

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI YENİ 4-AMİNOKİNAZOLİN KARBOKSAMİDİN
TÜREVLERİNİN SENTEZİ, YAPILARININ
AYDINLATILMASI VE ANTİKANSER
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

Cemre ACAR HALICI

**FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Tuncagül ALTUNTAŞ**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
20L0237002 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ANKARA
2021**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Bazı Yeni 4-Aminokinazolin Karboksamidin Türevlerinin Sentezi, Yapılarının Aydınlatılması ve Antikanser Aktivitelerinin İncelenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Cemre ACAR HALICI

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY SAYFASI

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Kimya Anabilim Dalında

Cemre ACAR HALICI tarafından hazırlanan

“Bazı Yeni 4-Aminokinazolin Karboksamidin Türevlerinin Sentezi, Yapılarının Aydınlatılması ve Antikanser Aktivitelerinin İncelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 14.09.2021

İmza
Prof. Dr. A. Hakan GÖKER
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Prof. Dr. Tuncagül ALTUNTAŞ (Danışman)
Ankara Üniversitesi
Raportör

İmza
Prof. Dr. Fügen ÖZKANLI
Hacettepe Üniversitesi
Üye

İmza
Prof. Dr. Meral TUNÇBİLEK
Ankara Üniversitesi
Üye

İmza
Prof. Dr. Burcu ÇALIŞKAN
Gazi Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay Sayfası	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xi
Çizelgeler	xx
1.GİRİŞ	1
1.1. Kanser	4
1.1.1. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK)	7
1.2. Protein Tirozin Kinaz	9
1.3. Epidermal Büyüme Faktörü	12
1.4. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü	13
1.5. Kanser Tedavisinde EGFR Hedefli Yaklaşım	17
1.6. EGFR TKI'lerin Tarihsel Geliştirilme Aşamaları	19
1.6.1. FDA Onaylı İlk EGFR TKI'lerin Keşfi	26
1.6.2. EGFR Mutasyonlarının Bulunması ve EGFR TKI'ler ile İlişkisi	29
1.6.2.1. Birinci Nesil İnhibitörlere Karşı Kazanılmış Direnç: T790M Mutasyonu	31
1.6.3. Geri Dönüşümsüz İnhibitörlerin Geliştirilmesi	32
1.7. EGFR TKI'lerin Sınıflandırması	34
1.8. Üçüncü Nesil İnhibitörlere Karşı Gelişen Direnç: C797S Mutasyonu	36
1.9. FDA Onaylı EGFR TKI Bileşikler	37
1.9.1. Gefitinib	37
1.9.2. Erlotinib	38
1.9.3. Lapatinib	39
1.9.4. Afatinib	40
1.9.5. Dacomitinib	41

1.9.6. Osimertinib	42
1.10. Kinazolin Bileşiklerinin Enzimle Olası Etkileşimleri	42
1.11. Kinazolin Yapısının Genel Özellikleri	44
1.11.1. Kinazolin Yapısının Genel Sentez Yöntemleri	46
1.12. Amidin Yapısının Genel Özellikleri	49
1.12.1. Amidin Yapısının Genel Sentez Yöntemleri	49
1.13. 4-Aminokinazolin Yapısı Taşıyan Bileşikler ile Yapılmış Bazı Antikanser Çalışmaları	53
2. GEREÇ VE YÖNTEM	62
2.1. Tasarlanan Türevlerin Sentezi	62
2.1.1. Benzonitril Yapısı İçeren 4-Amino-6,7-dimetoksikinazolin Türevlerinin Sentez Yöntemi	62
2.1.2. Bileşik 4, 5 ve 6'nın Sentez Yöntemi	63
2.1.3. Amidin Yapısı Taşıyan Türevlerin (7a-7e, 8a-8e, 9a-9e) Sentez Yöntemi	63
2.1.4. Amidoksim Yapısı Taşıyan Türevlerin (7f, 8f, 9f) Sentez Yöntemi	64
2.2. Materyal ve Yöntem	67
2.2.1. Sentezlenen Bileşiklerin Analitik İncelemelerinde Kullanılan Yöntemler	67
2.2.1.1. Kromatografik Analizler	67
2.2.1.2. Erime Noktası Tayinleri	68
2.2.1.3. Elementel Analiz	68
2.2.1.4. Spektral Analizler	68
2.2.2. Sentez İşlemlerinde Kullanılan Kimyasal Maddeler	69
2.2.3. Sentezlenen Bileşiklerin Antikanser Aktivitelerinin Saptanması	69
2.2.4. Moleküler Doking Çalışmaları	71
3. BULGULAR	73
3.1. Başlangıç Maddelerinin Sentezi	73
3.1.1. 6,7-Dimetoksikinazolin-4-ol (1)	73
3.1.2. 4-Kloro-6,7-dimetoksikinazolin (2)	76
3.1.3. 4-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]benzonitril (3a)	79
3.1.4. 3-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]benzonitril (3b)	81
3.1.5. 4-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]metil]benzonitril (3c)	85

3.2. 4, 5, 6 Kodlu Sonuç Bileşiklerinin Sentez Yöntemi	90
3.2.1. 6,7-Dimetoksi- <i>N</i> -(2,3,4-triklorofenil)kinazolin-4-amin (4)	90
3.2.2. <i>N</i> -(2-Kloropiridin-3-il)-6,7-dimetoksikinazolin-4-amin (5)	94
3.2.3. <i>N</i> -[4-Floro-3-(triflorometil)fenil]-6,7-dimetoksikinazolin-4-amin (6)	98
3.3. Amidin Grubu Taşıyan 6,7-Dimetoksikinazolin Türevlerinin (7a-7e, 8a-8e, 9a-9e) Genel Sentez Yöntemi	102
3.3.1. 4-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]benzimidamid (7a)	102
3.3.2. 4-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]- <i>N</i> -izopropilbenzimidamid (7b)	107
3.3.3. <i>N</i> -[4-(4,5-Dihidro-1 <i>H</i> -imidazol-2-il)fenil]-6,7-dimetoksikinazolin-4-amin (7c)	110
3.3.4. <i>N</i> -Siklopropil-4-[(6,7-dimetoksikinazolin-4-il)amino]benzimidamid (7d)	113
3.3.5. <i>N</i> -Sikloheksil-4-[(6,7-dimetoksikinazolin-4-il)amino]benzimidamid (7e)	116
3.3.6. 3-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]benzimidamid (8a)	118
3.3.7. 3-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]- <i>N</i> -izopropilbenzimidamid (8b)	121
3.3.8. <i>N</i> -[3-(4,5-Dihidro-1 <i>H</i> -imidazol-2-il)fenil]-6,7-dimetoksikinazolin-4-amin (8c)	124
3.3.9. <i>N</i> -Siklopropil-3-[(6,7-dimetoksikinazolin-4-il)amino]benzimidamid (8d)	128
3.3.10. <i>N,N'</i> -Disiklopropil-3-[(6,7-dimetoksikinazolin-4-il)amino]benzimidamid (8e)	131
3.3.11. 4-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]metil]benzimidamid (9a)	134
3.3.12. 4-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]metil]- <i>N</i> -izopropilbenzimidamid (9b)	137
3.3.13. <i>N</i> -[4-(4,5-Dihidro-1 <i>H</i> -imidazol-2-il)benzil]-6,7-dimetoksikinazolin-4-amin (9c)	140
3.3.14. <i>N</i> -Siklopropil-4-[(6,7-dimetoksikinazolin-4-il)amino]metil]benzimidamid (9d)	145
3.3.15. <i>N</i> -Sikloheksil-4-[(6,7-dimetoksikinazolin-4-il)amino]metil]benzimidamid (9e)	148
3.4. Amidoksim Grubu Taşıyan 6,7-Dimetoksikinazolin Türevlerinin (7f, 8f, 9f) Genel Sentez Yöntemi	150
3.4.1. 4-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]- <i>N'</i> -hidroksibenzimidamid (7f)	151
3.4.2. 3-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]- <i>N'</i> -hidroksibenzimidamid (8f)	153
3.4.3. 4-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]metil]- <i>N'</i> -hidroksibenzimidamid (9f)	156

3.5. Bileşiklerin Fizikokimyasal Parametrelerinin İncelenmesi	161
3.6. Sentezlenen Bileşiklerin Antikanser Aktivitelerinin Saptanması	162
3.7. Moleküler Doking Çalışmaları	163
4. TARTIŞMA	167
5.SONUÇ VE ÖNERİLER	178
ÖZET	180
SUMMARY	181
KAYNAKLAR	182
ÖZGEÇMİŞ	



ÖNSÖZ

Doktoram boyunca beni destekleyen değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Tuncagül ALTUNTAŞ hocama,

Doktoramın başından sonuna kadar bana yol gösteren, akademik bilgisi ve özverisini her zaman örnek aldığım, sentezlenen bileşiklerin MASS, NMR, 2D NMR analizlerini gerçekleştiren Sayın Prof. Dr. Hakan GÖKER hocama,

Sentezlenen bileşiklerin elementel analizlerini gerçekleştiren Sayın Doç. Dr. Mehmet ALP'e, aktivite tayin çalışmalarının yapılmasındaki emeklerinden dolayı Sayın Prof. Dr. Arzu ONAY-BEŞİKÇİ ve Dr. Ecz. Berna GÜVEN'e,

Bileşiklerin doking çalışmalarında gösterdiği emeği ve yardımları için Dr. Ecz. İsmail Çelik'e,

Bilimsel anlamda takıldığım her konuda bana yardımcı olan, deneyimini paylaşan arkadaşım ve hocam Dr. Ecz. Fatıma DOĞANÇ'a ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli arkadaşım Bil. Uzm. Ecz. Pınar KUL'a,

Bilgi ve deneyimleriyle bana her konuda yardımcı olan Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve araştırma görevlisi olduğum süre boyunca çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Akademik hayatımın her aşamasında benimle aynı heyecanı yaşayan, birlikte sınav stresi çeken ve mezuniyet mutluluğu yaşayan annem, babam, ablama aynı zamanda tezimdeki azımsanamayacak emeği için eşim Alperen HALICI'ya teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarına 20L0237002 kodlu proje kapsamında sağladığı destekle BAP'a,

Doktora eğitimim boyunca 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında sağladığı bursla bana destek olan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
γ	Gama
ADP	Adenozin Difosfat
ATP	Adenozin Trifosfat
CAQ	4-(3-kloroanilino)kinazolin
DMF	Dimetilformamid
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ESI	Elektrosprey İyonizasyon
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi
HER	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
kDa	Kilodalton
KHDAK	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
MAPK	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
NRTK	Reseptör Olmayan Tirozin Kinaz
PDB	Protein Veri Bankası (Protein Data Bank)
PI3K	Fosfatidil İnositol 3-Kinaz
RTK	Reseptör Tirozin Kinaz
STAT	Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü
TGF- α	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Alfa
TK	Tirozin Kinaz
TKI	Tirozin Kinaz İnhibitörü
TMS	Tetrametilsilan

UV Ultraviyole
VEGFR-2 Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü-2



ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	FDA onaylı EGFR TKI bileşikler	3
Şekil 1.2.	ATP yapısı	9
Şekil 1.3.	Reseptör tirozin kinazın otofosforilasyonu	11
Şekil 1.4.	EGFR ve dimerik kompleksin yapısı	15
Şekil 1.5.	EGFR sinyal iletim yolları	16
Şekil 1.6.	a) 4-(3-kloroanilino)kinazolin, b) 4-(3-bromoanilino)kinazolin, c) 4-(3-metilanilino)kinazolin	20
Şekil 1.7.	a) 4-(3-metilanilino)kinazolin, b) 4-(3-metilanilino)-6,7-dimetoksikinazolin	21
Şekil 1.8.	4-(3-bromoanilino)-6,7-dimetoksikinazolin (PD153035) bileşiği	22
Şekil 1.9.	a) 4-(3-bromoanilino)-6-metoksikinazolin b) 4-(3-bromoanilino)-7-metoksikinazolin c) 4-(3-bromoanilino)-6,7-dimetoksikinazolin	23
Şekil 1.10.	a) 4-(3-bromoanilino)kinolin, b) 1-(3-bromoanilino)izokinolin, c) 4-(3-bromoanilino)sinnolin, d) 4-(3-bromoanilino)ftalazin, e) 2-(3-bromoanilino)kinoksalin, f) 4-(3-bromoanilino)benzotriazin, g) 4-(3-bromoanilino)kinazolin	24
Şekil 1.11.	a ve b) 4-(benzilamino)kinazolin türevleri c) 4-(fenetilamino)kinazolin türevleri	24
Şekil 1.12.	a) <i>N</i> -(izokinolin-4-il)-6,7-dimetoksikinazolin-4-amin b) <i>N</i> -(izokinolin-1-il)-6,7-dimetoksikinazolin-4-amin c) <i>N</i> -(kinazolin-4-il)-6,7-dimetoksikinazolin-4-amin	25
Şekil 1.13.	PD 158780 (Piridopirimidin yapısı) ve CGP 59326 (Pirolopirimidin yapısı) kodlu bileşikler	26
Şekil 1.14.	a) 4-(3-metilanilino)-6,7-dimetoksikinazolin bileşiği b ve c) metabolitleri	27
Şekil 1.15.	a) 4-(3-kloro-4-florofenilamino)-6,7-dimetoksikinazolin bileşiği b) ZD1839: <i>N</i> -(3-kloro-4-florofenil)-7-metoksi-6-(3-morfolin-4-ilpropoksi)kinazolin-4-amin	27

Şekil 1.16.	CP-358,774 kodlu bileşik: <i>N</i> -(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoksi etoksi)kinazolin-4-amin	28
Şekil 1.17.	EGFR mutasyonları	32
Şekil 1.18.	CL-387,785 kodlu bileşik, <i>N</i> -[4-[(3-bromofenil)amino]-6-kinazolinil]-2-butinamid	34
Şekil 1.19.	Gefitinib: <i>N</i> -(3-kloro-4-florofenil)-7-metoksi-6-(3-morfolin-4-ilpropoksi)kinazolin-4-amin	37
Şekil 1.20.	Erlotinib: <i>N</i> -(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoksietoksi)kinazolin-4-amin	38
Şekil 1.21.	Lapatinib: <i>N</i> -[3-kloro-4-[(3-florofenil)metoksi]fenil]-6-[5-[(2-metilsulfoniletilamino)metil]furan-2-il]kinazolin-4-amin	39
Şekil 1.22.	Afatinib: (<i>E</i>)- <i>N</i> -[4-(3-kloro-4-floroanilino)-7-[(3 <i>S</i>)-oksolan-3-il]oksikinazolin-6-il]-4-(dimetilamino)büt-2-enamid	40
Şekil 1.23.	Dacomitinib: (<i>E</i>)- <i>N</i> -[4-(3-kloro-4-floroanilino)-7-metoksi kinazolin-6-il]-4-piperidin-1-ilbüt-2-enamid	41
Şekil 1.24.	Osimertinib: <i>N</i> -[2-[2-(dimetilamino)etil-metilamino]-4-metoksi-5-[[4-(1-metilindol-3-il)pirimidin-2-il]amino]fenil] prop-2-enamid	42
Şekil 1.25.	Kinazolinlerin enzimle olası etkileşimleri	43
Şekil 1.26.	Kinazolin yapısı ve halka numaralandırması	44
Şekil 1.27.	2-Siyano-3,4-dihidro-4-oksokinazolin	45
Şekil 1.28.	Kinazolinon halka sisteminin tautomerisi	45
Şekil 1.29.	Niementowski sentezi	46
Şekil 1.30.	Antranilik asidin primer aminle kondenzasyonu	46
Şekil 1.31.	Mikrodalga altında 4(3 <i>H</i>)-kinazolinon sentez yöntemi	47
Şekil 1.32.	Mikrodalga yöntemiyle 3,1-benzoksazinon ara ürünü üzerinden 3-metilkinazolin-4-on sentezi	47
Şekil 1.33.	Grimmel, Guinther ve Morgan sentez yöntemi	47
Şekil 1.34.	Metil 2-aminobenzoat'tan hareketle 4(3 <i>H</i>)-kinazolinon sentezi	48
Şekil 1.35.	Etil 2-asetamido-5-nitrobenzoat'tan hareketle 4(3 <i>H</i>)-kinazolinon sentez yöntemi	48

Şekil 1.36.	Sen ve Ray Sentez yöntemi	48
Şekil 1.37.	2-Aminobenzofenonlardan hareketle 4-fenilkinazolin türevlerinin sentezi	48
Şekil 1.38.	Amidin grubunun tautomer yapısı	49
Şekil 1.39.	Pinner reaksiyonunun mekanizması	50
Şekil 1.40.	İmidat hidroklorürün reaksiyonları	51
Şekil 1.41.	Cornell yöntemiyle benzamidin sentezi	51
Şekil 1.42.	<i>N</i> -süstitüe amidlerden hareketle amidin sentezi	52
Şekil 1.43.	Nitrillerden lewis asidi varlığında amidin sentezi	52
Şekil 1.44.	Dialkilsilyanamid'den hareketle magnezyum bromür varlığında amidin sentezi	52
Şekil 1.45.	AST1306	53
Şekil 1.46.	4-Tiyosemikarbazidkinazolin türevleri	54
Şekil 1.47.	4-Anilinokinazolin-amino asit türevi bileşik	54
Şekil 1.48.	Aril semikarbazon yapısı taşıyan kinazolin türevi	55
Şekil 1.49.	Dioksolan, dioksan ve dioksepin halkaları taşıyan 4-anilino kinazolin türevleri	55
Şekil 1.50.	Oksooksazolidin halkası içeren kinazolin türevi	56
Şekil 1.51.	Üreido veya tiyoüreido yan zincirleri taşıyan 4-anilino kinazolin türevleri	57
Şekil 1.52.	Hidrofilik amino alkil zinciri ile türevlendirilmiş 4-anilino kinazolin türevi	57
Şekil 1.53.	4-(4-(<i>E</i>)-(propen-1-il)fenilamino)kinazolin türevi	58
Şekil 1.54.	6,7-Disüstitüe-4-(arilamino)kinazolin türevleri	58
Şekil 1.55.	6-Benzamid-4-aminokinazolin türevi	59
Şekil 1.56.	[1,4]Dioksino[2,3- <i>f</i>]kinazolin türevi	59
Şekil 1.57.	2-Kloro-4-anilino-kinazolin türevi	60
Şekil 1.58.	Kinazolinil-diaril üre türevi	60

Şekil 1.59.	Sentezlenen 4-amino-6,7-dimetoksikinazolin türevleri	61
Şekil 2.1.	Benzonitril yapısı taşıyan 4-amino-6,7-dimetoksikinazolin türevlerinin (3a, 3b, 3c) sentezi	62
Şekil 2.2.	Amidin yapısı taşıyan türevlerin sentezi	64
Şekil 2.3.	Amidoksim yapısı taşıyan türevlerin sentezi	65
Şekil 2.4.	ADP-Glo™ Kinaz Testi	70
Şekil 3.1.	Bileşik 1'in Kütle Spektrumu	74
Şekil 3.2.	Bileşik 1'in ¹ H-NMR Spektrumu	74
Şekil 3.3.	Bileşik 1'in ¹³ C-NMR Spektrumu	75
Şekil 3.4.	Bileşik 1'in HSQC Spektrumu	75
Şekil 3.5.	Bileşik 1'in NOESY Spektrumu	76
Şekil 3.6.	Bileşik 2'nin Kütle Spektrumu	77
Şekil 3.7.	Bileşik 2'nin ¹ H-NMR Spektrumu	78
Şekil 3.8.	Bileşik 2'nin ¹³ C-NMR Spektrumu	78
Şekil 3.9.	Bileşik 3a'nın Kütle Spektrumu	80
Şekil 3.10.	Bileşik 3a'nın ¹ H-NMR Spektrumu	80
Şekil 3.11.	Bileşik 3a'nın ¹³ C-NMR Spektrumu	81
Şekil 3.12.	Bileşik 3b'nin Kütle Spektrumu	82
Şekil 3.13.	Bileşik 3b'nin ¹ H-NMR Spektrumu	83
Şekil 3.14.	Bileşik 3b'nin ¹³ C-NMR Spektrumu	83
Şekil 3.15.	Bileşik 3b'nin COSY Spektrumu	84
Şekil 3.16.	Bileşik 3b'nin NOESY Spektrumu	84
Şekil 3.17.	Bileşik 3b'nin HSQC Spektrumu	85
Şekil 3.18.	Bileşik 3c'nin Kütle Spektrumu	87
Şekil 3.19.	Bileşik 3c'nin ¹ H-NMR Spektrumu	87

Şekil 3.20.	Bileşik 3c'nin ^{13}C -NMR Spektrumu	88
Şekil 3.21.	Bileşik 3c'nin COSY Spektrumu	88
Şekil 3.22.	Bileşik 3c'nin ROESY Spektrumu	89
Şekil 3.23.	Bileşik 3c'nin HSQC Spektrumu	89
Şekil 3.24.	Bileşik 3c'nin HMBC Spektrumu	90
Şekil 3.25.	Bileşik 4'ün Kütle Spektrumu	92
Şekil 3.26.	Bileşik 4'ün ^1H -NMR Spektrumu	92
Şekil 3.27.	Bileşik 4'ün ^{13}C -NMR Spektrumu	93
Şekil 3.28.	Bileşik 4'ün NOESY Spektrumu	93
Şekil 3.29.	Bileşik 5'in Kütle Spektrumu	95
Şekil 3.30.	Bileşik 5'in ^1H -NMR Spektrumu	95
Şekil 3.31.	Bileşik 5'in ^{13}C -NMR Spektrumu	96
Şekil 3.32.	Bileşik 5'in COSY Spektrumu	96
Şekil 3.33.	Bileşik 5'in HSQC Spektrumu	97
Şekil 3.34.	Bileşik 5'in NOESY Spektrumu	97
Şekil 3.35.	Bileşik 6'nın Kütle Spektrumu	99
Şekil 3.36.	Bileşik 6'nın ^1H -NMR Spektrumu	100
Şekil 3.37.	Bileşik 6'nın ^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6 + \text{D}_2\text{O}$) Spektrumu	100
Şekil 3.38.	Bileşik 6'nın COSY Spektrumu	101
Şekil 3.39.	Bileşik 6'nın NOESY Spektrumu	101
Şekil 3.40.	4-[(6,7-dimetoksikinazolin-4-il)amino]benzonitril (3a) bileşiğine ait IR spektrumu	103
Şekil 3.41.	İmidat esterine ait IR spektrumu	103
Şekil 3.42.	Bileşik 7a'nın Kütle Spektrumu	105
Şekil 3.43.	Bileşik 7a'nın ^1H -NMR Spektrumu	105

Şekil 3.44.	Bileşik 7a'nın ^1H -NMR (DMSO- d_6 + D_2O) Spektrumu	106
Şekil 3.45.	Bileşik 7a'nın ^{13}C -NMR Spektrumu	106
Şekil 3.46.	Bileşik 7a'nın COSY Spektrumu	107
Şekil 3.47.	Bileşik 7b'nin Kütle Spektrumu	108
Şekil 3.48.	Bileşik 7b'nin ^1H -NMR Spektrumu	109
Şekil 3.49.	Bileşik 7b'nin ^{13}C -NMR Spektrumu	109
Şekil 3.50.	Bileşik 7b'nin HSQC Spektrumu	110
Şekil 3.51.	Bileşik 7c'nin Kütle Spektrumu	111
Şekil 3.52.	Bileşik 7c'nin ^1H -NMR Spektrumu	112
Şekil 3.53.	Bileşik 7c'nin ^{13}C -NMR Spektrumu	112
Şekil 3.54.	Bileşik 7c'nin HSQC Spektrumu	113
Şekil 3.55.	Bileşik 7d'nin Kütle Spektrumu	114
Şekil 3.56.	Bileşik 7d'nin ^1H -NMR Spektrumu	115
Şekil 3.57.	Bileşik 7d'nin ^{13}C -NMR Spektrumu	115
Şekil 3.58.	Bileşik 7e'nin Kütle Spektrumu	117
Şekil 3.59.	Bileşik 7e'nin ^1H -NMR Spektrumu	117
Şekil 3.60.	Bileşik 7e'nin ^{13}C -NMR Spektrumu	118
Şekil 3.61.	Bileşik 8a'nın Kütle Spektrumu	119
Şekil 3.62.	Bileşik 8a'nın ^1H -NMR Spektrumu	120
Şekil 3.63.	Bileşik 8a'nın ^{13}C -NMR Spektrumu	120
Şekil 3.64.	Bileşik 8a'nın HSQC Spektrumu	121
Şekil 3.65.	Bileşik 8b'nin Kütle Spektrumu	122
Şekil 3.66.	Bileşik 8b'nin ^1H -NMR Spektrumu	123
Şekil 3.67.	Bileşik 8b'nin ^{13}C -NMR Spektrumu	123
Şekil 3.68.	Bileşik 8b'nin HSQC Spektrumu	124

Şekil 3.69.	Bileşik 8c'nin Kütle Spektrumu	125
Şekil 3.70.	Bileşik 8c'nin ^1H -NMR Spektrumu	126
Şekil 3.71.	Bileşik 8c'nin ^{13}C -NMR Spektrumu	126
Şekil 3.72.	Bileşik 8c'nin COSY Spektrumu	127
Şekil 3.73.	Bileşik 8c'nin HSQC Spektrumu	127
Şekil 3.74.	Bileşik 8d'nin Kütle Spektrumu	129
Şekil 3.75.	Bileşik 8d'nin ^1H -NMR Spektrumu	130
Şekil 3.76.	Bileşik 8d'nin ^{13}C -NMR Spektrumu	130
Şekil 3.77.	Bileşik 8d'nin COSY Spektrumu	131
Şekil 3.78.	Bileşik 8e'nin Kütle Spektrumu	132
Şekil 3.79.	Bileşik 8e'nin ^1H -NMR Spektrumu	133
Şekil 3.80.	Bileşik 8e'nin ^{13}C -NMR Spektrumu	133
Şekil 3.81.	Bileşik 8e'nin HSQC Spektrumu	134
Şekil 3.82.	Bileşik 9a'nın Kütle Spektrumu	135
Şekil 3.83.	Bileşik 9a'nın ^1H -NMR Spektrumu	136
Şekil 3.84.	Bileşik 9a'nın ^{13}C -NMR Spektrumu	136
Şekil 3.85.	Bileşik 9a'nın HSQC Spektrumu	137
Şekil 3.86.	Bileşik 9b'nin Kütle Spektrumu	138
Şekil 3.87.	Bileşik 9b'nin ^1H -NMR Spektrumu	139
Şekil 3.88.	Bileşik 9b'nin ^{13}C -NMR Spektrumu	139
Şekil 3.89.	Bileşik 9b'nin HSQC Spektrumu	140
Şekil 3.90.	Bileşik 9c'nin Kütle Spektrumu	142
Şekil 3.91.	Bileşik 9c'nin ^1H -NMR Spektrumu	142
Şekil 3.92.	Bileşik 9c'nin ^{13}C -NMR Spektrumu	143
Şekil 3.93.	Bileşik 9c'nin COSY Spektrumu	143

Şekil 3.94.	Bileşik 9c'nin HMBC Spektrumu	144
Şekil 3.95.	Bileşik 9c'nin HSQC Spektrumu	144
Şekil 3.96.	Bileşik 9c'nin NOESY Spektrumu	145
Şekil 3.97.	Bileşik 9d'nin Kütle Spektrumu	146
Şekil 3.98.	Bileşik 9d'nin ¹ H-NMR Spektrumu	147
Şekil 3.99.	Bileşik 9d'nin ¹³ C-NMR Spektrumu	147
Şekil 3.100.	Bileşik 9e'nin Kütle Spektrumu	149
Şekil 3.101.	Bileşik 9e'nin ¹ H-NMR Spektrumu	149
Şekil 3.102.	Bileşik 9e'nin ¹³ C-NMR Spektrumu	150
Şekil 3.103.	Bileşik 7f'nin Kütle Spektrumu	152
Şekil 3.104.	Bileşik 7f'nin ¹ H-NMR Spektrumu	152
Şekil 3.105.	Bileşik 7f'nin ¹³ C-NMR Spektrumu	153
Şekil 3.106.	Bileşik 8f'nin Kütle Spektrumu	154
Şekil 3.107.	Bileşik 8f'nin ¹ H-NMR Spektrumu	155
Şekil 3.108.	Bileşik 8f'nin ¹³ C-NMR Spektrumu	155
Şekil 3.109.	Bileşik 9f'nin Kütle Spektrumu	157
Şekil 3.110.	Bileşik 9f'nin ¹ H-NMR Spektrumu	158
Şekil 3.111.	Bileşik 9f'nin ¹³ C-NMR Spektrumu	158
Şekil 3.112.	Bileşik 9f'nin COSY Spektrumu	159
Şekil 3.113.	Bileşik 9f'nin HMBC Spektrumu	159
Şekil 3.114.	Bileşik 9f'nin HSQC Spektrumu	160
Şekil 3.115.	Bileşik 9f'nin NOESY Spektrumu	160
Şekil 3.116.	Sentezlenen bileşiklerin EGFR kinaz için inhibisyon değerleri	163
Şekil 3.117.	EGFR aktif bölgesinde erlotinib (koyu yeşil), bileşik 4 (pembe), bileşik 6 (yeşil) ve bileşik 8f (mavi)'nin üst üste çakışmış görüntüsü	165

Şekil 3.118.	Bileşik 4 (pembe)'ün EGFR'nin aktif bölgesindeki bağlanma pozu (solda) ve PDB: 1M17 enzimi ile etkileşiminin 2 boyutlu gösterimi (sağda)	165
Şekil 3.119.	Bileşik 6 (yeşil)'nin EGFR'nin aktif bölgesindeki bağlanma pozu (solda) ve PDB: 1M17 enzimi ile etkileşiminin 2 boyutlu gösterimi (sağda)	166
Şekil 3.120.	Bileşik 8f (mavi)'nin EGFR'nin aktif bölgesindeki bağlanma pozu (solda) ve PDB: 1M17 enzimi ile etkileşiminin 2 boyutlu gösterimi (sağda)	166
Şekil 4.1.	Bileşik 9c'nin kısmi NOESY spektrumu	171
Şekil 4.2.	Bileşik 9c'nin kısmi COSY spektrumu	172
Şekil 4.3.	Bileşik 9c'nin kısmi HSQC spektrumu	173
Şekil 4.4.	Bileşik 9c'nin kısmi HMBC spektrumu	174

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1.	Sentezlenen 6,7-dimetoksikinazolin türevleri	65
Çizelge 3.1.	Sentezlenen türevlerin moleköl ağırlıkları, hidrojen bağı donör ve akseptör sayıları, dönebilen bağı sayıları, polar yüzey alanları ve logP değerleri	162
Çizelge 3.2.	Sentezlenen bileşiklerin doking skorları	164



1.GİRİŞ

Kanser, sık görülmesi ve öldürücülüğünün yüksek olması nedeniyle çağımızın en önemli sağlık sorunlarından biridir. Dünya çapında kansere bağlı ölüm oranı, kalp hastalığına bağlı ölümlerden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Hatta, gelişmiş ülkelerde, kanser nedenli ölümler artık kardiyovasküler hastalıklara bağlı ölümlerden daha yaygın görülmeye başlamıştır (Hulvat, 2020). 20. yüzyılın büyük bölümünde kansere bağlı ölüm oranlarında artış gözlenmiştir. Bu durum, artan tütün kullanımına bağlı olarak gözlenen akciğer kanserinin hızlı artışı ile ilişkilidir. Bununla birlikte, sigara kullanımındaki azalma ve bazı kanserlerin erken teşhisi ve tedavisindeki gelişmeler, 1991 yılından bu yana kanser ölüm oranında sürekli bir düşüşe neden olmuştur. Buna rağmen, 2021 yılında, yalnızca Amerika’da 608.570 kişinin kanserden öleceği tahmin edilmektedir ve bu da günde 1600'den fazla ölüme karşılık gelmektedir (Siegel ve ark., 2021). Kansere bağlı ölümler, erkeklerde sırasıyla akciğer, prostat ve kolorektum kanserlerinden, kadınlarda ise akciğer, meme ve kolorektum kanserlerinden kaynaklanmaktadır (Hulvat, 2020 ve Siegel ve ark., 2021). Tüm bu verilen bilgiler göz önüne alındığında, büyük bir halk sağlığı sorunu olmaya devam eden kanser ve kanserin tedavisi çok sayıda araştırmamanın yapıldığı bir alan haline gelmiştir.

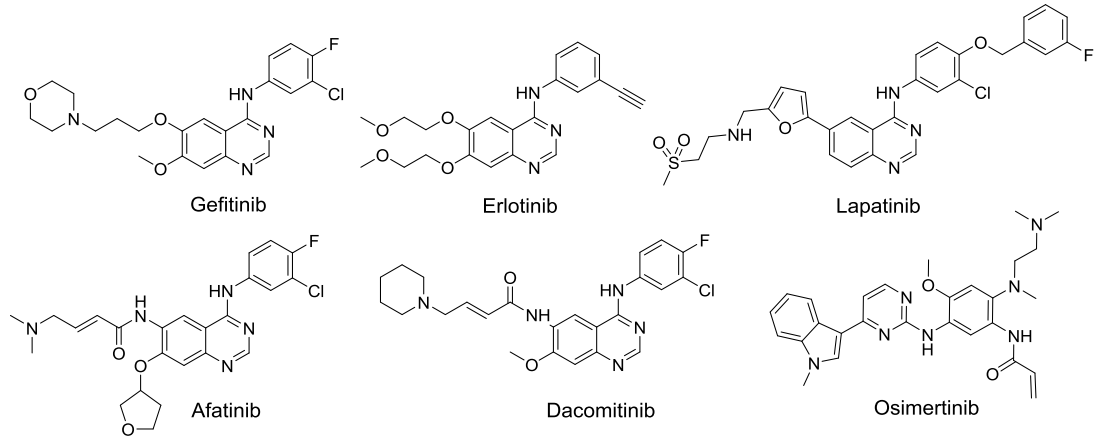
İlaç keşfindeki hızlı ilerlemeye rağmen, mevcut antikanser ilaçlarda etkinlik, güvenlik ve seçicilik eksikliği hala çözülememiş, başlıca sorun olmaya devam etmektedir. Benzersiz bir kemoterapi türü olan hedeflendirilmiş tedavi ile belirli genler veya proteinler hedeflenerek kanser hücrelerinin büyümesi ve yayılması durdurulmaktadır (Bansal ve Malhotra, 2020).

Protein kinazlar ve kanser ilişkisi, kanser araştırmalarının önemli bir kısmında yer almaktadır. Bir protein tirozin kinaz olan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR), son yıllarda kanser tedavisi için bir hedef haline gelmiştir (Cohen, 2002).

Hücre proliferasyonu, motilitesi ve adezyonu, invazyon, hücre sağkalımı ve anjiyogenez gibi normal fizyolojik süreçlerde rol oynayan EGFR'nin, kanserli dokularda anormal davranış gösterdiği bulunmuştur. Bu nedenle hücrelerde, mutasyona uğramış veya aşırı eksprese edilmiş olduğu gözlenen EGFR, sıklıkla tümör büyümesi ile ilişkilendirilmektedir (Woodburn, 1999). Akciğer, meme, yumurtalık, kolon, pankreas, mesane kanserleri gibi kanser türlerinde EGFR'nin yüksek düzeyde görüldüğü ve bu durumun hastalığın ilerlemesi, metastazı ve kötü prognozuyla bağlantılı olduğu bulunmuştur (Salomon ve ark., 1995). Bu ilişki göz önünde bulundurulduğunda, kanser tedavisi için, artmış seviyelerde görülen EGFR iyi bir hedef oluşturmakta ve EGFR'yi hedef alarak inhibe edebilen bileşikler bulunması için çaba harcanmaktadır (Chang ve ark., 2017 ve Cohen, 2002).

EGFR'yi inhibe etmek için enzim inhibitörleri, antikorlar, antikor-toksinler, antisens gibi çeşitli yaklaşımlar benimsenmektedir. Bunlar arasında antikorlar ve özellikle de küçük moleküllü enzim inhibitörleri ön plana çıkmıştır. Küçük moleküllü enzim inhibitörleri aracılığıyla EGFR'nin tirozin kinaz aktivitesinin inhibisyonu ve böylelikle EGFR fonksiyonunun inhibisyonu amaçlanmaktadır (Woodburn, 1999).

1990'lı yılların başında 4-anilinokinazolinlerin Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü Tirozin Kinaz İnhibitörü (EGFR TKI) etkiye sahip olduğunun keşfedilmesi ve PD153035 bileşiğinin (Fry ve ark., 1994) etkinliğinin gösterilmesinin ardından bu tip ajanlarla ilgili çalışmalar hızlanmıştır ve pek çok küçük moleküllü tirozin kinaz inhibitörü geliştirilmiştir. Bu bileşikler arasında, Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmış ve kanser tedavisi için kullanılmakta olan gefitinib, erlotinib, lapatinib, afatinib, dacomitinib ve osimertinib bileşikler (Şekil 1.1) yer almaktadır (Acar ve Altuntaş, 2019; Ismail ve ark., 2016 ve Shah ve Lester, 2020).



Şekil 1.1. FDA onaylı EGFR TKI bileşikler

EGFR TKI kullanımının, bazı EGFR mutasyonlarını barındıran kanser hastalarında hayatta kalma oranına fayda sağladığı gözlenmiştir (Ayati ve ark., 2020 ve Bikker ve ark., 2009). Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK)’ne bağlı ölümlerin son yıllarda azalmasında, KHDAK yaygın mutasyonlarına karşı hedeflenmiş EGFR TKI’lerinin kullanımı ve bu inhibitörlerin kanser hastalarının yaşam süresine sağladığı katkının önemli seviyede payı olduğu düşünülmektedir (Siegel ve ark., 2021). Klinik çalışmalarla çok sayıda EGFR TKI değerlendirilmiştir, ancak bu inhibitörlerin uzun süreli kullanımları sonucu EGFR’nin tirozin kinaz alanında ortaya çıkan genetik mutasyonlar (T790M ve C797S mutasyonları) ilaçlardan beklenen etkinin elde edilmesi önünde büyük engel oluşturmıştır. Birçok yeni çalışma ile, EGFR’nin tirozin kinaz alanındaki spesifik mutasyonları hedefleyen küçük moleküller tasarlanmaktadır. Bu amaçla, çok sayıda bileşik sentezlenmiş, EGFR TKI olarak değerlendirilmiş ve hem *in vitro* hem de *in vivo* deneylerde umut verici sonuçlar elde edilebilmiştir, ancak daha verimli ajanlar bulmak için bu alandaki çalışmalar devam etmektedir (Ayati ve ark., 2020).

EGFR’yi inhibe eden belirli bileşikler bulunmuş olmasına rağmen kanserin oldukça komplike bir hastalık olması ve EGFR’nin bulunan ilaç moleküllerine karşı direnç geliştirmesi nedeniyle tedavide istenen fayda sağlanamamıştır. Kanser tedavisi için EGFR’yi tam ve etkili şekilde inhibe edecek yeni ilaç moleküllerine gereksinim vardır.

1.1. Kanser

Yaşamın devamlılığı; hücre çoğalması, hücre ölümü gibi hücrenin yaşamsal faaliyetlerinin düzenli şekilde devam etmesine bağlıdır. Normal hücreler aralıksız işbirliği içinde çalışırlar ve çevrelerindeki diğer hücreler tarafından talimat verildiğinde çoğalırlar. Canlı organizmada bulunan bütün hücreler belirli bir yaşam süresine sahiptir ve bu süre sonunda ölmeye programlanmışlardır. Organizmadaki ömürlerini tamamlayan hücrelerin, ölümünü kontrol eden mekanizmalar bulunur. Ancak meydana gelebilecek bir moleküler sorun sonucunda, bu kontrol mekanizmaları ve düzenli işleyen sistem bozulabilmektedir. Bu durum, hücrelerin kontrolsüz ve aşırı çoğalması ile sonuçlanabilmekte ve bu da tümör oluşumuna ve ilerleyen süreçte tümörün çevre dokulara zarar vermesi sonucu kanser oluşumuna sebep olmaktadır. Kısaca kanser, hücrelerin metabolik değişiklikler sonucu aşırı ve düzensiz çoğalmalarına, vücudun kontrol mekanizmalarından ve immün sistemden kaçmalarına ve ilerleyen süreçte daha uzak dokulara metastaz oluşturmalarına sebep olan çok aşamalı bir süreçtir (Weinberg, 1996).

Tümörlerin metastatik yayılması, büyüme faktörlerinin dahil olduğu bir dizi olayın sonucudur. Öncelikle tümör hücreleri çoğalırlar, hücre dışı matriksle ve komşu hücrelerle temaslarına olan bağımlılıklarını kaybederler, ardından damar duvarından geçip kan dolaşımına girer ve hedef organa varıp yeni bir koloni oluştururlar (Khazaie ve ark., 1993).

Normal hücrelerin kanser öncesi bir lezyondan, kötü huylu tümör hücrelerine dönüşümü, bir kişinin genetik faktörleri ile üç kategoride toplanabilen dış etkenler arasındaki etkileşimin sonucudur. Bu dış etkenler: 1) ultraviyole ve iyonlaştırıcı radyasyon gibi fiziksel kanserojenler 2) asbest, tütün dumanı bileşenleri, aflatoksin ve arsenik gibi kimyasal kanserojenler 3) belirli virüsler, bakteriler veya parazitlerden kaynaklanan enfeksiyonlar gibi biyolojik kanserojenlerdir (WHO, 2021).

Kansere neden olan genetik değişiklikler kalıtsal olarak aktarılabildiği gibi, hücre bölünmesi sırasında ortaya çıkan hataların bir sonucu olarak veya çevresel bazı maruziyetlerin neden olduğu DNA hasarı nedeniyle de ortaya çıkabilir. Tütün kullanımı, alkol kullanımı, sağlıksız beslenme, fiziksel hareketsizlik ve hava kirliliği kanser için risk faktörleridir (WHO, 2021).

Kanserlerin ortaya çıkmasında, hücre döngüsü ilerleme hızı (hücre bölünmesi), hücre büyümesi (hücre kütlesi) ve programlanmış hücre ölümü (apoptoz) arasındaki kritik denge önemlidir. Kanser hücreleri apoptoz işlemini başlatan sinyalleri algılamayabilir ve kontrolsüz bölünme sürecine girebilirler (Blume-Jensen ve Hunter, 2001).

İki gen sınıfı, kanseri tetiklemede büyük rol oynamakta ve kanserde görülen kontrolsüz hücre çoğalmasının büyük çoğunu açıklamaktadır. Normal bir hücrenin yaşam döngüsü sürecinde Protoonkogenler büyümeyi teşvik ederken, tümör baskılayıcı genler inhibe etmektedirler. Protoonkogenler mutasyona uğradıklarında, aşırı çoğalmaya neden olan kanserojen onkogenler haline gelebilmektedir. Tümör baskılayıcı genler ise, mutasyonlarla etkisiz hale getirildiklerinde, hücredeki uygunsuz büyümeyi engelleyen mekanizmanın kaybolması ile kansere katkıda bulunmaktadır (Weinberg, 1996).

Belirli sinyal proteinleri ve yolakları, onkogenik mutasyonlar tarafından diğerlerine göre çok daha sık hedeflenmektedirler. Özellikle hücre dışı büyümeyi, farklılaşmayı ve gelişim sinyallerini yöneten moleküller, kanserlerde sıklıkla mutasyona uğrarlar. Örneğin, reseptör protein tirozin kinazlar yapısal olarak mutasyona uğradığında veya değiştirildiğinde, onkogenler tarafından kodlanan güçlü onkoproteinler haline gelebilir ve hücresel dönüşüme neden olabilirler (Blume-Jensen ve Hunter, 2001).

İyi huylu tümörler kanserli değildir. Genellikle cerrahi müdahale ile çıkarılabilirler ve çoğu durumda tekrarlamazlar. İyi huylu tümörlerdeki hücreler vücudun diğer bölgelerine yayılmazlar. Ancak kötü huylu tümörler kanserlidir. Bu

tümörlerdeki hücreler çevresindeki dokuları istila edebilir ve vücudun diğer bölgelerine yayılabilirler (Mitra ve ark., 2018). Tümör tipinin doğru şekilde tahmin edilmesi, tedavinin daha iyi yapılabilmesi ve toksisitenin en aza indirilebilmesi açısından önemlidir. Tümörün doğru tanımlanması, tümörlü dokunun morfolojik özelliklerine dayanmaktadır.

Kanserler, kanserin kaynaklandığı doku tipine göre (histolojik tip) veya vücutta kanserin ilk geliştiği yere göre iki şekilde sınıflanmaktadır. İlk sınıflandırma yöntemine göre kanseri histolojik açıdan; karsinom, sarkom, miyelom, lösemi, lenfoma ve karışık tipler olmak üzere altı ana kategoriye ayırmak mümkündür.

- Karsinom, epitel kökenli malign bir neoplazmadır, başka bir deyişle derinin veya iç organların, bezlerin yüzeyini kaplayan dokunun kanseri anlamına gelir. Epitel dokusu vücudun her yerinde bulunur ve epitel dokusunun maligniteleri olan karsinomlar, tüm kanser vakalarının % 80-90'ını oluşturmaktadırlar. Karsinomlar iki ana alt tipe ayrılır: bir organ veya bezde gelişen adenokarsinom ve skuamöz epitelden kaynaklanan skuamöz hücreli karsinom. Karsinomlar genellikle katı tümörler oluştururlar. Karsinomların örnekleri arasında prostat kanseri, göğüs kanseri, akciğer kanseri ve kolorektal kanser yer almaktadır.
- Sarkom, kemikler, tendonlar, kıkırdak, kas ve yağ gibi destekleyici ve bağ dokularından kaynaklanan kanseri ifade eder. Sarkom tümörleri genellikle içinde büyüdükleri dokuya benzerler. Osteosarkom (kemikte), Kondrosarkom (kıkırdakta), Leiomyosarkom (düz kasta), Fibrosarkom (lifli dokuda), Liposarkom (yağ dokusunda), Gliom (beyinde bulunan nörojenik bağ dokusunda) gibi türleri bulunmaktadır.
- Miyelom, kemik iliğinin plazma hücrelerinden kaynaklanan kanserdir.
- Lösemi (kan kanseri), kemik iliği kanseridir. Hastalık genellikle olgunlaşmamış beyaz kan hücrelerinin aşırı üretimi ile ilişkilidir. Bu olgunlaşmamış beyaz kan hücreleri gerektiği şekilde performans gösteremezler, bu nedenle hastalar genellikle enfeksiyona yatkındırlar. Lösemi ayrıca kırmızı kan hücrelerini de etkilemekte ve anemi nedeniyle zayıf kan pıhtılaşmasına ve yorgunluğa neden olabilmektedir.

- Lenfoma, bağışıklık sistemi hücrelerinden kaynaklanır. Vücut sıvılarını saflaştıran ve enfeksiyonla savaşan beyaz kan hücreleri veya lenfositler üreten damarlar, düğümler ve organlardan (özellikle dalak, bademcikler ve timus) oluşan lenfatik sistemin bezlerinde veya düğümlerinde gelişir. Bazen "sıvı kanserler" olarak adlandırılan lösemilerin aksine, lenfomalar "katı kanserlerdir".
- Karışık tipler, farklı kategoriden kanser türlerini içeren kanserlerdir. Adenoskuamöz karsinom veya karsinosarkomda olduğu gibi farklı tip kanserler bir arada bulunmaktadır.

Kanserin ikinci sınıflandırma yönteminde, vücutta ortaya çıktığı yer baz alınmaktadır. Akciğer, göğüs, prostat, baş-boyun, ağız ve beyin kanseri gibi spesifik yüzlerce farklı kanser bulunmaktadır (Cooper, 2000; Mitra ve ark., 2018 ve National Cancer Institute, 2021).

1.1.1. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK)

Akciğer kanseri, dünya çapında kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedeni olup her iki cinsiyette de en çok ölüme sebep olan kanser türüdür (Bray ve ark., 2018). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) (2021) verilerine göre, akciğer kanseri Amerika, Kanada, Çin, Rusya gibi pek çok ülkenin yanı sıra Türkiye’de de kanser türleri arasında ölüm oranı en yüksek olan kanserdir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)’nün ilk 10 ölüm nedenini açıkladığı rapora göre ise, trakea, bronş ve akciğer kanseri nedenli ölümler, dünya çapında tüm ölüm sebepleri arasında 6. sırada yer almaktadır (WHO, 2020).

Akciğer kanserlerinin büyük bir çoğunluğunu epitel hücrelerden köken alan karsinomlar oluşturmaktadır. Akciğer kanserleri geleneksel olarak küçük hücreli akciğer kanseri (vakaların yaklaşık % 15-20’si) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (vakaların yaklaşık % 80-85’i) olarak ikiye ayrılmaktadır (Inamura, 2017 ve Zheng, 2016). DSÖ’nün 2015 yılında yaptığı sınıflandırmada (Travis ve ark., 2015), KHDAK histolojik farklılıkları ve akciğer kanserinde hedeflenebilir genetik

değişikliklerine dayalı olarak adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinomu içeren alt tiplere ayrılmış olsa da genel bir terim olarak hâlâ kullanılmaktadır.

Küçük hücreli akciğer kanseri, akciğer kanserinin en ölümcül alt tipi olup belirlenebilmiş moleküler hedefli bir tedavi yöntemine sahip değildir (Inamura, 2017). KHDAK tedavisi ise oldukça komplike olup, ameliyat, radyoterapi ya da kemoterapiyi içeren tedavi yöntemleri hastaya ve kanserin evresine bağlı olarak değişmektedir (Duma ve ark., 2019). KHDAK hastalarının, dörtte üçünden fazlası, bölgesel olarak ilerlemiş veya metastaz yapmış kansere sahiptir. Tedavi için cerrahi rezeksiyon uygulanan hastaların büyük bir kısmında hastalık yeniden nüksetmekte ve kanser metastaz yapmaktadır (Evans, 2005).

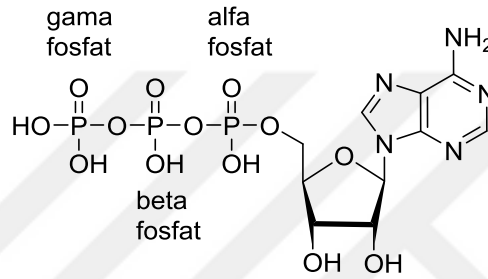
KHDAK'nin onkogenezinin ve ilerlemesinin altında yatan moleküler olayların derinlemesine araştırılmasıyla, KHDAK vakalarının çoğunda, bir tür tirozin kinaz reseptörü olan EGFR'nin aşırı ekspresyonu olduğu görülmüş (Pao ve Miller, 2005) ve böylelikle EGFR, KHDAK tedavisinin dönüm noktası hedeflerinden biri haline gelmiştir (Lin ve ark., 2014).

KHDAK 2 yıllık bağıl sağkalımı, 2009'dan 2010'a kadar tanı konulan kişiler için % 34'ken, 2015'ten 2016'ya kadar tanı konulan kişiler için % 42'ye yükselmiştir. Akciğer kanserine karşı iyileştirilmiş tedavi yöntemleri sayesinde kansere bağlı ölümlerde son yıllarda düşüş meydana gelmiştir (Siegel ve ark., 2021).

Görülme sıklığı göz önüne alındığında ve kansere bağlı ölümlerin büyük bir kısmını oluşturduğu düşünüldüğünde önemli bir sağlık problemi olan KHDAK için, etkili tedavi yöntemleri bulma çalışmaları devam etmektedir.

1.2. Protein Tirozin Kinaz

Kinazlar, adenosin trifosfat (ATP)'ın terminal γ -fosfatını (Şekil 1.2), çeşitli protein, lipid veya karbonhidrat substratlarının bir veya daha fazla hidroksil grubuna aktararak fosforilasyon reaksiyonlarını katalize eden, enzimatik aktiviteye sahip büyük bir protein sınıfını temsil etmektedir. Bu nedenle kinazlar, fosforilasyon için hedeflenen ilgili molekül sınıfına göre protein kinazlar, lipid kinazlar ve karbonhidrat kinazlar olarak tanımlanırlar (Tridente, 2017, s:9-56).



Şekil 1.2. ATP yapısı

Proteinlerin tersinir fosforilasyonu, hücre sinyalizasyonu ve bir dizi önemli fonksiyonun hücre içi aktivasyonunu tetiklemek ve kontrol etmek için gerekli bir mekanizmadır. Protein fosforilasyonu için gerekli değişiklikler, tirozin, serin veya treonin amino asitlerinden birinin yan zincirine ATP'nin terminal fosfat grubunu kovalent olarak bağlayan (fosforilasyon) protein kinazlar ve ters aktivite (defosforilasyon) gösteren protein fosfatazlar tarafından düzenlenir. Bir proteine fosfat gruplarının bağlanması ve uzaklaştırılması, enzimin katalitik bölgesinin alternatif aktivasyonu / blokajına ve protein-protein etkileşimleri yoluyla ilgili yapısal ve fonksiyonel değişikliklere (büyüme, farklılaşma, yapışma, hareketlilik, ölüm) neden olur (Tridente, 2017, s:9-56).

Protein kinazlar, hücre biyolojisinin hemen hemen her alanında önemli bir düzenleyici rol oynar. Bu enzimler apoptoz, hücre döngüsü ilerlemesi, hücre bölünme ve büyümesi, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi, hücre farklılaşması, gelişmesi, bağışıklık tepkisi, sinir sistemi dinamikleri, metabolizma ve transkripsiyon

dahil olmak üzere birçok hücresel süreci düzenler. Protein fosforilasyonu ayrıca gelişim sırasında hücreler arası iletişimde, fizyolojik tepkilerde ve homeostazda kritik bir rol oynamaktadır (Hunter, 2000; Manning ve ark., 2002 ve Roskoski Jr, 2019).

Protein kinazlar, insanda var olan tüm genlerin yaklaşık % 1,7'sini oluşturmakta olup, bu durum protein kinaz ailesini en büyük gen ailelerinden biri yapmaktadır. İnsan vücudundaki protein kinaz ailesi 518 üyeden oluşmaktadır. Fosforilasyonda yer alan spesifik substratlar olan amino asit kalıntılarının doğasına bağlı olarak, bu enzimler; protein serin / treonin kinazlar, protein tirozin kinazlar ve tirozin kinaz benzeri proteinler (atipik kinazlar) olarak sınıflandırılmaktadırlar (Manning ve ark., 2002 ve Roskoski Jr, 2019).

Protein kinazlar substratlarına göre alt aileler halinde gruplandırıldığında:

a. Tirozin Kinazlar (TK): 90 üye

i. Reseptör Tirozin Kinazlar (RTK): 58 üye

RTK alt grupları (20 alt aile): ALK/LTK, TAM, CCK4, DDR, EGFR/HER, EPH, FGFR, INSR/IGF1R, LMR, MET/RON, MUSK, PDGFR, RET, ROR, ROS, RYK, SuRTK106, TIE/TEK, TRK, VEGFR

ii. Reseptör Olmayan Tirozin Kinazlar (NRTK): 32 üye

NRTK alt grupları (10 alt aile): ABL, CSK, FAK, FES, FRK, JAK, SRC, SYK, TEC, TNK

b. Serin / Treonin Kinazlar: 385 üye

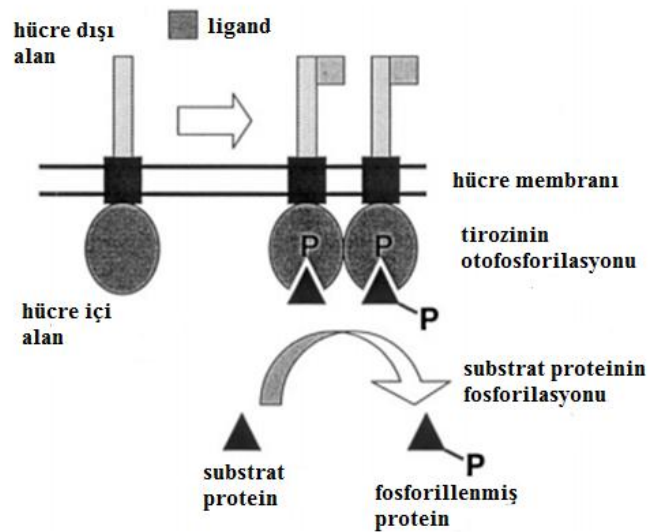
i. Reseptör Serin / Treonin Kinazlar

ii. Reseptör Olmayan Serin / Treonin Kinazlar

c. Tirozin kinaz benzeri proteinler (atipik kinazlar): 43 üye (Roskoski Jr, 2019 ve Tridente, 2017, s:9-56).

Protein tirozin kinazlar, reseptör ve reseptör olmayan tirozin kinazlar olarak iki ana gruba ayrılmaktadırlar. Reseptör olmayan tirozin kinazlar, transmembran alanlardan yoksundurlar; sitozol, çekirdek ve plazma membranının iç yüzeyinde bulunurlar. Reseptör tirozin kinazlar ise; hücre dışı alanda bir ligand bağlama bölgesi, bir transmembran sarmal ve hücre içi alanda bir protein tirozin kinaz alanına sahiptirler, ayrıca ek olarak hücre içi alanda düzenleyici bölgeler içermektedirler. (Krause ve Van Etten, 2005 ve Lemmon ve Schlessinger, 2010). Tüm RTK'lerin kinaz alanları, bir N-terminal lobu, bir C-terminal lobu olmak üzere iki loplu yapıya sahiptir. Loblar arasında ise, ATP'nin bağlanma bölgesi olan bir yarık bulunmaktadır (Roskoski, 2019 ve Stamos ve ark., 2002).

Ligandın yokluğunda, RTK'ler fosforile edilmemiş ve monomerik haldedirler ve ayrıca kinaz alanlarının konformasyonu inaktiftir. RTK'ler, ligand hücre dışı alana bağlandığında aktive olurlar, bu da reseptör dimerizasyonuna, otoinhibitör etkileşimin bozulmasına ve kinaz alanında düzenleyici bir tirozinin otofosforilasyonuna neden olmaktadır (Şekil 1.3). Bu değişiklikler, kritik amino asit kalıntılarının yeniden düzenlenmesine sebep olur ve meydana gelen aktivasyon ile çeşitli sinyal proteinleri zara toplanır ve sinyal yolları aktif hale gelir (Krause ve Van Etten, 2005).



Şekil 1.3. Reseptör tirozin kinazın otofosforilasyonu

RTK'lerin fosforilasyonu sayesinde, hücre dışı sinyaller hücre içi bölmeye aktarılmaktadır, böylece hayatta kalma, proliferasyon, farklılaşma, yer değiştirme ve anjiyogenez gibi temel hücre fonksiyonları bu membran proteinler aracılığıyla düzenlenmektedir (Lemmon ve Schlessinger, 2010 ve Tridente, 2017, s:9-56).

Normal fizyolojik koşullar altında, kinazların düzenlenmesi sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Ancak patolojik koşullar altında kinaz aktiviteleri düzensiz olabilir ve bu enzimler tarafından yönetilen hücre içi sinyal ağlarının bozulması, kanser, diyabet, otoimmün, kardiyovasküler, enflamatuvar hastalıklar ve sinir bozuklukları dahil birçok hastalığa yol açmaktadır (Hunter, 2000 ve Roskoski Jr, 2019).

Mutasyona uğramış, düzensiz bir formda bulunan veya anormal derecede yüksek seviyelerde eksprese edilen belirli TK'lerin, normal hücrelerin bir tümör hücresine dönüşmesine sebep olduğu bulunmuştur. Anormal işleve sahip TK'ler tümör gelişimi için oldukça önemlidir, öyle ki tanımlanmış protoonkogenlerin çoğu, TK aktivitesine sahip proteinleri kodlamaktadır (Hunter, 1991).

1.3. Epidermal Büyüme Faktörü

Stanley Cohen isimli bir biyokimyagerin, kanserli hücrelerde büyümeye neden olan mekanizmayı bulmak için 1950'li yıllarda başlayan araştırmaları, 1960'lı yıllarda Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)'nin keşfedilmesine olanak sağlamıştır. Gerçekleştirdiği deneylerde, fare submaksiller bezlerinden izole edilen bir proteinin yeni doğan hayvanlarda erken diş gelişimine sebep olduğu ve göz kapağı açılmasını hızlandığı görülmüştür (Cohen, 1962). Ayrıca bir diğer çalışmada, farelerden alınan tümör hücrelerinin civciv embriyolarına aktarıldığında embriyolarda epidermal proliferasyonu ve keratinizasyonu belirgin şekilde uyaran bir maddenin salındığının gözlemlenmesi üzerine keşfedilen bu maddeye Epidermal Büyüme Faktörü adı verilmiştir (Cohen, 1965). Cohen, yaptığı hayvan deneyleri ile EGF'nin embriyonel gelişim üzerinde ve vücudun normal dengesinin sağlanmasında önemli

rol oynadığını kanıtlamıştır. EGF'nin keşfinden sonra, moleküler yapısını da açıklamasıyla birlikte, bu çalışmaları onun 1986 yılında Nobel Ödülü'nü almasını sağlamıştır (Nobel Prize, 2021).

EGF'nin glikoz ve amino asit taşınmasının uyarılması, protein sentezinin aktivasyonu ve DNA sentezinin ve hücre replikasyonunun başlatılması dahil olmak üzere bir dizi olayı artırdığı keşfedildikten sonra, daha ileri çalışmalarda, EGF'nin fibroblastlar, karaciğer hücreleri ve vasküler hücrelerin yanı sıra endokrin hücreleri, tiroid, yumurtalıklar ve hipofiz bezleri de dahil olmak üzere çok çeşitli hücrelerin büyümesini uyardığı belirlenmiştir (Nobel Prize, 2021).

Hedef hücrelerin yüzeyinde reseptörler olarak adlandırılan spesifik bağlanma bölgelerinin varlığı, EGF'nin faaliyeti için bir ön şarttır. Bu reseptörler EGF'yi yakalamakta ve EGF reseptör kompleksi hücre içine çeşitli sinyaller yollamaktadır. EGF'nin biyolojik etkisinin görülebilmesindeki en önemli aşama, EGF reseptörü üzerindeki spesifik bir tirozin amino asidinin fosforilasyonudur. Reseptörün tirozine özgü otofosforilasyon gerçekleştirdiğinin bulunması, dışarıdan gelen bir sinyalin hücrenin içine nasıl ulaştığının anlaşılmasında oldukça önemli bir adımdır (Carpenter ve ark., 1978). Daha sonra bu olayın, birçok büyüme faktörünün etkilerine aracılık ettiği genel bir yol olduğu gösterilmiştir.

Tüm bu keşifler, malformasyon ve gelişim hataları, gecikmiş yara iyileşmesi, kas distrofisi ve tümör hastalıkları gibi çeşitli klinik bozuklukların patogenezinin anlaşılması ve tedavisinde öncü olmuştur (Nobel Prize, 2021).

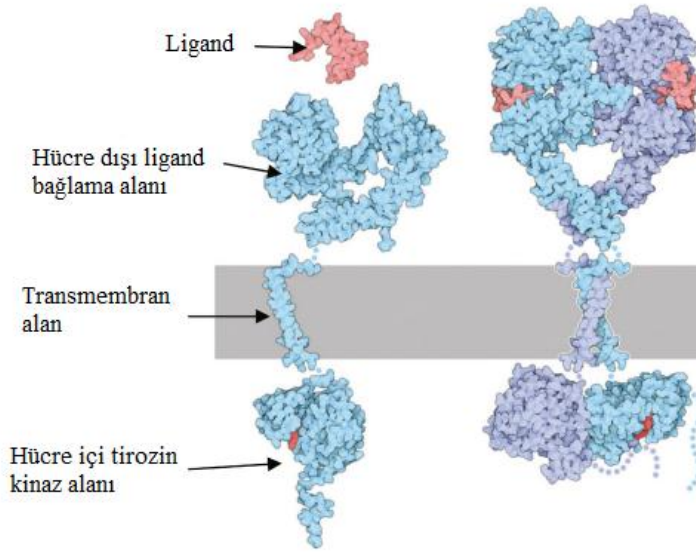
1.4. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) (ErbB-1 veya HER-1) dört üye içeren ErbB (HER) reseptör tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir. Ailenin diğer üyeleri, ErbB-2 (HER-2/Neu), ErbB-3 (HER-3) ve ErbB-4 (HER-4)'dir (Janmaat ve Giaccone, 2003; Mendelsohn ve Baselga, 2000 ve Yarden ve Sliwkowski, 2001).

EGFR'ye yapı ve fonksiyon açısından benzerlik gösteren bu üyeler de, transmembran yapılı RTK'lerdir (Herbst, 2004).

EGFR, hücre yüzeyinde yer alan 170 kDa ağırlığında bir glikoproteindir (Karunagaran ve ark., 1996). 28 ekson içeren EGFR geni tarafından sentezlenmektedir (Lynch ve ark., 2004). EGF, dönüştürücü büyüme faktörü- α (TGF- α), amfiregulin, heparin bağlayıcı EGF ve betaselülin dahil olmak üzere birçok ligand EGFR'ye bağlanmakta ve onu aktive etmektedir. EGF ve TGF- α 'nın, EGFR için en önemli ligandlar olduğu düşünülmektedir (Herbst, 2004). EGFR, ayrıca hormonlar, lenfokinler ve stres faktörleri gibi reseptöre doğrudan bağlanmayan uyarılar tarafından da aktive edilebilmektedir. EGFR'nin bu şekilde aktive olmasının, bazı hücrel yanıtlar için gerekli olduğu düşünülmektedir (Carpenter, 1999).

Tüm reseptör kinazların ortak yapısı gibi, EGFR de hücre dışı bir ligand bağlama alanı, bir transmembran bölge ve tirozin kinaz aktivitesi olan bir hücre içi alandan oluşmaktadır. Reseptör aktive edilmediğinde, inaktif monomerler şeklinde bulunmaktadır (Khazaie ve ark., 1993). Reseptörün aktivasyonu, TGF- α veya EGF gibi spesifik bir ligand, hücre dışı ligand bağlama alanından reseptöre bağlandığında oluşmaktadır. Bu konformasyonel değişikliğe bağlı olarak, başka bir EGFR proteini veya genellikle ErbB-2 olmak üzere başka bir ErbB reseptörü ile reseptör dimerizasyonu (Şekil 1.4) meydana gelmektedir (Graus-Porta ve ark., 1997; Karunagaran ve ark., 1996 ve Schlessinger, 2002). İki EGFR arasındaki dimerizasyon homodimerizasyon, EGFR'nin ErbB ailesine ait başka bir reseptörle yaptığı dimerizasyon ise heterodimerizasyon olarak adlandırılmaktadır (Mendelsohn ve Baselga, 2000).

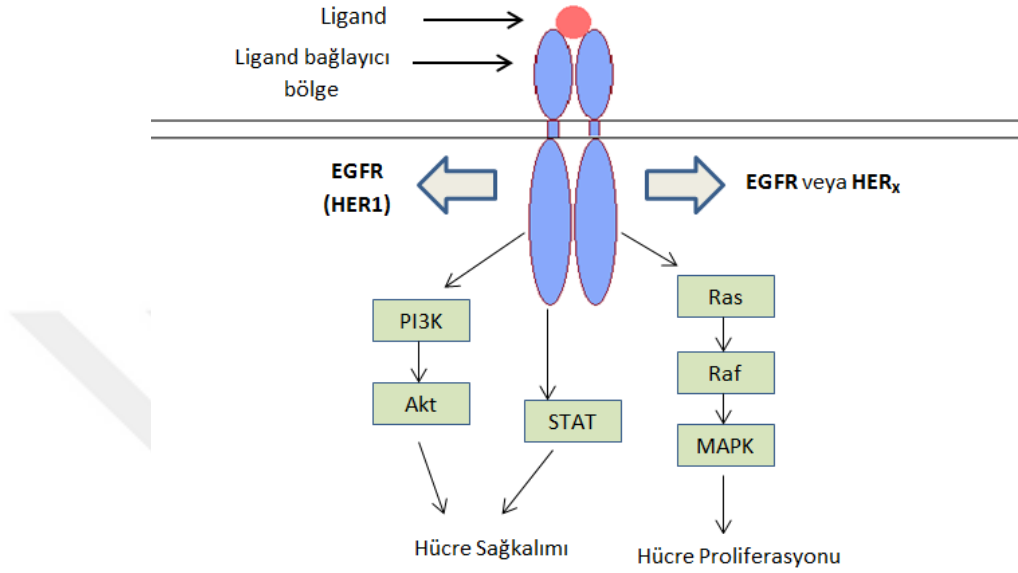


Şekil 1.4. EGFR ve dimerik kompleksin yapısı. EGFR (mavi), hücre dışı alan, transmembran alan ve hücre içi kinaz alanından oluşmaktadır. Şekilde, hücre dışı alanla etkileşen ligand (pembe) ve kinaz alanında ATP bağlama bölgesine bağlanan ATP (kırmızı) gösterilmektedir (Han ve Du, 2017).

Dimerizasyonla birlikte, reseptörün hücre içi kinaz alanının aktivasyonu ve kinaz alanında bulunan tirozin kalıntılarının otofosforilasyonu meydana gelir (Mendelsohn ve Baselga, 2000 ve Yarden ve Sliwkowski, 2001). Bu otofosforilasyon, kinaz alanındaki tirozin kalıntılarına, ATP'den bir fosfat transfer edilmesi yoluyla gerçekleşmektedir (Schlessinger, 2002). Otofosforilasyonla birlikte, sitoplazmik tirozin kinaz alanları ve sinyal akışı tetiklenmektedir. Sitozolden bir dizi protein ve lipid yapılı ikincil haberci toplanmakta ve böylece hücre içi sinyal iletimi başlatılmaktadır (Mendelsohn ve Baselga, 2000 ve Tridente, 2017, s:9-56).

Sinyal iletiminden sorumlu çeşitli yollar bulunmaktadır (Şekil 1.5). Bu sinyalleme yollarından biri, hücre proliferasyonunun artmasına neden olan Ras-Raf- mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolağıdır. Diğer bir ana yolak, hücre döngüsü ilerlemesini ve aynı zamanda hücre sağkalımını düzenleyen fosfatidil inositol 3-kinaz (PI3K)-Akt yolağıdır (Mendelsohn ve Baselga, 2000 ve Yarden ve Sliwkowski, 2001). Hücrenin hayatta kalması için önemli olan bir başka yolak da sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) yolağıdır (Schlessinger, 2002). Normal hücresel sinyal iletimlerinin yanı sıra, malignite gelişimine katkıda bulunan gen ekspresyonu, hücresel proliferasyon, anjiyogenez ve apoptozun

inhibisyonu gibi biyolojik süreçler de bu yollarla düzenlenmektedir. Ayrıca, yolların aktivasyonunun tümör hücresi hareketliliğini ve metastazı teşvik ettiği gösterilmiştir (Herbst, 2004).



Şekil 1.5. EGFR sinyal iletim yolları (Pao ve Miller, 2005).

EGFR'nin hücrel sinyallemede yer alan bir protein TK olduğu bulunduğundan sonra, ErbB 1983 yılında tavuklarda eritroblastoz ve sarkomların nedeni olarak tanımlanmış (Yamamoto ve ark., 1983) ve EGFR'nin anormal davranış gösterdiği durumlarda kanseri indükleyebilen bir onkogen olduğu belirlenmiştir. Daha sonrasında ise, EGFR'nin normal dokulara göre pek çok kanser tipinde daha yüksek seviyelerde eksprese edildiği ve katı tümör büyümesini teşvik ettiği gösterilmiştir (Nicholson ve ark., 2001).

EGFR'de meydana gelen bu düzensizlik, çeşitli hücrel süreçlerin aktivasyonu yoluyla tümör oluşumuna sebep olduğu gibi sitotoksik ilaç direncini de artırabilir ya da metastaza yol açabilir ve bu durum genellikle kötü prognozla ilişkilendirilmektedir (Krause ve Van Etten, 2005 ve Nicholson ve ark., 2001).

EGFR, en az üç ana mekanizma yoluyla kanseri indüklemektedir: EGFR ligandlarının aşırı ekspresyonu, EGFR amplifikasyonu ve EGFR'nin mutasyonel aktivasyonu. Oluşan mutasyonlar sonucu, liganddan bağımsız yapısal reseptör aktivasyonu, alternatif sinyal yollarının aktivasyonu ve apoptotik mekanizmaların ortadan kaldırılması görülebilmektedir (Pao ve Miller, 2005).

EGFR'nin aktive edici mutasyonları ve aşırı ekspresyonu, meme karsinomları, glioblastomalar, yumurtalık ve KHDAK dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde rol oynamaktadır (Blume-Jensen ve Hunter, 2001). EGFR genellikle epitel orijinli tümörlerde ve özellikle baş ve boyun kanserinde (% 80-100), KHDAK'de (% 40-80), kolorektal kanserinde (% 25-100), mide (% 33-80), pankreas (% 30-50), yumurtalık (% 35-70), meme (% 15-37) ve prostat (% 40-90) kanserlerinde ve glioblastoma multiforme (% 40-92) anormal şekilde bulunmaktadır (Tridente, 2017, s:123-144).

Hücrel proliferasyon, hayatta kalma ve metastazı yönetmedeki önemli rolü, EGFR'yi çekici bir moleküler hedef haline getirmektedir. EGFR'nin faaliyetlerine müdahale edilmesiyle sinyal iletiminin kesintiye uğratılması hedeflenmektedir. Reseptörün aktivitesi inhibe edilerek büyüme faktörlerinin sinyal yolları bloke edilebilir ve tümör büyümesi etkili bir şekilde önlenir. Aynı zamanda, EGFR'nin aşırı ekspresyonu, tümör hücrelerini normal hücrelerden ayırarak EGFR inhibe edici moleküllerin tümör hücreleri üzerinde daha seçici davranmasını ve agresif proliferasyonunu azaltmasını mümkün kılabilir. Bu nedenle EGFR, sinyal akışını durdurmak ve kanserle baş edebilmek amacıyla bir araç olarak görünmekte ve antikanser ajanların tasarımı için değerli bir hedefi temsil etmektedir (Herbst, 2004).

1.5. Kanser Tedavisinde EGFR Hedefli Yaklaşım

Kanser ile mücadelede güçlü sağlık sistemleri, erişilebilir erken teşhis, kaliteli tedavi ve bakım hizmetlerinin doğru sağlanması, birçok kanser türünde hayatta kalma oranlarını artırmaktadır. Kanser tedavisinde öncelikli amaçlar; kanseri

iyileştirmek, yaşamı önemli ölçüde uzatmak ve hastanın yaşam kalitesini iyileştirmek. Tedavi genellikle radyoterapi, kemoterapi ve/veya cerrahi girişim şeklindedir (WHO, 2021).

1960'lı yıllardan beri KHDAK kemoterapisi için, alkilleyici ajanlar başta olmak üzere birçok ilaç kullanılmıştır. 2000'li yıllara kadar klinik araştırmalar, metastatik KHDAK için mevcut standart kemoterapiyi platin bazlı tedavi olarak tanımlamıştır. Geleneksel olarak ifosfamid, vindesin, sisplatin, karboplatin ve mitomisin dahil sadece birkaç ajanın KHDAK için aktiviteye sahip olduğu kabul edilmiştir. Bunlardan sisplatin, % 20'den daha az yanıt oranlarına sahip olmasına rağmen, ilerlemiş KHDAK'de sağkalımı artırma olasılığı en yüksek ilaç olarak görülmüştür. Bununla birlikte, bu tedaviler genellikle kemik iliği baskılanması dahil olmak üzere istenmeyen toksisitelerle ilişkilidir ve hastalık üzerine spesifik değildirler (Evans, 2005).

Geleneksel sitotoksik kemoterapinin aksine, normal hücrelerin işleyişini büyük ölçüde bozulmadan bırakırken, kanser hücrelerinin oluşumunu, çoğalmasını ve/veya metastazını kesintiye uğratmak amacıyla yeni ilaç geliştirme çalışmaları önem kazanmıştır (Herbst, 2004). Kanser tedavisi için, son yıllarda moleküler düzeyde hedefe yönelik kanser tedavi yöntemleri geliştirilmiştir (Pao ve Miller, 2005).

Protein kinazların mutasyonları ve düzensizliği, birçok hastalıkta nedensel rol oynadığı için, bu enzimlerin agonistlerinin ve antagonistlerinin geliştirilmesi hastalıkların tedavisi için olanak sağlamaktadır (Manning ve ark., 2002). Kontrolsüz EGFR aktivitesinin beyin, baş boyun, yumurtalık, uterus, rahim ağzı, mesane, akciğer kanserleriyle, KHDAK ve kanserin metastatik potansiyeliyle ve kötü prognozla ilişkili olduğunun (Janmaat ve Giaccone, 2003; Pao ve Miller, 2005; Sainsbury ve ark., 1985 ve Veale ve ark., 1987) bulunması üzerine, EGFR'yi hedeflemenin kanser tedavisinde benzersiz bir yol olabileceği düşünülmüştür (Janmaat ve Giaccone, 2003).

EGFR aracılı hücrel olaylara müdahale etmek amacıyla reseptörü spesifik olarak hedefleyen birkaç yaklaşım geliştirilmiştir. Tirozin kinazı inhibe etmek amacıyla geliştirilen ilaçların temel prensipleri, ATP veya substratların reseptöre bağlanmasına müdahale ederek kinazın katalitik aktivitesini doğrudan inhibe etmek ya da reseptörlerin dimerizasyonlarını bloke ederek aktivasyonu inhibe etmektir (Krause ve Van Etten, 2005). Bu amaçla, bugüne kadar en kapsamlı olarak incelenen iki yaklaşım, hücre dışı reseptör alanına yönelik monoklonal antikorların kullanımı ve hücre içi EGFR tirozin kinaz (EGFR TK) aktivitesine müdahale eden küçük molekülü bileşikler olan tirozin kinaz inhibitörlerinin (TKI) kullanımıdır (Herbst, 2004).

Monoklonal antikorlar, reseptörün hücre dışı alanına bağlanmak için, reseptörün endojen ligandlarıyla rekabet ederek ligand bağlanmasını kısıtlar ve EGFR TK inhibitör etki gösterirler. EGFR TK aktivitesini doğrudan inhibe eden küçük moleküller ise kinazın hücre içi ATP bağlanma bölgesine bağlanmak için ATP ile rekabet ederek etki göstermektedirler (Ismail ve ark., 2016).

Geleneksel sitotoksik yaklaşımlar, radyasyon ve kemoterapi ile karşılaştırıldığında bu ajanlar farklı etki mekanizmasına ve farklı toksisite profillerine sahiptirler. Kanser tedavisinde, bu ajanların tek başına ya da geleneksel sitotoksik tedaviler ile aditif veya sinerjistik etki elde etmek için kombinasyon halinde kullanımını içeren yaklaşımlar söz konusudur (Herbst, 2004 ve Janmaat ve Giaccone, 2003).

1.6. EGFR TKI'lerin Tarihsel Geliştirilme Aşamaları

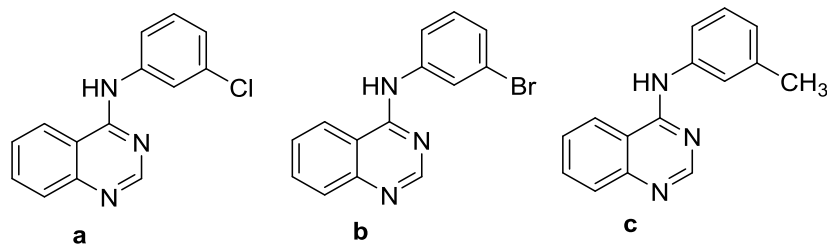
Antikanser bileşik araştırmaları için, yalnızca EGFR'yi hedef alan ve EGFR kinazı seçici olarak inhibe edebilecek ilaçların bulunması önemli bir konu haline gelmiştir. Protein kinaz inhibisyonuna yönelik keşif yaklaşımlarında ilk başlarda, EGFR'nin kinazlarla ve özellikle ErbB ailesinin diğer üyeleriyle olan yapısal benzerlikleri nedeniyle yalnızca EGFR'yi inhibe etmenin olası olmadığı

düşünülmüştür. Ancak araştırmalar moleküllerde yapılan çeşitli sübstitüsyonların sağladığı çeşitliliğin, kinazlar ve ErbB ailesinin üyeleri için farklı seçiciliklerle sonuçlandığını ve yalnız bir kinazı inhibe etmenin mümkün olduğunu göstermiştir (Fry, 2003).

Yaish ve ark. (1988) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, insülin reseptör tirozin kinaz aktivitesini etkilemeden EGFR tirozin kinaz aktivitesini etkili bir şekilde inhibe edebilen küçük moleküller bulmanın mümkün olduğu bildirilmiş ve EGF ile uyarılan tümör hücresi büyümesini seçici olarak inhibe eden yeni bir inhibitör serisinin özellikleri açıklanmıştır.

1990'lı yılların başında EGFR TK'nin yapısı ve katalitik mekanizmasının araştırılmasıyla, inhibitör etki gösteren yeni bir TKI sınıfı olarak anilinokinazolin yapısı taşıyan bileşiklerin tanımlanmasına yol açmıştır.

Barker ve Davies (1992) tarafından yapılan çalışmayla ilk kez, 4-anilinokinazolinlerin EGFR inhibitörleri olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Tasarlanan 4-(3-kloroanilino)kinazolin, 4-(3-bromoanilino)kinazolin ve 4-(3-metil anilino)kinazolin bileşiklerinin (Şekil 1.6) EGFR tirozin kinazı, sırasıyla 40, 20 ve 180 nM IC₅₀ değerleriyle inhibe ettikleri bildirilmiştir. Bulunan bu bileşikler, o tarihe kadar bulunmuş inhibitörlere oranla çok daha fazla aktivite göstermişlerdir.



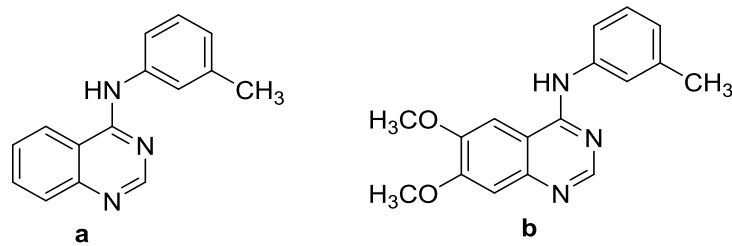
Şekil 1.6. a) 4-(3-kloroanilino)kinazolin, b) 4-(3-bromoanilino)kinazolin, c) 4-(3-metilanilino) kinazolin

EGFR TKI ile yapılan ilk araştırmalar sırasında, inhibitörlerin EGFR aktivitesini bloke edebilmesinin, EGF'ye bağlı proliferasyonu bloke etme kabiliyetlerine bağlı olduğu düşünülmüştür. EGFR'ye bağlanan ve onu aktif hale

getiren EGF molekülü genel hedef olarak görülmüş ve reseptöre bağlanmak için EGF ile yarışan seçici blokerlerin rasyonel tasarımıyla geliştirilebileceği hipotezi güçlenmiştir. İnhibitörlerin ATP ile yarışmalı olarak EGFR'ye bağlanmasının, kinazların ATP bağlanma alanındaki yüksek sekans benzerliğinden dolayı seçicilikten yoksun olacağı düşünülmüştür. Ayrıca, çoğu kinazın ATP için bağlanma sabiti (K_m) genellikle mikromolar aralıkta olduğundan, ATP bağlanma yerinin inhibitörler için uygun olmadığı düşünülmüştür. Bu düşünce, kinazların ATP ceplerine nanomolar hatta pikomolar afinitelerle bağlanan pek çok inhibitörün keşfiyle değişmiştir (Fry, 2003).

