



**ANTİKANSER ETKİLİ 2,4-DİAMİNOPİRİMİDİN TÜREVİ BİLEŞİKLERİN SENTEZLERİ VE
ETKİ MEKANİZMALARININ İNCELENMESİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

Deniz LENGELİ

**DOKTORA TEZİ
FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

MART 2021

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Deniz Lengerli

22.03.21

ANTİKANSER ETKİLİ 2,4-DİAMİNOPİRİMİDİN TÜREVİ BİLEŞİKLERİN SENTEZLERİ VE ETKİ
MEKANİZMALARININ İNCELENMESİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

(Doktora Tezi)

Deniz Lengerli

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mart 2021

ÖZET

Kanser, insan ölümlerine neden olan etkenler arasında üst sıralarda yer almaktadır. Meme kanseri ise özellikle kadınlar arasında en sık görülme ve ölüm oranına sahip kanser türü olarak dikkat çekmektedir. Günümüzde meme kanseri tedavisinde kullanılan mevcut hedeflendirilmiş tedavilere karşı zamanla gelişen terapötik direnç potansiyel yeni hedefler üzerine yapılan çalışmaları da beraberinde getirmiştir. Bu yeni terapötik hedeflerden biri de sentrozom ve mikrotübüller ile etkileşim içinde bulunan hücre içi TACC protein ailesinin bir üyesi olan TACC3 proteindir. Aşırı ekspresyonu çeşitli kanser türleri ile ilişkilendirilen TACC3 proteinin meme kanseri oluşumunda da rol oynadığına yönelik kanıtlar, bu proteini meme kanseri tedavisinde ilgi çekici hale getirmektedir. 2,4-Diaminopirimidin yapısı ise antikanser etkili ilaç keşfi çalışmalarında sıklıkla tekrarlanan bir motiftir. Bahsedilen bu bilgiler doğrultusunda; araştırma grubumuz tarafından antikanser etkili yeni bir TACC3 inhibitörü bileşik keşfi amacı ile yürütülen çalışmalar sonucunda 3-(4-metoksifenil)-N-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin kimyasal yapısında bir bileşik keşfedilmiştir. BO-264 olarak adlandırılan bu bileşik, yüksek derecede TACC3 ekspresyonu gösteren insan JIMT-1 (meme) kanseri hücre hattına karşı 188-258 nM gibi oldukça düşük bir IC₅₀ değer aralığında sitotoksikite göstermiştir. Fakat yapılan in vitro ve in vivo farmakokinetik çalışmalarda; insan karaciğer mikrozomlarına hızlı yarılanma ömrü (t_{1/2}= 5,86 dk) ve yüksek hepatik klirens değeri (CL_{int}= 236,44 µL/dk/mg protein) ile metabolik açıdan dayanıksız bir bileşik olduğu sonucuna ulaşılan BO-264'ün farelerde oral biyoyararlanım değeri % 11,8 olarak tayin edilmiştir. Bu tez kapsamında BO-264'ün biyolojik etkinliğini geliştirmek ayrıca in vitro ADME ve biyoyararlanım profilini iyileştirmek amacıyla yetmiş adet yeni türev sentezlenmiştir. Bu türevlerden 4-metoksifenil halkasının üçüncü konumunda flor sübstitüenti taşıyan Bileşik 28, JIMT-1 hücre hattına karşı gösterdiği 13 nM'lık IC₅₀ değeri ile serinin en aktif bileşiği olmuştur. Buna karşın aynı hücre hattında nispeten daha düşük bir etkinliğe (IC₅₀= 206 nM) sahip olan Bileşik 89, iki farklı formülasyonla gerçekleştirilen in vivo farmakokinetik çalışmalarda % 60'ın üzerinde oral biyoyararlanım sergilemiştir. Sonuç olarak Bileşik 89'un antikanser ilaç geliştirme çalışmalarında daha ileri klinik gelişim potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir.

Bilim Kodu : 1019
Anahtar Kelimeler : Meme kanseri, TACC3, 2,4-Diaminopirimidin
Sayfa Adedi : 239
Danışman : Prof. Dr. Erden BANOĞLU

STUDIES ON THE SYNTHESIS AND ANTICANCER ACTIVITY OF NOVEL
2,4-DIAMINOPYRIMIDINE DERIVATIVES

(Ph. D. Thesis)

Deniz Lengerli

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
March 2021

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of human deaths globally, and breast cancer is the most common type of cancer, especially among women, with a high mortality rate. Therefore, studies on potential new targets have become important due to the therapeutic resistance developed against therapies currently used in breast cancer treatment. One of these new therapeutic targets is the TACC3 protein, a member of the intracellular TACC protein family that interacts with the centrosome and microtubules. Overexpression of the TACC3 protein has been associated with various types of cancer including breast cancer making TACC3 as a remarkable biological target for cancer treatment. The 2,4-Diaminopyrimidine ring system is a frequently used motif in anticancer drug discovery. Based on this potential, a compound with the chemical structure of 3-(4-methoxyphenyl)-N-(2-morpholinopyrimidin-4-yl) isoxazol-5-amine, namely BO-264, was discovered as a new TACC3 inhibitor chemotype by our research group. BO-264 showed potent cytotoxicity against the high TACC3 expressing human JIMT-1 (breast) cancer cell line with IC₅₀ values in the range of 188-258 nM. However, the in vitro and in vivo pharmacokinetic studies demonstrated that BO-264 had a limited oral bioavailability of 11,8%, and is a metabolically unstable compound due to its short half-life ($t_{1/2}$ = 5,86 min) and high hepatic clearance (CL_{int} = 236,44 μ L/min/mg protein) in human liver microsomes. In this thesis, seventy new derivatives were synthesized in order to improve the biological efficiency of BO-264, and to optimize the in vitro ADME and bioavailability profile. Among these derivatives, Compound 28 which has fluorine substituent in the third position of the 4-methoxyphenyl ring was the most active compound in the series with its IC₅₀ value of 13 nM against the JIMT-1 cell line. Moreover, Compound 89, which has a relatively good activity (IC₅₀ = 206 nM) in the same cell line, showed over 60% oral bioavailability in in vivo pharmacokinetic studies with in two different formulations. To conclude, Compound 89 has the potential for further clinical development in anticancer drug development studies.

Science Code : 1019
Key Words : Breast cancer, TACC3, 2,4-Diaminopyrimidine
Page Namber : 239
Advisor : Prof. Dr. Erden BANOĞLU

TEŞEKKÜR

Tüm doktora sürecim ve tez çalışmalarım boyunca engin tecrübe ve bilgi birikimini büyük bir özveri ile paylaşılarak bana yol gösteren, her türlü yardımını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım ve Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Başkanı çok değerli hocam Prof. Dr. Erden BANOĞLU'na; çalışma disiplini, azmi ve güçlü duruşu ile örnek aldığım ve tez çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübesinden sıklıkla faydalanmaya imkan bulduğum sevgili hocam Prof. Dr. Burcu ÇALIŞKAN'a en içten saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Doç. Dr. Özgür ŞAHİN ve kendisinin danışmanlığında biyolojik aktivite çalışmalarını büyük bir titizlikle gerçekleştiren Bilkent Üniversitesi'nden Dr. Özge AKBULUT'a; analiz çalışmalarını gerçekleştiren Ankara Üniversitesi'nden Prof. Dr. Hakan GÖKER'e ve Gazi Üniversitesi'nden Doç. Dr. Burcu AYDINER'e; doktora eğitimim boyunca sundukları çalışma ortamı için anabilim dalımızın kıymetli tüm öğretim üye ve yardımcılarına; tez çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen araştırma grubumuzun (Banoglu Research Group) değerli üyelerine içtenlikle teşekkür ediyorum.

Doktora eğitimim süresince aldığım bursla bana destek olan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK-215S015); ayrıca 100/2000 Doktora Programı dahilinde bursiyeri olduğum Yükseköğretim Kurulu'na ve bu bursu kazanmamda emeği geçen kıymetli hocam Prof. Dr. Tijen ÖNKOL'a teşekkür ediyorum.

Çalışmalarım sırasında her zaman yanımda olan, desteklerini esirgemeyen ve dostlukları ile bana güç veren çok değerli arkadaşlarım Merve BARDAKKAYA, Kübra İBİŞ, Sümeyye TURANLI ve Azize Gizem ERGÜL'e tüm kalbimle teşekkür ediyorum.

Hayatım boyunca bana olan güvenlerini kaybetmeden aldığım her kararda arkamda duran, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, maddi ve manevi her türlü destekleriyle beni bugünlere getiren sevgili anneme ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunuyor ve bu tezi onlara ithaf ediyorum...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	9
2.1. Meme Kanseri ve Meme Kanserinde Hedeflendirilmiş İlaç Tedavisi Yaklaşımı.....	9
2.2. İnsan TACC Proteinlerinin Fizyolojik Önemi ve Hedeflendirilmiş Kanser Tedavisindeki Yeri.....	14
2.3. İlaç Geliştirme Sürecinde Pirimidin Halkasının Terapötik Önemi.....	19
2.4. Antikanser İlaç Geliştirme Sürecinde 2,4-Diaminopirimidin İskeletinin Önemi.....	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	55
3.1. Kimyasal Çalışmalar.....	55
3.1.1. Gereçler.....	55
3.1.2. Genel Sentez Yöntemleri.....	57
3.2. Analitik Çalışmalar.....	65
3.2.1. Erime derecesi tayini.....	65
3.2.2. ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR spektrumları.....	65
3.2.3. HRMS spektrumları.....	65
3.3. Biyolojik Çalışmalar.....	67

Sayfa

3.3.1. Hücre kültürü.....	67
3.3.2. Hücre canlılığı deneyleri.....	67
3.3.3. Hedef duyarlı bileşik afinite testleri (DARTS).....	68
3.3.4. Western blot analizi.....	68
3.4. İn Vitro ADME ve Biyoyararlanım Çalışmaları.....	69
3.4.1. Öncü bileşik BO-264 ve BO-264 türevi bileşiklerin <i>in vitro</i> ADME çalışmaları.....	69
3.4.2. Öncü bileşik BO-264 ve Bileşik 89'un <i>in vivo</i> farmakokinetik çalışmaları.....	71
4. BULGULAR.....	73
4.1. Kimyasal Bulgular.....	73
4.2. Biyolojik Bulgular.....	186
4.3. Farmakokinetik Bulgular.....	190
4.3.1. Öncü bileşik BO-264 üzerinde gerçekleştirilen <i>in vitro</i> ve <i>in vivo</i> ADME çalışmaları sonuçları.....	190
4.3.2. Öncü bileşik BO-264 üzerinde gerçekleştirilen metabolit tayini çalışmaları.....	191
4.3.3. Tez kapsamında seçilen bazı bileşiklerin mikrozomal stabilite çalışma sonuçları.....	192
4.3.4. Bileşik 89 üzerinde gerçekleştirilen <i>in vitro</i> ve <i>in vivo</i> ADME çalışmaları sonuçları.....	194
5. TARTIŞMA.....	195
5.1. Sentez Çalışmaları.....	195
5.2. Yapı Aydınlatma Çalışmaları.....	205
5.3. Biyolojik Çalışmalar ve Yapı Etki İlişkileri.....	208
5.3.1. Bileşik 89'un sitotoksosite özelliklerinin kolon kanseri hücre hatlarında Sülforadamin B (SRB) analizi ile incelenmesi.....	218
5.3.2. BO-264 ve Bileşik 89'un hücresel yollar üzerindeki etkilerinin protein ifade analizi ile incelenmesi.....	219
5.3.3. BO-264 ve Bileşik 89'un hedef duyarlı afinite testleri (DARTS).....	220

	Sayfa
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	223
KAYNAKLAR.....	225
ÖZGEÇMİŞ.....	239

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 1.1. Tez kapsamında fenil halkası modifikasyonları doğrultusunda sentezlenen ilk final bileşik serisi.....	4
Çizelge 1.1. (devam) Tez kapsamında fenil halkası modifikasyonları doğrultusunda sentezlenen ilk final bileşik serisi.....	5
Çizelge 1.2. Tez kapsamında morfolin halkası modifikasyonları doğrultusunda sentezlenen ikinci seri final bileşikler.....	5
Çizelge 1.3. Tez kapsamında pirimidin halkası ve ara zincir modifikasyonları doğrultusunda sentezlenen üçüncü final bileşik serisi.....	6
Çizelge 1.4. Tez kapsamında sentezlenen hibrit final bileşik serisi.....	7
Çizelge 2.1. Bileşik 10, 11 ve 12' ye ait aktivite sonuçları.....	31
Çizelge 2.2. Bileşik 16'nın farklı kanser hücre hatlarındaki sitotoksikite değerleri.....	35
Çizelge 2.3. Bileşik 17'nin <i>in vitro</i> aktivite değerleri.....	36
Çizelge 2.4. Bileşik 20'nin <i>in vitro</i> sitotoksikite değerleri.....	39
Çizelge 2.5. Bileşik 21'in aktivite değerleri.....	40
Çizelge 2.6. Bileşik 22'ye ait <i>in vitro</i> aktivite değerleri.....	42
Çizelge 2.7. Bileşik 25 ve 26'nın aktivite sonuçları.....	45
Çizelge 2.8. Bileşik 30 ve Bileşik 31'e ait aktivite değerleri.....	48
Çizelge 4.1. Bileşik 5-29, Bileşik 34, Bileşik 39, Bileşik 41 ve Bileşik 43'ün IC ₅₀ değerleri.....	186
Çizelge 4.2. Bileşik 44-69'un IC ₅₀ değerleri.....	187
Çizelge 4.3. Bileşik 70, Bileşik 72, Bileşik 76-82'nin IC ₅₀ değerleri.....	188
Çizelge 4.4. Bileşik 83-91'in IC ₅₀ değerleri.....	189
Çizelge 4.5. BO-264'ün fizikokimyasal profili ve <i>in vitro</i> ADME özellikleri.....	190
Çizelge 4.6. BO-264'ün <i>in vivo</i> biyoyararlanım özellikleri.....	190
Çizelge 4.7. BO-264'ün insan karaciğer hepatositleri ile inkübasyonu sonucu majör metabolitlerinin tespit çalışmaları.....	191
Çizelge 4.8. R ₁ modifikasyonları sonucu elde edilen Bileşik 13, 19, 24, 27, 28 ve 34'ün insan karaciğer mikrozomal stabilite test sonuçları.....	192

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.9. R ₂ modifikasyonları sonucu elde edilen Bileşik 42, 43, 45, 47-49, 51-54 ve 63'ün insan karaciğer mikrozomal stabilite test sonuçları.....	192
Çizelge 4.10. Ara zincir ve pirimidin halkası modifikasyonları sonucu elde edilen Bileşik 75 ve 77'nin insan karaciğer mikrozomal stabilite test sonuçları.....	193
Çizelge 4.11. Hibrit Bileşik 81-85 ve 87-89'un insan karaciğer mikrozomal stabilite test sonuçları.....	193
Çizelge 4.12. Bileşik 89'un fizikokimyasal profili ve <i>in vitro</i> ADME özellikleri.....	194
Çizelge 4.13. Bileşik 89'un <i>in vivo</i> biyoyararlanım özellikleri.....	194
Çizelge 5.1. R ₁ modifikasyonları sonucu elde edilen final Bileşik 5-29.....	197
Çizelge 5.2. R ₂ modifikasyonları sonucu elde edilen final Bileşik 42-60, 63-67.....	202
Çizelge 5.3. Pirimidin halkası modifikasyonları sonucu elde edilen final Bileşik 68, 70, 74-76.....	203
Çizelge 5.4. BO-264 ve Bileşik 89'un kolon kanseri hücre hatlarındaki IC ₅₀ değerleri.....	218

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Öncü bileşik BO-264'ün kimyasal yapısı.....	3
Şekil 1.2. BO-264'ten hareketle tasarlanan yeni analogların modifikasyon stratejileri.....	4
Şekil 2.1. Dünya genelinde kadınlarda görülen farklı kanser türlerindeki yeni kanser vakaları ve ölüm oranlarının 2018 yılındaki yüzdeleri (GLOBOCAN 2018) (referans [11]'den uyarlanmıştır).....	9
Şekil 2.2. TACC3/ch-TOG/klatrin kompleksi ile mikrotübüller arası çapraz-bağlı köprü oluşum süreci (referans [34]'ten uyarlanmıştır).....	16
Şekil 2.3. TACC3 inhibitörü bileşikler; SPL-B, KHS101 ve BO-264.....	18
Şekil 2.4. Pirimidin halkası ve bazı kaynaşmış pirimidin analogları.....	19
Şekil 2.5. 2,4-diaminopirimidin yapısı taşıyan bazı kinaz inhibitörü bileşikler.....	22
Şekil 2.6. (a) CDK2 inhibitörü bileşik R547 (b) R547'nin aktif bölge ile etkileşimi (referans [65]'ten uyarlanmıştır).....	23
Şekil 2.7. (a) PF-562,271 bileşiğinin yapısı (b) PF-562,271'in aktif bölge ile etkileşimi (referans [66]'den uyarlanmıştır).....	24
Şekil 2.8. (a) MK-2 inhibitörü Bileşik 1 ve Bileşik 2 (b) Bileşik 1'in hidrofilik cep etkileşimi (referans [68]'den uyarlanmıştır).....	25
Şekil 2.9. ALK inhibitörü olarak geliştirilen bileşikler.....	26
Şekil 2.10. Cephalon tarafından geliştirilen ALK ve c-Met inhibitörü Bileşik 3-5.....	28
Şekil 2.11. Dual c-Met/ALK inhibitörü Bileşik 6 ve ALK inhibitörü Bileşik 7.....	29
Şekil 2.12. Dual ALK/HSP90 inhibitörü Bileşik 8 ve 9.....	30
Şekil 2.13. ALK inhibitörü Bileşik 10, Bileşik 11 ve Bileşik 12.....	31
Şekil 2.14. ALK inhibitörü Bileşik 13.....	32
Şekil 2.15. ALK/ROS1 inhibitörü bileşik 14 ve 15.....	33
Şekil 2.16. Bileşik 16'nın geliştirilme süreci.....	35
Şekil 2.17. Bileşik 17'nin geliştirilme aşaması.....	35
Şekil 2.18. Bileşik 18'in geliştirme stratejisi.....	36
Şekil 2.19. Bileşik 19 ve IC ₅₀ değerleri.....	38

Şekil	Sayfa
Şekil 2.20. Bileşik 20'nin geliştirilme stratejisi.....	39
Şekil 2.21. Aurora A inhibitörü Bileşik 21.....	40
Şekil 2.22. Aurora A/B inhibitörü PF-038114735.....	41
Şekil 2.23. CDK2 inhibitörü Bileşik 22'nin geliştirilmesi.....	42
Şekil 2.24. CDK6/9 dual inhibitörü Bileşik 24'ün geliştirilmesi.....	44
Şekil 2.25. Pazopanib'ten hareketle geliştirilen Bileşik 25 ve 26.....	45
Şekil 2.26. HDAC/VEGFR dual inhibitörü Bileşik 27 ve 28.....	46
Şekil 2.27. Bileşik 30 ve 31'in geliştirilme stratejisi.....	47
Şekil 2.28. Dual FAK/IGF-1R inhibitörü NVP-TAE226 ve bazı insan kanser hücre hatlarındaki aktivite değerleri.....	49
Şekil.2.29. FLT3 inhibitörü olarak Bileşik 32'den hareketle Bileşik 33'ün geliştirilmesi.....	50
Şekil 2.30. HSP90-Cdc37 protein-protein etkileşimi inhibisyonu gerçekleştiren bileşikler.....	51
Şekil 2.31. BCL6 inhibitörü Bileşik 36.....	52
Şekil 2.32. Bileşik 37'den hareketle BI-3802 ve BI-3812'nin geliştirilmesi.....	53
Şekil 5.1. BO-264 öncü bileşiği üzerinde gerçekleştirilen modifikasyonlar.....	195
Şekil 5.2. Bileşik 5-29 için genel sentez şeması.....	196
Şekil 5.3. Bileşik 34 için genel sentez şeması.....	197
Şekil 5.4. Bileşik 39 için genel sentez şeması.....	198
Şekil 5.5. Bileşik 41'e ait genel sentez şeması.....	198
Şekil 5.6. R ₂ modifikasyonları ile gerçekleştirilen Bileşik 42-57'un ve Bileşik 59'un sentezi.....	199
Şekil 5.7. Bileşik 58'in ve Bileşik 60'ın sentezi.....	200
Şekil 5.8. Bileşik 63-67'nin sentezi.....	201
Şekil 5.9. Bileşik 68 ve Bileşik 70'in sentezi.....	201
Şekil 5.10. R ₃ ve R ₄ modifikasyonları ile gerçekleşen Bileşik 74-76 sentezi.....	202
Şekil 5.11. R ₅ modifikasyonu kapsamında gerçekleştirilen Bileşik 77-80'nin sentezi	203

Şekil	Sayfa
Şekil 5.12. Hibrit final bileşik serisi Bileşik 81-89'un sentez şeması.....	204
Şekil 5.13. İnsan hepatositleri ile inkübasyondan sonra HPLC/MS/MS ile tanımlanan ana BO-264 metabolitleri.....	209
Şekil 5.14. BO-264'ün DMPK (ilaç metabolizması-Farmakokinetik) karakterizasyonu.....	210
Şekil 5.15. 4-metoksifenil halkası modifikasyonu çerçevesinde sentezlenen ilk seri bileşiklerin IC ₅₀ değerleri.....	211
Şekil 5.16. Ar-O-CH ₃ , Ar-O-CF ₃ , Ar-O-CHF ₂ ve Ar-CF ₂ -CH ₃ yapılarının konformasyonel açıları (referans [138]'den uyarlanmıştır).....	212
Şekil 5.17. 4-metoksifenil halkası modifikasyonu çerçevesinde sentezlenen ikinci seri bileşiklerin IC ₅₀ değerleri.....	213
Şekil 5.18. Morfolin halkası modifikasyonu çerçevesinde sentezlenen ilk seri bileşiklerin IC ₅₀ değerleri.....	213
Şekil 5.19. Morfolin açık halka analoglarının IC ₅₀ değerleri.....	214
Şekil 5.20. Ara zincir ve pirimidin halkası modifikasyonları çerçevesinde sentezlenen bileşiklerin IC ₅₀ değerleri.....	215
Şekil 5.21. Sentezlenen hibrit bileşiklerin IC ₅₀ değerleri.....	216
Şekil 5.22. Hibrit bileşiklerin insan karaciğer mikrozomlarındaki t _{1/2} değerleri.....	216
Şekil 5.23. IV ve PO yoldan uygulanan Bileşik 89'un CD-1 farelerinde göstermiş olduğu zamana bağlı plazma konsantrasyon grafiği.....	217

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 5.1. Bileşik 89'un ^1H -NMR spektrumu.....	206
Resim 5.2. Bileşik 89'un ^{13}C -NMR spektrumu.....	207
Resim 5.3. BO-264 ve Bileşik 89 ile 24 saat inkübe edilen JIMT-1 (A) ve HCT-116 (B) hücrelerinde hücre içi protein seviyelerinin Western blot yöntemi ile incelenmesi.....	220
Resim 5.4. BO-264 ve Bileşik 89'a ait DARTS analiz sonuçları (A) İlgili bileşiklere ilişkin bağıl TACC3 bant yoğunlukları.....	221

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda alfabetik sırayla sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
% F	Yüzde biyoyararlanım
°C	Santigrat derece
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
A549	İnsan küçük hücreli akciğer kanseri hücre hattı
akb	Atomik kütle birimi
AGS	İnsan mide kanseri hücre hattı
AUC	Eğri altında kalan alan
C₀	Başlangıç konsantrasyonu
Caco-2	İnsan kolorektal adenokarsinom hücre hattı
CAL51	İnsan meme kanseri hücre hattı
CC₅₀	% 50 oranında hücre sel sitotoksositeye neden olan doz
CL_{int}	Hepatik klirens
C_{max}	Maksimum konsantrasyon
COLO205	İnsan kolon kanseri hücre hattı
dk	Dakika
EC₅₀	% 50 oranında etki elde etmek için gerekli olan doz
GI₅₀	% 50 oranında büyüme inhibisyonuna neden olan doz
H125	İnsan akciğer kanseri hücre hattı
H2228	İnsan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı
H3122	İnsan akciğer kanseri hücre hattı
HCC1954	İnsan meme epitelyal hücre hattı
HCC78	İnsan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı
HCT-116	İnsan kolon kanseri hücre hattı
HCT-8	İnsan kolon epitelyal hücre hattı

Simgeler	Açıklama
HEL	İnsan lösemi hücre hattı
HeLa	İnsan servikal kanser hücre hattı
HepG2	İnsan hepatoselüler karsinoma hücre hattı
HT-29	İnsan kolon kanseri hücre hattı
Hz, MHz	Hertz, Megahertz
IC₅₀	Maksimum inhibisyonun % 50'sini oluşturan ilaç konsantrasyonu
JIMT-1	İnsan meme kanseri hücre hattı
K562	İnsan lösemi hücre hattı
Karpas-299	İnsan lenfoma hücre hattı
KATO III	İnsan gastrik kanser hücre hattı
K_d	Ayrışma sabiti
kg	Kilogram
KG1	İnsan lösemi hücre hattı
K_i	İnhibisyon sabiti
Log D_{7,4}	Dağılım katsayısı (pH= 7,4)
MCF-7	İnsan meme kanseri hücre hattı
MDA-MB-231	İnsan meme kanseri hücre hattı
MDA-MB-436	İnsan meme kanseri hücre hattı
mg	Miligram
ml	Mililitre
mmol	Milimol
MOLT4	İnsan lösemi hücre hattı
MV4-11	İnsan lösemi hücre hattı
N	Normalite
NCI-60	İnsan kanser hücre hatları paneli
ng	Nanogram
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
OVCAR-3	İnsan yumurtalık kanseri hücre hattı
PC-3	İnsan prostat kanseri hücre hattı

Simgeler	Açıklama
ppm	Parts per million
RPMI8226	İnsan miyeloma hücre hattı
s	Saat
SK-MEL-23	İnsan melanom hücre hattı
SKOV-3	İnsan yumurtalık kanseri hücre hattı
SU-DHL-4	İnsan lenfoma hücre hattı
SUIT-2	İnsan pankreas kanseri hücre hattı
t_{1/2}	Kandaki ilaç konsantrasyonu yarılanıncaya kadar geçen süre
t_{max}	Kandaki ilaç konsantrasyonu maksimuma ulaşınca kadar geçen süre
V_{ss}	Kararlı durum dağılım hacmi

Kısaltmalar	Açıklama
ADME	Absorbsiyon-dağılım-metabolizasyon-atılım
AKT	Protein kinaz B
ALCL	Anaplastic large-cell lymphoma
ALK	Anaplastik lenfoma kinaz
AML	Akut miyeloid lösemi
ATP	Adenozin trifosfat
ATX	Autotaxin
BCL6	B-hücreli lenfoma 6 protein
Boc	Tersiyer bütilloksikarbonil
BORA	Aurora A protein kinaz aktivatör proteini
BRCA	Meme kanseri duyarlılık proteini
CAS	Chemical Abstracts Service
Cdc37	CDC37 geni tarafından kodlanan bir protein
CDK	Cyclin dependent kinase
ch-TOG	Colonic and hepatic tumor overexpressed gene protein
c-Met	Hepatosit büyüme faktörü

Kısaltmalar	Açıklama
CYP450	Sitokrom P450
DARTS	Drug Affinity Responsive Target Stability
DFG	Protein kinazlarda aspartik asit-fenilalanin-glisin aminoasitlerinden oluşan bölge
DIPEA	<i>N,N</i> -Diizopropiletilamin
DMAP	4-Dimetilaminopiridin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamit
DMSO-<i>d</i>₆	Dötero dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDCI	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimit
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
EMT	Epithelial mesenchymal transition
ER	Estrogen receptors
FAK	Fokal adezyon kinaz
FBDD	Fragment based drug discovery
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FGFR	Fibroblast growth factor receptors
FKM	Fare karaciğer mikrozomları
FLT3	Fms-like tyrosine kinase 3
HDAC	Histon deasetilaz
HER	Human epidermal growth factor receptor
HL-60	İnsan lösemi hücre hattı
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografi
HR	Hormon reseptörleri
HRMS	Yüksek çözünürlüklü kütle spektroskopisi
HSP90	Heat shock protein 90

Kısaltmalar	Açıklama
IGF-1R	Insulin like growth factor type 1 receptor
IR	İnsülin reseptörü
İKM	İnsan karaciğer mikrozomları
İTK	İnce tabaka kromatografisi
JAK	Janus kinaz
LC/MS	Liquid chromatography/mass spectrometry
m-CPBA	<i>meta</i> -Kloroperoksibenzoik asit
MeOH	Metanol
MK2	Mitojenle aktive edilen protein kinaz ile aktive edilen protein kinaz 2
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
<i>n</i>-BuLi	<i>n</i> -Bütillityum
NEAA	Non-Essential Amino Acids
NMP	<i>N</i> -metil-2-pirolidon
NMR	Nükleer manyetik rezonans
NSCLC	Non-small cell lung carcinoma
PARP	Poli (ADP-riboz) polimeraz
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PPB	Plazma proteinlerine bağlanma
PPIs	Protein–protein interactions
PR	Progesteron reseptörü
PVDF	Poliviniliden flüorür
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma
RNA	Ribonükleik asit
ROS1	Repressor of silencing 1
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SERD	Selective estrogen receptor degrader
SERM	Selective estrogen receptor modulator
SRB	Sülforadamin B
SYK	Spleen tyrosine kinase
TACC	Transforming acidic coiled-coil

Kısaltmalar	Açıklama
TBS-T	Tris-buffered saline-Tween 20
TCA	Trikloroasetik asit
TEA	Trietilamin
THF	Tetrahidrofuran
TNBC	Triple-negative breast cancer
TPX2	Targeting protein for Xklp2
UPLC	Ultra-Performanslı Sıvı Kromatografi
VEGFR	Vascular endothelial growth factor

1. GİRİŞ

Kanser; çeşitli fiziksel, kimyasal, biyolojik ve/veya genetik faktörlerin etkisiyle normal sınırlarının dışında büyüyen, öncelikle yakın dokuları istila edip sonrasında ise vücuttaki diğer doku ve organlara yayılabilen anormal hücrelerin kontrol dışı çoğalması olarak tanımlanan geniş bir grup hastalıktır [1]. İnsan ölümlerine neden olan etkenler arasında oldukça üst sıralarda yer alan kanser; 21'inci yüzyılda dünyanın her ülkesinde yaşam beklentisinin artmasının önündeki en önemli engel olarak kabul edilmektedir [2]. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2018 yılındaki verilerine göre dünya çapında tahmini 18,1 milyon insan kansere yakalanırken, vakaların yaklaşık %53'ü (9,6 milyon) hayatını kaybetmektedir. Bu ölüm sayısının 2020 yılında 10 milyona, 2040 yılına gelindiğinde ise yaklaşık 16,5 milyona ulaşacağı düşünülmektedir [3].

Günümüzde bilinen 100'den fazla kanser türü arasında meme kanseri; özellikle kadınlar arasında en sık görülme ve ölüm oranına sahip kanser türü olarak dikkat çekmektedir [4]. Dünya genelinde sadece 2018 yılında yaklaşık 2,1 milyon yeni meme kanseri vakası teşhis edilmekle birlikte, ülkemizde de meme kanseri oldukça ciddi bir sağlık problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Tüm kanser vakalarının yaklaşık %11'ini oluşturan meme kanseri, akciğer kanserinden sonra ülkemizde en sık gözlenen ikinci kanser türüdür [5].

Oldukça heterojen yapıda bir kanser türü olarak kabul edilen meme kanserinin birbirinden farklı histokimyasal özellik gösteren çok sayıda alt tipi tanımlanmıştır. Her alt tipte kanser biyobelirteçleri farklı derecelerde ifade edilirken, hastalık seyri ve tedaviye verilen yanıt; genetik, epigenetik ve çevresel risk faktörlerinin de etkisi ile hastadan hastaya değişkenlik gösterebilmektedir. Belirtilen bu sorun, meme kanseri tedavisinde karşılaşılan en büyük zorluktur [6].

Son yıllarda moleküler biyoloji ve genetik alanındaki ilerlemeler sayesinde meme kanseri biyolojisinin daha iyi anlaşılması, tanı yöntemlerindeki gelişmeler ve erken aşamada teşhisin yaygınlaşması; meme kanseri görülme sıklığında ve ölüm oranlarında düşüşe yardımcı olsa da hastaya özgü maksimum terapötik yararın sağlanacağı bir tedavi için yeni

tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu noktada ise belirli bir hedefe spesifik etki gösteren terapötik ajanların rolü büyüktür [6].

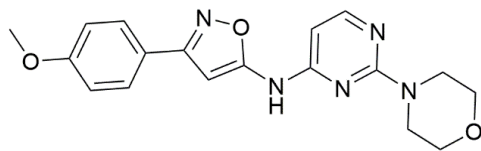
Günümüzde meme kanseri tedavisinde, çok sayıda biyolojik yolak ve biyomolekül hedef olarak kullanılmasına rağmen mevcut hedeflendirilmiş tedavilere karşı zamanla gelişen terapötik direnç; potansiyel yeni hedefler üzerine yapılan çalışmaları da beraberinde getirmiştir. Bu yeni terapötik hedeflerden biri de sentrozom ve mikrotübül ile etkileşim içinde bulunan hücre içi TACC (Transforming Acidic Coiled Coil) protein ailesinin bir üyesi olan TACC3 proteindir. Aşırı ekspresyonu çeşitli kanser türleri ile ilişkilendirilen bu proteinin, meme kanseri oluşumunda da rol oynadığına yönelik kanıtlar mevcuttur. Bu durum; TACC3 proteinini meme kanseri tedavisinde ilgi çekici bir hedef haline getirmektedir [7].

Azot içeren heterosiklik bileşikler; yapısal çeşitliliği ve geniş bir farmakolojik aktivite yelpazesine sahip olması nedeniyle ile uzun yıllar boyunca ilaç geliştirme çabalarında araştırmacıların dikkatini uyandıran sentetik hedefler arasında yer almaktadır [8]. Bu yapı sınıfının önemli bir üyesi olan pirimidinler; farklı biyolojik aktivite (antikanser, antiviral, antimikrobiyal, antienflamatuar vb.) potansiyeline sahip birçok sentetik ve doğal üründe göze çarpmaktadır. Özellikle antikanser etkili ilaç keşfi çalışmalarında pirimidin yapısı sıklıkla tekrarlanan bir motiftir. Çok sayıda pirimidin ve kaynaşmış pirimidin yapısı taşıyan bileşiğin, çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanımı FDA (Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onay almıştır [9]. Farklı pirimidin türevleri arasında 2,4-diaminopirimidinler ise; kanser üzerindeki önemli kemoterapötik etkileri nedeniyle son zamanlarda önemli ölçüde dikkat çekmektedir.

Bahsedilen bu olgular doğrultusunda; araştırma grubumuz tarafından antikanser etkili yeni bir TACC3 inhibitörü bileşik keşfi amacı ile yürütülen çalışmalar sonucunda 3-(4-metoksifenil)-N-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin kimyasal yapısında bir bileşik keşfedilmiştir (Şekil 1.1). BO-264 olarak adlandırılan bu bileşik; öncelikle aşırı TACC3 ekspresyonu gösteren insan meme kanseri hücre hattına (JIMT-1) karşı test edilmiş ve 0,188-0,258 μ M gibi oldukça düşük bir IC₅₀ (maksimum inhibitör etkinin %50'sini oluşturan ilaç konsantrasyonu) değer aralığında kanser hücre proliferasyonunu inhibe etmiştir.

Sonrasında gerçekleştirilen ileri biyolojik analizler sonucunda BO-264 bileşiğinin antiproliferatif etkisini; TACC3 inhibisyonu ($K_d = 1,5$ nM) ile indüklenen mitotik tutulma, deoksiribo nükleik asit (DNA) hasarı ve apoptoz aracılı hücre ölümü ile gerçekleştiği gösterilmiştir. Ayrıca BO-264'ün, fibroblast büyüme faktörü reseptörü (FGFR)-TACC3 onkogenik füzyon proteinini eksprese eden kanser hücreleri üzerinde de antiproliferatif aktivite sergilediği tespit edilmiştir [10].

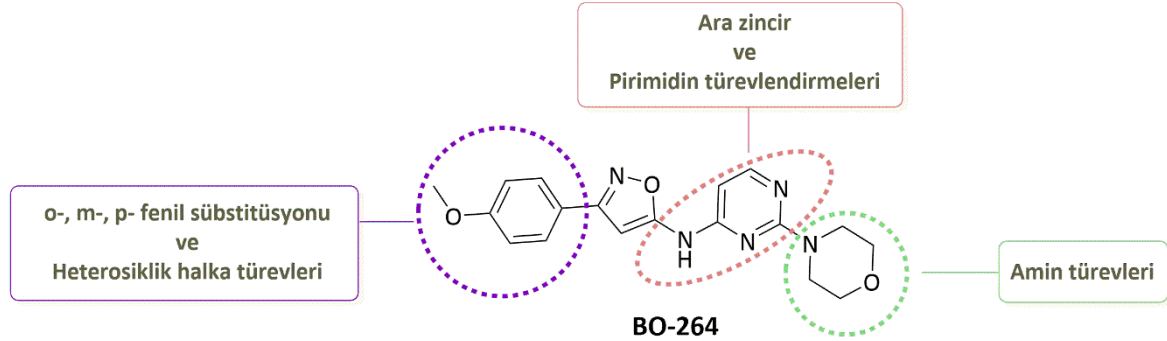
İlaç geliştirme çabalarında umut vadeden bu biyolojik etkinlik profiline karşı, öncü BO-264 bileşiği üzerinde gerçekleştirilen *in vitro* ADME (Absorbsiyon-Dağılım-Metabolizasyon-Atılım) ve biyoyararlanım çalışmalarında ise beklenen sonuçlar elde edilememiştir. Ortalama bir lipofilisite değerine ($\log D_{7,4} = 2,3$) sahip BO-264 bileşiğinin pH 7,4 ortamında ne yazık ki düşük çözünürlüğe ($7,4$ μ M) sahip olduğu saptanmıştır. İnsan karaciğer mikrozomal stabilite testlerinde ise; BO-264'ün hızlı yarılanma ömrü ($t_{1/2} = 5,86$ dakika) ve yüksek hepatik klirens değeri ($CL_{int} = 236,44$ μ L/dakika/mg protein) ile metabolik açıdan dayanıksız bir bileşik olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca farelerde *in vivo* farmakokinetik çalışmaları sonucunda elde edilen % 11,8'lik oral biyoyararlanım değeri, öncü bileşik BO-264'ün farmakokinetik profilinin optimize edilmesi gerekliliğini beraberinde getirmiştir.



Şekil 1.1. Öncü bileşik BO-264'ün kimyasal yapısı

Bu tez çalışması kapsamında; öncü BO-264 bileşiğinden yola çıkılarak, izoksazol ve 2,4-diaminopirimidin motifini bir arada taşıyan potansiyel TACC3 inhibitörü bileşiklerin sentez çalışmaları gerçekleştirilmiş ve yapı-etki ilişkileri incelenmiştir. Öngörülen yapısal modifikasyon yaklaşımlarında; antikanser aktivitenin korunması ya da daha iyileştirilmesi amaçlanmış, bir yandan da bileşiklerin ilaç olabilme özelliklerini iyileştirmek adına *in vitro* ADME özelliklerini optimize etmek hedeflenmiştir. Bu doğrultuda orijinal yetmiş adet BO-264 analogu sentezlenerek yapıları aydınlatılmış, tüm final bileşiklerin JIMT-1 kanser hücre hattına karşı sitotoksik aktiviteleri ve seçilen bazı bileşiklerin *in vitro* ADME özellikleri değerlendirilmiştir.

Tez kapsamında sentezlenen bileşiklerin tasarımı; öncü bileşik BO-264'ün 3 farklı bölgesi üzerinde yoğunlaşan modifikasyonlar doğrultusunda gerçekleştirilmiştir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. BO-264'ten hareketle tasarlanan yeni analogların modifikasyon stratejileri

İlk seri bileşiklerde BO-264 bileşiğinin fenil halkasına odaklanılmış ve bu halkanın orto, meta ve/veya para konumlarına getirilen farklı elektron çekici ve salıcı grupların biyolojik aktiviteye olan katkısı 4-OCH₃ grubu taşıyan BO-264'ün etkinliği ve metabolik stabilitesi ile kıyaslanmıştır. Ayrıca fenil halkası haricinde; piridinil, benzo[d][1,3]dioksolil, 2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioksolil, 2,3-dihidrobenzofuranil gibi farklı doymamış heterosiklik halkaların da sitotoksositeye olan etkisi incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda sentezlenen bileşikler Çizelge 1.1'de belirtilmiştir.

Çizelge 1.1. Tez kapsamında fenil halkası modifikasyonları doğrultusunda sentezlenen ilk final bileşik serisi

Bileşik	R ₁	Bileşik	R ₁	Bileşik	R ₁
BO-264		14		24	
5		15		25	
6		16		26	
7		17		27	
8		18		28	
9		19		29	

Çizelge 1.1. (devam) Tez kapsamında fenil halkası modifikasyonları doğrultusunda sentezlenen ilk final bileşik serisi

10		20		34	
11		21		39	
12		22		41	
13		23			

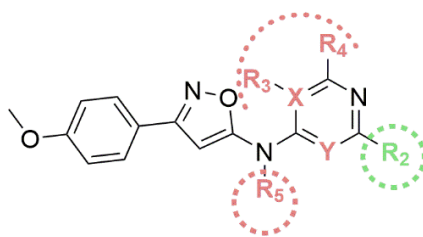
İkinci seri bileşiklerde; BO-264 bileşiğinin 4-OCH₃ fenil grubu korunarak, morfolin halkası yerine farklı amin türevleri getirilmiştir. Bu seri bileşiklerde biyolojik aktivitenin korunması amaçlanırken, bir yandan da moleküllerin metabolik stabilitelerini iyileştirme yönünde tasarımlar yapılmıştır. Bu doğrultuda sentezlenen bileşikler Çizelge 1.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 1.2. Tez kapsamında morfolin halkası modifikasyonları doğrultusunda sentezlenen ikinci seri final bileşikler

Bileşik	R ₂	Bileşik	R ₂	Bileşik	R ₂
42		50		58	
43		51		59	
44		52		60	
45		53		63	
46		54		64	
47		55		65	
48		56		66	
49		57		67	

Üçüncü seri bileşiklerde ise; pirimidin halkası ve bu yapıyı izoksazol halkasının 5. konumuna bağlayan ara zincir üzerinde gerçekleştirilen süstitüsyonların yapı-etki ilişkisine katkısı incelenmiştir. Bu kapsamda sentezlenen bileşiklerde 4-OCH₃ fenil grubu korunarak ilk önce pirimidin halkası piridin ve triazin ile değiştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda pirimidin halkasının biyolojik aktivitede kritik rol oynadığı sonucuna ulaşılmış ve yeni türevlerin sentezinde; pirimidin halkasının 5. ve 6. konumlarında farklı süstitüentler denenmiştir. Ayrıca bu türevlerde daha başarılı biyolojik aktivite gösteren ve metabolik açıdan daha stabil olabileceği düşünülen 4-floropiperidin halkası morfolin grubu yerine tercih edilmiştir. Ara zincir analoglarında ise; metil, farklı aminoalkil ve asetonitril süstitüsyonları denenmiştir. Sentezlenen bileşikler Çizelge 1.3'te belirtilmiştir.

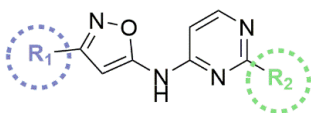
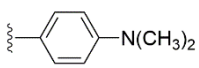
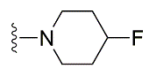
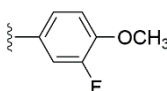
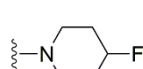
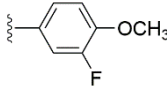
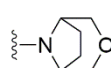
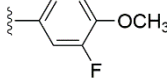
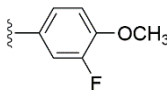
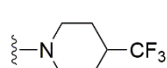
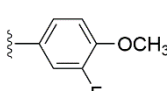
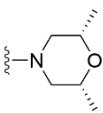
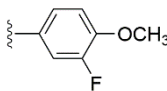
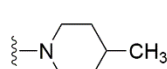
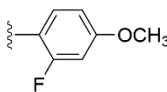
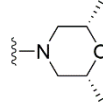
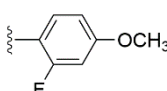
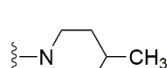
Çizelge 1.3. Tez kapsamında pirimidin halkası ve ara zincir modifikasyonları doğrultusunda sentezlenen üçüncü final bileşik serisi



Bileşik	X	Y	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
68	C	C		-H	-H	-H
70	N	N		-H	-H	-H
74	C	N		-Cl	-H	-H
75	C	N		-F	-H	-H
76	C	N		-H	-CH ₃	-H
77	C	N		-H	-H	-CH ₃
78	C	N		-H	-H	-C ₂ H ₄ N(CH ₃) ₂
79	C	N		-H	-H	-C ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂
80	C	N		-H	-H	-CH ₂ CN

Gerçekleştirilen tüm optimizasyon çalışmaları sonucunda; fenil halkası ve morfolin halkası üzerinde optimal aktivite sergileyen sübstitüsyon paternlerini bir arada taşıyan bir seri hibrit molekül sentezlenmiştir (Çizelge 1.4).

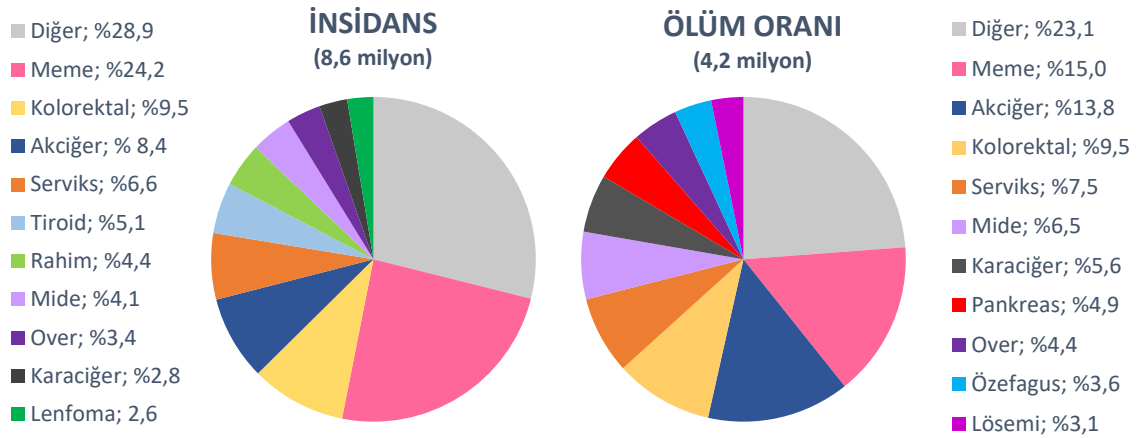
Çizelge 1.4. Tez kapsamında sentezlenen hibrit final bileşik serisi

		
Bileşik	R ₁	R ₂
81		
82		
83		
84		
85		
86		
87		
88		
89		

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri ve Meme Kanserinde Hedeflendirilmiş İlaç Tedavisi Yaklaşımı

Meme kanseri; genel anlamda epitel meme dokusunda meydana gelen kontrolsüz hücre çoğalması sonucu kötü huylu lezyonların oluşması ile karakterize bir hastalıktır [11]. Meme kanseri her iki cinsiyette de görülmekle birlikte, kadınlar arasında en yaygın görülen ve en çok ölüme sebebiyet veren kanser türüdür [12]. Erken tanı yöntemleri, yeni tedavi stratejileri ile elde edilen başarılar ve sağlık sistemindeki gelişmelere rağmen, kadınlarda görülen her dört kanser vakasından bir tanesi meme kanseri olarak karşımıza çıkmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2018 yılı verilerine göre; yaklaşık 627 000 kadının meme kanserinden hayatını kaybettiği tahmin edilmektedir ki bu rakam kadınlar arasındaki tüm kanser ölümlerinin yaklaşık % 15'i oluşturmaktadır [13].



Şekil 2.1. Dünya genelinde kadınlarda görülen farklı kanser türlerindeki yeni kanser vakaları ve ölüm oranlarının 2018 yılındaki yüzdeleri (GLOBOCAN 2018) ([11]'den uyarlanmıştır)

Meme kanseri insidansı coğrafi bölgelere göre değişkenlik göstermekle birlikte, gelişmiş ülkelerdeki kadınlar arasında daha yüksek oranda görülmektedir. İlerleyen yaş, östrojenik uyarılarda uzun süreli artış meydana getiren koşullar (oral kontraseptif kullanımı, erken menarş, geç menopoz vb.), artmış karsinogen maruziyeti ve genetik hasarlar başlıca risk faktörleri olarak meme kanserinin görülme sıklığını arttıran durumlardır [6].

Genellikle heterojen yapıda bir kanser tipi olarak kabul edilen meme kanseri, fenotipik ve morfolojik özelliklerine göre birçok şekilde sınıflandırılabilir. Bu sınıflara ait alt tipler ise klinikte birbirinden çok farklı davranışlar göstermektedir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre; meme karsinomları on dokuz farklı ana alt tipe kategorize edilirken [14], immünohistokimyasal özelliklerine göre üç temel tipte incelenebilir. Bunlar; hormon reseptörü (HR) pozitif, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER-2) pozitif ve üçlü negatif meme kanserleridir (TNBC) [15].

HR-pozitif kanserlerde tümör hücresi, kendi büyümesini destekleyebilen östrojen ve progesteron hormonları için östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörüne (PR) sahiptir. Tümör hücrelerinde ER veya PR ekspresyonunun en az % 1 oranında görülmesi, HR-pozitif olarak sınıflandırılması için yeterlidir. Tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık % 70'ini HR-pozitif kanserler oluşturur. HR-pozitif meme kanserleri ayrıca iki alt tipe daha ayrılabilir. Bunlar; ER-pozitif ve/veya PR-pozitif ve HER-2 negatif olma eğiliminde olan Luminal A, ER-pozitif ve/veya PR-pozitif ve HER-2 pozitif olma eğiliminde olan Luminal B tipi meme kanseridir [16].

HER-2-pozitif meme kanseri patogenezinin ise; tümör hücrelerinin transmembran bir tirozin kinaz proteini olan HER-2'yi kodlayan onkogenlerdeki aktivasyon artışı durumu ile karakterize olduğu görülür. HR-pozitif kanser hücreleri ile karşılaştırıldığında, HER-2-pozitif alt tipinin çok daha agresif ve hızlı ilerlediği ve bu nedenle daha kötü bir hastalık seyrine sahip olduğu bilinmektedir. Bunun nedeni; kanser hücrelerinin yüzeyinde aşırı eksprese edilen büyüme faktörü reseptörleri yolu ile daha fazla büyüme faktörüne maruz kalmasıdır. Meme kanserlerinin yaklaşık % 20'si HER-2 pozitifdir [16].

İstatiksel olarak meme kanserlerinin % 15'ini oluşturan olan üçlü negatif meme kanseri alt tipinin; ER, PR ve HER-2 reseptörlerini eksprese etmediği ve moleküler açıdan patogenezinin belirsiz olduğu bilinmektedir. Bu nedenle uygulanacak tedavi stratejilerinin etkisiz ve yetersiz kaldığı üçlü negatif meme kanseri vakaları yüksek nüks olasılığı taşıırken, diğer alt tipler arasında en kötü hastalık seyrine sahip olduğu söylenebilir [16, 17].

Teşhis edildikten sonra, meme kanseri tedavisinin akılcı bir doğrultuda şekillendirilmesi önem arz etmektedir. Doğru terapötik stratejilerin uygulanması, hastaların hayat kalitesinde gerçekleştirdiği iyileşme beraberinde sağ kalım süresinde de artış oluşturarak tedaviyi daha efektif hale getirmektedir. Bu bakımdan hastalığın histopatolojik analizinin iyi yapılması oldukça kritiktir. Tümörün büyüklüğü, derecesi, sahip olduğu reseptör çeşitleri (hangi meme kanseri alt tipine ait olduğu) ve metastaz durumu değerlendirilmesi gereken başlıca prognostik parametrelerdir [18].

Tümörün metastaz durumuna göre temel olarak meme kanseri tedavisi; lokal veya sistemik olarak gerçekleştirilir. Metastaz yapmamış vakalarda cerrahi müdahale ve radyoterapiden oluşan lokal tedavinin ön plana çıktığı görülürken, daha ağır bir tablo sergileyen metastatik meme kanserinde ise çeşitli kemoterapötik ajanlar ile gerçekleştirilen sistematik tedavi tercih edilir. Bu tedaviye gerektiği durumlarda cerrahi operasyon ve radyoterapi de eşlik edebilir [16].

Sistematik meme kanseri tedavisinde kullanılan terapötik ilaçları iki grupta sınıflandırmak mümkündür. Bu grup ilaçlar; kanser hücresi ile sağlıklı hücre arasında ayırım yapmaksızın tahribat gerçekleştiren klasik sitotoksik kemoterapötikler (Paklitaksel, Dosetaksel, Doksorubisin, Kapesitabin vb.) ve ilgili biyolojik hedefe yönelik geliştirilen yeni nesil kemoterapötik ilaçlardır [19]. Özellikle ikinci gruba dahil olan ilaçlar göstermiş olduğu seçicilik özelliği ile önemli bir klinik avantaja sahiptir.

20'nci yüzyılda başlayan moleküler biyoloji ve genetik alanındaki önemli gelişmeler zaman içerisinde hız kazanarak meme kanseri patofizyolojisinin aydınlatılmasına yardımcı olmuş, bu sayede tedaviye yönelik yeni biyolojik hedefler ve bu hedefler üzerinde etkili yeni ilaç molekülleri keşfedilmiştir [11].

Östrojen, HR-pozitif meme kanseri üzerine çalışılmış temel biyolojik hedeflerden biridir. Çeşitli yollardan bu hormonun tümör hücresinde gerçekleştirdiği fonksiyonların önüne geçmek, klinikte yardımına başvurulmuş bir tedavi stratejisi olmuştur [20]. Hormon terapisi adı altında uygulanan bu tedavide; seçici östrojen reseptörü modülatörü (SERM) olarak reseptör blokajı oluşturan Tamoksifen, seçici östrojen reseptör degradörü (SERD)

Fulvestrant ve östrojen biyosentezini durduran aromataz inhibitörleri; Letrozol, Anastrozol bileşikleri tek başına veya birlikte sıklıkla tercih edilmektedir [21-23]. Bu tedavi yaklaşımı ile HR-pozitif meme kanseri vakalarının yaklaşık % 85'i gibi büyük bir yüzdesinde, teşhisten sonra beş yıldan uzun süreli sağ kalım rapor edilmiştir [15].

HER-2 proteini, HER-2-pozitif meme kanserinde aşırı eksprese edilen biyobelirteç reseptörlerden biri olarak hedeflendirilmiş tedavide yerini almıştır. HER-2 sinyal yolağı üzerinde çeşitli mekanizmalar (reseptör dimerizasyon inhibisyonu, reseptör degradasyonu, PI3K-AKT sinyal yolu inhibisyonu, antikora bağlı hücrel sitotoksikite vb.) ile etki gösteren Trastuzumab ve Pertuzumab gibi monoklonal antikorlar, HER-1/HER-2 dual tirozin kinaz inhibitörü Lapatinib ve HER-1/HER-2/HER-4 üzerinde geri dönüşümsüz inhibisyon meydana getiren Neratinib, klinikte başarılı sonuçlar elde edilen terapötik ilaçlardır [24].

Fakat bahsi geçen ilaç grupları TNBC gibi bu hedefleri eksprese etmeyen meme kanseri türleri üzerinde etkisiz kalmakla beraber, zaman içinde hastalarda gelişen direnç sorunuyla da karşı karşıya gelmiştir. Bu sebeple araştırmacılar alternatif biyolojik hedeflere yönelmiş ve yeni terapötik ajanlara ihtiyaç duymuştur.

Siklin bağımlı kinazlar (CDK); hücre döngüsü regülasyonunun önemli öncül moleküllerindendir. HER-2 ve/veya diğer büyüme faktörü aracılı hücre proliferasyonu siklin bağımlı kinazların aktivasyonu ile gerçekleşir. CDK'larda meydana gelen mutasyonlar sonucu gerçekleşen kontrolsüz hücre artışı, meme dahil olmak üzere çok çeşitli kanser türlerinde gözlemlenen bir durumdur ve CDK'ları potansiyel bir terapötik hedef haline getirmiştir. Özellikle CDK4/6 enzimlerinin aşırı aktivasyonunun meme kanseri tümör patofizyolojisi ile ilişkilendirilmesi; bu kinazlar üzerinde etkili küçük inhibitör moleküllerin geliştirilmesinin yolunu açmıştır ve Abemasiklib, Palbosiklib ve Ribosiklib gibi CDK4/6 inhibitörlerinin postmenapozal HR-pozitif, HER-2-negatif metastatik meme kanseri tedavisinde kullanımı FDA tarafından onay almıştır [25, 26].

PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunun, meme kanserlerinin % 70'inde aşırı aktivasyonu söz konusudur. Ayrıca HR-pozitif meme kanseri vakalarında hormon tedavisine karşı gelişen direncin bu yolak işleyişinde meydana gelen düzensizliklerden kaynaklanabileceği de

düşünülmektedir. Bu sebepler, yolak boyunca görev alan proteinleri tedavi için olası ilaç hedefleri haline getirmektedir. Bu doğrultuda; literatürde farklı mekanizmalarla etki gösteren birçok küçük ilaç molekülü geliştirilmiş ve çeşitli klinik çalışmalar gerçekleştirmiştir [20, 27]. Günümüzde mTOR inhibitörü olarak etki gösteren Everolimus ve PI3Kα enzim inhibitörü Alpelisib FDA onaylı bileşikler olarak meme kanseri tedavisinde yerini almıştır [28, 29].

Meme kanseri duyarlılık genlerinde (BRCA1 ve BRCA2) meydana gelen mutasyonlar, meme kanseri ile ilişkilendirilen ve hedefe yönelik klinik etkinlik gösteren tedaviye sahip tek DNA değişikliğidir [16]. BRCA'lar, farklı sinyal yollarında lokalize olan ve birçok proteinle etkileşime girerek DNA hasar onarımında rol oynayan tümör baskılayıcı genler olarak bilinirler. BRCA genlerinde meydana gelen mutasyonlar meme kanseri geliştirme riskini arttırır (BRCA1 mutasyonu olan kadınların % 55-65'inin, BRCA2 mutasyonu olan kadınların ise yaklaşık % 45'inin yetmiş yaşına kadar meme kanserine yakalanacağı tahmin edilmektedir) [30].

BRCA mutasyonlarına sahip meme kanserlerinin tedavisinde poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) protein ailesinin önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. PARP'lar, tıpkı BRCA1/2 genleri gibi DNA hasarı onarımı dahil birçok hücresel süreçte önemli görevler alan bir grup enzimdir. PARP inhibitörleri kullanılarak; BRCA1 ve BRCA2 mutasyonu taşıyan tümörlerde DNA tamir mekanizmasının blokajı sonucu hücre ölümünün indüklenmesi klinik öncesi çalışmalarda gösterilmiştir [27].

Bu grubun iki üyesi; Olaparib ve Talozaparib metastatik meme kanseri tedavisinde FDA'dan onay almakla birlikte, Veliparib ve Niraparib gibi diğer üyelerin de içinde bulunduğu PARP inhibitörlerinin tek başlarına veya diğer sitotoksik ajanlarla beraber kullanılarak, meme kanseri üzerindeki etkinliklerinin değerlendirildiği çok sayıda klinik çalışma gerçekleştirilmektedir [31-33].

2.2. İnsan TACC Proteinlerinin Fizyolojik Önemi ve Hedeflendirilmiş Kanser Tedavisindeki Yeri

Mitoz bölünme; farklı evrelerden oluşan ve genetik bilginin, meydana gelen yeni hücrelere aynı şekilde aktarılmasında önem arz eden, hücre döngüsünün en kısa fazıdır. Karmaşık bir proses olan mitoz bölünmenin düzgün işleyişi, birçok protein ve/veya protein kompleksi gibi biyomoleküller tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Bu biyomoleküller arasında *mikrotübül organizasyon merkezi* olarak adlandırılan sentrozomların fonksiyonları oldukça kritiktir. Sentrozomlar mikrotübül dinamiklerinin düzenlenmesinde bazı hücre içi proteinlerle birlikte eşgüdümlü olarak çalışır. Bu proteinlerin başında TACC protein ailesi gelmektedir [34, 35].

TACC protein ailesi üyeleri, taşıdıkları yaklaşık 200 amino asitten oluşan ve oldukça iyi korunmuş bir C-terminal TACC bölgesi ile karakterizedir [34]. Taşıdıkları TACC bölgesi aracılığı ile farklı adaptör proteinlerle etkileşim içinde bulunarak; hücre büyümesi ve farklılaşması, transkripsiyonel mekanizmanın düzenlenmesi, sentrozom bütünlüğünün korunması gibi önemli biyolojik fonksiyonların gerçekleşmesinde rol alır. Özellikle hücre bölünmesi esnasında bu proteinlerin mikrotübüllere bağlanması için TACC bölgesinin gerekli olduğu kanısı yaygındır. Farklı organizmalarda da tespit edilen TACC proteinlerinin, insanlarda TACC1, TACC2 ve TACC3 olmak üzere 3 farklı izoformu bulunmaktadır [35, 36].

Daha çok beyin, böbrek, timüs ve over dokularında embriyonik gelişme süresince baskın olarak eksprese edilen TACC1 proteininin; Aurora A, B ve C kinaz enzimleri ile etkileşim içine girerek mitoz bölünme işleyişinin düzgün gerçekleşmesinde görev aldığı düşünülmektedir. İnsan kanser hücre hatlarında artmış TACC1 aktivasyonun tümör oluşumu ile ilişkilendirilebilir olması, bu proteinin taşıdığı onkojenik potansiyele dikkat çekmektedir [36].

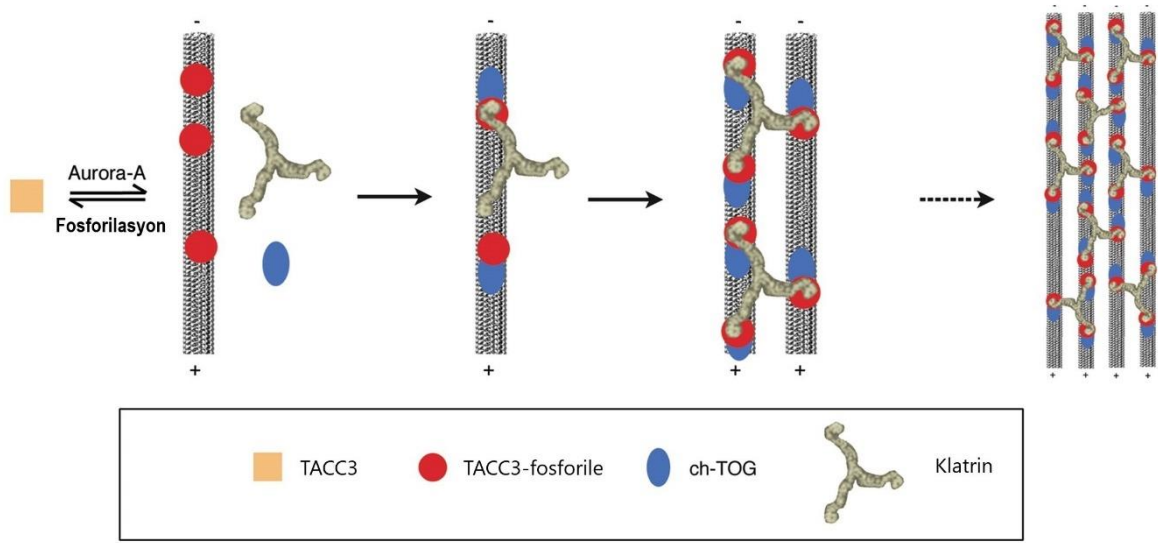
TACC2 proteini; yüksek oranda beyin, akciğer, over, böbrek, meme dokularında eksprese edilir ve tüm hücre döngüsü boyunca sentrozomlarda lokalize bir şekilde döngünün G₂/M evresinde önemli rol oynar. Ayrıca TACC2'nin transkripsiyon işlevinin düzenlenmesinde de görev aldığına dair kanıtlar vardır. Çeşitli insan kanser vakalarında TACC2 geninin

ekspresyon durumu değişkenlik gösterdiği için tümör oluşumu ile ilgili net bir ilişkilendirme yapılamamaktadır [36].

TACC3 proteininin ise; testis, akciğer, dalak, kemik iliği, periferel lökosit dokularında ekspresyonu yaygındır ve diğer TACC proteinleri gibi mitoz bölünmenin mikrotübül organizasyonu ve düzgün kromozom ayrışması aşamalarında aktif görev aldığı düşünölmektedir [37]. Günümüzde TACC3 proteininin bu görevi nasıl bir regölatör fonksiyon ile gerçekleştirdiği kesin bir şekilde bilinmemesine rağmen, yapılan çalışmalar bazı mekanizmalar üzerine odaklanmıştır.

Bu mekanizmalardan ilki; TACC3 proteinlerinin sentrozomlar aracılığı ile mikrotübül nükleasyonunun gerçekleşmesine yardımcı olduğu yönündedir. Fakat bu mekanizma sentrozomda lokalize olan bir proteinin, mitotik ipliklerin organizasyonu ve kromozom hizalaması üzerinde nasıl bu kadar güçlü bir etkiye sahip olduğuna tam olarak açıklık getirememiştir [35].

Diğer bir mekanizma ise; ilk mekanizmaya ek olarak TACC3 proteininin, hüre içi adaptör biyomoleküller olan ch-TOG (kolonik ve hepatik tümör overeksprese gen) ve klatrin ile oluşturduğu protein kompleksi vasıtasıyla mikrotübüller arası köprü oluşturduğu ve bu sayede de mitotik iplikleri düzenlediği doğrultusundadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. TACC3/ch-TOG/klatrin kompleksi ile mikrotübüller arası çapraz-bağlı köprü oluşum süreci ([34]'ten uyarlanmıştır)

Bu kompleksin oluşmasında; Aurora A kinaz aracılı TACC3 proteininin Ser558 aminoasidinin fosforilasyonu mekanizmayı başlatıcı basamaktır ve mitotik hücrelerin sentrozomlarında TACC3'ün aktif hale gelerek lokalize olmasını sağlar. Ardından aktive olan TACC3, ch-TOG ve klatrin ağır zinciri ile direkt etkileşime girerek mitotik iplik ağı üzerinde yoğunlaşır. Meydana gelen protein kompleksi bitişik paralel mikrotübüller arasında çapraz-bağlı köprüler oluşturarak kinetokor iplikleri stabilize eder [37, 38].

Genel olarak insanlarda TACC proteinlerinin olağan dışı ekspresyon durumu bazı malignitelerle ilişkilendirilmiştir [39]. Bu malignitelerin başında kanser gelmektedir. Farklı kanser türleri için; TACC1, TACC2 ve TACC3 proteininin anormal ekspresyonunun söz konusu olduğu durumlar mevcuttur [40-43]. Özellikle TACC3'te beklenmedik ekspresyon değişikliklerinin diğer iki proteine kıyasla daha yaygın gözlemlenmesi, onu kanser tedavisinde daha ilgi çekici bir hedef haline getirmektedir [35].

TACC3 geni, farklı kanserlerde artan ve azalan yönde regüle olabilmektedir. Bu yüzden tam olarak tümör baskılayıcı gen veya onkojen olarak sınıflandırılmamaktadır. Fakat prostat [44] karaciğer [45], kolorektal [46], renal [47], akciğer [48], gastrik [49] ve meme [50, 51] gibi son derece geniş yelpazedeki kanser dokularında artmış durumda olan TACC3 seviyesi,

bu proteinin teşhis ve prognoz için potansiyel bir moleküler belirteç olabileceğini düşündürmektedir [35].

