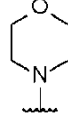


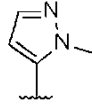
ÖZET**ERK İNHİBİTÖRLERİ OLARAK TİENO[2,3-C]PİROL-4-ON TÜREVLERİ**

Bu buluş hücre dışı sinyalin regüle ettiği kinazın (ERK) aktivitesini inhibe eden ve kanser tedavisinde yararlı olabilen tieno[2,3-c]pirol-4-on bileşiklerini sunmaktadır.

2. İstem 1'e uygun bileşik veya tuz olup, burada R^2 ve R^3 bağımsız olarak metildir.
3. İstem 2'ye uygun bileşik veya tuz olup, burada R^4 hidrojenidir.
4. İstem 3'e uygun bileşik veya tuz olup, burada $R^1 =$



5. İstem 4'e uygun bileşik veya tuz olup, burada $R^5 =$



6. İstem 5'e uygun bileşik olup, 6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzudur.
7. İstem 6'ya uygun bileşik olup, 6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on'dur.
8. İstem 1-7'nin herhangi birine uygun bileşiği veya tuzu ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı, seyreltici veya eksipiyan içeren bir farmasötik bileşim.
9. Terapide kullanım için İstem 1-7'nin herhangi birine uygun bileşik veya tuz.
10. Kanser tedavisinde kullanım için İstem 1-7'nin herhangi birine uygun bileşik veya tuz.
11. Kanser tedavisinde ramusirumabla kombinasyon halinde eş zamanlı, ayrı veya ardışık uygulamada kullanım için İstem 6'ya uygun bileşik veya tuz.
12. Kanser tedavisinde [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-floro-4-(7-floro-3-izopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-aminle veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzuyla kombinasyon halinde eş zamanlı, ayrı veya ardışık uygulamada kullanım için İstem 6'ya uygun bileşik veya tuz.
13. İstem 10-12'nin herhangi birine uygun kullanım için bileşik veya tuz olup, burada kanser melanom, kolorektal kanser, pankreas kanseri ve küçük hücreli dışı akciğer kanserinden oluşan gruptan seçilir.

- 14.** İstem 13'e uygun kullanım için bileşik veya tuz olup, burada kanser kolorektal kanserdir.
- 15.** İstem 13'e uygun kullanım için bileşik veya tuz olup, burada kanser pankreas kanseridir.
- 5 **16.** İstem 13'e uygun kullanım için bileşik veya tuz olup, burada kanser küçük hücreli dışı akciğer kanseridir.

TARİFNAME

ERK İNHİBİTÖRLERİ OLARAK TIENO[2,3-C]PİROL-4-ON TÜREVLERİ

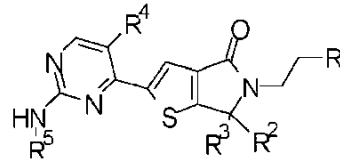
Açıklama

Bu buluş hücre dışı sinyalin regüle ettiği kinazın (ERK) aktivitesini inhibe eden ve kanser tedavisi için yararlı olabilen tieno[2,3-c]pirol-4-on bileşiklerine veya bunların farmasötik olarak kabul edilebilir tuzlarına ve bileşikleri içeren farmasötik bileşimlere ilişkindir.

ERK/MAPK yolu hücre proliferasyonu için önemlidir ve birçok tümörde aktive olduğu sıklıkla gözlemlenmektedir. ERK1/2'nin akış yukarısında olan RAS genleri kolorektal kanser, melanom, küçük hücreli dışı akciğer kanseri gibi çeşitli kanserlerin yanı sıra meme ve pankreas tümörlerinde mutasyona uğrar. Yüksek RAS aktivitesine birçok beşeri tümörde yükselmiş ERK aktivitesi eşlik eder. Çalışmalar ERK'in RAS sinyallerinin önemli bir bileşeni olduğunu göstermiştir. Bu gözlemler geniş bir beşeri tümörler spektrumunda kansere karşı terapilerin geliştirilmesi için ERK1/2 sinyal yolunun çekiciliğini desteklemektedir.

ERK inhibitörleri bu alanda bilinmektedir; örneğin bakınız: WO2013130976. Ayrıca, başka aminopirimidin bileşikleri bu alanda bilinmektedir; örneğin WO 2010/022121, US 2003/0064982 ve WO 2007/053776'ya bakınız. Alternatif ERK inhibitörlerinin, daha özel olarak kanser tedavisine yönelik olanların temin edilmesine hâlâ ihtiyaç duyulmaktadır. Dolayısıyla bu buluş kanser tedavisi için yararlı olabilen ERK1/2 inhibitörleri sunmaktadır.

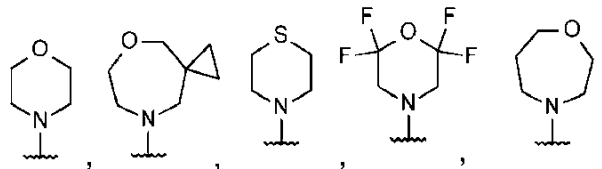
Bu buluş aşağıdaki formülü haiz bir bileşiği veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu sunmaktadır:

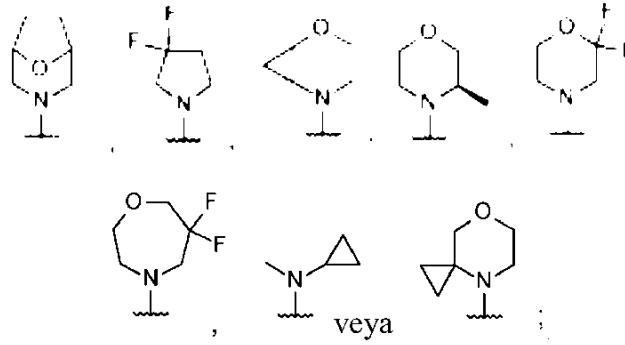


Formül I

burada:

R¹ =

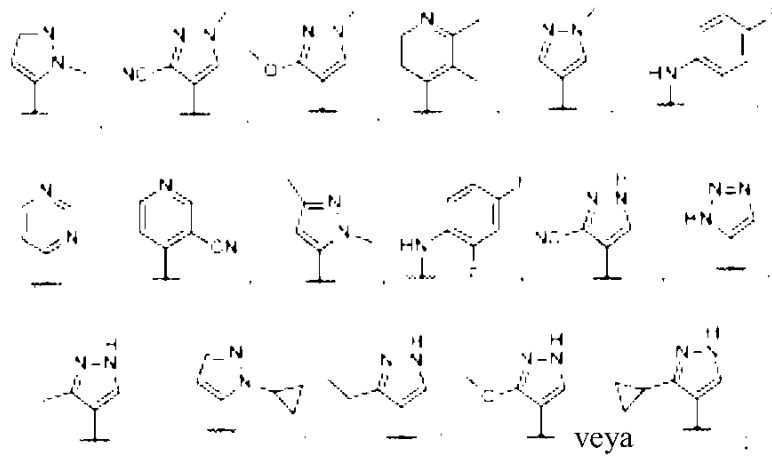




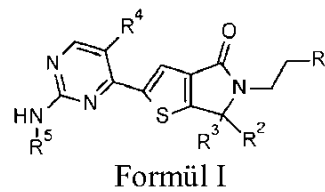
R^2 ve R^3 bağımsız bir şekilde metildir veya R^2 ve R^3 birlikte alındığında siklopropili oluşturabilir;

5 R^4 hidrojen, metil, kloro, floro veya trifluometildir; ve

$R^5 =$

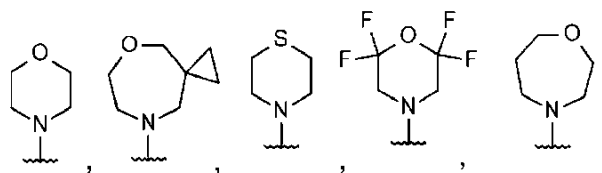


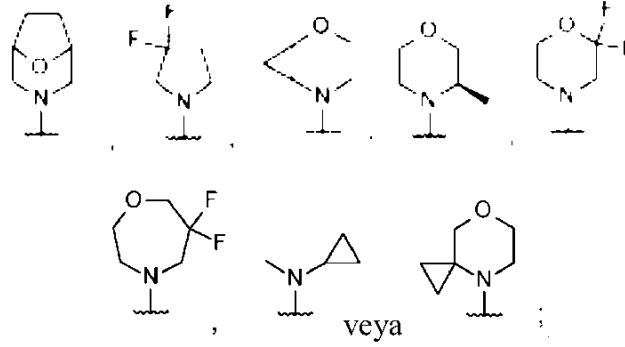
10 Bu buluş ayrıca aşağıdaki formülü haiz bir bileşiği veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu sunmaktadır:



burada:

$R^1 =$

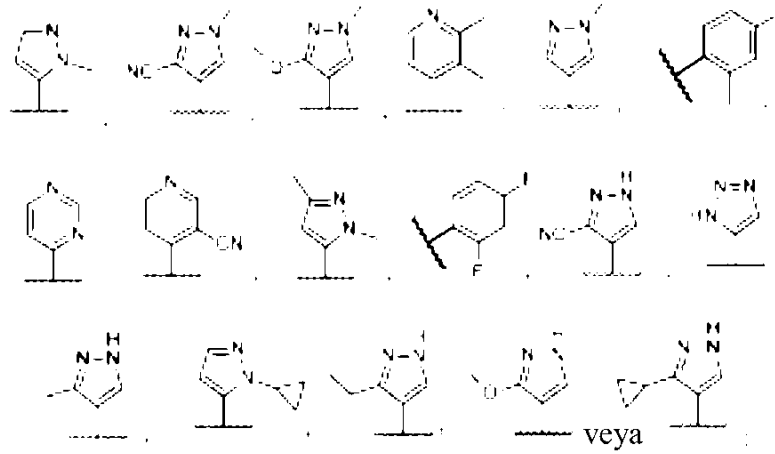




R^2 ve R^3 bağımsız bir şekilde metildir ve R^2 ve R^3 birlikte alındığında siklopropili oluşturabilir;

5 R^4 hidrojen, metil, kloro, floro veya triflorometildir; ve

$R^5 =$



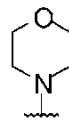
10 Bu buluş ayrıca R^2 ve R^3 'ün metil olduğu Formül I'in bir bileşiği için bir düzenleme sunmaktadır.

Bu buluş ayrıca R^4 'ün hidrojen olduğu Formül I'in bir bileşiği için başka bir düzenleme sunmaktadır.

Bu buluş ayrıca R^4 'ün hidrojen olduğu Formül I'in bir bileşiği için başka bir düzenleme sunmaktadır.

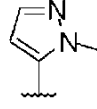
15

Bu buluş ayrıca R^1 'in



olduğu Formül I'in bir bileşiği için yine başka bir düzenleme sunmaktadır.

Bu buluş ayrıca R⁵'in



olduğu Formül I'in bir bileşiği için yine başka bir düzenleme sunmaktadır.

Tercihen bu buluş, 6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on olan bir bileşik veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu sunmaktadır.

Özel bir düzenleme olarak, bu buluş 6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on olan bileşiği sunmaktadır.

10 Bu buluş 6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı, seyreltici veya ekşiyan içeren bir farmasötik bileşim sunmaktadır. Bu buluş 6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on'u ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı, seyreltici veya ekşiyan içeren bir farmasötik bileşim sunmaktadır.

Bu buluş tedavide kullanım için 6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu sunmaktadır. Bu buluş kanser tedavisinde kullanım için 6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu sunmaktadır. Bu buluş kanser tedavisinde kullanım için farmasötik bir bileşim sunmaktadır, farmasötik bileşim 6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içerir.

Bu buluş ayrıca tedavide kullanım için 6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on'u sunmaktadır. Bu buluş kanser tedavisinde kullanım için 6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on'u sunmaktadır. Bu buluş kanser tedavisinde kullanım için bir farmasötik

bileşim sunmakta olup, farmasötik bileşim 6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on içerir.

Bu buluş provides 6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunun kanser tedavisine yönelik bir ilacın imalatında kullanımını sunmaktadır. Bu buluş ayrıca 6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on'un kanser tedavisine yönelik bir ilacın imalatında kullanımını sunmaktadır.

- 10 Bu buluş 6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on'u bir kristal formunda sunmaktadır. Bu buluş ayrıca 6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on'u, 15.5°, 17.1°, 18.0°, 20.2°, 21.5° ve 22.1°'den oluşan gruptan seçilen piklerin biri veya daha fazlasıyla kombinasyon halinde 19.3°'te oluşan, $2\theta \pm 0.2^\circ$ 'deki karakteristik piklere sahip bir X-ışını toz kırınım deseniyle karakterize edilen bir kristal formunda sunmaktadır.

- Ayrıca bu buluş, kanserin melanom, kolorektal kanser, pankreas kanseri ve küçük hücreli dışı akciğer kanserinden oluşan gruptan seçildiği, burada açıklandığı gibi kullanımların tercih edilen düzenlemelerini sunmaktadır. Tercih edilen kanserler kolorektal kanser, 20 pankreas kanseri ve küçük hücreli dışı akciğer kanseridir.

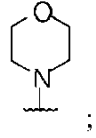
- Bu buluş ayrıca kanser tedavisinde bir veya daha fazla kemoterapi maddesiyle kombinasyon halinde eş zamanlı, ayrı veya ardışık uygulamada kullanım için 6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu 25 sunmaktadır. Böyle bir kombinasyon için tercih edilen kemoterapi maddeleri pan-RAF inhibitörü bir bileşik, daha özel olarak 1-(3,3-dimetilbütül)-3-(2-floro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)üre), CDK4/6 inhibitörü bir bileşik, daha özel olarak palbosiklib, ribosiklib veya [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-floro-4-(7-floro-3-izopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amin veya bunun 30 farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu, veya bir anti-VEGFR2 antikoru, daha özel olarak ramusirimabdır. Böyle bir kombinasyon için tercih edilen diğer kemoterapi maddeleri TGF-beta reseptör kinaz inhibitörü bir bileşik, daha özel olarak galunisertib

- (WO 2004/048382'ye bakınız), bir ALK-5 kinaz inhibitörü, daha özel olarak EW-7197, MEK inhibitörü bir bileşik, daha özel olarak kobimetinib veya trametinib veya Notch inhibitörü bir bileşik, daha özel olarak 4,4,4-trifloro-N-[(1S)-2-[[[(7S)-5-(2-hidroksietil)-6-okso-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-7-il]amino]-1-metil-2-okso-etil]bütanamiddir (WO 2013/016081'e bakınız). Böyle bir kombinasyon için tercih edilen diğer kemoterapi maddeleri bir PD-L1 (Programlı ölüm ligandı 1) inhibitörü veya bir PD-1 (Programlı ölüm 1) inhibitörüdür.

Bu buluş tercihen aşağıdaki süstituentleri içeren Formül I'in bileşiklerini kapsar:

a) R1 =

10



b) R2 metildir;

c) R3 metildir;

d) R4 hidrojenidir; veya

e) R5 =

15



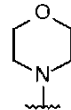
Daha tercihen, bu buluş aşağıdaki süstitent kombinasyonlarını haiz Formül I'in bileşiklerini içerir:

a) R² ve R³ metildir;

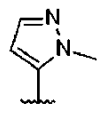
b) R² metildir, R³ metildir ve R⁴ hidrojenidir;

20

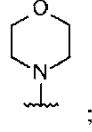
c) R¹ =



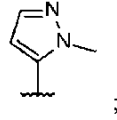
ve R⁵ =



d) R^2 metildir, R^3 metildir, R^4 hidrojen ve $R^1 =$

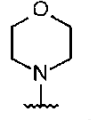


e) R^2 metildir, R^3 metildir, R^4 hidrojen ve $R^5 =$



5 veya

f) R^2 metildir, R^3 metildir, R^4 hidrojen ve $R^1 =$



ve $R^5 =$



10 Yukarıda ve buluşun açıklaması boyunca kullanılan aşağıdaki terimler, aksi belirtilmedikçe, aşağıdaki anlamlara sahip olarak anlaşılacaktır:

“Farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı, seyreltici veya eksipiyen” bu alanda biyolojik olarak etken maddeleri memelilere, örneğin insanlara tatbik etmek için genel olarak kabul edilen bir ortamdır.

15 “Farmasötik olarak kabul edilebilir tuzlar” veya “farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuz” bu buluşun bileşiğinin görece toksik olmayan, inorganik ve organik tuzunu veya tuzlarını belirtmektedir.

20 “Etkili miktar”, bu buluşun bileşiğinin veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunun veya bu buluşun bir bileşiğini veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren farmasötik bileşimin, araştırmacı, veteriner, tıp doktoru veya başka klinisyen tarafından araştırılmakta olan bir doku, sistem, hayvan, memeli veya insanda biyolojik veya tıbbi bir yanıtı veya istenen terapötik etkiye yol açacak miktarını belirtmektedir.

“Tedavi”, “tedavi etmek”, “tedavi etme” ve bunun gibi terimler bir hastalığın ilerlemesinin yavaşlatılmasını veya tersine çevrilmesini içerecek şekilde kullanılmaktadır. Bu terimler, bir hastalık veya rahatsızlık fiilen elimine edilmese bile ve hastalığın veya rahatsızlığın ilerlemesi bizzat yavaşlatılmasa veya tersine çevrilmese bile, hastalığın veya rahatsızlığın
 5 bir veya daha fazla semptomunun hafifletilmesini, iyileştirilmesini, zayıflatılmasını, elimine edilmesini veya azaltılmasını da kapsamaktadır.

Bu alanda uzman olanlar bu buluşun bileşiklerinin tuzlar oluşturabildiğini takdir edeceklerdir. Bu buluşun bileşikleri bazik heterosikller içerir ve dolayısıyla çeşitli inorganik ve organik asitlerin herhangi biriyle reaksiyona girerek farmasötik olarak kabul
 10 edilebilir asit ilave tuzları oluşturur. Bu farmasötik olarak kabul edilebilir asit ilave tuzları ve bunları hazırlamak için genel metodoloji bu alanda iyi bilinmektedir. Örneğin bakınız: P. Stahl ve diğerleri, HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2008); S.M. Berge ve diğerleri “Pharmaceutical Salts”, Journal of Pharmaceutical Sciences, Cilt 66, No. 1, Ocak 1977.

15 Bu buluşun bileşikleri tercihen çeşitli yollarla uygulanan farmasötik bileşimler olarak formüle edilir. Tercihen bu bileşimler ağızdan uygulama içindir. Bu farmasötik bileşimler ve bunları hazırlamak için işlemler bu alanda iyi bilinmektedir. Örneğin bakınız: REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (A. Gennaro ve diğerleri, 21. basım, Mack Publishing Co., 2005).

20 Bu buluşun bileşikleri geniş bir dozaj aralığında genel olarak etkilidir. Örneğin, günlük dozajlar normal olarak yaklaşık 1 ila 2000 mg günlük aralığı içindedir. Tercihen bu dozlar 50 ila 1000 mg günlük aralığı içindedir. Daha tercihen bu dozlar 125 ila 400 mg günlük aralığı içindedir. Bazı durumlarda, yukarıda sözü edilen aralıkların alt sınırının altındaki dozaj seviyeleri yeterinden fazla olabilir, başka durumlarda ise daha büyük dozlar
 25 kullanılabilir ve dolayısıyla yukarıdaki dozaj aralıkları herhangi bir şekilde buluşun çerçevesini sınırlandırmaya yönelik değildir. Bileşiğin fiilen uygulanan miktarının bir doktor tarafından, tedavi edilecek hastalık, seçilen uygulama yolu, uygulanan bileşik ve bileşikler, hastanın yaşı, ağırlığı ve yanıtı ve hastanın semptomlarının şiddeti de dâhil olmak üzere ilişkili koşulların ışığında belirleneceği takdir edilecektir.

30 Bu alanda uzman olanlar bu buluşun bazı bileşiklerinin en azından bir kiral merkez içerdiğini takdir edeceklerdir. Bu buluş tek tek bütün enantiyomerlerin veya diastereomerlerin yanı sıra, rasematlar da dâhil olmak üzere sözü edilen bileşiklerin

enantiyomerlerinin ve diastereomerlerinin karışımlarını kapsamaktadır. Bu buluşun en az bir kiral merkez içeren bileşiklerinin münferit enantiyomerler veya diastereomerler olarak var olması tercih edilir. Münferit enantiyomerler veya diastereomerler kiral tepkime maddeleriyle başlanarak veya stereoselektif veya stereospesifik sentetik tekniklerle

5 hazırlanabilir. Alternatif olarak münferit enantiyomerler veya diastereomerler karışımlardan standart kiral kromatografi veya kristalizasyon teknikleriyle izole edilebilir.

Bir bileşik adındaki “izomer 1” ibaresi, karşılık gelen aramaddenin veya bu buluşun bileşiğinin, bir enantiyomerler çiftinin bir karışımı kiral kromatografiyle ayrıldığında elute

10 olan iki enantiyomerin ilki olduğunu belirtir. Bir bileşik adındaki “izomer 2” ibaresi, karşılık gelen aramaddenin veya bu buluşun bileşiğinin, bir enantiyomerler çiftinin bir karışımı kiral kromatografiyle ayrıldığında elute olan iki enantiyomerin ikincisi olduğunu belirtir.

