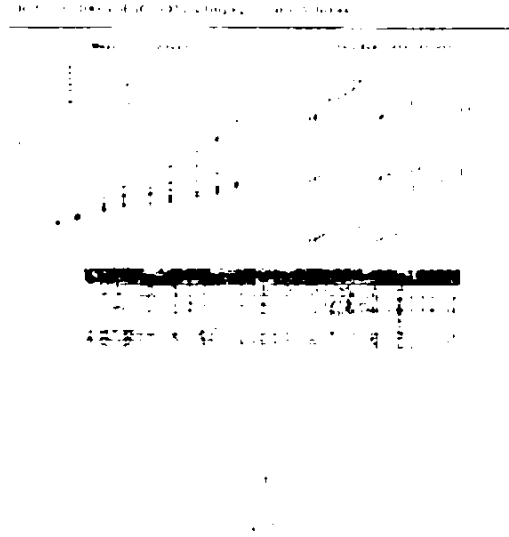


OZET

KANSER TEDAVİSİ İÇİN AKT VE MEK İNHİBE EDİCİ BİLEŞİKLERİN KOMBİNASYONLARI

5

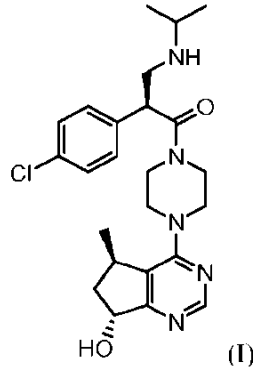


Bu buluş, a) formül I bileşiği: (formül I) veya onun farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzunu; ve GDC-0973, PD-0325901 ve bunların farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzları arasından seçilen başka bir ajanı içeren kombinasyonlar ortaya koyar. Bu kombinasyonlar, bilhassa kanser gibi hiperproliferatif hastalıkların tedavisi için faydalıdırlar.

15

İSTEMLER

1. Kolon kanseri, melanom, akciğer kanseri ve prostat kanseri arasından seçilen bir hiperproliferatif hastalığın tedavisinde kullanım için, aşağıda gösterilen formül I'e sahip olan bir bileşik veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu ile GDC-0973 veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzunun bir kombinasyonu:



10

2. İstem 1'e uygun kullanım için, istem 1'e uygun kombinasyon olup, burada hiperproliferatif hastalık kolon kanseri, metastatik melanom ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri arasından seçilir.
- 15 3. İstem 1 veya 2'ye uygun kullanım için, istem 1'e veya 2'ye uygun kombinasyon olup, burada:
- a) formül I bileşiği veya onun tuzu, GDC-0973 veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu ile eşzamanlı uygulanır; veya
- 20 b) formül I bileşiği veya onun tuzu ile GDC-0973 veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu sırayla uygulanırlar; veya

c) GDC-0973 veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzunun uygulanması, kombinasyonun uygulanmasından yaklaşık 1 ilâ yaklaşık 10 gün önce başlar; veya

d) formül I bileşiği veya onun tuzunun uygulanması, kombinasyonun uygulanmasından yaklaşık 1 ilâ yaklaşık 10 gün önce başlar; veya

e) formül I bileşiği veya onun tuzunun uygulanması ile GDC-0973 veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzunun uygulanması aynı gün başlarlar.

10

15

20

25

24770

TARİFNAME**KANSER TEDAVİSİ İÇİN AKT VE MEK İNHİBE EDİCİ****BİLEŞİKLERİN KOMBİNASYONLARI**

5

BULUŞUN RUÇHAN HAKKI

Bu buluş başvurusu, 1 Nisan 2011 tarihinde başvurusu yapılmış olan
10 61/471.038 sayılı ABD Geçici Patent Başvurusuna dayanarak rüçhan hakkı talep etmektedir.

BULUŞUN ALANI

15 Bu buluş, genel itibarıyla, kanser gibi hiperproliferatif hastalıklara karşı aktiviteye sahip olan bileşiklerden meydana gelen ve AKT kinaz aktivitesini inhibe eden bileşikler barındıran farmasötik kombinasyonlar ile ilgilidir.

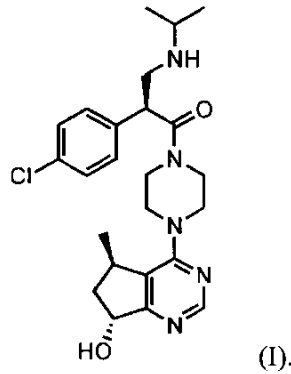
20 BULUŞUN ARKA PLANI

Protein kinazlar (PK), terminal (gama) fosfatın ATP'den transfer edilmesi yoluyla proteinlerin tirozin, serin ve treonin artıkları üzerindeki hidroksi gruplarının fosforilasyonunu katalize eden
25 enzimlerdir. Bu enzimler, öyle ya da böyle PK aktivitesine bağlı olarak, sinyal iletim yolları aracılığıyla hücre büyümesini, farklılaşmasını ve proliferasyonunu, yani hücre yaşamıyla ilgili hemen

hemen tüm evreleri modüle ederler (Hardie, G. and Hanks, S. (1995) The Protein Kinase Facts Book. I and II, Academic Press, San Diego, CA). Ote yandan, anormal PK aktivitesi, psoriasis gibi hayati tehlikesi nispeten düşük sayılabilecek hastalıklardan glioblastom (beyin kanseri) gibi epey ölümcül ve tehlikeli hastalıklara değin muhtelif hastalıkların bir belirtisi olarak tanımlanmıştır. Protein kinazlar, önemli bir terapötik modülasyon hedefi sınıfını teşkil ederler (Cohen, P. (2002) Nature Rev. Drug Discovery 1:309).

- 10 WO 2008/006040 sayılı Uluslararası Patent Başvurusunda, aşağıda gösterilen (S)-2-(4-klorofenil)-1-(4-(((5R,7R)-7-hidroksi-5-metil-6,7-dihidro-5H-siklopenta [d]pirimidin-4-il) piperazin-1-il)-3-(izopropilamino)propan-1-on (formül I) bileşiğinin aralarında bulunduğu bir dizi AKT inhibitörü tartışılmaktadır:

15



- WO 2010/006225 sayılı Uluslararası Patent Başvurusunda, bir proliferatif hastalığın, özellikle de bir solid tümör hastalığının tedavisi için Ras/Raf/Mek yolağını modüle eden bir bileşik ve bir fosfoinositid 3-kinaz inhibe edici bileşik içeren bir farmasötik kombinasyon; bu gibi bir kombinasyon ihtiva eden bir farmasötik bileşim; bu gibi bir kombinasyonun bir proliferatif hastalığın tedavisi için olan bir ilacın

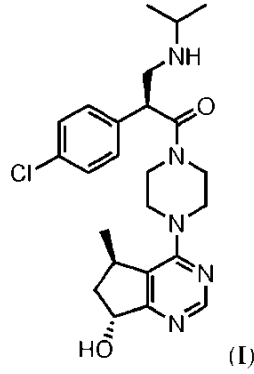
5 hazırlanmasında kullanımı; eşzamanlı, ayrı ayrı veya sıralı kullanıma yönelik bir kombine preparat olarak bu gibi bir kombinasyonu barındıran bir ticari paket veya ürün; ve bir sıcakkanlı hayvanın, özellikle de bir insanın tedavisine yönelik bir tedavi yöntemi tartışılmaktadır.

Kanser gibi hiperproliferatif hastalıkların tedavisinde kullanıma yönelik gelişmiş bileşimlere günümüzde hâlâ ihtiyaç duyulmaktadır.

10 BULUŞUN ÖZETİ

Formül I'e sahip olan bileşik veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu belirli başka spesifik ajanlar ile kombinasyon halinde uygulanarak, in vitro ortamda ve in vivo ortamda kanser hücrelerinin 15 büyümesinin inhibisyonunda aditif veya sinerjistik etkiler elde edilebileceği belirlenmiştir. Bu kombinasyonlar ve ilgili yöntemler, kanser gibi hiperproliferatif hastalıkların tedavisinde faydalı olabilirler.

20 Bu buluşun birinci özelliği, kolon kanseri, melanom, akciğer kanseri ve prostat kanseri arasından seçilen bir hiperproliferatif hastalığın tedavisinde kullanım için olan ve aşağıda gösterilen formül I'e sahip olan bir bileşik veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu ile GDC-0973 veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir 25 tuzundan meydana gelen bir kombinasyondur:



Buluşun yapılarından birinde, buluşun birinci özelliğine göre kullanım için buluşun birinci özelliğine uygun bir kombinasyon söz konusu olup, burada hiperproliferatif hastalık kolon kanseri, metastatik melanom ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri arasından seçilen bir hastalıktır.

Buluşun bir diğer yapısında, buluşun birinci özelliğine göre kullanım için buluşun birinci özelliğine uygun bir kombinasyon söz konusu olup, burada:

- a) formül I bileşiği veya onun tuzu, GDC-0973 veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu ile eşzamanlı uygulanır; veya
- 15 b) formül I bileşiği veya onun tuzu ile GDC-0973 veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu sırayla uygulanırlar; veya
- c) GDC-0973 veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzunun uygulanması, kombinasyonun uygulanmasından yaklaşık 1 ilâ yaklaşık 10 gün önce başlar; veya
- 20 d) formül I bileşiği veya onun tuzunun uygulanması, kombinasyonun uygulanmasından yaklaşık 1 ilâ yaklaşık 10 gün önce başlar; veya

e) formül I bileşiğı veya onun tuzunun uygulanması ile GDC-0973 veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzunun uygulanması aynı gün başlarlar.

- 5 Buluşun belirli yapılarında, kanser, PTEN mutasyonu ile ilişkili bir kanser hastalığıdır.

Buluşun belirli yapılarında, kanser, AKT mutasyonu, aşırı ekspresyonu veya amplifikasyonu ile ilişkili bir kanser hastalığıdır.

10

Buluşun belirli yapılarında, kanser, PI3K mutasyonu ile ilişkili bir kanser hastalığıdır.

- 15 Buluşun belirli yapılarında, kanser, Her2/ErbB2 amplifikasyonu ile ilişkili bir kanser hastalığıdır.

- 20 Buluşun belirli yapılarında, bir formül I bileşiğı veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu, GDC-0973 veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu ile kombinasyon halinde uygulanır.

- 25 Buluşun belirli yapılarında, seçilen kanserlerden biri için GDC-0973 ile tedavi gören bir hastanın yaşam kalitesini artırmak üzere terapötik maksatla kullanım için olan bir formül I bileşiğı veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu ortaya koyulmaktadır.

Buluşun belirli yapılarında, AKT kinazın modüle ettiği seçilen kanserlerden birinin tedavisinde kullanım için olan ve a) bir formül I

bileşiğı veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu ile b) GDC-0973 ve PD-0325901'den meydana gelen bir kombinasyon ortaya koyulmaktadır.

- 5 Buluşun belirli yapılarında, seçilen kanserlerden birinin tedavisinde kullanım için, bir formül I bileşiğı veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzunun, bir kabın ve formül I bileşiğinin GDC-0973 ve PD-0325901 ile uygulanacağına işaret eden bir kullanma talimatı veya etiketinin bulunduğu bir kit ortaya koyulmaktadır.

10

Buluşun belirli yapılarında, seçilen kanserlerden birinin tedavisinde ayrı ayrı, eşzamanlı veya sıralı kullanım için bir kombine preparat olarak, formül I'e sahip olan bir bileşik veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzunun, GDC-0973'ün ve PD-0325901'in
15 bulunduğu bir ürün ortaya koyulmaktadır.

- 20 Aralarında melanom, akciğer, kolon, yumurtalık, böbrek, meme, prostat, pankreas kanser hücre hatlarının bulunduğu birçok hücre çeşidinde in vitro ortamda GDC-0068 ve GDC-0973 kombinasyonu verildiğinde sinerji/aditivite görülmektedir ve bu bulgu in vivo ortamda melanom, kolon ve akciğer ksenograft modellerinde de teyit edilmiştir. Ras/Raf'a veya her iki yolak aktivasyonuna da dayalı tümör çeşitlerinde sinerji gözlemlenmiştir. GDC-0068 ve GDC-0973 kombinasyonu muhtelif hücrelere dozlandığında melanom, akciğer
25 (örneğin NSCLC) ve kolon hatlarının sinerji sergiledikleri görülmüştür. GDC-0068 ve GDC-0973 kombinasyonu ile yapılan dozlamada, (luminal (ER+), Her2+ ve bazal üçlü negatif meme kanser hücrelerinin dahil olduğu) meme kanser hücreleri de sinerji

sergileyebilirler. GDC-0068 ve GDC-0973 kombinasyonu ile yapılan uygulama karşısında, tek başına Meki'ye duyarlı hücrelerde dahi sinerji gözlemlenmiştir.

- 5 Kanser hücresinin mutasyon durumunun o kanser hücresinin farklı tedavi protokollerine nasıl cevap vereceğine işaret eden bir biyomarker olduğu keşfedilmiştir. Örneğin, Kras ve/veya Braf mutasyonları ile birlikte PI3K yolağı (örneğin PI3K veya AKT) mutasyonları barındıran kanser hücreleri, burada açıklanan
- 10 kombinasyon tedavilerine pozitif (örneğin sinerjistik) cevaplar verebilirler. Ayrıca, kanser hücresinin PTEN durumu da bir biyomarkerdir.

- A2058 (PTEN yok/Braf mutant) melanom modelinde, GDC-0068 ve
- 15 GDC-0973 kombinasyonu kullanıldığında kuvvetli bir sinerji saptanmıştır. Bütün GDC-0973 dozlarında ve yüksek GDC-0068 dozlarında (75 ve 100 mg/kg), denk ve karşılaştırılabilir tek ajan tümör büyümesi inhibisyonu (TGI) kaydedilmiştir. 50 mg/kg GDC-0068 kullanıldığında TGI görülmemektedir. İki ilacın da yer aldığı
- 20 kombinasyon bu modelde iyi tolere edilmiş ve yaklaşık %13 düzeyinde bir maksimum ağırlık kaybı meydana gelmiştir.

ŞEKİLLERE DAİR KISA AÇIKLAMALAR

- 25 Şekil 1'de, GDC-0068 ile GDC-0973'ten (2,5 mg/kg) oluşan kombinasyon ile tümör hacimlerine istinaden elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

Şekil 2'de, GDC-0068 ile GDC-0973'ten (5,0 mg/kg) oluşan kombinasyon ile tümör hacimlerine istinaden elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

Şekil 3'te, GDC-0068 ile GDC-0973'ten (7,5 mg/kg) oluşan kombinasyon ile tümör hacimlerine istinaden elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

Şekil 4'te, GDC-0068 ile GDC-0973'ten oluşan kombinasyon ile in vitro ortamda kolorektal kanser hücre hatlarına karşı elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

Şekil 5'te, GDC-0068 ile GDC-0973'ten oluşan kombinasyon ile HCT-116'ya (Kolon - PI3K ve Kras Mutant) karşı elde edilen sonuçlar gösterilmektedir. Söz konusu kombinasyonun HCT-116 hücrelerinde hücre viyabilitesine etkilerinin gösterildiği iki boyutlu (2D) ısı haritaları sunulmaktadır. X ekseninde artan sırayla GDC-0068 konsantrasyonları, y ekseninde ise artan sırayla GDC-0973 konsantrasyonları yer almaktadır. Sağ tarafta, kombinasyon halinde veya ayrı ajanlar olarak kullanılan GDC-0068 ile GDC-0973'ün her konsantrasyonuna istinaden kaydedilen inhibisyon yüzdelerinin gösterildiği yüzde inhibisyon (% inhibisyon) ısı haritaları bulunmaktadır; vehiküle (DMSO) maruz bırakılan kontrol 0'a ayarlanmıştır. Solda gösterilen ısı haritaları ve her doz çifti için BLISS skorları hesaplanmıştır.

Şekil 6'da, GDC-0068 ile GDC-0973'ten oluşan kombinasyon ile in vitro ortamda NSCLC hücre hatlarına karşı elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

Şekil 7'de, GDC-0068 ile GDC-0973'ten oluşan kombinasyon ile H2122'ye (NSCLC - Kras Mutant) karşı elde edilen sonuçlar gösterilmektedir. Söz konusu kombinasyonun NCI-H2122

hücrelerinde hücre viyabilitesine etkilerinin gösterildiği iki boyutlu (2D) ısı haritaları sunulmaktadır. X ekseninde artan sırayla GDC-0068 konsantrasyonları, y ekseninde ise artan sırayla GDC-0973 konsantrasyonları yer almaktadır. Sağ tarafta, 5 kombinasyon halinde veya ayrı ajanlar olarak kullanılan GDC-0068 ile GDC-0973'ün her konsantrasyonuna istinaden kaydedilen inhibisyon yüzdelerinin gösterildiği yüzde inhibisyon (% inhibisyon) ısı haritaları bulunmaktadır; vehiküle (DMSO) maruz bırakılan kontrol 0'a ayarlanmıştır. Solda gösterilen ısı haritaları ve her doz çifti 10 için BLISS skorları hesaplanmıştır.

Şekil 8'de, GDC-0068 ile GDC-0973'ten oluşan kombinasyon ile in vitro ortamda Melanom hücre hatlarına karşı elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

Şekil 9'da, GDC-0068 ile GDC-0973'ten oluşan kombinasyon ile 15 A2058'e (Melanom - PTEN -/- ve Braf Mutant) karşı elde edilen sonuçlar gösterilmektedir. Söz konusu kombinasyonun A2058 hücrelerinde hücre viyabilitesine etkilerinin gösterildiği iki boyutlu (2D) ısı haritaları sunulmaktadır. Solda gösterilen ısı haritaları ve her doz çifti için BLISS skorları hesaplanmıştır. X ekseninde artan 20 sırayla GDC-0068 konsantrasyonları, y ekseninde ise artan sırayla GDC-0973 konsantrasyonları yer almaktadır. Sağ tarafta, kombinasyon halinde veya ayrı ajanlar olarak kullanılan GDC-0068 ile GDC-0973'ün her konsantrasyonuna istinaden kaydedilen inhibisyon yüzdelerinin gösterildiği yüzde inhibisyon (% inhibisyon) 25 ısı haritaları bulunmaktadır; vehiküle (DMSO) maruz bırakılan kontrol 0'a ayarlanmıştır.

Şekil 10'da, tek ajan uygulamalarında elde edilen sonuçlara kıyasla AKT ve MEK yolak aktivitelerinde kaydedilen daha yüksek knockdown gösterilmektedir.

5 Şekil 11'de, GDC-0973 ile GDC-0068'den meydana gelen kombinasyon ile MDA-MB-468 meme kanseri hücre hattına karşı elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

Şekil 12'de, GDC-0068 ile GDC-0973'ten meydana gelen kombinasyon ile in vitro ortamda meme kanseri hücre hatlarına karşı elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

10 Şekil 13'te, GDC-0068 ile GDC-0973'ten meydana gelen kombinasyon ile yumurtalık kanserine karşı elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

15 Şekil 14'te, GDC-0068 ile GDC-0973'ten meydana gelen kombinasyon ile in vitro ortamda prostat kanseri hücre hatlarına karşı elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

Şekil 15'te, Oral Dozlanan GDC-0068 + GDC-0973 (MEK inhibitörü) kombinasyonu ile MX-1 Meme Tümörlerinde elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

20 Şekil 16'da, Oral Dozlanan GDC-0068 + GDC-0973 (MEK inhibitörü) kombinasyonu ile H2122 NSCLC Tümörlerinde elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

Şekil 17'de, Oral Dozlanan GDC-0068 + GDC-0973 (MEK inhibitörü) kombinasyonu ile SW1990 Pankreas tümörlerinde elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

25 Şekil 18'de, Oral Dozlanan GDC-0068 + GDC-0973 (MEK inhibitörü) kombinasyonu ile Pa_Tu-8902 Pankreas Tümörlerinde elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

Şekil 19'da, Oral Dozlanan GDC-0068 + GDC-0973 (MEK inhibitörü) kombinasyonu ile 537Mel Melanom Tümörlerinde elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

- 5 Şekil 20'de, Oral Dozlanan GDC-0068 + GDC-0973 (MEK inhibitörü) kombinasyonu ile A2058 Melanom Tümörlerinde elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

Şekil 21'de, Oral Dozlanan GDC-0068 + GDC-0973 (MEK inhibitörü) kombinasyonu ile HCT-116 Kolorektal Tümörlerinde elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

- 10 Şekiller 22a-22b'de, çeşitli hücre hatlarında hücre viyabilitesini inhibe etme konusunda tek ajan tedavileri ile kombinasyon tedavisi arasında yapılan karşılaştırmaların sonuçları gösterilmektedir. GDC-0068 hücre potensi PI3K/PTEN/HER2'deki alterasyonlardan kaynaklanan Akt aktivasyonu ile ilişkili bir profil çizerken, GDC-0973 hücre potensi
- 15 RAS veya B-RAF mutasyonlarından kaynaklanan MEK aktivasyonu ile ilişkili bir profil çizmiştir. GDC-0068'e ve GDC-0973'e duyarlı hücre hatları genelde karşılıklı olarak birbirlerini dışlarlar. Test edilen hücre hatlarının yaklaşık üçte biri her iki ajana da direnç göstermiştir (bkz: Şekiller 22a-22b). GDC-0068 ve GDC-0973 kombinasyonu, test
- 20 edilen hücre hatlarının çoğunda tek ajan uygulamalarına kıyasla hücre viyabilitesini daha kuvvetli ölçüde inhibe etmiştir. Kombinasyon etkileri, BLISS bağımsızlık modeli (Lehár et al. 2007) kullanılarak değerlendirilmiştir.

- 25 Şekil 22a'da yer alan üstteki grafikte, Birden Çok Kanseri Hücre Hattında GDC-0068 ve GDC-0973 için kaydedilen Tek Ajan IC50 Değerleri gösterilmektedir. Hücreler, RPMI + %10 FBS'de artan konsantrasyonlarda tek başına GDC-0068 veya GDC-0973 ya da bunlardan oluşan kombinasyon ile işleminden geçirilmiş ve 4 gün

geçtikten sonra CellTiter-Glo kullanılarak viyabilite bakımından analiz edilmişlerdir. Alttaki müteakıl grafikte, bir dizi spesifik genotip için kaydedilen GDC-0068 ve GDC-0973 kombinasyon sinerjisi gösterilmektedir. Renkli bloklar, bir Mutasyon, Delesyon veya Aktivasyonun varlığına işaret etmektedir. B-RAF, RAS, HER2, PI3K veya PTEN'deki mutasyonlar/alterasyonlar, her hücre hattı altında renkli bir kare ile gösterilmektedirler (B-RAF, kahverengi; RAS, kırmızı; HER2, mavi; PTEN, koyu yeşil; PI3K'ye istinaden, açık yeşil PIK3CA'da kinaz domaini mutasyonları bulunduğuna işaret etmektedir, açık mavi ise kinaz domaininde olmayan başka mutasyonlar veya amplifikasyonlar bulunduğuna işaret etmektedir). PTEN alterasyonları, ya bu proteine ilişkin olarak Western blot ile tespit edilebilir olmayan bir sinyal söz konusu olduğuna ya da gende bir mutasyon bulunduğuna işaret etmektedirler. Her hücre hattına istinaden doku kaynakları da farklı renklerde gösterilmektedir ve ilgili dokuları temsil eden kısaltmalar şöyledir: meme (Br), kolon (Co), küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (Lu), melanom (Me), yumurtalık (Ov), prostat (Pr) ve böbrek (Re).

Şekil 22b'de, Birden Çok Hücre hattında GDC-0068 ve GDC-0973 için hesaplanan toplam pozitif kombinasyon Bliss Skorları gösterilmektedir. Toplam pozitif BLISS skorları ile anlaşıldığı üzere birden çok hücre hattında, özellikle de RAS/RAF yolağı aktivasyonunun söz konusu hücre hatlarında ya da PI3K/Akt ve RAS/RAF yolağı aktivasyonlarının her ikisinin de söz konusu olduğu hücre hatlarında sinerjistik etkiler gözlemlenmiştir. GDC-0068 ve GDC-0973'e ilişkin toplam pozitif BLISS skorları her hücre hattında ayrı ayrı hesaplanmıştır.

Şekil 23'te, 537MEL Melanom, PTEN yok, Braf amp/delde GDC-0068 ve GDC-0973 için kaydedilen Bliss Isı Haritası ve % İnhibisyon gösterilmektedir; GDC-0068 ile GDC-0973'ten meydana gelen kombinasyon her iki yolağı da inhibe etmiş ve hücre ölümünü artırmıştır.

Şekil 24'te, GDC-0068 ve GDC-0973 ile 24 Saat Boyunca Uygulamaya Tâbi Tutulan İnsan HTC116 Kolon Hücre Hattına İlişkin Yapılan Western Blot Analizi gösterilmektedir. HCT-116 hücreleri, belirtilen konsantrasyonlardaki GDC-0068 ve GDC-0973 ile yaklaşık 3 saat boyunca inkübe edilmişlerdir. Akt, MEK ve onların downstream markerlerinin fosforilasyonu Western blotlar ile analiz edilmiştir.

Şekil 25'te, 537MEL Melanom, PTEN yok, Braf amp/delde GDC-0068 ve GDC-0973 kombinasyonunun daha iyi bir etkinlik sağladığı gösterilmektedir.

Şekil 26'da, Vehikül Uygulanan Kontrole Kıyasla GDC-0068 ve GDC-0973 Kombinasyonu ile Fosfo-Protein Ekspresyon Seviyelerinde Sağlanan İstatistiksel Açıdan Anlamlı Değişimler gösterilmektedir. Farelere tek doz halinde 100 mg/kg GDC-0068 veya 7,5 mg/kg GDC-0973 ya da kombinasyon verildikten 3 saat sonra A2058x1 tümörleri toplanmıştır. Tümörler, ters faz protein dizisi (RPPA) kullanılarak analiz edilmişlerdir.

Şekil 27'de, A2058 ksenograft tümörlerinde Tek Ajan Uygulamalarına Kıyasla GDC-0068 ve GDC-0973 Kombinasyonu ile dozlamadan sonra Fosfo-Protein Ekspresyon Seviyelerinde Kaydedilen İstatistiksel Açıdan Anlamlı Değişimler gösterilmektedir.

Şekil 28'de, MALME3M hücrelerinde kombinasyonun hücre viyabilitesine etkilerinin gösterildiği iki boyutlu (2D) ısı haritaları

sunulmaktadır. X ekseninde artan sırayla GDC-0068 konsantrasyonları, y ekseninde ise artan sırayla GDC-0973 konsantrasyonları yer almaktadır. Yüzde inhibisyon (% inhibisyon) ısı haritası, kombinasyon halinde veya ayrı ajanlar olarak kullanılan

5 GDC-0068 ile GDC-0973'ün her konsantrasyonuna istinaden kaydedilen inhibisyon yüzdelerini göstermektedir; kontrol vehiküle (DMSO) maruz bırakılmıştır ve 0'a ayarlanmıştır.

Şekil 29'da, MALME3 hücrelerinde kombinasyonun hücre viyabilitesine etkilerinin gösterildiği iki boyutlu (2D) ısı haritaları

10 sunulmaktadır. X ekseninde artan sırayla GDC-0068 konsantrasyonları, y ekseninde ise artan sırayla GDC-0973 konsantrasyonları yer almaktadır. Yüzde inhibisyon (% inhibisyon) ısı haritası, kombinasyon halinde veya ayrı ajanlar olarak kullanılan

15 GDC-0068 ile GDC-0973'ün her konsantrasyonuna istinaden kaydedilen inhibisyon yüzdelerini göstermektedir; kontrol vehiküle (DMSO) maruz bırakılmıştır ve 0'a ayarlanmıştır. Sağda gösterilen ısı haritaları ve her doz çifti için BLISS skorları hesaplanmıştır.

Şekil 30'da, NCI-BL2122 hücrelerinde kombinasyonun hücre viyabilitesine etkilerinin gösterildiği iki boyutlu (2D) ısı haritaları

20 sunulmaktadır. X ekseninde artan sırayla GDC-0068 konsantrasyonları, y ekseninde ise artan sırayla GDC-0973 konsantrasyonları yer almaktadır. Yüzde inhibisyon (% inhibisyon) ısı haritası, kombinasyon halinde veya ayrı ajanlar olarak kullanılan

25 GDC-0068 ile GDC-0973'ün her konsantrasyonuna istinaden kaydedilen inhibisyon yüzdelerini göstermektedir; kontrol vehiküle (DMSO) maruz bırakılmıştır ve 0'a ayarlanmıştır. Sağda gösterilen ısı haritaları ve her doz çifti için BLISS skorları hesaplanmıştır.

Şekil 31'de, GDC-0068 ve GDC-0973 kombinasyonu ile fosfo-protein ekspresyon seviyelerinde elde edilen değişimler (24 saat) ve AKT ve MEK yolaklarında sağlanan modülasyon gösterilmektedir. Farelere tek doz halinde 100 mg/kg GDC-0068 veya 7,5 mg/kg GDC-0973 ya da kombinasyon verildikten 24 saat sonra A2058x1 tümörleri toplanmıştır. Tümörler, ters faz protein dizisi (RPPA) kullanılarak analiz edilmişlerdir.

BULUŞUN ÖRNEK NİTELİĞİNDEKİ YAPILARINA DAİR 10 AYRINTILI AÇIKLAMA VE TANIMLAR

Bu tarifnamede ve istemlerde geçen "ihtiva eder", "ihtiva eden", "içerir", "içeren" ve türevi kelime ve terimler, atıf yapılan özellikler, tamsayılar, komponentler ya da basamakların mevcut olduğunu gösterirler, ancak başka özellik veya özelliklerin, tamsayı veya tamsayıların, komponent veya komponentlerin, basamak veya basamakların ya da bunlardan oluşan grup veya grupların mevcut olmadığına ya da buluşun kapsamına dahil edilemeyeceğine dair bir yargı veya ima taşımazlar.

20

"Tedavi etme" ve "tedavi" terimleri, hem terapötik tedaviyi, hem de amacı istenmeyen bir fizyolojik değişim veya bozukluğu, örneğin kanserin büyümesi, gelişmesi veya yayılmasını önlemek veya yavaşlatmak (azaltmak) olan profilaktik veya önleyici uygulama ve tedbirleri içine alan bir anlam taşırlar. Bu buluşun amaçları bakımından, faydalı ya da istenen klinik sonuçlar arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, tespit edilebilir düzeyde olsun ya da olmasın, semptomların hafiflemesi, hastalığın yayılımının azalması,

25

- stabil (yani kötüleşmeyen) hastalık durumu, hastalık progresyonunun gecikmesi ya da yavaşlaması, hastalık durumunun iyileşmesi ya da palyasyonu ve (kısmi ya da tam) remisyon vardır. "Tedavi", tedavi verilmeyen durumda beklenen sağ kalıma kıyasla sağ kalımın 5 uzatılması anlamına da gelebilir. Tedaviye ihtiyacı olanlar arasında, ilgili hastalık veya bozukluktan hâlihazırda mustarip olanlar, ilgili hastalık veya bozukluğa yatkınlığı bulunanlar ve ilgili hastalık veya bozukluğun meydana gelmesinin önlenmesi gerekenler bulunur.
- 10 "Terapötik açıdan etkin miktar" tabiri, (i) belirli bir hastalığı, rahatsızlığı ya da bozukluğu tedavi etmek, (ii) belirli bir hastalık, rahatsızlık ya da bozukluğa ait bir veya daha fazla sayıda semptomu hafifletmek, iyileştirmek veya ortadan kaldırmak ya da (iii) burada tanımlanan belirli bir hastalık, rahatsızlık ya da bozukluğa ait bir veya 15 daha fazla sayıda semptomun başlamasını önlemek ya da geciktirmek için, bu buluşa konu olan bir bileşikten kullanılması gereken miktar anlamına gelir. Kanseri söz konusu ise, ilacın terapötik açıdan etkin miktarı, kanser hücrelerinin sayısını azaltabilir; tümör boyutlarını küçültebilir; periferik organlara yönelik kanser hücresi infiltrasyonunu 20 inhibe edebilir (yani, belirli bir düzeye kadar yavaşlatabilir ve tercihen durdurabilir); tümör metastazını inhibe edebilir (yani, belirli bir düzeye kadar yavaşlatabilir ve tercihen durdurabilir); tümör büyümesini belirli bir düzeye kadar inhibe edebilir ve/veya kanserle ilişkili semptomların birini veya birden fazlasını belirli bir düzeye 25 kadar hafifletebilir. İlaç kanser hücrelerinin çoğalmasını önleyebildiği ve/veya mevcut kanser hücrelerini öldürebildiği düzeyde sitostatik ve/veya sitotoksik olabilir. Kanseri tedavisinde etkinlik, örneğin

hastalık progresyonuna kadar geçen süre (TTP) değerlendirilerek ve/veya cevap oranı (RR) tayin edilerek ölçülebilir.

