

ÖZET

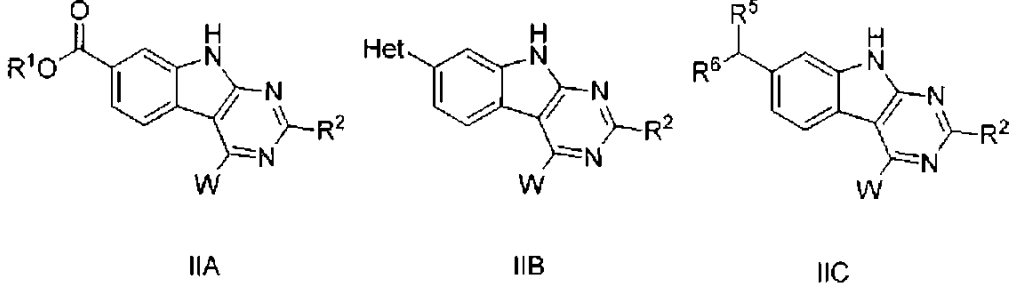
PİRİMİDO[4,5-B]INDOL TÜREVLERİ VE HEMATOPOETİK KÖK HÜCRELERİNİN EKSPRESYONUNDA BUNLARIN KULLANIMI

5

Pirimido [4,5-b]indol türevleri sağlanmaktadır. Bu bileşikler, hematopoetik kök hücre popülasyonları, özellikle insan hematopoetik kök hücre popülasyonları genişletilmesi için faydalıdır. Bileşikler aynı zamanda, hematopoetik kök hücreleri kapsayan hastaların medikal tedavisinde faydalıdır.

İSTEMLER

1. Formül IIA, formül IIB veya formül IIC'nin bir bileşiği



5

veya bunun bir tuzu olup,

Het, 3 ila 7-üyelili heterosikl olup, isteğe bağlanarak bir veya daha fazla R¹ veya R^A ile ikame edilmektedir;

10

R⁵ ve R⁶ aynı veya farklı ve her biri bağlanarak L'dir, veya N, O ve S'den seçilmiş isteğe bağlanarak bir veya daha fazla heteroatom içeren 5-üyelili bir halka oluşturmak üzere C ile birleşmektedir, isteğe bağlanarak halka bir veya daha fazla R¹ veya R^A ile ikame edilmektedir;

15

W ise 74) -(N(R₁)-L)_n-N(R₁)R₁

Veya W'dir.

1) -H,

2) -halogen,

20

3) -OR¹,

4) -L-OH,

5) -L-OR¹,

6) -SR¹,

7) -CN,

25

8) -P(O)(OR¹)(OR¹),

9) -NHR¹,

10) -N(R¹)R¹,

11) -L-NH₂,

12) -L-NHR¹,

	13)	$-L-N(R^1)R^1$,
	14)	$-L-SR^1$,
	15)	$-L-S(O)R^1$,
	16)	$-L-S(O)_2R^1$,
5	17)	$-L-P(O)(OR^1)(OR^1)$,
	18)	$-C(O)OR^1$,
	19)	$-C(O)NH_2$,
	20)	$-C(O)NHR^1$,
	21)	$-C(O)N(R^1)R^1$,
10	22)	$-NHC(O)R^1$,
	23)	$-NR^1C(O)R^1$,
	24)	$-NHC(O)OR^1$,
	25)	$-NR^1C(O)OR^1$,
	26)	$-OC(O)NH_2$,
15	27)	$-OC(O)NHR^1$,
	28)	$-OC(O)N(R^1)R^1$,
	29)	$-OC(O)R^1$,
	30)	$-C(O)R^1$,
	31)	$-NHC(O)NH_2$,
20	32)	$-NHC(O)NHR^1$,
	33)	$-NHC(O)N(R^1)R^1$,
	34)	$-NR^1C(O)NH_2$,
	35)	$-NR^1C(O)NHR^1$,
	36)	$-NR^1C(O)N(R^1)R^1$,
25	37)	$-NHS(O)_2R^1$,
	38)	$-NR^1S(O)_2R^1$,
	39)	$-S(O)_2NH_2$,
	40)	$-S(O)_2NHR^1$,
	41)	$-S(O)_2N(R^1)R^1$,
30	42)	$-S(O)R^1$,
	43)	$-S(O)_2R^1$,
	44)	$-OS(O)_2R^1$,
	45)	$-S(O)_2OR^1$,
35	46)	-1, 2 veya 3 R ^A veya R ¹ ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiş benzil,

- 47) -L ve heteroaril gruplarından birine veya her ikisine ekli olan bir veya daha fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiş L-heteroaril,
- 48) -L ve heterosiklik gruplarından birine veya her ikisine ekli olan bir veya daha fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiş L-heterosiklik,
- 5 49) -L ve aril gruplarından birine veya her ikisine ekli olan bir veya daha fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiş L-aril,
- 50) -L-NR¹(R¹),
- 51) -L-)NR¹,
- 52) -L-(N(R¹)-L)_n-N(R¹)R¹,
- 10 53) - L ve heteroaril gruplarından birine veya her ikisine ekli olan bir veya daha fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiş -L-(N(R¹)-L)_n heteroaril,
- 54) - L ve heterosiklik gruplarından birine veya her ikisine ekli olan bir veya daha fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiş -L-(N(R¹)-L)_n heterosiklik,
- 15 55) - L ve aril gruplarından birine veya her ikisine ekli olan bir veya daha fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiş -L-(N(R¹)-L)_n aril,
- 56) -O-L-N(R¹)R¹,
- 57) L ve heteroaril gruplarından birine veya her ikisine ekli olan bir veya daha fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiş -O-L- heteroaril,
- 20 58) L ve heterosiklik gruplarından birine veya her ikisine ekli olan bir veya daha fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiş -O-L- heterosiklik,
- 59) L ve aril gruplarından birine veya her ikisine ekli olan bir veya daha fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiş -O-L- aril,
- 25 60) -O-L)₂-NR¹,
- 61) -O-L-(N(R¹)-L)_n - N(R¹)R¹,
- 62) L ve heteroaril gruplarından birine veya her ikisine ekli olan bir veya daha fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiş -O-L-(N(R¹)-L)_n - heteroaril,
- 30 63) L ve heterosiklik gruplarından birine veya her ikisine ekli olan bir veya daha fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiş -O-L-(N(R¹)-L)_n - heterosiklik,
- 64) bir veya daha fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiş -O-L-(N(R¹)-L)_n- aril,
- 35 65) bir veya daha fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiş

-S-L- heteroaril,

66) bir veya daha fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiş

-S-L- heterosiklil,

67) L ve aril gruplarından birine veya her ikisine ekli olan bir veya daha fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiş -S-L- aril,

68) $-S-L)_2NR^1$,

69) $-S-L-(N(R^1)-L)_n - N(R^1)R^1$,

70) bir veya daha fazla R^A ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiş -S-L- $(N(R^1)-L)_n$ - heteroaril,

71) bir veya daha fazla R^A ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiş -S-L- $(N(R^1)-L)_n$ - heterosiklil,

72) bir veya daha fazla R^A ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiş -S-L- $(N(R^1)-L)_n$ - aril,

73) $-NR^1(R^1)$,

75) $-N(R^1)L)_2-NR^1$,

76) $-(N(R^1)-L)_n - N(R^1)R^A$,

77) bir veya daha fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiş $-(N(R^1)-L)_n$ - heteroaril,

78) bir veya daha fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiş $-(N(R^1)-L)_n$ - heterosiklil,

79) bir veya daha fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiş $-(N(R^1)-L)_n$ - aril,

80) bir veya daha fazla R^A ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiş - heteroaril, veya

81) bir veya daha fazla R^A ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiş -aril,

ve burada her bir ikame, eğer halihazırda mevcut değilse, isteğe bağlanarak L grubuna eklidir,

ve burada iki R^1 ikamesi aynı nitrojen atomunda mevcut olduğunda, her bir R^1 ikamesi bu aşamadan sonra açılacak olan R^1 değerlerinin listesinden bağlanarak seçilmektedir,

ve burada n, 0, 1, 2, 3, 4, veya 5 arasından birine eşit bir tamsayıdır,

ve burada, (R^1) ve R^1 bir nitrojen atomuna eklendiklerinde, N, 0 ve S'den seçilmiş bir veya daha fazla heteroatomu isteğe bağlanarak içeren bir 3 ila 7-üyeli halka oluşturmak üzere isteğe bağlanarak nitrojen atomu ile birleşmektedir, isteğe bağlanarak halka bir

veya daha fazla R^1 veya R^A ile ikame edilmektedir;

L, 4) $-C_{3-7}$ sikloalkil veya 1) $-C_{1-6}$ alkildir,

veya L aşağıdakilerden biridir:

- 5 2) $-C_{2-6}$ alkenil,
 3) $-C_{2-6}$ alkinil,
 5) $-C_{3-7}$ sikloalkenil,
 6) heterosiklil,
 7) $-C_{1-6}$ alkil- $-C_{3-7}$ sikloalkil,
10 8) $-C_{1-6}$ alkil-heterosiklil,
 9) aril, veya
 10) heteroaril,

ve burada alkil, alkenil, alkinil, sikloalkil, sikloalkenil, heterosiklil, aril ve heteroaril
15 grupları her biri bağms olarak bir veya iki R^A ikamesi ile isteğe bağ olarak ikame
edilmektedir;

R^1 aşağıdakilerden biridir

- 20 1) -H,
 2) $-C_{1-6}$ alkil,
 3) $-C_{2-6}$ alkenil,
 4) $-C_{2-6}$ alkinil,
 5) $-C_{3-7}$ sikloalkil,
 6) $-C_{3-7}$ sikloalkenil,
25 7) $-C_{1-5}$ perflorinatlı,
 8) -heterosiklil,
 9) -aril,
 10) -heteroaril,
 11) -benzil'dir, veya
30 12) 5-[(3aS,4S,6aR)-2-oksoheksahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il]pentanoildir,
ve burada alkil, alkenil, alkinil, sikloalkenil, perflorinatlı alkil, heterosiklil, aril,
heteroaril ve benzil grupları her biri bağms olarak 1, 2 veya 3 R^A veya R^1
ikameleri ile isteğe bağ olarak ikame edilmektedir;

- 35 R^2 , 7) 1, 2 veya 3 R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağ olarak ikame edilmiş benzil; veya

1) -H'dir,

Veya R^2 aşağıdakilerden biridir

2) $-C_{1-6}$ alkil,

3) $-SR^1$,

4) $-C(O)R^1$,

5) $-S(O)R^1$,

6) $-S(O)_2R^1$,

8) L ve heteroaril gruplarından birine veya her ikisine ekli olan bir veya daha fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiş -L-heteroaril,

9) L ve heterosiklik gruplarından birine veya her ikisine ekli olan bir veya daha fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiş -L-heterosiklik,

10) L ve aril gruplarından birine veya her ikisine ekli olan bir veya daha fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiş -L-aril,

11) bir veya daha fazla R^A veya R^1 ikamesi ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiş -heteroaril, veya

12) bir veya daha fazla R^A veya R^1 ikamesi ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiş -aril,

ve burada her bir ikame, eğer halihazırda mevcut değilse, isteğe bağlı olarak L grubuna eklidir;

R^A aşağıdakilerden biridir

1) -halojen,

2) $-CF_3$,

3) $-OH$,

4) $-OR^1$,

5) $-L-OH$,

6) $-L-OR^1$,

7) $-OCF_3$,

8) $-SH$,

9) $-SR^1$,

10) $-CN$,

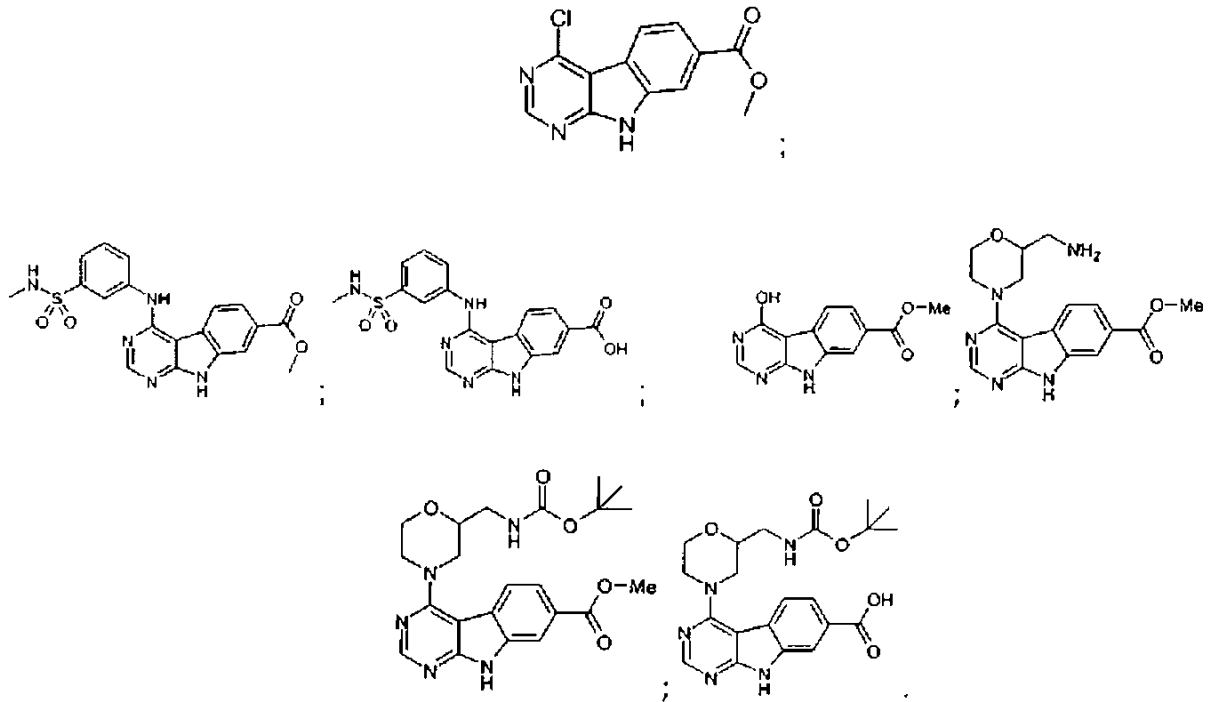
11) $-NO_2$,

12) $-NH_2$,

	13) $-\text{NHR}^1$,
	14) $-\text{NR}^1\text{R}^1$,
	15) $-\text{L-NH}_2$,
	16) $-\text{L-NHR}^1$,
5	17) $-\text{L-NR}^4\text{R}^1$,
	18) $-\text{L-SR}^1$,
	19) $-\text{L-S(O)R}^1$,
	20) $-\text{L-S(O)}_2\text{R}^1$,
	21) $-\text{C(O)OH}$,
10	22) $-\text{C(O)OR}^1$,
	23) $-\text{C(O)NH}_2$,
	24) $-\text{C(O)NHR}^1$,
	25) $-\text{C(O)N(R}^1\text{)R}^1$,
	26) $-\text{NHC(O)R}^1$,
15	27) $-\text{NR}^1\text{C(O)R}^1$,
	28) $-\text{NHC(O)OR}^1$,
	29) $-\text{NR}^1\text{C(O)OR}^1$,
	30) $-\text{OC(O)NH}_2$,
	31) $-\text{OC(O)NHR}^1$,
20	32) $-\text{OC(O)N(R}^1\text{)R}^1$,
	33) $-\text{OC(O)R}^1$,
	34) $-\text{C(O)R}^1$,
	35) $-\text{NHC(O)NH}_2$,
	36) $-\text{NHC(O)NHR}^1$,
25	37) $-\text{NHC(O)N(R}^1\text{)R}^1$,
	38) $-\text{NR}^1\text{C(O)NH}_2$,
	39) $-\text{NR}^1\text{C(O)NHR}^1$,
	40) $-\text{NR}^1\text{C(O)N(R}^1\text{)R}^1$,
	41) $-\text{NHS(O)}_2\text{R}^1$,
30	42) $-\text{NR}^1\text{S(O)}_2\text{R}^1$,
	43) $-\text{S(O)}_2\text{NH}_2$,
	44) $-\text{S(O)}_2\text{NHR}^1$,
	45) $-\text{S(O)}_2\text{N(R}^1\text{)R}^1$,
	46) $-\text{S(O)R}^1$,
35	47) $-\text{S(O)}_2\text{R}^1$,

- 48) $-\text{OS}(\text{O})_2\text{R}^1$,
 49) $-\text{S}(\text{O})_2\text{OR}^1$,
 50) -benzil,
 51) $-\text{N}_3$, veya
 52) $-\text{C}(-\text{N}=\text{N}-)(\text{CF}_3)$,

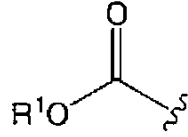
ve burada benzil grubu, Formül IIA, formül IIB veya formül IIC bileşiğinin aşağıdakilerden farklı olması koşuluyla isteğe bağlı olarak 1, 2 veya 3 R^A veya R^1 ikameleri ile ikame edilmektedir,



2. Heteroatomun, R^5 ve R^6 ile birlikte oluşturulan 5-üyelî halkada N olduğu, İstem 1'e göre bir bileşik.

3. Söz konusu bileşiğin, formül IIC'ye sahip olduğu ve R^2 'nin benzil olduğu İstem 1 veya 2'ye göre bir bileşik.

4. İstem 1'e göre bir bileşik olup, burada: formül IIA'da,



CO₂Me'dir ve formül IIC'de, 2-metil-2H-tetrazol-5-ili oluşturmak üzere R⁵ ve R⁶ C ile birleşmektedir;

5

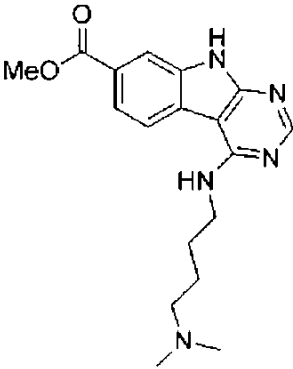
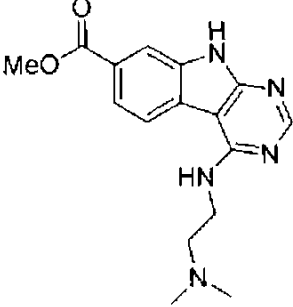
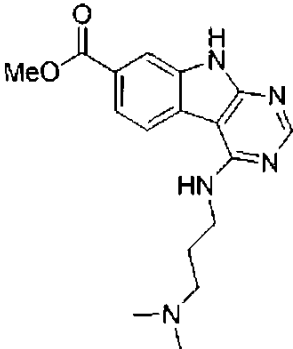
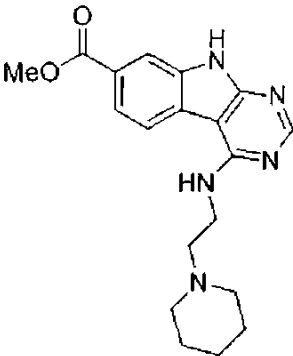
R² benzil, 3-tiyenilmetil veya 3-piridinil metildir; ve

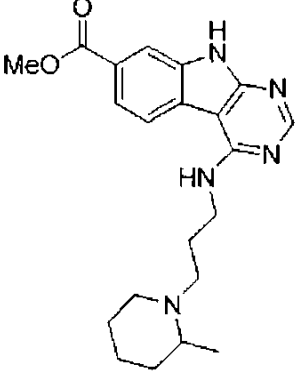
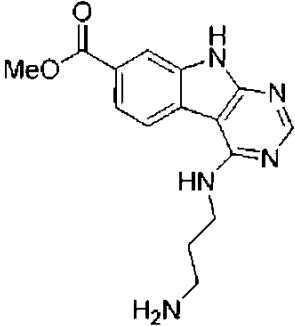
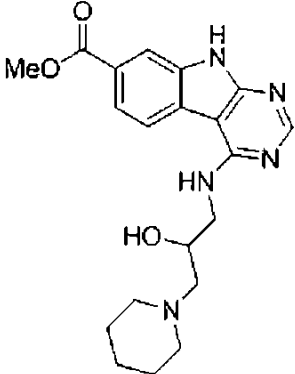
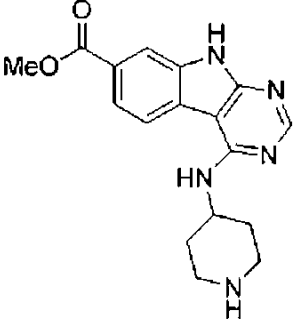
W, NH-L-N(R¹)R^{1'}'dir, burada L C₂₋₄ alkildir ve R¹ ise C₁₋₄ alkildir veya (R¹) ve R¹, isteğe bağlanarak N, O ve S'den seçilmiş bir veya daha fazla başka heteroatom içeren 3 ila 7- üyeli halka oluşturmak üzere ekli oldukları nitrojen atomuyla birleşmektedir, isteğe bağlanarak halka bir veya daha fazla R¹ veya R^A ile ikame edilmektedir.

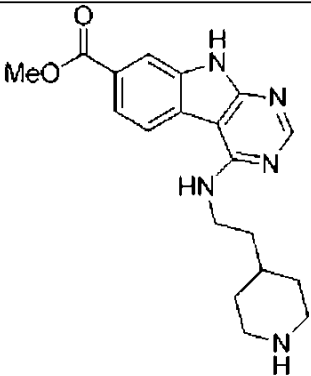
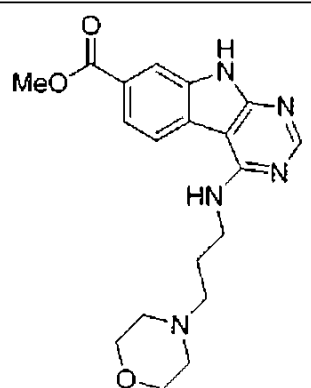
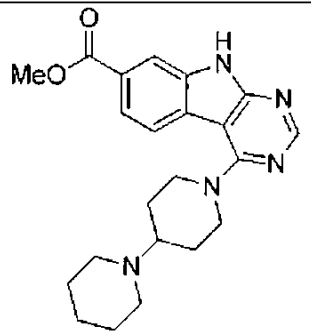
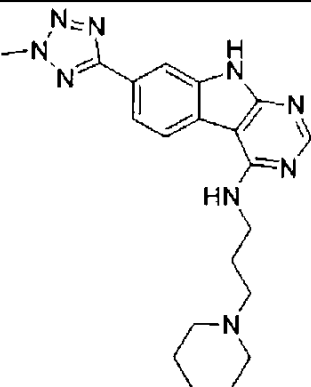
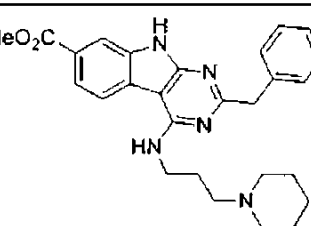
10

5. Aşağıdaki gibi bir bileşik:

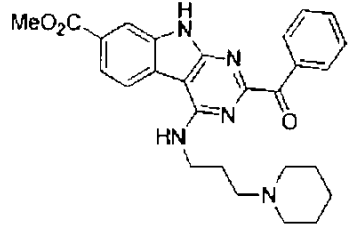
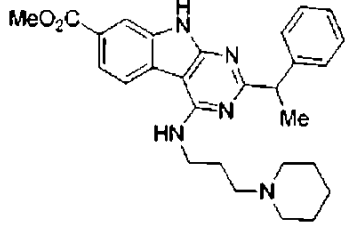
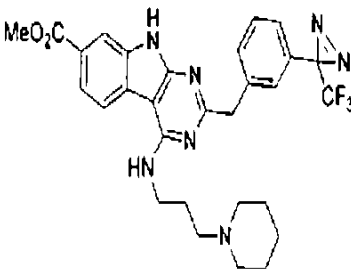
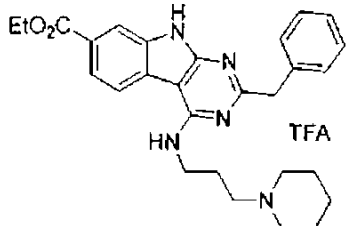
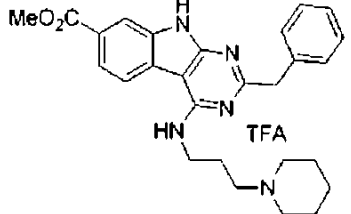
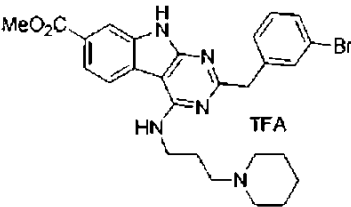
Bileşik Numarası	Yapı
1	
2	

3	 <chem>CN(C)CCCCNC1=CNC2=CC=CC=C2C1=CN3C=NC=N3</chem>
4	 <chem>CN(C)CCNC1=CNC2=CC=CC=C2C1=CN3C=NC=N3</chem>
5	 <chem>CN(C)CCCCNC1=CNC2=CC=CC=C2C1=CN3C=NC=N3</chem>
6	 <chem>C1CCNCCC1CCNC1=CNC2=CC=CC=C2C1=CN3C=NC=N3</chem>

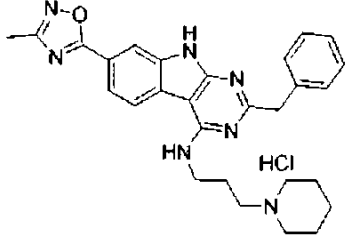
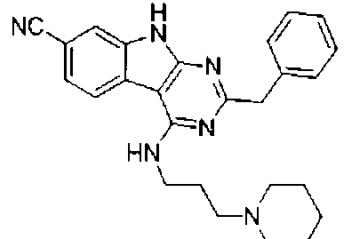
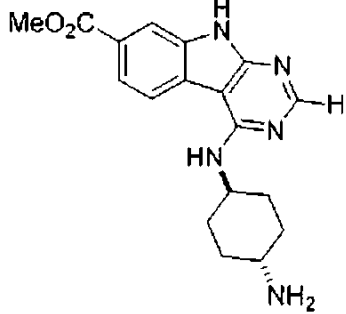
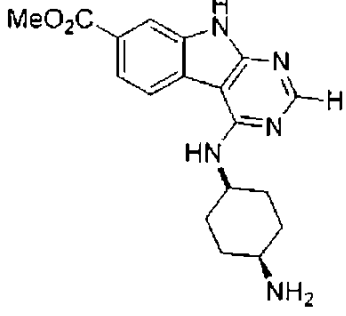
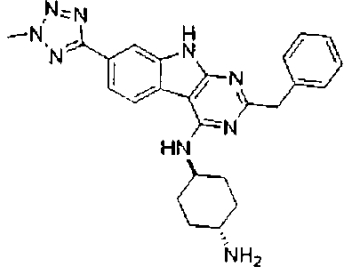
7	
8	
9	
10	

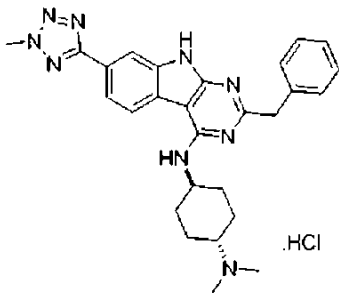
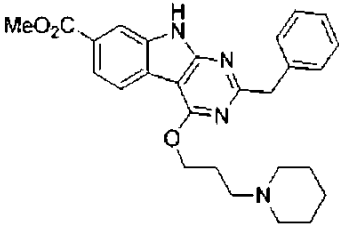
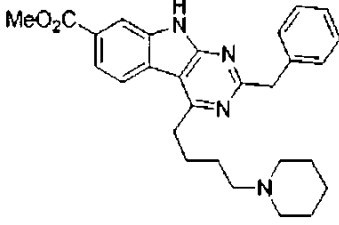
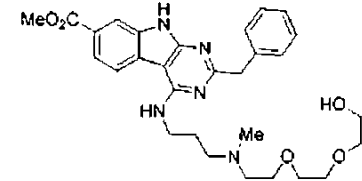
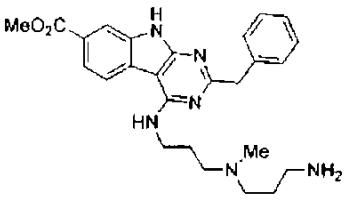
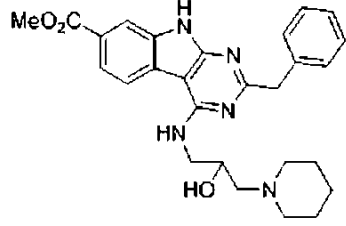
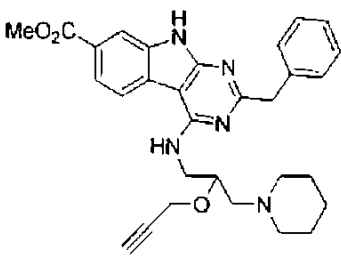
11	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3c(c2)ncn3NCCC4CCNCC4</chem>
12	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3c(c2)ncn3NCCC4CCOCC4</chem>
13	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3c(c2)ncn3NCCCN4CCN(C4)CC5CCNCC5</chem>
14	 <chem>CN1C=NN=N1c2ccc3c(c2)c4c(c3)ncn4NCCC5CCNCC5</chem>
15	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3c(c2)nc4c3ncn4CCc5cccnc5NCCC6CCNCC6</chem>

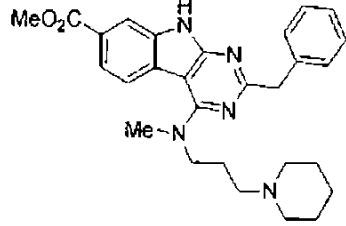
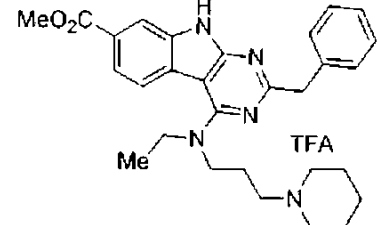
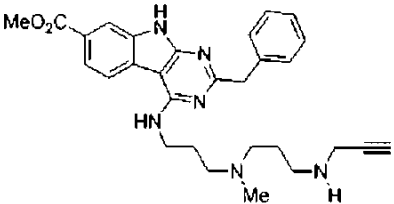
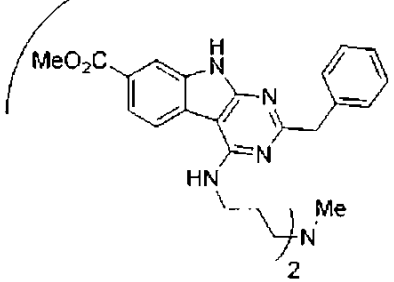
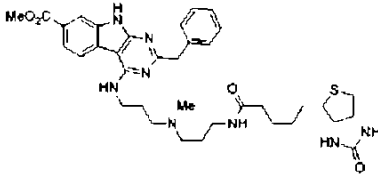
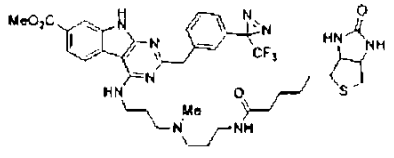
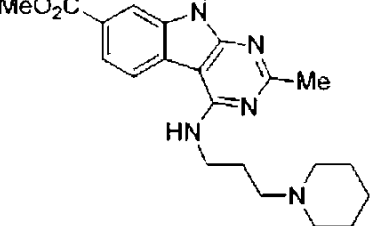
16	
17	
18	
19	
20	
21	
22	

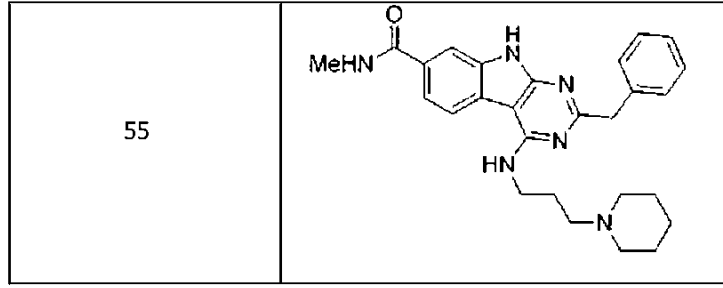
23	
24	
25	
26	
27	
28	

29	
30	
31	
32	
33	
34	
35	

36	
37	
38	
39	
40	

41	
42	
43	
44	
45	
46	
47	

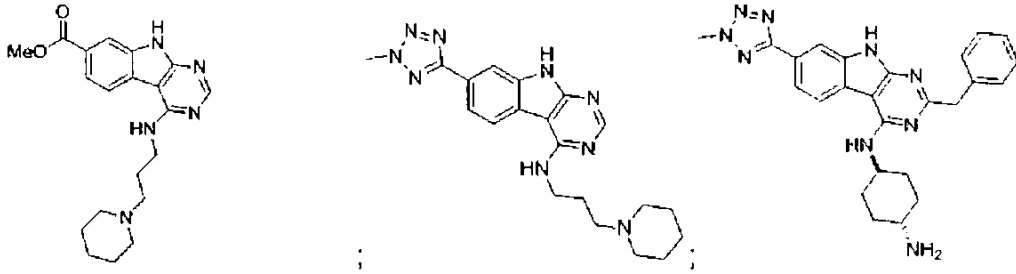
48	
49	
50	
51	
52	
53	
54	



veya bunun bir tuzu.

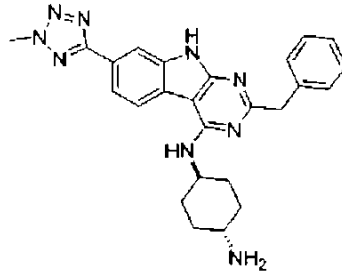
6. İstem 1'e göre bir bileşik olup, aşağıdaki şekildedir:

5



veya bunun bir farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu.

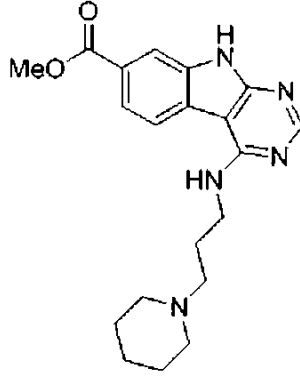
10 7. İstem 1'e göre bir bileşik olup, burada bileşik aşağıdaki şekildedir:



veya bunun bir farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu.

15

8. İstem 1'e göre bir bileşik olup, burada bileşik aşağıdaki şekildedir:



veya bunun bir farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu.

- 5 **9.** Kök ve progenitör hücrelerin arttırılmasına yönelik bir yöntem olup, bu yöntem şunları içermektedir: isteğe bağlı olarak bir biyolojik veya başka bir küçük hücre olan en az bir hücre genişleme faktörü ile birlikte, İstemler 1 ila 8'den herhangi birine göre bir bileşik veya bir tuzu içeren bir ajan ile hematopoetik kök hücreleri içeren bir başlatma hücre popülasyonunun *in vitro* veya *ex vivo* kültürlenmesi.
- 10 **10.** Başlatma hücre popülasyonunun, mobilize periferik kandan (mPB), kemik iliğinden (BM) veya göbek kordon kanından (UCB) hasat edilen CD34+ hücrelerini kapsadığı, İstem 9'a göre yöntem.
- 15 **11.** İstemler 1 ila 8'den herhangi birine göre bir bileşiği veya bunun bir tuzunu içeren bir farmasötik bileşim, ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı.
- 20 **12.** Bir süjude bir hematopoetik rahatsızlığı/malignitenin, bir otoimmün hastalığı ve/veya bir kalıtsal immün yetmezliği hastalığının tedavisinde kullanıma yönelik İstemler 1 ila 8'den herhangi birine göre bir bileşik veya bunun bir tuzu.
- 25 **13.** Söz konusu hematopoetik rahatsızlığı/malignitenin, otoimmün hastalığı ve/veya kalıtsal immün yetmezliği hastalığı; kemik iliği yetmezliği durumları, küresel olarak ilgili çeşitli konjenital hastalıklar (örneğin, orak hücre anemisi ve talasemi), lupus, akut miyeloid lösemi, akut lenfoblastik lösemi, kronik miyeloid lösemi, kronik lenfositik lösemi, miyeloproliferatif rahatsızlıklar, miyelodiplastik sendromlar, çoklu miyelom, Hodgkin dışı lenfoma, Hodgkin hastalığı, aplastik anemi, saf kırmızı hücre aplazisi, hemoglobinüri, Fankoni anemisi, talasemi, orak hücre anemisi, Wiskott-Aldrich sendromu, doğuştan

kusurlar metabolizması (Gaucher hastalığı gibi) içerdği, İstem 12'ye göre bileşik.

14. İntravenöz infüzyon için uygun olan, İstem 11'e göre bir farmasötik bileşim.

- 5 **15.** Genişleyen hematopoetik kök hücrelerinde kullanıma yönelik bir kit olup, İstemler 1 ile 8'den herhangi birine göre bir bileşiği, veya bunun bir tuzunu, kullanıma yönelik talimatlar içermektedir, bu kit bir biyolojik veya başka bir küçük molekül olan en az bir hücre genişleme faktörünü içermektedir.

TARİFNAME

PİRİMİDO[4,5-B]INDOL TÜREVLERİ VE HEMATOPOETİK KÖK HÜCRELERİNİN EKSPRESYONUNDA BUNLARIN KULLANIMI

5

İLGİLİ BAŞVURUYA ÇAPRAZ REFERANS

Bu başvuru, 27 Ocak 2012 tarihinde dosyalanan 61/591,521 Numaralı U.S. Geçici Başvuruya rüçhan faydası talep etmektedir.

10

TEKNİK ALAN

Buluş pirimido[4,5-b]indol türevleri ile ilgilidir. Aynı zamanda, buluş hematopoetik kök hücrelerin genişlemesine yönelik olarak pirimido[4,5-b]indol türevlerinin kullanımı ile ilgilidir.

15

ÖNCEKİ TEKNİK

Hematopoetik kök hücrelerin (HSCler) ana kaynakları kemik iliği ve göbek kordon kanı (UCB). HSCler, hematolojik malignitler, kemik iliği yetersizliği durumları küresel olarak ilgili çeşitli konjenital hastalıklara (örneğin, orak hücre anemisi ve talasemi) ve lupu gibi otoimmün hastalıklara sahip hastalarda tedavilere ulaşılmasına yönelik en etkili tedavi stratejilerinden birini oluşturan nakil ortamında (otolog veya alojenik) kullanılmaktadır. Bununla birlikte, hayat kurtarıcı veya yaşam iyileştirici tedavi için bu fırsat, prosedürün güvenli ve başarılı kılınması için bu hücreleri *ex vivo* olarak yeterince çoğaltmadığı için dünya çapında binlerce insan için erişilebilir değildir. Daha özel olarak, her 3 hasta için, insan lökosit antijeni (HLA) özdeş donör bulunamadığı için, organ nakli için fırsattan vazgeçecektir. Başka bir oranda hastalar, başarılı organ nakli için greftte (başka bir deyişle, kordon kanı veya otolog) çok az HSC mevcut olduğu için nakle erişemeyecektir. İlik naklinin güvenliği ve etkililiği doğrudan aşılama için mevcut olan HSClerin ve progenitör hücrelerin sayısına bağlıdır. Ne kadar çok infüze edilebilirse, o kadar hızlı bir şekilde hematolojik fonksiyon yenilenmektedir ve daha kısa granülosit eksikliği veya trombosit eksikliğinde dolaylı kanama veya granülositlerin eksikliğinden dolayı enfeksiyon riski penceresidir. Yeterli HSClerin sağlanmasıdaki zorluk, miyeloablative olmayan kondisyonlanmanın, majör kalıtsal kan rahatsızlıkları (dünya çapında morbidite ve ölümün başlıca genetik nedeni) gen tedavisi bağlamında tercih edildiği durumlarda daha da artmaktadır.

Yetişkinlerde, HSC'ler genellikle kemik iliğinde bulunmaktadırlar ve otolog veya allojenik hematopoetik kök hücre nakli (HSCT) için aferez ile toplanmadan önce dolaşımına girmesi için mobilize edilmektedir. Yeterli sayıda CD34+ hücrelerin toplanması bir (HSClerin) bir vekil markörü, CD34+ hücrelerinin dozu başarıyla ve hematopoetik geri kazanımın hızını etkilediği için çok önemlidir. Birkaç rapor, yüksek infüzyonlu bir CD34+ hücre dozunun bağışıklık olarak gelişmiş sağkalımın tahmini olduğunu önermektedir.