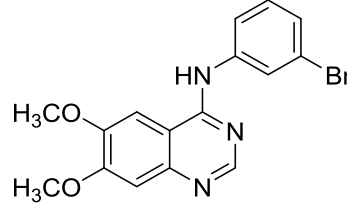
Ward ve ark. (1994), tarafından gerçekleştirilen araştırma ile güçlü EGFR TKI etkiye sahip olduğu bulunan 4-(3-kloroanilino)kinazolin (CAQ) yapısındaki yeni bileşiğin, bu etkisini hangi mekanizma üzerinden gerçekleştirdiği incelenmiştir. *In vitro* ortamda konsantrasyona bağlı bir şekilde EGF ile uyarılan büyümeyi inhibe ettiği gözlenmiştir. İnhibisyon mekanizmasının ATP ile ilişkili olduğu, molekülün EGFR'ye muhtemelen ATP bağlanma bölgesinden ve ATP ile yarışmalı olarak bağlandığı bulunmuştur.

Barker (1993) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, anilinokinazolin ana yapısına sahip daha geniş bir seri incelenmiştir. Kinazolin halkasının 6. ve 7. pozisyonlarında elektron veren süstitüentlerin yer almasıyla inhibitör aktivitenin olumlu yönde etkilendiği gözlenmiştir. Sentezlenen ve incelen seride, 4-(3-metilanilino)-6,7-dimetoksikinazolin bileşiğinin, 4-(3-metilanilino)kinazolin bileşiğine (Şekil 1.7) göre EGFR tirozin kinaz aktivitesi yönünden çok daha güçlü olduğu gösterilmiştir.



Şekil 1.7. a) 4-(3-metilanilino)kinazolin, b) 4-(3-metilanilino)-6,7-dimetoksikinazolin

Fry ve ark. (1994), tarafından 4-(3-bromoanilino)-6,7-dimetoksikinazolin (PD153035) (Şekil 1.8) bileşiğinin yüksek potens ve seçiciliğe sahip olan bir EGFR tirozin kinaz inhibitörü ($IC_{50}=29 \pm 5,1$ pM) olduğu ve pikomolar konsantrasyonlarda uygulanabilir olduğu bulunmuştur.



Şekil 1.8. 4-(3-bromoanilino)-6,7-dimetoksikinazolin (PD153035) bileşiği

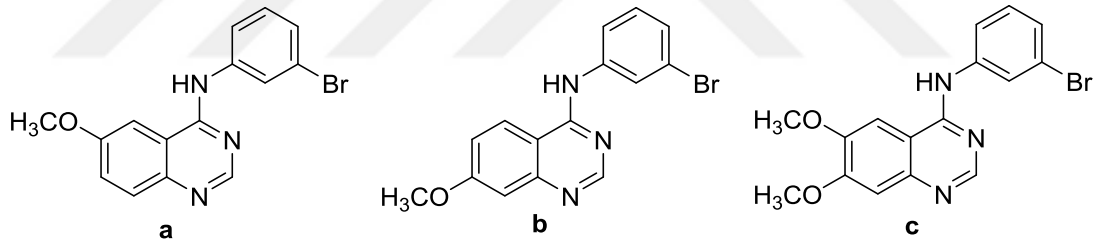
PD153035 bileşiği, daha önce keşfedilmiş inhibitörlere göre, dört/beş kat daha fazla EGFR TK inhibisyonuna ve iki/üç kat daha fazla hücrel fosforilasyon inhibisyonuna sahiptir. Etkisini, ATP ile yarışmalı olarak EGFR'nin ATP bağlanma bölgesine bağlanarak gösterdiği bulunmuştur. Bu keşif, araştırmacıların başlardaki EGFR hedefleme hipotezlerini değiştirmiştir. Protein kinazların ATP bağlayıcı bölgelerinin hedef seçilmesinin EGFR için spesifiklik sağlamayacağı düşüncesi yerini, en yüksek seçiciliğe sahip ve en aktif bileşiklerin ATP bölgesini hedeflediği görüşüne bırakmıştır (Fry, 1996).

Yapı etki çalışmaları en güçlü 4-anilinokinazolin türevlerinin, anilin halkasının *meta* konumunda küçük, lipofilik sübstitüentlere sahip olan bileşikler olduğunu göstermiştir. Kinazolin halkasının, aktivite için kesinlikle gerekli olduğu, ancak kinazolin üzerindeki sübstitüentlerin aktiviteyi oldukça etkilediği görülmüştür. NO_2 , NH_2 ve OCH_3 sübstitüentlerine sahip türevler karşılaştırılmış ve kinazolin halkasına elektron verici gruplar bağlı olduğunda aktivitenin daha yüksek olduğu bulunmuştur. En güçlü aktivite ise kinazolin halkası 6. ve 7. konumlardan disübstitüe edildiğinde görülmüştür (Denny ve ark., 1996).

Wakeling ve ark. (1996), tarafından yapılan çalışmada, EGFR TK ile 4-anilinokinazolinlerin hücre büyümesini önleyici gücü arasında basit bir ilişki olmadığı belirtilmiştir. Sübstitüentlerin yapısı ve anilin halkası üzerindeki

konumlarının, aktiviteyi büyük oranda etkilediği bildirilmiştir. 4-(3-kloroanilino)kinazolin bileşiğinde (Şekil 1.6) olduğu gibi, klor grubunun *meta* konumunda bulunması, *orto* veya *para* konumlarına göre aktiviteye daha fazla katkı sağlamıştır.

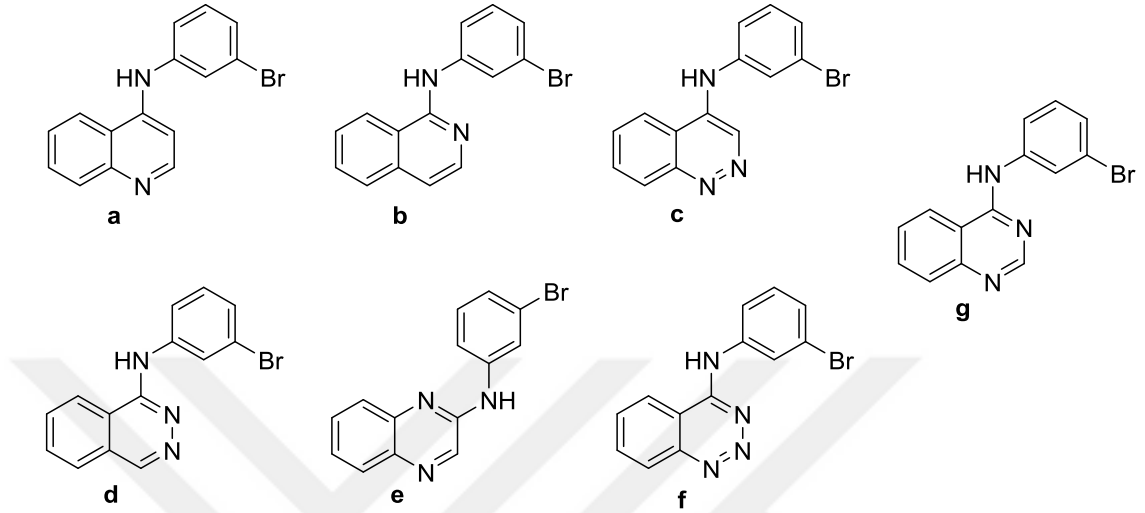
Bridges ve ark. (1996), tarafından 4-anilinokinazolin yapısına sahip bileşikler ile yapılan bir çalışmada, anilinin 3. pozisyonunda bulunan elektron çekici lipofilik sübstitüentlerin aktiviteye katkısı olduğu ve optimum aktivitenin klor ve brom ile sağlandığı belirtilmiştir. 4-(3-bromoanilino)-6-metoksikinazolin (Şekil 1.9 a) bileşiği 30 nM IC₅₀ değerine ve 4-(3-bromoanilino)-7-metoksikinazolin (Şekil 1.9 b) bileşiği 10 nM IC₅₀ değerine sahipken 4-(3-bromoanilino)-6,7-dimetoksikinazolin (Şekil 1.9 c) bileşiğinin 0,025 nM IC₅₀ değerine sahip olduğu belirtilmiştir. Kinazolin halkasına elektron veren sübstitüentler 6. ve 7. konumlardan bağlandığında aktivite artarken, sübstitüentlerin 5. ve 8. konumlardan bağlanmasıyla aktivitenin ciddi anlamda azaldığı bildirilmiştir.



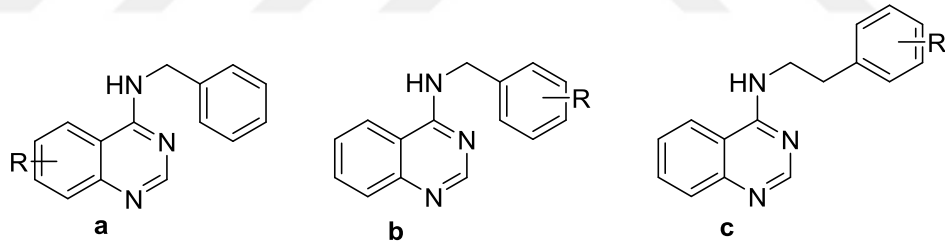
Şekil 1.9. a) 4-(3-bromoanilino)-6-metoksikinazolin b) 4-(3-bromoanilino)-7-metoksikinazolin c) 4-(3-bromoanilino)-6,7-dimetoksikinazolin

Rewcastle ve ark. (1995), gerçekleştirdikleri çalışmada 4-(3-bromoanilino)kinazolin, 4-(3-bromoanilino)kinolin, 1-(3-bromoanilino)izokinolin, 4-(3-bromoanilino) sinnolin, 4-(3-bromoanilino)ftalazin, 2-(3-bromoanilino)kinoksalin ve 4-(3-bromo anilino)benzotriazin türevlerinin (Şekil 1.10) inhibitör etkinliklerini incelemiş ve aralarında 4-anilinokinazolin yapısının bu EGFR inhibitörleri sınıfı için birincil farmakofor olduğunu göstermiştir. 4-anilinokinazolin türevleri anilin grubunun 3. konumundan küçük lipofilik elektron çekici sübstitüentler ile sübstitüe edildiğinde, yukarıda verilen araştırmalara benzer şekilde, aktivitenin arttığı belirtilmiştir. Sentezlenen seride, anilin grubunun azot atomuna bağlı hidrojen bir

süstituent ile değıştirildiğinde aktivitenin azaldığı gözlenmiştir. Anilin grubu yerine benzilamino ya da fenetilamino getirildiğinde (Şekil 1.11) ise bileşiklerin genellikle daha az etkili olduğu bildirilmiştir.



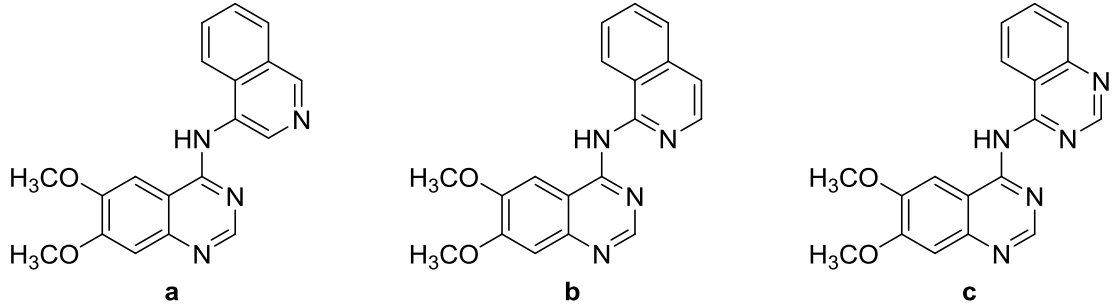
Şekil 1.10. a) 4-(3-bromoanilino)kinolin, b) 1-(3-bromoanilino)izokinolin, c) 4-(3-bromoanilino)sinnolin, d) 4-(3-bromoanilino)ftalazin, e) 2-(3-bromoanilino)kinoksalin, f) 4-(3-bromoanilino)benzotriazin, g) 4-(3-bromoanilino)kinazolin



Şekil 1.11. a ve b) 4-(benzilamino)kinazolin türevleri c) 4-(fenetilamino)kinazolin türevleri

Gibson ve ark. (1997), tarafından yapılan çalışmada 4-amino-6,7-dimetoksikinazolin yapısı amino grubu üzerinden çeşitli gruplarla türevlendirilmiştir. Ancak bileşikler bu amino grubundan türevlendirildiğinde ve azot üzerinde hidrojen bulunmadığında, EGFR TK inhibe edici etkilerinin azaldığı bildirilmiştir, bu durum amin yapısı üzerindeki hidrojenin enzimle etkileşim ve aktivite için önemli olduğunu düşündürmüştür. Sentezlenen türevler arasında en etkili bileşik, 0,0064 μM IC_{50} değeri ile *N*-(izokinolin-4-il)-6,7-dimetoksikinazolin-4-amin (Şekil 1.12 a) olarak bulunmuştur. Benzer yapıya sahip *N*-(izokinolin-1-il)-6,7-dimetoksikinazolin-4-amin (Şekil 1.12 b) ve *N*-(kinazolin-4-il)-6,7-dimetoksikinazolin-4-amin (Şekil 1.12 c)

bileşiklerinin IC₅₀ değerleri ise sırasıyla 0,2 µM ve >1 µM olarak bulunmuş ve amin grubuna *para* konumunda bulunan bir azot atomunun aktiviteyi azaltacak yönde etkisi olabileceği belirtilmiştir.

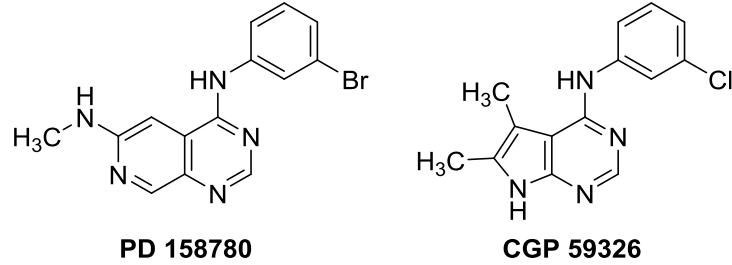


Şekil 1.12. a) *N*-(izokinolin-4-il)-6,7-dimetoksikinazolin-4-amin b) *N*-(izokinolin-1-il)-6,7-dimetoksikinazolin-4-amin c) *N*-(kinazolin-4-il)-6,7-dimetoksikinazolin-4-amin

Kinazolinlerle yapılan çalışmalar, imidazolokinazolinler, pirolokinazolinler ve pirazolokinazolinler gibi trisiklik türevleri de içerecek şekilde genişletilmiştir. Tüm bu bisiklik veya trisiklik yapıların, EGFR ile etkileşiminin, ATP'nin adenin bazı için bağlanma bölgesine karşılık gelen dar bir hidrofobik cebe geri dönüşümlü bağlanarak gerçekleştiği bildirilmiştir (Fry, 1999).

Kinazolinlerle elde edilen etkilere benzer şekilde, piridopirimidinler ile de EGFR tirozin kinaza karşı oldukça güçlü etkiler gözlenmiş ve piridopirimidinlerden oluşan bir inhibitör sınıfı ortaya çıkmıştır. Örneğin piridopirimidin yapısına sahip ajanlardan biri olan PD 158780 kodlu bileşiğin (Şekil 1.13) EGFR tirozin kinazı (IC₅₀=8 pM) inhibe ettiği belirtilmiştir (Rewcastle ve ark., 1996). Benzer şekilde, pirolopirimidin yapısına sahip türevlerle yapılan çalışmalar ATP ile yarışmalı olarak EGFR tirozin kinazı inhibe ettiğini göstermektedir. Örneğin pirolopirimidin yapısına sahip ve *in vivo* ortamda aktivite çalışmaları gerçekleştirilen CGP 59326 kodlu (Traxler ve ark., 1997) bileşiğin (Şekil 1.13) EGFR TK inhibe edici etkiye (IC₅₀=0,027 µM) sahip olduğu belirtilmiştir (Traxler ve ark., 1996). Pirolopirimidin yapısındaki CGP 59326 kodlu bu bileşikte, 4-(3-kloroanilino)kinazolin bileşiğinde (Wakeling ve ark., 1996) olduğu gibi, anilin yapısı üzerinde *meta* konumunda yer alan klor grubunun, *orto* ya da *para* konumuna taşınması ile etkinin azaldığı gözlenmiştir. Bu durum anilin grubunun 3. konumunda yer alan süstitüentin enzimle etkileşim

için önemli olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, sentezlenen bu türevler, yine EGFR TKI olabilecek şekilde etkinlikleri gösterilmiş pirazolopirimidin yapılarının tasarlanması için de öncü olmuşlardır (Traxler ve ark., 1997).



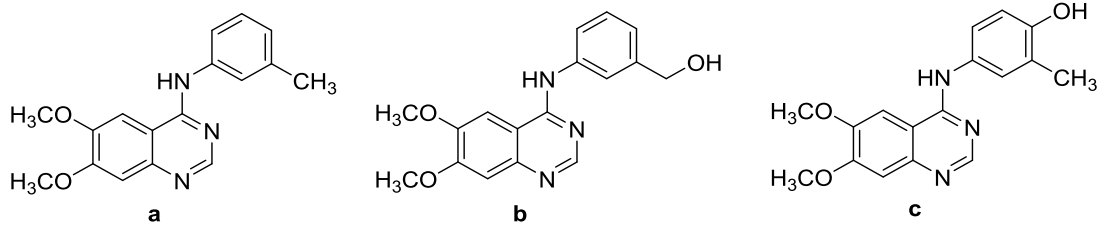
Şekil 1.13. PD 158780 (Piridopirimidin yapısı) ve CGP 59326 (Pirolopirimidin yapısı) kodlu bileşikler

Çok farklı yapılarda EGFR TKI'leri tasarlanmış ve inhibitör etkinliğe sahip oldukları gösterilmiş olsa da, bu yapılar arasında en etkili inhibitörler, 4-anilinokinazolinleri, 4-[ar(alk)ilamino]piridopirimidinleri ve 4-fenilamino pirolopirimidinleri içeren üç kimyasal seriden türetilmiştir. Bu temel yapılar arasında, 4-anilinokinazolin yapısı, EGFR TKI etkinliği ile ön plana çıkmış ve bu yapıya sahip pek çok türev sentezlenmiştir (Fry, 1999).

1.6.1. FDA Onaylı İlk EGFR TKI'lerin Keşfi

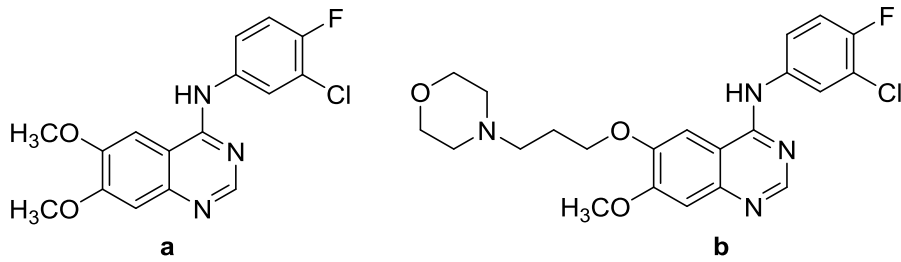
Yapı aktivite çalışmaları ile 4-anilinokinazolin yapısı taşıyan bir bileşiğin sahip olması gereken ana kriterler belirlenmiştir. Bunlar, kinazolinin 6. ve 7. pozisyonlarında elektron veren sübstitüentler; 2, 5 ve 8. pozisyonlarında serbest bir -CH; anilinin *meta* konumunda küçük bir lipofilik sübstitüent; N-4 pozisyonunda serbest bir hidrojenenden oluşmaktadır. Bu özellikleri taşıyan ve *in vitro* olarak EGFR tirozin kinaza karşı en güçlü olduğu düşünülen 4-anilinokinazolin türevleri belirlenmiştir. Bu türevlerden biri olan 4-(3-metilanilino)-6,7-dimetoksikinazolin bileşiği (Şekil 1.14 a), güçlü bir EGFR TKI ($IC_{50} = 5$ nM) etkiye sahiptir. Bu bileşik, farelerde A431 insan tümör ksenograftlarına karşı antitümör aktivite göstermiştir, ancak hızla metabolize edildiği görülmüştür. Yarılanma ömrü yaklaşık 1 saat olup oksidasyona uğrayarak iki ana metabolit vermektedir. Metil grubunun oksidasyonu,

benzil alkol türevini (Şekil 1.14 b) ve anilin grubunun *para* pozisyonundan oksidasyonu ise fenol metabolitini (Şekil 1.14 c) oluşturmaktadır (Barker ve ark., 2001).



Şekil 1.14. a) 4-(3-metilanilino)-6,7-dimetoksikinazolin bileşiği b ve c) metabolitleri

EGFR TKI etkisi ($IC_{50}=9$ nM) oldukça yüksek olan, 4-(3-kloro-4-florofenilamino)-6,7-dimetoksikinazolin (Şekil 1.15 a) bileşiği, belirtilen metabolizma yolağına dirençli olup fareler üzerine yapılan çalışmada bileşiğin yarılanma ömrü 3 saat bulunmuştur. Bileşiğin lipofiliklik ve çözünürlük gibi fiziksel özelliklerini değiştirmek ve *in vivo* aktivitesini geliştirmek amacıyla, metoksi yan zincirlerindeki alkil gruplarının modifikasyonu yapılmıştır. Bu şekilde tasarlanan ilaç adayı ZD1839 (Şekil 1.15 b) *in vitro* olarak bildirilen en güçlü bileşik olmamasına rağmen ($IC_{50}=23$ nM) 24 saatlik süre boyunca *in vivo* olarak yüksek ve sürekli kan seviyelerine ulaşabilmektedir (Barker ve ark., 2001 ve Gibson, 1996).

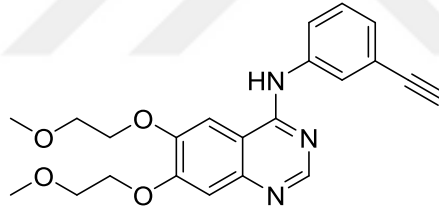


Şekil 1.15. a) 4-(3-kloro-4-florofenilamino)-6,7-dimetoksikinazolin bileşiği b) ZD1839: N-(3-kloro-4-florofenil)-7-metoksi-6-(3-morfolin-4-ilpropoksi)kinazolin-4-amin

Diğer EGFR TKI olarak tasarlanan bileşikler gibi ZD1839 kodlu bileşik de, EGFR tirozin kinazı inhibe edici etkisini, ATP ile yarışmalı olarak EGFR'ye ATP bağlanma bölgesinden bağlanarak gösterdiği bildirilmiştir. Bu bileşik, daha kapsamlı *in vitro* ve *in vivo* değerlendirmelere tabi tutulmuştur. *In vivo* deneyler, bileşiğin

oldukça iyi bir oral biyoyararlanıma sahip olduğunu ve 4 ay kadar tedavi edilen farelerde çok az toksisiteye sahip olduğunu göstermiştir. Akciğer, kolon ve prostat karsinomları dahil olmak üzere birçok insan tümör ksenograft modeline karşı da önemli *in vivo* aktivite göstermiştir (Fry, 1999 ve Wakeling ve ark., 2002).

Yapı etki çalışmalarında belirlenmiş kriterlere uygun olarak tasarlanmış, bir diğer 4-anilinokinazolin türevi CP-358,774 kodlu bileşiktir. Bu bileşik de fiziksel özellikleri değiştirmek amacıyla kinazolin halkasının 6. ve 7. konumlarından modifikasyona tabi tutulmuştur. *N*-(3-etinilfenil)-6,7-*bis*(2-metoksietoksi)kinazolin-4-amin yapısına (Şekil 1.16) sahip bileşiğin, EGFR tirozin kinazı güçlü ($IC_{50}=2$ nM) ve seçici bir şekilde inhibe ettiği bildirilmiştir. EGFR TKI etkisini, ATP ile yarışmalı olarak EGFR'nin ATP bağlanma bölgesine geri dönüşümlü bağlanarak göstermektedir (Moyer ve ark., 1997 ve Schnur ve Arnold, 1996). İnsan tümör ksenograft modellerine karşı önemli *in vivo* aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir (Pollack ve ark., 1999).



Şekil 1.16. CP-358,774 kodlu bileşik: *N*-(3-etinilfenil)-6,7-*bis*(2-metoksietoksi)kinazolin-4-amin

Bileşikler üzerine gerçekleştirilen klinik çalışmalarla birlikte, ZD1839 kodlu bileşik, FDA tarafından EGFR TKI olarak ilk onaylanan bileşik olup, gefitinib jenerik adıyla kanser tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Kısa bir süre sonra, CP-358,774 kodlu bileşik de EGFR TKI olarak kullanımı için erlotinib jenerik adıyla FDA'dan onay almıştır.

1.6.2. EGFR Mutasyonlarının Bulunması ve EGFR TKI'ler ile İlişkisi

Antikanser amaçla kullanılmaya başlanan EGFR TKI'lerin bir süre sonra, etkinlik çalışmaları sonuçlarının birbirinden farklılık gösterdiği ve bazı hasta gruplarının (sigara içmeyenler, kadınlar ve Asyalılar) bu inhibitörlerden daha fazla yarar sağladığı gözlenmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda, bu hasta gruplarının tümörlerinde mutasyona daha sık rastlandığı ortaya çıkmıştır (Mitsudomi ve ark., 2005 ve Pao ve Miller, 2005).

İnhibitörlerle tedaviye olumlu yanıt veren tümörlü hastaların çoğunda tümör, EGFR geninin somatik mutasyonlarını içermektedir. Bu mutasyonlar, ekzon 19 bölgesinde 746-759 kodonları arası amino asitleri etkileyen E746, L747, E749, A750, T751, S752 gibi silinme mutasyonları veya ekzon 21'de görülen L858R (858 kodonunda lösin amino asidinin arginin amino asidi ile yer değiştirmesi) ile ekzon 18'de görülen G719S (719 kodonunda glisin amino asidinin serin amino asidi ile yer değiştirmesi) nokta mutasyonlarıdır (Bikker ve ark., 2009 ve Kobayashi ve ark., 2005).

EGFR geninin kinaz alanında somatik mutasyonlara sahip KHDAK hastalarının, küçük moleküllü EGFR inhibitörleriyle yapılan tedaviye daha duyarlı olduğu bulunmuştur. Kristalografik çalışmalar, mutasyonların, EGFR'nin ATP yarığı yakınında bulunan amino asit kalıntılarının yeniden düzenlenmesine sebep olduğunu göstermektedir. Ayrıca mutasyonların, hem ATP'nin hem de yarışmalı inhibitörlerin EGFR'ye bağlanmasını etkilediği bildirilmektedir. Bu mekanizma, hem ligand bağlanmasından sonra artan reseptör aktivasyonunu hem de inhibitörler tarafından indüklenen artmış inhibisyonu açıklamaktadır (Lynch ve ark., 2004). Kinaz alanında görülen ve aktive edici mutasyonlar olarak bilinen bu mutasyonlar, enzimin daha çok çalışmasına sebep olmakta, sinyal akışını ve antiapoptotik mekanizmaları değiştirerek onkogenik etkilere aracılık etmektedirler (Bikker ve ark., 2009 ve Kobayashi ve ark., 2005).

Mutasyon barındıran EGFR'lere sahip hücre hatları ile yapılan çalışmalarda, gefitinib ve erlotinibin ekzon 21'de ve ekzon 18'de nokta mutasyonuna, ekzon 19'da silinme mutasyonuna sahip hücre hatlarını daha düşük konsantrasyonlarla inhibe ettiği gözlenmiştir. Gefitinibin doğal tip EGFR'yi inhibe etmesi için gereken konsantrasyon yaklaşık 10 μ M iken, bu belirli mutasyonlara sahip hastalarda plazma konsantrasyonlarının 10 kat ve daha fazla artmış olduğu görülmüştür. Belirli mutasyonları barındıran hücre hatlarında enzime duyarlılık artmakta ve inhibitörün daha düşük konsantrasyonlarında etki gözlenmektedir (Johnson ve Jänne, 2005).

Doğal tip EGFR yapısı ile yapılan karşılaştırmalar, L858R mutasyonu ve G719S mutasyonunun, inaktif konformasyonu stabilize eden etkileşimleri bozarak kinazı aktive ettiğini göstermektedir. Gefitinibin doğal tip kinaza ve mutant kinazlara bağlanma afinitelerinin ölçümü, L858R ve G719S mutantına, doğal tip kinaza göre daha büyük afinite ile bağlandığını ortaya çıkarmaktadır. L858R mutantının doğal tip EGFR kinazdan 50 kat daha aktif olduğu, G719S mutantının ise doğal tip EGFR kinazdan yaklaşık 10-20 kat daha aktif olduğu bulunmuştur (Bikker ve ark., 2009 ve Yun ve ark. 2007).

KHDAK'de bilinen tüm mutasyonların yaklaşık % 80'ini oluşturan en yaygın EGFR kinaz alanı mutasyonları, ekson 19'da görülen silinme mutasyonları ve ekson 21'deki L858R nokta mutasyonudur. Bu mutasyonlarla EGFR kinaz, gefitinib ve erlotinib inhibitörlerine daha duyarlı hale gelmektedir. Çalışmalar, gefitinib tedavisi uygulandığında EGFR kinaz alanı mutasyonlarını barındıran KHDAK hastalarının, doğal tip EGFR'ye sahip hastalara kıyasla tedaviye önemli ölçüde daha yüksek yanıt verdiklerini ve daha uzun yaşam süresine sahip olduklarını göstermiştir (Ji ve ark., 2006).

EGFR'nin tirozin kinaz alanı içindeki spesifik aktive edici mutasyonları, Avrupa merkezli çalışmalarda % 10-15'lik, Orta Doğu merkezli çalışmalarda % 21-37'lik, Asya popülasyon merkezli çalışmalarda % 27-62'lik mutasyon sıklığına sahipken, Türk popülasyonu ile gerçekleştirilen bir çalışmada EGFR mutasyon

sıklığının % 16,6 olduğu gösterilmiştir ve en yaygın mutasyonlar, ekson 19 ve 21'de tespit edilmiştir (Calibasi-Kocal ve ark., 2020).

1.6.2.1. Birinci Nesil İnhibitörlere Karşı Kazanılmış Direnç: T790M Mutasyonu

Akciğer adenokarsinomuna sahip bir hastada, gefitinibe duyarlı olduğu tanımlanmış bir EGFR mutasyonuna benzer bir mutasyon tespit edilmiş ve gefitinibe tedaviye başlanmıştır. Ancak 24 aylık tedavi sonrasında hastanın durumu kötüleşmiştir. Hastalığın tekrarlamasının, EGFR'nin tirozin kinaz alanında oluşan ve gefitinibe direnç kazandıran ikincil bir mutasyona bağlı olduğu ortaya çıkmıştır. Gefitinibe direnç oluşumuna sebep olan bu mutasyon, T790M (790 kodonunda treonin amino asidinin yerine metiyonin amino asidinin gelmesi) mutasyonudur (Kobayashi ve ark., 2005).

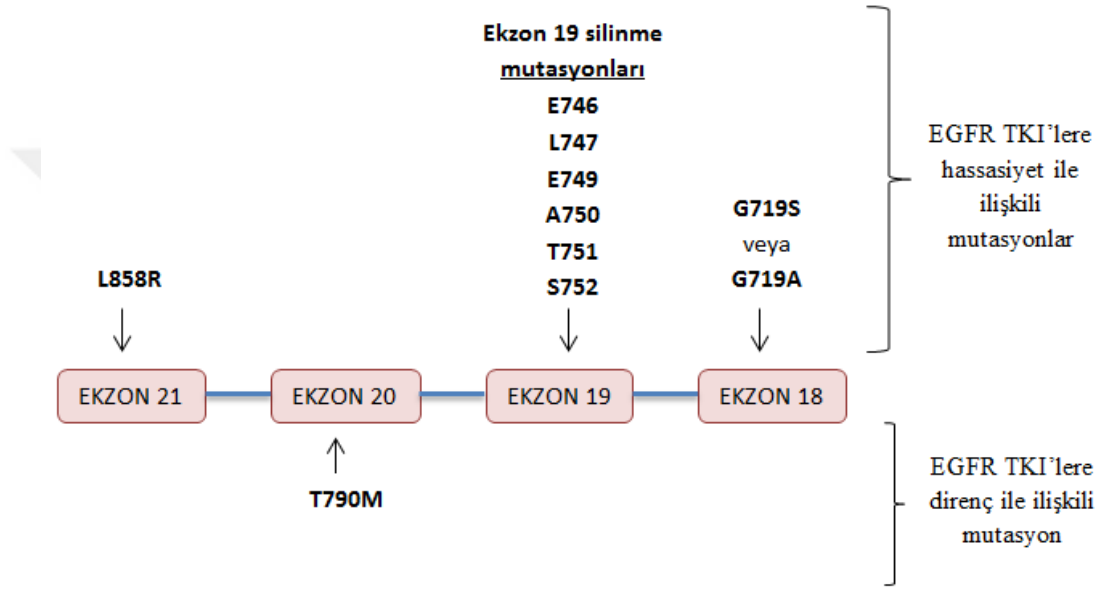
Gefitinib veya erlotinib ile tedavi edildiğinde belirgin klinik iyileşme gösteren neredeyse tüm hastalarda bir süre sonra, kazanılmış veya ikincil ilaç direnci nedeniyle hastalığın ilerlediği görülmüştür (Pao ve Miller, 2005).

T790M mutasyonu, EGFR TKI'lerine karşı gelişen en yaygın direnç mekanizmasıdır (Kim ve ark., 2012). EGFR TKI ile tedavi aldıktan sonra hastalığı ilerleyen hastaların %50-60'ında görülmektedir (Han ve Du, 2017 ve Proto ve ark., 2017).

Yapısal modelleme çalışmaları, metiyonin amino asidinin daha hacimli olması nedeniyle, gefitinib veya erlotinib ile EGFR T790 arasındaki önemli bir hidrojen bağı oluşumunu bozduğu ve EGFR'nin ATP bağlanma cebine inhibitörün bağlanmasını önleyen sterik bir engel oluşturduğunu göstermektedir. Ayrıca biyokimyasal çalışmalar, T790M mutasyonu varlığında gefitinibin, EGFR'nin fosforilasyonunu inhibe edemediğini göstermektedir (Han ve Du, 2017 ve Pao ve ark., 2005). T790M mutasyonu, kinazın ATP'ye olan afinitesini yaklaşık beş kat

artırır, bu da gefitinib ve erlotinib gibi ATP ile geri dönüşümlü olarak yarışan inhibitörlere duyarlılığı azaltır (Han ve Du, 2017).

Bu durum, inhibitör yanıtlarının spesifik mutasyonlara olan bağımlılığını göstermektedir. İnhibitörlere duyarlı mutant yapılarına özgü ilaç moleküllerinin tasarlanması ya da hastaların mutasyon varlığı durumlarına göre uygun tedaviyi alması yönünden önemlidir.



Şekil 1.17. EGFR mutasyonları

1.6.3. Geri Dönüşümsüz İnhibitörlerin Geliştirilmesi

Gefitinib ve erlotinibe karşı oluşan direnç mutasyonu, bu inhibitörlerin kullanımını kısıtlayan önemli bir problem haline gelmiştir. Direnç mutasyonu, yeni bileşiklerin tasarlanmasını gerekli kılmıştır. Araştırmacılar, ATP bağlanma bölgesine geri dönüşümlü olarak bağlanan gefitinib ve erlotinib yerine, bu bölge ile geri dönüşümsüz şekilde bağlanacak yeni ajanlar tasarlamaya başlamıştır.

Geri dönüşümsüz inhibitörlere ihtiyaç duyulmasının bir diğer nedeni, *in vitro* ortamda güçlü aktivite gösteren bazı inhibitör bileşikler ile yapılan *in vivo* deneylerde

beklenen etkilerin gözlenememesidir. Bu durum bazı moleküllerin plazma yarılanma sürelerinin çok kısa olması nedeniyle ortaya çıkmaktadır. İlaç plazma veya tümörden temizlendikten sonra da ilacın etkisinin devam etmesi istenmiş ve uzun süreli etkinin geri dönüşümsüz inhibitörlerle mümkün olabileceği düşünülmüştür (Discafani ve ark., 1999).

Geri dönüşümsüz bir inhibitör geri dönüşümlü bir inhibitöre göre, hedefin daha uzun süre inhibe edilmesini sağladığı için çoklu dozlama gereksinimini de azaltmaktadır. Ancak geri dönüşümsüz ajan elde etmek için molekül üzerinde yapılan modifikasyonlar, molekülün daha toksik hale gelmesine sebep olabilmekte ve hedefe olan seçicilik için engel oluşturabilmektedir. Geri dönüşümsüz EGFR inhibitörü elde etmek ve molekülün ATP bağlanma cebine geri döndürülemez bir şekilde bağlanabilmesi için moleküle alkilleyici bir grubun veya Michael akseptörünün eklenmesi gerekmektedir. EGFR, geri dönüşümsüz bağ oluşumu sağlayabilecek sistein kalıntısı (Cys773, Cys797) ve Lys721 gibi amino asitler içermektedir. İnhibitörlerde yapılan modifikasyonlarla, ATP bağlanma alanı içindeki spesifik sistein kalıntıları hedeflenmekte, EGFR tirozin kinazın seçici geri dönüşümsüz inhibitörleri EGFR'nin inaktivasyonuna yol açmaktadır (Fry, 1999).

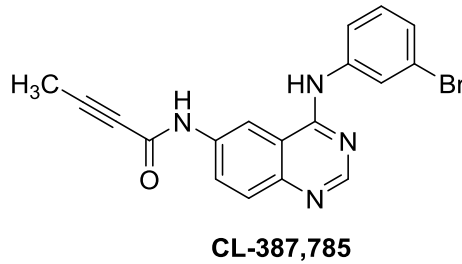
EGFR'yi geri dönüşümsüz bir şekilde inaktive etmek için akrilamid yapısı taşıyan kinazolin türevleri tasarlanmıştır. Bu bileşikler, ATP bağlanma bölgesi içinde yer alan sistein amino asidi tarafından hızlı bir nükleofilik saldırıya maruz kalmaktadır ve alkilasyon yoluyla amino asitler üzerinden EGFR'ye kovalent olarak bağlanmaktadır. Akrilamid grubunun, hedeflenmiş molekül üzerinde doğru konumlandırıldığında, yalnızca hedef sistein amino asidi ile reaksiyona girdiği ve bu moleküllerin diğer herhangi bir nükleofil ile neredeyse hiç reaksiyona girmedeği belirtilmektedir (Fry ve ark., 1998 ve Mendelsohn ve Baselga, 2000).

Kinazolin bileşiklerinin 6. veya 7. pozisyonlarının, reseptörün Cys773 kalıntısına ulaşabileceği öne sürülmüştür. Kinazolin halkasının 6. veya 7. pozisyonlarında akrilamid taşıyan inhibitörlerin, EGFR için geri dönüşümsüz

alkilleyici ajanlar olabilecekleri, nanomolar düzeyde inhibe edici etkiler ve *in vivo* antitümör aktiviteler ile gösterilmiştir (Bridges, 1999).

Tasarlanan geri dönüşümsüz inhibitörlerin T790M mutasyonuna karşı aktif olabilecekleri bildirilmiştir. Gefitinibe veya erlotinibe dirençli tümörler, geri dönüşümsüz EGFR inhibitörlerine, anilino kinazolin veya benzer yapılarda olmalarına rağmen duyarlılık gösterebilmektedirler (Kwak ve ark., 2005).

Araştırmalar sırasında, EGFR'nin yanı sıra ErbB ailesinin başka üyelerinin de eş zamanlı olarak inhibe edilmesiyle antitümör etkinin artırılması amaçlanmıştır. Kinazolin halkasının veya benzer halka sistemlerinin (Wissner ve ark., 2003) 6. veya 7. pozisyonuna Michael akseptör grupların yerleştirildiği yapısal modifikasyonlar yapılarak EGFR ile birlikte ErbB-2'yi de spesifik olarak inaktive eden, çeşitli inhibitörler bulunmuştur. Çalışmada sentezlenen CL-387,785 kodlu bileşiğin (Şekil 1.18) 6. konumunda bulunan üçlü bağ ile ATP bağlanma bölgesinde bulunan bir amino asit kalıntısının alkilasyon yoluyla kovalent bağ oluşturduğu düşünülmektedir (Discafani ve ark., 1996). Bunun sonucu olarak, T790M mutasyonunun, CL-387,785 bileşiği tarafından etkin bir şekilde engellenebileceği belirtilmektedir (Kobayashi ve ark., 2005).



Şekil 1.18. CL-387,785 kodlu bileşik, N-[4-[(3-bromofenil)amino]-6-kinazolinil]-2-butanamid

1.7. EGFR TKI'lerin Sınıflandırması

EGFR tirozin kinaz inhibitörleri, aktiviteleri, EGFR'ye karşı seçicilik dereceleri, etkinin geri dönüşümlü oluşu ve biyoyararlanımları açısından

birbirlerinden farklılık göstermektedirler. Çoğu kinazolin halka yapısına sahiptir ve genellikle hepsi oral yoldan kullanılmaktadırlar. Tüm bileşikler, EGFR tirozin kinaz için oldukça seçici olup, ATP bağlanma bölgesinin rekabetçi inhibitörleridir (Mendelsohn ve Baselga, 2000).

Farklı özelliklere sahip EGFR TKI'leri üç nesil altında toplamak mümkündür. Birinci nesil (gefitinib, erlotinib ve lapatinib) geri dönüşümlü EGFR TKI'lerden, ikinci (afatinib ve dacomitinib) ve üçüncü nesil (osimertinib) geri dönüşümsüz EGFR TKI'lerden oluşmaktadır (Acar ve Altuntaş, 2019 ve Shah ve Lester, 2020). EGFR TKI'ler ile ilgili yapılan son çalışmalarda, mutasyonlarla baş edebilmek amacıyla geri dönüşümsüz inhibisyon sağlayan dördüncü nesil inhibitörlerin tasarlandığı belirtilmektedir (Ayati ve ark., 2020).

Kanser tedavisi için EGFR'ye karşı seçici inhibitör arayışına öncülük eden 4-anilinokinazolinler, özellikle birinci ve ikinci nesil EGFR inhibitörleri için önemli bir iskelet yapısı oluşturmaktadır (Han ve Du, 2017). Birinci nesil EGFR TKI'ler olan gefitinib ve erlotinib, reseptörün hücre içi kinaz alanında ATP ile yarışmalı olarak rekabet etmekte, ATP bağlanma bölgesine geri dönüşümlü olarak bağlanmakta, otofosforilasyonu inhibe edip hücre içi sinyal iletimini zayıflatarak EGFR sinyallemesini kesintiye uğratmaktadırlar. Aktive edici mutasyonlarla yapısal olarak aktif hale gelmiş EGFR'yi güçlü bir şekilde inhibe eden ajanlardır. Ayrıca, doğal tip EGFR'yi de bir miktar inhibe etmektedirler. Hem gefitinib hem de erlotinib, EGFR aktive edici mutasyonlarına sahip KHDAK'nin birinci basamak tedavisi için onaylanmıştır. Bununla birlikte, zamanla çoğu hastada gelişen direnç mutasyonu EGFR'nin ATP afinitesini artırarak ATP ile rekabet eden TKI'lerin gücünü azaltmakta ve kullanımlarını kısıtlamaktadır. Birinci nesil EGFR TKI'lere karşı kazanılmış direnç mekanizmaları, EGFR'ye geri dönüşümsüz şekilde bağlanma mekanizmasına sahip ve aynı anda birden fazla ErbB reseptörünü inhibe edebilen ikinci nesil EGFR TKI'lerin geliştirilmesine yol açmıştır. Bu ajanlar, afatinib ve dacomitinibi içermektedir. İkinci nesil ajanlar, EGFR'nin ATP bağlanma bölgesinde bulunan Cys797 veya Cys773 ile kovalent bağ oluşturmak amacıyla yapılarında elektrofilik akrilamid yapısı taşımaktadırlar. Çalışmalar afatinibin, hem doğal tip

EGFR hem de L858R veya ekzon 19 silinme mutasyonu barındıran EGFR'ye karşı, birinci nesil EGFR TKI'lere kıyasla üstün *in vitro* aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Ancak, ikinci nesil inhibitörler, klinik kullanımlarını büyük ölçüde sınırlayan doz sınırlayıcı toksisiteye sahiptirler. Aynı zamanda doğal tip EGFR'ye olan etkileri de kullanımlarını sınırlamaktadır. Son veriler, tıpkı birinci nesil EGFR TKI'lerde olduğu gibi, T790M mutasyonunun afatinibe karşı en baskın direnç mekanizması olduğunu ve pek çok vakada tespit edildiğini göstermiştir. Kazanılmış direnç sorunu, T790M mutasyonu barındıran tümörleri güçlü bir şekilde inhibe eden ve doğal tip EGFR'yi inhibe etmeyecek küçük moleküllerin arayışına yol açmıştır. Geliştirilen üçüncü nesil inhibitörler, genellikle aminopirimidin iskeletine sahip olup reseptördeki Cys797 ile kovalent bağ yapmak üzere elektrofilik akrilamid yapısı taşımaktadırlar. Klinik olarak en gelişmiş üçüncü nesil EGFR TKI, hem reseptörün doğal tip formu üzerinde seçiciliğe sahip hem de T790M mutasyonunun geri dönüşümsüz inhibitörü olan osimertinibdir. Tümörleri T790M mutasyonunu barındıran hastalarda klinik başarılar sağlanabilmiştir (Ayati ve ark., 2020; Han ve Du, 2017 ve Shah ve Lester, 2020).

1.8. Üçüncü Nesil İnhibitörlere Karşı Gelişen Direnç: C797S Mutasyonu

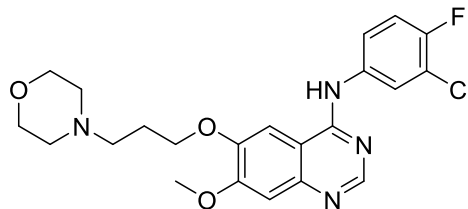
Son yıllarda yapılan çalışmalar, üçüncü nesil ajanların kullanımı sonucu gelişen ve bileşiğin enzimle kovalent bağ oluşturmasını önleyen bir C797S mutasyonunun (797 kodonunda sistein amino asidinin yerine serin amino asidinin gelmesi) geliştiğini göstermektedir (Thress ve ark., 2015 ve Wang ve ark., 2016). Osimertinib ile tedavi sırasında geliştiği bildirilen bu direnç mutasyonu, ekzon 20'de EGFR'nin 797 kodonunda bulunan sistein amino asidi ile osimertinib arasındaki kovalent bağı zayıflatmaktadır. Bu durum, ilacın terapötik etkisini kısıtlamakta ve araştırmacıları yeni ilaç keşiflerine yönlendirmektedir (Proto ve ark., 2017). T790M ve C797S direnç mutasyonlarıyla baş edebilmek için dördüncü nesil ajanlar geliştirilmektedir (Wang ve ark., 2016).

Birinci nesil inhibitörlerin etkinliklerini Cys797'dan bağımsız olarak sergiledikleri gösterilmiştir (Wang ve ark., 2017). Bu nedenle, C797S mutasyonunu barındıran hastalarda birinci ve ikinci nesil EGFR TKI'lere karşı yanıt oranlarını araştıran çalışmalar bulunmaktadır (Proto ve ark., 2017). T790M ve C797S direnç mutasyonlarını barındıran hastalarda birinci ve üçüncü nesil EGFR TKI kombinasyonlarının kullanımı araştırılmıştır. T790M ve C797S mutasyonlarının konfigürasyonunun tedavide hücresel yanıtı etkilediği bulunmuştur. İki EGFR mutasyonu farklı DNA zincirlerinde yer aldığına, hücrelerin üçüncü nesil EGFR TKI'lere dirençli olduğunu, ancak birinci ve üçüncü nesil EGFR TKI'lerin kombinasyonuna duyarlı olduğu ve EGFR sinyallemede inhibisyona yol açtığı *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir (Niederst ve ark., 2015).

T790M ve C797S mutasyonlarını farklı DNA zincirlerinde bulunduran KHDAK hastaları ile yapılan birinci ve üçüncü nesil kombinasyon tedavisinin uygulanmaya başlamasının ardından hızlı ancak kısa süreli iyileşme görülmüştür, bir süre sonra hastalık ilerlemeye devam etmiştir (Arulananda ve ark., 2017 ve Wang ve ark., 2017). Birinci ve üçüncü nesil ajanların kombine kullanımını içeren tedavi şeklinin umut verici bir yöntem olduğu düşünülmektedir, ancak çalışmalarla etkinliğinin değerlendirilmesi gerekmektedir.

1.9. FDA Onaylı EGFR TKI Bileşikler

1.9.1. Gefitinib

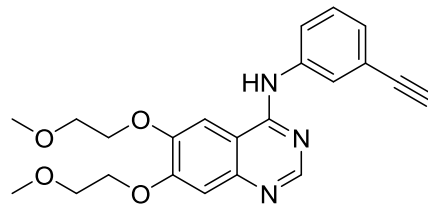


Şekil 1.19. Gefitinib: N-(3-kloro-4-florofenil)-7-metoksi-6-(3-morfolin-4-ilpropoksi)kinazolin-4-amin

ZD1839 koduyla keşfedilen ve EGFR tirozin kinazı inhibe ettiği ($IC_{50}=23$ nM) bildirilen gefitinib (Barker ve ark., 2001), Faz II çalışmaları (Fukuoka ve ark., 2003 ve Kris ve ark., 2003) ve Faz III çalışmaları (Giaccone ve ark., 2004 ve Herbst ve ark., 2004) sonucu 5 Mayıs 2003 tarihinde FDA'dan, hem platin bazlı hem de dosetaksel kemoterapilerinin başarısızlığından sonra lokal olarak ilerlemiş veya metastatik KHDAK olan hastaların tedavisinde monoterapi olarak kullanılması için onay almıştır (Cohen, 2003 ve FDA, 2021).

Gefitinib, *in vivo* aktiviteyi ve stabiliteyi iyileştirmek için 4-anilinokinazolin yapısında gerçekleştirilen yapısal modifikasyonlar ile elde edilmiştir (Barker ve ark., 2001). Akciğer kanserinin tedavisi için moleküler hedefle tasarlanmış ve FDA onayı alan ilk ajandır, ancak aktivitesi KHDAK olan bir hasta alt grubuyla sınırlıdır. Klinik çalışmalarda, gefitinib ile tedavi edilen hastaların sağkalımında artış gözlenememesi nedeniyle FDA onayı geri çekilmiştir. Ardından tümörlerdeki mutasyonların anlaşılması ve bu mutasyona sahip hasta grubu dikkate alınarak yapılan faz III çalışmaları (Maemondo ve ark., 2010 ve Mok ve ark., 2009) sonrası standart kemoterapiye olan üstünlüğü gösterilmiştir ve gefitinib 2015 yılında FDA tarafından, tümörleri EGFR ekson 19 silinme mutasyonuna veya ekson 21 (L858R) mutasyonuna sahip olan metastatik KHDAK hastalarının birinci basamak tedavisi için yeniden onaylamıştır (Tridente, 2017, s:123-144 ve FDA, 2021).

1.9.2. Erlotinib

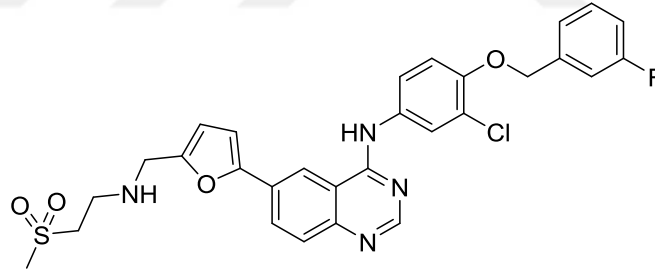


Şekil 1.20. Erlotinib: *N*-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoksietoksi)kinazolin-4-amin

CP-358,774 kodu ile keşfedilen ve EGFR tirozin kinazı güçlü ($IC_{50}=2$ nM) şekilde inhibe ettiği gözlenen erlotinibin (Moyer ve ark., 1997), gerçekleştirilen Faz

II çalışması ile (Pérez-Soler, 2004) klinik fayda sağlaması muhtemel bir aktif ajan olduğu gösterilmiştir. Faz III çalışmalarında ise (Gatzemeier ve ark., 2004 ve Herbst ve ark., 2005) standart kemoterapiye göre üstünlüğü gözlenmemiş ancak bazı hasta gruplarında etkili olduğu belirlenmiştir. Bir diğer faz III çalışması ile erlotinib kullanımının KHDAK hastalarında hayatta kalma süresini uzattığının gösterilmesi üzerine (Shepherd ve ark., 2004), 18 Kasım 2004'te FDA tarafından en az bir önceki kemoterapi rejiminin başarısızlığından sonra lokal olarak ilerlemiş veya metastatik KHDAK hastalarının tedavisi için monoterapi olarak onay almıştır (Cohen, 2005 ve FDA, 2021). EGFR'nin aktive edici mutasyonlarına sahip hastalarla yapılan daha ileri çalışmalarda erlotinibin etkinliği gösterilmiştir (Zhou ve ark., 2011). FDA tarafından 2013 yılında, tümörleri EGFR ekson 19 silinme mutasyonu veya ekson 21 (L858R) mutasyonuna sahip olan metastatik KHDAK hastalarının birinci basamak tedavisi için onayı genişletilmiştir (Tridente, 2017, s:145-164 ve FDA, 2021).

1.9.3. Lapatinib

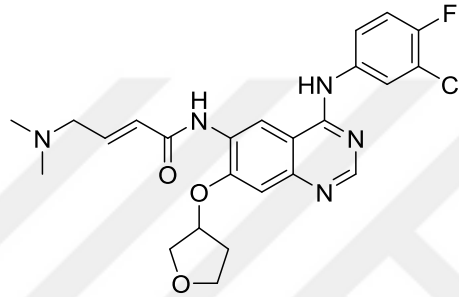


Şekil 1.21. Lapatinib: *N*-[3-kloro-4-[(3-florofenil)metoksi]fenil]-6-[5-[(2-metilsulfoniletilamino) metil]furan-2-il]kinazolin-4-amin

Gefitinib ve erlotinib, EGFR üzerine yüksek seçiciliğe sahipken diğer ErbB üyelerine karşı düşük aktiviteye sahiplerdir. Oysaki lapatinib hem EGFR hem de ErbB-2'ye karşı yüksek aktivite sergilemektedir (Roskoski Jr, 2019). EGFR'ye karşı 10,2 nM ve ErbB-2'ye karşı 9,8 nM IC₅₀ değerlerine sahip güçlü bir inhibitördür. Geri dönüşümlü olarak hem EGFR hem de ErbB-2'nin inhibitörü olması nedeniyle, tek başına EGFR veya ErbB-2'yi hedefleyen tedavilerden daha geniş bir kanser hastası popülasyonuna fayda sağlayabileceği düşünülmektedir (Rusnak ve ark., 2001). ErbB-2 ve EGFR ekspresyonunun düzensiz olduğu meme kanserinin tedavisi

için aktivitesi değerlendirilmiş ve etkili bir ajan olabileceği belirtilmiştir (Konecny ve ark., 2006). 13 Mart 2007’de FDA tarafından, tümörleri ErbB-2’yi aşırı eksprese eden ilerlemiş veya metastatik meme kanseri olan ve daha önceden antrasiklin, taksan ve trastuzumab ile tedavi görmüş hastaların tedavisinde kapesitabin ile kombine halde kullanımı onaylanmıştır (FDA, 2021).

1.9.4. Afatinib



Şekil 1.22. Afatinib: (E)-N-[4-(3-kloro-4-floroanilino)-7-[(3S)-oksolan-3-il]oksikinazolin-6-il]-4-(dimetilamino)büt-2-enamid

Afatinib, EGFR C797 ile kovalent bir bağ oluşturarak L858R mutantını geri dönüşümsüz bir şekilde inhibe etmektedir. Kinazolin halkasının 6. konumundaki süstitüenti üzerinde $\alpha\beta$ -doymamış karbonil grubuna sahip olan afatinibin bu çift bağı ile nükleofil (C797’de bulunan -SH) arasında kovalent bir bağ oluşmaktadır (Roskoski Jr, 2019).

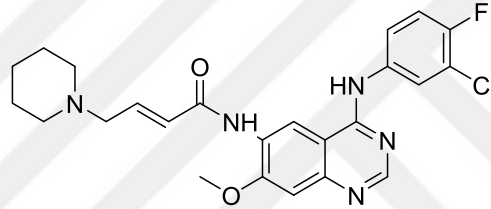
İkinci nesil geri dönüşümsüz bir ajan olan afatinib, EGFR yanı sıra ErbB-2’yi de inhibe etmektedir. EGFR’ye karşı 0,5 nM IC_{50} değeri ve ErbB-2’ye karşı 14 nM IC_{50} değerine sahip inhibe edici aktivitesiyle güçlü bir inhibitördür (Bordoni, 2011).

Klinik araştırmalardan elde edilen umut verici sonuçlar ile (Sequist ve ark., 2013 ve Wu ve ark., 2014), KHDAK tümörlerinde EGFR ekson 19 silinme mutasyonu veya ekson 21 (L858R) mutasyonuna sahip metastatik KHDAK hastalarının birinci basamak tedavisi için 7 Aralık 2013 tarihinde FDA tarafından onaylanmıştır (FDA, 2021).

Özellikle son verilerle, EGFR T790M ile elde edilen direnç mutasyonunun ortaya çıkmasının, erlotinib veya gefitinib ile tedavi edilen hastalarda olduğu gibi afatinib ile tedavi edilen hastalarda da yaygın olduğu gösterilmiştir (Wu ve ark., 2016).

Afatinib, potansiyel olarak gefitinibe göre daha iyi bir etkinlik sergilemekle birlikte daha yüksek / şiddetli toksisitelerle, özellikle kızarıklık ve ishale neden olmaktadır (Tridente, 2017, s:123-144).

1.9.5. Dacomitinib

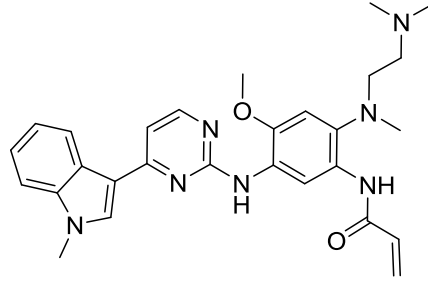


Şekil 1.23. Dacomitinib: (E)-N-[4-(3-kloro-4-floroanilino)-7-metoksikinazolin-6-il]-4-piperidin-1-ilbüt-2-enamid

EGFR otofosforilasyonunu, A431 insan skuamöz hücreli karsinomlarında 15,1 nM IC₅₀ değeri ile inhibe etmektedir. EGFR'nin yanı sıra ErbB-2 ve ErbB-4 üzerine de aktiviteye sahiptir. EGFR'nin ATP bağlanma bölgesindeki amino asit Cys773, ErbB-2 ve ErbB-4'teki benzer kalıntılar olan sırasıyla Cys784 ve Cys778 sistein kalıntıları ile kovalent bağ yaparak etkileşime girebilen geri dönüşümsüz bir inhibitördür (Gonzales ve ark., 2008).

İkinci nesil geri dönüşümsüz bir ajan olan dacomitinibin, EGFR mutasyonuna sahip KHDAK hastaları ile yapılan Faz III çalışması ile birinci nesil ajanlara göre etkinliği değerlendirilmiştir (Wu ve ark., 2017). 27 Eylül 2018'de, FDA tarafından EGFR ekson 19 silinme mutasyonu veya ekson 21 (L858R) mutasyonuna sahip metastatik KHDAK hastalarının birinci basamak tedavisi için onaylanmıştır (FDA, 2021).

1.9.6. Osimertinib



Şekil 1.24. Osimertinib: *N*-[2-[2-(dimetilamino)etil-metilamino]-4-metoksi-5-[[4-(1-metilindol-3-il)pirimidin-2-il]amino]fenil]prop-2-enamid

Üçüncü nesil ajanlardan biri olan osimertinib anilinopirimidin yapısındadır. Bu bileşik taşıdığı elektrofilik akrilamid yapısı sayesinde, C797 ile kovalent bir bağ oluşturarak hedef enzimi geri dönüşümsüz şekilde inhibe etmektedir. T790M mutasyonuna sahip hastaların tedavisi için onaylanan ilk ilaçtır (Roskoski Jr, 2019). FDA tarafından 2015 yılında, daha önce başka EGFR TKI tedavisi almış ancak hastalığı ilerleme göstermiş ve EGFR T790M mutasyonuna sahip metastatik KHDAK hastalarında kullanımı için onaylanmıştır. 2018 yılında, EGFR aktive edici mutasyonlara sahip metastatik KHDAK hastalarının birinci basamak tedavisi için; 2020 yılında ise, tümör rezeksiyonu sonrası adjuvan tedavi için onayı genişletilmiştir (FDA, 2021).

1.10. Kinazolin Bileşiklerinin Enzimle Olası Etkileşimleri

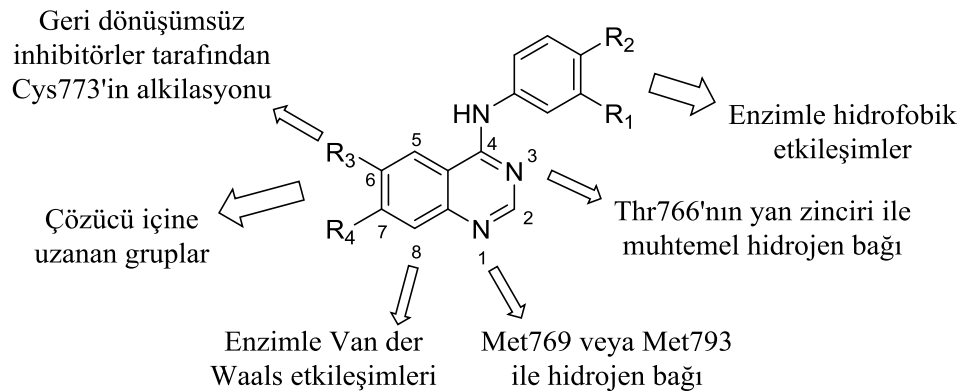
Kinazolin yapısı taşıyan inhibitörler için afinite ve seçicilik, bir dizi hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşim tarafından sağlanmaktadır. Erlotinib ile yapılan kristalografi çalışmaları ile belirlendiği üzere; kinazolinler N1-C8 kenarı, çözücüye doğru yönlendirilmiş C6 ve C7 konumlarındaki süstitüentler ve hidrofobik cebe yerleşen anilin grubu üzerinden enzimle etkileşmektedir (Fry, 2003).

Enzimde bulunan Met769'un amid NH'ı ile erlotinibin kinazolin halkasının N1'i arasında hidrojen bağı oluşturulur. N1'in karbon atomu ile değiştirilmesi,

inhibitör etkide 3700 kattan fazla bir düşüşe neden olmaktadır, bu durum N1 ile olan etkileşimin, kinazolin inhibitörleri ile EGFR arasındaki en önemli etkileşimlerden biri olduğunu göstermektedir. N3'ün karbon atomu ile değiştirilmesi ise aktiviteyi yaklaşık 200 kat azaltmaktadır, bu da afinite için önemli olduğunu ancak, N1'e göre daha küçük bir katkı sağladığını göstermektedir (Fry, 2003). Kinazolin halkasının N3'ü ve Thr766'nın yan zinciri arasında muhtemelen bir hidrojen bağı oluşmaktadır (Palmer ve ark., 1997). C8'in azot ile süstitüe edilmesinin etkiyi azaltması nedeniyle C8 konumuyla enzim arasında van der Waals gibi çekici güçlerin etkili olabileceği önerilmiştir (Fry, 2003). Anilin kısmı ile birlikte asetilen grubu, Lys721, Leu764 ve Thr766 amino asit kalıntıları ile çevrili bir cepte kalır (Stamos ve ark., 2002).

Gefitinibin kristalografik yapısı, kinazolin halkasının N1 azotu ile Met793'ün NH'ı arasında bir hidrojen bağı oluşumunu göstermektedir. 3-Kloro-4-florofenil grubu, enzim ile hidrofobik etkileşim kurmaktadır. Kinazolinin 7-metoksi grubu enzimle van der Waals etkileşimi yaparken, 6-propilmorfolino grubu çözücü içine uzanmaktadır (Roskoski, 2019).

Afatinib ve dacomitinib için kinazolin halkasının N1'i, enzimin Met793'ü ile etkileşime girmektedir, Met793'ün amid NH'ı ile afatinib ve dacomitinibin kinazolin çekirdeği arasında bir hidrojen bağı oluşturulmaktadır (Han ve Du, 2017).

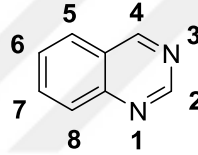


Şekil 1.25. Kinazolinlerin enzimle olası etkileşimleri

1.11. Kinazolin Yapısının Genel Özellikleri

Günümüzde kullanılan pek çok ilacın yapısında heterosiklik halka sistemleri bulunmaktadır. Yapısında en az bir heteroatom (karbon dışında, genellikle oksijen, nitrojen ve sülfür) bulunduran siklik bileşikler, heterosiklik bileşikler olarak adlandırılmaktadır (Tiwary ve ark., 2015).

Kinazolin (1,3-diazanaftalen / benzo-1,3-diazin / benzopirimidin) çift halkalı bir yapı olup pirimidin halkasına, iki bitişik karbon atomu üzerinden kaynaşmış bir benzen halkası içeren heterosiklik bir bileşiktir (Alagarsamy ve ark., 2018). Kinazolin halkası, pirimidin halkasının kaynaşmış kenarına komşu olan azot üzerinden numaralandırılmaya başlanır (Şekil 1.26), önce pirimidin sonra benzen halkası olacak şekilde tüm kenarlar numaralandırılır.

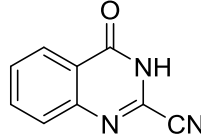


Şekil 1.26. Kinazolin yapısı ve halka numaralandırması

Kaynaşmış bir benzen halkasının varlığı, pirimidin halkasının özelliklerini önemli ölçüde değiştirmektedir. İki azot atomu eşdeğer değildir ve bu durum kinazolin reaksiyonlarına yansımaktadır. Kinazolinlerin özellikleri büyük ölçüde, taşıdıkları sübstitüentin doğasına, sübstitüentin pirimidin halkasında veya benzen halkasında oluşuna ve pirimidin halkasında konjugasyon olup olmamasına bağlıdır (Asif, 2014).

Kinazolinler, biyolojik aktivitelerinin çok çeşitli olması nedeniyle önemli ölçüde ilgi çeken bileşiklerdir. Kinazolin ve kinazolinon türevleri, antimalaryal, antikanser, antimikrobiyal, antifungal, antiviral, antiprotozoal, antiinflamatuvar, diüretik, kas gevşetici, antitüberküloz, antidepresan, antikonvülsan gibi geniş bir biyoaktivite yelpazesine sahiptir (Asif, 2014 ve Ravez ve ark., 2015).

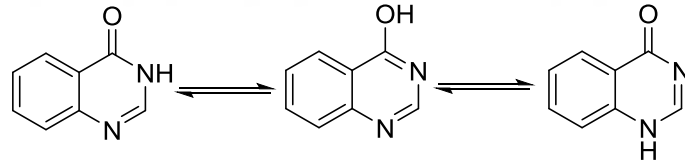
1869'da Griess (Griess, 1869 ve Griess, 1878) tarafından, ilk kinazolin türevidir olan 2-siyano-3,4-dihidro-4-oksokinazolin (Şekil 1.27) hazırlanmıştır (Ravez ve ark., 2015).



Şekil 1.27. 2-Siyano-3,4-dihidro-4-oksokinazolin

Kinazolinon, bitki aleminin çeşitli familyalarından, hayvanlardan ve mikroorganizmalardan izole edilmiş yaklaşık 150 doğal alkaloidin yapı taşıdır (Mhaske ve Argade, 2006). Kinazolinon önemli bir farmakofordur, 2. ve/veya 3. konumundan süstitüe edilmiş doğal kaynaklı veya sentetik çok sayıda kinazolinon mevcuttur (Abbas, 2020 ve Mhaske ve Argade, 2006).

4-Hidroksikinazolin, 4(3*H*)-kinazolinon ile tautomerik olup (Şekil 1.28) kinazolin halkasının süstitüe edilmesi için sıklıkla kullanılan bir ara üründür (Abbas, 2020).



Şekil 1.28. Kinazolinon halka sisteminin tautomerisi

Kinazolin halkasının 4. pozisyonunda amin veya süstitüe amin içeren ve 6. pozisyonunda halojen veya elektron bakımından zengin süstitüentler içeren kinazolin türevleri antikanser aktiviteleri için tercih edilen yapılardır (Wang ve Gao, 2013). Kinazolin türevleri, özellikle 4-anilinokinazolinler, pek çok biyolojik aktivitesinin yanı sıra özellikle EGFR inhibitörleri olarak yıllardır ilgi çeken yapılardır (Zhang ve ark., 2017).

4-Anilino (veya fenoksi) kinazolin bileşiklerine yönelik en yaygın sentez yaklaşımı, 4(3*H*)-kinazolinon ara ürünü üzerinden 4-klorokinazolinlerin hazırlanması ve ardından anilinler veya fenollerle reaksiyona sokulmasıdır (Jin ve ark., 2018).

1.11.1. Kinazolin Yapısının Genel Sentez Yöntemleri

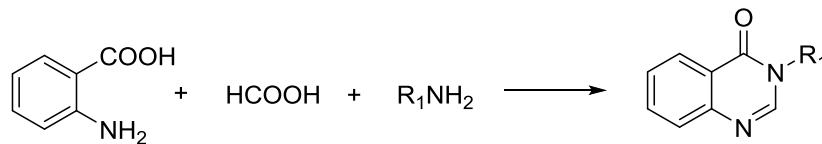
Kinazolin türevlerinin sentezi için başlangıç maddesi olarak çoğunlukla antranilik asit ya da antranilik asidin bir türevi kullanılmaktadır. 4(3*H*)-kinazolinonların sentezlerine yönelik birçok sentetik yöntem bildirilse de en yaygın yöntem, Niementowski reaksiyonudur (Jin ve ark., 2018).

Niementowski Sentezi'nde (Von Niementowski, 1894), 4-okso-3,4-dihidrokinazolinleri elde etmek için süstitüe edilmiş ya da süstitüe edilmemiş antranilik asit ve amid (formamid veya süstitüe amid) 125-130°C'de reaksiyona sokulmaktadır (Şekil 1.29). Bir su molekülünün eliminasyonu ve halka kapanması meydana gelmektedir. Bu yöntem, kinazolinlerin sentezinde sıklıkla kullanılan klasik bir yöntemdir (Bansal ve Malhotra, 2020 ve Tiwary ve ark., 2015).



Şekil 1.29. Niementowski sentezi

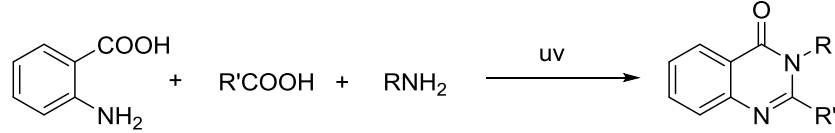
Antranilik asidin primer aminlerle kondenzasyonu, reaksiyon gerçekleştirilebilmektedir (Şekil 1.30). Antranilik asit, formik asit ile açılınmakta ve amonyak ya da süstitüe amin türevi ile ısıtılarak 4(3*H*)-kinazolinon yapısı oluşturulmaktadır (Tiwary ve ark., 2015).



Şekil 1.30. Antranilik asidin primer aminle kondenzasyonu

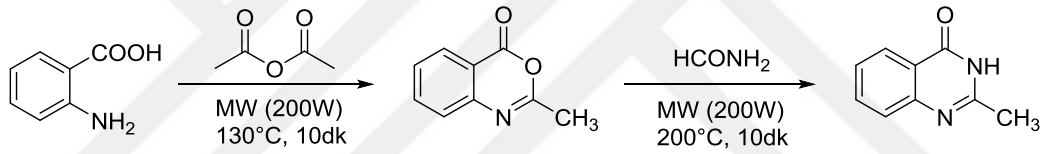
Niementowski reaksiyonunun, daha yüksek verimlerle daha kısa sürede tamamlanabilmesi için reaksiyonun mikrodalgada çözücüsüz olarak gerçekleştiği çalışmalar yapılmıştır. Mikrodalga yöntemiyle (Şekil 1.31), 3-süstitüe-4(3*H*)-

kinazolinon türevleri ve 2,3-disüstitüe-4(3*H*)-kinazolinon türevleri antranilik asit, süstitüe asit ve amin varlığında elde edilebilmiştir (Kidwai ve ark., 2003).



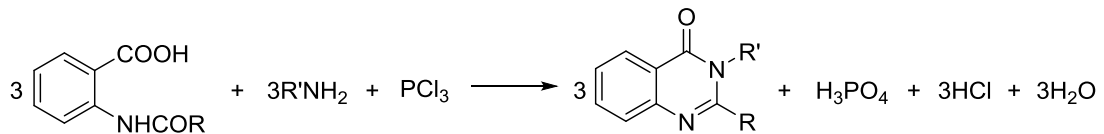
Şekil 1.31. Mikrodalga altında 4(3*H*)-kinazolinon sentez yöntemi

Kinazolin halkasının mikrodalga ile kısa sürede oluşturulabildiği bir diğer yöntemde ise (Şekil 1.32), antranilik asit ve asetik anhidrit mikrodalga altında reaksiyona sokulmuş ve 3,1-benzoksazinon yapısı elde edilmiştir. Ardından oluşan ara ürün, formamid ile mikrodalga altında reaksiyona girdiğinde %84 verimle 2-metilkinazolin-4-on bileşiğine ulaşılmaktadır (Nouira ve ark., 2008).



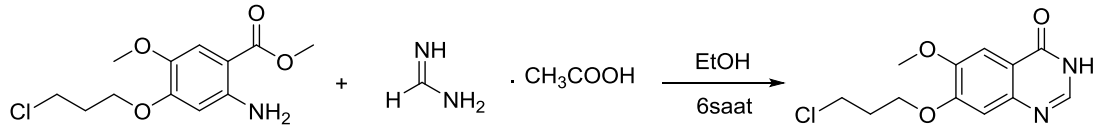
Şekil 1.32. Mikrodalga yöntemiyle 3,1-benzoksazinon ara ürünü üzerinden 3-metilkinazolin-4-on sentezi

Grimmel, Guinther ve Morgan Sentez yöntemine (Şekil 1.33) göre, *N*-açılantranilik asitler, toluen içinde fosfortriklorür ve primer bir amin ile ısıtıldığında, 2,3-disüstitüe-3,4-dihidro-4-oksokinazolin yapısı oluşmaktadır (Grimmel ve ark., 1946).



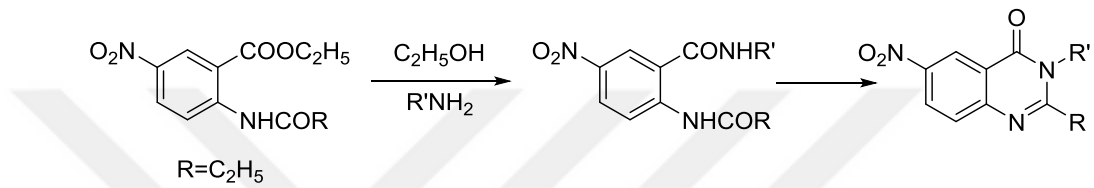
Şekil 1.33. Grimmer, Guinther ve Morgan sentez yöntemi

Metil 2-aminobenzoat ve formamidin asetat etanol varlığında ısıtıldığında 4(3*H*)-kinazolinon türevleri elde edilebilmektedir (Şekil 1.34) (Chang ve ark., 2017).



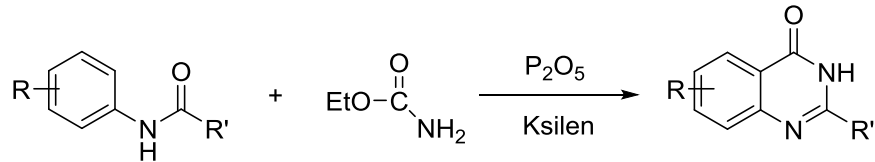
Şekil 1.34. Metil 2-aminobenzoat'tan hareketle 4(3H)-kinazolinon sentezi

Etil 2-asetamido-5-nitrobenzoat, alkol varlığında uygun aminlerle ısıtıldığında 2-etil-3,4-dihidro-6-nitro-4-oksokinazolin yapısını vermektedir (Şekil 1.35) (Asif, 2014).



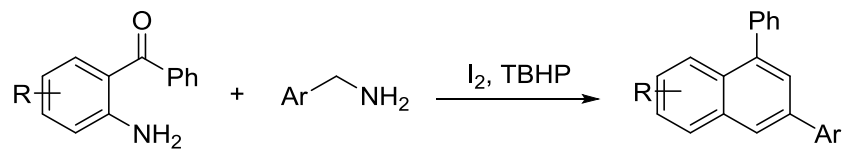
Şekil 1.35. Etil 2-asetamido-5-nitrobenzoat'tan hareketle 4(3H)-kinazolinon sentez yöntemi

Sen ve Ray Sentezi olarak bilinen yönteme (Şekil 1.36) göre, süstitüe anilidlerin ksilen içinde üretan ve fosfor pentoksit ile ısıtılması, 3,4-dihidro-4-oksokinazolinleri vermektedir (Asif, 2014 ve Brown, 1996).



Şekil 1.36. Sen ve Ray Sentez yöntemi

2-Aminobenzofenonlar ve benzilik aminlerden *tert*-butil hidroperoksit varlığında 4-fenilkinazolin türevleri yüksek verimlerle elde edilebilmektedir (Şekil 1.37) (Zhang ve ark., 2010).

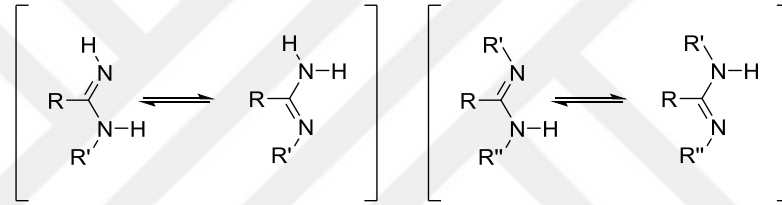


Şekil 1.37. 2-Aminobenzofenonlardan hareketle 4-fenilkinazolin türevlerinin sentezi

1.12. Amidin Yapısının Genel Özellikleri

Organik kimya sentez yöntemlerinde sıklıkla yer alan amidin grubu antihistaminik, antiinflamatuar, antibakteriyel, antifungal ve antikanser olarak kullanılan pek çok ilaç molekülünün yapısında bulunmaktadır (Greenhill ve Lue, 1993).

İki azot atomu içeren amidin yapısı, azot atomları üzerinde monosübstitüe ve disübstitüe grupların varlığında tautomerizm sergilemektedir (Şekil 1.38). Sübstitüe amidinler için iki farklı izomerik formül yazmak mümkündür (Shriner ve Neumann, 1944).



Şekil 1.38. Amidin grubunun tautomer yapısı

Sübstitüe edilmemiş amidinler güçlü bazlardır, baziklik dereceleri sübstitüsyon ile değişmektedir (Aly ve Nour-El-Din, 2008). Azotlardan birine elektron çekici bir grubun bağlanması, baziklik derecesini önemli ölçüde azaltmaktadır (Greenhill ve Lue, 1993).

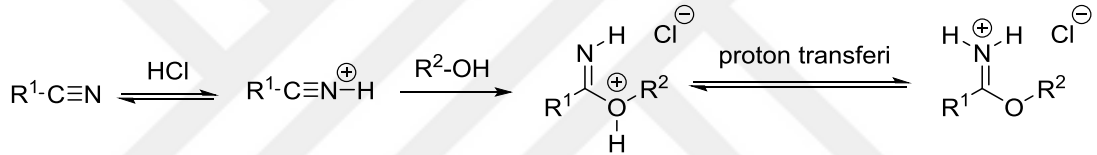
İmidamidler olarak da adlandırılan amidin grubu, her iki azot üzerinde de sübstitüe grup taşıdığı anda azotlar *N* ve *N'* olarak adlandırılmaktadır (Shriner ve Neumann, 1944).

1.12.1. Amidin Yapısının Genel Sentez Yöntemleri

İlk kez 1877 yılında Pinner ve Klein tarafından bulunan yöntemle göre (Pinner ve Klein, 1877 ve Pinner ve Klein, 1878), imidik esterler yoluyla nitrillerden

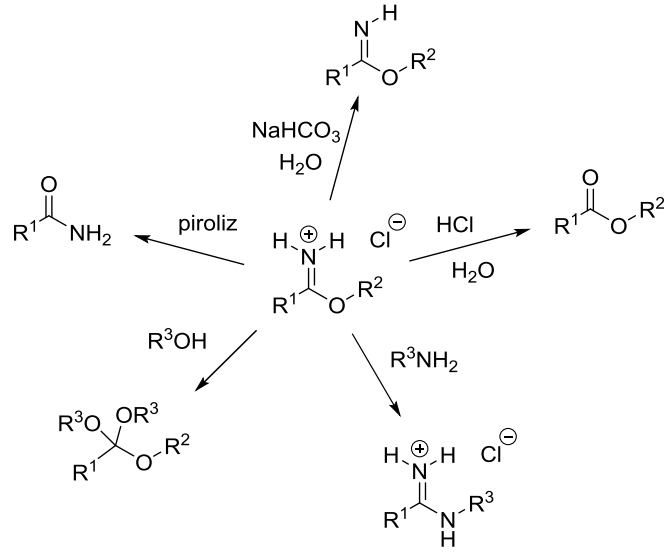
süstitüe edilmemiş amidinlerin sentezi yapılabilmektedir. Pratik ve kullanışlı olan bu yöntemde; nitril, susuz bir alkol içinde çözülür veya süspanse edilir ve kuru hidrojen klorür ile muamele edilerek bir imidik ester hidroklorür oluşturulur. Bu ara madde daha sonra alkol içinde çözünmüş amonyak ile reaksiyona girerek amidin hidroklorürü oluşturmaktadır (Shriner ve Neumann, 1944).

Muhtemel reaksiyon mekanizması, nitrilin güçlü bir asit olan hidrojen klorür ile protonlanması ile başlamaktadır. Böylece oluşan oldukça aktif nitrilyum katyonu ortamdaki alkol tarafından atağa uğrar. Son olarak meydana gelen proton transferi ile imidat hidroklorür oluşur. Pinner reaksiyonunda en iyi sonuçlar birincil veya ikincil alkoller ve alifatik veya aromatik nitriller ile elde edilmektedir (Şekil 1.39) (Pfaff ve ark., 2013).



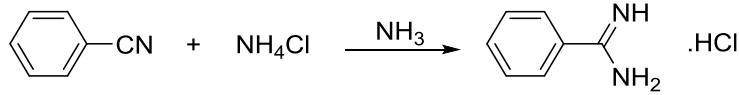
Şekil 1.39. Pinner reaksiyonunun mekanizması

İmidat türevleri oldukça dayanıksız ve reaktiftirler, izole edilmeleri zordur. Farklı ürünlerin oluşumu için ara basamak olarak yararlanılırlar. İmidat hidroklorürlerle çeşitli yapılar elde edilebilmektedir. Düşük pH'da hidroliz ile ester yapısı, bazik pH'da hidrolizle imidat yapısı oluşmaktadır. Aminler ile reaksiyona girerse, amidinyum bileşiklerini vermektedir. Alkollerle reaksiyon, *orto* esterleri oluşturur. Piroliz edilmeleri ise amid yapısını meydana getirmektedir (Şekil 1.40) (Pfaff ve ark., 2013).