"Kanser" ve "kanseroz" terimleri, normalde düzensiz ve kontrolsüz hücre büyümesi ile karakterize edilen ve memelilerde görülen fizyolojik durum ve hastalıklara atıf yapar veya bu gibi hastalık ve durumları tanımlarlar. Bir "tümör", bir veya daha fazla sayıda kanseroz hücre içerir. Kanser hastalıklarına örnek olarak, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, karsinom, lenfoma, blastom, sarkom ve lösemi ya da lenfoid malignansiler gösterilebilir. Bu tarz kanser hastalıklarına verilebilecek daha somut örnekler arasında, skuamöz hücreli kanser (örneğin epitel skuamöz hücreli kanser); küçük hücreli akciğer kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ("NSCLC"), akciğer adenokarsinomu ve skuamöz akciğer karsinomu da dahil akciğer kanseri; peritoneum kanseri; hepatoselüler kanser; gastrointestinal kanser de dahil gastrik kanser ya da mide kanseri; pankreas kanseri, glioblastom; serviks kanseri; yumurtalık kanseri; karaciğer kanseri; mesane kanseri; hepatom; meme kanseri; kolon kanseri; rektal kanser; colorektal kanser; endometrium ya da uterin karsinomu; tükürük bezi karsinomu; böbrek kanseri ya da renal kanser; prostat kanseri; vulva kanseri; tiroid kanseri; hepatik karsinom; anal karsinom; penis karsinomu; ve baş ve boyun kanseri sayılabilir. Burada bahsi geçen gastrik kanser, midenin herhangi bir kısmında gelişebilecek ve mide boyunca ve diğer organlara, özellikle de özofagus, akciğerler, lenf nodları ve karaciğere yayılabilecek olan mide kanserini içine alan bir anlam taşır.

Bir "kemoterapötik ajan", nasıl bir etki mekanizmasına sahip olduğu fark etmeksizin, kanser tedavisinde faydalı olan bir biyolojik (büyük molekül) veya kimyasal (küçük molekül) bileşiği teşkil eder.

- 5 Bir "platin ajanı", karboplatin, sisplatin ve oksaliplatinin örnek gösterilebileceği, platin içeren bir kemoterapötik ajandır.

- "Memeli" terimi, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, insanlar, fareler, sıçanlar, gine domuzları, maymunlar, köpekler, kediler, atlar, inekler, 10 domuzlar, koyunlar ve kümes hayvanlarını içine alan bir anlam taşır. Hasta terimi bir memeliye atıf yapar ve buluşun yapılarından birinde, hasta bir insandır.

- "Kullanma talimatı" terimi, terapötik ürünlerin koyulduğu ticari 15 ambalajlara dahil edilen ve endikasyonlar, kullanım şekli, dozaj, uygulama şekli, kontrendikasyonlar ve/veya ilgili terapötik ürünlerin kullanımına ilişkin uyarılar hakkında bilgi veren talimatname metnine atıf yapar.

- 20 Burada geçen "farmasötik açıdan kabul edilebilir tuz" ifadesi, bu buluşa uygun bir bileşiğin farmasötik açıdan kabul edilebilir organik veya inorganik tuzlarına atıf yapar. Örnek niteliğindeki tuzlar arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, sülfat, sitrat, asetat, oksalat, klorür, bromür, iyodür, nitrat, bisülfat, fosfat, asit fosfat, 25 izonikotinat, laktat, salisilat, asit sitrat, tartrat, oleat, tannat, pantotenat, bitartrat, askorbat, süksinat, maleat, gentisinat, fumarat, glukonat, glukuronat, sakkarat, format, benzoat, glutamat, metansülfonat "mesilat", etansülfonat, benzensülfonat, p-

toluensülfonat ve pamoat (yani 1,1'-metilen-bis-(2-hidroksi-3-naftoat)) tuzları sayılabilir. Bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuz, başka bir molekül, örneğin bir asetat iyonunu, bir süksinat iyonunu ya da başka bir karşıt iyonu da içine alan bir yapıda olabilir. Karşıt iyon, parent

5 bileşik üzerindeki yükü stabilize eden herhangi bir organik ya da inorganik moietye olabilir. Bunun yanı sıra, bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzun yapısında birden fazla sayıda yüklü atom bulunabilir. Farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzun yapısında birden fazla sayıda yüklü atomun bulunduğu hallerde, söz konusu tuz birden fazla sayıda

10 karşıt iyonla sahip olabilir. Sonuç olarak, bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuz, bir veya daha fazla sayıda yüklü atom ve/veya bir veya daha fazla sayıda karşıt iyon içerebilir.

İstenen farmasötik açıdan kabul edilebilir tuz, sektörde kullanılan

15 uygun herhangi bir yöntem ile hazırlanabilir. Örneğin, hidroklorik asit, hidrobromik asit, sülfürik asit, nitrik asit, metansülfonik asit, fosforik asit veya benzeri bir inorganik asitle ya da asetik asit, maleik asit, süksinik asit, mandelik asit, fumarik asit, malonik asit, piruvik asit, oksalik asit, glikolik asit, salisilik asit, bir piranosidil asit,

20 örneğin, glukuronik asit ya da galakturonik asit, bir alfa hidroksi asit, örneğin sitrik asit ya da tartarik asit, bir amino asit, örneğin aspartik asit ya da glutamik asit, bir aromatik asit, örneğin benzoik asit ya da sinamik asit, bir sülfonik asit, örneğin p-toluensülfonik asit ya da etansülfonik asit veya benzeri bir organik asitle serbest bazı işleme

25 tâbi tutmak suretiyle hazırlanabilir. Bazı farmasötik bileşiklerden farmasötik açıdan faydalı veya kabul edilebilir tuzlar oluşturmak için kullanıma genelde uygun oldukları düşünülen asitler, örneğin aşağıda belirtilen eserlerde tartışılmaktadırlar: P. Stahl et al, Camille G. (eds.)

- Handbook of Pharmaceutical Salts. Properties, Selection and Use. (2002) Zurich: Wiley-VCH; S. Berge et al, Journal of Pharmaceutical Sciences (1977) 66(1) 1 19; P. Gould, International J. of Pharmaceutics (1986) 33 201 217; Anderson et al, The Practice of Medicinal Chemistry (1996), Academic Press, New York; Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., (1995) Mack Publishing Co., Easton PA; ve The Orange Book (Food & Drug Administration, Washington, D.C.'nin web sitesinde yer almaktadır).
- 10 "Farmasötik açıdan kabul edilebilir" tabiri, atıf yapılan maddenin ya da bileşimin formülasyonda bulunan diğer bileşenlerle ve/veya tedavinin uygulanacağı memeliyle kimyasal ve/veya toksikolojik açıdan geçimli olması gerektiğine işaret eder.
- 15 Burada geçen "sinerjistik" terimi, tek başlarına uygulanan iki veya daha fazla sayıda ajanın aditif etkilerinden daha etkin ve etkili olan bir terapötik kombinasyonu nitelemek için kullanılmaktadır. Formül I'e sahip olan bir bileşik veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu ile GDC-0973 ve PD-0325901'den biri arasındaki bir sinerjistik
- 20 etkileşim, burada açıklanan eseylerden elde edilen sonuçlar temelinde belirlenebilir. Bu eseylerin sonuçları, bir Kombinasyon İndeksi elde etmeye odaklı CalcuSyn yazılımı ile Chou ve Talaly kombinasyon yöntemi ve Doz-Etki Analizi (Chou and Talalay, 1984, Adv. Enzyme Regul. 22:27-55) gerçekleştirilerek analiz edilebilirler. Burada sunulan
- 25 kombinasyonlar bir dizi farklı esey sisteminde değerlendirilmişlerdir ve elde edilen veriler, antikanser ajanları arasındaki sinerji, aditivite ve antagonizmayı ölçmeye yarayan bir standart program kullanılarak analiz edilebilir. Chou ve Talalay imzalı "New Avenues in

Developmental Cancer Chemotherapy', Academic Press, 1987" eserinin ikinci bölümünde örnek bir program anlatılmaktadır. 0,8'den küçük Kombinasyon İndeksi değerleri sinerji bulunduğu, 1,2'den büyük değerler antagonizma söz konusu olduğuna ve 0,8 ile 1,2 arasında kalan değerler aditif etkilerin bulunduğu işaret ederler. Kombinasyon tedavisi "sinerji" sağlayabilir ve "sinerjistiklik" söz konusu olduğunu, yani etkin bileşenler birlikte kullanıldıklarında ulaşılan etkinin söz konusu bileşikler ayrı ayrı kullanılarak elde edilen etkilerin toplamından büyük olduğunu kanıtlayabilir. Etkin bileşenler (1) bir kombine, birim dozaj formülasyonu halinde birlikte formüle edilip eşzamanlı uygulandıklarında veya verildiklerinde, (2) ayrı formülasyon halinde dönüşümlü veya birbirlerine paralel olarak verildiklerinde ya da (3) belirli başka bir rejimle verildiklerinde bir sinerjistik etkiye ulaşılabilir. Dönüşümlü tedaviye istinaden, bileşikler sırayla, örneğin ayrı enjektörlerle yapılan farklı enjeksiyonlar halinde uygulandıklarında veya verildiklerinde bir sinerjistik etkiye ulaşılabilir. Genelde, dönüşümlü tedavi sırasında her etkin bileşenin etkin dozajı sırayla, yani art arda uygulanırken, kombinasyon tedavisinde iki veya daha fazla sayıda etkin bileşenin etkin dozajları birlikte uygulanırlar. Kombinasyon etkileri, hem BLISS bağımsızlık modeli hem de en yüksek tek ajan (HSA) modeli kullanılarak değerlendirilmişlerdir (Lehár et al. 2007, Molecular Systems Biology 3:80). BLISS skorlarıyla tek ajan uygulamalarına kıyasla elde edilen kuvvetlenme derecesi ölçülür ve bir (0'dan büyük olan) pozitif BLISS skoru basit aditiviteden daha fazlasının söz konusu olduğunu gösterir. Bir 250'den büyük kümülatif pozitif BLISS skoru, test edilen konsantrasyon aralıkları dahilinde kuvvetli bir sinerji söz konusu olduğu şeklinde değerlendirilir. Bir (0'dan büyük) HSA skoru,

mütekabil konsantrasyonlarda tek ajan kullanımlarında kaydedilen cevapların maksimumundan daha büyük bir kombinasyon etkisi söz konusu olduğuna işaret eder.

- 5 Tümör büyümesi inhibisyonunu (TGI) ölçme yöntemleri sektörde bilinirler. Bir örnek yöntemde, tedaviden önce ve sonra hastanın ortalama tümör hacimleri belirlenir ve daha sonra kıyaslanır. Tümör hacimleri, sektörde bilinen herhangi bir yöntemle, örneğin UltraCal IV kumpas (Fred V. Fowler Company) veya PET (pozitron emisyon tomografisi) ya da başka bir yöntem kullanılarak iki boyut (uzunluk ve genişlik) cinsinden ölçülebilirler. Tümör hacmi (mm^3) = (uzunluk x genişlik²) x 0,5 denklemi kullanılabilir. Tümör hacimlerinin birden çok zaman aralığında ölçümü bir karma modellenli Lineer Karma Etkiler (LME) yaklaşımı (Pinheiro et al. 2009) kullanılarak gerçekleştirilebilir. Bu yaklaşımla, tekrarlanan ölçümlerin hepsi (ve birden çok hasta) dikkate alınıp değerlendirilebilir. Kübik regresyon splaynları kullanılarak, her doz seviyesindeki tümör hacmine karşı zaman için lineer olmayan bir profil oluşturulabilir. Daha sonra bu lineer olmayan profiller karma model kapsamında dozla ilişkilendirilebilirler. Vehiküle göre bir yüzde değeri olarak tümör büyümesi inhibisyonu değeri, aşağıda gösterilen denklem kullanılarak, vehiküle göre beher günde oluşturulan eğri altında kalan alanın (AUC) yüzde cinsinden değeri olarak hesaplanabilir:

$$\% TGI = 100 \left[1 - \left(\frac{AUC_{tedavi/gün}}{AUC_{vehikül/gün}} \right) \right]$$

Bu denklem kullanılarak elde edilen bir %100 TGI değeri tümör stazına, yaklaşık %1'den büyük fakat yaklaşık %100'den küçük bir değer tümör büyümesi inhibisyonuna ve yaklaşık %100'den büyük bir değer tümör regresyonuna işaret eder.

5

BİR FORMUL I BİLEŞİĞİNİN HAZIRLANMASI

Formül I'e sahip olan bileşik ve onun tuzları, WO 2008/006040 sayılı Uluslararası Patent Başvurusunda ya da aşağıdaki Örnek I'de tarif edildiği gibi hazırlanabilir. Formül I bileşikleri hazırlanırken, ara ürünlerin uzak fonksiyonallitelerinin (örneğin primer veya sekonder aminler ve benzeri) korunması gerekebilir. Bu tarz bir korumaya ihtiyaç duyulup duyulmadığı, uzak fonksiyonallitenin niteliğine ve hazırlama yöntemlerinin koşullarına bağlı olarak anlaşılabacaktır. Uygun amin-koruma grupları (NH-Pg) arasında, asetil, trifloroasetil, t-bütoksikarbonil (BOC), benziloksikarbonil (CBz) ve 9-florenilmetilenoksikarbonil (Fmoc) bulunur. Sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanlar bu gibi bir korumanın sağlanmasının gerekip gerekmediğini kolayca belirleyebilirler. Koruma grupları ve onların kullanımı hakkında genel bir tarif ve açıklama için bkz: T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, New York, 1991.

25

AYIRMA YÖNTEMLERİ

Formül I bileşiklerini hazırlamak için kullanılan sentez yöntemlerinin herhangi birinde, reaksiyon ürünlerini birbirlerinden ve/veya başlangıç maddelerinden ayırmak fayda sağlayabilir. Her basamak veya

basamak serisinin istenen ürünleri, ulaşılan ürün, sektörde yaygın kullanılan tekniklerden faydalanılarak istenen homojenlik derecesine ulaşılan dek ayrıştırılır ve/veya saflaştırılırlar. Bu gibi standart ayırma teknikleri arasında, çok-fazlı ekstraksiyon, bir çözücü veya
 5 çözücü karışımından kristalizasyon, distilasyon, süblimasyon ve kromatografi bulunur. Farklı birçok kromatografi yönteminden herhangi biri uygulanabilir; bunlar arasında örneğin şunlar sayılabilir: ters-faz ve normal faz; boyut dışlama; iyon değiştirme; yüksek, orta ve düşük basınçlı sıvı kromatografisi yöntemleri ve aparatı; küçük ölçekli
 10 analitik; benzetimli hareketli yatak (SMB) ve preparatif ince veya kalın tabaka kromatografisi; ve ayrıca küçük ölçekli ince tabaka ve flaş kromatografisi teknikleri.

Bir diğer ayırma yöntemi çeşidi, bir istenen ürün, reaksiyona
 15 girmemiş başlangıç maddesi, reaksiyon yan ürünü ya da benzeri başka bir maddeye bağlanma veya onu ayrılabilir hale getirme kabiliyetine sahip olmasından dolayı seçilen bir reaktifin bahsi geçen maddenin bulunduğu bir karışıma uygulanmasına dayanır. Bu gibi reaktifler arasında, aktif karbon, moleküler elek, iyon değiştirme vasatları ve
 20 benzeri adsorbanlar ve absorbanlar bulunur. Reaktifler, alternatif olarak, bir bazık madde söz konusu ise asitleri, bir asidik madde söz konusu ise bazları, antikorların örnek gösterilebileceği bağlanma reaktiflerini, bağlanma proteinlerini, taç eterler gibi seçici şelatörleri, sıvı/sıvı iyon değiştirme reaktiflerini (LIX) veya benzeri başka
 25 unsurları teşkil edebilirler.

Ayırma yöntemi olarak hangi yöntemin kullanılacağı, ayrılması hedeflenen maddelerin tabiatına bağlıdır. Örnek vermek gerekirse,

distilasyon ve süblimasyonda kaynama noktası ve molekül ağırlığı, kromatografide polar fonksiyonel grupların bulunup bulunmaması, çok-fazlı ekstraksiyonda maddelerin asidik ve bazik vasatlardaki stabilitesi ve benzeri faktörler önem arz eder. Sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanlar, istenen sonuca ulaşmak için hangi tekniklerin daha verimli ve faydalı olacağını anlayacaklardır.

Diastereomerik karışımlar, sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanlarca iyi bilinen yöntemler, örneğin kromatografi ve/veya fraksiyonel kristalizasyon yöntemleri kullanılarak, fiziksel kimyasal farkları temelinde diastereomerlerine ayrılabilirler. Enantiyomerler, enantiyomerik karışımın optik bakımdan aktif uygun bir bileşikle (örneğin bir kiral alkol veya Mosher asit klorür gibi bir kiral yardımcıyla) tepkimeye sokularak bir diastereomerik karışıma dönüştürülmesi, diastereomerlerin ayrılması ve münferit diastereoizomerlerin mütekabil saf enantiyomerlere dönüştürülmesi (örneğin hidroliz) yoluyla ayrılabilirler. Ayrıca, buluşa konu olan bileşiklerden bazıları atropizomer (örneğin substitüsyonlu biariller) olabilirler ve bu buluşun bir parçası olarak değerlendirilirler.

Enantiyomerler, bir kiral HPLC kolonu kullanılarak da ayrılabilirler.

Bir tekil stereoizomer, örneğin mütekabil stereoizomeri hemen hemen hiç bulunmayan bir enantiyomer, rasemik karışımın örneğin optik açıdan aktif ayrıştırıcı ajanlar yardımıyla diastereomerler oluşturulmasına dayanan bir yöntem kullanılarak ayrıştırılması yoluyla elde edilebilir (Eliel, E. and Wilen, S. "Stereochemistry of Organic Compounds," John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994; Lochmuller, C. H., J. Chromatogr., (1975) 113(3):283-302). Buluşa

konu olan kiral bileşiklerden oluşan rasemik karışımlar, uygun herhangi bir yöntem kullanılarak ayrıştırılabilir ve izole edilebilirler ve bu gibi yöntemler arasında aşağıda belirtilenler sayılabilir: (1) kiral bileşiklerle iyonik diastereomerik tuzların oluşturulması ve bunların fraksiyonel kristalizasyon veya başka yöntemler tatbik edilerek ayrıştırılması; (2) derive edici reaktiflerle diastereomerik bileşiklerin oluşturulması, diastereomerlerin ayrıştırılması ve bunların saf stereoizomerlere dönüştürülmesi; ve (3) büyük ölçüde saf veya zenginleştirilmiş stereoizomerlerin doğrudan doğruya kiral koşullar altında ayrıştırılması. Bkz: "Drug Stereochemistry, Analytical Methods and Pharmacology," Irving W. Wainer, Ed., Marcel Dekker, Inc., New York (1993). Yöntem (1)'de, diastereomerik tuzlar, brusin, kinin, efedrin, striknin, α -metil- β -feniletilamin (amfetamin) ve benzeri enantiyomerik olarak saf kiral bazların karboksilik asit ve sülfonik asit gibi asidik fonksiyonalite taşıyan asimetric bileşiklerle tepkimeye sokulması yoluyla oluşturulabilirler. Diastereomerik tuzlar, fraksiyonel kristalizasyon veya iyonik kromatografi yoluyla ayrışmaları yönünde indüklenebilirler. Amino bileşiklerinin optik izomerlerinin ayrıştırılması için kamforsülfonik asit, tartarik asit, mandelik asit veya laktik asit gibi kiral karboksilik veya sülfonik asitlerin ilave edilmesi de diastereomerik tuzların oluşmasını sağlayabilir.

Alternatif olarak, yöntem (2)'de, ayrıştırılması hedeflenen substrat bir kiral bileşiğin bir enantiyomeri ile tepkimeye sokularak bir diastereomerik çift oluşturulur (E. and Wilen, S. "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., 1994, p. 322). Diastereomerik bileşikler, asimetric bileşiklerin metil derivatları gibi

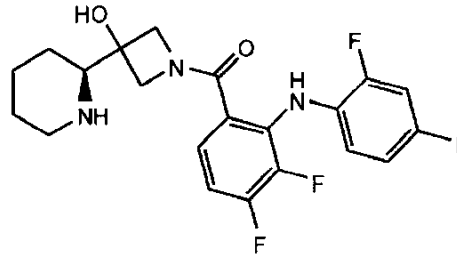
- enantiyomerik olarak saf kiral derive edici reaktiflerle tepkimeye sokulması ve ardından diastereomerler ayrıştırılıp hidrolize tâbi tutularak saf veya zenginleştirilmiş enantiyomer elde edilmesi yoluyla oluşturulabilirler. Bir optik saflık belirleme yönteminde, rasemik
- 5 karışımın bir mentil ester, örneğin bir baz eşliğinde (-) mentil kloroformat ya da Mosher esteri, yani α -metoksi- α -(triflorometil)fenil asetat (Jacob III. J. Org. Chem., (1982) 47:4165) gibi kiral esterleri oluşturulur ve iki atropizomerik enantiyomer veya diastereomerin bulunup bulunmadığı yönünden ^1H NMR spektrumu analiz edilir.
- 10 Atropizomerik bileşiklerin stabil diastereomerleri, atropizomerik naftil-izokinolinleri ayrıştırma amaçlı yöntemler tatbik edilerek normal- ve ters-faz kromatografisi yoluyla ayrıştırılıp izole edilebilirler (WO 96/15111). Yöntem (3)'te, iki enantiyomerden oluşan bir rasemik karışım, bir kiral sabit faz kullanılarak
- 15 kromatografi yoluyla ayrıştırılabilir ("Chiral Liquid Chromatography" (1989) W. J. Lough, Ed., Chapman and Hall, New York; Okamoto, J. of Chromatogr., (1990) 513:375-378). Zenginleştirilmiş veya saflaştırılmış enantiyomerler, asimetric karbon atomları bulunan diğer kiral molekülleri ayırt etmek maksadıyla, optik çevirme ve dairesel
- 20 dikroizm gibi yöntemler uygulanarak ayırt edilebilirler.

KEMOTERAPÖTİK AJANLAR

- Belirli kemoterapötik ajanlar, formül I'e sahip olan bir bileşik veya
- 25 onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu ile kombinasyon halinde kullanıldıklarında in vitro ve in vivo ortamlarda hücresel proliferasyonu inhibe etme konusunda şaşırtıcı ve beklenmedik

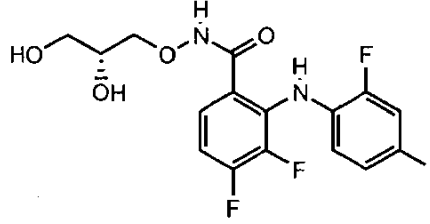
özellikler ortaya koymuşlardır. Bu gibi kemoterapötik ajanlar arasında, GDC-0973 ve PD-0325901 ve bulunmaktadır.

XL-518 adıyla da bilinen GDC-0973, insan tümörlerinde sıklıkla aktive olan RAS/RAF/MEK/ERK yolağının kilit bileşenlerinden biri olan mitojen aktive protein kinaz kinaz (MAPKK) adıyla da bilinen MEK'in seçici bir inhibitörüdür. MEK/ERK yolağının uygunsuz aktivasyonu, eksojen büyüme faktörlerinin bulunmadığı hallerde hücre büyümesini destekler ve artırır. GDC-0973'ün solid tümörlere karşı değerlendirildiği bir Faz I klinik deneyi halen devam etmektedir. GDC-0973, WO 2007044515 (A1) sayılı Uluslararası Patent Başvurusunda tarif edildiği gibi hazırlanabilir. GDC-0973'ün adı şudur: (S)-(3,4-difloro-2-(2-floro-4-iyodofenilamino)fenil)(3-hidroksi-3-(piperidin-2-il)azetidin-1-il)metanon; ve yapısı aşağıda gösterildiği gibidir:



PD-0325901 (CAS Kayıt No. 391210-10-9, Pfizer), kanser hastalıkları için bir potansiyel oral tablet tedavisi olan bir ikinci jenerasyon, ATP kompetitif olmayan, allosterik MEK inhibitörüdür (US 6960614; US 6972298; US 2004/147478; US 2005/085550). Meme tümörleri, kolon tümörleri ve melanomun potansiyel tedavisine ilişkin olarak Faz II klinik deneyleri gerçekleştirilmiştir. PD-0325901, (R)-N-(2,3-

dihidroksipropoksi) -3,4-difloro -2-(2-floro-4-iyodofenilamino) benzamid olarak adlandırılmaktadır ve aşağıda gösterilen yapıya sahiptir:



5

FARMASÖTİK BİLEŞİMLER

Buluşa konu olan farmasötik bileşimler veya formülasyonlar arasında, formül I bileşiğinin veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzunun, GDC-0973'ün ve bir veya daha fazla sayıda farmasötik açıdan kabul edilebilir taşıyıcı, glidant, seyreltici veya yardımcı maddenin yer aldığı kombinasyonlar bulunur.

Bir örnekte, GDC-0068 veya onun bir tuzu ile bir veya daha fazla sayıda farmasötik açıdan kabul edilebilir taşıyıcı, glidant, seyreltici veya yardımcı maddenin yer aldığı oral uygulamalı bir birinci formülasyon ve GDC-0973 veya onun bir tuzu ile bir veya daha fazla sayıda farmasötik açıdan kabul edilebilir taşıyıcı, glidant, seyreltici veya yardımcı maddenin yer aldığı oral uygulamalı bir ikinci formülasyon bulunur.

Formül I bileşiği veya onun farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu ile GDC-0973, solvatsız formda bulunabilecekleri gibi, su, etanol ve benzeri farmasötik açıdan kabul edilebilir çözücüler ile birlikte

25

solvatlı formda da bulunabilirler ve bu buluşun hem solvatlı formları hem de solvatsız formları içine alan bir kapsama sahip olması hedeflenmektedir.

- 5 Formül I bileşiği veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu ve GDC-0973, farklı tautomerik formlarda da bulunabilirler ve bu gibi tautomerik formların hepsi bu buluşun kapsamı içerisinde sayılır. "Tautomer" ya da "tautomerik form" terimi, farklı enerji değerleri sergileyen ve bir düşük enerji bariyeri aracılığıyla birbirlerine
- 10 dönüştürülebilecek olan yapısal izomerlere atıf yapar. Örneğin, (prototropik tautomerler olarak da bilinen) proton tautomerleri, keto-enol veya imin-enamin izomerizasyonu gibi, bir proton migrasyonu aracılığıyla birbirlerine dönüştürülebilirler. Valans tautomerleri ise, bağlanma elektronlarının bazılarının yeniden düzenlenmesi yoluyla
- 15 karşılıklı dönüştürülebilirler.

- Farmasötik bileşimler, hem bulk bileşimi, hem de farmasötik açıdan etkin olmayan yardımcı maddeler, seyrelticiler, taşıyıcılar veya glidantlar ile birlikte bir formül I bileşiği veya onun bir farmasötik
- 20 açıdan kabul edilebilir tuzu ve GDC-0973 dahil birden fazla sayıda (örneğin iki) farmasötik açıdan etkin maddeden oluşan ayrı dozaj birimlerini kapsarlar. Bulk bileşim ve her bir ayrı dozaj birimi, yukarıda bahsi geçen farmasötik açıdan etkin maddelerden sabit miktarlarda içerebilir. Bulk bileşim, henüz ayrı münferit dozaj
- 25 birimleri haline büründürülmemiş olan üründür. Tablet, hap, kapsül ve benzeri bir oral dozaj birim, bir temsili dozaj birimi olarak gösterilebilir. Buluşa konu olan bir farmasötik bileşimi uygulamak suretiyle bir hastayı tedavi etmeye dayanan burada açıklanan tedavi

yöntemi de benzer şekilde bulk bileşim ve münferit ayrı dozaj birimleri ile yapılabilecek uygulamaları ayrı ayrı içine alan bir anlam ve kapsamda tasarlanmıştır.

- 5 Farmasötik bileşimler, bir veya daha fazla sayıda atomun doğada genelde bulundukları atomik kütle veya kütle numarasından farklı bir atomik kütle veya kütle numarasına sahip olan bir atomla ikame edilmiş olması hariç burada açıklanan bileşiklerle özdeş olan izotopik olarak etiketli bileşikleri de kapsar. Belirtilen belirli bir atom veya
- 10 elementin bütün izotopları, bu buluşa konu olan bileşiklerin ve onların kullanım şekillerinin kapsamı dahilinde sayılırlar. Bileşiklere dahil edilebilecek örnek niteliğindeki izotoplar arasında, ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{18}F , ^{36}Cl , ^{123}I ve ^{125}I gibi hidrojen, karbon, nitrojen, oksijen, fosfor, sülfür, flor, klor ve iyot
- 15 izotopları bulunur. Belirli izotopik olarak etiketli buluşa uygun bileşikler (örneğin ^3H ve ^{14}C ile etiketli olanlar), bileşik ve/veya substrat doku dağılım eseylerinde kullanıma uygundur. Tritiyumlu (^3H) ve karbon-14 (^{14}C) izotopları, hazırlanmaları ve tespit edilmeleri kolay olduğu için faydalıdır. Ayrıca, döteryum (^2H) gibi daha ağır
- 20 izotoplarla ikame yapılması, söz konusu durumda metabolik stabilite daha kuvvetli olacak olmasına bağlı olarak belirli terapötik avantajlar sağlayabilir (örneğin, in vivo yarı ömrü artırabilir ya da dozaj gerekliliklerinin azalmasını sağlayabilir) ve dolayısıyla bazı durumlarda tercih edilebilir. ^{15}O , ^{13}N , ^{11}C ve ^{18}F gibi pozitron yayan
- 25 izotoplar, substrat reseptörü kullanımını incelemek amacıyla pozitron emisyon tomografisinde (PET) kullanılabilirler.

Formül I bileşiği veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu

ile GDC-0973, insanlar da dahil olmak üzere memelilerde seçilen kanser hastalıklarından birinin (profilaktik tedaviyi de içine alan bir anlamda) terapötik tedavisine yönelik bir terapötik kombinasyonda kullanılmak üzere standart farmasötik pratiğe göre formüle edilirler.

- 5 Buluşun yapılarından birinde, bir veya daha fazla sayıda farmasötik açıdan kabul edilebilir taşıyıcı, glidant, seyreltici veya yardımcı madde ile birlikte bir formül I bileşiği veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzunu ve GDC-0973 içeren bir farmasötik bileşim ortaya koyulmaktadır.

10

Kullanıma uygun taşıyıcılar, seyrelticiler ve yardımcı maddeler sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanlarca iyi bilinmekte olup, bu tarz maddeler arasında örneğin karbonhidratlar, vakslar, suda çözünür ve/veya şişebilir polimerler, hidrofilik veya hidrofobik maddeler,

- 15 jelatin, yağlar, çözücüler, su ve benzerleri bulunur. Kullanılacak olan taşıyıcı, seyreltici veya yardımcı madde, buluşa konu olan bileşiğin hangi yolla ve amaçla uygulanacağına bağlı olacaktır. Çözücüler, genelde, sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanların memelilere yönelik uygulama için güvenilir kabul ettikleri (GRAS) çözücüler arasından seçilirler. Genel itibarıyla, güvenli çözücüler, suyun ve suda çözünür veya suyla karışabilir nitelikte olan diğer toksik olmayan çözücülerin örnek gösterilebileceği toksik olmayan aköz çözücülerdir.

- 20 Uygun aköz çözücüler arasında, su, etanol, propilen glikol, polietilen glikoller (örneğin PEG 400, PEG 300), benzeri maddeler ve bunların
- 25 karışımları bulunur. Formülasyonlarda bir veya daha fazla sayıda tampon, stabilize edici ajan, yüzey aktif madde, ıslatıcı ajan, kayganlaştırıcı ajan, emülsifiye edici, süspanse edici ajan, koruyucu, antioksidan, opaklaştırıcı ajan, glidant, işleme yardımcısı,

renklendirici, tatlandırıcı, koku verici ajan, aroma maddesi ve şık bir ilaç (örneğin buluşa konu olan bir bileşik ya da onun bulunduğu bir farmasötik bileşim) sunumu sağlayacak ya da farmasötik ürünün (ilaç) üretiminde yardımcı olacak bilinen başka katkı maddeleri de bulunabilir.

Formülasyonlar, konvansiyonel çözündürme ve karıştırma prosedürleri uygulanarak hazırlanabilirler. Örneğin, bulk etkin madde (yani buluşa konu olan bileşik ya da onun stabilize formu, örneğin bir siklodekstrin derivatı veya bilinen başka bir kompleksleştirme ajanı ile oluşturulmuş bir kompleks), yukarıda açıklanan yardımcı maddelerden birinin veya birden fazlasının eşliğinde uygun bir çözücüde çözündürülür. Buluşa konu olan bileşik, normalde, ilaç dozajının kolayca kontrol altında tutulabilmesini sağlayacak ve hastanın reçete edilen dozlama rejimine uyabilmesine olanak sağlayacak farmasötik dozaj formlarında formüle edilir.

Uygulama için hazırlanan farmasötik bileşim (veya formülasyon), ilacın hangi metotla uygulanacağına bağlı olarak çeşitli farklı yollarla ambalajlanabilir. Piyasaya sürülen bir ürünün bünyesinde genelde bir kap ve bu kabın içerisinde uygun bir formda farmasötik formülasyon bulunur. Uygun kap çeşitleri sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanlarca iyi bilinmekte olup, bunlara örnek olarak şişe (plastik ve cam), saşe, ampul, plastik torba, metal silindir ve benzeri malzemeler gösterilebilir. Kapta, uygun olmayan kişilerin ambalajın içindekilere erişimini önlemeye yarayan kurcalamaya dayanıklı bir düzenek de bulunabilir. Buna ek olarak, kabın üzerine kabın içindekileri

tanımlayan bir etiket yapıştırılır. Bu etikete, gerekiyorsa ürünle ilgili uyarılar da yazılabilir.

Bileşiklerin farmasötik formülasyonları, çeşitli farklı uygulama yolları ve çeşitlerine uygun farklı formlarda hazırlanabilirler. Örneğin, istenen saflık derecesine sahip olan formül I bileşiği veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu, bir liyofilize formülasyon, öğütülmüş toz ya da bir aköz çözelti formunda isteğe bağlı olarak farmasötik açıdan kabul edilebilir seyrelticiler, taşıyıcılar, yardımcı maddeler veya stabilizatörlerle (Remington's Pharmaceutical Sciences (1995) 18th edition, Mack Publ. Co., Easton, PA) karıştırılabilir. Formülasyon çalışması, bileşiğin istenen saflık derecesinde ve uygun pH'de ortam sıcaklığı altında fizyolojik açıdan kabul edilebilir taşıyıcılarla, yani kullanıldıkları dozajlar ve konsantrasyonlarda alıcılar için toksik olmayan taşıyıcılarla karıştırılması yoluyla gerçekleştirilebilir. Formülasyonun pH seviyesi, temelde bileşiğin kullanım şekline ve konsantrasyonuna bağlı olmakla birlikte, yaklaşık 3 ile yaklaşık 8 arası değerlerde seyredebilir.