Bu buluşun bileşikleri bu alanda iyi bilinen ve takdir edilen sentetik usullere göre

15 hazırlanabilir. Bu reaksiyonların aşamaları için uygun reaksiyon koşulları bu alanda iyi bilinmektedir ve çözücülerin ve yardımcı tepkime maddelerinin uygun süstitüsyonları bu alanda uzman olanların becerileri dâhilindedir. Benzer bir şekilde, bu alanda uzman olanlar sentetik aramaddelerin gerekli olduğu veya istendiği zaman iyi bilinen çeşitli tekniklerle izole edilebildiğini ve/veya saflaştırılabildiğini ve sıklıkla çeşitli aramaddelerin çok az

20 saflaştırmayla veya hiç saflaştırma yapılmadan sonraki sentetik aşamalarda doğrudan kullanılmasının mümkün olacağını takdir edeceklerdir. Ayrıca bu alanda uzman olanlar, bazı durumlarda kısımların dâhil edilme sırasının kritik olmadığını takdir edeceklerdir. Bu buluşun bileşiklerini üretmek için gereken aşamaların spesifik sırası, vasıflı kimyagerin takdir edeceği gibi sentezlenen spesifik bileşiğe, başlangıç bileşiğine ve süstitüe edilmiş

25 kısımların nispi kararlılığına bağlıdır. Aksi belirtilmedikçe bütün süstitüentler daha önce tanımlandığı gibidir ve bütün tepkime maddeleri bu alanda iyi bilinmekte ve anlaşılmaktadır.

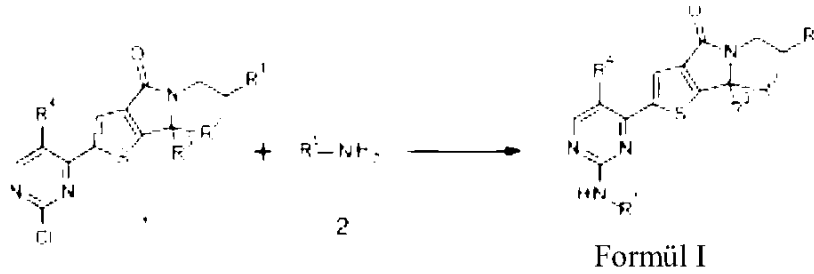
Burada kullanılan aşağıdaki terimler belirtilen anlamlara sahiptir: “ACN” asetonitrili belirtir; “DCM” diklorometanı belirtir; “DMF” N,N-dimetilformamidi belirtir; “DMSO”

30 dimetil sülfoksiti belirtir; “DTT” ditiotritolü belirtir; “EDTA” etilendiamintetraasetik asidi belirtir; “EGTA” etilen glikol tetraasetik asidi belirtir; “ELISA” enzime bağlı immünosorbent tahlilini belirtir; “EtOAc” etil asetatı belirtir; “EtOH” etanolü belirtir;

“FBS” fetal büyükbaş hayvan serumunu belirtir; “HBSS” Hank Dengeli Tuz Çözeltilisini belirtir; “IC₅₀” yarı maksimal inhibitör konsantrasyonu belirtir; “IVTI” in vivo hedef inhibisyonunu belirtir; “MS” kütle spektroskopisini belirtir; “MeOH” metanolü belirtir; “NMR” nükleer manyetik rezonansı belirtir; “PBS” Tween-20 içeren fosfat tamponlu salini belirtir; “THF” tetrahidrofuranı belirtir; “UVW” ultraviyole dalga uzunluğunu belirtir ve “XRD” X-ışını kırınımını belirtir.

Aksi belirtilmedikçe burada açıklanan bileşikler ACDLABS veya Accelrys Draw 4.1 kullanılarak adlandırılmakta ve numaralandırılmaktadır.

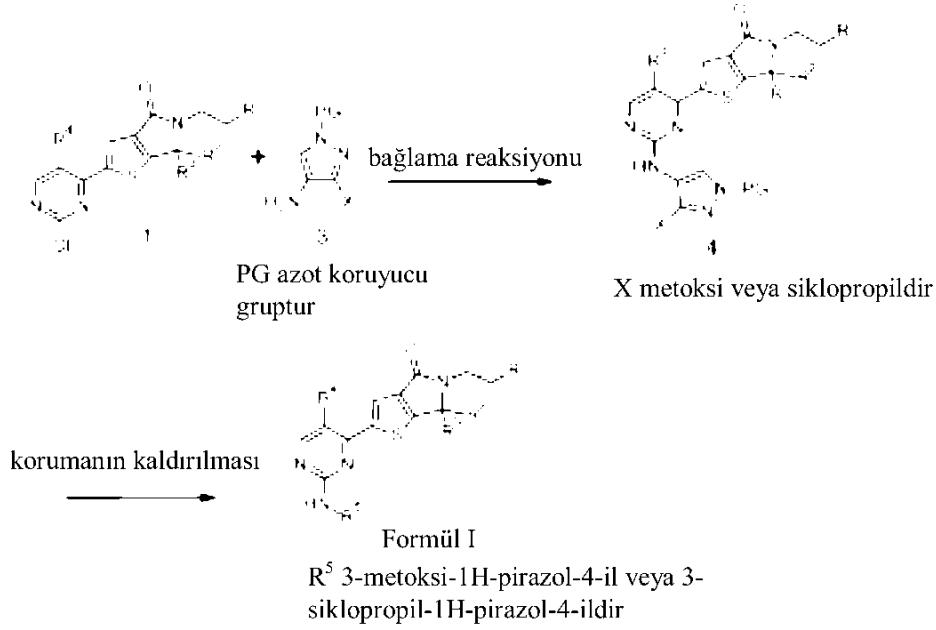
Bu buluşun bileşikleri R¹, R², R³, R⁴ ve R⁵’in daha önce tanımlandığı gibi olduğu aşağıdaki şemalarda gösterildiği gibi sentezlenebilir.



Şema 1: Formül I’in bileşiklerinin sentezi

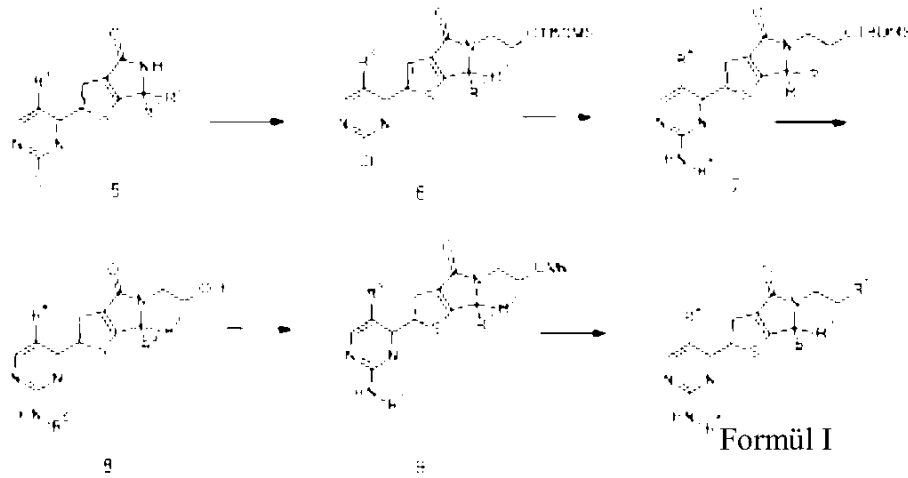
Şema 1’de Formül I’in bileşiklerinin genel sentezi gösterilmektedir. Bileşik 1 iyi bilinen aromatik süstitüsyon veya bağlama reaksiyonu koşulları altında uygun bir şekilde süstitüe edilmiş Bileşik 2’yle reaksiyona sokularak Formül I’in bir bileşiği elde edilir.

Daha spesifik olarak Bileşik 1 sodyum hidrür, izopropilmagnezyum klorür, sezyum karbonat, potasyum karbonat veya *ter*-bütoksit gibi uygun bir bazın varlığında yüksek sıcaklıkta Bileşik 2’yle reaksiyona sokulur. İsteğe bağlı olarak 1,4-dioksan veya *ter*-bütanol gibi uygun bir çözücü içinde 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilksanten veya 2-(di-*ter*-bütillfosfino)-2’,4’,6’-triizopropil-3,6-dimetoksi-1,1’-bifenil gibi uygun bir ligand maddesinin ve paladyum(II)asetat, tris(dibenzilidenaseton)dipaladyum(0) veya kloro[2-(di-*ter*-bütillfosfino)-2’,4’,6’-triizopropil-1,1’-bifenil][2-(2-aminoetil)fenil]paladyum(II) gibi uygun bir katalizörün ilave edilmesi de Formül I’in bir bileşiğini verebilir.



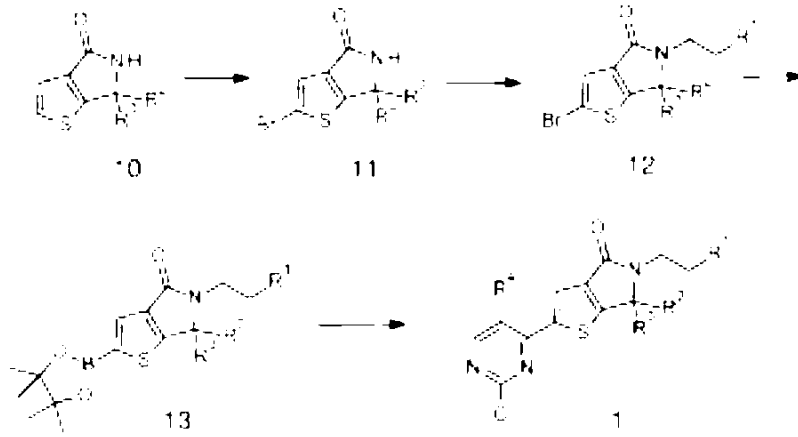
Şema 2: R^5 3-metoksi-1H-pirazol-4-il veya 3-siklopropil-1H-pirazol-4-il olduğunda Formül I'in bileşiklerinin sentezi

Şema 2, R^5 3-metoksi-1H-pirazol-4-il veya 3-siklopropil-1H-pirazol-4-il olduğunda Formül I'in bileşiklerinin sentezini göstermektedir. Bileşik 1, daha önce açıklandığı gibi iyi bilinen bağlama reaksiyonu koşulları altında, ter-bütiloksikarbonil gibi uygun azot koruyucu gruplarla uygun bir şekilde sübstitüe edilen bir pirazol amin olan Bileşik 3'le reaksiyona sokularak Bileşik 4 elde edilir. Daha sonra Bileşik 4, 1,4-dioksan veya MeOH gibi uygun bir çözücü içinde hidrojen klorür veya trifloroasetik asit gibi uygun bir azot korumasını kaldırıcı maddeyle reaksiyona sokularak R^5 'in 3-metoksi-1H-pirazol-4-il veya 3-siklopropil-1H-pirazol-4-il olduğu Formül I'in bir bileşiği elde edilir.



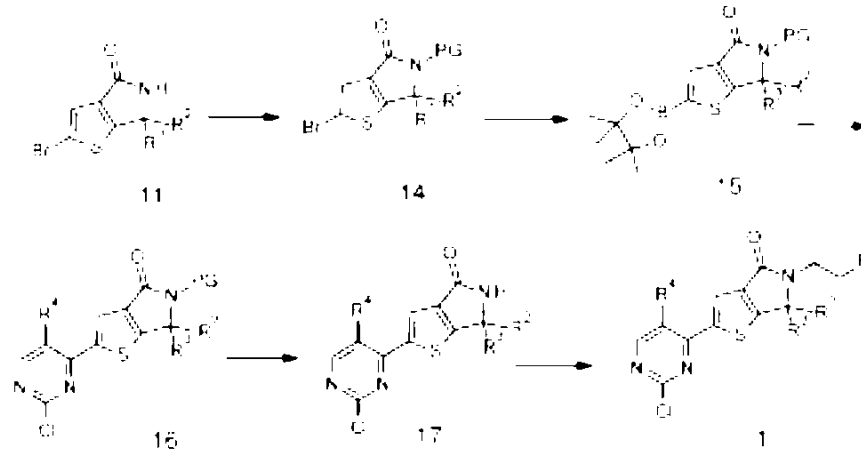
Şema 3: Formül I'in bileşiklerinin alternatif sentezi

Şema 3, Formül I'in bileşiklerinin alternatif bir sentezini göstermektedir. Bileşik 5, DMF gibi uygun bir çözücü içinde sodyum hidrür gibi uygun bir bazın varlığında (2-bromoetoksi)-*ter*-bütildimetilsilanla reaksiyona sokularak Bileşik 6 elde edilir. Daha sonra Bileşik 6 daha önce açıklandığı gibi iyi bilinen bağlama reaksiyonu koşulları altında uygun bir şekilde süstitüe edilmiş bir Bileşik 2'yle (R^5-NH_2) reaksiyona sokularak Bileşik 7 elde edilir. Bileşik 7 bir THF ve su karışımı gibi uygun bir çözücü içinde asetik asit gibi uygun bir korumayı kaldırma maddesiyle reaksiyona sokularak Bileşik 8 elde edilir. Bileşik 8 daha sonra trietilamin gibi uygun bir bazın varlığında DMF gibi uygun bir çözücü içinde metansülfonil klorürle reaksiyona sokularak Bileşik 9 elde edilir. Bileşik 9 ACN gibi uygun bir çözücü içinde uygun bir aminle reaksiyona sokularak Formül I'in bir bileşiği elde edilir.



Şema 4: Bileşik 1'in sentezi

Şema 4, Bileşik 1'in sentezi için usulü göstermektedir. Bileşik 10, ACN gibi uygun bir çözücü içinde N-bromosüksinimid gibi uygun bir brominasyon maddesiyle reaksiyona sokularak Bileşik 11 elde edilir. Bileşik 11 sodyum hidrür veya sodyum hidroksit gibi uygun bir bazla ve 4-(2-kloroetil)morfolin gibi uygun bir N-alkilasyon maddesiyle reaksiyona sokularak Bileşik 12 elde edilir. Bileşik 12, yüksek bir sıcaklıkta 1,4-dioksan gibi uygun bir çözücü içinde bis(pinakolato)dibor, potasyum asetat gibi uygun bir baz ve (1,1'-bis(difenilfosfino)ferrosen)paladyum(II) klorür gibi uygun bir katalizörle reaksiyona sokularak Bileşik 13 elde edilir. Bileşik 13, yüksek bir sıcaklıkta bir 1,4-dioksan ve su karışımı gibi uygun bir çözücü içinde 2,4-dikloro-5-metilpirimidin gibi uygun bir şekilde süstitüe edilmiş bir pirimidin bileşiği, potasyum karbonat gibi uygun bir baz, tetrakis(trifenilfosfin)paladyum gibi uygun bir katalizörle reaksiyona sokularak Bileşik 1 elde edilir.

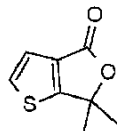


Şema 5: Bileşik 1'in alternatif sentezi

Şema 5, Bileşik 1'in sentezi için alternatif bir usulü göstermektedir. Bileşik 11 N,N-diizopropiletilamin gibi uygun bir bazın varlığında ACN gibi uygun bir çözücü içinde di-ter-bütildikarbonat gibi uygun bir azot koruyucu maddeyle reaksiyona sokularak Bileşik 14 elde edilir. Bileşik 14, daha önce açıklandığı gibi iyi bilinen bağlama reaksiyonu koşulları altında bis(pinakolato)diborla reaksiyona sokularak Bileşik 15 elde edilir. Bileşik 15 daha önce açıklandığı gibi iyi bilinen bağlama reaksiyonu koşulları altında uygun bir şekilde sübstitüe edilmiş bir pirimidin bileşiğiyle reaksiyona sokularak Bileşik 16 elde edilir. Bileşik 16'nın koruması DCM veya 1,4-dioksan gibi uygun bir çözücü içinde trifloroasetik asit veya hidrojen klorür gibi uygun bir korumayı kaldırma maddesiyle kaldırılarak Bileşik 17 elde edilir. Bileşik 17 sodyum hidrür gibi uygun bir bazın varlığında N-metilpirolidon gibi uygun bir çözücü içinde 4-(2-bromoetil)morfolin gibi uygun bir alkilasyon maddesiyle reaksiyona sokularak Bileşik 1 elde edilir.

Terkip 1

15 6,6-Dimetiltieno[2,3-c]furan-4-on



THF (9750 mL) içindeki bir 3-tiofenkarboksilik asit (250 g, 1.95 mol) çözeltisini 20 L'lik 3 boyunlu bir şişede -70°C'ye soğutun. Bu çözeltiye, sıcaklığı -55°C'nin altında tutarak yavaş yavaş n-bütillityum (heksan içinde 2.5 M, 1872 mL, 4.68 mol) ilave edin.

20 Reaksiyon karışımını bir saat -70°C'de karıştırın. -70°C'de yavaş yavaş aseton (187 mL, 2.55 mol) ilave edin. Reaksiyon karışımını 0°C'ye ısınmaya bırakın ve üç saat 0°C'de

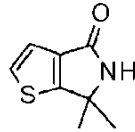
karıştırın. Elde edilen çözeltiye 0°C’de 4 M HCl (1500 mL) ilave edin ve reaksiyon karışımını oda sıcaklığına ısınmaya bırakın. Elde edilen karışımı gece boyunca karıştırın. Reaksiyon karışımını bir diyatumlu toprak yatağından süzün ve yatağı tolueenle (3 x 500 mL) yıkayın. Süzüntüyü azaltılmış basınç altında konsantre edin. Elde edilen işlenmemiş

5 tortuyu tolueen (3750 mL) ve su (250 mL) içinde eritin ve oda sıcaklığında p-tolueen sülfonik asit (100.1 g, 0.526 mol) ilave edin. Reaksiyon karışımını 16 saat 100°C’de geri akıtın. Reaksiyonu oda sıcaklığına soğutun ve 50°C’de azaltılmış basınç altında konsantre edin. Oluşan tortuyu su içinde eritin ve EtOAc (2 x 10 L) ile ekstrakte edin. Organik tabakayı doymuş sulu sodyum bikarbonat ve suyla yıkayın. Organik tabakayı susuz

10 sodyum sülfat üzerinde kurutun, süzün ve süzüntüyü 50°C’de azaltılmış basınç altında konsantre ederek yukarıdaki bileşiği (200 g, %61) kahverengi ağdalı sıvı olarak elde edin. MS (m/z): 169 (M+1).

Terkip 2

6,6-Dimetil-5H-tieno[2,3-c]pirol-4-on

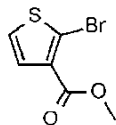


15 5 L’lik bir otoklova amonyum hidroksit (1000 mL) içindeki bir 6,6-dimetiltieno[2,3-c]furan-4-on (150 g, 0.891 mol) çözeltisini yükleyin. Kapalı bir ortamda, reaksiyon karışımını dikkatle 200°C bir sıcaklığa getirin ve dört saat 200°C’de karıştırın. Dört saat sonra, reaksiyon karışımını oda sıcaklığına soğutun ve amonyak gazını serbest bırakın.

20 Reaksiyon karışımını DCM’yle (3 x 750 mL) ekstrakte edin. Organik tabakayı suyla (1 x 750 mL) yıkayın ve susuz sodyum sülfat üzerinde kurutun, süzün ve süzüntüyü 50°C’de azaltılmış basınç altında konsantre ederek yukarıdaki bileşiği (100 g, %67) elde edin. MS (m/z): 168 (M+1).

Terkip 3

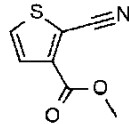
Metil 2-bromotiofen-3-karboksilat



MeOH (100 mL) içindeki bir 2-bromo-3-tiofenkarboksilik asit (10.1 g, 49 mmol) çözeltisini sülfürik asitle (2.5 mL, 45 mmol) işlemiden geçirin. Reaksiyon karışımını gece boyunca geri akışa ısıtın. Karışımı azaltılmış basınç altında konsantre ederek organik çözücüyü uzaklaştırın ve oluşan karışımı buz soğukluğunda su içine dökün. Soğuk çözeltiyi EtOAc'yle ekstrakte edin. Birleşik organik ekstraktları suyla, ardından bir doymuş sulu sodyum bikarbonat çözeltisiyle yıkayın. Organik çözeltiyi susuz sodyum sülfat üzerinde kurutun, süzün ve süzüntüyü azaltılmış basınç altında konsantre ederek yukarıdaki bileşiği (10.77 g, %100) elde edin. ¹H NMR (400.15 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.65 (d, J=6 Hz, 1H), 7.34 (d, J=6 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H).

10 Terkip 4

Metil 2-siyanotiofen-3-karboksilat

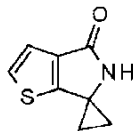


N-metilpirolidon (130 mL) içindeki bir metil 2-bromotiofen-3-karboksilat (28 g, 128 mmol) ve bakır siyanür (15 g, 167 mmol) karışımını gece boyunca 120°C'ye ısıtın.