Şekil 1.40. İmidat hidroklorürün reaksiyonları

Cornell (1928) tarafından bildirilen yönteme (Şekil 1.41) göre, süstitüe edilmemiş amidinleri elde etmek mümkündür. Benzamidin hidroklorür ve alifatik amidinler, karşılık gelen nitrillerin sıvı amonyak içinde amonyum klorür ile ısıtılmasıyla oluşturulabilir, ancak bu yöntemde düşük verimler elde edilmektedir (Shriner ve Neumann, 1944).

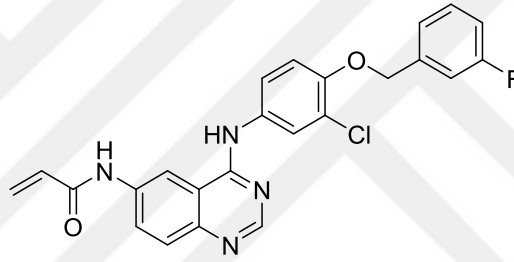


Şekil 1.41. Cornell yöntemiyle benzamidin sentezi

Süstitüe amidinler; *N*-süstitüe amidlerin önce fosfor pentaklorür ile imidoil klorüre dönüştürülmesi, ardından amonyak ile reaksiyona sokulmasıyla da elde edilebilmektedir (Şekil 1.42). Oluşan imidoil klorürler primer aminlerle reaksiyona sokulduğunda disüstitüe amidinleri, sekonder aminlerle reaksiyona sokulduğunda trisüstitüe amidinleri verirler. İmidoil klorürlerin sentezinde fosfor oksiklorür veya tanyonil klorür gibi reaktifler de kullanılabilir, ancak genellikle daha düşük verimler elde edilmektedir (Aly ve Nour-El-Din, 2008 ve Shriner ve Neumann, 1944).

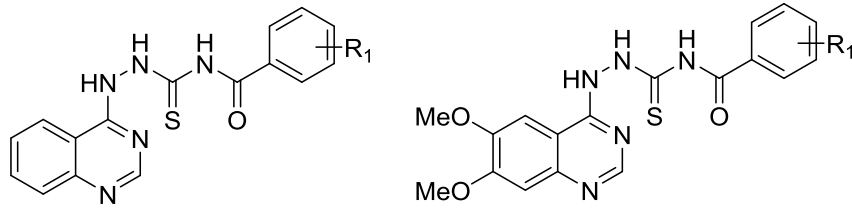
1.13. 4-Aminokinazolin Yapısı Taşıyan Bileşikler ile Yapılmış Bazı Antikanser Çalışmaları

AST1306 (Şekil 1.45), doğal tip EGFR, ErbB-2 ve mutant EGFR T790M/L858R'yi inhibe eden çok hedefli TKI'dır. Farklı kinaz tiplerini inhibe etme potansiyeli araştırılmış ve diğer kinaz tiplerine etki göstermezken EGFR ($IC_{50}=0,5\pm0,2$ nM), ErbB-2 ($IC_{50}=3,0\pm1,5$ nM) ve EGFR T790M/L858R ($IC_{50}=12\pm2$ nM)'yi spesifik olarak inhibe ettiği gözlenmiştir. Bu inhibitör yapısal olarak, akrilamid grubu bulundurmaktadır, EGFR'de bulunan sistein kalıntısı Cys797 ile bir alkilasyon reaksiyonu gerçekleştirerek enzimi geri dönüşümsüz şekilde inhibe etmektedir (Xie ve ark., 2011).



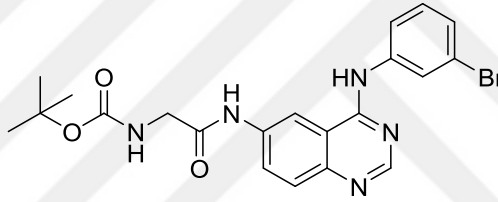
Şekil 1.45. AST1306

He ve ark. (2012), tarafından yapılan çalışmada, bir dizi 4-tiyosemikarbazid kinazolin türevi (Şekil 1.46) sentezlenmiş, beş insan kanser hücre hattına karşı antitümör aktiviteleri 5-florourasil ile karşılaştırılarak değerlendirilmiş ve yapı-aktivite ilişkileri elde edilmiştir. Bileşikler μ M aralıkta, 5-florourasile benzer veya daha yüksek sitotoksosite göstermişlerdir. Genel olarak, kinazolin halkasının 6. ve 7. pozisyonlarına metoksi gruplarının eklenmesi, eşdeğer veya azalmış sitotoksisiteye yol açmıştır. Benzen halkası üzerindeki sübstitüentler sitotoksisiteyi önemli ölçüde etkilemektedir. Benzen üzerinde sübstitüent olmadığı ya da 4. konumda klor veya flor bulunduğunda daha yüksek sitotoksosite gözlenirken, halkaya metil ve metoksi gruplarının eklenmesi sitotoksisiteyi azaltmıştır.



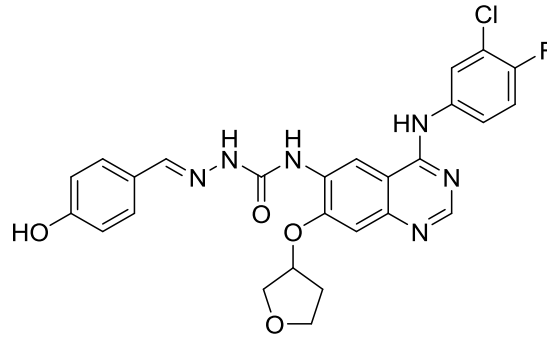
Şekil 1.46. 4-Tiyosemikarbazidkinazolin türevleri

Zheng ve ark. (2017), tarafından insan hepatoselüler karsinoma hücresi HepG2'ye karşı antiproliferatif etki gösteren bir dizi 4-anilinokinazolin-amino asit türevi sentezlenmiştir. Şekil 1.47'de verilen bileşik, HepG2'ye karşı *in vitro* orta derecede ($IC_{50}=8,3 \mu M$) aktiviteye sahipken, inhibitör etkinlik çalışmasında diğer kinazlara kıyasla 2000 katın üzerinde spesifiklik gösterdiği EGFR'yi ($IC_{50} = 0,0032 \mu M$) güçlü bir şekilde inhibe etmektedir.



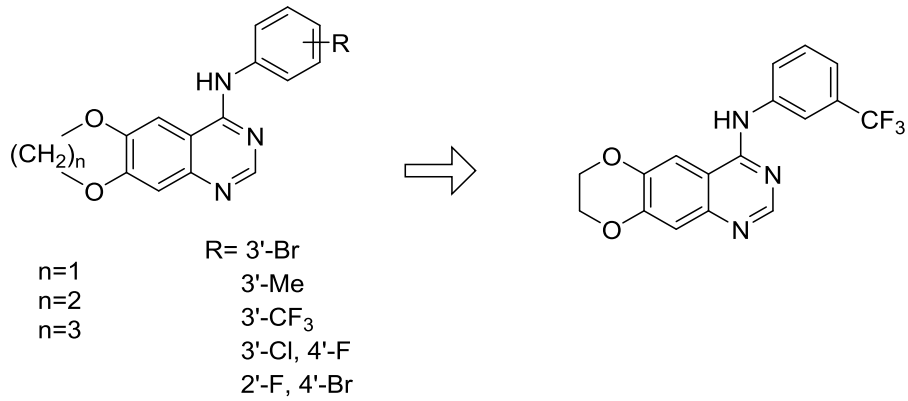
Şekil 1.47. 4-Anilinokinazolin-amino asit türevi bileşik

Tu ve ark. (2017), tarafından aril semikarbazon yapısı taşıyan kinazolin türevleri sentezlenip, IC_{50} değerleri A549, HepG2, MCF-7 ve PC-3 kanser hücre hatlarına karşı afatinib ile karşılaştırılarak test edilmiştir. Sentezlenen seri arasında, nanomolar aralıkta IC_{50} değerleri ile güçlü sitotoksikite ve seçicilik gösteren bileşikler bulunmaktadır. Şekil 1.48'de verilen bileşik, en umut verici bileşik olup A549 ($IC_{50}=1,32 \pm 0,38 \mu M$), HepG2 ($IC_{50}=0,07 \pm 0,01 \mu M$), MCF-7 ($IC_{50}=0,91 \pm 0,29 \mu M$) ve PC-3 ($IC_{50}=4,89 \pm 0,69 \mu M$) kanser hücre hatlarına karşı afatinibe (sırasıyla $1,40 \pm 0,83 \mu M$; $1,33 \pm 1,28 \mu M$; $2,63 \pm 1,06 \mu M$ ve $3,96 \pm 0,59 \mu M$) kıyasla daha yüksek etkinlik göstermiştir. EGFR kinaza karşı aktivitesi ($IC_{50}=56 nM$) ise, referans bileşik afatinibe ($IC_{50}=1,6 nM$) göre daha düşük bulunmuştur.



Şekil 1.48. Aril semikarbazon yapısı taşıyan kinazolin türevi

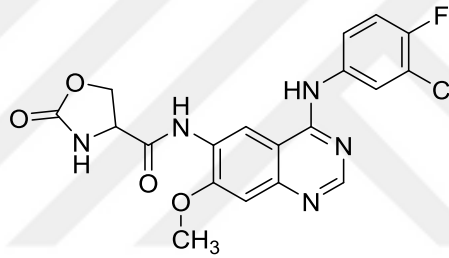
Chilin ve ark. (2010), tarafından 4-anilinokinazolin yapısının 6. ve 7. pozisyonlarına dioksolan, dioksan ve dioksepin gibi çeşitli dioksijenlenmiş halkaların getirildiği türevler sentezlenmiştir. Bu türevlerin antiproliferatif ve EGFR inhibitör aktiviteleri incelenmiştir. Anilin halkasının 3. konumunda bir brom atomu, metil veya triflorometil grupları taşıyan bileşikler, 2,4 ve 3,4 konumlarında iki halojen atomu ile süstitüe edilen türevlerden daha aktif bulunmuştur. Sentezlenen seri içinde, bir dioksan halkası ve 3. konumunda triflorometil grubu ile süstitüe edilmiş 4-anilin yapısı taşıyan bileşik (Şekil 1.49), EGFR fosforilasyonunu inhibe etme gücü ve A431 ($IC_{50}=0,77 \mu M$) hücre hattına karşı gösterdiği sitotoksosite ile en aktif bileşik olarak bulunmuştur.



Şekil 1.49. Dioksolan, dioksan ve dioksepin halkaları taşıyan 4-anilinokinazolin türevleri

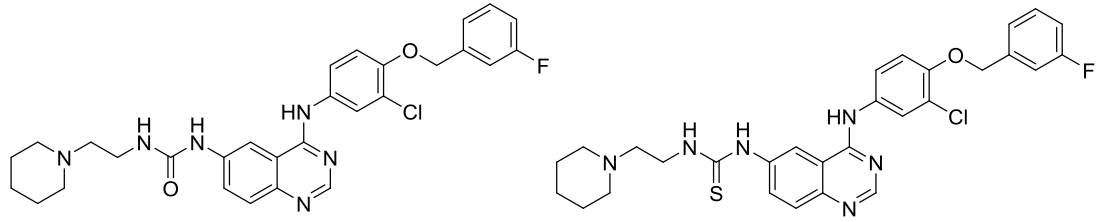
Shao ve ark. (2016), tarafından oksooksazolidin halkası içeren kinazolin türevleri sentezlenmiş, EGFR ve EGFR'nin mutant formlarına karşı inhibitör aktiviteleri değerlendirilmiştir. Türevlerin çoğu, A431 hücre hattına ve gefitinibe

dirençli NCI-H1975 hücre hattına karşı μM değerlerde antiproliferatif aktivite sergilemişlerdir. Seçilen bileşiklerin farklı EGFR kinaz türlerini (EGFR doğal tip, EGFR L858R ve EGFR T790M) inhibe edici aktiviteleri gefitinibe karşı değerlendirilmiştir. Test edilen bileşiklerden bazıları, özellikle EGFR T790M mutanlığı üzerinde, gefitinibden daha güçlü aktivite göstermişlerdir. Özellikle, kinazolin halkasının 4. pozisyonunda 3-kloro-4-florobenzenin yapısına sahip bileşikler ($\text{IC}_{50} < 100 \text{ nM}$), EGFR T790M mutanlığı üzerine gefitinibden ($\text{IC}_{50} = 173 \text{ nM}$) daha yüksek inhibe edici aktivite sergilemektedirler. 4. pozisyonundaki hacimli süstituentler, EGFR T790M inhibitör aktivitesinde 2-5 kat azalmaya yol açmaktadır. Türevler arasında en güçlü bileşik (Şekil 1.50), EGFR L858R ($\text{IC}_{50} = 0,31 \text{ nM}$) ve EGFR T790M mutanlığına karşı ($\text{IC}_{50} = 26,33 \text{ nM}$) güçlü inhibisyon göstermiştir.



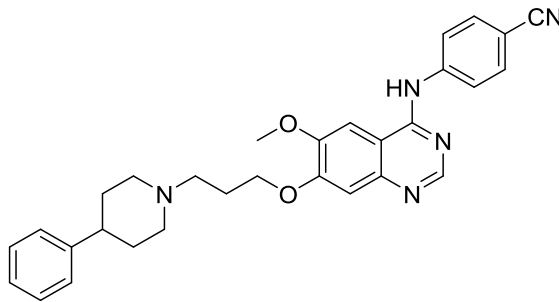
Şekil 1.50. Oksooksazolidin halkası içeren kinazolin türevi

Mowafy ve ark. (2016), tarafından 6. konumda üreido veya tiyoüreido yan zincirleri taşıyan ve 4-anilin yapısı üzerinden süstitüe edilmiş 4-anilinokinazolin türevleri sentezlenmiş, doğal tip EGFR ve mutant EGFR'nin inhibitörleri olarak değerlendirilmiştir. Bileşiklerin çoğu, düşük nanomolar aralıkta ($< 0,495\text{--}9,05 \text{ nM}$) IC_{50} değerleri ile EGFR kinaz doğal tipi inhibe etmişlerdir. Bileşikler, L858R/T790M mutanlığına karşı önemli inhibisyon ($\text{IC}_{50} = 1,76\text{--}2,38 \mu\text{M}$) göstermişlerdir. Ayrıca, lapatinibe ($\text{IC}_{50} = 60,1 \text{ nM}$) kıyasla önemli ErbB-2 enzim inhibisyonuna ($\text{IC}_{50} = 19,2\text{--}40,6 \text{ nM}$) sahip oldukları bulunmuştur. SAR çalışmaları ile, kinazolinin 6. pozisyonunda etil piperidino üre / etil piperidino tiyoüre ve 4. pozisyonunda (3-kloro-4-(3-florobenziloksi)fenil)amino hacimli grubuna sahip Şekil 1.51'de verilen bileşiklerin, L858R/T790M mutanlığına karşı en güçlü ve en umut verici yapılar olduğu belirtilmektedir.



Şekil 1.51. Üreido veya tiyüreido yan zincirleri taşıyan 4-anilinokinazolin türevleri

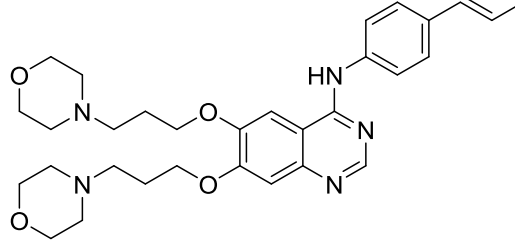
Chang ve ark. (2017), tarafından yapılan çalışmada, anilin halkasının 2., 3. veya 4. konumundan siyano ile süstitüe edilmiş, kinazolin halkasının 7. konumundan hidrofilik amino alkil zincirleri ile türevlendirilmiş 4-aminokinazolin bileşikleri sentezlenmiştir. Seri arasında, kinazolin halkasının 7. pozisyonuna bir propil grubuyla bağlanmış 4-fenilpiperidinil süstitüenti taşıyan Şekil 1.52’de verilen bileşik, HepG2, A549, DU145, MCF-7 ve SH-SY5Y hücre hatlarına karşı yaklaşık 5-10 μM IC_{50} değerleri ile gefitinibe göre güçlü sitotoksiste göstermiştir. Ayrıca, bileşiğin EGFR TKI aktivitesi ($\text{IC}_{50}=3,62 \text{ nM}$), gefitinib ($\text{IC}_{50}=2,21 \text{ nM}$) ile karşılaştırılabilir seviyede bulunmuştur. Bileşiklerle yapılan SAR çalışmaları, anilin halkası üzerindeki belirli süstitüentlerin, amino asit kalıntıları ile hidrojen bağı yapmaları nedeniyle, *meta* konumuna kıyasla *orto* veya *para* pozisyonlarında konumlanmasıyla daha umut verici aktiviteler elde edilebileceği belirtilmiştir.



Şekil 1.52. Hidrofilik amino alkil zinciri ile türevlendirilmiş 4-anilinokinazolin türevi

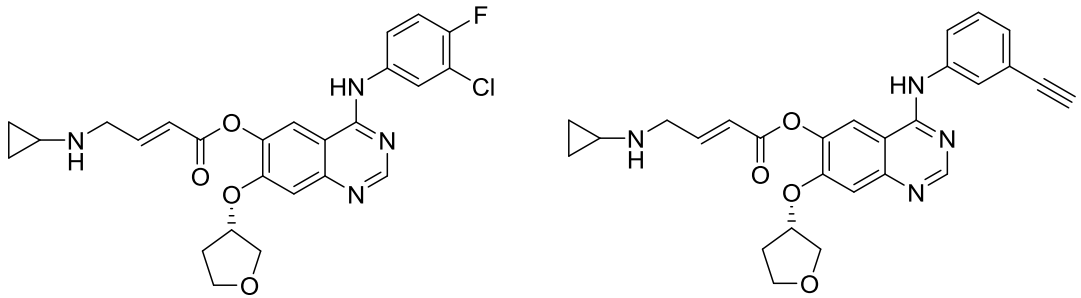
Chen ve ark. (2017), kinazolin halkasının 6. ve 7. pozisyonlarında benzer hidrofilik gruplara sahip 4-(4-(*E*)-(propen-1-il)fenilamino)kinazolin türevleri geliştirmişlerdir. Bileşikler arasında, 6. ve 7. konumda morfolinopropoksi bulunduran türev (Şekil 1.53), test edilen dört A431, A549, NCI-H1975 ve SW480 tümör hücre hattına karşı ($\text{IC}_{50}=1,35-8,83 \mu\text{M}$) yüksek antiproliferatif aktivite

göstermiştir. Ayrıca bu bileşik ($IC_{50}=20,72$ nM), lapatinibe ($IC_{50}=27,06$ nM) kıyasla daha iyi EGFR inhibitör aktiviteye sahip bulunmuştur.



Şekil 1.53. 4-(4-(E)-(propen-1-il)fenilamino)kinazolin türevi

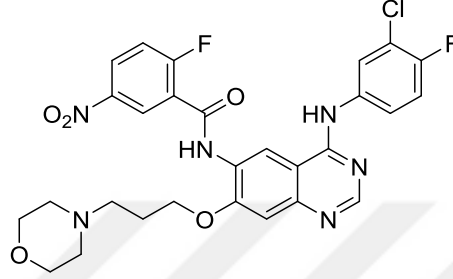
Zhang ve ark. (2015), tarafından bir dizi 6,7-disübstitüe-4-(arilamino)kinazolin türevi sentezlenmiş ve EGFR inhibitör aktiviteleri afatinib ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Özellikle, Şekil 1.54’de verilen 3-kloro-4-floroanilin yapısı taşıyan bileşik ($IC_{50}=6,5$ nm) ve 3-etinilanilino yapısı taşıyan bileşik ($IC_{50}=5,6$ nm), afatinib ($IC_{50}=1,0$ nm) ile karşılaştırılabilir EGFR inhibisyonuna sahip bulunmuştur. EGFR'ye dirençli H1975 hücrelerine karşı GI_{50} değerleri sırasıyla 10,2 ve 16,1 nM bulunmuş olup afatinibden ($GI_{50}=107,1$ nm) daha güçlü inhibisyon göstermişlerdir. Kinazolin halkasının 6. konumunda, primer amin sübstitüenti taşıyan Michael akseptörüne sahip bileşiklerin, afatinib ile karşılaştırıldığında T790M mutantına karşı daha yüksek aktivite gösterdikleri belirtilmiştir.



Şekil 1.54. 6,7-Disübstitüe-4-(arilamino)kinazolin türevleri

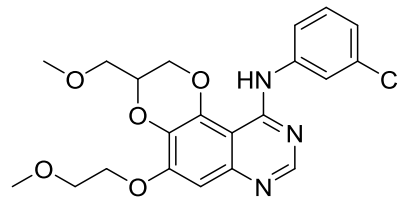
Hou ve ark. (2018), tarafından 6. pozisyonunda sübstitüe benzamid grupları taşıyan bir dizi 4-aminokinazolin türevi sentezlenmiş ve EGFR inhibitörü olarak

değerlendirilmiştir. Şekil 1.55’de verilen bileşik ($IC_{50}=5$ nM), güçlü EGFR inhibisyonu sergilemiştir. Ayrıca farklı EGFR mutasyonlarını barındıran hücre hatlarına karşı etkili olduğu bulunmuş, doğal tip EGFR’ye sahip hücre hatlarına karşı neredeyse hiç antiproliferatif aktiviteye sahip olmadığı gözlenmiştir. Bu sayede doğal tip EGFR inhibisyonu sonucu görülen toksik etkilerin beklenmediği belirtilmiştir.



Şekil 1.55. 6-Benzamid-4-aminokinazolin türevi

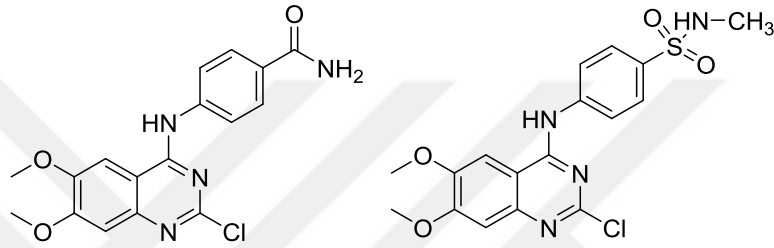
Qin ve ark. (2021), tarafından EGFR inhibitörleri olarak bir dizi yeni [1,4]dioksino[2,3-*f*]kinazolin türevleri sentezlenmiştir. İncelenen bileşikler, EGFR kinaza karşı 10,29-652,3 nM aralığında IC_{50} değerleri ile inhibisyon göstermişlerdir. Şekil 1.56’da verilen bileşiğin ($IC_{50}=10,29$ nM), doking çalışmalarında EGFR’nin ATP bağlanma cebine uyumlu bir şekilde bağlanabileceği gösterilmiştir. Ayrıca, A549 ($IC_{50}=9,95 \times 10^3$ nM) ve NCI-H157 hücrelerine ($IC_{50}=11,66 \times 10^3$ nM) karşı antiproliferatif aktivite gösterdiği belirtilmiştir.



Şekil 1.56. [1,4]Dioksino[2,3-*f*]kinazolin türevi

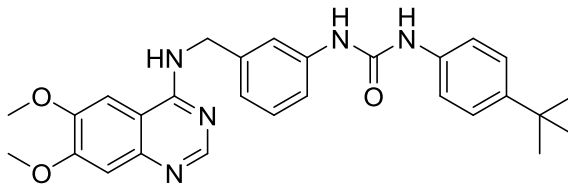
De Castro Barbosa ve ark. (2014), tarafından EGFR’nin yanı sıra vasküler endotelial büyüme faktörü-2 (VEGFR-2)’yi de inhibe eden 2-kloro-4-anilino-kinazolin türevleri sentezlenmiştir. En aktif türevler Şekil 1.57’de verilen benzamid ve *N*-metilbenzensülfonamid yapısı taşıyan bileşikler olup, EGFR’yi sırasıyla 0,90

μM ve $1,63 \mu\text{M}$ IC_{50} değeriyle, VEGFR-2'yi sırasıyla $1,17 \mu\text{M}$ ve $0,85 \mu\text{M}$ IC_{50} değeriyle inhibe etmişlerdir. SAR çalışmaları, kinazolin halkasında 6,7-dimetoksi süstituentlerinin dioksalan halkası ile değıştirilmesinin aktivite kaybına sebep olduğunu, doking çalışmaları metoksi gruplarının yerine getirilen dioksalan halkasının enzim ile etkileşim için elverişsiz olduğunu göstermiştir. Ayrıca, anilin grubunun *para* pozisyonunda bulunan bir hidrojen bağı donörünün, EGFR ve VEGFR-2 bağlanma bölgelerinde korunmuş glutamin ve aspartat amino asitleri ile etkileşim için önemli olduğu belirtilmiştir.



Şekil 1.57. 2-Kloro-4-anilinokinazolin türevi

Chen ve ark. (2016), tarafından bir dizi yeni kinazolinil-diaril üre türevi sentezlenmiş ve *in vitro* antiproliferatif aktiviteleri üç kanser hücre hattına (HepG2, MGC-803 ve A549) karşı değerlendirilmiştir. Bileşikler, 6. ve 7. konumdan süstitüe edilmemiş kinazolin türevlerini ve 6,7-dimetoksikinazolin türevlerini içerecek şekilde tasarlanmıştır. Sonuçlar karşılaştırıldığında, dimetoksi türevlerinin özellikle A549 hücrelerine karşı daha güçlü antiproliferatif aktiviteler sergilediği gözlenmiştir. Sentezlenen seri içinden Şekil 1.58'de verilen bileşiğin, HepG2 ($\text{IC}_{50}=6,85\pm0,35 \mu\text{M}$), MGC-803 ($\text{IC}_{50}=6,79\pm0,53 \mu\text{M}$) ve A549 ($\text{IC}_{50}=5,21\pm0,47 \mu\text{M}$) hücre hatlarına karşı gefitinib (IC_{50} değeri sırasıyla $18,22\pm1,84 \mu\text{M}$; $26,19\pm1,49 \mu\text{M}$; $8,28\pm0,66 \mu\text{M}$) ile karşılaştırıldığında oldukça güçlü antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir.



Şekil 1.58. Kinazolinil-diaril üre türevi

Chemical structure of a quinazolinone derivative. The core structure is a quinazolinone with a methoxy group (H₃CO) at position 6 and a methoxy group (H₃CO) at position 7. The nitrogen at position 4 is substituted with a group X. The group X is further substituted with R₁, R₂, and R₃. The nitrogen at position 2 is substituted with a group R₄.

X	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
C	Cl	Cl	Cl	
N	Cl	-	H	
C	H	CF ₃	F	

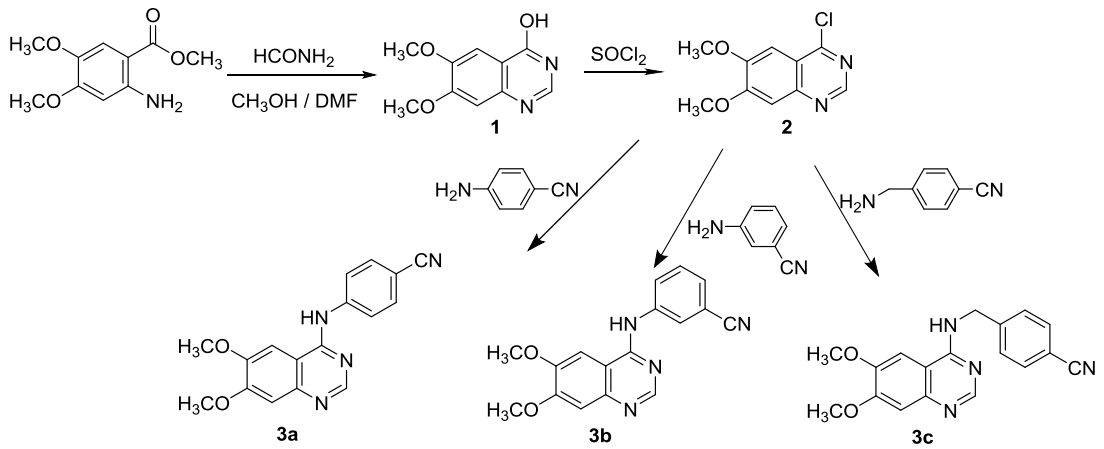
61

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Tasarlanan Türevlerin Sentezi

2.1.1. Benzonitril Yapısı İçeren 4-Amino-6,7-dimetoksikinazolin Türevlerinin Sentez Yöntemi

Başlangıç maddesi olan metil 2-amino-4,5-dimetoksibenzoat üzerine DMF, metanol, formamid ve %25'lik NaOCH₃ eklenerek halka kapanması ve kinazolin yapısının oluşumu sağlanmıştır. Elde edilen 6,7-dimetoksikinazolin-4-ol (**1**) bileşiği tiyonil klorür ve DMF ile reaksiyona sokulmuştur. Nükleofilik süstitüsyon reaksiyonu ile bileşikteki hidroksil grubu klor ile yer değiştirmiş ve 4-kloro-6,7-dimetoksikinazolin (**2**) bileşiği elde edilmiştir. Benzonitril yapısı taşıyan 4-amino-6,7-dimetoksikinazolin türevlerinin (**3a**, **3b**, **3c**) sentezlenmesi için, 4-kloro-6,7-dimetoksikinazolin (**2**) bileşiği sırasıyla 4-aminobenzonitril ve 3-aminobenzonitril ile 2-propanol varlığında, 4-(aminometil)benzonitril ile asetonitril varlığında reaksiyona sokulmuştur (Şekil 2.1). Elde edilen **1**, **2**, **3a**, **3b** ve **3c** kodlu bileşiklerin saflık kontrolleri İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) ile yapılmış, erime noktaları tayin edilmiş, ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve kütle analizleri ile kimyasal yapıları kanıtlanmıştır.



Şekil 2.1. Benzonitril yapısı taşıyan 4-amino-6,7-dimetoksikinazolin türevlerinin (**3a**, **3b**, **3c**) sentezi

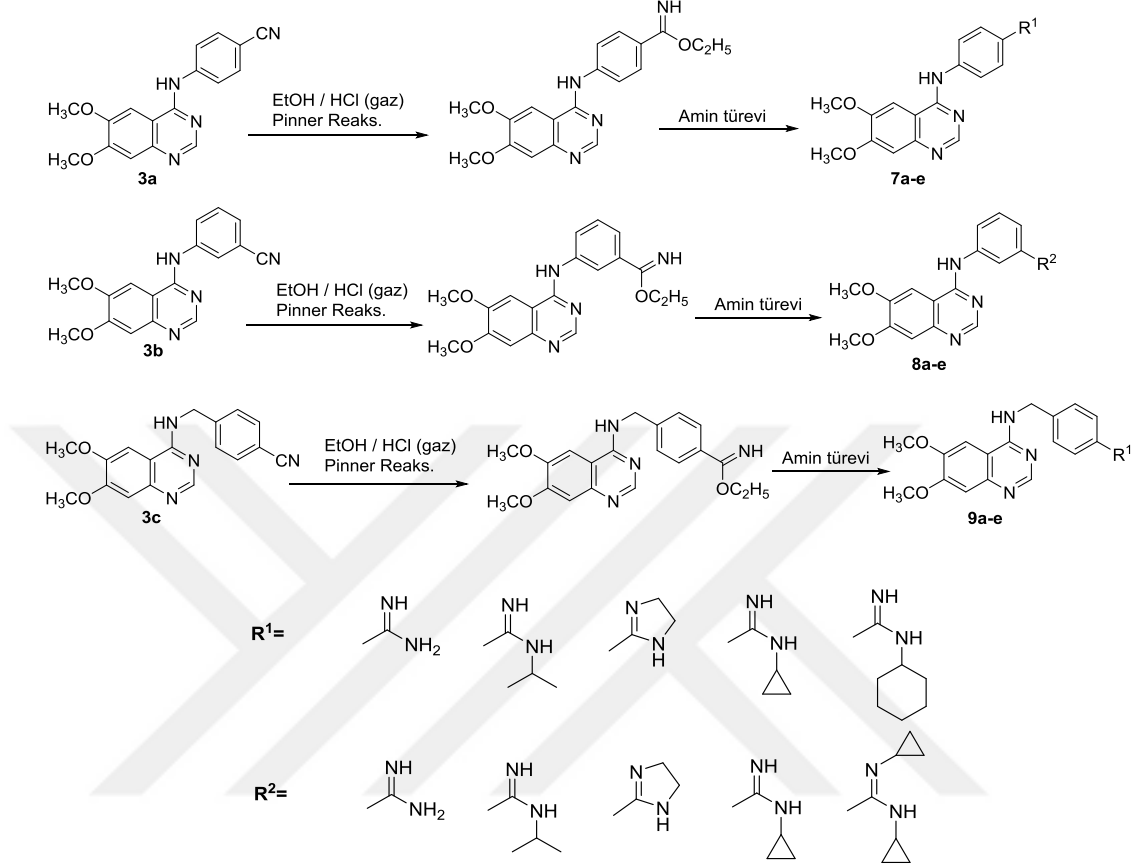
2.1.2. Bileşik 4, 5 ve 6'nın Sentez Yöntemi

Bileşikler 4, 5 ve 6'yı elde etmek için, sentezlemiş olduğumuz 4-kloro-6,7-dimetoksikinazolin (2) uygun amin türevi (bileşik 4 için 2,3,4-trikloroanilin, bileşik 5 için 3-amino-2-kloropiridin ve bileşik 6 için 4-floro-3-(triflorometil)anilin) ile 2-propanol içerisinde reaksiyona sokulmuştur. Reaksiyon tamamlandığı zaman çözelti süzölmüş ve çökeleğin üzerine potasyum karbonat çözeltisi eklenerek karıştırılmış ve bazikleşen bileşik süzölmüştür. Kristalizasyon yapılarak sonuç ürünler saf olarak elde edilmiştir. Gerekli olduğunda, bileşiklerin HCl tuzları etanol içinde HCl gazı geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Erime noktaları tayin edilmiş, ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve kütle analizleri ile kimyasal yapıları kanıtlanmıştır.

2.1.3. Amidin Yapısı Taşıyan Türevlerin (7a-7e, 8a-8e, 9a-9e) Sentez Yöntemi

Bileşiklerde amidin yapısını elde etmek için, daha önceden sentezlenmiş türevlerdeki nitril grubu öncelikle, Pinner reaksiyonu ile imidat esteri haline dönüştürölmüştür. Ardından amonyak ya da amin ilavesiyle imidat esterlerinden, amidin grubu oluşturulmuştur. Bu amaçla 3a, 3b ve 3c kodlu bileşiklere, kuru HCl gazı ile doyurulmuş mutlak etanol eklenerek ağzı kapatılmış balon içinde 2 gün oda ısısında karıştırılmıştır. Ardından üzerine petrol eteri ilave edilerek vakum yardımıyla süzölmüş ve oda sıcaklığında vakum varlığında kurutulmuştur. Böylece 3a, 3b ve 3c kodlu bileşiklerdeki nitril grupları imidat esterlerine dönüştürölmüştür. Stabil olmayan imidat esterleri yapı aydınlatması yapılmaksızın, absolü etanol ve sonuç bileşiğı için uygun amin türeviyle, amidin elde etmek için reaksiyona sokulmuştur (Şekil 2.2). Reaksiyon sonlandığında solvanları uçurulmuştur. Üzerlerine potasyum karbonat çözeltisi eklenerek karıştırılıp süzölmüştür (Göker ve ark., 2005 ve Özden ve ark., 2005). İTK ile kontrol edilip gerekli olduğü durumlarda kolon kromatografisi ile CHCl₃: MeOH: NH₃ (100:20:0,5) solvan sistemi yardımıyla madde saf olarak elde edilmiştir. Bileşiklerin HCl tuzları etanol içinde HCl gazı geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen sonuç bileşiklerin (7a-7e, 8a-8e, 9a-9e)

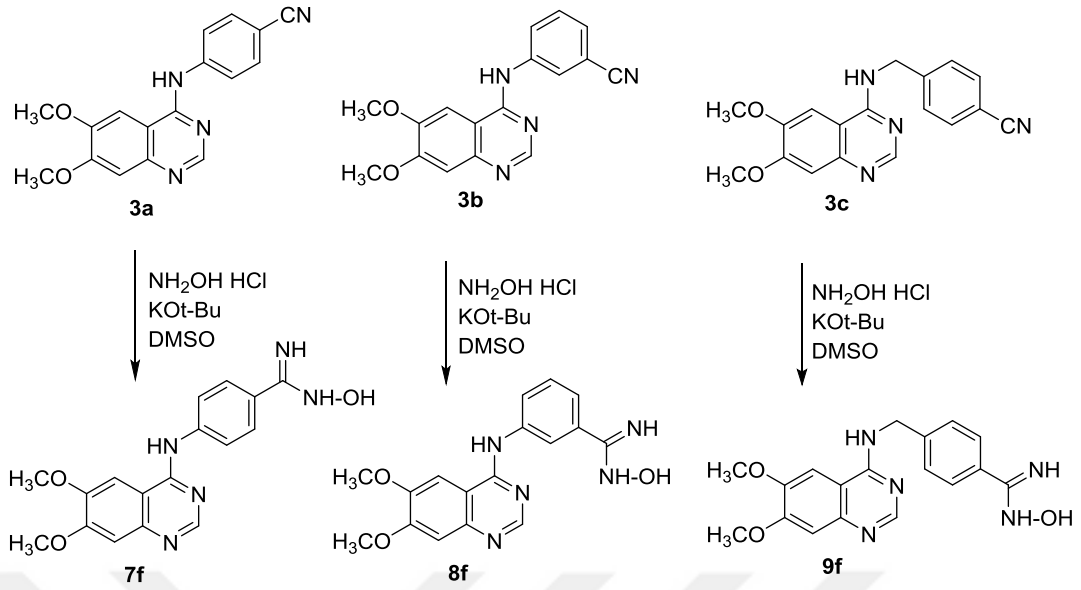
erime noktaları tayin edilmiş, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ ve kütle analizleri ile kimyasal yapıları kanıtlanmıştır.



Şekil 2.2. Amidin yapısı taşıyan türevlerin sentezi

2.1.4. Amidoksim Yapısı Taşıyan Türevlerin (7f, 8f, 9f) Sentez Yöntemi

Amidoksim türevlerini elde etmek için, öncelikle hidroksilamin hidroklorür üzerine dimetil sülfoksit (DMSO) ilave edilerek çözündürülmüştür. Çözelti üzerine potasyum *tert*-bütoksit yavaşça eklenmiş, sıcaklık 5°C'nin altında tutularak karıştırılmıştır. Ardından 3a, 3b ve 3c kodlu bileşiklerden uygun olan ara bileşik de çözeltiye eklenerek karışmaya bırakılmıştır. Reaksiyon sonlandığında maddelerin su ile çökmesi sağlanmış ve süzölmüştür (Hu ve ark., 2013) (Şekil 2.3). Gerekli olduğunda, bileşiklerin HCl tuzları etanol içinde HCl gazı geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen sonuç bileşiklerin (7f, 8f, 9f) erime noktaları tayin edilmiş, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ ve kütle analizleri ile kimyasal yapıları kanıtlanmıştır.

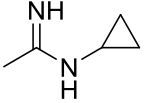
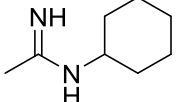
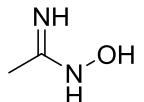
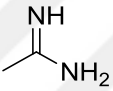
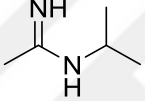
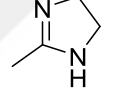
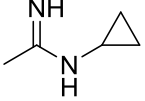
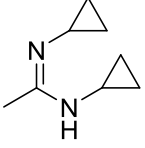
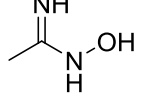
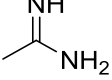
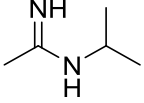


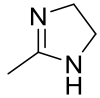
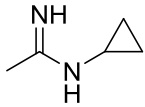
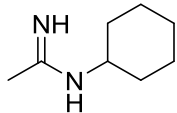
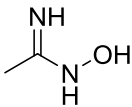
Şekil 2.3. Amidoksim yapısı taşıyan türevlerin sentezi

Sentezlenen 4-amino-6,7-dimetoksikinazolin türevleri Çizelge 2.1. de yer almaktadır.

Çizelge 2.1. Sentezlenen 6,7-dimetoksikinazolin türevleri

Bileşik no	X	Y	R ₁	R ₂	R ₃
4	-	C	Cl	Cl	Cl
5	-	N	Cl	H	H
6	-	C	H	CF ₃	F
7a	-	C	H	H	
7b	-	C	H	H	

7c	-	C	H	H	
7d	-	C	H	H	
7e	-	C	H	H	
7f	-	C	H	H	
8a	-	C	H	H	
8b	-	C	H	H	
8c	-	C	H	H	
8d	-	C	H	H	
8e	-	C	H	H	
8f	-	C	H	H	
9a	CH ₂	C	H	H	
9b	CH ₂	C	H	H	

9c	CH ₂	C	H	H	
9d	CH ₂	C	H	H	
9e	CH ₂	C	H	H	
9f	CH ₂	C	H	H	

2.2. Materyal ve Yöntem

2.2.1. Sentezlenen Bileşiklerin Analitik İncelemelerinde Kullanılan Yöntemler

2.2.1.1. Kromatografik Analizler

Sentez çalışmaları sırasında reaksiyonların ilerleyişini izlemek, elde edilen ürünlerin saflık derecelerini saptamak amacı ile İnce Tabaka Kromatografisinden (İTK) yararlanılmıştır. Bu amaçla Kieselgel-60 GF₂₅₄ kaplı alüminyum plaklar (Merck) kullanılmış ve plak üzerinde lekelerin belirlenmesinde 254 nm dalga boyundaki UV ışığından (Camag UV Lambası) yararlanılmıştır. Sentezlenen bileşiklerin saflaştırılması için silicagel 60 (0,040-0,063 mm; 230-400 mesh) yardımıyla kolon kromatografisi kullanılmıştır.

2.2.1.2. Erime Noktası Tayinleri

Erime noktası tayinleri, Büchi B-540 cihazı ile kapiller yöntem uygulanarak yapılmıştır.

2.2.1.3. Elementel Analiz *

Elementel analizler, Leco 932 CHNS Elementel analiz cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

2.2.1.4. Spektral Analizler

Kütle (MASS) Spektrumları *

Kütle analizleri, Waters ZQ Mikromass LC-MS spektrometresinde, elektrosprey iyonizasyon (ESI) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektrumları * (^1H , ^{13}C , 2D-COSY, 2D-HSQC, 2D-HMBC, 2D-NOESY, 2D-ROESY)

NMR spektrumları, Varian Mercury-400 Agilent FT-NMR spektrometresinde alınmıştır. İç standart madde olarak tetrametilsilan (TMS), çözücü olarak CDCl_3 , CD_3OD ve $\text{DMSO}-d_6$ kullanılmıştır. Belirtilen çözücüler ile net NMR spektrumu elde edilemediği durumlarda NMR tüpü içine D_2O ilave edilmiş ve sonra spektrumlar tekrar alınmıştır.

* Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

2.2.2. Sentez İşlemlerinde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Metanol (Riedel-de Haen), etanol (Merck), 2-propanol (Riedel-de Haen), diklorometan (Sigma-Aldrich), metil 2-amino-4,5-dimetoksibenzoat (Sigma-Aldrich), *N,N*-dimetilformamid (Fluka), formamid (Sigma-Aldrich), %25'lik sodyum metoksit solüsyonu (Sigma-Aldrich), tiyonil klorür (Sigma-Aldrich), 4-aminobenzonitril (Sigma-Aldrich), 3-aminobenzonitril (Sigma-Aldrich), 4-(aminometil)benzonitril (Sigma-Aldrich), asetonitril (Riedel-de Haen), 4-floro-3-(triflorometil)anilin (Merck), 2,3,4-trikloroanilin (Sigma-Aldrich), 3-amino-2-kloropiridin (Sigma-Aldrich), petrol eteri (Merck), hidroklorik asit %37 (Riedel-de Haen), izopropilamin (Sigma-Aldrich), siklopropilamin (Sigma-Aldrich), sikloheksilamin (Sigma-Aldrich), etilendiamin (Sigma-Aldrich), kloroform (Sigma-Aldrich), amonyak (Merck), potasyum karbonat (Merck), hidroksilamin hidroklorür (Merck), potasyum *tert*-bütoksit (Sigma-Aldrich), dimetil sülfoksit (Sigma-Aldrich), toluen (Merck), hekzan (Sigma-Aldrich), etilasetat (Riedel-de Haen), aseton (Sigma-Aldrich).

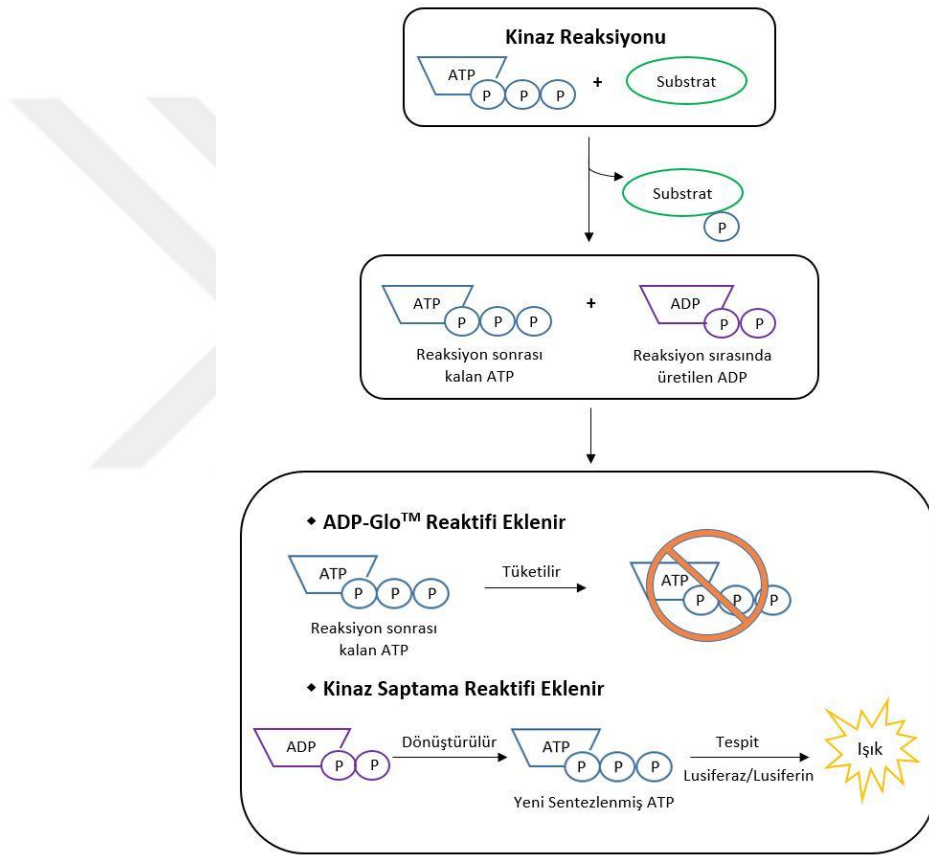
2.2.3. Sentezlenen Bileşiklerin Antikanser Aktivitelerinin Saptanması

Kinaz Enzim Sistemleri; rekombinant kinaz enzimi, enzim için uygun bir substrat, reaksiyon tamponu ve tamamlayıcı reaktifler içermektedir. ADP-Glo™ Test kiti, Kinaz Enzim Sistemi ile birlikte, kimyasal bileşiklerin kinaz aktivitesi üzerindeki etkisini gözlemlemek için uygun bir yöntem sağlamaktadır.

ADP-Glo™ Kinaz Testleri, kinaz reaksiyonu sırasında üretilen ADP miktarının ölçülerek kinaz aktivitesinin saptandığı, lüminesans bazlı ADP tespit deneyleridir. Duyarlı ve hassas bir test olan ADP-Glo™ Kinaz Testinde, yüksek saflıkta ATP ve kinaz reaksiyonu için uygun bir substrat kullanılmaktadır.

EGFR testi, EGFR Kinaz Enzim Sistemi (Promega; V3831) ve ADP-Glo™ Kinaz Test kiti (Promega; V9101) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ADP-Glo™

Kinaz Testi birkaç aşamalı olarak gerçekleştirilir. Öncelikle, kinaz reaksiyonundan sonra, kinaz reaksiyonunu sona erdirmek ve kalan ATP'yi tüketmek için ortama bir ATP tüketme reaktifi (ADP-Glo™ Reaktifi) eklenir ve geriye yalnızca ADP kalır. Sonrasında, eş zamanlı olarak ADP'yi ATP'ye dönüştürmek ve yeni sentezlenen ATP'nin lusiferaz / lusiferin reaksiyonu ile ışığa dönüştürülmesi için bir Kinaz Saptama Reaktifi eklenir. Üretilen ışık, bir lüminometre kullanılarak ölçülür. Bu lüminesans, üretilen ADP konsantrasyonu ile orantılıdır ve kinaz aktivitesi ile ilişkilidir (Promega, 2019a ve Promega, 2019b) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. ADP-Glo™ Kinaz Testi

Kullanılacak EGFR kinaz enzimi miktarı, ATP konsantrasyonu ve substrat miktarı, sentezlenen bileşiklerin inhibitör etkinliği test edilmeden önce optimize edilmiştir. 25 ng rekombine insan EGFR kinazı ve 5 µM ATP kullanılmıştır. Ortama, EGFR substratı olarak 1 µg PolyE4Y1 ve sentezlenen bileşiklerden 10 µM ilave edilmiş ve toplam hacim 25 µL olacak şekilde kinaz reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonu sonlandırmak ve kullanılmayan ATP'yi tüketmek için 25 µL ADP-Glo™

reaktifi eklenmiştir. Kinaz reaksiyonu sırasında üretilen ADP'yi ATP'ye dönüştürmek için bir Kinaz Saptama Reaktifi eklenmiştir. Yeni sentezlenmiş ATP miktarı da lusiferaz / lusiferin reaksiyonu ile belirlenmiştir.

Maksimum kinaz aktivitesinin belirlenmesi için, yalnız EGFR kinaz, PolyE4Y1, ATP, seyreltici ajan ve % 5 DMSO'nun bulunduğu reaksiyon ortamında (inhibitör eklenmeden) gerçekleşen kinaz reaksiyonundan elde edilen lüminesans ölçülmüştür. Sentezlenen bileşiklerin ve referans bileşiğin inhibe edici etkinliği, inhibitör varlığındaki enzim aktivitesi ile maksimum enzim aktivitesi karşılaştırılarak belirlenmiştir. Yüzde inhibisyon değerleri, maksimum aktivitenin lüminesansına bağlı olarak hesaplanmıştır. Deney koşullarının doğrulanması için, sentezlenen bileşiklerin inhibe edici etkinlikleri daha sonra, EGFR inhibitörü olduğu bilinen referans bileşik erlotinib ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

2.2.4. Moleküler Doking Çalışmaları

Moleküler doking çalışmaları, Schrödinger Small-Molecule Drug Discovery Suite 2021-2 (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bileşiklerin kimyasal yapıları ChemDraw 16.0 kullanılarak çizilmiştir. Ligantların hazırlanması için “LigPrep” modülü kullanılarak üç boyutlu yapıları minimize edilerek hazırlanmıştır. Alan kuvvetleri olarak OPLS4 tercih edilmiştir. İyonizasyon durumları $7,00 \pm 2,00$ pH aralığında Epik kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Protein hazırlanması, “Protein Preparation Wizard” modülü kullanılarak üç aşamada gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada, protein yapısı Protein Data Bank (PDB) veri tabanından (PDB kodu: 1M17) indirilmiş ve yapıya hidrojenler eklenmiştir. Metallerle bağ oluşturulmaması için tanımlanmış, disülfid bağlarının oluşturulması, heteroatom gruplarından 5 Å uzaklıktaki su moleküllerinin silinmesi

ve Epik kullanılarak $7,00 \pm 2,00$ pH olası durumların oluşturulması ile ön hazırlıkları yapılmıştır. İkinci aşamada, uygun zincir seçilerek su molekülleri ve ligant dışındaki diğer yapılar silinmiştir. Üçüncü aşamada, hidrojen bağı belirlenmesi ve su numunesi oryantasyonu ile PROKA 7,00 pH kullanılarak optimize edilmiştir. Sonunda OPLS4 alan kuvvetleri kullanıp minimize edilerek protein hazırlanmıştır.

Grid kutusu (ligant bağlanma bölgesi), protein ligant kompleksindeki ligant atomlarından herhangi biri aracılığıyla $20 \times 20 \times 20 \text{ \AA}^3$ boyutunda olacak şekilde “Receptor Grid Generation” modülü ile oluşturulmuştur. 1M17 için aktif bölge koordinatları kristal yapıdaki erlotinib baz alınarak x: 21,32; y: 0,51; z: 52,45 olarak belirlenmiştir.

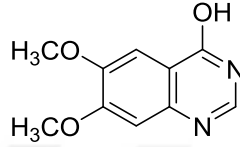
Daha önceden hazırlanan ligant, protein ve grid kutusu kullanılarak, Extra Precision (XP) algoritması ile enzimin aktif bölgesine doking işlemi gerçekleştirilmiştir. Protein yapısı sabit, ligantlar ise esnek özellikte olacak şekilde tercih edilmiştir. Tüm bileşiklerin doking skoru, glide skoru ve glide emodel skoru hesaplanmış ve iki/üç boyutlu ligant-protein etkileşimleri belirlenmiştir.

Protein ve ligant etkileşimi sonucunda oluşan enerjinin ölçümü Prime “molecular mechanics-generalized born surface area” (MMGBSA) metodu kullanılarak hesaplanmıştır. Ligantlar ve protein yapısı daha önce yapılan XP’den seçilmiştir. Solvatasyon modeli olarak VSGB ve alan kuvveti olarak OPLS4 tercih edilerek gerçekleştirilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Başlangıç Maddelerinin Sentezi

3.1.1. 6,7-Dimetoksikinazolin-4-ol (1)



Metil 2-amino-4,5-dimetoksibenzoat (2 g, 9,5 mmol) üzerine DMF (16 ml), metanol (4 ml), formamid (1,6 ml) ve %25'lik NaOCH₃ (5,6 ml) eklenerek 130°C'de 10 saat kaynatıldı. 10 saat sonunda reaksiyon sonlandırıldı ve çözelti üzerine önce soğuk su, ardından nötralleşene kadar 1N HCl çözeltisi eklendi. Çöken madde süzüldü (Bridges ve ark., 1996 ve Furuta ve ark., 2006). Sonuçta % 88 verimle 1,72 g beyaz renkli ürün elde edildi.

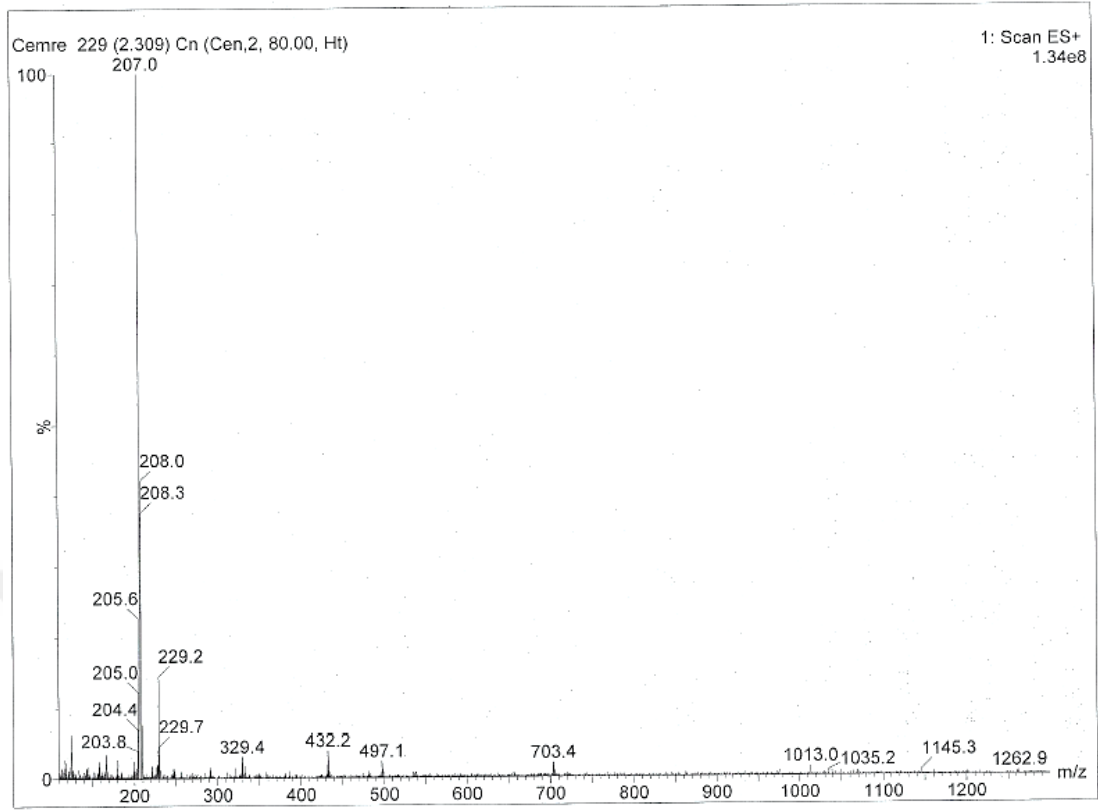
Erime noktası: 293-295°C (295,5-297°C, Sun ve ark., 2018).

Kütle m/z (ESI+): 207 [M+H] (%100) (Molekül formülü: C₁₀H₁₀N₂O₃).

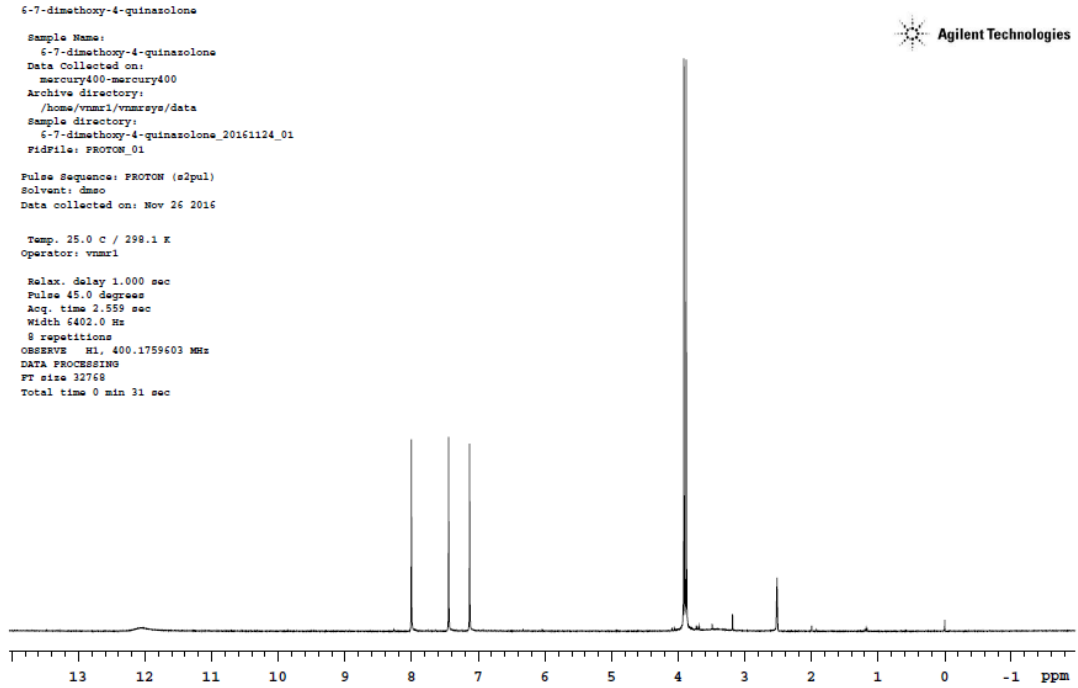
¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm : 3,88 (s, 3H, 6-OCH₃); 3,91 (s, 3H, 7-OCH₃); 7,13 (s, 1H, H-8); 7,44 (s, 1H, H-5); 8,00 (s, 1H, H-2); 12,03 (brs, 1H).

NOESY (DMSO-*d*₆) δ ppm : [6-OCH₃ : H-5], [7-OCH₃ : H-8].

¹³C-NMR ve HSQC (DMSO-*d*₆) δ ppm : 160,05; 154,42; 148,52; 144,75; 143,84 (CH-2); 115,57; 107,92 (CH-8); 104,89 (CH-5); 55,89 (-OCH₃); 55,66 (-OCH₃).



Şekil 3.1. Bileşik 1'in Kütle Spektrumu



Şekil 3.2. Bileşik 1'in ¹H-NMR Spektrumu

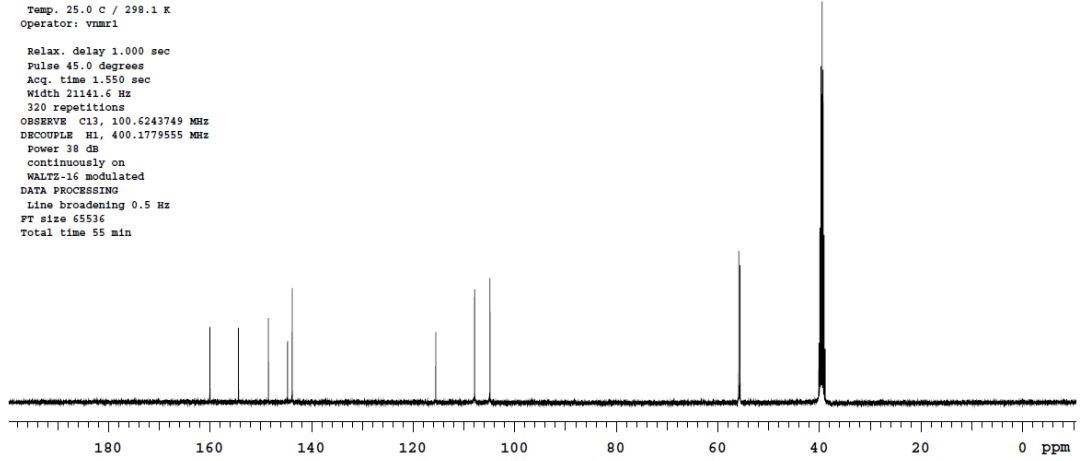
6-7-dimethoxy-4-quinazalone

Sample Name:
6-7-dimethoxy-4-quinazalone
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
6-7-dimethoxy-4-quinazalone_20161124_01
FidFile: current

Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Nov 26 2016

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.550 sec
Width 21141.6 Hz
320 repetitions
OBSERVE C13, 100.6243749 MHz
DECOUPLE H1, 400.1779555 MHz
Power 38 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 55 min



Şekil 3.3. Bileşik 1'in ^{13}C -NMR Spektrumu

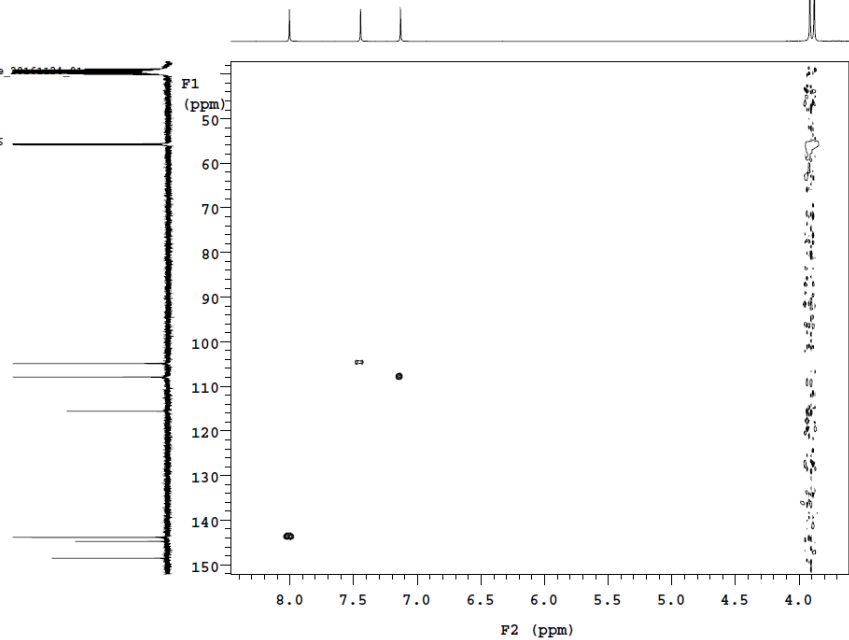
6-7-dimethoxy-4-quinazalone

Sample Name:
6-7-dimethoxy-4-quinazalone
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
6-7-dimethoxy-4-quinazalone_20161124_01
FidFile: ghsqc_01

Pulse Sequence: ghsqc
Solvent: dmsc
Data collected on: Nov 26 2016

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 6402.0 Hz
2D Width 19115.9 Hz
8 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE H1, 400.1759594 MHz
DECOUPLE C13, 100.6328828 MHz
Power 41 dB
on during acquisition
off during delay
GARP-1 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.069 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.006 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 43 min



Şekil 3.4. Bileşik 1'in HSQC Spektrumu

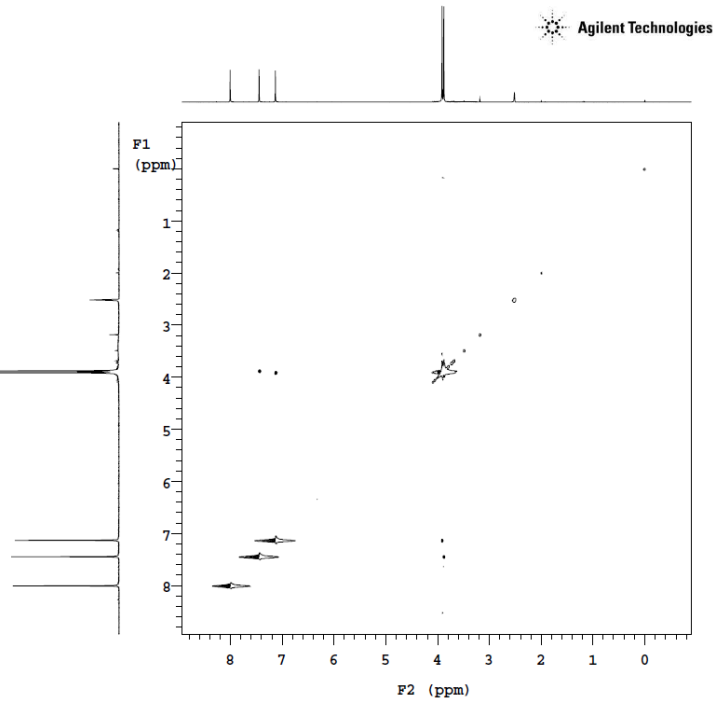
6-7-dimethoxy-4-quinazoline

Sample Name:
6-7-dimethoxy-4-quinazoline
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
6-7-dimethoxy-4-quinazoline_20161124_01
Fidfile: NOESY_01

Pulse Sequence: NOESY
Solvent: dms
Data collected on: Nov 26 2016

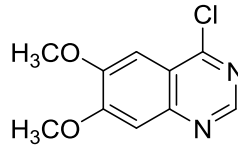
Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 3935.5 Hz
2D Width 3935.5 Hz
8 repetitions
2 x 200 increments
OBSERVE R1, 400.1759603 MHz
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.069 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.047 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 1 hr, 18 min



Şekil 3.5. Bileşik 1'in NOESY Spektrumu

3.1.2. 4-Kloro-6,7-dimetoksikinazolin (2)



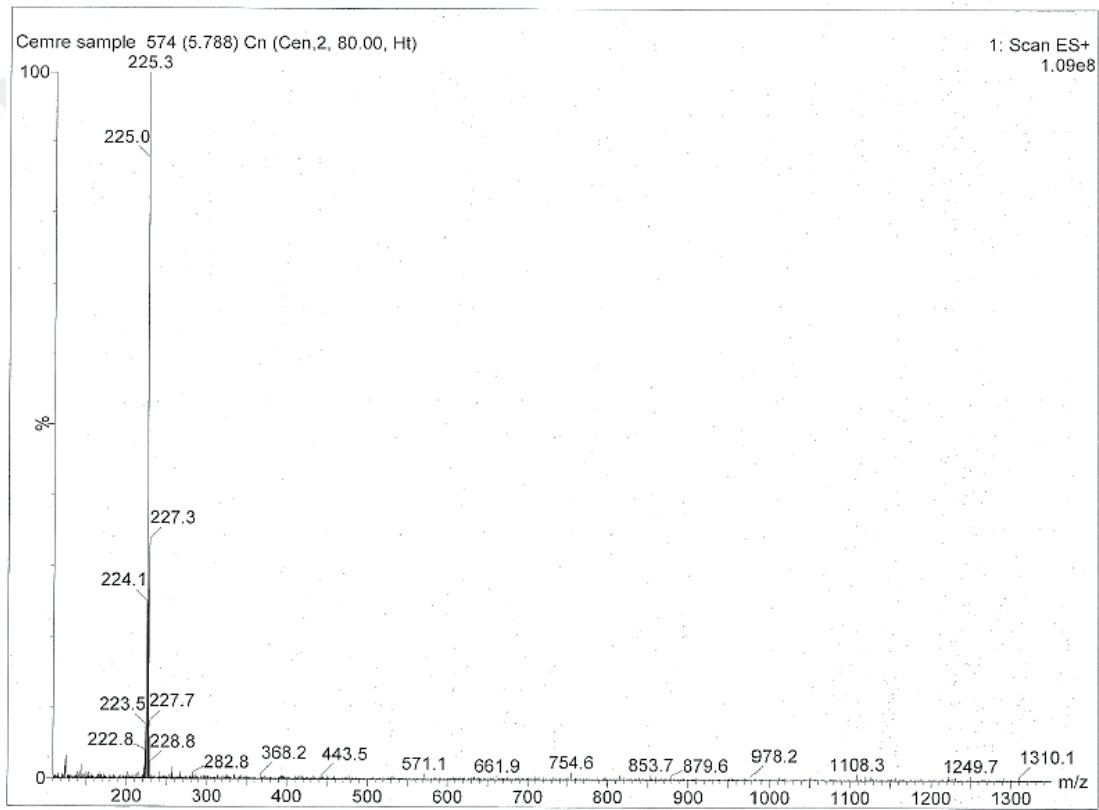
6,7-Dimetoksikinazolin-4-ol (**1**) (1,8 g, 8,7 mmol) üzerine tiyonil klorür (10 ml) ve DMF (0,2 ml) eklenerek 80°C'de 4 saat karıştırıldı. Reaksiyon bitiminde rotavapor yardımıyla SOCl₂ uçuruldu. Elde edilen katı madde, potasyum karbonat çözeltisi ile bazık hale getirildi. Süzüldü ve su ile yıkandı (Boyer ve ark., 2009). Ardından madde kurutuldu ve toluen ile kristalizasyon yapıldı. Sonuçta % 70 verimle 1,36 g sarımsı renkli ürün elde edildi.

Erime noktası: 187-188°C (186-188°C, Tran ve ark., 2013).

Kütle m/z (ESI+): 225,3 [M+H] (%100); 227,3 [M+H+2] (%33) (Molekül formülü: C₁₀H₉N₂O₂Cl).

¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm : 4,05 (s, 3H, -OCH₃); 4,06 (s, 3H, -OCH₃); 7,32 (s, 1H, H-5 veya H-8); 7,37 (s, 1H, H-5 veya H-8); 8,85 (s, 1H, H-2).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ ppm : 159,04; 156,76; 152,46; 151,43; 149,02; 119,54; 106,86; 102,64; 56,61 (-OCH₃); 56,42 (-OCH₃).



Şekil 3.6. Bileşik 2'nin Kütle Spektrumu

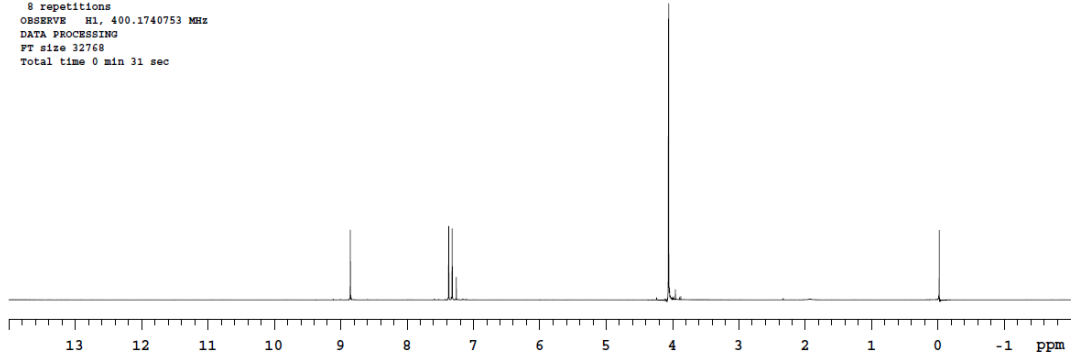
4-Chloro-6-7-diMeOquinazoline-Base



Sample Name:
4-Chloro-6-7-diMeOquinazoline-Base
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
4-Chloro-6-7-diMeOquinazoline-Base_20170409_01
FidFile: PROTON_01

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: cdcl3
Data collected on: Apr 9 2017

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.559 sec
Width 6402.0 Hz
8 repetitions
OBSERVE H1, 400.1740753 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min 31 sec



Şekil 3.7. Bileşik 2'nin ^1H -NMR Spektrumu

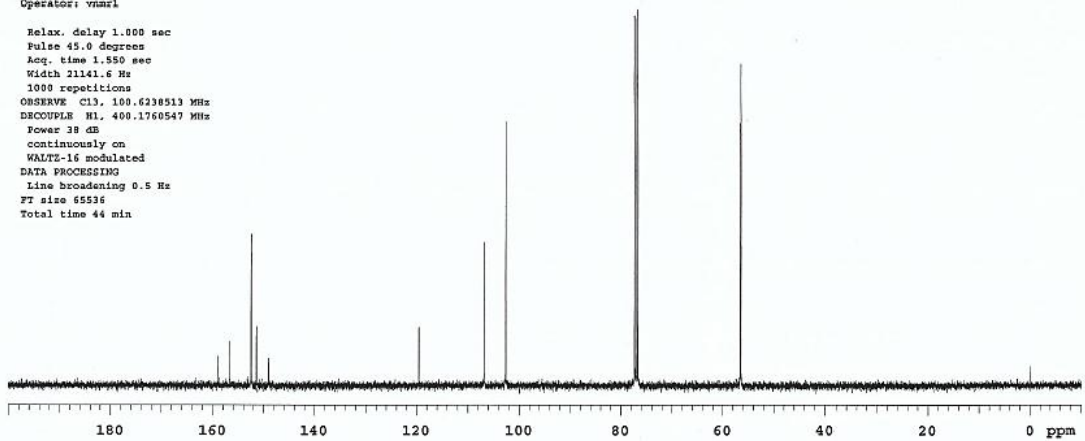
4-Chloro-6-7-diMeOquinazoline-Base



Sample Name:
4-Chloro-6-7-diMeOquinazoline-Base
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
4-Chloro-6-7-diMeOquinazoline-Base_20170409_01
FidFile: CARBON_01

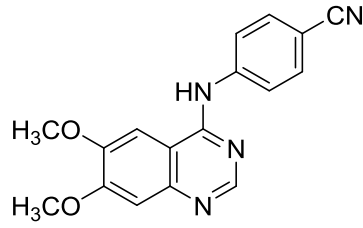
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: cdcl3
Data collected on: Apr 9 2017

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.550 sec
Width 21141.6 Hz
1000 repetitions
OBSERVE C13, 100.6238513 MHz
DECOUPLE H1, 400.1760547 MHz
Power 38 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 44 min



Şekil 3.8. Bileşik 2'nin ^{13}C -NMR Spektrumu

3.1.3. 4-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]benzonitril (3a)



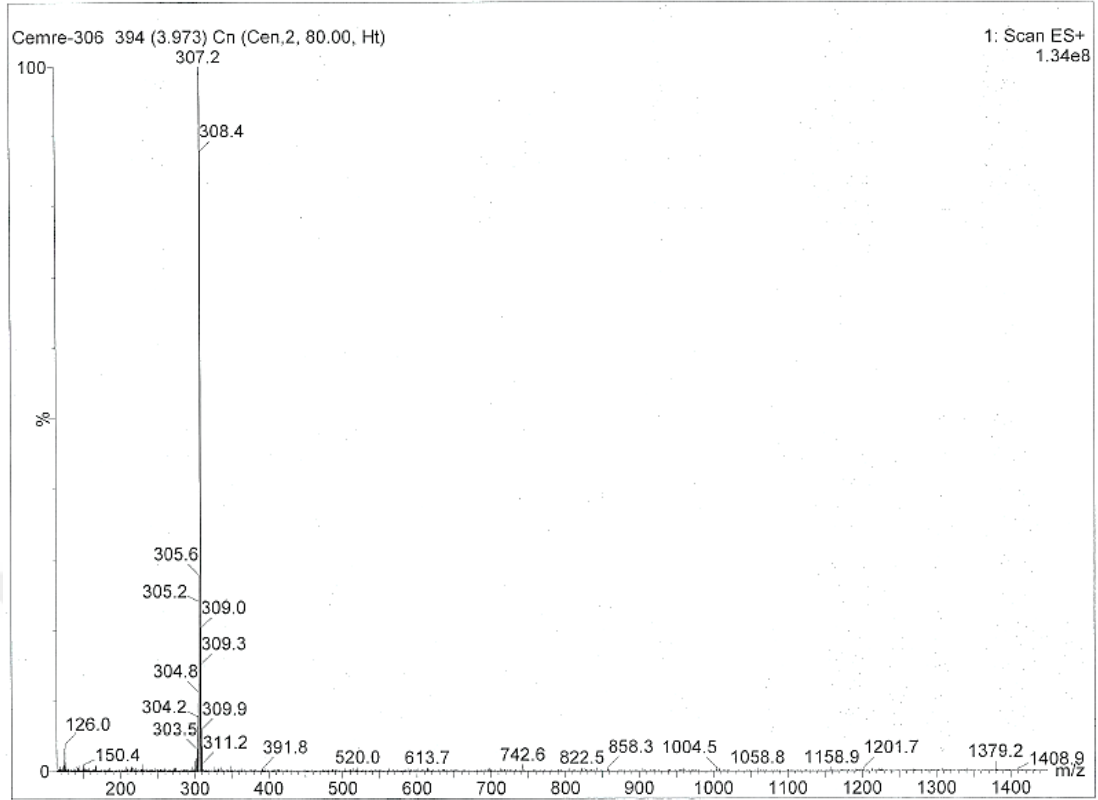
4-Kloro-6,7-dimetoksikinazolin (2) (200 mg, 0,89 mmol) 2-propanol içerisinde çözüldü. 4-aminobenzonitril (210 mg, 1,8 mmol) eklenerek 80°C’de karıştırıldı. Reaksiyon, İTK ile (hekzan:etil asetat 1:1) solvan sistemi kullanılarak takip edildi. Reaksiyon sonlandığında solvanı uçuruldu. Elde edilen katı madde, potasyum karbonat çözeltisi ile bazik hale getirildi. Süzüldü ve su ile yıkandı (Yang ve ark., 2011). % 69 verimle 188 mg ürün elde edildi.

Erime noktası: >300°C

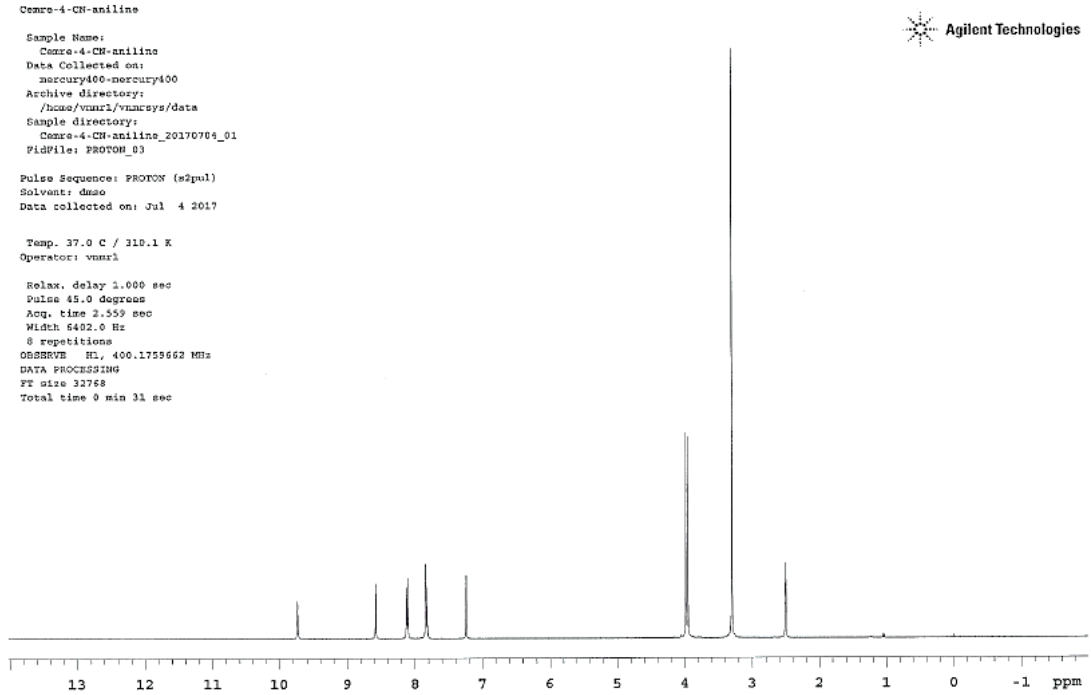
Kütle m/z (ESI+): 307,2 [M+H] (%100) (Molekül formülü: C₁₇H₁₄N₄O₂).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm : 3,95 (s, 3H, -OCH₃); 3,98 (s, 3H, -OCH₃); 7,24 (s, 1H, H-8); 7,84 (d, 3H, *J*=8Hz, H-2’,6’ ve H-5); 8,11 (d, 2H, *J*=8,8Hz, H-3’,5’); 8,58 (s, 1H, H-2); 9,79 (s, 1H, -NH).

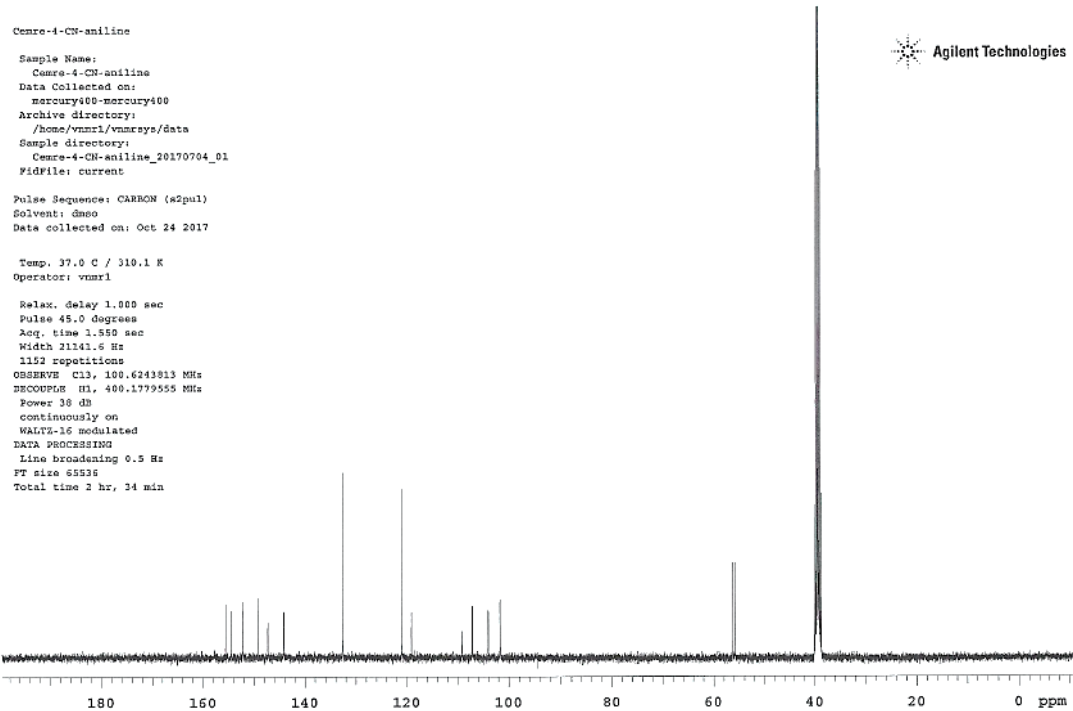
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm : 155,67; 154,63; 152,31; 149,20; 147,34; 144,15; 132,71; 121,14; 119,21; 109,21; 107,17; 104,12; 101,76; 56,23 (-OCH₃); 55,85 (-OCH₃).