Farmasötik formülasyonun steril olması tercih edilir. Daha somut ifade etmek gerekirse, in vivo uygulama için kullanılacak olan formülasyonlar steril olmalıdırlar. Bu sterilizasyon, formülasyonu steril filtrasyon membranlarından geçirerek filtrasyona tâbi tutmak suretiyle kolayca sağlanabilir.

25

Farmasötik formülasyon bir katı bileşim, bir liyofilize formülasyon veya bir aköz çözelti olarak saklanabilir.

Farmasötik formülasyonlar, iyi tıp uygulamasına uygun bir tarzda, yani söz konusu ilkelere uygun miktarlar, konsantrasyonlar, programlar, seyir, vehiküller ve uygulama yolu ile dozlanacak ve uygulanacaklardır. Bu bağlamda dikkate alınması gereken faktörler arasında, tedavi edilmesi hedeflenen hastalığın ne olduğu, tedavi edilmesi hedeflenen memelinin türü, tedavi edilecek hastanın klinik durumu, hastalığın sebebi, ajanın uygulanacağı yer, uygulama yöntemi, uygulama programı ve tıbbi uygulamayı yürütecek uzmanlarca bilinen başka faktörler bulunur. Uygulanacak olan bileşiğin "terapötik açıdan etkin miktarı", bu gibi faktörler üzerine yapılan mülahazalar temelinde tayin edilecek ve koagülasyon faktörü aracılı hastalığı önlemek, hafifletmek ya da tedavi etmek için gereken asgari miktar olacaktır. Bu miktarın konakçı için olan veya konakçıyı kanamaya karşı istatistiksel açıdan anlamlı ölçüde daha duyarlı hale getiren seviyeden düşük olması tercih edilir.

Kabul edilebilir seyrelticiler, taşıyıcılar, yardımcı maddeler ve stabilizatörler, kullanıldıkları dozajlar ve konsantrasyonlarda alıcılar için toksik olmayan maddeler olup, bunlar arasında fosfat, sitrat ve başka organik asitlerin örnek gösterilebileceği tamponlar; askorbik asit ve metioninin örnek gösterilebileceği antioksidanlar; koruyucular (örneğin oktadesildimetilbenzil amonyum klorür; heksametonyum klorür; benzalkonyum klorür, benzetonyum klorür; fenol, bütıl veya benzil alkol; alkil parabenler, örneğin metil veya propil paraben, katekol; rezorkinol; sikloheksanol; 3-pentanol; ve m-kresol); düşük molekül ağırlıklı (yaklaşık 10 artıktan daha kısa) polipeptidler; proteinler, örneğin serum albümini, jelatin veya immünoglobulinler; polivinilpirolidon gibi hidrofilik polimerler; glisin, glutamin,

asparajin, histidin, arjinin veya lizin gibi amino asitler; glukoz, mannoz veya dekstrinler gibi monosakkaritler, disakkaritler ve diğer karbonhidratlar; EDTA gibi şelatlama ajanları; sukroz, mannitol, trehaloz veya sorbitol gibi şekerler; sodyum gibi tuz-oluşturucu karşı-
5 iyonlar; metal kompleksleri (örneğin Zn-protein kompleksleri); ve/veya TWEEN™, PLURONICS™ veya polietilen glikol (PEG) gibi iyonik olmayan yüzey aktif maddeler sayılabilir. Etkin farmasötik bileşenler, örneğin koaservasyon teknikleriyle ya da arayüzey polimerizasyonu ile hazırlanan mikrokapsüllerin, örneğin sırasıyla
10 hidroksimetilselüloz ya da jelatin-mikrokapsüller ve poli-(metilmetakrilat) mikrokapsüllerin içinde, koloidal ilaç taşıma sistemlerinin (örneğin lipozomlar, albümin mikrosferler, mikroemülsiyonlar, nano-partiküller ve nanokapsüller) içinde ya da makroemülsiyonların içinde hapsedilmiş halde de sunulabilirler. Bu
15 teknikler, "Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, (1995) Mack Publ. Co., Easton, PA" eserinde açıklanmaktadır.

Bir formül I bileşiği veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzundan sürekli-salımlı preparatlar hazırlanabilir. Sürekli-salımlı
20 preparatlara verilebilecek uygun örneklerden biri bir Formül I bileşiği veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzunun bulunduğu katı hidrofobik polimerlerden oluşan yarı-geçirgen matrisler olup, bu matrisler şekillendirilmiş materyaller formunda, örneğin film ya da mikrokapsül formunda kullanılırlar. Sürekli-salımlı matrislere örnek
25 olarak polyeşterler, hidrojeller (örneğin poli(2-hidroksietil-metakrilat) ya da poli(vinilalkol)), polilaktidler (US 3773919), L-glutamik asit ve gama-etil-L-glutamat kopolimerleri, bozundurulamayan etilen-vinil asetat, bozundurulabilir laktik asit-glikolik asit kopolimerleri, örneğin

LUPRON DEPOT™ (laktik asit-glikolik asit kopolimeri ve löprolid asetatın oluşan enjekte edilebilir mikrosferler) ve poli-D-(-)-3-hidroksibütirik asit gösterilebilir.

- 5 Farmasötik formülasyonlar, burada ayrıntılarıyla açıklanan uygulama yolları için uygun olan formülasyonlardır. Formülasyonlar birim dozaj formunda sunulabilir ve eczacılık sektöründe iyi bilinen uygun yöntemlerden herhangi biriyle hazırlanabilirler. İlgili teknikler ve formülasyonlar genel hatlarıyla "Remington's Pharmaceutical Sciences 18th Ed. (1995) Mack Publishing Co., Easton, PA" eserinde bulunabilirler. Bu yöntemlerde, etkin bileşenin bir veya daha fazla sayıda yardımcı bileşeni teşkil eden taşıyıcı ile bir araya getirildiği bir basamak bulunur. Formülasyonlar genelde etkin bileşenin sıvı taşıyıcılar veya ince parçalı katı taşıyıcılar ya da hem sıvı hem de katı taşıyıcılar ile üniform ve yoğun ölçüde bir araya getirilmesi ve daha sonra gerekiyorsa ürünün şekillendirilmesi yoluyla hazırlanırlar.

- 20 Bir formül I bileşiği veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu ve/veya kemoterapötik ajanın yer aldığı oral uygulama için uygun formülasyonlar, her birinde önceden belirlenmiş miktarda bir formül I bileşiği veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu ve/veya bir kemoterapötik ajan bulunan haplar, sert veya yumuşak kapsüller, örneğin jelatin kapsüller, kaşeler, yuvarlak yassı haplar, lozanjlar, aköz veya yağ süspansiyonları, dağılabilir tozlar veya granüller, emülsiyonlar, şuruplar veya eliksirler gibi ayrı birimler halinde hazırlanabilirler. Formül I bileşiği veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzundan kullanılacak miktar ile kemoterapötik ajandan kullanılacak miktar, bir birleşik formülasyon olarak bir hap,

kapsül, çözelti veya süspansiyon içerisinde birlikte formüle edilebilir. Alternatif olarak, formül I bileşiği veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu ile kemoterapötik ajan, dönüşümlü uygulama ile kullanılmak üzere, bir hap, kapsül, çözelti veya süspansiyonda
5 birbirlerinden ayrı formüle edilebilirler.

Formülasyonlar, farmasötik bileşimlerin üretimine istinaden sektörde bilinen uygun herhangi bir yöntemden istifade edilerek hazırlanabilirler ve bu tarz bileşimlere, lezzetli ve yenilebilir bir
10 preparat elde etmek maksadıyla tatlandırıcı maddeler, aroma maddeleri, renklendiriciler ve koruyucuların aralarında bulunduğu bir veya daha fazla sayıda madde katılabilir. Sıkıştırılmış tabletler, isteğe bağlı olarak bir bağlayıcı, kayganlaştırıcı, inert seyreltici, koruyucu, yüzey aktif madde ya da dağıtıcı madde ile birlikte karıştırılmış halde
15 olan ve serbest akışkan bir formda, örneğin toz ya da granüller formunda bulunan etkin bileşenin uygun bir makinede sıkıştırılması yoluyla hazırlanabilirler. Kalıplanmış tabletler, bir inert sıvı seyreltici ile nemlendirilmiş haldeki toz halinde etkin bileşenden oluşan bir karışımın uygun bir makinede kalıplanması yoluyla yapılabilirler.

20

Tabletler, isteğe bağlı olarak kaplanabilir veya çizilebilirler ve isteğe bağlı olarak, etkin bileşenin tabletten yavaş veya kontrollü bir ölçüde salınmasını sağlayacak bir şekilde formüle edilebilirler. Tablet formundaki bir farmasötik formülasyonda yardımcı madde olarak
25 şunlar bulunabilir: Tableti meydana getirecek olan toz halindeki ilacın bulk hacmini artırmak için kullanılan dolgu maddesi (veya seyreltici); Tableti yutulduğunda kırılıp küçük fragmanlar haline gelmeye, ideal olarak ayrı ilaç partikülleri haline gelmeye yönlendirmek ve ilacın

hızlı çözünüp absorbe olmasını teşvik etmek için kullanılan dağıtıcılar; Granüller ve tabletlerin gerekli mekanik mukavemete sahip olmalarını sağlamak ve bir tabletin sıkıştırıldıktan sonra formunu korumasını sağlamak, öyle ki tabletin ambalajlama, sevkiyat ve rutin elleçleme faaliyetleri sırasında kırılıp bileşen tozlarına ayrılmasını önlemek için kullanılan bağlayıcı; Tableti oluşturan tozun üretim sırasındaki akışkanlığını artırmak için kullanılan glidant; Tableti oluştururken kullanılan tozun üretim sırasında tableti preslemek maksadıyla kullanılan ekipmana yapışmamasını sağlamak için kullanılan kayganlaştırıcı. Bu maddeler, toz karışımlarının preslerden geçerkenki akışkanlıklarını artırır ve bitmiş tabletler ekipmandan çıkarılırken meydana gelebilecek sürtünme ve kırılma olaylarını minimize ederler; Glidanta benzer bir işleve sahip olan ve tableti oluşturan toz ile üretim sırasında tablet basmak için kullanılan makine arasındaki yapışmayı azaltmak için kullanılan yapışma önleyici; Tabletlerle daha hoş bir tat kazandırmak ya da hoş olmayan bir tadı gizlemek maksadıyla dahil edilen aroma maddesi; Ürünün tanınmasına ve hasta uyumu sağlanmasına yardımcı olmak maksadıyla kullanılan renklendirici.

20

Etkin maddeyi, tablet üretimi için uygun toksik olmayan farmasötik açıdan kabul edilebilir yardımcı maddelerle karışık halde ihtiva eden tabletler kabul edilebilir sayılırlar. Bahsi geçen yardımcı maddeler arasında, örneğin, kalsiyum veya sodyum karbonat, laktoz, kalsiyum veya sodyum fosfat gibi inert seyrelticiler; mısır nişastası veya alginik asit gibi granüle edici ve dağıtıcı ajanlar; nişasta, jelatin veya akasya gibi bağlanma maddeleri ve magnezyum stearat, stearik asit veya talk gibi kayganlaştırıcı maddeler sayılabilir. Tabletler kaplamasız bir

25

şekilde sunulabilecekleri gibi, hedef maddenin gastrointestinal sistemde dağılıp adsorbe olmasını geciktirmek ve böylelikle daha uzun bir süre boyunca devam eden bir etki oluşmasını sağlamak maksadıyla, mikroenkapsülasyonun örnek gösterilebileceği sektörde bilinen tekniklerle kaplanarak da sunulabilirler. Örneğin, tek başına ya da bir vaks ile birlikte gliseril monostearat veya gliseril distearat gibi bir geciktirici madde kullanılabilir.

Göz veya başka harici dokuların, örneğin ağız ve cildin tedavisinde, formülasyonların etkin bileşen(ler)i örneğin %0,075 ile %20 a/a arası bir miktarda ihtiva eden bir topikal merhem veya krem formunda uygulanmaları tercih edilir. Etkin bileşenler bir merhem formunda formüle edilmişlerse, bir parafinik veya suyla karışabilir merhem bazıyla kullanılabilirler. Alternatif olarak, etkin bileşenler, bir su içinde-yağ krem bazıyla birlikte bir krem formunda formüle edilebilirler.

İstenirse, krem bazının aköz fazına bir polihidrik alkol, yani propilen glikol, bütan 1,3-diol, mannitol, sorbitol, gliserol ve (PEG 400 de dahil) polietilen glikol gibi iki veya daha fazla sayıda hidroksil grubu barındıran bir alkol ya da bunların bir karışımı katılabilir. Topikal formülasyonlarda etkin bileşenin cilde veya diğer olası etki altındaki bölgelere adsorbe olabilmesini veya nüfuz edebilmesini kolaylaştıracak bir bileşik bulunması arzu edilebilir. Bu gibi dermal penetrasyon artırıcılara örnek olarak dimetil sülfoksit ve ona benzeyen analoglar gösterilebilir.

Bir katı yağ veya bir sıvı yağ ya da hem bir katı yağ hem de bir sıvı

yağı ile en az bir adet emülsifiye ediciden oluşan bir karışımın örnek olarak gösterilebileceği bu buluşa uygun emülsiyonların yağ fazı bilinen bileşenlerden bilinen bir yolla oluşturulabilirler. Tercihen, bir stabilizatör görevi gören bir lipofilik emülsifiye edici ile birlikte bir

5 hidrofilik emülsifiye edici kullanılır. Stabilizatör(ler)le birlikte ya da stabilizatör(ler) olmadan emülsifiye edici(ler), emülsifiye edici vaks denen oluşumu meydana getirir ve bu vaks da, sıvı yağ ve katı yağ ile birlikte, krem formülasyonlarının yağlı dağınık fazını teşkil eden emülsifiye edici merhem bazını oluşturur. Formülasyonda kullanım

10 için uygun emülsifiye ediciler ve emülsiyon stabilizatörleri arasında, Tween® 60, Span® 80, setostearil alkol, benzil alkol, miristil alkol, gliseril monostearat ve sodyum lauril sülfat bulunur.

Farmasötik formülasyonların aköz süspansiyonlarında, etkin maddeler

15 aköz süspansiyonların üretimi için uygun yardımcı maddeler ile karışım halinde bulunurlar. Bu yardımcı maddelere örnek olarak, sodyum karboksimetilselüloz, kroskarmelloz povidon, metilselüloz, hidroksipropil metilselüloz, sodyum alginat, polivinilpirolidon, kitre ve akasya zankı gibi bir süspanse edici ajan ve bir doğada

20 kendiliğinden oluşan fosfatid (örneğin lesitin), bir alkilen oksit ile bir yağ asidinin (örneğin polioksietilen stearat) bir kondenzasyon ürünü, etilen oksit ile bir uzun zincirli alifatik alkolün (örneğin heptadekaetilenoksisetanol) bir kondenzasyon ürünü, etilen oksit ile bir yağ asidi ve bir heksitol anhidritten (örneğin polioksietilen sorbitan

25 monooleat) elde edilmiş bir kısmi esterin bir kondenzasyon ürünü gibi dağıtıcı veya ıslatıcı ajanlar gösterilebilir. Aköz süspansiyon, etil veya n-propil p-hidroksi-benzoat gibi bir veya daha fazla sayıda koruyucu, bir veya daha fazla sayıda renklendirici ajan, bir veya daha fazla

sayıda aroma maddesi ve sukroz veya sakarin gibi bir veya daha fazla sayıda tatlandırıcı ajan da ihtiva edebilir.

Farmasötik bileşimler, bir enjekte edilebilir steril preparat formunda, 5 örneğin bir enjekte edilebilir steril aköz veya yağsı süspansiyon formunda olabilirler. Bu süspansiyon, yukarıda daha önceden bahsi geçmiş olan uygun dağıtıcı veya ıslatıcı ajanlar ve süspanse edici ajanlar kullanılarak sektörde bilinen prosedürler çerçevesinde formüle edilebilir. Enjekte edilebilir steril preparat, bir toksik olmayan, 10 parenteral olarak kabul edilebilir seyreltici veya çözücüde hazırlanmış bir enjekte edilebilir steril çözelti veya süspansiyon, örneğin 1,3-bütandiolde hazırlanmış bir çözelti olabilir ya da bir liyofilize tozdan hazırlanabilir. Kullanılabilecek kabul edilebilir vehiküller ve çözücüler arasında, su, Ringer çözeltisi ve izotonik sodyum klorür 15 çözeltisi bulunur. Bunların yanı sıra, konvansiyonel uygulamaya göre, çözücü veya süspanse edici vasat olarak steril sabit yağlar kullanılabilir. Sentetik mono- veya digliseritler de dahil olmak üzere herhangi bir hafif sabit yağ bu amaçla kullanılabilir. Enjekte edilebilir preparatlar hazırlanırken, bunların yanı sıra oleik asit gibi yağ asitleri 20 de kullanılabilir.

Taşıyıcı madde ile bir araya getirilip bir tekli dozaj formu üretilirken kullanılacak olan etkin bileşen miktarı, tedavi edilmesi hedeflenen konakçının hangi türe mensup olduğuna ve tatbik edilecek uygulama 25 yoluna bağlı olarak farklılık gösterecektir. Örneğin, insanlarda oral yolla kullanılması hedeflenerek hazırlanan bir süreli salımlı formülasyon, toplam bileşim miktarının (ağırlık:ağırlık) yaklaşık %5'i ile yaklaşık %95'i arası bir düzeyde olabilecek uygun ve işe yarar bir

miktarda taşıyıcı madde ile bileştirilmiş halde yaklaşık 1 ilâ 1000 mg etkin madde ihtiva edebilir. Farmasötik bileşim, uygulama için kolayca ölçülebilir miktarlar sağlayacak şekilde hazırlanabilir. Örneğin, intravenöz infüzyonla uygulanması hedeflenen bir aköz çözelti, yaklaşık 30 mL/saat hızla uygun bir hacimde infüzyon yapılabilmesi adına çözeltinin her mililitresi başına yaklaşık 3 ile 500 µg arası bir miktarda etkin bileşen içerebilir.

Parenteral uygulama için uygun formülasyonlar arasında, formülasyonu uygulamanın yapılacağı alıcının kanıyla izotonik hale getiren antioksidanlar, tamponlar, bakteriyostatlar ve solütlerin bulunabileceği aköz olan ve olmayan steril enjeksiyonluk çözeltiler ve süspanse edici ajanlar ve kıvamlaştırıcı ajanların bulunabileceği aköz olan ve olmayan steril süspansiyonlar yer alır.

15

Gözde topikal uygulama için uygun formülasyonlar arasında, etkin bileşenin uygun bir taşıyıcı, özellikle de söz konusu etkin bileşen için uygun bir aköz çözücü içerisinde çözündürülerek veya süspanse edilerek kullanıldığı göz damlaları da bulunur. Bu tarz formülasyonlarda etkin bileşen tercihen yaklaşık %0,5 ile %20 a/a arası, örneğin yaklaşık %0,5 ile %10 a/a arası bir konsantrasyonda, örneğin yaklaşık %1,5 a/a konsantrasyonunda bulunur.

Ağızda topikal uygulama için uygun formülasyonlar arasında, etkin bileşeni genelde sukroz, akasya veya kitre olmak üzere bir aromalı baz bünyesinde ihtiva eden lozanjlar; etkin bileşeni jelatin ve gliserin ya da sukroz ve akasya gibi bir inert baz bünyesinde barındıran pastiller

25

ve etkin bileşeni uygun bir sıvı taşıyıcı içerisinde ihtiva eden ağız gargaraları bulunur.

5 Rektal uygulanmak üzere hazırlanan formülasyonlar, örneğin kakao yağı veya bir salisilat ihtiva eden uygun bir bazla bir supozituar olarak sunulabilirler.

İntrapulmoner veya nazal uygulama için uygun formülasyonlar, keseciklere ulaşabilmesi için nazal pasaja doğru hızlı inhalasyon
10 yoluyla ya da ağızdan inhalasyon yoluyla uygulanmak üzere, örneğin (0,5 mikron, 1 mikron, 30 mikron, 35 mikron ve benzeri mikron cinsinden artışların söz konusu olduğu 0,1 ile 500 mikron arası partikül büyüklüklerini içine alan bir anlamda) 0,1 ile 500 mikron arası bir partikül büyüklüğünde hazırlanırlar. Uygun formülasyonlar
15 arasında, etkin bileşenin bulunduğu aköz veya yağlı çözeltiler sayılabilir. Aerosol veya kuru toz şeklinde uygulama için uygun formülasyonlar, konvansiyonel yöntemlere göre hazırlanabilir ve başka terapötik ajanlarla, örneğin aşağıda belirtilen hastalıkların tedavisi veya profilaksisinde bugüne dek kullanılagelmiş olan
20 bileşiklerle birlikte uygulanabilirler.

Vajinal uygulama için uygun formülasyonlar, etkin bileşenin yanı sıra örneğin sektörde bu tarz formülasyonlarda kullanıma uygun oldukları bilinen taşıyıcıların bulunduğu peserler, tamponlar, kremler, jeller,
25 macunlar, köpükler ya da sprey formülasyonları olarak sunulabilirler.

Formülasyonlar, birim doz veya çoklu doz kaplarında, örneğin sızdırmaz kapatılmış ampuller veya flakonlarda ambalajlanabilir ve

kullanımdan hemen önce su gibi steril bir sıvı taşıyıcının eklenmesini gerektiren dondurarak kurutma (liyofilize) koşulları altında saklanabilirler. Ekstamporane enjeksiyonluk çözeltiler ve süspansiyonlar, daha önceden açıklanmış olan tipte steril tozlar, granüller ve tabletlerden hazırlanırlar. Tercih edilen birim dozaj formülasyonları, etkin bileşenin burada yukarıda aktarılmış olduğu gibi bir günlük doz veya birim günlük alt-dozunu ya da onun uygun bir parçasını ihtiva eden formülasyonlardır.

- 10 Buluşun bir yapısında, bir veteriner taşıyıcı ile birlikte bir formül I bileşiği veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu ve GDC-0973'ün bulunduğu veteriner bileşimler ortaya koyulmaktadır. Veteriner taşıyıcılar, bileşimi uygulamak için kullanılabilecek olan ve veterinerlik sektöründe inert veya kabul edilebilir olup etkin bileşenle geçimli olan katı, sıvı veya gaz halindeki maddelerdir. Bu veteriner bileşimler, parenteral yolla, oral yolla ya da tercih edilen başka herhangi bir yolla uygulanabilirler.

KOMBİNASYON TEDAVİSİ

20

- Formül I bileşiği veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu, premalign olan ve neoplastik olmayan ya da malign olmayan hiperproliferatif hastalıklar ile birlikte tümörleri, kanser hastalıklarını ve neoplastik doku durumlarını içine alan bir anlamda bir hiperproliferatif hastalık veya bozukluğun tedavisi için olan başka kemoterapötik ajanlar ile kombinasyon halinde kullanılabilir. Buluşun belirli yapılarında, bir Formül I bileşiği veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu, kombinasyon tedavisini teşkil eden bir

dozlama rejimi kapsamında GDC-0973 ile kombine edilir. Buluşun yapılarından birinde, bu terapötik kombinasyon, terapötik açıdan etkin miktardaki bir formül I bileşiğinin veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzunun günde iki defa ile üç haftada bir defa (q3wk) 5 arası bir sıklıkta uygulandığı ve terapötik açıdan etkin miktarda GDC-0973'ün günde iki defa ile üç haftada bir defa arası bir sıklıkta uygulandığı bir dozlama rejimi ile uygulanır.

Kombinasyon tedavisi eşzamanlı ya da sıralı bir rejim olarak 10 uygulanabilir. Sıralı uygulama yapılacaksa, kombinasyon iki veya daha fazla sayıda uygulama yapılarak uygulanabilir. Kombine uygulama, hem ayrı formülasyonlar kullanılarak gerçekleştirilen birlikte uygulamayı, hem de uygulamalar arasında bir zaman aralığı bırakılan fakat her iki etkin maddenin de (veya bütün etkin 15 maddelerin) sahip oldukları biyolojik aktiviteleri eşzamanlı olarak ortaya koymalarına olanak sağlayacak herhangi bir sırayla gerçekleştirilen sıralı uygulamayı içine alan bir anlam taşır.

Buluşun yapılarından birinde, formül I bileşiği veya onun farmasötik 20 açıdan kabul edilebilir tuzu, GDC-0973 uygulamasına başladıktan sonraki yaklaşık 1 ilâ yaklaşık 10 günlük bir süre boyunca uygulanabilir. Buluşun bir diğer spesifik yapısında, formül I bileşiği veya onun farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu, GDC-0973 uygulamasına başlanmadan önceki yaklaşık 1 ilâ yaklaşık 10 günlük 25 bir süre boyunca uygulanabilir. Buluşun bir diğer spesifik yapısında, formül I bileşiği veya onun farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzunun uygulanması ile GDC-0973'ün uygulanması aynı gün başlatılır.

Yukarıda belirtilen birlikte uygulanılması tasarlanan ajanların uygun dozajları günümüzde kullanılan dozajlardır ve yeni ortaya konmuş olan madde ile diğer kemoterapötik ajanlar veya tedavilerin kombine etkisi (sinerji) sayesinde, örneğin terapötik indeksi artırmak ya da toksisiteyi veya başka yan etkiler veya istenmeyen sonuçları hafifletmek adına düşürülebilirler. Formül I bileşiği veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu ile GDC-0973'ün miktarları ve uygulama zamanlamaları, istenen kombine terapötik etkiye ulaşma hedefi göz önünde tutularak seçileceklerdir.

10

FARMASÖTİK BİLEŞİMLERİN UYGULANMASI

Bileşikler, tedavi edilmesi hedeflenen hastalık için uygun herhangi bir yolla uygulanabilirler. Uygun yollar arasında, oral, parenteral (subkütan, intramüsküler, intravenöz, intraarteriyel, inhalasyon, intradermal, intratekal, epidural ve infüzyon teknikleri dahil), transdermal, rektal, nazal, topikal (bukkal ve dilaltı dahil), vajinal, intraperitoneal, intrapulmoner ve intranazal uygulama yolları bulunur. Topikal uygulama kapsamında ayrıca transdermal uygulama, örneğin transdermal yamalar veya iyontoforez cihazları da kullanılabilir.

20

İlaçların formülasyonu, "Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., (1995) Mack Publishing Co., Easton, PA" eserinde tartışılmaktadır. "Lieberman, H. A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, Vol 3, 2nd Ed., New York, NY" eserinde, ilaç formülasyonlarına dair başka örnekler bulunabilir. Lokal immünosüpresif tedavisi için, bileşikler, greftin perfüzyonunu veya greftin transplantasyondan önce inhibitör ile temas

25

- ettirilmesini içine alan bir anlamda intralezyonel uygulama ile uygulanabilirler. Tercih edilen uygulama yolunun örneğin alıcının durumuna göre farklılık gösterebileceği anlaşılabacaktır. Bileşik oral yolla uygulanacaksa, bir farmasötik açıdan kabul edilebilir taşıyıcı, 5 glidant veya yardımcı madde ile birlikte bir hap, kapsül, tablet veya benzeri başka bir formda formüle edilebilir. Bileşik parenteral yolla uygulanacaksa, aşağıda detaylandırılmış olduğu gibi, bir farmasötik açıdan kabul edilebilir parenteral vehikül veya seyreltici ile birlikte bir enjekte edilebilir birim dozaj formunda formüle edilebilir.
- 10 İnsan hastalarında kullanılabilecek olan dozlar, beher gün için yaklaşık 20 mg ilâ 1600 mg formül I bileşiği veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu arasında değişir. Yaklaşık 50 mg ile yaklaşık 800 mg bileşik arası dozlar tipik dozlar olarak gösterilebilir.
- 15 Bir doz, bileşiğin absorpsiyonu, dağılımı, metabolizması ve atılımını içine alan bir anlamda farmakokinetik (PK) ve farmakodinamik (PD) özelliklerine bağlı olarak günde bir defa (QD), günde iki defa (BID) veya daha sık aralıklarla uygulanabilir. Bunun yanı sıra, dozaj ve uygulama rejimi toksisite faktörlerinden de etkilenebilir. Oral yolla 20 uygulanacak olan bir hap, kapsül veya tablet, belirlenmiş bir süre boyunca günde iki defa, günde bir defa veya daha az sıklıkta, örneğin haftada bir defa veya iki haftada bir veya üç haftada bir alınabilir. Rejim, bir dizi tedavi döngüsü boyunca tekrarlanabilir.

25 TEDAVİ YONTEMLERİ

- (1) Bir formül I bileşiği veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu ile (2) bir kemoterapötik ajandan oluşan terapötik

kombinasyonlar, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın ve fakat memelilerde AKT kinazın modüle edici etkisiyle görülenler de dahil olmak üzere hastalıklar, rahatsızlıklar ve/veya bozuklukların tedavisi için faydalıdır. Burada açıklanan yöntemlere göre tedavi

5 edilebilecek olan kanser hastalıkları arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, mezotelyoma, gliom, pankreas kanseri, meme kanseri, akciğer kanseri, yumurtalı kanseri, prostat kanseri, melanom, gastrik kanser, kolon kanseri ve baş ve boyun kanseri bulunur.

10 Belirli kombinasyonların belirli kanser fenotiplerine karşı gelişmiş etkiler sağladıkları belirlenmiştir. Örneğin, belirli kombinasyonlar, PTEN mutasyonu (veya düşük veya yok durumu), AKT mutasyonu (veya yüksek pAKT ekspresyon veya amplifikasyon seviyeleri), PI3K mutasyonu, Her2/ErbB2 amplifikasyonu, RAS mutasyonları, RAF

15 mutasyonları veya yukarıda belirtilenlerin bir kombinasyonu ile bağlantılı kanserlere karşı gelişmiş etkiler sağlarlar.

Buna bağlı olarak, burada açıklanan belirli kombinasyonlar bilhassa bu kanser çeşitlerine karşı faydalı olabilirler.

20

Örneğin kolorektal kanserde, RAS/RAF mutasyonları ile birlikte PI3K/AKT mutasyonlarının (örneğin PI3K H1047R, E545K, D549N, P421L, L568F, L569F, P449T veya bunların kombinasyonları) bulunması, burada açıklanan kombinasyonlara kuvvetli cevaplar

25 verileceğinin habercisidir ve GDC-0068 artı GDC-0973 kombinasyonuna istinaden kuvvetli sinerji görülmüştür.

Ayrıca küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde, (i) PI3K/AKT mutasyonları (PI3K E545K, L997P, M772X, N996H veya bunların kombinasyonları) ve RAS/RAF mutasyonlarının (Q61H, G12C, Q61K, N85K, G12S, BRAF V600E veya bunların kombinasyonları) birlikte bulunduğu ve (ii) PI3K mutasyonlarının bulunmadığı ancak RAS/RAF kombinasyonlarının bulunduğu durumlarda GDC-0068 artı GDC-0973 kombinasyonuna istinaden kuvvetli sinerji gözlemlenmiştir.

10 Ote yandan melanomda, (i) BRAF V600E mutasyonlarının bulunduğu ve (ii) PTEN mutasyonları, yok veya düşük durumuyla ya da yüksek pAKT ekspresyon veya aktivite seviyeleriyle birlikte BRAF V600E mutasyonları veya delesyonları veya amplifikasyonlarının söz konusu olduğu durumlarda GDC-0068 artı GDC-0973 kombinasyonuna
15 istinaden kuvvetli sinerji kaydedilmiştir.

Bir hastada BRAF V600E mutasyonu bulunup bulunmadığını test etmek için kullanılabilecek kitler ticari piyasada mevcuttur. Bunların bir örneği, formaline sabitlenmiş, parafine gömülmüş (FFPET) insan
20 melanom dokusunda BRAF V600E mutasyonunu tespit edebilen COBAS® 4800 B RAF V600 Mutasyon Testidir (Roche Molecular Systems Inc.). Bu ürün ABD'de, BRAF geninin mutasyonlu formunu barındıran melanom tümörlerinin yer aldığı hastaları tedavi etmek için tasarlanmış vemurafenib veya onun bir farmasötik açıdan kabul
25 edilebilir tuzu ile tedavi için bir eş tanı testi olarak onaylanmıştır. Preklinik ve klinik araştırmalarda, Cobas® BRAF Mutasyonu Testi, COSMIC veritabanında rapor edilen bütün BRAF mutasyonlarının >~ %85'ini temsil eden BRAF V600E (1799 T>A) mutasyonunu tespit

etme konusunda %97,3 oranında pozitif uyuşma göstermiştir. Formaline sabitlenmiş, parafine gömülmüş dokuda (FFPET), Cobas® BRAF Mutasyonu Testi, > %5 mutasyon seviyesindeki V600E mutasyonlarını tespit edebilir. Test, V600D ve V600K gibi başka
5 V600 mutasyonlarını da tespit edebilir. Cobas® BRAF Mutasyonu Testi, hastadan alınan doku numunesi veya tümör hücreleri gibi numunelerde numune alımını takip eden <8 saat içerisinde gerçekleştirilebilir. Cobas® 4800 BRAF V600 Mutasyonu Testi, Cobas® 4800 System, v2.0'de gerçekleştirilen bir gerçek zamanlı PCR
10 testidir ve BRAF V600E mutasyonu taşıyan tümörlerin bulunduğu melanom hastalarının belirlenip seçilmesinde yardımcı olması için kullanılır.