- 15 Reaksiyonu oda sıcaklığına soğutun ve EtOAc'yle seyreltin. Organik çözeltiyi doymuş NaCl'yle yıkayın, susuz sodyum sülfat üzerinde kurutun, süzün ve süzüntüyü azaltılmış basınç altında konsantre edin. Tortuyu heksan içinde %25 EtOAc elüsyonuyla silis jel kolon kromatografisiyle saflaştırarak yukarıdaki bileşiği (15.2 g, %71) elde edin. ¹H NMR (400.15 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.10 (d, J=5 Hz, 1H), 7.58 (d, J=5 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H).

20 Terkip 5

Spiro[5H-tieno[2,3-c]pirol-6,1'-siklopropan]-4-on



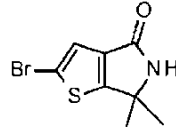
- Dietil eter (330 mL) içindeki -70°C'deki bir metil 2-siyanotiofen-3-karboksilat (13.7 g, 79 mmol) ve titanyum tetra(izopropoksit) (24.8 g, 87.4 mmol) çözeltisini bir etilmagnezyum bromür çözeltisiyle (dietil eter içinde 3 M, 58 mL, 175 mmol) işlemiden geçirin. Reaksiyon karışımını 60 dakika karıştırın. Soğutma banyosunu çıkarın ve karışımı bir saatte yavaş yavaş oda sıcaklığına ısınmaya bırakın. Bor triflorür eterat (22.6 mL, 159 mmol) ilave edin

ve karışımı bir saat daha karıştırın. Reaksiyonu 1 N hidroklorik asitle (240 mL) söndürün ve gece boyunca karıştırın. Organik tabakayı ayırın ve sulu tabakayı ek eterle geri ekstrakte edin. Organik ekstraktları birleştirin ve doymuş sulu sodyum bikarbonat ve doymuş NaCl'yle yıkayın. Organik çözeltiyi susuz sodyum sülfat üzerinde kurutun, süzün ve

5 süzüntüyü azaltılmış basınç altında konsantre edin. Tortuyu bir C18 kolonunda (Kolon: 275 g; Hareketli Faz: A) su içinde %0.10 formik asit, B) ACN içinde %0.10 formik asit; Gradyan %5-45 B; Akış Hızı: 80 mL/dakika) HPLC'yle saflaştırarak yukarıdaki bileşiği (1.02 g, %35) elde edin. ¹H NMR (400.15 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.43 (bs, 1H), 7.53 (d, J=5 Hz, 1H), 7.12 (d, J=5 Hz, 1H), 1.51 (m, 2H), 1.38 (m, 2H).

10 Terkip 6

2-Bromo-6,6-dimetil-5H-tieno[2,3-c]pirol-4-on



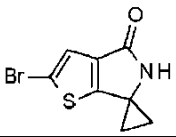
6,6-Dimetil-5H-tieno[2,3-c]pirol-4-on (835 g, 4.99 mol) içeren 20 L'lik bir şişeye ACN (10000 mL) ilave edin ve çözeltiyi 10°C'ye soğutun. Reaksiyon karışımına dört eşit

15 porsiyon halinde N-bromosüksinimid (444.4 g, 2.49 mol) ilave edin ve altı saat 25°C'de karıştırın. Reaksiyon karışımını azaltılmış basınç altında konsantre edin ve oluşan bileşiği su içinde bulamaç haline getirin ve EtOAc'yle (3 x 4.1 L) ekstrakte edin. Birleşik organik ekstraktları su (3 x 4.1 L) ve doymuş NaCl'yle (4.1 L) yıkayın, susuz sodyum sülfat üzerinde kurutun ve süzün. Organik çözeltiyi ek partilerle biraraya getirmek için saklayın.

20 Yukarıdakiyle aynı işlemi kullanarak, sırasıyla 650 g ve 835 g 6,6-dimetil-5H-tieno[2,3-c]pirol-4-on ile başlayarak iki ek parti hazırlayın. Üç turdan gelen organik çözeltileri birleştirin ve 50°C'de azaltılmış basınç altında konsantre ederek 2-bromo-6,6-dimetil-5H-tieno[2,3-c]pirol-4-on'u kahverengi yapışkan malzeme olarak elde edin. Oluşan ürünü dietil eter/heksan (2:1 hacim/hacim) içinde bulamaç haline getirin ve süzerek yukarıdaki

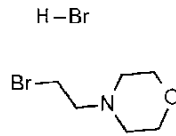
25 bileşiği (1542 g, %45) elde edin. MS (m/z): 246/248 (M+1/M+3).

Aşağıdaki bileşik esas itibarıyla Terkip 6'nın usulüyle hazırlanır.

Terkip. No.	Bileşik Adı	Yapı	MS (m/z):
7	2-Bromospiro[5H-tieno[2,3-c]pirol-6,1'-siklopropane]-4-on		244/246 (M+1/M+3)

Terkip 8

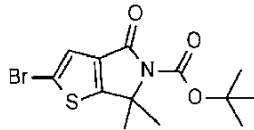
4-(2-Bromoetil)morfolin hidrobromür



- 5 DCM (2.44 L) içindeki bir trifenilfosfin dibromür (124 g, 293 mmol) çözeltisini, reaksiyon sıcaklığını 25°C'nin altında tutarak bir saatte damla damla DCM (60 mL) içindeki bir 4-morfolintanol (32 g, 244 mmol) çözeltisiyle işlemiden geçirin. Karışımı gece boyunca oda sıcaklığında karıştırın. Tepkime maddelerini uygun şekilde ölçeklendirerek, 4-morfolinetanolle (10 g, 76 mmol) başlayarak ek bir reaksiyon uygulayın. Reaksiyon
- 10 karışımlarını birleştirin ve katıları vakumlu süzmeyle toplayarak yukarıdaki bileşiği (76.7 g, %84) elde edin. ¹H NMR (399.8 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.05 (m, 2H), 3.84 (m, 2H), 3.78 (t, J=7 Hz, 1H), 3.67 (t, J=7 Hz, 2H), 3.56 (m, 2H), 3.26 (m, 2H).

Terkip 9

ter-Bütil 2-bromo-6,6-dimetil-4-okso-tieno[2,3-c]pirol-5-karboksilat



15

Sentetik usul 1:

- ACN (481 mL) içindeki bir 2-bromo-6,6-dimetil-5H-tieno[2,3-c]pirol-4-on (25 g, 102 mmol), 4-dimetilaminopiridin (1.25 g, 10 mmol) ve N,N-diizopropiletilamin (24 mL, 138 mmol) çözeltisini di-*ter*-bütildikarbonatla (35 g, 162 mmol) işlemiden geçirin. Karışımı
- 20 gece boyunca oda sıcaklığında karıştırın. Karışımı azaltılmış basınç altında konsantre edin. Karışımı heksanla seyreltin, karışımı bir silis jel yatağından süzün ve yatağı heksanla, ardından heksan içinde %20 DCM'yle elute edin. Süzüntüyü kuruyana kadar konsantre

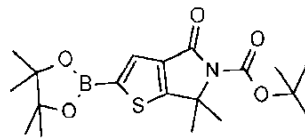
ederek yukarıdaki bileşiği (36.5 g, %93) turuncu bir yağ olarak elde edin. ^1H NMR (399.8 MHz, CDCl_3) δ 7.19 (s, 1H), 1.74 (s, 6H), 1.58 (s, 9H).

Sentetik usul 2:

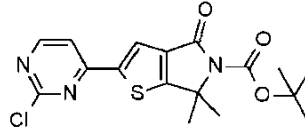
ACN (2 L) içindeki bir 2-bromo-6,6-dimetil-5H-tieno[2,3-c]pirol-4-on (200 g, 813 mmol),
 5 N,N-dimetilpiridin-4-amin (9.93 g, 81 mmol) ve di-*ter*-bütildikarbonat (266 g, 1219 mmol)
 çözeltisini damla damla N,N-diizopropiletilaminle (213 mL, 1219 mmol) işleminden geçirin.
 Karışımı dört saat oda sıcaklığında karıştırın. Reaksiyonu iki saat 30°C'ye ısıtın. Karışımı
 oda sıcaklığına soğutun ve gece boyunca karıştırın. Karışımı azaltılmış basınç altında
 konsantre edin. Karışımı EtOAc ile seyreltin ve oluşan organik çözeltiyi iki kez suyla (300
 10 mL), ardından doymuş NaCl'yle (300 mL) yıkayın. Organik çözeltiyi susuz sodyum sülfat
 üzerinde kurutun, süzün ve süzüntüyü azaltılmış basınç altında konsantre edin. Tortuyu
 heksan içinde %0-20 EtOAc gradyanıyla elute ederek bir silis jel yatağı üzerinde
 saflaştırmak suretiyle yukarıdaki bileşiği (253 g, %90) elde edin. MS (m/z): 290/292 (M-
 izobüten+1/M-izobüten+3). ^1H NMR (399.8 MHz, CDCl_3) δ 7.19 (s, 1H), 1.74 (s, 6H),
 15 1.58 (s, 9H).

Terkip 10

***ter*-Bütil 6,6-dimetil-4-okso-2-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioksaborolan-2-il)tieno[2,3-c]pirol-5-karboksilat**



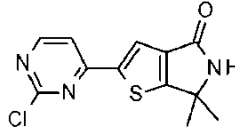
20 1,4-Dioksan (1.6 L) içindeki bir *ter*-bütil 2-bromo-6,6-dimetil-4-okso-tieno[2,3-c]pirol-5-
 karboksilat (114 g, 329 mmol), bis(pinakolato)dibor (125 g, 494 mmol) ve potasyum asetat
 (97 g, 988 mmol) karışımının gazını 10 dakika azotla giderin. (1,1'-
 bis(difenilfosfino)ferrosen)paladyum(II) klorür (5.38 g, 6.6 mmol) ilave edin ve karışımı
 dört saat 90°C'de ısıtın. Reaksiyon karışımını oda sıcaklığına soğutun ve bir CELITE®
 25 yatağından süzün. Süzüntüyü konsantre edin ve sonra tortuyu heksan içinde %10
 EtOAc'yle işleminden geçirin. Çökteliyi vakumlu süzmeyle toplayarak yukarıdaki bileşiği
 (65.8 g, %40) elde edin. MS (m/z): 338 (M-izobüten+1).

Terkip 11***ter*-Bütil 2-(2-kloropirimidin-4-il)-6,6-dimetil-4-okso-tieno[2,3-c]pirol-5-karboksilat****Sentetik usul 1:**

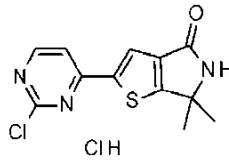
- 5 1,4-Dioksan içindeki bir *ter*-bütil 2-bromo-6,6-dimetil-4-okso-tieno[2,3-c]pirol-5-karboksilat (36 g, 104 mmol), bis(pinakolato)dibor (59.8 g, 235 mmol) ve potasyum asetat (33.2 g, 338 mmol) karışımının gazını 10 dakika azotla giderin. (1,1'-bis(difenilfosfino)ferrosen)paladyum(II) klorür (4.45 g, 5.5 mmol) ilave edin ve karışımı 90°C'ye ısıtın. Karışımı iki saat 90°C'de ısıtın. Reaksiyonu oda sıcaklığına soğutun ve üç
- 10 saat karıştırın. 2,4-Dikloropirimidin (22 g, 145 mmol), ardından su (83 mL) içinde bir potasyum karbonat (20.4 g, 147 mmol) çözeltisi ilave edin. Oluşan karışımın gazını 10 dakika azotla giderin. Tetrakis(trifenilfosfin)paladyum (1.59 g, 1.38 mmol) ilave edin ve karışımı iki saat 90°C'ye ısıtın. Karışımı oda sıcaklığına soğutun ve bir CELITE® yatağından süzün. Süzüntüyü üç porsiyon su ve bir porsiyon doymuş NaCl'yle yıkayın.
- 15 Organikleri azaltılmış basınç altında konsantre edin. Tortuyu DCM içinde %0-25 EtOAc gradyanıyla elute ederek silis jel kolon kromatografisiyle saflaştırmak suretiyle yukarıdaki bileşiği (11 g, %59) elde edin. MS (m/z): 324 (M-izobüten+1).

Sentetik usul 2

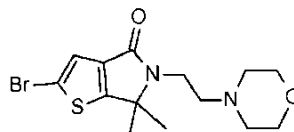
- 1,4-Dioksan (100 mL) içindeki bir *ter*-bütil 6,6-dimetil-4-okso-2-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioksaborolan-2-il)tieno[2,3-c]pirol-5-karboksilat (11.7 g, 30 mmol), 2,4-dikloropirimidin (13 g, 89 mmol), potasyum karbonat (20.4 g, 147 mmol) ve su (50 mL) karışımının gazını 10 dakika azotla giderin. Tetrakis(trifenilfosfin)paladyum (2.58 g, 2.2 mmol) ilave edin ve karışımı 1.5 saat 87°C'ye ısıtın. Karışımı oda sıcaklığına soğutun. Karışımı EtOAc'yle (1 L) seyreltin ve oluşan çözeltiyi suyla ve doymuş NaCl'yle yıkayın. Organik çözeltiyi susuz
- 25 sodyum sülfat üzerinde kurutun, süzün ve süzüntüyü azaltılmış basınç altında konsantre edin. Tortuyu heksan (200 mL) içinde %30 EtOAc'yle işleminden geçirin ve oluşan çökeltiliyi vakumlu süzmeyle toplayarak yukarıdaki bileşiği (7.6 g, %67) elde edin. MS (m/z): 324 (M-izobüten+1).

Terkip 12**2-(2-Kloropirimidin-4-il)-6,6-dimetil-5H-tieno[2,3-c]pirol-4-on**

DCM (25 mL) içindeki bir *ter*-bütül 2-(2-kloropirimidin-4-il)-6,6-dimetil-4-okso-tieno[2,3-c]pirol-5-karboksilat (6.36 g, 16.7 mmol) ve trifloroasetik asit (25 mL) karışımını iki saat oda sıcaklığında karıştırın. Karışımı azaltılmış basınç altında konsantre edin ve tortuyu DCM'yle seyreltin. Karışımı doymuş sulu sodyum bikarbonat çözeltisiyle bölüştürün ve iki fazlı emülsiyondan katıları toplayın. Katıları eterle yıkayın ve gece boyunca 50°C'de vakum altında kurutarak yukarıdaki bileşiği (4.65 g, %99) elde edin. MS (m/z): 280 (M+1).

Terkip 13**2-(2-Kloropirimidin-4-il)-6,6-dimetil-5H-tieno[2,3-c]pirol-4-on hidroklorür**

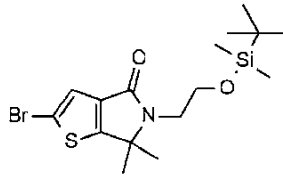
1,4-Dioksan (585 mL) içindeki bir *ter*-bütül 2-(2-kloropirimidin-4-il)-6,6-dimetil-4-okso-tieno[2,3-c]pirol-5-karboksilat (66.7 g, 176 mmol) ve hidrojen klorür (1,4-dioksan içinde 4 M, 263 mL, 1054 mmol) çözeltisini beş saat 30°C'de ısıtın. Isıtma elemanını çıkarın ve karışımı gece boyunca oda sıcaklığında karıştırın. Reaksiyon karışımına yavaş yavaş heksan (800 mL) ilave edin. Oluşan bulamaçı 10 dakika karıştırın ve katıları vakumlu süzmeyle toplayın. Katıyı vakum altında kurutarak yukarıdaki bileşiği (56 g, %100) elde edin. MS (m/z): 280 (M+1).

Terkip 14**2-Bromo-6,6-dimetil-5-(2-morfolinoetil)tieno[2,3-c]pirol-4-on**

- Suya (250 mL) sodyum hidroksit (160 g, 4 mol) ilave edin ve berrak bir çözelti oluşana kadar karışımı karıştırın. 1,4-Dioksan (2 L), ardından 2-bromo-6,6-dimetil-5H-tieno[2,3-c]pirol-4-on (215 g, 874 mmol), tetrabütillamonyum iyodür (300 g, 812 mmol) ve 4-(2-kloroetil)morfolin hidroklorür (300 g, 1564 mmol) ilave edin. Karışımı bir saat 80°C’de ısıtın. Reaksiyon karışımını oda sıcaklığına soğutun. Reaksiyonu suyla (2 L) seyreltin ve karışımı EtOAc’yle (3 x 2 L) ekstrakte edin. Birleşik organik ekstraktları susuz sodyum sülfat üzerinde kurutun, süzün ve süzüntüyü azaltılmış basınç altında konsantre edin. DCM (2 L) ve heksan (2 L) ilave edin ve oluşan organik çözeltiyi doymuş NaCl’yle (2 x 1 L) yıkayın. Organik çözeltiyi azaltılmış basınç altında minimum bir hacme konsantre edin.
- Katıları süzerek çıkarmak suretiyle yukarıdaki bileşiği (180 g, %57) elde edin. MS (m/z): 359/361 (M+1/M+3).

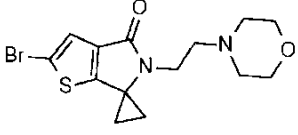
Terkip 15

2-Bromo-5-[2-[*ter*-bütildimetilsilil]oksietil]-6,6-dimetil-tieno[2,3-c]pirol-4-on



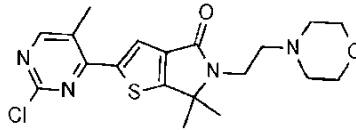
- 0°C’de DMF (203 mL) içindeki bir sodyum hidrür süspansiyonunu (mineral yağ içinde ağırlıkça %60, 3.9 g, 97.5 mmol) 2-bromo-6,6-dimetil-5H-tieno[2,3-c]pirol-4-on (20 g, 81.3 mmol), ardından (2-bromoetoksi)-*ter*-bütildimetilsilanla (23.3 g, 97.5 mmol) işleminden geçirin. Reaksiyonu bir saat 0°C’de karıştırın. Buz banyosunu çıkarın ve reaksiyon karışımını gece boyunca karıştırın. Reaksiyon karışımını doymuş sulu amonyum klorürle söndürün ve EtOAc’yle ekstrakte edin. Organik çözeltiyi doymuş NaCl’yle yıkayın. Organik çözeltiyi susuz sodyum sülfat üzerinde kurutun, süzün ve süzüntüyü azaltılmış basınç altında konsantre edin. Tortuyu heksan içinde %20 EtOAc’yle elute ederek silis jel kolon kromatografisiyle saflaştırmak suretiyle yukarıdaki bileşiği (26 g, %79) elde edin. MS (m/z): 404/406 (M+1/M+3).

Aşağıdaki bileşik esas itibarıyla Terkip 15'in usulüyle hazırlanır.

Terkip. No.	Bileşik Adı	Yapı	MS (m/z):
16	2'-Bromo-5'-(2-morfolinoetil)spiro[siklopropan-1,6'-tieno[2,3-c]pirol]-4'-on		357/359 (M+1/M+3)

Terkip 17

2-(2-Kloro-5-metil-pirimidin-4-il)-6,6-dimetil-5-(2-morfolinoetil)tieno[2,3-c]pirol-4-on



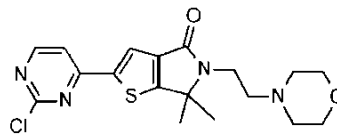
- 5 1,4-Dioksan (80 mL) içindeki bir 2-bromo-6,6-dimetil-5-(2-morfolinoetil)tieno[2,3-c]pirol-4-on (5.76 g, 16 mmol), bis(pinakolato)dibor (4.88 g, 19.2 mmol) ve potasyum asetat (4.86 g, 48 mmol) karışımının gazını azotla 20 dakika giderin. (1,1'-bis(difenilfosfino)ferrosen)paladyum(II) klorür (668 mg, 0.80 mmol) ilave edin ve karışımı gece boyunca 90°C'de ısıtın. Reaksiyonu oda sıcaklığına soğutun, süzüntüyü konsantre
- 10 edin ve sonra EtOAc'yle işlem den geçirin. Çökeltiyi vakumlu süzmeyle toplayın. Katıya (3.7 g) 2,4-dikloro-5-metilpirimidin (1.5 g, 9.1 mmol), 1,4-dioksan (50 mL), potasyum karbonat (3.8 g, 27 mmol) ve su (33 mL) ilave edin. Oluşan karışımın gazını azotla 20 dakika giderin. Tetrakis(trifenilfosfine)paladyum (790 mg, 0.68 mmol) ilave edin ve karışımı iki saat 90°C'ye ısıtın. Karışımı oda sıcaklığına soğutun ve EtOAc'yle seyreltin.
- 15 Organik çözeltiyi doymuş NaCl'yle yıkayın. Organik çözeltiyi susuz sodyum sülfat üzerinde kurutun, süzün ve süzüntüyü azaltılmış basınç altında konsantre edin. Tortuyu EtOAc içinde %0-10 MeOH gradyanıyla elute ederek silis jel kolon kromatografisiyle saflaştırmak suretiyle yukarıdaki bileşiği (1.82 g, %19) elde edin. MS (m/z): 407 (M+1).

