

ÖZET

FİLOVİRİDAE VİRÜS ENFEKSİYONLARININ TEDAVİSİNE YÖNELİK YÖNTEMLER

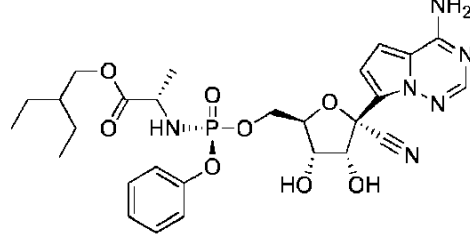
5

Burada, Filoviridae virüs enfeksiyonlarının tedavisine yönelik bileşikler ve farmasötik bileşimleri hazırlama yöntemleri sağlanır. Sağlanan bileşikler, bileşimler ve yöntemler özellikle Marburg virüsü, Ebola virüsü ve Cueva virüsü enfeksiyonlarının tedavisinde faydalıdır.

10

İSTEMLER

1. Aşağıdaki yapıya sahip bir bileşik veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu:



5

2. İstem 1'de tanımlanan bileşiğin veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunun terapötik olarak etkili bir miktarınlı içeren bir farmasötik bileşim.

3. İstem 1'de tanımlanan bileşik veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu ile birlikte farmasötik olarak kabul edilebilir bir veya daha fazla taşıyıcı ve isteğe bağlı olarak diğer terapötik ajanlar içeren bir farmasötik bileşim.

4. İstem 3'te tanımlanan farmasötik bileşim olup, özelliği; diğer terapötik ajanların ribavirin, palivizumab, motavizumab, RSV-IGIV (RespiGam®), MEDI-557, A-60444, MDT-637, BMS-433771, amiodaron, dronedaron, verapamil, Ebola Nekahet Plazması (ECP), TKM-100201, BCX4430 ((2S,3S,4R,5R)-2-(4-amino-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)-5-

- (hidroksimetil)pirrolidin-3,4-diol), favipiravir (T-705 veya Avigan olarak da bilinir), T-705 monofosfat, T-705 difosfat, T-705 trifosfat, FGI-106 (1-N,7-N-bis[3-(dimetilamino)propil]-3,9-dimetilkinolino[8,7-h]kinolon-1,7-diamin), JK-05, TKM-Ebola, ZMapp, rNAPc2, VRC-EBOADC076-00-VP, OS-2966, MVA-BN filo, brinsidofovir, Vaxart adenovirüs vektörü 5 esaslı ebola aşısı, Ad26-ZEBOV, FiloVax aşısı, GOVX-E301, GOVX-E302, ebola virüsü giriş inhibitörleri (NPC1 inhibitörleri) ve rVSV-EBOV ve bunların karışımlarından oluşan gruptan seçilmesidir.

5. İstem 4'te tanımlanan farmasötik bileşim olup, özelliği; diğer terapötik ajanların ZMapp olmasıdır.

6. İstem 1'de tanımlanan bileşik veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu olup, özelliği; bir insanda bir *Filoviridae* enfeksiyonunun tedavisini amaçlayan bir yöntemde kullanılmaya yönelik olmasıdır.
- 5 7. İstem 6'da tanımlanan kullanıma yönelik bileşik veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu olup, özelliği; *Filoviridae* enfeksiyonunun bir ebola virüsü enfeksiyonu olmasıdır.
- 10 8. İstem 6'da tanımlanan kullanıma yönelik bileşik veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu olup, özelliği; *Filoviridae* enfeksiyonunun bir Marburg virüsü enfeksiyonu olmasıdır.

TARİFNAME

FİLOVİRİDAE VİRÜS ENFEKSİYONLARININ TEDAVİSİNE YÖNELİK YÖNTEMLER

5

BULUŞ SAHASI

Buluş genel olarak *Filoviridae* virüs enfeksiyonları'nın tedavi yöntemlerinde kullanılmaya yönelik bileşikler ve özellikle de Ebola virüsü, Marburg virüsü ve Cueva virüsünün tedavisine yönelik yöntemler ve nükleositler ile ilgilidir.

BULUŞUN ALTYAPISI

15 Filovirüsler (örneğin Ebola virüsü (EBOV) ve Marburg virüsü (MARV)) en ölümcül ve yıkıcı virüsler arasındadır. İnsanlarda ve insan harici primatlarda (örneğin maymunlar, goriller ve şempanzeler) ağır, çoğu kez ölümcül viral kanamalı ateşlere yol açar. Filovirüsler özellikle olası biyolojik silahlar olarak ilgi görmektedir, çünkü hava yoluyla yayılma ve silah haline gelme potansiyeline sahiptir.

Filovirüs enfeksiyonu için inkübasyon süresi 2 ila 21 gün aralığında değişir. Hastalığın başlangıcı anidir ve yüksek ateş, baş ağrıları, eklem ve kas ağrıları, boğaz ağrısı, yorgunluk, ishal, kusma ve mide ağrısı ile karakterizedir. Bazı hastalarda döküntü, gözlerde kızarıklık, hıçkırık ve iç ve dış kanama görülebilir. Virüsle enfekte olduktan sonraki bir hafta içerisinde birçok hasta göğüs ağrıları ve çoklu organ yetmezliğini tecrübe eder, şoka girer ve ölür. Bazı hastalarda ölümden önce körlük ve ileri derecede kanama gözlemlenir.

Filoviridae, bir RNA virüsleri ailesidir. Filoviridae ailesinin iki üyesi belirlenmiştir: EBOV ve MARV. Filoviridae

ailesinin iki anahtar patojenik tipi belirlenmiştir: Ebola virüsü ve MARV. MARV'nin belirli bir varyantı mevcuttur ve ebola virüsünün belirlenmiş beş türü bulunmaktadır: Zaire (yani Ebola virüsü, EBOV), Sudan, Tai Forest, Bundibugyo ve Reston. Filoviridae'nin kesin kökeni, konumları ve doğal habitatı bilinmemektedir. Ancak, mevcut kanıtlara ve benzer virüslerin doğasına dayanarak, Filoviridae'nin zoonotik (yani hayvan kökenli) olduğu ve normalde Afrika kıtasına özgü bir hayvan konakçıda korunduğu varsayılır.

10

30 yıldan uzun bir süre boyunca ebola virüsleri Orta Afrika'da enfeksiyonlu hastalarda ağır hastalığa neden olan periyodik kanamalı ateş epizotları ile ilişkilendirilmiştir. Salgınlardaki mortalite oranları ebola virüsünün Sudan türleri (SEBOV) için %50'den ebola virüsünün Zaire türleri için %90'a (EBOV, ZEBOV) kadar değişir (Sanchez vd., Filoviridae: Marburg and Ebola Viruses, in Fields Virology (eds. Knipe, D.M. & Howley, P.M.) 1409-1448 (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia)). 2007'nin sonlarında Uganda'da ebola virüsünün belirgin yeni türlerinden dolayı ortaya çıkan bir salgın yaklaşık %25'lik bir ölüm oranı ile sonuçlanmıştır (Towner vd., PLoS Pathog., 4:e1000212 (2008)). ZEBOV ayrıca Afrika'nın bu bölgesinde yabancıl şebek popülasyonları da yok etmiştir (Walsh vd., Nature, 422:611-614 (2003)).

25

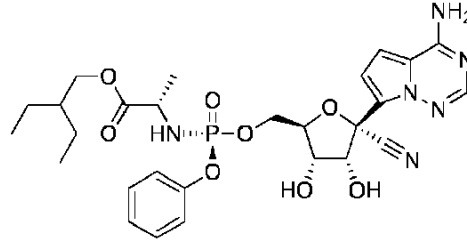
Ebola virüsleri (yani EBOV) de dahil olmak üzere Filovirüs enfeksiyonlarının önlenmesi ve tedavisi birçok zorluk içerir. Aslında, EBOV enfeksiyonlarının önlenmesine veya yönetimine yönelik herhangi bir aşı veya temas sonrası tedavi yöntemi mevcut değildir. Bunun yerine hastalara destekleyici tedavi, yani elektrolit ve sıvı dengelemesi, oksijen, kan basıncı idamesi ve herhangi bir ikincil enfeksiyon için tedavi uygulanır.

30

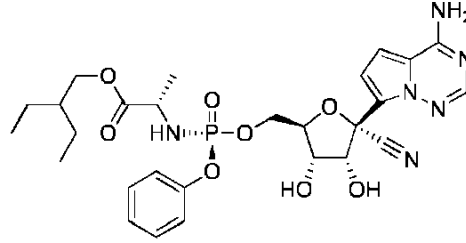
Dolayısıyla, EBOV enfeksiyonların tedavisine yönelik bileşimlere ve yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Mevcut buluş, bu ve diğer ihtiyaçları karşılamaktadır.

5 BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

Aşağıdaki yapıya sahip bir bileşik veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu sağlanır:



10 İhtiyaçlı olan bir insanda bir *Filoviridae* enfeksiyonunun tedavisini amaçlayan bir yöntemde kullanılmaya yönelik bir bileşik veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu sağlanır, burada bahsedilen bileşik aşağıdaki yapıya sahiptir:



15

BULUŞUN DETAYLI AÇIKLAMASI

I. TANIMLAR

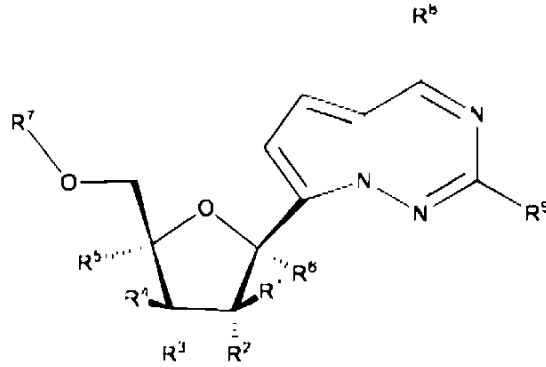
20 Aksi belirtilmedikçe, burada kullanılan terimlerin ve ifadelerin aşağıda verilen anlamlara sahip olması amaçlanır.

Burada markaların kullanıldığı durumlarda, başvuru sahipleri başlıca olarak markalı ürünü ve markalı ürünün farmasötik etken maddesini (maddelerini) dahil etmeyi amaçlar.

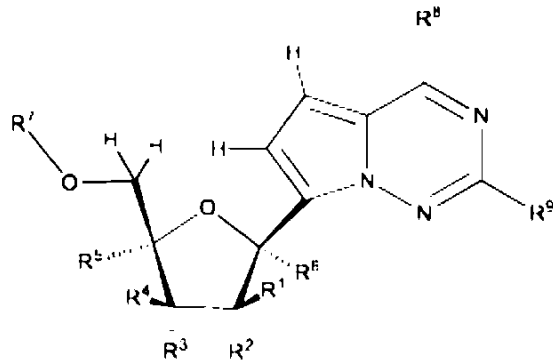
25

Burada kullanıldığ[haliiyle, "buluş konusu bir bileşik", istem
1'de belirtilen yapıya sahip bir bileşiği veya farmasötik
olarak kabul edilebilir bir tuzunu ifade eder. Benzer bir
şekilde, izole edilebilir ara ürünler ile ilgili olarak, "bir
5 Formül (sayı) bileşiği" ifadesi, bu formüle sahip bir bileşiği
ve farmasötik olarak kabul edilebilir tuzları ifade eder.

Aksi belirtilmedikçe, buluş konusu bileşiğin karbon
atomları[ın değeriğinin dört olması amaçlanı[. Karbon
10 atomları[ın dörtlük bir değeriği sağlamak için yeterli sayıda
değişkene sahip olmadığ[bazı kimyasal yapı gösterimlerinde,
dörtlük bir değeriği sağlamak için ihtiyaç duyulan geriye
kalan karbon sübstituentlerinin hidrojen olduğu
varsayılmalıdır. Örneğin,



15 ile aşağıdaki yapı aynı anlama sahiptir:



"Koruyucu grup", bir bileşikte bir fonksiyonel grubun
20 özelliklerini veya bir bütün olarak bileşiğin özelliklerini
maskeleyen veya değiştiren bir grubu ifade eder. Bir koruyucu
grubun kimyasal alt yapı[büyük ölçüde değişkenlik gösterir.
Bir koruyucu grubun işlevlerinden biri, ana ilaç maddesinin

sentezinde bir ara ürün olarak işlev görmektedir. Kimyasal koruyucu gruplar ve korumaya alma/korumadan çıkarma stratejileri ilgili alanda iyi bilinir. Bkz. "Protective Groups in Organic Chemistry", Theodora W. Greene (John Wiley & Sons, Inc., New York, 1991. Bkz. ayrıca Protective Groups in Organic Chemistry, Peter G. M. Wuts and Theodora W. Greene, 4th Ed., 2006. Koruyucu gruplar çoğu kez arzu edilen kimyasal reaksiyonların verimliliğini desteklemek, örneğin kimyasal bağların düzenli ve planlı bir şekilde oluşmasını ve kopmasını sağlamak amacıyla belirli fonksiyonel grupların reaktivitesini maskeleyerek için kullanılır. Bir bileşiğin fonksiyonel gruplarının korunması, korumalı fonksiyonel grubun reaktivitesinin yanı sıra başka fiziksel özellikleri, örneğin polarlık, lipofiliklik (hidrofobiklik) ve yaygın analiz araçları ile ölçülebilen diğer özellikleri değiştirir. Kimyasal olarak korumalı ara ürünlerin kendileri de biyolojik olarak aktif veya pasif olabilir. "Hidroksi koruyucu gruplar", hidroksi grupların (-OH) korumak için faydalı koruyucu gruplar ifade eder.

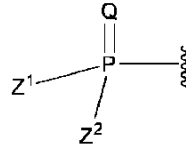
Korumalı bileşikler ayrıca *in vitro* ve *in vivo* olarak değiştirilmiş ve bazı durumlarda optimize edilmiş özellikler, örneğin hücre zarlarından geçiş ve enzimatik yıkılma veya tecride karşı direnç özellikleri sergileyebilir. Bu senaryoda, hedeflenen terapötik etkilere sahip korumalı bileşikler öncül ilaç olarak adlandırılabilir. Bir koruyucu grubun başka bir işlevi, ana ilacı bir öncül ilaca dönüştürmek ve böylece öncül ilaç *in vivo* dönüşümünden sonra ana ilacın salınmasını sağlamaktır. Aktif öncül ilaçlar ana ilahtan daha etkili bir şekilde emilebilir, dolayısıyla öncül ilaçlar ana ilahtan daha yüksek *in vivo* etki gücüne sahip olabilir. Koruyucu gruplar, kimyasal ara ürünler söz konusu olduğunda *in vitro* olarak veya öncül ilaçlar söz konusu olduğunda *in vivo* olarak uzaklaştırılır. Kimyasal ara ürünler için, koruma kaldırdıktan sonra elde edilen ürünlerin, örneğin alkollerin

fizyolojik olarak kabul edilebilir olması özellikle önemli değildir, ancak genel olarak ürünlerin farmakolojik olarak zararsız olması daha çok arzu edilebilir.

5 "Kiral" terimi, ayna görüntü partneri ile  rt  meme özellięine sahip molekülleri ifade eder, "akiral" terimi ise ayna görüntü partneri ile  rt  ebilen molekülleri ifade eder.

10 "Stereoizomerler" terimi, özdeş kimyasal bile ime sahip olan, ancak atomların veya grupların uzayda dizilimi bak l m ndan farklılık gösteren bileşikleri ifade eder.

"Diastereomer", iki veya daha fazla kiral merkeze sahip olan ve molekülleri birbirinin ayna görüntüsü olmayan bir stereoizomeri ifade eder. Diastereomerler farklı fiziksel özelliklere, örneğin farklı erime noktalarına, kaynama noktalarına, spektrum özelliklerine, reaktivitelere ve biyolojik özelliklere sahiptir. Örneğin Formül IV bileşikleri, R⁷'nin



20 olması ve Z¹ ve Z²'nin farklı olması durumunda bir kiral fosfor atomuna sahip olabilir. Z¹ veya Z²'den en az birinin de bir kiral merkez içermesi,  rneęin Z¹ veya Z²'nin azota bağlı, kiral, doğal yoldan meydana gelen bir  -amino asit esteri
25 olması halinde Formül IV bileşiği diastereomerler formunda bulunacaktır, çünkü molekülde iki kiral merkez mevcuttur. Burada tarif edilen bu tip diastereomerlerin tümü ve bunların kullan mlar  mevcut buluşun kapsamına girer. Diastereomerlerin kar   mlar  elektroforez, kristalizasyon ve/veya kromatografi
30 gibi yüksek  z n rl kl  analiz prosedürleriyle ayrılabilir. Diastereomerler farklı fiziksel özelliklere, örneğin bunlarla s n rl  olmamak kaydıyla farklı  z n rl klere, kimyasal kararlılıklara ve kristallik derecelerine sahip olabilir ve

ayrıca farklı biyolojik özelliklere, örneğin bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla farklı enzimatik stabilitelere, emilimlere ve metabolik stabilitelere sahip olabilir.

- 5 "Enansiyomerler", bir bileşiğin, birbirlerinin örtüşmeyen ayna görüntüleri olan iki stereoizomerini ifade eder.

Bir miktar ile bağlantılı olarak kullanılan "yaklaşık" niteleyicisi belirtilen değeri kapsar ve has içerikte
10 belirtilen anlama sahiptir (örneğin belirli miktar ölçümü ile ilişkili hata derecesini içerir).

Burada kullanıldığı haliyle "tedavi etmek" terimi, aksi belirtilmedikçe, bu terimin uygulandığı bozukluğun veya
15 durumun ya da bu bozukluğun veya durumun bir veya daha fazla semptomunun tersine çevrilmesi, hafifletilmesi, ilerlemesinin durdurulması veya önlenmesi anlamına gelir. Burada kullanıldığı haliyle "tedavi" terimi, tedavi etme eylemini ifade eder, "tedavi etmek" terimi hemen yukarıda tanımlandığı
20 gibidir.

Burada kullanıldığı haliyle "terapötik olarak etkili miktar" terimi, burada tarif edilen bir bileşimde bulunan Formül IV bileşiğinin, bu tip bir bileşim seçilen uygulama yolundan
25 verildiğinde, öngörülen fizyolojik yanıt veya arzu edilen biyolojik etkiyi vermek üzere tedavi edilecek bir bireyin solunum yolları ve akciğer salgılarında ve dokularında ya da alternatif olarak kan dolaşımında arzu edilen bir ilaç düzeyini sağlamak için ihtiyaç duyulan miktarın ifade eder.
30 Kesin miktar çok sayıda faktöre, örneğin belirli Formül IV bileşiğine, bileşimin spesifik aktivitesine, kullanılan uygulama cihazına, bileşimin fiziksel karakteristiklerine, hedeflenen kullanıma ve ayrıca hasta unsurlarına, örneğin hastalık durumunun ağırlığına, hasta işbirliğine ve
35 benzerlerine bağlı olacaktır ve burada sağlanan bilgiler

doğrultusunda ilgili alanın uzmanlarıncaya kolayca belirlenebilir.

5 "Normal salin" terimi, %0.9 (a/h) oranında NaCl içeren bir sulu solüsyonu ifade eder.

"Hipertonik salin" terimi, %0.9'dan (a/h) yüksek oranda NaCl içeren bir sulu solüsyonu ifade eder. Örneğin %3'lük hipertonik salin, %3 (a/h) oranında NaCl içerecektir.

10

"Bir reaksiyon karşımının oluşturulması", en az iki farklı türü birbiriyle karşıacak ve reaksiyona girebilecek şekilde temas ettirme prosesini ifade eder. Ancak elde edilen reaksiyon ürününün, doğrudan eklenen reaktifler arasındaki bir reaksiyondan veya reaksiyon karşımında üretilebilecek eklenen reaktiflerden bir veya daha fazlasının bir ara ürününden elde edilebileceği takdir edilecektir.

20 "Kenetleme maddesi", iki farklı bileşiği birbirine kenetleme kapasitesine sahip bir maddeyi ifade eder. Kenetleme maddeleri katalitik veya stokiyometrik olabilir. Kenetleme maddeleri örneğin lityum esaslı kenetleme maddeleri veya magnezyum esaslı kenetleme maddeleri, mesela bir Grignard reaktifi olabilir. Örnek kenetleme maddeleri, bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla n-BuLi, MgCl₂, iPrMgCl, tBuMgCl, PhMgCl veya bunların kombinasyonları kapsar.

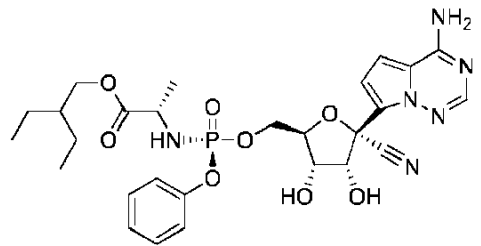
30 "Korumadan çökarma maddesi", bir koruyucu grubu uzaklaştırma kapasitesine sahip herhangi bir maddeyi ifade eder. Korumadan çökarma maddesi, kullanılan koruyucu grubun türüne bağlı olacaktır. Temsili korumadan çökarma maddeleri ilgili alanda bilinir ve Protective Groups in Organic Chemistry, Peter G. M. Wuts and Theodora W. Greene, 4th Ed., 2006 referanslı yayında bulunabilir.

35

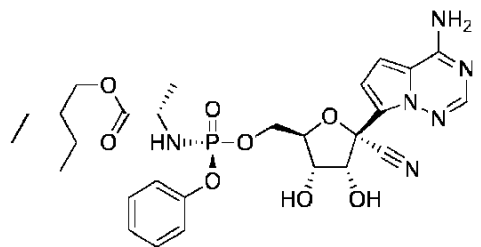
II. BULUŞ KONUSU BİLEŞİKLER

İlerleyen k[esim]lerde, örnekleri a[ç]ıklamalarda, yapı[da] ve formüllerde belirtilen buluşun belirli yapı[lan]malarına atıf
5 yapılacaktır. Buluş ilerleyen k[esim]lerde sıralanan yapı[lan]malara başvurularak tarif edilecektir, ancak mevcut buluşun bu yapı[lan]malar ile s[ın]ırlı olmadı[ğ]ı anlaşılmalıdır. Aksine buluşun, istemlerin kapsamına girdiği sürece tüm alternatifleri, de[ğ]işiklikleri ve eşdeğerleri kapsaması
10 amaçlan[ır].

İhtiyacı olan bir insanda bir *Filoviridae* enfeksiyonunun tedavisini amaçlayan bir yöntemde kullanılmaya yönelik bir bileşik veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu
15 sağlanırlr, bu kullanımlm, aşağıdaki yapıya sahip bir bileşiğin terapötik olarak etkili bir miktarınlmın verilmesini içerir:

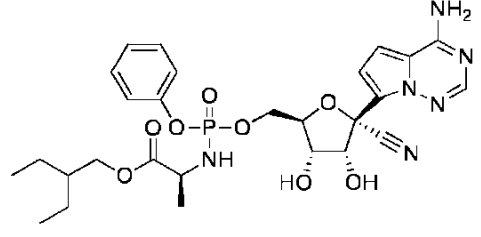


Mevcut buluş, aşağıdaki bileşiği veya farmasötik olarak kabul
20 edilebilir bir tuzunu sağlar:

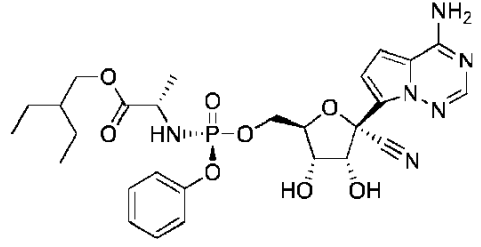


Burada açöklanan bileşiklerin isimleri, kimyasal bileşikleri adlandırmaya yönelik ACD/Name yazılımıyla (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Kanada) sağlanmıştır. Diğer bileşikler veya radikaller yaygın isimlerle veya sistematik veya sistematik olmayan isimlerle adlandırılabilir. Burada

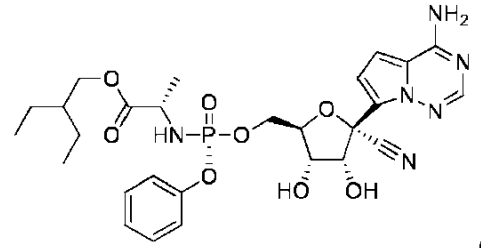
açıklanan bileşiklerin adlandırılması ve numaralandırılması aşağıdaki temsili bileşik ile gösterilir:



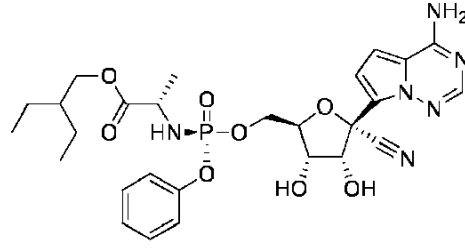
bu bileşik (2S)-2-etilbütül 2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi)(fenoksi)fosforilamino)propanoat olarak adlandırılır. Buluş konusu bileşik şudur:



bu bileşik (S)-2-etilbütül 2-((((S)-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi)(fenoksi)fosforil)amino)propanoat olarak adlandırılır. Ayrıca aşağıdaki açıklanır:



bu bileşik (S)-2-etilbütül 2-((((R)-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi)(fenoksi)fosforil)amino)propanoat olarak adlandırılır. (S)-2-etilbütül2-((((R)-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi)(fenoksi)fosforil)amino)propanoat ayrıca şu şekilde gösterilebilir:



Burada tarif edilen buluş konusu bileşiğe yapılan herhangi bir atf, bu bileşiğin fizyolojik olarak kabul edilebilir bir tuzuna yapılan bir atf da kapsar. Buluş konusu bileşiklerin fizyolojik olarak kabul edilebilir tuzların örnekleri, bir alkali metal veya bir toprak alkali metal (örneğin Na^+ , Li^+ , K^+ , Ca^{+2} ve Mg^{+2}), amonyum ve NR_4^+ (burada R burada tanımlanmış gibidir) gibi uygun bir bazdan türetilen tuzları kapsar. Bir azot atomunun veya bir amino grubunun fizyolojik olarak kabul edilebilir tuzları, (a) inorganik asitler, örneğin hidroklorik asit, hidrobromik asit, sülfürik asit, sülfamik asitler, fosforik asit, nitrik asit ve benzerleriyle oluşturulan asit katılma tuzları; (b) organik asitler, örneğin asetik asit, oksalik asit, tartarik asit, süksinik asit, maleik asit, fumarik asit, glukonik asit, sitrik asit, malik asit, askorbik asit, benzoik asit, izetionik asit, laktobiyonik asit, tannik asit, palmitik asit, aljinik asit, poliglutamik asit, naftalinsülfonik asit, metansülfonik asit, p-tolüensülfonik asit, benzensülfonik asit, naftalindisülfonik asit, poligalakturonik asit, malonik asit, sülfosalisilik asit, glikolik asit, 2-hidroksi-3-naftoat, pamoat, salisilik asit, stearik asit, ftalik asit, mandelik asit, laktik asit, etansülfonik asit, lizin, arginin, glutamik asit, glisin, serin, treonin, alanin, izolösin, lösin ve benzerleriyle oluşturulan tuzlar ve (c) klor, brom ve iyot gibi element anyonlarından oluşturulan tuzları kapsar. Bir hidroksi grubuna sahip bir bileşiğin fizyolojik olarak kabul edilebilir tuzları, bahsedilen bileşiğin Na^+ ve NR_4^+ gibi uygun bir katyon ile kombinasyon halindeki anyonunu kapsar.

Buluş konusu bileşik ve farmasötik olarak kabul edilebilir tuzlar farklı polimorflar veya psödopolimorflar halinde bulunabilir. Burada kullanıldığında haliyle kristalin polimorfizmi, bir kristalin bileşiğin farklı kristal yapıları halinde bulunma becerisini ifade eder. Kristalin polimorfizmi kristal paketindeki farklılıklardan (paket polimorfizmi) veya aynı molekülün farklı konformerleri arasındaki paket farklılıklarından (konformasyonel polimorfizm) kaynaklanabilir. Burada kullanıldığında haliyle kristalin psödopolimorfizmi, bir bileşiğin bir hidratının veya solvatının farklı kristal yapıları halinde bulunma becerisini ifade eder. Buluş konusu psödopolimorflar, kristal paketindeki farklılıklardan (paket psödopolimorfizmi) veya aynı molekülün farklı konformerleri arasındaki paket farklılıklarından (konformasyonel psödopolimorfizm) dolayı ortaya çıkabilir. Mevcut buluş, Formül IV bileşiklerinin ve farmasötik olarak kabul edilebilir tuzlarının tüm polimorflarını ve psödopolimorflarını kapsar.

Buluş konusu bileşik ve farmasötik olarak kabul edilebilir tuzların ayrıca bir amorf katı formunda bulunabilir. Burada kullanıldığında haliyle bir amorf katı, katı içerisindeki atomların konumlarının uzun mesafeli herhangi bir düzene sahip olmadığında bir katıdır. Bu tanımla, kristal boyutunun iki nanometre veya daha küçük olduğu durumlar için de geçerlidir. Buluş konusu amorf formlar oluşturmak için solventler de dahil olmak üzere katkı maddeleri kullanılabilir. Mevcut buluş, Formül IV bileşiklerinin ve farmasötik olarak kabul edilebilir tuzlarının tüm amorf formlarını kapsar.

30 Terapötik kullanım için, buluş konusu bileşiğin etken maddelerinin tuzları fizyolojik olarak kabul edilebilir olacaktır, yani fizyolojik olarak kabul edilebilir bir asitten veya bazdan türetilen tuzlar olacaktır. Ancak fizyolojik olarak kabul edilebilir olmayan asitlerin veya bazların

tuzlar da örneğin fizyolojik olarak kabul edilebilir bir bileşiğin hazırlanmasında veya saflaştırılmasında kullanıma sahiptir. Fizyolojik olarak kabul edilebilir bir asitten veya bazdan türetilip türetilmediği dikkate alınmaksızın tüm tuzlar
5 mevcut buluşun kapsamına girer.

Son olarak, buradaki bileşimlerin buluş konusu bileşikleri iyonlaşmamış ve ayrıca zwitteriyonik formda ve hidratlarda olduğu gibi stokiometrik miktarlarda su ile kombinasyon
10 halinde içerdiği anlaşılmaktadır.

Buluş konusu bileşiğin ve farmasötik olarak kabul edilebilir tuzların tüm enansiyomerleri, diastereomerleri ve rasemik karışımları, totomerleri, polimorfları ve psödopolimorfların
15 mevcut buluşun kapsamına girdiği dikkate alınmalıdır. Bu tip enansiyomerler ve diastereomerlerden oluşan tüm karışımlar da mevcut buluşun kapsamındadır.

Buluş konusu bileşik kiral merkezlere, örneğin kiral karbon veya fosfor atomlarına sahiptir. Rasemik karışımlar iyi bilinen tekniklerle, örneğin optik olarak aktif ek maddeler, örneğin asitler veya bazlar ile oluşturulan diastereomerik tuzların ayrılması ve akabinde tekrar optik olarak aktif maddelere dönüştürülmesi yoluyla esasen optik olarak saf ayrı
20 izomerlerine ayrılır. Çoğu durumda, arzu edilen optik izomer, arzu edilen başlangıç materyalinin uygun stereoizomeri ile başlamak suretiyle stereospesifik reaksiyonlarla sentezlenir.

Burada kullanılan stereokimyasal tanımlar ve dönüşümler genel olarak S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical
30 Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York ve Eliel, E. ve Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York referanslı yayınlara uygundur. Birçok organik bileşik optik olarak aktif formda bulunur, yani
35 düzlemsel polarize ışığın düzlemini döndürme becerisine

sahiptir. Optik olarak aktif bir bileşik tarif edilirken, molekülün kiral merkez (merkezler) etrafında mutlak konfigürasyonunu göstermek için D ve L ya da R ve S ön ekleri kullanılır. Bileşik tarafından düzlemsel polarize ışığın dönme işaretini göstermek için d ve l, D ve L veya (+) ve (-) ön ekleri kullanılır, S, (-) veya l ön ekleri bileşiğin sola çeviren nitelikte olduğunu gösterir, R, (+) veya d ön ekli bir bileşik ise sağa çeviren niteliktedir. Belirli bir kimyasal yapı için bu stereoizomerler birbirlerinin ayna görüntüleri olmaları dışında özdeşdir. Spesifik bir stereoizomer ayrıca bir enansiyomer olarak adlandırılabilir ve bu tip izomerlerin bir karışımı çoğu kez bir enansiyomerik karışım olarak anılır. Bir kimyasal reaksiyonda veya proseste herhangi bir stereoseleksiyon veya stereospesifisitenin bulunmadığı durumlarda ortaya çıkabileceği üzere, enansiyomerlerin 50:50'lik bir karışımı bir rasemik karışım veya bir rasemat olarak adlandırılır. "Rasemik karışım" ve "rasemat" terimleri, iki enansiyomerik türün optik aktiviteden yoksun eşmolar bir karışımını ifade eder.

Buluş konusu bileşikler ayrıca belirli durumlarda totomerik izomerler olarak bulunabilir. Bu bağlamda sadece bir delokalize rezonans yapısı gösterilebilir, ancak böylesi tüm formlar buluşun kapsamına girer. Örneğin pürin, pirimidin, imidazol, guanidin, amidin ve tetrazol sistemleri için en-amin totomerleri mevcut olabilir ve bunların tüm olası totomerik formları buluşun kapsamındadır.

Burada verilen herhangi bir formülün veya yapının ayrıca bileşiklerin işaretli formları ve ayrıca izotopik olarak işaretli formları temsil etmesi amaçlanır. İzotopik olarak işaretli bileşikler, bir veya daha fazla atomun seçilen bir atom kütesine veya kütle numarasına sahip bir atom ile ikame edilmesi durumunda burada verilen formüllerle gösterilen yapılara sahiptir. Burada tarif edilen bileşiklere dahil

edilebilecek izotopların örnekleri, hidrojen, karbon, azot, oksijen, fosfor, flor ve klor izotopları, örneğin bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla ^2H (döteryum, D), ^3H (trityum), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl ve ^{125}I izotopları bunları kapsar.

5 Burada izotopik olarak işaretli çeşitli bileşikler, örneğin ^3H , ^{13}C ve ^{14}C gibi radyoaktif izotopların dahil edildiği bileşikler açıklanır. İzotopik olarak işaretli bu tip bileşikler metabolizma çalışmaları, reaksiyon kinetik çalışmaları, saptama veya görüntüleme teknikleri, örneğin pozitron emisyon
10 tomografisi (PET) veya bilgisayarlı tek foton emisyon tomografisi (SPECT), mesela ilaç veya substrat doku dağılım analizlerinde veya hastaların radyoaktif tedavisinde faydalı olabilir.

15 Tarifname ayrıca bir karbon atomuna bağlı 1 ila n hidrojen atomunun (burada n moleküldeki hidrojen atomlarının sayıları) döteryum ile ikame edildiği buluş konusu bileşiklerini kapsar. Bu tip bileşikler metabolizmaya karşı artmış direnç sergiler ve dolayısıyla bir memeliye, özellikle bir insana verildiğinde
20 herhangi bir Formül IV bileşiğinin yarım ömrünü uzatmak için faydalıdır. Bkz. örneğin Foster, "Deuterium Isotope Effects in Studies of Drug Metabolism", Trends Pharmacol. Sci. 5(12):524-527 (1984). Bu tip bileşikler ilgili alanda iyi bilinen yöntemlerle, örneğin bir veya daha fazla hidrojen atomu
25 döteryum ile ikame edilmiş olan başlangıç materyalleri kullanılarak sentezlenir.

Burada tarif edilen döteryum işaretli veya süstitüe terapötik bileşikler, dağılım, metabolizma ve ekskresyon (ADME) ile
30 ilgili iyileştirilmiş DMPK (ilaç metabolizması ve farmakokinetikler) özelliklerine sahip olabilir. Döteryum gibi daha ağır izotoplarla yapılan süstitüsyonlar, daha yüksek metabolik stabiliteden kaynaklanan artmış in vivo yarı ömür, azalmış dozaj gereksinimleri ve/veya terapötik indekste
35 iyileşme gibi belirli avantajlar sağlayabilir. ^{18}F işaretli bir

bileşik PET veya SPECT çalışmaları için faydalı olabilir. Burada açıklanan izotopik olarak işaretli bileşikler ve bunların öncül ilaçları genel olarak aşağıda verilen şemalarda ya da örnekler ve preparatlarda açıklanan prosedürlere göre izotopik olarak işaretlenmemiş bir reaktifin kolayca temin edilebilen izotopik olarak işaretlenmiş bir reaktif ile süstitüe edilmesi yoluyla hazırlanabilir. Bu bağlamda döteryumun Formül IV bileşiğinde bir süstitüent olarak kabul edildiği anlaşılmalıdır.

10

Böylesi daha ağır bir izotopun, özellikle döteryumun konsantrasyonu bir izotopik zenginleştirme faktörü ile tanımlanabilir. Burada açıklanan bileşiklerde spesifik olarak belirli bir izotop olduğu belirtilmeyen herhangi bir atomun, bu atomun kararlı herhangi bir izotopunu temsil etmesi amaçlanılır. Aksi belirtilmedikçe, bir pozisyonun spesifik olarak "H" veya "hidrojen" şeklinde belirtildiği durumlarda, pozisyonun hidrojeni doğal bolluktaki izotopik bileşiminde içerdiği anlaşılmalıdır. Dolayısıyla, burada açıklanan bileşiklerde spesifik olarak döteryum (D) şeklinde belirtilen herhangi bir atomun döteryumu temsil etmesi amaçlanılır.