PTEN yok (veya düşük) durumu, sektörde bilinen uygun herhangi bir
15 araçla ölçülebilir. Bunlara verilebilecek örneklerden biri IHC'dir. Alternatif olarak, Western blot analizi de kullanılabilir. PTEN antikorları ticari piyasada mevcuttur (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, Cascade Biosciences, Winchester, MA). "Neshat, M. S. et al. Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of
20 FRAP/mTOR, Proc. Natl Acad. Sci. USA 98, 10314-10319 (2001)" ve "Perren, A., et. al. Immunohistochemical Evidence of Loss of PTEN Expression in Primary Ductal Adenocarcinomas of the Breast, American Journal of Pathology, Vol. 155, No. 4, October 1999" eserlerinde, PTEN durumunun tespitine yönelik IHC ve Western blot
25 analizi için örnek prosedürler bulunabilir. Ek olarak, sektörde bilinen teknikler kullanılarak, AKT mutasyonu, PI3K mutasyonu ve Her2/ErbB2 amplifikasyonu ile bağlantılı kanserler de belirlenip tanımlanabilir.

Bir numunede aktive olmayan veya fosforlanmış olmayan AKT'nin seviyesine kıyasla AKT aktivasyon veya fosforilasyon ("pAKT" seviyesi) sektörde bilinen yöntemlerle ölçülebilir. pAKT durumu, bir oran (örneğin bir tümör hücresindeki pAKT miktarı aynı tipteki tümöröz olmayan bir hücredeki pAKT miktarına bölünerek elde edilen değer) olarak veya bir çıkarma işleminin sonucu (örneğin bir tümör hücresindeki pAKT miktarından hücredeki veya aynı tipteki tümöröz olmayan bir hücredeki pAKT miktarı çıkarılarak elde edilen değer) olarak ifade edilebilir. pAKT profili, AKT'nin fosforlanmış downstream hedeflerinin (örneğin pGSK veya PRAS40) ölçülerek hesaplanan yolağın aktivasyon seviyesi cinsinden de ifade edilebilir. Bir yüksek pAKT, numunedeki genel AKT içeriğinin aktivasyon veya fosforilasyon seviyelerinin bir taban çizgisi değerinden daha yüksek olduğuna işaret eder. Bir örnekte, taban çizgisi değeri, belirli bir hücre tipine ilişkin bazal pAKT seviyelerini teşkil eder. Bir diğer örnekte, taban çizgisi değeri, belirli bir numune hücresi popülasyonundaki, örneğin kanseröz olan veya olmayan hücrelerdeki ortalama pAKT seviyesidir. Bir diğer örnekte, bir yüksek pAKT, aynı memeliden veya bir hasta popülasyonundan alınan aynı tipteki normal ve sağlıklı (örneğin tümöröz olmayan) hücrelerin ortalamasına kıyasla, fosforlanmış veya aktive AKT'yi aşırı düzeyde eksprese eden veya amplifiye eden bir tümör hücresinin bulunduğu işaret eder. pAKT profili, başka markerlerle birlikte de kullanılabilir, örneğin belirli PI3K/AKT kinaz yolağı inhibitörlerinin etkinliğini kestirmek için FOXO3a lokalizasyon profilleriyle birlikte ya da örneğin başta metastatik veya cerrahi olarak çıkarılamayacak olan melanom gibi vemerafenibe dirençli kanser hastalıklarının bulunduğu hastalarda olmak üzere formül I bileşikleriyle vemurafenibden oluşan belirli

kombinasyonların etkinliğini kestirmek için BRAF V600E mutasyon durumuyla birlikte kullanılabilir. Doku numunelerinde pAKT ölçümü yapmaya yaraya kitler ticari piyasada mevcuttur (örneğin fosfo-Akt (Thr308) STAR ELISA kiti, EMD Millipore).

5

PI3K, KRAS ve AKT mutasyonlarının varlığını test etmeye yarayan kitler ticari piyasada mevcuttur (Qiagen).

URETİM NESNELERİ

10

Buluşun bir diğer yapısında, yukarıda belirtilen hastalıklar ve bozuklukların tedavisinde faydalı olan bir formül I bileşiğinin veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzunun bulunduğu bir üretim nesnesi veya "kit" ortaya koyulmaktadır. Buluşun yapılarından birinde, kitte bir kap ve bir formül I bileşiği veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu bulunur.

15

Kitte, kabın üzerinde veya kap ile birlikte sunulan bir etiket veya kullanma talimatı da bulunabilir. "Kullanma talimatı" terimi, terapötik ürünlerin koyulduğu ticari ambalajlara dahil edilen ve endikasyonlar, kullanım şekli, dozaj, uygulama şekli, kontrendikasyonlar ve/veya ilgili terapötik ürünlerin kullanımına ilişkin uyarılar hakkında bilgi veren talimatname metnine atıf yapar. Uygun kaplar arasında, örneğin şişeler, flakonlar, enjektörler, blister ambalajlar ve benzerleri sayılabilir. Kap, çeşitli farklı malzemelerden yapılmış, örneğin cam veya plastikten yapılmış olabilir bir kap olabilir. Kap, hedef rahatsızlığı tedavi etme konusunda etkin ve etkili olan bir formül I bileşiğini veya onun farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzunu ya da

20

25

onun yer aldığı bir formülasyonu barındırabilir ve bir steril giriş portuna sahip olabilir (örneğin kap, bir hipodermik enjeksiyon iğnesi kullanılarak delinebilecek bir tıpanın yer aldığı bir flakon ya da bir intravenöz çözelti torbası olabilir). Bileşimde yer alan etkin maddelerden en az biri bir formül I bileşiğidir ya da onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzudur. Etiket veya kullanma talimatında, bileşimin seçilen rahatsızlığı, örneğin kanseri tedavi etmek için kullanıldığına işaret edilir. Buluşun yapılarından birinde, etiket veya kullanma talimatında, bir formül I bileşiğini veya onun farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzunu içeren bileşimin anormal hücre büyümesinden kaynaklanan bir hastalığı tedavi etmek için kullanılabileceğine işaret edilir. Etiket veya kullanma talimatında, bileşimin başka hastalıkları tedavi etmek için kullanılabileceğine de işaret edilebilir. Alternatif veya ek olarak, üretim nesnesi kapsamında, örneğin bakteriyostatik enjeksiyonluk su (BWFI), fosfat-tamponlu salin, Ringer çözeltisi ve dekstrozu çözeltisi gibi bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tampon içeren bir ikinci kap da yer alabilir. Üretim nesnesi kapsamında, ticari açıdan ve kullanıcı açısından bakıldığında ürünle beraber sunulması tercih edilebilecek olan başka materyaller, örneğin başka tamponlar, seyrelticiler, filtreler, iğneler ve enjektörler de yer alabilir.

Kitte, bir formül I bileşiğinin veya onun farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzunun ve varsa ikinci farmasötik formülasyonun nasıl uygulanması gerektiğini anlatan bir talimatname de bulunabilir. Örneğin, eğer ilgili kitte bir formül I bileşiğini veya onun farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzunu içeren bir birinci bileşim ve onun yanı sıra bir ikinci farmasötik formülasyon varsa, bu kitte, söz konusu

birinci ve ikinci farmasötik bileşimlerin ilgili tedaviye ihtiyacı olan bir hastaya eşzamanlı olarak, sırayla veya ayrı ayrı uygulanmalarının gerektiğini ortaya koyan bir talimatname de bulunabilir.

- 5 Buluşun bir diğer yapısında, bir formül I bileşiğinin veya onun farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzunun örneğin tablet veya kapsül gibi katı oral formlarıyla yapılacak uygulamalara uygun kitler söz konusudur. Bu gibi bir kitte bir dizi birim dozajın bulunması tercih edilir. Bu gibi kitlerde, dozajların hedeflenen kullanım amacına göre
- 10 yerleştirilmiş olduğu bir kart da bulunabilir. Bu gibi bir kite verilebilecek örneklerden biri "blister ambalaj"dır. Blister ambalajlar, ambalajlama sektöründe iyi bilinmekte olup, farmasötik birim dozaj formlarını ambalajlamak için yaygın olarak kullanılmaktadırlar. İstenirse, rakam, harf veya başka tip bir işaret karakteri formunda ya
- 15 da tedavi programı içerisinde dozajların uygulanabileceği günleri gösteren bir takvim formunda bir hatırlatıcı da kite dahil edilebilir.

- Buluşun yapılarından birine göre, bir kit, (a) bir formül I bileşiğinin veya onun farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzunun yer aldığı ve (b)
- 20 bir ikinci farmasötik formülasyonun yer aldığı bir ikinci kap ihtiva edebilir ve burada bahsi geçen ikinci farmasötik formülasyonda GDC-0973 bulunur. Alternatif veya ek olarak, kitte, bakteriyostatik enjeksiyonluk su (BWFI), fosfat-tamponlu salin, Ringer çözeltisi ve dekstroz çözeltisi gibi bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tampon
 - 25 içeren bir üçüncü kap da bulunabilir. Kitte, ticari açıdan ve/veya kullanıcı açısından tercih edilebilecek başka materyaller, örneğin başka tamponlar, seyrelticiler, filtreler, iğneler ve enjektörler de bulunabilir.

Bir formül I bileşiğinin veya onun farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzunun yer aldığı bir bileşim ile GDC-0973'ün yer aldığı bir bileşimin bulunduğu bir kitte, ilgili bileşimleri ayrı ayrı içeren, örneğin bölümlere ayrılmış bir şişe veya bölümlere ayrılmış bir folyo ambalaj içerisinde ihtiva eden bir kap yer alabilir; bununla birlikte, söz konusu bileşimler bölümlere ayrılmamış aynı kap içerisinde beraber de sunulabilirler. Kitte, normalde, ayrı komponentlerin nasıl uygulanmaları gerektiğini anlatan bir kullanma talimatı dokümanı bulunur. Ayrı komponentlerin farklı dozaj formları (örneğin oral ve parenteral) halinde uygulanmalarının tercih edildiği, farklı dozlama aralıklarıyla uygulanmalarının hedeflendiği ya da kombinasyon bileşenlerinin uygulamayı yürüten doktor tarafından titre edilmesinin tercih edildiği durumlarda, kit formu bilhassa avantaj sağlar.

15 SPESİFİK BULUŞ YAPILARI

Buluşun bir spesifik yapısında, kanser, PTEN mutasyonu ile ilişkilidir.

Buluşun bir spesifik yapısında, kanser, AKT mutasyonu, aşırı ekspresyonu veya amplifikasyonu ile ilişkilidir.

Buluşun bir spesifik yapısında, kanser, PI3K mutasyonu ile ilişkilidir.

Buluşun bir spesifik yapısında, kanser, KRAS mutasyonu ile ilişkilidir.

Buluşun bir spesifik yapısında, kanser, BRAF mutasyonu ile ilişkilidir.

Buluşun bir spesifik yapısında, kanser, (1) PTEN, AKT veya PI3K mutasyonu ile (2) bir KRAS veya BRAF mutasyonunun kombinasyonu ile ilişkilidir.

- 5 Buluşun bir spesifik yapısında, kanser, GDC-0068 ve GDC-0973 tek ajan tedavilerinden birine veya her ikisine de dirençlidir, fakat GDC-0068 ve GDC-0973 kombinasyon tedavisine duyarlıdır.

- 10 Buluşun bir spesifik özelliğinde, formül I bileşiği veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu, GDC-0973 veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu ile kombinasyon halinde uygulanır ve kanser, kolon kanseridir.

- 15 Buluşun bir spesifik özelliğinde, formül I bileşiği veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu, GDC-0973 veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu ile kombinasyon halinde uygulanır ve kanser, akciğer kanseridir.

- 20 Buluşun bir spesifik özelliğinde, formül I bileşiği veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu, GDC-0973 veya onun bir farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu ile kombinasyon halinde uygulanır ve kanser, melanomdur.

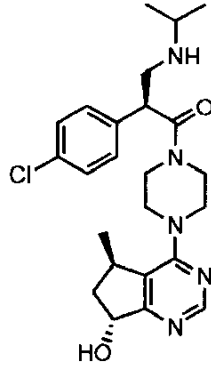
25 **ÖRNEKLER**

Buluşu örneklendirmek amacıyla aşağıdaki örnekler sunulmuştur. Buluşun kapsamının bu örnekler ile sınırlı olmadığı, bu örneklerin

yalnızca buluşu tatbik ederken kullanılabilecek bir yöntem önermek maksadıyla sunulmuş oldukları anlaşılmalıdır.

Örnek 1

5



(S)-2-(4-klorofenil)-1-(4-((5R,7R)-7-hidroksi-5-metil-6,7-dihidro-5H-siklopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-3-(izopropilamino)propan-1-on

10

Basamak 1: EtOAc (900 mL) içerisinde yer alan etil pülegenat (130 g, 662 mmol) bir kuru buz-izopropanol banyosunda -78°C sıcaklığa ulaşana dek soğutuldu. Daha sonra bu karışım, rengi mora dönene dek ozonolize tâbi tutuldu. Bu aşamada ozon oluşumu kesildi ve reaksiyon karışımı kuru-buz banyosundan çıkarıldı. Reaksiyon karışımının rengi sarıya dönene dek içerisinde oksijen geçirildi. Akabinde, reaksiyon karışımı vakum uygulanarak konsantre edildi ve kalan artık bir miktar glasiyel asetik asitte (400 mL) çözündürüldü. Çözelti 0°C sıcaklığa ulaşana dek soğutuldu ve ardından 30 dakika boyunca parça parça Zn tozu (65 g, 993 mmol) eklendi. Daha sonra, reaksiyon karışımı 2 saat boyunca karışmaya bırakıldı ve müteakiben, bir Celite pedden geçirilip filtrelenerek çinko tozundan arındırıldı. NaOH ve NaHCO₃

20

kullanılarak asetik asit nötralize edilip pH seviyesi 7'ye getirildi ve daha sonra asetik asit bir miktar eterle (3 X 800 mL) ekstrakte edildi. Bir araya toplanan organiklerin tuzlu su ve MgSO₄ ile kurutulmaları ve ardından konsantre edilmeleri sonucunda, kahverengi renkli bir sıvı
 5 formunda (2R)-etil 2-metil-5-oksosiklopentan-karboksilat (107 g, %95) elde edildi.

Basamak 2: MeOH (1,2 L) içerisinde yer alan bir (R)-etil 2-metil-5-oksosiklopentankarboksilat (106,0 g, 622,78 mmol) çözeltisine
 10 amonyum asetat (240,03 g, 3113,9 mmol) ilave edildi. Elde edilen reaksiyon karışımı oda sıcaklığı altında 20 saat boyunca nitrojen atmosferinde karıştırıldı ve ardından TLC ve HPLC ile yapılan değerlendirmeye göre reaksiyonun tamamlandığı saptandı. Reaksiyon karışımı konsantre edilerek MeOH çıkarıldı. Kalan artığın DCM'de
 15 çözündürülmesi, H₂O ile iki defa ve tuzlu suyla bir defa yıkanması, kurutulması (Na₂SO₄), filtrelenmesi ve ardından konsantre edilmesi sonucunda turuncu renkli bir yağ formunda (R)-etil 2-amino-5-metilsiklopent-1-enkarboksilat (102 g, %97) elde edildi. LC/MS (APCI+) m/z 170 [M+H]⁺.

20

Basamak 3: Formamidde (303,456 mL, 7640,19 mmol) yer alan ve (R)-etil 2-amino-5-metilsiklopent-1-enkarboksilat (161,61 g, 955,024 mmol) ve amonyum format (90,3298 g, 1432,54 mmol) içeren bir çözelti, 150°C'ye tekabül eden bir dahili sıcaklığa ulaşana dek ısıtıldı
 25 ve 17 saat boyunca karıştırıldı. Daha sonra reaksiyon karışımı soğutulup 2 L hacimli bir tek boyunlu şişeye aktarıldı. Akabinde, yüksek vakumlu distilasyon uygulanarak fazla formamidin çıkarıldı. Formamidin çıkışı sona erdiğinde, imbikte kalan yağ DCM içerisinde

5 çözündürüldü ve tuzlu suyla (3 X 200 mL) yıkandı. Aköz yıkama suları birlikte DCM ile ekstrakte edildiler. Bir araya toplanan organik ekstraktlar kurutuldu (Na_2SO_4), ardından filtrelendi ve son olarak konsantre edildiler. Elde edilen kahverengi renkli yağ minimal DCM
 10 içerisinde çözündürüldü ve bu çözelti bir ayırma hunisinin yardımıyla bir karıştırılmış eter çözeltisine (yaklaşık 5 hacim eter-DCM çözeltisi) eklenerek bir miktar kahverengi renkli presipitat oluşması sağlandı. Bu kahverengi renkli presipitat bir vasat sinter hunisinde filtrasyon yapılarak çıkarıldı ve bu huni daha sonra eterle durulanıp akabinde
 15 atıldı. Oluşan filtrat konsantre edildi, eterden tritürasyon iki defa daha tekrarlandı ve elde edilen ürün yüksek vakum hattı üzerinde kurutularak kahverengi-yeşil renkli bir macunsu katı formunda (R)-5-metil-6,7-dihidro-5H-siklopenta[d]pirimidin-4-ole (93,225 g, %65,00 verim) ulaşıldı. LC/MS (APCI-) m/z 149,2.

15

Basamak 4: DCE (1,2 L) içerisinde yer alan bir (R)-5-metil-6,7-dihidro-5H-siklopenta[d]pirimidin-4-ol (152,2 g, 1013 mmol)
 20 çözeltisine 0°C sıcaklık altında bir ekleme hunisi yardımıyla yavaşça sek POCl_3 (463,9 mL, 5067 mmol) ilave edildi. Bu işlem tamamlandıktan sonra, elde edilen reaksiyon karışımı oda sıcaklığına ulaşana dek ısıtıldı, ardından geri akış sıcaklığına ulaşana dek ısıtıldı ve 70 dakika boyunca karıştırıldı. Reaksiyonun tamamlandığı HPLC ile belirlendi. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığına ulaşana dek soğutuldu ve akabinde POCl_3 fazlası 4 parça halinde aşağıda tarif
 25 edildiği gibi söndürüldü: Reaksiyon karışımı bir ayırma hunisine aktarıldı ve bir buz banyosu içerisinde soğutulmuş doymuş NaHCO_3 ile buzdan oluşan bir çözeltinin bulunduğu bir behere bu huni aracılığıyla damlatıldı. Reaksiyon karışımının her bir kısmı ilave

edildikten sonra, söndürülmüş olan karışım 30 dakika boyunca karıştırılarak, ayırma hunisine aktarılmadan önce POCl_3 'ün tamamen ortadan kalktığından emin olundu. Karışım ayırma hunisine aktarıldı ve DCM ile iki defa ekstrakte edildi. Bir araya toplanan ekstraktlar

5 kurutuldu (Na_2SO_4), ardından filtrelendi ve son olarak konsantre edildiler. Ham ürün, aşağıda tarif edildiği gibi silika jel üzerinde saflaştırıldı: Silika jel (1 kg) 9:1 oranında heksan:etil asetatla birlikte 3 L hacimli bir sinterli huniye aktararak bulamaç haline getirildi, vakum uygulanarak silika çökteldi ve daha sonra bunun üzeri kumla

10 kaplandı. Ham ürüne bir DCM/heksan karışımı yüklendi ve bileşik 1 L hacimli kollu şişelerde vakum altında elüe edildi. İlk önce yüksek R_f değerleri ortaya koyan yan ürünler elüe oldu ve bu sayede kahverengi renkli bir yağ formunda (R)-4-kloro-5-metil-6,7-dihidro-5H-siklopenta[d]pirimidin (104,4 g, %61,09 verim) elde edildi. Bir

15 miktar n-BuOH'de (250 mL) yer alan bir (R)-4-kloro-5-metil-6,7-dihidro-5H-siklopenta[d]pirimidin (30,0 g, 178 mmol) çözeltisinin üzerine trietilamin (93,0 ml, 534 mmol) ve tert-bütil piperazin-1-karboksilat (34,8 g, 187 mmol) ilave edildi. Elde edilen reaksiyon karışımı nitrojen atmosferi altında geri akış sıcaklığına ulaşana dek

20 ısıtıldı ve gece boyunca (17 saat) karıştırıldı, ardından bir döner buharlaştırıcıda konsantre edildi. Oluşan yağ bir miktar DCM'de çözüldürüldü, H_2O ile yıkandı, kurutuldu (Na_2SO_4), filtrelendi ve son olarak konsantre edildi. Oluşan kahverengi renkli yağın önce ürün temiz bir şekilde elüe olana dek 2:1 heksanlar:etil asetat ile ve daha

25 sonra 1:1 ilâ 1:5 DCM:etil asetat gradyanıyla elüsyon yapılarak silika jel üzerinde saflaştırılması sonucunda, bej renkli bir toz formunda (R)-tert-bütil 4-(5-metil-6,7-dihidro-5H-siklopenta[d]pirimidin-4-il)

piperazin-1-karboksilat (42,0 g, %74,1 verim) elde edildi. LC/MS (APCI+) m/z 319,1 [M+H]⁺.

Basamak 5: CHCl₃'te (310 mL) yer alan 0°C sıcaklıktaki bir (R)-tert-bütül 4-(5-metil-6,7-dihidro-5H-siklopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-karboksilat (20,0 g, 62,8 mmol) çözeltisinin üzerine bir miktar maksimum %77 katı MCPBA (23,9 g, 107 mmol) parça parça ilave edildi. Elde edilen reaksiyon karışımı 5 dakika boyunca karıştırıldı, ardından oda sıcaklığına varana dek ısıtıldı ve 90 dakika boyunca karıştırıldı. 7,5 saat sonra HPLC ile bakıldığında benzer bir görüntü gözlemlendi. Bunun üzerine reaksiyon karışımı 0°C sıcaklığa ulaşana dek soğutuldu, daha sonra NaHCO₃ (13,2 g, 157 mmol) ve 0,5 eşdeğeri düzeyinde biraz daha m-CPBA ilave edildi. Reaksiyon karışımı takip eden gece boyunca (14 saat) karıştırıldı. Ardından reaksiyon karışımı 0°C sıcaklığa ulaşana dek soğutuldu ve ekleme hunisi yardımıyla H₂O'de (50 mL) yer alan bir Na₂S₂O₃ (29,8 g, 188 mmol) çözeltisi damlatıldı. Bunu takiben, yine ekleme hunisi aracılığıyla H₂O'da (70 mL) yer alan bir Na₂CO₃ (24,6 g, 232 mmol) çözelti eklendi. Reaksiyon karışımı müteakip 30 dakika boyunca karıştırıldı ve daha sonra karışım bir miktar CHCl₃ (3 X 150 mL) ile ekstrakte edildi. Bir araya toplanan ekstraktların kurutulmaları (Na₂SO₄), filtrelenmeleri ve konsantre edilmeleri sonucunda N-oksit elde edildi. LC/MS (APCI+) m/z 335,1 [M+H]⁺.

Basamak 6: Basamak 5'te elde edilen N-oksidin (21.0 g, 62.8 mmol) üzerine AC₂O (77,0 ml, 816 mmol) ilave edildi. Elde edilen reaksiyon karışımı 90°C sıcaklıktaki bir kum banyosunda nitrojen atmosferi altında ısıtıldı ve 100 dakika boyunca karıştırıldı. Daha sonra

- reaksiyon karışımı oda sıcaklığına ulaşana dek soğutuldu ve asetik anhidrit fazlası döner buharlaştırma uygulamasıyla uzaklaştırıldı. Oluşan yağ bir miktar DCM'de çözündürüldü ve elde edilen çözelti buzla doygunlaştırılmış Na_2CO_3 'ün üzerine dikkatle döküldü.
- 5 Karışımın DCM ile ekstrakte edilmesi ve bir araya toplanan ekstraktların kurutulmaları (Na_2SO_4), filtrelenmeleri ve konsantre edilmeleri sonucunda, kahverengi renkli bir köpük formunda tert-bütül 4-(7-asetoksi-5-metil-6,7-dihidro-5H-siklopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-karboksilat (23,6 g, %100) elde edildi. LC/MS (APCI+) 10 m/z 377,1 [M+H]⁺.

- Basamak 7: 2:1 THF:H₂O'da (320 mL) yer alan 0°C sıcaklıktaki bir (5R)-tert-bütül 4-(7-asetoksi-5-metil-6,7-dihidro-5H-siklopenta[d] 15 pirimidin-4-il)piperazin-1-karboksilat (23,6 g, 62,69 mmol) çözeltisinin üzerine LiOH-H₂O (6,577 g, 156,7 mmol) ilave edildi. Elde edilen reaksiyon karışımı 10 dakika boyunca karıştırıldı ve daha sonra oda sıcaklığına ulaşana dek ısıtıldı. 3 saat ve 4,5 saat sonra yapılan LC/MS'de aynı görüntü gözlemlendi. Bunun üzerine reaksiyon karışımı 0°C sıcaklığa ulaşana dek soğutuldu ve ardından karışımın 20 üzerine doymuş NH₄Cl ilave edildi. Karışım 5 dakika boyunca karıştırıldı ve döner buharlaştırma uygulamasıyla THF'nin büyük bir kısmı uzaklaştırıldı. Karışım bir miktar EtOAc (3 X 250 mL) ile ekstrakte edildi ve bir araya toplanan ekstraktlar kurutuldu (Na_2SO_4), 25 filtrelendi ve konsantre edildiler. Oluşturulan ham ürün Biotage 65M'den hızla geçirildi: 4:1 DCM:etil asetat, daha sonra 1:1 ilâ 1:4 DCM:etil asetat gradyanı. Ürün elüe olduktan sonra, etil asetat kolondan geçirilip boşaltıldı. Daha sonra 30:1 DCM:MeOH ile, ürünün geri kalanı (8,83 g) elüe edildi. Karışık fraksiyonların aynı

koşullar altında Biotage 40 M'den yeniden hızla geçirilmeleri sonucunda 2,99 g daha ürün elde edildi ve sonuç olarak, kahverengi renkli bir köpük formunda bir birleşik (5R)-tert-bütil 4-(7-hidroksi-5-metil-6,7-dihidro-5H-siklopenta[d] pirimidin-4-il) piperazin-1-karboksilat (11,82 g, %56,38 verim) çıktısına ulaşıldı. LC/MS (APCI+) m/z 335,1 [M+H]⁺.

Basamak 8: DCM'de (150 mL) yer alan -78°C sıcaklıktaki bir ioksalil klorür (3,35 mL, 38,4 mmol) çözeltisinin üzerine bir ekleme hunisi aracılığıyla DCM'de (50 mL) yer alan bir DMSO (5,45 ml, 76,8 mmol) çözeltisi damlatıldı. Elde edilen reaksiyon karışımı müteakip 35 dakika boyunca karıştırıldı ve daha sonra yine ekleme hunisi aracılığıyla DCM'de (80 mL) yer alan bir (5R)-tert-bütil 4-(7-hidroksi-5-metil -6,7-dihidro-5H-siklopenta[d]pirimidin-4-il) piperazin-1-karboksilat (9,17 g, 27,4 mmol) çözeltisi yavaşça ilave edildi. Daha sonra reaksiyon karışımı -78°C sıcaklık altında 1 saat daha karıştırıldı ve akabinde karışıma sek trietilamin (18,0 ml, 129 mmol) eklendi. Müteakiben reaksiyon karışımı oda sıcaklığına ulaşana dek ısınmaya bırakıldı ve daha sonra 30 dakika boyunca karıştırıldı. Akabinde H₂O eklendi. Karışım bir miktar DCM (3 X 200 mL) ile ekstrakte edildi ve bir araya toplanan ekstraktlar kurutuldu (Na₂SO₄), filtrelendi ve vakum altında konsantre edildiler. Oluşan ham ürün silika jelde saflaştırıldı (Biotage 65M): ürün elüe olana dek kolondan önce yaklaşık 800 mL 4:1 DCM:EtOAc, ardından 1:1 DCM:etil asetat gradyanı geçirildi, daha sonra 1:4 DCM:EtOAc ile ürün elüe edilerek, kahverengi renkli bir köpük formunda (R)-tert-bütil 4-(5-metil-7-okso-6,7-dihidro-5H-siklopenta [d]pirimidin-4-il) piperazin-1-karboksilat (7,5 g, %82,3 verim) elde edildi. Bu köpüğün

DCM/heksanlardan konsantre edilmesi (3 X) sonucunda, çok açık kahverengi renkli bir köpük elde edildi. HPLC > %95 alan. LC/MS (APCI+) m/z 333 [M+H]⁺.

- 5 Basamak 9: DCM'de (kullanılmadan 30 dakika önce nitrojenle gazdan arındırılmış 210 mL) yer alan bir (R)-tert-bütil 4-(5-metil-7-okso-6,7-dihidro-5H-siklopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-karboksilat (9,75 g, 29,3 mmol) çözeltisinin üzerine trietilamin (kullanılmadan 30 dakika önce nitrojenle gazdan arındırılmış 4,33 ml, 31,1 mmol) ve
- 10 formik asit (kullanılmadan 30 dakika önce nitrojenle gazdan arındırılmış 1,36 ml, 36,1 mmol) ilave edildi. Elde edilen karışım 5 dakika boyunca karıştırıldı ve ardından üzerine bir Ru katalizörü (0,0933 g, 0,147 mmol) eklendi. Akabinde karışım pozitif nitrojen basıncı altında gece boyunca (18 saat) karıştırıldı. Takiben reaksiyon
- 15 karışımı kuruyana dek konsantre edildi ve yüksek vakuma tâbi tutularak kurutuldu. Oluşan saf olmayan madde, Biotage 65M'ye yüklendi, 500 mL 1:1 DCM:etil asetatla yıkandı, daha sonra ürüne (2. nokta) ulaşılan dek 1:4 DCM:etil asetatla, ardından sek etil asetata varana değin ilgili gradyanla elüsyon yapıldı, ardından 25:1
- 20 DCM:MeOH ile ürünün geri kalanı elüe edildi. Fraksiyonlar bir araya toplandı ve bir döner buharlaştırıcıda buharlaştırıldılar. Kalan artığı DCM/heksanlardan tekrar konsantre edilmesi sonucunda, bej renkli bir köpük formunda bir tert-bütil 4-((5R,7R)-7-hidroksi-5-metil-6,7-dihidro-5H-siklopenta [d]pirimidin-4-il) piperazin-1-karboksilat
- 25 (majör) ve tert-bütil 4-((5R,7S)-7-hidroksi-5-metil-6,7-dihidro-5H-siklopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-karboksilat (minör) karışımı (9,35 g, %95,3 verim) elde edildi. LC/MS (APCI+) m/z 335 [M+H]⁺.

¹H NMR (CDCl₃), karbinol metinin entegrasyonunun sağladığı %88 oranında diastereoselektivite söz konusu olduğunu göstermektedir.

Basamak 10: DCM'de (110 mL) yer alan ve tert-bütül 4-((5R,7R)-7-hidroksi-5-metil-6,7-dihidro-5H-siklopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-karboksilat (7,0 g, 20,9 mmol) ve trietilamin (4,38 ml, 31,4 mmol) içeren 0°C sıcaklıktaki bir çözeltinin üzerine 4-nitrobenzoil klorür (4,27 g, 23,0 mmol) ilave edildi. Reaksiyon karışımı gece boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı ve daha sonra üzerine doymuş NaHCO₃ eklendi. Daha sonra karışım 10 dakika boyunca karıştırıldı ve ardından DCM ile ekstrakte edildi. Bir araya toplanan ekstraktlar kurutuldu (Na₂SO₄), filtrelendi ve konsantre edildiler. Ham ürün Biotage 65M'den hızla geçirildi (3:1 heksanlar:etil asetat ham ürüne yüklendi, daha sonra 2:1 heksanlar:etil asetatla tert-bütül 4-((5R,7R)-5-metil-7-(4-nitrobenzoiloksi)-6,7-dihidro-5H-siklopenta[d] pirimidin-4-il)piperazin-1-karboksilat ve birkaç karışık fraksiyon elüe edildi). Daha sonra 1:2 heksanlar:etil asetat kullanılarak tert-bütül 4-((5R,7S)-5-metil-7-(4-nitrobenzoiloksi)-6,7-dihidro-5H-siklopenta[d] pirimidin-4-il)piperazin-1-karboksilat elüe edildi. Ürünü barındıran fraksiyonların döner buharlaştırma yoluyla konsantre edilmeleri sonucunda, sarı renkli bir köpük formunda tert-bütül 4-((5R,7R)-5-metil-7-(4-nitrobenzoiloksi)-6,7-dihidro-5H-siklopenta[d] pirimidin-4-il)piperazin-1-karboksilat (8,55 g, %84,5 verim) elde edildi. ¹H NMR (CDCl₃), tek diastereomer göstermektedir. Diğer diastereomerin bulunduğu fraksiyonların döner buharlaştırma yoluyla konsantre edilmeleri sonucunda, kahverengi renkli bir köpük formunda tert-bütül 4-((5R,7S)-5-metil-7-(4-nitrobenzoiloksi) -6,7-dihidro -5H-siklopenta

[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-karboksilat (0,356 g, %3,52 verim) elde edildi. LC/MS (APCI+) m/z 484 [M+H]⁺.