Şekil 3.9. Bileşik 3a'nın Kütle Spektrumu

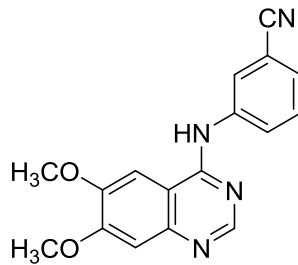


Şekil 3.10. Bileşik 3a'nın ¹H-NMR Spektrumu



Şekil 3.11. Bileşik 3a'nın ^{13}C -NMR Spektrumu

3.1.4. 3-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]benzonitril (3b)



4-Kloro-6,7-dimetoksikinazolin (2) (200 mg, 0,89 mmol) 2-propanol içerisinde çözüldü. 3-aminobenzonitril (105 mg, 0,89 mmol) eklenerek 80°C'de karıştırıldı. Reaksiyon, İTK ile (hekzan:etil asetat 1:1) solvan sistemi kullanılarak takip edildi. Reaksiyon sonlandığında solvanı uçuruldu. Elde edilen katı madde, potasyum karbonat çözeltisi ile bazik hale getirildi. Süzüldü ve su ile yıkandı. % 78 verimle 213 mg ürün elde edildi.

Erime noktası: 283-285°C

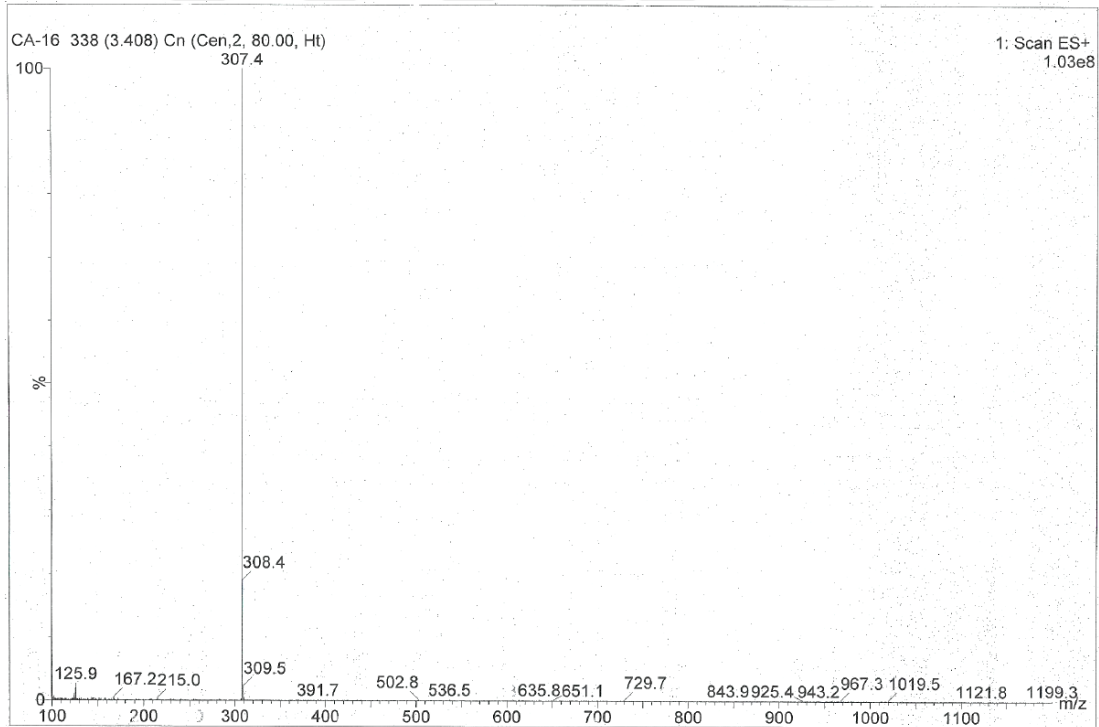
Kütle m/z (ESI+): 307,4 [M+H] (%100) (Molekül formülü: C₁₇H₁₄N₄O₂).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm : 3,93 (s, 3H, 7-OCH₃); 3,96 (s, 3H, 6-OCH₃); 7,19 (s, 1H, H-8); 7,52 (d, 1H, *J*=7,6Hz, H-4' veya H-6'); 7,58 (t, 1H, *J*=8Hz, H-5'); 7,78 (s, 1H, H-5); 8,13 (d, 1H, *J*=9,2Hz, H-4' veya H-6'); 8,35 (t, 1H, *J*=1,6Hz, H-2'); 8,53 (s, 1H, H-2); 9,62 (s, 1H, -NH).

COSY (DMSO-*d*₆) δ ppm : [H-5' : H-4'], [H-5' : H-6'].

NOESY (DMSO-*d*₆) δ ppm : [H-5 : -NH], [H-5 : 6-OCH₃], [H-8 : 7-OCH₃].

¹³C-NMR ve HSQC (DMSO-*d*₆) δ ppm : 155,86; 154,44; 152,49 (CH-2); 149,06; 147,15; 140,53; 129,79 (CH-5'); 126,29; 126,17; 124,43 (CH-2'); 118,87; 111,22; 108,87; 107,19 (CH-8); 101,59 (CH-5); 56,19 (-OCH₃); 55,81 (-OCH₃).



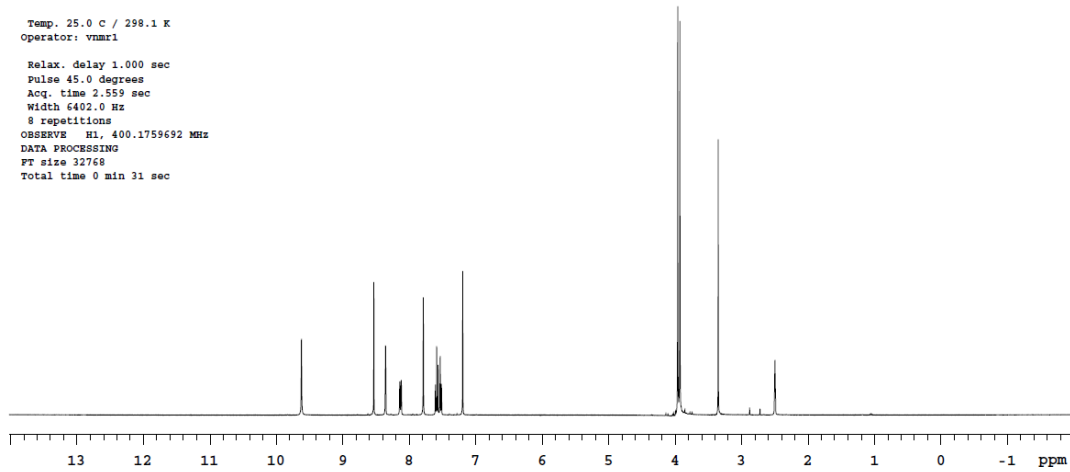
Şekil 3.12. Bileşik 3b'nin Kütle Spektrumu

CA-16_3CN



Sample Name:
CA-16_3CN
Data collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
CA-16_3CN_20180411_01
FidFile: PROTON_01
Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Apr 11 2018

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.559 sec
Width 6402.0 Hz
8 repetitions
OBSERVE H1, 400.1759692 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min 31 sec



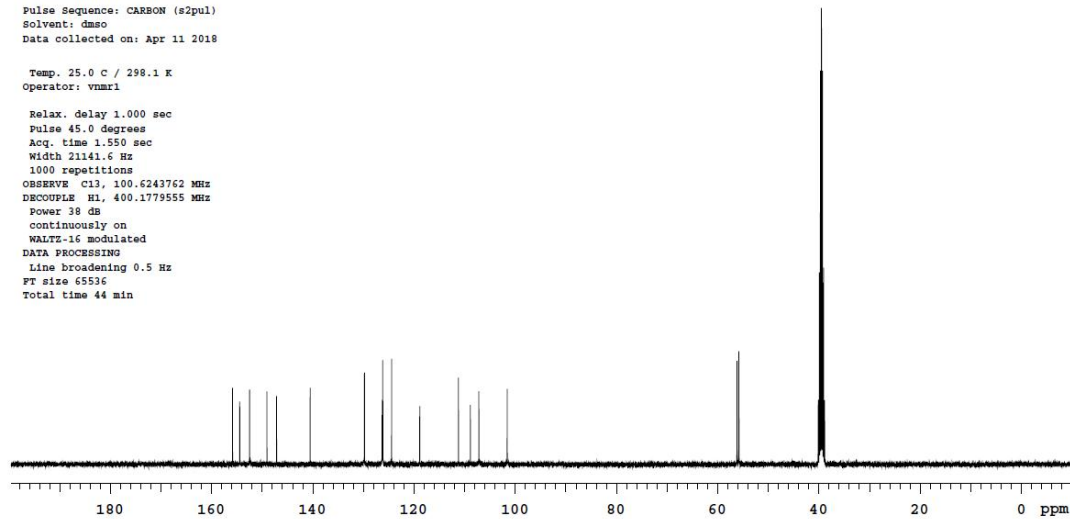
Şekil 3.13. Bileşik 3b'nin ¹H-NMR Spektrumu

CA-16_3CN

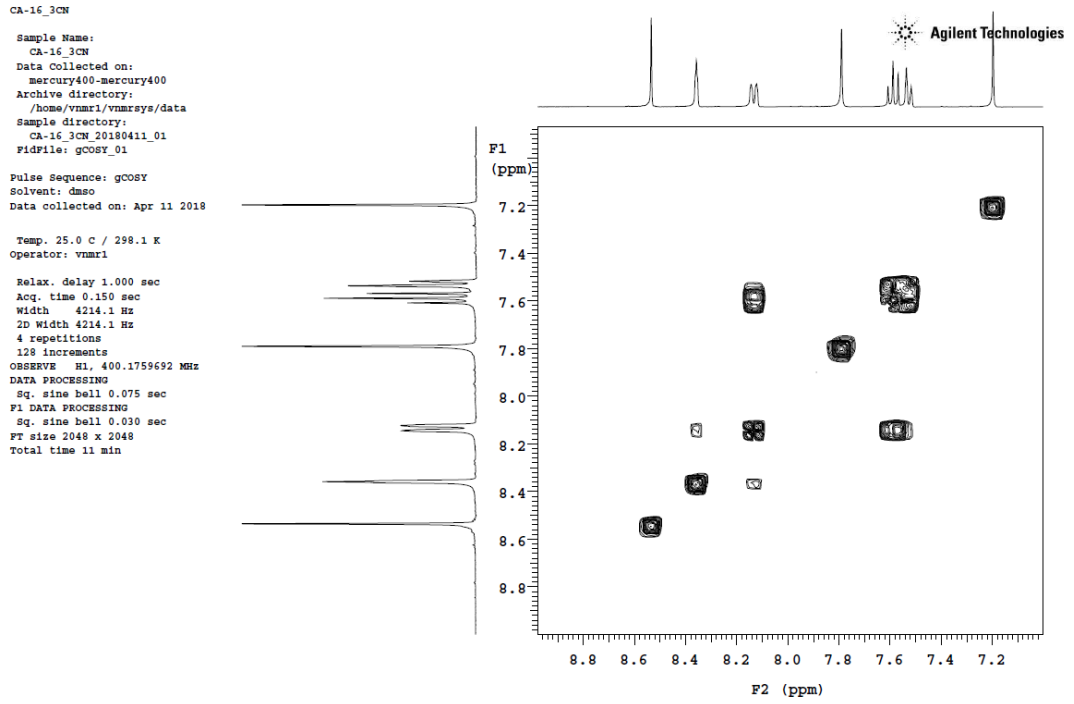


Sample Name:
CA-16_3CN
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
CA-16_3CN_20180411_01
FidFile: CARBON_01
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Apr 11 2018

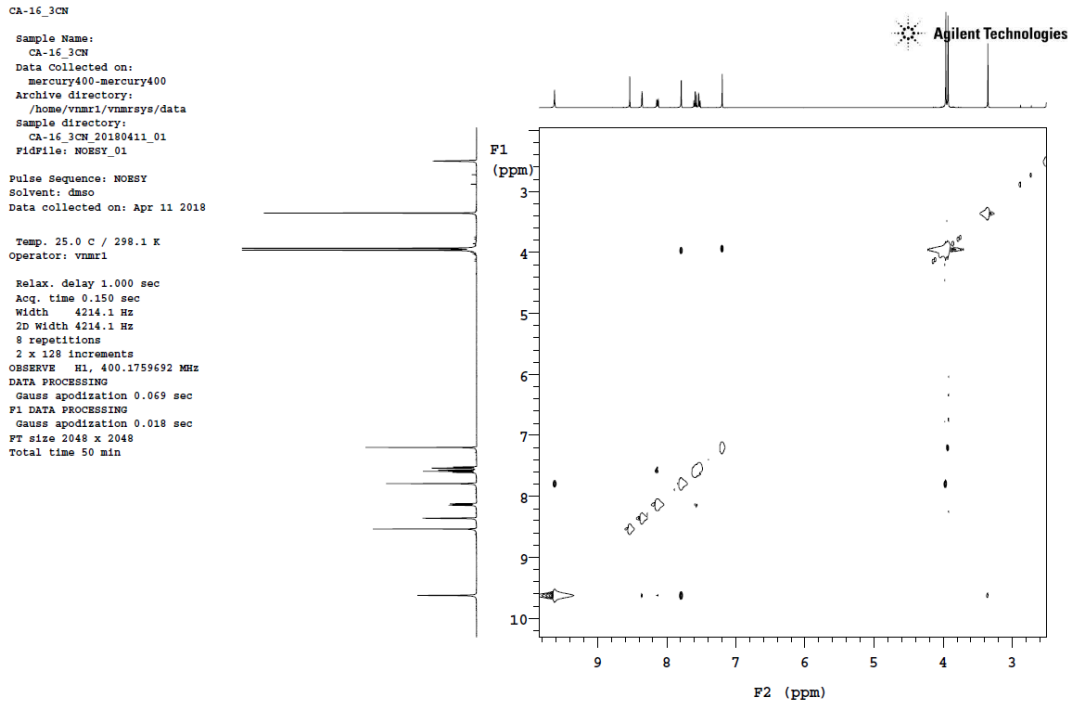
Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.550 sec
Width 21141.6 Hz
1000 repetitions
OBSERVE C13, 100.6243762 MHz
DECOUPLE H1, 400.1779555 MHz
Power 38 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 44 min



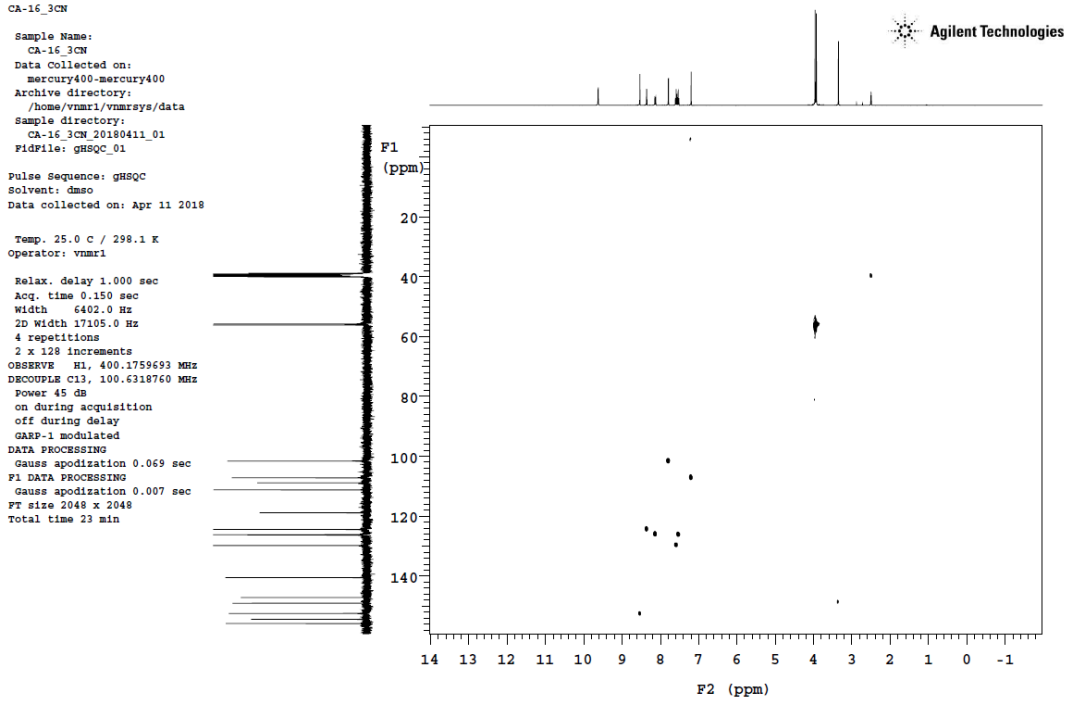
Şekil 3.14. Bileşik 3b'nin ¹³C-NMR Spektrumu



Şekil 3.15. Bileşik 3b'nin COSY Spektrumu

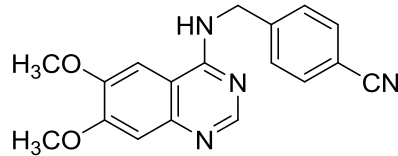


Şekil 3.16. Bileşik 3b'nin NOESY Spektrumu



Şekil 3.17. Bileşik 3b'nin HSQC Spektrumu

3.1.5. 4-[[6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]metil]benzonitril (3c)



Ticari olarak satın alınmış 4-(aminometil)benzonitril hidroklorür maddesi öncelikle potasyum karbonat çözeltisiyle karıştırılarak bazik hale getirildi. Ardından çözeltinin suyu uçuruldu ve madde, etanol ilavesiyle çözöldü. Çözelti süzöldü ve süzöntü uçurularak 4-(aminometil)benzonitril elde edildi.

4-Kloro-6,7-dimetoksikinazolin (2) (583 mg, 2,6 mmol) ve 4-(aminometil)benzonitril (344 mg, 2,6 mmol) asetonitril (12 ml) içerisinde 80°C'de karıştırıldı. Reaksiyon, İTK ile CH₂Cl₂ : MeOH (10:0,4) solvan sistemi kullanılarak takip edildi. Solvanı uçuruldu ve elde edilen katı madde, potasyum karbonat çözeltisi ile bazik hale getirildi. Süzöldü ve su ile yıkandı. CH₂Cl₂ : MeOH (10:0,4) solvan

sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. % 39 verimle 324 mg ürün elde edildi.

Erime noktası: 117-120°C

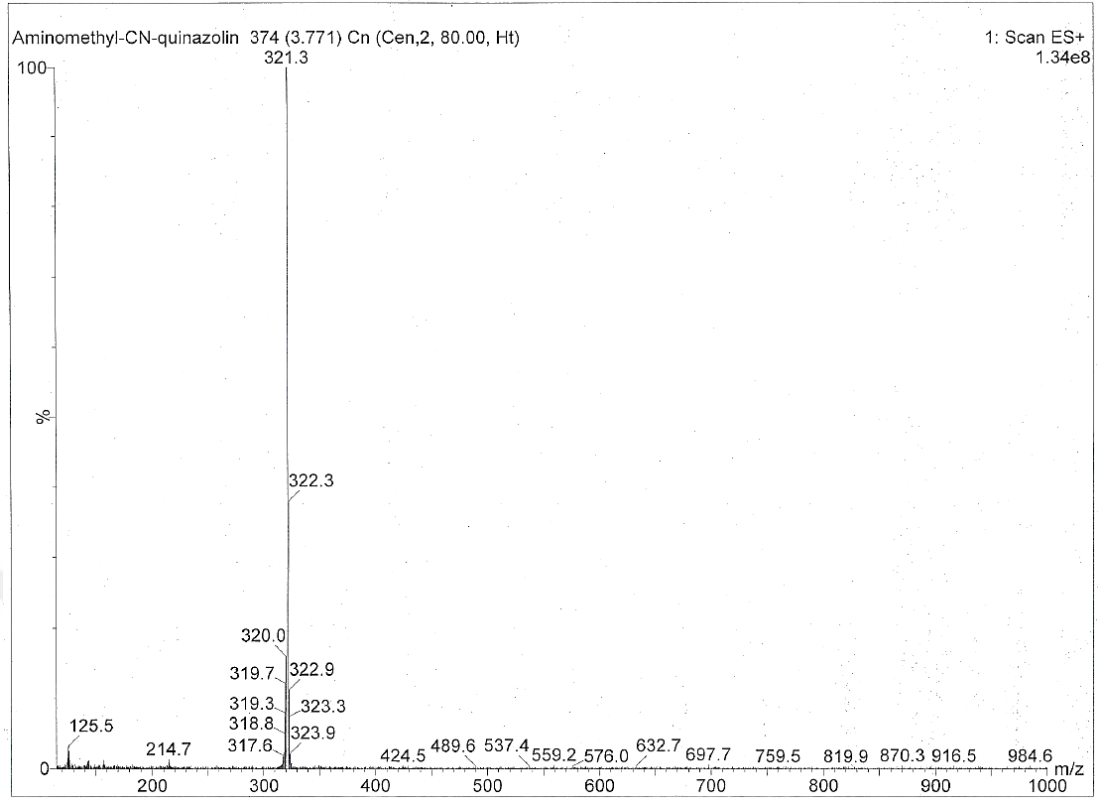
Kütle m/z (ESI+): 321,3 [M+H] (%100) (Molekül formülü: C₁₈H₁₆N₄O₂).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm : 3,90 (s, 6H, -OCH₃ x2); 4,85 (d, 2H, *J*=6Hz, -CH₂); 7,12 (s, 1H, H-8); 7,54 (d, 2H, *J*=8,4Hz, H-2',6'); 7,67 (s, 1H, H-5); 7,78 (d, 2H, *J*=8,4Hz, H-3',5'); 8,30 (s, 1H, H-2); 8,57 (t, 1H, *J*=6Hz, -NH).

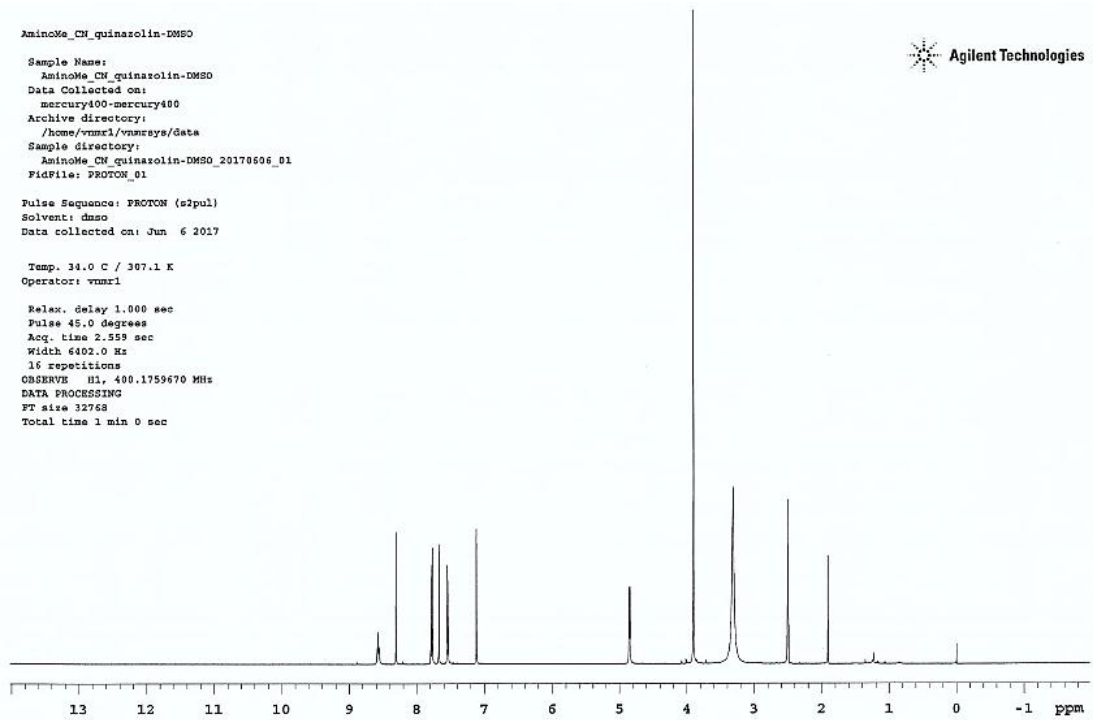
COSY (DMSO-*d*₆) δ ppm : [H-2',6' : H-3',5'].

ROESY (DMSO-*d*₆) δ ppm : [-CH₂ : H-2',6'], [H-5 : -NH].

¹³C-NMR, HSQC ve HMBC (DMSO-*d*₆) δ ppm : 158,10 (C-4); 153,88 (C-6 veya C-7); 153,29 (CH-2); 148,44 (C-6 veya C-7); 146,07 (C-8a); 145,90 (C-1'); 132,16 (CH-3',5'); 127,91 (CH-2',6'); 118,82 (-CN); 109,37 (C-4'); 108,37 (C-4a); 107,03 (CH-8); 101,81 (CH-5); 55,94 (-OCH₃); 55,64 (-OCH₃); 43,23 (-CH₂).



Şekil 3.18. Bileşik 3c'nin Kütle Spektrumu



Şekil 3.19. Bileşik 3c'nin ¹H-NMR Spektrumu

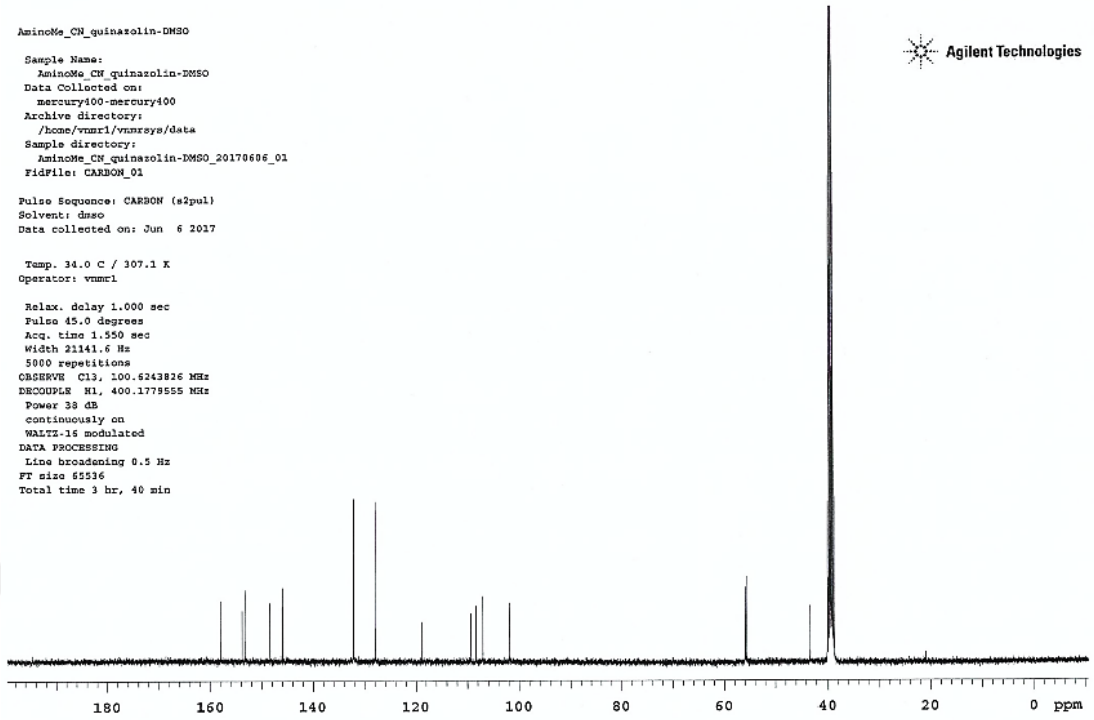
AminoMe_CN_quinazolin-DMSO

Sample Name:
AminoMe_CN_quinazolin-DMSO
Data Collected on:
Mercury400-Mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
AminoMe_CN_quinazolin-DMSO_20170606_01
FidFile: CARBON_01

Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Jun 6 2017

Temp. 34.0 C / 307.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.550 sec
Width 21141.6 Hz
5000 repetitions
OBSERVE C13, 100.6243826 MHz
DECOUPLE H1, 400.1779555 MHz
Power 33 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 3 hr, 40 min



Şekil 3.20. Bileşik 3c'nin ^{13}C -NMR Spektrumu

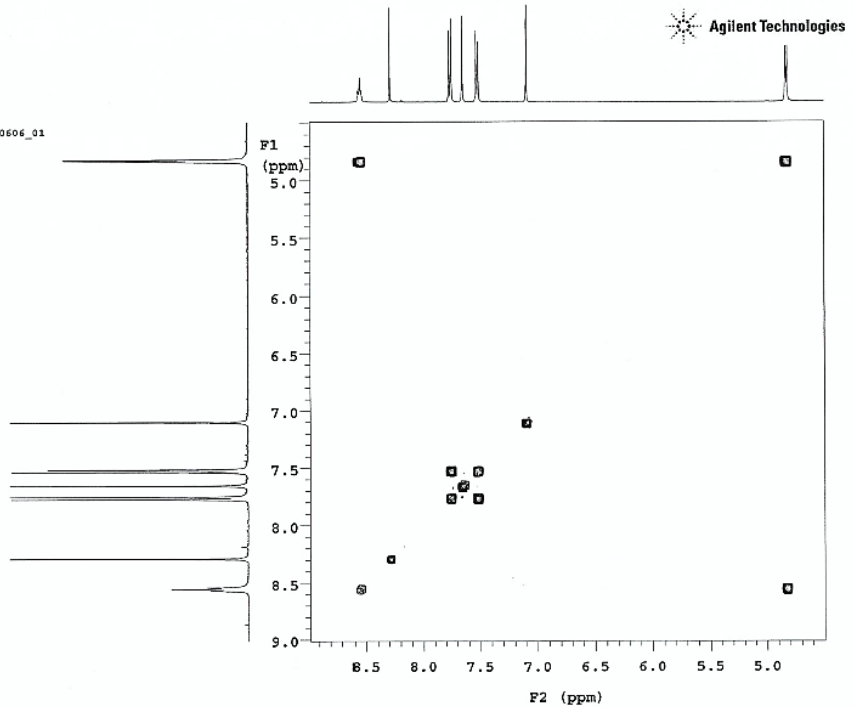
AminoMe_CN_quinazolin-DMSO

Sample Name:
AminoMe_CN_quinazolin-DMSO
Data Collected on:
Mercury400-Mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
AminoMe_CN_quinazolin-DMSO_20170606_01
FidFile: gCOSY_01

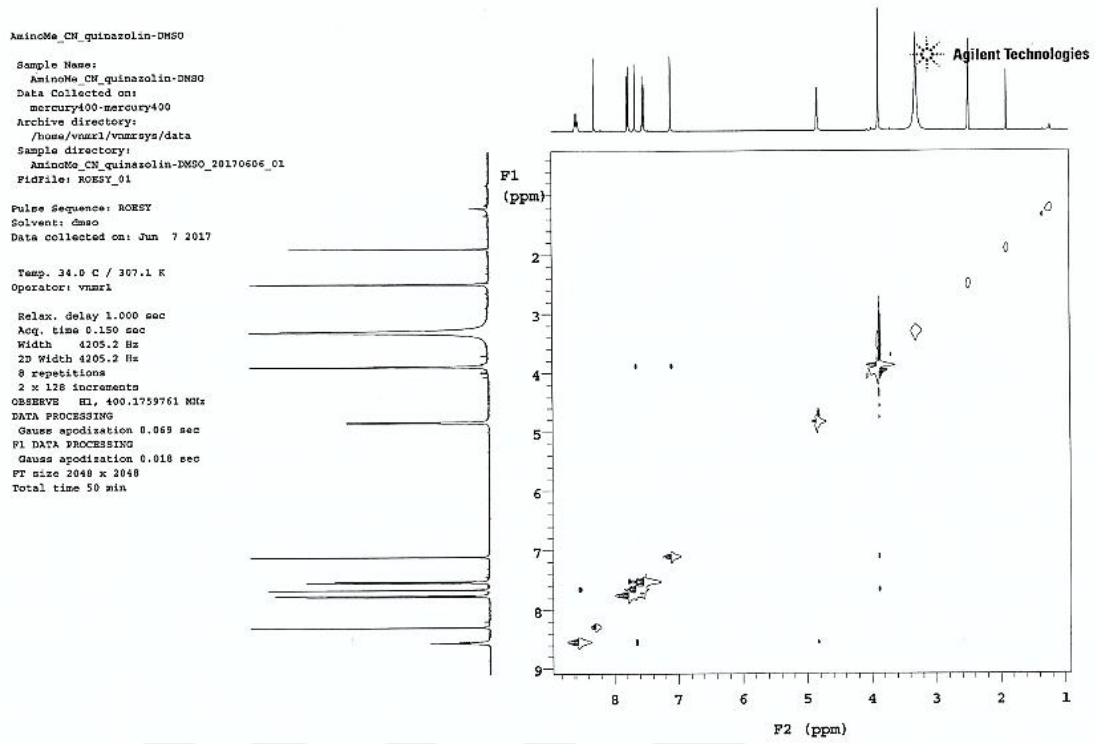
Pulse Sequence: gCOSY
Solvent: dmsd
Data collected on: Jun 6 2017

Temp. 34.0 C / 307.1 K
Operator: vnmr1

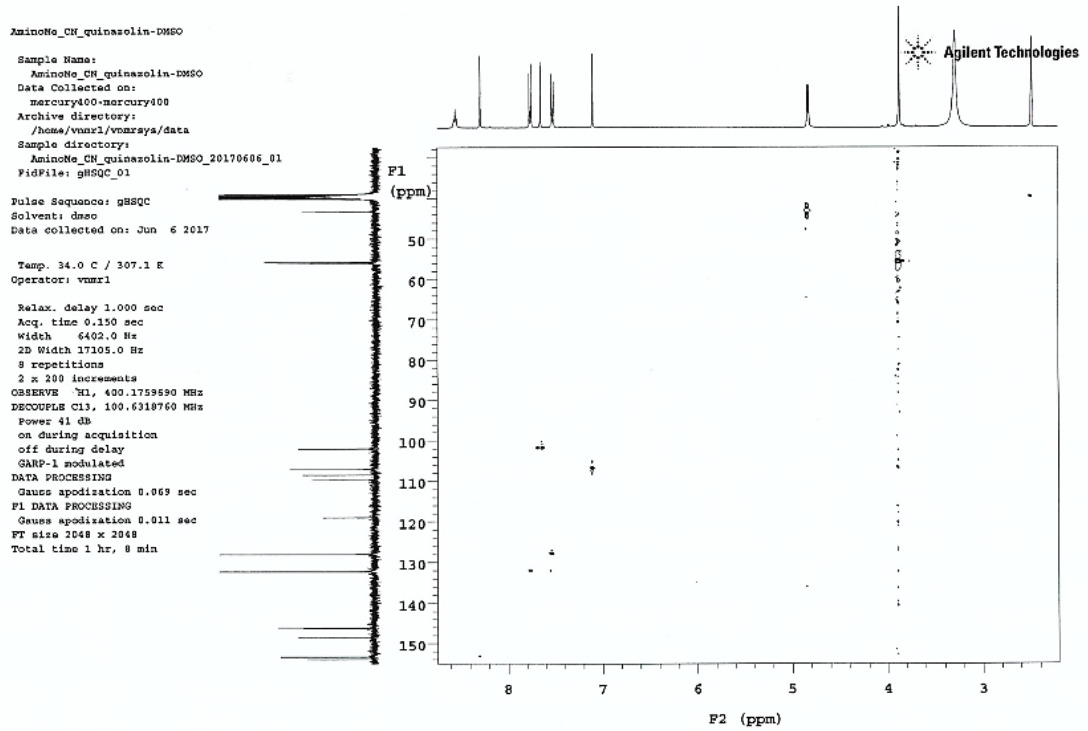
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 4210.5 Hz
2D Width 4210.5 Hz
4 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.075 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.030 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 11 min



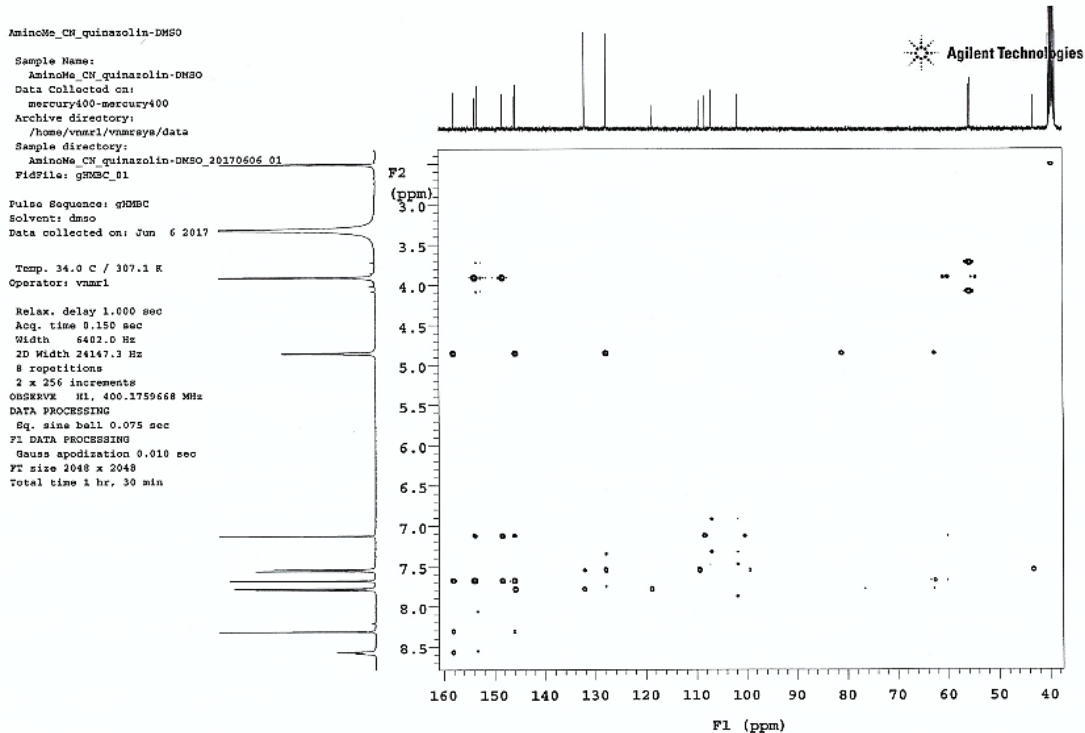
Şekil 3.21. Bileşik 3c'nin COSY Spektrumu



Şekil 3.22. Bileşik 3c'nin ROESY Spektrumu



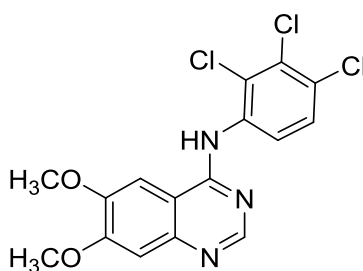
Şekil 3.23. Bileşik 3c'nin HSQC Spektrumu



Şekil 3.24. Bileşik 3c'nin HMBC Spektrumu

3.2. 4, 5, 6 Kodlu Sonuç Bileşiklerinin Sentez Yöntemi

3.2.1. 6,7-Dimetoksi-N-(2,3,4-triklorofenil)kinazolin-4-amin (4)



4-Kloro-6,7-dimetoksikinazolin (2) (225 mg, 1 mmol) 2,3,4-trikloroanilin (196 mg, 1 mmol) 2-propanol (5 ml) içerisinde 80°C'de karıştırıldı. Reaksiyon sonlandığında çözelti süzüldü ve potasyum karbonat çözeltisi ile karıştırılıp süzüldü. Diklorometan ile kristallendirildi. % 47 verimle 180 mg ürün elde edildi.

Erime noktası: 253-255°C

Elementel Analiz: C₁₆H₁₂Cl₃N₃O₂

Hesaplanan : %C: 49,96 %H: 3,14 %N: 10,92

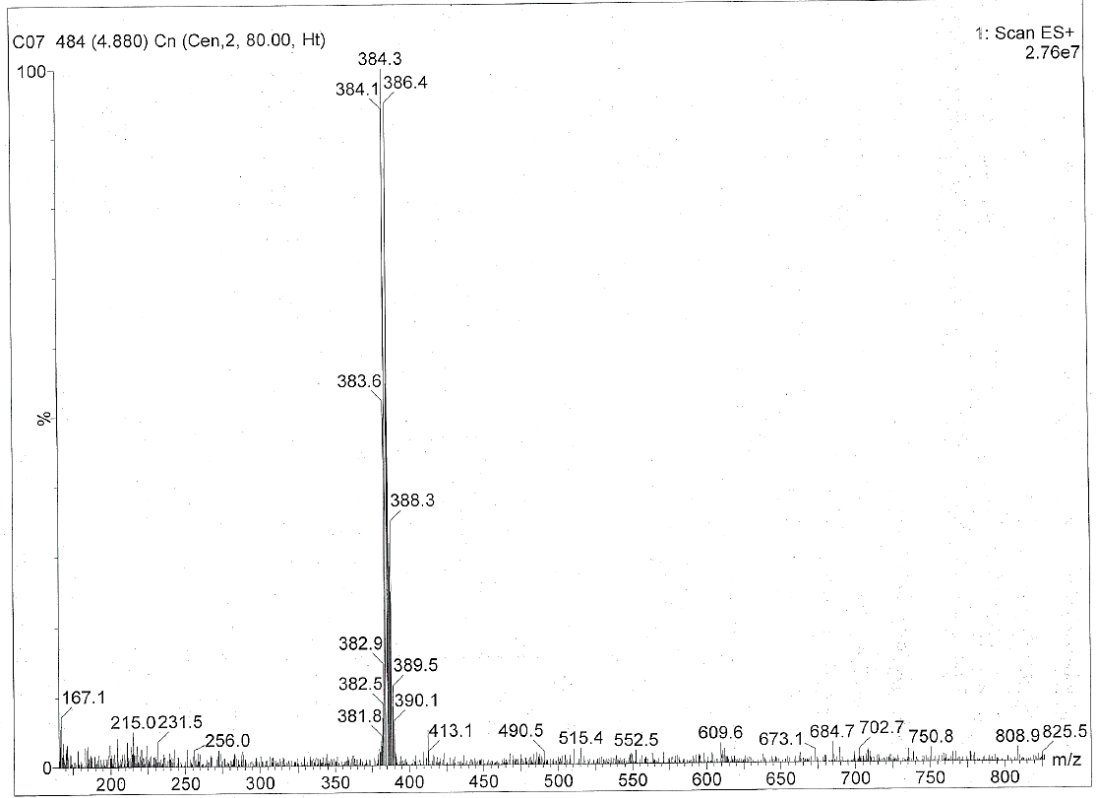
Bulunan : %C: 49,65 %H: 3,13 %N: 10,90

Kütle m/z (ESI+): 384,3 [M+H] (%100); 386,4 [M+H+2] (%98); 388,3 [M+H+4] (%33); 390,1 [M+H+6] (%4).

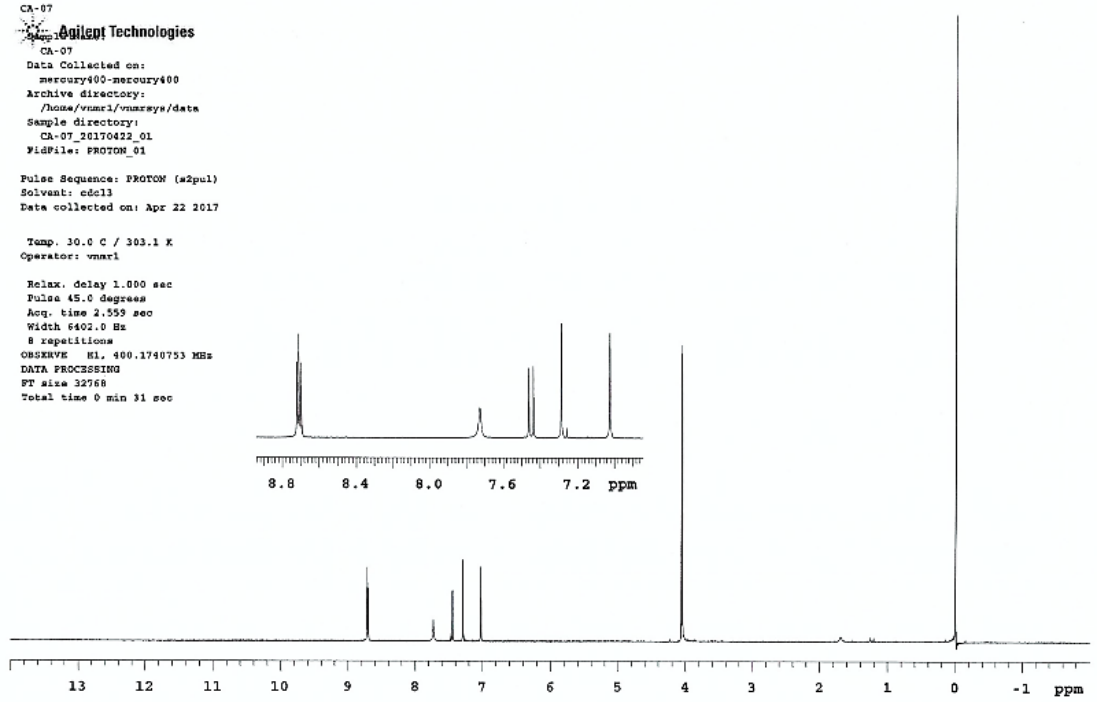
¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm : 4,04 (s, 3H, 7-OCH₃); 4,05 (s, 3H, 6-OCH₃); 7,02 (s, 1H, H-5); 7,28 (s, 1H, H-8); 7,45 (d, 1H, J=9,2Hz, fenil protonu); 7,72 (brs, 1H, -NH); 8,69-8,71 (m, 2H, H-2 ve fenil protonu).

NOESY (CDCl₃) δ ppm : [H-5 : -NH], [6-OCH₃ : H-5], [7-OCH₃ : H-8].

¹³C-NMR (CDCl₃) δ ppm : 155,21; 155,20; 153,02; 150,14; 147,82; 135,72; 131,34; 128,41; 127,41; 123,16; 120,31; 109,47; 108,14; 98,39; 56,33 (-OCH₃); 56,22 (-OCH₃).



Şekil 3.25. Bileşik 4'ün Kütle Spektrumu



Şekil 3.26. Bileşik 4'ün ¹H-NMR Spektrumu

CA-07

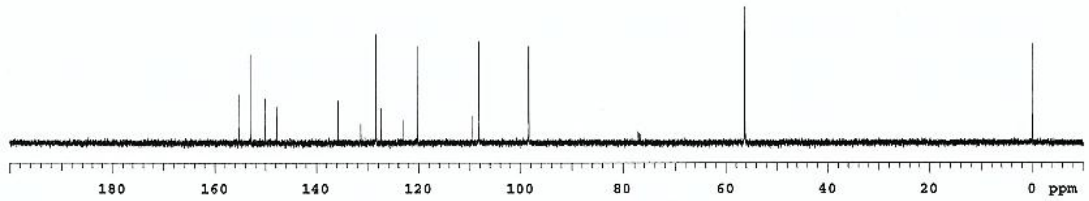


Sample Name:
CA-07
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
CA-07_20170422_01
FidFile: CARBON_01

Pulse Sequence: CARBON (w2pul)
Solvent: cdcl3
Data collected on: Apr 22 2017

Temp. 30.0 C / 303.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.550 sec
Width 21341.6 Hz
1512 repetitions
OBSERVE CH 100.6218513 MHz
DECOUPLE H1, 400.1760547 MHz
Power 38 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 55536
Total time 1 hr, 6 min



Şekil 3.27. Bileşik 4'ün ^{13}C -NMR Spektrumu

CA-07

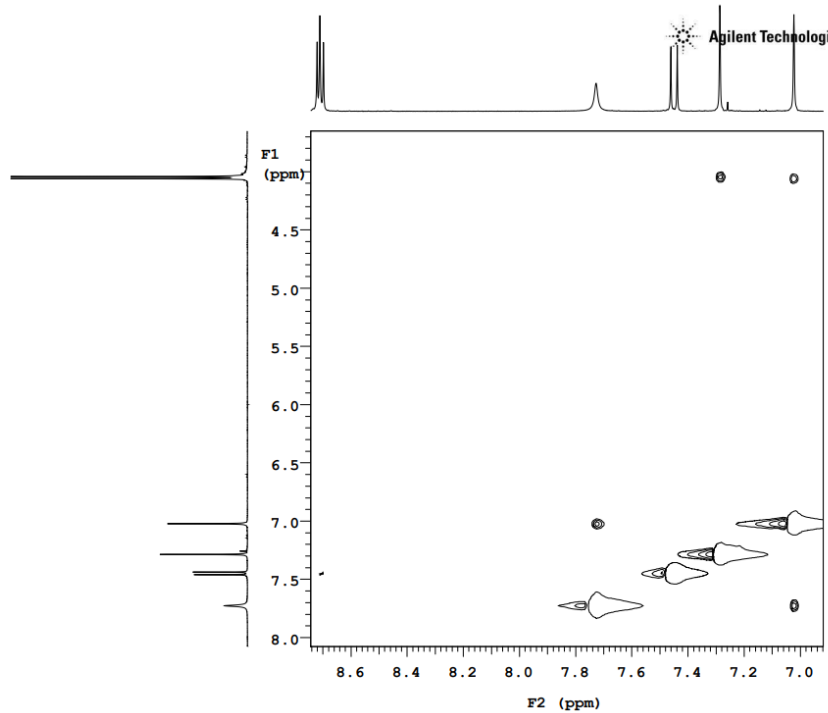


Sample Name:
CA-07
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
CA-07_20170422_01
FidFile: NOESY_01

Pulse Sequence: NOESY
Solvent: cdcl3
Data collected on: Apr 22 2017

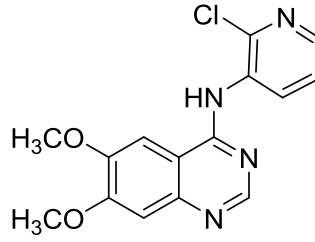
Temp. 30.0 C / 303.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 4344.0 Hz
2D Width 4344.0 Hz
8 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE H1, 400.1740753 MHz
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.069 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.018 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 50 min



Şekil 3.28. Bileşik 4'ün NOESY Spektrumu

3.2.2. N-(2-Kloropiridin-3-il)-6,7-dimetoksikinazolin-4-amin (5)



4-Kloro-6,7-dimetoksikinazolin (2) (187 mg, 0,83 mmol) 3-amino-2-kloropiridin (107 mg, 0,83 mmol) 2-propanol (5 ml) içerisinde 80°C’de karıştırıldı. Reaksiyon sonlandığında çözelti süzüldü ve potasyum karbonat çözeltisi ile karıştırılıp süzüldü. Hekzan ve etil asetat ile kristallendirildi. % 72 verimle 190 mg ürün elde edildi.

Erime noktası: 218-220°C

Elementel Analiz: C₁₅H₁₃ClN₄O₂

Hesaplanan : %C: 56,87 %H: 4,13 %N: 17,68

Bulunan : %C: 56,65 %H: 4,32 %N: 17,38

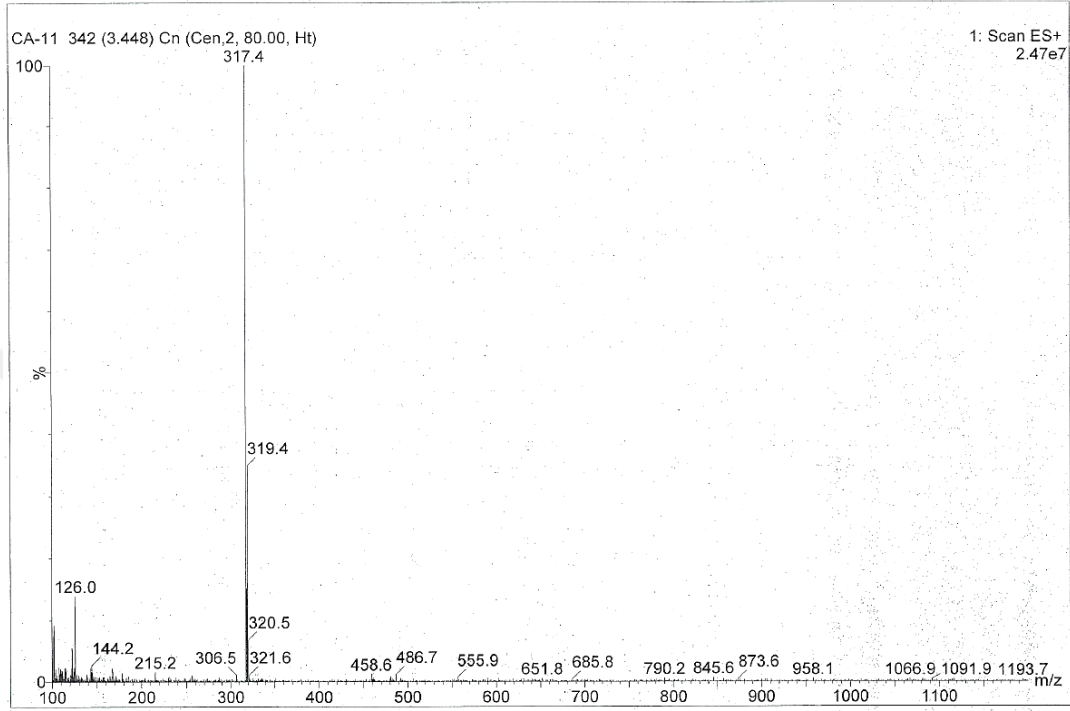
Kütle m/z (ESI+): 317,4 [M+H] (%100); 319,4 [M+H+2] (%33).

¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm : 4,03 (s, 3H, 7-OCH₃); 4,05 (s, 3H, 6-OCH₃); 7,01 (s, 1H, H-5); 7,27 (s, 1H, H-8); 7,32 (q, 1H, H-5’); 7,77 (brs, 1H, -NH); 8,09 (dd, 1H, J=4&1,2Hz, H-4’ veya H-6’); 8,71 (s, 1H, H-2); 9,18 (dd, 1H, J=8&1,6Hz, H-4’ veya H-6’).

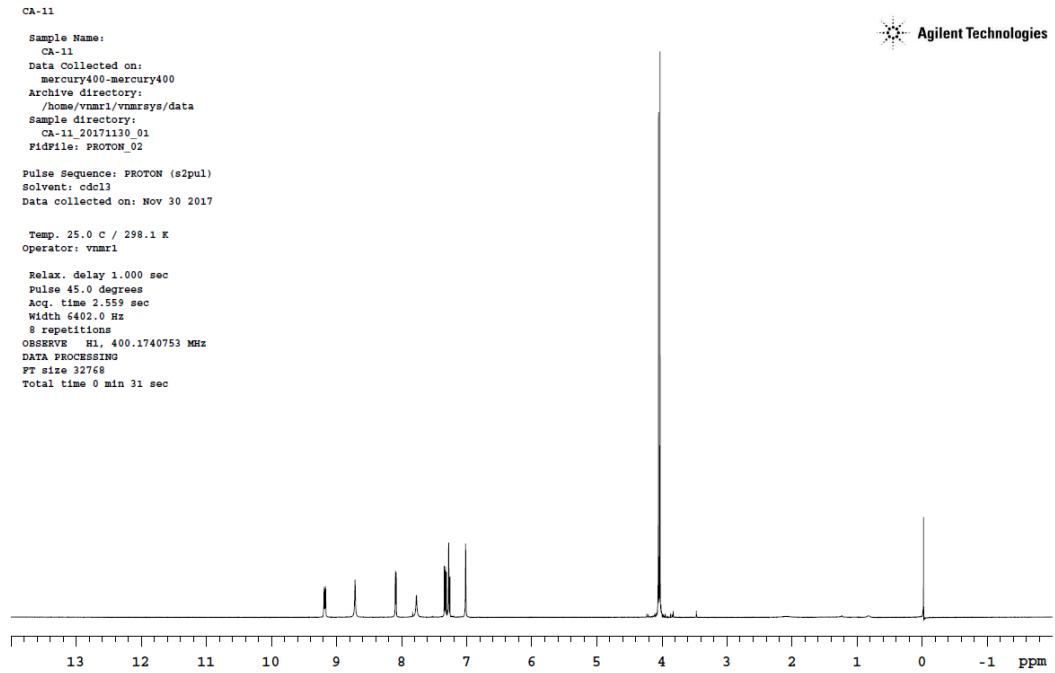
COSY (CDCl₃) δ ppm : [H-5’ : H-4’], [H-5’ : H-6’].

NOESY (CDCl₃) δ ppm : [H-5 : -NH], [6-OCH₃ : H-5], [7-OCH₃ : H-8].

^{13}C -NMR ve HSQC (CDCl_3) δ ppm : 155,18; 152,88; 150,14; 147,73; 142,62 (CH-4' veya CH-6'); 140,20; 132,90; 129,11 (CH-4' veya CH-6'); 123,33 (CH-5'); 109,47; 108,09 (CH-8); 98,28 (CH-5); 56,34 (-OCH₃); 56,18 (-OCH₃).



Şekil 3.29. Bileşik 5'in Kütle Spektrumu



Şekil 3.30. Bileşik 5'in ^1H -NMR Spektrumu

CA-11

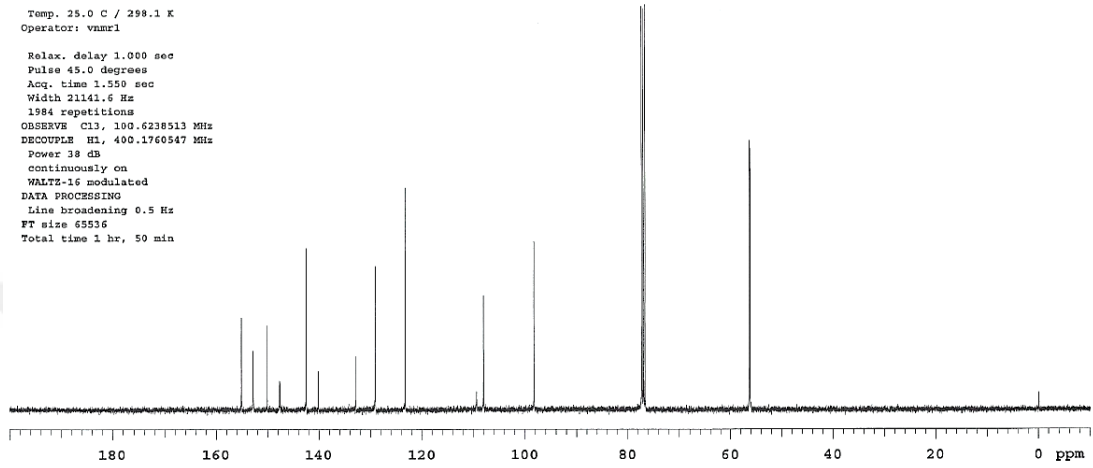


Sample Name:
CA-11
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
CA-11_20171130_01
FidFile: current

Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: cdcl3
Data collected on: Nov 30 2017

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.550 sec
Width 21141.6 Hz
1984 repetitions
OBSERVE C13, 100.6238513 MHz
DECOUPLE H1, 400.1760547 MHz
Power 38 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 1 hr, 50 min



Şekil 3.31. Bileşik 5'in ^{13}C -NMR Spektrumu

CA-11

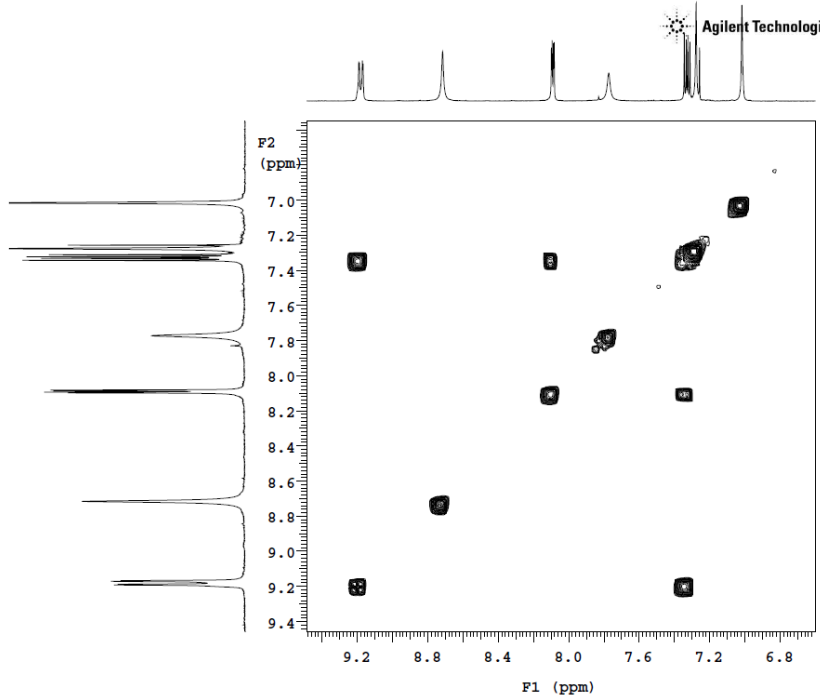


Sample Name:
CA-11
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
CA-11_20171130_01
FidFile: gcOSY_01

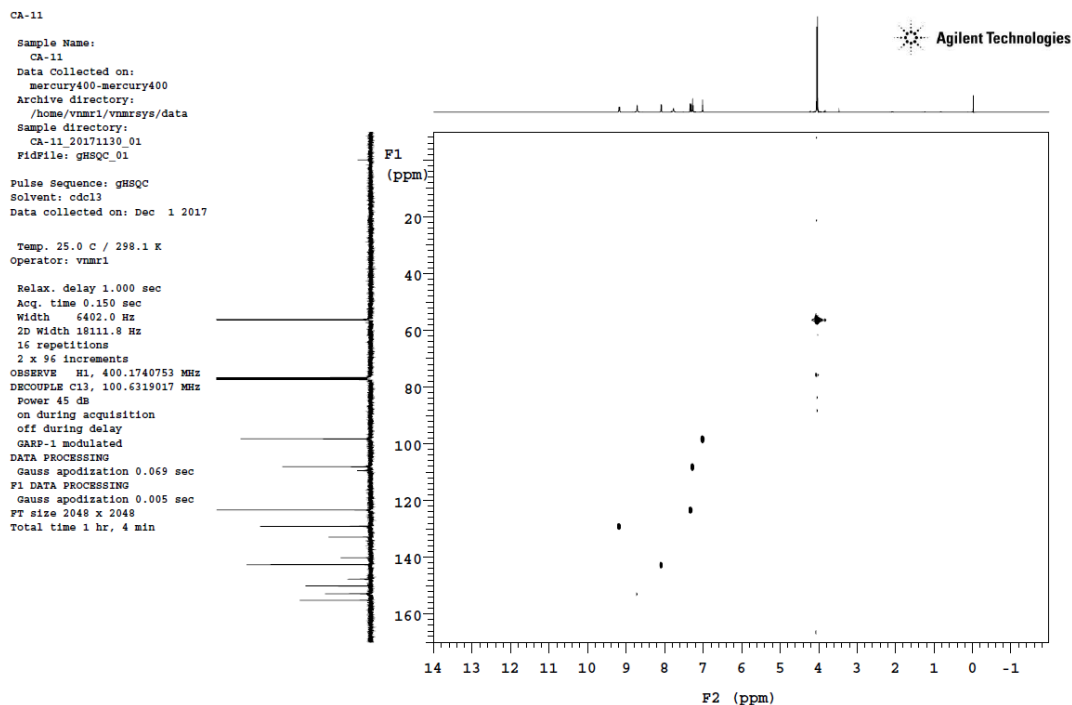
Pulse Sequence: gcOSY
Solvent: cdcl3
Data collected on: Nov 30 2017

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

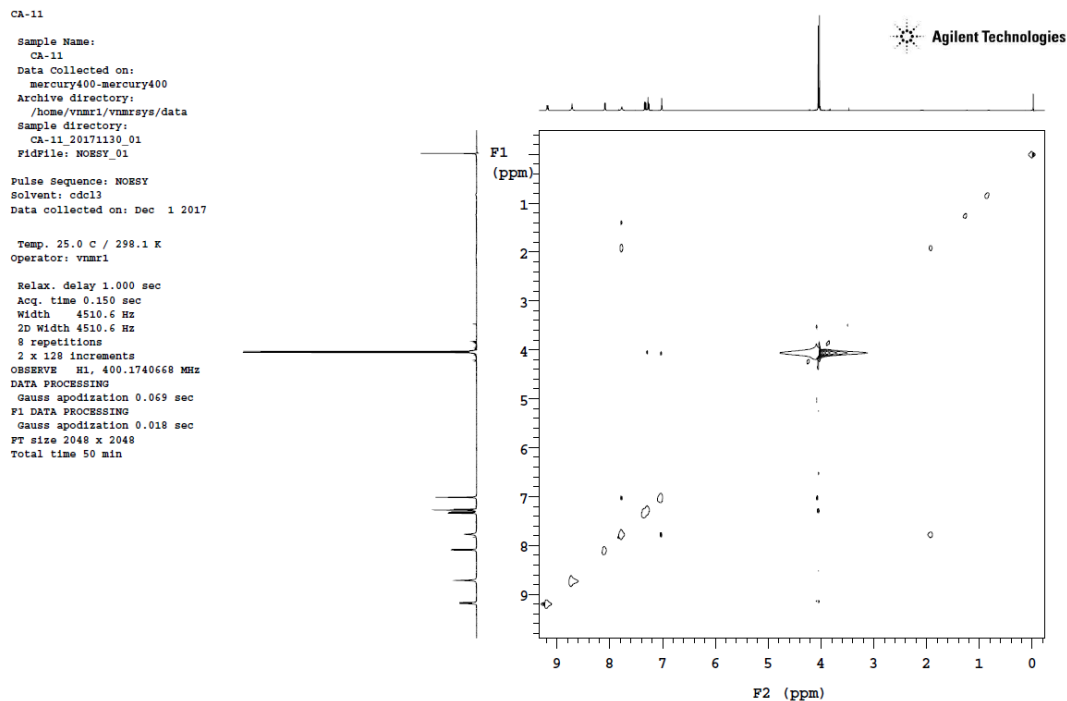
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 4510.6 Hz
2D Width 4510.6 Hz
4 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 400.1740663 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.075 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.028 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 11 min



Şekil 3.32. Bileşik 5'in COSY Spektrumu

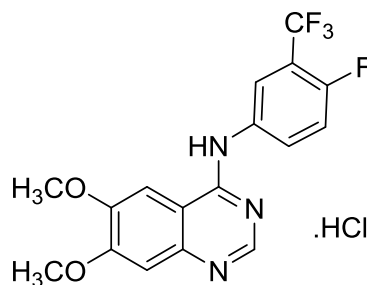


Şekil 3.33. Bileşik 5'in HSQC Spektrumu



Şekil 3.34. Bileşik 5'in NOESY Spektrumu

3.2.3. N-[4-Floro-3-(triflorometil)fenil]-6,7-dimetoksikinazolin-4-amin (6)



4-Kloro-6,7-dimetoksikinazolin (2) (190 mg, 0,85 mmol) ve 4-floro-3-(triflorometil)anilin (152 mg, 0,85 mmol) 2-propanol (5 ml) içerisinde 80°C’de karıştırıldı. Reaksiyon sonlandığında çözelti süzüldü ve potasyum karbonat çözeltisi ile karıştırılıp süzüldü. Etanol ile kristallendirildi. Etanol içinde HCl gazı geçirilerek HCl tuzu haline getirildi. % 73 verimle 250 mg ürün elde edildi.

Erime noktası: 285°C

Elementel Analiz: C₁₇H₁₃F₄N₃O₂ . HCl

Hesaplanan : %C: 50,57 %H: 3,49 %N: 10,40

Bulunan : %C: 50,49 %H: 3,70 %N: 10,38

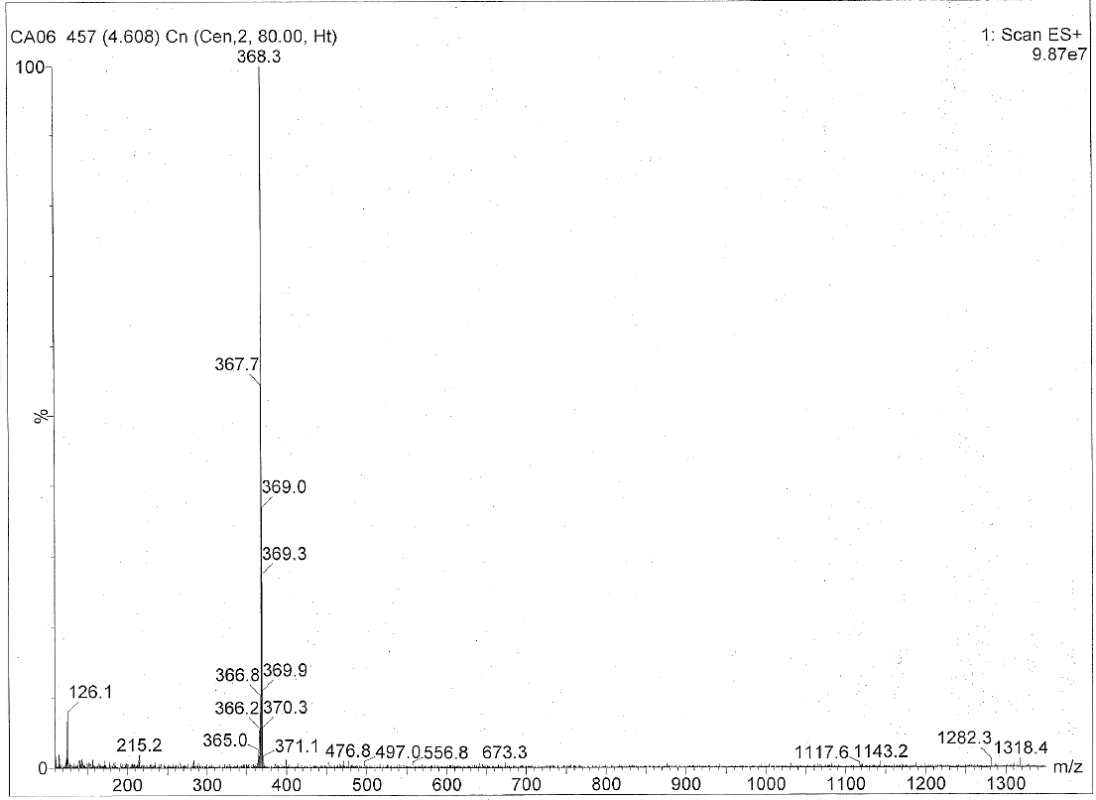
Kütle m/z (ESI+): 368,3 [M+H] (%100).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm : 3,42 (brs, HCl); 3,98 (s, 3H, 7-OCH₃); 4,03 (s, 3H, 6-OCH₃); 7,37 (s, 1H, H-8); 7,63 (t, 1H, *J*=9,6Hz, H-6’); 8,14-8,18 (m, 1H, H-5’); 8,22 (dd, 1H, *J*=6,4&2,4Hz, H-2’); 8,48 (s, 1H, H-5); 8,88 (s, 1H, H-2); 11,89 (s, 1H, -NH).

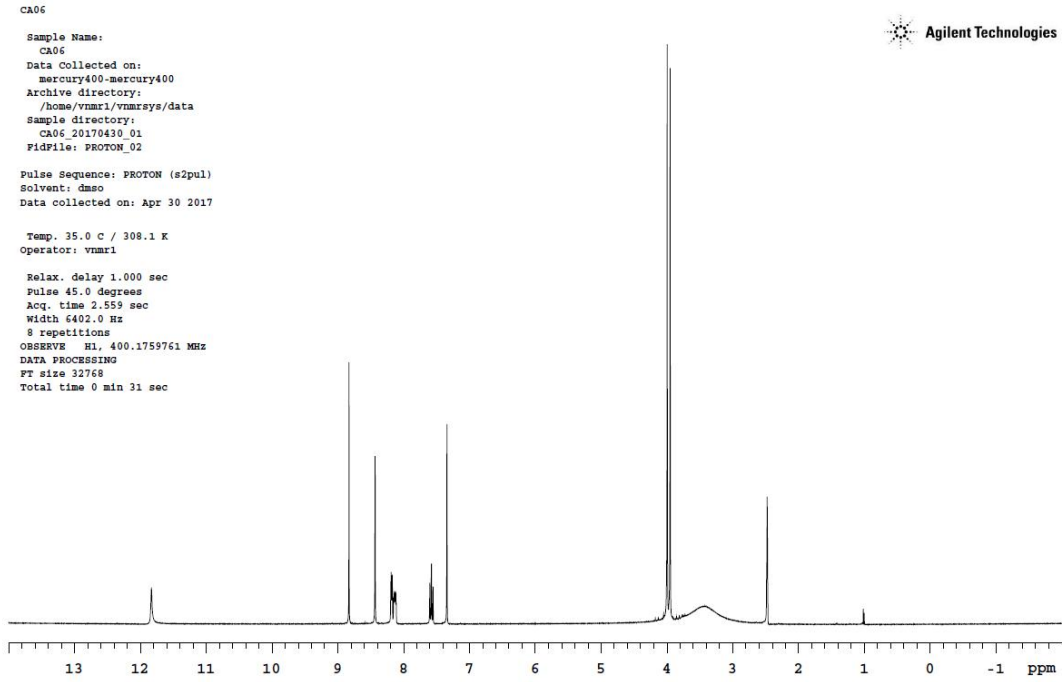
¹H-NMR (DMSO-*d*₆ + D₂O) δ ppm : 3,97 (s, 3H, -OCH₃); 3,99 (s, 3H, -OCH₃); 7,16 (s, 1H, H-8); 7,50 (t, 1H, *J*=9,6Hz, H-6’); 7,95 (s, 1H, H-5); 7,97-7,99 (m, 1H); 8,01 (m, 1H); 8,71 (s, 1H, H-2).

COSY (DMSO-*d*₆) δ ppm : [H-5' : H-6'].

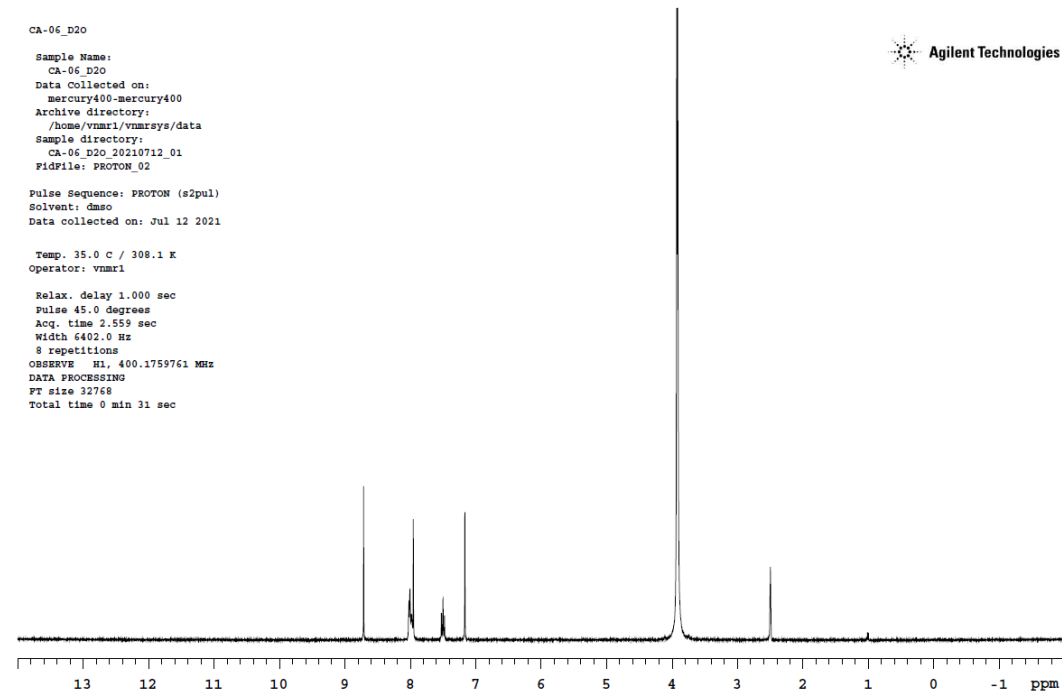
NOESY (DMSO-*d*₆) δ ppm : [H-5 : -NH], [6-OCH₃ : H-5], [7-OCH₃ : H-8].



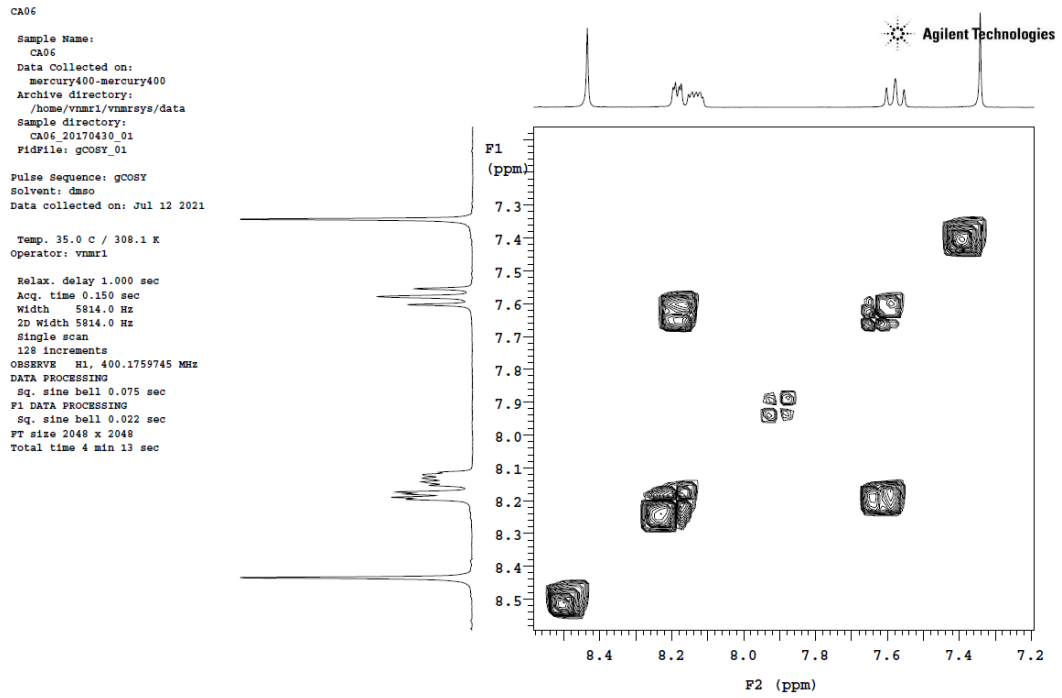
Şekil 3.35. Bileşik 6'nın Kütle Spektrumu



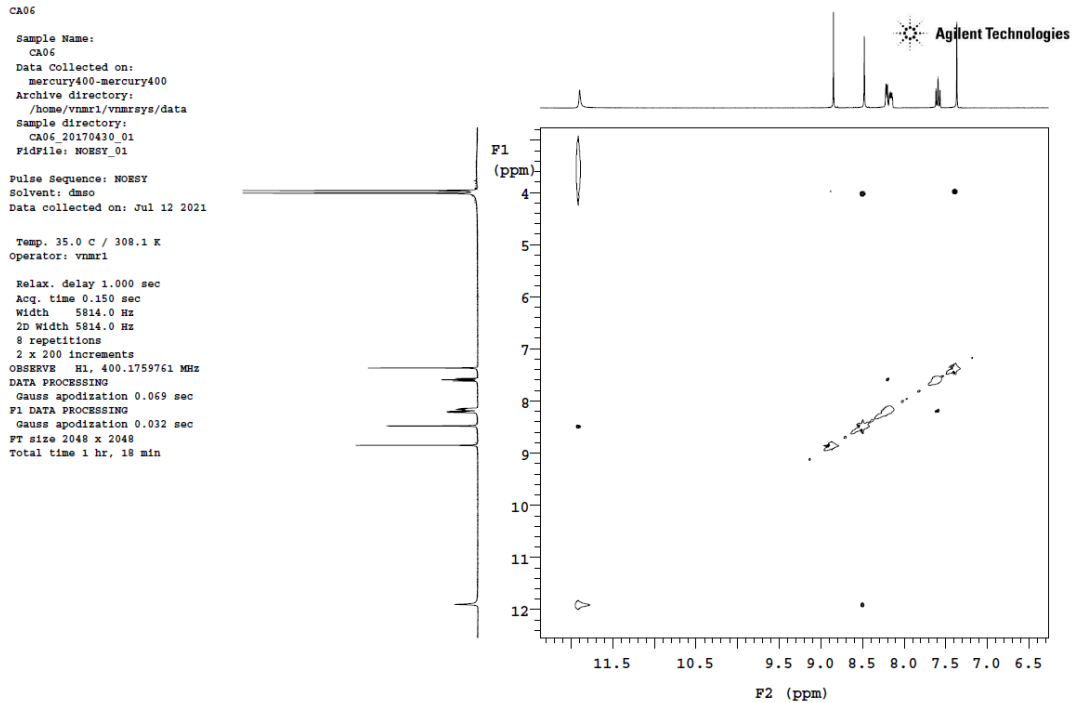
Şekil 3.36. Bileşik 6'nın ^1H -NMR Spektrumu



Şekil 3.37. Bileşik 6'nın ^1H -NMR ($\text{DMSO-}d_6 + \text{D}_2\text{O}$) Spektrumu



Şekil 3.38. Bileşik 6'nın COSY Spektrumu

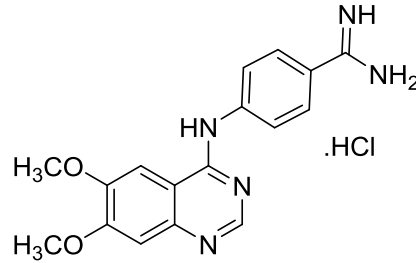


Şekil 3.39. Bileşik 6'nın NOESY Spektrumu

3.3. Amidin Grubu Taşıyan 6,7-Dimetoksikinazolin Türevlerinin (7a-7e, 8a-8e, 9a-9e) Genel Sentez Yöntemi

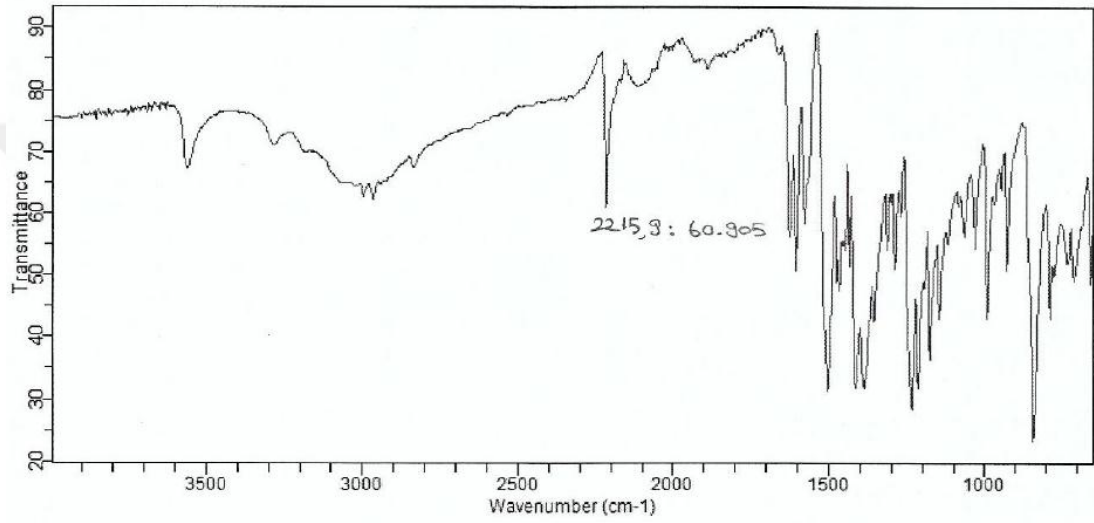
Mutlak etanol buz banyosuna alındı ve 40 dakika boyunca kuru HCl gazı geçirildi. HCl gazına doyurulmuş mutlak etanol, sonuç bileşiğini elde etmek için **3a**, **3b** ve **3c** bileşiklerinden uygun olan türev ile ağzı kapatılmış balon içinde 2 gün boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Petrol eteri ilavesiyle yağsı madde çöktürüldü, vakum yardımıyla süzüldü ve oda sıcaklığında vakum varlığında kurutuldu. Elde edilen imidat esteri derhal mutlak etanol ve uygun amin türeviyle (veya amonyakla) bir gece 25-30°C'de karıştırıldı. Reaksiyon sonlandığında solvan uçuruldu. Üzerine potasyum karbonat çözeltisi eklenerek karıştırılıp süzüldü. İTK ile kontrol edilip gerekli olduğu durumlarda kolon kromatografisi ile CHCl₃: MeOH: NH₃ (100:20:0,5) solvan sistemi yardımıyla madde saf olarak elde edildi. Etanol içinde HCl gazı geçirilmesiyle bileşiklerin HCl tuzları hazırlandı.

