



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **104147** (13) **C2**
(51) МПК (2013.01)
C07D 417/14 (2006.01)
A61K 31/4439 (2006.01)
A61P 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

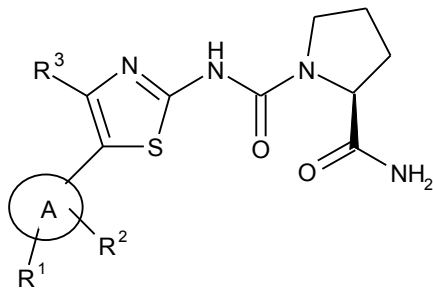
(21) Номер заявки:	а 2011 02837	(72) Винахідник(и):	Караватті Джорджо (CH/CH), Фейрхерст Робін Алек (GB/GB), Фуре Паскаль (FR/CH), Гуаньяно Віто (IT/CH), Імбах Патриція (CH/CH)
(22) Дата подання заявки:	08.09.2009	(73) Власник(и):	НОВАРТИС АГ, Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel, Switzerland (CH)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.01.2014	(74) Представник:	Дубинський Михайло Ілліч, реєстр. №70
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	08164104.5, 61/096,674	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2004/096797 A1; 11.11.2004 WO 2005/021519 A2; 10.03.2005
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	10.09.2008, 12.09.2008		
(33) Код держави- учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP, US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	11.07.2011, Бюл.№ 13		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.01.2014, Бюл.№ 1		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2009/061644, 08.09.2009		

**(54) ПОХІДНА ПІРОЛІДИНДИКАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ ТА ЇЇ ЗАСТОСУВАННЯ У ЛІКУВАННІ
ПРОЛІФЕРАТИВНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ**

(57) Реферат:

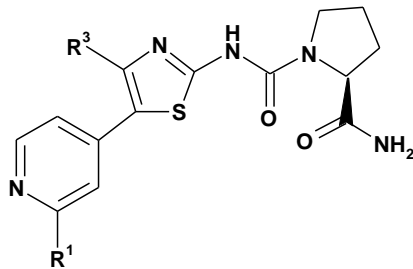
UA 104147 C2

Представлений винахід стосується сполуки формули (I)



(I)

або її солі, у якій замісники визначені в описі, композиції та застосування сполук для лікування захворювань, перебіг яких полегшується шляхом інгібування фосфатидилінозит-3-кінази.



Даний винахід відноситься до особливих 2-карбоксамідциклоаміно-похідних сечовини як нових інгібіторів фосфатидилінозит (PI) 3-кінази-альфа, їх фармацевтично прийнятних солей, проліків та способів їх одержання. Даний винахід також відноситься до композицій цих сполук окремо або в комбінації щонайменше з одним додатковим терапевтичним засобом та

5 не обов'язково у комбінації з фармацевтично прийнятним носієм. Даний винахід також відноситься до способів застосування цих сполук окремо або в комбінації щонайменше з одним додатковим терапевтичним засобом для профілактики або лікування цілого ряду захворювань, переважно опосередкованих аномальною активністю однієї або більшої кількості наступних речовин: факторів росту, рецепторних тирозинкіназ, протеїнсерін/треонінкіназ, пов'язаних з

10 білком G рецепторів та фосфоліпідкіназ та фосфатаз.

Фосфатидилінозит-3-кінази (PI3K) являють собою сімейство ліпідних кіназ, які каталізують перенос фосфату в D-3'-положення інозитвмісних ліпідів з утворенням фосфоінозит-3-фосфату (PIP), фосфоінозит-3,4-дифосфату (PIP₂) та фосфоінозит-3,4,5-трифосфату (PIP₃), які, у свою чергу, діють як вторинні месенджери в каскадах передачі сигналів шляхом залучення білків, які

15 містять гомологічні плекстрину FYVE, Phox та інші зв'язуючі фосфоліпіди домени, в різні передаючі сигнали комплекси, які часто є присутніми на плазматичній мембрані ((Vanhaesebroeck et al., Annu. Rev. Biochem. 70:535 (2001); Katso et al., Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 17:615 (2001)). Середовища PI3K, що належать до двох класів, які є підкласами класу 1, PI3K класу 1A являють собою гетеродимери, що складаються з каталітичної субодиноці p110

20 (ізоформи α , β , δ), конститутивно асоційованої з регуляторною субодиноцею, яка може являти собою p85 α , p55 α , p50 α , p85 β або p55 γ . Підклас, що являє собою клас 1B, складається з одного представника сімейства, а саме, гетеродимеру, який включає каталітичну субодиноцю p110 γ , асоційовану з двома регуляторними субодиноцями p101 або p84 (Fruman et al., Annu. Rev. Biochem. 67:481 (1998); Suire et al., Curr. Biol. 15:566 (2005)). Модулярні домени субодиноць

25 p85/55/50 включають домени, гомологічні Src (SH2), які зв'язують залишки фосфотирозину в контексті специфічної послідовності на активованому рецепторі та цитоплазматичних тирозинкіназах, що приводить до активації та локалізації PI3K класу 1A. PI3K класу 1B активуються безпосередньо зшитими з протеїном G рецепторами, з якими зв'язується багато різнорідних пептидних та непептидних лігандів (Stephens et al., Cell 89:105 (1997)); Katso et al., Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 17:615-675 (2001)). В результаті утворені фосфоліпідні продукти PI3K

30 класу I зв'язують рецептори, розташовані вище в шляху передачі сигналу, з розташованими нижче в шляху передачі сигналу клітинними елементами, що роблять вплив на проліферацію, виживання, хемотаксис, направлену міграцію клітин, рухливість, метаболізм, запальні та алергійні відповіді, транскрипцію та трансляцію (Cantley et al., Cell 64:281 (1991); Escobedo and Williams, Nature 335:85 (1988); Fantl et al., Cell 69:413 (1992)).

У багатьох випадках PIP₂ та PIP₃ приводять до рекрутменту Akt, людського продукту, гомологічного вірусному онкогену v-Akt, на плазматичній мембрані, де він діє як вузлова точка для багатьох внутріклітинних шляхів передачі сигналів, важливих для росту та виживання (Fantl et al., Cell 69:413-423(1992); Bader et al., Nat. Rev. Cancer 5:921 (2005); Vivanco and Sawyer, Nat. Rev. Cancer 2:489 (2002)). Аномальна регуляція PI3K, яка часто підвищує виживання завдяки активації Akt, є одним з найбільш превалюючих явищ при раку у людини та, як встановлено, відбувається на декількох рівнях. У гена-супресора пухлин PTEN, який дефосфорилує

40 фосфоінозитиди в 3'-положенні інозитного кільця та тому має здатність антагонізувати активність PI3K, у багатьох типах пухлин відсутня функціональна активність. В інших типах пухлин відбувається ампліфікація генів, кодуючих ізоформу p110 α , PIK3CA та Akt, та підвищений рівень експресії білкових продуктів цих генів був продемонстрований при деяких видах раку людини. Крім того, для деяких видів раку людини описані мутації та транслокації субодиноці p85 α , яка служить для підвищуючої регуляції комплексу p85-p110. Та, нарешті, встановлено, що соматичні міссенс-мутації PIK3CA, які активують шляхи подальшої передачі

50 сигналу, достатньо часто зустрічаються при багатьох видах раку людини (Kang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:802 (2005); Samuels et al., Science 304:554 (2004); Samuels et al., Cancer Cell 7:561-573(2005)). Ці дані свідчать про те, що порушення регуляції фосфоінозит-3-кінази та компонентів, що знаходяться вище та нижче в цьому шляху передачі сигналу, є одним з найбільш розповсюджених видів порушення регуляції, асоційованих з раком та проліферативними захворюваннями людини (Parsons et al., Nature 436:792(2005); Hennessey et al., Nature Rev. Drug Dis. 4:988-1004 (2005)).

Тому інгібітори PI3K-альфа повинні бути корисними для лікування проліферативного захворювання та інших порушень.

В WO 2004/096797 розкриті деякі похідні тіазолу як інгібітори PI3K-гама та їх застосування як

60 лікарські засоби, зокрема, для лікування запальних та алергійних патологічних станів.

В WO 2005/021519 також розкриті деякі похідні тiazолу як інгібітори PI3K-гама та їх застосування як лікарські засоби, зокрема, для лікування запальних та алергічних патологічних станів.

В WO 2006/051270 також розкриті деякі похідні тiazолу як інгібітори PI3K-альфа та їх застосування як лікарські засоби, зокрема, внаслідок їх протипухлинної активності.

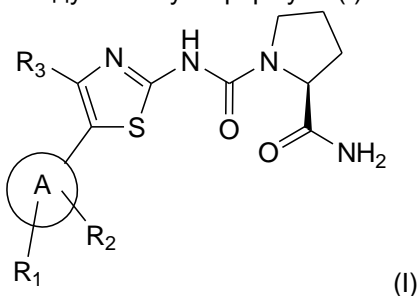
В WO 2007/129044 також розкриті деякі похідні тiazолу як інгібітори PI3K-альфа та їх застосування як лікарські засоби, зокрема, внаслідок їх протипухлинної активності.

З урахуванням попереднього рівня техніки необхідно одержання додаткових сполук, застосованих для лікування проліферативних захворювань, зокрема, сполук, що мають покращену селективність та/або більшу/покращену активність.

Згідно винаходу було встановлено, що 2-карбоксамідциклоамінопохідні сечовини формули (I), приведені нижче, мають сприятливі фармакологічні характеристики та інгібують, наприклад, PI3K (фосфатидилінозит-3-кіназа). Зокрема, за даними біохімічних та/або проведених з використанням клітин аналізів ці сполуки переважно мають високий ступінь селективності по відношенню до PI3K-альфа у порівнянні з селективністю по відношенню до підтипів бета та/або дельта, та/або гама. Тому сполуки формули I застосовні, наприклад, для лікування захворювань, що залежать від кіназ PI3 (переважно PI3K-альфа, таких як при яких спостерігаються надекспресування або ампліфікація PI3K-альфа, соматичні мутації PIK3CA або мутації зародкового типу або соматичні мутації PTEN або мутації та транслокації p85α, які забезпечують підвищуючу регуляцію комплексу p85-p110), особливо проліферативних захворювань, таких як пухлинні захворювання та лейкози.

Крім того, ці сполуки переважно мають покращену метаболічну стабільність та тому знижений кліренс, що приводить до покращених фармакокінетичних профілів.

Першим об'єктом даного винаходу є сполуки формули (I)



або їх солі, у якій

A позначає гетероарил;

R¹ позначає (1) необов'язково заміщений алкіл; (2) необов'язково заміщений циклоалкіл; (3) необов'язково заміщений арил; (4) необов'язково заміщений амін; (5) необов'язково заміщений сульфоніл; (6) галоген;

R² позначає водень, дейтерій або замісник, визначений для R¹;

R³ позначає водень, галоген, необов'язково заміщений алкіл;

включаючи 2-амід, 1-({5-[2-(трет-бутил)-піримідин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іл}-амід) (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти.

Даний винахід можна краще зрозуміти за допомогою наведеного нижче опису, включаючи наведений нижче словник термінів та наступні приклади. Для стислості вкажемо, що розкриття та публікації, процитовані в даному описі, включені в даний винахід як посилання. При використанні в даному винаході терміни "включаючи", "що містить" та "що включає" застосовуються в широкому, не обмежувальному сенсі.

Будь-яка формула, наведена в даному винаході, призначена для опису сполук, що мають структуру, представлену структурною формулою, а також деяких їх варіантів та форм. Зокрема, сполуки будь-якої формули, наведеної в даному винаході, можуть містити асиметричні центри та тому існувати в різних енантіомерних формах. Якщо в сполуці формули (I) міститься щонайменше один асиметричний атом вуглецю, то така сполука може існувати в оптично активній формі або у вигляді суміші оптичних ізомерів, наприклад, у вигляді рацемічної суміші. Усі оптичні ізомери та їх суміші, включаючи рацемічні суміші, входять в обсяг даного винаходу. Таким чином, будь-яка конкретна формула, наведена в даному винаході, означає рацемат, одну або більшу кількість енантіомерних форм, одну або більшу кількість діастереоізомерних форм, одну або більшу кількість атропоізомерних форм та їх сумішей. Крім того, деякі структури можуть існувати у вигляді геометричних ізомерів (тобто цис- та транс-ізомерів), у вигляді таутомерів або у вигляді атропоізомерів.

Будь-яка формула, наведена в даному винаході, характеризує гідрати, сольвати та поліморфні форми таких сполук та їх суміші.

Будь-яка формула, наведена в даному винаході, також характеризує немічені форми, а також ізотопно-мічені форми сполук. Ізотопно-мічені сполуки мають структури, що описуються формулами, наведеними в даному винаході, за виключенням того, що один або більша кількість атомів замінені на атоми, що мають зазначені атомні маси або масові числа. Приклади ізотопів, які можна вводити в сполуки, запропоновані в даному винаході, включають ізотопи водню, вуглецю, азоту, кисню, фосфору, сірки, фтору та хлору, такі як ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{125}I , відповідно. В обсяг даного винаходу входять різні ізотопно-мічені сполуки, запропоновані в даному винаході, наприклад, у які включені радіоактивні ізотопи, такі як ^3H , ^{13}C , та ^{14}C . Такі ізотопно-мічені сполуки застосовні для вивчення метаболізму (переважно, що містять ^{14}C), кінетики реакцій (що містять, наприклад, ^2H або ^3H), у методологіях детектування комп'ютерна томографія (ОФЕКТ), включаючи дослідження розподілу лікарського засобу або субстрату в тканинах або променеву терапію пацієнтів. Зокрема, сполука, що містить ^{18}F або мічена ним, може бути особливо кращою для досліджень за допомогою ПЕТ або ОФЕКТ. Ізотопно-мічені сполуки, запропоновані в даному винаході, та їх проліки звичайно можна одержати за методиками, розкритими у схемах або у прикладах та синтезах, описаних нижче, шляхом заміни реагенту, що не містить ізотопу, на легко доступний ізотопно-мічений реагент.

Крім того, заміщення більш важкими ізотопами, переважно дейтерієм (тобто ^2H або D), може забезпечити деякі терапевтичні переваги, обумовлені їх більш високою метаболічною стабільністю, наприклад, збільшеною тривалістю напіввиведення in vivo або можливістю використання менших доз, або поліпшенням терапевтичного індексу. Слід розуміти, що в цьому контексті дейтерій розглядається як замісник в сполуці формули (I). Концентрацію такого більш важкого ізотопу, зокрема, дейтерію, можна визначити за допомогою коефіцієнта ізотопного збагачення. Термін "коефіцієнт ізотопного збагачення" при використанні в даному винаході означає відношення вмісту ізотопу до вмісту конкретного ізотопу в природі. Якщо замісник у сполуці, запропонованій в даному винаході, означає дейтерій, то така сполука характеризується коефіцієнтом ізотопного збагачення для кожного позначеного атому дейтерію, рівним не менше 3500 (вміст дейтерію для кожного позначеного атома дейтерію дорівнює 52,5 %), не менше 4000 (вміст дейтерію дорівнює 60 %), не менше 4500 (вміст дейтерію дорівнює 67,5 %), не менше 5000 (вміст дейтерію дорівнює 75 %), не менше 5500 (вміст дейтерію дорівнює 82,5 %), не менше 6000 (вміст дейтерію дорівнює 90 %), не менше 6333,3 (вміст дейтерію дорівнює 95 %), не менше 6466,7 (вміст дейтерію дорівнює 97 %), не менше 6600 (вміст дейтерію дорівнює 99 %) або не менше 6633,3 (вміст дейтерію дорівнює 99,5 %). У сполуках, запропонованих у даному винаході, будь-який атом, спеціально не позначений як конкретний ізотоп, означає будь-який стабільний ізотоп цього атому. Якщо не зазначено інше, коли спеціально зазначено "H" або "водень", це означає водень, що має природний ізотопний склад. Відповідно, у сполуках, запропонованих у даному винаході, будь-який атом, спеціально позначений, як дейтерій (D) означає атом із вмістом дейтерію, наприклад, у зазначених вище діапазонах.

Вибір значення конкретного фрагменту з переліку можливих значень при описі будь-якої формули, наведеної в даному винаході, не означає завдання значення цього фрагменту для іншої частини даного опису. Інакше кажучи, якщо змінна міститься більш одного разу, тоді вибір її значень з переліку значень не залежить від вибору значень цієї змінної у формулі, що знаходиться в іншій частині даного опису (де у варіантах здійснення одне або більша кількість та аж до всіх більш загальних значень, охарактеризованих вище або нижче, як кращі, можна замінити на більш краще визначення та в такий спосіб утворювати відповідний більш кращий варіант здійснення даного винаходу).

Якщо використовується множина (наприклад, сполуки, солі), тоді вона включає і однину (наприклад, одну сполуку, одну сіль). Використання терміну "сполука" не виключає того, що (наприклад, у фармацевтичному препараті) міститься більше, ніж одна сполука формули (I) (або її сіль).

Якщо не зазначено інше, то в даному описі застосовні зазначені нижче загальні визначення: Галоген означає фтор, бром, хлор або йод, переважно фтор, хлор. Галогензаміщені групи та фрагменти, такі як алкіл, заміщений галогеном (галогеналкіл), можуть бути моно-, полі- або пергалогенованими.

Гетероатоми являють собою атоми, що не є атомами вуглецю та водню, переважно азот (N), кисень (O) або сірку (S), більш переважно азот.

Вуглецевмісні групи, фрагменти або молекули містять від 1 до 7, переважно від 1 до 6, більш переважно від 1 до 4, найбільш переважно 1 або 2 атоми вуглецю. Будь-яка нециклічна вуглецевмісна група або фрагмент, що містить більше 1 атому вуглецю, має лінійний або розгалужений ланцюг.

5 Приставка "нижч." або "C₁-C₇" означає радикал, що містить максимально до 7 включно, переважно - максимально до 4 включно атомів вуглецю, використовувані радикали є лінійними або розгалуженими та містять одне або декілька розгалужень.

"Алкіл" означає алкільну групу, що має лінійний або розгалужений ланцюг, переважно являє собою C₁-C₁₂-алкіл, що має лінійний або розгалужений ланцюг, особливо переважно являє собою C₁-C₇-алкіл, що має лінійний або розгалужений ланцюг, наприклад, метил, етил, н- або ізопропіл, н-, ізо-, втор- або трет-бутил, н-пентил, н-гексил, н-гептил, н-октил, н-ноніл, н-децил, н-ундецил, н-додецил, особливо кращими є метил, етил, н-пропіл, ізопропіл та н-бутил та ізобутил. Алкіл може бути незаміщеним або заміщеним. Типові замісники включають, але не обмежуються тільки ними, гідроксигрупу, алкоксигрупу, галоген та аміногрупу. Прикладом заміщеного алкілу є трифторметил. Циклоалкіл також може бути замісником алкілу. Прикладом такого випадку є фрагмент (алкіл)-циклопропіл або алкандіілциклопропіл, наприклад, -CH₂-циклопропіл. C₁-C₇-Алкіл переважно являє собою алкіл, що містить від 1 включно до 7 включно, переважно від 1 включно до 4 включно атомів вуглецю, та є лінійним або розгалуженим; нижч. алкіл переважно являє собою бутил, такий як н-бутил, втор-бутил, ізобутил, трет-бутил, пропіл, такий як н-пропіл або ізопропіл, етил або, переважно, метил.

20 Кожен алкільний фрагмент інших груп, таких як "алкоксигрупа", "алкоксиалкіл", "алкоксикарбоніл", "алкоксикарбонілакіл", "алкілсульфоніл", "алкілсульфоксил", "алкіламіногрупа", "галогеналкіл" має таке ж значення, як зазначено в приведеному вище визначенні "алкілу".

25 "Алкандііл" означає алкандіільну групу, що має лінійний або розгалужений ланцюг, за допомогою двох різних атомів вуглецю зв'язану з фрагментом, він переважно являє собою C₁-C₁₂-алкандііл, що має лінійний або розгалужений ланцюг, особливо переважно являє собою C₁-C₆-алкандііл, що має лінійний або розгалужений ланцюг; наприклад, метандііл (-CH₂-), 1,2-етандііл (-CH₂-CH₂-), 1,1-етандііл ((-CH(CH₃)-), 1,1-, 1,2-, 1,3-пропандііл та 1,1-, 1,2-, 1,3-, 1,4-бутандііл, особливо переважно метандііл, 1,1-етандііл, 1,2-етандііл, 1,3-пропандііл, 1,4-бутандііл.

30 "Алкендііл" означає алкендіільну групу, що має лінійний або розгалужений ланцюг, за допомогою двох різних атомів вуглецю зв'язану з фрагментом, він переважно являє собою C₂-C₆-алкендііл, що має лінійний або розгалужений ланцюг; наприклад, -CH=CH-, -CH=C(CH₃)-, -CH=CH-CH₂-, -C(CH₃)=CH-CH₂-, -CH=C(CH₃)-CH₂-, -CH=CH-C(CH₃)H-, -CH=CH-CH=CH-, -C(CH₃)=CH-CH=CH-, -CH=C(CH₃)-CH=CH-, особливо переважно -CH=CH-CH₂-, -CH=CH-CH=CH-. Алкендііл може бути заміщеним або незаміщеним.

35 "Циклоалкіл" означає насичений або частково насичений моноциклічний, конденсований поліциклічний або спірозчленований поліциклічний карбоцикл, що містить від 3 до 12 кільцевих атомів в одному карбоциклі. Ілюстративні приклади циклоалкільних груп включають наступні фрагменти: циклопропіл, циклобутил, циклопентил та циклогексил. Циклоалкіл може бути незаміщеним або заміщеним; типові замісники вказані у визначенні алкілу та також включають сам алкіл (наприклад, метил). Фрагмент типу -(CH₃)циклопропіл вважається заміщеним циклоалкілом.

45 "Арил" означає ароматичну гомоциклічну кільцеву систему, що містить 6 або більшу кількість атомів вуглецю; арил переважно являє собою ароматичний фрагмент, що містить від 6 до 14 кільцевих атомів вуглецю, більш переважно від 6 до 10 кільцевих атомів вуглецю, таку як феніл або нафтил, переважно феніл. Арил може бути незаміщеним або містити один або більшу кількість, переважно до трьох, більш переважно до двох замісників, незалежно вибраних з групи, що включає незаміщений або заміщений гетероцикліл, описаний вище, переважно піролідиніл, такий як піролідинову групу, оксопіролідиніл, такий як оксопіролідинову групу, C₁-C₇-алкілпіролідиніл, 2,5-ди-(C₁-C₇-алкіл)піролідиніл, такий як 2,5-ди-(C₁-C₇-алкіл)-піролідинову групу, тетрагідрофураніл, тіофеніл, C₁-C₇-алкілпіразолідиніл, піридиніл, C₁-C₇-алкілпіперидиніл, піперидинову групу, піперидинову групу, що містить як замісники аміногрупу або N-моно- або N, N-ди-[нижч. алкіл, феніл, C₁-C₇-алканойл та/або феніл-нижч. алкіл)-аміногрупу, незаміщений або N-нижч. алкілзаміщений піперидиніл, приєднаний через кільцевий атом вуглецю, піперазинову групу, нижч. алкілпіперазинову групу, морфолінову групу, тіоморфолінову групу, S-оксотіоморфолінову групу або S, S-діоксотіоморфолінову групу; C₁-C₇-алкіл, аміно-C₁-C₇-алкіл, N-C₁-C₇-алканойламіно-C₁-C₇-алкіл, N-C₁-C₇-алкансульфоніламіно-C₁-C₇-алкіл, карбамоїл-C₁-C₇-алкіл, [N-моно- або N, N-ди-(C₁-C₇-алкіл)-карбамоїл]-C₁-C₇-алкіл, C₁-C₇-алкансульфініл-C₁-C₇-

алкіл, C₁-C₇-алкансульфоніл-C₁-C₇-алкіл, феніл, нафтил, моно- – три-[C₁-C₇-алкіл, галоген та/або ціано]-феніл або моно- – три-[C₁-C₇-алкіл, галоген та/або ціано]-нафтил; C₃-C₈-циклоалкіл, моно- – три-[C₁-C₇-алкіл та/або гідрокси]-C₃-C₈-циклоалкіл; галоген, гідроксигрупу, нижч. алкоксигрупу, нижч.-алкокси-нижч. алкоксигрупу, (нижч.-алкокси)-нижч. алкокси-нижч. алкоксигрупу, галоген-C₁-C₇-алкоксигрупу, феноксигрупу, нафтилоксигрупу, феніл- або нафтил-нижч. алкоксигрупу; аміно-C₁-C₇-алкоксигрупу, нижч.-алканоліоксигрупу, бензоліоксигрупу, нафтоліоксигрупу, форміл (CHO), аміногрупу, N-моно- або N, N-ди-(C₁-C₇-алкіл)-аміногрупу, C₁-C₇-алканоліаміногрупу, C₁-C₇-алкансульфоніл-аміногрупу, карбоксигрупу, нижч. алкоксикарбоніл, наприклад; феніл- або нафтил-нижч. алкоксикарбоніл, такий як бензілоксикарбоніл; C₁-C₇-алканолі, такий як ацетил, бензолі, нафтолі, карбамоіл, N-моно- або N, N-дизаміщений карбамоіл, такий як N-моно- або N, N-дизаміщений карбамоіл, де замісники вибрані з групи, що включає нижч. алкіл, (нижч.-алкокси)-нижч. алкіл та гідрокси-нижч. алкіл; амідінову групу, гуанідінову групу, уреїдну групу, меркаптогрупу, нижч. алкілтіогрупу, феніл- або нафтилтіогрупу, феніл- або нафтил-нижч. алкілтіогрупу, нижч. алкілфенілтіогрупу, нижч. алкілнафтилтіогрупу, галоген-нижч. алкілмеркаптогрупу, сульфогрупу (-SO₃H), нижч. алкансульфоніл, феніл- або нафтилсульфоніл, феніл- або нафтил-нижч. алкілсульфоніл, алкілфенілсульфоніл, галоген-нижч. алкілсульфоніл, такий як трифторметансульфоніл; сульфонамідну групу, бензосульфонамідну групу, азидну групу, азидо-C₁-C₇-алкіл, переважно азидометил, C₁-C₇-алкансульфоніл, сульфамойл, N-моно- або N, N-ди-(C₁-C₇-алкіл)-сульфамойл, морфоліноссульфоніл, тіоморфоліноссульфоніл, ціаногрупу та нітрогрупу; де кожен феніл або нафтил (також в феноксигрупі або нафтоксигрупі), зазначений вище як замісник або частина замісника заміщеного алкілу (або також заміщеного арилу, гетероциклілу та т. п., вказаного в даному винаході), сам є незаміщеним або містить один або більшу кількість, наприклад, до трьох, переважно 1 або 2 замісники, незалежно вибраних з групи, що включає галоген, галоген-нижч. алкіл, такий як трифторметил, гідроксигрупу, нижч. алкоксигрупу, азидну групу, аміногрупу, N-моно- або N, N-ди-(нижч. алкіл та/або C₁-C₇-алканолі)-аміногрупу, нітрогрупу, карбоксигрупу, нижч.-алкоксикарбоніл, карбамоіл, ціаногрупу та/або сульфамойл.

"Гетероцикліл" означає гетероциклічний радикал, який є ненасиченим (= що містить в кільці (кільцях) найбільш можливу кількість спряжених подвійних зв'язків), насиченим або частково насиченим та переважно являє собою моноциклічне або, в більш широкому об'єкті даного винаходу, біциклічне, трициклічне або спірозчленоване поліциклічне кільце; та містить від 3 до 24, більш переважно від 4 до 16, найбільш переважно від 5 до 10 та найбільш переважно 5 або 6 кільцевих атомів; де один або більша кількість, переважно від 1 до 4, переважно 1 або 2 кільцевих атоми вуглецю замінені на гетероатом, приєднане кільце переважно містить від 4 до 12, переважно від 5 до 7 кільцевих атомів. Гетероциклічний радикал (гетероцикліл) може бути незаміщеним або містити один або більшу кількість, переважно від 1 до 3 замісників, незалежно вибраних з групи, що включає замісники, визначені вище для заміщеного алкілу, та/або один або більшу кількість наступних замісників: оксогрупу (=O), тіокарбоніл (=S), іміногрупу (=NH), іміно-нижч. алкіл. Крім того, гетероцикліл переважно являє собою гетероциклільний радикал, вибраний з групи, що включає оксираніл, азіриніл, азиридиніл, 1,2-оксатіоланіл, тієніл (=тіофеніл), фураніл, тетрагідрофурил, піраніл, тіопіраніл, тіантреніл, ізобензофураніл, бензофураніл, хроменіл, 2H-піроліл, піроліл, піролініл, піролідініл, імідазоліл, імідазолідиніл, бензімідазоліл, піразоліл, піразиніл, піразолідиніл, тіазоліл, ізотіазоліл, дитіазоліл, оксазоліл, ізоксазоліл, піридил, піразиніл, піримідиніл, піперидиніл, піперазиніл, піридазиніл, морфолініл, тіоморфолініл, (S-оксо- або S, S-діоксо)-тіоморфолініл, індолізиніл, азепаніл, діазепаніл, переважно 1,4-діазепаніл, ізоіндоліл, 3H-індоліл, індоліл, бензімідазоліл, кумарил, індазоліл, триазоліл, тетразоліл, пуриніл, 4H-хінолізиніл, ізохіноліл, хіноліл, тетрагідрохіноліл, тетрагідрізохіноліл, декагідрохіноліл, октагідрізохіноліл, бензофураніл, дибензофураніл, бензотіофеніл, дибензотіофеніл, фталазиніл, нафтиридиніл, хіноксаліл, хіназолініл, хіназолініл, циннолініл, птеридиніл, карбазоліл, бета-карболініл, фенантридиніл, акридиніл, піримідиніл, фенантролініл, фуразаніл, феназиніл, фенотіазиніл, феноксазиніл, хроменіл, ізохроманіл, хроманіл, бензо[1,3]діоксол-5-іл та 2,3-дигідробензо[1,4]діоксин-6-іл, кожен з цих радикалів є незаміщеним або містить один або більшу кількість, переважно до трьох, замісників, вибраних з числа вказаних вище для заміщеного арилу, та/або один або більшу кількість наступних замісників: оксогрупу (=O), тіокарбоніл (=S), іміногрупу (=NH), іміно-нижч. алкіл.

"Арилалкіл" означає арильну групу, приєднану до молекули через алкільну групу, таку як метильну або етильну групу, переважно фенетильну або бензильну, більш переважно бензильну. Аналогічним чином, циклоалкілалкіл та гетероцикліл означає циклоалкільну групу, приєднану до молекули через алкільну групу, або гетероциклільну групу, приєднану до

молекули через алкільну групу. В кожному випадку арил, гетероцикліл, циклоалкіл та алкіл може бути заміщеним, як визначено вище.

"Лікування" включає профілактичне (попереджувальне) та терапевтичне лікування, а також затримку прогресування захворювання або порушення.

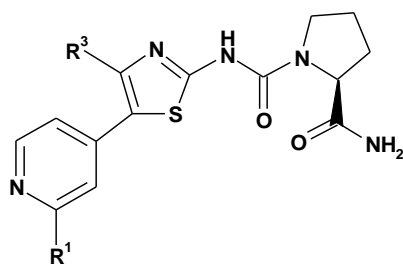
5 "Опосередковані РІЗ кіназою захворювання" (переважно опосередковані РІЗК-альфа захворювання та захворювання, опосередковані надекспресуванням або ампліфікацією РІЗК-альфа, соматичними мутаціями РІЗСА або мутаціями зародкового типу або соматичними мутаціями РТЕН або мутаціями та транслокаціями р85α, які забезпечують підвищуючу регуляцію комплексу р85-р110) переважно являють собою порушення, які реагують
10 сприятливим чином (наприклад, відбувається ослаблення одного або більшої кількості симптомів, затримка початку захворювання, аж до тимчасового або повного виліковування захворювання) на інгібування кінази РІЗ, переважно на інгібування РІЗК-альфа або її мутантної форми (де з числа захворювань, що піддаються лікуванню, в особливо можна відмітити проліферативні захворювання, такі як пухлинні захворювання та лейкози).

15 "Солі" (те, що означає вираз "або її солі" або "або її сіль") можуть міститися окремо або в суміші з вільною сполукою формули (I) та переважно являють собою фармацевтично прийнятні солі. Такі солі, наприклад, утворюються у вигляді солей приєднання з кислотами, переважно з органічними або неорганічними кислотами, зі сполук формули (I), що містять основний атом азоту, переважно фармацевтично прийнятні солі. Підходящими неорганічними кислотами є,
20 наприклад, галогеноводневі кислоти, такі як хлористоводнева кислота, сірчана кислота або фосфорна кислота. Підходящими органічними кислотами є, наприклад, карбонові кислоти або сульфонові кислоти, такі як фумарова кислота або метансульфонова кислота. Для виділення та очищення також можна використовувати фармацевтично неприйнятні солі, наприклад, пікрати або перхлорати. Для терапевтичного застосування використовують тільки фармацевтично
25 прийнятні солі або вільні сполуки (якщо вони застосовні у вигляді фармацевтичних препаратів) та тому вони є кращими. Внаслідок близької спорідненості нових сполук у вільній формі та у формі їх солей, включаючи солі, які можна використовувати як проміжні продукти, наприклад, при очищенні або ідентифікації нових сполук, будь-яку вказівку на вільну сполуку вище та нижче в даному винаході слід розуміти також і як вказівку на відповідні солі, якщо це є підходящим або
30 доцільним. Солі сполук формули (I) переважно являють собою фармацевтично прийнятні солі; підходящі протиіони, що утворюють фармацевтично прийнятні солі, відомі в даній галузі техніки.

"Комбінація" означає фіксовану комбінацію в одній разовій дозованій формі або набір компонентів для комбінованого введення, при якому сполуку формули (I) та компонент комбінації (наприклад, інший лікарський засіб, як зазначено нижче, що також називається як
35 "терапевтичний засіб" або "засіб, що спільно вводиться") можна незалежно вводити одночасно або окремо через певні проміжки часу, переважно таким чином, щоб ці проміжки часу дозволяли компонентам комбінації виявляти спільний, наприклад, синергетичний вплив. Терміни "спільне введення" або "комбіноване введення" та т.п. при використанні в даному винаході означають введення обраного компоненту комбінації одному суб'єкту, який цього потребує, (наприклад,
40 пацієнтові) та включають режими лікування, при яких засіб необов'язково вводять одним та тим же шляхом або в один та той же час. Термін "фармацевтична комбінація" при використанні в даному винаході означає препарат, отриманий змішуванням або комбінуванням більше одного активного інгредієнту, та включає фіксовані та нефіксовані комбінації активних інгредієнтів. Термін "фіксована комбінація" означає, що активні інгредієнти, наприклад, сполуку формули (I)
45 та компонент комбінації, обидва вводять пацієнтові одночасно у вигляді одного об'єкта або дози. Термін "нефіксована комбінація" означає, що активні інгредієнти, наприклад, сполуку формули (I) та компонент комбінації, обидва вводять пацієнтові у вигляді окремих об'єктів спільно, одночасно або послідовно без встановлених часових обмежень та таке введення забезпечує терапевтично ефективні вмісти цих двох сполук в організмі пацієнта. Останнє також
50 відноситься до змішаного лікування, наприклад, введенню трьох або більшої кількості активних інгредієнтів.

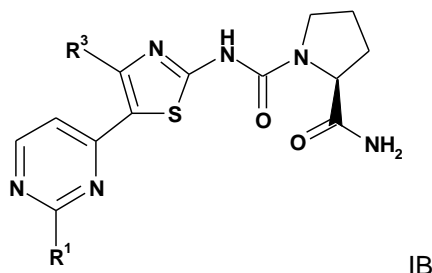
В кращих варіантах здійснення, які є переважними незалежно, разом або в будь-якій комбінації або субкомбінації, даний винахід відноситься до сполуки формули (I) у формі вільної
55 основи або у формі солі приєднання з кислотою, у якій замісники є такими, як визначено в даному винаході.

В одному кращому варіанті здійснення даний винахід відноситься до сполуки формули ІА



у якій замісники є такими, як визначено для сполуки формули (I).

В іншому кращому варіанті здійснення даний винахід відноситься до сполуки формули IB

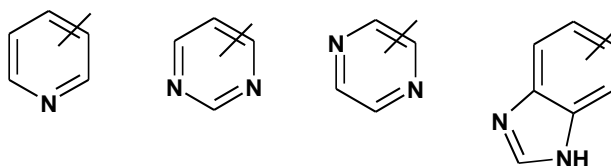


5 у якій замісники є такими, як визначено для сполуки формули (I).

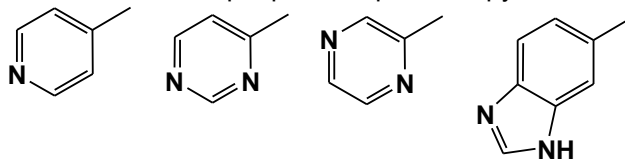
Таким чином, сполука формули (I) також включає сполуки формули (IA) та (IB). В контексті даного винаходу також застосовні наступні визначення.

А переважно позначає гетероарил, що містить 1 або 2 атоми азоту та від 5 до 10 атомів, що утворюють цикл.

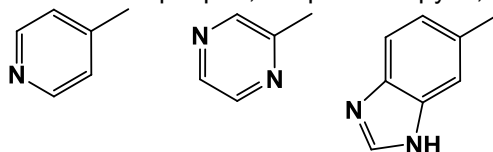
10 А особливо переважно позначає гетероарил, вибраний з групи, що включає:



А ще більш переважно позначає гетероарил, вибраний з групи, що включає:



А найбільш переважно позначає гетероарил, вибраний з групи, що включає:



15 R¹ переважно позначає один з наступних замісників:

(1) незаміщений або заміщений, переважно заміщений C₁-C₇-алкіл, де вказані замісники незалежно вибрані з одного або більшої кількості, переважно з 1-9 наступних замісників: дейтерій, галоген, ціаногрупу, C₃-C₁₂-циклоалкіл, C₁-C₇-алкіламіногрупу, ди(C₁-C₇-алкіл)аміногрупу, C₁-C₇-алкіламінокарбоніл, ди(C₁-C₇-алкіл)амінокарбоніл, C₁-C₇-алкоксигрупу, фенол (який є незаміщеним або містить один або більшу кількість, переважно один наступний замісник: C₁-C₇-алкіл, C₁-C₇-алкоксигрупу, ди(C₁-C₇-алкіл)аміно-C₁-C₇-алкоксигрупу), феноксигрупу (яка є незаміщеною або містить один або більшу кількість, переважно один наступний замісник: C₁-C₇-алкіл, C₁-C₇-алкоксигрупу, ди(C₁-C₇-алкіл)аміно-C₁-C₇-алкоксигрупу);

(2) незаміщений або заміщений C₃-C₁₂-циклоалкіл, де вказані замісники незалежно вибрані з одного або більшої кількості, переважно з 1-4 наступних замісників: дейтерій, галоген, ціаногрупу, C₁-C₇-алкіл, C₁-C₇-алкіламіногрупу, ди(C₁-C₇-алкіл)аміногрупу, амінокарбоніл, C₁-C₇-алкіламінокарбоніл, ди(C₁-C₇-алкіл)амінокарбоніл, C₁-C₇-алкоксигрупу, фенол (який є незаміщеним або містить один або більшу кількість, переважно один наступний замісник: C₁-C₇-алкіл, C₁-C₇-алкоксигрупу, ди(C₁-C₇-алкіл)аміно-C₁-C₇-алкоксигрупу), феноксигрупу (яка є

незаміщеною або містить один або більшу кількість, переважно один наступний замісник: C_1 - C_7 -алкіл, C_1 - C_7 -алкоксигрупу, ди(C_1 - C_7 -алкіл)аміно- C_1 - C_7 -алкоксигрупу);

5 (3) незаміщений або заміщений феніл, де вказані замісники незалежно вибрані з одного або більшої кількості, переважно 1-2 наступних фрагментів: дейтерій, галоген, ціаногрупу, C_1 - C_7 -алкіл, C_1 - C_7 -алкіламіногрупу, ди(C_1 - C_7 -алкіл)аміногрупу, C_1 - C_7 -алкіламінокарбоніл, ди(C_1 - C_7 -алкіл)амінокарбоніл, C_1 - C_7 -алкоксигрупу;

10 (4) незаміщений, моно- або дизаміщений амін; де вказані замісники незалежно вибрані з числа наступних фрагментів: дейтерій, C_1 - C_7 -алкіл (який є незаміщеним або містить один або більшу кількість замісників, вибраних з групи, що включає дейтерій, фтор, хлор, гідроксигрупу), C_1 - C_7 -алкілкарбоніл, феніл (який є незаміщеним або містить один або більшу кількість, переважно один з наступних замісників: C_1 - C_7 -алкіл, C_1 - C_7 -алкоксигрупу, ди(C_1 - C_7 -алкіл)аміно- C_1 - C_7 -алкоксигрупу), фенілсульфоніл (який є незаміщеним або містить один або більшу кількість, переважно один з наступних замісників: C_1 - C_7 -алкіл, C_1 - C_7 -алкоксигрупу, ди(C_1 - C_7 -алкіл)аміно- C_1 - C_7 -алкоксигрупу),

15 (5) заміщений сульфоніл; де вказаний замісник вибраний з числа наступних фрагментів: C_1 - C_7 -алкіл (який є незаміщеним або містить один або більшу кількість замісників, вибраних з групи, що включає дейтерій, фтор, хлор, гідроксигрупу), C_1 - C_7 -алкіламіногрупу (де алкільний фрагмент є незаміщеним або містить один або більшу кількість замісників, вибраних з групи, що включає дейтерій, фтор, хлор, гідроксигрупу), ди- C_1 - C_7 -алкіламіногрупу (де алкільний фрагмент є незаміщеним або містить один або більшу кількість замісників, вибраних з групи, що включає дейтерій, фтор, хлор, гідроксигрупу);

(6) фтор, хлор.

R^1 особливо переважно позначає один з наступних замісників:

25 (1) незаміщений або заміщений, переважно заміщений C_1 - C_7 -алкіл, де вказані замісники незалежно вибрані з одного або більшої кількості, переважно з 1-9 наступних замісників: дейтерій, фтор, або 1-2 наступних фрагментів: C_3 - C_5 -циклоалкіл;

(2) необов'язково заміщений C_3 - C_5 -циклоалкіл, де вказані замісники незалежно вибрані з одного або більшої кількості, переважно з 1-4 наступних замісників: дейтерій, C_1 - C_4 -алкіл (переважно метил), фтор, ціаногрупу, амінокарбоніл;

30 (3) необов'язково заміщений феніл, де вказані замісники незалежно вибрані з одного або більшої кількості, переважно 1-2 наступних фрагментів: дейтерій, галоген, ціаногрупу, C_1 - C_7 -алкіл, C_1 - C_7 -алкіламіногрупу, ди(C_1 - C_7 -алкіл)аміногрупу, C_1 - C_7 -алкіламінокарбоніл, ди(C_1 - C_7 -алкіл)амінокарбоніл, C_1 - C_7 -алкоксигрупу;

35 (4) необов'язково моно- або дизаміщений амін; де вказані замісники незалежно вибрані з числа наступних фрагментів: дейтерій, C_1 - C_7 -алкіл (який є незаміщеним або містить один або більшу кількість замісників, вибраних з групи, що включає дейтерій, фтор, хлор, гідроксигрупу), фенілсульфоніл (який є незаміщеним або містить один або більшу кількість, переважно один з наступних замісників: C_1 - C_7 -алкіл, C_1 - C_7 -алкоксигрупу, ди(C_1 - C_7 -алкіл)аміно- C_1 - C_7 -алкоксигрупу),

40 (5) заміщений сульфоніл; де вказаний замісник вибраний з числа наступних фрагментів: C_1 - C_7 -алкіл (який є незаміщеним або містить один або більшу кількість замісників, вибраних з групи, що включає дейтерій, фтор), піролідинову групу, (який є незаміщеним або містить один або більшу кількість замісників, вибраних з групи, що включає дейтерій, гідроксигрупу, оксогрупу; переважно одну оксогрупу),

(6) фтор, хлор.

45 R^1 ще більш переважно позначає:

(1) циклопропілметил або необов'язково заміщений розгалужений C_3 - C_7 -алкіл, де вказані замісники незалежно вибрані з одного або більшої кількості, переважно з 1-9 наступних замісників: дейтерій, фтор;

50 (2) необов'язково заміщений циклопропіл або циклобутил, де вказані замісники незалежно вибрані з одного або більшої кількості, переважно з 1-4 наступних замісників: метил, дейтерій, фтор, ціаногрупу, амінокарбоніл;

(3) необов'язково заміщений феніл, де вказані замісники незалежно вибрані з одного або більшої кількості, переважно 1-2 наступних фрагментів: дейтерій, галоген, ціаногрупу, C_1 - C_7 -алкіл, C_1 - C_7 -алкіламіногрупу, ди(C_1 - C_7 -алкіл)аміногрупу, C_1 - C_7 -алкіламінокарбоніл, ди(C_1 - C_7 -алкіл)амінокарбоніл, C_1 - C_7 -алкоксигрупу;

55 (4) необов'язково моно- або дизаміщений амін; де вказані замісники незалежно вибрані з числа наступних фрагментів: дейтерій, C_1 - C_7 -алкіл (який є незаміщеним або містить один або більшу кількість замісників, вибраних з групи, що включає дейтерій, фтор, хлор, гідроксигрупу), фенілсульфоніл (який є незаміщеним або містить один або більшу кількість, переважно один з наступних замісників: C_1 - C_7 -алкіл, C_1 - C_7 -алкоксигрупа, ди(C_1 - C_7 -алкіл)аміно- C_1 - C_7 -алкоксигрупа),

(5) заміщений сульфоніл; де вказаний замісник вибраний з числа наступних фрагментів: C₁-C₇-алкіл (який є незаміщеним або містить один або більшу кількість замісників, вибраних з групи, що включає дейтерій, фтор), піролідинова група (яка є незаміщеною або містить один або більшу кількість замісників, вибраних з групи, що включає дейтерій, гідроксигрупу, оксогрупу; переважно одну оксогрупу),

(6) фтор, хлор.

R¹ ще більш переважно позначає один з наступних замісників: -C(CH₃)₂CF₃, C(CD₃)₃, 1-метилциклопропіл, переважно в контексті (I-A) та (I-B).

R² переважно позначає замісник, визначений для R¹.

R² більш переважно позначає водень або дейтерій.

R² особливо переважно позначає водень.

R² в альтернативному варіанті здійснення позначає метил.

R³ переважно позначає (1) водень, (2) галоген, (3) необов'язково заміщений C₁-C₇-алкіл, де вказані замісники незалежно вибрані з одного або більшої кількості, переважно 1-3 наступних фрагментів: дейтерій, галоген, C₁-C₇-алкіламіногрупа, ди(C₁-C₇-алкіл)аміногрупа.

R³ особливо переважно позначає (1) водень, (2) фтор, хлор, (3) необов'язково заміщений метил, де вказані замісники незалежно вибрані з одного або більшої кількості, переважно 1-3 наступних фрагментів: дейтерій, фтор, хлор, диметиламіногрупа.

R³ ще більш переважно позначає водень, метил, CD₃, CH₂Cl, CH₂F, CH₂N(CH₃)₃; переважно метил.

Даний винахід також відноситься до сполуки формули (I), визначеної в даному винаході, за виключенням таких сполук, у яких R¹ та/або R² позначає трет-бутил.

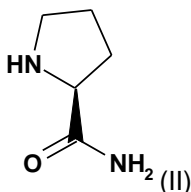
Даний винахід також відноситься до фармацевтично прийнятних проліків сполуки формули (I).

Даний винахід також відноситься до фармацевтично прийнятних метаболітів сполуки формули (I).

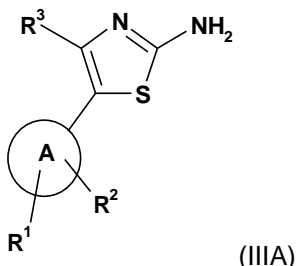
Даний винахід переважно відноситься до сполук формули (I), приведених в прикладах, а також до способів одержання, описаних в даному винаході.

Даний винахід також відноситься до способів одержання сполуки формули (I). В принципі є підходящими всі відомі методики перетворення різних амінів в відповідні похідні сечовини та їх можна використовувати із застосуванням відповідної вихідної речовини.

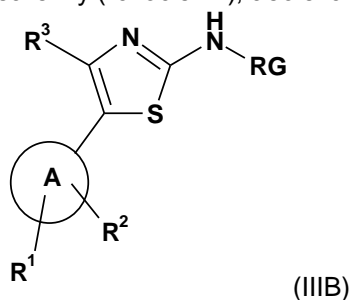
Таким чином, даний винахід переважно відноситься до способу одержання сполуки формули (I), який включає реакцію сполуки формули (II)



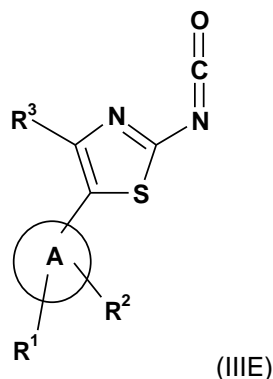
або зі сполукою формули (IIIA)



у якій замісники є такими, як визначено в даному винаході, та R³ додатково може позначати хлор, в присутності активуючого реагенту ("спосіб A"), або зі сполукою формули (IIIB)



у якій R^1 та R^2 є такими, як визначено в даному винаході, R^3 є таким, як визначено в даному винаході та додатково може позначати хлор та RG позначає реакційноздатну групу, таку як імідазолікарбоніл, яка може реагувати безпосередньо або шляхом утворення проміжного ізоціанату формули (III E) ("спосіб B"),



5

у якій замісники є такими, як визначено в (III B),

в кожному випадку необов'язково в присутності розріджувача та необов'язково в присутності засобу, що сприяє протіканню реакції, та

10 вилучення отриманої сполуки формули (I) у вільній формі або у формі солі та, необов'язково перетворення сполуки формули (I), отриманої за способом A або способом B, в іншу сполуку формули (I), та/або перетворення отриманої солі сполуки формули (I) в іншу її сіль, та/або перетворення отриманої вільної сполуки формули (I) в її сіль, та/або відділення отриманого ізомеру сполуки формули (I) від одного або більшої кількості різних отриманих ізомерів формули I.

15 Умови проведення реакцій

Спосіб можна здійснити за методиками, відомими у даній галузі техніки, або описаними нижче в прикладах. Наприклад, сполуку формули II можна ввести в реакцію із сполукою формули III у розчиннику, наприклад, диметилформаміді, у присутності основи, наприклад, органічного аміну, наприклад, триетиламіну.

20 Коли вище або нижче в даному винаході зазначені значення температури, до них слід додати слово "приблизно", як вказівка на невеликі відхилення від наведених числових значень, наприклад, припустимими є відхилення, що становлять $\pm 10\%$.

25 Усі реакції можуть протікати в присутності одного або більшої кількості розріджувачів та/або розчинників. Вихідні речовини можна використовувати в еквімолярних кількостях; альтернативно, сполуки можна використовувати в надлишку, наприклад, як розчинник або для зсуву рівноваги, або для загального підвищення швидкостей реакцій.

Засоби, що сприяють протіканню реакцій, такі як кислоти, основи або каталізатори, можна додати в підходящих кількостях, як це відомо в даній області техніки, необхідних для протікання реакції та відповідно до загальновідомих методик.