İki en yaygın olarak kullanılan mobilize rejimi, granülosit-koloni uyarıcı faktörü (G-CSF) ve G-CSF plus kemoterapidir. Health Canada tarafından Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından 2008 ve 2011 yılında onaylanan bir CXCR4 antagonisti olan Plerixafor, G-CSF ile uygulandığında HSClerin mobilizasyonunu artırmaktadır. Bununla birlikte, Plerixafor, lösemili hücrelerin mobilizasyonu nedeniyle lösemili hastalarda kontrendikedir. Halihazırda kullanılan mobilizasyon rejimleri ile yeterli sayıda CD34+ hücre/kg elde edilememesinin, hastaların %15'ini etkileyeceği tahmin edilmektedir (hastalar arasında değişim göstermektedir). Hematolojik malignitelerde otolog HSCT kullanımı, hem normal hem de kanser kök hücrelerinin kemik iliğinde mevcut olduğu ve dolayısıyla muhtemelen mobilize olduğu için önemlidir.

BM veya mPBSC ile allojenik HSCT başka bir nakil alternatifidir. Bununla birlikte, bu tip nakli için uygun olan hastaların üçte biri ila dörtte biri uygun bir donör bulamamaktadır. Nakil yapılmalara yönelik olarak, graft-versus-host hastalığı, nüksetme veya graft reddi nedeniyle yüksek oranda nakille ilişkili ölüm; ve uzun süre boyunca immün yetmezliği riski bulunmaktadır. Alternatif olarak, göbek kordon kanının allojenik HSCT'de geçerli bir seçenek olduğu gösterilmektedir. Bununla birlikte, tek bir CB ünitesi tipik olarak hızlı ve etkili bir hematopoetik iyileşme için yetişkin bir hasta için yetersiz HSCler sağlamaktadır.

Sitokin-araçlı kısa süreli yaşam sürdürme ve fare sulandırma tahlilleri ile ölçülen kemirgen veya insan HSC sayılarında orta dereceli bir artışla destekleyen *in vitro* koşullar genel olarak, progenitör hücre popülasyonlarının ikinci türünde çok daha güçlü bir artışla beraberinde getirmektedir. Kemirgen ve insan HSClerinde daha belirgin artışlar, fibroblast büyüme faktörü (FGF), insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinler, anjiyopoietin benzeri büyüme faktörleri ve pleiotrofin gibi diğer faktörleri içeren kültürlerde son zamanlarda açığanmaktadır. Bununla birlikte, bu son raporlar şu ana kadar tektir ve bağışıklık onay beklemektedir. Standart sitokinlerle *in vitro* olarak elde edilen HSClerde kısa süreli

artışlar, kaçınılmaz olarak nihai HSC tükenmesi takip edebilmektedir.

İnsan HSC genişlemesine yönelik alternatif stratejiler, kültürlerine stromal elemanlar veya çözünür morfojenik ligandlar (örneğin, Notch, Wnt ve Hedgehog yolları uyararak), spesifik hücre içi sinyal iletim yollarını hedeflenmiş manipülasyonunu (PGE2, ROS, p38 ve MAPK inhibitörleri) veya spesifik transkripsiyon faktörlerinin (örneğin, Hox, Hlf) manipülasyonunu dahil etmektedir. HSClerin *ex vivo* genişlemesine yönelik diğer prelinik yaklaşımlar şunlar ile inkübasyonu kapsamaktadır i) StemRegenin1 (SR1), bir aril hidrokarbon reseptör antagonisti (Boitano, AE ve ark. "Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells" Science 329: 1345-1348. 2010); ii) Garcinol, bir histon asetiltransferaz inhibitörü (Nishino, T ve ark. "Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by Garcinol, a potent inhibitor of histone acetyltransferase" PLoS ONE 6(9): e24298. 2011); ve iii) NR-101, bir peptidil olmayan küçük molekül c-MPL agonisti (Nishino ve ark. "Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by a small-molecule agonist of c-MPL" Exp. Hem. 2009; 37:1364-1377). SR1'in karakterizasyonu, düşük molekül ağırlığı (LMW) bileşiklerin HSC genişlemesini destekleme kapasitesine sahip olduğu prensibi için bir kanı sağlanmıştır.

Klinik çalışmalar, sadece uygulanan nakillerin kalıcılığı için gerekliliği değil, aynı zamanda, infüzyon sonrası kısa süreli yeniden yerleşen hücrelerin sayısına bağlı olan nakil sonrası yararlı granülosit seviyelerinin ortaya çıkma süresini en aza indirmenin önemini vurgulamaktadır. Kültürde sitokinlerle genişletilmiş ilik veya kordon kan hücrelerinin nakli, bugüne kadar tedavi edilmemiş hücrelere kıyasla hematopoetik iyileşmenin klinik olarak yararlı hastanmasını göstermektedir. İmmobilize edilmiş Notch ligandları kullanılarak genişletilmiş hücrelerle yapılan denemelerin önceki sonuçları herhangi bir (hatta orta dereceli) progenitör hücre genişleme stratejisi için potansiyel klinik fayda gösteren ilk kişi olmuştur (Delaney ve ark. "Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution" Nat. Med. 16(2): 232-236. 2010). Bununla birlikte, bu yaklaşım, *ex vivo* genişleme basamağında immobilize edilmiş bir Delta-1 füzyon proteini kullanma ihtiyacı ve kök hücreler üzerinde belgelenmiş etkinin olmamasıyla sonuçlanmıştır (etkinin, daha farklı progenitörlerle sonuçlandığı görülmektedir). Klinik denemede diğer yaklaşımlar şunlar kapsamaktadır i) StemEx, tedavi edilmemiş UCB hücreleri ile birlikte infüze edilmiş, bakışlatör tetraetil-enepentamin (TEPA) ile kültürlenmiş UCB hücrelerinin bir kombinasyonu; Faz I sonuçları önceki raporlara kıyasla nötrofil veya trombosit aşılama süresinin iyileşmediğini göstermektedir (de Lima M ve ark. "Transplantation of ex vivo

expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase I/II clinical trial" Bone Marrow Transplant. 2008; 41(9): 771-778); ve bir faz I denemesinde UCBT'nin yuvalanması için geliştirilmesi için kullanılan 16-16 dimetil prostaglandin E2 (PGE2).

5 Bu yüzden, hematopoetik kök ve progenitör hücrelerin genişlemesinin artırılması için yeni stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır. Belirli pirimido[4,5-b]indol türevleri, bu konuda kullanılan teknikte bilinmektedir; bunlar örneğin şu patent dokümanlarında açıklanmaktadır: WO 2003/037898; WO 2004/058764; WO 1998/042708; WO 1997/002266; WO 2000/066585; WO 1993/020078; WO 2006/116733; WO 2008/055233; WO 2010/006032; WO 10 1995/019970; WO 2005/037825; ve WO 2009/004329.

WO 2010/059401 numaralı patent dokümanı immüno yetmezlik ve otoimmün hastalıklarda yanıtı çeşitli hematopoetik rahatsızlıklara kalıtsal olarak sahip olan hastada otoimmün veya allojenik nakil için CD34+ hücrelerinin sayısını genişletilmesi için ikameli purinil, pirrolo[2,3-d]pirimidinil, pirazolo[3,4-d]pirimidinil ve imidazo[4,5-c]piridin bileşikleri gibi bisiklik heterosiklik bileşikleri açıklamaktadır.

WO2011/056739 numaralı patent dokümanı troponin I-etkileşimli kinaz (TNNI3K) inhibe eden trisiklik pirimido-indol-4il-amino-benzensülfonamid, tetrahidro-pirimido-indol-4il-amino-benzensülfonamid ve tetrahidro-pirido-pirrolo-pirimidin-4il amino-benzensülfonamid bileşikleri, kardiyak dokular için yüksek oranda seçici ekspresyon sergileyen bir protein kinazı açıklamaktadır.

WO2009/004329 numaralı patent dokümanı trisiklik bileşikleri, özellikle Kontrol Noktası Kinaz 1 (CHK1) kinaz fonksiyonunu inhibe eden 9H-pirimido[4,5-b]indol, 9H-pirido[4',3':4,5]pirrolo[2,3-d]piridin, ve 9H-1,3,6,9-tetraaza-floren bileşiklerini açıklamaktadır. Bu bileşikler, CHK1'in aracılık ettiği hastalıklar ve durumların tedavisinde kullanılmaktadır.

Bununla birlikte, bu dokümanlar, buluşa göre pirimido[4,5-b]indol türevlerini ve hematopoetik kök ve progenitör hücrelerinin genişlemesinde bunların kullanıldığını açıklamamaktadır.

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

35 Şekil 1: Bileşik 1, aril hidrokarbon (AhR) yolu aracılığıyla etki etmemektedir. Mobilize

periferik kan CD34(+) hücreleri, 12 saat boyunca DMSO, SR1 [AhR antagonisti 1000nM] ve Bileşik 1 [500nM] ile kültürlenmiştir, hücreler toplanmış ve AhR'ye yanıt veren genler (CYP1B1 ve AhRR) için gerçek zamanlı RT-PCR gerçekleştirilmiştir. SR1'in aksine Bileşik 1, fonksiyonunun AhR yolunda bağış olduğunu öne sunan AhR-aşağıak yönünde hedef genlerini baskılamamaktadır

Şekil 2: Bileşik 1'in etkisi tersinirdir. 7 gün boyunca bileşik 1 (yeşil renkle gösterilmiştir) veya vehikül (mavi renkle gösterilen, DMSO) ile kültürlenmiş mobilize periferik kan CD34(+) hücreleri yeni ortamlarda Bileşik ilavesi ile veya olmadan (sırasıyla katya karşıkesikli çizgi) ile yeniden kaplanmıştır. Hücreler 8 gün daha kültürlenmiştir ve CD34+CD45RA-'nin yüzdesi izlenmiştir. CD34+CD45RA- yüzdesindeki hafif bir azalma, etkisinin tersinir olduğunu belirten bileşik1 ykandığında gözlemlenmiştir.

Şekil 3: Flt3,SCF, ve TPO, bileşik 1 aracılı kök hücre genişlemesi için gereklidir. Mobilize periferik kan CD34(+) hücreleri, büyüme faktörlerinin (Flt3+SCF+TPO) varlığında veya yokluğunda 7 gün boyunca kültürlenmiştir. CD34+CD45RA- hücre sayım gözlenen etki için gereksinimlerini ortaya koyan büyüme faktörlerinin yokluğunda daha düşüktü.

Şekil 4: A) Bileşik 1, CD34+ mobilize periferik kan hücrelerinin farklılaşmasını azaltmaktadır. FACS analizi ile saptandığı üzere bileşik 1, DMSO ile tedavi edilmiş kontrol hücrelerine kıyasla CD34+ hücre popülasyonunu genişletebilmiştir. SR1, farklılaşmanın inhibisyonunun kombinasyon ile daha da önemli olduğunu ortaya koyan genişlemiş kültür hücresi CD34+'nın tutulması için bileşik1 ile sinerjize edilmiştir. B) Bileşik 1, CD34+ kordon kan hücrelerinin farklılaşmasını azaltmaktadır. C) Bileşik 40, CD34+ kordon kan hücrelerinin farklılaşmasını azaltmaktadır. D) Bileşik 40, CD34+ hücre farklılaşmasının supresyonu üzerinde doza bağlı bir etki göstermektedir.

Şekil 5: A) Bileşik 1, mobilize edilmiş periferik kan türevli CD34+ ve CD34+CD45RA hücre popülasyonları ex vivo olarak genişletmektedir. Toplam hücre sayımı, DMSO ve bileşik 1 ile tedavi edilmiş hücrelerde aynı olmasına rağmen, CD34+ popülasyonu, DMSO'ninkinin iki katından fazlaydı. Benzer şekilde, CD34+CD45RA- popülasyonu, bileşik 1 ile tedavi edilen gruba karşı DMSO'da üç kat daha fazlaydı. Bu gözlem, SR1 ile birlikte tedavi geliştirilmiştir. B) Bileşik 1, 7 günlük inkübasyon sırasında kordon kan türevli CD34+ ve CD34+CD45RA hücrelerinin genişlemesini artırmaktadır. B) Bileşik 1, 12 günlük inkübasyon sırasında kordon kan türevli CD34+ and CD34+CD45RA- hücrelerinin in vitro

genişlemesi üzerine pozitif etki uygulamaktadır

Şekil 6: CD34+ mPB hücreleri, vehikül (DMSO), SR1, bileşik 1 ve bileşik 1 ile SR1'in bir kombinasyonu varlığında on gün boyunca kültürlenmiştir. 50,000 ve 500,000 tedavi edilmiş hücrelerin sonucu, NSG farelerinde nakledilmiş ve insan hematopoetik aşılama için değerlendirilmesi için nakilden 13 hafta sonra kemik iliği analizi gerçekleştirilmiştir. Herhangi bir belirli hücre dozunda, Bileşik 1 ile tedavi edilen CD34+ mPB hücreleri, DMSO'ninkinden daha iyi aşılanmıştır. İlginç bir şekilde, BM'de insan CD45+ hücrelerinin yüzdesi, bireysel bileşiklere kıyasla kombinasyon (bileşik 1+SR1) ile tedavi edilen hücreleri alan NSG farelerinde en yüksekti.

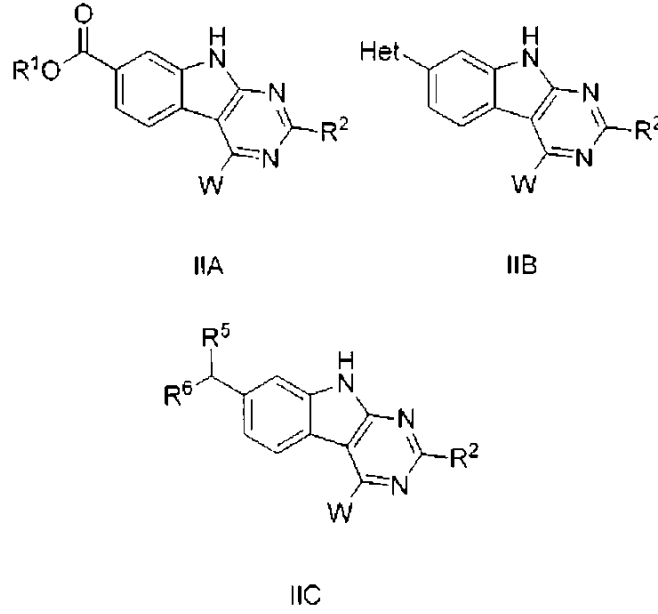
Şekil 7: A) Bileşik 1 genişletilmiş hücreler, NSG farelerinde insan hematopoietik hücrelerinin sulandırılmaktadır. Vehikül (DMSO), SR1, bileşik 1 ve kombinasyon ile tedavi edilmiş 5,000 CD34+CB Hücresinin sonucu, immün yetmezliği olan NSG farelerine nakledilmiştir. Nakilden 8- hafta sonra, kemik iliği analizi, DMSO hariç tüm tedavi gruplarında insan CD45+ aşılama göstermiştir. Kombinasyonla tedavi edilen hücreler (bileşik1+SR1) en yüksek aşılama seviyelerini göstermiştir. B) 12 günlük in vitro inkübasyon sırasında Bileşik 40, NSG fare kemik iliğini aşılama kapasitesine sahip insan hemopoietik hücrelerinin kaybını önlemektedir.

Şekil 8: Akış sitometrisi ile ölçülen kesikli besleme yaklaşımı kullanılarak biyoreaktörde primitif hücre fenotiplerinin (CD34+, CD34+CD90+, ve CD34+CD45RA+) genişlemesi. FB kontrolü = Bileşik 40 olmadan kesikli besleme, Cpd 40 = Bileşik 40 ile kesikli besleme.

BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

Buluş sahipleri bazı pirimido[4,5-b]indol türevlerini keşfetmiştir. Bu bileşikler, hematopoetik kök hücre popülasyonları, özellikle insan hematopoetik kök hücre popülasyonları genişletilmesi için faydalıdır. Bileşikler aynı zamanda, hematopoetik kök hücreleri kapsayan hastalar için medikal tedavisinde faydalıdır.

Bir yöne göre, buluş aşağıdaki genel formül IIA, IIB ve IIC'ye ait bileşikler sağlamaktadır



5 Yukarıdaki genel formül IIA, IIB ve IIC'deki ikameler, başka bir deyişle W, R¹, R² ve Het, aşağıda tanımlanan şekildedir.

Bir yöne göre, buluş, genel formül IIA, IIB veya IIC'ye ait bir bileşiği içeren farmasötik bileşimler sağlamaktadır.

10 Bir yöne göre buluş, hematopoetik kök hücrelerinin genişletilmesi için genel formül IIA, IIB veya IIC'ye ait bir bileşiğin kullanılması açıklamaktadır. Buluşun yapılandırımlarında, hematopoetik kök hücreler insan hücreleridir.

15 Bir yöne göre buluş, hematopoetik kök hücrelerin veya progenitör hücrelerin artırılmasında bir yöntem sağlamaktadır. Bu yöntem, genel formül IIA, IIB veya IIC'ye ait bir bileşik varlığında bir başlatma hücre popülasyonunun *in vitro* veya *ex vivo* kültürlenmesini içermektedir. Başlatma hücre popülasyonu, mobilize periferik kandan (mPB), kemik iliğinden (BM) veya göbek kordon kanından (UCB) hasat edilen CD34+ hücrelerini içermektedir. Dahası, buluşa göre yöntemin yapılandırımlarında, opsiyonel olarak, genel formül IIA, IIB

20 veya IIC'nin bir bileşiğinin varlığında başlatma hücre popülasyonunun kültürü, bir biyolojik veya başka bir küçük molekül olan en az bir hücre genişleme faktörü ile birlikte gerçekleştirilmektedir.

25 Bir yöne göre, buluş; buluşa ait yöntemle genişleyen bir hücre popülasyonunu, daha spesifik olarak, buluşa göre bir bileşiği kullanarak genişleyen bir hücre popülasyonunu

açıklandı. Yapılanlarda, buluş, buluşa ait yöntemle göre genişlemiş hematopoetik kök hücrelerini, daha spesifik olarak, buluşa göre bir bileşiği kullanarak genişlemiş hematopoetik kök hücrelerini açıklamaktadır.

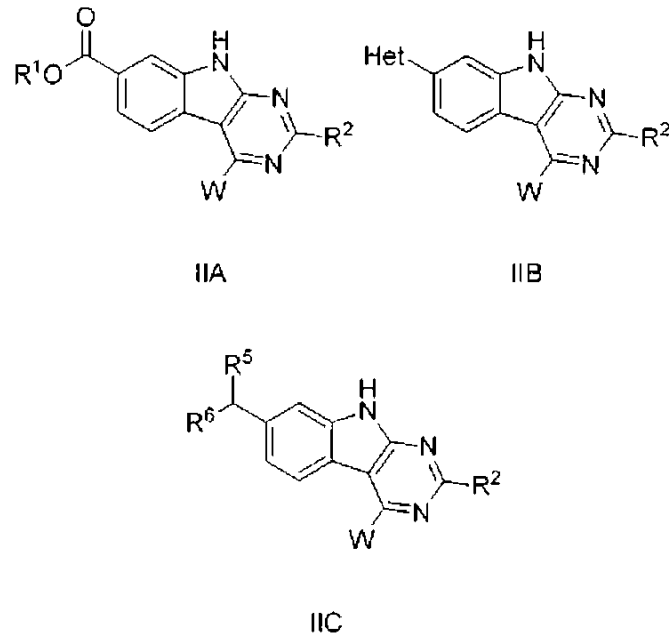
- 5 Bir yöne göre, buluş, bir süjede bir hematopoetik rahatsızlık/malignite, bir otoimmün hastalık ve/veya bir kalıtsal immüno yetmezliği hastalığının tedavisinde kullanıma yönelik genel formül IIA, IIB veya IIC'ye ait bir bileşik sağlamaktadır.

- 10 Buluşa ait yapılanlarda, hematopoetik rahatsızlık/malignite, otoimmün hastalığı ve/veya kalıtsal immün yetmezliği hastalığı, kemik iliği yetmezliği durumları, küresel olarak ilgili çeşitli konjenital hastalıklar (örneğin, orak hücre anemisi ve talasemi), lupus, akut miyeloid lösemi, akut lenfoblastik lösemi, kronik miyeloid lösemi, kronik lenfositik lösemi, miyeloproliferatif rahatsızlıklar, miyelodiplastik sendromlar, çoklu miyelom, Hodgkin dışı lenfoma, Hodgkin hastalığı, aplastik anemi, saf kök hücre aplazisi, Wiskott-Aldrich sendromu, doğuştan kusurlar metabolizması (Gaucher hastalığı gibi) içermektedir.

- 20 Bir yöne göre, buluş; kök veya progenitor hücrelerin arttırılmasında veya hematopoetik kök hücrelerinin genişlemesinde kullanıma yönelik bir kit sağlamaktadır, bu kit, genel formül IIA, IIB veya IIC'ye ait bir bileşiği ve kullanıma yönelik talimatları içermektedir. Buluşun yapılanlarında, kit; bir biyolojik olan veya başka bir küçük molekül olan en az bir hücre genişleme faktörünü içermektedir.

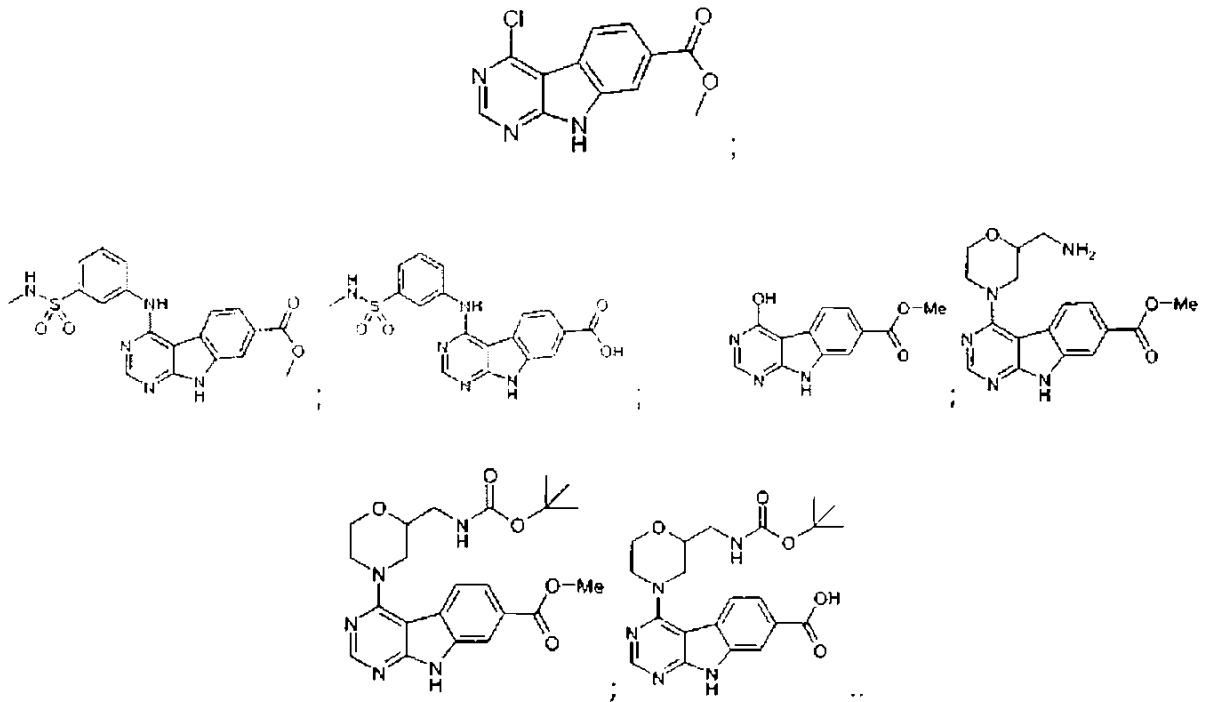
BULUŞUN AYRINTILI AÇIKLAMASI

- 25 Buluş sahipleri belirli pirimido[4,5-b]indol türevlerini keşfetmiştir. Bu bileşikler, hematopoetik kök hücre popülasyonları, özellikle insan hematopoetik kök hücre popülasyonları genişletilmesi için faydalıdır. Bileşikler aynı zamanda, hematopoetik kök hücreleri kapsayan hastalıkların medikal tedavisinde faydalıdır.
- 30 Buluşa göre bileşikler aşağıda gösterilen genel Formül IIA, IIB veya IIC'ye sahiptir. Bu tür bileşiklerin tuzları aynı zamanda buluşa göre bileşiklerin kapsamı dahilindedir.



Formüller IIA, IIB ve IIC'de, ikameler, formül IIA, formül IIB veya formül IIC'nin bundan farklı olması koşuluyla aşağıda özetlenen şekilde belirlenmektedir.

5



Daha spesifik olarak, W burada 74) $-(N(R^1)-L)_n - N(R^1)R^{1'}$ 'dir veya W burada 1) -H, 2) - halogen, 3) $-OR^1$, 4) $-L-OH$, 5) $-L-OR^1$, 6) $-SR^1$, 7) $-CN$, 8) $-P(O)(OR^1)(OR^1)$, 9) $-NHR^1$, 10) $-N(R^1)R^1$, 11) $-L-NH_2$, 12) $-L-NHR^1$, 13) $-L-N(R^1)R^1$, 14) $-L-SR^1$, 15) $-L-S(O)R^1$, 16) $-L-S(O)_2R^1$,

17) $-L-P(O)(OR^1)(OR^1)$, 18) $-C(O)OR^1$, 19) $-C(O)NH_2$, 20) $-C(O)NHR^1$, 21) $-C(O)N(R^1)R^1$, 22) $-NHC(O)R^1$, 23) $-NR^1C(O)R^1$, 24) $-NHC(O)OR^1$, 25) $-NR^1C(O)OR^1$, 26) $-OC(O)NH_2$, 27) $-OC(O)NHR^1$, 28) $-OC(O)N(R^1)R^1$, 29) $-OC(O)R^1$, 30) $-C(O)R^1$, 31) $-NHC(O)NH_2$, 32) $-NHC(O)NHR^1$, 33) $-NHC(O)N(R^1)R^1$, 34) $-NR^1C(O)NH_2$, 35) $-NR^1C(O)NHR^1$, 36) $-NR^1C(O)N(R^1)R^1$, 37) $-NHS(O)_2R^1$, 38) $-NR^1S(O)_2R^1$, 39) $-S(O)_2NH_2$, 40) $-S(O)_2NHR^1$, 41) $-S(O)_2N(R^1)R^1$, 42) $-S(O)R^1$, 43) $-S(O)_2R^1$, 44) $-OS(O)_2R^1$, 45) $-S(O)_2OR^1$, 46) -benzil olup 1, 2 veya 3 R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiştir, 47) -L-heteroaril ise L ve heteroaril gruplarından birisine veya her ikisine ekli olan bir veya birden fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiştir, 48) -L-heterosiklil ise L ve heteroaril gruplarından birisine veya her ikisine ekli olan bir veya birden fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiştir, 49) -L-aril ise L ve aril gruplarından birisine veya her ikisine ekli olan bir veya birden fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiştir, 50) $-L-NR^1(R^1)$, 51) $-L)_2 NR^1$, 52) $-L-(N(R^1)-L)_n - N(R^1)R^1$, 53) $-L-(N(R^1)-L)_n$ - heteroaril ise L ve heteroaril gruplarından birisine veya her ikisine ekli olan bir veya birden fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiştir, 54) $-L-(N(R^1)-L)_n$ - heterosiklil ise L ve heterosiklil gruplarından birisine veya her ikisine ekli olan bir veya birden fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiştir, 55) $-L-(N(R^1)-L)_n$ - aril ise L ve aril gruplarından birisine veya her ikisine ekli olan bir veya birden fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiştir, 56) $-O-L-N(R^1)R^1$, 57) -O-L- heteroaril ise L ve heteroaril gruplarından birisine veya her ikisine ekli olan bir veya birden fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiştir, 58) -O-L- heterosiklil ise L ve heterosiklil gruplarından birisine veya her ikisine ekli olan bir veya birden fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiştir, 59) -O-L- aril ise L ve aril gruplarından birisine veya her ikisine ekli olan bir veya birden fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiştir, 60) $-O-L)_2-NR^1$, 61) $-O-L-(N(R^1)-L)_n - N(R^1)R^1$, 62) $-O-L-(N(R^1)-L)_n$ - heteroaril ise L ve heteroaril gruplarından birisine veya her ikisine ekli olan bir veya birden fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiştir, 63) $-O-L-(N(R^1)-L)_n$ - heterosiklil ise L ve heterosiklil gruplarından birisine veya her ikisine ekli olan bir veya birden fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiştir, 64) $-O-L-(N(R^1)-L)_n$ - aril ise bir veya birden fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiştir, 65) -S-L- heteroaril ise bir veya birden fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiştir, 66) -S-L- heterosiklil ise bir veya birden fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiştir, 67) -S-L- aril ise L ve aril gruplarından birisine veya her ikisine ekli olan bir veya birden fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiştir, 68) $-S-L)_2 NR^1$, 69) $-S-L-(N(R^1)-L)_n - N(R^1)R^1$, 70) $-S-L-(N(R^1)-L)_n$ - heteroaril ise bir veya birden fazla R^A ikameleri

ile isteğe bağlanarak ikame edilmiştir, 71) $-S-L-(N(R^1)-L)_n$ - heterosiklil ise bir veya birden fazla R^A ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiştir, 72) $-S-L-(N(R^1)-L)_n$ - aril ise bir veya birden fazla R^A ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiştir, 73) $-NR^1(R^1)$, 75) $-N(R^1)L_2$ - NR^1 , 76) $-(N(R^1)-L)_n - N(R^1)R^A$, 77) $-(N(R^1)-L)_n$ - heteroaril ise bir veya birden fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiştir, 78) $-(N(R^1)-L)_n$ - heterosiklil ise bir veya birden fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiştir, 79) $-(N(R^1)-L)_n$ - aril ise bir veya birden fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiştir, 80) - heteroaril ise bir veya birden fazla R^A ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiştir, veya 81) -aril ise bir veya birden fazla R^A ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiştir. Bu listede, her bir ikame isteğe bağlanarak, eğer halihazırda mevcut değilse, L grubuna eklenebilir; ve iki R^1 ikamesi aynı nitrojen atomunda mevcutsa her bir R^1 ikamesi bu aşamadan sonra açılacak olan R^1 değerleri listesinden bağlanarak seçilir; ve n burada 0, 1, 2, 3, 4, veya 5'ten birine eşdeğer olan bir tam sayıdır ve (R^1) ve R^1 bir nitrojen atomuna eklendiklerinde, isteğe bağlanarak 3 ila 7-üyelik halka oluşturmak için nitrojen atomuyla birleşirler ve bu, N, O ve S'den seçilmiş bir veya birden fazla heteroatomu isteğe bağlanarak içerir, isteğe bağlanarak halka bir veya birden fazla R^1 veya R^A ile ikame edilmiştir.

L burada: 1) $-C_{1-6}$ alkil, veya 4) $-C_{3-7}$ sikloalkil, veya L is 2) $-C_{2-6}$ alkenil, 3) $-C_{2-6}$ alkinil, 5) $-C_{3-7}$ sikloalkenil, 6) heterosiklil, 7) $-C_{1-6}$ alkil- C_{3-7} sikloalkil, 8) $-C_{1-6}$ alkil-heterosiklil, 9) aril, veya 10) heteroarildir. Bu listede, alkil, alkenil, alkinil, sikloalkil, sikloalkenil, heterosiklil, aril ve heteroaril grupları her biri bağlanarak bir veya iki R^A ikamesi ile ikame edilmiştir.

R^1 burada: 1) $-H$, 2) $-C_{1-6}$ alkil, 3) $-C_{2-6}$ alkenil, 4) $-C_{2-6}$ alkinil, 5) $-C_{3-7}$ sikloalkil, 6) $-C_{3-7}$ sikloalkenil, 7) $-C_{1-5}$ perflorinatlı, 8) -heterosiklil, 9) -aril, 10) -heteroaril, 11) -benzil, veya 12) 5-[(3aS,4S,6aR)-2-oksoheksahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il]pentanoil'dir. Bu listede, alkil, alkenil, alkinil, sikloalkenil, perflorinatlı alkil, heterosiklil, aril, heteroaril ve benzil grupları her biri isteğe bağlanarak 1, 2 veya 3 R^A veya R^1 ikameleri ile ikame edilmiştir.

R^2 burada: 7) -benzil olup isteğe bağlanarak 1, 2 veya 3 R^A veya R^1 ikameleri ile ikame edilmiştir veya 1) $-H$, veya R^2 burada: 2) $-C_{1-6}$ alkil, 3) $-SR^1$, 4) $-C(O)R^1$, 5) $-S(O)R^1$, 6) $-S(O)_2R^1$ 'dir, 8) -L-heteroaril ise L ve heteroaril gruplarından birisine veya her ikisine ekli olan bir veya birden fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiştir, 9) -L-heterosiklil ise L ve heterosiklil gruplarından birisine veya her ikisine ekli olan bir veya birden fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiştir, 10) -L-aril ise L ve aril

gruplardan birisine veya her ikisine ekli olan bir veya birden fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiştir, 11) -heteroaril optionally se bir veya birden fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiştir, veya 12) -aril se bir veya birden fazla R^A veya R^1 ikameleri ile isteğe bağlanarak ikame edilmiştir. Bu listede, her bir ikame eğer
5 halihazırda mevcut değilse isteğe bağlanarak L grubuna eklidir.

R^A burada: 1) -halojen, 2) $-CF_3$, 3) $-OH$, 4) $-OR^1$, 5) $-L-OH$, 6) $-L-OR^1$, 7) $-OCF_3$, 8) $-SH$, 9) $-SR^1$, 10) $-CN$, 11) $-NO_2$, 12) $-NH_2$, 13) $-NHR^1$, 14) $-NR^1R^1$, 15) $-L-NH_2$, 16) $-L-NHR^1$, 17) $-L-NR^1R^1$, 18) $-L-SR^1$, 19) $-L-S(O)R^1$, 20) $-L-S(O)_2R^1$, 21) $-C(O)OH$, 22) $-C(O)OR^1$, 23) $-C(O)NH_2$,
10 24) $-C(O)NHR^1$, 25) $-C(O)N(R^1)R^1$, 26) $-NHC(O)R^1$, 27) $-NR^1C(O)R^1$, 28) $-NHC(O)OR^1$, 29) $-NR^1C(O)OR^1$, 30) $-OC(O)NH_2$, 31) $-OC(O)NHR^1$, 32) $-OC(O)N(R^1)R^1$, 33) $-OC(O)R^1$, 34) $-C(O)R^1$, 35) $-NHC(O)NH_2$, 36) $-NHC(O)NHR^1$, 37) $-NHC(O)N(R^1)R^1$, 38) $-NR^1C(O)NH_2$, 39) $-NR^1C(O)NHR^1$, 40) $-NR^1C(O)N(R^1)R^1$, 41) $-NHS(O)_2R^1$, 42) $-NR^1S(O)_2R^1$, 43) $-S(O)_2NH_2$, 44) $-S(O)_2NHR^1$, 45) $-S(O)_2N(R^1)R^1$, 46) $-S(O)R^1$, 47) $-S(O)_2R^1$, 48) $-OS(O)_2R^1$, 49) $-S(O)_2OR^1$, 50)
15 -benzil, 51) $-N_3$, veya 52) $-C(-N=N-)(CF_3)$ 'tür. Bu listede, benzil grupları isteğe bağlanarak 1, 2 veya 3 R^A veya R^1 ikameleri ile ikame edilmiştir.

Yukarıdaki genel formül IIB'nin bileşiklerinde, Het, isteğe bağlanarak yukarıda belirlenen şekilde bir veya daha fazla R^1 veya R^A ile ikame edilen, 3 ila 7-üyel heterosiklidir.

Yukarıdaki genel formül IIC'nin bileşiklerinde, R^5 ve R^6 , aynı veya farklı ve her biri yukarıda belirlenen şekilde bağlanarak L'dir veya bunlar, isteğe bağlanarak N, O ve S'den seçilen bir veya daha fazla heteroatomu kapsayan bir 5-üyel halkanın oluşturulması için C ile bir araya gelmektedir ve isteğe bağlanarak halka bir veya daha fazla R^1 veya R^A ile ikame
25 edilmektedir. Diğer yapılandırmalarda, halka, 5-üyel halkadır ve heteroatom bir nitorjen atomudur. Yine başka yapılandırmalarda, halka dört nitrojen atomunu kapsamaktadır. Yine başka yapılandırmalarda, R^2 benzildir.

Buluşun yapılandırmalarında, buluşa ait bileşikler, burada aşağıda Tablo 1'de tasvir edilen bileşikler No. 1 ila 55'tir. Bu tür bileşiklerin tuzları aynı zamanda buluşa göre bileşiklerin kapsamı dahilindedir.

Buluşun diğer yapılandırmalarında, bileşikler aşağıda Tablo 1'de tasvir edilen formüllere sahiptir. Bu tür bileşiklerin tuzları aynı zamanda buluşa göre bileşiklerin kapsamı dahilindedir.

Tanımlar:

Aksi belirtilmedikçe, aşağıdaki tanımlar geçerlidir:

- 5 "Bir" ve "bu" gibi tekil formlar, metin açıkça aksini belirtmedikçe ilgili çoğul atıfları içermektedir.

10 Burada kullanıldığı haliyle, "içeren" teriminin, "içeren" kelimesinden sonra gelen elemanlar listesinde gerekli veya zorunlu olduğunu, ancak diğer elemanlar opsiyonel olduğu ve mevcut olabileceği veya olmayabileceği anlamına gelmesi amaçlanmaktadır

15 Burada kullanıldığı haliyle, "-den oluşan" teriminin, "-den oluşan" ifadesinden sonra gelenleri kapsamaması ve bunlarla sınırlı kalmaması anlamına gelmesi amaçlanmaktadır. Dolayısıyla "-den oluşan" ifadesi, listelenen elemanlar gerekli veya zorunlu olduğunu ve başka hiçbir eleman bulunmadığını belirtmektedir.

20 Burada kullanıldığı haliyle, "alkil" teriminin, belirli sayıda karbon atomuna sahip olan hem dallı hem de düz zincirli doymuş alifatik hidrokarbon gruplarını kapsamaması amaçlanmaktadır. Örneğin, C₁-C₆ alkildeki C₁-C₆ bir lineer veya dallı doymuş düzenlemede 1, 2, 3, 4, 5 veya 6 karbona sahip olan grupları kapsayan olarak belirlenmektedir. Yukarıda belirlendiği gibi C₁-C₆ alkil örnekleri, bunlarla sınırlı olmamak üzere, metil, etil, n-propil, i-propil, n-bütil, t-bütil, i-bütil, pentil ve heksil içermektedir.

25 Burada kullanıldığı haliyle, "sikloalkil" teriminin, burada belirlenen sayıda karbon atomuna sahip olan bir monosiklik doymuş alifatik hidrokarbon grubunu ifade etmesi amaçlanmaktadır. Örneğin, C₃-C₇ sikloalkilde C₃-C₇ bir monosiklik doymuş düzenlemede 3, 4, 5, 6 veya 7 karbona sahip olan grupları kapsayan olarak belirlenmektedir. Yukarıda belirlendiği gibi C₃-C₇ sikloalkil örnekleri,, bunlarla sınırlı olmamak üzere, siklopropil, siklobütil, siklopentil, sikloheksil ve sikloheptil kapsamaktadır

30 Burada kullanıldığı haliyle, "alkenil" teriminin, burada belirlenen sayıda karbon atomuna sahip olan ve karbon atomlarından en az ikisinin, bir çift bağ ile birbirlerine bağlandığı ve ya E ya da Z rejyokimya ve bunların kombinasyonlarına sahip olan doymamış düz veya dallı zinciri ifade etmesi amaçlanmaktadır. Örneğin, C₂-C₆ alkenil içindeki C₂-C₆, lineer veya dallı bir düzenlemede 2, 3, 4, 5 veya 6 karbona sahip gruplar dahil olmak üzere

35

belirlenmektedir, karbon atomlarından en az ikisi bir çift bağ ile bağlanmaktadır. C_2-C_6 alkenilin örnekler, bunlarla sınırlanmamak üzere, etenil (vinil), 1-propenil, 2-propenil, 1-bütenil ve benzerini kapsamaktadır.