3.3.1. 4-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]benzimidamid (7a)

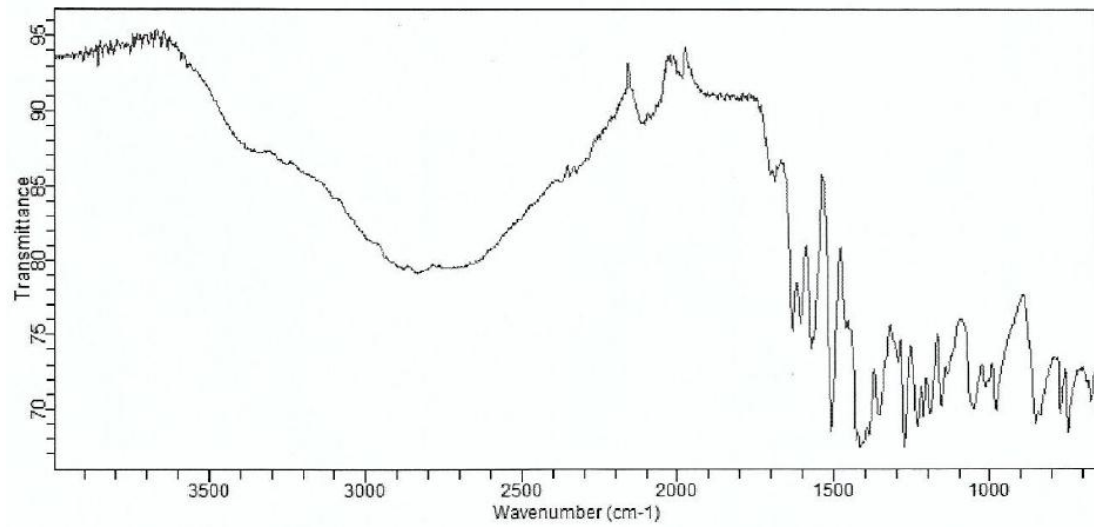


4-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]benzonitril (**3a**) (240 mg) imidat esteri oluşturmak için 3.3'de verilen yöntemle göre reaksiyona sokuldu. Oluşan imidat esteri, amonyak gazı ile doyurulmuş 5 ml mutlak etanol içinde oda sıcaklığında bir gece karıştırıldı. Süre sonunda madde eterle çöktürüldü, süzüldü. Potasyum karbonat çözeltisi ile karıştırılıp tekrar süzüldü. Etanol içinde HCl gazı geçirilerek HCl tuzu haline getirildi. % 61 verimle 202 mg ürün elde edildi.

7a kodlu bileşiğin sentezi sırasında Pinner reaksiyonun doğru ilerleyip ilerlemediğini gözlemlemek için, öncelikle ara ürün olan 4-[(6,7-dimetoksikinazolin-4-il)amino]benzonitril (**3a**) bileşiğinin IR ölçümü alınmıştır. IR spektrumu Agilent Technologies Cary 630 FTIR spektrometre kullanılarak elde edilmiştir. Bu IR spektrumunda CN bağına ait band belirgin şekilde gözlenmektedir. Ardından reaksiyon ortamından alınan numune ile yapılan IR ölçümünde CN bandının kaybolduğu, reaksiyonun ilerlediği gözlenmiştir.



Şekil 3.40. 4-[(6,7-dimetoksikinazolin-4-il)amino]benzonitril (**3a**) bileşiğine ait IR spektrumu



Şekil 3.41. İmidat esterine ait IR spektrumu

Erime noktası: 278-280°C

Elementel Analiz: $C_{17}H_{17}N_5O_2 \cdot 2HCl \cdot 1,5H_2O$

Hesaplanan : %C: 48,24 %H: 5,24 %N: 16,54

Bulunan : %C: 48,17 %H: 5,34 %N: 16,73

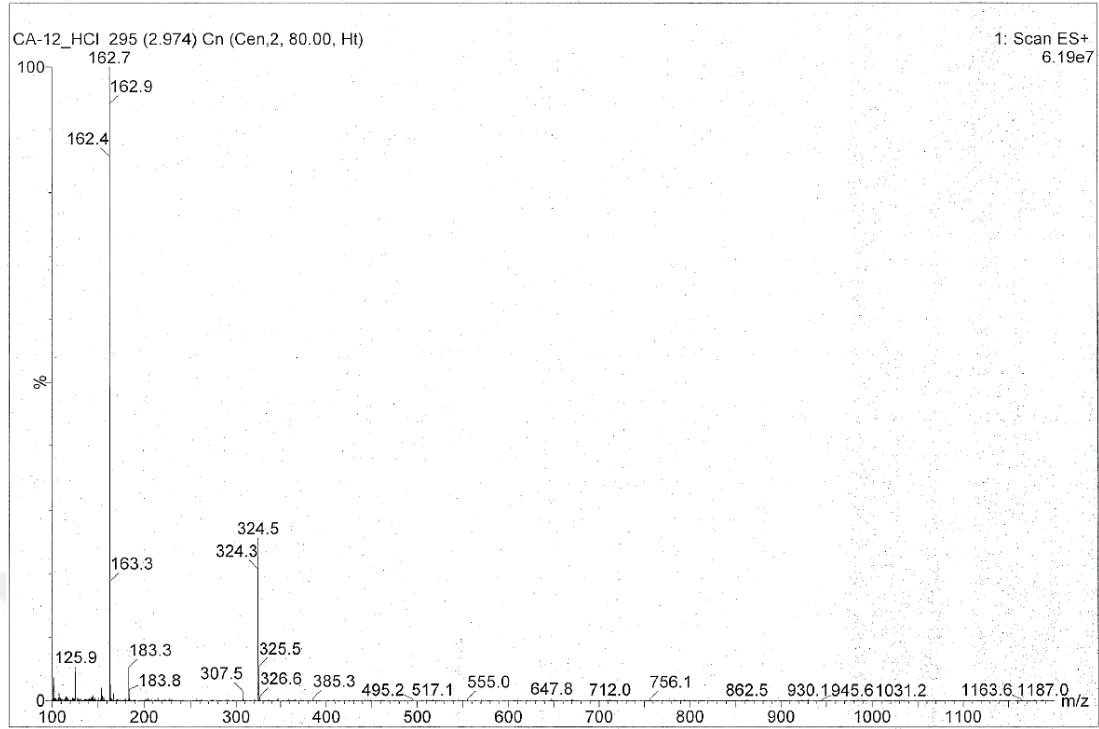
Kütle m/z (ESI+): 324,5 [M+H] (%25).

1H -NMR (DMSO- d_6) δ ppm: 3,99 (s, 3H, -OCH₃); 4,06 (s, 3H, -OCH₃); 7,48 (s, 1H, H-5 veya H-8); 7,95 (d, 2H, $J=9,2$ Hz, H-2',6'); 8,13 (d, 2H, $J=9,2$ Hz, H-3',5'); 8,66 (s, 1H, H-5 veya H-8); 8,87 (s, 1H, H-2); 9,23 (s, 2H); 9,45 (s, 2H); 12,01 (s, 1H).

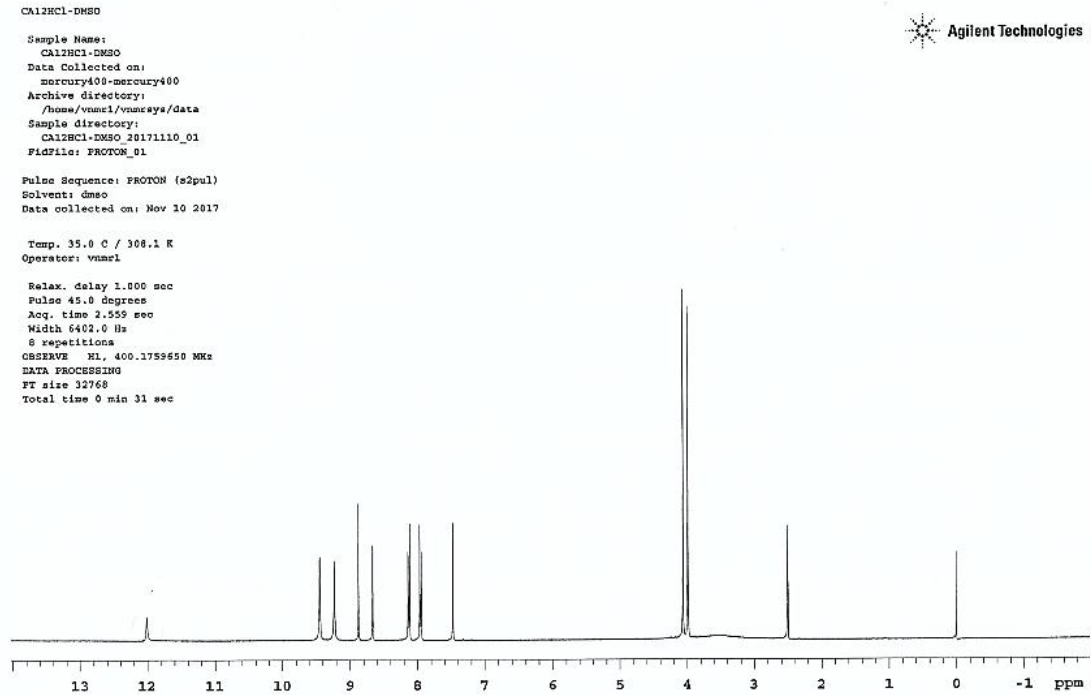
1H -NMR (DMSO- d_6 + D₂O) δ ppm : 4,01 (s, 3H, -OCH₃); 4,03 (s, 3H, -OCH₃); 7,39 (s, 1H, H-5 veya H-8); 7,97 (d, 2H, $J=9,2$ Hz, H-2',6'); 8,09 (d, 2H, $J=9,2$ Hz, H-3',5'); 8,38 (s, 1H, H-5 veya H-8); 8,85 (s, 1H, H-2).

COSY (DMSO- d_6) δ ppm : [H-2',6' : H-3',5'].

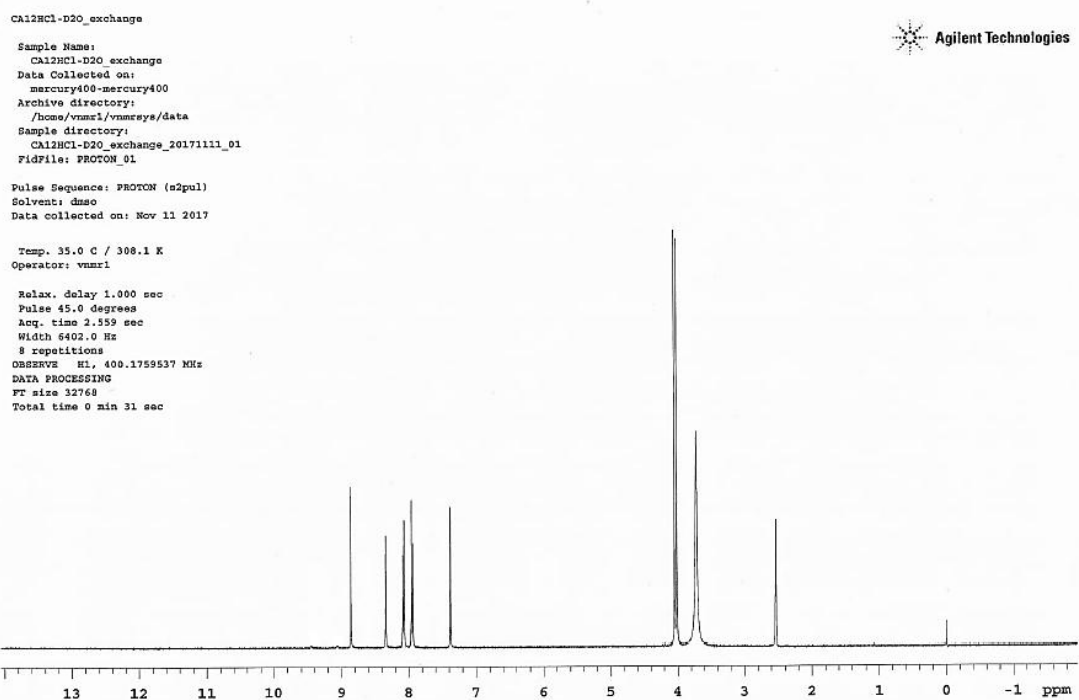
^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ ppm : 164,90; 157,96; 156,36; 150,22; 148,46; 142,39; 136,57; 128,51; 124,14; 123,95; 107,85; 104,59; 100,02; 57,28 (-OCH₃); 56,37 (-OCH₃).



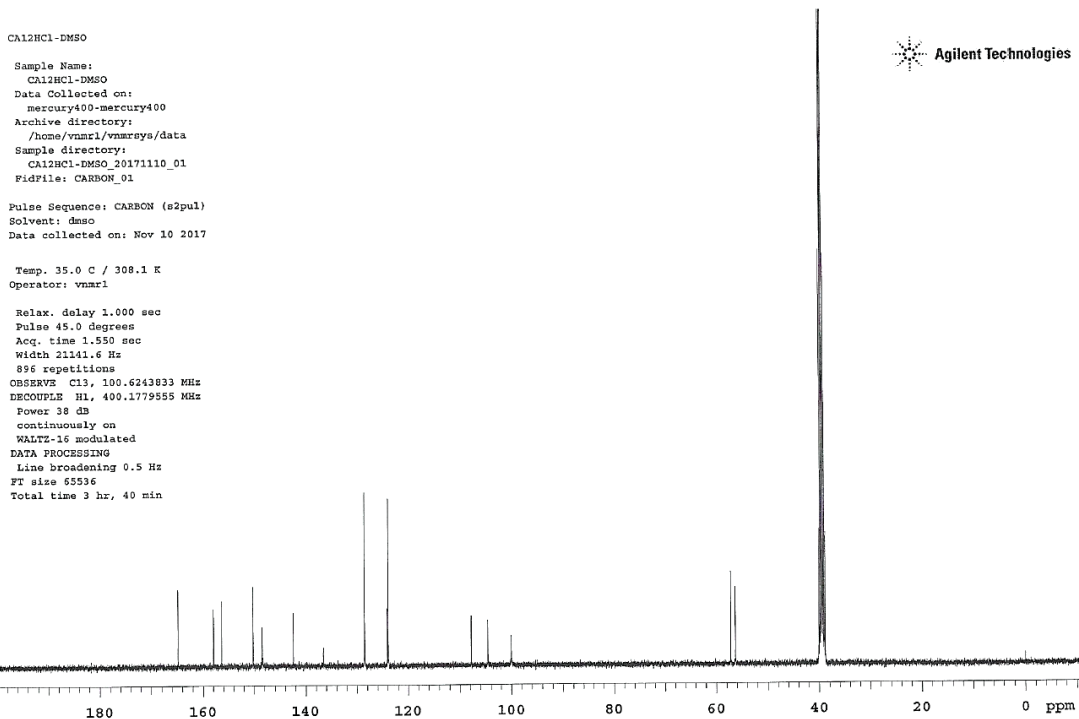
Şekil 3.42. Bileşik 7a'nın Kütle Spektrumu



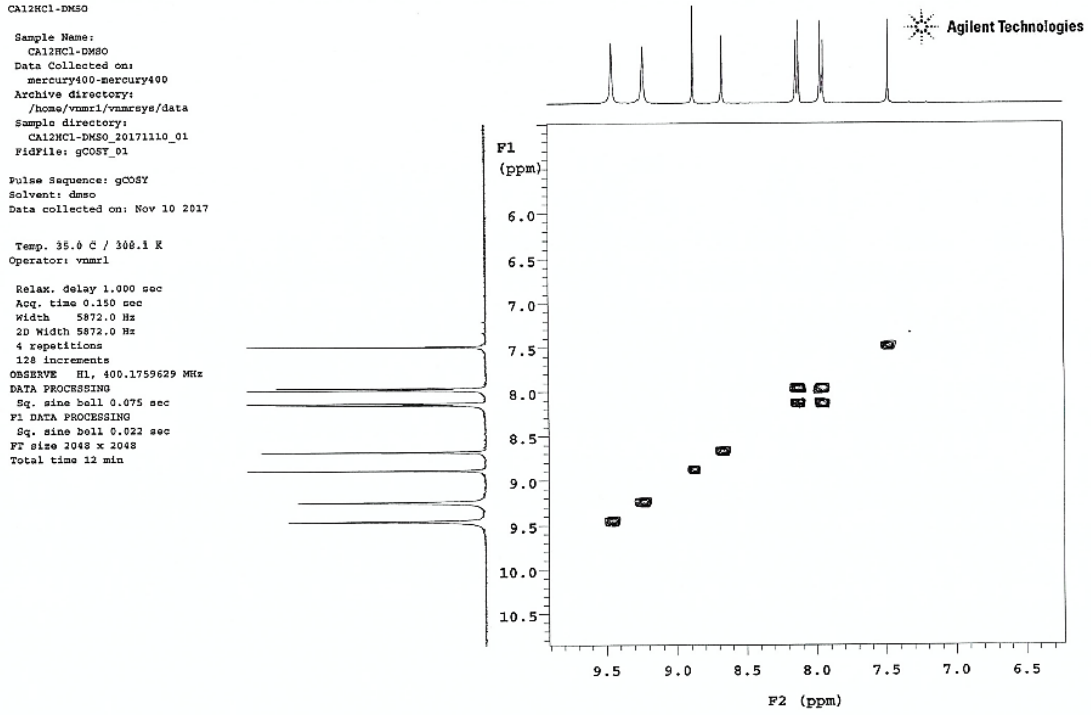
Şekil 3.43. Bileşik 7a'nın ¹H-NMR Spektrumu



Şekil 3.44. Bileşik 7a'nın ^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6 + \text{D}_2\text{O}$) Spektrumu

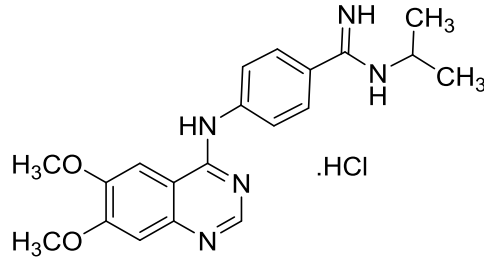


Şekil 3.45. Bileşik 7a'nın ^{13}C -NMR Spektrumu



Şekil 3.46. Bileşik 7a'nın COSY Spektrumu

3.3.2. 4-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]-N-izopropilbenzimidamid (7b)



4-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]benzonitril (**3a**) (300 mg) imidat esteri oluşturmak için 3.3'de verilen yönteme göre reaksiyona sokuldu. Oluşan imidat esterine 0,25 ml izopropilamin ve 5 ml mutlak etanol eklenerek oda sıcaklığında bir gece karıştırıldı. Süre sonunda solvan uçuruldu. Potasyum karbonat çözeltisi ile karıştırılıp süzüldü. Etanol içinde HCl gazı geçirilerek HCl tuzu haline getirildi. % 36 verimle 163 mg ürün elde edildi.

Erimme noktası: 286-288°C

Elementel Analiz: $C_{20}H_{23}N_5O_2 \cdot 2HCl \cdot H_2O$

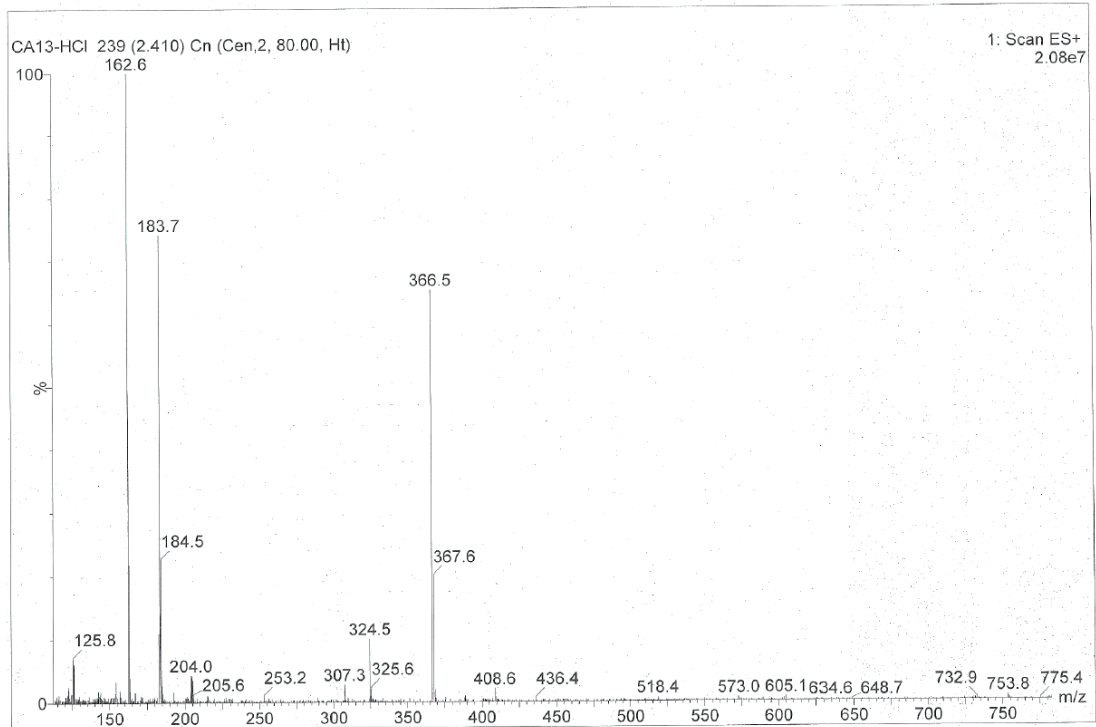
Hesaplanan : %C: 52,63 %H: 5,96 %N: 15,35

Bulunan : %C: 52,19 %H: 6,05 %N: 15,41

Kütle m/z (ESI+): 366,5 [M+H] (%65).

1H -NMR (DMSO- d_6 + D_2O) δ ppm : 1,33 (d, 6H, $J=6,8$ Hz, $-CH_3$); 3,97 (s, 3H, $-OCH_3$); 4,02 (s, 3H, $-OCH_3$); 4,04-4,07 (m, 1H, $-CH$); 7,34 (s, 1H, H-5 veya H-8); 7,84 (d, 2H, $J=9,2$ Hz, fenil protonları); 8,01 (d, 2H, $J=8,8$ Hz, fenil protonları); 8,22 (s, 1H, H-5 veya H-8); 8,81 (s, 1H, H-2).

^{13}C -NMR ve HSQC (DMSO- d_6 + D_2O) δ ppm : 161,66; 158,41; 157,18; 150,92; 148,71; 141,58; 136,16; 129,21; 126,29; 124,64; 107,83; 103,84 (CH-5 veya CH-8); 100,18 (CH-5 veya CH-8); 57,34 ($-OCH_3$); 57,08 ($-OCH_3$); 45,59 ($-CH$); 21,41 ($-CH_3$).



Şekil 3.47. Bileşik 7b'nin Kütle Spektrumu

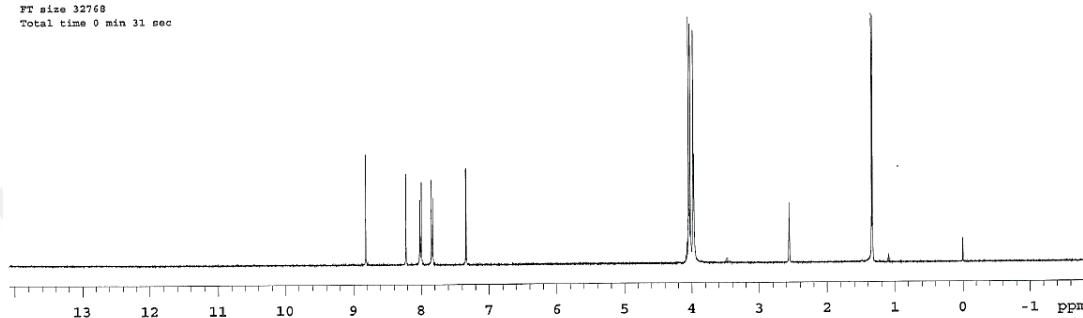
CA13HCl-D2O



Sample Name:
CA13HCl-D2O
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
CA13HCl-D2O_20171113_01
FidFile: PROTON_01
Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Nov 13 2017

Temp. 35.0 C / 308.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.559 sec
Width 6402.9 Hz
3 repetitions
OBSERVE H1, 400.1759435 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min 31 sec



Şekil 3.48. Bileşik 7b'nin ^1H -NMR Spektrumu

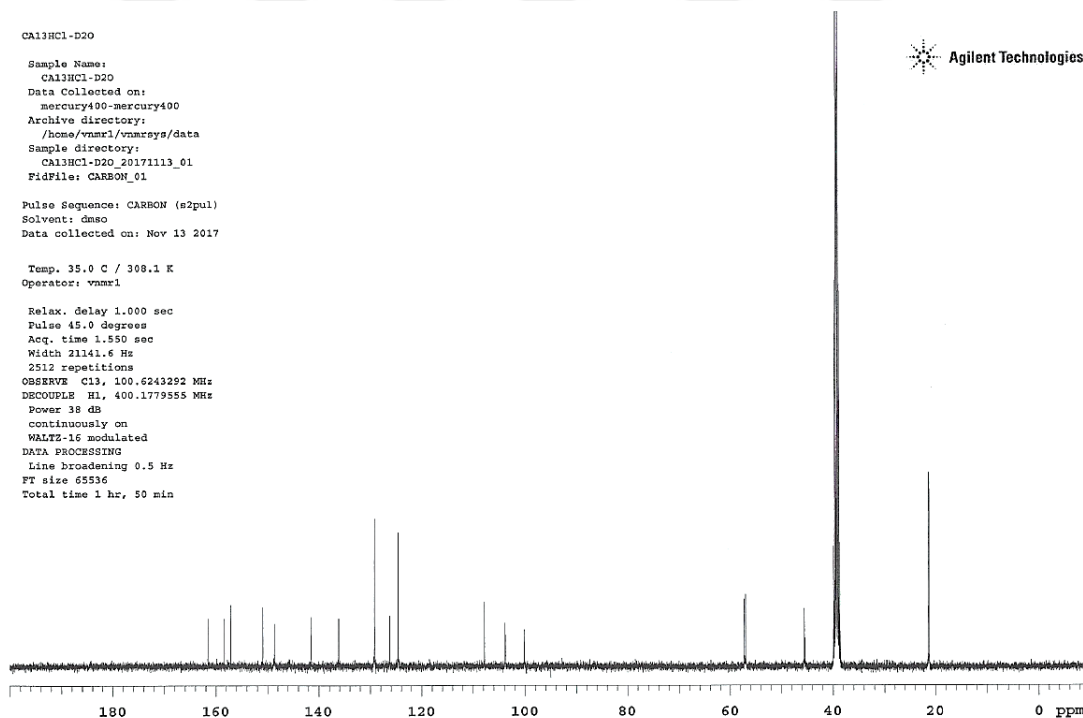
CA13HCl-D2O



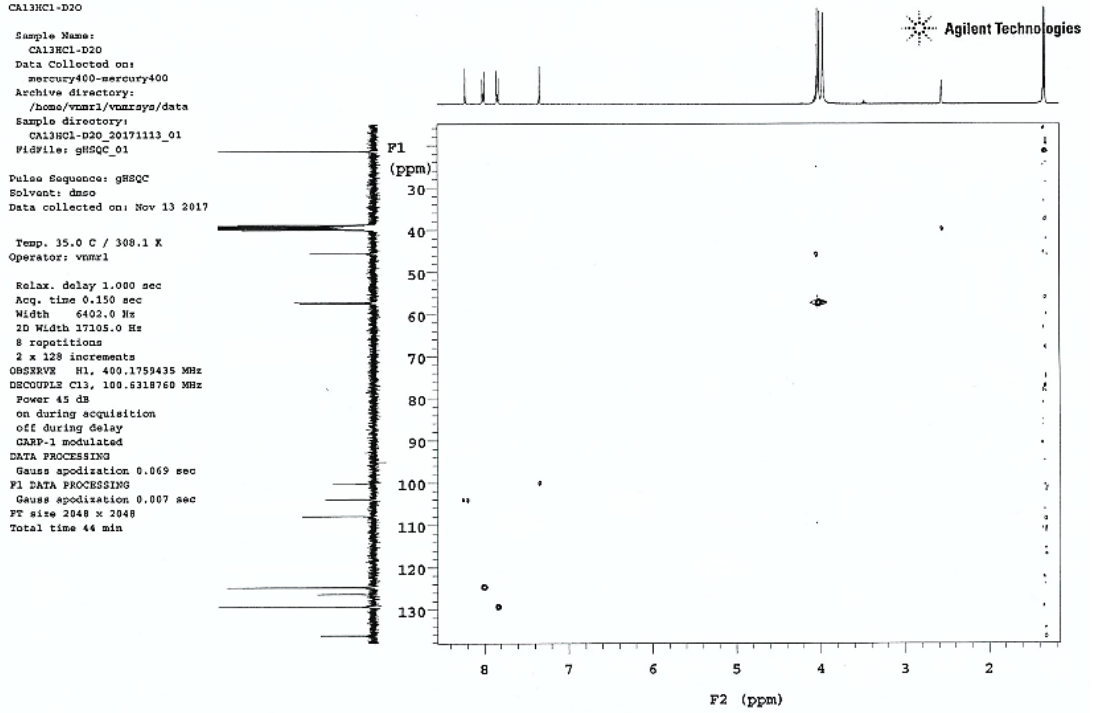
Sample Name:
CA13HCl-D2O
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
CA13HCl-D2O_20171113_01
FidFile: CARBON_01
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Nov 13 2017

Temp. 35.0 C / 308.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.550 sec
Width 21141.6 Hz
2512 repetitions
OBSERVE C13, 100.6243292 MHz
DECOUPLE H1, 400.1779555 MHz
Power 38 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 1 hr, 50 min

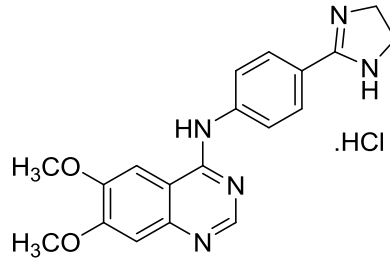


Şekil 3.49. Bileşik 7b'nin ^{13}C -NMR Spektrumu



Şekil 3.50. Bileşik 7b'nin HSQC Spektrumu

3.3.3. N-[4-(4,5-Dihidro-1H-imidazol-2-il)fenil]-6,7-dimetoksikinazolin-4-amin (7c)



4-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]benzonitril (**3a**) (250 mg) imidat esterine oluşturmak için 3.3'de verilen yönteme göre reaksiyona sokuldu. Oluşan imidat esterine 0,25 ml etilendiamin ve 5 ml mutlak etanol eklenerek oda sıcaklığında bir gece karıştırıldı. Süre sonunda solvan uçuruldu. Potasyum karbonat çözeltisi ile karıştırılıp s z ld  ve su ile yıkandı. Etanol içinde HCl gazı geçirilerek HCl tuzu haline getirildi. % 41 verimle 147 mg ürün elde edildi.

Erime noktası: 276-277°C

Elementel Analiz: C₁₉H₁₉N₅O₂ · 2HCl · H₂O

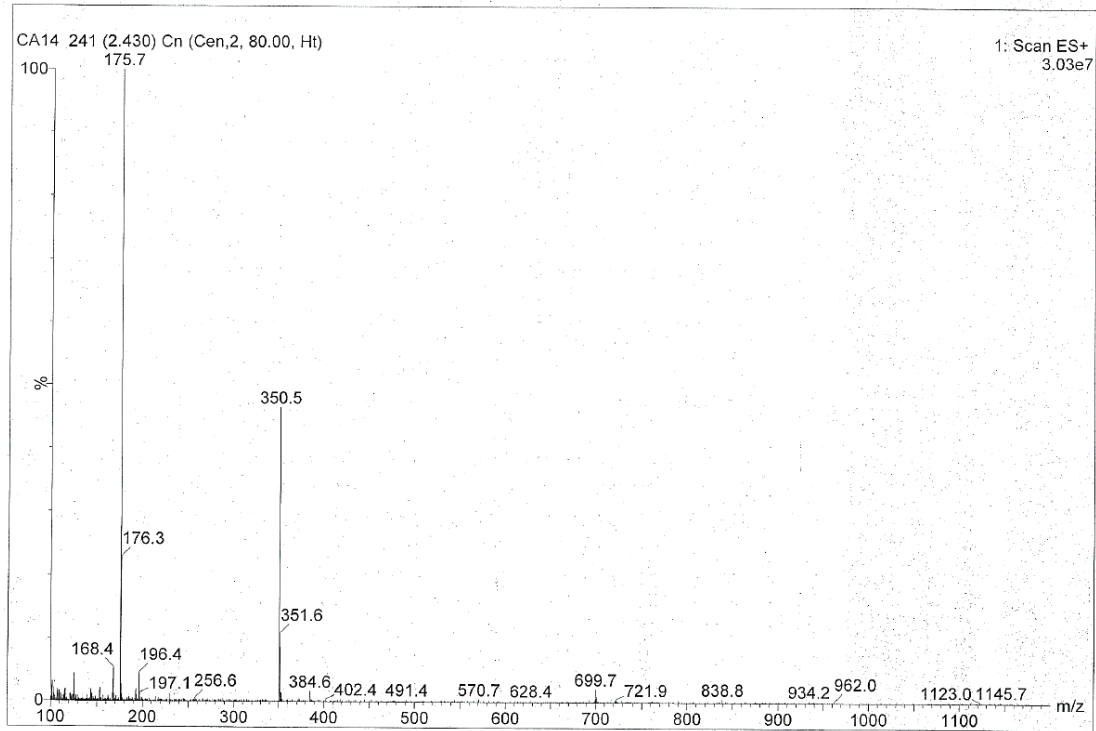
Hesaplanan : %C: 51,82 %H: 5,26 %N: 15,90

Bulunan : %C: 51,39 %H: 5,63 %N: 15,75

Kütle m/z (ESI+): 350,5 [M+H] (%47).

¹H-NMR (DMSO-d₆ + D₂O) δ ppm : 3,92 (s, 3H, -OCH₃); 3,93 (s, 3H, -OCH₃); 3,96 (s, 4H, -CH₂); 7,17 (s, 1H, H-5 veya H-8); 7,85 (d, 2H, J=8,8Hz, fenil protonları); 7,92 (s, 1H, H-5 veya H-8); 7,94 (d, 2H, J=8,8Hz, fenil protonları); 8,67 (s, 1H, H-2).

¹³C-NMR ve HSQC (DMSO-d₆ + D₂O) δ ppm : 164,86; 158,23; 157,27; 150,95; 148,53; 142,62; 136,28; 129,37; 124,42; 119,03; 107,90; 103,27 (CH-5 veya CH-8); 100,20 (CH-5 veya CH-8); 57,12 (-OCH₃); 57,06 (-OCH₃); 44,67 (-CH₂).



Şekil 3.51. Bileşik 7c'nin Kütle Spektrumu

CA-14-DMSO-D2O

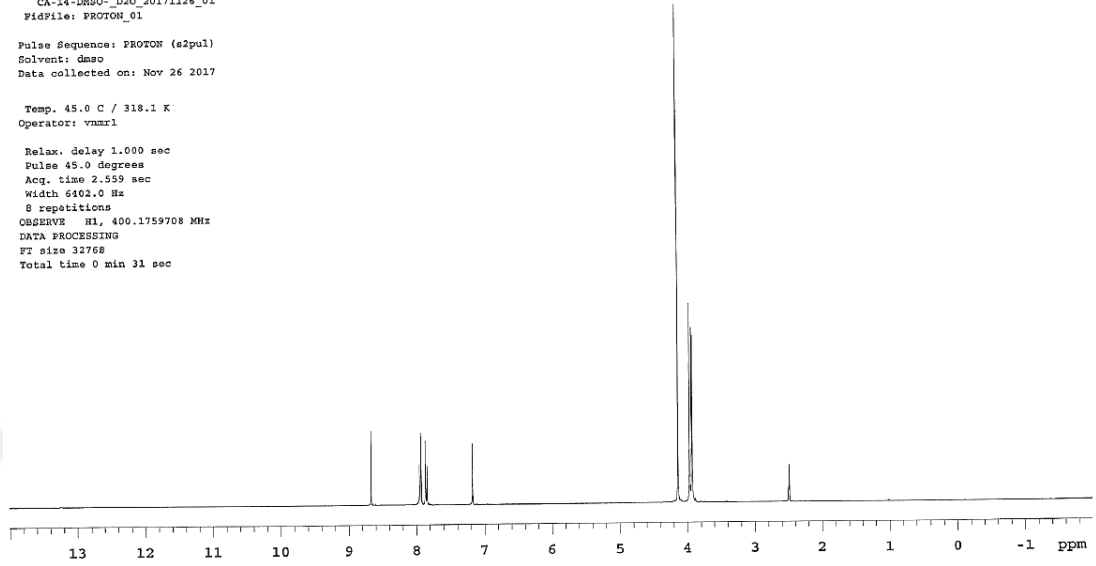


Sample Name:
CA-14-DMSO-D2O
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
CA-14-DMSO-D2O_20171126_01
FidFile: PROTON_01

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Nov 26 2017

Temp. 45.0 C / 318.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.559 sec
Width 6402.0 Hz
8 repetitions
OBSERVE H1, 400.1759708 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min 31 sec



Şekil 3.52. Bileşik 7c'nin ¹H-NMR Spektrumu

CA-14-DMSO-D2O

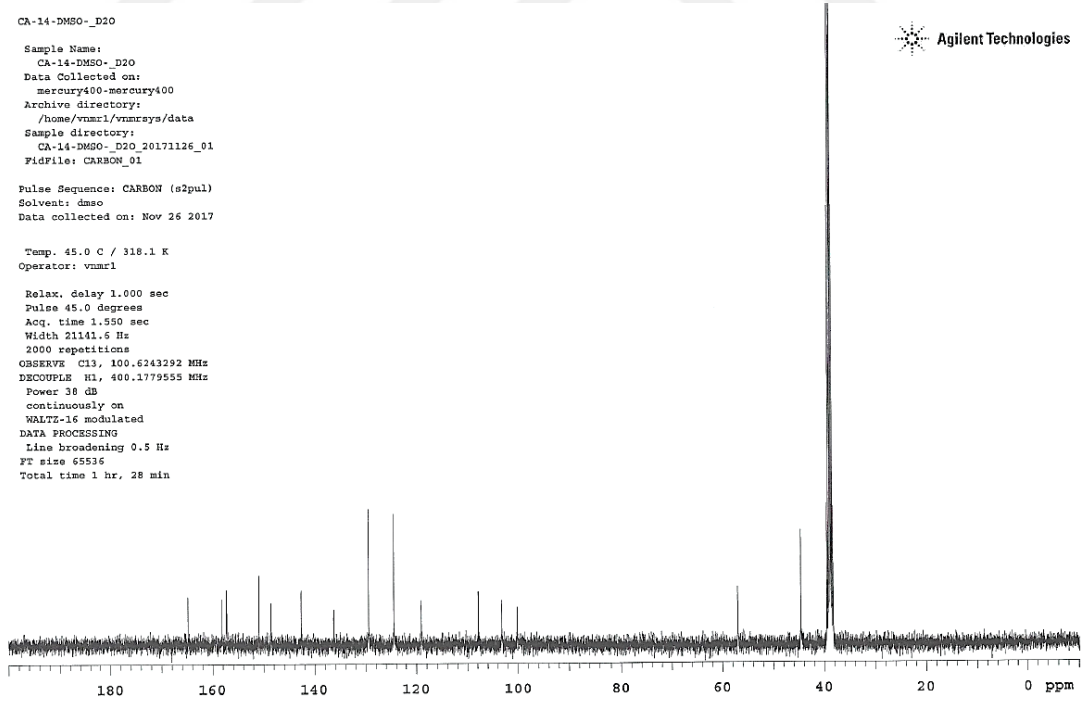


Sample Name:
CA-14-DMSO-D2O
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
CA-14-DMSO-D2O_20171126_01
FidFile: CARBON_01

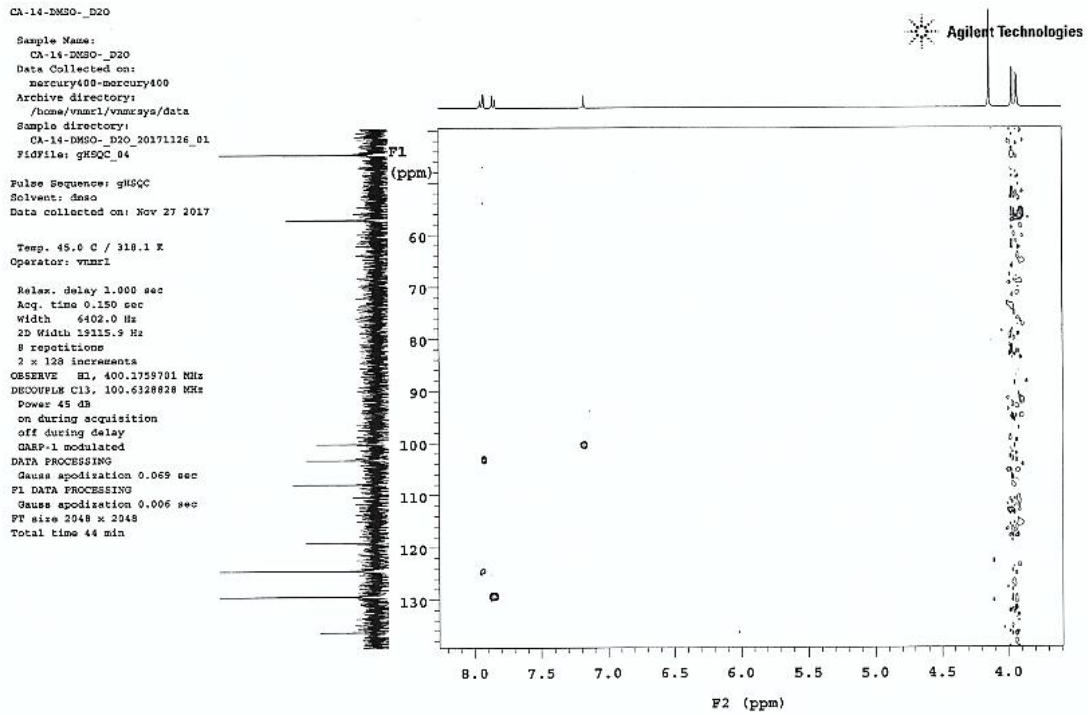
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Nov 26 2017

Temp. 45.0 C / 318.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.550 sec
Width 21141.6 Hz
2000 repetitions
OBSERVE C13, 100.6243292 MHz
DECOUPLE H1, 400.1779555 MHz
Power 38 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 1 hr, 28 min

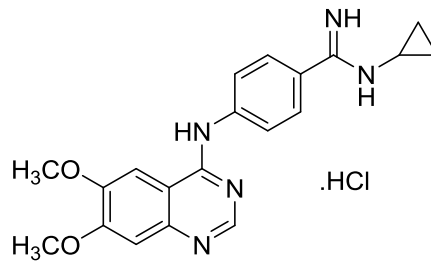


Şekil 3.53. Bileşik 7c'nin ¹³C-NMR Spektrumu



Şekil 3.54. Bileşik 7c'nin HSQC Spektrumu

3.3.4. N-Siklopropil-4-[(6,7-dimetoksikinazolin-4-il)amino]benzimidamid (7d)



4-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]benzonitril (**3a**) (350 mg) imidat esteri oluşturmak için 3.3'de verilen yönteme göre reaksiyona sokuldu. Oluşan imidat esterine 0,25 ml siklopropilamin ve 5 ml mutlak etanol eklenerek oda sıcaklığında bir gece karıştırıldı. Süre sonunda solvan uçuruldu. Potasyum karbonat çözeltisi ile karıştırılıp süzüldü. CHCl_3 : MeOH: NH_3 (100:20:0,5) solvan sistemi yardımıyla kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Etanol içinde HCl gazı geçirilerek HCl tuzu haline getirildi. % 39 verimle 206 mg ürün elde edildi.

Erime noktası: 272-274°C

Elementel Analiz: C₂₀H₂₁N₅O₂ . 2HCl . 1,5H₂O

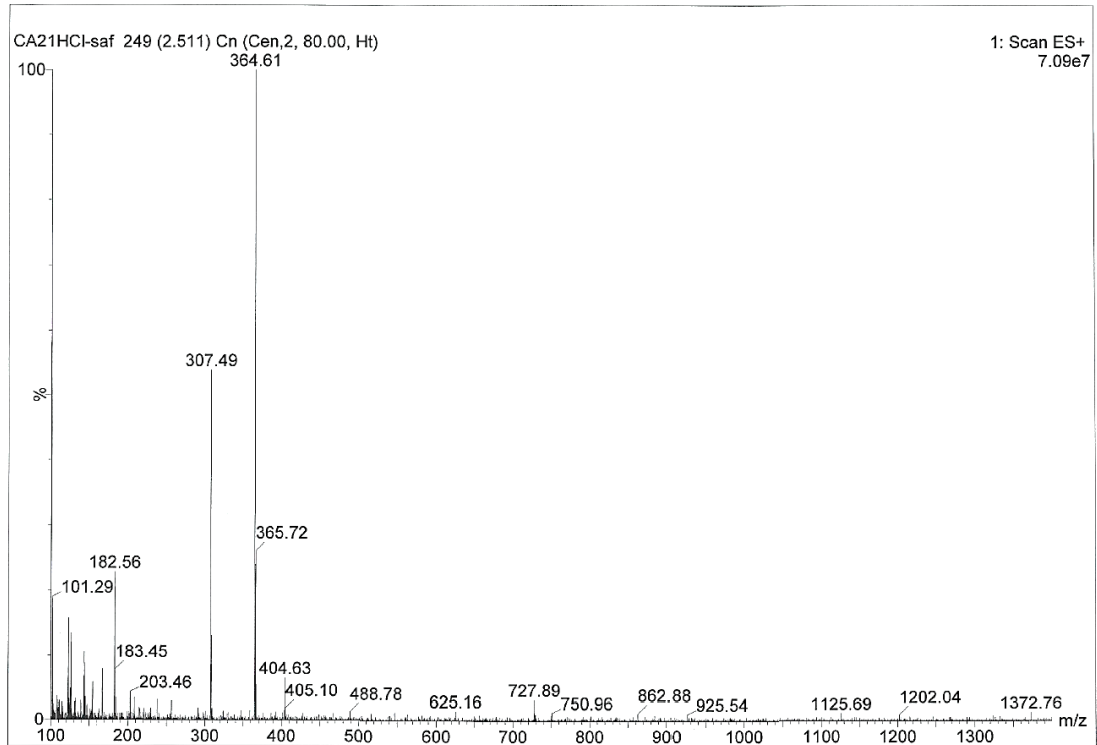
Hesaplanan : %C: 51,84 %H: 5,65 %N: 15,11

Bulunan : %C: 51,80 %H: 5,91 %N: 15,09

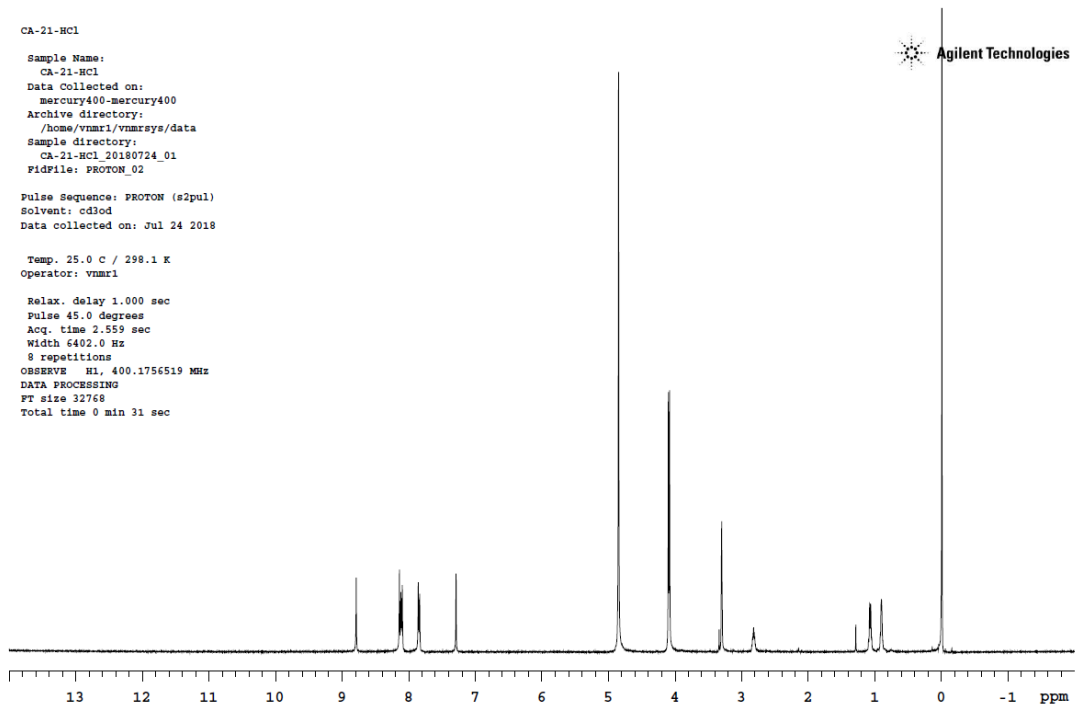
Kütle m/z (ESI+): 364,6 [M+H] (%100).

¹H-NMR (CD₃OD) δ ppm : 0,89-0,91 (m, 2H, -CH₂); 1,04-1,07 (m, 2H, -CH₂); 2,80-2,82 (m, 1H, -CH); 4,08 (s, 3H, -OCH₃); 4,10 (s, 3H, -OCH₃); 7,28 (s, 1H, H-5 veya H-8); 7,84 (d, 2H, *J*=8,4Hz, fenil protonları); 8,10 (d, 2H, *J*=8,8Hz, fenil protonları); 8,13 (s, 1H, H-5 veya H-8); 8,78 (s, 1H, H-2).

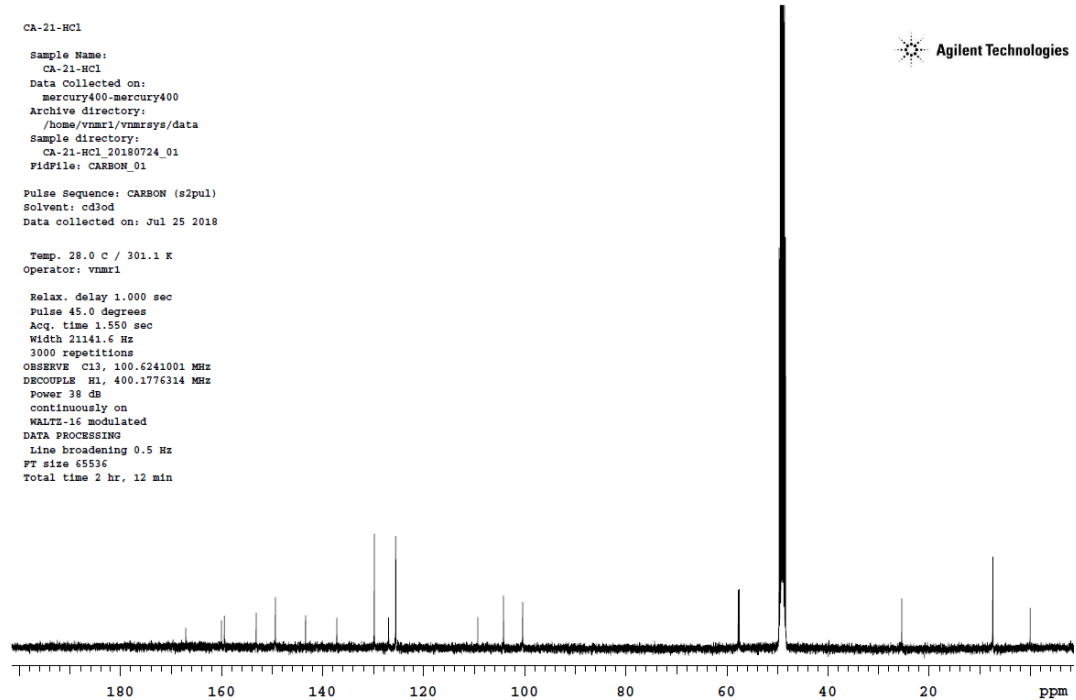
¹³C-NMR (CD₃OD) δ ppm : 167,12; 160,06; 159,49; 153,19; 149,39; 143,41; 137,22; 129,81; 126,98; 125,57; 109,32; 104,24; 100,45; 57,77 (-OCH₃); 57,59 (-OCH₃); 25,41; 7,39.



Şekil 3.55. Bileşik 7d'nin Kütle Spektrumu

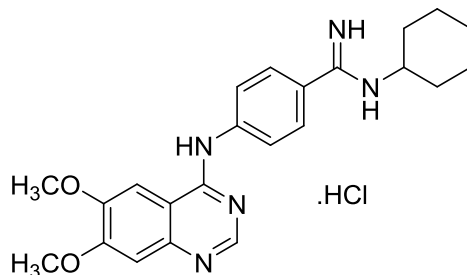


Şekil 3.56. Bileşik 7d'nin ^1H -NMR Spektrumu



Şekil 3.57. Bileşik 7d'nin ^{13}C -NMR Spektrumu

3.3.5. N-Sikloheksil-4-[(6,7-dimetoksikinazolin-4-il)amino]benzimidamid (7e)



4-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]benzonitril (**3a**) (300 mg) imidat esteri oluşturmak için 3.3'de verilen yönteme göre reaksiyona sokuldu. Oluşan imidat esterine 0,25 ml sikloheksilamin ve 5 ml mutlak etanol eklenerek oda sıcaklığında bir gece karıştırıldı. Süre sonunda solvan uçuruldu. Potasyum karbonat    ltisi ile karıştırılıp s z ld . CHCl₃: MeOH: NH₃ (100:20:0,5) solvan sistemi yardımıyla kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Etanol içinde HCl gazı geçirilerek HCl tuzu haline getirildi. % 28 verimle 142 mg ürün elde edildi.

Erime noktası: 266-267 C

Elementel Analiz: C₂₃H₂₇N₅O₂ . 2HCl . 2,5H₂O

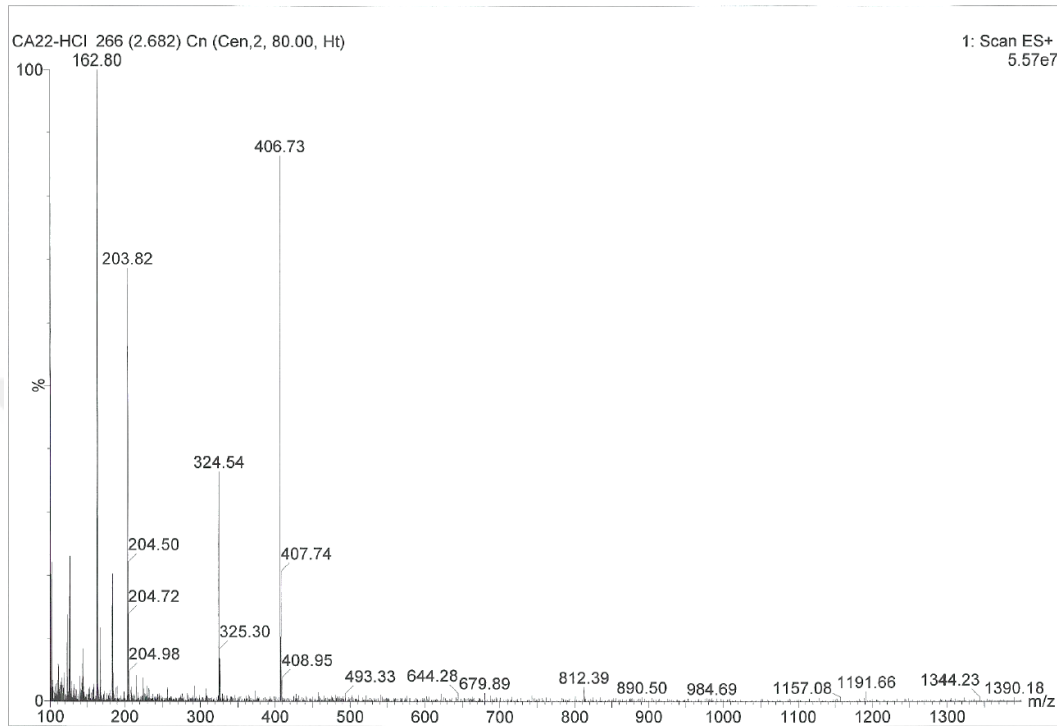
Hesaplanan : %C: 52,77 %H: 6,55 %N: 13,37

Bulunan : %C: 53,09 %H: 6,70 %N: 13,57

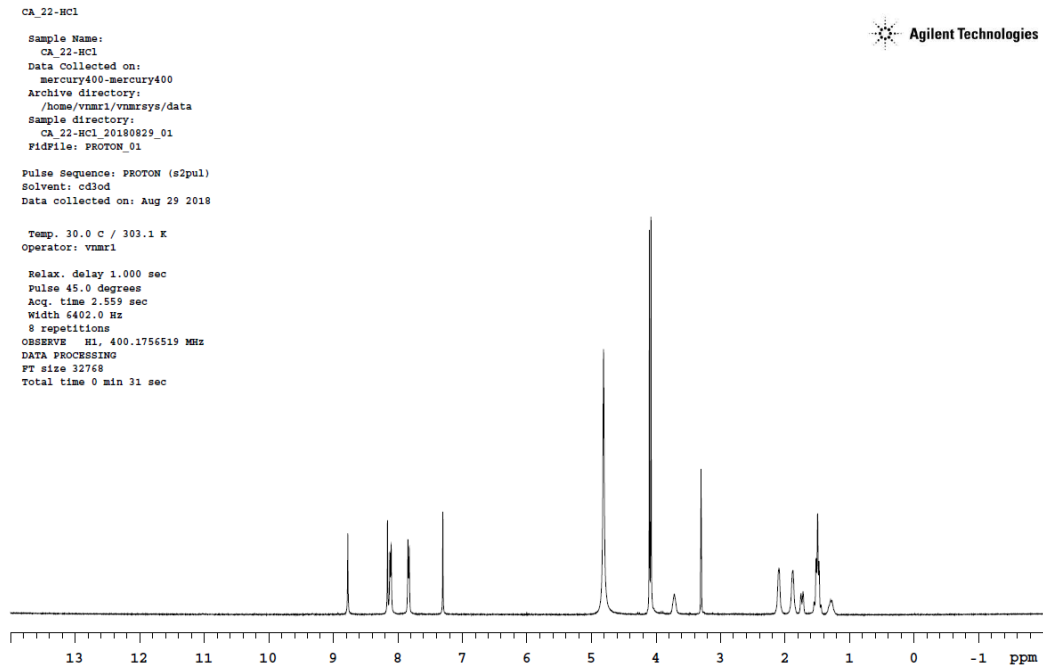
K tle m/z (ESI+): 406,7 [M+H] (%85).

¹H-NMR (CD₃OD)   ppm : 1,27-1,29 (m, 1H, sikloheksil -CH₂); 1,46-1,54 (m, 4H, sikloheksil -CH₂); 1,72-1,75 (m, 1H, sikloheksil -CH₂); 1,86-1,89 (m, 2H, sikloheksil -CH₂); 2,08-2,10 (m, 2H, sikloheksil -CH₂); 3,71-3,72 (m, 1H, sikloheksil -CH); 4,07 (s, 3H, -OCH₃); 4,10 (s, 3H, -OCH₃); 7,30 (s, 1H, H-5 veya H-8); 7,83 (d, 2H, J=8,4Hz, fenil protonları); 8,11 (d, 2H, J=8,4Hz, fenil protonları); 8,16 (s, 1H, H-5 veya H-8); 8,77 (s, 1H, H-2).

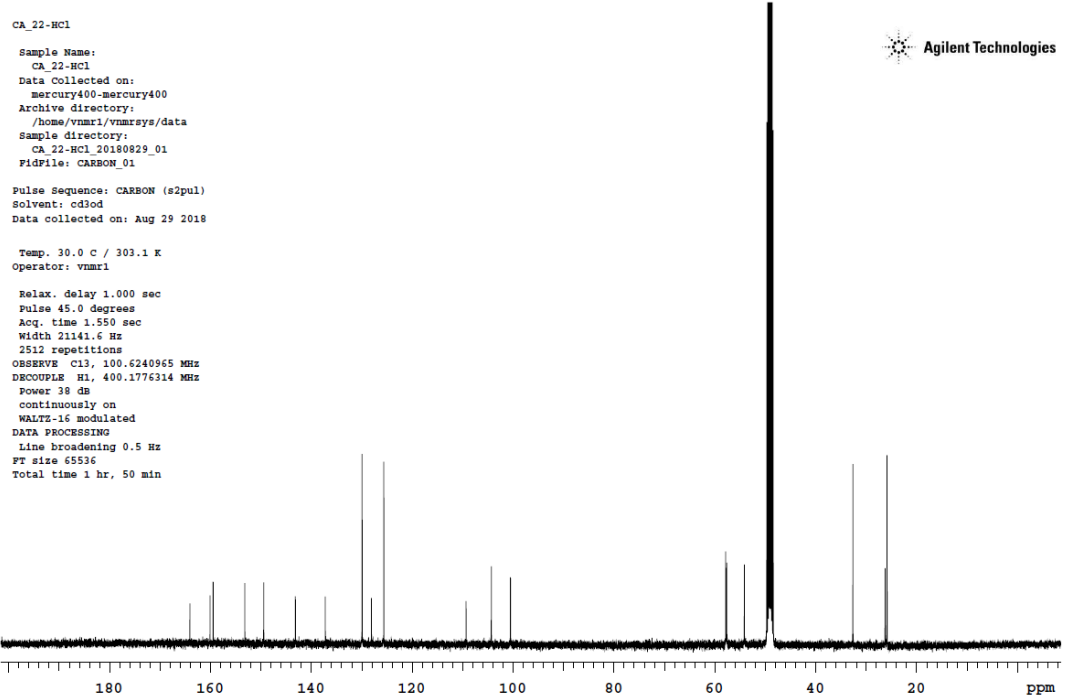
^{13}C -NMR (CD_3OD) δ ppm : 164,10; 160,11; 159,49; 153,21; 149,45; 143,18; 137,26; 129,96; 128,11; 125,65; 109,34; 104,33; 100,54; 57,87 ($-\text{OCH}_3$); 57,66 ($-\text{OCH}_3$); 54,18; 32,66; 26,26; 25,89.



Şekil 3.58. Bileşik 7e'nin Kütle Spektrumu

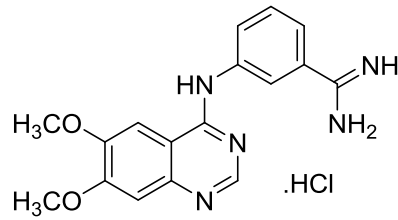


Şekil 3.59. Bileşik 7e'nin ^1H -NMR Spektrumu



Şekil 3.60. Bileşik 7e'nin ^{13}C -NMR Spektrumu

3.3.6. 3-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]benzimidamid (8a)



3-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]benzonitril (**3b**) (240 mg) imidat esteri oluşturmak için 3.3'de verilen yönteme göre reaksiyona sokuldu. Oluşan imidat esteri, amonyak gazı ile doyurulmuş 5 ml mutlak etanol içinde oda sıcaklığında bir gece karıştırıldı. Süre sonunda solvan uçuruldu. Potasyum karbonat çözeltisi ile karıştırılıp süzüldü ve su ile yıkandı. Etanol içinde HCl gazı geçirilerek HCl tuzu haline getirildi. % 58 verimle 196 mg ürün elde edildi.

Erime noktası: 263-265°C

Elementel Analiz: $C_{17}H_{17}N_5O_2 \cdot 2HCl \cdot 2H_2O$

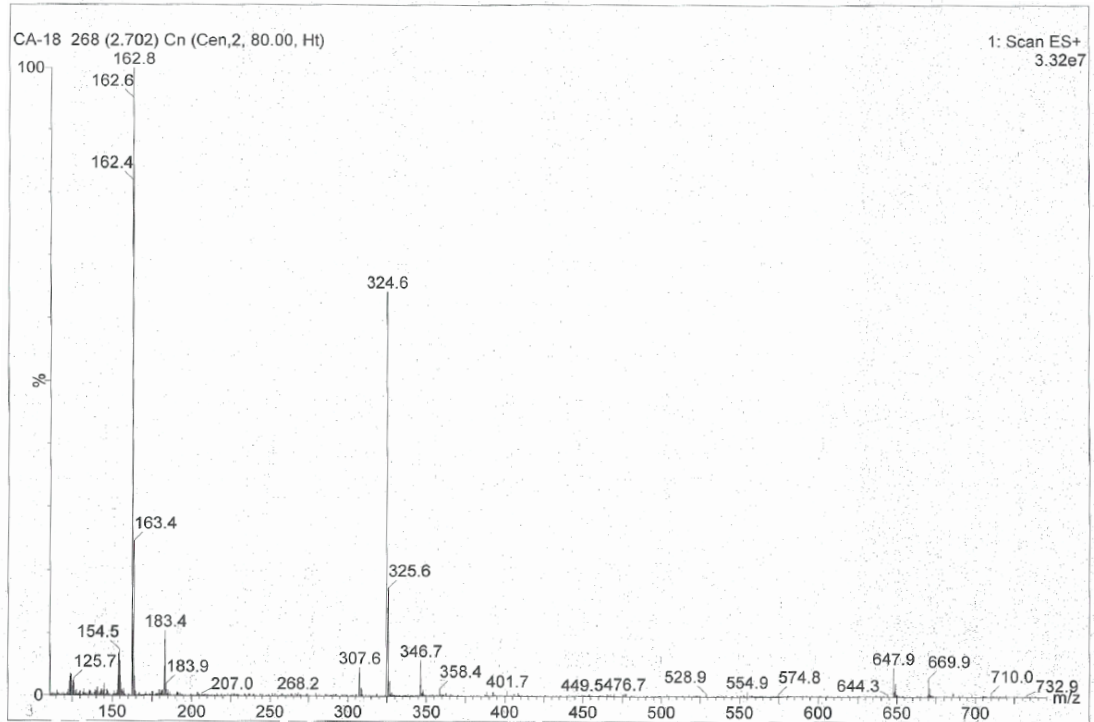
Hesaplanan : %C: 47,23 %H: 5,36 %N: 16,20

Bulunan : %C: 47,61 %H: 5,38 %N: 15,85

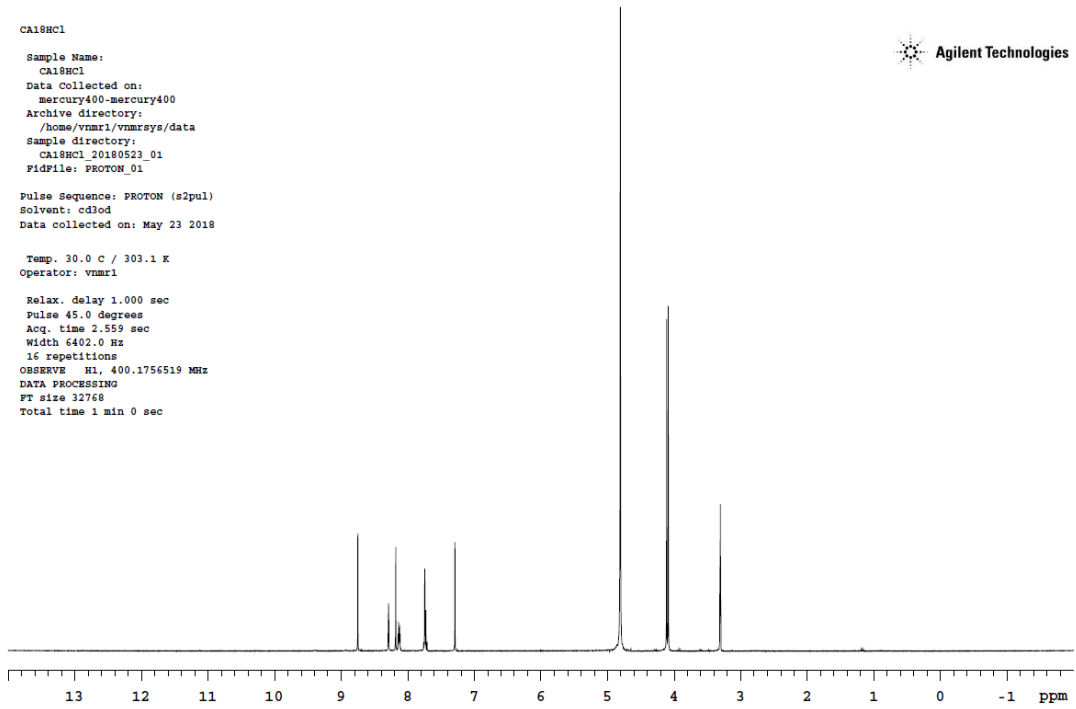
Kütle m/z (ESI+): 324,6 [M+H] (%63).

1H -NMR (CD_3OD) δ ppm : 4,08 (s, 3H, $-OCH_3$); 4,11 (s, 3H, $-OCH_3$); 7,29 (s, 1H, H-5 ve H-8); 7,70-7,76 (m, 2H); 8,11-8,14 (m, 1H); 8,18 (s, 1H, H-5 ve H-8); 8,28-8,29 (m, 1H); 8,75 (s, 1H, H-2).

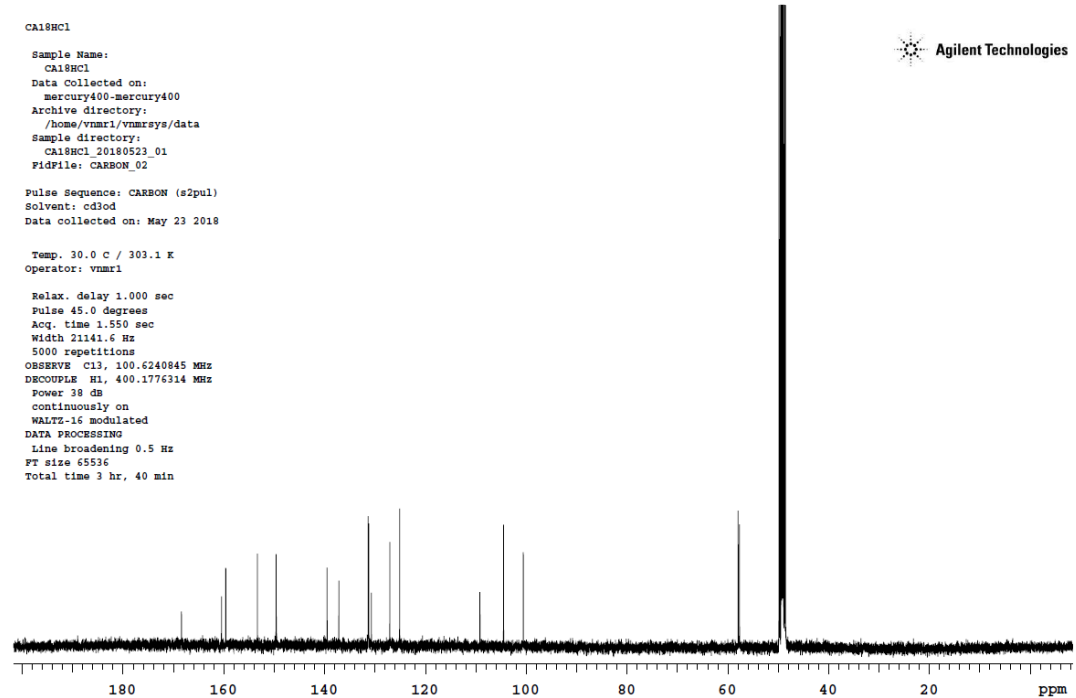
^{13}C -NMR ve HSQC (CD_3OD) δ ppm : 168,40; 160,45; 159,61; 153,32; 149,61; 139,50; 137,17; 131,34; 131,24; 130,72; 127,06; 125,11; 109,19; 104,49; 100,57 (CH-5 veya CH-8); 57,94 ($-OCH_3$); 57,68 ($-OCH_3$).



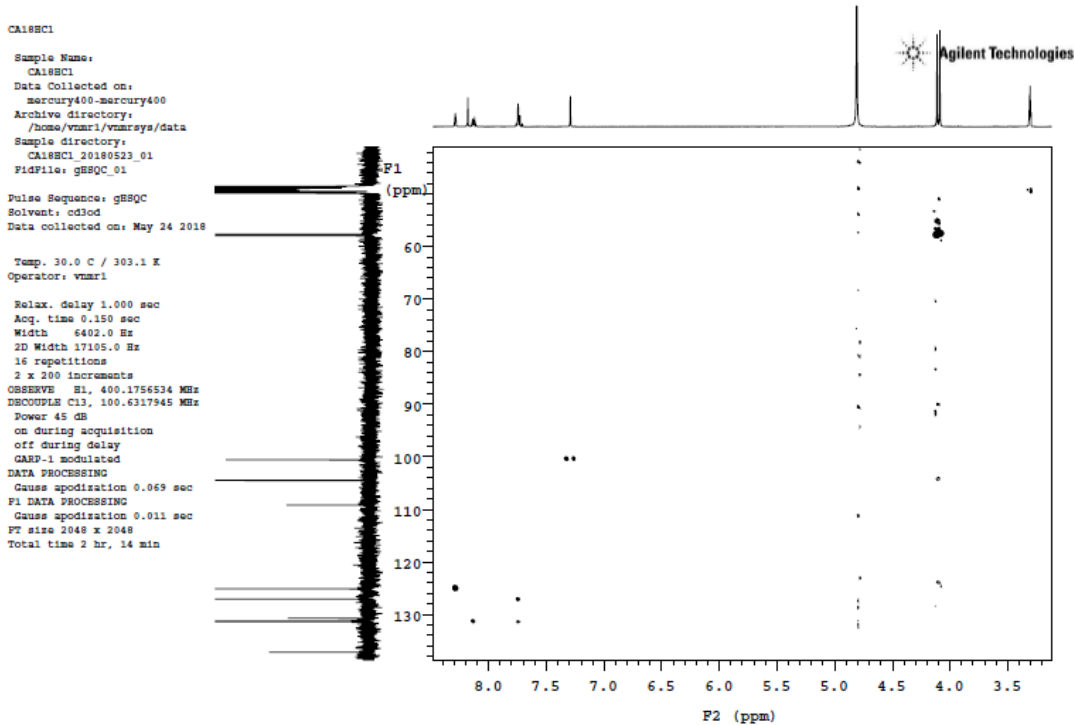
Şekil 3.61. Bileşik 8a'nın Kütle Spektrumu



Şekil 3.62. Bileşik 8a'nın ^1H -NMR Spektrumu

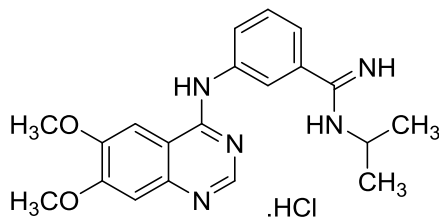


Şekil 3.63. Bileşik 8a'nın ^{13}C -NMR Spektrumu



Şekil 3.64. Bileşik 8a'nın HSQC Spektrumu

3.3.7. 3-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]-N-izopropilbenzimidamid (8b)



3-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]benzonitril (**3a**) (230 mg) imidat esterini oluşturmak için 3.3'de verilen yönteme göre reaksiyona sokuldu. Oluşan imidat esterine 0,25 ml izopropilamin ve 5 ml mutlak etanol eklenerek oda sıcaklığında bir gece karıştırıldı. Süre sonunda solvan uçuruldu. Potasyum karbonat çözeltisi ile karıştırılıp süzüldü. CHCl_3 : MeOH: NH_3 (100:20:0,5) solvan sistemi yardımıyla kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Etanol içinde HCl gazı geçirilerek HCl tuzu haline getirildi. % 25 verimle 86 mg ürün elde edildi.

Erime noktası: 285-286°C

Elementel Analiz: $C_{20}H_{23}N_5O_2 \cdot 2HCl \cdot H_2O$

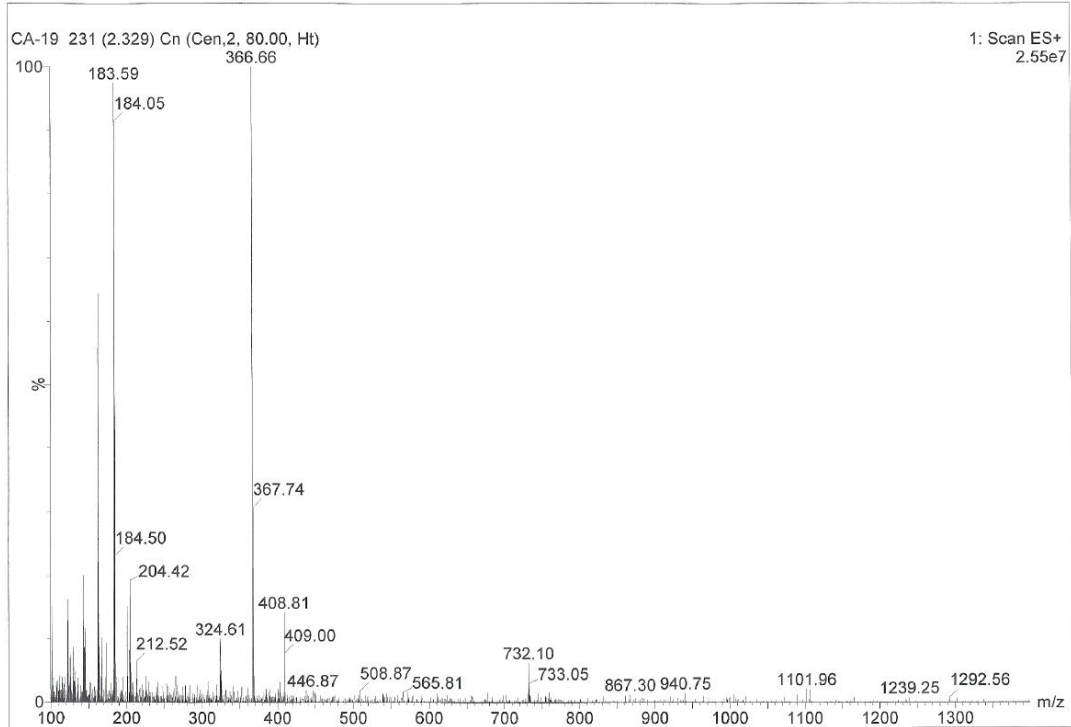
Hesaplanan : %C: 52,63 %H: 5,96 %N: 15,34

Bulunan : %C: 52,21 %H: 6,16 %N: 15,27

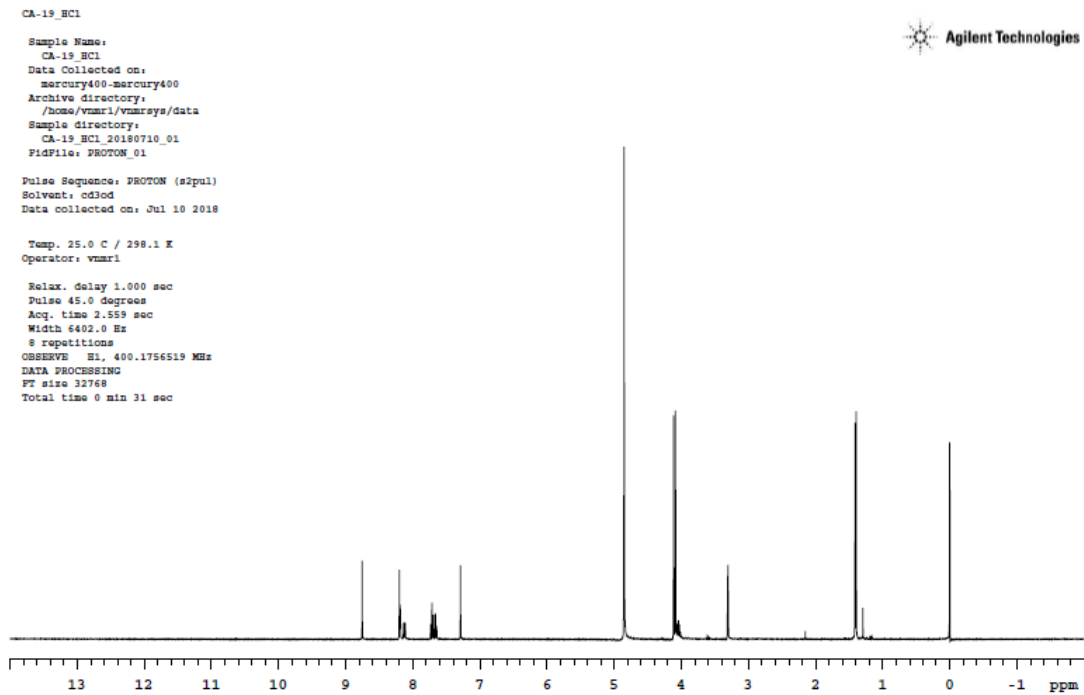
Kütle m/z (ESI+): 366,6 [M+H] (%100).