30 Захисні групи

35 Якщо у вихідній речовині, описаній в даному винаході, або в будь-якому попереднику одну або більшу кількість інших функціональних груп, наприклад, карбоксигрупу, гідроксигрупу, аміногрупу сульфгідрил та т.п., необхідно забезпечити захисною групою, оскільки вони не повинні брати участь у реакції або впливати на реакцію, тоді ними є захисні групи, які звичайно використовуються при синтезі пептидних сполук, а також цефалоспоринових та пеніцилінів, а також похідних нуклеїнових кислот та цукрів. Захисні групи є такими групами, які після видалення не повинні міститися в кінцевих сполуках, а групи, які залишаються як замісники, у використаному в даному описі сенсі не є захисними групами, які вводять у вихідну речовину або на проміжній стадії та видаляють для одержання кінцевої сполуки. Також і у випадку перетворень сполуки формули (I) в іншу сполуку формули (I) захисні групи можна вводити та видаляти, якщо це доцільно або необхідно.

40 Захисні групи можуть вже міститися в попередниках та повинні захищати відповідні функціональні групи від вступу в небажані вторинні реакції, такі як ацилювання, утворення простого ефіру, утворення складного ефіру, окиснення, сольволиз та аналогічні реакції. Особливістю захисних груп є те, що їх можна легко, тобто без небажаних вторинних реакцій, видаляти, звичайно за допомогою ацетолізу, протолізу, сольволізу, відновлення, фотолізу, а також при впливі ферментів, наприклад, при умовах, аналогічних фізіологічним умовам, та вони не містяться в кінцевих продуктах. Фахівцеві в даній галузі техніки відомо або він легко може

45

встановити, які захисні групи є підходящими для проведення реакцій, зазначених вище та нижче в даному винаході.

Захист таких функціональних груп за допомогою таких захисних груп, самі захисні групи та реакції їх видалення описані, наприклад, в стандартних довідниках, таких як J. F. W. McOmie, "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, London and New York 1973, у T. W. Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", Third edition, Wiley, New York 1999, у "The Peptides"; Volume 3 (editors: E. Gross and J. Meienhofer), Academic Press, London and New York 1981, у "Methoden der organischen Chemie" (Методи органічної хімії), Houben Weyl, 4th edition, Volume 15/I, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974, у H.-D. Jakubke and H. Jeschkeit, "Aminosäuren, Peptide, Proteine" (Амінокислоти, пептиди, білки), Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, and Basel 1982 та у Jochen Lehmann, "Chemie der Kohlenhydrate: Monosaccharide und Derivate" (Хімія карбогідратів: карбогідрати та похідні), Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974.

Необов'язкові реакції та перетворення

Сполуку формули (I) можна перетворити в іншу сполуку формули I.

Сполуку формули (I), у якій R³ позначає фтор, можна одержати шляхом перетворення відповідної хлорпохідної в сполуку, що містить фтор. Такі реакції відомі та називаються реакціями заміщення. Це перетворення може протікати на стадії, що включає вихідну речовину формули (IIIA або B), або шляхом перетворення відповідної сполуки формули I.

В сполуці формули (I), у якій замісник містить аміногрупу або аміно-C₁-C₇-алкіл як замісник, аміногрупу можна перетворити в аціламіногрупу, наприклад, C₁-C₇-алканоліламіногрупу або C₁-C₇-алкансульфоніламіногрупу, за реакцією з відповідним C₁-C₇-алканолілгалогенідом або C₁-C₇-алкансульфонілгалогенідом, наприклад, відповідним хлоридом, в присутності третинної азотистої основи, такої як триетиламін або піридин, за відсутності або в присутності підходящого розчинника, такого як метиленхлорид, наприклад, при температурах в діапазоні від -20 до 50 °C, наприклад, приблизно при кімнатній температурі.

В сполуці формули (I), у якій замісник містить ціаногрупу як замісник, ціаногрупу можна перетворити в амінометильну групу, наприклад, шляхом гідрування в присутності підходящого каталізатору на основі металу, такого як нікель Ренея або кобальт Ренея, в підходящому розчиннику, наприклад, нижч. алканолі, такому як метанол та/або етанол, наприклад, при температурах в діапазоні від -20 до 50 °C, наприклад, приблизно при кімнатній температурі.

Солі сполуки формули (I) із солеутворюючою групою можна одержати за відомими методиками. Так, солі приєднання сполук формули (I) з кислотами можна одержати обробкою кислотою або підходящим аніонообмінним реагентом. Сіль із двома молекулами кислоти (наприклад, дигалогенід сполуки формули I) також можна перетворити в сіль із однією молекулою кислоти на молекулу сполуки (наприклад, моногалогенід); це можна виконати шляхом нагрівання до плавлення або наприклад, шляхом нагрівання у вигляді твердої речовини у високому вакуумі при підвищеній температурі, наприклад, рівній від 130 до 170 °C, у результаті чого з однієї молекули сполуки формули I віддається одна молекула кислоти. Солі звичайно можна перетворити у вільні сполуки, наприклад, шляхом обробки підходящими основними сполуками, наприклад, карбонатами лужних металів, гідрокарбонатами лужних металів або гідроксидами лужних металів, звичайно карбонатом калію або гідроксидом натрію.

Суміші стереоізомерів, наприклад, суміші діастереоізомерів можна розділити на відповідні ізомери за відомими методиками, за допомогою підходящих методик розділення. Наприклад, суміші діастереоізомерів можна розділити на індивідуальні діастереоізомери за допомогою фракціонованої кристалізації, хроматографії, розподілу в розчинниках та аналогічних методик. Це розділення можна проводити або для вихідної сполуки або для самої сполуки формули (I). Енантіомери можна розділити шляхом утворення діастереоізомерних солей, наприклад, шляхом утворення солі з енантіомерно чистою хіральною кислотою або за допомогою хроматографії, наприклад, ВЕРХ (високоєфективна рідинна хроматографія), з використанням хроматографічних субстратів, що містять хіральні ліганди.

Слід підкреслити, що реакції, аналогічні реакціям перетворення, зазначеним у цьому розділі, також можна проводити з підходящими проміжними продуктами (і таким чином, вони застосовні для одержання відповідних вихідних речовин).

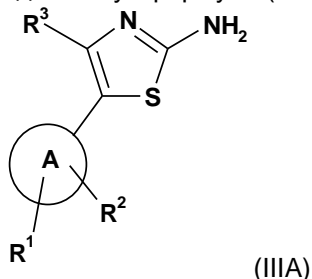
Вихідні речовини:

Вихідні речовини формул II та III, а також інші вихідні речовини, зазначені в даному винаході, наприклад, нижче, можна одержати за методиками, які відомі в даній галузі техніки, або за аналогічними методиками, або вони є в продажу. Якщо одержання вихідних речовин спеціально не описане, тоді сполуки є відомими або їх можна одержати за методиками, аналогічними відомим у даній галузі техніки, наприклад, описаним у WO 05/021519 або WO04/096797, або розкритим нижче в даному винаході. Нові вихідні речовини, а також способи

їх одержання також є варіантами здійснення даного винаходу. У кращих варіантах здійснення використовують такі вихідні речовини та реакцію вибирають таким чином, щоб можна було одержати кращі сполуки.

- 5 У вихідних речовинах (включаючи проміжні продукти), які також можна використовувати та/або одержувати у вигляді солей якщо це є підходящим та доцільним, замісники переважно є такими, як визначено для сполуки формули (I).

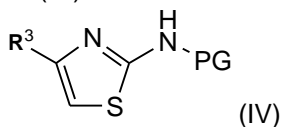
Даний винахід також відноситься до сполук формули (IIIA) або їх солей



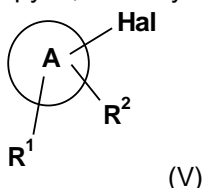
у якій замісники є такими, як визначено для сполуки формули (I).

- 10 Даний винахід також відноситься до способів одержання сполуки формули (IIIA). У принципі, усі відомі способи, які приводять до комбінації двох компонентів арил/гетероарил (такі як реакції типу реакції Хека) з утворенням відповідної похідної сечовини, є підходящими та можуть бути використані із застосуванням відповідної вихідної речовини. Таким чином, даний винахід також

- 15 (стадія 1) реакцію сполуки формули (IV)



у якій R³ є таким, як визначено в даному винаході, та додатково може позначати галоген, PG позначає захисну групу, таку як ацильна група, із сполукою формули (V)

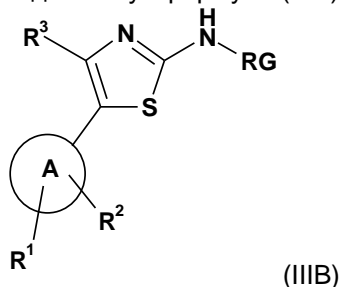


- 20 у якій R¹, R², A є такими, як визначено в даному винаході та Hal позначає галоген, такий як бром, за реакцією Хека; необов'язково в присутності розріджувача та необов'язково в присутності засобу, що сприяє проходженню реакції;

- 25 (стадія 2), з наступним видаленням захисної групи, наприклад, в кислому середовищі; необов'язково в присутності розріджувача та необов'язково в присутності засобу, що сприяє протіканню реакції; та

- вилучення отриманої сполуки формули (IIIA) у вільній формі або у формі солі та, необов'язково перетворення отриманої сполуки формули (IIIA) в іншу сполуку формули (IIIA), та/або перетворення отриманої солі сполуки формули (IIIA) в іншу її сіль, та/або перетворення отриманої вільної сполуки формули (IIIA) в її сіль, та/або відділення отриманого ізомеру сполуки формули (IIIA) від одного або більшої кількості різних отриманих ізомерів формули (IIIA).

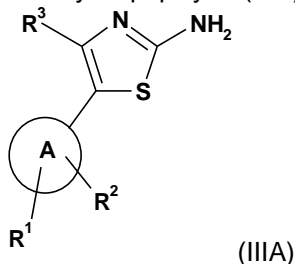
Даний винахід також відноситься до сполук формули (IIIB) або їх солей



- 35 у якій R¹, R², A є такими, як визначено для сполуки формули (I), RG позначає реакційноздатну групу, переважно імідазолілкарбоніл, яка може реагувати безпосередньо або

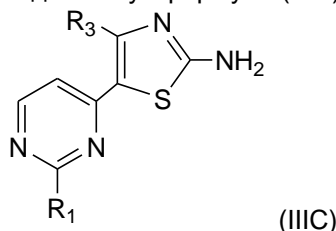
шляхом утворення проміжного ізоціанату формули (IIIE), та R^3 є таким, як визначено в даному винаході, та додатково може позначати галоген.

- 5 Даний винахід також відноситься до способів одержання сполуки формули (IIIB). В принципі, всі відомі способи, які забезпечують перетворення аміну або його солі у відповідну активовану похідну, є підходящими та можуть бути використані із застосуванням відповідної вихідної речовини. Таким чином, даний винахід також відноситься до способу одержання сполуки формули (IIIB), який включає реакцію сполуки формули (IIIA)

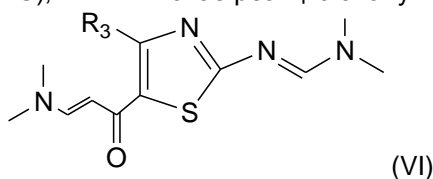


- 10 у якій замісники є такими, як визначено в даному винаході, з активуючим реагентом, таким як 1,1'-карбонілдіімідазол, необов'язково в присутності розріджувача та необов'язково в присутності засобу, що сприяє протіканню реакції; та вилучення отриманої сполуки формули (IIIB) у вільній формі або у формі солі, та необов'язково перетворення отриманої сполуки формули (IIIB) в іншу сполуку формули (IIIB), та/або перетворення отриманої солі сполуки формули (IIIB) в іншу її сіль, та/або
- 15 перетворення отриманої вільної сполуки формули (IIIB) в її сіль, та/або відділення отриманого ізомеру сполуки формули (IIIB) від одного або більшої кількості різних отриманих ізомерів формули (IIIB).

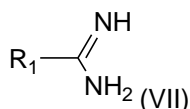
Даний винахід також відноситься до сполук формули (IIIC) або їх солей



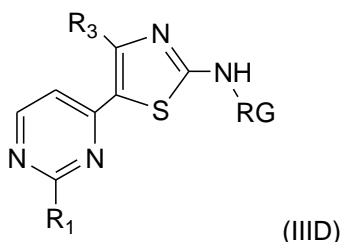
- 20 у якій замісники є такими, як визначено для сполуки формули (I). Даний винахід також відноситься до способів одержання сполуки формули (IIIC). В принципі, всі реакції замикання циклу є підходящими та можуть бути використані із застосуванням відповідної вихідної речовини. Таким чином, даний винахід також відноситься до способу одержання сполуки формули (IIIC), який включає реакцію сполуки формули (VI)



- 25 у якій R^3 є таким, як визначено в даному винаході, та додатково може позначати галоген, із сполукою формули (VII)

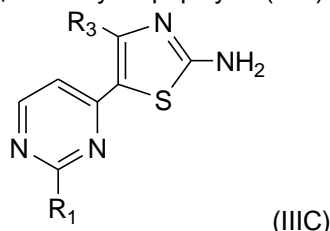


- 30 у якій R^1 є таким, як визначено в даному винаході; необов'язково в присутності розріджувача та необов'язково в присутності засобу, що сприяє проходженню реакції; та вилучення отриманої сполуки формули (IIIC) у вільній формі або у формі солі, та необов'язково перетворення отриманої сполуки формули (IIIC) в іншу сполуку формули (IIIC), та/або перетворення отриманої солі сполуки формули (IIIC) в іншу її сіль, та/або перетворення отриманої вільної сполуки формули (IIIC) в її сіль, та/або відділення отриманого ізомеру сполуки формули (IIIC) від одного або більшої кількості різних отриманих ізомерів формули (IIIC).
- 35 Даний винахід також відноситься до сполук формули (IIID) або їх солей



у якій R^1 є таким, як визначено в даному винаході, RG позначає реакційноздатну групу, переважно імідазолікарбоніл, R^3 є таким, як визначено в даному винаході, та додатково може позначати галоген.

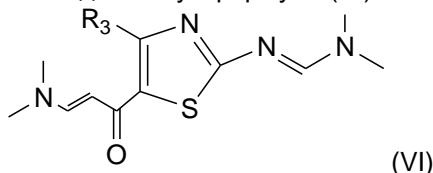
- 5 Даний винахід також відноситься до способів одержання сполуки формули (IIID). В принципі, всі відомі способи, які забезпечують перетворення аміну або його солі у відповідну активовану похідну, є підходящими та можуть бути використані із застосуванням відповідної вихідної речовини. Таким чином, даний винахід також відноситься до способу одержання сполуки формули (IIID), який включає реакцію сполуки формули (IIIC)



у якій замісники є такими, як визначено вище, з активуючим реагентом, таким як 1,1'-карбонілдіімідазол, необов'язково в присутності розріджувача та необов'язково в присутності засобу, що сприяє проходженню реакції; та

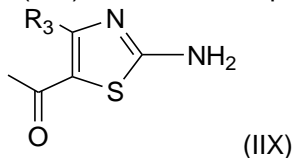
15 вилучення отриманої сполуки формули (IIID) у вільній формі або у формі солі, та необов'язково перетворення отриманої сполуки формули (IIID) в іншу сполуку формули (IIID), та/або перетворення отриманої солі сполуки формули (IIID) в іншу її сіль, та/або перетворення отриманої вільної сполуки формули (IIID) в її сіль, та/або відділення отриманого ізомеру сполуки формули (IIID) від одного або більшої кількості різних отриманих ізомерів формули (IIID).

20 Даний винахід також відноситься до сполук формули (VI) або їх солей



у якій R^3 є таким, як визначено в даному винаході, та додатково може позначати галоген.

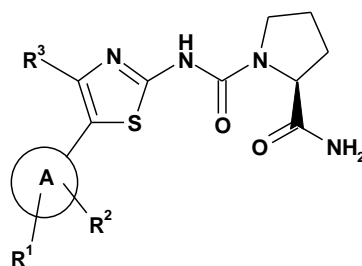
25 Даний винахід також відноситься до способів одержання сполуки формули (VI). В принципі, можна використовувати всі відомі способи, що підходять для такого перетворення, із застосуванням відповідної вихідної речовини. Таким чином, даний винахід також відноситься до способу одержання сполуки формули (IIID), який включає реакцію сполуки формули (IIX)



30 у якій R^3 є таким, як визначено для формули (I), та додатково може позначати галоген, з ацеталем диметилформаміду, таким як диметилацеталь ДМФА, з одержанням сполуки формули (VI);

35 вилучення отриманої сполуки формули (IIID) у вільній формі або у формі солі, та необов'язково перетворення отриманої сполуки формули (IIX) в іншу сполуку формули (IIX), та/або перетворення отриманої солі сполуки формули (IIX) в іншу її сіль, та/або перетворення отриманої вільної сполуки формули (IIX) в її сіль, та/або відділення отриманого ізомеру сполуки формули (IIX) від одного або більшої кількості різних отриманих ізомерів формули (IIX).

Сполуки формули (I),



(I),

також включають сполуки субформул (IA), (IB) та їх фармацевтично прийнятні солі, у якій А позначає гетероарил;

R¹ позначає (1) необов'язково заміщений алкіл; (2) необов'язково заміщений циклоалкіл; (3) необов'язково заміщений арил; (4) необов'язково заміщений амін; (5) необов'язково заміщений сульфоніл; (6) галоген;

R² позначає водень, дейтерій або замісник, визначений для R¹;

R³ позначає водень, галоген, необов'язково заміщений алкіл;

застосовні як лікарські засоби. Тому в одному варіанті здійснення даний винахід відноситься до композицій, призначених для застосування в медицині або ветеринарії, коли показано інгібування PI3K. Цей варіант здійснення також включає сполуку (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід, 1-({5-[2-(трет-бутил)-піримідин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іл}-амід, але альтернативно виключає вказану сполуку.

В одному варіанті здійснення даний винахід відноситься до лікування клітинних проліферативних захворювань, таких як пухлини та/або ріст ракових клітин, опосередковуваних за допомогою PI3K. Захворювання можуть включати такі, при яких спостерігаються надекспресування або ампліфікація PI3K-альфа, соматичні мутації PIK3CA або мутації зародкового типу або соматичні мутації PTEN або мутації та транслокації р85α, які забезпечують підвищуювальну регуляцію комплексу р85-р110. Зокрема, ці сполуки застосовні для лікування ракових захворювань людини або тварини (наприклад, миші), включаючи, наприклад, саркому, ракові захворювання легенів, бронхів, передміхурової залози, молочної залози (включаючи спорадичні ракові захворювання молочної залози та страждаючих на хворобу Коудена), підшлункової залози, шлунково-кишковий рак, товстої кишки, прямої кишки, карциному товстої кишки, колоректальну аденому, щитовидної залози, печінки, внутрішньопечіночних жовчних проток, гепатоцелюлярні, надниркових залоз, шлунку, гліому, гліобластому, ендометрію, меланому, нирок, ниркових лоханок, сечового міхура, тіла матки, шейки матки, піхви, яєчників, множинну мієлому, стравоходу, лейкоз, гострий мієлолейкоз, хронічний мієлолейкоз, лімфолейкоз, мієлолейкоз, головного мозку, карциному головного мозку, порожнини рота та глотки, гортані, тонкого кишечника, неходжкінську лімфому, меланому, ворсинчасту аденому товстої кишки, неоплазію, неоплазію епітеліального характеру, лімфоми, карциному молочної залози, базально-клітинну карциному, плоскоклітинну карциному, старечий кератоз, пухлинні захворювання, включаючи солідні пухлини, пухлини голови та шиї, справжню поліцитемію, есенціальну тромбоцитемію, мієлофіброз із мієлоїдною метаплазією та хворобу Вальденстрема.

В інших варіантах здійснення патологічний стан або порушення (наприклад, опосередковане за допомогою PI3K) вибране з групи, що включає: справжню поліцитемію, есенціальну тромбоцитемію, мієлофіброз із мієлоїдною метаплазією, астму, ХОЗЛ (хронічне обструктивне захворювання легенів), ГРДС (гострий респіраторний дистресс синдром), синдром Леффлера, еозинофільну пневмонію, зараження паразитами (зокрема, багатоклітинними) (включаючи тропічну еозинофілію), бронхолегеневий аспергілез, нодозний поліартеріїт (включаючи синдром Черджа-Строса), еозинофільну гранулему, пов'язані з еозинофілами порушення, що впливають на дихальні шляхи, викликані реакцією на лікарський засіб, псоріаз, контактний дерматит, atopічний дерматит, гніздну alopecію, багатформну еритему, герпетриформний дерматит, склеродерму, вітиліго, алергійний васкуліт, уртикарію, булезний pemфігоїд, червоний вовчак, пухирчатку, вроджений булезний епідермоліз, аутоімунні захворювання крові (наприклад, гемолітичну анемію, апластичну анемію, справжню еритроцитарну анемію та ідіопатичну тромбоцитопенію), системний червоний вовчак, поліхондрію, склеродерму, гранулематоз Вегенера, дерматоміозит, хронічний активний гепатит, злоякісну міастенію, синдром Стивенса-Джонсона, ідіопатичне спру, аутоімунне запальне захворювання кишечника (наприклад, виразковий коліт та хвороба Крона), ендокринну офтальмопатію, дифузійний токсичний зоб, саркоїдоз, альвеоліт, хронічний гіперчутливий пневмоніт, розсіяний склероз, первинний біліарний цироз, увеїт (передній та задній), інтерстиціальний фіброз легенів, псоріатичний

артрит, гломерулонефрит, серцево-судинні захворювання, атеросклероз, гіпертензію, тромбоз глибоких вен, удар, інфаркт міокарда, нестабільну стенокардію, тромбоемболію, емболію легенів, тромболітичні захворювання, гостру артеріальну ішемію, тромботичні оклюзії периферійних судин та ішемічну хворобу серця, реперфузійні ураження, ретинопатію, таку як

5 діабетична ретинопатія або викликана киснем гіпербарична ретинопатія, та патологічні стани, що характеризуються підвищеним внутрішньоочним тиском або секрецією внутрішньоочної рідини, такі як глаукома.

Для зазначених вище випадків застосування необхідна доза, зрозуміло, буде мінятися залежно від шляху введення, конкретного патологічного стану, що піддається лікуванню, та

10 необхідного ефекту. Звичайно вказують, що задовільні результати систематично забезпечуються при добових дозах, рівних від приблизно 0,03 до приблизно 100,0 мг/(кг маси тіла), наприклад, від приблизно 0,03 до приблизно 10,0 мг/(кг маси тіла). Показана добова доза для великого ссавця, наприклад, людини, знаходиться в діапазоні від приблизно 0,5 мг до

15 приблизно 3 г, наприклад, від приблизно 5 мг до приблизно 1,5 г, та її звичайно вводять, наприклад, у вигляді розділених доз до 4 разів на добу або у формі пролонгованої дії. Разові дозовані форми, що підходять для перорального введення, містять від приблизно 0,1 до приблизно 500 мг, наприклад, від приблизно 1,0 до приблизно 500 мг активного інгредієнту.

Сполуки формули (I) можна вводити будь-яким підходящим шляхом, зокрема, ентерально, наприклад, перорально, наприклад, у вигляді таблеток або капсул, або парентерально,

20 наприклад, у вигляді розчинів або суспензій для ін'єкцій, місцево, наприклад, у вигляді лосьйонів, гелів, мазей або кремів, шляхом інгаляції, назально або у формі супозиторію.

Сполуки формули (I) можна вводити у вільній формі або у формі фармацевтично прийнятної солі, наприклад, як зазначено вище. Такі солі можна одержати звичайним чином та вони мають активність такого ж порядку, як вільні сполуки.

25 Таким чином, даний винахід також відноситься до:

- способу попередження або лікування патологічних станів, порушень або захворювань, опосередкованих активацією ферменту PI3K (наприклад, кінази PI3-альфа), наприклад, таких, як вказано вище, у суб'єкта, що потребує такого лікування, який включає введення зазначеному

30 суб'єкту сполуки формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі у ефективній кількості;

- сполуки формули (I) у вільній формі або у формі фармацевтично прийнятної солі як лікарського засобу, наприклад, у будь-якому зі способів, зазначених в даному винаході;

- сполуки формули (I) у вільній формі або у формі фармацевтично прийнятної солі, призначеної для застосування як лікарського засобу, наприклад, у будь-якому зі способів, зазначених в даному винаході, переважно для застосування при одному або більшій кількості

35 захворювань, що опосередковуються фосфатидилінозит-3-кіназою;

- застосування сполуки формули (I) у вільній формі або у формі фармацевтично прийнятної солі у будь-якому зі способів, зазначених в даному винаході, зокрема, для лікування одного або

- застосування сполуки формули (I) у вільній формі або у формі фармацевтично прийнятної солі у будь-якому зі способів, зазначених в даному винаході, зокрема, для приготування

40 лікарського засобу, призначеного для лікування одного або більшої кількості захворювань, опосередкованих фосфатидилінозит-3-кіназою.

PI3K виступають як вузол других месенджерів, який об'єднує паралельні шляхи передачі сигналів, та з'являється все більше даних про те, що комбінація інгібітору PI3K з інгібіторами

45 інших шляхів буде застосовна для лікування раку та проліферативних захворювань у людей.

Приблизно у 20-30 % людей, що страждають на рак молочної залози, надекспресується Her-2/neu-ErbB2, мішень для лікарського препарату трастузумаб. Хоча показано, що трастузумаб

50 приводить до тривалих відповідей у деяких пацієнтів, у яких експресується Her2/neu-ErbB2, відповідь спостерігається тільки у частини цих пацієнтів. Останні дослідження показали, що таку обмежену відповідь можна суттєво покращити за допомогою комбінації трастузумаба з інгібіторами шляху PI3K або PI3K/AKT (Chan et al., Breast Can. Res. Treat. 91:187 (2005), Woods Ignatoski et al., Brit. J. Cancer 82:666 (2000), Nagata et al., Cancer Cell 6:117 (2004)).

При різних злоякісних захворюваннях людей відбуваються активуючі мутації або спостерігається підвищений вміст Her1/EGFR та для впливу на цю рецепторну тирозинкіназу

55 розроблений цілий ряд антитіл та невеликих молекул-інгібіторів, у тому числі тарцева, гефітиніб та ербитукс. Однак, хоча інгібітори EGFR проявляють протипухлинну активність по відношенню до деяких пухлин людини (наприклад, NSCLC), вони не збільшують загальну виживаність для всіх пацієнтів, у яких є пухлини, що експресують EGFR. Це можна пояснити тим, що для багатьох мішеней Her1/EGFR, розташованих нижче в шляху передачі сигналу, включаючи шлях

60 PI3K/Akt, з високою частотою відбуваються мутації або порушення регуляції при різних

злоякісних проявах. Наприклад, за даними досліджень *in vitro* гефітініб пригнічує ріст лінії клітин аденокарциноми. Однак можна вибрати субклони цих ліній клітин, які резистентні до впливу гефітінібу та в яких спостерігається посилена активація шляху PI3K/Akt. Понижувальна регуляція або інгібування цього шляху робить резистентні субклони чутливими до гефітінібу (Kokubo et al., Brit. J. Cancer 92:1711 (2005)). Крім того, у моделі раку молочної залози *in vitro* з використанням лінії клітин, у яких схована мутація PTEN та відбувається надекспресування EGFR, інгібування та шляху PI3K/Akt, та EGFR приводить до синергетичного ефекту (She et al., Cancer Cell 8:287-297(2005)). Ці результати показують, що комбінація гефітінібу та інгібіторів шляху PI3K/Akt, імовірно, буде привабливою методологією для лікування раку.

У моделі ксенотрансплантату гліобластоми комбінація AEE778 (інгібітор Her-2/neu/ErbB2, VEGFR та EGFR) та RAD001 (інгібітор mTOR, розташований у прямому напрямку в шляху передачі сигналу мішені Akt) приводить до більшої сумарної ефективності, ніж при використанні цих засобів окремо (Goudar et al., Mol. Cancer Ther. 4:101-112 (2005)).

Антиестрогени, такі як тамоксифен, пригнічують ріст раку молочної залози, викликаючи зупинку клітинного циклу, для якої необхідний вплив інгібітору p27Kip клітинного циклу. Нещодавно показано, що активація шляху кінази Ras-Raf-MAP змінює стан фосфорилування p27Kip, таким чином, що послабляється його інгібуючий вплив при зупинці клітинного циклу, що сприяє резистентності до антиестрогенів (Donovan, et al, J. Biol. Chem. 276:40888, 2001). Як показано в публікації Donovan et al., інгібування сигнального шляху MAPK шляхом лікування інгібітором MEK обертає аномальний стан фосфорилування p27 у випадку резистентних до гормону ліній клітин раку молочної залози та тим самим відновлює чутливість до гормону. Аналогічним чином, фосфорилування p27Kip за допомогою Akt також усуває його вплив при зупинці клітинного циклу (Viglietto et al., Nat Med. 8:1145 (2002)).

Відповідно до цього в іншому об'єкті сполуки формули (I) застосовуються для лікування залежних від гормонів типів раку, таких як рак молочної та передміхурової залози. Їх застосування спрямоване на повернення резистентності до гормонів, що звичайно спостерігається для цих типів раку при використанні звичайних протиракових засобів.

При ракових захворюваннях крові, таких як хронічний мієлолейкоз (ХМЛ), транслокація хромосом відповідала за конститутивно активовану BCR-Abl тирозинкіназу. Страждаючи цими захворюваннями пацієнти реагують на іматиніб, невелику молекулу - інгібітор тирозинкінази, внаслідок інгібування активності кінази Abl. Однак на прогресуючій стадії захворювання багато пацієнтів спочатку реагують на іматиніб, але потім відбувається рецидив внаслідок мутацій, що приводять до резистентності, у домені кінази Abl. Дослідження *in vitro* показали, що для надання впливу BCR-Abl використовує шлях кінази Ras-Raf. Крім того, інгібування на тому ж шляху більше однієї кінази приводить до додаткового захисту від мутацій, що приводять до резистентності.

Відповідно до цього в іншому об'єкті сполуки формули (I) застосовують у комбінації щонайменше з одним додатковим засобом, вибраним з групи інгібіторів кінази, таким як глєєвек®, для лікування ракових захворювань крові, таких як хронічний мієлолейкоз (ХМЛ). Їх застосування спрямоване на повернення або попередження резистентності по відношенню до зазначеного щонайменше одного додаткового засобу.

Оскільки активація шляху PI3K/Akt сприяє виживанню клітин, інгібування цього шляху в комбінації із засобами, які сприяють апоптозу ракових клітин, включаючи променеву терапію та хіміотерапію, приведе до поліпшеної відповіді (Ghobrial et al., CA Cancer J. Clin 55:178-194 (2005)). Прикладом є комбінація інгібітору кінази PI3 з карбоплатином, яка виявляє синергетичний ефект при дослідженнях проліферації та апоптозу *in vitro*, а також при дослідженнях ефективності впливу на пухлину *in vivo* з використанням моделі ксенотрансплантату раку яєчників (Westfall та Skinner, Mol. Cancer Ther 4:1764-1771 (2005)).

З'являється усе більше даних про те, що інгібітори PI3-кіназ класів 1A та 1B можуть мати терапевтичну цінність не тільки при раку та проліферативних захворюваннях, але та при інших типах захворювань. Встановлено, що інгібування p110 β , ізоформи PI3K, що є продуктом гену PIK3CB, може брати участь в індукційній зрушенні активації тромбоцитів (Jackson et al., Nature Medicine 11:507-514 (2005)). Таким чином, інгібітор PI3K, який інгібує p110 β , можна застосовувати як єдиний засіб або в комбінації з антитромботичною терапією. Ізоформа p110 δ , яка є продуктом гену PIK3CD, є важливою для В- клітинної функції та диференціації (Clayton et al., J. Exp. Med. 196:753-763 (2002)), а також для залежних та незалежних від Т-клітин імунних відповідей (Jou et al., Mol. Cell. Biol. 22:8580-8590 (2002)) та диференціації мастоцитів (Ali et al., Nature 431:1007-1011 (2004)). Таким чином, слід очікувати, що інгібітори p110 δ можуть бути застосовними для лікування пов'язаних з В-клітинами аутоімунних захворювань та астми. Нарешті, інгібування p110 γ , ізоформи, що є продуктом гену PIK3CG, приводить до зниженої Т-

клітинної, але не В-клітинної відповіді (Reif et al., J. Immunol. 173:2236-2240 (2004)) та ефективність інгібування цієї ізоформи продемонстрована на моделях аутоімунних захворювань на тваринах (Camps et al., Nature Medicine 11:936-943 (2005), Barber et al., Nature Medicine 11:933-935 (2005)).

5 Даний винахід також відноситься до фармацевтичних композицій, що включають щонайменше одну сполуку формули (I) разом з фармацевтично прийнятним інертним наповнювачем, придатним для введення людині або тварині окремо або разом з іншими протираковими засобами.

10 Даний винахід також відноситься до способів лікування людей або тварин, що страждають від клітинного проліферативного захворювання, такого як рак. Таким чином, даний винахід відноситься до способів лікування людини або тварини, що потребує такого лікування, що включають введення суб'єкту сполуки формули (I) окремо або в комбінації з іншими протираковими засобами в терапевтично ефективній кількості. Зокрема, композиції можна приготувати спільно у вигляді комбінованого лікарського засобу або вводити окремо.

15 Протиракові засоби, що підходять для застосування разом із сполукою формули (I), включають, але не обмежуються тільки ними, одну або більшу кількість сполук, вибраних з групи, що включає інгібітори кінази, антиестрогени, антиандрогени, інші інгібітори, хіміотерапевтичні протиракові лікарські засоби, алкілюючі засоби, хелатні засоби, модифікатори біологічної відповіді, протиракові вакцини, засоби антизначеннєвої терапії, наведені нижче:

20 А. Інгібітори кінази: Інгібітори кінази, призначені для застосування як протиракові засоби разом із сполукою формули (I), включають інгібітори кіназ рецептору епідермального фактору росту (EGFR), такі як невеликі молекули хіналозинів, наприклад, гефітиніб (US 5457105, US 5616582 та US 5770599), ZD-6474 (WO 01/32651), ерлотиніб (тарцева®, US 5747498 та WO 96/30347) та лапатиніб (US 6727256 та WO 02/02552), інгібітори кіназ рецептору судинного

25 ендотеліального фактору росту (VEGFR), включаючи SU-11248 (WO 01/60814), SU 5416 (US 5883113 та WO 99/61422), SU 6668 (US 5883113 та WO 99/61422), CHIR-258 (US 6605617 та US 6774237), ваталаніб або PTK-787 (US 6258812), VEGF-Трап (WO 02/57423), B43-геністеїн (WO-09606116), фенретинід (п-гідроксифеніламіноретиноева кислота) (US 4323581), IM-862 (WO 02/62826), бевацизумаб або авастин® (WO 94/10202), KRN-951, 3-[5-(метилсульфоніл)піперидинметил]-індоліл]-хінолон, AG-13736 та AG-13925, піроло[2,1-f][1,2,4]триазини, ZK-304709, велгін®, VMMA-3601, EG-004, CEP-701 (US 5621100), Cand5 (WO 04/09769), інгібітори тирозинкінази Erb2, такі як пертузумаб (WO 01/00245), трастузумаб та ритуксимаб, інгібітори Akt протеїнкінази, такі як RX-0201, інгібітори протеїнкінази C (PKC), такі як LY-317615 (WO 95/17182) та перифосин (US 2003171303), інгібітори кінази Raf/Map/MEK/Ras,

35 включаючи сорафеніб (BAY 43-9006), ARQ-350RP, LErafAON, BMS-354825 AMG-548 та інші, розкриті в WO 03/82272, інгібітори кінази рецептору фактору росту фібробластів (FGFR), інгібітори клітинно-залежної кінази (CDK), включаючи CYC-202 та росковітин (WO 97/20842 та WO 99/02162), інгібітори кіназ рецептору тромбоцитарного фактору росту (PDGFR), такі як CHIR-258, 3G3 mAb, AG-13736, SU-11248 та SU6668, та інгібітори кінази Bcr-Abl та білків злиття, такі як STI-571 або глєєвек® (імаїтиніб).

40 В. Антиестрогени: Впливаючі на естрогени засоби, призначені для застосування в протираковій терапії разом із сполукою формули (I), включають селективні модулятори естрогенного рецептору (SERMs), включаючи тамоксифен, тореміфен, ралоксифен, інгібітори ароматази, включаючи аримідекс® або анастрозол, негативні регулятори естрогенного рецептору (ERDs), включаючи фаслодекс® або фульвестрант.

45 С. Антиандрогени: Впливаючі на андрогени засоби, призначені для застосування в протираковій терапії разом із сполукою формули (I), включають флутамід, бікалутамід, фінастерид, аміноглютетамід, кетоконазол та кортикостероїди.

50 D. Інші інгібітори: Інші інгібітори, призначені для застосування як протиракові засоби разом із сполукою формули (I), включають інгібітори протеїнафранезилтрансферази, включаючи типіфарніб або R-115777 (US 2003134846 та WO 97/21701), BMS-214662, AZD-3409 та FTI-277, інгібітори топоізомерази, включаючи мербарон та дифломотекан (BN-80915), інгібітори мітотичних кінезинових білків веретена (KSP), включаючи SB-743921 та MKI-833, модулятори протеосоми, такі як бортезоміб або велкаде® (US 5780454), XL-784, та інгібітори циклооксигенази 2 (COX-2), включаючи нестероїдні протизапальні лікарські засоби I (NSAIDs).

55 E. Хіміотерапевтичні протиракові лікарські засоби: Конкретні протиракові хіміотерапевтичні засоби, призначені для застосування як протиракові засоби разом із сполукою формули (I), включають анастрозол (аримідекс®), бікалутамід (казодекс®), блеоміцинсульфат (бленоксан®), бусульфан (мілеран®), бусульфан для ін'єкцій (бусульфекс®), капецитабін (кселода®), N4-пентоксикабоніл-5-дезоксид-5-фторцитидин, карбоплатин (параплатин®), кармустин (BiCNU®),

60

хлорамбуцил (лейкеран[®]), цисплатин (платинол[®]), кладрибін (лейстатин[®]), циклофосфамід (цитоксан[®] або неосар[®]), цитарабін, цитозинарабінозид (цитосар-U[®]), ліпосомний цитарабін для ін'єкцій (DeroCyt[®]), дакарбазин (DTIC-Dome[®]), дактиноміцин (актиноміцин D, космеган), даунорубіцингідрохлорид (церубідин[®]), ліпосомний даунорубіцинцитрат для ін'єкцій (DaunoXome[®]), дексаметазон, доцетаксел (таксотер[®], US 2004073044), доксорубіцингідрохлорид (адриаміцин[®], рубекс[®]), етопозид (вепезид[®]), флударабінфосфат (флудара[®]), 5-фторурацил (адруцил[®], ефудекс[®]), флутамід (ейлексин[®]), тезацитибін, гемцитабін (дифтордезоксцитидин), гідроксисечовина (гідреа[®]), ідарубіцин (ідаміцин[®]), іфосфамід (IFEX[®]), іринотекан (камптосар[®]), L-аспарагіназа (ЕЛСПАР[®]), лейковорин-кальцій, мелфалан (алкеран[®]), 6-меркаптопурин (пуринетол[®]), метотрексат (фолекс[®]), мітоксандрон (новантрон[®]), міотарг, паклітаксел (таксол[®]), фенікс (іттрій-90/MX-DTPA), пентостатин, поліфепросан 20 з імплантатом кармустину (гліадел[®]), тамоксифенцитрат (нолвадекс[®]), теніпозид (вумон[®]), 6-тіогуанін, тіотепа, трипапазамін (тиразон[®]), топотекангідрохлорид для ін'єкцій (гікамптин[®]), вінбластин (велбан[®]), вінкрисдин (онковін[®]) та вінорелбін (навелбін[®]).

5 F. Алкілюючі засоби: Алкілюючі засоби, призначені для застосування разом із сполукою формули (I), включають VNP-40101M або клоретизин, оксалиплатин (US 4169846, WO 03/24978 та WO 03/04505), глүфосфамід, мафосфамід, етопфос (US 5041424), преднімустин, треосульфат, бусульфат, ірофлувен (ацилфульвен), пенкломедин, піразолоакридин (PD-115934), О6-бензилгуанін, децитабін (5-аза-2-дезоксцитидин), бросталіцин, мітоміцин С (MitoExtra), TLK-286 (телцита[®]), темозоломід, трабектедин (US 5478932), AP-5280 (композиція цисплатину на основі платинату), порфіроміцин, та клеаразид (меклоретамін).

10 G. Хелатні засоби: Хелатні засоби, призначені для застосування разом із сполукою формули (I), включають тетратіомолібдат (WO 01/60814), RP-697, хімерик Т84.66 (сТ84.66), гадофосвесет (вазовіст[®]), дефероксамін та блеоміцин, необов'язково у сполученні з електропорацією (ЕРТ).

25 H. Модифікатори біологічної відповіді: Модифікатори біологічної відповіді, такі як імунномодулятори, призначені для застосування разом із сполукою формули (I), включають стауроспорин та його макроциклічні аналоги, включаючи UCN-01, CEP-701 та мідостаурин (див. WO 02/30941, WO 97/07081, WO 89/07105, US 5621100, WO 93/07153, WO 01/04125, WO 02/30941, WO 93/08809, WO 94/06799, WO 00/27422, WO 96/13506 та WO 88/07045), скваламін (WO 01/79255), DA-9601 (WO 98/04541 та US 6025387), алемтузумаб, інтерферони (наприклад, IFN-а, IFN-б та т. п.), інтерлейкіни, переважно IL-2 або алдеслейкін, а також IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12 та їх активні біологічні варіанти, що містять амінокислотні послідовності, що становлять більше 70 % від нативної послідовності людини, алтретамін (гексален[®]), SU 101 або лефлуномід (WO 04/06834 та US 6331555), імідазохіноліни, такі як ресихімод та іміхімод (US 4689338, 5389640, 5268376, 4929624, 5266575, 5352784, 5494916, 5482936, 5346905, 5395937, 5238944 та 5525612), та SMIPs (невеликі молекули, що модулюють імунотерапевтичні засоби), включаючи бензазоли, антрахінони, тіосемікарбазони та триптантрини (WO 04/87153, WO 04/64759 та WO 04/60308).

40 I. Протиракові вакцини: Протиракові вакцини, призначені для застосування разом із сполукою формули (I), включають авіцин[®] (Tetrahedron Lett. 26:2269-70 (1974)), ореговомаб (OvaRex[®]), тератоп[®] (STn-KLH), вакцини проти мелатоми, серія GI-4000 (GI-4014, GI-4015 та GI-4016), націлені на 5 мутацій білку Ras, GlioVax-1, MelaVax, адвексин[®] або INGN-201 (WO 95/12660), Sig/E7/LAMP-1, кодуючий HPV-16 E7, вакцину MAGE-3 або M3TK (WO 94/05304), HER-2VAX, ACTIVE, який стимулює Т-клітини, специфічні для пухлин, протиракову вакцину GM-CSF та вакцини на основі моноцитогенів Listeria.

50 J. Засоби антисмислової терапії: Протиракові засоби, призначені для застосування разом із сполукою формули (I), також включають анти смислові композиції, такі як AEG-35156 (GEM-640), AP-12009 та AP-11014 (TGF-бета-2-специфічні антисмислові олігонуклеотиди), AVI-4126, AVI-4557, AVI-4472, облімерсен (генасенс[®]), JFS2, апринокарсен (WO 97/29780), GTI-2040 (антисмисловий олігонуклеотид, що впливає на R2 рибонуклеотидредуктази мРНК) (WO 98/05769), GTI-2501 (WO 98/05769), капсульовані в ліпосомах антисмислові олігодезоксинуклеотиди c-Raf (LErafAON) (WO 98/43095), та Sirna-027 (основані на імунній РНК лікарські засоби, що впливають на VEGFR-1 мРНК).

55 Сполуку формули (I) також можна об'єднати в фармацевтичній композиції з бронхорозширюючими або антигістамінними лікарськими речовинами. Такі бронхорозширюючі лікарські засоби включають антихолінергічні або антимускаринові засоби, зокрема, глікопіролат, іпратропійбромід, окситропійбромід та тіотропійбромід, ОрМ3, аклідиній, CHF5407, GSK233705 та агоністи β-2-адренорецептору, такі як салбутамол, тербуталін, салметерол, кармотерол, мілветерол та, переважно, індакатерол та формотерол. Разом застосовні терапевтичні

антигістамінні лікарські речовини включають цетиризингідрохлорид, клемастин фумарат, прометазин, лоратадин, дезлоратадин, дифенгідрамін та фексофенадингідрохлорид.

Іншим об'єктом даного винаходу є комбінація, що включає сполуку формули (I) та одну або більшу кількість сполук, які застосовні для лікування тромболітичного захворювання, захворювання серця, удару тощо. Такі сполуки включають аспірин, стрептокіназу, активатор плазміногену тканини, урокіназу, антикоагулянт, лікарські засоби, що перешкоджають агрегації тромбоцитів (наприклад, ПЛАВІКС; клопідогрелбісульфат), статин (наприклад, ЛІПІТОР або кальцієва сіль аторвастатину), ЗОКОР (симвастатин), КРЕСТОР (росувастатин) та т. п.), бета-блокатор (наприклад, атенолол), НОРВАСК (амлодипінбезилат) та інгібітор АХЕ (ацтилхолинестерази) (наприклад, лізиноприл).

Іншим об'єктом даного винаходу є комбінація, що включає сполуку формули (I) та одну або більшу кількість сполук, які застосовні для лікування гіпертензії. Такі сполуки включають інгібітори АХЕ, засоби, що знижують вміст ліпідів, такі як статини, ЛІПІТОР (кальцієва сіль аторвастатину), блокатори кальцієвих каналів, такі як НОРВАСК (амлодипінбезилат).

Іншим об'єктом даного винаходу є комбінація, що включає сполуку формули (I) та одну або більшу кількість сполук, вибраних з групи, що включає фібрати, бета-блокатори, інгібітори NEP1, антагоністи ангіотензинового рецептору 2 та засоби, що перешкоджають агрегації тромбоцитів.

Іншим об'єктом даного винаходу є комбінація, що включає сполуку формули (I) та сполуку, застосовну для лікування запальних захворювань, включаючи ревматоїдний артрит. Таку сполуку можна вибрати з групи, що включає інгібітори TNF- α , такі як анти-TNF- α моноклональні антитіла (такі як РЕМІКАДЕ, CDP-870) та D2E7 (ГУМІРА) та молекули імуноглобуліну злиття рецептору TNF (такі як ЕМБРЕЛ), інгібітори IL-1, антагоністи рецептору розчинного IL-1R α (наприклад, КІНЕРЕТ або інгібітори ICE), нестероїдні протизапальні лікарські засоби (НПЗЛЗ), піроксикам, диклофенак, напроксен, флурбіпрофен, фенопрофен, кетопрофен, ібупрофен, фенамати, мефенамінову кислоту, індометацин, суліндак, апазон, піразолони, фенілбутазон, аспірин, інгібітори COX-2 (такі як ЦЕЛЕБРЕКС (целекоксиб), ПРЕКСИГ (луміракоксиб)), інгібітори металопротеази (переважно селективні інгібітори MMP-13), p2 \times 7 інгібітори, α 2 μ -інгібітори, НЕЙРОТИН, прегабалін, що застосовується в низькій дозі метотрексат, лефлуномід, гідроксихлорхін, d-пеніциламін, ауранофін або препарати золота, що вводять парентерально або перорально.

Іншим об'єктом даного винаходу є комбінація, що включає сполуку формули (I) та сполуку, застосовну для лікування остеоартриту. Таку сполуку можна вибрати з групи, що включає стандартні нестероїдні протизапальні лікарські засоби (далі НПЗЛЗ), такі як піроксикам, диклофенак, пропіонові кислоти, такі як, напроксен, флурбіпрофен, фенопрофен, кетопрофен та ібупрофен, фенамати, такі як мефенамінова кислота, індометацин, суліндак, апазон, піразолони, такі як фенілбутазон, саліцилати, такі як аспірин, інгібітори COX-2, такі як целекоксиб, валдекоксиб, луміракоксиб та еторикоксиб, анальгетики та внутрісуглобні лікарські засоби, такі як кортикостероїди, та гіалуронові кислоти, такі як гіалган та синвіск.

Іншим об'єктом даного винаходу є комбінація, що включає сполуку формули (I) та противірусний засіб та/або антисептичну сполуку. Такий противірусний засіб можна вибрати з групи, що включає вірацепт, AZT, ацикловір та фамцикловір. Таку антисептичну сполуку можна вибрати з групи, що включає валант.

Іншим об'єктом даного винаходу є комбінація, що включає сполуку формули (I) та один або більшу кількість засобів, вибраних з групи, що включає засоби, що діють на ЦНС (центрально нервова система), такі як антидепресанти (сертралін), лікарські засоби для лікування хвороби Паркінсона (такі як депреніл, L-дофа, реквіп, мірапекс, інгібітори МАОВ, такі як селегін та расагілін, інгібітори comP, такі як тасмар, інгібітори A-2, інгібітори повторного всмоктування допаміну, антагоністи NMDA, агоністи нікотину, агоністи допаміну та інгібітори нейронної синтази оксиду азоту).

Іншим об'єктом даного винаходу є комбінація, що включає сполуку формули (I) та один або більшу кількість лікарських засобів для лікування хвороби Альцгеймера. Такий лікарський засіб для лікування хвороби Альцгеймера можна вибрати з групи, що включає донепезил, такрин, α 2 δ -інгібітори, НЕЙРОТИН, прегабалін, інгібітори COX-2, пропентофілін та метрифонат.

Іншим об'єктом даного винаходу є комбінація, що включає сполуку формули (I) та засоби для лікування остеопорозу та/або імундепресивний засіб. Такі засоби для лікування остеопорозу можна вибрати з групи, що включає ЕВІСТА (ралоксифенгідрохлорид), дролоксифен, лазофоксифен та фосамакс. Такі імундепресивні засоби можна вибрати з групи, що включає FK-506 та рапаміцин.

В інших кращих варіантах здійснення даний винахід відноситься до наборів, які включають одну або більшу кількість сполук формули (I) компонент комбінації, розкритий в даному

винаході. Типові набори включають інгібітор PI3K (наприклад, сполука формули (I)) та аркуш-вкладиш або інше маркування, що містить вказівку для лікування клітинного проліферативного захворювання шляхом введення інгібуючої PI3K кількості сполуки (сполук).

Звичайно сполуки формули (I) вводять в терапевтично ефективній кількості за будь-яким із загальноприйнятих шляхів введення засобів, які призначені для аналогічних цілей. Використовувана кількість сполуки формули (I), тобто активного інгредієнту, буде залежати від безлічі факторів, таких як важкість захворювання, що піддають лікуванню, вік та відносний стан здоров'я суб'єкта, активність сполуки, що використовується, шлях та форма введення та інших факторів. Лікарський засіб можна вводити більше одного разу на добу, переважно один або два рази на добу. Усі ці фактори знаходяться у межах компетенції лікаря. Терапевтично ефективні кількості сполук формули I можуть бути в діапазоні від приблизно 0,05 до приблизно 50 мг/(кг маси тіла) реципієнта на добу; переважно приблизно 0,1-25 мг/кг/добу, більш переважно приблизно від 0,5 до 10 мг/кг/добу. Так, для введення пацієнтові масою 70 кг найбільш кращий діапазон доз становить приблизно 35-70 мг на добу.