Aşağıdaki bileşikler esas itibarıyla Terkip 17'nin usulüyle hazırlanır.

Terkip. No.	Bileşik Adı	Yapı	MS (m/z):
18	2-(2,5-Dikloropirimidin-4-il)-6,6-dimetil-5-(2-morfolinoetil)tieno[2,3-c]pirol-4-on		427 (M+1)
19	2-(2-Kloro-5-floro-pirimidin-4-il)-6,6-dimetil-5-(2-morfolinoetil)tieno[2,3-c]pirol-4-on		411 (M+1)
20	2-[2-Kloro-5-(triflorometil)pirimidin-4-il]-6,6-dimetil-5-(2-morfolinoetil)tieno[2,3-c]pirol-4-on		461 (M+1)
21	5-[2-[<i>ter</i> -Bütil(dimetil)silyl]oksietil]-2-(2-kloropirimidin-4-il)-6,6-dimetil-tieno[2,3-c]pirol-4-on		438 (M+1)
22	2-(2-Kloropirimidin-4-il)-6,6-dimetil-5-[2-(5-oksa-8-azaspiro[2.6]nonan-8-il)etil]tieno[2,3-c]pirol-4-on		433 (M+1)
23	2'-(2-Kloropirimidin-4-il)-5'-(2-morfolinoetil)spiro[siklopropan-1,6'-tieno[2,3-c]pirol]-4'-on		391 (M+1)

Terkip 24

2-(2-Kloropirimidin-4-il)-6,6-dimetil-5-(2-morfolinoetil)tieno[2,3-c]pirol-4-on



5 Sentetik usul 1:

1.4-Dioksan (1 L) içindeki bir 2-bromo-6,6-dimetil-5-(2-morfolinoetil)tieno[2,3-c]pirol-4-on (200 g, 557 mmol), bis(pinakolato)dibor (200 g, 788 mmol) ve potasyum asetat (200 g, 2038 mmol) karışımının gazını azotla 15 dakika giderin. (1,1'-

bis(difenilfosfino)ferrosen)paladyum(II) klorür (20 g, 27 mmol) ilave edin ve karışımı 90°C'ye ısıtın. Karışımı bir saat 90°C'de ısıtın. Reaksiyonu 50°C'ye soğutun ve potasyum karbonat (250 g, 1809 mmol), 2,4-dikloropirimidin (230 g, 1543 mmol) ve su (300 mL) ilave edin. Karışımı bir saat 90°C'de ısıtın. Karışımı 35°C'ye soğutun ve su (700 mL) ilave
 5 edin. Reaksiyon karışımını DCM'yle (2 L) ekstrakte edin. Sulu çözeltiyi DCM'yle (500 mL) geri ekstrakte edin. Birleşik organik çözeltileri susuz magnezyum sülfat üzerinde kurutun, süzün ve süzüntüyü azaltılmış basınç altında konsantre edin. Tortuyu heksan (2 L) içinde %10 EtOAc'yle seyreltin ve bir saat karıştırın. Ana çözeltiyi boşaltın ve katıları heksanla (500 mL) durulayın. Katıları DCM (300 mL) içinde eritin ve yavaş yavaş heksan
 10 (2 L) ilave edin. Oluşan katıları vakumlu süzmeyle toplayın ve kurutarak yukarıdaki bileşiği (150 g, %65) elde edin. MS (m/z): 393 (M+1).

Sentetik usul 2:

N-metilpirolidon (211 mL) içindeki bir 2-(2-kloropirimidin-4-il)-6,6-dimetil-5H-tieno[2,3-c]pirol-4-on hidroklorür (10 g, 32 mmol) ve tetrabütilamonyum iyodür (1.17 g, 3.16 mmol)
 15 karışımını bir buzlu su banyosu kullanarak 0°C'ye soğutun. Porsiyon porsiyon sodyum hidrür (mineral yağ içinde ağırlıkça %60, 5.06 g, 126.5 mmol) ilave edin. Karışımı 10 dakika 0°C'de karıştırın ve sonra 4-(2-bromoetil)morfolin hidrobromür (13.9 g, 50.6 mmol) ilave edin. Buz banyosunu çıkarın ve karışımı dört saat karıştırın. Reaksiyon karışımını doymuş sulu amonyum klorürle söndürün ve karışımı suyla (1 L) seyreltin.
 20 Karışımı izopropil asetatla (4 x 700 mL) ekstrakte edin. Birleşik organik ekstraktları susuz sodyum sülfat üzerinde kurutun, süzün ve süzüntüyü azaltılmış basınç altında konsantre edin. Heksan içinde %20 EtOAc ilave edin ve karışımı bir saat karıştırın. Katıyı vakumlu süzmeyle toplayın ve kurutarak yukarıdaki bileşiği (8.6 g, %69) elde edin. MS (m/z): 393 (M+1).

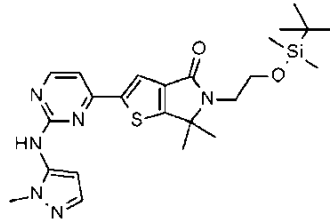
Sentetik usul 3:

DMF (14 mL) içindeki bir 2-(2-kloropirimidin-4-il)-6,6-dimetil-5H-tieno[2,3-c]pirol-4-on (500 mg, 1.4 mmol) çözeltisini sodyum hidrürle (mineral yağ içinde ağırlıkça %60, 129 mg, 3.2 mmol) işleminden geçirin. Karışımı 10 dakika karıştırdıktan sonra 4-(2-bromoetil)morfolin hidroklorür (412 mg, 1.8 mmol) ilave edin. Reaksiyon karışımını gece
 30 boyunca oda sıcaklığında karıştırın. Karışımı 0°C'ye soğutun ve 4-(2-bromoetil)morfolin hidroklorür (165 mg, 0.7 mmol), ardından sodyum hidrür (mineral yağ içinde ağırlıkça %60, 14 mg, 0.4 mmol) ilave edin. Buz banyosunu çıkarın ve karışımı gece boyunca oda

sıcaklığında karıştırın. Sodyum hidrür (mineral yağ içinde ağırlıkça %60, 14 mg, 0.4 mmol) ilave edin ve oluşan karışımı beş saat oda sıcaklığında karıştırın. Karışımı suyla seyreltin ve EtOAc'yle ekstrakte edin. Organik ekstraktları %5 sulu lityum klorürle yıkayın. Organik çözeltiyi azaltılmış basınç altında konsantre edin. Tortuyu DCM içinde
5 %0-10 MeOH gradyanıyla elute ederek silis jel kolon kromatografisiyle saflaştırmak suretiyle yukarıdaki bileşiği (524 mg, %93) elde edin. MS (m/z): 393 (M+1).

Terkip 25

5-[2-[*ter*-Bütil(dimetil)silil]oksietil]-6,6-dimetil-2-[2-[(2-metilpirazol-3-il)amino]pirimidin-4-il]tieno[2,3-c]pirol-4-on

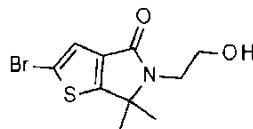


Bir 5-[2-[*ter*-bütil(dimetil)silil]oksietil]-2-(2-kloropirimidin-4-il)-6,6-dimetil-tieno[2,3-c]pirol-4-on (6 g, 13.7 mmol), 2-metilpirazol-3-amin (1.60 g, 16.4 mmol), sezyum karbonat (8.92 g, 27.4 mmol), 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilksanten (790 mg, 1.37 mmol) ve 1,4-dioksan (150 mL) karışımının gazını 10 dakika azotla giderin.

15 Paladyum(II)asetat (610 mg, 2.74 mmol) ilave edin ve karışımı 2.5 saat 90°C'de ısıtın. Karışımı oda sıcaklığına soğutun ve karışımı gece boyunca oda sıcaklığında karıştırın. Reaksiyon karışımını DCM içinde %10 MeOH ile seyreltin ve karışımı 15 dakika karıştırın. Karışımı CELITE®'ten süzün ve katıları DCM içinde %10 MeOH ile yıkayın. Süzüntüyü azaltılmış basınç altında konsantre edin. Tortuyu DCM içinde %60-100 EtOAc
20 gradyanıyla elute ederek silis jel kolon kromatografisiyle saflaştırmak suretiyle yukarıdaki bileşiği (5.73 g, %84) elde edin. MS (m/z): 499 (M+1).

Terkip 26

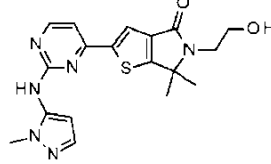
2-Bromo-5-(2-hidroksietil)-6,6-dimetil-tieno[2,3-c]pirol-4-on



25 THF (40 mL) içindeki 2-bromo-5-[2-[*ter*-bütil(dimetil)silil]oksietil]-6,6-dimetil-tieno[2,3-c]pirol-4-on'u (26 g, 64 mmol) asetik asit (120 mL) ve suyla (40 mL) işleminden geçirin.

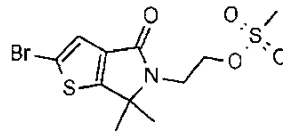
Karışımı gece boyunca oda sıcaklığında karıştırın. Reaksiyon karışımını azaltılmış basınç altında konsantre edin. Tortuyu EtOAc'yle seyreltin ve oluşan çözeltiyi doymuş sulu sodyum bikarbonat, ardından doymuş NaCl'yle yıkayın. Organik çözeltiyi susuz sodyum sülfat üzerinde kurutun, süzün ve süzüntüyü konsantre ederek yukarıdaki bileşiği (18.97 g, 5 %100) elde edin. MS (m/z): 290/292 (M+1/M+3).

Aşağıdaki bileşik esas itibarıyla Terkip 26'nın usulüyle hazırlanır.

Terkip. No.	Bileşik Adı	Yapı	Yorumlar	MS (m/z):
27	5-(2-Hidroksietil)-6,6-dimetil-2-[2-[(2-metilpirazol-3-il)amino]pirimidin-4-il]tieno[2,3-c]pirol-4-on		4 N HCl dioksan kullanılır.	385 (M+1)

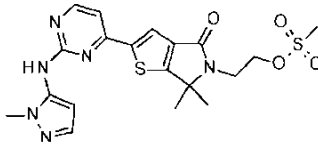
Terkip 28

2-(2-Bromo-6,6-dimetil-4-okso-tieno[2,3-c]pirol-5-il)etil metansülfonat



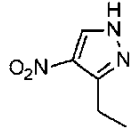
- 10 DCM (300 mL) içindeki bir 2-bromo-5-(2-hidroksietil)-6,6-dimetil-tieno[2,3-c]pirol-4-on (18.97 g, 65.4 mmol) çözeltisini 0°C'ye soğutun. Karışımı trietilamin (13.7 mL, 98.1 mmol) ve metansülfonil klorürle (8.24 g, 71.9 mmol) işleminden geçirin. Karışımı iki saat 0°C'de karıştırın. Çözeltiyi su ve doymuş NaCl'yle yıkayın. Organik çözeltiyi susuz sodyum sülfat üzerinde kurutun, süzün ve süzüntüyü azaltılmış basınç altında konsantre edin. Tortuyu EtOAc'yle elute ederek silis jel kolon kromatografisiyle saflaştırmak suretiyle yukarıdaki bileşiği (23.8 g, %99) elde edin. MS (m/z): 368/370 (M+1/M+3).

Aşağıdaki bileşik esas itibarıyla Terkip 28'in usulüyle hazırlanır.

Terkip. No.	Bileşik Adı	Yapı	MS (m/z):
29	2-[6,6-Dimetil-2-[2-[(2-metilpirazol-3-il)amino]pirimidin-4-il]-4-okso-tieno[2,3-c]pirol-5-il]etil metansülfonat		463 (M+1)

Terkip 30

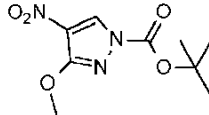
3-Etil-4-nitro-1H-pirazol



- 5 3-Etil-1H-pirazolü (1 g, 10.4 mmol) sülfürik asit (5 mL) içinde eritin ve karışımı -5°C'ye soğutun. Karışıma porsiyon porsiyon potasyum nitrat (1.16 g, 11.4 mmol) ilave edin. Karışımı yavaş yavaş oda sıcaklığına ısınmaya bırakarak gece boyunca karıştırın. Karışımı 0°C'ye soğutun ve pH yaklaşık 10 olana kadar yavaş yavaş amonyum hidroksitle söndürün. Oluşan katıyı vakumlu süzmeyle toplayın ve az miktarda suyla yıkayın.
- 10 Süüntüyü 0°C'ye soğutun ve sonra katıyı vakumlu süzmeyle süzüntüden toplayın ve az miktarda suyla yıkayın. Katıları birleştirin ve DCM içinde eritin. Organik çözeltiyi susuz sodyum sülfat üzerinde kurutun, süzün ve süzüntüyü azaltılmış basınç altında konsantre edin. Bir kez dietil eterle birlikte buharlaştırarak yukarıdaki bileşiği (1.34 g, %91) elde edin. MS (m/z): 140 (M-1).

15 Terkip 31

ter-Bütil 3-metoksi-4-nitro-pirazol-1-karboksilat

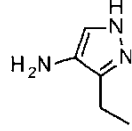


- DCM (300 mL) içindeki bir 5-metoksi-4-nitro-1H-pirazol (3 g, 21 mmol), di-ter-bütil-dikarbonat (6.9 g, 31.6 mmol) ve 4-dimetilaminopiridin (1.28 g, 10.5 mmol)
- 20 süspansiyonunu trietilaminle (5.85 mL, 42 mmol) işlemde geçirin ve karışımı gece boyunca oda sıcaklığında karıştırın. Reaksiyon karışımını azaltılmış basınç altında konsantre edin. Tortuyu heksan içinde %1-10 EtOAc gradyanıyla elute ederek silis jel

kolon kromatografisiyle saflaştırmak suretiyle yukarıdaki bileşiği (3.48 g, %68) elde edin. ^1H NMR (399.8 MHz, DMSO- d_6) δ 9.10 (s, 1H), 3.98 (s, 3H), 1.56 (s, 9H).

Terkip 32

3 -Etil-1H-pirazol-4-amin



5

EtOH (21 mL) içindeki bir paladyum (karbon üzerinde ağırlıkça %5, 450 mg, 0.21 mmol) süspansiyonunu 3-etil-4-nitro-1H-pirazole (300 mg, 2.13 mmol) işleminden geçirin. Oluşan karışımı 6.5 saat bir hidrojen atmosferi altında karıştırın. Reaksiyon karışımını CELITE®'ten süzün ve katıları ek EtOH ile durulayın. Süzüntüyü azaltılmış basınç altında konsantre ederek yukarıdaki bileşiği (240 g, %99) elde edin. ^1H NMR (400.1 MHz, CD₃CN) δ 7.02 (s, 1H), 2.54 (q, J=7 Hz, 3H), 1.17 (t, J=7 Hz, 9H).

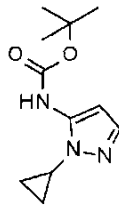
10

Aşağıdaki bileşik esas itibarıyla Terkip 32'nin usulüyle hazırlanır.

Terkip No.	Bileşik Adı	Yapı	MS (m/z):
33	<i>ter</i> -Bütil 4-amino-3-metoksi-pirazol-1-karboksilat		214 (M+1)

Terkip 34

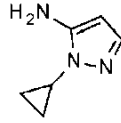
ter-Bütil N-(2-siklopropilpirazol-3-il)karbamat



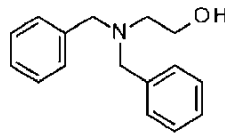
15

THF (35 mL) içindeki bir 2-siklopropilpirazol-3-karboksilik asit (4 g, 26 mmol) çözeltisini 0°C'ye soğuttuktan sonra trietilamin (5.5 mL, 39 mmol), ardından difenilfosfonik azit (8.5 mL, 39 mmol) ilave edin. Reaksiyon sıcaklığını yavaş yavaş oda sıcaklığına ısıtarken karışımı dört saat karıştırın. *ter*-Bütil alkol (4.99 mL) ilave edin ve karışımı 18 saat 70°C'de ısıtın. Reaksiyon karışımını azaltılmış basınç altında konsantre edin. Tortuyu DCM içinde %0-20 MeOH gradyanıyla elute ederek silis jel kolon kromatografisiyle saflaştırmak suretiyle yukarıdaki bileşiği (5.39 g, %92) elde edin. MS (m/z): 224 (M+1).

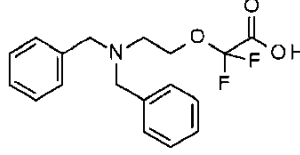
20

Terkip 35**2-Siklopropilpirazol-3-amin**

DCM (12 mL) içindeki bir *ter*-bütil N-(2-siklopropilpirazol-3-il)karbamat (5.39 g, 24 mmol) çözeltisini trifloroasetik asitle (16 mL, 213 mmol) işlemden geçirin. Çözeltiyi bir saat oda sıcaklığında karıştırın. Reaksiyon karışımını azaltılmış basınç altında konsantre edin. Tortuyu DCM içinde eritin ve sulu fazın pH'si >7'de kalana kadar doymuş sulu sodyum bikarbonat çözeltisiyle işlemden geçirin. Fazları ayırın ve organik fazı susuz sodyum sülfat üzerinde kurutun. Karışımı süzün ve süzüntüyü azaltılmış basınç altında konsantre edin. Sulu fazı azaltılmış basınç altında konsantre edin. Organik ve sulu fazlardan tortuları birleştirin ve ters faz kolon kromatografisiyle (Kolon: 130 g C18; Hareketli Faz: A) su, B) ACN; Gradyan: %0-20 B) saflaştırın. Fraksiyonları konsantre edin ve tortuyu DCM içinde %25 MeOH içinde eritin. Karışımı süzün ve süzüntüyü azaltılmış basınç altında konsantre edin. Tortuyu EtOAc içinde eritin ve su ilave edin. Tabakaları ayırın ve sulu tabakayı EtOAc'yle (8 x 100 mL) geri ekstrakte edin. Birleşik organik ekstraktı azaltılmış basınç altında konsantre ederek yukarıdaki bileşiği (2.27 g, %76) elde edin. ¹H NMR (400.1 MHz, CD₃CN) δ 7.02 (d, J=2 Hz, 1H), 5.33 (d, J=2 Hz, 1H), 4.28 (bs, 2H), 3.10 (m, 1H), 0.96 (m, 4H).

Terkip 36**2-(Dibenzilamino)etanol**

ACN (35 mL) içindeki bir 2-(benzilamino)etanol (0.95 mL, 6.6 mmol) karışımını potasyum karbonat (1.83 g, 13.2 mmol), ardından benzil bromürle (1.18 mL, 9.89 mmol) işlemden geçirin. Reaksiyon karışımını 1.5 saat 80°C'de ısıtın. Reaksiyonu oda sıcaklığına soğutun ve karışımı süzün. Süzüntüyü azaltılmış basınç altında konsantre edin ve tortuyu heksan içinde %0-30 EtOAc gradyanıyla elute ederek silis jel kolon kromatografisiyle saflaştırmak suretiyle yukarıdaki bileşiği (1.7g, %100) elde edin. MS (m/z): 242 (M+1).

Terkip 37**2-[2-(Dibenzilamino)etoksi]-2,2-difloro-asetik asit**

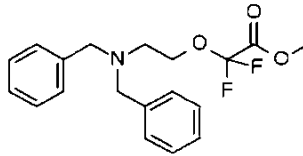
0°C'de THF (12 mL) içindeki bir 2-(dibenzilamino)etanol (1.5 g, 6.2 mmol) ve sodyum kloro-2,2-difloro-asetik asit (950 mg, 6.19 mmol) çözeltisini sodyum hidrürle (mineral yağ içinde ağırlıkça %60, 500 mg, 12.5 mmol) işleminden geçirin. Reaksiyon karışımını gece boyunca geri akışa ısıtın. Reaksiyon karışımına daha sodyum hidrür (mineral yağ içinde ağırlıkça %60, 120 mg, 3 mmol) ilave edin ve bir saat daha ısıtmaya devam edin.

Reaksiyonu oda sıcaklığına soğutun ve suyla seyreltin. Karışımı dietil eterle ekstrakte edin.

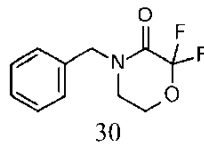
- 10 Tabakaları ayırın ve sulu tabakayı 6 N hidroklorik asitle pH 6'ya ayarlayın. Sulu çözeltiyi EtOAc'yle ekstrakte edin. Bütün organik çözeltileri bileştirin ve susuz sodyum sülfat üzerinde kurutun. Karışımı süzün ve süzüntüyü azaltılmış basınç altında konsantre ederek yukarıdaki bileşiği (1.03 g, %49) elde edin. MS (m/z): 336 (M+1).