1H -NMR (CD_3OD) δ ppm : 1,40 (d, 6H, $J=6,4Hz$, $-CH_3$); 4,02-4,07 (m, 1H, $-CH$); 4,08 (s, 3H, $-OCH_3$); 4,11 (s, 3H, $-OCH_3$); 7,29 (s, 1H, H-5 veya H-8); 7,65 (dt, 1H, $J=8\&1,6Hz$, H-4' veya H-6'); 7,71 (t, 1H, $J=8Hz$, H-5'); 8,12 (dt, 1H, $J=8\&1,2Hz$, H-4' veya H-6'); 8,18 (t, 1H, $J=2Hz$, H-2'); 8,20 (s, 1H, H-5 veya H-8); 8,75 (s, 1H, H-2).

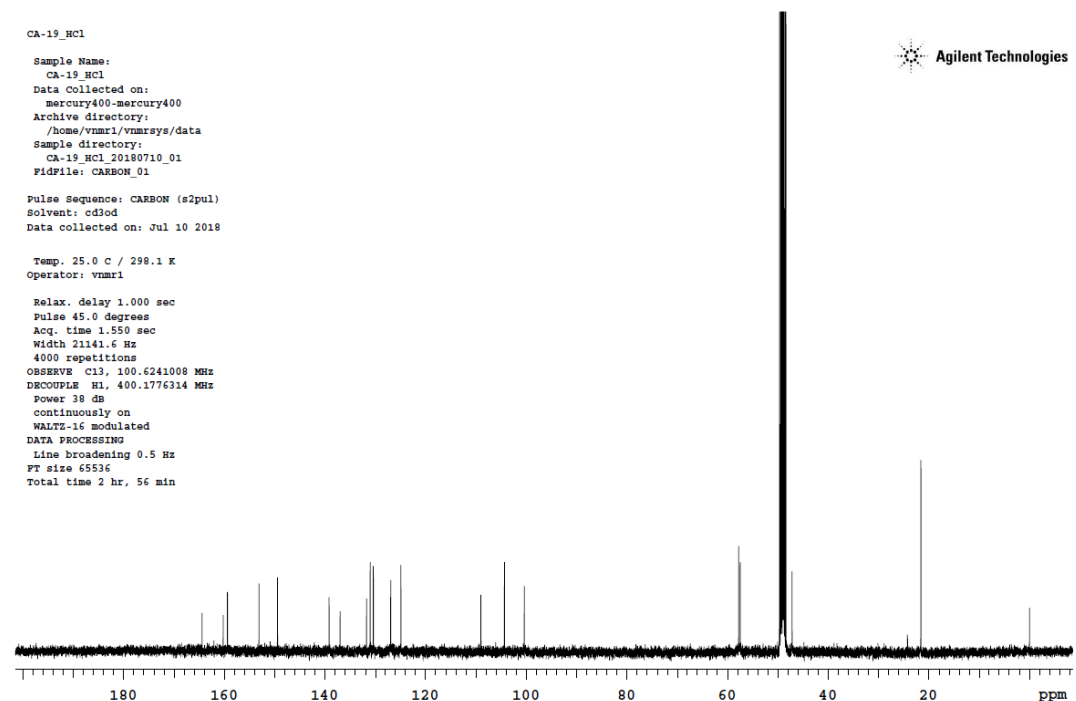
^{13}C -NMR ve HSQC (CD_3OD) δ ppm : 164,45; 160,25; 159,40; 153,13; 149,46; 139,20; 137,02; 131,76; 131,04; 130,41; 126,96; 124,93; 109,03; 104,35; 100,41 (CH-5 veya CH-8); 57,81 ($-OCH_3$); 57,50 ($-OCH_3$); 47,19; 21,58 ($-CH_3$).



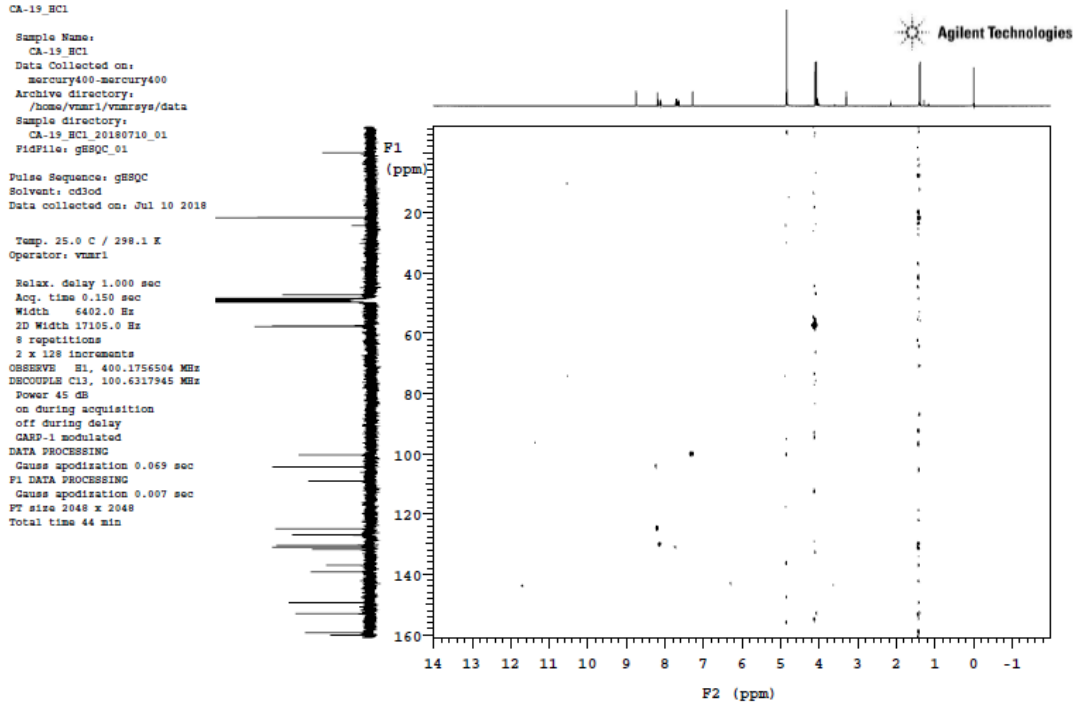
Şekil 3.65. Bileşik 8b'nin Kütle Spektrumu



Şekil 3.66. Bileşik 8b'nin ^1H -NMR Spektrumu

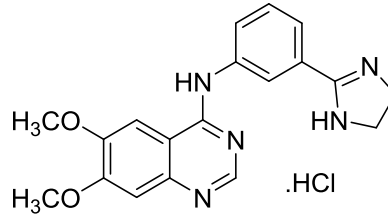


Şekil 3.67. Bileşik 8b'nin ^{13}C -NMR Spektrumu



Şekil 3.68. Bileşik 8b'nin HSQC Spektrumu

3.3.8. N-[3-(4,5-Dihidro-1H-imidazol-2-il)fenil]-6,7-dimetoksikinazolin-4-amin (8c)



3-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]benzonitril (**3b**) (200 mg) imidat esterini oluşturmak için 3.3'de verilen yönteme göre reaksiyona sokuldu. Oluşan imidat esterine 0,25 ml etilendiamin ve 5 ml mutlak etanol eklenerek oda sıcaklığında bir gece karıştırıldı. Süre sonunda solvan uçuruldu. Potasyum karbonat çözeltisi ile karıştırılıp süzüldü. Etanol içinde HCl gazı geçirilerek HCl tuzu haline getirildi. % 59 verimle 170 mg ürün elde edildi.

Erime noktası: 259-261°C

Elementel Analiz: $C_{19}H_{19}N_5O_2 \cdot 2HCl \cdot H_2O$

Hesaplanan : %C: 51,82 %H: 5,26 %N: 15,90

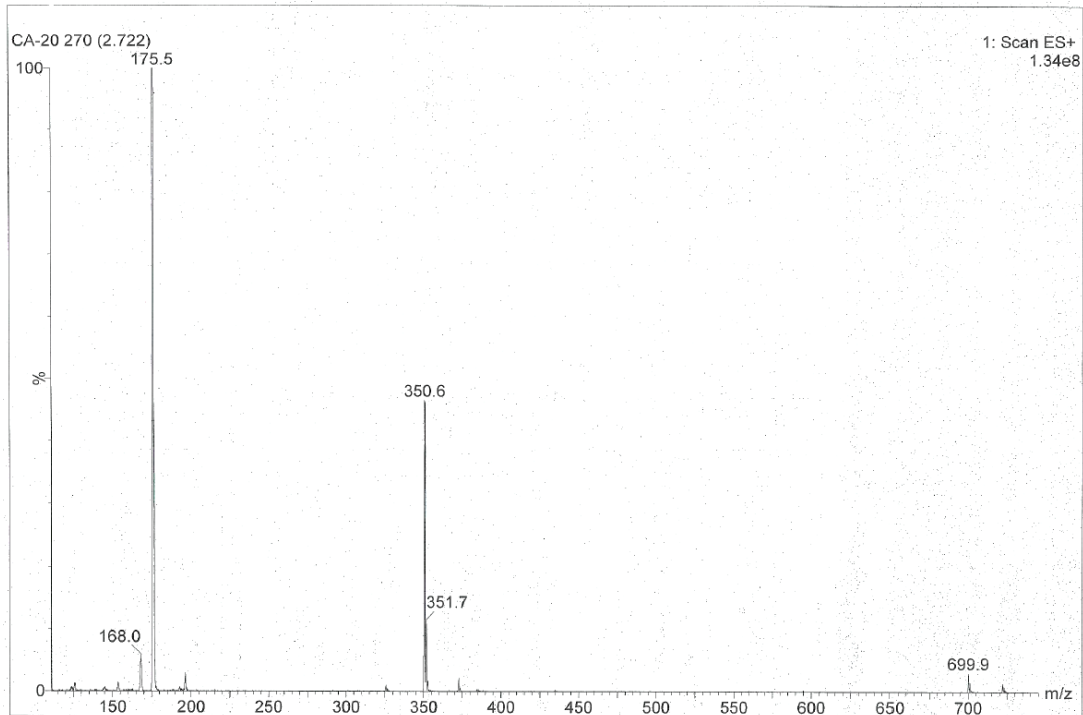
Bulunan : %C: 51,59 %H: 5,64 %N: 15,73

Kütle m/z (ESI+): 350,6 [M+H] (%45).

1H -NMR (DMSO- d_6) δ ppm : 3,82 (s, 4H, -CH₂); 3,93 (s, 3H, -OCH₃); 3,98 (s, 3H, -OCH₃); 7,19 (s, 1H, H-5 veya H-8); 7,52 (t, 1H, $J=8$ Hz, H-5'); 7,61 (d, 1H, $J=7,6$ Hz, H-4' veya H-6'); 8,01 (s, 1H, H-5 veya H-8); 8,08 (dd, 1H, $J=7,2$ &1,2Hz, H-4' veya H-6'); 8,41 (t, 1H, $J=2$ Hz, H-2'); 8,47 (s, 1H, H-2); 9,90 (s, 1H, -NH).

COSY (DMSO- d_6) δ ppm : [H-5' : H-4'], [H-5' : H-6'].

^{13}C -NMR ve HSQC (DMSO- d_6) δ ppm : 164,57; 156,31; 154,35; 152,67 (CH-2); 148,98; 147,04; 140,03; 128,72 (CH-5'); 126,43; 126,18; 122,50; 121,61 (CH-2'); 108,98; 107,06 (CH-5 veya CH-8); 102,33 (CH-5 veya CH-8); 56,43 (-OCH₃); 55,78 (-OCH₃); 46,88 (-CH₂).

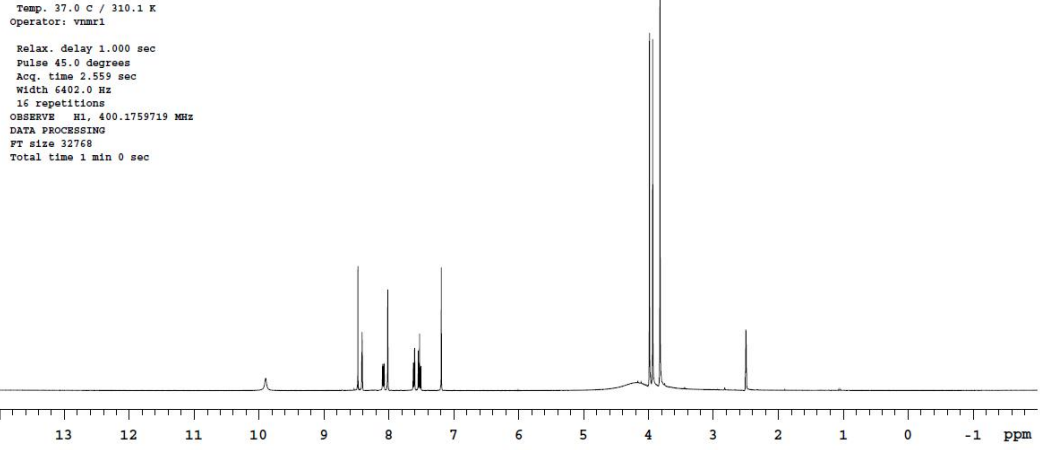


Şekil 3.69. Bileşik 8c'nin Kütle Spektrumu

CA-20



Sample Name:
CA-20
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
CA-20_20180520_01
FidFile: PROTON_01
Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: May 20 2018

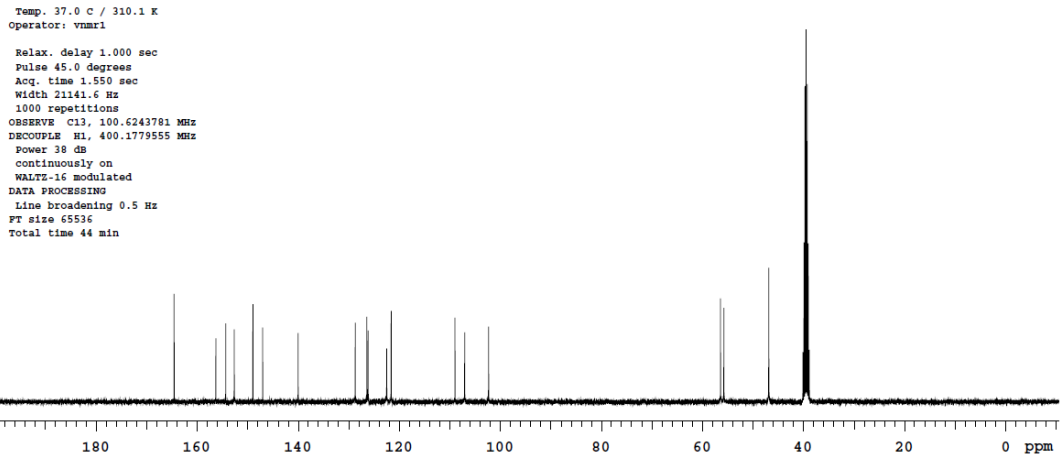


Şekil 3.70. Bileşik 8c'nin ^1H -NMR Spektrumu

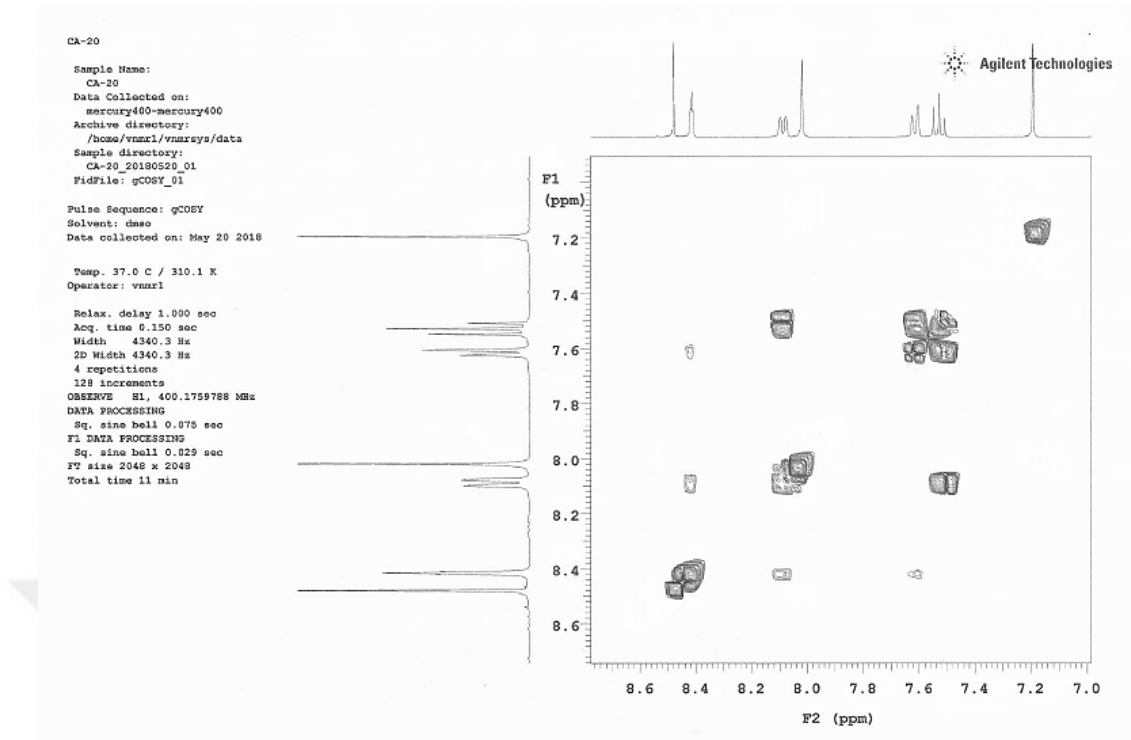
CA-20



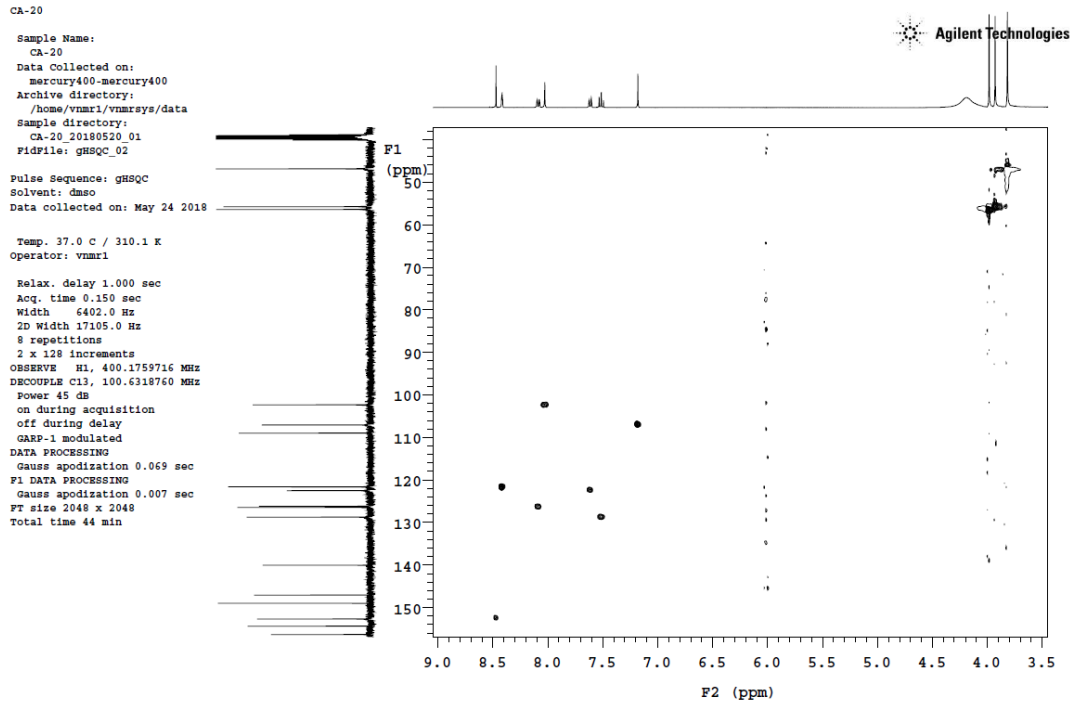
Sample Name:
CA-20
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
CA-20_20180520_01
FidFile: CARBON_01
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: May 24 2018



Şekil 3.71. Bileşik 8c'nin ^{13}C -NMR Spektrumu

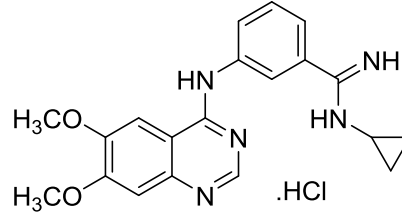


Şekil 3.72. Bileşik 8c'nin COSY Spektrumu



Şekil 3.73. Bileşik 8c'nin HSQC Spektrumu

3.3.9. N-Siklopropil-3-[(6,7-dimetoksikinazolin-4-il)amino]benzimidamid (8d)



3-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]benzonitril (**3b**) (300 mg) imidat esteri oluşturmak için 3.3'de verilen yönteme göre reaksiyona sokuldu. Oluşan imidat esterine 0,25 ml siklopropilamin ve 5 ml mutlak etanol eklenerek oda sıcaklığında bir gece karıştırıldı. Süre sonunda solvan uçuruldu. Potasyum karbonat çözeltisi ile karıştırılıp süzüldü. CHCl_3 : MeOH: NH_3 (100:20:0,5) solvan sistemi yardımıyla kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Etanol içinde HCl gazı geçirilerek HCl tuzu haline getirildi. % 51 verimle 217 mg ürün elde edildi.

Erime noktası: 270-272°C

Elementel Analiz: $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_2 \cdot \text{HCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Hesaplanan : %C: 55,11 %H: 6,01 %N: 16,06

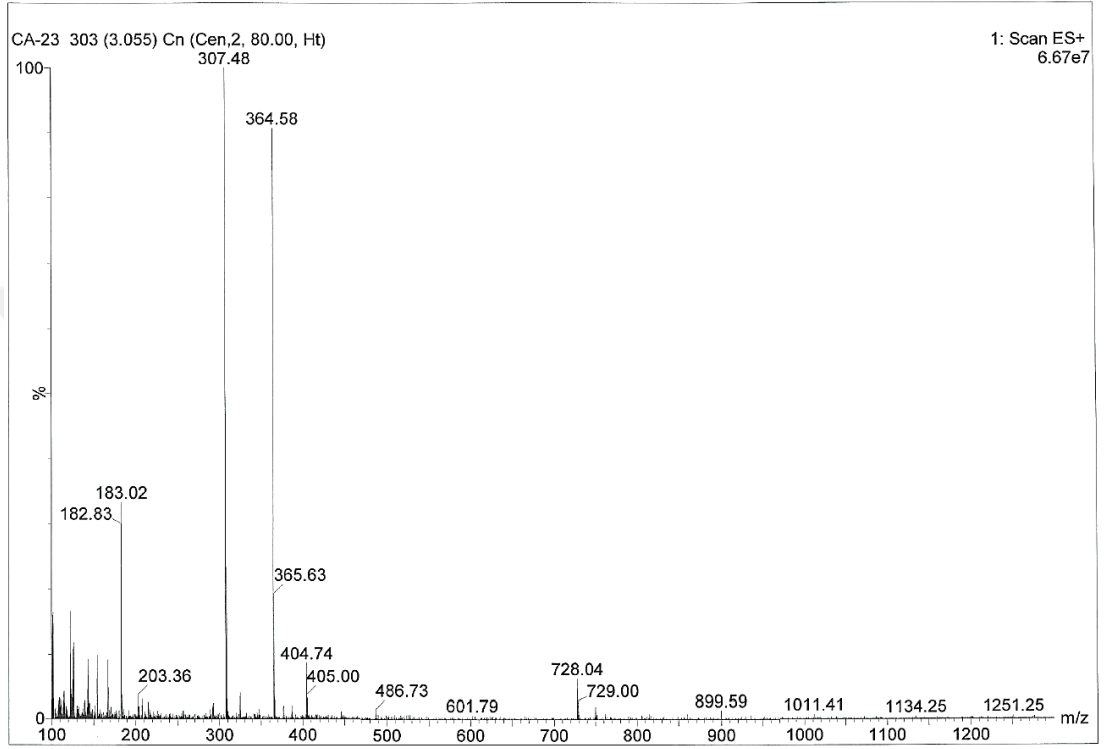
Bulunan : %C: 55,52 %H: 5,69 %N: 15,66

Kütle m/z (ESI+): 364,5 [M+H] (%90).

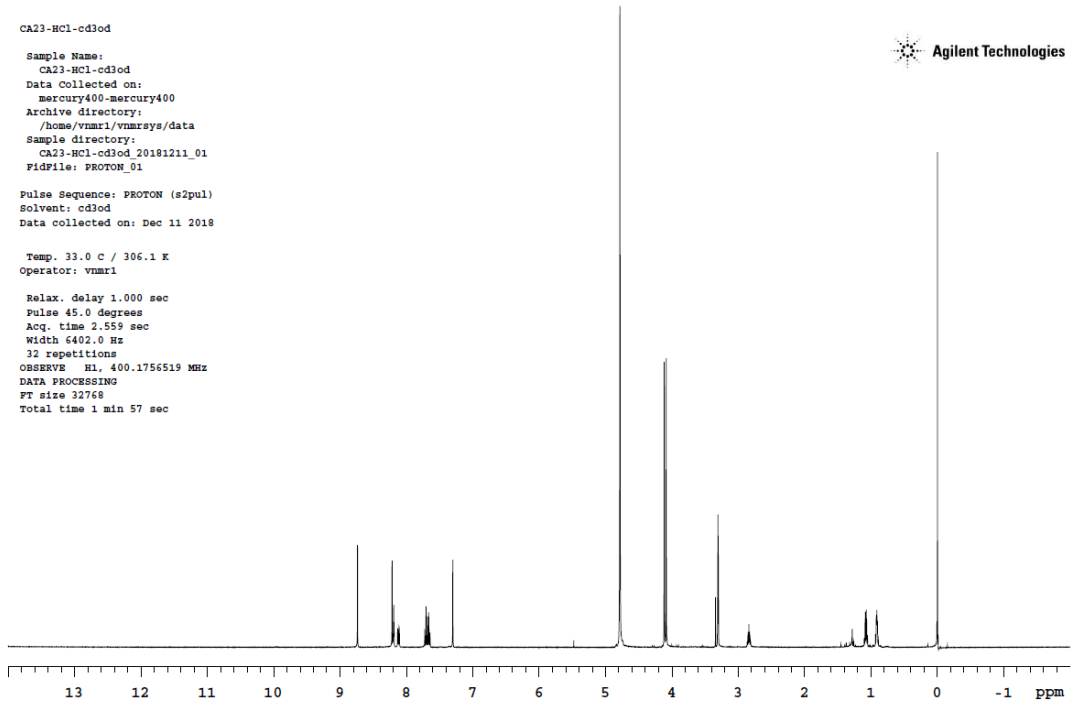
$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ ppm : 0,88-0,93 (m, 2H, $-\text{CH}_2$); 1,05-1,10 (m, 2H, $-\text{CH}_2$); 2,82-2,85 (m, 1H, $-\text{CH}$); 4,08 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$); 4,11 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$); 7,30 (s, 1H, H-5 veya H-8); 7,65 (dt, 1H, $J=8\&1,2\text{Hz}$, H-4' veya H-6'); 7,70 (t, 1H, $J=8\text{Hz}$, H-5'); 8,11 (dt, 1H, $J=8\&2\text{Hz}$, H-4' veya H-6'); 8,19 (t, 1H, $J=2\text{Hz}$, H-2'); 8,21 (s, 1H, H-5 veya H-8); 8,73 (s, 1H, H-2).

COSY (CD_3OD) δ ppm : [H-5' : H-4'], [H-5' : H-6'].

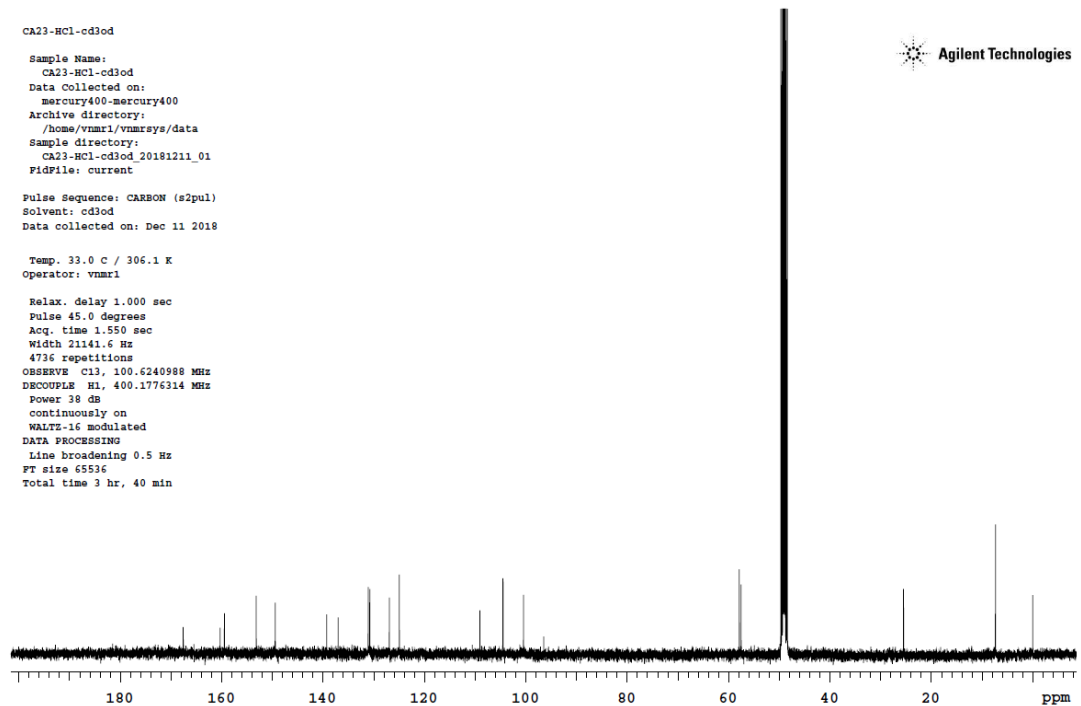
^{13}C -NMR (CD_3OD) δ ppm : 167,58; 160,30; 159,46; 153,18; 149,43; 139,27; 137,02; 131,09; 130,81; 130,78; 126,93; 124,95; 109,06; 104,51; 100,46; 57,89 (-OCH₃); 57,54 (-OCH₃); 25,50 (-CH); 7,36 (-CH₂).



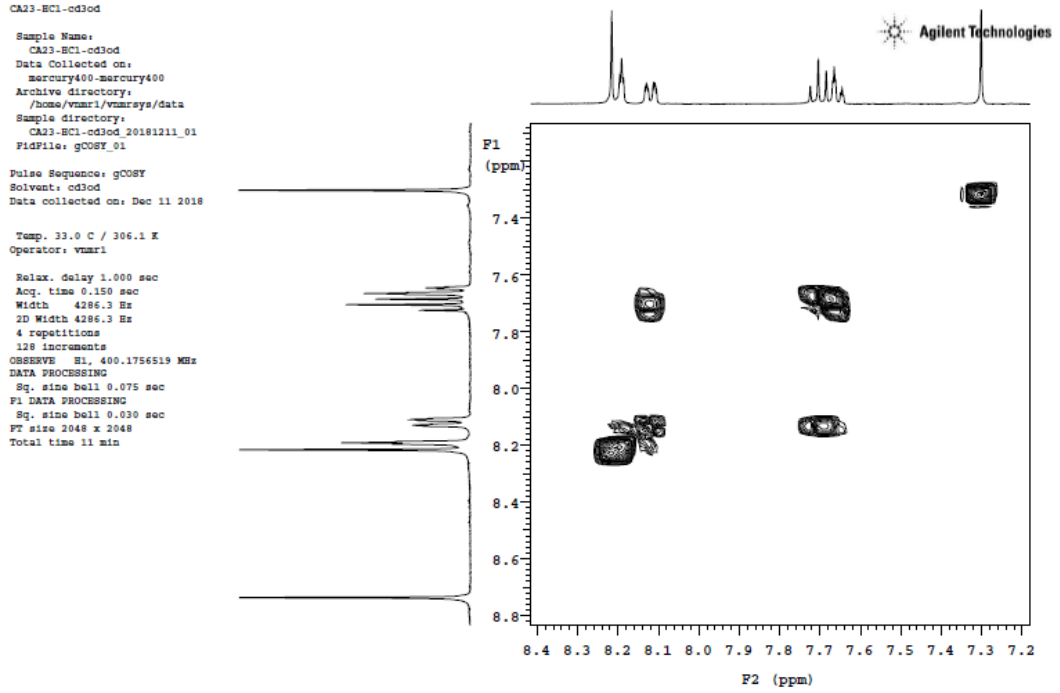
Şekil 3.74. Bileşik 8d'nin Kütle Spektrumu



Şekil 3.75. Bileşik 8d'nin ^1H -NMR Spektrumu

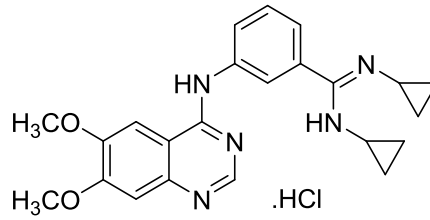


Şekil 3.76. Bileşik 8d'nin ^{13}C -NMR Spektrumu



Şekil 3.77. Bileşik **8d**'nin COSY Spektrumu

3.3.10. *N,N'*-Disiklopropil-3-[(6,7-dimetoksikinazolin-4-il)amino] benzimidamid (**8e**)



3-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]benzonitril (**3b**) (300 mg) imidat esteri oluşturmak için 3.3'de verilen yönteme göre reaksiyona sokuldu. Oluşan imidat esterine 0,4 ml siklopropilamin ve 5 ml mutlak etanol eklenerek oda sıcaklığında bir gece karıştırıldı. Süre sonunda solvan uçuruldu. Potasyum karbonat çözeltisi ile karıştırılıp süzüldü. Metanol ve aseton ile kristallendirildi. Etanol içinde HCl gazı geçirilerek HCl tuzu haline getirildi. % 42 verimle 207 mg ürün elde edildi.

Erime noktası: 256-257°C

Elementel Analiz: $C_{23}H_{25}N_5O_2 \cdot 2HCl \cdot 1,5H_2O$

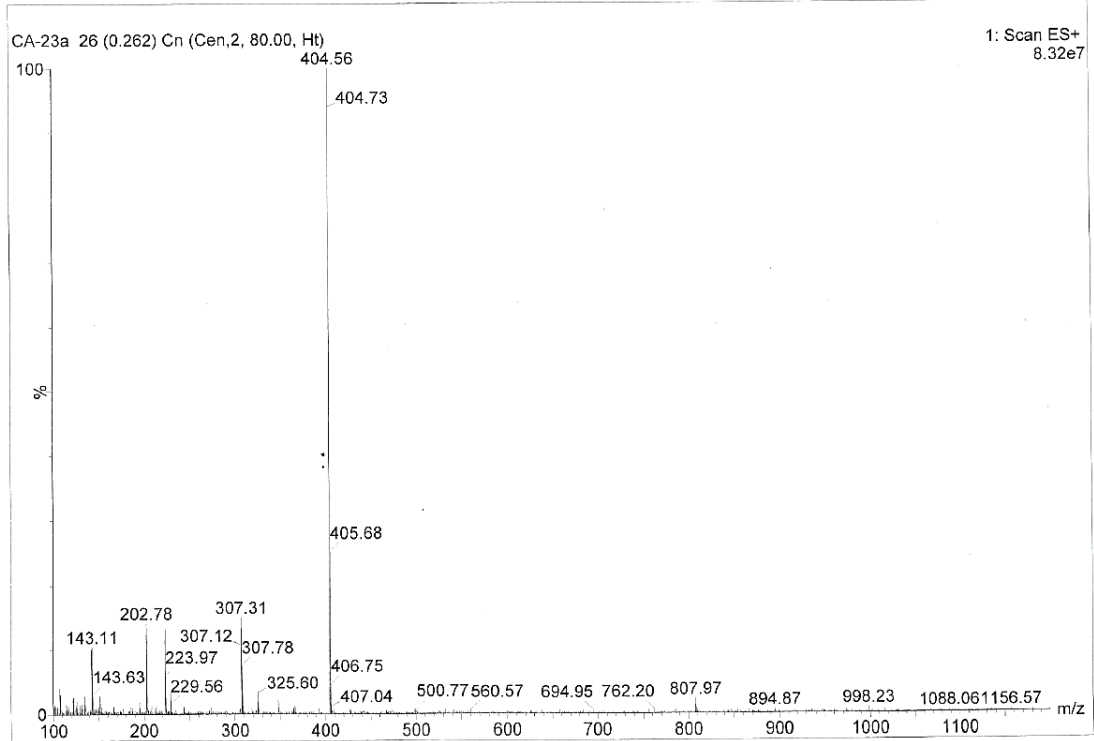
Hesaplanan : %C: 54,87 %H: 6,00 %N: 13,91

Bulunan : %C: 54,60 %H: 6,17 %N: 14,03

Kütle m/z (ESI+): 404,5 [M+H] (%100).

1H -NMR (CD_3OD) δ ppm : 0,74-0,79 (m, 4H, $-CH_2$); 0,86-1,11 (m, 4H, $-CH_2$); 2,79-2,82 (m, 1H, $-CH$); 2,99-3,03 (m, 1H, $-CH$); 4,06 (s, 3H, $-OCH_3$); 4,10 (s, 3H, $-OCH_3$); 7,28 (s, 1H, H-5 veya H-8); 7,58 (dt, 1H, $J=7,6\&1,2Hz$); 7,71 (t, 1H, $J=7,6Hz$, H-5'); 8,09 (dd, 1H, $J=8\&2,2Hz$); 8,21-8,22 (m, 2H); 8,73 (s, 1H, H-2).

^{13}C -NMR ve HSQC (CD_3OD) δ ppm : 169,01; 160,16; 159,29; 153,03; 149,41; 138,92; 136,90; 130,90 (CH-5'); 130,42; 129,51; 127,34; 125,75; 108,98; 104,52; 100,40; 57,95 ($-OCH_3$); 57,55 ($-OCH_3$); 28,80 ($-CH$); 25,34 ($-CH$); 8,97 ($-CH_2$); 7,66 ($-CH_2$).



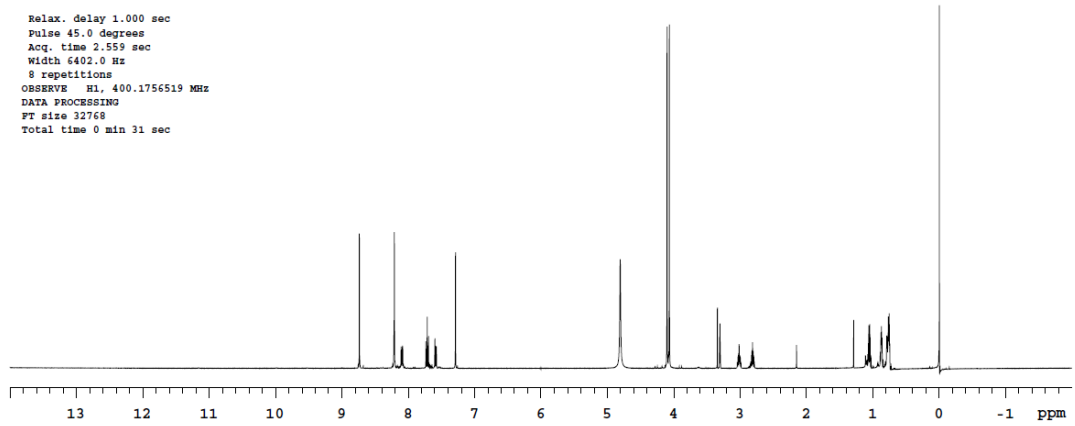
Şekil 3.78. Bileşik 8e'nin Kütle Spektrumu

CA23a-HCl-cift_cyclopropyl-cd3od
 Sample Name:
 CA23a-HCl-cift_cyclopropyl-cd3od
 Data Collected on:
 mercury400-mercury400
 Archive directory:
 /home/vnmr1/vnmrsys/data
 Sample directory:
 CA23a-HCl-cift_cyclopropyl-cd3od_20180729_01
 FidFile: PROTON_01



Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
 Solvent: cd3od
 Data collected on: Jul 29 2018

Temp. 30.0 C / 303.1 K
 Operator: vnmr1
 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 2.559 sec
 Width 6402.0 Hz
 8 repetitions
 OBSERVE H1, 400.1756519 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32768
 Total time 0 min 31 sec



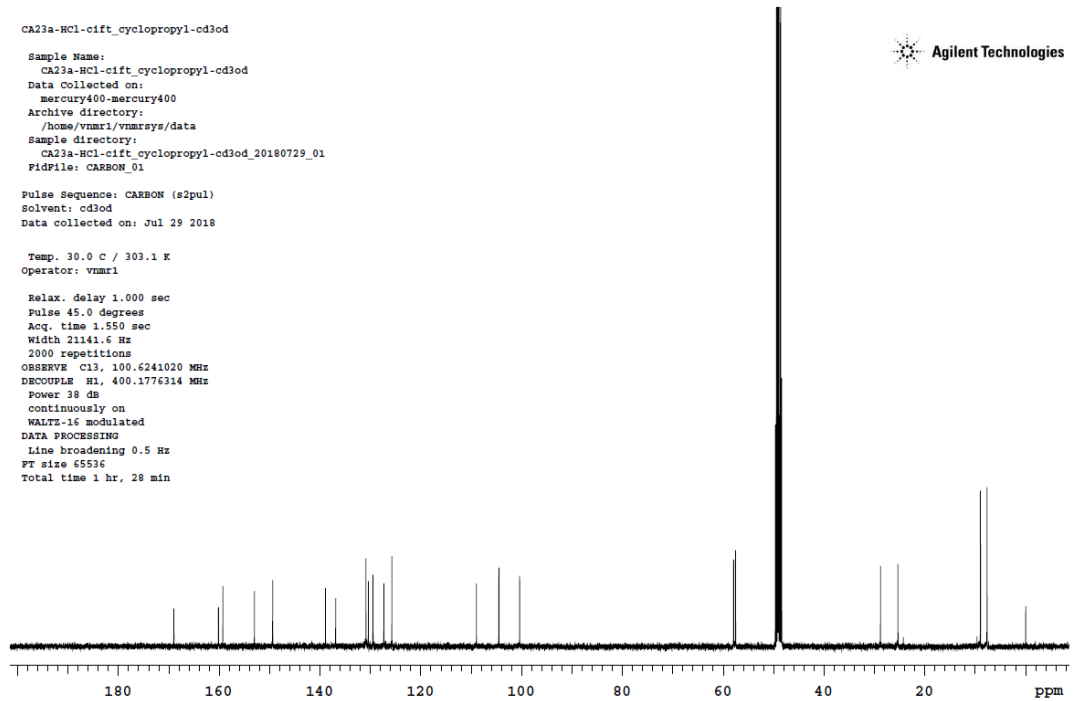
Şekil 3.79. Bileşik 8e'nin ^1H -NMR Spektrumu

CA23a-HCl-cift_cyclopropyl-cd3od
 Sample Name:
 CA23a-HCl-cift_cyclopropyl-cd3od
 Data Collected on:
 mercury400-mercury400
 Archive directory:
 /home/vnmr1/vnmrsys/data
 Sample directory:
 CA23a-HCl-cift_cyclopropyl-cd3od_20180729_01
 FidFile: CARBON_01

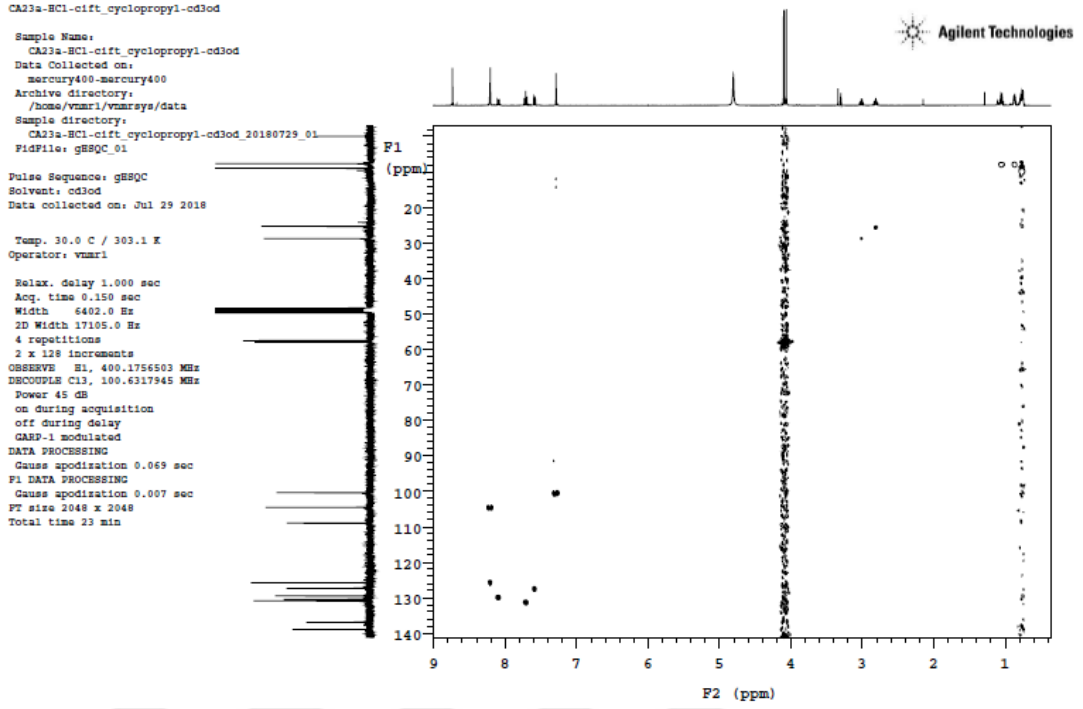


Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
 Solvent: cd3od
 Data collected on: Jul 29 2018

Temp. 30.0 C / 303.1 K
 Operator: vnmr1
 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 1.550 sec
 Width 21141.6 Hz
 2000 repetitions
 OBSERVE C13, 100.6241020 MHz
 DECOUPLE H1, 400.1776314 MHz
 Power 38 dB
 continuously on
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 0.5 Hz
 FT size 65536
 Total time 1 hr, 28 min

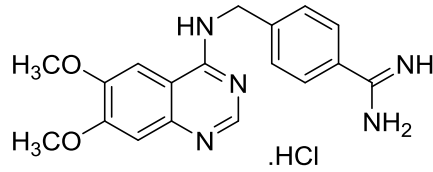


Şekil 3.80. Bileşik 8e'nin ^{13}C -NMR Spektrumu



Şekil 3.81. Bileşik 8e'nin HSQC Spektrumu

3.3.11. 4-[[[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]metil]benzimidamid (9a)



4-[[[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]metil]benzonitril (3c) (185 mg) imidat esteri oluşturmak için 3.3'de verilen yöntemle göre reaksiyona sokuldu. Oluşan imidat esteri, amonyak gazı ile doyurulmuş 5 ml mutlak etanol içinde oda bir gece karıştırıldı. Süre sonunda solvan uçuruldu. Potasyum karbonat çözeltisi ile karıştırılıp süzüldü. Etanol içinde HCl gazı geçirilerek HCl tuzu haline getirildi. % 27 verimle 69 mg ürün elde edildi.

Erime noktası: 281-283°C

Elementel Analiz: $C_{18}H_{19}N_5O_2 \cdot 2HCl \cdot 2H_2O$

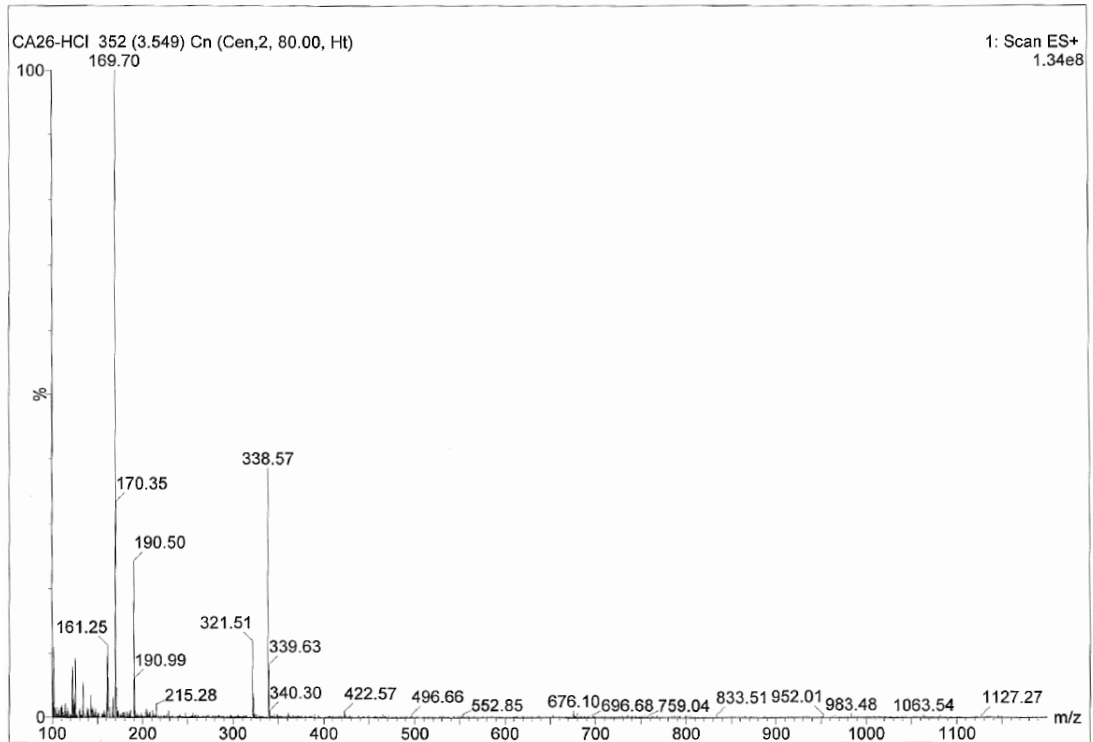
Hesaplanan : %C: 48,44 %H: 5,64 %N: 15,69

Bulunan : %C: 48,63 %H: 5,36 %N: 15,49

Kütle m/z (ESI+): 338,5 [M+H] (%40).

1H -NMR (CD_3OD) δ ppm : 4,03 (s, 3H, $-OCH_3$); 4,04 (s, 3H, $-OCH_3$); 5,11 (s, 2H, $-CH_2$); 7,21 (s, 1H, H-5 veya H-8); 7,71 (d, 2H, $J=8Hz$, fenil protonları); 7,79 (d, 2H, $J=8Hz$, fenil protonları); 7,89 (s, 1H, H-5 veya H-8); 8,65 (s, 1H, H-2).

^{13}C -NMR ve HSQC (CD_3OD) δ ppm : 168,12; 161,40; 158,76; 152,64; 149,82; 145,76; 135,97; 129,84; 129,37; 128,64; 108,30; 104,06 (CH-5 veya CH-8); 100,44 (CH-5 veya CH-8); 57,51 ($-OCH_3$); 57,38 ($-OCH_3$); 45,90 ($-CH_2$).



Şekil 3.82. Bileşik 9a'nın Kütle Spektrumu

CA26-HCl-cd3od

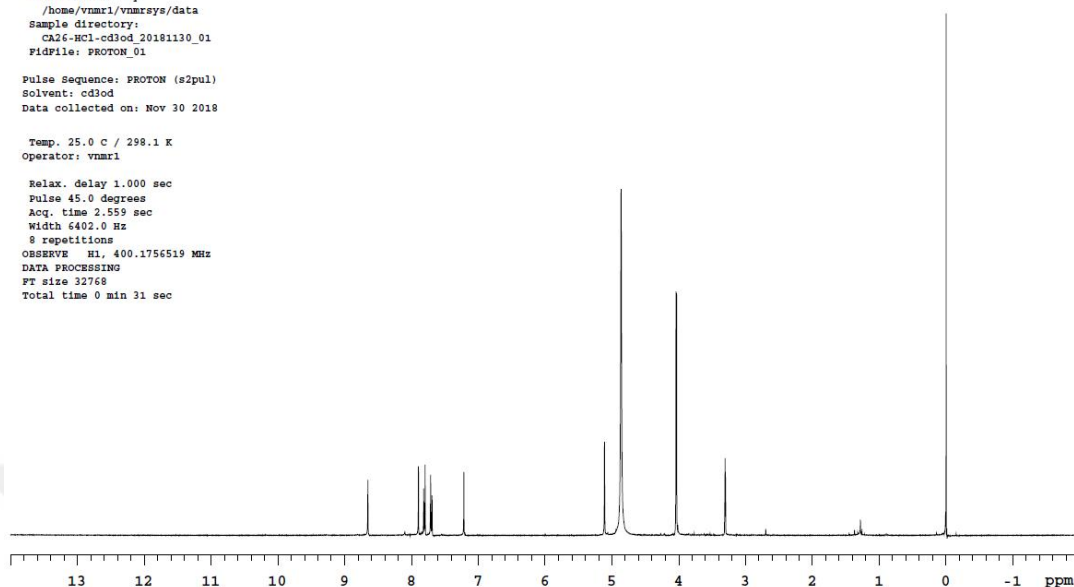


Sample Name:
CA26-HCl-cd3od
Data collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
CA26-HCl-cd3od_20181130_01
FidFile: PROTON_01

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: cd3od
Data collected on: Nov 30 2018

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.559 sec
Width 6402.0 Hz
8 repetitions
OBSERVE H1, 400.1756519 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min 31 sec



Şekil 3.83. Bileşik 9a'nın ^1H -NMR Spektrumu

CA26-HCl-cd3od

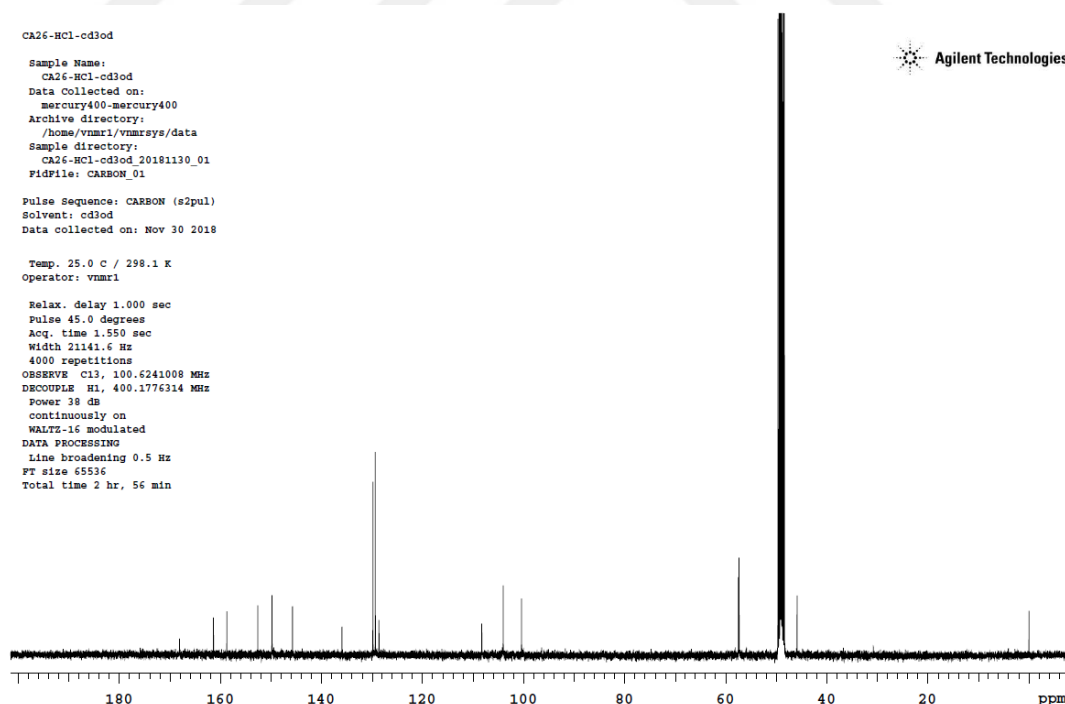


Sample Name:
CA26-HCl-cd3od
Data collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
CA26-HCl-cd3od_20181130_01
FidFile: CARBON_01

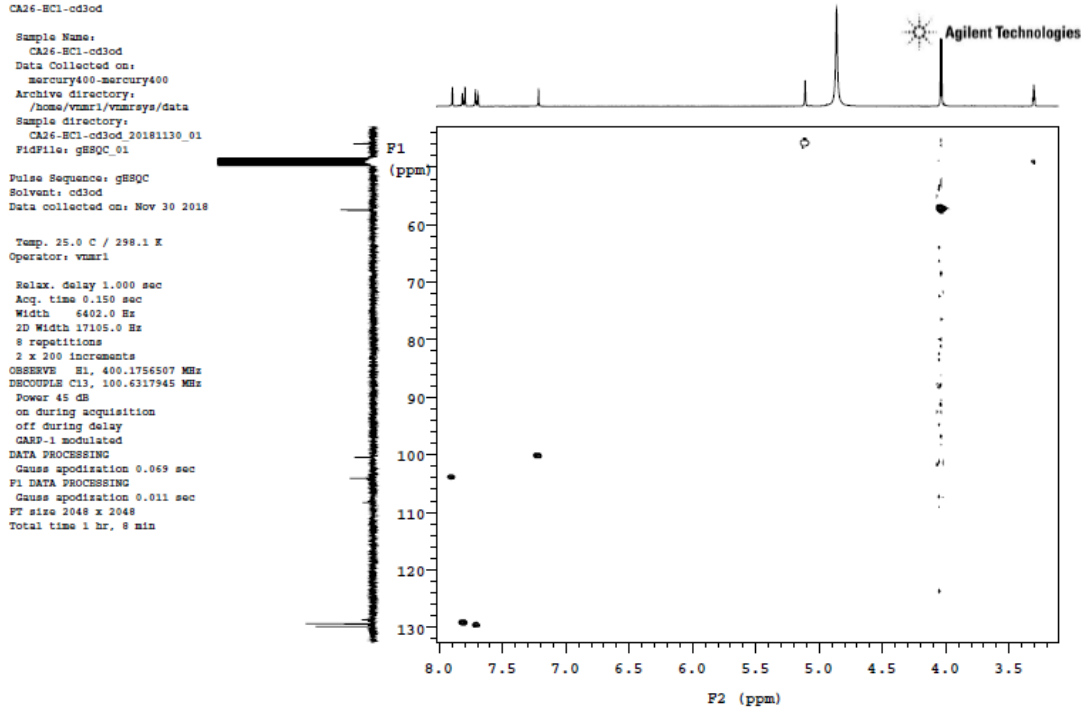
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: cd3od
Data collected on: Nov 30 2018

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.550 sec
Width 21141.6 Hz
4000 repetitions
OBSERVE C13, 100.6241008 MHz
DECOUPLE H1, 400.1776314 MHz
Power 38 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 2 hr, 56 min

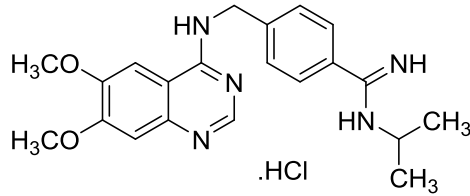


Şekil 3.84. Bileşik 9a'nın ^{13}C -NMR Spektrumu



Şekil 3.85. Bileşik 9a'nın HSQC Spektrumu

3.3.12. 4-[[[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]metil]-N-izopropil benzimidamid (9b)



4-[[[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]metil]benzonitril (3c) (240 mg) imidat esterini oluşturmak için 3.3'de verilen yöntemle göre reaksiyona sokuldu. Oluşan imidat esterine 0,25 ml izopropilamin ve 5 ml mutlak etanol eklenerek oda sıcaklığında bir gece karıştırıldı. Süre sonunda solvan uçuruldu. Potasyum karbonat çözeltisi ile karıştırılıp süzülde. CHCl₃: MeOH: NH₃ (100:20:0,5) solvan sistemi yardımıyla kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Etanol içinde HCl gazı geçirilerek HCl tuzu haline getirildi. % 17 verimle 65 mg ürün elde edildi.

Erime noktası: 248-250°C

Elementel Analiz: $C_{21}H_{25}N_5O_2 \cdot 2HCl \cdot 3,5H_2O$

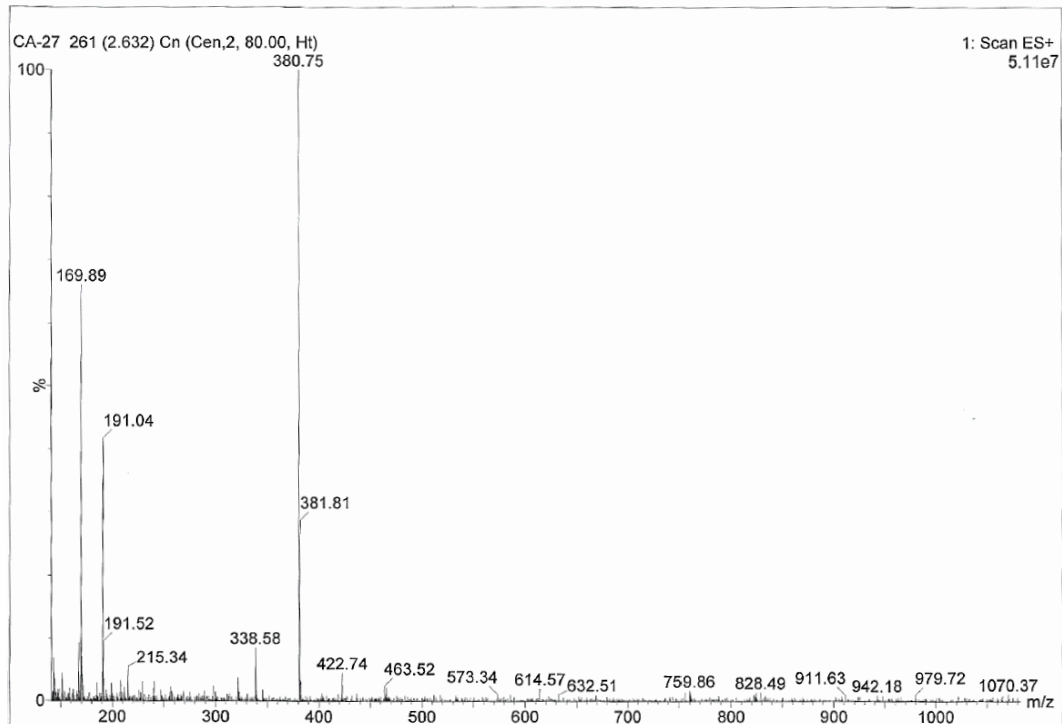
Hesaplanan : %C: 48,93 %H: 6,65 %N: 13,59

Bulunan : %C: 49,08 %H: 7,07 %N: 13,45

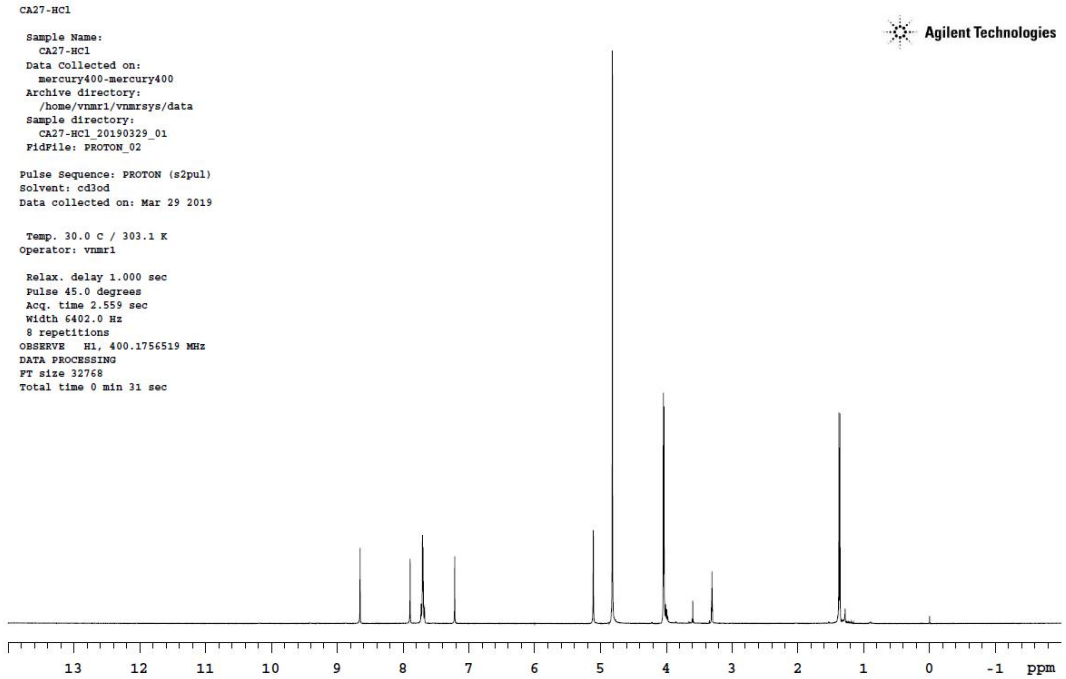
Kütle m/z (ESI+): 380,7 [M+H] (%100).

1H -NMR (CD_3OD) δ ppm : 1,36 (d, 6H, $J=6,4Hz$, $-CH_3$); 3,97-4,02 (m, 1H, $-CH$); 4,03 (s, 3H, $-OCH_3$); 4,04 (s, 3H, $-OCH_3$); 5,10 (s, 2H, $-CH_2$); 7,21 (s, 1H, H-5 veya H-8); 7,68 (d, 2H, $J=8,4Hz$, fenil protonları); 7,71 (d, 2H, $J=8,4Hz$, fenil protonları); 7,89 (s, 1H, H-5 veya H-8); 8,65 (s, 1H, H-2).

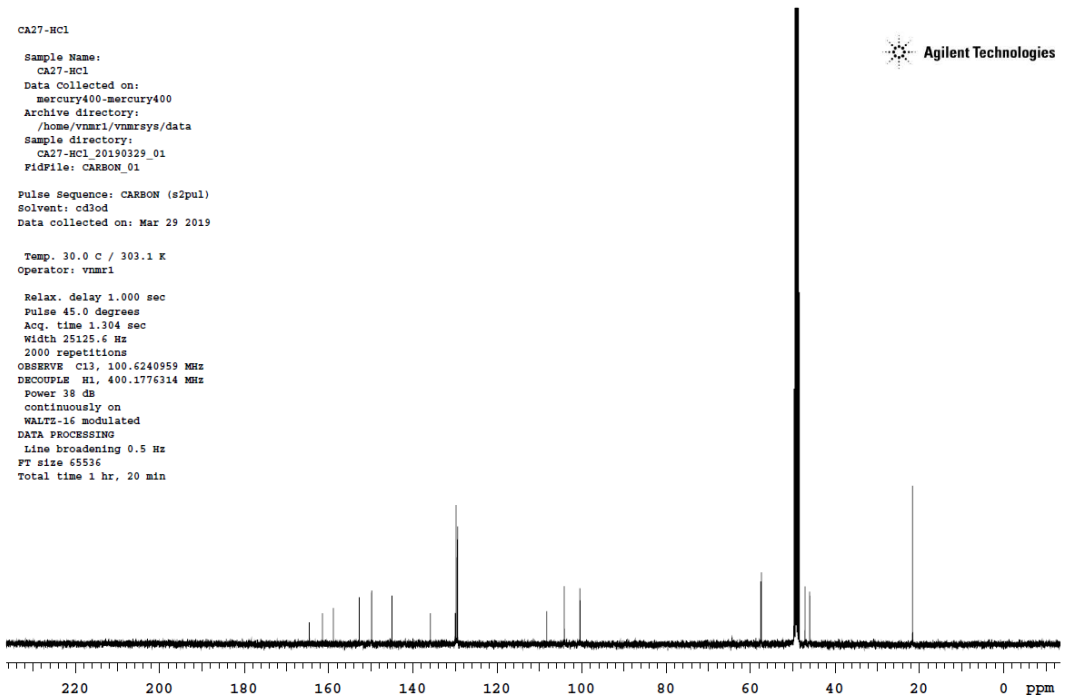
^{13}C -NMR ve HSQC (CD_3OD) δ ppm : 164,57; 161,46; 158,87; 152,74; 149,80; 144,98; 135,89; 130,02; 129,78; 129,44; 108,32; 104,16 (CH-5 veya CH-8); 100,43 (CH-5 veya CH-8); 57,59 ($-OCH_3$); 57,45 ($-OCH_3$); 47,11; 45,99; 21,62 ($-CH_3$).



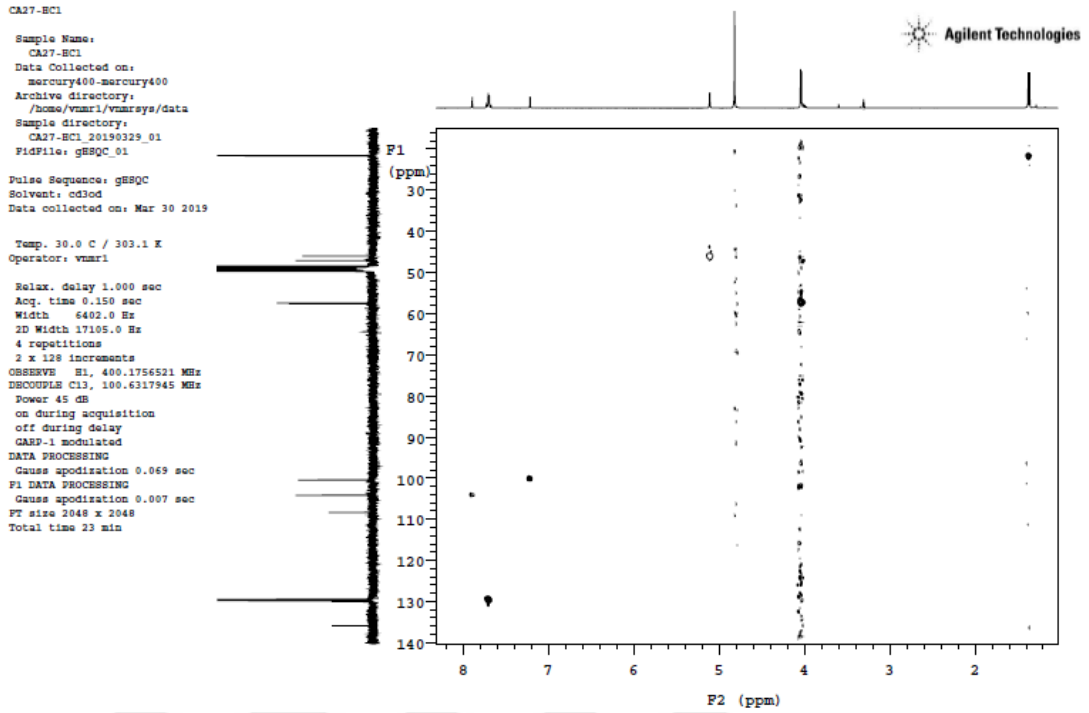
Şekil 3.86. Bileşik **9b**'nin Kütle Spektrumu



Şekil 3.87. Bileşik 9b'nin ^1H -NMR Spektrumu

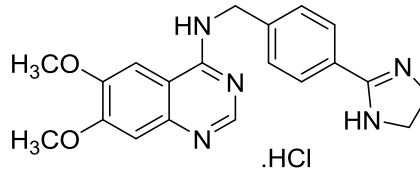


Şekil 3.88. Bileşik 9b'nin ^{13}C -NMR Spektrumu



Şekil 3.89. Bileşik 9b'nin HSQC Spektrumu

3.3.13. N-[4-(4,5-Dihidro-1H-imidazol-2-il)benzil]-6,7-dimetoksikinazolin-4-amin (9c)



4-[[4-(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]metil]benzonitril (3c) (230 mg) imidat esterini oluşturmak için 3.3'de verilen yöntemle göre reaksiyona sokuldu. Oluşan imidat esterine 0,25 ml etilendiamin ve 5 ml mutlak etanol eklenerek oda sıcaklığında bir gece karıştırıldı. Süre sonunda solvan uçuruldu. Potasyum karbonat çözeltisi ile karıştırılıp süzülde. Etanol içinde HCl gazı geçirilerek HCl tuzu haline getirildi. % 26 verimle 80 mg ürün elde edildi.

Erime noktası: 298-299°C

Elementel Analiz: C₂₀H₂₁N₅O₂ . 1,5HCl

Hesaplanan : %C: 57,45 %H: 5,42 %N: 16,75

Bulunan : %C: 57,44 %H: 5,85 %N: 16,68

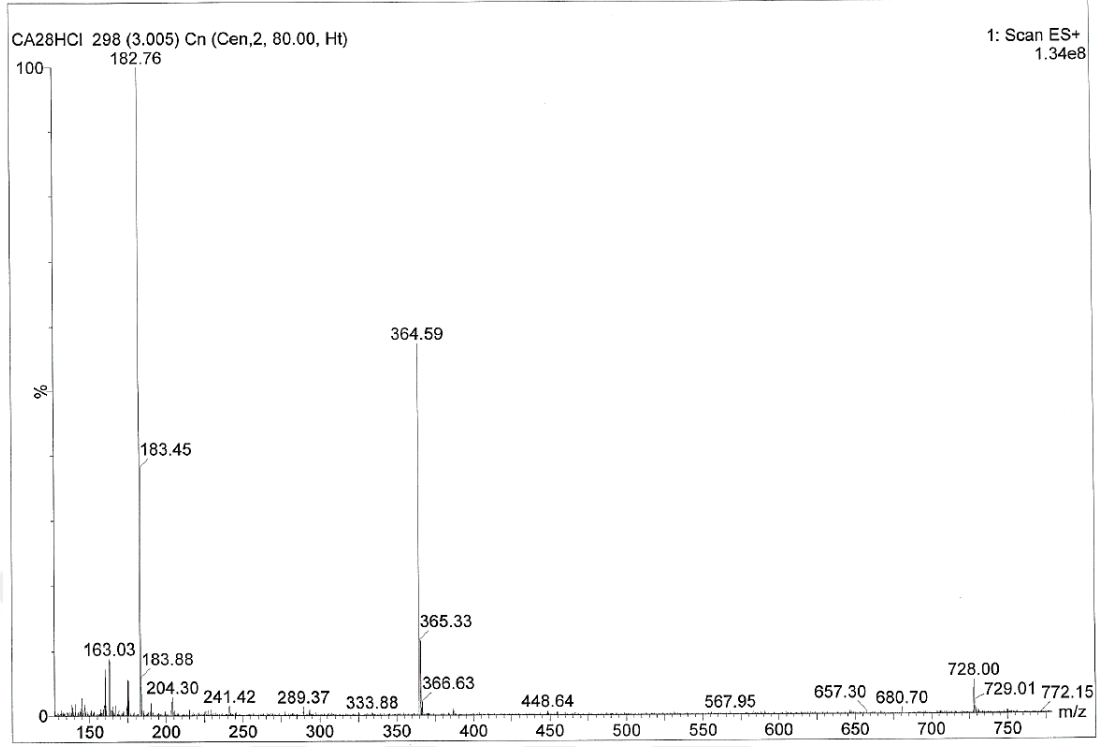
Kütle m/z (ESI+): 364,5 [M+H] (%57).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm : 3,89 (s, 3H, -OCH₃); 3,91 (s, 3H, -OCH₃); 3,97 (s, 4H, 2-imidazolin-CH₂); 4,85 (d, 2H, *J*=5,6Hz, -CH₂); 7,10 (s, 1H, H-8); 7,60 (d, 2H, *J*=8,4Hz, H-2',6'); 7,79 (s, 1H, H-5); 7,95 (d, 2H, *J*=8Hz, H-3',5'); 8,29 (s, 1H, H-2); 8,84 (t, 1H, *J*=6Hz, -NH); 10,66 (brs, 1H, 2-imidazolin-NH).

COSY (DMSO-*d*₆) δ ppm : [H-2',6' : H-3',5'].

NOESY (DMSO-*d*₆) δ ppm : [H-5 : -NH], [H-2',6' : -CH₂].

¹³C-NMR, HSQC ve HMBC (DMSO-*d*₆) δ ppm : 164,92 (C-1''); 158,39 (C-4); 154,10 (CH-2); 153,50 (C-6 veya C-7); 148,66 (C-6 veya C-7); 147,56 (C-1'); 146,14 (C-8a); 128,76 (CH-3',5'); 127,89 (CH-2',6'); 120,68 (C-4'); 108,67 (C-4a); 107,12 (CH-8); 102,34 (CH-5); 56,30 (-OCH₃); 55,90 (-OCH₃); 44,47 (2-imidazolin-CH₂); 43,46 (-CH₂).



