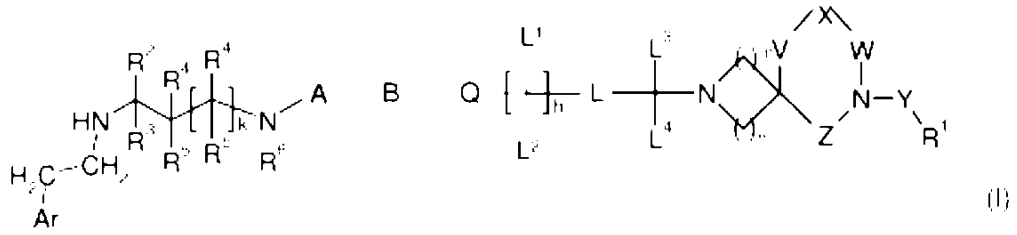


ÖZET

SPIROSİKLIK AMİD TÜREVLERİ

Formüle (I) ait spirosiklik amid türevleridir

5



burada

- 10 ArCH₂CH₂NH-, bir β-adrenoseptör bağlanma grubunu temsil eder, bunların hazırlanmasına yönelik prosesler, bunları içeren farmasötik bileşimler, bu tür farmasötik bileşimlerin hazırlanmasına yönelik bir proses, terapide kullanımları ve bunların hazırlanmasında kullanıma yönelik ara ürünlerdir.

İSTEMLER

1. Bir formül (I) bileşiği veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu ve 3-(2-kloro-3-((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)-N-siklopentil-N-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)propanamiddir.
5
2. Bir formül (I) bileşiği ve 3-(2-kloro-3-((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)-N-siklopentil-N-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)propanamid, sülfat tuzudur.
10
3. Bir formül (I) bileşiği veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu ve *N*-Bütil-*N*-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamiddir.
15
4. Bir formül (I) bileşiği veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu ve *N*-Bütil-*N*-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid ditrifloroasetattır.
20
5. Burada daha önce tanımlandığı üzere istemler 1-4'ten herhangi birine göre bir formül (I) bileşiği veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu olup, özelliği terapide kullanıma yönelik olmasıdır.
25
6. Bir ilaç üretiminde istemler 1-4'ten herhangi birine göre bir formül (I) bileşiği veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunun kullanımı olup, özelliği terapide kullanıma yönelik olmasıdır.
30
7. Farmasötik bir bileşim olup, özelliği farmasötik olarak kabul edilebilir bir adjuvan, seyreltici veya taşıyıcı ile birlikte istemler 1-4'ten herhangi birine göre bir formül (I) bileşiği veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içermesidir.
35

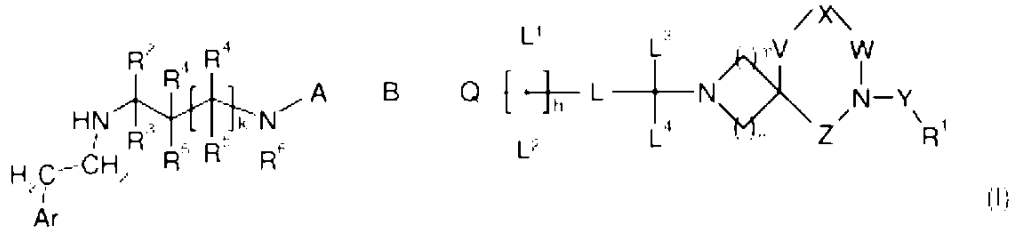
TARİFNAME SPIROSİKLİK AMİD TÜREVLERİ

Mevcut buluş, spirosiklik amid türevleri, bunların hazırlanmasına yönelik bir proses, bunları içeren farmasötik bileşimler, bu tür farmasötik bileşimlerin hazırlanmasına yönelik bir proses, bunların terapide kullanımları ve bunların hazırlanmasına yönelik ara ürünleri ile ilgilidir.

Kronik obstrüktif pulmoner hastalık (COPD) ve astım dahil çeşitli pulmoner bozukluklara yönelik ilk tedavi seçeneği, bronkodilatörlerin kullanımı yoluyla olur. Muskarinik-reseptör antagonistleri (anti- kolinerjikler), COPD'de hava yolu sıkışıklığının ana ters çevrilebilir bileşeni, vagal kolinerjik tonun azaltılması ile etkinliklerini sergileyen bronkodilatörlerdir. β -adrenoseptör agonistleri de asetilkolin dahil olmak üzere bir dizi aracıya bronkokonstriktör yanıtlarını fonksiyonel olarak antagonize etme kabiliyetleri nedeniyle bronkodilatörlerdir.

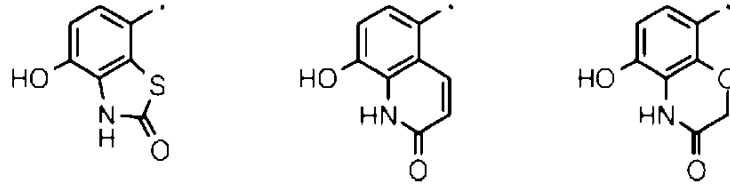
Akciğer fonksiyonunun geliştirilmesine ek olarak bu ajanlar, nefes darlığı (nefessizlik), yaşam kalitesi, egzersiz toleransını geliştirir ve bunlar alevlenmeyi azaltır. Birkaç klinik çalışma, bir antikolinerjik ve a β_2 -reseptör agonistinin kombine şekilde uygulanmasının ayrı bileşenlerin her birinden daha etkili olduğu göstermiştir (van Noord, J.A., Aumann, J-L., Janssens, E., Smeets, J.J., Verhaert, J., Disse, B., Mueller, A. & Cornelissen, P.J.G., 2005. "Comparizon of tiotropium once daily, formoterol twice daily ve both combined once daily in patients with COPD", *Eur. Respir. J.*, vol 26, pp 214-222.). Muskarinik ve β_2 -reseptörlerinde (MABA'lar) aktivitelere sahip olan tek bir molekül, her tekli ajana göre etkinlik ve yan-etki profili bakımından COPD hastalarına ek faydalar sağlayabilir. Ek olarak ikili aktiviteye sahip bir molekül ayrıca tekli terapilerin birlikte uygulanmasına göre kullanım kolaylığı ve hasta uyumu bakımından faydalar sunabilir. Tek bir ajan ayrıca iki ayrı bileşik ile karşılaştırıldığında bir diğer terapötik ile kombine edilmesi halinde üçlü etki terapileri için potansiyel sunarak, formülasyon perspektifinden faydalı olabilir.

Tarifnameye ait bir birinci açığa göre bu noktada bir formül (I) bileşiği sağlanır



burada

ArCH₂CH₂NH- bir β -adrenoseptör bağlanma grubunu temsil eder burada Ar, aşağıdakilerin herhangi birinden seçilir



$R^2, R^3, R^4, R^5, R^{4'}$ ve $R^{5'}$ 'in her biri hidrojen

$k, 0$ 'dır

R^6 , halojen, C_{1-6} alkil (3 halojen atomu ile isteğe bağlı olarak süstitüe edilmiştir), OR^{10} , C_{1-6} alkilS(O)₀₋₂, NR^8R^9 , $OC(O)(C_{1-6}$ alkil), halojen, C_{1-6} alkil (3 halojen atomu ile isteğe bağlı olarak süstitüe edilmiştir), OR^{10} , C_{1-6} alkilS(O)₀₋₂, NR^8R^9 ve $OC(O)(C_{1-6}$ alkil)'den bağımsız olarak seçilen 3 süstitüent ile isteğe bağlı olarak süstitüe edilen C_{3-8} sikloalkilden (burada karbon atomlarından biri veya ikisi O, S veya N ile değiştirilebilir) seçilen 3 süstitüent ile isteğe bağlı olarak süstitüe edilen bir C_{1-8} alkil grubudur;

veya

R^6 , isteğe bağlı olarak süstitüe edilmiş aril veya heteroaril grubu ile süstitüe edilen bir C_{1-8} alkil grubudur;

veya

R^6 , halojen, C_{1-6} alkil (3 halojen atomu ile isteğe bağlı olarak süstitüe edilir ve/veya burada iki alkil grubu, 9 halka atomundan bir halka oluşturabilir), OR^{10} , C_{1-6} alkilS(O)₀₋₂, NR^8R^9 , $OC(O)(C_{1-6}$ alkil) ve isteğe bağlı olarak süstitüe edilen aril veya heteroarilden bağımsız olarak seçilen 3 süstitüent ile isteğe bağlı olarak süstitüe edilen bir C_{3-9} sikloalkil grubudur (burada halka karbon atomlarının biri veya ikisi, O, S veya N ile değiştirilebilir);

veya

R^6 , halojen, C_{1-6} alkil, OR^{10} ve C_{1-6} alkilS(O)₀₋₂'den bağımsız olarak seçilen 3 süstitüent ile isteğe bağlı olarak süstitüe edilen bir C_{7-9} bisikloalkil grubudur veya

5 R^6 , N, O ve S'den bağımsız olarak seçilen iki heteroatom içeren 5- veya 6-üyeli aromatik veya aromatik olmayan heterosiklik halkasıdır;

10 R^8 ve R^9 bağımsız olarak hidrojen, C_{1-6} alkildir veya R^8 ve R^9 , 9 halka atomu (isteğe bağlı olarak O, N veya S'den seçilen ilave bir heteroatom içerir) içeren bir heterosiklik halkayı oluşturmak üzere birleştirilebilir burada halka halojen, hidroksil, C_{1-6} alkil veya C_{3-6} sikloalkilden bağımsız olarak seçilen üç süstitüent ile isteğe bağlı olarak süstitüe edilebilir ve burada alkil ve sikloalkil, halojen, hidroksil ve C_{1-6} alkoksiden bağımsız olarak seçilen üç süstitüent ile isteğe bağlı olarak süstitüe edilebilir;

15 R^{10} , hidrojen, C_{1-6} alkil veya C_{3-6} sikloalkili temsil eder, burada alkil ve sikloalkil, halojen, hidroksil ve C_{1-6} alkoksiden bağımsız olarak seçilen üç süstitüent ile isteğe bağlı olarak süstitüe edilebilir;

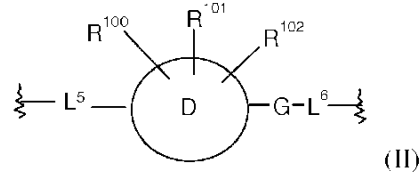
A, C(O)'dur;

B, etilendir

Q, oksijendir;

R^7 , hidrojen veya C_{1-6} alkildir;

20 **L**, Formül (II) grubu ile temsil edilir



burada L^5 , $C(L^1)(L^2)$ 'ye bağlanır ve L^6 , $C(L^3)(L^4)$ 'e bağlanır ve;

25 burada halka D, bir fenil, tiyofen, furan veya tiyazol halkasını temsil eder;

R^{100} , R^{101} ve R^{102} her biri bağımsız olarak hidrojen, halojen (örneğin florin veya klorin), C_{1-4} alkil, C_{1-4} alkoksi ve CF_3 'ten seçilir;

L^5 , 2 metil grubu ile isteğe bağlı olarak süstitüe edilen bir C_{1-4} alkilen grubudur;s veya

30 L^5 , $-(CH_2)_qQ^1(CH_2)_t-$ 'yi temsil eder burada Q^1 oksijen veya sülfürdür ve t, 0, 1 veya 2'dir ve q, 1 veya 2'dir

G bir bağ, oksijen, $CR^{10}R^{10}$ veya S'yi temsil eder;

G, oksijen veya S'yi temsil ettiğinde L^6 , iki metil grubu ile isteğe bağlı olarak süstitüe edilen bir C_{1-2} alkilen grubudur;

G, bir bağı veya $CR^{10}R^{10'}$ nu temsil ettiğinde L^6 bir bağ veya iki metil grubu ile isteğe bağlı olarak süstitüe edilen bir C_{1-2} alkilen grubudur;

5 L^1 ve L^2 bağımsız olarak hidrojeni temsil eder;

h , 1'dir

L^3 ve L^4 bağımsız olarak hidrojeni temsil eder;

R^1 aşağıdakilerden seçilir;

10 (i) isteğe bağlı olarak süstitüe edilen 3-8 üyeli halka, söz konusu halka aromatik veya tamamen veya kısmen doymuştur ve burada dört halka atomu, N, O ve S'den bağımsız olarak seçilen heteroatomlar ile değiştirilebilir;

15 (ii) 10 atomun isteğe bağlı olarak süstitüe edilen bir kaynaşık bisiklik halka sistemi, söz konusu halkalar aromatik veya tamamen veya kısmen doymuştur ve burada dört halka atomu, N, O ve S'den bağımsız olarak seçilen heteroatomlar ile değiştirilebilir;

20 (iii) isteğe bağlı olarak süstitüe edilen bir C_{1-6} alkil grubu burada karbon atomlarının biri veya ikisi, O, S veya N ile değiştirilebilir ve burada söz konusu alkil grubu yukarıdaki (i) ve (ii)'den bağımsız olarak seçilen bir halka sistemi ile bir kez veya iki kez süstitüe edilebilir ve burada C_{1-6} alkil zinciri halojen, siyano, $S(O)_{0-2}R^{10}$, NR^8R^9 , $S(O)_2NR^8R^9$, $C(O)NR^8R^9$, $C(O)OR^{10}$, $NR^{10}S(O)_2R^{11}$, $NR^{10}C(O)R^{10}$, $NR^{10}C(O)OR^{11}$, $NR^{10}C(O)NR^8R^9$, OR^{10} , C_{1-6} alkil ve C_{3-6} sikloalkilden (burada iki C_{1-3} alkil zinciri, sekiz halka atomunun isteğe bağlı olarak süstitüe edilen sikloalkil halkasını oluşturmak üzere birleştirilebilir) seçilen beş süstitüent ile süstitüe edilebilir

25 ve burada yukarıdaki (i), (ii) ve (iii)'teki herhangi bir halka için "isteğe bağlı olarak süstitüe edilen", halojen, siyano, nitro, SH, $S(O)_{0-2}R^{10}$, NR^8R^9 , $S(O)_2NR^8R^9$, $C(O)NR^8R^9$, $C(O)OR^{10}$, $NR^{10}S(O)_2R^{11}$, $NR^{10}C(O)R^{10}$, $NR^{10}C(O)OR^{11}$, $NR^{10}C(O)NR^8R^9$, OR^{10} , C_{1-6} alkil veya C_{3-6} sikloalkilden bağımsız olarak seçilen dört süstitüent ile isteğe bağlı olarak süstitüe edildiği anlamına gelir (burada alkil veya sikloalkilin bir karbon atomu, N, O veya S ile isteğe bağlı olarak değiştirilebilir ve alkil veya sikloalkil, C_{1-6} alkil, halojen, siyano, SH, $S(O)_{0-2}R^{10}$, NR^8R^9 , $S(O)_2NR^8R^9$, $C(O)NR^8R^9$, $C(O)OR^{10}$, $NR^{10}S(O)_2R^{11}$, $NR^{10}C(O)R^{10}$, $NR^{10}C(O)OR^{11}$, $NR^{10}C(O)NR^8R^9$ ve OR^{10} 'dan seçilen beş süstitüent ile isteğe bağlı olarak süstitüe edilebilir),

30

ve burada (i) ve (ii)'deki doymuş halka sistemleri ayrıca köprülü halka yapılarını oluşturmak üzere birleştirilebilen üç C₁₋₆ alkil grubu ile süstitüe edilebilir, isteğe bağlı olarak halojen veya OR¹⁰ ile süstitüe edilebilir. Bu halka sistemlerinin örnekleri adamanti ve bisiklo[2.2.1]heptanil içerir;

5 **X**, O'yu temsil eder;

m = 1 veya 2;

n = 1 veya 2; bunun koşulu **m + n** toplamının 2'den daha büyük veya buna eşit olmasıdır;

W, CR¹²R¹³-CR¹²R¹³ veya CR¹²R¹³-CR¹²R¹³-CR¹²R¹³'ü temsil eder;

10 **V** ve **Z** bağımsız olarak bir bağı, CR¹²R¹³ veya CR¹²R¹³-CR¹²R¹³'ü temsil eder, bunun koşulu **X**, **O** veya S(O)₀₋₂'yi temsil ettiğinde **m**, **V** ve **Z**'nin halkalardaki tüm heteroatomlar en az iki karbon atomu ile ayrılacak şekilde olmasıdır;

Y, C(O)'yu temsil eder;

R¹² ve **R¹³** her biri bağımsız olarak hidrojen, florin, C₁₋₆ alkil veya C₃₋₆ sikloalkil

15 temsil eder; veya

R¹² ve **R¹³** aynı karbon atomuna bağlandığında, bağlandıkları karbon atomu ile birlikte, ek olarak 3 ila 6 üyeli alifatik halkayı oluşturabilir;

ve farmasötik olarak kabul edilebilir tuzlarıdır.

20 "β-adrenoseptör bağlanma grubu" ile örneğin "β-adrenergic receptors in Comprehensive Medicinal Chemistry, 1990, B.E. Main, p187 (Pergamon Press) inceleme makalesinde kısaca açıklandığı gibi bir β-adrenergik reseptöre bağlanabilen bir grup ifade edilir. Bu tür gruplar ayrıca örneğin WO/2005092841, US/20050215542, WO/2005070872, WO/2006023460, WO/2006051373, WO/2006087315, 25 WO/2006032627'den bilinir. Ayrıca bakınız WO2007018461, WO2008075025, WO2008075026 ve WO2008096119.

Buluşun örneklendirilmiş her bir bileşiği veya herhangi bir uygun kombinasyonu, buluşun belirli ve bağımsız bir açısını temsil eder.

30

Mevcut buluşa ait belirli bileşiklerin çözünmüş, örneğin hidratlanmış ve ayrıca çözünmemiş formlar halinde bulunabildiği anlaşılabacaktır. Mevcut buluşun, bu tür çözünmüş tüm formları kapsadığı anlaşılabacaktır. Belirli formül (I) bileşikler, stereoizomerik formlarda bulunabilir. Buluşun, formül (I) bileşiklerinin tüm geometrik ve

optik izomerlerini ve rasetmatlar dahil karışımlarını kapsadığı anlaşılabacaktır. Totomerler ve karışımları da mevcut buluşun bir açısını oluşturur.

Herhangi bir kuaterner karbonun, daha spesifik olarak spirosiklik sistemde bulunan
5 kuaterner karbonun örneğin "Silicon switches of Marketed Drugs: Mini-reviews in Med. Chem.", 2006, 6, 1169-1177'de açıklandığı üzere bir silikon atomu ile değiştirilmesi açıklanır.

Tanımlar

10

Aksi belirtilmedikçe:

'Heteroaril' terimi, N, O ve S'den seçilen üç heteroatoma sahip 7 atom, uygun şekilde 5 veya 6 atomlu bir aromatik halka sistemini ifade eder. Bu tür heteroaril halkalarının
15 örnekleri tiyazolil, tiyenil, izoksazolil, furil, izoksazolil, izotiyazolil, oksazolil, oksadiazolil, pirazinil, piridazinil, pirazolil, piridil, pirimidinil, pirolil, tetrazolil, 1,3,4-tiyadiazolil, tiyazolil, tiyenil, triazolil ve benzeri içerir. Heteroaril grubu herhangi bir mevcut karbon veya nitrojen atomu ile bağlanabilir.

20 'Kaynaşık bisiklik halka' terimi, 12 atomlu bir halka sistemini ifade eder burada 2 halka kaynaşıktır. Sistem isteğe bağlı olarak N, S ve O'dan seçilen 4 heteroatom içerebilir. Halkalar bağımsız olarak aromatik, kısmen doymuş veya tamamen doymuş olabilir. Bu tür kaynaşık bisiklik halka sistemlerinin örnekleri benzo[b]tiyenil, benzofuranil, benzo[d]imidazolil, kinoksalinil, pirazolo[1,5-a]pirimidinil, pirazolo[1,5-a]piridinil,
25 dihidrobenzo[b][1,4]dioksinil, 4,5,6,7-tetrahidro-2H-indazolil, benzo[d][1,3]dioksolil, benzoksazolil, benzotiyazolil, benzofuranil, benzotiyenil, naftil, indanil, 1,2,3,4-tetrahidronaftil, 1,2,3,4-tetrahidrokinolinil, 5,6,7,8-tetrahidrokinolinil ve benzerini içerir. Halka sistemi, uygun herhangi bir nitrojen veya karbon atomu ile molekülün geri kalanına bağlanabilir.

30

'Aril' terimi, bir aromatik karbosiklik halkayı ifade eder. Örnekler fenil, naftil ve benzeridir.

'Alisiklik' terimi, doymuş veya doymamış olabilen ancak bir benzenoid veya diğer
35 aromatik sistem olamayan bir karbosiklik halka yapısına sahip bir grubu ifade eder.

'Alifatik' terimi, aromatik olmayan bir grubu ifade eder.

'Heteroalifatik halka' terimi, tamamen veya kısmen doymuş ancak aromatik olmayan bir heterosiklik halkayı ifade eder. Halka, N, O veya S'den seçilen 4 heteroatomu olan 10 atoma sahiptir. Örnekler piperidin, morfolin, tetrahidrofuran, pirolidin ve benzeridir.

'Aril', 'heteroaril', 'kaynaşık bisiklik', 'alisiklik' ve 'heteroalifatik' halka grupları, C₁₋₆ alkil, C₃₋₆ sikloalkil, halojen, siyano, nitro, SH, S(O)₀₋₂R¹⁰, NR⁸R⁹, S(O)₂NR⁸R⁹, C(O)NR⁸R⁹, C(O)OR¹⁰, NR¹⁰S(O)₂R¹¹, NR¹⁰C(O)R¹⁰, NR¹⁰C(O)OR¹¹, NR¹⁰C(O)NR⁸N⁹, OR¹⁰'dan seçilen bir veya daha fazla sübstitüent grubu ile sübstitüe edilebilir.

Aksi belirtilmedikçe mevcut spesifikasyon bağlamında alkil grupları ve kısımları düz veya dallanmış zincir olabilir ve örneğin metil, etil, n-propil, izo-propil, n-bütil, izo-bütil veya tert-bütil içerir. Sikloalkil grupları monosiklik örneğin siklopentil veya sikloheksildir. Halojen örneğin florid, klorid veya bromiddir.

Mevcut spesifikasyon bağlamında burada bir grubun üç sübstitüent ile isteğe bağlı olarak sübstitüe edilebildiği belirtilir, grup sübstitüe edilmemiş veya sübstitüe edilmiş olabilir; sübstitüe edildiğinde grup genellikle bir, iki veya üç sübstitüent ile sübstitüe edilecektir. Genellikle bir hidroksil kısmı, bir nitrojen atomu, bir diğer oksijen atomu veya bir sülfür atomuna bitişik olan bir karbon atomuna bağlanmayacaktır.