Terkip 38

- 15 **Metil 2-[2-(dibenzilamino)etoksi]-2,2-difloro-asetat**



Toluen (9 ml) ve MeOH (2 mL) içindeki bir 2-[2-(dibenzilamino)etoksi]-2,2-difloro-asetik asit (100 mg, 0.298 mmol) çözeltisini damla damla (trimetilsilil)diazometanla (heksan içinde 2 M, 0.16 mL, 0.32 mmol) işleminden geçirin. Karışımı 15 dakika oda sıcaklığında karıştırın. Reaksiyonu asetik asitle (0.1 mL) söndürün ve reaksiyon karışımını azaltılmış basınç altında konsantre ederek yukarıdaki bileşiği (102 mg, %98) elde edin. MS (m/z): 350 (M+1).

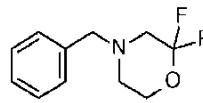
Terkip 39**4-Benzil-2,2-difloro-morfolin-3-on**

EtOH (15 mL) içindeki bir paladyum (karbon üzerinde %10, 50 mg, 0.141 mmol) süspansiyonunu EtOH (15 mL) içindeki metil 2-[2-(dibenzilamino)etoksi]-2,2-difloroasetatla (485 mg, 1.39 mmol) işleminden geçirin. Reaksiyon karışımını gece boyunca oda sıcaklığında bir hidrojen atmosferi (balon) altında karıştırın. Reaksiyon karışımını

5 CELITE®'ten süzün ve süzüntüyü azaltılmış basınç altında konsantre ederek yukarıdaki bileşiği (294 mg, %93) elde edin. MS (m/z): 228 (M+1).

Terkip 40

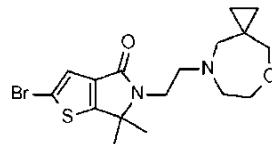
4-Benzil-2,2-difloro-morfolin



- 10 THF (13 mL) içindeki bir 4-benzil-2,2-difloro-morfolin-3-on (290 mg, 1.28 mmol) çözeltisini bor dimetil sülfür kompleksiyle (THF içinde 2 M, 3.06 mL, 6.12 mmol) işleminden geçirin. Reaksiyon karışımını 3.5 saat 55°C'de ısıttıktan sonra ısıyı giderin ve gece boyunca karıştırmaya devam edin. Reaksiyon karışımını iki saat daha 55°C'ye ısıtın. Reaksiyon karışımını oda sıcaklığına soğutun ve damla damla hidroklorik asit (6 N, 3.06
- 15 mL, 18.4 mmol) ilavesiyle söndürün. Reaksiyon karışımını bir saat 100°C'de ısıtın. Karışımı oda sıcaklığına soğutun ve azaltılmış basınç altında konsantre edin. Karışımı suyla seyreltin ve 2 N sodyum hidroksitle pH'yi 12'ye ayarlayın. Karışımı EtOAc'yle ekstrakte edin. Organik ekstraktları susuz sodyum sülfat üzerinde kurutun, süzün ve süzüntüyü azaltılmış basınç altında konsantre ederek yukarıdaki bileşiği (120 mg, %44)
- 20 elde edin. MS (m/z): 214 (M+1).

Terkip 41

2-Bromo-6,6-dimetil-5-[2-(5-oksa-8-azaspiro[2.6]nonan-8-il)etil]tieno[2,3-c]pirol-4-on

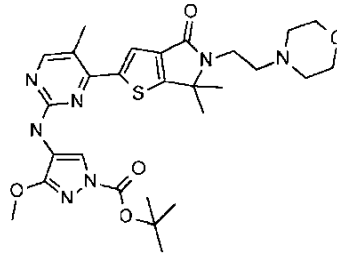


- DMF (33 mL) içindeki bir 2-(2-bromo-6,6-dimetil-4-okso-tieno[2,3-c]pirol-5-il)etil
- 25 metansülfonat (2.76 g, 6.9 mmol) ve 5-oksa-8-azaspiro[2.6]nonan (2.18, 16.3 mmol) karışımını gece boyunca 80°C'de ısıtın. Karışımı oda sıcaklığına soğutun ve EtOAc'yle seyreltin. Organik çözeltiyi doymuş NaCl'yle (3 x 30 mL) yıkayın. Organik çözeltiyi susuz sodyum sülfat üzerinde kurutun, süzün ve süzüntüyü azaltılmış basınç altında konsantre

edin. Tortuyu ters faz kolon kromatografisiyle (Kolon: 100g altın C18; Hareketli Faz: A) su içinde %0.1 formik asit, B) ACN içinde %0.1 formik asit; Gradyan: 5 dakika %5 B, 20 dakikada %5-%50 B; Akış Hızı: 53 mL/dakika) saflaştırarak yukarıdaki bileşiği (3.6 g, %85) elde edin. MS (m/z): 399/401 (M+1/M+3).

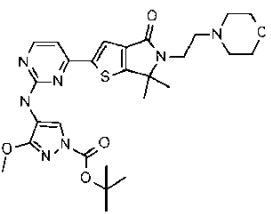
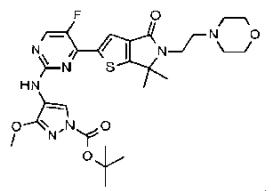
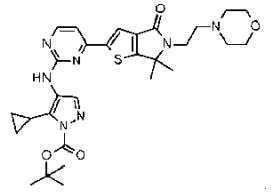
5 Terkip 42

ter-Bütil 4-[[4-[6,6-dimetil-5-(2-morfolinoetil)-4-okso-tieno[2,3-c]pirol-2-il]-5-metil-pirimidin-2-il]amino]-3-metoksi-pirazol-1-karboksilat



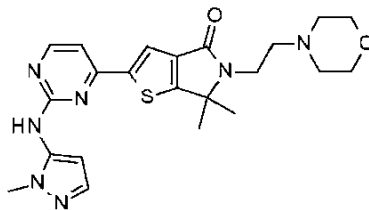
- Bir 2-(2-kloro-5-metil-pirimidin-4-il)-6,6-dimetil-5-(2-morfolinoetil)tieno[2,3-c]pirol-4-on (250 mg, 0.61 mmol), *ter*-bütil 4-amino-3-metoksi-pirazol-1-karboksilat (157 mg, 0.74 mmol), sezyum karbonat (300 mg, 0.92 mmol), 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilksanten (71 mg, 0.12 mmol) ve 1,4-dioksan (6.4 mL) karışımının gazını 15 dakika azotla giderin. Paladyum(II)asetat (14 mg, 0.0614 mmol) ilave edin ve karışımı gece boyunca 110°C'de ısıtın. Karışımı oda sıcaklığına soğutun ve EtOAc'yle seyreltin. Organik çözeltiyi doymuş NaCl'yle yıkayın. Organik çözeltiyi susuz sodum sülfat üzerinde kurutun, süzün ve süzüntüyü azaltılmış basınç altında konantre edin. Tortuyu bir C18 kolonu (Kolon: 150 g; Hareketli Faz: A) Su içinde %0.10 Formik Asit, B) ACN içinde %0.10 Formik Asit; Gradyan: %10-50 B; Akış Hızı: 60 mL/dakika) saflaştırarak yukarıdaki bileşiği (101 mg, %28) elde edin. MS (m/z): 584 (M+1).

Aşağıdaki bileşikler esas itibarıyla Terkip 42'nin usulüyle hazırlanır.

Terkip No.	Bileşik Adı	Yapı	Yorum	MS (m/z):
43	<i>ter</i> -Bütil 4-[[4-[6,6-dimetil-5-(2-morfolinoetil)-4-okso-tieno[2,3-c]pirol-2-il]pirimidin-2-il]amino]-3-metoksi-pirazol-1-karboksilat		Katalizör: tris (dibenziliden aseton) dipaladyum (0)	570 (M+1)
44	<i>ter</i> -Bütil 4-[[4-[6,6-dimetil-5-(2-morfolinoetil)-4-okso-tieno[2,3-c]pirol-2-il]-5-floro-pirimidin-2-il]amino]-3-metoksi-pirazol-1-karboksilat			588 (M+1)
45	<i>ter</i> -Bütil 5-siklopropil-4-[[4-[6,6-dimetil-5-(2-morfolinoetil)-4-okso-tieno[2,3-c]pirol-2-il]pirimidin-2-il]amino]pirazol-1-karboksilat			580 (M+1)

Örnek 1

6,6-Dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on



Sentetik usul 1:

N-metilpirolidon (500 mL) içindeki bir sodyum hidrür (mineral yağ içinde ağırlıkça %60, 30 g, 750 mmol) süspansiyonuna yavaş yavaş 2-metilpirazol-3-amin (75 g, 772 mmol) ilave edin. Oluşan karışımı 90 dakika karıştırın. N-metilpirolidon (200 mL) içindeki bir 2-(2-kloropirimidin-4-il)-6,6-dimetil-5-(2-morfolinoetil)tieno[2,3-c]pirol-4-on (145 g, 369 mmol) çözeltisini ilave edin. Eksotermik reaksiyonu oda sıcaklığına soğutun ve reaksiyonu su (3 L) içine dökün. Konsantre hidroklorik asitle (200 mL) pH'yi ~3'e ayarlayın. Karışımı DCM'yle (4 x 2 L) ekstrakte edin. Sulu tabakayı 5 M sodyum hidroksit kullanarak nötralize edin. Bu sulu çözeltiyi DCM'yle (2 x 2 L) ekstrakte edin. Bu organik ekstraktları 10 birleştirin ve suyla (2 L) yıkayın. Organikleri susuz sodyum sülfat üzerinde kurutun, süzün ve süzüntüyü azaltılmış basınç altında konsantre edin. Tortuyu art arda DCM (2 L), DCM (2 L) içinde %2.5 EtOH, DCM (2 L) içinde %5 EtOH, DCM (2 L) içinde %7.5 EtOH ve son olarak DCM (10 L) içinde %10 EtOH ile elute ederek bir silis jel yatağında (2 kg) saflaştırın. Uygun fraksiyonları azaltılmış basınç altında konsantre edin. EtOAc (1 L) ilave 15 eddin ve azaltılmış basınç altında konsantre edin. EtOAc (1 L) ilave edin ve azaltılmış basınç altında konsantre edin. EtOAc (500 mL) ve heksan (500 mL) ilave edin. Katıyı vakumlu süzmeyle toplayın ve katıyı heksanla (500 mL) yıkayın. Katıyı 50°C'de vakum altında kurutarak yukarıdaki bileşiği (65.7 g, %39) elde edin. MS (m/z): 454 (M+1).

Sentetik usul 2:

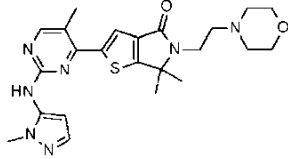
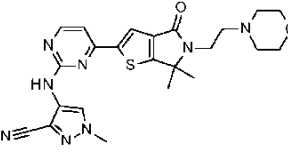
20 Bir 2-(2-kloropirimidin-4-il)-6,6-dimetil-5-(2-morfolinoetil)tieno[2,3-c]pirol-4-on (20.8 g, 52.9 mmol), 2-metilpirazol-3-amin (5.7 g, 58.2 mmol), sezyum karbonat (37.9 g, 116.5 mmol), 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilksanten (2.6 g, 4.5 mmol) ve 1,4-dioksan (529 mL) karışımının gazını 10 dakika azotla giderin. Tris(dibenzilidenaseton)dipaladyum(0) (2.4 g, 2.6 mmol) ilave edin ve karışımı dört saat 85°C'ye ısıtın. Karışımı oda sıcaklığına 25 soğutun ve karışımı filtre kâğıdından süzün. Süzüntüyü azaltılmış basınç altında konsantre edin. 8 g 2-(2-kloropirimidin-4-il)-6,6-dimetil-5-(2-morfolinoetil)tieno[2,3-c]pirol-4-on'la başlayarak reaksiyonu tekrarlayın ve iki tortuyu birleştirin. Tortuyu, (DCM içinde %10 EtOAc) içinde %5-25 MeOH gradyanıyla elute ederek silis jel kolon kromatografisiyle (330 g) saflaştırın. Fraksiyonları toplayın ve azaltılmış basınç altında konsantre edin. 30 Tortuyu DCM içinde %10 EtOAc içinde %5-25 MeOH gradyanıyla elute ederek silis jel kolon kromatografisiyle (330 g) yeniden saflaştırın. Fraksiyonları toplayın ve azaltılmış basınç altında konsantre edin. Tortuyu DCM (400 mL) içinde erittikten sonra aseton (1 L)

ilave edin. Karışımı azaltılmış basınç altında yavaş yavaş yaklaşık 700 mL'ye konsantre edin. Katıyı vakumlu süzmeyle toplayarak yukarıdaki bileşiği (14.8 g, %48) elde edin MS (m/z): 454 (M+1).

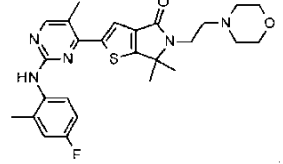
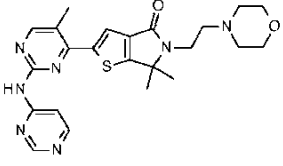
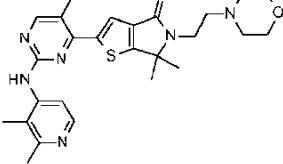
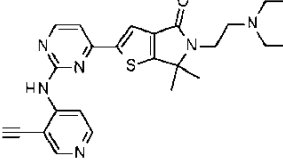
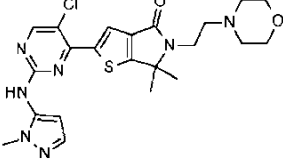
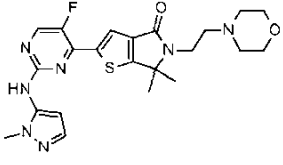
Sentetik usul 3:

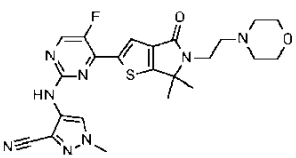
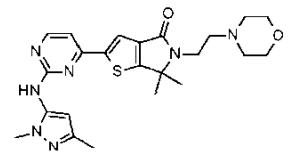
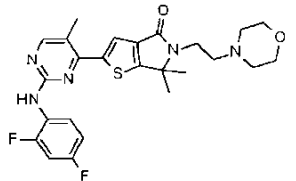
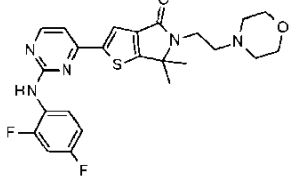
- 5 Bir 2-(2-kloropirimidin-4-il)-6,6-dimetil-5-(2-morfolinoetil)tieno[2,3-c]pirol-4-on (250 mg, 0.64 mmol), 2-metilpirazol-3-amin (124 mg, 1.3 mmol), sezyum karbonat (622 mg, 1.9 mmol), 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilksanten (55 mg, 0.095 mmol) ve 1,4-dioksan (6.4 mL) karışımının gazını 15 dakika azotla giderin. Paladyum(II)asetat (14.3 mg, 0.0636 mmol) ilave edin ve karışımı gece boyunca 90°C'de ısıtın. Karışımı oda sıcaklığına
- 10 soğutun ve karışımı filtre kâğıdından süzün. Katıları DCM içinde %10 MeOH ile yıkayın. Süzüntüyü azaltılmış basınç altında konsantre edin. Reaksiyonu tekrarlayın ve iki tortuyu birleştirin. Tortuyu su içinde 10 mM amonyum karbonat (pH 10) içinde 85 mL/dakikalık bir %9-28 ACN gradyanıyla elute ederek bir C18 kolonunda (30 x 75 mm, 5 µm, xbridge ODB) HPLC'yle saflaştırın. Fraksiyonları toplayın ve ACN'yi uzaklaştırmak için
- 15 azaltılmış basınç altında konsantre edin. Sulu çözeltiyi liyofilize ederek yukarıdaki bileşiği (100 mg, %18) elde edin. MS (m/z): 454 (M+1).

Aşağıdaki bileşikler esas itibarıyla Örnek 1'deki sentetik usul 3'e göre hazırlanır.

Ör. No.	Kimyasal ad	Yapı	Fiziksel veriler MS (m/z):
2	6,6-Dimetil-2-{5-metil-2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on		468 (M+1)
3	4-[(4-{6,6-Dimetil-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-4-okso-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-2-il}pirimidin-2-il)amino]-1-metil-1H-pirazol-3-karbonitril		479 (M+1)

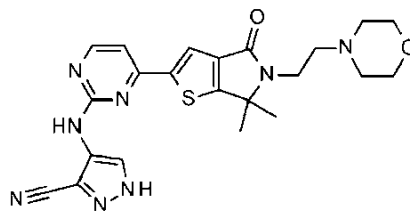
Ör. No.	Kimyasal ad	Yapı	Fiziksel veriler MS (m/z):
4	6,6-Dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(5-oksa-8-azaspiro[2.6]non-8-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on		494 (M+1)
5	2'-{2-[(1-Metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5'-[2-(morfolin-4-il)etil]spiro[siklopropan-1,6'-tieno[2,3-c]pirol]-4'(5'H)-on		452 (M+1)
6	6,6-Dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]-5-(triflorometil)pirimidin-4-il}-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on		522 (M+1)
7	2-{2-[(3-Metoksi-1-metil-1H-pirazol-4-il)amino]-5-metilpirimidin-4-il}-6,6-dimetil-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on		498 (M+1)
8	2-{2-[(2,3-Dimetilpiridin-4-il)amino]pirimidin-4-il}-6,6-dimetil-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on		479 (M+1)
9	6,6-Dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-4-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on		454 (M+1)

Ör. No.	Kimyasal ad	Yapı	Fiziksel veriler MS (m/z):
10	2-{2-[(4-Floro-2-metilfenil)amino]-5-metilpirimidin-4-il}-6,6-dimetil-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on		496 (M+1)
11	6,6-Dimetil-2-[5-metil-2-(pirimidin-4-ilamino)pirimidin-4-il]-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on		466 (M+1)
12	2-{2-[(2,3-Dimetilpiridin-4-il)amino]-5-metilpirimidin-4-il}-6,6-dimetil-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on		493 (M+1)
13	4-[(4-{6,6-Dimetil-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-4-okso-5,6-tieno[2,3-c]pirol-2-dihidro-4H-il}pirimidin-2-il)amino]piridin-3-karbonitril		476 (M+1)
14	2-{5-Kloro-2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-6,6-dimetil-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on		488 (M+1)
15	2-{5-Floro-2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-6,6-dimetil-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on		472 (M+1)

Ör. No.	Kimyasal ad	Yapı	Fiziksel veriler MS (m/z):
16	4-[(4-{6,6-Dimetil-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-4-okso-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-2-il}-5-floropirimidin-2-il)amino]-1-metil-1H-pirazol-3-karbonitril		497 (M+1)
17*	2-{2-[(1,3-Dimetil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-6,6-dimetil-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on		468 (M+1)
18	2-{2-[(2,4-Diflorofenil)amino]-5-metilpirimidin-4-il}-6,6-dimetil-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on		500 (M+1)
19	2-{2-[(2,4-Diflorofenil)amino]pirimidin-4-il}-6,6-dimetil-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on		486 (M+1)
*: Ligand olarak [(4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilksanten)-2-(2'-amino-1,1'-bifenil)]paladyum(II) metansülfonat kullanın.			

Örnek 20

4-[(4-{6,6-Dimetil-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-4-okso-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-2-il}pirimidin-2-il)amino]-1H-pirazol-5-karbonitril



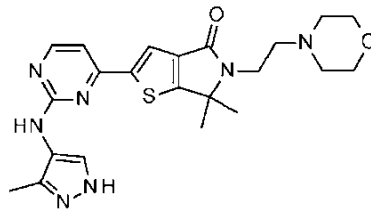
- Bir 2-(2-kloropirimidin-4-il)-6,6-dimetil-5-(2-morfolinoetil)tieno[2,3-c]pirol-4-on (350 mg, 0.89 mmol), 4-amino-1H-pirazol-5-karbonitril (116 mg, 1.07 mmol), potasyum karbonat (320 mg, 2.32 mmol), 2-(di-*ter*-bütilfosfino)-2',4',6'-triizopropil-3,6-dimetoksi-1,1'-bifenil (87 mg, 0.18 mmol), *ter*-bütil alkol (2.3 mL) ve asetik asit (bir damla)
- 5 çözeltisini iki saat 90°C'de ısıtın. Karışımı oda sıcaklığına soğutun. Karışımı DCM içinde %10 MeOH ile seyreltin ve çözeltiyi üstte az miktarda silis jel olmak üzere bir CELITE® kolonundan süzün. Kolonu DCM içinde %10 MeOH ile yıkayın ve süzüntüyü azaltılmış basınç altında konsantre edin. Tortuyu ters faz kolon kromatografisiyle (Kolon: C18, 275 g Altın; Hareketli Faz: A) %5 MeOH ile birlikte su içinde 10 mM amonyum bikarbonat, B) 10 ACN; Gradyan: 5 dakika %10 B, 25 dakikada %40 B'ye gradyan; Akış Hızı: 125 mL/dakika) saflaştırarak yukarıdaki bileşiği (240 mg, %58) elde edin. MS (m/z): 465 (M+1).

Aşağıdaki bileşik esas itibarıyla Örnek 20'nin usulüyle hazırlanır.