Basamak 11: 2:1 THF:H₂O'da (40 mL) yer alan 0°C sıcaklıktaki bir tert-bütül 4-((5R,7R)-5-metil-7-(4-nitrobenzoiloksi)-6,7-dihidro-5H-siklopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-karboksilat (2,30 g, 4,76 mmol) çözeltisinin üzerine LiOH-H₂O (0,499 g, 11,9 mmol) ilave edildi. Elde edilen reaksiyon karışımı oda sıcaklığına ulaşana dek ısıtıldı ve 1 saat boyunca karıştırıldı. THF döner buharlaştırma yoluyla çıkarıldı, doymuş NaHCO₃ eklendi ve karışım bir miktar etil asetat ile ekstrakte edildi. Bir araya toplanan ekstraktların doymuş NaHCO₃ ile yıkanmaları (1 X), kurutulmaları (Na₂SO₄), filtrelenmeleri ve konsantre edilmeleri sonucunda sarı renkli bir köpük formunda 4-((5R,7R)-7-hidroksi-5-metil-6,7-dihidro-5H-siklopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-karboksilat (1,59 g, %100,0 verim) elde edildi. Workup işleminden sonra yapılan HPLC'ye göre, üründe sadece > %98 alan saflığı söz konusuydu. LC/MS (APCI+) m/z 335 [M+H]⁺. Benzer bir yöntem kullanılarak tert-bütül 4-((5R,7S)-7-hidroksi-5-metil-6,7-dihidro-5H-siklopenta[d] pirimidin-4-il) piperazin-1-karboksilat hazırlandı.

Basamak 12: Dioksanda (15 mL) yer alan bir tert-bütül 4-((5R,7R)-7-hidroksi-5-metil-6,7-dihidro-5H-siklopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-karboksilat (0,600 g, 1,79 mmol) çözeltisinin üzerine 4M HCl/dioksan (11,2 ml, 44,9 mmol) ilave edildi. Reaksiyon karışımı nitrojen atmosferinde oda sıcaklığı altında gece boyunca (20 saat) karıştırıldı. Daha sonra karışım kuruyana dek konsantre edildi ve yüksek vakum hattı üzerinde kurutuldu. Ham ürün eterde süspanse

edildi, ultrasona tâbi tutuldu ve 5 dakika boyunca karıştırıldı. Katıların nitrojen basıncı yardımıyla bir orta boy sinterli huniden geçirilip filtre edilerek izole edilmeleri, eter ile durulanmaları, nitrojen basıncı altında kurutulmaları ve bir yüksek vakum hattı üzerinde bir kez daha kurutulmaları sonucunda, sarı renkli bir toz formunda (5R,7R)-5-metil-4-(piperazin-1-il)-6,7-dihidro-5H-siklopenta[d]pirimidin-7-ol dihidroklorür (0,440 g, %79,8 verim) elde edildi. LC/MS (APCI+) m/z 235. Benzer bir yöntem kullanılarak (5R,7S)-5-metil-4-(piperazin-1-il)-6,7-dihidro-5H-siklopenta[d]pirimidin-7-ol dihidroklorür hazırlandı.

Basamak 13: Bir miktar metil 2-(4-klorofenil)asetat (36,7 g, 199 mmol) ve paraformaldehit (6,27 g, 290 mmol), DMSO'da (400 mL) çözüldürüldü/süspanse edildi ve NaOMe (537 mg, 9,94 mmol) ile işleminden geçirildi. Elde edilen karışım, TLC analizi ile ham ürüne ulaşıldığı anlaşılıp reaksiyon tamamlanana dek oda sıcaklığı altında 2 saat boyunca karışmaya bırakıldı. Daha sonra karışım buzlu soğuk suyun (700 mL; beyaz emülsiyon) üzerine döküldü ve 1M HCl çözeltisi eklenerek nötralize edildi. Aköz katman bir miktar etil asetat (3 X) ile ekstrakte edildi ve organikler bir araya toplandılar. Organik katman bir miktar su (2 X) ve tuzlu suyla (1 X) yıkandı, ayrıldı, MgSO₄ ile kurutuldu, filtrelendi ve vakuma tâbi tutularak konsantre edildi ve bu işlemler sonucunda sarı renkli bir yağ formunda ham ürün elde edildi. Kalan artık, silika jel bulunan büyük boy bir sinterli filtreye yüklendi ve başlangıç maddesi/olefin toplanana dek 9:1 heksanlar:etil asetat ile elüe edildi. Daha sonra, istenen saf ürün tamamen elüe olana dek dolgu 1:1 heksanlar:etil asetat ile elüe edildi.

Konsantre saf fraksiyonlardan, renksiz bir yağ formunda metil 2-(4-klorofenil)-3-hidroksipropanoat (39,4 g, %92) elde edildi.

Basamak 14: Bir miktar metil 2-(4-klorofenil)-3-hidroksipropanoat (39,4 g, 184 mmol) DCM'de (500 mL) çözündürüldü ve TEA (64,0 mL, 459 mmol) ile işlemden geçirildi. Çözelti 0°C sıcaklığa ulaşana dek soğutuldu ve üzerine yavaşça MsCl (15,6 mL 202 mmol) uygulanarak işlemden geçirildi, daha sonra TLC analizi ile yapılan gözleme göre reaksiyonun tamamlandığı görülene dek 30 dakika boyunca karışmaya bırakıldı. Daha sonra çözelti 1N HCl çözeltisi ile bölüştürüldü ve aköz katman DCM ile bir kez ekstrakte edildi. Bir araya toplanan organik katmanlar 1N HCl çözeltisi ile bir kez daha yıkandılar, ayrıldılar, seyreltil NaHCO₃ çözeltisi ile yıkandılar ve son olarak ayrıldılar. Organik katmanın MgSO₄ ile kurutulması, filtrelenmesi ve vakum altında konsantre edilmesi sonucunda turuncu renkli bir yağ oluştu. Kalan artık, bir silika jel dolgusu bulunan büyük boy bir sinterli filtreye yüklenip 9:1 heksanlar:etil asetat ile elüe edildi ve bu işlemler sonucunda, TLC analizi ile saptandığı üzere istenen saf ürün elde edildi. Konsantre saf fraksiyonlardan, renksiz bir yağ formunda metil 2-(4-klorofenil)akrilat (30,8 g, %85) elde edildi. Bu metil (2-(4-klorofenil)akrilat (500 mg, 2,54 mmol), THF'de (1,35 mL) yer alan bir çözelti olarak, 0°C sıcaklıkta THF'de (5,0 mL) yer alan karıştırılmış bir i-PrNH₂ (217 µL, 2,54 mmol) çözeltisinin üzerine ilave edildi. Elde edilen reaksiyon karışımı, LCMS analiz ile reaksiyonun tamamlandığı görülene dek gece boyunca oda sıcaklığı altında karışmaya bırakıldı. Daha sonra, sürekli karıştırılan aminin üzerine pipet aracılığıyla Boc₂O (584 µL, 2,54 mmol) eklendi. Reaksiyon, karışımda yapılan LCMS ve TLC analizi ile tamamlandığı

tespit edilene dek gece boyunca karışmaya bırakıldı. Çözeltilinin vakuma tâbi tutularak konsantre edilmesi sonucunda, renksiz bir yağ formunda metil 3-(tert-bütoksikarbonil(izopropil)amino)-2-(4-klorofenil)propanoat (854 mg, %94) elde edildi. LC/MS (APCI+) m/z 256,1 [M-Boc]⁺.

Basamak 15: Bir miktar metil 3-(tert-bütoksikarbonil(izopropil)amino)-2-(4-klorofenil)propanoat (133 g, 374 mmol) THF'de (1,0 L) çözündürüldü ve oda sıcaklığında KOTMS (56,0 g, 392 mmol) ile işleminden geçirildi. Karışım, ham üründe yapılan LCMS analizi ile reaksiyonun tamamlandığı saptanana dek gece boyunca karışmaya bırakıldı. Ardından karışım vakum altında konsantre edilerek bir ıslak köpük elde edildi ve bunun gece boyunca vakum altında kurumaya bırakılması sonucunda beyaz renkli bir katı formunda 3-(tert-bütoksikarbonil(izopropil)amino)-2-(4-klorofenil)propanoata (148,7 g, %105) ulaşıldı. LC/MS (APCI+) m/z 242,1 [M-Boc-K]⁺.

Basamak 16: Bir miktar potasyum 3-(tert-bütoksikarbonil(izopropil)amino)-2-(4-klorofenil)propanoat (77,2 g, 203 mmol) THF'de (515 mL) çözündürüldü ve oda sıcaklığında pivaloil klorür (26,3 mL, 213 mmol) ile işleminden geçirildi. Karışım, karışık anhidrit oluşana dek 3 saat boyunca karışmaya bırakıldı. Ayrı bir şişede (S)-4-beziloksazolidin-2-on (46,1 g, 260 mmol) THF'de (600 mL) çözündürüldü ve -78°C sıcaklığa ulaşana dek soğutuldu. Çözelti n-BuLi (heksanlarda yer alan 102 mL hacminde bir 2,50 M çözelti, 254 mmol) ile işleminden geçirildi ve bir saat boyunca karışmaya bırakıldı. Hazırlanan anhidr çözelti, sürekli karıştırılan Li-

oksazolidinonun üzerine kanül yardımıyla ilave edildi ve karışım oda sıcaklığına ulaşana dek gece boyunca ısınmaya bırakıldı. Daha sonra karışım, doymuş amonyum klorür çözeltisi eklenerek söndürüldü ve daha fazla su ve etil asetat arasında bölüştürüldü. Aköz katman birkaç
5 defa ekstrakte edildi ve organikler bir araya toplandılar. Organik katman önce su ve ardından tuzlu suyla yıkandı, ayrıldı, $MgSO_4$ üzerinde kurutuldu, filtrelendi ve vakuma tâbi tutularak konsantre edildi. Kalan artığın kromatografi (4:1 heksanlar:etil asetat ile elüsyon yapılan silika jel) ile saflaştırılması/ayrıştırılması (diastereomerler)
10 sonucunda, viskoz yağlar formunda bulunan tamamen ayrılmış diastereomerler elde edildi: tert-bütil (R)-3-((S)-4-benzil-2-oksooksazolidin-3-il) -2-(4-klorofenil)-3-oksopropil (izopropil) karbamat (12,16 g, asit rasematın 1/2'si temelinde %24) ve tert-bütil (S)-((S)-4-benzil -2-oksooksazolidin-3-il) -2-(4-klorofenil)-3-oksopropil(izopropil)karbamat (39,14 g, asit rasematın 1/2'si
15 temelinde %77). LC/MS (APCI+) m/z 401,2 [M-Boc]+.

Basamak 17: THF (30 mL) ile suyun (15 mL) bulunduğu oda sıcaklığındaki sürekli karıştırılan bir çözeltinin üzerine çözünene dek
20 LiOH-H₂O (168 mg, 4,00 mmol) ilave edildi. Elde edilen karışım bir miktar hidrojen peroksit (suda yer alan 658 µL hacimli ağırlıkça %35'lik bir çözelti, 8,00 mmol) ile işleminden geçirildi ve 10 dakika boyunca oda sıcaklığında karışmaya bırakıldı. Daha sonra reaksiyon bir buz banyosunda 0°C sıcaklığa ulaşana dek soğutuldu ve 10
25 dakikalık bir süre boyunca THF'de (15 mL) yer alan bir çözelti olarak ekleme hunisi aracılığıyla tert-bütil (S)-3((S)-4-benzil-2-oksooksazolidin-3-il)-2-(4-klorofenil) -3-oksopropil (izopropil) karbamat (1,00 g, 2,00 mmol) ilave edildi. Ham üründe yapılan LCMS

analizi ile reaksiyonun tamamlandığı gözlemlenene dek, karışım oda sıcaklığı altında gece boyunca karışmaya bırakıldı. Reaksiyon 0°C sıcaklığa ulaşana dek soğutuldu ve daha sonra on dakikalık bir süre boyunca ekleme hunisi aracılığıyla 1M Na₂SO₃ (9,00 mL) çözeltisi ile işleminden geçirildi. Ekleme tamamlandıktan sonra, karışım oda sıcaklığına varana dek 10 dakika boyunca ısınmaya bırakıldı. Karışım, içerisindeki THF'yi çıkarmak maksadıyla konsantre edildi ve daha sonra bir miktar su ile seyreltilti. Aköz katman etil asetat (atılmıştır) ile iki defa yıkandı. Aköz katman, etil asetatla bölümlere ayrıldı ve daha sonra pH 2-3 seviyesine ulaşılana dek sürekli karıştırılıp üzerine 1M HCl damlatıldı. Aköz katman etil asetat ile iki defa ekstrakte edildi ve organikler bir araya toplandılar. Organik bir miktar suyla yıkandı, ayrıldı, MgSO₄ ile kurutuldu, filtrelendi ve vakuma altında konsantre edildi. Renksiz yağ ürünü bir saat boyunca yüksek vakuma tâbi tutulup karıştırılarak, bir viskoz yağ/köpük formunda (S)-3-(tert-bütoksikarbonil(izopropil)amino)-2-(4-klorofenil)propanoik asit (685 mg, %100) elde edildi. LC/MS (APCI+) m/z 242,1 [M-Boc]+.

Basamak 18: DCM (40 mL) ile DIEA'da (5,0 mL, 28,7 mmol) yer alan ve (5R,7R)-5-metil-4-(piperazin-1-il)-6,7-dihidro-5H-siklopenta[d]pirimidin-7-ol dihidroklorür (2,92 g, 9,51 mmol) ve (S)-3-(tert-bütoksikarbonil(izopropil)amino)-2-(4-klorofenil)propanoik asit (3,25 g, 9,51 mmol) içeren bir çözelti oda sıcaklığı altında 10 dakika boyunca karıştırıldı. Daha sonra karışımın üzerine HBTU (3,61 g, 9,51 mmol) ilave edildi. Karışım takip eden 1 saat boyunca oda sıcaklığı altında karıştırıldı. Ardından çözücü çıkarıldı ve kalan artık bir miktar etil asetat (500 mL) çözündürüldü ve su (6 X 100 mL) ile yıkandı. Organik faz kurutuldu ve konsantre edildi. Kalan artığın

kolon kromatografisine tâbi tutulup EtOAc-DCM/MeOH (20:1) ile elüe edilmesi sonucunda tert-bütil (S)-2-(4-klorofenil)-3-(4-((5R,7R)-7-hidroksi-5-metil-6,7-dihidro-5H-siklopenta[d] pirimidin-4-il) piperazin-1-il)-3-oksopropil(izopropil)karbamat (3,68 g, %69) elde edildi. LC/MS (APCI+) m/z 558,2 [M+H]⁺.

Basamak 19: Bir miktar tert-bütil (S)-2-(4-klorofenil)-3-(4-((5R,7R)-7-hidroksi-5-metil-6,7-dihidro-5H-siklopenta [d]pirimidin-4-il) piperazin-1-il)-3-oksopropil(izopropil) karbamat (2,50 g, 4,48 mmol) dioksanda (22,4 mL) çözündürüldü ve dioksanda (22,4 mL, 89,6 mmol) yer alan 4M HCl ile oda sıcaklığı altında işleminden geçirildi. Elde edilen çözelti, ham üründe yapılan LCMS analizi ile reaksiyonun tamamlandığı saptanana dek gece boyunca karışmaya bırakıldı. Daha sonra çözelti vakum altında konsantre edilerek bir jel elde edildi ve bu jel minimal miktarda metanolde (10 mL) çözündürüldü. Ardından çözelti pipet yardımıyla karıştırılmış etere (300 mL) aktarılarak beyaz renkli bir presipitat halinde istenen ürün elde edildi. Söz konusu ekleme işleminin yaklaşık olarak yarısında, beyaz renkli presipitat eriyip sarı renkli bir jel haline geldi. Madde vakum altında konsantre edilerek sarı renkli bir jel elde edildi ve bu jelin gece boyunca indirgenmiş basınç altında bekletilmesi sonucunda, açık sarı renkli bir toz formunda (S)-2-(4-klorofenil)-1-(4-((5R,7R)-7-hidroksi-5-metil-6,7-dihidro-5H-siklopenta [d]pirimidin-4-il) piperazin-1-il)-3-(izopropilamino)propan-1-on dihidroklorür (2,14 g, %90) elde edildi. ¹H NMR (D₂O, 400 MHz) 8,39 (s, 1H), 7,37-7,35 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,23-7,20 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 5,29-5,25 (m, 1H), 4,33-4,29 (m, 1H), 4,14-4,10 (m, 1H), 3,89-3,19 (m, 11H), 2,23-2,17 (m,

1H), 2,08-1,99 (m, 1H), 1,20-1,18 (m, 6H), 0,98-0,96 (d, J = 6,8 Hz, 3H). MS (APCI+) [M+H]⁺458.

Ornek 2: İn Vitro Hücre Proliferasyonu Eseyleri

5

Formül I bileşiği ile belirli spesifik kemoterapötik ajanların bulunduğu kombinasyonların in vitro potensi, ticari piyasada Promega Corp., Madison, WI firmasından edinilebilecek olan CellTiter-Glo® Luminesan Hücre Viyabilitesi Eseyi kullanılarak ölçülebilir. Bu

10 homojen esey yöntemi, Coleoptera lüsiferazının rekombinan ekspresyonuna dayanır (US 5583024; US 5674713; US 5700670) ve metabolik açıdan aktif hücrelerin göstergesi olan mevcut ATP miktarına dair yapılan ölçüm temelinde kültürdeki canlı hücrelerin sayısını belirlemeye yarar (Crouch et al (1993) J. Immunol. Meth.

15 160:81-88; US 6602677). CellTiter-Glo® Eseyi 96 veya 384 kuyucuklu formatta gerçekleştirilebilir ve bu olanak, eseyin otomatik yüksek verimli taramada (HTS) kullanılmasını mümkün kılar (Cree et al (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404). Homojen esey prosedüründe, reaktif (CellTiter-Glo® Reaktifi) tek başına doğrudan serum takviyeli

20 vasatta kültürlenmiş hücrelere eklenir. Hücrelerin yıkanmasına, vasatın çıkarılmasına ve birden çok pipetleme yapılmasına gerek yoktur. Bu sistem, reaktif ilave edilip içerik karıştırıldıktan sonraki 10 dakika içerisinde bir 384 kuyucuklu formatta 15 hücre/kuyucuk kadar az bir seviyede belirleme yapabilir.

25

Homojen "ekle-karıştır-ölç" formatı, mevcut ATP miktarıyla orantılı bir lüminesan sinyalin oluşması ve hücre lizisi sonucunu doğurur. ATP miktarı, kültürde bulunan hücrelerin sayısı ile doğru orantılıdır.

CellTiter-Glo® Eseyi, kullanılan hücre tipine ve vasata bağlı olarak yarı-ömrü genellikle beş saatten daha uzun olan, lusiferaz reaksiyonu ile üretilen bir "ışığı-tipi" lüminesan sinyal oluşturur. Canlı hücreler, bağıl lüminesan birimleriyle (RLU) ifade edilir. Substrat olarak kullanılan Kınkanatlı Lüsiferini, rekombinan ateşböceği lüsiferazı ile oksitlenerek karboksilden arındırılır ve eşzamanlı olarak ATP AMP'ye dönüşür ve fotonlar oluşur. Bahsi geçen daha uzun süreli yarı-ömür, reaktif enjektörleri kullanma ihtiyacını ortadan kaldırır ve birden çok plakada yürütülen sürekli veya kesikli işleme için esneklik sağlar. Bu hücre proliferasyonu eseyi, çeşitli farklı çok-kuyucuklu formatlarla, örneğin 96 veya 834 kuyucuklu formatla kullanılabilir. Veriler, lüminometre veya CCD kamera görüntüleme cihazı ile kayıt altına alınabilir. Lüminesans çıktısı, zamana karşı ölçülen bağıl ışık birimleri (RLU) cinsinden ifade edilir.

15

Örnek 3: İn Vivo Tümör Ksenograft Etkinliği

Buluşa uygun temsili kombinasyonların etkinliği, kanser hücreleri allograftları veya ksenograftları sıçanlara implante edilerek ve tümör barındıran hayvanlar söz konusu kombinasyonlar ile tedavi edilerek in vivo ortamda ölçüldü. Hücre hattına, tümör hücrelerinde belirli mutasyonların bulunup bulunmadığına, bileşiklerin hangi sırayla uygulandığına, dozlama rejimine ve başka faktörlere bağlı olarak değişken sonuçlar beklenebilir. Denek fareler, ilaç(lar) veya kontrol (Vehikül) ile uygulamaya tâbi tutuldular ve tümörün iki katına katlanmasına, logaritmik hücre ölümüne ve tümör inhibisyonuna kadar geçen süreyi ölçmek maksadıyla birkaç hafta veya daha uzun bir süre boyunca izlendiler. Bu modelde test edilmiş olan buluşun temsili

25

kombinasyonlarına ait sonuçlar Şekillerde sunulmaktadır. Şekillerde gösterilen veriler, temsili kombinasyonların ilgili ajanlar tek başlarına uygulandıklarında elde edilen sonuçlara kıyasla daha iyi gelişmiş sonuçlar sağladıklarını kanıtlamaktadır.

5

Örnek 4: PTEN Durumunun Ölçülmesi

PTEN durumu, sektörde bilinen uygun herhangi bir yolla ölçülebilir. Bunlara verilebilecek örneklerden biri IHC'dir. Alternatif olarak, Western blot analizi de kullanılabilir. PTEN antikorları ticari piyasada mevcuttur (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, Cascade Biosciences, Winchester, MA). "Neshat, M. S. et al. Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR, Proc. Natl Acad. Sci. USA 98, 10314-10319 (2001)" ve "Perren, A., et. al. Immunohistochemical Evidence of Loss of PTEN Expression in Primary Ductal Adenocarcinomas of the Breast, American Journal of Pathology, Vol. 155, No. 4, October 1999" eserlerinde, PTEN durumunun tespitine yönelik IHC ve Western blot analizi için örnek prosedürler bulunabilir. Ek olarak, sektörde bilinen teknikler kullanılarak, AKT mutasyonu, PI3K mutasyonu ve Her2/ErbB2 amplifikasyonu ile bağlantılı kanserler de belirlenip tanımlanabilir.

Örnek 5: Hücre Viyabilitesi Eseyleri

Hücreler, siyah renkli ve berrak tabanlı 384 adet kuyucuktan oluşan plakalara (Katalog 353962; Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ) kuyucuk başına 1500 hücre düşecek bir yoğunlukta yatırıldılar ve 37°C sıcaklık, %5 CO₂'de tüm geceyi içine alan bir ile 1,5 gün arası

bir süre boyunca inkübe edildiler. Daha sonra hücelere GDC-0068, GDC-0973 veya bunların kombinasyonunun seri seyreltileri ilave edildi ve elde edilen içerik 96 saat daha inkübe edildi. Daha sonra, üreticinin ortaya koyduğu protokol (CellTiter-Glo lüminesan Hücre Viyabilitesi Eseyi kiti; Katalog G7573; Promega, Madison, WI) takip edilerek hücresel adenozin trifosfat (ATP) seviyeleri ölçülüp hücre viyabilitesi belirlendi. Lüminesans sinyali, bir EnVision 2101 Çok-etiketli Okuyucuda (PerkinElmer; Waltham, MA) kaydedildi. Yüzde inhibisyon, aşağıda ifade edildiği gibi, GDC-0068 ve GDC-0973 kombinasyonuna maruz bırakılan hücrelerin bağıl ışık birimi (RLU) DMSO'ya maruz bırakılan hücrelerin RLU'suna bölünüp çıkan sonuç 1'den çıkarılarak hesaplandı:

$$\% \text{ inhibisyon} = 1 - (\text{RLU}_{\text{kombinasyon}} / \text{RLU}_{\text{DMSO}})$$

15

BLISS analizinde, beklenen % inhibisyon ($E = E_{\text{QDC0068}} + E_{\text{GDC-0973}} - E_{\text{GDC-0068}} \times E_{\text{GDC-0973}}$), deneysel olarak gözlemlenen % inhibisyon E_{OBS} ile karşılaştırıldı. BLISS skoru, beklenen % inhibisyon E ile deneysel olarak gözlemlenen inhibisyon E_{OBS} arasındaki farkı ($\Delta E = E_{\text{OBS}} - E$) teşkil etmektedir.

20

BLISS skorlarıyla tek ajan uygulamalarına kıyasla elde edilen kuvvetlenme derecesi ölçülür ve bir pozitif BLISS skoru basit aditiviteden daha fazlasının söz konusu olduğunu gösterir. Bir 250'den büyük toplam pozitif BLISS skoru, test edilen konsantrasyon aralıkları dahilinde kuvvetli bir sinerji söz konusu olduğu şeklinde değerlendirilir.

25

Aşağıda belirtilen üç kanser hücre hattına istinaden oluşturulan ısı haritaları ile kombinasyon potenslerine dair örnekler gösterilmektedir: PTEN bulunmayan ve B-RAF^{V600E} mutasyonu bulunan bir melanom hücre hattı olan A2058 (bkz: Şekil 9); PIK3CA^{H1047R} ve KRAS^{G13D} mutasyonları bulunan bir kolorektal kanser (CRC) hücre hattı olan HCT-116 (bkz: Şekil 5); ve bir KRAS^{G12C} mutasyonu bulunan bir küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) hücre hattı olan NCI-H2122 (bkz: Şekil 7). Uç hücre hattında da 0,37 ile 10 µm arasında kalan GDC-0068 konsantrasyonları ve 0,062 ile 0,56 µm arasında kalan GDC-0973 konsantrasyonlarında, her doz çifti için ≥ 15 olan BLISS skorları eşliğinde kuvvetli sinerjistik etkiler gözlemlendi.

GDC-0068 ile GDC-0973 arasındaki sinerjistik etkinin RAS/RAF ve/veya PI3K/Akt yolaklarının aktivasyonuna bağlı olup olmadığını araştırmak maksadıyla, bir melanom hastasından alınan bir hücre hatları setinde kombinasyon etkileri karşılaştırıldı: MALME3M B-RAF^{V600E} metastatik melanom hücre hattı ve hasta-eşleştirilmiş MALME3 normal cilt fibroblastları. MALME3M hücreleri, düşük konsantrasyonlarda GDC-0973'e duyarlılık gösterdi ve GDC-0068'in tek ajan aktivitesinin söz konusu olmamasına rağmen düşük GDC-0973 konsantrasyonları ve geniş bir GDC-0068 konsantrasyon aralığında kuvvetli sinerjistik etki gözlemlendi (bkz: Şekil 28). Buna karşın, MALME3 hücreleri GDC-0973'e karşı direnç gösterdi ve GDC-0068 ile yapılan kombinasyonda sinerjizm tespit edilmedi (bkz: Şekil 29). Benzer şekilde, NSCLC hücre hattı NCI-H2122 olarak aynı hastadan alınmış olan NCI-BL2122 normal B lenfoblastları da NCI-H2122 hücrelerinde görülen kuvvetli sinerjinin (bkz: Şekil 7) tersine

GDC-0973 ve GDC-0068 kombinasyonuna karşı herhangi bir sinerjistik cevap sergilemediler (bkz: Şekil 30). Bu sonuçlar, RAS/RAF yolağının ya da hem PI3K/Akt yolağını hem de RAS/RAF yolağının aktif olduğu kanser hücrelerinde MEK ve Akt inhibitörlerinden meydana gelen kombinasyonlarla seçici olarak terapötik bir fayda elde edilebileceğini göstermektedir.

Ornek 6: Western Blot Analizi

10 Kaplara (10 cm²) 10 mL hacmindeki iki milyon hücre ekildi ve takip eden gece boyunca (yaklaşık 16 saat) %5 CO₂ atmosferi altında 37°C sıcaklıkta inkübasyon gerçekleştirildi. Daha sonra hücreler 3 saat boyunca 1 ve 3 µM GDC-0068, 0,25 ve 0,75 µM GDC-0973 veya 1 µM GDC-0068 artı 0,25 µM GDC-0973'e tâbi tutuldular. Bu işlemin
15 ardından hücreler soğuk fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandılar ve proteaz inhibitörleri (Roche, Almanya), 1 mM fenilmetansülfonil florür (PMSF) ve Sigma (St. Louis, MO) mamulü Fosfataz İnhibitörü Kokteylleri 1 ve 2 takviyeli Biosource (Carlsbad, CA) mamulü 1 X Hücre Ekstraksiyon Tamponunda lize edildiler. Protein
20 konsantrasyonu, Bradford yöntemi (Bio-Rad Protein Eseyi (Bio-Rad; Hercules, CA) ile belirlendi. İmmünoblotlar için, Tris-Glisin %4-20 gradyanlı jellerle (Invitrogen; Carlsbad, CA) gerçekleştirilen elektroforez ile eşit miktarlarda protein ayrıştırıldı; proteinler, Bio-Rad'ın geliştirmiş olduğu Criterion sistemi ve protokolü kullanılarak
25 nitroselüloz membranlara aktarıldılar.

Aksi belirtilmedikçe, hepsi Cell Signaling Technologies'den (Beverly, MA) temin edilmiş olan aşağıda antikorlar kullanılmıştır:

- anti-pAkt (S473)
- anti-pAkt (T308)
- anti pMEK1/2 (S217/221)
- anti-pFoxO1 (T24)/FoxO3a (T32)
- 5 anti-pPRAS40 (T246)
- anti-p4EBP1 (T37/46)
- anti-pERK1/2 (T202/Y204)
- anti-pTSC2 (T1462)
- anti-pS6 (S235/236)
- 10 anti-pS6 (S240/244)
- poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) ve yarılmış PARP
- GAPDH (Advanced ImmunoChemical; Long Beach, CA)

- Kombinasyonun Akt ve Mek sinyaline etkisini incelemek için, 1 ve 3
- 15 μ M GDC-0068, 0,25 ve 0,75 μ M GDC-0973 ya da sinerjistik etkinin gözlemlendiği 1 μ M GDC-0068 artı 0,25 μ M GDC-0973 kombinasyonuna maruz bırakılan HCT-116 CRC hücrelerinde Western blotlar üzerinden Akt ile MEK'in her ikisinin de downstream hedefleri değerlendirildi. Şekil 24'te gösterildiği gibi, kombinasyon
- 20 kullanıldığında Akt ile MEK'in her ikisinin de downstream hedeflerinin birlikte knockdown olduğu, pTSC2, pS6 (hem s235/236 hem de S240/244), PARP ve yarılmış PARP gibi bir dizi hedefin kuvvetli ölçüde knockdown olduğu, ajanlardan herhangi birinin tek başına ama daha yüksek bir dozda kullanıldığı duruma kıyasla daha
- 25 iyi bir knockdown meydana geldiği gözlemlendi.

Örnek 7: Akış Sitometrisi Eseyleri

HCT-116 hücreleri 96 kuyucuklu doku kültürü plakalarına ekildiler. 37°C, %5 CO₂'de gece boyunca inkübasyon yapıldıktan sonra, hücreler 4 gün boyunca artan konsantrasyonlarda GDC-0068 veya GDC-0973 ya da bu ikisinin kombinasyonuna tâbi tutuldular.

5 Apoptozu tespit etmek için, 4 mM CaCl₂, 5 µL aneksin V-florescein izotiosiyanat (FITC) (BD Pharmingen; Franklin Lakes, NJ) ve 5 µg/mL propidyum iyodür (PI) içeren 100 µL PBS'ye 100 µL hücre süspansiyonu eklendi. Karışım 30 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edildi ve hücreler bir akış sitometresi (BD Biosciences; San

10 Jose, CA) ile analiz edildiler.

Hem tek başına ajan uygulamalarında hem de GDC-0068 ve GDC-0973 çiftinden oluşan kombinasyon ile yapılan uygulamada propidyum iyodür- (PI) veya aneksin V- (AV) pozitif hücrelerin

15 yüzdesi ölçüldü ve hücre ölümü indüksiyonuna yönelik sinerjistik etki BLISS analizi ile analiz edildi. Kombinasyon uygulaması tek ajan uygulamalarına kıyasla daha yüksek bir PI⁺/AV⁺ hücre yüzdesi sağladı ve 0,37 ilâ 10 µM GDC-0068 ile 0,185 ilâ 0,556 µM GDC-0973'te

20 kuvvetli sinerjistik etki (BLISS skoru ≥ 15) gözlemlendi. Dolayısıyla, GDC-0068 ve GDC-0973 arasındaki kombinasyon HCT-116 hücrelerinde hücre ölümü indüksiyonu konusunda da sinerjistik etki sağladı.

Sektörde bilgi ve beceri uzmanların kolaylıkla anlayabilecekleri üzere

25 yukarıda gösterilen yapı ve proseste pek çok modifikasyon ve değişiklik yapılabilir ve dolayısıyla buluşun kapsamının yukarıda anlatıldığı gibi olan yapı ve proses ile sınırlı kalması hedeflenmemektedir.

TARİFNAME İÇERİSİNDE ATIF YAPILAN REFERANSLAR

Başvuru sahibi tarafından atıf yapılan referanslara ilişkin bu liste, yalnızca okuyucunun yardımı içindir ve Avrupa Patent Belgesinin bir kısmını oluşturmaz. Her ne kadar referansların derlenmesine büyük önem verilmiş olsa da, hatalar veya eksiklikler engellenememektedir ve EPO bu bağlamda hiçbir sorumluluk kabul etmemektedir.