Formül (I) bileşikleri, farmasötikler olarak, özellikle muskarinik reseptör (M1, M2 ve M3) antagonistleri, özellikle M3 antagonistleri dahil ikili adrenerjik β reseptör agonistleri ve antikolinergik ajanlar olarak aktiviteye sahiptir. Formül (I) bileşikleri ve bunların farmasötik olarak kabul edilebilir tuzları ile tedavi edilebilen hastalıklar ve durumlar şunları içerir:

1. solunum yolu: aşağıdakiler dahil obstrüktif solunum yolu hastalıkları: astım, bronşiyal, alerjik, intrinsik, ekstrinsik, egzersiz kaynaklı, ilaç kaynaklı (aspirin ve NSAID-kaynaklı dahil) ve toz-kaynaklı astım, aralıklı ve sürekli formları ve tüm ciddiyet seviyeleri dahil ve diğer solunum yolu hiper-responsifliği nedenleri; kronik obstrüktif akciğer hastalığı (COPD); bronşit, enfeksiyöz ve eozinofilik bronşit dahil; emfizem; bronşiyektazi; kistik fibroz; sarkoidoz; çiftçi akciğeri ve bağlantılı hastalıklar; hipersensitivite pnömoniti; akciğer fibrozu, örneğin kriptojenik fibroz

alveolit, idiyopatik interstisyel pnömoni, fibroz komplikasyonlu anti-neoplastik terapi ve kronik enfeksiyon, örneğin tüberküloz ve aspergilloz ve diğer fungal enfeksiyonlar; akciğer transplantasyonu komplikasyonları; akciğer vaskülatürünün vaskülitik ve trombotik bozuklukları ve pulmoner hipertansiyon; antitüssif aktivite, 5 solunum yollarının inflamatuvar ve sekretuar durumları ile bağlantılı kronik öksürük ve iyatrojenik öksürük; akut ve kronik rinit örneğin rinit medikamentoza ve vazomotor rinit; perenniyal ve mevsimsel alerjik rinit örneğin rinit nervoza (saman nezlesi); nazal polipozis; akut viral enfeksiyon örneğin sıradan soğuk algınlığı ve respiratuvar sinsisyal virüs, influenza, koronavirüs (SARS dahil) veya adenovirüs 10 kaynaklı enfeksiyon; veya eozinofilik özofagus;

2. kemik ve eklemler: osteoartrit/osteoartroz ile ilişkili veya bunlar dahil artritler, örneğin doğumsal kalça displazisine primer ve sekonder; servikal ve lumbal spondilit ve alt bacak ve boyun ağrısı; osteoporoz; romatoid artrit ve Still hastalığı; 15 ankilozan spondilit, psoriatik artrit, reaktif artrit ve farklılaşmamış spondiloartropati dahil seronegatif spondiloartropatiler; septik artrit ve diğer enfeksiyon ilişkili artropati ve kemik hastalıkları örneğin tüberküloz, Potts hastalığı ve Poncet sendromu dahil; urat gut, kalsiyum pirofosfat biriktirme hastalığı ve kalsiyum apatit ilişkili tendon, bursal ve sinoviyal inflamasyon dahil akut ve kronik kristal indüklü 20 sinovit; Behcet hastalığı; primer ve sekonder Sjogren sendromu; sistemik skleroz ve sınırlı sikleroderma; sistemik lupus eritematozus, karışık bağ doku hastalığı ve farklılaşmamış bağ doku hastalığı; dermatomiyozit ve polimiyozit dahil inflamatuvar miyopatiler; polimiyaljiya romatika; herhangi bir eklem dağılımı ve ilişkili sendromların idiyopatik inflamatuvar artritleri dahil juvenil artrit ve romatizma ateşi 25 ve bunun sistemik komplikasyonları; dev hücreli arterit, Takayasu arterit, Churg-Strauss sendromu, poliarteritis nodoza, mikroskopik poliarterit ve viral enfeksiyon, aşırıduyarlılık reaksiyonları, kriyoglobülin ve paraproteinler ile ilişkili vaskülitler dahil vaskülitler; alt sırt ağrısı; Ailevi Akdeniz ateşi, Muckle-Wells sendromu ve Ailevi İrlanda ateşi, Kikuchi hastalığı; ilaç indüklü eklem ağrısı, tendonitler ve 30 miyopatiler;

3. yaralanma [örneğin spor yaralanmaları] veya hastalık nedeniyle muskuloskeletal bozuklukların ağrı ve bağ dokusunun yeniden yapılanması; artritler (örneğin romatoid artrit, osteoartrit, gut veya kristal artropati), diğer eklem hastalığı (örneğin 35 intervertebral disk dejenerasyonu veya temporomandibular eklem dejenerasyonu),

kemik yeniden yapılanma hastalığı (örneğin osteoporoz, Paget hastalığı veya osteonekroz), polikondrit, skleroderma, karışık bağ doku bozukluğu, spondiloartropatiler veya periodontal hastalık (örneğin periodontit);

- 5 4. cilt: sedef, atopik dermatit, temas dermatiti veya diğer ekzematöz dermatozlar ve gecikmiş tip hipersensitivite reaksiyonları; fito- ve fotodermatit; seborroik dermatit, dermatit herpetiformis, liken planus, liken sklerozus ve atrofika, piyoderma gangrenosum, cilt sarkoidi, diskoid lupus eritematozus, pemfigus, pemfigoid, epidermolizis bulloza, ürtiker, anjiyo-ödem, vaskülit, toksik eritemalar, kütanöz
- 10 ezinofililer, alopesi areata, erkek tipi kellik, Sweet sendromu, Weber-Christian sendromu, eritema multiform; enfektif ve enfektif-olmayan selülit; pannikülit; kütanöz lenfomalar, melanom-olmayan cilt kanseri ve diğer displastik lezyonlar; ilaç-indüklemeli bozukluklar örneğin sabit ilaç erüpsiyonları;
- 15 5. gözler: blefarit; konjonktivit, perenniyal ve vernal alerjik konjonktivit dahil; iritis; anterior ve posterior üveit; koroidit; retinayı etkileyen otoimmün, dejeneratif veya inflamatuvar bozukluklar; sempatik oftalmit dahil oftalmit; sarkoidoz; viral, fungal ve bakteriyel infeksiyonlar;
- 20 6. gastrointestinal kanal: glosit, jinvit, periodontit; reflü dahil özofagus; eozinofilik gastro-enterit, mastositoz, Crohn hastalığı, ülseratif kolit dahil kolit, proktit, prurit ani; çölyak hastalığı, irritabl bağırsak sendromu ve bağırsaktan uzak etkilere sahip olabilen gıda ile ilişkili allerjiler (örneğin migren, rinit veya egzama);
- 25 7. abdominal: hepatit, otoimmün, alkolik ve viral dahil; karaciğer fibrozu ve sirozu; kolesistit; pankreatit, hem akut hem de kronik;
- 30 8. genitoüriner: interstisyel dahil nefrit ve glomerülonefrit; nefrotik sendrom; sistit örneğin akut ve kronik (interstisyel) sistit ve Hunner ülseri; akut ve kronik üretrit, prostatit, epididimit, ooforit ve salpingit; vülvo-vajinit; Peyronie hastalığı; erektil disfonksiyon (hem erkek hem dişi);
- 35 9. allogreft reddi: örneğin, böbrek, kalp, karaciğer, akciğer, kemik iliği, cilt veya kornea transplantasyonu sonrası veya kan transfüzyonu sonrası akut ve kronik; veya kronik graft versus host hastalığı;

10. CNS: CJD ve nvCJD dahil Alzheimer hastalığı ve diğer demans bozuklukları; amiloidoz; multipl skleroz ve diğer demiyelinizan sendromlar; serebral aterosklerosis ve vaskülit; temporal arterit; miyastenya gravis; viskeral ağrı, baş ağrısı, migren, trigeminal nevralji, atipik fasiyel ağrı, eklem ve kemik ağrısı, kanser ve tümör invazyonundan kaynaklanan ağrı, dahil akut ve kronik ağrı (akut, aralıklı veya kalıcı, merkezi veya periferik kökenli olsa da olmasa da), diyabetik, post-herpetik ve HIV-ilişkili nöropatiler dahil nöropatik ağrı sendromları; nörosarkoidoz; malign, enfeksiyöz veya otoimmün proseslerin merkezi ve periferik sinir sistemi komplikasyonları;
11. diğer oto-immün ve alerjik bozukluklar örneğin, Hashimoto tiroiditi, Graves hastalığı, Addison hastalığı, diabet mellitus, idiyopatik trombositopenik purpura, eozinofilik fasitis, hiper-IgE sendromu, antifosfolipid sendromu;
12. inflamatuvar veya immünolojik bir bileşen dahil diğer bozukluklar; kazanılmış immün yetmezlik sendromu (AIDS), cüzzam, Sezar sendromu ve paraneoplastik sendromlar dahil;
13. kardiyovasküler: koroner ve periferik dolaşımı etkileyen ateroskleroz; perikardit; miyokardit; miyokardiyal sarkoid dahil inflamatuvar ve oto-immün kardiyomiyopatiler; iskemik reperfüzyon yaralanmaları; endokardit, valvulit ve enfektif (örneğin sifilitik) dahil aortit; vaskülit; filibit ve tromboz dahil, derin ven trombozu ve varikoz ven komplikasyonları dahil proksimal ve periferik ven bozuklukları;
14. onkoloji: prostat, göğüs, akciğer, yumurtalık, pankreas, bağırsak ve kolon, mide, cilt ve beyin tümörleri dahil yaygın kanserler ve kemik iliğini (lösemiler dahil) ve lenfoproliferatif sistemleri etkileyen maligniteler, örneğin Hodgkin ve Hodgkin olmayan lenfomaların tedavisi; metastatik hastalık ve tümör tekrarlamaları ve paraneoplastik sendromların önlenmesi ve tedavisi dahil; ve
15. gastrointestinal kanal: Çölyak hastalığı, proktit, eozinofilik gastro-enterit, mastositoz, Crohn hastalığı, ülseratif kolit, mikroskopik kolit, belirsiz kolit, irritabl bağırsak bozukluğu, irritabl bağırsak sendromu, inflamatuvar olmayan diyare,

örneğin migren, rinit ve egzama gibi, bağırsaktan uzak etkilere sahip olabilen gıda ile ilişkili alerjiler.

Dolayısıyla mevcut buluş, terapide kullanıma yönelik olarak daha önce tanımlanan
5 şekilde bir formül (I) bileşiği veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu sağlar.

İlave bir açıda mevcut buluş, terapide kullanıma yönelik bir ilacın üretiminde daha önce tanımlanan şekilde bir formül (I) bileşiği veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunun kullanımını sağlar.

10

Mevcut spesifikasyon bağlamında “terapi” terimi ayrıca aksini belirten spesifik göstergeler olmadıkça “profilaksi” içerir. “Terapötik” ve “terapötik olarak” terimleri buna uygun şekilde yorumlanmalıdır.

15 Profilaksi, söz konusu hastalık veya durumun önceki bir epizodundan muzdarip olan veya başka şekilde yüksek risk altında olduğu düşünülen kişilerin tedavisi ile özellikle ilişkili olması beklenir. Belirli bir hastalık veya durumun gelişme riski altındaki kişiler genellikle hastalık veya durumdan ailevi geçmişe sahip olanları veya genetik test veya tarama yoluyla özellikle hastalık veya durumu geliştirmeye eğimli olanları içerir.

20

Özellikle buluşa ait bileşikler, yetişkinde solunum güçlüğü sendromu (ARDS), pulmoner amfizem, bronşit, bronşiektazi, kronik obstrüktif pulmoner hastalık (COPD), astım ve rinit tedavisinde kullanılabilir.

25 Yukarıda bahsedilen terapötik kullanımlara yönelik olarak uygulanan dozaj, elbette, kullanılan bileşik, uygulama modu, istenen tedavi ve belirtilen bozukluk ile değişkenlik gösterecektir. Örneğin buluşa ait bileşiğin günlük dozajı, solunması halinde, vücut ağırlığı kilogramına ($\mu\text{g/kg}$) göre 0.05 mikrogram ila vücut ağırlığı kilogramına ($\mu\text{g/kg}$) göre 100 mikrogram aralığında olabilir. Alternatif olarak bileşiğin oral olarak
30 uygulanması halinde buluşa ait bileşiğin günlük dozajı, vücut ağırlığı kilogramına ($\mu\text{g/kg}$) göre 0.01 mikrogram ila vücut ağırlığı kilogramına (mg/kg) göre 100 miligram aralığında olabilir.

Formül (I) bileşikleri ve farmasötik olarak kabul edilebilir tuzları, kendi başlarına kullanılabilir ancak genellikle farmasötik bir bileşim formunda uygulanacaktır burada
35 formül (I) bileşiği/tuzu (aktif bileşen), farmasötik olarak kabul edilebilir bir adjuvan,

seyreltici veya taşıyıcı ile ilişki içindedir. Uygun farmasötik formülasyonların seçimi ve hazırlanmasına yönelik klasik prosedürler örneğin "Pharmaceuticals - The Science of Dosage Form Designs", M. E. Aulton, Churchill Livingstone, 1988 içerisinde açıklanır.

- 5 Uygulama moduna bağlı olarak farmasötik bileşim, from %0.05 ila 99 w (ağırlıkça yüzde), daha çok tercihen %0.05 ila 80 w, yine daha çok tercihen %0.10 ila 70 w ve hatta daha çok tercihen %0.10 ila 50 w aktif bileşen içerecektir, ağırlıkça tüm yüzdeler toplam bileşime dayanır.
- 10 Mevcut buluş ayrıca farmasötik olarak kabul edilebilir bir adjuvan, seyreltici veya taşıyıcı ile ilişkili olarak buradan önce tanımlanan bir formül (I) bileşiği veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren farmasötik bir bileşim sağlar.

- 15 Buluş ayrıca farmasötik olarak kabul edilebilir bir adjuvan, seyreltici veya taşıyıcı ile buradan önce tanımlanan bir formül (I) bileşiği veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunun karıştırılmasını içeren buluşa ait farmasötik bir bileşimin hazırlanmasına yönelik bir proses sağlar.

- 20 Farmasötik bileşimler, örneğin kremler, solüsyonlar, süspansiyonlar, Hidrofloroalkan (HFA) aerosoller ve kuru toz formülasyonları, örneğin Turbuhaler® olarak bilinen solunum cihazındaki formülasyonlar formunda topikal olarak (örneğin cilde veya akciğer ve/veya hava yollarına) uygulanabilir; veya sistemik olarak, örneğin tabletler, kapsüller, şuruplar, tozlar veya granüller formunda oral uygulama ile; veya solüsyonlar veya süspansiyonlar formunda parenteral uygulama ile; veya subkütanöz uygulama 25 yoluyla veya supozituarlar formunda rektal uygulama ile; veya transdermal olarak uygulanabilir.

- 30 Buluşa ait bileşiklerin kuru toz formülasyonları ve basınçlı HFA aerosolleri, oral veya nazal inhalasyon yoluyla uygulanabilir. Inhalasyon için bileşik istenen şekilde ince olarak bölünür. İnce şekilde bölünen bileşik tercihen 10 µm'den daha az kütle medyan çapına sahiptir ve bir C₈-C₂₀ yağ asidi veya tuzu, (örneğin oleik asit), bir safra tuzu, bir fosfolipid, bir alkil sakkarit, bir perflorine veya polietoksile edilmiş sürfaktan veya diğer farmasötik olarak kabul edilebilir dağıtıcı gibi bir dağıtıcı yardımcı ile bir itici gaz karışımında süspansiyon edilebilir.

Buluşa ait bileşikler ayrıca kuru toz solunum cihazı yoluyla uygulanabilir. Solunum cihazı, tek veya çok dozlu bir solunum cihazı olabilir ve nefesle aktive edilen bir kuru toz solunum cihazı olabilir.

- 5 Bir olasılık, buluşa ait ince şekilde bölünen bileşiğin taşıyıcı bir madde, örneğin bir mono-, di- veya polisakkarit, bir şeker alkolü veya bir diğer poliol ile karıştırılmasıdır. Uygun taşıyıcılar şekerler, örneğin laktoz, glukoz, raffinöz, melezitoz, laktitol, maltitol, trehaloz, sukroz, mannitol; ve nişastadır. Alternatif olarak ince şekilde bölünen bileşik bir diğer ile kaplanabilir. Toz karışım ayrıca her biri aktif bileşiğin istenen dozunu içeren
- 10 sert jelatin kapsüllere dağıtılabilir.

- Bir diğer olasılık, ince şekilde bölünen tozun inhalasyon prosedürü sırasında ayrılan küreler halinde işlenmesidir. Bu küre biçimine getirilen toz, örneğin daha sonra hasta tarafından solunan istenen dozu bir dozlama biriminin ölçtüğü Turbuhaler® olarak
- 15 bilinen çok dozlu bir solunum cihazının ilaç rezervuarına doldurulabilir. Bu sistem ile aktif bileşen, taşıyıcı bir madde ile veya bu olmaksızın hastaya dağıtılır.

- Oral uygulama için buluşa ait bileşik, bir adjuvan veya bir taşıyıcı, örneğin laktoz, sakkaroz, sorbitol, mannitol; bir nişasta, örneğin patates nişastası, mısır nişastası veya
- 20 amilopektin; bir selüloz derivesi; bir bağlayıcı, örneğin jelatin veya polivinilpirolidon; ve/veya bir yağlayıcı, örneğin magnezyum stearat, kalsiyum stearat, polietilen glikol, bir vaks, parafin ve benzeri ile karıştırılabilir ve daha sonra tabletler halinde sıkıştırılabilir. Kaplanmış tabletlerin gerekli olması halinde yukarıda açıklanan şekilde hazırlanan özler, örneğin arap zıncı, jelatin, talkum ve titanyum dioksit içerebilen konsantre bir
- 25 şeker solüsyonu ile kaplanabilir. Alternatif olarak tablet, uygun şekilde uçucu organik bir solvent içerisinde çözünen uygun bir polimer ile kaplanabilir.

- Yumuşak jelatin kapsüllerin hazırlanmasına yönelik olarak buluşa ait bileşik, örneğin bir bitkisel yağ veya polietilen glikol ile karıştırılabilir. Sert jelatin kapsüller, tabletlere
- 30 yönelik yukarıda bahsedilen eksipyanlar kullanılarak bileşiğe ait granülleri içerebilir. Ayrıca buluşa ait bileşiğin sıvı veya yarı katı formülasyonlar sert jelatin kapsüllere doldurulabilir.

- Oral uygulamaya yönelik sıvı preparatlar, şuruplar veya süspansiyonlar, örneğin buluşa ait bileşiği içeren solüsyonlar formunda olabilir, denge şeker ve bir etanol, su, gliserol
- 35 ve propilen glikol karışımıdır. İsteğe bağlı olarak bu tür sıvı preparatlar renklendirici

ajanlar, lezzet verici ajanlar, sakkarin ve/veya kalınlaştırıcı bir ajan olarak karboksimetilselüloz veya teknikte uzman kişilerce bilinen diğer ekspiyanları içerebilir.

Buluş bu noktada aşağıdaki Örneklere referans ile ancak bununla sınırlandırılmadan
5 gösterilecektir burada aşağıdaki Genel Yöntemler kullanılmıştır:

Genel Yöntemler

Aksi belirtilmedikçe başlangıç materyalleri ticari olarak temin edilebilir. Tüm
10 solventler ve ticari reaktifler, laboratuvar kalitesindedir ve alındığı gibi kullanılmıştır. Tüm işlemler ortam sıcaklığında, *diğer bir ifadeyle* 17 ila 28°C aralığında ve uygun olduğunda nitrojen gibi inert bir gaz atmosferi altında gerçekleştirilmiştir. 'Mikrodalga' ile ısıtma, bir CEM Discover® mikrodalga reaktöründe değişken güçlü mikrodalga radyasyonu kullanılarak sabit sıcaklığa ısıtmaya refere eder. Hidrojenasyon
15 reaksiyonları, detaylı şekilde açıklandığı üzere bir Buchi Peteric® sistemi veya bir ThalesNano H-Cube® sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm solüsyonların konsantrasyonu, *örneğin* bir Büchi Rotavapor® döner buharlaştırıcı kullanılarak düşük basınç altında (*vakumda*) buharlaşma yoluyla gerçekleştirilmiştir.

20 İnce Katman kromatografisi (TLC), bir floresan (UV₂₅₄) belirteci ile silika (partikül boyutu <63 µm; gözeneklilik 60 Å; yüzey alanı ~500 m²/g) ile kaplanan alüminyum veya cam destekli plakalar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elüsyonu takiben plakalar, UV₂₅₄ radyasyonu ile veya iyodin (silika üzerinden önceden absorbe edilmiştir), aköz bir potasyum permanganat solüsyonu veya aköz bir seryum (IV) amonyum nitrat
25 solüsyonu gibi uygun bir belirteç ile gelişme yoluyla görselleştirilmiştir. Belirteç preparatlarının örnekleri 'Experimental Organic Chemistry: Preparative ve Microscale' 2nd Ed. (Harwood, L., Moody, C. and Percy, J.), WileyBlackwell, 1998 içerisinde bulunabilir.

30 Analitik HPLC, %0.1 aköz trifloroasetik asit, %0.1 aköz formik asit, %0.1 aköz amonyum asetat veya %0.1 aköz amonyak içinde bir asetonitril gradyanı ile ayrıştırılarak; bir Waters XBridge™ C8 3.5 µm kolon; %0.1 aköz amonyak içinde bir asetonitril gradyanı olan bir Waters XBridge™ C18 3.5 µm kolon; %0.1 aköz trifloroasetik asit içinde bir asetonitril gradyanı olan bir Waters Symmetry™ C18 3.5 µm
35 kolon; %0.1 aköz trifloroasetik asit içinde bir asetonitril gradyanı olan bir Waters

Sunfire™ C8 3.5 µm kolon; veya %0.1 aköz trifloroasetik asit içinde bir asetronitril gradyanı olan bir Phenomenex Gemini™ C18 3 µm kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıştırılan piklerin UV spektrumları, bir Agilent 1100® sisteminde bir diyot dizisi veya eşdeğeri kullanılarak ölçülmüştür.

5

Silika (partikül boyutu <63 µm; gözeneklilik 60 Å; yüzey alanı ~500 m²/g) üzerinde orta basınçlı sıvı kromatografisi (MPLC), önceden paketlenmiş Biotage FLASH™ kolonları veya eşdeğeri, *örneğin* Thomson SINGLE StEP™, Biotage Isololute™, Teledyne Isco RediSep™ veya Silicycle UltraPure silika kolonları tavsiye edilen solvent akış hızları ve numune yüklerinde kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fraksiyon saflığı, TLC veya analitik HPLC kullanılarak belirlenmiştir.

10

Preparatif HPLC, detaylı şekilde açıklandığı üzere 30 - 35 mL/dakikalık bir akış hızında sabit bir faz olarak Phenomenex Gemini™ NX C18 (30 x 100 mm, 5 µm) kolonu, Waters Sunfire™ Prep C8 (30 x 100 mm, 10 µm) kolonu, Waters Sunfire™ Prep C18 (30 x 100 mm, 5 µm) kolonu veya Waters XBridge™ C8 (30 x 100 mm, 5 µm) kolonu kullanılarak %0.1 veya %0.2 aköz TFA, aköz formik asit veya aköz amonyak solüsyonu içerisinde bir asetronitril veya metanol gradyanı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fraksiyonlar, 220 veya 254 nm gibi bir dalga boyunca UV spektroskopisi ile tespiti takiben toplanmıştır. Fraksiyon saflığı, TLC veya analitik HPLC kullanılarak belirlenmiştir.

15

20

¹H NMR spektrumları, Bruker Avance 600 (600 MHz), Bruker DRX 500 (500 MHz) veya Varian UnityInova 500 MHz, 400 MHz veya 300 MHz aletinde kaydedilmiştir. Merkezi kloroform-*d* (CDCl₃; δ_H 7.27 ppm), dimetilsulfoksit-*d*₆ (d₆-DMSO; δ_H 2.50 ppm) veya metanol-*d*₄ (CD₃OD; δ_H 3.31 ppm) pikleri veya dahili bir tetrametilsilan standardı (TMS; δ_H 0.00 ppm) referanslar olarak kullanılmıştır. Kütle spektrumları, analitik HPLC takip edilerek bir Agilent MSD (+ve ve -ve APCI ve/veya elektrosprey (*örneğin* multimod formunda)) üzerinde kaydedilmiştir.

25

30

Diğer tüm prosesler, *örneğin* 'Experimental Organic Chemistry: Preparative ve Microscale' 2nd Ed. (Harwood, L., Moody, C. ve Percy, J.), WileyBlackwell, 1998 içerisinde detaylı şekilde açıklandığı üzere standart laboratuvar teknikleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

35

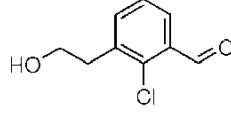
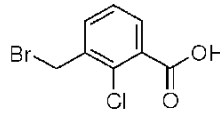
Örneklere kullanılan kısaltmalar veya terimler aşağıdaki anlamlara sahiptir:

	g	gram
	h	saat(ler)
5	min	dakika(lar)
	mL	mililitre
	AIBN	azobisisobütironitril
	CDI	1,1'-karbonildiimidazol
	DCM	diklorometan
10	DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
	DMSO	dimetilsülfoksit
	HATU	<i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronyum hekzaflorofosfat
	HCl	hidrojen klorid/hidroklorik asit
	HPLC	yüksek performanslı sıvı kromatografisi
15	Hunig bazı	<i>N,N</i> -diizopropiletilamin
	IPA	izopropanol
	MeOH	metanol
	MTBE	metil <i>tert</i> -bütil eter
	NBS	<i>N</i> -bromosüksinimid
20	NCS	<i>N</i> -klorosüksinimid
	NMP	1-metilpirolidin-2-on
	RT	oda sıcaklığı
	T3P	2-propanfosfonik asit anhidrit
	TBAF	tetrabütilamonyum florid
25	TFA	trifloroasetik asit
	THF	tetrahidrofuran
	Tosic-65	Biotage AB. tarafından tedarik edilen makro gözenekli polimer bağlı iyon değişim reçinesi
	Triton-B	benziltrimetilamonyum hidroksit
30		

Sentetik Ara Ürünlerin Hazırlanması

A) Aromatik bağlayıcı kısımların hazırlanması:

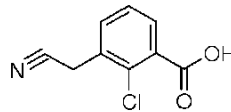
35 Aromatik Ara Ürün 11

2-Kloro-3-(2-hidroksietil) benzaldehit**5 a) 3-(Bromometil)-2-klorobenzoik asit**

- Benzoil peroksit (1.33 g), klorobenzen (250 mL) içerisinde bir 2-kloro-3-metilbenzoik asit (25 g) ve N-bromosüksinimid (28.7 g) süspansiyonuna eklenmiştir ve ortaya çıkan karışım, 4 saat 85°C'ye ısıtılmıştır. Karışım, etil asetat (100 mL) ile seyreltilmiştir ve %10 aköz tuzlu su (3 x 100 mL) ile yıkanmıştır. Organik katman magnezyum sülfat üzerinde kurutulmuştur, filtrelenmiştir ve buharlaştırılmıştır. Bej katı, beyaz bir katı olarak alt başlıktaki bileşiği vermek üzere etil asetat (~75 mL)/izoheksandan (~250 mL) yeniden kristalize edilmiştir. Verim 25.3 g.
- ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.93 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.66 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.36 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 4.67 (s, 2H). Bir değiştirilebilir proton gözlenmemiştir.

b) 2-Kloro-3-(siyanometil)benzoik asit

20



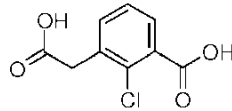
- DMF (150 mL) içerisinde bir 3-(bromometil)-2-klorobenzoik asit [Aromatik Ara Ürün 11, adım a] (13.2 g) solüsyonu, su (50 mL içerisindeki bir potasyum siyanür (7.23 g) solüsyonu ile muamele edilmiştir ve ortaya çıkan solüsyon, oda sıcaklığında bir gece karıştırılmıştır. Karışım, su (200 mL) ile seyreltilmiştir ve bir nitrojen akımı vasıtasıyla beyazlatıcı solüsyon yoluyla serbest kalmış herhangi bir HCN havalandırılarak, konsantre hidroklorik asit (25 mL) ile dikkatli bir şekilde asitleştirilmiştir. 2 saat karıştırıldıktan sonra aköz faz, etil asetat (3 x 250 mL) ile ekstrakte edilmiştir. Kombine organik fazlar, su (3 x 250 mL) ve tuzlu su (250 mL) ile yıkanmıştır, magnezyum sülfat

üzerinde kurutulmuştur, filtrelenmiştir ve beyaz bir katı olarak alt başlıktaki bileşiği vermek üzere buharlaştırılmıştır. Verim 10.3 g.

^1H NMR (300 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$) δ 13.54 (s, 1H), 7.75 - 7.67 (m, 2H), 7.48 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 4.16 (s, 2H).

5

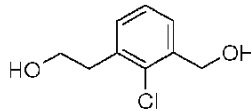
c) 3-(Karboksimetil)-2-klorobenzoik asit



- 10 Konsantre sülfürik asit (60 mL), buz soğukluğunda suya (75 mL) damlatılarak eklenmiştir ve ortaya çıkan solüsyon, 2-kloro-3-(siyanometil)benzoik aside [Aromatik Ara Ürün 11, adım b] (14 g) eklenmiştir. Ortaya çıkan süspansiyon, başlangıç materyalinin çözündüğü ve yeni bir çökeltinin gözlemlendiği 30 dakika boyunca reflükse (165°C) ısıtılmıştır. Reaksiyonun soğumasına olanak tanınmıştır ve su (250 mL) ile
- 15 seyreltilmiştir ve etil asetat (3 x 500 mL) ile ekstrakte edilmiştir. Kombine organik fazlar, su (250 mL) ve tuzlu su (250 mL) ile yıkanmıştır, daha sonra magnezyum sülfat üzerinde kurutulmuştur ve beyaz bir katı olarak alt başlıktaki bileşiği vermek üzere buharlaştırılmıştır. Verim 13.7 g.