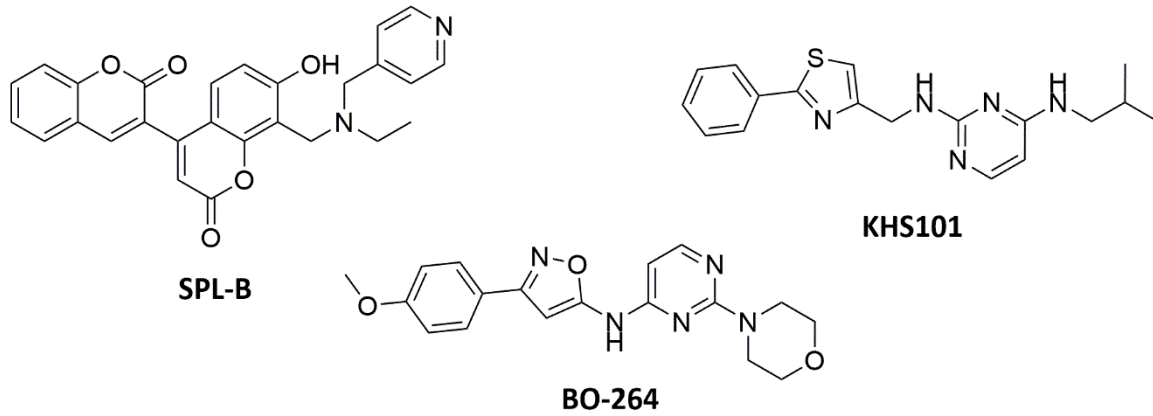
TACC3 inhibisyonunun farklı mekanizmalar üzerinden antikanser etki gösterdiği düşünülmektedir. Bu mekanizmalardan biri; mutasyona uğramış veya ekspresyonu artmış epitelyal büyüme faktör reseptörü (EGFR) ile ilişkili kanser vakalarında EGFR'nin bağlanma partneri TACC3 proteininin deplesyonu ile gerçekleşen epitelyal-mezenşimal geçiş (EMT) blokasyonudur [52].

Füzyon genleri, genellikle kanser durumlarında rastlanan kromozomal anormalliklerdir ve FGFR3-TACC3 füzyon proteini de bunlardan biridir. FGFR3-TACC3 füzyon proteinin yapısında TACC bölgesi büyük ölçüde korunmuştur ve bu bölgenin varlığı FGFR3 aktivasyon seviyelerinin değişmesine yol açmaktadır. Yapılan çalışmalar, FGFR3-TACC3'ün kanser olgusunda bir teşhis belirteci ve terapötik hedef olarak yararlı olabileceği yönündedir [35, 53, 54].

Artmış TACC3 aktivasyonu-kanser ilişkisi birçok çalışma tarafından desteklenmiş olmasına rağmen, literatürde TACC3 inhibisyonu gerçekleştiren küçük molekül sayısı yok denecek kadar azdır ve henüz herhangi bir inhibitör bileşiğin klinik çalışması söz konusu değildir.

Literatürdeki bu moleküllerden ilki; Yao ve arkadaşları tarafından geliştirilen bir dizi dikumarin yapısında molekül arasından, TACC3 fonksiyonları üzerinde etki göstererek over kanser hücre hatlarında (OVCAR-3, SKOV-3) doza bağımlı mitoz inhibisyonu gerçekleştiren ve *in vivo* olarak da antitümör aktivitesi ispatlanan SPL-B bileşiğidir [55] (Şekil 2.3).

Diğer bir molekül ise Wurdak ve arkadaşları tarafından keşfedilen, aminotiyazol ve pirimidin motiflerini taşıyan KHS101 bileşiğidir [56] (Şekil 2.3). KHS101'in, TACC3 ile etkileşerek nöronal farklılaşmayı arttırdığı, ayrıca hücre döngüsü ilerleyişini ve proliferasyonunu inhibe ettiği düşünülmektedir. Son yapılan çalışmalar; KHS101 bileşiğinin çeşitli karsinomlar (karaciğer, serviks, meme) üzerinde antikanser etki potansiyeline sahip olduğunu kanıtlar niteliktedir [7].



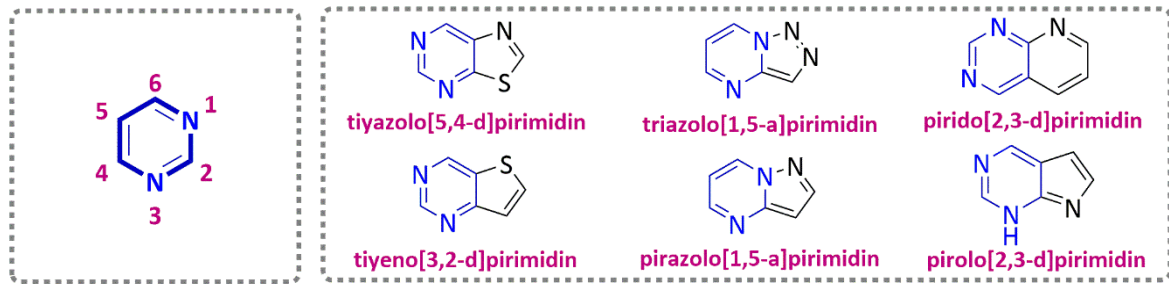
Şekil 2.3. TACC3 inhibitörü bileşikler; SPL-B, KHS101 ve BO-264

2020 yılına gelindiğinde ise; literatürde bahsi geçen bileşiklerin arasına araştırma grubumuz tarafından tasarlanıp sentezlenen, yeni potent TACC3 inhibitörü BO-264 bileşiği katılmıştır (Şekil 2.3). Akbulut ve diğerleri tarafından gerçekleştirilen ileri biyolojik çalışmalar doğrultusunda TACC3 ile olan etkileşimi kanıtlanan BO-264'ün, JIMT-1 hücre hattı üzerinde nanomolar seviyede göstermiş olduğu potent sitotoksik etkinliği oldukça dikkat çekicidir (IC_{50} = 188-258 nM). Ayrıca bileşik; MDA-MB-231, MDA-MB-436, CAL51 ve HCC1954 gibi farklı meme kanseri hücre panellerinde de IC_{50} = 0,12-0,36 μ M değer aralığında biyolojik aktivite sergilemiştir. NCI-60 insan kanser hücre hattı paneli ile gerçekleştirilen çalışmalarda ise; BO-264 molekülünün dokuz farklı kanser tipine ait altmış farklı hücre hattının % 90'ından fazlasına karşı 1 μ M'dan daha düşük GI_{50} değerlerinde gösterdiği antiproliferatif etkinlik umut vericidir. Alınan bu başarılı sonuçlar; BO-264 bileşiğini, diğer TACC3 inhibitörlerine kıyasla antikanser ilaç adayı geliştirme çabalarında daha üstün kılmaktadır [10].

2.3. İlaç Geliştirme Sürecinde Pirimidin Halkasının Terapötik Önemi

Heterosiklik halkalar, biyoaktif bileşiklerin büyük çoğunda rastlanan, yapısal çeşitlilik sunan ve terapötik potansiyelleri olan ayrıcalıklı yapılardır. Bu sebeplerle modern ilaç tasarımı vazgeçilmez bir unsur olup terapötik ilaçların yapılarında sıklıkla yer alırlar. Beş veya altı üyeli, azot atomu taşıyan ve/veya bu azot atomlarına değişik konumlarda kükürt, oksijen bulunduran türevler en çok tercih edilen heterosiklik halkalardır [57].

Pirimidin (1,3-diazin), birinci ve üçüncü konumlarında iki azot atomu içeren doymamış altı üyeli heteroaromatik organik bileşiklerin genel adıdır. Pirimidinler ve bunların kaynaştırılmış analogları, doymamış heterosiklik yapıların büyük bir grubunu oluşturur (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Pirimidin halkası ve bazı kaynaşmış pirimidin analogları

Pirimidin motifi çok sayıda doğal bileşikte göze çarpmakla beraber, özellikle DNA ve RNA yapı birimleri olan bazlarının yapısında yer alması açısından büyük önem taşımaktadır. Geniş bir yelpazede biyolojik etki potansiyeline sahip ilaç moleküllerinin de yapısında bulunan pirimidinler, ilaç keşif sürecinde gösterdikleri farmakolojik etki potansiyeli açısından değerli bir halka sistemidir ve göstermiş olduğu terapötik etkiler arasında; antikanser, antiviral, antimikrobiyal, antienflamatuar, analjezik, antioksidan ve antimalaryal aktivite sayılabilir [57-59].

Bu terapötik etkiler arasında antikanser etkiyi ayrı bir yere koymak gerekir. Pirimidin çekirdeği taşıyan birçok molekül (5-Fluorourasil, Dasatinib, İmatinib vb.), klinikte farklı mekanizmalar yoluyla etki gösteren, güçlü antikanser ajanlar olarak kullanılmaktadır [60]. Ayrıca son zamanlarda yapılan çok sayıda çalışma pirimidin ve kaynaşmış pirimidin yapısı

taşıyan yeni küçük aktif moleküllerin antikanser potansiyellerini vurgulamaktadır. Farklı protein kinaz (JAK, VEGFR, FAK, RAF, CDK, PI3K vb.), ısı şoku proteini (HSP90), HDAC (Histon deasetilaz), ATX (Autotaxin) inhibisyonu, pirimidin farmakoforu taşıyan antikanser etkili ilaç adayı bileşiklerin göstermiş olduğu biyolojik mekanizmalar arasında sayılabilir [61].

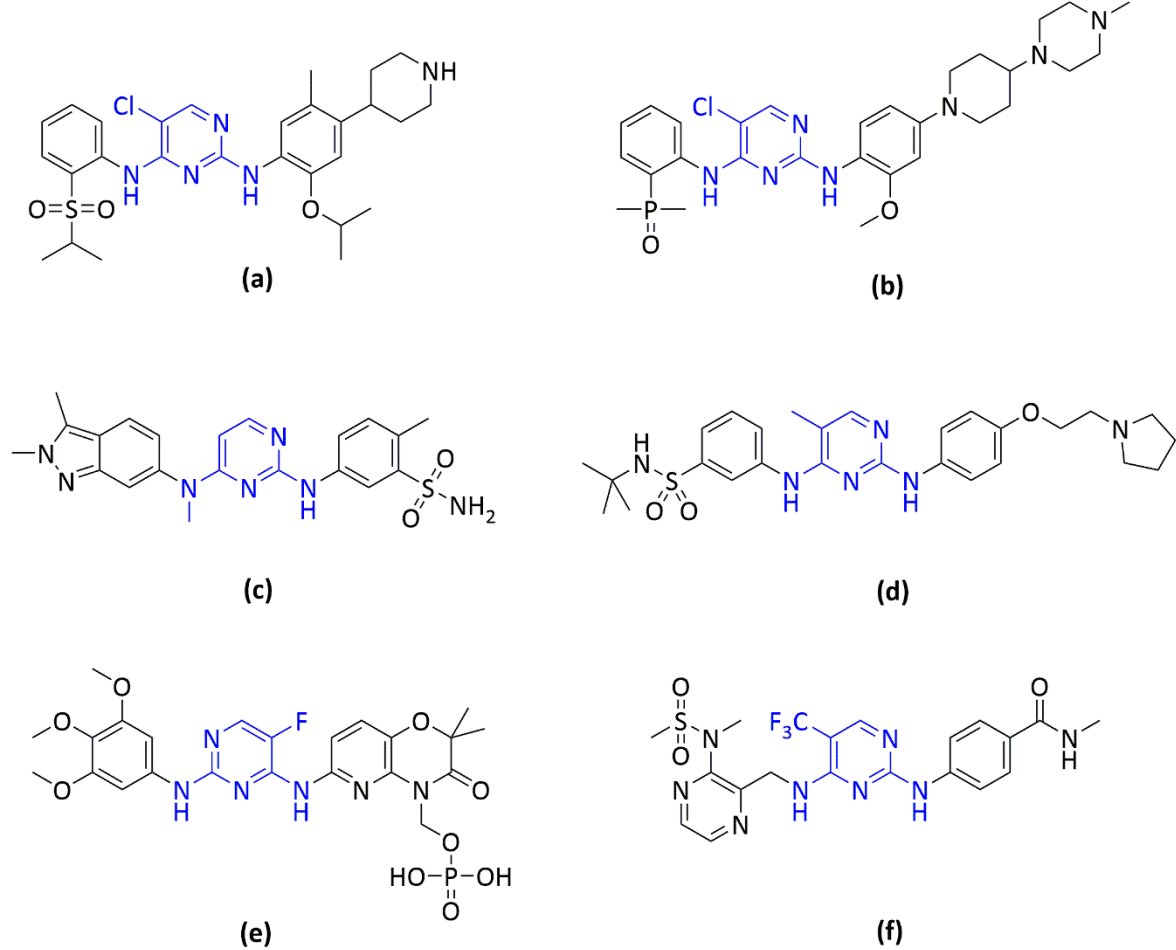
2.4. Antikanser İlaç Geliştirme Sürecinde 2,4-Diaminopirimidin İskeletinin Önemi

Geleneksel antikanser kemoterapötiklerin aksine, hastalığa özgü spesifik moleküler değişiklikler üzerine hedeflendirilmiş küçük ilaç moleküllerinin kullanımı giderek önem kazanan bir kanser tedavi stratejisidir [62]. Bu alanda yıllardır üzerinde çalışılan kinaz inhibitörleri, hedeflendirilmiş tedavi yaklaşımının gözde ilaç grupları arasında yer almaktadır. Günümüze kadar birçok kinaz hedefi keşfedilip klinik çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır [63]. Son yıllarda ise oldukça fazla yeni kinaz inhibitörünün antiproliferatif etkisi rapor edilmiştir. Kinaz inhibitörlerinde en çok göze çarpan yapı pirimidin iskeleti olup, klinik olarak kullanımı FDA tarafından onaylanmış birçok molekülün bu motifi taşımakta olduğu görülmektedir [64]. Yapısal olarak çeşitli pirimidin türevleri arasında; 2,4-diaminopirimidinler, kanser üzerindeki önemli kemoterapötik etkileri nedeniyle önemli ölçüde dikkat çekmektedir.

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) tedavisinde kullanılan anaplastik lenfoma kinaz (ALK) inhibitörleri olan; Seritinib (a) ve Brigatinib (b), anjiyogenez inhibisyonu aracılığı ile tümör büyümesini yavaşlatarak ileri derece böbrek kanseri ve bazı yumuşak doku sarkomalarının tedavisinde kullanılan çoklu kinaz inhibitörü Pazopanib (c), miyelofibrozisin klinik tedavisinde etkili janus kinaz (JAK) inhibitörü Fedratinib (d) ve dalak tirozin kinaz (SYK) inhibitörü olarak kronik immün trombosit yetmezliğinde endike Fostamatinib (e) FDA tarafından onaylanan ve 2,4-diaminopirimidin iskeletinin ön planda olduğu kemoterapötiklere örnek olarak verilebilmektedir [65] (Şekil 2.5). Ayrıca 2,4-diaminopirimidin çekirdeğine sahip bir başka molekül olan ve FDA'nın yumurtalık kanserinde *orphan drug* kategorisinde yer alan fokal adezyon kinaz (FAK) inhibitörü Defaktinib (f)'in, farklı antikanser ilaçlar ile kombinasyonlarının çeşitli kanser türleri üzerinde klinik çalışmaları yürütülmektedir [66] (Şekil 2.5).

Bahsi geçen moleküller gibi birçok kinaz inhibitörünün aminopirimidin çekirdeğini içermesi, araştırmacıları bu yapının kinaz enzimleri ile etkileşimde önemli bir görevi olduğu düşüncesine sevk etmiştir. Nitekim yapılan mekanistik çalışmalarla, pirimidin ve kaynaşmış pirimidin yapısı taşıyan; pürinler, pirolopirimidinler, pirazolopirimidinler, piridopirimidinler, kinazolinler gibi heterosiklik halkaların; kinaz enzimlerinin destek bağlanma bölgesinde

enzimin aktifleşmesinden sorumlu ATP (Adenozin trifosfat) molekülünün yapısında bulunan adenin bazının yapmış olduğu etkileşimi taklit ettiği sonucuna ulaşılmıştır [67].

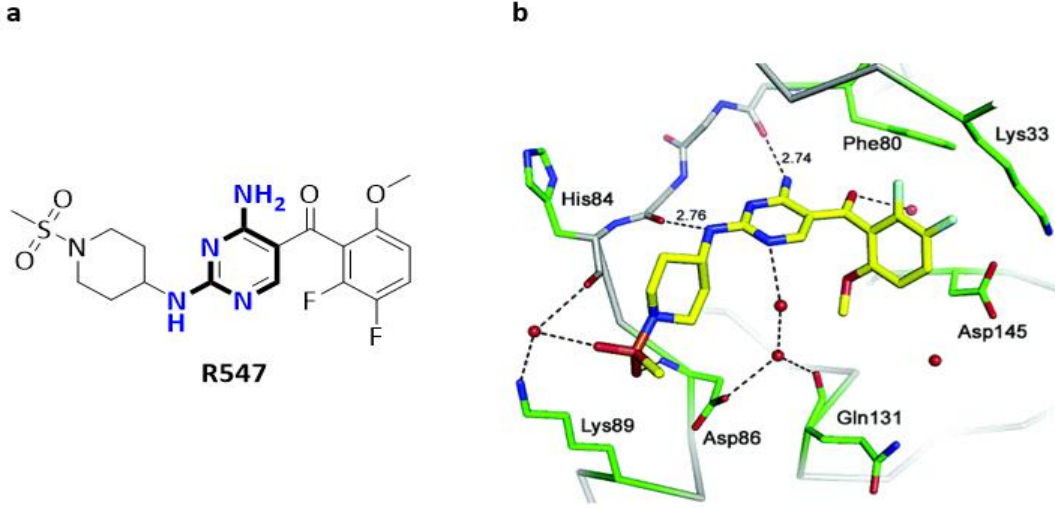


Şekil 2.5. 2,4-Diaminopirimidin yapısı taşıyan bazı kinaz inhibitörü bileşikler

Pirimidin çekirdeğinin enzim aktif bölgeleri ile yapmış olduğu etkileşimleri açıklayan araştırmalara Roche firması tarafından yürütülen ve literatüre R547 bileşiğini kazandıran çalışma örnek olarak verilebilir. Chu ve arkadaşları tarafından 2006 yılında gerçekleştirilen bu çalışmada; diaminopirimidin yapısı taşıyan bir seri bileşiğin CDK'lar üzerinden antitümör aktiviteleri araştırılmıştır [68].

Çeşitli medisinale kimya yaklaşımlarıyla sentezlenen bileşik setlerinin, insan kolon kanser hücre hattı (HCT-116) üzerinde sitotoksik aktivitesine ve farklı CDK alt aileleri (CDK1, CDK2, CDK4) üzerindeki afinitesine bakılmıştır. Sentezlenen bileşikler arasında en etkili olan ve

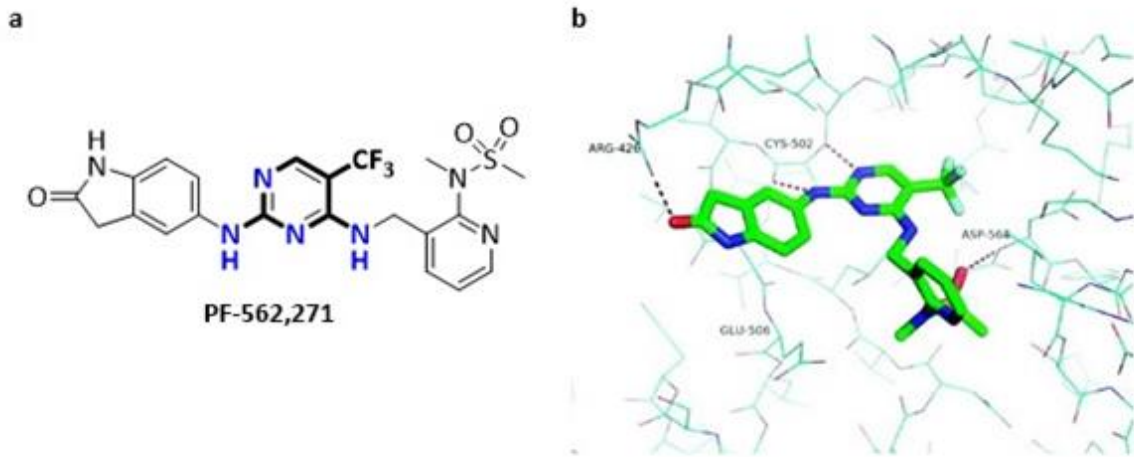
2,4-diaminopirimidin yapısı taşıyan R547'nin CDK2 ile yapmış olduğu etkileşimler incelenmiştir (R547 bileşiği, IC_{50} = 0,08 μ M ve CDK2 inhibisyon değeri, K_i = 0,003 μ M).



Şekil 2.6. (a) CDK2 inhibitörü bileşik R547 (b) R547'nin aktif bölge ile etkileşimi ([65]'ten uyarlanmıştır)

Alınan sonuçlara göre; bileşiğin diaminopirimidin çekirdeğinin enzim aktif destek bölgesinde bulunan Phe80, Glu81, Phe82, Leu83 amino asit kalıntılarıyla oluşturduğu hidrojen bağlarının, anahtar etkileşim olduğu düşünülmüştür. Ayrıca pirimidin halkasının 3 numaralı konumunda bulunan azot atomunun, kristal su molekülleri aracılığı ile Gln131 ve Asp86 amino asitleri ile oluşturduğu köprünün etkileşimi güçlendirdiği kanısına varılmıştır (Şekil 2.6).

2008 yılında ise benzer bir çalışma Pfizer tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmada FAK inhibisyonu aracılı kanser tedavisinde, tek başına ya da diğer sitotoksik ajanlarla beraber kullanılabilmeye aday PF-562,271 bileşiği geliştirilmiş ve bu bileşiğin enzim ile olan etkileşimi X-ışını kristalografisi aracılığıyla gösterilmiştir [69].

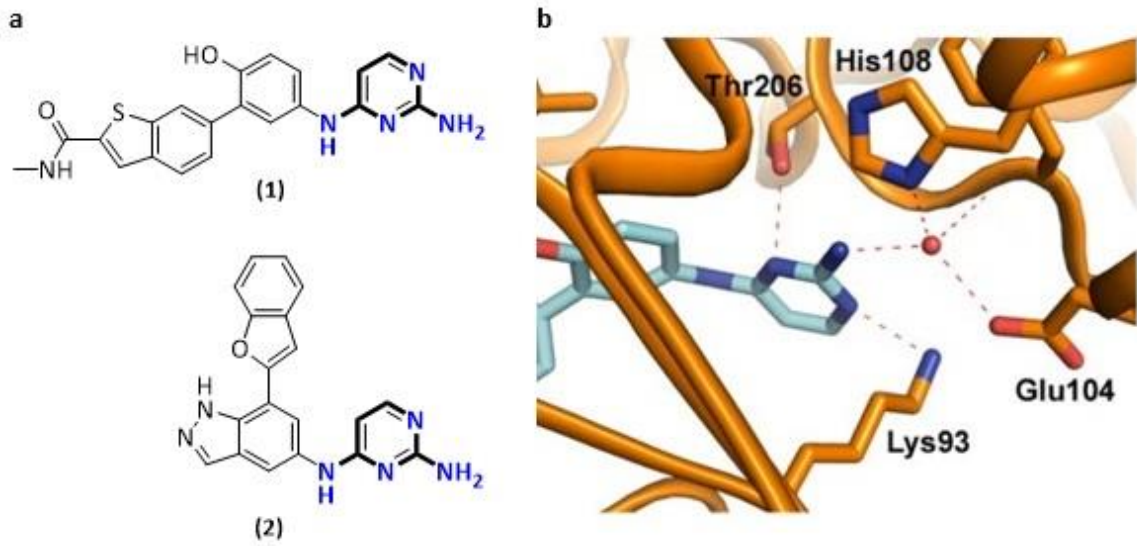


Şekil 2.7. (a) PF-562,271 bileşiğinin yapısı (b) PF-562,271'in aktif bölge ile etkileşimi ([66]'dan uyarlanmıştır)

Beklendiği gibi; PF-562,271 üzerinde taşıdığı 2,4-diaminopirimidin yapısıyla, enzim destek bölgesinde ATP molekülünün yapmış olduğu etkileşimi taklit etmiştir. Özellikle pirimidin halkasının ikinci konumundaki sekonder amin yapısı ve bir numaralı azot atomunun Cys502 amino asidiyle kurmuş olduğu hidrojen bağlarının, bileşiğin enzimle yapmış olduğu tüm hidrojen bağlarının önemli bölümünü oluşturduğu gözlemlenmiştir (Şekil 2.7).

Serin/treonin protein kinaz ailesi üyesi; mitojenle aktive edilen protein kinazla aktive edilen protein kinaz 2 (MK2); hücre apoptozu, bölünmesi ve enflamasyon yanıtının oluşması gibi biyolojik mekanizmada görev alan, bu nedenle de kanser ve enflamasyon tedavisinde kullanılabilecek terapötik bir hedef olması açısından önemli bir proteindir [70]. 2010 yılına gelindiğinde Agiriadi ve çalışma ekibinin gerçekleştirdiği çalışma, 2,4-diaminopirimidin halkasının MK2 enzimi ile gerçekleştirdiği yeni bir etkileşim şekli keşfi ile sonuçlanmıştır.

MK2 inhibisyon potansiyeli sergileyen bir dizi bileşik arasından belirledikleri iki bileşik üzerinde moleküler modelleme çalışmaları yürüten araştırmacılar, Bileşik 1'in MK2 enzimi ile oluşturulan kristal kompleksini incelemiştir. Sonuç olarak; pirimidin halkasının her iki azot atomunun da hinge bölgesinden farklı olarak ile Lys93 (katalitik lizin) ve Thr206 (DFG motifinden önce gelen) ile hidrojen bağlarından bir ağ oluşturduğunu ve bu azot atomlarının biyolojik etki için çok önemli olduğunu göstermiştir [71] (Şekil 2.8).

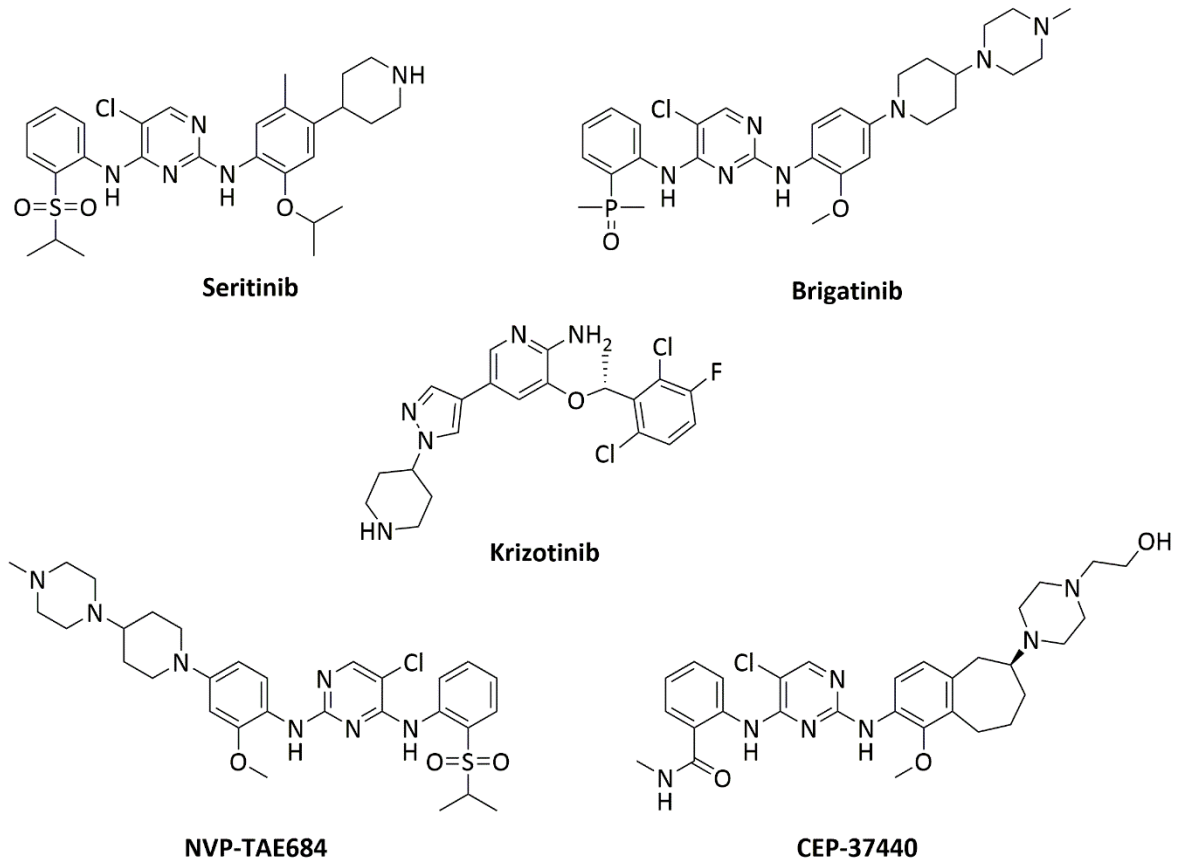


Şekil 2.8. (a) MK-2 inhibitörü Bileşik 1 ve Bileşik 2 (b) Bileşik 1'in hidrofilik cep etkileşimi ([68]'den uyarlanmıştır)

Araştırmacılar ek olarak, pirimidin halkasının ikinci konumundaki amin yapısının enzimin hidrofilik cebinde bir tetrahedral su köprüsü aracılığı ile; Glu104, His108 , Asp207 amino asitleri (DFG motifinde yer alan) ile güçlü bir etkileşim içinde olduğunu gözlemlemişlerdir (Şekil 2.8). Peşi sıra yayınladıkları çalışmalarında ise bu bileşiklerin yapı temelli optimizasyon araştırmalarını gerçekleştirmişlerdir [72].

2,4-diaminopirimidin yapısı taşıyan bileşikler üzerinde ilerleyen yıllar içinde farklı kanser türleri için çok sayıda biyolojik hedefe yönelik yapı-etki ilişki araştırmaları gerçekleştirilmiştir. Bu biyolojik hedefler arasında özellikle anaplastik lenfoma kinaz (ALK) ailesi dikkat çekmektedir. Literatürde karşılaşılan 2,4-diaminopirimidin motifine sahip moleküllerin büyük bir kısmı, bu kinaz ailesi üzerinde inhibitör etki sergilemektedir. Anaplastik lenfoma kinazlar; insülin reseptörü süper ailesine ait bir reseptör tirozin kinazdır. Anaplastik lenfoma kinaz gen aktivasyonu, anaplastik büyük hücreli lenfoma (ALCL), akciğer kanseri ve nöroblastom gibi birçok kanser türünün patofizyolojik sürecinde gözlemlenen bir durumdur [73]. Bu durum seçici ALK inhibisyonunu, kanser tedavisinde gözde bir hedef haline getirmiştir. Belirtilen yaklaşım doğrultusunda Novartis firmasının geliştirdiği NVP-TAE684 nanomolar seviyede ALK inhibisyonu gösteren öncül bileşiklerden biridir [74] (Şekil 2.9). Fakat bu bileşik, oksidatif metabolizasyonu sonucu oluşturduğu toksik etkilerden ötürü klinik çalışmalara girememiştir [75].

Sonraki yıllarda Pfizer tarafından geliştirilen c-Met/ALK spesifik inhibitörü Krizotinib, ALK pozitif akciğer kanseri hastalarının tedavisi için onaylanan bir bileşik olmuştur (Şekil 2.9). Krizotinib'in başlangıçta gösterdiği klinik başarısına rağmen, hastalarda bu ajana karşı sonradan kazanılan direnç durumu ile yeni ALK inhibitörü bileşiklerin keşfine ihtiyaç duyulmuştur [76]. Bu durum ardından geliştirilen Seritinib ve Brigatinib; FDA tarafından onaylanmış ve Krizotinib direnci oluşan ALK pozitif kanser vakalarında etkili inhibitör bileşikler olarak tedavide yerini almıştır. Ayrıca Teva Pharmaceutical tarafından Faz 1 klinik çalışmaları tamamlanan CEP-37440 bileşiği de bu alanda etkili başka bir inhibitör moleküldür (CEP-37440 bileşiği için, ALK (enzimatik), IC_{50} = 3,1 nM ve ALK (hücresel) IC_{50} = 22 nM) [77] (Şekil 2.9).



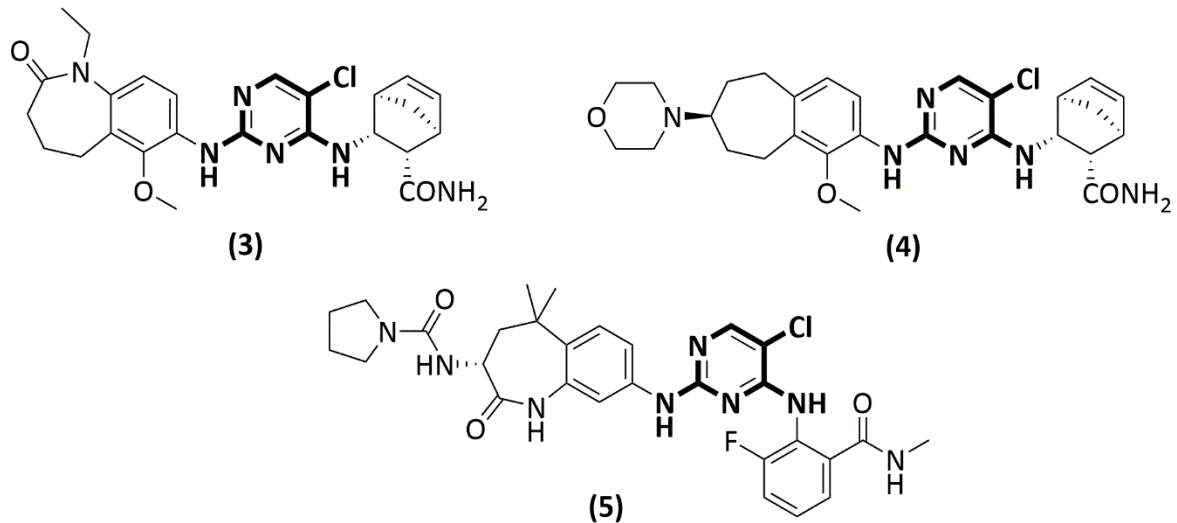
Şekil 2.9. ALK inhibitörü olarak geliştirilen bileşikler

Bahsi geçen bileşiklerden Krizotinib hariç, hepsinin ortak nokta olarak 2,4-diaminopirimidin motifini taşıması dikkat çeken bir durumdur ve araştırmacılar için yeni aday ilaç molekülü keşfinde bir başlangıç noktası oluşturmuştur. Cephalon firması tarafından bu düşünce

doğrultusunda ALK ve c-Met kinaz inhibitörü geliştirmek adına bir dizi çalışma gerçekleştirilmiştir.

2010 yılında Ott ve arkadaşları, literatürde ALK inhibitörü olarak karşılaşılan bileşik yapılarından yola çıkmış, 2,4-diaminopirimidin iskeleti ve benzazepinon halkası taşıyan farklı bileşik setleri tasarlayarak sentezlemiştir [78]. Bu setler içinde oldukça potent bir türev olan Bileşik 3, ALK üzerinde hem enzimatik hem de Karpas-299 (lenfoma) hücre hattında gerçekleştirilen biyolojik deneylerde nanomolar seviyede etkinlik göstermiştir (ALK (enzimatik); IC_{50} = 14 nM ve ALK (hücresel); IC_{50} = 45 nM) (Şekil 2.10). Ayrıca bu etkinlik insülin reseptörleri (IR) üzerinde sergilediği inhibisyondan yaklaşık 40 kat daha seçicidir (Bileşik 3 için, IR (enzimatik) IC_{50} = 597 nM). *In vivo* antitümör aktivite sonuçları ile de umut vaat eden bir bileşik olduğunu kanıtlayan Bileşik 3'ün sonraki senelerde üzerinde gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları, Bileşik 4'ün keşif yolunu açmıştır.

2012 yılında Gingrich ve arkadaşları tarafından tasarlanıp sentezlenen ve Bileşik 3'ten farklı olarak; aminobenzosikloheptan kaynaşmış halka sistemine sübstitüe morfolin yapısı taşıyan Bileşik 4, ALK enzimi üzerindeki oldukça seçici ve potent etkinlik profili ile ön plana çıkmıştır (ALK (enzimatik); IC_{50} = 1,9 nM ve ALK (hücresel); IC_{50} = 20 nM) (Şekil 2.10). Bileşik 3'e kıyasla hücresel ve enzimatik etkinliği artan Bileşik 4'ün, ALK enzimi üzerinde insülin reseptörlerine kıyasla yaklaşık altı yüz kat daha seçici olduğu tespit edilmiş ve yapılan ileri biyolojik çalışmalarla da oral olarak oldukça aktif antitümör bir ajan adayı olduğu ispatlanmıştır [79, 80].



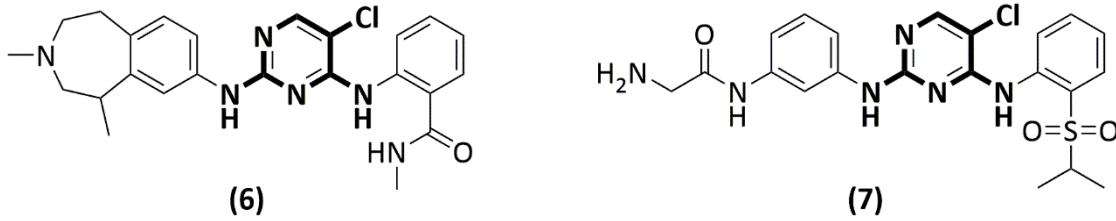
Şekil 2.10. Cephalon tarafından geliştirilen ALK ve c-Met inhibitörü Bileşik 3-5

ALK inhibisyonu gibi c-Met inhibisyonu da güncel kanser tedavisinde kullanılan hedeflendirilmiş bir stratejidir [81, 82]. Cephalon tarafından yürütülen başka bir çalışmada ise; biyolojik aktivitesinde meydana gelen artışı çeşitli kanser olguları ile ilişkilendirilen c-Met sinyal yolağı üzerine odaklanılmıştır. Literatüre yeni c-Met inhibitörü bileşikler kazandırmak ve bu bileşiklerin oral biyoyararlanımlarını arttıracak değişiklikler yapmak amacıyla yola çıkan Milkiewicz ve araştırma grubu, amidobenzazepinon ve 2,4-diaminopirimidin yapılarını bir arada taşıyan bileşik türevleri sentezlemiş, bu türevlerin enzimatik ve hücrel aktivite analizlerini gerçekleştirmiştir [83].

Sentezlenen bileşikleri yapı-etki ilişkisi açısından değerlendiren araştırmacılar, diaminopirimidin halkasının 4. konumuna getirilen florobenzamit grubunun, inhibitör etkinin seçiciliğinde önemli yeri olduğunu tespit etmiş ve bu yapıyı tüm bileşiklerde korumuştur. Benzazepinon halkası üzerinden türevlendirilen moleküller arasından Bileşik 5, potent biyolojik aktivitesi ve tolere edilebilir farmakokinetik özellikleri ile insülin reseptörlerine kıyasla seçici bir c-Met inhibitörü olarak dikkat çekmiştir (c-Met (enzimatik); IC_{50} = 24 nM, ALK (hücrel); IC_{50} = 26 nM, IR (enzimatik); IC_{50} = 1418 nM) (Şekil 2.10).

2014 yılına gelindiğinde ise Liu ve arkadaşları hem ALK hem de c-Met inhibisyonunu bir arada gerçekleştirerek NSCLC tedavisinde kullanılmaya aday yeni 2,4-diarilaminopirimidin türevleri keşfetmek amacı ile çalışmalarını başlatmışlardır [84]. Sentezlenen türevler

arasından N-metilbenzazepin motifi taşıyan Bileşik 6, hücresel bazda nanomolar seviyedeki aktivitesiyle Krizotinib ve NVP-TAE684 gibi etkinliği kanıtlanmış bileşikler ile kıyaslanabilir ölçüde dual c-Met/ALK inhibisyonu oluşturarak, araştırmacıları hedeflenen amaca ulaştırmıştır (c-Met (enzimatik); IC_{50} = 6 nM ve c-Met (hücresel)= 7 nM, ALK (enzimatik); IC_{50} = 9 nM ve ALK (enzimatik); IC_{50} = 14 nM) (Şekil 2.11).



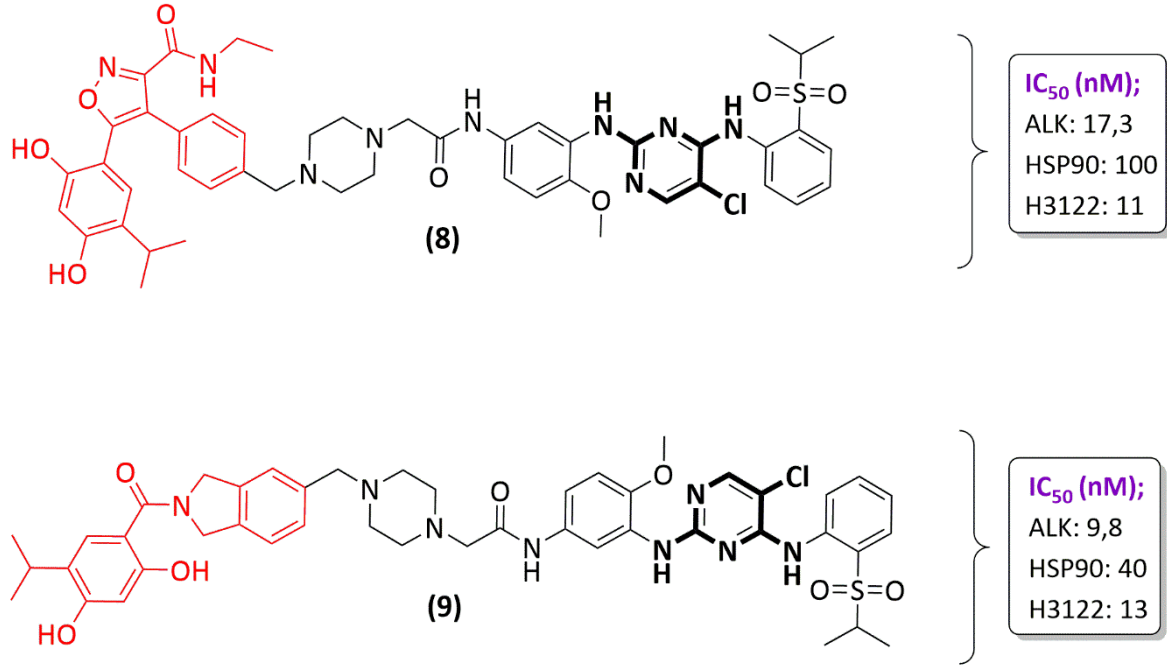
Şekil 2.11. Dual c-Met/ALK inhibitörü Bileşik 6 ve ALK inhibitörü Bileşik 7

Bir sene sonra gerçekleştirilen başka çalışmada ise; aynı araştırma ekibi kaynaşmış benzazepin, benzazepinon gibi halka sistemlerinden uzaklaşıp, amino asit benzeri yan zincir ile sübstitüe edilmiş bileşikler tasarlayarak hem alışılmışın dışına çıkmak hem de nokta mutasyonuna uğramış ALK^{L1196M} enzimine karşı etkili yeni inhibitör bileşikler geliştirmek adına yola çıkmış ve Bileşik 7'ye ulaşmıştır [85] (Şekil 2.11).

Bileşik 7, ALK üzerinde IC_{50} =2,7 nM gibi bir değer ile etkinlik gösterirken, ALK^{L1196M} enziminde Krizotinib'e kıyasla 8 kat daha potent profil sergilemiştir (Bileşik 7 için; IC_{50} (ALK^{L1196M})= 15,3 nM, Krizotinib için; IC_{50} (ALK^{L1196M})= 122 nM). Ayrıca A549 (akciğer) insan kanser hücre hattında mikromolar seviyede antiproliferatif etki (IC_{50} = 1,1 μ M) oluşturarak ve SUP-M2 ksenograft model üzerinde doza bağlı olarak tümör büyümesini % 89'dan fazla inhibe ederek umut vaat eden bir bileşik olduğunu kanıtlamıştır.

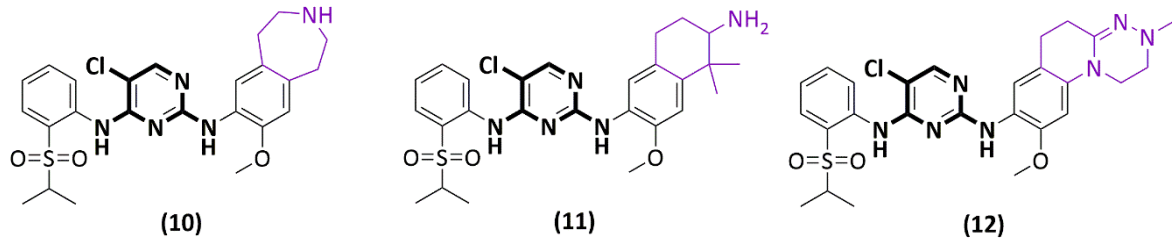
Nitekim Bileşik 7, 2018 yılında yürütülen dual ALK/HSP90 inhibitörü bileşik geliştirme çabalarında, klinik olarak etkinliği kanıtlanan HSP90 inhibitörleri; AUY922 ve AT13387 ile çıkış noktası olmuştur. Bu üç bileşikten esinlenerek oluşturulan fragmanlar, farklı zincir yapıları ile birbirlerine bağlanarak yeni hibrit türevler elde edilmiştir. Geng ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada, özellikle sentezlenen iki bileşik (Bileşik 8 ve Bileşik 9) hem ALK ve HSP90 proteinleri üzerinde gerçekleştirilen deneylerde hem de H3122 (akciğer) kanser

hücre hattında gösterdiği başarılı biyolojik etkinlik profilleri ile amaçlanan hedef doğrultusunda araştırmacıları başarıya ulaştırmıştır [86] (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Dual ALK/HSP90 inhibitörü Bileşik 8 ve 9

Kang ve çalışma ekibi tarafından yapılan bir dizi çalışmada ise farklı ALK inhibitörü bileşik serileri geliştirilmiştir. 2015 yılında yayınlanan ilk seride, Seritinib ve CEP-37440 moleküllerinin yapısal özellikleri göz önünde bulundurularak, 2,4-diaminopirimidin iskeleti ve farklı aminobenzazepin halkaları taşıyacak şekilde tasarlanan bileşikler arasından Bileşik 10; ALK (wt.) ve ALK^{1196M} hedefleri üzerinde enzimatik ve hücre bazlı biyolojik deneylerde başarılı sonuçlar elde etmiştir. Ayrıca mikrozomal stabilite ve seçili bazı farmakokinetik çalışmalara tabi tutulan Bileşik 10'un ilaç adayı olabilecek moleküler özellikleri taşıması, özellikle de 12 saat gibi bir yarılanma ömrüne sahip olması *in vivo* çalışmalar için araştırmacıları cesaretlendirmiştir. Bileşik 10'un H3122 tümör ksenograft modeli *in vivo* fare deneyinde alınan sonuçları, Seritinib ile kıyaslanabilecek derecede antitümör aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir [87].



Şekil 2.13. ALK inhibitörü Bileşik 10, Bileşik 11 ve Bileşik 12

Aynı çalışma grubu tarafından 2016 yılında yapılan diğer bir çalışmada ise, Bileşik 10'un anti-ALK potansiyelini optimize etmek ve yapısal çeşitliliği arttırmak için; aminobenzazepin motifi farklı tetrahidronaftalenil türevleriyle değiştirilerek yeni bileşikler tasarlanmıştır. Sonuçta ALK inhibisyon potansiyeli daha güçlü olan Bileşik 11 elde edilmiştir. Bileşik 10'a uygulanan biyolojik testlere ilave olarak Bileşik 11'in, doksan altı farklı kinazdan oluşan bir test kiti üzerinde seçicilik potansiyeline de bakılmış ve 1 μ M konsantrasyonda bu enzimlerin 26 tanesini güçlü (>% 90 inhibisyon), on dokuz tanesini ise ortalama seviyede (% 70-% 90 inhibisyon) inhibe ederek ALK inhibitörü olmasının yanı sıra çoklu kinaz inhibitörü de olduğu gösterilmiştir. H3122 tümör ksenograft modelinde ise; Bileşik 11'in, Seritinib'den daha güçlü antitümör aktiviteye sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır [88].

Ertesi yıl yayınladıkları bileşik serisinde araştırmacılar, diaminopirimidin yapısı ile kaynaşmış farklı trisiklik halkaları taşıyan türevler sentezlemişler ve umut vaat edici antitümör etkisi ile Bileşik 12'yi bu serinin en aktif bileşiği olarak belirlemişlerdir [89].

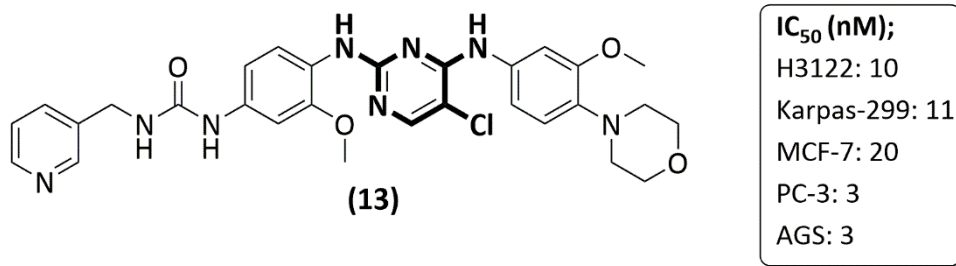
Çizelge 2.1. Bileşik 10, 11 ve 12' ye ait aktivite sonuçları

	ALK (wt.) (IC ₅₀)	ALK ^{1196M} (IC ₅₀)	H3122 (CC ₅₀)
Bileşik 10	1,8 nM	1,6 nM	37 nM
Bileşik 11	0,7 nM	1,5 nM	16 nM
Bileşik 12	1,7 nM	8,1 nM	36 nM
Seritinib	14 nM	29 nM	38 nM

2019 yılına gelindiğinde Chen ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise; 2,4-diaminopirimidin yapısına ek olarak ALK enzimi ile olan etkileşimi güçlendirmek adına

hidrojen bağı donör/akseptörü üre motifi ile hibridize edilmiş yeni bileşikler tasarlamışlar ve yapı-etki ilişkilerini incelemişlerdir [90].

Sentezlenen tüm bileşiklerin hücresel antiproliferatif aktiviteleri H3122 ve Karpas-299 hücre hatlarında gerçekleştirilmiştir. Alınan sonuçlara göre seri içindeki en aktif molekül olan Bileşik 13; Seritinib pozitif kontrolüne karşı kıyaslanabilir derecede inhibitör etki göstermiştir (Bileşik 13 için; H3122(IC₅₀)= 0,010 ± 0,008 µM, Karpas-299(IC₅₀)= 0,011 ± 0,005 µM ve Seritinib için; H3122(IC₅₀)= 0,018 ± 0,007 µM, Karpas-299(IC₅₀)= 0,013 ± 0,003 µM). Ayrıca Bileşik 13'ün; MCF-7 (meme), PC-3 (prostat) ve AGS (mide) gibi çeşitli insan kanser hücre hatlarında da başarılı biyolojik etki göstermesi ile geniş spektrumda bir antiproliferatif ajan olduğu kanıtlanmıştır. Bileşik 13 üzerinde yapılan moleküler modelleme çalışmaları ise, araştırmacıların sentetik stratejilerini haklı çıkaracak yönde gerçekleşmiştir. Bileşiğin taşıdığı üre grubu, enzim aktif bölgesi Lys1150 ve Asp1270 amino asitleri ile fazladan hidrojen bağları oluşturmuştur.



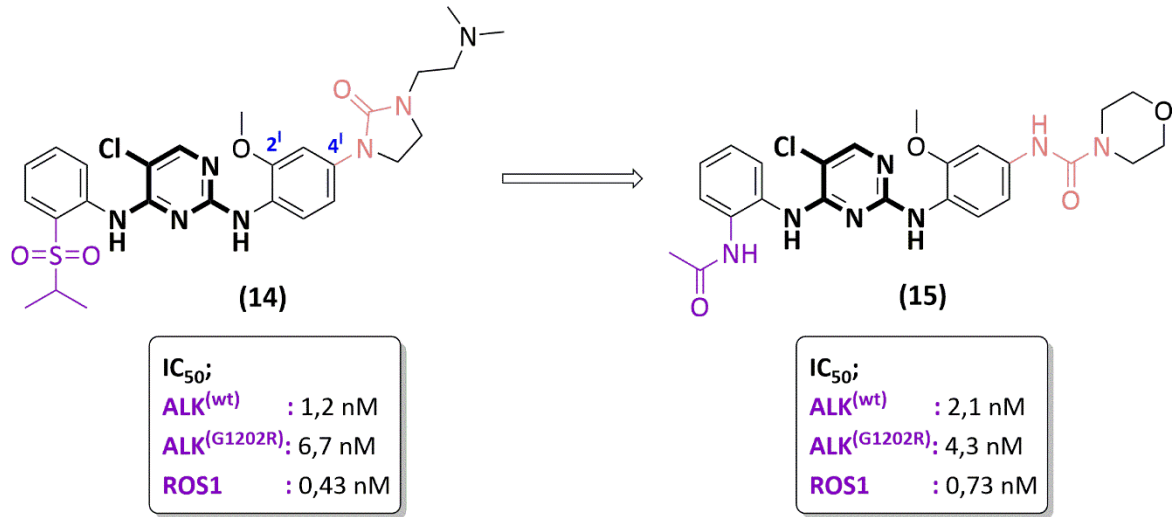
Şekil 2.14. ALK inhibitörü Bileşik 13

Aynı yıl Lei ve araştırma ekibi tarafından gerçekleştirilen, 2,4-diaminopirimidin iskeleti ve üre motifinin bir arada kullanıldığı başka bir dizi çalışmada ise; araştırmacılar ALK enzimi üzerinde gerçekleşen G1202R nokta mutasyonu üzerine odaklanmışlardır. G1202R nokta mutasyonu sonucu ALK enzimi, Seritinib gibi geliştirilen en yeni terapötik ajanlara bile direnç kazanmaktadır. Oluşan direnç sonucunda klinik açıdan tedavi güçleşmekte ve bu sorunun üstesinden gelebilecek yeni inhibitör bileşik adaylarına ihtiyaç duyulmaktadır [91].

Bu doğrultuda yola çıkan Lei ve ekibi öncelikle Seritinib'in ALK^{G1202R} enzimi ile olan etkileşimlerini moleküler modelleme teknikleri yardımıyla incelemiş ve direnç gelişiminde

kritik rol oynayan bazı amino asit etkileşimlerini göz önünde bulundurarak, bileşik tasarımı yapılacak farmakofor grupları belirlemiştir.

Sentezlenecek yeni moleküllerde 5-kloro-2,4-diarilaminopirimidin iskeleti korunurken, 4' konuma alifatik amin/amit sübstitüsyonu taşıyan imidazolidin-2-on yapısı getirilerek Asp1203 amino asidi ile hidrojen bağı etkileşimi yakalanması amaçlanmıştır. Ayrıca Seritinib bileşiğinde bulunan ve ALK^{G1202R} enziminin Arg1202 aminoasidi üzerinde sterik çakışmaya neden olan 2' konumundaki izopropoksi grubu, kıyasla daha küçük metoksi grubu ile değiştirilmiştir. Sonuçta elde edilen Bileşik 14; ALK ve mutant ALK^{G1202R} enzimi üzerinde pozitif kontrol Seritinib'e karşı üstün aktivite göstermiştir. Aynı zamanda çeşitli kanser olgularında ekspresyon artışı ile karakterize bir tirozin kinaz olan ROS1'in üzerinde de inhibitör etki meydana getiren Bileşik 14, bu özelliği ile ALK/ROS1 dual inhibitörü olduğunu ispatlamıştır. Ayrıca Bileşik 14, ALK ve ROS1 pozitif insan kanser hücre hatlarında gerçekleştirilen testlerde IC₅₀= 14-73 nM değer aralığında antiproliferatif etki sergilemiştir [91].



Şekil 2.15. ALK/ROS1 inhibitörü Bileşik 14 ve 15

Aynı araştırma grubunun yaptığı diğer bir çalışmada ise; Bileşik 14'ün ALK^{G1202R} ve ROS1 enzimleri ile etkileşimini kuvvetlendirmek amaçlanmış, ayrıca lipofilik etkisi göz önüne alındığında yüksek oranda plazma proteinlerine bağlanmaya yol açabilen izopropilsülfonil grubunun, daha makul bir fizikokimyasal profil elde etmek adına asetilamin grubu ile

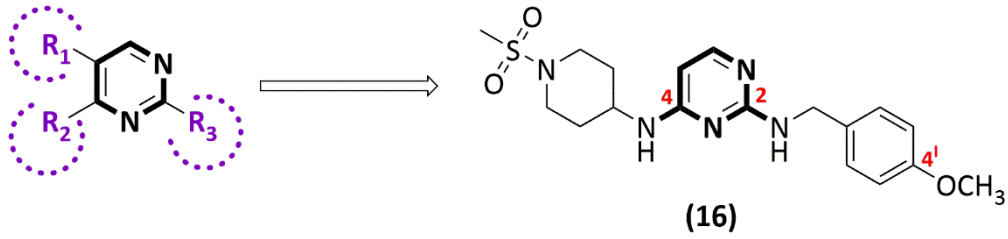
değişimi planlanmıştır. Bu öncüller doğrultusunda gerçekleştirilen medisinal kimya yaklaşımları Bileşik 15'in keşfi ile sonuçlanmıştır.

Bileşik 15; Met1199 ve Lys1150 amino asitleri ile beklenen etkileşim paternini sergilerken, taşımış olduğu üre motifinin NH- ve karbonil grupları sırası ile Asp1203 (ROS1 enzimi için Asp2033) ve Leu1122 amino asitleri ile hidrojen bağları oluşturduğu ve göstermiş olduğu bu tetragonal bağlanma modunun da güçlü inhibitör etkinlikte önemli rol oynadığı düşünülmüştür. H2228 (akciğer), Karpas299 (lenfoma), HCC78 (akciğer) ve A549 hücre hatlarında 27-56 nM IC₅₀ değer aralığında sitotoksik etkisine ek olarak Bileşik 15'in doza bağlı hücresel apoptozu indüklediğinin tespiti yapılmıştır [92].

İki veya daha fazla aktif farmakoforu tek bir molekülde kaynaştıran yeni hibrit antikanser ajanlar tasarlayarak; kanserin birden fazla biyolojik hedefi üzerinde sinerjik etki elde etme çabası, araştırmacılar tarafından son yıllarda benimsenen bir tedavi stratejisi olmuştur [93]. Bu amaç doğrultusunda çeşitli heterosiklik çekirdeklerin bir arada kullanıldığı hibrit bileşiklerin tasarımı gerçekleştirilmiş ve antiproliferatif aktiviteleri incelenmiştir.

2014 yılında Ma ve arkadaşları, piperidin ve piperazin motifleri taşıyan 2,4-diaminopirimidin iskeletine sahip bileşikler sentezleyerek yapı-etki ilişkilerini incelemiş, ayrıca bu bileşiklerin çeşitli insan kanser hücre hatlarında (HepG2, A549, MDA-MBA-231 ve MCF-7) 5-florourasile kıyasla antitümör aktivitelerini göstermiştir [94].

Sentetik açıdan araştırmacılar daha çok pirimidin halkasının ikinci ve dördüncü konumu üzerinden ilerlemiş, bu pozisyonlara heterosiklik amin grupları (*N*-(metilsülfonil)piperidin ve *N*-metilpiperazin) veya sübstitüe fenilalkilamin yapıları getirmiştir (R₂/R₃ sübstitüentleri). R₁ grubu olarak ise; klor ya da hidrojeni tercih etmiştir. Sentezlenen tüm bileşiklerin biyolojik aktivitesi incelendiğinde *N*-(metilsülfonil)piperidin taşıyan türevlerin *N*-metil piperazin taşıyanlara oranla daha güçlü antiproliferatif etki gösterdikleri ve bu yapının da pirimidinin dördüncü konumuna sübstitüe olması gerektiği sonucuna ulaşılmıştır. R₁ grubu olarak klor, sitotoksik aktivitede düşüşe yol açarken fenil halkasının 4' konumunda metoksi grubu taşıyan türevlerin çoğunun başarılı sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir.



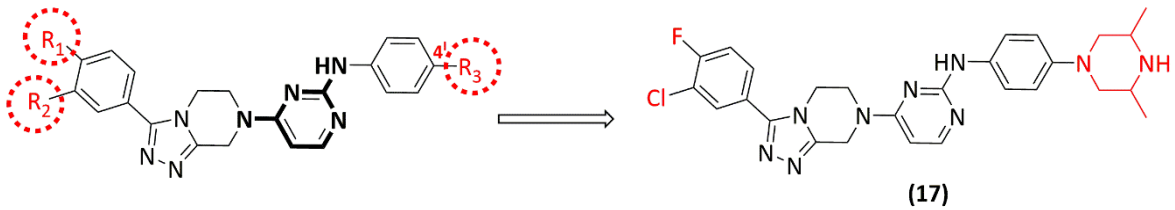
Şekil 2.16. Bileşik 16'nın geliştirilme süreci

Bu sonuçlara dayanarak Bileşik 16, tüm kanser hücre panellerinde sentezlenen diğer türevlerden ve 5-florourasil'den daha potent olduğunu göstermiştir. Ayrıca Bileşik 16 ile doza bağlı olarak gerçekleştirilen hücre döngüsü analizlerinde, bileşiğin hücre döngüsünü G₂/M fazında durdurarak etki gösterdiği ispatlanmıştır.

Çizelge 2.2. Bileşik 16'nın farklı kanser hücre hatlarındaki sitotoksosite değerleri

	HepG2 (IC ₅₀)	A549 (IC ₅₀)	MDA-MB-231 (IC ₅₀)	MCF-7 (IC ₅₀)
Bileşik 16	20,19 µM	12,78 µM	7,46 µM	16,24 µM
5-florourasil	46,83 µM	35,41 µM	24,60 µM	39,88 µM

Hu ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada; antiproliferatif etkisi kanıtlanmış birçok bileşiğin yapısında bulunan 2-aminopirimidin iskeleti ile bu alanda son yıllarda üzerine çalışılan bir yapı olan triazolopiperazin halkası taşıyan hibrit moleküller sentezlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin A549, HCT-116, PC-3 ve MCF-7 insan kanser hücre hatlarında Palbosiklib ve Momelotinib pozitif kontrollerine karşı sitotoksik aktivitelerine bakılmıştır. Ayrıca bileşiklerdeki yapısal değişikliklerin aktivite potensini nasıl etkilediği değerlendirilmiştir [95].



Şekil 2.17. Bileşik 17'nin geliştirilme aşaması

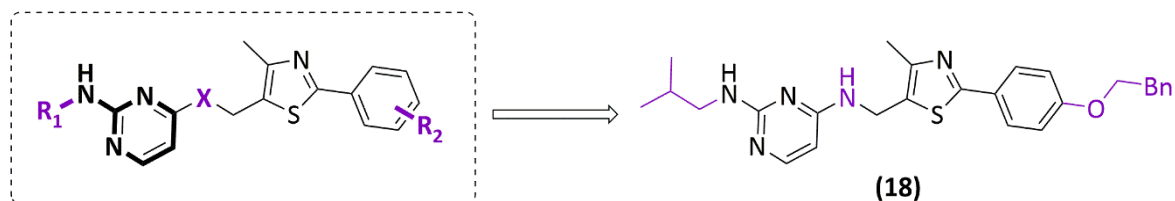
Yapı-etki ilişkileri doğrultusunda ilk olarak; tasarlanan bileşiklerin triazolopiperazin halkası üzerinde farklı elektron çekici ve salıcı sübstitüentler ($R_1/R_2 = -F, -Cl, -CF_3, -CH_3$) içeren fenil grubu denenmiştir. Özellikle A549 hücre hattında elektron çekici grupların sitotoksik etkiye pozitif katkı yaptıkları, elektron salıcı sübstitüentlerin ise tam tersi etki gösterdiği saptanmıştır. Pirimidin halkasına komşu fenil halkasının 4' konumuna ise bileşiklerin fizikokimyasal özelliklerini değiştirmek adına farklı heterosiklik amin grupları (R_3) dahil edilmiştir. Morfolin, tiyomorfolin, piperidin, pirolidin ve piperazin türevleri arasından en iyi aktivite sonucu; 2,6-dimetilpiperazin ile alınmıştır.

Tüm bu verilerin ışığında elde edilen Bileşik 17, *in vitro* sitotoksikite çalışmalarında serinin en aktif bileşiği olmuş ve ileri mekanistik analizlere tabi tutulmuştur. A549 hücre paneli üzerinde Bileşik 17'nin 0,08 ve 2 μM konsantrasyonda gerçekleştirilen hücre döngüsü deneyinde; hücre döngüsünü S evresinde durdurduğu ve apoptoz aracılı antiproliferatif etki gösterdiği kanıtlanmıştır.

Çizelge 2.3. Bileşik 17'nin *in vitro* aktivite değerleri

	IC ₅₀ (μM)			
	A549	HCT-116	PC-3	MCF-7
Bileşik 17	2,14	3,59	5,52	3,69
Palbosiklib	2,02	3,69	6,82	3,52
Momelotinib	1,56	3,25	4,21	3,30

2015 yılında Zhou ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada ise araştırmacılar; 2,4-diaminopirimidin ve ariltiyazol iskeletini bir arada taşıyan bileşikler sentezlemek ve sentezledikleri bileşiklerin üzerinde gerçekleştirdikleri yapısal değişikliklerin insan meme kanseri hücre hatları (MCF-7, MDA-MB-231) üzerindeki antiproliferatif aktivite ile ilişkisini incelemek üzere yola çıkmışlardır [96].



Şekil 2.18. Bileşik 18'in geliştirme stratejisi

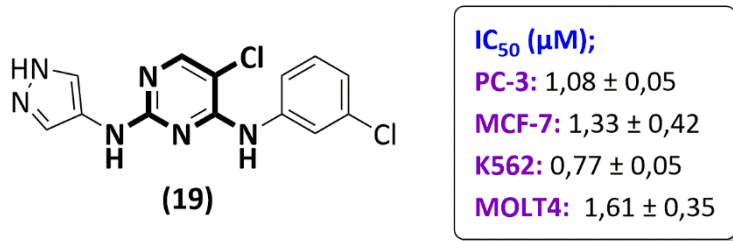
Tasarladıkları hit bileşik iskeletinin üç farklı bölgesi üzerine yoğunlaşan araştırmacılar, öncelikle pirimidin halkasının ikinci konumunda bir amin grubunun bulunması ve bu amin grubunun da sübstitüe olmasının sitotoksik aktivite açısından gerekli olduğunun tespitini yapmıştır. R₁ grubu izobütil olduğunda ise en iyi aktivite sonucunu elde etmiştir. Ardından tiyazol halkası ile pirimidin halkasını birbirine bağlayan ara zincirde azot ve oksijen köprülerini denemiş, eter köprüsü taşıyan türevlerde aktivitenin kaybolduğunu gözlemlemişlerdir. Son olarak fenil halkası üzerinde değişik konumlarda (*o*-, *m*-, *p*-) farklı sübstitüentlerin (R₂) denemesi yapılmıştır. Alınan sonuçlar; *para* sübstitüsyonun tercih edilmesi gerektiğini ve bu konumda taşınan benzilalkoksi grubunun optimal antiproliferatif etki oluşturduğunu göstermiştir.

Bu bilgilere göre ulaşılan Bileşik 18, belirlenen hücre hattında da mikromolar seviyede sitotoksik etkisi ile meme kanseri tedavisinde kullanılabilecek etkili bir bileşik olma konusunda umut vaat etmektedir (Bileşik 18 için MCF-7, IC₅₀= 3,18 ± 0,70 µM; MDA-MB-231, IC₅₀= 2,00 ± 0,02 µM). Özellikle MCF-7 hücre hattında kontrol grubu Dasatinib'e karşı yaklaşık 2,5 kat daha potent olması dikkat çekicidir (Dasatinib için; MCF-7 IC₅₀= 8,05 ± 1,05 µM, MDA-MB-231 IC₅₀= 1,12 ± 0,53 µM).