20

Dalgalar çizgiler,

~~~~~

25

bitişik alt yapılar, gruplar, fonksiyonel gruplar veya atomlara yönelik kovalent bağ bağlantı yerlerini gösterir.

Buluş konusu bileşik ilgili alanın uzmanları tarafından bilinen yöntemlerle hazırlanabilir. Örneğin buluş konusu bileşik, U.S. Patent No. 8,008,264 ve U.S. Başvuru Yayın No. US 2012/0027752'de tarif edilen yöntemlere göre hazırlanabilir.

30

35

### III. FARMASÖTİK FORMÜLASYONLAR

Buluş konusu bileşik, mutlak uygulamaya göre seçilecek konvansiyonel taşıyıcılar ve eksipiyenler ile birlikte formüle edilir. Tabletler eksipiyenler, glidantlar, dolgu maddeleri, bağlayıcılar ve benzerlerini içerecektir. Sulu formülasyonlar steril formda hazırlanır ve oral uygulama durumunda başka bir şekilde uygulanması arzu edildiğinde genel olarak izotonik olacaktır. Tüm formülasyonlar isteğe bağlı olarak "Handbook of Pharmaceutical Excipients" (1986) referanslı yayında tarif edilenler gibi eksipiyenler içerecektir. Eksipiyenler askorbik asit ve başka antioksidanlar, kelatlayıcılar, örneğin EDTA, karbonhidratlar, örneğin dekstran, hidroksialkilselüloz, hidroksialkilmetilselüloz, stearik asit ve benzerlerini kapsar. Formülasyonların pH seviyesi yaklaşık 3 ile yaklaşık 11 aralığında değişir, ancak yaygın olarak yaklaşık 7 ile 10'dur. Bazı yapılanmalarda, formülasyonların pH seviyesi yaklaşık 2 ile yaklaşık 5 aralığında değişir, ancak yaygın olarak yaklaşık 3 ile yaklaşık 4'tür. Bazı yapılanmalarda, formülasyonların pH seviyesi yaklaşık 2 ile yaklaşık 10 aralığında değişir, ancak yaygın olarak yaklaşık 3.5 ile yaklaşık 8.5'tir.

Etken maddelerin tek başına verilmesi mümkündür, ancak farmasötik formülasyonlar şeklinde sunulması tercih edilebilir. Veterinerlik ve insan kullanımlarına yönelik buluş konusu formülasyonlar, yukarıda tanımlandığı üzere en az bir etken maddeyi, kabul edilebilir bir veya daha fazla taşıyıcı ve isteğe bağlı olarak diğer terapötik bileşenler, özellikle burada ele alınan ilave terapötik bileşenler ile birlikte içerir. Taşıyıcı (taşıyıcılar), formülasyonun diğer terkip maddeleri ile uyumlu olması ve alıcı için fizyolojik olarak zararsız olması bakımından "kabul edilebilir" olmalıdır.

Formülasyonlar, yukarıdaki uygulama yolları için uygun olanları kapsar. Formülasyonlar uygun bir şekilde birim dozaj formu halinde sunulabilir ve eczacılık alanında layıkıyla bilinen metotlardan herhangi birine göre hazırlanabilir.

- 5 Teknikler ve formülasyonlar genel olarak Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, PA) referansları yayında bulunabilir. Bu tip yöntemler, etken maddenin bir veya daha fazla yardımcı terkip maddesinden oluşan bir taşıyıcı ile bir araya getirilmesi adını içerir.
- 10 Formülasyonlar genel olarak etken madde ile sıvı taşıyıcıları veya ince şekilde bölünmüş katı taşıyıcıları veya her ikisini tekdüze ve derinlemesine birleştirerek ve daha sonra gerekli görüldüğü takdirde elde edilen ürünü şekillendirerek hazırlanabilir.

15

Oral uygulama için uygun buluş konusu formülasyonlar, her biri etken maddenin önceden belirlenmiş bir miktarını toz veya granül, bir sıvı veya susuz sıvı içerisinde solüsyon veya süspansiyon ya da suda yağ tipi sıvı emülsiyon veya yağda su

20 tipi sıvı emülsiyon formunda içeren ayrı birimler halinde, mesela kapsüller, kaşeler veya tabletler halinde sunulabilir. Etken madde bir bolus, elektuar veya macun formunda da uygulanabilir.

- 25 Bir tablet, bir veya daha fazla yardımcı terkip maddesi ile birlikte basım veya döküm yöntemleri ile üretilir. Basılan tabletler, toz veya granül gibi bir serbest akışkan formundaki etken maddenin, uygun bir makine içerisinde, isteğe göre bir bağlayıcı, koruyucu, atıl seyreltici, yüzey aktif veya
- 30 dağıtıcı ile karışım halinde basılması yoluyla hazırlanabilir. Kalıplanmış tabletler, bir atıl sıvı seyreltici ile nemlendirilmiş toz halindeki etken maddeyi içeren bir karışımın uygun bir makinede kalıplanması yoluyla hazırlanabilir. Tabletler isteğe göre kaplanmış veya çentikli

olabilir ve isteğe bağı olarak içerdği etken maddenin yavaş veya kontrollü salınmasını sağlayacak şekilde formüle edilir.

Göz veya ağız ve cilt gibi diğer harici dokulardaki enfeksiyonlar için, formülasyonlar tercihen etken maddeyi (maddeleri) in örneğin %0.075 ila %20 (a/a) (etken maddeyi (maddeleri) %0.1 ila %20 aralığında %0.1'lik (a/a), örneğin %0.6'lik (a/a), %0.7'lik (a/a) vs. artışlarla içerir), tercihen %0.2 ila %15 (a/a) ve en çok tercih edildiği haliyle %0.5 ila %10'luk (a/a) bir miktarda içeren bir topikal merhem veya krem formunda uygulanır. Bir merhem içerisinde formüle edildiklerinde etken maddeler parafinik veya suyla karışabilen bir merhem bazı ile birlikte kullanılabilir. Alternatif olarak etken maddeler bir krem içerisinde suda yağ tipi bir krem bazı ile birlikte formüle edilebilir.

Arzu edildiği takdirde, krem bazının sulu fazı örneğin en az %30 (a/a) oranında bir polihidrik alkol, yani iki veya daha fazla hidroksil grubuna sahip bir alkol, örneğin propilen glikol, bütan 1,3-diol, mannitol, sorbitol, gliserol ve polietilen glikol (PEG 400 dahil) ve bunların karışımlarını içerebilir. Topikal formülasyonlar, arzu edilebileceği üzere, ciltte veya etkilenmiş diğer alanlarda etken maddenin Emilimini veya penetrasyonunu artıran bir bileşik içerebilir. Bu tip dermal penetrasyon artırımların örnekleri dimetil sülfoksit ve ilgili analogları kapsar.

Buluş konusu emülsiyonların yağlı fazı bilinen bir şekilde bilinen terkip maddelerinden oluşabilir. Faz sadece bir emülgatör (emülgan olarak da bilinir) içerebilir, ancak arzu edilebileceği üzere en az bir emülgatör ile bir kat yağ ve/veya bir sulu yağın bir karışımını içerir. Tercihen, bir stabilizör olarak işlev gören bir lipofilik emülgatör ile birlikte bir hidrofilik emülgatör dahil edilir. Ayrıca hem bir sulu yağın hem de bir kat yağın dahil edilmesi tercih edilir.

Stabilizör (stabilizörler) ile birlikte veya bunlar olmaksızın, emülgatör (emülgatörler) birlikte emülgatör vaksı meydana getirir, vaks ise sıvı yağ ve katı yağ ile birlikte krem formülasyonlarındaki yağlı dağılımı oluşturan emülgatör merhem bazında meydana getirir.

Buluş konusu formülasyonda kullanılmaya uygun emülganlar ve emülsiyon stabilizörleri Tween® 60, Span® 80, ketostearil alkol, benzil alkol, miristil alkol, gliseril mono-stearat ve sodyum lauril sülfatı kapsar. Buluş konusu formülasyonda kullanılmaya uygun diğer emülganlar ve emülsiyon stabilizörleri Tween® 80'i içerir.

Formülasyon için uygun sıvı yağlar ve katı yağların seçimi, arzu edilen kozmetik özelliklerin elde edilmesi esasına dayanır. Krem tercihen tüplerden veya diğer kaplardan sıvıya dökmek için uygun tutarlılığa sahip olan, yağsız olmayan, leke bırakmayan ve yıkanabilir bir üründür. Düz veya dallanmış zincirli, monobazik veya dibazik alkil esterleri, örneğin di-izoadipat, izosetil stearat, hindistan cevizi yağ asitlerinin propilen glikol diesteri, izopropil miristat, desil oleat, izopropil palmitat, bütül stearat, 2-etilheksil palmitat veya Crodamol CAP olarak bilinen dallanmış zincirli esterlerin bir karışımı kullanılabilir, bunlardan son üçü tercih edilen esterlerdir. Bunlar, gerekli özelliklere bağlı olarak tek başına veya kombinasyon halinde kullanılabilir. Alternatif olarak yüksek erime noktalı lipitler, örneğin beyaz yumuşak parafin ve/veya sıvı parafin veya diğer mineral yağlar kullanılabilir.

Buluş konusu farmasötik formülasyonlar, farmasötik olarak kabul edilebilir bir veya daha fazla taşıyıcı veya ekspiyan ve isteğe bağlı olarak diğer terapötik ajanlar ile birlikte buluş konusu bir kombinasyonu içerir. Etken madde içeren farmasötik formülasyonlar, hedeflenen uygulama yöntemi için

uygun herhangi bir formda bulunabilir. Oral kullanıma için  
örneğin tabletler, troşeler, pastiller, sulu veya yağlı  
süspansiyonlar, dağılabilir tozlar veya granüller,  
emülsiyonlar, sert veya yumuşak kapsüller, şuruplar veya  
5 eliksirler hazırlanabilir. Oral kullanıma yönelik bileşimler,  
farmasötik bileşimlerin üretimi için ilgili alanda bilinen  
herhangi bir yöntemle göre hazırlanabilir ve bu tip bileşimler  
yenebilir bir preparat sağlamak amacıyla tatlandırıcılar,  
aroma katıcılar, renklendiriciler ve koruyucular da dahil  
10 olmak üzere bir veya daha fazla madde içerebilir. Etken  
maddeyi tablet üretimi için uygun toksik olmayan farmasötik  
olarak kabul edilebilir ekşiyan ile birlikte içeren  
tabletler kabul edilebilir niteliktedir. Bu ekşiyanlar  
örneğin kalsiyum veya sodyum karbonat, laktoz, kalsiyum veya  
15 sodyum fosfat gibi atıl seyrelticiler; mısır nişastas veya  
aljinik asit gibi granülleştiriciler ve dağıtıcılar; nişasta,  
jelatin veya akasya gibi bağlayıcılar ve magnezyum stearat,  
stearik asit veya talk gibi kaydırıcılar olabilir. Tabletler  
kaplanmamış olabilir veya gastrointestinal sistemde dağılmay  
20 ve emilimi geciktirmek ve böylece daha uzun bir süre boyunca  
sürekli bir etki sağlamak için mikrokapsülleme gibi bilinen  
tekniklerle kaplanabilir. Örneğin gliseril monostearat veya  
gliseril distearat gibi salın süresini geciktirici bir  
materyal tek başına veya bir vaks ile birlikte kullanılabilir.

25

Oral kullanıma yönelik formülasyonlar ayrıca etken maddeyi  
kalsiyum fosfat veya kaolin gibi bir atıl katı seyreltici ile  
karşılm halinde içeren sert jelatin kapsüller veya etken  
maddeyi su veya bir yağ ortamı, örneğin yerfıstığı yağı, sıvı  
30 parafin veya zeytinyağı ile karşılm halinde içeren yumuşak  
jelatin kapsüller şeklinde sunulabilir.

Buluş konusu sulu süspansiyonlar etken maddeleri sulu  
süspansiyon üretimi için uygun ekşiyanlar ile karşılm  
35 halinde içerir. Bu tip ekşiyanlar sodyum



karboksimetilselüloz, metilselüloz, hidroksipropil metilselüloz, sodyum aljinat, polivinilpirrolidon, kitre zımkı ve akasya zımkı gibi bir süspansiyon yapılcıy ve doğal yoldan meydana gelen bir fosfatid (örneğin lesitin), bir alkilen oksit ile bir yağ asidinin kondenzasyon ürünü (örneğin polioksietilen stearat), etilen oksit ile bir uzun zincirli alifatik alkolün kondenzasyon ürünü (örneğin heptadekaetilenoksiketanol), etilen oksit ile bir yağ asidinden ve bir heksitol anhidrürden türetilen bir kısmi esterin kondenzasyon ürünü (örneğin polioksietilen sorbitan monooleat) gibi dağıtıcı veya sılatıcılar kapsar. Süspansiyon yapıcıların sınırlanmadık olmayan diğer örnekleri Captizol® (sülfobütil eter betasiklodekstrin, SBE-β-CD) ürününü kapsar. Sulu süspansiyon ayrıca bir veya daha fazla koruyucu, mesela etil veya n-propil p-hidroksi-benzoat, bir veya daha fazla renklendirici, bir veya daha fazla aroma katıcı ve bir veya daha fazla tatlandırıcı, mesela sakaroz veya sakarin içerebilir.

Yağ süspansiyonları etken maddenin bir bitkisel yağ, örneğin yerfilistikli yağ, zeytinyağı, susam yağı veya hindistancevizi yağında ya da sıvı parafin gibi bir mineral yağda süspansiyon haline getirilmesi yoluyla formüle edilebilir. Oral süspansiyonlar balmumu, sert parafin veya setil alkol gibi bir kıvam artırıcı içerebilir. Bir yenabilir oral preparatın elde edilmesi amacıyla formülasyonlara yukarıda belirtilenlere benzer tatlandırıcı maddeler ve aroma katıcı maddeler ilave edilebilir. Bu bileşimler askorbik asit gibi bir antioksidan ilave edilerek korunabilir.

30

Bir sulu süspansiyonun su ilave edilerek hazırlanması için elverişli buluş konusu dağılabilen tozlar ve granüller sayesinde etken maddenin bir dispersiyon yapıcılı veya sılatıcılı, süspansiyon yapıcılı ve bir veya daha fazla koruyucu ile karışım halinde sağlanabilir. Uygun dispersiyon yapıcılı veya sılatıcılı

35

ve süspansiyon yapıları örnekleri yukarıda verilmiştir. İlave ekşiپیانلار، örneğin tatlandırıcılar، aroma katkılar ve renklendiriciler de ilave edilebilir.

5 Buluş konusu farmasötik bileşimler ayrıca suda yağ emülsiyonlar formunda bulunabilir. Burada yağ fazı olarak bir bitkisel yağ، örneğin zeytinyağı veya yerfıstığı yağı ya da bir mineral yağ، örneğin sıvı parafin veya bunların bir karışımı kullanılabilir. Uygun emülgatörler doğal yoldan  
10 meydana gelen zamlar، örneğin akasya zamlı veya kitre zamları؛ doğal yoldan meydana gelen fosfatitleri، örneğin soya fasulyesi lesitinini، yağ asitlerinden ve heksitol anhidrürlerden türetilen esterleri veya kısmi esterleri،  
15 örneğin sorbitan monooleat ve bu kısmi esterlerin etilen oksit ile kondenzasyon ürünlerini، örneğin polioksietilen sorbitan monooleat kapsar. Emülsiyon ayrıca tatlandırıcı ve aroma katkısı ihtiva edebilir. Şuruplar ve eliksirler gliserol، sorbitol veya sakaroz gibi tatlandırıcılar ile birlikte formüle edilebilir. Bu tip formülasyonlar ayrıca bir  
20 yatıştırıcı، bir koruyucu، bir aroma katkısı veya bir renklendirici ihtiva edebilir.

Buluş konusu farmasötik bileşimler bir enjektde edilebilir steril preparat، örneğin bir enjektde edilebilir steril sulu  
25 veya yağlı süspansiyon formunda olabilir. Bu süspansiyon ilgili alanın bilinen tekniklerine göre yukarıda belirtilen uygun dispersiyon yapıları veya emülsiyon yapıları ve süspansiyon yapıları kullanılması yoluyla formüle edilebilir. Steril enjektde edilebilir preparat ayrıca bir  
30 toksik olmayan parenteral olarak kabul edilebilir seyreltici veya solvent içinde bir steril enjektde edilebilir solüsyon veya süspansiyon، örneğin 1,3-bütan-diol içinde bir solüsyon olabilir ya da bir liyofilize toz şeklinde hazırlanabilir. Steril enjektde edilebilir preparat ayrıca parenteral olarak  
35 kabul edilebilir bir seyreltici veya solvent içinde bir steril

- enjekte edilebilir solüsyon veya süspansiyon olabilir. Kullanılabilecek uygun araçlar ve solventler su, Ringer solüsyonu ve izotonik sodyum klorür solüsyonudur. Bunların yanı sıra, bir solvent veya süspansiyon yapıldı ortam olarak steril sabit yağlar da konvansiyonel şekilde kullanılabilir. Bu amaçla, sentetik mono veya di-gliseritler de dahil olmak üzere herhangi bir karma sabit yağ da kullanılabilir. Bunlara ek olarak, enjekte edilebilir preparatlar hazırlanırken benzer şekilde oleik asit gibi yağ asitleri de kullanılabilir.
- 5 10 Kullanılabilecek kabul edilebilir araçlar ve solventler arasında su, Ringer solüsyonu, izotonik sodyum klorür solüsyonu, hipertonic sodyum klorür solüsyonu ve hipotonik sodyum klorür solüsyonu yer alır.
- 15 Bir tekli dozaj formunu üretmek üzere taşıyıcı materyal ile birleştirilebilecek etken madde miktarı, tedavi edilen konakçıya ve belirli uygulama moduna bağlı olarak değişecektir. Örneğin insanlarda oral uygulamaya yönelik bir zaman salınım formülasyon, toplam bileşimin yaklaşık %5 ila
- 20 yaklaşık %95'i (ağırlık:ağırlık) aralığında değişebilen uygun ve elverişli bir taşıyıcı materyal miktarı ile birlikte terkip edilmiş halde yaklaşık olarak 1 ila 1000 mg etken madde içerebilir. Farmasötik bileşim uygulama için kolayca ölçülebilir miktarlar sağlayacak şekilde hazırlanabilir.
- 25 Örneğin intravenöz infüzyona yönelik bir sulu solüsyon, uygun bir hacmin yaklaşık 30 mL/saatlik bir hızda infüzyonunu sağlayabilecek şekilde bir mililitre solüsyonda yaklaşık 3 ila 500 µg etken madde içerebilir.
- 30 Göze topikal uygulama için uygun formülasyonlar ayrıca etken maddenin uygun bir taşıyıcı içinde, özellikle etken madde için bir sulu solvent içinde çözülmesi veya süspansiyon haline getirilmesi yoluyla elde edilen göz damlaları da kapsar. Bu tip formülasyonlarda etken madde tercihen %0.5 ila %20'lik,

avantajlı bir şekilde %0.5 ila %10'luk ve özellikle yaklaşık %1.5'lik (a/a) bir konsantrasyonda bulunur.

Ağızda topikal uygulama için uygun formülasyonlar, etken maddeyi bir aromalı baz, genellikle sakaroz ve akasya veya kitre içerisinde ihtiva eden pastilleri; etken maddeyi bir atıl baz, örneğin jelatin ve gliserin veya sakaroz ve akasya içerisinde ihtiva eden pastilleri ve etken maddeyi uygun bir sıvı taşıyıcı içerisinde ihtiva eden gargaralar kapsar.

10

Rektal uygulamaya yönelik formülasyonlar, örneğin kakao yağı veya bir salisilat içeren uygun bir baz ile bir fitil formunda sunulabilir.

15 İntrapulmoner veya nazal uygulama için uygun formülasyonlar, alveol keselerine ulaşmasını sağlamak üzere nazal geçitten hızlı inhalasyon yoluyla veya ağızdan inhalasyon yoluyla uygulanan örneğin 0.1 ila 500 mikron aralığında bir partikül boyutuna (örneğin 0.5, 1, 30, 35 vs.) sahiptir. Uygun  
20 formülasyonlar etken maddenin sulu veya yağlı solüsyonları kapsar. Aerosol veya kuru toz uygulaması için uygun formülasyonlar konvansiyonel yöntemlere göre hazırlanabilir ve diğer terapötik ajanlar, örneğin aşağıda tarif edildiği üzere bugüne kadar of *Filoviridae* enfeksiyonlarının tedavisinde veya  
25 profilaksisinde kullanılan bileşikler ile birlikte uygulanabilir.

Vajinal uygulama için uygun formülasyonlar, etken maddenin yanı sıra ilgili alanda uygun olduğu bilinen taşıyıcılar  
30 içeren peserler, tamponlar, kremler, jeller, macunlar, köpükler veya sprey formülasyonları kapsar.

Parenteral uygulama için uygun formülasyonlar, formülasyonun alıcının kanı ile izotonikliğini ayarlayan antioksidanlar,  
35 tamponlar, bakteriyostatik maddeler ve çözücüler gibi ilave

maddeler ihtiva edebilen sulu ve susuz steril enjeksiyon solüsyonlar ve süspansiyon yapıcı maddeler ve kıvam artırıcı maddeler ihtiva edebilen sulu ve susuz steril süspansiyonlar içerir.

5

Formülasyonlar tek dozluk veya çok dozluk kaplar, örneğin kapalı ampullerin veya flakonların içinde sunulur ve kullanımdan hemen önce sadece enjeksiyonluk su gibi bir steril sıvı taşıyıcıların eklenmesini gerektiren dondurularak kurutulmuş (liyofilize) bir formda saklanabilir. Ekstemporane enjeksiyon solüsyonlar ve süspansiyonlar, yukarıda tarif edilen tipteki steril tozlardan, granüllerden ve tabletlerden hazırlanır. Tercih edilen birim dozaj formülasyonlar, yukarıda belirtildiği üzere etken maddenin bir günlük dozunu veya birim günlük alt dozunu veya bunların uygun bir fraksiyonunu içeren formülasyonlardır.

Buluş konusu formülasyonların, yukarıda özellikle belirtilen terkip maddelerine ek olarak, ilgili alanda formülasyonun tipine göre konvansiyonel olarak kullanılan başka maddeleri de içerebileceği, mesela oral uygulamaya yönelik formülasyonların aroma katkıları ihtiva edebileceği anlaşılmaktadır.

Buluş ilaveten yukarıda tanımlanan en az bir etken maddeyi bir veterinerlik taşıyıcısıyla birlikte içeren veterinerlik bileşimleri sağlar.

Veterinerlik taşıyıcıların bileşimin uygulanması için faydalı materyallerdir ve aksi takdirde atıl veya veterinerlik alanında kabul edilebilir olan ve etken madde ile uyumlu olan katı, sıvı veya gaz halinde materyaller olabilir. Bu veterinerlik bileşimleri oral yoldan, parenteral yoldan veya arzu edilen herhangi bir diğer yoldan uygulanabilir.

Buluş konusu bileşik, daha seyrek doz uygulaması sağlamak veya belirli bir etken maddenin farmakokinetik veya toksisite profilini iyileştirmek amacıyla etken madde salınımının kontrol edildiği ve düzenlendiği, etken madde olarak buluş konusu bileşiği içeren kontrollü salımlı farmasötik formülasyonlar ("kontrollü salımlı formülasyonlar") sağlamak için kullanılır.

#### IV. UYGULAMA YOLLARI

Buluş konusu bileşik (ilerleyen kısımlarda etken maddeler olarak anılacaktır), tedavi edilecek duruma uygun herhangi bir yoldan verilebilir. Uygun yollar oral, rektal, nazal, pulmoner, topikal (bukkal ve sublingual dahil), vajinal ve parenteral (subkütanöz, intramusküler, intravenöz, intradermal, intratekal ve epidural dahil) ve benzerlerini kapsar. Tercih edilen yolun örneğinin aldığı durumuna bağlı olarak değişebileceği takdir edilecektir. Buluş konusu bileşiğin bir avantajı, oral biyoyararlanıma sahip olması ve oral yoldan dozlanabilmesidir.

Buluş konusu bileşik, *Filoviridae* enfeksiyonundan mustarip insanlara temas etme ihtimali bulunan veya halihazırda *Filoviridae* enfeksiyonundan mustarip olan bir insana herhangi bir zamanda uygulanabilir. Bazı yapılanmalarda buluş konusu bileşik, *Filoviridae* enfeksiyonundan mustarip insanlara temas eden insanlara profilaktik olarak uygulanabilir. Bazı yapılanmalarda, buluş konusu bileşiğin uygulaması, *Filoviridae* enfeksiyonu için pozitif sonuç veren, ancak *Filoviridae* enfeksiyonunun semptomları henüz göstermemiş olan insanlara yönelik olabilir. Bazı yapılanmalarda, buluş konusu bileşiğin uygulaması, *Filoviridae* enfeksiyonunun semptomları sergilemeye başlayan insanlara yönelik olabilir.

Etken maddenin etkili dozu en azından tedavi edilen durumun doğasına, toksisiteye, bileşiğin profilaktik olarak (daha

düşük dozlar) veya aktif bir virüs enfeksiyonuna karşı kullanılmıyıp kullanılmadığına, uygulama yöntemine ve farmasötik formülasyona bağlıdır ve klinisyen tarafından konvansiyonel doz artırım çalışmalarıyla belirlenecektir. Yaklaşık 0.0001  
5 ila yaklaşık 100 mg/kg beden ağırlığı/gün; tipik olarak yaklaşık 0.01 ila yaklaşık 10 mg/kg beden ağırlığı/gün; daha tipik olarak yaklaşık 0.01 ila yaklaşık 5 mg/kg beden ağırlığı/gün; en tipik haliyle yaklaşık 0.05 ila yaklaşık 0.5 mg/kg beden ağırlığı/gün olması beklenebilir. Örneğin yaklaşık  
10 70 kg'lık beden ağırlığına sahip bir erişkin insan için günlük aday doz 1 mg ila 1000 mg ve tercihen 5 mg ila 500 mg aralığında değişecektir ve tekli veya çoklu doz formunda bulunabilir.

15 *Filoviridae* enfeksiyonunun tedavisine yönelik buluş konusu bir bileşiğin etkili dozu, dozun profilaktik olarak veya halihazırda *Filoviridae* enfeksiyonundan mustarip bir insanı tedavi etmek için kullanılmıyıp kullanılmayacağına bağlı olabilir. Doz ayrıca *Filoviridae* enfeksiyonundan mustarip  
20 insanın semptomları henüz sergilememesine veya *Filoviridae* enfeksiyonunun semptomları halihazırda sergilemesine bağlı olarak değişebilir. *Filoviridae* enfeksiyonu için pozitif sonuç veren insanlar ve *Filoviridae* enfeksiyonunun semptomları sergileyen insanlar tedavi etmek için, profilaktik tedavi  
25 gören insanlara kıyasla daha yüksek dozlara ihtiyaç duyulabilir.

Buluş konusu bileşiklerin uygulanması için uygun herhangi bir süre öngörülür. Örneğin uygulama, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,  
30 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 veya 90 gün de dahil olmak üzere 1 gün ila 100 gün sürebilir. Uygulama ayrıca 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 veya 14 hafta da dahil olmak üzere 1 hafta ila 15 hafta sürebilir. Daha uzun uygulama süreleri de öngörülür. Uygulama süresi bileşiğin profilaktik olarak veya  
35 bir *Filoviridae* enfeksiyonundan mustarip bir insanı tedavi

etmek için verilip verilmediğine bağlı olabilir. Örneğin bir profilaktik uygulama, insanın bir *Filoviridae* enfeksiyonundan mustarip diğer insanlarla düzenli temas halinde bulunduğu süre boyunca ve bir *Filoviridae* enfeksiyonundan mustarip bir insana son temastan sonra uygun bir süre boyunca sürdürülebilir. Halihazırda bir *Filoviridae* enfeksiyonundan mustarip insanlar için uygulama süresi, hastanın tedavi edilmesi için gerekli herhangi bir süre ve *Filoviridae* enfeksiyonunun nüksetmemesini sağlamak üzere *Filoviridae* enfeksiyonu için negatif sonuç veren bir testten sonra uygun bir süre olabilir.

## V. KOMBİNASYON TEDAVİSİ

Buluş konusu bileşimler ayrıca diğer etken maddelerle kombinasyon halinde kullanılabilir. *Filoviridae* virüs enfeksiyonlarının tedavisi için, tercih edildiği haliyle, diğer aktif terapötik ajan, *Filoviridae* virüs enfeksiyonlarına, özellikle Marburg virüsü, Ebola virüsü ve Cueva virüsü enfeksiyonlarına karşı aktiftir. Bu diğer aktif terapötik ajanların sınırlı olmayan örnekleri ribavirin, palivizumab, motavizumab, RSV-IGIV (RespiGam®), MEDI-557, A-60444, MDT-637, BMS-433771, amiodaron, dronedaron, verapamil, Ebola Nekahet Plazması (ECP), TKM-100201, BCX4430 ((2S,3S,4R,5R)-2-(4-amino-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)-5-(hidroksimetil)pirrolidin-3,4-diol), favipiravir (T-705 veya Avigan olarak da bilinir), T-705 monofosfat, T-705 difosfat, T-705 trifosfat, FGI-106 (1-N,7-N-bis[3-(dimetilamino)propil]-3,9-dimetilkinolino[8,7-h]kinolon-1,7-diamin), JK-05, TKM-Ebola, ZMapp, rNAPc2, VRC-EBOADC076-00-VP, OS-2966, MVA-BN filo, brinsidofovir, Vaxart adenovirüs vektörü 5 esaslı ebola aşısı, Ad26-ZEBOV, FiloVax aşısı, GOVX-E301, GOVX-E302, ebola virüsü giriş inhibitörleri (NPC1 inhibitörleri) ve rVSV-EBOV ve bunların karşılımlarıdır. Buluş konusu bileşikler ve bileşimler ayrıca spesifik RNA sekanslarıyla baz çifti dupleksleri oluşturarak translasyonel süreçlere müdahale etmek



üzere tasarlanan sentetik antisens oligonükleotit analogları olan fosforamidat morfolino oligomerleri (PMO'lar) ile kombinasyon halinde kullanılabilir. PMO'ların örnekleri AVI-7287, AVI-7288, AVI-7537, AVI-7539, AVI-6002 ve AVI-6003'ü kapsar. Buluş konusu bileşikler ve bileşimler ayrıca parenteral sıvılar (dekstroz salin ve Ringer laktatı dahil) ve besin, antibiyotik (metronidazol ve sefalosporin antibiyotikleri, örneğin seftriakson ve sefuroksim dahil) ve/veya antifungal profilaksi, ateş ve ağrı ilaçları, antiemetik (örneğin metoklopramid) ve/veya antidiyareik ajanlar, vitamin ve mineral takviyeleri (K Vitamini ve çinko sülfat dahil), anti-enflamatuar ajanlar (örneğin ibuprofen), ağrı ilaçları ve hasta popülasyonunda diğer yaygın hastalıklara yönelik ilaçlar, örneğin antimalaryal ajanlar (artemeter ve artesunat-lumefantrin kombinasyon tedavisi dahil), tifo (kinolon antibiyotikleri, örneğin siprofloksasin, makrolid antibiyotikleri, örneğin azitromisin, sefalosporin antibiyotikleri, örneğin seftriakson veya aminopenisilinler, örneğin ampisilin dahil) veya şigelloz da dahil olmak üzere Filoviridae virüs enfeksiyonlu hastalara sağlanan genel bakım ile birlikte kullanılmaya yöneliktir.

Ayrıca, buluş konusu herhangi bir bileşiğin bir hastaya eşzamanlı veya sıralı uygulama için bir birim doza formunda bir veya daha fazla ilave aktif terapötik ajan ile birleştirilmesi de mümkündür. Kombinasyon tedavisi eşzamanlı veya sıralı bir rejim olarak uygulanabilir. Kombinasyon sıralı olarak verildiğinde iki veya daha fazla uygulamada verilebilir.

30

Buluş konusu bir bileşiğin bir veya daha fazla başka aktif terapötik ajan ile birlikte uygulanması genel olarak buluş konusu bir bileşiğin ve bir veya daha fazla diğer aktif terapötik ajanın eşzamanlı veya sıralı uygulanması ifade eder, yani buluş konusu bileşiğin ve bir veya daha fazla diğer aktif

35

terapötik ajanın terapötik olarak etkili miktarlar hastanın vücudunda aynı anda bulunur.

Birlikte uygulama, buluş konusu bileşiklerin birim dozajların, bir veya daha fazla diğer aktif terapötik ajanın birim dozajları uygulanmadan önce veya uygulandıktan sonra uygulanması, örneğin buluş konusu bileşiklerin, bir veya daha fazla diğer aktif terapötik ajan uygulandıktan sonra saniyeler, dakikalar veya saatler içerisinde uygulanması içerir. Örneğin ilk önce buluş konusu bir bileşiğin bir birim dozu uygulanabilir, akabinde saniyeler veya dakikalar içerisinde bir veya daha fazla diğer aktif terapötik ajanın bir birim dozu uygulanır. Alternatif olarak, ilk önce bir veya daha fazla diğer terapötik ajanın bir birim dozu uygulanabilir, akabinde saniyeler veya dakikalar içerisinde buluş konusu bir bileşiğin bir birim dozu uygulanır. Bazı durumlarda, ilk önce buluş konusu bir bileşiğin bir birim dozunun verilmesi, akabinde saatler içerisinde (örneğin 1-12 saat) bir veya daha fazla diğer aktif terapötik ajanın bir birim dozunun verilmesi arzu edilebilir. Diğer durumlarda, ilk önce bir veya daha fazla diğer aktif terapötik ajanın bir birim dozunun verilmesi, akabinde saatler içerisinde (örneğin 1-12 saat) buluş konusu bir bileşiğin bir birim dozunun verilmesi arzu edilebilir.

