



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK
LİSANS
TEZİ**

**ARİLOKSİ BENZAMİT YAPISINDA SİRTUİN
İNHİBİTÖRÜ OLABİLECEK BİLEŞİKLERİN TASARIMI,
SENTEZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI**

SEMİH YAĞCI

FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI

OCAK 2021



**ARİLOKSİ BENZAMİT YAPISINDA SİRTUİN İNHİBİTÖRÜ OLABİLECEK BİLEŞİKLERİN
TASARIMI, SENTEZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI**

Semih YAĞCI

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Ocak 2021

ETİK BEYAN

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

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Semih YAGCI

12.01.2021

ARİLOKSİ BENZAMİT YAPISINDA SİRTUİN İNHİBİTÖRÜ OLABİLECEK BİLEŞİKLERİN TASARIMI,
SENTEZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI
(Yüksek Lisans Tezi)

Semih YAĞCI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Ocak 2021

ÖZET

Sirtuinler (SIRT), bakteriden memeliye kadar tüm canlı gruplarında varlığını evrimsel olarak korumuş olan nikotinamid adenin dinükleotit (NAD⁺) bağımlı histon deasetilaz (HDAC) enzim ailesine mensup bir gruptur. Bu enzim grubu, NAD⁺ kosubstratını kullanarak histon veya histon olmayan substratlardaki lizin kalıntılarını geri dönüşümlü olarak deasetile etmektedir. Çok sayıda çalışma, sirtuinlerin anormal enzimatik aktivitesinin diyabet, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser ile bağlantılı olduğunu göstermiştir. Daha önceki çalışmamızda yeni SIRT inhibitörü bileşiklerin keşfi amacıyla gerçekleştirilen farmakofor temelli sanal tarama çalışması sonucu SIRT1/2 inhibitör etki gösteren ariloksibenzamit yapısında bir bileşiğine (300 µM'da inhibisyon, SIRT1: %31,45; SIRT2: %42,47) ulaşılmıştır. Tez çalışmamızda, daha etkili türevlere ulaşmak amacıyla bu bileşik üzerinde kimyasal modifikasyonlar yapılarak onu yeni olmak üzere on dört bileşik tasarlanmıştır. Sentez çalışması tamamlanan on dört bileşik, *in vitro* SIRT1-3 inhibitör etkileri açısından değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, **GS01** (100 µM'da inhibisyon, SIRT1: %56,53; SIRT2: %10,80), **GS02** (100 µM'da inhibisyon, SIRT1: %48,15; SIRT2: inhibisyon yok) ve **GS11** (100 µM'da inhibisyon, SIRT1: %46,04; SIRT2: inhibisyon yok) kodlu bileşiklerde selektif SIRT1 inhibitör etki gözlenirken, seri içerisinde en yüksek SIRT2 inhibitör etki **GS14** kodlu bileşik (100 µM'da inhibisyon, SIRT1: %47,16; SIRT2: %51,61) için gözlenmiştir. Ayrıca, **GS01**, **GS02**, **GS11** ve **GS14** kodlu bileşiklerin, yapısal modifikasyonlarla sağlanan SIRT1/2 inhibisyonundaki iyileşmenin sitotoksik özelliklerine etkisini belirlemek için MCF-7 insan meme kanseri hücre hattına karşı *in vitro* sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Bileşiklerin sitotoksik etkileri, SIRT1/2 inhibisyon değerleriyle ilişkili bulunmuştur. Sonuç olarak, çalışmanın başlangıç noktası olan ariloksibenzamit türevi bileşiğe göre daha etkili ve selektif SIRT inhibitörlerine ulaşılmıştır.

Bilim Kodu : 1019
Anahtar Kelimeler : Sirtuin, ilaç tasarımı, Enzim inhibisyonu
Sayfa Adedi : 81
Danışman : Prof. Dr. Gökçen EREN

DESIGN, SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY STUDIES ON ARYLOXY BENZAMIDE
DERIVATIVES WITH POTENTIAL INHIBITORY EFFECT AGAINST SIRTUIN
(M. Sc. Thesis)

Semih YAGCI

GAZI UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
January 2021

ABSTRACT

Sirtuins (SIRT) are a class of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺)-dependent protein histone deacetylases (HDACs) that are evolutionarily conserved from bacteria to mammals. This group of enzymes catalyses the reversible deacetylation of lysine residues in the histones or non-histone substrates using NAD⁺ as a cosubstrate. Numerous studies have demonstrated that the aberrant enzymatic activity of SIRT has been linked to various diseases like diabetes, cancer, and neurodegenerative disorders. Previously, we performed a pharmacophore-based virtual screening campaign and an aryloxybenzamide derivative displaying SIRT1/2 inhibitory effect was identified as a hit compound (inh%, SIRT1: 31,45%; SIRT2: 42,47% @300 μ M). In the current study, the hit-to-lead optimization on the hit compound was explored in order to improve the SIRT inhibition. Fourteen compounds, ten of which were new, have been synthesized and subjected to *in vitro* biological evaluation for their inhibitory activity against SIRT1-3. By the structural modifications performed, a significant improvement was observed in selective SIRT1 inhibition for **GS01**, **GS02**, and **GS11** (inh%, SIRT1: 56,53%, 48,15%, 46,04%; SIRT2: 10,80%, no inhibition, no inhibition @100 μ M, respectively). Moreover, the highest SIRT2 inhibitory activity was observed for **GS14** (inh%, SIRT1: 47,16%; SIRT2: 51,61% @100 μ M). Furthermore, **GS01**, **GS02**, **GS11**, and **GS14** were subjected to *in vitro* cytotoxicity assay against MCF-7 human breast cancer cell line to determine the influence of the improvement in SIRT1/2 inhibition along with the structural modifications on the cytotoxic properties of the compounds. The cytotoxicity of the compounds was found to be correlated with their SIRT inhibitory profiles. Overall, the compounds with more potent and selective SIRT inhibition compared to that of the hit compound were obtained.

Science Code : 1019

Keywords : Sirtuin, Drug design, Enzyme inhibition

Page Number : 81

Supervisor : Prof. Dr. Gokcen EREN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın hazırlanması, değerlendirilmesi ve çalışmalarım sırasında değerli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, her sorun yaşadığımda yakından ilgilenen ve yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetinden beni mahrum bırakamayan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Gökçen EREN'e tüm içtenliğimle teşekkürlerimi ve minnetlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında destek ve yardımlarını esirgemeyen Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü saygıdeğer Prof. Dr. Yasemin DÜNDAR hocama teşekkürlerimi sunarım.

Biyolojik aktivite çalışmalarını gerçekleştiren Gazi Üniversitesi Biyokimya ABD Öğretim Üyesi saygıdeğer hocam Prof. Dr. Yeşim ÖZKAN'a ve Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya ABD Öğretim Üyesi saygıdeğer Doç. Dr. Filiz BAKAR ATEŞ hocama,

Çalışmalarım sırasında beni yalnız bırakmayan, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım hocam Arş. Gör. Dr. Mahmut GÖZELLE'ye, bana her anlamda destek olan laboratuvar arkadaşım Arş. Gör. Selen Gözde KAYA'ya,

Yoğun çalışmalarım sırasında manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK Proje No: 118S673) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Sirtuin	5
2.2. Sirtuin 1 (SIRT1).....	8
2.3. Sirtuin 2 (SIRT2).....	10
2.4. SIRT1/2 İnhibitörleri	12
3. YÖNTEM	17
3.1. Kimyasal Çalışmalar.....	17
3.1.1. Materyal.....	17
3.1.2. Genel sentez yöntemleri	17
3.2. Analitik Çalışmalar.....	18
3.2.1. Erime derecesi tayini.....	18
3.2.2. İnce tabaka kromatografisi	19
3.2.3. Kolon kromatografisi.....	19
3.2.4. Otomatik flash kromatografisi	19
3.2.5. ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR spektrumları	19
3.2.6. HRMS spektrumları	20
3.3. Moleküler Docking Çalışmaları	20
3.4. <i>In vitro</i> SIRT1, SIRT2, SIRT3 İnhibisyon Testleri	21
3.5. <i>In vitro</i> Sitotoksosite Çalışmaları	21
4. BULGULAR.....	23
4.1. Kimyasal Bulgular	23
4.2. Biyolojik Bulgular	56

Sayfa

4.3. Moleküler Modelleme Bulguları	57
5. TARTIŞMA.....	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
KAYNAKLAR.....	73
ÖZGEÇMİŞ	81



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 1.1. Tez çalışması kapsamında tasarlanan bileşikler	3
Çizelge 4.1. Test edilen moleküllerin SIRT1-3 % inhibisyon değerleri	56



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Sanal tarama çıktısı Bileşik A 'nın kimyasal yapısı	2
Şekil 1.2. Bileşik A 'nın insan SIRT2 aktif bölgesi ile (PDB: 5DY4) etkileşimleri ve yeni türevlerin tasarımı için değişiklik yapılan konumlar.....	2
Şekil 2.1. SIRT1-7 izoformlarına ait alt-hücrel lokalizasyonlar [23]	6
Şekil 2.2. SIRT1-7 genel yapısını oluşturan bölgeler [27]	7
Şekil 2.3. SIRT1-7 tarafından katalizlenen reaksiyonlar [30].....	8
Şekil 2.4. SIRT1 aktivatörü resveratrol ve STAC bileşiklerinden SRT2104'ün kimyasal yapısı.....	9
Şekil 2.5. SIRT1/2 inhibitörlerinin kimyasal yapıları.....	15
Şekil 4.1. Bileşik GS01 'in ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR spektrumları.....	29
Şekil 4.2. Bileşik GS02 'nin ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR spektrumları.....	31
Şekil 4.3. Bileşik GS03 'ün ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR spektrumları.....	33
Şekil 4.4. Bileşik GS04 'ün ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR spektrumları.....	35
Şekil 4.5. Bileşik GS05 'in ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR spektrumları.....	37
Şekil 4.6. Bileşik GS06 'nin ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR spektrumları.....	39
Şekil 4.7. Bileşik GS07 'nin ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR spektrumları.....	41
Şekil 4.8. Bileşik GS08 'in ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR spektrumları.....	43
Şekil 4.9. Bileşik GS09 'un ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR spektrumları.....	45
Şekil 4.10. Bileşik GS010 'un ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR spektrumları.....	47
Şekil 4.11. Bileşik GS011 'in ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR spektrumları.....	49
Şekil 4.12. Bileşik GS012 'nin ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR spektrumları.....	51
Şekil 4.13. Bileşik GS013 'ün ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR spektrumları.....	53
Şekil 4.14. Bileşik GS014 'ün ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR spektrumları.....	55
Şekil 4.15. Değişik konsantrasyonlardaki bileşiklerle muamele edilen MCF-7 hücre hattında tespit edilen % hücre canlılığı değerleri. *p<0.05, #p<0.0001.	57

Şekil

Sayfa

- Şekil 4.16. SIRT1 aktif bölgesi (PDB: 4I5I). (A) EX-527 analogunun x-ray kristal yapısındaki bağlantı modu. (B) Bileşik **A** için belirlenen bağlantı modu (XP Glidescore: -6,789 kcal/mol). (C) Bileşik **GS01** için belirlenen bağlantı modu (XP Glidescore: -10,018 kcal/mol). (D) Bileşik **GS02** için belirlenen bağlantı modu (XP Glidescore: -7,280 kcal/mol). (E) Bileşik **GS11** için belirlenen bağlantı modu (XP Glidescore: -7,785 kcal/mol). (F) Bileşik **GS14** için belirlenen bağlantı modu (XP Glidescore: -8.650 kcal/mol). H bağları, aromatik H bağları, π -katyon ve π - π etkileşimleri sırasıyla sarı, kırmızı, turuncu ve turkuaz renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.....59
- Şekil 4.17. SIRT2 aktif bölgesi (PDB: 5DY4). (A) SirReal analogunun x-ray kristal yapısındaki bağlantı modu. (B) Bileşik **A** için belirlenen bağlantı modu (XP Glidescore: -9,032 kcal/mol). (C) Bileşik **GS01** için belirlenen bağlantı modu (XP Glidescore: -9,787 kcal/mol). (D) Bileşik **GS14** için belirlenen bağlantı modu (XP Glidescore: -11,877 kcal/mol). H bağları, aromatik H bağları, π -katyon ve π - π etkileşimleri sırasıyla sarı, kırmızı, turuncu ve turkuaz renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir. Selektif SIRT2 inhibitörleri için geliştirilen dört üyeli farmakofor model. R1, R2, R3: aromatik halka, A1: H bağı akseptör.61
- Şekil 5.1. Yeni selektif SIRT2 inhibitörlerinin keşfi amacıyla uygulanan sanal tarama yöntemi ve öncü bileşik **A**'nın *in vitro* SIRT aktivite sonuçları.....63
- Şekil 5.2. Bileşik **A** üzerinde gerçekleştirilen kimyasal modifikasyonlar64
- Şekil 5.3. **GS01-14** kodlu bileşiklerin sentez şeması. (a) **2a**, **2b**, **2d**: CuI, Cs₂CO₃, *N,N*-dimetilglisin, 1,4-dioksan, DMF, 100 °C, 24 saat; (b) **2c**, **2e**: Pd(dba)₂, *t*-BuXPhos, K₃PO₄, toluen, reflaks, 6-8 saat; (c) i. NaOH, H₂O, THF, etanol, reflaks, 1-2 saat, ii. kons. HCl; (d) uygun amin türevi, EDC, DMAP, DCM, oda sıcaklığı, 24 saat; (e) i. NH₂OH.HCl, NaOH, H₂O, etanol, oda sıcaklığı, 1 saat, ii. NCS, DMF, oda sıcaklığı, 4 saat; (f) 1,2,3,4-tetrahidroizokinolin, TEA, DCM, 0 °C → oda sıcaklığı, 1 saat.....66

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklamalar
α	Alfa
Å	Angstrom
π	Pi
δ	Delta, Kimyasal kayma
μ l	Mikrolitre
ml	Mililitre
μ M	Mikromolar
nM	Nanomolar
mM	Milimolar
mmol	Milimol
Hz	Hertz
MHz	Megahertz
kkal	Kilokalori
kDa	Kilodalton
ppm	Milyonda bir

Kisaltmalar	Açıklamalar
ACN	Asetonitril
ATP	Adenozin trifosfat
BCL6	B hücreli lenfoma 6
CAS	Kimyasal abstrakt servisi
CASP8	Kaspaz 8
c-Myc	Hücrel miyelositomatozis onkojen
DCM	Diklorometan
DMAP	4-Dimetilaminopiridin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Besiyeri
DMF	N,N-Dimetilformamit
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit

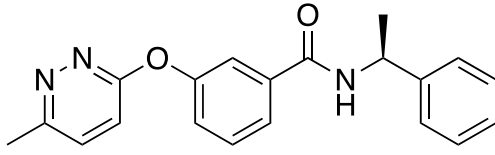
Kısaltmalar	Açıklamalar
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimit
E2F1	E2F transkripsiyon faktör 1
FOXO1/ FOXO3a	Forkhead box protein O1/ Forkhead box protein O3a
HDAC	Histon deasetilaz
HIF-1α	Hipoksi ile indüklenen faktör 1 alfa
HIV	İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü
HRMS	Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi
HTS	Yüksek çıktılı tarama
IC₅₀	%50 Oranında inhibisyon için gerekli inhibitör konsantrasyonu
IL1	İnterlökin 1
KDAC	Lizin deasetilaz
LogP	Partisyon katsayısı
MAPK	Mitojen ile aktive edilen protein kinaz
MAR1	Çiftleşme tipi lokus proteini 1
NAD⁺	Nikotinamid adenin dinükleotit
NCS	N-klorosüksinimit
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
PDB	Protein data bank
PGC-1α	PPAR- γ koaktivatör 1 alfa
PPAR-γ	Peroksizom proliferatörüyle aktive reseptör gamma
p53/ p65/ p73	Tümör protein 53/ 65/ 73
Pd(dba)₂	Palladyum(0) bis(dibenzilidenaseton)
RMSD	Kare ortalamalarının karekökündeki sapma
SIRT	Sirtuin
<i>t</i>-BuXPhos	2-Di- <i>t</i> -butilfosfino-2',4',6'-triizopropilbifenil
TEA	Trietilamin
THF	Tetrahidrofuran
TNF-α	Tümör nekroz faktörü alfa
UCP-2	Eşleşme bozucu protein 2
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü

1. GİRİŞ

Nikotinamid adenin dinükleotit (NAD⁺) bağımlı sınıf III histon deasetilaz (HDAC) olarak bilinen Sirtuin (SIRT) enzim ailesinin, transkripsiyon, hücre sağ kalımı, genom stabilitesi, DNA hasarı, DNA onarımı ve yaşam süresi gibi çeşitli biyolojik süreçlerde görev almasından dolayı [1] tip II diyabet, obezite, kanser, yaşlanma ve çeşitli nörodejeneratif hastalıklar ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, SIRT aktivitesinin modülasyonu terapötik öneme sahiptir ve bu enzim ailesi, ilişkilendirildikleri hastalıkların tedavisi için ilgi çekici bir hedef haline gelmiştir.

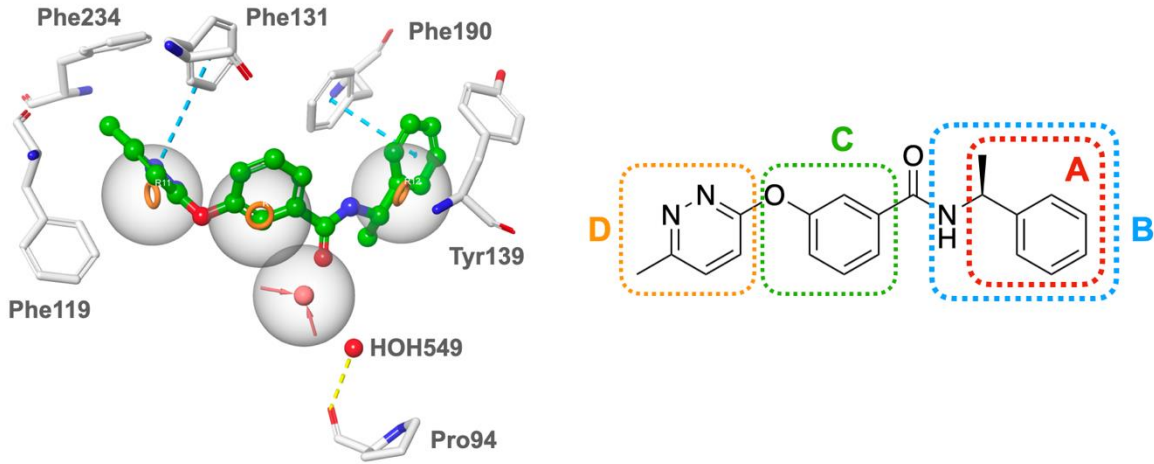
Memeli sirtuinleri için hücrel lokalizasyonları ve enzimatik görevleri açısından farklılık gösteren yedi izoform (SIRT1-7) aydınlatılmıştır. Bu izoformlar arasında üzerinde en çok çalışma yapılan SIRT1 ve SIRT2 izoformlarıdır. Günümüze kadar kimyasal yapı olarak çeşitlilik gösteren nikotinamid, splitomisin ve türevleri, sirtinol, tenovin, suramin ve türevleri, kambinol, salermit, toksoflavin, tiyobarbitüratlar gibi çeşitli bileşiklerin SIRT1 ve SIRT2 inhibitör aktivite gösterdiği bildirilmiştir [2–9]. Ancak bu inhibitörlerinin hiçbirisi ilaç olarak onay alamamıştır. Bu nedenle, SIRT enzimlerinin biyolojik fonksiyonlarını daha iyi anlayabilmek ve potansiyel terapötik endikasyonlarını keşfedebilmek için etkili ve tercihen selektif SIRT inhibitörlerine ihtiyaç devam etmektedir.

SIRT2 inhibitörü geliştirme çalışmalarında başlangıç noktası olabilecek öncü moleküllerin keşfi amacıyla başlattığımız çalışmada [10], ligant ve yapı temelli yaklaşımların birlikte kullanılmasıyla dört üyeli bir farmakofor model elde edilmiş ve bu model kullanılarak ZINC veri tabanında sanal tarama çalışması gerçekleştirilmiştir. SIRT izoformlarına karşı etkinliği *in vitro* olarak test edilen sanal tarama çıktısı bileşiklerinden (S)-3-[(6-metilpiridazin-3-il)oksi]-N-(1-feniletil)benzamid (**A**), 300 µM konsantrasyonda SIRT1 enzim aktivitesini yaklaşık %32 oranında düşürürken, SIRT2 enzimini karşı yaklaşık %43 oranında inhibe etmiştir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Sanal tarama çıktısı Bileşik **A**'nın kimyasal yapısı

İnsan SIRT2 aktif bölgesinde (PDB: 5DY4) [11] gerçekleştirilen moleküler docking çalışmalarına göre Bileşik **A**, metilpiridazin halkası aktif bölge girişinde Phe131 ile, feniletil grubu ile de selektivite cebine yönelerek Phe190 ile π - π etkileşimleri göstermiştir. SIRT2 inhibitör etki için önemi vurgulanan diğer bağlantıları da elde etmek amacıyla Bileşik **A** üzerinde “öncü bileşik optimizasyonu” çalışması yapılmış, Şekil 1.2’de gösterilen bölgelerde (A-D) değişikliklere gidilmiştir. Bu değişikliklerin enzim-inhibitör kompleksi üzerine etkileri incelenerek yeni bileşiklerin tasarımı gerçekleştirilmiştir.



Şekil 1.2. Bileşik **A**'nın insan SIRT2 aktif bölgesi ile (PDB: 5DY4) etkileşimleri ve yeni türevlerin tasarımı için değişiklik yapılan konumlar

Tez çalışmamız kapsamında, ariloksibenzamit yapı çekirdeği taşıyan **A** kodlu öncü bileşikten hareketle onu yeni olmak üzere toplamda on dört bileşik (**GS01-14**) tasarlanmış, sentez ve yapı aydınlatma çalışmaları tamamlanmıştır. Elde edilen on dört final bileşiğin, SIRT1-3 enzim aktiviteleri üzerine etkileri *in vitro* olarak test edilmiş, SIRT1 ve SIRT2 enzimlerine karşı inhibitör etki gösteren bileşiklerin MCF-7 insan meme kanseri hücre hattına karşı antiproliferatif özellikleri belirlenmiştir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Tez çalışması kapsamında tasarlanan bileşikler

Kod	Kimyasal yapı	Kod	Kimyasal yapı
GS01		GS08	
GS02		GS09	
GS03		GS10	
GS04		GS11	
GS05		GS12	
GS06		GS13	
GS07		GS14	



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sirtuin

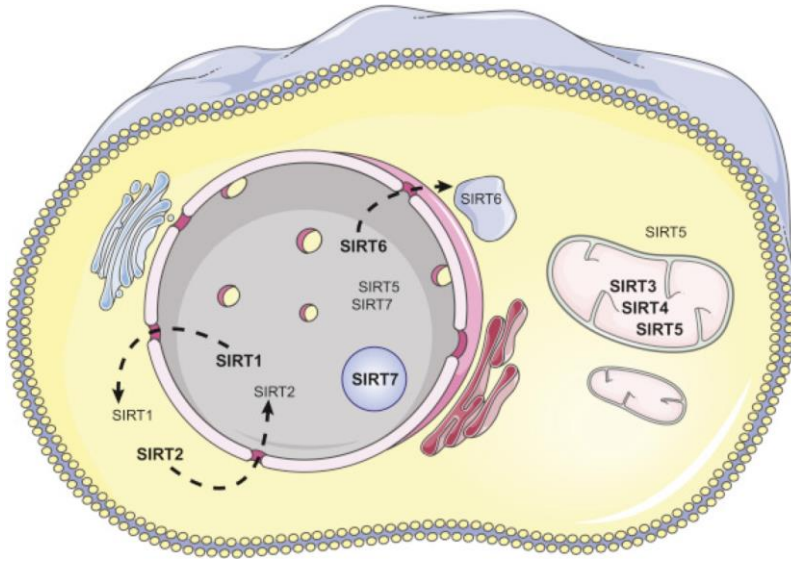
Lizin deasetilazlar (KDAC), çeşitli hastalıklarının gelişimi ve ilerlemesiyle birlikte çoklu fizyolojik süreçlerde rol alan önemli epigenetik modifikasyondan sorumlu enzimler olarak bilinmekte; katalizi desteklemek için bir çinko iyonu (Zn^{2+}) kullanan klasik histon deasetilazlar (HDAC) ve kofaktör olarak NAD^+ kullanan histon deasetilazlar yani sirtuinler olarak sınıflandırılmaktadırlar [12].

Sirtuin genleri ile ilgili ilk çalışma, 1979 yılında Klar ve arkadaşları tarafından yapılmış, *Saccharomyces cerevisiae* mayasında kısırlığa neden olan bir mutasyon sayesinde başlangıçta MAR1 olarak bilinen ilk sirtuin geni Sir2 keşfedilmiştir [13]. 1987 yılında Rine tarafından ek mutasyonlar ve bunlardan sorumlu diğer genler (Sir1-4) keşfedilerek, MAR terminolojisi, Sir (Silent Information Regulator) olarak değiştirilmiştir [14,15]. Elde edilen bu ön verilerden on yıl sonra Gottlieb ve Esposito, Sir2 geninin maya için toksik özellikte olan ekstrakromozal ribozomal DNA (rDNA) halka oluşumunun baskılanması için gerekli tek Sir geni olduğunu, bu nedenle Sir2 ile yaşam döngüsünün uzaması arasında bir ilişki olduğunu göstermişlerdir [16]. Mayadaki SIR2 homologlarına ait bulgular sonrasında Frye, beş adet Sir2 insan homologunu tanımlamış ve bakteriler, solucanlar, sinekler, bitkiler ve memelilerde gözlemlenen bu büyük gen ailesi günümüzde sirtuin olarak adlandırılmaya başlamıştır [17].

Farklı türlere ait sirtuinler, amino asit dizilimi benzerliği temel alınarak dört grupta sınıflandırılmaktadır. Memeli SIRT1-3 ve mayadaki tüm sirtuinler, bu sınıflandırmada birinci sınıfta, memeli SIRT4 ikinci sınıfta, SIRT5 üçüncü sınıfta, SIRT6 ve SIRT7 ise dördüncü sınıfta yer almaktadır [18].