Tıpkı tiyazol gibi pirazol halkasının da diaminopirimidin yapısı ile birlikte kullanıldığı antikanser bileşiklerin örnekleri de literatürde karşımıza çıkmaktadır. Örnek olarak Liang ve arkadaşlarının 2016 yılında yapmış oldukları çalışma verilebilir [97]. JAK/STAT (Janus kinaz/sinyal transdüserleri ve transkripsiyon aktivatörleri) sinyal hattı; bağışıklık, hematopoez ve hücre büyümesinde kritik roller oynayan önemli bir biyolojik yolaktır ve bu yolakta meydana gelen anormallikler kanser gibi birçok hastalığa yol açar. Bu nedenle, JAK/STAT sinyal mekanizması antitümör etkinlik gösteren umut verici bir biyolojik hedeftir [98].

Literatürlerde antikanser etki gösteren JAK inhibitörleri yapılarından yola çıkarak Liang ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada; potansiyel JAK inhibitörü olarak tasarlanmış 4-amino-(1*H*)-pirazol ve pirimidin halkası taşıyan hibrit moleküller arasından Bileşik 19, *in vitro* enzim deneylerinde üç JAK enzimi alt tipine karşı dikkat çekici derecede inhibisyon yaratmıştır (JAK1 için; IC₅₀= 3,4 nM, JAK2 için; IC₅₀= 2,2 nM, JAK3 için; IC₅₀= 3,5 nM). Ayrıca

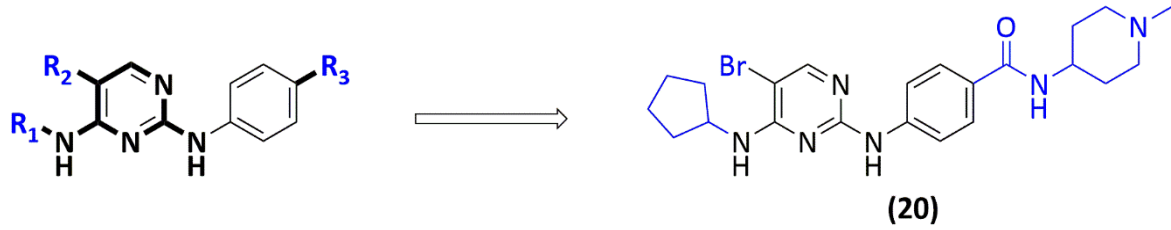
PC-3, MCF-7, HEL (lösemi), K562 (lösemi), MOLT4 (lösemi) kanser hücre hatları üzerinde pozitif kontrol Ruxolitinib'e kıyasla düşük mikromolar seviyede sitotoksik aktivite göstermiştir [97].



Şekil 2.19. Bileşik 19 ve IC₅₀ değerleri

Diaminopirimidin türevi bileşiklerin üzerinde çalışıldığı antikanser hedeflerden biri de serin/treonin kinaz ailesidir. Aurora kinazlar, serin/treonin kinazların bir alt ailesidir. Bu alt aile; Aurora A, B ve C olarak adlandırılan üç farklı enzim içerir. Aurora A kinaz; mitoz bölünme sırasında TACC, kinesin5, g-Tubulin, Xklp2 hedefleyen protein (TPX2), BORA (Aurora A protein kinaz aktivatör proteini), BRCA1, CDC25B, PAK1, HEF1 ve HDAC6 gibi sentrozom olgunlaşması, mitotik iplikçik oluşumu ve bağlanması, kromozomların hizalanması ve sitokineze yardımcı çeşitli merkez substrat proteinlerini toplayarak hücre döngüsünün düzenlenmesinde görev alır. Aurora B ve Aurora C'nin de kromozom yoğunlaşması, segregasyonu ve mikrotübül bağlanmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir [99].

Aurora A ve Aurora B'nin ekspresyonu çeşitli kanser olgularında yükselir ve kötü prognoz ile ilişkilendirilir. Aurora kinazların hücre mitozu ve tümör oluşumunu düzenlemedeki potansiyel rolleri, onları antikanser tedavisi için çekici hedefler haline getirmektedir. Bu bağlamda Qin ve arkadaşları tarafından 2015 yılında bir dizi 2,4-diaminopirimidin türevi bileşiğin Aurora A kinaz inhibisyonu aracılı antikanser etkileri araştırılmıştır [100].



Şekil 2.20. Bileşik 20'nin geliştirilme stratejisi

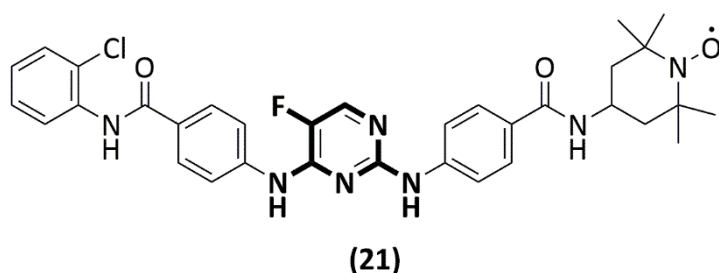
Araştırmacılar bileşiklerin yapı-etki ilişkisini incelemek adına; pirimidin halkasının 2. ve 4. konumuna farklı süstitüsyon paternleri getirerek inhibitör etkiyi Aurora A enzimi üzerinde seçici hale getirmeyi ve 5. konuma getirilen elektron çekici gruplar ile oluşan antiproliferatif etki değişimini gözlemlemeyi amaçlamıştır. Bu amaçlar doğrultusunda elde edilen bileşiklerin yapı-aktivite ilişkileri incelendiğinde; pirimidin halkasının beşinci konumunun aktivite için önemli bir yeri olduğu, R₂ süstitüenti olarak denenen elektron çekici gruplardan; brom ve klorun daha iyi sonuçlar verdiği, flor ve nitro grubunun ise aktiviteyi düşürdüğü görülmüştür. Farklı düz zincir ve siklik aminler arasından siklopropilin R₁, bir amit köprüsü ile fenil halkasına bağlanmış N-metilpiperidinin ise R₃ süstitüenti olarak optimum aktivite sergilediği ispatlanmış ve Bileşik 20'ye ulaşılmıştır.

Bileşik 20'nin HeLa (serviks), A549, HCT-8 (kolorektal) ve Hep-G2 (karaciğer) insan tümör hücre hatları üzerinde VX-680 kontrol bileşiğine göre daha potent bir sitotoksisite göstermesinin ardından, HeLa hücrelerinde Western-blot yöntemi ile Aurora A ve B üzerindeki seçiciliğine bakılmıştır. Bileşik 20'nin Aurora A üzerinde 35 kat daha seçici etki gösterdiği saptanmış, yapılan ELISA (Enzyme linked immuno sorbent assay) testleri ile de alınan sonuçlar doğrulanmıştır (Bileşik 20 Aurora A için, IC₅₀= 0,012 µM; Aurora B için IC₅₀= 0,430 µM). Ayrıca Bileşik 20 üzerinde gerçekleştirilen ileri mekanistik çalışmalarla, doza bağımlı olarak hücre döngüsünü G2/M fazında durdurduğu kanıtlanmıştır.

Çizelge 2.4. Bileşik 20'nin *in vitro* sitotoksisite değerleri

	IC ₅₀ (µM)			
	HCT-8	A549	HeLa	Hep-G2
Bileşik 20	3,6	0,5	0,9	2,4
VX-680	44,6	19,4	27,3	63,4

2019 yılında Qin ve arkadaşları gibi Sang ve araştırma grubu da seçici olarak potansiyel Aurora A inhibitörü bir dizi bileşik tasarlayarak, sentez çalışmalarını gerçekleştirmiştir. 2,4-bisanilinopirimidin farmakoforu ile bazı antitümör etkinlik gösteren ajanların yapısında dikkat çeken nitroksit motifini bir arada taşıyan bu bileşik seti içerisinde Bileşik 21; enzimatik deneylerde Aurora A'ya karşı Aurora B'den yaklaşık 67 kat daha seçici bir inhibisyon sergilemiş (Aurora A için; IC_{50} = 0,06 nM, Aurora B için; IC_{50} = 2,5 nM) ve çeşitli insan kanser hücre panellerinde pozitif kontrol bileşiği VX-680'den daha güçlü bir antiproliferatif etkinlik profili çizmiştir. Ayrıca HeLa hücrelerinde gerçekleştirilen mekanistik çalışmalar; Bileşik 21'in doza bağlı olarak mitotik iplik oluşumunu bloke etmek vasıtasıyla hücre döngüsünü G_2/M fazında durdurup, apoptoz kaynaklı hücre ölümüne sebebiyet verdiğini kanıtlar niteliktedir [101].



Şekil 2.21. Aurora A inhibitörü Bileşik 21

Dikkat çeken bir nokta ise bileşik yapı-etki ilişkisi açısından incelendiğinde ortaya çıkmıştır. Bileşik 21'den sadece nitroksit yapısını taşıması ile ayrılan benzer bir türevde tüm hücre hatlarına karşı biyolojik aktivite kaybı yaşanması, bu serbest radikal yapının antikanser etkiye katkısını gözler önüne sunmaktadır.

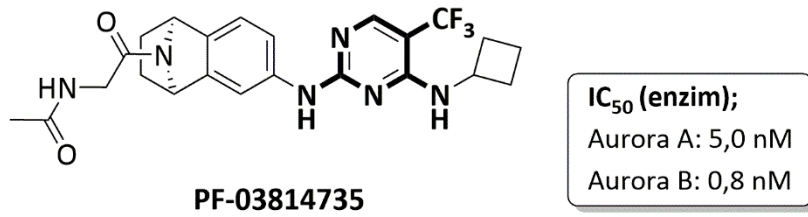
Çizelge 2.5. Bileşik 21'in aktivite değerleri

	GI_{50} (μ M)			
	HeLa	A549	HepG2	LoVo
Bileşik 21	$0,4 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,6$	$1,2 \pm 0,9$	$7,3 \pm 1,5$
VX-680	$46,2 \pm 5,5$	$35,8 \pm 3,4$	$53,3 \pm 5,5$	$45,3 \pm 4,5$

Pfizer tarafından keşfedilen ve 2,4-dimaminopirimidin iskeleti taşıyan PF-03814735 bileşiği ise başka bir Aurora inhibitörü olarak karşımıza çıkmaktadır. Katı tümör tedavisinde Faz 1

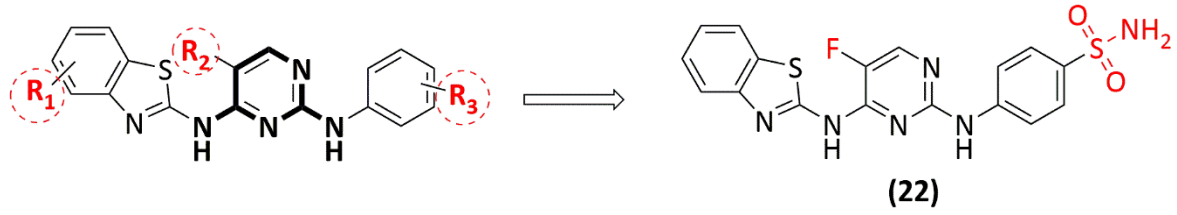
klirik çalışmaları tamamlanan bu bileşiğin, ATP ile yarışmalı olarak Aurora A/B inhibisyonu oluşturarak sitokinezi bloke ettiği ve antiproliferatif ekti gösterdiği çeşitli *in vitro* ve *in vivo* alışmalarla kanıtlanmıştır [102].

Nanomolar seviyede enzimatik etkinliğe sahip PF-038114735 bileşiğinin farklı insan kanser hücre hatlarında antiproliferatif etkinliği incelenmiş, HCT-116, A549 ve H125 ve lösemi (HL-60) hücre panellerinde oldukça aktif olduğu sonucuna varılmıştır (PF-038114735 için IC₅₀ değerleri; HCT-116= 70 nM, A549= 90 nM; H125= 150 nM, HL-60= 110 nM). Ayrıca HCT-116, COLO205, MDA-MB-231 ve HL-60 fare ksenograft modellerinde 30mg/kg dozda sırası ile % 78, % 66, % 63 ve % 57 oranlarında tümör büyümesini inhibe eden bileşiğin, umut vaat eden bir antikanser ajan adayı olduğu gösterilmiştir.



şekil 2.22. Aurora A/B inhibitörü PF-038114735

Bir diğer serin/treonin kinaz alt ailesi ise siklin bağlı kinaz enzimleridir. CDK'lar, hücre bölünmelerini düzenlemedeki hayati rolleri ile bilinen protein kinazlardır. CDK ailesinin bir yesi olarak CDK2'nin, hücre döngüsü düzenlenmesinde temel görevleri olduğu düşünülmektedir. Ayrıca CDK2'nin hücre farklılaşmasında ve apoptozda önemli bir rol oynadığı bulunmuştur. Normal dokuların aksine, insan tümörlerinde CDK2'nin aşırı eksprese edilmesi sıklıkla karşılaşılan bir olgudur. Son yıllarda çok sayıda CDK2 inhibitörü, sayısız kanser türünü tedavi etmek için klinik çalışmalara girmiştir. Bu inhibitörler yapısal açıdan çeşitlilik göstermekle birlikte klinik değerlendirmedeki çoğu CDK2 inhibitörünün aminopirimidin iskeleti içerdiği belirtilmiştir. Bu bilgiler işığında Diao ve arkadaşları 2019 yılında güçlü CDK2 inhibitörü 2,4-disübstitüe pirimidin ve 2-aminobenzotiyazol yapısı taşıyan bir seri yeni hibrit bileşiğin antiproliferatif etkilerini araştırmıştır [103].



Şekil 2.23. CDK2 inhibitörü Bileşik 22'nin geliştirilmesi

Belirledikleri hit pirimidin-benzotiyazol iskeleti üzerinde farklı konumlardan R_1 , R_2 , R_3 sübtitüsyonu ile sitotoksik etkinin nasıl değiştiği üzerine çalışmalar gerçekleştirmeyi amaçlayan araştırmacılar, öncelikle benzotiyazol halkasının; flor, klor, metil, metoksi gibi gruplar (R_1) ile sübtitüe edildiğinde, tüm hücre hatlarında biyolojik etki kayıplarının yaşandığının tespitini yapmışlardır. Pirimidin halkasına komşu fenil halkasının *m*- ve *p*-konumlarına R_3 sübtitüenti olarak elektron salıcı ve çekici gruplar getirildiğinde ise en güçlü etkinin sülfamoil grubu ile sağlandığını gözlemlemişlerdir. Pirimidin halkasının beşinci konumuna getirilen sübtitüentler ($R_2 = -F, -CH_3$) etkiyi göreceli olarak düşürse de bu konumda flor taşıyan Bileşik 22 ile beş hücre hattında da kabul edilebilir düzeyde sitotoksisite sağlanmıştır.

Bileşik 22 ve pozitif kontrol grubu olan AZD5438 ile CDK2/A2 üzerinde gerçekleştirilen enzim inhibisyon deneyleri ise oldukça umut vericidir. Bileşik 22'nin, AZD5438'e oranla üç kat daha potent olduğunu ispatlanmıştır (Bileşik 22 için; $IC_{50} = 15,4 \pm 4,4$ nM, AZD543 için; $IC_{50} = 45$ nM). Ayrıca Bileşik 22'nin ileri biyolojik aktivite çalışmaları da yapılmış, HCT-116 hücre hattı üzerinde akış sitometrisi yöntemiyle hücre döngüsünü G_2/M fazında durdurup, doza bağımlı apoptozu indüklediği keşfedilmiştir.

Çizelge 2.6. Bileşik 22'ye ait *in vitro* aktivite değerleri

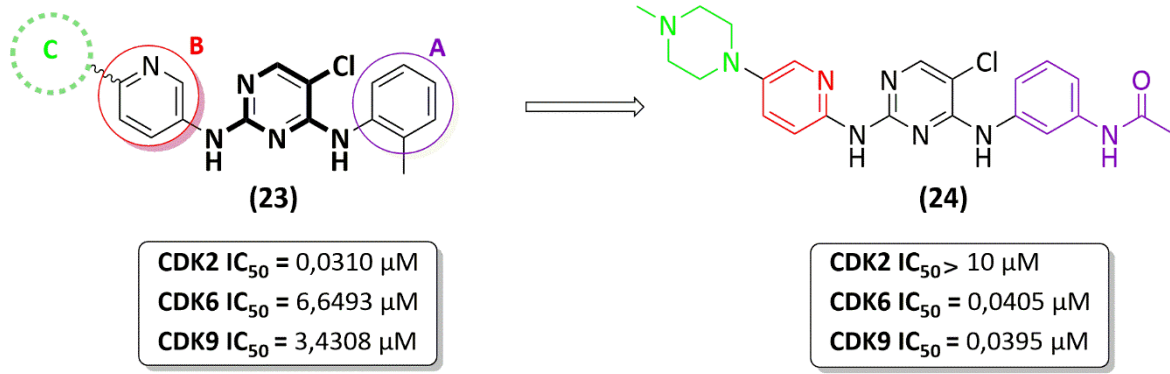
	IC_{50} (μM)				
	HCT-116	MDA-MB-231	MCF-7	HeLa	PC-3
Bileşik 22	$0,70 \pm 0,03$	$1,80 \pm 0,22$	$10,91 \pm 2,01$	$0,45 \pm 0,09$	$0,92 \pm 0,58$
AZD5438	$0,47 \pm 0,14$	$7,20 \pm 0,55$	$10,67 \pm 0,69$	$0,73 \pm 0,12$	$0,36 \pm 0,09$

CDK enzim inhibitörleri, klinikte etkili ve başarılı antikanser ajan adayları olmasına rağmen kısa vadede terapötik direnç gelişimine ve çeşitli istenmeyen yan etki profili göstermeye

yatkın bileşiklerdir. Bu gibi olumsuzlukların üstesinden gelebilmek adına araştırmacılar; birden fazla CDK enzimini hedefleyen bir tedavi stratejisinin gerçekleştirilmesi üzerine çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. Nitekim bu çalışmalardan alınan sonuçlar; çoklu CDK enzim inhibisyonunun tek bir CDK enzimini hedef alan aktif bileşik ile elde edilen inhibisyona kıyasla daha başarılı olduğunu göstermektedir [104].

Son yıllarda CDK6 ve CDK9 enzimleri, kritik hücresel proseslerde almış oldukları görevler açısından akut miyeloid lösemi (AML) gibi kanser türlerinde ilgi çekici terapötik hedefler haline gelmektedir. Ayrıca meme kanseri hastalarında, klinikte kullanılan CDK4/6 inhibitörlerine karşı gelişen direncin CDK9'un aşırı ekspresyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu düşünce; CDK6 ve CDK9'u aynı anda hedefleyen küçük molekül inhibitör bileşiklerin hem antikanser aktiviteye sinerjik katkı sağlayacağı hem de mevcut CDK inhibitörlerine karşı oluşan direncin üstesinden gelebileceği yaklaşımını gündeme getirmiştir. Bu yaklaşımdan hareketle 2020 yılında Wang ve arkadaşları dual CDK6/9 inhibitörü bileşiklerin sentezi ve antitümör etkinliğini araştırmak adına yola çıkmışlardır [104].

Kendi bileşik kütüphaneleri üzerinde enzim tarama çalışmaları ile; CDK2, 6 ve 9 enzimleri üzerinde inhibisyon potansiyeline sahip ve de farklı tümör hücre hatlarında 38,6-56,2 μM IC_{50} değerinde antiproliferatif etkili 2,4-diaminopirimidin türevi Bileşik 23'ü hit bileşik olarak belirleyen araştırmacılar, hem bileşiğin CDK6/9 üzerindeki seçiciliğini arttırmak hem de antiproliferatif aktivitesini iyileştirmek için bir dizi yapısal modifikasyon stratejisi gerçekleştirmişlerdir. Bu amaç doğrultusunda Wang ve ekibi, moleküler modelleme teknikleri ile var olan CDK6 ve CDK9 inhibitörlerinin, enzim ile yapmış olduğu etkileşim şekillerini belirlemiş, sonrasında ise Bileşik 23'ün üç farklı bölgesi üzerinde türevlendirmeye gitmiştir.



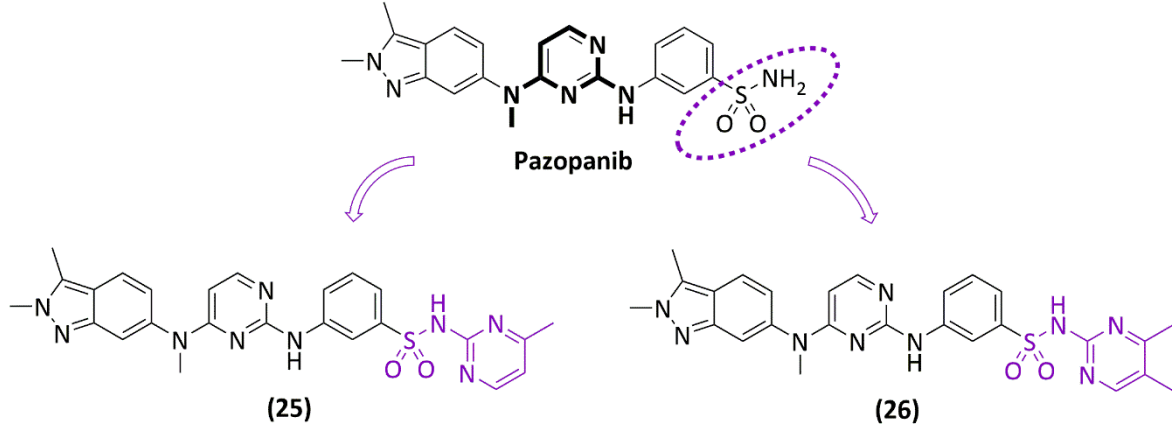
Şekil 2.24. CDK6/9 dual inhibitörü Bileşik 24'ün geliştirilmesi

Yapı-etki ilişkisi incelendiğinde; 2,4-diaminopirimidin yapısı korunmak koşulu ile A halkasına getirilen asetilamino grubunun enzim hidrofobik cebi ile anahtar etkileşimler gerçekleştirdiği ve piridin halkasının biyolojik aktivite için gerekli olduğunun tespiti yapılmıştır. Ayrıca bu halka sistemine, mevcut CDK4/6 inhibitörlerinin yapısında da bulunan alifatik heterosiklik yapıların süstitüsyonunun aktiviteye olumlu katkı sağladığı gözlenirken, en potent etkinin *N*-metilpiperazin ile elde edildiği belirlenmiştir. Tüm bu modifikasyonlar sonucunda; CDK6/9 üzerinde seçici ve çeşitli kanser hücre hatlarında 4,0-8,1 μ M aralığında IC_{50} değerlerine sahip Bileşik 24'e ulaşılmıştır. İleri biyolojik çalışmalar sonucu; hücre döngüsünü bloke ederek apoptoz aracılı antiproliferatif etki gösterdiği belirlenen Bileşik 24'ün ayrıca kabul edilebilir farmakokinetik özelliklere sahip olduğunun da tespiti yapılmış, bu sayede MDA-MB-231 fare ksenograft modeli üzerinde *in vivo* etkinliği de test edilebilmiştir. Sonuç olarak; pozitif kontrol Abemasiklib ile kıyaslanabilir seviyede antitümör etki gösteren Bileşik 24, kanser tedavisinde umut vaat eden bir bileşik adayı olarak literatürde yerini almıştır [104].

Tümör anjiyogenezi, tümör hücresinin proliferasyonu, invazyonu ve metastazı için önemli bir basamaktır. Özellikle vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörleri (VEGFR)'nin de yer aldığı tirozin kinazlar, anjiyogenezi ile yakından ilişkili olan sinyal iletim yollarında önemli bir rol oynar. Bu nedenle, anjiyogenezi inhibisyonu yapabilen küçük moleküllerin tasarımı medisinai kimyacılar için alternatif bir kanser tedavi stratejisi fırsatı yaratır [105].

Bu amaç doğrultusunda tasarlanan ve 2,4-diaminopirimidin iskeleti taşıyan Pazopanib, VEGFR-2, EGFR, AKT1, ALK1 ve ABL1 gibi birçok kinazı inhibe ederek anjiyogenezi azalttığı rapor edilen bir antikanser ilaçtır. Geniş bir yelpazede güçlü etki göstermesi ve klinik

çalışmalarda verdiği makul sonuçlar, Pazopanib'i optimize etme konusunda araştırmacıları heveslendirmiştir. Bu doğrultuda yola çıkan Jia ve arkadaşları 2014 yılında yayınladıkları çalışmada bir seri Pazopanib analogu tasarlayıp sentezlemişlerdir [105].



Şekil 2.25. Pazopanib'den hareketle geliştirilen Bileşik 25 ve 26

Sonuçta ufak yapısal değişikliklerle elde ettikleri iki molekül (Bileşik 25 ve 26) oldukça başarılı biyolojik aktivite profili göstermiştir. Ayrıca bu iki bileşik ile gerçekleştirdikleri anti-anjiyogenez test çalışmalarında da Pazopanib'e eş değer sonuçlar alınmıştır.

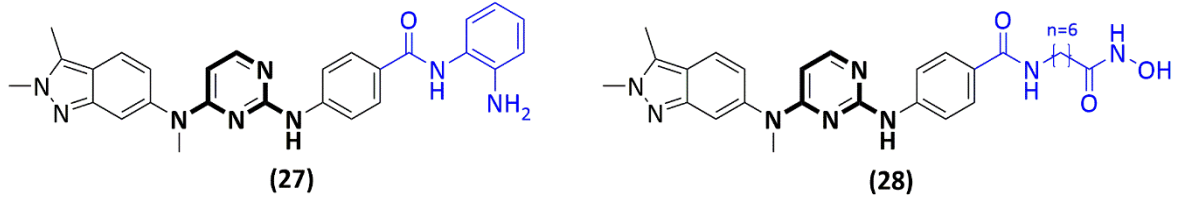
Çizelge 2.7. Bileşik 25 ve 26'nın aktivite sonuçları

	IC ₅₀ (µM)	
	VEGFR-2	ABL-1
Bileşik 25	0,025	0,062
Bileşik 26	0,012	0,022
Pazopanib	0,043	0,62

Pazopanib baz alınarak gerçekleştirilen bir diğer çalışma ise Zang ve araştırma grubu tarafından yürütülmüştür. Bu çalışmada kanser tedavisinde önemli terapötik hedefler olan HDAC ve VEGFR inhibitörlerinin sahip olduğu dezavantajlı özelliklerinin üstesinden gelebilmek için iki farklı ilaç grubunun motiflerini bir arada taşıyan çok hedefli yeni küçük ilaç molekülleri tasarımı amaçlanmıştır [106].

Bu amaç doğrultusunda daha önceden çeşitli VEGFR inhibitörleri ile kombinasyonları faz 1 klinik çalışmalarda [107] kullanıldığı bilinen Pazopanib çıkış noktası olarak belirlenmiş ve

Pazopanib'in 2,4-diarilaminopirimidin iskeleti korunarak, bu iskelete farklı uzunlukta ve çeşitlilikte ara zincirler ile HDAC inhibitörü bileşiklerin taşımış oldukları karakteristik çinko bağlayıcı grupların süstitüsü gerçleştirilmiştir.

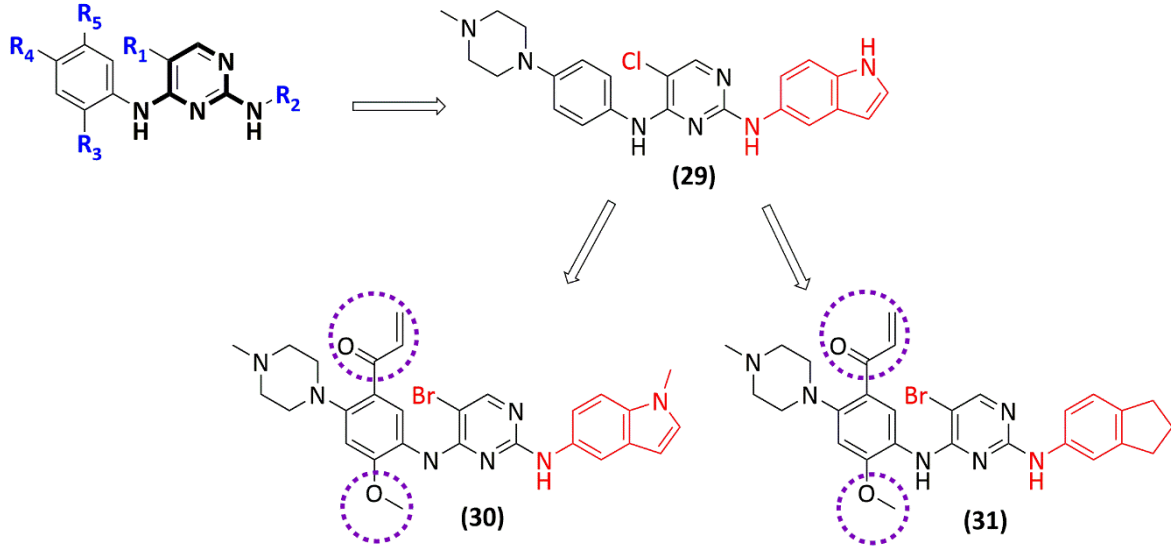


Şekil 2.26. HDAC/VEGFR dual inhibitörü Bileşik 27 ve 28

Sentezlenen tüm bileşikler arasından *o*-aminoanilit grubu taşıyan Bileşik 27 ve hidroksamik asit taşıyan Bileşik 28 dikkate değer dual inhibitör etki göstermiştir. Her iki bileşik de mikromolar düzeyde HDAC ve VEGFR inhibisyonu sergilerken, bu etkinin mevcut hedeflerin farklı izoformlarına karşı seçicilik arz ettiği gözlenmiştir (Bileşik 27 için; IC_{50} (HDAC1)= 0,59 μ M, IC_{50} (HDAC2)= 0,91 μ M, IC_{50} (HDAC3)= 0,43 μ M, Bileşik 28 için; IC_{50} (VEGFR1)= 0,035 μ M, IC_{50} (VEGFR2)= 0,046 μ M, IC_{50} (VEGFR3)= 0,113 μ M). Ayrıca bileşiklerin *in vitro* hücresel antiproliferatif etkileri de incelenmiş ve farklı insan kanser hücre panellerinde özellikle de hematolojik tümör hücre hatlarına karşı umut vaat eden sonuçlar alınmıştır (Bileşik 27 için; IC_{50} (MOLT-4)= 0,94 μ M, IC_{50} (KG1)= 0,67 μ M ve Bileşik 28 için; IC_{50} (MOLT-4)= 0,34 μ M, IC_{50} (KG1)= 1,60 μ M). Bileşiklerin biyolojik aktiviteleri HT-29 (kolorektal) fare ksenograft modellerinde yapılan *in vivo* analizlerle de desteklenmiştir [106].

Başka bir tirozin kinaz alt ailesi ise epidermal büyüme faktörü reseptörleridir. EGFR proteininin mutasyona uğraması ve/veya aşırı eksprese edilmesi farklı insan kanser türlerinde sıklıkla gözlemlenen bir durumdur ve bu protein, kanser tedavisi için değerli bir terapötik hedef olarak görülmektedir [108]. Yıllar içinde keşfedilen EGFR inhibitörleriyle klinikte başarılı sonuçlar alınmasına rağmen, hedefte gelişen nokta mutasyonlar (TR790M mutasyonu vb.) sonucu etkinliklerinin azalması veya mevcut terapötik ajanların doz sınırlayıcı bazı yan etkilerinden dolayı yeni EGFR inhibitörü bileşiklerin keşfi kaçınılmaz hale gelmiştir [109].

Mutasyona uğramış EGFR'ler üzerinde seçici inhibisyon gösteren küçük antikanser moleküller keşfetmek amacı ile yola çıkan Chen ve arkadaşları; tasarladıkları öncü Bileşik 29'un (Bileşik 29 için; $IC_{50}(\mu M)$ EGFR (wt.)= 0,557, $IC_{50}(\mu M)$ EGFR^{L858R/TR790M}= 0,046) EGFR^{L858R/TR790M} üzerinde olan seçici inhibitör etkisini arttırmak adına 2017 yılında yapı temelli modifikasyon çalışmaları gerçekleştirmiştir.



Şekil 2.27. Bileşik 30 ve 31'in geliştirilme stratejisi

Araştırmacılar öncelikle moleküler modelleme teknikleri ile öncü Bileşik 29'un enzimin aktif bölgesi ile yapmış olduğu etkileşimleri incelemişlerdir. Bileşik 29, taşıdığı 2-aminopirimidin motifi ile enzimin destek bölgesindeki Leu792 ve Met793 ile hidrojen bağı aracılığıyla etkileşim yapmıştır. Pirimidinin beşinci konumu ($R_1 = -Cl$) Met790 amino asidi ile van der Waals etkileşimi gösterirken, indol halkası (R_2) aktif bölgenin hidrofobik cebiyle, *N*-metilpiperazin halkası (R_4) ise ATP cebiyle etkileşim içindedir.

Molekülün EGFR^{L858R/TR790M} inhibisyonu üzerindeki seçiciliğinde ana iskelet üzerinde R_1 süstitüsyonlarının etkili olabileceği saptanmıştır. R_1 grubu olarak elektron çekici ($-CF_3$, $-NO_2$ vb.), elektron salıcı ($-OCH_3$, $-CH_3$ vb.) ve halojen ($-F$, $-Br$ vb.) gruplar denenmiş ve en güçlü inhibitör etkinin brom süstitüenti ile elde edildiği görülmüştür. Daha sonra 2-amino pirimidin halkası (R_2 grubu) farklı aromatik heterosiklik halkalarla (indazol, indolin, kinoksalin vb.) türevlendirilmiştir. Özellikle indan ve 1-metilindol taşıyan bileşiklerde inhibitör etkide seçici bir artış gözlemlenmiştir. Fenil halkasında R_4 grubu olarak *N*-

metilpiperazin sabit tutulurken, pirimidin halkasına göre *o*- konumuna getirilen metoksi sübstütüsyonu (R₃) ile inhibisyon etkisi arttırılmış, *m*- konumundaki akrilamit grubu (R₅) ise aktif bölgede Cys797 amino asidi ile geri dönüşümsüz ek bir etkileşim sağlamıştır.

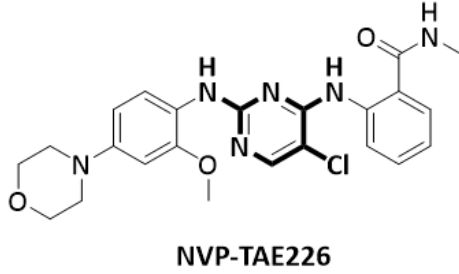
Yapı-etki çalışmaları sonucunda en potent iki bileşik (Bileşik 30 ve 31) insan epidermal karsinoma (A431) ve insan akciğer kanseri (H1975) hücre hatlarında kabul edilebilir biyolojik etki profili göstermiştir [109].

Çizelge 2.8. Bileşik 30 ve Bileşik 31'e ait aktivite değerleri

	EGFR IC ₅₀ (nM)		Hücresel Antiproliferatif Aktivite IC ₅₀ (μM)	
	Wt.	L585R/T790M	A431	H1975
Bileşik 30	280,4 ± 279,9	4,1 ± 2,4	1,693 ± 0,413	0,184 ± 0,108
Bileşik 31	202,5 ± 112,4	3,2 ± 1,8	2,595 ± 1,847	0,276 ± 0,266

Fokal adezyon kinazlar ve insülin benzeri büyüme 1 reseptörü (IGF-1R) birçok hücreyel fonksiyonun düzenlenmesinde görev alan tirozin kinaz alt ailelerindendir. Her iki kinaz enziminin aşırı ekspresyonu, kanser hücrelerinin proliferasyonunda ve metastaz olgusunda ilişkilendirilen bir durumdur. Aynı sinyal yolağında birlikte görev alan bu iki enzimin birlikte inhibe edilerek güçlü bir antiproliferatif etki elde edilmesi, medisinal kimyacılar için hedeflenen bir terapötik strateji olmuştur.

Bu doğrultuda Liu ve arkadaşları tarafından Novartis firmasının desteği ile 2007 yılında literatüre kazandırılan dual FAK/IGF-1R kinaz inhibitörü (FAK enzimi için; IC₅₀= 5,5 nM, IGF-1R enzimi için; IC₅₀= 140 nM) olan ve yapısında 2,4-diaminopirimidin motifi bulunduran NVP-TAE226 bileşiği, 2019 yılında Fukami ve çalışma ekibi tarafından ileri mekanistik biyoloji analizlerine tabi tutulmuştur. Geniş çeşitlilikte insan kanser hücre panelleri üzerinde test edilen bileşiğin 0,17-1,2 μM değer aralığında potent bir antiproliferatif etki göstererek umut vaat eden bir antikanser ilaç adayı olduğu tespit edilmiştir [110, 111].

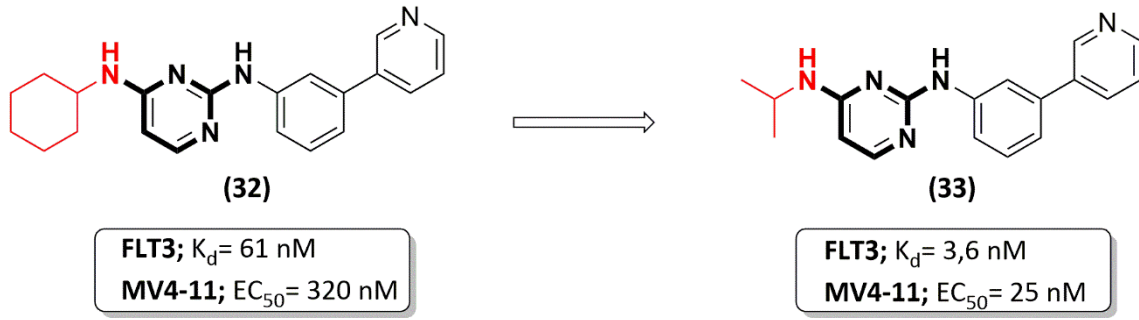


Kanser Hücre Hattı	GI ₅₀ (μM) ± SEM
MCF-7 (meme)	1,2 ± 0,22
MDA-MB-231 (meme)	0,56 ± 0,22
PC-3/M (prostat)	0,83 ± 0,29
HCT-116 (kolon)	0,42 ± 0,056
KATOIII (mide)	0,54 ± 0,064
SUIT-2 (pankreas)	0,18 ± 0,029
RPMI8226 (miyelom)	0,33 ± 0,060
SK-MEL-23 (melanom)	0,17 ± 0,009

Şekil 2.28. Dual FAK/IGF-1R inhibitörü NVP-TAE226 ve bazı insan kanser hücre hatlarındaki aktivite değerleri

Başka bir tirozin kinaz alt ailesi üyesi olan FMS benzeri tirozin kinazlar (FLT3), hemopoeitik kök hücrelerin hayatta kalması, çoğalması ve farklılaşmasında önemli rol oynar. FLT3 kinazı kodlayan gen mutasyonları sonucu gelişen enzim aktivasyonu, özellikle AML vakalarının yaklaşık üçte birinde karşılaşılan bir olgudur ve hastalığın tedavisi için önemli bir hedef olduğu düşünülmektedir [112]. FLT3 inhibisyonu aracılı AML tedavisinde kullanılmak adına tasarlanan bileşiklere örnek olarak, Jarusiewicz ve arkadaşlarının 2017 yılında yapmış oldukları çalışma verilebilir [113].

Araştırma grubu tarafından belirlenen 2,4-diaminopirimidin yapısı taşıyan hit Bileşik 32'nin, farklı kinaz enzimleri üzerinde ligant temelli afinite çalışmaları gerçekleştirilmiş ve söz konusu bileşiğin diğer kinaz türlerine kıyasla FLT3 için seçici bir bağlanma gösterdiği ($K_d = 61$ nM), ayrıca insan kanser hücre hattı MV4-11 (lösemi) üzerinde 0,32 μM'lik EC₅₀ değerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Daha önceden FLT3 inhibisyonu ile ilişkilendirilmeyen Bileşik 32, umut vaat eden aktivite profili ile araştırmacıları ileri yapı-etki ilişkilerini incelemeye yönlendirmiştir.



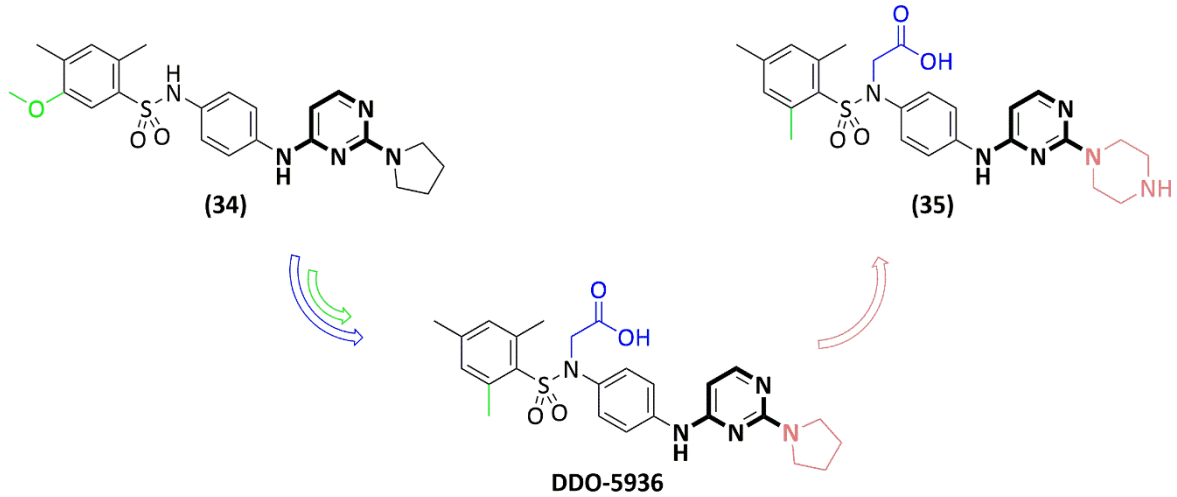
Şekil 2.29. FLT3 inhibitörü olarak Bileşik 32’den hareketle Bileşik 33’ün geliştirilmesi

Yapı-aktivite ilişkileri açısından; molekül üzerindeki pirimidin halkasının piridin izosteri ile değiştirilmesi ile yaşanan aktivite kaybı, her iki pirimidin azot atomunun da inhibitör aktivite için gerekli olduğunu göstermiştir. Sonrasında pirimidin halkasının ikinci ve dördüncü konumdaki azot köprüleri eter köprüsü olacak şekilde türevler hazırlanmış ve enzimatik aktivitede olumlu bir iyileşme gözlemlenmemiştir. Bu veriler, araştırmacıların sentezleyecekleri yeni türevlerde 2,4-diamino pirimidin yapısını mutlaka korunması gerektiği sonucunu ortaya çıkarmıştır. Sonrasında izlenilen yolda; aminopirimidin iskeletini çevreleyen asılı hidrofobik grupların yapısal önemleri araştırılmış ve dördüncü konumdaki sikloheksil sübstitüenti sabitken, ikinci konumdaki grupların sübstitüe bifenil yapılarıyla değiştirilmesi de olumlu sonuçlar vermemiştir. En son fizikokimyasal özellikleri iyileştirme adına sikloheksil halkası, kısa düz zincirli amin yapıları ve siklik alifatik gruplarla değiştirilmiş, Bileşik 32’den yaklaşık on üç kat daha etkili ve FLT3’e karşı yirmi kat daha seçici Bileşik 33’e ulaşılmıştır.

Hücre içerisindeki hayati olayların düzenlenmesinden sorumlu sinyal yollarında çok sayıda hücre içi protein önemli rol oynamaktadır. Bu hücre içi proteinlerden biri olan moleküler ısı şoku proteini (HSP90) kanser hücrelerinin de büyümesinde ve çoğalmasında temel efektörlerden biri olarak son on yılda umut verici bir antikanser hedefi olarak kabul edilmektedir. Fakat klinik çalışmalara giren ve doğrudan HSP90 inhibisyonu yapan birkaç küçük molekül, göstermiş olduğu toksisiteler ve sınırlı etkinliklerinden piyasaya girmek için geliştirilmeye ihtiyaç duymaktadır. Bu noktada araştırmacılar HSP90’ın, protein-protein etkileşimi yoluyla birlikte çalıştığı eş-şaperonlar üzerinden inhibisyonuna yönelmiştir. Bu şaşaperonlar arasında üzerine çalışılan Cdc37 proteini, çeşitli kanser durumları ile

ilişkilendirilmiş ve HSP90-Cdc37 protein-protein inhibisyonu ile daha güvenli ve seçici bir kanser tedavi stratejisi gündeme gelmiştir [114].

Bu doğrultuda Jiang ve araştırma grubu tarafından 2019 yılında yapılan çalışma Bileşik 34'ün keşfi ile sonuçlanmıştır (Bileşik 34 için, $K_d(\text{HSP90}) = 21,1 \mu\text{M}$). Ortalama bir bağlanma afinite değerine sahip Bileşik 34 üzerinde fizikokimyasal özelliklerini iyileştirmek adına yapılan sentetik yaklaşımlar ardından Bileşik 34'ten daha iyi bağlanma afinitesine sahip ve insan HCT-116 kanser hücre hattı üzerinde kabul edilebilir derecede inhibisyon gösteren DDO-5936 bileşiğine ulaşılmıştır (DDO-5936 için; $K_d = 3,86 \mu\text{M}$, $\text{IC}_{50}(\text{HCT-116}) = 10,24 \mu\text{M}$) [114].



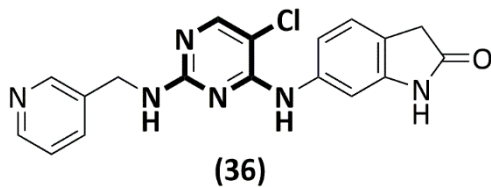
Şekil 2.30. HSP90-Cdc37 protein-protein etkileşimi inhibisyonu gerçekleştiren bileşikler

Peşi sıra 2020 yılında yayınlanan başka bir çalışmalarında ise; DDO-5936 üzerinde yapılan ikinci bir yapı-aktivite çalışması başarı ile sonuçlanmış ve sentezlenen analoglar arasından Bileşik 35 ile bağlanma afinitesinde ve hücresel inhibisyon potensinde neredeyse 10 kat iyileşme yakalanmıştır (Bileşik 33 için; $K_d = 0,5 \mu\text{M}$, $\text{IC}_{50}(\text{HCT-116}) = 1,73 \mu\text{M}$) [115].

B hücreli lenfoma 6 (BCL6), çok çeşitli hücresel fonksiyonlara katılan çok yönlü bir protein-protein etkileşim motifi olan BTB/POZ protein ailesine ait, yaygın büyük B hücreli lenfositlerin farklılaşması ve proliferasyonunda da rol oynayan transkripsiyonel bir

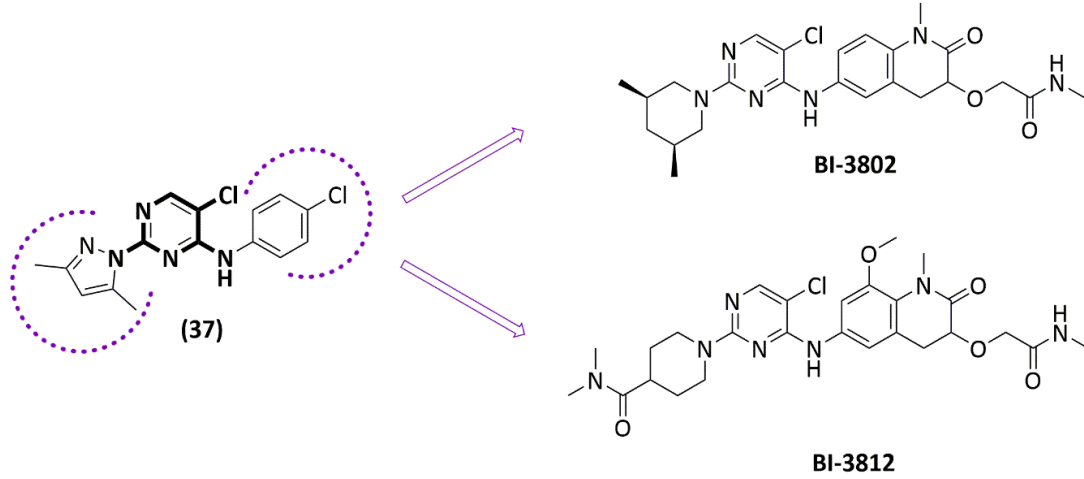
faktördür. Bu nedendir ki otoimmün hastalıkların ve kanserin tedavisinde etkili bir terapötik hedef olduğu düşünülmektedir [116].

Takeda tarafından 2017 yılında fragman temelli ilaç keşfi (FBDD) metodu ve bileşik kütüphaneleri taramaları elde ettikleri sonuç bileşiklerin hibridizasyonu yaklaşımı ile yürütülen BCL6 protein-protein etkileşim inhibitörü elde etme çalışmaları, 2,4-diaminopirimidin iskeletine sahip Bileşik 36'nın keşfi ile sonuç vermiştir [116]. Bileşik 36, kabul edilebilir değerlerde BCL6 bağlanma afinitesi ve protein-protein etkileşimi (PPI) göstermiştir (Bileşik 36 için; $K_d = 0,078 \mu\text{M}$, $\text{IC}_{50}(\text{PPI}) = 0,48 \mu\text{M}$ (ELISA), hücresel $\text{IC}_{50}(\text{PPI}) = 8,6 \mu\text{M}$).



Şekil 2.31. BCL6 inhibitörü Bileşik 36

Aynı yıl yürütülen bir başka çalışmada ise Kerres ve arkadaşları, lenfoma tedavisinde umut verici BCL6 proteininin yapısını genotoksik stres oluşumu vasıtasıyla bozarak, bu proteinin inhibisyonu ile sağlanacak biyolojik etkiden daha güçlü bir antiproliferatif aktivite elde etmek üzerine yoğunlaşmışlardır [117]. Araştırmacılar, sanal kütüphane taramaları gerçekleştirmiş, BCL6 proteininin BTB bölgesi ile etkileşebilecek 202 aktif bileşik üzerinde farklı mekanistik testler ile yapılan elemelerin ardından başlangıç noktası olacak Bileşik 37'ye ulaşmıştır.



Şekil 2.32. Bileşik 37'den hareketle BI-3802 ve BI-3812'nin geliştirilmesi

Bileşik 37 üzerinde gerçekleştirilen yapı temelli moleküler modelleme çalışmaları ardından, yapı-etki ilişkileri, sentezlenen analoglar üzerinden incelenmiş ve nanomolar seviyede inhibitör aktivite gösteren (IC_{50} değerleri < 3 nM) bileşikler BI-3812 ve BI-3802 elde edilmiştir. Ayrıca gerçekleştirilen ileri biyolojik çalışmalar sonucu BI-3802'in $5 \mu M$ konsantrasyonda, insan kanser hücre hattı SU-DHL-4 (lenfoma) üzerinde % 80 oranında BCL6 degradasyonu ile antiproliferatif etki oluşturduğunun tespiti yapılmıştır.

Bu kısma kadar ele alınan literatür verileri doğrultusunda, 2,4-diaminopirimidin yapısı; başta kinaz enzimleri olmak üzere, geniş yelpazede biyolojik hedef üzerinde antikanser etki potansiyeli gösteren bileşiklerin yapısında sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Sonuç olarak; ilaç geliştirme çabalarında olası etkinlik profili ile araştırmacıların dikkatini çeken bu kimyasal motif, bu tez kapsamında sentezlenen bileşiklerin de temel farmakofor grubunu oluşturmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kimyasal Çalışmalar

3.1.1. Gereçler

Sentez çalışmalarında kullanılan çözücüler analitik saflıktadır. Kullanılan kimyasallar Sigma-Aldrich& Merck (Almanya), ABCR (Almanya), Enamine (Ukrayna) ve Manchester Organics (İngiltere)'den temin edildi.

İnce tabaka kromatografisi (İTK) ile yapılan kontroller

Bileşiklerin kimyasal sentez çalışmalarında ve saflık kontrollerinde Silikajel GF254 (Merck) hazır plaklar kullanıldı. Çözücü sistemi olarak; hekzan:etil asetat (60:40; 80:20), diklorometan:etil asetat (60:40; 80:20), diklorometan:izopropanol (94:6) ve diklorometan:metanol (96:4) tercih edildi. Lekelerin belirlenmesinde 254 ve 280 nm dalga boylarındaki ultraviyole (UV) ışığından, ninhidrin ve dragendorff belirteçlerinden yararlanıldı.

Flash kromatografi

Sentezlenen bileşiklerin saflaştırma işlemleri UV dedektörü bulunan Teledyne ISCO Combiflash® Otomatik Flash Kromatografi Sistemi ve Buchi Reveleris® PREP Otomatik Flash Kromatografi Sistemi kullanılarak yapıldı. Sabit faz olarak RediSep® Rf ve RediSep Rf Gold® silika kolonları (12 g, 24 g ve 40 g), hareketli faz olarak hekzan:etil asetat, diklorometan:etil asetat, diklorometan:izopropanol veya diklorometan:metanol gradient çözücü sistemleri kullanıldı.

Preparatif HPLC sistemi

Bazı sentezlenen bileşiklerde ise saflaştırma sistemi olarak Buchi Reveleris® PREP Otomatik Preparatif HPLC Sistemi ve Interchim puriFlash®4250 Otomatik Preparatif LC Sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Sabit faz olarak Buchi US15C18HQ-250/212-C18 silika kolonu, hareketli faz olarak su: asetonytril (40:60) gradient çözücü sistemi kullanıldı.

3.1.2. Genel Sentez Yöntemleri

Yöntem 1: Ester türevi bileşiklerin genel sentez yöntemleri (Bileşik 1a, Bileşik 1f-l, Bileşik 1n-p, Bileşik 1r-v, Bileşik 1x-z, Bileşik 35)

Yöntem 1a: İlgili karboksilik asit türevinin (15 mmol) susuz etanol veya metanol içindeki çözeltisi üzerine tiyonil klorür (34 mmol) oda sıcaklığında eklendi. 4 saat boyunca geri çeviren soğutucu altında ısıtıldı. Süre sonunda reaksiyon ortamı vakum altında uçuruldu. Bileşik 1k için elde edilen ham ürün hekzan:etil asetat (95:5) solvan sistemi kullanılarak otomatik flash kromatografi sistemi ile saflaştırıldı. Diğer bileşikler herhangi bir saflaştırma işlemine tabi tutulmadan bir sonraki basamakta kullanıldı (Bileşik 1a, 1f-j, 1l, 1n-p, 1t-v, 1x-z, Bileşik 35).

Yöntem 1b: İlgili karboksilik asit türevleri (6,5 mmol), 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) karbodiimit (EDCI) (6,5 mmol), 4-dimetilaminopiridin (DMAP) (3,25 mmol) ve susuz etanol (16,25 mmol), diklorometan içinde bir gece boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Süre sonunda reaksiyon ortamına su eklendi ve diklorometan (3x20 ml) ile ekstre edildi, organik faz doymuş sulu sodyum klorür çözeltisi (2x10 ml) ile yıkandı. Susuz sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra uçuruldu. Ham ürün diklorometan:etil asetat (80:20) solvan sistemi kullanılarak saflaştırıldı (Bileşik 1r,s).

Yöntem 2: Fenaçil bromür türevi Bileşik 30'un elde edilmesinde kullanılan sentez yöntemi

2-Floro-4-metoksiasetofenonun (3,52 mmol) asetonitril içindeki çözeltisi üzerine tetrabütilamonyum tribromür (TBABr₃) (3,59 mmol) eklenerek gece boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Süre sonunda reaksiyon ortamında bulunan solvan düşük basınç altında uçuruldu ve balon içeriği sulu sodyum metabisülfat (Na₂S₂O₅) çözeltisi içine alındı. Elde edilen katı vakum altında su ile yıkanarak süzüldü ve kurumaya bırakıldı. Ardından herhangi bir saflaştırma işlemine tabi tutulmadan bir sonraki basamakta kullanıldı (Bileşik 30).

Yöntem 3: β -Ketonitril türevi bileşiklerin genel sentez yöntemleri (Bileşik 2a-c, Bileşik 2e-z Bileşik 31, Bileşik 36)

Yöntem 3a: Yöntem 1 ile sentezlenmiş veya hazır alınmış ilgili etil esteri türevi bileşik (9 mmol) ve sodyum hidrür (NaH) (27 mmol), toluen içerisinde çözöldü. Ardından reaksiyon ortamına asetonitril (45 mmol) ilave edilerek 2 saat azot atmosferinde ve geri çeviren soğutucu altında ısıtıldı. Süre sonunda oluşan tuz, petrol eteri ile yıkanarak vakum altında süzöldü. Elde edilen tuz, su içine alınarak derişik hidroklorik asit çözöltisi ile asitlendirildi. Oluşan çökelek, süzöldükten sonra sulu sodyum bikarbonat çözöltisiyle yıkanarak tekrar vakum altında süzöldü ve kurutuldu (Bileşik 2a-c, 2e-z).

Yöntem 3b: Yöntem 2 ile sentezlenmiş Bileşik 30'un (2,95 mmol) etanol içerisindeki çözöltisi üzerine potasyum siyanürün (KCN) (5,90 mmol) sulu çözöltisi damla damla ilave edildi (Kullanılan solvan miktarları; Bileşik 30'un reaksiyon ortamındaki konsantrasyonu 0,2 M ve EtOH:H₂O oranı 3:2 olacak şekilde ayarlandı). Reaksiyon 4 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Süre sonunda reaksiyon ortamına su eklendi ve derişik HCl çözöltisi ile asitlendirildi. Oluşan çökelek su ile yıkanarak vakum altında süzöldü ve kurutuldu. Elde edilen ham ürün hekzan:etil asetat (70:30) solvan sistemi kullanılarak saflaştırıldı (Bileşik 31).

Yöntem 3c: Kuru ortam koşullarında -78 °C'de asetonitrilin (25 mmol) kuru toluen içerisindeki çözöltisi üzerine damla damla *n*-bütilityum (*n*-BuLi) (25 mmol) ilave edilip 1 saat karıştırıldı. Ardından ilgili metil etil esteri türevi Bileşik 36, kuru toluen içerisinde çözölererek (2,5 mmol) eklendi ve reaksiyon ortamı oda sıcaklığına getirilerek gece boyu karışmaya bırakıldı. Süre sonunda reaksiyon ortamı 2N HCl ile asitlendirildi ve etil asetat (3x20 ml) ile ekstre edildi, organik faz doymuş sulu sodyum klorür çözöltisi (2x10 ml) ile yıkandı. Susuz sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra uçuruldu. Elde edilen ham ürün hekzan:etil asetat (70:30) solvan sistemi kullanılarak saflaştırıldı (Bileşik 36).

Yöntem 4: Halka kapama reaksiyonu sonucu elde edilen izoksazol amin türevi bileşiklerin genel sentez yöntemleri (Bileşik 3a-z, Bileşik 32, Bileşik 37)

Yöntem 4a: Yöntem 3a ile sentezlenmiş veya satın alınmış ilgili β -ketonitril türevi (2,85 mmol), su içinde çözülerek üzerine hidroksilamin hidroklorür ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) (2,99 mmol) ve sodyum hidroksit (NaOH) (5,84 mmol) eklendi. Reaksiyon, azot atmosferinde ve geri çeviren soğutucu altında başlangıç maddesi tükenene kadar ısıtıldı. Süre sonunda reaksiyon ortamına su ilave edilerek etil asetat (3x20 ml) ile ekstre edildi, organik faz doymuş sulu sodyum klorür çözeltisi (2x10 ml) ile yıkandı. Susuz sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra kuruluğa kadar vakum altında uçuruldu. Elde edilen ham ürün hekzan:etil asetat (60:40) veya diklorometan:etil asetat (80:20) solvan sistemleri kullanılarak otomatik flash kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı (Bileşik 3a-z).

Yöntem 4b: $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (3,24 mmol) ve sodyum asetat (NaOAc) (3,24 mmol) metanol içerisinde çözülerek 1 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Ardından sentezlenmiş ilgili β -ketonitril türevi reaksiyon ortamına eklenerek oda sıcaklığında gece boyunca karışmaya devam edildi. Süre sonunda metanol vakum altında uçuruldu. Oluşan ham katı üzerine su ilave edilerek etil asetat ile (3x20 ml) ile ekstre edildi. Organik faz doymuş sulu sodyum klorür çözeltisi (2x10 ml) ile yıkandı ve susuz sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra kuruluğa kadar vakum altında uçuruldu. Elde edilen ham ürün diklorometan:etil asetat (80:20) solvan sistemi kullanılarak otomatik flash kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı (Bileşik 32, 37).

Yöntem 5: Pirimidin yapısı taşıyan izoksazol amin türevi ara başlangıç maddelerinin genel sentez yöntemleri (Bileşik 4a-z, Bileşik 33, Bileşik 38, Bileşik 61-62, Bileşik 71-73)

Yöntem 5a: Yöntem 4 ile sentezlenmiş ilgili izoksazol amin türevi (0,96 mmol), tersiyer bütanol içerisine alındıktan sonra üzerine potasyum tersiyer bütoksit ($t\text{-BuOK}$) (2,4 mmol) eklenerek 40°C 'de 1 saat boyunca karıştırıldı. Sonrasında ilgili 2-kloropirimidin türevi bileşik (1,44 mmol) eklendi ve gece boyunca karışmaya bırakıldı. Süre sonunda reaksiyon içeriği amonyum klorürün sulu çözeltisine alındı ve etil asetat (3x40 ml) ile ekstre edildi, organik faz doymuş sulu sodyum klorür çözeltisi (2x10 ml) ile yıkandı. Susuz sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra kuruluğa kadar vakum altında uçuruldu ve elde edilen ham ürün diklorometan:etil asetat (60:40) solvan sistemi kullanılarak otomatik flash kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı (Bileşik 4a-z, Bileşik 33, 38, 71-73).

Yöntem 5b: Bileşik 4a (1,05 mmol) *N,N*-dimetilasetamit içerisinde alındıktan sonra üzerine NaH (3,15 mmol) eklenerek oda sıcaklığında 1 saat boyunca karıştırıldı. Sonrasında 4-kloro-2-(metiltiyo)-pirimidin (1,05 mmol) eklendi ve gece boyunca karıştırılmaya devam edildi. Süre sonunda reaksiyon içeriği suya alındı. Çöken katı su ile yıkanarak vakum altında süzüldü ve kurumaya bırakıldı. Elde edilen ham ürün su:asetonitril (30:70) solvan sistemi kullanılarak otomatik preparatif kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı (Bileşik 61).

Yöntem 5c: Yöntem 5b ile sentezlenmiş Bileşik 61 (0,5 mmol) ve *meta*-kloroperbenzoik asit *m*-CPBA (0,5 mmol); diklorometan:*N,N*-dimetilformamit (5:1) solvan sistemi içerisinde alınarak oda sıcaklığında gece boyunca karıştırıldı. Süre sonunda reaksiyon içeriği sulu sodyum sülfite çözeltisine alındı. Oluşan çökelek su ile yıkanarak vakum altında süzüldü ve kurumaya bırakıldı. Elde edilen ham ürün su:asetonitril (30:70) solvan sistemi kullanılarak otomatik preparatif kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı (Bileşik 62).

Yöntem 6: 2,4-Diaminopirimidin yapısı taşıyan final bileşiklerin genel sentez yöntemleri (Bileşik 5-29, Bileşik 34, Bileşik 39, Bileşik 41-57, Bileşik 59, Bileşik 63-67, Bileşik 74-76, Bileşik 81-89)

Yöntem 6a: Yöntem 4 ile elde edilen ve pirimidin yapısı taşıyan ara başlangıç maddesi (0,35 mmol), *n*-bütanol içerisinde çözüldükten sonra ilgili amin türevi bileşik (1,05 mmol) eklendi. Reaksiyon azot atmosferinde, geri çeviren soğutucu altında 3 saat ısıtıldıktan sonra, içerik suya boşaltıldı. Oluşan çökelek su ile yıkanarak vakum altında süzüldü ve kurutuldu. Daha sonra elde edilen ham ürün diklorometan:etil asetat (60:40) veya diklorometan:metanol (96:4) solvan sistemi kullanılarak otomatik flash kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı (Bileşik 5-29, 34, 39, 41, 42, 49-57, 59, 84-89).

Yöntem 6b: Hidroklorür tuzu olarak satın alınan ilgili amin türevi bileşik (0,71 mmol) *n*-bütanol içinde çözüldü. Üzerine *N,N*-diizopropiletilamin (DIPEA) (0,81 mmol) eklendikten sonra 60 °C'de 1 saat boyunca karıştırılarak tuzundan kurtarıldı. Süre sonunda reaksiyona yöntem 4 ile elde edilen ve pirimidin yapısı taşıyan ara başlangıç maddesi (0,33 mmol) ilave edilerek azot atmosferinde, geri çeviren soğutucu altında bir gece boyunca ısıtıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra, ortam su içine alındığında oluşan çökelek vakum altında

süzülerek kurutuldu. Ham ürün, diklorometan:etil asetat (60:40), diklorometan:izopropanol (94:6) veya diklorometan:metanol (96:4) solvan sistemi kullanılarak otomatik flash kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı (Bileşik 43-48, 74-76, 81-83).

Yöntem 6c: Bileşik 62 (0,15 mmol) ve ilgili primer amin türevi bileşik (0,15 mmol) N-metilpirolidon (NMP) içinde çözöldü. Reaksiyon, ağzı kapalı tüp içerisinde 100 °C'lik yağ banyosunda başlangıç maddesi tükenene kadar ısıtıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra, ortam su içine alındı ve oluşan çökelek vakum altında süzölerek kurutuldu. Ham ürün, diklorometan:metanol (94:6) solvan sistemi kullanılarak otomatik flash kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı (Bileşik 63-65).

Yöntem 6d: Bileşik 62 (0,17 mmol) ve etanolamin (2,04 mmol) dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözöldü. Reaksiyon, oda sıcaklığında 96 saat boyunca karıştırıldı. Süre sonunda, ortam su içine alındı ve oluşan çökelek vakum altında süzölerek kurutuldu. Ham ürün, diklorometan:metanol (90:10) solvan sistemi kullanılarak otomatik flash kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı (Bileşik 66).

Yöntem 6e: Bileşik 62 (0,30 mmol), trietilamin (TEA) (0,90 mmol) ve metilamin (1,80 mmol) etanol içinde çözöldü. Reaksiyon, ağzı kapalı tüp içerisinde ve 100 °C'lik yağ banyosunda 4 saat karıştırıldı. Süre sonunda, etanol vakum altında uçuruldu. Elde edilen ham ürün, önce diklorometan:metanol (90:10) solvan sistemi kullanılarak otomatik flash kromatografi yöntemi ile, sonrasında ise su:asetonitril (30:70) solvan sistemi kullanılarak otomatik preparatif kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı (Bileşik 67).

Yöntem 7: 4-(4-kloro-1,3,5-triazin-2-il)morfolin ara bileşiğinin elde edilmesinde kullanılan sentez yöntemi (Bileşik 69)

2,4-Dikloro-1,3,5-triazinin (1,33 mmol) tetrahidrofuran (THF) içerisindeki çözeltisi üzerine morfolin (1,73 mmol) damla damla eklendi ve oda sıcaklığında karışmaya bırakıldı. 3 saat sonunda reaksiyon ortamı suya alınarak sodyum bikarbonat ile nötralize edildi ve etil asetat (3x25 ml) ile ekstre edildi, organik faz doymuş sulu sodyum klorür çözeltisi (2x10 ml) ile

yıkandı. Susuz sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra kuruluğa kadar vakum altında uçuruldu ve elde edilen ham ürün hekzan:etil asetat (60:40) solvan sistemi kullanılarak otomatik flash kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı.

Yöntem 8: 2,4-Diaminopirimidin yapısı yerine 2,4-diaminopiridin ve 2,4-diaminotriazin taşıyan final bileşiklerin sentez yöntemleri (Bileşik 68 ve Bileşik 70)

Yöntem 8a: Bileşik 3a (0,53 mmol) ve 4-bromo-2-morfolinopiridin (0,53 mmol) metil-THF içerisinde çözülerek azot altında 15 dakika boyunca degaze edildikten sonra üzerine sodyum tersiyer bütoksit (*t*-BuONa) (0,58 mmol) ve Pd(XantPhos)Cl₂ (0,0053 mmol) eklenerek 15 dakika daha degaze edildi ve gece boyunca ağzı kapatılmış tüpte, 75 °C'lik yağ banyosunda karıştırıldı. Süre sonunda reaksiyon içeriği balona alındı ve metil-THF düşük basınç altında uçurularak elde edilen katı suya alındı. Ardından diklorometan (3x25 ml) ile ekstre edildi ve organik faz doymuş sulu sodyum klorür çözeltisi (2x10) ile yıkandı. Susuz sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra kuruluğa kadar uçuruldu. Ham ürün, diklorometan:etil asetat (60:40) solvan sistemi kullanılarak otomatik flash kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı (Bileşik 68).