Звичайно сполуки формули (I) вводять у вигляді фармацевтичних композицій за будь-яким з наступних шляхів: перорально, системно (наприклад, кризьшкірно, назально або за допомогою супозиторію) або парентерально (наприклад, внутрім'язово, внутрішньовенно або підшкірно). Кращим шляхом введення є пероральний з використанням звичайного добового режиму, який можна змінити у відповідності зі ступенем ураження. Композиції можуть бути у формі таблеток, пігулок, капсул, напіврідких речовин, порошків, препаратів пролонгованої дії, розчинів, суспензій, еліксирів, аерозолів або будь-яких інших підходящих композицій. Іншим кращим шляхом введення сполук формули (I) є інгаляція. Вона є ефективною методикою доставки терапевтичного засобу безпосередньо в дихальні шляхи.

Вибір композиції залежить від різних факторів, таких як шлях введення лікарського засобу та біологічна доступність лікарської речовини. Для доставки шляхом інгаляції сполуки можна приготувати у вигляді рідкого розчину, суспензій, аерозольного препарату або сухого порошку та помістити в дозуючий пристрій, що підходить для введення. Є кілька типів фармацевтичних пристроїв для інгаляції - інгалятори типу небулайзера, мірні дозуючі інгалятори (МДІ) та інгалятори для сухих порошків (ІСП). В обладнаннях типу небулайзера утворюється потік повітря високої швидкості, який розпорошує терапевтичний засіб (який приготовлено в рідкій формі) у повітряну дисперсію, яка попадає в дихальні шляхи пацієнта. МДІ звичайно містять композицію разом із стисненим газом. Після активації пристрою викидає відмірену кількість терапевтичного засобу за допомогою стисненого газу та в такий спосіб є надійним засобом введення заданої кількості засобу. ІСП дозує терапевтичні засоби у вигляді сипучого порошку, який може диспергуватися у вдихуваному пацієнтом потоці повітря. Для одержання сипучого порошку терапевтичний засіб готують разом з інертним наповнювачем, таким як лактоза. Певна кількість терапевтичного засобу зберігається у вигляді капсули та подається при кожному спрацюванні.

Даний винахід також відноситься до композицій, у яких розмір часток сполуки формули (I) знаходиться в діапазоні 10 – 1000 нм, переважно 10 - 400 нм. Такі фармацевтичні композиції розроблені спеціально для лікарських засобів, що мають низьку біологічну доступність, оснований на тому, що біологічну доступність можна поліпшити шляхом збільшення площі поверхні, тобто зменшення розміру часток. Наприклад, в U.S. № 4107288 описана фармацевтична композиція, що має частки з розміром у діапазоні приблизно від 10 до 1000 нм, у якій активна речовина нанесена на матрицю з зшитих макромолекул. В U.S. № 5145684 описане приготування фармацевтичної композиції, у якій лікарську речовину розпорошують у наночастинки (середній розмір часток становить 400 нм) у присутності модифікатора поверхні та потім диспергують у рідкому середовищі та отримують фармацевтичну композицію, що має досить високу біологічну доступність. Обидва документа включені в даний винахід як посилання.

Іншим об'єктом даного винаходу є фармацевтичні композиції, що містять (терапевтично ефективну кількість) сполуки формули (I) та щонайменше один фармацевтично прийнятний інертний наповнювач. Прийнятні інертні наповнювачі є нетоксичними, сприяють введенню та не виявляють несприятливого впливу на терапевтичні характеристики сполуки формули I. Такий інертний наповнювач може бути будь-яким твердим, рідким, напіврідким або, у випадку аерозольної композиції, газоподібним інертним наповнювачем, які звичайно є в розпорядженні фахівця в даній галузі техніки.

Тверді фармацевтичні інертні наповнювачі включають крохмаль, целюлозу, тальк, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, борошно, крейду, силікагель, стеарат магнію, стеарат натрію, гліцеринмоностеарат, хлорид натрію, сухе знежирене молоко тощо.

Рідкі та напіврідкі інертні наповнювачі можна вибрати з групи, що включає гліцерин, пропіленгліколь, воду, етанол та різні масла, включаючи отримані з нафти, тварин, рослинного або синтетичного походження, наприклад, арахісове масло, соєве масло, мінеральне масло, кунжутне масло тощо. Кращі рідкі носії, особливо призначені для розчинів для ін'єкцій, включають воду, фізіологічний розчин, водний розчин декстрази та гліколі.

Стиснені гази можна використовувати для диспергування сполуки формули I в аерозольній формі. Інертними газами, що підходять для цієї мети, є азот, діоксид вуглецю та т.п. Інші підходящі фармацевтично прийнятні інертні наповнювачі та їх композиції описані в публікації Remington's Pharmaceutical Sciences, edited by E. W. Martin (Mack Publishing Company, 18th ed., 1990).

Кількість сполуки в композиції може мінятися в широких межах, що використовуються фахівцями в даній галузі техніки. Звичайно, композиція містить, у мас. %, приблизно 0,01-99,99 мас. % сполуки формули (I) у перерахуванні на повну масу композиції, а решта являють собою один або більшу кількість підходящих фармацевтичних інертних наповнювачів. Переважно, якщо сполука міститься в кількості, що становить приблизно 1-80 мас. %.

Даний винахід також відноситься до фармацевтичної композиції, що включає (тобто містить або вміщує у собі) щонайменше одну сполуку формули (I) та щонайменше один фармацевтично прийнятний інертний наповнювач.

Фармацевтичні композиції, що включають сполуку формули (I) у вільній формі або у формі фармацевтично прийнятної солі разом щонайменше з одним фармацевтично прийнятним інертним наповнювачем (таким як носій та/або розріджувач), можна приготувати звичайним чином шляхом змішування компонентів.

Об'єднані фармацевтичні композиції, що включають сполуку формули (I) у вільній формі або у формі фармацевтично прийнятної солі та що додатково включають компонент комбінації (в одній дозованій разовій формі або у вигляді набору компонентів) разом щонайменше з одним фармацевтично прийнятним носієм та/або розріджувачем, можна приготувати звичайним чином шляхом змішування зазначених активних інгредієнтів з фармацевтично прийнятним носієм та/або розріджувачем.

Таким чином, іншими об'єктами даного винаходу є:

- об'єднана фармацевтична композиція, наприклад, призначена для застосування в будь-якому із способів, описаних у даному винаході, що включає сполуку формули (I) у вільній формі або у формі фармацевтично прийнятної солі разом з фармацевтично прийнятним розріджувачем та/або носієм;

- об'єднана фармацевтична композиція, що включає сполуку формули (I) у вільній формі або у формі фармацевтично прийнятної солі як активний інгредієнт; один або більшу кількість фармацевтично прийнятних носіїв та/або розріджувачів та необов'язково одну або більшу кількість додаткових лікарських речовин. Така об'єднана фармацевтична композиція може бути у вигляді однієї разової дози або у вигляді набору компонентів;

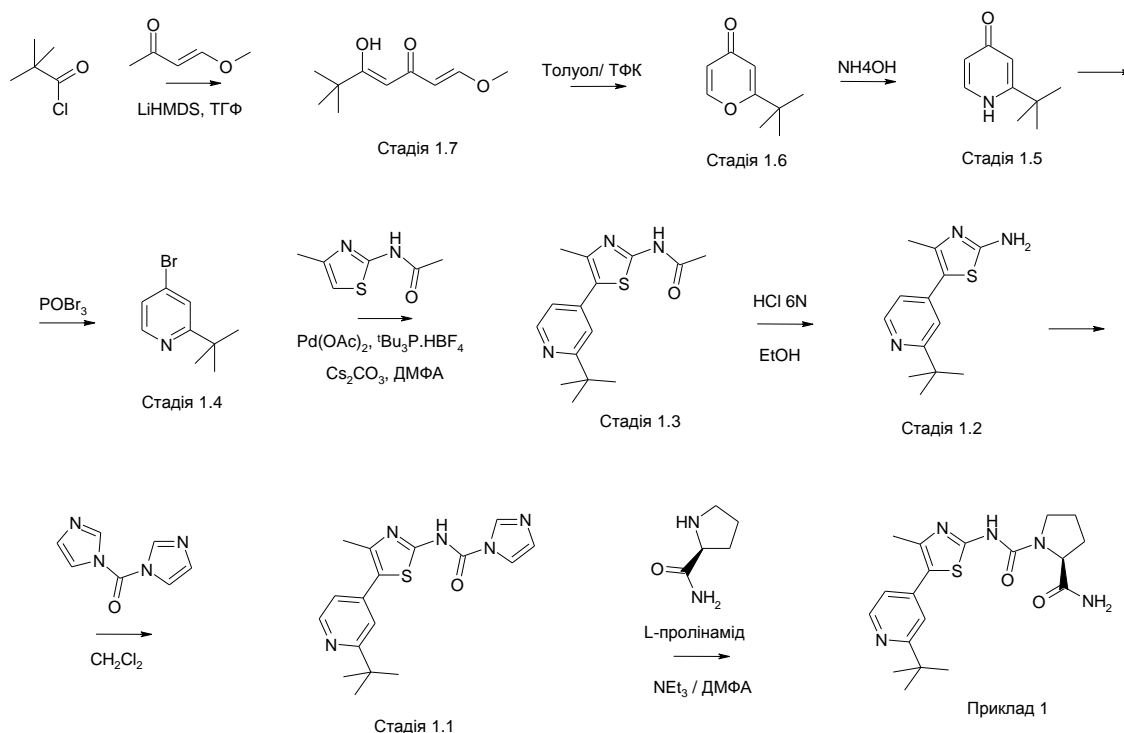
- об'єднана фармацевтична композиція, що включає сполуку формули (I) у вільній формі або у формі фармацевтично прийнятної солі в терапевтично ефективній кількості, та другу лікарську речовину, призначену для одночасного або послідовного введення;

- спосіб, визначений вище, що включає спільне введення, наприклад, одночасне або послідовне, сполуки формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі в терапевтично ефективній нетоксичній кількості, та щонайменше другої лікарської речовини, наприклад, зазначеної вище;

- фармацевтична комбінація, наприклад, набір, що включає а) перший засіб, який являє собою сполуку формули (I), розкриту в даному винаході, у вільній формі або у формі фармацевтично прийнятної солі, та б) щонайменше один засіб, що спільно вводиться, зазначений вище, та такий набір може містити інструкції з його введення.

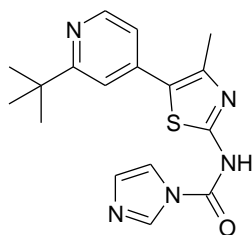
Приведені нижче приклади сполук формули (I) ілюструють даний винахід, не обмежуючи його обсяг. Способи одержання таких сполук описані нижче в даному винаході.

Приклад 1: 2-Амід, 1-{{5-(2-трет-бутилпіридин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл}-амід} (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти



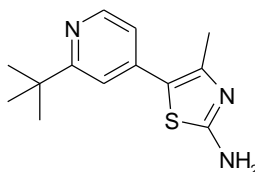
Et₃N (1,54 мл, 11,1 ммоль, 3 екв.) додають до розчину [5-(2-трет-бутилпіридин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-аміду імідазол-1-карбонової кислоти (стадія 1.1) (1,26 г, 3,7 ммоль) та L-пролінаміду (0,548 г, 4,8 ммоль, 1,3 екв.) в ДМФА (25 мл) в атмосфері аргону. Реакційну суміш перемішують впродовж 14 год. при КТ, реакцію зупиняють шляхом додавання насиченого розчину NaHCO₃ та екстрагують за допомогою EtOAc. Органічну фазу промивають насиченим розчином NaHCO₃, сушать (Na₂SO₄), фільтрують та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (ДХМ/MeOH, 1:0 → 94:6), потім розтирають з Et₂O та отримують 1,22 г шуканої сполуки у вигляді білої твердої речовини: ІЕР-МС: 388,1 [M+H]⁺; t_R=2,35 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,36 (ДХМ/MeOH, 9:1). ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСO-d₆) δ (част./млн): 1,32 (s, 9 H) 1,75-1,95 (m, 3 H) 1,97-2,13 (m, 1 H) 2,39 (s, 3 H) 3,38-3,50 (m, 1 H) 3,52-3,65 (m., 1 H) 4,10-4,40 (m, 1 H) 6,94 (br. s., 1 H) 7,22 (d, 1 H) 7,30-7,48 (m, 2 H) 8,49 (d, 1 H) 10,87 (br. s., 1 H).

Стадія 1.1: [5-(2-Трет-бутилпіридин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-амід імідазол-1-карбонової кислоти



Суміш 5-(2-трет-бутилпіридин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іламіну (стадія 1.2) (1 г, 4,05 ммоль) та 1,1'-карбонілдіімідазолу (0,984 г, 6,07 ммоль, 1,5 екв.) в ДХМ (50 мл) перемішують впродовж 4 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником та дають охолотитися. Отриманий осад збирають фільтруванням та отримують 1,26 г шуканої сполуки у вигляді білої твердої речовини: ІЕР-МС: 340,2 [M-H]⁻; t_R=2,85 хвил. (система 1).

Стадія 1.2: 5-(2-трет-Бутилпіридин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іламін

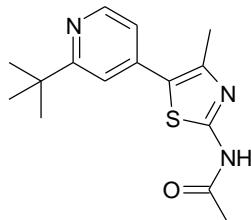


Суміш N-[5-(2-трет-бутилпіридин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-ацетаміду (стадія 1.3) (2 г, 7 ммоль), 6 н. водного розчину HCl (10 мл) та EtOH (50 мл) перемішують впродовж 2 год. при 85 °C, дають охолотитися, реакцію зупиняють шляхом додавання насиченого розчину NaHCO₃

та екстрагують сумішшю ДХМ/МеОН (9:1, об./об.). Органічну фазу промивають насиченим розчином NaHCO_3 , сушать (Na_2SO_4), фільтрують та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (ДХМ/МеОН, 1:0 \rightarrow 96:4) та отримують 1,21 г шуканої сполуки у вигляді жовтої твердої речовини: ІЕР-МС: 248,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; ТШХ: $R_f=0,36$ (ДХМ/МеОН, 9:1).

5

Стадія 1.3: N-[5-(2-трет-Бутилпіридин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-ацетамід

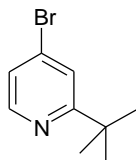


Суміш 2-ацетамідо-4-метилтіазолу (1,2 г, 7,7 ммоль, 1,1 екв.), карбонату цезію (4,55 г, 14 ммоль, 2 екв.), три-трет-бутилфосфінтетрафторборату (0,406 г, 1,4 ммоль, 0,2 екв.), ацетату паладію(II) (0,15 г, 0,7 ммоль, 0,1 екв.) та 4-бром-2-трет-бутилпіридину (стадія 1.4) (1,5 г, 7 ммоль) в ДМФА (50 мл) перемішують впродовж 1,5 год. при 90 °С в атмосфері аргону, дають охолотитися, реакцію зупиняють шляхом додавання насиченого розчину NaHCO_3 та фільтрують через шар целіту. Фільтрат екстрагують за допомогою EtOAc. Органічну фазу промивають насиченим розчином NaHCO_3 , сушать (Na_2SO_4), фільтрують та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (ДХМ/МеОН, 1:0 \rightarrow 97:3) та отримують 2,02 г шуканої сполуки у вигляді жовтої твердої речовини: ІЕР-МС: 290,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; ТШХ: $R_f=0,35$ (ДХМ/МеОН, 9:1).

10

15

Стадія 1.4: 4-Бром-2-трет-бутилпіридин

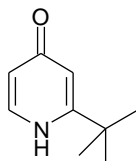


Суміш 2-трет-бутил-1Н-піридин-4-ону (стадія 1.5) (4,25 г, 28 ммоль) та POBr_3 (8,88 г, 31 ммоль, 1,1 екв.) нагрівають при 120 °С, перемішують впродовж 15 хвил., дають охолотитися, реакцію зупиняють шляхом додавання насиченого розчину NaHCO_3 та екстрагують сумішшю ДХМ/МеОН (9:1, об./об.). Органічну фазу промивають насиченим розчином NaHCO_3 , сушать (Na_2SO_4), фільтрують та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (Hex/EtOAc, 95:5) та отримують 5,18 г шуканої сполуки у вигляді жовтого масла: ІЕР-МС: 214,0/216,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; $t_R=2,49$ хвил. (система 1); ТШХ: $R_f=0,35$ (Hex/EtOAc, 1:1).

20

25

Стадія 1.5: 2-трет-Бутил-1Н-піридин-4-он

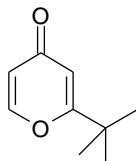


Суміш 2-трет-бутилпіран-4-ону (стадія 1.6) (5,74 г, 37,7 ммоль) та 30 % водного розчину гідроксиду амонію (100 мл) перемішують впродовж 1 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником, дають охолотитися та концентрують. Залишок розтирають з МеОН (200 мл) та фільтрують. Фільтрат концентрують та залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (ДХМ/МеОН/ $\text{NH}_3^{\text{водн.}}$, 94:5:1 \rightarrow 92:7:1) та отримують 4,46 г шуканої сполуки у вигляді жовтої твердої речовини: ІЕР-МС: 152,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; $t_R=1,45$ хвил. (система 1); ТШХ: $R_f=0,11$ (ДХМ/МеОН, 9:1).

30

35

Стадія 1.6: 2-трет-Бутилпіран-4-он

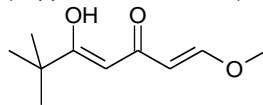


Суміш 5-гідрокси-1-метокси-6,6-диметилгепта-1,4-дієн-3-ону (стадія 1.7) (6,8 г, 36,9 ммоль) та ТФК (5,65 мл, 74 ммоль, 2 екв.) в бензолі (250 мл) перемішують впродовж 14 год. при КТ та

40

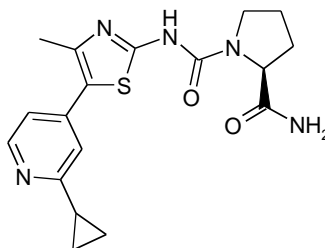
концентрують. Очищення залишку за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (Hex/EtOAc, 1:0 → 75:25) забезпечує одержання 5,74 г шуканої сполуки у вигляді жовтого масла: ІЕР-МС: 153,1 [M+H]⁺; t_R=3,21 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,22 (Hex/EtOAc, 1:1).

Стадія 1.7: 5-Гідрокси-1-метокси-6,6-диметилгепта-1,4-дієн-3-он



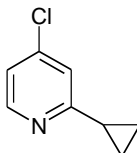
LiHMDS (1M в ТГФ, 100 мл, 2 екв.) по краплям додають до холодного (-78 °С) розчину 4-метокси-3-бутен-2-ону (10 мл, 100 ммоль, 2 екв.) в ТГФ (400 мл). Після 30 хвил. перемішування при -78 °С додають розчин півалоїлхлорид (6,12 мл, 50 ммоль) в ТГФ (100 мл). Отриманій суміші дають нагріватися до КТ впродовж 2 год. та реакцію зупиняють шляхом додавання насиченого розчину NH₄Cl. ТГФ видаляють у вакуумі. Концентровану суміш екстрагують за допомогою Et₂O. Органічну фазу промивають сольовим розчином, сушать (Na₂SO₄), фільтрують та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (Hex/EtOAc, 1:0 → 85:15) та отримують 6,83 г шуканої сполуки у вигляді жовтого масла: ІЕР-МС: 185,1 [M+H]⁺; ТШХ: R_f=0,87 (Hex/EtOAc, 1:1).

Приклад 2: 2-Амід, 1-([5-(2-циклопропілпіридин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-амід) (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. На стадії 1.1 реакційну суміш перемішують впродовж 4 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником. На стадії 1.2 реакційну суміш перемішують впродовж 2 год. при 85 °С. На стадії 1.3 використовують 4-хлор-2-(1-метилциклопропіл)-піридин (стадія 2.1) та реакційну суміш перемішують впродовж 2 год. при 150 °С. Шукана сполука: ІЕР-МС: 372,1 [M+H]⁺; ТШХ: R_f=0,35 (ДХМ/MeOH, 9:1).

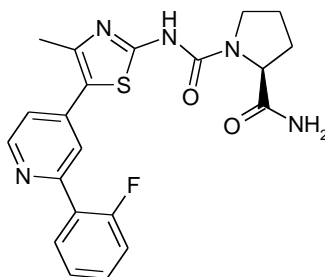
Стадія 2.1: 4-Хлор-2-циклопропілпіридин



Шукану сполуку отримують за модифікованою методикою, описаною в літературі [Comins, D. L.; Mantlo, N. B., Journal of Organic Chemistry, (1985), 50, 4410-4411].

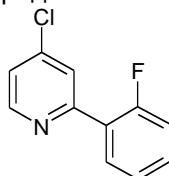
Циклопропілмагнійбромід (0,5M в ТГФ, 100 мл, 50 ммоль, 2,2 екв.) однією порцією додають до холодної (-78 °С) суспензії 4-хлорпіридингідрохлориду (3,4 г, 22 ммоль) в ТГФ (68 мл). Після 10 хвил. перемішування при -78 °С по краплям додають фенілхлорформіат (2,76 мл, 22 ммоль). Реакційну суміш перемішують при -78 °С впродовж 15 хвил., дають нагрітися до КТ, реакцію зупиняють шляхом додавання 20 % водного розчину NH₄Cl та екстрагують за допомогою Et₂O (2×100 мл). Органічну фазу промивають насиченим розчином NaHCO₃ (50 мл), сушать (Na₂SO₄), фільтрують та концентрують. До залишку, розчиненого у толуолі (100 мл), додають розчин о-хлоранілу (6 г, 24,2 ммоль, 1,1 екв.) в льодяній АсОН (50 мл). Реакційну суміш перемішують впродовж 14 год. при КТ, охолоджують до 0 °С, підключають шляхом додавання 10 % водного розчину NaOH та фільтрують через шар целіту. Органічний шар фільтрату промивають за допомогою H₂O (20 мл) та екстрагують 10 % водним розчином HCl (3×25 мл). Об'єднані кислі шари підключають шляхом додавання 20 % водного розчину NaOH та екстрагують за допомогою ДХМ (3×25 мл). Органічну фазу промивають за допомогою H₂O (50 мл), сушать (Na₂SO₄), фільтрують та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (ДХМ/MeOH, 1:0 → 99:1) та отримують 0,951 г шуканої сполуки у вигляді безбарвного масла: ІЕР-МС: 154,1 [M+H]⁺; t_R=1,41 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,85 (ДХМ/MeOH, 9:1).

Приклад 3: 2-Амід, 1-([5-[2-(2-фторфеніл)-піридин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іл]-амід) (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



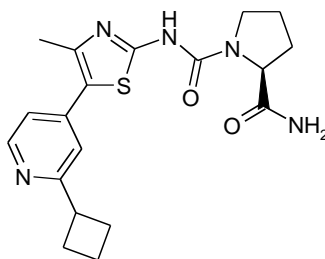
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з використанням 4-хлор-2-(2-фторфеніл)-піридину (стадія 3.1) та перемішування відповідної суміші впродовж 2 год. при 150 °C на стадії 1.3: ІЕР-МС: 426,1 [M+H]⁺; t_R=2,60 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,40 (ДХМ/МеОН, 9:1).

Стадія 3.1: 4-Хлор-2-(2-фторфеніл)-піридин



Суміш 2-фторфенілборонової кислоти (141 мг, 1 ммоль, 1,2 екв.) з EtOH (1 мл) при 105 °C в атмосфері аргону додають до суміші 4-хлор-2-йодпіридину [Choppin, S.; Gros, P.; Fort, Y., European Journal of Organic Chemistry (2001), (3), 603-606] (200 мг, 0,84 ммоль), PdCl₂(dppf) (18 мг, 0,025 ммоль, 0,03 екв.) та Na₂CO₃ (2 М розчин в H₂O, 1,68 мл, 3,36 ммоль, 4 екв.) в толуолі (2 мл). Реакційну суміш перемішують при 105 °C впродовж 1 год., дають охолотитися до КТ, реакцію зупиняють шляхом додавання насиченого розчину NaHCO₃ та екстрагують за допомогою EtOAc. Органічну фазу промивають насиченим розчином NaHCO₃, сушать (Na₂SO₄), фільтрують та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (Гекс/EtOAc, 1:0 → 97:3) та отримують 127 мг шуканої сполуки у вигляді білої твердої речовини: ІЕР-МС: 208,1 [M+H]⁺; t_R=4,66 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,27 (Гекс/EtOAc, 9:1).

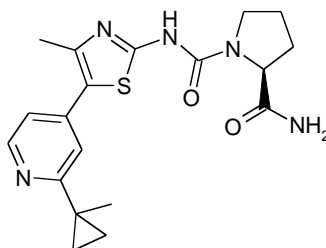
Приклад 4: 2-Амід, 1-([5-(2-циклобутилпіридин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-амід) (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. В прикладі 1 реакційну суміш перемішують впродовж 4 год. при КТ, розводять за допомогою EtOAc та H₂O та екстрагують за допомогою EtOAc. Після сушки та концентрування органічної фази, залишок очищують шляхом розтирання з ДХМ. На стадії 1.3 реакційну суміш перемішують впродовж 2 год. при 120 °C, охолоджують, розводять за допомогою EtOAc та H₂O, фільтрують через шар целіту та екстрагують за допомогою EtOAc. Після сушки та концентрування органічної фази залишок очищують шляхом розтирання з Et₂O. На стадії 1.5 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 80 °C та розтирання з МеОН не проводять. На стадії 1.7 4-метокси-3-бутен-2-он в ТГФ додають до холодного (-78 °C) розчину LiHMDS в ТГФ. Через 30 хвил. додають циклобутилкарбонілхлорид в ТГФ та реакційній суміші дають нагріватися до КТ впродовж 18 год.

Шукана сполука: ІЕР-МС: 386,1 [M+H]⁺; ТШХ: R_f=0,11 (ДХМ/МеОН, 95:5).

Приклад 5: 2-Амід, 1-([4-метил-5-[2-(1-метилциклопропіл)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амід) (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. На стадії 1.1 реакційну суміш перемішують впродовж 14 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником. На стадії 1.2 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 85 °С. На стадії 1.3 реакційну суміш перемішують впродовж 3 год. при 120 °С. На стадії 1.5 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 65-70 °С та розтирання з MeOH не проводять. На стадії 1.7 використовують 1-метил-циклопропанкарбонілхлорид (стадія 5.1).

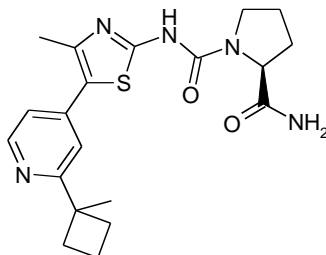
Шукана сполука: ІЕР-МС: 386,1 [M+H]⁺; ТШХ: R_f=0,40 (ДХМ/MeOH, 9:1). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ (част./млн): 0,71-0,87 (m, 2 H) 1,11-1,26 (m, 2 H) 1,47 (s, 3 H) 1,74-1,96 (m, 3 H) 2,00-2,15 (m, 1 H) 2,39 (s, 3 H) 3,35-3,52 (m, 1 H) 3,52-3,73 (m, 1 H) 4,10-4,40 (m, 1 H) 6,93 (br. s., 1 H) 7,15 (dd, 1 H) 7,27 (s, 1 H) 7,35 (s, 1 H) 8,40 (d, 1 H) 10,99 (br. s., 1 H).

Стадія 5.1: 1-Метилциклопропанкарбонілхлорид



Суміш 1-метилциклопропанкарбонової кислоти (10 г, 100 ммоль) та оксалілхлориду (10,49 мл, 120 ммоль, 1,2 екв.) в CHCl₃ (80 мл) перемішують впродовж 4 год. при 70 °С. Реакційну суміш концентрують та отримують 11,8 г шуканої сполуки у вигляді жовтого масла, яке використовують без додаткового очищення.

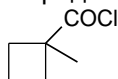
Приклад 6: 2-Амід, 1-({4-метил-5-[2-(1-метилциклобутил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амід) (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. В прикладі 1, реакцію зупиняють шляхом розведення сумішшю EtOAc та H₂O та екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.2 реакційну суміш перемішують впродовж 2 год. при 100 °С. На стадії 1.3 реакційну суміш перемішують впродовж 3 год. при 100 °С, розводять сумішшю EtOAc/H₂O та екстрагують за допомогою EtOAc. Після сушки та концентрування органічної фази залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (Hex/EtOAc, 1:4). На стадії 1.5 реакційну суміш перемішують впродовж 2 год. при 80 °С та розтирання з MeOH не проводять. На стадії 1.7 4-метокси-3-бутен-2-он (50 ммоль) в ТГФ (100 мл) додають до холодного (-78 °С) розчину LiHMDS (1M в ТГФ, 100 мл) в ТГФ (200 мл). Через 30 хвил. додають 1-метилциклобутанхлорид (стадія 6.1) та реакційній суміші дають нагріватися до КТ впродовж 18 год.

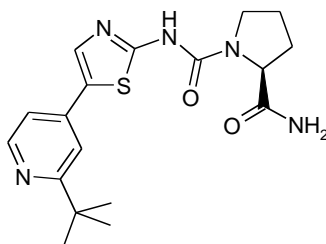
Шукана сполука: ІЕР-МС: 400,1 [M+H]⁺; ТШХ: R_f=0,06 (ДХМ/MeOH/NH₃^{водн.}, 94:5:1).

Стадія 6.1: 1-Метилциклобутанкарбонілхлорид



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадії 5.1, але з використанням 1-метилциклобутанкарбонової кислоти [Cowling, S. J.; Goodby, J. W., Chemical Communications, (2006), (39), 4107-4109].

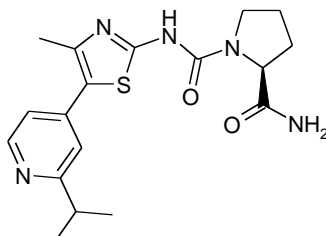
Приклад 7: 2-Амід, 1-{{5-(2-трет-бутилпіридин-4-іл)-тіазол-2-іл]-амід} (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, з наступними змінами. В прикладі 1 реакційну суміш перемішують впродовж 16 год. при КТ, реакцію зупиняють шляхом розведення сумішшю EtOAc/H₂O та екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.1 реакційну суміш перемішують впродовж 2 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником. На стадії 1.2 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 100 °С. На стадії 1.3 використовують N-тіазол-2-ілацетамід. Реакційну суміш перемішують впродовж 2 год. при 120 °С, розводять сумішшю EtOAc/H₂O та екстрагують за допомогою EtOAc. Після сушки та концентрування органічної фази залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (Hex/EtOAc, 1:1), потім розтирають з Et₂O.

Шукана сполука: ІЕР-МС: 374,1 [M+H]⁺; t_R=2,16 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,10 (ДХМ/MeOH/NH₃^{водн.}, 94:5:1).

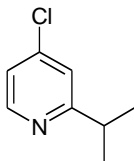
Приклад 8: 2-Амід, 1-{[5-(2-ізопропілпіридин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-амід} (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. В прикладі 1 реакційну суміш перемішують впродовж 16 год. при КТ, реакцію зупиняють шляхом розведення сумішшю EtOAc/H₂O та екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.2 реакційну суміш перемішують впродовж 2 год. при 100 °С. На стадії 1.3 використовують 4-хлор-2-ізопропілпіридин (стадія 8.1). Реакційну суміш перемішують впродовж 3 год. при 150 °С, розводять сумішшю EtOAc/H₂O та екстрагують за допомогою EtOAc. Після сушки та концентрування органічної фази залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (Hex/EtOAc, 25:75).

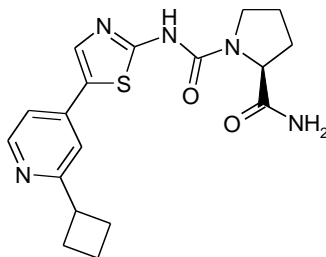
Шукана сполука: ІЕР-МС: 374,1 [M+H]⁺; t_R=1,99 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,10 (ДХМ/MeOH/NH₃^{водн.}, 94:5:1).

Стадія 8.1: 4-Хлор-2-ізопропілпіридин



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадії 2.1, але з використанням ізопропілмагнійхлориду (2М в ТГФ): ІЕР-МС: 156,0 [M+H]⁺; ТШХ: R_f=0,32 (ДХМ).

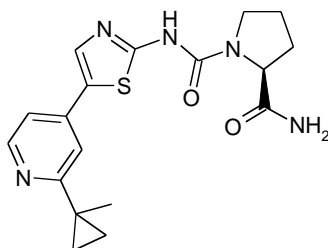
Приклад 9: 2-Амід, 1-{[5-(2-циклобутилпіридин-4-іл)-тіазол-2-іл]-амід} (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. В прикладі 1 реакційну суміш перемішують впродовж 16 год. при КТ, розводять сумішню ДХМ/Н₂О та екстрагують за допомогою ДХМ. На стадії 1.2 реакційну суміш перемішують впродовж 2 год. при 100 °С та неочищений продукт не очищують. На стадії 1.3 використовують N-тіазол-2-іацетамід. Реакційну суміш перемішують впродовж 3 год. при 120 °С, реакцію зупиняють шляхом розведення сумішню EtOAc/Н₂О та екстрагують за допомогою EtOAc. Після сушки та концентрування органічної фази залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (Hex/EtOAc, 2:3). На стадії 1.5 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 80 °С та розтирання з MeOH не проводять. На стадії 1.7 4-метокси-3-бутен-2-он (50 ммоль) в ТГФ (100 мл) додають до холодного (-78 °С) розчину LiHMDS (1М в ТГФ, 100 мл) в ТГФ (200 мл). Через 30 хвил. додають циклобутилкарбонілхлорид та реакційній суміші дають нагріватися до КТ впродовж 18 год.

Шукана сполука: ІЕР-МС: 372,1 [М+Н]⁺; ТШХ: R_f=0,13 (ДХМ/MeOH/NH₃^{водн.}, 91,5:7,5:1).

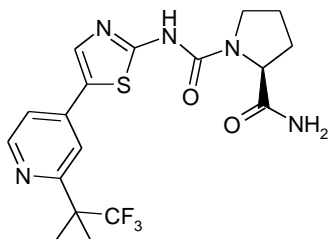
Приклад 10: 2-Амід, 1-({5-[2-(1-метилциклопропіл)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід) (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. На стадії 1.1 реакційну суміш перемішують впродовж 14 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником. На стадії 1.2 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 85 °С. На стадії 1.3 використовують N-тіазол-2-іацетамід та реакційну суміш перемішують впродовж 4 год. при 120 °С. На стадії 1.5 розтирання з MeOH не проводять. На стадії 1.7 використовують 1-метилциклопропанкарбонілхлорид (стадія 5.1).

Шукана сполука: ІЕР-МС: 372,1 [М+Н]⁺; ТШХ: R_f=0,43 (ДХМ/MeOH, 9:1).

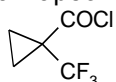
Приклад 11: 2-Амід, 1-({5-[2-(1-трифторметилциклопропіл)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід) (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. На стадії 1.1 реакційну суміш перемішують впродовж 14 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником. На стадії 1.3 використовують N-тіазол-2-іацетамід. Реакційну суміш перемішують впродовж 2 год. при 120 °С. На стадії 1.4 як розчинник використовують 1,2-дихлоретан (2,55 мл на 1 ммоль піридин-4-ону). Реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 83 °С та після зупинки реакції екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.5 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 65 °С та розтирання з MeOH не проводять. На стадії 1.7 використовують 1-трифторметилциклопропанкарбонілхлорид (стадія 11.1).

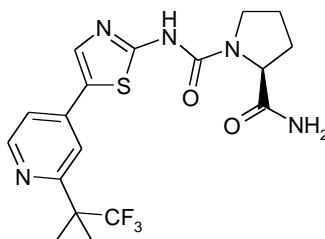
Шукана сполука: ІЕР-МС: 426,0 [М+Н]⁺; t_R=2,35 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,25 (ДХМ/MeOH, 9:1).

Стадія 11.1: 1-Трифторметилциклопропанкарбонілхлорид



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадії 5.1, але з використанням 1-трифторметилциклопропанкарбонової кислоти.

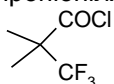
Приклад 12: 2-Амід, 1-({5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід) (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. В прикладі 1 реакційну суміш перемішують впродовж 5 год. при КТ. На стадії 1.1 реакційну суміш перемішують впродовж 14 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником. На стадії 1.2 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 85 °С та після зупинки реакції екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.3 використовують N-тіазол-2-ілацетамід. Реакційну суміш перемішують впродовж 2,5 год. при 120 °С. На стадії 1.4 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 83 °С та після зупинки реакції екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.5 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 65 °С та розтирання з MeOH не проводять. На стадії 1.6 неочищений продукт не очищують. На стадії 1.7 використовують 3,3,3-трифтор-2,2-диметилпропіонілхлорид (стадія 12.1).

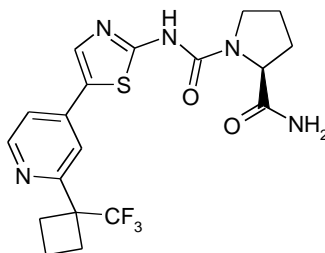
Шукана сполука: ІЕР-МС: 428,0 [M+H]⁺; t_R=2,75 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,21 (ДХМ/MeOH, 9:1).

Стадія 12.1: 3,3,3-Трифтор-2,2-диметилпропіонілхлорид



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадії 5.1, але з використанням 3,3,3-трифтор-2,2-диметилпропіонової кислоти.

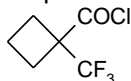
Приклад 13: 2-Амід, 1-({5-[2-(1-трифторметилциклобутил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід) (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. В прикладі 1 реакційну суміш перемішують впродовж 18 год. при КТ, реакцію зупиняють шляхом розведення сумішшю ДХМ/H₂O та екстрагують за допомогою ДХМ. На стадії 1.1 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником. На стадії 1.2 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 100 °С та після зупинки реакції екстрагують за допомогою ДХМ. На стадії 1.7 використовують N-тіазол-2-ілацетамід. Реакційну суміш перемішують впродовж 5 год. при 120 °С, реакцію зупиняють шляхом розведення сумішшю EtOAc/H₂O та екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.4 як розчинник використовують 1,2-дихлоретан (2,26 мл на 1 ммоль піридин-4-ону). Реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником та після зупинки реакції екстрагують за допомогою ДХМ. На стадії 1.5 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при КТ та розтирання з MeOH не проводять. На стадії 1.6 реакційну суміш перемішують впродовж 18 год. при КТ. На стадії 1.7 4-метокси-3-бутен-2-он в ТГФ додають до холодного (-78 °С) розчину LiHMDS в ТГФ. Через 30 хвил. додають 1-трифторметилциклобутанкарбонілхлорид (стадія 13.1) в ТГФ. Реакційній суміші дають нагріватися до КТ впродовж 18 год. та після зупинки реакції екстрагують за допомогою EtOAc.

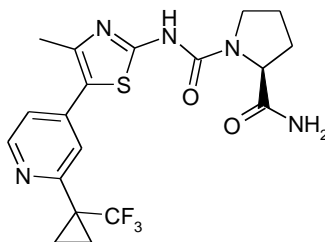
Шукана сполука: ІЕР-МС: 440,0 [M+H]⁺; t_R=2,68 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,08 (ДХМ/MeOH/NH₃^{водн.}, 91,5:7,5:1).

Стадія 13.1: 1-Трифторметилциклобутанкарбонілхлорид



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадії 5.1, але з використанням 1-трифторметилциклобутанкарбонової кислоти та перемішування реакційної суміші впродовж 2 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником.

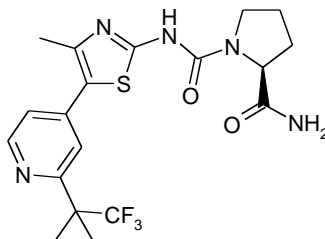
5 Приклад 14: 2-Амід, 1-({4-метил-5-[2-(1-трифторметилциклопропіл)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід) (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. На стадії 1.1 реакційну суміш перемішують впродовж 14 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником. На стадії 1.2 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 85 °C та після зупинки реакції екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.3 реакційну суміш перемішують впродовж 2 год. при 120 °C. На стадії 1.4 як розчинник використовують 1,2-дихлоретан (2,55 мл на 1 ммоль піридин-4-ону). Реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 83 °C та після зупинки реакції екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.5 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 65 °C та розтирання з MeOH не проводять. На стадії 1.7 використовують 1-трифторметилциклопропанкарбонільхлорид (стадія 11.1).

Шукана сполука: ІЕР-МС: 440,0 [M+H]⁺; t_R=2,65 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,36 (ДХМ/MeOH, 9:1). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ (част./млн): 1,41 (s, 4 H) 1,70-1,90 (m, 3 H) 2,00-2,10 (m, 1 H) 2,40 (s, 3 H) 3,36-3,52 (m, 1 H) 3,52-3,65 (m, 1 H) 4,10-4,40 (m, 1 H) 6,95 (br. s., 1 H) 7,37 (d, 2 H) 7,47 (s, 1 H) 8,52 (d, 1 H) 10,94 (br. s., 1 H).

20 Приклад 15: 2-Амід, 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід) (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



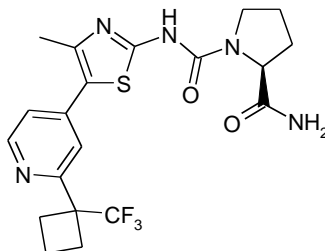
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. На стадії 1.1 реакційну суміш перемішують впродовж 14 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником. На стадії 1.2 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 85 °C та після зупинки реакції екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.3 реакційну суміш перемішують впродовж 2,5 год. при 120 °C. На стадії 1.4 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 83 °C та після зупинки реакції екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.5 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 65 °C та розтирання з MeOH не проводять. На стадії 1.6 неочищений продукт не очищують. На стадії 1.7 використовують 3,3,3-трифтор-2,2-диметилпропіонільхлорид (стадія 12.1).

Шукана сполука: ІЕР-МС: 442,0 [M+H]⁺; t_R=3,02 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,35 (ДХМ/MeOH, 9:1). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ (част./млн): 1,60 (s, 6 H) 1,70-1,95 (m, 3 H) 1,99-2,16 (m, 1 H) 2,40 (s, 3 H) 3,38-3,51 (m, 1 H) 3,51-3,69 (m, 1 H) 4,10-4,40 (m, 1 H) 6,95 (br. s., 1 H) 7,39 (d, 2 H) 7,53 (s, 1 H) 8,58 (d, 1 H) 10,93 (br. s., 1 H).

В альтернативній методиці шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами: N, N-диметилацетамід використовують замість ДМФА та суміш перемішують при 65 °C впродовж 2 год. На стадії 1.1 фенолхлорформіат (повільно додають) використовують замість 1,1'-карбонілдіімідазолу та реакцію проводять в ТГФ в присутності N, N-діетилізопропіламіну при кімнатній температурі (1,5 год.). На стадії 1.2 реакційну суміш кип'ятять із зворотним холодильником при перемішуванні впродовж 5 год. та після зупинки реакції екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.3 реакційну суміш перемішують впродовж 2 год. при 100 °C. На стадії 1.4 реакцію проводять в толуолі з використанням 1,1 екв. POBr₃ та 1,1 екв. трипропіламіну та суміш перемішують впродовж 2 год. при 80 °C та після зупинки реакції екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.5 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 65 °C та розтирання з MeOH не проводять. На стадії

1.6 толуол використовують замість бензолу та неочищений продукт не очищують. На стадії 1.7 використовують 3,3,3-трифтор-2,2-диметилпропіонілхлорид (стадія 12.1).

Приклад 16: 2-Амід, 1-({4-метил-5-[2-(1-трифторметилциклобутил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід) (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти

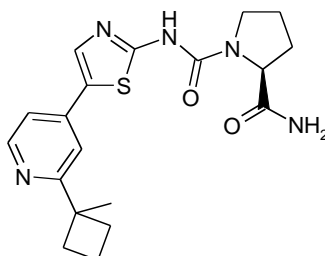


5

Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. В прикладі 1 реакційну суміш перемішують впродовж 72 год. при КТ, реакцію зупиняють шляхом розведення сумішшю ДХМ/H₂O та екстрагують за допомогою ДХМ. На стадії 1.1 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником. На стадії 1.2 реакційну суміш перемішують впродовж 2 год. при 100 °С та після зупинки реакції екстрагують за допомогою ДХМ. На стадії 1.3 реакційну суміш перемішують впродовж 6 год. при 120 °С, реакцію зупиняють шляхом розведення сумішшю EtOAc/H₂O, фільтрують через шар целіту та екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.4 як розчинник використовують 1,2-дихлоретан (2,26 мл на 1 ммоль піридин-4-ону). Реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником та після зупинки реакції екстрагують за допомогою ДХМ. На стадії 1.5 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при КТ та розтирання з MeOH не проводять. На стадії 1.6 реакційну суміш перемішують впродовж 18 год. при КТ. На стадії 1.7 4-метокси-3-бутен-2-он в ТГФ додають до холодного (-78 °С) розчину LiHMDS в ТГФ. Через 30 хвил. додають 1-трифторметилциклобутанкарбонілхлорид (стадія 13.1) в ТГФ. Реакційній суміші дають нагріватися до КТ впродовж 18 год. та після зупинки реакції екстрагують за допомогою EtOAc.

Шукана сполука: ІЕР-МС: 454,1 [M+H]⁺; t_R=2,90 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,22 (ДХМ/MeOH/NH₃^{водн.}, 91,5:7,5:1).

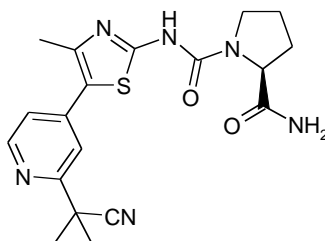
Приклад 17: 2-Амід, 1-({5-[2-(1-метилциклобутил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід) (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. В прикладі 1 реакційну суміш перемішують впродовж 24 год. при КТ, реакцію зупиняють шляхом розведення сумішшю EtOAc/H₂O та екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.2 реакційну суміш перемішують впродовж 2 год. при 100 °С та після зупинки реакції екстрагують за допомогою ДХМ. На стадії 1.7 використовують N-тіазол-2-ілацетамід. Реакційну суміш перемішують впродовж 3 год. при 100 °С, розводять сумішшю EtOAc/H₂O та екстрагують за допомогою EtOAc. Після сушки та концентрування органічної фази залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (Hex/EtOAc, 25:75). На стадії 1.5 реакційну суміш перемішують впродовж 2 год. при 80 °С та розтирання з MeOH не проводять. На стадії 1.7 4-метокси-3-бутен-2-он в ТГФ додають до холодного (-78 °С) розчину LiHMDS в ТГФ. Через 30 хвил. додають 1-метилциклобутанхлорид (стадія 6.1) в ТГФ та реакційній суміші дають нагріватися до КТ впродовж 18 год.

Шукана сполука: ІЕР-МС: 386,1 [M+H]⁺; t_R=2,32 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,05 (ДХМ/MeOH/NH₃^{водн.}, 94:5:1).

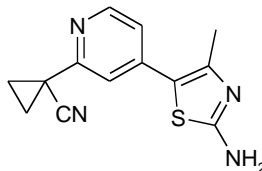
Приклад 18: 2-Амід, 1-({5-[2-(1-ціаноциклопропіл)-піридин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іл}-амід) (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. В прикладі 1 реакційну суміш перемішують впродовж 16 год. при КТ, реакцію зупиняють шляхом розведення сумішшю EtOAc/H₂O та екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.1 використовують 1-[4-(2-аміно-4-метилтіазол-5-іл)-піридин-2-іл]-циклопропан-карбонітрил (стадія 18.1) та реакційну суміш перемішують впродовж 2 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником.

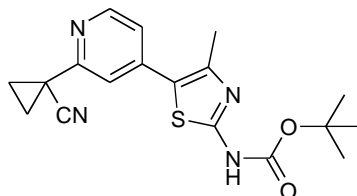
Шукана сполука: ІЕР-МС: 397,0 [M+H]⁺; t_R=2,90 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,08 (ДХМ/MeOH/NH₃^{водн.}, 94:5:1). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ (част./млн): 1,69-1,93 (m, 7 H) 2,00-2,20 (m, 1 H) 2,42 (s, 3 H) 3,38-3,50 (m, 1 H) 3,50-3,65 (m, 1 H) 4,10-4,40 (m, 1 H) 6,94 (br. s., 1 H) 7,34 (dd, 1 H) 7,37 (br. s., 1 H) 7,47 (s, 1 H) 8,47 (d, 1 H).

Стадія 18.1: 1-[4-(2-Аміно-4-метилтіазол-5-іл)-піридин-2-іл]-циклопропан-карбонітрил



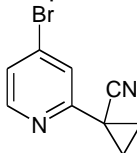
Суміш трет-бутилового ефіру {5-[2-(1-ціаноциклопропіл)-піридин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іл}-карбамінової кислоти (стадія 18.2) (295 мг), ДХМ (4 мл) та ТФК (1 мл) перемішують впродовж 2 год. при КТ та потім концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (ДХМ/MeOH/NH₃^{водн.}, 94:5:1) та отримують 182 мг шуканої сполуки: ІЕР-МС: 257,1 [M+H]⁺; t_R=2,54 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,30 ((ДХМ/MeOH/NH₃^{водн.}, 94:5:1).

Стадія 18.2: Трет-бутиловий ефір {5-[2-(1-ціаноциклопропіл)-піридин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іл}-карбамінової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадії 1.3, але з використанням 1-(4-бромпіридин-2-іл)-циклопропанкарбонітрилу (стадія 18.3) та трет-бутилового ефіру (4-метилтіазол-2-іл)-карбамінової кислоти (стадія 18.4). Реакційну суміш перемішують впродовж 2 год. при 100 °С, реакцію зупиняють шляхом розведення сумішшю EtOAc/H₂O та екстрагують за допомогою EtOAc. Неочищений продукт очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (Hex/EtOAc, 1:1) та отримують 122 мг шуканої сполуки у вигляді білої твердої речовини: ІЕР-МС: 357,1 [M+H]⁺; t_R=4,86 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,29 (Hex/EtOAc, 1:1).

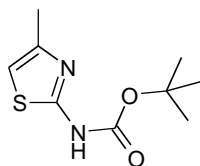
Стадія 18.3: 1-(4-Бромпіридин-2-іл)-циклопропанкарбонітрил



LiHMDS (1М в толуолі, 17,6 мл, 17,6 ммоль, 3,1 екв.) по краплям додають до холодної (-5 °С) суміші 4-бром-2-фторпіридину [Marsais, F. et al, Journal of Organic Chemistry, (1992), 57, 565-573] (1 г, 5,7 ммоль), циклопропанкарбонітрилу (1,25 мл, 17 ммоль, 3 екв.), 4 Å молекулярних сит та толуолу (20 мл). Реакційній суміші дають нагрітися до КТ, перемішують впродовж 16 год., виливають в H₂O та фільтрують. Фільтрат розводять сумішшю EtOAc/H₂O та екстрагують за допомогою EtOAc. Органічну фазу промивають за допомогою H₂O та сольовим розчином, сушать (Na₂SO₄), фільтрують та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової

хроматографії на силікагелі (Hex/EtOAc, 9:1) та отримують 620 мг шуканої сполуки у вигляді білої твердої речовини: ІЕР-МС: 223,1/225,1 $[M+H]^+$; t_R =4,22 хвил. (система 1); ТШХ: R_f =0,25 (Hex/EtOAc, 9:1).