- ^1H NMR (400MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$) δ 7.62 (dd, $J = 7.7, 1.8$ Hz, 1H), 7.54 (dd, $J = 7.7, 1.8$ Hz, 1H), 7.37 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 3.78 (s, 2H). İki değiştirilebilir proton gözlenmemiştir.
- 20

d) 2-(2-Kloro-3-(hidroksimetil)fenil)etanol



25

- Bir boran dimetil sülfid kompleksi (THF içinde 2M, 220 mL) solüsyonu, oda sıcaklığında kuru THF (800 mL) içerisinde bir 3-(karboksimetil)-2-klorobenzoik asit [Aromatik Ara Ürün 11, adım c] (18.9 g) süspansiyonuna 5 dakika parçalar halinde eklenmiştir. Ortaya çıkan efervesan süspansiyon oda sıcaklığında 30 dakika karıştırılmıştır, daha sonra 60 dakika reflükse ısıtılmıştır ve bir gece oda sıcaklığına soğumasına olanak tanınmıştır. Karışım, 15 dakika parçalar halinde metanol (100 mL) ilavesi ile söndürülmüştür ve kabarcıklanma durana kadar karıştırılmıştır. Konsantre aköz HCl (25 mL) eklenmiştir,
- 30

karışım 30 dakika karıştırılmıştır ve düşük basınç altında konsantre edilmiştir. Zamklı kalıntı etil asetat (500 mL) ile aköz HCl (2M, 200 mL) arasında parçalara ayrılmıştır. Fazlar ayrılmıştır ve aköz faz, etil asetat (2 x 300 mL) ile ekstrakte edilmiştir. Kombine organik fazlar tuzlu su (300 mL) ile ekstrakte edilmiştir, magnezyum sülfat üzerinde kurutulmuştur, filtrelenmiştir ve sarı bir yağ olarak alt başlıktaki bileşiği vermek üzere buharlaştırılmıştır. Verim 17.8 g.

¹H NMR (400 MHz, D₆-DMSO) δ 7.40 (dd, J = 7.0, 2.2 Hz, 1H), 7.29 - 7.21 (m, 2H), 5.34 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 4.71 (t, J = 4.9 Hz, 1H), 4.55 (d, J = 5.1 Hz, 2H), 3.63 - 3.56 (m, 2H), 2.87 (t, J = 7.2 Hz, 2H).

e) 2-Kloro-3-(2-hidroksietil)benzaldehit

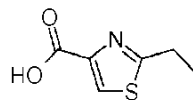
Manganez (IV) dioksit (43.1 g), kloroform (500 mL) içerisinde hafif bir 2-(2-kloro-3-(hidroksimetil)fenil)etanol [Aromatik Ara Ürün 11, adım d] (18.5 g) süspansiyonuna eklenmiştir ve ortaya çıkan süspansiyon, 2 saat reflükste ısıtılmıştır. Reaksiyon karışım soğutulmuştur, Selit yoluyla filtrelenmiştir ve filtre pedi, DCM (3 x 300 mL) ile yıkanmıştır. Kombine yıkama ürünleri ve filtrat buharlaştırılmıştır ve kalıntı, 3:1 ila 1:1 izoheksan:etil asetat gradyanı ile ayrıştırılarak flaş silika kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Ürünü içeren fraksiyonlar kombine edilmiştir ve beyaz bir katı olarak başlıktaki bileşiği vermek üzere buharlaştırılmıştır. Verim 12.00 g.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.55 (s, 1H), 10.54 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 7.83 (dd, J = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.55 (dd, J = 7.4, 1.8 Hz, 1H), 7.35 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 3.94 (q, J = 6.4 Hz, 2H), 3.11 (t, J = 6.5 Hz, 2H).

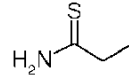
B) Karboksilik asitlerin hazırlanması:

Karboksilik Asit 1

2-Etiltiyazol-4-karboksilik asit



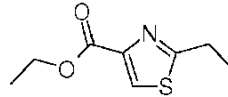
a) Propantiyoamid



Fosfor pentasülfid (15.2 g), metil *t*-bütil eter (900 mL) içerisinde bir propionamid (20 g) süspansiyonuna eklenmiştir ve karışım 18 saat karıştırılmıştır. Karışım, Selit yoluyla
5 filtrelenmiştir ve sarı bir yağ olarak alt başlıktaki bileşiği sağlamak üzere *vakumda* konsantre edilmiştir. Verim 15.8 g.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.59 (s, 1H), 6.88 (s, 1H), 2.70 (q, J = 7.5 Hz, 2H), 1.32 (t, J = 7.5 Hz, 3H).

10 b) Etil 2-etiltiyazol-4-karboksilat



Etil 3-bromo-2-oksopropanoat (24.7 mL), nitrojen altında 0-10°C'de etanol (150 mL)
15 içerisinde bir propantiyoamid [Karboksilik Asit 1, adım a] (15.8 g) solüsyonuna 10 dakika boyunca damlatılarak eklenmiştir. Ekleme işlemi tamamlandığında karışım, 18 saat ortam sıcaklığında karıştırılmıştır. Karışım, *vakumda* konsantre edilmiştir, kalıntı su ile seyreltilmiştir ve etil asetat (x 3) içinde ekstrakte edilmiştir. Kombine ekstraktlar, tuzlu su ile yıkanmıştır, magnezyum sülfat üzerinde kurutulmuştur, filtrelenmiştir ve
20 solvent uzaklaştırılmıştır. Ham ürün, izoheksan içerisinde %10, 15 ve 20 elüsyon gradyanı etil asetat, flaş silika kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Ürünü içeren fraksiyonlar, soluk yeşil bir katı olarak alt başlıktaki bileşiği sağlamak üzere kuruyana kadar buharlaştırılmıştır. Verim 16.0 g.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.06 (s, 1H), 4.42 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.10 (q, J = 7.5 Hz,
25 2H), 1.44 - 1.38 (m, 6H).

c) 2-Etiltiyazol-4-karboksilik asit

Konsantre HCl (75 mL), su (75 mL) içerisinde bir etil 2-etiltiyazol-4-karboksilat
30 [Karboksilik Asit 1, adım b] (16 g) süspansiyonuna eklenmiştir ve karışım, 100°C'de 24 saat karıştırılmıştır. Karışım soğutulmuştur ve *vakumda* konsantre edilmiştir. Kalıntı, aseton ile tritüre edilmiştir, katı filtrasyon yoluyla toplanmıştır ve gri bir katı olarak başlıktaki bileşiği sağlamak üzere *vakumda* kurutulmuştur. Verim 14.4 g.

M/Z 158 (M+H)⁺/56 (M-H)⁻ (APCI).

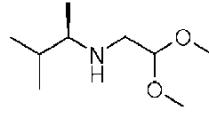
¹H NMR (400 MHz, D₆-DMSO) δ 8.31 (s, 1H), 3.01 (q, J = 7.5 Hz, 2H), 1.31 (t, J = 7.6 Hz, 3H). Bir değıştirilebilir proton gözlenmemiştir.

5 C) Aminlerin hazırlanması:

Amin 2

(R)-N-(2,2-Dimetoksietil)-3-metilbütan-2-amin

10



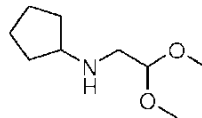
2,2-Dimetoksiasetaldehit (su içinde %60, 8.7 mL), metanol (25 mL) içerisindeki (R)-3-metilbütan-2-amin (5.0 g) eklenmiştir ve karışım, ortam sıcaklığında bir gece karıştırılmıştır. Su (10 mL) içerisinde karbon üzerinde paladyum (%5, 1.2 g) sulu karışımı eklenmiştir ve karışım, 3 saat karıştırma ile 5 bar basınçta hidrojenize edilmiştir. Karışım, Selit yoluyla filtrelenmiştir ve filtre pedi, metanol (3 x 100 mL) ile yıkanmıştır. Kombine filtrat ve yıkama ürünleri, ~10 mL'lik bir hacme konsantre edilmiştir ve daha sonra tolüen (200 mL) eklenmiştir. Karışım konsantre edilmiştir, daha fazla tolüen (200 mL) eklenmiştir ve karışım, sarı bir yağ olarak başlıktaki bileşiği vermek üzere bir kez daha konsantre edilmiştir. Verim 8.0 g.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4.46 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 3.38 (s, 6H), 2.78 (dd, J = 5.5, 11.9 Hz, 1H), 2.67 (dd, J = 5.5, 11.6 Hz, 1H), 2.49 - 2.39 (m, 1H), 1.76 - 1.62 (m, 1H), 0.96 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.90 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.85 (d, J = 6.7 Hz, 3H). Bir değıştirilebilir proton gözlenmemiştir.

25

Amin 6

N-(2,2-Dimetoksietil)siklopentanamin



30

(*R*)-3-metilbütan-2-amin yerine siklopentanamin (5.0 g) kullanılarak Amin 2 yöntemi ile hazırlanmıştır. Verim 9.4 g.

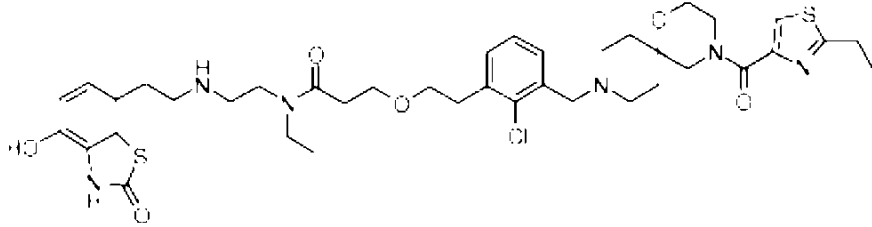
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.47 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 3.39 (s, 6H), 3.05 (beşli, J = 6.8 Hz, 1H), 2.72 (d, J = 5.4 Hz, 2H), 1.89 - 1.80 (m, 2H), 1.73 - 1.62 (m, 2H), 1.58 - 1.48 (m, 2H), 1.36 - 1.27 (m, 2H). Bir değiştirilebilir proton gözlenmemiştir.

Nihai Bileşiklerin Hazırlanması:

Aşağıdaki nihai bileşiklerin tümü, aksi belirtilmedikçe ditrifloroasetat tuzları olarak izole edilmiştir.

Referans Örnek 26

3-(2-Kloro-3-((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)-*N*-etil-*N*-(2-(2-(4-hidroksi-2-okso-2,3-dihidrobenzo[d]tiyazol-7-il)etilamino)etil)propanamid ditrifloroasetat



p-Tolüensülfonik asit monohidrat (0.51 g), THF (5 mL) içerisinde bir 3-(2-kloro-3-((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)-*N*-(2,2-dimetoksietil)-*N*-etilpropanamid (0.35 g) solüsyonuna eklenmiştir ve ortaya çıkan karışım oda sıcaklığında 15 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra solüsyon, bir NMP (2 mL) ve su (0.2 mL) karışımı içerisinde bir 7-(2-aminoetil)-4-hidroksibenzo[d]tiyazol-2(3H)-on hidroklorid [Org. Proc. Res. Dev. 2004, 8(4), 628] (0.20 g) ve sodyum bikarbonat (0.29 g) süspansiyonuna eklenmiştir. Ortaya çıkan bulanık solüsyon 10 dakika karıştırılmıştır, daha sonra sodyum triasetoksiborohidrit (0.34 g) eklenmiştir ve ortaya çıkan karışım bir gece karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımı, etil asetat (15 mL) ve doymuş sodyum bikarbonat solüsyonu (15 mL) arasında parçalara ayrılmıştır. Organik faz ayrılmıştır, %10 tuzlu su (2 x 15 mL) ile yıkanmıştır, sodyum sülfat üzerinde kurutulmuştur, filtrelenmiştir ve buharlaştırılmıştır. Kalıntı, elüsyon gradyanı

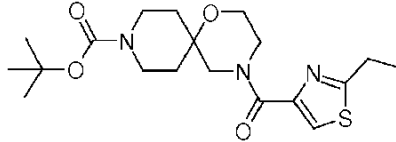
97.25:2.5:0.25 ila 92.3:7:0.7 diklorometan:metanol:'880' aköz amonyak, flaş silika kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Ürünü içeren fraksiyonlar kombine edilmiştir ve buharlaştırılmıştır. Ortaya çıkan zatk ayrıca preparatif HPLC (Gemini™ NX, Gradyan: %0.1 aköz TFA içerisinde %27-62 metanol) ile saflaştırılmıştır. Ürünü içeren fraksiyonlar kombine edilmiştir ve beyaz bir köpük olarak başlıktaki bileşiği sağlamak üzere buharlaştırılmıştır. Verim 0.17 g.

m/z 799 M^+ (MultiMode+).

1H NMR (500 MHz, D_6 -DMSO, 90°C) δ 11.35 (s, 1H), 7.95 - 7.90 (m, 1H), 7.53 - 7.47 (m, 1H), 7.44 - 7.38 (m, 1H), 7.36 - 7.30 (m, 1H), 6.87 - 6.81 (m, 1H), 6.77 - 6.71 (m, 1H), 4.36 - 4.23 (m, 2H), 3.75 - 2.54 (m, 30H), 2.06 - 1.94 (m, 2H), 1.83 - 1.68 (m, 2H), 1.38 - 1.29 (m, 3H), 1.16 - 1.03 (m, 3H). Dört değiştirilebilir proton gözlenmemiştir.

Bir başlangıç materyali olarak kullanılan 3-(2-kloro-3-((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)-*N*-(2,2-dimetoksietil)-etilpropanamid aşağıdaki gibi hazırlanmıştır:

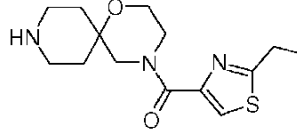
a) *tert*-Bütil 4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-karboksilat



T3P (THF içerisinde 1.6M, 51 mL), nitrojen altında DMF (120 mL) içerisinde karıştırılmış bir *tert*-bütil 1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-karboksilat hidroklorid [WuXi PharmaTech] (18 g), 2-etiltiyazol-4-karboksilik asit [Karboksilik Asit 1] (12.0 g) ve trietilamin (52 mL) süspansiyonuna damlatılarak eklenmiştir ve karışım, 20 saat ortam sıcaklığında karıştırılmıştır. Karışım su ile seyreltilmiştir ve etil asetat (x 3) içinde ekstrakte edilmiştir. Kombine ekstraktlar, %10 tuzlu su, %30 tuzlu su ve doymuş tuzlu su ile başarılı şekilde yıkanmıştır, magnezyum sülfat üzerinde kurutulmuştur, filtrelenmiştir ve solvent uzaklaştırılmıştır. Ham ürün, etil asetat ile ayrıştırılarak, flaş silika kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Saf fraksiyonları, sarı bir yağ olarak alt başlıktaki bileşiği sağlamak üzere kuruyana kadar buharlaştırılmıştır. Verim 24 g.

m/z 340 (M -tBu+H) $^+$ (APCI).

b) (2-Etiltiyazol-4-il)(1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-4-il)metanon trifloroasetat

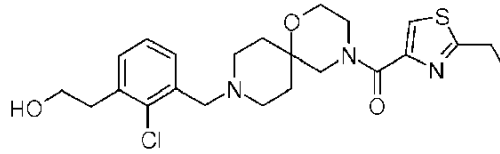


- 5 Trifloroasetik asit (20 mL), diklorometan (100 mL) içerisinde bir *tert-bütıl* 4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-karboksilat [Örnek 26, adım a] (24 g) solüsyonuna eklenmiştir ve karışım, 18 saat ortam sıcaklığında karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımı, tolüen (50 mL) ile seyreltilmiştir ve *vakumda* konsantre edilmiştir. Kalıntı, diklorometan (50 mL) içerisinde çözünmüştür, TFA (50 mL) eklenmiştir ve
- 10 karışım, 4 saat karıştırılmıştır. Karışım, tolüen (50 mL) ile seyreltilmiştir, *vakumda* konsantre edilmiştir, kalıntı eter ile tritüre edilmiştir ve çökelen katı, filtrasyon yoluyla toplanmıştır ve beyaz bir katı olarak alt başlıktaki bileşiği sağlamak üzere kurutulmuştur. Verim 28 g.

- ¹H NMR (400 MHz, D₆-DMSO) δ 8.55 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.04 - 8.00 (m, 1H), 3.81 - 3.51 (m, 6H), 3.18 - 2.91 (m, 6H), 2.00 - 1.90 (m, 2H), 1.72 - 1.56 (m, 2H), 1.32 (t, J = 7.2 Hz, 3H).
- 15

c) (9-(2-Kloro-3-(2-hidroksietil)benzil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-4-il)(2-etiltiyazol-4-il)metanon

20

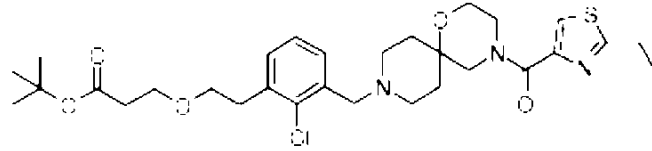


- Tetrahidrofuran (50 mL) içerisinde bir 2-kloro-3-(2-hidroksietil)benzaldehit [Aromatik Ara Ürün 11] (1.5 g) ve (2-etiltiyazol-4-il)(1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-4-il)metanon trifloroasetat [Örnek 26, adım b] (4.25 g) süspansiyonuna bir parça halinde trietilamin (2.5 mL) eklenmiştir. Karışım, 0.5 saat karıştırılmıştır, daha sonra sodyum triasetoksiborohidrit (2.58 g) bir parça halinde eklenmiştir ve ortaya çıkan solüsyon 2 saat karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımı, etil asetat (100 mL) ile doymuş sodyum bikarbonat solüsyonu (50 mL) arasında parçalara ayrılmıştır. Karışım, 10 dakika iyice
- 25
- çalkalanmıştır ve katmanlar ayrılmıştır. Aköz faz, etil asetat (100 mL) ile ekstrakte edilmiştir. Kombine organik solüsyonlar tuzlu su ile yıkanmıştır, sodyum sülfat üzerinde
- 30

kurutulmuştur, filtrelenmiştir ve buharlaştırılmıştır. Kalıntı, solvent olarak 95:5 etil asetat:triethylamin kullanılarak flaş silika kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Ürünü içeren fraksiyonlar kombine edilmiştir ve berrak bir yağ olarak alt başlıktaki bileşiği vermek üzere buharlaştırılmıştır. Verim 3.40 g.

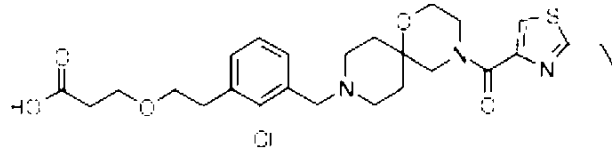
- 5 ^1H NMR (400 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$, 90°C) δ 7.89 (s, 1H), 7.33 - 7.28 (m, 1H), 7.24 - 7.16 (m, 2H), 4.35 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 3.68 - 3.60 (m, 8H), 3.55 (s, 2H), 3.02 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.89 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.46 - 2.31 (m, 4H), 1.75 - 1.67 (m, 2H), 1.59 - 1.51 (m, 2H), 1.33 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H).

- 10 d) ***tert*-Bütil 3-(2-kloro-3-((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)propanoat**



- 15 Triton-B (su içinde %40, 0.94 mL), asetonitril (1 mL) içerisinde bir (9-(2-kloro-3-(2-hidroksietil)benzil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-4-il)(2-etiltiyazol-4-il)metanon [Örnek 26, adım c] (3.2 g) ve *tert*-bütil akrilat (1.5 mL) solüsyonuna eklenmiştir ve ortaya çıkan karışım oda sıcaklığında bir gece karıştırılmıştır. Solvent buharlaştırılmıştır ve kalıntı, berrak bir yağ olarak alt başlıktaki bileşiği vermek üzere elüsyon gradyanı
- 20 1:1:0.05 etil asetat:izoheksan:triethylamin ile 95:5 etil asetat:triethylamin, flaş silika kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Verim 3.2 g.
- m/z 592 M^+ (APCI).

- 25 e) **3-(2-Kloro-3-((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)propanoik asit**

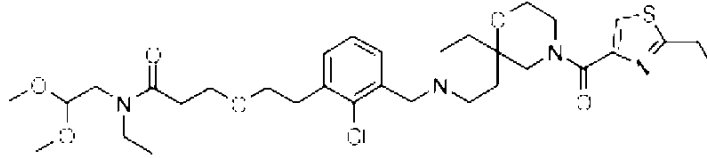


- TFA (10 mL), DCM (30 mL) içerisinde bir *tert*-bütil 3-(2-kloro-3-((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)propanoat [Örnek 26, adım d] (3.1 g) solüsyonuna eklenmiştir ve ortaya çıkan karışım 2 saat karıştırılmıştır, daha sonra buharlaştırılmıştır. Kalıntı, etil asetat (100 mL) ile doymuş sodyum
- 30

bikarbonat solüsyonu (50 mL) arasında parçalara ayrılmıştır. Fazlar ayrılmıştır ve aköz faz, daha fazla etil asetat (2 x 100 mL) ile yıkanmıştır. Aköz faz daha sonra asetik asit ile asitleştirilmiştir ve etil asetat (3 x 100 mL) ile ekstrakte edilmiştir. Kombine organik solüsyonlar sodyum sülfat üzerinde kurutulmuştur, filtrelenmiştir ve beyaz bir köpük olarak alt başlıktaki bileşiği vermek üzere buharlaştırılmıştır. Verim 2.7 g.

¹H NMR (400 MHz, D₆-DMSO, 90°C) δ 7.92 (s, 1H), 7.60 - 7.53 (m, 1H), 7.44 - 7.39 (m, 1H), 7.32 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 3.76 - 3.56 (m, 12H), 3.12 - 2.92 (m, 8H), 2.42 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.01 - 1.73 (m, 4H), 1.33 (t, J = 7.6 Hz, 3H). Bir değiştirilebilir proton gözlenmemiştir.

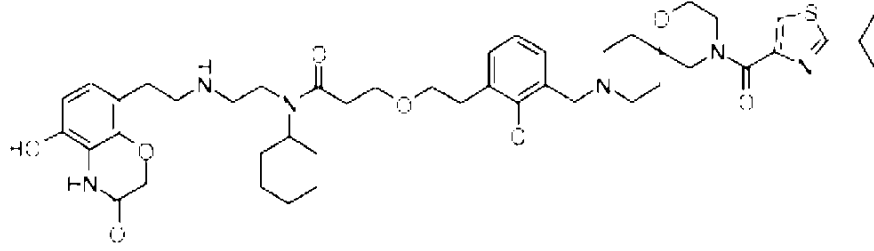
f) 3-(2-Kloro-3-((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)-N-(2,2-dimetoksietil)-N-etilpropanamid



HATU (1.06 g), DMF (5 mL) içerisinde bir 3-(2-kloro-3-((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)propanoik asit [Örnek 26, adım e] (0.75 g), Hunig bazı (1.22 mL) ve N-etil-2,2-dimetoksietanamin [US 2707186] (0.37 g) solüsyonuna eklenmiştir. Ortaya çıkan koyu solüsyon, oda sıcaklığında bir gece karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımı etil asetat (25 mL) ile %20 tuzlu su (25 mL) arasında parçalara ayrılmıştır. Organik katman ayrılmıştır ve %20 tuzlu su (2 x 25 mL) ile yıkanmıştır. Organik solüsyon buharlaştırılmıştır ve kalıntı, gradyan elüsyonu izoheksan:triethylamin 95:5 ila etil asetat:triethylamin 95:5., silika jel kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Ürünü içeren fraksiyonlar kombine edilmiştir ve bir yağ olarak alt başlıktaki bileşiği vermek üzere buharlaştırılmıştır. Verim 0.70 g.
m/z 651 M⁺ (APCI).

Referans Örnek 27

3-(2-Kloro-3-((4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)-N-sikloheksil-N-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)propanamid ditrifloroasetat



p-Tolüensülfonik asit monohidrat (0.29 g), DCM (5 mL) içerisinde bir 3-(2-kloro-3-((4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)-*N*-sikloheksil-*N*-(2,2-dimetoksietil)propanamid (0.22 g) solüsyonuna eklenmiştir ve ortaya çıkan karışım oda sıcaklığında 3 saat karıştırılmıştır. Solüsyon daha sonra bir NMP (2 mL) ve su (0.2 mL) karışımı içerisinde bir 8-(2-aminoetil)-5-hidroksi-2H-benzo[b][1,4]oksazin-3(4H)-on hidroklorid [WO 2008075025] (0.11 g) ve sodyum bikarbonat (0.17 g) süspansiyonuna eklenmiştir ve ortaya çıkan bulanık solüsyon 10 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra asetik asit (0.018 mL) akabinde sodyum triasetoksiborohidrit (0.16 g) eklenmiştir ve ortaya çıkan karışım bir gece karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımı, 2-metiltetrahidrofuran (15 mL) ile doymuş sodyum bikarbonat solüsyonu (15 mL) arasında parçalara ayrılmıştır. Organik faz ayrılmıştır, %10 tuzlu su (2 x 15 mL) ile yıkanmıştır, sodyum sülfat üzerinde kurutulmuştur, filtrelenmiştir ve buharlaştırılmıştır. Kalıntı, elüsyon gradyanı 97.25:2.5:0.25 ila 92.3:7:0.7 diklorometan:metanol:'880' aköz amonyak, flaş silika kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Ürünü içeren fraksiyonlar kombine edilmiştir ve buharlaştırılmıştır. Ortaya çıkan zambak, preparatif HPLC (Sunfire™, Gradyan: %0.2 aköz TFA içerisinde %35-60 metanol) ile saflaştırılmıştır. Ürünü içeren fraksiyonlar kombine edilmiştir, buharlaştırılmıştır ve beyaz bir katı olarak başlıktaki bileşiği vermek üzere eter ile tritüre edilmiştir. Verim 0.037 g.

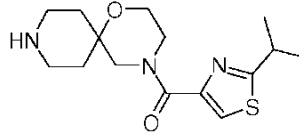
m/z 865 M^+ (MultiMode+).

1H NMR (400 MHz, D_6 -DMSO, 90°C) δ 9.40 (br s, 1H), 8.40 (br s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.49 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 7.32 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 6.66 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.49 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 4.53 (s, 2H), 4.26 (br s, 2H), 3.75 - 3.60 (m, 11H), 3.51 - 2.93 (m, 13H), 2.82 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.60 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.03 - 1.89 (m, 2H), 1.82 - 1.69 (m, 4H), 1.68 - 1.56 (m, 4H), 1.50 - 1.23 (m, 4H), 1.35 (d, J = 6.9 Hz, 6H).