- 5 Burada kullanılanla, "alkinil" teriminin, burada belirlenen sayıda karbon atomuna sahip olan ve en az iki karbon atomunun bir üçlü bağ ile birbirlerine bağlandığı doymamış, düz zincirli hidrokarbon gruplarını ifade etmesi amaçlanmaktadır. Örneğin, C_2-C_4 alkinil, bir zincirde 2, 3 veya 4 karbon atomuna sahip olan gruplar dahil olmak üzere belirlenmektedir, karbon atomlarından en az ikisi bir üçlü bağ ile birbirlerine bağlanmaktadır. Bu tür alkinilin örnekleri, bunlarla sınırlanmamak üzere, etenil, 1-propinil, 2-propinil ve benzerini kapsamaktadır.

- 15 Burada kullanılanla, "sikloalkenil" teriminin, burada belirli sayıda karbon atomuna sahip olan monosiklik doymuş alifatik hidrokarbon grubunu kapsamaması amaçlanmaktadır. Örneğin, C_3-C_7 sikloalkenil C_3-C_7 bir monosiklik düzenlemede 3, 4, 5, 6, veya 7 karbona sahip olan grupları kapsayan olarak belirlenmektedir. Yukarıda belirlenen şekilde C_3-C_7 sikloalkenilin örnekleri, bunlarla sınırlanamamak üzere, siklopentenil, sikloheksenil ve benzerini kapsamaktadır.

- 20 "Halo" veya "halojen" teriminin, burada kullanılanla, florin, klor, bromür veya iyodu ifade etmesi amaçlanmaktadır.

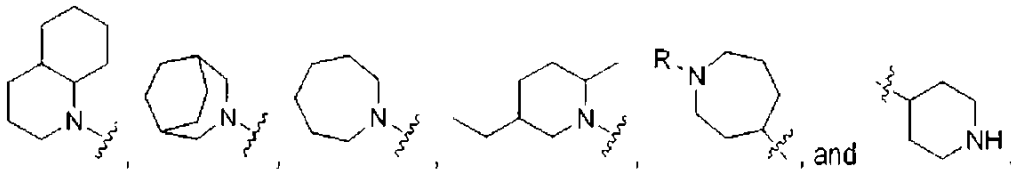
- 25 Burada kullanılanla, "haloalkil" teriminin, her bir hidrojen atomunun sınırlanarak bir halojen atomu ile değiştirilebildiği bir alkil ifade etmesi amaçlanmaktadır. Haloalkilin örnekleri, bunlarla sınırlanmamak üzere, CH_2F , CHF_2 ve CF_3 'ü kapsamaktadır.

- 30 Burada kullanılanla, "aril" terimi, ya tek başına ya da başka bir radikal ile kombinasyon halinde, aromatik, doymuş veya doymamış olabilen bir ikinci 5- veya 6-üyelik karboksilik gruba ayrılmaya kaynaştırılabilen 6 karbon atomunu barındıran bir karboksilik aromatik monosiklik gruba anlamına gelmektedir. Aril örnekleri, bunlarla sınırlanmamak üzere, fenil, indanil, 1-naftil, 2-naftil, tetrahidronaftil ve benzerini kapsamaktadır. Aril, sikloalkil halkası veya aromatik halka üzerinde uygun bir konumda başka bir gruba bağlanabilmektedir.

- 35 Burada kullanılanla, "heteroaril" terimi, en fazla 10 atoma sahip bir monosiklik veya

bisiklik halka sistemini ifade etmektedir, burada en az bir halka aromattir ve, O, N ve S'den oluşan gruptan seçilen 1 ila 4 hetero atomunu barındırmaktadır. Heteroaril, bir halka karbon atomu veya heteroatomlardan biri aracılığıyla bağlanabilmektedir. Heteroaril örnekleri arasında (ki sadece bunlarla sınırlı değildir) şunlar yer alır: tiyenil, benzimidazolil, benzo[b]tiyenil, furil, benzofuranil, piranil, iso-benzofuranil, kromenil, ksantenil, 2H-pirrolil, pirrolil, imidazolil, pirazolil, piridil, pirazinil, pirimidinil, piridazinil, indolizinil, isoindolil, 3H-indolil, indolil, indazolil, purinil, 4H-kuinolinil, isokuinolinil, kuinolil, fitalazinil, naptiridinil, kuinoksalinil, kuinazolinil, sinolinil, pteridinil, isotiyazolil, isokromanil, kromanil, isoksazolil, furazanil, indolinil, isoindolinil, tiyazolo[4,5-b]-piridin, tetrazolil, oksadiazolil, tiyadiazolil, tiyenil ve florozin türevleri.

Burada kullanılan gibi, "heterosikl," "heterosiklik" veya "heterosiklik" teriminin anlamı şunu ifade etmek ister: 3, 4, 5, 6, veya 7 üyeli aromatik olmayan halka sistemi olup O, N ve S'den oluşan gruptan seçilmiş 1 ila 4 heteroatom içermektedir. Heterosiklik örnekleri arasında (ki sadece bunlarla sınırlı değildir) pirrolidinil, tetrahidrofuranil, piperidil, 3,5-dimetilpiperidil, pirrolinil, piperazinil, imidazolidinil, morfolinil, imidazolinil, pirazolidinil, pirazolinil, ve benzerleri yer alır ve burada bu aşamadan sonra açıklanacak olan halkayla olan bağlantıya nitrojen atomunda ya da karbon atomunda yer alır.



Burada kullanılan haliyle, "isteğe bağlı olarak bir veya daha fazla ikame ile ikame edilen" teriminin ve "isteğe bağlı olarak en az bir ikame ile ikame edilen" bunun eşdeğer teriminin, sonrasında açıklanan durumların oluşabileceği veya oluşamayacağı ve açıklanan durumun veya olayın meydana geldiği örnekleri ve olmadıkları örnekleri kapsadığını ifade edilmesi amaçlanmaktadır. Tanımla, sınırlı beş ikameyi ifade etmesi amaçlanmaktadır.

Burada kullanılan haliyle, "süje" veya "hasta" teriminin, insanlar ve primatlar, kediler, köpekler, domuzlar, sığırlar, koyunlar, keçiler, atlar, tavşanlar, fareler, fareler ve benzerleri gibi insan olmayan memelileri ifade etmesi amaçlanmaktadır.

Eğer ikame edicilerin kendileri burada açılan sentetik yöntemlerle bağdaşmazsa, ikame maddesi bu yöntemlerde kullanılan tepkime koşullarına stabil olan uygun bir koruyucu grupta (PG) korunabilmektedir. Koruyucu grup, arzu edilen bir ara ya da hedef bileşiğinin sağlanması için yöntemin tepkime sırasındaki uygun bir noktada giderilebilmektedir. Uygun koruyucu gruplar ve bu tür uygun koruyucu gruplar kullanılarak farklı ikamelerinin korunması veya korumasının kaldırılması yönelik yöntemler teknikte uzman kişilerce bilinmektedir; bunun örnekleri, T. Greene and P. Wuts, "Protecting Groups in Chemical Synthesis" (4'üncü baskı) John Wiley & Sons, NY (2007) eserinde bulunabilmektedir. Doküman boyunca kullanılan koruyucu grupların örnekleri, bunlarla sınırlanmamak üzere, Fmoc, Bn, Boc, CBz ve COCF₃'ü kapsamaktadır. Bazı durumlarda, bir ikame, burada açılan yöntemlerde kullanılan tepkime koşulları altında reaktif olacak şekilde özel olarak seçilebilmektedir. Bu koşullar altında, tepkime koşulları seçilen ikameyi, burada açılan yöntemlerde bir ara bileşikte faydalanan veya bir hedef bileşik içerisinde arzu edilen bir ikame olan başka bir ikameye dönüştürmektedir,

Burada kullanılanla, "farmasötik olarak kabul edilebilir tuz" teriminin, hem asit hem de baz ilaveli tuzları ifade etmesi amaçlanmaktadır.

Burada kullanılanla, "farmasötik olarak kabul edilebilir asit ilaveli tuz" teriminin; serbest bazların etkisini ve özelliklerini tutan, biyolojik olarak olmayan veya aksi halde arzu edilmeyen ve hidroklorik asit, hidrobromik asit, sülfürik asit, nitrik asit, fosforik asit, ve benzeri gibi inorganik asitleri ve asetik asit, trifloroasetik asit, propiyonik asit, glikolik asit, piruvik asit, oksalik asit, maleik asit, malonik asit, süksinik asit, fumarik asit, tartarik asit, sitrik asit, benzoik asit, sinamik asit, mandelik asit, metansülfonik asit, etansülfoni asit, p-toluensülfonik asit, salisilik asit, ve benzeri gibi organik asitler ile oluşturulan bu tuzları ifade etmesi amaçlanmaktadır.

Burada kullanılanla, "farmasötik olarak kabul edilebilir tuz" teriminin, serbest asitlerin biyolojik etkisini ve özelliklerini tutan ve biyolojik olarak olmayan veya aksi halde arzu edilmeyen bu tuzları ifade etmesi amaçlanmaktadır. Bu tuzlar, serbest aside inorganik bir baz veya organik bir baz ilavesi ile hazırlanmaktadır. İnorganik bazlardan türetilen tuzlar, bunlarla sınırlanmamak üzere, sodyum, potasyum, lityum, amonyum, kalsiyum, magnezyum, demir, çinko, bakır, manganez, alüminyum tuzları ve benzerini kapsamaktadır. Organik bazlardan türetilen tuzlar; bunlarla sınırlanmamak üzere, doğal olarak oluşan ikameli aminler, siklik

aminler ve izopropilamin, trimetilamin, dietilamin, trietilamin, tripropilamin, etanolamin, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, disikloheksilamin, lizin, arjinin, histidin, kafein, prokain, hidrobamin, kolin, betain, etilendiamin, glukozamin, metilglukoamin, tebromür, purinler, piperazin, piperidin, N-etilpiperidin, poliamin reçinleri ve benzeri gibi bazik iyon değişim reçinlerini kapsayan ikameli aminleri, birincil, ikincil ve üçüncül aminlerin tuzları kapsamaktadır

Buluşa göre bileşikler veya bunların farmasötik olarak kabul edilebilir tuzları bir veya daha fazla asimetric merkezleri, kiral eksenleri, ve kiral düzlemleri barındırmaktadır ve bu yüzden, enantiyomerlere, diaesteromerlere ve diğer stereoizomerik formlara yol açabilmektedir ve amino asitler için (R)- veya (S)- veya, (D)- veya (L)-gibi mutlak stereokimya bakımından belirlenebilmektedir, Mevcut buluşun, bu tür olası izomerlerin tümünün yanı sıra bunların rasemik ve optik olarak saf formları kapsamaması amaçlanmaktadır Optik olarak aktif (+) ve (-), (R)- ve (S)-, veya (D)- ve (L)-izomerler, kiral sintonlar veya kiral reaktifler kullanılarak hazırlanabilmektedir veya ters fazlı HPLC gibi geleneksel teknikler kullanılarak çözülebilmektedir. Rasemik karışımlar hazırlanabilmektedir ve sonrasında ayrı ayrı optik izomerlere ayrılabilir veya bu optik izomerler, kiral sentez ile hazırlanabilmektedir. Enantiyomerler, teknikte uzman kişilerce bilinen yöntemlerle, örneğin sonrasında kristalleştirmeye, gaz-sıvı veya sıvı-kromatografisiyle, bir enantiyomerin bir enantiyomer spesifik reaktif ile seçici tepkimesiyle ayrılabilen diastereoizomerik tuzların oluşturulmasıyla çözülebilmektedir. Teknikte uzman kişilerce, arzu edilen enantiyomerin, bir ayırma tekniği ile başka bir kimyasal oluşuma dönüştürülmesi durumunda, arzu edilen enantiyomerik formun oluşturulması için ilave bir adım gerekli olduğu takdir edilecektir. Alternatif olarak spesifik enantiyomerler, optik olarak aktif reaktifler, substratlar, katalizörler veya çözücüler kullanılarak asimetric sentez ile veya bir enantiyomeri asimetric transformasyonla dönüştürerek sentezlenebilmektedir.

Buluşa göre belirli bileşikler bir epimerler karışımı halinde mevcut olabilmektedir. Epimerler, ilgili bileşikte mevcut olan iki veya daha fazla stereojenik merkezden sadece birinde ters konfigürasyona sahip diastereoizomerler anlamına gelmektedir.

Buluşa göre bileşikler, Zwitteriyonik formda mevcut olabilmektedir ve mevcut buluş, bu bileşiklerin Zwitteriyonik formları ve bunların karışımları kapsamaktadır

Ek olarak, buluşa göre olan bileşikler ayrıca sulu ve susuz formlarda da bulunabilmektedir.

Burada açılan formüllerden herhangi birine ait bileşiğin hidratları dahil edilmektedir. Başka bir yapılandırılarda, burada açılan formüllerin herhangi birine göre bileşik bir monohidrat Buluşun yapılandırılmalarında, burada açılan bileşikler yaklaşık %10 veya daha az, yaklaşık %9 veya daha az, yaklaşık %8 veya daha az, yaklaşık %7 veya daha az, yaklaşık %6 veya daha az, yaklaşık %5 veya daha az, yaklaşık %4 veya daha az, yaklaşık %3 veya daha az, yaklaşık %2 veya daha az, yaklaşık %1 veya daha az, yaklaşık %0.5 veya daha az, yaklaşık %0.1 veya daha az su içermektedir. Diğer yapılandırmalarda, burada açılan bileşikler, ağda yaklaşık %0.1 veya daha fazla, yaklaşık %0.5 veya daha fazla, yaklaşık %1 veya daha fazla, yaklaşık %2 veya daha fazla, yaklaşık %3 veya daha fazla, yaklaşık %4 veya daha fazla, yaklaşık %5 veya daha fazla veya yaklaşık %6 veya daha fazla su içermektedir.

Burada kullanıldığı haliyle, "EC₅₀" teriminin vehikül kültürlerine (DMSO) karşı CD34+CD45RA- hücre sayısında %50 oranında bir artış ile sonuçlanan konsantrasyonu ifade etmesi amaçlanmaktadır

Burada kullanıldığı haliyle, "hematopoetik kök hücreleri" veya "HSCler" teriminin, bunlar, granüositler (örneğin, promiyelositler, nötrofiller, eosinofiller, bazofiller) eritrositler (örneğin, retikülositler, eritrositler), trombositler (örneğin, megakaryoblastlar, trombosit üreten megakaryositler, trombositler) ve monositler (örneğin, monositler, makrofajlar) gibi fonksiyonel olgun hücrelere farklılaşmasında olanak sağlayan hem çoklu yetiye hem de çoklu yetilerini (kendi kendini yenileme) muhafaza ederken yenilenme kapasitesine sahip olan hücreleri ifade etmesi amaçlanmaktadır

HSCler başlatma hücre popülasyonunun bir parçasıdır. Bu hücreler isteğe bağlı olarak hematopoetik kaynaklı hücreleri içeren vücuttan veya vücudun bir organından elde edilmektedir. Bu tür kaynaklar fraksiyone olmayan kemik iliği, göbek kordonu, periferik kan, karaciğer, timus, lenf ve dalaktır. Yukarıda bahsedilen ham veya fraksiyone edilmemiş kan ürünlerinin tümü, hematopoetik kök hücre özelliklerine sahip hücreler için, teknolojiye uzman kişilerce bilinen şekillerde zenginleştirilebilmektedir.

Burada kullanıldığı haliyle "başlatma hücre popülasyonu" terimi, teknikte bilindiği gibi yukarıda belirtilen çeşitli kaynaklardan birinden toplanan HSCleri içeren bir hücre popülasyonunun belirlenmesi anlamına gelmektedir. Başlatma hücre popülasyonu, hücre yüzey markörü CD34+'nın varlığına dayanarak seçilen bir hücre popülasyonunu ifade eden CD34+

hücrelerinde zenginleştirilebilmektedir. CD34+ hücreleri, örneğin akış sitometrisi ve floresan olarak etiketli anti-CD34 antikörleri kullanılarak tespit edilebilmektedir ve sayılabilmektedir. Dahası, başlatma hücre popülasyonu doğrudan genişleme için kullanılabilmektedir veya sonraki bir zamanda kullanılmak üzere dondurulabilmektedir ve depolanabilmektedir.

5

Hematopoez sırasında, HSCler önce progenitör aşamada, miyeloid soyuna ve lenfoid soyuna bölünmektedir, sonrasında sırasıyla miyeloid kök hücrelere (karışık koloni oluşturan hücreler, CFU-GEMM) ve lenfoid kök hücrelere farklılaşmaktadır. Ayrıca, miyeloid kök hücreleri; eritroid patlama oluşturan hücreler (BFU-E) ve eritroid koloni oluşturan hücreler (CFU-E) aracılığıyla eritrositlere, megakaryosit koloni oluşturan hücreler (CFU-MEG) aracılığıyla trombositlere, 10 granülosit-makrofaj koloni oluşturan hücreler (CFU-GM) aracılığıyla monositlere, nötrofillere, ve bazofillere ve eünofil koloni oluşturan hücreler (CFU-Eo) aracılığıyla eosinofillere farklılaşırken lenfoid kök hücreler, T lenfoid progenitör hücreleri aracılığıyla T hücrelerine ve B lenfoid progenitör hücreleri aracılığıyla B hücrelerine farklılaşmaktadır. Bu miyeloid kök 15 hücreler ve bunlardan türetilmiş çeşitli hematopoetik progenitör hücreler, yumuşak agar, yarı katı metilselülozlu ortam veya benzerlerinde çeşitli sitokinlerin varlığında oluşturdukları kolonilerin özellikleri ile tanımlanmaktadır.

Mevcut buluş ayrıca, buluşa göre ve burada açıklanan şekilde bir bileşiğin veya bunun bir 20 tuzunun şu rahatsızlıkların sınıflayıcı olmayan listesinden muzdarip olan bir süjenin (veya hastanın) tedavisine yönelik bir ilacın preparasyonunda kullanılmak kapsamaktadır yukarıda bahsedilen rahatsızlıklardan veya oto-immün rahatsızlıklardan muzdarip olan bir süjenin (veya hasta) otolog veya allojenik nakli veya tedavisi. Hematolojik maligniteler/rahatsızlıklar ve konjenital hastalıkların örnekleri sınıflama olmadan akut miyeloid lösemi, akut lenfoblastik 25 lösemi, kronik miyeloid lösemi, kronik lenfositik lösemi, miyeloproliferatif rahatsızlıklar, miyelodiplastik sendromlar, çoklu miyelom, Hodgkin dışı lenfoma, Hodgkin hastalığı, aplastik anemi, saf kırmızı hücre aplazisi, Wiskott-Aldrich sendromu, doğuştan kusurlar metabolizması (Gaucher hastalığı gibi) kapsayabilmektedir. Nakilden faydalanabilen immünolojik rahatsızlıkların örnekleri çok fazladır ve çoklu skleroz, lupus, belirli formlar ve 30 arterit, şiddetli birleştirilmiş immüno yetmezlikleri ve benzerini kapsamaktadır.

Dolayısıyla, mevcut buluş, yukarıda belirtilen rahatsızlıkların/malignitelerin herhangi birine sahip bir hastaya, buluşa uygun bir bileşik kullanılarak genişletilen HSC'lerin uygulanmasını kapsamaktadır.

35

Ayrıca yukarıda açıklandığı üzere bileşikler ve bileşimler şu şekilde olmayan ortamlarda kullanıma yöneliktir: yukarıda bahsedilen rahatsızlıklardan veya oto-immün rahatsızlıklardan muzdarip olan bir süjenin (veya hasta) otolog veya allojenik nakli veya tedavisi. Hematolojik maligniteler/rahatsızlıklar ve konjenital hastalıkların örnekleri sınırlama olmadan akut miyeloid lösemi, akut lenfoblastik lösemi, kronik miyeloid lösemi, kronik lenfositik lösemi, miyeloproliferatif rahatsızlıklar, miyelodiplastik sendromlar, çoklu miyelom, Hodgkin dışı lenfoma, Hodgkin hastalığı, aplastik anemi, saf kömür hücre aplazisi, Wiskott-Aldrich sendromu, doğuştan kusurlar metabolizmasında (Gaucher hastalığı gibi) kapsayabilmektedir. Nakilden faydalanabilen immünolojik rahatsızlıkların örnekleri çok fazladır ve çoklu skleroz, lupus, belirli formlar ve arterit, şiddetli birleştirilmiş immüno yetmezlikleri ve benzerini kapsamaktadır.

Dolayısıyla, mevcut buluş, yukarıda bahsedilen rahatsızlıkların/malignitelerin herhangi birine maruz kalan bir hastaya, buluşa uygun bir bileşik kullanılarak genişletilen HSCLerin uygulanmasını kapsamaktadır.

Mevcut buluşta ayrıca açıklanan aynı zamanda, buluşa uygun ve burada açıklanan yöntemi kullanarak genişlemeden sonra elde edilen bir hücre popülasyonudur. Mevcut buluşun yöntemini kullanarak hücre genişlemesi, örneğin nötrofil veya trombosit aşılma hızlandırma süresinde yardımcı olan progenitör hücrelerin sayısında bir artışa yol açabilmektedir. Bu tür yöntem şunları içermektedir: HSCLerin sayısını arttırabilen bir ajan ile HSCLerden oluşan bir başlatma popülasyonunun kültürlenmesi. Başlatma popülasyonu, ilgili hücre yüzeyi marköründe veya bunların bir kombinasyonunda zenginleştirilebilmektedir (örneğin, CD34+, CD34+CD45RA+/-)

HSCLerin genişletilmesine yönelik yöntemler

Bu yüzden buluş, hematopoetik kök hücrelerinin genişletilmesine yönelik bir yöntem ile ilgili olup, (a) hematopoetik kök hücreleri içeren bir başlatma hücresi popülasyonunun sağlanması ve (b) hematopoetik kök hücrelerinin genişlemesi için uygun koşullar altında söz konusu başlatma hücresi popülasyonunun ex vivo olarak kültürlenmesini içermektedir.

Bu yüzden buluş, hematopoetik kök hücrelerinin genişletilmesine yönelik bir yöntem ile ilgili olup, (a) hematopoetik kök hücreleri içeren bir başlatma hücresi popülasyonunun sağlanması ve (b) hematopoetik kök hücrelerinin genişlemesi için uygun koşullar altında söz konusu

başlatma hücresi popülasyonunun ex vivo olarak kültürlenmesini içermektedir.

5 Spesifik bir yapılandırılmada, hematopoetik kök hücrelerinin genişletilmesine yönelik söz konusu yöntem olup, (a) hematopoetik kök hücreleri içeren bir başlatma hücresi popülasyonunun sağlanması ve (b) mevcut buluşa ait bileşiğin veya bileşimin varlığında söz konusu başlatma hücresi popülasyonunun ex vivo olarak kültürlenmesini içermektedir.

10 Hücre popülasyonu ilk olarak, başlatma hücre popülasyonunun sağlanması için spesifik hücresel markörlere dayanarak negatif ve/veya pozitif hücre seçimi dahil olmak üzere zenginleştirme veya saflaştırma adımlarına tabi tutulabilmektedir. Spesifik hücresel markörlere dayanarak söz konusu başlatma hücre popülasyonunu izole etme yöntemleri, spesifik hücre yüzeyi markörleri ile etkileşime giren antikörler veya ligandlar bağlağı sitometrisi veya katı veya çözünmez substrat olarak da adlandırılan floresan aktif hücre ayırma (FACS) teknolojisini kullanabilmektedir. Örneğin hücreler, antikörler içeren katı bir substrat
15 (örneğin boncuk kolonlar, balonlar, manyetik partiküller) ile temas ettirilebilmektedir ve herhangi bir bağlanmamış hücrel giderilebilmektedir. Manyetik veya paramanyetik boncuklar içeren katı bir substrat kullanıldığında, boncuklara bağlı hücreler, bir manyetik ayırma ile kolayca izole edilebilmektedir.

20 Bir yapılandırılmada, söz konusu başlatma hücre popülasyonu, CD34+ hücrelerinde zenginleştirilmektedir. CD34+ hücrelerinde kan hücresi popülasyonunun zenginleştirilmesine yönelik yöntemler arasında Miltenyi Biotec (CD34+ direct isolation kit, Miltenyi Biotec, Bergisch, Gladbach, Almanya) tarafından veya Baxter (Isolex 3000) tarafından piyasada satılan kitleir kapsamaktadır.

25 Tek bir doğumdan elde edilen kordon kanı miktarı bir yetişkinin veya daha büyük bir çocuğun tedavisi için genellikle yetersizdir. Buluşa ait bileşiği veya bileşimi kullanan genişleme yönteminin bir avantajı yalnızca bir kordon kanı biriminden elde edilen yeterli miktarda hematopoetik kök hücrelerinin üretimini sağlamasıdır.

30 Bu doğrultuda, bir yapılandırılmada, başlatma hücre popülasyonu, CD34+ hücrelerinde zenginleştirilmiş neonatal göbek kordon kanı hücrelerinden türetilmektedir. İlgili bir yapılandırılmada, söz konusu başlatma hücre popülasyonu bir veya iki göbek kordonu kan biriminden türetilmektedir.

35

Başka bir yapılandırılarda, başlatma hücre popülasyonu, CD34+ hücrelerinde zenginleştirilmiş insan mobilize periferik kan hücrelerinden türetilmektedir. İlgili bir yapılandırılarda söz konusu başlatma hücre popülasyonu, sadece bir hastadan izole edilmiş insan mobilize periferik kan hücrelerinden türetilmektedir.

5

Söz konusu başlatma hücre popülasyonu, tercihen, bazı yapılandırılarda, %90'dan fazla CD34+ hücrelerinden en az %50 oranında CD34+ hücrelerini barındırabilmektedir.

10 Hematopoetik kök hücre genişlemesi için başlatma hücre popülasyonunun kültür koşulları başlangıç hücre popülasyonuna, arzu edilen son hücre sayısına ve arzu edilen son HSC oranına bağlı olarak değişim gösterecektir.

15 Spesifik bir yapılandırılarda, özellikle, CD34+ hücrelerinde zenginleştirilmiş göbek kordonu kan hücrelerinden bir başlatma hücresi popülasyonunun kullanılmasıyla, kültür koşulları genellikle HSC genişlemesi için teknikte bilinen sitokinler ve büyüme faktörleri gibi diğer hücre genişleme faktörlerinin kullanılmaktadır. Bu tür sitokinler ve büyüme faktörleri biyolojik veya küçük moleküller olabilmektedir ve bunlarla sınırlanmadan IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, G-CSF, GM-CSF, SCF, Flt3-L, trombopoietin (TPO) eritropoietin ve bunların analogları da kapsamaktadır. Burada kullanılanla "analoglar", sınırlama olmadan, TPO reseptörüne karşıagonist gibi (örneğin, WO 2007/145227 numaralı patent yayınında ayrıntılandırılan VB22B sc(Fv)2 ve benzeri) sitokin reseptör agonistleri veya doğal olarak oluşan formlara kıyaslandığında artırılmış veya azaltılmış biyolojik etkinliğe sahip varyantları kapsayan doğal olarak oluşan formlar gibi biyolojik etkinliğe sahip olan sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin herhangi bir yapısal varyantı da kapsamaktadır. Sitokin ve büyüme faktörü kombinasyonları terminal olarak farklılaşmış hücrelerin üretimini sınırlandırarak HSC'yi ve progenitör hücreleri genişletmek üzere seçilmektedir. Özel bir yapılandırılarda, bir veya daha fazla sitokin ve büyüme faktörü, SCF, Flt3-L ve TPO'dan oluşan gruptan seçilmektedir.

30 B-hücresi uyarıcı faktör 2 olarak da bilinen insan IL6 veya interleukin-6, Kishimoto, Ann. review of 1 mm. 23:1 2005) tarafından açılanmaktadır ve piyasada satılmaktadır. Aynı zamanda c-kit ligand, mast hücre büyüme faktörü veya Çelik faktörü olarak da bilinen insan SCF veya kök hücre faktörü açılanmaktadır (Smith, M A ve ark., ACTA Haematologica, 105, 3:143, 2001) ve piyasada satılmaktadır. FL olarak da adlandırılan Flt3-L veya FLT-3 Ligand, flt3-reseptörüne bağlanan bir faktördür. Bu açılanmıştır (Hannum C, Nature 368 (6472): 643-8) ve piyasada satılmaktadır. Aynı zamanda megakaryosit büyüme faktörü (MGDF) veya

c-Mpl ligand olarak bilinen TPO veya trombopoietin açılmaktadır (Kaushansky K (2006), N. Engl J. Med. 354 (19): 2034-45) ve piyasada satılmaktadır

Yukarıda bahsedilen kimyasal bileşenler ve biyolojik bileşenler; yalnızca bunların ortama ilave edilmesi ile değil aynı zamanda bunların kültür için kullanılan substrat veya destek yüzeyinin üzerine immobilize edilmesi ile, spesifik olarak, uygun bir çözücüde kullanılan bir bileşenin çözündürülmesi, substratın veya desteğin sonuçta oluşan çözelti ile kaplanması ve sonrasında bileşenin fazlalığının yıkanması ile kullanılabilir. Kullanılacak olan bu tür bir bileşen, bileşene bağlanan bir madde ile başlangıç olarak kaplanan substrat veya desteğe ilave edilebilmektedir.

HSC'nin genişlemesi, bileşim bakımından doğal ortamda, yarı-sentetik ortamda veya bir sentetik ortamda gerçekleştirilebilmektedir, ve şekil bakımından bir katı ortam, bir yarıkatı ortam veya bir sıvı ortam ve yukarıda açıklanan hücre genişleme faktörlerinin karışımları ile takviye edilen hematopoetik kök hücre ve/veya hematopoetik progenitör hücre kültürü için kullanılan herhangi bir besin olabilmektedir. Bu tür ortam tipik olarak sodyum, potasyum, kalsiyum, magnezyum, fosfor, klor, amino asitler, vitaminler, sitokinler, hormonlar, antibiyotikler, serum, yağ asitleri, sakaridler veya benzerlerini içermektedir. Kültürde, diğer kimyasal bileşenler veya biyolojik bileşenler, gerekli olması halinde tek tek veya kombinasyon halinde dahil edilebilmektedir. Ortama dahil edilecek bu tür bileşenler; fetal dana serumu, insan serumu, at serumu, insülin, transferrin, laktoferrin, kolesterol, etanolamin, sodyum selenit, monotiyogliserol, 2-merkaptoetanol, sıgı serum albumin, sodyum piruvat, polietilen glikol, çeşitli vitaminler, çeşitli amino asitler, agar, agaroz, kolajen, metilselüloz, çeşitli sitokinler, çeşitli büyüme faktörleri veya benzerleri olabilmektedir. HSClerin genişlemesine yönelik bir yöntem için uygun bu tür bazal ortamın örnekleri sıralama olmadan; StemSpan™ Serumsuz Genişleme Ortamı (SFEM) (StemCell Technologies, Vancouver, Kanada), StemSpan™ H3000-Tanımlı Ortam (StemCell Technologies, Vancouver, Kanada), CellGro™, SCGM (CellGenix, Freiburg Almanya), StemPro™-34 SFM (Invitrogen), Dulbecco Modifiye Eagle Ortamı (DMEM), Ham Besin Karışımı H12 Karışımı F12, McCoy 5A ortamı, Eagles Minimum Esas Ortamı (EMEM), α MEM ortamı (alfa Modifiye Eagles Minimum Esas Ortamı), RPMI1640 ortamı, Isocove Modifiye Dulbecco Ortamı (IMDM), StemPro34 (Invitrogen), X-VIVO 10 (Cambrex), X-VIVO 15 (Cambrex) ve Stemline II'yi (Sigma-Aldrich) kapsamaktadır

Bir yapılandırılarda, buluşa ait bileşik veya bileşim, HSC genişlemesi için uygun olan bir konsantrasyon altında söz konusu başlatma hücre popülasyonunun genişleme yöntemi

sırasında uygulanmaktadır. Spesifik bir yapılandırılarda, söz konusu bileşik veya bileşim, 1 ve 3000 nmol arasında veya örneğin 1 ve 100 nmol arasında bir konsantrasyonda uygulanmaktadır.

- 5 Başlatma hücre popülasyonunun esas olarak, bir veya iki kordon kan birimlerinden veya PB hücrelerinden veya hasat edilen kemik iliğinden CD34+ zenginleştirilmiş hücrelerden oluştuğu bir spesifik yapılandırılarda, hücreler, örneğin, 2 ve 21 gün arasında ve/veya belirtilen katta genişleme ve karakteristik hücre popülasyonu elde edilene kadar HSC genişlemesine yönelik koşullar altında büyütülmektedir. Özel bir yapılandırılarda, hücreler 21 gün, 12 gün, 10 gün
- 10 veya 7 günden fazla olmayan HSC genişleme koşullarında ex vivo olarak büyütülmektedir.

- Hücre popülasyonu sonrasında, buluşa ait bileşik veya bileşimin ve/veya herhangi bir diğer hücre kültürünün giderilmesi için uygulanabilmektedir ve kısa süre boyunca uygun bir hücre süspansiyon ortamında veya uzun süreli depolama ortamında, örneğin, dondurarak
- 15 saklamaya uygun bir ortamda yeniden süspansiyon halinde tutulabilmektedir.

- HSCler ve/veya hematopoetik progenitör hücreler, genellikle isteğe bağlı olarak bir hücre dışı matris veya bir hücre yapışma molekülü ile preliner kaplamadan sonra, bir Petri kabı, bir balon, bir plastik torba, bir Teflon™ torba gibi hayvan hücre kültürü için kullanılan bir kültür
- 20 kabında kültürlenebilmektedir. Bu tür bir kaplamaya yönelik malzeme; kolojenler Ito XIX, fibronektin, vitronektin, lamininler 1 ila 12, nitrojen, tenaskin, trombospondin, von Willebrand faktörü, osteoponin, fibronojen, çeşitli elastinler, çeşitli proteoglikanlar, çeşitli kadherinler, dezmokolin, dezmoglein, çeşitli integrinler, E-selektin, P-selektin, L-selektin, immünoglobulin üst ailesi, Matrigel, poli-D-lizin, poli-L-lizin, kitin, kitosan, Seforaz, aljinik asit jel, hidrojel veya
- 25 bunların bir fragmenti olabilmektedir. Bu tür bir kaplama malzemesi, yapay olarak modifiye edilmiş bir amino asit sekansına sahip olan bir rekombinant malzeme olabilmektedir. Hematopoetik kök hücreleri ve/veya hematopoetik progenitör hücreleri; mekanik olarak ortam bileşimini, pH'ı ve benzerini kontrol edebilen ve yüksek yoğunluklu kültür elde edebilen bir biyoreaktör kullanılarak kültürlenebilmektedir (Schwartz R M, Proc. Natl. Acad. Sci. ABD.,
- 30 88:6760, 1991; Koller M R, Bone Marrow Transplant, 21:653, 1998; Koller, M R, Blood, 82: 378, 1993; Astori G, Bone Marrow Transplant, 35: 1101, 2005).

- Buluş ayrıca yukarıda açıklanan genişleme yöntemi elde edilebilen veya elde edilen genişleşmiş HSClere sahip bir hücre popülasyonunu açıklamaktadır. Spesifik bir
- 35 yapılandırılarda, bu tür hücre popülasyonu, bir memeli konakçıda uygulanmaya uygun

farmasötik olarak kabul edilebilir bir ortamda yeniden yeniden süspansiyon halinde tutulmaktadır, böylelikle terapötik bir bileşim sağlanmaktadır.

5 Buluş ayrıca genişletilmiş HSC'ye sahip hücre popülasyonunu veya bunun bir memeli süjede allojenik veya otolog kök hücre nakli kullanılarak yönelik bileşimi açıklamaktadır.

Burada sözü edilen özne, örneğin, bir kemik iliği donörü veya tükenmiş veya sınırlı kan hücreleri seviyelerine sahip veya bu risk altında olan bir bireydir. Opsiyonel olarak, süje kemik iliği hasatından önce bir kemik iliği donörü veya kemik iliği hasatı sonrasında bir kemik iliği donörüdür. Süje isteğe bağlanarak bir kemik iliği nakli alınmaktadır. Burada açıklanan yöntemler özellikle, yaşlı süjeler veya daha önce bir immün tüketen tedaviye veya örneğin lösemi veya lenfoma tedavisi için kemoterapi gibi miyeloablatif tedaviye maruz kalan süjeler gibi sınırlı kemik iliği rezervine sahip süjeler için yararlıdır. İsteğe bağlanarak süje, düşük kan seviyesine sahiptir veya kontrol kan hücreleri seviyesine kıyasla düşük kan hücreleri seviyesi geliştirme riski altındadır. Burada kullanıldığı haliyle, kontrol kan hücreleri seviyesi terimi, bir süjeden önce veya süjedeki kan hücreleri seviyelerini değiştiren bir olayın yokluğunda bulunan bir süjedeki ortalama kan hücreleri seviyesini belirtmektedir. Bir süjede kan hücreleri seviyelerini değiştiren bir olay, örneğin anemi, travma, kemoterapi, kemik iliği nakli ve radyasyon tedavisini kapsamaktadır. Örneğin, süje örneğin travma nedeniyle anemi veya kan kaybına sahiptir.

Nakil, mevcut buluşun yöntemi ile genişletilmiş bir hematopoetik kök hücrelere ve/veya hematopoetik progenitör hücrelere ek olarak bir tampon çözeltisi, bir antibiyotik, bir farmasötik içeren bir bileşim olabilmektedir.

25 Genleşmiş HSC popülasyonu veya genişlemiş HSClere sahip hücre popülasyonunu içeren bileşim, süjeye örneğin, kemoterapi, radyasyon terapisi veya bir kemik iliği nakli öncesinde, bunlar ile aynı anda veya sonrasında uygulanabilmektedir. Süje isteğe bağlanarak örneğin kemik iliği kaybı veya tükenmiş kemik iliği ile karakterize edilen konjenital, genetik veya edinilmiş sendromla ilişkili olarak tükenmiş kemik iliğine sahiptir. Dolayısıyla, süje isteğe bağlanarak hematopoez ihtiyacı olan bir süjedir. Opsiyonel olarak, süje bir kemik iliği donörüdür veya tükenmiş kemik iliği olan veya risk altında olan bir süjedir.

35 Hematopoetik kök hücre manipülasyonu, kemoterapi veya radyasyon tedavisine ilave bir tedavi olarak faydalıdır. Örneğin, HSCler periferik kana lokalize edilmektedir ve sonrasında

kemoterapiye tabi tutulacak bir süjeden izole edilmektedir ve tedaviden sonra hücreler geri döndürülmektedir. Bu nedenle, süje kemoterapi, radyasyon tedavisi gibi bir bağışıklık hücresi tüketen tedavi gören veya bir kemik iliği nakli için bir donör olarak işlev gören bir süjedir. Kemik iliği, vücuttaki en üretken dokulardan biridir ve bu nedenle genellikle kemoterapi ilaçları ve radyasyondan zarar gören organdır. Sonuç, kemoterapi veya radyasyon tedavisi sırasında kan hücresi üretiminin hızla bir şekilde yok edilmesi ve hematopoetik sistemin bir hasta kemoterapi ile yeniden tedavi edilmeden önce kan hücresi kaynakları yenilemesine izin verilmesi için kemoterapi veya radyasyonun sonlandırılması gerektirir. Bu yüzden, burada açıklandığı gibi, burada açıklanan yöntemlerle üretilen HSCler veya kan hücreleri isteğe bağlı olarak ilave kan hücrelerine ihtiyaç duyan bu tür hastalara uygulanmaktadır.