Стадія 18.4: Трет-бутиловий ефір (4-метилтіазол-2-іл)-карбамінової кислоти



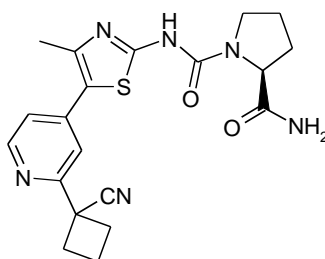
5

Розчин ди-трет-бутилдикарбонату (21 г, 96,5 ммоль, 1,1 екв.) в t-BuOH (50 мл) додають до розчину 4-метил-2-амінотіазолу (10 г, 87,7 ммоль) та ДМАП (1,1 г, 8,8 ммоль, 0,1 екв.) в t-BuOH (50 мл). Реакційну суміш перемішують впродовж 72 год. при КТ та концентрують. Залишок розводять сумішшю EtOAc/H₂O та екстрагують за допомогою EtOAc. Органічну фазу промивають за допомогою H₂O та сольовим розчином, сушать (Na₂SO₄), фільтрують та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (ДХМ/MeOH, 98:2) та отримують 15,2 г шуканої сполуки у вигляді білої твердої речовини: ІЕР-МС: 215,1 $[M+H]^+$; t_R =3,43 хвил. (система 1); ТШХ: R_f =0,30 (ДХМ/MeOH, 98:2).

10

Приклад 19: 2-Амід, 1-({5-[2-(1-ціаноциклобутил)-піридин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іл}-амід) (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти

15

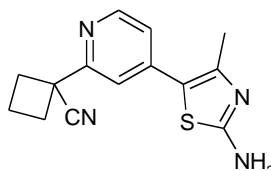


Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. В прикладі 1 реакційну суміш перемішують впродовж 6 год. при КТ. На стадії 1.1 використовують 1-[4-(2-аміно-4-метилтіазол-5-іл)-піридин-2-іл]-циклобутанкарбонітрил (стадія 19.1) та реакційну суміш перемішують впродовж 3 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником.

20

Шукана сполука: ІЕР-МС: 411,1 $[M+H]^+$; ТШХ: R_f =0,36 (ДХМ/MeOH, 9:1).

Стадія 19.1: 1-[4-(2-Аміно-4-метилтіазол-5-іл)-піридин-2-іл]-циклобутан-карбонітрил

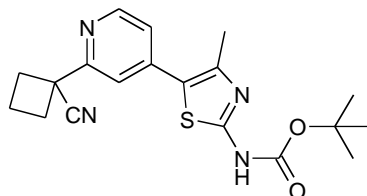


25

Суміш трет-бутилового ефіру {5-[2-(1-ціаноциклобутил)-піридин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іл}-карбамінової кислоти (стадія 19.2) (300 мг), ДХМ (5 мл) та ТФК (1 мл) перемішують впродовж 4 год. при КТ, реакцію зупиняють шляхом додавання насиченого розчину NaHCO₃ (50 мл) та екстрагують за допомогою ДХМ (3×75 мл). Органічну фазу промивають насиченим розчином NaHCO₃ (2×50 мл), сушать (Na₂SO₄), фільтрують та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (ДХМ/MeOH, 1:0 → 96:4) та отримують 181 мг шуканої сполуки у вигляді жовтої твердої речовини: ІЕР-МС: 271,1 $[M+H]^+$; t_R =2,48 хвил. (система 1); ТШХ: R_f =0,45 (ДХМ/MeOH, 9:1).

30

Стадія 19.2: Трет-бутиловий ефір {5-[2-(1-ціаноциклобутил)-піридин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іл}-карбамінової кислоти

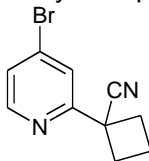


35

Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадії 1.3, але з використанням 1-(4-бромпіридин-2-іл)-циклобутанкарбонітрилу (стадія 19.3) та трет-бутилового

ефіру (4-метилтіазол-2-іл)-карбамінової кислоти (стадія 18.4). Реакційну суміш перемішують впродовж 3 год. при 100 °С. Шукана сполука: ІЕР-МС: 371,1 [M+H]⁺; t_R=4,86 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,66 (Hex/EtOAc, 1:1).

Стадія 19.3: 1-(4-Бромпіридин-2-іл)-циклобутанкарбонітрил



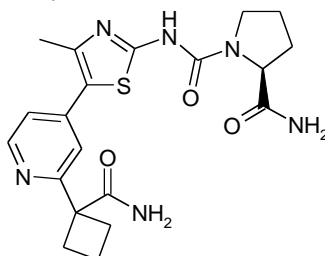
5

LiHMDS (1M в толуолі, 17,7 мл, 17,7 ммоль, 3,1 екв.) по краплям додають до холодного (-5 °С) розчину 4-бром-2-фторпіридину [Marsais, F. et al, Journal of Organic Chemistry, (1992), 57, 565-573] (1 г, 5,7 ммоль) та циклобутанкарбонітрилу (1,39 г, 17,1 ммоль, 3 екв.) в толуолі (20 мл). Реакційній суміші дають нагрітися до КТ, перемішують впродовж 5 год., реакцію зупиняють шляхом додавання насиченого розчину NaHCO₃ (50 мл) та фільтрують через шар целіту. Фільтрат екстрагують за допомогою EtOAc (3×75 мл). Органічну фазу промивають насиченим розчином NaHCO₃ (2×50 мл), сушать (Na₂SO₄), фільтрують та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (Hex/EtOAc, 1:0 → 95:5) та отримують 933 мг шуканої сполуки у вигляді жовтого масла: ІЕР-МС: 237,0/239,0 [M+H]⁺; t_R=4,27 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,30 (Hex/EtOAc, 9:1).

10

15

Приклад 20: 2-Амід, 1-({5-[2-(1-карбамойлциклобутил)-піридин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іл}-амід (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти)



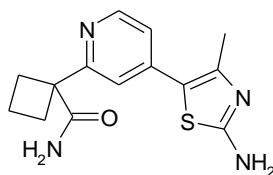
20

Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. В прикладі 1 реакційну суміш перемішують впродовж 3 год. при КТ. На стадії 1.1 використовують амід 1-[4-(2-аміно-4-метилтіазол-5-іл)-піридин-2-іл]-циклобутанкарбонової кислоти (стадія 20.1) та реакційну суміш перемішують впродовж 12 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником.

25

Шукана сполука: ІЕР-МС: 429,1 [M+H]⁺; t_R=2,90 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,11 (ДХМ/MeOH, 9:1).

Стадія 20.1: Амід 1-[4-(2-аміно-4-метилтіазол-5-іл)-піридин-2-іл]-циклобутанкарбонової кислоти

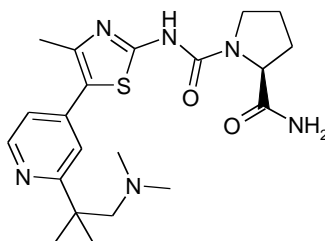


30

Суміш трет-бутилового ефіру {5-[2-(1-ціаноциклобутил)-піридин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іл}-карбамінової кислоти (стадія 19.2) (640 мг, 1,73 ммоль) та концентрованої сірчаної кислоти перемішують впродовж 40 хвил. при 0 °С, дають нагрітися до КТ, перемішують впродовж 1 год., реакцію зупиняють шляхом додавання насиченого розчину NaHCO₃ (50 мл) та екстрагують за допомогою ДХМ (3×75 мл). Органічну фазу промивають насиченим розчином NaHCO₃ (2×50 мл), сушать (Na₂SO₄), фільтрують та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (ДХМ/MeOH/NH₃^{водн.}, 99:0:1 → 93:6:1) та отримують 35 мг шуканої сполуки у вигляді жовтої твердої речовини: ІЕР-МС: 289,1 [M+H]⁺; ТШХ: R_f=0,32 (ДХМ/MeOH, 9:1).

35

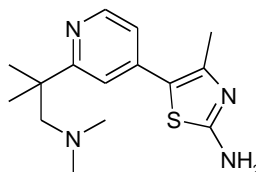
Приклад 21: 2-Амід, 1-({5-[2-(2-диметиламіно-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іл}-амід (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти)



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. На стадії 1.1 використовують 5-[2-(2-диметиламіно-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іламін (стадія 21.1) та реакційну суміш перемішують впродовж 14 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником.

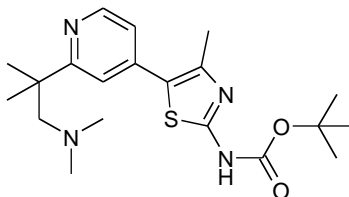
Шукана сполука: ІЕР-МС: 431,1 [M+H]⁺; ТШХ: R_f=0,12 (ДХМ/МеОН, 9:1).

Стадія 21.1: 5-[2-(2-Диметиламіно-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іламін



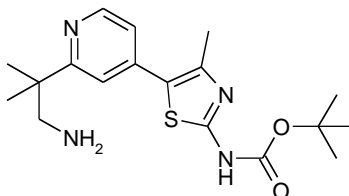
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадії 19.1, але з використанням трет-бутилового ефіру {5-[2-(2-диметиламіно-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іл}-карбамінової кислоти (стадія 21.2) та перемішування реакційної суміші впродовж 2 год. при КТ. Шукана сполука: ІЕР-МС: 291,1 [M+H]⁺; t_R=2,48 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,11 (ДХМ/МеОН, 9:1).

Стадія 21.2: Трет-бутиловий ефір {5-[2-(2-диметиламіно-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іл}-карбамінової кислоти



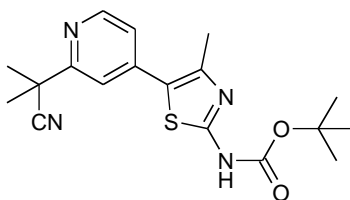
Формальдегід (36 % в Н₂О, 0,144 мл, 1,87 ммоль, 2 екв.) додають до суміші трет-бутилового ефіру {5-[2-(2-аміно-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іл}-карбамінової кислоти (стадія 21.3) (0,34 г, 0,94 ммоль) та ацетоксисборогідриду натрію (0,6 г, 2,82 ммоль, 3 екв.) в 1,2-дихлоретані (10 мл). Реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при КТ та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (ДХМ/МеОН/Н₃^{водн.}, 99:0:1 → 97:2:1) та отримують 0,222 г шуканої сполуки у вигляді білої твердої речовини: ІЕР-МС: 391,2 [M+H]⁺; t_R=4,27 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,15 (ДХМ/МеОН, 9:1).

Стадія 21.3: Трет-бутиловий ефір {5-[2-(2-аміно-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іл}-карбамінової кислоти



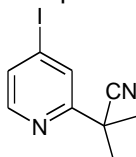
LiAlH₄ (1М в ТГФ, 3,06 мл, 3,06 ммоль, 1,5 екв.) додають до розчину трет-бутилового ефіру {5-[2-(ціанодиметилметил)-піридин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іл}-карбамінової кислоти (стадія 21.4) (0,73 г, 2,04 ммоль) в ТГФ (10 мл) в атмосфері аргону. Реакційну суміш перемішують впродовж 2 год. при КТ, реакцію зупиняють шляхом додавання Н₂О (20 мл) та екстрагують за допомогою EtOAc (2×75 мл). Органічну фазу промивають насиченим розчином NaHCO₃ (2×50 мл), сушать (Na₂SO₄), фільтрують та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (ДХМ/МеОН/Н₃^{водн.}, 99:0:1 → 94:5:1) та отримують 318 мг шуканої сполуки у вигляді коричневої твердої речовини: ІЕР-МС: 363,1 [M+H]⁺; ТШХ: R_f=0,11 (ДХМ/МеОН, 9:1).

Стадія 21.4: Трет-бутиловий ефір {5-[2-(ціанодиметилметил)-піридин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іл}-карбамінової кислоти



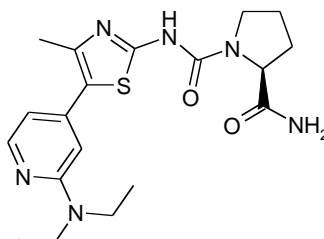
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадії 1.3, але з використанням 2-(4-йодпіридин-2-іл)-2-метилпропіонітрилу (стадія 21.5) та трет-бутилового ефіру (4-метилтіазол-2-іл)-карбамінової кислоти (стадія 18.4). Реакційну суміш перемішують впродовж 3 год. при 100 °С. Шукана сполука: ІЕР-МС: 359,1 [M+H]⁺; ТШХ: R_f=0,47 (Hex/EtOAc, 1:1).

Стадія 21.5: 2-(4-йодпіридин-2-іл)-2-метилпропіонітрил



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадії 19.3, але з використанням 2-фтор-4-йодпіридину. Шукана сполука: ІЕР-МС: 273,0 [M+H]⁺; t_R=4,22 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,36 (Hex/EtOAc, 9:1).

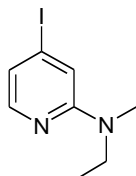
Приклад 22: 2-Амід, 1-{{5-(2-діетиламінопіридин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл}-амід} (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. В прикладі 1 реакційну суміш перемішують впродовж 18 год. при КТ, реакцію зупиняють шляхом розведення сумішшю ДХМ/H₂O та екстрагують за допомогою ДХМ. На стадії 1.1 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником. На стадії 1.2 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 100 °С та після зупинки реакції екстрагують за допомогою ДХМ. На стадії 1.7 використовують діетил-(4-йодпіридин-2-іл)-амін (стадія 22.1). Реакційну суміш перемішують впродовж 16 год. при 120 °С, реакцію зупиняють шляхом розведення сумішшю EtOAc/H₂O, фільтрують через шар целіту та екстрагують за допомогою EtOAc.

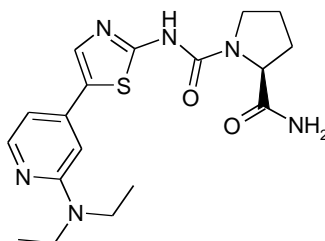
Шукана сполука: ІЕР-МС: 403,2 [M+H]⁺; t_R=2,38 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,10 (ДХМ/MeOH/NH₃^{водн.}, 91,5:7,5:1).

Стадія 22.1: Діетил-(4-йодпіридин-2-іл)-амін



Суміш 2-фтор-4-йодпіридину (2 г, 8,97 ммоль), діетиламіну (2,77 мл, 26,9 ммоль, 3 екв.) та K₂CO₃ (2,48 г, 17,94 ммоль, 2 екв.) в ДМФА (20 мл) перемішують впродовж 18 год. при 100 °С, дають охолотитися до КТ, розводять сумішшю EtOAc/H₂O та екстрагують за допомогою EtOAc. Органічну фазу промивають за допомогою H₂O та сольовим розчином (Na₂SO₄), фільтрують та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (Hex/Et₂O, 98:2) та отримують 2,3 г шуканої сполуки у вигляді жовтого масла: ІЕР-МС: 277,1 [M+H]⁺; ТШХ: R_f=0,52 (Hex/Et₂O, 98:2).

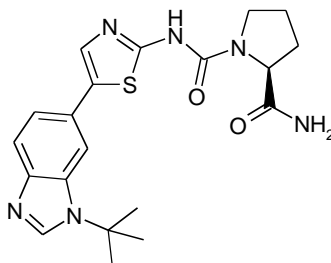
Приклад 23: 2-Амід, 1-{{5-(2-діетиламінопіридин-4-іл)-тіазол-2-іл}-амід} (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. В прикладі 1 реакційну суміш перемішують впродовж 18 год. при КТ, реакцію зупиняють шляхом розведення сумішшю ДХМ/H₂O та екстрагують за допомогою ДХМ. На стадії 1.1 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником. На стадії 1.2 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 100 °С та після зупинки реакції екстрагують за допомогою ДХМ. На стадії 1.7 використовують діетил-(4-йодпіридин-2-іл)-амін (стадія 22.1) та N-тіазол-2-іацетамід. Реакційну суміш перемішують впродовж 5 год. при 120 °С, реакцію зупиняють шляхом розведення сумішшю EtOAc/H₂O, фільтрують через шар целіту та екстрагують за допомогою EtOAc.

Шукана сполука: ІЕР-МС: 389,2 [M+H]⁺; t_R=2,28 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,34 (ДХМ/MeOH/NH₃^{водн.}, 91,5:7,5:1).

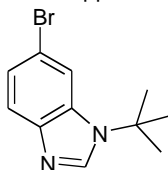
Приклад 24: 2-Амід, 1-[[5-(3-трет-бутил-3Н-бензімідазол-5-іл)-тіазол-2-іл]-амід} (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. В прикладі 1 реакційну суміш перемішують впродовж 5 год. при КТ. На стадії 1.1 реакційну суміш перемішують впродовж 14 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником. На стадії 1.2 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 85 °С та після зупинки реакції екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.7 використовують 6-бром-1-трет-бутил-1Н-бензімідазол (стадія 24.1) та N-тіазол-2-іацетамід. Реакційну суміш перемішують впродовж 7 год. при 120 °С.

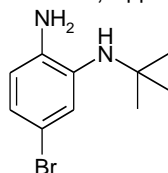
Шукана сполука: ІЕР-МС: 413,2 [M+H]⁺; t_R=2,29 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,45 (ДХМ/MeOH, 9:1).

Стадія 24.1: 6-Бром-1-трет-бутил-1Н-бензімідазол



Суміш 4-бром-N*2*-трет-бутилбензол-1,2-діаміну (стадія 24.2) (2,14 г, 8,80 ммоль) та триетилортоформіату (14,7 мл, 88 ммоль) перемішують впродовж 1 год. при 148 °С, дають охолотитися та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (ДХМ/MeOH, 1:0 → 99:1) та отримують 1,74 г шуканої сполуки у вигляді білої твердої речовини: ІЕР-МС: 253,0/255,0 [M+H]⁺; t_R=2,88 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,54 (ДХМ/MeOH, 9:1).

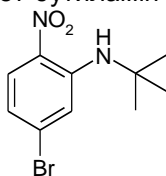
Стадія 24.2: 4-Бром-N*2*-трет-бутилбензол-1,2-діамін



Суспензію (5-бром-2-нітрофеніл)-трет-бутиламіну (стадія 24.3) (6 г, 21,97 ммоль) та нікелю Ренея (2 г) в суміші MeOH/ТГФ (1:1 об./об., 600 мл) перемішують впродовж 9 год. при КТ в

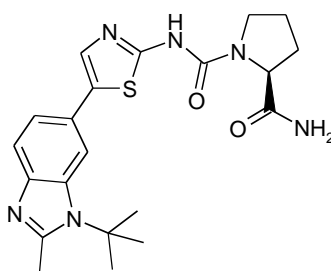
атмосфері водню. Реакційну суміш фільтрують через шар целіту та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (Hex/EtOAc, 97:3 → 3:1) та отримують 4,4 г шуканої сполуки у вигляді чорного масла: ІЕР-МС: 243,0/245,0 [M+H]⁺; t_R=2,75 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,89 (Hex/EtOAc, 1:1).

5 Стадія 24.3: (5-Бром-2-нітрофеніл)-трет-бутиламін



10 Суміш 4-бром-2-фторнітробензолу (4 г, 18,2 ммоль) та трет-бутиламіну (4,78 мл, 45,5 ммоль, 2,5 екв.) в EtOH (80 мл) перемішують впродовж 15 год. при 85 °С, дають охолотитися та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (Hex/EtOAc, 1:0 → 99:1) та отримують 4,8 г шуканої сполуки у вигляді помаранчевої твердої речовини: ІЕР-МС: 273,0/275,0 [M+H]⁺; t_R=5,68 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,49 (Hex/EtOAc, 9:1).

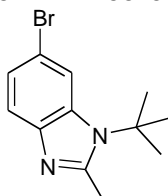
Приклад 25: 2-Амід, 1-{[5-(3-трет-бутил-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)-тіазол-2-іл]-амід} (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



15 Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. На стадії 1.1 реакційну суміш перемішують впродовж 14 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником. На стадії 1.2 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 85 °С та після зупинки реакції екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.7 використовують 6-бром-1-трет-бутил-2-метил-1Н-бензімідазол (стадія 25.1) та N-тіазол-2-ілацетамід. Реакційну суміш перемішують впродовж 5 год. при 120 °С.

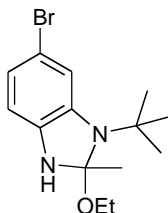
20 Шукана сполука: ІЕР-МС: 427,2 [M+H]⁺; t_R=2,37 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,38 (ДХМ/MeOH, 9:1).

Стадія 25.1: 6-Бром-1-трет-бутил-2-метил-1Н-бензімідазол



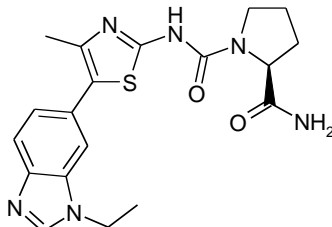
25 Суміш 6-бром-1-трет-бутил-2-етоксиметил-2-метил-2,3-дигідро-1Н-бензімідазолу (стадія 25.2) (2,04 г, 6,51 ммоль) та ТФК (10 мл) перемішують при КТ впродовж ночі, реакцію зупиняють шляхом додавання насиченого розчину NaHCO₃ (100 мл) та екстрагують за допомогою EtOAc (2×150 мл). Органічну фазу промивають насиченим розчином NaHCO₃ (2×50 мл), сушать (Na₂SO₄), фільтрують та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (ДХМ/MeOH, 1:0 → 98:2) та отримують 1,05 г шуканої сполуки у вигляді білої твердої речовини: ІЕР-МС: 267,0/269,0 [M+H]⁺; t_R=2,99 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,58 (ДХМ/MeOH, 9:1).

30 Стадія 25.2: 6-Бром-1-трет-бутил-2-етоксиметил-2-метил-2,3-дигідро-1Н-бензімідазол



Суміш 4-бром-N*2*-трет-бутилбензол-1,2-діаміну (стадія 24.2) (2,14 г, 8,80 ммоль) та триетилортоацетату (16,2 мл, 88 ммоль, 10 екв.) перемішують впродовж 1 год. при 142 °С, дають охолотитися та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (Hex/EtOAc, 1:0 → 95:5) та отримують 2,04 г шуканої сполуки у вигляді пурпурного масла: ІЕР-МС: 313,0/315,0 [M+H]⁺; ТШХ: R_f=0,67 (Hex/EtOAc, 9:1).

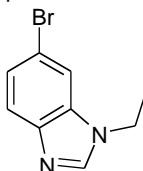
Приклад 26: 2-Амід, 1-{[5-(3-етил-3Н-бензімідазол-5-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-амід} (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. На стадії 1.1 реакційну суміш перемішують впродовж 15 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником. На стадії 1.2 реакційну суміш перемішують впродовж 3 год. при 85 °С та після зупинки реакції екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.7 використовують 6-бром-1-етил-1Н-бензімідазол (стадія 26.1) та N-тіазол-2-ілацетамід. Реакційну суміш перемішують впродовж 14 год. при 120 °С.

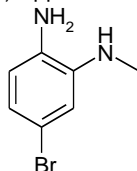
Шукана сполука: ІЕР-МС: 399,1 [M+H]⁺; t_R=1,73 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,25 (ДХМ/MeOH, 9:1).

Стадія 26.1: 6-Бром-1-етил-1Н-бензімідазол



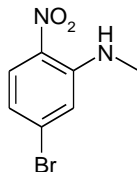
Суміш 4-бром-N*2*-етилбензол-1,2-діаміну (стадія 26.2) (2 г, 9,3 ммоль) та триетилортоформіату (15,5 мл, 93 ммоль, 10 екв.) перемішують впродовж 1 год. при 148 °С, дають охолотитися та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (ДХМ/MeOH, 1:0 → 98:2) та отримують 2,05 г шуканої сполуки у вигляді білої твердої речовини: ІЕР-МС: 225,1/227,1 [M+H]⁺; t_R=2,31 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,58 (ДХМ/MeOH, 9:1).

Стадія 26.2: 4-Бром-N*2*-етилбензол-1,2-діамін



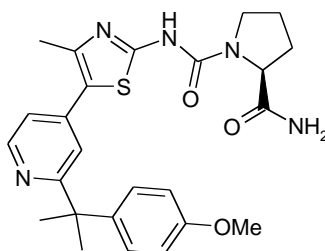
Суспензію (5-бром-2-нітрофеніл)-етиламіну (стадія 26.3) (6 г, 24,48 ммоль) та нікелю Ренея (2 г) в MeOH/ТГФ (1:1 об./об., 600 мл) перемішують впродовж 9 год. при КТ в атмосфері водню. Реакційну суміш фільтрують через шар целіту та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (Hex/EtOAc, 95:5 → 85:15) та отримують 4,51 г шуканої сполуки у вигляді чорного масла: ІЕР-МС: 213,1/215,1 [M-H]⁻; t_R=2,53 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,57 (Hex/EtOAc, 1:1).

Стадія 26.3: (5-Бром-2-нітрофеніл)-етиламін



Суміш 4-бром-2-фторнітробензолу (6 г, 27,3 ммоль), метиламіну (2М в MeOH, 34,1 мл, 68,2 ммоль, 2,5 екв.) та EtOH (80 мл) перемішують впродовж 15 год. при 85 °С, дають охолотитися та концентрують. Залишок очищують шляхом розтирання та отримують 6 г шуканої сполуки у вигляді жовтої твердої речовини: t_R=5,13 хвил. (система 1).

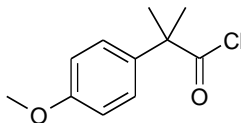
Приклад 27: 2-Амід, 1-[(5-{2-[1-(4-метоксифеніл)-1-метилетил]-піридин-4-іл}-4-метилтіазол-2-іл)-амід] (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. В прикладі 1 реакційну суміш перемішують впродовж 24 год. при КТ, реакцію зупиняють шляхом розведення сумішшю EtOAc/H₂O. На стадії 1.2 реакційну суміш перемішують впродовж 2 год. при 100 °С та після зупинки реакції екстрагують за допомогою ДХМ. На стадії 1.3 реакційну суміш перемішують впродовж 3 год. при 100 °С, реакцію зупиняють шляхом розведення сумішшю EtOAc/H₂O та екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.4 як розчинник використовують 1,2-дихлоретан (4,3 мл на 1 ммоль піридин-4-ону). Реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником, виливають в насичений розчин NaHCO₃ та екстрагують за допомогою ДХМ. На стадії 1.5 реакційну суміш перемішують впродовж 23 год. при 80 °С та розтирання з MeOH не проводять. На стадії 1.6 реакційну суміш перемішують впродовж 21 год. при КТ. На стадії 1.7 4-метокси-3-бутен-2-он в ТГФ додають до холодного (-78 °С) розчину LiHMDS в ТГФ. Через 30 хвил. додають 2-(4-метоксифеніл)-2-метилпропіонілхлорид (стадія 27.1) в ТГФ та реакційній суміші дають нагріватися до КТ впродовж 16 год.

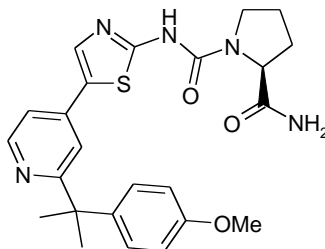
Шукана сполука: ІЕР-МС: 480,0 [M+H]⁺; t_R=3,05 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,13 (ДХМ/MeOH/NH₃^{водн.}, 94:5:1).

Стадія 27.1: 2-(4-Метоксифеніл)-2-метилпропіонілхлорид



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадії 5.1, але з використанням 2-(4-метоксифеніл)-2-метилпропіонової кислоти та перемішування реакційної суміші впродовж 3 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником.

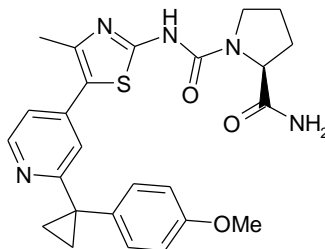
Приклад 28: 2-Амід, 1-[(5-{2-[1-(4-метоксифеніл)-1-метилетил]-піридин-4-іл}-тіазол-2-іл)-амід] (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. В прикладі 1 реакційну суміш перемішують впродовж 16 год. при КТ, реакцію зупиняють шляхом розведення сумішшю EtOAc/H₂O. На стадії 1.2 реакційну суміш перемішують впродовж 2 год. при 100 °С та після зупинки реакції екстрагують за допомогою ДХМ. На стадії 1.7 використовують N-тіазол-2-ілацетамід. Реакційну суміш перемішують впродовж 5 год. при 100 °С, реакцію зупиняють шляхом розведення сумішшю EtOAc/H₂O та екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.4 як розчинник використовують 1,2-дихлоретан (4,3 мл на 1 ммоль піридин-4-ону). Реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником, виливають в насичений розчин NaHCO₃ та екстрагують за допомогою ДХМ. На стадії 1.5 реакційну суміш перемішують впродовж 23 год. при 80 °С та розтирання з MeOH не проводять. На стадії 1.6 реакційну суміш перемішують впродовж 21 год. при КТ. На стадії 1.7 4-метокси-3-бутен-2-он в ТГФ додають до холодного (-78 °С) розчину LiHMDS в ТГФ. Через 30 хвил. додають 2-(4-метоксифеніл)-2-метилпропіонілхлорид (стадія 27.1) в ТГФ та реакційній суміші дають нагріватися до КТ впродовж 16 год.

Шукана сполука: ІЕР-МС: 466,1 $[M+H]^+$; $t_R=2,91$ хвил. (система 1); ТШХ: $R_f=0,23$ (ДХМ/MeOH/ $NH_3^{водн.}$, 94:5:1).

Приклад 29: 2-Амід, 1-[(5-{2-[1-(4-метоксифеніл)-циклопропіл]-піридин-4-іл}-4-метилтіазол-2-іл)-амід] (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



5

Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. В прикладі 1 реакційну суміш перемішують впродовж 21 год. при КТ, реакцію зупиняють шляхом розведення сумішшю EtOAc/ H_2O . На стадії 1.2 реакційну суміш перемішують впродовж 3 год. при 100 °C та після зупинки реакції екстрагують за допомогою ДХМ. На стадії 1.3 реакційну суміш перемішують впродовж 6 год. при 100 °C, реакцію зупиняють шляхом розведення сумішшю EtOAc/ H_2O та екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.4 як розчинник використовують 1,2-дихлоретан (4,3 мл на 1 ммоль піридин-4-ону). Реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником, виливають в насичений розчин $NaHCO_3$ та екстрагують за допомогою ДХМ. На стадії 1.5 реакційну суміш перемішують впродовж 18 год. при 80 °C та розтирання з MeOH не проводять. На стадії 1.6 реакційну суміш перемішують впродовж 18 год. при КТ. На стадії 1.7 4-метокси-3-бутен-2-он в ТГФ додають до холодного (-78 °C) розчину LiHMDS в ТГФ. Через 30 хвил. додають 1-(4-метоксифеніл)-циклопропанкарбонілхлорид (стадія 29.1) в ТГФ та реакційній суміші дають нагріватися до КТ впродовж 16 год.

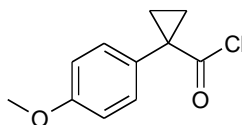
10

15

20

Шукана сполука: ІЕР-МС: 478,1 $[M+H]^+$; $t_R=2,65$ хвил. (система 1); ТШХ: $R_f=0,09$ (ДХМ/MeOH/ $NH_3^{водн.}$, 94:5:1).

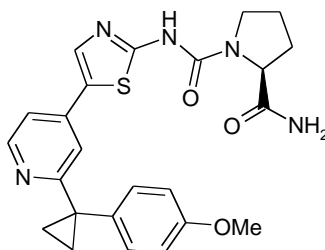
Стадія 29.1: 1-(4-Метоксифеніл)-циклопропанкарбонілхлорид



25

Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадії 5.1, але з використанням 1-(4-метоксифеніл)-циклопропілкарбонової кислоти та перемішування реакційної суміші впродовж 3 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником.

Приклад 30: 2-Амід, 1-[(5-{2-[1-(4-метоксифеніл)-циклопропіл]-піридин-4-іл}-тіазол-2-іл)-амід] (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



30

Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. В прикладі 1 реакційну суміш перемішують впродовж 16 год. при КТ, реакцію зупиняють шляхом розведення сумішшю EtOAc/ H_2O . На стадії 1.2 реакційну суміш перемішують впродовж 3 год. при 100 °C та після зупинки реакції екстрагують за допомогою ДХМ. На стадії 1.7 використовують N-тіазол-2-ілацетамід. Реакційну суміш перемішують впродовж 28 год. при 100 °C, реакцію зупиняють шляхом розведення сумішшю EtOAc/ H_2O та екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.4 як розчинник використовують 1,2-дихлоретан (4,3 мл на 1 ммоль піридин-4-ону). Реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником, виливають в насичений розчин $NaHCO_3$ та екстрагують за допомогою ДХМ. На стадії 1.5 реакційну суміш перемішують впродовж 18 год. при 80 °C та розтирання з MeOH не проводять. На стадії 1.6 реакційну суміш перемішують впродовж 18 год. при КТ. На стадії 1.7 4-метокси-3-бутен-2-он в ТГФ додають до холодного (-78 °C) розчину

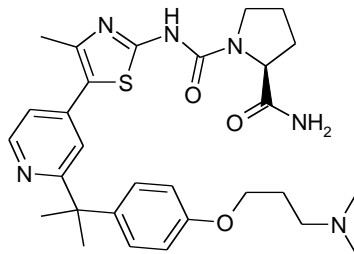
35

40

LiHMDS в ТГФ. Через 30 хвил. додають 1-(4-метоксифеніл)-циклопропанкарбонілхлорид (стадія 29.1) в ТГФ та реакційній суміші дають нагріватися до КТ впродовж 16 год.

Шукана сполука: ІЕР-МС: 464,1 [M+H]⁺; t_R=2,90 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,06 (ДХМ/МеОН/НН₃^{водн.}, 94:5:1).

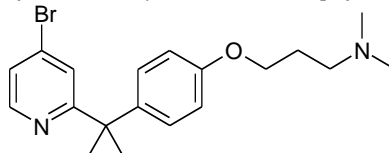
5 Приклад 31: 2-Амід, 1-{[5-(2-{1-[4-(3-диметиламінопропокси)-феніл]-1-метилетил}-піридин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-амід} (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. В прикладі 1 реакційну суміш перемішують впродовж 18 год. при КТ, реакцію зупиняють шляхом розведення сумішшю EtOAc/H₂O. На стадії 1.2 реакційну суміш перемішують впродовж 7 год. при 100 °C та після зупинки реакції екстрагують за допомогою ДХМ. На стадії 1.7 використовують (3-{4-[1-(4-бромпіридин-2-іл)-1-метилетил]-фенокси}-пропіл)-диметиламін (стадія 31.1). Реакційну суміш перемішують впродовж 2 год. при 120 °C, реакцію зупиняють шляхом розведення сумішшю EtOAc/H₂O та екстрагують за допомогою EtOAc.

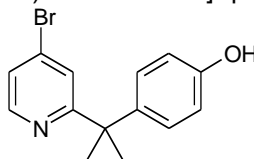
15 Шукана сполука: ІЕР-МС: 551,1 [M+H]⁺; t_R=2,38 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,05 (ДХМ/МеОН/НН₃^{водн.}, 94:5:1).

Стадія 31.1: (3-{4-[1-(4-Бромпіридин-2-іл)-1-метилетил]-фенокси}-пропіл)-диметиламін



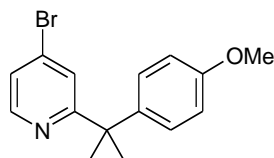
Гідроксид натрію (гранули тонко подрібнюють, 0,488 г, 12,2 ммоль, 5 екв.) додають до розчину 4-[1-(4-бромпіридин-2-іл)-1-метилетил]-фенолу (стадія 31.2) (0,714 г, 2,44 ммоль) в ДМФА (5 мл). Суміш перемішують впродовж 20 хвил. при КТ. Додають 3-диметиламіно-1-пропілхлоридгідрохлорид (0,611 г, 3,87 ммоль, 1,6 екв.). Реакційну суміш нагрівають до 90 °C, перемішують впродовж 10 год., дають охолотитися, розводять сумішшю EtOAc/H₂O та екстрагують за допомогою EtOAc. Органічну фазу промивають за допомогою Н₂O та сольовим розчином, сушать (Na₂SO₄), фільтрують та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (ДХМ/МеОН/НН₃^{водн.}, 94:5:1) та отримують 0,398 г шуканої сполуки у вигляді неочищеного коричневого масла, яке використовують без додаткового очищення: ІЕР-МС: 377,1/379,0 [M+H]⁺; ТШХ: R_f=0,22 (ДХМ/МеОН/НН₃^{водн.}, 94:5:1).

Стадія 31.2: 4-[1-(4-Бромпіридин-2-іл)-1-метилетил]-фенол



ВВr₃ (1М в ДХМ, 23 ммоль, 8 екв.) по краплям додають до холодного (0 °C) розчину 4-бром-2-[1-(4-метоксифеніл)-1-метилетил]-піридину (стадія 31.3) (0,878 г, 2,87 ммоль) в ДХМ (42 мл) в атмосфері аргону. Реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 0 °C, дають нагріватися до КТ, перемішують впродовж 18 год., охолоджують до 0 °C та реакцію зупиняють шляхом додавання безводного МеОН. Суміш концентрують, розводять 6М водним розчином НСІ, перемішують впродовж 1 год., нейтралізують до рН 7 та екстрагують за допомогою ДХМ. Органічну фазу сушать (Na₂SO₄), фільтрують та концентрують. Залишок використовують без очищення.

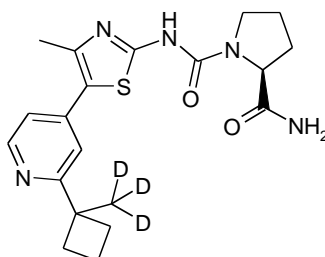
Стадія 31.3: 4-Бром-2-[1-(4-метоксифеніл)-1-метилетил]-піридин



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадіях 1.4-1.7, але з наступними змінами. На стадії як розчинник використовують 1.4 1,2-дихлоретан (4,3 мл на 1 ммоль піридин-4-ону). Реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником, виливають в насичений водний розчин NaHCO_3 та екстрагують за допомогою ДХМ. На стадії 1.5 реакційну суміш перемішують впродовж 23 год. при 80°C та розтирання з MeOH не проводять. На стадії 1.6 реакційну суміш перемішують впродовж 21 год. при КТ. На стадії 1.7 4-метокси-3-бутен-2-он в ТГФ додають до холодного (-78°C) розчину LiHMDS в ТГФ. Через 30 хвил. додають 2-(4-метоксифеніл)-2-метилпропіонілхлорид (стадія 27.1) в ТГФ та реакційній суміші дають нагріватися до КТ впродовж 16 год.

Шукана сполука: ІЕР-МС: 306,0/308,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; $t_R=3,94$ хвил. (система 1); ТШХ: $R_f=0,55$ (Hex/EtOAc, 7:3).

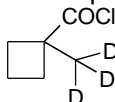
Приклад 32: 2-Амід, 1-({4-метил-5-[2-(1-d3-метилциклобутил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід) (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. В прикладі 1 реакційну суміш перемішують впродовж 18 год. при КТ, реакцію зупиняють шляхом розведення сумішшю ДХМ/ H_2O та екстрагують за допомогою ДХМ. На стадії 1.1 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником. На стадії 1.2 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 100°C та після зупинки реакції екстрагують за допомогою ДХМ. На стадії 1.7 до нагрітої суміші реагентів, що залишилися, додають паладієвий каталізатор та отриману суміш перемішують впродовж 1 год. при 120°C , розводять сумішшю EtOAc/ H_2O та екстрагують за допомогою EtOAc. Після сушки та концентрування органічної фази залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (Hex/EtOAc, 1:4). На стадії 1.5 реакційну суміш перемішують впродовж 3 год. при 80°C та розтирання з MeOH не проводять. На стадії 1.7 4-метокси-3-бутен-2-он в ТГФ додають до холодного (-78°C) розчину LiHMDS в ТГФ. Через 30 хвил. додають 1-d3-метилциклобутанхлорид (стадія 32.1) в ТГФ та реакційній суміші дають нагріватися до КТ впродовж 16 год.

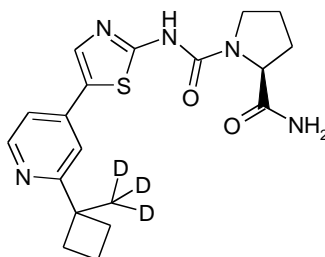
Шукана сполука: ІЕР-МС: 403,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; ТШХ: $R_f=0,22$ (ДХМ/MeOH/ $\text{NH}_3^{\text{водн.}}$, 91,5:7,5:1).

Стадія 32.1: 1-d3-Метилциклобутанкарбонілхлорид



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадії 5.1, але з використанням 1-d3-метилциклобутанкарбонової кислоти, яку отримують за опублікованою методикою [Cowling, S. J.; Goodby, J. W., Chemical Communications, (2006), (39), 4107-4109], але з використанням d3-метилйодиду.

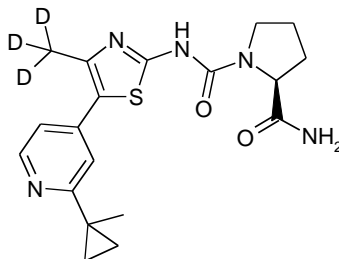
Приклад 33: 2-Амід, 1-({5-[2-(1-d3-метилциклобутил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід) (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. В прикладі 1 реакційну суміш перемішують впродовж 18 год. при КТ, реакцію зупиняють шляхом розведення сумішшю ДХМ/H₂O та екстрагують за допомогою ДХМ. На стадії 1.1 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником. На стадії 1.2 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 100 °С та після зупинки реакції екстрагують за допомогою ДХМ. На стадії 1.7 використовують N-тіазол-2-ілацетамід. До нагрітої суміші реагентів, що залишилися, додають паладієвий каталізатор. Отриману суміш перемішують впродовж 7 год. при 120 °С, розводять сумішшю EtOAc/H₂O, фільтрують через шар целіту та екстрагують за допомогою EtOAc. Після сушки та концентрування органічної фази залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (Hex/EtOAc, 1:4). На стадії 1.5 реакційну суміш перемішують впродовж 3 год. при 80 °С та розтирання з MeOH не проводять. На стадії 1.7 4-метокси-3-бутен-2-он в ТГФ додають до холодного (-78 °С) розчину LiHMDS в ТГФ. Через 30 хвил. додають 1-d₃-метилциклобутанхлорид (стадія 32.1) в ТГФ та реакційній суміші дають нагріватися до КТ впродовж 16 год.

Шукана сполука: ІЕР-МС: 389,2 [M+H]⁺; t_R=2,30 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,11 (ДХМ/MeOH/NH₃^{водн.}, 91,5:7,5:1).

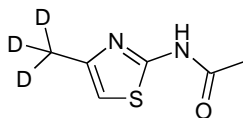
Приклад 34: 2-Амід, 1-({4-d₃-метил-5-[2-(1-метилциклопропіл)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід) (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. На стадії 1.1 реакційну суміш перемішують впродовж 8 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником. На стадії 1.2 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 85 °С та після зупинки реакції екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.7 використовують 2-ацетамідо-4-d₃-метилтіазол (стадія 34.1). Реакційну суміш перемішують впродовж 2 год. при 120 °С. На стадії 1.5 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 65-70 °С та розтирання з MeOH не проводять. На стадії 1.7 використовують 1-метилциклопропанкарбонілхлорид (стадія 5.1).

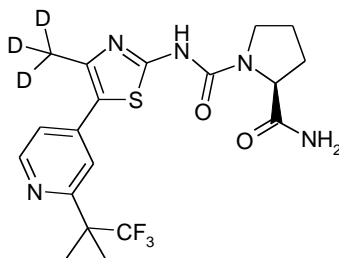
Шукана сполука: ІЕР-МС: 389,2 [M+H]⁺; t_R=2,12 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,35 (ДХМ/MeOH, 9:1).

Стадія 34.1: 2-Ацетамідо-4-d₃-метилтіазол



Суміш 1-бромпропан-2-ону-d₅ [Challacombe, K. et al, Journal of the Chemical Society Perkin Trans. I, (1988), 2213-2218] (1,25 г, 8,8 ммоль) та 1-ацетил-2-тиосечовини (1 г, 8,8 ммоль) в EtOH (20 мл) перемішують впродовж 2 год. при 85 °С, дають охолотитися та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (Hex/EtOAc, 85:15 → 1:1) та отримують 1,08 г шуканої сполуки у вигляді помаранчевої твердої речовини: ІЕР-МС: 160,0 [M+H]⁺; ТШХ: R_f=0,25 (Hex/EtOAc, 1:1).

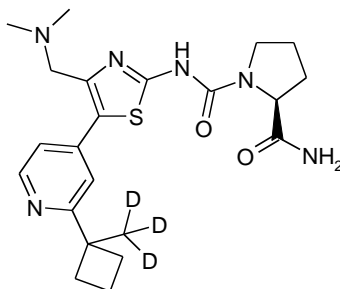
Приклад 35: 2-Амід, 1-({4-d₃-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід) (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. На стадії 1.1 реакційну суміш перемішують впродовж 8 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником. На стадії 1.2 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 85 °С та після зупинки реакції екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.7 використовують 2-ацетамідо-4-d₃-метилтіазол (стадія 34.1). Реакційну суміш перемішують впродовж 2 год. при 120 °С. На стадії 1.4 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 83 °С та після зупинки реакції екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.5 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 65 °С та розтирання з MeOH не проводять. На стадії 1.6 неочищений продукт не очищують. На стадії 1.7 використовують 3,3,3-трифтор-2,2-диметилпропіонілхлорид (стадія 12.1).

Шукана сполука: API-ES-MS: 445,1 [M+H]⁺; t_R=3,00 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,51 (ДХМ/MeOH, 9:1).

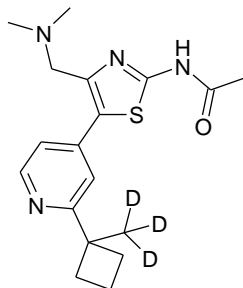
Приклад 36: 2-Амід, 1-({4-диметиламінометил-5-[2-(1-d₃-метил-цикло-бутил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід) (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. В прикладі 1 реакційну суміш перемішують впродовж 18 год. при КТ, реакцію зупиняють шляхом розведення сумішшю ДХМ/H₂O та екстрагують за допомогою ДХМ. На стадії 1.1 реакційну суміш перемішують впродовж 2 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником. На стадії 1.2 використовують N-{4-диметиламінометил-5-[2-(1-d₃-метилциклобутил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-ацетамід (стадія 36.1). Реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 100 °С та після зупинки реакції екстрагують за допомогою ДХМ.

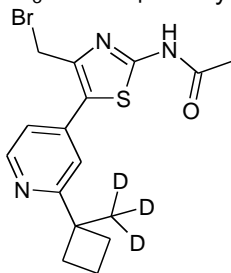
Шукана сполука: IEP-MS: 446,1 [M+H]⁺; ТШХ: R_f=0,40 (ДХМ/MeOH/NH₃^{водн.}, 89:10:1).

Стадія 36.1: N-{4-Диметиламінометил-5-[2-(1-d₃-метилциклобутил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-ацетамід



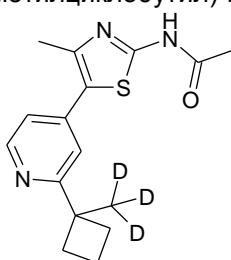
Суміш N-{4-бромметил-5-[2-(1-d₃-метилциклобутил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-ацетаміду (стадія 36.2) (150 мг, 0,391 ммоль), диметиламінгідрохлориду (38,3 мг, 0,470 ммоль, 1,2 екв.) та карбонату цезію (293 мг, 0,900 ммоль, 2,3 екв.) в ДМФА (2 мл) перемішують впродовж 2 год. при КТ, розводять сумішшю EtOAc/H₂O та екстрагують за допомогою EtOAc. Органічну фазу промивають за допомогою H₂O та сольовим розчином, сушать (Na₂SO₄), фільтрують та концентрують. Залишок очищують шляхом розтирання з Et₂O та отримують 89 мг шуканої сполуки у вигляді білої твердої речовини: IEP-MS: 348,2 [M+H]⁺.

Стадія 36.2: N-{4-Бромметил-5-[2-(1-d₃-метилциклобутил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-ацетамід



NBS (554 мг, 3,06 ммоль, 1,1 екв.) додають до розчину N-{4-метил-5-[2-(1-d₃-метилциклобутил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-ацетаміду (стадія 36.3) (846 мг, 2,78 ммоль) в CCl₄ (20 мл) та CHCl₃ (16 мл). Реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при КТ, промивають за допомогою H₂O та сольовим розчином, сушать (Na₂SO₄), фільтрують та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (Hex/EtOAc, 1:4) та отримують 572 мг шуканої сполуки у вигляді блідо-жовтої твердої речовини: ІЕР-МС: 383,0/385,0 [M+H]⁺; t_R=3,12 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,45 (Hex/EtOAc, 1:4).

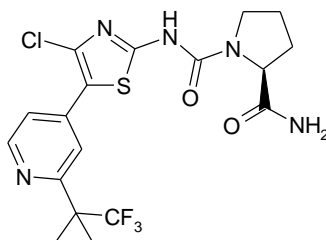
Стадія 36.3: N-{4-Метил-5-[2-(1-d₃-метилциклобутил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-ацетамід



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадіях 1.3-1.7, але з наступними змінами. На стадії 1.3 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 120 °С та реакцію зупиняють шляхом розведення сумішшю EtOAc/H₂O. На стадії 1.5 реакційну суміш перемішують впродовж 3 год. при 80 °С та розтирання з MeOH не проводять. На стадії 1.7 4-метокси-3-бутен-2-он в ТГФ додають до холодного (-78 °С) розчину LiHMDS в ТГФ. Через 30 хвил. додають 1-d₃-метилциклобутанхлорид (стадія 32.1) в ТГФ та реакційній суміші дають нагріватися до КТ впродовж 16 год.

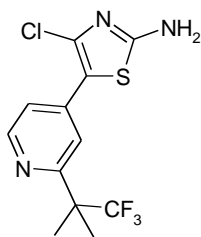
Шукана сполука: ІЕР-МС: 305,2 [M+H]⁺; ТШХ: R_f=0,24 (Hex/EtOAc, 1:4).

Приклад 37: 2-Амід, 1-({4-хлор-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід) (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти



Суміш 4-хлор-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іламіну (стадія 37.1) (100 мг, 0,311 ммоль) та фосгену (0,164 мл, 0,311 ммоль) в піридині (2 мл) перемішують впродовж 1 год. при 105 °С. Додають L-пролінамід (106 мг, 0,932 ммоль, 3 екв.). Отриману суміш перемішують впродовж 30 хвил. при 105 °С, дають охолотитися, реакцію зупиняють шляхом додавання насиченого розчину NaHCO₃ (100 мл) та екстрагують за допомогою EtOAc (2×100 мл). Органічну фазу промивають насиченим розчином NaHCO₃ (100 мл), сушать (Na₂SO₄), фільтрують та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (ДХМ/MeOH, 99:1 → 94:6) та отримують 46 мг шуканої сполуки у вигляді жовтої твердої речовини: ІЕР-МС: 461,9 [M+H]⁺; t_R=3,60 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,28 (ДХМ/MeOH, 9:1).

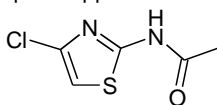
Стадія 37.1: 4-Хлор-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іламін



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадіях 1.2-1.7, але з наступними змінами. На стадії 1.2 реакційну суміш перемішують впродовж 3 год. при 85 °С та після зупинки реакції екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.7 використовують N-(4-хлортіазол-2-іл)-ацетамід (стадія 37.2). Реакційну суміш перемішують впродовж 2 год. при 120 °С. На стадії 1.4 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 83 °С та після зупинки реакції екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.5 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 65 °С та розтирання з MeOH не проводять. На стадії 1.6 неочищений продукт не очищують. На стадії 1.7 використовують 3,3,3-трифтор-2,2-диметилпропіонілхлорид (стадія 12.1).