Üç değiştirilebilir proton gözlenmemiştir.

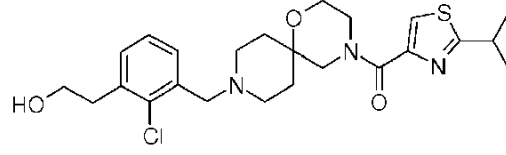
Bir başlangıç materyali olarak 3-(2-kloro-3-((4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)-N-sikloheksil-N-(2,2-dimetoksietil)propanamid aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

5 a) **(2-İzopropiltiyazol-4-il)(1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-4-il)metanon hidroklorid**



- 10 2-metiltetrahidrofuran (140 mL) içerisinde bir 2-izopropiltiyazol-4-karboksilik asit (12 g) ve tert-bütil 1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-karboksilat hidroklorid [WuXi PharmaTech] (20 g) solüsyonu, buzlu su içinde soğutulmuştur ve trietilamin (47 mL) akabinde T3P (THF içinde 1.6M, 54 mL) ile muamele edilmiştir. Karışımın oda sıcaklığına ıllmasına olanak tanınmıştır ve 1 saat karıştırılmıştır. Su (140 mL),
- 15 karıştırma ile eklenmiştir, daha sonra fazlar ayrılmıştır. Organik faz su (80 mL) ile yıkanmıştır ve daha sonra <30°C'lik bir sıcaklık kullanılarak düşük basınç altında (~100 mL) hacme kadar konsantre edilmiştir. IPA (75 mL) eklenmiştir ve karışım, (~100 mL) hacme kadar konsantre edilmiştir. Daha fazla IPA (75 mL) eklenmiştir ve karışım yeniden (~100 mL) hacme kadar konsantre edilmiştir. IPA (~6M, 81 mL) içerisinde bir
- 20 hidrojen klorid solüsyonu, buzlu su içinde soğutma ile eklenmiştir, daha sonra karışım, 40°C'ye ılıtılmıştır ve 3.5 saat karıştırılmıştır. Karışım oda sıcaklığına soğutulmuştur, MTBE (34 mL) ile seyreltilmiştir ve 30 dakika karıştırılmıştır. Ortaya çıkan çökelmiş katı, filtrasyon yoluyla uzaklaştırılmıştır ve bir gece 55°C'de bir vakum fırınında kurutulmuştur. Verim 20.5 g.
- 25 ¹H NMR (400 MHz, D₆-DMSO) δ 8.88 (d, J = 41.0 Hz, 2H), 8.05 (s, 1H), 3.86 - 3.46 (m, 6H), 3.32 (beşli, J = 6.7 Hz, 1H), 3.17 - 3.02 (m, 2H), 3.01 - 2.85 (m, 2H), 1.96 (d, J = 14.1 Hz, 2H), 1.81 - 1.55 (m, 2H), 1.35 (d, J = 6.9 Hz, 6H).

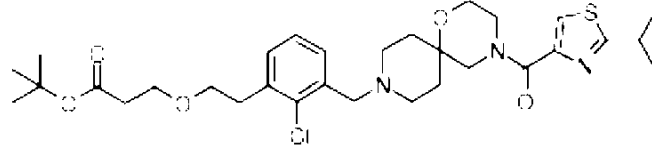
30 b) **(9-(2-Kloro-3-(2-hidroksietil)benzil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-4-il)(2-izopropiltiyazol-4-il)metanon**



(2-etiltiyazol-4-il)(1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-4-il)metanon trifloroasetat yerine (2-izopropiltiyazol-4-il)(1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-4-il)metanon hidroklorid [Örnek 27, adım a] (1.37 g) ve tetrahidrofuran yerine 2-metiltetrahidrofuran (50 mL) kullanılarak Örnek 26, adım c yöntemi ile hazırlanmıştır. Verim 1.00 g.

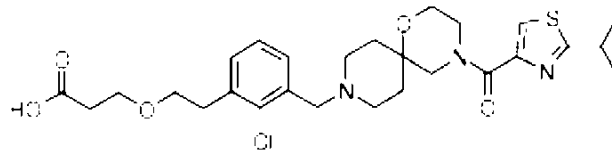
¹H NMR (400 MHz, D₆-DMSO 90°C) δ 7.91 (d, J = 1.3 Hz, 1H), 7.30 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.24 - 7.16 (m, 2H), 4.36 (t, J = 5.1 Hz, 1H), 3.73 - 3.59 (m, 8H), 3.55 (s, 2H), 3.32 (yedili, J = 6.8 Hz, 1H), 2.89 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.46 - 2.40 (m, 1H), 2.40 - 2.28 (m, 1H), 2.17 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 1.91 (beşli, J = 7.5 Hz, 1H), 1.77 - 1.65 (m, 2H), 1.62 - 1.50 (m, 2H), 1.36 (d, J = 6.5 Hz, 6H).

c) **tert-Bütil 3-(2-kloro-3-((4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)propanoat**



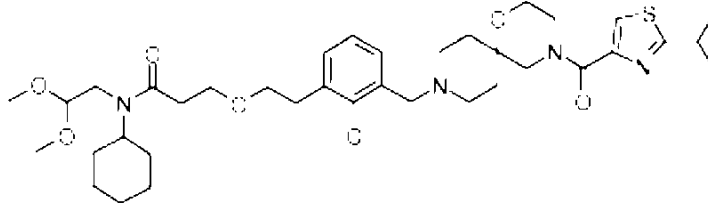
(9-(2-floro-3-(2-hidroksietil)benzil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-4-il)(2-izopropiltiyazol-4-il)metanon yerine (9-(2-kloro-3-(2-hidroksietil)benzil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-4-il)(2-izopropiltiyazol-4-il)metanon [Örnek 27, adım b] (1.0 g) kullanılarak Örnek 7, adım c yöntemi ile hazırlanmıştır. Verim 0.93 g. m/z 606 M⁺ (APCI).

d) **3-(2-kloro-3-((4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)propanoik asit**



Tert-bütil 3-(2-floro-3-((4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)propanoat yerine *tert*-bütil 3-(2-kloro-3-((4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)propanoat [Örnek 27, adım c] (0.93 g) kullanılarak Örnek 7, adım d yöntemi ile hazırlanmıştır. Verim 0.76 g.
m/z 550 M⁺ (APCI).

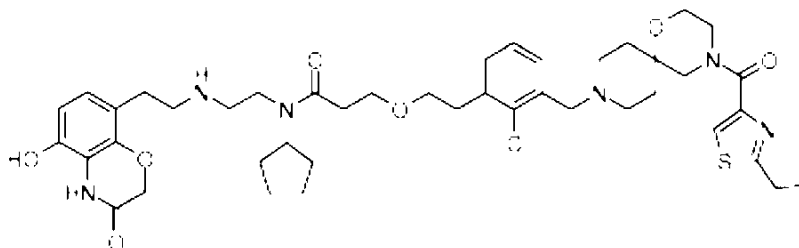
e) **3-(2-Kloro-3-((4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)-N-sikloheksil-N-(2,2-dimetoksietil)propanamid**



3-(2-floro-3-((4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)propanoik asit yerine 3-(2-kloro-3-((4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)propanoik asit [Örnek 27, adım d] (0.28 g) ve *N*-(2,2-dimetoksietil)sikloheptanamin yerine *N*-(2,2-dimetoksietil)sikloheksanamin [WO 2008075025] (0.10 g) kullanılarak Örnek 7, adım e yöntemi ile hazırlanmıştır. Verim 0.11 g.
m/z 719 M⁺ (APCI).

Örnek 33

3-(2-Kloro-3-((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)-N-siklopentil-N-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)propanamid ditrifloroasetat



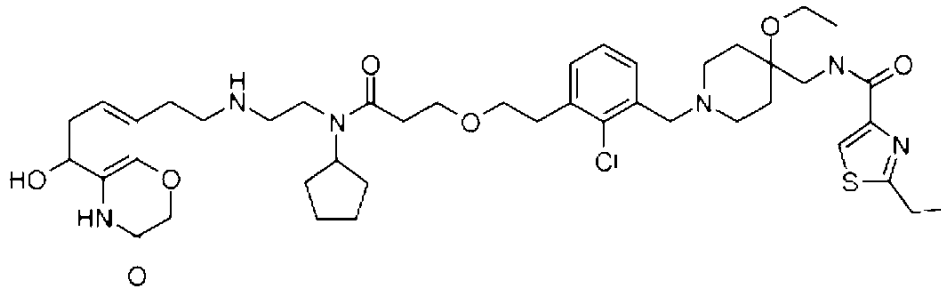
m/z 837 M⁺ (MultiMode+).

¹H NMR (500 MHz, D₆-DMSO, 90°C) δ 9.37 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.52 - 7.48 (m, 1H), 7.44 - 7.39 (m, 1H), 7.36 - 7.30 (m, 1H), 6.66 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.48 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 4.53 (s, 2H), 4.34 - 4.16 (m, 2H), 3.74 - 2.96 (m, 25H), 2.82 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.62 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 2.02 - 1.41 (m, 12H), 1.32 (t, J = 7.5 Hz, 3H). Üç değiştirilebilir proton gözlenmemiştir.

Örnek 33a

10

3-(2-kloro-3-(((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)-N-siklopentil-N-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)propanamid, sülfat tuzu



15

THF (80 mL) ve NMP (8.0 mL) içerisinde bir 3-(2-kloro-3-(((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)-N-siklopentil-N-(2,2-dimetoksietil)propanamid (9.6 g) solüsyonuna tosik asit.H₂O (13.25 g) eklenmiştir ve reaksiyon, ortam sıcaklığında 30 dakika ayrıştırılmıştır.

20

Bu sırada NMP (48.0 mL) ve su (4.8 mL) içerisinde bir 8-(2-aminoetil)-5-hidroksi-2H-benzo[b][1,4]oksazin-3(4H)-on.HCl (4.09 g) solüsyonuna sodyum bikarbonat (7.84 g) eklenmiştir ve reaksiyon, ortam sıcaklığında 30 dakika karıştırılmıştır.

25

Yukarıdaki aldehit solüsyonu, amin solüsyonuna eklenmiştir ve reaksiyon, sodyum triasetoksiborohidrit (8.86 g) ilavesinden önce 15 dakika karıştırılmıştır. Reaksiyon daha sonra ortam sıcaklığında 90 dakika karıştırılmıştır.

Reaksiyon karışımı, EtOAc (300mL) ile seyreltilmiştir ve doymuş sodyum bikarbonat (2x300mL) ve tuzlu su ile yıkanmıştır. Etil asetat solüsyonu daha sonra *vakumda* buharlaştırılmıştır. Ham ürün, 3-(2-kloro-3-((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)-N-siklopentil-N-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)propanamid (4.90 g) sağlamak üzere DCM (300mL) akabinde diklorometan içerisindeki %6-9 7N NH₃/metanol ile ayrıştırılarak, silika kromatografisi ile saflaştırılmıştır.

Etanol (50 mL) içerisinde bir 3-(2-kloro-3-((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)-N-siklopentil-N-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)propanamid (4.9 g) solüsyonuna sülfürik asit (0.5 Molar aköz) (10.62 mL) eklenmiştir. Reaksiyon, ortam sıcaklığında 5 dakika karıştırılmıştır.

Reaksiyon karışımı, yaklaşık 5-10ml'ye *vakumda* buharlaştırılmıştır, MeCN eklenmiştir ve solvent, 5.2g beyaz bir katı vermek üzere buharlaştırılmıştır (x2).

Yukarıdaki materyal (5.2g), MeOH (100mL) içerisinde çözünmüştür, kristallin materyali (bakınız aşağı)* ile tohumlanmıştır ve ortam sıcaklığında 72 saat karıştırılmıştır. Katı filtrelenmiştir, MeOH ile yıkanmıştır ve kristalin beyaz bir katı olarak 3-(2-kloro-3-((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)-N-siklopentil-N-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)propanamid, sülfat tuzu (3.04 g) vermek üzere ortam sıcaklığında *vakumda* kurutulmuştur.

[M+H]⁺=837 (calc=837) (MultiMode⁺)

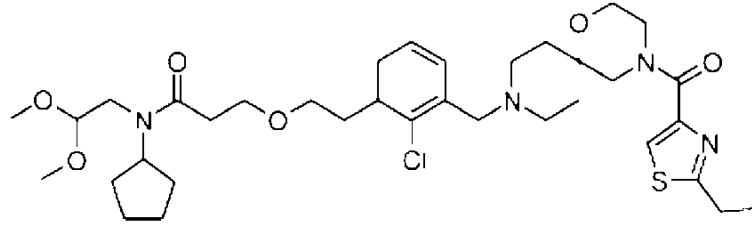
¹H NMR (400 MHz, D₆-DMSO) δ 9.96 - 9.90 (m, 1H), 9.82 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.40 - 7.18 (m, 3H), 6.69 - 6.63 (m, 1H), 6.51 - 6.45 (m, 1H), 4.54 (s, 2H), 4.17 (beşli, J = 8.5 Hz, 1H), 3.75 - 3.45 (m, 12H), 3.37 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 3.09 - 2.90 (m, 8H), 2.77 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.69 - 2.22 (m, 8H), 1.84 - 1.21 (m, 16H)

*Bir miktar ditrifloroasetat tuzu (1.05g) (örnek 33), DCM (30mL) ile doymuş sodyum bikarbonat (30mL) arasında parçalara ayrılmıştır. Aköz katman ayrıca DCM ile ekstrakte edilmiştir. Kombine organikler, Na₂SO₄ üzerinde kurutulmuştur ve beyaz bir köpük olarak 3-(2-kloro-3-((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)-N-siklopentil-N-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-

3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)propanamid (0.82 g) vermek üzere *vakumda* buharlaştırılmıştır.

Etanol (5 mL) içerisinde bir 3-(2-kloro-3-((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)-N-siklopentil-N-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)propanamid (230 mg) solüsyonuna sülfürik asit (0.5 Molar aköz) (0.549 mL) eklenmiştir. 5 dakika sonra karışım *vakumda* buharlaştırılmıştır ve beyaz bir katı (280mg) vermek üzere MeCN (x2) ile azeotropalanmıştır. Bu materyalden 50mg, metanol (5mL) içerisinde çözünmüştür ve buhar difüzyon deneyi koşulları (anti solvent olarak dietil eter kullanılmıştır) altında 15 mL dietil eter 6 gün boyunca eklenmiştir. Kristalin katı (20mg) filtrasyon yoluyla toplanmıştır.

3-(2-kloro-3-((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)-N-siklopentil-N-(2,2-dimetoksietil)propanamid

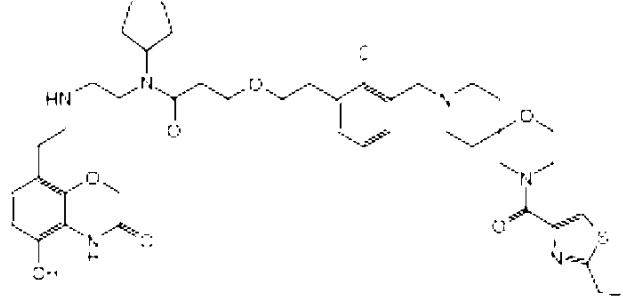


DCM (100 mL) içerisinde bir 3-(2-kloro-3-((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)propanoik asit (9.8 g) solüsyonuna Hunig Bazı (9.58 mL) eklenmiştir. Reaksiyon, N-(2,2-dimetoksietil)siklopentanamin (4.12 g) akabinde HATU (7.65 g) ilavesinden önce 10 dakika karıştırılmıştır. 1 saat sonra reaksiyon karışımı, DCM (200mL) ile seyreltilmiştir ve doymuş sodyum bikarbonat (300mL) akabinde su (300mL) ile yıkanmıştır. DCM solüsyonu, Na₂SO₄ üzerinde kurutulmuştur, filtrelenmiştir ve *vakumda* buharlaştırılmıştır. Ham ürün, soluk sarı bir zatk olarak 3-(2-kloro-3-((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)-N-siklopentil-N-(2,2-dimetoksietil)propanamid (12.0 g) sağlamak üzere diklorometan içinde %2 ila 5 7N/NH₃/metanol le ayrıştırılarak silika kromatografisi ile saflaştırılmıştır.

m/z = 691 [M+H]⁺

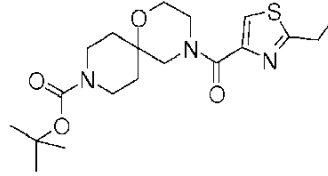
Örnek 33b

3-(2-Kloro-3-((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)-N-siklopentil-N-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)propanamid



5

a) tert-Bütil 4-(4-etiltiyazol-2-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-karboksilat



10

Bir tert-bütil 1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-karboksilat hidroklorid (sınırlandırıcı reaktif) ve 4-etiltiyazol-2-karboksilik asit (1 molar eşdeğer) karışımı, DCM (4.5 hacim) içerisinde süspanse edilmiştir ve 16°C'ye soğutulmuştur. Buna parçalar halinde trietilamin (5 molar eşdeğer) eklenmiştir. Koyu süspansiyon, 6°C'ye soğutulmuştur ve

15 T3P (THF içerisinde 1.57M'nin 1.1 molar eşdeğeri), 0.5 saat boyunca 5-15°C'de damlatılarak eklenmiştir. Reaksiyon karışımının 22°C'ye ılımasına olanak tanınmıştır ve 22°C'de 2 saat karıştırılmıştır. Karışım su (6.5 hacim, 4°C ekzoterm) ile seyreltilmiştir ve karışım, 10 dakika karıştırılmıştır; aköz ayrılmıştır ve DCM (4.5 hacim) ile ekstrakte edilmiştir. Kombine organikler, doymuş aköz sodyum bikarbonat solüsyonu (5.5 hacim)

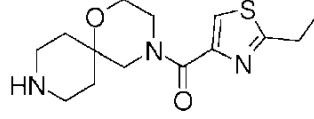
20 ve %20 tuzlu su solüsyonu (1.5 hacim) ile yıkanmıştır. Organikler, anhidroz sodyum sülfat üzerinde kurutulmuştur, filtrelenmiştir ve kahverengi bir yağ vermek üzere buharlaştırılmıştır. Verim: %96 teorik.

m/z [M+H]⁺=296 -boc (calc=396) (Multimode+)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.84 (s, 1H), 4.08 - 3.51 (m, 10H), 3.22 (dd, *J* = 15.0, 25.7 Hz, 2H), 3.04 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.88 - 1.78 (m, 2H), 1.55 (d, *J* = 26.2 Hz, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.40 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H).

25

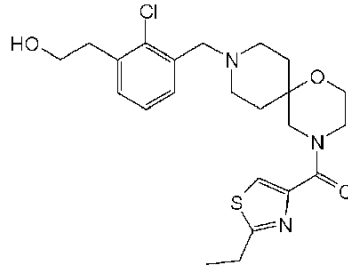
b) (2-Etiltiyazol-4-il)(1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-4-il)metanon



- 5 iPrOH (3 hacim) içerisinde bir tert-bütül 4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-karboksilat (sınırlandırıcı reaktif) (adım a) solüsyonuna hidrojen klorid (iPrOH içinde bir 5-6N solüsyonunun 2 molar eşdeğeri) eklenmiştir. Reaksiyon karışımı ısıtılmıştır ve 22°C'ye soğutulmadan önce 18 saat 49°C'de (iç) karıştırılmıştır. TBME (4.3 hacim) eklenmiştir ve süspansiyon, 22°C'de 3 gün
- 10 karıştırılmıştır. Katı, filtrasyon yoluyla toplanmıştır, TBME (3.5 hacim) ile yıkanmıştır ve beyazımsı bir katı vermek üzere 2 gün hava ile kurutulmuştur. Verim %95 teorik.
- m/z [M+H]⁺=295 (calc=295) (Multimode+)
- ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.03 (s, 1H), 3.82 - 3.50 (m, 8H), 3.14 - 2.86 (m, 8H), 1.32 (t, J = 7.5 Hz, 3H).

15

c) (9-(2-Kloro-3-(2-hidroksietil)benzil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-4-il)(2-etiltiyazol-4-il)metanon



20

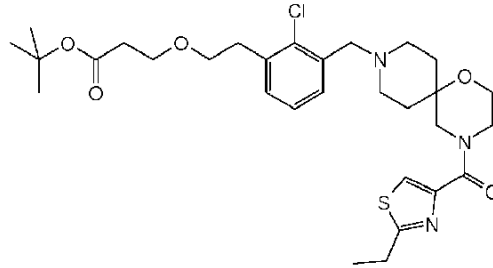
- DCM (12 hacim) içerisinde bir 2-kloro-3-(2-hidroksietil)benzaldehit (1.1 molar eşdeğer) solüsyonuna (2-etiltiyazol-4-il)(1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-4-il)metanon ((sınırlayıcı reaktif) (adım b) eklenmiştir. Trietilamin (2 molar eşdeğer) eklenmiştir ve karışım 1.15 saat karıştırılmıştır. Sodyum triasetoksiborohidrit (2.5 molar eşdeğer),
- 25 sıcaklık 25°C'nin altında muhafaza edilirken 15 dakika boyunca parçalar halinde eklenmiştir. Reaksiyon karışımı, ortam sıcaklığında 22.5 saat karıştırılmıştır. Doymuş aköz sodyum bikarbonat solüsyonu (8 hacim) yavaş bir şekilde eklenmiştir ve karışım 1 saat iyice karıştırılmıştır; aköz ayrılmıştır ve DCM (5.3 hacim) ile ekstrakte edilmiştir. Kombine organikler %20 tuzlu su solüsyonu (5.3 hacim) ile yıkanmıştır, anhidroz

sodyum sülfat üzerinde kurutulmuştur, filtrelenmiştir ve kahverengi bir yağ vermek üzere buharlaştırılmıştır. Verim %107 teorik.

m/z $[M+H]^+=465$ (calc=465) (Multimode+)

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.80 (s, 1H), 7.38 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H), 7.17 (d, $J = 4.3$ Hz, 2H), 3.89 (dd, $J = 15.4, 22.0$ Hz, 4H), 3.78 (s, 2H), 3.63 (d, $J = 11.9$ Hz, 3H), 3.04 (t, $J = 6.6$ Hz, 4H), 2.49 (s, 4H), 1.85 (s, 3H), 1.66 (d, $J = 74.8$ Hz, 2H), 1.42 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H).

d) **tert-Bütil 3-(2-kloro-3-((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)propanoat**

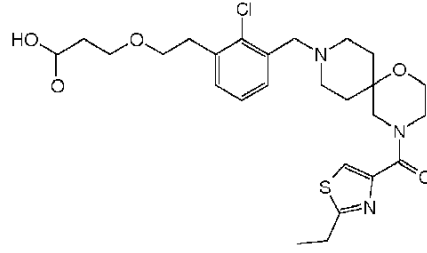


Triton-B (su içinde %40 solüsyonun 0.3 molar eşdeğeri), asetonitril (3.4 hacim) içerisinde bir (9-(2-kloro-3-(2-hidroksietil)benzil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-4-il)(2-etiltiyazol-4-il)metanon (sınırlayıcı reaktif) (adım c) ve tert-bütil akrilat (5 molar eşdeğer) solüsyonuna eklenmiştir. Reaksiyon ortam sıcaklığında 1 saat karıştırılmıştır. Solvent buharlaştırılmıştır ve kalıntı, su (2 hacim) ile 2-MeTHF (2 hacim) arasında parçalara ayrılmıştır. Katmanlar ayrılmıştır ve organikler, anhidroz sodyum sülfat üzerinde kurutulmuştur, filtrelenmiştir ve kahverengi bir yağ vermek üzere buharlaştırılmıştır. Verim: %94 teorik.

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.80 (s, 1H), 7.44 - 7.31 (m, 1H), 7.22 - 7.09 (m, 2H), 4.01 - 3.48 (m, 11H), 3.10 - 2.95 (m, 4H), 2.62 - 2.39 (m, 6H), 1.94 - 1.63 (m, 2H), 1.63 - 1.50 (m, 2H), 1.47 - 1.35 (m, 13H).

25

e) **3-(2-Kloro-3-((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)propanoik asit**

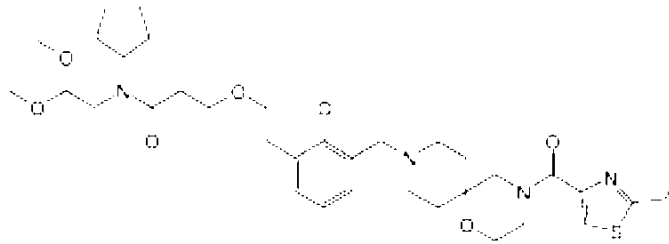


DCM (2.8 hacim) içerisinde bir tert-bütül 3-(2-kloro-3-((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5] undekan-9-il)metil)fenetoksi)propanoat (sınırlayıcı reaktif)
 5 (adım d) solüsyonu, 5°C'ye soğutulmuştur. Trifloroasetik asit (10 molar eşdeğer) 20 dakika (15°C'ye ekzoterm) boyunca eklenmiştir. Reaksiyon karışımı ortam sıcaklığına ılıtılmıştır ve 18 saat karıştırılmıştır. Tolüen (3 hacim) eklenmiştir ve karışım buharlaştırılmıştır. Ortaya çıkan zatk, tolüen (2 x 1.5 hacim) ile tritüre edilmiştir ve kahverengi bir zatk vermek üzere buharlaştırılmıştır. Verim: %200 teorik. (ham ürün
 10 ile gerçekleştirilmiştir – NMR analizi, zatkta tutulan TFA nedeniyle kalan ağırlık ile ağırlıkça ~%45 saflık gösterir)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.88 (s, 1H), 7.40 - 7.33 (m, 2H), 7.27 - 7.22 (m, 1H), 4.42 (d, J = 5.0 Hz, 2H), 3.90 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 3.82 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 3.77 (dd, J = 5.9, 10.6 Hz, 4H), 3.69 (dd, J = 6.2, 11.8 Hz, 2H), 3.65 (s, 2H), 3.26 - 3.13 (m, 2H), 3.09 -
 15 2.98 (m, 4H), 2.67 (dt, J = 5.8, 11.6 Hz, 1H), 2.49 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 2.16 (t, J = 14.1 Hz, 2H), 1.98 (dd, J = 8.5, 19.8 Hz, 2H), 1.45 - 1.31 (m, 3H).

f) 3-(2-Kloro-3-((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)-N-siklopentil-N-(2,2-dimetoksietil)propanamid

20



DCM (6.4 hacim) içerisinde bir 3-(2-kloro-3-((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)propanoik asit (sınırlayıcı reaktif) (adım e)
 25 solüsyonuna 13°C'ye soğutulmuştur. Trietilamin (15 molar eşdeğer) 80 dakika (5°C'lik ekzoterm) eklenmiştir. N-(2,2-dimetoksietil)siklopentanamin (1.3 molar eşdeğer) 5 dakika (sıfır ekzoterm) eklenmiştir. Karışımın ortam sıcaklığına ılımasına olanak

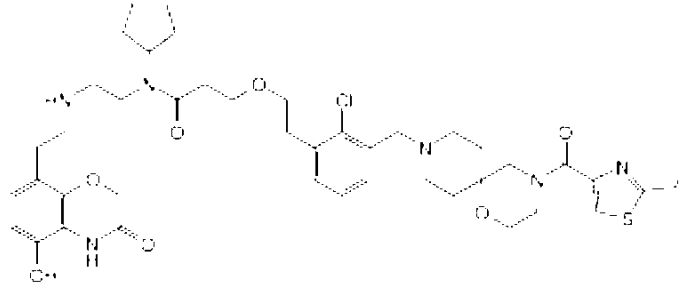
tanınmıştır ve 22°C'de 45 dakika karıştırılmıştır. T3P (THF içerisinde 1.57M solüsyonun 2 molar eşdeğeri), 10 dakika (ekzoterm 8°C) parçalar halinde eklenmiştir. Reaksiyon karışımı 22°C'de 1.5 saat karıştırılmıştır. Doymuş sodyum bikarbonat solüsyonu eklenmiştir (4.2 hacim) ve karışım 5 dakika karıştırılmıştır. Katmanlar parçalara ayrılmıştır ve aköz, DCM (1.4 hacim) ile ekstrakte edilmiştir. Kombine organikler %20 tuzlu su solüsyonu (1.4 hacim) ile yıkanmıştır, anhidroz sodyum sülfat üzerinde kurutulmuştur, filtrelenmiştir ve buharlaştırılmıştır. Ham kalıntı, sarı bir yağ vermek üzere %95 DCM: %5 (9:1 MeOH:aköz NH₃) ile ürünün ayrıştırılarak Si kolon kromatografisi (1500g biotage snap kartuşu) ile saflaştırılmıştır. Verim: %79 teorik.