25

Kombinasyon tedavisi "sinerji" ve "sinerjistik etki" sağlayabilir, yani birlikte kullanılan etken maddelerin etkisinin, bileşikler ayrı olarak kullanıldığında elde edilen etkilerin toplamından daha yüksek olması sağlayabilir. Bir sinerjistik etki, etken maddelerin (1) birlikte formüle edilmesi ve bir birleşik formülasyonda eşzamanlı olarak verilmesi veya uygulanması; (2) ayrı formülasyonlar halinde dönüşümlü veya paralel olarak uygulanması ya da (3) bazı başka rejimler yoluyla elde edilebilir. Dönüşümlü tedavi uygulandığında, bileşikler örneğin ayrı tabletlerde, haplarda

35

veya kapsüllerde sıralı olarak verildiğinde veya uygulandığında ya da ayrı şeklelerde farklı enjeksiyonlarla bir sinerjistik etki elde edilebilir. Genel olarak, dönüşümlü tedavi süresince her bir etken maddenin etkili bir dozajı sıralı olarak, yani seri olarak uygulanır, kombinasyon tedavisinde ise iki veya daha fazla etken maddenin etkili dozajları birlikte uygulanır. Bir sinerjistik anti-viral etki, kombinasyondaki her bir bileşiğin kestirilen saf katkısal etkilerinden daha yüksek bir antiviral etkiyi ifade eder.

10

Daha başka bir yapılanmada mevcut başvuru, bir hücrede *Filoviridae* polimerazın inhibe edilmesine yönelik yöntemler sağlar, bu yöntemler şunları içerir: buluş konusu bileşiğin veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu, solvatı ve/veya esterinin etkili bir miktarın bir Filovirüs ile enfekte bir hücreye temas ettirilmesi ve böylece *Filoviridae* polimerazın inhibe edilmesi.

15

Daha başka bir yapılanmada mevcut başvuru, bir hücrede *Filoviridae* polimerazın inhibe edilmesine yönelik yöntemler sağlar, bu yöntemler şunları içerir: buluş konusu bileşiğin veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu, solvatı ve/veya esterinin ve en az bir ilave aktif terapötik ajanın etkili bir miktarın Filovirüs ile enfekte bir hücreye temas ettirilmesi ve böylece *Filoviridae* polimerazın inhibe edilmesi.

20

25

Daha başka bir yapılanmada mevcut başvuru, bir hücrede *Filoviridae* polimerazın inhibe edilmesine yönelik yöntemler sağlar, bu yöntemler şunu içerir: buluş konusu bileşiğin veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu, solvatı ve/veya esterinin ve seçilen en az bir ilave aktif terapötik ajanın etkili bir miktarının *Filoviridae* virüsü ile enfekte bir hücreye temas ettirilmesi.

30

35

Daha başka bir yapılanmada mevcut başvuru, bir insanda *Filoviridae* virüs enfeksiyonunun tedavisini amaçlayan yöntemlerde kullanılmaya yönelik buluş konusu bileşiği sağlar, bu yöntemler şunu içerir: buluş konusu bileşiğin veya 5 farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunun terapötik olarak etkili bir miktarın hastaya verilmesi.

Daha başka bir yapılanmada mevcut başvuru, bir insanda *Filoviridae* virüs enfeksiyonunun tedavisini amaçlayan yöntemlerde kullanılmaya yönelik buluş konusu bileşiği sağlar, bu yöntemler şunları içerir: buluş konusu bileşiğin veya 10 farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunun ve en az bir ilave aktif terapötik ajanın terapötik olarak etkili bir miktarın hastaya verilmesi ve böylece *Filoviridae* 15 polimerazın inhibe edilmesi.

Daha başka bir yapılanmada mevcut başvuru, bir insanda *Filoviridae* virüs enfeksiyonunun tedavisini amaçlayan yöntemlerde kullanılmaya yönelik buluş konusu bileşiği sağlar, bu yöntemler şunu içerir: buluş konusu bileşiğin veya 20 farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunun ve en az bir ilave aktif terapötik ajanın terapötik olarak etkili bir miktarın hastaya verilmesi.

Ayrıca, buluş konusu bir bileşiği veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren bir kit sağlanır. Burada tarif edilen kitlerin her biri, bileşiğin ihtiyacı olan bir bireyde (örneğin insanda) bir hastalığın veya durumun tedavisinde kullanılmaya yönelik bir etiket ve/veya talimatlar içerebilir. 25 Bazı yapılanmalarda hastalık veya durum, bir Ebola virüs enfeksiyonu veya bir Marburg virüs enfeksiyonu da dahil olmak üzere bir insan *Filoviridae* virüs enfeksiyonudur. Diğer yapılanmalarda, her bir kit ayrıca buluş konusu bileşik ile kombinasyon halinde ilave tıbbi ajanların ihtiyacı olan bir 30 bireyde (örneğin insan) bir hastalığın veya durumun 35

tedavisinde kullanıma yönelik talimatlar içerebilir. Bunlar arasında belirli yapılanmalarda hastalık veya durum, bir Ebola virüs enfeksiyonu veya bir Marburg virüs enfeksiyonu da dahil olmak üzere bir insan Filoviridae virüs enfeksiyonudur. Burada  
5 sağlanan kitlerin her birinde, burada tarif edilen bir bileşiğin veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu, rasemat, enansiyomeri, diastereomeri, totomeri, polimorfu, psödopolimorfu, amorf formu, hidrat veya solvatın ayrı doz birimlerinin kite dahil edildiği ilave bir yapılanma  
10 mevcuttur. Ayrı dozaj birimlerinin örnekleri haplar, tabletler, kapsüller, önceden doldurulmuş şırıngalar veya şırınga kartuşları, IV torbalar ve benzerlerini kapsar, bunların her biri, ilgili bileşiğin veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunun terapötik olarak etkili bir  
15 miktarı içerir. Bazı yapılanmalarda kit bir tekli dozaj birimi içerebilir ve diğerlerinde çoklu dozaj birimleri, örneğin belirli bir rejim veya süre için gerekli sayıda dozaj birimi mevcuttur.

20 Ayrıca, buluş konusu bir bileşik veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu ile birlikte bir kap içeren ürünler sağlanabilir. Buluşun bir yönü itibarıyla ürün, buluş konusu bileşik veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu ile birlikte bir kap içerir. Ayrı yapılanmalarda ürünün kabı bir  
25 flakon, kavanoz, ampul, önceden yüklenmiş şırınga, blister paket, teneke kutu, şişe, kutu veya bir intravenöz torba olabilir.

## 30 VI. BİR *FILOVİRİDAE* POLİMERAZIN İNHİBİSYONUNA YÖNELİK YÖNTEMLER

Buluşun başka bir yönü, *Filoviridae* polimeraz aktivitesinin inhibisyonunu amaçlayan yöntemlerde kullanılmaya yönelik buluş konusu bileşik veya bileşim ile ilgilidir, bu yöntemler,

*Filoviridae* içerdığı düşünülen bir numunenin buluş konusu bir bileşik veya bileşim ile muamele edilmesi adımı içerir.

Buluş konusu bileşiklerle muamele edilebilecek *Filoviridae*,  
5 tipik olarak primatlar enfekte eden tek iplikli negatif sens  
RNA virüsleridir. Filovirüsler neredeyse tüm hücre türlerinde  
çoğalma becerisine sahiptir. Filovirüs antijenleri ve  
virionlar öncelikli olarak enfeksiyonlu bir bireyin  
fibroblastlarında ve interstisyumunda bulunur. Filovirüslerin  
10 belirlenmiş üç cinsi mevcuttur: Ebola virüsü (EBOV; beş tür);  
Marburg virüsü (MARV) ve Lloviu virüsü (LLOV) olarak da  
bilinen Cuevavirüs. Virionlar (viral partiküller)  
karakteristik olarak düz, kavisli, kvrml olabilen veya "6"  
veya "U" şeklinde bir konfigürasyonda bulunan uzun,  
15 silindirik, filamentöz partiküller biçimindedir. Bazen  
dallanmış halde bulunurlar ve partiküllerin uzunluğu oldukça  
değişkendir, ancak çapları (yaklaşık 80 nm) tutarlıdır.  
Filovirüs genomu 4 adet virion yapı proteinini (VP30, VP35,  
nükleoprotein (NP) ve bir polimeraz proteini (L-pol)) ve 3  
20 adet membran ile bağlantılı proteini (VP40, glikoprotein (GP)  
ve VP24) kodlayan yedi gen içerir.

Ebola virüs cinsi bilinen beş türe sahiptir: (1) Bundibugyo  
virüsü (BDBV, önceden BEBOV) olarak da bilinen *Bundibugyo*  
25 *ebolavirus*; (2) Reston virüsü veya Ebola-Reston (RESTV,  
önceden REBOV) olarak da bilinen *Reston ebolavirus*; (3) Sudan  
virüsü veya Ebola-Sudan (SUDV, önceden SEBOV) olarak da  
bilinen *Sudan ebolavirus*; (4) Tai Forest virüsü veya Ebola-Tai  
(TAFV, önceden CIEBOV) olarak da bilinen *Tai Forest ebolavirus*  
30 ve (5) Ebola virüsü veya Ebola-Zaire (EBOV, önceden ZEBOV)  
olarak da bilinen *Zaire ebolavirus*.

Marburg virüs cinsi, Marburg virüsü (MARV) veya Ravn virüsü  
(RAVV) olarak da bilinen *Marburg marburgvirus* türünü kapsar.

Cuevavirüs cinsi, Lloviu virüsü (LLOV) olarak da bilinen *Lloviu cuevavirus* türünü içerir.

Buluş konusu bileşimler, *Filoviridae* polimeraz inhibitörleri olarak ve bu tip inhibitörler için ara ürünler olarak işlev görebilir veya aşağıda tarif edilen kullanımlara sahiptir. İnhibitörler, *Filoviridae* polimeraza özgü bir geometriye sahip *Filoviridae* polimerazın yüzeyinde veya bir boşluğunda bulunan lokasyonlara bağlanacaktır. *Filoviridae* polimeraza bağlanan bileşimler değişken tersinirlik dereceleriyle bağlanacaktır. Büyük ölçüde tersinmez şekilde bağlanan bileşikler, buluş konusu bu yöntemde kullanılmaya yönelik ideal adaylardır. Büyük ölçüde tersinmez şekilde bağlanan bileşimler işaretlendiklerinde *Filoviridae* polimeraz tayinine yönelik problemler olarak faydalıdır. Dolayısıyla tarifname, *Filoviridae* polimeraz içerdiği düşünülen bir numunede *Filoviridae* polimerazın saptanmasına yönelik yöntemler ile ilgilidir, bu yöntemler şu adlımları içerir: *Filoviridae* polimeraz içerdiği düşünülen bir numunenin, buluş konusu bir bileşiği bir işarete bağlı halde içeren bir bileşim ile muamele edilmesi ve numunenin işaret aktivitesine etkisinin gözlemlenmesi. Uygun işaretler tanımlanan alanlarda iyi bilinir ve stabil serbest radikaller, floroforlar, radyoaktif izotoplar, enzimler, kemilüminesan gruplar ve kromojenleri kapsar. Burada sağlanan bileşikler hidroksil, karboksil, sülfhidril veya amino gibi fonksiyonel gruplar kullanılarak konvansiyonel şekilde işaretlenir.

*Filoviridae* polimeraz içerdiği düşünülen numuneler buluş kapsamında doğal veya yapay materyaller, örneğin canlı organizmalar; doku veya hücre kültürleri; biyolojik numuneler, örneğin biyolojik materyal numuneleri (kan, serum, idrar, serebrospinal sıvı, gözyaşları, balgam, tükürük, doku numuneleri ve benzerleri); laboratuvar numuneleri; gıda, su veya hava numuneleri; biyolojik ürün numuneleri, örneğin

- hücrelerin, özellikle arzu edilen bir glikoproteini sentezleyen rekombinant hücrelerin özütleri ve benzerlerini kapsar. Numunenin tipik olarak *Filoviridae* polimeraz üreten bir organizmayla, özellikle *Filoviridae* virüsü gibi bir patojenik organizma içerdği düşünülecektir. Numuneler su ve organik solvent\su karışımları gibi herhangi bir ortamın içine alınabilir. Numuneler, insanlar gibi canlı organizmalar ve hücre kültürleri gibi yapay materyalleri kapsar.
- 10 Burada açıklanan muamele adımları, buluş konusu bileşimin numuneye ilave edilmesini veya bileşimin bir öncülünün numuneye ilave edilmesini içerir. Ekleme adımları yukarıda tarif edilen herhangi bir uygulama yöntemini içerir.
- 15 Arzu edildiği takdirde, bileşim uygulandıktan sonra *Filoviridae* polimeraz aktivitesi, *Filoviridae* polimeraz aktivitesini saptamaya yönelik doğrudan ve dolaylı yöntemler de dahil olmak üzere herhangi bir yöntemle gözlemlenebilir. *Filoviridae* polimeraz aktivitesini saptamaya yönelik nicel, nitel ve yarı nicel yöntemlerin tümü öngörülmektedir. Tipik olarak yukarıda tarif edilen tarama yöntemlerinden biri uygulanır, ancak bir canlı organizmanın fizyolojik özelliklerinin gözlemlenmesi gibi herhangi bir diğer yöntem de geçerlidir.
- 25 *Filoviridae* polimeraz içeren organizmalar *Filoviridae* virüsünü kapsar. Buluş konusu bileşikler hayvanlarda veya insanlarda *Filoviridae* enfeksiyonlarının tedavisinde veya profilaksisinde faydalıdır.
- 30 Ancak, insan *Filoviridae* virüslerini inhibe etme kapasitesine sahip bileşikler taranırken, enzim analiz sonuçlarının hücre kültürü analizleriyle korelasyon halinde olmayabileceği dikkate alınmalıdır. Dolayısıyla, hücre esaslı bir analiz birincil tarama aracı olmalıdır.



Başka bir yapılanmada mevcut başvuru, bir insanda *Filoviridae* virüs enfeksiyonunun tedavisini amaçlayan yöntemlerde kullanılmaya yönelik buluş konusu bileşiği sağlar, bu yöntemler şunu içerir: bir Formül IV bileşiğinin veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu, solvat ve/veya esterinin terapötik olarak etkili bir miktarın hastaya verilmesi. Bazı yapılanmalarda, *Filoviridae* enfeksiyonu bir *Filoviridae* virüsünden kaynaklanır. Bazı yapılanmalarda, *Filoviridae* enfeksiyonu bir Ebola virüsünden kaynaklanır. Bazı yapılanmalarda, *Filoviridae* enfeksiyonu *Bundibugyo ebolavirus*, *Reston ebolavirus*, *Sudan ebolavirus*, *Tai Forest ebolavirus* veya *Zaire ebolavirus* kaynaklıdır. Bazı yapılanmalarda, *Filoviridae* enfeksiyonu bir *Marburg* virüsünden kaynaklanır. Bazı yapılanmalarda, *Filoviridae* enfeksiyonu bir *Lloviu* virüsünden kaynaklanır. Bazı yapılanmalarda, bir *Filoviridae* polimeraz inhibe edilir.

Buluş konusu bileşik, halihazırda bir *Filoviridae* enfeksiyonundan mustarip olan bir insanın tedavisinde kullanılabilir veya *Filoviridae* enfeksiyonu ihtimalini azaltmak veya önlemek için profilaktik olarak uygulanabilir. *Filoviridae* enfeksiyonları kanamalı ateş, hematemez, ishal, retrosternal karın ağrısı ve prostrasyon ile karakterize edilebilir. İnkübasyon süresi, *Filoviridae* enfeksiyonundan mustarip bir insana temastan sonra yaklaşık 21 gündür. *Filoviridae* enfeksiyonu tipik olarak ölümle sonlanır.

## **VII. *FILOVIRIDAE* POLİMERAZ İNHİBİTÖRLERİNE YÖNELİK TARAMALAR.**

Buluş konusu bileşimler, enzim aktivitesini değerlendirmeye yönelik konvansiyonel tekniklerden herhangi biri aracılığıyla, *Filoviridae* polimeraza karşı inhibe edici aktivite için taranır. Buluş kapsamında tipik olarak bileşimler ilk önce *in vitro* *Filoviridae* polimeraz inhibisyonu için taranır ve

akabinde inhibe edici aktivite sergileyen bileşimler *in vivo* aktivite için taranır. *İn vivo* kullanımları için yaklaşık  $5 \times 10^{-6}$  M'den ve tercihen yaklaşık  $1 \times 10^{-7}$  M'den düşük *in vitro*  $K_i$  (inhibisyon sabitleri) değerlerine sahip bileşimler tercih edilir.

Faydalı *in vitro* taramalar ayrıntılı olarak tarif edilmiştir ve burada tekrar verilmeyecektir. Ancak uygun *in vitro* analizler örneklerde açıklanmaktadır.

## VIII. BİLEŞİKLERİN HAZIRLANIŞI

### ÖRNEKLER

Deneylerin ayrıntıları tarif edilirken belirli kısaltmalar ve terimler kullanılır. Bunların çoğu ilgili alanın uzmanları tarafından anlaşılır olmasına rağmen, Tablo 1, bu kısaltmaların ve terimlerin birçoğunun bir listesini içerir.

**Tablo 1. Kısaltmalar ve terimler listesi.**

| Kısaltma          | Anlamı                                  |
|-------------------|-----------------------------------------|
| AC <sub>2</sub> O | asetik anhidrür                         |
| AIBN              | 2,2'-azobis(2-metilpropionitril)        |
| Bn                | benzil                                  |
| BnBr              | benzilbromür                            |
| BSA               | bis(trimetilsilil)asetamid              |
| BzCl              | benzoil klorür                          |
| CDI               | karbonil diimidazol                     |
| DABCO             | 1,4-diazabisiklo[2.2.2]oktan            |
| DBN               | 1,5-diazabisiklo[4.3.0]non-5-en         |
| DDQ               | 2,3-dikloro-5,6-disiyano-1,4-benzokinon |
| DBU               | 1,5-diazabisiklo[5.4.0]undek-5-en       |
| DCA               | dikloroasetamid                         |
| DCC               | disikloheksilkarbodiimid                |
| DCM               | diklorometan                            |
| DMAP              | 4-dimetilaminopiridin                   |

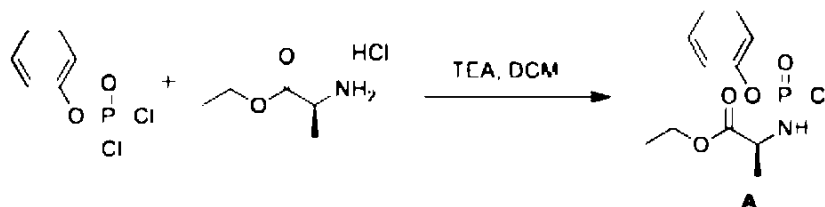
|                 |                                      |
|-----------------|--------------------------------------|
| DME             | 1,2-dimetoksietan                    |
| DMTC1           | dimetoksitritil klorür               |
| DMSO            | dimetilsülfoksit                     |
| DMTr            | 4,4'-dimetoksitritil                 |
| DMF             | dimetilformamid                      |
| EtOAc           | etil asetat                          |
| ESI             | elektrosprey iyonizasyonu            |
| EtOAc           | etil asetat                          |
| HMDS            | heksametildisilazan                  |
| HPLC            | Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi  |
| LDA             | lityum diizopropilamid               |
| LRMS            | düşük çözünürlüklü kütle spektrumu   |
| MCPBA           | meta-kloroperbenzoik asit            |
| MeCN            | asetonitril                          |
| MeOH            | metanol                              |
| MMTC            | mono metoksitritil klorür            |
| m/z veya<br>m/e | kütle/yük oranı                      |
| MH <sup>+</sup> | kütle artı 1                         |
| MH <sup>-</sup> | kütle eksi 1                         |
| MsOH            | metansülfonik asit                   |
| MS veya ms      | kütle spektrumu                      |
| MTBE            | tert-bütiletıl eter                  |
| NBS             | N-bromosüksinimid                    |
| Ph              | fenil                                |
| os veya<br>o.s. | oda sıcaklığı                        |
| TBAF            | tetrabütılamonyum florür             |
| THF             | tetrahidrofuran                      |
| TMSC1           | klorotrimetilsilan                   |
| TMSBr           | bromotrimetilsilan                   |
| TMSI            | iyodotrimetilsilan                   |
| TMSOTf          | (trimetilsilil)triflorometilsülfonat |
| TEA             | trietylamin                          |
| TBA             | tribütılamin                         |
| TBAP            | tribütılamonyum pirofosfat           |

|                |                                                             |
|----------------|-------------------------------------------------------------|
| TBSCl          | t-bütildimetilsilil klorür                                  |
| TEAB           | triethylamonyum bikarbonat                                  |
| TFA            | trifloroasetik asit                                         |
| TLC veya tlc   | ince tabaka kromatografisi                                  |
| Tr             | trifenilmetil                                               |
| Tol            | 4-metilbenzoil                                              |
| Turbo Grignard | 1:1'lik izopropilmagnezyum klorür ve lityum klorür karışımı |
| δ              | tetrametilsilana göre aşağı alan milyonda kısım             |

### A. Bileşiklerin Hazırlanışı

Örnekler 1, 3, 11, 13, 15, 18, 20, 24-34 ve 35a referans örnekleridir. Bileşikler 1, 10, 15, 21-31 ve bileşik 9'un (R) diastereomeri referans bileşiklerdir.

#### Örnek 1. (2S)-etil 2-(kloro(fenoksi)fosforilamino)propanoat (Kloridat A)

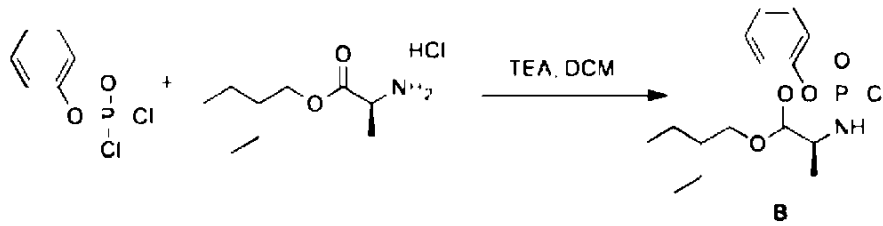


Etil alanin ester hidroklorür tuzu (1.69 g, 11 mmol) içinde çözülmüştür susuz  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) ve karışım  $0^\circ\text{C}$ 'ye soğutma eşliğinde  $\text{N}_2$  (g) altında karıştırılmıştır. Fenil diklorofosfat (1.49 mL, 10 mmol) ilave edilmiştir ve akabinde yaklaşık 10 dk boyunca damlalar halinde  $\text{Et}_3\text{N}$  ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı akabinde yavaşça oda sıcaklığına iletılmış ve yaklaşık 12 sa karıştırılmıştır. Susuz  $\text{Et}_2\text{O}$  (50 mL) ilave edilmiştir ve karışım yaklaşık 30 dk karıştırılmıştır. Oluşan katı filtreleme yoluyla uzaklaştırılmış ve süzöntü düşük basınç altında konsantre edilmiştir. Kalıntı, ara ürün **A**'y

vermek üzere heksanlar içinde %0-50 EtOAc ile ayrıştırılarak silika jel kromatografisine tabi tutulmuştur.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.39-7.27 (m, 5H), 4.27 (m, 3H), 1.52 (m, 3H), 1.32 (m, 3H).  $^{31}\text{P}$  NMR (121.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.2, 7.8.

5

**Örnek 2. (2S)-2-etilbütıl 2-(kloro(fenoksi)fosforilamino)propanoat (Kloridat B)**

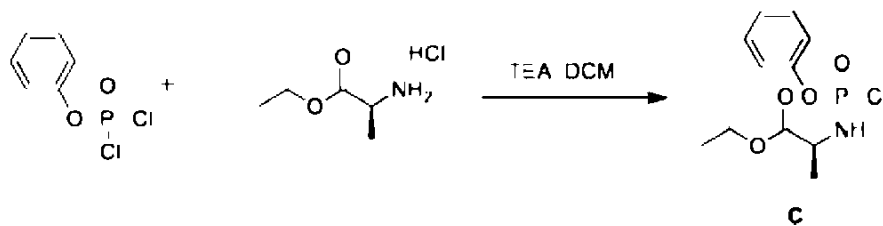


10

2-Etilbütıl alanin klorofosforamidat ester **B**, kloridat **A** ile aynı prosedüre göre hazırlanmıştır, ancak burada etil alanin ester yerine 2-etilbütıl alanin ester kullanılmıştır. Materyal bir sonraki reaksiyonda ham olarak kullanılabilir. Metanol veya etanol ile muamele ikame ürünü gerekli LCMS sinyali ile birlikte verir.

15

**Örnek 3. (2S)-izopropıl 2-(kloro(fenoksi)fosforilamino)propanoat (Kloridat C)**



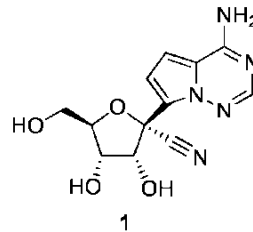
20

İzopropıl alanin klorofosforamidat ester **C**, kloridat **A** ile aynı prosedüre göre hazırlanmıştır, ancak burada etil alanin ester yerine izopropıl alanin ester kullanılmıştır. Materyal bir sonraki reaksiyonda ham olarak kullanılabilir. Metanol veya etanol ile muamele ikame ürünü gerekli LCMS sinyali ile birlikte verir.

25

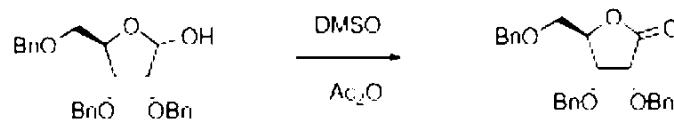
**Örnek 4. (2R,3R,4S,5R)-2-(4-aminopirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)tetrahidrofuran-2-karbonitril (Bileşik 1)**

5

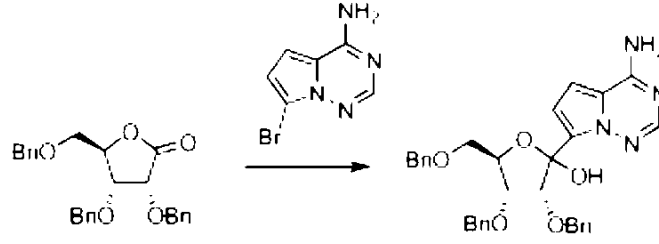


(2R,3R,4S,5R)-2-(4-aminopirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)tetrahidrofuran-2-

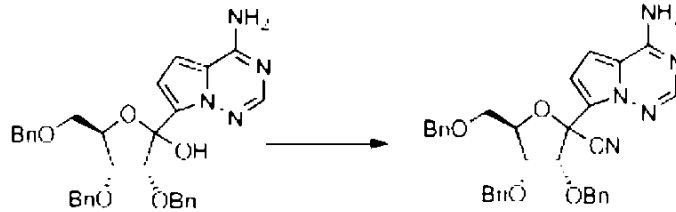
10 karbonitrilin hazırlanışı aşağıda açıklanır.



Piyasadan temin edilebilen laktol (10 g, 23.8 mmol) N<sub>2</sub> (g) altında susuz DMSO (30 mL) içinde çözülmüştür. AC<sub>2</sub>O (20 mL) ilave edilmiştir ve elde edilen reaksiyon karışımı yaklaşık 48 sa boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımı buzlu H<sub>2</sub>O (500 mL) üzerine boşaltılmıştır ve karışım 20 dk karıştırılmıştır. Karışım EtOAc (200 mL x 3) ile özütlenmiştir ve birleştirilen organik özütler akabinde H<sub>2</sub>O (200 mL x 3) ile yıkanmıştır. Organik özüt susuz MgSO<sub>4</sub> üzerinde kurutulmuştur, filtrelenmiştir ve düşük basınç altında konsantre edilmiştir. Kalıntı CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> içinde çözülmüştür ve laktonu vermek üzere heksanlar içinde %25 EtOAc ile ayrıştırılarak silika jel kromatografisine tabi tutulmuştur. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.30-7.34 (m, 13H), 7.19-7.21 (m, 2H), 4.55-4.72 (m, 6H), 4.47 (s, 2H), 4.28 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 3.66 (m, 2H). LCMS m/z 436.1 [M+H<sub>2</sub>O], 435.2 [M+OH]<sup>-</sup> Tr = 2.82 dk. HPLC Tr = 4.59 [H<sub>2</sub> içinde %2-98 ACN], 5 dk boyunca 2 mL/dk'lik akış hızında.



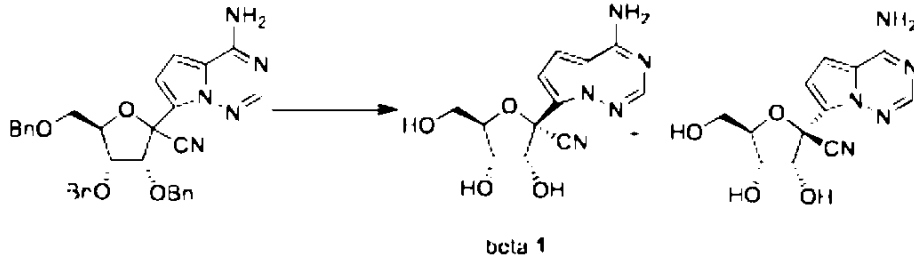
Bromopirazol (WO2009/132135'e göre hazırlanmıştır) (0.5 g, 2.4 mmol)  $N_2(g)$  altında susuz THF (10 mL) içinde süspansiyon haline getirilmiştir. Süspansiyon karıştırılmış ve TMSCl (0.67 mL, 5.28 mmol) ilave edilmiştir. Karışım oda sıcaklığında 20 dk karıştırılmış ve akabinde yaklaşık  $-78^\circ C$ 'ye soğutulmuştur, bu noktadan sonra yavaşça bir n-BuLi solüsyonu (6 mL, heksanlar içinde 1.6 N, 9.6 mmol) ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı yaklaşık  $-78^\circ C$ 'de 10 dk karıştırılmış ve akabinde şırınga yardımıyla lakton (1 g, 2.4 mmol) ilave edilmiştir. Reaksiyonun tamamlandıktan sonra LCMS ölçümüyle doğrulandıktan sonra reaksiyonu bastırmak için AcOH ilave edilmiştir. Karışım düşük basınç altında konsantre edilmiştir ve kalıntı bir  $CH_2Cl_2$  ve  $H_2O$  (100 mL, 1:1) karışımı içinde çözülmüştür. Organik katman ayrılmıştır ve  $H_2O$  (50 mL) ile yıkanmıştır. Organik katman akabinde susuz  $MgSO_4$  üzerinde kurutulmuştur, filtrelenmiştir ve düşük basınç altında konsantre edilmiştir. Kalıntı, ürünü anomerlerin 1:1'lik bir karışımı olarak vermek üzere heksanlar içinde %0-50 EtOAc ile ayrıştırılarak silika jel kromatografisine tabi tutulmuştur. LCMS  $m/z$  553 [M+H].



Hidroksi nükleosit (1.1 g, 2.0 mmol) susuz  $CH_2Cl_2$  (40 mL) içinde çözülmüştür ve solüsyon  $N_2(g)$  altında karıştırma eşliğinde yaklaşık  $-78^\circ C$ 'ye soğutulmuştur. TMSCN (0.931 mL, 7 mmol) ilave edilmiştir ve karışım 10 dk daha karıştırılmıştır. Reaksiyona yavaşça TMSOTf (1.63 mL, 9.0 mmol) ilave edilmiştir

ve karışım 1 sa karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımı akabinde CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (120 mL) ile seyreltilmiştir ve reaksiyonu bastırmak için sulu NaHCO<sub>3</sub> (120 mL) ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı 10 dk daha karıştırılmıştır ve organik katman ayrılmıştır.

5 Sulu katman CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (150 mL) ile özütlenmiştir ve birleştirilen organik özütler susuz MgSO<sub>4</sub> üzerinde kurutulmuştur, filtrelenmiştir ve düşük basınç altında konsantre edilmiştir. Kalıntı minimum miktarda CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> içinde çözülmüştür ve tribenzil siyano nükleositi bir anomerler karışımı olarak vermek üzere 10 %0-75 EtOAc ve heksanlar gradyanı ile ayrıştırılarak silika jel kromatografisine tabi tutulmuştur. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ 7.94 (s, 0.5H), 7.88 (s, 0.5H), 7.29-7.43 (m, 13H), 7.11-7.19 (m, 1H), 6.82-6.88 (m, 1H), 6.70-6.76 (m, 1H), 6.41 (bs, 2H), 5.10 (d, J = 3.9 Hz, 0.5H), 4.96 (d, J = 5.1 Hz, 0.5H), 15 4.31-4.85 (m, 7H), 4.09-4.18 (m, 2H), 3.61-3.90 (m, 2H). LCMS m/z 562 [M+H].

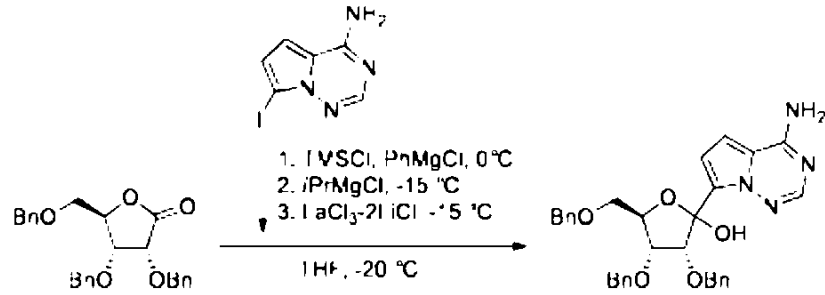


Tribenzil siyano nükleosit (70 mg, 0.124 mmol) susuz CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 20 mL) içinde çözülmüştür ve N<sub>2</sub> (g) altında yaklaşık -20°C'ye soğutulmuştur. Bir BCl<sub>3</sub> solüsyonu (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> içinde 1 N, 0.506 mL, 0.506 mmol) ilave edilmiştir ve reaksiyon karışımı -78°C'de 1 sa karıştırılmıştır. Reaksiyonun tamamlandıktan sonra LC/MS ile doğrulandıktan sonra reaksiyonu bastırmak için MeOH ilave 25 edilmiştir. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığına soğumaya bırakılmıştır ve solvent düşük basınç altında uzaklaştırılmıştır. Kalıntı, α-anomeri ve β-anomeri 1'i ayrıştırmak üzere 5 dk boyunca H<sub>2</sub>O (%0.1 TFA), akabinde 35 dk boyunca H<sub>2</sub>O (%0.1 TFA) içinde %0-70 MeCN gradyanı ile 30 ayrıştırılarak C18 ters fazlı HPLC'ye tabi tutulmuştur. (α-anomer) <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.96 (s, 1H), 7.20 (d, J = 4.8



Hz, 1H), 6.91 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H), 4.97 (d,  $J = 4.4$  Hz, 1H), 4.56-4.62 (m, 1H), 4.08-4.14 (m, 1H), 3.90 (dd,  $J = 12.9, 2.4$  Hz, 1H), 3.70 (dd,  $J = 13.2, 4.5$  Hz, 1H). ( $\beta$ -anomer)  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  7.91 (s, 1H), 7.80-8.00 (br s, 2H), 6.85-6.89 (m, 2H), 6.07 (d,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 5.17 (br s, 1H), 4.90 (br s, 1H), 4.63 (t,  $J = 3.9$  Hz, 1H), 4.02-4.06 (m, 1H), 3.94 (br s, 1H), 3.48-3.64 (m, 2H). LCMS  $m/z$  292.2  $[\text{M}+\text{H}]$ , 290.0  $[\text{M}-\text{H}]$ . Tr= 0.35 dk.  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, DMSO), 156.0, 148.3, 124.3, 117.8, 117.0, 111.2, 101.3, 85.8, 79.0, 74.7, 70.5, 61.4. HPLC Tr = 1.32 dk.