Tarifname içerisinde atıfta bulunulan patent dökümanları:

- US 61471038 B [0001]
- WO 2008006040 A [0004] [0038]
- WO 2010006225 A [0005]
- WO 9615111 A [0044]
- WO 2007044515 A1 [0046]
- US 6960614 B [0047]
- US 6972298 B [0047]
- US 2004147478 A [0047]
- US 2005085550 A [0047]
- US 3773919 A [0063]
- US 5583024 A [0137]
- US 5674713 A [0137]
- US 5700670 A [0137]
- US 6602677 B [0137]

10

Tarifnamede belirtilen patentleştirilmemiş literatür:

- **HARDIE, G. ; HANKS, S.** The Protein Kinase Facts Book. Academic Press, 1995, I, , II [0003]
- **COHEN, P.** Nature Rev. Drug Discovery, 2002, vol. 1, 309 [0003]
- Handbook of Pharmaceutical Salts. Properties, Selection and Use. Zurich: Wiley-VCH, 2002 [0033]
- **S. BERGE et al.** Journal of Pharmaceutical Sciences, 1977, vol. 66 (1), 1-19 [0033]
- **LOCHMULLER, C. H. J.** Chromatogr., 1975, vol. 113 (3), 283-302 [0043]
- Drug Stereochemistry, Analytical Methods and Pharmacology. Marcel Dekker, Inc, 1993 [0043]
- **E.; WILEN, S.** Stereochemistry of Organic Compounds. John Wiley & Sons, Inc, 1994, 322 [0044]
- **JACOB III. J.** Org. Chem., 1982, vol. 47, 4165 [0044]

- **P. GOULD.** International J. of Pharmaceutics, 1986, vol. 33 (201), 217 [0033]
- **ANDERSON et al.** The Practice of Medicinal Chemistry. Academic Press, 1996 [0033]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Co, 1995 [0033] [0064] [0088]
- The Orange Book. Food & Drug Administration [0033]
- **CHOU ; TALALAY.** Adv. Enzyme Regul., 1984, vol. 22, 27-55 [0035]
- **CHOU ; TALALAY.** New Avenues in Developmental Cancer Chemotherapy. Academic Press, 1987 [0035]
- **LEHAR et al.** Molecular Systems Biology, 2007, vol. 3, 80 [0035]
- **T. W. GREENE.** Protective Groups in Organic Synthesis. John Wiley & Sons, 1991 [0038]
- **ELIEL, E. ; WILEN, S.** Stereochemistry of Organic Compounds. John Wiley & Sons, Inc, 1994 [0043]
- Chiral Liquid Chromatography. Chapman and Hall, 1989 [0044]
- **OKAMOTO.** J. of Chromatogr., 1990, vol. 513, 375-378 [0044]
- CHEMICAL ABSTRACTS, 391210-10-9 [0047]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publ. Co, 1995 [0058] [0062]
- Pharmaceutical Dosage Forms. Marcel Decker, vol. 3 [0088]
- **NESHAT, M. S. et al.** Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2001, vol. 98, 10314-10319 [0097] [0140]
- **PERREN, A.** Immunohistochemical Evidence of Loss of PTEN Expression in Primary Ductal Adenocarcinomas of the Breast. American Journal of Pathology, October 1999, vol. 155 (4) [0097] [0140]
- **CROUCH et al.** J. Immunol. Meth., 1993, vol. 160, 81-88 [0137]
- **CREE et al.** AntiCancer Drugs, 1995, vol. 6, 398-404 [0137]

ŞEKİLLERDEKİ YAZILARIN ANLAMLARI

ŞEKİL 1

A = GDC – 0068 ve GDC - 0973

5 B = Tümör Hacimleri

C = Ortalama Tümör Hacmi

D = Münferit Tümör Hacmi

E = Vehikül

F = Tümör Hacmi

10 G = Test Ajanı

H = Uygulama Yolu

I = Program

J = Doz

K = Gün

15 L = Son Gün

M = (hacim)

N = (alt,üst)

ŞEKİL 4

20 O = İn Vitro Kolorektal Kanser

P = IC50'ler

R = Bliss Skorları

S = Doku

T = Hücre Hattı

25 U =Akt yolağı aktivasyonu

V = Ras/Raf aktivasyonu

Y = diğerleri

Z = Toplam Pozitif

A1 = Toplam

B1 = Kolon

C1 = moleküler alt - tip

D1 = PI3K aktivasyonu

5 E1 = MAPK aktivasyonu

F1 = Çevrim

G1 = Maksimum

H1 = PI3K ve Ras yolağı mutasyonları yüksek sıklıkta birlikte görülmüşlerdir

10 I1 = Her iki yolak mutasyonunun da bulunduğu hücrelerde kuvvetli sinerji görülmüştür

J1 = AKT2 mutasyonu

K1 = PI3K Mutasyonu

15 **ŞEKİL 5**

L1 = (kolon – PI3K ve Kras Mutant) in vitro Mek ve Akt Kombinasyonu

M1 = Toplam Bliss

N1 = Pozitif Bliss

20 O1 = Minimum

P1 = Bliss Skoru Aralığı

R1 = Bliss skoru

S1 = İnhibisyon

25 **ŞEKİL 6**

T1 = moleküler alt-tip

U1 = akciğer

V1 = B Lenfoblastı

Y1 = Bilinen herhangi bir PI3K yolağı mutasyonunun yer almadığı, yalnızca Ras / Raf mutasyonlarının bulunduğu hücreler de dahil test edilen bütün hücrelerde kuvvetli sinerji görülmüştür.

Z1 = (NSCLC –Kras Mutant) İn Vitro Mek ve Akt Kombinasyonu

5

ŞEKİL 8

A2 = Melanom

B2 = Normal Fibroblast

C2 = yüksek

10 D2 = Sıklıkla Pten- ile birlikte, bazen PI3K mutasyonu veya Akt3 aşırı ekspresyonu ile birlikte görülen ağırlıklı olarak Braf mutasyonu

E2 = Bilinen herhangi bir PI3K yolağı mutasyonunun yer almadığı, yalnızca BRAf mutasyonunun bulunduğu hücreler de dahil test edilen bütün melanom hücrelerinde kuvvetli sinerji görülmüştür.

15

ŞEKİL 9

F2 = Maksimum % İnhibisyon

G2 = Kombinasyon

H2 = Sadece

20 I2 = A2058 (Melanom – PTEN -/- ve Braf Mutant) İn Vitro Mek ve Akt Kombinasyonu

J2 = Minimal İn Vitro Tek Ajan Aktivitesi

ŞEKİL 10

25 K2 = Tek ajan uygulamalarına kıyasla her iki yolak aktivitesinde de kaydedilen daha kuvvetli knockdown

L2 = meme

M2 = hücre viyabilitesinin % inhibisyonu

N2 = Bliss ek skoru
 O2 = Kombinasyon etkisi
 P2 = Akti etkisi
 R2 = MEKi etkisi

5 S2 = tek ajan etkisi

ŞEKİL 11

T2 = Sinerji
 U2 = MDAMB468'de tek bileşik dozu cevabı

10 V2 = MDAMB468'de normalize edilmiş tek bileşik dozu cevabı

Y2 = Viyabilite
 Z2 = Normalize Veriler

A3 = Bağlı
 B3 = Mutlak

15 C3 = kombinasyon

ŞEKİL 12

D3 = PTEN yok
 E3 = Bazal alt - tip

20 F3 = Artan sinerji

G3 = Bazal
 H3 = Luminal

I3 = 0068 + MEKi, bazı meme kanseri hücre hatlarında iyi kombinasyon faydaları göstermektedirler.

25

ŞEKİL 13

J3 = Yumurtaılık
 K3 = KOPYA

L3 = PI3K ve Ras yolağı mutasyonları düşük sıklıkta birlikte görülmüşlerdir.

M3 = Yumurtalık kanserlerinde Raf-1 ve A-Raf aktivasyonu görülmüş ancak Braf aktivasyonu görülmemiştir.

- 5 N3 = Tek başına GDC – 0068 kullanımına ya da her iki ajanın birlikte kullanımına dirençli hücreler de dahil olmak üzere bilinen herhangi bir Ras / Raf mutasyonu bulunmayan hücrelerde sinerji görülmüştür.

ŞEKİL 14

- 10 O3 = Prostat

P3 = Hem PI3K mutasyonu hem de Braf mutasyonu bulunan bir hücre hattında sinerji görülmüştür.

ŞEKİL 15

- 15 R3 = MX-1 Meme Tümörlerinde Oral Dozlanan GDC – 0068 + GDC-0973 (MEK inhibitörü)

ŞEKİL 16

S3 = metil selüloz tween

- 20 T3 = H2122 NSCLC Tümörlerinde Oral Dozlanan GDC-0068 + GDC 0973(MEK inhibitörü)

ŞEKİL 17

- 25 U3 = SW1990 Pankreas Tümörlerinde Oral Dozlanan GDC-0068+GDC-0973 (MEK inhibitörü)

ŞEKİL 18

V3 = Pa_Tu-8902 Pankreas Tümörlerinde Oral Dozlanan GDC-0068 + GDC-0973 (MEK inhibitörü)

ŞEKİL 19

5 Y3 = 537Mel Melanom Tümörlerinde Oral Dozlanan GDC-9968 + GDC-0973 (MEK inhibitörü)

ŞEKİL 20

10 Z3 = A2058 Melanom Tümörlerinde Oral Dozlanan GDC-0068 + GDC-0973 (MEK inhibitörü)

ŞEKİL 21

15 A4 = HCT-116 Kolorektal Tümörlerinde Oral Dozlanan GDC-0068 + GDC-0973 (MEK inhibitörü)

ŞEKİL 22a

B4 = Tek Ajan IC50'leri
C4 = Genotipler
D4 = Birden Çok Hücre Hattında GDC-0068 ve GDC-0973
20 Kombinasyonunun Sinerjisi

ŞEKİL 22b

E4 = Kombinasyon Bliss Skorları

25 ŞEKİL 24

F4 = Yarılmış

ŞEKİL 25

G4 = LME'ye Uydurulmuş Tümör Hacmi

H4 = Kombinasyon gruplarında daha kuvvetli TGI görülmüştür.

I4 = Kombinasyonun sağladığı TGI %81'dir.

J4 = Tek ajan GDC-0068 aktivitesinin sağladığı TGI <0
5 düzeyindedir.

K4 = Tek ajan GDC-0973'ün sağladığı TGI %30'dur.

ŞEKİL 26

L4 = Vehikül Uygulanan Kontrole Kıyasla Fosfo-Protein Ekspresyon

10 Seviyelerinde Sağlanan İstatiksel Açıdan Anlamlı Değişimler

M4 = Ekspresyonda Meydana Gelen Misli Değişim

N4 = alfa

O4 = Histon

P4 = Fosfo – Proteinler

15

ŞEKİL 27

R4 = Tek ajan Uygulamalarına Kıyasla Kombinasyon Uygulaması ile
Fosfo-Protein Ekspresyon Seviyelerinde Sağlanan İstatiksel Açıdan
Anlamlı Değişimler

20 S4 = GDC-0068'e kıyasla kombinasyon

T4 = GDC-0973'e kıyasla kombinasyon

ŞEKİL 31

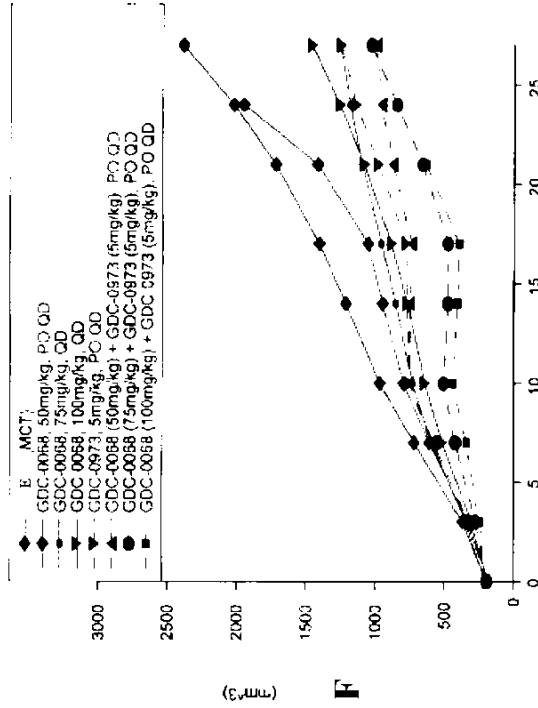
U4 = Fosfo-Protein Ekspresyon Seviyelerindeki Değişimler (24 saat)

25 V4 = Vehiküle Kıyasla Log2 Misli Değişim

SEKİL 2

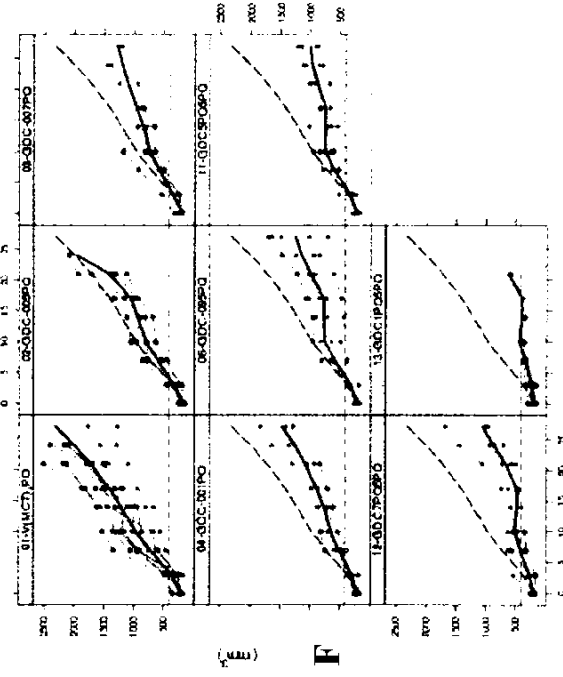
A (5mg/kg):

C



B

D

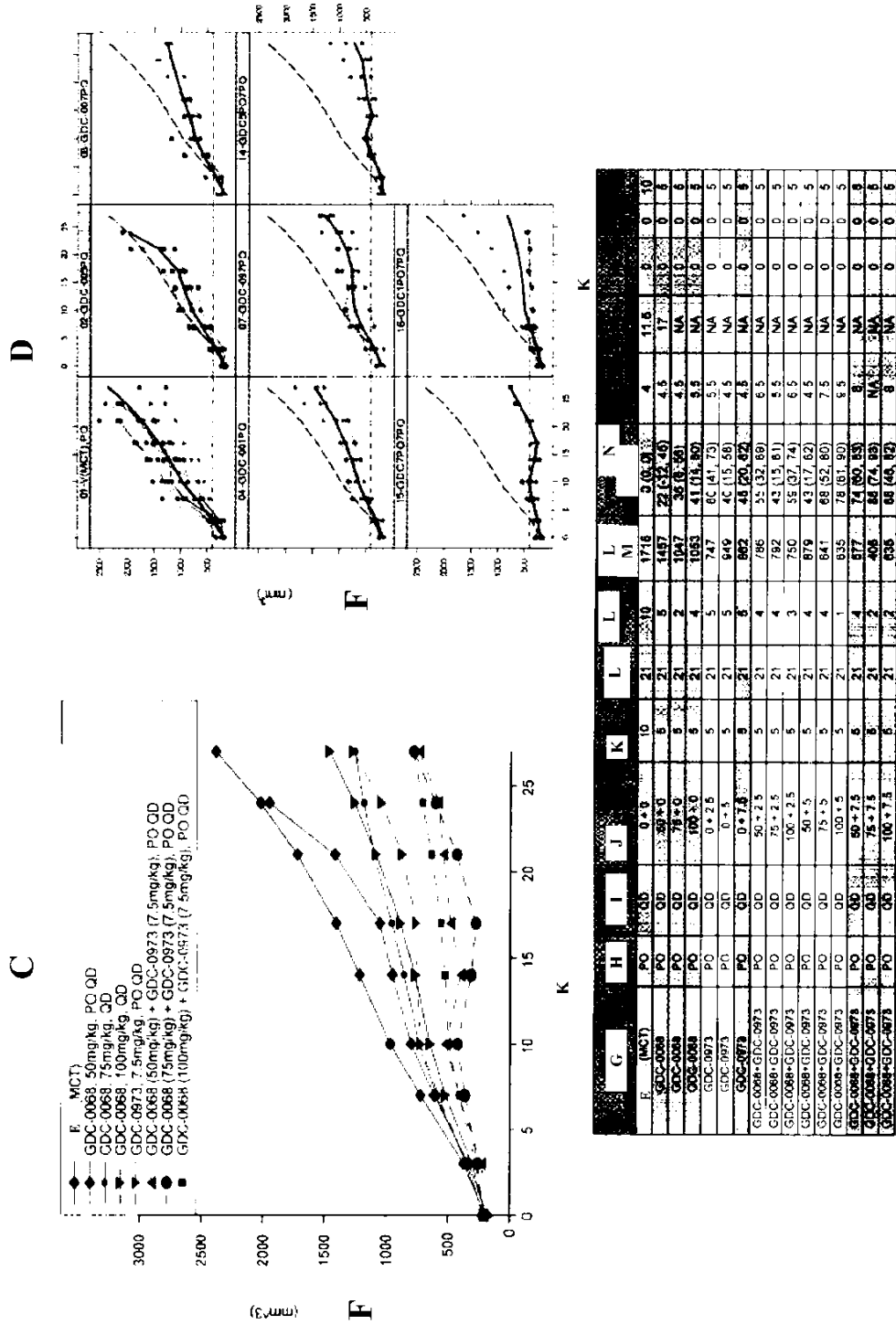


K

K

G	H	I	J	K	L	M	N
E (MCT)	PO	QD	0 + 0	10	21	10	0 (0, 0)
GDC-0068	PO	QD	50 + 0	5	21	5	17 (12, 45)
GDC-0068	PO	QD	75 + 0	5	21	2	18 (10, 55)
GDC-0068	PO	QD	100 + 0	5	21	4	10 (3, 60)
GDC-0973	PO	QD	0 + 2.5	5	21	5	74 (41, 73)
GDC-0973	PO	QD	0 + 5	5	21	8	94 (45, 85)
GDC-0973	PO	QD	0 + 7.5	5	21	5	86 (45, 62)
GDC-0068+GDC-0973	PO	QD	50 + 2.5	5	21	4	78 (55, 69)
GDC-0068+GDC-0973	PO	QD	75 + 2.5	5	21	4	79 (43, 61)
GDC-0068+GDC-0973	PO	QD	100 + 2.5	5	21	3	59 (37, 74)
GDC-0068+GDC-0973	PO	QD	50 + 5	5	21	4	48 (47, 62)
GDC-0068+GDC-0973	PO	QD	75 + 5	5	21	4	61 (63, 60)
GDC-0068+GDC-0973	PO	QD	100 + 5	5	21	1	65 (78, 61)
GDC-0068+GDC-0973	PO	QD	50 + 7.5	5	21	4	57 (74, 60)
GDC-0068+GDC-0973	PO	QD	75 + 7.5	5	21	2	40 (85, 74)
GDC-0068+GDC-0973	PO	QD	100 + 7.5	5	21	2	63 (88, 82)

(7.5mg/kg) :



SEKIL 4 O

S	T	U	V	RTK	Y	P		R	
								Z	A1
B1	HCT-116 (PRC)*	PI3K H1047R	Kras G13D		E-Cad, RER+	GDC-0068XL-518	>10		460
B1	PLD-1 (PRC)*	PI3K E545K, D549N	Kras G13D		p53, RER+		>10		339
B1	LS174T (PRC)*	PI3K H1047	Kras G12D		E-Cad, RER+		9.13		242
B1	HM-7	PI3K H1047	Kras G12D				7.09	228	140
B1	LS180	PI3K H1047R, P421L	Kras G12D		RER+		>10	226	173
B1	HT-29 (PRC)*	PI3K L568F, L569F, P449T	Braf V600E		p53		>10	204	201
B1	SW620 (PRC)*		Kras G12V		RER+		>10	199	156

	T	C1	D1	E1	GDC-0068 IC50 (uM)	FI 1	FI 2	FI 3
CRC	KM12		PTEN-			6/29/2009	7/10/2009	8/17/2009
CRC	Lovo		J1	KRAS	2.3			
CRC	LS180		K1	KRAS	2.25			
CRC	MDST8		PTEN-	BRAF	GI		\$	
CRC	HT-29		K1	BRAF	GI		\$	

• H1

• I1

SEKIL 6 NSCLC P

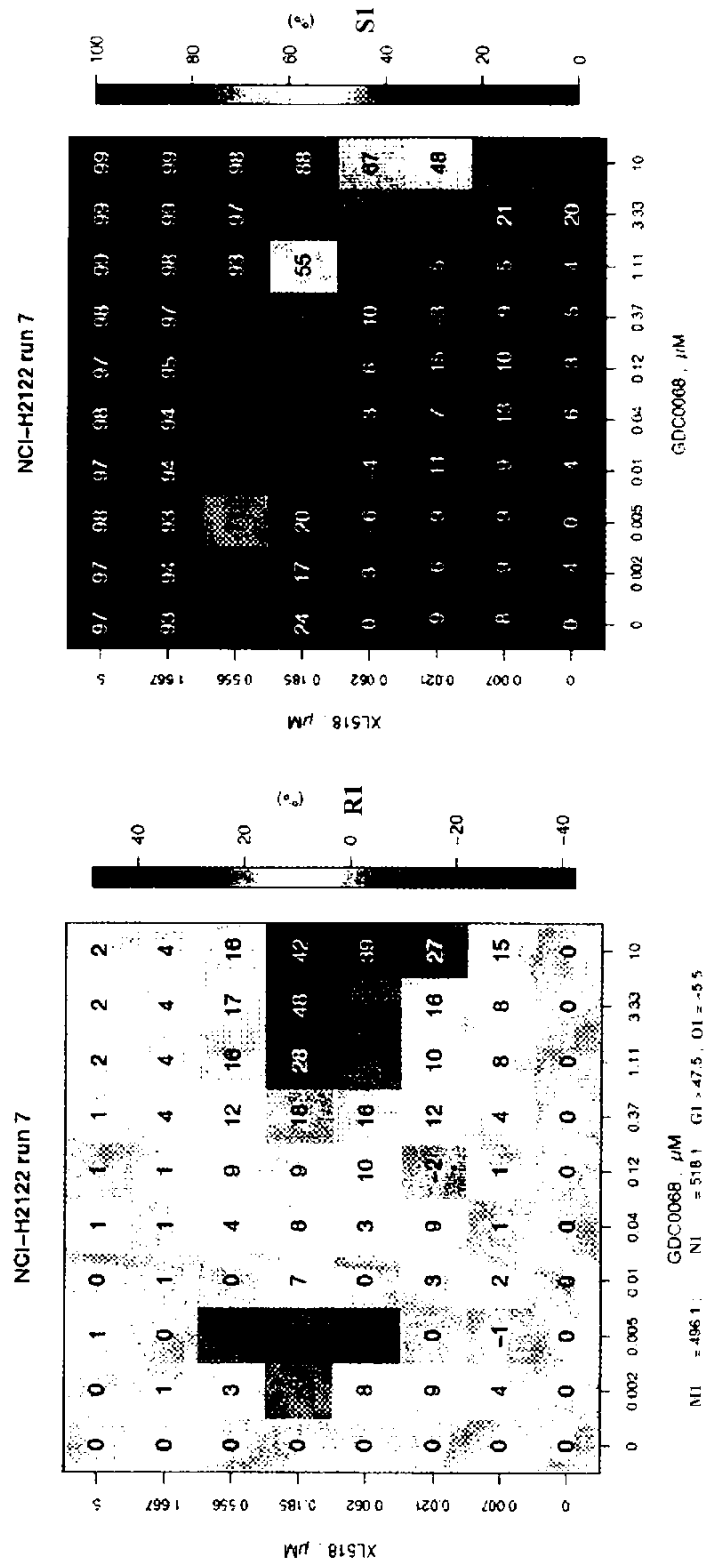
S	T	U	V	RTK	Y	GDC-0068	XL-518	P	Z	R
UI-NSCLC	H460 (PRC)*	PI3K E545K	Kras Q61H	EGFR L933P	LKB1	>10	>5			468
UI-NSCLC	NCI-H2122		Kras G12C		p53, LKB1	>10	0.3			496
UI-NSCLC	H1299 (PRC)*		Nras Q61K		p53	>10	3.01			384
UI-NSCLC	SK-MES-1 (PRC)*	PI3K L997P	Kras N85K		p53	>10	0.50			277
UI-NSCLC	MV522 (PRC)*		Braf V600E			>10	0.04			125
UI-NSCLC	A549 (PRC)*	PI3K M772X, N996H	Kras G12S		p53, LKB1	>10	0.34			180
V1	NCI-BL2122					4.54	>5		12	-549

	T	T1	D1	E1	GDC-0068 IC50 (uM)	F1 1	F1 2	F1 3
NSCLC	NCI-H2122	WT		KRAS	G1	6/29/2009	7/10/2009	8/17/2009
NSCLC	NCI-H460	K1		KRAS	G1	s	s	s

- H1
- Y1

SEKIL 7 H2122

Z1



P1 : GDC-0973 0.021-0.185uM, GDC-0068 0.37-10uM

SEKİL 8 A2

S	T	U	V	RTK	Y	P		R	
						GDC-0068	XL-518	Z	A1
A2			Braf V600E			>10	0.07		684
A2		Akt3 C2	Braf V600E			>10	0.01		548
A2		PTEN-	Braf V600E		p53	>10	0.6		446
A2		PTEN-	Braf del amp			2.33	0.02		428
B2	MALME3					5.02	>5	42	-142

D2

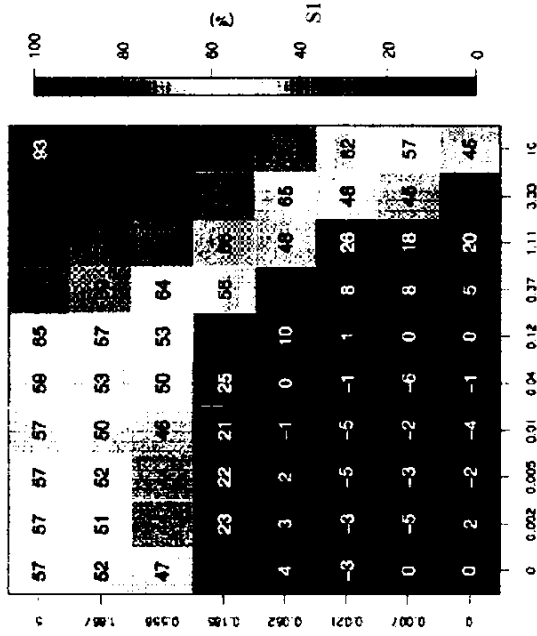
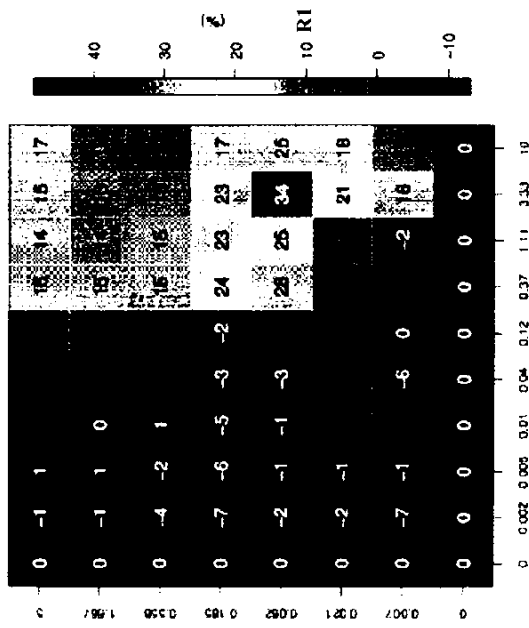
E2

SEKIL 9

I2
J2

BLISS
A2058 F1 1

%
S1
A2058 F1 1

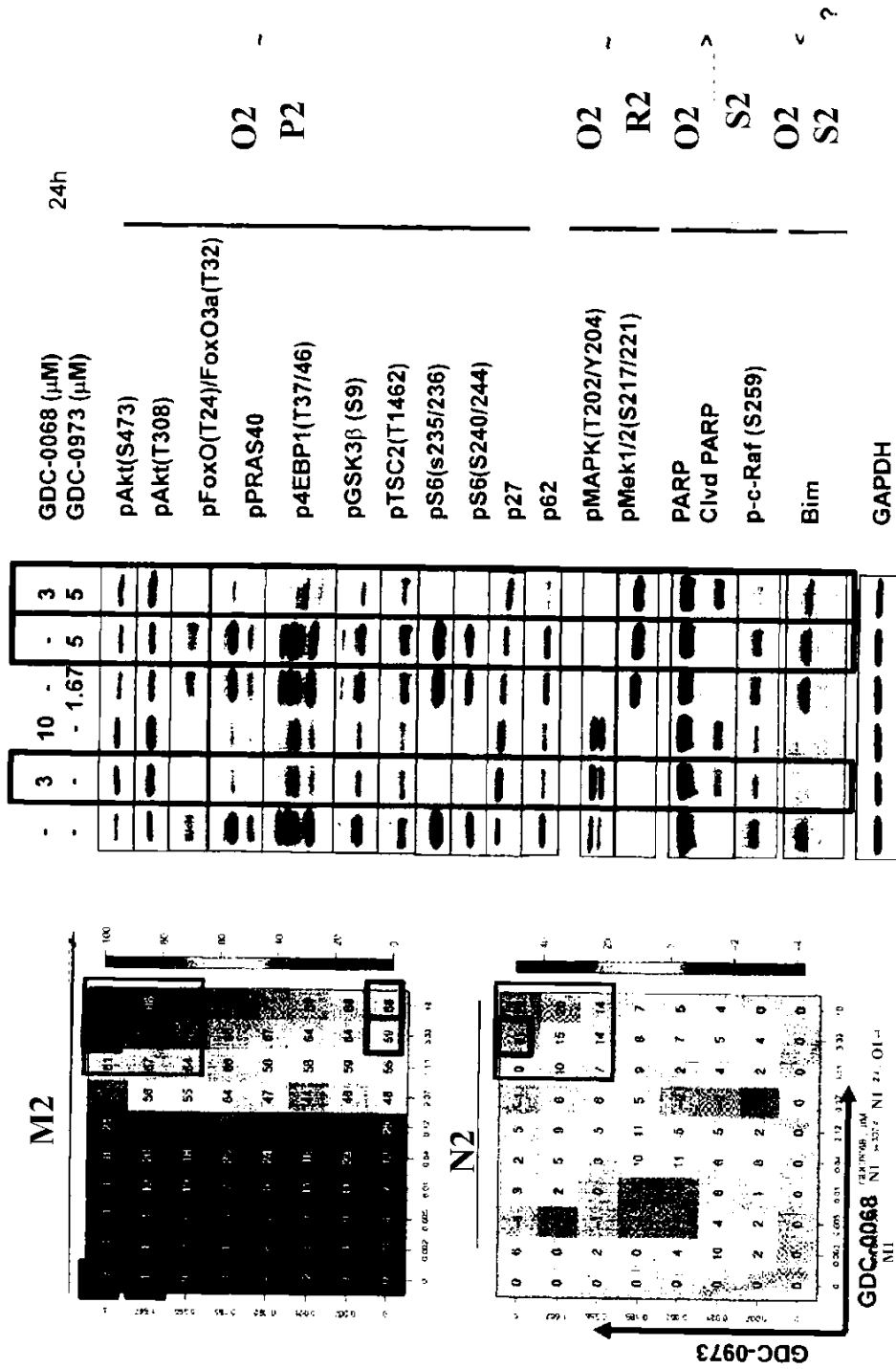


MI 446.1. N1 -502.4. G1 337. O1 -7.4

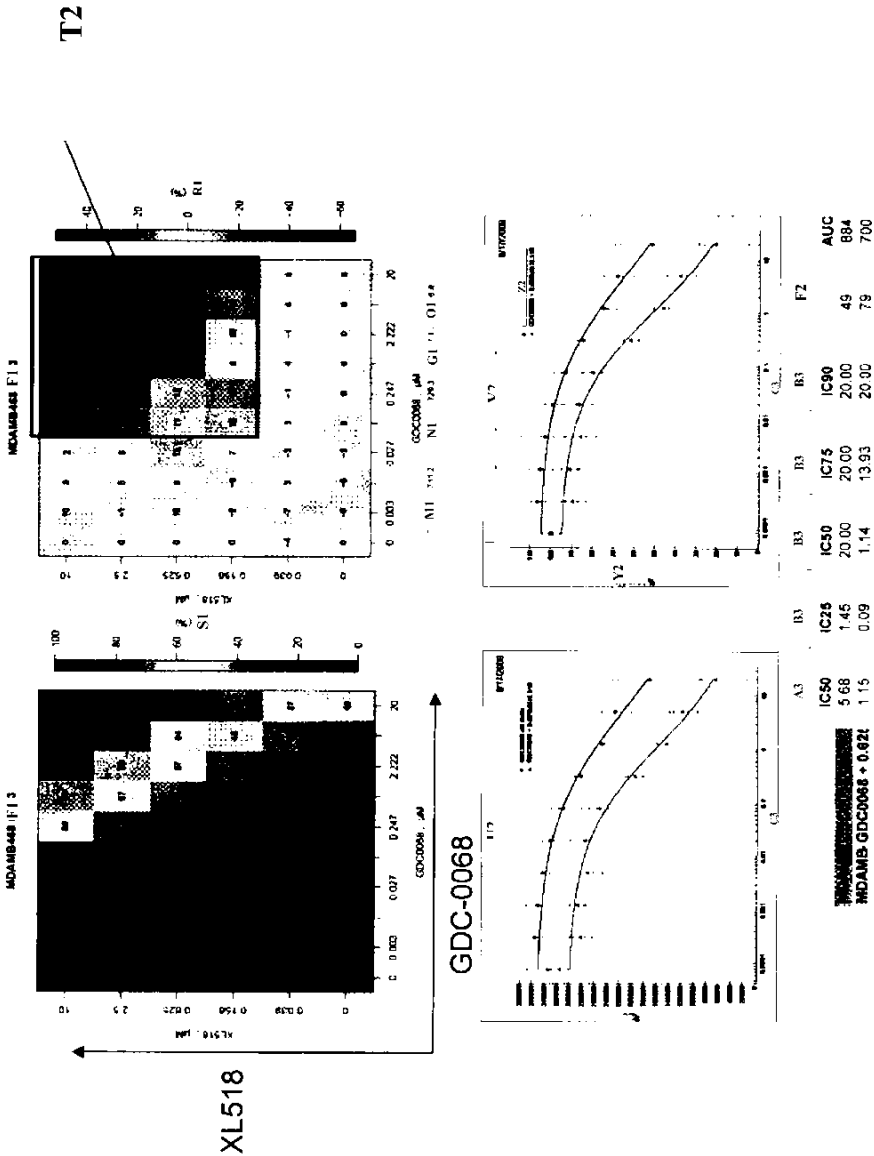
S	T	P				R				F2			
		PTEN	PI3K	Kras	Braf	Y	GDC-0068 0973	A1	# G2 BS>15	[GDC-00681 09731 @ G1 @ G1	GDC-0068 0973 H2 H2		
A2058	A2	N			V600F		>10	>5	502	34	93	45	57

P1 : GDC-0973 0.21uM-0.185uM, GDC-0068 0.37-10uM
Brian B Lee, Kui Lin

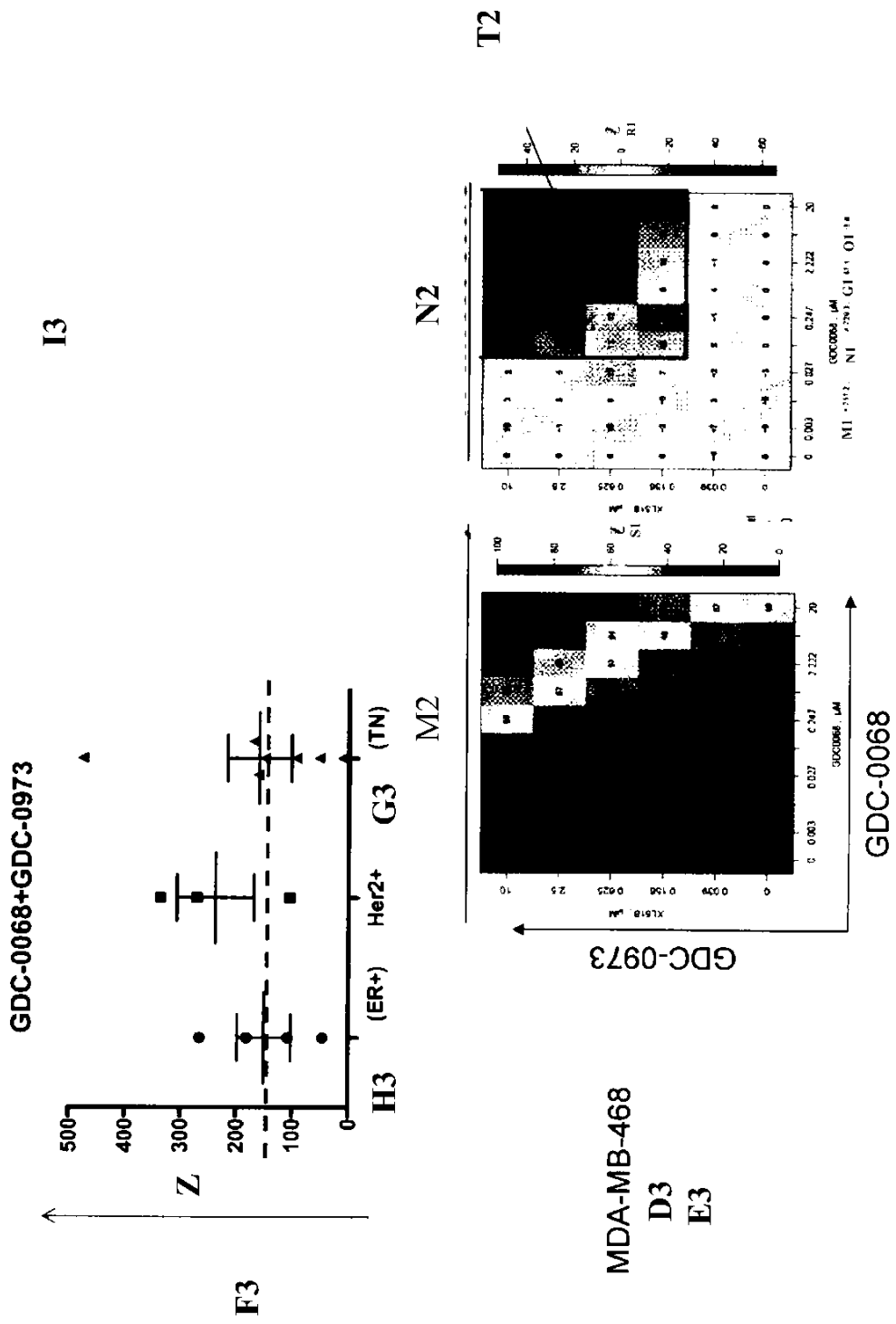
BT474M1 (ER+ L2 , PI3K K111N, Her2+, Braf G534D?)