Yöntem 8b: Bileşik 3a (1,18 mmol) tersiyer bütanol içerisine alındıktan sonra üzerine *t*-BuOK (2,93 mmol) eklenerek 40 °C'de 1 saat boyunca karıştırıldı. Sonrasında Bileşik 69 (1,77 mmol) eklendi ve 72 saat boyunca karışmaya bırakıldı. Süre sonunda reaksiyon içeriği amonyum klorürün sulu çözeltisine alındı ve etil asetat (3x40 ml) ile ekstre edildi, organik faz doymuş sulu sodyum klorür çözeltisi (2x10 ml) ile yıkandı. Susuz sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra kuruluğa kadar vakum altında uçuruldu ve elde edilen ham ürün diklorometan:etil asetat (60:40) solvan sistemi kullanılarak otomatik flash kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı (Bileşik 70).

Yöntem 9: Bileşik 4a'nın taşıdığı metoksi grubunun hidrolizi için kullanılan sentez yöntemi (Bileşik 40)

N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4a; 0,44 mmol), azot atmosferi altında diklorometan içerisinde çözüldü. Buz banyosunda karıştırılırken, bor

tribromür (BBr_3) (1,32 mmol) ilave edildi ve gece boyu karışmaya bırakıldı. Süre sonunda reaksiyon ortamına 1,5 ml metanol ilave edilerek BBr_3 'ün fazlası etkisiz hale getirildi. Reaksiyon ortamı suya boşaltıldı ve oluşan çökelek vakum altında süzülüp, kurutuldu. Elde edilen ham ürün, su:asetonitril (40:60) solvan sistemi kullanılarak otomatik preparatif kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı.

Yöntem 10: Koruyucu tersiyer bütoksi karbonil (Boc) grubunun hidrolizinde kullanılan sentez yöntemi (Bileşik 58)

Tersiyer bütıl 4-(4-((3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-il)amino)pirimidin-2-il)piperazin-1-karboksilat bileşiğı (0,32 mmol), diklorometan içerisinde çözülerek üzerine 1 ml trifloroasetik asit eklendikten sonra oda sıcaklığında karışmaya bırakıldı. 1 saat sonunda reaksiyon ortamındaki solvan vakum altında uzaklaştırılıp, eter ilave edildi. Sonuçta oluşan tuz suya alındı ve 2N sodyum hidroksit çözeltisi ile ortamın pH' si bazik değerlere getirildi. Daha sonra diklorometan (3x25 ml) ile ekstre edildi, organik faz doymuş sulu sodyum klorür çözeltisi (2x10) ile yıkandı. Susuz sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra kuruluğa kadar uçuruldu. Ham ürün, su:asetonitril (40:60) solvan sistemi kullanılarak otomatik preparatif kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı.

Yöntem 11: Bileşik 59'un taşıdığı etil esteri grubunun hidrolizinde kullanılan sentez yöntemi (Bileşik 60)

Etil 1-(4-((3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-il)amino)pirimidin-2-il)piperidin-4-karboksilat (Bileşik 59, 0,11 mmol), tetrahidrofuran:su (1:1) karışımında çözöldü. Lityum hidroksit monohidrat ($\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$) ilave edildikten sonra geri çeviren soğutucu altında 5 saat boyunca ısıtıldı. Süre sonunda reaksiyon ortamından tetrahidrofuran uçurulup su eklendi ve derişik hidroklorik asit çözeltisi eklenerek pH değeri 5 oluncaya kadar asitlendirildi. Oluşan çökelek su ile yıkanarak süzöldü. Ham ürün, su:asetonitril (40:60) solvan sistemi kullanılarak otomatik preparatif kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı.

Yöntem 12: Öncü bileşik BO-264'ün ara zincir azotu sübstütüsyonunda kullanılan genel sentez yöntemleri (Bileşik 77-80)

Yöntem 12a: 3-(4-Metoksifenil)-*N*-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (BO-264; 0,28 mmol), azot atmosferi altında *N,N*-Dimetilformamit (DMF) içerisinde çözülerek, sezyum karbonat (Cs_2CO_3) (0,56 mmol) eklendi. 1 saat oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra iyodometan (CH_3I) (0,42 mmol) ilave edilerek 2 saat daha reaksiyona devam edildi. Süre sonunda reaksiyon içeriği suya boşaltıldı. Oluşan çökelek su ile yıkanarak vakum altında süzüldü ve kurutuldu. Ham ürün, diklorometan:etil asetat (60:40) solvan sistemi kullanılarak otomatik flash kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı (Bileşik 77).

Yöntem 12b: 3-(4-Metoksifenil)-*N*-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (BO-264; 0,28 mmol) DMF içerisinde çözülerek üzerine NaH (1,40 mmol) eklendi. 1 saat oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra NaH (1,85 mmol) ile DMF içerisinde nötralize edilen ilgili kloroetil amonyum tuzu (0,62 mmol) ilave edilip gece boyunca reaksiyona devam edildi. Süre sonunda reaksiyon içeriği suya boşaltıldı. Ardından etil asetat (3x30 ml) ile ekstre edildi, organik faz doymuş sulu sodyum klorür çözeltisi (2x10) ile yıkandı. Susuz sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra kuruluğa kadar uçuruldu. Ham ürün, diklorometan:metanol (90:10) solvan sistemi kullanılarak otomatik flash kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı (Bileşik 78,79).

Yöntem 12c: 3-(4-Metoksifenil)-*N*-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (BO-264; 0,28 mmol) DMF içerisinde çözülerek üzerine NaH (0,70 mmol) eklendi. 1 saat oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra kloroasetonitril (1,26 mmol) ilave edilip 40 °C'de 72 saat boyunca ısıtıldı. Süre sonunda reaksiyon içeriği suya boşaltıldı. Oluşan çökelek su ile yıkanarak vakum altında süzüldü ve kurutuldu. Ham ürün, diklorometan:metanol (96:4) solvan sistemi kullanılarak otomatik flash kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı (Bileşik 80).

3.2. Analitik Çalışmalar

3.2.1. Erime derecesi tayini

Bileşiklerin erime dereceleri, Stuart SMP50 dijital erime derecesi cihazıyla tayin edildi ve değerler düzeltilmeden verildi.

3.2.2. ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

Sentezlenen final ürünlerin proton ve karbon nükleer manyetik rezonans (^1H -NMR ve ^{13}C -NMR) spektrumları DMSO- d_6 çözeltisi içinde, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda iç standart olarak kullanılan tetrametilsilan ile Varian Mercury 400 Digital FT-NMR Spektrometresinde ^1H -NMR için 400 MHz, ^{13}C -NMR spektrumu için 100 MHz ve Bruker AvanceNeo 500 MHz NMR Spektrometresinde ^1H -NMR için 500 MHz, ^{13}C -NMR spektrumu için 125 MHz frekansta çekildi.

Sentezlenen ara ürünlerin ^1H -NMR spektrumları ise; DMSO- d_6 çözeltisi içinde Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Merkez Laboratuvarı'nda iç standart olarak kullanılan tetrametilsilan ile Bruker Ultrashield 300 MHz Sıvı NMR Spektrometresi'nde 300 MHz, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda iç standart olarak kullanılan tetrametilsilan ile Varian Mercury 400 Digital FT-NMR Spektrometresinde ^1H -NMR için 400 MHz ve Bruker AvanceNeo 500 MHz NMR Spektrometresinde ise ^1H -NMR için 500 MHz frekansta çekildi.

Kimyasal kayma değerleri ppm (δ) olarak ifade edildi. Eşleşme sabitleri ise Hertz (Hz) olarak verildi.

3.2.3. HRMS spektrumları

Sentezlenen bileşiklerin yüksek çözünürlüklü kütle spektroskopisi (HRMS) spektrumları metanol içerisindeki çözeltilerinden pozitif iyon (ESI+) ve negatif iyon (ESI-) elektrosprey iyonizasyon teknikleri ile Waters LCT Premier XE UPLC/MS-TOF sistemi ile MassLynx 4.1

yazılımı ve Agilent Technologies 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS sistemi kullanılarak alındı. UPLC/MS-TOF sisteminde; sabit faz olarak Aquitiy BEH C18 kolon (2,1*100 mm 1,7 μ M, akış hızı 0,25 ml/dakika), hareketli faz olarak formik asit içeren (% 0,1) CH₃CN:H₂O (% 1-% 90) gradient çözücü sistemi kullanılırken, Q-TOF LC/MS analizlerinde Aquitiy BEH C18 kolon (2,1*50 mm 1,7 μ M, akış hızı 0,40 ml/dakika), hareketli faz olarak formik asit içeren (% 0,1) MeOH:H₂O (% 1-% 90) gradient çözücü sistemi kullanılmıştır.

3.3. Biyolojik Çalışmalar

Sentezlenen bileşiklerin biyolojik aktivite çalışmaları Bilkent Üniversitesi'nde Doç. Dr. Özgür ŞAHİN danışmanlığındaki Özge AKBULUT tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. Hücre kültürü

JIMT-1, HCT-116, HT-29 ve RKO hücre hatları; haftada 2-3 defa pasajlanmak üzere % 5 CO₂ ve 37 °C sıcaklık ortamında 100 mm'lik petri kaplarında çoğaltılmıştır. JIMT-1 ve RKO hücreleri %10 FBS (Fetal Bovine Serum), % 1 NEAA (Non-Essential Amino Acids) ve % 1 Penisilin/Streptomisin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besiyerinde; HCT-116 ve HT-29 hücreleri % 10 FBS, % 1 NEAA, % 1 Penisilin/Streptomisin, içeren McCoy's 5A Modified Medium besiyerinde büyütülmüştür.

3.3.2. Hücre canlılığı deneyleri

Hücre canlılığı deneyleri için; 96-kuyucuklu plakalara her grupta üçer tekrar olacak şekilde kuyucuk başına JIMT-1 hücre hattı için 3 000 hücre; HCT-116 ve HT-29 hücre hattı için 4 000 hücre ve RKO hücre hattı için 5 000 hücre ekilmiştir. Ekimden 24 saat sonra hücrelere, test edilmek istenen bileşik veya inhibitör 0,01; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 1; 5; 10 ve 100 µM konsantrasyonlarda verilmiş ve uygulamadan 72 saat sonra Sülföradamin B (SRB) testi kullanılarak hücre canlılığı ölçümü yapılmıştır. Hücreler önce % 25 trikloroasetik asit (TCA) ile + 4°C de 1 saat fikse edilmiş, sonrasında 5 kere ddH₂O ile yıkanmıştır. Daha sonra hücreler SRB ile 30 dakika boyunca oda sıcaklığında boyanmış ve fazla olan boya % 1 asetik asit ile yıkanmıştır. Canlı hücrelere bağlanan boyayı çözmek için; hücreler 10 mM Tris bazı ile 15 dakika inkübe edildikten sonra 554 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Bileşik uygulanan kuyucuklardan alınan sinyaller, kontrol grubundan alınan sinyallere göre normalleştirilerek hesaplanmıştır. Çalışmada kontrol grubu olarak DMSO kullanılmıştır.

3.3.3. Hedef duyarlı bileşik afinite testleri (DARTS)

HCT-116 hücreleri % 70-80 konfluansa gelene kadar büyütölüp DARTS liziz tamponu kullanılarak parçalanmıştır. Hücre lizatı-etken bileşik karışımları, bağlanmaya izin vermek için 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Her numune; 2 µl 8 ng/µl'lık pronaz çözeltisi veya sadece tampon çözeltisi ile karıştırılıp oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Protein sindirimi, 2 µl proteaz inhibitörü eklenerek ve 10 dakika buz üzerinde bekletilerek durdurulmuştur. Sonrasında lizatlar 8 µl 4X SDS tamponu ile karıştırılıp 70 °C'de 10 dakika ısıtılmıştır. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamit Jel Elektroferez), anti-TACC3 ve anti-CDK4 antikoru ile birlikte negatif kontrol olarak kullanıldı.

3.3.4. Western blot analizi

Protein örneklerinin konsantrasyonu ve yükleme miktarları, 4X protein yükleme boyası ve RIPA çözeltisi kullanılarak dengelenmiştir. Ardından örnekler 95 °C'de 3-5 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Poliakrilamit bazlı stacking ve resolving jelleri hazırlandıktan sonra kuyucuk başına 10-20 µg protein örneği yüklenmiştir. Daha sonra, proteinler PVDF membranına blot edilip, transfer işlemi tamamlandıktan sonra PVDF (Poliviniliden flüorür) membranı Ponceau S solüsyonu ile boyanmış ve istenilen proteinler moleküler ağırlık belirteçlerine göre kesilmiştir. Kesilen membranların bloklama işlemi, % 5 (kütle/hacim) süt:TBS-T (Tris-buffered saline-Tween 20) veya % 5 (kütle/hacim) BSA:TBS-T solüsyonlarında oda sıcaklığında 1 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Ardından membranlar primer antikorlar kullanılarak oda sıcaklığında 1 saat veya gece boyunca +4 °C'de inkübe edilmiştir. Primer antikor inkübasyonundan sonra membranlar 1X TBS-T ile yıkanmış ve ardından sekonder antikorlar kullanılarak oda sıcaklığında 1 saat veya gece boyunca +4 °C'de inkübe edilmiştir. Daha sonrasında membranlar tekrardan 1X TBS-T ile yıkanmıştır. Enhanced chemiluminescence (ECL) solüsyonu membranlara uygulanıp, protein seviyelerini temsil eden sinyaller, Amersham görüntüleyici ile elde edilmiştir.

3.4. İn Vitro ADME ve Biyoyararlanım Çalışmaları

3.4.1. Öncü bileşik BO-264 ve BO-264 türevi bileşiklerin *in vitro* ADME çalışmaları

Öncü bileşik BO-264'ün *in vitro* ADME profiline yönelik çalışmalar tarafımızdan tasarlanmış ve Chicago Illinois Üniversitesi'nden (USA), metabolit tayini çalışmaları Syngene International Limited'ten (Hindistan) hizmet alımı olarak gerçekleştirilmiştir. Tez dahilinde sentezlenen bazı analogların ise; karaciğer mikrozomlarındaki stabilite çalışmaları ve Bileşik 89'un fizikokimyasal özelliklerine yönelik ayrıntılı çalışmalar Eurofins Discovery Company (USA), Syngene International Limited (Hindistan) ve Pharmaron Technology Development'dan (Ningbo, Çin) hizmet alımı olarak gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen analizler için özet protokoller aşağıda örneklendirilmiştir.

Kinetik çözünürlük tayini

Test bileşiğinin belirlenen konsantrasyonlardaki (200 μ M) kinetik çözünürlüğü fosfat tamponunda (pH= 7,4), simüle edilmiş gastrik sıvıda (SGF; pH 1,2) veya simüle edilmiş intestinal sıvıda (SİF, pH 6,8) değerlendirilmiştir. Tüm analizler çalkalama (shake-flask) yöntemi ile 25 °C'de 24 saat boyunca gerçekleştirilmiş ve testler iki kez tekrarlanmıştır. Ölçümler UV-VIS spektroskopisi ile gerçekleştirilmiştir. Suda çözünürlük (μ M), organik çözücü (metanol/su, 60/40, v/v) içeren bir kalibrasyon standartına ait (200 μ M) ana pikin pik alanı ile tampon çözelti örneğindeki pikin pik alanı ile karşılaştırılarak belirlenmiştir.

LogD tayini

Dağılım katsayısı (LogD) doygun oktanol/sodyum fosfat tamponu (50 mM, pH 7,4) (1:1) karışımında belirlenmiştir. Test bileşiğinin farklı final konsantrasyonlardaki (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 1 μ M) örnekleri 1 saat 25 °C'de, Verapamil ve Atenolol bileşiklerine karşı inkübe edilmiş, tüm bileşiklerin dağılım katsayıları hem organik hem de sulu fazda bulunan madde konsantrasyonlarının UV-VIS spektroskopisi ile ölçümü sonucu belirlenmiştir. Tüm inkübasyonlar 3 tekrar olarak gerçekleştirilmiştir.

Plazma proteinlerine bağlanma tayini

Test bileşiğinin (final konsantrasyon 1 μ M), türe özgü plazmada solüsyonu hazırlanmıştır. Bu solüsyon, bir denge diyaliz sisteminde membranın bir tarafına eklenirken, tampon solüsyonu diğer tarafa eklenmiş ve sistemin 37 ° C'de dengeye ulaşmasına izin verilmiştir. Membranın her iki tarafındaki bileşik konsantrasyonu, LC-MS/MS ile ölçülmüş ve bağlanmamış bileşiğin fraksiyonu hesaplanmıştır.

Caco-2 permeabilite tayini

Test bileşiği (10 μ M final konsantrasyon), tek katmanda birleşen Caco-2 hücrelerinin apikal tarafına 0,5 ml ve bazolateral tarafına 1,5 ml olacak şekilde eklenmiş ve 37 ° C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre içerisinde 30, 60, 90 ve 120'nci dakikalarda numuneler toplanmış ve geçirgenlik, LC-MS/MS kullanılarak katmanlar arasında test bileşiğinin görünümü izlenerek ölçülmüştür.

Mikrozomal stabilite tayini

Test bileşiği (1 μ M), ilgili türün karaciğer mikrozomları (0,5 mg/ml) ile 37 ° C'de 45 dakikalık bir deney boyunca farklı zaman noktalarında (0, 5,10, 15, 30 ve 45'inci dakikalar) inkübe edilmiştir. Bu zaman aralıklarında alınan numuneler, LC-MS/MS ile analiz edilip $t_{1/2}$ ve klirens değerleri (CL_{int}) hesaplanmıştır.

hERG inhibisyonu tayini

hERG potasyum kanalını eksprese eden HEK-293 hücre hattı üzerinde, test bileşiği beş farklı konsantrasyonda (30; 10; 3,33; 1,1 ve 0,37 μ M) inkübe edilmiş ve akım uygulanmıştır. İnkübasyondan önceki akımda meydana gelen değişim yüzdesel olarak belirlenmiş ve oluşturulan doz cevap eğrisi ile IC_{50} değeri hesaplanmıştır. Deneyler iki kez tekrar edilmiştir.

Sitokrom P450 (CYP450) inhibisyonu tayini

Test bileşiği farklı konsantrasyonlarda (0,1 μ M - 30 μ M), sitokrom P450 izoformuna özgü substrat (1 μ L) varlığında insan karaciğer mikrozomları (0,2 mg/ml) ve NADPH ile inkübe edilerek; CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4-T ve CYP3A4-M'ye özgü reaksiyonlar için oluşan metabolitler; UPLC/MS/MS ile izlenmiş ve IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

Metabolit Tayini Çalışmaları

10 μ M konsantrasyondaki test bileşiği ile inkübe edilen insan karaciğer hücrelerinden 0, 60 ve 120'nci dakikalarda alınan örneklerde, LC-HRMS/MS (AB Sciex Triple TOF 5600+ (HRMS); HPLC: Agilent 1290 Infinity II) analizi yardımıyla metabolit tayini gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, beklenen metabolitlerin kütle parçalanma ürünlerine göre yorumlanmıştır.

3.4.2. Öncü bileşik BO-264 ve Bileşik 89'un *in vivo* farmakokinetik çalışmaları

BO-264 bileşiğinin *in vivo* farmakokinetik çalışmaları Chicago Illinois Üniversitesi'nde (USA) gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar; dişi CD-1 farelerde, tek doz 5 mg/kg intravenöz (IV) ve tek doz 25 mg/kg oral (PO) olarak gerçekleştirilmiştir. IV formülasyon olarak % 0,05 HPMC, 2N HCl (pH 1-2) kullanılırken, PO formülasyon; % 0,05 HPMC, 0,3 g Tween 80, 2N HCl (pH 1-2) olacak şekilde ayarlanmıştır. Belirlenen zaman aralıkları başında (0, 5, 15, 30, 60, 120, 240 ve 360 dakika) üçer fareden kan örnekleri toplanmıştır. Toplanan tüm örneklerde plazmadaki BO-264 konsantrasyonları ölçümleri LC-MS yöntemi ile yapılmış (Shimadzu LC-MS 8050, Shimadzu Corp., Kyoto, Japonya) ve ilgili farmakokinetik parametreler Phoenix WinNonlin'i (versiyon 6.2) sistemi kullanarak belirlenmiştir.

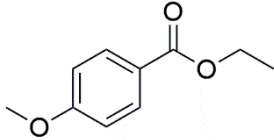
Bileşik 89'un ise biyoyararlanım çalışmaları ise Pharmaron Technology Development (Beijing, Çin) tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda; erkek CD-1 farelerde tek doz 50 mg/kg oral yoldan 2 farklı formülasyon (PO_A ve PO_B) kullanılmıştır. PO_A formülasyonu; % 50 PEG400, % 50 100 mM pH 4 asetat tamponu (% 40 Cremophor RH40 içeren), PO_B formülasyonu ise; % 50 Susam yağı, % 30 Cremophor RH40, % 20 PEG400 şeklinde

uygulanmıştır. Belirlenen zaman aralıkları başında (0,25; 0,5; 1; 2; 4; 7 ve 24 saat) 3'er fareden kan örnekleri toplanmıştır. Toplanan tüm örneklerde plazmadaki Bileşik 89 konsantrasyonlarının lmleri LC-MS-MS yöntemi ile yapılmış (Shimadzu LC-40D X3 CN) ve ilgili farmakokinetik parametreler iç standart yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

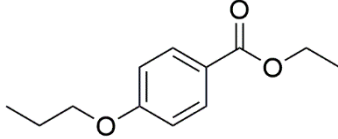
4.1. Kimyasal Bulgular

Etil 4-metoksibenzoat (Bileşik 1a)



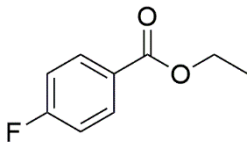
4-Metoksibenzoik asitten hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 1a'ya göre sentezlendi (Verim: % 86). CAS: 94-30-4. $C_{10}H_{13}O_3$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 181,0865; bulunan: 181.0858.

Etil 4-propoksibenzoat (Bileşik 1f)

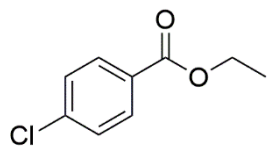


4-Propoksibenzoik asitten hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 1a'ya göre sentezlendi (Verim: % 80). CAS: 100256-94-8. $C_{12}H_{17}O_3$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 209,1178; bulunan: 209,1168.

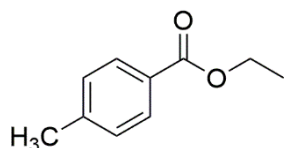
Etil 4-florobenzoat (Bileşik 1g)



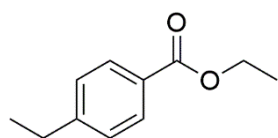
4-Florobenzoik asitten hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 1a'ya göre sentezlendi (Verim: % 74). CAS: 451-46-7. $C_9H_{10}FO_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 169,0665; bulunan: 169,0660.

Etil 4-klorobenzoat (Bileşik 1h)

4-Klorobenzoik asitten hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 1a'ya göre sentezlendi (Verim: % 97). CAS: 7335-27-5. $C_9H_9ClO_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 185,0369; bulunan: 185,0363.

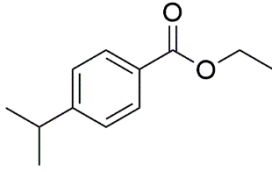
Etil 4-metilbenzoat (Bileşik 1i)

4-Metilbenzoik asitten hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 1a'ya göre sentezlendi (Verim: % 89). CAS: 94-08-6. $C_{10}H_{12}O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 165,0916; bulunan: 165,0913.

Etil 4-etilbenzoat (Bileşik 1j)

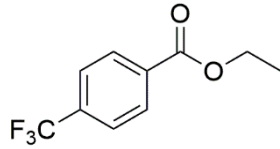
4-Etilbenzoik asitten hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 1a'ya göre sentezlendi (Verim: % 89). CAS: 36207-13-3. $C_{11}H_{14}O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 179,1072; bulunan: 179,1058.

Etil 4-izopropilbenzoat (Bileşik 1k)



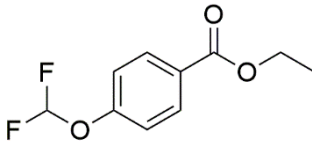
4-İzopropilbenzoik asitten hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 1a'ya göre sentezlendi (Verim: % 57). CAS: 19024-50-1. $C_{12}H_{17}O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 193,1229; bulunan: 193,1221.

Etil 4-(triflorometil)benzoat (Bileşik 1l)

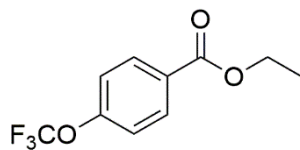


4-(Triflorometil)benzoik asitten hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 1a'ya göre sentezlendi (Verim: % 72). CAS: 583-02-8. $C_{10}H_9F_3O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 219,0633; bulunan: 219,0634.

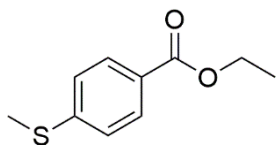
Etil 4-(diflorometoksi)benzoat (Bileşik 1n)



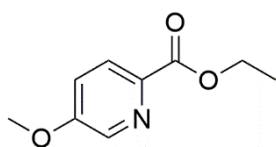
4-(Diflorometoksi)benzoik asitten hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 1a'ya göre sentezlendi (Verim: % 88). CAS: 773134-78-4. $C_{10}H_{11}F_2O_3$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 217,0676; bulunan: 217,0669.

Etil 4-(triflorometoksi)benzoat (Bileşik 1o)

4-(Triflorometoksi)benzoik asitten hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 1a'ya göre sentezlendi (Verim: % 94). CAS: 587-18-8. $C_{10}H_{10}F_3O_3$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 235,0582; bulunan: 235,0586.

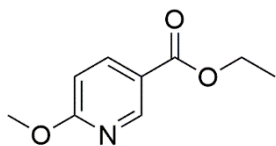
Etil 4-(metiltiyo)benzoat (Bileşik 1p)

4-(Metiltiyo)benzoik asitten hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 1a'ya göre sentezlendi (Verim: % 84). CAS: 1778-10-5. $C_{10}H_{13}O_2S$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 197,0636; bulunan: 197,0634.

Etil 5-metoksipikolinat (Bileşik 1r)

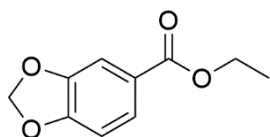
3-Metoksi-5-piridinkarboksilik asitten hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 1b'ye göre sentezlendi (Verim: % 75). CAS: 40473-03-8. $C_9H_{12}NO_3$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 182,0817; bulunan: 182,0809.

Etil 6-metoksinikotinat (Bileşik 1s)



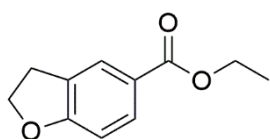
2-Metoksi-5-piridinkarboksilik asitten hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 1b'ye göre sentezlendi (Verim: % 81). CAS: 74925-37-4. $C_9H_{12}NO_3$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 182,0817; bulunan: 182,0810.

Etil benzo[d][1,3]dioksol-5-karboksilat (Bileşik 1t)

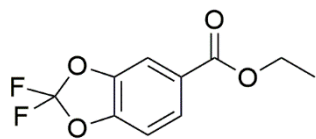


Benzo[d][1,3]dioksol-5-karboksilik asitten hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 1a'ya göre sentezlendi (Verim: % 78). CAS: 6951-08-2. $C_{10}H_{11}O_4$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 195,0657; bulunan: 195,0653.

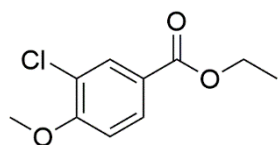
Etil 2,3-dihidrobenezofuran-5-karboksilat (Bileşik 1u)



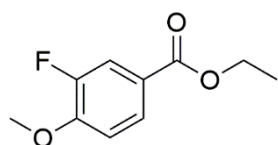
2,3-Dihidrobenezofuran-5-karboksilik asitten hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 1a'ya göre sentezlendi (Verim: % 80). CAS: 83751-12-6. $C_{11}H_{13}O_3$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 193,0865; bulunan: 193,0860.

Etil 2,2-diflorobenzo[d][1,3]dioksol-5-karboksilat (Bileşik 1v)

2,2-Diflorobenzo[d][1,3]dioksol-5-karboksilik asitten hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 1a'ya göre sentezlendi (Verim: % 77). CAS: 157489-19-5. $C_{10}H_9F_2O_4$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 231,0469; bulunan: 231,0469.

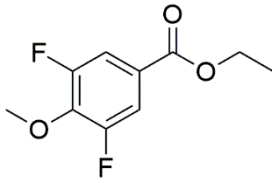
Etil 3-kloro-4-metoksibenzoat (Bileşik 1x)

3-Kloro-4-metoksibenzoik asitten hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 1a'ya göre sentezlendi (Verim: % 93). CAS: 14670-04-3. $C_{10}H_{12}ClO_3$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 215,0475; bulunan: 215,0474.

Etil 3-floro-4-metoksibenzoat (Bileşik 1y)

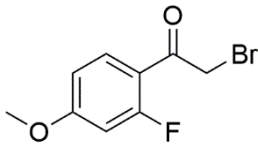
3-Floro-4-metoksibenzoik asitten hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 1a'ya göre sentezlendi (Verim: % 95). CAS: 170645-87-1. $C_{10}H_{12}FO_3$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 199,0770; bulunan: 199,0762.

Etil 3,5-difloro-4-metoksibenzoat (Bileşik 1z)



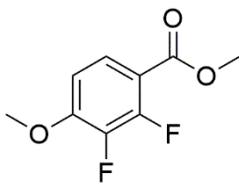
3,5-Difloro-4-metoksibenzoik asitten hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 1a'ya göre sentezlendi (Verim: % 95). CAS: 1256482-44-6. $C_{10}H_{11}F_2O_3$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 217,0676; bulunan: 217,0669.

2-Bromo-1-(2-floro-4-metoksifenil)etan-1-on (Bileşik 30)

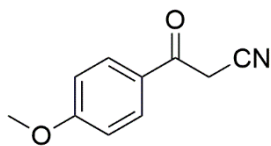


1-(2-Floro-4-metoksifenil)etan-1-ondan hareketle 3.1.2.'de belirtilen sentez yöntemi 2'ye göre sentezlendi (Verim: % 81). CAS: 157014-35-2. Erime derecesi: 68,7-70,7 °C [Lit. E.D: 66 °C][118]. $C_9H_9BrFO_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 246,9770; bulunan: 246,9775.

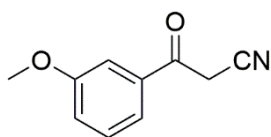
Metil 2,3-difloro-4-metoksibenzoat (Bileşik 35)



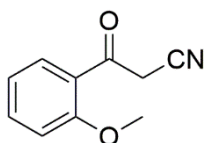
2,3-Difloro-4-metoksibenzoik asitten hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 1a'ya göre sentezlendi (Verim: % 96). CAS: 544704-78-1. Erime derecesi: 91,6-93,6 °C $C_9H_9F_2O_3$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 203,0520; bulunan: 203,0516.

3-(4-Metoksifenil)-3-oksopropanitril (Bileşik 2a)

Etil 4-metoksibenzoattan (Bileşik 1a) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 3a'ya göre sentezlendi (Verim: % 77). CAS: 3672-47-7. Erime derecesi: 126,5-127,4 °C [Lit. E.D: 123-126 °C][119]. $C_{10}H_8NO_2$ için; HRMS (m/z) $[M-H]^-$ hesaplanan: 174,0561; bulunan: 174,0564.

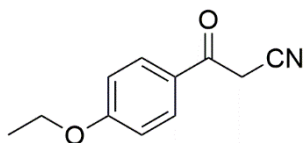
3-(3-Metoksifenil)-3-oksopropanitril (Bileşik 2b)

Etil 3-metoksibenzoattan hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 3a'ya göre sentezlendi (Verim: % 66). CAS: 21667-60-7. Erime derecesi: 86,2-86,9 °C [Lit. E.D: 87,3-88,2 °C][120]. $C_{10}H_8NO_2$ için; HRMS (m/z) $[M-H]^-$ hesaplanan: 174,0561; bulunan: 174,0560.

3-(2-Metoksifenil)-3-oksopropanitril (Bileşik 2c)

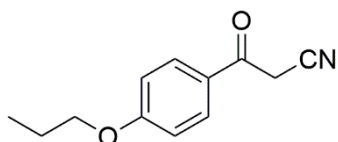
Etil 2-metoksibenzoattan hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 3a'ya göre sentezlendi (Verim: % 67). CAS: 35276-83-6. Erime derecesi: 85,2-86,8 °C [Lit. E.D: 87-88 °C][121]. $C_{10}H_8NO_2$ için; HRMS (m/z) $[M-H]^-$ hesaplanan: 174,0561; bulunan: 174,0554.

3-(4-Etoksifenil)-3-oksopropanitril (Bileşik 2e)



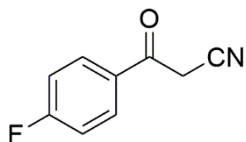
Etil 4-metoksibenzoattan hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 3a'ya göre sentezlendi (Verim: % 57). CAS: 54605-62-8. Erime derecesi: 119,5-121,4 °C. $C_{11}H_{10}NO_2$ için; HRMS (m/z) $[M-H]^-$ hesaplanan: 188,0712; bulunan: 188,0718. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 1,33 (3H, t, $J=7,5$ Hz); 4,13 (2H, q, $J=7,5$ Hz); 4,69 (2H, s); 7,07 (2H, d, $J=6,0$ Hz); 7,88 (2H, d, $J=6,0$ Hz).

3-Okso-3-(4-propoksifenil)propanitril (Bileşik 2f)

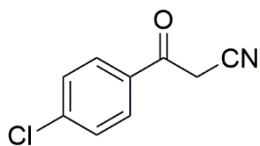


Etil 4-propoksibenzoattan (Bileşik 1f) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 3a'ya göre sentezlendi (Verim: % 76). CAS: 1071325-08-0. Erime derecesi: 83,3-84,8 °C. $C_{12}H_{12}NO_2$ için; HRMS (m/z) $[M-H]^-$ hesaplanan: 202,0868; bulunan: 202,0877. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 0,98 (3H, t, $J=8,0$ Hz); 1,69-1,81 (1H, s); 4,04 (2H, t, $J=8,0$ Hz); 4,68 (2H, s); 7,08 (2H, d, $J=9,0$ Hz); 7,90 (2H, d, $J=9,0$ Hz).

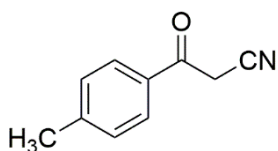
3-(4-Florofenil)-3-oksopropanitril (Bileşik 2g)



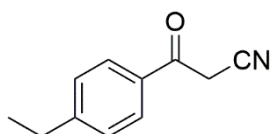
Etil 4-florobenzoattan (Bileşik 1g) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 3a'ya göre sentezlendi (Verim: % 64). CAS: 4640-67-9. Erime derecesi: 77,1-78,3 °C [Lit. E.D: 75-77 °C][122]. C_9H_5FNO için; HRMS (m/z) $[M-H]^-$ hesaplanan: 162,0355; bulunan: 162,0361.

3-(4-Klorofenil)-3-oksopropanitril (Bileşik 2h)

Etil 4-klorobenzoattan (Bileşik 1h) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 3a'ya göre sentezlendi (Verim: % 83). CAS: 4640-66-8. Erime derecesi: 124,5-125,9 °C [Lit. E.D: 125-127 °C][123]. C_9H_5ClNO için; HRMS (m/z) $[M-H]^-$ hesaplanan: 178,0060; bulunan: 178,0071.

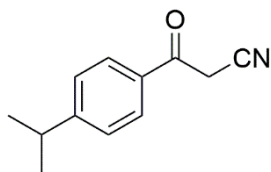
3-Okso-3-(p-tolil)propanitril (Bileşik 2i)

Etil 4-metilbenzoattan (Bileşik 1i) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 3a'ya göre sentezlendi (Verim: % 62). CAS: 7391-28-8. Erime derecesi: 98,2-99,0 °C [Lit. E.D: 99-100 °C][124]. $C_{10}H_8NO$ için; HRMS (m/z) $[M-H]^-$ hesaplanan: 158,0606; bulunan: 158,0616.

3-(4-Etilfenil)-3-oksopropanitril (Bileşik 2j)

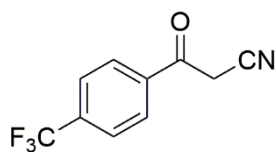
Etil 4-etilbenzoattan (Bileşik 1j) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 3a'ya göre sentezlendi (Verim: % 52). CAS: 96220-15-4. Erime derecesi: 101,0-102,1 °C. $C_{11}H_{10}NO$ için; HRMS (m/z) $[M-H]^-$ hesaplanan: 172,0762; bulunan: 172,0774. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 1,20 (3H, t, J = 8,0 Hz); 2,70 (2H, q, J = 8,0 Hz); 4,75 (2H, s); 7,42 (2H, d, J = 9,0 Hz); 7,87 (2H, d, J = 9,0 Hz).

3-(4-İzopropilfenil)-3-oksopropanitril (Bileşik 2k)



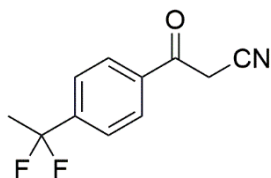
Etil 4-izopropilbenzoattan (Bileşik 1k) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 3a'ya göre sentezlendi (Verim: % 65). CAS: 199102-70-0. Erime derecesi: 86,3-87,6 °C. $C_{12}H_{12}NO$ için; HRMS (m/z) $[M-H]^-$ hesaplanan: 186,0919; bulunan: 186,0930. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 1,21 (3H, s); 1,23 (3H, s); 2,94-3,03 (1H, s); 4,75 (2H, s); 7,44 (2H, d, $J=6,0$ Hz); 7,87 (2H, d, $J=6,0$ Hz).

3-Okso-3-(4-(triflorometil)fenil)propanitril (Bileşik 2l)

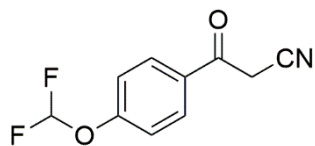


Etil 4-(triflorometil)benzoattan (Bileşik 1l) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 3a'ya göre sentezlendi (Verim: % 81). CAS: 71682-94-5. Erime derecesi: 43,8-44,2 °C [Lit. E.D: 43-45 °C][119]. $C_{10}H_5F_3NO$ için; HRMS (m/z) $[M-H]^-$ hesaplanan: 212,0323; bulunan: 212,0334.

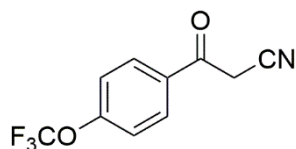
3-(4-(1,1-Difloroetil)fenil)-3-oksopropanitril (Bileşik 2m)



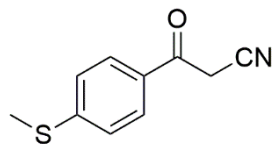
Etil 4-(1,1-difloroetil)benzoattan hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 3a'ya göre sentezlendi (Verim: % 67). Erime derecesi: 71,0-72,5 °C. $C_{11}H_8F_2NO$ için; HRMS (m/z) $[M-H]^-$ hesaplanan: 208,0574; bulunan: 208,0581. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 2,00 (3H, t, $J=12,0$ Hz); 4,80 (2H, s); 7,76 (2H, d, $J=9,0$ Hz); 8,04 (2H, d, $J=9,0$ Hz).

3-(4-(Diflorometoksi)fenil)-3-oksopropanitril (Bileşik 2n)

Etil 4-(diflorometoksi)benzoattan (Bileşik 1n) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 3a'ya göre sentezlendi (Verim: % 80). CAS: 1017036-63-3. Erime derecesi: 84,7-85,3 °C. $C_{10}H_6F_2NO_2$ için; HRMS (m/z) $[M-H]^-$ hesaplanan: 210,0367; bulunan: 210,0376. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 4,75 (2H, s); 7,35 (2H, d, $J=9,0$ Hz); 7,45 (2H, d, $J=75,0$ Hz); 8,02 (2H, d, $J=9,0$ Hz).

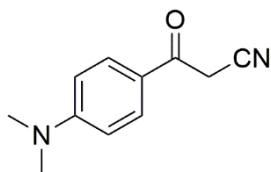
3-Okso-3-(4-(triflorometoksi)fenil)propanitril (Bileşik 2o)

Etil 4-(triflorometoksi)benzoattan (Bileşik 1o) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 3a'ya göre sentezlendi (Verim: % 42). CAS: 122454-46-0. Erime derecesi: 78,0-78,8 °C [Lit. E.D: 74-75,4 °C][125]. $C_{10}H_5F_3NO_2$ için; HRMS (m/z) $[M-H]^-$ hesaplanan: 228,0272; bulunan: 228,0280.

3-(4-(Metiltiyo)fenil)-3-oksopropanitril (Bileşik 2p)

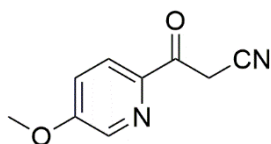
Etil 4-(metiltiyo)benzoattan (Bileşik 1p) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 3a'ya göre sentezlendi (Verim: % 57). CAS: 1344045-96-0. Erime derecesi: 96,4-96,9 °C [Lit. E.D: 97-97,5 °C][126]. $C_{10}H_8NOS$ için; HRMS (m/z) $[M-H]^-$ hesaplanan: 190,0327; bulunan: 190,0336.

3-(4-(Dimetilamino)fenil)-3-oksopropanitril (Bileşik 2q)



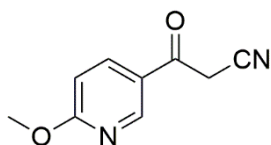
Etil 4-(dimetilamino)benzoattan hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 3a'ya göre sentezlendi (Verim: % 50). CAS: 70988-03-3. Erime derecesi: 168,1-168,9 °C [Lit. E.D: 164-165 °C][127]. $C_{11}H_{13}N_2O$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 189,1028; bulunan: 189,1027.

3-(5-Metoksipiridin-3-il)-3-oksopropanitril (Bileşik 2r)



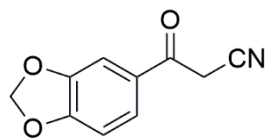
Etil 5-metoksipikolinattan (Bileşik 1r) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 3a'ya göre sentezlendi (Verim: % 53). Erime derecesi: 155,2-156,7 °C. $C_9H_9N_2O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 177,0664; bulunan: 177,0665. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 3,96 (3H, s); 4,75 (2H, s); 6,98 (1H, d, $J = 9,0$ Hz); 8,17 (1H, dd, $J = 9,0$ Hz, $J = 3,0$ Hz); 8,80 (1H, d, $J = 3,0$ Hz).

3-(6-Metoksipiridin-3-il)-3-oksopropanitril (Bileşik 2s)



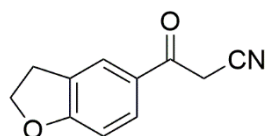
Etil 6-metoksinikotinattan (Bileşik 1s) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 3a'ya göre sentezlendi (Verim: % 49). CAS: 932040-51-2. Erime derecesi: 99,0-100,9 °C. $C_9H_9N_2O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 177,0664; bulunan: 177,0662. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 3,94 (3H, s); 4,66 (2H, s); 7,60 (1H, dd, $J = 9,0$ Hz, $J = 3,0$ Hz); 8,04 (1H, d, $J = 9,0$); 8,42 (1H, d, $J = 3,0$ Hz).

3-(Benzo[d][1,3]dioksol-5-il)-3-oksopropanitril (Bileşik 2t)



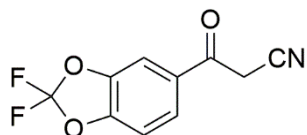
Etil benzo[d][1,3]dioksol-5-karboksilattan (Bileşik 1t) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 3a'ya göre sentezlendi (Verim: % 36). CAS: 96220-14-3. Erime derecesi: 128,9-130,0 °C (dekompoze) [Lit. E.D: 131-133 °C][128]. C₁₀H₆NO₃ için; HRMS (m/z) [M-H]⁻ hesaplanan: 188,0348; bulunan: 188,0359.

3-(2,3-Dihydrobenzofuran-5-il)-3-oksopropanitril (Bileşik 2u)



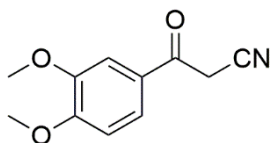
Etil 2,3-dihydrobenzofuran-5-karboksilattan (Bileşik 1u) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 3a'ya göre sentezlendi (Verim: % 66). CAS: 1248784-44-2. Erime derecesi: 144,6-146,3 °C. C₁₁H₁₀NO₂ için; HRMS (m/z) [M-H]⁺ hesaplanan: 188,0712; bulunan: 188,0710. ¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,23 (2H, t, *J* = 8,8 Hz); 4,63 (2H, s); 4,65 (2H, t, *J* = 8,8 Hz); 6,89 (1H, d, *J* = 8,2 Hz); 7,75 (1H, dd, *J* = 8,2 Hz, *J* = 1,5 Hz); 7,75 (1H, d, *J* = 1,5 Hz).

3-(2,2-Diflorobenzo[d][1,3]dioksol-5-il)-3-oksopropanitril (Bileşik 2v)



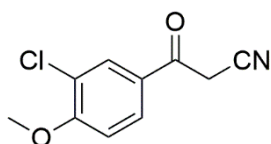
Etil 2,2-diflorobenzo[d][1,3]dioksol-5-karboksilattan (Bileşik 1v) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 3a'ya göre sentezlendi (Verim: % 52). CAS: 267880-89-7. Erime derecesi: 88,2-89,5 °C. C₁₀H₄NO₃ için; HRMS (m/z) [M-H]⁻ hesaplanan: 224,0159; bulunan: 224,0217. ¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 4,74 (2H, s); 7,61 (1H, d, *J* = 8,8 Hz); 7,87 (1H, dd, *J* = 8,8 Hz, *J* = 1,6 Hz); 7,95 (1H, d, *J* = 1,6 Hz).

3-(3,4-Dimetoksifenil)-3-oksopropanitril (Bileşik 2w)



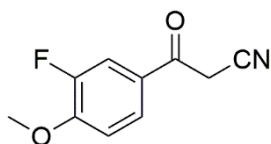
Etil 3,4-dimetoksibenzoattan hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 3a'ya göre sentezlendi (Verim: % 50). CAS: 4640-69-1. Erime derecesi: 135,9-137,0 °C [Lit. E.D: 134,4-135,7 °C][129]. $C_{11}H_{10}NO_3$ için; HRMS (m/z) $[M-H]^-$ hesaplanan: 204,0661; bulunan: 204,0672.

3-(3-Kloro-4-metoksifenil)-3-oksopropanitril (Bileşik 2x)

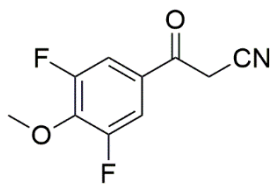


Etil 3-kloro-4-metoksibenzoattan (Bileşik 1x) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 3a'ya göre sentezlendi (Verim: % 42). CAS: 1243822-62-9. Erime derecesi: 100,7-101,5 °C. $C_{10}H_9ClNO_2$ için; HRMS (m/z) $[M-H]^+$ hesaplanan: 210,0322; bulunan: 210,0318. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 3,97 (3H, s); 4,73 (2H, s); 7,33 (1H, d, $J=9,0$ Hz); 7,92-8,00 (2H, m).

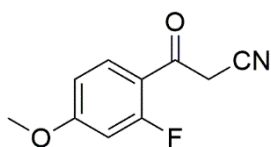
3-(3-Floro-4-metoksifenil)-3-oksopropanitril (Bileşik 2y)



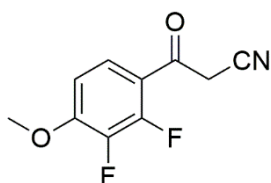
Etil 3-floro-4-metoksibenzoattan (Bileşik 1y) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 3a'ya göre sentezlendi (Verim: % 83). CAS: 898786-96-4. Erime derecesi: 117,3-118,5 °C. $C_{10}H_7FNO_2$ için; HRMS (m/z) $[M-H]^-$ hesaplanan: 192,0461; bulunan: 192,0473. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 3,95 (3H, s); 4,71 (2H, s); 7,34 (1H, t, $J=9,0$ Hz); 7,75-7,82 (2H, m).

3-(3,5-Difloro-4-metoksifenil)-3-oksopropanitril (Bileşik 2z)

Etil 3,5-difloro-4-metoksibenzoattan (Bileşik 1z) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 3a'ya göre sentezlendi (Verim: % 41). CAS: 1290181-16-6. Erime derecesi: 89,6-91,2 °C. $C_{10}H_6F_2NO_2$ için; HRMS (m/z) $[M-H]^-$ hesaplanan: 210,0367; bulunan: 210,0378. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 4,07 (3H, s); 4,71 (2H, s); 7,73 (2H, d, J = 9,0 Hz).

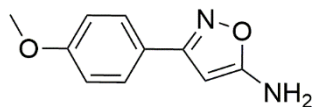
3-(2-Floro-4-metoksifenil)-3-oksopropanitril (Bileşik 31)

2-Bromo-1-(2-floro-4-metoksifenil)etan-1-ondan (Bileşik 30) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 3b'ye göre sentezlendi (Verim: % 60). CAS: 1290181-04-2. Erime derecesi: 91,5-93,1 °C. $C_{10}H_9FNO_2$ için; HRMS (m/z) $[M-H]^+$ hesaplanan: 194,0617; bulunan: 194,0608. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 3,87 (3H, s); 4,53 (2H, d, J = 3,0 Hz); 6,95 (1H, dd, J = 9,0 Hz, J = 3,0 Hz); 7,01 (1H, dd, J = 15,0 Hz, J = 3,0 Hz); 7,86 (1H, t, J = 9,0 Hz).

3-(2,3-Difloro-4-metoksifenil)-3-oksopropanitril (Bileşik 36)

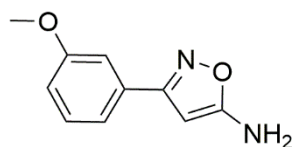
Metil 2,3-difloro-4-metoksibenzoattan (Bileşik 35) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 3c'ye göre sentezlendi (Verim: % 46). Erime derecesi: 129,1-130,7 °C. $C_{10}H_6F_2NO_2$ için; HRMS (m/z) $[M-H]^-$ hesaplanan: 210,0367; bulunan: 210,0374. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 3,98 (3H, s); 4,59 (2H, s); 7,20 (1H, t, J = 7,5 Hz); 7,74 (1H, t, J = 7,5 Hz).

3-(4-Metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3a)



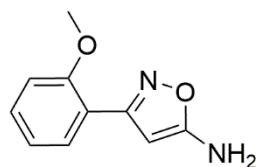
3-(4-Metoksifenil)-3-oksopropanitrilden (Bileşik 2a) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 4a'ya göre sentezlendi (Verim: % 59). CAS: 86685-98-5. Erime derecesi: 135,4-137,2 °C [Lit. E.D: 136-137 °C][130]. $C_{10}H_{11}N_2O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 191,0821; bulunan: 191,0812.

3-(3-Metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3b)

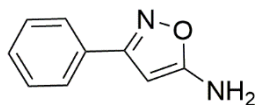


3-(3-Metoksifenil)-3-oksopropanitrilden (Bileşik 2b) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 4a'ya göre sentezlendi (Verim: % 46). CAS: 119162-46-8. Erime derecesi: 92,1-94,0 °C. $C_{10}H_{11}N_2O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 191,0821; bulunan: 191,0816. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 3,80 (3H, s); 5,41 (1H, s); 6,77 (2H, s); 7,01 (1H, d, J = 9,0 Hz); 7,24-7,39 (3H, m).

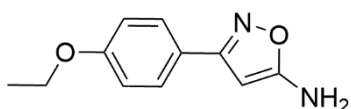
3-(2-Metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3c)



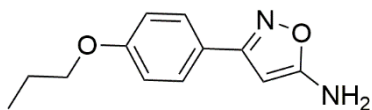
3-(2-Metoksifenil)-3-oksopropanitrilden (Bileşik 2c) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 4a'ya göre sentezlendi (Verim: % 58). CAS: 54606-19-8. Erime derecesi: 95,5-96,7 °C. $C_{10}H_{11}N_2O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 191,0821; bulunan: 191,0813. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 3,83 (3H, s); 5,37 (1H, s); 6,62 (2H, s); 6,99 (1H, t, J = 9,0 Hz); 7,13 (1H, d, J = 9,0 Hz); 7,41 (1H, t, J = 9,0 Hz); 7,65 (1H, t, J = 9,0 Hz).

3-Fenilizoksazol-5-amin (Bileşik 3d)

3-Okso-3-fenilpropanitrilden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 4a'ya göre sentezlendi (Verim: % 86). CAS: 4369-55-5. Erime derecesi: 110,7-112,1 °C [Lit. E.D: 109-112 °C][131]. $C_9H_9N_2O$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 161,0715; bulunan: 161,0714.

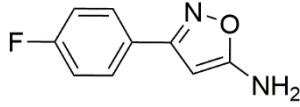
3-(4-Etoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3e)

3-(4-Etoksifenil)-3-oksopropanitrilden (Bileşik 2e) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 4a'ya göre sentezlendi (Verim: % 59). CAS: 54606-18-7. Erime derecesi: 127,6-129,1 °C. $C_{11}H_{13}N_2O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 205,0977; bulunan: 205,0970. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 1,34 (3H, t, J = 7,5 Hz); 4,06 (2H, q, J = 7,5 Hz); 5,32 (1H, s); 6,69 (2H, s); 6,98 (2H, d, J = 9,0 Hz); 7,64 (2H, d, J = 9,0 Hz).

3-(4-Propoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3f)

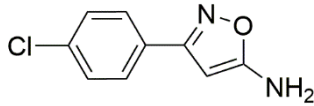
3-Okso-3-(4-propoksifenil)propanitrilden (Bileşik 2f) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 4a'ya göre sentezlendi (Verim: % 37). CAS: 1368896-25-6. Erime derecesi: 136,7-137,8 °C. $C_{12}H_{15}N_2O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 219,1134; bulunan: 219,1123. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 0,99 (3H, t, J = 7,5 Hz); 1,68-1,80 (1H, m); 3,96 (2H, t, J = 7,5 Hz); 5,32 (1H, s); 6,69 (2H, s); 6,98 (2H, d, J = 7,5 Hz); 7,64 (2H, d, J = 7,5 Hz).

3-(4-Florofenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3g)



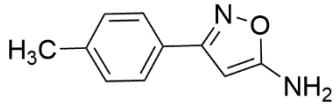
3-(4-Florofenil)-3-oksopropanitrilden (Bileşik 2g) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 4a'ya göre sentezlendi (Verim: % 41). CAS: 81465-82-9. Erime derecesi: 102,1-103,1 °C [Lit. E.D: 104-105 °C][130]. $C_9H_8FN_2O$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 179,0621; bulunan: 179,0619.

3-(4-Klorofenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3h)

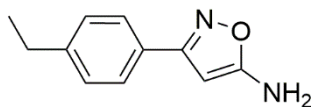


3-(4-Klorofenil)-3-oksopropanitrilden (Bileşik 2h) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 4a'ya göre sentezlendi (Verim: %56). CAS: 33866-48-7. Erime derecesi: 163,7-164,3 °C [Lit. E.D: 165-166 °C][130]. $C_9H_8ClN_2O$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 195,0325; bulunan: 195,0319.

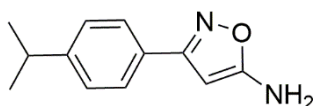
3-(p-Tolil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3i)



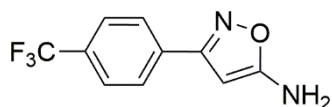
3-Okso-3-(p-tolil)propanitrilden (Bileşik 2i) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 4a'ya göre sentezlendi (Verim: % 46). CAS: 28883-91-2. Erime derecesi: 152,1-153,9 °C [Lit. E.D: 149-150 °C][130]. $C_{10}H_{11}N_2O$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 175,0871; bulunan: 175,0864.

3-(4-Etilfenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3j)

3-(4-Etilfenil)-3-oksopropanitrilden (Bileşik 2j) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 4a'ya göre sentezlendi (Verim: % 52). CAS: 1020955-20-7. Erime derecesi: 109,0-110,7 °C. $C_{11}H_{13}N_2O$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 189,1028; bulunan: 189,1021. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 1,19 (3H, d, $J=7,5$ Hz); 2,63 (3H, q, $J=7,5$ Hz); 5,36 (1H, s); 6,73 (2H, s); 7,28 (1H, d, $J=9,0$ Hz); 7,62 (1H, d, $J=9,0$ Hz).

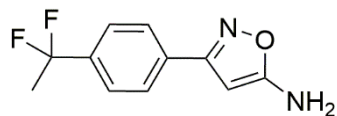
3-(4-İzopropilfenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3k)

3-(4-İzopropilfenil)-3-oksopropanitrilden (Bileşik 2k) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 4a'ya göre sentezlendi (Verim: % 30). CAS: 1020996-98-8. Erime derecesi: 114,3-115,5 °C. $C_{12}H_{15}N_2O$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 203,1184; bulunan: 203,1180. 1H -NMR Spektrumu (500 MHz, DMSO- d_6): δ 1,21 (6H, d, $J=6,95$ Hz); 2,88-2,93 (1H, m); 5,36 (2H, s); 6,73 (1H, s); 7,64 (2H, d, $J=8,3$ Hz); 7,84 (2H, d, $J=8,3$ Hz).

3-(4-(Triflorometil)fenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3l)

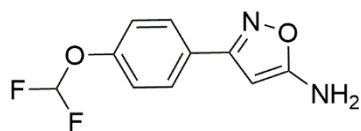
3-Okso-3-(4-(triflorometil)fenil)propanitrilden (Bileşik 2l) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 4a'ya göre sentezlendi (Verim: % 52). CAS: 81465-84-1. Erime derecesi: 143,7-145,6 °C [Lit. E.D: 144-145 °C][130]. $C_{10}H_8F_3N_2O$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 229,0589; bulunan: 229,0581.

3-(4-(1,1-Difloroetil)fenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3m)



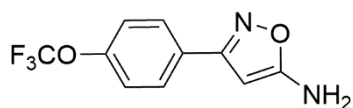
3-(4-(1,1-Difloroetil)fenil)-3-oksopropanitrilden (Bileşik 2m) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 4a'ya göre sentezlendi (Verim: % 40). CAS: 1895639-00-5. Erime derecesi: 130,5-132,2 °C. $C_{11}H_{11}F_2N_2O$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 225,0839; 225,0836. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 1,99 (3H, t, J = 12,0 Hz); 5,45 (1H, s); 6,83 (2H, s); 7,64 (2H, d, J = 7,5 Hz); 7,84 (2H, d, J = 7,5 Hz).

3-(4-(Diflorometoksi)fenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3n)

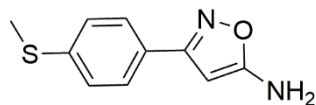


3-(4-(Diflorometoksi)fenil)-3-oksopropanitrilden (Bileşik 2n) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 4a'ya göre sentezlendi (Verim: % 42). CAS: 1020955-05-8. Erime derecesi: 83,7-85,7 °C. $C_{10}H_9F_2N_2O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 227,0632; bulunan: 227,0638. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 5,40 (1H, s); 6,79 (2H, s); 7,25 (2H, d, J = 9,0 Hz); 7,31 (1H, t, J = 7,5 Hz); 7,79 (2H, d, J = 9,0 Hz).

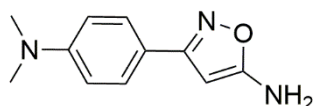
3-(4-(Triflorometoksi)fenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3o)



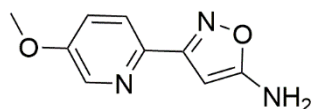
3-Okso-3-(4-(triflorometoksi)fenil)propanitrilden (Bileşik 2o) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 4a'ya göre sentezlendi (Verim: % 54). CAS: 1715359-08-2. Erime derecesi: 94,5-96,5 °C. $C_{10}H_8F_3N_2O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 245,0538; bulunan: 245,0527. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 5,44 (1H, s); 6,84 (2H, s); 7,45 (2H, d, J = 9,0 Hz); 7,87 (2H, d, J = 9,0 Hz).

3-(4-(Metiltiyo)fenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3p)

3-(4-(Metiltiyo)fenil)-3-oksopropanitrilden (Bileşik 2p) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 4a'ya göre sentezlendi (Verim: % 45). CAS: 501116-51-4. Erime derecesi: 151,7-153,1 °C. $C_{10}H_{11}N_2OS$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 207,0592; bulunan: 207,0591. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 2,54 (3H, s); 5,38 (1H, s); 6,76 (2H, s); 7,32 (1H, d, $J=9,0$ Hz); 7,65 (1H, d, $J=9,0$ Hz).

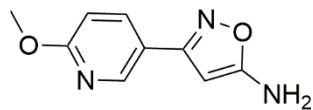
3-(4-(Dimetilamino)fenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3q)

3-(4-(Dimetilamino)fenil)-3-oksopropanitrilden (Bileşik 2q) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 4a'ya göre sentezlendi (Verim: % 58). CAS: 887591-43-7. Erime derecesi: 194,9-196,5 °C (dekompoze). $C_{11}H_{14}N_3O$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 204,1137; bulunan: 204,1140. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 2,94 (6H, s); 5,26 (1H, s); 6,59 (2H, s); 6,74 (2H, d, $J=9,0$ Hz); 7,52 (2H, d, $J=9,0$ Hz).

3-(5-Metoksipiridin-2-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 3r)

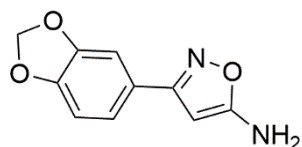
3-(5-Metoksipiridin-3-il)-3-oksopropanitrilden (Bileşik 2r) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 4a'ya göre sentezlendi (Verim: % 46). CAS: 2228605-98-7. Erime derecesi: 125,9-126,4 °C. $C_9H_{10}N_3O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 192,0773; bulunan: 192,0765. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 3,87 (3H, s); 5,39 (1H, s); 6,81 (2H, s); 7,47 (1H, dd, $J=9,0$ Hz, $J=3,0$ Hz); 7,81 (1H, d, $J=9,0$ Hz); 8,35 (1H, d, $J=3,0$ Hz).

3-(6-Metoksipiridin-3-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 3s)



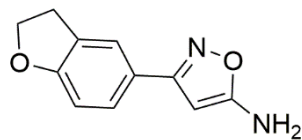
3-(6-Metoksipiridin-3-il)-3-oksopropanitrilden (Bileşik 2s) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 4a'ya göre sentezlendi (Verim: % 35). CAS: 2228307-46-6. Erime derecesi: 184,5-185,2 °C. $C_9H_{10}N_3O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 192,0773; bulunan: 192,0766. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 3,88 (3H, s); 5,42 (1H, s); 6,81 (2H, s); 6,90 (1H, d, $J=9,0$ Hz); 8,01 (1H, dd, $J=9,0$ Hz, $J=3,0$ Hz); 8,52 (1H, d, $J=3,0$ Hz).

3-(Benzo[d][1,3]dioksol-5-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 3t)



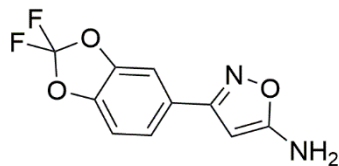
3-(Benzo[d][1,3]dioksol-5-il)-3-oksopropanitrilden (Bileşik 2t) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 4a'ya göre sentezlendi (Verim: % 48). CAS: 938006-68-9. Erime derecesi: 179,2-181,0 °C. $C_{10}H_9N_2O_3$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 205,0613; bulunan: 205,0604. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 5,35 (1H, s); 6,07 (2H, s); 6,72 (1H, s); 6,98 (1H, d, $J=9,0$ Hz); 7,23-7,25 (2H, m).

3-(2,3-Dihydrobenzofuran-5-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 3u)



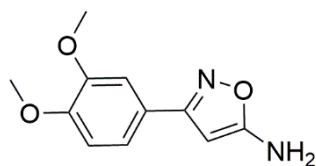
3-(2,3-Dihydrobenzofuran-5-il)-3-oksopropanitrilden (Bileşik 2u) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 4a'ya göre sentezlendi (Verim: % 52). CAS: 1250709-84-2. Erime derecesi: 123,5-124,5 °C. $C_{11}H_{10}N_2O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 203,0821; bulunan: 203,0818. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 3,21 (2H, t, $J=9,0$ Hz); 4,56 (2H, t, $J=9,0$ Hz); 5,30 (1H, s); 6,66 (2H, s); 6,80 (1H, d, $J=9,0$ Hz); 7,44 (1H, d, $J=9,0$ Hz); 7,58 (1H, s).

3-(2,2-Diflorobenzo[d][1,3]dioksol-5-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 3v)



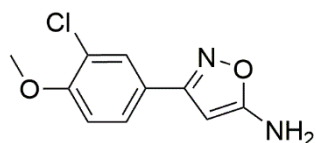
3-(2,2-Diflorobenzo[d][1,3]dioksol-5-il)-3-oksopropanitrilden (Bileşik 2v) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 4a'ya göre sentezlendi (Verim: % 36). CAS: 1891489-89-6. Erime derecesi: 129,9-131,5 °C. $C_{10}H_7F_2N_2O_3$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 241,0425; bulunan: 241,0432. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 5,45 (1H, s); 6,84 (2H, s); 7,48 (1H, d, $J=9,0$ Hz); 7,61 (1H, d, $J=9,0$ Hz); 7,76 (1H, s).

3-(3,4-dimetoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3w)



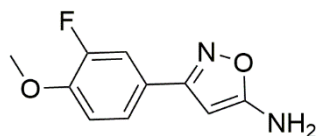
3-(3,4-Dimetoksifenil)-3-oksopropanitrilden (Bileşik 2w) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 4a'ya göre sentezlendi (Verim: % 58). CAS: 501325-88-8. Erime derecesi: 164,7-166,7 °C. $C_{11}H_{13}N_2O_3$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 221,0926; bulunan: 221,0919. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 3,97 (3H, s); 3,80 (3H, s); 5,36 (1H, s); 6,70 (2H, s); 7,00 (1H, d, $J=9,0$ Hz); 7,24-7,27 (2H, m).

3-(3-Kloro-4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3x)



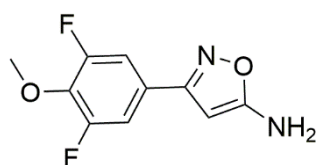
3-(3-Kloro-4-metoksifenil)-3-oksopropanitrilden (Bileşik 2x) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 4a'ya göre sentezlendi (Verim: % 52). CAS: 501116-41-2. Erime derecesi: 147,2-148,9 °C. $C_{10}H_{10}ClN_2O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 225,0431; bulunan: 225,0429. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 3,90 (3H, s); 5,41 (1H, s); 6,78 (2H, s); 7,22 (1H, d, $J=9,0$ Hz); 7,66-7,76 (2H, m).

3-(3-Floro-4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3y)



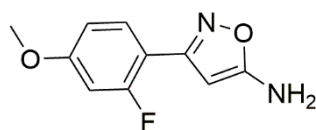
3-(3-Floro-4-metoksifenil)-3-oksopropanitrilden (Bileşik 2y) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 4a'ya göre sentezlendi (Verim: % 47). CAS: 501326-05-2. Erime derecesi: 167,9-169,5 °C. $C_{10}H_{10}FN_2O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 209,0726; bulunan: 209,0730. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 3,83 (3H, s); 5,40 (1H, s); 6,76 (2H, s); 7,20 (1H, t, J = 9,0 Hz); 7,50-7,58 (2H, m).