Sağlananlar; in vivo, in vitro, veya ex vivo olarak HSClerin profilerasyonunu artırebilen bir terapötik ile (örneğin, bir küçük molekül, bir antikör, veya benzeri) kombinasyon halinde yukarıda açıklanan şekilde buluşa ait bir bileşik veya bir bileşim ile genişletilen HSC ve isteğe bağlı olarak en az bir farmasötik olarak kabul edilebilir yardımcı madde veya taşıyıcı HSC profilerasyonunu artırebilen bir terapötik ile şunlar ifade edilmektedir: TPO reseptörüne karşı bir agonist antikör (örneğin, WO 2007/145227 numaralı patent yayınında ayrıntılı olarak açıklanan VB22B sc(Fv)2 ve benzeri); SCF, IL-6, Flt-3 ligand, TPO veya bir TPO mimetik gibi bir sitokin (örneğin, WO/2007/022269; WO/2007/009120; WO/2004/054515; WO/2003/103686; WO/2002/085343; WO/2002/049413; WO/2001/089457; WO/2001/039773; WO/2001/034585; WO/2001/021180; WO/2001/021180; WO/2001/017349; WO/2000/066112; WO/2000/035446; WO/2000/028987; WO/2008/028645 numaralı patent dokümanlarında açıklanan; ve benzeri gibi); granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF); granülit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF); bir prostaglandin veya bir prostaglandin reseptör agonisti (örneğin, WO/2008/073748 numaralı patent dokümanında ayrıntılı olarak açıklanan şekilde, prostaglandin E2 reseptör-1 (EP-1) agonisti, prostaglandin E2 reseptör-2 (EP-2) agonisti, prostaglandin E2 reseptör-3 (EP-3) agonisti ve prostaglandin E2 reseptör-4 (EP-4) agonistleri); tetraetilenpentin (TEPA); Çentik-ligandları (Delta-1); ve/veya bir WNT agonisti. Ek olarak, mezenkimal kök hücreler (MSCler) ile kök hücrelerin kültürlenmesi, graft-versus-host hastalığı (GVHD) önlemektedir ve kök hücre genişlemesine yardımcı olabilmektedir,

Farmasötik olarak kabul edilebilir ile, biyolojik olarak olmayan veya aksi halde arzu edilmeyen bir malzeme ifade edilmektedir, başka bir deyişle, malzeme, içinde barındırıldığı farmasötik bileşenin diğer bileşenleri ile bir sağlığa zararlı şekilde arzu edilmeyen biyolojik etkilere yol

açmadan veya bunlar ile etkileşime girmeden bir süje veya hücreye uygulanabilmektedir. Taşıyıcı veya yardımcı madde, aktif içeriğin bozunumunun en aza indirilmesi ve süje veya hücrede yan etkilerin en aza indirilmesi için seçilmektedir.

- 5 Bileşimler, burada açıklanan yöntemlerde kullanıma yönelik olarak geleneksel şekilde formüle edilmektedir. Uygulama, siteden uzmanlığa sahip biri tarafından etkili olduğu bilinen herhangi bir yoldan gerçekleştirilmektedir. Örneğin, bileşim, oral olarak, parenteral olarak (örneğin intravenöz olarak), intramüsküler enjeksiyonla, intraperitoneal enjeksiyonla, transdermal, ekstrakorporel, intranazal veya topikal olarak uygulanmaktadır

10

Tercih edilen uygulama yöntemi intravenöz infüzyondur. Transfekte edilen hücrelerin sayısı, cinsiyet, yaş, ağırlık, hastalık veya rahatsızlıkları, rahatsızlık evresi, hücre popülasyonunda arzu edilen hücre yüzdesi ve terapötik bir faydanın üretilmesi için gereken hücre miktarı gibi faktörleri dikkate alacaktır. Özel bir yapılandırılarda, bileşim intravenöz infüzyon ile uygulanmaktadır ve kordon kanı için en az $\geq 0.3 \times 10^5$ CD34+/kg veya $> 2 \times 10^6$ CD34+ ve kemik iliği veya mobilize periferik kan hücreleri için 2.5×10^5 CD34+/kg veya daha fazlasını içermektedir. Spesifik bir yapılandırılarda, infüzyon edilen hücrelerin tümü tek bir doğumdan genişletilmiş kordon kan hücrelerinden türetilmektedir.

15

- 20 Genişletilmiş hematopoetik kök hücreler ve/veya hematopoetik progenitör hücreler, örneğin, lösemi tedavisi durumunda damlatarak bir anti kanser ilaç toplam vücut iridasyonu veya kanser hücrelerinin eradikasyonu için veya donör hücre aşılmasını kolaylaştırılmasını için bir immünosupresif ilaç ile önceden tedavi edilen hastalara infüze edilebilmektedir. Tedavi edilecek hastalar, önceden tedavi ve hücre nakli yöntemi, sorumlu kişi tarafından uygun bir şekilde seçilmektedir. Ayrıca bu şekilde nakledilen hematopoetik kök hücrelerin ve/veya hematopoetik progenitör hücrelerin aşılmasını hemotopoiesisin iyileştirilmesi, naklin yan etkilerinin ve naklin terapötik etkilerinin bulunması dahil terapisinde kullanılan siteden bir tahlil ile belirlenebilmektedir.

25

- 30 Yukarıda açıklandığı üzere, mevcut buluş hematopoetik kök hücreleri ve/veya hematopoetik progenitör hücrelerin genişletilmesini ve genişletilmiş HSCLer kullanılarak nakil tedavisinin kısa sürede güvenli ve kolay bir şekilde yapılmasını mümkün kılmaktadır

30

- Burada ayrıca sağlanan , burada açıklanan bileşenlerin bir veya daha fazlasıyla doldurulmuş bir veya daha fazla kap içeren bir kittir. Bu tür kitler isteğe bağlı olarak ihtiyaç duyulduğunda

35

veya arzu edildiğinde çözeltiler ve tamponlar içermektedir. Kit isteğe bağlı olarak yukarıda açıklanan yöntemlerle hazırlanan genişletilmiş bir kök hücre popülasyonu içermektedir veya genişletilmiş bir HSC popülasyonunun üretilmesi için kaplar veya bileşimler içerebilmektedir. Özellikle, buluş, hematopoetik kök hücrelerin ex vivo genişlemesine yönelik bir kit sağlamakta olup, Buluşun Kısa Açıklamasında belirlenen şekilde bir bileşik ve HSC genişlemesi için bir yöntemde bu tür bileşiğin kullanıma yönelik talimatları ve isteğe bağlı olarak bir veya daha fazla hücre genişleme faktörleri veya hücre büyüme için ortam, özellikle yukarıda açıklanan şekilde HSC büyümesi için özel bir ortam içermektedir. Kit ayrıca anti-CD34, anti-CD38 ve/veya anti-CD45RA antikorları gibi hücrelerin üretimini izlemeye yönelik antikorlar içerebilmektedir. Özel bir yapılandırılarda, bu tür kit ayrıca IL6, FLT3-L, SCF ve TPO'dan oluşan gruptan seçilen bir veya daha fazla hücre genişletme faktörünü kapsamaktadır. İsteğe bağlı olarak bu tür paket(ler) veya kit(ler) ile ilişkili olan kullanıma yönelik talimatlardır.

In vivo uygulama: Aynı zamanda sağlanan zaman içinde kullanıma yönelik bileşiğin bir veya daha fazla dozunu içeren bir süjede HSCLerin artırılması için buluşa ait etkili miktarda bir bileşiğin sağlanması yönelik bir kittir, burada kitteki buluşa ait bileşiğin toplam dozları bir süjede HSCLerin artırılması için yeterli olan etkili bir miktara eşittir. Zaman dilimi yaklaşık bir ila birkaç gün veya hafta veya aydır. Dolayısıyla, zaman dilimi en az yaklaşık 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 20, 21, 30 veya 60 gün veya daha fazla veya bir ve 180 gün arasında herhangi bir gün sayılabilir.

Biyolojik Tahliller

Tarama Tahlili

HSC kendi kendini yenilemesinin yeni varsayılan agonistlerinin tanımlanması için, birincil insan mobilize CD34+ hücreleri üzerinde küçük molekül bileşiklerinin (5,280 düşük molekül ağırlıklı bileşikler) bir kütüphanesinin test edilmesi için yüksek çözümlü tarama tahlili uyarlanmıştır. Aynı zamanda, CD34+ hücrelerinin izole edilmesi için teknikte uzman bir kişi tarafından bilinen çeşitli kaynaklardan gelen CD34+ hücrelerine uygulandığı anlaşılmaktadır. Mononükleer hücreler, Fare antiinsan CD34+APC (BD Pharmingen'den elde edilen) ile boyanmıştır ve sonrasında Anti-APC manyetik MicroBeads (MACS, Miltenyi Biotec'den elde edilen) ile manyetik olarak etiketlenmiştir. Manyetik olarak etiketlenmiş hücreler, AutoMACS kolonu kullanılarak alınyulmuştur. Çalışmamız interleukin-6, trombopoietin, Flt-3 ligand ve bir kök hücre faktörü ile takviye edilen ortamda kültürlenmiş mobilize periferik kan türevli

CD34+CD45RA- hücrelerin, CD34+CD45RA- popülasyonunda bir azalma ve HSC depleasyonu ile bir arada bulunan mononükleer hücrelerin (MNC) genişlemesini artırabilmesine dayanmaktadır. Bu kaybı önleyen düşük moleküler ağırlıklı bileşikler bu yüzden HSC genişlemesinin agonistleri olarak etki edebilmektedir.

5

Bir 384-kuyucuklu plaka içerisinde, 2000 CD34+ hücre/kuyucuk, 1 µM test bileşikleri veya %0.1 DMSO (vehikül) içeren 50 µl ortam içerisinde kültürlenmiştir. CD34+CD45RA hücrelerinin oranı deneyin başlangıcında ve 7 günlük bir inkübasyonun ardından saptanmıştır. Farklı kimyasal yapılara sahip 5,280 bileşikten altı başlangıçta test edilen CD34+CD45RA hücresi genişlemesini artırmıştır ve on yedi (17), kontrole (DMSO) kıyasla CD34-CD45RA+ hücrelerinin oranlarındaki artışla saptanan şekilde farklılaşmayarak artırmıştır. CD34+CD45RA hücre popülasyonunun genişlemesini artıran altı bileşik, bir ikincil ekranda yeniden analiz edilmiştir. Bu altı bileşikten dördü, huCD34+ hücrelerinin *ex vivo* genişlemesini artırdığı gösterilen bir etki mekanizması (SR1'ler ile aynı gösterilen aril hidrokarbon reseptörü (AhR) antagonistleri olarak etki etmektedir. Aril hidrokarbon reseptörü (AhR) antagonistleri olmadıkları saptanan diğer iki bileşiğin, 7 günlük inkübasyon sırasında CD34+ hücrelerini kapsayan MNCLerin genişlemesini artırdığı gösterilmiştir. Tanımlanan geriye kalan iki bileşikten biri, Bileşik 1'dir (Tablo 1).

10

15

20

25

30

35

Buluşun bileşiklerinin hematopoetik kök hücre genişlemesi üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi için aşağıdaki biyolojik deneyler kullanılmıştır. **Kültür ortamı** Kullanılan kültür ortamı şu rekombinant sitokinler ile takviye edilen serumsuz ortamdan oluşmuştur: vehikül (DMSO), pozitif kontrol (SR1), veya buluşa ait bir bileşik veya bileşiklerin bir kombinasyonunun varlığında, her birinin 100ng/ml'lik bir nihai konsantrasyonda olduğu, interlökin-6, trombopoietin, Flt-3 ligand, ve kök hücre faktörü. **Hücre Kültürü:** İlk hasatları CD34+ hücre saflığı, akış sitometrisi ile saptanan şekilde %90'dan daha yüksekti. CD34+CD45RA- alt popülasyon %70'ten daha yüksek saflık seviyelerine ulaşmıştır. Hücreler 40,000 hücre/ml'de plakalanmıştır ve 7 ila 12 gün boyunca 37°C'de %5 CO₂'de inkübe edilmiştir. Uzun süreli kültürle ilgili olarak, mobilize PB'den 200,000 CD34+hücre/ml, 500 nM'de vehikül (DMSO), pozitif kontrol, veya buluşa ait bir bileşiğin varlığında, her birinin 100ng/ml'lik bir nihai konsantrasyonda olduğu, interlökin-6, trombopoietin, Flt-3 ligand, ve kök hücre faktörü ile takviye edilen serumsuz ortam ile kaplanmıştır. 10 günlük bir *ex vivo* kültürden sonra Bileşik 1 (Tablo 1), MNCLerin 7 katından fazla genişlemesini, CD34+ hücrelerinde girdi değerlerine göre 5 kattan fazla artış (0'ın içi) ve vehikül için saptanan değerler üzerinden neredeyse 4 kat artış desteklemiştir. 10 günlük *ex vivo* kültürden sonra,

Bileşik 1 ile tedavi edilmiş hücreler, vehikül (DMSO) (22.8 ± 0.9) ile kültürlenmiş hücrelere kıyasla yüksek seviyede CD34 ekspresyonu (65.8 ± 5.5) almamıştır. Dahası sadece Bileşik 1 ile tedavi edilmiş hücreler, CD34+CD45RA popülasyonunun (24.8 ± 0.9) en yüksek ekspresyonunu vehikülün en yüksek ekspresyonu ile karşılaştırdığında (4.7 ± 0.4) almamıştır. Bileşik 1 ile kültürlenmiş CD34+CD45 sayıları vehikül kuvveti ile karşılaştırdığında neredeyse 3 kat, girdi sayısından 7 kat artışı göstermiştir. Son olarak, buluşa ait bileşikler, vehikül durumuna kıyasla CD34+CD45RA hücrelerinin sayısında %50 oranında artış üreten etkili konsantrasyonun belirlenmesi için bir doz-cevap formatında (1 nM ila 5000 nM arasında değişim gösteren konsantrasyonlar) test edilmiştir. Sonuçlar Tablo 1'de gösterilmektedir.

Bileşik 1, aril hidrokarbon (AhR) yolu aracılığıyla etki etmemektedir (Şekil 1)

Sonrasında, primitif CD34+CD45RA- primitif hematopoetik hücre üzerinde Bileşik 1'in etkisinin kültürde hızlı bir şekilde tersinir olduğunu belgeledik. Bu etki, CD34+ mobilize periferik kan hücrelerinin, Bileşik 1'in hücrelerin yoklanması ile giderildiği en fazla 7 gün boyunca Bileşik 1 varlığında kültürlendiği Şekil 2'de en iyi şekilde gösterilmektedir. Yeşil noktalı çizgi, CD34+CD45RA hücrelerinin oranındaki azalmayı, hızlı kontrol edilen kültürlerin (DMSO: katı mavi ve noktalı çizgiler) takip ettiğini gösterirken, Bileşik 1'in mevcudiyetinde tutulan hücreler, 2 haftalık kültür (düz yeşil çizgi) boyunca daha primitif bir fenotipi alıyordu göstermektedir. Bu sonuçlar ayrıca, 2 gün içinde bileşik içermeyen maruziyetin hücrelerin kontrol kültürlerinde görüldüğü gibi farklılaşma işaretleri edindiğini ayrıca göstermektedir. Bu yüzden, Bileşik 1'in etkisi, primitif insan hücreleri üzerinde hızlı bir şekilde tersinirdir.

Bileşik 1 bir mitojen değildir (Şekil 3)

Ayrıca Bileşik 1'in, büyüme faktörü yokluğunda bağış olarak hücre profilerasyonunu tetiklemediğini gösterilmektedir. Şekil 3'te gösterilen bu sonuçlar, Aril Hidrokarbon reseptörünün (SR1) antagonisti ile gözlemlenene benzer şekilde, Bileşik 1'in 3 listelenen büyüme faktörü, başka bir deyişle, Flt3, TPO ve SCF'den herhangi birinin yokluğunda hücre profilerasyonunu indükleyemediğini belirtmektedir. Bu, SR1'e benzer şekilde, Bileşik 1'in, primitif HSC fenotipinin ex vivo yaşam sürdürme üzerindeki etkisinin, bu popülasyon üzerindeki mitojenik bir etkisinden değil, ancak hücre farklılaşmasını önlenmesinden kaynaklandığını göstermektedir.

Bileşik 1 ve Bileşik 40'ın her ikisi hücre farklılaşmasını önlemektedir ve AhR antagonisti ile sinerjize edilmektedir (Şekil 4).

- 5 Bileşik 1'in ve aynı zamanda bunun kuvvetli türevi Bileşik 40'tan birinin hem sitolojik analiz hem de sitometri kullanarak hücre farklılaşması üzerindeki etkisini değerlendirdik. Her iki çalışma türü Bileşik 1 ve bunun türevi Bileşik 40'ın hücre farklılaşmasını önlediğini göstermiştir. FACS sonuçları Şekil 4'te gösterilmektedir. Şekil 4A, Bileşik 1'in mobilize edilmiş periferik kan hücresi farklılaşması üzerindeki etkisini göstermektedir. 7 günlük bir genişlemenin ardından, nispeten saf (> %85 CD34+) mobilize periferik kan popülasyonu (DMSO) veya Bileşik 1 veya SR1 veya Bileşik 1 + SR1'in kontrolüne maruz bırakılmıştır. Sonuçlar, kontrol kültürlerinde hücrelerin hızlı bir şekilde CD34 hücre yüzey ekspresyonunu gevşettiğini gösterirken, bu etki kesin optimum SR1 ve Bileşik 1 seviyeleri eklenerek ortadan kaldırılmıştır. İlginç bir şekilde, hem SR1 hem de Bileşik 1, hücre yüzeyinde CD34 ekspresyonunu sürdürmede sinerjize olmaktadır. Bu gözlemler, Şekil 4B'deki kordon kanı numuneleri için ve ayrıca Şekil 4C'deki Bileşik 40 ile tekrar edilmiştir.

- Buna ek olarak, Bileşik 1 veya Bileşik 40'ın etkisinin daha primitif bir fenotipe sahip olan hücreler üzerinde en etkileyici olduğunu gösterdik. Örneğin, CD34⁺CD45RA⁻ hücreleri (Şekil 20 4A ila 4C'nin alt panellerinde sol üst kadrant), Bileşik 1 veya 40 ile desteklenmiş kültürlerde, SR1 veya kontrol kültürlerinde olduğundan çok daha fazladır. Yine, bu kültürlerde Bileşik 1 veya bileşik 40 artı SR1'in ilave etkileri gözlenmektedir.

- Şekil 4D, CD34 markörünün primitif insan HSC zenginleştirilmiş popülasyonunun yüzeyi 25 üzerinde kaybolmasını önlemede Bileşik 40'ın kuvvetini gösteren bir doz-yanıt eğrisi sağlamaktadır. Farklı bileşik dozu ile değişen CD34 ekspresyonuna dikkat edilmelidir.

Bileşikler 1 ve 40, insan HSC fenotipini ex vivo olarak genişletmektedir (Şekil 5).

- 30 Şekil 5, Bileşik 1'in aynı zamanda Bileşik 40'ın hem kısa süreli hem de uzun süreli kültürlerde insan HSC fenotipini ex vivo olarak genişlettiğini göstermektedir. Şekil 5A, CD34+ mobilize periferik kanla (mPB) başlatılan ve 12 gün boyunca sürdürülen kültürlerde toplam hücre sayısının girişin yaklaşık 20 katına kadar arttığını göstermektedir, Genleşme seviyesi, kültürlerin Bileşik 1, SR1, Bileşik 1 + SR1 veya kontrol DMSO ile başlatılıp başlatılmamasına 35 bakılmaksızın aynıdır. En çarpıcı şekilde, Bileşik 1'in etkisi, Bileşik 1'in mevcudiyetinde yaklaşık

on kat ve Bileşik 1 + SR1'in mevcudiyetinde yaklaşık on beş kat genişleyen daha primitif CD34+CD45RA- hücre alt popülasyonu üzerinde gözlenmektedir. Şekil 4'te sunulan sonuçlarla birlikte bu gözlem, Bileşik 1'in hücre profilerasyonu üzerinde bir etkisi olmadığını, bunun yerine daha olgun hücreler zararlı net genişlemelerine yol açan CD34+ CD45RA- hücrelerinin farklılaşmasını önlenmesini ortaya koymaktadır. Şekil 5B'deki sonuçlar, Bileşik 1'in, yedi günlük bir süre boyunca 30-40 kat CD34+CD45RA- kan hücrelerinin genişlemesine yol açacağını, buna karşın bu hücrelerin DMSO (kontrol) varlığında yaklaşık on beş kat genişlediğini göstermektedir. Şekil 5C, benzer sonuçları göstermektedir, ancak bu kez on iki güne uzatılmış kültürlerle ve Bileşik 1, Bileşik 40 ile değiştirilmiştir. Yine, sol panelde belirtildiği üzere, toplam hücre genişlemesi, hücrelerin DMSO (kontrol), SR1, Bileşik 40 veya her ikisi de Bileşik 40 artı SR1'e maruz kalması durumunda aynıdır. En etkileyici şekilde, daha primitif CD34+CD45RA hücreleri, Bileşik 40 ile takviye edilmiş kültürlerde 12 günde 80 kat genişlerken, bu hücreler, Aril Hidrokarbon Represör antagonistine göre SR1 ile başlatılan kültürlerde, bu bileşiğin üstünlüğünü gösteren 20 kattan biraz daha az genişlemektedir.

Kısacası, bu sonuçlar, Bileşik 1 ve Bileşik 40'ın, her ikisi de mobilize edilmiş periferik kan veya kordon kan hücrelerinden türetilmiş CD34⁺ ile CD34⁺ ve daha primitif CD34⁺ CD45RA- popülasyonunun genişlemesi üzerinde büyük etkilere sahip olduğunu göstermektedir.

Genişlemiş hücrelerin *ex vivo* fonksiyonelliği, kültür (CFU-C) tahlilinde geleneksel koloni-oluşturan birimler kullanılarak test edilmiştir. Tedavi edilmemiş hücreler veya DMSO ile inkübe edilmiş hücreler, pozitif kontrol veya buluşa ait bir bileşik, geleneksel koşullarda metilselüloz ortamda kaplanmıştır. Örneğin, Bileşik 1 (Tablo 1, Örnek 1), çok yetili hematopoetik progenitörlerin sayısını arttırmaktadır. 10 gün boyunca Bileşik 1 ile tedavi edilmiş 1000 CD34+ mPB hücrelerinin metilselüloz kültürü, giriş hücreleri üzerinde çok soylu granülosit eritrosit, makrofaj ve megakaryositte (GEMM kolonileri) 5 kat bir artış ve kontrol hücrelerine kıyasla 10 kat bir artış ile sonuçlanmıştır. Bu, burada açılan Bileşik 1'in çok yetili progenitör hücrelerin genişlemesini arttırdığını ortaya koymaktadır.

NSG fare modeli kullanılarak değerlendirilen Bileşik 1'in kültürlenmiş mPB HSC üzerindeki etkisi (Şekil 6)

Sonrasında Bileşik 1 ve Bileşik 40'ın kordon kanı ve mobilize edilmiş periferik kan insan HSC'sinin on ila on iki gün boyunca *in vitro* olarak genişlediği ve *in vivo* olarak NSG fare modeline uygulandığını değerlendirdik. Bu deneylerin amacı, bileşiğimizin, Şekil 4 ve 5'te

gösterilen primitif HSC fenotipi üzerindeki etkisinin aynı zamanda, uzun süreli tekrarlayan kemik iliği kök/progenitor hücreleri üzerinde gözlemlendiğini doğrulamaktadır. Şekil 6, fare kemik iliğinin, nakil sonrası üç hafta değerlendirilen insan hücreleri tarafından sulandırılmış olduğunu göstermektedir. Mobilize kan için, 50,000 ve 500,000 hücrelerin sonucu 6A'da sunulmaktadır. Burada gösterildiği gibi, HSC agonisti SR1, NSG fare modelinde değerlendirilen şekilde insan kök hücrelerini genişletmede DMSO'dan (kontrol) tutarlı olarak daha iyiydi. Yine Bileşik 1, bu deneylerde SR1'den daha üstün görünmektedir. İn vitro kültürlerde görüldüğü üzere, Bileşik 1 ve SR1 bu deneylerde sinerjik bir etki göstermiştir (Şekil 6).

10 NSG fare modeli kullanılarak değerlendirilen kültürlenmiş Kordon Kanı(CB) HSC üzerinde Bileşik 1 ve 40'ın Etkisi (Şekil 7)

Şekil 7, Bileşik 1 ve Bileşik 40'ın, NSG fare modelinde in vivo olarak değerlendirilen kültürlenmiş kordon kanı-insan HSC'si üzerindeki etkisini göstermektedir. Şekil 7A'daki sonuçlar, Bileşik 1'in, kontrol kültürleriyle karşılaştırıldığında insan hücrelerinin sulandırma aktivitesi üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bu deneyler kısa süreli kültürlerde, başka bir deyişle 7 günde gerçekleştirilmiştir. En önemlisi, Şekil 7B, Bileşik 40'ın 1500 CD34+ hücreleri kullanıldığında DMSO kontrolü için %2'ye kıyasla %10 oranda ortalama sulandırma seviyeleri ile oldukça önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bileşik 40'ın bu deneyde Bileşik 1 (Şekil 7A) üzerindeki daha büyük etkisi potansiyel olarak, Şekil 7B'de açıklanan deneylerde kullanılan daha uzun kültür süresinden kaynaklanmaktadır. Daha kesin in vivo deneyler, daha uzun kültür süreleri (12 ila 16 gün) kullanılarak bir sonraki bölümde sağlanmaktadır.

25 NSG fare modeli kullanılarak değerlendirilen kültürlenmiş Kordon Kanı(CB) HSC üzerinde Bileşik 1 ve 40'ın Etkisi (Şekil 8)

Zandstra ve ark. yakın zamanda, kesikli besleme adı verilen yeni bir yöntemin, insan HSC genişlemesine yol açan in vitro koşulları optimize ettiğini belgelemiştir (US7,795,024 Numaralı US Patent dokümanı). Buluşa ait bileşiklerin, daha önce optimize edilmiş bu kesikli besleme koşullarında aktif olup olmadığını doğrulamak istedik. Bu çalışmalar için, 12 ila 16 gün boyunca kesikli besleme + Bileşik 40 ile in vitro olarak kültürü takiben kordon kanı türevli hematopoetik kök hücrelerin (HSC) genişlemesini değerlendirdik. HSC sayıları-insan hücrelerinin immün yetersizliği olan farelere aşılanmasıyla dayanarak değerlendirilmiştir.

Şekil 8'de gösterildiği üzere, Bileşik 40 (Cpd 40) ilavesi, CD34+CD45RA-hücreleri dahil olmak üzere test edilen tüm popülasyonların en az 16 güne kadar genişlemesi üzerinde büyük bir etki sağlamıştır. Bu etki, kesikli besleme (Şekil 8'deki FB) ve Bileşik 40 arasındaki sinerjiyi açıkça gösteren 12-16 günlük zaman noktalarında en etkileyiciydi.

5

Ayrıca, yeni zenginleştirilmiş CD34+ hücreleri ve 12 veya 16 gün boyunca genişletilmiş hücreler, nakilden 24 saat önce 5000 (250rad) alt-ölümcül (250rad) olarak 5000 (250rad) dışı NOD/SCID /IL-2Rγc-sf (NSG) farelere nakledilmiştir. Hücreler kuyruk damarından intravenöz olarak enjekte edilmiştir. Tanımlanan zaman noktalarında (3'üncü hafta, 9'uncu hafta ve 16'ncı hafta) hayvanlar feda edilmiştir ve iki tibiazdan ve iki femurdan kemik iliği toplanmıştır. Kemik iliği, kemik iliği hücrelerinin tükenmesi ve insan hücrelerinin tutulması ölçmek üzere akış sitometrisi ile değerlendirilmiştir. Hücrelerin $\geq 0.5\%$ 'i insan CD45 ve insan HLA-ABC için pozitif ise hücreler aşılama için pozitif olarak puanlanmıştır. Her değerlendirme noktasında, bazı hayvanlar bağış histoloji analizi için gönderilmiştir.

15

Aşağıdaki Tablo 2'de gösterildiği gibi, 16 haftalık zaman noktalarında sonlarında, her koşul için aşılamanın bir doz tepkisi bulunmaktadır. Sıralı seyreltme analizi, en yüksek HSC genişlemesinin, kesikli besleme + Bileşik 40 12 günlük kültür (18.4 kat) tarafından üretildiğini ortaya koymuştur. Bu, kesikli beslemenin kontrolünün 12 günlük kültür (8.1 kat) tarafından üretilen genişlemeden önemli ölçüde daha yüksekti. 16 günlük kültüre kıyasla her iki koşulda da 12 günlük kültür ile daha yüksek genişleme elde edilmiştir. Bu sonuçlar, Bileşik 40'ın varlığında in vitro net insan HSC genişlemesinin ve kesikli besleme şartlarında aktivitesinin kesin olarak gösterilmesini sağlamaktadır (Şekil 8 + Tablo 2).

20

Tablo 2: 16'nci Haftanın sıralı seyreltme aşılama verisinin kısa açıklaması

Koşul	HSClerin sayısı	TNC genişlemesi	0'nci gün HSC eşdeğeri	Net HSC genişlemesi*
0'nci gün yeni	1/6115	Uygulanamaz	1/6115	Uygulanamaz
12'nci gün Kesikli besleme	1/117676	156	1/754.3	8.1
12'inci gün Kesikli besleme + Cpd 40	1/54548	164	1/332.6	18.4
16'nci gün Kesikli besleme	1/635952	413	1/1539.8	4
16'nci gün Kesikli besleme + Cpd 40	1/323585	495	1/653.7	9.4

* Net HSC Genişlemesi = (# HSC 0'nci Gün)/(# HSC 12'inci Gün veya 16'nci Gün); 16'nci haftada NSG farelerinde sıralı seyreltme analizi (LDA) kullanılarak ölçülmüştür

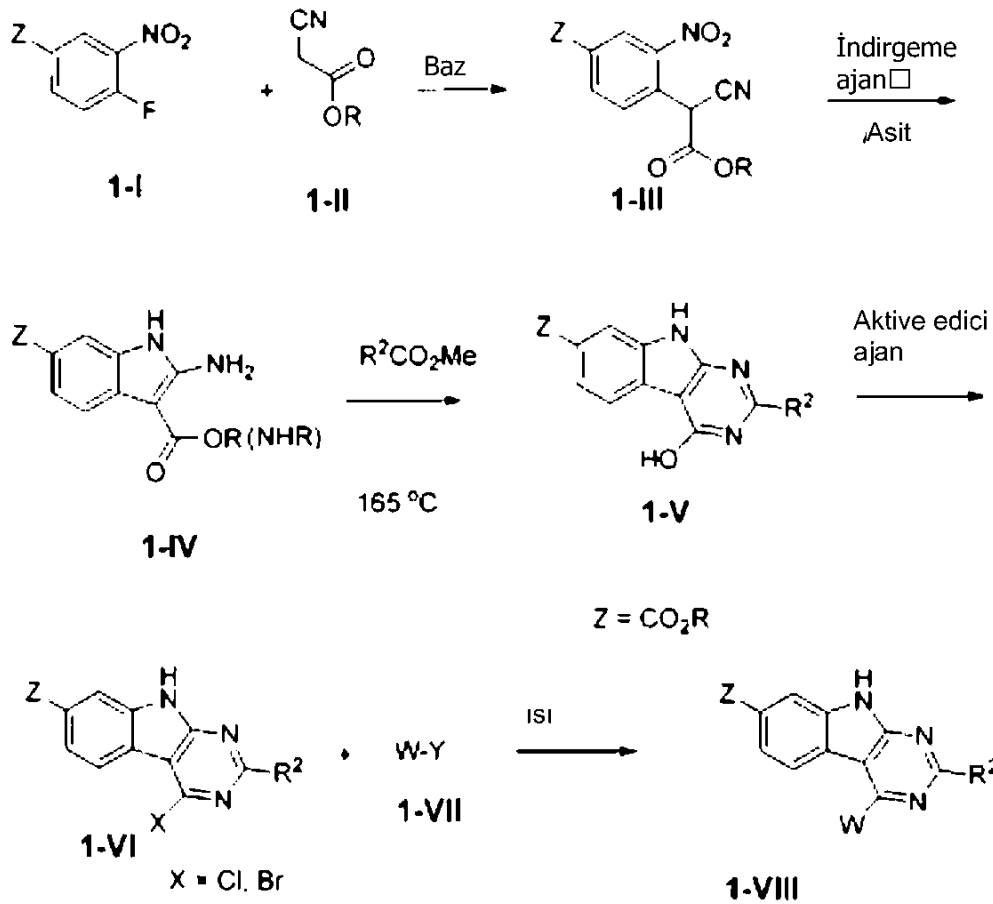
25

SENTETİK METODOLOJİ

Aşağıda özetlenen sentetik metodoloji, ikame Z'nin pirimido indol çekirdeklerinin 7-konumunda olduğu buluşun yapılandırılmaları ile ilgilidir, Teknikte uzman kişi tarafından anlaşılabilceği üzere, bir benzer sentetik metodoloji, ikame Z'nin, örneğin, 5, 8 veya 6-konumu, özellikle 6-konumunda gibi farklı bir konumda olduğu buluşun yapılandırılmalarıyla yönelik olarak, bu tür kişice anlaşılan varyasyonlar ile gerçekleştirilebilmektedir.

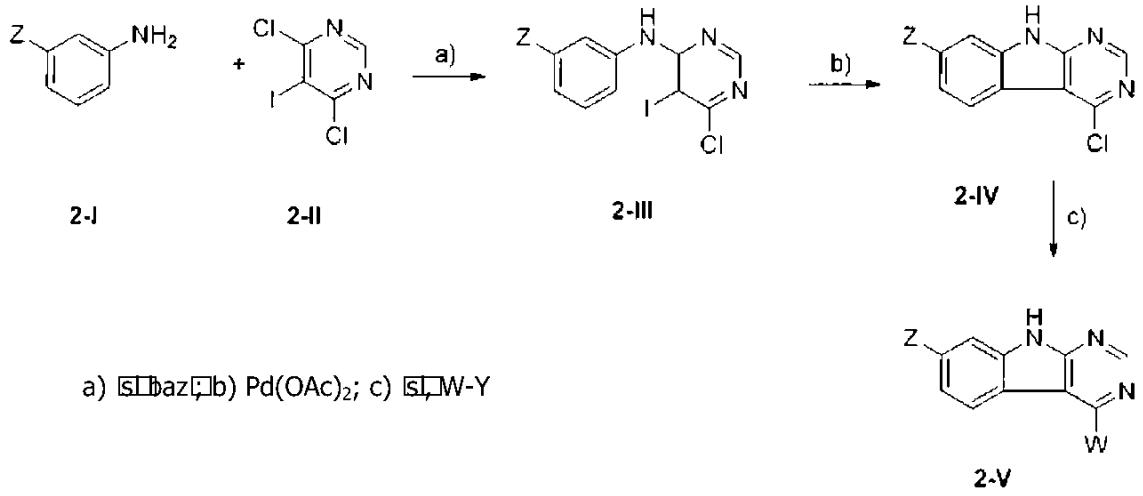
Şema 1, mevcut buluşun bileşiklerine ortak prekürsörün (**1-VI**) sentezini açıklamaktadır. Birinci adımda, bir aril florür **1-I**, sodyum hidrit gibi anacak bununla sınırlı olmayan bir bazın varlığında bir alkil siyanoasetat **1-II** ile işlenmektedir. Sonuçta oluşan ürün **1-III** sonrasında, formamid ve amonyum format ile işlem üzerine pirimidinlere **1-V**'e dönüştürülen amino indollerin **1-IV** sağlanması için asetik asitte çinko tozu gibi, ancak bununla sınırlı olmayan, bir indirgeyici ajan ile işlenmektedir. Bileşikler **1-V**, mevcut buluşun bileşikleri **1-VIII**'ün sağlanması için aminler **1-VII** ile işlenen reaktif ara maddelerin **1-VI** sağlanması için fosforil klorür veya fosforil bromür gibi reaktifler ile işlenmektedir.

Şema 1



Şema 2, bileşik **2-V**'in preparasyonunu açıklamaktadır. 4,6-dikloro-5-iyodopirimidin **2-II**'nin ve ilgili fenol, anilin veya tiyofenol **2-I**'nin bir baz ile veya baz olmadan tepkimesi (Morsin M. ve ark. Chemistry-A European Journal, 2009, cilt 15, #6, sayfa 1468-1477) veya aramaddelerin **2-III**'ü vermesi için bir paladyum katalizörü. Sonuçta oluşan ara maddeler **2-III**, Pd(OAc)₂ ile trisiklik eklenti **2-IV**'e dönüştürülmektedir (Zhang M. ve ark. Tetrahedron Letters, 2002, cilt43, sayfa 8235). Son olarak, burada aşağıda özetlenen Örnek 1'e göre, mevcut buluşun **2-V** bileşikleri elde edilmektedir.

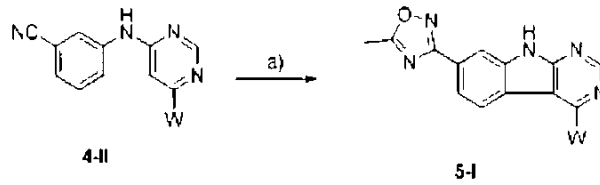
Şema 2



Şema 3: Bileşikler **4-II**, hidroksil amin ve bunu takiben dimetilasetamid dimetilasetal ile işlenmektedir (Tully W.R. ve ark. Journal of Medicinal Chemistry, 1991, cilt 34, sayfa 2060.

5 Bu, bileşikler **5-I**'i vermektedir.

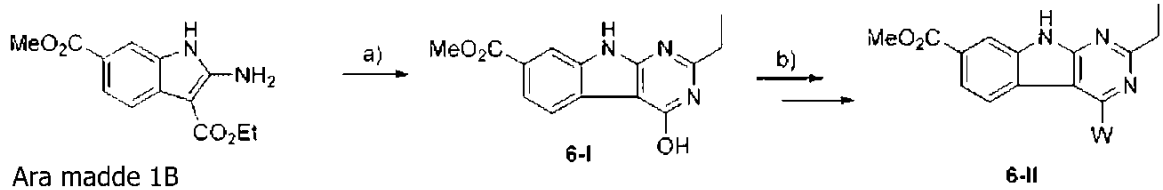
Şema 3



10 Şema 4: Ara madde 1B (burada aşağıdaki Örnek 1), HCl/dioksan içindeki propiyonitril, bunu takiben metil 2-etil-4-hidroksi-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (**6-I**) verecek şekilde bazik bir işlenmektedir. Sonrasında Örnek 1 için açılan prosedürlere göre **6-II** bileşikleri elde edilmektedir.

15

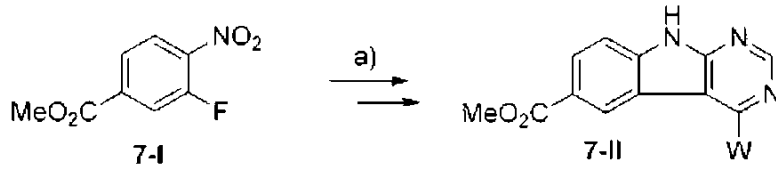
Şema 4



a) HCl, propiyonitril; b) bakınız Örnek 1

Şema 5: Metil 3-floro-4-nitrobenzoat **7-I**'den başlayarak ve Örnek 1'in prosedürüne göre bileşikler **7-II** elde edilmektedir.

Şema 5



a) bakınız örnek 1

Örnekler

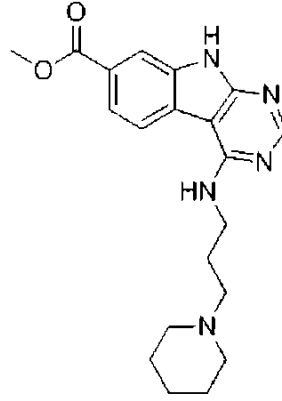
Genel

15 Rapor edilen HPLC algılama süresi, aşağıdaki Çözücü A koşulları kullanılarak ters fazlı HPLC'ye (Agilent, 1200 serisi) yöneliktir: MeOH:H₂O:TFA (5:95:0.05); Çözücü B: MeOH:H₂O:TFA (95:5:0.05); akış 3.0 mL/dk; 2.0 dakikada gradyan %0 ila 100 B; kolon: ZorbaxC18, 3.5 mikron, 4.6 x 30 mm; dalga boyu 220 nm.