10 m/z [M+H]⁺=691 (calc=691) (Multimode+)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.81 (s, 1H), 7.41 - 7.26 (m, 1H), 7.15 (d, *J* = 3.4 Hz, 2H), 4.69 - 4.62 (m, 1H), 4.37 (dd, *J* = 6.8, 12.0 Hz, 1H), 4.21 - 4.08 (m, 1H), 3.99 - 3.52 (m, 12H), 3.45 - 3.36 (m, 8H), 3.28 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 3.11 - 2.97 (m, 4H), 2.70 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.63 - 2.36 (m, 4H), 1.93 - 1.32 (m, 16H)

15

g) 3-(2-Kloro-3-((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)-N-siklopentil-N-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)propanamid



20

THF (9.5 hacim) içerisinde bir 3-(2-kloro-3-((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)-N-siklopentil-N-(2,2-

25 dimetoksietil)propanamid (sınırlayıcı reaktif) (adım f) solüsyonu, 40°C'ye ısıtılmıştır. P-Tolüensülfonik asit monohidrat (5 molar eşdeğer) eklenmiştir ve karışım, 10 dakika 40°C'de tutulmuştur. Su (16 hacim) içerisinde bir sodyum bikarbonat (8 molar eşdeğer) solüsyonu yavaş bir şekilde reaksiyon karışımına eklenmiştir. Köpürme durur durmaz aköz, etil asetat (2 x 16 hacim) ile ekstrakte edilmiştir. Kombine organikler, anhidroz sodyum sülfat üzerinde kurutulmuştur, filtrelenmiştir ve buharlaştırılmıştır. Kalıntı, NMP 30 (4 hacim) içinde çözünmüştür ve ortam sıcaklığında 3 saat daha önceden karıştırılan

NMP (4 hacim), su (0.4 hacim) ve sodyum bikarbonat (3 molar eşdeğer) içerisinde bir 8-(2-aminoetil)-5-hidroksi-2H-benzo[b][1,4]oksazin-3(4H)-on.HCl (1.2 molar eşdeğer) süspansiyonuna eklenmiştir. Reaksiyon karışımı, ortam sıcaklığında 30 dakika karıştırılmıştır. Sodyum triasetoksiborohidrit (3 molar eşdeğer) bir parça halinde
 5 eklenmiştir ve karışım, ortam sıcaklığında 90 dakika karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımına yavaş bir şekilde doymuş sodyum bikarbonat solüsyonu (16 hacim) (daha çok köpürme ve 10°C'lik ekzoterm) eklenmiştir. 2-MeTHF (16 hacim) eklenmiştir. Katmanlar ayrılmıştır ve aköz, 2-MeTHF (16 hacim) ile ekstrakte edilmiştir. Kombine organikler, sodyum bikarbonat (pH8) (2000 mL su içerisinde bir 15 g sodyum
 10 bikarbonat solüsyonunun 2 x 16 hacmi) içeren su ile yıkanmıştır. Organikler anhidroz sodyum sülfat üzerinde kurutulmuştur, filtrelenmiştir ve buharlaştırılmıştır. Ham kalıntı, ürünü ayrıştırmak üzere DCM içerisinde %1 amonyak/%5 metanole artan DCM içerisinde elüsyon gradyanı %1 amonyak/%3 metanol, Si silika kromatografisi (750g snap biotage kolonu) ile saflaştırılmıştır. Saf fraksiyonlar, beyazımsı kıtır bir köpük
 15 sağlamak üzere kuruyana kadar buharlaştırılmıştır. Verim: %33 teorik.

m/z [M+H]⁺=837 (calc=837) (Multimode+)

¹H NMR (400 MHz, DMSO, 90°C) δ 7.89 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 7.31 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 7.20 (dt, J = 7.3, 14.7 Hz, 2H), 6.61 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.43 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 4.46 (d, J = 1.4 Hz, 2H), 4.29 - 4.13 (m, 1H), 3.71 - 3.49 (m, 12H), 3.18 (t, J = 7.2 Hz, 2H),
 20 3.08 - 2.90 (m, 7H), 2.71 - 2.29 (m, 12H), 1.67 (d, J = 14.9 Hz, 6H), 1.51 (d, J = 23.5 Hz, 6H), 1.33 (dd, J = 6.0, 7.5 Hz, 3H).

h) 3-(2-Kloro-3-((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)-N-siklopentil-N-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4] oksazin-8-il)etilamino)etil)propanamid.sülfürik asit monohidrat tuzu.
 25

Metanol (6 hacim) içerisinde bir 3-(2-kloro-3-((4-(2-etiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)metil)fenetoksi)-N-siklopentil-N-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)propanamid (sınırlayıcı reaktif)
 30 (adım g) 37.85 g, 45.20 mmol) solüsyonu 50°C'ye ısıtılmıştır ve metanol (6 hacim) içerisinde sülfürik asit (1 molar eşdeğer), 10 dakika damlatılarak eklenmiştir. Karışım, tohumlanmıştır ve 50°C'de 1 saat karıştırılmıştır. Karışım, 2 saat ortam sıcaklığına soğutulmuştur ve 18 saat karıştırılmıştır. Çökelti, filtrasyon yoluyla toplanmıştır ve

beyaz bir katıyı vermek üzere vakum altında (sıfır ısı) fırında kurutulmuştur. Verim: %76 teorik.

m/z $[M+H]^+=837$ (calc=837) (Multimode+)

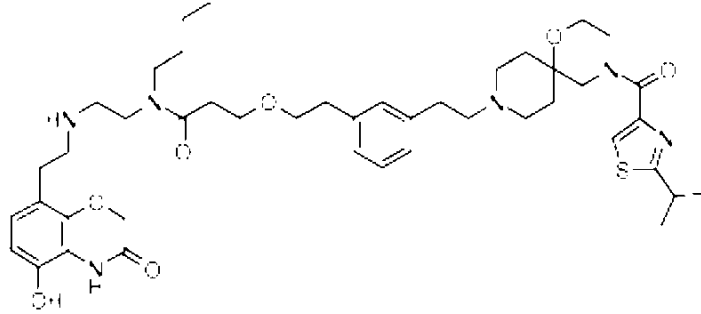
1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 7.99 (s, 1H), 7.43 - 7.16 (m, 3H), 6.67 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 6.48 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 4.59 - 4.36 (m, 2H), 4.23 - 4.13 (m, 1H), 3.63 (dt, J = 27.8, 53.1 Hz, 12H), 3.37 (dd, J = 9.0, 16.1 Hz, 6H), 3.11 - 2.89 (m, 8H), 2.77 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.64 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 2.38 (dd, J = 33.4, 51.6 Hz, 4H), 1.83 - 1.38 (m, 12H), 1.32 (s, 3H).

10 Örnek 3333a, aşağıdaki Karboksilik Asitler ve Aminler kullanılarak hazırlanmıştır:

Örnek Numarası	Karboksilik Asit	Amin
33, 33a	Karboksilik Asit 1	Amin 6

Örnek 34

15 ***N*-Bütil-*N*-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid ditrifloroasetat**



20

N-Bütil-*N*-(2,2-dimetoksietil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid (0.45 g), tetrahidrofuran (10 mL) içerisinde çözünmüştür ve tosik asit (0.28 g) eklenmiştir. Karışım oda sıcaklığında 1 saat karıştırılmıştır, daha sonra NMP (4 mL) ve su (0.5 mL) içerisinde bir 8-(2-aminoetil)-5-hidroksi-2H-benzo[b][1,4]oksazin-3(4H)-on hidroklorid [WO 2008075025] (0.245 g) ve sodyum bikarbonat (0.20 g) karışımına eklenmiştir ve 15 dakika karıştırılmıştır. Sodyum triasetoksiborohidrit (0.35 g) ve asetik asit (0.5 mL) daha sonra

25

eklenmiştir ve karışım oda sıcaklığında 16 saat karıştırılmıştır. Karışım, doymuş sodyum bikarbonat solüsyonuna boşaltılmıştır ve etil asetat ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraktlar kombine edilmiştir ve düşük basınç altında buharlaştırılmıştır. Kalıntı, solvent olarak %1 '880' aköz amonyak içeren diklorometan içinde %8 metanol

5 kullanılarak flaş silika kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Preparatif HPLC (Sunfire™, Gradyan: %0.1 aköz TFA içerisinde %33-68 metanol) ile ilave saflaştırma, beyaz bir katı olarak başlıktaki bileşiği sağlamıştır. Verim 0.194 g.

m/z 819 M⁺ (MultiMode+).

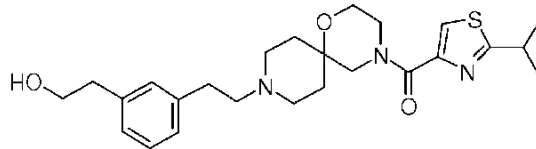
¹H NMR (400 MHz, D₆-DMSO, 90°C) δ 9.44 - 9.34 (m, 1H), 8.36 - 8.27 (m, 1H), 7.97

10 (s, 1H), 7.26 - 7.19 (m, 1H), 7.15 - 7.08 (m, 3H), 6.68 - 6.63 (m, 1H), 6.51 - 6.45 (m, 1H), 4.53 (s, 2H), 3.73 - 3.48 (m, 14H), 3.37 - 2.52 (m, 20H), 2.15 - 1.41 (m, 6H), 1.36 (d, J = 6.9 Hz, 6H), 1.32 - 1.25 (m, 2H), 0.91 (t, J = 7.4 Hz, 3H). İki değiştirilebilir proton gözlenmemiştir.

15 Bir başlangıç materyali olarak kullanılan *N*-bütil-*N*-(2,2-dimetoksietil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

a) **(9-(3-(2-Hidroksietil)penetil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-4-il)(2-izopropiltiyazol-4-il)metanon**

20



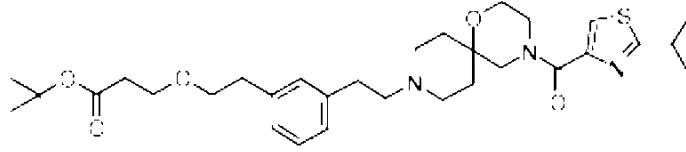
Asetonitril (600 mL) ve su (10 mL) içerisinde bir (2-izopropiltiyazol-4-il)(1-oksa-4,9-

25 diazaspiro[5.5]undekan-4-il)metanon hidroklorid [Referans Örnek 27, adım a] (10 g) ve 2-(3-(2-bromoetil)fenil)etanol [Organometallics 2002, 21(20), 4217] (10 g) ve potasyum karbonat (16 g) karışımı, 36 saat 60°C'de ısıtılmıştır. Solvent süzümüştür ve düşük basınç altında buharlaştırılmıştır. Kalıntı, etil asetat ile tuzlu su arasında parçalara ayrılmıştır, aköz katman etil asetat ile yeniden ekstrakte edilmiştir ve kombine organik

30 katmanlar kurutulmuştur, filtrelenmiştir ve solvent düşük basınç altında buharlaştırılmıştır. Kalıntı, solvent olarak %1 trietilamin içeren etil asetat içinde %5 metanol kullanılarak flaş silika kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Ürünü içeren

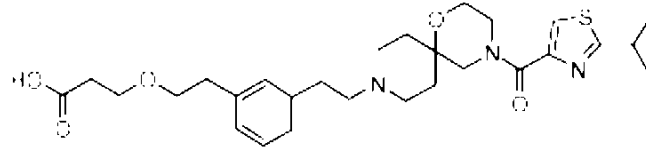
fraksiyonlar, alt başlıktaki bileşiği sağlamak üzere kuruyana kadar buharlaştırılmıştır. Verim 11 g.
m/z 458 (M+H)⁺ (APCI).

- 5 **b) tert-Bütil 3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanoat**



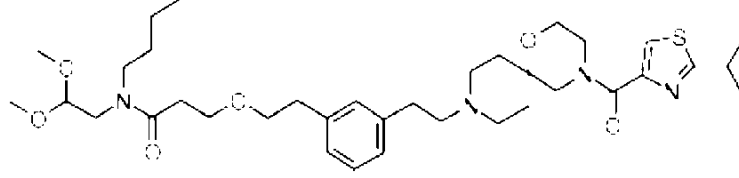
- 10 (9-(3-(2-Hidroksietil)penetil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-4-il)(2-izopropiltiyazol-4-il)metanon [Örnek 34, adım a] (2.4 g), asetonitril (2 mL) içerisinde çözünmüştür ve tert-bütil akrilat (1.7 mL) akabinde benziltrimetilamonyum hidroksit (su içinde %40, 0.72 mL) eklenmiştir. Karışım ortam sıcaklığında 3 saat karıştırılmıştır. Uçucular, düşük basınç altında uzaklaştırılmıştır ve kalıntı, alt başlıktaki bileşiği sağlamak üzere %1
15 '880' aköz amonyak içeren diklorometan içerisinde %3 metanol ile ayrıştırılarak flaş silika kromatografisi ile saflaştırılmıştır Verim 2.7 g.
m/z 586 (M+H)⁺ (APCI).

- 20 **c) 3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanoik asit**



- tert-Bütil 3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanoat [Örnek 34, adım b] (0.70 g), diklorometan (8 mL) içinde karıştırılmıştır ve trifloroasetik asit (2 mL) eklenmiştir. Solüsyon, 18 saat karıştırılmıştır, daha sonra uçucular alt başlıktaki bileşiği sağlamak üzere düşük basınç altında uzaklaştırılmıştır. Verim 1.0 g.
m/z 530 (M+H)⁺ (APCI).

d) ***N*-Bütil-*N*-(2,2-dimetoksietil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid**



5

3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanoik asit [Örnek 34, adım c] (0.50 g), Hunig bazı (0.58 mL) ve *N*-(2,2-dimetoksietil)bütan-1-amin [J. Am. Chem. Soc. 1949, 71(6), 2272] (0.12 g), diklorometan (10 mL) içerisinde çözünmüştür. HATU (0.33 g) daha sonra eklenmiştir ve 10 karışım oda sıcaklığında 24 saat karıştırılmıştır. Karışım su içine boşaltılmıştır ve diklorometan ile ekstrakte edilmiştir. Organik ekstraktlar kombine edilmiştir ve alt başlıktaki bileşiği vermek üzere düşük basınç altında buharlaştırılmıştır. Verim 0.45 g. m/z 673 (M+H)⁺ (APCI).

15 **Örnek 34a**

***N*-Bütil-*N*-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid Sülfat tuzu Modifikasyon A**

20

etanol (20mL) içerisinde bir *N*-bütil-*N*-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid (100mg) solüsyonuna (hazırlama için aşağı bakınız) sülfürik asit (su içinde 244 µl 0.5M solüsyon) eklenmiştir. 25 Bu solüsyonun yarısı, 16 saat bekletilmiştir ve *N*-Bütil-*N*-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid Sülfat tuzu Modifikasyon A, filtrasyon yoluyla toplanmıştır. Verim 5mg.

30

Tosik asit monohidrat (4.24 g), THF (30 mL) içerisinde bir *N*-bütil-*N*-(2,2-dimetoksietil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid (3 g) solüsyonuna eklenmiştir ve ortaya çıkan karışım oda

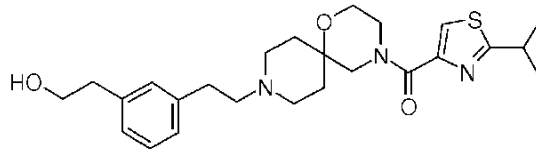
sıcaklığında 1 saat karıştırılmıştır. NMP (1 mL) eklenmiştir ve solüsyon daha sonra 45 dakika karıştırılan bir NMP (16 mL) ve su (1.6 mL) karışımı içerisinde bir 8-(2-aminoetil)-5-hidroksi-2H-benzo[b][1,4]oksazin-3(4H)-on HCl (1.636 g) ve sodyum bikarbonat (3.00 g) süspansiyonuna eklenmiştir. Aldehitin oluşturulduğu balon, NMP (2mL) ile durulanmıştır ve yıkama ürünleri, süspansiyona eklenmiştir ve ortaya çıkan bulanık solüsyon, 20 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra sodyum triasetoksiborohidrit (2.83 g) eklenmiştir ve ortaya çıkan karışım 1 saat karıştırılmıştır.

Reaksiyon karışımı, 2-metilTHF (200mL) ile doymuş sodyum bikarbonat solüsyonu (150mL) arasında parçalara ayrılmıştır. Su (~100mL), çöktürler çözünene kadar eklenmiştir. Karışım 10 dakika (gaz evrimi durana kadar) çalkalanmıştır. 2-metilTHF solüsyonu ayrılmıştır, sodyum sülfat üzerinde kurutulmuştur, filtrelenmiştir ve buharlaştırılmıştır.

Kalıntı, %1 880 amonyak ile diklorometan içerisinde %8 metanol ile ayrıştırılarak flaş silika kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Saf fraksiyonlar, kuruyana kadar buharlaştırılmıştır. Bu zatk, etanol (30 mL) içerisinde çözünmüştür ve 1 eşdeğer sülfürik asit (0.5 molar aköz solüsyondan) ile muamele edilmiştir. Solventler buharlaştırılmıştır ve kalıntı, asetonitril (x2) ile azeotropalanmıştır. Ortaya çıkan zatk, etanol (15 mL) içinde çözünmüştür ve sülfat modifikasyon A (Örnek 34a, 10mg) ile tohumlanmıştır. Karışım oda sıcaklığında 2 gün karıştırılmıştır, nitrojen altında filtrelenmiştir ve etanol (5 mL) akabinde asetonitril (5 mL) akabinde eter (10 mL) ile yıkanmıştır. Verim 1.8 g.

m/z 819.4 (multimode+)

a) (9-(3-(2-Hidroksietil)penetil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-4-il)(2-izopropiltiyazol-4-il)metanon



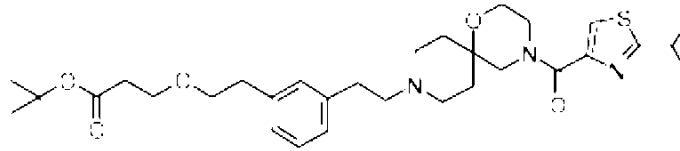
Asetonitril (700 mL) ve su (13 mL) içerisinde bir (2-izopropiltiyazol-4-il)(1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-4-il)metanon hidroklorid [Referans Örnek 27, adım a] (13.6 g) ve 2-(3-(2-bromoetil)fenil)etanol [Organometallics 2002, 21(20), 4217] (13.51 g) ve

potasyum karbonat (21.7 g) karışımı, 36 saat 60°C'de ısıtılmıştır. Solvent süzölmüştür ve düşük basınç altında buharlaştırılmıştır. Kalıntı, etil asetat ile tuzlu su arasında parçalara ayrılmıştır, aköz katman etil asetat ile yeniden ekstrakte edilmiştir ve kombine organik katmanlar kurutulmuştur, filtrelenmiştir ve solvent düşük basınç altında buharlaştırılmıştır. Kalıntı, solvent olarak %1 trietilamin içeren etil asetat içerisinde %5 metanol kullanılarak flaş silika kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Ürünü içeren fraksiyonlar, alt başlıktaki bileşiği sağlamak üzere kuruyana kadar buharlaştırılmıştır. Verim 13.2 g.

m/z 458 (M+H)⁺ (APCI).

10

b) *tert*-Bütil 3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanoat



15

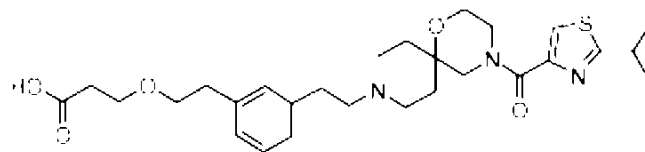
(9-(3-(2-Hidroksietil)penetil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-4-il)(2-izopropiltiyazol-4-il)metanon [Örnek 34a, adım a] (13.2 g), asetonitril (20 mL) içerisinde çözünmüştür ve *tert*-bütil akrilat (8.13 g) akabinde benziltrimetilamonyum hidroksit (su içinde %40, 3.93 mL) eklenmiştir. Karışım ortam sıcaklığında 3 saat karıştırılmıştır. Uçucular, düşük basınç altında uzaklaştırılmıştır ve kalıntı, alt başlıktaki bileşiği sağlamak üzere etil asetat içeren %5 metanol ve %1 trietilamin ile ayrıştırılarak flaş silika kromatografisi ile saflaştırılmıştır Verim 13.2 g.

20

m/z 586 (M+H)⁺ (APCI).

25

c) 3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanoik asit trifloroasetat tuzu



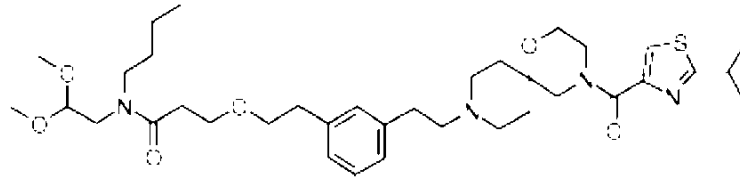
30

tert-Bütil 3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanoat [Örnek 34a, adım b] (13.2 g), diklorometan (150 mL)

içerisinde karıştırılmıştır ve trifloroasetik asit (50 mL) eklenmiştir. Solüsyon, 1 saat karıştırılmıştır. Solventler düşük basınç altında buharlaştırılmıştır ve kalıntı, asetonitril içerisinde çözünmüştür ve solüsyon, alt başlıktaki bileşiği sağlamak üzere düşük basınç altında buharlaştırılmıştır. Verim 14.4 g.

5 m/z 530 (M+H)⁺ (APCI).

d) N-Bütil-N-(2,2-dimetoksietil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid



10

T3P (THF içerisinde 15.67 mL 1.57M solüsyon), DMF (180 mL) içerisinde karıştırılmış bir 3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanoik asit trifloroasetat tuzu [Örnek 34a, adım c] (14.4 g) ve N-(2,2-dimetoksietil)bütan-1-amin [J. Am. Chem. Soc. 1949, 71(6), 2272] (3.97 g) ve trietilamin (21.83 mL) solüsyonuna 15 dakika boyunca damlatılarak eklenmiştir. Karışım, 20°C'de 3 saat karıştırılmıştır ve daha sonra etil asetat ile aköz tuzlu su arasında parçalara ayrılmıştır. Organik katman, aköz tuzlu su (x2) ile yıkanmıştır, sodyum sülfat üzerinde kurutulmuştur, filtrelenmiştir ve solvent, alt başlıktaki bileşiği vermek üzere düşük basınç altında buharlaştırılmıştır. Verim 15.00 g.

15

20 m/z 673.4 (M+H)⁺

Örnek 34b

25 N-Bütil-N-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid

N-Bütil-N-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid Sülfat tuzu Modifikasyon A (Örnek 34a) (1.73 g), DCM/metanol içerisinde çözünmüştür, filtrelenmiştir ve kuruyana

30

kadar buharlaştırılmıştır. Ortaya çıkan zatk, doymuş aköz bikarb (100 mL) ve taze şekilde damıtılmış MeTHF (150 mL) arasında parçalara ayrılmıştır ve karışım 10 dakika iyice karıştırılmıştır. Organik katman ayrılmıştır, taze sodyum bikarbonat (x2) ile yıkanmıştır, sodyum sülfat üzerinde kurutulmuştur, filtrelenmiştir ve bir köpük olarak

5 başlıktaki bileşiği vermek üzere düşük basınç altında buharlaştırılmıştır. Verim 1.2g.

m/z 819.4 (multimod+)

¹H NMR (400 MHz, D₆-DMSO, 90°C) δ 7.93 (s, 1H), 7.13 (t, 1H), 7.03-6.99 (m, 3H), 6.60 (d, 1H), 6.42 (d, 1H), 4.45 (s, 2H), 3.66-3.56 (m, 10H), 3.31-3.20 (m, 5H), 2.74 (t, 2H), 2.70-2.36 (m, 16H), 1.69-1.65 (m, 2H), 1.55-1.53 (m, 2H), 1.43 (s, 2H), 1.35 (d, 6H), 1.25-1.23 (m, 2H), 0.87 (t, 3H). artı 3 değıştirilemez madde gözlemlenmemiştir

10

Örnek 34c

***N*-Bütil-*N*-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid sülfat tuzu Modifikasyon B**

15

Etanol (5 mL) içerisinde *N*-bütil-*N*-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid (Örnek 34b)(0.1 g), sülfürik asit (0.244 ml 0.5M aköz solüsyonu) ile muamele edilmiştir. Solventler, düşük vakum altında buharlaştırılmıştır ve kalıntı, beyaz bir katı vermek üzere dietil eter ile tritüre edilmiştir.