3-(3,5-Difloro-4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3z)



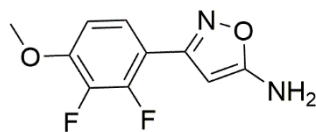
3-(3,5-Difloro-4-metoksifenil)-3-oksopropanitrilden (Bileşik 2z) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 4a'ya göre sentezlendi (Verim: % 49). CAS: 1898223-05-6. Erime derecesi: 131,4-132,2 °C. $C_{10}H_9F_2N_2O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 227,0632; bulunan: 227,0629. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 3,97 (3H, s); 5,48 (1H, s); 6,86 (2H, s); 7,51 (2H, d, J = 12,0 Hz).

3-(2-Floro-4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 32)



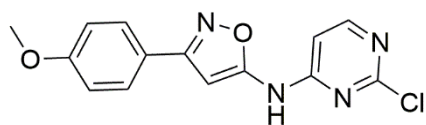
3-(2-Floro-4-metoksifenil)-3-oksopropanitrilden (Bileşik 31) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 4b'ye göre sentezlendi (Verim: % 65). CAS: 1598360-32-7. Erime derecesi: 119,5-120,5 °C. $C_{10}H_{10}FN_2O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 209,0726; bulunan: 209,0725. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 3,81 (3H, s); 5,27 (1H, d, J = 3,0 Hz); 6,75 (2H, s); 6,87 (1H, dd, J = 9,0 Hz, J = 3,0 Hz); 6,94 (1H, dd, J = 12,0 Hz, J = 3,0 Hz); 7,70 (1H, d, J = 7,5 Hz).

3-(2,3-Difloro-4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 37)



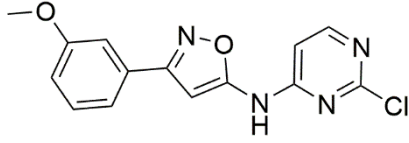
3-(2,3-Difloro-4-metoksifenil)-3-oksopropanitrilden (Bileşik 36) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 4b'ye göre sentezlendi (Verim: % 85). CAS: 1891467-19-8. Erime derecesi: 141,4-143,2 °C. $C_{10}H_9F_2N_2O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 227,0632; bulunan: 227,0639. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 3,92 (3H, s); 5,30 (1H, d, $J = 3,0$ Hz); 6,84 (2H, s); 7,11 (1H, t, $J = 7,5$ Hz); 7,54 (1H, t, $J = 7,5$ Hz).

N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4a)



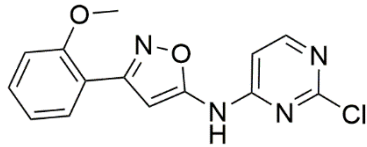
3-(4-Metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3a) ve 2,4-dikloropirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 42). Erime derecesi: 197,0-198,8 °C. $C_{14}H_{12}ClN_4O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 303,0649; bulunan: 303,0645. 1H -NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO- d_6): δ 3,82 (3H, s); 6,68 (1H, s); 7,01 (1H, d, $J = 5,8$ Hz); 7,07 (2H, d, $J = 8,6$ Hz); 7,77 (2H, d, $J = 8,6$ Hz); 8,40 (1H, d, $J = 5,8$ Hz); 11,73 (1H, s).

N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(3-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4b)

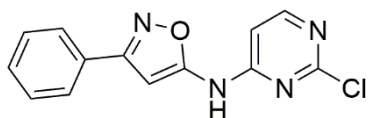


3-(3-Metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3b) ve 2,4-dikloropirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 31). Erime derecesi: 183,7-185,7 °C. $C_{14}H_{12}ClN_4O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 303,0649; bulunan: 303,0638. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 3,84 (3H, s); 6,75 (1H, s); 7,03 (1H, d, $J=6,0$ Hz); 7,10 (1H, d, $J=9,0$ Hz); 7,37-7,43 (3H, m); 8,43 (1H, d, $J=6,0$ Hz); 11,84 (1H, s).

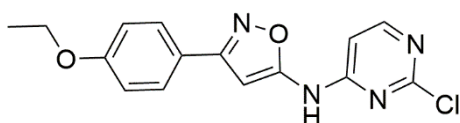
N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(2-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4c)



3-(2-Metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3c) ve 2,4-dikloropirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 39). Erime derecesi: 193,0-194,1 °C. $C_{14}H_{12}ClN_4O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 303,0649; bulunan: 303,0640. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 3,89 (3H, s); 6,71 (1H, s); 6,99 (1H, d, $J=6,0$ Hz); 7,07 (1H, t, $J=7,5$ Hz); 7,22 (1H, d, $J=7,5$ Hz); 7,50 (1H, d, $J=7,5$ Hz); 7,75 (1H, d, $J=7,5$ Hz); 8,40 (1H, d, $J=6,0$ Hz); 11,77 (1H, s).

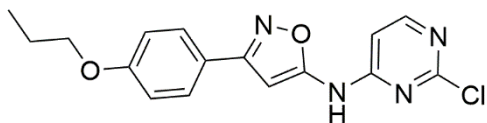
N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-fenilizoksazol-5-amin (Bileşik 4d)

3-Fenilizoksazol-5-amin (Bileşik 3d) ve 2,4-dikloropirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 41). Erime derecesi: 193,5-195,0 °C. $C_{13}H_{10}ClN_4O$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 273,0543; bulunan: 273,0531. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 6,75 (1H, s); 7,02 (1H, d, $J=6,0$ Hz); 7,50-7,53 (3H, m); 7,82-7,86 (2H, m); 8,41 (1H, d, $J=6,0$ Hz); 11,86 (1H, s).

N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-etoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4e)

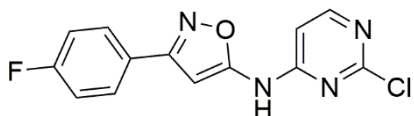
3-(4-Etoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3e) ve 2,4-dikloropirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 31). Erime derecesi: 206,7-208,5 °C (dekompoze). $C_{15}H_{14}ClN_4O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 317,0805; bulunan: 317,0794. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 1,36 (3H, t, $J=6,0$ Hz); 4,10 (2H, q, $J=6,0$ Hz); 6,70 (1H, s); 7,02 (1H, d, $J=6,0$ Hz); 7,07 (2H, d, $J=9,0$ Hz); 7,77 (2H, d, $J=9,0$ Hz); 8,42 (1H, d, $J=6,0$ Hz); 11,79 (1H, s).

N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-propoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4f)



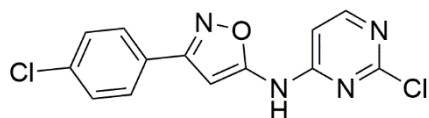
3-(4-Propoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3f) ve 2,4-dikloropirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 29). Erime derecesi: 194,7-196,4 °C. $C_{16}H_{16}ClN_4O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 331,0962; bulunan: 331,0951. 1H -NMR Spektrumu (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 0,99 (3H, t, $J=7,5$ Hz); 1,70-1,81 (2H, m); 3,99 (2H, t, $J=6,0$ Hz); 6,69 (1H, s); 7,01 (1H, d, $J=6,0$ Hz); 7,07 (2H, d, $J=9,0$ Hz); 7,77 (2H, d, $J=9,0$ Hz); 8,41 (1H, d, $J=6,0$ Hz); 11,78 (1H, s).

N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-florofenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4g)



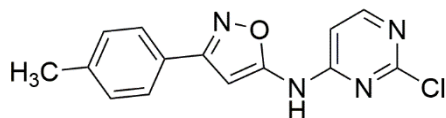
3-(4-Florofenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3g) ve 2,4-dikloropirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 49). Erime derecesi: 244,5-246,1 °C (dekompoze). $C_{13}H_9ClFN_4O$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 291,0449; bulunan: 291,0438. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 6,76 (1H, s); 7,03 (1H, d, $J=6,0$ Hz); 7,38 (2H, t, $J=7,5$ Hz); 7,93 (2H, d, $J=7,5$ Hz); 8,43 (1H, d, $J=6,0$ Hz); 11,86 (1H, s).

3-(4-Klorofenil)-N-(2-kloropirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 4h)



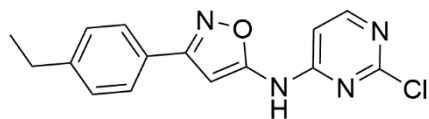
3-(4-klorofenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3h) ve 2,4-dikloropirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 40). Erime derecesi: 221,5-222,7 °C (dekompoze). $C_{13}H_9Cl_2N_4O$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 307,0153; bulunan: 307,0141 . 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 6,78 (1H, s); 7,03 (1H, d, $J= 6,0$ Hz); 7,60 (2H, d, $J= 7,5$ Hz); 7,89 (2H, d, $J= 7,5$ Hz); 8,43 (1H, d, $J= 6,0$ Hz); 11,88 (1H, s).

N-(2-Kloropirimidin-4-il)-3-(p-tolil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4i)



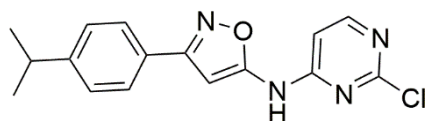
3-(p-Tolil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3i) ve 2,4-dikloropirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 30). Erime derecesi: 206,3-208,4 °C. $C_{14}H_{12}ClN_4O$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 287,0700; bulunan: 287,0702. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 2,37 (3H, s); 6,72 (1H, s); 7,02 (1H, d, $J= 4,5$ Hz); 7,34 (2H, d, $J= 7,5$ Hz); 7,74 (2H, d, $J= 7,5$ Hz); 8,41 (1H, d, $J= 4,5$ Hz); 11,84 (1H, s).

N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-etilfenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4j)



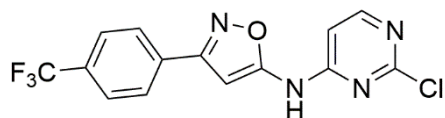
3-(4-Etilfenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3j) ve 2,4-dikloropirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 39). Erime derecesi: 199,8-201,5 °C. $C_{15}H_{14}ClN_4O$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 301,0856; bulunan: 301,0862. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 1,21 (3H, t, $J = 7,5$ Hz); 2,67 (3H, q, $J = 7,5$ Hz); 6,72 (1H, s); 7,02 (1H, d, $J = 6,0$ Hz); 7,37 (2H, d, $J = 7,5$ Hz); 7,76 (2H, d, $J = 7,5$ Hz); 8,42 (1H, d, $J = 6,0$ Hz); 11,82 (1H, s).

N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-izopropilfenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4k)



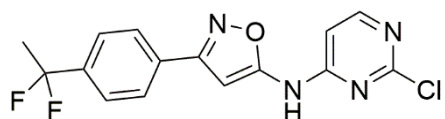
3-(4-İzopropilfenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3k) ve 2,4-dikloropirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 34). Erime derecesi: 195,2-196,1 °C. $C_{16}H_{16}ClN_4O$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 315,1013; bulunan: 315,0999. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 1,23 (3H, s); 1,25 (3H, s); 2,91-3,00 (1H, m); 6,72 (1H, s); 7,02 (1H, d, $J = 6,0$ Hz); 7,40 (2H, d, $J = 9,0$ Hz); 7,79 (2H, d, $J = 9,0$ Hz); 8,42 (1H, d, $J = 6,0$ Hz); 11,83 (1H, s).

N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-(triflorometil)fenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4l)



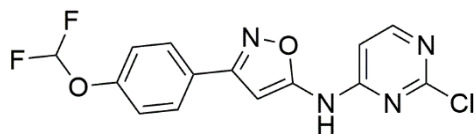
3-(4-(Triflorometil)fenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3l) ve 2,4-dikloropirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 47). Erime derecesi: 221,5-222,4 °C. $C_{14}H_9ClF_3N_4O$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 341,0417; bulunan: 341,0402. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 6,85 (1H, s); 7,04 (1H, d, $J=6,0$ Hz); 7,91 (2H, d, $J=9,0$ Hz); 8,10 (2H, d, $J=9,0$ Hz); 8,44 (1H, d, $J=6,0$ Hz); 11,94 (1H, s).

N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-(1,1-difloroetil)fenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4m)



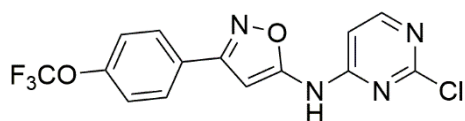
3-(4-(1,1-Difloroetil)fenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3m) ve 2,4-dikloropirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 39). Erime derecesi: 204,2-205,0 °C (dekompoze). $C_{15}H_{12}ClF_2N_4O$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 337,0668; bulunan: 337,0654. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 1,19 (3H, t, $J=12,0$ Hz); 6,80 (1H, s); 7,03 (1H, d, $J=6,0$ Hz); 7,72 (2H, d, $J=7,5$ Hz); 7,97 (2H, d, $J=7,5$ Hz); 8,43 (1H, d, $J=6,0$ Hz); 11,89 (1H, s).

N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-(diflorometoksi)fenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4n)

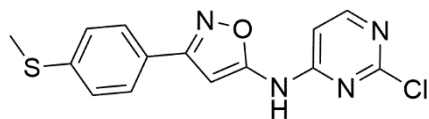


3-(4-(Diflorometoksi)fenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3n) ve 2,4-dikloropirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 31). Erime derecesi: 209,4-211,2 °C (dekompoze). $C_{14}H_{10}ClF_2N_4O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 339,0460; bulunan: 339,0461. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 6,76 (1H, s); 7,03 (1H, d, $J = 6,0$ Hz); 7,35 (1H, t, $J = 75,0$ Hz); 7,33 (2H, d, $J = 9,0$ Hz); 7,93 (2H, d, $J = 9,0$ Hz); 8,43 (1H, d, $J = 6,0$ Hz); 11,86 (1H, s).

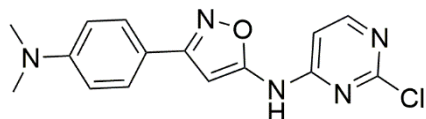
N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-(triflorometoksi)fenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4o)



3-(4-(Triflorometoksi)fenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3o) ve 2,4-dikloropirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 43). Erime derecesi: 188,6-190,0 °C. $C_{14}H_9ClF_3N_4O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 357,0366; bulunan: 357,0364. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 6,79 (1H, s); 7,03 (1H, d, $J = 6,0$ Hz); 7,53 (2H, d, $J = 6,0$ Hz); 8,00 (2H, d, $J = 6,0$ Hz); 8,43 (1H, d, $J = 6,0$ Hz); 11,89 (1H, s).

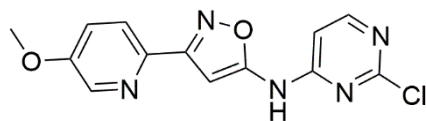
N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-(metiltiyo)fenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4p)

3-(4-(Metiltiyo)fenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3p) ve 2,4-dikloropirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 34). Erime derecesi: 209,5-210,7 °C. $C_{14}H_{12}ClN_4OS$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 319,0420; bulunan: 319,0416. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 2,53 (3H, s); 6,74 (1H, s); 7,02 (1H, d, $J=6,0$ Hz); 7,40 (2H, d, $J=9,0$ Hz); 7,79 (2H, d, $J=9,0$ Hz); 8,42 (1H, d, $J=6,0$ Hz); 11,83 (1H, s).

N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-(dimetilamino)fenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4q)

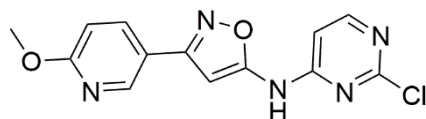
3-(4-(Dimetilamino)fenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3r) ve 2,4-dikloropirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 33). Erime derecesi: 208,0-209,8 °C (dekompoze). $C_{15}H_{15}ClN_5O$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 316,0965; bulunan: 316,0962. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 2,98 (6H, s); 6,63 (1H, s); 6,81 (2H, d, $J=7,5$ Hz); 7,01 (1H, d, $J=6,0$ Hz); 7,64 (2H, d, $J=7,5$ Hz); 8,40 (1H, d, $J=6,0$ Hz); 11,41 (1H, s).

N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(5-metoksipiridin-2-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 4r)



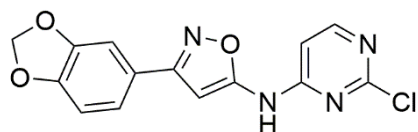
3-(5-Metoksipiridin-3-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 3r) ve 2,4-dikloropirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 27). Erime derecesi: 269,7-271,7 °C (dekompoze). $C_{13}H_{11}ClN_5O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 304,0601; bulunan: 304,0607. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 3,90 (3H, s); 6,83 (1H, s); 6,99 (1H, d, J = 6,0 Hz); 7,55 (1H, dd, J = 7,5 Hz, J = 3,0 Hz); 7,96 (1H, d, J = 7,5 Hz); 8,41 (1H, d, J = 6,0 Hz); 8,46 (1H, d, J = 3,0 Hz); 11,86 (1H, s).

N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(6-metoksipiridin-3-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 4s)



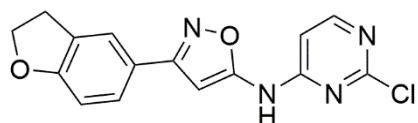
3-(6-Metoksipiridin-3-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 3s) ve 2,4-dikloropirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 20). Erime derecesi: 235,0-236,0 °C (dekompoze). $C_{13}H_{11}ClN_5O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 304,0605; bulunan: 304,0601. 1H -NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO- d_6): δ 3,92 (3H, s); 6,76 (1H, s); 6,97 (1H, d, J = 8,4 Hz); 7,01 (1H, d, J = 5,8 Hz); 8,14 (1H, dd, J = 8,4 Hz, J = 2,4 Hz); 8,41 (1H, d, J = 5,8 Hz); 8,66 (1H, d, J = 2,4 Hz); 11,86 (1H, s).

3-(Benzo[d][1,3]dioksol-5-il)-N-(2-kloropirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 4t)



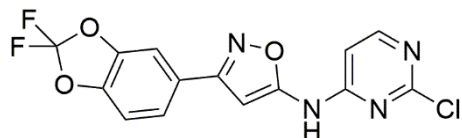
3-(Benzo[d][1,3]dioksol-5-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 3t) ve 2,4-dikloropirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 30). Erime derecesi: 224,6-225,8 °C. $C_{14}H_{10}ClN_4O_3$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 317,0441; bulunan: 317,0453. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 6,12 (2H, s); 6,70 (1H, s); 7,02 (1H, d, $J=6,0$ Hz); 7,01-7,05 (1H, m); 7,35-7,38 (2H, m); 8,43 (1H, d, $J=6,0$ Hz); 11,86 (1H, s).

N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(2,3-dihydrobenzofuran-5-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 4u)



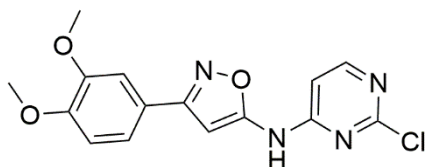
3-(2,3-Dihydrobenzofuran-5-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 3u) ve 2,4-dikloropirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 36). Erime derecesi: 211,8-212,1 °C (dekompoze). $C_{15}H_{12}ClN_4O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 315,0649; bulunan: 315,0645. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 3,26 (2H, t, $J=9,0$ Hz); 4,60 (2H, t, $J=9,0$ Hz); 6,66 (1H, s); 6,89 (1H, d, $J=9,0$ Hz); 7,01 (1H, d, $J=4,5$ Hz); 7,59 (1H, d, $J=9,0$ Hz); 7,71 (1H, s); 8,41 (1H, d, $J=4,5$ Hz); 11,75 (1H, s).

N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(2,2-diflorobenzo[*d*][1,3]dioksol-5-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 4v)



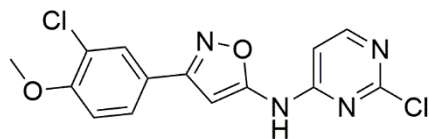
3-(2,2-Diflorobenzo[*d*][1,3]dioksol-5-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 3v) ve 2,4-dikloropirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 38). Erime derecesi: 216,1-217,3 °C. $C_{14}H_8ClF_2N_4O_3$ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 353,0253; bulunan: 353,0260. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 6,79 (1H, s); 7,02 (1H, d, *J*= 6,0 Hz); 7,56 (1H, d, *J*= 9,0 Hz); 7,74 (1H, d, *J*= 9,0 Hz); 7,92 (1H, s); 8,42 (1H, d, *J*= 6,0 Hz); 11,86 (1H, s).

N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(3,4-dimetoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4w)



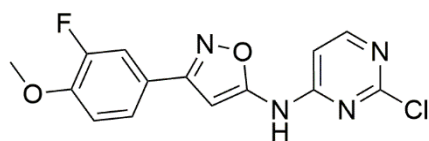
3-(3,4-Dimetoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3w) ve 2,4-dikloropirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 34). Erime derecesi: 205,4-206,9 °C. $C_{15}H_{14}ClN_4O_3$ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 333,0754; bulunan: 333,0757. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,81 (3H, s); 3,83 (3H, s); 6,25 (1H, d, *J*= 5,2 Hz); 6,61 (1H, s); 7,06 (1H, d, *J*= 8,4 Hz); 7,33-7,37 (2H, m); 8,12 (1H, d, *J*= 5,2 Hz); 11,00 (1H, s).

3-(3-Kloro-4-metoksifenil)-N-(2-kloropirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 4x)



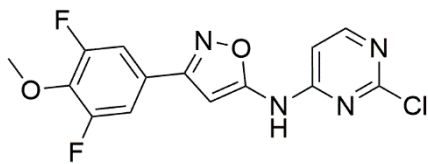
3-(3-Kloro-4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3x) ve 2,4-dikloropirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 29). Erime derecesi: 229,5-231,1 °C (dekompoze). $C_{14}H_{11}Cl_2N_4O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 337,0259; bulunan: 337,0221. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 3,93 (3H, s); 6,75 (1H, s); 7,02 (1H, d, $J=6,0$ Hz); 7,30 (1H, d, $J=9,0$ Hz); 7,80-7,91 (2H, m); 8,42 (1H, d, $J=6,0$ Hz); 11,82 (1H, s).

N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(3-floro-4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4y)



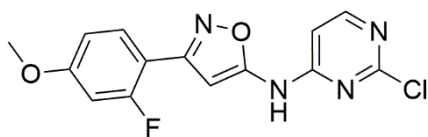
3-(3-Floro-4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3y) ve 2,4-dikloropirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 30). Erime derecesi: 214,7-215,6 °C (dekompoze). $C_{14}H_{11}ClFN_4O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 321,0555; bulunan: 321,0540. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 3,91 (3H, s); 6,74 (1H, s); 7,02 (1H, d, $J=6,0$ Hz); 7,31 (1H, d, $J=9,0$ Hz); 7,64-7,72 (2H, m); 8,42 (1H, d, $J=6,0$ Hz); 11,81 (1H, s).

N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(3,5-difloro-4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4z)



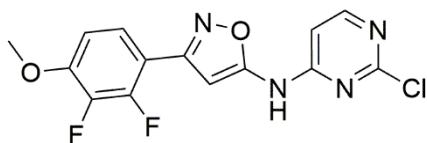
3-(3,5-Difloro-4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3z) ve 2,4-dikloropirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 31). Erime derecesi: 225,4-226,1 °C. $C_{14}H_{10}ClF_2N_4O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 339,0460; bulunan: 339,0446. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 4,01 (3H, s); 6,81 (1H, s); 7,02 (1H, d, $J=6,0$ Hz); 7,68 (2H, d, $J=9,0$ Hz); 7,68 (2H, d, $J=9,0$ Hz); 8,41 (1H, d, $J=6,0$ Hz); 11,86 (1H, s).

N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(2-floro-4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 33)



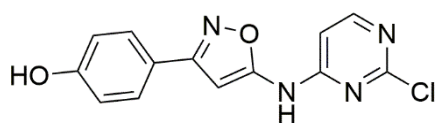
3-(2-Floro-4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 32) ve 2,4-dikloropirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 33). Erime derecesi: 226,0-228,0 °C. $C_{14}H_{11}ClFN_4O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 321,0555; bulunan: 321,0553. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 3,85 (3H, s); 6,71 (1H, d, $J=3,0$ Hz); 6,93-7,06 (3H, m); 7,82 (1H, t, $J=9,0$ Hz); 8,41 (1H, d, $J=6,0$ Hz); 11,86 (1H, s).

N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(2,3-difloro-4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 38)



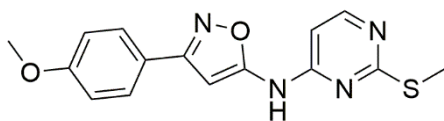
3-(2,3-Difloro-4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 37) ve 2,4-dikloropirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: %25). Erime derecesi: 197,3-199,5 °C. $C_{14}H_{10}ClF_2N_4O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 339,0460; bulunan: 339,0466. 1H -NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO- d_6): δ 3,96 (3H, s); 6,73 (1H, s); 7,01 (1H, d, $J = 4,0$ Hz); 7,20 (1H, t, $J = 8,0$ Hz); 7,68 (1H, t, $J = 8,0$ Hz); 8,43 (1H, d, $J = 4,0$ Hz); 11,97 (1H, s).

4-(5-((2-Kloropirimidin-4-il)amino)izoksazol-3-il)fenol (Bileşik 40)



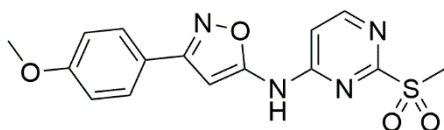
N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin'den (Bileşik 4a) hareketle 3.1.2.'de belirtilen sentez yöntemi 9'a göre sentezlendi (Verim: % 76). Erime derecesi: 226,8-228,8°C (dekompoze). $C_{13}H_{11}ClN_4O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 289,0492; bulunan: 289,0479. 1H -NMR Spektrumu (500 MHz, DMSO- d_6): δ 6,65 (1H, s); 6,90 (2H, d, $J = 8,55$ Hz); 7,01 (1H, d, $J = 5,75$ Hz); 7,67 (2H, d, $J = 8,55$ Hz); 8,41 (2H, d, $J = 8,55$ Hz); 9,92 (1H, s); 11,75 (1H, s).

3-(4-Metoksifenil)-N-(2-(metiltiyo)pirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 61)

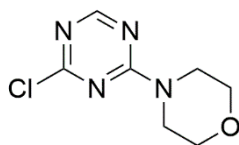


3-(4-Metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3a) ve 4-kloro-2-(metiltiyo)pirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5b'ye göre sentezlendi (Verim: % 92). Erime derecesi: 226,2-227,7 °C. $C_{15}H_{15}N_4O_2S$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 315,0916; bulunan: 315,0925. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 2,58 (3H, s); 3,82 (1H, s); 6,69 (1H, d, J = 6,0 Hz); 6,71 (1H, s); 7,07 (2H, d, J = 7,5 Hz); 7,75 (1H, d, J = 7,5 Hz); 8,30 (1H, d, J = 6,0 Hz); 12,04 (1H, s).

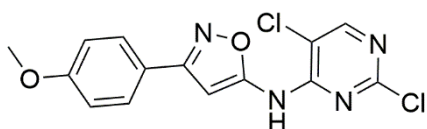
3-(4-Metoksifenil)-N-(2-(metiltiyo)pirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 62)



3-(4-Metoksifenil)-N-(2-(metiltiyo)pirimidin-4-il)izoksazol-5-amin'den (Bileşik 61) hareketle 3.1.2.'de belirtilen sentez yöntemi 5c'ye göre sentezlendi (Verim: % 79). Erime derecesi: 185,3-186,9 °C. $C_{15}H_{14}N_4O_4S$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 347,0814; bulunan: 347,0823. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6): δ 3,43 (3H, s); 3,82 (1H, s); 6,84 (1H, s); 7,10 (2H, d, J = 9,0 Hz); 7,21 (1H, d, J = 6,0 Hz); 7,76 (2H, d, J = 9,0 Hz); 8,68 (1H, d, J = 6,0 Hz); 12,04 (1H, s).

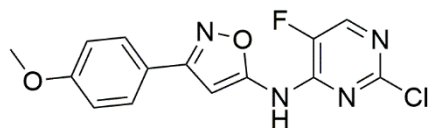
4-(4-Kloro-1,3,5-triazin-2-il)morfolin (Bileşik 69)

2,4-Dikloro-1,3,5-triazinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen sentez yöntemi 7'ye göre sentezlendi (Verim: % 38). CAS: 16350-74-6. Erime derecesi: 85,9-87,7 °C. $C_7H_{10}ClN_4O$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 201,0543 ; bulunan: 201,0537.

N-(2,5-dikloropirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 71)

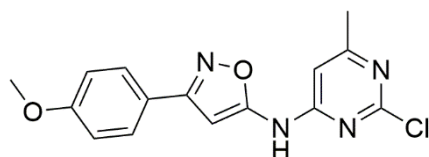
3-(4-Metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3a) ve 2,4,5-trikloropirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 23). Erime derecesi: 224,7-225,7 °C. $C_{14}H_{11}Cl_2N_4O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 337,0259; bulunan: 337,0256. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 3,83 (3H, s); 6,83 (1H, s); 7,09 (2H, d, $J = 9,0$ Hz); 7,80 (2H, d, $J = 9,0$ Hz); 8,60 (1H, s); 11,33 (1H, s).

N-(2-kloro-5-floropirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 72)



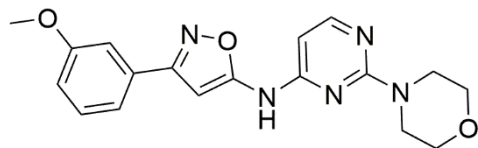
3-(4-Metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3a) ve 2,4-dikloro-5-floropirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 28). Erime derecesi: 219,5-221,2 °C. $C_{14}H_{11}ClFN_4O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 321,0555; bulunan: 321,0547. 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 3,83 (3H, s); 6,78 (1H, s); 7,09 (2H, d, $J=9,0$ Hz); 7,80 (2H, d, $J=9,0$ Hz); 8,55 (1H, d, $J=3,0$ Hz); 11,99 (1H, s).

N-(2-kloro-6-metilpirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 73)



3-(4-Metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3a) ve 2,4-dikloro-6-metilpirimidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 30). Erime derecesi: 220,7-221,6 °C. $C_{15}H_{14}ClN_4O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 317,0805; bulunan: 317,0804 1H -NMR Spektrumu (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 2,39 (3H, s); 3,83 (3H, s); 6,67 (1H, s); 6,85 (1H, s); 7,08 (2H, d, $J=9,0$ Hz); 7,79 (2H, d, $J=9,0$ Hz); 11,66 (1H, s).

3-(3-Metoksifenil)-N-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 5)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(3-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4b) ve morfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 61).

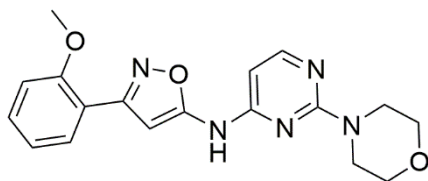
Erime derecesi: 206,8-208,7 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,70-3,72 (8H, m); 3,83 (3H, s); 6,27 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 6,61 (1H, s), 7,06-7,45 (4H, m); 8,13 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 10,98 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 44,08; 55,12; 65,98; 84,51; 97,00; 111,27; 116,03; 118,77; 130,23; 130,34; 157,36; 157,52; 159,55; 161,35; 162,46; 162,86.

C₁₈H₂₀N₅O₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 354,1566; bulunan: 354,1555.

3-(2-Metoksifenil)-N-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 6)



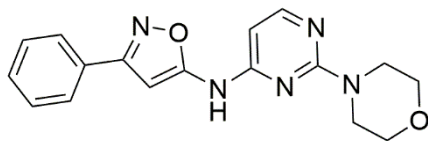
N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(2-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4c) ve morfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 60).

Erime derecesi: 201,9-203,3 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,71-3,72 (8H, m); 3,85 (3H, s); 6,24 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 6,78 (1H, s); 7,05 (1H, td, *J*= 7,6 Hz, *J*= 1,6 Hz); 7,18 (1H, d, *J*= 7,6 Hz); 7,47 (1H, td, *J*= 7,6 Hz, *J*= 1,6 Hz); 7,79 (1H, dd, *J*= 7,6 Hz, *J*= 1,6 Hz); 8,11 (1H, d, *J*= 5,6 Hz), 11,02 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 44,00; 55,50; 65,91; 87,93; 97,12; 112,27; 117,55; 120,68; 128,34; 131,41; 156,99; 157,28; 157,32; 160,17; 161,31; 161,92.

C₁₈H₂₀N₅O₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 354,1566; bulunan: 354,1567.

N-(2-morfolinopirimidin-4-il)-3-fenilizoksazol-5-amin (Bileşik 7)

N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-fenilizoksazol-5-amin (Bileşik 4d) ve morfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 58).

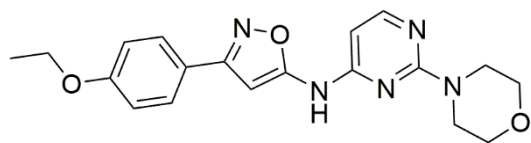
Erime derecesi: 209,6-211,3 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,68-3,72 (8H, m); 6,26 (1H, d, *J*= 5,8 Hz); 6,60 (1H, s); 7,48-7,52 (3H, m); 7,80-7,82 (2H, m); 8,12 (1H, d, *J*= 5,8 Hz); 11,00 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 44,06; 65,91; 84,19; 96,93; 126,33; 128,96; 129,03; 129,97; 157,34; 157,43; 161,31; 162,47; 162,84.

C₁₇H₁₈N₅O₂ için; HRMS (*m/z*) [*M*+H]⁺ hesaplanan: 324,1460; bulunan: 324,1461.

3-(4-Etoksifenil)-N-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 8)



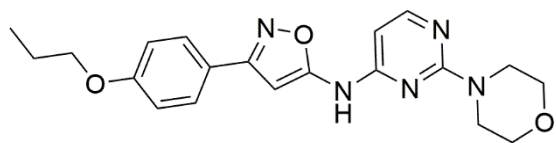
N-(2-Kloropirimidin-4-il)-3-(4-etoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4e) ve morfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 65).

Erime derecesi: 215,8-217,3 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,34 (3H, t, *J*= 6,8 Hz); 3,70-3,71 (8H, m); 4,07 (2H, q, *J*= 6,8 Hz); 6,26 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 6,64 (1H, s); 7,02 (2H, d, *J*= 8,4 Hz); 7,73 (2H, d, *J*= 8,4 Hz); 8,12 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 10,99 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14,54; 44,09; 63,18; 65,99; 83,99; 96,99; 114,83; 121,28; 127,86; 157,38; 157,44; 159,88; 161,36; 162,14; 162,58.

C₁₉H₂₁N₅O₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 368,1723; bulunan: 368,1732.

N-(2-morfolinopirimidin-4-il)-3-(4-propoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 9)

N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-propoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4f) ve morfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 70).

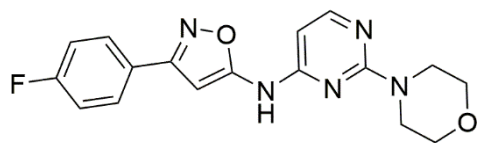
Erime derecesi: 202,3-203,1 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0,98 (3H, t, *J*= 7,0 Hz); 1,72-1,77 (2H, m); 3,70-3,71 (8H, m); 3,99 (2H, t, *J*= 7,0 Hz); 6,26 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 6,53 (1H, s); 7,04 (2H, d, *J*= 8,6 Hz); 7,72 (2H, d, *J*= 8,6 Hz); 8,12 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 10,93 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10,23; 21,88; 44,08; 65,93; 69,06; 84,01; 96,93; 114,87; 121,28; 127,80; 157,39; 160,02; 161,33; 162,10; 162,57.

C₂₀H₂₃N₅O₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 382,1879; bulunan: 382,1882.

3-(4-Florofenil)-N-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 10)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-florofenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4g) ve morfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 69).

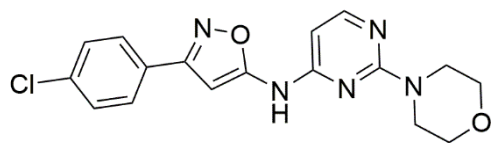
Erime derecesi: 219,9-221,0 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,69-3,71 (8H, m); 6,26 (1H, d, *J*= 5,4 Hz); 6,59 (1H, s); 7,34 (2H, t, *J*= 8,7 Hz); 7,87 (2H, dd, *J*= 8,7 Hz, *J*= 5,4 Hz), 8,13 (1H, d, *J*= 5,4 Hz), 11,03 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 44,09; 65,98; 84,22; 96,98; 116,02 (d, ²*J*_{C-F}= 21,8 Hz); 125,60 (d, ⁴*J*_{C-F}= 3,2 Hz); 128,71 (d, ³*J*_{C-F}= 9,0 Hz); 157,34; 157,49; 161,35; 161,63; 162,97; 163,07 (d, ¹*J*_{C-F}= 245,6 Hz).

C₁₇H₁₇FN₅O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 342,1366; bulunan: 342,1350.

3-(4-Klorofenil)-N-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 11)



3-(4-Klorofenil)-N-(2-kloropirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 4h) ve morfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 53).

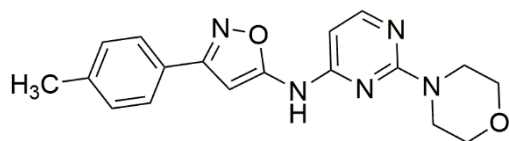
Erime derecesi: 227,2-228,9 °C (dekompoze).

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,69-3,70 (8H, m); 6,27 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 6,61 (1H, s); 7,56 (2H, d, *J*= 8,2 Hz); 7,83 (2H, d, *J*= 8,2 Hz); 8,13 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 11,03 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 44,07; 65,94; 84,22; 96,94; 127,88; 128,15; 129,06; 134,67; 157,31; 157,49; 161,32; 161,54; 163,07.

C₁₇H₁₇ClN₅O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 358,1071; bulunan: 358,1072.

N-(2-morfolinopirimidin-4-il)-3-(*p*-tolil)izoksazol-5-amin (Bileşik 12)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(*p*-tolil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4i) ve morfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 53).

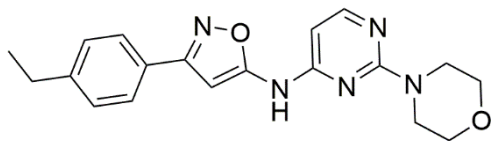
Erime derecesi: 215,3-217,3 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2,36 (3H, s); 3,70-3,71 (8H, m); 6,26 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 6,56 (1H, s); 7,31 (2H, d, *J*= 7,8 Hz); 7,69 (2H, d, *J*= 7,8 Hz); 8,12 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 10,97 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 20,94; 44,10; 65,99; 84,18; 97,00; 126,28; 126,32; 129,60; 139,74; 157,38; 157,48; 161,36; 162,46; 162,74.

C₁₈H₂₀N₅O₂ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 338,1617; bulunan: 338,1613.

3-(4-Etilfenil)-N-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 13)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-etilfenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4j) ve morfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 59).

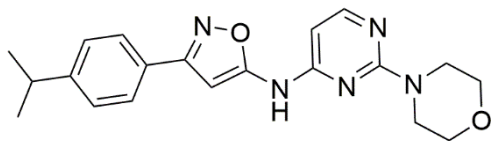
Erime derecesi: 213,9-215,2 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,18 (3H, t, *J*= 7,6 Hz); 2,63 (2H, q, *J*= 7,6 Hz); 3,68-3,69 (8H, m); 6,24 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 6,56 (1H, s); 7,32 (2H, d, *J*= 8,4 Hz); 7,70 (2H, d, *J*= 8,4 Hz); 8,10 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 11,00 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 15,28; 27,93; 44,02; 65,91; 84,12; 96,93; 126,34; 126,46; 128,35; 145,87; 157,30; 157,40; 161,29; 162,39; 162,65.

C₁₉H₂₂N₅O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 352,1774; bulunan: 352,1764.

3-(4-İzopropilfenil)-N-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 14)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-izopropilfenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4k) ve morfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 65).

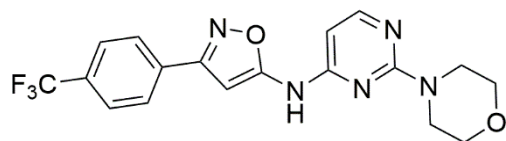
Erime derecesi: 224,5-226,0 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,24 (6H, d, *J*= 6,8 Hz); 2,95 (1H, h, *J*= 6,8 Hz); 3,70-3,73 (8H, m); 6,27 (1H, d, *J*= 5,2 Hz); 6,59 (1H, s); 7,39 (2H, d, *J*= 8,2 Hz); 7,74 (2H, d, *J*= 8,2 Hz); 8,13 (1H, d, *J*= 5,2 Hz); 11,04 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 23,58; 33,25; 44,04; 65,92; 84,14; 96,96; 126,39; 126,62; 126,92; 150,44; 157,31; 157,41; 161,31; 162,40; 162,66.

C₂₀H₂₃N₅O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 366,1930; bulunan: 366,1915.

N-(2-morfolinopirimidin-4-il)-3-(4-(triflorometil)fenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 15)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-(triflorometil)fenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4I) ve morfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 53).

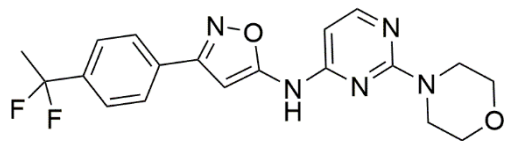
Erime derecesi: 225,0-227,0 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,70-3,71 (8H, m); 6,27 (1H, d, *J*= 5,2 Hz); 6,84 (1H, s); 7,86 (2H, d, *J*= 8,4 Hz); 8,03 (2H, d, *J*= 8,4 Hz); 8,13 (1H, d, *J*= 5,2 Hz); 11,07 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 44,07; 65,92; 84,40; 96,95; 123,90 (q, ¹*J*_{C-F}= 270,6 Hz); 125,86 (q, ³*J*_{C-F}= 3,2 Hz); 127,18; 130,06 (q, ²*J*_{C-F}= 31,4 Hz); 132,94; 157,27; 157,50; 161,31; 161,41; 163,32.

C₁₈H₁₇F₃N₅O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 392,1334; bulunan: 392,1339.

3-(4-(1,1-Difloroetil)fenil)-*N*-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 16)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-(1,1-difloroetil)fenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4m) ve morfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 63).

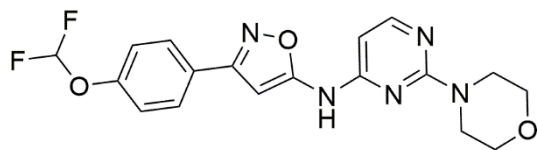
Erime derecesi: 221,3-223,1 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2,00 (3H, t, J_{C-F} = 19 Hz); 3,70-3,71 (8H, m); 6,27 (1H, d, J = 5,6 Hz); 6,66 (1H, s); 7,70 (2H, d, J = 8,6 Hz); 7,93 (2H, d, J = 8,6 Hz); 8,14 (1H, d, J = 5,6 Hz); 11,10 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 25,16 (t, $^2J_{C-F}$ = 28,6 Hz); 44,30; 66,19; 84,58; 97,23; 122,30 (t, $^1J_{C-F}$ = 236,6 Hz); 125,61 (t, $^2J_{C-F}$ = 26,7 Hz); 126,95; 130,86; 138,94; 157,53; 157,76; 161,56; 162,06; 163,32.

C₁₉H₂₀F₂N₅O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 388,1585; bulunan: 388,1575.

3-(4-(Diflorometoksi)fenil)-N-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 17)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-(diflorometoksi)fenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4n) ve morfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 70).

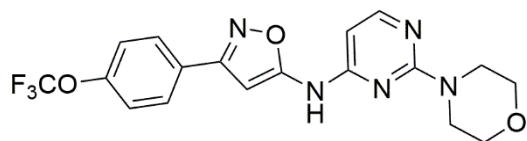
Erime derecesi: 202,8-204,8 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,69-3,70 (8H, m); 6,25 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 7,30 (2H, d, *J*= 8,6 Hz); 7,33 (1H, t, *J*_{C-F}= 74,0 Hz); 7,87 (2H, d, *J*= 8,6 Hz); 8,12 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 11,05 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 44,07; 65,96; 84,17; 96,98; 116,11 (t, ¹*J*_{C-F}= 256,5 Hz); 118,98; 125,92; 128,26; 152,11 (t, ³*J*_{C-F}= 3,5 Hz); 157,30; 157,47; 161,33; 161,63; 162,93.

C₁₈H₁₈F₂N₅O₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 390,1378; bulunan: 390,1361.

N-(2-morfolinopirimidin-4-il)-3-(4-(triflorometoksi)fenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 18)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-(triflorometoksi)fenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4o) ve morfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 58).

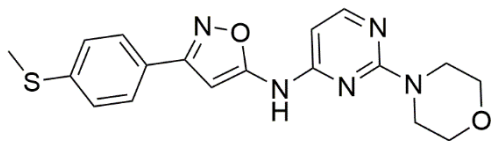
Erime derecesi: 196,5-198,5 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,71 (8H, m); 6,27 (1H, d, *J*= 4,6 Hz); 6,64 (1H, s); 7,51 (2H, d, *J*= 7,6 Hz); 7,96 (2H, d, *J*= 7.6 Hz); 8,14 (1H, d, *J*= 4,6 Hz); 11,10 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 44,08; 65,96; 84,26; 96,99; 121,48; 128,27; 128,51; 149,36; 157,28; 157,51; 161,33; 161,40; 163,12.

C₁₈H₁₇F₃N₅O₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 408,1283; bulunan: 408,1289.

3-(4-(Metiltiyo)fenil)-N-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 19)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-(metiltiyo)fenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4p) ve morfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 65).

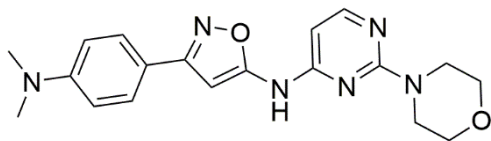
Erime derecesi: 197,7-199,5 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2,50 (3H, s); 3,68-3,69 (8H, m); 6,23 (1H, d, *J*= 5,4 Hz); 6,56 (1H, s); 7,35 (2H, d, *J*= 8,0 Hz); 7,72 (2H, d, *J*= 8,0 Hz); 8,10 (1H, d, *J*= 5,4 Hz); 11,00 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14,19; 44,04; 65,93; 84,03; 96,95; 125,22; 125,82; 126,74; 140,81; 157,29; 157,43; 161,29; 162,01; 162,74.

C₁₈H₂₀N₅O₂S için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 370,1338; bulunan: 370,1334.

3-(4-(Dimetilamino)fenil)-N-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 20)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-(dimetilamino)fenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4q) ve morfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 66).

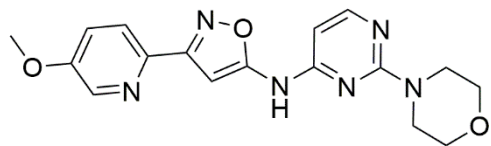
Erime derecesi: 212,8-214,8 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): 2,97 (6H, s); 3,70-3,71 (8H, m); 6,25 (1H, d, *J* = 5,4 Hz); 6,50 (1H, s); 6,79 (2H, d, *J* = 8,4 Hz); 7,62 (2H, d, *J* = 8,4 Hz); 8,12 (1H, d, *J* = 5,4 Hz); 10,93 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 40,23; 44,57; 66,44; 84,21; 97,46; 112,44; 116,60; 127,72; 151,77; 157,85; 157,88; 161,83; 162,64; 162,95.

C₁₉H₂₃N₆O₂ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 367,1882; bulunan: 367,1884.

3-(5-Metoksipiridin-2-il)-N-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 21)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(5-metoksipiridin-3-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 4r) ve morfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 45).

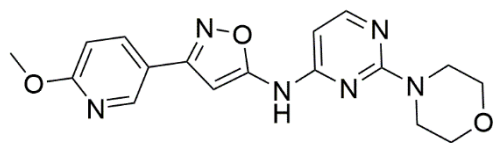
Erime derecesi: 213,0-214,3 °C (dekompoze).

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,71-3,72 (8H, m); 3,90 (3H, s); 6,27 (2H, d, *J*= 5,2 Hz); 6,62 (1H, s); 7,53 (1H, dd, *J*= 8,4 Hz, *J*= 2,9 Hz); 7,93 (1H, d, *J*= 8,7 Hz); 8,14 (1H, d, *J*= 5,2 Hz); 8,43 (1H, d, *J*= 2,9 Hz); 11,10 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 44,08; 55,78; 65,93; 84,54; 97,10; 121,34; 121,80; 137,59; 140,39; 156,19; 157,35; 157,50; 161,34; 162,73; 163,09.

C₁₇H₁₉N₆O₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 355,1519; bulunan: 355,1508.

3-(6-Metoksipiridin-3-il)-N-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 22)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(6-metoksipiridin-3-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 4s) ve morfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 81).

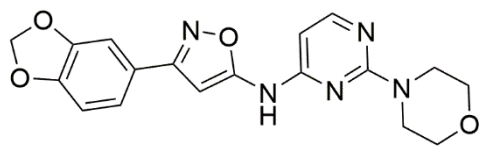
Erime derecesi: 200,6-201,1 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,68-3,69 (8H, m); 3,90 (3H, s); 6,23 (2H, d, *J*= 5,2 Hz); 6,59 (1H, s); 6,93 (2H, d, *J*= 8,4 Hz); 8,08-8,11 (2H, m); 8,14 (1H, d, *J*= 5,2 Hz); 8,62 (1H, d, *J*= 2,4 Hz); 11,00 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 44,02; 53,44; 65,96; 83,73; 96,95; 110,98; 118,75; 136,84; 145,26; 157,25; 157,42; 160,06; 161,30; 162,80; 164,45.

C₁₇H₁₉N₆O₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 355,1519; bulunan: 355,1514.

3-(Benzo[d][1,3]dioksol-5-il)-N-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 23)



3-(benzo[d][1,3]dioksol-5-il)-N-(2-kloropirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 4t) ve morfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 56).

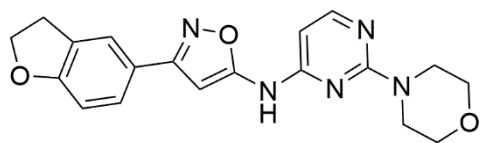
Erime derecesi: 218,2-219,4 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,67-3,68 (8H, m); 6,08 (2H, s); 6,23 (1H, d, *J*= 5,4 Hz); 6,51 (1H, s); 7,00-7,02 (1H, m); 7,29-7,32 (2H, m); 8,10 (1H, d, *J*= 5,4 Hz); 10,96 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 44,08; 66,00; 84,22; 96,97; 101,49; 106,30; 108,75; 120,92; 122,93; 147,83; 148,75; 157,38; 157,47; 161,36; 162,18; 162,67.

C₁₈H₁₈N₅O₄ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 368,1348; bulunan: 368,1348.

3-(2,3-Dihydrobenzofuran-5-il)-N-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 24)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(2,3-dihydrobenzofuran-5-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 4u) ve morfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 50).

Erime derecesi: 236,5-237,3 °C.

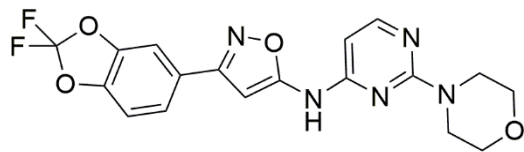
¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,24 (2H, t, *J*= 8,8 Hz); 3,70-3,71 (8H, m); 4,59 (2H, t, *J*= 8,8 Hz); 6,26 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 6,52 (1H, s); 6,87 (1H, d, *J*= 8,0 Hz); 7,55 (1H, dd, *J*= 8,0 Hz, *J*= 1,5 Hz); 7,68 (1H, d, *J*= 1,5 Hz); 8,12 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 10,96 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 28,83; 44,10; 65,98; 71,42; 84,05; 96,96; 109,27; 121,33; 123,20; 126,76; 128,38; 157,40; 157,45; 161,25; 161,36; 162,44; 162,49.

C₁₉H₂₀N₅O₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 366,1566; bulunan: 366,1554.

3-(2,2-Diflorobenzo[d][1,3]dioksol-5-il)-N-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin

(Bileşik 25)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(2,2-diflorobenzo[d][1,3]dioksol-5-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 4v) ve morfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 55).

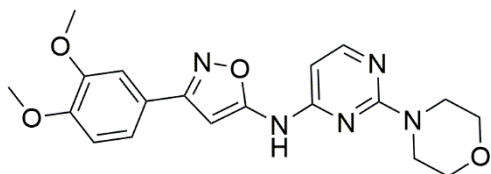
Erime derecesi: 223,6-225,2 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,69-3,70 (8H, m); 6,25 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 6,61 (1H, s); 7,53 (1H, d, *J*= 8,0 Hz); 7,69 (1H, dd, *J*= 8,0 Hz, *J*= 1,6 Hz); 7,85 (1H, d, *J*= 1,6 Hz); 8,12 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 11,07 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 44,09; 66,01; 84,32; 96,98; 108,28; 110,64; 123,21; 125,80; 131,16 (t, ¹*J*_{C-F}= 252,6 Hz); 143,24; 143,80; 157,31; 157,52; 161,36; 161,51; 163,10.

C₁₈H₁₆F₂N₅O₄ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 404,1170; bulunan: 404,1165.

3-(3,4-Dimetoksifenil)-N-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 26)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(3,4-dimetoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4w) ve morfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 46).

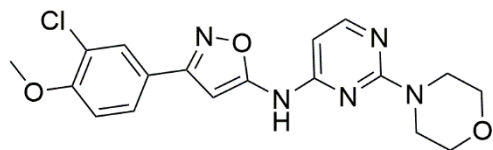
Erime derecesi: 201,7-203,1 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,70-3,71 (8H, m); 3,81 (3H, s); 3,83 (3H, s); 6,25 (1H, d, *J*= 5,2 Hz); 6,61 (1H, s); 7,06 (1H, d, *J*= 8,4 Hz); 7,33-7,37 (2H, m); 8,12 (1H, d, *J*= 5,2 Hz); 11,00 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 44,08; 55,36; 55,53; 65,98; 84,32; 96,99; 109,22; 111,87; 119,37; 121,49; 148,90; 150,29; 157,36; 157,47; 161,36; 162,31; 162,57.

C₁₉H₂₂N₅O₄ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 384,1672; bulunan: 384,1654.

3-(3-Kloro-4-metoksifenil)-N-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 27)



3-(3-Kloro-4-metoksifenil)-N-(2-kloropirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 4x) ve morfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 55).

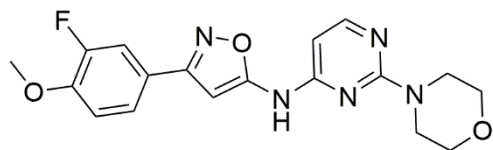
Erime derecesi: 208,2-209,6 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,67-3,68 (8H, m); 3,90 (3H, s); 6,24 (1H, d, *J*= 6,0 Hz); 6,58 (1H, s); 7,26 (1H, d, *J*= 8,6 Hz); 7,75 (1H, dd, *J*= 8,6 Hz, *J*= 2,0 Hz); 7,83 (1H, d, *J*= 2,0 Hz); 8,11 (1H, d, *J*= 6,0 Hz); 11,01 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 44,10; 56,32; 66,01; 84,18; 96,96; 113,21; 121,63; 122,34; 126,86; 127,47; 155,81; 157,38; 157,57; 161,24; 161,37; 162,91.

C₁₈H₁₉ClN₅O₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 388,1176; bulunan: 388,1161.

3-(3-Floro-4-metoksifenil)-N-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 28)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(3-floro-4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4y) ve morfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 52).

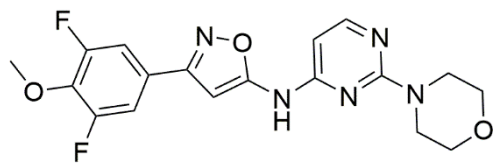
Erime derecesi: 192,6-193,8 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,67-3,68 (8H, m); 3,87 (3H, s); 6,23 (1H, d, *J*= 5,4 Hz); 6,55 (1H, s); 7,26 (1H, t, *J*= 8,6 Hz); 7,57-7,63 (2H, m); 8,10 (1H, d, *J*= 5,4 Hz); 11,00 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 44,04; 56,02; 65,96; 84,10; 96,93; 113,64 (d, ²*J*_{C-F}= 19,2 Hz); 114,11; 121,76 (d, ³*J*_{C-F}= 7,1 Hz), 123,26 (d, ⁴*J*_{C-F}= 3,2 Hz); 148,51 (d, ²*J*_{C-F}= 10,2 Hz); 151,40 (d, ¹*J*_{C-F}= 243,0 Hz); 157,31; 157,44; 161,31; 161,37 (d, ²*J*_{C-F}= 1,9 Hz); 162,82.

C₁₈H₁₉FN₅O₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 372,1472; bulunan: 372,1454.

3-(3,5-Difloro-4-metoksifenil)-N-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 29)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(3,5-difloro-4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4z) ve morfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 81).

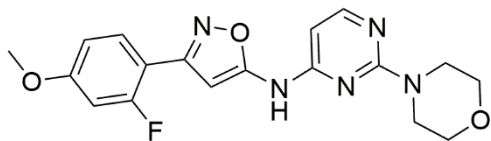
Erime derecesi: 174,1-175,2 °C.

¹H-NMR Spektrumu (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,70-3,71 (8H, m); 4,00 (3H, s); 6,26 (1H, d, *J*= 5,5 Hz); 6,61 (1H, s); 7,60 (2H, d, *J*= 9,0 Hz); 8,13 (1H, d, *J*= 5,5 Hz); 11,06 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 44,58; 62,27 (t, ⁴*J*_{C-F}= 3,3 Hz); 66,52; 84,86; 97,43; 111,36 (dd, ²*J*_{C-F}= 24,2 Hz, ⁴*J*_{C-F}= 6,4 Hz); 124,71 (t, ³*J*_{C-F}= 10,0 Hz); 137,68 (t, ²*J*_{C-F}= 13,9 Hz); 155,56 (dd, ¹*J*_{C-F}= 245,0 Hz, ³*J*_{C-F}= 6,5 Hz); 157,82; 158,06; 161,19; 161,86; 163,76.

C₁₈H₁₈F₂N₅O₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 390,1378; bulunan: 390,1373.

3-(2-Floro-4-metoksifenil)-N-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 34)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(2-floro-4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 33) ve morfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 71).

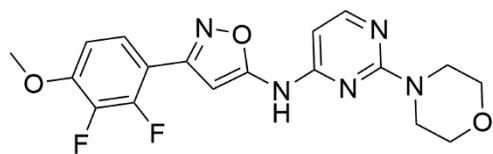
Erime derecesi: 204,6-205,7 °C.

¹H-NMR Spektrumu (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,69-3,71 (8H, m); 3,84 (3H, s); 6,25 (1H, d, *J*= 5,5 Hz); 6,63 (1H, d, *J*= 3,9 Hz); 6,93 (1H, dd, *J*= 8,75 Hz, *J*= 2,45 Hz); 7,02 (1H, dd, *J*= 13,0 Hz, *J*= 2,45 Hz); 7,82 (1H, t, *J*= 8,75 Hz); 8,13 (1H, d, *J*= 5,5 Hz); 11,09 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 44,57; 56,35; 66,39; 86,77 (d, ³*J*_{C-F}= 9,6 Hz); 97,59; 102,69 (d, ²*J*_{C-F}= 25,5 Hz); 109,46 (d, ²*J*_{C-F}= 12,1 Hz); 111,95 (d, ⁴*J*_{C-F}= 1,8 Hz); 129,66 (d, ⁴*J*_{C-F}= 4,9 Hz); 157,76; 157,98; 158,29 (d, ⁴*J*_{C-F}= 2,0 Hz); 161,13 (d, ¹*J*_{C-F}= 248,4 Hz); 162,78 (d, ³*J*_{C-F}= 11,3 Hz); 163,13.

C₁₈H₁₉FN₅O₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 372,1472; bulunan: 372,1459.

3-(2,3-Difloro-4-metoksifenil)-N-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 39)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(2,3-difloro-4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 38) ve morfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 52).

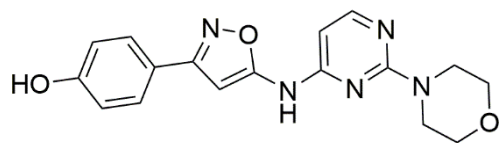
Erime derecesi: 235,5-237,1 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,67-3,68 (8H, m); 3,92 (3H, s); 6,23 (1H, d, *J*= 5,4 Hz); 6,23 (1H, d, *J*= 2,8 Hz); 7,14 (1H, t, *J*= 8,3 Hz); 7,63 (1H, t, *J*= 8,3 Hz); 8,13 (1H, d, *J*= 5,4 Hz); 11,14 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 43,99; 56,66; 65,85; 85,91 (d, ³*J*_{C-F}= 7,7 Hz); 97,04; 109,52; 110,43 (d, ³*J*_{C-F}= 9,0 Hz); 122,71 (d, ⁴*J*_{C-F}= 3,9 Hz); 140,35 (dd, ¹*J*_{C-F}= 243,7 Hz, ²*J*_{C-F}= 14,1 Hz); 148,53 (dd, ¹*J*_{C-F}= 249,7 Hz, ²*J*_{C-F}= 11,2 Hz); 149,70; 157,13; 157,21; 157,46; 161,20; 162,80.

C₁₈H₁₈F₂N₅O₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 390,1378; bulunan: 390,1362.

4-(5-((2-Morfolinopirimidin-4-il)amino)izoksazol-3-il)fenol (Bileşik 41)



4-(5-((2-Kloropirimidin-4-il)amino)izoksazol-3-il)fenol (Bileşik 40) ve morfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 70).

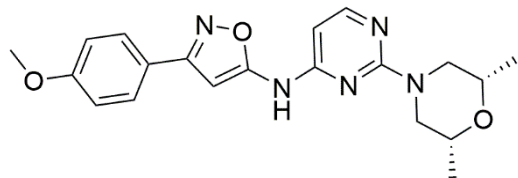
Erime derecesi: 243,3-244,9 °C (dekompoze).

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,67-3,68 (8H, m); 6,22 (1H, d, *J*= 5,2 Hz); 6,48 (1H, s); 6,85 (2H, d, *J*= 8,6 Hz); 7,61 (2H, d, *J*= 8,6 Hz); 8,09 (1H, d, *J*= 5,2 Hz); 9,86 (1H, s); 10,93 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 44,05; 65,94; 83,85; 96,93; 115,71; 119,78; 127,87; 157,35; 157,38; 159,03; 161,31; 162,31; 162,39.

C₁₇H₁₈N₅O₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 340,1410; bulunan: 340,1403.

N-(2-((2*R*,6*S*)-2,6-dimetilmorfolino)pirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin
(Bileşik 42)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4a) ve (2*R*,6*S*)-2,6-dimetilmorfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 47).

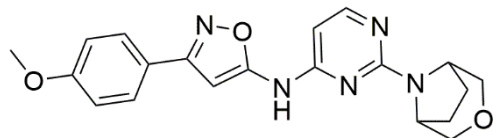
Erime derecesi: 193,0-194,2 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,16 (3H, s); 1,18 (3H, s); 2,54-2,60 (2H, m); 3,57-3,61 (2H, m); 3,82 (3H, s); 4,46-4,49 (2H, m); 6,24 (1H, d, *J*= 5,2 Hz), 6,58 (1H, s); 7,05 (2H, d, *J*= 8,8 Hz); 7,72 (2H, d, *J*= 8,8 Hz), 8,11 (1H, d, *J*= 5,2 Hz); 10,96 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 18,66; 49,14; 55,22; 70,82; 84,19; 96,71; 114,36; 121,42; 127,55; 157,27; 157,43; 160,60; 160,89; 161,95; 162,55.

C₂₀H₂₄N₅O₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 382,1879; bulunan: 382,1866.

N-(2-(3-oksa-8-azabisiklo[3.2.1]oktan-8-il)pirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 43)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4a) ve 3-oksa-8-azabisiklo[3.2.1]oktan hidroklorür tuzundan hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6b'ye göre sentezlendi (Verim: % 18).

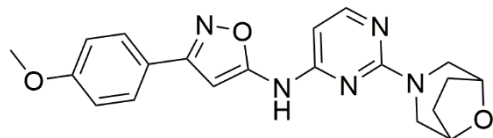
Erime derecesi: 199,5-200,5°C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,92-2,00 (4H, m); 3,60 (2H, d, *J*= 10,6 Hz); 3,67 (2H, d, *J*= 10,6 Hz); 3,82 (3H, s); 4,59 (2H, m); 6,26 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 6,51 (1H, s); 7,06 (2H, d, *J*= 9,0 Hz); 7,73 (2H, d, *J*= 9,0 Hz); 8,12 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 10,97 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 26,62; 55,05; 55,24; 70,31; 83,88; 97,14; 114,47; 121,43; 127,83; 157,60; 157,80; 160,05; 160,61; 162,11; 162,63.

C₂₀H₂₂N₅O₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 380,1723; bulunan: 380,1727.

N-(2-(8-oksa-3-azabisiklo[3.2.1]oktan-3-il)pirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 44)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4a) ve 8-oksa-3-azabisiklo[3.2.1]oktan hidroklorür tuzundan hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6b'ye göre sentezlendi (Verim: % 24).

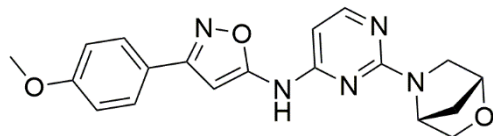
Erime derecesi: 201,9-203,8 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,67-1,83 (4H, m); 3,12 (2H, d, *J*= 12,4 Hz); 3,82 (3H, s); 4,15 (2H, d, *J*= 12,4 Hz), 4,44 (2H, m); 6,23 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 6,55 (1H, s); 7,06 (2H, d, *J*= 9,0 Hz); 7,74 (2H, d, *J*= 9,0 Hz); 8,08 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 10,97 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 27,49; 49,59; 55,19; 72,78; 83,91; 96,81; 114,39; 121,37; 127,80; 157,12; 157,27; 160,54; 162,05; 162,16; 162,57.

C₂₀H₂₂N₅O₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 380,1723; bulunan: 380,1715.

N-(2-((1*R*,4*R*)-2-oksa-5-azabisiklo[2.2.1]heptan-5-il)pirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 45)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4a) ve (1*R*,4*R*)-2-oksa-5-azabisiklo[2.2.1]heptan hidroklorür tuzundan hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6b'ye göre sentezlendi (Verim: % 34).

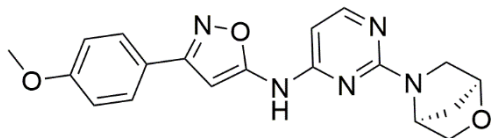
Erime derecesi: 199,5-200,5 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,89-1,93 (2H, m); 3,49-3,72 (4H, m); 3,82 (3H, s); 4,69-4,94 (2H, m); 6,22 (1H, d, *J*= 4,6 Hz); 6,64 (1H, s); 7,06 (2H, d, *J*= 8,4 Hz); 7,75 (2H, d, *J*= 8,4 Hz); 8,07 (1H, d, *J*= 4,6 Hz); 10,94 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 36,68; 55,75; 57,00; 73,51; 76,29; 84,58; 96,98; 114,95; 122,01; 128,32; 157,80; 158,01; 160,55; 161,10; 162,60; 163,15.

C₁₉H₂₀N₅O₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 366,1566; bulunan: 366,1580.

N-(2-((1*S*,4*S*)-2-oksa-5-azabisiklo[2.2.1]heptan-5-il)pirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 46)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4a) ve (1*S*,4*S*)-2-oksa-5-azabisiklo[2.2.1]heptan hidroklorür tuzundan hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6b'ye göre sentezlendi (Verim: % 43).

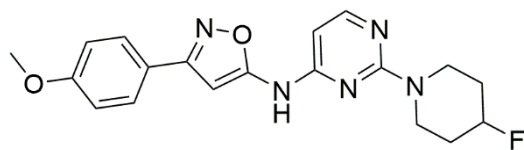
Erime derecesi: 201,7-203,2 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,90-2,00 (2H, m); 3,53-3,72 (4H, m); 3,83 (3H, s); 4,72-4,95 (2H, m); 6,23 (1H, d, *J*= 6,0 Hz); 6,67 (1H, s); 7,08 (2H, d, *J*= 8,0 Hz); 7,76 (2H, d, *J*= 8,0 Hz); 8,09 (1H, d, *J*= 6,0 Hz); 11,00 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 36,72; 55,75; 56,99; 73,51; 76,30; 84,59, 96,98; 114,95; 122,01; 128,33; 157,99; 158,07; 160,55; 161,10; 162,60; 163,16.