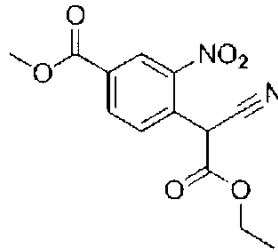
20 Kütle spektrumları aşağıdaki LC koşulları kullanarak Agilent Technologies'den elde edilen 6210 G1969A LC/MSD TOF spektrometresinde veya Agilent Technologies'den elde edilen Quadrupole LC/MS Model G6120B üzerinde kaydedilmiştir: Çözücü A: AcCN:H₂O:HCOOH (5:95:0.05); Çözücü B: AcCN:H₂O:HCOOH (95:5:0.05); 2.0 dakikada gradyan %0 ila 100 B; akış 0.3 mL/dk; kolon: ZorbaxC18, 3.5 mikron, 2.1 x 30 mm; dalga boyu 220 nm.

DeneySEL Prosedürler

Örnek 1



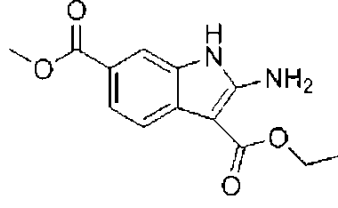
Metil 4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat Aramadde 1A



Metil 4-(1-siyano-2-etoksi-2-oksoetil)-3-nitrobenzoat

10 Etil 2-siyanoasetat (10.9 mL, 102 mmol) *N,N*-dimetilformamit (125 mL) içinde yer alan %60 sodyum hidrit (4.10 g, 102 mmol) süspansiyonuna 0°C'de yavaşça ilave edilir ve böylece gri bir süspansiyon elde edilir. Karışım 0°C'de 15 dakika boyunca karıştırılır ve *N,N*-dimetilformamit (125 mL) içinde yer alan metil 4-floro-3-nitrobenzoat (10.2 g, 51 mmol) ilave edilir. Elde edilen nihai koyu kırmızı karışım 0°C'de 30 dakika boyunca karıştırılır ve oda sıcaklığında 3 saat boyunca. Reaksiyon karışımına 1N HCl (40 mL) ve etil asetat (40 mL) ile 15 seyreltilir. Ayrıştırma için sulu katman etil asetat ile ekstrakte edilir (3 x 50 mL). Organik katmanlar birleştirilir ve anhidrit sodyum sülfat üzerinde kurutulur, filtre edilir ve konsantre edilir ve böylece bir tortu elde edilir (26 g) ve bu flaş kromatografi vasıtasıyla saflaştırılır (%100 heksanlar ile başlar ve yavaş yavaş etil asetat %100 etil asetatla tamamlamak için ilave edilir) ve böylece 14.9 g nihai bileşik elde edilir. LCMS m/z 291.0 (M - H)⁻, bekletme 20 süresi (analitik HPLC üzerinde) = 1.76 dakika.

Aramadde 1B

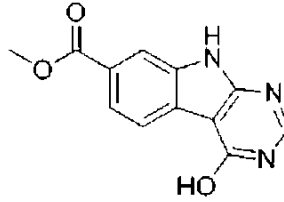


3-etil 6-metil 2-amino-1H-indol-3,6-dikarboksilat

- 5 500 mL yuvarlak tabanlı şişeye metil 4-(1-siyano-2-etoksi-2-oksoetil)-3-nitrobenzoat (14.9 g, 51.0 mmol) ve asetik asit (255 mL) içinde yer alan çinko tozu (16.7 g, 255 mmol) ilave edilir ve böylece gri bir süspansiyon elde edilir. Çinkonun ilave edilmesi 35 dakika oda sıcaklığında nitrojen atmosferi üzerinde ve hafif eksotermik olarak gerçekleştirilir. Karışım 100°C'de 15 saat boyunca ~~ısıtılır~~ Karışım soğutulmaya bırakılır, selit içinde filtre edilir ve etil asetat ile durulanır. Buharlaştırma işlemi sonrasında diklorometan-heksan içinde öğütülmüş bir tortu elde edilir ve filtreleme işleminden sonra 6.3 g nihai bileşik elde edilir. LCMS m/z 263.2 (M + H)⁺, bekletme süresi (analitik HPLC üzerinde) = 1.90 dakika.

Aramadde 1C

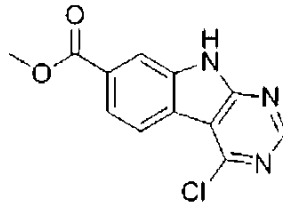
15



metil 4-hidroksi-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat

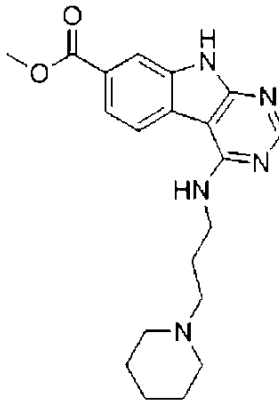
- 20 100 mL yuvarlak tabanlı şişeye 3-etil 6-metil 2-amino-1H-indol-3,6-dikarboksilat (1.1 g, 4.19 mmol), amonyum format (0.53 g, 8.39 mmol), ve formamit (16.7 mL, 419 mmol) ilave edilir ve böylece baki rengi süspansiyon elde edilir ve bu 165°C'ye 12 saat boyunca ~~ısıtılır~~ Karışım oda sıcaklığına soğutulması sağlanır ve su ilave edilir. Elde edilen nihai çökelti filtre edilir, hava ile kurutulur ve gece boyunca yüksek vakum altında kurutulur ve böylece 1.1 g
- 25 nihai bileşik elde edilir. LCMS m/z 244.2 (M + H)⁺, bekletme süresi (analitik HPLC üzerinde) = 1.51 dakika.

Aramadde 1D

metil 4-kloro-9*H*-pirimido[4,5-*b*]indol-7-karboksilat

100 mL yuvarlak tabanlı şişede metil 4-hidroksi-9H-pirimido[4,5-*b*]indol-7-karboksilat (1.1 g, 4.5 mmol) ve fosforlu oksiklorür (15 mL, 161 mmol) karışımı 90°C'ye 16 saat 50°C'de sıcaklığa soğutulur ve azaltılmış basınç altında buharlaştırılır. Tortu diklorometan (20 mL) içinde süspanse edilir ve selit içinde filtre edilir. Buharlaştırma işlemi sonrasında nihai bileşik elde kavuniçi katı olarak elde edilir (360 mg). LCMS m/z 262.0 (M+H)⁺, bekletme süresi (analitik HPLC üzerinde) = 2.02 dakika.

Örnek 1



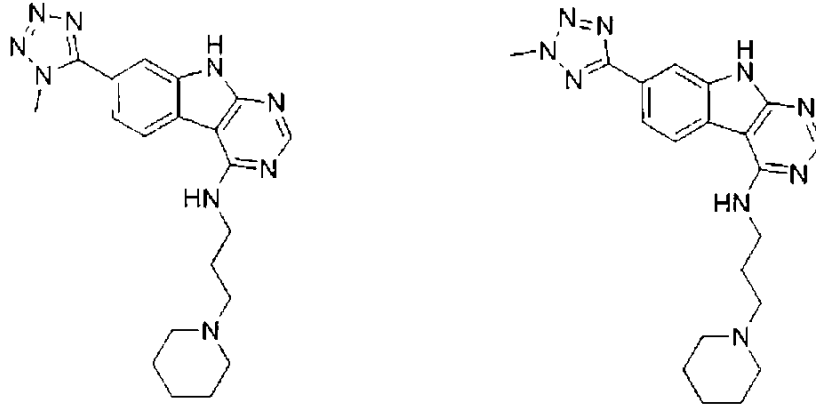
metil 4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9*H*-pirimido[4,5-*b*]indol-7-karboksilat

2-5 mL mikrodalga şişesi içinde metanol (2 mL) metil 4-kloro-9-*H*-pirimido[4,5-*b*]indol-7-karboksilat (86 mg, 0.33 mmol), trietilamin (0.09 mL, 0.66 mmol) ve 3-(piperidin-1-il)propan-1-amin (0.078 mL, 0.49 mmol) ilave edilir ve karışım 140°C'ye 15 dakika boyunca mikrodalga reaktörü içinde ısıtılır. Karışım oda sıcaklığına soğutulması sağlanır ve azaltılmış basınçta altında buharlaştırılır. Ham materyal *N,N*-dimetilformamit içinde çözündürülür ve ters evre Zorbax SB-C18 sütun 21.2 x 100 mm üzerinde saflaştırılır ve MeOH - Su - %0.1 TFA ile

ayrıştırılır. Gradyan: İsookratik %20 4 dakika boyunca bu işlemin ardından gradyan %100 MeOH 15 dakika hazırlanır. Nihai bileşik trifloroasetik asit salt elde edilir (ilgili serbest baz ve HCl tuzu teknikte uzman kişiler tarafından bilinen standart prosedürlere hazırlanmıştır). LCMS m/z 368.2 (M+H)⁺, bekleme süresi (analitik HPLC üzerinde) = 1.38 dakika.

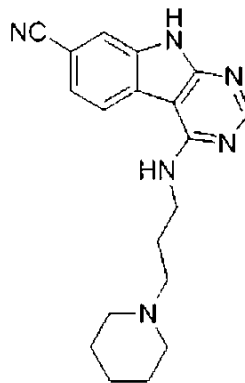
5

Örnek 14



- 10 7-(1-metil-1H-tetrazol-5-il)-N-(3-(piperidin-1-il)propil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-amin ve 7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-N-(3-(piperidin-1-il)propil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-amin.

Aramadde 14A



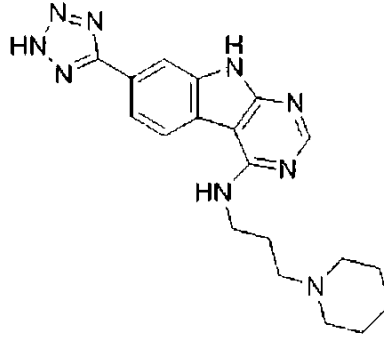
15

4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karbonitril

Örnek 1'de açıklanan prosedüre göre hazırlanmıştır. 4-floro-3-nitrobenzonitril, Aramadde 2A'den başlayarak.

20

Aramadde 14B

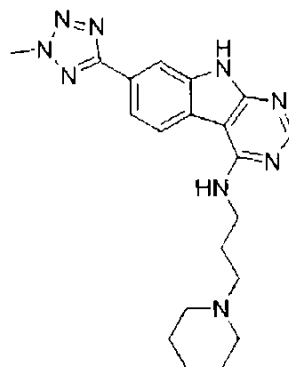
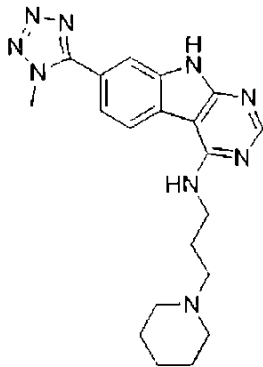


5

N-(3-(piperidin-1-yl)propil)-7-(2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-amin

2-5 mL mikrodalga şişesi içinde (triflorometil)benzen (2 mL) içinde yer alan 4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karbonitril (47.5 mg, 0.142 mmol) ve azidotribütültin (409 µl, 1.491 mmol) ilave edilir ve böylece bakı rengi süspansiyon elde edilir. şişe mikrodalga içine yerleştirilir ve 180°C'ye 30 dakika boyunca ısıtılır. Karışım kuru oluncaya kadar konsantre edilir ve MeOH (3 mL) ve ardından Dioksan (1.07 mL, 4.26 mmol) HCl 4M ilave edilir ve böylece sarı bir çözelti elde edilir. Elde edilen nihai çözeltiye dietil eter (3 mL) ilave edilir ve 20°C'de 16 saat karıştırılır. Elde edilen katı Buchner üzerinde toplanır. Kek dietil eter (3 x 1 mL) ve heksan (3 x 1 mL) ile yıkanır ve katı 30°C'de yüksek vakum altında sabit bir ağırlıkta elde edilinceye kadar kurutulur ve böylece 56 mg nihai bileşik HCl tuzu olarak elde edilir. LCMS m/z 378.2 (M+H)⁺, bekletme süresi (analitik HPLC üzerinde) = 1.30 dakika.

20 Örnek 14

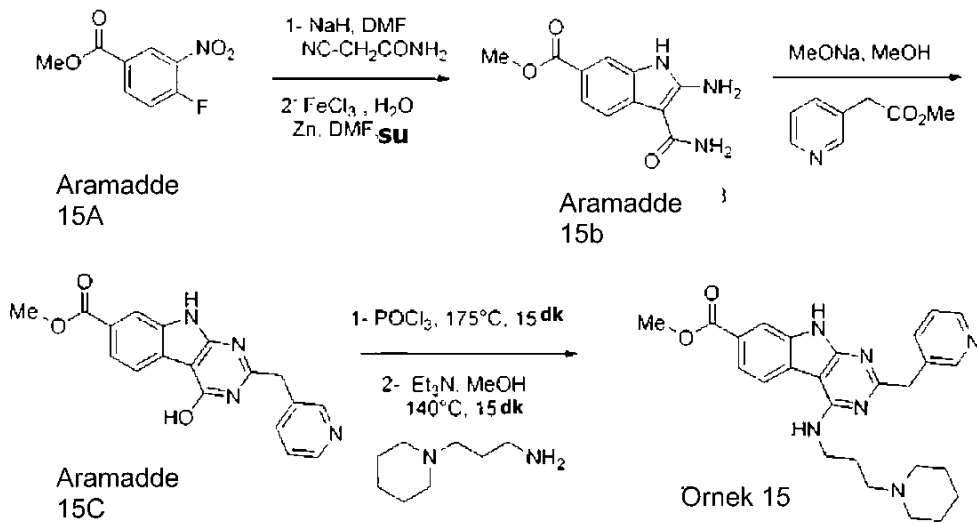


7-(1-metil-1H-tetrazol-5-il)-N-(3-(piperidin-1-il)propil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-amin ve 7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-N-(3-(piperidin-1-il)propil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-amin

- 5 25 mL yuvarlak tabanlı şişeye N-(3-(piperidin-1-il)propil)-7-(2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-amin hidroklorür (43 mg, 0.10 mmol) ve *N,N*-diisopropiletilamin (36 µl, 0.21 mmol) in tetrahidrofuran (2 mL) ve metanol (0.5 ml) ilave edilir ve böylece bakı rengi süspansiyon elde edilir. Heksan (260 µl, 0.52 mmol) içinde yer alan trimetilsilildiazometan 2M bu işlemin ardından ilave edilir. Elde edilen nihai ince sarı süspansiyon 20°C'de 3 saat boyunca karıştırılır ve asetik asit (59 µl, 1.04 mmol) ilave edilir. Stirring continued 30 dakika boyunca ve solventler vakum altında çıkarılır ve böylece bir tortu elde edilir ve bu flaş kromatografi vasıtasıyla saflaştırılır (%100 diklorometan ile başlar ve kademeli olarak ilave edilir karışım diklorometan : metanol: %28 olarak ağzı cinsinden. Sulu amonyum hidroksit (90 : 10 : 1) artırarak %100 diklorometan ile tamamlanır metanol: %28 olarak ağzı cinsinden. Sulu amonyum hidroksit (90 : 10 : 1). Birinci ayrıştırılacak ürün 7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-N-(3-(piperidin-1-il)propil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-amin (19 mg) ile elde edilir. LCMS m/z 392.2 (M+H)⁺, bekletme süresi (analitik HPLC üzerinde) = 1.44 dakika. İkinci ayrıştırılacak ürün 7-(1-metil-1H-tetrazol-5-il)-N-(3-(piperidin-1-il)propil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-amin (5 mg). LCMS m/z 392.2 (M+H)⁺, bekletme süresi (analitik HPLC üzerinde) = 1.27 dakika.

20

Örnek 15



- 25 NaH (3.41 g, 85 mmol) DMF içinde yer alan (53 mL) soğuk 2-siyanoasetamit (7.18 g, 85

mmol) çözeltisine k₂CO₃ olarak ilave edilir. 30 dakika sonra oda sıcaklığında, 15 mL DMF içinde metil 4-floro-3-nitrobenzoat (8.5 g, 42.7 mmol) çözeltisi damla şeklinde ilave edilir. 3 saat sonra buz, su ve 12 mL HCl (%10) karışımı ilave edilir. Elde edilen nihai katı filtre edilir, su ile durulan ve gece boyunca yüksek vakum altında kurutulur ve böylece 9.1 g metil 4-(2-amino-1-siyano-2-oksoetil)-3-nitrobenzoat elde edilir:

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.93 (s, 3 H) 5.78 (s, 1 H) 7.77 (s, 1 H) 7.91 (d, *J*=7.83 Hz, 1 H) 8.04 (s, 1 H) 8.39 (dd, *J*=8.02, 1.76 Hz, 1H) 8.56 (d, *J*=1.56 Hz, 1 H).

Ferik klorür heksahidrat (1.540 g, 5.70 mmol) ve çinko (1.242 g, 19.00 mmol) ham DMF içinde yer alan (4.75 mL) yukarıdaki gibi hazırlanmış siyano-amit (0.5 g, 1.900 mmol) ve su (4.75 mL) çözeltisine ilave edilir ve böylece sarı bir süspansiyon elde edilir. Eksoterm sonrasında karışım 100°C'ye 45 dakika ısıtılır ve bu işlemin ardından yavaşça 20°C'ye soğutulur ve 22 saat boyunca karıştırılır. Katı filtre edilir, DMF (3 x 3 mL) ile yıkanır ve filtrate su (40 mL) ile 0°C'de karıştırılarak seyreltilir. Katı filtre edilir ve kek su (2 x 5 mL) ile yıkanır. Katı genelde safsızlıklar içerir. Sulu katman EtOAc ile ekstrakte edilir (3 x 50 mL) ve birleştirilen organik katmanlar su (50 mL) ile yıkanır ve bu işlemin ardından tuzlu su ile (30 mL) yıkanır. Organik katman anhidrit MgSO₄ üzerinde kurutulur, filtre edilir ve konsantre edilir ve böylece 287 mg kahverengi katı olarak elde edilir ve bu aseton (6 mL) ile uygulamaya alınır ve böylece katı süspansiyon elde edilir ki bu heksan (5 mL) ile seyreltilir. Bu işlemin ardından katı toplanır ve kurutulur 40°C'de yüksek vakum altında sabit bir ağırlık elde edilinceye kadar ve böylece Aramadde 15B metil 2-amino-3-karbamoil-1H-indol-6-karboksilat (162 mg, %36.6 verim) kırmızı beyaz katı olarak elde edilir: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.80 (s, 3 H) 6.62 (br. s., 2 H) 7.04 - 7.18 (m, 2 H) 7.53 - 7.63 (m, 2 H) 7.72 (s, 1 H) 10.80 (s, 1 H); MS *m/z* 232.2 (M+H)⁺; HPLC ca. %96, ODA SICAKLIĞINDA = 1.37 dakika.

Metanol içinde yer alan (0.954 mL) Aramadde 15B (0.100 g, 0.429 mmol), metil 2-(piridin-3-il)asetat (0.130 g, 0.858 mmol) ve MeOH (0.196 mL) içinde %25 ağırlık cinsinden sodyum metoksit karışımı mikrodalga fırın içine yerleştirilir ve 140°C'ye 45 dakika ısıtılır. Soğutma sonrasında, AcOH (0.050 mL, 0.879 mmol) ilave edilir ve elde edilen nihai bulamaç 20°C'de 1 saat karıştırılır. Katılar filtre edilir, MeOH (3 x 0.5 mL) ile yıkanır. 20°C'de yüksek vakum altında sabit bir ağırlık elde edilinceye kadar kurutulur ve böylece Aramadde 15C elde edilir: metil 4-hidroksi-2-(piridin-3-ilmetil)-9H-pirimido[4,5-*b*]indol-7-karboksilat (82 mg, %57.2 verim) kahverengi katı olarak elde edilir: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.87 (s, 3 H) 4.09 (s, 2 H) 7.34 - 7.40 (m, 1 H) 7.79 (dt, *J*=8.1, 1.8 Hz, 1 H) 7.83 (dd, *J*=8.2, 1.2 Hz, 1 H) 7.99 (d, *J*=0.8 Hz, 1 H) 8.02 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 8.48 (dd, *J*=4.9, 1.4 Hz, 1 H) 8.60 (d, *J*=2.0

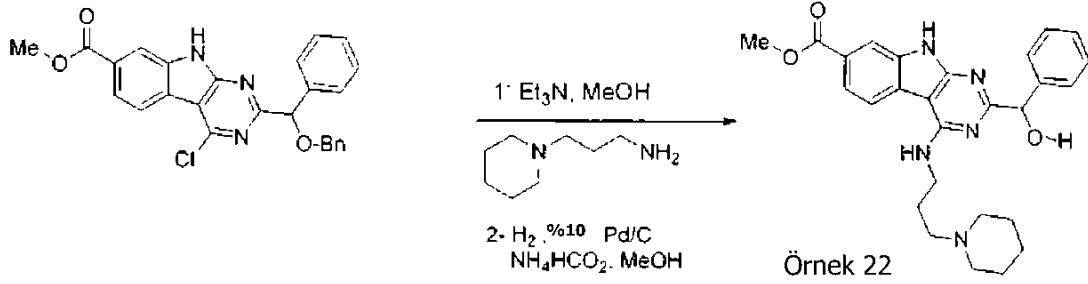
Hz, 1 H) 12.49 (br. s., 2 H): MS m/z 335.2 (M+H)⁺; HPLC %95.2 @ 220 nm ve %92.8 @ 254 nm, ODA SICAKLIĞINDA = 1.42 dakika.

5 POCl₃ (0.948 mL, 10.17 mmol) içinde yer alan metil 4-hidroksi-2-(piridin-3-ilmetil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (0.050 g, 0.150 mmol) karışım içine yerleştirilir ve 175°C'ye 15 dakika boyunca mikrodalga fırında soğutma sonrasında, reaksiyon karışım buz-su (19 mL) içine dökülür ve bu işlemin ardından 50% sulu NaOH (2.7 mL) yavaşça ilave edilmesiyle pH 8 değerine başlaştırılır ve son olarak EtOAc (20 mL) ile seyreltilir, katılar filtre edilir (klorürden ilk ürün) ve sulu katman EtOAc ile ekstrakte edilir (20 mL) ve birleştirilen organik katmanlar anhidrit MgSO₄ üzerinde kurutulur, filtre edilir ve kuru oluncaya kadar konsantre edilir ve böylece ilave 35 mg arzu edilen klorür türevi ürün elde edilir. Birleştirilen izole edilmiş metil 4-kloro-2-(piridin-3-ilmetil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (53 mg, %100 verim) ürünleri bir sonraki adımda doğrudan kullanılır.

15 MeOH (2.5 mL) içinde yer alan metil 4-kloro-2-(piridin-3-ilmetil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (0.053 g, 0.150 mmol), 3-(piperidin-1-il)propan-1-amin (0.072 mL, 0.451 mmol) ve trietilamin (0.063 mL, 0.451 mmol) karışım içine yerleştirilir ve 140°C'ye 15 dakika boyunca mikrodalga fırında 15 dakika boyunca soğutma sonrasında ve solventin buharlaştırılmasından sonra, tortu flaş kromatografi vasıtasıyla saflaştırılır ve böylece 23 mg sarıya + katı elde edilir ve bu CH₃CN (3 mL) ile seyreltilir ve 30 dakika boyunca karıştırılır. Katılar filtre edilir ve CH₃CN (2 x 0.5 mL) ile yıkanır, bu işlemin ardından 30°C'de yüksek vakum altında sabit bir ağırlık elde edilinceye kadar kurutulur ve böylece Örnek 15 bileşiği elde edilir: metil 4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-2-(piridin-3-ilmetil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (11 mg, %16 verim) bakır rengi katı olarak elde edilir: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.31 - 1.44 (m, 2 H) 1.44 - 1.56 (m, 4 H) 1.71 - 1.86 (m, 2 H) 2.17 - 2.47 (m, 6 H) 3.56 - 3.66 (m, 2 H) 3.88 (s, 3 H) 4.08 (s, 2 H) 7.28 - 7.34 (m, 1 H) 7.43 (t, J=5.5 Hz, 1 H) 7.76 (dt, J=7.8, 2.0 Hz, 1 H) 7.81 (dd, J=8.2, 1.4 Hz, 1 H) 7.99 (d, J=1.4 Hz, 1 H) 8.35 (d, J=8.2 Hz, 1 H) 8.41 (dd, J=4.7, 1.6 Hz, 1 H) 8.59 (d, J=2.0 Hz, 1 H) 12.08 (s, 1 H); MS m/z 459.2 (M+H)⁺; HPLC >%99.5, ODA SICAKLIĞINDA = 1.43 dakika.

30

Örnek 22



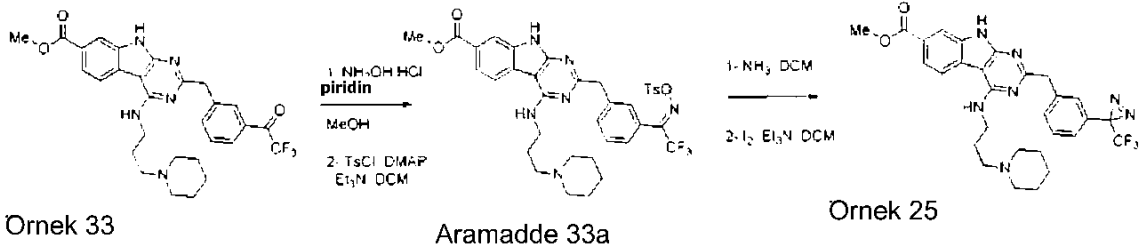
MeOH (3.8 mL) içinde yer alan metil 2-((benziloksi)(fenil)metil)-4-kloro-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (Örnek 15 için açıldığında gibi, 0.228 g, 0.498 mmol), 3-(piperidin-1-il)propan-1-amin (0.158 mL, 0.996 mmol) ve trietilamin (0.173 mL, 1.245 mmol) karışımı mikrodalga fırın içine yerleştirilir ve 140°C'ye 30 dakika boyunca 500 W Oda sıcaklığında soğutulduktan sonra, karışım kuru oluncaya kadar konsantre edilir ve tortu flaş kromatografi vasıtasıyla saflaştırılır ve böylece metil 2-((benziloksi)(fenil)metil)-4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimi-do[4,5-b]indol-7-karboksilat (172 mg, %61.3 verim) açıldığında olarak elde edilir: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.29 - 1.42 (m, 2 H) 1.42 - 1.56 (m, 4 H) 1.72 - 1.91 (m, 2 H) 2.18 - 2.47 (m, 6 H) 3.66 (tt, J=13.2, 6.6 Hz, 2 H) 3.88 (s, 3 H) 4.54 (d, J=11.7 Hz, 1 H) 4.64 (d, J=12.1 Hz, 1 H) 5.50 (s, 1 H) 7.21 - 7.43 (m, 8 H) 7.51 (t, J=5.9 Hz, 1 H) 7.57 (d, J=7.0 Hz, 2 H) 7.82 (dd, J=8.2, 1.2 Hz, 1 H) 8.00 (d, J=1.2 Hz, 1 H) 8.38 (d, J=8.2 Hz, 1 H) 12.22 (s, 1 H); HRMS m/z 564.2979 (M+H)⁺; HPLC %99.6, ODA SICAKLIĞINDA = 2.02 dakika.

Benzil grubun hidrojenoliz işlemi metil 2-((benziloksi)(fenil)metil)-4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (0.042 g, 0.075 mmol) türevi üzerinde %10 olarak ağartıcı cinsinden (%50 sıvı) (0.159 g, 0.075 mmol) ve amonyum format (0.235 g, 3.73 mmol) hidrojen altında metanol içinde yer alan Pd-C varlığında gerçekleştirilir. 26 saat 55°C'de karıştırıldıktan sonra, reaksiyon karışımını selit üzerinde filtre edilir, MeOH ile durulanır ve kuru oluncaya kadar döner buharlaştırıcısında konsantre edilir ve böylece 133 mg tortu elde edilir ki bu RP HPLC ile Zorbax SB-C18 sütun kullanılarak saflaştırılır, 21.2 x 150 mm ile ayrıştırılır MeOH - su - %0.1 TFA ve böylece 21.9 mg (%50 verim) Örnek 22 elde edilir: metil 2-(hidroksi(fenil)metil)-4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat, TFA salt beyaz katı olarak elde edilir: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.30 - 1.43 (m, 1 H) 1.52 - 1.73 (m, 3 H) 1.79 (br. d, J=14.5 Hz, 2 H) 1.96 - 2.09 (m, 2 H) 2.54 (s, 1 H) 2.74 - 2.89 (m, 2 H) 3.11 (dt, J=10.4, 5.4 Hz, 2 H) 3.38 (d, J=12.1 Hz, 2 H) 3.71 - 3.77 (m, 2 H) 3.88 (s, 3 H) 5.63 (s, 1 H) 7.19 - 7.26 (m, 1 H) 7.27 - 7.35 (m, 2 H) 7.48 - 7.56 (m, 2 H) 7.62 (t, J=5.9 Hz, 1 H) 7.85 (dd, J=8.2, 1.4 Hz, 1 H) 8.03 (d, J=1.4 Hz,

1 H) 8.38 (d, J=8.2 Hz, 1 H) 8.92 (br. s., 1 H) 12.21 (s, 1 H); HRMS m/z 474.2511 (M+H)⁺; HPLC >%99, ODA SICAKLIĞINDA = 1.68 dakika.

Dess-Martin periodinan reaktifi (22.67 mg, 0.053 mmol) DCM (1000 µL, 15.54 mmol) içinde yer alan metil 2-(hidroksi(fenil)metil)-4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (Örnek 22 bileşiği) ve TFA (15.7 mg, 0.027 mmol) karışımına ilave edilir ve böylece açık-kavuniçi bir çözelti elde edilir. 1 saat sonra, solvent buharlaştırılır ve tortu flaş kromatografi vasıtasıyla saflaştırılır ve böylece Örnek 23 elde edilir: metil 2-benzoil-4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (10 mg, %79 verim) açık-sarı katı olarak elde edilir: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.27 - 1.36 (m, 2 H) 1.36 - 1.48 (m, 4 H) 1.74 - 1.88 (m, 2 H) 2.14 - 2.44 (m, 6 H) 3.52 - 3.68 (m, 2 H) 3.91 (s, 3 H) 7.54 (t, J=7.8 Hz, 2 H) 7.69 (t, J=7.4 Hz, 1 H) 7.76 (t, J=5.1 Hz, 1 H) 7.90 (dd, J=8.2, 1.4 Hz, 1 H) 7.94 (d, J=7.0 Hz, 2 H) 8.10 (d, J=1.4 Hz, 1 H) 8.52 (d, J=8.2 Hz, 1 H) 12.43 (s, 1 H) ; HRMS m/z 472.2342 (M+H)⁺; HPLC %97.1 @ 220 nm ve %98.9 @ 254 nm, ODA SICAKLIĞINDA = 1.86 dakika.

Örnek 25



20

Hidroksilamin hidroklorür (0.08 g, 1.2 mmol) MeOH (4.00 mL) ve piridin (0.666 mL) içinde yer alan metil 4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-2-(3-(2,2,2-trifloroasetil)benzil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (Örnek 33 bileşiği) (0.285 g, 0.515 mmol) içine ilave edilir ve böylece sarı bir çözelti elde edilir. 60°C'de 5 gün süttükten sonra, karışım kuru oluncaya kadar konsantre edilir ve tortu DCM (75 mL) ve MeOH (15 mL) içinde çözündürülür ve bu çözelti doymuş NaHCO₃ (20 mL) ile yıkanır. Sulu katman karışımına CH₂Cl₂ (50 mL) ve MeOH (10 mL) ile iki kere ekstrakte edilir ve birleştirilen organik katmanlar anhidrit MgSO₄ üzerinde kurutulur, filtre edilir ve kuru oluncaya kadar konsantre edilir ve böylece metil 4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-2-(3-(2,2,2-trifloro-1-(hidroksiimino)etil)benzil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (293 mg, %100 verim) kırmızı beyaz katı olarak elde edilir: ¹H NMR (400

30

MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.32 - 1.43 (m, 2 H) 1.44 - 1.56 (m, 4 H) 1.76 - 1.87 (m, 2 H) 2.23 - 2.44 (m, 6 H) 3.57 - 3.67 (m, 2 H) 3.88 (s, 3 H) 4.04 - 4.12 (m, 2 H) 7.25 - 7.33 (m, 1 H) 7.34 - 7.46 (m, 2 H) 7.50 (m, J=7.6, 4.1 Hz, 1 H) 7.55 (d, J=7.4 Hz, 1 H) 7.81 (dd, J=8.2, 1.2 Hz, 1 H) 7.99 (d, J=1.2 Hz, 1 H) 8.36 (d, J=8.2 Hz, 1 H) 12.07 (d, J=3.5 Hz, 1 H); MS m/z 569.2 (M+H)⁺; HPLC >%95, ODA SICAKLIĞINDA = 1.88 dakika.

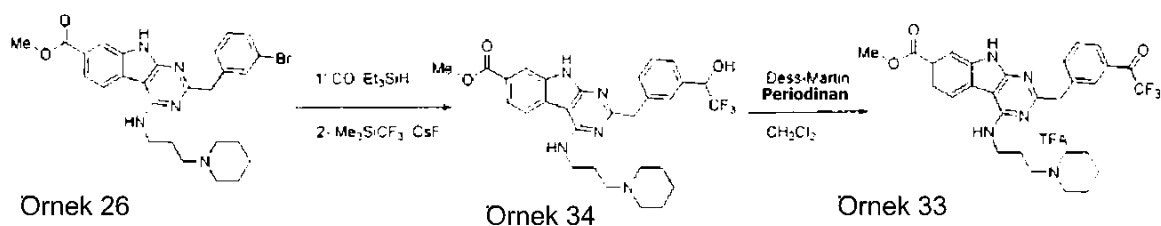
Tosil klorür (0.048 g, 0.251 mmol) DCM (10.00 mL) içinde yer alan soğuk metil 4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-2-(3-(2,2,2-trifloro-1-(hidroksiimino)etil)benzil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (0.130 g, 0.229 mmol), 4-dimetilaminopiridin (2.79 mg, 0.023 mmol) ve trietilamin (0.038 mL, 0.274 mmol) karışımına katılarak ilave edilir ve böylece beyaz bir süspansiyon elde edilir. Oda sıcaklığında bir saat sonra, karışımın bir çözeltisi DCM (10 mL) ile seyreltilir ve su (3 x 10 mL) ile yıkanır. Organik katman anhidrit MgSO₄ üzerinde kurutulur, filtre edilir ve kuru oluncaya kadar konsantre edilir ve böylece metil 4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-2-(3-(2,2,2-trifloro-1-((tosyloksi)imino)etil)benzil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (188 mg, %99 verim) bakır rengi köpük olarak elde edilir: MS m/z 723.2 (M+H)⁺; HPLC >%89, ODA SICAKLIĞINDA = 2.09 dakika.

DCM (5.00 mL) içinde yer alan metil 4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-2-(3-(2,2,2-trifloro-1-((tosiloksi)imino)etil)benzil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (0.188 g, 0.260 mmol) çözeltisi -78°C'ye soğutulur, amonyak (1.689 mL, 78 mmol) ilave edilir ve tüp sızdırılmaz bir şekilde kapatılır ve 20°C'ye iletir. Reaksiyon karışımı zamanla maviye dönüşür ve 3.5 saat sonra bu tekrar -78°C'ye soğutulur ve bu işlemin ardından yavaşça 20°C'ye iletir ve burada septa + nitrojen çukur amonyakın çoğunu buharlaştırır. 3.5 saat sonra, reaksiyon karışımı Buchner ile filtre edilir ve böylece amonyum p-toluenesulfonate çoğu çıkarılır. Katılar DCM (3 x 1.5 mL) ile yıkanır ve filtrat kuru oluncaya kadar konsantre edilir ve böylece sarı bir köpük elde edilir ve bu flaş kromatografi vasıtasıyla saflaştırılır ve böylece metil 4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-2-(3-(3-(tri-florometil)diaziridin-3-il)benzil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (115 mg, %78 verim) beyaz köpük olarak elde edilir: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.31 - 1.43 (m, 2 H) 1.50 (quin, J=5.3 Hz, 4 H) 1.80 (dt, J=14.1, 7.0 Hz, 2 H) 2.32 (m, J=6.7, 6.7 Hz, 6 H) 3.58 - 3.67 (m, 2 H) 3.88 (s, 3 H) 3.93 (br. d, J=7.4 Hz, 1 H) 4.05 (br. d, J=8.6 Hz, 1 H) 4.07 (s, 2 H) 7.32 - 7.43 (m, 3 H) 7.47 (m, J=6.3 Hz, 1 H) 7.59 (s, 1 H) 7.81 (dd, J=8.4, 1.2 Hz, 1 H) 7.99 (d, J=1.2 Hz, 1 H) 8.35 (d, J=8.4 Hz, 1 H) 12.07 (s, 1 H); MS m/z 568.2 (M+H)⁺; HPLC >%94, ODA SICAKLIĞINDA = 1.72 dakika.

İyodür (0.028 g, 0.111 mmol) karışımın DCM (2 mL) içinde yer alan metil 4-((3-(piperidin-1-

il)propil)amino)-2-(3-(3-(tri-florometil)diaziridin-3-il)benzil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (0.060 g, 0.106 mmol) ve trietilamin (0.044 mL, 0.317 mmol) içine ilave edilir ve böylece sarı bir çözelti elde edilir. 15 dakika sonra, solvent azaltılır ve basıncı altında buharlaştırılır ve böylece bir tortu elde edilir ve bu flaş kromatografi vasıtasıyla saflaştırılır ve böylece 95 mg sarı bir köpük elde edilir. Köpük DCM (15 mL) içinde çözündürülür ve doymuş NaHCO₃ (10 mL) ile yıkanır. Organik katman anhidrit MgSO₄ üzerinde kurutulur, filtre edilir ve kuru oluncaya kadar konsantre edilir ve böylece Örnek 25 bileşiği elde edilir: metil 4-((3-(piperidin-1-il)pro-pil)amino)-2-(3-(3-(triflorometil)-3H-diazirin-3-il)benzil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (50 mg, %84 verim) açık sarı katı olarak elde edilir: ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.36 (m, J=5.1 Hz, 2 H) 1.48 (kuin, J=5.5 Hz, 4 H) 1.76 (kuin, J=7.0 Hz, 2 H) 2.30 (br. t, J=6.5, 6.5 Hz, 6 H) 3.54 - 3.67 (m, 2 H) 3.88 (s, 3 H) 4.09 (s, 2 H) 7.14 (d, J=7.8 Hz, 1 H) 7.26 (s, 1 H) 7.38 - 7.47 (m, 2 H) 7.52 (d, J=7.4 Hz, 1 H) 7.81 (d, J=8.2 Hz, 1 H) 7.99 (s, 1 H) 8.35 (d, J=8.2 Hz, 1 H) 12.06 (s, 1 H); HRMS m/z 566.2497 (M+H)⁺; HPLC %94.5 @ 220 nm ve %92.9 @ 254 nm, ODA SICAKLIĞINDA = 2.05 dakika.