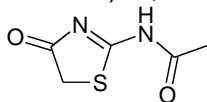
Шукана сполука: ІЕР-МС: 322,1 [M+H]⁺; t_R=3,58 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,45 (ДХМ/MeOH, 9:1).

Стадія 37.2: N-(4-Хлортіазол-2-іл)-ацетамід



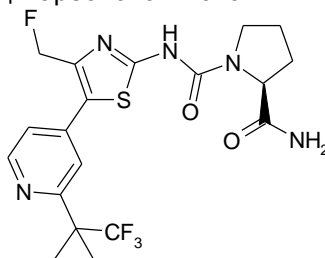
Суміш N-(4-оксо-4,5-дигідротіазол-2-іл)-ацетаміду (стадія 37.3) (14,8 г, 94 ммоль) та POCl₃ (175 мл, 20 екв.) нагрівають при 105 °С, перемішують впродовж 15 хвил., дають охолотитися та концентрують. Залишок виливають в суміш лід-Н₂O та екстрагують за допомогою EtOAc (2×100 мл). Органічну фазу промивають насиченим розчином NaHCO₃ (2×100 мл), сушать (Na₂SO₄), фільтрують та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (ДХМ/MeOH, 99:1) та отримують 13,9 г шуканої сполуки у вигляді білої твердої речовини: ІЕР-МС: 177,0 [M+H]⁺; t_R=2,74 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,66 (ДХМ/MeOH, 9:1).

Стадія 37.3: N-(4-Оксо-4,5-дигідротіазол-2-іл)-ацетамід



Суміш псевдотіогідантоїну (16 г, 138 ммоль) та оцтового ангідриду (16,9 мл, 179 ммоль, 1,3 екв.) в піридині (150 мл) нагрівають при 115 °С, перемішують впродовж 1 год. та дають охолотитися. Отриманий осад збирають фільтруванням та отримують 12,64 г шуканої сполуки у вигляді коричневої твердої речовини: ІЕР-МС: 159,0 [M+H]⁺.

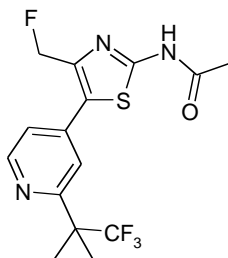
Приклад 38: 2-Амід, 1-({4-фторметил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід) (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. В прикладі 1 реакційну суміш перемішують впродовж 18 год. при КТ, реакцію зупиняють шляхом розведення сумішшю ДХМ/Н₂O та екстрагують за допомогою ДХМ. На стадії 1.1 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником, концентрують та отриману неочищену речовину використовують без очищення. На стадії 1.2 використовують N-{4-фторметил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-ацетамід (стадія 38.1). Реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 100 °С та після зупинки реакції екстрагують за допомогою ДХМ. Неочищену речовину не очищують.

Шукана сполука: ІЕР-МС: 460,0 [M+H]⁺; ТШХ: R_f=0,44 (ДХМ/MeOH/Н₃^{водн.}, 91,5:7,5:1)

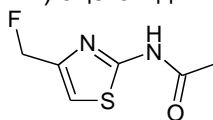
Стадія 38.1: N-{4-Фторметил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-ацетамід



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадіях 1.3-1.7, але з наступними змінами. На стадії 1.3 використовують N-(4-фторметилтіазол-2-іл)-ацетамід (стадія 38.2). Реакційну суміш перемішують впродовж 7 год. при 90 °С, впродовж 5 год. при 100 °С та реакцію зупиняють шляхом розведення сумішшю EtOAc та H₂O. На стадії 1.5 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 65 °С та розтирання з MeOH не проводять. На стадії 1.6 неочищений продукт не очищують. На стадії 1.7 використовують 3,3,3-трифтор-2,2-диметилпропіонілхлорид (стадія 12.1).

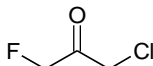
Шукана сполука: ІЕР-МС: 362,1 [M+H]⁺; t_R=4,18 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,29 (Hex/EtOAc, 1:1).

Стадія 38.2: N-(4-Фторметилтіазол-2-іл)-ацетамід



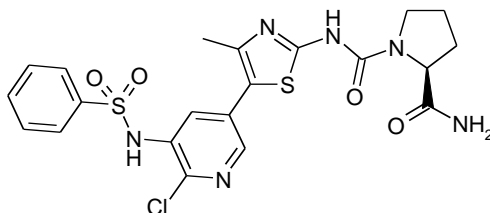
Суміш 1-хлор-3-фторпропан-2-ону (стадія 38.3) (1,14 г, 10,3 ммоль) та N-ацетил-2-тіосечовини (1,22 г, 10,3 ммоль) в EtOH (10 мл) перемішують впродовж 1,5 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником, дають охолотитися та концентрують. Залишок розчиняють в суміші ДХМ/H₂O та екстрагують за допомогою ДХМ. Органічну фазу сушать (Na₂SO₄), фільтрують та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (Hex/EtOAc, 1:1) та отримують 0,143 г шуканої сполуки: ІЕР-МС: 173,1 [M-H]⁻; t_R=1,98 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,21 (Hex/EtOAc, 1:1).

Стадія 38.3: 1-Хлор-3-фторпропан-2-он



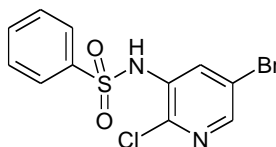
1-Фтор-3-хлорізопропанол (2,7 мл, 31,2 ммоль) повільно додають в колбу, що містить 30 мл реагенту Джонса (отриманий шляхом додавання 230 мл концентрованої сірчаної кислоти до 267 г триоксиду хрому в 700 мл H₂O розведення за допомогою H₂O до 1 л), охолодженого до 5 °С. Реакційній суміші дають нагрітися до КТ, перемішують впродовж 18 год., виливають в насичений розчин NaHCO₃ та екстрагують за допомогою Et₂O. Органічну фазу промивають сольовим розчином, сушать (Na₂SO₄), фільтрують та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (ДХМ) та отримують 1,14 г шуканої сполуки у вигляді неочищеного жовтого масла.

Приклад 39: 2-Амід, 1-[[5-(5-бензолсульфоніламіно-6-хлорпіридин-3-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-амід] (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти



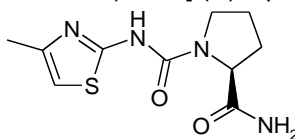
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадії 1.3, але з наступними змінами. Використовують 2-амід, 1-[[4-метилтіазол-2-іл]-амід] (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти (стадія 39.2) та N-(5-бром-2-хлорпіридин-3-іл)-бензолсульфонамід (стадія 39.1). До нагрітої суміші реагентів, що залишилися, додають паладієвий каталізатор та отриману суміш перемішують впродовж 3 год. при 135 °С, розводять за допомогою EtOAc та H₂O, фільтрують через шар целіту та екстрагують за допомогою EtOAc. Після сушки та концентрування органічної фази залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі та за допомогою ВЕРХ з оберненою фазою. Шукана сполука: ІЕР-МС: 519,0/521,1 [M-H]⁻; t_R=3,33 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,09 (ДХМ/MeOH/NH₃^{водн.}, 84:15:1).

Стадія 39.1: N-(5-Бром-2-хлорпіридин-3-іл)-бензолсульфонамід



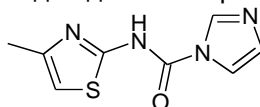
Розчин бензолсульфонілхлориду (1,23 мл, 9,62 ммоль, 2 екв.) в ДХМ (50 мл) впродовж 15 хвил. в атмосфері аргону по краплям додають до розчину 3-аміно-5-бром-2-хлорпіридину [Jouve, K.; Bergman, J., Journal of Heterocyclic Chemistry, (2003), 40(2), 261-268] (1 г, 4,81 ммоль) та піридину (1,94 мл, 24 ммоль, 5 екв.) в ДХМ (20 мл). Отриману суміш перемішують впродовж 20 год. при КТ, концентрують, розводять за допомогою H_2O та екстрагують за допомогою ДХМ. Органічну фазу промивають сольовим розчином, сушать (Na_2SO_4), фільтрують та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (ДХМ) та отримують 163 мг шуканої сполуки у вигляді білої твердої речовини: ІЕР-МС: 346,9 [M-H]⁻; t_R =4,33 хвил. (система 1); ТШХ: R_f =0,23 (ДХМ).

Стадія 39.2: 2-Амід, 1-[(4-метилтіазол-2-іл)-амід] (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти



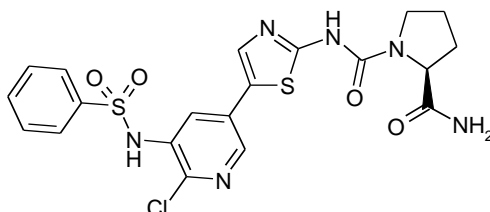
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з використанням (4-метилтіазол-2-іл)-аміду імідазол-1-карбонової кислоти (стадія 39.3). Реакційну суміш перемішують впродовж 18 год. при КТ та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (ДХМ/MeOH/ $NH_3^{водн.}$, 94:5:1), потім розтирають з Et_2O . Шукана сполука: ІЕР-МС: 253,2 [M-H]⁻; ТШХ: R_f =0,18 (ДХМ/MeOH/ $NH_3^{водн.}$, 84:15:1).

Стадія 39.3: (4-Метилтіазол-2-іл)-амід імідазол-1-карбонової кислоти



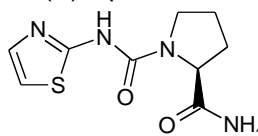
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадії 1.1, але з використанням 2-ацетамідо-4-метилтіазолу та перемішування реакційної суміші впродовж 5,5 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником.

Приклад 40: 2-Амід, 1-{[5-(5-бензолсульфоніламіно-6-хлорпіридин-3-іл)-тіазол-2-іл]-амід} (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти



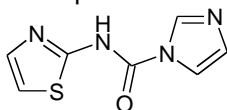
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадії 1.3, але з наступними змінами. Використовують 2-амід, 1-тіазол-2-іламід (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти (стадія 40.1) та N-(5-бром-2-хлорпіридин-3-іл)-бензолсульфонамід (стадія 39.1). До нагрітої суміші реагентів, що залишилися, додають паладієвий каталізатор та отриману суміш перемішують впродовж 6 год. при 120 °C, концентрують, розводять сумішшю ДХМ/MeOH, фільтрують через шар целіту та фільтрат концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі та за допомогою ВЕРХ з оберненою фазою. Шукана сполука: ІЕР-МС: 506,9 [M+H]⁺; t_R =3,21 хвил. (система 1).

Стадія 40.1: 2-Амід, 1-тіазол-2-іламід (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти



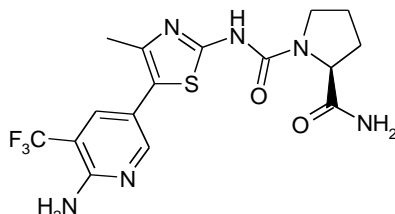
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з використанням тіазол-2-іламиду імідазол-1-карбонової кислоти (стадія 40.2). Реакційну суміш перемішують впродовж 18 год. при КТ та концентрують. Залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (ДХМ/MeOH/ $NH_3^{водн.}$, 94:5:1), потім розтирають з $EtOAc$. Шукана сполука: ІЕР-МС: 239,2 [M-H]⁻; ТШХ: R_f =0,11 (ДХМ/MeOH/ $NH_3^{водн.}$, 84:15:1).

Стадія 40.2: Тіазол-2-іламід імідазол-1-карбонової кислоти



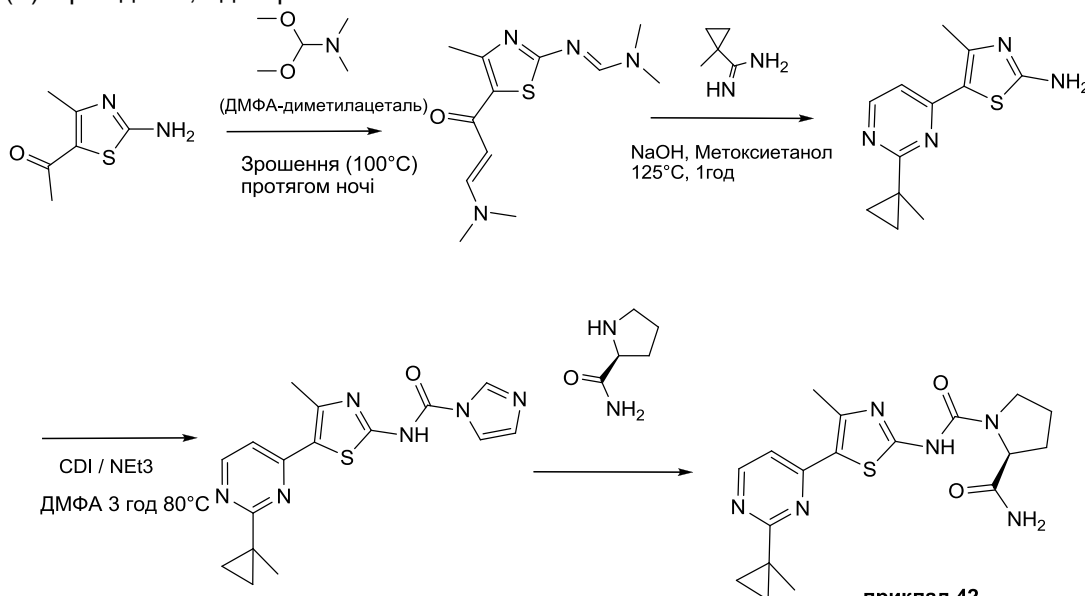
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадії 1.1, але з використанням N-тіазол-2-ілацетаміду та перемішування реакційної суміші впродовж 5 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником.

Приклад 41: 2-Амід, 1-[[5-(6-аміно-5-трифторметилпіридин-3-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-амід] (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



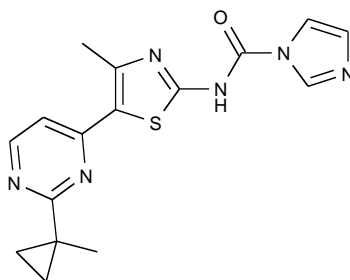
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадії 1.3, але з наступними змінами. Використовують 2-амід, 1-[[4-метилтіазол-2-іл]-амід] (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти (стадія 39.2) та 5-бром-3-трифторметилпіридин-2-іламін (WO2007095588). До нагрітої суміші реагентів, що залишилися, додають паладієвий каталізатор та отриману суміш перемішують впродовж 3 год. при 120 °С, розводять сумішню ДХМ/Н₂О та екстрагують за допомогою ДХМ. Після сушки та концентрування органічної фази залишок очищують за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі та за допомогою ВЕРХ з оберненою фазою. Шукана сполука: ІЕР-МС: 413,1 [М-Н]⁺; ТШХ: R_f=0,27 (ДХМ/MeOH/NH₃^{водн}, 89:10:1).

Приклад 42: 2-Амід, 1-((4-метил-5-[2-(1-метилциклопропіл)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іл)-амід] (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



{4-Метил-5-[2-(1-метилциклопропіл)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід імідазол-1-карбонової кислоти (4,0 г) при кімнатній температурі при перемішуванні додають до розчину L-пролінамиду (1,48 г) та триетиламіну (4,1 мл) в ДМФА (46 мл). Реакційну суміш витримують при кімнатній температурі впродовж 22 год., випарюють та шукану сполуку отримують у вигляді білої твердої речовини після кристалізації з метанолу (60 мл) та води (20 мл). ВЕРХ/МС: час утримання 1,24 хвил., М+Н 387,1 та М-Н 385,2.

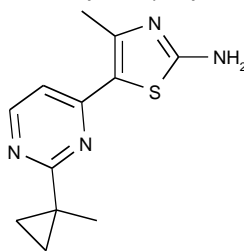
Стадія 42.1: {4-Метил-5-[2-(1-метилциклопропіл)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід імідазол-1-карбонової кислоти



Карбонілдіімідазол (4,56 г) додають до розчину 4-метил-5-[2-(1-метилциклопропіл)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну (10,5 г) та триетиламіну (4,28 мл) в ДМФА (26 мл) при кімнатній температурі та потім нагрівають впродовж 2 год. при 80 °С. Після охолодження шукану сполуку виділяють фільтруванням.

5

Стадія 42.2: 4-Метил-5-[2-(1-метилциклопропіл)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іламін

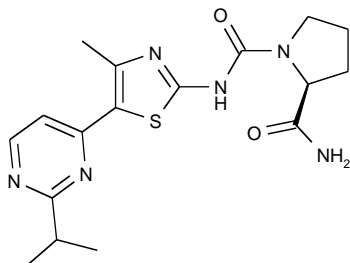


Порошкоподібний гідроксид натрію (5,86 г) додають до розчину N'-[5-(3-диметиламіноакрилоїл)-4-метилтіазол-2-іл]-N, N-диметилформамідину (13 г, отримують, як це описано в публікації S. Wang et al J. Med. Chem. 2004, 47, 1662-1675.) та 1-метилциклопропанкарбоксамідінгідрохлориду (7,2 г, отримують, як це описано в EP0227415) в 2-метоксиетанолі (98 мл) та суміш при перемішуванні нагрівають при 125 °С впродовж 1 год. Реакційну суміш охолоджують, додають воду та шукану сполуку виділяють фільтруванням. ІЕР-МС: М+Н 247 та М-Н 245.

10

15

Приклад 43: 2-Амід, 1-{[5-(2-ізопропілпіримідин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-амід} (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти

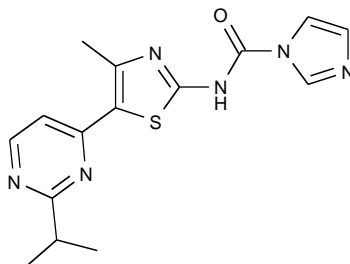


[5-(2-Ізопропілпіримідин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-амід (50 мг) імідазол-1-карбонової кислоти додають до розчину L-пролінамід (19 мг) та триетиламіну (26 мкл) в ДМФА (152 мкл) при кімнатній температурі. Суміш перемішують впродовж 2 год. при 40 °С та потім очищують за допомогою препаративної хроматографії з оберненою фазою. Фракції, що містять шукану сполуку, поглинають за допомогою 300 мг BondElut SPE картриджу SCX та потім виділяють 7М розчином амонію в метанолі (1 мл). Шукану сполуку отримують шляхом випарювання. ІЕР-МС: М+Н 275 та М-Н 273.

20

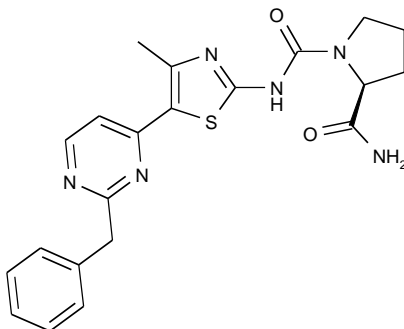
25

Стадія 43.1: Імідазол-1-карбонової кислоти {4-метил-5-[2-ізопропілпіримідин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід



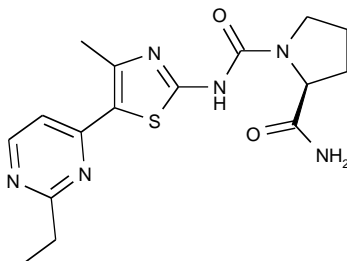
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 42, але з використанням 4-метил-5-[2-ізопропілпіримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну замість 4-метил-5-[2-(1-метилциклопропіл)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну.

5 Приклад 44: 2-Амід, 1-{[5-(2-бензилпіримідин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-амід} (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



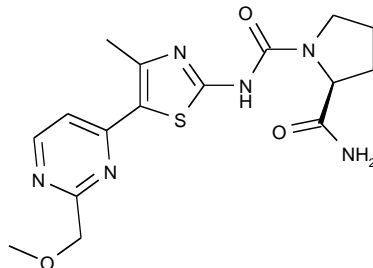
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 43, але з використанням 4-метил-5-[2-бензилпіримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну замість 4-метил-5-[2-ізопропілпіримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну. ІЕР-МС: М+Н 423 та М-Н 421.

10 Приклад 45: 2-Амід, 1-{[5-(2-етилпіримідин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-амід} (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



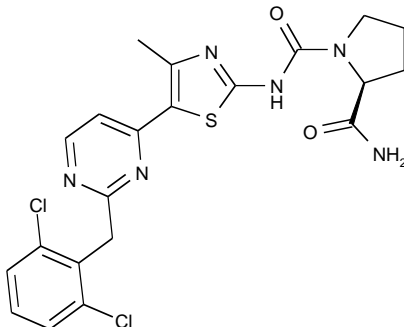
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 43, але з використанням 4-метил-5-[2-етилпіримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну замість 4-метил-5-[2-ізопропілпіримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну. ІЕР-МС: М+Н 361 та М-Н 359.

15 Приклад 46: 2-Амід, 1-{[5-(2-метоксиметилпіримідин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-амід} (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



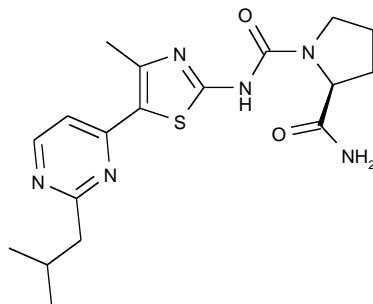
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 43, але з використанням 4-метил-5-[2-метоксиметилпіримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну замість 4-метил-5-[2-ізопропілпіримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну. ІЕР-МС: М+Н 377 та М-Н 375.

20 Приклад 47: 2-Амід, 1-{[5-[2-(2,6-дихлорбензил)-піримідин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іл]-амід} (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



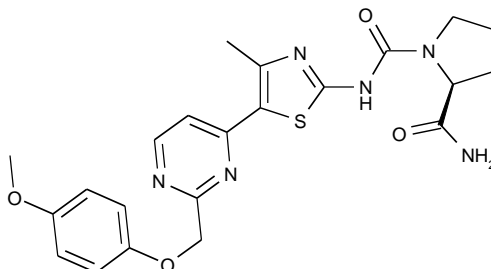
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 43, але з використанням 4-метил-5-[2-(2,6-дихлорбензил)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну замість 4-метил-5-[2-ізопропілпіримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну. ІЕР-МС: М+Н 491, 493 та М-Н 489, 491.

Приклад 48: 2-Амід, 1-({5-[2-(ізобутилпіримідин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-амід} (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



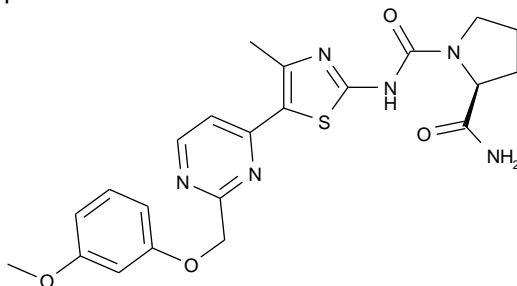
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 43, але з використанням 4-метил-5-[2-ізобутилпіримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну замість 4-метил-5-[2-ізопропілпіримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну. ІЕР-МС: М+Н 389 та М-Н 387.

Приклад 49: 2-Амід, 1-({5-[2-(4-метоксифеноксиметил)-піримідин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іл]-амід} (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



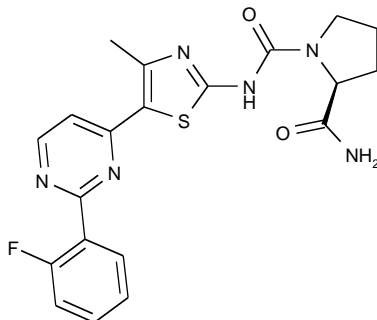
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 43, але з використанням 4-метил-5-[2-(4-метоксифеноксиметил)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну замість 4-метил-5-[2-ізопропілпіримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну. ІЕР-МС: М+Н 469 та М-Н 467.

Приклад 50: 2-Амід, 1-({5-[2-(3-метоксифеноксиметил)-піримідин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іл]-амід} (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



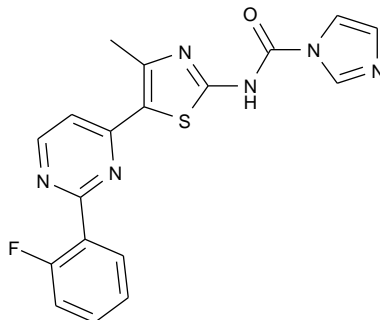
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 43, але з використанням 4-метил-5-[2-(3-метоксифеноксиметил)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну замість 4-метил-5-[2-ізопропілпіримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну. ІЕР-МС М-Н 467.

Приклад 51: 2-Амід, 1-({5-[2-(2-фторфеніл)-піримідин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іл]-амід} (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



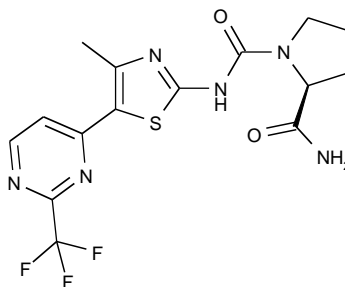
{5-[2-(2-фторфеніл)-піримідин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іл]-амід імідазол-1-карбонової кислоти (415 мг) при кімнатній температурі додають до розчину L-пролінамід (137 мг) та триетиламіну (182 мкл) в ДМФА (1,1 мл). Суміш перемішують впродовж 18 год. при 40 °С, випарюють та кристалізують з метанолу (8 мл) та води (2 мл) та отримують шукану сполуку у вигляді білої твердої речовини. ІЕР-МС: М+Н 427 та М-Н 425.

Стадія 51.1 {5-[2-(2-Фторфеніл)-піримідин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іл]-амід: імідазол-1-карбонової кислоти



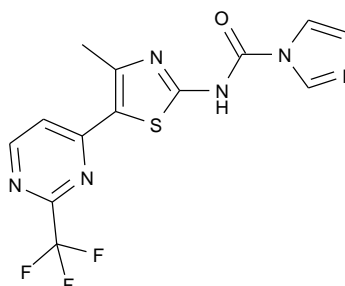
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 43, але з використанням 4-метил-5-[2-(2-фторфеніл)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну замість 4-метил-5-[2-(1-метилциклопропіл)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну.

Приклад 52: 2-Амід, 1-({5-(2-трифторметилпіримідин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-амід} (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



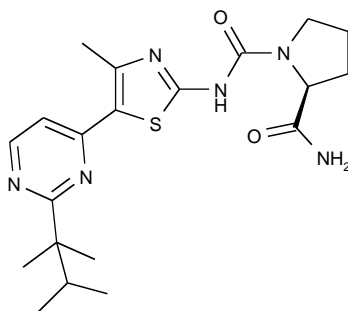
L-Пролінамід (9 мг) при кімнатній температурі додають до розчину [5-(2-трифторметилпіримідин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-аміду імідазол-1-карбонової кислоти (25 мг) та триетиламіну (12 мкл) в ДМФА (71 мкл). Суміш перемішують впродовж 18 год. при 25 °С та очищують за допомогою препаративної хроматографії з оберненою фазою. Фракції, що містять шукану сполуку, поглинають за допомогою 300 мг BondElut SPE картриджу SCX та потім виділяють 7М розчином амонію в метанолі (1 мл). Шукану сполуку отримують шляхом випарювання. ІЕР-МС: М+Н 401 та М-Н 399.

Стадія 52.1: {4-Метил-5-[2-трифторметилпіримідин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амід імідазол-1-карбонової кислоти



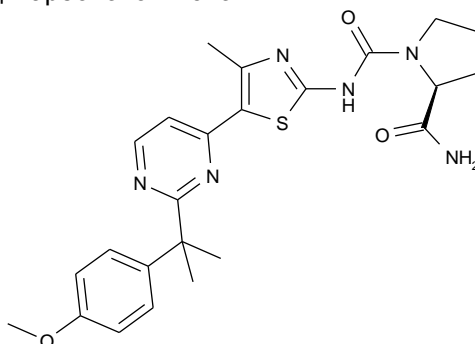
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 43, але з використанням 4-метил-5-[2-трифторметилпіримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну замість 4-метил-5-[2-(1-метилциклопропіл)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну.

Приклад 53: 2-Амід, 1-({4-метил-5-[2-(1,1,2-триметилпропіл)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амід} (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



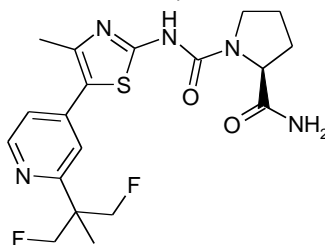
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 51, але з використанням 4-метил-5-[2-(1,1,2-триметилпропіл)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну замість 4-метил-5-[2-(2-фторфеніл)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну. ІЕР-МС: М+Н 417 та М-Н 415.

5 Приклад 54: 2-Амід, 1-[(5-{2-[1-(4-метоксифеніл)-1-метилетил]-піримідин-4-іл}-4-метилтіазол-2-іл)-амід] (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 51, але з використанням 5-{2-[1-(4-метоксифеніл)-1-метилетил]-піримідин-4-іл}-4-метилтіазол-2-іламіну замість 4-метил-5-[2-(2-фторфеніл)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну. ІЕР-МС: М+Н 495 та М-Н 493.

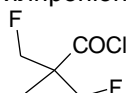
10 Приклад 55: 2-Амід, 1-[(5-{2-(2-фтор-1-фторметил-1-метилетил)-піридин-4-іл}-4-метилтіазол-2-іл)-амід] (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



15 Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. В прикладі 1 реакційну суміш перемішують впродовж 6 год. при КТ. На стадії 1.1 реакційну суміш перемішують впродовж 15 год. при кип'ятінні із зворотним холодильником. На стадії 1.2 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 100 °С та після зупинки реакції екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.3 реакційну суміш перемішують впродовж 2 год. при 120 °С. На стадії 1.4 реакційну суміш перемішують впродовж 30 хвил. при 85 °С та після зупинки реакції екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.5 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 65 °С та розтирання з MeOH не проводять. На стадії 1.6 неочищений продукт не очищують. На стадії 1.7 використовують 3-фтор-2-фторметил-2-метилпропіонілхлорид (стадія 55.1).

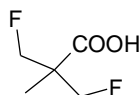
20 Шукана сполука: ІЕР-МС: 424,1 [М+Н]⁺; t_R=2,40 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,35 (ДХМ/MeOH, 9:1).

25 Стадія 55.1: 3-Фтор-2-фторметил-2-метилпропіонілхлорид



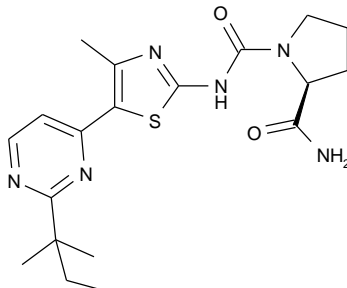
30 Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадії 5.1, але з використанням 3-фтор-2-фторметил-2-метилпропіонової кислоти (стадія 55.2).

Стадія 55.2: 3-Фтор-2-фторметил-2-метилпропіонова кислота



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадії 73.2, але з використанням метилового ефіру 3-фтор-2-фторметил-2-метилпропіонової кислоти (одержання описано в WO 2007/053394). ІЕР-МС: 137,0 [M-H]⁻.

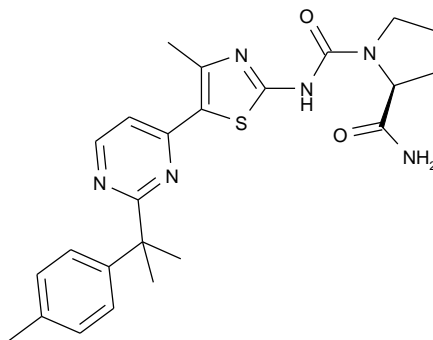
- 5 Приклад 56: 2-Амід, 1-({4-метил-5-[2-(1,1-диметилпропіл)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід) (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 43, але з використанням 4-метил-5-[2-(1,1-диметилпропіл)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну замість 4-метил-5-[2-ізопропілпіримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну. ІЕР-МС: M+H 403 та M-H 401.

10

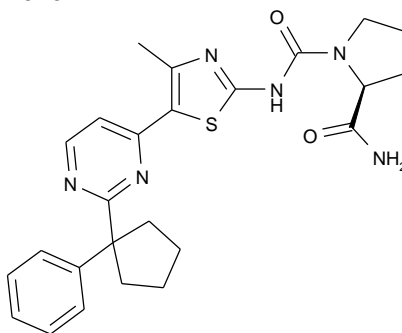
Приклад 57: 2-Амід, 1-({4-метил-5-[2-(1-метил-1-п-толілетил)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід) (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 43, але з використанням 4-метил-5-[2-(1-метил-1-п-толілетил)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну замість 4-метил-5-[2-ізопропілпіримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну. ІЕР-МС: M+H 479 та M-H 477.

15

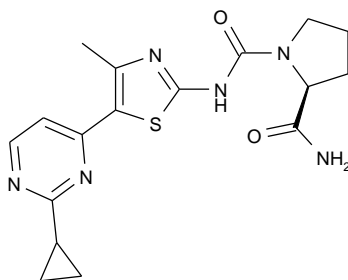
Приклад 58: 2-Амід, 1-({4-метил-5-[2-(1-фенілциклопентил)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід) (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 43, але з використанням 4-метил-5-[2-(1-фенілциклопентил)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну замість 4-метил-5-[2-ізопропілпіримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну. ІЕР-МС: M+H 477 та M-H 475.

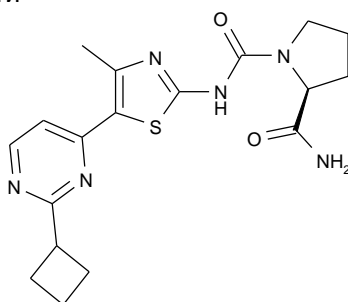
20

Приклад 59: 2-Амід, 1-({4-метил-5-[2-циклопропілпіримідин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід) (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



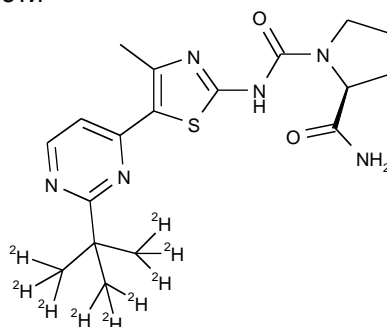
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 43, але з використанням 4-метил-5-[2-циклопропілпіримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну замість 4-метил-5-[2-ізопропілпіримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну. ІЕР-МС: М+Н 373 та М-Н 371.

5 Приклад 60: 2-Амід, 1-({4-метил-5-[2-циклобутилпіримідин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід) (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



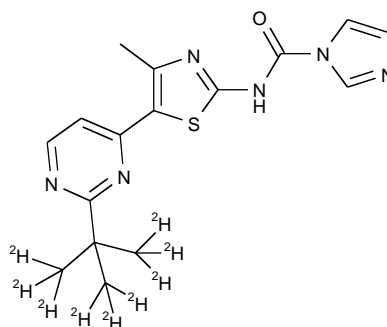
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 52, але з використанням 4-метил-5-[2-циклобутилпіримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну замість 4-метил-5-[2-трифторметилпіримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну. ІЕР-МС: М+Н 387 та М-Н 385.

10 Приклад 61: 2-Амід, 1-([5-(2-d₉-трет-бутилпіримідин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-амід) (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



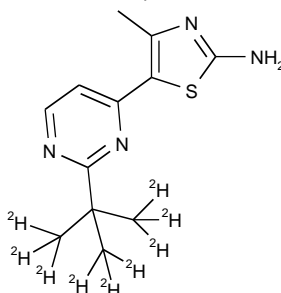
[5-(2-d₉-Трет-бутилпіримідин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-амід імідазол-1-карбонової кислоти (0,82 г) при кімнатній температурі при перемішуванні додають до розчину L-пролінаміду (0,29 г) та триетиламіну (0,81 мл) в ДМФА (5 мл). Реакційну суміш витримують при кімнатній температурі впродовж 22 год., потім випарюють та після дворазової кристалізації сумішшю 2:1 метанол: вода отримують шукану сполуку у вигляді білої твердої речовини. ВЕРХ/МС: час утримання 1,27 хвил., М+Н 398,3 та М-Н 396,3.

15 Стадія 61.1: [5-(2-d₉-трет-бутилпіримідин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-амід імідазол-1-карбонової кислоти



Карбонілдіімідазол (0,77 г) при кімнатній температурі при перемішуванні додають до розчину 5-(2-d₉-трет-бутилпіримідин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іламіну (1,11 г) в ДМФА (4,3 мл). Потім реакційну суміш витримують впродовж 18 год. при 25 °С та потім шукану сполуку виділяють фільтруванням.

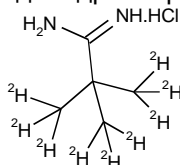
5 Стадія 61.2: 5-(2-d₉-трет-бутилпіримідин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іламін



10 Порошкоподібний гідроксид натрію (3,71 г) додають до розчину N'-[5-(3-диметиламіноакрилоїл)-4-метилтіазол-2-іл]-N, N-диметилформамідину (5,51 г) та d₉-2,2-диметилпропіонамідингідрохлориду (4,50 г) в 2-метоксиетанолі (41 мл) та суміш при перемішуванні нагрівають при 125 °С впродовж 1 год. Реакційну суміш охолоджують, додають воду та неочищений продукт виділяють фільтруванням. Неочищений продукт очищують за допомогою препаративної ВЕРХ та фракції, що містять шукану сполуку, піддають розподіленню між дихлорметаном та водним розчином бікарбонату натрію. Після випарювання висушених дихлорметанових шарів отримують шукану сполуку у вигляді жовтої твердої речовини.

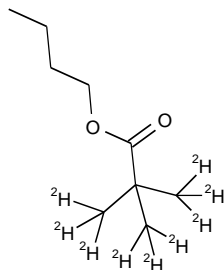
15 ВЕРХ/МС: час утримання 1,12 хвил., М+Н 258,4.

Стадія 61.3: d₉-2,2-Диметилпропіонамідингідрохлорид



20 2М Розчин триметилалюмінію в толуолі (61 мл) по краплям додають до суспензії хлориду амонію (6,53 г) в толуолі (46 мл) при охолодженні в бане з льодом. Реакційну суміш перемішують впродовж 4 год. при кімнатній температурі та додають бутиловий ефір d₉-2,2-диметилпропіонової кислоти (6,3 г). Після нагрівання при 80 °С впродовж 4 днів реакційну суміш охолоджують до 0 °С та по краплям додають метанол (200 мл). Після перемішування обробки ультразвуком впродовж 1 год. при кімнатній температурі реакційну суміш фільтрують через Нуфл, промивають метанолом та фільтрат випарюють та отримують шукану сполуку у вигляді майже білої твердої речовини.

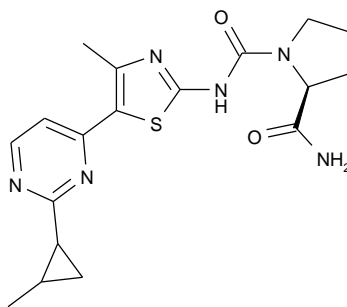
Стадія 61.4: Бутиловий ефір d₉-2,2-диметилпропіонової кислоти



30 d₉-трет-Бутилхлорид (5,0 г) впродовж 1 год. порціями додають до суспензії магнію (1,50 г) в тетрагідрофурані (20 мл), активованої каталітичною кількістю йоду, при нагріванні, необхідною для постійного кипіння. Потім реакційну суміш нагрівають впродовж ще 1 год. для забезпечення повного утворення реагенту Грін'єра. Потім отриманий розчин реагенту Грін'єра по краплям додають до розчину бутилового ефіру імідазол-1-карбонової кислоти (7,5 г, отримують, як це описано в публікації Т. Werner and A.G.M. Barrett J. Org. Chem. 2006, 71, 4302-4304.) в тетрагідрофурані (40 мл) при охолодженні в бане з льодом. Реакційну суміш перемішують

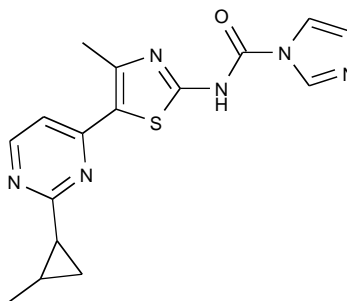
35 впродовж 18 год. при кімнатній температурі, додають воду (200 мл), суміш фільтрують через Нуфл, фільтрат екстрагують діетиловим ефіром та шари, що містять діетиловий ефір, сушать над сульфатом натрію та випарюють та отримують шукану сполуку.

Приклад 62: 2-Амід, 1-({4-метил-5-[2-(2-метилциклопропіл)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід) (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



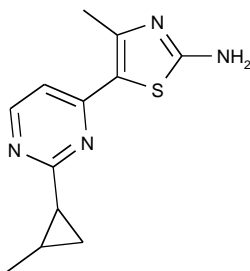
{4-Метил-5-[2-(2-метилциклопропіл)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід імідазол-1-карбонової
кислоти (50 мг) при кімнатній температурі при перемішуванні додають до розчину L-пролінамід
(18 мг) та триетиламіну (25 мкл) в ДМФА (147 мкл). Реакційну суміш перемішують при 40 °С
впродовж 2 год. та очищують за допомогою препаративної хроматографії з оберненою фазою.
Фракції, що містять шукану сполуку, поглинають за допомогою 300 мг BondElut SPE картриджу
SCX та потім виділяють 7М розчином амонію в метанолі (1 мл). Шукану сполуку отримують
шляхом випарювання. ІЕР-МС: М+Н 387 та М-Н 385.

Стадія 62.1: {4-Метил-5-[2-(2-метилциклопропіл)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід імідазол-1-
карбонової кислоти



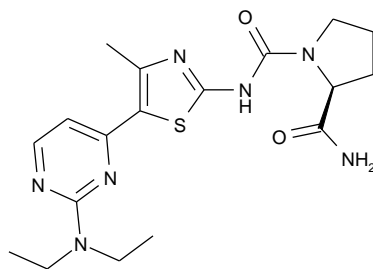
Карбонілдіімідазол (487 мг) при кімнатній температурі додають до розчину 4-метил-5-[2-(2-
метилциклопропіл)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну (370 мг) та триетиламіну (251 мкл) в ДМФА
(1,5 мл) та потім нагрівають впродовж 2 год. при 40 °С. Реакційну суміш випарюють та
розтирають з хлороформом. Шукану сполуку виділяють фільтруванням.

Стадія 62.2: 4-Метил-5-[2-(2-метилциклопропіл)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іламін



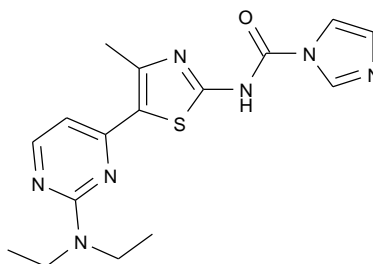
Порошкоподібний гідроксид натрію (300 мг) додають до розчину N'-[5-(3-
диметиламіноакрилоїл)-4-метилтіазол-2-іл]-N, N-диметилформамідину (1 г, отримують, як це
описано в публікації S. Wang et al. J. Med. Chem. 2004, 47, 1662-1675.) та цис/транс 2-
метилциклопропанкарбоксамідінгідрохлориду (0,61 г, отримують, як це описано в WO
03/087064) в 2-метоксиетанолі (3,8 мл) та суміш при перемішуванні нагрівають при 125 °С
впродовж 1 год. Реакційну суміш охолоджують, фільтрують, промивають водою та отримують
шукану сполуку. МС: М+Н 247 та М-Н 245.

Приклад 63: 2-Амід, 1-[[5-(2-діетиламінопіримідин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-амід} (S)-
піролідін-1,2-дикарбонової кислоти



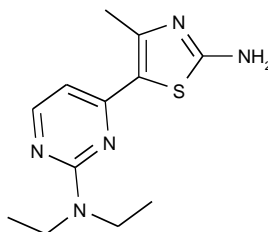
[5-(2-Діетиламінопіримідин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-амід імідазол-1-карбонової кислоти (40 мг) при кімнатній температурі при перемішуванні додають до розчину L-пролінамиду (14 мг) та триетиламіну (19 мкл) в ДМФА (147 мкл). Реакційну суміш перемішують при 40 °С впродовж 2 год. та очищують за допомогою препаративної хроматографії з оберненою фазою. Фракції, що містять шукану сполуку, поглинають за допомогою 300 мг BondElut SPE картриджа SCX та потім виділяють 7М розчином амонію в метанолі (1 мл). Шукану сполуку отримують шляхом випарювання. ІЕР-МС: М+Н 404 та М-Н 402.

Стадія 63.1: [5-(2-Діетиламінопіримідин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-амід імідазол-1-карбонової кислоти



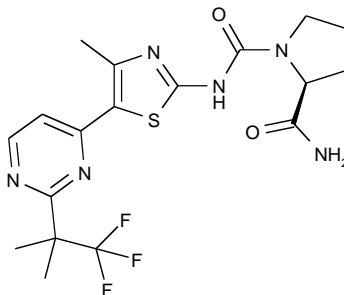
Карбонілдіімідазол (437 мг) при кімнатній температурі додають до розчину [4-(2-аміно-4-метилтіазол-5-іл)-піримідин-2-іл]-діетиламіну (355 мг) та триетиламіну (207 мкл) в ДМФА (1,4 мл) та потім нагрівають впродовж 18 год. при 80 °С. Реакційну суміш випарюють та розтирають з хлороформом. Шукану сполуку виділяють фільтруванням.

Стадія 63.2: [4-(2-Аміно-4-метилтіазол-5-іл)-піримідин-2-іл]-діетиламін



Порошкоподібний гідроксид натрію (150 мг) додають до розчину N'-[5-(3-диметиламіноакрилоїл)-4-метилтіазол-2-іл]-N, N-диметилформамідину (0,5 г, отримують, як це описано в публікації S. Wang et al. J. Med. Chem. 2004, 47, 1662-1675.) та 1,1-діетилгуанідину (259 мг) в 2-метоксиетанолі (1,9 мл) та суміш при перемішуванні нагрівають при 125 °С впродовж 1 год. Реакційну суміш концентрують у вакуумі та очищують за допомогою хроматографії з нормальною фазою, елюент; ДХМ/ЕtОAc, та отримують шукану сполуку. ІЕР-МС: М+Н 264 та М-Н 262.

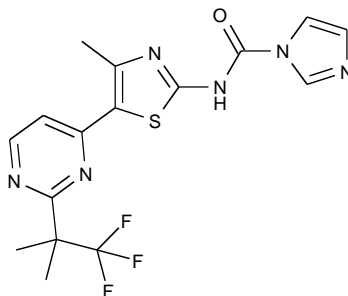
Приклад 64: 2-Амід, 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід) (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти



{4-Метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід імідазол-1-карбонової кислоти (69 мг) при кімнатній температурі при перемішуванні додають до розчину L-

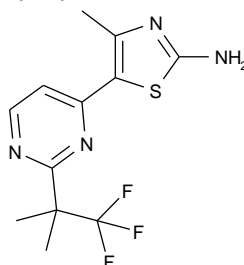
пролінаміду (22 мг) та триетиламіну (53 мг) в ДМФА (1 мл). Реакційну суміш витримують при кімнатній температурі впродовж 22 год., потім випарюють та після кристалізації з метанолу (2 мл) та води (1 мл) отримують шукану сполуку у вигляді білої твердої речовини. ВЕРХ/МС: час утримання 1,80 хвил., М+Н 443,1 та М-Н 441,2.

- 5 Стадія 64.1: {4-Метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід імідазол-1-карбонової кислоти



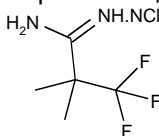
- 10 Карбонілдіімідазол (38 мг) при кімнатній температурі додають до розчину 4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну (65 мг) в ДХМ (1 мл) та ДМФА (0,2 мл) та потім витримують впродовж 18 год. при 25 °С. Після охолодження шукану сполуку виділяють фільтруванням.

Стадія 64.2: 4-Метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іламін



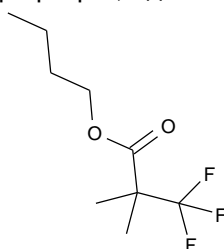
- 15 Порошкоподібний гідроксид натрію (0,42 г) додають до розчину N'-[5-((E)-3-диметиламіноакрилоїл)-4-метилтіазол-2-іл]-N, N-диметилформамідину (0,93 г, отримують, як це описано в публікації S. Wang et al. J. Med. Chem. 2004, 47, 1662-1675.) та 3,3,3-трифтор-2,2-диметилпропіонамідінгідрохлориду (0,54 г) в 2-метоксиетанолі (7 мл) та суміш при перемішуванні нагрівають при 125 °С впродовж 1 год. Реакційну суміш охолоджують, додають воду та водний шар 4 рази екстрагують 10 % метанолом в дихлорметані. Об'єднані органічні шари очищують за допомогою хроматографії з оберненою фазою та до фракцій, що містять шукану сполуку, додають бікарбонат натрію та отримують білий осад, який збирають фільтруванням. ВЕРХ/МС: час утримання 1,47 хвил., М+Н 303,1.

Стадія 64.3: 3,3,3-Трифтор-2,2-диметилпропіонамідінгідрохлорид



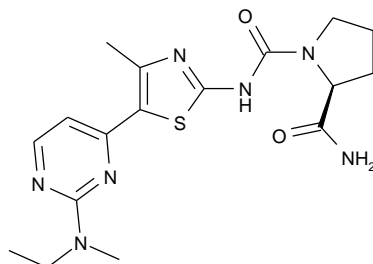
- 25 Шукану сполуку синтезують за методикою, описаною на стадії 61.3, з наступними змінами. Бутиловий ефір 3,3,3-трифтор-2,2-диметилпропіонової кислоти використовують замість бутилового ефіру d₉-2,2-диметилпропіонової кислоти та суміш перемішують впродовж 3 днів при 80 °С. Неочищений продукт переносять в ДХМ, обробляють невеликою кількістю HCl в EtOH та випарюють. Залишок розтирають з ДХМ, фільтрують та сушать та отримують шукану сполуку у вигляді майже білої твердої речовини.

Стадія 64.4: Бутиловий ефір 3,3,3-трифтор-2,2-диметилпропіонової кислоти



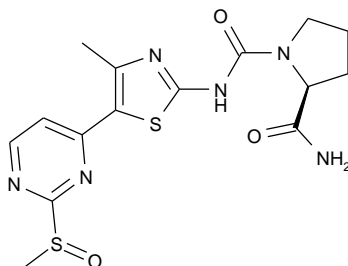
3,3,3-Трифтор-2,2-диметилпропіонову кислоту (3,0 г, 19,2 ммоль) та краплю ДМФА розчиняють в 30 мл ДХМ при КТ по краплям обробляють оксалілхлоридом (1,85 мл, 21,1 ммоль). Через 2 год. припиняється виділення газу та суміш повільно обробляють триетиламіном (5,36 мл, 38,4 ммоль), потім н-бутанолом (2,1 мл, 23 ммоль). Суміш перемішують впродовж ночі, розчинник випарюють та залишок перемішують з гексанами. Тверду речовину відфільтровують та фільтрат випарюють та отримують коричнево-червоне масло. Перегонка в апараті Кугельрора (10 мбар, температура печі 60-80 °С) забезпечує одержання шуканої сполуки у вигляді безбарвної рідини.