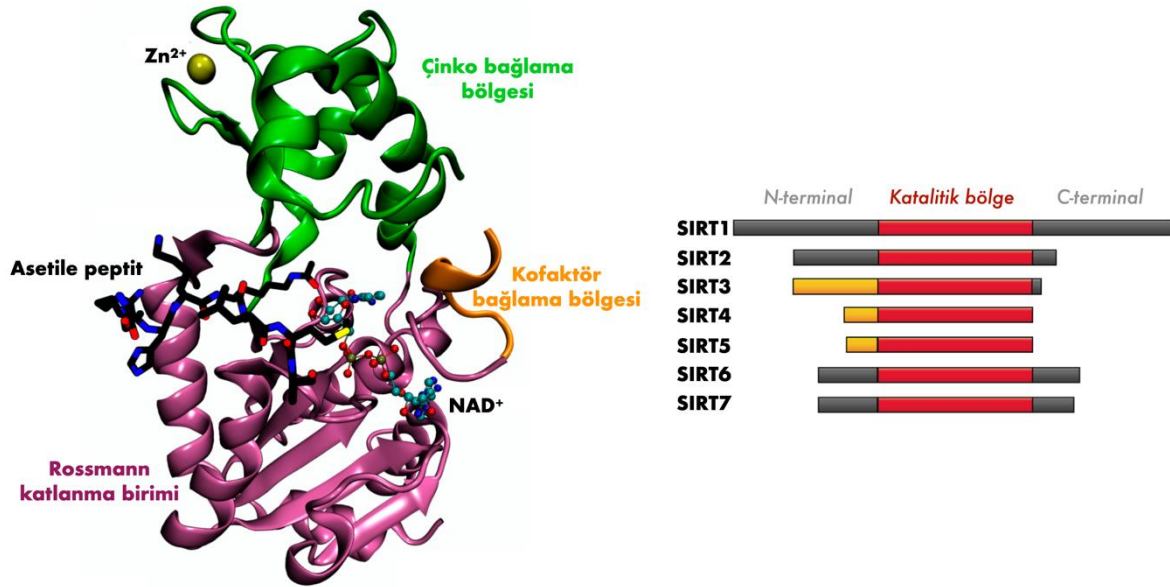
Alt-hücrel lokalizasyonları ve enzimatik görevleri açısından farklılık gösteren yedi izoformdan (SIRT1-7) oluşan memeli sirtuinlerinin, katalitik aktiviteleri ve lokalizasyonları N- ve C-terminalleri tarafından düzenlenmektedir [19]. SIRT1 ve SIRT2, hücre döngüsünde çekirdek ve sitoplazma arasında hareket halinde bulunsalar da SIRT1 birincil olarak çekirdeksel

deasetilaz, hücre döngüsünün G₂/M fazı süresince çekirdekte lokalize olduğu bilinen SIRT2 ise en önemli sitozolik izoform olarak kabul edilmektedir. SIRT3-5, mitokondriyal sirtuinler olarak bilinmektedirler [20]. İki formda bulunan SIRT3'ün, uzun formu (lSIRT3) çekirdekte, kısa formu (sSIRT3) ise ağırlıklı olarak mitokondride lokalize olmaktadır [21]. SIRT6, yalnızca çekirdeksel izoform olarak bilinmektedir. Bugüne kadar, SIRT7 için bilinen çekirdeksel kısa formundan (sSIRT7; 45 kDa) biraz daha uzun formu (lSIRT7; 47,5 kDa) sitozolik form olarak tanımlanmaktadır [22]. Memeli sirtuinlerinin alt-hücrel lokalizasyonları Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



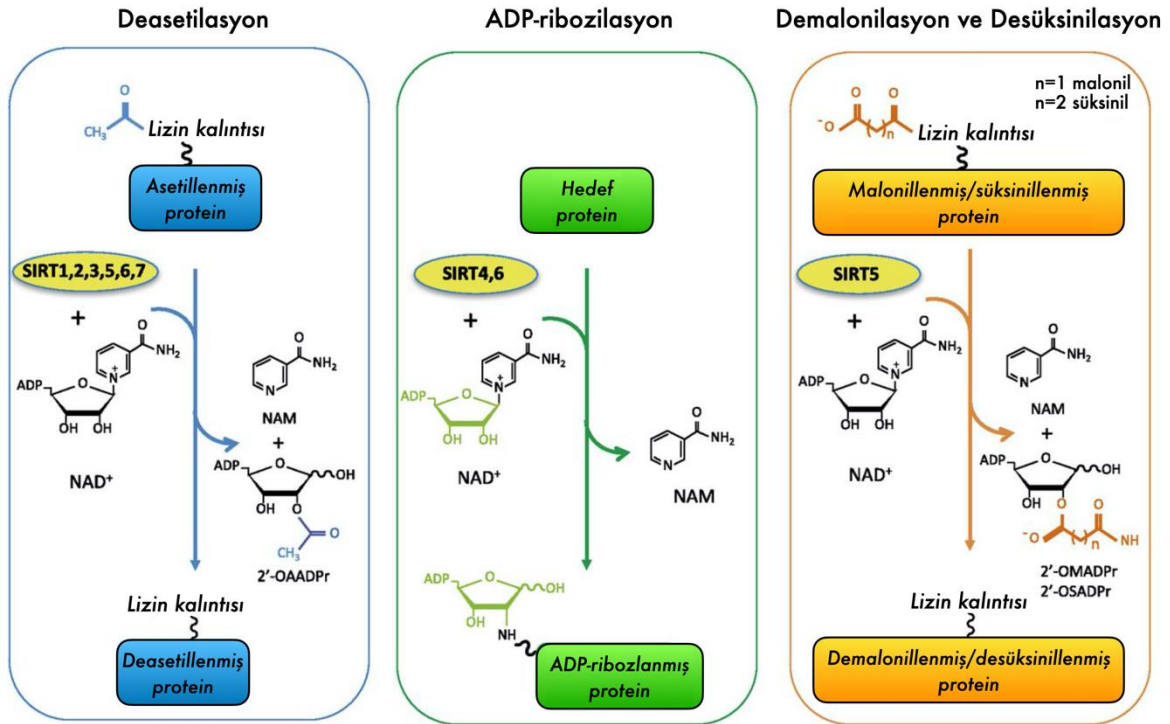
Şekil 2.1. SIRT1-7 izoformlarına ait alt-hücrel lokalizasyonlar [23]

Memeli SIRT izoformları, yaklaşık 275 amino asitten oluşan korunmuş bir katalitik çekirdeği paylaşırlarken N- ve C-terminal yan bölgelerinde uzunluk ve dizilim bakımından değişiklik göstermektedir [24]. SIRT enzim yapısı [25], NAD⁺ bağlayıcı geniş ve yapısal olarak tüm izoformlarda korunmuş bir Rossmann katlanma birimi ile yapısal olarak çeşitlilik gösteren daha küçük bir Zn²⁺ bağlama bölgesinden ve bu iki bölgeyi birbirine bağlayan birkaç döngü içeren katalitik bölgeden oluşmaktadır. Bu döngüler, NAD⁺ ve asetilenmiş peptit substratlarının ters yönden girip enzime bağlanmasını sağlayan uzun bir hidrofobik kanal yaratmaktadır (Şekil 2.2) [26].



Şekil 2.2. SIRT1-7 genel yapısını oluşturan bölgeler [27]

Sirtuinler, temel olarak histonlardaki veya histon olmayan substratlardaki lizin kalıntılarının geri dönüşümlü deasetilasyon reaksiyonunu katalizlemektedirler. SIRT4 ve SIRT6 izoformları önemli bir deasetilasyon aktivitesi göstermezken ADP-ribosiltransferaz aktiviteye sahiptir. SIRT5 ise, demalonilaz, desüksinilaz aktiviteleri içeren deasetilasyon reaksiyonlarını katalizlemektedir [26,28]. Sirtuinler, NAD⁺'nın nikotinamid ribozil bağını kırarak asetil grubunu proteinlerden kosubstratlarına aktardıklarından, deasetilazdan daha çok transasetilaz olarak düşünülmektedirler. Sirtuinlerin katalizlediği NAD⁺ bağımlı deasetilasyon reaksiyonunun mekanizması tam olarak aydınlatılmıştır. İlk basamağı açıl lizin substratının NAD⁺ yapısındaki riboza atağını içeren ADP-ribosiltransferaz reaksiyonu oluşturmakta, nikotinamid ve ADP-ribozlanmış alkilamidat ara ürünü meydana gelmektedir. Sirtuin aktif bölgesinde korunmuş histidin amino asitinin baz olarak alkilamidat ara ürününden proton koparmasıyla siklik bir ara ürün oluşmakta ve daha sonrasında bu ürün O-asetil-ADP-riboz yapısına dekompoze olmaktadır (Şekil 2.3) [29].



Şekil 2.3. SIRT1-7 tarafından katalizlenen reaksiyonlar [30]

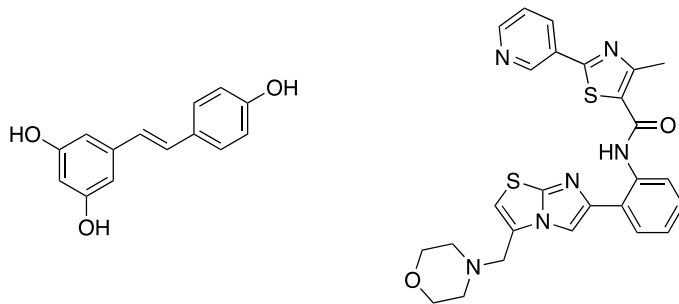
Substrat çeşitliliğinin fazla olması nedeniyle sirtuinler, metabolizma, hücre yaşamı, apoptozis, gen ekspresyonu, DNA tamiri gibi fizyolojik olayların düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar. Bu nedenle bu enzimler kanser, diyabet, obezite, Alzheimer, Huntington ve Parkinson gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklar dahil yaşlanma ile ilişkili çeşitli bozukluklarla ilişkilendirilmiştir [31].

2.2. Sirtuin 1 (SIRT1)

Sirtuin ailesinin en kapsamlı olarak çalışılmış üyesi olan SIRT1'in, gen ekspresyonunun baskılanması, genomik stabilite, stres direnci, hücre bölünmesi, glukoz ve lipid metabolizması, enflamasyon ve apoptozis ile ilişkili olduğu çok sayıda çalışma ile gösterilmiştir [32]. SIRT1, DNA onarım proteinleri, hücre sinyal molekülleri ve NF- κ B, FOXO1, p53, PPAR- γ , PGC-1 α , E2F1 gibi birçok transkripsiyonel düzenleyiciler dahil olmak üzere histon veya histon olmayan substratların deasetilasyon reaksiyonunu katalizleyerek transkripsiyonu, protein stabilitesini ve aktivitesini düzenlemektedir [33].

Glukoz ve lipid metabolizmasında önemli bir rol üstlenen SIRT1, iskelet kasında PGC-1 α üzerinden yağ asidi oksidasyonunu ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu, karaciğerde PGC-1 α ve FOXO1 üzerinden glukoneogenezi ve yağ asidi oksidasyonunu, pankreasta ise UCP-2 üzerinden insülin sekresyonunu arttırmaktadır. SIRT1, NF- κ B deasetilasyonu ile proenflamatuvar sitokinlerin baskılanmasını sağlayarak enflamasyonu negatif yönde düzenlemektedir. Ayrıca, FOXO3a deasetilasyonu ile antioksidan salınımını arttırarak hücreyi oksidatif strese karşı korumaktadır. SIRT1'in tümör oluşumu ile ilgili fizyolojik fonksiyonları arasında, tümör baskılayıcı özelliğe sahip p53 ve p73'e ait transkripsiyonel fonksiyonların baskılayarak apoptozisi engellemenin yanı sıra BCL6'nın pozitif yönde düzenlenmesi ve FOXO1 bağımlı VEGF indüksiyonu yer almaktadır [34]. Bunlar dışında prostat, deri, meme, akciğer ve kolon kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde SIRT1 ekspresyonunun yüksek olduğu bildirilmektedir [33].

SIRT1 izoformu, organizmada yaşam süresinin uzamasına yol açmakta ve strese dayanıklılığı arttırmaktadır. Hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda, açlık veya kalori kısıtlamasıyla pek çok dokuda SIRT1 seviyesinin indüklendiği ve memelilerde yaşam sürecini kontrol eden mekanizmalardan birinin sirtuin bağımlı olduğu bildirilmiştir. Bu veriler doğrultusunda, SIRT1 enziminin inhibisyonu bazı kanser modellerinde ümit vaad etse de aktivasyonu yaşlanmayla ilgili hastalıkların tedavisi için hedeflenmiştir. Doğal fenolik yapıda bir bileşik olan resveratrolün yanı sıra Sinclair ve arkadaşları tarafından yapılan HTS çalışması sonucu keşfedilen sentetik STAC bileşikler, günümüze kadar etkinliği bildirilen SIRT1 aktivatörleridir (Şekil 2.4) [35].



Şekil 2.4. SIRT1 aktivatörü resveratrol ve STAC bileşiklerinden SRT2104'ün kimyasal yapısı

SIRT1 ile kanser arasındaki ilişki tam olarak aydınlatılamamış olsa da SIRT1 enziminin hem tümör baskılayıcı hem de tümör oluşumunu destekleyici rolü olduğunu ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır. Tümör baskılayıcı etkisi NF- κ B and HIF-1 α gibi transkripsiyonel faktörleri deasetile ederek baskılamasıyla TNF- α üzerinden apoptozisin indüklenmesiyle meydana gelebileceği düşünülmektedir. Tümör oluşumunu destekleyici rolü ise, hücre çoğalmasında önemli bir düzenleyici olan c-Myc seviyelerini artırmasıyla ortaya çıkmaktadır [36]. Bu nedenle SIRT1 aktivasyonu dışında özellikle antikanser tedavide hedef olarak belirlenen SIRT1 enzimine karşı inhibitör bileşiklerin geliştirilmesi için pek çok çalışma yapılmaktadır.

İnhibitör bağlı insan SIRT1 x-ray kristal yapısı (PDB: 4I5I), ilk olarak 2013 yılında Zhao ve arkadaşları tarafından aydınlatılarak selektif SIRT1 inhibitörü EX-527 analogu ve NAD⁺ bağlı SIRT1 katalitik bölgesi belirlenmiştir. İnhibitörün gösterdiği yüksek SIRT1 afinitesinin kofaktör bağlanmasına bağlı olduğu ve bu tip inhibitörlerin NAD⁺'yı asetilenmiş substratın katalitik cebe girişini bloke eden inaktif konformasyona zorlayarak etkilerini gösterdikleri bildirilmiştir. SIRT1 aktif bölgesi; (i) hidrofobik özellik taşıyan substrat bağlanma cebi, (ii) NAD⁺ bağlanma bölgesi olmak üzere iki ana bağlanma bölgesinden oluşmaktadır. İnhibitörün bulunduğu hidrofobik cebin Ile270, Phe273, Ile279, Phe297, Ile347, Ile411 ve Phe413 amino asitlerinden oluştuğu; inhibitör bileşiğin Asp348, Ile347 ve HOH12 kristal su aracılığıyla Ala262 ve Ile270 ile H bağı, Phe273 ile de π - π etkileşimi meydana getirdiği bildirilmiştir [37].

2.3. Sirtuin 2 (SIRT2)

Sirtuin 2 izoformu, ağırlıklı olarak sitoplazmada bulunmakta fakat hücre döngüsünün G₂/M fazı süresince çekirdekte lokalize olmaktadır. Çekirdekte histon H3 ve H4, sitoplazmada ise α -tubulin, p35, p65, FOXO1, FOXO3a gibi histon olmayan proteinlerin deasetilasyonunu sağlayarak mikrotübül stabilizasyonunda, gen ekspresyonunda ve hücre döngüsünün devamlılığında rol oynayan tek sirtuin izoformu olarak bilinmektedir [38].

SIRT2, yüksek oranda beyinde eksprese edildiği için, inhibisyonunun nöroprotektif etkilere neden olacağı düşünülmüş ve yapılan çalışmalar sonucu bu düşüncüyü doğrulayan bulgulara

ulaşılmıştır. Green ve arkadaşları tarafından bildirilen sonuçlara göre, SIRT2 inhibitörü olan nikotinamit, Alzheimer hastalığına ait bir hayvan modelinde asetilenmiş α -tubulin miktarını arttırıp, Thr231-fosforile tau miktarını azaltarak mental aktivitelerin geri dönmesini sağlamıştır [39]. Outeiro ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise, SIRT2 inhibisyonunun Parkinson hastalığının hücresel modelinde α -sinüklein toksisitesini ortadan kaldırdığı bildirilmiştir [40]. SIRT2 inhibisyonunun, aynı zamanda nöronal kolesterol düşüşünü azalttığı ve Huntington hastalığının hücresel modellerinde nöroprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir [41,42]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, SIRT2 enziminin p53 üzerine olan inhibitör etkisi nedeniyle tümör oluşumunda rol oynadığı belirtilmiş; HeLa ve MCF-7 hücrelerinde, hepatoselüler ve pankreatik karsinomlarda hücre proliferasyonunu azalttığı bildirilmiştir [43–46]. SIRT2 enziminin selektif inhibisyonunun C6 glioma hücrelerinde apoptozisi indüklediğini ve küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücrelerinde (A549 ve H1299) p53 asetilasyonunun artması sağlanarak hücre proliferasyonunu azalttığını gösteren çalışmalar literatürde kayıtlıdır [44,47]. Ayrıca, SIRT2'nin hücre içi enerji kullanımıyla yakından ilişkili olduğu da göstermektedir [48]. Bu nedenle SIRT2, kanser ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde ümit vaad eden bir hedef haline gelmiş, inhibitör bileşiklerin geliştirilmesi için çalışmalara başlanmıştır [49].

İnsan SIRT2 enziminin küçük molekül yapısında bir inhibitörle bağlı kompleksine ait x-ray kristal yapıları (PDB: 4RMG, 5DY4) aydınlatılarak SIRT2 aktif bölgesi ve inhibisyon için gerekli etkileşimler açıklanmıştır [11,50]. SIRT1 enziminde olduğu gibi SIRT2 katalitik bölgesi, Rossmann katlanma birimi ve çinko bağlama bölgesinden oluşmakta, substrat peptidin aktif bölgeye bağlanmasıyla katalitik bölgede konformasyonel değişiklikler meydana gelmektedir. SIRT2 substrat bağlama cebinin, SIRT1'e göre daha geniş olduğu, bu nedenle daha hacimli yapıların SIRT2 enzimini daha iyi inhibe edebileceği de belirtilmiştir [51]. Ayrıca yapılan çalışmalar sonunda SIRT2 aktif bölgesinde SIRT1'den farklı olarak Tyr139 ve Phe190 amino asitlerinin oluşturduğu bir selektivite cebinin varlığı ortaya konulmuş, selektif SIRT2 inhibisyonu için bu bölge ile uyumun ve etkileşimlerin gerekliliği bildirilmiştir. Bunlara ek olarak, aktif bölge girişinde Phe119, Phe131 ve Phe234 amino asitleriyle π - π etkileşimlerinin ve HOH549 kristal su köprüsü ile Pro94 arasındaki H bağının aktif bölgeyle etkileşim için önemli olduğu vurgulanmıştır [11].

2.4. SIRT1/2 İnhibitörleri

Literatürde özellikle son on yılda çok sayıda SIRT modülatörü bildirilmiştir. Uzun yıllar boyunca, SIRT aktivatörleri (SIRTa) esas olarak kardiyovasküler ve metabolik hastalıklar gibi yaşlanmaya bağlı bozuklukların tedavisi ve önlenmesi için önerilmişken, SIRT inhibitörleri (SIRTi) çoğunlukla kanser, nörodejeneratif ve kas hastalıklarının tedavisi için önerilmiştir. Kanser de dahil olmak üzere hemen hemen tüm yaşla ilişkili bozukluklarda her bir SIRT izoformunun çok yönlü ve sıklıkla "ying-yang" rolüne ilişkin en son bulgular, aktivasyon veya inhibisyon için belirlenen hedef sınıflandırmasını ciddi bir şekilde sorgulamaktadır. Bu nedenle, izoformlara özel modülatörlere olan ihtiyaç vurgulanmakta, SIRT1 ve SIRT2 izoformlarının çalışma mekanizmalarını tam olarak aydınlatmak ve aktivitelerini düzenlemek amacıyla yeni moleküllerin geliştirilmesine odaklanılmaktadır.

Sirtuinlerin endojen inhibitörü olan nikotinamit, enzim aktif bölgesine bağlanarak substratın enzime bağlanmasını bloke etmekte ve NAD⁺'nın hem deaçile hem de ADP-ribozile olmasını engellemektedir. Nikotinamit için belirlenen bu inhibisyon mekanizmasından yola çıkılarak analogları hazırlanmış ve hem SIRT1'e hem de SIRT2'ye karşı inhibitör etkili 2-benzilbenzamid (1) (SIRT1 IC₅₀=17 µM) ve 2-((3-(3-florofenetoksi)fenil)amino)benzamid (2) (SIRT2 IC₅₀=0,57 µM) türevlerine ulaşılmıştır [38].

Hidroksinaftaldehit türevi sirtinol (3), mayada yapılan fenotipik tarama sonucunda keşfedilmiş, demir kelasyonu ile SIRT2 inhibisyonu (SIRT1 IC₅₀=37-131 µM; SIRT2 IC₅₀=38 µM) yaptığı bildirilmiştir [52]. Ayrıca, sirtinolün Ras/MAPK yolağını inhibe ederek MCF-7 meme kanseri hücrelerinde ve H1299 akciğer kanseri hücrelerinde yaşlanmaya bağlı büyüme durmasını indüklediği gösterilmiştir. Diğer bir hidroksinaftaldehit türevi olan kambinol (4), SIRT1/2 inhibitörü (SIRT1 IC₅₀=56 µM; SIRT2 IC₅₀=59 µM) olarak bildirilmiş, fakat sfingomiyelinaz 2 gibi başka hedefleri de inhibe ettiği ve sirtinole benzer seçicilik problemiyle karşı karşıya kaldığı gözlenmiştir [53]. Kambinol, primer nöronlarda TNF-α veya IL1 ile indüklenen seramit artışını ve hücre ölümünü azaltmıştır [54].

Maya sirtuinleri üzerine inhibitör etkiye sahip olmasına rağmen insan homologlarına karşı etkisiz bulunan splitomisin (5) üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmış, arilsplitomisin

türevlerinde SIRT inhibitör etkinin olduğu bildirilmiştir [55]. Bu çalışma sonunda dikkat çeken splitomisin türevi HR73'ün **(6)** ($\text{SIRT1 IC}_{50} \leq 5 \mu\text{M}$) p53 hiperasetilasyonunu indüklediği ve HIV transkripsiyonunu önemli ölçüde azalttığı gösterilmiş, bu nedenle SIRT1'in HIV enfeksiyonu için yeni bir terapötik hedef olabileceği bildirilmiştir.

Sirtinol yapısındaki fenil halkasının üçüncü konumunda yer alan amit yapısının ters amit şekline dönüştürülmesiyle elde edilen salermit **(7)** ($\text{SIRT1 IC}_{50} = 43 \mu\text{M}$; $\text{SIRT2 IC}_{50} = 25 \mu\text{M}$) sirtinole göre daha etkili bir SIRT inhibitörü olarak bildirilmiş, pek çok kanser hücresinde p53 üzerinden CASP8 ve TNF- α gibi proapoptotik genlerin aktivasyonu ile apoptozisi indüklediği gösterilmiştir [56].

ChemBridge veri tabanında yapılan fenotipik tarama sonucunda aralarında Tenovin-43'ün **(8)** ($\text{SIRT1 IC}_{50} = 21,5 \mu\text{M}$; $\text{SIRT2 IC}_{50} = 0,8 \mu\text{M}$) yer aldığı tenovin serisi bileşikler, SIRT1/2 inhibitörleri olarak keşfedilmiştir. Devamında yapılan çalışmalarla SIRT2 enzimini SIRT1'e göre daha yüksek oranda inhibe eden Tenovin-D3 **(9)** ($\text{SIRT1 IC}_{50} > 90 \mu\text{M}$; $\text{SIRT2 IC}_{50} = 21,8 \mu\text{M}$) bileşiğine ulaşılmıştır [57].

2005 yılında Napper ve arkadaşları tarafından keşfedilen EX-527 **(10)**, selektif SIRT1 inhibisyonu ($\text{SIRT1 IC}_{50} = 38 \text{ nM}$; $\text{SIRT2 IC}_{50} = 19,6 \mu\text{M}$) göstermiştir [37,58]., Siena Biotech tarafından yapılan bir faz II klinik çalışması, EX-527'nin klinik olmayan Huntington hastalığı modellerinde güvenli olduğunu ve hastalarında iyi tolere edildiğini göstermiş, ancak çalışma henüz faz III klinik denemelere ilerlememiştir [59]. Şu anda, EX-527 endometriozis ve ilgili hastalıklar bağlamında değerlendirilmesi için yeni bir klinik araştırma kurulmaktadır (NCT04184323). Therrien ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, EX-527 yapısındaki indol halkası pirazol iskeleti ile değiştirilerek SIRT1 enzimine karşı SIRT2'ye göre daha etkili, aralarında BY-13a'nın da **(11)** ($\text{SIRT1 IC}_{50} = 0,8 \mu\text{M}$; $\text{SIRT2 IC}_{50} = 1,7 \mu\text{M}$) yer aldığı bisiklik pirazol yapısında bileşiklere ulaşılmıştır [2].

Tiyeno[3,2-*d*]pirimidin-6-karbokamit iskeletinin güçlü bir sirtuin inhibitör yapısı **(12)** ($\text{SIRT1 IC}_{50} = 4 \text{ nM}$; $\text{SIRT2 IC}_{50} = 3 \text{ nM}$) olduğu Disch ve arkadaşları tarafından yayınlanan bir çalışmada bildirilmiştir [60].

2006 yılında Trapp ve arkadaşları, sirtuin inhibitörlerini tanımlamak için adenozin içeren kofaktörleri, ligantları bağlayan enzimleri ve reseptörleri hedefleyen bir çalışma yapmış, NAD^+ ve ATP adenozin kalıntısı taşıdığı için birçok kinaz inhibitörü SIRT inhibisyon etkileri açısından değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, bis-indolil maleimit yapısında Ro31-8220 (**13**) (SIRT1 IC_{50} =3,5 μM ; SIRT2 IC_{50} =0,8 μM), indolinon yapısında GW5074 (**14**) (SIRT1 IC_{50} =42 μM ; SIRT2 IC_{50} =18 μM) ve α -siyanopropenomit yapısında AGK2 (**15**) (SIRT1 IC_{50} >40 μM ; SIRT2 IC_{50} =3,5 μM) SIRT inhibitörü olarak tanımlanmıştır [61].