Örnekler 33 ve 34



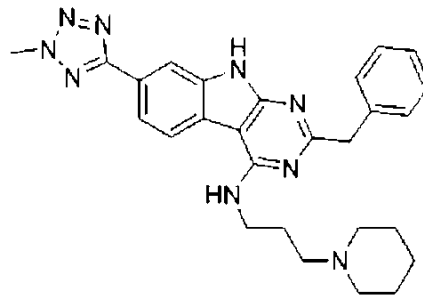
CO metil 2-(3-bromobenzil)-4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimi-do[4,5-b]indol-7-karboksilat (hazırlanmış Örnek 15, 0.090 g, 0.168 mmol), trietilsilan (0.054 mL, 0.336 mmol) ve PdCl₂ (dppf) (6.14 mg, 8.39 μmol) çözeltisi içinde fokurdattırılır ve karışım gece boyunca 95°C'de ısıtılır. Ham karışım preparatif HPLC ile saflaştırılır ve böylece 44mg karbonilatlı ürün katı olarak elde edilir: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.28 - 1.40 (m, 1 H) 1.50 - 1.72 (m, 3 H) 1.73 - 1.84 (m, 2 H) 1.95 - 2.06 (m, 2 H) 2.74 - 2.87 (m, 2 H) 3.03 - 3.12 (m, 2 H) 3.33 - 3.41 (m, 2 H) 3.88 (s, 3 H) 4.20 (s, 2 H) 7.46 - 7.60 (m, 2 H) 7.73 (d, J=7.83 Hz, 1 H) 7.79 (d, J=7.43 Hz, 1 H) 7.84 (dd, J=8.22, 1.57 Hz, 1 H) 7.91 (s, 1 H) 8.01 (d, J=1.17 Hz, 1 H) 8.37 (d, J=8.61 Hz, 1 H) 8.92 (br. s., 1 H) 10.00 (s, 1 H) 12.16 (s, 1 H).

Trimetil(triflorometil)silan (0.7 mL, 3.5 mmol) karışımına metil 2-(3-formilbenzil)-4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (0.260 g, 0.535 mmol) ve

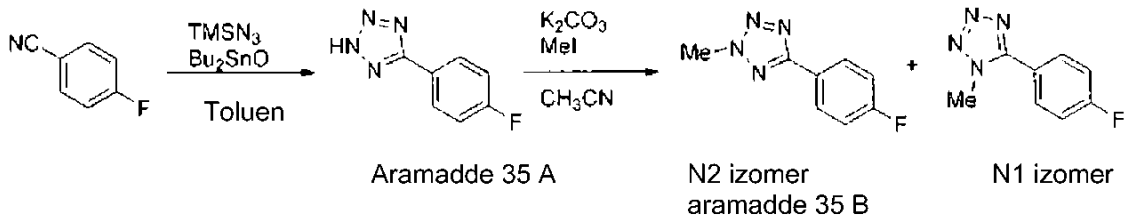
sezyum florür (5.69 mg, 0.037 mmol) ilave edilir ve 0°C'ye soğutulur. 2 gün oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra, HCl konsantrasyonuna (0.5 mL) 2 mL su ilave edilir ve 15 dakika karıştırılır. Karışım etil asetat ile seyreltilir, katı Na₂CO₃ ile nötrlenir, evreler ayrıştırılır ve sulu katman etil asetat (EA) ile 2 kere ekstrakte edilir. Birleştirilen organik katmanlar su ile yıkanır, anhidrit MgSO₄ üzerinde kurutulur, filtre edilir ve solvent çıkarılır ve böylece bir tortu elde edilir ki bu preparatif HPLC ile saflaştırılır ve böylece 126 mg ilgili TFA tuzu elde edilir: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.24 - 1.43 (m, 1 H) 1.49 - 1.73 (m, 4 H) 1.73 - 1.82 (m, 2 H) 1.97 - 2.07 (m, 2 H) 2.80 (q, J=11.70 Hz, 2 H) 3.02 - 3.12 (m, 2 H) 3.36 - 3.42 (m, 2 H) 3.88 (s, 3 H) 4.10 (s, 2 H) 5.12 (q, J=7.17 Hz, 1 H) 6.81 (br. s., 1 H) 7.30 - 7.35 (m, 2 H) 7.36 - 7.42 (m, 1 H) 7.48 - 7.58 (m, 2 H) 7.84 (dd, J=8.41, 1.37 Hz, 1 H) 8.01 (s, 1 H) 8.37 (d, J=8.61 Hz, 1 H) 8.95 (br. s., 1 H) 12.17 (s, 1 H); MS m/z 554.2 (M+H)⁺; HPLC RT 2.142 dakika.

Dess-Martin periodinan (56.5 mg, 0.133 mmol) DCM (753 µL) içinde yer alan metil 4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-2-(3-(2,2,2-trifloro-1-hidroksietil)benzil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (20 mg, 0.036 mmol) içine ilave edilir ve böylece beyaz bir süspansiyon elde edilir. 20°C'de 1 saat boyunca karıştırıldıktan sonra karışım flaş kromatografi vasıtasıyla saflaştırılır ve böylece metil 4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-2-(3-(2,2,2-trifloroasetil)benzil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat Örnek 33 (18.4 mg, %92 verim) olarak sarı katı formda elde edilir: ¹H NMR DMSO-d₆ içinde arzu edilen ürün ile uyumludur ve hidrat formları nedeniyle komplikedir; HRMS m/z 554.2384 (M+H)⁺; HPLC >%95, ODA SICAKLIĞINDA = 1.76 ve 1.87 dakika (keton + hidrat).

Örnek 35



Aramadde 35B: N2 izomer öncül



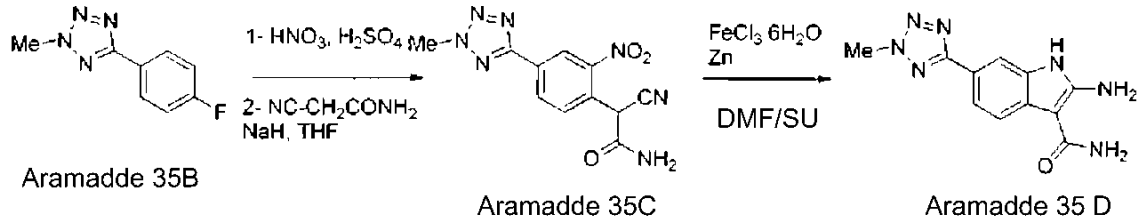
Toluen (165 mL) içinde yer alan 4-florobenzonitril (5 g, 41.3 mmol), dibütiltin oksit (2.055 g, 8.26 mmol), ve trimetilsilil azit (8.22 mL, 61.9 mmol) karıştırılır ve 100°C'ye 16.5 saat 5 karıştırılır. Oda sıcaklığında soğutulduktan sonra, organik katman NaOH 1M (83 mL) ile ekstrakte edilir ve sulu katman EtOAc (2 x 85 mL) ile yıkanır. Sulu katman HCl 2M (41.3 mL) ile asitleştirilir ve pH 2 değeri sağlanır. Sulu karışım EtOAc ile iki kere ekstrakte edilir (200 mL bu işlemin ardından 100 mL) ve birleştirilen organik katmanlar tuzlu su ile yıkanır (60 mL), anhidrit MgSO₄ üzerinde kurutulur, filtre edilir ve kuru oluncaya kadar konsantre edilir ve 10 böylece Aramadde 35A (5-(4-florofenil)-2H-tetrazol, 6.61 g, %98 verim) beyaz katı olarak elde edilir: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 7.42 - 7.53 (m, 2 H) 8.04 - 8.14 (m, 2 H); MS m/z 165.2 (M+H)⁺; HPLC >%99.5, ODA SICAKLIĞINDA = 1.96 dakika.

Asetonitril (115 mL) içinde yer alan 5-(4-florofenil)-2H-tetrazol (6.61 g, 40.3 mmol), K₂CO₃ 15 (6.68 g, 48.3 mmol), ve iometan (3.02 mL, 48.3 mmol) karıştırılır 1 saat reflaksa 82°C (ca. 82°C). Soğutma sonrasında, karışım kuru oluncaya kadar konsantre edilir ve tortu su (75 mL) ve EtOAc (100 mL) arasında ayrıştırılır. Katmanlar ayrıştırılır, sulu katman EtOAc (50 mL) ile tekrar ekstrakte edilir ve birleştirilen organik katmanlar su (50 mL) ve tuzlu su (50 mL) ile yıkanır. Organik katman anhidrit MgSO₄ üzerinde kurutulur, filtre edilir ve konsantre edilir ve 20 böylece 9.5 g renksiz bir yağ olarak elde edilir ve bu bekleme alarak katılaşır. Tortu flaş kromatografi vasıtasıyla saflaştırılır ve böylece 2 ana ürün elde edilir: Aramadde 35B N2 izomer olarak elde edilir: 5-(4-florofenil)-2-metil-2H-tetrazol (5.09 g, %70.9 verim) beyaz katı olarak elde edilir: 4.42 ppm'de metil grubu ve aromatik protonlar arasında hiçbir NOE gözlemlenmemiştir; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 4.42 (s, 3 H) 7.33 - 7.45 (m, 2 H) 8.03 - 8.14 (m, 2 H); MS m/z 179.2 (M+H)⁺; HPLC >%99.5, ODA SICAKLIĞINDA = 1.75 25 dakika.

N1 izomer: 5-(4-florofenil)-1-metil-1H-tetrazol (1.87 g, %26.1 verim) beyaz katı olarak elde edilir: 4.16 ppm'de metil grubu ve aromatik protonlar arasında hiçbir NOE gözlemlenmemiştir, 7.89 - 7.97 ppm yapıyı teyit eder; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 4.16 (s, 3 H) 7.43 - 7.53 (m, 2 H) 7.89 - 7.97 (m, 2 H); MS m/z 179.2 (M+H)⁺; HPLC 30

>99.5%, ODA SICAKLIĞINDA = 1.29 dakika.

Aramadde 35 C ve D



5

Sülfürik asit (16.45 mL, 309 mmol) içinde yer alan Aramadde 35B (5-(4-florofenil)-2-metil-2H-tetrazol, 1 g, 5.61 mmol) çözeltisi 0°C'ye soğutulur ve bu işlemin ardından dumanlı tüten nitrik asit (0.288 mL, 6.17 mmol) damla şeklinde ilave edilir. 2.5 saat sonra, daha fazla fumik nitrik asit (0.065 mL, 1.403 mmol) ilave edilir ve karışım 20°C'ye soğutulur. 5 saat sonra, karışım 2:1 buz-su karışım (150 mL) içine dökülür ve böylece beyaz bir süspansiyon elde edilir. 30 dakika sonra, katı filtre edilir, su (4 x 10 mL, nötr pH elde edilinceye kadar) ile yıkanır, 25°C'de yüksek vakum altında sabit bir ağırlık elde edilinceye kadar kurutulur: 5-(4-floro-3-nitrofenil)-2-metil-2H-tetrazol (1.16 g, %93 verim) kırmızı beyaz katı olarak elde edilir: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 4.47 (s, 3 H) 7.81 (dd, J=11.2, 8.8 Hz, 1 H) 8.44 (ddd, J=8.7, 4.2, 2.3 Hz, 1 H) 8.68 (dd, J=7.2, 2.2 Hz, 1 H); MS m/z 224.2 (M+H)⁺; HPLC %98.3, ODA SICAKLIĞINDA = 1.72 dakika.

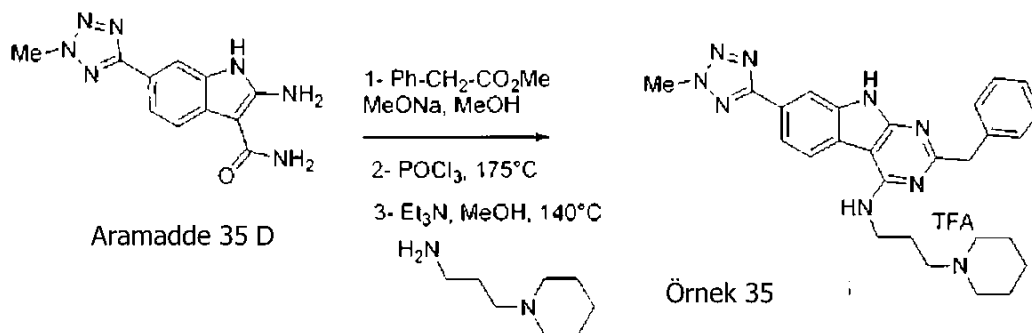
15

DMF içinde yer alan (2.268 mL) 2-siyanoasetamit (0.888 g, 10.56 mmol) çözeltisi %60 olarak ağırlık cinsinden sodyum hidrit süspansiyonuna ilave edilir. DMF içinde yer alan (5.67 mL) mineral yağ (0.443 g, 11.08 mmol) ilave edilir ve böylece gri bir süspansiyon elde edilir. 0°C'ye soğutma sonrasında (Not: Hidrojen Gazı gelişimi) elde edilen nihai karışım 0°C'de 30 dakika boyunca karıştırılır. Bu işlemin ardından DMF içinde yer alan (2.3 mL) 5-(4-floro-3-nitrofenil)-2-metil-2H-tetrazol (1.15 g, 5.15 mmol) çözeltisi ilave edilir ve böylece koyu mor çözelti elde edilir. 3 saat sonra, reaksiyon karışımı yavaşça buz - su karışımı (33.0 mL) ve konsantre HCl (0.952 mL) içine dökülür. Elde edilen nihai sarı bulamaç 30 dakika boyunca karıştırılır, katı filtre edilir, su (3 x 5 mL) ile yıkanır ve bu işlemin ardından Heksan (2 x 5 mL) ile yıkanır, 40°C'de yüksek vakum altında sabit bir ağırlık elde edilinceye kadar kurutulur ve böylece 2-siyano-2-(4-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-2-nitrofenil)asetamit (1.41 g, %95 verim) sarı katı olarak elde edilir: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 4.49 (s, 3 H) 5.77 (s, 1 H) 7.77 (s, 1 H) 7.95 (d, J=8.2 Hz, 1 H) 8.03 (s, 1 H) 8.51 (dd, J=8.2, 1.8 Hz, 1 H) 8.70 (d, J=1.8

30

Hz, 1 H); MS m/z 288.1 (M+H)⁺; HPLC %96.4 @ 220 nm, ODA SICAKLIĞINDA = 1.31 dakika.

5 Ferrik klorür heksahidrat (2.82 g, 10.44 mmol) ve çinko (2.276 g, 34.8 mmol) kışın kışın olarak DMF içinde yer alan (8.71 mL) 2-siyano-2-(4-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-2-nitrofenil)asetamit (1 g, 3.48 mmol) ve su (8.71 mL) karışımına ilave edilir ve böylece sarı bir süspansiyon elde edilir ve bu 100°C'ye 1.25 saat içinde ısıtılır. Karışım bu işlemin ardından 20°C'ye soğutulur, MeOH (50.0 mL) ile seyreltilir, selit üzerinde filtre edilir ve azaltılmış basıncı altında 20 mL'ye konsantre edilir (böylece çoğu MeOH çıkarılır). Bu işlemin ardından 10 karışım su (50 mL) ve EtOAc (100 mL) ile seyreltilir, şiddetli bir şekilde karıştırılır ve filtre edilir. Sulu katman EtOAc ile ekstrakte edilir (2 x 50 mL) ve birleştirilen organik katmanlar doymuş NaHCO₃ (50 mL) ve tuzlu su (50 mL) ile yıkanır. Organik katman anhidrit MgSO₄ üzerinde kurutulur, filtre edilir ve konsantre edilir ve böylece 489 mg mor katı olarak elde edilir ve bu flaş kromatografi vasıtasıyla saflaştırılır ve böylece 2-amino-6-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-1H-indol-3-karboksamit (356 mg, %39.7 verim) mor katı olarak elde edilir: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 4.38 (s, 3 H) 6.57 (s, 2 H) 7.01 (s, 2 H) 7.61 - 7.69 (m, 2 H) 7.81 (s, 1 H) 10.77 (s, 1 H); MS m/z 258.2 (M+H)⁺; HPLC ca, %78, ODA SICAKLIĞINDA = 1.34 dakika.



Bir mikrodalga tüpü içinde yer alan aramade 35D (2-amino-6-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-1H-indol-3-karboksamit, 0.35 g, 1.361 mmol), metil 2-fenilasetat (0.288 mL, 2.041 mmol) ve %25 ağırlık cinsinden MeOH (0.467 mL) içindeki sodyum metoksit ve metanol (3.03 mL) karışımını mikrodalga fırını içine yerleştirilir ve 140°C'ye bir saat içinde ısıtılır. Oda sıcaklığında soğutulduktan sonra ve su (1 mL) ile seyreltilir ve AcOH (4 mL) karışım 30 dakika boyunca karıştırılır ve kristalleşme sağlanır. Katı filtre edilir, MeOH (5 x 1 mL) ile yıkanır, 40°C'de yüksek vakum altında sabit bir ağırlık elde edilinceye kadar kurutulur ve böylece 2-benzil-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-ol (220 mg, %45.2 verim) kahverengi

katı olarak elde edilir. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 4.03 (s, 2 H) 4.43 (s, 3 H) 7.24 - 7.29 (m, 1 H) 7.34 (t, J=7.8 Hz, 2 H) 7.37 - 7.43 (m, 2 H) 7.92 (dd, J=8.0, 1.4 Hz, 1 H) 8.04 - 8.10 (m, 2 H) 12.38 (s, 1 H) 12.47 (s, 1 H); MS m/z 358.2 (M+H)⁺; HPLC %82.9, ODA SICAKLIĞINDA = 1.89 dakika.

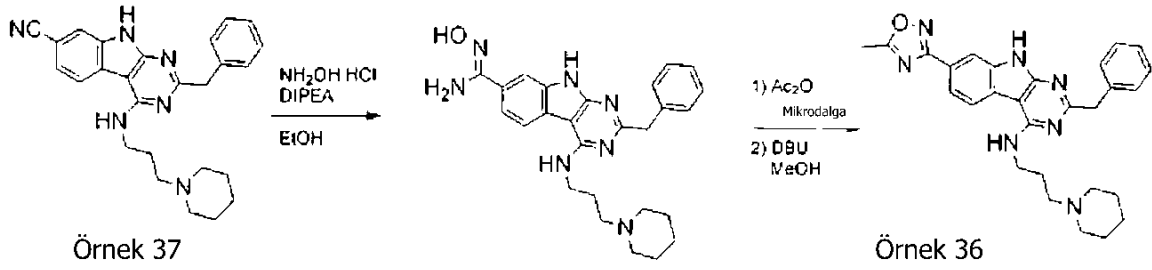
5

2-5 mL mikrodalga şişesi içine ham ürün 2-benzil-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-ol (0.220 g, 0.616 mmol) ve POCl₃ (3.90 mL, 41.9 mmol) ilave edilir ve böylece kahverengi bir süspansiyon elde edilir. Şişe mikrodalga içine yerleştirilir ve 175°C'ye 15 dakika ısıtılır, bu işlemin ardından soğutulmaya bırakılır. Reaksiyon karışımı bu işlemin ardından su ve buz karışımı (80 ml) içine dökülür, pH 8 değerine NaOH %50 olarak ağzı cinsinden (11 mL) yavaşça ilave edilmesiyle bazlaşır ve bu işlemin ardından EtOAc (80 mL) ilav edilir. Some katılar filtre edilir ve katmanlar ayrıştırılır. Sulu katman EtOAc ile ekstrakte edilir (80 mL) ve organik katman anhidrit MgSO₄ üzerinde kurutulur, filtre edilir ve kuru oluncaya kadar konsantre edilir ve böylece ilgili kloro türevi elde edilir: 2-benzil-4-kloro-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol (189 mg, %82 verim) kahverengi katı olarak elde edilir ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 4.31 (s, 2 H) 4.46 (s, 3 H) 7.20 - 7.26 (m, 1 H) 7.28 - 7.39 (m, 4 H) 8.09 (dd, J=8.2, 1.2 Hz, 1 H) 8.21 - 8.25 (m, 1 H) 8.39 (d, J=8.2 Hz, 1 H) 12.93 (s, 1 H); MS m/z 376.2 (M+H)⁺; HPLC %95.6, ODA SICAKLIĞINDA = 2.30 dakika.

20

MeOH (0.6 mL) içinde yer alan ve yukarıda açıklanmış gibi hazırlanan 2-benzil-4-kloro-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol (0.050 mg, 0.133 mmol) ve Et₃N (0.037 mL, 0.266 mmol) ve 3-(piperidin-1-il)propan-1-amin (0.033 mL, 0.200 mmol) karışımı 25 dakika 140°C'de mikrodalga fırında ısıtılır. Soğutma sonrasında ve solventin buharlaştırılmasından neticesinde, tortu RP-HPLC (MeOH-su (%0.5 TFA) %20 ila %100 MeOH olarak saflaştırılır ve böylece 55 mg Örnek 35 elde edilir: 2-benzil-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-N-(3-(piperidin-1-il)propil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-amin 2,2,2-trifloroasetat; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.27 - 1.41 (m, 1 H) 1.53 - 1.72 (m, 3 H) 1.79 (d, J=13.69 Hz, 2 H) 1.98 - 2.09 (m, 2 H) 2.75 - 2.87 (m, 2 H) 3.09 (dt, J=10.27, 5.23 Hz, 2 H) 3.39 (d, J=11.35 Hz, 2 H) 3.69 (q, J=5.87 Hz, 2 H) 4.09 (s, 2 H) 4.44 (s, 3 H) 7.18 - 7.24 (m, 1 H) 7.31 (t, J=7.63 Hz, 2 H) 7.35 - 7.42 (m, 2 H) 7.51 (br. s., 1 H) 7.93 (dd, J=8.22, 1.17 Hz, 1 H) 8.11 (d, J=1.17 Hz, 1 H) 8.43 (d, J=8.22 Hz, 1 H) 9.04 (br. s., 1 H) 12.15 (s, 1 H); HPLC %99 254 nm, Oda sıcaklığı (Rt) 2.063 dakika; HRMS m/z 482.2817 (M+H)⁺.

35 **Örnek 36** (siyanür metil oksadiazol)

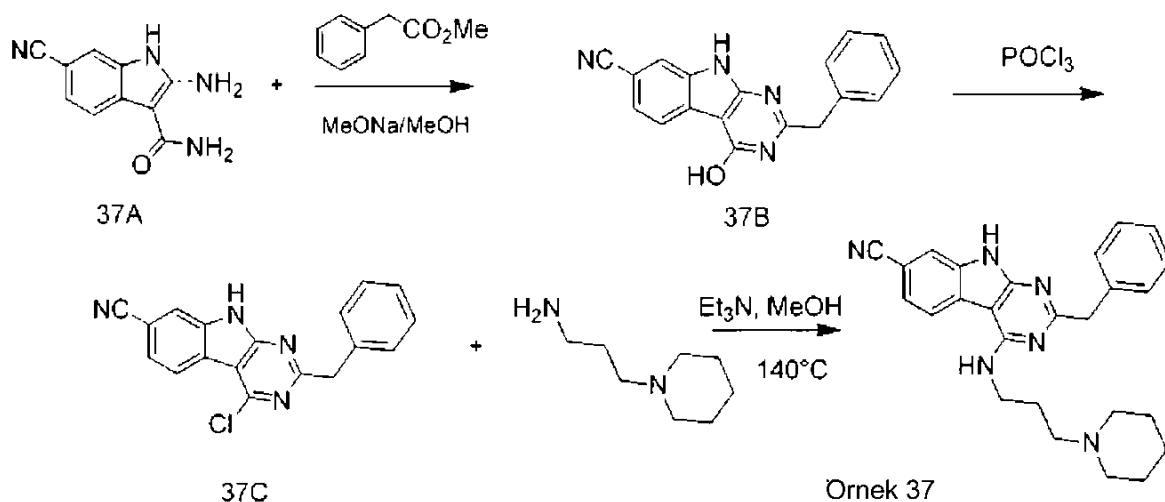


Hidroksilamin hidroklorür (32.7 mg, 0.471 mmol) EtOH (1.5 mL) içinde yer alan Örnek 37 (2-benzil-4-((3-(pip-eridin-1-il)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karbonitril, 50 mg, 0.118 mmol) çözeltisine ilave edilir ve ardından DIPEA (84 µL, 0.483 mmol) eklenir ve böylece açık sarı bir süspansiyon elde edilir. 2.5 gün oda sıcaklığında ve 6 saat 75°C'de karıştırıldıktan sonra, solvent buharlaştırılır ve su (3 mL) 39 dakika karıştırıldıktan sonra ilave edilir, katı toplanır, su (3 x 1 mL) ile yıkanır ve katı materyal 35°C'de yüksek vakum altında sabit bir ağırlıkta elde edilinceye kadar kurutulur ve böylece (Z)-2-benzil-N'-hidroksi-4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksimidamit - HCl (53 mg, 0.107 mmol, %91 verim) bakır rengi katı olarak elde edilir; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.58 - 1.85 (m, 6 H) 1.98 - 2.10 (m, 2 H) 2.69 - 2.90 (m, 2 H) 2.94 - 3.15 (m, 2 H) 3.34 - 3.46 (m, 2 H) 3.59 - 3.74 (m, 2 H) 4.05 (s, 2 H) 5.84 (br. s., 2 H) 7.15 - 7.24 (m, 1 H) 7.29 (t, J=7.4 Hz, 3 H) 7.37 (d, J=7.4 Hz, 2 H) 7.55 (dd, J=8.2, 1.2 Hz, 1 H) 7.72 (d, J=1.2 Hz, 1 H) 8.25 (d, J=8.6 Hz, 1 H) 9.47 (d, J=7.4 Hz, 1 H) 9.56 (s, 1 H) 11.88 (s, 1 H); HRMS m/z 458.2662 (M+H)⁺. HPLC %95.4 @ 220 nm ve %97.4 @ 254 nm, ODA SICAKLIĞINDA = 1.40 dakika.

Asetik anhidrit (0.917 mL, 9.72 mmol) (Z)-2-benzil-N'-hidroksi-4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksimidamit, HCl (0.040 g, 0.081 mmol) ilave edilir ve böylece bakır rengi süspansiyon elde edilir ve karışım mikrodalga ile 140°C'ye 30 dakika boyunca ısıtılır. Solvent bu işlemin ardından buharlaştırılır ve tortu flaş kromatografi vasıtasıyla saflaştırılır ve böylece 36 mg (%85 verim) 1-(2-benzil-7-(5-metil-1,2,4-oksadiazol-3-il)-4-((3-(piperidin-1-il)pro-pil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-9-il)etanon bakır rengi katı olarak elde edilir ki bu derhal metanol içinde (2.3 mL) çözündürülür ve DBU (0.021 mL, 0.138 mmol) ile uygulamaya alınır. Elde edilen nihai sarı çözelti reflaksa 30 dakika boyunca ısıtılır, bu işlemin ardından 0°C'ye 1 saat boyunca karıştırılarak soğutulur. Katılar filtre edilir ve soğuk MeOH (2 x 0.5 mL) ile yıkanır, 40°C'de yüksek vakum altında sabit bir ağırlıkta elde edilinceye kadar kurutulur ve böylece Örnek 36 elde edilir: 2-benzil-7-(5-metil-1,2,4-oksadiazol-3-il)-N-(3-(piperidin-1-il)propil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-amin (20 mg, %51.3

verim) bakı rengi katılarak elde edilir: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.38 (m, $J=4.7$ Hz, 2 H) 1.50 (kuin, $J=5.5$ Hz, 4 H) 1.80 (kuin, $J=6.9$ Hz, 2 H) 2.18 - 2.45 (m, 6 H) 2.67 (s, 3 H) 3.57 - 3.70 (m, 2 H) 4.04 (s, 2 H) 7.15 - 7.22 (m, 1 H) 7.27 (m, $J=7.6$, 7.6 Hz, 2 H) 7.34 (t, $J=5.9$ Hz, 1 H) 7.36 - 7.40 (m, 2 H) 7.83 (dd, $J=8.2$, 1.4 Hz, 1 H) 8.01 (d, $J=1.4$ Hz, 1 H) 8.39 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 12.02 (br. s., 1 H); HRMS m/z 482.2663 ($M+H$) $^+$. HPLC %99.3, ODA SICAKLIĞINDA = 1,79 dakika.

Örnek 37

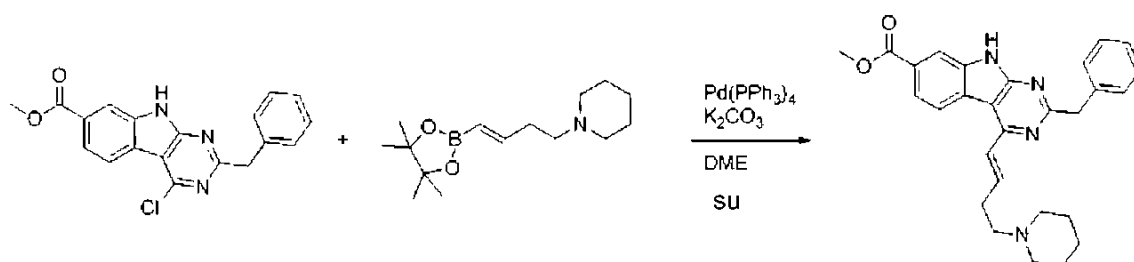


Kavuniçi 2-amino-6-siyano-1H-indol-3-karboksamit (0.172 g, 0.859 mmol), metil 2-fenilasetat (0.303 mL, 2.148 mmol) ve MeOH (0.403 mL, 2.148 mmol) içinde yer alan %30 olarak ağ cinsinden metanol içinde yer alan (2.82 mL) sodyum metoksit konsantre edilir ve mikrodalga tüpü içinde 140°C'de 45 dakika Daha sonra, %30 olarak ağ cinsinden MeOH (0.201 mL, 1.074 mmol) içinde yeni metil 2-fenilasetat (0.151 mL, 1.074 mmol) ve sodyum metoksit serisi ilave edilir ve şişe mikrodalga içine yerleştirilir ve 140°C'de 45 dakika tekrar Daha sonra, oda sıcaklığında soğutulduktan sonra, AcOH (0.197 mL, 3.44 mmol) ilave edilir ve elde edilen nihai bulamaç 20°C'de 1 saat karıştırılır. Katılar filtre edilir, MeOH (3 x 1 mL) ile yıkanır ve 20°C'de yüksek vakum altında sabit bir ağı elde edilinceye kadar kurutulur ve böylece Aramadde 37B elde edilir: 2-benzil-4-hidroksi-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karbonitril (182 mg, %70.5 verim) bakı rengi katılarak elde edilir: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 4.03 (s, 2 H) 7.22 - 7.29 (m, 1 H) 7.30 - 7.36 (m, 2 H) 7.36 - 7.43 (m, 2 H) 7.58 (dd, $J=8.2$, 1.4 Hz, 1 H) 7.82 - 7.87 (m, 1 H) 8.05 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 12.59 (br. s., 2 H); MS m/z 301.2 ($M+H$) $^+$; HPLC %94.2 @ 220 nm ve %91.3 @ 254 nm; ODA SICAKLIĞINDA = 1.90 dakika.

Kısmen 2-benzil-4-hidroksi-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karbonitril (Aramadde 37B, 0.180 g, 0.599 mmol) ve fosforik oksiklorür (3.63 mL, 39.0 mmol) karışımı 95°C'ye 500 rpm ve 16 saat boyunca karıştırılır. Döner buharlaştırıcı üzerinde konsantre edildikten sonra, elde edilen nihai 5 kırmızı köpük doymuş NaHCO₃ (10 mL) içinde süspansiyon edilir ve 30 dakika boyunca karıştırılır. Katılar toplanır ve su (3 x 1 mL) ile yıkanır. 40°C'de yüksek vakum altında sabit bir ağırlıkta elde edilinceye kadar kurutulur ve böylece Aramadde 37C elde edilir: 2-benzil-4-kloro-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karbonitril (190 mg, %99 verim) bakır rengi katı olarak elde edilir ve bu bir sonraki adımda doğrudan kullanılır. MS m/z 319.2 (M+H)⁺; HPLC %95.0 @ 220 nm 10 ve %92.3 @ 254 nm, ODA SICAKLIĞINDA = 2.28 dakika.

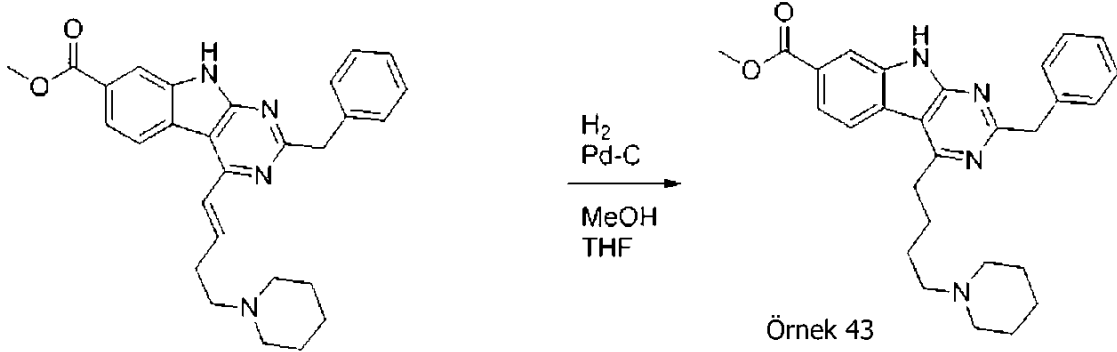
MeOH (4.50 mL) 2-benzil-4-kloro-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karbonitril (Aramadde 37C, 0.190 g, 0.596 mmol), 3-(piperidin-1-il)propan-1-amin (0.142 mL, 0.894 mmol) ve trietilamin (0.208 mL, 1.490 mmol) karışımı mikrodalga ile 140°C 30 dakika boyunca 500 rpm. Bu işlemin 15 ardından kuru oluncaya kadar konsantre edilir ve böylece 346 mg kavuniçi katı olarak elde edilir ki bu flaş kromatografi vasıtasıyla saflaştırılır ve böylece 176 mg sarı katı olarak elde edilir ve bu eter (7 mL) içinde süspansiyon edilir ve 20°C'de 1 saat karıştırılır. Katılar filtre edilir, eter (3 x 1 mL) ile yıkanır ve 30°C'de yüksek vakum altında sabit bir ağırlıkta elde edilinceye kadar kurutulur ve böylece 2-benzil-4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karbonitril Örnek 37 (172 mg, %68.0 verim) olarak açık sarı katı formda elde edilir: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.30 - 1.43 (m, 2 H) 1.43 - 1.57 (m, 4 H) 1.80 (m, J=5.5 Hz, 2 H) 2.18 - 2.47 (m, 6 H) 3.62 (q, J=6.4 Hz, 2 H) 4.04 (s, 2 H) 7.15 - 7.22 (m, 1 H) 7.27 (m, J=7.4, 7.4 Hz, 2 H) 7.33 - 7.39 (m, 2 H) 7.47 (t, J=5.7 Hz, 1 H) 7.62 (dd, J=8.2, 1.2 Hz, 1 H) 7.79 (d, J=1.2 Hz, 1 H) 8.43 (d, J=8.2 Hz, 1 H) 12.19 (s, 1 H); HRMS 25 m/z 425.2448 (M+H)⁺; HPLC >%99, ODA SICAKLIĞINDA = 1.68 dakika.

Örnek 43



2-5 mL mikrodalga şişesi içine metil 2-benzil-4-kloro-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat

(0.100 g, 0.284 mmol), (E)-1-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioksaborolan-2-il)büt-3-en-1-il)piperidin (0.113 g, 0.426 mmol), potasyum karbonat (0.106 g, 0.768 mmol) ve Pd(Ph₃P)₄ (0.05 g, 0.044 mmol) ilave edilir. Şişe N₂ (3 vakum + refill sikles) ile yıkanır DME (2.84 mL) ve su (0.398 mL) ilave edilir ve şişe N₂ (bir vakum + yeniden doldurma) ile çalkalanır ve bu işlemin ardından 110°C'ye ısıtılır ve bu esnada 24 saat karıştırılır. Soğutma sonrasında, karışım kuru oluncaya kadar azaltılır, basınç altında konsantre edilir ve tortu flaş kromatografi vasıtasıyla saflaştırılır ve böylece (E)-metil 2-benzil-4-(4-(piperidin-1-il)büt-1-en-1-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (55 mg, 0.121 mmol, %42.6 verim) açık sarı katı olarak elde edilir: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.41 (s, 2 H) 1.50 - 1.61 (m, 4 H) 2.30 - 2.47 (m, 4 H) 2.53 - 2.59 (m, 2 H) 2.59 - 2.70 (m, 2 H) 3.91 (s, 3 H) 4.27 (s, 2 H) 7.16 - 7.24 (m, 1 H) 7.29 (t, J=7.6 Hz, 2 H) 7.34 - 7.43 (m, 4 H) 7.88 (dd, J=8.2, 1.4 Hz, 1 H) 8.07 (d, J=1.4 Hz, 1 H) 8.41 (d, J=8.2 Hz, 1 H) 12.48 (s, 1 H); HRMS m/z 455.2442 (M+H)⁺; HPLC %100 @ 220 nm ve %99.4 @ 254 nm, ODA SICAKLIĞINDA = 1.84 dakika.

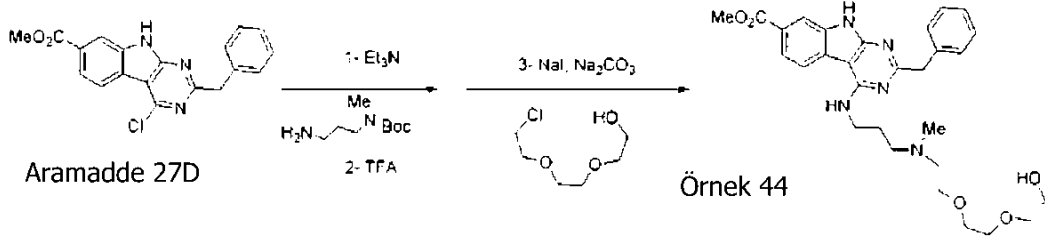


MeOH (2 mL) ve THF (2 mL) içinde yer alan (E)-metil 2-benzil-4-(4-(piperidin-1-il)büt-1-en-1-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (20 mg, 0.044 mmol) ve %10 olarak ağda cinsinden (%50 şak) Pd-C (23.41 mg) karışım 17 saat hidrojen ile uygulamaya alınır. Reaksiyon karışım DCM (3 mL) ile seyreltilir, filtre edilir, MeOH ile durulanır (2 x 2 mL) ve bu işlemin ardından DCM (2 x 2 mL) ile durulanır ve kuru oluncaya kadar konsantre edilir ve böylece 19 mg açık sarı katı olarak elde edilir ki bu flaş kromatografi vasıtasıyla saflaştırılır ve böylece CH₃CN (2 mL) ile uygulamaya alınmış beyaz katı (14 mg) elde edilir. Beyaz süspansiyon 20°C'de 1 saat boyunca karıştırıldıktan sonra, katı filtre edilir, CH₃CN (1 x 1 mL) ile yıkanır ve 40°C'de yüksek vakum altında sabit bir ağırlık elde edilinceye kadar kurutulur ve böylece Örnek 43 bileşiği metil 2-benzil-4-(4-(piperidin-1-il)büt-1-en-1-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (14.4 mg, %71.7 verim) olarak beyaz katı formda elde edilir: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.36 (m, J=5.5 Hz, 2 H) 1.45 (kuin, J=5.5 Hz, 4 H) 1.57 (kuin, J=7.3 Hz, 2

H) 1.83 (dt, J=14.9, 7.4 Hz, 2 H) 2.18 - 2.31 (m, 6 H) 3.20 - 3.28 (m, 2 H) 3.91 (s, 3 H) 4.26 (s, 2 H) 7.16 - 7.22 (m, 1 H) 7.28 (t, J=7.4 Hz, 2 H) 7.32 - 7.38 (m, 2 H) 7.90 (dd, J=8.2, 1.2 Hz, 1 H) 8.09 (d, J=1.2 Hz, 1 H) 8.25 (d, J=8.2 Hz, 1 H) 12.48 (br. s., 1 H); HRMS m/z 457.2598 (M+H)⁺; HPLC >%99.5, ODA SICAKLIĞINDA = 1.75 dakika.