Приклад 65: 2-Амід, 1-({5-[2-(етилметиламіно)-піримідин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іл}-амід) (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти



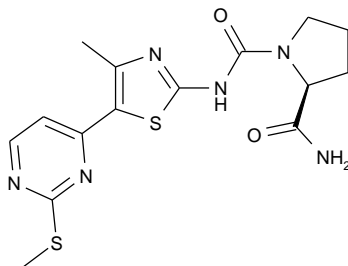
Суміш (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід, 1-{{5-(2-метансульфінілпіримідин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл}-аміду} (60 мг) та N-етилметиламіну (45 мг) нагрівають впродовж 18 год. при 80 °С в герметизованій пробірці. Потім неочищений продукт очищують за допомогою препаративної хроматографії з оберненою фазою. Фракції, що містять шукану сполуку, поглинають за допомогою 300 мг BondElut SPE картриджа SCX та потім виділяють 7М розчином амонію в метанолі (1 мл). Шукану сполуку отримують шляхом випарювання. ІЕР-МС: М+Н 390.

Стадія 65.1: 2-Амід, 1-{{5-(2-метансульфінілпіримідин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл}-амід} (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти



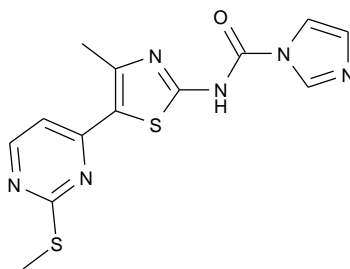
Мета-хлорпероксибензойну кислоту (0,50 г) при 0 °С додають до розчину 2-аміду, 1-{{4-метил-5-(2-метилсульфанілпіримідин-4-іл)-тіазол-2-іл}-аміду} (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти (1,7 г) в дихлорметані (8,5 мл). Через 1 год. реакційну суміш випарюють та очищують за допомогою хроматографії з нормальною фазою, при елюванні сумішшю дихлорметан/метанол в градієнтному режимі та отримують шукану сполуку у вигляді жовтої твердої речовини. ІЕР-МС: М+Н 395 та М-Н 393.

Стадія 65.2: 2-Амід, 1-{{4-метил-5-(2-метилсульфанілпіримідин-4-іл)-тіазол-2-іл}-амід} (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти



[4-Метил-5-(2-метилсульфанілпіримідин-4-іл)-тіазол-2-іл]-амід імідазол-1-карбонової кислоти (1,0 г) при кімнатній температурі при перемішуванні додають до розчину L-пролінаміду (379 мг) та триетиламіну (0,51 мл) в ДМФА (3 мл). Реакційну суміш перемішують при 40 °С впродовж 2 год., потім випарюють та після осадження дихлорметаном та водою отримують шукану сполуку у вигляді помаранчевої твердої речовини. ІЕР-МС: М+Н 379 та М-Н 377.

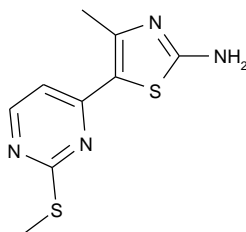
Стадія 65.3: [4-Метил-5-(2-метилсульфанілпіримідин-4-іл)-тіазол-2-іл]-амід імідазол-1-карбонової кислоти



Карбонілдіімідазол (1,77 г) при кімнатній температурі додають до розчину 4-метил-5-(2-метилсульфанілпіримідин-4-іл)-тіазол-2-іламіну (1,3 г) в триетиламіні (0,84 мл) та ДМФА (5,5 мл) та перемішують впродовж 2 год. при 80 °С. Після охолодження шукану сполуку виділяють фільтруванням.

5

Стадія 65.4: 4-Метил-5-(2-метилсульфанілпіримідин-4-іл)-тіазол-2-іламін

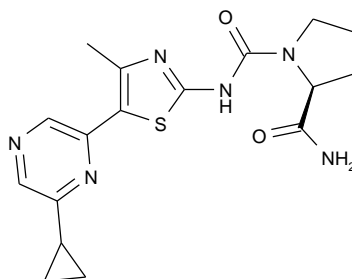


Порошкоподібний гідроксид натрію (1,09 г) додають до розчину N'-[5-(3-диметиламіноакрилоїл)-4-метилтіазол-2-іл]-N, N-диметилформамідину (2,0 г, отримують, як це описано в публікації S. Wang et al. J. Med. Chem. 2004, 47, 1662-1675.) та тіосечовини (0,57 г) у етанолі (25 мл) та суміш при перемішуванні кип'ятять із зворотним холодильником впродовж 3 год. Реакційну суміш охолоджують до кімнатної температури та додають воду, потім метилйодид (0,47 мл). Через 1 год. при кімнатній температурі етанол видаляють шляхом випарювання та додають воду та значення рН доводять до 7 2 н. водним розчином хлористоводневої кислоти. Потім шукану сполуку виділяють фільтруванням. ІЕР-МС: М+Н 239 та М-Н 237.

10

15

Приклад 66: 2-Амід, 1-{[5-(6-циклопропілпіразин-2-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-амід} (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти

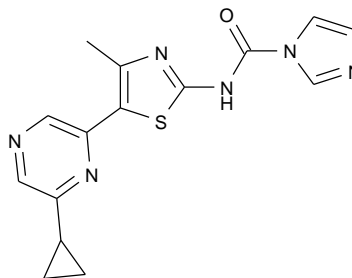


20

[5-(6-Циклопропілпіразин-2-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-амід імідазол-1-карбонової кислоти (78 мг) при кімнатній температурі при перемішуванні додають до розчину L-пролінаміду (30 мг) та триетиламіну (83 мкл) в ДМФА (1 мл). Реакційну суміш витримують при кімнатній температурі впродовж 18 год., випарюють та після кристалізації з метанолу (1 мл) та води (0,5 мл) отримують шукану сполуку у вигляді жовтувато-білої твердої речовини. ВЕРХ/МС: час утримання 1,40 хвил., М+Н 373,1 та М-Н 371,3.

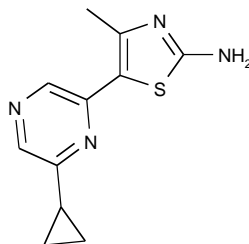
25

Стадія 66.1 [5-(6-Циклопропілпіразин-2-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-амід: імідазол-1-карбонової кислоти



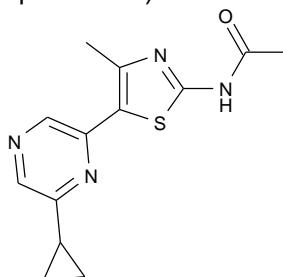
Карбонілдіімідазол (74 мг) при кімнатній температурі додають до розчину 5-(6-циклопропілпіразин-2-іл)-4-метилтіазол-2-іламіну (96 мг) в ДМФА (2 мл) та витримують впродовж 18 год. при кімнатній температурі. Реакційну суміш фільтрують, промивають дихлорметаном та отримують шукану сполуку.

5 Стадія 66.2: 5-(6-Циклопропілпіразин-2-іл)-4-метилтіазол-2-іламін



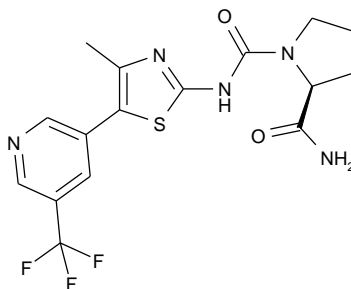
Концентровану хлористоводневу кислоту (0,4 мл) при кімнатній температурі додають до N-[5-(6-циклопропілпіразин-2-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-ацетаміду (120 мг) у етанолі (9 мл) та суміш кип'ятять із зворотним холодильником впродовж 18 год. Охолоджену реакційну суміш випарюють, нейтралізують водним розчином гідрокарбонату натрію та екстрагують 10 % метанолом в ДХМ. Об'єднані органічні екстракти сушать над сульфатом натрію та випарюють та отримують шукану сполуку. ВЕРХ/МС: час утримання 0,93 хвил., M+H 233,3.

Стадія 66.3: N-[5-(6-Циклопропілпіразин-2-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-ацетамід



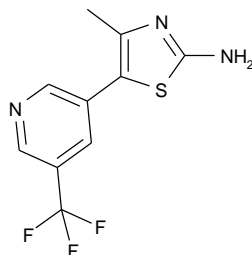
Аргон при кімнатній температурі впродовж 5 хвил. пропускають через суміш 2-циклопропіл-6-хлорпіразину (154 мг, отримують за методикою, описаною в публікації A. Fürstner et al. J. Am. Chem. Soc. 2002, 214, 13856-13863.), 2-ацетамідо-4-метилтіазолу (200 мг), ацетату паладію (24 мг), три-трет-бутилфосфонійтетрафторборату (61 мг) та карбонату цезію (678 мг) в ДМФА (3 мл). Реакційну суміш нагрівають в герметизованій посудині в атмосфері аргону впродовж 45 хвил. при 150 °C в мікрохвильовому апараті Biotage Initiator™. Реакційну суміш фільтрують та очищують за допомогою препаративної ВЕРХ. Фракції, що містять шукану сполуку, об'єднують та випарюють для видалення ацетонітрилу та шукану сполуку виділяють фільтруванням у вигляді бежевої твердої речовини. ВЕРХ/МС: час утримання 1,65 хвил., M+H 275,3.

Приклад 67: 2-Амід, 1-{[4-метил-5-(5-трифторметилпіридин-3-іл)-тіазол-2-іл]-амід} (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



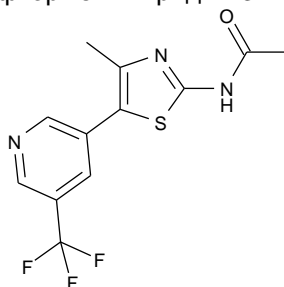
Карбонілдіімідазол (29 мг) при кімнатній температурі при перемішуванні додають до розчину 4-метил-5-(5-трифторметилпіридин-3-іл)-тіазол-2-іламіну (42 мг) та триетиламіну (50 мкл) в ДМФА (1 мл) та суміш витримують впродовж 18 год. при кімнатній температурі. Додають L-пролінамід (20 мг) та реакційну суміш витримують впродовж ще 8 год. при кімнатній температурі, випарюють та після кристалізації з метанолу (3 мл) та води (1,5 мл) отримують шукану сполуку у вигляді білої твердої речовини. ІЕР-МС: M+H 400.

Стадія 67.1: 4-Метил-5-(5-трифторметилпіридин-3-іл)-тіазол-2-іламін



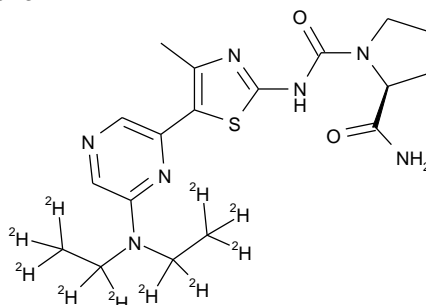
Триметилсилілхлорид (0,3 мл) при кімнатній температурі додають до N-[4-метил-5-(5-трифторметилпіридин-3-іл)-тіазол-2-іл]-ацетаміду (44 мг) у етанолі (2 мл) та суміш перемішують при кімнатній температурі впродовж 4,5 год. Потім реакційну суміш нагрівають при 50 °С впродовж 18 год., охолоджують, випарюють та після розтирання з діетиловим ефіром шукану сполуку виділяють фільтруванням.

Стадія 67.2: N-[4-Метил-5-(5-трифторметилпіридин-3-іл)-тіазол-2-іл]-ацетамід



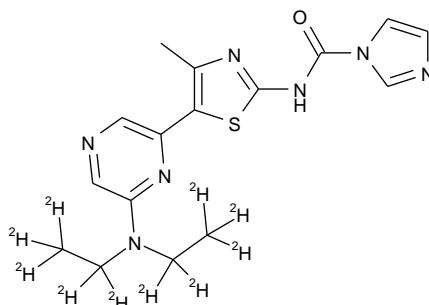
Аргон при кімнатній температурі впродовж 5 хвил. пропускають через суміш гідрохлориду 5-(трифторметил)-3-піридинборонової кислоти (263 мг, отримують, як це описано в WO 2007/134828.), 2-ацетиламіно-5-йод-4-метилтіазолу (260 мг, отримують, як це описано в WO 2006/125807), 1,1'-біс-(дифенілфосфіно)-фероцендихлорпаладію(II) (38 мг), карбонату натрію (488 мг) в ДМЕ (2,3 мл) та води (2,3 мл). Реакційну суміш нагрівають в герметизованій посудині в атмосфері аргону впродовж 30 хвил. при 80 °С та потім впродовж 60 хвил. при 80 °С в мікрохвильовому апараті Biotage Initiator™. Після охолодження реакційну суміш екстрагують за допомогою ДХМ, об'єднані органічні шари випарюють з силікагелем та очищують за допомогою хроматографії з нормальною фазою (елюент; градієнтний режим від ДХМ до 1:1 ДХМ: етилацетат). Потім фракції, що містять продукт, розтирають з метанолом (5 мл), ДМФА (0,3 мл) та водою (1,3 мл) та фільтрують та отримують шукану сполуку у вигляді бежевої твердої речовини.

Приклад 68: 2-Амід, 1-{[5-(6-d₁₀-діетиламінопіразин-2-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-амід} (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти



[5-(6-d₁₀-Діетиламінопіразин-2-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-амід (82 мг) імідазол-1-карбонової кислоти при кімнатній температурі при перемішуванні додають до розчину L-пролінамиду (28 мг) та триетиламіну (78 мкл) в ДМФА (1 мл). Реакційну суміш витримують при кімнатній температурі впродовж 14 год., випарюють та після кристалізації з метанолу (1 мл) та води (0,5 мл) отримують шукану сполуку у вигляді жовтувато-білої твердої речовини. ВЕРХ/МС: час утримання 1,41 хвил., М+Н 414,2 та М-Н 412,3.

Стадія 68.1: [5-(6-d₁₀-Діетиламінопіразин-2-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-амід імідазол-1-карбонової кислоти

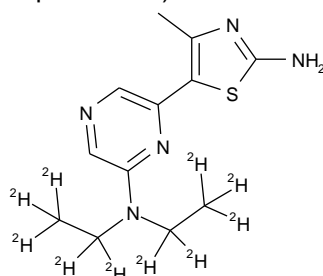


Карбонілдіімідазол (78 мг) при кімнатній температурі додають до розчину 5-(6-d₁₀-діетиламінопіразин-2-іл)-4-метилтіазол-2-іламіну (121 мг) в ДМФА (2 мл) та витримують впродовж 3,5 год. при кімнатній температурі. Реакційну суміш фільтрують, промивають

5

дихлорметаном та отримують шукану сполуку.

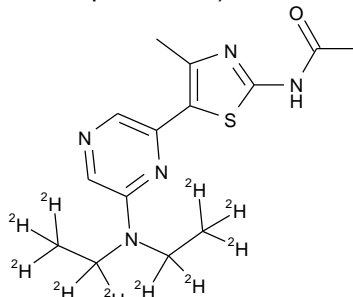
Стадія 68.2: 5-(6-d₁₀-Діетиламінопіразин-2-іл)-4-метилтіазол-2-іламін



Концентровану хлористоводневу кислоту (0,4 мл) при кімнатній температурі додають до N-[5-(6-d₁₀-діетиламінопіразин-2-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-ацетаміду (140 мг) у етанолі (9 мл) та суміш кип'ятять із зворотним холодильником впродовж 40 год. Охолоджену реакційну суміш випарюють, нейтралізують водним розчином гідрокарбонату натрію та екстрагують 10 % метанолом в ДХМ. Об'єднані органічні екстракти сушать над сульфатом натрію та випарюють та отримують шукану сполуку. ВЕРХ/МС: час утримання 1,17 хвил., M+H 274,4.

10

Стадія 68.3: N-[5-(6-d₁₀-Діетиламінопіразин-2-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-ацетамід

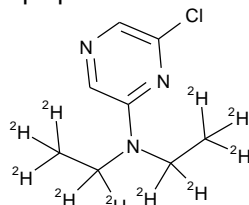


15

Аргон при кімнатній температурі впродовж 5 хвил. пропускають через суміш 2-d₁₀-діетиламіно-6-хлорпіразину (293 мг), 2-ацетамідо-4-метилтіазолу (300 мг), ацетату паладію (24 мг), три-трет-бутилфосфонітетрафторборату (61 мг) та карбонату цезію (1,02 г) в ДМФА (3 мл). Реакційну суміш нагрівають в герметизованій посудині в атмосфері аргону впродовж 45 хвил. при 150 °C в мікрохвильовому апараті Biotage Initiator™, фільтрують та очищують за допомогою препаративної ВЕРХ. Фракції, що містять шукану сполуку, об'єднують та випарюють для видалення ацетонітрилу та шукану сполуку виділяють фільтруванням у вигляді бежевої твердої речовини. ВЕРХ/МС: час утримання 1,68 хвил., M+H 316,3.

20

Стадія 68.4: 2-d₁₀-Діетиламіно-6-хлорпіразин

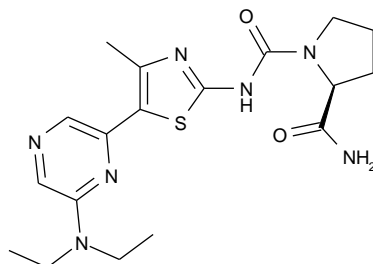


25

d₁₀-Діетиламін (0,5 г) при кімнатній температурі при перемішуванні додають до суміші 2,6-дихлорпіразину (0,93 г) та карбонату калію (1,41 г) в ацетонітрилі (4 мл). Потім реакційну суміш нагрівають при 55 °C впродовж 60 год., охолоджують, додають воду та потім екстрагують

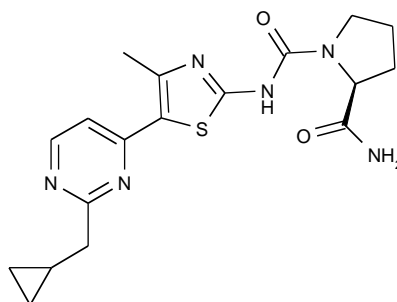
дихлорметаном. Об'єднані органічні екстракти сушать над сульфатом натрію, випарюють та очищують за допомогою хроматографії з нормальною фазою, елюент ДХМ, та отримують шукану сполуку. ВЕРХ/МС: час утримання 2,10 хвил., M+H 196,4 та 198,4.

5 Приклад 69: 2-Амід, 1-{{5-(6-діетиламінопіразин-2-іл)-4-метилтіазол-2-іл}-амід} (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



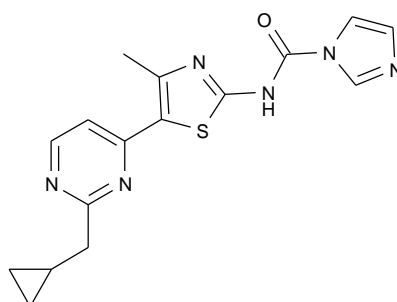
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 68, але з використанням діетиламіну замість d₁₀-діетиламіну. ВЕРХ/МС: час утримання 1,43 хвил., M+H 404,2 та 402,3.

10 Приклад 70: 2-Амід, 1-{{5-(2-циклопропілметилпіримідин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл}-амід} (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



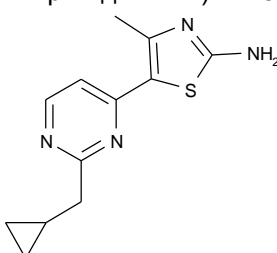
15 Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 42, але з використанням [5-(2-циклопропілметилпіримідин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-аміду імідазол-1-карбонової кислоти замість {4-метил-5-[2-(1-метилциклопропіл)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іл}-аміду імідазол-1-карбонової кислоти. Т. пл. 220-222 °С, ІЕР-МС [M+H]⁺ 387,1, ТШХ: R_f=0,2 (ДХМ/EtOH 95:5)

Стадія 70.1: [5-(2-Циклопропілметилпіримідин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-амід імідазол-1-карбонової кислоти



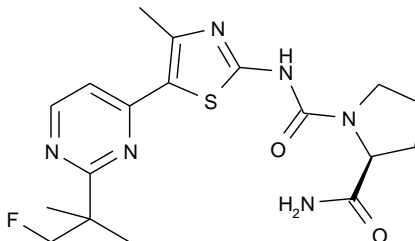
20 Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадії 42.1, але з використанням 5-(2-циклопропілметилпіримідин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іламіну замість 4-метил-5-[2-(1-метилциклопропіл)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну та реакційну суміш перемішують впродовж 15 год. Т. пл. 240-243 °С, ІЕР-МС [M+H]⁺ 305,1, ТШХ: R_f=0,35 (ДХМ/EtOH 95:5).

25 Стадія 70.2: 5-(2-Циклопропілметилпіримідин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іламін



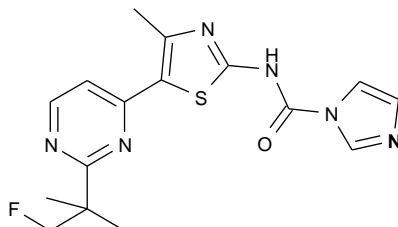
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадії 42.2, але з використанням 2-циклопропілацетамідінгідрохлориду замість 1-метилциклопропанкарбоксамідінгідрохлориду. Т. пл. 198-200 °С, ІЕР-МС $[M+H]^+$ 247,1, ТШХ: $R_f=0,25$ (ДХМ/ЕтОН 95:5).

5 Приклад 71: 2-Амід, 1-({5-[2-(2-фтор-1,1-диметилетил)-піримідин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іл}-амід) (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



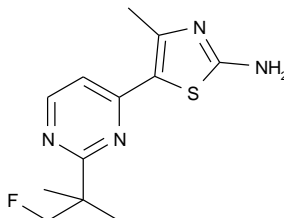
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 42, але з використанням {5-[2-(2-фтор-1,1-диметилетил)-піримідин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іл}-аміду імідазол-1-карбонової кислоти замість {4-метил-5-[2-(1-метилциклопропіл)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іл}-аміду імідазол-1-карбонової кислоти. Т. пл. 187-190 °С, ІЕР-МС $[M+H]^+$ 407,1, ТШХ: $R_f=0,3$ (ДХМ/ЕтОН 95:5)

10 Стадія 71.1: {5-[2-(2-Фтор-1,1-диметилетил)-піримідин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іл}-амід імідазол-1-карбонової кислоти



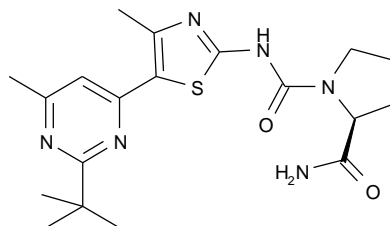
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадії 42.1, але з використанням 5-[2-(2-фтор-1,1-диметилетил)-піримідин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іламіну замість 4-метил-5-[2-(1-метилциклопропіл)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну та реакційну суміш перемішують впродовж 16 год. при 80 °С.

15 Стадія 71.2: 5-[2-(2-Фтор-1,1-диметилетил)-піримідин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іламін



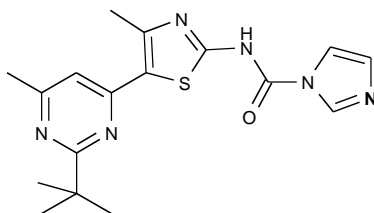
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадії 42.2, але з використанням 3-фтор-2,2-диметилпропіонамідінгідрохлориду замість 1-метилциклопропанкарбоксамідінгідрохлориду. ІЕР-МС $[M+H]^+$ 267,1, ТШХ: $R_f=0,4$ (ДХМ/ЕтОН 95:5).

25 Приклад 72: 2-Амід, 1-({5-(2-трет-бутил-6-метилпіримідин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл}-амід) (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти



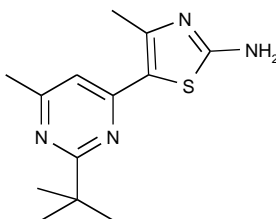
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 42, але з використанням [5-(2-трет-бутил-6-метилпіримідин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-аміду імідазол-1-карбонової кислоти замість {4-метил-5-[2-(1-метилциклопропіл)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іл}-аміду імідазол-1-карбонової кислоти. Т. пл. 197-199 °С, ІЕР-МС $[M+H]^+$ 403,1, ТШХ: $R_f=0,3$ (ДХМ/ЕтОН 95:5)

Стадія 72.1: [5-(2-Трет-бутил-6-метилпіримідин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-амід імідазол-1-карбонової кислоти



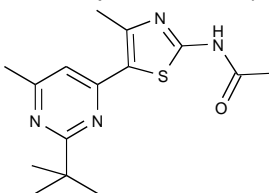
- 5 Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадії 42.1, але з використанням 5-(2-трет-бутил-6-метилпіримідин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іламіну замість 4-метил-5-[2-(1-метилциклопропіл)-піримідин-4-іл]-тіазол-2-іламіну та реакційну суміш перемішують впродовж 16 год. ІЕР-МС $[M-H]^-$ 355,2.

Стадія 72.2: 5-(2-трет-Бутил-6-метилпіримідин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іламін



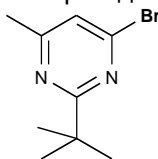
- 10 Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадії 1.2, але з використанням N-[5-(2-трет-бутил-6-метилпіримідин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-ацетаміду замість N-[5-(2-трет-бутилпіридин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-ацетаміду та з використанням 2 н. HCl. Реакційну суміш перемішують впродовж 16 год. при КТ та потім впродовж 3 год. при 90 °С. ІЕР-МС $[M+H]^+$ 263,1.

- 15 Стадія 72.3: N-[5-(2-Трет-бутил-6-метилпіримідин-4-іл)-4-метилтіазол-2-іл]-ацетамід



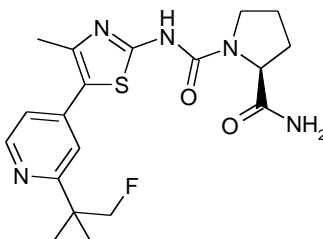
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадії 1.3, але з використанням 4-бром-2-трет-бутил-6-метилпіримідину замість 4-бром-2-трет-бутилпіридину. ІЕР-МС $[M+H]^+$ 305,2.

- 20 Стадія 72.4: 4-Бром-2-трет-бутил-6-метилпіримідин



Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадії 1.4, але з використанням 2-трет-бутил-6-метил-3Н-піримідин-4-ону замість 2-трет-бутил-1Н-піридин-4-ону. ІЕР-МС $[M+H]^+$ 229/231,0. ТШХ: $R_f=0,58$ (гексани/ДХМ 7:3)

- 25 Приклад 73: 2-Амід, 1-({5-[2-(2-фтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-4-метилтіазол-2-іл}-амід) (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти

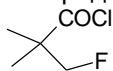


- 30 Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною в прикладі 1, але з наступними змінами. В прикладі 1 реакційну суміш перемішують впродовж 6 год. при КТ. На стадії 1.1 реакційну суміш перемішують впродовж 15 год. при кип'ятінні із зворотним

холодильником. На стадії 1.2 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 100 °С та після зупинки реакції екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.3 реакційну суміш перемішують впродовж 4 год. при 120 °С. На стадії 1.4 реакційну суміш перемішують впродовж 30 хвил. при 85 °С та після зупинки реакції екстрагують за допомогою EtOAc. На стадії 1.5 реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. при 70 °С та розтирання з MeOH не проводять. На стадії 1.6 неочищений продукт не очищують. На стадії 1.7 використовують 3-фтор-2,2-диметилпропіонілхлорид (стадія 76.1).

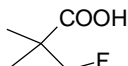
Шукана сполука: IEP-МС: 406,1 [M+H]⁺; t_R=2,20 хвил. (система 1); ТШХ: R_f=0,47 (ДХМ/MeOH, 9:1).

Стадія 73.1: 3-Фтор-2,2-диметилпропіонілхлорид



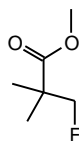
Шукану сполуку отримують за аналогією з методикою, описаною на стадії 5.1, але з використанням 3-фтор-2,2-диметилпропіонової кислоти (стадія 73.2).

Стадія 73.2: 3-Фтор-2,2-диметилпропіонова кислота



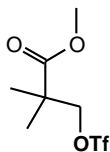
Розчин 6,9 г (38,6 ммоль) метилового ефіру 3-фтор-2,2-диметилпропіонової кислоти в 30 мл метанолу обробляють за допомогою 38,6 мл (77 ммоль) 2 н. NaOH та суміш кип'ятять із зворотним холодильником впродовж 3 год. Суміш охолоджують до КТ та розчинник випарюють. Залишок піддають розподіленню між водою та ДХМ. Водну фазу підкислюють шляхом додавання 50 мл 2 н. HCl та екстрагують етилацетатом. Органічну фазу промивають сольовим розчином, сушать над сульфатом натрію та випарюють. Безбарвний залишок перемішують з гексанами, нерозчинну речовину видаляють фільтруванням та фільтрат випарюють та отримують шукану сполуку у вигляді безбарвної твердої речовини. IEP-МС: 119,0 [M-H]⁻.

Стадія 73.3: Метилловий ефір 3-фтор-2,2-диметилпропіонової кислоти



27 мл 1 М Розчину тетрабутиламонійфториду в ТГФ повільно та при охолодженні льодом додають до розчину 7,25 г (27,4 ммоль) метилового ефіру 2,2-диметил-3-трифторметансульфонілоксипропіонової кислоти в 150 мл ТГФ. Отриманий розчин перемішують впродовж 6 год. при 0 °С та потім впродовж 10 год. при КТ. Розчинник обережно випарюють та залишок піддають розподіленню між ДХМ та сольовим розчином. Органічну фазу промивають сольовим розчином, сушать над сульфатом натрію та обережно випарюють. Коричневе масло переганяють в апараті Кугельрора (температура печі від 120 до 150 °С) та отримують шукану сполуку у вигляді безбарвної рідини.

Стадія 73.4: Метилловий ефір 2,2-диметил-3-трифторметансульфоніл-оксипропіонової кислоти



До розчину 3,64 г (27,5 ммоль) метилового ефіру 3-гідрокси-2,2-диметилпропіонової кислоти та 4,82 мл (41,3 ммоль) 2,6-лутидину в 50 мл сухого ДХМ при -70 °С та в атмосфері азоту повільно додають ангідрид трифторметансульфонової кислоти (5,12 мл, 30,3 ммоль). Жовтий розчин перемішують впродовж 5 хвил. при -70 °С, потім охолоджуючу баню видаляють та суміш перемішують впродовж 3 год. при КТ. Забарвлення переходить з жовтого в помаранчеве, потім в коричневе. Додають ДХМ (50 мл) та розчин двічі промивають за допомогою 2 н. HCl, сушать над сульфатом натрію та випарюють досуха. Коричневий залишок сушать у вакуумі та шукану сполуку використовують без додаткового очищення. ТШХ: R_f=0,72 (EtOAc/гексани 1:2).

Умови проведення аналітичної ВЕРХ:

Лінійний градієнтний режим 20-100 % розчинник А впродовж 5 хвил. + 1,5 хвил. 100 % розчинник А; детектування при 215 нм, швидкість потоку 1 мл/хвил. при 30 °С. Колонка: Nucleosil 100-3 C18 (70×4,0 мм). Розчинник А=CH₃CN+0,1 % ТФК; Розчинник В=H₂O+0,1 % ТФК.

Умови проведення МС:

Прилад: Micromass Platform II, елюент: 15 % метанолу у воді, що містить 0,2 % 25 % розчину гідроксиду амонію

Спектри ^1H -ЯМР знімали на спектрометрі Varian Mercury 400 у вказаних розчинниках. Абревіатури: br: широкий; s: синглет; d: дублет; t: триплет; q: квартет; част./млн: частин на мільйон.

Умови проведення ВЕРХ/МС:

Прилад: Hewlett Packard Agilent 1100 series, колонка: XBridge™ C18 2,5 мкм 3,0×30 мм, температура: 50 °С, елюент: 2-канальна система: канал А-5 % ацетонітрилу у воді, канал В - ацетонітрил, що містить 1,0 % мурашиної кислоти.

Час (хвил.)	Канал В, %	Швидкість потоку (мл/хвил.)
0	5	1,4
3,7	95	1,4
4,4	95	2,4
4,45	95	2,4

детектування: Agilent 1100 DAD 210-350 нм та Waters Micromass ZQ 2000 IEP+ та IEP-.

Препаративна ВЕРХ:

Прилад: препаративна система Gilson HPLC, колонка: Sunfire™ Prep C18 OBD™ 5 мкм 30×100 мм, температура: 25 °С, елюент: градієнтний режим 5-100 % ацетонітрилу в 0,05 % водному розчині трифтороцтової кислоти за 20 хвил., швидкість потоку: 30 мл/хвил., детектування: УФ 254 нм.

Абревіатури та скорочення:

BBr ₃	трибромід бора
^t BuP.NBF ₄	три-трет-бутилфосфінітетрафторборат
ДХМ	дихлорметан
ДІЕА	діізопропілетиламін
ДМАП	4-(диметиламіно)піридин
ДМЕ	1,2-диметоксиетан
ДМФА	диметилформамід
ДМП	1,3-диметил-3,4,5,6-тетрагідро-2-(1H)-піримідинон
ДМСО	диметилсульфоксид
Hex	гексан
л	літр(и)
LiHMDS	біс(триметилсиліл)амід літію
т. пл.	температура плавлення
РХСД	рідинна хроматографія середнього тиску
NBS	N-бромсукцинімід
NMP	1-метил-2-піролідон
PdCl ₂ (dppf)	[1,1'-біс(дифенілфосфіно)фероцен]дихлорпаладій(II)
Pd(PPh ₃) ₄	тетракіс(трифенілфосфін)паладій(0)
R _f	співвідношення фронтів (ТШХ)
КТ	кімнатна температура
ТФК	трифтороцтова кислота
ТГФ	тетрагідрофуран
ТШХ	тонкошарова хроматографія
t _R	час утримання

Приклад А: Ефективність як інгібіторів кінази PI3

Дослідження PI3K KinaseGlo: 50 нл Розведені сполуки дозували в чорні невеликого об'єму незв'язуючі виготовлені з полістиролу (NBS) 384-лункові планшети (Costar Cat. No. NBS#3676). L-а-Фосфатидилінозит (PI), що поставляється у вигляді розчину в метанолі концентрації 10 мг/мл, поміщали в скляну пробірку та сушили в потоці азоту. Потім його шляхом струшування повторно суспендували в 3 % розчині октилглюкозиду (ОГ) та зберігали при 4 °С. Люмінесцентний аналіз кінази KinaseGlo (Promega, Madison/WI, USA) являє собою гомогенну методику HTS визначення активності кінази шляхом кількісного визначення кількості АТФ (аденозинтрифосфат), що залишився в розчині після реакції кінази.

Додавали 5 мкл суміші PI/ОГ, що містить підтип PI3K (таблиця 1). Реакції кінази ініціювали шляхом додавання 5 мкл суміші АТФ, що містить в кінцевому об'ємі 10 мкл 10 мМ Tris-HCl [Tris - тріс(гідроксиметиламінометан)] рН 7,5, 3 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl, 0,05 % ХЛАПС (3-((3-холамідопропіл)диметиламоній)-1-пропансульфонова кислота), 1 мМ ДТТ (дитіотреїтол) та 1 мкл АТФ, та проводили при кімнатній температурі. Реакції зупиняли за допомогою 10 мкл KinaseGlo та через 10 хвил. планшети зчитували за допомогою пристрою для зчитування Synergy2 при часі інтегрування, рівному 0,1 с/лунку. Для 100 % інгібування реакції кінази в планшетах для досліджень додавали 2,5 мкл інгібітору рап-класу 1 PI3 кінази (стандарт), а рівне 0 % інгібування забезпечували шляхом використання розчинника з розріджувачем (90 % ДМСО у воді). Стандарт використовували як контрольну сполуку та по 2 рази поміщали у всі планшети для дослідження у вигляді 16 розведень.

Таблиця 1

Дослідження PI3Ks за допомогою KinaseGlo: умови проведення дослідження та реагенти

Об'єм (10 мкл)	Вміст ферменту (нМ)	АТФ (мкМ)	PI/ОГ (мкМ/мкг/мл)	NaCl (мМ)	Mg ²⁺ (мМ)	ХЛАПС (%)	ДТТ (мМ)	Час (хвил)
PI3Ka	10	1	11/10	50	3	0,05	1	30
PI3Kβ	25	1	11/10	50	3	0,05	1	30
PI3Kγ	150	1	22/20	50	3	0,05	1	90
PI3Kδ	10	1	11/10	50	3	0,05	1	30

Клонування PI3K

Конструкції PI3Kα, PI3Kβ та PI3Kδ являють собою злиття домену р85α іSH2 та відповідних ізоформ р110. Фрагмент р85α та гени ізоформ р110 генерували за допомогою ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція) з першої спіралі кДНК, генерованої при КТ за допомогою ПЛР з наявною у продажу РНК, виділеною з плаценти, сім'яника та головного мозку, як це описано нижче. Конструкцію PI3Kγ отримували з Roger Williams lab, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK (November, 2003) та вона описана в публікації (Pacold, Michael E.; Suire, Sabine; Perisic, Olga; Lara-Gonzalez, Samuel; Davis, Colin T.; Walker, Edward H.; Hawkins, Phillip T.; Stephens, Len; Eccleston, John F.; Williams, Roger L. Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma. Cell (2000), 103(6), 931-943).

Конструкції PI3Kα та білки

PI3Kα wt	BV1075	p85iSH2(461-568)-GGGGGGGGGGGGG-p110α(21-1068)-His
----------	--------	---

BV1075: Конструкцію для бакуловірусу BV-1075 генерували шляхом лігування трьох фрагментів, що включає фрагмент р85 та фрагмент р110α, клоновані у вектор рBlueBac4.5. Фрагмент р85 отримували з плазмиди р1661-2, ферментованої за допомогою Nhe/Spe. Фрагмент р110α, отриманий з клону перевіряли шляхом секвенування та використовували в LR410 як фрагмент SpeI/HindIII. Для генерації вектору експресії LR410 бакуловірусу використовували реакцію Gateway LR для переносу вставки в Gateway адаптований рBlueBac4.5 (Invitrogen). Вектор для клонування, рBlueBac4.5 (Invitrogen) ферментували за допомогою Nhe/HindIII. Це давало конструкцію PED 153.8. Компонент р85 (iSH2) генерували за допомогою ПЛР з використанням ORF 318 (описано вище) як матриці та одного прямого праймеру KAC1028 (5'-gctagcatgcgagaatatgatagat-tatatgaag-aatatacc) та двох зворотних праймерів, KAC1029 (5'-gcctccaccac-ctccgctg-gttaaagctgttcatacggttgc) та KAC1039 (5'-tactagtc-cgcctccaccacctccgctccaccacctccgss). Ці два зворотних праймери перекриваються та вводять 12х лінкер Gly та N-кінцеву послідовність гену р110α в сайт SpeI. Лінкер 12х Gly замінює одиничний лінкер Gly в конструкції BV1052. Фрагмент ПЛР клонували в рCR2.1 TOPO (Invitrogen). За допомогою секвенування встановлено, що з отриманих клонів коректним був р1661-2. Цю плазмиду ферментували за допомогою Nhe та SpeI та отриманий фрагмент виділяли за допомогою гелю та очищали для субклонування.

Фрагмент для клонування р110α генерували за допомогою ферментації клону LR410 (див. вище) за допомогою Spe I та HindIII. Сайт SpeI знаходиться в кодуючій області гену р110α. Отриманий фрагмент виділяли за допомогою гелю та очищували для субклонування. Вектор для клонування, рBlueBac4.5 (Invitrogen) отримували шляхом ферментування за допомогою Nhe та HindIII. Розрізаний вектор очищували на колонці Qiagen та потім дефосфорильовали за

допомогою лужної фосфатази кишечнику теля (CIP) (BioLabs). Після закінчення реакції з CIP розрізаний вектор повторно очищували на колонці та отримували кінцевий вектор. Лігування трьох фрагментів проводили з використанням лігази Roche Rapid у відповідності із специфікаціями постачальника. Кінцеву плазмиду перевіряли за допомогою секвенування.

Домен кінази.

Послідовність білків для BV 1075:

```

1 MREYDRLYEE YTRTSQEIQM KRTAIEAFNE TIKIFEEQCQ TQERYKEYI EKFKREGNEK
61 EIQRIMHNYD KLKSRISIEI DSRRLLEEDL KKQAAEYREI DKRMNSIKPG GGGGGGGGGG
121 GLVECLLPNG MIVTLECLRE ATLITIKHEL FKEARKYPLH QLLQDESSYI FVSVTQEAER
181 EEFDETTRRL CDLRLFQPFV KVIPVGNRE EKILNREIGF AIGMPVCEFD MVKDPVQDF
241 RRNILNVCKE AVDLRDLNSP HSRAMYVYPP NVESPELKP HIYNKLDKGQ IIVVIWVIVS
301 PNNDKQKYTL KINHDCVPEQ VIAEAIKKKT RSMLLSSEQL KLCVLEYQGGK YILKVCGCDE
361 YFLEKYPLSQ YKYIRSCIML GRMPNLMMLA KESLYSQLPM DCFTMPSYSR RISTATPYMN
421 GETSTKSLWV INSALRIKIL CATYVNVNIR DIDKIYVRTG IYHGGEPLCD NVNTQRVPCS
481 NPRWNEWLNY DIYIPDLPR ARLCLSICSV KGRKGAKKEH CPLAWGNINL FDYTDTLVSG
541 KMALNLWPVP HGLEDLLNPI GVTGSNPKE TPCLELEFDW FSSVVKFPDM
SVIEEHANWS
601 VSREAGFSYS HAGLSNRLAR DNELRENDKE QLKAISTRDP LSEITEQEKD FLWSHRHYCV
661 TIPEILPKLL LSVKWNSRDE VAQMYCLVKD WPPIKPEQAM ELLDCNYPDP MVRGFAVRCL
721 EKYLTDKLS QYLIQLVQVL KYEQYLDNLL VRFLKKALT NQRIGHFFFW HLKSEMHNKT
781 VSQRFGLLE SYCRACGMYL KHLNRQVEAM EKILNLTDL KQEKKDETQK VQMKFLVEQM
841 RRPDFMDALQ GFLSPLNPAH QLGNLRLLEC RIMSSAKRPL WLNWENPDIM SELLFQNNEI
901 IFKNGDDLRLQ DMLTLQIIRI MENIWQNNQGL DLRMLPYGCL SIGDCVGLIE VVRNSHTIMQ
961 IQCKGGLKGA LQFNSHTLHQ WLKDKNKGEI YDAAIDLFTR SCAGYCVATF ILGIGDRHNS
1021 NIMVKDDGQL FHIDFGHFLD HKKKKFGYKR ERVPFVLTQD FLVIVSKGAQ ECTKTREFER
1081 FQEMCYKAYL AIRQHANLFI NLFSSMMLGSG MPELQSFDDI AYIRKTLALD KTEQEALYF
1141 MKQMNDANHG GWTTKMDWIF HTIKQHALNE LGGAHHHHHH (SEQ ID NO: 4)

```

Конструкції PI3K β та білки

PI3K β	BV949	p85iSH2(461-N58K-568)-GGGGGG-p110 β (2-1070)-His
--------------	-------	--

BV949: Продукти ПЛР для внутрішнього домену SH2 (iSH2) субодиниць p85 PI3K α , PI3K β та PI3K δ та для повнорозмірної субодиниці p110 β генерували та піддавали злиттю за допомогою ПЛР, що перекривається. Продукт iSH2 ПЛР отримували з першої спіралі кДНК, генерованої при КТ за допомогою ПЛР з наявною у продажу РНК людини, виділеною з плаценти, сім'янику та головного мозку (Clontech), спочатку з використанням праймерів gwG130-p01 (5'-CGAGAATATGATAGATTATATGAAGAAT-3') та gwG130-p02 (5'-TGGTTT-AATGCTGTTTCATACGTTTGTCAAT-3'). Потім, при вторинній реакції ПЛР отримані за допомогою Gateway рекомбінацію сайтів AttB1 та лінкерні послідовності додавали відповідно на 5'-кінець та 3'-кінець фрагменту p85 iSH2 з використанням праймерів gwG130-p03 (5'-GGGACAAGTT-TGTACAAAAAAGCAGGCTACGAAGGAGATATACATATGCGAGAATATGATAGATTATATGAAGAAT-3') та gwG130-p05 (5'-ACTGAAGCATCCTCCTC-CTCCTCCT-CCTGGTTTAATGCTGTTTCATACGTTTGTGTC-3'). Фрагмент p110 β отримували за допомогою ПЛР з використанням як матрицю клону p110 β (з невідомого джерела, послідовність перевірена) з використанням праймерів gwG130-p04 (5'-ATTAAACCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGATGCTT-CAGTTTCATAATGCCTCCTGCT-3'), який містить лінкерні послідовності та 5'-кінець p110 β , та gwG130-p06 (5'-AGCTCCGTGATGGTGATGGTGATGTGCTCCAGATC-TGTAGTCTTTCCGAA-CTGTGTG-3'), який містить послідовності 3'-кінця p110- β , підданого злиттю з гістидиновою міткою. Зборку білку злиття p85-iSH2/p110 β проводили за допомогою ПЛР реакції лінкерів, що перекривається, на 3'-кінці фрагменту iSH2 та 5'-кінці фрагменту p110 β з використанням вказаного вище праймеру gwG130-p03 та праймеру, що містить гістидинову мітку, що перекривається, та AttB2 рекомбінаційну послідовність (5'-GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG-TTAAAGCTCCGTGATGGTGATGGTGATGTGCTCC-3'). Цей кінцевий продукт в реакції Gateway (Invitrogen) OR повторно об'єднували в донорний вектор pDONR201 (Invitrogen) для одержання внутрішнього клону ORF253. Цей клон перевіряли шляхом секвенування та використовували в реакції Gateway LR (Invitrogen) для переносу вставки в адаптований за допомогою Gateway вектор pBlueBac4.5 (Invitrogen) для генерації вектору експресії LR280 бакуловірусу. Цей LR280 містив мутацію амінокислоти в послідовності p85.

Домен кінази.

Послідовність білків для BV949:

1 MREYDRLYEE YTRTSQEIQM KRTAIEAFNE TIKIFEEQCQ TQERYKEYI EKFKREGKEK
 61 EIQRMHNYD KLKSRISIEI DSRRRLEEDL KKQAAEYREI DKRMNSIKPG GGGGGCFSFI
 121 MPPAMADILD IWAVIDSQIAS DGSIPVDFLL PTGIYIQLEV PREATISYIK QMLWKQVHNY
 5 181 PMFNLLMDID SYMFACVNQT AVYEELEDET RRLCDVRPFL PVLKLVTRSC DPGEKLDISKI
 241 GVLIGKGLHE FDSLKDPEVN EFRKMRKFS EEKILSLVGL SWMDWLKQTY PPEHEPSIPE
 301 NLEDKLYGGK LIVAVHFENC QDVFSFQVSP NMNPIKVNEL AIQRLTIHG KEDEVSPYDY
 361 VLQVSGRVEY VFGDHPLIQF QYIRNCVMNR ALPHFILVEC CKIKKMYEQE MIAIEAANR
 421 NSSNLPLPLP PKKTRIIHV WENNNPFQIV LVKGNKLNTE ETVKVHVRAG LFHGTELLCK
 10 481 TIVSSEVSGK NDHIWNEPLE FDINICDLPR MARLCFAVYA VLDKVKTKKS TKTINPSKYQ
 541 TIRKAGKVHY PVAWVNTMVF DFKGQLRTGD IILHSWSSFP DELEEMLNPM GTVQTNPYTE
 601 NATALHVKFP ENKKQPYYPY PFDKIEKAA EIASSDSANV SSRGGKKFLP VLKEILDRDP
 661 LSQLCENEMD LIWTLRQDCR EIFPQSLPKL LLSIKWNKLE DVAQLQALLQ IWPKLPPREA
 721 LELLDNFYPD QYVREYAVGC LRQMSDEELS QYLLQLVQVL KYEPFLDCAL SRFLLERALG
 15 781 NRRIGQFLFW HLRSEVHIPA VSVQFGVILE AYCRGSVGHM KVLKQVEAL NKLKTLSLI
 841 KLNVAKLNRA KGKEAMHTCL KQSAYREALS DLQSPLNPCV ILSELYVEKC KYMDSKMKPL
 901 WLVDYNNKVFG EDSVGVIFKN GDDLRLQDMLT LQMLRLMDLL WKEAGLDLRM
 LPYGCLATGD
 961 RSLGIEVVST SETIADIQLN SSNVAAAAAF NKDALLNWLK EYNSGDDLDR AIEEFTLSA
 20 1021 GYCVASYVLG IGDHSDNIM VKKTGQLFHI DFGHILGNFK SKFGIKRERV PFILTYDFIH
 1081 VIQQGKTGNT EKFGFRQCC EDAYLILRRH GNLFITLFAL MLTAGLPELT SVKDIQYLKD
 1141 SLALGKSEEE ALKQFKQKFD EALRESWTTK VNWMAHTVRK DYRSGAHHHH HHGA
 (SEQ ID NO: 12)
 Домен кінази.
 25 Конструкція PI3K γ та білок

PI3K γ	BV950	p110 γ (Δ 143-[Met144-1102])-His
---------------	-------	---

Конструкцію отримували з Roger Williams lab, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK (November, 2003). Опис конструкції приведено в публікації (Pacold, Michael E.; Suire, Sabine; Perisic, Olga; Lara-Gonzalez, Samuel; Davis, Colin T.; Walker, Edward H.; Hawkins, Phillip T.; Stephens, Len; Eccleston, John F.; Williams, Roger L. Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma. Cell (2000), 103(6), 931-943). В конструкції був відсутній N-кінцевий 144 аа.