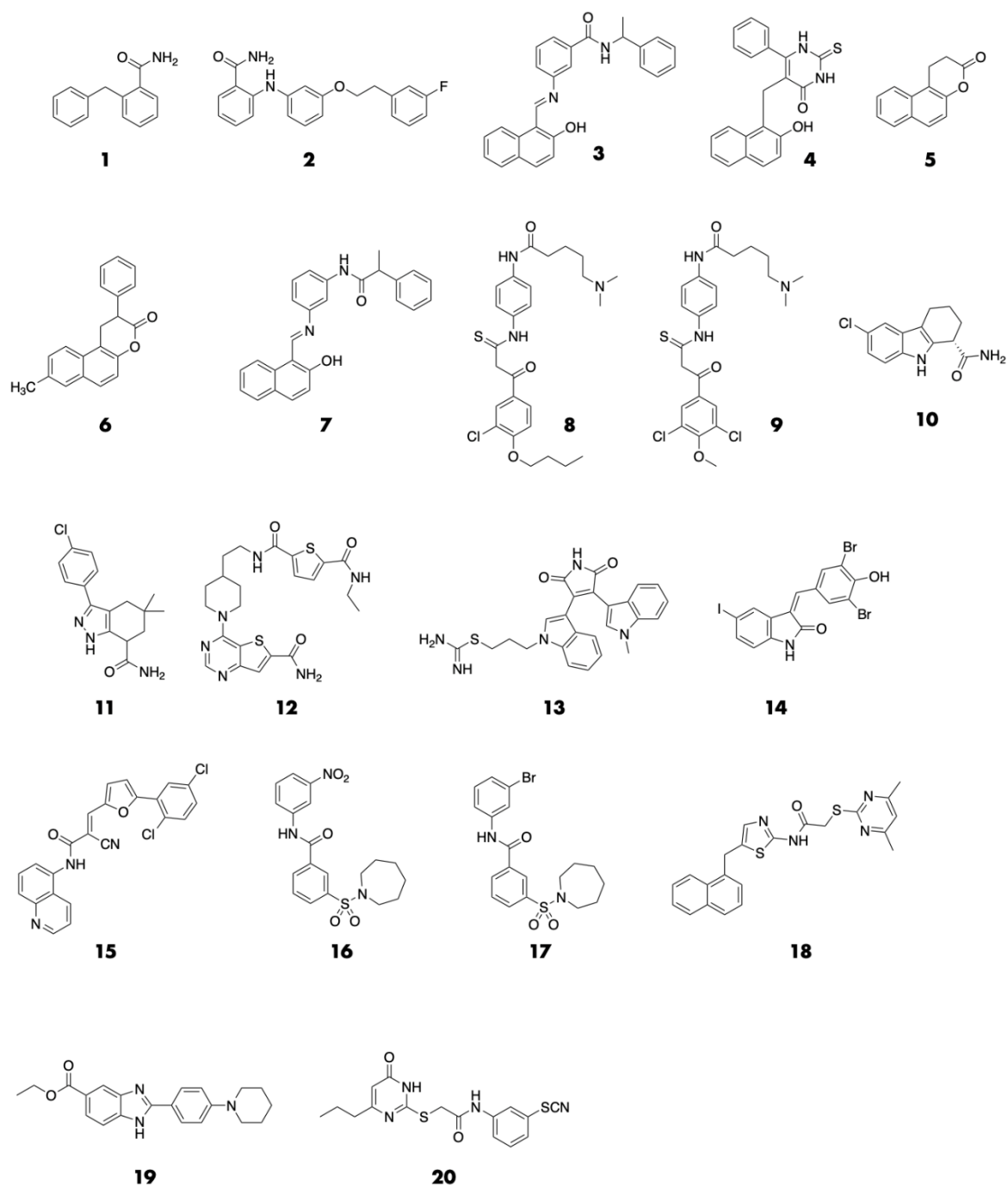
2007 yılında Outeiro ve arkadaşları, selektif SIRT2 inhibitörü olan AGK2 ve sülfobenzamit türevi AK1'in (**16**) (SIRT1 IC_{50} >50 μM ; SIRT2 IC_{50} =12,5 μM), Parkinson hastalığına ait hücresel modelde α -sinüklein toksisitesini yok ettiğini bildirmişlerdir [40]. Diğer bir sülfobenzamit türevi AK7'nin (**17**) ise selektif olarak SIRT2 inhibisyonu (SIRT1 IC_{50} >100 μM ; SIRT2 IC_{50} =15,5 μM) ile nöronal kolesterolu düşürdüğü yayınlanmıştır [42].

Oldukça güçlü ve selektif bir SIRT2 inhibitörü olan SirReal2 (**18**) (SIRT1 IC_{50} >100 μM ; SIRT2 IC_{50} =0,44 μM) kendine özgü bir inhibisyon mekanizması göstermekte, SIRT2 enzimini açık bir durumda kilitleyip aktif bölgenin yeniden düzenlenmesine yol açmaktadır ve daha önce keşfedilmemiş bir SIRT2 selektivite cebine bağlanmaktadır [50].

Tan ve arkadaşları 5-alkoksikarbonil-2-fenil benzimidazol çekirdeği taşıyan bir seri bileşiği SIRT1/2 inhibitörü olarak bildirmişlerdir [62]. Seri içerisinde BZD9L1'in (**19**) (SIRT1 IC_{50} =19-43 μM ; SIRT2 IC_{50} =8,8 μM) apoptozis yoluyla hem HCT116 hem de HT29 metastatik kolorektal kanser hücre hatlarının canlılığını, hücre göçünü ve koloni oluşturma kabiliyetini azalttığı gösterilmiştir.

2020 yılında Wössner ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma sonucu olarak feniltiyosiyanat grubu taşıyan tiyenopirimidon türevlerinin (**20**) (SIRT1 IC_{50} =13 μM ; SIRT2 IC_{50} =23, 50 μM konsantrasyonda) selektif SIRT1 inhibisyonu yaptığı bildirilmiştir [63].

SIRT1 ve SIRT2 izoformlarına karşı inhibisyon etki gösterdiği bildirilen bileşiklerin kimyasal yapıları Şekil 2.5'de sunulmuştur.



Şekil 2.5. SIRT1/2 inhibitörlerinin kimyasal yapıları



3. YÖNTEM

3.1. Kimyasal Çalışmalar

3.1.1. Materyal

Çalışmalarımızda kullanılan çözücü ve re ajanlar analitik saflıktadır. Kullanılan kimyasallar, Abcr (Almanya), Sigma-Aldrich (Almanya), Merck (Almanya) ve Isolab (Almanya) firmalarının ürünleridir.

3.1.2. Genel sentez yöntemleri

Etil 3- veya 4-ariloksibenzoat türevleri (2a-e)

Yöntem 1 [64]: Sentezlenecek bileşiğe uygun aril bromür (2 ekivalan) ve etil hidroksibenzoat (1 ekivalan) türevleri, Cul (0,3 ekivalan), *N,N*-dimetilglisin (1 ekivalan) ve Cs₂CO₃ (2 ekivalan) varlığında, 1,4-dioksan:DMF (8:2) karışımı içerisinde argon atmosferi altında 100 °C'de 24 saat süreyle ısıtılır. Süre sonunda soğutulan reaksiyon karışımı etil asetat ve su ile seyreltilip organik faz ayrılır. Sulu faz tekrar etil asetat (3x10 ml) ile ekste edilir. Birleştirilen organik fazlar, tuzlu su (3x10 ml) ile yıkanır, susuz Na₂SO₄ ile kurutulur ve alçak basınç altında yoğunlaştırılır. Elde edilen kalıntı, uygun solvan sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılır.

Yöntem 2 [65]: Pd(dba)₂ (0,01 ekivalan), *t*-BuXPhos (0,015 ekivalan) ve K₃PO₄ (2 ekivalan) karışımı toluen içerisinde çözülerek 15 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırılır. Süre sonunda, 2-bromopirimidin (**1c**, 1 ekivalan) ve etil hidroksibenzoat türevinin (1,2 ekivalan) toluen içerisindeki çözeltisi karışıma eklenir ve 6-8 saat süreyle geri çeviren soğutucu altında ısıtılır. Süre sonunda reaksiyon ortamı alçak basınç altında yoğunlaştırılır. Sonrasında kalıntıya etil asetat eklenerek, %5 NaOH çözeltisi (3x10 ml) ve tuzlu su (3x10 ml) ile ekstre edilir. Organik fazlar birleştirilerek susuz Na₂SO₄ ile kurutulur ve alçak basınç

altında yoğunlaştırılır. Elde edilen kalıntı, uygun solvan sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılır.

3- veya 4-Ariloksibenzoik asit türevleri (3a-e)

Uygun etil ariloksibenzoat türevinin (1 ekivalan) THF:Etanol (2:1) içerisindeki çözeltisinin üzerine 1 ml 1 M NaOH çözeltisi eklenerek, 1-2 saat süreyle geri çeviren soğutucu altında ısıtılır. Süre sonunda reaksiyon ortamı derişik HCl ile pH=6 olacak şekilde asitlendirilir. Devamında etil asetat (3x10 ml) ile ekstre edilir, organik fazlar birleştirilerek susuz Na₂SO₄ ile kurutulur ve alçak basınç altında yoğunlaştırılır. Elde edilen katı kurutulur.

3- veya 4-Ariloksi benzamit türevleri (GS01-13)

Sentezlenecek bileşige uygun benzoik asit türevi (1 ekivalan), EDC (1,2 ekivalan) ve DMAP (0,2 ekivalan) karışımı DCM içerisinde çözölür ve 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırılır. Sonrasında, uygun amin türevi (1 ekivalan) eklenerek oda sıcaklığında gece boyu karıştırılmaya devam edilir. Süre sonunda reaksiyon ortamı DCM ile seyreltilerek, sırasıyla 1 M HCl (3x10 ml), %5 NaHCO₃ çözeltisi (3x10 ml) ve tuzlu su (3x10 ml) ile ekstre edilir. Birleştirilen organik fazlar, susuz Na₂SO₄ ile kurutulur ve alçak basınç altında yoğunlaştırılır. Elde edilen kalıntı, uygun solvan sistemi kullanılarak kolon kromatografisi, otomatik flash kromatografisi veya kristallendirme yöntemlerinden biri ile saflaştırılır.

3.2. Analitik Çalışmalar

3.2.1. Erime derecesi tayini

Sentezlenen bileşiklerin erime dereceleri, Schmelzpunktbestimmer SMP-II dijital erime derecesi tayin cihazı ile belirlenmiş olup değerler düzeltilmeden verilmiştir.

3.2.2. İnce tabaka kromatografisi

Sentez çalışmalarında ve bileşiklerin saflık kontrollerinde, Merck TLC Silica gel 60 F₂₅₄ markalı hazır alüminyum plaklar ile çözücü sistemi olarak *n*-hekzan:etil asetat, petrol eteri:etil asetat, DCM:etil asetat veya DCM:metanol kullanılmıştır. Lekelerin belirlenmesinde uv ışığından (254 ve 366 nm) ve dragendorff, ninhidrin, vanilin belirteçlerinden yararlanılmıştır.

3.2.3. Kolon kromatografisi

Sentezlenen bileşiklerin saflaştırma işlemlerinde, sabit faz olarak silika (Merck Silica gel 60 (0,063-0,200)) ile hareketli faz olarak çeşitli oranlarda *n*-hekzan:etil asetat, petrol eteri:etil asetat, DCM:etil asetat ve DCM:metanol çözücü sistemleri kullanılmıştır.

3.2.4. Otomatik flash kromatografisi

Sentezlenen bileşiklerden saflaştırılma işlemlerinde, uv dedektörlü Teledyne ISCO Combiflash® Otomatik Flash Kromatografi Sistemi kullanılmıştır. Sabit faz olarak RediSep® silika kolonlar (12 g) ile hareketli faz olarak çeşitli oranlarda *n*-hekzan:etil asetat, DCM:etil asetat ve DCM:metanol çözücü sistemleri kullanılmıştır.

3.2.5. ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları

Sentezlenen bileşiklerin ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda Varian Mercury 400 High Performance Digital FT-NMR ve Bruker Avance Neo 500 MHz FT-NMR Spektrometre cihazları ile DMSO-*d*₆ veya CDCl₃ içinde alınıp kayma değerleri δ (ppm) skalasında değerlendirilmiş, *J* değerleri Hz cinsinden verilmiştir.

3.2.6. HRMS spektrumları

Sentezlenen bileşiklerin HRMS spektrumları, Waters LCT Premier XE UPLC/MS-TOF sistemi kullanılarak pozitif iyon (ESI+) elektrosprey iyonizasyon yöntemi ile metanol içinde alınmıştır.

3.3. Moleküler Docking Çalışmaları

Moleküler docking çalışmaları, Schrödinger Small-Molecule Drug Discovery Suite 2020-2 (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İnsan SIRT1 (PDB: 4I5I) [37] ve insan SIRT2 (PDB: 5DY4) [11] enzimlerinin x-ray kristal yapıları RCSB Protein Data Bank veri tabanından indirilmiş, Schrödinger programının Protein Preparation Wizard modülü kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlık aşamasında aktif bölgedeki HOH702, HOH717 (SIRT1) and HOH549 (SIRT2) hariç kristal su molekülleri silinmiş, hidrojen atomları eklenmiş, eksik veya yanlış atom tipleri düzeltilmiştir. OPLS3e kuvvet alanı uygulanarak RMSD değeri en fazla 0,3 Å olacak şekilde enerji minimizasyonu yapılmıştır. Enzim x-ray kristal yapısında bulunan inhibitör molekül seçilerek, inhibitörün çevresinde aktif bölgeyi koordinatlarıyla tanımlayan 20 Å'luk bir kutu (grid), "receptor grid generation" paneli ile oluşturulmuştur. Bu aşamada kuvvet alanı olarak yine OPLS3e kullanılmış, Van der waals ölçeklendirme faktörü 1,00 ve yük parçalı kesme noktası 0,25 olarak tanımlanmıştır. Elde edilen reseptör grid dosyaları moleküler docking çalışmasında kullanılmak üzere kaydedilmiştir. Moleküler docking çalışması için seçilen bileşikler, Schrödinger programının Maestro ara yüzünde çizilmiş ve LigPrep (Schrödinger Release 2020-2: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020) modülü ile varsayılan değerler kullanılarak bileşiklerin üç boyutlu yapıları hazırlanmıştır. Moleküller, önceden kaydedilen grid dosyası üzerinden Schrödinger programının Glide modülü ile enzim aktif bölgesine Extra Precision (XP) algoritması kullanılarak Van der waals ölçeklendirme faktörü 0,80 ve yük parçalı kesme noktası 0,15 olacak şekilde yerleştirilmiştir [66]. Elde edilen sonuçlar GlideScore değerleri temel alınarak incelenip, moleküllere ait uygun bağlantı modları belirlenmiştir.

3.4. *In vitro* SIRT1, SIRT2, SIRT3 İnhibisyon Testleri

Sentezlenen bileşiklerin *in vitro* SIRT inhibitör etkilerinin belirlenmesinde FLUOR DE LYS® Fluorometric Drug Discovery Kiti (BML-AK555-0001 SIRT1; BML-AK556-0001 SIRT2; BML-AK557-0001 SIRT3, Enzo Life Sciences) üretici firmanın belirlediği protokole uyularak kullanılmıştır. Referans bileşik olarak SIRT inhibitörü suramin ve selektif SIRT1 inhibitörü EX-527 seçilmiştir. Test edilen tüm bileşiklerin DMSO ve/veya SIRT test tamponundaki çözeltileri 100 µM konsantrasyonda taranmıştır. Final konsantrasyonda DMSO miktarı, en fazla %1 olacak şekilde belirlenmiştir. Enzim kitinin çalışma protokolü iki basamaktan oluşmaktadır. İlk basamakta, 96-kuyucuklu mikrolakada test bileşikleri (10 µl/kuyucuk) ile insan rekombinant SIRT enziminin (BML-SE239 SIRT1; BML-SE25 SIRT2; BML-SE270 SIRT3, 15 µl/kuyucuk) 37 °C'de 1 saat süreyle inkübasyonu, süre sonunda NAD⁺ ve FLUOR DE LYS® deasetilaz substratı (BML-KI177 SIRT1; BML-KI179 SIRT2 ve SIRT3) karışımının (25 µl/kuyucuk) ilave edilmesi ve yine 37 °C'de 1 saat süreyle inkübasyonu sonucu maksimum enzim aktivitesi sağlanmıştır. İkinci basamakta ise FLUOR DE LYS® Developer II (BML-KI176) ve 2 mM nikotinamit karışımının (50 µl/kuyucuk) ilavesi ile enzim aktivitesi durdurulmuş, deasetilasyon bağımlı floresan sinyalin oluşması için 37 °C'de 45 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Her bir kuyucuğa ait floresan ışım, eksitasyon 360 nm, emisyon 460 nm dalga boylarında SpectraMax i3x Multi-mode (Molecular Devices) mikrolaka okuyucu cihazı ile ölçülmüştür. Elde edilen değerler, kör kuyucuklarından okunan floresans değerlerine göre normalize edilmiş ve bileşiklerin % inhibisyon değerleri aşağıda verilen eşitliğe (Eş. 3.1) göre hesaplanmıştır. Her bir deney iki defa tekrarlanmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = 1 - \left(\frac{\text{Enzim aktivitesi}_{\text{bileşik}} - \text{Kör}}{\text{Enzim aktivitesi}_{\text{kontrol}} - \text{Kör}} \times 100 \right) \quad (3.1)$$

3.5. *In vitro* Sitotoksite Çalışmaları

SIRT1/2 enzim aktivitesine etkili olduğu tespit edilen bileşiklerin sitotoksik etkileri insan meme kanser hücre hattı MCF-7 üzerinde MTT yöntemiyle [67,68] belirlenmiştir. İnsan meme kanseri hücre hattı MCF-7, %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyerinde 37 °C'de %5 CO₂ hücre inkübatörü içerisinde

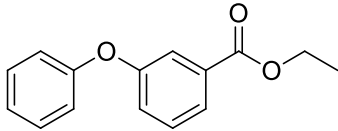
büyütülmüştür. Başlangıç sayısı olarak 5×10^4 hücre/ml olacak şekilde hazırlanan hücre süspansiyonu, 96 gözlü plakaya 180 μ l/göz olacak şekilde ekilmiş ve 37 °C'de %5 CO₂ hücre inkübatöründe 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra, hücreler test edilen bileşiklerin değişik konsantrasyonlardaki (1, 10, 25, 50, 100 and 200 μ M) çözeltileri ile 48 ve 72 saat olmak üzere iki inkübasyon süresince muamele edilmiştir. Süre sonunda hücrelere, 5 mg/ml MTT reajanı ilave edilmiş ve 4 saat boyunca tekrar inkübe edilmiş, devamında çözünmüş formazan kristallerine ait absorbands değerleri, 540 nm dalga boyunda mikroparka okuyucu cihazı (Thermo) ile ölçülmüştür. Elde edilen değerler kullanılarak her bir bileşik için % hücre canlılığı aşağıda verilen eşitliğe (Eş. 3.2) göre hesaplanmış, istatistiksel analizi tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile gerçekleştirilmiştir. Test bileşikleriyle muamele görmeyen hücreler kontrol olarak alınmıştır. Her bir deney üç defa tekrarlanmıştır. Bileşiklerin IC₅₀ değerleri, doz yanıt eğrileri yardımıyla GraphPad Prism 6.0 programı kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Hücre canlılığı} = \frac{\text{Absorbans}_{\text{bileşik}}}{\text{Absorbans}_{\text{kontrol}}} \times 100 \quad (3.2)$$

4. BULGULAR

4.1. Kimyasal Bulgular

Etil 3-fenoksibenzoat (**2a**) [65]



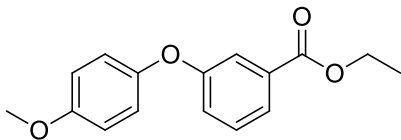
632 μ l (6 mmol) **1a** ve 499 mg (3 mmol) etil 3-hidroksibenzoattan hareketle genel sentez yöntemi 1'e göre sentezlenmiş, petrol eteri:etil asetat (30:1) solvan sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Sarımsı yağ şeklinde bir bileşiktir.

Verim: 618 mg, %85

CAS: 60677-14-7

$C_{15}H_{14}O_3$ için HRMS (m/z): $[M+H]^+$ Hesaplanan: 243,1021; Bulunan: 243,1028

Etil 3-(4-metoksifenoksi)benzoat (**2b**)

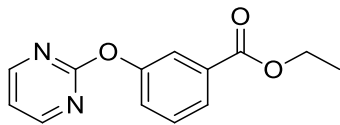


1122 mg (6 mmol) **1b** ve 498 mg (3 mmol) etil 3-hidroksibenzoattan hareketle genel sentez yöntemi 1'e göre sentezlenmiş, petrol eteri:etil asetat (30:1) solvan sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Renksiz yağ şeklinde bir bileşiktir.

Verim: 394 mg, %48

CAS: 773134-61-5

$C_{16}H_{16}O_4$ için HRMS (m/z): $[M+H]^+$ Hesaplanan: 373,1127; Bulunan: 373,1137

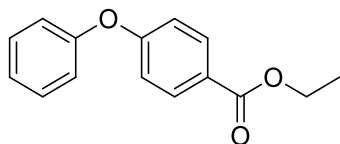
Etil 3-(pirimidin-2-iloksi)benzoat (**2c**)

795 mg (5 mmol) **1c** ve 997 mg (6 mmol) etil 3-hidroksibenzoattan hareketle genel sentez yöntemi 2'ye göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat (80:20) solvan sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Sarımsı yağ şeklinde bir bileşiktir.

Verim: 988 mg, %81

CAS: 1159822-51-1

C₁₃H₁₂N₂O₃ için HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ Hesaplanan: 245,0926; Bulunan: 245,0933

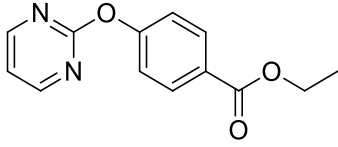
Etil 4-fenoksibenzoat (**2d**) [65]

632 µl (6 mmol) **1a** ve 498 mg (3 mmol) etil 4-hidroksibenzoattan hareketle genel sentez yöntemi 1'e göre sentezlenmiş, petrol eteri:etil asetat (30:1) solvan sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Sarımsı yağ şeklinde bir bileşiktir.

Verim: 393 mg, %54

CAS: 31994-68-0

C₁₅H₁₄O₃ için HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ Hesaplanan: 243,1021; Bulunan: 243,1019

Etil 4-(pirimidin-2-iloksi)benzoat (**2e**)

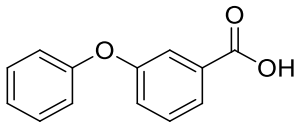
79 mg (0,5 mmol) **1c** ve 100 mg (0,6 mmol) etil 4-hidroksibenzoattan hareketle genel sentez yöntemi 2'ye göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat (70:30) solvan sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz katı bir bileşiktir.

Verim: 97 mg, %79

CAS: 1484643-26-6

Erime derecesi: 86,8-87,5 °C

C₁₃H₁₂N₂O₃ için HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ Hesaplanan: 245,0926; Bulunan: 245,0920

3-Fenoksibenzoik asit (**3a**) [69]

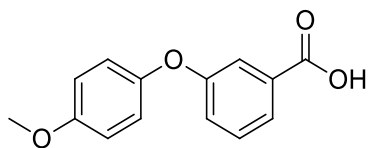
606 mg (2,5 mmol) **2a'**dan hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiştir. Beyaz katı bir bileşiktir.

Verim: 503 mg, %94

CAS: 3739-38-6

Erime derecesi: 147,9-148,3 °C

C₁₃H₁₀O₃ için HRMS (*m/z*): [M+ACN+H]⁺ Hesaplanan: 256,0974; Bulunan: 256,0973

3-(4-Metoksifeniloksi)benzoik asit (**3b**) [64]

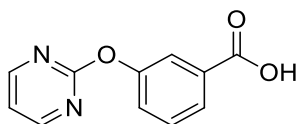
335 mg (1,23 mmol) **2b**'den hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiştir. Beyaz katı bir bileşiktir.

Verim: 267 mg, %89

CAS: 117423-75-3

Erime derecesi: 143,8-144,1 °C

C₁₄H₁₂O₄ için HRMS (*m/z*): [M+ACN+H]⁺ Hesaplanan: 286,1079; Bulunan: 286,1084

3-(Pirimidin-2-iloksi)benzoik asit (**3c**) [70]

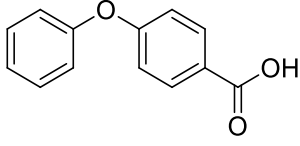
892 mg (3,65 mmol) **2c**'den hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiştir. Beyaz katı bir bileşiktir.

Verim: 442 mg, %56

CAS: 176034-07-4

Erime derecesi: 180,4-181,0 °C

C₁₁H₈N₂O₃ için HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ Hesaplanan: 217,0613; Bulunan: 217,0612

4-Fenoksibenzoik asit (**3d**) [71]

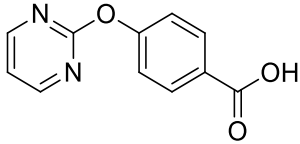
392 mg (1,62 mmol) **2d**'den hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiştir. Beyaz katı bir bileşiktir.

Verim: 305 mg, %89

CAS: 2215-77-2

Erime derecesi: 162,7-163,2 °C

C₁₃H₁₀O₃ için HRMS (*m/z*): [M+ACN+H]⁺ Hesaplanan: 256,0974; Bulunan: 256,0975

4-(Pirimidin-2-iloksi)benzoik asit (**3e**) [71]

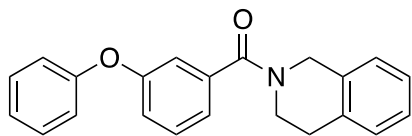
782 mg (3,2 mmol) **2e**'den hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, etanol ile kristallendirilerek saflaştırılmıştır. Beyaz katı bir bileşiktir.

Verim: 436 mg, %63

CAS: 855423-33-5

Erime derecesi: 167,3-167,6 °C

C₁₁H₈N₂O₃ için HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ Hesaplanan: 217,0613; Bulunan: 217,0612

(3,4-Dihidroizokinolin-2(1*H*)-il)-(3-fenoksifenil)metanon (GS01)

171 mg (0,8 mmol) **3a** ve 100 μ l (0,8 mmol) 1,2,3,4-tetrahidroizokinolinden hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat (85:15) solvan sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Sarımsı yağ şeklinde bir bileşiktir.

Verim: 200 mg, %76

CAS: 380211-07-4

C₂₂H₁₉NO₂ için HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ Hesaplanan: 330,1494; Bulunan: 330,1494

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 2,83 (1H, br s), 2,96 (1H, br s); 3,63 (1H, br s); 3,96 (1H, br s); 4,57 (1H, br s); 4,86 (1H, br s); 6,91-6,94 (1H, m); 7,03-7,20 (9H, m); 7,33-7,40 (3H, m) ppm.

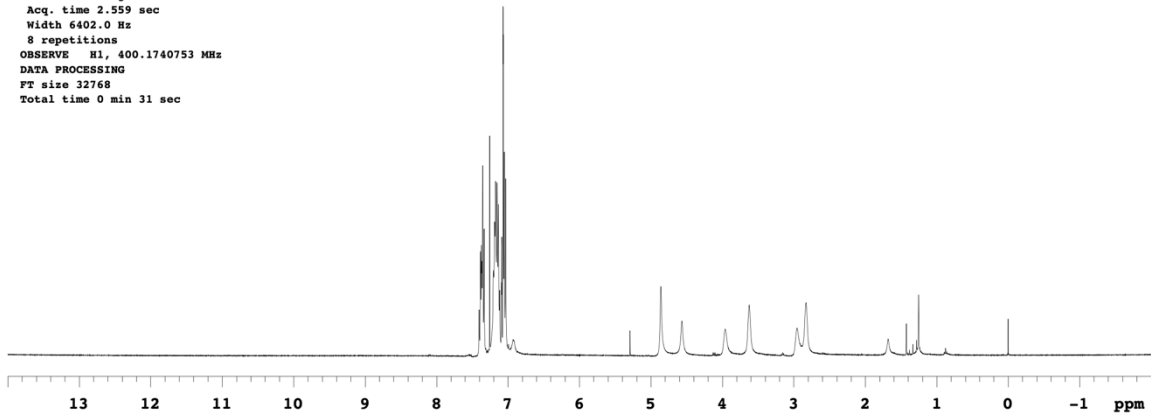
¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 29,55; 44,82; 45,27; 49,71; 116,67; 117,13; 119,40; 119,77; 121,32; 123,87; 125,89; 126,62; 128,66; 128,98; 129,92; 130,07; 132,83; 133,75; 137,74; 156,46; 157,67 ppm.