ŞEKİL 11 XL518 x GDC0068 G2 – MDA-MB-468



SEKİL 12 GDC-0973 (MEKİ) + GDC0068 C3



SEKİL 13 J3

S	T	U	V	RTK	Y	P	R
J3		PI3Kp110amp, p85mut, Akt2amp				GDC-0068 XL-518	Z AI
J3		ND	ND	ND	p53	9.04>5	573
J3		PTEN-, PI3K H1047Y	Kras G13C		ND	>10 1.81	334
J3		PI3K H1047R				0.67 2.48	282
J3		PI3K O1069W				>10 >5	239
J3		PTEN mut			p53	0.66 0.39	211
J3			Bratdel		p53,p16	>10 0.98	131
J3						9.19 0.39	107
J3							47

	T	C1	D1	E1	GDC-0068 IC50 (uM)	F1 1	F1 2	F1 3
J3	TOV21G		PTEN/PI3K	KRAS	0.558	6/29/2009	7/10/2009	8/17/2009
J3	CAOV3		PIK3CA 4 K3		GI	8		
J3	EFO27		PTEN		0.55			
J3	OVCAR3		AKT2 amp		1.44			
J3	SKOV3		PI3K		GI			8

• L3 M3 N3 to

•

•

•

SEKİL 14 O3

		T	C1	D1	E1	GDC-0068 IC50 (uM)	F1 1 6/29/2009	F1 2 7/10/2009	F1 3 8/17/2009
O3		22RV1		K1	BRAF	9.09			
O3		DU145		WT		G1			
O3		PC3		PTEN-		2.26			
O3		PC3MLN4		PTEN-		11.03			
						IC50>5			

L3

P3

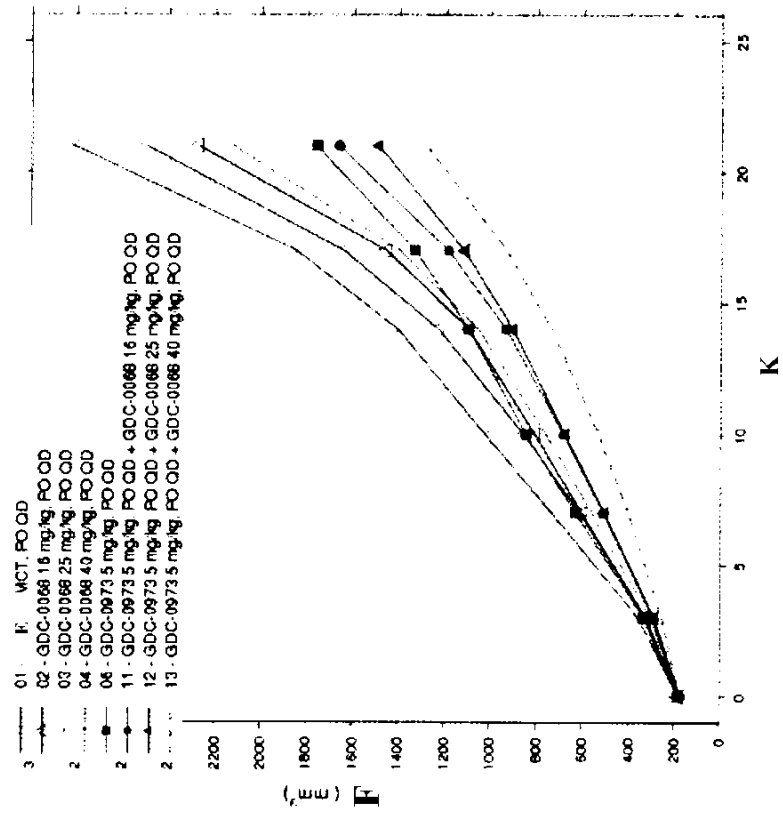
•

•

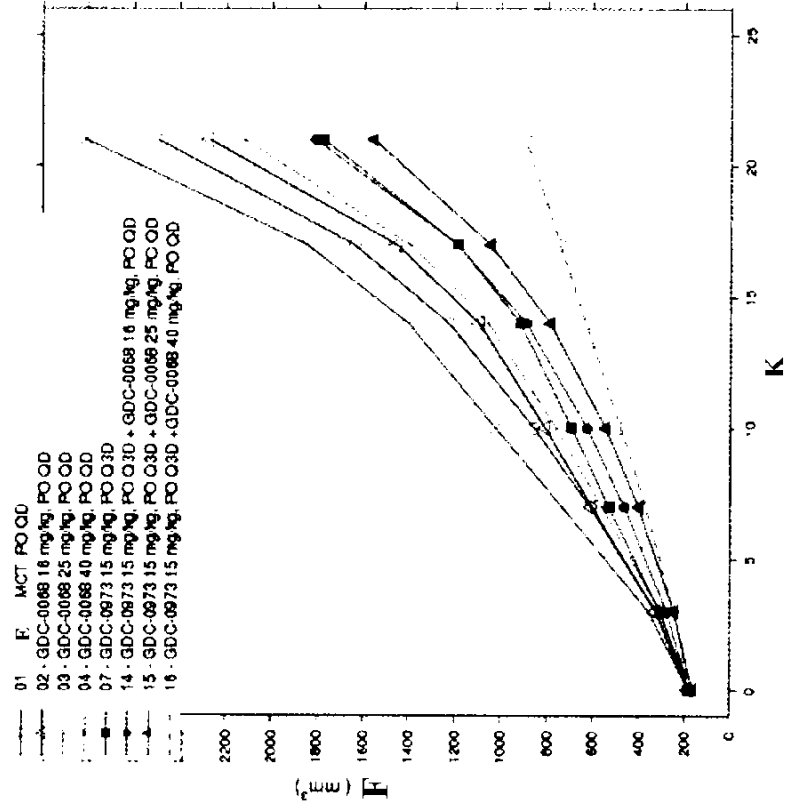
SEKİL 15

R3

GDC-0973 5mg/kg QD

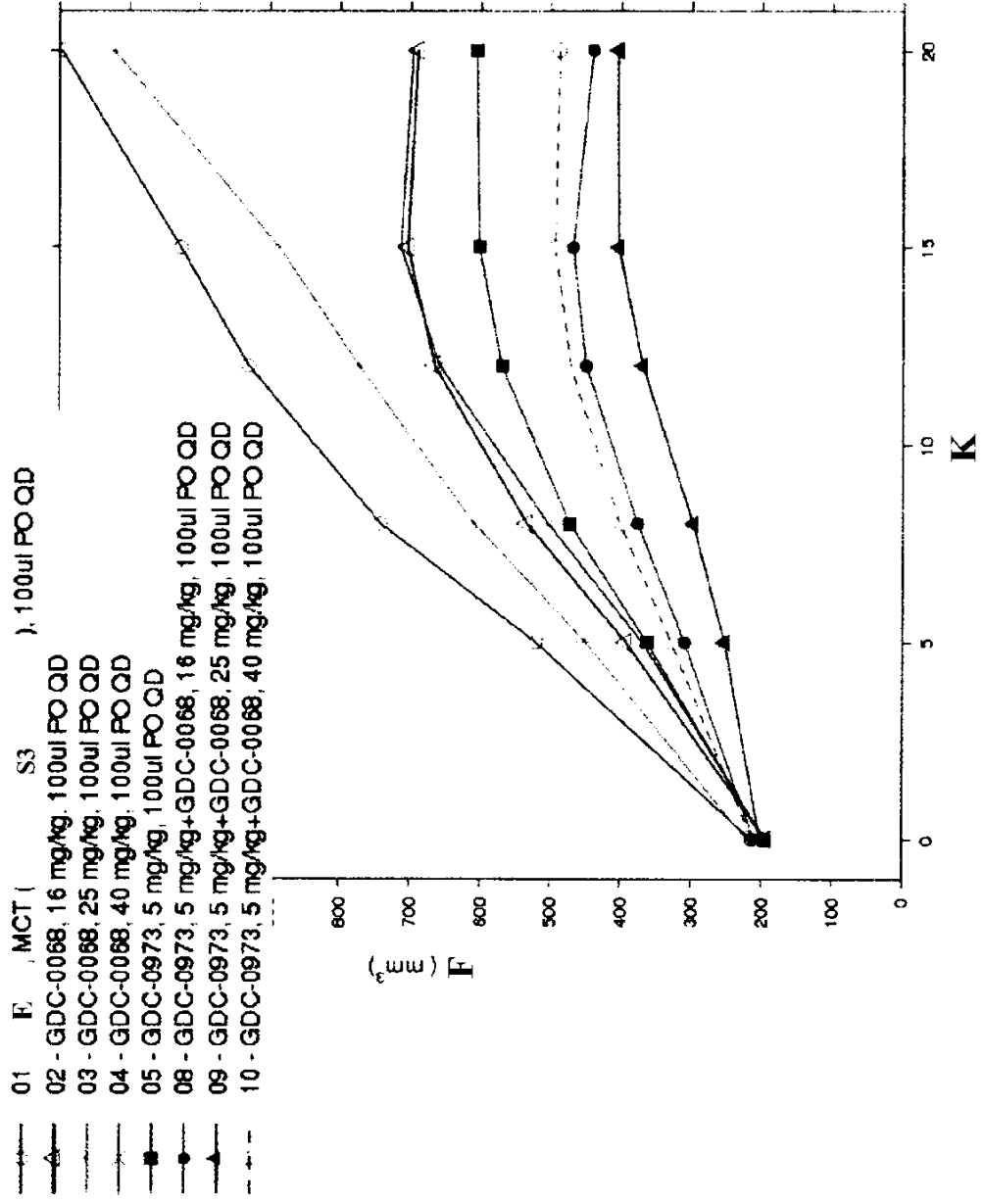


GDC-0973 15mg/kg Q3D



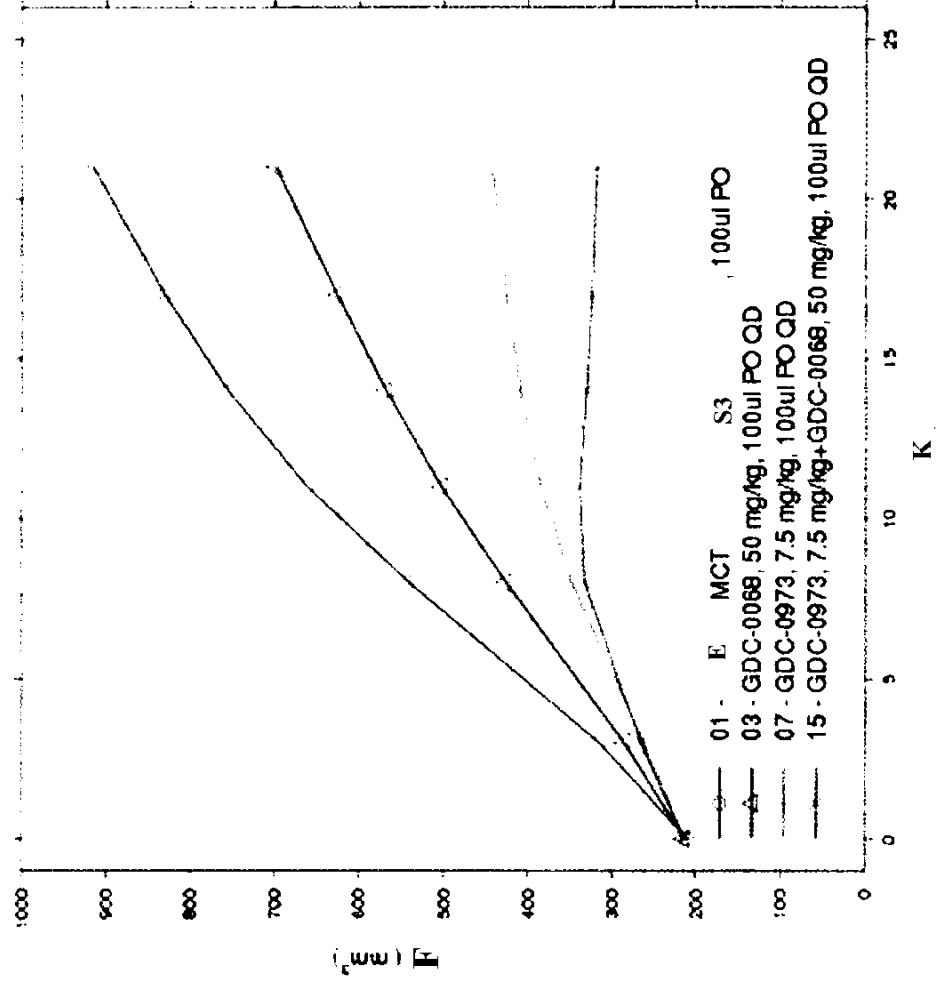
ŞEKİL 16

T3



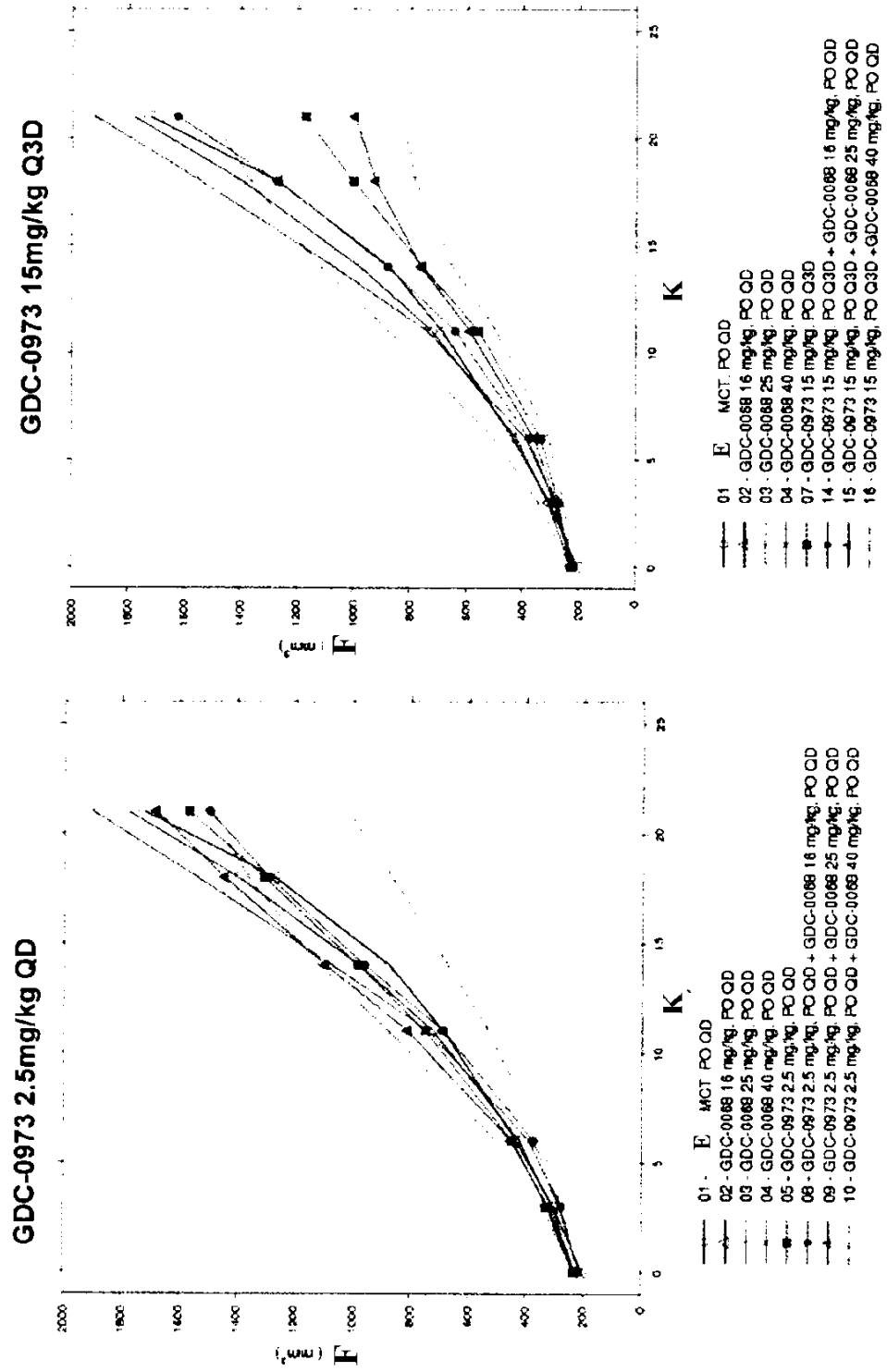
ŞEKİL 17

U3

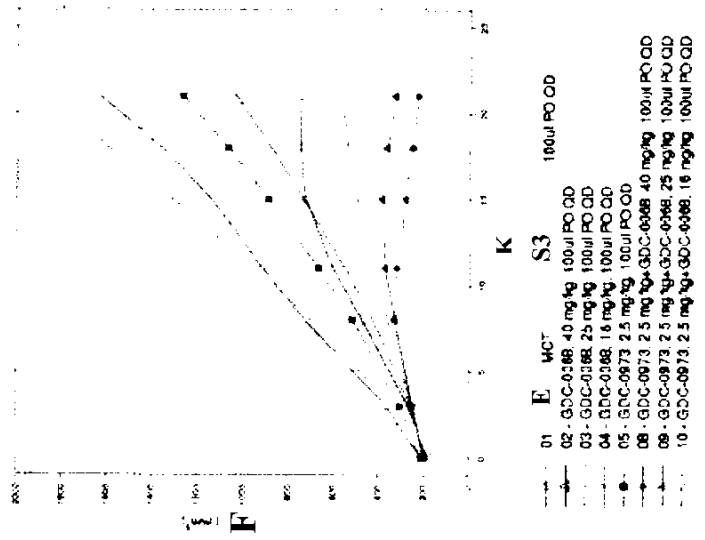


ŞEKİL 18

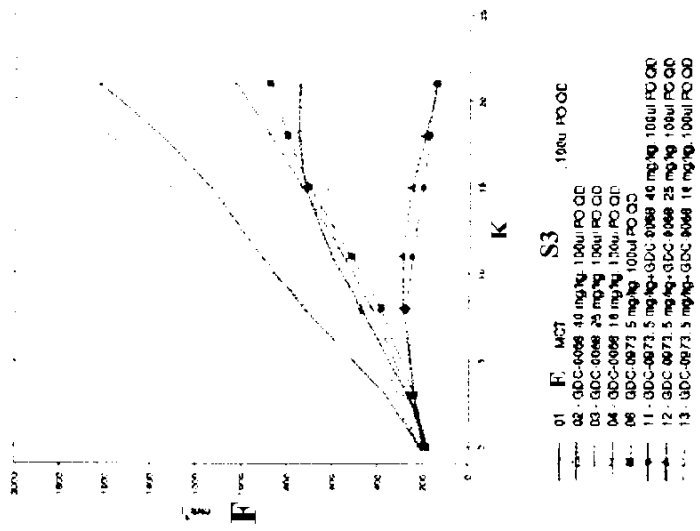
V3



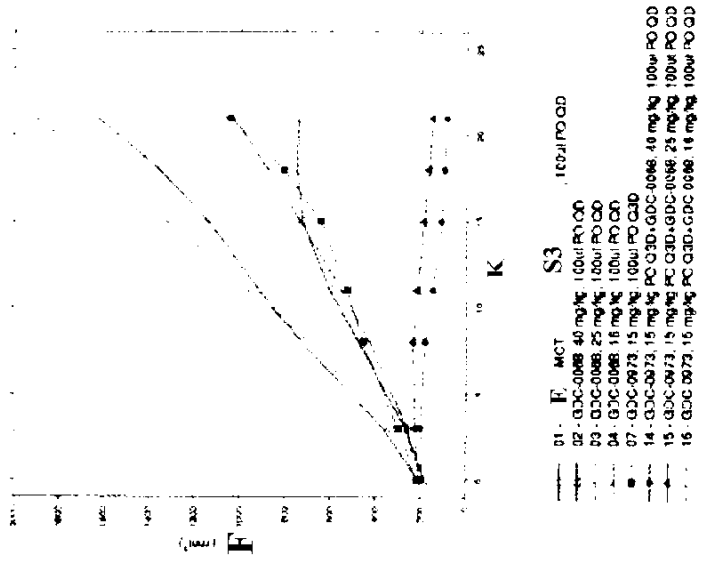
GDC-0973 2.5mg/kg QD



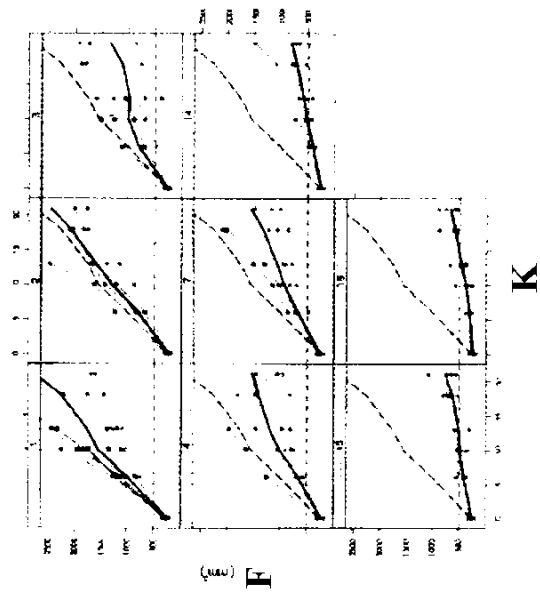
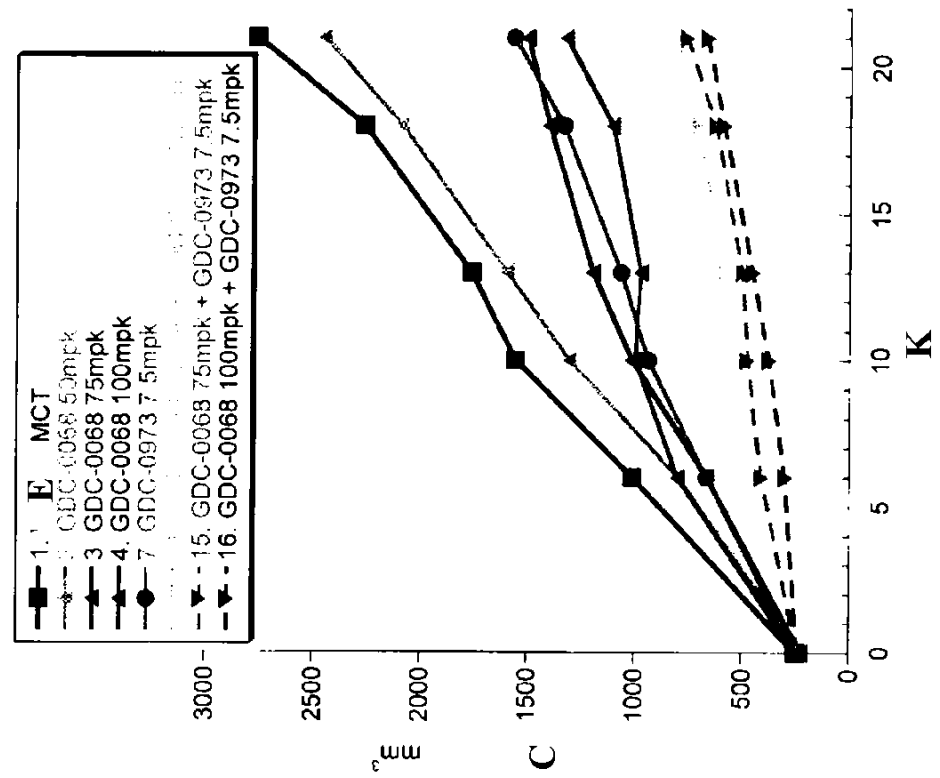
GDC-0973 5mg/kg QD