20

Bu katının 10mg'si, bir etanol ve etil asetat (9:1, 1mL) karışımı içinde süspanse edilmiştir ve 1 hafta oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Ortaya çıkan katı, beyaz bir katı olarak *N*-Bütil-*N*-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid sülfat tuzu Modifikasyon B vermek üzere filtrasyon yoluyla toplanmıştır. Verim 3mg.

25

30

m/z 819.3 (M+H)⁺

Örnek 34d

***N*-Bütil-*N*-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid sülfat tuzu Modifikasyon C**

5 Etanol (5 mL) içerisinde *N*-bütil-*N*-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid (Örnek 34b)(0.1 g), sülfürik asit (0.244 ml 0.5M aköz solüsyon) ile muamele edilmiştir. Solventler, düşük vakum altında buharlaştırılmıştır ve kalıntı, beyaz bir katı vermek üzere dietil eter ile tritüre edilmiştir.

Bu katının 10mg'si, bir Dioksan ve etil asetat (9:1, 1mL) karışımı içinde süspanse edilmiştir ve 1 hafta oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Ortaya çıkan katı, beyaz bir katı olarak *N*-Bütil-*N*-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid sülfat tuzu Modifikasyon C vermek üzere filtrasyon yoluyla toplanmıştır. Verim 3mg
m/z 819.3 (M+H)⁺

20 **Örnek 34e**

***N*-Bütil-*N*-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid sülfat tuzu Modifikasyon D**

25 Etanol (5 mL) içerisinde *N*-bütil-*N*-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid (Örnek 34b)(0.1 g), sülfürik asit (0.244 ml 0.5M aköz solüsyon) ile muamele edilmiştir. Solventler, düşük vakum altında buharlaştırılmıştır ve kalıntı, beyaz bir katı vermek üzere dietil eter ile tritüre edilmiştir.

Bu katının 10mg'si, 1,4-dioksan (1 mL) içerisinde süspanse edilmiştir ve 12 gün oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Ortaya çıkan katı, beyaz bir katı olarak *N*-Bütil-*N*-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-

izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid sülfat tuzu Modifikasyon D vermek üzere filtrasyon yoluyla toplanmıştır. Verim 3mg.

m/z 819.3 (M+H)⁺

5

Örnek 34f

***N*-Bütil-*N*-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-**

10 **diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid sülfat tuzu Modifikasyon E**

Etanol (5 mL) içerisinde *N*-bütil-*N*-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid (Örnek 34b)(0.1 g), sülfürik asit (0.244 ml 0.5M aköz solüsyon) ile muamele edilmiştir. Solventler, düşük vakum altında buharlaştırılmıştır ve kalıntı, beyaz bir katı vermek üzere dietil eter ile tritüre edilmiştir.

Bu katının 10mg'si, bir Dioksan ve DMF (9:1, 1mL) karışımı içerisinde süspanse edilmiştir ve 12 gün oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Ortaya çıkan katı, beyaz bir katı olarak *N*-Bütil-*N*-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid sülfat tuzu Modifikasyon E vermek üzere filtrasyon yoluyla toplanmıştır. Verim 3mg.

25 m/z 819.3 (M+H)⁺

Örnek 34g

***N*-Bütil-*N*-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-**

30 **diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid sülfat tuzu Modifikasyon F**

Etanol (5 mL) içerisinde *N*-bütil-*N*-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid (Örnek 34b)(0.1 g), sülfürik

35

asit (0.244 ml 0.5M aköz solüsyon) ile muamele edilmiştir. Solventler, düşük vakum altında buharlaştırılmıştır ve kalıntı, beyaz bir katı vermek üzere dietil eter ile tritüre edilmiştir.

- 5 Bu katının 10mg'si, bir metanol ve asetonitril (9:1, 1mL) karışımı içerisinde süspanse edilmiştir ve 1 hafta oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Ortaya çıkan katı, beyaz bir katı olarak *N*-Bütil-*N*-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid sülfat tuzu Modifikasyon F
- 10 vermek üzere filtrasyon yoluyla toplanmıştır. Verim 3mg.
m/z 819.3 (M+H)⁺

Örnek 34h

- 15 ***N*-Bütil-*N*-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid sülfat tuzu Modifikasyon G**

- Etanol (5 mL) içerisinde *N*-bütil-*N*-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid (Örnek 34b)(0.1 g), sülfürik asit (0.244 ml 0.5M aköz solüsyon) ile muamele edilmiştir. Solventler, düşük vakum altında buharlaştırılmıştır ve kalıntı, beyaz bir katı vermek üzere dietil eter ile tritüre edilmiştir.

- 25 Bu katının 10mg'si, reflükse edici su (~0.2mL) içinde çözünmüştür ve asetonitril (~4mL) yavaş bir şekilde eklenmiştir. Ortaya çıkan karışımın bir gece soğumasına olanak tanınmıştır. Ortaya çıkan çökelti filtrasyon yoluyla izole edilmiştir ve beyaz bir katı olarak *N*-Bütil-*N*-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid sülfat tuzu modifikasyon G
- 30 vermek üzere vakum altında kurutulmuştur. Verim 2mg

- N*-Bütil-*N*-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-
- 35

diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid sülfat tuzu Modifikasyon A (örnek 34a)(0.117g), tohumlanmıştır, sülfat tuzu Modifikasyon G ve asetonitril içinde %5 su (3mL) eklenmiştir. 1 saat karıştırma işlemi sonrasında bir zamlık oluşmuştur ve 24 saat sonra beyaz bir süspansiyon oluşmuştur. 72 saat sonra beyaz bir katı olarak *N*-Bütil-*N*-

5 (2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid sülfat tuzu modifikasyon G filtrasyon yoluyla toplanmıştır. Verim 101mg.

m/z 819.3 (M+H)⁺

10 ¹H NMR (400 MHz, D₆-DMSO, 90°C) δ 9.33 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.16 (t, 1H), 7.05-7.02 (m, 3H), 6.65 (d, 1H), 6.47 (d, 1H), 4.51 (s, 2H), 3.70-3.55 (m, 10H), 3.50-2.40 (m, 23H), 1.80-1.70 (m, 2H), 1.65-1.55 (m, 2H), 1.48 (s, 2H), 1.36 (d, 6H), 1.28-1.27 (m, 2H), 0.90 (t, 3H). artı 4 değişmez madde gözlenmemiştir.

15 **Örnek 34i**

***N*-Bütil-*N*-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-**

diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid napadisilat tuzu

20 **Modifikasyon B**

N-bütil-*N*-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-

diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid (örnek 34b) (332 mg), IPA (3 mL) içinde çözünmüştür ve IPA (8 mL) içerisinde bir 1,5-naftalendisülfonik asit tetrahidrat (144 mg) solüsyonu eklenmiştir. 10 dakika karıştırma sonrasında ortaya çıkan katı filtrelenmiştir ve az miktarda IPA (1 mL) ve daha sonra eter ile yıkanmıştır.

Metanol (1 mL) içerisinde 20 mg, Örnek 39a (0.5 mg) ile tohumlanmıştır ve oda sıcaklığında 1 gün karıştırılmıştır. *N*-Bütil-*N*-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid napadisilat tuzu Modifikasyon B filtrelenmiştir. Verim 10mg.

m/z 819.3 (M+H)⁺

¹H NMR (400 MHz, D₆-DMSO, 90°C) δ 9.36 (s, 1H), 8.96 (d, 2H), 8.30 (s, 1H), 7.97 (d, 2H), 7.35 (t, 2H), 7.21 (t, 1H), 7.10-7.06 (m, 3H), 6.65 (d, 1H), 6.48 (d, 1H), 4.53 (s, 2H), 3.72-3.50 (m, 12H), 3.40-2.45 (m, 21H), 2.07 (s, 2H), 1.75 (s, 2H), 1.46 (s, 2H), 1.36 (d, 6H), 1.29-1.26 (m, 2H), 0.89 (t, 3H). artı 3 değişken

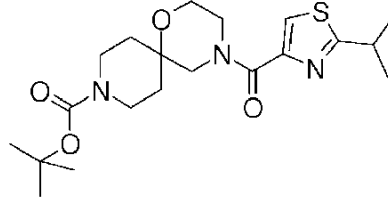
5

Örnek 34i

***N*-Bütil-*N*-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2*H*-benzo[*b*][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid**

10

a) *tert*-Bütil 4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-karboksilat



15

Nitrojen altında DCM (10 hacim içerisinde bir *tert*-bütil 1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-karboksilat hidroklorid ve trietilamin (5 molar eşdeğer) süspansiyonuna 4-izopropiltiyazol-2-karboksilik asit (1 molar eşdeğer) eklenmiştir akabinde THF içerisinde bir T3P solüsyonu (1.57M solüsyon, 1.1 molar eşdeğer) 50 dakika damlatılarak eklenmiştir [23°C'lik ekzoterm gözlemlenmiştir]. Karışım 4 saat karıştırılmıştır, su (2x 1 L) ile yıkanmıştır, kurutulmuştur (Na₂SO₄), filtrelenmiştir ve turuncu bir şurup ortaya çıkarmak üzere *vakumda* konsantre edilmiştir. Verim: %99 teorik.

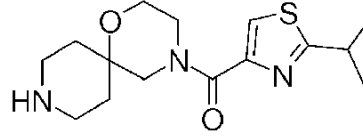
20

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.86 (s, 1H), 4.06 - 3.86 (m, 2H), 3.86 - 3.48 (m, 6H), 3.30 (yedili, J 6.8 Hz, 1H), 3.32 - 3.10 (m, 2H), 1.87 - 1.79 (m, 2H), 1.64 - 1.52 (m, 1H), 1.52 - 1.40 (m, 1H) 1.45 (s, 9H) ve 1.40 (d, J = 6.8 Hz, 6H).

25

b) (2-izopropiltiyazol-4-il)(1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-4-il)metanon, hidroklorid tuzu

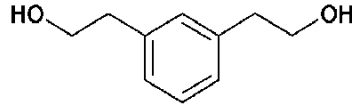
30



Nitrojen altında 40°C'de iPrOH (3 hacim) içerisinde bir *tert*-bütil 4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-karboksilat solüsyonuna bir 5-6N HCl in
5 izopropanol (2-2.4 molar eşdeğer) solüsyonu eklenmiştir. Karışım, 40°C'de 18 saat karıştırılmıştır, oda sıcaklığına soğutulmuştur ve TBME (4 hacim) ile seyreltilmiştir. Oda sıcaklığında 2 saat karıştırılmıştır, filtrasyon yoluyla toplanmıştır, TBME ile yıkanmıştır ve beyazımsı bir toz ortaya çıkarmak üzere hava ile kurutulmuştur. Verim: %97 teorik.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.74 - 9.59 (m, 1H), 9.59 - 9.44 (m, 1H), 7.88 (s, 1H),
10 4.06 - 3.86 (m, 2H), 3.86 - 3.58 (m, 4H), 3.40 - 3.12 (m, 5H), 2.28 - 2.06 (m, 2H), 2.06 - 1.84 (m, 2H) ve 1.42 (d, J = 6.4 Hz, 6H).

c) 2,2'-(1,3-fenilen)dietanol

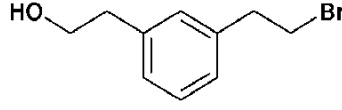


15

Me-THF (21.0 L, 14.0 hacim) içerisinde bir 2,2'-(1,3-fenilen)diasetik asit (1.50 kg, 7.72 mol, 1.0 eşdeğer) solüsyonuna, sıcaklık 31-40°C aralığında muhafaza edilirken in Me-THF (12.00 L, 8 hacim) içerisinde bir lityum alüminyum hidrit pelleti (1.25 kg, 32.81 mol, 4.25 eşdeğer) süspansiyonu 2 saat 6 dakika boyunca yüklenmiştir. Reaksiyon karışımı daha sonra 2 saat 10 dakika boyunca 50°C'ye ısıtılmıştır ve ilave bir 15 saat 8 dakika 50°C'de tutulmuştur. Karışım 23°C'ye soğutulmuştur ve fazla lityum alüminyum hidrit, ekleme işlemleri boyunca sıcaklık 30°C'nin altında muhafaza edilirken 2 saat 21 dakika su (1.25 L), 41 dakika %15 w/v sodyum hidroksit (1.25 L) ve 13 dakika su (1.25 L)
25 ilavesi ile söndürülmüştür. Süspansiyon filtrelenmiştir ve filtre keki, DCM (2 x 15.00 L, 2 x 10 hacim) ile yeniden sulu karışım haline getirilmiştir. Kombine filtratlar, 1.18 kg materyal sağlamak üzere 45°C'de konsantre edilmiştir. Tolüen içeriği için düzelttiğinde bu, beyaz bir katı olarak izole edilen materyalin 1.12 kg'lık (%87 Th., ağırlıkça %75) bir verimini sağlamıştır.

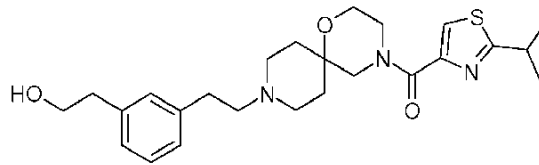
30 ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.0-7.25 (m, 4H), 3.75 (t, 4H), 2.80 (t, 4H)

d) 2-(3-(2-bromoetil)fenil)etanol



Bir 2,2'-(1,3-fenilen)dietanol (adım c) (1.03 kg, 6.22 mol, 1.0 eşdeğer) tolüen (13.49 L, 15.0 hacim) içerisinde ve %48 HBr (1.44 L, 12.75 mol, 2.05 eşdeğer) süspansiyonu, 87°C'de 14 saat karıştırılmıştır. Ek %48 w/w HBr (0.35 L 3.11 mol, 0.5 eşdeğer) yüklenmiştir ve karışım, ilave bir 24 saat reflükste karıştırılmıştır. Karışım ortam sıcaklığına soğutulmuştur ve katmanlar ayrılmıştır. Organik katman, 1.39 kg materyal sağlamak üzere konsantre edilmiştir. Saflaştırma, 800 g'lık iki eşit yığına bölünmüştür. Ham meta-bromoalkol (800g), DCM (1.6 L, 2 hacim w.r.t. ham materyal kütlesi) içerisinde çözünmüştür ve kuru bir silika jel pedine (3.6 kg, ağırlıkça 4 eşdeğer) yüklenmiştir. Ped, hızlı işlenen yabancı maddeleri uzaklaştırmak üzere %10 IPAc/Heptan (16L) daha sonra ürünü yıkamak üzere %50 IPAc/Heptan (20L) ile ayrıştırılmıştır. Her bir silika pedinden alınan fraksiyonları içeren ürün kombine edilmiştir, 40-45°C'de konsantre edilmiştir ve daha sonra soluk sarı bir yağ olarak 1.32 kg (%81 Th.) meta-bromoalkol sağlamak üzere sabit ağırlığa kadar kurutulmuştur. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.0-7.25 (m, 4H), 3.75 (t, 2H), 3.60 (t, 2H), 3.15 (t, 2H), 2.82 (t, 2H)

e) (9-(3-(2-Hidroksietil)penetil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-4-il)(2-izopropiltiyazol-4-il)metanon



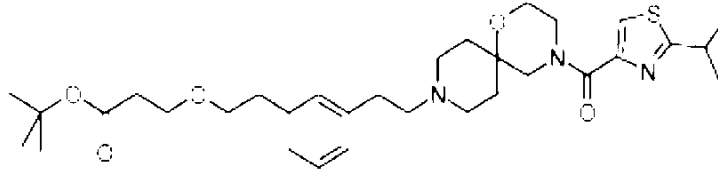
Oda sıcaklığında asetronitril (10 hacim) içerisinde bir 2-(3-(2-bromoetil)fenil)etanol (1.15 molar eşdeğer) solüsyonu içindeki bir (2-izopropiltiyazol-4-il)(1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-4-il)metanon hidroklorid süspansiyonuna potasyum karbonat (4 molar eşdeğer) akabinde su (0.167 hacim eklenmiştir. Karışım, 60°C'de 66 saat karıştırılmıştır, oda sıcaklığına soğutulmuştur, filtrelenmiştir, MeCN ile yıkanmıştır ve ham turuncu bir zatk ortaya çıkarmak üzere *vakumda* konsantre edilmiştir. Bu zatk, EtOAc (3 hacim) içerisinde çözünmüştür ve 2N HCl (1.1 molar eşdeğer) ile yıkanmıştır. Aköz katman 2N NaOH (1.5 molar eşdeğer) kullanılarak bazik hale getirilmiştir ve

TBME (2x 2 hacim) [TBME içinde çözünmeyen ara yüzde görünen bir yağ] ile ekstrakte edilmiştir. Kombine organikler ve yağ, EtOAc (1 hacim) [çözünmüş yağ] ile seyreltilmiştir, kurutulmuştur (Na₂SO₄), filtrelenmiştir ve turuncu bir zatk ortaya çıkarmak üzere *vakumda* konsantre edilmiştir. Verim: %88 teorik.

- 5 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.84 (s, 1H), 7.23 (t, J=8.0 Hz, 1H), 7.08 - 7.06 (m, 3H), 4.03 - 3.93 (m, 1H), 3.93 - 3.83 (m, 1H), 3.85 (t, J=6.4 Hz, 2H), 3.82 - 3.74 (m, 4H), 3.71 - 3.62 (m, 1H), 3.32 (yedili, J=6.8 Hz, 1H), 2.87 - 2.76 (m, 2H), 2.84 (t, J=6.8 Hz, 2H), 2.70 - 2.40 (m, 6H), 1.96 - 1.85 (m, 2H), 1.85 - 1.71 (m, 2H), 1.71 - 1.53 (m, 2H) ve 1.41 (d, J = 6.8 Hz, 6H).

10

f) **tert-Bütil 3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanoat**



15

Asetonitril (5 hacim) içerisinde bir (9-(3-(2-hidroksietil)penetil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-4-il)(2-izopropiltiyazol-4-il)metanon (sınırlayıcı reaktif) süspansiyonuna *tert-bütil* akrilat (5 molar eşdeğer) akabinde benziltrimetilamonyum hidroksit solüsyonu (su içinde ağırlıkça %40, 0.3 molar eşdeğer) eklenmiştir. Karışım oda sıcaklığında 1 saat karıştırılmıştır.

20

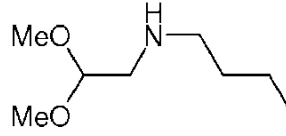
Karışım, MeTHF ile su (her biri 5 hacim) arasında parçalara ayrılan ham kahverengi bir yağ ortaya çıkarmak üzere *vakumda* konsantre edilmiştir. Organik katman kurutulmuştur (Na₂SO₄), filtrelenmiştir ve soluk sarı bir şurup ortaya çıkarmak üzere *vakumda* konsantre edilmiştir. Verim: %106 teorik.

25

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.83 (s, 1H), 7.19 (t, J=8.0 Hz, 1H), 7.07 - 7.00 (m, 3H), 4.03 - 3.92 (m, 1H), 3.92 - 3.84 (m, 1H), 3.82 - 3.72 (m, 3H), 3.684 (t, J=6.4 Hz, 2H), 3.675 (t, J=6.4 Hz, 2H), 3.64 (t, J=7.2 Hz, 2H), 3.31 (yedili, J=6.8 Hz, 1H), 2.84 (t, J=7.2 Hz, 2H), 2.81 - 2.71 (m, 2H), 2.68 - 2.50 (m, 3H), 2.48 (t, J=6.8 Hz, 2H), 2.47 (t, J=6.4 Hz, 2H), 1.94 - 1.90 (m, 1H), 1.90 - 1.85 (m, 1H), 1.81 - 1.65 (m, 1H), 1.63 - 1.51 (m, 1H), 1.44 (s, 9H) ve 1.41 (d, J = 6.8 Hz, 6H).

30

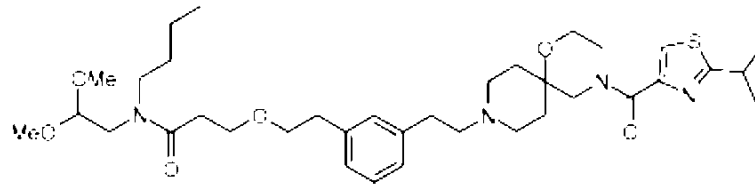
g) **N-(2,2-Dimetoksietil)bütan-1-amin**



EtOH (5 hacim) içerisinde bir bütan-1-amin (sınırlayıcı reaktif) solüsyonuna su (1 molar eşdeğer) içinde 2,2-dimetoksiasetaldehit (%60) eklenmiştir ve karışım oda sıcaklığında 4 gün karıştırılmıştır. EtOH (1 hacim) içerisinde karbon üzerinde %5 paladyum (0.01 molar eşdeğer) sulu karışımı eklenmiştir ve karışım, 20 saat 3 bar basınçta hidrojenize edilmiştir. Karışım, bir cam fiber filtre kağıdı yoluyla filtrelenmiştir, EtOH (2x 3 hacim) ile yıkanmıştır ve ana çözelti bulanık kahverengi bir yağ ortaya çıkarmak üzere dikkatli bir şekilde konsantre edilmiştir. Bu yağ DCM (15 hacim) içerisinde çözünmüştür, kurutulmuştur (Na₂SO₄), filtrelenmiştir ve turuncu bir yağ ortaya çıkarmak üzere *vakumda* konsantre edilmiştir. Verim: %101 teorik.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.48 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 3.39 (s, 6H), 2.74 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 2.62 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.48 (beşli, J = 7.2 Hz, 2H), 1.31 (altılı, J = 7.2 Hz, 2H) ve 0.92 (t, J = 7.2 Hz, 3H).

h) N-bütil-N-(2,2-dimetoksietil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid

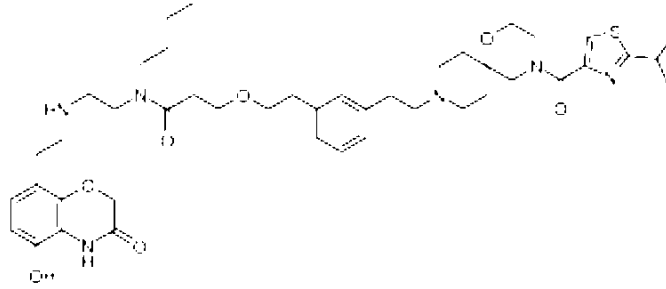


22°C'de diklorometan (4 hacim) içerisinde bir tert-bütil 3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanoat (sınırlayıcı reaktif) solüsyonuna 1 saat damlatılarak TFA (10 molar eşdeğer) eklenmiştir [yaklaşık 5 mL TFA eklendikten sonra 8°C'lik bir ekzoterm meydana gelmiştir ve 1 saat sonra sıcaklık 25°C'ye düşmüştür]. Karışım ortam sıcaklığında 72 saat karıştırılmıştır, *vakumda* konsantre edilmiştir, asetonitril (4 hacim) içinde yeniden çözünmüştür ve bir buz banyosu içinde soğutulmuştur. Trietilamin (10 molar eşdeğer) akabinde N-(dimetoksietil)-N-bütilamin (1.2 molar eşdeğer), THF (1.3 molar eşdeğer) içerisinde T3P'nin 1.57M solüsyonu damlatılarak eklenmeden önce eklenmiştir. Karışım, 22°C'de 20 saat karıştırılmıştır, ham kırmızı bir yağ ortaya çıkarmak üzere *vakumda* konsantre

edilmiştir. DCM (4 hacim) içinde yeniden çözünmüştür ve doymuş sodyum bikarbonat solüsyonu (4 hacim) ile yıkanmıştır. Kurutulmuştur (Na_2SO_4), filtrelenmiştir ve kırmızı bir şurup ortaya çıkarmak üzere *vakumda* konsantre edilmiştir. Verim: %106 teorik.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.90 (s, 1H), 7.17 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.11 - 6.98 (m, 3H), 4.50 - 4.43 (m, 1H), 3.90 - 3.59 (m, 10H), 3.41 - 3.32 (m, 13H), 2.78 (t, $J=6.8$ Hz, 4H), 2.68 - 2.54 (m, 8H), 2.00 - 1.86 (m, 1H), 1.80 - 1.43 (m, 3H), 1.40 (d, $J=6.8$ Hz, 6H), 1.35 - 1.22 (m, 2H) ve 0.97 - 0.88 (m, 3H).

i) **N-Bütil-N-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid**



15 *p*-Tolüensülfonik asit monohidrat (4 molar eşdeğer), THF (10 hacim) içerisinde bir N-bütil-N-(2,2-dimetoksietil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid (sınırlayıcı reaktif) solüsyonuna eklenmiştir ve ortaya çıkan karışım, oda sıcaklığında 1 sata karıştırılmıştır. Solüsyon daha sonra oda sıcaklığında 1 saat karıştırılan bir NMP (4 hacim) ve su (0.45 hacim)

20 karışımı içerisindeki bir 8-(2-aminoetil)-5-hidroksi-2H-benzo[b][1,4]oksazin-3(4H)-on hidroklorid(1 molar eşdeğer) ve sodyum bikarbonat (6.5 molar eşdeğer) süspansiyonuna peristaltik bir pompa vasıtasıyla eklenmiştir. Ortaya çıkan bulank solüsyon, sodyum triasetoksiborohidrit (3 molar eşdeğer) parçalar halinde eklenmeden önce 30 dakika karıştırılmıştır ve ortaya çıkan karışım 1 saat karıştırılmıştır.

25

Reaksiyon karışımı, doymuş sodyum bikarbonat solüsyonu (10 hacim) ile söndürülmüştür, çökeltiler çözülene ve gaz evrimi durana (~15 dakika) kadar su (5 hacim) eklenmiştir. MeTHF (2x 10 hacim) ile ekstrakte edilmiştir ve kombine ekstraktlar su (10 hacim) ile yıkanmıştır, kurutulmuştur (Na_2SO_4), filtrelenmiştir ve eluent DCM/%8

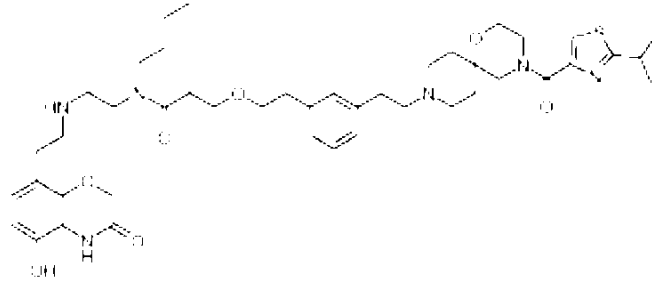
30 MeOH/%1 amonyak, silika (ham reaksiyon karışımının 10 kat ağırlığı) üzerinde

saflaştırılan kahverengi bir şurup vermek üzere *vakumda* konsantre edilmiştir. kullanılarak.