Sample Name:
Ala5
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrSYS/data
Sample directory:
Ala5_20190716_01
FidFile: PROTON_02

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: cdcl3
Data collected on: Jul 16 2019

Temp. 24.0 C / 297.1 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

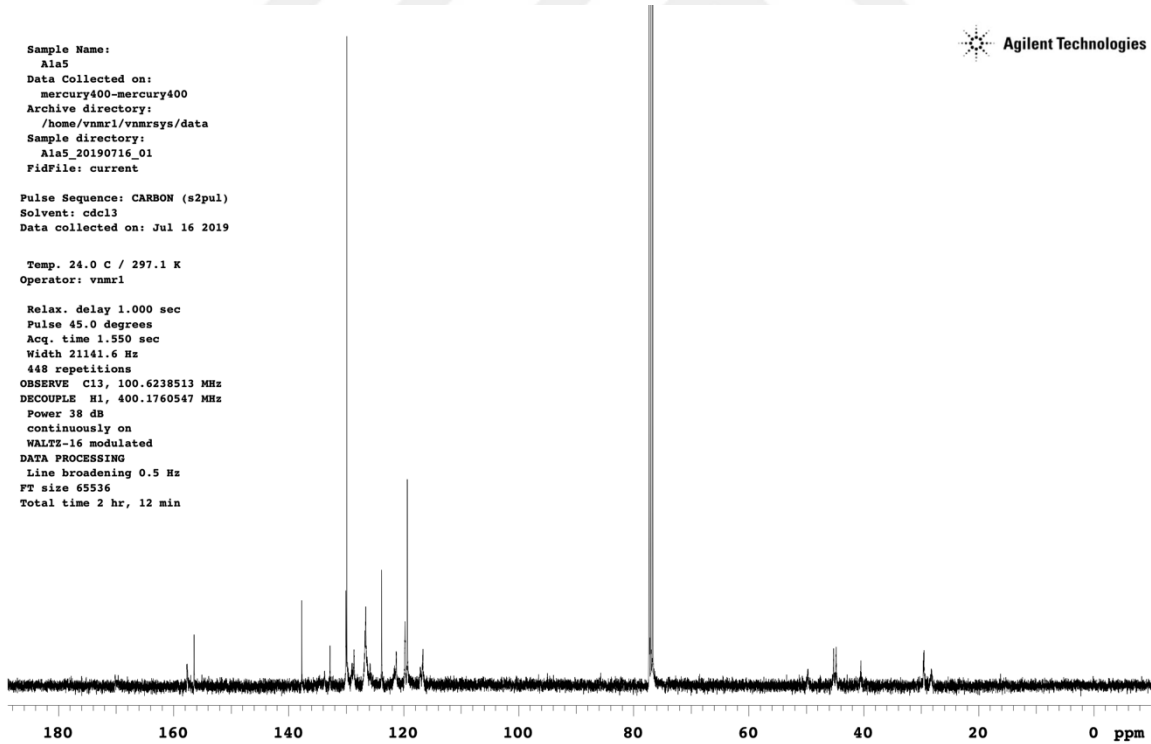


Sample Name:
Ala5
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrSYS/data
Sample directory:
Ala5_20190716_01
FidFile: current

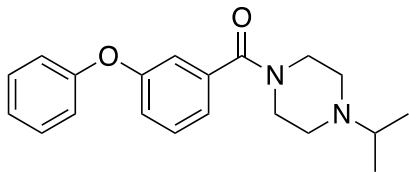
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: cdcl3
Data collected on: Jul 16 2019

Temp. 24.0 C / 297.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.550 sec
Width 21141.6 Hz
448 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 2 hr, 12 min



Şekil 4.1. Bileşik **GS01**'in ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

(4-izopropilpiperazin-1-il)(3-fenoksifenil)metanon (GS02)

171 mg (0,8 mmol) **3a** ve 115 μ l (0,8 mmol) 1-izopropilpiperazinden hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, DCM:metanol (98:2) solvan sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Sarımsı yağ şeklinde bir bileşiktir.

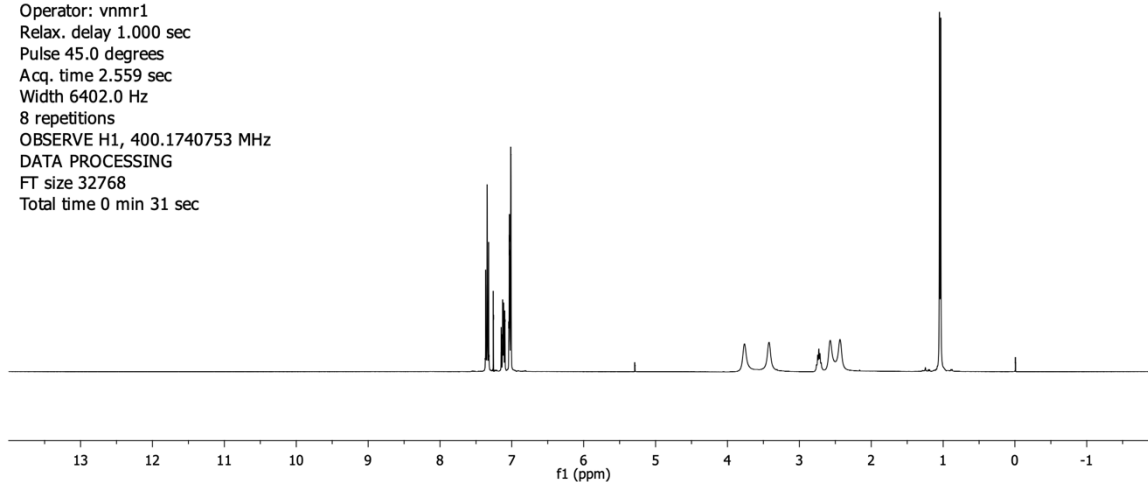
Verim: 190 mg, %73

C₂₀H₂₄N₂O₂ için HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ Hesaplanan: 325,1916; Bulunan: 325,1914

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1,04 (6H, d, *J*=6,4 Hz); 2,44 (2H, br s); 2,57 (2H, br s); 2,71-2,75 (1H, m); 3,42 (2H, br s); 3,76 (2H, br s); 7,01-7,04 (4H, m); 7,10-7,15 (2H, m); 7,35 (3H, t, *J*=8,0 Hz) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 18,27; 42,31; 47,89; 48,24; 49,00; 54,64; 117,01; 119,35; 119,55; 121,54; 123,83; 129,89; 129,96; 137,51; 156,46; 157,56; 169,35 ppm.

Sample Name:
 A1a7
 Data Collected on:
 mercury400-mercury400
 Archive directory:
 /home/vnmr1/vnmrsys/data
 Sample directory:
 A1a7_20190916_01
 FidFile: PROTON_02
 Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
 Solvent: cdd3
 Data collected on: Nov 7 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
 8 repetitions
 OBSERVE H1, 400.1740753 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32768
 Total time 0 min 31 sec



Sample Name:
 Ala7
 Data Collected on:
 mercury400-mercury400
 Archive directory:
 /home/vnmr1/vnmrsys/data
 Sample directory:
 Ala7_20190716_01
 FidFile: CARBON_01

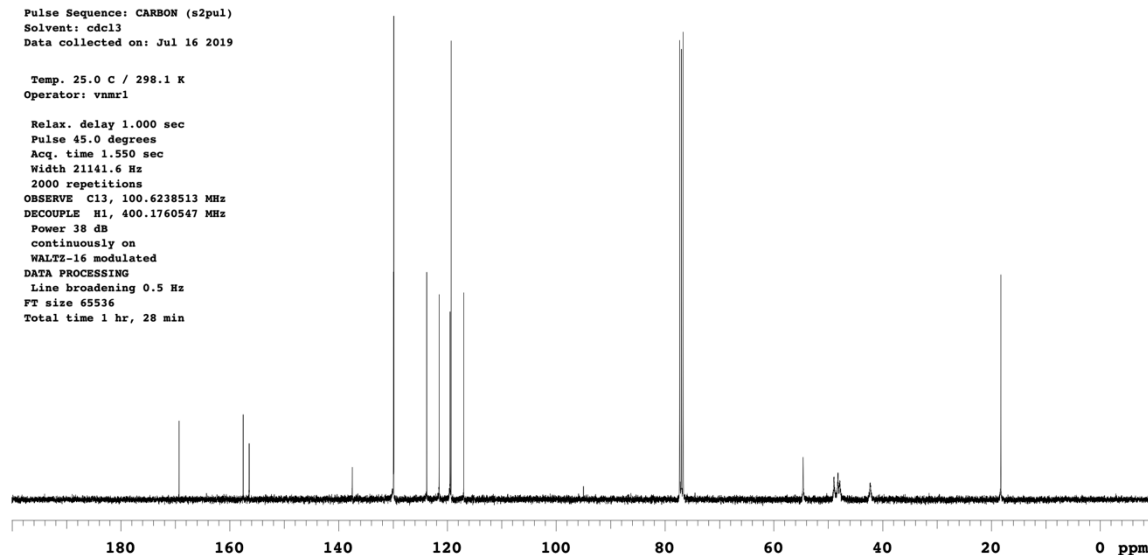


Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
 Solvent: cdcl3
 Data collected on: Jul 16 2019

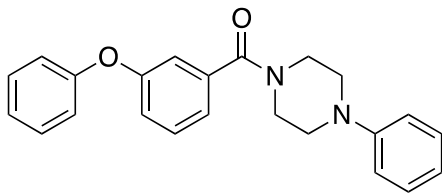
Temp. 25.0 C / 298.1 K
 Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 1.550 sec
 Width 21141.6 Hz
 2000 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, 28 min



Şekil 4.2. Bileşik **GS02**'nin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

(3-Fenoksifenil)(4-fenilpiperazin-1-il)metanon (GS03)

171 mg (0,8 mmol) **3a** ve 122 μ l (0,8 mmol) 1-fenilpiperazinden hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat (60:40) solvan sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Renksiz yağ şeklinde bir bileşiktir.

Verim: 248 mg, %92

CAS: 863761-56-2

C₂₃H₂₂N₂O₂ için HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ Hesaplanan: 359,1760; Bulunan: 359,1772

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 3,11 (2H, br s); 3,23 (2H, br s); 3,58 (2H, br s); 3,90 (2H, br s); 6,89-6,93 (3H, m); 7,03-7,08 (4H, m); 7,12-7,16 (2H, m); 7,26-7,30 (2H, m); 7,34-7,40 (3H, m) ppm.

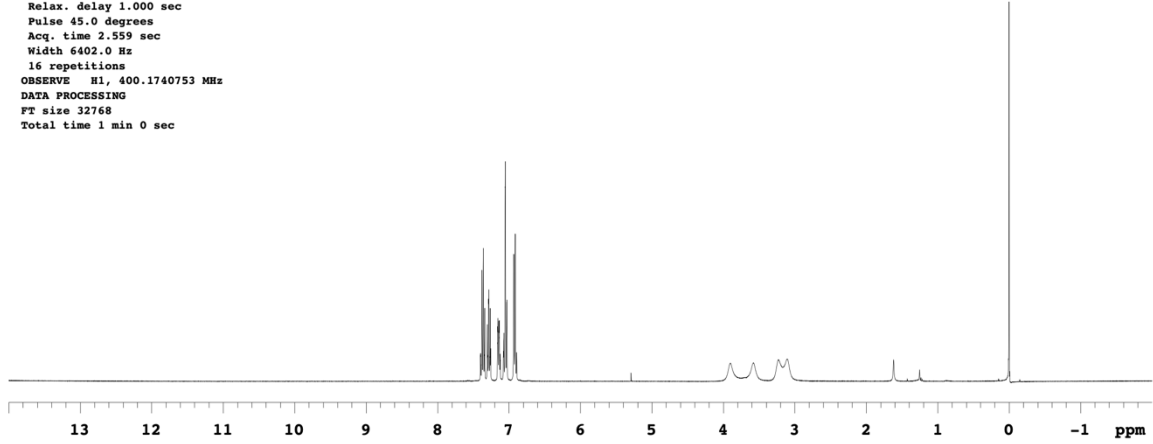
¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 42,05; 47,45; 49,89; 116,75; 116,99; 119,40; 119,73; 120,67; 121,54; 123,92; 129,26; 129,93; 130,07; 137,26; 150,91; 156,41; 157,70; 169,58 ppm.

Sample Name:
Ala6
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
Ala6_20190714_01
FidFile: PROTON_01

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: cdcl3
Data collected on: Jul 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, 400.1740753 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 1 min 0 sec

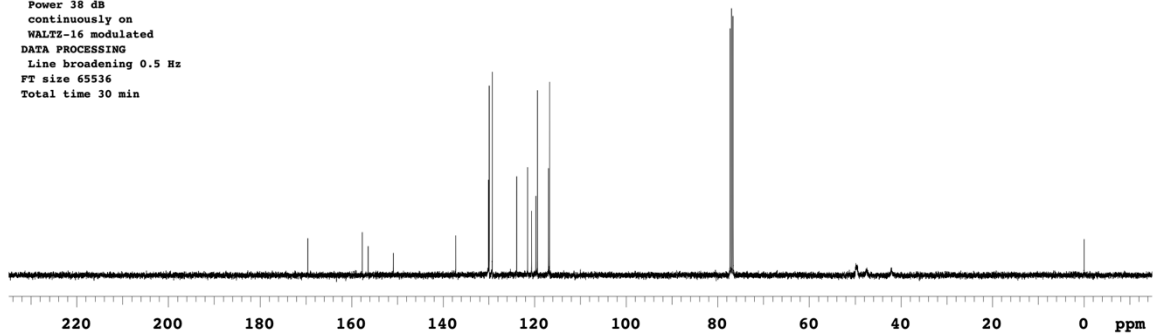


Sample Name:
Ala6
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
Ala6_20190714_01
FidFile: CARBON_01

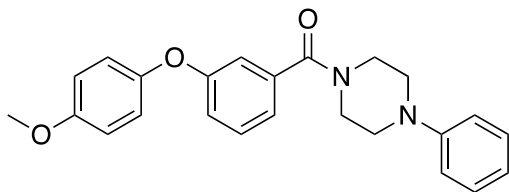
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: cdcl3
Data collected on: Jul 14 2019

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
756 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 30 min



Şekil 4.3. Bileşik **GS03**'ün ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

(3-(4-Metoksifenoksi)fenil)(4-fenilpiperazin-1-il)metanon (GS04)

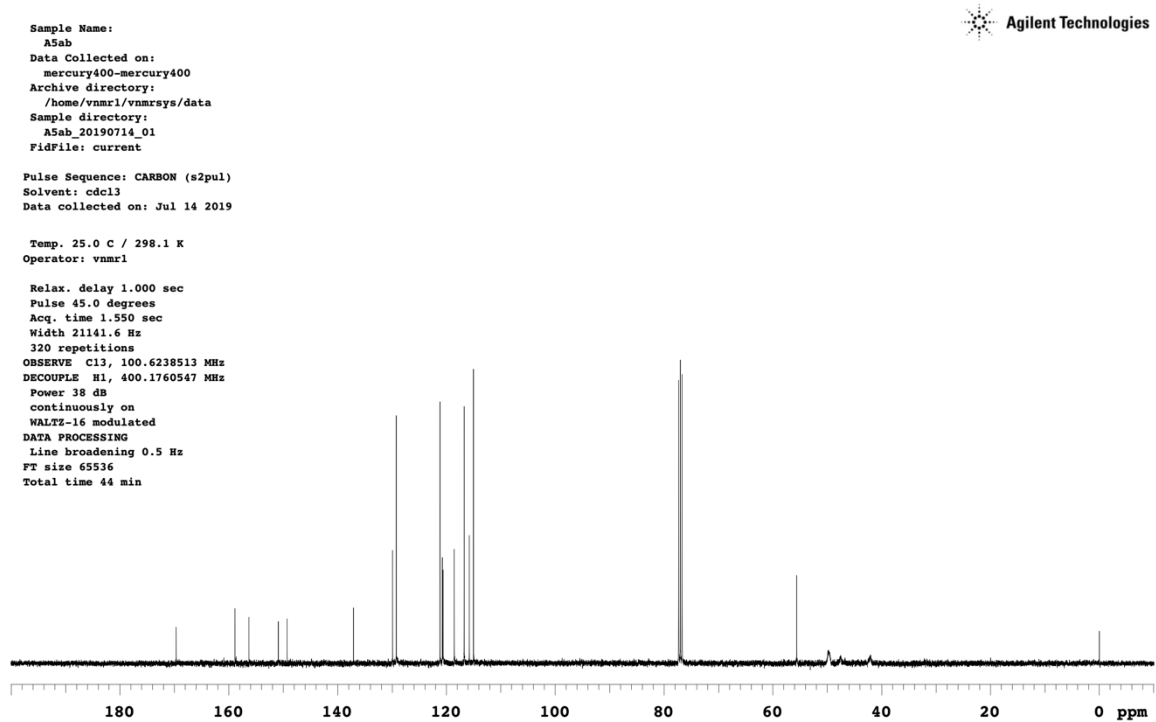
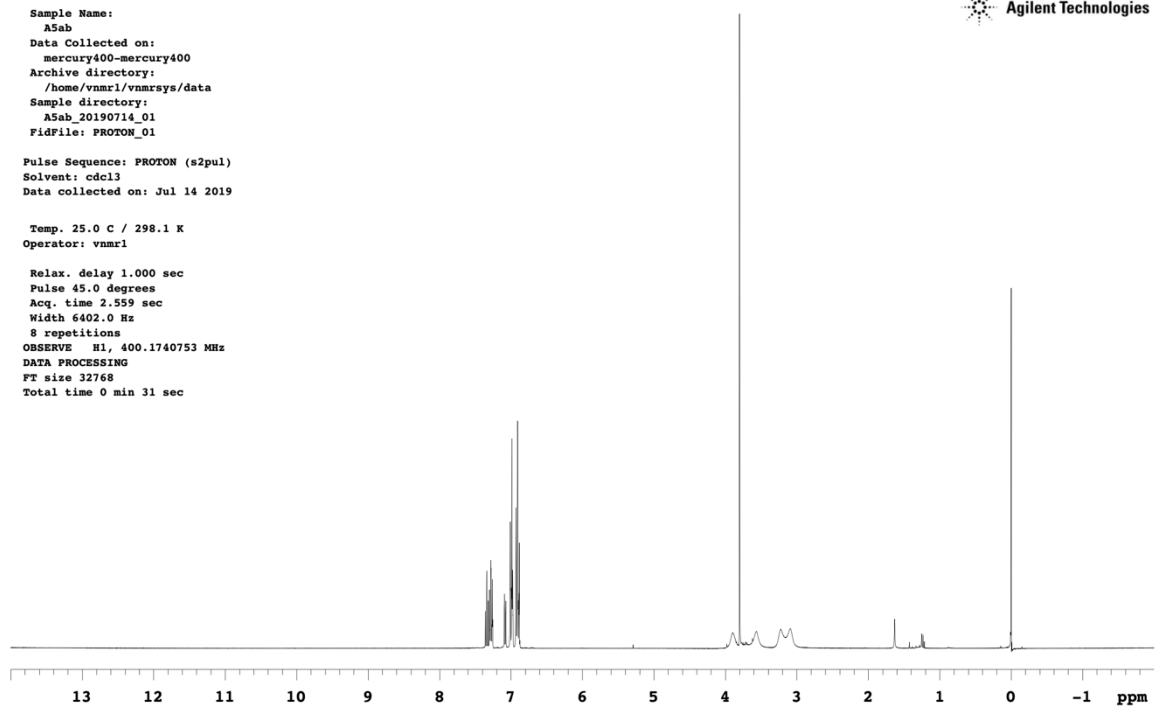
171 mg (0,7 mmol) **3b** ve 107 μ l (0,7 mmol) 1-fenilpiperazinden hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat gradient akış kullanılarak otomatik flash kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Sarımsı yağ şeklinde bir bileşiktir.

Verim: 239 mg, %88

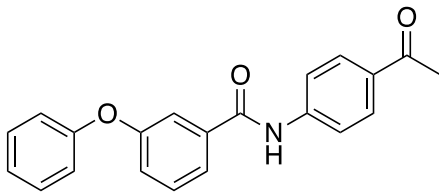
C₂₄H₂₄N₂O₃ için HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ Hesaplanan: 389,1865; Bulunan: 389,1866

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 3,10 (2H, br s); 3,23 (2H, br s); 3,57 (2H, br s); 3,80 (3H, s); 3,90 (2H, br s); 6,88-6,93 (5H, m); 6,97-7,01 (4H, m); 7,08 (1H, d, *J*=7,6 Hz); 7,26-7,30 (2H, m); 7,34 (1H, t, *J*=8,0 Hz) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 42,12; 47,56; 49,81; 55,64; 115,02; 115,80; 116,74; 118,60; 120,65; 120,78; 121,21; 129,25; 129,93; 137,11; 149,31; 150,92; 156,32; 158,88; 169,69 ppm.



Şekil 4.4. Bileşik **GS04**'ün ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(4-Asetilfenil)-3-fenoksibenzamit (GS05)

107 mg (0,5 mmol) **3a** ve 68 mg (0,5 mmol) 4'-aminoasetofenondan hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, etanol ile kristallendirilerek saflaştırılmıştır. Beyaz katı bir bileşiktir.

Verim: 110 mg, %67

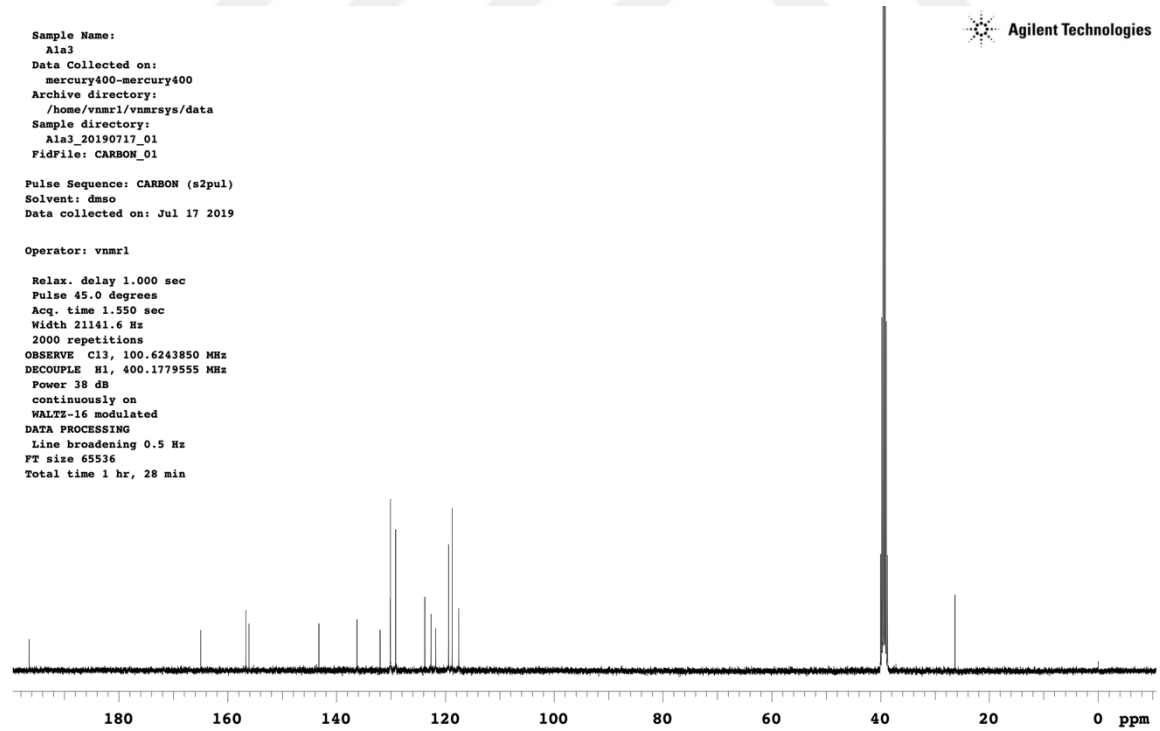
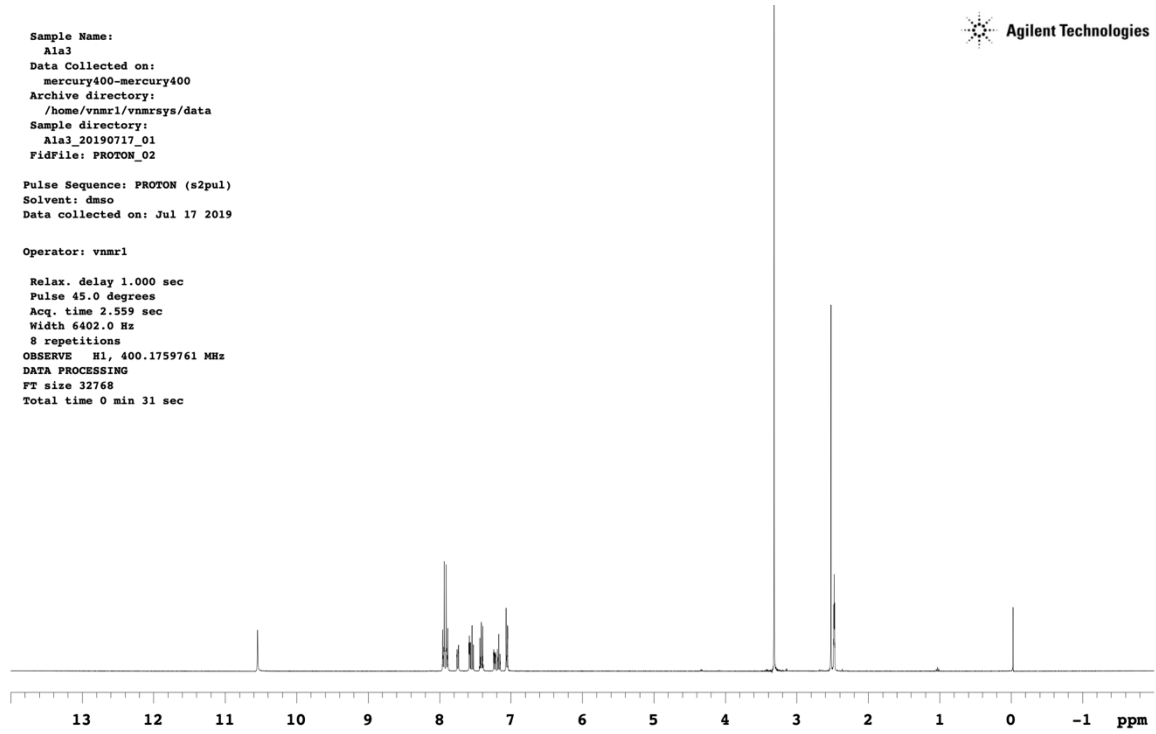
CAS: 733034-83-8

Erime derecesi: 155,0-155,4 °C

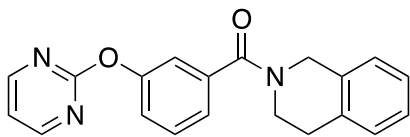
C₂₁H₁₇NO₃ için HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ Hesaplanan: 332,1287; Bulunan: 332,1291

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2,52 (3H, s); 7,04-7,07 (2H, m); 7,17 (1H, t, *J*=7,4 Hz); 7,23 (1H, dd, *J*=8,0 ve 2,4 Hz); 7,39-7,43 (2H, m); 7,55 (1H, t, *J*=8,0 Hz); 7,58 (1H, t, *J*=2,0 Hz); 7,75 (1H, dt, *J*=8,4 ve 1,4 Hz); 7,89-7,96 (4H, m); 10,55 (1H, br s) ppm.

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 26,38; 117,57; 118,79; 119,45; 121,81; 122,68; 123,81; 129,17; 130,12; 130,16; 132,03; 136,27; 143,27; 156,12; 156,70; 164,98; 196,51 ppm.