Ör. No.	Kimyasal ad	Yapı	Fiziksel veriler MS (m/z):
21	6,6-Dimetil-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-2-[2-(1H-1,2,3-triazol-5-ilamino)pirimidin-4-il]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on		441 (M+1)

Örnek 22

- 15 **6,6-Dimetil-2-{2-[(5-metil-1H-pirazol-4-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on**



- Bir 2-(2-kloropirimidin-4-il)-6,6-dimetil-5-(2-morfolinoetil)tieno[2,3-c]pirol-4-on (230 mg, 0.59 mmol), 3-metil-1H-pirazol-4-amin (142 mg, 0.73 mmol), kloro[2-(di-*ter*-bütilfosfino)-2',4',6'-triizopropil-1,1'-bifenil][2-(2-aminoetil)fenil]]paladyum(II) (8 mg, 0.012 mmol), 2-di-*ter*-bütilfosfino-2',4',6'-triizopropilbifenil (5 mg, 0.012 mmol) ve
- 20

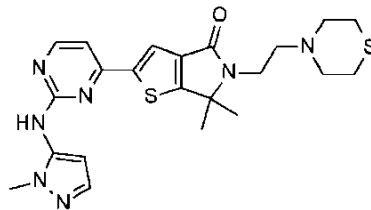
sodyum *ter*-bütoksit (118 mg, 1.2 mmol) karışımını azotla üç kez gazdan arındırın. *ter*-Bütil alkol (2 mL) ilave edin, reaksiyonu kapatın ve karışımı 1.5 saat oda sıcaklığında karıştırın. Reaksiyon karışımını EtOAc'yle işlemiden geçirin ve karışımı gece boyunca karıştırın. Azaltılmış basınç altında konsantre edin. Tortuyu EtOAc içinde eritin ve organik çözeltiyi doymuş sulu amonyum klorürle yıkayın. Sulu tabakayı EtOAc'yle iki kez geri ekstrakte edin. Birleşik organik ekstraktları susuz sodyum sülfat üzerinde kurutun, süzün ve süzüntüyü azaltılmış basınç altında konsantre edin. Tortuyu DCM içinde %0-10 MeOH gradyanıyla elute ederek silis jel kolon kromatografisiyle saflaştırmak suretiyle yukarıdaki bileşiği (164 mg, %62) elde edin. MS (m/z): 454 (M+1).

10 Aşağıdaki bileşikler esas itibarıyla Örnek 22'nin usulüyle hazırlanır.

Ör. No.	Kimyasal ad	Yapı	Fiziksel veriler MS (m/z):
23	2-{2-[(1-Siklopropil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-6,6-dimetil-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on		480 (M+1)
24	2-{2-[(5-Etil-1H-pirazol-4-il)amino]pirimidin-4-il}-6,6-dimetil-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on		468 (M+1)

Örnek 25

6,6-Dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(tiomorfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on



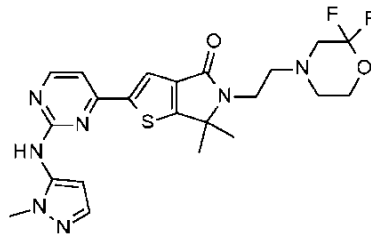
15 ACN (2 mL) içindeki bir 2-[6,6-dimetil-2-[2-[(2-metilpirazol-3-il)amino]pirimidin-4-il]-4-okso-tieno[2,3-c]pirol-5-il]etil metansülfonat (260 mg, 0.56 mmol), tiomorfolin (116 mg, 1.12 mmol) ve trietilamin (0.18 mL, 0.38 mmol) karışımını gece boyunca 60°C'de ısıtın.

- Karışımı oda sıcaklığına soğutun ve çözeltiyi CELITE®’den süzün. Katıları DCM içinde %10 MeOH ile yıkayın ve süzüntüyü azaltılmış basınç altında konsantre edin. Tortuyu ters faz kolon kromatografisiyle (Kolon: C18, 275 g Altın; Hareketli Faz: A) su içinde %5 MeOH içinde 10 mM Amonyak, B) ACN; Gradyan: 5 dakika %10 B, 25 dakikada %10-65 B’ye gradyan; Akış Hızı: 200 mL/dakika) saflaştırarak yukarıdaki bileşiği (170 mg, %64) elde edin. MS (m/z): 470 (M+1).

Aşağıdaki bileşikler esas itibarıyla Örnek 25’in usulüyle hazırlanır.

Ör. No.	Kimyasal ad	Yapı	Fiziksel veriler MS (m/z):
26	6,6-Dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(2,2,6,6-tetrafloromorfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on		526 (M+1)
27	6,6-Dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(1,4-oksazepan-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on		468 (M+1)
28	6,6-Dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(8-oksa-3-azabisiklo[3.2.1]okt-3-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on		480 (M+1)
29	5-[2-(3,3-Difloropirolidin-1-il)etil]-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on		474 (M+1)

Ör. No.	Kimyasal ad	Yapı	Fiziksel veriler MS (m/z):
30	6,6-Dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(2-oksa-5-azabisiklo[4.1.0]hept-5-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on		466 (M+1)
31	6,6-Dimetil-5-{2-[(3R)-3-metilmorfolin-4-il]etil}-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on		468 (M+1)

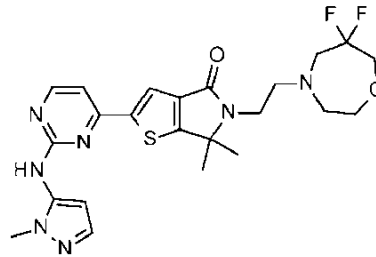
Örnek 32**5-[2-(2,2-Difloromorfolin-4-il)etil]-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on**

- 5 EtOAc (5 mL) içindeki bir paladyum hidroksit (karbon üzerinde %20, 63 mg, 0.09 mmol) süspansiyonunu EtOAc (5 mL) içinde 4-benzil-2,2-difloro-morfolinle (95 mg, 0.45 mmol) işleminden geçirin. Reaksiyon karışımını beş saat oda sıcaklığında bir hidrojen atmosferi (balon) altında karıştırın. Reaksiyon karışımını CELITE®'ten süzün ve süzüntüyü izole edin. Süzüntüye trietilamin (0.11 mL, 0.79 mmol) ve 2-[6,6-dimetil-2-[2-[(2-metilpirazol-3-il)amino]pirimidin-4-il]-4-okso-tieno[2,3-c]pirol-5-il]etil metansülfonat (306 mg, 0.66 mmol) ilave edin. Karışımı bir saat 80°C'de karıştırın. ACN (15 mL) ilave edin ve karışımı 10 iki gün 80°C'de ısıtın. Reaksiyon karışımını oda sıcaklığına soğutun ve azaltılmış basınç altında konsantre edin. Tortuyu EtOAc içinde %0-10 MeOH gradyanıyla elute ederek silis

jel kolon kromatografisiyle saflaştırın. Fraksiyonları azaltılmış basınç altında konsantre edin. Totuyu heksan içinde %50-100 EtOAc gradyanıyla, ardından ikinci bir EtOAc içinde %0-10 MeOH gradyanıyla elute ederek silis jel kolon kromatografisiyle yeniden saflaştırmak suretiyle yukarıdaki bileşiği (47 mg, %30) elde edin. MS (m/z): 490 (M+1).

5 Örnek 33

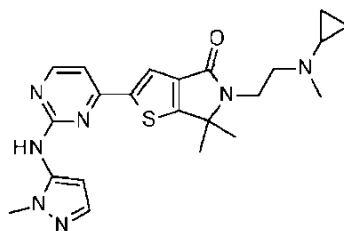
5-[2-(6,6-Difloro-1,4-oksazepan-4-il)etil]-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on



- 6,6-Difloro-1,4-oksazepan hidroklorürü (200 mg, 0.15 mmol) DCM (5 mL) içinde karbonat reçinesiyle (3 molar eşdeğer) işlemden geçirin. Süspansiyonu bir saat döndürün. Katıları süzerek çıkarın ve süzüntüyü p-toluensülfonik asitle (250 mg, 1.45 mmol) işlemden geçirin. Oluşan karışımı iki saat karıştırdıktan sonra karışımı azaltılmış basınç altında konsantre edin. ACN (2 mL) ve 2-[6,6-dimetil-2-{2-[(2-metilpirazol-3-il)amino]pirimidin-4-il}-4-okso-tieno[2,3-c]pirol-5-il]etil metansülfonat (200 mg, 0.43 mmol) ilave edin. Oluşan çözeltiyi trietilaminle (0.15 mL, 1.08 mmol) işlemden geçirin. Reaksiyon kabını kapatın ve karışımı 3 saat 80°C'de ısıtın. Oda sıcaklığına soğutun ve reaksiyon karışımını konsantre edin. Tortuyu ters faz kolon kromatografisiyle (Kolon: 50 g C18; Hareketli Faz: A) su içinde %0.1 TFA, B) ACN içinde %0.1 TFA; Gradyan: %10-80 B) saflaştırın. Ürünü içeren fraksiyonları konsantre edin. Tortuyu DCM içinde eritin ve doymuş sulu sodyum bikarbonat çözeltisiyle yıkayın. Organik çözeltiyi susuz sodyum sülfat üzerinde kurutun, süzün ve süzüntüyü azaltılmış basınç altında konsantre edin. Tortuyu ters faz kolon kromatografisiyle (Kolon: 15 g Altın C18; Hareketli Faz: A) %10 MeOH ile birlikte su içinde 10 mM amonyum bikarbonat, B) ACN; Gradyan: %10-80 B) saflaştırarak yukarıdaki bileşiği (16 mg, %7) elde edin. MS (m/z): 504 (M+1).

25 Örnek 34

5-{2-[Siklopropil(metil)amino]etil}-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on



DMF (1.7 mL) içindeki bir 2-[6,6-dimetil-2-[2-[(2-metilpirazol-3-il)amino]pirimidin-4-il]-4-okso-tieno[2,3-c]pirol-5-il]etil metansülfonat (70 mg, 0.16 mmol) ve N-metilsiklopropanamin (77 mg, 1.08 mmol) çözeltisini gece boyunca 90°C'de ısıtın.

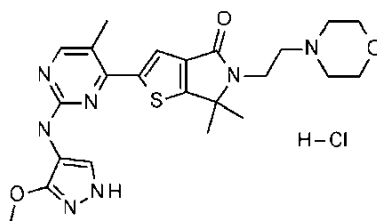
- 5 Karışımı oda sıcaklığına soğutun. Çözeltiyi ters faz kolon kromatografisiyle (Kolon: 100 g Altın C18,; Hareketli Faz: A) su içinde %0.1 formik asit, B) %0.1 formik asit ACN; Gradyan: 5 dakika %150 B, 25 dakikada %65 B'ye gradyan; Akış Hızı: 60 mL/dakika) saflaştırarak yukarıdaki bileşiği (70 mg, %37) elde edin. MS (m/z): 438 (M+1).

Aşağıdaki bileşik esas itibarıyla Örnek 34'ün usulüyle hazırlanır.

Ör. No.	Kimyasal ad	Yapı	Fiziksel veriler MS (m/z):
35	6,6-Dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(7-oksa-4-azaspiro[2.5]okt-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on		480 (M+1)

10 Örnek 36

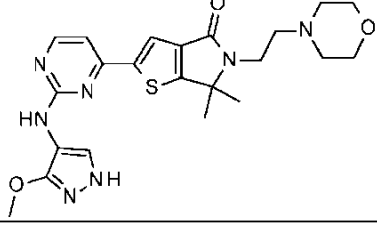
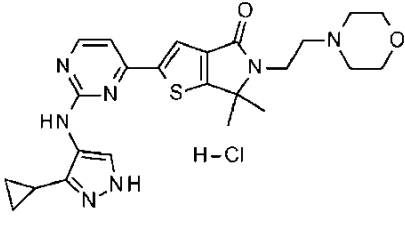
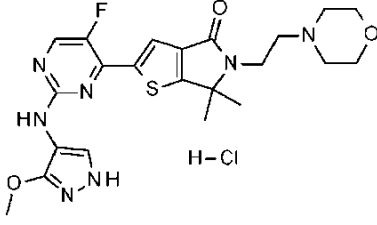
2-{2-[(3-Metoksi-1H-pirazol-4-il)amino]-5-metilpirimidin-4-il}-6,6-dimetil-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on hidroklorür



- MeOH (20 mL) içindeki bir *ter*-bütil 4-[[4-[6,6-dimetil-5-(2-morfolinoetil)-4-okso-tieno[2,3-c]pirol-2-il]-5-metil-pirimidin-2-il]amino]-3-metoksi-pirazol-1-karboksilat (101 mg, 0.173 mmol) ve hidrojen klorür (1,4-dioksan içinde 4.0 M, 2 mL, 8 mmol) çözeltisini

12 saat oda sıcaklığında karıştırın. Karışımı kuruyana kadar konsantre ederek yukarıdaki bileşiği (80 mg, %89) elde edin. 484 (M+1).

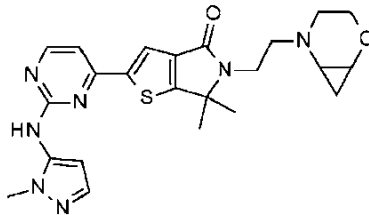
Aşağıdaki bileşikler esas itibarıyla Örnek 36'nın usulüyle hazırlanır.

Ör. No.	Kimyasal ad	Yapı	Fiziksel MS (m/z):
37*	2-{2-[(3-Metoksi-1H-pirazol-4-il)amino]pirimidin-4-il}-6,6-dimetil-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on		470 (M+1)
38	2-{2-[(5-Siklopropil-1H-pirazol-4-il)amino]pirimidin-4-il}-6,6-dimetil-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on hidroklorür		480 (M+1)
39	2-{5-Floro-2-[(3-metoksi-1H-pirazol-4-il)amino]pirimidin-4-il}-6,6-dimetil-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on hidroklorür		488 (M+1)

*: Serbest baz reaksiyondan sonra hazırlandı

Örnek 40

- 5 **6,6-Dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(2-oksa-5-azabisiklo[4.1.0]hept-5-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on, izomer 2**



6,6-Dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(2-oksa-5-azabisiklo[4.1.0]hept-5-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on'u (Örnek 30) kiral

kolon kromatografisiyle (Kolon: Lux Cellulose-4 21.2 x 250 mm; Hareketli Faz: %40 izopropil alkol (%0.2 izopropilamin)/CO₂); Elüsyon Süresi: 11 dakika) saflaştırarak yukarıdaki bileşiği (24 mg, %34) elde edin. MS (m/z): 466 (M+1).

X-Işını Toz Kırınımı

- 5 Kristal katıların XRD desenleri bir CuK α kaynağı $\lambda = 1.54060 \text{ \AA}$) ve 35 kV ve 50 mA'da çalışan bir Vantec detektörle teçhiz edilmiş bir Bruker D4 Endeavor X-ışını toz kırınım ölçerde elde edilir. Numune, 2θ 'da 4 ve 40° arasında, 2θ 'da 0.009° aşama büyüklüğüyle ve 0.5 saniye/aşama tarama hızı ve 0.6 mm ıraksaklık, 5.28 sabit saçılma önleyici ve 9.5 mm detektör yarıklarıyla taranır. Kuru toz bir kuvars numune tutucu üzerine konur ve bir lam
- 10 kullanılarak düz bir yüzey elde edilir. Kristal formu kırınım desenleri çevresel sıcaklık ve bağıl nemde toplanır. Kristalografi alanında herhangi bir belirli kristal formu için kırınım piklerinin nispi şiddetlerinin, kristal morfolojisi ve habitüsü gibi faktörlerden kaynaklanan tercih edilen yönelime bağlı olarak değişebildiği iyi bilinmektedir. Tercih edilen yönelimin etkilerinin bulunduğu yerde, pik şiddetler değişir, ama polimorfun karakteristik pik
- 15 pozisyonları değişmez. Ayrıca, kristalografi alanında, herhangi bir belirli kristal formu için açılal pik pozisyonlarının biraz değişebildiği de iyi bilinmektedir. Örneğin, pik pozisyonları bir numunenin analiz edildiği sıcaklık veya nemdeki bir değişikliğe, numunenin yerinin değişmesine veya bir iç standardın olup olmamasına bağlı olarak değişebilir. Buradaki durumda 2θ 'da ± 0.2 pik pozisyonu değişkenliği belirtilen kristal
- 20 formunun kesin tespitini engellemeden bu potansiyel değişiklikleri dikkate alacaktır. Bir kristal formu, ayırt edici piklerin ($^{\circ} 2\theta$ birimleriyle), tipik olarak daha belirgin piklerin herhangi bir benzersiz kombinasyonu esas alınarak teyit edilebilir. Çevresel sıcaklık ve bağıl nemde elde edilen kristal formu kırınım desenleri, 8.853 ve 26.774 derece 2-tetadaki NIST 675 standart pikleri esas alınarak ayarlanır.

25 Örnek 1, Kristal Formu 1'in X-Işını Toz Kırınımı

6,6-Dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on (Kristal Formu 1)

- Bir ACN (1 mL) ve su (1 mL) çözeltisine 6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]pirimidin-4-il}-5-[2-(morfolin-4-il)etil]-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirol-4-on
- 30 (103 mg) ilave edin ve karışımı 10 dakika 70°C'de ısıtın. Süzün ve çözeltiyi gece boyunca oda sıcaklığına soğumaya bırakın. Çözeltiye beş saatte yavaş yavaş su (2 mL) ilave edin.

Katıları vakumlu süzmeyle toplayın ve suyla yıkayın. Katıları havayla kurutarak yukarıdaki bileşiği (94 mg, %92) elde edin.

- Örnek 1 Kristal Formu 1'in hazırlanmış bir numunesi CuK α radyasyonu kullanılarak aşağıdaki Tablo 1'de açıklandığı gibi kırınım piklerine (2-teta değerleri) sahip ve özellikle 5 15.5, 17.1, 18.0, 20.2, 21.5 ve 22.1 dereceden oluşan gruptan seçilen piklerin biriyle veya daha fazlasıyla kombinasyon halinde 19.3 derecede piklere sahip bir XRD deseniyle karakterize edilir; kırınım açıları için tolerans 0.2 derecedir.

Tablo 1: X Örnek 1 Kristal Formu 1'in X-ışını toz kırınım pikleri

Pik	Açı (°2-Teta) $\pm 0.2^\circ$	Bağıl Şiddet (en şiddetli pik %'si)
1	7.1	7
2	8.8	11
3	12.6	7
4	14.3	6
5	15.5	29
6	16.6	15
7	17.1	25
8	17.6	8
9	18.0	63
10	18.7	13
11	19.3	100
12	20.2	24
13	20.7	14
14	21.5	27
15	22.1	26
16	22.8	9
17	23.8	13

Pik	Açı (°2-Teta) $\pm 0.2^\circ$	Bağıl Şiddet (en şiddetli pik %'si)
18	24.5	10
19	26.4	15
20	27.2	13
21	28.0	9
22	29.3	8

Çeşitli bulgular, tümör başlangıcı, büyümesi ve ilerlemesinde rol oynayan süreçlere kanser hücrelerindeki bir veya daha fazla sinyal yolunun aktivasyonunun aracılık ettiğine işaret etmektedir. Mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolu, hücre proliferasyonu ve hayatta kalımının temel bir regülatörüdür. ERK bu yolun akış aşağı bir üyesidir ve EGFR, FGFR, PDGFR, VEGFR ve bunun gibi aktive olmuş reseptör tirozin kinazlardan (RTK'ler) hücre dışı sinyallerin iletiminde merkezi bir rol oynar. Bu yol RAF, MEK ve ERK (hücre dışı sinyalin regüle ettiği kinaz) kinazlardan oluşan üç katlı bir kinaz kaskadıdır ve bu yolun aktivasyonu küçük bir GTPase olan RAS'ın aktivasyonu ile başlar. RAS'ın aktivasyonu bir serin/treonin kinaz olan RAF'ın toplanması ve aktivasyonuna yol açar. Aktive olan RAF daha sonra MEK/1/2'yi fosforlar ve aktive eder, o da ERK1/2'yi fosforlar ve aktive eder. ERK1/2 aktive olduğunda hücre proliferasyonu, büyümesi, hayatta kalımı ve EMT'de (epitelyalden mezenkimale geçiş) rol oynayan çeşitli akış aşağı sitoplazmik ve nükleer hedefleri fosforlar.

RAS/MAPK yolu hücre proliferasyonu için en önemli yollardan biridir ve bu yolun sıklıkla bütün beşeri kanserlerin ~%30'unda aktive olduğuna inanılmaktadır. Temel MAPK yolu aktivasyonu RAS, BRAF, MEK1'deki aktive edici mutasyonlardan, tümör baskılayıcı NF1 kaybı veya mutasyonların aracılık ettiği akış yukarı aktivasyon, RTK'lerin amplifikasyonları veya ligand dolayımı aktivasyonundan kaynaklanabilir. Üç RAS familyası genin (KRAS, NRAS ve HRAS) hepsinin kolorektal kanser, melanom, akciğer ve pankreas kanseri de dâhil olmak üzere çeşitli kanserlerde, en yaygın olarak kodon 12, 13 ve 61'deki tek nokta mutasyonlarının bir sonucu olarak somatik olarak mutasyona uğradığı gösterilmiştir. Bu mutasyonlar, artan ERK1/2 aktivitesi ve büyüme sinyallerinin eşlik ettiği temel RAS aktivasyonuna neden olar. KRAS'ın kodonları 12, 13 ve 61'deki mutasyonlar, EGFR'yi inhibe eden bileşiklere ve monoklonal antikorlara direnç verir.