**(3R,4R,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis(benziloksi)-5-((benziloksi)metil)tetrahidrofuran-2-olün  $\text{LaCl}_3\cdot 2\text{LiCl}$  ile hazırlanışı**



THF (67 mL) içinde bir 7-iyodopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-4-amin (7.5 g, 28.8 mmol, 1.0 ekv) solüsyonu hazırlanmıştır. Solüsyon yaklaşık 0°C'ye soğutulmuştur ve TMSCl (3.3 mL, 30.3 mmol, 1.05 ekv) ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı yaklaşık 30 dk karıştırılmıştır ve akabinde iç sıcaklık 5°C'nin altında tutulurken PhMgCl (THF içinde 2 M; 28 mL, 56.8 mmol, 1.97 ekv) ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı yaklaşık 0°C'de yaklaşık 35 dk çalkalanmıştır ve akabinde yaklaşık -15°C'ye soğutulmuştur. Akabinde iç sıcaklık yaklaşık -10°C'nin altında tutulurken iPrMgCl (THF içinde 2 M, 14 mL, 30.2 mmol, 1.05 ekv) ilave edilmiştir. Yaklaşık -15°C'de yaklaşık olarak 15 dakika sonra, iç sıcaklık yaklaşık -15°C'nin altında tutulurken  $\text{LaCl}_3\cdot 2\text{LiCl}$  (THF içinde 0.6 M, 50 mL, 14.4 mmol, 0.5

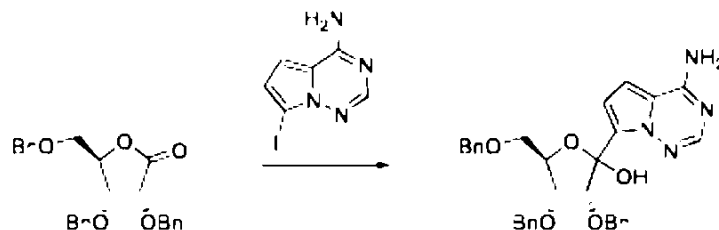
ekv) ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı yaklaşık -20°C'de yaklaşık 25 dk çalkalanmıştır.

Ayrı bir şişede, THF (45 mL) içinde bir (3R,4R,5R)-3,4-bis(benziloksi)-5-((benziloksi)metil)dihidrofuran-2(3H)-on (10.0 g, 23.9 mmol, 0.83 ekv) solüsyonu hazırlanmıştır. Solüsyon yaklaşık -20°C'ye soğutulmuştur ve akabinde iç sıcaklık yaklaşık -15°C'nin altında tutulurken Grignard solüsyonuna aktarılmıştır. Elde edilen reaksiyon karışımı yaklaşık -20°C'de yaklaşık 30 dk çalkalanmıştır.

Reaksiyon 2 M HCl (53 mL) ile bastırılmıştır ve karışım yaklaşık 15°C'ye ısıtılmıştır. iPrOAc (38 mL) ilave edilmiştir ve organik ve sulu fazlar ayrılmıştır. Alttaki sulu katman tahliye edilmiştir ve üstteki organik katman sırasıyla yaklaşık %2.5 NaHCO<sub>3</sub> (53 mL), yaklaşık %2.5 NaHCO<sub>3</sub> (53 mL) ve yaklaşık %10 NaCl (53 mL) ile yıkanmıştır.

Organik faz yaklaşık 45 mL'ye konsantre edilmiştir ve akabinde iPrOAc (75 mL) ile seyreltilmiştir. Solüsyon tekrar yaklaşık 45 mL'ye konsantre edilmiştir ve akabinde iPrOAc (23 mL) ile seyreltilmiştir. Solüsyon yaklaşık 45 mL'ye konsantre edilmiştir ve akabinde bir Celite pedi üzerinden filtrelenmiştir. Filtrelenen solüsyon yaklaşık 26 mL'ye konsantre edilmiştir ve akabinde MTBE (75 mL) ile seyreltilmiştir. 2 sa sonra yavaşça heptan (23 mL) ilave edilmiştir ve bulamaç yaklaşık 25°C'de yaklaşık 2 sa karıştırılmıştır ve akabinde yaklaşık 8 sa boyunca yaklaşık -5°C'ye soğutulmuştur. Katılar filtreleme yoluyla izole edilmiştir ve filtre hamuru MTBE/heptan (4:1, 23 mL) ile yıkanmıştır. Katılar, (3R,4R,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis(benziloksi)-5-((benziloksi)metil)tetrahidrofuran-2-ölü vermek üzere bir vakumlu filtrede en fazla yaklaşık 35°C'de kurutulmuştur.

**(3R,4R,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis(benziloksi)-5-((benziloksi)metil)tetrahidrofuran-2-olün CeCl<sub>3</sub> ile hazırlanışı**



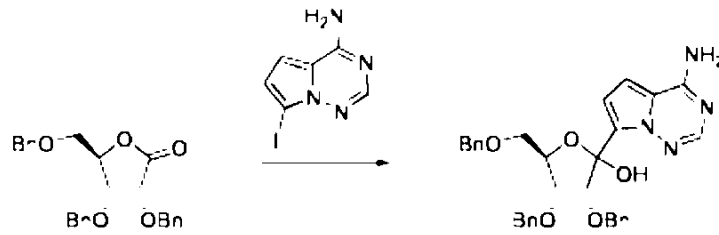
5

İyodopirrazol (5.02 g, 19.3 mmol) THF (45 g) içinde çözülmüştür ve solüsyon karıştırılma eşliğinde yaklaşık 0°C'ye soğutulmuştur. TMSCl (2.04 g, 18.7 mmol) ilave edilmiştir ve yaklaşık 1 sa sonra fenil magnezyum klorür (THF içinde 2.0 M, 19.9 g, 38.2 mmol) ilave edilmiştir. Reaksiyon yaklaşık -20°C'ye soğutulmuştur ve yavaşça izo-propil magnezyum klorür (THF içinde 2.0 M, 9.99 g, 20.5 mmol) ilave edilmiştir. Yaklaşık 30 dk sonra reaksiyon karışımı yaklaşık -20°C'de THF (22 g) içindeki susuz seryum klorür (4.75 g, 19.3 mmol) karışımına aktarılmıştır. Yaklaşık 1.5 sa sonra yavaşça THF (22 g) içindeki lakton (6.73 g, 16.1 mmol) solüsyonu ilave edilmiştir ve elde edilen reaksiyon karışımı yaklaşık 1 sa karıştırılmıştır. 2 M HCl (41 g) ilave edilmiştir, karışım yaklaşık 15°C'ye ısıtılmıştır ve izo-propil asetat (35 g) ilave edilmiştir. Katmanlar ayrılmıştır ve organik katman %2.5 NaHCO<sub>3</sub> (40 g x 2), %10 NaCl (35 g x 1) ile yıkanmıştır ve yaklaşık 30 mL'lik hacme konsantre edilmiştir. izo-Propil asetat (44 g) yüklenmiştir ve solüsyon yaklaşık 30 mL'lik hacme konsantre edilmiştir. izo-Propil asetat (43 g) yüklenmiştir ve solüsyon yaklaşık 30 mL'lik hacme konsantre edilmiştir. Solüsyon filtrelenmiştir ve süzüntü yaklaşık 18 mL'lik hacme konsantre edilmiştir. tert-Bütilmetil eter (37 g) ve akabinde ürün tohum kristalleri (10.7 mg) ilave edilmiştir. Yaklaşık 14 sa sonra n-heptan (10.5 g) ilave edilmiştir ve karışım yaklaşık -5°C'ye soğutulmuştur ve filtrelenmiştir.

30

Katmanlar yaklaşık -5°C'de *tert*-bütilmetil eter (9 g) ile yıkanmıştır ve ürünü vermek üzere yaklaşık 34°C'de yaklaşık 15 sa boyunca vakum altında kurutulmuştur.

5 **(3R,4R,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis(benziloksi)-5-((benziloksi)metil)tetrahidrofuran-2-olün**  
**CeCl<sub>3</sub> ve *i*PrMgCl-LiCl ile hazırlanışı**



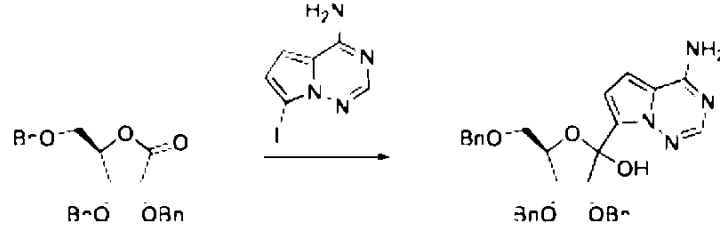
10

İyodopirazol (5.03 g, 19.3 mmol) THF (45 g) içinde çözülmüştür ve solüsyon N<sub>2</sub>(g) altında karıştırma eşliğinde yaklaşık 0°C'ye soğutulmuştur. TMSCl (2.06 g, 19.0 mmol) ilave edilmiştir ve yaklaşık 1 sa sonra fenil magnezyum klorür (THF içinde 2.0 M, 20.23 g, 38.8 mmol) ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı yaklaşık -20°C'ye soğutulmuştur ve yavaşça *izo*-propil magnezyum klorür-lityum klorür kompleksi (THF içinde 2.0 M, 15.37 g, 21.0 mmol) ilave edilmiştir. Yaklaşık 1 sa sonra reaksiyon karışımı yaklaşık -20°C'de THF (22 g) içindeki seryum klorür (4.77 g, 19.4 mmol) karışımına aktarılmıştır. Yaklaşık 1 sa sonra yavaşça THF (23 g) içindeki lakton (6.75 g, 16.1 mmol) solüsyonu ilave edilmiştir ve elde edilen reaksiyon karışımı yaklaşık 1.5 sa karıştırılmıştır. 2 M HCl (40 g) ilave edilmiştir, karışım yaklaşık 15°C'ye ısıtılmıştır ve *izo*-propil asetat (35 g) ilave edilmiştir. Katmanlar ayrılmıştır ve organik katman %2.5 NaHCO<sub>3</sub> (40 g x 2), %10 NaCl (36 g x 1) ile yıkanmıştır ve yaklaşık 30 mL'lik hacme konsantre edilmiştir. *izo*-Propil asetat (44 g) ilave edilmiştir ve solüsyon yaklaşık 30 mL'lik hacme konsantre edilmiştir. Solüsyon filtrelenmiştir ve süzüntü yaklaşık 18 mL'lik hacme konsantre edilmiştir. *tert*-Bütilmetil eter (37 g)

30

ve akabinde ürün tohum kristalleri (10.5 mg) ilave edilmiştir. Yaklaşık 14 sa sonra *n*-heptan (11 g) ilave edilmiştir ve karışım yaklaşık -5°C'ye soğutulmuştur ve filtrelenmiştir. Katılar yaklaşık -5°C'de *tert*-bütilmetil eter (9 g) ile yıkanmıştır ve ürünü vermek üzere yaklaşık 34°C'de yaklaşık 15 sa boyunca vakum altında kurutulmuştur.

**(3R,4R,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis(benziloksi)-5-((benziloksi)metil)tetrahidrofuran-2-olün**  
**YCl<sub>3</sub> ile hazırlanışı**

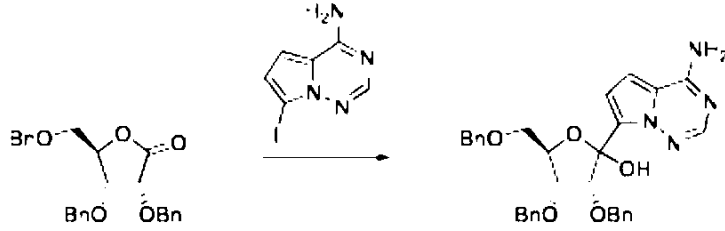


İyodopirazol (4.99 g, 19.2 mmol) THF (44 g) içinde çözülmüştür ve solüsyon karıştırma eşliğinde yaklaşık 0°C'ye soğutulmuştur. TMSCl (2.45 mL, 19.4 mmol) ilave edilmiştir ve yaklaşık 30 dk sonra fenil magnezyum klorür (THF içinde 2.0 M, 20.29 g, 39.0 mmol) ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı yaklaşık -20°C'ye soğutulmuştur ve yavaşça *izo*-propil magnezyum klorür (THF içinde 2.0 M, 9.85 g, 20.1 mmol) ilave edilmiştir. Yaklaşık 30 dk sonra, reaksiyon karışımı yaklaşık -20°C'de THF (24 g) içindeki susuz itriyum klorür (3.76 g, 19.3 mmol) ve lakton (6.68 g, 16.0 mmol) karışımına aktarılmıştır. Yaklaşık 2.5 sa sonra 2 M HCl (30 g) ilave edilmiştir, karışım yaklaşık 15°C'ye ısıtılmıştır ve *izo*-propil asetat (22 g) ilave edilmiştir. Katmanlar ayrılmıştır ve organik katman %2.5 NaHCO<sub>3</sub> (40 g x 2), %10 NaCl (35 g x 1) ile yıkanmıştır ve yaklaşık 30 mL'lik hacme konsantre edilmiştir. *izo*-Propil asetat (44 g) yüklenmiştir ve solüsyon yaklaşık 30 mL'lik hacme konsantre edilmiştir. *izo*-Propil asetat (45 g) yüklenmiştir ve solüsyon yaklaşık 30 mL'lik

hacme konsantre edilmiştir. Solüsyon filtrelenmiştir ve süzöntü yaklaşık 18 mL'lik hacme konsantre edilmiştir. *tert*-Bütilmetil eter (37 g) ve akabinde ürün tohum kristalleri (11.5 mg) ilave edilmiştir. Yaklaşık 1 sa sonra *n*-heptan (15 mL) ilave edilmiştir ve karışım yaklaşık -5°C'ye soğutulmuştur ve yaklaşık 17 sa çalkalanmıştır. Bulamaç filtrelenmiştir ve katılar, önceden yaklaşık -5°C'ye soğutulmuş bir *tert*-bütilmetil eter (8 g)/*n*-heptan (2 g) karışımı ile yıkanmıştır. Elde edilen katılar, ürünü vermek üzere yaklaşık 34°C'de yaklaşık 22 sa boyunca vakum altında kurutulmuştur.

**(3R,4R,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis(benziloksi)-5-((benziloksi)metil)tetrahidrofuran-2-olün**  
**NdCl<sub>3</sub> ile hazırlanışı**

15

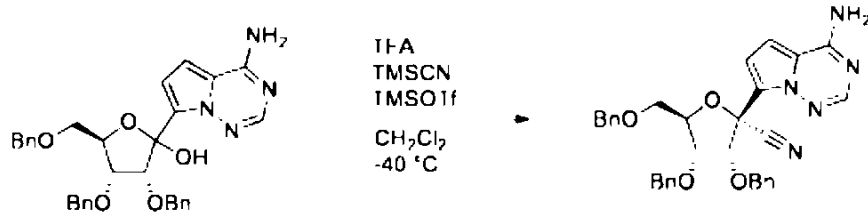


İyodopirazol (5.02 g, 19.3 mmol) THF (38 g) içinde çözülmüştür ve solüsyon N<sub>2</sub>(g) altında karıştırma eşliğinde yaklaşık 0°C'ye soğutulmuştur. TMSCl (2.45 mL, 19.4 mmol) ilave edilmiştir ve yaklaşık 1 sa sonra fenilmagnezyum klorür (THF içinde 2.0 M, 19.75 g, 38.0 mmol) ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı yaklaşık -20°C'ye soğutulmuştur ve yavaşça *izo*-propilmagnezyum klorür (THF içinde 2.0 M, 9.40 g, 19.2 mmol) ilave edilmiştir. Yaklaşık 1.5 sa sonra, reaksiyon karışımı yaklaşık -20°C'de THF (22 g) içindeki susuz neodim (III) klorür (4.03 g, 16.1 mmol) ve lakton (6.70 g, 16.0 mmol) karışımına aktarılmıştır. Yaklaşık 1.5 sa sonra reaksiyon karışımı -10°C'ye soğutulmuştur ve 2 sa daha geçtikten sonra 2 M HCl (36 g) ilave edilmiştir. Karışım yaklaşık 15°C'ye soğutulmuştur ve *izo*-propil asetat (23 g) ilave edilmiştir. Katmanlar ayrılmıştır ve organik katman

%2.5 NaHCO<sub>3</sub> (44 g x 2), %10 NaCl (41 g x 1) ile yıkanmıştır ve yaklaşık 30 mL'lik hacme konsantre edilmiştir. izo-Propil asetat (44 g) yüklenmiştir ve solüsyon yaklaşık 30 mL'lik hacme konsantre edilmiştir. izo-Propil asetat (45 g) 5 yüklenmiştir ve solüsyon yaklaşık 30 mL'lik hacme konsantre edilmiştir. Solüsyon filtrelenmiştir ve süzöntü yaklaşık 18 mL'lik hacme konsantre edilmiştir. tert-Bütilmetil eter (37 g) ve akabinde ürün tohum kristalleri (11.9 mg) ilave edilmiştir. Yaklaşık 1 sa sonra n-heptan (15 mL) ilave edilmiştir ve 10 karışım yaklaşık -5°C'ye soğutulmuştur ve yaklaşık 15 sa çalkalanmıştır. Bulamaç filtrelenmiştir ve katılar, önceden yaklaşık -5°C'ye soğutulmuş bir tert-bütilmetil eter (8 g)/n-heptan (11 g) karışımı ile yıkanmıştır. Elde edilen katılar, ürünü vermek üzere yaklaşık 34°C'de yaklaşık 25 sa boyunca 15 vakum altında kurutulmuştur.

**(2R,3R,4R,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis(benziloksi)-5-((benziloksi)metil)tetrahidrofuran-2-karbonitrilin hazırlanışı**

20



DCM (100 mL) içinde önceden soğutulmuş (-40°C) (3R,4R,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4- 25 bis(benziloksi)-5-((benziloksi)metil)tetrahidrofuran-2-ol (10.0 gram, 18.1 mmol, 1.0 ekv.) solüsyonuna iç sıcaklık yaklaşık -25°C'nin altında tutulurken trifloroasetik asit (6.19 gram, 54.3 mmol, 3.0 ekv.) ve akabinde DCM (50 mL) içinde önceden soğutulmuş (-30°C) TMSOTf (24.1 gram, 108.6 30 mmol, 6.0 ekv.) ve TMSCN (10.8 gram, 108.6 mmol, 6.0 ekv.) solüsyonu yüklenmiştir. Reaksiyon karışım yaklaşık -30°C'nin altında en az 10 dakika çalkalanmıştır ve önceden soğutulmuş

(yaklaşık -10°C) ağırlıkça %20'lik sulu KOH solüsyonu (120 mL) içinde bastırılmıştır. İki fazlı karışım ortam sıcaklığına eşitlenmiştir. Organik katman ayrılmıştır ve ağırlıkça %10'luk sulu NaCl (50 mL x 3) ile yıkanmıştır. Organik faz 5 filtrelenmiştir, vakum altında yaklaşık 50 mL'ye konsantre edilmiştir, tolüen (200 mL) ile tekrar seyreltilmiştir ve yaklaşık 50°C'de vakum altında 140 mL'ye konsantre edilmiştir. Solüsyon yaklaşık 55°C'de (2R,3R,4R,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis(benziloksi)-5-  
10 ((benziloksi)metil)tetrahidrofuran-2-karbonitril ile aşılmalıdır. Yaklaşık 55°C'de yaklaşık bir saat çalkalanmıştır ve yaklaşık 6 saat boyunca yaklaşık 0°C'ye soğutulmuştur. Katılar filtreleme yoluyla izole edilmiştir ve filtre hamuru tolüen (30 mL) ile yıkanmıştır. Katılar yaklaşık  
15 50°C'de vakum altında kurutulmuştur.

**(2R,3R,4R,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis(benziloksi)-5-((benziloksi)metil)tetrahidrofuran-2-karbonitrilin Akış Kimyası ile hazırlanışı**

20

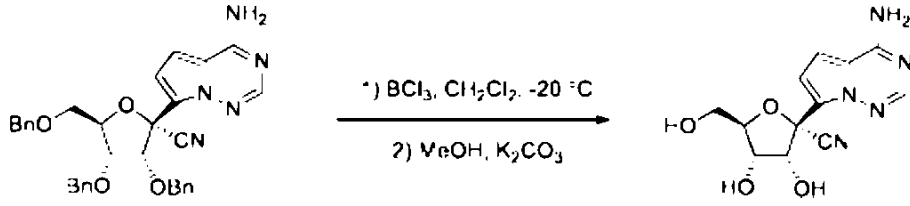


(3R,4R,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis(benziloksi)-5-((benziloksi)metil)tetrahidrofuran-2-ol  
25 (460.07 g DCM içinde 23.0 g), TMSOTf (138.07 g DCM içinde 55.81 g) ve TMSCN (138.10 g DCM içinde 25.03 g) solüsyonları yaklaşık -40°C'de bir boru tipi reaktöre sırayla pompalanmıştır. Reaksiyon karışımı bir şişede toplanmıştır ve %20'lik sulu KOH solüsyonu (46.91 g KOH ve 210 g su) içeren  
30 buz banyosunda tutulmuştur. Katmanlar ayrılmıştır ve organik faz sırasıyla %10'luk sulu KOH solüsyonu (10 g KOH ve 90 mL su) ve %10'luk tuzlu su (100 g x 2) ile yıkanmıştır. Organik



faz vakum altında yaklaşık 4 birim hacme konsantre edilmiştir, izopropil alkol (162.89 g) yüklenmiştir ve karşım vakum altında yaklaşık 10 birim hacme konsantre edilmiştir. İçerikler yaklaşık 60°C'ye ısıtılmıştır, akabinde yaklaşık 6.5 saatliğine yaklaşık 0°C'ye ayarlanmıştır ve yaklaşık 0°C'de yaklaşık 15.5 sa çalkalanmıştır. Elde edilen bulamaç filtrelenmiştir, katılar izopropil alkol (61.79 g) ile durulanmıştır ve akabinde ürünü vermek üzere düşük basınç altında gece boyunca yaklaşık 50°C'de kurutulmuştur.

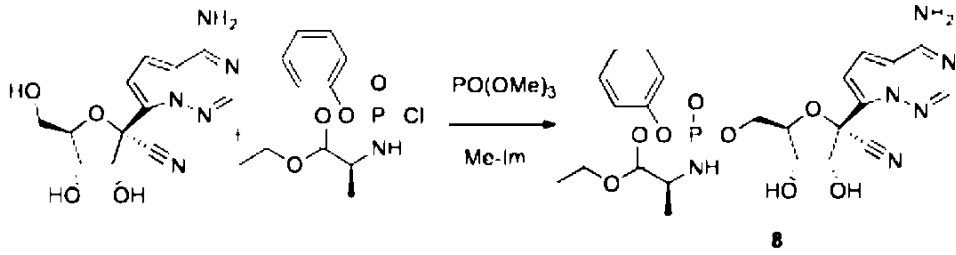
**(2R,3R,4S,5R)-2-(4-aminopirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil) tetrahidrofuran-2-karbonitrilin hazırlanış**



Tribenzil siyano nükleosit (48.8 g, 86.9 mmol, 1.0 ekv.) susuz CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (244 mL) içinde çözülmüştür ve yaklaşık -20°C'ye soğutulmuştur. İç sıcaklık yaklaşık -15°C'nin altında tutulurken damlalar halinde bir BCl<sub>3</sub> solüsyonu (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> içinde 1 M, 295 mL, 295 mmol, 3.4 ekv.) ilave edilmiştir. Ekleme işleminden sonra reaksiyon karşım yaklaşık -20°C'de 1 sa karşıtırılmıştır. İç sıcaklık -15°C'nin altında tutulurken damlalar halinde MeOH (340 ml) ilave edilmiştir. Elde edilen solüsyon yaklaşık 250 ml'ye damıtılmıştır, akabinde tekrar yaklaşık 250 ml MeOH yüklenmiştir. Elde edilen solüsyon tekrar yaklaşık 250 ml'ye damıtılmıştır, akabinde yaklaşık 250 ml MeOH yüklenmiştir ve son olarak yaklaşık 125 ml'ye damıtılmıştır. Su (125 ml) ve akabinde K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solüsyonu (su içinde ağırlıkça %20, 125 ml) ilave edilmiştir. pH seviyesi kontrol edilmiştir ve ~3 olarak bulunmuştur. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solüsyonu (su içinde ağırlıkça %20, 50 ml) ilave edilmiştir ve pH

seviyesi ~8 olarak bulunmuştur. Elde edilen bulamaç gece boyunca karıştırılmıştır, akabinde filtrelenmiştir ve su (50 ml) ve MeOH (50 ml) ile yıkanmıştır. Yaş ürün hamuru gece boyunca yaklaşık 40°C'de kurutulmuştur. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.96 (s, 1H), 7.20 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 6.91 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 4.97 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 4.56-4.62 (m, 1H), 4.08-4.14 (m, 1H), 3.90 (dd, J = 12.9, 2.4 Hz, 1H), 3.70 (dd, J = 13.2, 4.5 Hz, 1H).

10 **Örnek 11. (2S)-izopropil 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrol[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi) (fenoksi)-fosforilamino)propanoat (Bileşik 8)**



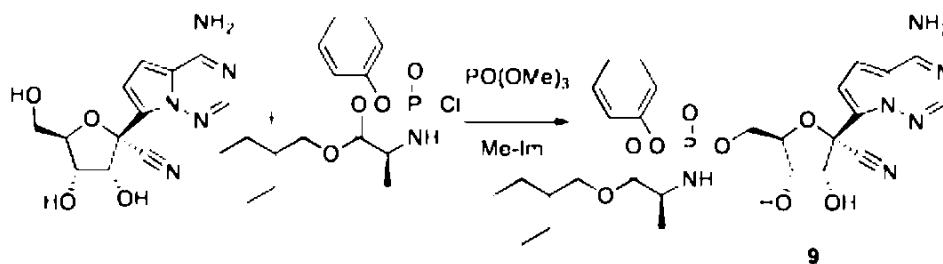
Nükleosit **1** (45 mg, 0.15 mmol) susuz trimetil fosfat (0.5 mL) içinde çözülmüştür ve solüsyon N<sub>2</sub> (g) altında yaklaşık 0°C'de karıştırılmıştır. Solüsyona metil imidazol (36 µL, 0.45 mmol) ilave edilmiştir. Klorofosforamidat **C** (69 mg, 0.225 mmol) susuz THF (0.25 mL) içinde çözülmüştür ve nükleosit karışımına damlalar halinde ilave edilmiştir. Reaksiyonun tamamlandıktan sonra LCMS ile doğrulandıktan sonra reaksiyon karışımı EtOAc ile seyreltilmiştir ve doymuş sulu NaHCO<sub>3</sub> solüsyonu, doymuş NaCl ile yıkanmıştır, susuz Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> üzerinde kurutulmuştur, filtrelenmiştir ve düşük basınç altında konsantre edilmiştir. Kalıntı, ürünü vermek üzere CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> içinde %0-5 MeOH ile ayrıştırılarak silika jel kromatografisine ve akabinde preparatif HPLC'ye tabi tutulmuştur. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.95 (m, 1H), 7.31-6.97 (m, 7H), 4.94 (m, 1H), 4.78 (m, 1H), 4.43 (m, 3H), 4.20 (m, 1H), 3.80 (d, 1H), 1.30-1.18 (m, 9H).

$^{31}\text{P}$  NMR (121.4 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  3.8. LCMS  $m/z$  561.0  $[\text{M}+\text{H}]$ , 559.0  $[\text{M}-\text{H}]$ .

**Örnek 12. (2S)-2-etilbütil 2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi) (fenoksi) fosforilamino) propanoat (Bileşik 9)**

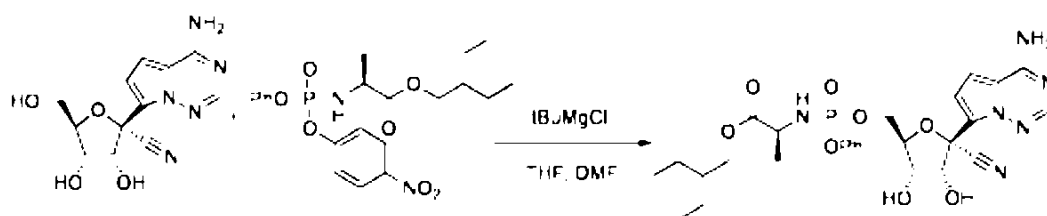
Bileşik 9, aşağıda tarif edilen birtakım yöntemlere göre hazırlanabilir.

### Prosedür 1



Bileşik 8'in hazırlama yöntemine göre Bileşik 1 ve kloridat B'den hazırlanmıştır.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.87 (m, 1H), 7.31-7.16 (m, 5H), 6.92-6.89 (m, 2H), 4.78 (m, 1H), 4.50-3.80 (m, 7H), 1.45-1.24 (m, 8H), 0.95-0.84 (m, 6H).  $^{31}\text{P}$  NMR (121.4 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  3.7. LCMS  $m/z$  603.1  $[\text{M}+\text{H}]$ , 601.0  $[\text{M}-\text{H}]$ .

### Prosedür 2



(2S)-2-etilbütil 2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi) (fenoksi) fosforil) amino) propanoat. (2S)-2-

etilbütül

2-(((4-

nitrofenoksi)(fenoksi)fosforil)amino)propanoat (1.08 g, 2.4 mmol) susuz DMF (9 mL) içinde çözülmüştür ve oda sıcaklığında azot atmosferi altında karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımına bir kışım halinde (2R,3R,4S,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-dihidroksi-5-

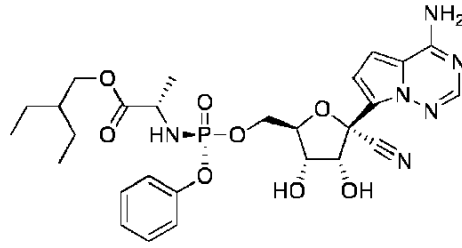
(hidroksimetil)tetrahidrofuran-2-karbonitril (350 mg, 1.2 mmol) ilave edilmiştir. Akabinde reaksiyona yaklaşık 10 dakika boyunca damlalar halinde THF içindeki *t*-bütilmagnezyum klorür solüsyonu (1 M, 1.8 mL, 1.8 mmol) ilave edilmiştir. Reaksiyon yaklaşık 2 sa karıştırılmıştır, bu noktada reaksiyon karışımına etil asetat (50 mL) ile seyreltilmiştir ve doymuş sulu sodyum bikarbonat solüsyonu (15 mL x 3) ve akabinde doymuş sulu sodyum klorür solüsyonu (15 mL) ile yıkanmıştır. Organik katman susuz sodyum sülfat üzerinde kurutulmuştur ve düşük basınç altında konsantre edilmiştir. Elde edilen yağ, (2S)-2-etilbütül

2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi)(fenoksi)fosforil)amino) propanoat (311 mg, %43, fosforda 1:0.4'lük diastereomerik karışım) bir beyaz katı olarak vermek üzere silika jel kolon kromatografisi (DCM içinde %0-10 MeOH) ile saflaştırılmıştır. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.85 (m, 1H), 7.34 - 7.23 (m, 2H), 7.21 - 7.09 (m, 3H), 6.94 - 6.84 (m, 2H), 4.78 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 4.46 - 4.33 (m, 2H), 4.33 - 4.24 (m, 1H), 4.18 (m, 1H), 4.05 - 3.80 (m, 3H), 1.52 - 1.39 (m, 1H), 1.38 - 1.20 (m, 7H), 0.85 (m, 6H). <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 3.71, 3.65. LCMS *m/z* 603.1 [M+H], 600.9 [M-H]. HPLC (8.5 dk boyunca %0.1'lik TFA değiştirici ile birlikte %2-98 MeCN-H<sub>2</sub>O gradyanı, 1.5 mL/dk, Kolon: Phenomenex Kinetex C18, 2.6 µm 100 Å, 4.6 x 100 mm) *t<sub>R</sub>* = 5.544 dk, 5.601 dk.

### (S) ve (R) Diastereomerlerinin Ayrılması

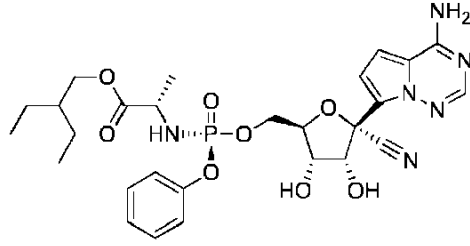
(2S)-2-etilbütül 2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi)(fenoksi)fosforil)amino) propanoat, asetonitril içinde çözülmüştür. Elde edilen solüsyon Lux Selüloz-2 kiral kolonuna yüklenmiştir, asetonitril içinde dengelenmiştir ve izokratik asetonitril/metanol (95:5 (h/h)) ile ayrıştırılmıştır. İlk ayrılan diastereomer 17.4 dk'lık bir kalış süresine sahiptir ve ikinci ayrılan diastereomer 25.0 dk'lık bir kalış süresine sahiptir.

İlk Ayrılan Diastereomer (S)-2-etilbütül 2-(((R)-((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi)(fenoksi)fosforil)amino)propanoattır:



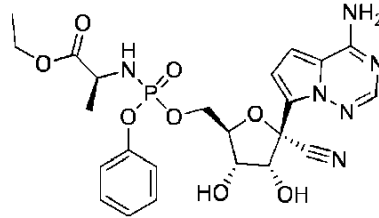
<sup>1</sup>HNMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.05 (s, 1H), 7.36 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 7.29 (br t, J = 7.8 Hz, 2H), 7.19 - 7.13 (m, 3H), 7.11 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 4.73 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.48 - 4.38 (m, 2H), 4.37 - 4.28 (m, 1H), 4.17 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.08 - 3.94 (m, 2H), 3.94 - 3.80 (m, 1H), 1.48 (sep, J = 12.0, 6.1 Hz, 1H), 1.34 (p, J = 7.3 Hz, 4H), 1.29 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 0.87 (t, J = 7.4 Hz, 6H). <sup>31</sup>PNMR (162 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 3.71 (s). HPLC (8.5 dk boyunca %0.1'lik TFA değiştirici ile birlikte %2-98 MeCN-H<sub>2</sub>O gradyanı, 1.5 mL/dk, Kolon: Phenomenex Kinetex C18, 2.6 µm 100 Å, 4.6 x 100 mm) t<sub>R</sub> = 5.585 dk.

İkinci Ayrılan Diastereomer (S)-2-etilbütül 2-(((S)-((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi)(fenoksi)fosforil)amino)propanoattır:



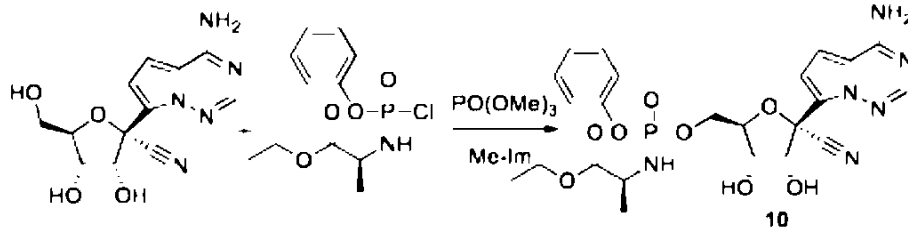
<sup>1</sup>HNMNR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.08 (s, 1H), 7.36 - 7.28 (m, 3H), 7.23 - 7.14 (m, 3H), 7.08 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 4.71 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 4.45 - 4.34 (m, 2H), 4.32 - 4.24 (m, 1H), 4.14 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 4.08 - 3.94 (m, 2H), 3.93 - 3.85 (m, 1H), 1.47 (sep, *J* = 6.2 Hz, 1H), 1.38 - 1.26 (m, 7H), 0.87 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H). <sup>31</sup>PNMNR (162 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 3.73 (s). HPLC (8.5 dk boyunca %0.1'lik TFA değiştirici ile birlikte %2-98 MeCN-H<sub>2</sub>O gradyanı, 1.5 mL/dk, Kolon: Phenomenex Kinetex C18, 2.6 um 100 Å, 4.6 x 100 mm) *t<sub>R</sub>* = 5.629 dk.

**Örnek 13. (2S)-etil 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahydrofuran-2-il)metoksi) (fenoksi)fosforilamino) propanoat (Bileşik 10)**



(2S)-etil 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyan-3,4-dihidroksitetrahydrofuran-2-il)metoksi) (fenoksi)fosforil)amino)propanoat hazırlanışında açıklanır.

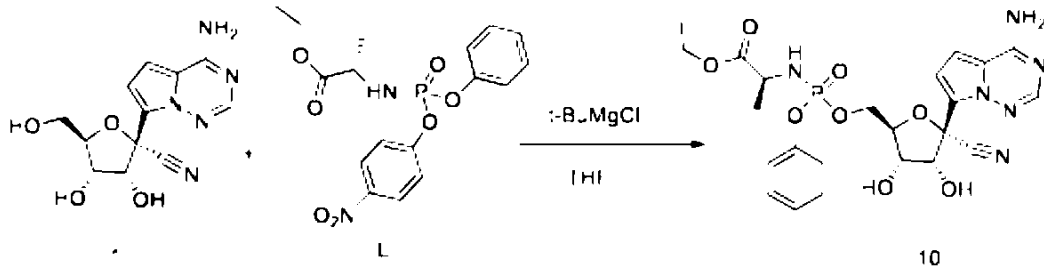
### Prosedür 1. Kloridat A ile hazırlama yöntemi



5 Bileşik **8**'in hazırlama yöntemine göre Bileşik **1** ve kloridat **A**'dan hazırlanmıştır. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.95 (m, 1H), 7.32-6.97 (m, 7H), 4.78 (m, 1H), 4.43-4.08 (m, 6H), 3.83 (m, 1H), 1.31-1.18 (m, 6H). <sup>31</sup>P NMR (121.4 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 3.7. LCMS m/z 547.0 [M+H], 545.0 [M-H].

10

### Prosedür 2. Nitro-Benzen Bileşiği L ile hazırlama yöntemi

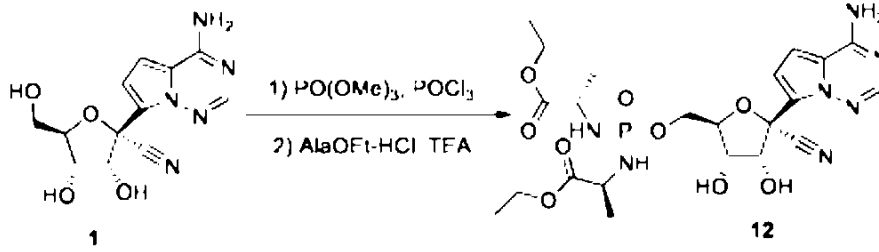


15 Bileşik **1** (50 mg, 0.17 mmol) NMP-THF (1:1 mL)) içinde çözülmüştür ve buz banyosuyla soğutulmuştur. Akabinde yaklaşık 5 dk boyunca tBuMgCl (0.257 mL, 0.257 mmol) ilave edilmiştir. Elde edilen karışım oda sıcaklığına soğutmaya bırakılmıştır ve yaklaşık 30 dk karıştırılmıştır. Akabinde THF (2 mL) içindeki  
20 bileşik **L** (US20120009147'ye göre hazırlanmıştır, 74.6 mg, 0.189 mmol) solüsyonu ilave edilmiştir. Yaklaşık 30 dk sonra reaksiyon karışımı bileşik **29**'u bir sarı katı olarak vermek üzere HPLC (su içinde %10 ila 80 asetonitril) ile saflaştırılmıştır. Katı, bileşik **29**'u vermek üzere tekrar  
25 silika jel kromatografisi (DCM içinde %0 ila %20 MeOH) ile saflaştırılmıştır. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.76 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 7.25 - 7.14 (m, 2H), 7.11 - 6.99 (m, 3H), 6.87 - 6.72

(m, 2H), 4.70 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1H), 4.39 - 4.24 (m, 2H), 4.20 (dddd,  $J = 9.7, 7.9, 5.1, 2.8$  Hz, 1H), 4.10 (dt,  $J = 12.8, 5.5$  Hz, 1H), 4.06 - 3.91 (m, 2H), 3.72 (ddq,  $J = 14.3, 9.3, 7.1$  Hz, 1H), 1.17 (dd,  $J = 7.1, 1.0$  Hz, 1H), 1.14 - 1.06 (m, 5H).

<sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  3.73, 3.68. MS  $m/z = 547$  (M+1)<sup>+</sup>.

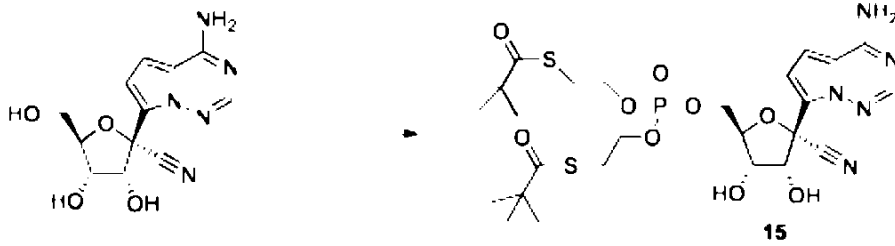
**Örnek 15. (2S,2'S)-dietil 2,2'-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahydrofuran-2-il)metoksi)fosforil)bis(azanedil) dipropanoat (Bileşik 12)**



Nükleosit **1** (14.6 mg, 0.05 mmol) susuz trimetil fosfat (0.5 mL) içinde çözölmüştür ve oda sıcaklığında N<sub>2</sub>(g) altında karıştırılmıştır. POCl<sub>3</sub> (9.2  $\mu$ L, 0.1 mmol) ilave edilmiştir ve karışım yaklaşık 60 dk karıştırılmıştır. Alanin etil ester hidroklorür (61 mg, 0.4 mmol) ve akabinde Et<sub>3</sub>N (70  $\mu$ L, 0.5 mmol) ilave edilmiştir. Elde edilen karışım yaklaşık 15 dk karıştırılmıştır ve akabinde 9-10'luk bir solüsyon pH seviyesi sağlamak üzere ek Et<sub>3</sub>N (70  $\mu$ L, 0.5 mmol) ilave edilmiştir. Karışım yaklaşık 2 sa karıştırılmıştır ve akabinde EtOAc ile seyreltilmiştir, doymuş sulu NaHCO<sub>3</sub> solüsyonu, akabinde doymuş sulu NaCl solüsyonu ile yıkanmıştır. Organik katman susuz Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> üzerinde kurutulmuştur ve düşük basınç altında konsantre edilmiştir. Kalıntı, ürün **12**'yi vermek üzere preparatif HPLC'ye (C<sub>18</sub> kolonu) tabi tutulmuştur. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.13 (s, 1H), 7.41 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H), 7.18 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H), 4.78 (d,  $J = 5.6$  Hz, 1H), 4.36 (m, 1H), 4.25-4.08 (m, 7H), 3.83 (m, 2H), 1.33-1.23 (m, 12H). <sup>31</sup>P NMR (121.4 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  13.8. LCMS  $m/z$  570.0 [M+H], 568.0 [M-H].

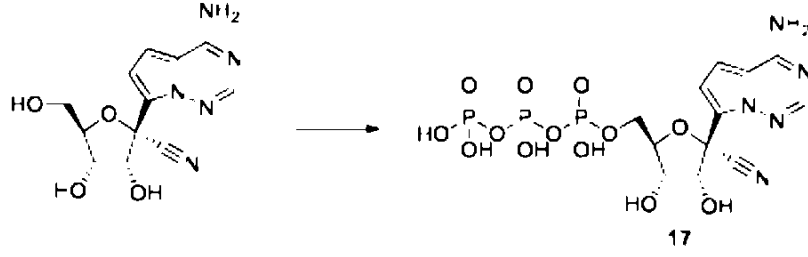


**Örnek 18.** S,S'-2,2'-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi) fosforil)bis (oksi)bis (etan-2,1-diil) bis (2,2-dimetilpropanoat) (Bileşik 15)



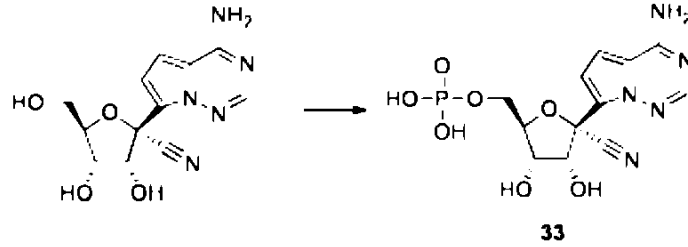
Nükleosit **1** (0.028 g, 0.096 mmol), trimetilfosfat (1 mL) içinde çözülmüştür. Reaksiyon N<sub>2</sub>(g) altında karıştırılmıştır ve akabinde 1H-tetrazol (0.021 g, 0.29 mmol) ile muamele edilmiştir. Reaksiyon karışımı 0°C'ye soğutulmuştur ve fosfan (Nucleoside Nucleotides, Nucleic acids; 14; 3-5; 1995; 763 - 766. Lefebvre, Isabelle; Pompon, Alain; Perigaud, Christian; Girardet, Jean-Luc; Gosselin, Gilles; vd.) (87 mg, 0.192 mmol) ilave edilmiştir. Reaksiyon 2 sa karıştırılmıştır ve akabinde %30 hidrojen peroksit (0.120 mL) ile başlatılmıştır. Karışım oda sıcaklığında 30 dk karıştırılmıştır ve akabinde doymuş sulu sodyum tiosülfat (1 mL) ile muamele edilmiştir. Karışım 10 dk karıştırılmıştır ve akabinde düşük basınç altında konsantre edilmiştir. Kalıntı, başlık ürünü **15**'i izole etmek üzere preparatif HPLC'ye tabi tutulmuştur. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ 7.98 (s, 1H), 6.92 (d, 1H), 6.81 (d, 1H), 6.44 (bs, 2H), 4.82 (m, 2H), 4.47 (m, 1H), 4.24 (m, 2H), 4.00 (m, 4H), 3.80 (bs, 1H), 3.11 (m, 4H), 1.24 (s, 9H). <sup>31</sup>P NMR (121.4 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ -1.85 (s). LCMS m/z 661 [M+H].