Şekil 4.5. Bileşik **GS05**'in ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

(3,4-Dihidroizokinolin-2(1*H*)-il)(3-(pirimidin-2-iloksi)fenil)metanon (GS06)

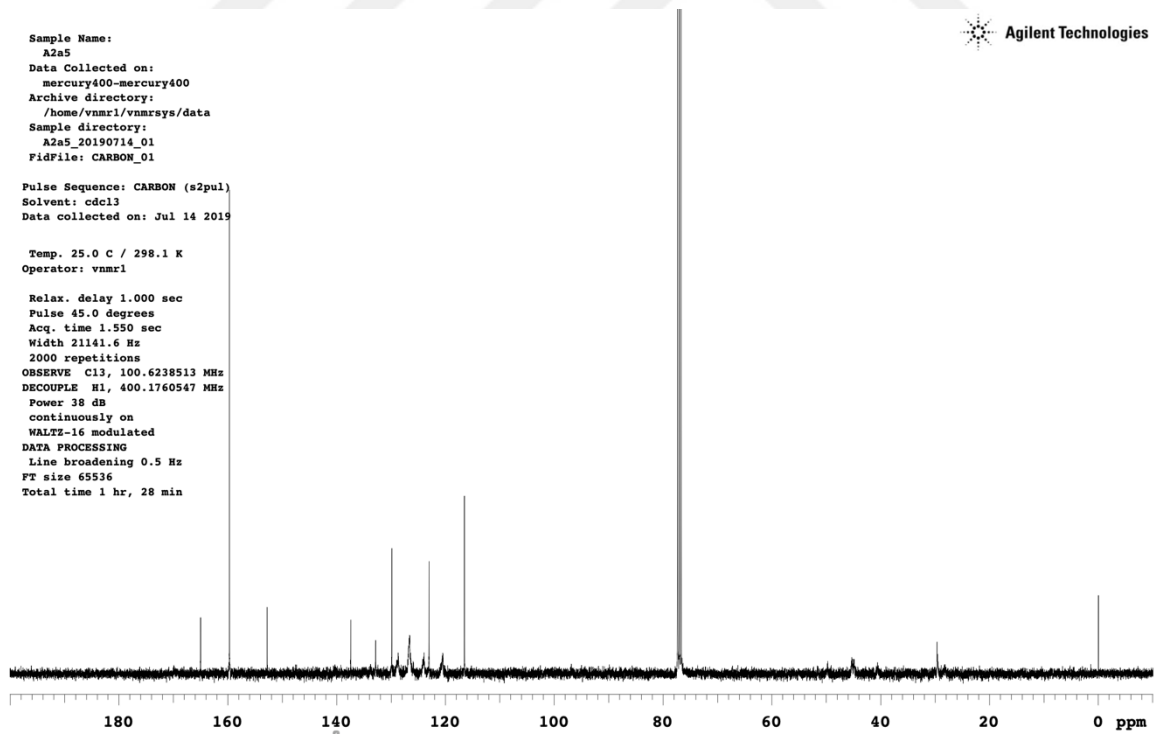
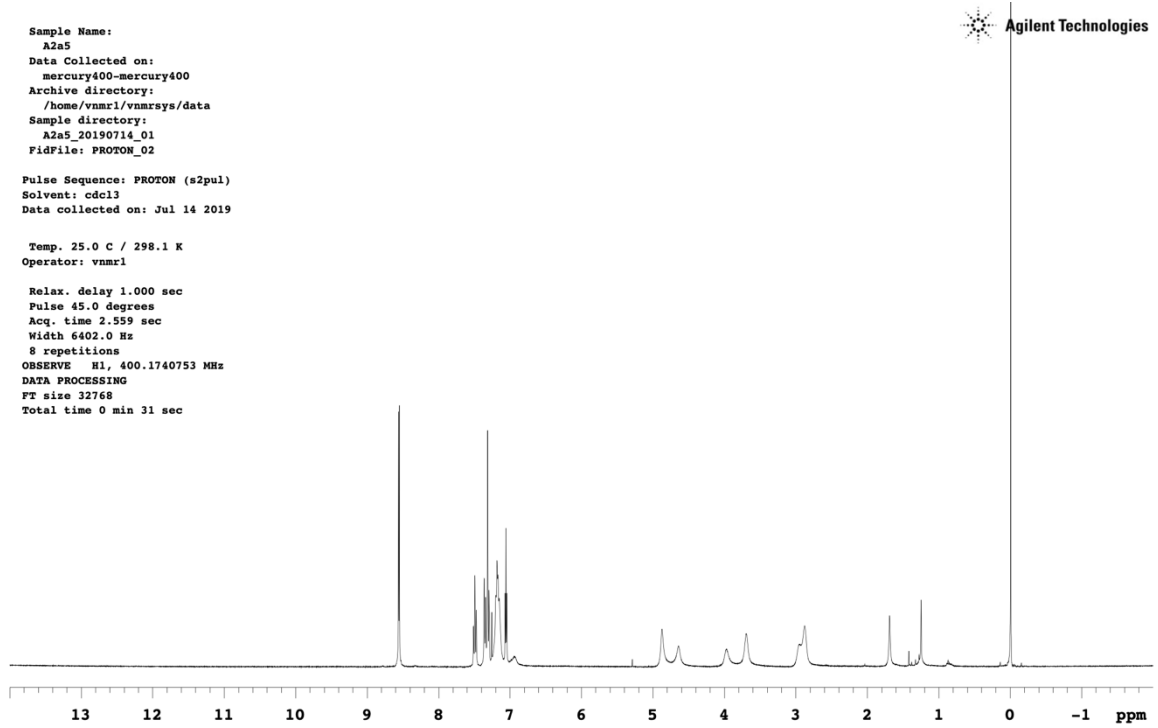
160 mg (0,74 mmol) **3c** ve 93 µl (0,74 mmol) 1,2,3,4-tetrahidroizokinolinden hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, DCM:etil asetat (80:20) solvan sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Sarımsı yağ şeklinde bir bileşiktir.

Verim: 194 mg, %79

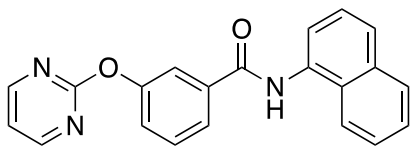
C₂₀H₁₇N₃O₂ için HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ Hesaplanan: 332,1399; Bulunan: 332,1403

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 2,88 (1H, br s); 2,96 (1H, br s); 3,70 (1H, br s); 3,97 (1H, br s); 4,64 (1H, br s); 4,87 (1H, br s); 7,06 (1H, t, *J*=4,6 Hz); 7,15-7,36 (7H, m); 7,49 (1H, t, *J*=7,8 Hz); 8,55 (2H, d, *J*=4,8 Hz) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 29,68; 44,96; 45,35; 49,76; 116,50; 120,51; 123,03; 123,95; 126,64; 128,71; 129,88; 132,85; 137,43; 152,79; 159,72; 165,03 ppm.



Şekil 4.6. Bileşik **GS06**'nın ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(Naftalen-1-il)-3-(pirimidin-2-iloksi)benzamid (**GS07**)

173 mg (0,8 mmol) **3c** ve 108 mg (0,8 mmol) 1-naftilaminden hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, 2-propanol ile kristallendirilerek saflaştırılmıştır. Beyaz katı bir bileşiktir.

Verim: 109 mg, %40

Erime derecesi: 132,0-132,5 °C

C₂₁H₁₅N₃O₂ için HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ Hesaplanan: 342,1243; Bulunan: 342,1245

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 7,29 (1H, t, *J*=4,8 Hz); 7,46-7,48 (1H, m); 7,52-7,65 (5H, m); 7,85 (1H, d, *J*=7,6 Hz); 7,90 (1H, t, *J*=2,0 Hz); 7,95-8,00 (3H, m); 8,67 (2H, d, *J*=4,4 Hz); 10,46 (1H, br s) ppm.

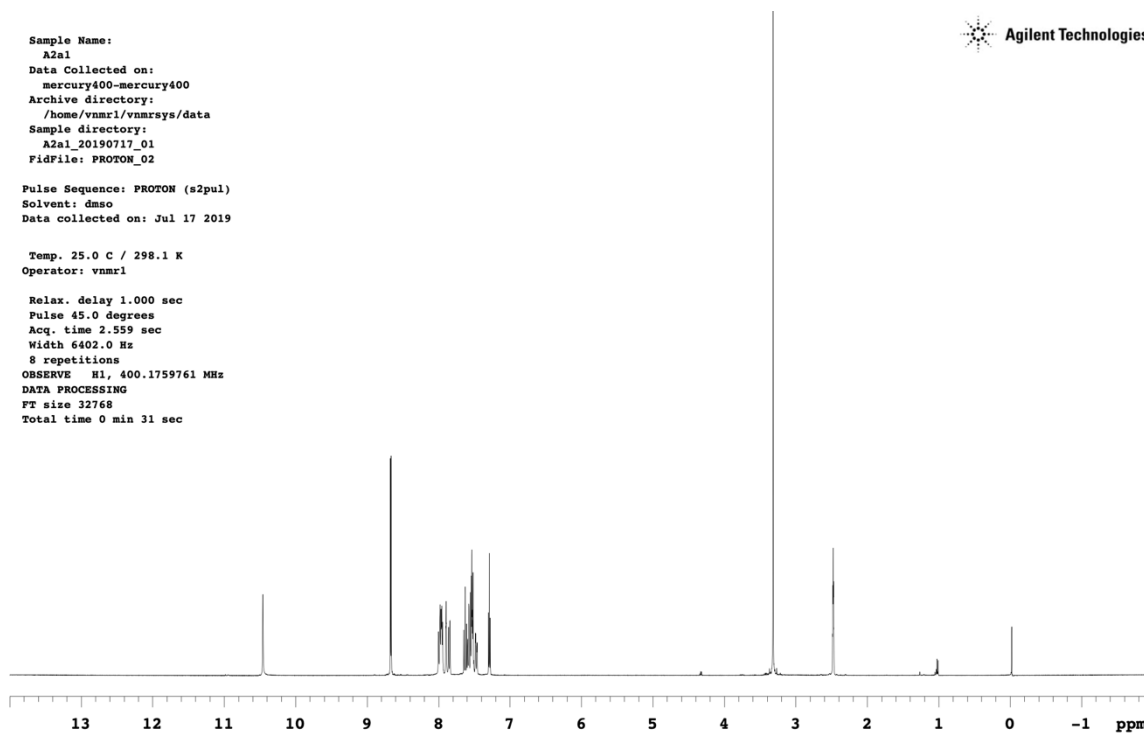
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 116,71; 117,17; 120,86; 120,93; 124,65; 124,84; 125,12; 126,39; 127,41; 127,44; 128,15; 129,87; 130,04; 133,27; 136,41; 136,58; 152,75; 160,15; 164,63; 164,68 ppm.

Sample Name:
A2a1
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
A2a1_20190717_01
FidFile: PROTON_02

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Jul 17 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
8 repetitions
OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min 31 sec

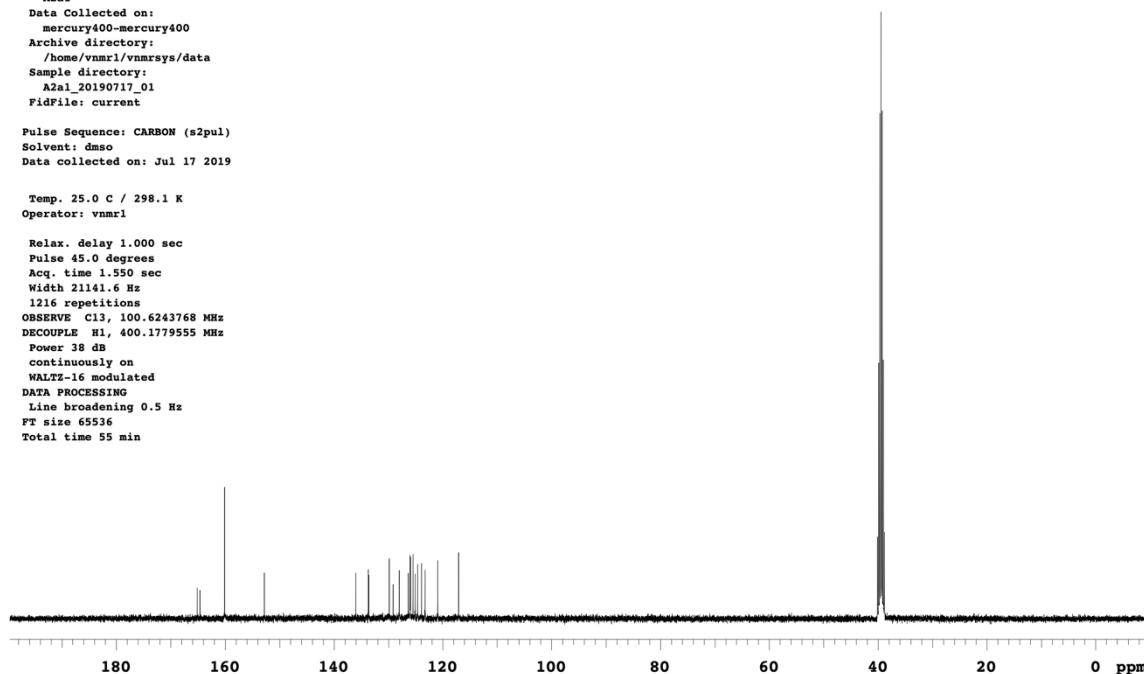


Sample Name:
A2a1
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
A2a1_20190717_01
FidFile: current

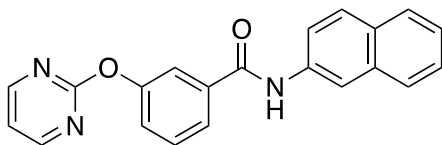
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Jul 17 2019

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
1216 repetitions
OBSERVE C13, 100.6243768 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 4.7. Bileşik **GS07**'nin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(Naftalen-2-il)-3-(pirimidin-2-iloksi)benzamid (GS08)

173 mg (0,8 mmol) **3c** ve 108 mg (0,8 mmol) 2-naftilaminden hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, 2-propanol ile kristallendirilerek saflaştırılmıştır. Beyaz katı bir bileşiktir.

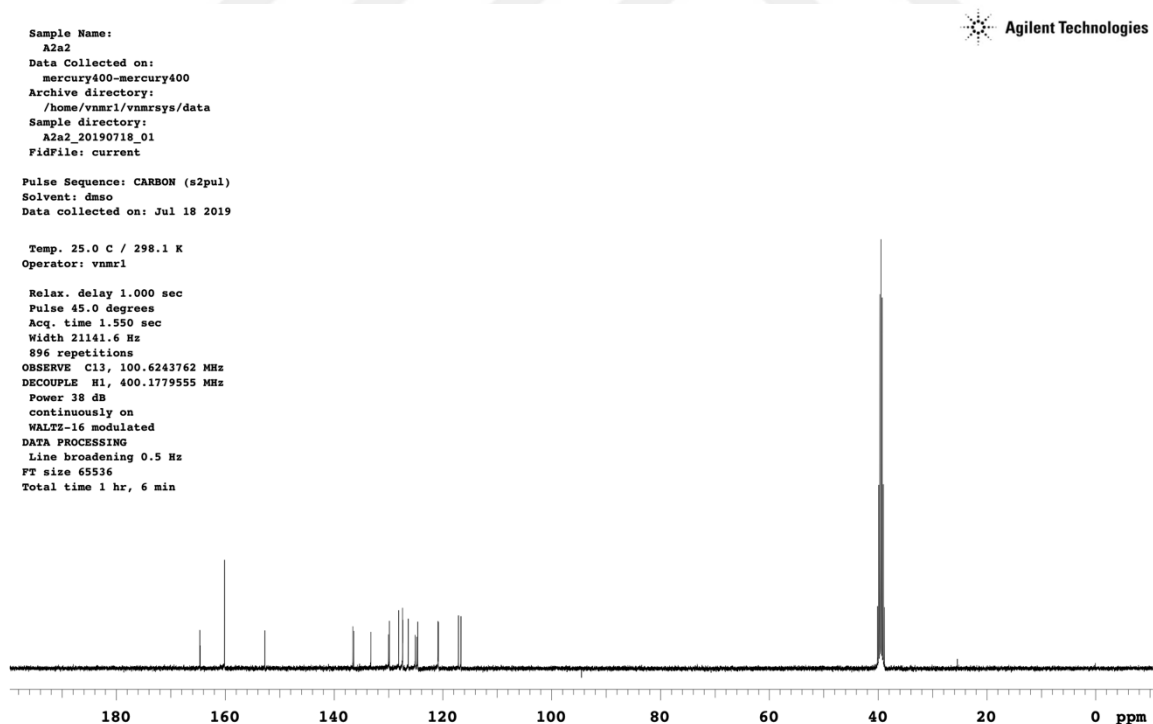
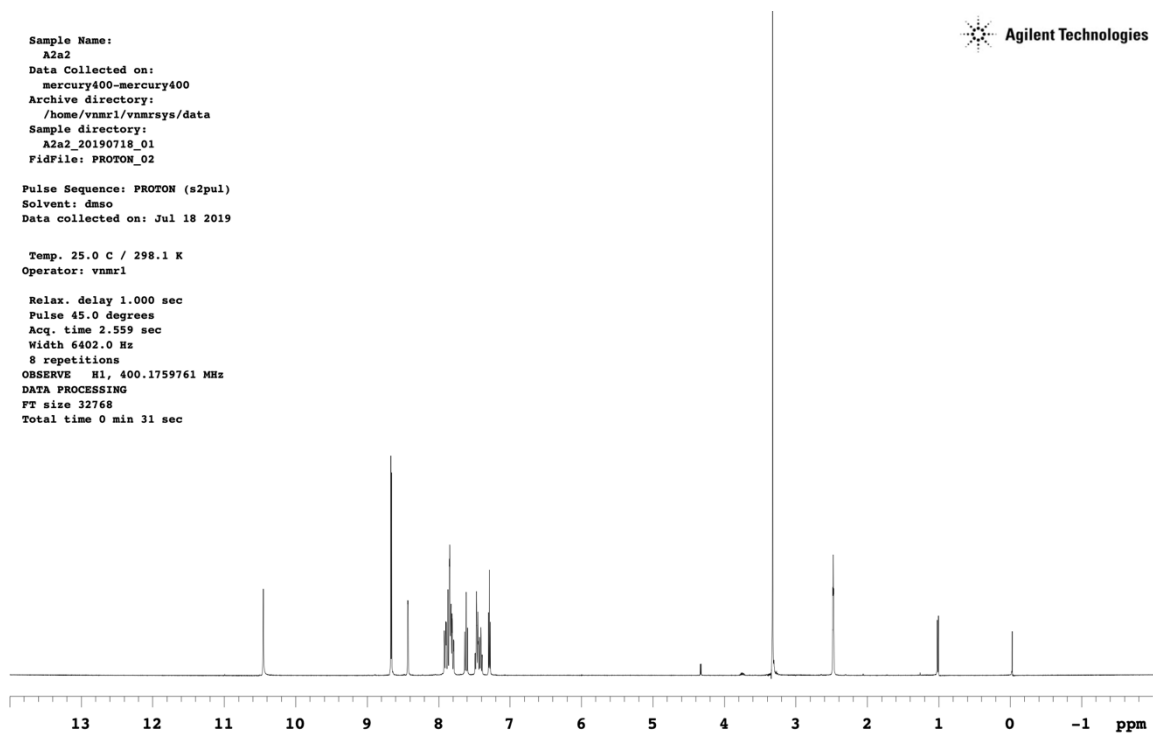
Verim: 166 mg, %61

Erime derecesi: 173,2-175,2 °C

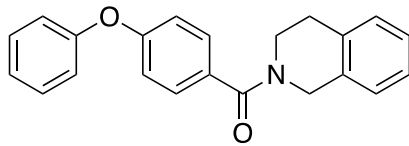
C₂₁H₁₅N₃O₂ için HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ Hesaplanan: 342,1243; Bulunan: 342,1238

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 7,29 (1H, t, *J*=5,0 Hz); 7,39-7,49 (3H, m); 7,61 (1H, t, *J*=7,8 Hz); 7,79-7,92 (6H, m); 8,43 (1H, d, *J*=1,6 Hz); 8,67 (2H, d, *J*=4,8 Hz); 10,46 (1H, br s) ppm.

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 116,71; 117,17; 120,86; 120,93; 124,65; 124,84; 125,12; 126,39; 127,41; 127,44; 128,15; 129,87; 130,04; 133,27; 136,41; 135,58; 152,75; 160,15; 164,63; 164,68 ppm.



Şekil 4.8. Bileşik **GS08**'in ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

(3,4-Dihidroizokinolin-2(1*H*)-il)(4-fenoksifenil)metanon (GS09)

150 mg (0,7 mmol) **3d** ve 88 μ l (0,7 mmol) 1,2,3,4 tetrahidroizokinolinden hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat (85:15) solvan sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Renksiz yağ şeklinde bir bileşiktir.

Verim: 196 mg, %85

CAS: 476298-18-7

C₂₂H₁₉NO₂ için HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ Hesaplanan: 330,1494; Bulunan: 330,1490

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 2,93 (2H, br s); 3,69-3,95 (2H, m); 4,69-4,85 (2H, m); 7,01-7,07 (4H, m); 7,14-7,19 (5H, m); 7,36-7,40 (2H, m); 7,45 (2H, d, *J*=8,8 Hz) ppm.

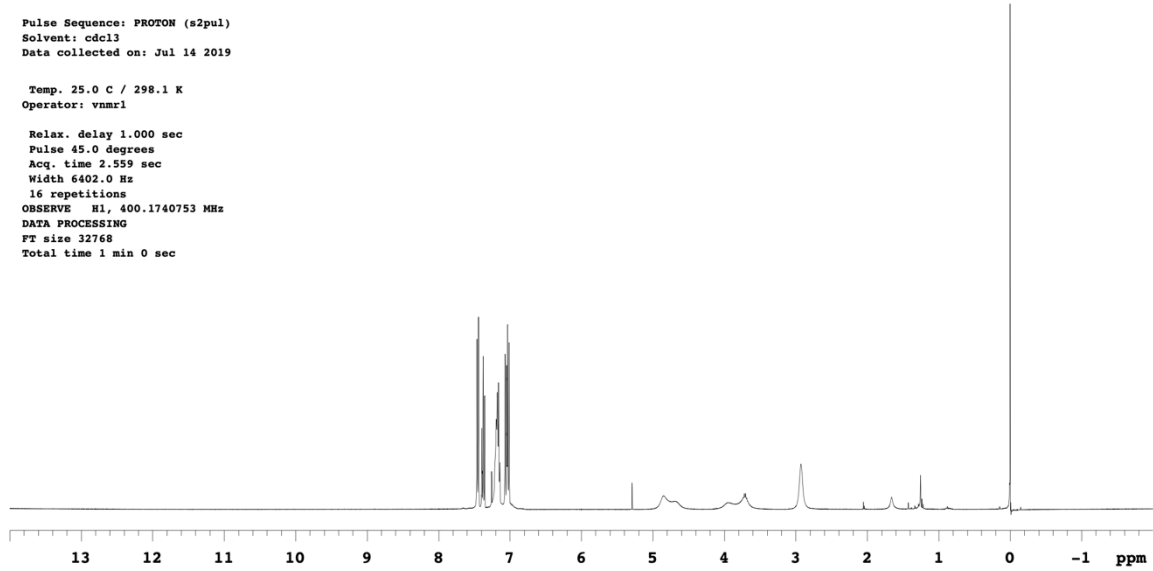
¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 29,68; 45,69; 46,62; 118,05; 119,60; 124,03; 126,50; 126,71; 129,07; 129,93; 130,48; 133,01; 156,23; 158,98 ppm.

Sample Name:
Alb5
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
Alb5_20190714_01
FidFile: PROTON_01

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: cdc13
Data collected on: Jul 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, 400.1740753 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 1 min 0 sec

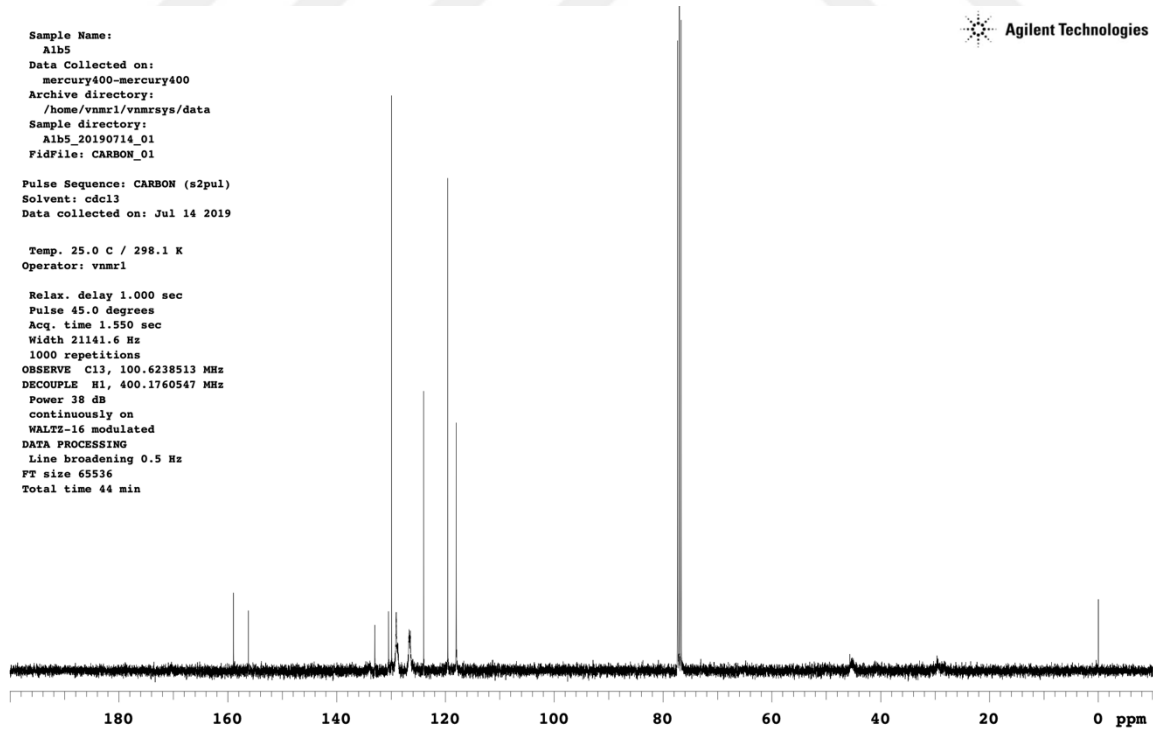


Sample Name:
Alb5
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
Alb5_20190714_01
FidFile: CARBON_01

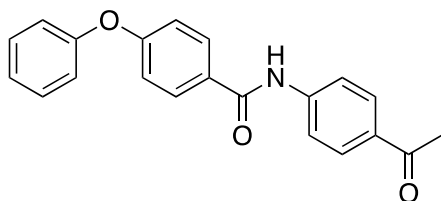
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: cdc13
Data collected on: Jul 14 2019

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
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 4.9. Bileşik **GS09**'un ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(4-Asetilfenil)-4-fenoksibenzamit (GS10)

101mg (0,47 mmol) **3d** ve 64 mg (0,47 mmol) 4'-aminoasetofenondan hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, aseton ile kristallendirilerek saflaştırılmıştır. Beyaz katı bir bileşiktir.

Verim: 78 mg, %50

CAS: 723755-90-6

Erime derecesi: 212,4-212,8 °C

C₂₁H₁₇NO₃ için HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ Hesaplanan: 332,1287; Bulunan: 332,1284

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2,53 (3H, s); 7,07-7,11 (4H, m); 7,21 (1H, t, *J*=7,4 Hz); 7,44 (2H, t, *J*=8,0 Hz); 7,90-8,00 (6H, m); 10,47 (1H, s) ppm.