Şekil 3.90. Bileşik 9c'nin Kütle Spektrumu

CA28HCl

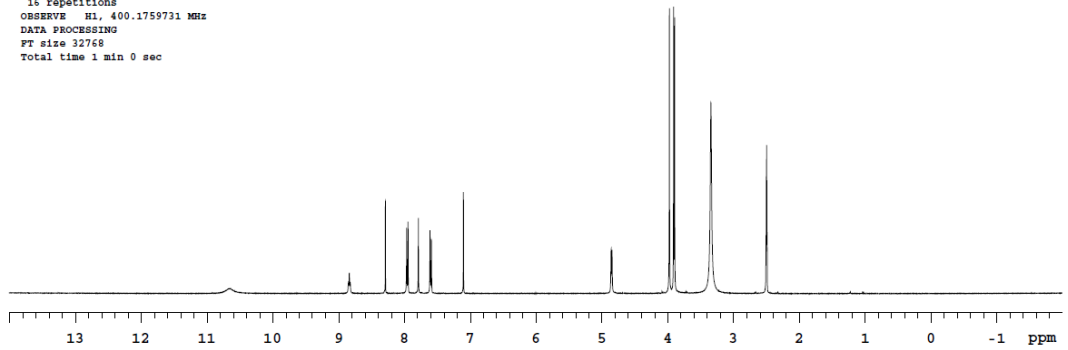
Sample Name:
CA28HCl
Data collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
CA28HCl_20190214_01
Fidfile: PROTON_03

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Feb 14 2019

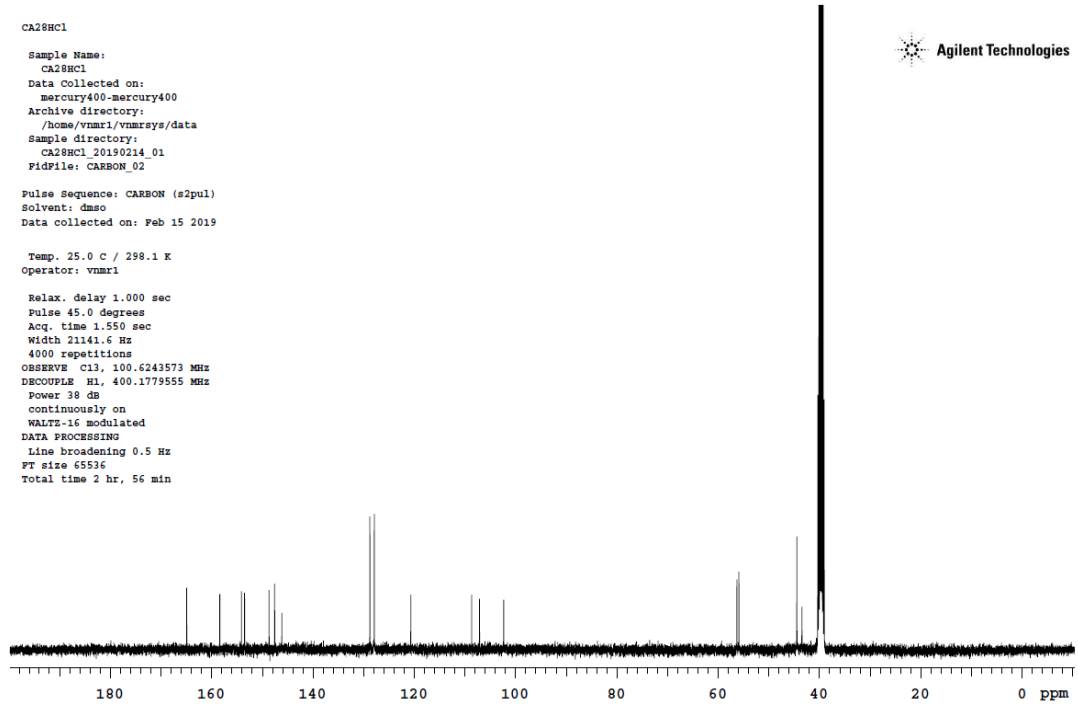
Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.559 sec
Width 6402.0 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1, 400.1759731 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 1 min 0 sec

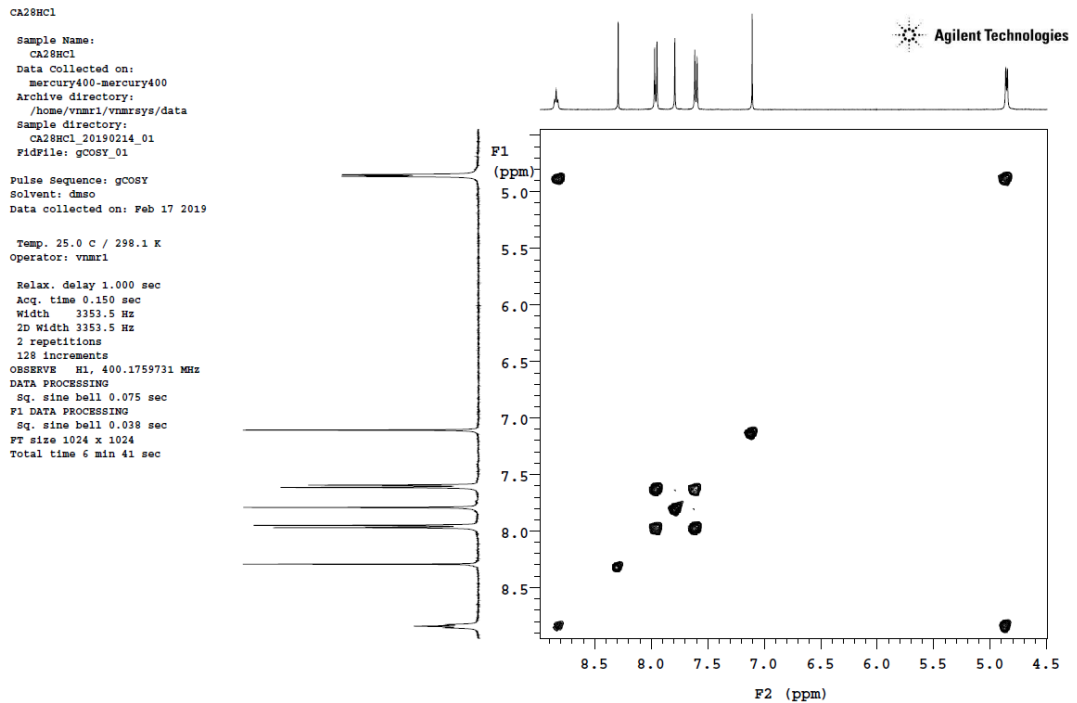
Agilent Technologies



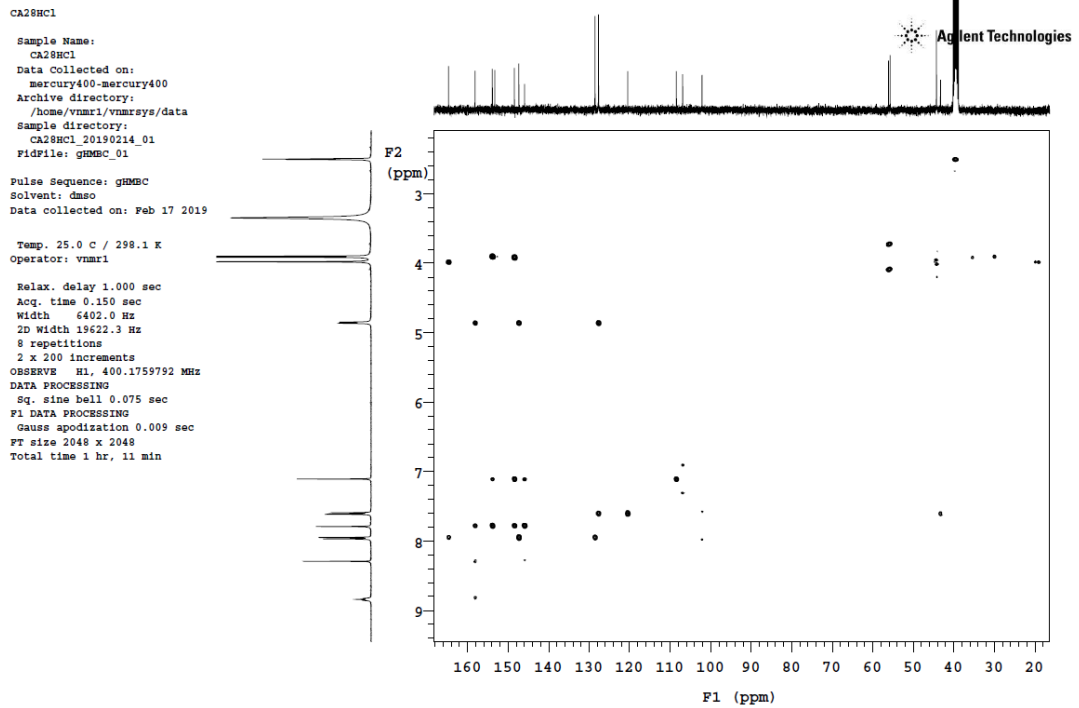
Şekil 3.91. Bileşik 9c'nin ¹H-NMR Spektrumu



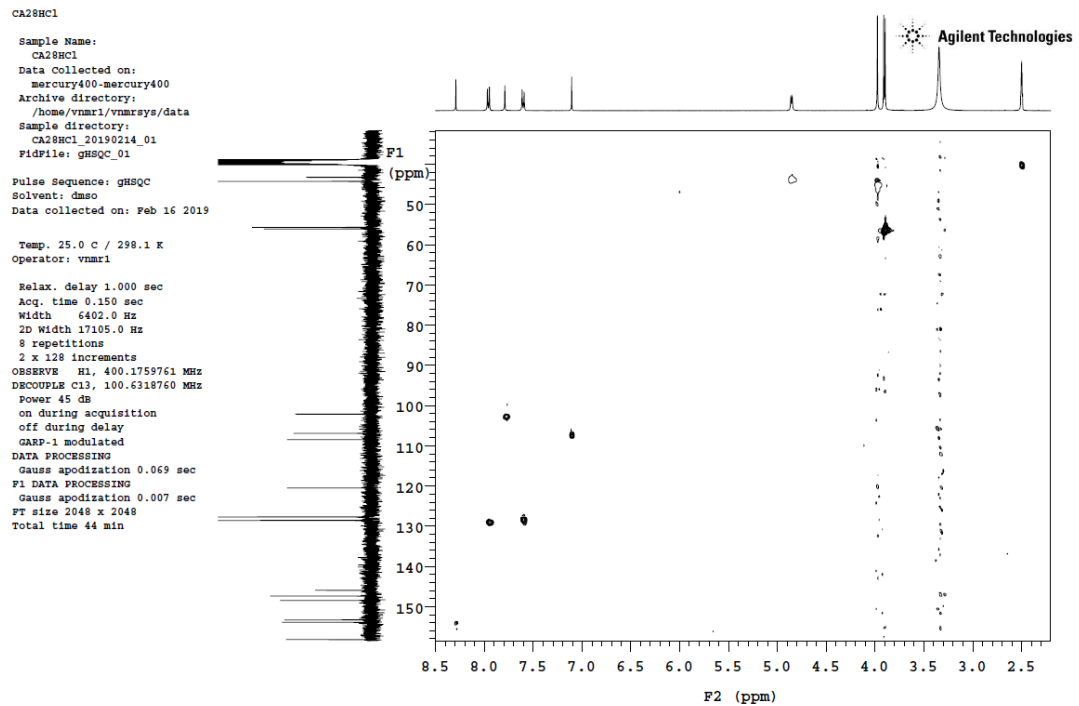
Şekil 3.92. Bileşik 9c'nin ^{13}C -NMR Spektrumu



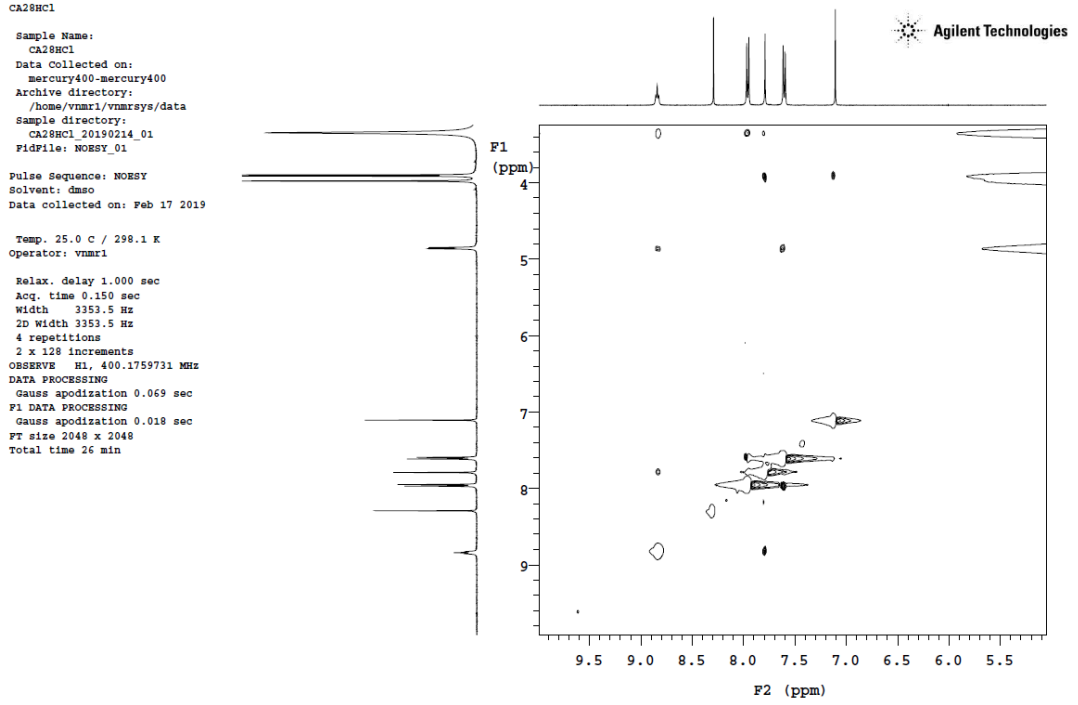
Şekil 3.93. Bileşik 9c'nin COSY Spektrumu



Şekil 3.94. Bileşik 9c'nin HMBC Spektrumu

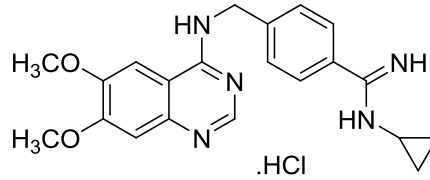


Şekil 3.95. Bileşik 9c'nin HSQC Spektrumu



Şekil 3.96. Bileşik 9c'nin NOESY Spektrumu

3.3.14. N-Siklopropil-4-[[[(6,7-dimetoksikinazolin-4-il)amino]metil]benzimidamid (9d)



4-[[[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]metil]benzonitril (3c) (140 mg) imidat esterini oluşturmak için 3.3'de verilen yöntemle göre reaksiyona sokuldu. Oluşan imidat esterine 0,25 ml siklopropilamin ve 3 ml mutlak etanol eklenerek oda sıcaklığında bir gece karıştırıldı. Süre sonunda solvan uçuruldu. Potasyum karbonat çözeltisi ile karıştırılıp süzüldü. CHCl_3 : MeOH: NH_3 (100:20:0,5) solvan sistemi yardımıyla kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Etanol içinde HCl gazı geçirilerek HCl tuzu haline getirildi. % 33 verimle 66 mg ürün elde edildi.

Erime noktası: 284-286°C (bubling)

Elementel Analiz: $C_{21}H_{23}N_5O_2 \cdot HCl \cdot 2,5H_2O$

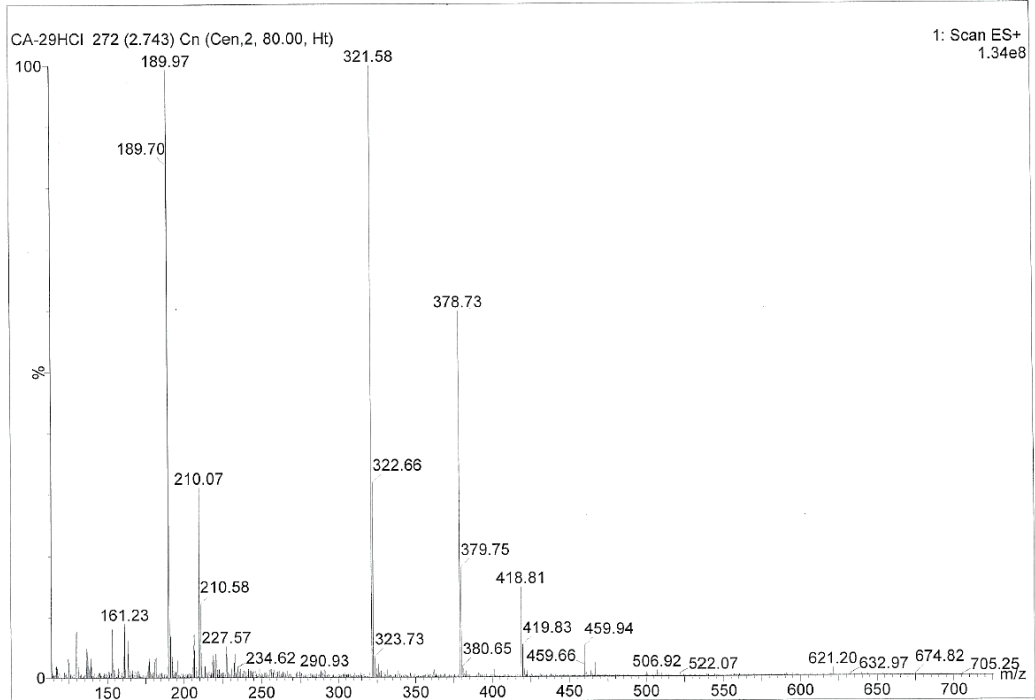
Hesaplanan : %C: 54,96 %H: 6,37 %N: 15,26

Bulunan : %C: 54,88 %H: 6,26 %N: 14,89

Kütle m/z (ESI+): 378,7 [M+H] (%60).

1H -NMR (CD_3OD) δ ppm : 0,86-0,88 (m, 2H, siklopropil- CH_2); 1,02-1,05 (m, 2H, siklopropil- CH_2); 2,78-2,79 (m, 1H, siklopropil-CH); 4,02 (s, 3H, $-OCH_3$); 4,03 (s, 3H, $-OCH_3$); 5,09 (s, 2H, $-CH_2$); 7,22 (s, 1H, H-5 veya H-8); 7,68 (d, 2H, $J=8,4Hz$, fenil protonları); 7,72 (d, 2H, $J=8Hz$, fenil protonları); 7,92 (s, 1H, H-5 veya H-8); 8,64 (s, 1H, H-2); 9,05 (brs, 1H, $-NH$); 9,54 (brs, 1H, $-NH$); 9,80 (brs, 1H, $-NH$).

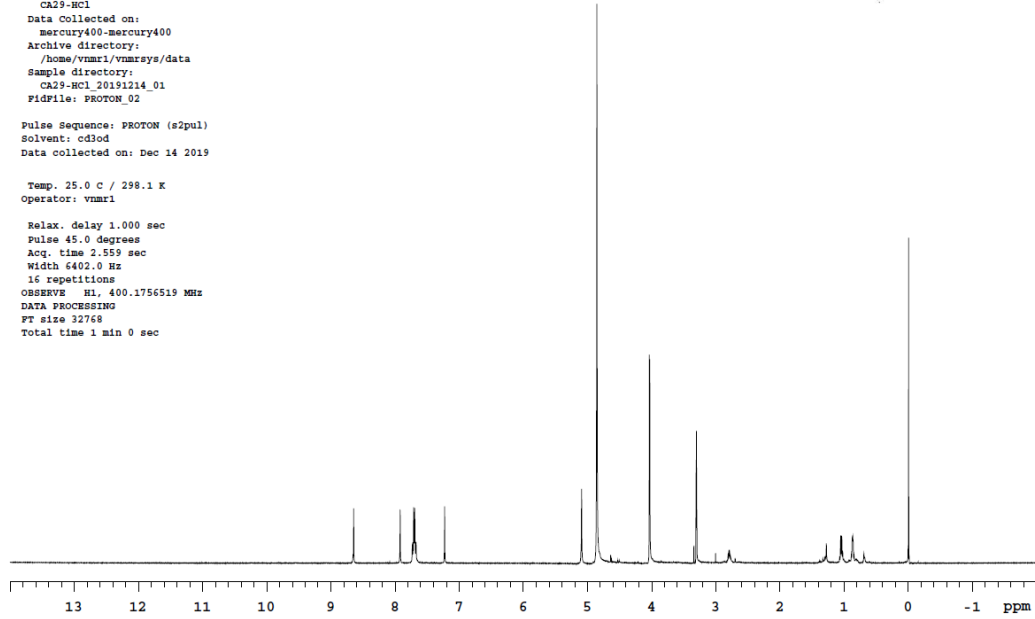
^{13}C -NMR (CD_3OD) δ ppm : 167,50; 161,33; 158,71; 152,59; 149,72; 145,23; 135,78; 129,83; 129,33; 128,91; 108,24; 104,19; 100,37; 57,62 ($-OCH_3$); 57,43 ($-OCH_3$); 45,88; 25,35; 7,34.



Şekil 3.97. Bileşik 9d'nin Kütle Spektrumu

CA29-HCl

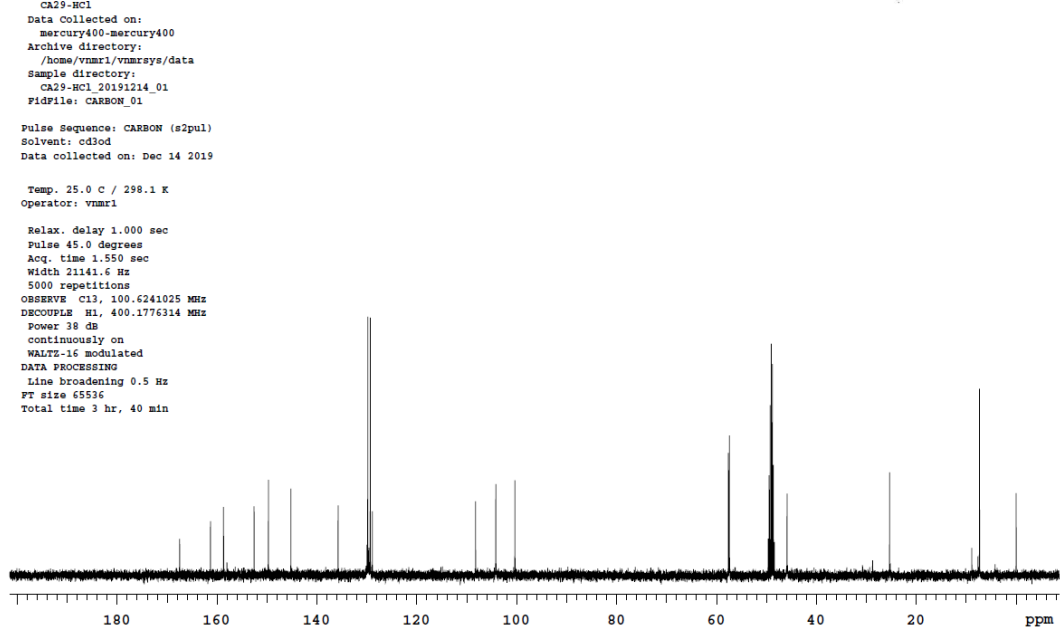
Sample Name:
CA29-HCl
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
CA29-HCl_20191214_01
FidFile: PROTON_02
Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: cd3od
Data collected on: Dec 14 2019
Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.559 sec
Width 6402.0 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1, 400.1756519 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 1 min 0 sec



Şekil 3.98. Bileşik 9d'nin ^1H -NMR Spektrumu

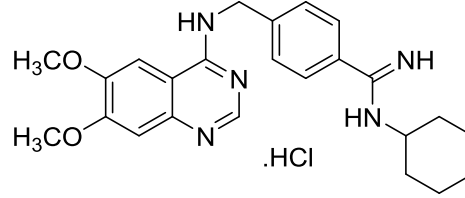
CA29-HCl

Sample Name:
CA29-HCl
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
CA29-HCl_20191214_01
FidFile: CARBON_01
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: cd3od
Data collected on: Dec 14 2019
Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.550 sec
Width 21141.6 Hz
5000 repetitions
OBSERVE C13, 100.6241025 MHz
DECOUPLE H1, 400.1776314 MHz
power 38 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 3 hr, 40 min



Şekil 3.99. Bileşik 9d'nin ^{13}C -NMR Spektrumu

3.3.15. N-Sikloheksil-4-[[[(6,7-dimetoksikinazolin-4-il)amino]metil]benzimidamid (9e)



4-[[[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]metil]benzonitril (**3c**) (130 mg) imidat esterini oluşturmak için 3.3'de verilen yönteme göre reaksiyona sokuldu. Oluşan imidat esterine 0,25 ml sikloheksilamin ve 3 ml mutlak etanol eklenerek oda sıcaklığında bir gece karıştırıldı. Süre sonunda solvan uçuruldu. Potasyum karbonat çözeltisi ile karıştırılıp szld. CHCl₃: MeOH: NH₃ (100:20:0,5) solvan sistemi yardımıyla kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Etanol içinde HCl gazı geçirilerek HCl tuzu haline getirildi. % 36 verimle 82 mg ürün elde edildi.

Erime noktası: 255-257°C

Elementel Analiz: C₂₄H₂₉N₅O₂ . 2HCl . 4H₂O

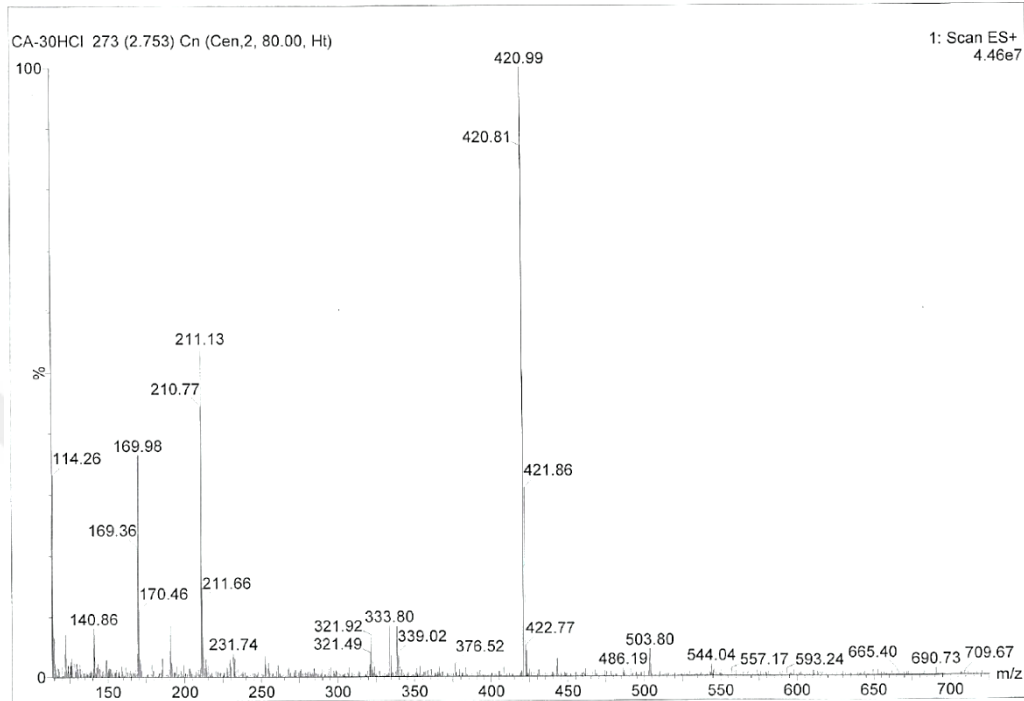
Hesaplanan : %C: 51,06 %H: 6,96 %N: 12,40

Bulunan : %C: 51,09 %H: 6,93 %N: 12,68

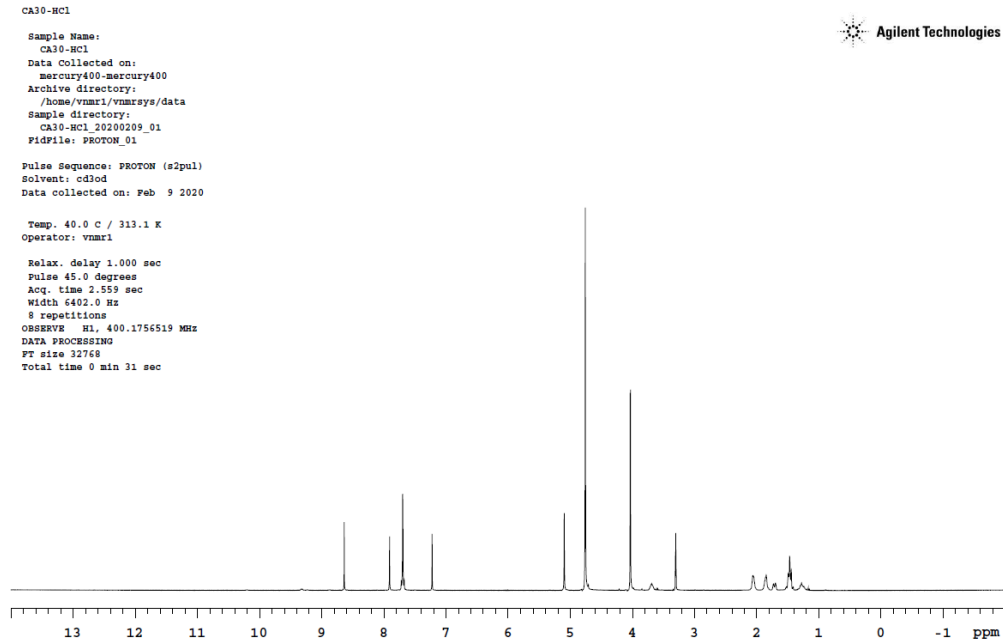
Ktle m/z (ESI⁺): 420,9 [M+H] (%100).

¹H-NMR (CD₃OD)  ppm : 1,26-1,28 (m, 1H, sikloheksil -CH₂); 1,43-1,50 (m, 4H, sikloheksil -CH₂); 1,69-1,73 (m, 1H, sikloheksil -CH₂); 1,84-1,86 (m, 2H, sikloheksil -CH₂); 2,04-2,06 (m, 2H, sikloheksil -CH₂); 3,68-3,70 (m, 1H, sikloheksil -CH); 4,03 (s, 3H, -OCH₃); 4,04 (s, 3H, -OCH₃); 5,09 (s, 2H, -CH₂); 7,22 (s, 1H, H-5 veya H-8); 7,68 (d, 2H, J=8,4Hz, fenil protonları); 7,71 (d, 2H, J=9,2Hz, fenil protonları); 7,90 (s, 1H, H-5 veya H-8); 8,63 (s, 1H, H-2).

¹³C-NMR (CD₃OD) δ ppm : 164,49; 161,37; 158,80; 152,67; 149,69; 144,90; 135,80; 129,98; 129,77; 129,41; 108,26; 104,28; 100,44; 57,65; 57,45; 54,09; 45,95; 32,55; 26,18; 25,80.



Şekil 3.100. Bileşik 9e'nin Kütle Spektrumu



Şekil 3.101. Bileşik 9e'nin ¹H-NMR Spektrumu

CA30-HCl

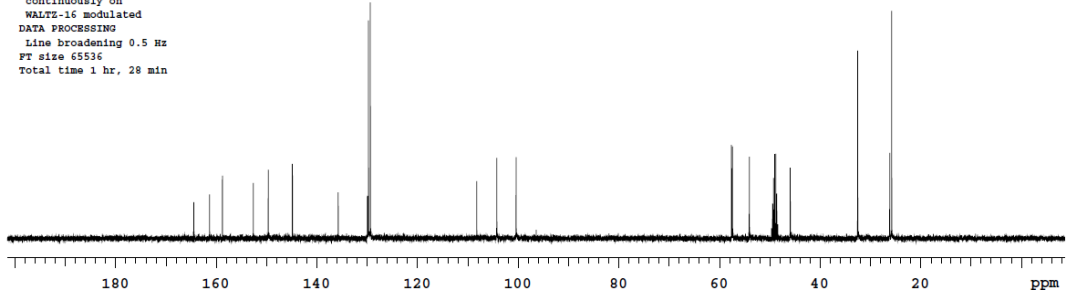
Sample Name:
CA30-HCl
Data Collected on:
Mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
CA30-HCl_20200209_01
FidFile: CARBON_01

Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: cd3od
Data collected on: Feb 9 2020

Temp. 40.0 C / 313.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.550 sec
Width 21141.6 Hz
2000 repetitions
OBSERVE c13, 100.6241015 MHz
DECOUPLE H1, 400.1776314 MHz
Power 38 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 1 hr, 29 min

Agilent Technologies

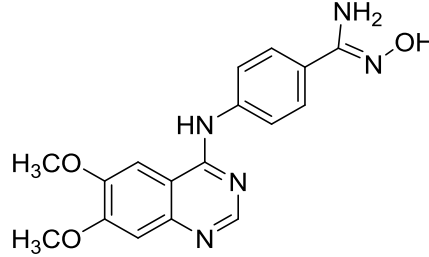


Şekil 3.102. Bileşik 9e'nin ¹³C-NMR Spektrumu

3.4. Amidoksim Grubu Taşıyan 6,7-Dimetoksikinazolin Türevlerinin (7f, 8f, 9f) Genel Sentez Yöntemi

Hidroksilamin hidroklorür (1,38 g, 20 mmol), DMSO (4,5 ml) içinde çözündürüldü. Sıcaklık 5°C'nin altında tutularak karıştırıldı. Çözelti üzerine potasyum *tert*-bütoksit (2,24 g, 20 mmol) yavaşça eklenerek 30 dakika daha karıştırıldı. Ardından sonuç ürün eldesi için uygun olan **3a**, **3b** ve **3c** kodlu bileşik (1 mmol) de çözelti içine eklenerek bir gece karışmaya bırakıldı. Reaksiyon sonlandığında maddelerin su ile çökmesi sağlandı ve süzüldü. Gerekli olduğunda, etanol içinde HCl gazı geçirilmesiyle bileşiklerin HCl tuzları hazırlandı.

3.4.1. 4-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]-N'-hidroksibenzimidamid (7f)



4-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]benzonitril (**3a**) (306 mg, 1 mmol), 3.4'de verilen yöntemle göre çözeltiye eklendi ve sonuç ürün belirtilen yöntemle % 82 verimle 280 mg olarak elde edildi.

Erime noktası: 289-290°C

Elementel Analiz: C₁₇H₁₇N₅O₃

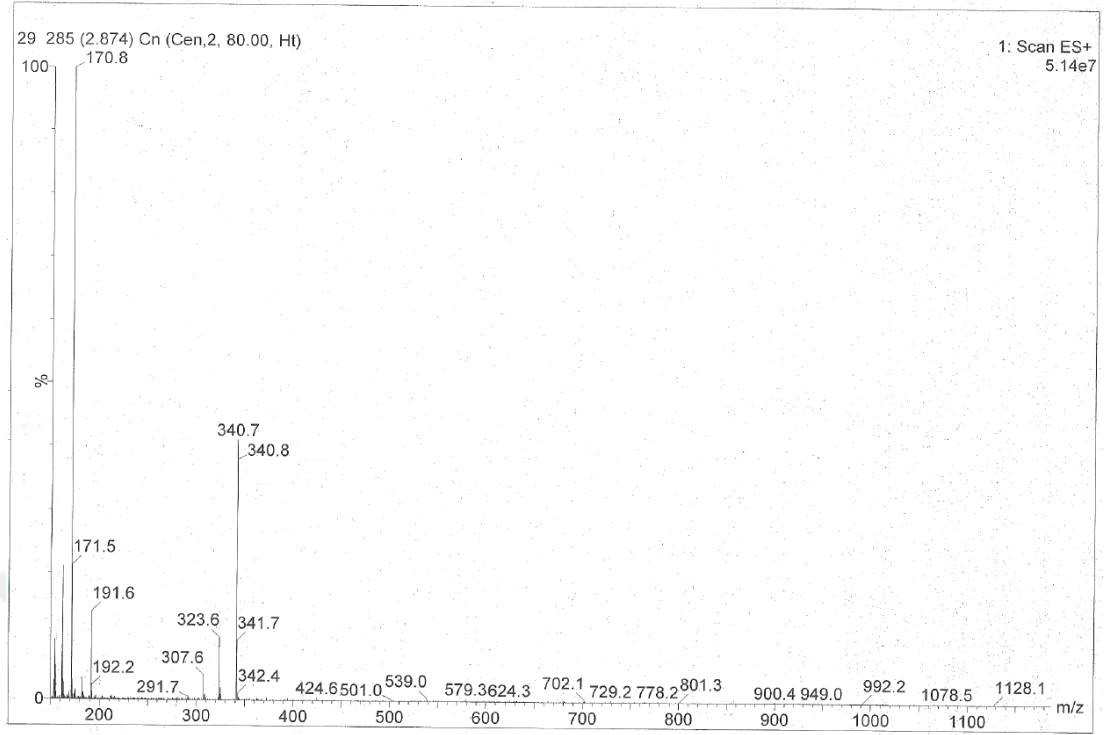
Hesaplanan : %C: 60,16 %H: 5,04 %N: 20,63

Bulunan : %C: 59,95 %H: 5,41 %N: 20,28

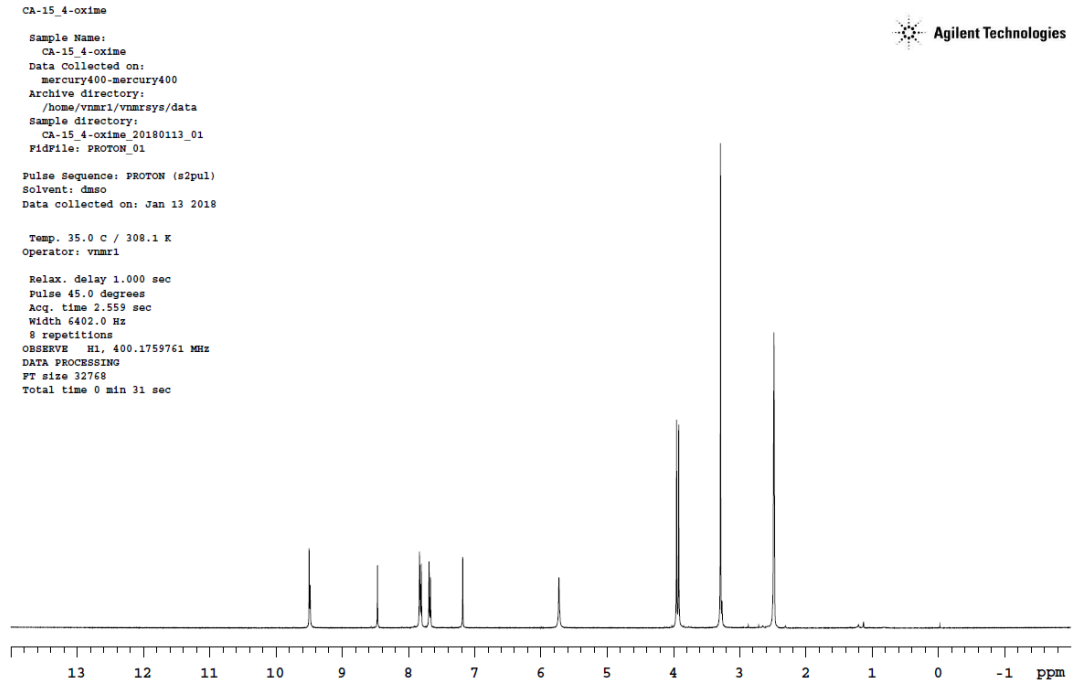
Kütle m/z (ESI+): 340,7 [M+H] (%40).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm : 4,00 (s, 3H, -OCH₃); 4,06 (s, 3H, -OCH₃); 7,46 (s, 1H, H-5 veya H-8); 7,84 (d, 2H, *J*=8,8Hz, fenil protonları); 8,08 (d, 2H, *J*=9,2Hz, fenil protonları); 8,64 (s, 1H, H-5 veya H-8); 8,90 (s, 1H, H-2); 9,14 (brs, 1H); 11,28 (brs, 1H); 12,02 (s, 1H).

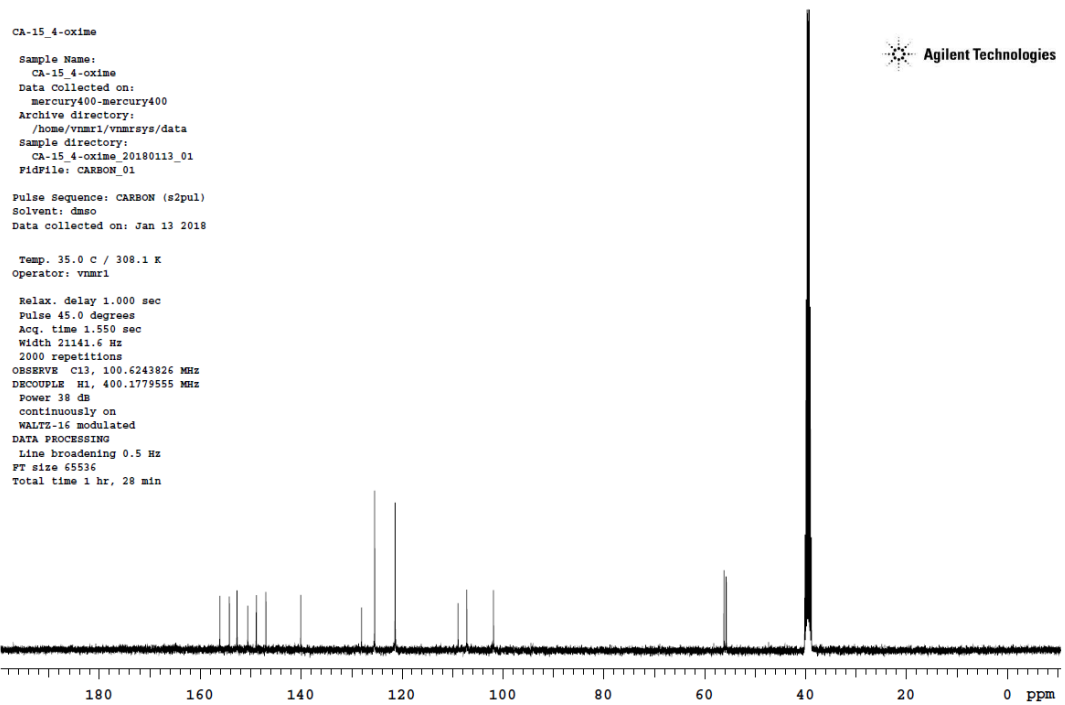
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm : 156,13; 154,24; 152,72; 150,59; 148,88; 146,99; 140,09; 128,03; 125,43; 121,37; 108,90; 107,17; 101,88; 56,19 (-OCH₃); 55,74 (-OCH₃).



Şekil 3.103. Bileşik 7f'nin Kütle Spektrumu

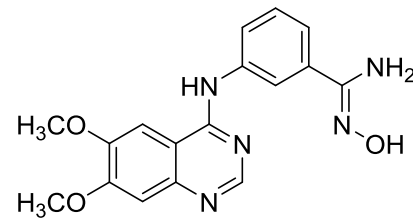


Şekil 3.104. Bileşik 7f'nin ¹H-NMR Spektrumu



Şekil 3.105. Bileşik 7f'nin ^{13}C -NMR Spektrumu

3.4.2. 3-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]-*N'*-hidroksibenzimidamid (8f)



3-[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]benzonitril (**3b**) (306 mg, 1 mmol), 3.4'de verilen yöntemle göre çözeltiye eklendi ve sonuç ürün belirtilen yöntemle % 55 verimle 196 mg olarak elde edildi.

Erime noktası: 218-219°C

Elementel Analiz: $C_{17}H_{17}N_5O_3 \cdot H_2O$

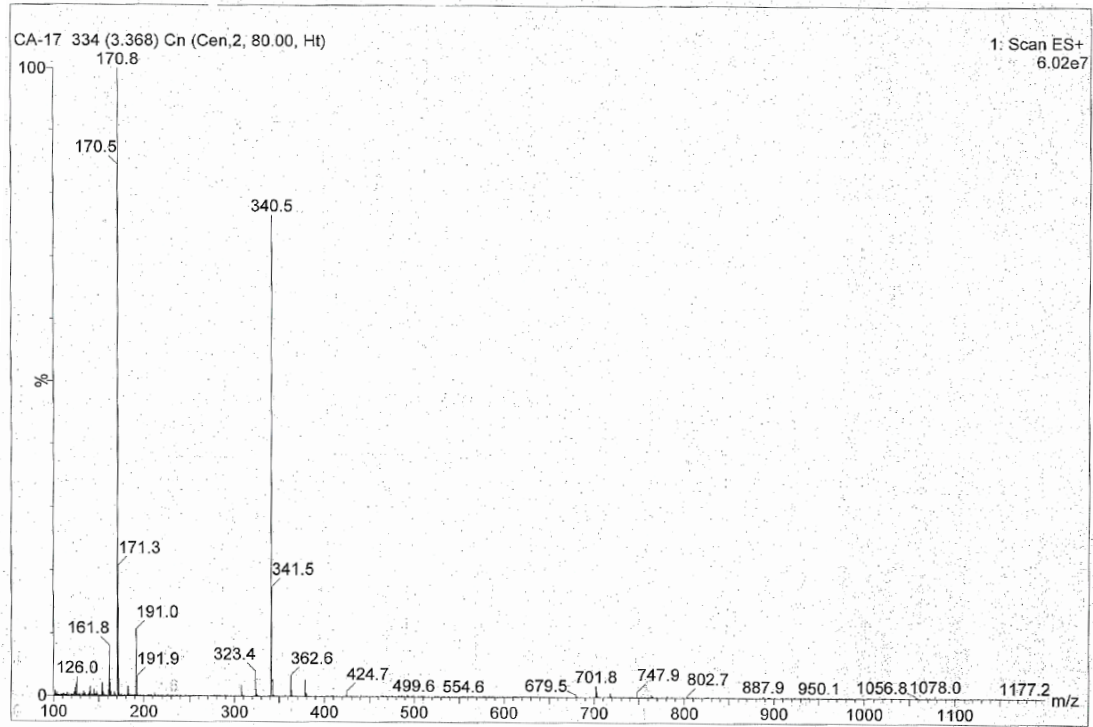
Hesaplanan : %C: 57,13 %H: 5,35 %N: 19,59

Bulunan : %C: 57,54 %H: 5,60 %N: 19,57

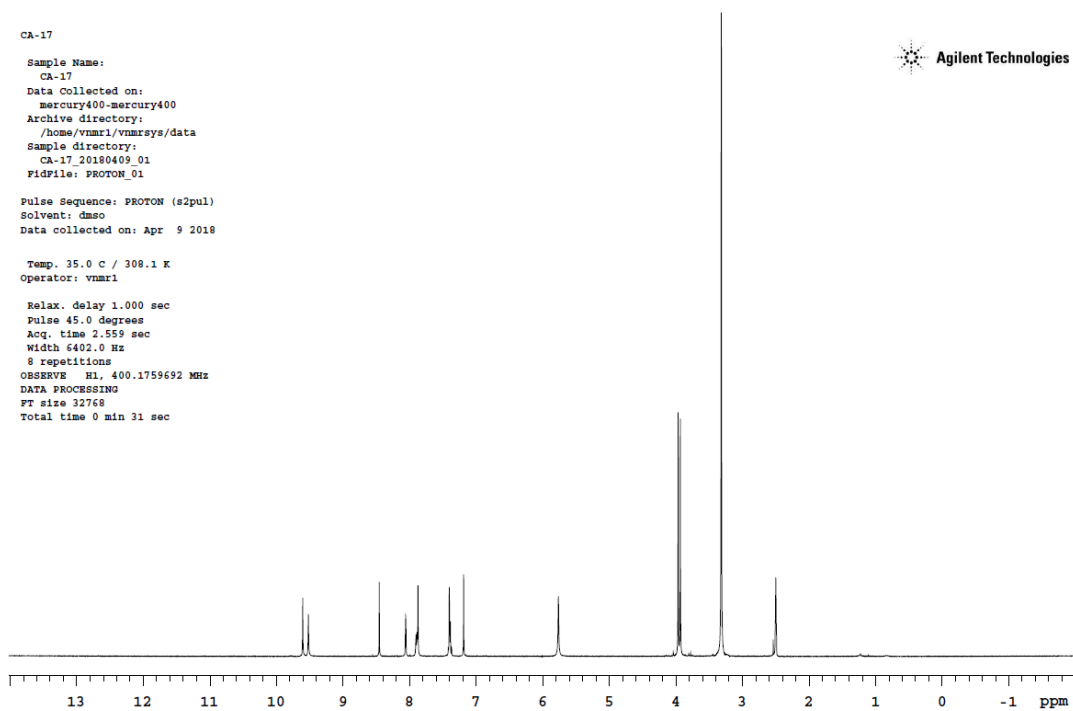
Kütle m/z (ESI+): 340,5 [M+H] (%75).

1H -NMR (DMSO- d_6) δ ppm : 3,93 (s, 3H, -OCH₃); 3,96 (s, 3H, -OCH₃); 5,76 (s, 2H, -NH₂); 7,18 (s, 1H, H-5 veya H-8); 7,36-7,41 (m, 2H, fenil protonları); 7,87-7,91 (m, 2H, fenil protonları); 8,05 (s, 1H, H-5 veya H-8); 8,45 (s, 1H, H-2); 9,52 (s, 1H); 9,60 (s, 1H).

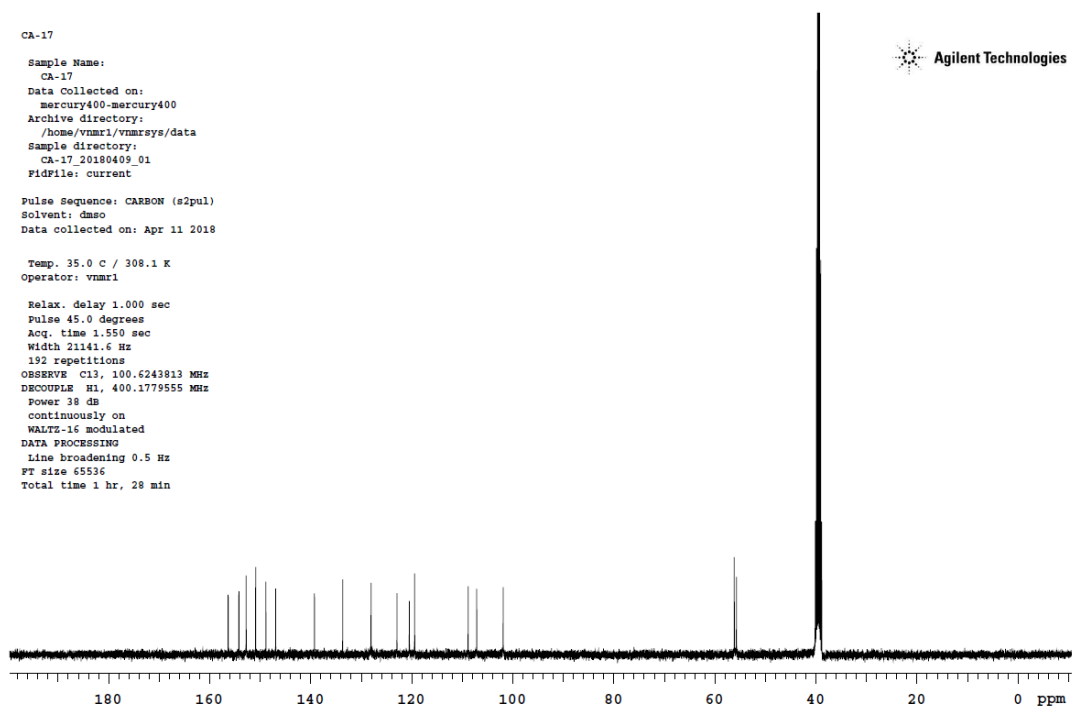
^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ ppm : 156,34; 154,20; 152,77; 150,90; 148,86; 146,93; 139,26; 133,67; 128,05; 122,91; 120,48; 119,43; 108,84; 107,14; 101,91; 56,17 (-OCH₃); 55,74 (-OCH₃).



Şekil 3.106. Bileşik 8f'nin Kütle Spektrumu

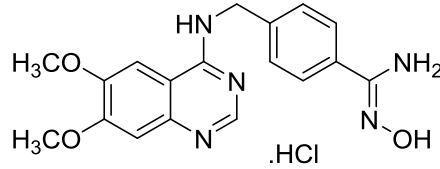


Şekil 3.107. Bileşik 8f'nin ^1H -NMR Spektrumu



Şekil 3.108. Bileşik 8f'nin ^{13}C -NMR Spektrumu

3.4.3. 4-[[[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]metil]-N'-hidroksi benzimidamid (9f)



4-[[[(6,7-Dimetoksikinazolin-4-il)amino]metil]benzonitril (**3c**) (320 mg, 1 mmol) 3.4'de verilen yöntemle göre çözeltiye eklendi. Yöntemle göre hazırlanan ürün, etanol içinde HCl gazı geçirilerek HCl tuzu haline getirildi. Sonuç ürün % 67 verimle 293 mg olarak elde edildi.

Erime noktası: 259-261°C

Elementel Analiz: C₁₈H₁₉N₅O₃ . 2HCl . 0,5H₂O

Hesaplanan : %C: 49,66 %H: 5,09 %N: 16,08

Bulunan : %C: 49,51 %H: 5,49 %N: 15,72

Kütle m/z (ESI+): 354,6 [M+H] (%55).

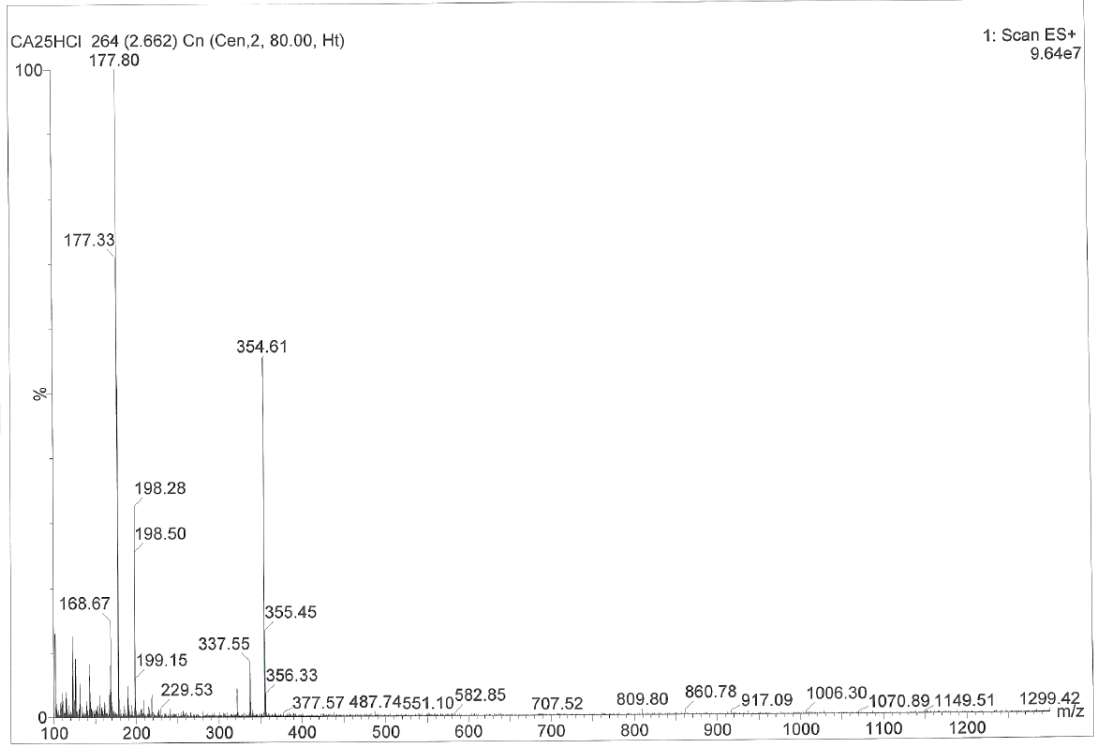
¹H-NMR (DMSO-*d*₆ + D₂O) δ ppm : 3,92 (s, 3H, -OCH₃); 3,93 (s, 3H, -OCH₃); 4,97 (s, 2H, -CH₂); 7,19 (s, 1H, H-5 veya H-8); 7,57 (d, 2H, *J*=8Hz, H-2',6'); 7,64 (d, 2H, *J*=8,4Hz, H-3',5'); 7,91 (s, 1H, H-5 veya H-8); 8,67 (s, 1H, H-2).

COSY (DMSO-*d*₆ + D₂O) δ ppm : [H-2',6' : H-3',5'].

NOESY (DMSO-*d*₆ + D₂O) δ ppm : [H-2',6' : -CH₂].

¹³C-NMR, HSQC ve HMBC (DMSO-*d*₆ + D₂O) δ ppm : 160,09 (C-amidoksim); 159,95 (C-4); 156,85 (C-7); 150,75 (C-6); 149,23 (CH-2); 144,04 (C-1'); 134,56 (C-8a); 128,67 (CH-3',5'); 128,62 (CH-2',6'); 124,76 (C-4'); 107,06

(C-4a); 103,84 (CH-5 veya CH-8); 100,05 (CH-5 veya CH-8); 57,27 (-OCH₃); 57,18 (-OCH₃); 42,27 (-CH₂).



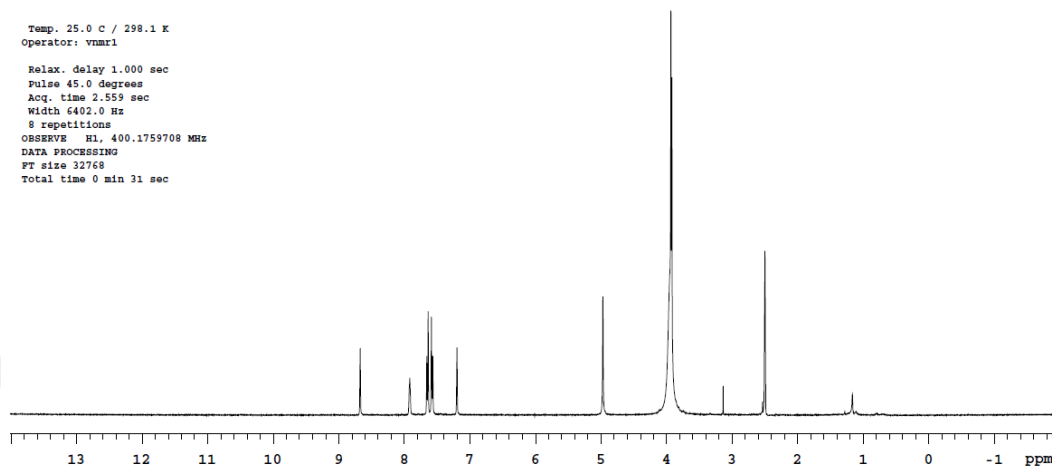
Şekil 3.109. Bileşik 9f'nin Kütle Spektrumu

CA25HCl-D2O



Sample Name:
CA25HCl-D2O
Data collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
CA25HCl-D2O_20181111_01
FidFile: PROTON_01
Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Nov 11 2018

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.559 sec
Width 6402.0 Hz
8 repetitions
OBSERVE H1, 400.1759708 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min 31 sec



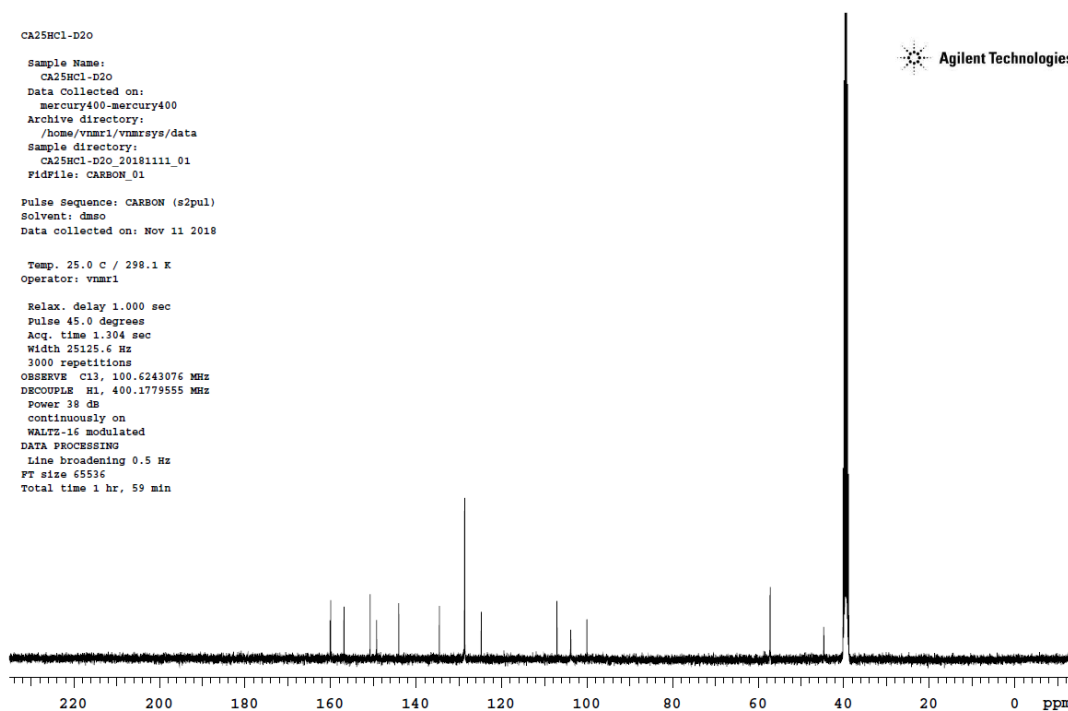
Şekil 3.110. Bileşik 9f'nin ^1H -NMR Spektrumu

CA25HCl-D2O

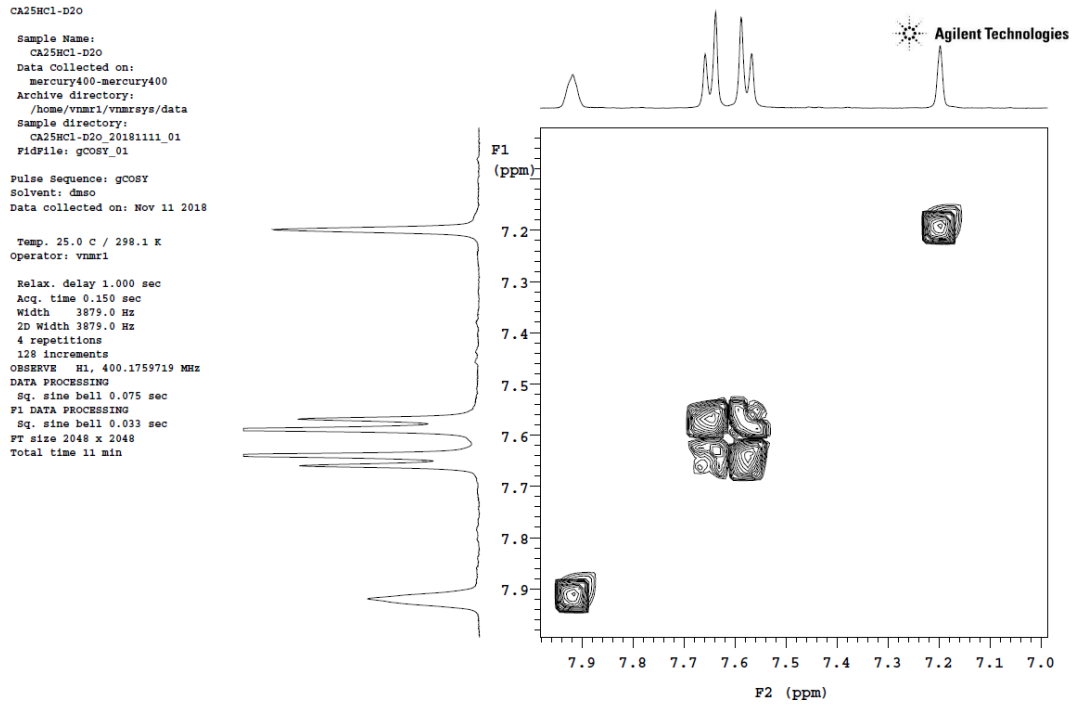


Sample Name:
CA25HCl-D2O
Data collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
CA25HCl-D2O_20181111_01
FidFile: CARBON_01
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Nov 11 2018

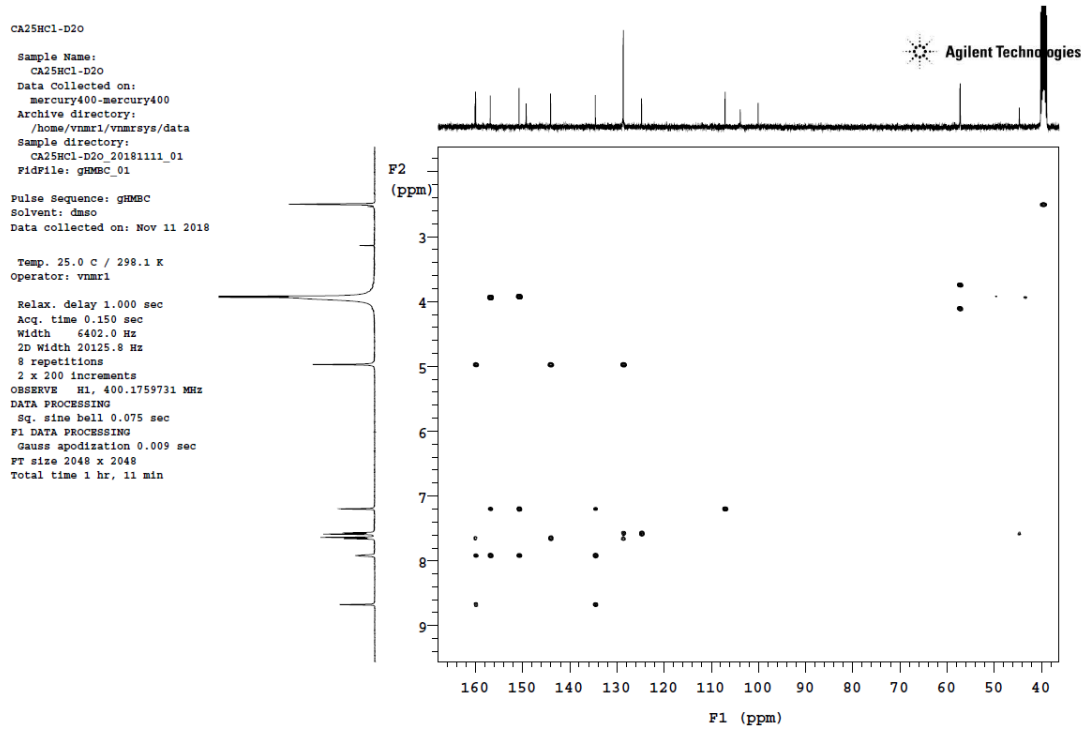
Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.304 sec
Width 25125.6 Hz
3000 repetitions
OBSERVE C13, 100.6243076 MHz
DECOUPLE H1, 400.1779555 MHz
Power 38 dB
Continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 1 hr, 59 min



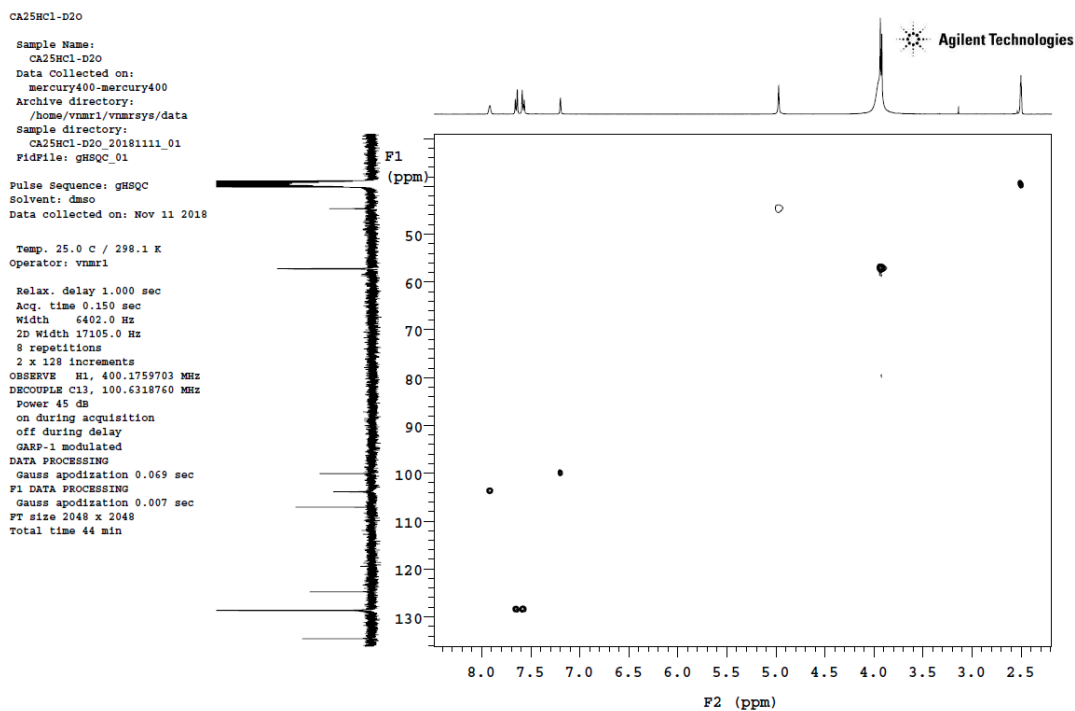
Şekil 3.111. Bileşik 9f'nin ^{13}C -NMR Spektrumu



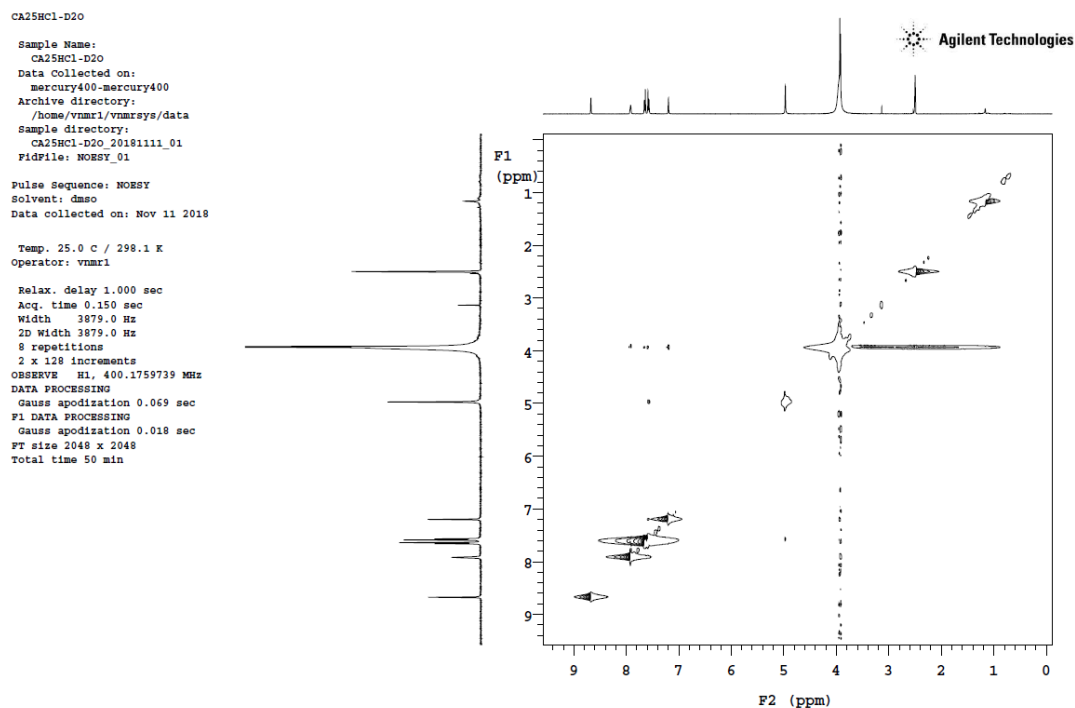
Şekil 3.112. Bileşik 9f'nin COSY Spektrumu



Şekil 3.113. Bileşik 9f'nin HMBC Spektrumu



Şekil 3.114. Bileşik 9f'nin HSQC Spektrumu



Şekil 3.115. Bileşik 9f'nin NOESY Spektrumu

3.5. Bileşiklerin Fizikokimyasal Parametrelerinin İncelenmesi

Lipinski Kuralları, kimyasal bir bileşiğin oral biyoyararlanımını tahmin etmek için, test edilen bileşikler fizikokimyasal özelliklerine (emilim, dağılım, metabolizma, eliminasyon) göre kantitatif olarak değerlendiren kurallardır. Değerlendirme ölçeğine dayanan Lipinski kuralları, çok sayıda ilaç etken maddesi kullanılarak formüle edilmiştir ve test edilen bileşiklerin ilaç olarak oral uygulama için uygunluklarını değerlendirmektedir (Lipinski ve ark., 1997).

Oral olarak alınabilecek aktif bir molekülün fizikokimyasal parametreleri genel olarak şu kurallara uymalıdır: molekül ağırlığı 500'ün altında, lipofilisite katsayısı (logP) 5 ve 5'in altında olmalı; hidrojen bağı yapan (hidrojen donörü, HBD) atomların sayısı 5 ve 5'ten az ve moleküldeki hidrojen bağı kabul eden (hidrojen akseptörü, HBA) atomların sayısı 10 ve 10'dan az olmalıdır. Lipinski'ye göre, bu kurallarda bir taneden fazla ihlal yapılmaması gerekmektedir.

Veber kuralları olarak bilinen kurallara göre de, bir kimyasal bileşik 10 veya daha az dönebilen bağa ve $140 \text{ \AA}^2$ veya daha az kutuplaşmış (polar) yüzey alanına sahip olduğunda oral biyoyararlanımının iyi olma olasılığı yüksektir. Dönebilen bağların moleküler esnekliği yansıttığı ve membran geçişini kontrol ettiği düşünülmektedir (Veber ve ark., 2002).

Sentezlenen bileşiklerin internet üzerinden Molinspiration programı (Molinspiration Cheminformatics, 2020) kullanılarak moleküler özellikleri hesaplanmıştır. Bileşiklerin polar yüzey alanı, molekül ağırlığı (MA), dönebilen bağ sayısı, hidrojen bağı akseptörü sayısı (HBA), hidrojen bağı donörü sayısı (HBD) ve lipofilisite (logP) parametreleri hesaplanmıştır (Çizelge 3.1). Tüm bileşikler Lipinski ve Veber kurallarına hidrojen bağı akseptörü sayısı ≤ 10 , hidrojen bağı donörü sayısı ≤ 5 , rotasyon yapabilen bağ sayısı ≤ 10 , polar yüzey alanı $\leq 140 \text{ \AA}^2$ ve logP için 0,85-4,26 (bileşik 4 hariç), molekül ağırlığı için 316,75-419,53 aralığındaki değerlerle uymaktadır. Kurallardan sapan bir değer (bileşik 4'ün logP değeri 5,17) bulunmuştur, ancak bir tek sapan değer olması durumunda kuralların bozulmadığı belirtildiği için tüm bileşiklerin kurallara uyduğu söylenebilir.

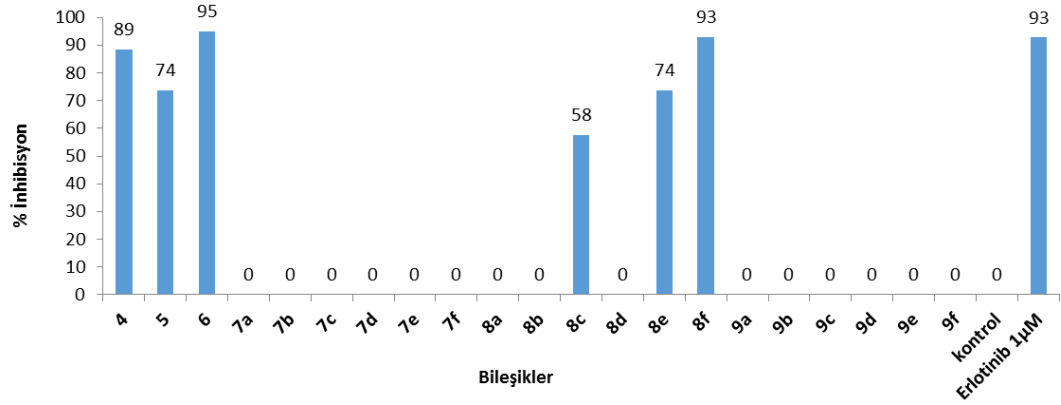
Çizelge 3.1. Sentezlenen türevlerin molekül ağırlıkları, hidrojen bağı donör ve akseptör sayıları, dönebilen bağı sayıları, polar yüzey alanları ve logP değerleri

Bileşik no	MA	Polar yüzey alanı	Dönebilen bağı sayısı	HBA	HBD	logP
	<500	$\leq 140 \text{ Å}^2$	≤ 10	≤ 10	≤ 5	≤ 5
4	384,65	56,28	4	5	1	5,17
5	316,75	69,17	4	6	1	3,01
6	367,30	56,28	5	5	1	4,26
7a	323,36	106,15	5	7	4	1,66
7b	365,44	92,16	7	7	3	2,71
7c	349,39	80,67	5	7	2	2,14
7d	363,42	92,16	7	7	3	2,40
7e	405,50	92,16	7	7	3	3,94
7f	339,36	114,89	5	8	4	1,59
8a	323,36	106,15	5	7	4	1,64
8b	365,44	92,16	7	7	3	2,69
8c	349,39	80,67	5	7	2	2,12
8d	363,42	92,16	7	7	3	2,38
8e	403,49	80,67	8	7	2	2,99
8f	339,36	114,89	5	8	4	1,56
9a	337,38	106,15	6	7	4	0,93
9b	379,46	92,16	8	7	3	1,97
9c	363,42	80,67	6	7	2	1,41
9d	377,45	92,16	8	7	3	1,67
9e	419,53	92,16	8	7	3	3,21
9f	353,38	114,89	6	8	4	0,85

3.6. Sentezlenen Bileşiklerin Antikanser Aktivitelerinin Saptanması

Sentezlenen bileşiklerin EGFR kinaz inhibitör aktiviteleri, materyal ve yöntem bölümünde belirtildiği şekilde, ADP-Glo™ test kiti kullanılarak *in vitro* olarak ölçülmüştür. Uygulanan deney, kitlerde bulunan EGFR kinazın, substrat (PolyE4Y1) ve ATP varlığında fosforilasyon reaksiyonu meydana getirmesi ve bu reaksiyon sonucu oluşan lüminesansın, luminometre cihazı yardımıyla belirlenmesi esasına dayanır. Sentezlenen bileşikler (4, 5, 6, 7a-7f, 8a-8f, 9a-9f) deney ortamına

eklenerek, bileşiklerin varlığında ölçülen enzim aktivitesi maksimum aktivite ile karşılaştırılmış ve inhibisyon değerleri bulunmuştur. Bileşikler EGFR kinazı, Şekil 3.116'de gösterildiği üzere, değişen derecelerde (% 0 - % 95) inhibe etmişlerdir. Sentezlenen bileşiklerin inhibisyon değerleri referans bileşik olan erlotinib (% 93) ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.116. Sentezlenen bileşiklerin EGFR kinaz için inhibisyon değerleri

3.7. Moleküler Doking Çalışmaları

Moleküler doking çalışmaları, ligant ve proteinin bağlanma pozunu ve oluşturulan bağların belirlenmesi için günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada sentezlenen tüm bileşiklerin moleküler doking işlemi gerçekleştirilmiş ve doking skorları değerlendirilmiştir. Aktivite çalışmalarında en etkili bulunan **4**, **6** ve **8f** bileşiklerinin enzimle iki boyutlu etkileşimleri ve üç boyutlu protein-ligant bağlanma konformasyonları belirlenmiştir.

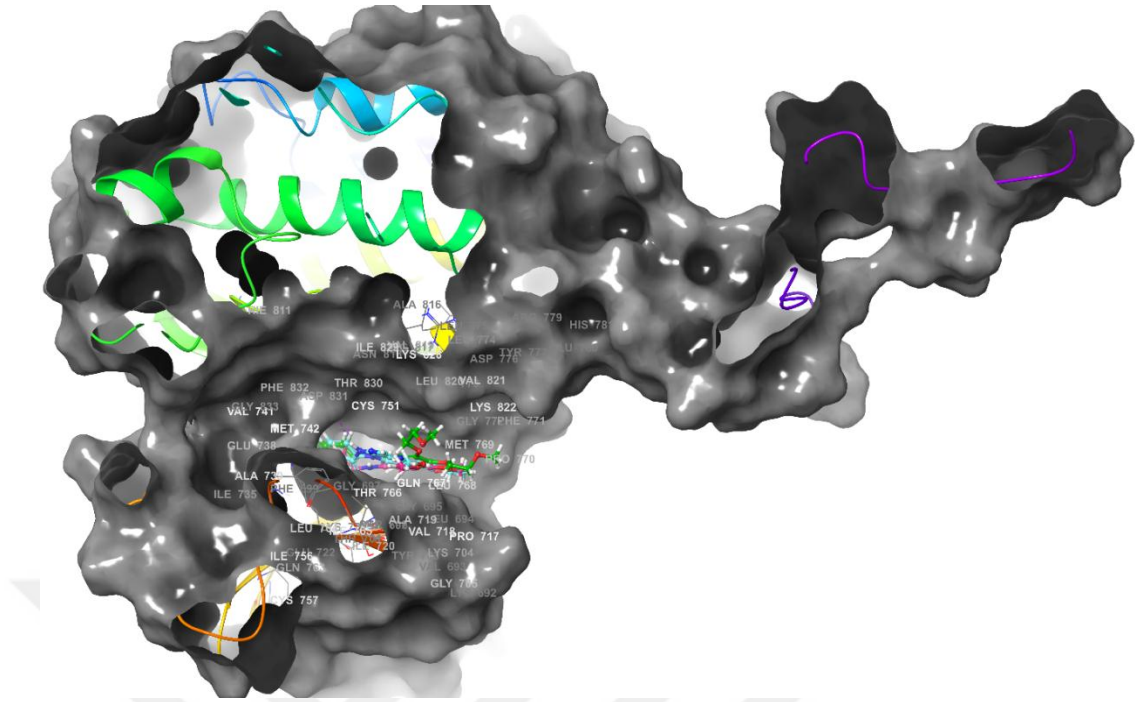
Gerçekleştirilen doking işleminin validasyonunun sağlanması amacıyla X ışını kristal yapısında bulunan PDB: 1M17 kodlu yapıdan erlotinib bileşiği çıkarılmış ve aynı bölgeye re-doking işlemi yapılmıştır. Elde edilen bağlanma pozu ile kristal yapıda bulunan erlotinibin bağlanma pozu arasında RMSD= 1,5 Å olarak bulunmuştur. Doking işlemi sonucu, erlotinibin -9,232 glide skoruna ve -72,493 glide emodel skoruna sahip olduğu gözlenmiştir. Sentezlenen bileşiklere ait değerler

Çizelge 3.2’de verilmiştir. Doking analizlerinin sonuçlarına göre bazı bileşiklerin (**4**, **7a**, **7b**, **7d**, **7f**, **8a**, **8b**, **8d**, **8f**, **9b**), -8’den daha küçük glide skorları ile erlotinibe benzer değerlere sahip olduğu görülmüştür.

Çizelge 3.2. Sentezlenen bileşiklerin doking skorları

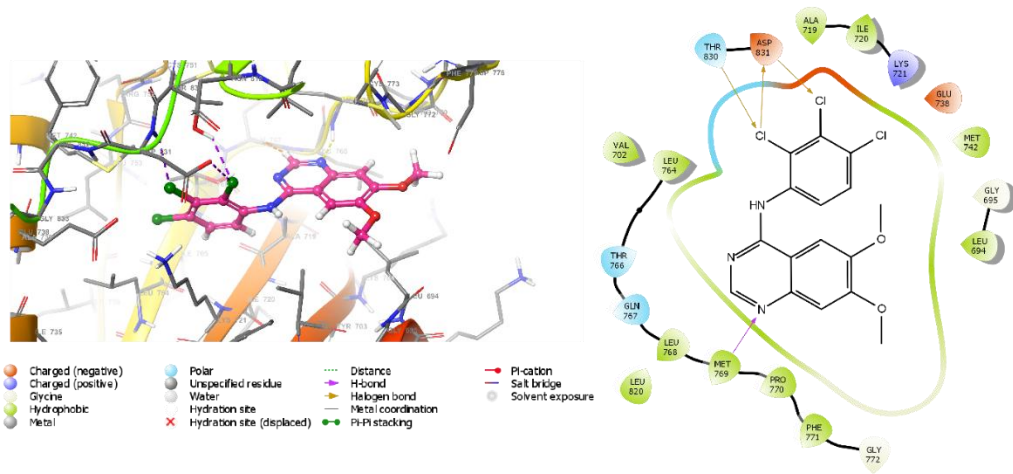
Bileşik	Glide Score	Glide Emodel
4	-8,318	-61,868
5	-7,934	-59,003
6	-6,652	-48,432
7a	-9,209	-68,036
7b	-8,262	-57,135
7c	-7,207	-57,337
7d	-9,232	-75,065
7e	-6,604	-62,074
7f	-9,252	-65,094
8a	-8,102	-64,593
8b	-8,018	-57,005
8c	-7,407	-61,087
8d	-8,278	-65,902
8e	-6,348	-60,261
8f	-8,142	-76,210
9a	-7,890	-62,140
9b	-8,231	-64,588
9c	-6,221	-55,069
9d	-6,509	-59,715
9e	-5,461	-63,930
9f	-7,752	-64,407
Erlotinib	-9,232	-72,493

EGFR kinaz inhibitör aktivite çalışmalarında en etkili olduğu bulunan bileşikler, bileşik **4** (aktivitesi %89), bileşik **6** (aktivitesi %95) ve bileşik **8f** (aktivitesi %93)’nin moleküler doking işlemleri sonucu elde edilen konformasyonları erlotinib ile üst üste karşılaştırılmıştır (Şekil 3.117).



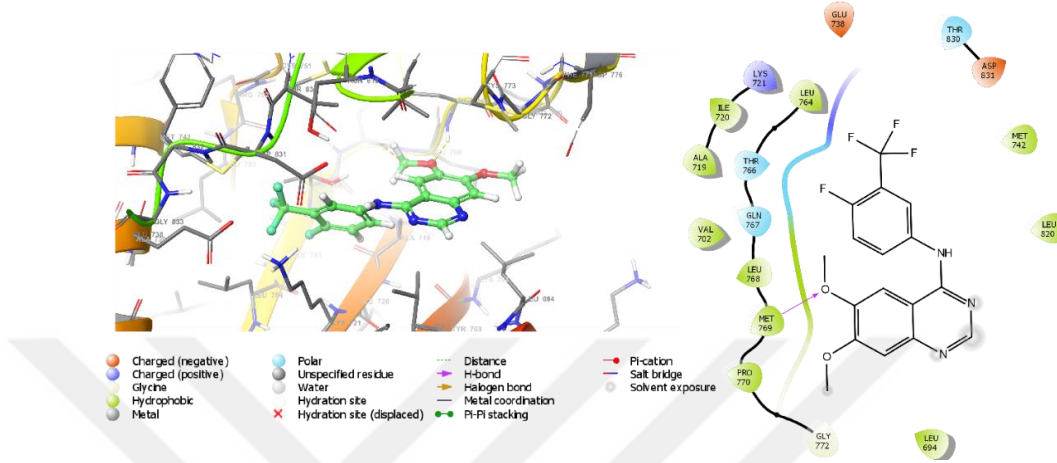
Şekil 3.117. EGFR aktif bölgesinde erlotinib (koyu yeşil), bileşik 4 (pembe), bileşik 6 (yeşil) ve bileşik 8f (mavi)'nin üst üste çakışmış görüntüsü

Bileşik 4'ün kinazolin halkasındaki N1 azot atomu ile EGFR'nin aktif bölgesinde Met769 (2,06 Å) arasında bir hidrojen bağı oluşmaktadır. Asp831 (2,78 Å ve 3,32 Å) ve Thr830 (2,49 Å) ile bileşiğin anilin halkası üzerindeki klor grupları arasında halojen bağları oluşmaktadır. Ayrıca Val702, Leu764, Leu820, Leu768, Pro770, Phe771, Leu694, Met742, Ile720 ve Ala719 ile hidrofobik etkileşimler meydana gelmektedir (Şekil 3.118).



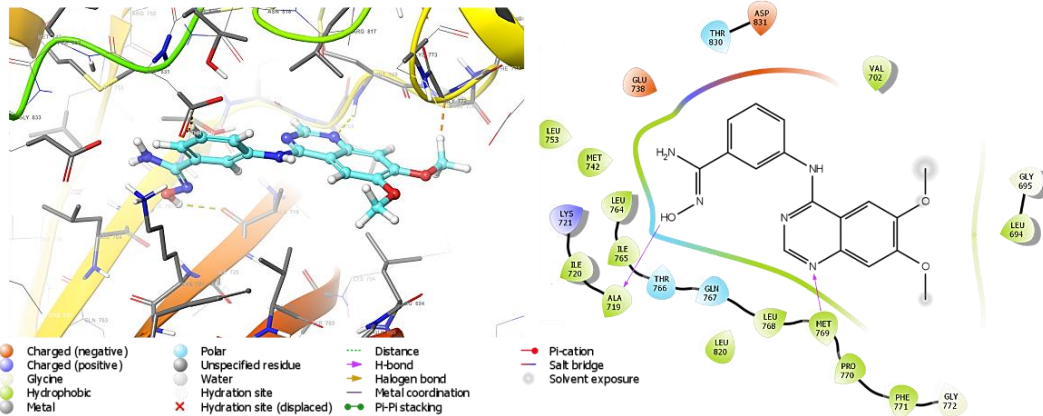
Şekil 3.118. Bileşik 4 (pembe)'ün EGFR'nin aktif bölgesindeki bağlanma pozunu (solda) ve PDB: 1M17 enzimi ile etkileşiminin 2 boyutlu gösterimi (sağda)

Bileşik 6'nın 6-metoksi grubundaki oksijen atomu ile EGFR'nin aktif bölgesinde Met769 (2,24 Å) arasında bir hidrojen bağı oluşmaktadır. Ayrıca Pro770, Leu768, Val702, Ala719, Ile720, Leu764, Met742, Leu820 ve Leu694 ile hidrofobik etkileşimler meydana gelmektedir (Şekil 3.119).