**Örnek 20.** (((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metil tetrahidrojen trifosfat (Bileşik 17)



Bileşik **17**, önceden tarif edilen (WO2012012776) benzer bir prosedüre göre bileşik **1**'den hazırlanmıştır. Ürün sodyum tuzu olarak izole edilmiştir. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.76 (s, 1H), 6.88 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 6.73 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 4.86 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.43 (m, 1H), 4.39 (m, 1H), 4.05 (m, 1H), 3.94 (m, 1H). <sup>31</sup>P NMR (121.4 MHz, D<sub>2</sub>O) δ -5.4 (d, 1P), -10.8 (d, 1P), -21.1 (t, 1P). LCMS m/z 530 [M-H], 531.9 [M+H] Tr = 0.22 dk. HPLC iyon değiştirme Tr=9.95 dk.

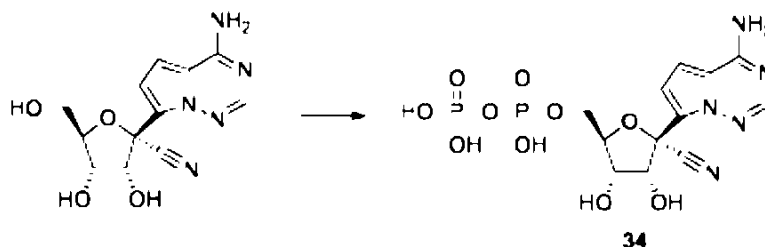
**Örnek 20-a. ((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metil fosfat (Bileşik 33)**



Yaklaşık 0.05 mmol bileşik **1** ve yaklaşık 0.5 mL trimetilfosfat karışımı yaklaşık bir ila yaklaşık 48 saatliğine kapalı bir kaba yerleştirilmiştir. Karışım yaklaşık -10°C ila yaklaşık 10°C'ye soğutulmuştur ve yaklaşık 0.075 mmol fosfor oksiklorür ilave edilmiştir. Yaklaşık bir ila yaklaşık 24 saat sonra reaksiyon yaklaşık 0.5 mL 1 M'lik tetraetilamonyum bikarbonat ile bastırılmıştır ve arzu edilen fraksiyonlar başlık bileşiğini vermek üzere anyon değiştirme kromatografisi ile izole edilmiştir.

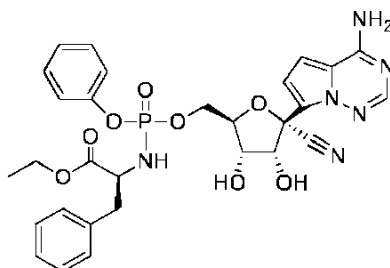
Bileşik **33** önceden tarif edildiği üzere (WO2011150288) bileşik 1'den bis-trietilamonyum tuzu olarak hazırlanmıştır. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.82 (s, 1H), 6.91 – 6.88 (m, 1H), 6.81 – 6.78 (m, 1H), 4.87 – 4.84 (m, 1H), 4.40 – 4.30 (m, 2H), 3.95 – 3.77 (m, 2H), 3.10 – 3.00 (m, 6H), 1.20 – 1.10 (m, 9H). <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 2.33. MS m/z 371.

**Örnek 20-b. ((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metil trihidrojen difosfat (Bileşik 34)**



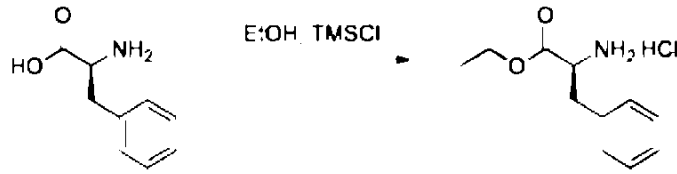
Bileşik **34**, önceden tarif edildiği üzere (WO2002057425) bileşik 1'den tri-lityum tuzu olarak hazırlanmıştır. <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O) δ -5.34 (d), -9.75 (d). MS m/z 451.

**Örnek 24. (2S)-etil 2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi) (fenoksi) fosforil) amino)-3-fenilpropanoat (21)**



(2S)-etil 2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi) (fenoksi) fosforil) amino)-3-fenilpropanoat hazırlanış aşağıda açıklanır.

**(S)-etil 2-amino-3-fenilpropanoat hidroklorürün hazırlanışı.**

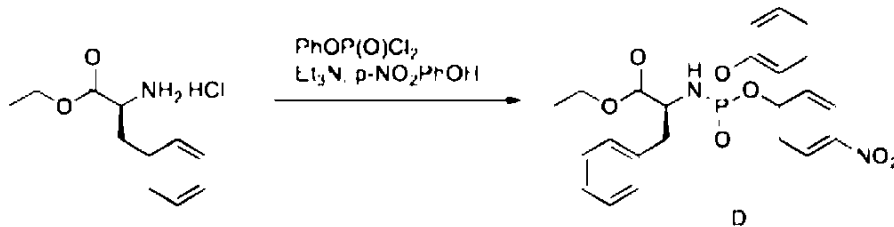


5

L-Fenilalanin (5 g, 30 mmol), EtOH (30 mL) içerisine alınmıştır. Reaksiyona oda sıcaklığında TMSCl (6.915 mL, 54 mmol) ilave edilmiştir. Reaksiyon kabına bir geri akış kondansatörü takılmıştır ve reaksiyon 80°C'lik bir banyoya yerleştirilmiştir. Reaksiyon gece boyu karışmaya bırakılmıştır. Ertesi gün reaksiyon oda sıcaklığına soğutulmuştur, düşük basınç altında konsantre edilmiştir ve elde edilen kalıntı Et<sub>2</sub>O içerisine alınmıştır. Elde edilen bulamaç filtrelenmiştir ve izole edilen katılar tekrar Et<sub>2</sub>O ile yıkanmıştır. Yıkanan katılar, (S)-etil 2-amino-3-fenilpropanoat hidroklorür örneğini vermek üzere yüksek vakum altına yerleştirilmiştir. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.52 (s, 3H), 7.30 (m, 5H), 4.24 (ABX, J<sub>AX</sub> = 7.8 Hz, J<sub>BX</sub> = 6.2 Hz, 1H), 4.11 (m, 2H), 3.17, 3.05 (ABX, J<sub>AB</sub> = -14 Hz, J<sub>BX</sub> = 5.8 Hz, J<sub>AX</sub> = 7.6 Hz, 2H), 1.09 (t, J = 6.8 Hz, 3H).

20

**(2S)-etil 2-(((4-nitrofenoksi) (fenoksi) fosforil) amino)-3-fenilpropanoatın (Bileşik D) hazırlanışı**

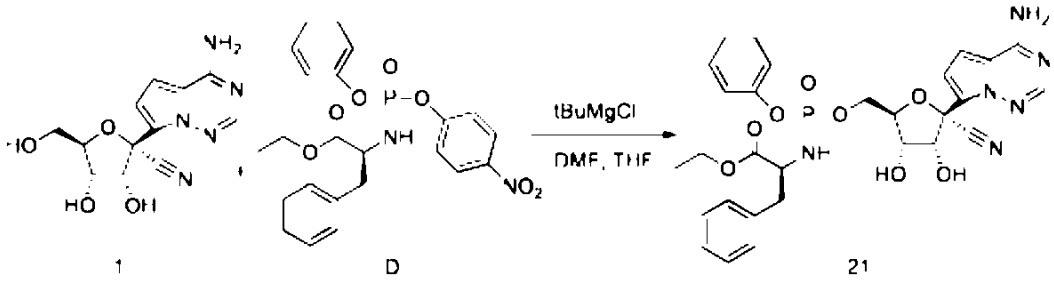


25

(S)-etil 2-amino-3-fenilpropanoat hidroklorür (1.01 g, 4.41 mmol) DCM (50 mL) içinde çözölmüştür. Bu solüsyon yaklaşık 0°C'ye soğutulmuştur ve PhOP(O)Cl<sub>2</sub> (0.656 mL, 4.41 mmol) ilave

edilmiştir, akabinde 5 dk boyunca yavaşça Et<sub>3</sub>N (1.62 mL, 11.5 mmol) ilave edilmiştir. Soğutma banyosu uzaklaştırılmış ve reaksiyon oda sıcaklığına ısınmaya ve 80 dk boyunca karışmaya bırakılmıştır. p-NO<sub>2</sub>PhOH (0.583 g, 4.19 mmol) ve akabinde daha fazla Et<sub>3</sub>N (0.3 mL, 2.1 mmol) ilave edilmiştir. Reaksiyonun ilerleyişi LC/MS ile izlenmiştir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra Et<sub>2</sub>O ile seyreltilmiştir ve elde edilen katılar filtreleme yoluyla uzaklaştırılmıştır. Süzüntü konsantre edilmiştir ve bileşik **D**, silika jel kolon kromatografisi (25 g kuru yük kartuşu, 120 g kolon; elüent: %100 heksanlar → heksanlar içinde %55 EtOAc) ile izole edilmiştir. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.17 (m, 2H), 7.33 (m, 2H), 7.09-7.25 (m, 10H), 4.17 (m, 1H), 4.07 (m, 2H), 3.08 (m, 1H), 2.84 (m, 1H), 1.14 (m, 3H). <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ -1.479 (s), -1.719 (s). MS m/z = 471.01 [M+1].

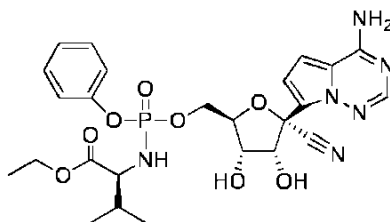
**(2S)-etil 2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi) (fenoksi fosforil) amino)-3-fenilpropanoatın (Bileşik 21) hazırlanışı**



Bileşik **1** (0.030 g, 0.103 mmol) DMF (1 mL) içinde çözülmüştür ve akabinde THF (0.5 mL) ilave edilmiştir. Reaksiyona şiddetli karıştırma eşliğinde damlalar halinde t-BuMgCl (1 M/THF, 154.5 µL, 0.154 µmol) ilave edilmiştir. Elde edilen beyaz bulamaç yaklaşık 30 dk boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Reaksiyona oda sıcaklığında damlalar halinde THF (1 mL) içindeki bileşik **D** (0.058 g, 0.124 mmol) solüsyonu ilave

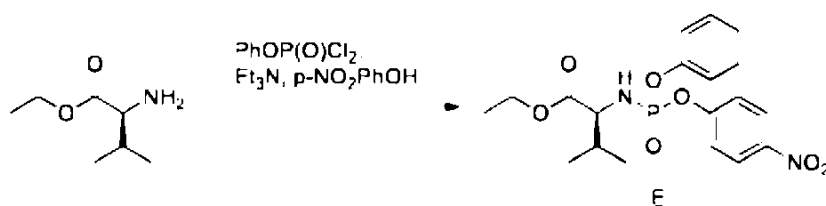
edilmiştir. Reaksiyonun ilerleyişi LC/MS ile izlenmiştir. Reaksiyonun ilerleyişi %50 dönüşüme ulaştığında reaksiyon bir buz banyosunda soğutulmuştur ve saf asetik asit (70 µL) ile bastırılmıştır. Reaksiyon konsantre edilmiştir ve bileşik **21** ters fazlı HPLC ile kalıntıdan izole edilmiştir. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.91 (d, *J* = 4 Hz, 1H), 7.90 (brs, 2H), 7.09-7.30 (m, 8H), 7.01, (t, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.89 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 6.82 (t, *J* = 4.4 Hz, 1H), 6.27 (m, 1H), 6.14 (m, 1H), 5.34 (m, 1H), 4.62 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.15 (m, 1H), 3.78-4.01 (m, 6H), 2.92 (m, 1H), 2.78 (m, 1H), 1.04 (m, 3H). <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3.69 (s), 3.34 (s). MS *m/z* = 623.0 [M+H].

**Örnek 25. (2S)-etil 2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi) (fenoksi) fosforil) amino)-3-metilbütanoat (22)**



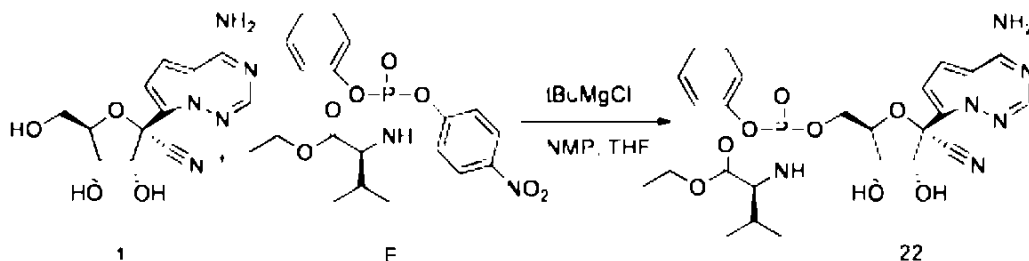
(2S)-etil 2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi) (fenoksi) fosforil) amino)-3-metilbütanoat hazırlanış aşağıda açıklanır.

**(2S)-etil 3-metil-2-(((4-nitrofenoksi) (fenoksi) fosforil) amino) bütanoat (Bileşik E) hazırlanış**



(S)-etil 2-amino-3-metilbütanoat (0.351 g, 1.932 mmol) DCM (17 mL) içinde çözülmüştür. Bu solüsyon bir buz banyosunda soğutulmuştur ve PhOP(O)Cl<sub>2</sub> (0.287 mL, 1.932 mmol) ilave edilmiştir, akabinde yaklaşık 5 dk boyunca yavaşça Et<sub>3</sub>N (1.62 mL, 11.4 mmol) ilave edilmiştir. Soğutma banyosu uzaklaştırılmıştır ve reaksiyon oda sıcaklığına ısınmaya ve 1 saatliğine karışmaya bırakılmıştır. *p*-NO<sub>2</sub>PhOH (0.255 g, 1.836 mmol) ilave edilmiştir ve reaksiyonun ilerleyişi LC/MS ile izlenmiştir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra karışım Et<sub>2</sub>O ile seyreltilmiştir ve elde edilen katılar filtreleme yoluyla uzaklaştırılmıştır. Süzüntü konsantre edilmiştir ve bileşik **E**, silika jel kolon kromatografisi (12 g kuru yük kartuşu, 80 g kolon; elüent: %100 heksanlar → heksanlar içinde %55 EtOAc) ile izole edilmiştir. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.30 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.48 (t, *J* = 9.6 Hz, 2H), 7.40 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.20-7.27 (m, 3H), 6.60 (quart, *J* = 11.6 Hz, 1H), 4.01 (m, 2H), 3.61 (m, 1H), 1.93 (m, 1H), 1.11 (m, 3H), 0.79 (m, 6H). <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ -0.342 (s), -0.578 (s). MS *m/z* = 422.9 [M+H].

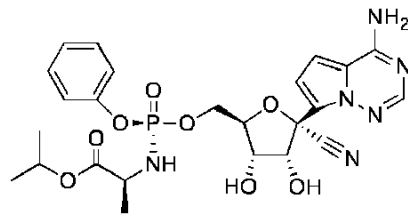
**(2S)-etil 2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi) (fenoksi) fosforil) amino)-3-metilbütanoat**  
**(Bileşik 22) hazırlanış**



Bileşik **1** (0.040 g, 0.137 mmol) NMP (1.5 mL) içinde çözülmüştür ve akabinde THF (0.25 mL) ilave edilmiştir. Bu solüsyon bir buz banyosunda soğutulmuştur ve şiddetli karıştırma eşliğinde damlalar halinde *t*-BuMgCl (1 M/THF, 425.7

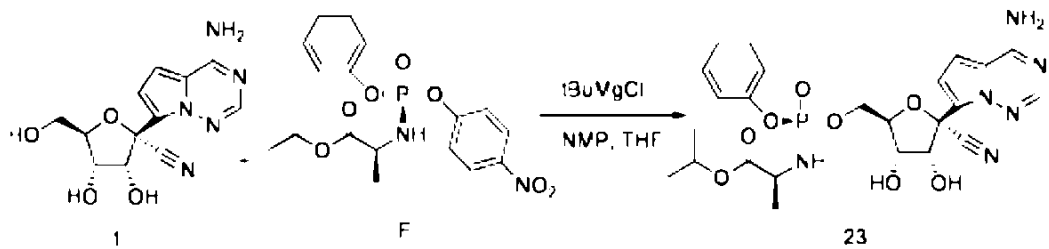
µL, 0.426 µmol) ilave edilmiştir. Buz banyosu uzaklaştırılmıştır ve elde edilen beyaz bulamaç yaklaşık 15 dk boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Reaksiyona oda sıcaklığında damlalar halinde THF (0.5 mL) içindeki bileşik **E** (0.081 g, 0.192 mmol) solüsyonu ilave edilmiştir. Reaksiyonun ilerleyişi LC/MS ile izlenmiştir. Reaksiyonun ilerleyişi %50 dönüşüme ulaştığında reaksiyon bir buz banyosunda soğutulmuştur ve saf asetik asit (70 µL) ile bastırılmıştır. Reaksiyon konsantre edilmiştir ve bileşik **22**, ters fazlı HPLC ile kalıntıdan yarı saflaştırılmıştır. Yarı saf materyal bileşik **22**'yi vermek üzere silika jel kolon kromatografisi (12 g kuru yük kartuşu, 40 g kolon; elüent: %100 EtOAc → EtOAc içinde %10 MeOH) ile tekrar saflaştırılmıştır. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.91 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.88 (brs, 2H), 7.32 (m, 2H), 7.15 (m, 3H), 6.90 (t, *J* = 4.2 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 6.26 (dd, *J* = 13.4, 6.2 Hz, 1H), 5.87 (quart. *J* = 11.2 Hz, 1H), 5.35 (m, 1H), 4.64 (m, 1H), 4.25 (m, 2H), 3.93-4.15 (m, 4H), 3.45 (m, 1H), 1.87 (m, 1H), 1.09-1.16 (m, 3H), 0.70-0.83 (m, 6H). <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.59 (s), 4.47 (s). MS *m/z* = 575.02 [M+H].

**Örnek 26. (S)-izopropil 2-(((R)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi)(fenoksi) fosforil) amino)propanoat (23)**



(S)-izopropil 2-(((R)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi)(fenoksi) fosforil) amino)propanoat'n hazırlanış aşağıda açıklanır.

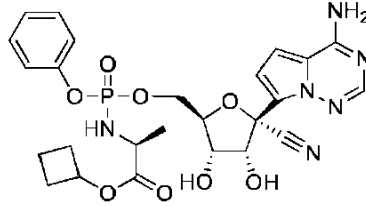




Bileşik 1 (60.0 mg, 206  $\mu\text{mol}$ ) NMP (0.28 mL) içinde  
 5 çözülmüştür. Oda sıcaklığında argon atmosferi altında THF (0.2  
 mL) ve akabinde tert-bütil magnezyum klorür (1.0 M solüsyon in  
 tetrahidrofuran, 0.309 mL) ilave edilmiştir. 20 dk sonra THF  
 (0.2 mL) içindeki bileşik **F** (Cho, A. vd. J. Med. Chem. 2014,  
 57, 1812-1825 referanslı yayına göre hazırlanmıştır, 81 mg,  
 206  $\mu\text{mol}$ ) solüsyonu ilave edilmiştir ve elde edilen karışım  
 10 yaklaşık  $50^\circ\text{C}$ 'ye ısıtılmıştır. 3 sa sonra reaksiyon karışımı  
 oda sıcaklığına soğumaya bırakılmıştır ve bileşik **23**'ü vermek  
 üzere doğrudan preparatif HPLC (Phenomenex Synergi 4u Hidro-RR  
 80Å 150 x 30 mm kolon, %5-100 asetonitril/su gradyanı) ile  
 15 saflaştırılmıştır.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.86 (s, 1H), 7.34  
 - 7.26 (m, 2H), 7.21 - 7.12 (m, 3H), 6.91 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 1H),  
 6.87 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 1H), 4.92 (sept,  $J$  = 6.3 Hz, 1H), 4.80  
 (d,  $J$  = 5.4 Hz, 1H), 4.43 - 4.34 (m, 1H), 4.33 - 4.24 (m, 1H),  
 4.18 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 1H), 3.82 (dq,  $J$  = 9.7, 7.1 Hz, 2H), 1.27  
 (dd,  $J$  = 7.1, 1.0 Hz, 3H), 1.18 (dd,  $J$  = 6.3, 4.8 Hz, 6H).  $^{31}\text{P}$   
 20 NMR (162 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  3.72 (s). LC/MS:  $t_R$  = 1.39 dk, MS  $m/z$  =  
 561.11  $[\text{M}+\text{H}]$ ; LC sistemi: Thermo Accela 1250 UHPLC; MS  
 sistemi: Thermo LCQ Fleet; Kolon: Kinetex 2.6 $\mu$  XB-C18 100A, 50  
 x 4.6 mm; Solventler: %0.1 asetik asit ile birlikte ACN, %0.1  
 asetik asit ile birlikte su; Gradyan: 0 dk-2.0 dk arasında %2-  
 25 100 ACN, 2.0 dk-3.05 dk arasında %100 ACN, 3.05 dk-3.2 dk  
 arasında %100-%2 ACN, 3.2 dk-3.5 dk arasında %2 ACN, 2  $\mu\text{L}$ /dk.  
 HPLC:  $t_R$  = 2.523 dk; HPLC sistemi: Agilent 1100 serisi; Kolon:  
 Gemini 5 $\mu$  C18 110A, 50 x 4.6 mm; Solventler: %0.1 TFA ile  
 birlikte ACN, %0.1 TFA ile birlikte Su; Gradyan: 0 dk-5.0 dk  
 30 arasında %2-98 ACN, 5.0 dk-6.0 dk arasında %98 ACN, 2 mL/dk.

**Örnek 27. (2S)-siklobütil 2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi) (fenoksi) fosforil) amino) propanoat (24)**

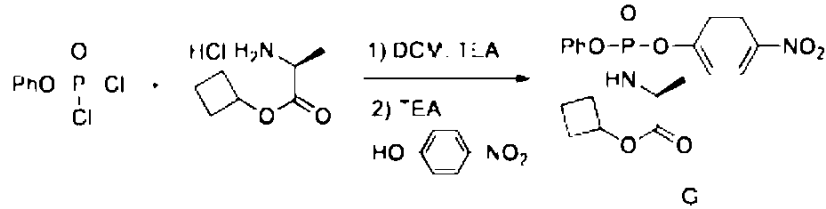
5



(2S)-siklobütil 2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-ammopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi) (fenoksi) fosforil) amino)propanoatLn hazırlanışL  
10 aşağıda açıklanılır.

**(2S)-siklobütil 2-((((4-nitrofenoksi) (fenoksi) fosforil) amino)propanoatın (Bileşik G) hazırlanış**

15



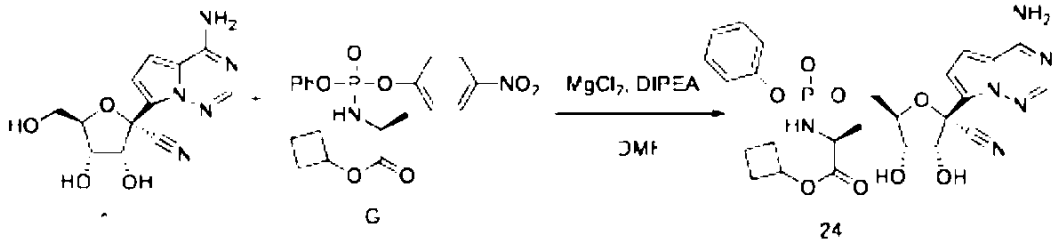
G

Fenil diklorofosfat (1.49 mL, 10 mmol) 10 mL susuz DCM içinde  
20 çözülmüştür ve azot atmosferi altında bir buz banyosunda karıştırılmıştır. Bir kışım halinde L-Alanin izobütil ester hidroklorür (0.9 g, 5 mmol) ilave edilmiştir. Akabinde damlalar halinde trietilamin (765 µL, 5.5 mmol) ilave edilmiştir. Reaksiyon yaklaşık 1 sa karıştırılmıştır. Tekrar  
25 damlalar halinde trietilamin (765 µL, 5.5 mmol) ilave edilmiştir ve reaksiyon yaklaşık 45 dk karıştırılmıştır. Bir kışım halinde p-nitrofenol (1.25g, 9 mmol) ilave edilmiştir ve yaklaşık 30 dk karıştırılmıştır. Trietilamin (765 µL, 5.5 mmol) ilave edilmiştir ve reaksiyon karışım yaklaşık 2 sa

karıştırılmıştır. Akabinde tekrar p-nitrofenol (1.25g, 9 mmol) ve trietilamin (765 µL, 5.5 mmol) ilave edilmiştir ve reaksiyon yaklaşık 2 sa daha karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımı düşük basınç altında konsantre edilmiştir. Elde edilen ham ürün EtOAc ile seyreltilmiştir ve %5 sulu sitrik asit solüsyonu ve akabinde doymuş sulu sodyum klorür solüsyonu ile iki kez yıkanmıştır. Akabinde organik katman susuz sodyum sülfat üzerinde kurutulmuştur ve düşük basınç altında konsantre edilmiştir. Ham kalıntı, bileşik G'yi vermek üzere silika jel kolonu (heksanlar içinde %0-20-50 EtOAc) ile saflaştırılmıştır. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.33 - 8.23 (m, 2H), 7.52 - 7.33 (m, 4H), 7.33 - 7.17 (m, 3H), 4.96 - 4.85 (m, 1H), 4.07 - 3.96 (m, 1H), 2.27 (m, 2H), 2.07 - 1.91 (m, 2H), 1.83 - 1.70 (m, 1H), 1.70 - 1.55 (m, 1H), 1.32 (m, 3H). <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ -1.36, -1.59. MS m/z = 420.9 [M+H].

**(2S)-siklobütil 2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi) (fenoksi fosforil) amino)propanoat (Bileşik 24)**

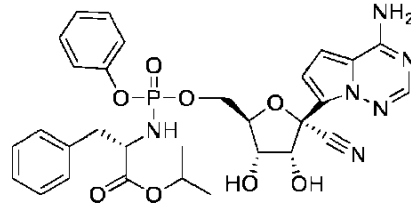
**hazırlanışı**



Bileşik 1 (58 mg, 0.2 mmol) ile bileşik G (101 mg, 0.24 mmol) 2 mL susuz DMF içinde karıştırılmıştır. Bir kısım halinde magnezyum klorür (42 mg, 0.44 mmol) ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı yaklaşık 50°C'ye ısıtılmıştır. DIPEA (87 µL, 0.5 mmol) ilave edilmiştir ve reaksiyon yaklaşık 50°C'de yaklaşık 2 sa karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığına soğutulmuştur, EtOAc ile seyreltilmiştir ve %5 sulu sitrik asit solüsyonu ve akabinde doymuş sulu sodyum

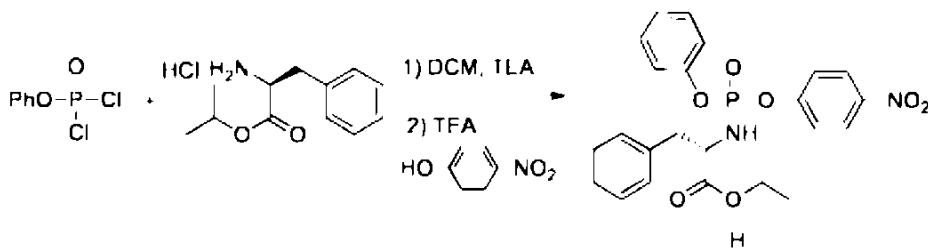
klorür solüsyonu ile yıkandı. Akabinde organik katman  
susuz sodyum sülfat üzerinde kurutulmuştur ve düşük basınç  
altında konsantre edilmiştir. Ham kalıntı, bileşik **24**'ü vermek  
üzere silika jel kolonu (DCM içinde %0-2-5 MeOH) ile  
5 saflaştırılmıştır. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Metanol-d<sub>4</sub>) δ 7.85 (m, 1H),  
7.34 - 7.22 (m, 2H), 7.22 - 7.08 (m, 3H), 6.94 - 6.84 (m, 2H),  
4.95 - 4.85 (m, 1H), 4.79 (m, 1H), 4.46 - 4.34 (m, 2H), 4.34 -  
4.24 (m, 1H), 4.19 (m, 1H), 3.81 (m, 1H), 2.27 (m, 2H), 2.01  
(m, 2H), 1.84 - 1.68 (m, 1H), 1.62 (m, 1H), 1.30 - 1.16 (m,  
10 3H). <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, cd<sub>3</sub>od) δ 3.70, 3.65. MS m/z = 573.0  
[M+H].

**Örnek 28. (2S)-izopropil 2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-  
aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-  
15 dihidroksitetrahydrofuran-2-  
il)metoksi) (fenoksi) fosforil) amino)-3-fenilpropanoat (25)**



(2S)-izopropil 2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-ammopirrolo[2,1-  
f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahydrofuran-  
2-il)metoksi) (fenoksi) fosforil) amino)-3-fenilpropanoat  
hazırlanış aşağıda açıklanır.

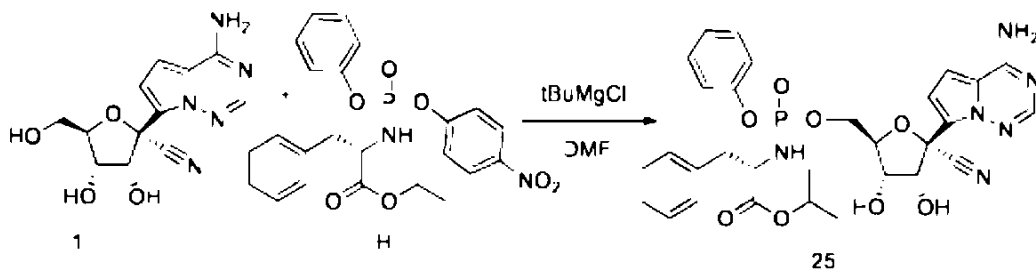
**(2S)-izopropil 2-(((4-nitrofenoksi) (fenoksi) fosforil) amino)-3-  
fenilpropanoatın (Bileşik H) hazırlanış**



Fenil diklorofosfat (718 µL, 4.8 mmol) 10 mL susuz DCM içinde  
çözülmüştür ve azot atmosferi altında bir buz banyosunda  
karıştırılmıştır. Bir kışım halinde L-fenilalanin izopropil  
5 ester hidroklorür (1 g, 4.1 mmol) ilave edilmiştir. Başka bir  
10 mL susuz DCM ilave edilmiştir. Damlalar halinde trietilamin  
(736 µL, 5.3 mmol) ilave edilmiştir ve reaksiyon karışımı  
yaklaşık 30 dk karıştırılmıştır. Akabinde tekrar damlalar  
halinde trietilamin (736 µL, 5.3 mmol) ilave edilmiştir ve  
15 reaksiyon karışımı 30 dk karıştırılmıştır. Akabinde tekrar  
damlalar halinde trietilamin (736 µL, 5.3 mmol) ilave  
edilmiştir ve reaksiyon karışımı yaklaşık 15 dk  
karıştırılmıştır. Akabinde p-nitrofenol (600 mg, 4.32 mmol)  
ilave edilmiştir. Akabinde buz banyosu uzaklaştırılmıştır ve  
15 reaksiyon karışımı oda sıcaklığına bırakılmıştır ve  
yaklaşık 2 sa karıştırılmıştır. Tekrar p-nitrofenol (50 mg) ve  
triethylamin (736 µL, 5.3 mmol) ilave edilmiştir ve reaksiyon  
karışımı yaklaşık 1 sa karıştırılmıştır.

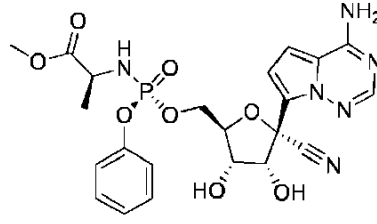
20 Reaksiyon karışımı akabinde düşük basınç altında konsantre  
edilmiştir ve EtOAc ile seyreltilmiştir ve %5 sulu sitrik asit  
solüsyonu, akabinde doymuş sulu sodyum klorür solüsyonu ile  
iki kez yıkanmıştır. Organik katman susuz sodyum sülfat  
25 üzerinde kurutulmuştur ve düşük basınç altında konsantre  
edilmiştir. Ham ürün, bileşik H'yi vermek üzere silika jel  
kolonu (heksanlar içinde %0-15 EtOAc) ile saflaştırılmıştır. <sup>1</sup>H  
NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.17 (m, 2H), 7.38 - 7.13 (m, 10H), 7.13  
- 7.02 (m, 2H), 4.95 (m, 1H), 4.31 (m, 1H), 3.69 (m, 1H), 3.02  
(dd, J = 6.1, 1.8 Hz, 2H), 1.21 - 1.08 (m, 6H). <sup>31</sup>P NMR (162  
30 MHz, cdcl<sub>3</sub>) δ -2.96, -2.98. MS m/z = 485.0 [M+H].

**(2S)-izopropil 2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi) (fenoksi) fosforil) amino)-3-fenilpropanoat**  
35 **(Bileşik 25) hazırlanış**



Bileşik **1** (58 mg, 0.2 mmol) ve bileşik **H** (116 mg, 0.24 mmol) karıştırılır ve 2 mL susuz DMF ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında azot atmosferi altında karıştırılır. 3 dakika boyunca damlalar halinde THF içinde 1 M tBuMgCl (300 µL, 0.3 mmol) ilave edilmiştir ve akabinde reaksiyon karışımı yaklaşık 16 sa karıştırılır. Reaksiyon karışımı EtOAc ile seyreltilmiştir ve %5 sulu sitrik asit solüsyonu, doymuş sulu sodyum bikarbonat solüsyonu ve akabinde doymuş sulu sodyum klorür solüsyonu ile yıkanmıştır. Organik katman susuz sodyum sülfat üzerinde kurutulmuştur ve düşük basınç altında konsantre edilmiştir. Ham kalıntı, bileşik **25**'i vermek üzere silika jel kolonu (DCM içinde %0-5 MeOH) ile saflaştırılmıştır. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.84 (m, 1H), 7.27 - 7.08 (m, 8H), 7.08 - 6.97 (m, 2H), 6.88 (m, 2H), 4.91 - 4.84 (m, 1H), 4.74 (m, 1H), 4.26 (m, 1H), 4.19 - 4.04 (m, 2H), 4.04 - 3.91 (m, 2H), 2.97 (m, 1H), 2.82 (m, 1H), 1.14 (m, 3H), 1.06 (m, 3H). <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 3.63, 3.25. MS m/z = 637.0 [M+H].

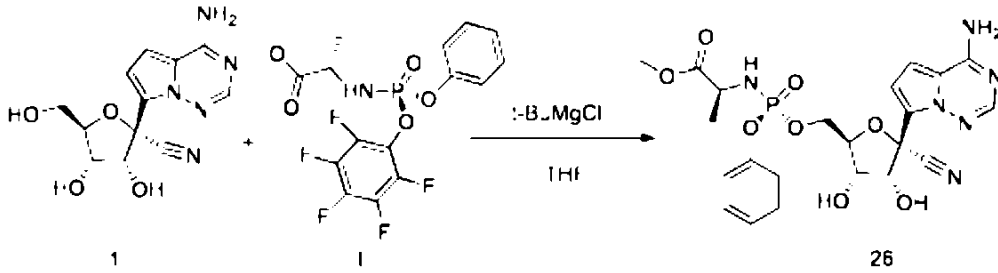
**Örnek 29. (S)-metil 2-(((S)-((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[02,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahydrofuran-2-il)metoksi)(fenoksi)fosforil)amino) propanoat (26)**



(S)-metil2-(((S)-((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-

f)[1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-

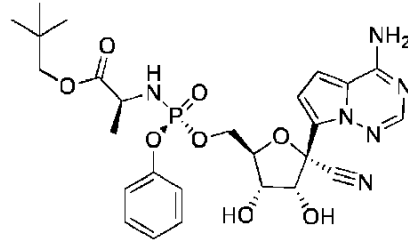
5 2-il)metoksi)(fenoksi)fosforil)amino)propanoat hazırlanmış  
aşağıda açıklanır.



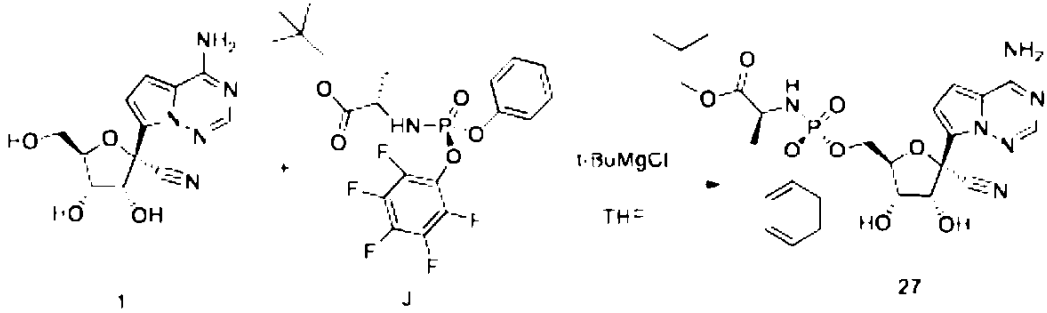
Bileşik **1** (100 mg, 0.34 mmol) THF (2 mL) içinde çözülmüştür ve  
10 bir buzlu su banyosuyla soğutulmuştur. Akabinde yavaşça  
damlalar halinde 1 M t-BuMgCl (0.52 mL, 0.77 mmol) ilave  
edilmiştir. Elde edilen karışım oda sıcaklığında yaklaşık 30  
dk karıştırılmıştır. Akabinde 5 dk boyunca THF (2 mL) içinde  
bileşik **I** (WO 2012142085'e göre hazırlanmıştır, 219 mg, 0.52  
15 mmol) ilave edilmiştir ve elde edilen karışım oda sıcaklığında  
yaklaşık 24 sa karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımının akabinde  
EtOAc ile seyreltilmiştir, buzlu su banyosuyla soğutulmuştur,  
sulu NaHCO<sub>3</sub> (2 mL) ile yıkanmıştır, tuzlu su ile yıkanmıştır,  
sodyum sülfat ile kurutulmuştur ve vakum altında konsantre  
20 edilmiştir. Elde edilen karışım, bileşik **26**'yı vermek üzere  
silika jel kolon kromatografisi (DCM içinde %0 ila %20 MeOH)  
ve prep-HPLC (su içinde %10 ila %80 asetonitril) ile  
saflaştırılmıştır. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.86 (s, 1H), 7.29  
(dd, *J* = 8.6, 7.2 Hz, 2H), 7.21 - 7.09 (m, 3H), 6.94 - 6.81  
25 (m, 2H), 4.79 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 4.38 (ddq, *J* = 10.8, 5.3,  
2.7 Hz, 2H), 4.33 - 4.23 (m, 1H), 4.18 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H),

3.86 (dq,  $J = 9.9, 7.1$  Hz, 1H), 3.62 (s, 3H), 1.27 (dd,  $J = 7.2, 1.1$  Hz, 3H). MS  $m/z = 533$  (M+1)<sup>+</sup>.

**Örnek 30. (S)-neopentil 2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi)(fenoksi)fosforil)amino) propanoat (27)**



(S)-neopentil 2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4] triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi)(fenoksi)fosforil)amino) propanoatın hazırlanış aşağıda açıklanır.

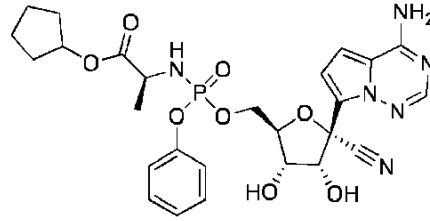


Bileşik **1** (100 mg, 0.34 mmol) THF (2 mL) içinde çözülmüştür ve buzlu su banyosuyla soğutulmuştur. Akabinde yavaşça damlalar halinde 1 M t-BuMgCl (0.52 mL, 0.77 mmol) ilave edilmiştir. Elde edilen karışım oda sıcaklığında yaklaşık 30 dk karıştırılmıştır. Akabinde yaklaşık 5 dk boyunca bileşik **J** (WO2012075140'a göre hazırlanmıştır, 248 mg, 0.52 mmol) ilave edilmiştir ve elde edilen karışım oda sıcaklığında yaklaşık 24 sa karıştırılmıştır, EtOAc ile seyreltilmiştir, buzlu su banyosuyla soğutulmuştur, sulu NaHCO<sub>3</sub> (2 mL) ile muamele

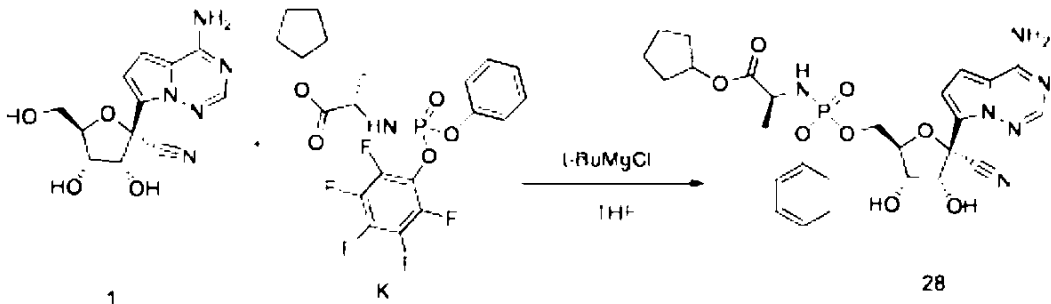


edilmiştir, tuzlu su ile yıkanmıştır, sodyum sülfat ile kurutulmuştur ve vakum altında konsantre edilmiştir. Elde edilen karışım, Bileşik **27**'yi vermek üzere silika jel kolon kromatografisi (DCM içinde %0 ila %20 MeOH) ve prep-HPLC (su içinde %10 ila %80 asetronitril) ile saflaştırılmıştır. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.86 (s, 1H), 7.36 - 7.24 (m, 2H), 7.23 - 7.10 (m, 3H), 6.96 - 6.85 (m, 2H), 4.78 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 4.38 (tdd, *J* = 10.0, 4.9, 2.5 Hz, 2H), 4.32 - 4.24 (m, 1H), 4.17 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 3.91 (dq, *J* = 9.8, 7.1 Hz, 1H), 3.81 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H), 3.69 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H), 1.31 (dd, *J* = 7.2, 1.1 Hz, 3H), 0.89 (s, 9H). MS *m/z* = 589 (M+1)<sup>+</sup>.

**Örnek 31. (2S)-siklopentil 2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi)(fenoksi)fosforil)amino) propanoat (28)**

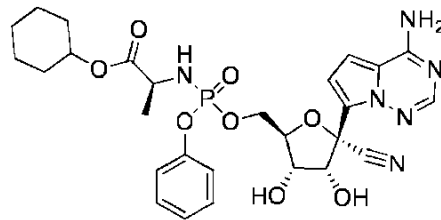


(2S)-siklopentil 2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi)(fenoksi)fosforil)amino) propanoatın hazırlanışı aşağıda açıklanır.



Bileşik **1** (100 mg, 0.34 mmol) THF (2 mL) içinde çözülmüştür ve buzlu su banyosuyla soğutulmuştur. Akabinde yavaşça damlalar halinde 1 M t-BuMgCl (0.52 mL, 0.77 mmol) ilave edilmiştir. Elde edilen karışım oda sıcaklığında yaklaşık 30 dk 5 karıştırılmıştır. Akabinde yaklaşık 5 dk boyunca THF (2 mL) içinde bileşik **K** (WO2012075140'a göre hazırlanmıştır, 247 mg, 0.52 mmol) ilave edilmiştir ve elde edilen karışım oda sıcaklığında yaklaşık 24 sa karıştırılmıştır, EtOAc ile seyreltilmiştir, buzlu su banyosuyla soğutulmuştur, sulu NaHCO<sub>3</sub> 10 (2 mL) ile muamele edilmiştir, tuzlu su ile yıkanmıştır, sodyum sülfat ile kurutulmuştur ve vakum altında konsantre edilmiştir. Elde edilen karışım, örnek **28**'i vermek üzere silika jel kolon kromatografisi (DCM içinde %0 ila %20 MeOH) ve prep-HPLC (su içinde %10 ila %80 asetonitril) ile 15 saflaştırılmıştır. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.85 (s, 1H), 7.33 - 7.22 (m, 2H), 7.14 (tdd, *J* = 7.6, 2.1, 1.1 Hz, 3H), 6.95 - 6.87 (m, 2H), 5.13 - 5.00 (m, 1H), 4.78 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 4.48 - 4.35 (m, 2H), 4.30 (ddd, *J* = 10.6, 5.7, 3.6 Hz, 1H), 4.19 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 3.78 (dq, *J* = 9.2, 7.1 Hz, 1H), 1.81 20 (dtd, *J* = 12.5, 5.9, 2.4 Hz, 2H), 1.74 - 1.49 (m, 6H), 1.21 (dd, *J* = 7.1, 1.2 Hz, 3H). MS *m/z* = 587 (M+1)<sup>+</sup>.

**Örnek 32. (2S)-sikloheksil 2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-**  
25 **dihidroksitetrahidrofuran-2-**  
**il)metoksi) (fenoksi) fosforil) amino) propanoat (29)**

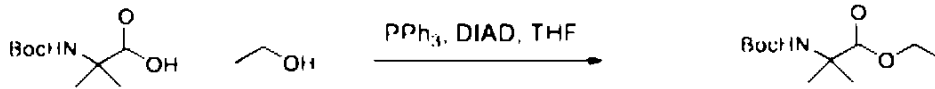




Etil 2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi)(fenoksi)fosforil)amino)-2-metilpropanoatın hazırlanışı aşağıda açıklanır.

5

**Etil 2-((tert-bütoksikarbonil)amino)-2-metilpropanoatın hazırlanışı**



10

Trifenilfosfin (6.18 g, 25.00 mmol) THF (30 mL) içine alınmıştır. Akabinde DIAD (4.92 mL, 25.00 mmol) yüklenmiştir ve oda sıcaklığında 10 dk karıştırılmıştır. 2-((tert-bütoksikarbonil)amino)-2-metilpropanoik asit (5.08 g, 25.00 mmol) THF (20 mL) içinde çözülmüştür ve reaksiyon karışımına ilave edilmiştir, akabinde etanol (2.19 mL, 37.49 mmol) ilave edilmiştir. Reaksiyon oda sıcaklığında yaklaşık 1 sa karışmaya bırakılmıştır. Solventler düşük basınç altında uzaklaştırılmıştır ve ham ürün 1:1'lik Et<sub>2</sub>O:Heksanlar (120 mL) içerisine alınmıştır. Katı trifenilfosfin oksit filtrelenerek uzaklaştırılmıştır ve solvent düşük basınç altında uzaklaştırılmıştır. Ham ürün minimal CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> içerisine alınmıştır ve etil 2-((tert-bütoksikarbonil)amino)-2-metilpropanoatı vermek üzere silika jel kromatografisi (%0-50 EtOAc/Hex) ile saflaştırılmıştır. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Kloroform-d) δ 4.18 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 1.49 (s, 6H), 1.43 (s, 9H), 1.27 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

15

20

25

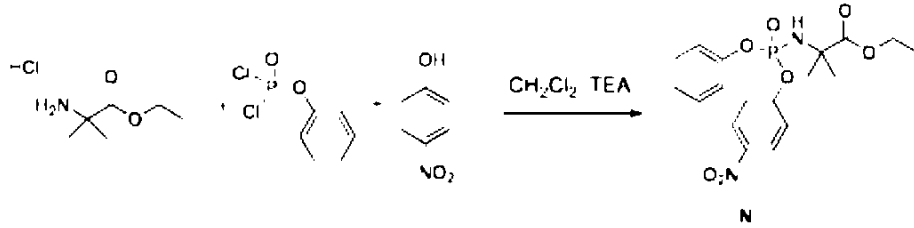