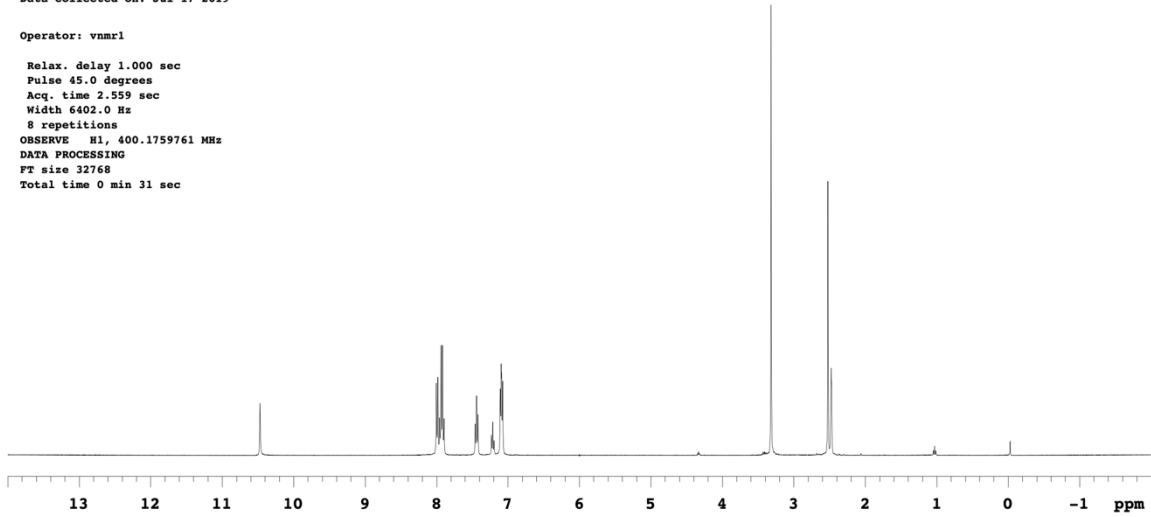
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 26,46; 117,40; 119,38; 119,62; 124,47; 129,04; 129,28; 130,15; 130,30; 131,92; 143,67; 155,44; 160,07; 165,15; 196,58 ppm.

Sample Name:
Alb3
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
Alb3_20190717_01
FidFile: PROTON_02

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Jul 17 2019

Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.559 sec
Width 6402.0 Hz
8 repetitions
OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min 31 sec

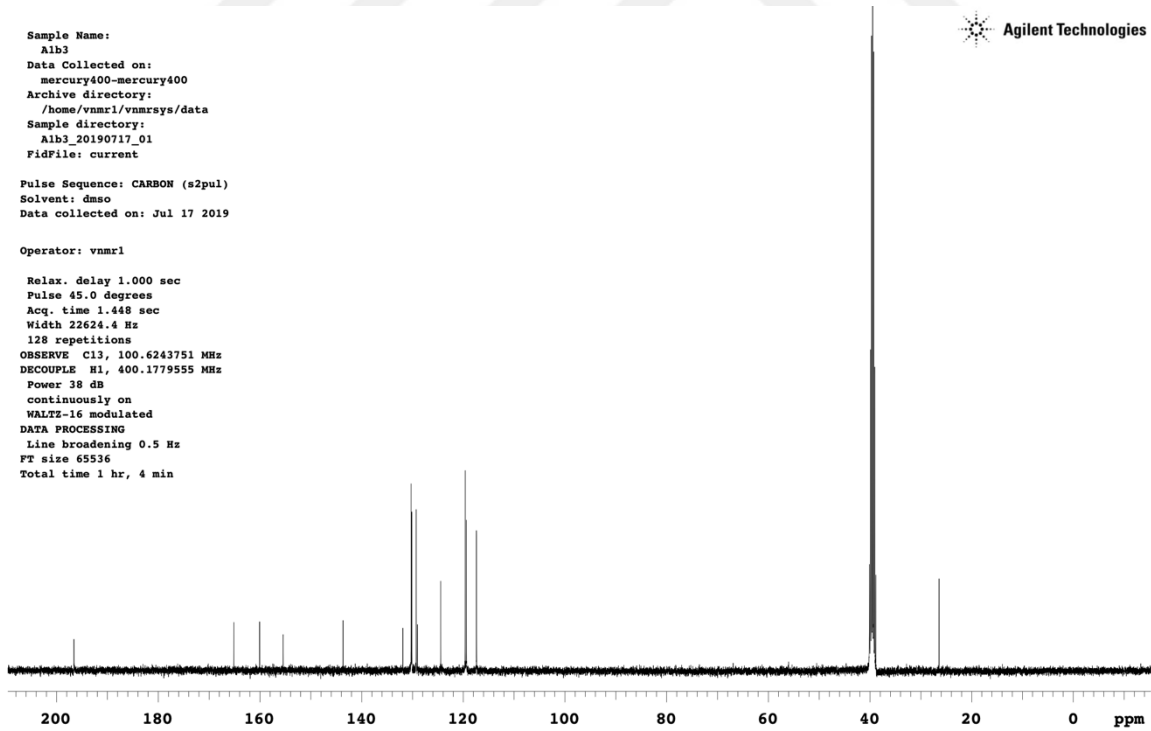


Sample Name:
Alb3
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
Alb3_20190717_01
FidFile: current

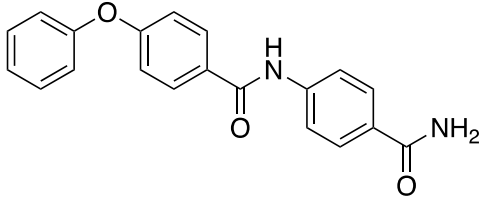
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Jul 17 2019

Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.448 sec
Width 22624.4 Hz
128 repetitions
OBSERVE C13, 100.6243751 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, 4 min



Şekil 4.10. Bileşik **GS010**'un ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(4-Karbomoilfenil)-4-fenoksibenzamit (GS11)

214 mg (1 mmol) **3d** ve 136 mg (1 mmol) 4-aminobenzamitten hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş; su, DCM ve etil asetat ile yıkanarak saflaştırılmıştır. Beyaz katı bir bileşiktir.

Verim: 272 mg, %82

CAS: 794577-49-4

Erime derecesi: > 300 °C

C₂₀H₁₆N₂O₃ için HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ Hesaplanan: 333,1239; Bulunan: 333,1243

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 7,07-7,10 (4H, m); 7,19-7,22 (2H, m); 7,43 (2H, t, *J*=7,6 Hz); 7,81-7,87 (5H, m); 7,99 (2H, d, *J*=8,8 Hz); 10,33 (1H, br s) ppm.

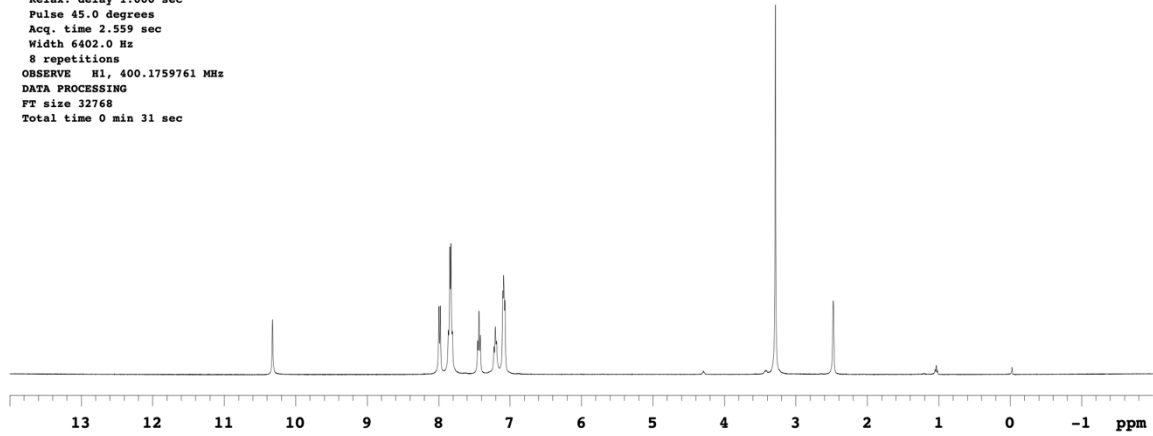
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 117,42; 119,29; 119,59; 124,43; 128,21; 129,06; 129,24; 130,06; 130,29; 141,89; 155,49; 159,95; 164,99; 167,40 ppm.

Sample Name:
Alb4
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
Alb4_20190717_01
FidFile: PROTON_01

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Jul 17 2019

Temp. 35.0 C / 308.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.559 sec
Width 6402.0 Hz
8 repetitions
OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min 31 sec

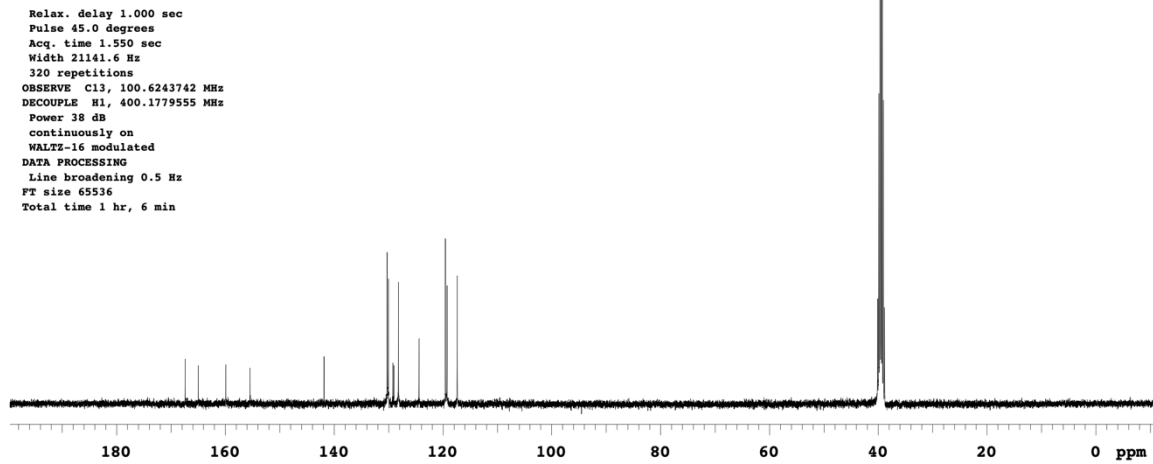


Sample Name:
Alb4
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
Alb4_20190717_01
FidFile: current

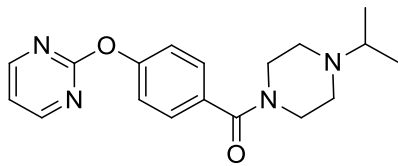
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Jul 17 2019

Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.550 sec
Width 21141.6 Hz
320 repetitions
OBSERVE C13, 100.6243742 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, 6 min



Şekil 4.11. Bileşik **GS011**'in ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

(4-izopropilpiperazin-1-il)(4-(pirimidin-2-iloksi)fenil)metanon (GS12)

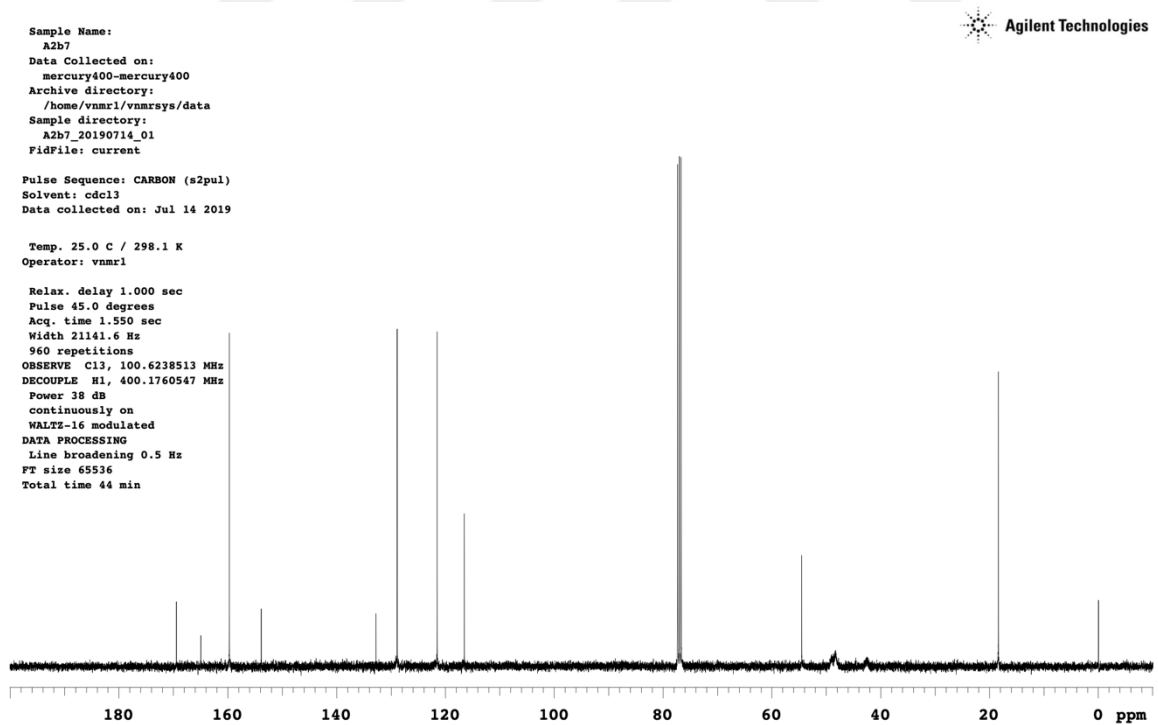
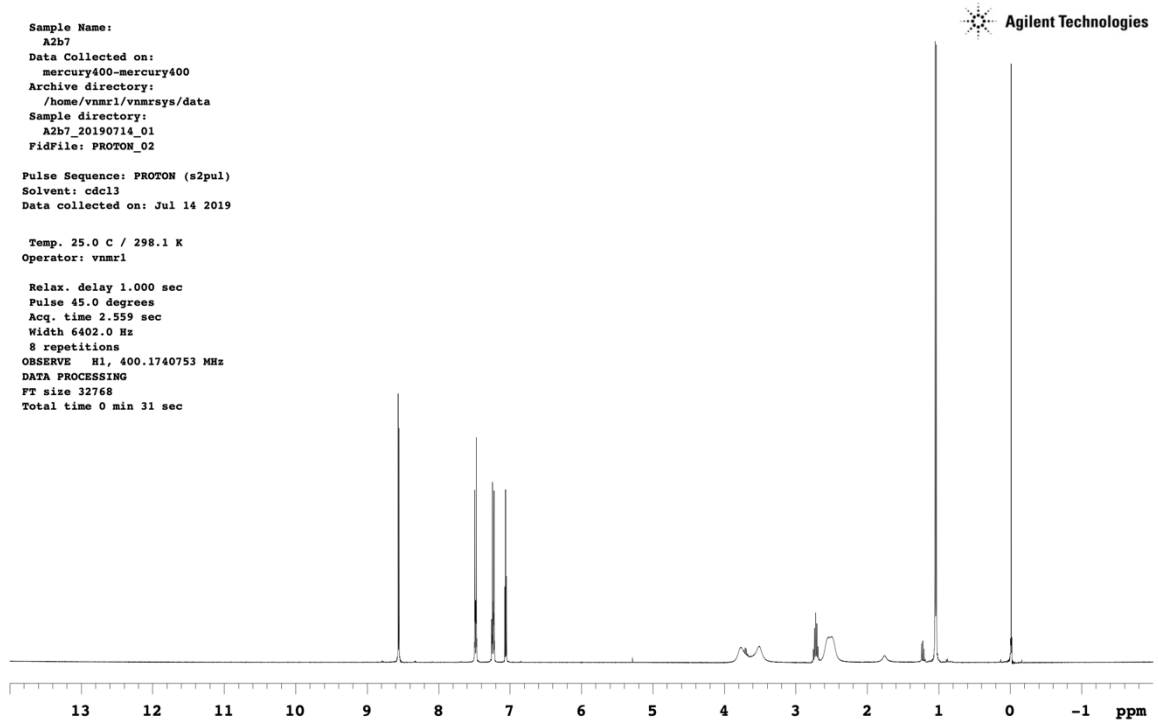
179 mg (0,83 mmol) **3e** ve 119 μ l (0,83 mmol) 1-izopropilpiperazinden hareketle DCM:metanol (90:10) solvan sistemiyle gradient akış kullanılarak otomatik flash kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Sarımsı yağ şeklinde bir bileşiktir.

Verim: 203 mg, %75

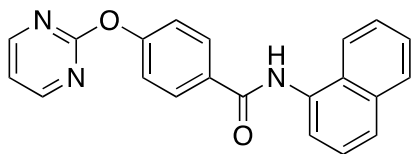
C₁₈H₂₂N₄O₂ için HRMS (m/z): [M+H]⁺ Hesaplanan: 327,1821; Bulunan: 327,1820

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1,04 (6H, d, $J=6,4$ Hz); 2,50 (4H, br s); 2,69-2,76 (1H, m); 3,51 (2H, br s); 3,77 (2H, br s); 7,06 (1H, t, $J=4,6$ Hz); 7,22-7,26 (2H, m); 7,47-7,50 (2H, m); 8,56 (2H, d, $J=5,2$ Hz) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 18,35; 42,54; 48,27; 48,70; 54,54; 116,53; 121,55; 128,89; 132,79; 153,87; 159,74; 164,96; 169,46 ppm.



Şekil 4.12. Bileşik **GS012**'nin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(Naftalen-1-il)-4-(pirimidin-2-iloksi)benzamid (GS13)

151 mg (0,7 mmol) **3e** ve 94 mg (0,7 mmol) 1-naftilaminden hareketle DCM:etil asetat (90:10) solvan sistemiyle gradient akış kullanılarak otomatik flash kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz katı bir bileşiktir.

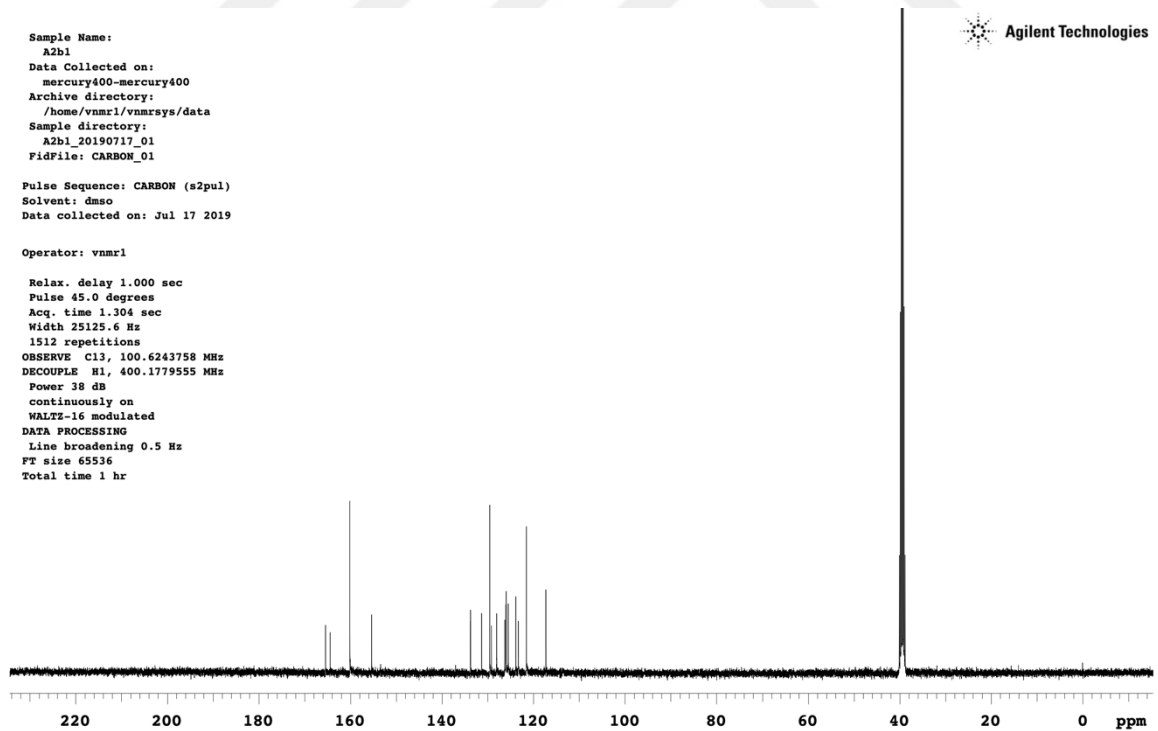
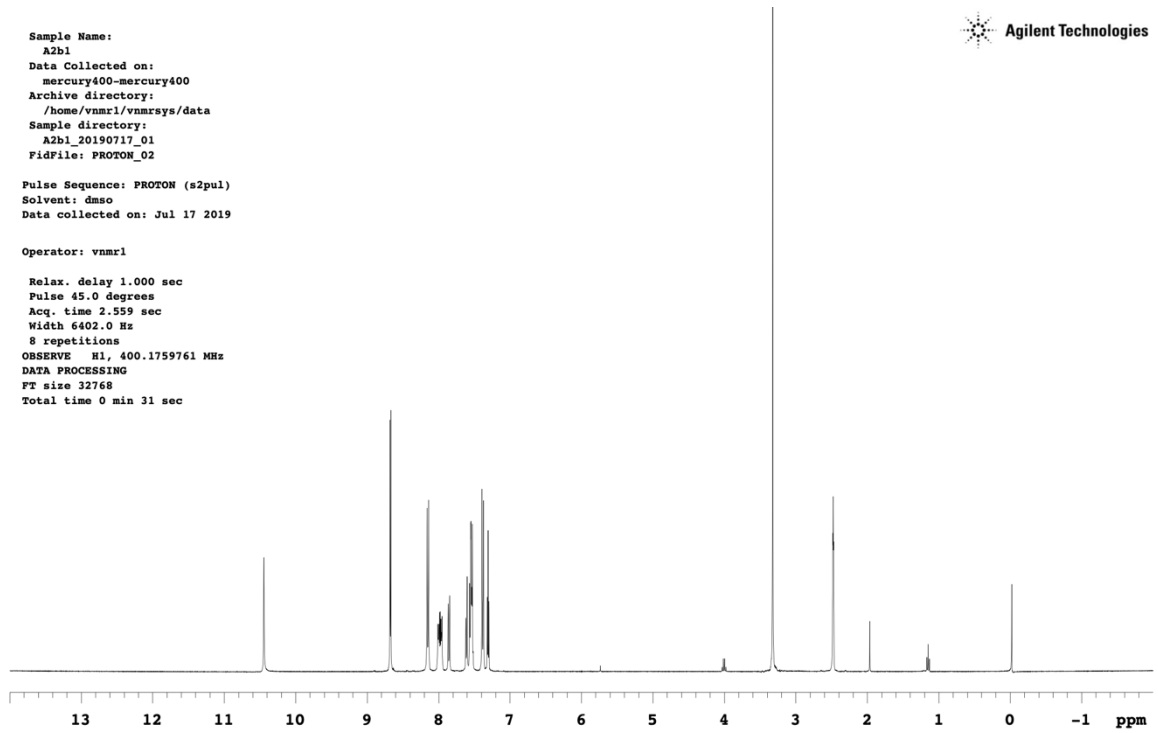
Verim: 164 mg, %48

Erime derecesi: 189,9-190,1 °C

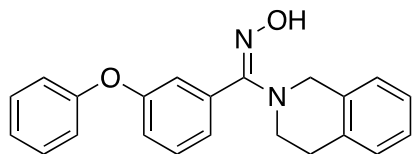
C₂₁H₁₅N₃O₂ için HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ Hesaplanan: 342,1243; Bulunan: 342,1244

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 7,31 (1H, t, *J*=4,6 Hz); 7,38 (2H, d, *J*=8,4 Hz); 7,52-7,61 (4H, m); 7,86 (1H, d, *J*=8,0 Hz); 7,95-8,01 (2H, m); 8,15 (2H, d, *J*=8,8 Hz); 8,68 (2H, d, *J*=4,4 Hz); 10,45 (1H, br s) ppm.

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 117,32; 121,58; 123,34; 123,89; 125,55; 125,98; 126,07; 126,29; 128,06; 129,20; 129,58; 131,35; 133,76; 133,82; 155,41; 160,17; 164,47; 165,48 ppm.