Verim: %29 teorik.

¹H NMR (400 MHz, d6-DMSO) δ 9.82 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.20 - 7.10 (m, 1H), 7.10 - 6.95 (m, 3H), 6.60 (d, J=8.0 Hz, 1H), 6.41 (d, J=8.0 Hz, 1H), 4.46 (s, 1H), 3.80 - 3.45 (m, 9H), 3.40 - 3.15 (m, 12H), 2.78 - 2.17 (m, 14H), 1.77 - 1.37 (m, 4H), 1.34 (d, J=6.8 Hz, 6H), 1.30 - 1.14 (m, 2H) ve 0.91 - 0.82 (m, 3H).

j) **N-Bütil-N-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid monosülfat tuzu**



N-bütil-N-(2-(2-(5-hidroksi-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-8-il)etilamino)etil)-3-(3-(2-(4-(2-izopropiltiyazol-4-karbonil)-1-oksa-4,9-diazaspiro[5.5]undekan-9-il)etil)fenetoksi)propanamid (sınırlayıcı reaktif), EtOH (15 hacim) içerisinde çözünmüştür ve 4.9M sülfürik asit (1 molar eşdeğer) eklenmiştir ve solüsyon oda sıcaklığında 48 saat karıştırılmıştır. Çökelti toplanmıştır, EtOH (1 hacim) ile yıkanmıştır ve beyaz bir katı (%70 geri kazanım) ortaya çıkarmak üzere vakum ile kurutulmuştur (40°C'de fırın, yağ pompası). MeCN (20 hacim) içerisinde %5 su eklenmiştir ve karışım, 6 gün karıştırılmıştır. Kristalin katı (form G) daha sonra filtrasyon yoluyla toplanmıştır (%95 geri kazanım).

¹H NMR (400 MHz, d6-DMSO) δ (ppm) 9.92 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.22 - 7.13 (m, 1H), 7.12 - 6.98 (m, 3H), 6.65 (d, J=8.0 Hz, 1H), 6.47 (d, J=8.0 Hz, 1H), 4.52 (d, J=8.0 Hz, 2H), 3.82 - 3.14 (m, 20H), 3.04 - 2.90 (m, 4H), 2.83 - 2.64 (m, 7H), 2.63 - 2.47 (m, 4H), 1.85 - 1.37 (m, 4H), 1.35 (d, J=6.8 Hz, 6H), 1.32 - 1.16 (m, 2H) ve 0.92 - 0.83 (m, 3H).

Buluşa ait bileşikler, örneğin aşağıdaki gibi teknikte bilinen analizler kullanılarak farmasötik aktivite için test edilebilir:

Adrenerjik $\beta 2$ aracılı cAMP üretimine yönelik analiz

Hücrenin hazırlanması

- 5 H292 hücreleri, %10 (v/v) FBS (fötal bovin serum) ve 2 mM L-glutamin içeren RPMI ortamında %5 CO₂, 37°C'de 225 cm² balon inkübatöründe yetiştirilir.

Deneysel Yöntem

- 10 Yapışık H292 hücreleri, 15 dakika Accutase™ hücre ayırma solüsyonu ile muamele yoluyla doku kültür balonlarından uzaklaştırılır. Balonlar, %5 CO₂, 37°C'de nemlendirilmiş bir inkübatörde 15 dakika inkübe edilir. Ayrılan hücreler, mL başına 0.1 x 10⁶ hücrede RPMI ortamında (%10 (v/v) FBS ve 2 mM L-glutamin içerir) yeniden süspanse edilir. 100 µL'deki 10000 hücre, bir doku kültürü ile muamele edilmiş 96
- 15 gözlü plakanın her bir gözüne eklenmiştir ve hücreler, %5 CO₂, 37°C'de nemlendirilmiş bir inkübatörde bir gece inkübe edilmiştir. Kültür ortamı uzaklaştırılır ve hücreler, 100 µL analiz tamponu ile iki kez yıkanır ve 50 µL analiz tamponu (10mM HEPES pH7.4 ve 5 mM glukoz içeren HBSS solüsyonu) ile değiştirilir. Hücreler 20 dakika oda sıcaklığında dinlendirilir bu süreden sonra 25 µL rolipram (%2.4 (v/v) dimetilsülfoksit
- 20 içeren analiz tamponunda yapılan 1.2 mM) eklenir. Hücreler, 10 dakika rolipram ile inkübe edilir bu süreden sonra test bileşikleri eklenir ve hücreler, oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edilir. Analizdeki nihai rolipram konsantrasyonu, 300 µM'dir ve nihai araç konsantrasyonu %1 (v/v) dimetilsülfoksittir. Reaksiyon, üst fazların uzaklaştırılması, 100 µL analiz tamponu ile bir kez yıkanması ve 50 µL lizis tamponu ile değiştirilmesi ile
- 25 durdurulur. Hücre mono katmanı 30 dakika (veya bir gece) -80°C'de dondurulur.

AlphaScreen™ cAMP tespiti

- Hücre lizatındaki cAMP (siklik adenosin monofosfat) konsantrasyonu, AlphaScreen™
- 30 metodolojisi kullanılarak belirlenir. Donuk hücre plakası, bir plaka çalkalayıcısında 20 dakika tavlanır daha sonra 10 µL hücre lizatı, 96 gözlü beyaz bir plakaya transfer edilir. Biotinlenmiş cAMP ile önceden inkübe edilen 40 µL karışık AlphaScreen™ tespit boncukları, her bir göze eklenir ve plaka, karanlıkta 3 saat oda sıcaklığında inkübe edilir. AlphaScreen™ sinyali, tavsiye edilen üretici ayarları ile bir EnVision
- 35 spektrofotometre (Perkin-Elmer Inc.) kullanılarak ölçülür. cAMP konsantrasyonları,

standart cAMP konsantrasyonlarının kullanıldığı aynı deneyde belirlenen bir kalibrasyon eğrisine referans ile belirlenir. Agonistlere yönelik konsantrasyon yanıt eğrileri oluşturulur ve veri, pEC_{50} ve İntrinsik Aktiviteyi belirlemek üzere dört parametrelilik mantık denkleminde uydurulur. İntrinsik Aktivite, her bir deneyde formoterol için belirlenen maksimum aktiviteye göre bir fraksiyon olarak ifade edilir.

Muskarinik 3 reseptör bağlanma analizi

M_3 reseptörüne bağlanan bileşiklerin afinitesi (pIC_{50}), bir sintilasyon proksimite analiz (SPA) formatında insan muskarinik asetilkolin M_3 reseptörü (M_3 -ACh) ifade eden CHO-K1 (Çin Hamster Yumurtalığı) hücre membranlarına [3H]N-metil skopolaminin (NMS) rekabetçi bağlanması ile belirlenir.

SPA boncukları, membranlar ile önceden kaplanır ve daha sonra buluşa ait bileşiklerin seri dilüsyonları, [3H]NMS de 0.1nM, kuartir K_d (deneysel olarak belirlenen ayrışma sabiti) ve analiz tamponu (5 mM $MgCl_2$ ve %0.1 (w/v) bovin serum albumin içeren 20 mM HEPES pH 7.4) ile göz başına 2mg boncukta inkübe edilir. Analiz, %1 (v/v) dimetil sülfoksit (DMSO) varlığında 200 μL 'lik bir nihai hacimde gerçekleştirilir. Toplam [3H]NMS bağlanması, rekabet eden bileşik yokluğunda belirlenir ve spesifik olmayan [3H]NMS bağlanması, 1 μM atropin varlığında belirlenir. Plakalar, oda sıcaklığında 16 saat inkübe edilir ve daha sonra normalleştirilmiş bir 3H protokolü kullanılarak Wallac Microbeta™ üzerinde okunur. Spesifik [3H]-NMS bağlanmasında %50 indirgeme için gerekli molar bileşik konsantrasyonunun negatif algoritması olarak tanımlanan pIC_{50} , belirlenir.

Buluşa ait bileşikler, yukarıdaki analizlerde test edilmiştir ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

Örnek No.	β_2 pEC_{50}	β_2 İntrinsik Aktivite	M_3 Bağlanması pIC_{50}
-----------	----------------------	------------------------------	-----------------------------

Örnek No.	β_2 pEC ₅₀	β_2 İntrinsik Aktivite	M ₃ Bağlanması pIC ₅₀
33	7.8	1.0	9.4
33a	7.8	1.0	9.3

Örnek No.	β_2 pEC ₅₀	β_2 İntrinsik Aktivite	M ₃ Bağlanması pIC ₅₀
34	8	1.0	9.0
34a	7.8	1.0	9.2

XRD VERİSİ

Ölçü Aleti Detayları:

5

◦ X-Işını Toz Kırınımı (XRPD) - 0.02° artış başına 100-saniye maruziyet ile 2° ila 40° 2 θ tarama aralığında 2 θ - θ konfigürasyonunda PANalytical X'Pert makinesi veya θ - θ konfigürasyonunda bir PANalytical Cubix makinesi. X-ışınları, 45kV ve 40mA'da çalışan bakır uzun ince odak tüpü yoluyla oluşturulur. Bakır X-ışınlarının dalga boyu 1.5418 Å'dur. Veri, ~ 2mg bileşiğin üzerine yerleştirildiği sıfır arka plan tutucularında toplanmıştır. Tutucu, kırılmayan düzlem boyunca kesilen ve daha sonra optik olarak düz bir bitişte parlatılan tek kristali bir silikondan yapılmıştır. Bu yüzey üzerindeki X-ışınları durumları, Bragg ekstinksiyon ile etkisiz duruma getirilmiştir.

10

15

◦ Diferansiyel Tarama Kalorimetri (DSC) termogramları, alüminyum tavalar ile TA Q1000 Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi kullanılarak ölçülmüştür. Numune ağırlıkları, 0.5 ila 5mg arasında değişmiştir. Prosedür, bir nitrojen gazı (50ml/dakika) akışı altında gerçekleştirilmiştir ve dakikada 10°C'lik sıcaklık artışı sabit oranında 25 ila 300°C arasındaki sıcaklıkta çalışılmıştır.

20

◦ Termogravimetrik Buhar Emilim (TGA) termogramları, platin tavalar ile bir TA Q500 Termogravimetrik Analiz Cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Numune ağırlıkları 1 ila 5mg arasında değişmiştir. Prosedür, bir nitrojen gazı akışı (60ml/dakika) altında gerçekleştirilmiştir ve dakikada 10°C'lik bir sıcaklık artışı sabit oranında Oda Sıcaklığı ila 300°C arasındaki sıcaklıkta çalışılmıştır.

25

◦ Gravimetrik Buhar Emilim (GVS) profilleri, Yüzey Ölçümleri Sistemleri Dinamik Buhar Emilim, DVS-1 veya bir DVS Advantage aleti kullanılarak ölçülmüştür. Yaklaşık 1-5mg katı numune, cam veya metal bir kaba yerleştirilmiştir ve numune ağırlığı, iki döngü adımlı yöntem sırasında (%40 ila 90 ila 0 ila 90 ila 0 bağıl nem (RH), %10 RH adımlarında) kaydedilmiştir.

30

Örnek 33a Sülfat tuzu (XRD spektrumu, Şekil 1'de gösterilir)

XRPD verisi Örnek 33a Sülfat tuzu

2 θ	Bağıl Yoğunluk %'si	d aralığı
4.4	4.51	20.30048
6.1	100	14.50763
6.9	11.28	12.73003
7.8	14.82	11.26734
9.1	8.3	9.72695
9.5	3.59	9.29727
9.9	9.72	8.89847
11.8	35.65	7.48101
12.2	26.49	7.24933
13.1	10.86	6.77877
13.5	2.98	6.54974
14.0	11.03	6.34316
14.8	20.25	5.98558
15.4	8.96	5.76719
15.7	88.25	5.64579
16.4	10.06	5.4091
16.7	11.03	5.30622
17.3	6.3	5.12687
17.5	11.35	5.0547
18.0	16.65	4.91905
18.3	12.72	4.85584
19.0	7.3	4.7
19.7	49.7	4.5
20.2	17.4	4.4

XRPD verisi Örnek 33a Sülfat tuzu

2 θ	Bağıl Yoğunluk %'si	d aralığı
20.8	9.5	4.3
21.4	61.6	4.2
21.9	8.1	4.1
22.1	9.1	4.0
22.4	19.4	4.0
22.7	18.3	3.9
23.6	23.0	3.8
24.2	9.7	3.7
24.5	47.9	3.6
25.0	10.3	3.6
25.6	2.5	3.5
26.1	8.4	3.4
26.9	10.2	3.3
27.2	8.5	3.3
27.5	9.8	3.2
29.7	2.2	3.0
30.8	21.6	2.9

Örnek 34a Sülfat Form A (XRD spektrumu, Şekil 2'de gösterilir)

XRPD Örnek 34 sülfat form A

2 θ	Bağıl Yoğunluk %'si	d aralığı
4.8	100.0	18.6
8.0	6.0	11.1
9.5	15.6	9.3

XRPD Örnek 34 sülfat form A

2 θ	Bağıl Yoğunluk %'si	d aralığı
11.3	2.8	7.8
14.1	15.3	6.3
15.7	8.5	5.6
16.2	7.1	5.5
17.9	13.6	5.0
18.6	8.4	4.8
21.4	20.2	4.1
23.0	8.0	3.9
24.7	4.4	3.6
28.7	2.8	3.1
31.9	1.0	2.8
34.2	0.9	2.6

Doğruluk - +/- 0.1

Örnek 34c Sülfat Form B (XRD spektrumu, Şekil 3'te gösterilir)

XRPD Örnek 34 sülfat form B

2 θ	Bağıl Yoğunluk %'si	d aralığı
4.6	67.8	19.1
7.9	20.7	11.1
9.3	84.0	9.6
10.0	10.7	8.9
11.2	7.0	7.9
12.1	4.2	7.3
13.9	100.0	6.4

XRPD Örnek 34 sülfat form B

2 θ	Bağıl Yoğunluk %'si	d aralığı
15.3	29.3	5.8
16.2	15.7	5.5
18.0	14.1	4.9
18.5	22.2	4.8
20.1	24.0	4.4
21.2	19.4	4.2
22.2	15.0	4.0
23.2	10.7	3.8
24.7	15.7	3.6
25.7	15.1	3.5
26.6	8.0	3.4
27.9	27.8	3.2
30.1	4.3	3.0
34.4	3.2	2.6

Doğruluk - +/- 0.1

Örnek 34d Sülfat Form C (XRD spektrumu, Şekil 4'te gösterilir)

XRPD Örnek 34 Sülfat form C

2 θ	Bağıl Yoğunluk %'si	d aralığı
4.4	100	20.3
5.8	5.34	15.2
7.8	7.62	11.4
8.7	5.48	10.2
9.5	16.14	9.3

XRPD Örnek 34 Sülfat form C

2 θ	Bağıl Yoğunluk %'si	d aralığı
12.0	7.09	7.4
13.0	6.81	6.8
14.2	7.97	6.2
15.6	6.32	5.7
16.6	15.22	5.3
17.4	27.82	5.1
17.8	30.16	5.0
18.4	19.39	4.8
20.7	21.31	4.3
21.8	23.55	4.1
23.4	10.81	3.8
24.7	9.78	3.6
26.0	7.53	3.4
26.8	6.45	3.3
28.4	3.69	3.1
31.4	2.19	2.8
33.7	2.26	2.7
37.0	1.65	2.4

Doğruluk - +/- 0.1

Örnek 34e Sülfat Form D (XRD spektrumu, Şekil 5'te gösterilir)

XRPD Örnek 34 sülfat form D

2 θ	Bağıl Yoğunluk %'si	d aralığı
4.3	100.0	20.3

XRPD Örnek 34 sülfat form D

2 θ	Bağıl Yoğunluk %'si	d aralığı
4.7	69.7	18.8
5.8	9.7	15.2
7.7	9.5	11.4
8.7	4.1	10.2
9.5	24.3	9.3
11.6	5.4	7.6
12.0	8.6	7.4
13.0	3.4	6.8
13.5	6.5	6.6
14.2	13.3	6.3
14.8	6.1	6.0
15.1	4.4	5.9
15.8	8.9	5.6
16.5	14.5	5.4
17.3	10.1	5.1
17.9	23.9	4.9
18.4	14.8	4.8
19.0	5.6	4.7
19.9	3.9	4.5
20.6	15.8	4.3
21.3	14.9	4.2
21.8	14.8	4.1
22.5	9.7	4.0
23.4	7.0	3.8

XRPD Örnek 34 sülfat form D

2 θ	Bağıl Yoğunluk %'si	d aralığı
24.7	8.4	3.6
26.8	4.2	3.3
28.6	4.1	3.1
29.5	6.4	3.0
31.9	1.7	2.8
33.9	1.5	2.6

Doğruluk - +/- 0.1

Örnek 34f Sülfat Form E (XRD spektrumu, Şekil 6'da gösterilir)

XRPD Örnek 34 sülfat form E

2 θ	Bağıl Yoğunluk %'si	d aralığı
4.3	93.2	20.5
5.8	11.8	15.2
7.8	15.0	11.4
8.6	11.1	10.2
9.5	55.5	9.3
11.6	22.5	7.6
12.1	18.0	7.3
13.0	35.6	6.8
13.6	6.4	6.5
14.3	28.3	6.2
14.9	32.6	5.9
15.1	60.5	5.9
15.5	18.1	5.7

XRPD Örnek 34 sülfat form E

2 θ	Bağıl Yoğunluk %'si	d aralığı
16.5	23.8	5.4
17.3	100.0	5.1
17.7	59.3	5.0
18.0	29.0	4.9
18.4	15.8	4.8
19.0	26.9	4.7
19.7	26.7	4.5
20.5	72.7	4.3
20.8	18.2	4.3
21.3	20.0	4.2
21.7	60.4	4.1
22.0	44.7	4.0
22.6	74.2	3.9
23.4	60.8	3.8
24.1	22.4	3.7
24.6	43.0	3.6
25.7	14.8	3.5
26.7	53.0	3.3
27.2	15.6	3.3
28.1	17.6	3.2
29.2	12.9	3.1
30.4	16.3	2.9
31.3	10.3	2.9
32.7	5.1	2.7

XRPD Örnek 34 sülfat form E

2 θ	Bağıl Yoğunluk %'si	d aralığı
33.3	7.4	2.7
34.4	8.6	2.6
36.3	8.4	2.5
37.0	9.9	2.4

Doğruluk - +/- 0.1

Örnek 34g Sülfat Form F (XRD spektrumu, Şekil 7'de gösterilir)

XRPD verisi Örnek 34 sülfat form F

2 θ	Bağıl Yoğunluk %'si	d aralığı
4.7	100.0	18.8
7.9	18.7	11.3
9.4	10.2	9.4
9.7	19.6	9.1
11.3	14.5	7.8
13.6	12.3	6.5
14.2	15.5	6.3
15.3	12.6	5.8
15.8	23.4	5.6
17.1	13.8	5.2
17.9	51.2	5.0
18.6	20.0	4.8
19.8	38.6	4.5
20.3	9.7	4.4
21.4	37.8	4.1

XRPD verisi Örnek 34 sülfat form F

2 θ	Bağıl Yoğunluk %'si	d aralığı
22.9	14.5	3.9
24.8	14.3	3.6
26.3	9.7	3.4
28.1	8.2	3.2
Doğruluk - +/- 0.1		

Örnek 34h Sülfat Form G (XRD spektrumu, Şekil 8'de gösterilir)

XRPD verisi Örnek 34 sülfat form G

2 θ	Bağıl Yoğunluk %'si	d aralığı
6.0	7.8	14.6
6.3	7.6	14.1
7.5	4.6	11.7
8.0	9.7	11.1
9.3	45.8	9.5
10.9	84.6	8.1
12.5	16.5	7.1
13.3	36.9	6.7
13.9	41.2	6.4
14.2	9.9	6.2
15.0	41.7	5.9
16.0	47.0	5.5
16.2	100.0	5.5
17.0	15.9	5.2
17.6	15.2	5.0

XRPD verisi Örnek 34 sülfat form G

2 θ	Bağıl Yoğunluk %'si	d aralığı
18.3	79.7	4.8
18.7	68.4	4.8
18.9	67.4	4.7
19.2	21.4	4.6
19.5	19.3	4.6
19.8	16.9	4.5
20.7	13.8	4.3
21.1	40.1	4.2
21.3	28.0	4.2
21.7	16.4	4.1
22.4	46.7	4.0
22.7	18.4	3.9
23.5	6.2	3.8
24.4	27.8	3.7
25.0	20.6	3.6
25.2	75.5	3.5
25.8	13.9	3.5
27.5	20.5	3.2
28.5	23.6	3.1
31.2	4.7	2.9
32.8	10.6	2.7
34.0	4.2	2.6

Doğruluk - +/- 0.1

Örnek 34i Napadisilat form B (XRD spektrumu, Şekil 9'da gösterilir)

XRPD verisi Örnek 34 napadisilat form B

2 θ	Bağıl Yoğunluk %'si	d aralığı
4.6	1.8	19.2
6.3	28.1	14.0
7.7	5.5	11.5
8.6	15.7	10.3
9.5	9.1	9.3
10.5	27.8	8.4
10.7	8.1	8.2
11.2	27.1	7.9
11.8	20.1	7.5
12.7	13.8	7.0
14.1	4.8	6.3
14.7	14.0	6.0
15.0	8.8	5.9
15.4	43.3	5.8
15.6	51.1	5.7
16.0	100.0	5.5
17.2	16.0	5.1
17.7	10.2	5.0
18.3	9.7	4.8
18.8	31.8	4.7
19.2	75.6	4.6
19.8	19.3	4.5
20.2	10.2	4.4
21.0	46.2	4.2

XRPD verisi Örnek 34 napadisilat form B

2 θ	Bağıl Yoğunluk %'si	d aralığı
21.2	38.4	4.2
21.6	26.1	4.1
22.2	53.7	4.0
22.5	16.4	3.9
23.6	25.8	3.8
24.3	11.7	3.7
25.4	53.8	3.5
25.9	8.6	3.4
26.8	2.8	3.3
27.3	12.3	3.3
27.5	8.5	3.2
28.0	6.1	3.2
28.4	5.1	3.1
29.3	9.1	3.1
29.6	10.6	3.0
30.5	7.0	2.9
31.9	2.0	2.8
32.9	1.9	2.7
33.5	3.7	2.7
35.9	1.4	2.5
37.6	3.9	2.4

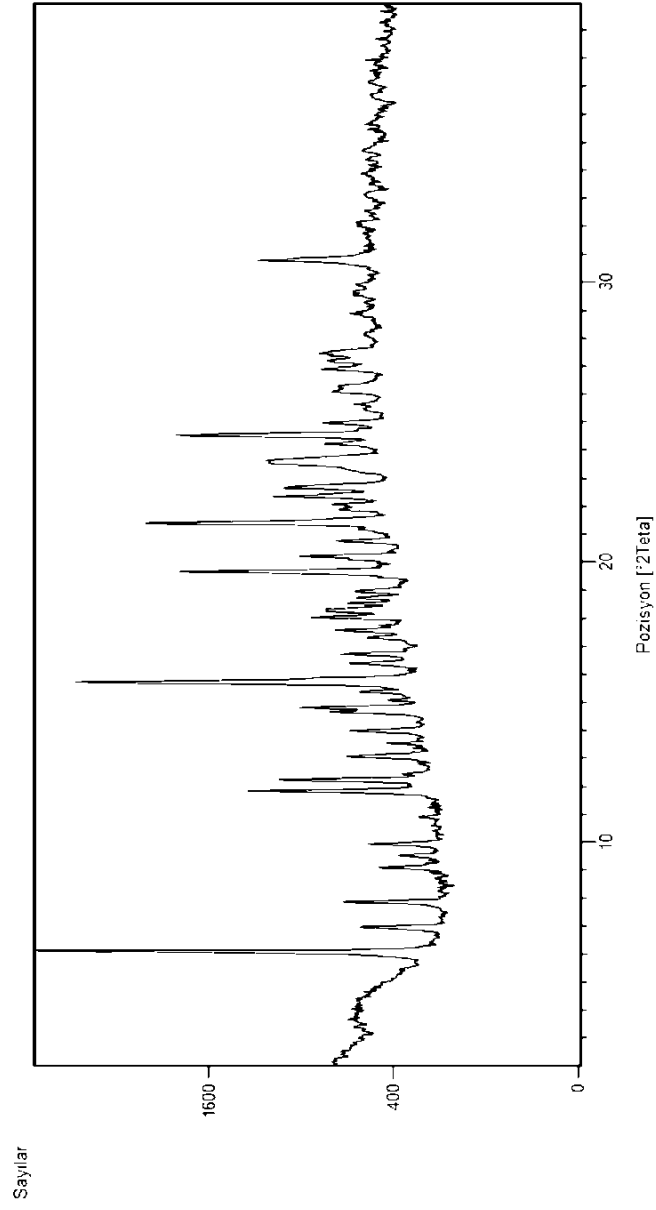
Doğruluk - +/- 0.1

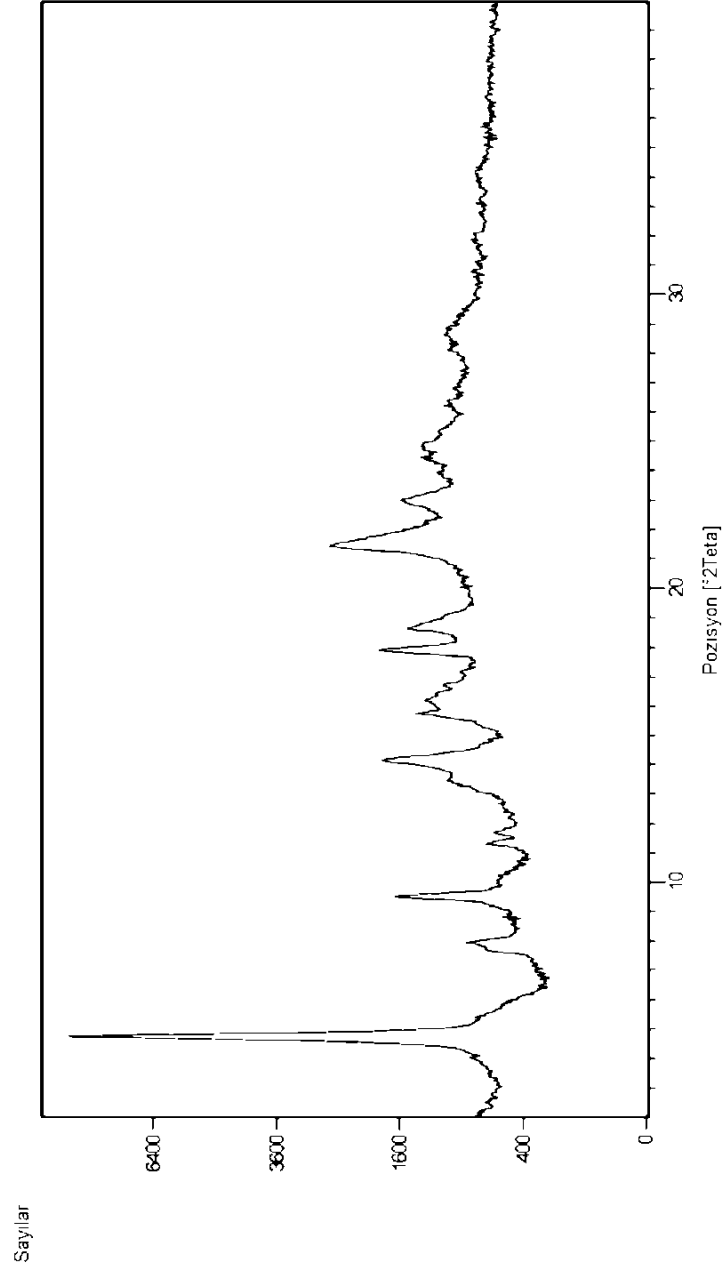
Şekil 1, Örnek 33a'ya ait sülfat tuzuna yönelik XRD spektrumunu gösterir;