**Etil 2-amino-2-metilpropanoat hidroklorürün hazırlanışı**

30



Etil 2-((tert-bütoksikarbonil)amino)-2-metilpropanoat (2.71 g, 11.72 mmol) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 mL) içerisine alınır ve yavaşça dioksan içinde 4 N HCl (25 mmol) ilave edilmiştir ve oda sıcaklığında karıştırılmıştır. 1 sa sonra reaksiyonun tamamlandığı TLC ile doğrulanmıştır. Solventler düşük basınç altında uzaklaştırılmıştır ve ham ürün iki kez Et<sub>2</sub>O ile birlikte buharlaştırılmıştır, akabinde etil 2-amino-2-metilpropanoat hidroklorürü vermek üzere yüksek vakum altına yerleştirilmiştir. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.70 (s, 3H), 4.18 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 1.46 (s, 6H), 1.21 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

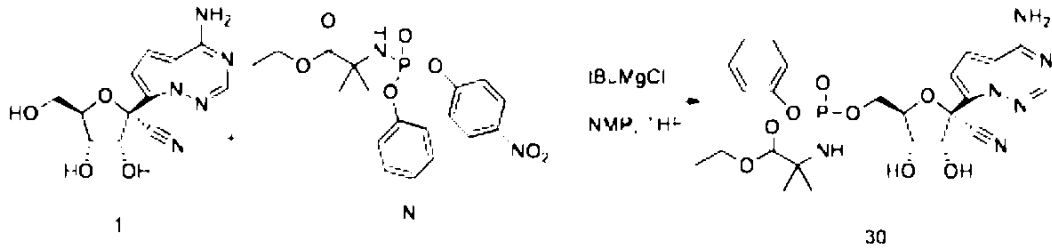
**Etil 2-metil-2-((4-nitrofenoksi) (fenoksi) fosforil) amino)propanoat (Bileşik N) hazırlanışı**



Fenil diklorofosfat (0.97 mL, 6.50 mmol) ve etil 2-amino-2-metilpropanoat hidroklorür (1.09 g, 6.50 mmol) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) içerisine alınır. Reaksiyon karışımı yaklaşık 0°C'ye soğutulmuştur ve yavaşça TEA (1.75 mL, 12.45 mmol) ilave edilmiştir. Soğutma banyosu uzaklaştırılmıştır ve reaksiyon karışımı oda sıcaklığında karışmaya bırakılmıştır. Yaklaşık 2 sa sonra amino asit ilavesinin tamamlandığı <sup>31</sup>P NMR ile doğrulanmıştır. p-Nitrofenol (0.860 g, 6.17 mmol) yüklenmiştir ve akabinde TEA (0.87 g, 7.69 mmol) ilave edilmiştir. Reaksiyon oda sıcaklığında karışmaya bırakılmıştır. Yaklaşık 2 sa sonra reaksiyonun tamamlandığı LCMS ile doğrulanmıştır. Reaksiyon Et<sub>2</sub>O ile seyreltilmiştir ve TEA•HCl tuzları filtrelenerek uzaklaştırılmıştır. Ham ürün konsantre

edilmiştir ve bileşik **N**'yi vermek üzere silika jel kromatografisi (%0-50 EtOAc/Hex) ile saflaştırılmıştır. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.37 - 8.21 (m, 2H), 7.55 - 7.44 (m, 2H), 7.43 - 7.33 (m, 2H), 7.30 - 7.09 (m, 3H), 6.57 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 3.99 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.39 (s, 6H), 1.08 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). LC/MS: *t*<sub>R</sub> = 1.65 dk, MS *m/z* = 408.97 [M+1].; LC sistemi: Thermo Accela 1250 UHPLC; MS sistemi: Thermo LCQ Fleet; Kolon: Kinetex 2.6μ XB-C18 100A, 50 x 3.00 mm; Solventler: %0.1 formik asit ile birlikte Asetonitril, %0.1 formik asit ile birlikte Su; Gradyan: 0 dk-2.4 dk arasında %2-100 ACN, 2.4 dk-2.80 dk arasında %100 ACN, 2.8 dk-2.85 dk arasında %100-%2 ACN, 2.85 dk-3.0 dk arasında %2 ACN, 1.8 mL/dk.

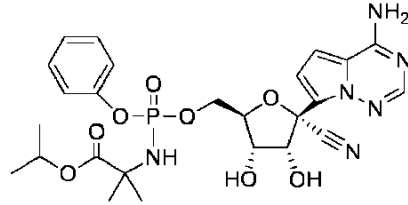
**Etil 2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi) (fenoksi) fosforil) amino)-2-metilpropanoat (Bileşik 30) hazırlanışı**



Bileşik **1** (66 mg, 0.23 mmol) NMP (2.0 mL) içerisine alınmıştır. Karışım yaklaşık 0°C'ye soğutulmuştur ve yavaşça tBuMgCl (THF içinde 1.0 M, 0.34 mL, 0.34 mmol) ilave edilmiştir. Reaksiyon yaklaşık 30 dk boyunca yaklaşık 0°C'de karışmaya bırakılmıştır, akabinde THF (1.0 mL) içinde çözülmüş bileşik **N** (139 mg, 0.34 mmol) solüsyonu ilave edilmiştir. Soğutma banyosu uzaklaştırılmıştır ve reaksiyon önceden ısıtılmış yaklaşık 50°C'lik yağ banyosuna yerleştirilmiştir. Yaklaşık 2 sa sonra reaksiyon oda sıcaklığına soğutulmuştur ve asetik asit ve metanol ile bastırılmıştır. Ham ürün konsantre

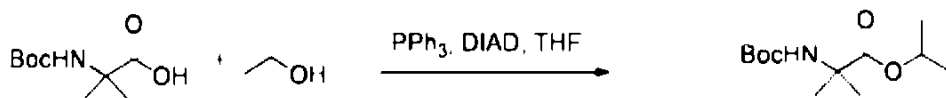
edilmiştir ve bileşik **30**'u vermek üzere değiştirici olmadan ters fazlı HPLC ile saflaştırılmıştır. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.89 (m, 3H), 7.31 (q, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.22 - 7.05 (m, 3H), 6.87 (d, *J* = 4.5, 1H), 6.80 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 6.27 (d, *J* = 11.7, 1H), 5.81 (d, *J* = 9.7, 1H), 5.35 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.64 (dt, *J* = 9.0, 5.6 Hz, 1H), 4.24 (m, 2H), 4.11 (m, 1H), 4.04-3.90 (m, 3H), 1.39 - 1.23 (m, 6H), 1.10 (t, *J* = 7.1, 3H). <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.45, 2.41. LC/MS: *t*<sub>R</sub> = 1.03 dk, MS *m/z* = 561.03 [M+1]; LC sistemi: Thermo Accela 1250 UHPLC; MS sistemi: Thermo LCQ Fleet; Kolon: Kinetex 2.6μ XB-C18 100A, 50 x 3.00 mm; Solventler: %0.1 formik asit ile birlikte Asetonitril, %0.1 formik asit ile birlikte Su; Gradyan: 0 dk-2.4 dk arasında %2-100 ACN, 2.4 dk-2.80 dk arasında %100 ACN, 2.8 dk-2.85 dk arasında %100-%2 ACN, 2.85 dk-3.0 dk arasında %2 ACN, 1.8 mL/dk.

**Örnek 34. İzopropil 2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi) (fenoksi) fosforil) amino)-2-metilpropanoat (31)**



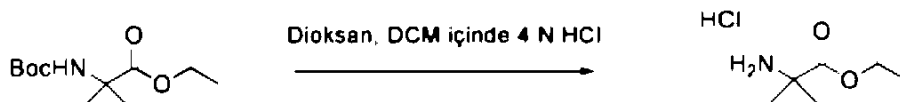
İzopropil 2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi) (fenoksi) fosforil) amino)-2-metilpropanoatın hazırlanış aşağıda açıklanır.

**İzopropil 2-((tert-bütoksikarbonil) amino)-2-metilpropanoat in hazırlanış**



Trifenilfosfin (6.17 g, 25.00 mmol) THF (30 mL) içine alınmıştır. Akabinde DIAD (4.92 mL, 25.00 mmol) yüklenmiştir ve oda sıcaklığında yaklaşık 10 dk karıştırılmıştır. 2-((tert-bütoksikarbonil)amino)-2-metilpropanoik asit (5.07 g, 25.00 mmol) THF (20 mL) içinde çözülmüştür ve reaksiyon karışımına ilave edilmiştir, akabinde izopropanol (1.91 mL, 25.00 mmol) ilave edilmiştir. Reaksiyon yaklaşık 1 sa boyunca oda sıcaklığında karışmaya bırakılmıştır. Solventler düşük basınç altında uzaklaştırılmıştır ve ham ürün 1:1'lik Et<sub>2</sub>O:Heksanlar (120 mL) içerisine alınmıştır. Katı trifenilfosfin oksit filtrelenerek uzaklaştırılmıştır ve solvent düşük basınç altında uzaklaştırılmıştır. Ham ürün minimal CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> içerisine alınmıştır ve izopropil 2-((tert-bütoksikarbonil)amino)-2-metilpropanoat vermek üzere silika jel kromatografisi (%0-50 EtOAc/Hex) ile saflaştırılmıştır. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 5.03 (p, J= 6.2 Hz, 1H), 1.48 (s, 6H), 1.40 (d, J= 6.2 Hz, 9H), 1.24 (d, J = 6.3 Hz, 6H).

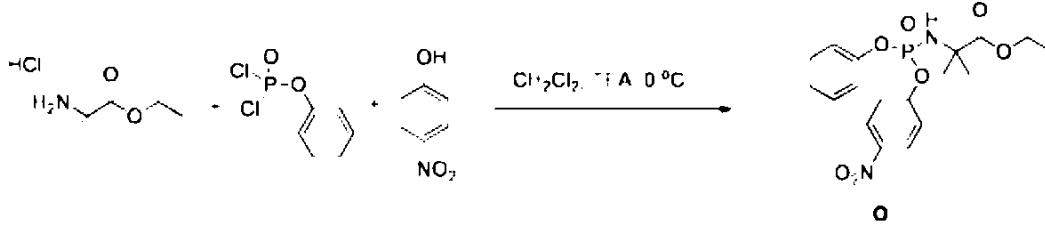
## İzopropil 2-amino-2-metilpropanoat hidroklorürün hazırlanışı



İzopropil 2-((tert-bütoksikarbonil)amino)-2-metilpropanoat (4.09 g, 16.67 mmol) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) içerisine alınmıştır ve yavaşça dioksan içinde 4 N HCl (50 mmol) ilave edilmiştir ve oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Yaklaşık 1 sa sonra reaksiyonun tamamlandığı TLC ile doğrulanmıştır. Solventler düşük basınç altında uzaklaştırılmıştır ve ham ürün iki kez Et<sub>2</sub>O ile birlikte buharlaştırılmıştır, akabinde izopropil 2-amino-2-metilpropanoat hidroklorürü vermek üzere yüksek vakum altına yerleştirilmiştir. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.61 (s, 3H), 4.96 (p, J = 6.2 Hz, 1H), 1.44 (s, 6H), 1.22 (d, J = 6.2 Hz, 6H).



**İzopropil 2-metil-2-(((4-nitrofenoksi)(fenoksi)fosforil)amino)propanoat'ın (Bileşik O) hazırlanışı**



5

Fenil diklorofosfat (0.83 mL, 5.58 mmol) ve izopropil 2-amino-2-metilpropanoat hidroklorür (1.01 g, 5.58 mmol) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) içerisine alınmıştır. Reaksiyon karışımı 0°C'ye soğutulmuştur ve yavaşça TEA (1.61 mL, 11.45 mmol) ilave edilmiştir. Soğutma banyosu uzaklaştırılmıştır ve reaksiyon karışımı oda sıcaklığında karışmaya bırakılmıştır. Yaklaşık 2 sa sonra amino asit ilavesinin tamamlandığı <sup>31</sup>P NMR ile doğrulanmıştır. p-Nitrofenol (0.74 g, 5.30 mmol) yüklenmiştir ve akabinde TEA (0.81, 5.84 mmol) ilave edilmiştir. Reaksiyon oda sıcaklığında karışmaya bırakılmıştır. Yaklaşık 2 sa sonra reaksiyonun tamamlandığı LCMS ile doğrulanmıştır. Reaksiyon Et<sub>2</sub>O ile seyreltilmiştir ve TEA•HCl tuzları filtrelenerek uzaklaştırılmıştır. Ham ürün konsantre edilmiştir ve bileşik O'yü vermek üzere silika jel kromatografisi (%0-50 EtOAc/Hex) ile saflaştırılmıştır. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.42 - 8.19 (m, 2H), 7.55 - 7.43 (m, 2H), 7.39 (dd, J = 8.6, 7.2 Hz, 2H), 7.30 - 7.12 (m, 3H), 6.53 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 4.82 (hept, J = 6.3 Hz, 1H), 1.38 (s, 6H), 1.09 (d, J = 6.3, 6H). <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ -2.84. LC/MS: t<sub>R</sub> = 1.73 dk, MS m/z = 422.92 [M+1]; LC sistemi: Thermo Accela 1250 UHPLC; MS sistemi: Thermo LCQ Fleet; Kolon: Kinetex 2.6µ XB-C18 100A, 50 x 3.00 mm; Solventler: %0.1 formik asit ile birlikte Asetonitril, %0.1 formik asit ile birlikte Su; Gradyan: 0 dk- 2.4 dk arasında %2-100 ACN, 2.4 dk-2.80 dk arasında %100 ACN,

10

15

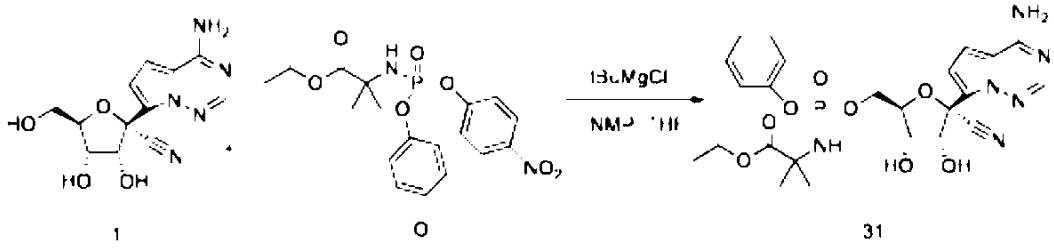
20

25

30

2.8 dk-2.85 dk arasında %100-%2 ACN, 2.85 dk-3.0 dk arasında %2 ACN, 1.8 mL/dk.

**İzopropil 2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi) (fenoksi fosforil) amino)-2-metilpropanoat (Bileşik 31) hazırlanışı**



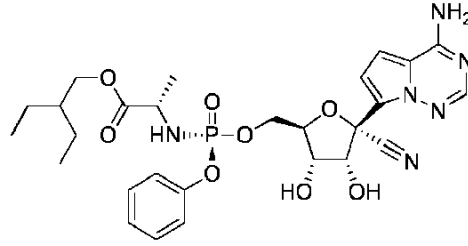
Bileşik **1** (66 mg, 0.23 mmol) NMP (2.0 mL) içerisine alınmıştır. Karışım yaklaşık 0°C'ye soğutulmuştur ve yavaşça tBuMgCl (THF içinde 1.0 M, 0.57 mL, 0.57mmol) ilave edilmiştir. Reaksiyon yaklaşık 30 dk boyunca yaklaşık 0°C'de karışmaya bırakılmıştır, akabinde THF (1.0 mL) içinde çözülmüş bileşik **0** (143 mg, 0.34 mmol) solüsyonu ilave edilmiştir. Soğutma banyosu uzaklaştırılmıştır ve reaksiyon önceden ısıtılmış yaklaşık 50°C'lik yağ banyosuna yerleştirilmiştir. Yaklaşık 2 saat sonra reaksiyon oda sıcaklığına soğutulmuştur ve asetik asit ve metanol ile bastırılmıştır. Ham ürün konsantre edilmiştir ve bileşik **31**'i vermek üzere değiştirici olmadan ters fazlı HPLC ile saflaştırılmıştır. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.88 (m, 3H), 7.30 (td, J = 8.5, 7.0 Hz, 2H), 7.20 - 7.04 (m, 3H), 6.87 (d, J = 4.5, 1H), 6.80 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 6.27 (d, 6.1 Hz, 1H), 5.75 (t, J = 9.1 Hz, 1H), 5.34 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 4.81 (p, J = 6.3 Hz, 1H), 4.71 - 4.50 (m, 1H), 4.23 (m, 2H), 4.11 (m, 1H), 4.03 -3.83 (m, 1H), 1.37- 1.23 (m, 6H), 1.18 - 1.04 (m, 6H). <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, DMSO) δ 2.47, 2.43. LC/MS: t<sub>R</sub> = 1.08 dk, MS m/z = 575.06 [M+1]; LC sistemi: Thermo Accela 1250 UHPLC; MS sistemi: Thermo LCQ Fleet; Kolon: Kinetex 2.6μ XB-C18 100A, 50 x 3.00 mm; Solventler: %0.1

formik asit ile birlikte Asetonitril, %0.1 formik asit ile birlikte Su; Gradyan: 0 dk-2.4 dk arasında %2-100 ACN, 2.4 dk-2.80 dk arasında %100 ACN, 2.8 dk-2.85 dk arasında %100-%2 ACN, 2.85 dk-3.0 dk arasında %2 ACN, 1.8 mL/dk.

5

**Örnek 35. (S)-2-etilbütil 2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4] triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi) (fenoksi) fosforil) amino)propanoat (32)**

10

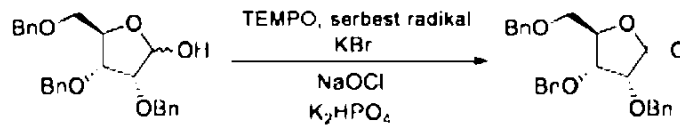


(S)-2-etilbütil 2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4] triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi) (fenoksi) fosforil) amino)propanoatın hazırlanışı aşağıda açıklanır.

15

**(3R,4R,5R)-3,4-bis(benziloksi)-5-((benziloksi)metil)dihidrofuran-2(3H)-onun hazırlanışı.**

20



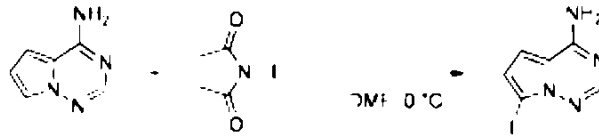
(3R,4R,5R)-3,4-bis(benziloksi)-5-((benziloksi)metil)dihidrofuran-2-ol (15.0 g) bileşiği MTBE (60.0 mL), KBr (424.5 mg), sulu K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> solüsyon (2.5 M, 14.3 mL) ve TEMPO (56 mg) ile birleştirilmiştir. Bu karışım yaklaşık 1°C'ye soğutulmuştur. Bir nişasta/iyodür testiyle doğrulandıktan üzere başlangıç materyali tamamen tükenene kadar kısımlar halinde yavaşça sulu ağartıcı solüsyonu (ağırlıkça %7.9) yüklenmiştir. Katmanlar ayrılmıştır ve sulu katman MTBE

25

30

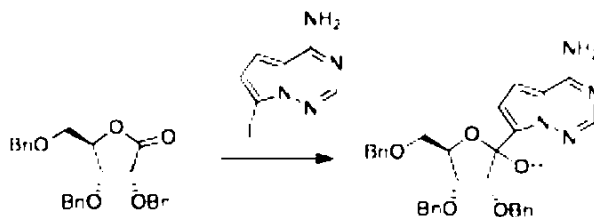
ile özütlenmiştir. Birleştirilen organik faz  $\text{MgSO}_4$  üzerinde kurutulmuştur ve ürün bir katı olarak vermek üzere düşük basınç altında konsantre edilmiştir.

5 **(4-amino-7-iyodopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin)'in hazırlanışı**



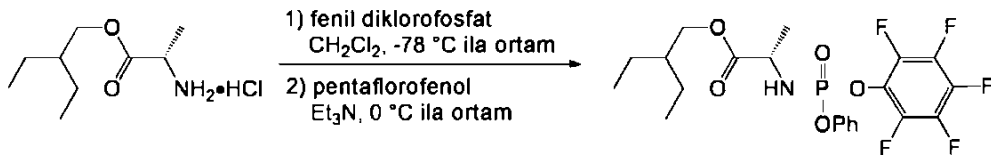
N,N-dimetilformamid (70.27 g) içindeki soğuk 4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]-triazin (10.03 g; 74.8 mmol) solüsyonuna içerikler yaklaşık  $0^\circ\text{C}$ 'de tutulurken kısımlar halinde N-iyodosüksinimid (17.01g; 75.6 mmol) yüklenmiştir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra (yaklaşık  $0^\circ\text{C}$ 'de yaklaşık 3 sa) reaksiyon karışımı, içerikler yaklaşık  $20-30^\circ\text{C}$ 'de tutulurken bir 1 M'lik sodyum hidroksit sulu solüsyonuna (11 g NaOH ve 276 mL su) aktarılmıştır. Elde edilen bulamaç yaklaşık  $22^\circ\text{C}$ 'de 1.5 sa çalkalanmıştır ve akabinde filtrelenmiştir. Katılar su (50 mL) ile durulanmıştır ve 4-amino-7-iyodopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazini bir katı olarak vermek üzere yaklaşık  $50^\circ\text{C}$ 'de vakum altında kurutulmuştur.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  7.90 (s, 1H), 7.78 (br s, 2H), 6.98 (d,  $J = 4.4$  Hz, 1H), 6.82 (d,  $J = 4.4$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  155.7, 149.1, 118.8, 118.1, 104.4, 71.9. MS  $m/z = 260.97$   $[\text{M}+\text{H}]$ .

25 **(3R,4R,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis(benziloksi)-5-((benziloksi)metil)tetrahidrofuran-2-olün (4-amino-7-iyodopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin) ile hazırlanışı**



Bir reaktöre azot atmosferi altında iyodobaz **2** (81 g) ve THF (1.6 L) yüklenmiştir. Elde edilen solüsyon yaklaşık 5°C'ye soğutulmuştur ve TMSCl (68 g) yüklenmiştir. Akabinde iç sıcaklık yaklaşık 5°C veya altında tutulurken yavaşça PhMgCl (345 mL, THF içinde 1.8 M) yüklenmiştir. Reaksiyon karışımı yaklaşık 0°C'de 30 dk karıştırılmıştır ve akabinde yaklaşık -15°C'ye soğutulmuştur. İç sıcaklık yaklaşık -12°C'nin altında tutulurken yavaşça iPrMgCl- LiCl (311 mL, THF içinde 1.1 M) yüklenmiştir. Yaklaşık -15°C'de yaklaşık 10 dakikalık karıştırıldıktan sonra reaksiyon karışımı yaklaşık -20°C'ye soğutulmuştur ve THF (400 mL) içindeki lakton **1** (130 g) solüsyonu yüklenmiştir. Reaksiyon karışımı akabinde yaklaşık -20°C'de yaklaşık 1 sa çalkalanmıştır ve AcOH (57 mL) ile bastırılmıştır. Reaksiyon karışımı yaklaşık 0°C'ye iletılmış ve sulu NaHCO<sub>3</sub> (ağırlıkça %5, 1300 mL) ile pH 7-8 olarak ayarlanmıştır. Reaksiyon karışımı akabinde EtOAc (1300 mL) ile seyreltilmiştir ve organik ve sulu katmanlar ayrılmıştır. Organik katman 1 N HCl (1300 mL), sulu NaHCO<sub>3</sub> (ağırlıkça %5, 1300 mL) ve tuzlu su (1300 mL) ile yıkanmıştır ve akabinde susuz Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> üzerinde kurutulmuştur ve kuruyana kadar konsantre edilmiştir. Bir MeOH ve EtOAc karışımından oluşan bir gradyan kullanılarak silika jel kolon kromatografisi ile saflaştırma ürünü vermiştir.

**((2S)-2-etilbütil 2-((perflorofenoksi) (fenoksi) fosforil) amino)propanoat)'ın (Sp ve Rp karışımı) hazırlanışı:**

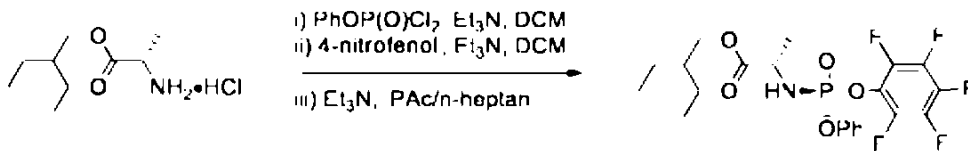


L-Alanin 2-etilbütil ester hidroklorür (5.0 g, 23.84 mmol) ile metilen klorür (40 mL) birleştirilmiştir, yaklaşık -78°C'ye soğutulmuştur ve fenil diklorofosfat (3.65 mL, 23.84 mmol)

ilave edilmiştir. Yaklaşık 60 dk boyunca yaklaşık -78°C'de trietilamin (6.6 mL, 47.68 mmol) ilave edilmiştir ve elde edilen karışım ortam sıcaklığında 3 sa karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımı yaklaşık 0°C'ye soğutulmuştur ve pentaflorofenol (4.4 g, 23.84 mmol) ilave edilmiştir. Yaklaşık 60 dk boyunca trietilamin (3.3 mL, 23.84 mmol) ilave edilmiştir. Karışım ortam sıcaklığında yaklaşık 3 sa karıştırılmıştır ve düşük basınç altında konsantre edilmiştir. Kalıntı EtOAc içinde çözülmüştür, birkaç kere bir sulu sodyum karbonat solüsyonu ile yıkanmıştır ve düşük basınç altında konsantre edilmiştir. Kalıntı bir EtOAc ve hekzanlar (%0 ila %30) gradyanı kullanılarak silika jel kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Fraksiyonlar içeren ürün, (2S)-2-etilbütül 2-(((perflorofenoksi)(fenoksi)fosforil)amino)propanoat bir katı olarak vermek üzere düşük basınç altında konsantre edilmiştir. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Kloroform-d) δ 7.41 - 7.32 (m, 4H), 7.30 - 7.17 (m, 6H), 4.24 - 4.16 (m, 1H), 4.13 - 4.03 (m, 4H), 4.01 - 3.89 (m, 1H), 1.59 - 1.42 (m, 8H), 1.40 - 1.31 (m, 8H), 0.88 (t, J = 7.5 Hz, 12H). <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, Kloroform-d) δ - 1.52. <sup>19</sup>F NMR (377 MHz, Kloroform-d) δ -153.63, -153.93 (m), -160.05 (td, J = 21.9, 3.6 Hz), -162.65 (qd, J = 22.4, 20.5, 4.5 Hz). MS m/z = 496 [M+H].

### ((2S)-2-etilbütül 2-

(((perflorofenoksi)(fenoksi)fosforil)amino)propanoat)'ın hazırlanışı:



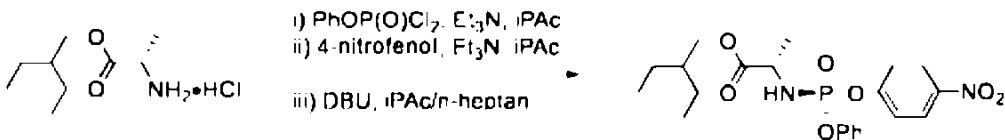
L-alanin-2-etilbütilester hidroklorür (40.10 g, 0.191 mmol) diklorometan (533 g) içinde çözülmüştür ve solüsyon N<sub>2</sub>(g) altında karıştırma eşliğinde yaklaşık -15°C'ye soğutulmuştur. Fenil diklorofosfat (40.32 g, 0.191 mol) ilave edilmiştir,

akabinde yavaşça trietilamin (41.58 g, 0.411 mmol) ilave edilmiştir ve reaksiyon karışımı yaklaşık -15°C'de yaklaşık 1.5 sa karıştırılmıştır. Pentaflorofenol (35.14 g, 0.191 mol) ve akabinde trietilamin (19.23 g, 0.190 mol) ilave edilmiştir ve reaksiyon karışımı yaklaşık 2 sa karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımı yaklaşık 0°C'ye soğutulmuştur ve 0.5 M HCl (279.19 g) ilave edilmiştir. Karışım yaklaşık 22°C'ye soğutulmuştur ve organik katman ayrılmıştır ve %5'lik sulu KHCO<sub>3</sub> solüsyonu (281 g) ve akabinde su (281 g) ile yıkanmıştır. Bir organik katman örneği (604.30 g solüsyondan 453.10 g) yaklaşık 120 mL'lik hacme konsantre edilmiştir, izopropil asetat (157 g) ilave edilmiştir ve solüsyon kuruyana kadar konsantre edilmiştir. Kalıntı izopropil asetat (158 g) içinde çözülmüştür. Elde edilen solüsyon yaklaşık 120 mL'lik hacme konsantre edilmiştir ve sıcaklık yaklaşık 45°C'ye ayarlanmıştır. n-Heptan (165 g) ilave edilmiştir ve karışım yaklaşık 1 sa boyunca 22°C'ye soğutulmuştur. n-Heptan (167 g) ilave edilmiştir ve karışım yaklaşık 0°C'ye soğutulmuştur. Trietilamin (2.90 g, 0.0287 mol) ilave edilmiştir ve karışım 0°C'de yaklaşık 17 sa karıştırılmıştır. Karışım filtrelenmiştir, katılar n-heptan (145 g) ile durulanmıştır ve katılar,

2-etilbütül ((S)-  
(pentaflorofenoksi) (fenoksi) fosforil)-L-  
alaninatı vermek üzere  
vakum altında yaklaşık 40°C'de yaklaşık 15 sa kurutulmuştur.

25

**2-Etilbütül ((S)-(4-nitrofenoksi) (fenoksi) fosforil)-L-alaninatın hazırlanışı:**

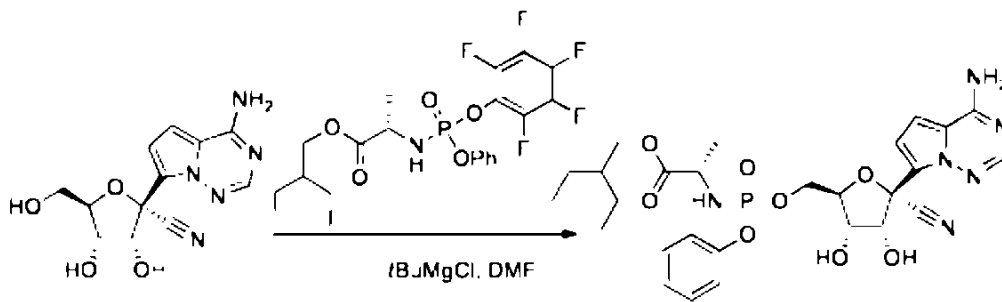


30

Bir L-alanin-2-etilbütilester hidroklorür (20.08 g, 95.8 mmol) ve izopropil asetat (174 g) bulamacı karıştırma eşliğinde yaklaşık -20°C'ye soğutulmuştur. Fenil diklorofosfat (20.37 g,

96.5 mmol) ilave edilmiştir, akabinde yavaşça trietil amin (20.97 g, 207.2 mmol) ilave edilmiştir ve karışım yaklaşık -20°C'de yaklaşık 1 sa karıştırılmıştır. 4-Nitrofenol (13.23 g, 95.1 mmol) ilave edilmiştir, akabinde yavaşça trietilamin (10.01 g, 98.8 mmol) ilave edilmiştir ve reaksiyon karışımı yaklaşık 1.5 sa karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımı yaklaşık 0°C'ye soğutulmuştur ve 0.5 M HCl (140 g) ilave edilmiştir. Organik katman ayrılmıştır ve %5 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (100 g x 2) ve %10 NaCl (100 g x 2) ile yıkanmıştır. Organik katman akabinde yaklaşık 80 mL'lik hacme konsantre edilmiştir ve izopropilasetat (4 g) ve akabinde n-heptan (110 g) ilave edilmiştir. Ürün tohum kristalleri (0.100 g) ve akabinde ikinci bir kısım n-heptan (110 g) ilave edilmiştir ve karışım yaklaşık 0°C'ye soğutulmuştur. 1,8-Diazabisikloundek-7-en (1.49 g, 9.79 mmol) ilave edilmiştir ve karışım yaklaşık 0°C'de yaklaşık 21 sa karıştırılmıştır. Elde edilen katılar filtrelenmiştir ve ilk önce n-heptan (61 g) ve akabinde H<sub>2</sub>O (100 g x 2) ile yıkanmıştır. Katılar yaklaşık 1.5 saatliğine H<sub>2</sub>O (200 g) ile karıştırılmıştır, filtrelenmiştir ve H<sub>2</sub>O (100 g x 3) ve akabinde n-heptan (61 g) ile durulanmıştır. Elde edilen katılar, 2-etilbütil ((S)-(4-nitrofenoksi)(fenoksi)fosforil)-L-alaninatı vermek üzere vakum altında yaklaşık 40°C'de yaklaşık 19 sa kurutulmuştur.

#### **Başlık Bileşiğinin (Sp ve Rp karışımı) hazırlanışı:**

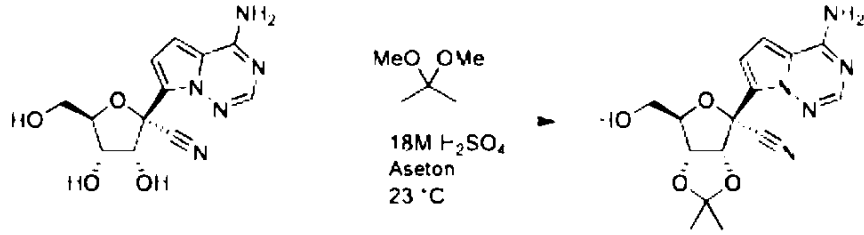


Nükleosit (29 mg, 0.1 mmol) ve fosfonamid (60 mg, 0.12 mmol) ve N,N-dimetilformamid (2 mL) ortam sıcaklığında



birleştirilmiştir. Yavaşça *tert*-bütil magnezyum klorür (THF içinde 1 M, 0.15 mL) ilave edilmiştir. Yaklaşık 1 sa sonra reaksiyon etil asetat ile seyreltilmiştir, sulu sitrik asit solüsyonu (ağırlıkça %5), sulu doymuş NaHCO<sub>3</sub> solüsyonu ve doymuş tuzlu su solüsyonu ile yıkanmıştır. Organik faz Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> üzerinde kurutulmuştur ve düşük basınç altında konsantre edilmiştir. Kalıntı, bir metanol ve CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (%0 ila %5) gradyanı kullanarak silika jel kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Fraksiyonları içeren ürün, ürünü vermek üzere düşük basınç altında konsantre edilmiştir.

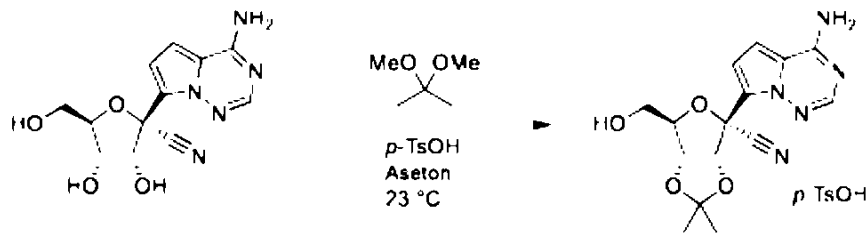
**(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-6-(hidroksimetil)-2,2-dimetiltetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-karbonitrilin hazırlanışı:**



Bir (2R,3R,4S,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)tetrahidrofuran-2-karbonitril (5.8g, 0.02 mol), 2,2-dimetoksipropan (11.59 mL, 0.09 mol) ve aseton (145 mL) karışımına ortam sıcaklığında sülfürik asit (18 M, 1.44 mL) ilave edilmiştir. Karışım yaklaşık 45°C'ye ısıtılmıştır. Yaklaşık 30 dk sonra karışım ortam sıcaklığına soğutulmuştur ve sodyum bikarbonat (5.8 g) ve su (5.8 mL) ilave edilmiştir. 15 dk sonra karışım düşük basınç altında konsantre edilmiştir. Kalıntı etil asetat (150 mL) ve su (50 mL) içerisine alınmıştır. Sulu katman etil asetat (50 mL x 2) ile ekstrakte edilmiştir. Birleştirilen organik faz sodyum sülfat üzerinde kurutulmuştur ve ham (2R,3R,4S,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)tetrahidrofuran-2-karbonitrili

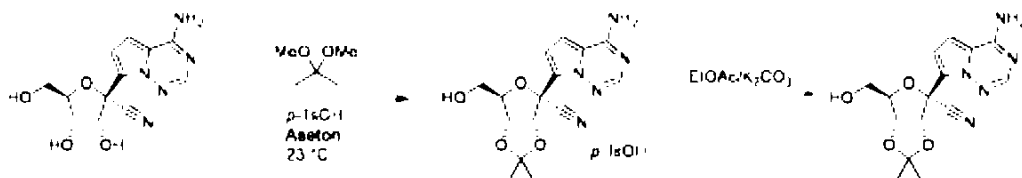
vermek üzere düşük basınç altında konsantre edilmiştir. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.84 (s, 1H), 6.93 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 5.40 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 5.00 (dd, *J* = 6.7, 3.3 Hz, 1H), 4.48 – 4.40 (m, 1H), 3.81 – 3.72 (m, 2H), 1.71 (s, 3H), 1.40 (s, 3H). MS *m/z* = 332.23 [M+1].

**(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-6-(hidroksimetil)-2,2-dimetiltetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-karbonitril TsOH tuzunun hazırlanışı:**



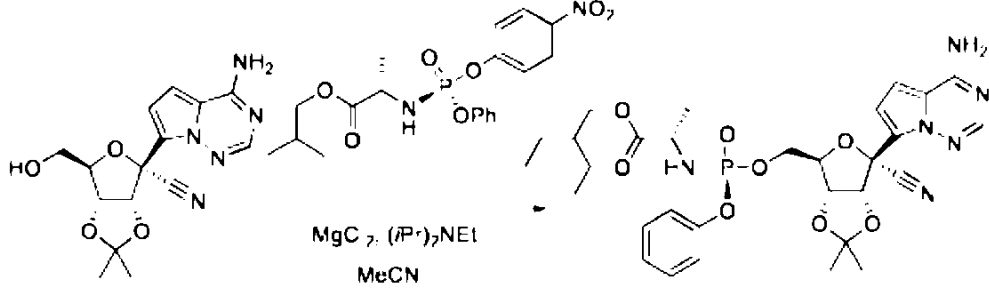
Bir (2R,3R,4S,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)tetrahidrofuran-2-karbonitril (5.0 g, 17.2 mmol, 1.0 ekv.), 2,2-dimetoksipropan (10.5 mL, 86 mmol, 5.0 ekv.) ve aseton (25 mL) karışımına ortam sıcaklığında *p*-tolilsülfonik asit (3.59 g, 1.1 ekv.) ilave edilmiştir. Karışım ortam sıcaklığında karıştırılmıştır. Yaklaşık 30 dk sonra, yaklaşık bir saat boyunca izopropil asetat (25 mL) ilave edilmiştir. Elde edilen bulamaç filtrelenmiştir ve 2:1'lik heptan:izopropil asetat (25 ml) ile durulanmıştır. Ürün vakum altında yaklaşık 40 °C'de kurutulmuştur.

**(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-6-(hidroksimetil)-2,2-dimetiltetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-karbonitrilin hazırlanışı:**



Bir (2R,3R,4S,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)tetrahidrofuran-2-karbonitril (5 g, 17.2 mmol, 1.0 ekv.), 2,2-dimetoksipropan (10.5 mL, 86 mmol, 5.0 ekv.) ve aseton (25 mL) karışımına ortam sıcaklığında p-tolilsülfonik asit (3.59 g, 1.1 ekv.) ilave edilmiştir. Karışım ortam sıcaklığında karıştırılmıştır. 30 dk sonra, bir saat boyunca izopropil asetat (25 mL) ilave edilmiştir. Elde edilen bulamaç filtrelenmiştir ve 2:1'lik heptan:izopropil asetat (25 ml) ile durulanmıştır. Ürün vakum altında 40°C'de kurutulmuştur. İzole edilen katı bir reaktöre yüklenmiştir ve %5'lik K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solüsyonu (50 ml) ve etil asetat (50 mL) ilave edilmiştir. Katmanlar ayrılmıştır ve sulu katman etil asetat (25 ml) ile yıkanmıştır. Birleştirilen organik katmanlar su (25 ml) ile yıkanmıştır, akabinde yaklaşık 25 ml'ye konsantre edilmiştir. Reaktöre tekrar izopropil asetat (25 ml) yüklenmiştir ve yaklaşık 25 ml'ye konsantre edilmiştir. Reaktöre tekrar izopropil asetat (25 ml) yüklenmiştir ve 25 ml'ye konsantre edilmiştir. Elde edilen solüsyon aşılınmıştır ve koyu bir bulamaç elde edilmiştir. Buraya bir saat boyunca heptan (25 ml) ilave edilmiştir. Elde edilen bulamaç filtrelenmiştir ve 2:1'lik heptan:izopropil asetat (25 ml) ile durulanmıştır. Ürün vakum altında 40°C'de kurutulmuştur. (2R,3R,4S,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)tetrahidrofuran-2-karbonitril. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.84 (s, 1H), 6.93 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 6.89 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 5.40 (d, J = 6.7 Hz, 1H), 5.00 (dd, J = 6.7, 3.3 Hz, 1H), 4.48 - 4.40 (m, 1H), 3.81 - 3.72 (m, 2H), 1.71 (s, 3H), 1.40 (s, 3H). MS m/z = 332.23 [M+1].

**(2S)-2-etilbütıl2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi) (fenoksi) fosforil) amino) propanoatın hazırlanışı:**



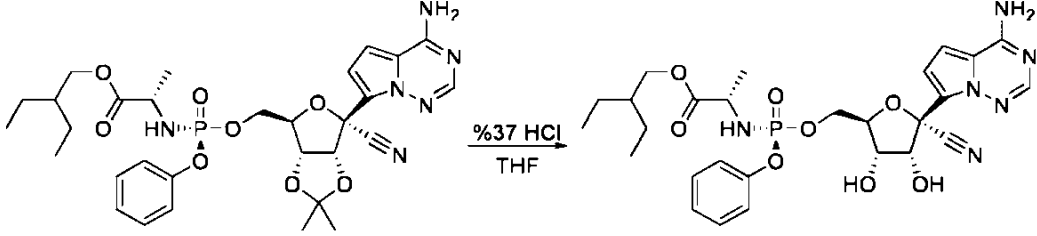
5

Asetonitril (100 mL) ile (2S)-2-etilbütıl 2-(((4-nitrofenoksi) (fenoksi) fosforil)-amino)propanoat (9.6 g, 21.31 mmol), substrat alkol (6.6 g, 0.02 mol), magnezyum klorür (1.9 g, 19.91 mmol) ortam sıcaklığında birleştirilmiştir. Karışım yaklaşık 15 dk çalkalanmıştır ve *N,N*-diizopropiletilamin (8.67 mL, 49.78 mmol) ilave edilmiştir. Yaklaşık 4 sa sonra reaksiyon etil asetat (100 mL) ile seyreltilmiştir, yaklaşık 0°C'ye soğutulmuştur ve sulu sitrik asit solüsyonu (ağırlıkça %5, 100 mL) ile birleştirilmiştir. Organik faz sulu sitrik asit solüsyonu (ağırlıkça %5, 100 mL) ve sulu doymuş amonyum klorür solüsyonu (40 mL), sulu potasyum karbonat solüsyonu (ağırlıkça %10, 2 x 100 mL) ve sulu doymuş tuzlu su solüsyonu (100 mL) ile yıkanmıştır. Organik faz sodyum sülfat ile kurutulmuştur ve ham ürünü vermek üzere düşük basınç altında konsantre edilmiştir. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.86 (s, 1H), 7.31 - 7.22 (m, 2H), 7.17 - 7.09 (m, 3H), 6.93 - 6.84 (m, 2H), 5.34 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.98 (dd, *J* = 6.6, 3.5 Hz, 1H), 4.59 - 4.50 (m, 1H), 4.36 - 4.22 (m, 2H), 4.02 (dd, *J* = 10.9, 5.7 Hz, 1H), 3.91 (dd, *J* = 10.9, 5.7 Hz, 1H), 3.83 (dq, *J* = 9.7, 7.1 Hz, 1H), 1.70 (s, 3H), 1.50 - 1.41 (m, 1H), 1.39 (s, 3H), 1.36 - 1.21 (m, 7H), 0.86 (t, *J* = 7.4 Hz, 6H). MS *m/z* = 643.21 [M+1].

25

(S)-2-etilbütil 2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi)fenoksi)fosforil)amino) propanoatın (Bileşik 32) hazırlanışı

5



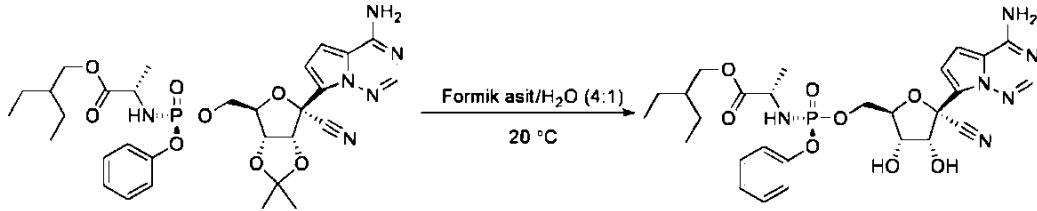