Şekil 3.119. Bileşik 6 (yeşil)'nin EGFR'nin aktif bölgesindeki bağlanma pozunu (solda) ve PDB: 1M17 enzimi ile etkileşiminin 2 boyutlu gösterimi (sağda)

Bileşik 8f'nin kinazolin halkasındaki N1 azot atomu ile EGFR'nin aktif bölgesinde Met769 (2,08 Å) arasında bir hidrojen bağı ve bileşiğin amidoksim grubundaki hidroksil grubu ile Ala719 (1,83 Å) arasında bir hidrojen bağı oluşmaktadır. Ayrıca Phe771, Pro770, Leu768, Leu820, Ile765, Leu764, Ile720, Met742, Leu753, Val702 ve Leu694 ile hidrofobik etkileşimler meydana gelmektedir. Kinazolin halkasına bağlı 6,7-dimetoksi gruplarının ise çözücü içine uzandığı görülmektedir (Şekil 3.120).



Şekil 3.120. Bileşik 8f (mavi)'nin EGFR'nin aktif bölgesindeki bağlanma pozunu (solda) ve PDB: 1M17 enzimi ile etkileşiminin 2 boyutlu gösterimi (sağda)

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, yeni 4-amino-6,7-dimetoksikinazolin türevlerinin tasarlanması, sentezlenmesi, *in vitro* EGFR tirozin kinaz aktivitesini inhibe etme potansiyellerinin incelenmesi ve enzimin aktif yoresine bağlanma özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bileşikler tasarlanırken, literatürde sıkça çalışmaları yapılmış ve genellikle nanomolar konsantrasyonlarda *in vitro* olarak güçlü inhibitör aktiviteler sergileyen, aynı zamanda mevcut EGFR tirozin kinaz inhibitörlerinin temel yapısını oluşturan 4-aminokinazolin yapısı (Chang ve ark., 2017) tercih edilmiştir.

Kinazolin türevleriyle yapılmış çalışmalar, halkaya elektron veren sübstituentlerin 6. ve 7. konumlardan bağlanmasıyla EGFR kinazı inhibe edici aktivitenin arttığını, sübstituentlerin 5. ve 8. konumlardan bağlanmasıyla aktivitenin ciddi anlamda azaldığını göstermektedir. En yüksek aktiviteler ise kinazolin halkası 6. ve 7. konumlarından metoksi ile türevlendirildiğinde elde edilmiştir (Barker, 1993; Bridges ve ark., 1996 ve Denny ve ark., 1996). Bildirilen bu çalışmaların sonuçlarına uyumlu şekilde, sentezlenen tüm bileşikler kinazolin halkasının 6. ve 7. konumlarında metoksi sübstituentleri taşıyacak şekilde tasarlanmışlardır.

Amino grubu üzerinden türevlendirilmiş 4-aminokinazolin yapısına sahip bileşiklerle yapılan çalışmalarda, amin yapısı üzerindeki serbest hidrojenin enzimle etkileşim için önemli olduğu ve azot üzerinde hidrojen taşımayacak şekilde hazırlanan türevlerde EGFR tirozin kinazı inhibe edici etkinin azaldığı bildirilmiştir (Gibson ve ark., 1997). Bu nedenle çalışmadaki tüm bileşikler amino grubu üzerinde serbest hidrojene sahip 4-amino-6,7-dimetoksikinazolin türevlerinden oluşmaktadır.

Bu çalışmada, amidin yapısı ile türevlendirilen bileşikler üç seri halinde tasarlanmışlardır. İlk seri anilin halkasının 4. konumundan türevlendirilmiş, ikinci seri anilin halkasının 3. konumundan türevlendirilmiş 4-anilino-6,7-

dimetoksikinazolin bileşiklerinden oluşmaktadır. Üçüncü seri ise, fenil halkasının 4. konumundan türevlendirilmiş *N*-benzil-6,7-dimetoksikinazolin-4-amin bileşiklerinden oluşmaktadır.

Sonuç bileşiklere (**4**, **5**, **6**, **7a-7f**, **8a-8f**, **9a-9f**) ulaşmak için, başlangıç maddesi olarak metil 2-amino-4,5-dimetoksibenzoat kullanılmış ve formamid ile halka kapanması sonucu 6,7-dimetoksikinazolin-4-ol (**1**) bileşiği elde edilmiştir. Ardından bu bileşikten, tıyonil klorür ile nükleofilik süstitüsyon reaksiyonu sonucu 4-kloro-6,7-dimetoksikinazolin (**2**) bileşiği oluşturulmuştur.

4-Kloro-6,7-dimetoksikinazolin (**2**) bileşiği sırasıyla 2,3,4-trikloroanilin, 3-amino-2-kloropiridin ve 4-floro-3-(triflorometil)anilin ile reaksiyona sokularak sonuç bileşikler **4**, **5** ve **6** sentezlenmiştir.

Amidin grubu taşıyan türevlerin sentezi için, öncelikle 4-kloro-6,7-dimetoksikinazolin (**2**) bileşiği sırasıyla 4-aminobenzonitril, 3-aminobenzonitril ve 4-(aminometil)benzonitril ile reaksiyona sokularak benzonitril yapısı taşıyan 4-amino-6,7-dimetoksikinazolin türevleri (**3a**, **3b**, **3c**) sentezlenmiştir. Bu türevlerdeki nitril grupları, Pinner reaksiyonu ile imidat esterleri üzerinden uygun amin türevleriyle birlikte amidin yapısı taşıyan sonuç bileşiklere (**7a-7e**, **8a-8e**, **9a-9e**) dönüştürülmüştür.

Amidoksim yapısı taşıyan türevlerin sentezi için, benzonitril yapısı taşıyan 4-amino-6,7-dimetoksikinazolin türevleri (**3a**, **3b**, **3c**) hidroksilamin hidroklorür, DMSO ve potasyum *tert*-bütoksit ile reaksiyona sokulmuş ve sonuç bileşikler **7f**, **8f**, **9f** elde edilmiştir.

Bu şekilde 5 adet ara ürün ve 21 adet sonuç bileşiğin sentezi gerçekleştirilmiştir. Bileşik **6** ve **7f** hariç diğer tüm sonuç ürünler orijinal bileşiklerdir. Sentezi yapılan tüm bileşiklerin saflık kontrolleri, İTK ve erime noktalarının tayini ile yapıldıktan sonra, yapılarını kanıtlamak üzere spektral analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla kütle analizleri (Mass spektral analizleri),

elementel analizleri, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR ve COSY, NOESY, ROESY, HSQC, HMBC gibi 2 boyutlu NMR analizleri yardımıyla elde edilen bulguların beklenen yapıları kanıtlar nitelikte olduğu bulunmuştur.

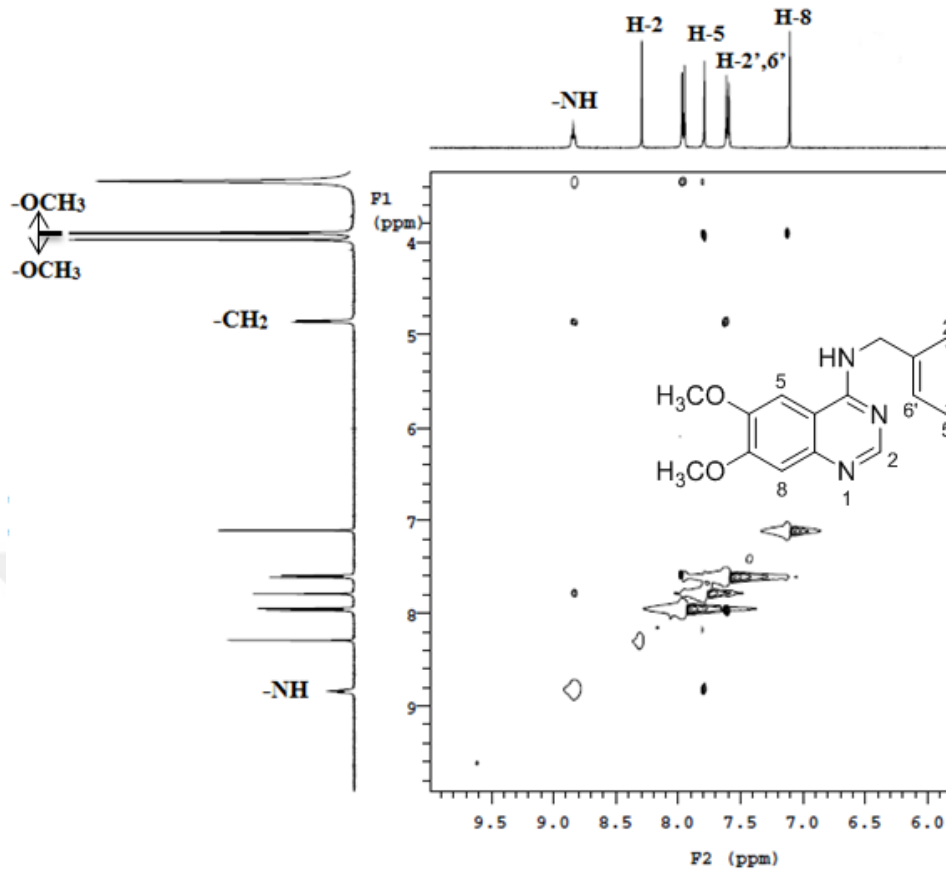
Bileşiklerin kütle analizleri Elektrosprey iyonizasyon (ESI) yöntemi, pozitif iyonizasyon tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiş ve sonuç bileşikler $(\text{M}+1)^+$ iyonları halinde gözlenmiştir.

Sentezlenen bileşiklerin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları çözünürlüklerine göre CDCl_3 , CD_3OD veya $\text{DMSO}-d_6$ çözücülerinde alınmıştır. Sentezlenen ara ürünlerin ve sonuç bileşiklerin ^1H -NMR spektrumları incelendiğinde literatürde bildirilenlere benzer şekilde (Ashok ve ark., 2016; Bridges ve ark., 1996 ve Yang ve ark., 2011); 6,7-dimetoksi gruplarının her ikisi de 3,88-4,11 ppm aralığında genellikle art arda iki singlet olarak gözlenmektedir. Kinazolin halkasının 5 ve 8 numaralı konumlarında bulunan protonlar, spektrumlarda genellikle 7,02-7,48 ppm ve 7,28-8,66 ppm aralığında 1H singlet olarak gözlenmişlerdir. Kinazolin halkasının 2 numaralı konumunda bulunan proton, 5 ve 8 numaralı konumlara göre daha düşük alanda genellikle 8,00-8,90 ppm aralığında 1H singlet olarak gözlenmiştir.

9a-9f bileşikleri ve **3c** bileşiğinde benzamidin yapısı ile amin yapısı arasında bulunan metilen köprüsü spektrumlarda 4,85-5,11 ppm aralığında 2H olarak görülmüştür. **7a-7f** ve **9a-9f** bileşiklerinde bulunan 1. ve 4. konumundan türevlendirilmiş benzen halkasına ait pikler, H-2',6' ve H-3',5' protonları için A_2X_2 sistemine uygun şekilde 2H dubletler halinde gözlenmiştir. **7b**, **8b**, **9b** bileşiklerinde izopropil yapısına ait metil gruplarının protonları 1,33-1,40 ppm aralığında 6H değerinde dublet, -CH protonu ise 3,97-4,07 ppm aralığında 1H multipler vermiştir. **7c**, **8c**, **9c** bileşiklerinde bulunan 2-imidazolin yapısında bulunan -CH₂ gruplarına ait protonlar 3,82-3,97 ppm aralığında 4H singlet olarak görülmektedir. **7d**, **8d**, **9d** bileşiklerinde bulunan siklopropil yapısına ait protonlar 0,86-2,85 ppm aralığında 2H multipler yapıda iki pik ve daha düşük alanda 1H multipler bir pik vermiştir.

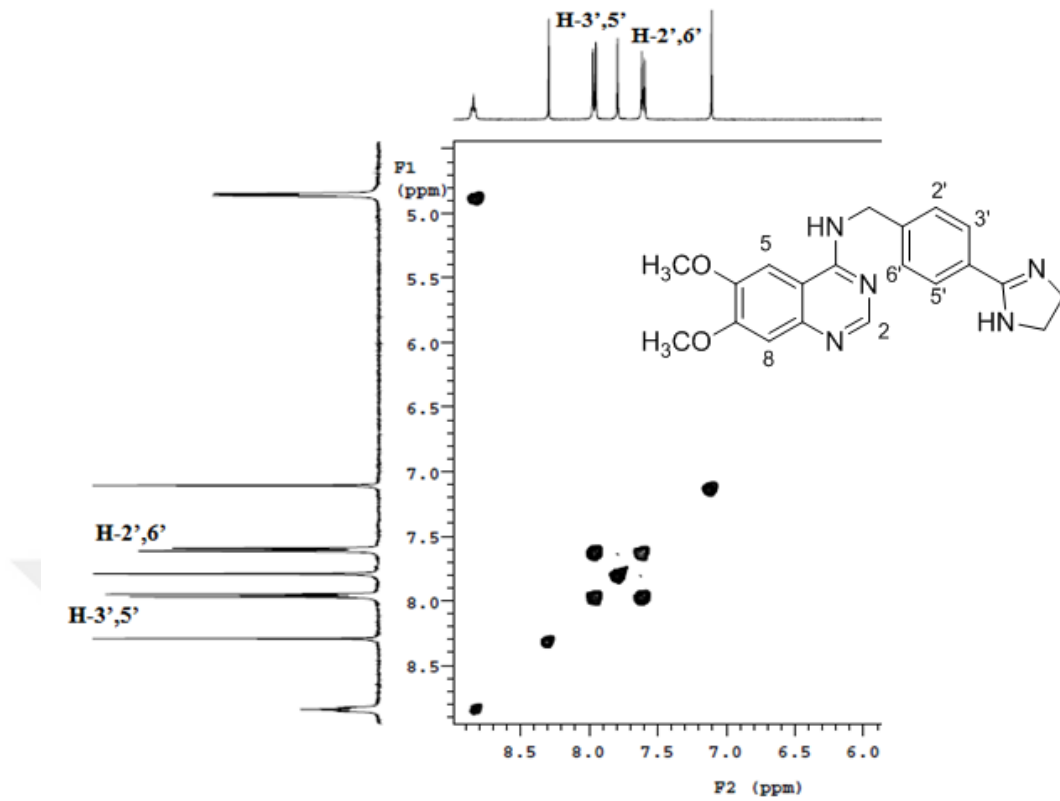
Bileşiklerin NMR spektrumlarındaki pikler net olarak ayırt edilemediğinde analiz sırasında NMR tüpü içine D₂O ilave edilmiştir. Örneğin bileşik **6**'nın ¹H-NMR analizlerinde gösterildiği üzere, heteroatoma bağlı protona ait pikin ve HCl tuzu yapısına sahip bileşiklerde gözlenen HCl'ye ait pikin diğer piklerden ayrımının kesin olarak yapılabilmesi amacıyla D₂O kullanılmıştır. D₂O ilavesiyle HCl'ye ait broad singlet olarak gözlenen pikin ve 11,89 ppm'de singlet olarak gözlenen NH'a ait pikin kaybolduğu görülmektedir.

2D-NMR teknikleri yardımıyla bazı bileşiklerin tüm proton ve karbonlarına ait kimyasal kayma yerleri belirlenebilmiştir. Bileşik **9c** üzerinden bu iki boyutlu NMR teknikleri değerlendirilecek olursa, NOESY spektrumu yardımıyla belli bir mesafe (4-5 Å) uzaklıkta uzaysal olarak etkileşen protonlar belirlenebilmiştir (Şekil 4.1). ¹H-NMR spektrumunda 4,85 ppm'de görülen, benzil yapısına ait -CH₂ grubunun NOESY spektrumunda yaptığı etkileşimler H-2',6' protonlarına ve 4. konumdaki -NH protonuna ait piklerin belirlenebilmesine yardımcıdır. 3,89 ve 3,91 ppm'de gözlenen -OCH₃ gruplarına ait piklerin, NOESY spektrumunda H-5 ve H-8 ile etkileştiği gözlenmektedir. -NH pikinin ise H-5 ile etkileştiği gözlenmektedir. Bu sayede singlet olarak gözlenen H-5 ve H-8 pikleri ayırt edilebilmektedir. Bu durum singlet olarak 8,29 ppm'de gözlenen pikin H-2'e ait olduğunun belirlenmesinde de yardımcı olur.



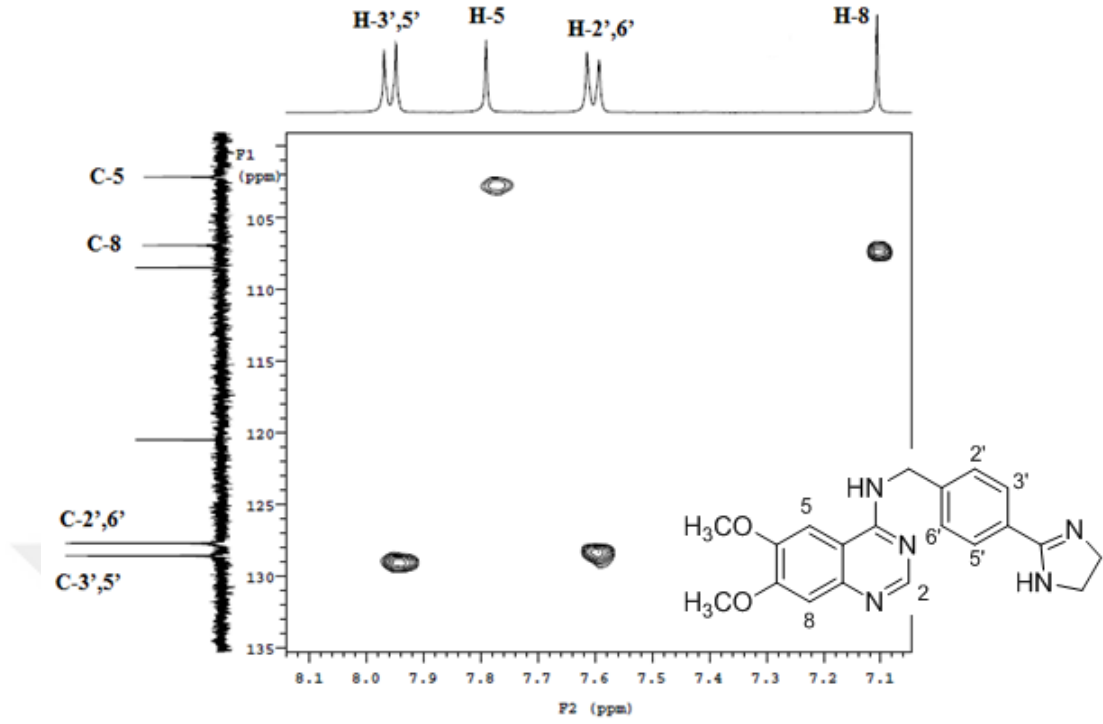
Şekil 4.1. Bileşik 9c'nin kısmi NOESY spektrumu

COSY spektrumu yardımıyla aynı tür çekirdeklerin birbirleriyle komşu olma durumu belirlenebilmektedir. Etkileşen protonlar spektrumda bir kare düzeninde yer alırlar. Bileşik **9c**'de, birbiriyle *orto* konumunda bulunan H-2',6' ve H-3',5' protonlarının etkileşimi COSY spektrumundan görülebilmektedir (Şekil 4.2).



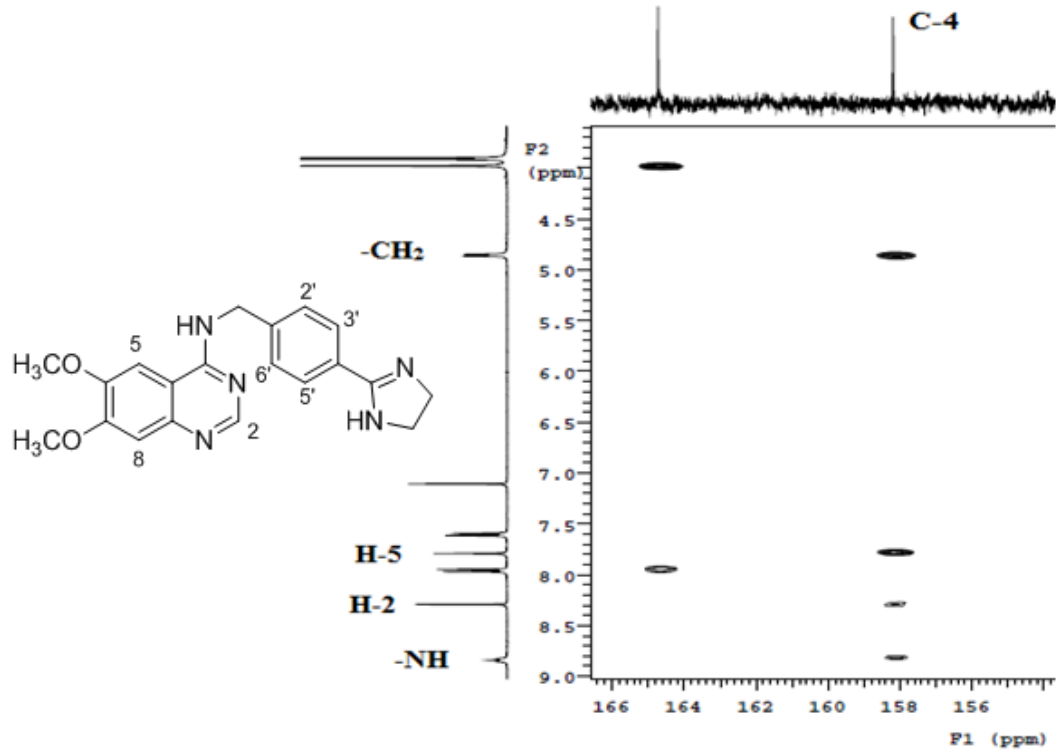
Şekil 4.2. Bileşik 9c'nin kısmi COSY spektrumu

HSQC spektrumu, moleküldeki protonlar ile bağlı oldukları karbonlar arasındaki etkileşimi göstermektedir. Spektrumun eksenlerinde proton pikleri ve karbon pikleri yer almaktadır. Bu piklerin kesiştiği yerlerde oluşan ve etkileşimlerini gösteren piklerden hangi protonun hangi karbona bağlı olduğunun anlaşılmasında yararlanılmaktadır. Bileşik 9c'ye ait HSQC spektrumu incelendiğinde H-5, H-8, H-2',6' ve H-3',5' protonlarının bağlı oldukları karbonlara ait pikler ayırt edilebilmektedir (Şekil 4.3). Benzer şekilde diğer piklerin tanımlanması bölüm 3.3.13'te verilmiştir.



Şekil 4.3. Bileşik 9c'nin kısmi HSQC spektrumu

HMBC spektrumu yardımıyla, karbonlar ve protonlar arasındaki 2, 3 ve hatta bazen 4 bağa kadar olan etkileşimler belirlenebilmektedir. Spektrumun bir ekseninde karbon pikleri ve diğer ekseninde proton pikleri bulunmaktadır. Bileşik **9c**'ye ait HMBC spektrumu incelendiğinde (Şekil 4.4) 158,39 ppm'de bulunan 4 numaralı karbon atomunun 2 ve 3 bağ uzaklıktaki $-CH_2$, H-5, H-2 ve $-NH$ ile etkileştiği görülmektedir. Benzer şekilde diğer piklerin tanımlanması bölüm 3.3.13'te verilmiştir.



Şekil 4.4. Bileşik 9c'nin kısmi HMBC spektrumu

Sentezlenen bileşiklerin elementel analiz sonuçları ve teorik olarak hesaplanan yüzde değerleri kıyaslandığında, sonuçların kabul edilebilir sapma değeri sınırları içerisinde kaldığı belirlenmiştir. Bu şekilde, sentezlenen türevlerin kimyasal yapıları ve saflıkları kanıtlanmıştır.

Sentezlenen türevler, Lipinski ve Veber kurallarına, logP için 0,85-4,26; moleküler ağırlık için 316,75-419,53 aralığındaki değerlerle ve hidrojen bağı akseptörü sayısı ≤ 10 , hidrojen bağı donörü sayısı ≤ 5 , rotasyon yapabilen bağ sayısı ≤ 10 değerleriyle uymaktadır. Yalnız bileşik 4; 5,17 bulunan logP değeri ile belirlenen kriterlerden sapma göstermektedir. Ancak birden fazla sapan değer olması durumunda kuralların bozulacağı belirtilmiştir. Bu nedenle, sentezlenen tüm bileşiklerin gerekli kriterleri sağladığı ve bileşiklerin oral yoldan alımıyla iyi bir biyoyararlanıma sahip olabileceği söylenebilir.

Bileşiklerin EGFR tirozin kinaz inhibitör aktivitelerinin değerlendirilmesi için, ADP-Glo™ Test kiti ve EGFR Kinaz Enzim Sistemi kullanılmıştır. Substrat ve ATP

varlığında EGFR tarafından gerçekleştirilen kinaz reaksiyonu sonrası ortamdaki ATP, lusiferaz/lusiferin reaksiyonu ile ışığa dönüştürülmüş ve üretilen ışık lüminometre kullanılarak ölçülmüştür. Tüm işlemler test protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Ölçülen lüminesans, reaksiyon sırasında üretilen ADP konsantrasyonu ile orantılıdır ve kinaz aktivitesi ile ilişkilidir. Bileşiklerin EGFR kinazı inhibe etme aktiviteleri yüzde olarak hesaplanmış ve referans bileşik erlotinib ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Elde edilen aktivite sonuçlarına göre, 6 bileşiğin EGFR tirozin kinazı inhibe etme potansiyeline sahip olduğu gözlenmiştir. **4, 5, 6, 8c, 8e ve 8f** kodlu bileşikler % 58 ile % 95 aralığında değişen aktivitelere sahip bulunmuşlardır. Referans bileşik olan erlotinibin aktivitesi % 93 olarak bulunmuştur. Bileşik **4** (% 89), bileşik **6** (% 95) ve bileşik **8f** (% 93) en etkili bileşiklerdir.

Sentezlenen bileşikler arasından, yapısında amidin grubu bulunan türevlerin EGFR kinaz inhibitörü aktivite sonuçları değerlendirildiğinde, amidin grubu *meta* konumunda bulunan türevlerin, *para* konumunda bulunanlara kıyasla daha aktif oldukları söylenebilir. Bu durum daha önceden yapılmış çalışmalarla (Bridges ve ark., 1996; Traxler ve ark., 1996 ve Wakeling ve ark., 1996) uyumlu sonuç vermiş olup, *meta* konumundaki süstitüentlerin enzimle etkileşim için önemli olduğunu düşündürmektedir.

Sentezlenen bileşiklerin EGFR ile etkileşim enerjilerinin ve etkileşim gösteren amino asitlerin belirlenmesi için EGFR inhibitörü olduğu bilinen erlotinib, referans bileşik olarak alınmış ve moleküler doking çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Glide doking etkileşim enerjileri -8'den küçük olan bileşiklerin (**4, 7a, 7b, 7d, 7f, 8a, 8b, 8d, 8f, 9b**) erlotinibe benzer (-9,232) etkileşim enerjilerine sahip oldukları ve EGFR ile etkileşebilecekleri sonucuna varılmıştır.

Sentezlenen türevlerin etkileşim skorları göz önüne alındığında, 2-imidazolin grubu taşıyan bileşiklerin (**7c, 8c, 9c**) ve *N*-sikloheksilbenzimidamid grubu taşıyan bileşiklerin (**7e, 9e**) etkileşim enerjilerinin daha yüksek olduğu görülmektedir.

Sentezlenen seride, 4-anilino-6,7-dimetoksikinazolin yapısındaki ve N-benzil-6,7-dimetoksikinazolin-4-amin yapısındaki bileşiklere benzer halkası üzerinden bağlanan hacimli grupların aktiviteyi azalttığı söylenebilir.

EGFR kinaz inhibitör aktivite sonuçlarına göre en etkili bulunan üç bileşiğin (**4**, **6**, **8f**) EGFR ile yaptığı etkileşimler incelenmiştir. Üç bileşiğin de enzimde bulunan Met769 ile hidrojen bağı oluşturarak ve çeşitli amino asitlerle hidrofobik etkileşimler göstererek EGFR aktif bölgesine bağlandığı gözlenmiştir.

Literatürde belirtildiği üzere (Fry, 2003), erlotinibin kinazolin halkasındaki N1 azot atomu ile enzimde bulunan Met769 arasında hidrojen bağı oluşmaktadır. Anilin grubu enzimle hidrobik etkileşimler yapmakta ve erlotinibin C6 ve C7 konumlarındaki süstitüentler çözücüye doğru yönlendirilmiş halde enzimle etkileşmektedir. Bileşik **4** ve **8f**, enzimde bulunan amino asitlerle erlotinibe benzer şekilde etkileşim göstermişlerdir. Her ikisi de Met769 ile kinazolin halkasının N1 azot atomu üzerinden hidrojen bağı oluşturmaktadır. Enzimle çeşitli amino asitler üzerinden hidrofobik etkileşimler yapmaktadırlar. Ayrıca bileşik **8f**, erlotinibe benzer şekilde C6 ve C7 konumlarındaki süstitüentler üzerinden çözücüye doğru yönlendirilmiş şekilde etkileşim göstermektedir.

En düşük doking skorlarına sahip olan bileşiklerin, en yüksek EGFR kinaz inhibitör aktivitesine sahip bileşikler olmadığı görülmüştür. Bu durum fizikokimyasal parametrelerin aktivitede önemli rol oynadığını düşündürmektedir. Doking sonuçları ile *in vitro* EGFR inhibitör etkileri arasında doğrusal bir ilişki görülmesi de, aktif olan bileşiklerin enzimin aktif bölgesi ile etkileşime girdiği ve hidrojen bağı yaptığı tespit edilmiştir.

Spesifik protein kinaz inhibitörü olarak tasarlanmış ve sentezlenmiş birçok bileşik bulunmaktadır. Bu bileşikler toksisite veya çözünürlükleri nedeniyle ilaç olarak kullanılamasalar dahi son derece yararlı araştırma ajanları olabilmektedirler (Cohen, 2002).

Çalışmada sentezlenen bileşiklerin EGFR kinaz inhibitörü olarak aktivite değerleri göz önüne alındığında, yararlı bileşikler olabilecekleri düşünülmektedir. Bileşiklerin, EGFR mutasyonu barındıran hücre hatlarında çalışılmasıyla değerli sonuçlar elde edilebilir. Aktive edici EGFR mutasyonları üzerindeki etkinliklerinin *in vivo* olarak değerlendirilmesi, belirli EGFR mutasyonlarını barındıran tümör hücreleri üzerine önemli sonuçlar verebilir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanserin görülme sıklığı ve kansere bağlı ölüm oranları göz önüne alındığında, kanser tedavisi çağımızda önemli bir araştırma konusu durumundadır. Kanseri etkin bir şekilde tedavi edebilmesinin yanı sıra kanserli olmayan normal vücut hücrelerini etkilemeyecek hedefe yönelik olarak tasarlanan yeni bileşiklerin keşfi önemlidir. Bir protein tirozin kinaz reseptörü olan EGFR'nin kanserli hücrelerde, normalden farklı davranış gösterdiği bilinmektedir. Bu zamana kadar geliştirilmiş ilaç moleküllerinde çözünürlük, yan etki, direnç gibi problemlerle karşılaşılması nedeniyle, potent ve selektif etkili yeni antikanser bileşiklere hâlâ ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada, EGFR'yi hedef alarak kanser tedavisinde etkin olarak kullanılması amaçlanan yeni bileşikler tasarlanmıştır.

Bu çalışmada, 6,7-dimetoksi-4-aminokinazolin yapısına sahip 21 adet bileşik tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Elde edilen bileşiklerin (**4**, **5**, **6**, **7a-7f**, **8a-8f**, **9a-9f**) saflıkları ve yapıları kütle analizleri, elementel analizleri, ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve COSY, NOESY, ROESY, HSQC, HMBC gibi 2 boyutlu NMR analizleri yardımıyla kanıtlanmıştır.

Sentezlenen 21 adet bileşiğin, *in vitro* EGFR tirozin kinaz inhibitör etkinlikleri ADP-Glo™ Test kiti kullanılarak ve referans bileşik erlotinib ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. EGFR kinaz inhibitör aktivite sonuçları yüzde olarak elde edilmiştir. Referans bileşik olan erlotinibin EGFR inhibitör aktivite sonucu % 93 olarak bulunmuştur. Aktivite sonuçları, amidin grubu taşımayan 4-aminokinazolin türevlerinden bileşik **4** için % 89, bileşik **5** için % 74 ve bileşik **6** için % 95 bulunurken, amidin grubu taşıyan türevlerde bileşik **8c** için % 58 ve bileşik **8e** için % 74, amidoksim grubu taşıyan bileşik **8f** için % 93 bulunmuştur. Sentezlenen diğer bileşiklerde aktivite gözlenmemiştir. Referans bileşik erlotinib ve sentezlenen bileşiklerin aktivite sonuçları karşılaştırıldığında, bileşik **8f**'nin erlotinibe eşdeğer etkiye sahip olduğu, bileşik **6**'nın ise erlotinibden daha aktif olduğu bulunmuştur.

Çalışmada, 4-aminokinazolin yapısı ve benzamidin grubu taşıyan bileşikler üç farklı konumdan türevlendirilecek şekilde hazırlanmıştır. Amidin grubunu anilin halkasının 4. konumunda veya 3. konumunda bulunduran türevler ve amidin grubunu fenil halkasının 4. konumunda bulunduran 4-(benzilamino)kinazolin yapısına sahip türevler sentezlenmiştir. Bu üç serinin aktivite sonuçları değerlendirildiğinde, en aktif türevlerin amidin grubunu anilin halkasının 3. konumunda taşıyan bileşikler olduğu söylenebilir.

Sentezlenen tüm bileşiklerin doking analizleri gerçekleştirilmiş ve doking skorları hesaplanmıştır. Referans bileşik olan erlotinibe ait doking skoru -9,232 olarak bulunmuştur. Sentezlenen bileşiklerden bazılarının (**4**, **7a**, **7b**, **7d**, **7f**, **8a**, **8b**, **8d**, **8f**, **9b**) -8,018 ile -9,252 aralığında değişen ve erlotinibe benzer seviyede doking skorlarına sahip olduğu görülmüştür.

EGFR kinaz inhibitör aktivite sonuçlarına göre inhibitör etkinliğe sahip olduğu gözlenen bileşiklerden (**4**, **5**, **6**, **8c**, **8e**, **8f**) en etkili olan ve inhibisyon değeri %80'in üstünde olan üç bileşik (**4**, **6**, **8f**) ile EGFR arasındaki etkileşimleri gözlemlemek için doking çalışmaları yapılmıştır. Bileşik **4**, **6** ve **8f** EGFR'nin aktif bölgesinde Met769 ile hidrojen bağı yapmakta ve çeşitli amino asitlerle hidrofobik etkileşimler kurarak enzime bağlanmaktadır.

Sentezlenen bileşikler arasında, referans bileşik erlotinibe kıyasla eşdeğer ve yüksek aktiveye sahip bileşikler olduğu göz önüne alındığında yapılan çalışma kanser tedavisine katkı sağlaması bakımından önemlidir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre aktif bulunan moleküllerin etki mekanizmalarının aydınlatılması, sitotoksiste çalışmalarının yapılması ve özellikle EGFR mutasyonları üzerindeki etkinliklerinin araştırılması bu konudaki ilaç etken madde arayışına katkı sağlayacaktır.

ÖZET

Bazı Yeni 4-Aminokinazolin Karboksamidin Türevlerinin Sentezi, Yapılarının Aydınlatılması ve Antikanser Aktivitelerinin İncelenmesi

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), kanser araştırmaları için önemli bir hedeftir. Kanserli dokularda artmış seviyelerde gözlenen EGFR'nin inhibe edilmesi ile tümör hücrelerinin büyümesi engellenebilir. Kinazolin türevleri, EGFR kinazın hedeflenmesinde yaygın olarak yararlanılan inhibitörlerdir ve yapısal optimizasyonları ile etkili antikanser ilaçlar geliştirilebilir. Bu çalışmada, bir dizi 4-amino-6,7-dimetoksikinazolin türevinin tasarlanıp sentezlenmesi, yapılarının aydınlatılması, moleküler doking çalışmalarının yapılması ve *in vitro* EGFR kinaz inhibitör aktivitelerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Sentez çalışmalarında, formamid ve metil 2-amino-4,5-dimetoksibenzoatın reaksiyonu ile 6,7-dimetoksikinazolin-4-ol (**1**) bileşiği elde edilmiştir. Ardından bileşik **1**, tiyonil klorür ile reaksiyona sokularak 4-kloro-6,7-dimetoksikinazolin (**2**) sentezlenmiştir. Bu bileşiğin (**2**) sırasıyla 2,3,4-trikloroanilin, 3-amino-2-kloropiridin ve 4-floro-3-(triflorometil)anilin ile reaksiyonu sonucu bileşikler **4**, **5** ve **6** elde edilmiştir. Daha sonra 4-kloro-6,7-dimetoksikinazolin (**2**), sırasıyla 4-aminobenzonitril, 3-aminobenzonitril ve 4-(aminometil)benzonitril ile reaksiyona sokularak benzonitril yapısı taşıyan 4-amino-6,7-dimetoksikinazolin türevleri (**3a**, **3b**, **3c**) sentezlenmiştir. Bu bileşikler, uygun amin türevleriyle Pinner reaksiyonuna sokularak amidin yapısı taşıyan **7a-7e**, **8a-8e**, **9a-9e** bileşikleri elde edilmiştir. Benzonitril yapısı taşıyan 4-amino-6,7-dimetoksikinazolin türevleri (**3a**, **3b**, **3c**), hidroksilamin hidroklorür, DMSO ve potasyum *tert*-bütoksit ile reaksiyona sokularak amidoksim yapısı taşıyan **7f**, **8f**, **9f** bileşikleri elde edilmiştir.

Sentezlenen 21 adet bileşiğin (**4**, **5**, **6**, **7a-7f**, **8a-8f**, **9a-9f**) kütle analizleri, elementel analizleri, ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve 2D-COSY, 2D-NOESY, 2D-ROESY, 2D-HSQC, 2D-HMBC analizleri yardımıyla yapıları kanıtlanmıştır.

Bileşiklerin *in vitro* EGFR kinaz inhibitör aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Referans bileşik olan erlotinibin aktivitesi % 93 olarak bulunmuştur. Erlotinib ile karşılaştırıldığında, bileşik **4** (% 89), bileşik **5** (% 74), bileşik **6** (% 95), bileşik **8c** (% 58), bileşik **8e** (% 74) ve bileşik **8f** (% 93)'nin EGFR kinaz inhibitör aktiviteye sahip ümit verici bileşikler oldukları bulunmuştur.

Doking çalışmaları ile tüm bileşiklerin doking skorları elde edilmiştir. EGFR kinaz inhibitör aktivite çalışmaları sonucu en etkili bulunan bileşikler **4**, **6** ve **8f**'nin doking çalışmaları ile enzimle bağlanma etkileşimleri değerlendirilmiş ve enzimin aktif bölgesine bağlandıkları gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: 4-Aminokinazolin, Amidin, Antikanser Aktivite, EGFR, Tirozin Kinaz

SUMMARY

Synthesis, Structure Elucidation and Anticancer Activities of Some New 4-Aminoquinazoline Carboxamidine Derivatives

The epidermal growth factor receptor (EGFR) is an important target for cancer research. The growth of tumor cells can be prevented by inhibiting EGFR, which is observed at increased levels in cancerous tissues. Quinazoline derivatives are widely used inhibitors for targeting EGFR kinase, and effective anticancer drugs can be developed with their structural optimization. In this study, it was aimed to design and synthesize a series of 4-amino-6,7-dimethoxyquinazoline derivatives, to elucidate their structures, to conduct molecular docking studies and to evaluate their *in vitro* EGFR kinase inhibitory activities.

In synthesis studies, 6,7-dimethoxyquinazolin-4-ol (**1**) was obtained with the reaction of formamide and methyl 2-amino-4,5-dimethoxybenzoate. Then, compound **1** was reacted with thionyl chloride to synthesize 4-chloro-6,7-dimethoxyquinazoline (**2**). As a result of the reaction of this compound (**2**) with 2,3,4-trichloroaniline, 3-amino-2-chloropyridine and 4-fluoro-3-(trifluoromethyl)aniline, respectively, compounds **4**, **5** and **6** were obtained. Then, 4-chloro-6,7-dimethoxyquinazoline (**2**) is reacted with 4-aminobenzonitrile, 3-aminobenzonitrile and 4-(aminomethyl)benzonitrile, respectively, to form 4-amino-6,7-dimethoxyquinazoline derivatives (**3a**, **3b**, **3c**) which have benzonitrile structure. These compounds were reacted (Pinner reaction) with appropriate amine derivatives to obtain compounds **7a-7e**, **8a-8e**, **9a-9e** having the amidine structure. 4-amino-6,7-dimethoxyquinazoline derivatives having benzonitrile structure (**3a**, **3b**, **3c**) were reacted with hydroxylamine hydrochloride, DMSO and potassium *tert*-butoxide to obtain compounds **7f**, **8f**, **9f** having amidoxime structure.

The chemical structures of 21 compounds (**4**, **5**, **6**, **7a-7f**, **8a-8f**, **9a-9f**) were elucidated with their Mass spectral data, elemental analysis and, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 2D-COSY, 2D-NOESY, 2D-ROESY, 2D-HSQC, 2D-HMBC spectra.

In vitro EGFR kinase inhibitory activity studies of the compounds were performed. The activity of the reference compound, erlotinib was 93%. Compared to erlotinib, compound **4** (89%), compound **5** (74%), compound **6** (95%), compound **8c** (58%), compound **8e** (74%), and compound **8f** (93%) were found to be promising compounds with EGFR kinase inhibitor activity.

Docking scores of all compounds were obtained by docking studies. Compounds **4**, **6** and **8f**, which were found to be the most effective in EGFR kinase inhibitory activity studies, were evaluated by docking studies their binding interactions with the enzyme, and they were shown to bind to the active site of the enzyme.

Keywords: 4-Aminoquinazoline, Amidine, Anticancer Activity, EGFR, Tyrosine Kinase

KAYNAKLAR

- ABBAS YS (2020). 4(3H)-Quinazolinone Derivatives: Syntheses, Physical Properties, Chemical Reaction, and Biological Properties. *Quinazolinone and Quinazoline Derivatives*. IntechOpen. 53-74.
- ACAR C, ALTUNTAŞ TG (2019). Hedefe yönelik kanser tedavisinde kullanılan akıllı ilaçlar: EGFR inhibitörleri. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences* **44(1)**: 47-63.
- ADAMS R, BEEBE, CH (1916). Action of the grignard reagent on cn compounds. Synthesis of amidines from cyanamides. *Journal of the American Chemical Society* **38(12)**: 2768–2772.
- ALAGARSAMY V, CHITRA K, SARAVANAN G, SOLOMON VR, SULTHANA MT, NARENDHAR B. (2018). An overview of quinazolines: Pharmacological significance and recent developments. *European Journal of Medicinal Chemistry* **151**: 628-685.
- ALY A, NOUR-EL-DIN AM (2008). Functionality of amidines and amidrazones. *Arkivoc* **1**: 153-194.
- ARULANANDA S, DO H, MUSAFER A, MITCHELL P, DOBROVIC A, JOHN T (2017). Combination osimertinib and gefitinib in C797S and T790M EGFR- mutated non–small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology* **12(11)**: 1728–1732.
- ASHOK A, THANUKRISHNAN K, BHOJYA NAIK HS, GHOSH S (2016). Novel 4-[5-(Substituted-1,2,4-oxadiazol-3-yl)phenylamine] derivatives of 6,7-dimethoxy-quinazolines as potent inhibitors of VEGF receptors I and II. *Asian Journal of Chemistry* **28(10)**: 2122–2130.
- ASIF M. (2014). Chemical characteristics, synthetic methods, and biological potential of quinazoline and quinazolinone derivatives. *International Journal of Medicinal Chemistry* **2014**:1–27.
- AYATI A, MOGHIMI S, SALARINEJAD S, SAFAVI M, POURAMIRI B, FOROUMADI A (2020). A review on progression of epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors as an efficient approach in cancer targeted therapy. *Bioorganic Chemistry* **99**: 103811.
- BANSAL R, MALHOTRA A (2020). Therapeutic progression of quinazolines as targeted chemotherapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **211**: 113016.
- BARKER AJ, DAVIES DH (1992) Therapeutic preparations containing quinazoline derivatives. European Patent, EP-0520722-A1.
- BARKER AJ, GIBSON KH, GRUNDY W, GODFREY AA, BARLOW JJ, HEALY MP, WOODBURN JR, ASHTON SE, CURRY BJ, SCARLETT L, HENTHORN L, RICHARDS L. (2001). Studies leading to the identification of ZD1839 (iressa™): an orally active, selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor targeted to the treatment of cancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **11(14)**: 1911-1914.
- BARKER AJ (1993) Quinazoline derivatives. European Patent, EP-0566226-A1.
- BIKKER JA, BROOIJMANS N, WISSNER A, MANSOUR TS (2009). Kinase domain mutations in cancer: implications for small molecule drug design strategies. *Journal of Medicinal Chemistry* **52(6)**: 1493-1509.
- BLUME JENSEN P, HUNTER T (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411(6835)**: 355-365.
- BORDONI RE (2011). Afatinib (BIBW-2992): a novel dual EGFR/HER2neu inhibitor with promising activity in non-small-cell lung cancer. *Clinical Practice* **8(1)**: 15.
- BOYER S, CANTIN D, LIANG SX (2009). U.S. Patent Application No. 12/300,751.
- BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, SIEGEL RL, TORRE LA, JEMAL A (2018). Global cancer statistics 2018: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **68**: 394-424.

- BRIDGES AJ (1999). The rationale and strategy used to develop a series of highly potent, irreversible, inhibitors of the epidermal growth factor receptor family of tyrosine kinases. *Current Medicinal Chemistry* **6(9)**: 825-844.
- BRIDGES AJ, ZHOU H, CODY DR, REWCASTLE GW, MCMICHAEL A, SHOWALTER HH, FRY DW, KRAKER AJ, DENNY WA (1996). Tyrosine kinase inhibitors. 8. An unusually steep structure- activity relationship for analogues of 4-(3-bromoanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline (PD 153035), a potent inhibitor of the epidermal growth factor receptor. *Journal of Medicinal Chemistry* **39(1)**: 267-276.
- BROWN DJ (1996). The Chemistry Of Heterocyclic Compounds. *Quinazolines*. John Wiley & Sons, Inc. 89.
- CALIBASI KOCAL G, AMIRFALLAH A, SEVER T, UMIT UNAL O, GUREL D, OZTOP I, ELLIDOKUZ H, BASBINAR Y. (2020). EGFR mutation status in a series of Turkish non-small cell lung cancer patients. *Biomedical Reports* **13(2)**: 1-1.
- CARPENTER G (1999). Employment of the epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways. *Journal of Cell Biology* **146**: 697-702.
- CARPENTER G, KING L, COHEN S (1978). Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro. *Nature* **276(5686)**: 409-410.
- CHANG J, REN H, ZHAO M, CHONG Y, ZHAO W, HE Y, ZHAO Y, ZHANG H, QI C. (2017). Development of a series of novel 4-anilinoquinazoline derivatives possessing quinazoline skeleton: Design, synthesis, EGFR kinase inhibitory efficacy, and evaluation of anticancer activities in vitro. *European Journal of Medicinal Chemistry* **138**: 669-688.
- CHEN J, WANG X, LI T, WU D, FU X, ZHANG G, SHEN X, WANG H (2016). Design, synthesis, and biological evaluation of novel quinazolinyldiaryl urea derivatives as potential anticancer agents. *European Journal of Medicinal Science* **107**: 12-25.
- CHEN L, ZHANG Y, LIU J, WANG W, LI X, ZHAO L, WANG W, LI B (2017). Novel 4-arylaminoquinazoline derivatives with (E)-propen-1-yl moiety as potent EGFR inhibitors with enhanced antiproliferative activities against tumor cells. *European Journal of Medicinal Chemistry* **138**: 689-697.
- CHILIN A, CONCONI MT, MARZARO G, GUIOTTO A, URBANI L, TONUS F, PARNIGOTTO P (2010). Exploring epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor features: the role of fused dioxxygenated rings on the quinazoline scaffold. *Journal of Medicinal Chemistry* **53(4)**: 1862-1866.
- COHEN MH (2003). FDA drug approval summary: gefitinib (ZD1839) (iressa(R)) tablets. *The Oncologist* **8(4)**: 303-306.
- COHEN MH (2005). FDA drug approval summary: erlotinib (tarceva(R)) tablets. *The Oncologist* **10(7)**: 461-466.
- COHEN P (2002). Protein kinases-the major drug targets of the twenty-first century? *Nature Reviews Drug Discovery* **1(4)**: 309-315.
- COHEN S (1962). Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *Journal of Biological Chemistry* **237(5)**: 1555-1562.
- COHEN S (1965). The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). *Developmental Biology* **12(3)**: 394-407.
- COOPER GM (2000). The Cell: A Molecular Approach. 2nd Ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- CORNELL EF (1928). The carbazyllic acids: the ammonia analogs of the carboxylic acids. *Journal of the American Chemical Society* **50(12)**: 3311-3318.
- DE CASTRO BARBOSA ML, LIMA LM, TESCH R, SANT'ANNA CMR, TOTZKE F, KUBBUTAT MH, SCHACHTELE C, LAUFER S, BARREIRO EJ (2014). Novel 2-chloro-4-anilino-quinazoline derivatives as EGFR and VEGFR-2 dual inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* **71**: 1-14.
- DENNY WA, REWCASTLE GW, BRIDGES AJ, FRY DW, KRAKER AJ (1996). Structure-activity relationships for 4-anilinoquinazolines as potent inhibitors at the atp binding site of the epidermal growth factor receptor in vitro. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **23(5)**: 424-427.

- DISCAFANI CM, CARROLL ML, FLOYD MB, HOLLANDER IJ, HUSAIN Z, JOHNSON BD, KITCHEN D, MAY KM, MALO MS, MINNICK AA, NILAKANTAN R, SHEN R, WANG FY, WISSNER A, GREENBERGER LM (1999). Irreversible inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase with In Vivo activity by N -[4-[(3-bromophenyl)amino]-6-quinazolinyl]-2-butanamide (CL-387,785). *Biochemical Pharmacology* **57(8)**: 917-925.
- DUMA N, SANTANA DAVILA R, MOLINA JR (2019). Non-Small cell lung cancer: epidemiology, screening, diagnosis, and treatment. *Mayo Clinic Proceedings* **94(8)**: 1623-1640.
- EVANS T (2005). Chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Seminars In Respiratory And Critical Care Medicine* **26(03)**: 304-313.
- FDA (2021). FDA-Approved drugs. Erişim Adresi: [<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm>]. Erişim Tarihi: 25/04/2021.
- FRY D (2003). Mechanism of action of erbB tyrosine kinase inhibitors. *Experimental Cell Research* **284(1)**: 131-139.
- FRY D, KRAKER A, MCMICHAEL A, AMBROSO L, NELSON J, LEOPOLD W, CONNORS RW, BRIDGES A (1994). A specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Science* **265(5175)**: 1093-1095.
- FRY DW (1996). Chapter 16. Recent advances in tyrosine kinase inhibitors. *Annual Reports in Medicinal Chemistry* **31**: 151-160.
- FRY DW (1999). Inhibition of the epidermal growth factor receptor family of tyrosine kinases as an approach to cancer chemotherapy. *Pharmacology & Therapeutics* **82(2-3)**: 207-218.
- FRY DW, BRIDGES AJ, DENNY WA, DOHERTY A, GREIS KD, HICKS JL, HOOK KE, KELLER PR, LEOPOLD WR, LOO AJ, MCNAMARA DJ, NELSON JM, SHERWOOD V, SMAILL JB, KALLMEYER-TRUMPP S, DOBRUSIN EM (1998). Specific, irreversible inactivation of the epidermal growth factor receptor and erbB2, by a new class of tyrosine kinase inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95(20)**: 12022-12027.
- FUKUOKA M, YANO S, GIACCONE G, TOMOHIDE T, NAKAGAWA K, NISHIWAKI DJ, VANSTEENKISTE J, KUDOH S, RISCHIN D, EEK R, HORAI T, NODA K, TAKATA I, SMIT E, AVERBUCH S, MACLEOD A, FEYEREISLOVA A, DONG RP, BASELGA J (2003). Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology* **21**: 2237-2246.
- FURUTA T, SAKAI T, SENGU T, OSAWA T, KUBO K, SHIMIZU T, SUZUKI R, YOSHINO T, ENDO M, MIWA A (2006). Identification of potent and selective inhibitors of PDGF receptor autophosphorylation. *Journal of Medicinal Chemistry* **49(7)**: 2186-2192.
- GATZEMEIER U, PLUZANSKA A, SZCZESNA A, KAUKEL E, ROUBEC J, BRENNSCHEIDT U, ROSA D, MUELLER B, VON PAWEL J (2004). Results of a phase III trial of erlotinib (OSI-774) combined with cisplatin and gemcitabine (GC) chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Clinical Oncology* **22(14_suppl)**: 7010-7010.
- GIACCONE G, HERBST RS, MANEGOLD C, SCAGLIOTTI GV, ROSELL R, MILLER V, NATALE RB, SCHILLER JH, PAWEL V, PLUZANSKA A, GATZEMEIER U, GROUS J, OCHS JS, AVERBUCH SD, WOLF MK, RENNIE P, FANDI A, JOHNSON DH (2004). Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial-INTACT 1. *Journal of Clinical Oncology* **22**: 777-784.
- GIBSON KH, GRUNDY W, GODFREY AA, WOODBURN JR, ASHTON SE, CURRY BJ, SCARLET L, BROWN DS (1997). Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase: Structure-activity relationships and antitumour activity of novel quinazolines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **7(21)**: 2723-2728.
- GIBSON K (1996) Quinazoline derivatives. World Patent Application WO 96/33980.
- GONZALES AJ, HOOK KE, ALTHAUS IW, ELLIS PA, TRACHET E, DELANEY AM., AHRVET PJ, ELLIS AT, AMATO MD, NELSON JM, FRY DW, ZHU T, LOI C, FAKHOURY SA, SCHLOSSER KM,

- SEXTON KE, WINTERS RT, REED JE, BRIDGES AJ, LETTIERE DJ, BAKER DA, YANG J, LEE HT, TECLE H, VINCENT PW (2008). Antitumor activity and pharmacokinetic properties of PF-00299804, a second-generation irreversible pan-erbB receptor tyrosine kinase inhibitor. *Molecular Cancer Therapeutics* **7**(7): 1880-1889.
- GÖKER H, ÖZDEN S, YILDIZ S, BOYKIN DW (2005). Synthesis and potent antibacterial activity against MRSA of some novel 1,2-disubstituted-1H-benzimidazole-N-alkylated-5-carboxamides. *European Journal of Medicinal Chemistry* **40**(10): 1062-1069.
- GRAUS PORTA D, BEERLI RR, DALY JM, HYNES NE (1997). ErbB-2, the pre-ferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* **16**: 1647-1655.
- GREENHILL JV, LUE P (1993). 5 amidines and guanidines in medicinal chemistry. *Progress in Medicinal Chemistry* **30**: 203-326.
- GRIESS P (1869). Ueber die einwirkung des cyans auf anthranilsäure. *Berichte* **2**: 415-418.
- GRIESS P (1878). Ueber die einwirkung von cyan auf amidobenzoës äure und anthranilsäure in wässrigerlösung. *Berichte* **11**: 1985-1988.
- GRIMMEL HW, GUENTHER A, MORGAN JF (1946). A new synthesis of 4-quinazolones. *Journal of the American Chemical Society* **68**(4): 542-543.
- HAN W, DU Y (2017). Recent development of the second and third generation irreversible epidermal growth factor receptor inhibitors. *Chemistry & Biodiversity* **14**(7): e1600372.
- HE J, WANG X, ZHAO X, LIANG Y, HE H, FU L (2012). Synthesis and antitumor activity of novel quinazoline derivatives containing thiosemicarbazide moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry* **54**: 925-930.
- HERBST RS (2004). Review of epidermal growth factor receptor biology. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **59**(2): S21-S26.
- HERBST RS, GIACCONE G, SCHILLER JH, NATALE RB, MILLER V, MANEGOLD C, SCAGLIOTTI G, ROSELL R, OLIFF I, REEVES JA, WOLF MK, KREBS AD, AVERBUCH SD, OCHS JS, GROUS J, FANDI A, JOHNSON DH (2004). Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 2 **22**: 785-794.
- HERBST RS, PRAGER D, HERMANN R, FEHRENBACHER L, JOHNSON BE, SANDLER A, TRAN HT, KLEIN P, LI X, RAMIES D, JOHNSON HD, MILLER VA (2005). TRIBUTE: A phase III trial of erlotinib hydrochloride (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology* **23**(25): 5892-5899.
- HOU W, REN Y, ZHANG Z, SUN H, MA Y, YAN B (2018). Novel quinazoline derivatives bearing various 6-benzamide moieties as highly selective and potent EGFR inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **26**(8): 1740-1750.
- HU L, PATEL A, BONDADA L, YANG S, WANG MZ, MUNDE M, WILSON WD, WENZLER T, BRUN R, BOYKIN DW (2013). Synthesis and antiprotozoal activity of dicationic 2,6-diphenylpyrazines and aza-analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **21**(21): 6732-6741.
- HULVAT MC (2020). Cancer incidence and trends. *Surgical Clinics of North America* **100**(3): 469-481.
- HUNTER T (1991). Cooperation between oncogenes. *Cell*, **64**(2): 249-270.
- HUNTER T (2000). Signaling-2000 and beyond. *Cell*, **100**: 113-127.
- INAMURA K (2017). Lung cancer: understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification. *Frontiers in Oncology* **7**: 193.
- INTERNATIONAL AGENCY for RESEARCH on CANCER (IARC) (2021). Erişim Adresi: [<https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map>]. Erişim tarihi: 08/05/2021.

- ISMAIL RS, ISMAIL NS, ABUSERII S, ELLA DA (2016). Recent advances in 4-aminoquinazoline based scaffold derivatives targeting EGFR kinases as anticancer agents. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences* **2(1)**: 9-19.
- JANMAAT ML, GIACCONE G (2003). Small-molecule epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *The Oncologist* **8(6)**: 576-586.
- JI H, LI D, CHEN L, SHIMAMURA T, KOBAYASHI S, MCNAMARA K, MAHMOOD U, MITCHELL A, SUN Y, AL-HASHEM R, CHIRIEAC LR, PADERA R, BRONSON RT, KIM W, JANNE PA, SHAPIRO GI, TENEN D, JOHNSON BE, WEISSLEDER R, SHARPLESS NE, WONG KK (2006). The impact of human EGFR kinase domain mutations on lung tumorigenesis and in vivo sensitivity to EGFR-targeted therapies. *Cancer Cell* **9(6)**: 485-495.
- JIN H, DAN HG, RAO GW (2018). Research progress in quinazoline derivatives as multi-target tyrosine kinase inhibitors. *Heterocyclic Communications* **24(1)**: 1-10.
- JOHNSON BE, JÄNNE PA (2005). Epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Research* **65(17)**: 7525-7529.
- KARUNAGARAN D, TZAHAR E, BEERLI RR, CHEN X, GRAUS PORTA D, RATZKIN BJ, SEGER R, HYNES NE, YARDEN Y (1996). ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J* **15**: 254-264.
- KHAZAIE K, SCHIRRMACHER V, LICHTNER RB (1993). EGF receptor in neoplasia and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews* **12(3-4)**: 255-274.
- KIDWAI M, RASTOGI S, MOHAN R, RUBY R (2003). A novel route to the niementowski reaction. *Croatica Chemica Acta* **76(4)**: 365-369.
- KIM Y, KO J, CUI Z, ABOLHODA A, AHN JS, OU SH, AHN JM, PARK K (2012). The EGFR T790M mutation in acquired resistance to an irreversible second-generation EGFR inhibitor. *Molecular Cancer Therapeutics* **11(3)**: 784-791.
- KOBAYASHI S, BOGGON TJ, DAYARAM T, JÄNNE PA, KOCHER O, MEYERSON M, JOHNSON EB, MICHAEL JE, TENEN DG, HALMOS, B. (2005). EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *New England Journal of Medicine* **352(8)**: 786-792.
- KONECNY GE, PEGRAM MD, VENKATESAN N, FINN R, YANG G, RAHMEH M, UNTCH M, RUSNAK DW, SPEHAR G, MULLIN RJ, KEITH BR, GILMER TM, BERGER M, PODRATZ KC, SLAMON DJ (2006). Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against her-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. *Cancer Research* **66(3)**: 1630-1639.
- KRAUSE DS, VAN ETEN RA (2005). Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *New England Journal of Medicine* **353(2)**: 172-187.
- KRIS M, NATALE RB, HERBST R, LYNCH TJ, PRAGER D, BELANI CP, SCHILLER, MD, KELLY K, SPIRIDONIDIS H, SANDLER A, ALBAIN KS, CELLA D, WOLF MK, AVERBUCH S, OCHS JJ, KAY AC (2003). Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer. *JAMA* **290**: 2149-2158.
- KWAK EL, SORDELLA R, BELL DW, GODIN HEYMANN N, OKIMOTO RA, BRANNIGAN BW, HARRIS LP, DRISCOLL DR, FIDIAS P, LYNCH TJ, RABINDRAN SK, MCGINNIS PJ, WISSNER A, SHARMA SV, ISSELBAHCHER KJ, SETTLEMAN J, HABER DA (2005). Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102(21)**: 7665-7670.
- LEMMON MA, SCHLESSINGER J (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141(7)**: 1117-1134.
- LIN Y, WANG X, JIN H (2014). EGFR-TKI resistance in NSCLC patients: mechanisms and strategies. *American Journal of Cancer Research* **4(5)**: 411-435.
- LIPINSKI CA, LOMBARDO F, DOMINY BW, FEENEY PJ (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* **23**: 3-25.

- LYNCH TJ, BELL DW, SORDELLA R, GURUBHAGAVATULA S, OKIMOTO RA, BRANNIGAN BW, HARRIS LP, HASERLAT SM, SUPKO JG, HALUSKO FG, LOUIS DN, CHRISTIANI DC, SETTLEMAN J, HABER DA (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *New England Journal of Medicine* **350(21)**: 2129-2139.
- MAEMONDO M, INOUE A, KOBAYASHI K, SUGAWARA S, OIZUMI S, ISOBE H, GEMMA A, HARADA M, YOSHIZAWA H, KINOSHITA I, FUJITA Y, OKINAGA S, HIRANO H, YOSHIMORI K, HARADA T, OGURA T, ANDO M, MIYAZAWA H, TANAKA T, SAIJO Y, HAGIWARA K, MORITA S, NUKIWA T (2010). Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *New England Journal of Medicine* **362(25)**: 2380-2388.
- MANNING G, WHYTE DB, MARTINEZ R, HUNTER T, SUDARSANAM S (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298(5600)**: 1912-1934.
- MENDELSON J, BASELGA J (2000). The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* **19(56)**: 6550-6565.
- MHASKE SB, ARGADE NP (2006). The chemistry of recently isolated naturally occurring quinazolinone alkaloids. *Tetrahedron* **62(42)**: 9787-9826.
- MITRA S, GANGULI S, CHAKRABARTI J (2018). Introduction. Cancer and Noncoding RNAs. *Academic Press*.1-18.
- MITSUDOMI T, KOSAKA T, ENDOH H, HORIO Y, HIDA T, MORI S, HATOOKA S, SHINODA M, TAKAHASHI T, YATABE Y (2005). Mutations of the epidermal growth factor receptor gene predict prolonged survival after gefitinib treatment in patients with non-small-cell lung cancer with postoperative recurrence. *Journal of Clinical Oncology* **23(11)**: 2513-2520.
- MOK TS, WU YL, THONGPRASERT S, YANG CH, CHU DT, SAIJO N, SUNPAWERAVONG P, HAN B, MARGONO B, ICHINOSE Y, NISHIWAKI Y, OHE Y, YANG J, CHEWASKULYONG B, JIANG H, DUFFIELD ES, WATKINS CL, ARMOUR AA, FUKUOKA M (2009). Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine* **361(10)**: 947-957.
- MOLINSPIRATION CHEMINFORMATICS (2020). Calculation of moleküler properties and prediction of bioactivity. Erişim Adresi: [<https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>]. Erişim Tarihi: 04/10/2020.
- MOWAFY S, GALANIS A, DOCTOR ZM, PARANAL RM, LASHEEN DS, FARAG NA, JANNE PA, ABOUZID KA (2016). Toward discovery of mutant EGFR inhibitors; Design, synthesis and in vitro biological evaluation of potent 4-arylamino-6-ureido and thioureido-quinazoline derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **24(16)**: 3501-3512.
- MOYER JD, BARBACCI EG, IWATA KK, ARNOLD L, BOMAN B, CUNNINGHAM A, DIORIO C, DOTY J, MORIN JM, MOYER MP, NEVEU M, POLLACK VA, PUSTILNIK LR, REYNOLDS MM, SLOAN D, THELEMAN A, MILLER P (1997). Induction of apoptosis and cell cycle arrest by CP-358,774, an inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Research* **57(21)**: 4838-4848.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE (2021). Cancer classification. Erişim Adresi: [<https://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html>]. Erişim tarihi: 29/05/2021.
- NICHOLSON RI, GEE JMW, HARPER ME (2001). EGFR and cancer prognosis. *European Journal of Cancer* **37**: 9-15.
- NIEDERST MJ, HU H, MULVEY HE, LOCKERMAN EL, GARCIA AR, PIOTROWSKA Z, SEQUIST LV, ENGELMAN JA (2015). The allelic context of the C797S mutation acquired upon treatment with third-generation egfr inhibitors impacts sensitivity to subsequent treatment strategies. *Clinical Cancer Research* **21(17)**: 3924-3933.
- NOBEL PRIZE (2021). The nobel prize in physiology or medicine 1986. Erişim Adresi: [<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1986/press-release/>]. Erişim Tarihi: 20/03/2021.

- NOUIRA I, KOSTAKIS IK, DUBOUILH C, CHOSSON E, IANNELLI M, BESSON T (2008). Decomposition of formamide assisted by microwaves, a tool for synthesis of nitrogen-containing heterocycles. *Tetrahedron Letters* **49(49)**: 7033-7036.
- ÖZDEN S, ATABEY D, YILDIZ S, GÖKER H (2005). Synthesis and potent antimicrobial activity of some novel methyl or ethyl 1H-benzimidazole-5-carboxylates derivatives carrying amide or amidine groups. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **13(5)**: 1587-1597.
- PALMER BD, TRUMPP KALLMEYER S, FRY DW, NELSON JM, SHOWALTER HDH, DENNY WA (1997). Tyrosine kinase inhibitors. 11. soluble analogues of pyrrolo- and pyrazoloquinazolines as epidermal growth factor receptor inhibitors: synthesis, biological evaluation, and modeling of the mode of binding. *Journal of Medicinal Chemistry* **40(10)**: 1519-1529.
- PAO W, MILLER VA (2005). Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: Current knowledge and future directions. *Journal of Clinical Oncology* **23**: 2556-2568.
- PAO W, MILLER VA, POLITI KA, RIELY GJ, SOMWAR R, ZAKOWSKI MF, KRIS MG, VARMUS, H. (2005). Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the egfr kinase domain. *PLoS Medicine* **2(3)**: e73.
- PÉREZ SOLER R. (2004). Phase II clinical trial data with the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib (OSI-774) in non-small-cell lung cancer. *Clinical Lung Cancer* **6**: S20-S23.
- PFAFF D, NEMECEK G, PODLECH J (2013). A lewis acid-promoted piner reaction. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **9(1)**: 1572-1577.
- PINNER A, KLEIN F (1877). Umwandlung der nitrile in imide. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **10(2)**: 1889-1897.
- PINNER A, KLEIN F (1878). Umwandlung der nitrile in imide. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **11(2)**: 1475-1487.
- POLLACK VA, SAVAGE DM, BAKER DA, TSAPARIKOS KE, SLOAN DE, MOYER JD, BARBACCI EG, PUSTILNIK LR, SMOLAREK TA, DAVIS JA, VAIDYA MP, ARNOLD LD, DOTY JL, IWATA KK, MORIN MJ (1999). Inhibition of epidermal growth factor receptor-associated tyrosine phosphorylation in human carcinomas with CP-358,774: dynamics of receptor inhibition in situ and antitumor effects in athymic mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **291(2)**: 739-748.
- PROMEGA (2019a). ADP-Glo™ kinase assay technical manual TM313. Erişim Adresi: [<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/adp-glo-kinase-assay-protocol.pdf?la=en>]. Erişim Tarihi: 20/05/2019.
- PROMEGA (2019b). Using the kinase enzyme systems with the adp-glo™ assay technical manual, TM553. Erişim Adresi: [<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/500/tm553-using-the-kinase-enzyme-systems-with-the-adp-glo-assay.pdf?la=en>]. Erişim Tarihi: 20/05/2019.
- PROTO C, RUSSO GL, CORRAO G, GANZINELLI M, FACCHINETTI F, MINARI R, TISEO M, GARASSINO MC (2017). Treatment in EGFR-mutated non-small cell lung cancer: How to block the receptor and overcome resistance mechanisms. *Tumori Journal* **103(4)**: 325-337.
- QIN X, YANG L, LIU P, YANG L, CHEN L, HU L, JIANG M (2021). Design, synthesis and biological evaluation of 2, 3-dihydro-[1, 4] dioxino [2, 3-f] quinazoline derivatives as EGFR inhibitors. *Bioorganic Chemistry* **110**: 104743.
- RAVEZ S, CASTILLO AGUILERA O, DEPREUX P, GOOSSENS L (2015). Quinazoline derivatives as anticancer drugs: a patent review (2011-present). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **25(7)**: 789-804.
- REWCASTLE GW, DENNY WA, BRIDGES AJ, ZHOU H, CODY DR, MCMICHAEL A, FRY DW (1995). Tyrosine kinase inhibitors. 5. Synthesis and structure-activity relationships for 4-[(phenylmethyl)amino]- and 4-(phenylamino)quinazolines as potent adenosine 5'-triphosphate binding site inhibitors of the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor. *Journal of Medicinal Chemistry* **38(18)**: 3482-3487.

- REWCASTLE GW, PALMER BD, THOMPSON AM, BRIDGES AJ, CODY DR, ZHOU H, FRY DW, MCMICHAEL A, DENNY WA (1996). Tyrosine kinase inhibitors. 10. Isomeric 4-[(3-bromophenyl)amino]pyrido[d]-pyrimidines are potent ATP binding site inhibitors of the tyrosine kinase function of the epidermal growth factor receptor. *Journal of Medicinal Chemistry* **39**: 1823-1835.
- ROSKOSKI JR R (2019). Small molecule inhibitors targeting the EGFR/ErbB family of protein-tyrosine kinases in human cancers. *Pharmacological Research* **139**: 395-411.
- RUSNAK DW, LACKEY K, AFFLECK K, WOOD ER, ALLIGOOD KJ, RHODES N, KEITH BR, MURRAY DM, KNIGHT WB, MULLIN RJ, GILMER TM (2001). The effects of the novel, reversible epidermal growth factor receptor/ErbB-2 tyrosine kinase inhibitor, GW2016, on the growth of human normal and tumor-derived cell lines in vitro and in vivo. *Molecular Cancer Therapeutics* **1**(2): 85-94.
- SAINSBURY JR, MALCOLM AJ, APPLETON DR, FARNDON JR, HARRIS AL (1985). Presence of epidermal growth factor receptor as an indicator of poor prognosis in patients with breast cancer. *Journal of Clinical Pathology* **38**(11): 1225-1228.
- SALOMON DS, BRANDT R, CIARDIELLO F, NORMANNO N (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **19**(3): 83-232.
- SCHLESSINGER J (2002). Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* **110**(6): 669-672.
- SCHNUR RC, ARNOLD LD (1996) Quinazoline derivatives. World Patent Application WO 96/30347.
- SEQUIST LV, YANG JCH, YAMAMOTO N, O'BYRNE K, HIRSH V, MOK T, GREATER LS, ORLOV S, TASI CM, BOYER M, SU WC, BENNOUNA J, KATO T, GORBUNOVA V, LEE KH, SHAH R, MASSEY D, ZAZULINA V, SCHULER M (2013). Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *Journal of Clinical Oncology* **31**(27): 3327-3334.
- SHAH R, LESTER JF (2020). Tyrosine kinase inhibitors for the treatment of EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: A clash of the generations. *Clinical Lung Cancer* **21**(3): e216-e228.
- SHAO J, CHEN E, SHU K, CHEN W, ZHANG G, YU Y (2016). 6-Oxoxazolidine-quinazolines as noncovalent inhibitors with the potential to target mutant forms of EGFR. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **24**: 3359-3370.
- SHEPHERD FA, PEREIRA J, CIULEANU TE, TAN EH, HIRSH V, THONGPRASERT S, BEZJAK A, TU D, SANTABARBARA P, SEYMOUR L (2004). A randomized placebo-controlled trial of erlotinib in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) following failure of 1st line or 2nd line chemotherapy. A national cancer institute of Canada clinical trials group (NCIC CTG) trial. *Journal of Clinical Oncology* **22**(14): 7022-7022.
- SHRINER RL, NEUMANN FW (1944). The chemistry of the amidines. *Chemical Reviews* **35**(3): 351-425.
- SIEGEL RL, MILLER KD, FUCHS HE, JEMAL A (2021). Cancer statistics. *Cancer Journal for Clinicians* **71**(1): 7-33.
- STAMOS J, SLIWKOWSKI MX, EIGENBROT C (2002). Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* **277**(48): 46265-46272.
- SUN S, ZHANG J, WANG N, KONG X, FU F, WANG H, YAO J (2018). Design and discovery of quinazoline- and thiourea-containing sorafenib analogs as EGFR and VEGFR-2 dual TK inhibitors. *Molecules* **23**(1): 24.
- THRESS KS, PAWELETZ CP, FELIP E, CHO BC, STETSON D, DOUGHERTY B, LAI Z, MARKOVETS A, VIVANCOS A, KUANG Y, ERCAN D, MATTHEWS SE, CANTARINI M, BARRETT JC, JANNE PA, OXNARD GR (2015). Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nature Medicine* **21**(6): 560-562.

- TIWARY BK, PRADHAN K, NANDA AK, CHAKRABORTY R (2015). Implication of quinazoline-4(3h)-ones in medicinal chemistry: A brief review. *Journal of Chemical Biology and Therapeutics* **1(1000104)**: 2572-0406.
- TRAN AT, WEN D, WEST NP, BAKER EN, BRITTON WJ, PAYNE RJ (2013). Inhibition studies on Mycobacterium tuberculosis N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase (GlmU). *Organic & biomolecular chemistry* **11(46)**: 8113-8126.
- TRAVIS WD, BRAMBILLA E, NICHOLSON AG, YATABE Y, AUSTIN JHM, BEASLEY MB, LUCIAN R, CHIRIEAC MD, DACIC S, DUHING E, DOUGLAS BF, GEISINGER K, HIRSCH FR, ISHIKAWA Y, KERR KM, NOGUCHI M, PELOSI G, POWELL AC, TSAO MS, WISTUBA I (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *Journal of Thoracic Oncology* **10(9)**: 1243-1260.
- TRAXLER P, BOLD G, FREI J, LANG M, LYDON N, METT H, BUCHDUNGER E, MEYER T, MUELLER M, FURET P (1997). Use of a pharmacophore model for the design of EGF-r tyrosine kinase inhibitors: 4-(phenylamino)pyrazolo[3,4-d]pyrimidines. *Journal of Medicinal Chemistry* **40(22)**: 3601-3616.
- TRAXLER PM, FURET P, METT H, BUCHDUNGER E, MEYER T, LYDON N (1996). 4-(Phenylamino)pyrrolopyrimidines: potent and selective, ATP site directed inhibitors of the EGF-receptor protein tyrosine kinase. *Journal of Medicinal Chemistry* **39(12)**: 2285-2292.
- TRIDENTE G (2017). *Adverse Events and Oncotargeted Kinase Inhibitors*. London, Academic Press.
- TU Y, WANG C, XU S, LAN Z, LI W, HAN J, ZHOU Y, ZHENG P, ZHU W (2017). Design, synthesis, and docking studies of quinazoline analogues bearing aryl semicarbazone scaffolds as potent EGFR inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **25(12)**: 3148-3157.
- VEALE D, ASHCROFT T, MARSH C, GIBSON GJ, HARRIS AL (1987). Epidermal growth factor receptors in non-small cell lung cancer. *British Journal of Cancer* **55(5)**: 513-516.
- VEBER DF, JOHNSON SR, CHENG HY, SMITH BR, WARD KW, KOPPLE KD (2002). Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry* **45(12)**: 2615-2623.
- VON NIEMENTOWSKI S (1894). Synthesen von chinazolinverbindungen. *Journal Für Praktische Chemie* **51(1)**: 564-572.
- WAKELING AE, BARKER AJ, DAVIES DH, BROWN DS, GREEN LR, CARTLIDGE SA, WOODBURN JR (1996). Specific inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase by 4-anilinoquinazolines. *Breast Cancer Research and Treatment* **38(1)**: 67-73.
- WAKELING AE, GUY SP, WOODBURN JR, ASHTON SE, CURRY BJ, BARKER AJ, GIBSON KH (2002). ZD1839 (Iressa): an orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy. *Cancer Research* **62(20)**: 5749-5754.
- WANG D, GAO F (2013). Quinazoline derivatives: synthesis and bioactivities. *Chemistry Central Journal* **7(1)**: 95.
- WANG S, TSUI ST, LIU C, SONG Y, LIU D (2016). EGFR C797S mutation mediates resistance to third-generation inhibitors in T790M-positive non-small cell lung cancer. *Journal of Hematology & Oncology* **9(1)**: 1-5.
- WANG Z, YANG J-J, HUANG J, YE J-Y, ZHANG X-C, TU H-Y, ZHANG HH, WU Y-L (2017). Lung adenocarcinoma harboring EGFR T790M and in trans C797S responds to combination therapy of first- and third-generation egfr tkis and shifts allelic configuration at resistance. *Journal of Thoracic Oncology* **12(11)**: 1723-1727.
- WARD WHJ, COOK PN, SLATER AM, DAVIES DH, HOLDGATE GA, GREEN LR (1994). Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Biochemical Pharmacology* **48(4)**: 659-666.
- WEINBERG RA (1996). How cancer arises. *Scientific American* **275(3)**: 62-70.
- WHO (2020). The top 10 causes of death. Erişim Adresi: [<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>]. Erişim tarihi: 08/05/2021.

- WHO (2021). Cancer. Erişim Adresi: [<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>]. Erişim tarihi: 08/05/2021.
- WISSNER A, OVERBEEK E, REICH MF, FLOYD MB, JOHNSON BD, MAMUYA N, ROSFJORD EC, DISCAFANI C, DAVIS R, SHI X, RABINDRAN KS, GRUBER BC, YE F, HALLETT WA, NILAKANTAN R, SHEN R, WANG Y-F, GREENBERG LM, TSOU H-R (2003). Synthesis and structure–activity relationships of 6,7-disubstituted 4-anilinoquinoline-3-carbonitriles. The design of an orally active, irreversible inhibitor of the tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the human epidermal growth factor receptor-2 (HER-2). *Journal of Medicinal Chemistry* **46**(1): 49-63.
- WOODBURN JR (1999). The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics* **82**(2-3): 241-250.
- WU SG, LIU YN, TSAI MF, CHANG YL, YU CJ, YANG PC, YANG JC, WEN YF, SHIH JY (2016). The mechanism of acquired resistance to irreversible EGFR tyrosine kinase inhibitor-afatinib in lung adenocarcinoma patients. *Oncotarget* **7**(11): 12404.
- WU YL, CHENG Y, ZHOU X, LEE KH, NAKAGAWA K, NIHO S, TSUJI F, LINKE R, ROSELL R, CORRAL J, MIGLIORINO MR, PLUZANSKI A, SBAR EI, WANG T, WHITE LJ, DPHIL SN, SANDIN R, MOK TS (2017). Dacomitinib versus gefitinib as first-line treatment for patients with EGFR-mutation-positive non-small-cell lung cancer (ARCHER 1050): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* **18**(11): 1454-1466.
- WU YL, ZHOU C, HU CP, FENG J, LU S, HUANG Y, LI P, HOU M, SHI HJ, LEE YK, ZU C-R, MASSEY D, KIM M, SHI Y, GEATER SL (2014). Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology* **15**(2): 213-222.
- XIE H, LIN L, TONG L, JIANG Y, ZHENG M, CHEN Z, JIANG X, ZHANG X, REN X, QU W, YANG Y, WAN H, CHEN Y, ZUO J, JIANG H, GENG M, DING J. (2011). AST1306, a novel irreversible inhibitor of the epidermal growth factor receptor 1 and 2, exhibits antitumor activity both in vitro and in vivo. *PLoS ONE* **6**(7): e21487.
- YAISH P, GAZIT A, GILON C, LEVITZKI A. (1988). Blocking of EGF-dependent cell proliferation by EGF receptor kinase inhibitors. *Science* **242**(4880): 933-935.
- YAMAMOTO T, HIHARA H, NISHIDA T, KAWAI S, TOYOSHIMA K (1983). A new avian erythroblastosis virus, AEV-H, carries erbB gene responsible for the induction of both erythroblastosis and sarcomas. *Cell* **34**(1): 225-232.
- YANG SH, KHADKA DB, CHO SH, JU HK, LEE KY, HAN HJ, LEE KT, CHO WJ (2011). Virtual screening and synthesis of quinazolines as novel JAK2 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **19**(2): 968-977.
- YARDEN Y, SLIWKOWSKI MX (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**(2): 127-137.
- YUN C-H, BOGGON TJ, LI Y, WOO MS, GREULICH H, MEYERSON M, ECK MJ (2007). Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity. *Cancer Cell* **11**(3): 217-227.
- ZHANG HQ, GONG FH, YE JQ, ZHANG C, YUE XH, LI CG, XU Y-G, SUN LP (2017). Design and discovery of 4-anilinoquinazoline-urea derivatives as dual TK inhibitors of EGFR and VEGFR-2. *European Journal of Medicinal Chemistry* **125**: 245-254.
- ZHANG J, ZHU D, YU C, WAN C, WANG Z (2010). A simple and efficient approach to the synthesis of 2-phenylquinazolines via sp³c–h functionalization. *Organic Letters* **12**(12): 2841-2843.
- ZHANG L, YANG Y, ZHOU H, ZHENG Q, LI Y, ZHENG S, ZHAO S, CHEN D, FAN C (2015). Structure-activity study of quinazoline derivatives leading to the discovery of potent EGFR-T790M inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* **102**: 445-463.

- ZHENG M (2016). Classification and pathology of lung cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America* **25(3)**: 447-468.
- ZHENG YG, SU J, GAO CY, JIANG P, AN L, XUE YS, GAO J, LIU Y (2017). Design, synthesis, and biological evaluation of novel 4-anilinoquinazoline derivatives bearing amino acid moiety as potential EGFR kinase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* **130**: 393-405.
- ZHOU C, WU YL, CHEN G, FENG J, LIU XQ, WANG C, ZHANG S, WANG J, ZHOU S, REN S, LU S, ZHANG L, HU C, HU C, LUO Y, CHEN L, YE M, HUANG J, YOU C. (2011). Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *The Lancet Oncology* **12(8)**: 735-742.