KRAS mutasyonları akciğer kanserlerinin %30'unda, pankreas kanserlerinin %90'ında,

mide kanserlerinin %10'unda ve kolorektal kanserlerin %50'sinde bulunur. NRAS mutasyonları melanomun yaklaşık %10-25'inde saptanmıştır. Ayrıca RAS mutasyonları (HRAS, KRAS ve NRAS) tiroit kanserlerinin ~%55-60'ında tespit edilmiştir. BRAF'taki somatik nokta mutasyonları beşeri tümörlerin yaklaşık %8'inde, en sık olarak melanom (%60), kolorektal kanser (%10) ve tiroit kanserlerinde (%50) ortaya çıkar. Melanomda, bütün BRAF mutasyonlarının kinaz sahası içinde olduğu görülür ve tek bir süstitüsyon (T-> A, V600E) mutasyonların %80'inden sorumludur. BRAF mutasyonları nadir durumlarda, RAS mutasyonlarıyla birbirini dışlayan bir şekilde bulunur, bu, bu genetik değişikliklerin ortak akış aşağı efektörleri aktive ettiğini düşündürmektedir.

10 **Biyolojik Tahliller**

Aşağıdaki tahliller bu buluşun örneklenen bileşiklerinin ERK1 ve ERK2 kinaz aktivitesi inhibitörleri olduğunu göstermektedir. Aşağıdaki tahlillerin sonuçları bu buluşun örneklenen bileşiklerinin kanser hücrelerinde ERK sinyallerini inhibe ettiğini de göstermektedir. Ayrıca, Örnek 1'in bileşiği kanserin bazı ksenograft tümör modellerinde ERK yolu hedef inhibisyonu göstermektedir. Ayrıca, Örnek 1'in bileşiği kanserin bazı ksenograft tümör modellerinde tümör büyümesini inhibe etmektedir.

ERK1 Kinaz Tahlili

Bu tahlilin amacı, bileşiklerin ERK1 kinaz aktivitesini inhibe etme kabiliyetini ölçmektir. ERK1 kinaz tahlilini bir TR-FRET tahlili kullanarak *in vitro* uygulayın. Reaksiyonları (12.5 µL) 384 kuyucuklu bir PROXIPLATE™ (Perkin Elmer, #GRN6260) içine, 5 µL ERK1 enzim (Invitrogen, #PR5254B, nihai konsantrasyon 100 ng/mL) artı substrat GFP-ATF2 (Invitrogen, # PV4445, nihai konsantrasyon 0.2 µM), kinaz tamponu (50 mM Hepes pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, %0.01 Triton X-100, 1 mM DTT) içinde hazırlanmış 5 µL ATP çözeltisi (Invitrogen, # PV3227, nihai konsantrasyon 10 µM) ve DMSO çözeltisi (nihai %4, hacim/hacim) içinde 2.5 µL test bileşikleri ilave ederek başlatın. Reaksiyon karışımını 60 dakika oda sıcaklığında inkübe edin. TR-FRET seyreltme tamponu (Invitrogen, # PV3574) içinde 12.5 µL durdurma tamponu (10 mM EDTA, 2 nM Tb-anti-pATF2 (pThr71) antikoru, Invitrogen, #PV4448) ilave ederek reaksiyonu durdurun. Plakaları 60 dakika daha oda sıcaklığında inkübe edin ve 340 nm eksitasyon dalga uzunluğunda bir ENVISION® (PerkinElmer) plaka okuyucuda okuyun. GFP alıcı emisyon sinyali (520 nm'de) Tb verici emisyon sinyali (495 nm'de) bölerek TR-FRET oranını hesaplayın. Bileşikler işleminden geçirilmiş kuyucukları plaka üzeri Max

(DMSO kontrolü) ve Min (Hiç enzim ilave edilmemiş) kontrol kuyucukları TR-FRET oranı verilerine göre kullanarak inhibisyon yüzdesini hesaplayın $\{\% \text{ inhibisyon} = 100 - [(test \text{ bileşiği} - \text{medyan Min}) / (\text{medyan Max} - \text{medyan Min}) \times 100]\}$. Bir 1:3 seyreltme şeması kullanarak bütün bileşikler 10 konsantrasyonda (20 μM ila 0.001 μM) test edin.

5 İnhibisyon yüzdesi ve on noktalı konsantrasyon verilerini ACTIVITYBASE® 7.3'ü (ID Business Solutions Limited) kullanarak 4 parametrelili bir doğrusal olmayan lojistik denkleme (denklem 205) uydurarak Abs_IC₅₀ değerlerini elde edin.

Buluşun çerçevesi içinde örneklenen bileşikler bu tahlilde esas olarak yukarıda açıklandığı gibi test edilir. Bu tahlilin sonuçları örneklenen bütün bileşiklerin ERK1 kinaz aktivitesini

10 0.15 μM 'den düşük IC₅₀ değerleriyle inhibe ettiğini göstermektedir. Örneğin, Örnek 1'in bileşiğinin IC₅₀ değeri 4.86 nM'dir (± 0.20 , n=7).

ERK2 Kinaz Tahlili

Bu tahlilin amacı, bileşiklerin ERK2 kinaz aktivitesini inhibe etme kabiliyetini ölçmektir. ERK2 kinaz tahlilini bir TR-FRET tahlili kullanarak *in vitro* uygulayın. Bütün

15 reaksiyonları (12.5 μL) 384 kuyucuklu bir PROXIPLATE™ (Perkin Elmer, #GRN6260) içine, 5 μL ERK2 enzim (Invitrogen, # PV3595B, nihai konsantrasyon 50 ng/mL) artı substrat GFP-ATF2 (Invitrogen, # PV4445, nihai konsantrasyon 0.2 μM), kinaz tamponu (50 mM Hepes pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, %0.01 Triton X-100, 1 mM DTT) içinde hazırlanmış 5 μL ATP çözeltisi (Invitrogen, # PV3227, nihai konsantrasyon 10 μM)

20 ve DMSO çözeltisi (nihai %4, hacim/hacim) içinde 2.5 μL test bileşikler ilave ederek başlatın. Reaksiyonları 60 dakika oda sıcaklığında inkübe edin. TR-FRET seyreltme tamponu (Invitrogen, # PV3574) içinde 12.5 μL durdurma tamponu (10 mM EDTA, 2 mM Tb-anti-pATF2 (pThr71) antikoru, Invitrogen, #PV4448) ilave ederek reaksiyonu durdurun. Plakaları 60 dakika daha oda sıcaklığında inkübe edin ve 340 nm eksitasyon

25 dalga uzunluğunda bir ENVISION® (PerkinElmer) plaka okuyucuda okuyun. GFP alıcı emisyon sinyali (520 nm'de) Tb verici emisyon sinyali (495 nm'de) bölerek TR-FRET oranını hesaplayın. Bileşik kuyucuklarını plaka üzeri Max (DMSO kontrolü) ve Min (Hiç enzim ilave edilmemiş) kontrol kuyucukları TR-FRET oranı verilerine göre kullanarak inhibisyon yüzdesini hesaplayın $\{\% \text{ inhibisyon} = 100 - [(test \text{ bileşiği} - \text{medyan}$

30 Min)/(medyan Max - medyan Min) X 100]\}. Bir 1:3 seyreltme şeması kullanarak bütün bileşikler 10 konsantrasyonda (20 μM ila 0.001 μM) test edin. İnhibisyon yüzdesi ve on noktalı konsantrasyon verilerini ACTIVITYBASE 7.3'ü (ID Business Solutions Limited)

kullanarak 4 parametrelili bir doğrusal olmayan lojistik denkleme (denklem 205) uydurarak Abs_IC50 değerlerini elde edin.

Buluşun çerçevesi içinde örneklenen bileşikler bu tahlilde esas olarak yukarıda açıklandığı gibi test edilir. Bu tahlilin sonuçları örneklenen bütün bileşiklerin ERK2 kinaz aktivitesini 0.15 μM 'den düşük IC₅₀ değerleriyle inhibe ettiğini göstermektedir. Örneğin, Örnek 1'in bileşiğinin IC₅₀ değeri 5.24 nM'dir (± 0.24 , n=7).

ERK1/2 Hücre Mekanik Tahlili (pRSK1 Alphascreen Tahlili)

Bu tahlilin amacı bileşiklerin *in vitro* kanser hücrelerinde ERK sinyallerini inhibe etme kabiliyetini ölçmektir. HCT116 kolorektal kanser hücre hattını (ATCC, # CCL-247)

- 10 kullanarak pRSK1 Alphascreen tahlilini uygulayın. Rutin olarak HCT116 hücrelerini T-150 şişelerinde %5 Fetal Büyükbaş Hayvan Serum (FBS), (Gibco, #16000-044) içeren Dulbecco Modifiye Eagle Ortamı (DMEM) (Hyclone, #SH30022) içinde kültürleyin ve 37°C'de %5 CO₂ inkübatöründe inkübe edin. Konfluent olduklarında hücreleri toplayın ve "tahlile hazır dondurulmuş hücreler" olarak 1×10^7 hücre/mL seviyesinde dondurma ortamında dondurun ve sıvı azot içinde saklayın. Tahlili uygulamak için, 40,000 HCT116 hücre/kuyucuğu 96 kuyucuklu bir doku kültürü plakasına kaplayın ve gece boyunca 37°C'de %5 CO₂ inkübatörde inkübe edin. Bileşikleri 20 μM en yüksek konsantrasyondan başlayarak 10 konsantrasyonda test edin ve %0.5 (hacim/hacim) nihai DMSO konsantrasyonu ile 1:3 seyreltme şeması (20 μM ile 0.001 μM) kullanın. Bileşikleri 20 μL serum içermeyen büyüme ortamı içinde ilave edin ve iki saat 37°C'de inkübe edin.

- Büyüme ortamını çıkarın ve her kuyucuğa 1x holt proteaz ve fosfat inhibitör kokteyli [Thermo, #78441] içeren 50 μL 1x liziz tamponu [Cell Signaling Technology, #9803] ilave edin ve 10 dakika oda sıcaklığında bir çalkalayıcıda inkübe edin. Her kuyucuktan 4 μL hücre lizatını 384 kuyucuklu bir tahlil plakasının [Perkin Elmer, #6006280] ilgili kuyucuklarına aktarın ve 5 μL reaksiyon karışımı [2000 pay 1x tahlil tamponu (Perkin Elmer, #A1000), 1 pay biyotin-RSK1 antikoru (Santa Cruz, #sc-231- β -G), 4 pay pRSK1 antikoru (Abcam, #ab32413), 35 pay alıcı boncuklar (Perkin Elmer, #6760617R)] ilave edin. Plakayı folyo plaka yalıtım elemanı ile (Beckman Coulter, # 538619) kapatın ve iki saat oda sıcaklığında inkübe edin. Her kuyucuğa 2 μL verici boncuklar [20 pay 1x tahlil tamponu, 1 pay verici boncuklar] ilave edin ve plakayı saydam plaka yalıtım elemanı ile (Applied Biosystems, #4311971) kapatın ve iki saat karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edin. Plakaları ENVISION® (PerkinElmer) plaka okuyucusunda okuyarak her kuyucuktaki

floresan şiddetini ölçün. pRSK1 inhibisyon yüzdesi [% inhibisyon = $100 - [(test\ bileşiği - medyan\ Min) / (medyan\ Max - medyan\ Min) \times 100]$ ve on noktalı konsantrasyon verilerini ACTIVITYBASE® 7.3'ü (ID Business Solutions Limited) kullanarak 4 parametrelili bir doğrusal olmayan lojistik denkleme (denklem 205) uydurarak Rel IC₅₀ değerlerini elde edin.

Buluşun çerçevesi içinde örneklenen bileşikler bu tahlilde esas olarak yukarıda açıklandığı gibi test edilir. Bu tahlilin sonuçları örneklenen bütün bileşiklerin tümör hücrelerinde ERK substratı (RSK) fosforlanmasını 3 µM'den düşük IC₅₀ değerleriyle inhibe ettiğini göstermektedir. Örneğin, Örnek 1'in bileşiğinin IC₅₀ değeri 0.429 µM'dir (±0.173, n=8).

10 **İn Vivo Hedef inhibisyonu (IVTI) Tahlili (pRSK1 ELISA Tahlili)**

Bu tahlilin amacı bir test bileşiğinin bir hayvan modelinde ERK1/2 substratının fosforlanmasını inhibe etme kabiliyetini ölçmektir. Harlan Laboratories'ten dişi atimik çıplak farelere (22-25 g) sağ böğür bölgesinden subkütanöz olarak 5x10⁶ HCT116 kolorektal kanser hücrelerini (ATCC, # CCL-247) 200 µL 1:1 Hank Dengeli Tuz Çözeltilisi (HBSS) + Matrigel çözeltisi içinde implante edin. İmplantasyondan sonraki yedinci gün başlayarak tümör büyümesini ve vücut ağırlığını haftada iki kez ölçün. Tümör büyüklükleri 300-500 mm³'e ulaştığında, hayvanları randomize edin ve beşer hayvandan oluşan gruplara ayırın. Hayvanlara bileşiğe uygun bir taşıyıcı içinde uygun bir dozda bileşiği veya tek başına taşıyıcıyı (taşıyıcı: %1 HEC/%0.25 Tween 80/%0.05 Köpük önleyici) ağızdan uygulayın ve doz uygulamasından sonra istenen zaman aralıklarında tümörleri ve kan alın. Hayvanları izofluran anestezisi artı servikal dislokasyonla öldürün. Tümörleri şoklayın ve ELISA tahliliyle pRSK1 seviyeleri açısından işleminden geçirene kadar -80°C'de saklayın. Kanı EDTA tüpleri içine alın ve plazma için döndürün ve 96 kuyucuklu bir plakada -80°C'de dondurun. Bileşik maruziyetlerini standart usulleri kullanarak belirleyin.

25 Tümörleri sıvı azot içinde pulverize edin ve 1x halt proteaz ve fosfataz inhibitör kokteyli (Thermo Scientific, #0861281), 1 mM fenilmetansülfonil florür (PMSF) (Sigma, # 93482-50ML-F) ve 1 µM sodyum metavanadat (Sigma, #590088) içeren 1x liziz tamponunda (MSD, #R60TX-3), soğuk bir odada (4°C) bir FastPrep-24™ Hücre Parçalama makinesinde (MP Biomedical) Matrix D boncukları (MP Biomedical, #6913-500)

30 kullanarak lize edin. Tümör lizatlarını 20 dakika 4°C'de 14000 devir/dakikada döndürdükten sonra yeni tüplere aktarın. Tümör veya hücre lizatları protein konsantrasyonunu Pierce BCA Protein Tahlil Kiti (kat. no. 23225, Thermo Scientific)

kullanarak belirleyin. Bu kit üç ana bileşen içerir: (1) 0.1 M sodyum hidroksit içinde sodyum karbonat, sodyum bikarbonat, bisinkoninik asit ve sodyum tartarat içeren BCA Tepkime Maddesi A, (2) %4 bakır sülfat içeren BCA Tepkime Maddesi B ve (3) %0.9 salin ve %0.05 sodyum azit içinde 2 mg/mL içeren albümin standart ampulleri. 96

- 5 kuyucuklu bir plakada, standart bir eğri oluşturmak için çift kopya kuyucuklara 25 µL içinde 20-2000 ug/mL konsantrasyon aralığı için büyükbaş hayvan serum albümini protein standardı ilave edin. Test kuyucuklarını kopyalamak için 25 µL 1 x PBS içinde seyreltilmiş hücre veya tümör lizatları ilave edin. %2 Tepkime Maddesi B'yi Tepkime Maddesi A'ya ilave ederek (2 mL B + 98 mL A) çalışma BCA tepkime maddesini hazırlayın, iyice
- 10 karıştırın ve her numuneye veya standarda 200 µL ilave edin. İyice karıştırın, plakayı kapatın ve 30 dakika 37°C'de inkübe edin. Plakayı oda sıcaklığına soğutun ve 562 nm'de veya yakınında absoransı bir plaka okuyucuda (Perkin Elmer'dan Envision plaka okuyucu) ölçün. Bütün diğer münferit standart ve bilinmeyen (hücre veya tümör lizatı) numune kopyalarının 562 nm ölçümlerinden boş standart kopyalarının ortalama 562 nm absorbans
- 15 ölçümünü çıkartın. Her büyükbaş hayvan serum albümini standardı için ortalama boş numuneye göre düzeltilmiş 562 nm ölçümünü µg/mL olarak konsantrasyonuna göre çizerek standart bir eğri hazırlayın. Microsoft Excel'de eğri uydurma logaritmalarını kullanarak her bilinmeyen numunenin protein konsantrasyonunu belirlemek için standart eğriyi kullanın. Geri kalan tümör lizatlarını -80°C'de dondurun. Sandviç ELISA'yla
- 20 pRSK1 ekspresyonunu ölçmek için bir kez dondurulmuş çözündürülmüş tümör lizatlarını kullanın.

- 96 kuyucuklu plakaları (Thermo, #15042) gece boyunca 4°C'de 40 ng RSK1 keçi antikoruyla (Santa Cruz, # sc-231-G) kaplayın ve bir saat oda sıcaklığında ve sonra gece boyunca 4°C'de inkübe edin. Plakaları üç kez 300 µL PBST'yle (%0.05 Tween-20 içeren
- 25 1x fosfat tamponlu salin (PBS)) yıkayın, kuyucuk başına 100 µL blokaj tamponuyla (Thermo Scientific, #37532) bloke edin ve iki saat oda sıcaklığında inkübe edin. Plakaları üç kez 300 µL PBST'yle yıkayın ve her kuyucuğa 20 µg tümör lizatı aktarın ve gece boyunca 4°C'de inkübe edin. Plakaları üç kez 300 µL PBST'yle yıkayın ve dört saat oda sıcaklığında 100 µL pRSK1 (T359/S363) tavşan antikoruyla (blokaj tamponunda 1:1000
 - 30 seyreltme) birlikte inkübe edin. Plakaları üç kez 300 µL PBST'yle yıkayın ve 100 µL anti tavşan HRP'ye konjuge ikincil antikorla (GE Healthcare BK, #NA934V; blokaj tamponunda 1:10000 oranında seyreltilmiş) birlikte inkübe edin. Bir saat oda sıcaklığında inkübe edin. Plakaları üç kez 300 µL PBST'yle yıkayın, 100 µL SUPERSIGNAL® ELISA

Femto maksimum duyarlılık substratı (Thermo, #37075) ilave edin ve bir dakika bir çalkalayıcı üzerinde inkübe edin. Bir ENVISION® plaka okuyucu kullanarak lüminesans sinyalinin belirleyin. Tek başına taşıyıcıyla tedavi edilmiş hayvanlardan alınan tümör lizatlarını %100 kabul ederek her tümör lizatındaki pRSK1 seviyesini belirleyin. Her numuneyi çift kopya olarak analiz edin ve hesaplamalar için ortalama sayıları kullanın. Excel ve XL Fit'i kullanarak TED₅₀'yi hesaplayın.

Buluşun çerçevesi içine giren bir bileşik bu tahlilde esas olarak yukarıda açıklandığı gibi test edilir. Bu tahlilin sonuçları Örnek 1'in bileşiğinin bir tümör ksenograft modelinde RSK1'in fosforlanmasını inhibe ettiğini gösterir. Örneğin Örnek 1'in bileşiğinin TED₅₀ değeri 16 mg/kg'dir.

Ksenograft Tümör Modelleri

Bu tahlilin amacı test bileşiği uygulamasına yanıt olarak tümör hacmindeki azalmayı ölçmektir. Beşeri kolorektal kanser hücreleri HCT116'yı (ATCC, # CCL-247) kültürde büyütün, toplayın ve dişi atimik çıplak farelerin (22-25 g, Harlan Laboratories) arka sağ böğrüne subkütanöz olarak 200 µL 1:1 HBSS+ matrigel çözeltisi içinde 5×10^6 hücre enjekte edin. Beşeri pankreas kanseri hücreler MIA PACA-2 (ATCC, # CRL-1420) veya beşeri küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücreleri CALU-6 (ATCC, # HTB-56) veya beşeri kolorektal kanser hücreleri COLO-205'i (ATCC, # CCL-222) kültürde büyütün, toplayın ve dişi atimik çıplak farelerin (22-25 g, Harlan Laboratories) arka sağ böğrüne subkütanöz olarak 200 µL 1:1 HBSS+ matrigel çözeltisi içinde 5×10^6 hücre enjekte edin. İmplantasyondan sonraki yedinci gün başlamak üzere haftada iki kez tümör büyümesini ve vücut ağırlığını ölçün. Tümör büyüklükleri 200-400 mm³'e ulaştığında, hayvanları randomize edin ve sekiz ila on hayvandan oluşan gruplara ayırın. Test bileşiğini uygun bir taşıyıcı (taşıyıcı: %1 HEC/%0.25 Tween 80/%0.05 Köpük Önleyici) içinde hazırlayın ve 14 ila 21 gün ağızdan gavajla uygulayın. Tümör yanıtı tedavi boyunca haftada iki kez yapılan tümör hacmi ölçümüyle belirlenir. Vücut ağırlığı toksisitenin genel bir ölçüsü olarak alınır.