5

Örnek 44



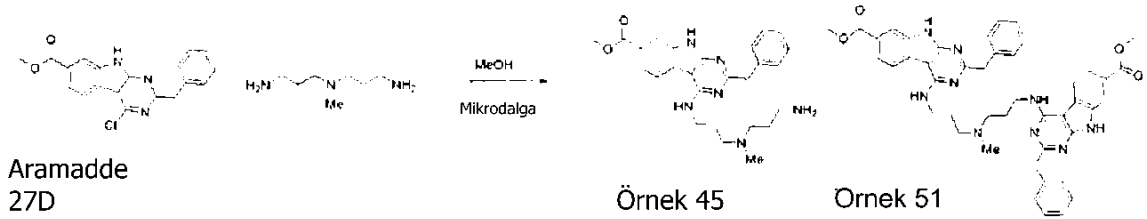
- 10 MeOH (1 mL) içinde yer alan metil 2-benzil-4-kloro-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (0.100 g, 0.284 mmol), Et₃N (0.079 mL, 0.569 mmol) ve tert-bütill (3-aminopropil)(metil)karbamat (0.080 g, 0.426 mmol) karışım mikrodalga fırını içinde 140°C'de 40 dakika ısıtılır. Solvent azaltılmalı basıncı altında çıkarılır ve tortu flaş kromatografi vasıtasıyla saflaştırılır ve böylece 0.092mg ham Boc türevi elde edilir ki bu bir sonraki adımda doğrudan kullanılır. TFA (1.0 ml, 12.98 mmol) damla şeklinde soğuk metil 2-benzil-4-((3-((tert-bütoksikarbonil)(metil)amino)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (0.092 g, 0.183 mmol) içine ilave edilir ve karışım 30 dakikada oda sıcaklığına getirilir. Toluene ile seyreltikten sonra, solvent azaltılmalı basıncı altında çıkarılır ve bu işlemin ardından tortu EtOAc ile seyreltilir ve böylece 85mg katı bir sonraki adımda doğrudan kullanılır. HRMS m/z 404.2091 (M+H)⁺.
- 20

- Metil 2-benzil-4-((3-(metilamino)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat 2,2,2-trifloroasetat (0.020 g, 0.039 mmol), sodyum karbonat (8.81 mg, 0.083 mmol), sodyum iodide (1.448 mg, 9.66 µmol) ve 2-(2-(2-kloroetoksi)etoksi)etanol (6.46 ml, 0.044 mmol) karışım 70°C'de aseton (0.2 mL) içinde ısıtılır. 15 saat sonra, 2-(2-(2-kloroetoksi)etoksi)etanol reaktifinin (6.46 µl, 0.044 mmol) ikinci kısımla ilave edilir ve karışım 70°C'de 15 saat boyunca tekrar ısıtılır. Oda sıcaklığına soğutulduktan sonra, karışım EtOAc ile seyreltilir, su ile yıkanır, anhidrit MgSO₄ üzerinde kurutulur, filtre edilir ve solvent buharlaştırılır ve böylece bir tortu elde edilir ve bu flaş kromatografi vasıtasıyla saflaştırılır ve böylece 9 mg Örnek 44 elde edilir: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.74 - 1.85 (m, 2 H) 2.25 (br. s., 3 H) 2.55 (br. s., 2 H) 3.32 - 3.36 (m, 4 H) 3.39 - 3.46 (m, 6 H) 3.51 (t, J=5.87
- 30

Hz, 2 H) 3.64 (q, J=6.52 Hz, 2 H) 3.88 (s, 3 H) 4.04 (s, 2 H) 4.53 (br. s., 1 H) 7.18 (t, J=7.40 Hz, 1 H) 7.28 (t, J=7.63 Hz, 2 H) 7.37 (d, J=7.04 Hz, 2 H) 7.55 (t, J=5.28 Hz, 1 H) 7.82 (dd, J=8.22, 1.17 Hz, 1 H) 7.99 (s, 1 H) 8.27 (d, J=8.22 Hz, 1 H) 12.05 (s, 1 H); HRMS m/z 536.2855 (M+H)⁺; HPLC RT 2.035 dakika.

5

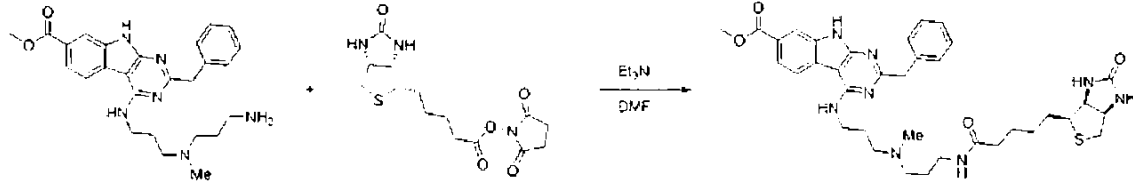
Örnekler 45 ve 51



- 10 2-5 mL mikrodalga şişesi içine MeOH (2.000 mL, 49.4 mmol) içinde yer alan metil 2-benzil-4-kloro-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (0.050 g, 0.142 mmol) ve *N*-(3-aminopropil)-*N*-metilpropan-1,3-diamin (0.115 mL, 0.711 mmol) ilave edilir ve böylece bakı rengi süspansiyon elde edilir. Şişe mikrodalga içine yerleştirilir ve 140°C'ye 30 dakika 30 dakika sonra, karışım kuru oluncaya kadar döner buharlaştırma üzerinde konsantre edilir ve
- 15 tortu flaş kromatografi vasıtasıyla saflaştırılır ve CH₃CN'den liyofilize edilir ve böylece iki farklı ürün elde edilir: Örnek 45 mono-*N*-alkilatlı ürün olarak elde edilir: metil 4-((3-aminopropil)(metilamino)propil)amino-2-benzil-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (44 mg, 67.2% verim) beyaz katı olarak elde edilir; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.44 (dt, J=13.8, 6.6 Hz, 2 H) 1.72 (dt, J=13.7, 6.8 Hz, 2 H) 2.11 (s, 3 H) 2.24 - 2.30 (m, 2 H) 2.33 (t, J=6.7 Hz, 2 H) 2.47 (br. s., 2 H) 3.51 - 3.61 (m, 2 H) 3.76 - 3.85 (m, 3 H) 3.97 (s, 2 H) 7.08 - 7.15 (m, 1 H) 7.17 - 7.24 (m, 2 H) 7.27 - 7.34 (m, 2 H) 7.50 (t, J=5.3 Hz, 1 H) 7.76 (dd, J=8.2, 1.6 Hz, 1 H) 7.92 (d, J=1.6 Hz, 1 H) 8.20 (d, J=8.2 Hz, 1 H); MS m/z 461.2 (M+H)⁺; HPLC >%99, ODA SICAKLIĞINDA = 1.63 dakika.
- 20
- 25 Örnek 51 bis-alkilatlı ürün olarak: dimetil 4,4'-(((metilazanediyl))bis(propan-3,1-diyl))bis(azanedi-il))bis(2-benzil-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat) (3.7 mg, %6.71 verim) açık sarı katı olarak elde edilir: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.18 - 1.29 (m, 4 H) 1.79 - 1.91 (m, 4 H) 2.25 (s, 3 H) 3.58 - 3.71 (m, 4 H) 3.84 (s, 6 H) 3.97 (s, 4 H) 7.07 - 7.16 (m, 2H) 7.22 (t, J=7.4 Hz, 4 H) 7.29 - 7.34 (m, 4 H) 7.53 (t, J=5.3 Hz, 2 H) 7.77 (dd, J=8.2, 1.4 Hz, 2 H) 7.96 (d, J=1.4 Hz, 2 H) 8.22 (d, J=8.2 Hz, 2 H) 12.01 (s, 2H); MS m/z 776.3 (M+H)⁺; HPLC %94.6 @ 220 nm ve %93.8 @ 254 nm, ODA SICAKLIĞINDA = 2.01
- 30

dakika.

Örnek 52



5

Örnek 45

Örnek 52

2,5-Dioksopirrolidin-1-il-5-((3aS,4S,6aR)-2-oksoheksahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoat (12.01 mg, 0.035 mmol) DMF içinde yer alan (750 µL, 9.69 mmol) metil 4-((3-((3-aminopropil)(metil)amino)propil)amino)-2-benzil-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (Örnek 45, 15 mg, 0.033 mmol) ve trietilamin (6,81 µL, 0.049 mmol) çözeltisine ilave edilir ve böylece açık sarı çözelti elde edilir. 20°C'de 1 saat boyunca karıştırıldıktan sonra, karışım kuru oluncaya kadar konsantre edilir ve tortu flaş kromatografi vasıtasıyla saflaştırılır ve böylece açık sarı bir köpük elde edilir, köpük Et₂O (1 mL) içinde süspansiyon edilir ve 30 dakika boyunca karıştırılır ve katı toplanır. Et₂O (2 x 0.5 mL) ile yıkanır ve 20°C'de yüksek vakum altında sabit bir ağırlık elde edilinceye kadar kurutulur ve böylece Örnek 52 bileşiği elde edilir: metil 2-benzil-4-((3-(me-til(3-(5-((3aS,4S,6aR)-2-oksoheksahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)propil)amino)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (17 mg, 76% verim) açık sarı katı olarak elde edilir: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.17 - 1.34 (m, 3 H) 1.36 - 1.51 (m, 2 H) 1.51 - 1.64 (m, 3 H) 1.78 (dt, J=13.5, 6.6 Hz, 2 H) 2.02 (t, J=7.4 Hz, 2 H) 2.17 (s, 3 H) 2.32 (t, J=7.0 Hz, 2 H) 2.40 (t, J=6.7 Hz, 2 H) 2.55 (d, J=12.3 Hz, 1 H) 2.77 (dd, J=12.3, 5.1 Hz, 1 H) 2.99 - 3.11 (m, 3 H) 3.58 - 3.68 (m, 2 H) 3.88 (s, 3 H) 4.04 (s, 2 H) 4.08 (m, J=4.9, 4.9, 2.3 Hz, 1 H) 4.26 (dd, J=7.6, 5.3 Hz, 1 H) 6.34 (s, 1 H) 6.40 (s, 1 H) 7.14 - 7.22 (m, 1 H) 7.27 (t, J=7.4 Hz, 2H) 7.37 (d, J=7.0 Hz, 2 H) 7.54 (t, J=5.5 Hz, 1 H) 7.74 (t, J=5.5 Hz, 1 H) 7.82 (dd, J=8.2, 1.6 Hz, 1 H) 7.99 (d, J=1.6 Hz, 1 H) 8.27 (d, J=8.2 Hz, 1 H) 12.05 (s, 1 H); MS m/z 687.3 (M+H)⁺; HPLC >%99.5, ODA SICAKLIĞINDA = 1.70 dakika.

15

20

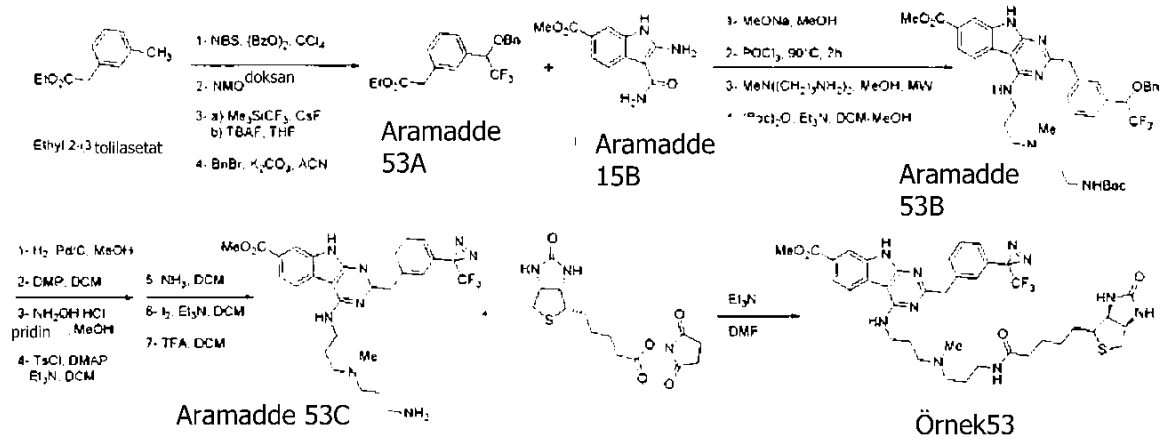
25

Örnek 53

30

Aramadde 53A ticari olarak temin edilebilir etil 2(3-tolil)asetat'tan hazırlanır. Bu işlemin ardından, Örnek 15, 45 ve 47'de açıklandığı gibi Aramadde 53B'den dönüştürülür. Daha sonra,

azirin kışın Örnek 25'te sağlanan açığamaya göre geliştirilir. Son adı Örnek 52'ye dayandırılır



- 5 Etil 2-(m-tolil)asetat (4.8 g, 26.9 mmol), NBS (5.27 g, 29.6 mmol) ve benzoil peroksit (0.110 g, 0.454 mmol) karışımında CCl₄ (28 mL) içinde reflaksa getirilir. 5 saat sonra, reaksiyon 5°C'ye soğutulur, filtre edilir ve solvent çökarı. Flaş kromatografi vasıtasıyla saflaştırılır ve bu işlemde etilasetat-heksan kullanılır ve böylece 3.8 g ilgili bromobenzil türevi elde edilir: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.19 (t, J=6.70 Hz, 3 H) 3.67 (s, 2 H) 4.09 (q, J=6.70 Hz, 2 H) 4.69 (s, 2 H) 7.15 - 7.25 (m, 1 H) 7.27 - 7.42 (m, 3 H); bu materyal bir sonraki adımda doğrudan kullanılır

- 1,4-dioksan (110 mL) içinde yer alan etil 2-(3-(bromometil)fenil)asetat (8.11 g, 31.5 mmol) ve 4-metilmorfolin 4-oksit hidrat (5.54 g, 47.3 mmol) karışımında 100°C'ye 1.5 saat SİTİLE Oda sıcaklığında soğutulduktan sonra, solventin hacmi yarıya indirilir ve bu işlemin ardından Et₂O:EtOAc (1:1, 120 mL) ile seyreltilir, su (50 mL) ile yıkanır ve sulu katman EtOAc (60 mL) ile ekstrakte edilir. Birleştirilen organik katmanlar su (2 x 50 mL) ile yıkanır ve bu işlemin ardından tuzlu su ile (50 mL) ile yıkanır. Organik katman anhidrit MgSO₄ üzerinde kurutulur, filtre edilir ve konsantre edilir ve böylece 4.72 g açık sarıyağ elde edilir ve bu flaş kromatografi vasıtasıyla saflaştırılır ve böylece 2-(3-formilfenil)asetat (2.91 g, %48 verim) açık sarıyağ elde edilir: ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.19 (t, J=7.0 Hz, 3 H) 3.81 (s, 2 H) 4.09 (q, J=7.0 Hz, 2 H) 7.52 - 7.65 (m, 2 H) 7.79 - 7.85 (m, 2 H) 10.00 (s, 1 H); MS m/z 207.2 (M+H)⁺; HPLC 99%, ODA SICAKLIĞINDA = 1.67 dakika.

- 25 Trimetil(triflorometil)silan (3.13 mL, 21.20 mmol) DMF içinde yer alan (20.19 mL) etil 2-(3-formilfenil)asetat (2.91 g, 15.14 mmol) karışımına ilave edilir ve sezyum florür (0.161 g, 1.060 mmol) 0 - 5°C'ye soğutulur. 1.5 saat karıştırıldıktan sonra, THF (15.14 mL) içinde yer

alan TBAF 1M çözeltisi ilave edilir. Elde edilen nihai sarı çözelti 0 - 5°C'de karıştırılır ve 30 dakika sonra, karıştırılmış su (150 mL) içine dökülür ve MTBE (1 x 150 mL, bu işlemin ardından 2 x 100 mL) ile ekstrakte edilir. Birleştirilen organik katmanlar su (1 x 150 mL bu işlemin ardından 1 x 100 mL) ve tuzlu su ile (100 mL) ile yıkanır ve bu işlemin ardından organik katman anhidrit MgSO₄ üzerinde kurutulur, filtre edilir ve konsantre edilir ve böylece 3.84 g açık kavuniçi yağ olarak elde edilir ve bu flaş kromatografi vasıtasıyla saflaştırılır ve böylece etil 2-(3-(2,2,2-trifloro-1-hidroksietil)fenil)asetat (663 mg, %16 verim) renksiz bir yağ olarak elde edilir: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.17 (t, J=7.0 Hz, 3 H) 3.68 (s, 2 H) 4.08 (q, J=7.0 Hz, 2 H) 5.13 (q, J=7.4 Hz, 1 H) 6.82 (s, 1 H) 7.24 - 7.31 (m, 1 H) 7.37 (t, J=7.2 Hz, 3 H); MS m/z 263.1 (M+H)⁺; HPLC %93.7 @ 220 nm, ODA SICAKLIĞINDA = 1.82 dakika.

Benzil bromür (0.330 mL, 2.78 mmol) asetonitril (17.00 mL) içinde yer alan etil 2-(3-(2,2,2-trifloro-1-hidroksietil)fenil)asetat (0.648 g, 2.471 mmol) ve K₂CO₃ (1.059 g, 7.66 mmol) karıştırılmasına ilave edilir ve karıştırılmış 24 saat karıştırılarak reflaksa yapılır (75 - 80°C). Soğutma sonrasında kuru oluncaya kadar konsantre edilir, tortu flaş kromatografi vasıtasıyla saflaştırılır ve böylece Aramadde 53A elde edilir: etil 2-(3-(1-(benziloksi)-2,2,2-trifloroetil)fenil)asetat (686 mg, 79% verim) renksiz bir yağ olarak elde edilir: MS m/z 353.2 (M+H)⁺; HPLC %99.7, ODA SICAKLIĞINDA = 2.19 dakika.

Aramadde 15B (0.310 g, 1.329 mmol), etil 2-(3-(1-(benziloksi)-2,2,2-trifloroetil)fenil)asetat (0.679 g, 1.927 mmol) ve metanol içinde yer alan (3.23 mL) Aramadde 53A ve %30 olarak ağaçk cinsinden/MeOH (0.524 mL) içinde sodyum metoksit karıştırılması ile ince kahverengi süspansiyon elde edilir ve bu mikrodalga içinde 140°C 1 saat boyunca yapılır Soğutma ve MeOH (0.75 mL) ve AcOH (0.167 mL, 2.92 mmol) ile seyreltme sonrasında elde edilen nihai süspansiyon 20°C'de 2 saat karıştırılır Katkı bu işlemin ardından toplanır ve MeOH (4 x 0.5 mL) ile yıkanır, bu işlemin ardından 40°C'de yüksek vakum altında sabit bir ağırlık elde edilinceye kadar kurutulur ve böylece metil 2-(3-(1-(benziloksi)-2,2,2-trifloroetil)benzil)-4-hidroksi-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (399 mg, 57.6% verim) bakır rengi katı olarak elde edilir: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 3.87 (s, 3 H) 4.09 (s, 2 H) 4.45 - 4.57 (m, 2 H) 5.23 (q, J=7.2 Hz, 1 H) 7.20 - 7.29 (m, 5 H) 7.36 - 7.51 (m, 3 H) 7.52 (s, 1 H) 7.84 (dd, J=8.2, 1.4 Hz, 1H) 8.01 (d, J=1.4 Hz, 1 H) 8.03 (d, J=8.2 Hz, 1 H) 12.46 (br. s., 1 H) 12.56 (br. s., 1 H); MS m/z 522.2 (M+H)⁺; HPLC %92.7 @ 220 nm ve %91.7 @ 254 nm, ODA SICAKLIĞINDA = 2.20 dakika.

Fosforlu oksiklorür (6 mL, 64,4 mmol) içinde yer alan metil 2-(3-(1-(benziloksi)-2,2,2-trifloroetil)benzil)-4-hidroksi-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (0.395 g, 0.757 mmol) karışım 90°C'ye 2 saat ısıtılır ve bu işlemin ardından soğutma sonrasında, bu kuru oluncaya kadar konsantre edilir ve böylece 650 mg kahverengi köpük olarak elde edilir ve bu doymuş NaHCO₃ (15 mL) içinde süspanse edilir ve 1 saat boyunca karıştırılır. Katı filtre edilir, su (3 x 2 mL) ile yıkanır ve 40°C'de yüksek vakum altında sabit bir ağırlıkta elde edilinceye kadar kurutulur ve böylece metil 2-(3-(1-(benziloksi)-2,2,2-trifloroetil)benzil)-4-kloro-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (375 mg, %92 verim) bakır rengi katı olarak elde edilir ve bir sonraki adımda bu şekliyle kullanılır. MS m/z 540.2 (M+H)⁺; HPLC %92, RT 2.51 dakika.

10

MeOH (9.83 mL, 243 mmol) içinde yer alan metil 2-(3-(1-(benziloksi)-2,2,2-trifloroetil)benzil)-4-kloro-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (0.375 g, 0.695 mmol) ve N1-(3-aminopropil)-N1-metilpropan-1,3-diamin (0.784 mL, 4.86 mmol) karışım mikrodalga fırında içinde 140°C'ye 30 dakika boyunca ısıtılır. Daha sonra, azaltıcı basıncı altında kuru oluncaya kadar konsantre edildikten sonra nihai kahverengi yağ olarak elde edilir ve bu kromatografi vasıtasıyla saflaştırılır ve böylece metil 4-((3-((3-amino-propil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(1-(benziloksi)-2,2,2-trifloroetil)benzil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (288 mg, %63.9 verim) sarı bir köpük elde edilir: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.48 (dt, J=14.0, 6.9 Hz, 2 H) 1.75 (kuin, J=6.7 Hz, 2 H) 2.14 (s, 3 H) 2.24 - 2.42 (m, 4 H) 2.52 - 2.60 (m, 2 H) 3.61 (q, J=6.3 Hz, 2 H) 3.88 (s, 3 H) 4.10 (s, 2 H) 4.49 (s, 2 H) 5.17 (q, J=7.0 Hz, 1 H) 7.18 - 7.30 (m, 5 H) 7.31 - 7.36 (m, 1 H) 7.39 (t, J=7.6 Hz, 1 H) 7.44 - 7.53 (m, 2 H) 7.58 (t, J=5.3 Hz, 1 H) 7.84 (dd, J=8.2, 1.4 Hz, 1 H) 8.00 (d, J=1.4 Hz, 1 H) 8.28 (d, J=8.2 Hz, 1 H); MS m/z 649.3 (M+H)⁺; HPLC %97.6 @ 220 nm ve %95.5 @ 254 nm, ODA SICAKLIĞINDA = 1.96 dakika.

25

DCM (1 mL) içinde yer alan di-tert-bütül dikarbonat (0.124 mL, 0.533 mmol) çözeltisi DCM (3 mL) içinde yer alan metil 4-((3-((3-aminopropil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(1-(benziloksi)-2,2,2-trifloroetil)benzil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (0.288 g, 0.444 mmol) ve trietilamin (0.074 mL, 0.533 mmol) ve MeOH (2 mL) karışımına yavaşça ilave edilir ve böylece sarı bir çözelti elde edilir. 20°C'de 45 dakika karıştırıldıktan sonra, çözelti kuru oluncaya kadar konsantre edilir ve böylece 373 mg sarı bir köpük elde edilir which flaş kromatografi vasıtasıyla saflaştırılır ve böylece Aramadde 53B metil 2-(3-(1-(benziloksi)-2,2,2-trifloroetil)benzil)-4-((3-((3-((tert-bütoksikarbonil)amino)propil)(metil)amino)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (306 mg, %92 verim) şeklinde sarı bir köpük elde edilir: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.33 (s, 9 H) 1.52 (dt, J=14.1, 7.0 Hz, 2 H) 1.67

35

- 1.81 (m, 2 H) 2.12 (s, 3 H) 2.28 (t, J=7.2 Hz, 2 H) 2.34 (t, J=6.8 Hz, 2 H) 2.92 (q, J=6.7 Hz, 2 H) 3.54 - 3.67 (m, 2 H) 3.88 (s, 3 H) 4.10 (s, 2 H) 4.49 (s, 2 H) 5.17 (q, J=6.8 Hz, 1 H) 6.76 (t, J=5.5 Hz, 1 H) 7.16 - 7.30 (m, 5 H) 7.31 - 7.36 (m, 1 H) 7.39 (t, J=7.6 Hz, 1 H) 7.43 - 7.51 (m, 2 H) 7.53 (t, J=5.3 Hz, 1 H) 7.83 (dd, J=8.4, 1.4 Hz, 1 H) 8.00 (d, J=1.4 Hz, 1 H) 8.27 (d, J=8.2 Hz, 1 H) 12.06 (s, 1 H); MS m/z 749.3 (M+H)⁺; HPLC %97.7, ODA SICAKLIĞINDA = 2.06 dakika.

Metil 2-(3-(1-(benziloksi)-2,2,2-trifloroetil)benzil)-4-((3-((3-((tert-bütoksikarbonil)amino)propil)(metil)amino)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (0.306 g, 0.409 mmol) ve MeOH (9.92 mL) içinde yer alan %10 olarak ağa cinsinden (%50 Etak) Pd-C (0.304 g, 0.143 mmol) karışım 20°C'de 22 saat boyunca hidrojen ile uygulamaya alınır. Daha sonra, reaksiyon karışım selit üzerinde filtre edilir, kek MeOH (2 x 10 mL) ve DCM:MeOH (1:1, 2 x 10 mL) ile durulan ve bu işlemin ardından kuru oluncaya kadar döner buharlaştırılarak üzerinde konsantre edilir ve böylece 226 mg bir yağ elde edilir ve bu flaş kromatografi vasıtasıyla saflaştırılır ve böylece metil 4-((3-((3-((tert-bütoksikarbonil)amino)propil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(2,2,2-trifloro-1-hidroksietil)benzil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (202 mg, %75 verim) beyaz köpük olarak elde edilir: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.33 (s, 9 H) 1.48 - 1.62 (m, 2 H) 1.71 - 1.85 (m, 2 H) 2.16 (s, 3 H) 2.25 - 2.35 (m, 2 H) 2.39 (t, J=6.8 Hz, 2 H) 2.86 - 3.00 (m, 2 H) 3.56 - 3.70 (m, 2 H) 3.88 (s, 3 H) 4.06 (s, 2 H) 5.01 - 5.14 (m, 1 H) 6.77 (m, J=6.3 Hz, 2 H) 7.30 (d, J=4.7 Hz, 2 H) 7.36 - 7.42 (m, 1 H) 7.49 (s, 1 H) 7.51 - 7.57 (m, 1 H) 7.82 (dd, J=8.2, 1.2 Hz, 1 H) 7.99 (d, J=1.2 Hz, 1 H) 8.26 (d, J=8.2 Hz, 1 H) 12.06 (br. s., 1 H); MS m/z 659.2 (M+H)⁺; HPLC >%97, ODA SICAKLIĞINDA = 1.90 dakika.

DCM (7.50 mL) içinde yer alan Metil 4-((3-((3-((tert-bütoksikarbonil)amino)propil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(2,2,2-trifluoro-1-hidroksietil)benzil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (0.200 g, 0.304 mmol) ve Dess-Martin periodinan reaktifi (0.567 g, 1.336 mmol) karışım 20°C'de bir saat karıştırılır. Kuru oluncaya kadar buharlaştırıldıktan sonra, tortu flaş kromatografi vasıtasıyla saflaştırılır ve böylece metil 4-((3-((3-((tert-bütoksikarbonil)amino)propil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(2,2,2-trifloroasetil)benzil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (181 mg, %91 verim) sarı bir köpük olarak elde edilir: ¹H NMR DMSO-d₆ içinde arzu edilen ürünle uyumludur ancak hidrat formları nedeniyle komplikedir: MS m/z 657.3 (M+H)⁺; HPLC %96.0 @ 220 nm ve %95.3 @ 254 nm, RT 1.87 ve 1.96 (keton + hidrat) dakika.

MeOH (1.9 mL) içinde yer alan Metil 4-((3-((3-((tert-bütoksikarbonil)amino)propil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(2,2,2-trifluoroasetil)benzil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (0.180 g, 0.274 mmol), hidroksilamin hidroklorür (0.023 g, 0.329 mmol) ve piridin (0.355 mL) karışım mikrodalga fırında 65°C'ye 48 saat

5 Reaksiyon karışımın kuru oluncaya kadar yoğunlaştırılmasından sonra, tortu çözeltisi doymuş NaHCO₃ (15 mL) ile yıkanan organik katman anhidrit MgSO₄ üzerinde kurutulur, filtre edilir ve kuru oluncaya kadar konsantre edilir ve böylece metil 4-((3-((3-((tert-bütoksikarbonil)amino)propil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(2,2,2-trifloro-1-

10 (hidroksiimino)etil)benzil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (184 mg, %100 verim) açık sarı köpük olarak elde edilir: MS m/z 672.3 (M+H)⁺; HPLC %96.0 @ 220 nm ve %91.4 @ 254 nm, ODA SICAKLIĞINDA = 2.01 dakika.

Ts-Cl (0.060 g, 0.315 mmol) DCM (12 mL) içinde yer alan metil 4-((3-((3-((tert-bütoksikarbonil)amino)propil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(2,2,2-trifloro-1-

15 (hidroksiimino)etil)benzil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (0.184 g, 0.274 mmol), DMAP (3.35 mg, 0.027 mmol) ve trietilamin (0.048 mL, 0.342 mmol) karışımına kısım kısım olarak ilave edilir ve böylece bakır rengi bir çözelti elde edilir. 1 saat sonra, reaksiyon karışım DCM (12 mL) ile seyreltilir, su (3 x 12 mL) ile yıkanan ve organik katman anhidrit MgSO₄ üzerinde kurutulur, filtre edilir ve kuru oluncaya kadar konsantre edilir ve böylece metil 4-((3-

20 ((3-((tert-bütoksikarbonil)amino)propil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(2,2,2-trifloro-1-((tosyloksi)imino)etil)benzil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (217 mg, %96 verim) bakır rengi köpük olarak elde edilir: MS m/z 826.2 (M+H)⁺; HPLC %93.2 @ 220 nm ve %91.3 @ 254 nm, ODA SICAKLIĞINDA = 2.20 dakika.

DCM (5.07 mL) içinde yer alan metil 4-((3-((3-((tert-bütoksikarbonil)amino)propil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(2,2,2-trifloro-1-

25 ((tosyloksi)imino)etil)benzil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (0.217 g, 0.263 mmol) çözeltisi -78°C'ye soğutulur ve amonyak (1.7 mL, 79 mmol) sızdıran bir tüp içine sıkıştırılır. Karışım yavaşça 20°C'ye iletir ve 3 saat karıştırılır. Tekrar -78°C'ye soğutulur, sızdıran tüp septa gaz çıkışı ile donatılır ve yavaşça 20°C'ye iletir ve böylece amonyak buharlaştırılır. 3

30 saat sonra, karışım kuru oluncaya kadar konsantre edilir ve bu işlemin ardından flaş kromatografi vasıtasıyla saflaştırılır ve böylece metil 4-((3-((3-((tert-bütoksikarbonil)amino)propil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(3-(triflorometil)diaziridin-3-

35 il)benzil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (139 mg, %79 verim) beyaz köpük olarak elde edilir: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.34 (s, 9 H) 1.52 - 1.62 (m, 2 H) 1.72 -

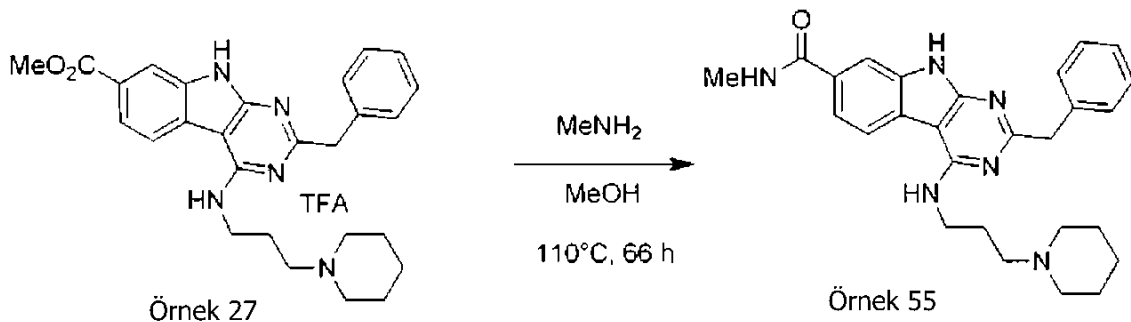
1.89 (m, 2 H) 2.08 - 2.25 (m, 3 H) 2.30 - 2.44 (m, 4 H) 2.94 (q, J=6.4 Hz, 2 H) 3.64 (q, J=6.5 Hz, 2 H) 3.88 (s, 3 H) 3.93 (d, J=8.4 Hz, 1 H) 4.04 (d, J=8.4 Hz, 1 H) 4.08 (s, 2 H) 6.78 (br. s., 1 H) 7.31 - 7.41 (m, 2 H) 7.44 - 7.50 (m, 1 H) 7.54 (t, J=5.5 Hz, 1 H) 7.59 (s, 1 H) 7.83 (dd, J=8.4, 1.4 Hz, 1 H) 7.99 (d, J=1.4 Hz, 1 H) 8.27 (d, J=8.4 Hz, 1 H) 12.07 (s, 1 H); MS m/z 671.4 (M+H)⁺; HPLC %98.6 @ 220 nm ve %96.4 @ 254 nm, ODA SICAKLIĞINDA = 1.91 dakika.

İyodin (27.8 mg, 0.110 mmol) 5 ml'lik korunan ve DCM (2 mL) içinde yer alan metil 4-((3-((3-((tert-bütoksikarbonil)amino)propil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(3-(triflorometil)diaziridin-3-il)benzil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (70 mg, 0.104 mmol) ve trietilamin (43.6 µL, 0.313 mmol) ile önceden doldurulmuş 5 mL yuvarlak tabanlı şişeye ilave edilir ve böylece açık sarı çözelti elde edilir. 20°C'de 15 dakika boyunca karıştırıldıktan sonra, solvent buharlaştırılır ve tortu flaş kromatografi vasıtasıyla saflaştırılır ve böylece metil 4-((3-((3-((tert-bütoksikarbonil)amino)propil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(3-(triflorometil)-3H-diazirin-3-il)benzil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (65 mg, 0.097 mmol, %93 verim) açık sarı köpük olarak elde edilir: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.33 (s, 9 H) 1.53 (dt, J=13.8, 7.0 Hz, 2 H) 1.70 - 1.82 (m, 2 H) 2.15 (br. s., 3 H) 2.24 - 2.34 (m, 2 H) 2.34 - 2.42 (m, 2 H) 2.87 - 2.98 (m, 2 H) 3.55 - 3.66 (m, 2 H) 3.88 (s, 3 H) 4.10 (s, 2 H) 6.76 (br. s., 1 H) 7.14 (d, J=8.2 Hz, 1 H) 7.27 (s, 1 H) 7.43 (t, J=7.8 Hz, 1 H) 7.49 - 7.58 (m, 2 H) 7.83 (dd, J=8.2, 1.4 Hz, 1 H) 7.99 (d, J=1.4 Hz, 1 H) 8.27 (d, J=8.2 Hz, 1 H) 12.06 (s, 1 H); MS m/z 669.2 (M+H)⁺; HPLC %97.6 @ 220 nm ve %97.3 @ 254 nm, ODA SICAKLIĞINDA = 2.18 dakika.

Trifloroasetik asit (0.400 mL, 5.19 mmol) DCM (4 mL) içinde yer alan metil 4-((3-((3-((tert-bütoksikarbonil)amino)propil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(3-(triflorometil)-3H-diazirin-3-il)benzil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (0.064 g, 0.096 mmol) çözeltisine ilave edilir ve böylece açık sarı çözelti elde edilir. 20°C'de 30 dakika boyunca karıştırıldıktan sonra, reaksiyon karışımı DCM (15 mL) ile seyreltilir, doymuş NaHCO₃ (10 mL) ile yıkanır ve sulu katman DCM (10 mL) ile tekrar ekstrakte edilir. Birleştirilen organik katmanlar anhidrit MgSO₄ üzerinde kurutulur, filtre edilir ve kuru oluncaya kadar konsantre edilir ve böylece Aramadde 53C: metil 4-((3-((3-aminopropil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(3-(triflorometil)-3H-diazirin-3-il)benzil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (45 mg, %83 verim) açık sarı köpük olarak elde edilir: HRMS m/z 569.2601 (M+H)⁺; HPLC %97.1 @ 220 nm ve %96,9 @ 254 nm, ODA SICAKLIĞINDA = 1.96 dakika.

2,5-Dioksopirrolidin-1-il-5-((3aS,4S,6aR)-2-oksoheksahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoat (29.2 mg, 0.085 mmol) karışımına DMF içinde yer alan (750 mL) metil 4-((3-aminopropil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(3-(triflorometil)-3H-diazirin-3-il)benzil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (45 mg, 0.079 mmol) ve trietilamin (16.55 µL, 0.119 mmol) ilave edilir ve böylece sarı bir çözelti elde edilir. 20°C'de 30 dakika boyunca karıştırıldıktan sonra, reaksiyon karışımına kavuniçi renginde yağ olarak yüksek vakum altında konsantre edilir ve tortu flaş kromatografi vasıtasıyla saflaştırılır ve böylece 56 mg beyaz katı olarak elde edilir ve bu CH₃CN'den liyofilize edilir ve böylece Örnek 53 bileşiği elde edilir: metil 4-((3-(metil(3-(5-((3aS,4S,6aR)-2-oksoheksahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)propil)amino)propil)amino)-2-(3-(3-(triflorometil)-3H-diazirin-3-il)benzil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksilat (51 mg, 0.064 mmol, %81 verim) beyaz katı olarak elde edilir: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.18 - 1.34 (m, 3 H) 1.35 - 1.50 (m, 3 H) 1.50 - 1.64 (m, 3 H) 1.70 - 1.82 (m, 2 H) 2.02 (t, J=7.4 Hz, 2 H) 2.15 (s, 3 H) 2.26 - 2.34 (m, 2 H) 2.37 (t, J=6.7 Hz, 2 H) 2.55 (d, J=12.5 Hz, 1 H) 2.77 (dd, J=12.1, 5.1 Hz, 1 H) 2.99 - 3.10 (m, 3 H) 3.56 - 3.66 (m, 2 H) 3.88 (s, 3 H) 4.03 - 4.14 (m, 1 H) 4.10 (s, 2 H) 4.26 (dd, J=7.6, 5.3 Hz, 1 H) 6.34 (s, 1 H) 6.39 (s, 1 H) 7.14 (d, J=7.4 Hz, 1 H) 7.28 (s, 1 H) 7.44 (t, J=7.8 Hz, 1 H) 7.52 (d, J=7.8 Hz, 1 H) 7.56 (t, J=5.3 Hz, 1 H) 7.73 (t, J=5.5 Hz, 1 H) 7.83 (dd, J=8.2, 1.4 Hz, 1 H) 8.00 (d, J=1.4 Hz, 1 H) 8.28 (d, J=8.2 Hz, 1 H) 12.07 (s, 1 H); HRMS m/z 795.3368 (M+H)⁺; HPLC %95.4 @ 220 nm ve %96.2 @ 254 nm, ODA SICAKLIĞINDA = 2.06 dakika.