Ham asetonid (12.85 g) ile tetrahidrofuran (50 mL) birleştirilmiştir ve düşük basınç altında konsantre edilmiştir. Kalıntı tetrahidrofuran (100 mL) içerisine alınmıştır, yaklaşık 0°C'ye soğutulmuştur ve yavaşça derişik HCl (20 mL) ilave edilmiştir. Karışım ortam sıcaklığına ısınmaya bırakılmıştır. HPLC analiziyle doğrulandığı üzere başlangıç asetonidi tükendikten sonra su (100 mL) ve akabinde sulu doymuş sodyum bikarbonat solüsyonu (200 mL) ilave edilmiştir. Karışım etil asetat (100 mL) ile özütlenmiştir, organik faz sulu doymuş tuzlu su solüsyonu (50 mL) ile yıkanmıştır, sodyum sülfat üzerinde kurutulmuştur ve düşük basınç altında konsantre edilmiştir. Kalıntı bir metanol ve etil asetat (%0 ila %20) gradyanı kullanılarak silika jel kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Fraksiyonları içeren ürün, ürünü vermek üzere düşük basınç altında konsantre edilmiştir.

25

30

**(S)-2-etilbütil 2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi)fenoksi)fosforil)amino) propanoat** (Bileşik 32)  
**hazırlanış**

5

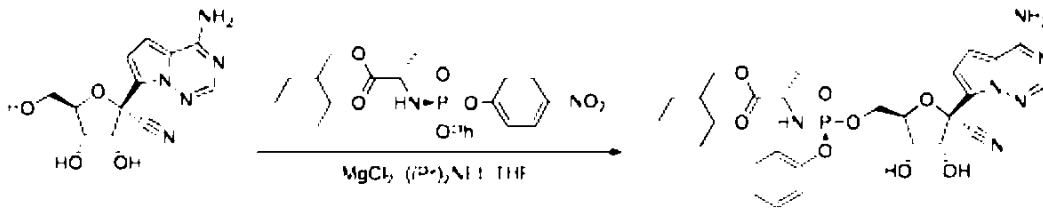


(S)-2-etilbütil 2-(((S)-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-6-siyano-2,2-dimetiltetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-il)metoksi)(fenoksi)fosforil)amino)propanoat (30 mg, 0.05 mmol) içeren bir flakona %80'lik sulu formik asit solüsyonu (1.5 mL) ilave edilmiştir. Yaklaşık 20°C'de 18 sa sonra tam dönüşüm HPLC ve LC-MS ile doğrulanmıştır. MS (m/z) = 603(M+1)<sup>+</sup>.

15

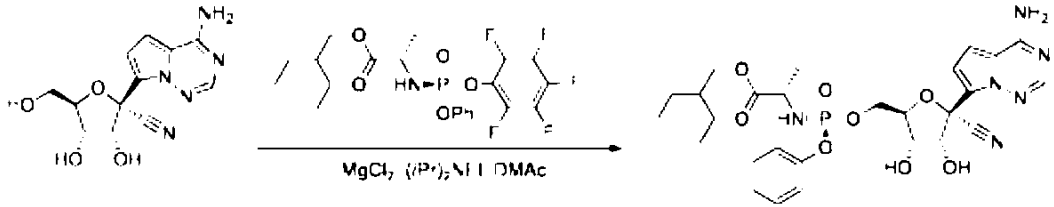
**(S)-2-etilbütil 2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolor[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi)fenoksi)fosforil)amino) propanoat** (Bileşik 32) Doğrudan Kenetleme ile hazırlanış

20



Bir (2R,3R,4S,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)tetrahidrofuran-2-karbonitril (0.5 g, 2 mmol), (S)-2-etilbütil 2-(((S)-4-nitrofenoksi)(fenoksi)fosforil)amino)propanoat (0.9 g, 2 mmol) ve MgCl<sub>2</sub> (0.2 g, 2 mmol) karışımına N,N-dimetilasetamid (10 mL) yüklenmiştir. Elde edilen karışım sürekli karıştırma eşliğinde yaklaşık 30°C'ye ısıtılmıştır. Akabinde yavaşça N,N-

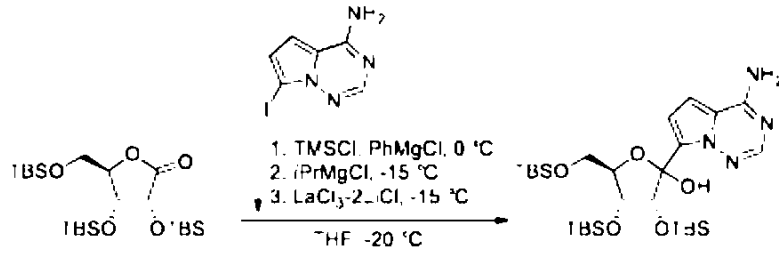
diizopropiletilamin (0.7 mL, 4 mmol) ilave edilmiştir ve reaksiyon karışımı yaklaşık 6 sa karıştırılmıştır. Su (10 mL) H<sub>2</sub>O ve akabinde 2-MeTHF (10 mL) yüklenmiştir ve organik ve sulu fazlar ayrılmıştır. Sulu katman akabinde 2-MeTHF (10 mL) ile geri özütlenmiştir. Organik katmanlar birleştirilmiştir ve yaklaşık %10'luk sitrik asit solüsyonu (10 mL), akabinde yaklaşık %10'luk K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solüsyonu (10 mL) ve H<sub>2</sub>O (10 mL) ile yıkanmıştır. Katmanlar ayrılmadan önce su yıkamasında emülsiyonlar ayrıştırmak için az miktarda tuzlu su ilave edilmiştir. Organik katman, 0.65 g köpük vermek üzere kuruyana kadar buharlaştırılmıştır. Akabinde iPrOAc (2.6 mL) ilave edilmiştir ve karışım çözünmeyi sağlamak için yaklaşık 40°C'ye ısıtılmıştır. Solüsyon yaklaşık 20°C'ye soğutulmuştur ve karışım yaklaşık 3 gün karıştırılmıştır. Katılar filtreleme yoluyla izole edilmiştir ve filtre hamuru az miktarda iPrOAc ile yıkanmıştır. Katılar, (S)-2-etilbütil 2-(((S)-((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi)(fenoksi)fosforil)amino)propanoat vermek üzere kurutulmuştur.



Bir (2R,3R,4S,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)tetrahidrofuran-2-karbonitril (0.2 g, 0.7 mmol), (S)-2-etilbütil 2-(((S)-(perflorofenoksi)(fenoksi)fosforil)amino)propanoat (0.3 g, 0.7 mmol) ve MgCl<sub>2</sub> (0.1 g, 1 mmol) karışımına N,N-dimetilasetamid (4 mL) yüklenmiştir. Elde edilen karışım sürekli karıştırma eşliğinde yaklaşık 30°C'ye ısıtılmıştır. Akabinde yavaşça N,N-diizopropiletilamin (0.3 mL, 2 mmol) ilave edilmiştir ve reaksiyon karışımı yaklaşık 5 sa karıştırılmıştır. Ürüne dönüşüm UPLC analiziyle doğrulanmıştır.

**(3R,4R,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis(tert-bütildimetilsilil)oksi)-5-(((tert-bütildimetilsilil)oksi)metil) tetrahidrofuran-2-olün**

**hazırlanışı**



THF (280 mL) içinde 7-iyodopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-4-amin  
 10 (13.9 g, 53.5 mmol) solüsyonu hazırlanmıştır. Solüsyon  
 yaklaşık 0 °C'ye soğutulmuştur ve TMSCl (13.6 mL, 107 mmol)  
 ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı yaklaşık 20 dk  
 karıştırılmıştır ve akabinde iç sıcaklık yaklaşık 5 °C'nin  
 altında tutulurken PhMgCl (THF içinde 2 M; 53.5 mL, 56.8 mmol)  
 15 ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı yaklaşık 0 °C'de yaklaşık  
 30 dk çalkalanmıştır ve akabinde yaklaşık -20 °C'ye  
 soğutulmuştur. Akabinde iç sıcaklık yaklaşık -15 °C'nin altında  
 tutulurken iPrMgCl-LiCl (THF içinde 1.3 M, 43.1 mL, 56 mmol)  
 ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı yaklaşık -20 °C'de  
 20 yaklaşık 30 dk çalkalanmıştır.

Ayrı bir şişede, LaCl<sub>3</sub>·2LiCl (THF içinde 0.6 M, 85 mL, 50.9  
 mmol) içinde bir (3R,4R,5R)-3,4-bis((tert-  
 25 bütildimetilsilil)oksi)-5-(((tert-  
 bütildimetilsilil)oksi)metil)dihidrofuran-2(3H)-on (25.0 g,  
 50.9 mmol, 0.83 ekv) solüsyonu hazırlanmıştır. Solüsyon  
 akabinde iç sıcaklık -20 °C'nin altında tutulurken Grignard  
 solüsyonuna aktarılmıştır. Elde edilen reaksiyon karışımı  
 yaklaşık -20 °C'de yaklaşık 4 sa çalkalanmıştır.

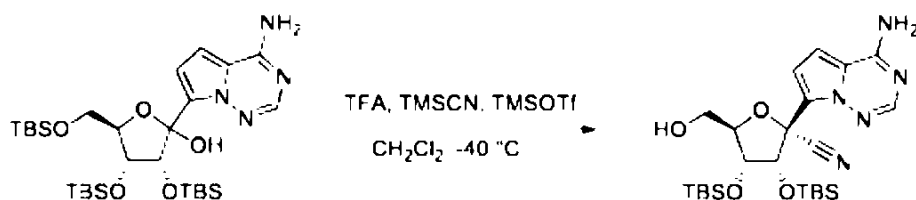


Reaksiyon 1 M HCl (140 mL) ile bastırılmıştır ve karışım ortam sıcaklığına iletmiştir. EtOAc (140 mL) ilave edilmiştir ve organik ve sulu fazlar ayrılmıştır. Su katmanı EtOAc (200 mL) ile özütlenmiştir. Birleştirilen EtOAc katmanları sırasıyla doymuş sulu NaHCO<sub>3</sub> (200 mL x 2), su (200 mL) ve tuzlu su (200 mL) ile özütlenmiştir. Organik katman konsantre edilmiştir ve akabinde (3R,4R,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis((tert-bütildimetilsilil)oksi)-5-

((tert-bütildimetilsilil)oksi)metil)tetrahidrofuran-2-ölü

vermek üzere silika jel kromatografisi (%30 EtOAc/heksan) ile saflaştırılmıştır. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.15 - 7.88 (m, 1H), 7.51 (d, J= 4.8 Hz, 0.5H), 7.02 - 6.92 (m, 0.5H), 6.65 - 6.57 (m, 1H), 5.66 - 5.24 (m, 3H), 4.49 - 3.50 (m, 4H), 0.97 - 0.78 (26H), 0.65 (s, 1.5H), 0.19 - 0.00 (m, 15.5H), -0.22 (s, 1H), -0.55 (s, 1H).. MS m/z = 626 (M+H).

**(2R,3R,4R,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis((tert-bütildimetilsilil)oksi)-5-(hidroksimetil)tetrahidrofuran-2-karbonitrilin hazırlanışı**



CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) içindeki (3R,4R,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis((tert-bütildimetilsilil)oksi)-5-(((tert-bütildimetilsilil)oksi)metil)tetrahidrofuran-2-öl (1.50 g, 2.40 mmol) solüsyonu yaklaşık -40°C'ye soğutulmuştur. Sıcaklık -20°C'nin altında tutulurken trifloroasetik asit (0.555 mL, 7.20 mmol) ilave edilmiştir. Aynı bir şişede, yaklaşık 15°C'de 5 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) içerisine trimetilsilil triflorometansülfonat (2.60 mL, 14.4 mmol) ve akabinde trimetilsilil siyanür (1.92 mL, 14.4 mmol) ilave edilmiştir ve solüsyon yaklaşık -30°C'ye soğutulmuştur. Soğutulan solüsyon,

sıcaklık -25°C'nin altında tutulurken (3R,4R,5R)-2-(4-aminopirrololo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis((tert-bütildimetilsilil)oksi)-5-

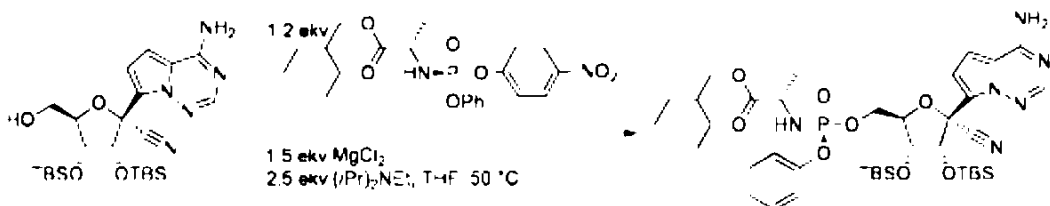
((tert-bütildimetilsilil)oksi)metil)tetrahidrofuran-2-ol

5 solüsyonuna ilave edilmiştir. Reaksiyon karışım yaklaşık -30°C'de 15 dk karıştırılmıştır. Reaksiyon trietilamin (3.34 mL, 24.0 mmol) ile bastırılmıştır ve karışım yaklaşık 0°C'ye iletılmıştır. Sıcaklık yaklaşık 20°C'nin altında tutulurken su (50 mL) ilave edilmiştir. Ekleme işlemi tamamlandığında  
10 karışım oda sıcaklığında 15 dk karıştırılmıştır. Katmanlar ayrılmıştır ve organik katman sırasıyla KOH (20 mL), su (20 mL) ve tuzlu su (20 mL) ile yıkanmıştır. Organik katman Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> üzerinde kurutulmuştur, konsantre edilmiştir ve akabinde ürünü diastereomerlerin bir 3.8:1'lik bir karışım olarak vermek  
15 üzere silika jel kromatografisi (%30 EtOAc / heksan) ile saflaştırılmıştır. Karışım, ürünü bir tekli diastereomer olarak vermek üzere prep-HPLC (su içinde %0 ila %95 ACN) ile tekrar saflaştırılmıştır. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.14-7.92 (m, 2H), 7.89 (s, 1H), 6.95 (d, J= 4.8 Hz, 1H), 6.88 (d, J= 4.4 Hz, 1H), 5.27 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 5.10 (dd, J = 7.7, 4.6 Hz, 1H), 4.31 (dd, J = 4.7, 1.4 Hz, 1H), 4.12 (ddd, J = 5.9, 4.1, 1.4 Hz, 1H), 3.80 - 3.69 (m, 1H), 3.56 (td, J = 7.8, 3.9 Hz, 1H), 0.93 (s, 9H), 0.75 (s, 9H), 0.11 (s, 3H), 0.09 (s, 3H), -0.15 (s, 3H), -0.62 (s, 3H). MS m/z = 520 (M+H).

25

**(S)-2-etilbütıl 2-(((S)-((2R,3R,4R,5R)-5-(4-aminopirrolor[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis((tert-bütildimetilsilil)oksi)-5-siyanotetrahidrofuran-2-il)metoksi)(fenoksi) fosforil)amino)propanoatın hazırlanışı**

30



Bir (2R,3R,4R,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis((tertbütildimetilsilil)oksi)-5-

(hidroksimetil)tetrahidrofuran-2-karbonitril (16 mg, 0.03 mmol), (S)-2-etilbütil

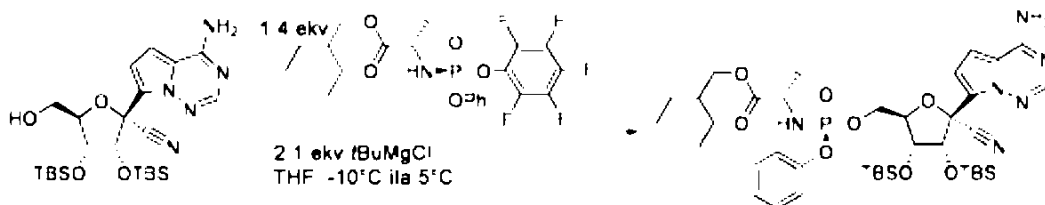
2-(((S)-(4-

5 nitrofenoksi)(fenoksi)fosforil)amino)propanoat (17 mg, 0.04 mmol) ve  $MgCl_2$  (4 mg, 0.05 mmol) karışımına THF (0.3 mL)

yüklenmiştir. Elde edilen karışım sürekli karıştırma eşliğinde yaklaşık  $50^\circ C$ 'ye ısıtılmıştır. Akabinde N,N-

diizopropiletilamin (0.013 mL, 0.08 mmol) ilave edilmiştir ve

reaksiyon karışımı 21 sa karıştırılmıştır. Ürüne dönüşüm UPLC ve LC-MS analiziyle doğrulanmıştır. MS  $m/z$  = 831 (M+H).



THF (0.3 mL) içindeki (2R,3R,4R,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis((tertbütildimetilsilil)oksi)-5-

(hidroksimetil)tetrahidrofuran-2-karbonitril (16 mg, 0.03 mmol) solüsyonu  $-10^\circ C$ 'ye soğutulmuştur. Damlalar halinde

tBuMgCl (0.07 mL, 0.07 mmol) ve akabinde THF (0.15 mL) içindeki (S)-2-etilbütil

2-(((S)-

(perflorofenoksi)(fenoksi)fosforil)amino)propanoat (22 mg, 0.04 mmol) solüsyonu ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı

$5^\circ C$ 'ye ısıtılmıştır ve 16 sa karıştırılmıştır. Reaksiyon MeOH ile bastırılmıştır, konsantre edilmiştir ve akabinde ürünü

vermek üzere silika jel kromatografisi (EtOAc /heksanlar) ile saflaştırılmıştır.  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.97 (s, 1H), 7.38

- 7.29 (m, 2H), 7.25 - 7.21 (m, 2H), 7.21 - 7.13 (m, 1H), 7.11 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 1H), 6.65 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 1H), 5.88 (br s,

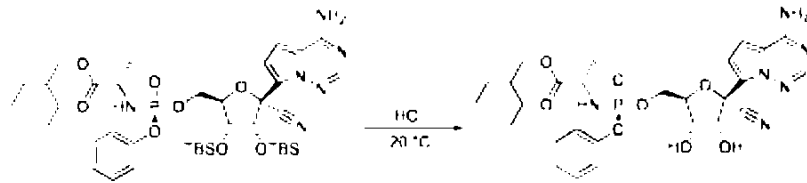
2H), 5.35 (d,  $J$  = 4.4 Hz, 1H), 4.49 - 4.41 (m, 1H), 4.41 - 4.35 (m, 1H), 4.32 - 4.26 (m, 1H), 4.24 (dd,  $J$  = 4.5, 1.7 Hz,

1H), 4.10 - 3.99 (m, 2H), 3.96 (dd,  $J$  = 10.9, 5.7 Hz, 1H), 3.80 - 3.72 (m, 1H), 1.48 (h,  $J$  = 6.2 Hz, 1H), 1.39 - 1.28 (m,

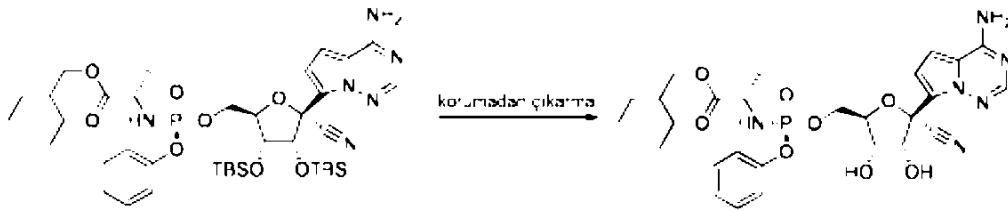
7H), 0.96 (s, 9H), 0.85 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 6H), 0.80 (s, 9H),

0.08 (s, 3H), 0.07 (s, 3H), -0.13 (s, 3H), -0.56 (s, 3H). <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.74 (s). MS m/z = 831 (M+H).

**(S)-2-etilbütül 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(4-aminopirrololo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis((tert-bütildimetilsilil)oksi)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi)(fenoksi)fosforil)amino)propanoat**ın hazırlanışı



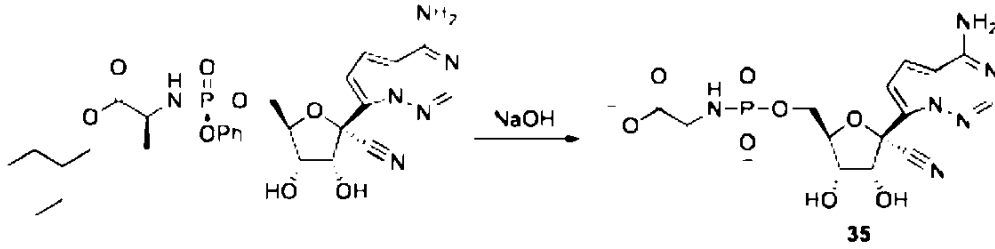
Ham (S)-2-etilbütül 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(4-aminopirrololo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis((tert-bütildimetilsilil)oksi)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi)(fenoksi)fosforil)amino)propanoat solüsyonu yaklaşık 0°C'ye soğutulmuştur ve yavaşça derişik HCl (0.05 mL, 0.62 mmol) ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı yaklaşık 20°C'de yaklaşık 72 sa karıştırılmıştır. Ürüne dönüşüm UPLC ve LC-MS analiziyle doğrulanmıştır. MS m/z = 603 (M+H).



Bir florür veya asit içindeki (S)-2-etilbütül 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(4-aminopirrololo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis((tert-bütildimetilsilil)oksi)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi)(fenoksi)fosforil)amino)propanoat solüsyonu, bir (S)-2-etilbütül 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(4-aminopirrololo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi)(fenoksi)fosforil)amino)propanoat solüsyonu halinde korumadan çıkarılabilir. Temsili florürler, bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla TBAF, KF, piridinyum hidrofloreür,

triethylamonyum hidroflorür, hidrojen florür, hidroklorik asit, tolüensülfonik asit veya herhangi bir diğer uygun florür kaynağı kapsar. Temsili asitler, bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. Protective Groups In Organic Synthesis, 4th Ed., John Wiley & Sons: New York, 2006 referanslı yayında tarif edilenleri içerir.

**Örnek 35-a. (((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi)oksidofosforil)alaninat (Bileşik 35)**



2-Etilbütil ((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-siyano-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-2-il)metoksi)(fenoksi)fosforil)-L-alaninat (130 mg, 0.216 mmol) bir asetonitril (6 mL) ve su (2 mL) karışımında çözülmüştür. 5 dk boyunca oda sıcaklığında damlalar halinde sulu sodyum hidroksit solüsyonu (2N, 0.5 mL) ilave edilmiştir ve reaksiyon karışımı karıştırılmıştır. 2 sa sonra elde edilen karışım düşük basınç altında konsantre edilmiştir ve kalıntı, arzu edilen ürünü bis-sodyum tuzu olarak vermek üzere bir C18 kolonu üzerinde su ile ayrıştırılarak HPLC ile saflaştırılmıştır. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.79 (s, 1H), 6.86 (d, J = 4.7 Hz, 1H), 6.80 (d, J = 4.7 Hz, 1H), 4.86 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 4.40 - 4.34 (m, 1H), 4.30 (dd, J = 5.3, 3.0 Hz, 1H), 3.75 (qdd, J = 11.6, 4.5, 3.1 Hz, 2H), 3.20 (dq, J = 8.6, 7.1 Hz, 1H), 0.86 (d, J = 7.0 Hz, 3H). <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.30. LCMS m/z 442.95 [M+H]. HPLC (8.5 dk boyunca %0.1'lik TFA değiştirici ile birlikte %2-98 MeCN-H<sub>2</sub>O gradyanı, 1.5 mL/dk,

Kolon: Phenomenex Kinetex C18, 2.6  $\mu$ m 100 Å, 4.6 x 100 mm)  $t_R$  = 2.694 dk.

## B. Antiviral Aktivite

5

Buluşun başka bir yönü, virüs enfeksiyonları inhibe edilmesine yönelik yöntemler ile ilgilidir, bu yöntemler, bu inhibisyona ihtiyacı olduğu düşünülen bir numunenin veya bireyin buluş konusu bir bileşim ile muamele edilmesi adını içerir.

10

Bir virüs içerdiği düşünülen numuneler buluş kapsamında doğal veya yapay materyaller, örneğin canlı organizmalar; doku veya hücre kültürleri; biyolojik numuneler, örneğin biyolojik materyal numuneleri (kan, serum, idrar, serebrospinal sıvı, gözyaşları, balgam, tükürük, doku numuneleri ve benzerleri); laboratuvar numuneleri; gıda, su veya hava numuneleri; biyolojik ürün numuneleri, örneğin hücrelerin, özellikle arzu edilen bir glikoproteini sentezleyen rekombinant hücrelerin özütleri ve benzerlerini kapsar. Numunenin tipik olarak bir virüs enfeksiyonunu uyaran bir organizmayı, sıklıkla bir tümör virüsü gibi bir patojenik organizmayı içerdiği düşünülecektir. Numuneler su ve organik solvent\su karışımları gibi herhangi bir ortamın içine alınabilir. Numuneler, insanlar gibi canlı organizmalar ve hücre kültürleri gibi yapay materyalleri kapsar.

20

25

30

Arzu edildiği takdirde, bileşim uygulandıktan sonra buluş konusu bir bileşiğin anti-virüs aktivitesi, bu tip aktiviteleri saptamaya yönelik doğrudan ve dolaylı yöntemler de dahil olmak üzere herhangi bir yöntemle gözlemlenebilir. Bu tip aktiviteleri saptamaya yönelik nicel, nitel ve yarı nicel yöntemlerin tümü öngörülmektedir. Tipik olarak yukarıda tarif edilen tarama yöntemlerinden biri uygulanır, ancak bir canlı

organizmanın fizyolojik özelliklerinin gözlemlenmesi gibi herhangi bir diğer yöntem de geçerlidir.

Buluş konusu bir bileşiğin antiviral aktivitesi, bilinen standart tarama protokolleriyle ölçülebilir. Örneğin bir bileşiğin antiviral aktivitesi aşağıdaki genel protokollerle ölçülebilir.

| Virüs        | Hücre dizisi | Plak formatı | Hücre sayısı | MOI (pfu/hücre) | İnkübasyon (Gün) | Okuma | Değerler |
|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|------------------|-------|----------|
| EBOV (Zaire) | Hela         | 384          | 4000         | 0.5             | 2                | HCS   | EC50     |
| EBOV (Zaire) | HFF-1        |              |              | 2               |                  | HCS   |          |
| EBOV-GFP     | Huh-7        | 96           | 10000        | 0.1             | 4                | GFP   |          |
| EBOV-GFP     | HMVEC-TERT   |              |              |                 |                  | GFP   |          |
| EBOV-LUC     | Huh-7        |              |              |                 |                  | LUC   |          |
| MARV-GFP     | Huh-7        |              |              |                 |                  | GFP   |          |
| NiV          | Hela         |              |              |                 |                  | CPE   |          |
| NiV-GFP      | HMVEC-TERT   |              |              |                 |                  | GFP   |          |
| NiV-LUC      | HMVEC-TERT   |              |              |                 |                  | LUC   |          |

EBOV: Ebola virüs suşu Zaire

EBOV-GFP: Yeşil floresan protein eksprese eden Ebola raportör virüsü

EBOV-LUC: Lüsiiferaz eksprese eden Ebola raportör virüsü

MARV-GFP: Yeşil floresan protein eksprese eden Marburg virüsü

NiV: Nipah virüsü

NiV-GFP: Yeşil floresan protein eksprese eden Nipah raportör virüsü

NiV-LUC: Lüsiiferaz eksprese eden Nipah raportör virüsü

|             |                                                                                          |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| HCS:        | Yüksek içerik görüntülemesi (ebola virüsü GP proteininin immün boyaması)                 |
| GFP:        | Yeşil floresan protein                                                                   |
| LUC:        | Lüsiferaz                                                                                |
| CPE         | CellTiter glo (CTG) reaktifi ile ölçülen sitopatik etkiler                               |
| Hela:       | Hela epitel hücresi (serviks karsinomu)                                                  |
| HFF-1:      | İnsan foreskin fibroblastı                                                               |
| Huh-7:      | Hepatosit                                                                                |
| HMVEC-TERT: | Telomeraz katalitik protein ile ölümsüzleştirilmiş insan mikrovasküler endotel hücreleri |

### **Örnek 36. Ebola virüsü antiviral aktivite ve sitotoksite analizleri**

5 Bileşik 1 ve Bileşik 9'un Ebola virüsü (EBOV), Marburg virüsü (MARV) (Tablo 2) ve Nipah virüsüne (NiV) (Tablo 3) karşı antiviral aktivitesi, lüsiferaz veya yeşil floresan protein (GFP) eksprese eden tam replikasyonlu raportör virüsler kullanılarak ölçülmüştür (Uebelhoer, L.S., 2014. AVR; Hoenen, T., 2013. AVR). Ayrıca, Bileşik 1 ve Bileşik 9'un Ebola virüsü (EBOV), Marburg virüsüne (MARV) (Tablo 2-a) karşı antiviral aktivitesi, lüsiferaz veya yeşil floresan protein (GFP) eksprese eden tam replikasyonlu raportör virüsler kullanılarak ölçülmüştür (Uebelhoer, L.S., 2014. AVR; Hoenen, T., 2013. AVR). Tüm çalışmalar Hastalık Kontrol ve Önleme (CDC) Merkezlerinde biyogüvenlik seviye 4 tecridi (BSL-4) altında gerçekleştirilmiştir. Ebola virüsü antiviral analizleri, telomeraz katalitik proteini ile ölümsüzleştirilmiş primer insan mikrovasküler endotel hücrelerinde (HMVEC-TERT) ve Huh-7 hücrelerinde gerçekleştirilmiştir (Shao, R., 2004, BBRC). Nipah virüsü antiviral aktivitesi HMVEC-TERT ve Hela hücrelerinde ölçülmüştür.

Antiviral analizler 96 gözlü plaklarda gerçekleştirilmiştir. Bileşiğin sekiz ila on konsantrasyonu ortamların içinde 3



katlık seri seyrelti artırımlarıyla seyreltilmiştir ve her bir seyrelti önceden ekilmiş tek katmanlı hücre tabakaları içeren plaklara üç kopya halinde 100 uL/göz oranında aktarılmıştır. Plaklar BSL-4 tecridine aktarılmıştır ve önceden titrasyon yoluyla belirlenen ve hücre kültür ortamlarında hazırlanan virüs stoğunun uygun seyreltisi, hücreleri ve seri seyreltilmiş bileşikleri içeren test plaklarına ilave edilmiştir. Her bir plak, sırasıyla %0 ve %100 virüs inhibisyon kontrolü olarak işlev gördüğü üzere, enfeksiyonlu muamele edilmemiş hücrelerin yer aldığı üç göze ve enfeksiyonsuz hücrelerin yer aldığı üç göze sahiptir. Enfeksiyondan sonra test plakları bir doku kültür inkübatöründe 3 ila 4 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, virüs replikasyonu bir Envision plak okuyucuda GFP raportör virüsleri için doğrudan floresans yoluyla veya lüsiferaz raportör virüsleri için sonradan lüsiferaz substratı ilave edilmesi suretiyle ölçülmüştür. Virüs verim analizleri için enfeksiyonlu hücrelerden ortamlar alınmıştır ve bir kısım ters transkripsiyonel nicel polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) ile viral RNA tayini için kullanılmıştır. Geriye kalan ortamlar seri seyreltilme işlemine tabi tutulmuştur ve %50 oranında sitopatik etkilere (TCID<sub>50</sub>) neden olan doku kültür enfeksiyöz dozunu Cell TiterGlo reaktifiyle (Promega, Madison, WI) belirlemek üzere taze tek katmanlı hücre tabakalarına enfekte etmek için seyreltik ortamlar kullanılarak enfeksiyöz virüs miktarı ölçülmüştür. Virüs sitopatik etki (CPE) analizleri için enfeksiyonlu hücrelerin viyabilitesi Cell TiterGlo reaktifiyle ölçülmüştür.

Test edilen her bir konsantrasyon için %0 ve %100 inhibisyon kontrollerine karşıyla inhibisyon yüzdesi hesaplanmıştır ve doğrusal olmayan regresyon aracılığıyla her bir bileşik için virüs replikasyonunu %50 oranında inhibe eden etkili bileşik konsantrasyonu olarak EC<sub>50</sub> değeri belirlenmiştir.

### **Örnek 37. EBOV-GFP HMVEC-TERT hücreleri**

HMVEC-TERT hücreleri 96 gözlü plaklara ekilmiştir. Bileşiğin sekiz ila on konsantrasyonu ortamların içinde 3 katlık seri seyrelti artırımlarla seyreltilmiştir ve her bir seyrelti önceden ekilmiş tek katmanlı HMVEC-TERT tabakaları içeren 96 gözlü plaklara üç kopya halinde 100 uL/göz oranında aktarılmıştır. Plaklar BSL-4 tecridine aktarılmıştır ve önceden titrasyon yoluyla belirlenen ve hücre kültür ortamlarında hazırlanan EBOV-GFP virüs stoğunun uygun seyreltisi, hücreleri ve seri seyreltilmiş bileşikler içeren test plaklarına ilave edilmiştir. Her bir plak, sırasıyla %0 ve %100 virüs inhibisyon kontrolü olarak işlev gördüğü üzere, enfeksiyonlu muamele edilmemiş hücrelerin yer aldığı üç göze ve enfeksiyonsuz hücrelerin yer aldığı üç göze sahiptir. Enfeksiyondan sonra test plakları bir doku kültür inkübatöründe 3 ila 4 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra virüs replikasyonu bir Envision plak okuyucuda raportör virüsten GFP ekspresyonunu ölçmek üzere doğrudan floresans ile ölçülmüştür. Test edilen her bir konsantrasyon için %0 ve %100 inhibisyon kontrollerine kıyasla inhibisyon yüzdesi hesaplanmıştır ve doğrusal olmayan regresyon araçlarıyla her bir bileşik için virüs replikasyonunu %50 oranında inhibe eden etkili bileşik konsantrasyonu olarak EC<sub>50</sub> değeri belirlenmiştir.

### **Örnek 38. EBOV-GFP Huh-7 hücreleri**

Huh-7 hücreleri 96 gözlü plaklara ekilmiştir. Bileşiğin sekiz ila on konsantrasyonu ortamların içinde 3 katlık seri seyrelti artırımlarla seyreltilmiştir ve her bir seyrelti önceden ekilmiş tek katmanlı Huh-7 tabakaları içeren 96 gözlü plaklara üç kopya halinde 100 uL/göz oranında aktarılmıştır. Plaklar BSL-4 tecridine aktarılmıştır ve önceden titrasyon yoluyla belirlenen ve hücre kültür ortamlarında hazırlanan EBOV-GFP

virüs stoğunun uygun seyreltisi, hücreleri ve seri seyreltilmiş bileşikleri içeren test plaklarına ilave edilmiştir. Her bir plak, sırasıyla %0 ve %100 virüs inhibisyon kontrolü olarak işlev gördüğü üzere, enfeksiyonlu muamele edilmemiş hücrelerin yer aldığı üç göze ve enfeksiyonsuz hücrelerin yer aldığı üç göze sahiptir. Enfeksiyondan sonra test plakları bir doku kültür inkübatöründe 3 ila 4 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra virüs replikasyonu bir Envision plak okuyucuda raportör virüsten GFP ekspresyonunu ölçmek üzere doğrudan floresans ile ölçülmüştür. Test edilen her bir konsantrasyon için %0 ve %100 inhibisyon kontrollerine kıyasla inhibisyon yüzdesi hesaplanmıştır ve doğrusal olmayan regresyon aracılığıyla her bir bileşik için virüs replikasyonunu %50 oranında inhibe eden etkili bileşik konsantrasyonu olarak EC<sub>50</sub> değeri belirlenmiştir.

### **Örnek 39. EBOV-Luc Huh-7 hücreleri**

Huh-7 hücreleri 96 gözlü plaklara ekilmiştir. Bileşiğin sekiz ila on konsantrasyonu ortamlarının içinde 3 katlık seri seyrelti artırımlarıyla seyreltilmiştir ve her bir seyrelti önceden ekilmiş tek katmanlı hücre tabakaları içeren plaklara üç kopya halinde 100 µL/göz oranında aktarılmıştır. Plaklar BSL-4 tecridine aktarılmıştır ve önceden titrasyon yoluyla belirlenen ve hücre kültür ortamlarında hazırlanan EBOV-Luc virüs stoğunun uygun seyreltisi, hücreleri ve seri seyreltilmiş bileşikleri içeren test plaklarına ilave edilmiştir. Her bir plak, sırasıyla %0 ve %100 virüs inhibisyon kontrolü olarak işlev gördüğü üzere, enfeksiyonlu muamele edilmemiş hücrelerin yer aldığı üç göze ve enfeksiyonsuz hücrelerin yer aldığı üç göze sahiptir. Enfeksiyondan sonra test plakları bir doku kültür inkübatöründe 3 ila 4 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra virüs replikasyonu bir Envision plak okuyucuda sonradan

lüsiferaz substratı ilave edilerek ölçülmüştür. Test edilen her bir konsantrasyon için %0 ve %100 inhibisyon kontrollerine kıyasla inhibisyon yüzdesi hesaplanmıştır ve doğrusal olmayan regresyon aracılığıyla her bir bileşik için virüs replikasyonunu %50 oranında inhibe eden etkili bileşik konsantrasyonu olarak EC<sub>50</sub> değeri belirlenmiştir.

#### **Örnek 40. MARV-GFP Huh-7 hücreleri**

Huh-7 hücreleri 96 gözlü plaklara ekilmiştir. Bileşiğin sekiz ila on konsantrasyonu ortamların içinde 3 katlık seri seyrelti artırımlarıyla seyreltilmiştir ve her bir seyrelti önceden ekilmiş tek katmanlı Huh-7 tabakaları içeren 96 gözlü plaklara üç kopya halinde 100 uL/göz oranında aktarılmıştır. Plaklar BSL-4 tecridine aktarılmıştır ve önceden titrasyon yoluyla belirlenen ve hücre kültür ortamlarında hazırlanan MARV-GFP virüs stoğunun uygun seyreltisi, hücreleri ve seri seyreltilmiş bileşikleri içeren test plaklarına ilave edilmiştir. Her bir plak, sırasıyla %0 ve %100 virüs inhibisyon kontrolü olarak işlev gördüğü üzere, enfeksiyonlu muamele edilmemiş hücrelerin yer aldığı üç göze ve enfeksiyonsuz hücrelerin yer aldığı üç göze sahiptir. Enfeksiyondan sonra test plakları bir doku kültür inkübatöründe 3 ila 4 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra virüs replikasyonu bir Envision plak okuyucuda raportör virüsten GFP ekspresyonunu ölçmek üzere doğrudan floresans ile ölçülmüştür. Test edilen her bir konsantrasyon için %0 ve %100 inhibisyon kontrollerine kıyasla inhibisyon yüzdesi hesaplanmıştır ve doğrusal olmayan regresyon aracılığıyla her bir bileşik için virüs replikasyonunu %50 oranında inhibe eden etkili bileşik konsantrasyonu olarak EC<sub>50</sub> değeri belirlenmiştir.