C₁₉H₂₀N₅O₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 366,1566; bulunan: 366,1580.

N-(2-(4-floropiperidin-1-il)pirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 47)



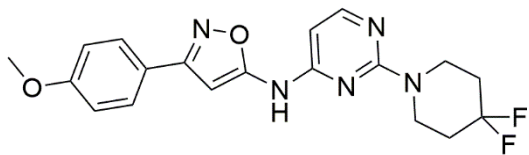
N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4a) ve 4-floropiperidin hidroklorür tuzundan hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6b'ye göre sentezlendi (Verim: % 60).

Erime derecesi: 210,1-211,2 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,74-1,98 (4H, m); 3,73-3,95 (7H, m); 4,87-4,99 (1H, m); 6,22 (1H, d, *J*= 5,4 Hz); 6,55 (1H, s); 7,07 (2H, d, *J*= 8,8 Hz); 7,73 (2H, d, *J*= 8,8 Hz); 8,11 (1H, d, *J*= 5,4 Hz); 10,98 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 30,68 (d, ²*J*_{C-F}= 19,1 Hz); 40,34 (d, ³*J*_{C-F}= 6,1 Hz); 55,25; 83,86; 88,85 (d, ¹*J*_{C-F}= 168,4 Hz); 96,58; 114,50; 121,43; 127,77; 157,46; 157,64; 160,63; 161,01; 162,09; 162,71.

C₁₉H₂₁FN₅O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 370,1679; bulunan: 370,1664.

N-(2-(4,4-difloropiperidin-1-il)pirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 48)

N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4a) ve 4,4-difloropiperidin hidroklorür tuzundan hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6b'ye göre sentezlendi (Verim: % 34).

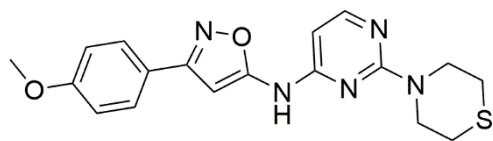
Erime derecesi: 219,9-221,3 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,98-2,10 (4H, m); 3,83 (3H, s); 3,92-3,94 (4H, m); 6,29 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 6,55 (1H, s); 7,07 (2H, d, *J*= 8,8 Hz); 7,76 (2H, d, *J*= 8,8 Hz); 8,14 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 11,04 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 33,05 (t, ²*J*_{C-F}= 22,5 Hz); 40,67; 55,24; 83,98; 97,14; 114,47; 121,39; 123,17 (t, ¹*J*_{C-F}= 239,6 Hz); 127,86; 157,55; 157,66; 160,63; 160,73; 162,13; 162,60.

C₁₉H₂₀F₂N₅O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 388,1585; bulunan: 388,1594.

3-(4-metoksifenil)-N-(2-tiyomorfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 49)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4a) ve tiyomorfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 45).

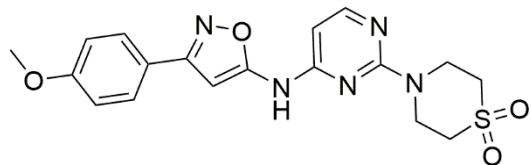
Erime derecesi: 181,7-182,9 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2,62-2,65 (4H, m); 3,80 (3H, s); 4,06-4,08 (4H, m); 6,21 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 6,49 (1H, s); 7,04 (2H, d, *J*= 8,8 Hz), 7,71 (2H, d, *J*= 8,8 Hz); 8,10 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 10,99 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 25,85; 46,34; 55,24; 83,85; 96,61; 114,49; 121,39; 127,80; 157,46; 157,63; 160,62; 160,67; 162,09; 162,66.

C₁₈H₂₀N₅O₂S için; HRMS (*m/z*) [*M*+H]⁺ hesaplanan: 370,1338; bulunan: 370,1343.

4-(4-((3-(4-Metoksifenil)izoksazol-5-il)amino)pirimidin-2-il)tiyomorfolin 1,1-dioksit (Bileşik 50)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4a) ve tiyomorfolin 1,1-dioksitten hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 47).

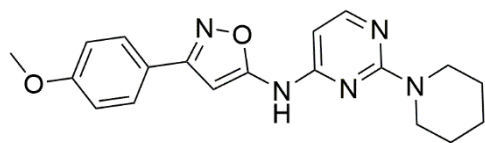
Erime derecesi: 230,9-232,7 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,20 (4H, m); 3,80 (3H, s); 4,22 (4H, m); 6,32 (1H, d, *J*= 5,32 Hz); 6,47 (1H, s); 7,04 (2H, d, *J*= 9,0 Hz); 7,75 (2H, d, *J*= 9,0 Hz); 8,15 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 8,15 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 11,08 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 42,46; 50,54; 55,24; 84,04; 97,80; 114,45; 121,30; 127,95; 157,65; 157,68; 160,19; 160,63; 162,15; 162,47.

C₁₈H₂₀N₅O₄S için; HRMS (*m/z*) [*M*+H]⁺ hesaplanan: 402,1236; bulunan: 402,1224.

3-(4-Metoksifenil)-N-(2-(piperidin-1-il)pirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 51)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4a) ve piperidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 61).

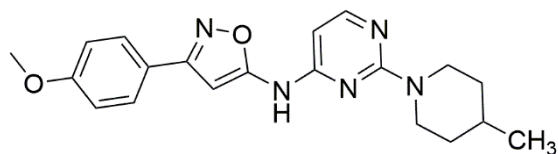
Erime derecesi: 198,1-200,1 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,54-1,64 (6H, m); 3,75-3,77 (4H, m); 3,81 (3H, s); 6,17 (1H, d, *J*= 5,8 Hz); 6,55 (1H, s); 7,07 (2H, d, *J*= 8,8 Hz); 7,71 (2H, d, *J*= 8,8 Hz); 8,08 (1H, d, *J*= 5,8 Hz); 10,92 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 24,33; 25,18; 44,57; 55,24; 83,72; 95,97; 114,49; 121,47; 127,68; 157,33; 157,56; 160,61; 161,08; 162,03; 162,81.

C₁₉H₂₂N₅O₂ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 352,1774; bulunan: 352,1761.

3-(4-Metoksifenil)-N-(2-(4-metilpiperidin-1-il)pirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 52)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4a) ve 4-metilpiperidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 52).

Erime derecesi: 171,4-173,3 °C.

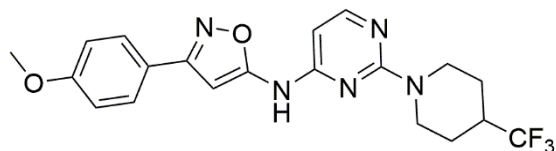
¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.90 (3H, d, *J*= 6,0 Hz); 1.05-1.07 (2H, m); 1.62-1.69 (3H, m); 2.87-2.93 (2H, m); 3.80 (3H, s); 4.58-4.61 (2H, m); 6.16 (1H, d, *J*= 5.4 Hz); 6.52 (1H, s); 7.05 (2H, d, *J*= 9,0 Hz); 7.69 (2H, d, *J*= 9,0 Hz); 8.06 (2H, d, *J*= 5,4 Hz); 10.86 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 21,66; 30,57; 33,36; 43,85; 55,18; 83,70; 95,96; 114,44; 121,45; 127,60; 157,60; 157,30; 157,48; 160,57; 161,05; 161,97; 162,75.

C₂₀H₂₄N₅O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 366,1930; bulunan: 366,1920.

3-(4-Metoksifenil)-N-(2-(4-(triflorometil)piperidin-1-il)pirimidin-4-il)izoksazol-5-amin

(Bileşik 53)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4a) ve 4-(triflorometil)piperidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 69).

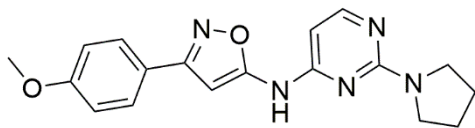
Erime derecesi: 188,0-189,8 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,34-1,44 (2H, m); 1,89-1,92 (2H, m); 2,61-2,64 (1H, m); 3,79 (3H, s); 4,72-4,75 (2H, m); 6,21 (1H, d, *J*= 5,4 Hz); 6,52 (1H, s); 7,05 (2H, d, *J*= 8,8 Hz); 7,72 (2H, d, *J*= 8,8 Hz); 8,09 (1H, d, *J*= 5,4 Hz); 10,97 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 23,72; 42,30; 55,19; 83,83; 96,65; 114,42; 121,38; 127,63 (q, ¹*J*_{C-F}= 275,8 Hz); 127,74; 157,38; 157,54; 160,58; 160,96; 162,05; 162,60.

C₂₀H₂₁F₃N₅O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 420,1647; bulunan: 420,1632.

3-(4-Metoksifenil)-N-(2-(pirolidin-1-il)pirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 54)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4a) ve pirolidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 61).

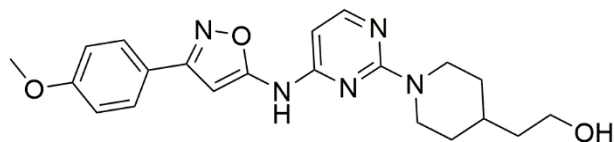
Erime derecesi: 233,3-235,3 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,93 (4H, m); 3,41-3,61 (4H, m); 3,80 (3H, s), 6,12 (1H, d, *J*= 5,8 Hz); 6,12 (1H, d, *J*= 5,8 Hz); 6,68 (1H, s); 7,04 (2H, d, *J*= 9,0 Hz); 7,70 (2H, d, *J*= 9,0 Hz); 8,03 (1H, d, *J*= 5,8 Hz); 10,90 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 24,98; 46,18; 55,18; 83,87; 95,57; 114,40; 121,52; 127,67; 156,94; 157,32; 159,75; 160,51; 162,01; 162,73.

C₁₈H₂₀N₅O₂ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 338,1617; bulunan: 338,1609.

2-(1-(4-((3-(4-Metoksifenil)izoksazol-5-il)amino)pirimidin-2-il)piperidin-4-il)etan-1-ol
(Bileşik 55)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4a) ve 2-(piperidin-4-il)etan-1-ol kullanılarak 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 77).

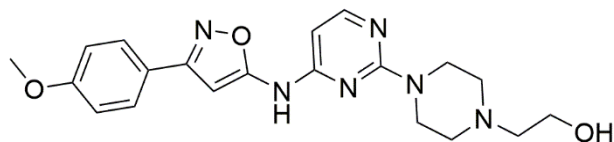
Erime derecesi: 168,1-169,8 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,07-1,16 (2H, m); 1,35-1,40 (2H, m); 1,67-1,75 (3H, m); 2,87-2,93 (2H, m); 3,46 (2H, q, *J* = 8,6 Hz); 3,81 (3H, s); 4,36 (1H, t, *J* = 8,6 Hz); 4,61-4,64 (2H, m); 6,16 (1H, d, *J* = 5,6 Hz); 6,54 (1H, s); 7,07 (2H, d, *J* = 8,8 Hz); 7,71 (2H, d, *J* = 8,8 Hz); 8,07 (1H, d, *J* = 5,6 Hz); 10,92 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 31,60; 32,36; 39,14; 43,92; 52,20; 58,12; 83,67; 95,97; 114,46; 121,41; 127,64; 157,26; 157,50; 160,57; 161,03; 161,97; 162,73.

C₂₁H₂₆N₅O₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 396,2036; bulunan: 396,2042.

2-(4-(4-((3-(4-Metoksifenil)izoksazol-5-il)amino)pirimidin-2-il)piperazin-1-il)etan-1-ol
(Bileşik 56)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4a) ve 2-(piperazin-1-il)etan-1-ol kullanılarak 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 59).

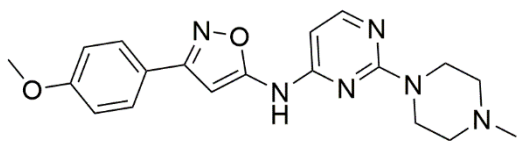
Erime derecesi: 166,8-168,0 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2,44 (2H, t, *J*= 5,8 Hz); 2,50-2,52 (4H, m); 3,55 (2H, q, *J*= 5,8 Hz); 3,82 (3H, s); 6,22 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 6,56 (1H, s); 7,08 (2H, d, *J*= 9,2 Hz); 7,75 (2H, d, *J*= 9.2 Hz); 8,10 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 10,97 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 43,62; 48,52; 52,95; 55,20; 58,48; 60,26; 83,85; 96,52; 114,43; 121,39; 127,75; 157,28; 157,43; 160,56; 161,18; 162,04; 162,69.

C₂₀H₂₅N₆O₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 397,1988; bulunan: 397,1975.

3-(4-Metoksifenil)-N-(2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 57)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4a) ve 1-metilpiperazin kullanılarak 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 79).

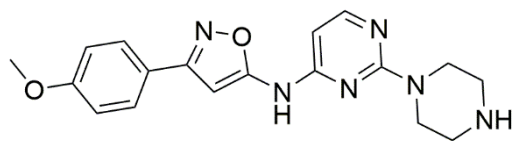
Erime derecesi: 194,8-195,4°C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2,21 (3H, s); 2,38 (4H, yayvan s); 3,74 (4H, yayvan s); 3,81 (3H, s); 6,21 (1H, d, *J*= 5,4 Hz); 6,54 (1H, s); 7,06 (2H, d, *J*= 8,6 Hz); 7,73 (2H, d, *J*= 8,6 Hz); 8,09 (1H, d, *J*= 5,4 Hz); 10,95 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 43,54; 45,81; 54,39; 55,24; 83,91; 96,59; 114,45; 121,44; 127,79; 157,33; 157,49; 160,59; 161,25; 162,08; 162,68.

C₁₉H₂₃N₆O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 367,1882; bulunan: 367,1886.

3-(4-Metoksifenil)-N-(2-(piperazin-1-il)pirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 58)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4a) ve Boc-piperazin kullanılarak 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlenen ara üründen hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 11'e göre sentezlendi (Verim: % 46).

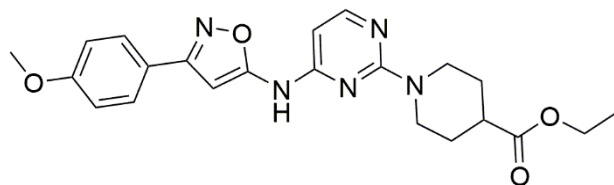
Erime derecesi: 179,5-181,2°C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2,69 (4H, yayvan s); 3,60 (4H, yayvan s); 3,78 (3H, s); 5,32 (1H, s); 7,00 (2H, d, *J* = 8,8 Hz); 7,29 (1H, d, *J* = 5,6 Hz); 7,54 (2H, d, *J* = 8,8 Hz); 8,08 (1H, d, *J* = 5,6 Hz); 9,62 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 44,32; 45,35; 55,24; 84,41; 98,08; 113,87; 127,56; 128,79; 157,96; 158,76; 159,47; 160,74; 160,95; 169,06.

C₁₈H₂₁N₆O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 353,1726; bulunan: 353,1730.

Etil 1-(4-((3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-il)amino)pirimidin-2-il)piperidin-4-karboksilat
(Bileşik 59)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4a) ve etil piperidin-4-karboksilattan hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 68).

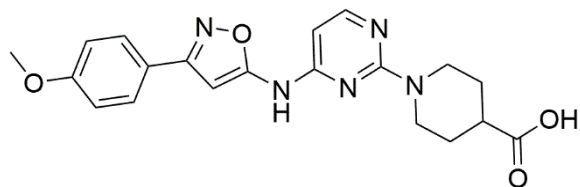
Erime derecesi: 185,6-186,5 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,16 (3H, t, *J*= 7,2 Hz); 1,47-1,56 (2H, m); 1,89-1,92 (2H, m); 2,60-2,66 (1H, m); 3,05-3,10 (2H, m); 3,80 (3H, s); 4,05 (2H, q, *J*= 7,2 Hz); 4,49-4,52 (2H, m); 6,19 (1H, d, *J*= 5,4 Hz); 6,52 (1H, s); 7,05 (2H, d, *J*= 8,8 Hz); 7,71 (2H, d, *J*= 8,8 Hz); 8,08 (2H, d, *J*= 5,4 Hz); 10,95 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14,01; 27,37; 40,38; 42,95; 55,19; 59,84; 83,75; 96,40; 114,43; 121,38; 127,69; 157,32; 157,52; 160,57; 161,04; 162,01; 162,65; 174,04.

C₂₂H₂₆N₅O₄ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 424,1985; bulunan: 424,1983.

1-(4-((3-(4-Metoksifenil)izoksazol-5-il)amino)pirimidin-2-il)piperidin-4-karboksilik asit
(Bileşik 60)



Etil 1-(4-((3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-il)amino)pirimidin-2-il)piperidin-4-karboksilat'tan (Bileşik 59) hareketle 3.1.2.'de belirtilen sentez yöntemi 12'ye göre sentezlendi (Verim: % 61).

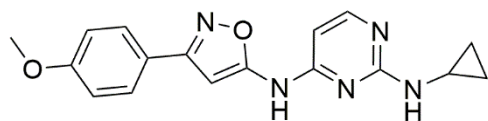
Erime derecesi: 210,3-212,1°C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,50-1,58 (2H, m); 1,90-1,93 (2H, m); 2,58 (1H, m); 3,10-3,15 (2H, m); 3,80 (3H, s); 4,48-4,52 (2H, m); 6,21 (1H, d, *J*= 5,4 Hz); 6,55 (1H, s); 7,08 (2H, d, *J*= 8,4 Hz); 7,73 (2H, d, *J*= 8,4 Hz); 8,10 (1H, d, *J*= 5,4 Hz); 10,92 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 27,53; 40,53; 43,12; 55,20; 83,73; 96,31; 114,46; 121,39; 127,66; 157,31; 157,52; 160,58; 161,05; 162,00; 162,69; 175,90.

C₂₀H₂₂N₅O₄ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 396,1672; bulunan: 396,1664.

*N*²-siklopropil-*N*⁴-(3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-il)pirimidin-2,4-diamin (Bileşik 63)



3-(4-Metoksifenil)-*N*-(2-(metiltiyo)pirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 62) ve siklopropanaminden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6c'ye göre sentezlendi (Verim: % 43).

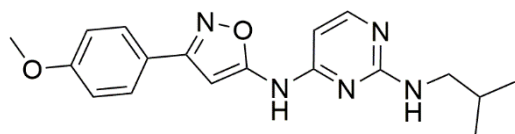
Erime derecesi: 211,9-212,8 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0,49-0,69 (4H, m); 2,71 (1H, yayvan s); 3,78 (3H, s); 6,15 (1H, yayvan s); 6,95-7,72 (6H, m); 8,00 (1H, yayvan s); 10,90 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7,06; 24,20; 55,77; 84,86; 114,91; 122,20; 128,24; 157,59; 157,90; 161,07; 162,60; 163,25; 163,49.

C₁₇H₁₈N₅O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 324,1461; bulunan: 324,1460.

*N*²-izobütil-*N*⁴-(3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-yl)pirimidin-2,4-diamin (Bileşik 64)



3-(4-Metoksifenil)-*N*-(2-(metiltiyo)pirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 62) ve izobütilaminden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6c'ye göre sentezlendi (Verim: % 41).

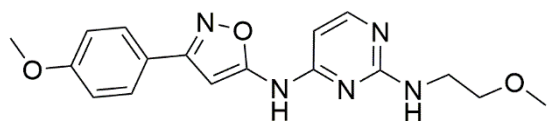
Erime derecesi: 131,8-133,2 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0,92 (6H, d, *J*= 6,5 Hz); 1,86-1,93 (1H, m); 3,15 (2H, d, *J*= 6,5 Hz); 3,83 (3H, s); 6,12 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 7,07 (2H, d, *J*= 8,8 Hz); 7,17 (1H, s); 7,78 (2H, bs); 7,99 (1H, d, *J*= 5,6 Hz), 10,84 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 20,79; 28,33; 48,95; 55,78; 114,84; 122,18; 128,28; 132,76; 157,60; 161,10; 162,60; 163,24.

C₁₈H₂₁N₅O₂ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 340,1774; bulunan: 340,1768.

*N*²-(2-metoksietil)-*N*⁴-(3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-il)pirimidin-2,4-diamin (Bileşik 65)



3-(4-Metoksifenil)-*N*-(2-(metiltiyo)pirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 62) ve 2-metoksietan-1-aminden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6c'ye göre sentezlendi (Verim: % 47).

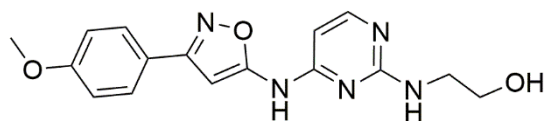
Erime derecesi: 188,5-188,8 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,28 (3H, s); 3,50 (4H, m); 3,83 (3H, s); 6,15 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 7,06-7,81 (5H, m); 8,01 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 10,87 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 40,78; 55,76; 58,42; 71,32; 85,12; 97,25; 114,81; 122,10; 128,33; 157,47; 161,08; 162,23; 162,60; 163,14.

C₁₇H₂₀N₅O₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 342,1566; bulunan: 342,1562.

2-((4-((3-(4-Metoksifenil)izoksazol-5-il)amino)pirimidin-2-il)amino)etan-1-ol (Bileşik 66)



3-(4-Metoksifenil)-*N*-(2-(metiltiyo)pirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 62) ve 2-2-aminoethan-1-ol'den hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6d'ye göre sentezlendi (Verim: % 34).

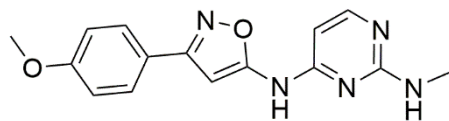
Erime derecesi: 222,7-224,7°C (dekompoze).

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,43-3,59 (4H, m); 3,84 (3H, s); 4,70 (1H, s); 6,17 (1H, d, *J* = 4,0 Hz); 7,03 (1H, s); 7,07 (2H, d, *J* = 8,0 Hz); 7,82 (2H, d, *J* = 8,0 Hz); 8,02 (1H, d, *J* = 4,0 Hz); 10,82 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 43,96; 55,77; 60,44; 84,46; 96,66; 114,82; 122,17; 128,34; 157,60; 161,08; 162,63; 163,17.

C₁₆H₁₈N₅O₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 328,1410; bulunan: 328,1398.

*N*⁴-(3-(4-Metoksifenil)izoksazol-5-il)-*N*²-metilpirimidin-2,4-diamin (Bileşik 67)



3-(4-Metoksifenil)-*N*-(2-(metiltiyo)pirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 62) ve metilaminden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6e'ye göre sentezlendi (Verim: % 42).

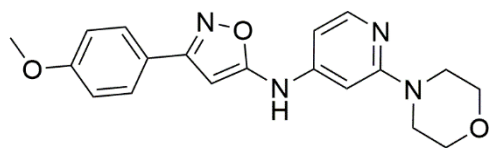
Erime derecesi: 207,5-208,9°C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2,86 (3H, s); 3,82 (3H, s); 6,13 (1H, d, *J*= 5,0 Hz); 6,98-7,08 (4H, m); 7,77 (2H, bs); 8,01 (1H, d, *J*= 5,0 Hz); 10,68 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 27,65; 55,20; 84,38; 114,30; 121,59; 127,71; 157,22; 160,52; 162,02; 162,68.

C₁₅H₁₆N₅O₂ için; HRMS (*m/z*) [*M*+H]⁺ hesaplanan: 298,1304; bulunan: 298,1290.

3-(4-Metoksifenil)-N-(2-morfolinopiridin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 68)



3-(4-Metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3a) ve 4-bromo-2-morfolinopiridinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 8a'ya göre sentezlendi (Verim: % 38).

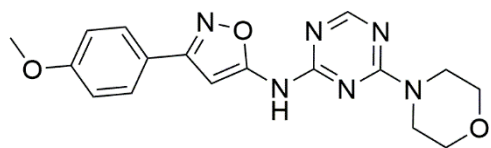
Erime derecesi: 201,3-201,9°C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,40-3,42 (4H, m); 3,69-3,72 (4H, m); 3,82 (3H, s); 6,35 (1H, s); 6,45 (1H, d, *J* = 1,6 Hz); 6,60 (1H, dd, *J* = 5,4 Hz, *J* = 1,6 Hz); 7,05 (2H, d, *J* = 8,6 Hz); 7,83 (2H, d, *J* = 8,6 Hz); 7,99 (1H, d, *J* = 5,4 Hz); 10,28 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 45,20; 55,26; 65,98; 81,38; 92,24; 102,40; 114,27; 121,45; 128,01; 147,75; 148,63; 160,53; 160,62; 162,43; 164,32.

C₁₉H₂₁N₄O₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 353,1614; bulunan: 353,1597.

3-(4-Metoksifenil)-N-(4-morfolino-1,3,5-triazin-2-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 70)



3-(4-Metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 3a) ve 4-(4-kloro-1,3,5-triazin-2-il)morfolin'den (Bileşik 69) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 8b'ye göre sentezlendi (Verim: % 52).

Erime derecesi: 260,7-261,6°C (dekompoze).

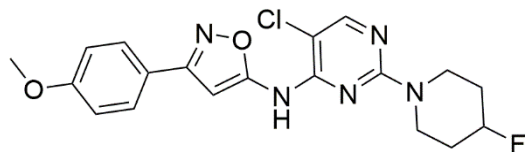
¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,66-3,79 (8H, m); 3,82 (3H, s); 6,61 (1H, s); 7,05 (2H, d, *J* = 8,8 Hz); 7,76 (2H, d, *J* = 8,6 Hz); 8,40 (1H, s); 11,38 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 43,51; 55,27; 65,83; 85,57; 114,42; 121,36; 127,94; 160,64; 161,62; 162,01; 162,55; 163,75; 166,36.

C₁₇H₁₉N₆O₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 355,1519; bulunan: 355,1525.

N-(5-kloro-2-(4-floropiperidin-1-il)pirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin

(Bileşik 74)



N-(2,5-dikloropirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 71) ve 4-floropiperidin hidroklorür tuzundan hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6b'ye göre sentezlendi (Verim: % 45).

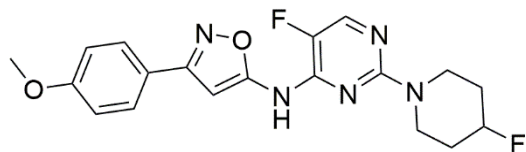
Erime derecesi: 204,3-206,3 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,69-1,74 (2H, m); 1,86-1,96 (2H, m); 3,68-3,73 (2H, m); 3,80 (3H, s); 3,84-3,89 (2H, m); 4,83-4,97 (1H, m); 6,64 (1H, s); 7,05 (2H, d, *J*= 8,6 Hz); 7,71 (2H, d, *J*= 8.6 Hz); 8,18 (1H, s); 10,50 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 30,47 (d, ²*J*_{C-F}= 19.1 Hz); 40,34 (d, ³*J*_{C-F}= 6.1 Hz); 55,20; 86,75; 88,52 (d, ¹*J*_{C-F}= 168.4 Hz); 102,52; 114,47; 121,22; 127,68; 153,10; 156,01; 159,02; 160,62; 161,91; 162,22.

C₂₀H₂₁ClFN₄O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 404,1290; bulunan: 404,1289.

N-(5-floro-2-(4-floropiperidin-1-il)pirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 75)



N-(2-kloro-5-floropirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 72) ve 4-floropiperidin hidroklorür tuzundan hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6b'ye göre sentezlendi (Verim: % 37).

Erime derecesi: 205,1-207,1 °C.

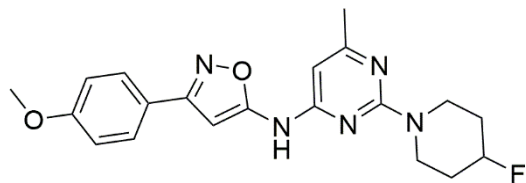
¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,68-1,74 (2H, m); 1,86-1,97 (2H, m); 3,64-3,70 (2H, m); 3,79 (3H, s); 3,84-3,89 (2H, m); 4,82-4,96 (1H, m); 6,60 (1H, s); 7,05 (2H, d, *J*= 8,6 Hz); 7,71 (2H, d, *J*= 8,6 Hz); 8,17 (1H, d, *J*= 3,2 Hz); 11,18 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 30,47 (d, ²*J*_{C-F}= 19,0 Hz); 40,69 (d, ³*J*_{C-F}= 6,8 Hz); 55,19; 85,34; 88,66 (d, ¹*J*_{C-F}= 168,4 Hz); 114,46; 121,23; 127,70; 139,39 (d, ¹*J*_{C-F}= 245,3 Hz); 142,68 (d, ²*J*_{C-F}= 19,1 Hz); 146,26 (d, ²*J*_{C-F}= 11,4 Hz); 157,18; 160,62; 161,96; 162,01.

C₁₉H₂₀F₂N₅O₂ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 388,1585; bulunan: 388,1579.

N-(2-(4-floropiperidin-1-il)-6-metilpirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin

(Bileşik 76)



N-(2-kloro-6-metilpirimidin-4-il)-3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 73) ve 4-floropiperidin hidroklorür tuzundan hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6b'ye göre sentezlendi (Verim: % 54).

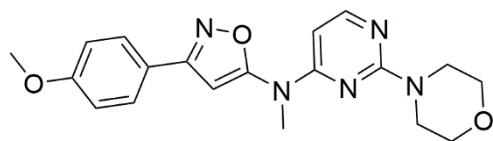
Erime derecesi: 184,7-186,6 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,68-1,73 (2H, m); 1,86-1,97 (2H, m); 2,19 (3H, s); 3,69-3,75 (2H, m); 3,80 (3H, s); 3,91-3,96 (2H, m); 4,83-4,96 (1H, m); 6,07 (1H, s); 6,50 (1H, s); 7,04 (2H, d, *J* = 9,0 Hz); 7,71 (2H, d, *J* = 9,0 Hz); 10,85 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 23,92; 30,68 (d, ²*J*_{C-F} = 18,3 Hz); 40,00 (d, ³*J*_{C-F} = 6,1 Hz); 55,18; 83,57; 88,86 (d, ¹*J*_{C-F} = 168,4 Hz); 94,96; 114,41; 121,44; 127,69; 157,77; 160,55; 160,87; 162,1; 162,90; 166,76.

C₂₀H₂₃FN₅O₂ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 384,1836; bulunan: 384,1842.

3-(4-Metoksifenil)-N-metil-N-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 77)



3-(4-Metoksifenil)-N-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin'den (BO-264) hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 12a'ya göre sentezlendi (Verim: % 87).

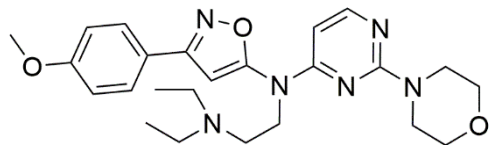
Erime derecesi: 123,7-125,5 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,47 (3H, s); 3,64-3,67 (8H, m); 3,80 (3H, s); 6,51 (1H, d, *J*= 6,0 Hz); 6,71 (1H, s); 7,04 (2H, d, *J*= 8,8 Hz); 7,77 (2H, d, *J*= 8,8 Hz); 8,17 (1H, d, *J*= 6,0 Hz).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 34,63; 43,91; 55,22; 65,89; 88,32; 96,26; 114,38; 121,10; 127,80; 158,18; 159,50; 160,68; 160,84; 162,37; 165,38.

C₂₀H₂₃FN₅O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 368,1723; bulunan: 368,1711.

*N*¹,*N*¹-dietil-*N*²-(3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-il)-*N*²-(2-morfolinopirimidin-4-il)etan-1,2-diamin (Bileşik 78)



3-(4-Metoksifenil)-*N*-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin'den (BO-264) ve *N*-(2-kloroetil)-*N,N*-dietilamonyum klorür tuzundan hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 12b'ye göre sentezlendi (Verim: % 75).

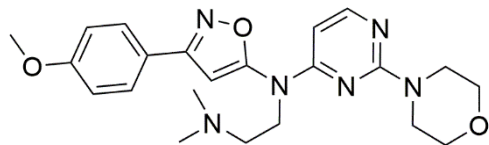
Erime derecesi: 67,1-68,2 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0,90 (6H, t, *J*= 7,0 Hz); 2,46-2,51 (4H, m); 2,68 (2H, t, *J*= 7,1 Hz); 3,67-3,71 (8H, m); 3,83 (3H, s); 4,07 (2H, t, *J*= 7,1 Hz); 6,41 (1H, d, *J*= 5,8 Hz); 6,74 (1H, s); 7,07 (2H, d, *J*= 8,8 Hz); 7,81 (2H, d, *J*= 8,8 Hz); 8,14 (1H, d, *J*= 5,8 Hz).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11,93; 43,90; 45,89; 46,73; 50,15; 55,20; 65,85; 89,61; 96,35; 114,35; 121,11; 127,79; 157,99; 159,99; 159,50; 160,69; 160,90; 162,41; 165,43.

C₂₄H₃₃N₆O₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 453,2614; bulunan: 453,2611.

*N*¹-(3-(4-metoksifenil)izoksazol-5-il)-*N*²,*N*²-dimetil-*N*¹-(2-morfolinopirimidin-4-il)etan-1,2-diamin (Bileşik 79)



3-(4-Metoksifenil)-*N*-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin'den (BO-264) ve *N*-(2-kloroetil)-*N,N*-dimetilamonyum klorür tuzundan hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 12b'ye göre sentezlendi (Verim: % 53).

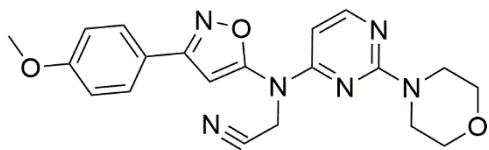
Erime derecesi: 88,2-89,4 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2,19 (6H, s); 2,54 (2H, t, *J*= 7,0 Hz); 3,66-3,69 (8H, m); 3,82 (3H, s); 4,09 (2H, t, *J*= 7,0 Hz); 6,38 (1H, d, *J*= 5,4 Hz); 6,77 (1H, s); 7,07 (2H, d, *J*= 9,0 Hz); 7,81 (2H, d, *J*= 9,0 Hz); 8,13 (1H, d, *J*= 5,4 Hz).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 43,91; 45,29; 45,52; 55,21; 56,41; 65,84; 90,10; 96,20; 114,35; 121,06; 127,82; 158,04; 159,46; 160,71; 160,89; 162,49; 165,27.

C₂₂H₂₉N₆O₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 425,2301; bulunan: 425,2301.

2-((3-(4-Metoksifenil)izoksazol-5-il)(2-morfolinopirimidin-4-il)amino)asetonitril (Bileşik 80)



3-(4-Metoksifenil)-*N*-(2-morfolinopirimidin-4-il)izoksazol-5-amin'den (BO-264) ve kloroasetonitrilden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 12c'ye göre sentezlendi (Verim: % 54).

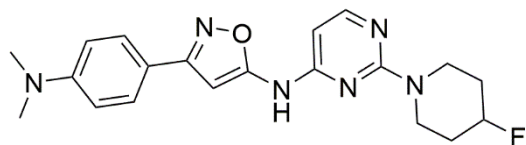
Erime derecesi: 178,1-178,4 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,67-3,77 (8H, m); 3,83 (3H, s); 5,14 (2H, s); 6,50 (1H, d, *J*= 5,4 Hz); 6,97 (1H, s); 7,09 (2H, d, *J*= 9,2 Hz); 7,84 (2H, d, *J*= 9,2 Hz); 8,24 (1H, d, *J*= 5,4 Hz).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 35,87; 43,92; 55,33; 65,95; 91,49; 96,11; 114,52; 116,58; 120,67; 128,03; 158,40; 158,99; 160,66; 160,97; 162,89; 163,79.

C₂₀H₂₁N₆O₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 393,1675; bulunan: 393,1690.

3-(4-(Dimetilamino)fenil)-N-(2-(4-floropiperidin-1-il)pirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 81)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(4-(dimetilamino)fenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4q) ve 4-floropiperidin hidroklorür tuzundan hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6b'ye göre sentezlendi (Verim: % 39).

Erime derecesi: 209,2-210,5 °C.

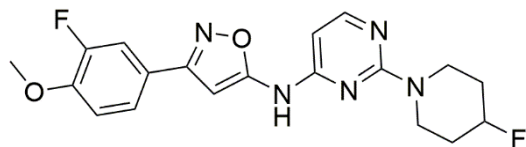
¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,72-1,77 (2H, m); 1,90-2,01 (2H, m); 2,97 (6H, s); 3,73-3,79 (2H, m); 3,94-3,99 (2H, m); 4,87-5,01 (1H, m); 6,23 (1H, d, *J*= 5,4 Hz); 6,51 (1H, s); 6,81 (2H, d, *J*= 9,0 Hz); 7,61 (2H, d, *J*= 9,0 Hz); 8,11 (1H, d, *J*= 5,4 Hz); 10,93 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 30,71 (d, ²*J*_{C-F}= 19,0 Hz); 39,70; 40,01; 83,53; 88,79 (d, ¹*J*_{C-F}= 168,0 Hz); 96,50; 111,96; 116,07; 127,10; 151,25; 157,42; 157,49; 160,95; 162,21; 162,37.

C₂₀H₂₄FN₆O için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 383,1996; bulunan: 383,1994.

3-(3-Floro-4-metoksifenil)-N-(2-(4-floropiperidin-1-il)pirimidin-4-il)izoksazol-5-amin

(Bileşik 82)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(3-floro-4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4y) ve 4-floropiperidin hidroklorür tuzundan hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6b'ye göre sentezlendi (Verim: % 42).

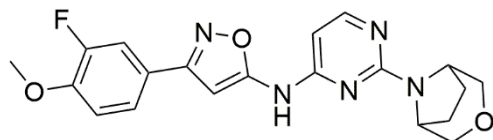
Erime derecesi: 162,4-164,4 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,71-1,75 (2H, m); 1,88-1,99 (2H, m); 3,71-3,77 (2H, m); 3,90 (3H, s); 3,93-3,97 (2H, m); 4,85-5,00 (1H, m); 6,23 (1H, d, *J* = 5,4 Hz); 6,57 (1H, s); 7,29-7,33 (1H, m); 7,58-7,64 (2H, m); 8,11 (1H, d, *J* = 5,4 Hz); 11,01 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 30,47 (d, ²*J*_{C-F} = 19,1 Hz); 40,07; 56,09; 84,00; 88,84 (d, ¹*J*_{C-F} = 168,4 Hz); 96,53; 113,58 (d, ²*J*_{C-F} = 19,8 Hz); 114,23; 121,80 (d, ³*J*_{C-F} = 7,6 Hz); 123,23 (d, ⁴*J*_{C-F} = 3,9 Hz); 148,58 (d, ²*J*_{C-F} = 9,9 Hz); 151,47 (d, ¹*J*_{C-F} = 243,1 Hz); 157,43; 157,68; 161,00; 161,36; 162,97.

C₁₉H₂₀F₂N₅O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 388,1585; bulunan: 388,1568.

N-(2-(3-oksa-8-azabisiklo[3.2.1]oktan-8-il)pirimidin-4-il)-3-(3-floro-4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 83)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(3-floro-4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4y) ve 3-oksa-8-azabisiklo[3.2.1]oktan hidroklorür tuzundan hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6b'ye göre sentezlendi (Verim: % 44).

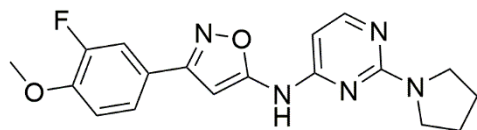
Erime derecesi: 232,7-234,7 °C (dekompoze).

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,99 (4H, m); 3,59-3,68 (4H, m); 3,91 (3H, s); 4,60 (2H, m); 6,27 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 6,55 (1H, s); 7,29-7,33 (1H, m); 7,59-7,66 (2H, m); 8,13 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 11,05 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 26,62; 55,04; 56,09; 70,33; 84,03; 97,10; 113,63 (d, ²*J*_{C-F}= 19,8 Hz); 114,22; 121,80 (d, ³*J*_{C-F}= 6,9 Hz); 123,31; 148,57 (d, ²*J*_{C-F}= 10,7 Hz); 151,45 (d, ¹*J*_{C-F}= 243,1 Hz); 157,57; 157,84; 160,05; 161,39; 162,89.

C₂₀H₂₁FN₅O₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 398,1628; bulunan: 398,1636.

3-(3-Floro-4-metoksifenil)-N-(2-(pirolidin-1-il)pirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 84)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(3-floro-4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4y) ve pirolidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 70).

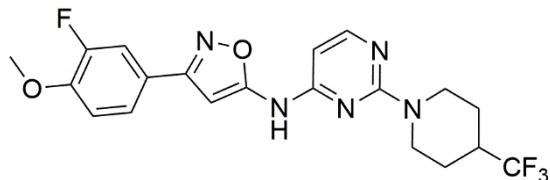
Erime derecesi: 208,7-210,7 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,92-1,96 (4H, m); 3,48-3,55 (4H, m); 3,88 (3H, s); 6,12 (1H, d, *J* = 5,8 Hz); 6,68 (1H, s); 7,25-7,29 (1H, m); 7,54-7,59 (2H, m); 8,03 (1H, d, *J* = 5,8 Hz); 10,93 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 25,50; 46,68; 56,54; 84,52; 96,07; 113,99 (d, ²*J*_{C-F} = 19,0 Hz); 114,68 (d, ⁴*J*_{C-F} = 2,0 Hz); 122,43 (d, ³*J*_{C-F} = 7,0 Hz); 123,65 (d, ⁴*J*_{C-F} = 3,0 Hz); 148,99 (d, ²*J*_{C-F} = 11,0 Hz); 151,94 (d, ¹*J*_{C-F} = 243,0 Hz); 157,43; 157,88; 160,26; 161,81 (d, ⁴*J*_{C-F} = 2,0 Hz); 163,53.

C₁₈H₁₉FN₅O₂ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 356,1523; bulunan: 356,1520.

3-(3-Floro-4-metoksifenil)-N-(2-(4-(triflorometil)piperidin-1-il)pirimidin-4-il)izoksazol-5-amin (Bileşik 85)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(3-floro-4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4y) ve 4-(triflorometil)piperidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 34).

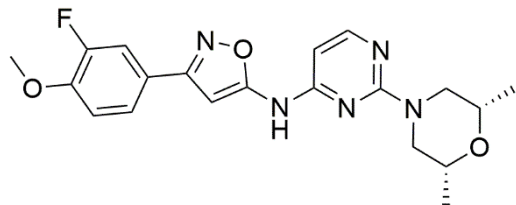
Erime derecesi: 171,7-172,5 °C.

¹H-NMR Spektrumu (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,43-1,46 (2H, m); 1,91-1,93 (2H, m); 2,64 (1H, m); 2,94-2,99 (2H, m); 3,91 (3H, s); 4,75-4,77 (2H, m); 6,24 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 6,57 (1H, s); 7,31 (1H, d, *J*= 8,7 Hz); 7,57-7,65 (2H, m); 8,12 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 11,02 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 24,27; 56,58; 84,53; 97,16; 114,09 (d, ²*J*_{C-F}= 19,3 Hz); 114,72; 122,29 (d, ³*J*_{C-F}= 7,2 Hz); 123,74 (d, ⁴*J*_{C-F}= 3,1 Hz); 128,17 (q, ¹*J*_{C-F}= 276,5 Hz); 149,07 (d, ²*J*_{C-F}= 10,2 Hz); 151,97 (d, ¹*J*_{C-F}= 243,2 Hz); 157,90; 158,13; 161,48; 161,88; 163,42.

C₂₀H₂₀F₄N₅O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 438,1553; bulunan: 438,1542.

N-(2-((2*R*,6*S*)-2,6-dimetilmorfolino)pirimidin-4-il)-3-(3-floro-4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 86)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(3-floro-4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4y) ve (2*R*,6*S*)-2,6-dimetilmorfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 80).

Erime derecesi: 195,5-196,6 °C.

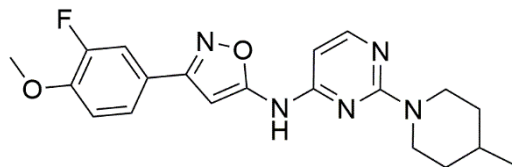
¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,16 (6H, d, *J*= 6,0 Hz); 2,50-2,58 (2H, m); 3,56-3,60 (2H, m); 3,89 (3H, s); 4,44-4,47 (2H, m); 6,22 (1H, d, *J*= 5,4 Hz); 6,60 (1H, s); 7,28 (1H, t, *J*= 9,0 Hz); 7,55-7,60 (2H, m); 8,10 (1H, d, *J*= 5,4 Hz); 11,04 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 18,65; 49,08; 56,05; 70,85; 84,36; 96,74; 113,55 (d, ²*J*_{C-F}= 19,9 Hz); 114,09; 121,73 (d, ³*J*_{C-F}= 7,1 Hz); 122,86 (d, ⁴*J*_{C-F}= 3,2 Hz); 148,53 (d, ²*J*_{C-F}= 10,2 Hz); 151,41 (d, ¹*J*_{C-F}= 243,0 Hz); 157,18; 157,49; 160,89; 161,21 (d, ⁴*J*_{C-F}= 2,6 Hz); 162,77.

C₂₀H₂₃FN₅O₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 400,1785; bulunan: 400,1783.

3-(3-Floro-4-metoksifenil)-N-(2-(4-metilpiperidin-1-il)pirimidin-4-il)izoksazol-5-amin

(Bileşik 87)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(3-floro-4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 4y) ve 4-metilpiperidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 79).

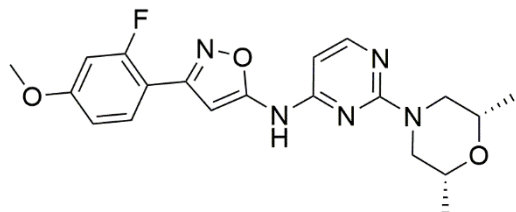
Erime derecesi: 157,6-159,6 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0,92 (3H, s); 1,07-1,11 (2H, m); 1,68-1,70 (3H, m); 2,88-2,93 (2H, m); 3,91 (3H, s); 4,61-4,64 (2H, m); 6,18 (1H, d, *J*= 5,4 Hz); 6,57 (1H, s); 7,32 (1H, t, *J*= 8,6 Hz); 7,56-7,61 (2H, m); 8,09 (1H, d, *J*= 5,4 Hz); 10,96 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 22,27; 31,16; 33,95; 44,42; 56,59; 84,36; 96,50; 113,99 (d, ²*J*_{C-F}= 19,3 Hz); 114,77; 122,33 (d, ³*J*_{C-F}= 6,9 Hz); 123,62 (d, ⁴*J*_{C-F}= 3,3 Hz); 149,07 (d, ²*J*_{C-F}= 10,8 Hz); 151,48 (d, ¹*J*_{C-F}= 243,3 Hz); 157,80; 157,80; 158,12; 161,57; 161,82; 163,42.

C₂₀H₂₃FN₅O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 384,1836; bulunan: 384,1845.

N-(2-((2*R*,6*S*)-2,6-dimetilmorfolino)pirimidin-4-il)-3-(2-floro-4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 88)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(2-floro-4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 33) ve (2*R*,6*S*)-2,6-dimetilmorfolinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 71).

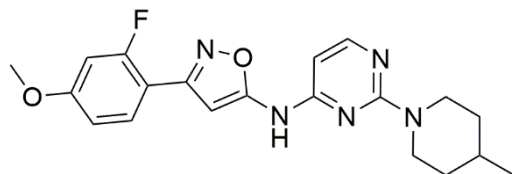
Erime derecesi: 226,0-227,4 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,17 (6H, d, *J*= 6,4 Hz); 2,53-2,59 (2H, m); 3,56-3,60 (2H, m); 3,83 (3H, s); 4,44-4,47 (2H, m); 6,21 (1H, d, *J*= 5,4 Hz); 6,67 (1H, d, *J*= 4,0 Hz); 6,91 (1H, dd, *J*= 8,6 Hz, *J*= 2,5 Hz); 7,00 (1H, dd, *J*= 13,4 Hz, *J*= 2,5 Hz); 7,84 (1H, t, *J*= 8,6 Hz); 8,10 (1H, d, *J*= 5,4 Hz); 11,11 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 19,15; 49,57; 56,38; 71,38; 86,78 (d, ³*J*_{C-F}= 11,0 Hz); 97,42; 102,69 (d, ²*J*_{C-F}= 26,0 Hz); 109,30 (d, ²*J*_{C-F}= 12,0 Hz); 112,17; 129,66 (d, ⁴*J*_{C-F}= 5,0 Hz); 157,61; 157,97; 158,11 (d, ⁴*J*_{C-F}= 3,0 Hz); 161,12 (d, ¹*J*_{C-F}= 248,0 Hz); 161,33; 162,58 (d, ³*J*_{C-F}= 12,0 Hz); 163,14 (d, ⁴*J*_{C-F}= 3,0 Hz).

C₂₀H₂₃FN₅O₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 400,1785; bulunan: 400,1779.

3-(2-Floro-4-metoksifenil)-N-(2-(4-metilpiperidin-1-il)pirimidin-4-il)izoksazol-5-amin
(Bileşik 89)



N-(2-kloropirimidin-4-il)-3-(2-floro-4-metoksifenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 33) ve 4-metilpiperidinden hareketle 3.1.2.'de belirtilen genel sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi (Verim: % 66).

Erime derecesi: 171,0-171,5 °C.

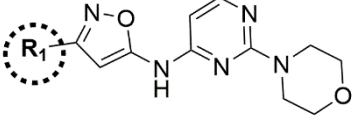
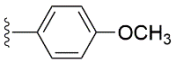
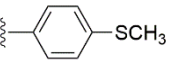
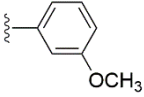
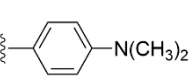
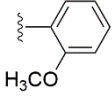
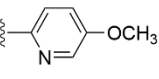
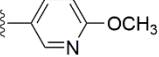
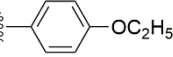
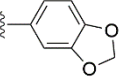
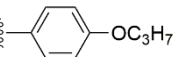
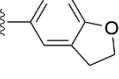
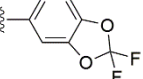
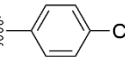
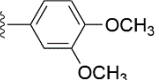
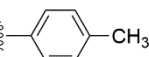
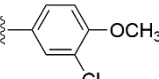
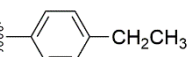
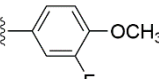
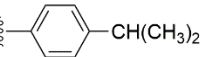
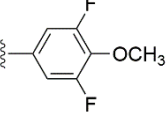
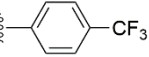
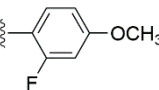
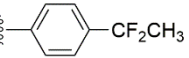
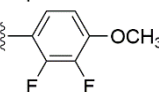
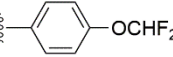
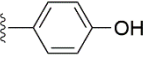
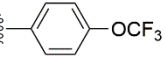
¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0,92 (3H, d, *J*= 6,4 Hz); 1,06-1,12 (2H, m); 1,65-1,68 (3H, m); 2,87-2,93 (2H, m); 3,83 (3H, s); 4,59-4,62 (2H, m); 6,15 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 6,67 (1H, d, *J*= 3,6 Hz); 6,93 (1H, dd, *J*= 8,6 Hz, *J*= 2,4 Hz); 7,03 (1H, dd, *J*= 13,4 Hz, *J*= 2,4 Hz); 7,82 (1H, t, *J*= 8,7 Hz); 8,08 (1H, d, *J*= 5,6 Hz); 11,02 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 22,31; 31,17; 33,92; 44,39; 56,35; 86,53 (d, ³*J*_{C-F}= 11,0 Hz); 96,64; 102,69 (d, ²*J*_{C-F}= 26,0 Hz); 109,41 (d, ²*J*_{C-F}= 12,0 Hz); 112,01; 129,47 (d, ⁴*J*_{C-F}= 5,0 Hz); 157,66; 158,07; 158,16 (d, ⁴*J*_{C-F}= 3,0 Hz); 161,17 (d, ¹*J*_{C-F}= 248,0 Hz); 161,50; 162,53 (d, ³*J*_{C-F}= 12,0 Hz); 163,30 (d, ⁴*J*_{C-F}= 2,0 Hz).

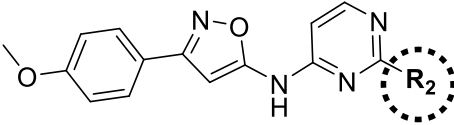
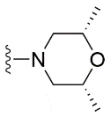
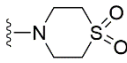
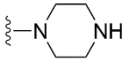
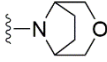
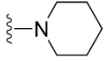
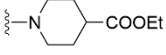
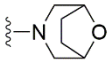
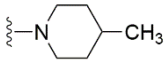
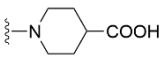
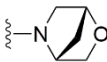
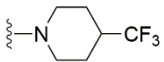
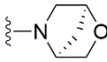
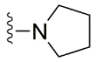
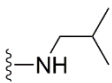
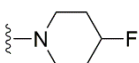
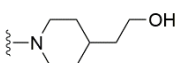
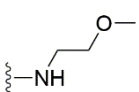
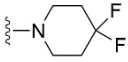
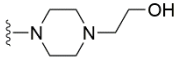
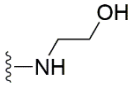
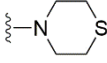
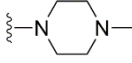
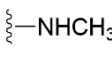
C₂₀H₂₃FN₅O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 384,1836; bulunan: 384,1831.

4.2. Biyolojik Bulgular

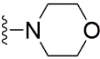
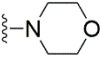
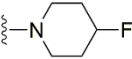
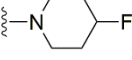
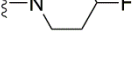
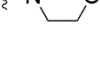
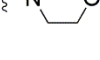
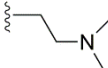
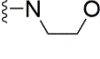
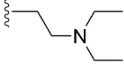
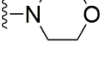
Çizelge 4.1. Bileşik 5-29, Bileşik 34, Bileşik 39, Bileşik 41 ve Bileşik 43'ün IC₅₀ değerleri

					
		IC ₅₀ (μM)		IC ₅₀ (μM)	
Bileşik	R ₁	JIMT-1	Bileşik	R ₁	JIMT-1
BO-264		0,188-0,258	19		0,030
5		3,440	20		0,120
6		8,270	21		>10
7		>10	22		7,300
8		0,810	23		0,870
9		>10	24		0,417
10		>10	25		>10
11		>10	26		0,730
12		0,640	27		0,480
13		0,259	28		0,013
14		3,610	29		>10
15		>10	34		0,051
16		>10	39		>10
17		4,230	41		>10
18		>10			

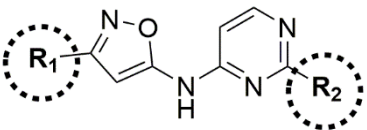
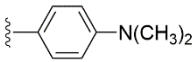
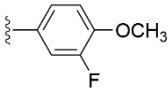
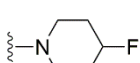
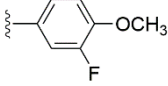
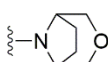
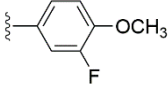
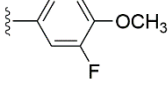
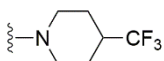
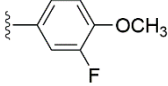
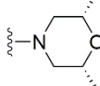
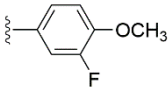
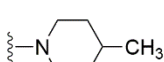
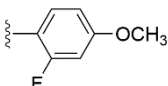
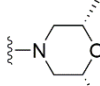
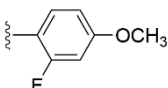
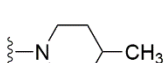
Çizelge 4.2. Bileşik 44-69'un IC₅₀ değerleri

								
		IC ₅₀ (μM)			IC ₅₀ (μM)			IC ₅₀ (μM)
Bileşik	R ₂	JIMT-1	Bileşik	R ₂	JIMT-1	Bileşik	R ₂	JIMT-1
42		0,230	50		>10	58		>10
43		0,160	51		0,116	59		>10
44		3,090	52		0,204	60		>10
45		0,480	53		0,056	63		0,108
46		2,020	54		0,105	64		0,429
47		0,130	55		3,970	65		0,694
48		0,370	56		>10	66		>10
49		0,113	57		1,560	67		3,540

Çizelge 4.3. Bileşik 70, Bileşik 72, Bileşik 76-82'nin IC₅₀ değerleri

							IC ₅₀ (μM)
							JIMT-1
Bileşik	X	Y	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	
68	C	C		-H	-H	-H	>10
70	N	N		-H	-H	-H	>10
74	C	N		-Cl	-H	-H	0,800
75	C	N		-F	-H	-H	0,540
76	C	N		-H	-CH ₃	-H	1,000
77	C	N		-H	-H	-CH ₃	0,160
78	C	N		-H	-H		>10
79	C	N		-H	-H		>10
80	C	N		-H	-H		>10

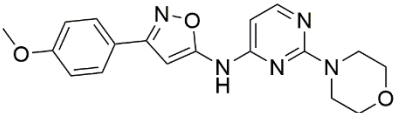
Çizelge 4.4. Bileşik 83-91'in IC₅₀ değerleri

			
Bileşik	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM)
			JIMT-1
81			0,157
82			0,145
83			0,053
84			0,049
85			0,121
86			0,122
87			0,032
88			0,442
89			0,206

4.3. Farmakokinetik Bulgular

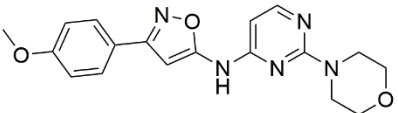
4.3.1. BO-264 üzerinde gerçekleştirilen *in vitro* ve *in vivo* ADME çalışmaları sonuçları

Çizelge 4.5. BO-264'ün fizikokimyasal profili ve *in vitro* ADME özellikleri

 BO-264			
Çözünürlük	7,4 µM (PBS, pH 7,4)	55,3 µM (SGF, pH 1,2)	40,4 µM (SİF, pH 6,8)
Log D		2,31	
İnsan PPB (% bağlanan)		98,87	
$t_{1/2}$ (dk)	5 (FKM)		12 (İKM)
CL _{int} (µL/dk/mg protein)	329 (FKM)		117,5 (İKM)
Caco-2 P_{app} (nm/s)	190,60 ± 61,82 (A→B)		241,03 ± 8,18 (B→A)

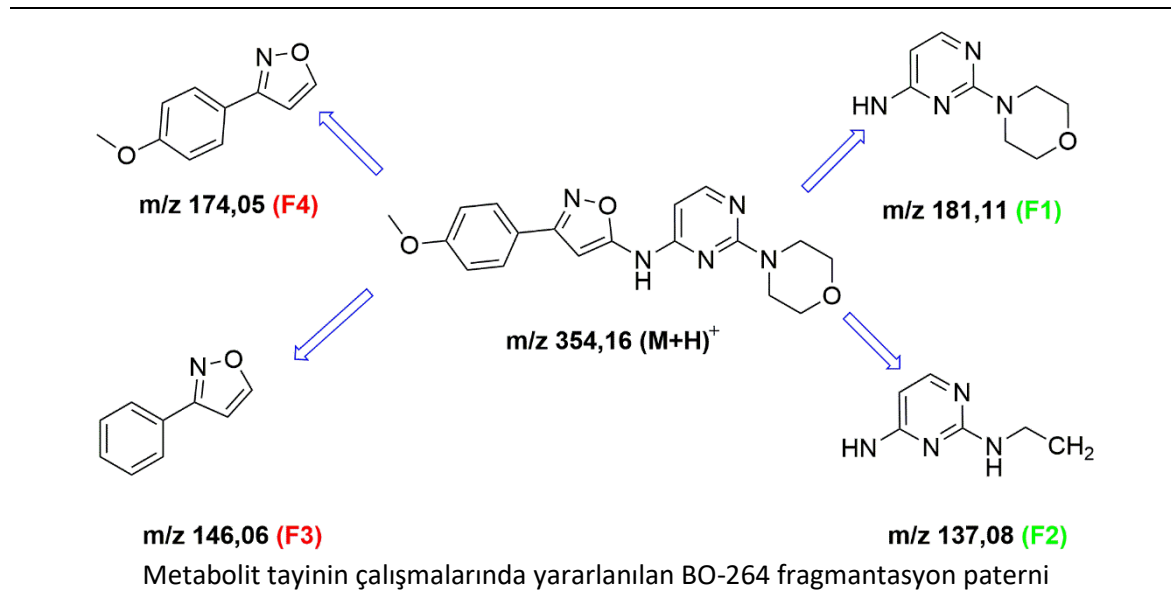
PBS: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi; SGF: Simüle edilmiş gastrik sıvı; SİF: Simüle edilmiş intestinal sıvı; FKM: Fare karaciğer mikrozomları; İKM: İnsan karaciğer mikrozomları; PPB: Plazma proteinlerine bağlanma

Çizelge 4.6. BO-264'ün *in vivo* farmakokinetik özellikleri

 BO-264		
	IV (5 mg/kg)	PO (25 mg/kg)
t_{max} (s)	0,083	0,25
C_0 (ng/ml)	3183	NA
C_{max} (ng/ml)	2296	433,7
AUC _(0-son) (s*ng/ml)	894,7	377,7
AUC _(0-inf) (s*ng/ml)	896,7	530,7
CL (ml/dk/kg)	5575,82	41107,31
V_{ss} (ml/kg)	7089,4	488,61
$t_{1/2}$ (s)	0,818	7,19
% F		11,8

4.3.2. Öncü bileşik BO-264 üzerinde gerçekleştirilen metabolit tayini çalışmaları

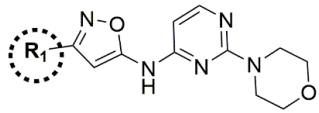
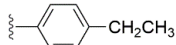
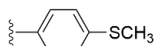
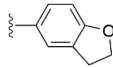
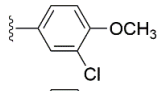
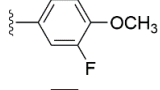
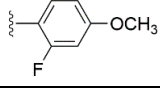
Çizelge 4.7. BO-264'ün insan karaciğer hepatositleri ile inkübasyonu sonucu majör metabolitlerinin tespit çalışmaları



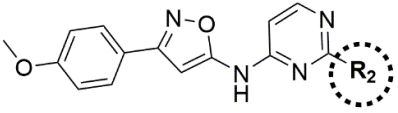
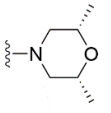
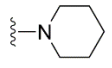
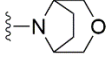
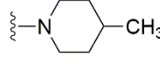
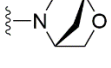
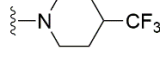
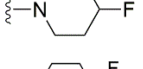
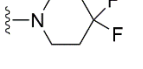
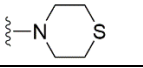
METABOLİT	METABOLİTLERİN MS/MS SPEKTRAL KORELASYONLARINA DAYALI YORUMLARI
M4	MS/MS fragmentasyonunun nötral 176 akb kaybı; glukuronit grubunun karakteristik m/z 370 değerini verir. Ayrıca bozulmamış F1, F2 fragmanlarına ek olarak F4 fragmentasyonunun 16 akb fazlasının gözlemlenmesi; molekülün sol tarafında gerçekleşen bir oksidasyonu düşündürmektedir.
M6	Bozulmamış F2, F3 ve F4 fragmanlarına ek olarak F1 fragmentasyonunun 16 akb fazlasının gözlemlenmesi; morfolin halkasında gerçekleşen bir oksidasyonu işaret etmektedir.
M13	MS/MS fragmentasyonunun 80 akb değerindeki (sülfat grubu) nötral kütle kaybı; sülfat konjugasyonunu işaret etmektedir. Ayrıca bozulmamış F1, F2 fragmanlarına ek olarak F4 fragmentasyonunun 14 akb eksiğinin gözlemlenmesi; molekülün sol tarafında gerçekleşmiş bir demetilasyonu düşündürmektedir.
M14	MS/MS fragmentasyonunun 80 akb değerindeki (sülfat grubu) nötral kütle kaybı; sülfat konjugasyonunu işaret etmektedir. Ayrıca bozulmamış F1, F2 fragmanlarına ek olarak F4 fragmentasyonunun 16 akb fazlasının gözlemlenmesi; molekülün sol tarafında gerçekleşmiş bir oksidasyonu düşündürmektedir.
M15	MS/MS fragmentasyonunun nötral 176 akb kaybı; glukuronit grubunun karakteristik m/z 370 değerini verir. Ayrıca bozulmamış F1 fragmentasyonunun 16 akb fazlasının gözlemlenmesi; molekülün sağ tarafında gerçekleşen bir oksidasyonu işaret etmektedir.

4.3.3. Tez kapsamında seçilen bazı bileşiklerin mikrozomal stabilite çalışma sonuçları

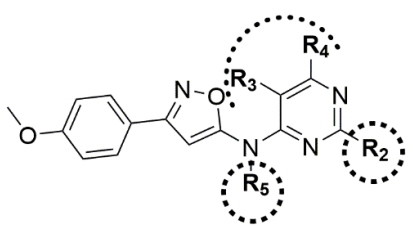
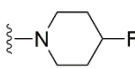
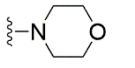
Çizelge 4.8. R₁ modifikasyonları sonucu elde edilen Bileşik 13, 19, 24, 27, 28 ve 34'ün insan karaciğer mikrozomal stabilite test sonuçları

			
Bileşik	R ₁	t _{1/2} (dk)	CL _{int} (μL/dk/mg protein)
13		6,95	199,55
19		2,45	565,44
24		6,35	218,40
27		7,02	197,48
28		12,84	107,93
34		7,22	192,09

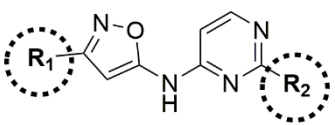
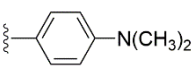
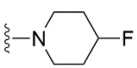
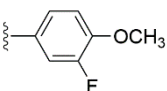
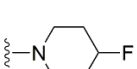
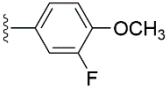
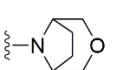
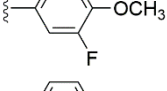
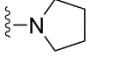
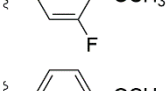
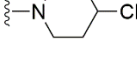
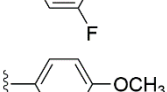
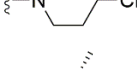
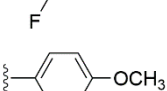
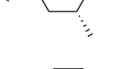
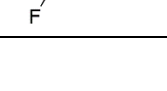
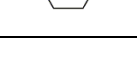
Çizelge 4.9. R₂ modifikasyonları sonucu elde edilen Bileşik 42, 43, 45, 47-49, 51-54 ve 63'ün insan karaciğer mikrozomal stabilite test sonuçları

							
Bileşik	R ₂	t _{1/2} (dk)	CL _{int} (μL/dk/mg protein)	Bileşik	R ₂	t _{1/2} (dk)	CL _{int} (μL/dk/mg protein)
42		28,74	48,23	51		14,69	94,33
43		23,75	58,36	52		28,04	49,43
45		28,08	49,36	53		21,18	65,45
47		9,73	142,47	54		8,78	157,77
48		12,30	112,64	63		7,62	181,93
49		7,38	187,74				

Çizelge 4.10. Ara zincir ve pirimidin halkası modifikasyonları sonucu elde edilen Bileşik 75 ve 77'nin insan karaciğer mikrozomal stabilite test sonuçları

						
Bileşik	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	t _{1/2} (dk)	CL _{int} (μL/dk/mg protein)
75		-F	-H	-H	9,41	147,28
77		-H	-H	-CH ₃	2,37	585,62

Çizelge 4.11. Hibrit Bileşik 81-85 ve 87-89'un insan karaciğer mikrozomal stabilite test sonuçları

				
Bileşik	R ₁	R ₂	t _{1/2} (dk)	CL _{int} (μL/dk/mg protein)
81			12,31	112,58
82			19,00	72,94
83			18,78	73,80
84			14,29	97,02
85			21,35	64,91
87			30,90	44,85
88			47,10	29,49
89			78,72	17,73

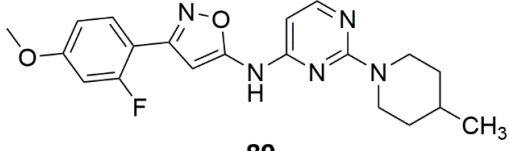
4.3.4. Bileşik 89 üzerinde gerçekleştirilen *in vitro* ve *in vivo* ADME çalışmaları sonuçları

Çizelge 4.12. Bileşik 89'un fizikokimyasal profili ve *in vitro* ADME özellikleri

					
89					
Çözünürlük	<1 µM (PBS, pH 7,4)		194,3 µM (SGF, pH 1,2)		4,2 µM (SİF, pH 6,8)
$t_{1/2}$ (dk)	29,15 _(FKM)				78,72 _(İKM)
CL _{int} (µL/dk/mg protein)	47,55 _(FKM)				17,74 _(İKM)
hERG inhibisyonu (µM)			17,16		
CYP450 inhibisyonu (µM)	CYP1A2	CYP2A6	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9
	>30	>30	>30	19,92	14,53
	CYP2C19	CYP2D6	CYP2E1	CYP3A4-M	CYP3A4-T
	2,17	>30	>30	12,08	11,85

PBS: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi; SGF: simüle edilmiş gastrik sıvı; SİF: Simüle edilmiş intestinal sıvı; FKM: Fare karaciğer mikrozomları; İKM: İnsan karaciğer mikrozomları

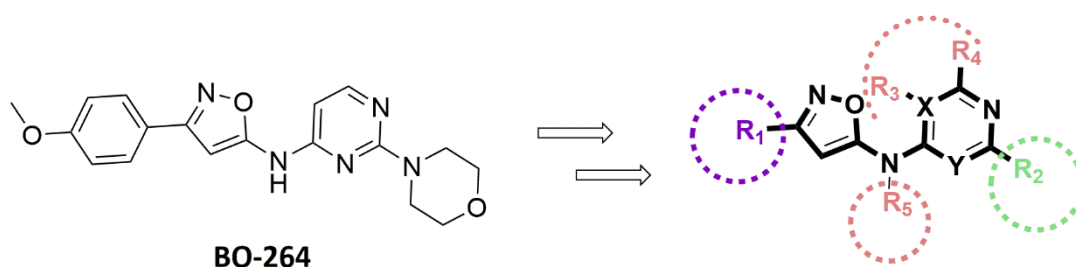
Çizelge 4.13. Bileşik 89'un *in vivo* biyoyararlanım özellikleri

			
89			
	IV (10 mg/kg)	PO _A (50 mg/kg)	PO _B (50 mg/kg)
t_{max} (s)	0,083	3,33	5,00
$t_{1/2}$ (s)	1,76	2,36	2,06
C _{max} (ng/ml)	6370	1453	1710
C ₀ (ng/ml)	8675		
AUC _(son) (s*ng/ml)	5356	17179	21550
AUC _(inf) (s*ng/ml)	5435	17213	22655
Vss _{obs} (L/kg)	2,78		
% F		63,3	79,7

5. TARTIŞMA

5.1. Sentez Çalışmaları

Bu tez çalışması kapsamında; öncü bileşik BO-264'ten yola çıkılarak, daha potent ve ilaç benzeri özellikleri iyileştirilmiş yeni bileşikler elde etmek amacıyla yürütülen sentez çalışmalarında, 4 farklı türevlendirme yaklaşımı üzerinden ilerlenmiştir.