Örnek 55

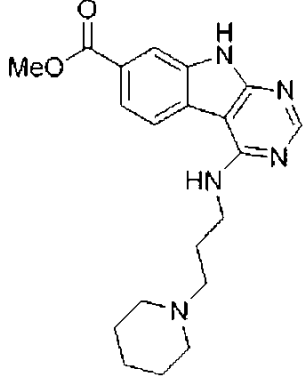
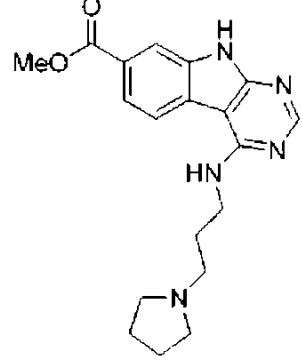
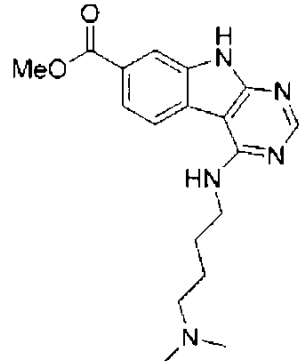
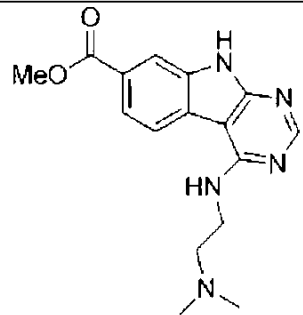


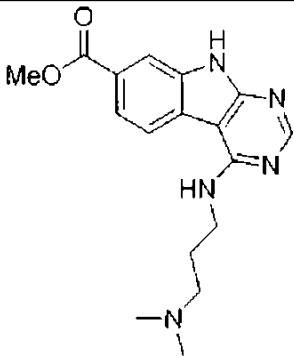
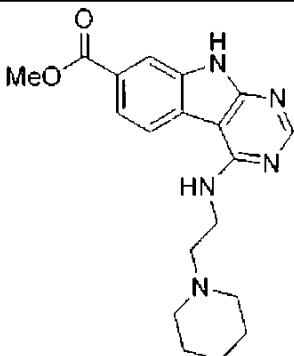
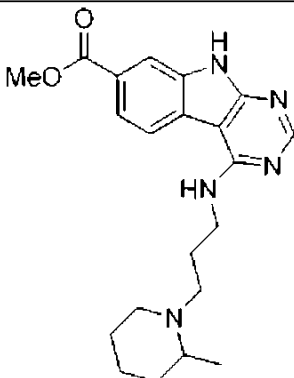
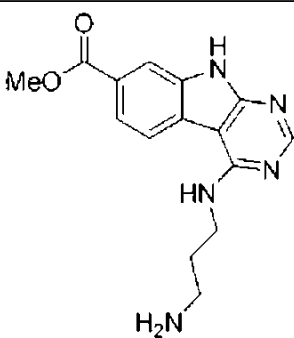
MeOH (10.00 mL) içinde metilamin 2M'de metil 2-benzil-4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7 karboksilat (Örnek 27, 0.030 g, 0.066 mmol) çözeltisi sızdırmaz bir tüp içine yerleştirilir ve 66 saat 110°C'ye ısıtılır, bu işlemin ardından karışım 20°C'ye

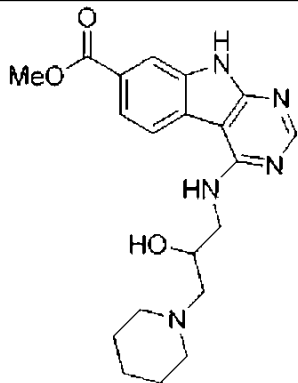
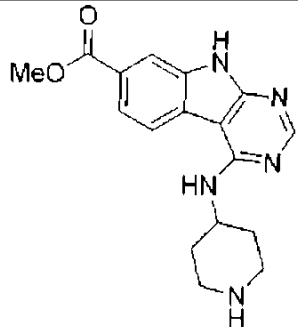
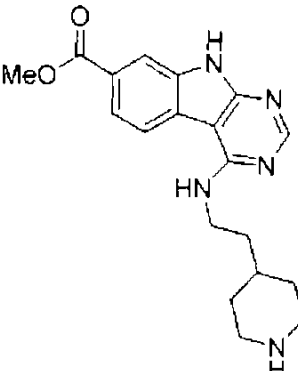
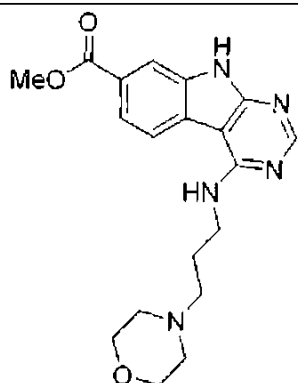
soğutulur, kuru oluncaya kadar konsantre edilir ve flaş kromatografi vasıtasıyla saflaştırılır ve böylece 28 mg renksiz bir yağ elde edilir ve bu eter (2 mL) içinde süspanse edilir. Nihai süspansiyon 2 saat karıştırılma sonrasında elde edilir, katılar Buchner üzerinde toplanır, kek eter (2 x 0.5 mL) ile yıkanılır ve ürün 40°C'de yüksek vakum altında sabit bir ağırlıkta elde edilinceye kadar kurutulur ve böylece Örnek 55 elde edilir: 2-benzil-N-metil-4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-karboksamid (23 mg, %77 verim) beyaz katı olarak elde edilir: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.38 (m, J=5.1 Hz, 2 H) 1.50 (kuin, J=5.5 Hz, 4 H) 1.80 (kuin, J=7.0 Hz, 2 H) 2.22 - 2.41 (m, 6 H) 2.81 (d, J=4.3 Hz, 3 H) 3.58 - 3.68 (m, 2 H) 4.03 (s, 2 H) 7.15 - 7.21 (m, 1 H) 7.27 (m, J=7.4, 7.4 Hz, 3 H) 7.34 - 7.40 (m, 2 H) 7.70 (dd, J=8.2, 1.4 Hz, 1 H) 7.90 (d, J=1.4 Hz, 1H) 8.27 (d, J=8.2 Hz, 1 H) 8.46 (q, J=4.3 Hz, 1 H) 11.96 (s, 1 H); HRMS m/z 457.2708 (M+H)⁺; HPLC >%99.5 @ 220 nm ve %98.9 @ 254 nm, ODA SICAKLIĞINDA = 1.53 dakika.

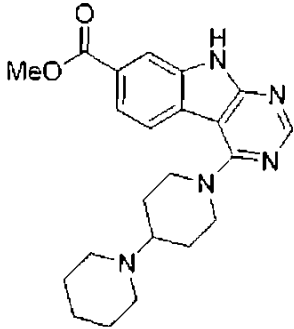
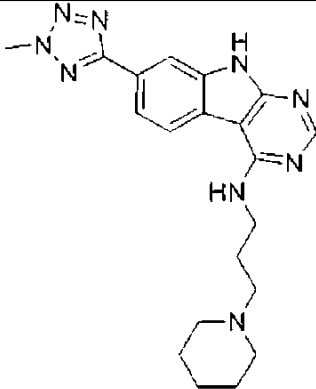
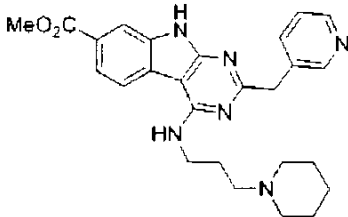
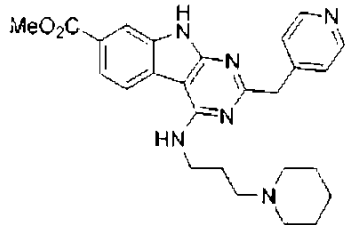
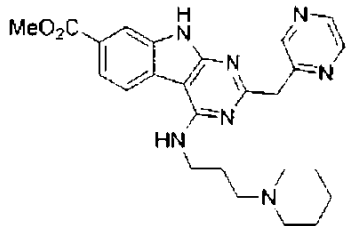
Bildirilen HPLC bekletme süresi ters-evre HPLC (Agilent, 1200 serisi) için olup burada aşağıdaki koşullar kullanılmıştır: Solvent A: MeOH:H₂O:TFA (5:95:0.05); Solvent B: MeOH:H₂O:TFA (95:5:0.05); akış 3.0 mL/dakika; gradyan 0 ila %100 B /2.0 dakika; sütun: ZorbaxC18, 3.5 mikron, 4.6 x 30 mm; dalga uzunluğu 220 nm.

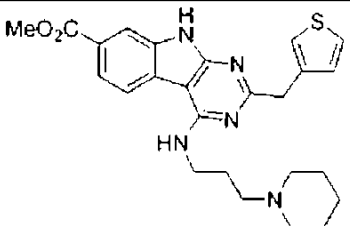
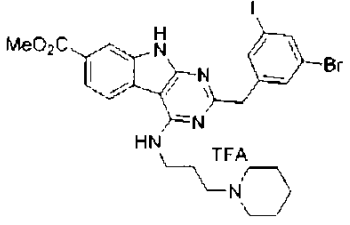
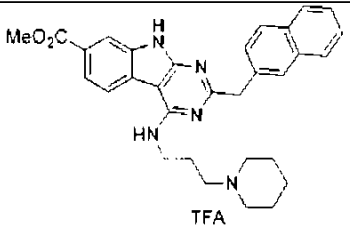
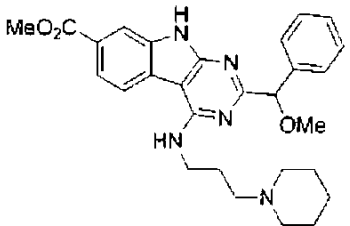
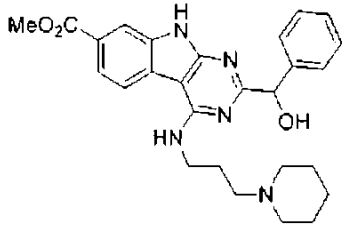
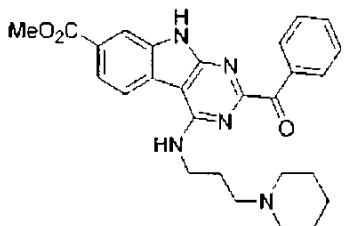
Tablo 1. Örneğe ait yapı, analitik HPLC bekleme süresi, LCMS verisi ve biyolojik veriler.

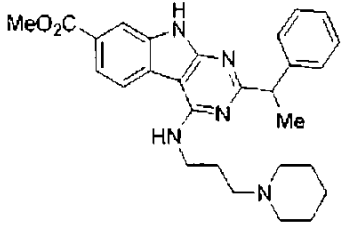
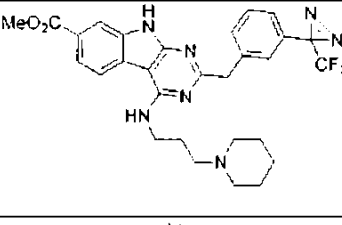
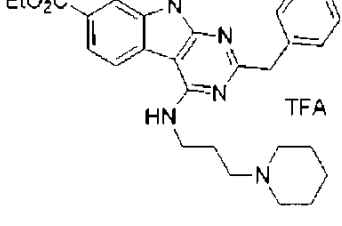
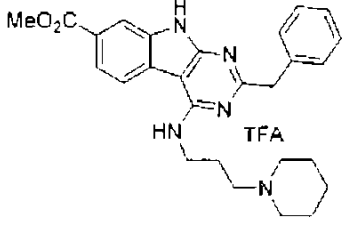
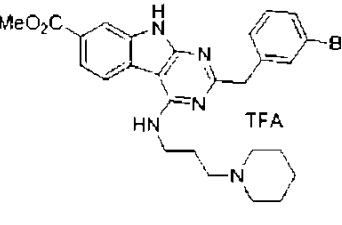
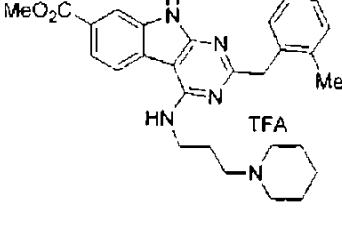
Bileşik No	Yapı	HPLC R _T (dakika) analitik	MSm/z (M+H) ⁺	Biyolojik veri (EC ₅₀)*
1		1.38	368.2	C
2		1.35	354.2	D
3		1.55	342.2	C
4		1.30	314.2	D

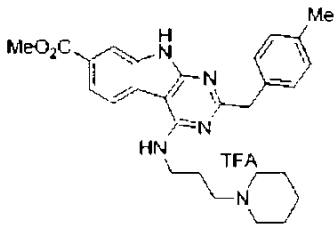
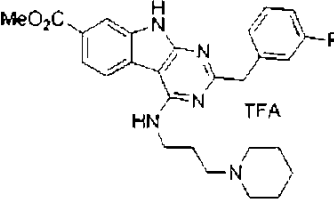
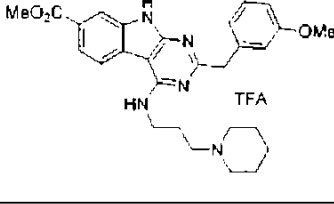
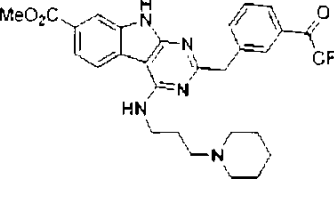
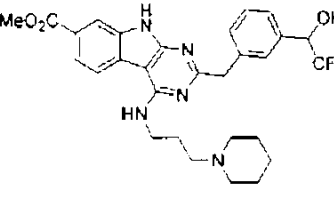
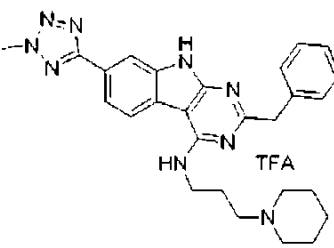
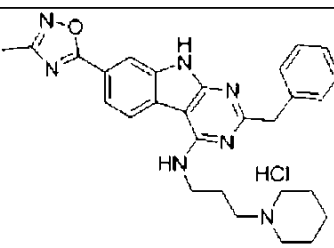
5		1.29	328.2	B
6		1.41	354.2	C
7		1.43	382.2	D
8		1.34	300.2	C

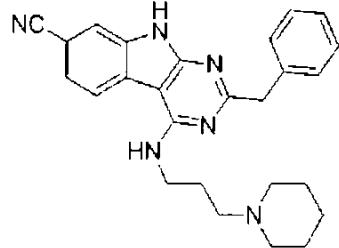
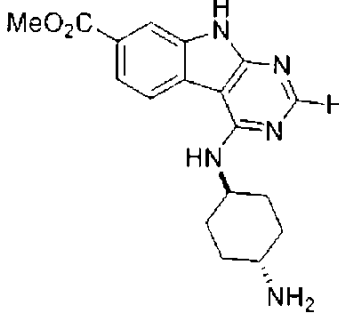
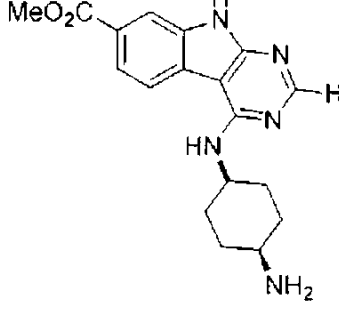
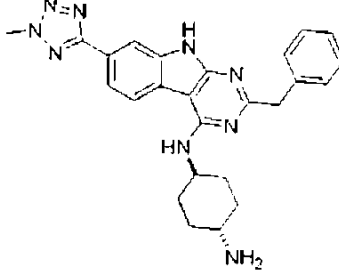
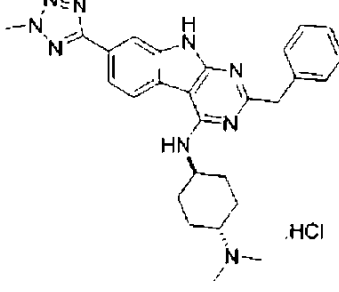
9		1.35	384.2	C
10		1.34	326.2	B
11		1.40	354.2	C
12		1.29	370.2	A

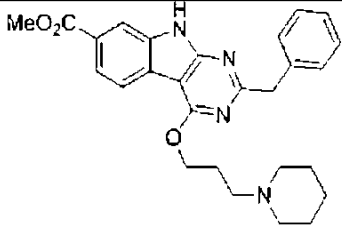
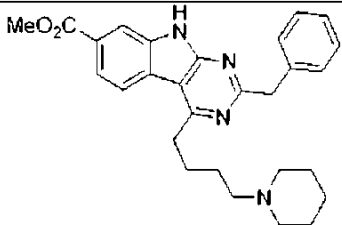
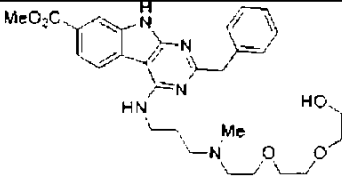
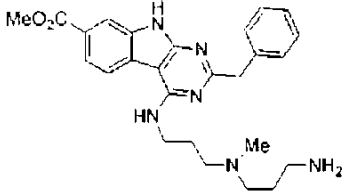
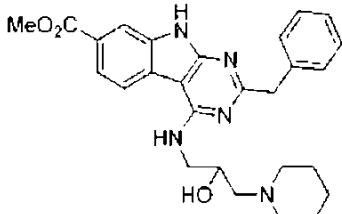
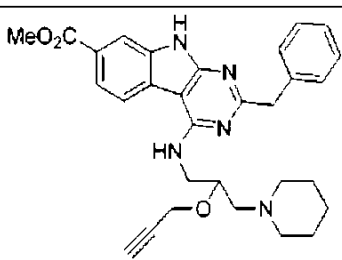
13		1.45	394.2	D
14		1.44	392.2	D
15		1.43	459.2	E
16		1.78	459.2518	C
17		1.54	460.2	B

18		2.068	464.2145	E
19		2.349	662.063	E
20		2.206	508.2707	D
21		1.78	488.2665	E
22		1.68	474.2511	F
23		2.129	472.2342	F

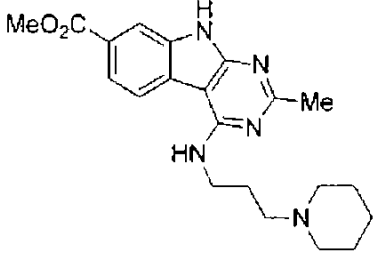
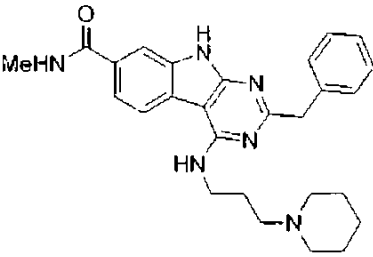
24		2.083	472.2724	E
25		2.05	566.2497	E
26		2.152	472.2733	F
27		2.052	458.2598	E
28		2.194	538.1670	E
29		2.142	472.2756	E

30		2.142	472.2740	E
31		2.112	476.2499	E
32		2.070	488.2690	E
33		1.761.87 (hidrat)	554.2384	E
34		2.142	554.2	E
35		2.063	482.28	E
36		1.79	482.2663	F

37		1.68	425.2448	C
38		1.44	340.2	D
39		1.38	340.2	C
40		1.72	454.2	E
41		1.71	482.2785	E

42		1.92	459.2392	B
43		1.75	457.2598	F
44		2.035	536.2867	E
45		1.63	461.2	E
46		1.70	474.2476	E
47		1.85	512.2632	E

48		1.74	472.2717	E
49		2.161	586.2839	A
50		1.65	499.2823	F
51		2.01	776.3	E
52		1.70	687.3	C
53		2.06	795.3368	F

54		1.46	382.2	A
55		1.53	457.2708	A

EC₅₀, vehikül kültürlerine (DMSO) kıyasla CD34+CD45RA- hücre sayımında %50 oranında bir artış ile sonuçlanan konsantrasyon olarak belirlenmektedir. *EC₅₀: A >1000 nM; B = 500-1000 nM; C = 250-500 nM; D = 100-250; E = <100 nM; F = gösterilen bileşik > 1.3 kat genişleme.

Ex vivo Fonksiyonel Tahlil:

Genişlemiş hücrelerin ex vivo fonksiyonelliği, kültür (CFU-C) tahlilinde geleneksel koloni-oluşturan birimler kullanılarak test edilmiştir. Tedavi edilmemiş hücreler veya DMSO ile inkübe edilmiş hücreler, pozitif kontrol veya buluşa ait bir bileşik, geleneksel koşullarda metilselüloz ortamda kaplanmıştır. Örneğin, Bileşik 1 (Tablo 1, Örnek 1), çok yetili hematopoetik progenitörlerin sayımını arttırmaktadır. 10 gün boyunca Bileşik 1 ile tedavi edilmiş 1000 CD34+ mPB hücrelerinin metilselüloz kültürü, giriş hücreleri üzerinde çok soylu granülosit eritrosit, makrofaj ve megakaryositte (GEMM kolonileri) 5 kat bir artış ve kontrol hücrelerine kıyasla 10 kat bir artış ile sonuçlanmıştır. Bu, Bileşik 1'in çok yetili progenitör hücrelerin genişlemesini arttırdığını ortaya koymaktadır.

In vivo Fonksiyonel Tahlil:

Buluşun bileşikleri ile kültürlenen CD34+ mPB hücreleri, immün yetmezlikli suş NOD scid gamma (NSG) farelerini aşmaktadır. 10 gün boyunca Bileşik 1 (Tablo 1, Örnek 1) ile kültürlenmiş 2,000,000 ve 500,000 CD34+ mPB hücrelerinin sonucu veya vehikül kontrol koşullarında NSG farelerinde nakledilmiştir, nakilden 8 hafta sonra, insan hematopoetik hücre

5 sulandırılarak insan CD45'e karşı antikor kullanılarak, NSG kemik iliğinde kontrol edilmiştir. Bileşik 1 ile tedavi edilen ancak vehikül ile tedavi edilmeyen hücreler NSG farelerini aşlayamamıştır. Dahası insan miyeloid ve lenfoid bölümlerinin sulandırılarak aynı zamanda onaylanmıştır çünkü kemik iliği hücreleri sırasıyla insan CD33+ ve CD19+ için pozitif. Bu sonuçlar, CD34+ mPB'nin Bileşik 1 ile genişlediğini, sadece aşlamaya katkıda bulunmakla kalmayıp aynı zamanda *in vivo* çoklu soylu repopülasyon potansiyelini koruduğunu da göstermektedir,

Bileşiklerin Kombinasyonu:

10

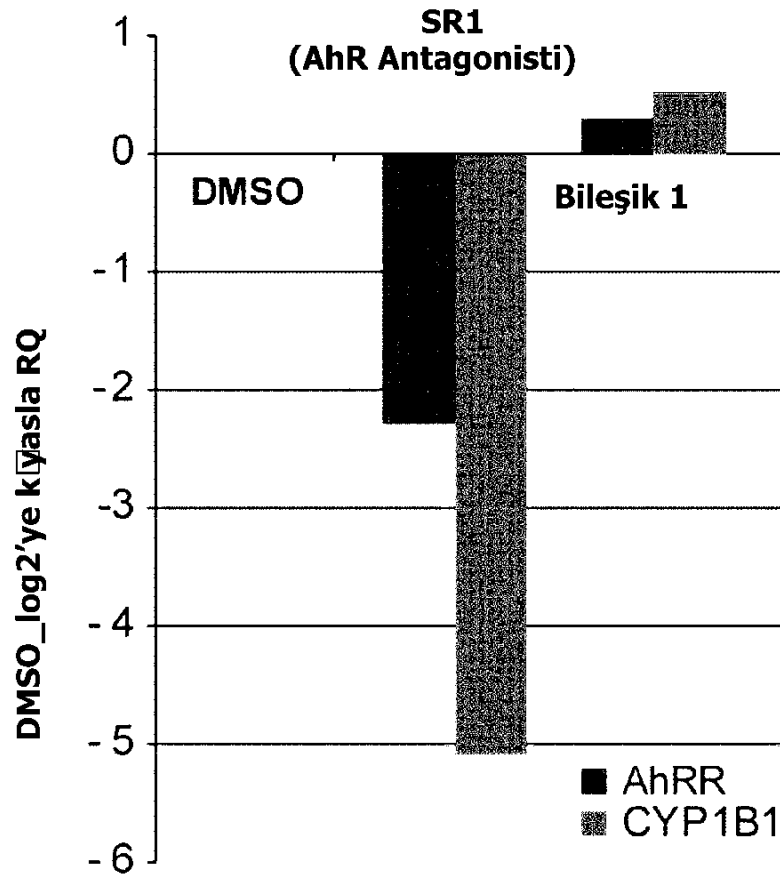
Buluşun bileşikleri ile kültürlenmiş CD34+ mPB hücreleri, immün yetmezlikli suş NOD scid gamma (NSG) farelerini aşlamaktadır 10 gün boyunca Bileşik 1 (Tablo 1, Örnek 1) ile kültürlenmiş 2,000,000 ve 500,000 CD34+ mPB hücrelerinin sonucu veya vehikül kontrol koşullarında NSG farelerinde nakledilmiştir. Nakilden 8 hafta sonra, insan hematopoetik hücre sulandırılarak insan CD45'e karşı antikor kullanılarak, NSG kemik iliğinde kontrol edilmiştir. Bileşik 1 ile tedavi edilen ancak vehikül ile tedavi edilmeyen hücreler NSG farelerini aşlayamamıştır. Dahası insan miyeloid ve lenfoid bölümlerinin sulandırılarak aynı zamanda onaylanmıştır çünkü kemik iliği hücreleri sırasıyla insan CD33+ ve CD19+ için pozitif. Bu sonuçlar, CD34+ mPB'nin Bileşik 1 ile genişlediğini, sadece aşlamaya katkıda bulunmakla kalmayıp aynı zamanda *in vivo* çoklu soylu repopülasyon potansiyelini koruduğunu da göstermektedir,

15

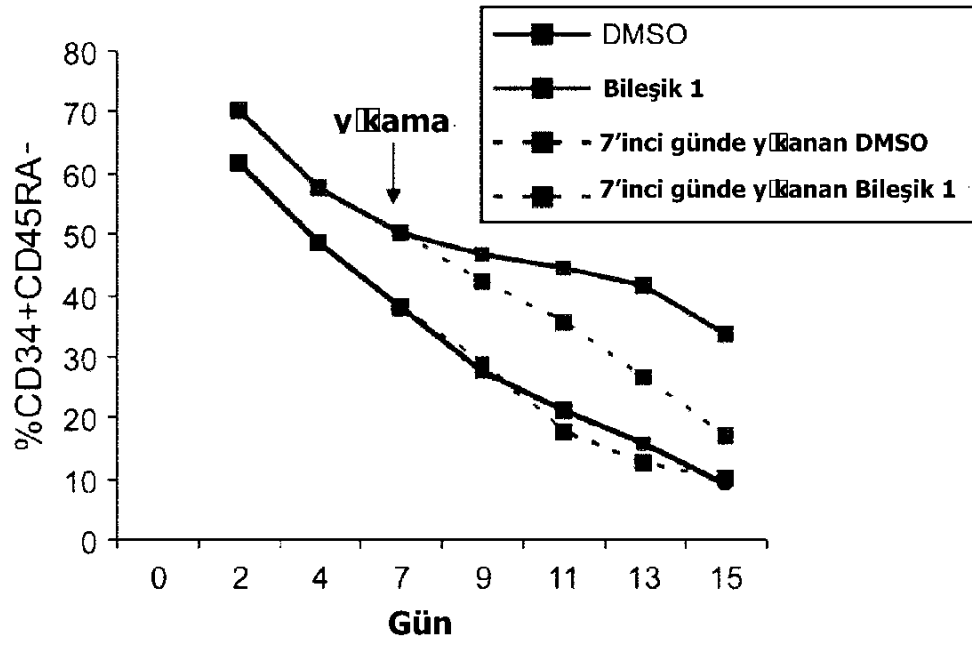
20

Burada açıklanan örnekler ve yapılandırmalar yalnızca amaçla ulaşıldığı ve bunun doğrultusunda çeşitli modifikasyonlar veya değişikliklerin, teknikte uzman kişi tarafından ortaya koyulacağı ve ekli istemlerin kapsamında dahil edileceği anlaşılmaktadır

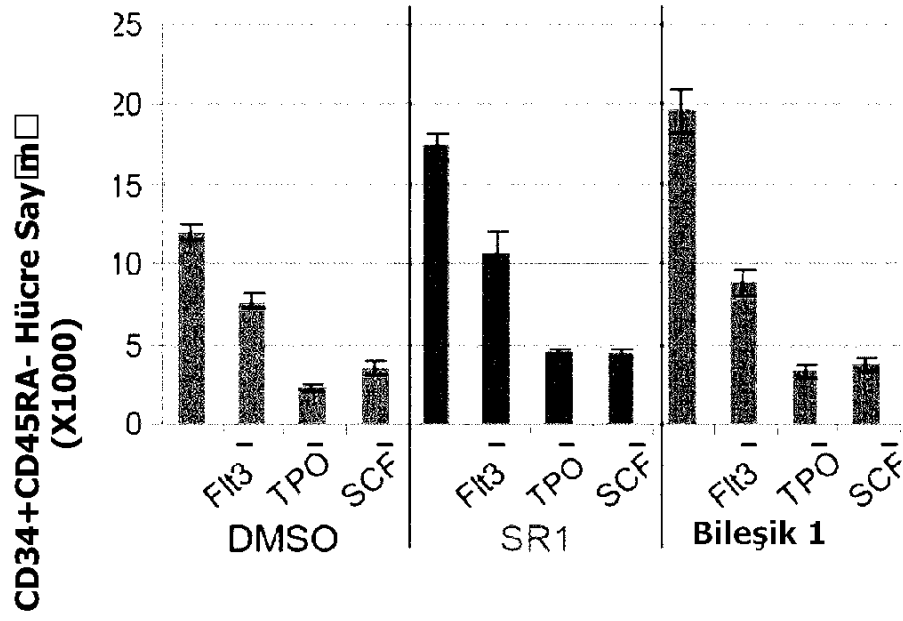
25



ŞEKİL 1

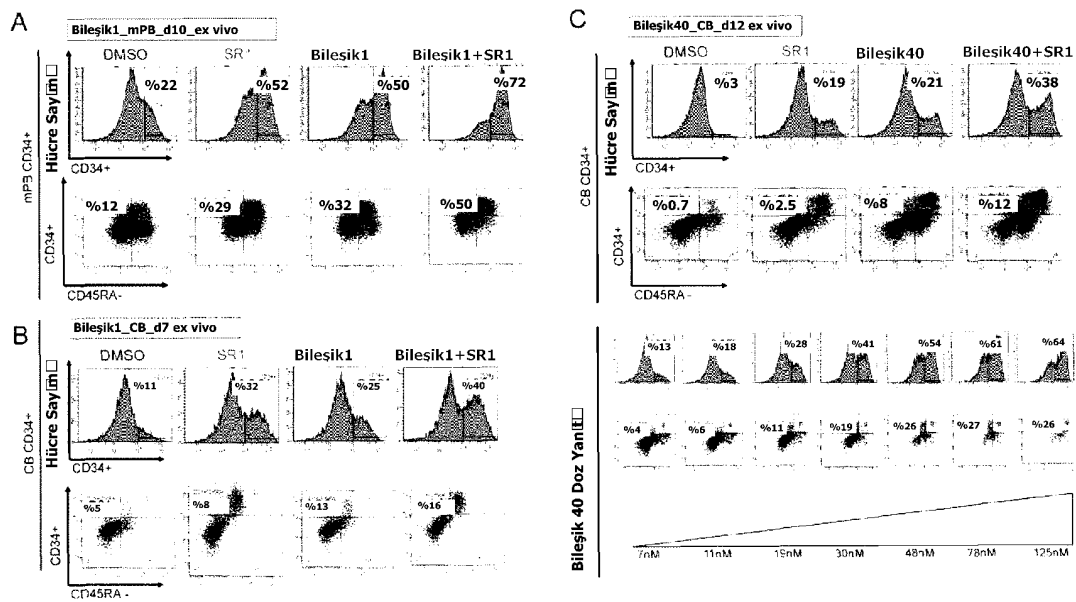


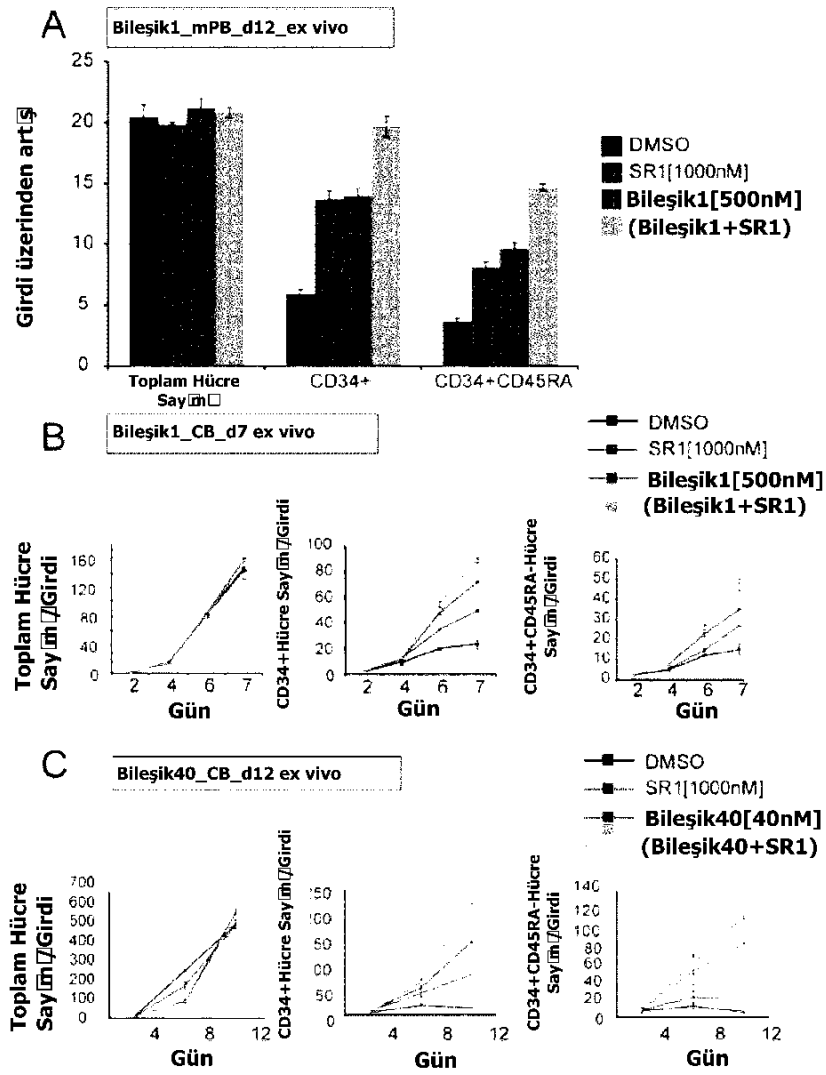
ŞEKİL 2



ŞEKİL 3

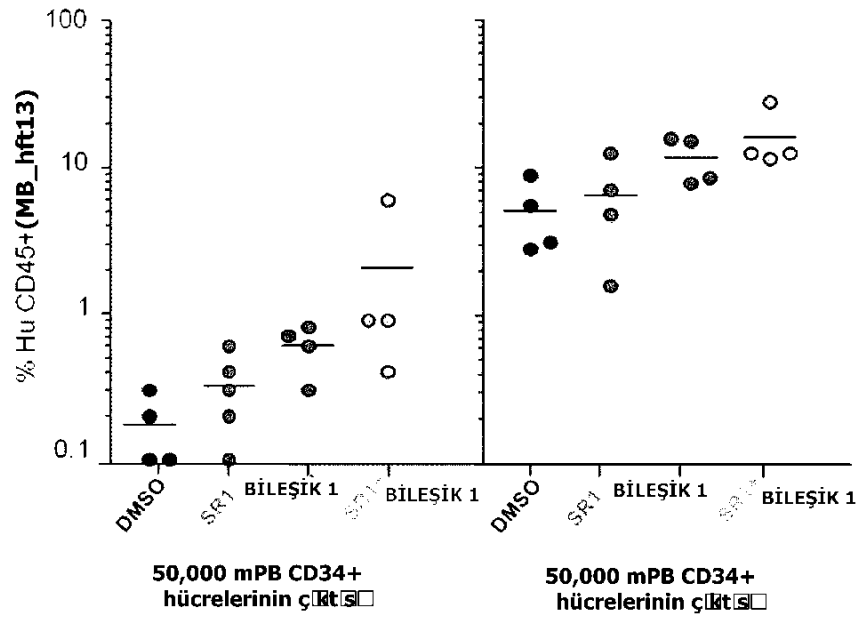
ŞEKİL 4



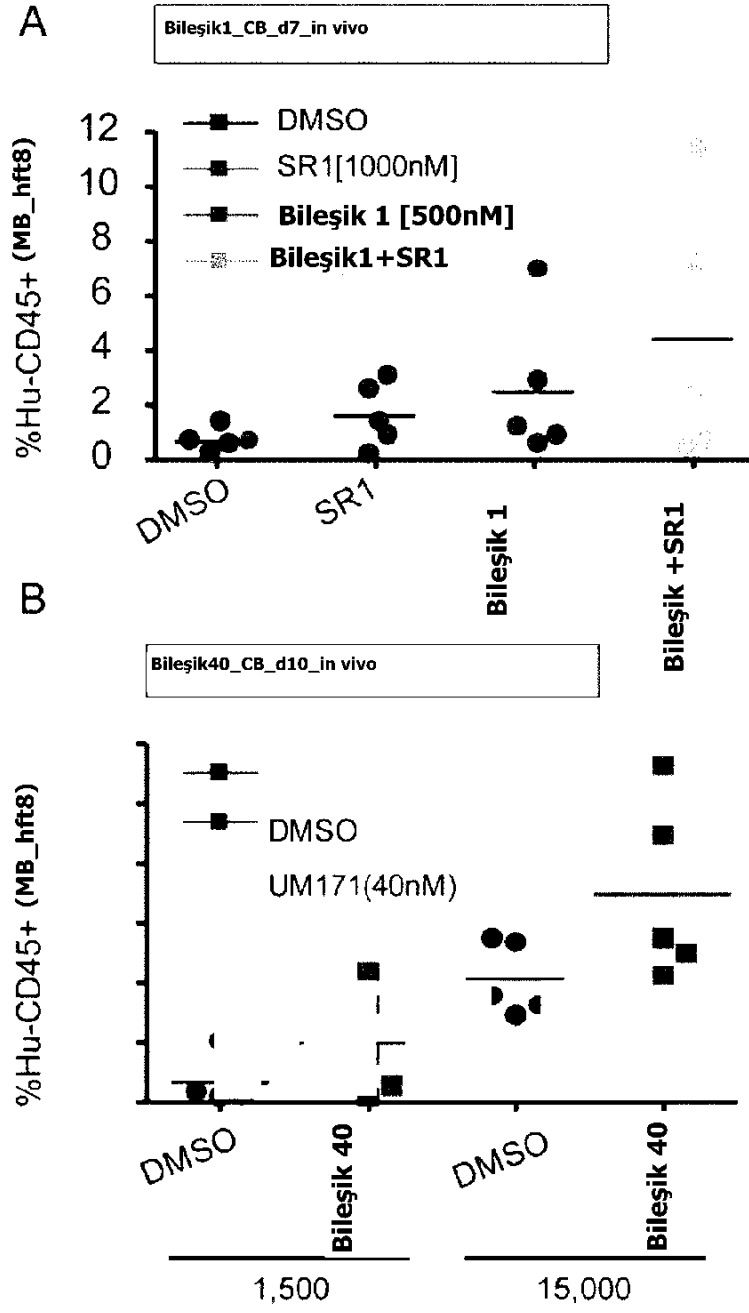


ŞEKİL 5

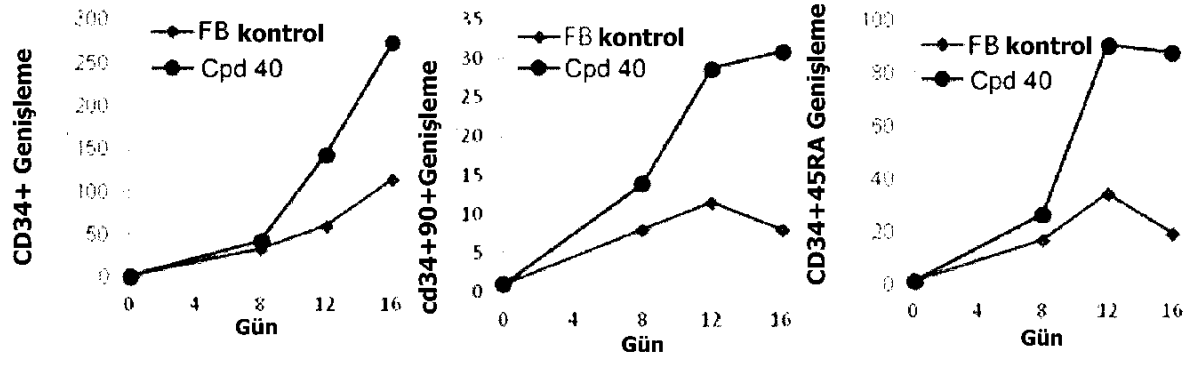
Bileşik1_mPB_d10_in vivo



ŞEKİL 6



ŞEKİL 7



ŞEKİL 8