Послідовність білків для BV950:

1 MSEESQAFQR QLTALIGYDV TDVSNVHDDE LEFTRRGLVT PRMAEVASRD PKLYAMHPWV
 61 TSKPLPEYLW KKIANNCFI VIHRRSTTSQT IKVSPDDTPG AILQSFFTKM AKKKSLMDIP
 121 ESQSEQDFVL RVCGRDEYLV GETPIKNFQW VRHCLKNAGEE IHVVLDTPPD
 PALDEVKKEE
 181 WPLVDDCTGV TGYHEQLTIH GKDHEVFTV SLWDCDRKFR VKIRGIDIPV LPRNTDLTVF
 40 241 VEANIQHGGQ VLCQRRTSPK PFTEEVLWNV WLEFSIKIKD LPKGALLNLQ IYCGKAPALS
 301 SKASAESPPS ESKGKVRLLY YVNLILLIDHR FLLRRGEYVL HMWQISGKGE DQGSFNADKL
 361 TSATNPDKEN SMSISILLDN YCHPIALPKH QPTPDPEGDR VRAEMPQNLR KQLEAIATD
 421 PLNPLTAEDK ELLWHFRYES LKHPKAYPKL FSSVKWQQQE IVAKTYQLLA
 RREVWDQSAL
 481 DVGLTMQLLD CNFSDENVRA IAVQKLESLE DDDVLHYLLQ LVQAVKFEPY HDSALARFLL
 541 KRGLRNKRIG HFLFWFLRSE IAQSRHYQQR FAVILEAYLR GCGTAMLHDF TQQVQVIEML
 601 QKVTLDIKSL SAEKYDVSSQ VISQLKQKLE NLQNSQLPES FRVPYDPGLK AGALAIEKCK
 661 VMASKKKPLW LEFKCADPTA LSNETIGIIF KHGDDLRLQDM LILQILRIME SIWETESLDL
 721 CLLPYGCIST GDKIGMIEIV KDATTIAIKI QSTVGNTGAF KDEVLNHWLW EKSPTEEKFO
 50 781 AAVERFVYSC AGYCVATFVL GIGDRHNDNI MITETGNLFH IDFGHILGNY KSFLGINKER
 841 VPFVLTPDFL FVMGTSGKKT SPHFQKFQDI CVKAYLALRH HTNLLILFS MMLMTGMPQL
 901 TSKEDIEYIR DALTVGKNEE DAKKYFLDQI EVCRDKGWTQ QFNWFLHLVL GIKQGEKHS
 961 HHHHHH (SEQ ID NO: 13)
 Конструкція PI3K δ та білок

PI3K δ	BV1060	p85iSH2(461-568)-GGGGGG-p110 δ (2-1044)-His
---------------	--------	--

BV1060: Продукти ПЛР для внутрішнього домену SH2 (iSH2) субодиниці p85 та для повнорозмірної субодиниці p110 δ генерували та піддавали злиттю за допомогою ПЛР, що

перекривається. Продукт iSH2 ПЛР генерували з використанням матриці ORF318 (див. вище) та праймерів gwG130-p03 (5'-GGGACAAG-TTTGTACAAAAAGCAGGCTACGAAGGAGATATACATATGC-GAGAATATGATAGATTATATGAAGAAT-3") та gwG154-p04 (5'-TCCTCCTCCT-CCTCCTCCTGGTTTAATGCTGTTTCATACGTTTGTGTC-3"). Фрагмент p110δ отримували з першої спіралі кДНК, генерованої при КТ за допомогою ПЛР з наявною у продажу РНК людини, виділеною з плаценти, сім'яника та головного мозку (Clontech), спочатку з використанням праймерів gwG154-p01 (5'-ATGCCCCCTGGGGTGGACTGCCCCAT-3") та gwG154-p02 (5'-CTACTGCCTGT-TGTCTTTGGACACGT-3"). В наступній реакції ПЛР лінкерні послідовності та гістидинову мітку додавали відповідно на 5'-кінець та 3'-кінець фрагменту p110δ з використанням праймерів gw154-p03 (5'-ATTAAACCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGACCCCTGGGGTGGAC-TGCCCCATGGA-3") та gwG154-p06 (5'-AGCTCCGTGATGGTGATGGTGAT-GTGCT-CCCTGCCTGTTGTCTTTGGACACGTTGT-3"). Зборку білку злиття p85-iSH2/p110δ проводили за допомогою третьої реакції ПЛР з використанням лінкерів, що перекриваються, на 3'-кінці фрагменту iSH2 та 5'-кінці фрагменту p110δ з використанням вказаного вище праймеру gwG130-p03 та праймеру, що містить гістидинову мітку, що перекривається, та Gateway (Invitrogen) AttB2 рекомбінаційні послідовності (5'-GGG-ACCACTTTGTACAAGAAAGCT-GGGTTTAA-GCTCCGTGATGGTGATGGTGAGTGCTCC-3"). Цей кінцевий продукт в реакції Gateway (Invitrogen) OR повторно об'єднували в донорний вектор pDONR201 (Invitrogen) для одержання внутрішнього клону ORF319. Цей клон перевіряли шляхом секвенування та використовували в реакції Gateway LR (Invitrogen) для переносу вставки в адаптований за допомогою Gateway вектор pBlueBac4.5 (Invitrogen) для генерації вектору експресії LR415 бакуловірусу.

Послідовність білків для BV1060:

```

1 MREYDRLYEE YTRTSQEIQM KRTAIEAFNE TIKIFEEQCQ TQERYKEYI EKFKREGNEK
61 EIQRIMHNYD KLKSRISIEI DSRRLLEEDL KKQAAEYREI DKRMNSIKPG GGGGGPPGVD
121 CPMEFWTKEE NQSVVDFLL PTGVYLNFPV SRNANLSTIK QLLWHRAQYE
PLFHMLSGPE
181 AYWFTCINQT AEQQUELEDEQ RRLCDVQPFL PVLRLVAREG DRVKKLINSQ ISLLIGKGLH
241 EFDSLCDPEV NDFRAKMCQF CEEAAARRQQ LGWEAWLQYS FPLQLEPSAQ
TWGPGTLRLP
301 NRALLVNVKF EGSEESFTFQ VSTKDVPLAL MACALRKKAT VFRQPLVEQP EDYTLQVNGR
361 HEYLYGSYPL CQFQYICSL HSGLTPHLM VHSSSILAMR DEQSNPAPQV QKPRAKPPPI
421 PAKKPSSVSL WSLEQPFRIE LIQGSKVNAD ERMKLVVQAG LFHGNEMLCK TVSSSEVSVC
481 SEPVWKQRLE FDINICDLPR MARLCFALYA VIEKAKKARS TKKSKKADC PIWANLMLF
541 DYKDQLKTGE RCLYMWPSVP DEKGELLNPT GTVRSNPNTD SAAALLICLP EVAPHPVYYP
601 ALEKILELGR HSECVHVTTEE EQLQLREILE RRGSGELYEH EKDLVWKLRLH EVQEHFPEAL
661 ARLLLVTWKN KHEDVAQMLY LLCSPWPELPV LSALELLDFS FPDCHVGSFA IKSRLKLTDD
721 ELFQYLLQLV QVLKYESYLD CELTKFLLDR ALANRKIGHF LFWHLRSEMH VPSVALRFG
781 ILEAYCRGST HHMKVLMKQG EALSKLKALN DFKVLSSQKT PKPQTKELMH
LCMRQEAYLE
841 ALSHLQSPLD PSTLLAEVCV EQCTFMDSKM KPLWIMYSNE EAGSGGSGVI IFKNGDDLRLQ
901 DMLTLQMIQL MDVLWKQEGE DLRMTPTYGCL PTGDRGLIE VVLRSDTIAN IQLNKSNNMAA
961 TAAFNKDALL NWLKSNNPGE ALDRAIEFT LSCAGYCVAT YVLGIGDRHS DNIMIRESGQ
1021 LFHIDFGHFL GNFKTKFGIN RERVFPILTY DFKVHVIQVGK TNNSEKFERF RGYCERAYTI
1081 LRRHGLLFLH LFALMRAAGL PELSCSKDIQ YLKDSLALGK TEEELKHFR VKFNEALRES
1141 WKTKVNWLAN NVSKDNRQEL GGAHHHHHH (SEQ ID NO: 20)

```

Очищення конструкцій PI3Kα, PI3Kβ та PI3Kγ

PI3Kα, PI3Kβ та PI3Kγ очищали з використанням двох стадій хроматографування: афінної хроматографії з імобілізацією іонами металу (IMAC) на Ni-сефарозній смоли (GE Healthcare) та гель-фільтрації з використанням колонки Superdex 200 26/60 (GE Healthcare). Всі буфери охолоджували до 4°C та лізис проводили при охолодженні льодом. Фракціонування на колонках проводили при кімнатній температурі. Всі буфери, використані для очищення PI3Kβ, на додаток до описаного нижче містили 0,05 % Triton X100.

Звичайно заморожені клітини, взяті з 10 л клітинної культури Tn5, повторно суспендували в "літичному буфері", що містить 20 mM Tris-Cl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 5 % гліцерину, 5 mM імідазолу, 1 mM NaF, 0,1 мкг/мл оадаєвої кислоти (ОКК), 5 mM ВМЕ, 1×повна суміш інгібіторів протеази – що не містить ЕДТК (етилендіамінтетраоцтова кислота) (20 таблеток/1 л буфера, Roche Applied Sciences), бензоназу (25 Од/(мл буфера), EMD Biosciences) при відношенні

кількості таблеток до кількості літичного буферу, що становить 1:6 об./об., та піддавали механічному лізису за допомогою 20 циклів обробки щільно підігнаним товкачиком. Лізат центрифугували при 45000 g впродовж 30 хвил. та надосадову рідину завантажували в попередньо приведену у рівновагу колонку IMAC (3 мл смоли/100 мл лізату). Колонку промивали за допомогою рівної 3-5 об'ємам колонки кількості літичного буферу, потім другий раз промивали за допомогою рівної 3-5 об'ємам колонки кількості суміші 20 mM Tris-Cl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 5 % гліцерину, 45 mM імідазолу, 1 mM NaF, 0,1 мкг/мл ОКК, 5 mM BME, 1× повна суміш інгібіторів протеази – що не містить ЕДТК. Білок елюювали сумішшю 20 mM Tris-Cl, pH 7,5, 0,5 M NaCl, 5 % гліцерину, 250 mM імідазолу, 1 mM NaF, 0,1 мкг/мл ОКК, 5 mM BME, 1× повна суміш інгібіторів протеази – що не містить ЕДТК. Відповідні фракції аналізували за допомогою SDS-PAGE (електрофорез на поліамідному гелі з використанням додецилсульфата натрію) та відповідно об'єднували. Білок додатково очищали за допомогою гель-фільтрації на колонці Superdex 200 26/60, приведений в рівновагу з сумішшю 20 mM Tris-Cl, pH 7,5, 0,5 M NaCl, 5 % гліцерин, 1 mM NaF, 5 mM ДТТ, 1× повна суміш інгібіторів протеази – що не містить ЕДТК. Відповідні фракції аналізували за допомогою SDS-PAGE та відповідно об'єднували. До об'єднаних фракцій додавали такий же об'єм буферу для діалізу (20 mM Tris-Cl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 50 % гліцерину, 5 mM NaF, 5 mM ДТТ) та потім проводили діаліз проти буферу для діалізу з двома замінами (одна заміна впродовж ночі). Білок зберігали при -20°C.

Очищення PI3K δ

PI3K δ очищали з використанням трьох стадій хроматографування: афінної хроматографії з іммобілізацією іонами металу на Ni-сефарозній смоли (GE Healthcare), гель-фільтрації з використанням колонки Superdex 200 26/60 (GE Healthcare) та на закінчення за допомогою іонного обміну на колонці Q-HP (GE Healthcare). Всі буфери охолоджували до 4°C та лізис проводили при охолодженні льодом. Фракціонування на колонках проводили при кімнатній температурі.

Звичайно заморожені клітини, взяті з 10 л клітинної культури Tn5, повторно суспендували в "літичному буфері", що містить 20 mM Tris-Cl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 5 % гліцерину, 5 mM імідазолу, 1 mM NaF, 0,1 мкг/мл оадаєвої кислоти (ОКК), 5 mM BME, 1×повна суміш інгібіторів протеази - що не містить ЕДТК (20 таблеток/1 л буфера, Roche Applied Sciences), бензоназу (25 Од/(мл буферу), EMD Biosciences) при відношенні кількості таблеток до кількості літичного буферу, що становить 1:10 об./об., та піддавали механічному лізису за допомогою 20 циклів обробки щільно підігнаним товкачиком. Лізат центрифугували при 45000 g впродовж 30 хвил. та надосадову рідину завантажували в попередньо приведену у рівновагу колонку IMAC (3 мл смоли/100 мл лізату). Колонку промивали за допомогою рівної 3-5 об'ємам колонки кількості літичного буферу, потім другий раз промивали за допомогою рівної 3-5 об'ємам колонки кількості суміші 20 mM Tris-Cl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 5 % гліцерину, 45 mM імідазолу, 1 mM NaF, 0,1 мкг/мл ОКК, 5 mM BME, 1× повна суміш інгібіторів протеази – що не містить ЕДТК. Білок елюювали сумішшю 20 mM Tris-Cl, pH 7,5, 0,5 M NaCl, 5 % гліцерину, 250 mM імідазолу, 1 mM NaF, 0,1 мкг/мл ОКК, 5 mM BME, 1× повна суміш інгібіторів протеази – що не містить ЕДТК. Відповідні фракції аналізували за допомогою SDS-PAGE та відповідно об'єднували. Білок додатково очищали за допомогою гель-фільтрації на колонці Superdex 200, приведений в рівновагу з сумішшю 20 mM Tris-Cl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 5 % гліцерину, 1 mM NaF, 0,1 мкг/мл ОКК, 5 mM ДТТ, 1× повна суміш інгібіторів протеази – що не містить ЕДТК. Відповідні фракції аналізували за допомогою SDS-PAGE та відповідно об'єднували. Ці фракції розводили "буфером А", що містить 20 mM Tris-Cl, pH 8,2, 5 % гліцерину, 1 mM NaF, 0,1 мкг/мл ОКК, 5 mM ДТТ при відношенні кількості фракцій до кількості буферу, рівному 1:10 об./об., та завантажували в підготовлену колонку Q-HP. Після закінчення завантаження зразку промивали за допомогою рівної 3-5 об'ємам колонки кількості буферу А та 5 % "буферу В", що містить 20 mM Tris-Cl, pH 8,2, 1 M NaCl, 5 % гліцерину, 1 mM NaF, 0,1 мкг/мл ОКК, 5 mM ДТТ. Білок елюювали в градієнтному режимі 5 %-30 % буферу В. Звичайно білок елюювався при ~200 mM NaCl. Відповідні фракції аналізували за допомогою SDS-PAGE та відповідно об'єднували. До об'єднаних фракцій додавали такий же об'єм буферу для діалізу (20 mM Tris-Cl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 50 % гліцерину, 1 mM NaF, 0,1 мкг/мл ОКК, 5 mM ДТТ) та потім проводили діаліз проти буферу для діалізу з двома замінами (одна заміна впродовж ночі). Білок зберігали при -20°C.

За допомогою описаних вище досліджень отримані наступні результати.

Приклад	PI3Ka/IC ₅₀ [мкмоль/л]	PI3Kb/IC ₅₀ [мкмоль/л]	PI3Kd/IC ₅₀ [мкмоль/л]	PI3Kg/IC ₅₀ [мкмоль/л]
1	0,014	4,428	0,971	0,680
27	0,081	5,200	0,271	1,563
12	0,010	3,874	0,197	0,352

Приклад	PI3Ka/IC ₅₀ [мкмоль/л]	PI3Kb/IC ₅₀ [мкмоль/л]	PI3Kd/IC ₅₀ [мкмоль/л]	PI3Kg/IC ₅₀ [мкмоль/л]
35	0,006	0,860	0,029	0,360
15	0,008	1,212	0,077	1,097
13	0,013	4,491	0,161	0,183
3	0,067	2,301	0,432	0,362
5	0,044	3,905	0,648	2,047
37	0,039	5,521	0,386	4,447
29	0,056	6,175	0,804	0,684
18	0,019	4,137	0,538	0,612
51	0,113	8,838	0,690	3,480
47	0,094	2,903	0,156	1,875
59	0,064	3,497	0,881	0,917
64	0,010	0,692	0,032	0,451
61	0,072	6,113	0,901	1,517
66	0,013	2,740	0,298	0,435
42	0,012	3,165	0,289	0,858
63	0,016	1,2	0,098	0,79

- 5 Сполуки, запропоновані в даному винаході, зокрема, кращі сполуки, запропоновані в даному винаході, наприклад, за даними біохімічного дослідження мають по відношенню до PI3K-альфа більшу селективність, ніж по відношенню до підтипів бета та/або дельта, та/або гама. За даними дослідження з використанням клітин ці сполуки також переважно мають по відношенню до PI3K-альфа більшу селективність, ніж по відношенню до підтипів бета та/або дельта, та/або гама.

Приклад В: Визначення метаболічного кліренсу in vitro

Абревіатури

АЦН	ацетонітрил
ВРМВ	всмоктування, розподілення, метаболізм та виведення
АУП	автоматичний пристрій для позиціонування лабораторного обладнання
%В	вміст розчиннику В в % при ВЕРХ
БП	біологічне перетворення (або метаболічна стабільність, або стабільність мікросом)
[C] _{t=0}	початкова (в момент часу 0) концентрація ДС in vitro
CL _h	печінковий кліренс (мл/хвил./кг)
CL _{int}	власна швидкість виведення (мкл реакційної суміші/хвил./мг мікросомного білку)
CL _{int} , s	власна швидкість виведення в перерахунку на масу печінки (мл реакційної суміші/хвил./г печінки)
Cyno	яванський макак
CYP(s)	цитохром(и) P450
DiH ₂ O	деіонізована вода
ER _h	коефіцієнт очищення в печінці
IEP	іонізація електророзпиленням
fub	вільна фракція лікарського засобу в крові або плазмі
fum	вільна фракція лікарського засобу в мікросомах
BC	внутрішній стандарт
kmic	швидкість виведення для мікросом
KPi	0,05M буфер на основі фосфату калію, pH 7,4

PX-	рідинна хроматографія з
MC/MC	тандемною мас-спектрометрією
MB	межа виявлення
M	вміст мікросомного білку при інкубації (мг/мл)
NADPH	β-нікотинамідаденіндинуклеотид-фосфат, відновна форма
HXC	нова хімічна сполука
HC3	неспецифічне зв'язування
Qh	кровоток в воротній судині (мл/хвил./кг)
об/хвил.	оборотів в хвилину
CB	стандартне відхилення
S-D	Sprague-Dawley
SF1	коефіцієнт перерахунку: міліграмів мікросомного білку на 1 г печінки
SF2	коефіцієнт перерахунку: грамів печінки на 1 кг маси тіла тварини
t1/2	період напіввиведення in vitro (хвил.)
ДС	досліджувана сполука
УДФГК	уридин-5'-дифосфоглюкуронова кислота
УГТ	уридин-5'-дифосфатглюкуронозилтрансферази
V	об'єм інкубуємої реакційної суміші (мкл)

- 5 Кінцеві концентрації дослідної сполуки та білку, а також тривалість інкубації приведені нижче (таблиця 1). Низькі концентрації дослідної сполуки вибрані для того, щоб можна було використовувати припущення про те, що кінетики реакцій розраховуються при концентраціях менших (або приблизно рівних) K_m . Відомо, що ДМСО робить інгібуючий вплив на активність СУР. Тому, концентрація ДМСО в середовищі для інкубування була обмежена значенням, рівним 0,01 % (об./об.), щоб заважаючий вплив на метаболізм було зведено до мінімуму.

Таблиця 1

Кінцеві компоненти реакційної суміші та концентрації при інкубації для дослідження метаболічного кліренсу

Компоненти реакційної суміші	Кінцева концентрація в реакційній суміші
0,05M буфер на основі фосфату калію, pH 7,4	50 mM
MgCl ₂	2,0 mM
NADPH	1,0 mM
УДФГК ^a	1,0 mM
Аламетацин ^a	25 мкг/мг мікросом печінки
Мікросоми печінки	0,5 мг/мл
Досліджувана сполука	1,0 мкМ
CAN	0,06 % (об./об.)
ДМСО (розчинник досліджуваної сполуки)	0,01 % (об./об.)

- 10 ^aОптимальні компоненти, необхідні тільки для відновлення активності УГТ (уридин-5'-дифосфатглюкуронозилтрансфераз).

Типовий експеримент проводять в 96-лункових планшетах при інкубуванні із струшуванням при 37 °С. Швидкість метаболічного виведення in vitro визначають за даними, зібраними в 4 моменти часу (наприклад, 0, 5, 15 та 30 хвил.), при реакції з участю кофактору (кофакторів)

(NADPH та/або УДФГК). Використовуване як від'ємний контроль інкубування впродовж 30 хвил. (без кофактору) також проводили для оцінки не зв'язаних з СYP характеристик стабільності (наприклад, хімічної нестабільності, не залежного від СYP метаболізму). Звичайно ДС в 10 мМ ДМСО розводять у співвідношенні 1:1000 в 0,6 % АЦН (об./об.) в DiH₂O до 10 мкМ.

Безпосередньо перед проведенням експерименту 1,25 мг/мл мікросомного білку суспендують в 50 мМ KPi. Для оцінки опосередкованого за допомогою УГТ метаболізму суспензію спочатку можна попередньо обробити шляхом проведеної впродовж 5 хвил. на льоду інкубації з аламетицином (25 мкг/мг мікросомного білку). ДС (35 мкл) додають до 140 мкл суспензії мікросом та отримують 175 мкл суміші фермент-субстрат. Цю суміш фермент-субстрат попередньо інкубують впродовж 15 хвил. при 37 °С. Інкубування негативного контролю проводять впродовж 30 хвил. шляхом об'єднання 25 мкл суміші фермент-субстрат з таким же об'ємом 50 мМ KPi, що містить 4 мМ MgCl₂. Після інкубації впродовж 30 хвил. при 37 °С реакцію зупиняють шляхом додавання 50 мкл АЦН, що містить внутрішній стандарт МС (2 мкМ алпренололу). В момент часу T=0 хвил. проводять обробку шляхом об'єднання 25 мкл суміші фермент-субстрат безпосередньо з 50 мкл АЦН, що містить внутрішній стандарт МС (2 мкМ алпренололу). Додають 25 мкл розчину кофактору (2 мМ NADPH в 50 мМ KPi з додаванням 4 мМ MgCl₂; необов'язково з включенням 2 мМ УДФГК для досліджень СYP+УГТ) для стимулювання повної зупинки реакції.

Реакції в об'ємі в решті моментів часу ініціюють шляхом додавання 125 мкл розчину кофактору (2 мМ NADPH в 50 мМ KPi з додаванням 4 мМ MgCl₂) до решти 125 мкл суміші фермент-субстрат. Для вивчення метаболізму УГТ в розчин кофактору також включають 2 мМ УДФГК. В задані моменти часу реакції (наприклад, 5, 15, 30 хвил.) відбирають аліквоти реакційної суміші (50 мкл) та реакції зупиняють шляхом додавання ацетонітрилу (50 мкл), що містить внутрішній стандарт для мас-спектрометрії (2 мкМ алпренололу). Всі зразки центрифугують при ~3400×g при 4 °С впродовж 10 хвил. надосадові рідини досліджують за допомогою РХ-МС/МС для кількісного визначення решти ДС. Виражений у відсотках вміст ДС в перерахунку на вміст в момент часу 0 використовують для оцінки константи швидкості виведення (k_{mic}) in vitro, яку можна використовувати для розрахунку швидкостей метаболічного виведення in vitro.

Аналіз зразків проводять за допомогою системи вискоефективної рідинної хроматографії-тандемної мас-спектрометрії (РХ/МС), що включає мас-спектрометр Waters Quattro Premiere, джерело іонів IEP, автоматичний пробовідбірник CTC-HTS Pal та насос Agilent LC. Зразки розділяють на колонці Atlantic C18, 2,1×30 мм, 3,5 мкм з використанням різкого градієнтного режиму для рухомої фази, представленого в таблиці 2. Рухома фаза А включає очищену воду, що містить 10 мМ форміату амонію. Рухома фаза В включає ацетонітрил, що містить 0,01 % мурашиної кислоти. Швидкість потоку рівна 1 мл/хвил... Інжектуючий об'єм рівний 10 мкл. Для очищення зразку продукти елюювання впродовж перших 30 с видаляють, як відходи. Сполуки детектують з використанням програмного забезпечення MassLynx/QuanLynx, за допомогою якого накопичуються дані щодо інтенсивностей для всіх фрагментів, зв'язаних з досліджуваною сполукою. Після збору необроблених даних програмне забезпечення за необхідності може об'єднати профілі до 3 фрагментів. Звичайно інтегрують пік фрагменту, що має найбільшу інтенсивність.

Таблиця 2

Градієнтний режим
для рухомої фази для ВЕРХ

Час (хвил.)%В	
0,0	5
0,2	5
0,85	95
1,02	95
1,05	5

Кожну швидкість виведення мікросом, k_{mic}, визначають за побудованою по 4 точках залежністю виведення, що визначають одноразово. Необроблені дані РХ-МС/МС для плато реакції перераховують в інтегровані площі піків аналізованих речовин для ДС та ВС. Для проведення стандартизованого співставлення даних ці значення можна перерахувати в значення відношень площ піків аналізована речовина:ВС.

Будують залежність натурального логарифму вираженого у відсотках вмісту ДС від часу протікання реакції (наприклад, в моменти часу 0, 5, 20 або 30 хвил.) у порівнянні з моментом часу 0 (на основі відношення площ піків). Нахил цієї залежності кліренсу, k_{mic} , використовують для розрахунку періоду напіввиведення *in vitro*, $t_{1/2}$, за допомогою рівняння (1). Для розгляду лінійної кінетики реакції, коли це можливо, дані, що відповідають вмісту ДС, що становить <10 %, виключають з залежності для кліренсу. Значення $t_{1/2}$ для реакції є ключовим показником, що використовується для розрахунку CL_{int} (рівняння 2)

Рівняння (1): $t_{1/2} = 0,693 / -k_{mic}$

Рівняння (2): $CL_{int} = 0,693 / -k_{mic} \cdot V/M$

За допомогою описаної вище методики отримані наступні результати.

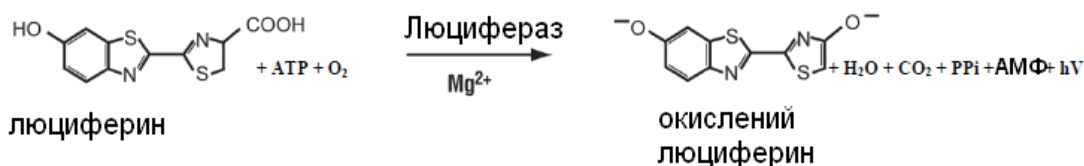
Пример	CYP MetCL-Ra/CL(int) [мкл.хвил ⁻¹ .мг ⁻¹]	CYP MetCL-Hu/CL(int) [мкл.хвил ⁻¹ .мг ⁻¹]
порівняльний приклад		
WO2004/096797, № 133	56	37
приклади, що відповідають даному винаходу		
15	29	33
61	22	19
55	29	27

Приклад С: Дослідження інгібування мутантів PI3K-альфа E545K та H1047R за допомогою люмінесцентного аналізу з використанням люциферази

Люмінесцентний аналіз є загальноприйнятою методикою для визначення концентрації АТФ (аденозинтрифосфат) та тому його можна використовувати для оцінки активності багатьох кіназ незалежно від їх субстрату. Люмінесцентний аналіз кінази KinaseGlo (Promega, Madison/WI, USA) являє собою гомогенну методику HTS визначення активності кінази шляхом кількісного визначення кількості АТФ, що залишилася в розчині після реакції кінази.

Фосфоінозит-3-кіназу інкубували при кімнатній температурі в 50 мкл середовища, що містить 1 мкМ АТФ, 5 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl, 5 мкг/мл фосфатидилінозиту сої (Avanti Polar lipids, Cat. Nr 840044C), 0,015 % октоглюкозиду (Sigma, Cat. Nr O9882), 0,01 % ХЛАПС, 1 мМ ДТТ, 2,5 % ДМСО та 10 мМ Tris-HCl pH 7,5. Реакцію кінази ініціювали шляхом додавання АТФ (попередня інкубація ферменту з інгібіторів впродовж 15 хвил.) та зупиняли через 1 год. за допомогою 50 мкл KinaseGlo® (Promega, cat. Nr V6714) та інтенсивність люмінесценції визначали за допомогою зчитуючого пристрою Victor II (інтегрування впродовж 0,1 с). Залежності апроксимували за допомогою нелінійної пересічі з використанням логістичного рівняння (model 205 °F XLfit®, ID Business Solutions, Guildford, UK).

Принцип люмінесцентного аналізу (KinaseGlo):



З використанням описаної вище системи дослідження та білків PI3K, отриманих з конструкцій, приведених в представленій нижче таблиці, оцінювали інгібуючу активність по відношенню до мутантної та дикого типу PI3K-альфа. Результати приведені в представленій нижче таблиці.

Тип	Код	Конструкція
Дикий тип	BV1075	p85iSH2(461-568)-GGGGGGGGGGGGG-p110α(21-1068)-His
E545K	BV1147	p85iSH2(461-568)-GGISGGGGGGIMV-p110α(21-E542K-1068)-His
H1047R	BV1097	p85iSH2(461-568)-GGISGGGGGGIMV-p110α(21-H1047R-1068)-His

Інгібування мутантної та дикого типу PI3K-альфа:

Приклад	PI3K-альфа дикого типу	PI3K-альфа E545K	PI3K-альфа H1047R
IC ₅₀ в нМ			
5	8,2	6,7	7,7
15	4,6	4,0	4,8

Приклад	PI3K-альфа дикого типу	PI3K-альфа E545K IC ₅₀ в нМ	PI3K-альфа H1047R
61	3,9	2,7	3,6

BV1147: Активуючу мутацію E545K, що виявляється при багатьох типах раку, вводили в ORF318 за допомогою сайт-специфічного мутагенезу з використанням набору для проведення мутагенезу QuickChange XL (Stratagene). За методикою, рекомендованою виробником, генерували мутагенні праймери gwG152-p15 (5'-CTCTCTGAAATCACTAAGCAGGAGAAAGATTTT-3") (SEQ ID NO: 21) та gwG152-p16 (5'-AAAATCTTTCT-CCTGCTTAGTGATTTTCAGAGAG-3") (SEQ ID NO: 22) ORF544. Цей клон перевіряли шляхом секвенування та використовували в реакції Gateway LR (Invitrogen) для переносу вставки в Gateway адаптований вектор pBlueBac4.5 (Invitrogen) з метою генерації вектору експресії бакуловірусу LR561.

Домен кінази.

Послідовність білків для BV1147:

```

1 MREYDRLYEE YTRTSQEIQM KRTAIEAFNE TIKIFEEQCQ TQERYKEYI EKFKREGNEK
61 EIQRIMHNYD KLKSRISIEI DSRRLLEEDL KKQAAEYREI DKRMNSIKPG GISGGGGGIM
121 VLVECLLPNG MIVTLECLRE ATLITIKHEL FKEARKYPLH QLLQDESSYI FVSVTQEAER
181 EEFDETRRL CDLRLFQPF LKVIEPVGNRE EKILNREIGF AIGMPVCEFD MVKDPEVQDF
241 RRNILNVCKE AVDLRDLNSP HSRAMYVYPP NVESSPELPK HIYNKLDKGQ IIVVIWVIVS
301 PNNDKQKYTL KINHDCVPEQ VIAEAIKKT RSMLLSSEQL KLCVLEYQGK YILKVCGCDE
361 YFLEKYPLSQ YKYIRSCIML GRMPNLMLMA KESLYSQLPM DCFTMPSYSR RISTATPYMN
421 GETSTKSLWV INSALRIKIL CATYVNVNIR DIDKIYVRTG IYHGGEPLCD NVNTQRVPCS
481 NPRWNEWLNY DIYIPDLPR ARLCLSICSV KGRKGAKKEH CPLAWGNINL FDYDTLVSG
541 KMALNLWPVP HGLEDLLNPI GVTGSNPKE TPCLELEFDW FSSVVKFPDM
SVIEEHANWS
601 VSREAGFSYS HAGLSNRLAR DNELRENDKE QLKAISTRDP LSEITKQEKD FLWSHRHYCV
661 TIPEILPKLL LSVKWNSRDE VAQMYCLVKD WPPIKPEQAM ELLDCNYPDP MVRGFAVRCL
721 EKYLTDKLS QYLIQLVQVL KYEQYLDNLL VRFLKKALT NQRIGHFFFW HLKSEMHNKT
781 VSQRFGLLE SYCRACGMYL KHLNRQVEAM EKILNLTDL KQEKKDETQK VQMKFLVEQM
841 RRPDFMDALQ GFLSPLNPAH QLGNLRLLEC RIMSSAKRPL WLNWENPDIM SELLFQNNIE
901 IFKNGDDLRLQ DMLTLQIIRI MENIWQNQGL DLRMLPYGCL SIGDCVGLIE VVRNSHTIMQ
961 IQCKGGLKGA LQFNSHTLHQ WLKDKNKGEI YDAAIDLFTR SCAGYCVATF ILGIGDRHNS
1021 NIMVKDDGQL FHIDFGHFLD HKKKKFGYKR ERVPFVLTQD FLVISKGAQ ECTKTREFER
1081 FQEMCYKAYL AIRQHANLFI NLFSSMMLGSG MPELQSFDDI AYIRKTLALD KTEQEALEYF
1141 MKQMNDANHG GWTTKMDWIF HTIKQHALNE LGGAHHHHHH (SEQ ID NO: 23).
```

BV1097: Активуючу мутацію H1047R, що виявляється при багатьох типах раку, вводили в ORF318 за допомогою сайт-специфічного мутагенезу з використанням набору для проведення мутагенезу QuickChange XL (Stratagene). За методикою, рекомендованою виробником, генерували мутагенні праймери gwG152-p07 (5'-CAAATGAATGATGCACGTCATGGTGGCTGGACA-3") (SEQ ID NO: 24) та gwG152-p11 (5'-TGTCAGCCA-CCATGACGTCATCATTCATTTG-3") (SEQ ID NO: 25) ORF396. Цей клон перевіряли шляхом секвенування та використовували в реакції Gateway LR (Invitrogen) для переносу вставки в Gateway адаптований вектор pBlueBac4.5 (Invitrogen) з метою генерації вектору експресії бакуловірусу LR480.

Домен кінази.

Послідовність білків для BV1097:

```

1 MREYDRLYEE YTRTSQEIQM KRTAIEAFNE TIKIFEEQCQ TQERYKEYI EKFKREGNEK
61 EIQRIMHNYD KLKSRISIEI DSRRLLEEDL KKQAAEYREI DKRMNSIKPG GISGGGGGIM
121 VLVECLLPNG MIVTLECLRE ATLITIKHEL FKEARKYPLH QLLQDESSYI FVSVTQEAER
181 EEFDETRRL CDLRLFQPF LKVIEPVGNRE EKILNREIGF AIGMPVCEFD MVKDPEVQDF
241 RRNILNVCKE AVDLRDLNSP HSRAMYVYPP NVESSPELPK HIYNKLDKGQ IIVVIWVIVS
301 PNNDKQKYTL KINHDCVPEQ VIAEAIKKT RSMLLSSEQL KLCVLEYQGK YILKVCGCDE
361 YFLEKYPLSQ YKYIRSCIML GRMPNLMLMA KESLYSQLPM DCFTMPSYSR RISTATPYMN
421 GETSTKSLWV INSALRIKIL CATYVNVNIR DIDKIYVRTG IYHGGEPLCD NVNTQRVPCS
481 NPRWNEWLNY DIYIPDLPR ARLCLSICSV KGRKGAKKEH CPLAWGNINL FDYDTLVSG
541 KMALNLWPVP HGLEDLLNPI GVTGSNPKE TPCLELEFDW FSSVVKFPDM
SVIEEHANWS
601 VSREAGFSYS HAGLSNRLAR DNELRENDKE QLKAISTRDP LSEITEQEKD FLWSHRHYCV
661 TIPEILPKLL LSVKWNSRDE VAQMYCLVKD WPPIKPEQAM ELLDCNYPDP MVRGFAVRCL
```

5

721 EKYLTDKLS QYLIQLVQVL KYEQYLDNLL VRFLKKALT NQRIGHFFFW HLKSEMHNKT
 781 VSQRFGLLLE SYCRACGMYL KHLNRQVEAM EKLINLTDIL KQEKKDETQK VQMKFLVEQM
 841 RRPDFMDALQ GFLSPLNPAH QLGNLRLLEC RIMSSAKRPL WLNWENPDIM SELLFQNNIE
 901 IFKNGDDLRLQ DMLTLQIIRI MENIWQNQGL DLRMLPYGCL SIGDCVGLIE VVRNSHTIMQ
 961 IQCKGGLKGA LQFNSHTLHQ WLKDKNKGEI YDAAIDLFTR SCAGYCVATF ILGIGDRHNS
 1021 NIMVKDDGQL FHIDFGHFLD HKKKKFGYKR ERVPFVLTQD FLIVISKGAQ ECTKTREFER
 1081 FQEMCYKAYL AIRQHANLFI NLFSSMMLGSG MPELQSFDDI AYIRKTLALD KTEQEALYF
 1141 MKQMNDARHG GWTTKMDWIF HTIKQHALNE LGGAHHHHHH (SEQ ID NO: 26).

10

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Новартіс АГ

<120> Органічні сполуки

<130> PAT052777A

<160> 26

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 42

<212> ДНК

<213> штучна

<220>

<223> Праймер ПЛР

<400> 1

gctagcatgc gagaatatga tagattatat gaagaatata cc

42

<210> 2

<211> 45

<212> ДНК

<213> штучна

<220>

<223> Праймер ПЛР

<400> 2

gcctccacca cctccgctcg gtttaatgct gttcatacgt ttgtc

45

<210> 3

<211> 42

<212> ДНК

<213> штучна

<220>

<223> Праймер ПЛР

<400> 3

tactagtcg cctccaccac ctccgctcc accacctcg cc

42

<210> 4

<211> 1180

<212> PRT

<213> штучна

<220>

<223> Конструкція кінази PI3K

<400> 4

Met Arg Glu Tyr Asp Arg Leu Tyr Glu Glu Tyr Thr Arg Thr Ser Gln
 1 5 10 15

Glu Ile Gln Met Lys Arg Thr Ala Ile Glu Ala Phe Asn Glu Thr Ile

20	25	30
Lys Ile Phe Glu Glu Gln Cys Gln Thr Gln Glu Arg Tyr Ser Lys Glu		
35	40	45
Tyr Ile Glu Lys Phe Lys Arg Glu Gly Asn Glu Lys Glu Ile Gln Arg		
50	55	60
Ile Met His Asn Tyr Asp Lys Leu Lys Ser Arg Ile Ser Glu Ile Ile		
65	70	75
Asp Ser Arg Arg Arg Leu Glu Glu Asp Leu Lys Lys Gln Ala Ala Glu		
85	90	95
Tyr Arg Glu Ile Asp Lys Arg Met Asn Ser Ile Lys Pro Gly Gly Gly		
100	105	110
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Leu Val Glu Cys Leu Leu Pro		
115	120	125
Asn Gly Met Ile Val Thr Leu Glu Cys Leu Arg Glu Ala Thr Leu Ile		
130	135	140
Thr Ile Lys His Glu Leu Phe Lys Glu Ala Arg Lys Tyr Pro Leu His		
145	150	155
Gln Leu Leu Gln Asp Glu Ser Ser Tyr Ile Phe Val Ser Val Thr Gln		
165	170	175
Glu Ala Glu Arg Glu Glu Phe Phe Asp Glu Thr Arg Arg Leu Cys Asp		
180	185	190
Leu Arg Leu Phe Gln Pro Phe Leu Lys Val Ile Glu Pro Val Gly Asn		
195	200	205
Arg Glu Glu Lys Ile Leu Asn Arg Glu Ile Gly Phe Ala Ile Gly Met		
210	215	220
Pro Val Cys Glu Phe Asp Met Val Lys Asp Pro Glu Val Gln Asp Phe		
225	230	235
Arg Arg Asn Ile Leu Asn Val Cys Lys Glu Ala Val Asp Leu Arg Asp		
245	250	255
Leu Asn Ser Pro His Ser Arg Ala Met Tyr Val Tyr Pro Pro Asn Val		
260	265	270

Glu Ser Ser Pro Glu Leu Pro Lys His Ile Tyr Asn Lys Leu Asp Lys
 275 280 285
 Gly Gln Ile Ile Val Val Ile Trp Val Ile Val Ser Pro Asn Asn Asp
 290 295 300
 Lys Gln Lys Tyr Thr Leu Lys Ile Asn His Asp Cys Val Pro Glu Gln
 305 310 315 320
 Val Ile Ala Glu Ala Ile Arg Lys Lys Thr Arg Ser Met Leu Leu Ser
 325 330 335
 Ser Glu Gln Leu Lys Leu Cys Val Leu Glu Tyr Gln Gly Lys Tyr Ile
 340 345 350
 Leu Lys Val Cys Gly Cys Asp Glu Tyr Phe Leu Glu Lys Tyr Pro Leu
 355 360 365
 Ser Gln Tyr Lys Tyr Ile Arg Ser Cys Ile Met Leu Gly Arg Met Pro
 370 375 380
 Asn Leu Met Leu Met Ala Lys Glu Ser Leu Tyr Ser Gln Leu Pro Met
 385 390 395 400
 Asp Cys Phe Thr Met Pro Ser Tyr Ser Arg Arg Ile Ser Thr Ala Thr
 405 410 415
 Pro Tyr Met Asn Gly Glu Thr Ser Thr Lys Ser Leu Trp Val Ile Asn
 420 425 430
 Ser Ala Leu Arg Ile Lys Ile Leu Cys Ala Thr Tyr Val Asn Val Asn
 435 440 445
 Ile Arg Asp Ile Asp Lys Ile Tyr Val Arg Thr Gly Ile Tyr His Gly
 450 455 460
 Gly Glu Pro Leu Cys Asp Asn Val Asn Thr Gln Arg Val Pro Cys Ser
 465 470 475 480
 Asn Pro Arg Trp Asn Glu Trp Leu Asn Tyr Asp Ile Tyr Ile Pro Asp
 485 490 495
 Leu Pro Arg Ala Ala Arg Leu Cys Leu Ser Ile Cys Ser Val Lys Gly
 500 505 510
 Arg Lys Gly Ala Lys Glu Glu His Cys Pro Leu Ala Trp Gly Asn Ile
 515 520 525

Asn Leu Phe Asp Tyr Thr Asp Thr Leu Val Ser Gly Lys Met Ala Leu
 530 535 540
 Asn Leu Trp Pro Val Pro His Gly Leu Glu Asp Leu Leu Asn Pro Ile
 545 550 555 560
 Gly Val Thr Gly Ser Asn Pro Asn Lys Glu Thr Pro Cys Leu Glu Leu
 565 570 575
 Glu Phe Asp Trp Phe Ser Ser Val Val Lys Phe Pro Asp Met Ser Val
 580 585 590
 Ile Glu Glu His Ala Asn Trp Ser Val Ser Arg Glu Ala Gly Phe Ser
 595 600 605
 Tyr Ser His Ala Gly Leu Ser Asn Arg Leu Ala Arg Asp Asn Glu Leu
 610 615 620
 Arg Glu Asn Asp Lys Glu Gln Leu Lys Ala Ile Ser Thr Arg Asp Pro
 625 630 635 640
 Leu Ser Glu Ile Thr Glu Gln Glu Lys Asp Phe Leu Trp Ser His Arg
 645 650 655
 His Tyr Cys Val Thr Ile Pro Glu Ile Leu Pro Lys Leu Leu Ser
 660 665 670
 Val Lys Trp Asn Ser Arg Asp Glu Val Ala Gln Met Tyr Cys Leu Val
 675 680 685
 Lys Asp Trp Pro Pro Ile Lys Pro Glu Gln Ala Met Glu Leu Leu Asp
 690 695 700
 Cys Asn Tyr Pro Asp Pro Met Val Arg Gly Phe Ala Val Arg Cys Leu
 705 710 715 720
 Glu Lys Tyr Leu Thr Asp Asp Lys Leu Ser Gln Tyr Leu Ile Gln Leu
 725 730 735
 Val Gln Val Leu Lys Tyr Glu Gln Tyr Leu Asp Asn Leu Leu Val Arg
 740 745 750
 Phe Leu Leu Lys Lys Ala Leu Thr Asn Gln Arg Ile Gly His Phe Phe
 755 760 765
 Phe Trp His Leu Lys Ser Glu Met His Asn Lys Thr Val Ser Gln Arg

770		775		780
Phe Gly Leu Leu Leu Glu Ser Tyr Cys Arg Ala Cys Gly Met Tyr Leu				
785		790	795	800
Lys His Leu Asn Arg Gln Val Glu Ala Met Glu Lys Leu Ile Asn Leu				
	805		810	815
Thr Asp Ile Leu Lys Gln Glu Lys Lys Asp Glu Thr Gln Lys Val Gln				
	820		825	830
Met Lys Phe Leu Val Glu Gln Met Arg Arg Pro Asp Phe Met Asp Ala				
	835		840	845
Leu Gln Gly Phe Leu Ser Pro Leu Asn Pro Ala His Gln Leu Gly Asn				
	850		855	860
Leu Arg Leu Glu Glu Cys Arg Ile Met Ser Ser Ala Lys Arg Pro Leu				
	865		870	875
Trp Leu Asn Trp Glu Asn Pro Asp Ile Met Ser Glu Leu Leu Phe Gln				
	885		890	895
Asn Asn Glu Ile Ile Phe Lys Asn Gly Asp Asp Leu Arg Gln Asp Met				
	900		905	910
Leu Thr Leu Gln Ile Ile Arg Ile Met Glu Asn Ile Trp Gln Asn Gln				
	915		920	925
Gly Leu Asp Leu Arg Met Leu Pro Tyr Gly Cys Leu Ser Ile Gly Asp				
	930		935	940
Cys Val Gly Leu Ile Glu Val Val Arg Asn Ser His Thr Ile Met Gln				
	945		950	955
Ile Gln Cys Lys Gly Gly Leu Lys Gly Ala Leu Gln Phe Asn Ser His				
	965		970	975
Thr Leu His Gln Trp Leu Lys Asp Lys Asn Lys Gly Glu Ile Tyr Asp				
	980		985	990
Ala Ala Ile Asp Leu Phe Thr Arg Ser Cys Ala Gly Tyr Cys Val Ala				
	995		1000	1005
Thr Phe Ile Leu Gly Ile Gly Asp Arg His Asn Ser Asn Ile Met				
	1010		1015	1020

Val Lys Asp Asp Gly Gln Leu Phe His Ile Asp Phe Gly His Phe
1025 1030 1035

Leu Asp His Lys Lys Lys Lys Phe Gly Tyr Lys Arg Glu Arg Val
1040 1045 1050

Pro Phe Val Leu Thr Gln Asp Phe Leu Ile Val Ile Ser Lys Gly
1055 1060 1065

Ala Gln Glu Cys Thr Lys Thr Arg Glu Phe Glu Arg Phe Gln Glu
1070 1075 1080

Met Cys Tyr Lys Ala Tyr Leu Ala Ile Arg Gln His Ala Asn Leu
1085 1090 1095

Phe Ile Asn Leu Phe Ser Met Met Leu Gly Ser Gly Met Pro Glu
1100 1105 1110

Leu Gln Ser Phe Asp Asp Ile Ala Tyr Ile Arg Lys Thr Leu Ala
1115 1120 1125

Leu Asp Lys Thr Glu Gln Glu Ala Leu Glu Tyr Phe Met Lys Gln
1130 1135 1140

Met Asn Asp Ala His His Gly Gly Trp Thr Thr Lys Met Asp Trp
1145 1150 1155

Ile Phe His Thr Ile Lys Gln His Ala Leu Asn Glu Leu Gly Gly
1160 1165 1170

Ala His His His His His His
1175 1180

<210> 5
<211> 28
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Праймер ПЛР

<400> 5
cgagaatatg atagattata tgaagaat

28

<210> 6
<211> 30
<212> ДНК
<213> штучна

<220>

<223> Праймер ПЛР

<400> 6
tgggtttaatg ctgttcatac gtttgtcaat 30

<210> 7
<211> 76
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Праймер ПЛР

<400> 7
gggacaagtt tgtacaaaa agcaggctac gaaggagata tacatatgcg agaatatgat 60
agattatatg aagaat 76

<210> 8
<211> 54
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Праймер ПЛР

<400> 8
actgaagcat cctcctcctc ctctcctgg ttaatgctg ttcatacgtt tgtc 54

<210> 9
<211> 54
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Праймер ПЛР

<400> 9
attaaaccag gaggaggagg aggaggatgc ttcagtttca taatgcctcc tgct 54

<210> 10
<211> 57
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Праймер ПЛР

<400> 10
agctccgtga tgggtgatggg gatgtgctcc agatctgtag tctttccgaa ctgtgtg 57

<210> 11
<211> 61
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Праймер ПЛР

<400> 11
 gggaccactt tgtacaagaa agctggggtt aagctccgtg atggtgatgg tgatgtgctc 60
 c 61

<210> 12
 <211> 1194
 <212> PRT
 <213> штучна

<220>
 <223> Конструкція кінази PI3K

<400> 12

Met Arg Glu Tyr Asp Arg Leu Tyr Glu Glu Tyr Thr Arg Thr Ser Gln
 1 5 10 15

Glu Ile Gln Met Lys Arg Thr Ala Ile Glu Ala Phe Asn Glu Thr Ile
 20 25 30

Lys Ile Phe Glu Glu Gln Cys Gln Thr Gln Glu Arg Tyr Ser Lys Glu
 35 40 45

Tyr Ile Glu Lys Phe Lys Arg Glu Gly Lys Glu Lys Glu Ile Gln Arg
 50 55 60

Ile Met His Asn Tyr Asp Lys Leu Lys Ser Arg Ile Ser Glu Ile Ile
 65 70 75 80

Asp Ser Arg Arg Arg Leu Glu Glu Asp Leu Lys Lys Gln Ala Ala Glu
 85 90 95

Tyr Arg Glu Ile Asp Lys Arg Met Asn Ser Ile Lys Pro Gly Gly Gly
 100 105 110

Gly Gly Gly Cys Phe Ser Phe Ile Met Pro Pro Ala Met Ala Asp Ile
 115 120 125

Leu Asp Ile Trp Ala Val Asp Ser Gln Ile Ala Ser Asp Gly Ser Ile
 130 135 140

Pro Val Asp Phe Leu Leu Pro Thr Gly Ile Tyr Ile Gln Leu Glu Val
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Thr Ile Ser Tyr Ile Lys Gln Met Leu Trp Lys Gln
 165 170 175

Val His Asn Tyr Pro Met Phe Asn Leu Leu Met Asp Ile Asp Ser Tyr
 180 185 190

Met	Phe	Ala	Cys	Val	Asn	Gln	Thr	Ala	Val	Tyr	Glu	Glu	Leu	Glu	Asp
		195					200					205			
Glu	Thr	Arg	Arg	Leu	Cys	Asp	Val	Arg	Pro	Phe	Leu	Pro	Val	Leu	Lys
	210					215					220				
Leu	Val	Thr	Arg	Ser	Cys	Asp	Pro	Gly	Glu	Lys	Leu	Asp	Ser	Lys	Ile
225					230					235					240
Gly	Val	Leu	Ile	Gly	Lys	Gly	Leu	His	Glu	Phe	Asp	Ser	Leu	Lys	Asp
				245					250					255	
Pro	Glu	Val	Asn	Glu	Phe	Arg	Arg	Lys	Met	Arg	Lys	Phe	Ser	Glu	Glu
			260					265					270		
Lys	Ile	Leu	Ser	Leu	Val	Gly	Leu	Ser	Trp	Met	Asp	Trp	Leu	Lys	Gln
	275						280					285			
Thr	Tyr	Pro	Pro	Glu	His	Glu	Pro	Ser	Ile	Pro	Glu	Asn	Leu	Glu	Asp
	290					295					300				
Lys	Leu	Tyr	Gly	Gly	Lys	Leu	Ile	Val	Ala	Val	His	Phe	Glu	Asn	Cys
305					310					315					320
Gln	Asp	Val	Phe	Ser	Phe	Gln	Val	Ser	Pro	Asn	Met	Asn	Pro	Ile	Lys
				325					330					335	
Val	Asn	Glu	Leu	Ala	Ile	Gln	Lys	Arg	Leu	Thr	Ile	His	Gly	Lys	Glu
			340					345					350		
Asp	Glu	Val	Ser	Pro	Tyr	Asp	Tyr	Val	Leu	Gln	Val	Ser	Gly	Arg	Val
		355					360					365			
Glu	Tyr	Val	Phe	Gly	Asp	His	Pro	Leu	Ile	Gln	Phe	Gln	Tyr	Ile	Arg
	370					375					380				
Asn	Cys	Val	Met	Asn	Arg	Ala	Leu	Pro	His	Phe	Ile	Leu	Val	Glu	Cys
385					390					395					400
Cys	Lys	Ile	Lys	Lys	Met	Tyr	Glu	Gln	Glu	Met	Ile	Ala	Ile	Glu	Ala
				405					410					415	
Ala	Ile	Asn	Arg	Asn	Ser	Ser	Asn	Leu	Pro	Leu	Pro	Leu	Pro	Pro	Lys
				420				425					430		