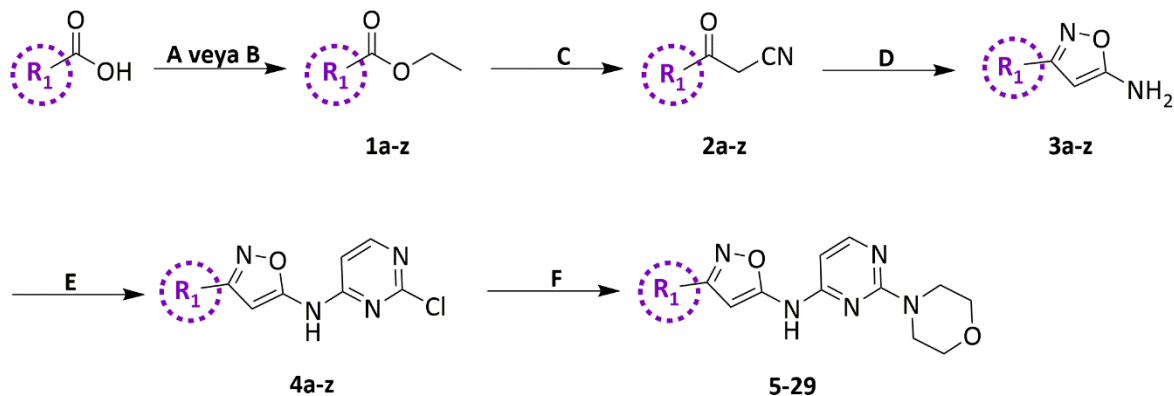
Şekil 5.1. BO-264 öncü bileşiği üzerinde gerçekleştirilen modifikasyonlar

Bu yaklaşımlar;

- Fenil halkası (R₁ grubu) modifikasyonları
- Morfolin halkası (R₂ grubu) modifikasyonları
- Pirimidin halkası (X, Y atomları ve R₃, R₄ grubu) modifikasyonları
- İzoksazol ve pirimidin halkalarını birbirine bağlayan ara zincir (R₅ grubu) modifikasyonları şeklindedir.

Tasarlanan türevler doğrultusunda, öncelikle BO-264 bileşiğinin metoksi fenil halkasına yoğunlaşmıştır. Halka üzerine mono sübstitüe şekilde *orto*, *meta* ve esas olarak da *para* konumlarında, farklı elektronik ve sterik özelliklere sahip kimyasal grupları taşıyan türevlerin sentezleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca halkanın para konumundaki metoksi grubu korunmak koşulu ile; orto konumunda flor, meta konumunda klor, flor ve metoksi grupları bulunan disübstitüe türevler ve halkanın her iki meta konumunda da flor taşıyan trisübstitüe bileşik sentez planına dahil edilmiştir. Ek olarak piridin, piperonil ve benzofuranil gibi bazı doymamış heterosiklik halkaların da R₁ grubu olarak yapı-etki ilişkisi

üzerine olan katkıları incelenmiştir. Bahsi geçen bileşik serisinin elde edilişi Şekil 5.2'deki genel sentez şemasında gösterilmiştir.



(A) SOCl₂, EtOH; (B) EDCI, DMAP, EtOH, DCM (C) NaH, MeCN; (D) H₂N.OH HCl, NaOH, H₂O; (E) t-BuOK, 2,4-dikloropirimidin; (F) Morfolin, n-BuOH.

Şekil 5.2. Bileşik 5-29 için genel sentez şeması

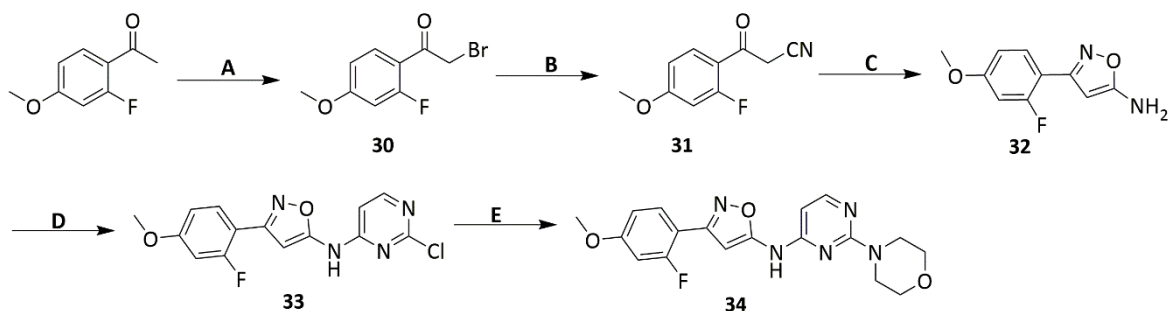
Bileşik 5-29 serisinin sentezi amacıyla öncelikle; uygun benzoik asit türevlerinin etil esterleri (Bileşik 1a-z) elde edilmiştir. Bileşik 1r için; 3-metoksi-5-piridilkarboksilik asit, Bileşik 1s için; 2-metoksi-5-piridilkarboksilik asit, Bileşik 1r için; benzo[d][1,3]dioksol-5-karboksilik asit, Bileşik 1u için; 2,3-dihidrobenzofuran-5-karboksilik asit, Bileşik 1v için; 2,2-difloro benzo[d][1,3]dioksol-5-karboksilik asit kullanılırken, bazı etil esteri türevleri ticari olarak elimizde bulunduğu için bu basamak uygulanmamıştır. Daha sonra Bileşik 1a-z'nin bazik ortam koşullarında asetonitril ile muamelesi sonucu β-ketonitril türevi Bileşik 2a-z elde edilmiş; bu türevlerin hidroksilamin hidroklorür ile reaksiyonu sonucunda 5-aminoizoksazol halkası kapanmıştır (Bileşik 3a-z). Elde edilen izoksazol amin türevi bileşiklerin 2,4-dikloropirimidin ile aromatik nükleofilik süstitüsyon reaksiyonu sonucunda Bileşik 4a-z ara başlangıç maddelerine ulaşılmıştır. Son basamakta Bileşik 4a-z pirimidin klorunun morfolin grubu ile yer değiştirmesi sonucu Çizelge 5.1'de belirtilen final bileşikler elde edilmiştir.

Çizelge 5.1. R₁ modifikasyonları sonucu elde edilen final Bileşik 5-29

5-29

5	3-Metoksifenil	14	4-İzopropilfenil	23	Benzo[d][1,3]dioksol-5-il
6	2-Metoksifenil	15	4-Triflorometilfenil	24	2,3-Dihidrobenzofuran-5-il
7	Fenil	16	4-Difloroetilfenil	25	2,2-Difloro benzo[d][1,3]dioksol-5-il
8	4-Etoksifenil	17	4-Diflorometoksifenil	26	3,4-Dimetoksifenil
9	4-Propoksifenil	18	4-Triflorometoksifenil	27	4-Metoksi-3-klorofenil
10	4-Florofenil	19	4-Tiyometilfenil	28	4-Metoksi-3-florofenil
11	4-Klorofenil	20	4-N,N-dimetilaminofenil	29	4-Metoksi-3,5-diflorofenil
12	4-Metilfenil	21	5-Metoksipiridinil		
13	4-Etilfenil	22	6-Metoksipiridinil		

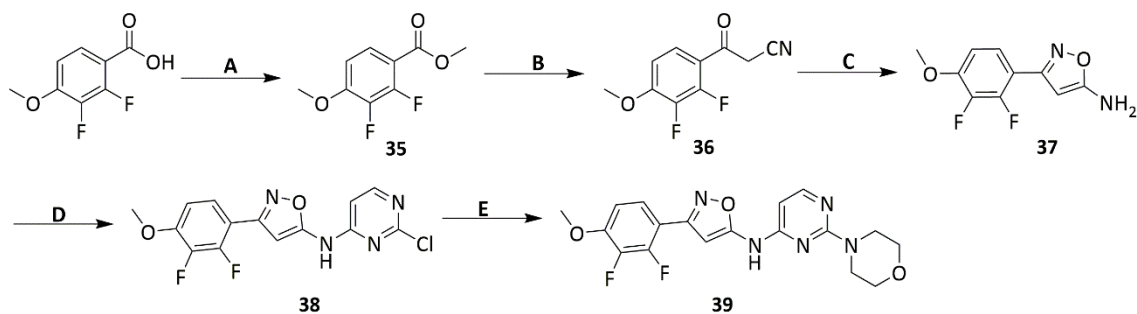
R₁ grubu modifikasyonları doğrultusunda; 4-metoksi fenil halkasının ikinci konumunda flor atomu taşıyan Bileşik 34 ve Bileşik 39 ise yukarıda bahsedilen genel sentez yöntemi ile elde edilemediğinden dolayı farklı sentetik yollar izlenmek durumunda kalınmıştır. Bu amaçla Bileşik 34 için; 2-floro-4-metoksiasetofenonun TBABr₃ varlığında elde edilen ilgili fenaçil bromür türevinin (Bileşik 30) EtOH:H₂O içindeki çözeltisi KCN ile muamele edilmiş, sonucunda Bileşik 31'e ulaşılmıştır. Bileşik 31'in bazik ortam koşullarında NH₂OH.HCl ile reaksiyonunda 5-aminoizoksazol halkası kapanmıştır (Bileşik 32). Elde edilen Bileşik 32'nin 2,4-dikloropirimidin ile aromatik nükleofilik sübstitüsyon reaksiyonu sonucunda ara başlangıç maddesi Bileşik 33'e ulaşılırken, son basamakta bahsi geçen bileşiğin morfolin ile muamelesi sonucu final Bileşik 34 elde edilmiştir.



(A) TBABr₃, MeCN; (B) KCN, EtOH, H₂O; (C) H₂N.OH HCl, NaOAc, MeOH; (D) t-BuOK, 2,4-dikloropirimidin; (E) Morfolin, n-BuOH.

Şekil 5.3. Bileşik 34 için genel sentez şeması

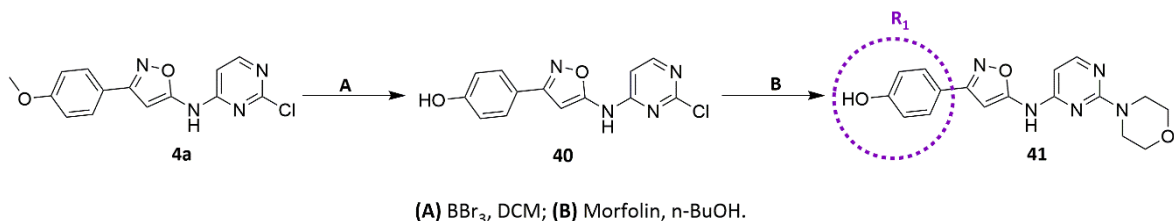
Bileşik 39'un sentezi ise; 2,3-difloro-4-metoksibenzoik asitten yola çıkılarak elde edilen metil esteri yapısındaki Bileşik 35'in, kuru ortam şartlarında ve -78°C sıcaklıkta $n\text{-BuLi}$ varlığında reaksiyonu sonucunda Bileşik 36'ya ulaşılmıştır. Bileşik 36'nın metanol içerisindeki çözeltisinin NaOAc varlığında $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ ile reaksiyonunda 5-aminoizoksazol halkası kapanmıştır (Bileşik 37). Elde edilen Bileşik 37'nin 2,4-dikloropirimidin ile aromatik nükleofilik sübstitüsyon reaksiyonu sonucunda Bileşik 38'e ulaşılırken; son basamakta bu ara başlangıç maddesinin morfolin ile muamelesi ile final Bileşik 39 elde edilmiştir.



(A) SOCl_2 , MeOH; (B) MeCN, $n\text{-Bütillityum}$, THF; (C) $\text{H}_2\text{N}\cdot\text{OH}\cdot\text{HCl}$, NaOAc, MeOH; (D) $t\text{-BuOK}$, 2,4-dikloropirimidin; (E) Morfolin, $n\text{-BuOH}$.

Şekil 5.4. Bileşik 39 için genel sentez şeması

Fenil halkası para konumunda hidroksil grubu taşıyan türev; Bileşik 41 için de farklı bir sentetik yol izlenmiştir. Bileşik 5-29 serisi için uygulanan genel sentez yöntemi ile elde edilen ara başlangıç maddesi Bileşik 4a, bu türev için başlangıç maddesi olarak belirlenmiştir. Bileşik 4a'nın BBr_3 varlığında gerçekleştirilen metoksi grubu hidrolizi sonucunda elde edilen Bileşik 40, morfolin ile reaksiyona sokularak Bileşik 41 sentezlenmiştir. Söz edilen bileşiğe ilişkin sentez şeması Şekil 5.5'te belirtilmiştir.

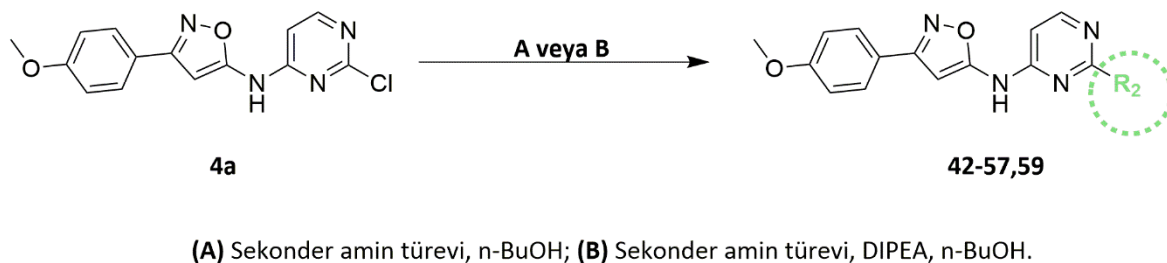


(A) BBr_3 , DCM; (B) Morfolin, $n\text{-BuOH}$.

Şekil 5.5. Bileşik 41'e ait genel sentez şeması

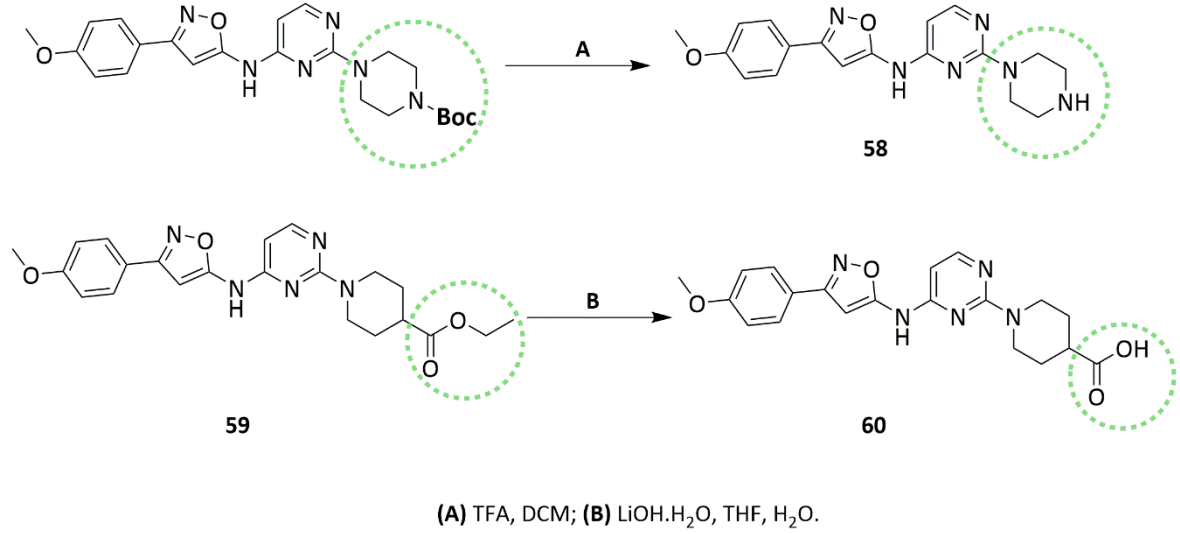
Öncü bileşik üzerinde gerçekleştirilen diğer bir türevlendirme stratejisi; morfolin halkası modifikasyonlarıdır. Bu halka üzerinde gerçekleştirilen modifikasyonlar çerçevesinde sentezlenen yeni bileşik serisinde 4-metoksifenil (R_1) grubu sabit tutulmuş, morfolin halkası yerine süstitüe/non-süstitüe morfolin biyoizosterleri, farklı uzunlukta alkil köprüsü taşıyan morfolin analogları, nispeten daha küçük hacimli alifatik heterosiklik halkalar ve çeşitli aminoalkil ve aminoetanol yapıları getirilerek, bu grupların sitotoksik aktiviteye olan katkıları incelenmiştir. Ayrıca izlenen modifikasyon yaklaşımında, molekülün fizikokimyasal özelliklerine olumlu katkı sağlayacak parametreler de göz önünde bulundurulmuştur.

Bu doğrultuda sentezlenen ara başlangıç maddesi 4a'nın bütanol içerisinde farklı amin türevleri ile süstitüsyon reaksiyonlarında farklı sentez yolları izlenmiştir. Kullanılan amin türevi serbest formda ise; ara başlangıç maddesi ile n-bütanol içerisinde ısıtılması sonucunda direkt reaksiyon verirken, ilgili amin türevi eğer hidroklorür tuzu halinde ise; serbest amin formuna geçebilmek adına reaksiyonda DIPEA varlığına ihtiyaç duyulmuştur. Sonuçta elde edilen final bileşiklere (Bileşik 42-57 ve Bileşik 59) ait sentez şeması Şekil 5.6'da gösterilmiştir.



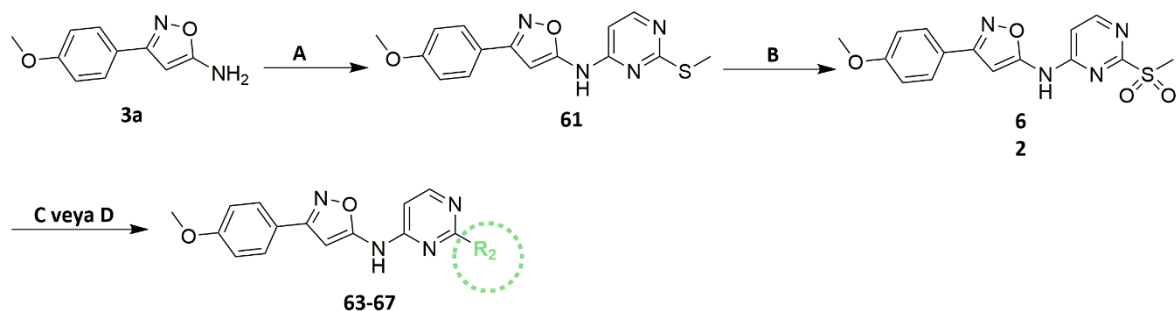
Şekil 5.6. R_2 modifikasyonları ile gerçekleştirilen Bileşik 42-57'un ve Bileşik 59'un sentezi

Bileşik 58 ve Bileşik 60 ise genel sentez yolağına ilave basamaklar eklenmesi sonucunda elde edilebilmiştir. Bileşik 58 için; Boc grubu ile korunmuş halde bulunan piperazin türevi, Bileşik 4a ile reaksiyonu sonrası trifloroasetik asitli ortamda Boc hidrolizine tabi tutulmuştur. Bileşik 60'ın sentezi ise; Bileşik 59'un taşıdığı ester grubunun LiOH.H₂O varlığında hidroliz edilmesi sonucu gerçekleştirilmiştir. İlgili bileşiklerin sentezi Şekil 5.7'de gösterilmiştir.



Şekil 5.7. Bileşik 58'in ve Bileşik 60'ın sentezi

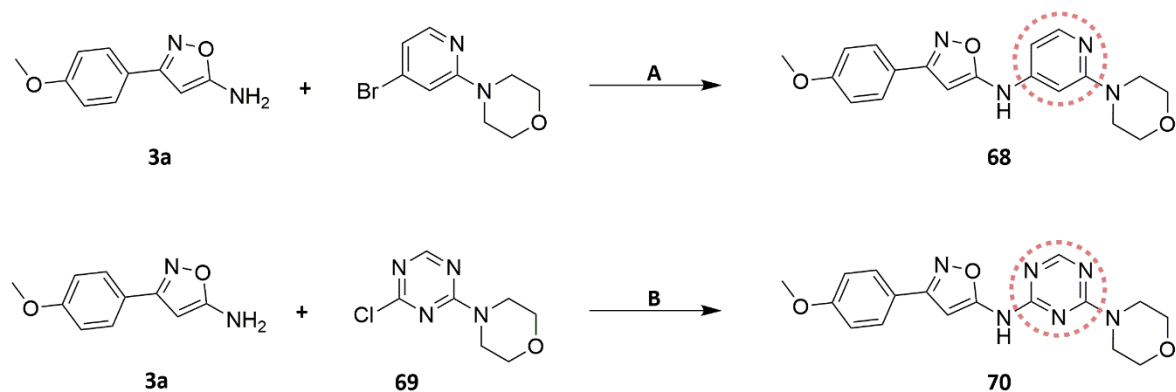
Morfolin modifikasyonları çerçevesinde; ara başlangıç maddesi Bileşik 4a'nın 2. konumundaki klor atomunun, kullanılan primer aminler ile sübstitüsyon reaksiyonu vermemesi neticesinde; sekonder amin yerine primer amin türevleri kullanılarak gerçekleştirilen final bileşik sentezlerinde farklı sentetik stratejiler izlenmiştir (Bileşik 63-67). Bu amaç doğrultusunda; Bileşik 3a'nın DMA içerisindeki çözeltisinin bazik ortam koşullarında 4-kloro-2-(metiltiyo)pirimidin ile reaksiyonu sonucu Bileşik 61 elde edilmiştir. Bileşik 61'in taşıdığı tiyometil yapısının *m*-CPBA varlığında yükseltgenmesi sonucu metilsülfonil grubu taşıyan Bileşik 62'ye ulaşılmıştır. Bileşik 62'nin NMP içerisindeki çözeltisinin primer amin ile nükleofilik aromatik sübstitüsyon reaksiyonu sonucunda Bileşik 63-66 elde edilmiştir. Bileşik 67'nin sentezinde ise farklı olarak; Bileşik 62'nin etanol içerisindeki çözeltisi TEA varlığında metilamin ile reaksiyona tabi tutulmuştur. Bahsi geçen bileşiklerin sentezi Şekil 5.8'de gösterilmiştir.



(A) 4-kloro-2-(metiltiy)pirimidin, NaH, DMA; (B) m-CPBA, DCM, DMF; (C) Primer amin türevi, NMP; (D) Metilamin, TEA, EtOH.

Şekil 5.8. Bileşik 63-67'nin sentezi

Öncü bileşik BO-264 üzerinde gerçekleştirilen bir diğer türevlendirme çalışması; pirimidin halkası modifikasyonlarıdır. Öncelikle pirimidin halkasının biyolojik aktivitedeki etkisini incelemek adına; molekülün 4-metoksifenil ve morfolin kısımları aynı kalmak şartı ile pirimidin yapısı yerine piridin ve triazin halkası taşıyan türevlerin sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla; Bileşik 3'ün *t*-BuONa ve Pd(Xanthphos)Cl₂ varlığında 4-bromo-2-morfolinopiridin ile kenetlenme reaksiyonu sonucu Bileşik 68, *t*-BuOK varlığında 4-(4-kloro-1,3,5-triazin-2-il)morfolin ile nükleofilik aromatik yer değiştirme reaksiyonu sonucunda da Bileşik 70 elde edilmiştir. İlgili bileşiklerin sentezi Şekil 5.9'da gösterilmiştir.

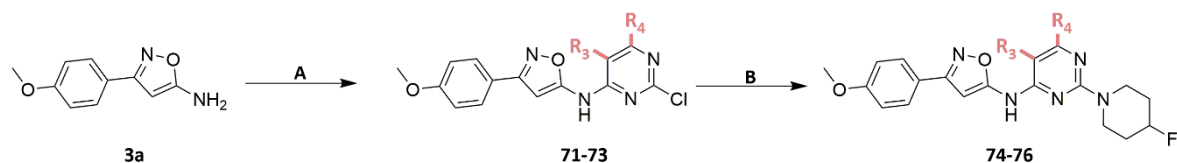


(A) 4-bromo-2-morfolinopiridin, *t*-BuONa, Pd(Xanthphos)Cl₂, Me-THF; (B) 4-(4-kloro-1,3,5-triazin-2-il)morfolin, *t*-BuOK, *t*-BuOH.

Şekil 5.9. Bileşik 68 ve Bileşik 70'in sentezi

JIMT-1 hücresel aktivite testlerinden alınan sonuçlar baz alınarak pirimidin halkası azotlarının sitotoksikite için gerekli olduğu tespitinin yapılması üzerine izlenen diğer bir

modifikasyon stratejisi ise; pirimidin halkasının beşinci ve altıncı konumlarına getirilen sübstituentlerin biyolojik aktiviteye olan katkısını değerlendirmek olmuştur. Bahsi geçen konumlarda flor, klor gibi halojen atomları ve metil grubunu taşıyan Bileşik 74-76, Şekil 5.10'da belirtilen sentez yöntemine göre sentezlenmiştir.

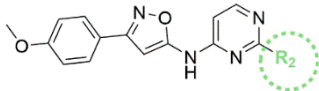


(A) 2,4-dikloropirimidin türevleri, *t*-BuOK; (B) 4-floropiperidin HCl, DIPEA, *n*-BuOH.

Şekil 5.10. R₃ ve R₄ modifikasyonları ile gerçekleşen Bileşik 74-76 sentezi

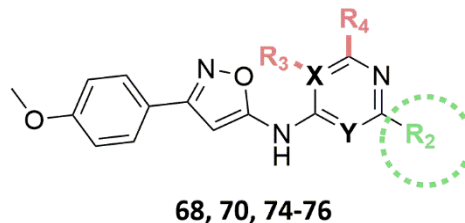
Bileşik 74-76 sentezi için; Bileşik 3a başlangıç bileşiğinden yola çıkılmış, bu bileşiğin farklı sübstitüsyon paternleri taşıyan pirimidin türevleri ile *t*-BuOK varlığında aromatik nükleofilik yer değiştirme reaksiyonu sonucu Bileşik 71-73 ara ürünleri elde edilmiştir. Daha sonrasında bu bileşiklerin, morfoline kıyasla daha potent sonuçlar alınan ve metabolik açıdan daha dayanıklı olduğu öngörülen 4-floropiperidin halkasıyla DIPEA varlığında gerçekleştirilen reaksiyonları sonucu Bileşik 74-76'ya ulaşılmıştır.

Çizelge 5.2. R₂ modifikasyonları sonucu elde edilen final Bileşik 42-60, 63-67

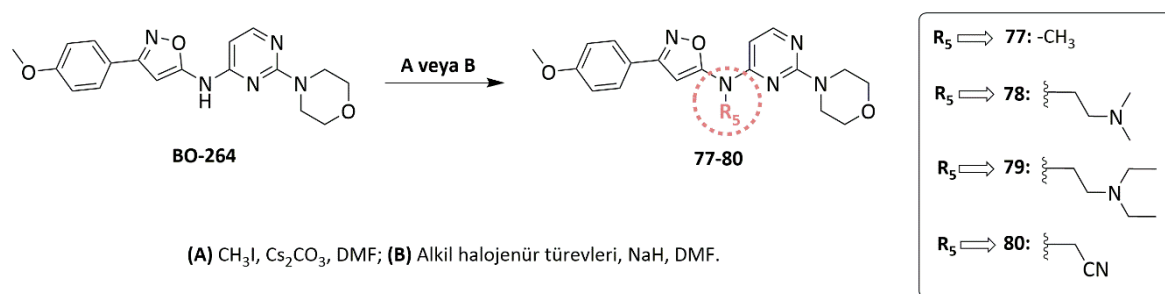
 (42-60, 63-67)					
42		48		54	
43		49		55	
44		50		56	
45		51		57	
46		52		58	
47		53		59	
				60	
				63	
				64	
				65	
				66	
				67	

Çizelge 5.3. Pirimidin halkası modifikasyonları sonucu elde edilen final Bileşik 68,70,74-76

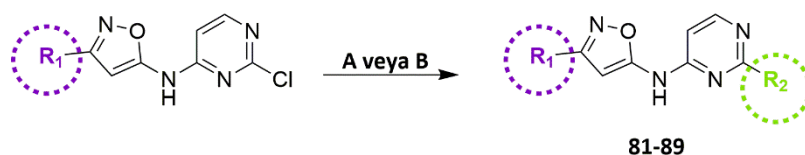
	X	Y	R ₂	R ₃	R ₄
68	C	C		-H	-H
70	N	N		-H	-H
74	C	N		-Cl	-H
75	C	N		-F	-H
76	C	N		-H	-CH ₃



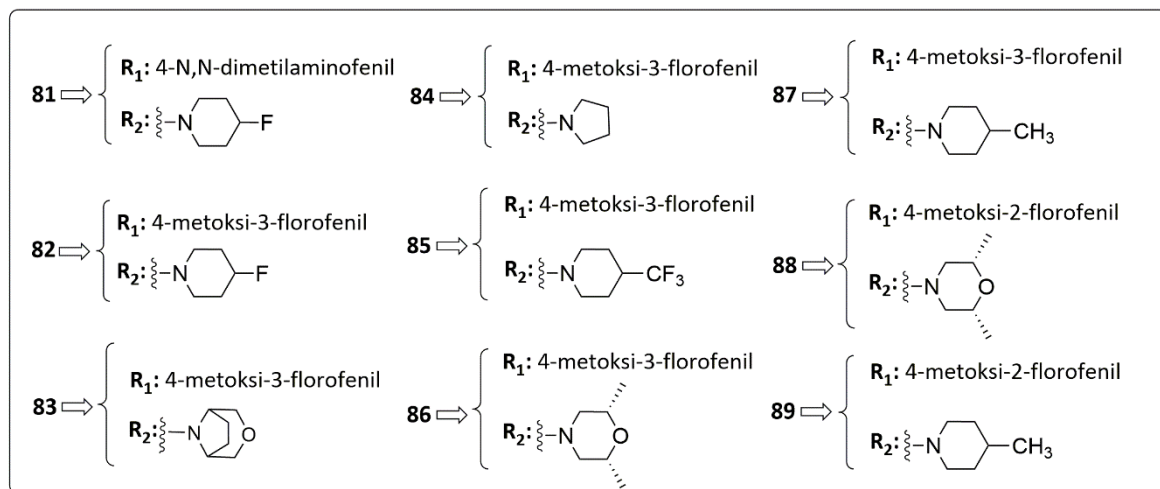
Tez kapsamında sentezi gerçekleştirilen bir diğer bileşik serisi ise; BO-264'ün taşıdığı serbest amin ara zinciri süstitüsyonlarının biyolojik aktivite üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla tasarlanan Bileşik 77-80 olmuştur. Öncü bileşiğin; Cs₂CO₃ varlığında metil iyodür ile metilasyonu sonucu elde edilen Bileşik 77'ye ve NaH varlığında farklı alkil halojenür türevleri ile reaksiyonu neticesinde ulaşılan Bileşik 78-80'e ilişkin sentez şeması Şekil 5.11'de gösterilmiştir.

Şekil 5.11. R₅ modifikasyonu kapsamında gerçekleştirilen Bileşik 77-80'nin sentezi

Sentez planı çerçevesinde gerçekleştirilen son modifikasyonlar; bahsi geçen R₁-R₅ modifikasyonlarının tümü göz önüne alınarak, biyolojik aktiviteye olumlu katkı sağlayan ve göreceli olarak optimize fizikokimyasal karaktere sahip komponentlerin bir araya getirildiği hibrit final bileşiklerin sentezidir. Bu kapsamda belirlenen ara başlangıç maddeleri Bileşik 4q, Bileşik 4y ve Bileşik 33'ün, ilgili siklik sekonder amin türevi ile Şekil 5.12'de belirtilen sentez yöntemi doğrultusunda reaksiyona sokulmuş ve sonucunda Bileşik 81-89 elde edilmiştir.



(A) Sekonder amin türevi, n-BuOH; (B) Sekonder amin türevi, DIPEA, n-BuOH.

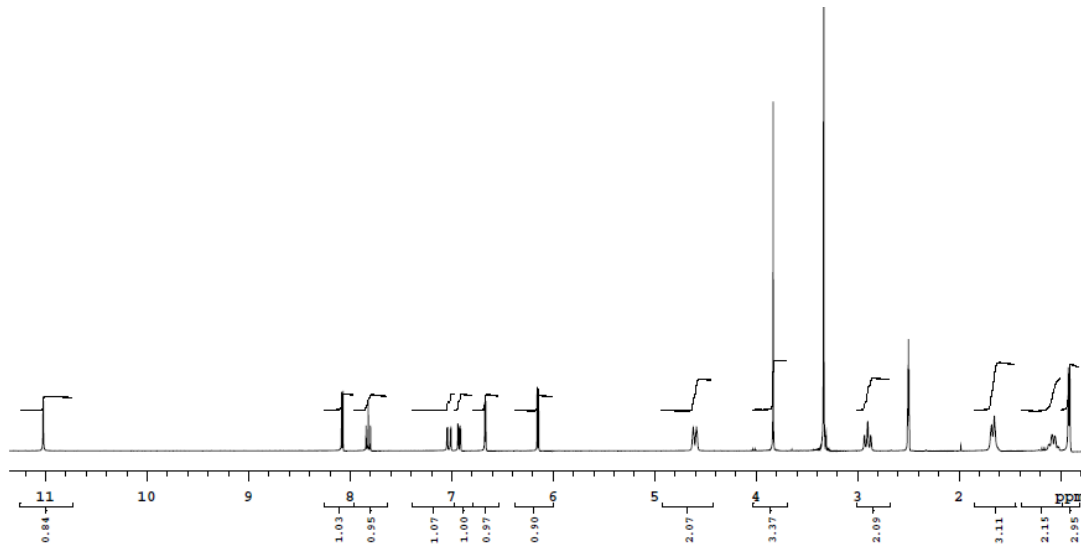


Şekil 5.12. Hibrit final bileşik serisi Bileşik 81-89'un sentez şeması

5.2. Yapı Aydınlatma Çalışmaları

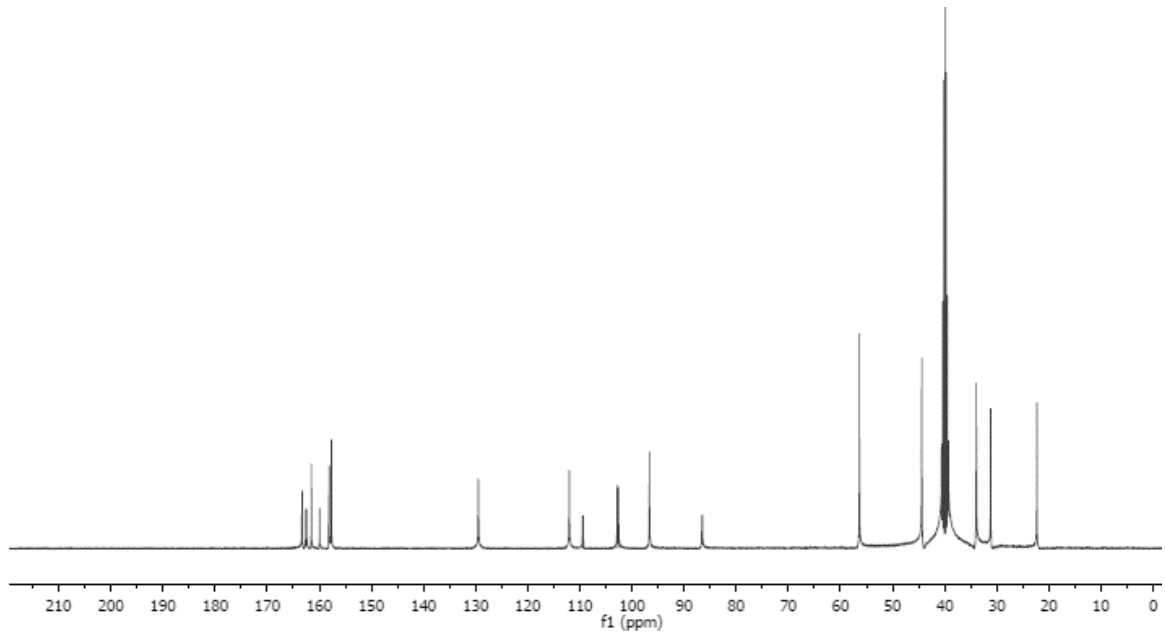
Bu tez dahilinde gerçekleştirilen sentez çalışmaları sonucunda; 36'sı orijinal olmak üzere toplamda 111 adet ara bileşik ve literatüre kayıtlı olmayan 70 adet orijinal final bileşik sentezlenmiştir.

Sentezlenen ara ürünlerin yapılarının aydınlatılmasında ^1H -NMR spektrumları ve HRMS sonuçları kullanılırken, final bileşiklerin yapıları ise ^1H -NMR, ^{13}C -NMR spektrumları ve HRMS sonuçları ile aydınlatılmıştır. Final ürün serisinin lider bileşiği olarak belirlenen Bileşik 89'un 400 MHz frekansta $\text{DMSO}-d_6$ solvanı içerisinde alınan ^1H -NMR spektrumunda; piperidin halkasına ait metil protonlarının 0,92 ppm'de 6,4 Hz eşleşme sabiti ile dublet (3H) olarak sinyal verdikleri görülmektedir. Piperidin halkasına ait diğer protonlar 1,06-1,12 ppm (2H), 1,65-1,68 ppm (3H), 2,87-2,93 ppm (2H) ve 4,59-4,62 ppm (2H) değerlerinde multiplet olarak gözlemlenmektedir. Bileşiğin fenil halkasının 4. konumunda taşımış olduğu metoksi grubuna ait protonlar, elektronegatif oksijen atomunun etkisi ile 3,83 ppm'de ve 3H değerinde singlet olarak sinyal vermiştir. İzoksazol halkasının dördüncü konumundaki tek protonun sinyali fenil halkasında bulunan flor atomunun etkisi ile 6,67 ppm'de 3,6 Hz eşleşme sabiti ile dublet olarak gözlemlenirken, Bileşik 89'un pirimidin motifine ait protonlar; 6,15 ve 8,08 ppm'de 5,6 Hz eşleşme sabiti ile dublet pikler şeklinde sinyal vermiştir. Fenil halkasının aromatik protonları incelendiğinde ise; flor atomuna komşu protonun 7,03 ppm'de dubletin dubleti ($J= 13,4$ Hz; $J= 2,4$ Hz), metoksi grubuna göre orto, flor atomuna göre ise para konumunda yer alan protonun 6,93 ppm'de dubletin dubleti ($J= 8,6$ Hz; $J= 2,4$ Hz) ve fenil halkasındaki son protonun ise 7,82 ppm'de ($J= 13,4$ Hz) triplet olarak sinyal verdiği gözlemlenmiştir. İzoksazol ve pirimidin halkalarını birbirine bağlayan amin köprüsü protonu ise 10,99 ppm'de singlet olarak sinyal vermiştir (Resim 5.1).



Resim 5.1. Bileşik 89'un ^1H -NMR spektrumu

Bileşik 89'un 100 MHz frekansta DMSO- d_6 solvanı içerisinde alınan ^{13}C -NMR spektrumunda; molekülün 4-metilpiperidin ve metoksi grubuna ait karbon atomlarının 22,31; 31,17; 33,92; 44,39 ve 56,35 ppm değerlerinde alifatik sahada sinyal verdikleri gözlemlenmiştir. Spektrumda aromatik saha incelendiğinde; flor atomuna komşu karbonlarda meydana gelen yarılmalar göze çarpmaktadır. Flor grubunun bağlı bulunduğu fenil halkasının 2. konumundaki karbon atomu 248 Hz eşleşme sabiti değeri ($^1J_{\text{C-F}}$) ile 161,17 ppm'de dublet şeklinde sinyal vermiştir. Flor atomuna 2 bağ uzaklıkta bulunan aromatik karbonlardan ilki 102,70 ppm'de ($^2J_{\text{C-F}} = 26,0$ Hz), ikinci karbon ise 109,41 ppm'de ($^2J_{\text{C-F}} = 12,0$ Hz) dublet pikler şeklinde gözlemlenmiştir. Flor grubu ile 3 bağ üzerinden etkileşim halinde bulunan metoksi grubunun bağlı olduğu fenil karbonu 162,53 ppm'de ($^3J_{\text{C-F}} = 12,0$ Hz) izoksazol karbonu ise 86,53 ppm'de ($^3J_{\text{C-F}} = 11,0$ Hz) dublet sinyal verirken, 4 bağ uzaklıkta bulunan karbon atomunun dublet piki 129,47 ppm'de gözlemlenmiştir ($^4J_{\text{C-F}} = 5,0$ Hz). Bahsedilen pikler haricinde aromatik sahada sinyal veren diğer pikler izoksazol ve pirimidin halkalarına aittir (Resim 5.2).

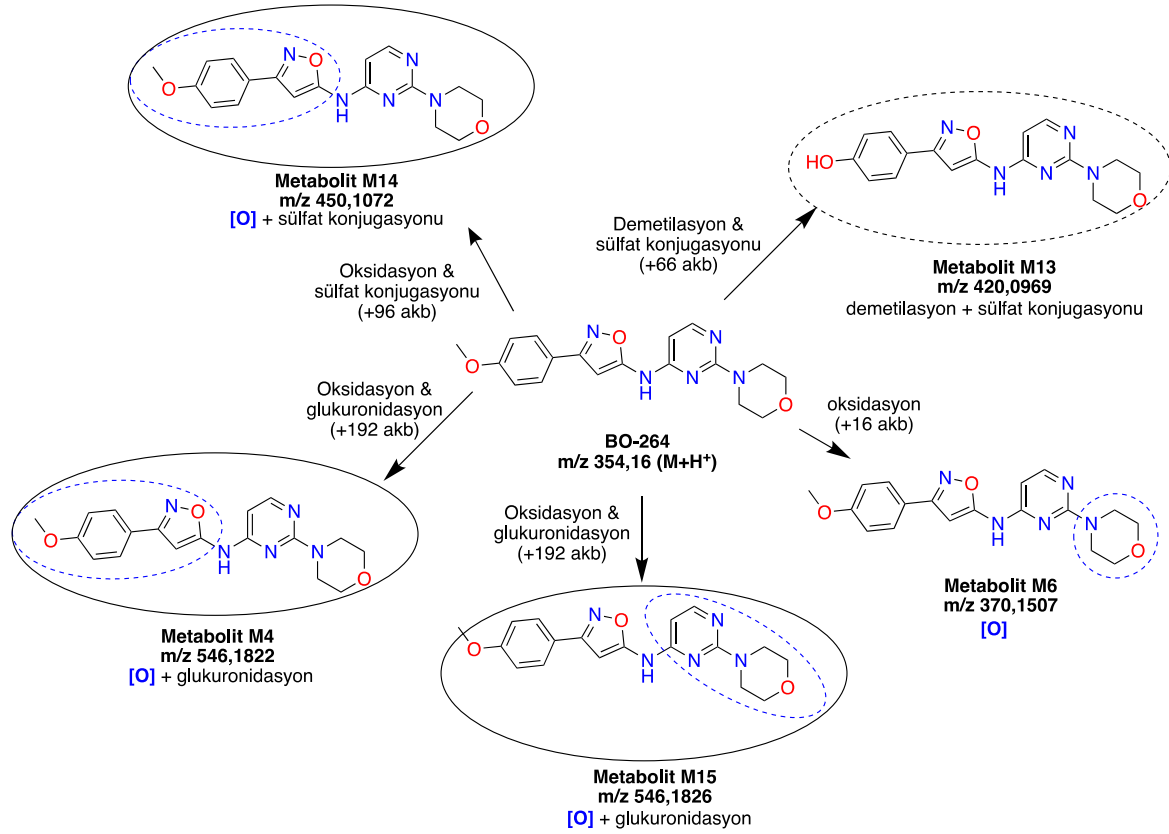


Resim 5.2. Bileşik 89'un ^{13}C -NMR spektrumu

5.3. Biyolojik Çalışmalar ve Yapı Etki İlişkileri

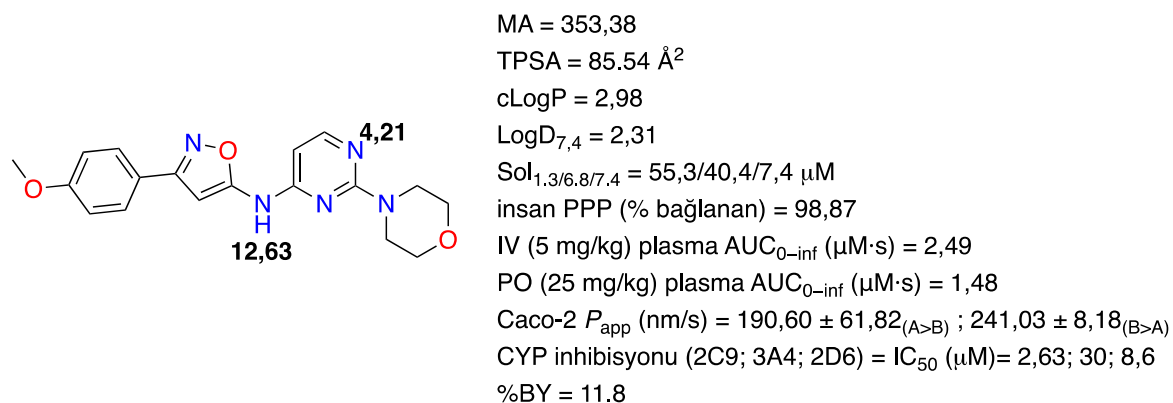
Bu tez çalışmasına temel oluşturan BO-264'ün farelerde gerçekleştirilen *in vivo* farmakokinetik çalışma sonuçları bu bileşiğin biyoyararlanımının oldukça düşük olduğunu göstermiştir ($F = \sim \% 12$). Düşük biyoyararlanıma neden olan faktörler arasında en önemlisi BO-264'ün metabolik dayanıksızlığı olarak öne çıkmaktadır. Şöyle ki; BO-264 fare ve insan mikrozomları ile inkübe edildiğinde hızla metabolize olmaktadır. Öncü bileşiğin *in vitro* karaciğer mikrozomlarındaki aşırı metabolik döngüsü (fare ve insan için, sırasıyla; 329 ve 117 $\mu\text{L}/\text{dk}/\text{mg}$ protein), metabolizmanın klirens mekanizmasına ve dolayısıyla düşük biyoyararlanıma çok önemli katkısının olduğunu düşündürmüştür. BO-264'ün *in vitro* yarılanma ömrü ($t_{1/2}$) fare mikrozomlarında 5 dk iken insan mikrozomlarında 12 dk olarak belirlenmiştir.

BO-264'ün fare ve insan mikrozomlarında bu yüksek metabolik dönüşümü; klinik gelişme potansiyeli olan aday bileşikleri tanımlamak için metabolik klirensin azaltılmasının gerekli olacağını düşündürmüştür. Bu nedenle; BO-264'ün metabolizması, insan karaciğer hepatositleri ile *in vitro* inkübasyonun ardından incelenmiştir. Mikrozomlar; membran bağlı ilaç metabolize edici enzimleri (Sitokrom P450'ler ve UDP-glukuronozil transferazlar vb.) içeren alt hücre fraksiyonları iken, hepatositler hücresel organizasyon içerisinde hem faz I hem de faz II ilaç metabolize eden enzimleri eksiksiz olarak içermektedir. Analiz sonuçlarına göre; BO-264 insan karaciğer hepatositleri ile inkübasyonu sonucunda yaklaşık % 25 oranında metabolize olmadan kalmakla birlikte oluşan on altı metaboliti öngörülebilmiştir (Çizelge 4.7). En çok oluşan beş metabolik dönüşüm Şekil 5.13'te gösterilmiştir. Şekilden anlaşılacağı üzere BO-264'in metabolizması majör olarak dealkilasyon ve sülfat konjugasyonu, oksidasyon, oksidasyon ve ardından glukuronidasyon (iki metabolit) ve oksidasyon ve ardından sülfat konjugasyonu şeklinde gerçekleşmektedir.



Şekil 5.13. İnsan hepatositleri ile inkübasyondan sonra HPLC/MS/MS ile tanımlanan ana BO-264 metabolitleri

BO-264'ün biyoyararlanımını sınırlandıran ikincil bir faktör olarak da fizyolojik pH'daki suda çözünürlüğünün düşük olmasından bahsedilebilir. BO-264 zayıf bazik karakterde bir bileşik olup en güçlü bazik pKa 4,21 ve en güçlü asidik pKa değeri 12,63 olarak hesaplanmıştır (Chemicalize, ChemAxon) (Şekil 5.14). Bu değerlerde BO-264; gastrointestinal sistemin mide dışındaki pH ortamlarında ve fizyolojik pH'da büyük çoğunlukla iyonize olmayan türler şeklinde bulunacağından dolayı çözünürlüğünün ve emilimin düşük olacağı düşünülmüştür. Nitekim, BO-264'ün deneysel olarak tayin edilen fizyolojik pH'daki suda çözünürlüğü düşük (7,4 µM) ve hesaplanmış cLogP değeri 2,98 ve deneysel LogD_{7,4} değeri 2,31 olup molekül yağda çözünürlüğü yüksek olarak değerlendirilmiştir (Şekil 5.14).



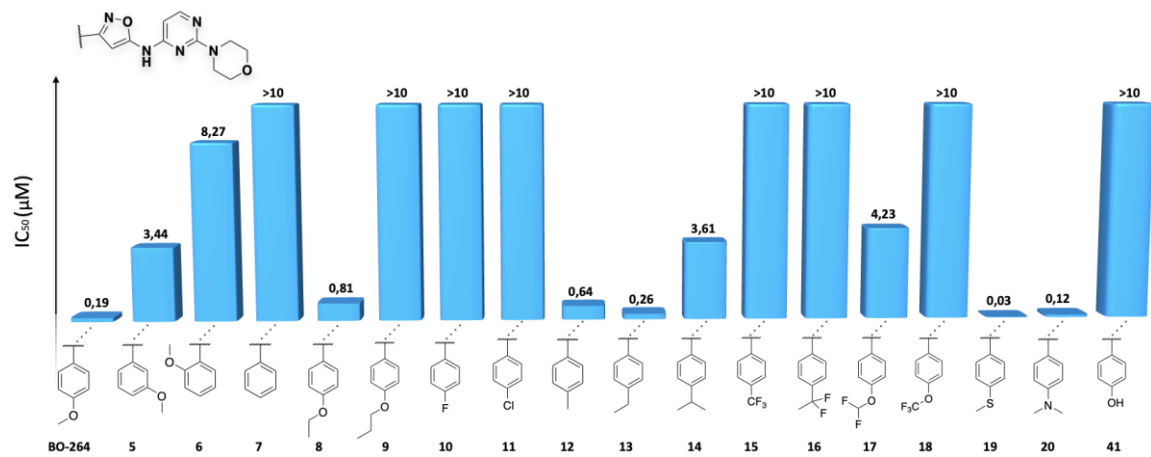
Şekil 5.14. BO-264'ün DMPK (ilaç metabolizması-Farmakokinetik) karakterizasyonu

Bu bilgiler; Lipinski'nin beş kuralını ihlal etmeyen BO-264 bileşiğinin sahip olduğu düşük oral biyoyararlanımının, büyük olasılıkla hem intestinal hem de karaciğer ilk geçiş metabolizmasına bağlı olabileceğini öne sürmektedir. Elde edilen verilere dayanarak, tez kapsamında yapı-etki ilişkisi (YEİ) kurulmasına yönelik tasarlanan çalışmalarda, bileşiklerin metabolik stabilitelerini arttırmak ayrıca hedeflenmiş ve bu doğrultuda öncü bileşik BO-264 üzerinde çeşitli kimyasal modifikasyonların gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

Yapı-etki ilişkisini anlamak maksadıyla BO-264 üzerinde tasarlanan yapısal modifikasyonlar sonucu sentezlenen 2,4-diaminopirimidin türevi final bileşiklerin; aşırı TACC3 proteini eksprese eden JIMT-1 hücreleri üzerinde antiproliferatif etkinlikleri test edilmiştir. Bileşiklerin biyolojik aktivite analiz sonuçları IC₅₀ değerleri ile ifade edilmiştir. Ek olarak, aktivite sonuçlarına göre seçilen bileşiklerin *in vitro* insan karaciğer mikrozomlarında metabolik stabiliteleri de test edilmiştir. Bütün sonuçlar ışığında en optimum bileşik ile farelerde *in vivo* biyoyararlanım çalışması yapılması planlanmıştır.

Tez çalışmaları dahilinde ilk olarak; ana metabolizasyondan sorumlu *p*-metoksi grubunun aktivite açısından öneminin anlaşılmasına yönelik değişiklikler gerçekleştirilmiştir. BO-264'ün pozisyonel izomerleri olan Bileşik 5 (*m*-metoksi) ve Bileşik 6 (*o*-metoksi) ile aktivitede önemli derecede kayıp yaşanırken, demetil (Bileşik 41) veya demetoksi (Bileşik 7) türevlerinde aktivitenin kaybolduğu görülmektedir (Şekil 5.15). Bu ilk sonuçlar *para* konumunda ikame edilen metoksi grubunun aktivite açısından önemini doğrulamaktadır.

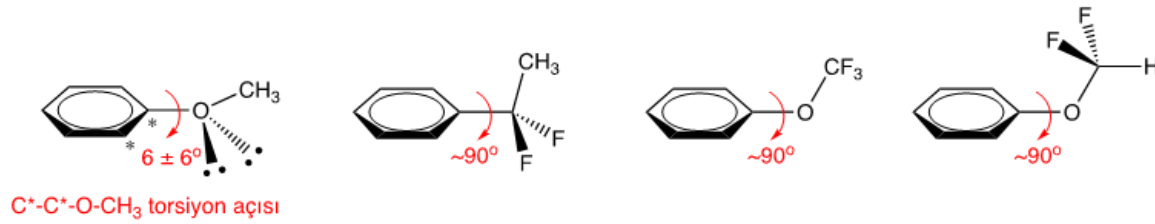
Sonrasında, metoksi grubunun hacimsel önemi etoksi (Bileşik 8) ve propoksi (Bileşik 9) türevleri ile test edilmiş ve alkoksi grubunun hacmi arttıkça aktivitenin kaybolduğu gözlemlenmiştir. Metabolik hassas nokta olan metoksi grubunun halojen ile değiştirildiği analoglarda da aktivitenin kaybolduğu görülmüştür. Metoksi yerine metil (Bileşik 12) ve etil (Bileşik 13) taşıyan türevlerde aktivite korunurken alkil grubunda hacimsel artış (*i*-propil, Bileşik 14) aktivitede önemli azalmaya neden olmuştur. Buraya kadar fenil halkasının *para* konumunda alkoksi ya da alkil grubu ikamesinin antiproliferatif etki açısından gerekliliği anlaşılma ile birlikte *para* konumunda bulunan süstitüentün hacimsel olarak belirli sınırlar içinde olmasının gerektiği ortaya konmuştur. Bu aşamada; metabolik dayanıklılığı arttıracak düşünülen klasik hidrojen → flor biyoizosterizm yaklaşımı uygulanarak sentezlenen trifluorometil, difluoroetil, diflorometoksi ve triflorometoksi (Bileşikler 15-18) türevlerinde de büyük aktivite kayıpları yaşanmıştır.



Şekil 5.15. 4-metoksifenil halkası modifikasyonu çerçevesinde sentezlenen ilk seri bileşiklerin IC₅₀ değerleri

Literatürde CF₂ parçası, çeşitli yapılarda oksijen atomunun bir taklidi olarak kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Bu yaklaşımda C–F bağının, oksijen elektron çiftlerinden birinin taklidi olduğu kabul edilmektedir [138]. Bu nedenle difluoroetil (CF₂CH₃) grubu, Şekil 5.16'da gösterilen yapısal metafora dayalı olarak aromatik bir CH₃O grubunun biyoizosteri olarak savunulmuştur. Bununla beraber, Cambridge Yapı Veritabanı (CSD) verilerine göre; Ar–O–CH₃ açılarının “ortaklanmamış elektron çifti-π” delokalizasyonunun sonucunda aromatik halka düzleminde 6 ± 6° saptığı, ancak bu açının Ar–O–CF₃, Ar–O–CHF₂ ve Ar–CF₂–CH₃

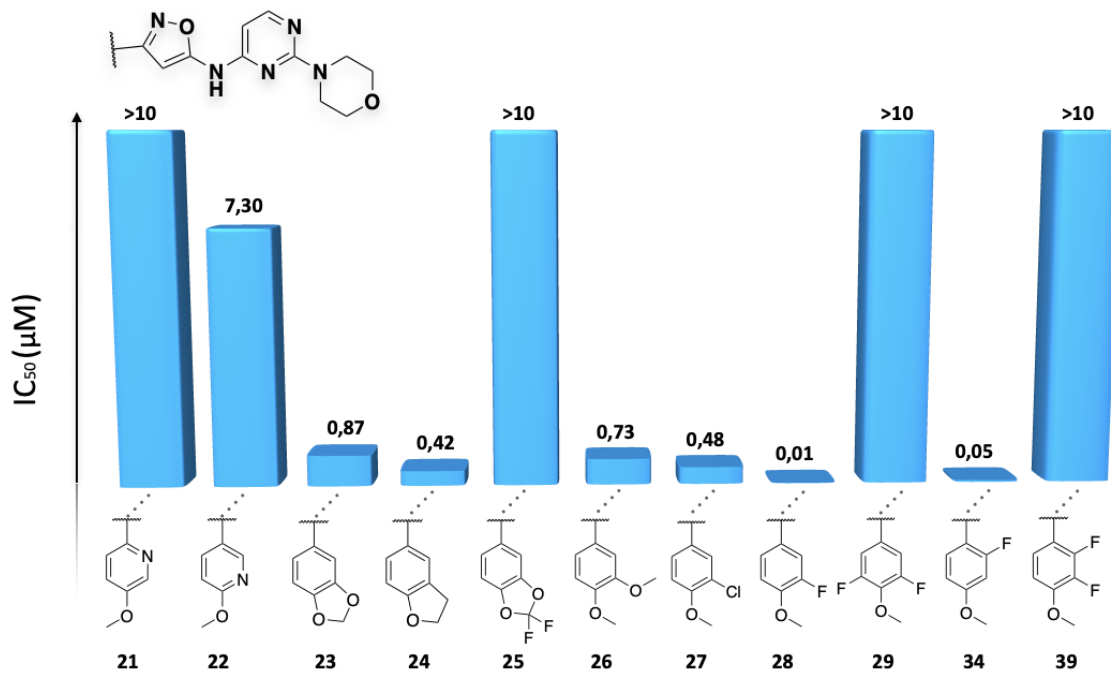
analoglarında ise aromatik halka düzlemine dikey olarak konumlandığı görülmektedir ($\sim 90^\circ$) [138]. Bu bulgular, fenil halkasının para konumunda ikame edilen grupların halka ile aynı düzlemde bulunmasının antiproliferatif aktivite açısından önemine işaret etmektedir. Bu bulgularla orantılı olarak metiltiyo (Bileşik 19) ve dimetilamin (Bileşik 20) analogları potent antiproliferatif etki göstermişlerdir.



Şekil 5.16. Ar-O-CH₃, Ar-O-CF₃, Ar-O-CHF₂ ve Ar-CF₂-CH₃ yapılarının konformasyonel açıları ([138]'den uyarlanmıştır)

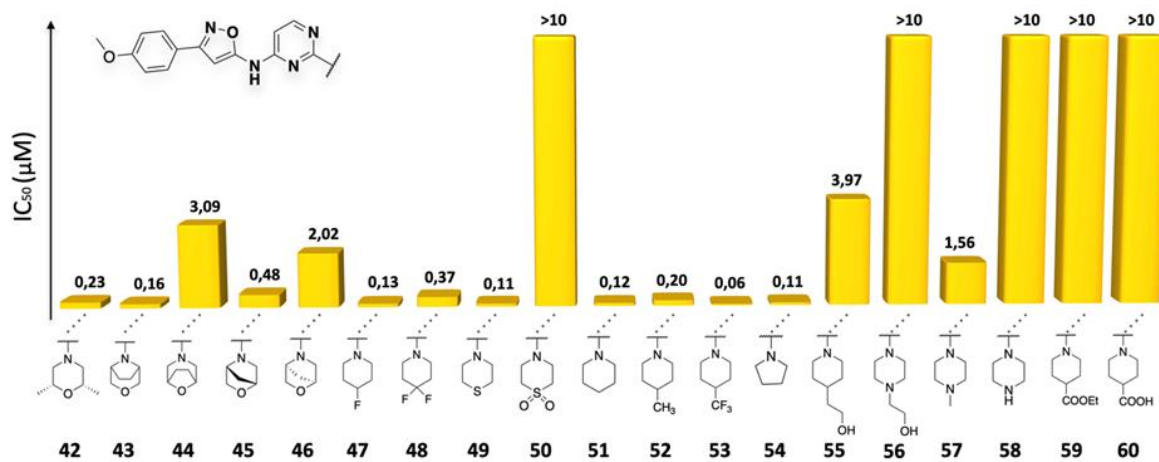
Fenil-piridin izosterizmi yaklaşımı ile hazırlanan metokspiridin türevleri (Bileşik 21 ve 22) ile gözlenen büyük aktivite kaybı ise molekülün bu bölgesinin tercihen hidrofobik karakterde olmasının gerekliliğini vurgulamaktadır. Sonraki aşamada metabolizmanın modüle edilmesi amacıyla fenil halkasında değişik süstitüentler taşıyan analoglar sentezlenmiştir (Şekil 5.17). *p*-Metoksi grubuna komşu karbondan -OCH₃, -F, -Cl taşıyan (Bileşik 26-28) veya *p*-metoksi grubunun halka içerisine alındığı (Bileşik 23 ve 24) türevlerde potent aktivite gözlemlenirken, yine daha hacimli diflorometilendioksi analogunda aktivite kaybı yaşanmıştır. Bununla beraber, metoksiye göre *orto* veya *meta* halka süstitüsüyonu aktivite açısından olumlu sonuçlanırken (Bileşik 26-28; 34), 2,3-difloro veya 3,5-diflorometoksi türevlerinde şiddetli aktivite kaybı yaşanmıştır.

Bu seriden seçilmiş aktif türevler (Bileşikler 13, 19, 24, 27, 28 ve 34) ile insan karaciğer mikrozomlarında gerçekleştirilen *in vitro* metabolik stabilite sonuçları bileşiklerin halen hızlı metabolize olduklarını ($t_{1/2}$ = 2,45-12,84 dk) göstermiştir. Bu nedenle morfolin halkası modifikasyonları ile YEİ çalışmalarına devam edilmesi gereği duyulmuştur.



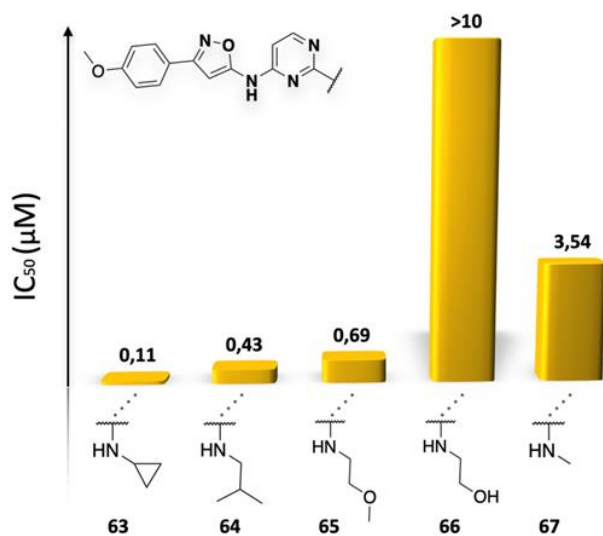
Şekil 5.17. 4-metoksifenil halkası modifikasyonu çerçevesinde sentezlenen ikinci seri bileşiklerin IC₅₀ değerleri

Metabolit tayini deneylerinin morfolin grubunun oksidatif metabolizma için önemli bir yöre olduğunu göstermesi nedeniyle bu aşamada Şekil 5.18’de gösterilen morfolin halkasının modifiye edildiği, örneğin; süstitüe ve köprülü türevleri, bir dizi analog hazırlanarak hem antiproliferatif aktivitenin korunması hem de metabolik stabilitenin artışı amaçlanmıştır.