Şekil 4.13. Bileşik **GS013**'ün ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

(E/Z)-(3,4-Dihidroizokinolin-2(1H)-il)(3-fenoksifenil)metanon oksim (GS14)

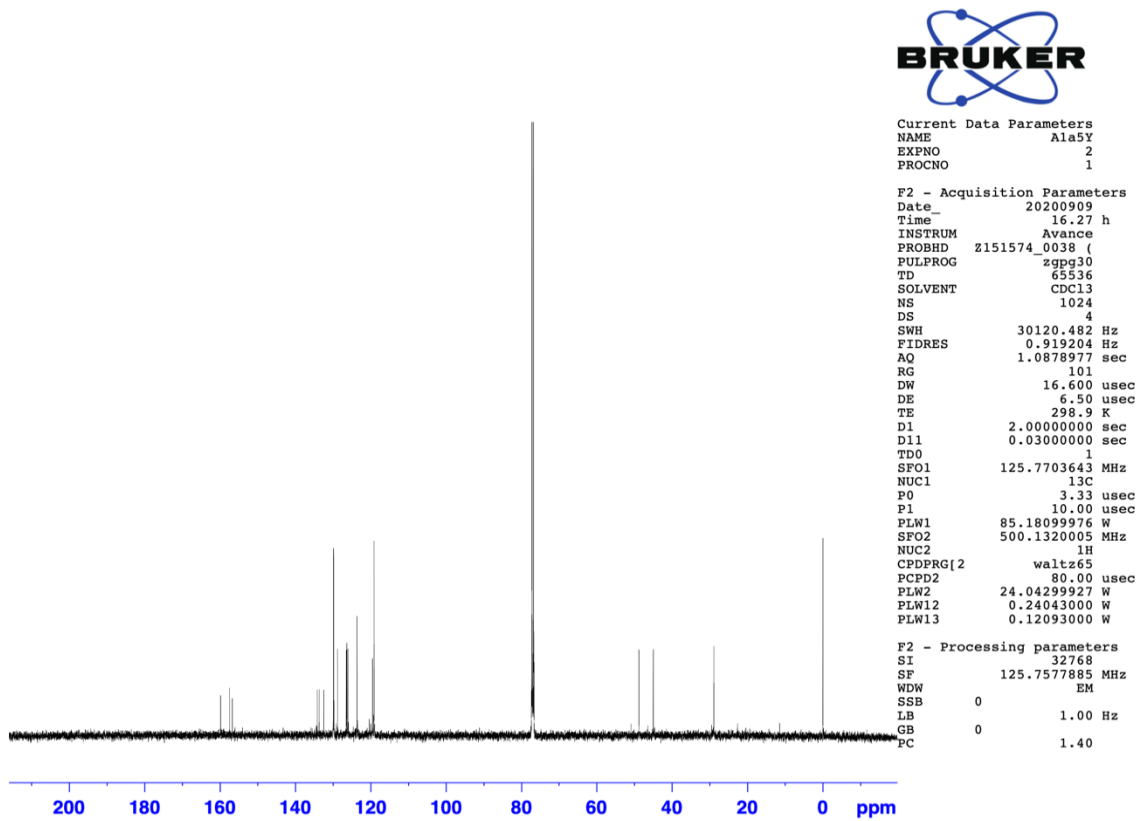
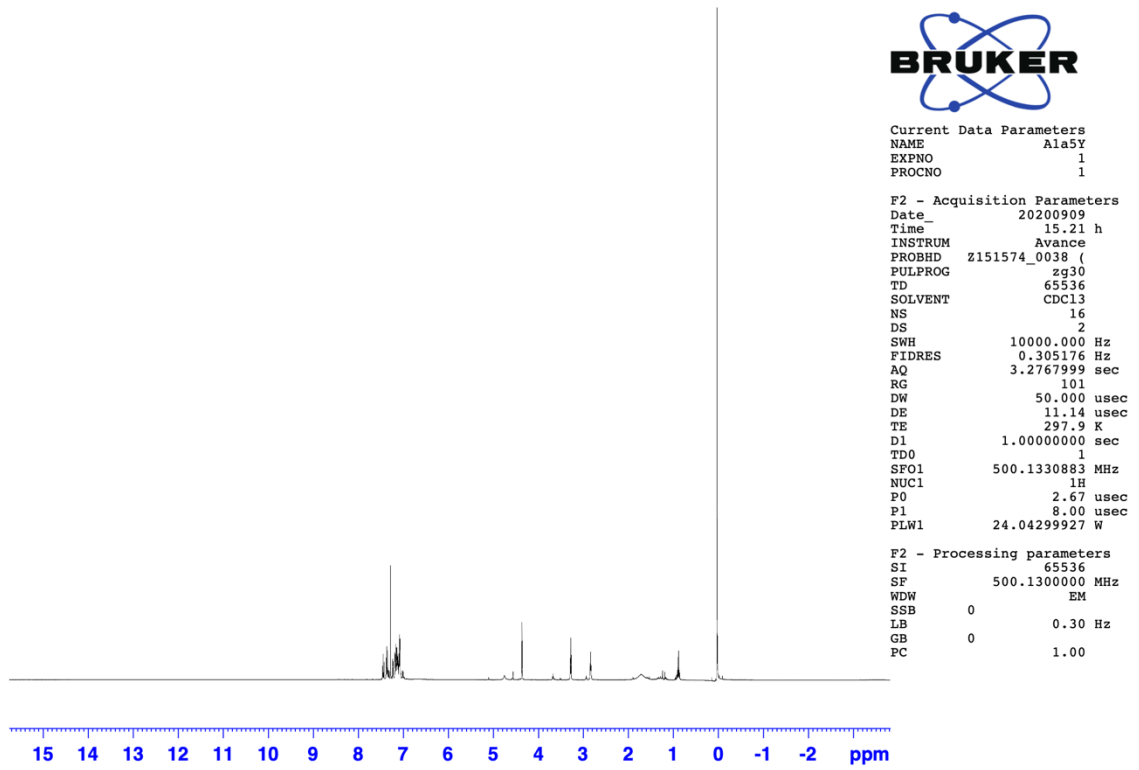
Daha önce bildirilen yönteme [72] göre sentezlenen 247 mg (1 mmol) (E/Z)-N-Hidroksi-3-fenoksibenzimidoyil klorürün DCM içerisindeki çözeltisine 0 °C'de 126 µl (1 mmol) 1,2,3,4-tetrahidroizokinolin ve 139 µl (1 mmol) TEA karışımının 10 ml DCM içerisindeki çözeltisi damla damla ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı 0 °C'de 15 dakika, sonrasında oda sıcaklığında 1 saat süreyle karıştırılmıştır. Süre sonunda karışım, %5 HCl çözeltisi (3x15 ml) ile yıkanmıştır. Birleştirilen organik fazlar, susuz Na₂SO₄ ile kurutulmuş ve alçak basınç altında yoğunlaştırılmıştır. Kalıntı, *n*-hekzan:etil asetat (72:28) solvan sistemi kullanılarak preparatif ince tabaka kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Renksiz yağ şeklinde bir bileşiktir.

Verim: 248 mg, %72

C₂₂H₂₁N₂O₂ için HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ Hesaplanan: 345,1603; Bulunan: 345,1591

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 2,83 (2H, t, *J*=5,8 Hz); 3,28 (2H, t, *J*=5,9 Hz); 4,37 (2H, s); 4,76 (1H, br s); 7,00-7,23 (10H, m); 7,32-7,46 (3H, m) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 28,89; 45,01; 48,79; 119,11; 119,18; 119,58; 123,64; 126,11; 126,33; 126,54; 128,84; 129,81; 129,85; 132,47; 133,69; 134,23; 156,74; 157,50; 159,85 ppm.

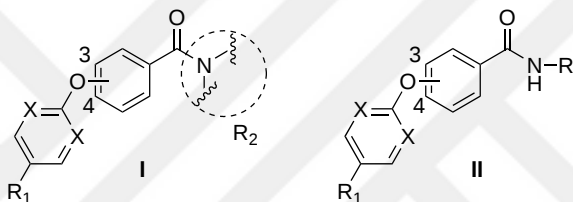
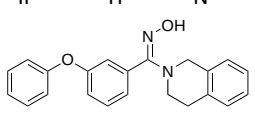
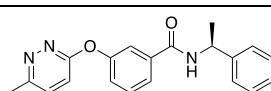


Şekil 4.14. Bileşik **GS014**'ün ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

4.2. Biyolojik Bulgular

Sentez ve yapı aydınlatma çalışmaları tamamlanan **GS01-14** kodlu bileşiklerin, SIRT1-3 enzimleri üzerine etkileri 100 μ M konsantrasyonda enzim kiti kullanılarak fluorimetrik yöntemle *in vitro* olarak belirlenmiştir. Deneyde referans bileşik olarak SIRT inhibitörü suramin (SIRT1 IC₅₀=297 nM; SIRT2 IC₅₀=1,15 μ M) ve selektif SIRT1 inhibitörü EX-527 (SIRT1 IC₅₀=38 nM; SIRT2 IC₅₀=19,6 μ M; SIRT3 IC₅₀=48,7 μ M) kullanılmıştır. SIRT1-3 enzimlerine karşı etkinliği test edilen bileşikler için hesaplanan % inhibisyon değerleri Çizelge 4.1’de sunulmuştur.

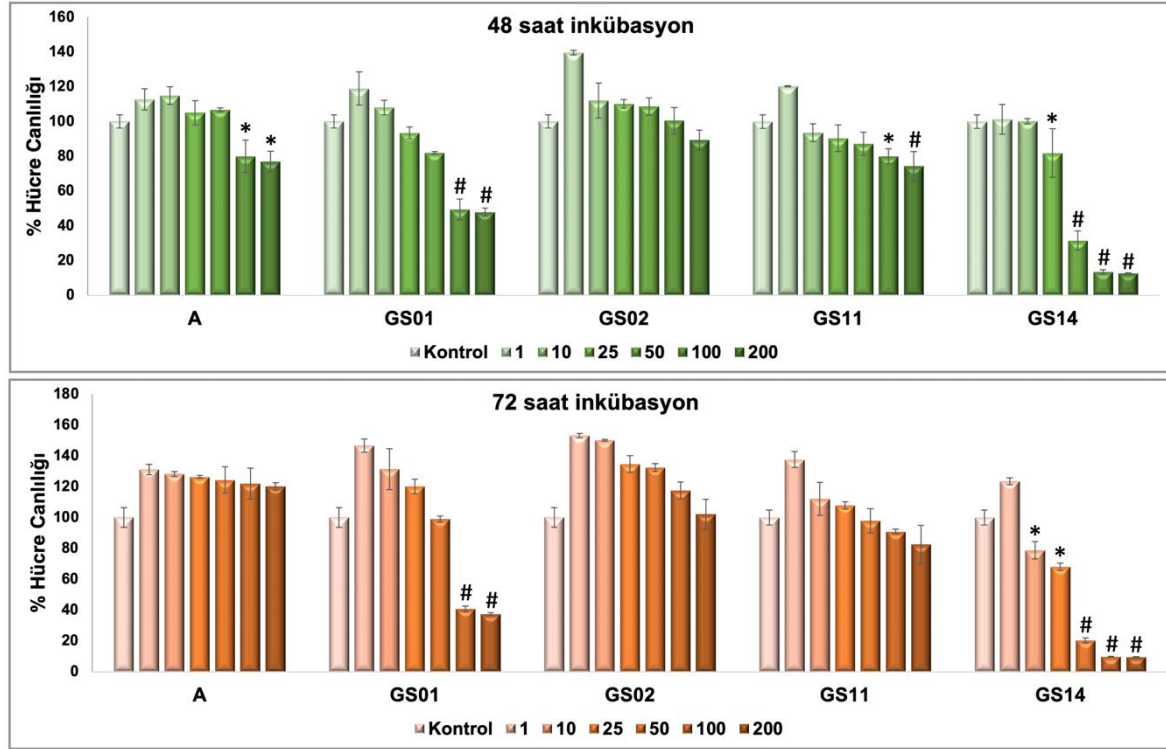
Çizelge 4.1. Test edilen moleküllerin SIRT1-3 % inhibisyon değerleri

						% İnhibisyon ^a		
Kod	Tür	R ₁	X	Konum	R ₂	SIRT1	SIRT2	SIRT3
GS01	I	H	CH	3	3,4-dihidroizokinolin-2(1H)-il	56.53±3.84	10.80±1.62	i.y.
GS02	I	H	CH	3	4-izopropilpiperazin-1-il	48.15±3.68	i.y.	i.y.
GS03	I	H	CH	3	4-fenilpiperazin-1-il	i.y.	i.y.	i.y.
GS04	I	OCH ₃	CH	3	4-fenilpiperazin-1-il	i.y.	i.y.	i.y.
GS05	II	H	CH	3	4-(COCH ₃)fenil	i.y.	11.06±0.91	5.79±1.16
GS06	I	H	N	3	3,4-dihidroizokinolin-2(1H)-il	i.y.	i.y.	i.y.
GS07	II	H	N	3	1-naftil	i.y.	i.y.	i.y.
GS08	II	H	N	3	2-naftil	36.08±2.74	17.12±2.05	i.y.
GS09	I	H	CH	4	3,4-dihidroizokinolin-2(1H)-il	21.50±5.13	i.y.	i.y.
GS10	II	H	CH	4	4-(COCH ₃)fenil	36.12±1.01	i.y.	i.y.
GS11	II	H	CH	4	4-(CONH ₂)fenil	46.04±7.31	i.y.	i.y.
GS12	I	H	N	4	4-izopropilpiperazin-1-il	i.y.	i.y.	i.y.
GS13	II	H	N	4	1-naftil	i.y.	i.y.	i.y.
GS14						47.16±1.49	51.61±0.14	i.y.
A ^b						31.45±1.73	42.47±1.42	18.23±2.61
EX-527						97.56±2.89	76.39±2.49	44.61±3.81
Suramin						94.52±0.92	98.37±0.25	96.82±3.26

^a % İnhibisyon değerleri “ortalama değer±standart sapma” olarak verilmiştir. n=2 olarak test edilmiştir. i.y.: inhibisyon yok.

^b 300 μ M konsantrasyonda test edilmiştir.

SIRT1/2 enzim aktivitesi üzerine etkili olarak bulunan bileşiklerin *in vitro* sitotoksik etkileri insan meme kanser hücre hattı MCF-7 kullanılarak MTT testi ile 48 ve 72 saat olmak üzere iki farklı zaman dilimi için belirlenmiş, bileşiklerin % hücre canlılığına olan etkileri Şekil 4.15'te sunulmuştur.



Şekil 4.15. Değişik konsantrasyonlardaki bileşiklerle muamele edilen MCF-7 hücre hattında tespit edilen % hücre canlılığı değerleri. *p<0.05, #p<0.0001.

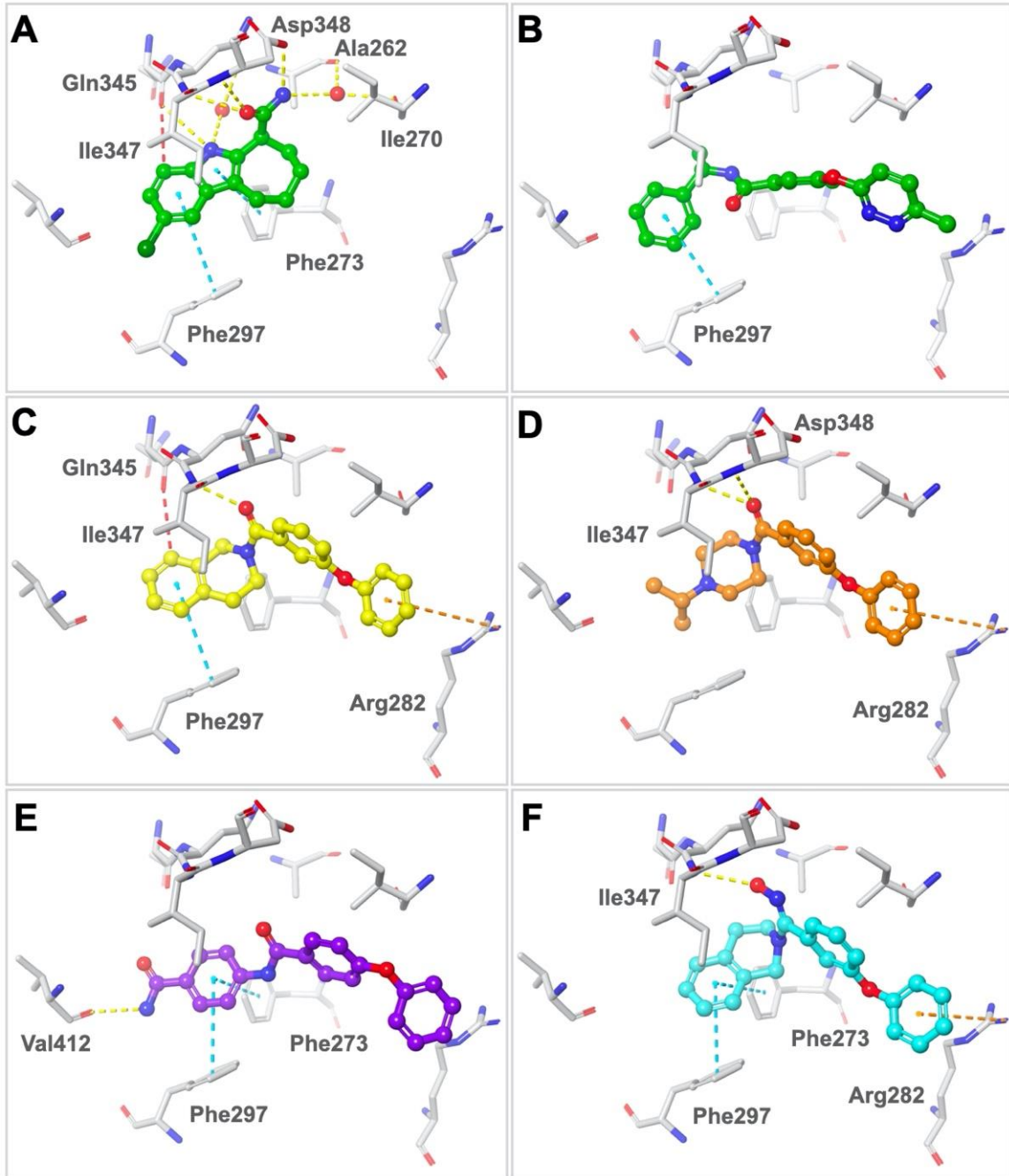
4.3. Moleküler Modelleme Bulguları

Bileşiklerin SIRT1-3 enzimlerine karşı etkinliklerinin tayin edildiği *in vitro* enzim deneyleri sonuçlarına göre SIRT1 ve SIRT2 enzim düzeylerini etkileyen **GS01**, **GS02**, **GS11** ve **GS14** kodlu bileşiklerin, ilgili enzim aktif bölgelerindeki bağlantı modları, aktif bölge amino asitleriyle meydana getirdikleri etkileşimler ve selektif SIRT2 inhibitörleri için daha önce geliştirilen farmakofor modelle uyumları moleküler docking çalışması ile belirlenmiştir.

Bileşiklerin SIRT1 enzim aktif bölgesindeki konformasyonları, SIRT1:EX-527 analogu kompleksinin x-ray kristali (PDB: 4I5I) kullanılarak belirlenmiştir. Şekil 4.16-A'da görüldüğü üzere, x-ray koligandı, SIRT1 aktif bölgesinin hidrofobik cebine, Phe273 ve Phe297 amino

asitleriyle π - π etkileşimi ve Ala262, Ile270, Gln345, Asp348 amino asitleriyle H bağı oluşturarak yerleşmektedir. Tez çalışmasında yer alan bileşiklerin tasarımı için başlangıç noktasını oluşturan Bileşik **A**'nın ise, EX-527 analogu ile aynı bölgeyi işgal ettiği fakat aktif bölge amino asitlerinden sadece Phe297 ile etkileştiği gözlenmiştir (Şekil 4.2-B).

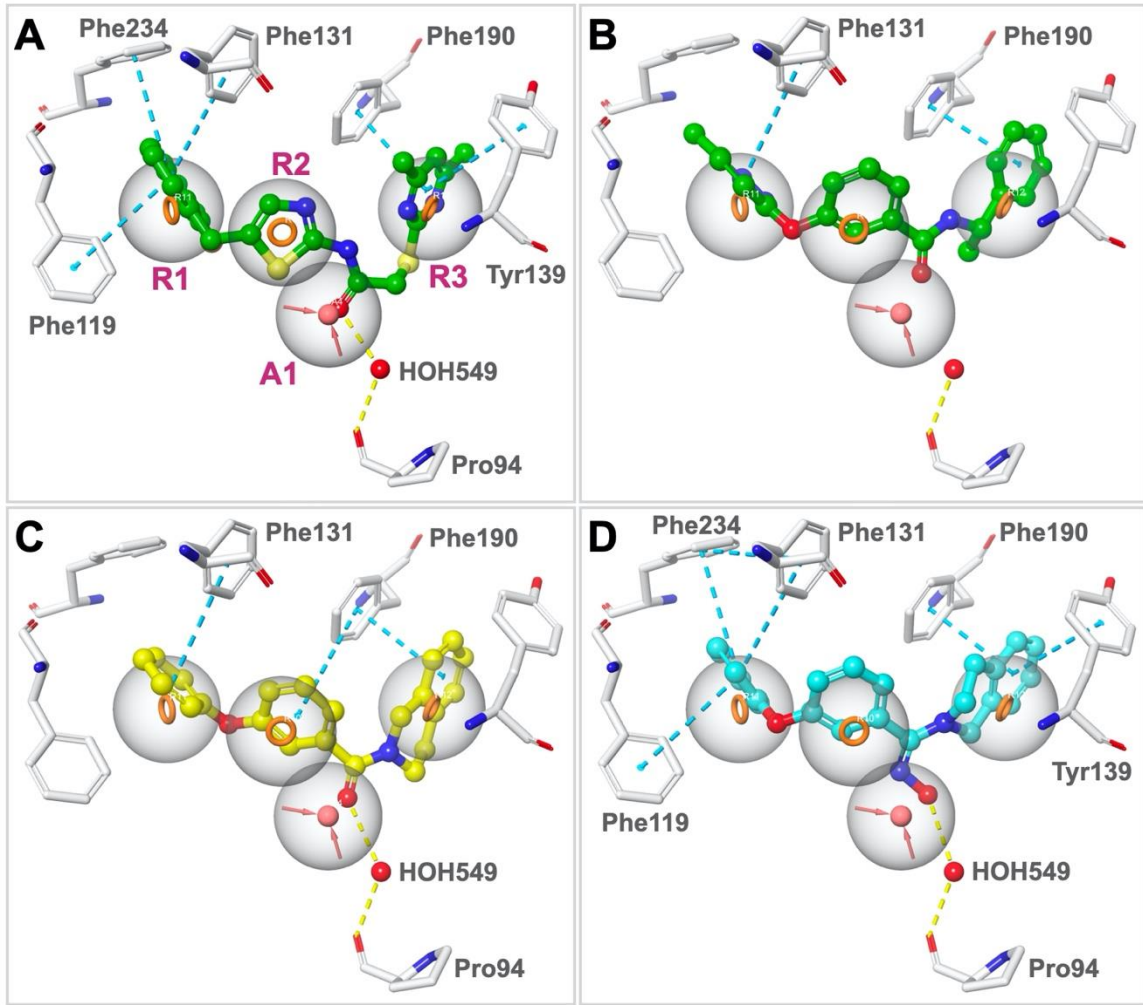
SIRT1 enzim aktivitesini %46.04-56.53 arasında değişen yüzdelerde inhibisyon yaptığı tespit edilen **GS01**, **GS02**, **GS11** ve **GS14** kodlu bileşikler için, SIRT1 aktif bölgesinde Bileşik **A** ile benzer bağlantı modları elde edilmiştir (Şekil 4.16). Bileşik **A** yapısında bulunan ve hiçbir etkileşme meydana getirmeden SIRT1 aktif bölgesinin giriş kısmına yönelen metilpiridazin grubu, fenil grubu ile değiştirildiğinde Arg282 ile π -katyon etkileşimi yakalanmıştır. Bileşik **GS01** ve **GS02**'nin karbonil oksijeni, EX-527 analogundaki karboksamit yapısıyla benzerlik göstererek Ile347 ve Asp348 amino asitleriyle H bağı üzerinden etkileşime girmiştir. Aynı durum Bileşik **GS14** için *N*-hidroksil imidamit yapısında gözlenmiştir. Bileşik **GS11** için, amit yapısına komşu fenil halkasındaki karboksamit süstitüsüyonu ile Phe273 ve Phe297 amino asitleriyle meydana gelen π - π etkileşimlerine ek olarak Val412 ile H bağı oluşumu sağlanmış, böylece SIRT1 aktif bölgesinin hidrofobik cebine diğer bileşiklere nazaran daha sıkı bağlandığı gözlenmiştir. Moleküler docking çalışmaları yapılan bileşiklerin, koligand EX-527 analogunun indol azotu ve karboksamit grubu ile sağladığı H bağı ağını meydana getirememesi, SIRT1 aktivitesini orta düzeyde inhibe etmelerinin göstergesi olarak düşünülmüştür.



Şekil 4.16. SIRT1 aktif bölgesi (PDB: 4I5I). (A) EX-527 analogunun x-ray kristal yapısındaki bağlantı modu. (B) Bileşik **A** için belirlenen bağlantı modu (XP Glidescore: -6,789 kcal/mol). (C) Bileşik **GS01** için belirlenen bağlantı modu (XP Glidescore: -10,018 kcal/mol). (D) Bileşik **GS02** için belirlenen bağlantı modu (XP Glidescore: -7,280 kcal/mol). (E) Bileşik **GS11** için belirlenen bağlantı modu (XP Glidescore: -7,785 kcal/mol). (F) Bileşik **GS14** için belirlenen bağlantı modu (XP Glidescore: -8.650 kcal/mol). H bağları, aromatik H bağları, π -kasyon ve π - π etkileşimleri sırasıyla sarı, kırmızı, turuncu ve turkuaz renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.

Sentezlenen bileşiklerden sadece Bileşik **GS14** için SIRT2 inhibisyonu gözlenmiştir. Bileşik **GS14**, daha önceki çalışmamızda selektif SIRT2 inhibitörleri için geliştirilen farmakofor modelin sunduğu veriler ışığı altında SIRT2 enzim aktivitesi üzerinde etkisiz bulunan Bileşik **GS01**'den hareketle tasarlanmıştır. Bu iki bileşik için SIRT2 üzerinde gözlenen etki farklılığını açıklamak adına **GS01** ve **GS14** kodlu bileşiklerin SIRT2 aktif bölgesindeki bağlantı modları moleküler docking çalışmaları ile belirlenmiştir.

SIRT2 x-ray yapısında koligant olarak yer alan SirReal analogu, aktif bölgenin substrat kanalında fenil halkası ile Phe119, Phe131 ve Phe234 amino asitleri arasında π - π etkileşimleri, selektivite cebinde 4,6-dimetilpirimidin halkası ile Tyr139 ve Phe190 amino asitleri arasında π - π etkileşimleri, karbonil oksijeni ile Pro94 amino asiti arasında yapısal su HOH549 köprülü H bağı meydana getirmektedir. Bileşik **GS14** için belirlenen bağlantı modu incelendiğinde, koligant yapısındaki 4,6-dimetilpirimidin halkasının yerine geçen izokinolin kalıntısının selektivite cebine yönlendiği ve bu bölgede beklenen π - π etkileşimleri gerçekleştirdiği gözlenmiştir. Bileşik **GS01** yapısında da izokinolin halkası olmasına rağmen selektivite cebinde Tyr139 ile etkileşim göstermemiş, bu durum karbonil oksijeni ile Pro94 amino asiti arasında HOH549 köprülü H bağı oluşması için bileşiğin diğer bileşiklere göre daha bükülmüş bir konformasyon almasıyla açıklanabilmektedir. Bileşik **GS01**'deki karbonil oksijeninin, Bileşik **GS14**'de *N*-hidroksil grubu ile değiştirilmesiyle bileşiğin daha rahat bir konformasyonla Pro94 amino asiti ile H bağına oluşturmaya olanak verilmiş, izokinolin halkasının selektivite cebinde Tyr139 amino asitine doğru yönelerek π - π etkileşimine girmesi sağlanmıştır (Şekil 4.17).

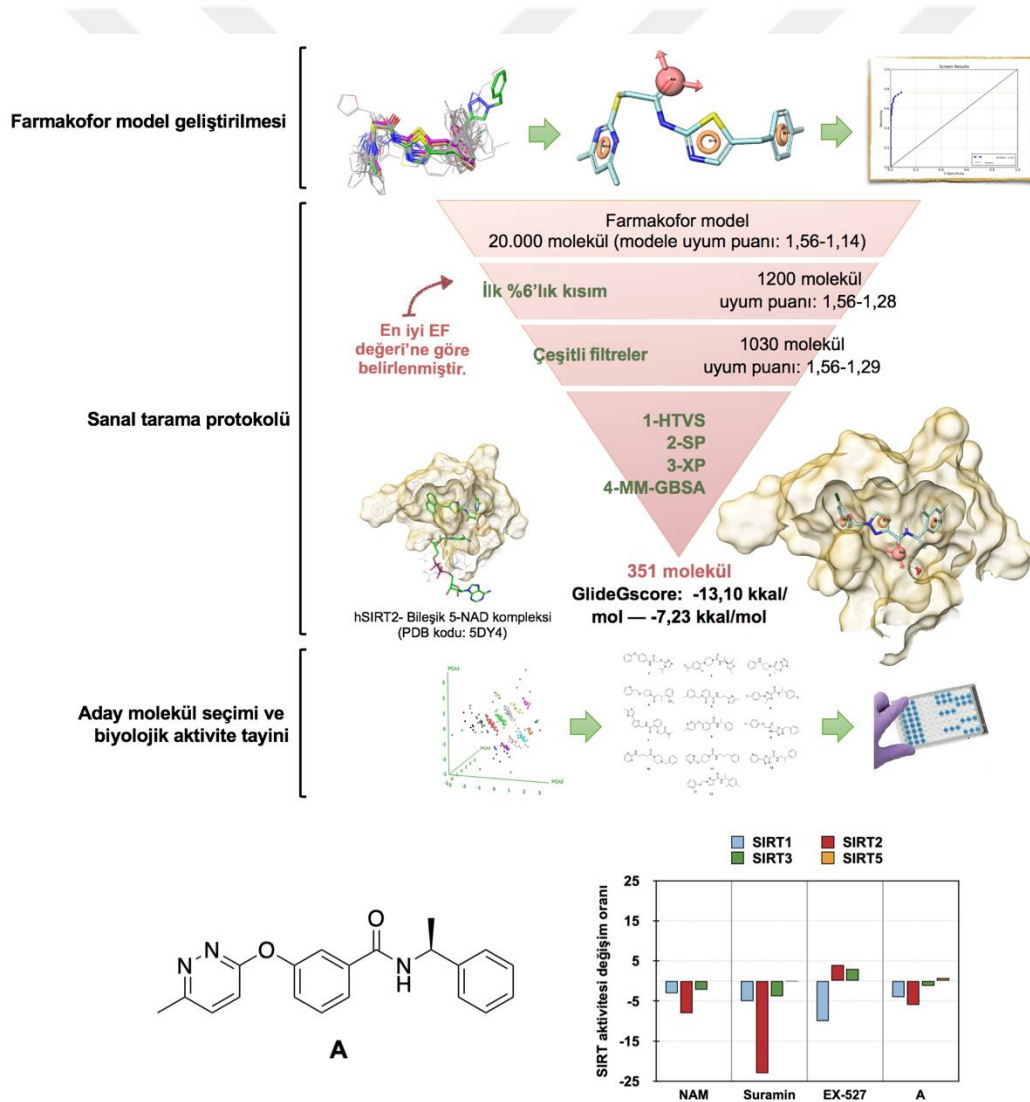


Şekil 4.17. SIRT2 aktif bölgesi (PDB: 5DY4). (A) SirReal analogunun x-ray kristal yapısındaki bağlantı modu. (B) Bileşik **A** için belirlenen bağlantı modu (XP Glidescore: -9,032 kcal/mol). (C) Bileşik **GS01** için belirlenen bağlantı modu (XP Glidescore: -9,787 kcal/mol). (D) Bileşik **GS14** için belirlenen bağlantı modu (XP Glidescore: -11,877 kcal/mol). H bağları, aromatik H bağları, π -katyon ve π - π etkileşimleri sırasıyla sarı, kırmızı, turuncu ve turkuaz renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir. Selektif SIRT2 inhibitörleri için geliştirilen dört üyeli farmakofor model. R1, R2, R3: aromatik halka, A1: H bağı akseptör.