#### **Örnek 41. Ebola Huh-7 (RNA)**

Huh-7 hücreleri 96 gözlü plaklara ekilmiştir. Bileşiğin sekiz  
ila on konsantrasyonu ortamların içinde 3 katlık seri seyrelti  
artırımlarla seyreltilmiştir ve her bir seyrelti önceden  
5 ekilmiş tek katmanlı Huh-7 hücre tabakaları içeren plaklara üç  
kopya halinde 100 uL/göz oranında aktarılmıştır. Plaklar BSL-4  
tecridine aktarılmıştır ve önceden titrasyon yoluyla  
belirlenen ve hücre kültür ortamlarında hazırlanan EBOV virüs  
10 stoğunun uygun seyreltisi, hücreleri ve seri seyreltilmiş  
bileşiklerini içeren test plaklarına ilave edilmiştir. Her bir  
plak, sırasıyla %0 ve %100 virüs inhibisyon kontrolü olarak  
işlev gördüğü üzere, enfeksiyonlu muamele edilmemiş hücrelerin  
yer aldığı üç göze ve enfeksiyonsuz hücrelerin yer aldığı üç  
15 göze sahiptir. Enfeksiyondan sonra test plakları bir doku  
kültür inkübatöründe 3 ila 4 gün inkübe edilmiştir.  
İnkübasyondan sonra enfeksiyonlu hücrelerden ortamlar  
alınmıştır ve bir kısım ters transkripsiyonel nicel polimeraz  
zincir reaksiyonu (RT-qPCR) ile viral RNA tayini için  
20 kullanılmıştır. Test edilen her bir konsantrasyon için %0 ve  
%100 inhibisyon kontrollerine kıyasla inhibisyon yüzdesi  
hesaplanmıştır ve doğrusal olmayan regresyon araçlarıyla her  
bir bileşik için virüs replikasyonunu %50 oranında inhibe eden  
etkili bileşik konsantrasyonu olarak EC<sub>50</sub> değeri  
25 belirlenmiştir.

#### **Örnek 42. Ebola Huh-7 (Verim)**

Huh-7 hücreleri 96 gözlü plaklara ekilmiştir. Bileşiğin sekiz  
30 ila on konsantrasyonu ortamların içinde 3 katlık seri seyrelti  
artırımlarla seyreltilmiştir ve her bir seyrelti önceden  
ekilmiş tek katmanlı Huh-7 hücre tabakaları içeren plaklara üç  
kopya halinde 100 uL/göz oranında aktarılmıştır. Plaklar BSL-4  
tecridine aktarılmıştır ve önceden titrasyon yoluyla  
35 belirlenen ve hücre kültür ortamlarında hazırlanan EBOV virüs

stoğunun uygun seyreltisi, hücreleri ve seri seyreltilmiş bileşiklerini içeren test plaklarına ilave edilmiştir. Her bir plak, sırasıyla %0 ve %100 virüs inhibisyon kontrolü olarak işlev gördüğü üzere, enfeksiyonlu muamele edilmemiş hücrelerin yer aldığı üç göze ve enfeksiyonsuz hücrelerin yer aldığı üç göze sahiptir. Enfeksiyondan sonra test plakları bir doku kültür inkübatöründe 3 ila 4 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra enfeksiyonlu hücrelerden ortamlar alınmış ve 10 katlık seri seyreltiler halinde seyreltilmiştir. %50 oranında sitopatik etkilere (TCID50) neden olan doku kültür enfeksiyöz dozunu Cell TiterGlo reaktifiyle (Promega, Madison, WI) belirlemek üzere taze tek katmanlı hücre tabakalarına enfekte etmek için seyreltik ortamlar kullanılarak enfeksiyöz virüs miktarı ölçülmüştür. Test edilen her bir konsantrasyon için %0 ve %100 inhibisyon kontrollerine kıyasla inhibisyon yüzdesi hesaplanmıştır ve doğrusal olmayan regresyon aracılığıyla her bir bileşik için virüs replikasyonunu %50 oranında inhibe eden etkili bileşik konsantrasyonu olarak EC<sub>50</sub> değeri belirlenmiştir.

20

#### **Örnek 43. Ebola HeLa hücreleri**

Seçilen bileşiklerin ebola virüs (EBOV) suşu Zaire'ye karşı antiviral aktivitesi Bulaşıcı Hastalıklar için US Army Tıbbi Araştırma Enstitüsünde (USAMRIID) biyogüvenlik seviye 4 tecridi (BSL-4) altında ölçülmüştür. HeLa hücreleri 384 gözlü plaklara 5000 hücre/göz oranında ekilmiştir. Her bir bileşiğin antiviral aktivitesi dört kopya halinde ölçülmüştür. Bileşiğin sekiz ila on konsantrasyonu HP300 dijital dağıtıcı olarak kullanılarak enfeksiyondan 2 sa önce 3 katlık seri seyrelti artırımlarıyla doğrudan hücre kültürlerine ilave edilmiştir. Plaklar BSL-4 tecridine aktarılmıştır ve önceden titrasyon yoluyla belirlenen ve hücre kültür ortamlarında hazırlanan virüs stoğunun uygun seyreltisi, hücreleri ve seri seyreltilmiş bileşiklerini içeren test plaklarına ilave

35

edilmiştir. Her bir plak, sırasıyla %0 ve %100 virüs inhibisyon kontrolü olarak işlev gördüğü üzere, enfeksiyonlu muamele edilmemiş hücrelerin yer aldığı üç göze ve enfeksiyonsuz hücrelerin yer aldığı üç göze sahiptir.

5 Enfeksiyondan sonra test plakları bir doku kültür inkübatöründe 2 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler formalin solüsyonunda tespit edilmiştir ve virüs replikasyonu, immün boyamadan ve Perkin Elmer Opera eşodaklı mikroskopi enstrümanı ile yüksek içerik görüntülemesinden sonra

10 Ebola glikoprotein düzeylerinin tayin edilmesi yoluyla ölçülmüştür. Test edilen her bir konsantrasyon için %0 ve %100 inhibisyon kontrollerine kıyasla inhibisyon yüzdesi hesaplanmıştır ve doğrusal olmayan regresyon aracılığıyla her bir bileşik için virüs replikasyonunu %50 oranında inhibe eden

15 etkili bileşik konsantrasyonu olarak EC<sub>50</sub> değeri belirlenmiştir.

#### **Örnek 44. Ebola Makrofaj kültürleri**

20 Seçilen bileşiklerin ebola virüs (EBOV) suşu Zaire'ye karşı antiviral aktivitesi Bulaşıcı Hastalıklar için US Army Tıbbi Araştırma Enstitüsünde (USAMRIID) biyogüvenlik seviye 4 tecridi (BSL-4) altında ölçülmüştür. Makrofaj kültürleri taze insan PBMC'lerinden izole edilmiştir ve 5ng/ml GM-CSF ve 50uM

25 B-merkaptoetanol varlığında farklılaştırılmıştır. Ortamlar her 2 günde bir yüklenmiştir ve 7 gün sonra doku kültür plağına yapılan hücreler x1 PBS içinde 0.5 M EDTA ile uzaklaştırılmıştır, 200 x g'de 10 dakika santrifüj yoluyla konsantre edilmiştir ve 384 gözlü analiz plaklarına 40,000

30 hücre/göz oranında ekilmiştir. Her bir bileşiğin antiviral aktivitesi dört kopya halinde ölçülmüştür. Bileşiğin sekiz ila on konsantrasyonu HP300 dijital dağıtıcı kullanılarak enfeksiyondan 2 sa önce 3 katlık seri seyrelti artırımlarıyla doğrudan hücre kültürlerine ilave edilmiştir. Plaklar BSL-4

35 tecridine aktarılmıştır ve önceden titrasyon yoluyla

belirlenen ve hücre kültür ortamlarında hazırlanan virüs stoğunun uygun seyreltisi, hücreleri ve seri seyreltilmiş bileşiklerini içeren test plaklarına ilave edilmiştir. Her bir plak, sırasıyla %0 ve %100 virüs inhibisyon kontrolü olarak işlev gördüğü üzere, enfeksiyonlu muamele edilmemiş hücrelerin yer aldığı üç göze ve enfeksiyonsuz hücrelerin yer aldığı üç göze sahiptir. Enfeksiyondan sonra test plakları bir doku kültür inkübatöründe 2 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler formalin solüsyonunda tespit edilmiştir ve virüs replikasyonu, immün boyamadan ve Perkin Elmer Opera eşodaklı mikroskopi enstrümanı ile yüksek içerik görüntülemesinden sonra Ebola glikoprotein düzeylerinin tayin edilmesi yoluyla ölçülmüştür. Test edilen her bir konsantrasyon için %0 ve %100 inhibisyon kontrollerine karşıyla inhibisyon yüzdesi hesaplanmıştır ve doğrusal olmayan regresyon analizi ile her bir bileşik için virüs replikasyonunu %50 oranında inhibe eden etkili bileşik konsantrasyonu olarak EC<sub>50</sub> değeri belirlenmiştir.

#### Örnek 45. Nipah-GFP HMVEC-TERT hücreleri

HMVEC-TERT hücreleri 96 gözlü plaklara ekilmiştir. Bileşiğin sekiz ila on konsantrasyonu ortamların içinde 3 katlık seri seyrelti artırımlarıyla seyreltilmiştir ve her bir seyrelti önceden ekilmiş tek katmanlı HMVEC-TERT tabakaları içeren 96 gözlü plaklara üç kopya halinde 100 uL/göz oranında aktarılmıştır. Plaklar BSL-4 tecridine aktarılmıştır ve önceden titrasyon yoluyla belirlenen ve hücre kültür ortamlarında hazırlanan NiV-GFP virüs stoğunun uygun seyreltisi, hücreleri ve seri seyreltilmiş bileşiklerini içeren test plaklarına ilave edilmiştir. Her bir plak, sırasıyla %0 ve %100 virüs inhibisyon kontrolü olarak işlev gördüğü üzere, enfeksiyonlu muamele edilmemiş hücrelerin yer aldığı üç göze ve enfeksiyonsuz hücrelerin yer aldığı üç göze sahiptir. Enfeksiyondan sonra test plakları bir doku kültür



inkübatöründe 3 ila 4 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra virüs replikasyonu bir Envision plak okuyucuda raportör virüsten GFP ekspresyonunu ölçmek üzere doğrudan floresans ile ölçülmüştür. Test edilen her bir konsantrasyon için %0 ve %100 inhibisyon kontrollerine karşıyasla inhibisyon yüzdesi hesaplanmıştır ve doğrusal olmayan regresyon aracılığıyla her bir bileşik için virüs replikasyonunu %50 oranında inhibe eden etkili bileşik konsantrasyonu olarak EC<sub>50</sub> değeri belirlenmiştir.

#### **Örnek 46. NiV-Luc HMVEC-TERT**

HMVEC-TERT hücreleri 96 gözlü plaklara ekilmiştir. Bileşiğin sekiz ila on konsantrasyonu ortamların içinde 3 katlık seri seyrelti artırlanlar ile seyreltilmiştir ve her bir seyrelti önceden ekilmiş tek katmanlı hücre tabakaları içeren plaklara üç kopya halinde 100 uL/göz oranında aktarılmıştır. Plaklar BSL-4 tecridine aktarılmıştır ve önceden titrasyon yoluyla belirlenen ve hücre kültür ortamlarında hazırlanan NiV-Luc virüs stoğunun uygun seyreltisi, hücreleri ve seri seyreltilmiş bileşikler içeren test plaklarına ilave edilmiştir. Her bir plak, sırasıyla %0 ve %100 virüs inhibisyon kontrolü olarak işlev gördüğü üzere, enfeksiyonlu muamele edilmemiş hücrelerin yer aldığı üç göze ve enfeksiyonsuz hücrelerin yer aldığı üç göze sahiptir. Enfeksiyondan sonra test plakları bir doku kültür inkübatöründe 3 ila 4 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra virüs replikasyonu bir Envision plak okuyucuda sonradan lüisiferaz substratı ilave edilerek ölçülmüştür. Test edilen her bir konsantrasyon için %0 ve %100 inhibisyon kontrollerine karşıyasla inhibisyon yüzdesi hesaplanmıştır ve doğrusal olmayan regresyon aracılığıyla her bir bileşik için virüs replikasyonunu %50 oranında inhibe eden etkili bileşik konsantrasyonu olarak EC<sub>50</sub> değeri belirlenmiştir.

#### **Örnek 47. NiV Hela (Verim)**

Hela hücreleri 96 gözlü plaklara ekilmiştir. Bileşiğin sekiz ila on konsantrasyonu ortamların içinde 3 katlık seri seyrelti artırımlarıyla seyreltilmiştir ve her bir seyrelti önceden ekilmiş tek katmanlı Hela hücre tabakaları içeren plaklara üç kopya halinde 100 uL/göz oranında aktarılmıştır. Plaklar BSL-4 tecridine aktarılmıştır ve önceden titrasyon yoluyla belirlenen ve hücre kültür ortamlarında hazırlanan Niv virüs stoğunun uygun seyreltisi, hücreleri ve seri seyreltilmiş bileşiklerini içeren test plaklarına ilave edilmiştir. Her bir plak, sırasıyla %0 ve %100 virüs inhibisyon kontrolü olarak işlev gördüğü üzere, enfeksiyonlu muamele edilmemiş hücrelerin yer aldığı üç göze ve enfeksiyonsuz hücrelerin yer aldığı üç göze sahiptir. Enfeksiyondan sonra test plakları bir doku kültür inkübatöründe 4 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra enfeksiyonlu hücrelerden ortamlar alınmıştır ve 10 katlık seri seyreltiler halinde seyreltilmiştir. %50 oranında sitopatik etkilere (TCID<sub>50</sub>) neden olan doku kültür enfeksiyöz dozunu Cell TiterGlo reaktifiyle (Promega, Madison, WI) belirlemek üzere taze tek katmanlı hücre tabakalarının enfekte etmek için seyreltik ortamlar kullanılarak enfeksiyöz virüs miktarı ölçülmüştür. Test edilen her bir konsantrasyon için %0 ve %100 inhibisyon kontrollerine kıyasla inhibisyon yüzdesi hesaplanmıştır ve doğrusal olmayan regresyon aracılığıyla her bir bileşik için virüs replikasyonunu %50 oranında inhibe eden etkili bileşik konsantrasyonu olarak EC<sub>50</sub> değeri belirlenmiştir.

#### **Örnek 48. Niv Hela (RNA)**

Huh-7 hücreleri 96 gözlü plaklara ekilmiştir. Bileşiğin sekiz ila on konsantrasyonu ortamların içinde 3 katlık seri seyrelti artırımlarıyla seyreltilmiştir ve her bir seyrelti önceden ekilmiş tek katmanlı Hela hücre tabakaları içeren plaklara üç

kopya halinde 100 uL/göz oranında aktarılmıştır. Plaklar BSL-4 tecridine aktarılmıştır ve önceden titrasyon yoluyla belirlenen ve hücre kültür ortamlarında hazırlanan Niv virüs stoğunun uygun seyreltisi, hücreleri ve seri seyreltilmiş bileşiklerini içeren test plaklarına ilave edilmiştir. Her bir plak, sırasıyla %0 ve %100 virüs inhibisyon kontrolü olarak işlev gördüğü üzere, enfeksiyonlu muamele edilmemiş hücrelerin yer aldığı üç göze ve enfeksiyonsuz hücrelerin yer aldığı üç göze sahiptir. Enfeksiyondan sonra test plakları bir doku kültür inkübatöründe 3 ila 4 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra enfeksiyonlu hücrelerden ortamlar alınmıştır ve bir kısım ters transkripsiyonel nicel polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) ile viral RNA tayini için kullanılmıştır. Test edilen her bir konsantrasyon için %0 ve %100 inhibisyon kontrollerine kıyasla inhibisyon yüzdesi hesaplanmıştır ve doğrusal olmayan regresyon aracılığıyla her bir bileşik için virüs replikasyonunu %50 oranında inhibe eden etkili bileşik konsantrasyonu olarak EC<sub>50</sub> değeri belirlenmiştir.

**Tablo 2: Ebola ve Marburg virüsü antiviral analizleri**

|                                | EC <sub>50</sub> (nM) |       |          |          |       |       |                                                   |          |
|--------------------------------|-----------------------|-------|----------|----------|-------|-------|---------------------------------------------------|----------|
| Analiz                         | Raportör Virüs        |       |          |          | RNA   | Verim | Antijen ekspresyonu (yüksek içerik görüntülemesi) |          |
| Virüs                          | EBOV-GFP              |       | EVOV-Luc | MARV-GFP | Ebola |       |                                                   |          |
| Hücre dizisi                   | HMVEC-TERT            | Huh-7 | Huh-7    | Huh-7    | Huh-7 |       | Hela                                              | Makrofağ |
| Bileşik 1                      | 771                   | 1492  | 3126     | 1726     | ND    | ND    | >20,000                                           | >20,000  |
| Bileşik 9                      | 121                   | 90    | ND       | ND       | 1     | 1029  | 290                                               | 501      |
| Bileşik 9'un (R) Diastereomeri | 62                    | 70    | ND       | ND       | ND    | ND    |                                                   |          |
| Bileşik 9'un (S)               | 40                    | 81    | ND       | ND       | ND    | ND    |                                                   |          |

|                                                                                                                                                                                                                          |       |     |    |    |    |    |          |         |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-----|----|----|----|----|----------|---------|
| Diastereomeri (Bileşik 32)                                                                                                                                                                                               |       |     |    |    |    |    |          |         |
| Bileşik 10                                                                                                                                                                                                               |       |     |    |    |    |    |          |         |
| Bileşik 15                                                                                                                                                                                                               | 630   | 271 | ND | ND | ND | ND |          |         |
| Bileşik 21                                                                                                                                                                                                               | 905   |     |    |    |    |    |          | 270     |
| Bileşik 22                                                                                                                                                                                                               | ND    | ND  | ND | ND | ND | ND |          |         |
| Bileşik 23                                                                                                                                                                                                               | 458   |     |    |    |    |    | 1650     | 243,350 |
| Bileşik 24                                                                                                                                                                                                               |       |     |    |    |    |    |          |         |
| Bileşik 25                                                                                                                                                                                                               |       |     |    |    |    |    |          |         |
| Bileşik 26                                                                                                                                                                                                               | 283   |     |    |    |    |    | 970,1180 | 1180    |
| Bileşik 27                                                                                                                                                                                                               | 82    |     |    |    |    |    | 182      |         |
| Bileşik 28                                                                                                                                                                                                               | 102   |     |    |    |    |    | 975      | 120     |
| Bileşik 29                                                                                                                                                                                                               |       |     |    |    |    |    |          |         |
| Bileşik 30                                                                                                                                                                                                               |       |     |    |    |    |    |          |         |
| Bileşik 31                                                                                                                                                                                                               | 11061 |     |    |    |    |    | >20,000  | 1230    |
| EBOV-GFP: GFP raportör genini eksprese eden Ebola virüsü<br>EBOV-Luc: Lüsiferaz raportör genini eksprese eden Ebola virüsü<br>MARV-GFP: GFP raportör genini eksprese eden Marburg virüsü<br>Ebola: Ebola virüs suşu 2014 |       |     |    |    |    |    |          |         |

**Tablo 2-a: Ebola ve Marburg virüsü antiviral analizleri**

|                                | EC <sub>50</sub> (nM) |       |          |          |       |       |                                                   |          |
|--------------------------------|-----------------------|-------|----------|----------|-------|-------|---------------------------------------------------|----------|
| Analiz                         | Raportör Virüs        |       |          |          | RNA   | Verim | Antijen ekspresyonu (yüksek içerik görüntülemesi) |          |
| Virüs                          | EBOV-GFP              |       | EVOV-Luc | MARV-GFP | Ebola |       |                                                   |          |
| Hücre dizisi                   | HMVEC-TERT            | Huh-7 | Huh-7    | Huh-7    | Huh-7 |       | Hela                                              | Makrofaj |
| Bileşik 1                      | 771                   | 1492  | 3126     | 1726     | ND    | ND    | >20,000                                           | >20,000  |
| Bileşik 9                      | 121                   | 90    | ND       | ND       | 1     | 1029  | 290, 270                                          | 501, 70  |
| Bileşik 9'un (R) Diastereomeri | 62                    | 70    | ND       | ND       | ND    | ND    | 210                                               | 112      |
| Bileşik 9'un (S)               | 40                    | 81    | ND       | ND       | ND    | ND    | 100                                               | 87       |

|                                                                                                                                                                                                                           |          |     |    |    |    |    |                  |               |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----|----|----|----|----|------------------|---------------|
| Diastereomeri<br>(Bileşik 32)                                                                                                                                                                                             |          |     |    |    |    |    |                  |               |
| Bileşik 10                                                                                                                                                                                                                |          |     |    |    |    |    | 3200             |               |
| Bileşik 15                                                                                                                                                                                                                | 630      | 271 | ND | ND | ND | ND | 520              | 501           |
| Bileşik 21                                                                                                                                                                                                                | 905, 473 |     |    |    |    |    |                  | 270           |
| Bileşik 22                                                                                                                                                                                                                | ND       | ND  | ND | ND | ND | ND | 11570            |               |
| Bileşik 23                                                                                                                                                                                                                | 458      |     |    |    |    |    | 1650, 1845       | 243, 350, 297 |
| Bileşik 24                                                                                                                                                                                                                |          |     |    |    |    |    | 785              |               |
| Bileşik 25                                                                                                                                                                                                                |          |     |    |    |    |    | 6720             |               |
| Bileşik 26                                                                                                                                                                                                                | 283      |     |    |    |    |    | 970, 1103, 1180, | 1180, 1290    |
| Bileşik 27                                                                                                                                                                                                                | 82       |     |    |    |    |    | 182              |               |
| Bileşik 28                                                                                                                                                                                                                | 102      |     |    |    |    |    | 975, 682         | 120           |
| Bileşik 29                                                                                                                                                                                                                |          |     |    |    |    |    | 275              |               |
| Bileşik 30                                                                                                                                                                                                                | 11061    |     |    |    |    |    | >20000           | 1230          |
| Bileşik 31                                                                                                                                                                                                                |          |     |    |    |    |    | >20,000, >10000  |               |
| EBOV-GFP: GFP raportör genini eksprese eden Ebola virüsü<br>EBOV-Luc: Lüsi feraz raportör genini eksprese eden Ebola virüsü<br>MARV-GFP: GFP raportör genini eksprese eden Marburg virüsü<br>Ebola: Ebola virüs suşu 2014 |          |     |    |    |    |    |                  |               |

**Tablo 3: Nipah ve Hendra virüsü antiviral analizleri**

|                                                                                                                                                | EC <sub>50</sub> (nM) |         |      |       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|---------|------|-------|
| Analiz                                                                                                                                         | Rapor tır Virüs       |         | CPE  | Verim |
| Virüs                                                                                                                                          | NiV GFP               | NiV Luc | NiV  |       |
| Hücre dizisi                                                                                                                                   | HMVEC-TERT            |         | Hela |       |
| Bileşik 1                                                                                                                                      | 13420                 | 3500    | 1484 | 1000  |
| Bileşik 9                                                                                                                                      | 60                    | 30      | ND   | ND    |
| NiV GFP: GFP raportör genini eksprese eden Nipah virüsü<br>NiV-Luc: Lüsi feraz raportör genini eksprese eden Nipah virüsü<br>NiV: Nipah virüsü |                       |         |      |       |

Buluş, spesifik ve tercih edilen çeşitli yapılanmalara ve tekniklere başvurularak açıklanmıştır. Ancak ilgili alanın uzmanları, buluşun kapsamı dışına çıkmaksızın birçok varyasyonun ve değişikliğin mümkün olduğunu anlayacaktır.