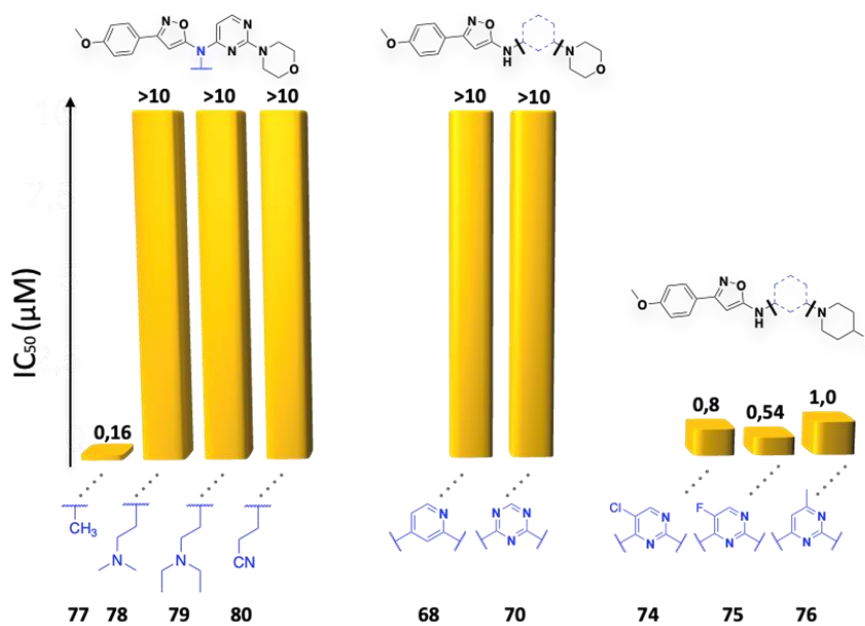
Şekil 5.18. Morfolin halkası modifikasyonu çerçevesinde sentezlenen ilk seri bileşiklerin IC₅₀ değerleri

İlk olarak morfolin halkasında 2,6-dimetil sübstitüsyonu (Bileşik 42), 3,5-etilen (Bileşik 43) veya 2,5-metilen (Bileşik 45) alkil köprüsü taşıyan türevler ile hem potent antiproliferatif aktivite korunmuş hem de metabolik stabilite de artış görülmüştür ($t_{1/2}$ = 28,74; 23,75; 28,08 dk). Bu bölgenin aktivite ile paralel olarak metabolik stabilitede artış oluşturabileceği anlaşıldıktan sonra morfolin biyoizosteri piperidin ve piperazin türevleri ile YEİ faaliyetlerine devam edilmiştir. Elde edilen sonuçlar morfolin oksijeninin aktivite açısından önem arz etmediği bu konumda CF ve CF₂ (Bileşik 47-48), S (Bileşik 49), C, C-CH₃, C-CF₃ (Bileşik 51-53) gibi nonpolar yer değiştirmelerle aktif moleküllerin elde edilmesinin bu bölgenin daha çok hidrofobik etkileşim için önemli olduğunu düşündürmüştür. Bu hipotez aynı konumda polarite artışı ile aktivitenin kaybolduğu sülfon türevi Bileşik 50 ve piperazin türevi Bileşik 58 ile de desteklenmektedir. Şöyle ki piperazin NH grubunun metillenmesi ile aktivite de geri kazanım olmaktadır (Bileşik 57). Bununla beraber, bu seride sadece 4-metilpiperidin (Bileşik 52) ve 4-trifloropiperidin (Bileşik 53) türevleri ile hem aktivite hem de metabolik dayanıklılığın aynı anda artış sağlanmıştır ($t_{1/2}$ = 28,04 ve 21,18 dk). Diğer aktif analoglardan seçilmiş bileşiklerin (Bileşik 47-49, 51, 54) metabolik stabilitesi düşük bulunmuştur ($t_{1/2}$ = 7,38-14,69 dk). Morfolin açık zincir analogları olarak sentezlenen sekonder amin türevleri ile elde edilen sonuçlar tercihen hacimli alkil sübstitüsyonunun (Bileşik 63-65) aktivite açısından önemini vurgularken polar aminoetanol taşıyan türevde (Bileşik 66) aktivite kaybı gözlemlenmiştir (Şekil 5.19). Bileşik 63'ün karaciğer mikrozomal stabilitesinin düşük olması sebebiyle ($t_{1/2}$ = 7,62 dk) sekonder amin türevleri ile devam edilmemiştir.



Şekil 5.19. Morfolin açık halka analoglarının IC₅₀ değerleri

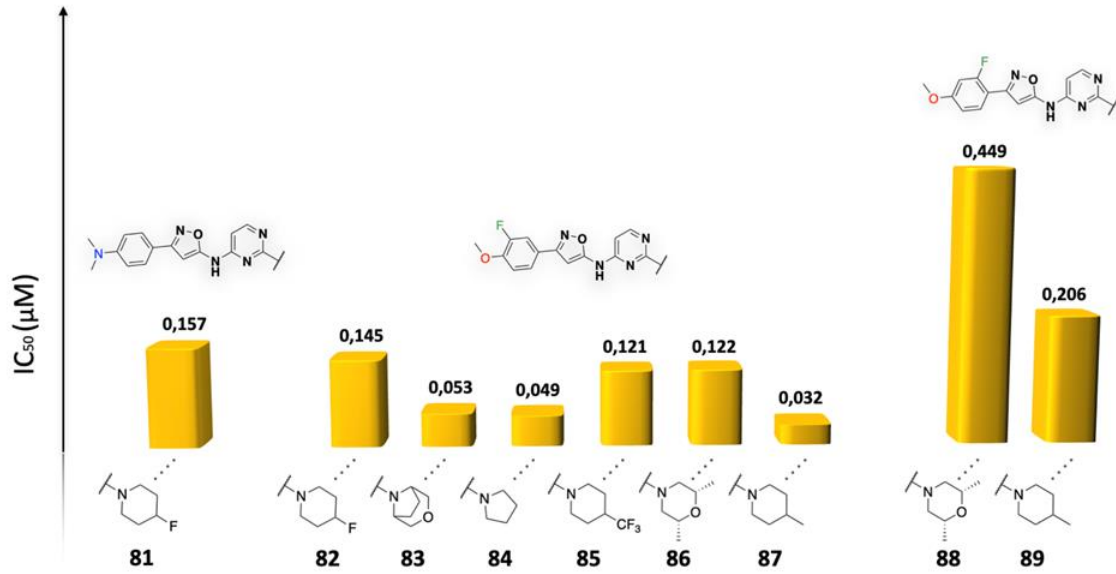
Öncü bileşik üzerinde gerçekleştirilen bir diğer YEİ stratejisi ise molekülün izoksazol ve pirimidin motiflerini bir araya getiren NH köprüsü ve pirimidin halkası modifikasyonlarıdır. Bu modifikasyonlar dahilinde öncelikle; merkezi pirimidin halkası ile izoksazol arasındaki NH grubunun, bağlayıcı rolünü ve farmakofor özellikte bir element olup olmadığını anlamak için çalışmalar planlanmıştır. Bu hipotezi doğrulamak için, sekonder amin grubu tersiyer amin grubu ile değiştirilmiştir (Bileşik 77). Bu türevde gözlenen potent antiproliferatif aktivite NH grubunun halkaları bağlayıcı görevi yaptığını düşündürmüştü ve bu konumdan molekülün suda çözünürlüğünü artırmaya yönelik iyonize olabilen alkil amin (Bileşik 78 ve 79) veya solvasyonu artırıcı polar asetonitril (Bileşik 80) yan zinciri taşıyan türevler sentezlenmiş ancak aktivitede yaşanan büyük kayıp nedeniyle beklenen sonuca ulaşamamıştır (Şekil 5.20).



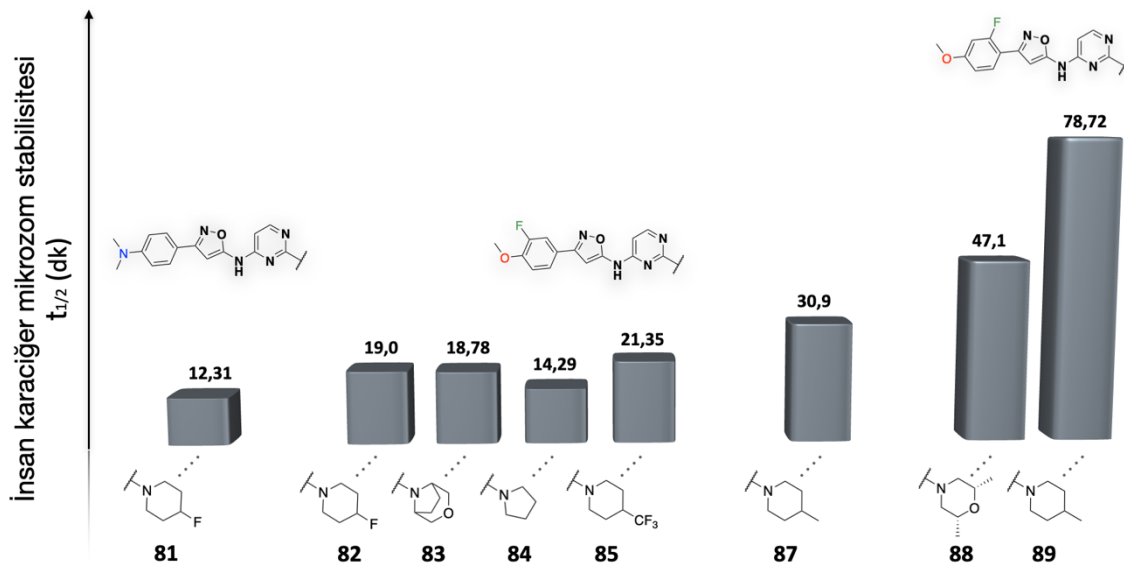
Şekil 5.20. Ara zincir ve pirimidin halkası modifikasyonları çerçevesinde sentezlenen bileşiklerin IC₅₀ değerleri

Sonraki YEİ yaklaşımı merkezi pirimidin halkasının farmakofor rolü üzerine olmuştur. Bu amaçla ilk olarak piridin (Bileşik 68) ve triazin (Bileşik 70) halkası ile değiştirildiği türevler sentezlenmiştir (Şekil 5.20). Bu modifikasyonlar sonucu aktivite kaybı yaşanması pirimidin halkasının farmakofor olarak önemini ortaya koymuştur. Bu aşamada pirimidin halkasının dördüncü ve beşinci konumlarında yapılan halojen ve alkil sübstitüsyonları içeren Bileşik

74-76 ile meydana gelen aktivitede azalma sonucunda non-sübstitüe pirimidin halkasının önemi ortaya konulmuştur. Bu seri bileşiklerden seçilen Bileşik 75 ($t_{1/2}$ = 9,41 dk) ve 77'nin ($t_{1/2}$ = 2,37 dk) karaciğer mikrozomal stabilitesi yine oldukça düşük bulunmuş olup bu bölgedeki değişikliklerin metabolik dayanıklılık için önemli olmadığı düşünülmüştür.



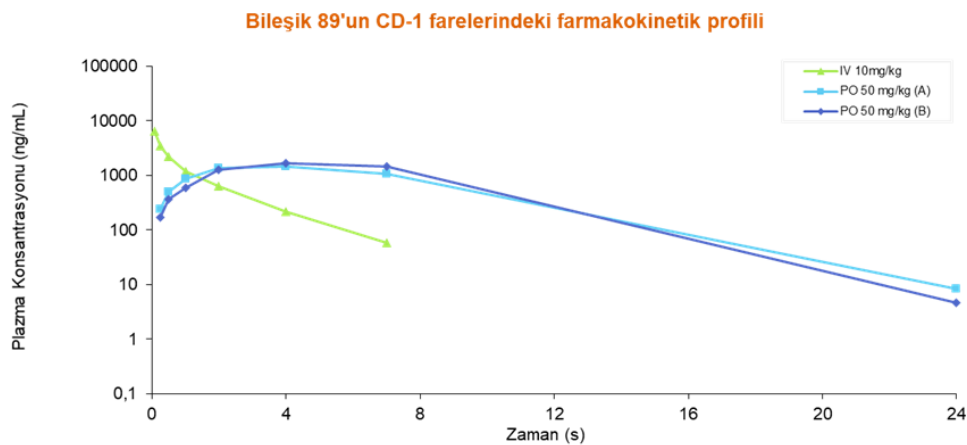
Şekil 5.21. Sentezlenen hibrit bileşiklerin IC₅₀ değerleri



Şekil 5.22. Hibrit bileşiklerin insan karaciğer mikrozomlarındaki $t_{1/2}$ değerleri

Tez kapsamında son etapta en aktif ligantlar olan; 3-F, 4-OCH₃-fenil türevi Bileşik 28 ve 2-F, 4-OCH₃-fenil türevi Bileşik 34'ün metabolik stabilitesini artırmak amacıyla yukarıda tespit edilen morfolin izosterleri ile hibridizasyonu sonucu bir seri yeni bileşik sentezi gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.21). Elde edilen sonuçlar incelendiğinde özellikle 2-F,4-OCH₃-fenil grubu ile 2,6-dimetilmorfolin (Bileşik 88; $t_{1/2}$ = 47,1 dk) veya 4-metilpiperidin (Bileşik 89; $t_{1/2}$ = 78,7 dk) kombinasyonunun metabolik stabilitede önemli oranda iyileşme sağladığı gözlemlenmiştir (Şekil 5.22). Böylece BO-264 üzerinde tamamlanan YEİ programının bir sonucu olarak, daha ileri *in vivo* farmakokinetik ve biyolojik etki mekanizması çalışmaları için Bileşik 89 geliştirme adayı olarak düşünülmüştür.

Bileşik 89'un *in vivo* farmakokinetik parametreleri ise CD-1 fareler kullanılarak belirlenmiştir (Çizelge 4.13 ve Şekil 5.23). Karaciğer mikrozomlarındaki metabolik stabilitenin bir yansıması olarak Bileşik 89, farelerde mükemmel oral biyoyararlanım göstermiştir. Bileşiğin hayvanlara uygulanması için biri su bazlı diğeri lipit bazlı iki farklı taşıyıcı sistem kullanılmıştır. Her iki formülasyon içerisinde 50 mg/kg dozda farelere Bileşik 89 uygulanması sonucunda biyoyararlanım değeri su bazlı formülasyon ile % 63 ve lipit bazlı formülasyon ile % 79 olarak tayin edilmiştir. *In vitro* metabolik stabilitede artışın *in vivo* biyoyararlanıma olumlu olarak yansıdığı görülmektedir (Bileşik 89'un *in vivo* klirens değeri; 31,6 ml/dk/kg). Bununla beraber, V_{dss} dağılım hacmi; 2,78 gibi yüksek değerde olup, bu da Bileşik 89'un dokulara yüksek oranda geçirgen olabileceğini göstermektedir.



Şekil 5.23. IV ve PO yoldan uygulanan Bileşik 89'un CD-1 farelerinde göstermiş olduğu zamana bağlı plazma konsantrasyon grafiği

Sonraki aşamada Bileşik 89'un potansiyel ilaç etkileşimleri açısından değerlendirilmesi için ilaç metabolize eden ana sitokrom P450 izoformları (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4-M ve CYP3A4-T) üzerindeki inhibitör etkisi incelenmiştir. Bileşik 89 sadece CYP2C19 ($IC_{50} = 2,17 \mu M$) izoformunu orta derecede inhibe etmiş, diğer bütün izoformlar üzerindeki inhibitör etkisi önemsiz ($IC_{50} = 11,85 - > 30 \mu M$) bulunmuştur.

Ayrıca Bileşik 89'un bu aşamada kardiyovasküler güvenilirlik açısından ileri geliştirmeye uygunluğu EKG'de QT uzamasına neden olan hERG (gecikmiş rektifiye potasyum kanalı) inhibisyonu açısından değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Bileşik 89'un hERG inhibitör etkisinin ($IC_{50} = 17,16 \mu M$) önemsiz derecede olduğunu göstermiştir.

5.3.1. Bileşik 89'un sitotoksikite özelliklerinin kolon kanseri hücre hatlarında Sülföradamin B (SRB) analizi ile incelenmesi

Başarılı bir farmakokinetik profile sahip olan ve JIMT-1 hücrelerinde BO-264 ile benzer sonuçlar veren Bileşik 89'un farklı kanser hücre hatlarındaki sitotoksitesini değerlendirmek adına hücre canlılığı deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla öncü bileşik BO-264'ün de antiproliferatif etki gösterdiği çeşitli kolon kanseri hücre hatları (HCT-116, RKO, HT-29) belirlenmiştir. Bileşik 89; HT-29 hücre hattında $4,11 \mu M$ 'lık bir sitotoksikite sergilerken, RKO ve HCT-116 hücre hatlarında daha potent sitotoksik aktivite sergilemiştir (RKO için; $IC_{50} = 0,203 \mu M$, HCT-116 için; $IC_{50} = 0,307 \mu M$) (Çizelge 5.4).

Çizelge 5.4. BO-264 ve Bileşik 89'un kolon kanseri hücre hatlarındaki IC_{50} değerleri

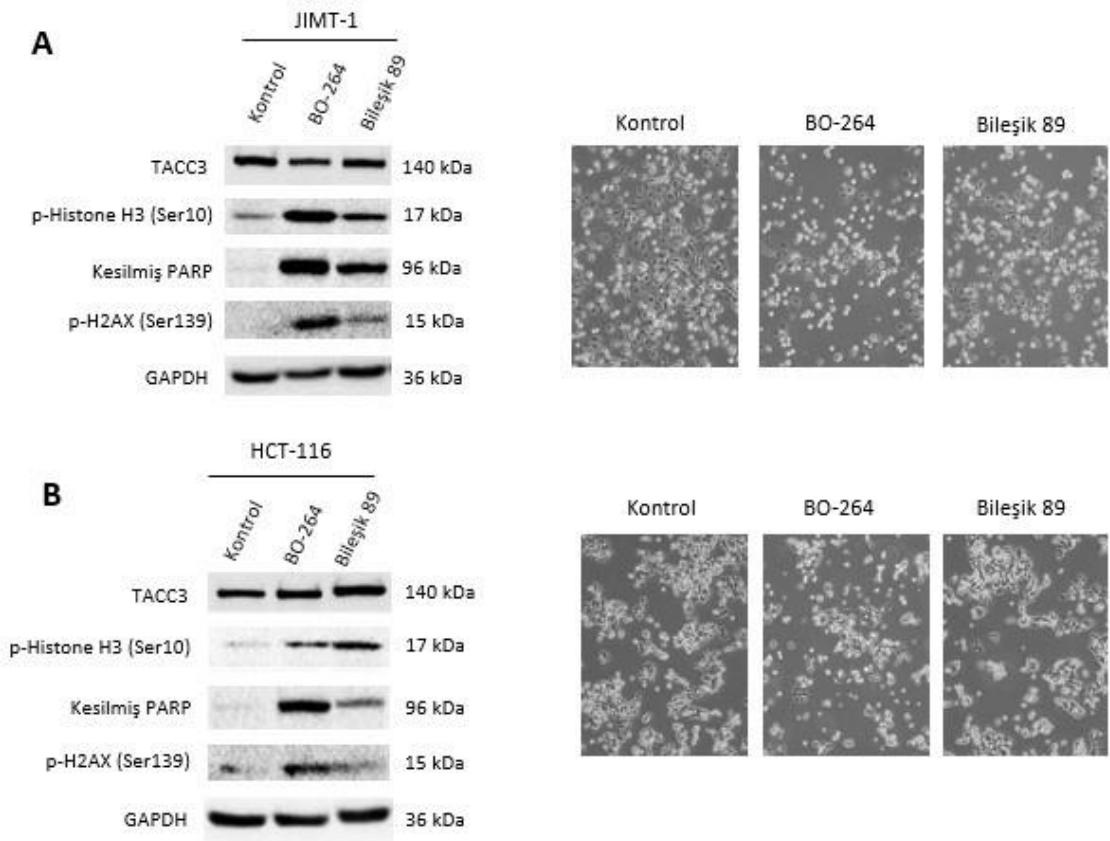
	$IC_{50} (\mu M)$		
	HT-29	RKO	HCT-116
BO-264	0,462	0,084	0,137
Bileşik 89	4,11	0,203	0,307

Bileşik 89'un özellikle TACC3 ekspresyonunun aşırı oranda olduğu HCT-116 hücre hattında [46] göstermiş olduğu potent antiproliferatif etkinlik, bileşiğin etki mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik çalışmalara yön vermiştir.

5.3.2. BO-264 ve Bileşik 89'un hücresel yollar üzerindeki etkilerinin protein ifade analizi ile incelenmesi

Günümüzde hücresel apoptozun saptanması ve miktarının belirlenmesi için çok çeşitli yöntemler ve belirteçler mevcuttur. PARP'lar DNA hasarındaki rolü nedeniyle kanser tedavisinde kullanılan hedef proteinler arasındadır. PARP1; PARP ailesinin temel üyelerindendir ve hücre apoptozu sırasında bu proteinin kaspazlar aracılığı ile parçalanması sonucu hücre içerisindeki kesilmiş PARP1 miktarında artış gözlemlenir [134]. Ayrıca apoptoz kaynaklı DNA kırıklarının büyük ölçüde H2AX fosforilasyonunu (p-H2AX) indüklediği gösterilmiştir [135]. Fosforile histon H3'ün (p-Histone H3) ise; meme kanserinin de aralarında bulunduğu çok sayıda malignitenin saptanmasında güvenilir bir mitoz belirteci olduğu işaret edilmektedir [136, 137].

Bileşik 89'un TACC3 inhibisyonu aracılı mitotik tutulma, DNA hasarı ve apoptoz belirteçleri üzerindeki etkisini Western blot yöntemi ile incelemek adına; JIMT-1 hücre hattı 200 nM, HCT-116 hücre hattı ise 250 nM konsantrasyonlarında BO-264 ve Bileşik 89 ile inkübe edilmiştir. Çalışmada kontrol grubu olarak DMSO kullanılırken, gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) ise eşit yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.



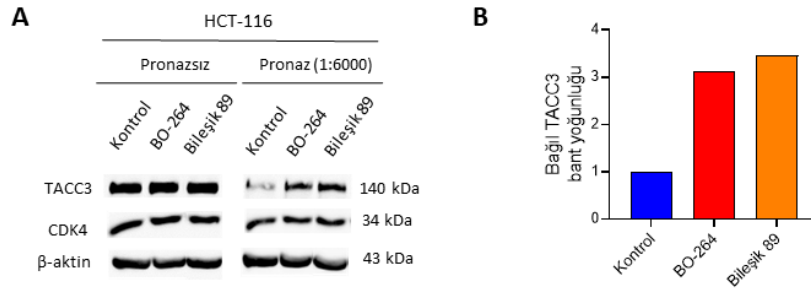
Resim 5.3. BO-264 ve Bileşik 89 ile 24 saat inkübe edilen JIMT-1 (A) ve HCT-116 (B) hücrelerinde hücre içi protein seviyelerinin Western Blot yöntemi ile incelenmesi ve ilgili hücrelerin 24 saat ilaç uygulaması sonrası 10X büyüklüğünde mikroskop ile çekilmiş görüntüleri

Sitotoksitite deneylerinde BO-264 ile yakın IC_{50} değerlerinde etki gösteren Bileşik 89'un, JIMT-1 ve HCT-116 hücrelerinde inkübasyonu sonucu protein seviyesindeki etkileri gözlemlenmiş ve öncü bileşik BO-264'e benzer şekilde p-Histon H3, kesilmiş PARP ve p-H2AX proteinlerinin seviyesini artırarak hücre apoptozuna yol açtığı gösterilmiştir (Resim 5.3).

5.3.3. BO-264 ve Bileşik 89'un hedef duyarlı afinite testleri (DARTS)

İlaç afinitesine duyarlı hedef stabilitesi (Drug Affinity Responsive Target Stability; DARTS), küçük ilaç moleküllerinin hedef proteinlerini belirlemek için kullanılan, geleneksel yöntemlere göre nispeten hızlı ve basit bir yöntemdir. Bu yöntemin en büyük avantajı, ilgili ilaç molekülünün immobilizasyonuna veya özel modifiye yöntemlerine (biyotin, floresan,

radyoizotop veya fotoafinite etiketleri vb.) gerek duyulmadan kullanabilmesidir [132, 133]. Bu yöntem hedef proteinin küçük molekül ligandı ile bağlanması sonucu proteolize karşı daha dayanıklı hale gelmesine dayanmaktadır. Bu amaçla, Bileşik 89'un TACC3 proteinini etkileştiğini kanıtlamak adına HCT-116 hücre hattında DARTS analizi gerçekleştirilmiştir. BO-264 ve Bileşik 89 ile hücreler 10 μ M konsantrasyonda inkübe edilirken, CDK4 hedef olmayan protein, β -aktin ise eşit yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Analiz sonuçlarına göre TACC3 inhibitör özelliği kanıtlanmış BO-264 öncü bileşiğine benzer şekilde Bileşik 89 da TACC3 ile etkileşerek pronaz tarafından degrade edilmesini engellediği görülmektedir (Resim 5.4).



Resim 5.4. BO-264 ve Bileşik 89'a ait DARTS analiz sonuçları (A), ilgili bileşiklere ilişkin bağlı TACC3 bant yoğunlukları (B)

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında elde edilen veriler ışığında, 2,4-diaminopirimidin motifini taşıyan bileşiklerin potent antiproliferatif etkisi nedeniyle TACC3 aşırı eksprese eden kanser türlerine karşı ileri klinik gelişim potansiyeline sahip olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Bu farmakofor yapıya sahip öncü bileşik BO-264 üzerinde gerçekleştirilen modifikasyonlar ile 70 adet final bileşik sentezi gerçekleştirilmiş ve meme kanseri hücre hattına karşı sitotoksiteleri incelenerek yapı-etki ilişkileri belirlenmiştir. Elde edilen yapı-etki ilişkisi sonuçlarına göre; genel olarak çoğu bileşikte önemli derecede antiproliferatif etki gözlemlenmekle birlikte 2,4-diaminopirimidin yapısının biyolojik aktivite açısından önemli olduğu, bileşiğin 4-metoksi fenil ve morfolin grubunun modifikasyonu aktivite açısından sınırlı değişikliklere izin verdiği, bu bölgelerde hacimli ve polar grupların aktivitenin azalmasına ya da kaybolmasına neden olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Ayrıca sentezlenen tüm bileşikler arasından seçilen, biyolojik etkinlikleri yeterli seviyede bazı türevlerin mikrozomal stabiliteleri değerlendirilmiştir. Alınan sonuçlar doğrultusunda; Bileşik 28 serinin en aktif ($IC_{50}= 0,013 \mu M$) analogu olmasına rağmen karaciğer mikrozomlarında düşük metabolik stabilite ($t_{1/2}= 12,84$ dk ve $CL_{int}= 107,93 \mu L/dk/mg$ protein) profili çizmiştir. Sentezlenen tüm türevler içerisinde Bileşik 89 ise öncü bileşik BO-264 ile kıyaslanabilir seviyede bir sitotoksik etkinlik ($IC_{50}= 0,206 \mu M$) göstermiş, *in vitro* ADME testlerinde; insan karaciğer mikrozomlarında sergilediği uzun yarılanma ömrü ($t_{1/2}= 78,72$ dk) ve düşük hepatik klirens değeri ($CL_{int}= 17,73 \mu L/dk/mg$ protein) ile BO-264'e kıyasla metabolik stabilitesi oldukça yüksek olarak tayin edilmiştir. Antiproliferatif etkinliği ve *in vitro* ADME özelliklerinin olumlu olması sonucunda Bileşik 89 ile farelerde gerçekleştirilen *in vivo* farmakokinetik çalışmalarda ise bu bileşiğin % 60'ın üzerinde oral biyoyararlanım sergilediği sonucuna ulaşılmıştır. Bileşik 89 ileri geliştirme açısından ilaç etkileşimleri ve kardiyovasküler yan etki potansiyeli açısından ayrıca güvenli olarak değerlendirilmiştir.

Bileşik 89'un da BO-264 bileşiğine benzer şekilde TACC3 inhibisyonu ile ilişkili antiproliferatif etkisi çeşitli yöntemlerle kanıtlanmıştır. Sonuç olarak tez kapsamında sentezlenen türevler arasından; Bileşik 89'un gerek etki profili gerek farmakokinetik

özellikleri ile ilaç geliştirme çabalarında umut vadeden ve gelişim potansiyeli ile dikkat çeken aday bir bileşik olduğu ortaya konulmuştur.

İn vitro ve *in vivo* farmakokinetik çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edilen Bileşik 89'un ileri dönemde insan meme ve kolon kanseri hücre hatları ile elde edilecek ksenograft fare modellerinde *in vivo* antitümör etkinliğini belirlemeye yönelik çalışmaların gerçekleştirilmesi planlanmıştır. Bunun yanında Bileşik 89 ile farklı kanser hücre panellerinde sitotoksosite deneyleri ile antikanser etki spektrumunun incelenmesi de gerçekleştirilecek faaliyetler arasındadır. Elde edilen/edilecek veriler ışığında Bileşik 89 ile ileri ön klinik çalışmalara aday bileşik geliştirilmesi yolunda önemli bir noktaya gelineceği öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

1. İnternet: WHO. (2021). Cancer. Retrieved from Web: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1, Son Erişim Tarihi:01.02.21.
2. Falzone, L., Salomone, S., and Libra, M. (2018). Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. *Frontiers in pharmacology*, 9(1300-1300).
3. İnternet: Observatory, G.C. (2020). Estimated number of deaths from 2018 to 2040, all cancers, both sexes, all ages. Retrieved from Web: https://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-isotype?type=1&type_sex=0&mode=population&sex=0&populations=900&cancers=39&age_group=value&apc_male=0&apc_female=0&single_unit=500000&print=0, Son Erişim Tarihi:01.06.2020.
4. Pavlopoulou, A., Spandidos, D.A., and Michalopoulos, I. (2015). Human cancer databases (review). *Oncology reports*, 33(1), 3-18.
5. İnternet: WHO. (2020). Cancer Country Profile 2020. Retrieved from Web: http://www9.who.int/cancer/country-profiles/TUR_2020.pdf, Son Erişim Tarihi:02.06.20.
6. Bland, K., Copeland, E., Klimberg, S.V., Gradishar, W. (2018). *The Breast* (Fifth Edition). USA: Elsevier, 315-330.
7. Campo, L. and Breuer, E.-K. (2018). Inhibition of TACC3 by a small molecule inhibitor in breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 498(4), 1085-1092.
8. Zahra, H., Ali, R., and Nima, R.-A. (2018). Anti-cancer Nitrogen-Containing Heterocyclic Compounds. *Current Organic Chemistry*, 22(23), 2256-2279.
9. Mohana Roopan, S. and Sompalle, R. (2016). Synthetic chemistry of pyrimidines and fused pyrimidines: A review. *Synthetic Communications*, 46(8), 645-672.
10. Akbulut, O., Lengerli, D., Saatci, O., Duman, E., Seker, U.O.S., Isik, A., Akyol, A., Caliskan, B., Banoglu, E., and Şahin, Ö. (2020). A Highly Potent TACC3 Inhibitor as a Novel Anti-cancer Drug Candidate. *Molecular Cancer Therapeutics*, 19(6), 1243-1254.
11. Lukong, K.E. (2017). Understanding breast cancer – The long and winding road. *BBA Clinical*, 7(64-77).
12. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424.

13. İnternet: WHO. Breast Cancer. Retrieved from Web: <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>, Son Erişim Tarihi:02.06.20.
14. Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., and Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 66.
15. Tang, Y., Wang, Y., Kiani, M.F., and Wang, B. (2016). Classification, Treatment Strategy, and Associated Drug Resistance in Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*, 16(5), 335-343.
16. Waks, A.G. and Winer, E.P. (2019). Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA*, 321(3), 288-300.
17. Bramati, A., Girelli, S., Torri, V., Farina, G., Galfrascoli, E., Piva, S., Moretti, A., Dazzani, M.C., Sburlati, P., and La Verde, N.M. (2014). Efficacy of biological agents in metastatic triple-negative breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 40(5), 605-613.
18. Becker, S. (2015). A historic and scientific review of breast cancer: The next global healthcare challenge. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 131(S36-S39).
19. Teven, C.M., Schmid, D.B., Sisco, M., Ward, J., and Howard, M.A. (2017). Systemic Therapy for Early-Stage Breast Cancer: What the Plastic Surgeon Should Know. *Eplasty*, 17(e7-e7).
20. Masoud, V. and Pagès, G. (2017). Targeted therapies in breast cancer: New challenges to fight against resistance. *World journal of clinical oncology*, 8(2), 120-134.
21. Vorobiof, D.A. (2016). Recent advances in the medical treatment of breast cancer. *F1000Research*, 5(2786-2786).
22. Carlson, R.W. (2005). The History and Mechanism of Action of Fulvestrant. *Clinical Breast Cancer*, 6(S5-S8).
23. Dutertre, M. and Smith, C.L. (2000). Molecular Mechanisms of Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM) Action. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 295(2), 431.
24. Oh, D.-Y. and Bang, Y.-J. (2020). HER2-targeted therapies — a role beyond breast cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 17(1), 33-48.
25. Shah, M., Nunes, M.R., and Stearns, V. (2018). CDK4/6 Inhibitors: Game Changers in the Management of Hormone Receptor–Positive Advanced Breast Cancer? *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 32(5), 216-222.
26. Hurvitz, S. and McCann, K. (2019). *Her2-Positive Breast Cancer* (First Edition). Philadelphia: Elsevier, 179-212.

27. Mohamed, A., Krajewski, K., Cakar, B., and Ma, C.X. (2013). Targeted Therapy for Breast Cancer. *The American Journal of Pathology*, 183(4), 1096-1112.
28. Sharma, M., Duan, Z., Zhao, H., Giordano, S.H., and Chavez-MacGregor, M. (2020). Real-World Patterns of Everolimus Use in Patients with Metastatic Breast Cancer. *The Oncologist*, 25(11), 937-942.
29. İnternet: FDA. (2019). FDA approves alpelisib for metastatic breast cancer. Retrieved from Web: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-alpelisib-metastatic-breast-cancer>, Son Erişim Tarihi:02.06.2020.
30. Godet, I. and Gilkes, D.M. (2017). BRCA1 and BRCA2 mutations and treatment strategies for breast cancer. *Integrative cancer science and therapeutics*, 4(1), 10.15761/ICST.1000228.
31. Livraghi, L. and Garber, J.E. (2015). PARP inhibitors in the management of breast cancer: current data and future prospects. *BMC Medicine*, 13(1), 188.
32. Geenen, J.J.J., Linn, S.C., Beijnen, J.H., and Schellens, J.H.M. (2018). PARP Inhibitors in the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Pharmacokinetics*, 57(4), 427-437.
33. Zimmer, A.S., Gillard, M., Lipkowitz, S., and Lee, J.-M. (2018). Update on PARP Inhibitors in Breast Cancer. *Current Treatment Options in Oncology*, 19(5), 21.
34. Harish, C.T., Madhurendra, S., Luitgard, N.-S., Daniel, P., Eyad Kalawy, F., Lothar, G., Hakima, E., André, A., Lutz, S., Stefan, R., Mohammad, R.A., and Roland, P.P. (2013). Role of centrosomal adaptor proteins of the TACC family in the regulation of microtubule dynamics during mitotic cell division. *Biological Chemistry*, 394(11), 1411-1423.
35. Ding, Z.-M., Huang, C.-J., Jiao, X.-F., Wu, D., and Huo, L.-J. (2017). The role of TACC3 in mitotic spindle organization. *Cytoskeleton*, 74(10), 369-378.
36. Ha, G.-H., Kim, J.-L., and Breuer, E.-K.Y. (2013). Transforming acidic coiled-coil proteins (TACCs) in human cancer. *Cancer Letters*, 336(1), 24-33.
37. Hood, F.E. and Royle, S.J. (2011). Pulling it together. *BioArchitecture*, 1(3), 105-109.
38. Cheeseman, L.P., Booth, D.G., Hood, F.E., Prior, I.A., and Royle, S.J. (2011). Aurora A kinase activity is required for localization of TACC3/ch-TOG/clathrin inter-microtubule bridges. *Communicative & Integrative Biology*, 4(4), 409-412.
39. Jiang, F., Kuang, B., Que, Y., Lin, Z., Yuan, L., Xiao, W., Peng, R., Zhang, X., and Zhang, X. (2016). The clinical significance of transforming acidic coiled-coil protein 3 expression in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*, 35(1), 436-446.
40. Lauffart, B., Vaughan, M.M., Eddy, R., Chervinsky, D., DiCioccio, R.A., Black, J.D., and Still, I.H. (2005). Aberrations of TACC1 and TACC3 are associated with ovarian cancer. *BMC Women's Health*, 5(1), 8.

41. Onodera, Y., Takagi, K., Miki, Y., Takayama, K.-i., Shibahara, Y., Watanabe, M., Ishida, T., Inoue, S., Sasano, H., and Suzuki, T. (2016). TACC2 (transforming acidic coiled-coil protein 2) in breast carcinoma as a potent prognostic predictor associated with cell proliferation. *Cancer Medicine*, 5(8), 1973-1982.
42. Takayama, K.-i., Horie-Inoue, K., Suzuki, T., Urano, T., Ikeda, K., Fujimura, T., Takahashi, S., Homma, Y., Ouchi, Y., and Inoue, S. (2012). TACC2 Is an Androgen-Responsive Cell Cycle Regulator Promoting Androgen-Mediated and Castration-Resistant Growth of Prostate Cancer. *Molecular Endocrinology*, 26(5), 748-761.
43. Lv, J., Yao, Y.-s., Zhou, F., Zhuang, L.-k., Yao, R.-y., Liang, J., Qiu, W.-s., and Yue, L. (2014). Prognosis significance of HER2 status and TACC1 expression in patients with gastric carcinoma. *Medical Oncology*, 31(11), 280.
44. Li, Q., Ye, L., Guo, W., Wang, M., Huang, S., and Peng, X. (2017). Overexpression of TACC3 is correlated with tumor aggressiveness and poor prognosis in prostate cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 486(4), 872-878.
45. Zhou, D.-S., Wang, H.-B., Zhou, Z.-G., Zhang, Y.-J., Zhong, Q., Xu, L., Huang, Y.-H., Yeung, S.-C., Chen, M.-S., and Zeng, M.-S. (2015). TACC3 promotes stemness and is a potential therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 6(27), 24163-24177.
46. Du, Y., Liu, L., Wang, C., Kuang, B., Yan, S., Zhou, A., Wen, C., Chen, J., Wu, Y., Yang, X., Feng, G., Liu, B., Iwamoto, A., Zeng, M., Wang, J., Zhang, X., and Liu, H. (2016). TACC3 promotes colorectal cancer tumourigenesis and correlates with poor prognosis. *Oncotarget*, 7(27), 41885-41897.
47. Guo, F. and Liu, Y. (2018). Knockdown of TACC3 Inhibits the Proliferation and Invasion of Human Renal Cell Carcinoma Cells. *Oncol Res*, 26(2), 183-189.
48. Jung, C.K., Jung, J.H., Park, G.S., Lee, A., Kang, C.S., and Lee, K.Y. (2006). Expression of transforming acidic coiled-coil containing protein 3 is a novel independent prognostic marker in non-small cell lung cancer. *Pathology International*, 56(9), 503-509.
49. Yun, M., Rong, J., Lin, Z.R., He, Y.L., Zhang, J.X., Peng, Z.W., Tang, L.Q., Zeng, M.S., Zhong, Q., and Ye, S. (2015). High expression of transforming acidic coiled coil-containing protein 3 strongly correlates with aggressive characteristics and poor prognosis of gastric cancer. *Oncol Rep*, 34(3), 1397-1405.
50. Song, H., Liu, C., Shen, N., Yi, P., Dong, F., Li, X., Zhang, N., and Huang, T. (2018). Overexpression of TACC3 in Breast Cancer Associates With Poor Prognosis. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 26(2),
51. Kim, J.-L., Ha, G.-H., Campo, L., and Breuer, E.-K. (2018). Negative regulation of BRCA1 by transforming acidic coiled-coil protein 3 (TACC3). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 496(2), 633-640.
52. Ha, G.-H., Kim, J.-L., and Breuer, E.-K. (2013). TACC3 is essential for EGF-mediated EMT in cervical cancer. *PloS one*, 8(8), e70353-e70353.

53. Tamura, R., Yoshihara, K., Saito, T., Ishimura, R., Martínez-Ledesma, J.E., Xin, H., Ishiguro, T., Mori, Y., Yamawaki, K., Suda, K., Sato, S., Itamochi, H., Motoyama, T., Aoki, Y., Okuda, S., Casingal, C.R., Nakaoka, H., Inoue, I., Verhaak, R.G.W., Komatsu, M., and Enomoto, T. (2018). Novel therapeutic strategy for cervical cancer harboring FGFR3-TACC3 fusions. *Oncogenesis*, 7(1), 4-4.
54. Best, S.A., Harapas, C.R., Kersbergen, A., Rath, V., Asselin-Labat, M.-L., and Sutherland, K.D. (2018). FGFR3-TACC3 is an oncogenic fusion protein in respiratory epithelium. *Oncogene*, 37(46), 6096-6104.
55. Yao, R., Kondoh, Y., Natsume, Y., Yamanaka, H., Inoue, M., Toki, H., Takagi, R., Shimizu, T., Yamori, T., Osada, H., and Noda, T. (2014). A small compound targeting TACC3 revealed its different spatiotemporal contributions for spindle assembly in cancer cells. *Oncogene*, 33(33), 4242-4252.
56. Wurdak, H., Zhu, S., Min, K.H., Aimone, L., Lairson, L.L., Watson, J., Chopiuk, G., Demas, J., Charette, B., Halder, R., Weerapana, E., Cravatt, B.F., Cline, H.T., Peters, E.C., Zhang, J., Walker, J.R., Wu, C., Chang, J., Tuntland, T., Cho, C.Y., and Schultz, P.G. (2010). A small molecule accelerates neuronal differentiation in the adult rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(38), 16542.
57. Jampilek, J. (2019). Heterocycles in Medicinal Chemistry. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(21), 3839.
58. Kumar, S. and Narasimhan, B. (2018). Therapeutic potential of heterocyclic pyrimidine scaffolds. *Chemistry Central Journal*, 12(1), 38.
59. Sanjiv, K., Aakash, D., and Balasubramanian, N. (2019). A Review on Synthesis, Anticancer and Antiviral Potentials of Pyrimidine Derivatives. *Current Bioactive Compounds*, 15(3), 289-303.
60. Ahmed, N.M., Youns, M., Soltan, M.K., and Said, A.M. (2019). Design, synthesis, molecular modelling, and biological evaluation of novel substituted pyrimidine derivatives as potential anticancer agents for hepatocellular carcinoma. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 34(1), 1110-1120.
61. Ramandeep, K., Prabhkirat, K., Sahil, S., Gurpreet, S., Samir, M., Preet, M.S.B., and Kunal, N. (2015). Anti-Cancer Pyrimidines in Diverse Scaffolds: A Review of Patent Literature. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 10(1), 23-71.
62. Baudino, T.A. (2015). Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Curr Drug Discov Technol*, 12(1), 3-20.
63. Zhang, J., Yang, P.L., and Gray, N.S. (2009). Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature Reviews Cancer*, 9(1), 28-39.

64. Yao, D., Zhou, Y., Zhu, L., Ouyang, L., Zhang, J., Jiang, Y., Zhao, Y., Sun, D., Yang, S., Yu, Y., and Wang, J. (2017). Design, synthesis and structure-activity relationship studies of a focused library of pyrimidine moiety with anti-proliferative and anti-metastasis activities in triple negative breast cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 140(155-171).
65. Roskoski, R. (2020). Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2020 update. *Pharmacological Research*, 152(104609).
66. İnternet: Medicine, N.L.o. Defaktinib. Retrieved from Web: https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=defactinib&type=&rslt=&recrs=b&recrs=a&recrs=f&recrs=d&age_v=&gndr=&intr=&titles=&outc=&spons=&lead=&id=&cntry=&state=&city=&dist=&locn=&strd_s=&strd_e=&prcd_s=&prcd_e=&sfpd_s=&sfpd_e=&lupd_s=&lupd_e=&sort=, Son Erişim Tarihi:03.06.20.
67. Vulpetti, A. and Pevarello, P. (2005). An analysis of the binding modes of ATP-competitive CDK2 inhibitors as revealed by X-ray structures of protein-inhibitor complexes. *Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents*, 5(5), 561-573.
68. Chu, X.-J., DePinto, W., Bartkovitz, D., So, S.-S., Vu, B.T., Packman, K., Lukacs, C., Ding, Q., Jiang, N., Wang, K., Goelzer, P., Yin, X., Smith, M.A., Higgins, B.X., Chen, Y., Xiang, Q., Moliterni, J., Kaplan, G., Graves, B., Lovey, A., and Fotouhi, N. (2006). Discovery of [4-Amino-2-(1-methanesulfonylpiperidin-4-ylamino)pyrimidin-5-yl](2,3-difluoro-6-methoxyphenyl)methanone (R547), A Potent and Selective Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor with Significant in Vivo Antitumor Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(22), 6549-6560.
69. Roberts, W.G., Ung, E., Whalen, P., Cooper, B., Hulford, C., Autry, C., Richter, D., Emerson, E., Lin, J., Kath, J., Coleman, K., Yao, L., Martinez-Alsina, L., Lorenzen, M., Berliner, M., Luzzio, M., Patel, N., Schmitt, E., LaGreca, S., Jani, J., Wessel, M., Marr, E., Griffor, M., and Vajdos, F. (2008). Antitumor Activity and Pharmacology of a Selective Focal Adhesion Kinase Inhibitor, PF-562,271. *Cancer Research*, 68(6), 1935.
70. Soni, S., Anand, P., and Padwad, Y.S. (2019). MAPKAPK2: the master regulator of RNA-binding proteins modulates transcript stability and tumor progression. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), 121.
71. Argiriadi, M.A., Ericsson, A.M., Harris, C.M., Banach, D.L., Borhani, D.W., Calderwood, D.J., Demers, M.D., DiMauro, J., Dixon, R.W., Hardman, J., Kwak, S., Li, B., Mankovich, J.A., Marcotte, D., Mullen, K.D., Ni, B., Pietras, M., Sadhukhan, R., Sousa, S., Tomlinson, M.J., Wang, L., Xiang, T., and Talanian, R.V. (2010). 2,4-Diaminopyrimidine MK2 inhibitors. Part I: Observation of an unexpected inhibitor binding mode. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20(1), 330-333.

72. Harris, C.M., Ericsson, A.M., Argiriadi, M.A., Barberis, C., Borhani, D.W., Burchat, A., Calderwood, D.J., Cunha, G.A., Dixon, R.W., Frank, K.E., Johnson, E.F., Kamens, J., Kwak, S., Li, B., Mullen, K.D., Perron, D.C., Wang, L., Wishart, N., Wu, X., Zhang, X., Zmetra, T.R., and Talanian, R.V. (2010). 2,4-Diaminopyrimidine MK2 inhibitors. Part II: Structure-based inhibitor optimization. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20(1), 334-337.
73. Della Corte, C.M., Viscardi, G., Di Liello, R., Fasano, M., Martinelli, E., Troiani, T., Ciardiello, F., and Morgillo, F. (2018). Role and targeting of anaplastic lymphoma kinase in cancer. *Molecular Cancer*, 17(1), 30.
74. Galkin, A.V., Melnick, J.S., Kim, S., Hood, T.L., Li, N., Li, L., Xia, G., Steensma, R., Chopiuk, G., Jiang, J., Wan, Y., Ding, P., Liu, Y., Sun, F., Schultz, P.G., Gray, N.S., and Warmuth, M. (2007). Identification of NVP-TAE684, a potent, selective, and efficacious inhibitor of NPM-ALK. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(1), 270.
75. Mologni, L. (2015). Expanding the portfolio of anti-ALK weapons. *Translational lung cancer research*, 4(1), 5-7.
76. Dagogo-Jack, I. and Shaw, A.T. (2016). Crizotinib resistance: implications for therapeutic strategies. *Annals of Oncology*, 27(iii42-iii50).
77. Latif, M., Ashraf, Z., Basit, S., Ghaffar, A., Zafar, M.S., Saeed, A., and Meo, S.A. (2018). Latest perspectives of orally bioavailable 2,4-diarylaminopyrimidine analogues (DAAPalogues) as anaplastic lymphoma kinase inhibitors: discovery and clinical developments. *RSC Advances*, 8(30), 16470-16493.
78. Ott, G.R., Tripathy, R., Cheng, M., McHugh, R., Anzalone, A.V., Underiner, T.L., Curry, M.A., Quail, M.R., Lu, L., Wan, W., Angeles, T.S., Albom, M.S., Aimone, L.D., Ator, M.A., Ruggeri, B.A., and Dorsey, B.D. (2010). Discovery of a Potent Inhibitor of Anaplastic Lymphoma Kinase with in Vivo Antitumor Activity. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 1(9), 493-498.
79. Gingrich, D.E., Lisko, J.G., Curry, M.A., Cheng, M., Quail, M., Lu, L., Wan, W., Albom, M.S., Angeles, T.S., Aimone, L.D., Haltiwanger, R.C., Wells-Knecht, K., Ott, G.R., Ghose, A.K., Ator, M.A., Ruggeri, B., and Dorsey, B.D. (2012). Discovery of an Orally Efficacious Inhibitor of Anaplastic Lymphoma Kinase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(10), 4580-4593.
80. Cheng, M., Quail, M.R., Gingrich, D.E., Ott, G.R., Lu, L., Wan, W., Albom, M.S., Angeles, T.S., Aimone, L.D., Cristofani, F., Machiorlatti, R., Abele, C., Ator, M.A., Dorsey, B.D., Inghirami, G., and Ruggeri, B.A. (2012). CEP-28122, a Highly Potent and Selective Orally Active Inhibitor of Anaplastic Lymphoma Kinase with Antitumor Activity in Experimental Models of Human Cancers. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(3), 670.

81. Mo, H.-N. and Liu, P. (2017). Targeting MET in cancer therapy. *Chronic diseases and translational medicine*, 3(3), 148-153.
82. Capelletti, M., Gelsomino, F., and Tiseo, M. (2014). MET and ALK as targets for the treatment of NSCLC. *Curr Pharm Des*, 20(24), 3914-3932.
83. Milkiewicz, K.L., Aimone, L.D., Albom, M.S., Angeles, T.S., Chang, H., Grobelny, J.V., Husten, J., LoSardo, C., Miknyoczki, S., Murthy, S., Rolon-Steele, D., Underiner, T.L., Weinberg, L.R., Worrell, C.S., Zeigler, K.S., and Dorsey, B.D. (2011). Improvement in oral bioavailability of 2,4-diaminopyrimidine c-Met inhibitors by incorporation of a 3-amidobenzazepin-2-one group. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(21), 6274-6284.
84. Liu, Z., Ai, J., Peng, X., Song, Z., Wu, K., Zhang, J., Yao, Q., Chen, Y., Ji, Y., Yang, Y., Geng, M., and Zhang, A. (2014). Novel 2,4-Diarylaminopyrimidine Analogues (DAAPalogues) Showing Potent c-Met/ALK Multikinase Inhibitory Activities. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 5(4), 304-308.
85. Song, Z., Yang, Y., Liu, Z., Peng, X., Guo, J., Yang, X., Wu, K., Ai, J., Ding, J., Geng, M., and Zhang, A. (2015). Discovery of Novel 2,4-Diarylaminopyrimidine Analogues (DAAPalogues) Showing Potent Inhibitory Activities against Both Wild-type and Mutant ALK Kinases. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(1), 197-211.
86. Geng, K., Liu, H., Song, Z., Zhang, C., Zhang, M., Yang, H., Cao, J., Geng, M., Shen, A., and Zhang, A. (2018). Design, synthesis and pharmacological evaluation of ALK and Hsp90 dual inhibitors bearing resorcinol and 2,4-diaminopyrimidine motifs. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 152(76-86).
87. Kang, G.A., Lee, M., Song, D., Lee, H.K., Ahn, S., Park, C.H., Lee, C.O., Yun, C.S., Jung, H., Kim, P., Ha, J.D., Cho, S.Y., Kim, H.R., and Hwang, J.Y. (2015). Synthesis and evaluation of novel 2,4-diaminopyrimidines bearing bicyclic aminobenzazepines for anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(18), 3992-3998.
88. Song, D., Lee, M., Park, C.H., Ahn, S., Yun, C.S., Lee, C.O., Kim, H.R., and Hwang, J.Y. (2016). Novel 2,4-diaminopyrimidines bearing tetrahydronaphthalenyl moiety against anaplastic lymphoma kinase (ALK): Synthesis, in vitro, ex vivo, and in vivo efficacy studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26(7), 1720-1725.
89. Achary, R., Mathi, G.R., Lee, D.H., Yun, C.S., Lee, C.O., Kim, H.R., Park, C.H., Kim, P., and Hwang, J.Y. (2017). Novel 2,4-diaminopyrimidines bearing fused tricyclic ring moiety for anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(10), 2185-2191.
90. Chen, H., Li, R., Ning, X., Zhao, X., Jin, Y., and Yin, Y. (2019). Synthesis and anti-tumor efficacy of novel 2, 4-diarylaminopyrimidine derivatives bearing N-(3-pyridinylmethyl) urea moiety as anaplastic lymphoma kinase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 178(141-153).

91. Lei, H., Jiang, N., Miao, X., Xing, L., Guo, M., Liu, Y., Xu, H., Gong, P., Zuo, D., and Zhai, X. (2019). Discovery of novel mutant-combating ALK and ROS1 dual inhibitors bearing imidazolidin-2-one moiety with reasonable PK properties. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 171(297-309).
92. Lei, H., Jia, F., Cao, M., Wang, J., Guo, M., Zhu, M., Zuo, D., and Zhai, X. (2019). An exploration of solvent-front region high affinity moiety leading to novel potent ALK & ROS1 dual inhibitors with mutant-combating effects. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 27(20), 115051.
93. Anighoro, A., Bajorath, J., and Rastelli, G. (2014). Polypharmacology: Challenges and Opportunities in Drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(19), 7874-7887.
94. Ma, W.-F., Yang, H.-K., Hu, M.-J., Li, Q., Ma, T.-Z., Zhou, Z.-Z., Liu, R.-Y., You, W.-W., and Zhao, P.-L. (2014). One-pot synthesis and antiproliferative activity of novel 2,4-diaminopyrimidine derivatives bearing piperidine and piperazine moieties. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 84(127-134).
95. Hu, G., Wang, C., Xin, X., Li, S., Li, Z., Zhao, Y., and Gong, P. (2019). Design, synthesis and biological evaluation of novel 2,4-diaminopyrimidine derivatives as potent antitumor agents. *New Journal of Chemistry*, 43(25), 10190-10202.
96. Zhou, W., Huang, A., Zhang, Y., Lin, Q., Guo, W., You, Z., Yi, Z., Liu, M., and Chen, Y. (2015). Design and optimization of hybrid of 2,4-diaminopyrimidine and arylthiazole scaffold as anticancer cell proliferation and migration agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 96(269-280).
97. Liang, X., Zang, J., Zhu, M., Gao, Q., Wang, B., Xu, W., and Zhang, Y. (2016). Design, Synthesis, and Antitumor Evaluation of 4-Amino-(1H)-pyrazole Derivatives as JAKs Inhibitors. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 7(10), 950-955.
98. Groner, B. and von Manstein, V. (2017). Jak Stat signaling and cancer: Opportunities, benefits and side effects of targeted inhibition. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 451(1-14).
99. Cheung, C.H.A., Sarvagalla, S., Lee, J.Y.-C., Huang, Y.-C., and Coumar, M.S. (2014). Aurora kinase inhibitor patents and agents in clinical testing: an update (2011 – 2013). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 24(9), 1021-1038.
100. Qin, W.-W., Sang, C.-Y., Zhang, L.-L., Wei, W., Tian, H.-Z., Liu, H.-X., Chen, S.-W., and Hui, L. (2015). Synthesis and biological evaluation of 2,4-diaminopyrimidines as selective Aurora A kinase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 95(174-184).
101. Sang, C.-Y., Qin, W.-W., Zhang, X.-J., Xu, Y., Ma, Y.-Z., Wang, X.-R., Hui, L., and Chen, S.-W. (2019). Synthesis and identification of 2,4-bisanilinopyrimidines bearing 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl as potential Aurora A inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 27(1), 65-78.

102. Jani, J.P., Arcari, J., Bernardo, V., Bhattacharya, S.K., Briere, D., Cohen, B.D., Coleman, K., Christensen, J.G., Emerson, E.O., Jakowski, A., Hook, K., Los, G., Moyer, J.D., Pruiimboom-Brees, I., Pustilnik, L., Rossi, A.M., Steyn, S.J., Su, C., Tsaparikos, K., Wishka, D., Yoon, K., and Jakubczak, J.L. (2010). PF-03814735, an Orally Bioavailable Small Molecule Aurora Kinase Inhibitor for Cancer Therapy. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(4), 883.
103. Diao, P.-C., Lin, W.-Y., Jian, X.-E., Li, Y.-H., You, W.-W., and Zhao, P.-L. (2019). Discovery of novel pyrimidine-based benzothiazole derivatives as potent cyclin-dependent kinase 2 inhibitors with anticancer activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 179(196-207).
104. Wang, Y., Chen, X., Yan, Y., Zhu, X., Liu, M., and Liu, X. (2020). Discovery and SARs of 5-Chloro-N4-phenyl-N2-(pyridin-2-yl)pyrimidine-2,4-diamine Derivatives as Oral Available and Dual CDK 6 and 9 Inhibitors with Potent Antitumor Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(6), 3327-3347.
105. Jia, Y., Zhang, J., Feng, J., Xu, F., Pan, H., and Xu, W. (2014). Design, Synthesis and Biological Evaluation of Pazopanib Derivatives as Antitumor Agents. *Chemical Biology & Drug Design*, 83(3), 306-316.
106. Zang, J., Liang, X., Huang, Y., Jia, Y., Li, X., Xu, W., Chou, C.J., and Zhang, Y. (2018). Discovery of Novel Pazopanib-Based HDAC and VEGFR Dual Inhibitors Targeting Cancer Epigenetics and Angiogenesis Simultaneously. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(12), 5304-5322.
107. Aggarwal, R., Thomas, S., Pawlowska, N., Bartelink, I., Grabowsky, J., Jahan, T., Cripps, A., Harb, A., Leng, J., Reinert, A., Mastroserio, I., Truong, T.-G., Ryan, C.J., and Munster, P.N. (2017). Inhibiting Histone Deacetylase as a Means to Reverse Resistance to Angiogenesis Inhibitors: Phase I Study of Abexinostat Plus Pazopanib in Advanced Solid Tumor Malignancies. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 35(11), 1231-1239.
108. Sigismund, S., Avanzato, D., and Lanzetti, L. (2018). Emerging functions of the EGFR in cancer. *Molecular oncology*, 12(1), 3-20.
109. Chen, L., Fu, W., Feng, C., Qu, R., Tong, L., Zheng, L., Fang, B., Qiu, Y., Hu, J., Cai, Y., Feng, J., Xie, H., Ding, J., Liu, Z., and Liang, G. (2017). Structure-based design and synthesis of 2,4-diaminopyrimidines as EGFR L858R/T790M selective inhibitors for NSCLC. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 140(510-527).
110. Liu, T.-J., LaFortune, T., Honda, T., Ohmori, O., Hatakeyama, S., Meyer, T., Jackson, D., de Groot, J., and Yung, W.K.A. (2007). Inhibition of both focal adhesion kinase and insulin-like growth factor-I receptor kinase suppresses glioma proliferation &in vitro& and &in vivo&. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(4), 1357.

111. Fukami, S., Tomioka, D., Murakami, Y., Honda, T., and Hatakeyama, S. (2019). Pharmacological profiling of a dual FAK/IGF-1R kinase inhibitor TAE226 in cellular and in vivo tumor models. *BMC Research Notes*, 12(1), 347.
112. Yokota, S., Kiyoi, H., Nakao, M., Iwai, T., Misawa, S., Okuda, T., Sonoda, Y., Abe, T., Kahsima, K., Matsuo, Y., and Naoe, T. (1997). Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia*, 11(10), 1605-1609.
113. Jarusiewicz, J.A., Jeon, J.Y., Connelly, M.C., Chen, Y., Yang, L., Baker, S.D., and Guy, R.K. (2017). Discovery of a Diaminopyrimidine FLT3 Inhibitor Active against Acute Myeloid Leukemia. *ACS Omega*, 2(5), 1985-2009.
114. Wang, L., Zhang, L., Li, L., Jiang, J., Zheng, Z., Shang, J., Wang, C., Chen, W., Bao, Q., Xu, X., Jiang, Z., Zhang, J., and You, Q. (2019). Small-molecule inhibitor targeting the Hsp90-Cdc37 protein-protein interaction in colorectal cancer. *Science advances*, 5(9), eaax2277-eaax2277.
115. Wang, L., Jiang, J., Zhang, L., Zhang, Q., Zhou, J., Li, L., Xu, X., and You, Q. (2020). Discovery and Optimization of Small Molecules Targeting the Protein-Protein Interaction of Heat Shock Protein 90 (Hsp90) and Cell Division Cycle 37 as Orally Active Inhibitors for the Treatment of Colorectal Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(3), 1281-1297.
116. Kamada, Y., Sakai, N., Sogabe, S., Ida, K., Oki, H., Sakamoto, K., Lane, W., Snell, G., Iida, M., Imaeda, Y., Sakamoto, J., and Matsui, J. (2017). Discovery of a B-Cell Lymphoma 6 Protein-Protein Interaction Inhibitor by a Biophysics-Driven Fragment-Based Approach. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(10), 4358-4368.
117. Kerres, N., Steurer, S., Schlager, S., Bader, G., Berger, H., Caligiuri, M., Dank, C., Engen, J.R., Ettmayer, P., Fischerauer, B., Flotzinger, G., Gerlach, D., Gerstberger, T., Gmaschitz, T., Greb, P., Han, B., Heyes, E., Jacob, R.E., Kessler, D., Kölle, H., Lamarre, L., Lancia, D.R., Lucas, S., Mayer, M., Mayr, K., Mischerikow, N., Mück, K., Peinsipp, C., Petermann, O., Reiser, U., Rudolph, D., Rumpel, K., Salomon, C., Scharn, D., Schnitzer, R., Schrenk, A., Schweifer, N., Thompson, D., Traxler, E., Varecka, R., Voss, T., Weiss-Puxbaum, A., Winkler, S., Zheng, X., Zoephel, A., Kraut, N., McConnell, D., Pearson, M., and Koegl, M. (2017). Chemically Induced Degradation of the Oncogenic Transcription Factor BCL6. *Cell Reports*, 20(12), 2860-2875.
118. Schäfer, A., Wellner, A., Strauss, M., Schäfer, A., Wolber, G., and Gust, R. (2012). Influence of Chlorine or Fluorine Substitution on the Estrogenic Properties of 1-Alkyl-2,3,5-tris(4-hydroxyphenyl)-1H-pyrroles. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(22), 9607-9618.
119. Havel, S., Khirsariya, P., Akavaram, N., Paruch, K., and Carbain, B. (2018). Preparation of 3,4-Substituted-5-Aminopyrazoles and 4-Substituted-2-Aminothiazoles. *The Journal of Organic Chemistry*, 83(24), 15380-15405.

120. Bagley, M.C., Dwyer, J.E., Baashen, M., Dix, M.C., Murziani, P.G.S., Rokicki, M.J., Kipling, D., and Davis, T. (2016). The effect of RO3201195 and a pyrazolyl ketone P38 MAPK inhibitor library on the proliferation of Werner syndrome cells. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 14(3), 947-956.
121. Pyo, A., Park, A., Jung, H.M., and Lee, S. (2012). Palladium-Catalyzed Carbonylation with Mo(CO)₆ for the Synthesis of Benzoylacetonitriles. *Synthesis*, 44(18), 2885-2888.
122. Shen, H., Li, J., Liu, Q., Pan, J., Huang, R., and Xiong, Y. (2015). Umpolung Strategy for Synthesis of β -Ketonitriles through Hypervalent Iodine-Promoted Cyanation of Silyl Enol Ethers. *The Journal of Organic Chemistry*, 80(14), 7212-7218.
123. Yang, Z., Son, K.-I., Li, S., Zhou, B., and Xu, J. (2014). Specific 1,2-Hydride Shift in the Boron Trifluoride Catalyzed Reactions of Aromatic Aldehydes with Diazoacetonitrile: Simple Synthesis of β -Ketonitriles. *European Journal of Organic Chemistry*, 2014(29), 6380-6384.
124. Xu, K., Liu, H., Hou, Y., Shen, J., Liu, D., and Zhang, W. (2019). A Pd-catalyzed asymmetric allylic substitution cascade via an asymmetric desymmetrization for the synthesis of bicyclic dihydrofurans. *Chemical Communications*, 55(88), 13295-13298.
125. Joubran, L., Jackson, W.R., Campi, E.M., Robinson, A.J., Wells, B.A., Godfrey, P.D., Callaway, J.K., and Jarrott, B. (2003). Arylpropanolamines Incorporating an Antioxidant Function as Neuroprotective Agents. *Australian Journal of Chemistry*, 56(6), 597-605.
126. Inoue, T., Morita, M., Tojo, T., Nagashima, A., Moritomo, A., Imai, K., and Miyake, H. (2013). Synthesis and SAR study of new thiazole derivatives as vascular adhesion protein-1 (VAP-1) inhibitors for the treatment of diabetic macular edema: Part 2. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(9), 2478-2494.
127. Khalil, K.D., Al-Matar, H.M., Al-Dorri, D.a.M., and Elnagdi, M.H. (2009). Studies with enamines and enaminonitriles: synthesis of 3-aryl and 3-heteroaryl-pyrazolo-[1,5-a]pyrimidines. *Tetrahedron*, 65(45), 9421-9427.
128. Heng, H., Wang, Z., Li, H., Huang, Y., Lan, Q., Guo, X., Zhang, L., Zhi, Y., Cai, J., Qin, T., Xiang, L., Wang, S., Chen, Y., Lu, T., and Lu, S. (2019). Combining structure- and property-based optimization to identify selective FLT3-ITD inhibitors with good antitumor efficacy in AML cell inoculated mouse xenograft model. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 176(248-267).
129. Jensen, M.T., Juhl, M., Nielsen, D.U., Jacobsen, M.F., Lindhardt, A.T., and Skrydstrup, T. (2016). Palladium-Catalyzed Carbonylative α -Arylation of tert-Butyl Cyanoacetate with (Hetero)aryl Bromides. *The Journal of Organic Chemistry*, 81(4), 1358-1366.
130. Ge, Y., Sun, W., Chen, Y., Huang, Y., Liu, Z., Jiang, Y., and Loh, T.-P. (2019). Reactions of 5-Aminoisoxazoles with α -Diazocarbonyl Compounds: Wolff Rearrangement vs N-H Insertion. *The Journal of Organic Chemistry*, 84(5), 2676-2688.

131. Krasavin, M., Korsakov, M., Zvonaryova, Z., Semyonychev, E., Tuccinardi, T., Kalinin, S., Tanç, M., and Supuran, C.T. (2017). Human carbonic anhydrase inhibitory profile of mono- and bis-sulfonamides synthesized via a direct sulfochlorination of 3- and 4-(hetero)arylisoxazol-5-amine scaffolds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(6), 1914-1925.
132. Hempel, J.E., Williams, C.H. and Hong, C.C. (2015). *Chemical Biology: Methods and Protocols* (First Edition). New York: Springer, 287-298.
133. Lomenick, B., Jung, G., Wohlschlegel, J.A., and Huang, J. (2011). Target Identification Using Drug Affinity Responsive Target Stability (DARTS). *Current Protocols in Chemical Biology*, 3(4), 163-180.
134. Green, A.R., Caracappa, D., Benhasouna, A.A., Alshareeda, A., Nolan, C.C., Macmillan, R.D., Madhusudan, S., Ellis, I.O., and Rakha, E.A. (2015). Biological and clinical significance of PARP1 protein expression in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 149(2), 353-362.
135. Ji, J., Zhang, Y., Redon, C.E., Reinhold, W.C., Chen, A.P., Fogli, L.K., Holbeck, S.L., Parchment, R.E., Hollingshead, M., Tomaszewski, J.E., Dudon, Q., Pommier, Y., Doroshow, J.H., and Bonner, W.M. (2017). Phosphorylated fraction of H2AX as a measurement for DNA damage in cancer cells and potential applications of a novel assay. *PloS one*, 12(2), e0171582-e0171582.
136. Kim, J.-Y., Jeong, H.S., Chung, T., Kim, M., Lee, J.H., Jung, W.H., and Koo, J.S. (2017). The value of phosphohistone H3 as a proliferation marker for evaluating invasive breast cancers: A comparative study with Ki67. *Oncotarget*, 8(39), 65064-65076.
137. Nielsen, P.S., Riber-Hansen, R., Jensen, T.O., Schmidt, H., and Steiniche, T. (2013). Proliferation indices of phosphohistone H3 and Ki67: strong prognostic markers in a consecutive cohort with stage I/II melanoma. *Modern Pathology*, 26(3), 404-413.
138. Meanwell, N.A. (2018). Fluorine and Fluorinated Motifs in the Design and Application of Bioisosteres for Drug Design. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(14), 5822-5880.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..