Buluşun çerçevesi içine giren bir bileşik bu tahlilde esas olarak yukarıdaki gibi test edilir. Örnek 1'in bileşiğinin aşağıda Tablo 2'de verilen delta T/C% değerlerine sahip olduğu tespit edilir. Bu sonuçlar Örnek 1'in bileşiğinin HCT116, MIA PACA-2, CALU-6 ve COLO-205 dâhil olmak üzere çeşitli beşeri kanser ksenograft modellerinde önemli tümöre karşı aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.

Tablo 2: Ksenogreft modellerinde Örnek 1'in etkinliği

Tümör Modeli	Doz (mg/kg)	Program	p-değeri	Delta T/C % veya Gerileme%	TGI%
HCT116	25	QD		-8	108
HCT116	50	QD	<0.001*	11	89
HCT116	100	QD	<0.001*	-25	125
MIA PACA-2	12.5	QD	0.003*	32	68
MIA PACA-2	25	QD	<0.001*	2	98
MIA PACA-2	50	QD	<0.001*	-22	122
MIA PACA-2	100	QD	<0.001*	-66	166
CALU-6	12.5	QD	0.010*	22	78
CALU-6	25	QD	0.005*	14	86
CALU-6	50	QD	<0.001*	-31	131
CALU-6	100	QD	<0.001*	-77	177
COLO-205	12.5	QD	<0.001*	-19	119
COLO-205	25	QD	<0.001*	-32	132
COLO-205	100	QD	<0.001*	-76	176

Tümör hacmine ilişkin analiz Log 10 ve SpatialPower kovaryans yapısına dayanır.

*: anlamlı (p<0.05)

NA: Uygulanamaz

Delta T/C% tedavi edilen bir gruptaki son nokta tümör hacmi başlangıç tümör hacminde veya üzerinde olduğunda hesaplanır. Formül $100 \cdot (T - T_0) / (C - C_0)$ olup, burada T ve C sırasıyla tedavi edilen grupta veya kontrol grubunda ortalama son nokta tümör hacimleridir. T_0 ve C_0 bu gruptaki ortalama başlangıç tümör hacimleridir.

Gerileme% son nokta hacmi başlangıcın altında olduğunda hesaplanır. Formül $100 \cdot (T - T_0) / T_0$ 'dır. Burada T_0 tedavi edilen grup için ortalama başlangıç tümör hacmidir.

HCT116, MIA PACA-2 ve CALU-6 modelleri için, T/C'deki değişiklik %'sini hesaplamak için 10. gün, 20. gün ve 15. gün başlangıca göre (randomizasyon) bütün grupların genel ortalaması kullanıldı.

İn Vivo Kombinasyon Çalışmaları

Tümör heterojenliği nedeniyle, etkili terapi için veya edinilmiş direnci aşmak için kanser tedavisinin bazı tiplerinde kombinasyon terapisi elzem hale gelmiştir. Hedeflenen terapilerin bir kombinasyonunun kanserlerin yavaşlatılmasında, hatta durdurulmasında daha etkili olduğu varsayılmaktadır. Bu çerçevede, Örnek 1'in bileşiği pan-RAF inhibitörü bir bileşik (bakınız: WO 2013/134243, 1-(3,3-dimetilbütül)-3-(2-floro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)üre, bundan böyle "pan-RAF inhibitörü bileşik"), CDK4/6 inhibitörü bir bileşik (bakınız: WO 2010/075074, [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-floro-4-(7-floro-3-izopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amin veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu), bundan böyle "CDK4/6 inhibitörü bileşik") veya DC101'le (örneğin bakınız: Witte L. ve diğerleri, Cancer Metastasis Rev., 17, 155-161, 1998, deneylerde farelerde bir anti-VEGFR2 Ab için bir vekil olarak kullanılabilen fare VEGFR2'ye karşı sıçan monoklonal antikoru, tercihen ramusirimab'la (bakınız: WO 2003/075840, Cyramza® olarak da bilinir, IMC-1121b, CAS kayıt numarası 947687-13-0)) kombinasyon halinde tümör büyümesi inhibisyonu açısından test edilir. Daha spesifik olarak, Örnek 1'in bileşiği, pan-RAF inhibitörü bileşik ve CDK4/6 inhibitörü bileşik kombinasyon halinde, bir KRAS mutantlı kolorektal kanser ksenograft modeli olan HCT116'da test edilir. Ayrıca, Örnek 1'in bileşiği CDK4/6 inhibitörü bileşik veya DC101'le kombinasyon halinde KRAS mutantlı küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NSCLC) ksenograft modelleri NCI-H441, A549 ve NCI-H2122'de test edilir.

HCT116 kombinasyon etkinlik çalışması atimik çıplak sıçanlarda yapılır. Beşeri kolorektal kanser hücreleri HCT116'yı (ATCC, # CCL-247) kültürde büyütün, toplayın ve 200 µL 1:1 HBSS+matrigel çözeltisi içinde 5×10^6 hücreyi dışı NIH çıplak sıçanlarının (120-145 gm, Taconic Farms) arka sağ böğrüne subkütanöz olarak enjekte edin. İmplantasyondan sonraki yedinci gün başlamak üzere haftada iki kez tümör büyümesini ve vücut ağırlığını ölçün. Ortalama tümör büyüklükleri 200-300 mm³'e ulaştığında, hayvanları randomize edin ve beş ila yedi hayvandan oluşan gruplara ayırın. Test bileşiğini uygun bir taşıyıcı (aşağıya bakınız) içinde hazırlayın ve 21 ila 28 gün ağızdan gavajla uygulayın. Tümör yanıtı tedavi boyunca haftada iki kez uygulanan tümör hacmi ölçümüyle belirlenir. Bu çalışmada kullanılan taşıyıcı %1 HEC (hidroksietil selüloz)/%0.25 Tween®80/%0.05 Köpük Önleyicidir. Örnek 1'in bileşiği ve pan-RAF inhibitörü bileşik %1 HEC /%0.25 Tween® 80/%0.05 Köpük Önleyici içinde formüle edilir. CDK4/6 inhibitörü bileşik 25

mM Sodyum fosfat tampon, pH 2 içinde %1 HEC içinde formüle edilir. Örnek 1'in bileşiğinin 10 mpk ve 20 mpk QD olarak uygulanması sırasıyla %52 ve %64 tümör büyümesi inhibisyonu tek madde aktivitesiyle sonuçlanır (Tablo 3). Buna karşılık, pan-RAF inhibitörü bileşiğinin 10 mpk ve 20 mpk BID olarak uygulanması sırasıyla %29 ve %68 tek madde aktivitesiyle sonuçlanır. 10 mpk BID olarak uygulanan pan-RAF inhibitörü bileşik dışında bütün tedaviler taşıyıcı kontrolüne göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). 10 mpk, QD Örnek 1'in bileşiğinin 10 mpk, BID pan-RAF inhibitörü bileşikle kombinasyon halinde uygulanması, %94 tümör büyümesi inhibisyonu ile ($p<0.001$) sonuçlanmaktadır ve kombinasyon sonucu Bliss Independence usulüyle hesaplandığında "Sinerjistik"tir (Tablo 3). Önemli bir vücut ağırlığı kaybı olmadığı için bu kombinasyon iyi tolere ediliyor gibi görünmektedir. 10 mpk, QD Örnek 1'in bileşiğinin 20 mpk, BID pan-RAF inhibitörü bileşikle kombinasyon halinde uygulanması da anlamlı ($p<0.05$) tümör büyümesi inhibisyonu ile (%95) sonuçlandı ve kombinasyon sonucu Bliss Independence usulüyle hesaplandığında "Aditif"tir (Tablo 3). Önemli bir vücut ağırlığı kaybı olmadığı için bu kombinasyon iyi tolere ediliyor gibi görünmektedir. Aynı çalışmada, 10 mpk, QD Örnek 1'in bileşiğinin 20 mpk QD CDK4/6 inhibitörüyle birlikte uygulanması %98 tümör büyümesi inhibisyonu ile sonuçlanmaktadır, Örnek 1'in bileşiğinin ve CDK4/6 inhibitörü bileşiğinin tek madde etkinliği ise sırasıyla %52 ve %76 tümör büyümesi inhibisyonudur. Bu iki maddenin kombinasyonu Bliss Independence usulüyle hesaplandığında istatistiksel olarak anlamlı bir "Aditif" sonuç vermektedir (Tablo 3). Önemli bir vücut ağırlığı kaybı olmadığı için bu kombinasyon iyi tolere ediliyor gibi görünmektedir. Bu sonuçlar Örnek 1'in bileşiğinin pan-RAF inhibitörü bileşikle veya CDK4/6 inhibitörü bileşikle kombinasyonunun, KRAS mutantlı kolorektal kanseri olan hastalar için daha fazla yarar sağlayabildiğini düşündürmektedir.

Tablo 3. HCT116 KRAS mutantlı kolorektal kanser ksenogreft modelinde Örnek 1'in bileşiminin pan-RAF inhibitörü bileşikle veya CDK4/6 inhibitörü bileşikle kombinasyonuna ilişkin çalışmalar

Tedavi	Bileşik	Doz (mg/kg)	Program	Delta T/C %	TGI %	p-değeri	Kombinasyon Sonucu**
1	Taşıyıcı	NA	BID	NA	NA	NA	NA
2	Örnek 1	10	QD	48	52	0.038*	NA
3	Örnek 1	20	QD	36	64	0.005*	NA
4	pan-RAF inhibitörü	10	BID	71	29	0.303	NA
5	pan-RAF inhibitörü	20	BID	32	68	0.001*	NA
6	CDK4/6 inhibitörü	20	QD	24	76	<0.001*	NA
7	Örnek 1 + pan-RAF inhibitörü	10, 10	QD, BID	6	94	<0.001*	Sinerjistik
8	Örnek 1 + pan-RAF inhibitörü	10, 20	QD, BID	5	95	<0.001*	Aditif
9	Örnek 1 + CDK4/6 inhibitörü	10, 20	QD, QD	2	98	<0.001*	Aditif

Tümör hacmine ilişkin analiz Log 10 ve SpatialPower kovaryans yapısına dayanır.

*: anlamlı (p<0.05)

**İki maddenin kombinasyonunun istatistiksel etkisi Bliss Independence usulüyle belirlenir: İlk olarak, bir tekrarlanan ölçümler modeli, grup, zaman ve zamana göre gruba karşı log tümör hacmine uydurulur. Daha sonra her zaman noktasında bir etkileşim etkisini değerlendirmek için kontrast tümceleri kullanılır. Kombinasyon için

beklenen aditif yanıt (EAR) tümör hacmi ölçeği esas alınarak, $EAR \text{ hacmi} = V1 * V2 / V0$ olarak hesaplanır, burada $V0$, $V1$ ve $V2$ sırasıyla taşıyıcı kontrolü, tek başına tedavi 1 ve tek başına tedavi 2 için tahmini ortalama tümör hacimleridir. Etkileşim testi anlamlıysa ($p < 0.05$), test edilen dozlarda ve programlarda, gözlemlenen kombinasyon hacmi EAR hacminden düşük ise sinerjistik olarak, gözlemlenen kombinasyon hacmi EAR hacminden yüksek ise antagonistik veya aksi halde aditif olarak belirlenir.

NA: Uygulanamaz

Delta T/C% tedavi edilen bir gruptaki son nokta tümör hacmi başlangıç tümör hacminde veya üzerinde olduğunda hesaplanır. Formül $100 * (T - T_0) / (C - C_0)$ olup, burada T ve C sırasıyla tedavi edilen grupta veya kontrol grubunda ortalama son nokta tümör hacimleridir. T_0 ve C_0 bu gruplardaki ortalama başlangıç tümör hacimleridir.

Bütün çalışmalarda 28 gün için doz

11. gün başlangıca (randomizasyon) göre bütün grupların genel ortalaması T/C'deki değişiklik yüzdesini hesaplamak için kullanıldı

Kombinasyonun etkinliği SCID farelerde A549 (KRAS_G12S) ve atimik çıplak farelerde NCI-H441 (KRAS_G12V) ve NCI-H2122 (KRAS_G12C) dâhil olmak üzere üç KRAS mutantlı NSCLC ksenograft modelinde de test edilir. Beşeri küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücreleri NCI-H441 (ATCC, # CRL-5807) ve NCI-H2122'yi (ATCC, #CRL-5985)

- 5 kültürde büyütün, toplayın ve dişi atimik çıplak farelerin (20-22 gm, Harlan Laboratories) arka sağ böğrüne subkütanöz olarak 200 μ L 1:1 HBSS+ matrigel çözeltisi içinde 5×10^6 hücre enjekte edin. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücreleri A549'u (ATCC, # CCL-185) kültürde büyütün, toplayın ve dişi CB-17 SCID farelerin (18-20 gm, Taconic Farms) arka sağ böğrüne subkütanöz olarak 200 μ L 1:1 HBSS+ matrigel çözeltisi içinde 5×10^6
- 10 hücre enjekte edin. Bütün hücre hatları için, implantasyondan sonraki yedinci gün başlamak üzere haftada iki kez tümör büyümesini ve vücut ağırlığını ölçün. Ortalama tümör büyüklükleri 200-300 mm^3 'e ulaştığında, hayvanları randomize edin ve beş ila yedi hayvandan oluşan gruplara ayırın. Test bileşimini uygun bir taşıyıcı (aşağıya bakınız) içinde hazırlayın ve 21 ila 28 gün ağızdan gavajla (Örnek 1'in bileşiği ve CDK4/6 inhibitörü
- 15 bileşik) veya intraperitoneal olarak (DC101) uygulayın. Tümör yanıtı, tedavi boyunca haftada iki kez uygulanan tümör hacmi ölçümüyle belirlenir. Bu çalışmalarda kullanılan taşıyıcı %1 HEC/%0.25 Tween® 80/%0.05 Köpük önleyicidir. Örnek 1'in bileşiği %1 HEC/%0.25Tween® 80/%0.05 Köpük Önleyici içinde formüle edilir ve CDK4/6 inhibitörü bileşik 25 mM sodyum fosfat tampon, pH 2 içinde %1 HEC içinde formüle edilir. Örnek

1'in bileşiğinin 50 mpk seviyesinde tek bir madde olarak uygulanması NCI-H2122 ve A549 tümörlerinde sırasıyla %41 ve %91 tümör büyümesi inhibisyonuyla sonuçlanmakta; ve NCI-H411 tümörlerinde %101 tümör büyümesi inhibisyonuna (yani %1 tümör gerilemesi) yol açmaktadır. CDK4/6 inhibitörü bileşiğin 50 mpk seviyesinde tek madde olarak uygulanması NCI-H2122, A549 ve NCI-H441 modellerinde sırasıyla %53, %51 ve %81 tümör büyümesi inhibisyonuyla sonuçlanmaktadır. Ayrıca Örnek 1'in bileşiğinin (50 mpk) CDK4/6 inhibitörü bileşikle (50 mpk) kombinasyonu, A549 ve NCI-H441 tümörlerinde sırasıyla %151 (yani %51 gerileme) ve %147 (yani %47 gerileme) tümör büyümesi inhibisyonuyla; ve NCI-H2122 tümörlerinde %82 tümör büyümesi inhibisyonuyla sonuçlanmaktadır. Üç tümör modelinin hepsinde kombinasyon sonucu Bliss Independence usulüyle hesaplandığında "Aditif"tir (Tablo 4). Genel olarak, önemli vücut ağırlığı kaybı olmamasının gösterdiği gibi bu çalışmalarda bütün tedavilerin iyi tolere edildiği görülmektedir. Aynı NCI-H441 ksenograft modelinde, fosfat tampon içinde DC101 de 28 gün boyunca tek madde olarak veya 50 mpk, QD Örnek 1'in bileşiğiyle kombinasyon halinde haftada iki kez (BIW) intraperitoneal olarak uygulanır. DC101'in 20 mpk BIW olarak uygulanması %102 tümör büyümesi inhibisyonu (yani %2 gerileme) tek madde aktivitesiyle sonuçlanır. 50 mpk, QD Örnek 1'in bileşiğinin 20 mpk, BIW olarak DC101'le kombinasyonu, %146 tümör büyümesi inhibisyonuyla (yani %46 gerileme) sonuçlanmaktadır. Bu kombinasyonun sonucu Bliss Independence usulüyle hesaplandığında "Aditif"tir (Tablo 4). Önemli vücut ağırlığı kaybı olmamasının gösterdiği gibi bu kombinasyon tolere ediliyor gibi görünmektedir. Bu sonuçlar, Örnek 1'in bileşiğinin CDK4/6 inhibitörü bileşikle veya bir anti-VEGFR2 antikoruyla kombinasyonunun, KRAS mutasyonu olan küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastaları için daha fazla yarar sağlayabildiğini düşündürmektedir.

Tablo 4: KRAS mutanlı küçük hücreli dışı akciğer kanseri ksenograft modellerinde Örnek 1'in bileşiğinin CDK4/6 inhibitörü bileşikle veya DC101'le kombinasyonuna ilişkin çalışmalar

Tümör Modeli	Tedavi	Bileşik	Doz (mg/kg)	Program ⁺	Delta T/C %	Gerileme %	p değeri (Taşıyıcıya göre)	Kombinasyon Etkisi**
NCI-H441 NSCLC Modeli	1	Taşıyıcı	NA	QD	NA	NA	NA	NA
	2	CDK4/6 inhibitörü	50	QD	19	NA	<0.001*	NA
	3	DC101	20	BIW	NA	2	<0.001*	Na
	4	Örnek 1	50	QD	NA	1	<0.001*	NA
	5	Örnek 1 + DC101	50 20	QD BIW	NA	46	<0.001*	Aditif
	6	Örnek 1 + CDK4/6 inhibitörü	50 50	QD QD	NA	47	<0.001*	Aditif
A549 NSCLC Modeli	1	Taşıyıcı	NA	QD	NA	NA	NA	NA
	2	CDK4/6 inhibitörü	50	QD	49	NA	0.033*	NA
	3	Örnek 1	50	QD	9	NA	<0.001*	NA
	4	Örnek + CDK4/6 inhibitörü	50 50	QD QD	NA	51	<0.001*	Aditif
NCI-H2122 NSCLC Modeli	1	Taşıyıcı	NA	QD	NA	NA	NA	NA
	2	CDK4/6 inhibitörü	50	QD	47	NA	0.008*	NA
	3	Örnek 1	50	QD	59	NA	0.055	NA
	4	Örnek 1 + CDK4/6 inhibitörü	50 50	QD QD	18	NA	<0.001*	Aditif

Tümör hacmi için analiz Log 10 dönüşümünü ve özel bir güç kovaryans yapısıyla tekrarlanan ANOVA ölçümlemleri esas alır

*: anlamlı ($p < 0.05$)

**İki maddenin kombinasyonunun istatistiksel etkisi Bliss Independence usulüyle belirlenir: İlk olarak, bir tekrarlanan ölçümler modeli, grup, zaman ve zamana göre gruba karşı log tümör hacmine uydurulur. Daha sonra her zaman noktasında bir etkileşim etkisini değerlendirmek için kontrast tümceleri kullanılır. Kombinasyon için beklenen aditif yanıt (EAR) tümör hacmi ölçüğü esas alınarak, $EAR\ hacmi = V1 * V2 / V0$ olarak hesaplanır, burada $V0$, $V1$ ve $V2$ sırasıyla taşıyıcı kontrolü, tek başına tedavi 1 ve tek başına tedavi 2 için tahmini ortalama tümör hacimleridir. Etkileşim testi anlamlı ($p < 0.05$) olduğunda, test edilen dozlarda ve programlarda, gözlemlenen kombinasyon hacmi EAR hacminden düşük ise sinerjistik olarak, gözlemlenen kombinasyon hacmi EAR hacminden yüksek ise antagonistik veya aksi halde aditif olarak belirlenir.

NA: Uygulanamaz

Delta T/C% tedavi edilen bir gruptaki son nokta tümör hacmi başlangıç tümör hacminde veya üzerinde olduğunda hesaplanır. Formül $100 * (T - T_0) / (C - C_0)$ olup, burada T ve C sırasıyla tedavi edilen grupta veya kontrol grubunda ortalama son nokta tümör hacimleridir. T_0 ve C_0 bu gruplardaki başlangıç tümör hacimleridir.

11. gün (HCT116), 25. gün (NCI-H441), 22. gün (A549), 18. günde (NCI-H2122) başlangıç (randomizasyon) T/C'deki değişiklik %'sini hesaplamak için kullanılır.

Bütün çalışmalarda 28 gün için doz