Lys Thr Arg Ile Ile Ser His Val Trp Glu Asn Asn Asn Pro Phe Gln
 435 440 445
 Ile Val Leu Val Lys Gly Asn Lys Leu Asn Thr Glu Glu Thr Val Lys
 450 455 460
 Val His Val Arg Ala Gly Leu Phe His Gly Thr Glu Leu Leu Cys Lys
 465 470 475 480
 Thr Ile Val Ser Ser Glu Val Ser Gly Lys Asn Asp His Ile Trp Asn
 485 490 495
 Glu Pro Leu Glu Phe Asp Ile Asn Ile Cys Asp Leu Pro Arg Met Ala
 500 505 510
 Arg Leu Cys Phe Ala Val Tyr Ala Val Leu Asp Lys Val Lys Thr Lys
 515 520 525
 Lys Ser Thr Lys Thr Ile Asn Pro Ser Lys Tyr Gln Thr Ile Arg Lys
 530 535 540
 Ala Gly Lys Val His Tyr Pro Val Ala Trp Val Asn Thr Met Val Phe
 545 550 555 560
 Asp Phe Lys Gly Gln Leu Arg Thr Gly Asp Ile Ile Leu His Ser Trp
 565 570 575
 Ser Ser Phe Pro Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Asn Pro Met Gly Thr
 580 585 590
 Val Gln Thr Asn Pro Tyr Thr Glu Asn Ala Thr Ala Leu His Val Lys
 595 600 605
 Phe Pro Glu Asn Lys Lys Gln Pro Tyr Tyr Tyr Pro Pro Phe Asp Lys
 610 615 620
 Ile Ile Glu Lys Ala Ala Glu Ile Ala Ser Ser Asp Ser Ala Asn Val
 625 630 635 640
 Ser Ser Arg Gly Gly Lys Lys Phe Leu Pro Val Leu Lys Glu Ile Leu
 645 650 655
 Asp Arg Asp Pro Leu Ser Gln Leu Cys Glu Asn Glu Met Asp Leu Ile
 660 665 670
 Trp Thr Leu Arg Gln Asp Cys Arg Glu Ile Phe Pro Gln Ser Leu Pro
 675 680 685

Lys Leu Leu Leu Ser Ile Lys Trp Asn Lys Leu Glu Asp Val Ala Gln
 690 695 700
 Leu Gln Ala Leu Leu Gln Ile Trp Pro Lys Leu Pro Pro Arg Glu Ala
 705 710 715 720
 Leu Glu Leu Leu Asp Phe Asn Tyr Pro Asp Gln Tyr Val Arg Glu Tyr
 725 730 735
 Ala Val Gly Cys Leu Arg Gln Met Ser Asp Glu Glu Leu Ser Gln Tyr
 740 745 750
 Leu Leu Gln Leu Val Gln Val Leu Lys Tyr Glu Pro Phe Leu Asp Cys
 755 760 765
 Ala Leu Ser Arg Phe Leu Leu Glu Arg Ala Leu Gly Asn Arg Arg Ile
 770 775 780
 Gly Gln Phe Leu Phe Trp His Leu Arg Ser Glu Val His Ile Pro Ala
 785 790 795 800
 Val Ser Val Gln Phe Gly Val Ile Leu Glu Ala Tyr Cys Arg Gly Ser
 805 810 815
 Val Gly His Met Lys Val Leu Ser Lys Gln Val Glu Ala Leu Asn Lys
 820 825 830
 Leu Lys Thr Leu Asn Ser Leu Ile Lys Leu Asn Ala Val Lys Leu Asn
 835 840 845
 Arg Ala Lys Gly Lys Glu Ala Met His Thr Cys Leu Lys Gln Ser Ala
 850 855 860
 Tyr Arg Glu Ala Leu Ser Asp Leu Gln Ser Pro Leu Asn Pro Cys Val
 865 870 875 880
 Ile Leu Ser Glu Leu Tyr Val Glu Lys Cys Lys Tyr Met Asp Ser Lys
 885 890 895
 Met Lys Pro Leu Trp Leu Val Tyr Asn Asn Lys Val Phe Gly Glu Asp
 900 905 910
 Ser Val Gly Val Ile Phe Lys Asn Gly Asp Asp Leu Arg Gln Asp Met
 915 920 925
 Leu Thr Leu Gln Met Leu Arg Leu Met Asp Leu Leu Trp Lys Glu Ala

930	935	940
Gly Leu Asp Leu Arg Met Leu Pro Tyr Gly Cys Leu Ala Thr Gly Asp		
945	950	955 960
Arg Ser Gly Leu Ile Glu Val Val Ser Thr Ser Glu Thr Ile Ala Asp		
	965	970 975
Ile Gln Leu Asn Ser Ser Asn Val Ala Ala Ala Ala Phe Asn Lys		
	980	985 990
Asp Ala Leu Leu Asn Trp Leu Lys Glu Tyr Asn Ser Gly Asp Asp Leu		
	995	1000 1005
Asp Arg Ala Ile Glu Glu Phe Thr Leu Ser Cys Ala Gly Tyr Cys		
	1010	1015 1020
Val Ala Ser Tyr Val Leu Gly Ile Gly Asp Arg His Ser Asp Asn		
	1025	1030 1035
Ile Met Val Lys Lys Thr Gly Gln Leu Phe His Ile Asp Phe Gly		
	1040	1045 1050
His Ile Leu Gly Asn Phe Lys Ser Lys Phe Gly Ile Lys Arg Glu		
	1055	1060 1065
Arg Val Pro Phe Ile Leu Thr Tyr Asp Phe Ile His Val Ile Gln		
	1070	1075 1080
Gln Gly Lys Thr Gly Asn Thr Glu Lys Phe Gly Arg Phe Arg Gln		
	1085	1090 1095
Cys Cys Glu Asp Ala Tyr Leu Ile Leu Arg Arg His Gly Asn Leu		
	1100	1105 1110
Phe Ile Thr Leu Phe Ala Leu Met Leu Thr Ala Gly Leu Pro Glu		
	1115	1120 1125
Leu Thr Ser Val Lys Asp Ile Gln Tyr Leu Lys Asp Ser Leu Ala		
	1130	1135 1140
Leu Gly Lys Ser Glu Glu Glu Ala Leu Lys Gln Phe Lys Gln Lys		
	1145	1150 1155
Phe Asp Glu Ala Leu Arg Glu Ser Trp Thr Thr Lys Val Asn Trp		
	1160	1165 1170

Met Ala His Thr Val Arg Lys Asp Tyr Arg Ser Gly Ala His His
1175 1180 1185

His His His His Gly Ala
1190

<210> 13
<211> 966
<212> PRT
<213> штучна

<220>
<223> Конструкція кінази PI3K

<400> 13

Met Ser Glu Glu Ser Gln Ala Phe Gln Arg Gln Leu Thr Ala Leu Ile
1 5 10 15

Gly Tyr Asp Val Thr Asp Val Ser Asn Val His Asp Asp Glu Leu Glu
20 25 30

Phe Thr Arg Arg Gly Leu Val Thr Pro Arg Met Ala Glu Val Ala Ser
35 40 45

Arg Asp Pro Lys Leu Tyr Ala Met His Pro Trp Val Thr Ser Lys Pro
50 55 60

Leu Pro Glu Tyr Leu Trp Lys Lys Ile Ala Asn Asn Cys Ile Phe Ile
65 70 75 80

Val Ile His Arg Ser Thr Thr Ser Gln Thr Ile Lys Val Ser Pro Asp
85 90 95

Asp Thr Pro Gly Ala Ile Leu Gln Ser Phe Phe Thr Lys Met Ala Lys
100 105 110

Lys Lys Ser Leu Met Asp Ile Pro Glu Ser Gln Ser Glu Gln Asp Phe
115 120 125

Val Leu Arg Val Cys Gly Arg Asp Glu Tyr Leu Val Gly Glu Thr Pro
130 135 140

Ile Lys Asn Phe Gln Trp Val Arg His Cys Leu Lys Asn Gly Glu Glu
145 150 155 160

Ile His Val Val Leu Asp Thr Pro Pro Asp Pro Ala Leu Asp Glu Val
165 170 175

Arg Lys Glu Glu Trp Pro Leu Val Asp Asp Cys Thr Gly Val Thr Gly

[illegible]

Leu Trp His Phe Arg Tyr Glu Ser Leu Lys His Pro Lys Ala Tyr Pro
 435 440 445
 Lys Leu Phe Ser Ser Val Lys Trp Gly Gln Gln Glu Ile Val Ala Lys
 450 455 460
 Thr Tyr Gln Leu Leu Ala Arg Arg Glu Val Trp Asp Gln Ser Ala Leu
 465 470 475 480
 Asp Val Gly Leu Thr Met Gln Leu Leu Asp Cys Asn Phe Ser Asp Glu
 485 490 495
 Asn Val Arg Ala Ile Ala Val Gln Lys Leu Glu Ser Leu Glu Asp Asp
 500 505 510
 Asp Val Leu His Tyr Leu Leu Gln Leu Val Gln Ala Val Lys Phe Glu
 515 520 525
 Pro Tyr His Asp Ser Ala Leu Ala Arg Phe Leu Leu Lys Arg Gly Leu
 530 535 540
 Arg Asn Lys Arg Ile Gly His Phe Leu Phe Trp Phe Leu Arg Ser Glu
 545 550 555 560
 Ile Ala Gln Ser Arg His Tyr Gln Gln Arg Phe Ala Val Ile Leu Glu
 565 570 575
 Ala Tyr Leu Arg Gly Cys Gly Thr Ala Met Leu His Asp Phe Thr Gln
 580 585 590
 Gln Val Gln Val Ile Glu Met Leu Gln Lys Val Thr Leu Asp Ile Lys
 595 600 605
 Ser Leu Ser Ala Glu Lys Tyr Asp Val Ser Ser Gln Val Ile Ser Gln
 610 615 620
 Leu Lys Gln Lys Leu Glu Asn Leu Gln Asn Ser Gln Leu Pro Glu Ser
 625 630 635 640
 Phe Arg Val Pro Tyr Asp Pro Gly Leu Lys Ala Gly Ala Leu Ala Ile
 645 650 655
 Glu Lys Cys Lys Val Met Ala Ser Lys Lys Lys Pro Leu Trp Leu Glu
 660 665 670
 Phe Lys Cys Ala Asp Pro Thr Ala Leu Ser Asn Glu Thr Ile Gly Ile
 675 680 685

Ile Phe Lys His Gly Asp Asp Leu Arg Gln Asp Met Leu Ile Leu Gln
690 695 700

Ile Leu Arg Ile Met Glu Ser Ile Trp Glu Thr Glu Ser Leu Asp Leu
705 710 715 720

Cys Leu Leu Pro Tyr Gly Cys Ile Ser Thr Gly Asp Lys Ile Gly Met
725 730 735

Ile Glu Ile Val Lys Asp Ala Thr Thr Ile Ala Lys Ile Gln Gln Ser
740 745 750

Thr Val Gly Asn Thr Gly Ala Phe Lys Asp Glu Val Leu Asn His Trp
755 760 765

Leu Lys Glu Lys Ser Pro Thr Glu Glu Lys Phe Gln Ala Ala Val Glu
770 775 780

Arg Phe Val Tyr Ser Cys Ala Gly Tyr Cys Val Ala Thr Phe Val Leu
785 790 795 800

Gly Ile Gly Asp Arg His Asn Asp Asn Ile Met Ile Thr Glu Thr Gly
805 810 815

Asn Leu Phe His Ile Asp Phe Gly His Ile Leu Gly Asn Tyr Lys Ser
820 825 830

Phe Leu Gly Ile Asn Lys Glu Arg Val Pro Phe Val Leu Thr Pro Asp
835 840 845

Phe Leu Phe Val Met Gly Thr Ser Gly Lys Lys Thr Ser Pro His Phe
850 855 860

Gln Lys Phe Gln Asp Ile Cys Val Lys Ala Tyr Leu Ala Leu Arg His
865 870 875 880

His Thr Asn Leu Leu Ile Ile Leu Phe Ser Met Met Leu Met Thr Gly
885 890 895

Met Pro Gln Leu Thr Ser Lys Glu Asp Ile Glu Tyr Ile Arg Asp Ala
900 905 910

Leu Thr Val Gly Lys Asn Glu Glu Asp Ala Lys Lys Tyr Phe Leu Asp
915 920 925

Gln Ile Glu Val Cys Arg Asp Lys Gly Trp Thr Val Gln Phe Asn Trp
930 935 940

Phe Leu His Leu Val Leu Gly Ile Lys Gln Gly Glu Lys His Ser Ala
945 950 955 960

His His His His His His
965

<210> 14
<211> 45
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Праймер ПЛР

<400> 14
tcctcctcct cctcctcctg gtttaatgct gttcatacgt ttgtc 45

<210> 15
<211> 26
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Праймер ПЛР

<400> 15
atgccccctg gggaggactg ccccat 26

<210> 16
<211> 26
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Праймер ПЛР

<400> 16
ctactgcctg ttgtcttttg acacgt 26

<210> 17
<211> 53
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Праймер ПЛР

<400> 17
attaaaccag gaggaggagg aggaggaccc cctgggggtg actgccccat gga 53

<210> 18
<211> 56
<212> ДНК
<213> штучна

<220>

<223> Праймер ПЛР

<400> 18

agctccgta tggatgatgg gatgtgctcc ctgctgttg tctttggaca cgttgt 56

<210> 19

<211> 60

<212> ДНК

<213> штучна

<220>

<223> Праймер ПЛР

<400> 19

gggaccactt tgtacaaga agctgggttt aagctccgtg atggtgatgg tgagtgtcc 60

<210> 20

<211> 1169

<212> PRT

<213> штучна

<220>

<223> Конструкція кінрази PI3K

<400> 20

Met Arg Glu Tyr Asp Arg Leu Tyr Glu Glu Tyr Thr Arg Thr Ser Gln
1 5 10 15

Glu Ile Gln Met Lys Arg Thr Ala Ile Glu Ala Phe Asn Glu Thr Ile
20 25 30

Lys Ile Phe Glu Glu Gln Cys Gln Thr Gln Glu Arg Tyr Ser Lys Glu
35 40 45

Tyr Ile Glu Lys Phe Lys Arg Glu Gly Asn Glu Lys Glu Ile Gln Arg
50 55 60

Ile Met His Asn Tyr Asp Lys Leu Lys Ser Arg Ile Ser Glu Ile Ile
65 70 75 80

Asp Ser Arg Arg Arg Leu Glu Glu Asp Leu Lys Lys Gln Ala Ala Glu
85 90 95

Tyr Arg Glu Ile Asp Lys Arg Met Asn Ser Ile Lys Pro Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Pro Pro Gly Val Asp Cys Pro Met Glu Phe Trp Thr Lys
115 120 125

Glu Glu Asn Gln Ser Val Val Val Asp Phe Leu Leu Pro Thr Gly Val
130 135 140

Tyr Leu Asn Phe Pro Val Ser Arg Asn Ala Asn Leu Ser Thr Ile Lys
145 150 155 160

Gln Leu Leu Trp His Arg Ala Gln Tyr Glu Pro Leu Phe His Met Leu
165 170 175

Ser Gly Pro Glu Ala Tyr Val Phe Thr Cys Ile Asn Gln Thr Ala Glu
180 185 190

Gln Gln Glu Leu Glu Asp Glu Gln Arg Arg Leu Cys Asp Val Gln Pro
195 200 205

Phe Leu Pro Val Leu Arg Leu Val Ala Arg Glu Gly Asp Arg Val Lys
210 215 220

Lys Leu Ile Asn Ser Gln Ile Ser Leu Leu Ile Gly Lys Gly Leu His
225 230 235 240

Glu Phe Asp Ser Leu Cys Asp Pro Glu Val Asn Asp Phe Arg Ala Lys
245 250 255

Met Cys Gln Phe Cys Glu Glu Ala Ala Ala Arg Arg Gln Gln Leu Gly
260 265 270

Trp Glu Ala Trp Leu Gln Tyr Ser Phe Pro Leu Gln Leu Glu Pro Ser
275 280 285

Ala Gln Thr Trp Gly Pro Gly Thr Leu Arg Leu Pro Asn Arg Ala Leu
290 295 300

Leu Val Asn Val Lys Phe Glu Gly Ser Glu Glu Ser Phe Thr Phe Gln
305 310 315 320

Val Ser Thr Lys Asp Val Pro Leu Ala Leu Met Ala Cys Ala Leu Arg
325 330 335

Lys Lys Ala Thr Val Phe Arg Gln Pro Leu Val Glu Gln Pro Glu Asp
340 345 350

Tyr Thr Leu Gln Val Asn Gly Arg His Glu Tyr Leu Tyr Gly Ser Tyr
355 360 365

Pro Leu Cys Gln Phe Gln Tyr Ile Cys Ser Cys Leu His Ser Gly Leu
370 375 380

Thr Pro His Leu Thr Met Val His Ser Ser Ser Ile Leu Ala Met Arg

385		390		395		400									
Asp	Glu	Gln	Ser	Asn	Pro	Ala	Pro	Gln	Val	Gln	Lys	Pro	Arg	Ala	Lys
				405					410					415	
Pro	Pro	Pro	Ile	Pro	Ala	Lys	Lys	Pro	Ser	Ser	Val	Ser	Leu	Trp	Ser
			420					425					430		
Leu	Glu	Gln	Pro	Phe	Arg	Ile	Glu	Leu	Ile	Gln	Gly	Ser	Lys	Val	Asn
		435					440					445			
Ala	Asp	Glu	Arg	Met	Lys	Leu	Val	Val	Gln	Ala	Gly	Leu	Phe	His	Gly
	450					455					460				
Asn	Glu	Met	Leu	Cys	Lys	Thr	Val	Ser	Ser	Ser	Glu	Val	Ser	Val	Cys
465					470					475					480
Ser	Glu	Pro	Val	Trp	Lys	Gln	Arg	Leu	Glu	Phe	Asp	Ile	Asn	Ile	Cys
				485					490					495	
Asp	Leu	Pro	Arg	Met	Ala	Arg	Leu	Cys	Phe	Ala	Leu	Tyr	Ala	Val	Ile
			500					505					510		
Glu	Lys	Ala	Lys	Lys	Ala	Arg	Ser	Thr	Lys	Lys	Lys	Ser	Lys	Lys	Ala
		515					520					525			
Asp	Cys	Pro	Ile	Ala	Trp	Ala	Asn	Leu	Met	Leu	Phe	Asp	Tyr	Lys	Asp
	530					535					540				
Gln	Leu	Lys	Thr	Gly	Glu	Arg	Cys	Leu	Tyr	Met	Trp	Pro	Ser	Val	Pro
545					550					555					560
Asp	Glu	Lys	Gly	Glu	Leu	Leu	Asn	Pro	Thr	Gly	Thr	Val	Arg	Ser	Asn
			565					570						575	
Pro	Asn	Thr	Asp	Ser	Ala	Ala	Ala	Leu	Leu	Ile	Cys	Leu	Pro	Glu	Val
			580					585					590		
Ala	Pro	His	Pro	Val	Tyr	Tyr	Pro	Ala	Leu	Glu	Lys	Ile	Leu	Glu	Leu
		595					600					605			
Gly	Arg	His	Ser	Glu	Cys	Val	His	Val	Thr	Glu	Glu	Glu	Gln	Leu	Gln
	610					615					620				
Leu	Arg	Glu	Ile	Leu	Glu	Arg	Arg	Gly	Ser	Gly	Glu	Leu	Tyr	Glu	His
625					630					635					640

Glu Lys Asp Leu Val Trp Lys Leu Arg His Glu Val Gln Glu His Phe
 645 650 655
 Pro Glu Ala Leu Ala Arg Leu Leu Leu Val Thr Lys Trp Asn Lys His
 660 665 670
 Glu Asp Val Ala Gln Met Leu Tyr Leu Leu Cys Ser Trp Pro Glu Leu
 675 680 685
 Pro Val Leu Ser Ala Leu Glu Leu Leu Asp Phe Ser Phe Pro Asp Cys
 690 695 700
 His Val Gly Ser Phe Ala Ile Lys Ser Leu Arg Lys Leu Thr Asp Asp
 705 710 715 720
 Glu Leu Phe Gln Tyr Leu Leu Gln Leu Val Gln Val Leu Lys Tyr Glu
 725 730 735
 Ser Tyr Leu Asp Cys Glu Leu Thr Lys Phe Leu Leu Asp Arg Ala Leu
 740 745 750
 Ala Asn Arg Lys Ile Gly His Phe Leu Phe Trp His Leu Arg Ser Glu
 755 760 765
 Met His Val Pro Ser Val Ala Leu Arg Phe Gly Leu Ile Leu Glu Ala
 770 775 780
 Tyr Cys Arg Gly Ser Thr His His Met Lys Val Leu Met Lys Gln Gly
 785 790 795 800
 Glu Ala Leu Ser Lys Leu Lys Ala Leu Asn Asp Phe Val Lys Leu Ser
 805 810 815
 Ser Gln Lys Thr Pro Lys Pro Gln Thr Lys Glu Leu Met His Leu Cys
 820 825 830
 Met Arg Gln Glu Ala Tyr Leu Glu Ala Leu Ser His Leu Gln Ser Pro
 835 840 845
 Leu Asp Pro Ser Thr Leu Leu Ala Glu Val Cys Val Glu Gln Cys Thr
 850 855 860
 Phe Met Asp Ser Lys Met Lys Pro Leu Trp Ile Met Tyr Ser Asn Glu
 865 870 875 880
 Glu Ala Gly Ser Gly Gly Ser Val Gly Ile Ile Phe Lys Asn Gly Asp
 885 890 895

Asp Leu Arg Gln Asp Met Leu Thr Leu Gln Met Ile Gln Leu Met Asp
 900 905 910
 Val Leu Trp Lys Gln Glu Gly Leu Asp Leu Arg Met Thr Pro Tyr Gly
 915 920 925
 Cys Leu Pro Thr Gly Asp Arg Thr Gly Leu Ile Glu Val Val Leu Arg
 930 935 940
 Ser Asp Thr Ile Ala Asn Ile Gln Leu Asn Lys Ser Asn Met Ala Ala
 945 950 955 960
 Thr Ala Ala Phe Asn Lys Asp Ala Leu Leu Asn Trp Leu Lys Ser Lys
 965 970 975
 Asn Pro Gly Glu Ala Leu Asp Arg Ala Ile Glu Glu Phe Thr Leu Ser
 980 985 990
 Cys Ala Gly Tyr Cys Val Ala Thr Tyr Val Leu Gly Ile Gly Asp Arg
 995 1000 1005
 His Ser Asp Asn Ile Met Ile Arg Glu Ser Gly Gln Leu Phe His
 1010 1015 1020
 Ile Asp Phe Gly His Phe Leu Gly Asn Phe Lys Thr Lys Phe Gly
 1025 1030 1035
 Ile Asn Arg Glu Arg Val Pro Phe Ile Leu Thr Tyr Asp Phe Val
 1040 1045 1050
 His Val Ile Gln Gln Gly Lys Thr Asn Asn Ser Glu Lys Phe Glu
 1055 1060 1065
 Arg Phe Arg Gly Tyr Cys Glu Arg Ala Tyr Thr Ile Leu Arg Arg
 1070 1075 1080
 His Gly Leu Leu Phe Leu His Leu Phe Ala Leu Met Arg Ala Ala
 1085 1090 1095
 Gly Leu Pro Glu Leu Ser Cys Ser Lys Asp Ile Gln Tyr Leu Lys
 1100 1105 1110
 Asp Ser Leu Ala Leu Gly Lys Thr Glu Glu Glu Ala Leu Lys His
 1115 1120 1125
 Phe Arg Val Lys Phe Asn Glu Ala Leu Arg Glu Ser Trp Lys Thr
 1130 1135 1140

Lys Val Asn Trp Leu Ala His Asn Val Ser Lys Asp Asn Arg Gln
1145 1150 1155

Glu Leu Gly Gly Ala His His His His His His
1160 1165

<210> 21
<211> 33
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Праймер ПЛР

<400> 21
ctctctgaaa tcactaagca ggagaaagat ttt 33

<210> 22
<211> 33
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Праймер ПЛР

<400> 22
aaaatctttc tcctgcttag tgatttcaga gag 33

<210> 23
<211> 1180
<212> PRT
<213> штучна

<220>
<223> Конструкція кінази PI3K

<400> 23

Met Arg Glu Tyr Asp Arg Leu Tyr Glu Glu Tyr Thr Arg Thr Ser Gln
1 5 10 15

Glu Ile Gln Met Lys Arg Thr Ala Ile Glu Ala Phe Asn Glu Thr Ile
20 25 30

Lys Ile Phe Glu Glu Gln Cys Gln Thr Gln Glu Arg Tyr Ser Lys Glu
35 40 45

Tyr Ile Glu Lys Phe Lys Arg Glu Gly Asn Glu Lys Glu Ile Gln Arg
50 55 60

Ile Met His Asn Tyr Asp Lys Leu Lys Ser Arg Ile Ser Glu Ile Ile
65 70 75 80

Asp Ser Arg Arg Arg Leu Glu Glu Asp Leu Lys Lys Gln Ala Ala Glu
 85 90 95
 Tyr Arg Glu Ile Asp Lys Arg Met Asn Ser Ile Lys Pro Gly Gly Ile
 100 105 110
 Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ile Met Val Leu Val Glu Cys Leu Leu Pro
 115 120 125
 Asn Gly Met Ile Val Thr Leu Glu Cys Leu Arg Glu Ala Thr Leu Ile
 130 135 140
 Thr Ile Lys His Glu Leu Phe Lys Glu Ala Arg Lys Tyr Pro Leu His
 145 150 155 160
 Gln Leu Leu Gln Asp Glu Ser Ser Tyr Ile Phe Val Ser Val Thr Gln
 165 170 175
 Glu Ala Glu Arg Glu Glu Phe Phe Asp Glu Thr Arg Arg Leu Cys Asp
 180 185 190
 Leu Arg Leu Phe Gln Pro Phe Leu Lys Val Ile Glu Pro Val Gly Asn
 195 200 205
 Arg Glu Glu Lys Ile Leu Asn Arg Glu Ile Gly Phe Ala Ile Gly Met
 210 215 220
 Pro Val Cys Glu Phe Asp Met Val Lys Asp Pro Glu Val Gln Asp Phe
 225 230 235 240
 Arg Arg Asn Ile Leu Asn Val Cys Lys Glu Ala Val Asp Leu Arg Asp
 245 250 255
 Leu Asn Ser Pro His Ser Arg Ala Met Tyr Val Tyr Pro Pro Asn Val
 260 265 270
 Glu Ser Ser Pro Glu Leu Pro Lys His Ile Tyr Asn Lys Leu Asp Lys
 275 280 285
 Gly Gln Ile Ile Val Val Ile Trp Val Ile Val Ser Pro Asn Asn Asp
 290 295 300
 Lys Gln Lys Tyr Thr Leu Lys Ile Asn His Asp Cys Val Pro Glu Gln
 305 310 315 320
 Val Ile Ala Glu Ala Ile Arg Lys Lys Thr Arg Ser Met Leu Leu Ser
 325 330 335

Ser Glu Gln Leu Lys Leu Cys Val Leu Glu Tyr Gln Gly Lys Tyr Ile
340 345 350

Leu Lys Val Cys Gly Cys Asp Glu Tyr Phe Leu Glu Lys Tyr Pro Leu
355 360 365

Ser Gln Tyr Lys Tyr Ile Arg Ser Cys Ile Met Leu Gly Arg Met Pro
370 375 380

Asn Leu Met Leu Met Ala Lys Glu Ser Leu Tyr Ser Gln Leu Pro Met
385 390 395 400

Asp Cys Phe Thr Met Pro Ser Tyr Ser Arg Arg Ile Ser Thr Ala Thr
405 410 415

Pro Tyr Met Asn Gly Glu Thr Ser Thr Lys Ser Leu Trp Val Ile Asn
420 425 430

Ser Ala Leu Arg Ile Lys Ile Leu Cys Ala Thr Tyr Val Asn Val Asn
435 440 445

Ile Arg Asp Ile Asp Lys Ile Tyr Val Arg Thr Gly Ile Tyr His Gly
450 455 460

Gly Glu Pro Leu Cys Asp Asn Val Asn Thr Gln Arg Val Pro Cys Ser
465 470 475 480

Asn Pro Arg Trp Asn Glu Trp Leu Asn Tyr Asp Ile Tyr Ile Pro Asp
485 490 495

Leu Pro Arg Ala Ala Arg Leu Cys Leu Ser Ile Cys Ser Val Lys Gly
500 505 510

Arg Lys Gly Ala Lys Glu Glu His Cys Pro Leu Ala Trp Gly Asn Ile
515 520 525

Asn Leu Phe Asp Tyr Thr Asp Thr Leu Val Ser Gly Lys Met Ala Leu
530 535 540

Asn Leu Trp Pro Val Pro His Gly Leu Glu Asp Leu Leu Asn Pro Ile
545 550 555 560

Gly Val Thr Gly Ser Asn Pro Asn Lys Glu Thr Pro Cys Leu Glu Leu
565 570 575

Glu Phe Asp Trp Phe Ser Ser Val Val Lys Phe Pro Asp Met Ser Val

580					585					590					
Ile	Glu	Glu	His	Ala	Asn	Trp	Ser	Val	Ser	Arg	Glu	Ala	Gly	Phe	Ser
		595					600					605			
Tyr	Ser	His	Ala	Gly	Leu	Ser	Asn	Arg	Leu	Ala	Arg	Asp	Asn	Glu	Leu
	610					615					620				
Arg	Glu	Asn	Asp	Lys	Glu	Gln	Leu	Lys	Ala	Ile	Ser	Thr	Arg	Asp	Pro
625					630					635					640
Leu	Ser	Glu	Ile	Thr	Lys	Gln	Glu	Lys	Asp	Phe	Leu	Trp	Ser	His	Arg
				645					650					655	
His	Tyr	Cys	Val	Thr	Ile	Pro	Glu	Ile	Leu	Pro	Lys	Leu	Leu	Leu	Ser
			660					665						670	
Val	Lys	Trp	Asn	Ser	Arg	Asp	Glu	Val	Ala	Gln	Met	Tyr	Cys	Leu	Val
		675					680					685			
Lys	Asp	Trp	Pro	Pro	Ile	Lys	Pro	Glu	Gln	Ala	Met	Glu	Leu	Leu	Asp
	690					695					700				
Cys	Asn	Tyr	Pro	Asp	Pro	Met	Val	Arg	Gly	Phe	Ala	Val	Arg	Cys	Leu
705					710					715					720
Glu	Lys	Tyr	Leu	Thr	Asp	Asp	Lys	Leu	Ser	Gln	Tyr	Leu	Ile	Gln	Leu
				725					730					735	
Val	Gln	Val	Leu	Lys	Tyr	Glu	Gln	Tyr	Leu	Asp	Asn	Leu	Leu	Val	Arg
			740					745					750		
Phe	Leu	Leu	Lys	Lys	Ala	Leu	Thr	Asn	Gln	Arg	Ile	Gly	His	Phe	Phe
	755						760					765			
Phe	Trp	His	Leu	Lys	Ser	Glu	Met	His	Asn	Lys	Thr	Val	Ser	Gln	Arg
	770					775					780				
Phe	Gly	Leu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Cys	Arg	Ala	Cys	Gly	Met	Tyr	Leu
785					790					795					800
Lys	His	Leu	Asn	Arg	Gln	Val	Glu	Ala	Met	Glu	Lys	Leu	Ile	Asn	Leu
			805						810					815	
Thr	Asp	Ile	Leu	Lys	Gln	Glu	Lys	Lys	Asp	Glu	Thr	Gln	Lys	Val	Gln
			820					825					830		

Met	Lys	Phe	Leu	Val	Glu	Gln	Met	Arg	Arg	Pro	Asp	Phe	Met	Asp	Ala
		835					840					845			
Leu	Gln	Gly	Phe	Leu	Ser	Pro	Leu	Asn	Pro	Ala	His	Gln	Leu	Gly	Asn
	850					855					860				
Leu	Arg	Leu	Glu	Glu	Cys	Arg	Ile	Met	Ser	Ser	Ala	Lys	Arg	Pro	Leu
865					870					875					880
Trp	Leu	Asn	Trp	Glu	Asn	Pro	Asp	Ile	Met	Ser	Glu	Leu	Leu	Phe	Gln
				885					890						895
Asn	Asn	Glu	Ile	Ile	Phe	Lys	Asn	Gly	Asp	Asp	Leu	Arg	Gln	Asp	Met
			900					905					910		
Leu	Thr	Leu	Gln	Ile	Ile	Arg	Ile	Met	Glu	Asn	Ile	Trp	Gln	Asn	Gln
		915					920						925		
Gly	Leu	Asp	Leu	Arg	Met	Leu	Pro	Tyr	Gly	Cys	Leu	Ser	Ile	Gly	Asp
	930					935					940				
Cys	Val	Gly	Leu	Ile	Glu	Val	Val	Arg	Asn	Ser	His	Thr	Ile	Met	Gln
945					950					955					960
Ile	Gln	Cys	Lys	Gly	Gly	Leu	Lys	Gly	Ala	Leu	Gln	Phe	Asn	Ser	His
				965					970						975
Thr	Leu	His	Gln	Trp	Leu	Lys	Asp	Lys	Asn	Lys	Gly	Glu	Ile	Tyr	Asp
			980					985						990	
Ala	Ala	Ile	Asp	Leu	Phe	Thr	Arg	Ser	Cys	Ala	Gly	Tyr	Cys	Val	Ala
		995					1000						1005		
Thr	Phe	Ile	Leu	Gly	Ile	Gly	Asp	Arg	His	Asn	Ser	Asn	Ile	Met	
	1010					1015					1020				
Val	Lys	Asp	Asp	Gly	Gln	Leu	Phe	His	Ile	Asp	Phe	Gly	His	Phe	
	1025					1030					1035				
Leu	Asp	His	Lys	Lys	Lys	Lys	Phe	Gly	Tyr	Lys	Arg	Glu	Arg	Val	
	1040					1045					1050				
Pro	Phe	Val	Leu	Thr	Gln	Asp	Phe	Leu	Ile	Val	Ile	Ser	Lys	Gly	
	1055					1060					1065				
Ala	Gln	Glu	Cys	Thr	Lys	Thr	Arg	Glu	Phe	Glu	Arg	Phe	Gln	Glu	
	1070					1075					1080				

Met Cys Tyr Lys Ala Tyr Leu Ala Ile Arg Gln His Ala Asn Leu
1085 1090 1095

Phe Ile Asn Leu Phe Ser Met Met Leu Gly Ser Gly Met Pro Glu
1100 1105 1110

Leu Gln Ser Phe Asp Asp Ile Ala Tyr Ile Arg Lys Thr Leu Ala
1115 1120 1125

Leu Asp Lys Thr Glu Gln Glu Ala Leu Glu Tyr Phe Met Lys Gln
1130 1135 1140

Met Asn Asp Ala His His Gly Gly Trp Thr Thr Lys Met Asp Trp
1145 1150 1155

Ile Phe His Thr Ile Lys Gln His Ala Leu Asn Glu Leu Gly Gly
1160 1165 1170

Ala His His His His His His
1175 1180

<210> 24
<211> 33
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Праймер ПЛР

<400> 24
caaatgaatg atgcacgtca tgggtggctgg aca

33

<210> 25
<211> 33
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Праймер ПЛР

<400> 25
tgtccagcca ccatgacgtg catcattcat ttg

33

<210> 26
<211> 1180
<212> PRT
<213> штучна

<220>
<223> Конструкція кінази PI3K

<400> 26

Met	Arg	Glu	Tyr	Asp	Arg	Leu	Tyr	Glu	Glu	Tyr	Thr	Arg	Thr	Ser	Gln	1	5	10	15
Glu	Ile	Gln	Met	Lys	Arg	Thr	Ala	Ile	Glu	Ala	Phe	Asn	Glu	Thr	Ile	20	25	30	
Lys	Ile	Phe	Glu	Glu	Gln	Cys	Gln	Thr	Gln	Glu	Arg	Tyr	Ser	Lys	Glu	35	40	45	
Tyr	Ile	Glu	Lys	Phe	Lys	Arg	Glu	Gly	Asn	Glu	Lys	Glu	Ile	Gln	Arg	50	55	60	
Ile	Met	His	Asn	Tyr	Asp	Lys	Leu	Lys	Ser	Arg	Ile	Ser	Glu	Ile	Ile	65	70	75	80
Asp	Ser	Arg	Arg	Arg	Leu	Glu	Glu	Asp	Leu	Lys	Lys	Gln	Ala	Ala	Glu	85	90	95	
Tyr	Arg	Glu	Ile	Asp	Lys	Arg	Met	Asn	Ser	Ile	Lys	Pro	Gly	Gly	Ile	100	105	110	
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ile	Met	Val	Leu	Val	Glu	Cys	Leu	Leu	Pro	115	120	125	
Asn	Gly	Met	Ile	Val	Thr	Leu	Glu	Cys	Leu	Arg	Glu	Ala	Thr	Leu	Ile	130	135	140	
Thr	Ile	Lys	His	Glu	Leu	Phe	Lys	Glu	Ala	Arg	Lys	Tyr	Pro	Leu	His	145	150	155	160
Gln	Leu	Leu	Gln	Asp	Glu	Ser	Ser	Tyr	Ile	Phe	Val	Ser	Val	Thr	Gln	165	170	175	
Glu	Ala	Glu	Arg	Glu	Glu	Phe	Phe	Asp	Glu	Thr	Arg	Arg	Leu	Cys	Asp	180	185	190	
Leu	Arg	Leu	Phe	Gln	Pro	Phe	Leu	Lys	Val	Ile	Glu	Pro	Val	Gly	Asn	195	200	205	
Arg	Glu	Glu	Lys	Ile	Leu	Asn	Arg	Glu	Ile	Gly	Phe	Ala	Ile	Gly	Met	210	215	220	
Pro	Val	Cys	Glu	Phe	Asp	Met	Val	Lys	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Asp	Phe	225	230	235	240
Arg	Arg	Asn	Ile	Leu	Asn	Val	Cys	Lys	Glu	Ala	Val	Asp	Leu	Arg	Asp	245	250	255	

Leu Asn Ser Pro His Ser Arg Ala Met Tyr Val Tyr Pro Pro Asn Val
 260 265 270
 Glu Ser Ser Pro Glu Leu Pro Lys His Ile Tyr Asn Lys Leu Asp Lys
 275 280 285
 Gly Gln Ile Ile Val Val Ile Trp Val Ile Val Ser Pro Asn Asn Asp
 290 295 300
 Lys Gln Lys Tyr Thr Leu Lys Ile Asn His Asp Cys Val Pro Glu Gln
 305 310 315 320
 Val Ile Ala Glu Ala Ile Arg Lys Lys Thr Arg Ser Met Leu Leu Ser
 325 330 335
 Ser Glu Gln Leu Lys Leu Cys Val Leu Glu Tyr Gln Gly Lys Tyr Ile
 340 345 350
 Leu Lys Val Cys Gly Cys Asp Glu Tyr Phe Leu Glu Lys Tyr Pro Leu
 355 360 365
 Ser Gln Tyr Lys Tyr Ile Arg Ser Cys Ile Met Leu Gly Arg Met Pro
 370 375 380
 Asn Leu Met Leu Met Ala Lys Glu Ser Leu Tyr Ser Gln Leu Pro Met
 385 390 395 400
 Asp Cys Phe Thr Met Pro Ser Tyr Ser Arg Arg Ile Ser Thr Ala Thr
 405 410 415
 Pro Tyr Met Asn Gly Glu Thr Ser Thr Lys Ser Leu Trp Val Ile Asn
 420 425 430
 Ser Ala Leu Arg Ile Lys Ile Leu Cys Ala Thr Tyr Val Asn Val Asn
 435 440 445
 Ile Arg Asp Ile Asp Lys Ile Tyr Val Arg Thr Gly Ile Tyr His Gly
 450 455 460
 Gly Glu Pro Leu Cys Asp Asn Val Asn Thr Gln Arg Val Pro Cys Ser
 465 470 475 480
 Asn Pro Arg Trp Asn Glu Trp Leu Asn Tyr Asp Ile Tyr Ile Pro Asp
 485 490 495
 Leu Pro Arg Ala Ala Arg Leu Cys Leu Ser Ile Cys Ser Val Lys Gly
 500 505 510

Arg Lys Gly Ala Lys Glu Glu His Cys Pro Leu Ala Trp Gly Asn Ile
515 520 525

Asn Leu Phe Asp Tyr Thr Asp Thr Leu Val Ser Gly Lys Met Ala Leu
530 535 540

Asn Leu Trp Pro Val Pro His Gly Leu Glu Asp Leu Leu Asn Pro Ile
545 550 555 560

Gly Val Thr Gly Ser Asn Pro Asn Lys Glu Thr Pro Cys Leu Glu Leu
565 570 575

Glu Phe Asp Trp Phe Ser Ser Val Val Lys Phe Pro Asp Met Ser Val
580 585 590

Ile Glu Glu His Ala Asn Trp Ser Val Ser Arg Glu Ala Gly Phe Ser
595 600 605

Tyr Ser His Ala Gly Leu Ser Asn Arg Leu Ala Arg Asp Asn Glu Leu
610 615 620

Arg Glu Asn Asp Lys Glu Gln Leu Lys Ala Ile Ser Thr Arg Asp Pro
625 630 635 640

Leu Ser Glu Ile Thr Glu Gln Glu Lys Asp Phe Leu Trp Ser His Arg
645 650 655

His Tyr Cys Val Thr Ile Pro Glu Ile Leu Pro Lys Leu Leu Leu Ser
660 665 670

Val Lys Trp Asn Ser Arg Asp Glu Val Ala Gln Met Tyr Cys Leu Val
675 680 685

Lys Asp Trp Pro Pro Ile Lys Pro Glu Gln Ala Met Glu Leu Leu Asp
690 695 700

Cys Asn Tyr Pro Asp Pro Met Val Arg Gly Phe Ala Val Arg Cys Leu
705 710 715 720

Glu Lys Tyr Leu Thr Asp Asp Lys Leu Ser Gln Tyr Leu Ile Gln Leu
725 730 735

Val Gln Val Leu Lys Tyr Glu Gln Tyr Leu Asp Asn Leu Leu Val Arg
740 745 750

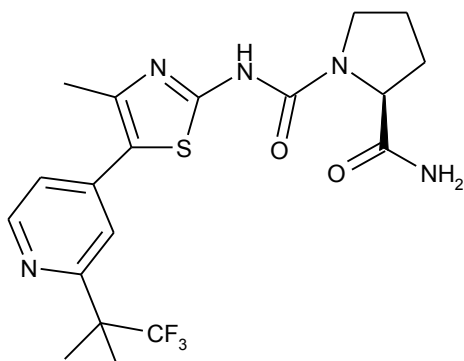
Phe Leu Leu Lys Lys Ala Leu Thr Asn Gln Arg Ile Gly His Phe Phe

755		760		765	
Phe Trp His Leu Lys Ser Glu Met His Asn Lys Thr Val Ser Gln Arg					
770		775		780	
Phe Gly Leu Leu Leu Glu Ser Tyr Cys Arg Ala Cys Gly Met Tyr Leu					
785		790		795	800
Lys His Leu Asn Arg Gln Val Glu Ala Met Glu Lys Leu Ile Asn Leu					
	805		810		815
Thr Asp Ile Leu Lys Gln Glu Lys Lys Asp Glu Thr Gln Lys Val Gln					
	820		825		830
Met Lys Phe Leu Val Glu Gln Met Arg Arg Pro Asp Phe Met Asp Ala					
	835		840		845
Leu Gln Gly Phe Leu Ser Pro Leu Asn Pro Ala His Gln Leu Gly Asn					
	850		855		860
Leu Arg Leu Glu Glu Cys Arg Ile Met Ser Ser Ala Lys Arg Pro Leu					
865		870		875	880
Trp Leu Asn Trp Glu Asn Pro Asp Ile Met Ser Glu Leu Leu Phe Gln					
	885		890		895
Asn Asn Glu Ile Ile Phe Lys Asn Gly Asp Asp Leu Arg Gln Asp Met					
	900		905		910
Leu Thr Leu Gln Ile Ile Arg Ile Met Glu Asn Ile Trp Gln Asn Gln					
	915		920		925
Gly Leu Asp Leu Arg Met Leu Pro Tyr Gly Cys Leu Ser Ile Gly Asp					
	930		935		940
Cys Val Gly Leu Ile Glu Val Val Arg Asn Ser His Thr Ile Met Gln					
945		950		955	960
Ile Gln Cys Lys Gly Gly Leu Lys Gly Ala Leu Gln Phe Asn Ser His					
	965		970		975
Thr Leu His Gln Trp Leu Lys Asp Lys Asn Lys Gly Glu Ile Tyr Asp					
	980		985		990
Ala Ala Ile Asp Leu Phe Thr Arg Ser Cys Ala Gly Tyr Cys Val Ala					
	995		1000		1005

Thr	Phe	Ile	Leu	Gly	Ile	Gly	Asp	Arg	His	Asn	Ser	Asn	Ile	Met
1010						1015					1020			
Val	Lys	Asp	Asp	Gly	Gln	Leu	Phe	His	Ile	Asp	Phe	Gly	His	Phe
1025						1030					1035			
Leu	Asp	His	Lys	Lys	Lys	Lys	Phe	Gly	Tyr	Lys	Arg	Glu	Arg	Val
1040						1045					1050			
Pro	Phe	Val	Leu	Thr	Gln	Asp	Phe	Leu	Ile	Val	Ile	Ser	Lys	Gly
1055						1060					1065			
Ala	Gln	Glu	Cys	Thr	Lys	Thr	Arg	Glu	Phe	Glu	Arg	Phe	Gln	Glu
1070						1075					1080			
Met	Cys	Tyr	Lys	Ala	Tyr	Leu	Ala	Ile	Arg	Gln	His	Ala	Asn	Leu
1085						1090					1095			
Phe	Ile	Asn	Leu	Phe	Ser	Met	Met	Leu	Gly	Ser	Gly	Met	Pro	Glu
1100						1105					1110			
Leu	Gln	Ser	Phe	Asp	Asp	Ile	Ala	Tyr	Ile	Arg	Lys	Thr	Leu	Ala
1115						1120					1125			
Leu	Asp	Lys	Thr	Glu	Gln	Glu	Ala	Leu	Glu	Tyr	Phe	Met	Lys	Gln
1130						1135					1140			
Met	Asn	Asp	Ala	Arg	His	Gly	Gly	Trp	Thr	Thr	Lys	Met	Asp	Trp
1145						1150					1155			
Ile	Phe	His	Thr	Ile	Lys	Gln	His	Ala	Leu	Asn	Glu	Leu	Gly	Gly
1160						1165					1170			
Ala	His	His	His	His	His	His								
1175						1180								

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Сполука, яка являє собою 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)піридин-4-іл]тіазол-2-іл}амід)-(S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти, структури:



у вільній формі або у формі фармацевтично прийнятної солі.

2. Сполука за п. 1 у вільній формі або у формі фармацевтично прийнятної солі для застосування як лікарського засобу.

3. Сполука за п. 1 або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування у лікуванні проліферативного захворювання; доброякісної або злоякісної пухлини; раку, вибраного з групи, що включає саркому, рак легенів, бронхів, передміхурової залози, молочної залози (включаючи спорадичні типи раку молочної залози та страждаючих хворобою Коудена), підшлункової залози, шлунково-кишковий рак, товстої кишки, прямої кишки, карциноми товстої кишки, колоректальної аденоми, щитовидної залози, печінки, внутріпечінкової жовчної протоки, гепатоцелюлярний рак, наднирковиків, шлунка, шлунково-кишкового тракту, гліоми, гліобластоми, ендометрія, меланому, нирок, ниркової миски, сечового міхура, тіла матки, шийки матки, піхви, яєчників, множинної мієломи, стравоходу, лейкозу, гострого мієлолейкозу, хронічного мієлолейкозу, лімфолейкозу, мієлолейкозу, головного мозку, карциноми головного мозку, порожнини рота та глотки, гортані, тонкого кишечника, неходжкінської лімфоми, меланому, ворсинчастої аденоми товстої кишки, неоплазії, неоплазії епітеліального характеру, лімфом, карциноми молочної залози, базально-клітинної карциноми, плоскоклітинної карциноми, старечого кератозу, пухлинних захворювань, включаючи солідні пухлини, пухлину голови або шиї, справжньої поліцитемії, есенціальної тромбоцитемії, мієлофіброзу з мієлоїдною метаплазією та хвороби Вальденстрема.

4. Застосування сполуки за п. 1, у вільній формі або у формі фармацевтично прийнятної солі, для приготування лікарського засобу для лікування одного або більшої кількості з проліферативного захворювання; доброякісної або злоякісної пухлини; раку, вибраного з групи, що включає саркому, рак легенів, бронхів, передміхурової залози, молочної залози (включаючи спорадичні типи раку молочної залози та страждаючих хворобою Коудена), підшлункової залози, шлунково-кишковий рак, товстої кишки, прямої кишки, карциноми товстої кишки, колоректальної аденоми, щитовидної залози, печінки, внутріпечінкової жовчної протоки, гепатоцелюлярний рак, наднирників, шлунка, шлунково-кишкового тракту, гліоми, гліобластоми, ендометрія, меланому, нирок, ниркової миски, сечового міхура, тіла матки, шийки матки, піхви, яєчників, множинної мієломи, стравоходу, лейкозу, гострого мієлолейкозу, хронічного мієлолейкозу, лімфолейкозу, мієлолейкозу, головного мозку, карциноми головного мозку, порожнини рота та глотки, гортані, тонкого кишечника, неходжкінської лімфоми, меланому, ворсинчастої аденоми товстої кишки, неоплазії, неоплазії епітеліального характеру, лімфом, карциноми молочної залози, базально-клітинної карциноми, плоскоклітинної карциноми, старечого кератозу, пухлинних захворювань, включаючи солідні пухлини, пухлину голови або шиї, справжньої поліцитемії, есенціальної тромбоцитемії, мієлофіброзу з мієлоїдною метаплазією та хвороби Вальденстрема.

5. Фармацевтична композиція, що містить сполуку за п. 1 у вільній формі або у формі фармацевтично прийнятної солі у терапевтично ефективній кількості та один або більшу кількість фармацевтично прийнятних інертних наповнювачів.

6. Фармацевтична композиція за п. 5 для застосування у лікуванні проліферативного захворювання; доброякісної або злоякісної пухлини; раку, вибраного з групи, що включає саркому, рак легенів, бронхів, передміхурової залози, молочної залози (включаючи спорадичні типи раку молочної залози та страждаючих хворобою Коудена), підшлункової залози, шлунково-кишковий рак, товстої кишки, прямої кишки, карциноми товстої кишки, колоректальної аденоми, щитовидної залози, печінки, внутріпечінкового жовчного протоку, гепатоцелюлярний рак, наднирників, шлунка, шлунково-кишкового тракту, гліоми, гліобластоми, ендометрію, меланому, нирок, ниркової миски, сечового міхура, тіла матки, шийки матки, піхви, яєчників, множинної мієломи, стравоходу, лейкозу, гострого мієлолейкозу, хронічного мієлолейкозу, лімфолейкозу, мієлолейкозу, головного мозку, карциноми головного мозку, порожнини рота та глотки, гортані, тонкого кишечника, неходжкінської лімфоми, меланому, ворсинчастої аденоми товстої кишки, неоплазії, неоплазії епітеліального характеру, лімфом, карциноми молочної залози, базально-клітинної карциноми, плоскоклітинної карциноми, старечого кератозу, пухлинних захворювань, включаючи солідні пухлини, пухлину голови або шиї, справжньої поліцитемії, есенціальної тромбоцитемії, мієлофіброзу з мієлоїдною метаплазією та хвороби Вальденстрема.

Комп'ютерна верстка М. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680,
Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601