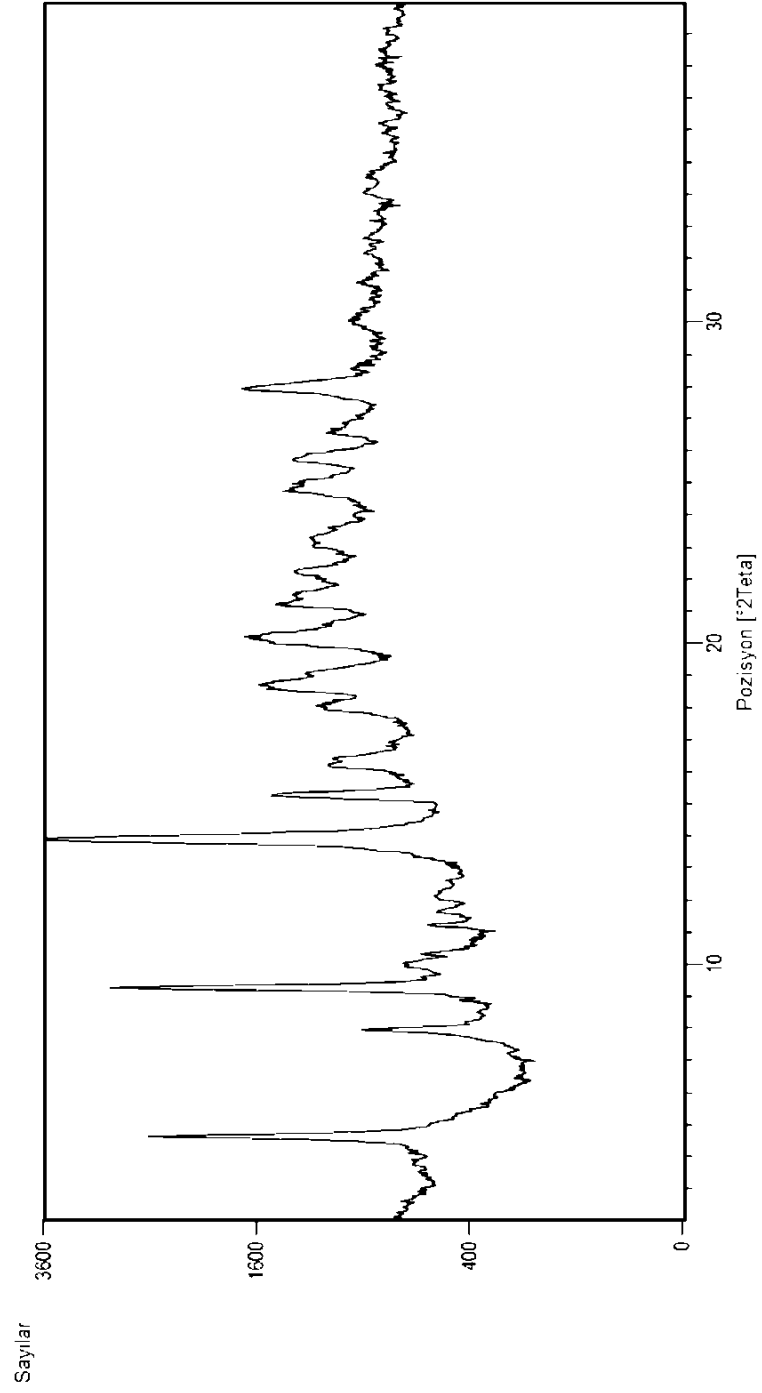
Şekil 2, Örnek 34a'ya ait sülfat Form A'ya yönelik XRD spektrumunu gösterir;

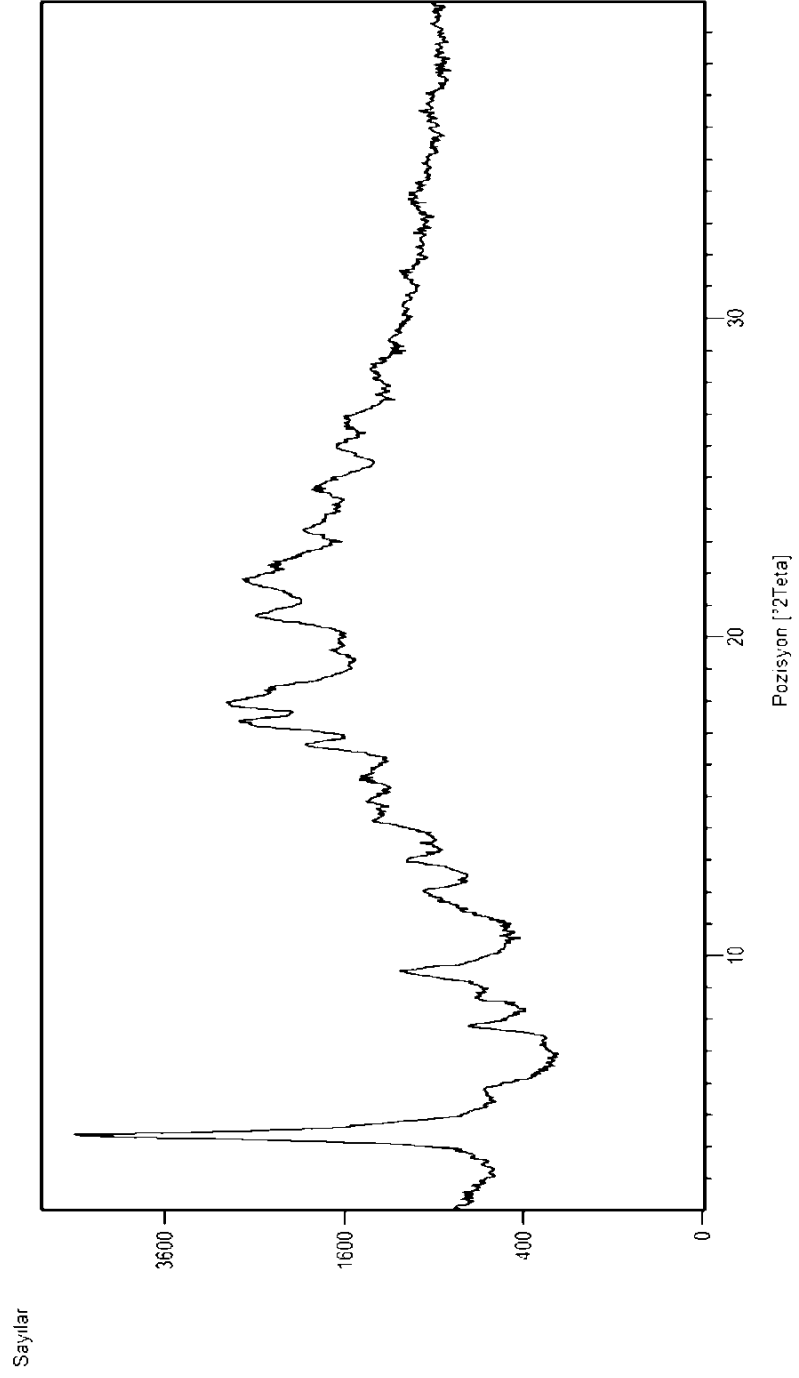
Şekil 3, Örnek 34c'ye ait sülfat Form B'ye yönelik XRD spektrumunu gösterir;

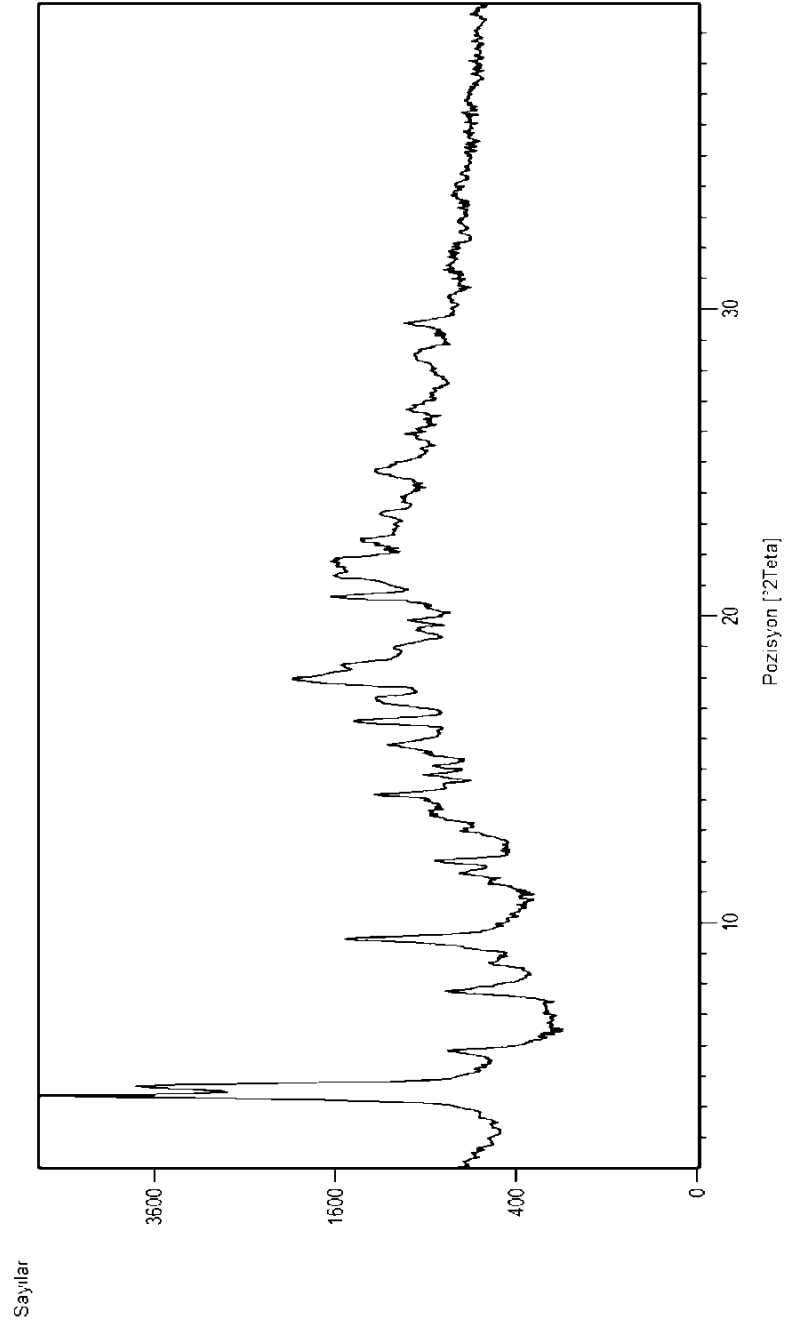
- 5 **Şekil 4**, Örnek 34d'ye ait sülfat Form C'ye yönelik XRD spektrumunu gösterir;
Şekil 5, Örnek 34e'ye ait sülfat Form D'ye yönelik XRD spektrumunu gösterir;
Şekil 6, Örnek 34f'ye ait sülfat Form E'ye yönelik XRD spektrumunu gösterir;
Şekil 7, Örnek 34g'ye ait sülfat Form F'ye yönelik XRD spektrumunu gösterir;
Şekil 8, Örnek 34h'ye ait sülfat Form G'ye yönelik XRD spektrumunu gösterir;
Şekil 9, Örnek 34i'ye ait napadisilat Form B'ye yönelik XRD spektrumunu gösterir.

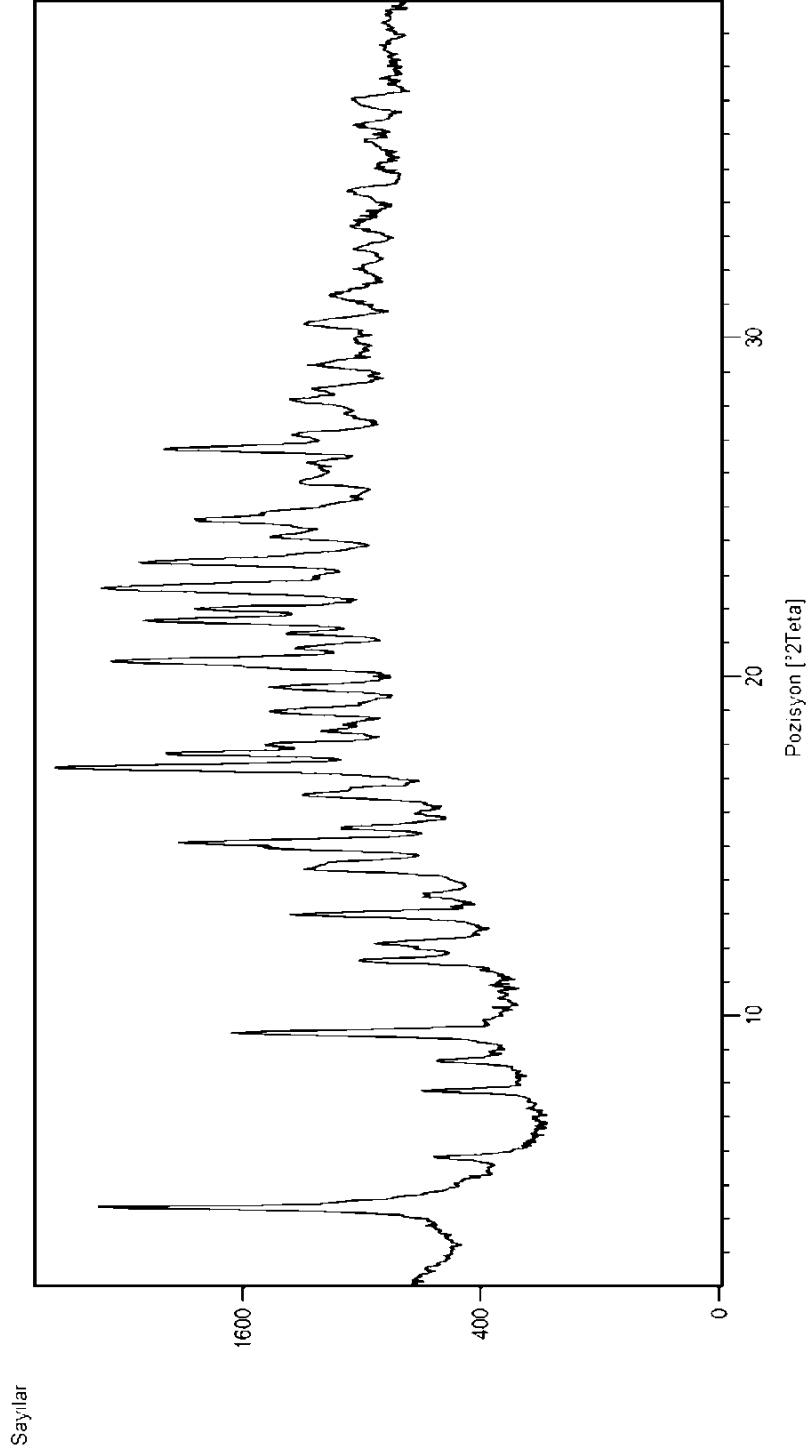
Şekil 1

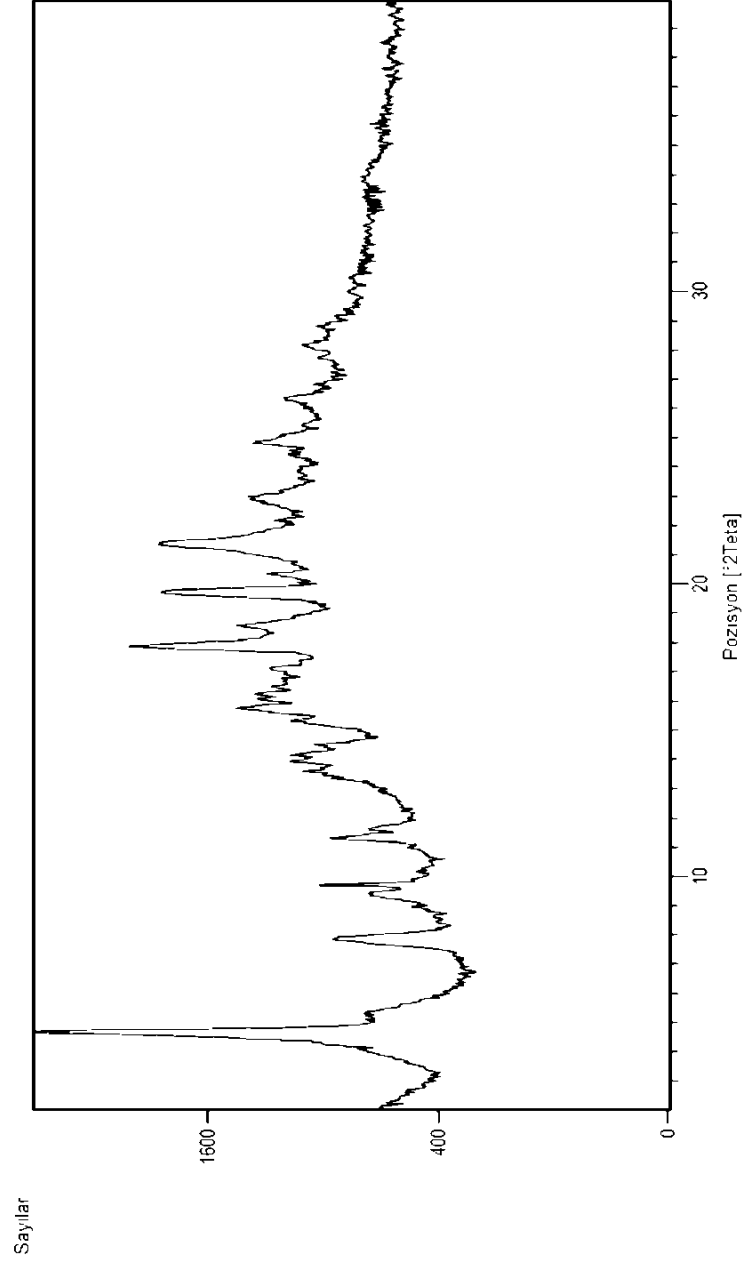
Şekil 2

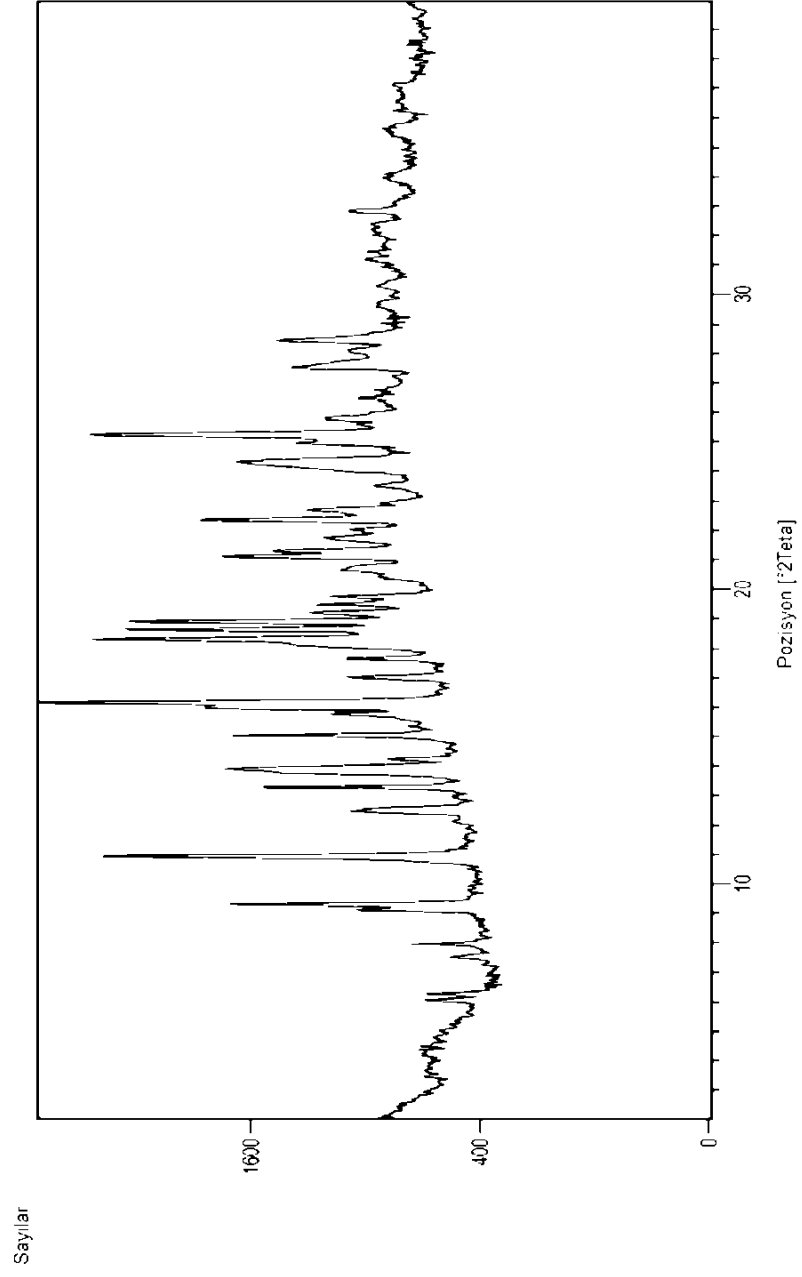
Şekil 3

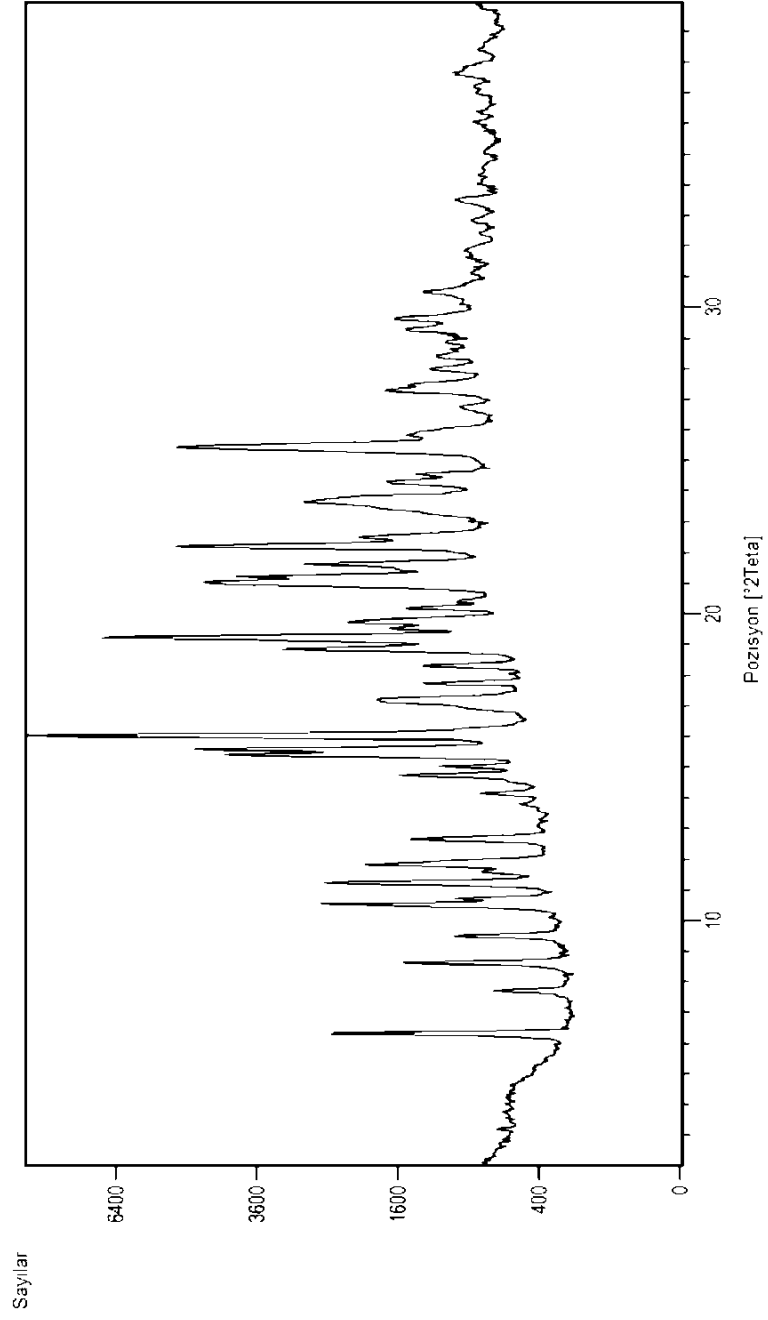
Şekil 4

Şekil 5

Şekil 6

Şekil 7

Sekil 8

Şekil 9

Şekil 10