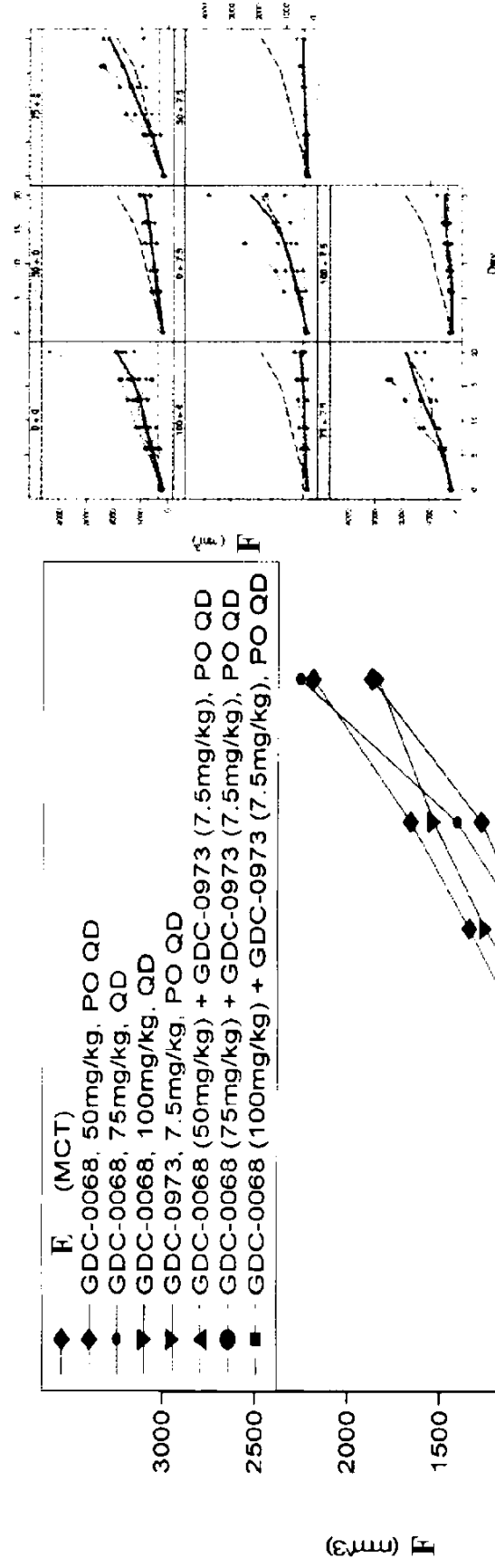


GDC-0973 15mg/kg Q3D



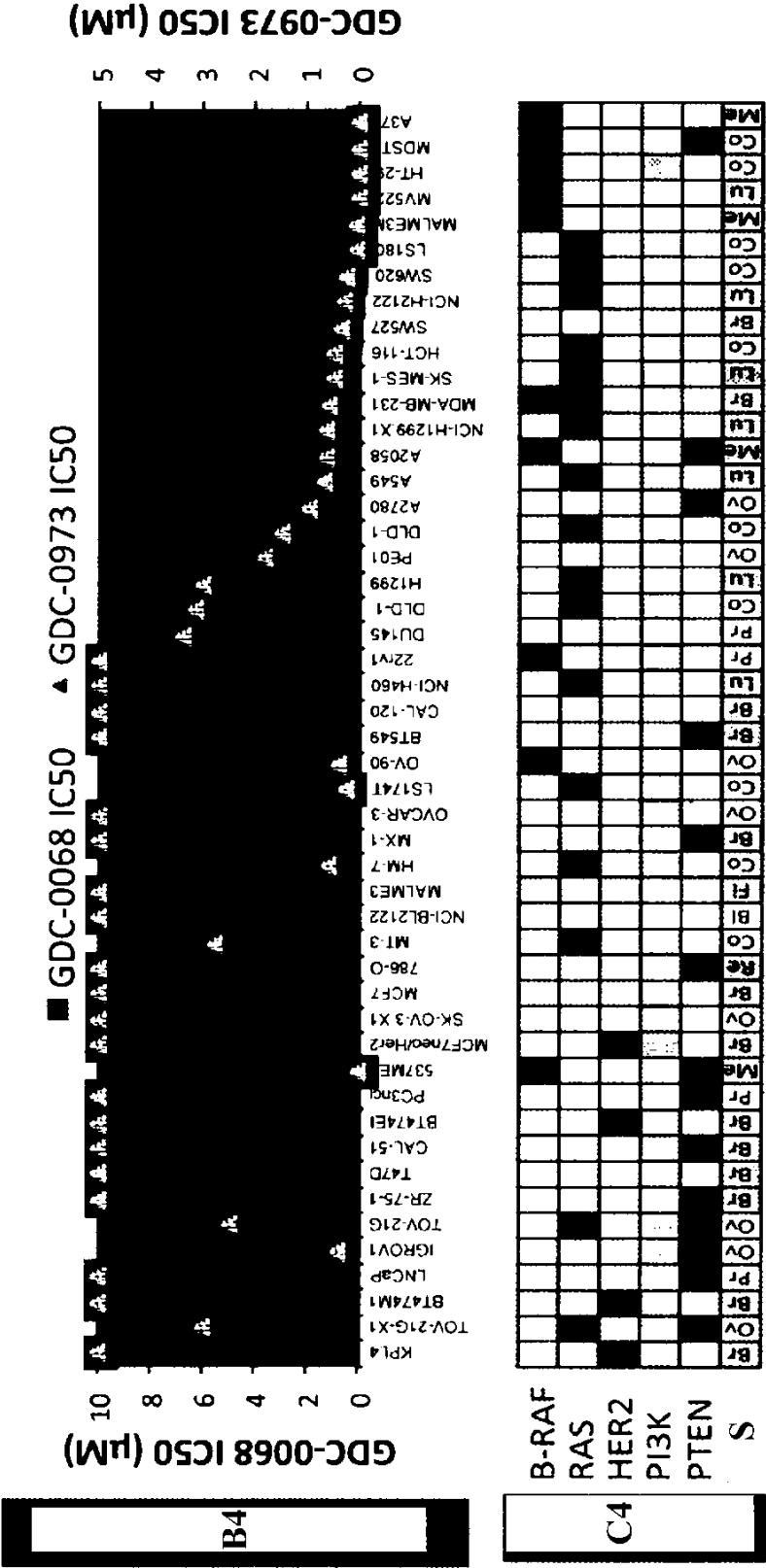
ŞEKİL 20

Z3



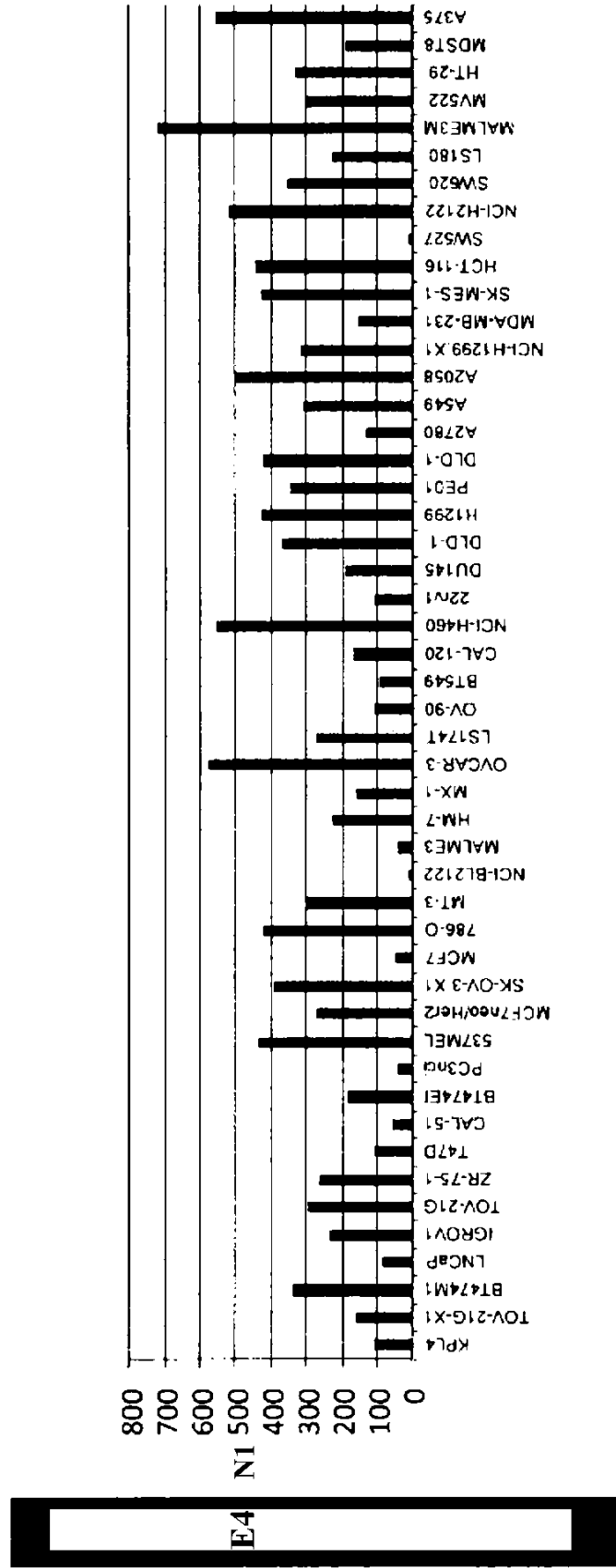
SEKİL 22a

D4



D4

SEKİL 22b

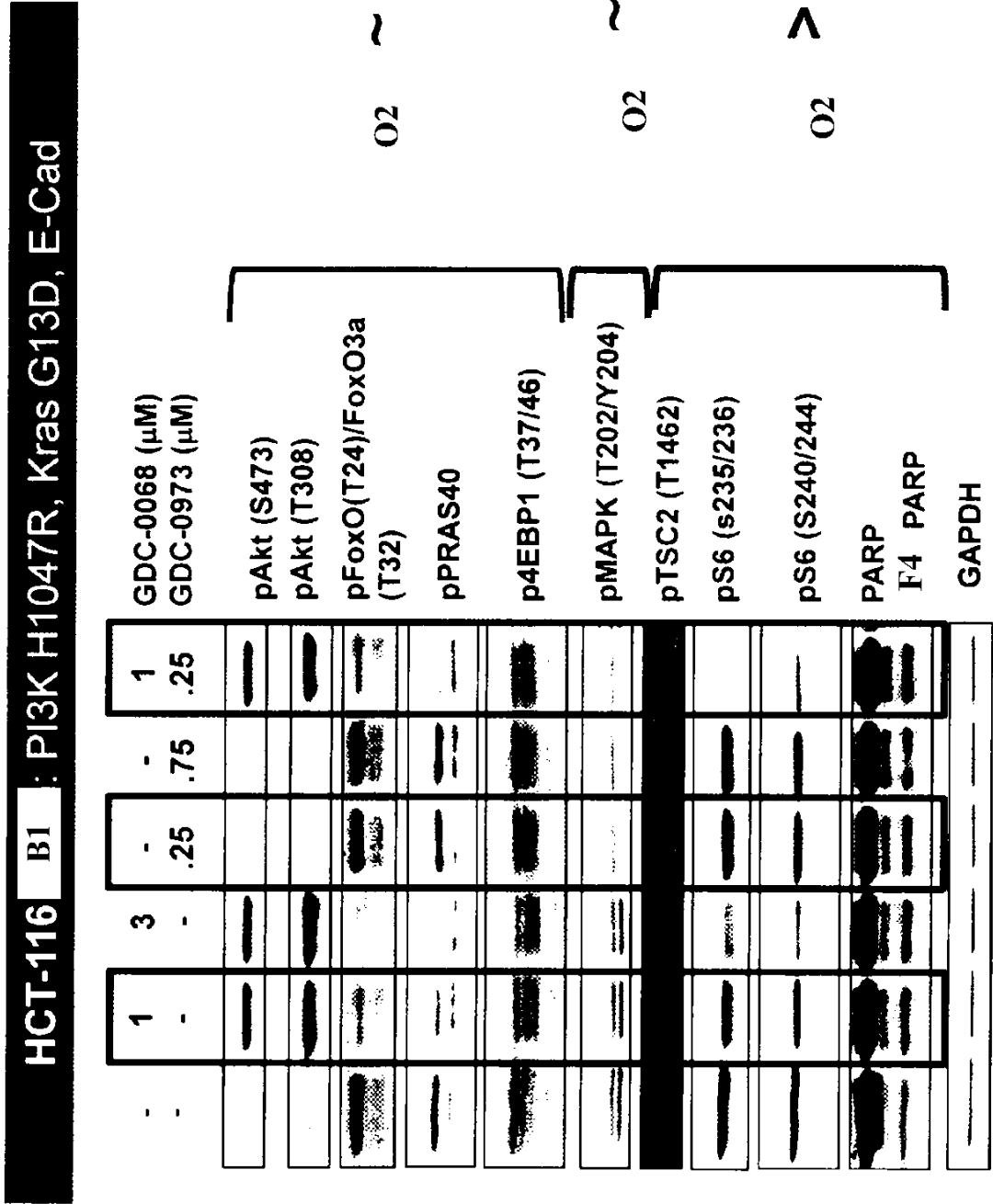


SEKİL 23

537MEL A2 : D3 , Braf amp/del

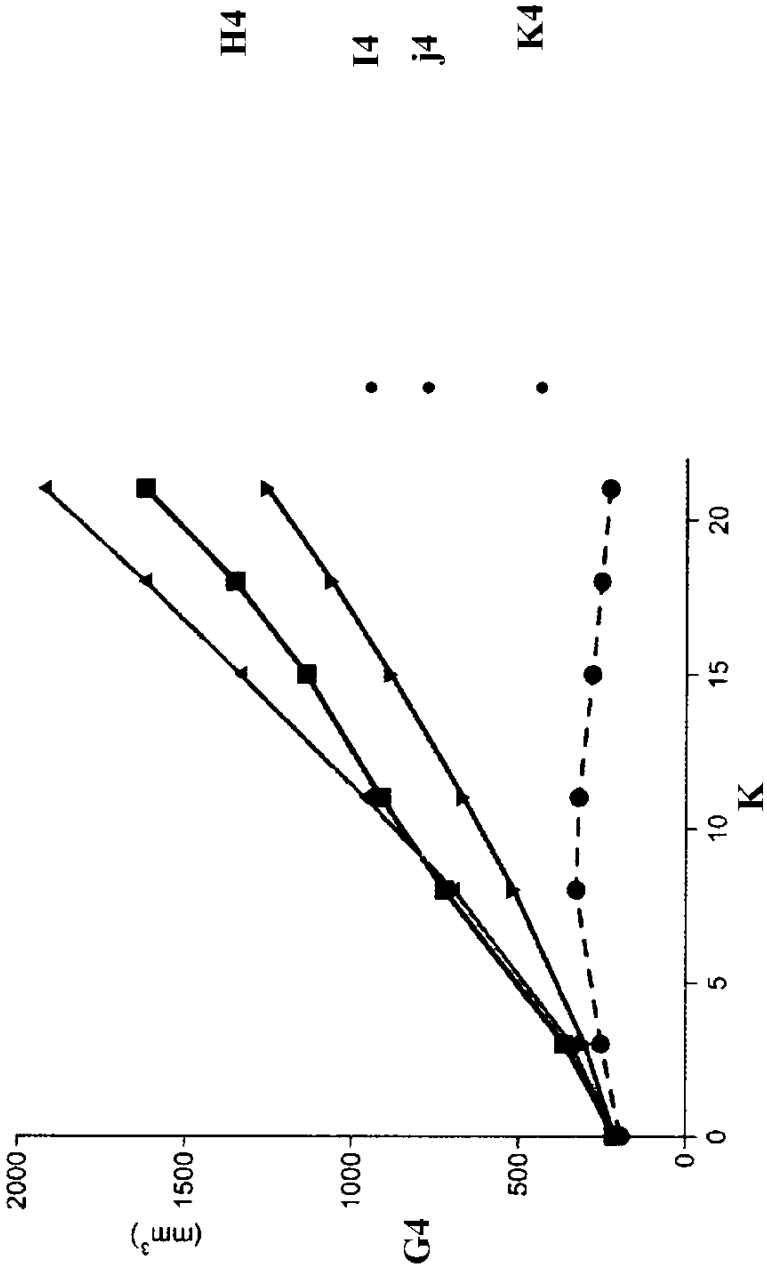


ŞEKİL 24

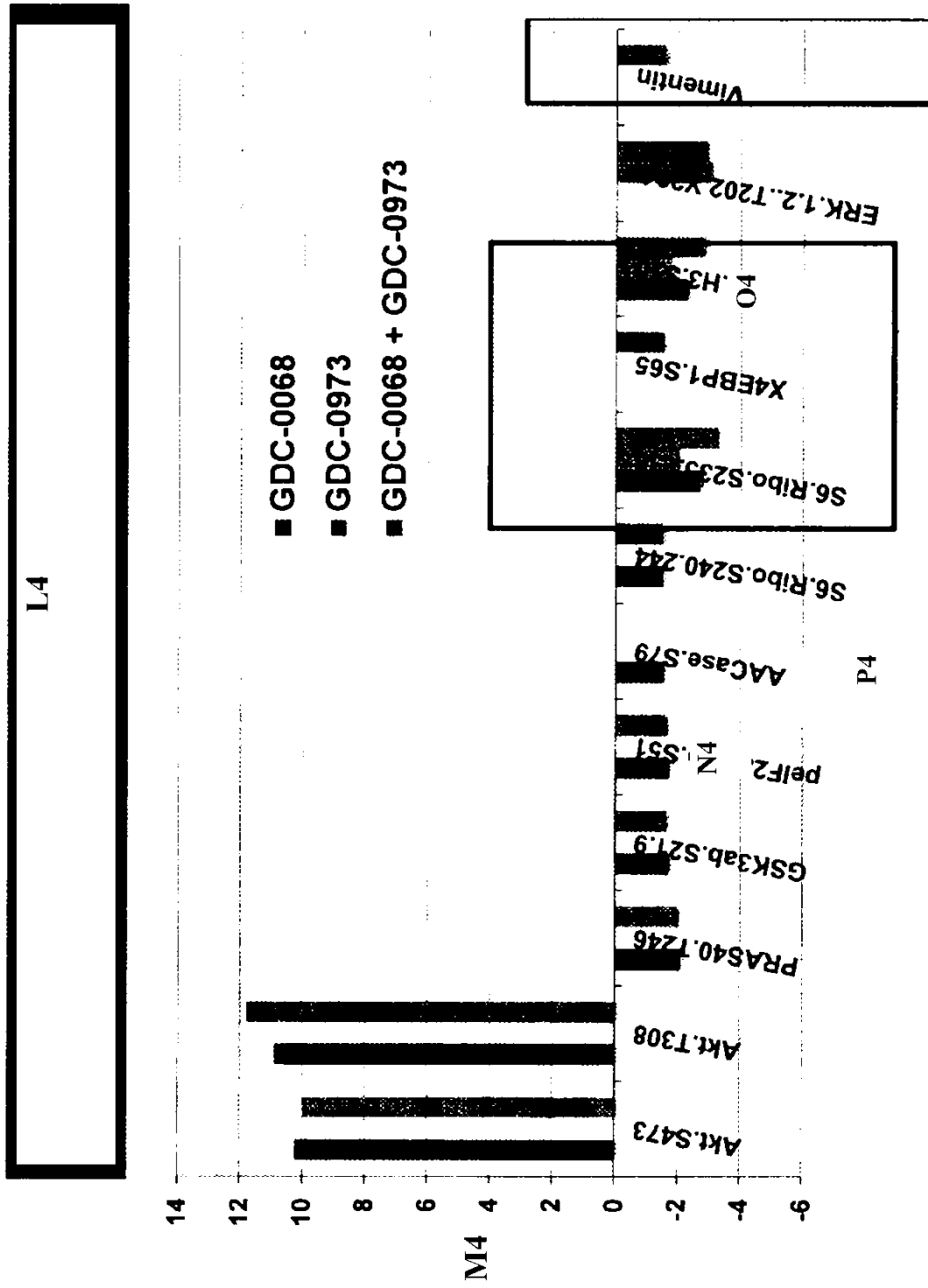


SEKİL 25

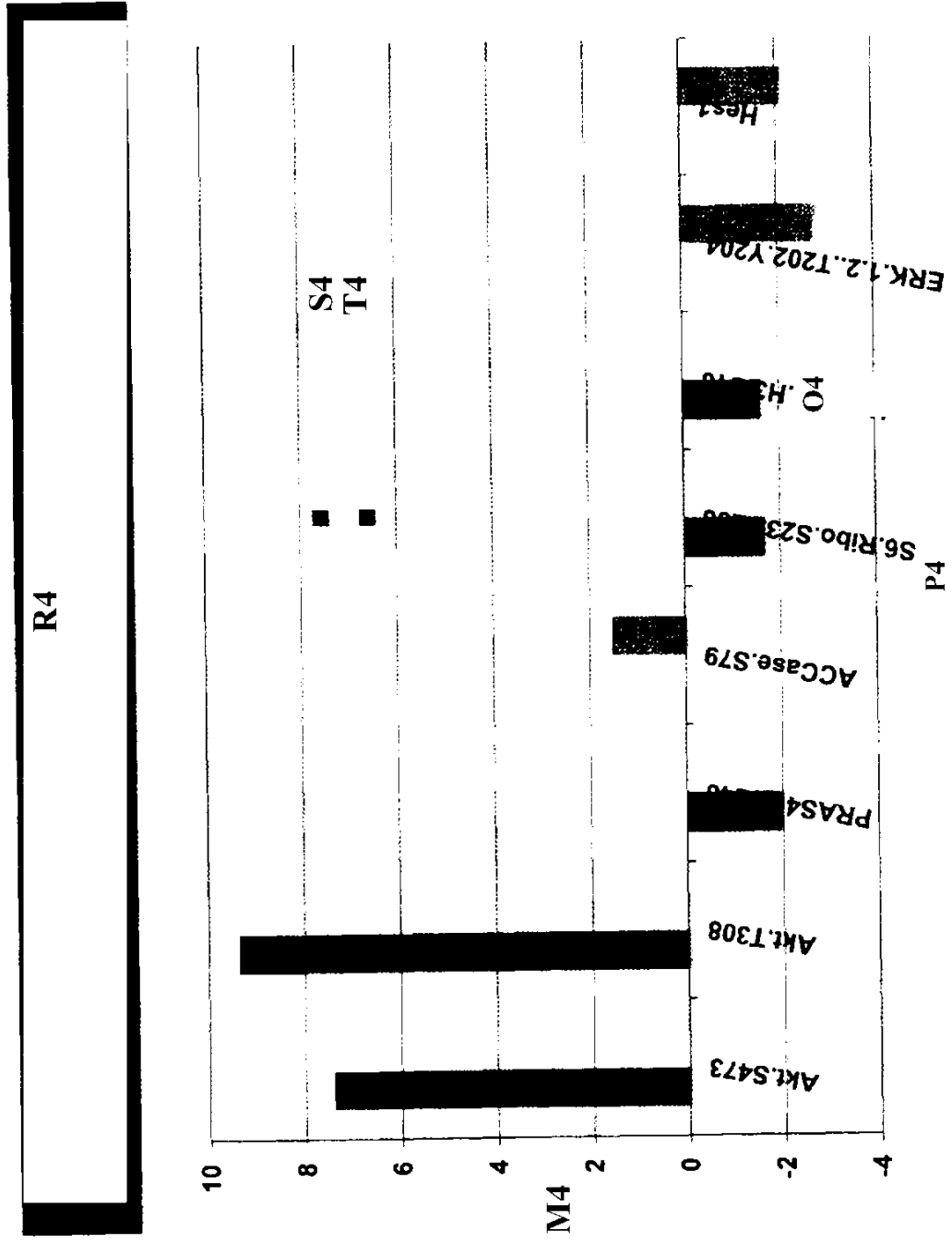
537MEL A2 : D3 Braf amp/del



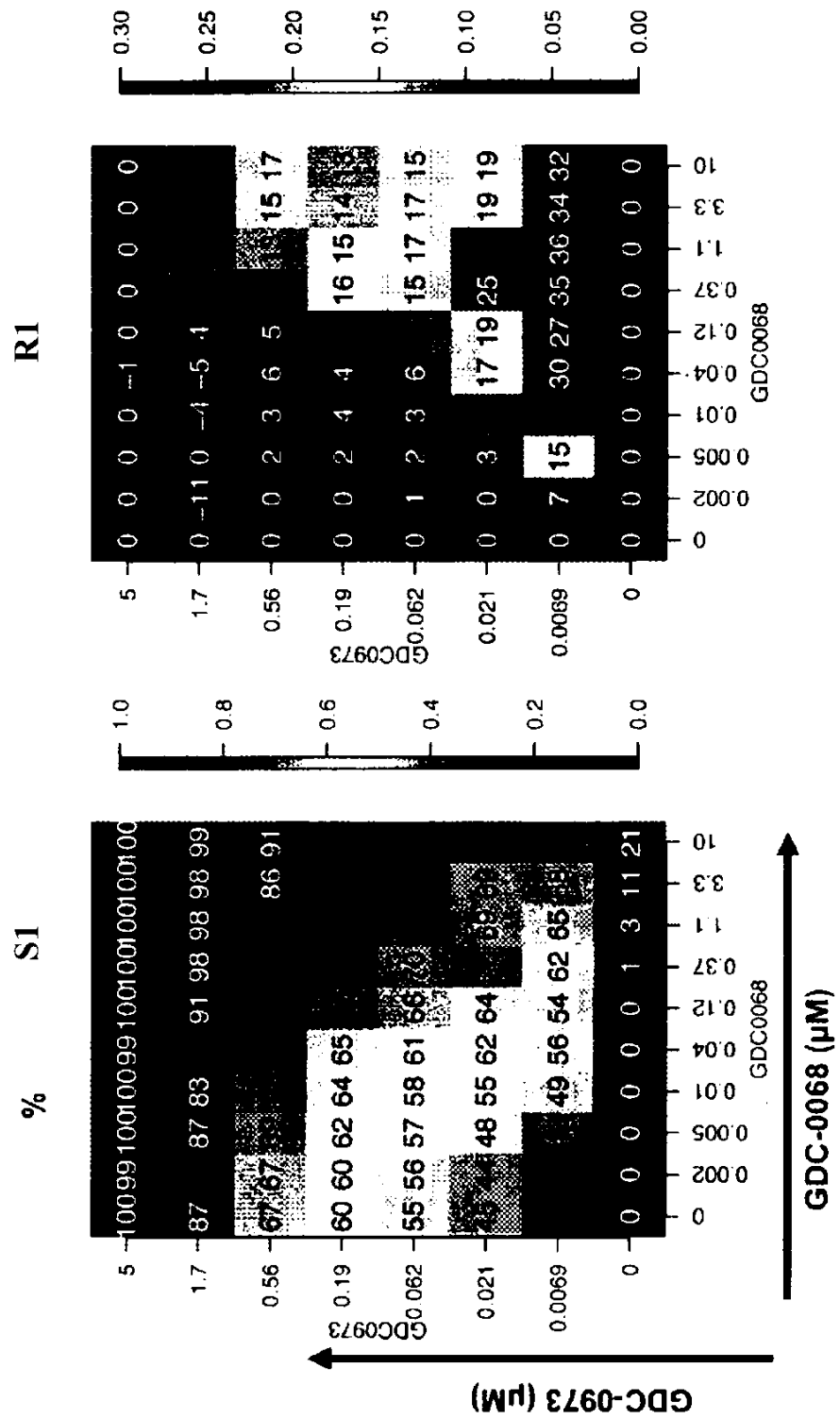
ŞEKİL 26



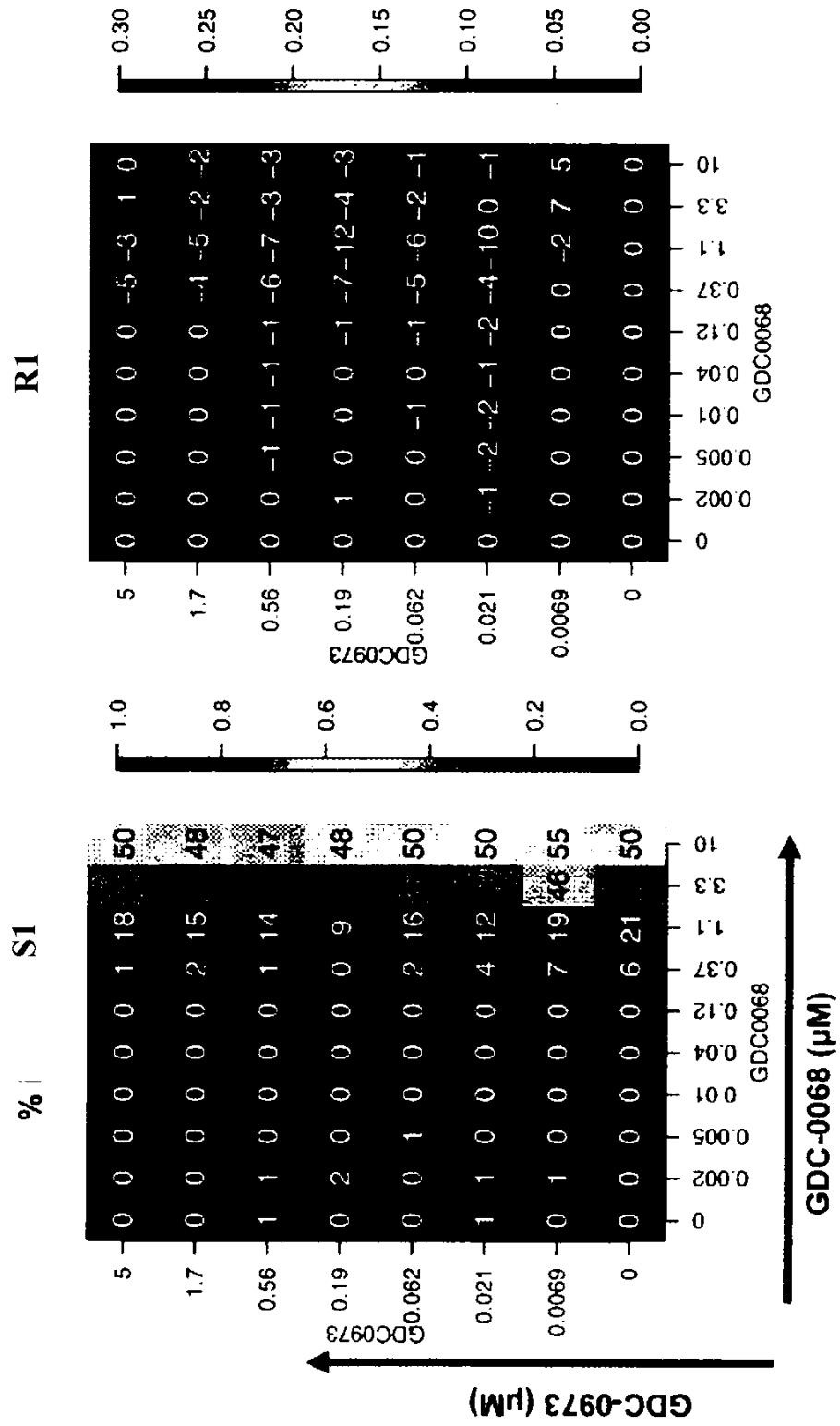
ŞEKİL 27



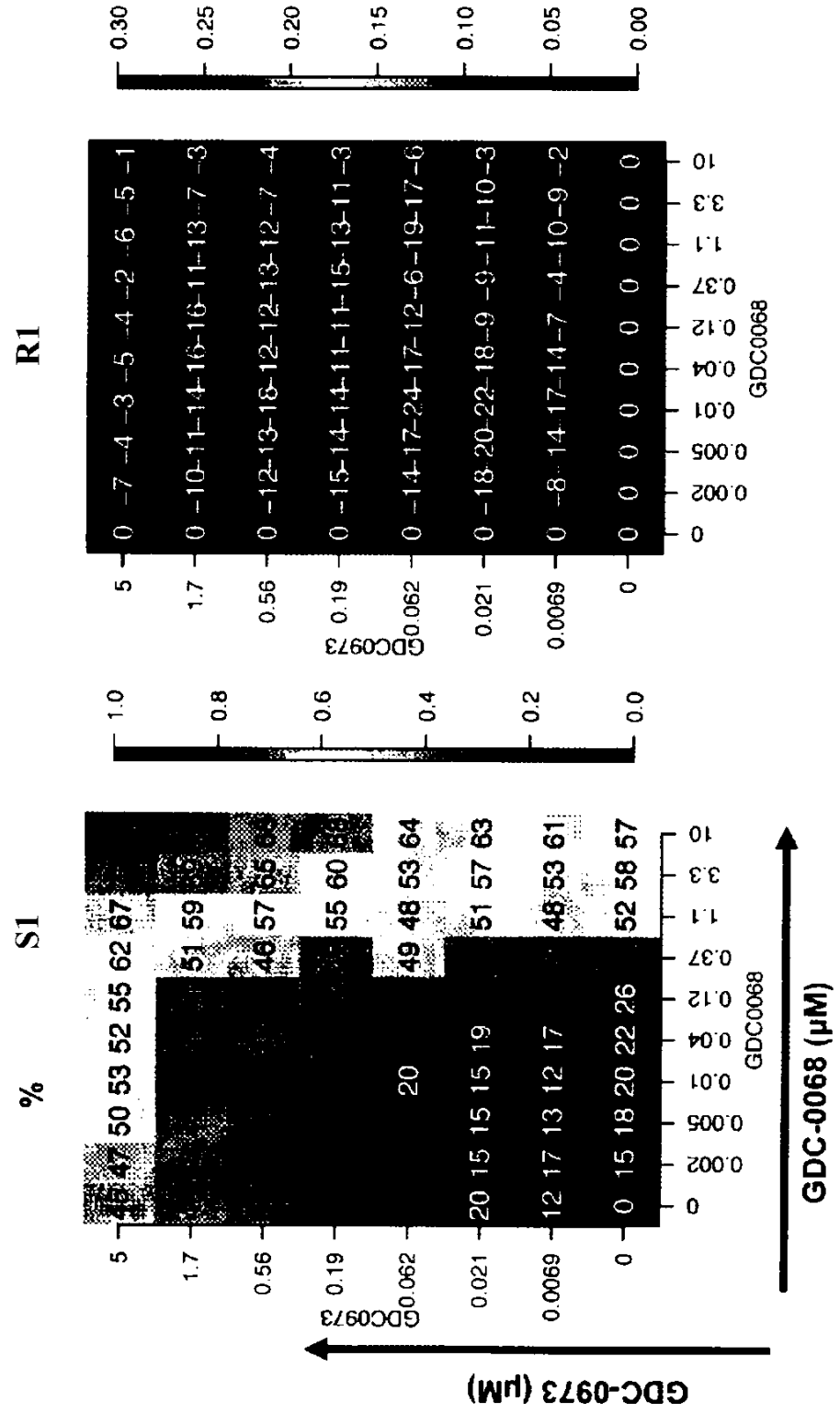
ŞEKİL 28

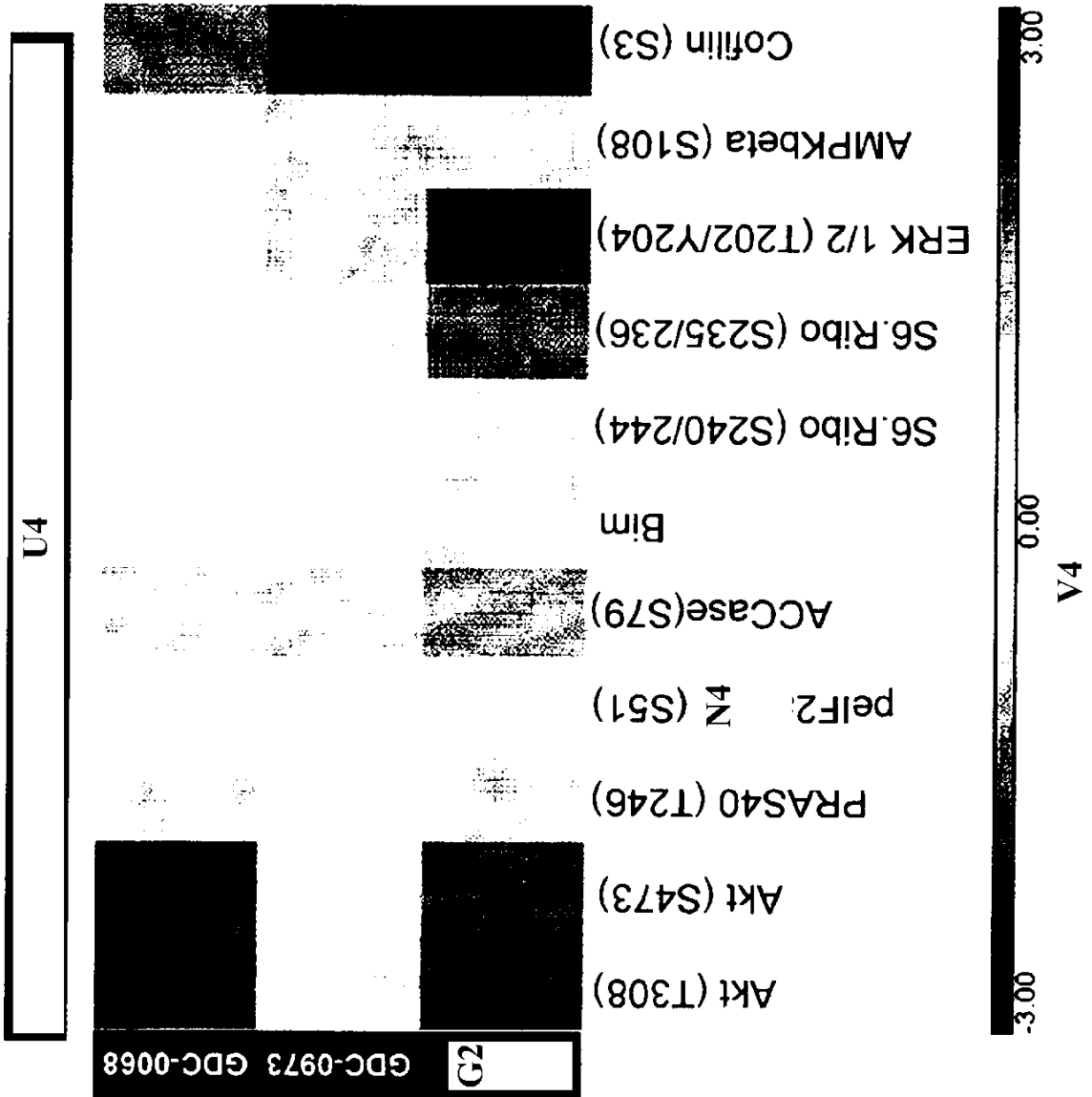


ŞEKİL 29



ŞEKİL 30





SEKİL 31