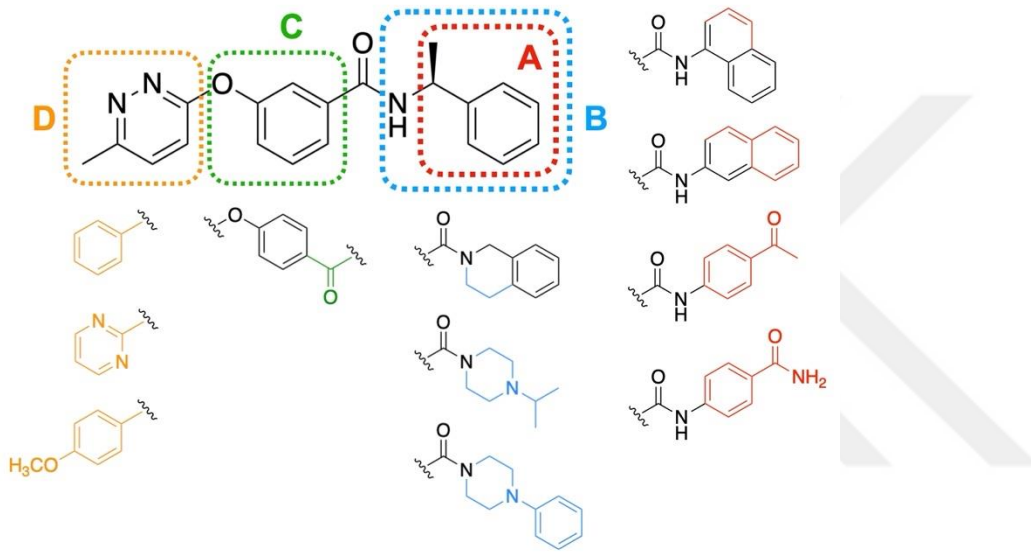
5. TARTIŞMA

Grubumuz tarafından 2019 yılında yayınlanan çalışmamızda [10], yeni selektif SIRT2 inhibitörlerinin keşfi amacıyla aminotiyazol türevi bir seri selektif SIRT2 inhibitörü kullanılarak geliştirilen farmakofor model ile ZINC veri tabanında sanal tarama çalışması yapılmıştır. Sanal tarama çıktısı bileşiklerin, *in vitro* SIRT1, SIRT2, SIRT3 ve SIRT5 aktiviteleri test edilmiş, ilgili enzimlerin aktiviteleri üzerinde etkisi tespit edilen üç öncü bileşikten (S)-3-[(6-metilpiridazin-3-il)oksi]-*N*-(1-feniletil)benzamid (**A**), tez çalışmamız kapsamında yeni bileşiklerin tasarımı için başlangıç noktasını oluşturmuştur (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. Yeni selektif SIRT2 inhibitörlerinin keşfi amacıyla uygulanan sanal tarama yöntemi ve öncü bileşik **A**'nın *in vitro* SIRT aktivite sonuçları

SIRT enzimine karşı daha etkili yeni bileşiklere ulaşmak amacıyla Bileşik **A** üzerinde “öncü bileşik optimizasyonu”, moleküler docking ve farmakofor modelleme gibi yapı-temelli ilaç tasarımı tekniklerinin yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Yapı üzerinde yapılması planlanan kimyasal modifikasyonlara, sentez çalışmalarının yapılabilirliği ve sonuç bileşiklere ait fizikokimyasal özelliklerin uygunluğu göz önüne alınarak karar verilmiştir. Bileşik **A** üzerinde yapılan değişiklikler, Şekil 5.2’de sunulduğu gibi A, B, C ve D ile gösterilen dört ana bölge üzerinde yapılmıştır.



Şekil 5.2. Bileşik **A** üzerinde gerçekleştirilen kimyasal modifikasyonlar

İlk olarak, hedef bileşiklerin sentezini kolaylaştırmak için kiralitenin kaldırılması amacıyla diğer bölgeler sabit tutulurken A bölgesi ile gösterilen 1-feniletıl grubu yerine 1-/2-naftıl, 4-asetilfenil ve 4-karbamoilfenil halkaları getirilmiştir.

Metilpiridazin halkası, öncü bileşikte SIRT2 aktif bölge girişine yerleşirken, bu grupların gelmesiyle elde edilen yeni bileşiklerde selektivite cebine yönelmiştir. Öncü bileşikle karşılaştırıldığında tersine dönen bu bağlantı modu nedeniyle SIRT2 inhibisyonu için önemli olduğu vurgulanan HOH549 aracılığıyla Pro94 amino asiti ile oluşturulan H bağı kaybolmuştur. Bunun yanında, ters bağlanma modu SIRT1 inhibisyonu için gerekli olan Asn346 amino asiti ile H bağının da oluşmasını engellemiştir. Bunun üzerine, D bölgesi ile gösterilen metilpiridazin halkası, fenil halkası ile yer değiştirilmiş ve istenen bağlanma modu elde edilmiştir. D bölgesine fenil halkasının eklenmesi ile LogP değerleri artan bazı

türevlerde lipofilik özelliği azaltmak için metilpiridazin, fenil yerine pirimidin halkası ile değiştirilmiştir.

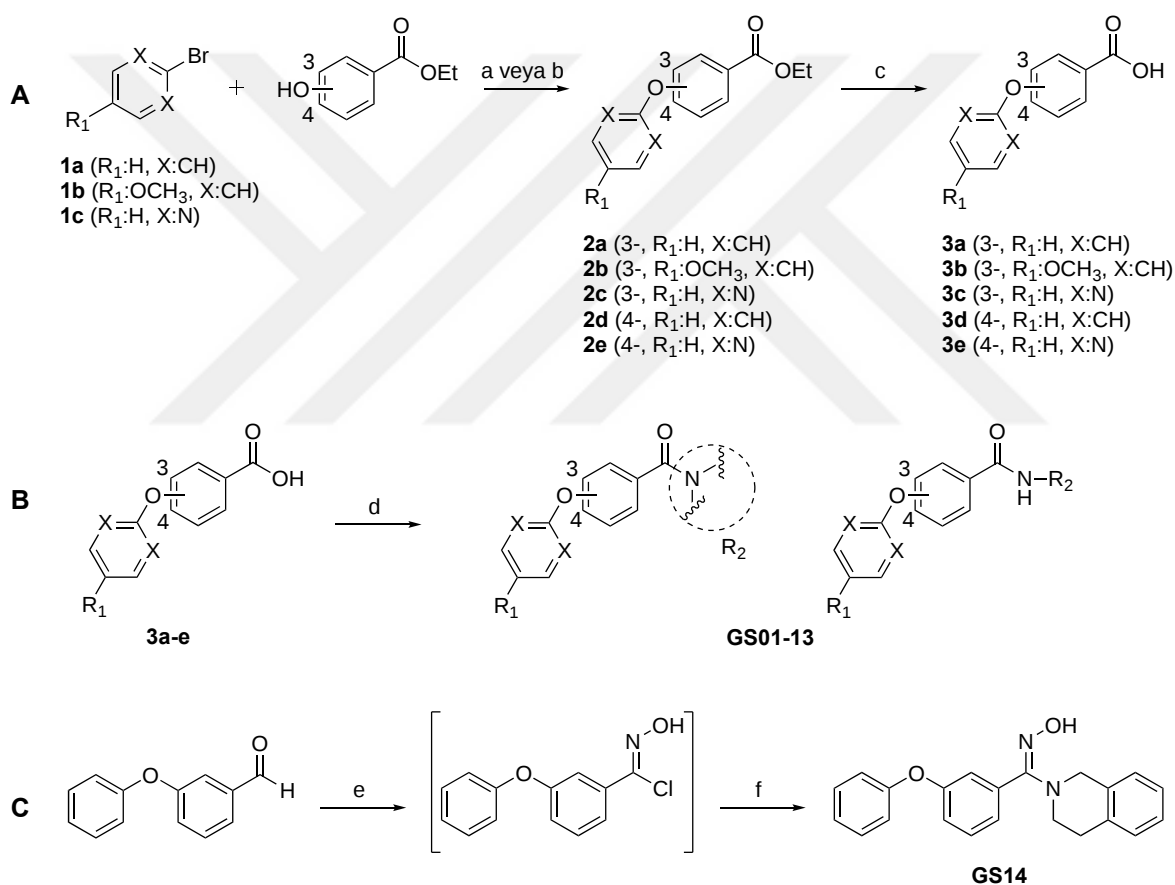
Öncü bileşik üzerinde gerçekleştirilen diğer bir modifikasyon için, SIRT2 selektivite cebi için yeni fragmanlar bulmak ve yine kiraliteyi ortadan kaldırmak amacıyla B bölgesine odaklanılmış ve amit azotu halka içine alınarak 1,2,3,4-tetrahidroizokinolin, 4-fenilpiperazin ve 4-izopropilpiperazin halkalarıyla siklik amit yapıları tasarlanmıştır. Amit azotunun halka içine alınmasıyla elde edilen bileşikler için de A bölgesinde yapılan değişiklik sonucu karşılaşılan ters bağlanma modu sorunu gözlenmiş, metilpiridazin halkasının fenil veya pirimidin halkaları ile değiştirilmesiyle bu sorun çözülmüştür.

Tasarlanan yeni bileşiklerde ariloksibenzamit iskeleti ağırlıklı olarak korunsa da bazı türevler için amit yapısı merkezi fenil halkasında meta pozisyondan para pozisyona kaydırılmıştır.

Son olarak, bu aşamaya kadar tasarlanan bileşikler (**GS01-13**) sentezlenmiş ve SIRT enzimlerine karşı etkileri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlarına dayanarak, benzamit iskeleti, SIRT2 aktif bölgesinde inhibisyon için önemi vurgulanan tüm etkileşimleri sağlamak ve aynı zamanda suda çözünürlüğü iyileştirmek amacıyla *N*-hidroksibenzimidamit yapısına modifiye edilmiştir. Moleküler docking çalışmalarına göre, bu modifikasyondan sonra SIRT2 bağlanmasında önemli bir gelişme gösteren, dolayısıyla karşılık gelen türeve kıyasla daha yüksek SIRT2 inhibisyonu göstermeyi vaat eden tek bileşik (**GS14**) sentezlenmiş ve SIRT1-3 enzimlerine karşı etkisi değerlendirilmiştir.

Tasarlanan **GS01-14** kodlu bileşiklerinin sentezi için izlenen yol Şekil 5.3'de özetlenmiştir. Etil arilbenzoat türevleri (**2a**, **2b**, **2d**), bromobenzen (**1a**) veya 4-bromoanisolin (**1b**), etil 3-/4-hidroksibenzoat ile CuI ve N,N-dimetilglisin varlığında verdiği kenetlenme reaksiyonu sonucu %48-85 arasında değişen verimlerle elde edilmiştir. Diğer etil arilbenzoat türevleri (**2c**, **2e**) için ise, 2-bromopirimidin (**1c**) ile etil 3-/4-hidroksibenzoat, Pd(dba)₂ ve *t*-BuXPhos kullanılarak reaksiyona sokulmuş, %79-81 verimle kenetlenme ürünleri elde edilmiştir. Daha sonra, Bileşik **2a-e**'nin bazik hidrolizi ile ariloksibenzoik asit türevlerine (**3a-e**) ulaşılmıştır. Elde edilen **3a-e** kodlu bileşikler sonrasında 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)

karbodiimit (EDC) ve 4-dimetilaminopiridin (DMAP) varlığında uygun aminlerle reaksiyona sokularak %40-92 arasında değişen verimlerle **GS01-13** kodlu final bileşikler elde edilmiştir. Bileşik **GS14** için öncelikle 3-fenoksibenzaldehit ve $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ arasındaki reaksiyon sonucu, 3-fenoksibenzaldehit oksim ara ürünü elde edilmiş, ileri bir saflaştırma işlemi uygulanmadan *N*-klorosüksinimit (NCS) ile reaksiyona sokularak 3-fenoksibenzohidroksiminoil klorür ara ürününe ulaşılmıştır. Son basamakta ise, 1,2,3,4-tetrahidroizokinolin ile 3-fenoksibenzohidroksiminoil klorürün trietilamin (TEA) varlığında verdiği reaksiyon sonucu %72 verimle **GS14** kodlu bileşik elde edilmiştir.



Şekil 5.3. **GS01-14** kodlu bileşiklerin sentez şeması. (a) **2a**, **2b**, **2d**: CuI , Cs_2CO_3 , *N,N*-dimetilglisin, 1,4-dioksan, DMF, 100 °C, 24 saat; (b) **2c**, **2e**: $\text{Pd}(\text{dba})_2$, *t*-BuXPhos, K_3PO_4 , toluen, reflaks, 6-8 saat; (c) i. NaOH , H_2O , THF, etanol, reflaks, 1-2 saat, ii. kons. HCl ; (d) uygun amin türevi, EDC, DMAP, DCM, oda sıcaklığı, 24 saat; (e) i. $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, NaOH , H_2O , etanol, oda sıcaklığı, 1 saat, ii. NCS, DMF, oda sıcaklığı, 4 saat; (f) 1,2,3,4-tetrahidroizokinolin, TEA, DCM, 0 °C → oda sıcaklığı, 1 saat.

Tez kapsamında sentez çalışmaları tamamlanan ara ürünlerin yapı aydınlatma çalışmalarında HRMS verileri, final bileşiklerde ise ^1H -NMR, ^{13}C -NMR ve HRMS verileri kullanılmıştır.

Elde edilen final bileşiklere ait ^1H -NMR spektrumları incelendiğinde, izokinolin halkası taşıyan türevlerde (**GS01**, **GS06** ve **GS09**) halkanın birinci konumunda yer alan hidrojenlere ait sinyaller 4,57-4,87 ppm arasında her biri 1H değerinde iki yayvan singlet veya 2H değerinde multipler olarak gözlenmiştir. Üçüncü konum hidrojenleri 3,63-3,96 ppm arasında; dördüncü konum hidrojenleri ise 2,83-2,96 ppm her biri 1H değerinde iki yayvan singlet veya 2H değerinde yayvan singlet veya 2H değerinde multipler olarak gözlenmiştir. Yapısında 4-izopropilpiperazin içeren bileşiklerin (**GS02** ve **GS12**) ^1H -NMR spektrumları incelendiğinde, izopropil grubuna ait metil hidrojenlerinin sinyalleri 1,04 ppm'de 6H değerinde dublet olarak, metil gruplarının bağlı olduğu karbon hidrojeninin ise 2,69-2,76 ppm arasında 1H değerinde multipler olarak görülmüştür. Piperazin halkasına ait hidrojenlerden ikinci konumunda yer alanlar 3,76 ppm'de 2H değerinde yayvan singlet şeklinde sinyal vermiştir. Üçüncü ve beşinci konumdaki hidrojenler için, **GS02** kodlu bileşikte 2,44-2,57 ppm arasında her biri 2H değerinde iki yayvan singlet sinyali gözlenirken **GS12** için 2,50 ppm'de 4H değerinde singlet sinyali görülmüştür. Piperazin halkasının altıncı konumundaki hidrojenler ise 3,42-3,51 ppm arasında 2H değerinde yayvan singlet sinyali oluşturmuştur. Yapısında 4-fenilpiperazin içeren bileşiklerin (**GS03** ve **GS04**) ^1H -NMR spektrumları incelendiğinde, piperazin halkasına ait hidrojenlerin 3,11; 3,23; 3,58; 3,90 ppm'lerde 2H değerinde yayvan singlet şeklinde sinyal verdikleri gözlenmiştir. Yapısına 4-asetilfenil halkası taşıyan **GS05** ve **GS10** kodlu bileşiklerde asetil grubuna ait metil hidrojenleri 2,53 ppm'de 3H değerinde singlet şeklinde sinyal verirken, 4-karbamoilfenil grubu taşıyan **GS11** kodlu bileşikteki amin hidrojenlerinin aromatik sahada sinyal vererek yapıdaki diğer aromatik hidrojenlerin sinyalleriyle iç içe girdiği gözlenmiştir. Yapısında pirimidin halkası bulunduran bileşiklerin (**GS06**, **GS07**, **GS08**, **GS012** ve **GS13**) ^1H -NMR spektrumları incelendiğinde, pirimidin halkasının dördüncü ve altıncı konumlarındaki hidrojenlerin eşdeğer davranarak 8,55-8,68 ppm arasında değişen skalada 2H değerinde triplet şeklinde ($J=4,4-5,2$ Hz), beşinci konum hidrojeninin ise 7,06-7,31 ppm arasında 1 H değerinde triplet şeklinde ($J=4,6-5,0$ Hz) sinyal verdiği gözlenmiştir. Amit azotunun halka içinde olmadığı bileşiklerde (**GS05**, **GS07**, **GS08**, **GS10**, **GS011**, **GS13**) amit hidrojeni 10,33-

10,55 ppm arasında bir skalada ^1H değerinde yayvan singlet olarak sinyal vermiştir. **GS14** kodlu bileşiğin yapısında bulunan oksim grubuna ait hidrojen sinyali 4,76 ppm'de ^1H değerinde yayvan singlet olarak tespit edilmiştir. Tüm final bileşiklere ait aromatik halka hidrojenleri için beklenildiği gibi 7,01-8,00 ppm arasında değişen bir skalada ağırlıklı olarak multipler şeklinde sinyal gözlenmiştir.

Elde edilen final bileşiklere ait ^{13}C -NMR spektrumları incelendiğinde, izokinolin halkası taşıyan türevlerde (**GS01**, **GS06** ve **GS09**) halkanın birinci, üçüncü ve dördüncü konumlarında yer alan karbonlara ait sinyaller 28,89-29,68 ppm arasında gözlenmiştir. Yapısında 4-izopropilpiperazin içeren bileşiklerin (**GS02** ve **GS12**) ^{13}C -NMR spektrumları incelendiğinde, izopropil grubuna ait metil karbonlarının 18,27-18,35 ppm arasında, metil gruplarının bağlı olduğu karbonun ise 54,54-54,64 ppm arasında sinyal verdiği görülmüştür. Piperazin halkası içeren tüm bileşiklerde (**GS02**, **GS03**, **GS04** ve **GS12**) halka karbonlarına ait sinyaller 42,05-49,89 ppm arasında gözlenmiştir. **GS05** ve **GS010** kodlu bileşiklerde bulunan asetil grubuna ait karbonil karbonu 196,58 ppm'de, **GS011** kodlu bileşikte bulunan karbamoil grubuna ait karbonil karbonu ise 167,40 ppm'de sinyal vermiştir. **GS014** kodlu bileşikte oksim grubunun karbonuna ait sinyal 159,85 ppm'de gözlenmiştir. Tüm final bileşiklere ait aromatik halka karbonlarına ait sinyaller beklenildiği gibi 116,53-164,96 ppm, amit yapısının karbonil karbonuna ait sinyal ise 157,67-169,69 ppm arasında değişen bir skalada görülmüştür.

Sentez ve yapı aydınlatma çalışmaları tamamlanan on dört final bileşik 100 μM konsantrasyonda SIRT1, SIRT2 ve SIRT3 enzimlerine karşı etkinliğinin belirlenmesi için test edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, öncü bileşik yapısındaki 1-feniletıl grubunun 4-asetilfenil (**GS10**) ve 4-karbamoilfenil (**GS11**) ile değiştirilmesiyle ulaşılan bileşiklerde çok kuvvetli olmasa da öncü bileşiğe kıyasla inhibisyon etkisinde artışla selektif SIRT1 inhibisyonu (%36-46) gözlenmiştir. Merkezi fenil halkasındaki süstitüsyonların para pozisyonunda olduğu **GS10** kodlu bileşiğin meta analogu (**GS05**), test edilen hiçbir SIRT izoformu için etkili bulunmamıştır. Yapısında 1-naftıl ve pirimidin (**GS07**, **GS13**) içeren bileşiklerin, test edilen tüm SIRT izoformlara karşı etkisiz olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, **GS07** kodlu bileşiğin 2-naftıl analogu (**GS08**), zayıf da olsa SIRT1 ve SIRT2 inhibisyonu göstermiştir. Yapıya 1,2,3,4-tetrahidroizokinolin ve 4-izopropilpiperazinin

eklenmesi ve böylece bir öncü bileşikteki sekonder amit grubunun tersiyer ve siklik bir amit yapısına dönüştürülmesiyle elde edilen bileşiklerden **GS01** ve **GS02** için öncü bileşiğe kıyasla artmış selektif SIRT1 inhibisyonu (sırasıyla %56 ve %48) gözlenmiştir. Bu bileşiklerin pirimidin taşıyan **GS06** ve **GS12** analogları ise SIRT enzimlerine karşı etkisiz bulunmuştur. Bununla birlikte 4-fenilpiperazin grubu taşıyan bileşikler için de (**GS03**, **GS04**) test edilen hiçbir SIRT izoformuna karşı etki gözlenmemiştir. **GS01** kodlu bileşikten türevlendirilen **GS14** kodlu bileşik, test edilen bileşikler içerisinde en aktif bulunan bileşik olup, öncü bileşik için gözlenen inhibisyon gücü önemli derecede artmıştır. Moleküler modelleme sonuçları doğrultusunda **GS01** yapısındaki amit grubunun *N*-hidroksiimidamit yapısına çevirilmesi, beklenildiği gibi SIRT1 inhibisyonu korurken SIRT2 inhibisyon gücünün artmasına neden olmuştur.

Bileşiklerin SIRT enzimlerine karşı gözlenen etkinlikleri, ilgili enzimlerin aktif bölgesinde bileşikler için belirlenen bağlantı modları ve meydana getirdikleri etkileşimlerle uyumlu bulunmuştur.

SIRT1 enziminin yüksek ekspresyonu ile meme kanseri hücrelerinin artmış yayılımı ve metastazı arasında önemli bir bağlantının olduğu bilinmekte [73,74], bunun yanında selektif SIRT2 inhibitörlerinin meme kanseri hücrelerine karşı sitotoksik etkilerini gösteren çalışmalar [45,75,76] bulunmaktadır. Bu nedenle, SIRT1/2 inhibisyonu gösterdiği tespit edilen **GS01**, **GS02**, **GS11** ve **GS14** kodlu bileşiklerin MCF-7 hücre hattına karşı sitotoksik etkileri belirlenen zaman aralıklarında doza bağımlı bir şekilde test edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, **GS14** kodlu bileşik, MCF-7 hücrelerinin canlılığını 48 saat ($IC_{50}=41,05 \mu M$) ve 72 saat ($IC_{50}=33,12 \mu M$) sonra, Bileşik A'ya (IC_{50} değerleri 48 saat için $327,76 \mu M$; 72 saat için $>1 mM$) kıyasla konsantrasyona bağlı bir şekilde önemli ölçüde azaltmış, SIRT1/2 enzim aktivitelerini etkili bir şekilde inhibe ettiği konsantrasyonlarda hücre canlılığını da inhibe ettiği bulunmuştur. Aynı durum, **GS14** kadar güçlü olmasa da öncü bileşiğe göre daha iyi bir inhibisyon profili (IC_{50} değerleri 48 saat için $159,32 \mu M$; 72 saat için $14,54 \mu M$) sergileyen **GS01** için de gözlenmiştir. **GS01** ve **GS14** kodlu bileşiklerin hücre canlılığı üzerindeki inhibisyon oranları karşılaştırıldığında, iki bileşiğin de benzer SIRT1 inhibisyon değerine sahip olduğu için SIRT2 inhibisyonunun varlığının sitotoksik etkiyi arttırdığı yönünde yorum yapılabilir. Orta düzeyde selektif SIRT1 inhibisyonu gösteren **GS02** ve **GS11** kodlu bileşik

için, 48 saat sonrasında öncü bileŖiŖinkine benzer bir sitotoksik etki (IC_{50} değerleri **GS02** için 464,94 μM ; **GS11** için 523,84 μM) gözlenirken, 72 saat sonrasında sitotoksik etkileri BileŖik **A'**ya oranla biraz daha artmıŖtır (IC_{50} değerleri **GS02** için 320,98 μM ; **GS11** için 356,18 μM). Sonuç olarak, elde edilen sitotoksik etki düzeyleri ile SIRT1/2 inhibisyon değerleri uyumlu bulunmuŖtur.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında, öncü bileşiğe göre SIRT enzimlerine daha iyi bağlanan ve dolayısıyla bu enzimlere karşı daha güçlü inhibisyon etkisi gösteren bileşiklere ulaşmak amacıyla moleküler modelleme tekniklerinin de yardımıyla öncü bileşik üzerinde kimyasal modifikasyonlar yapılarak bir “öncü bileşik optimizasyonu” çalışması yürütülmüştür. Belirlenen kimyasal modifikasyonlar sonucu bir seri ariloksibenzamit türevi bileşik sentezlenmiş, yapıları spektroskopik yöntemlerle aydınlatılmıştır. SIRT1-3 enzimlerine karşı 100 μ M konsantrasyonda etkinlikleri test edilen bileşikler arasında **GS01** (%56,53), **GS02** (%48,15) ve **GS11** (%46,04) selektif SIRT1 inhibitörü olarak bulunmuştur. Çalışmaların başlangıç noktasını oluşturan öncü bileşiğin 300 μ M konsantrasyonda SIRT1 enzimini %31,45 oranında inhibe ettiği düşünüldüğünde, yürütülen öncü bileşik optimizasyonunun başarılı olduğu görülmüştür. Ayrıca, SIRT2 inhibisyon gücünün artırılmasına yönelik kimyasal modifikasyonlar da başarılı bulunmuş, **GS01** kodlu bileşikten bu amaçla türetilen **GS14** kodlu bileşiğin SIRT2 inhibisyonunu %10,80 oranından %51,61 oranına çıkardığı görülmüştür. Gerçekleştirilen kimyasal modifikasyonların SIRT1/2 enzim inhibisyonu üzerine etkilerinin sitotoksik etki üzerine yansımaları görebilmek amacıyla **GS01**, **GS02**, **GS11** ve **GS14** kodlu bileşiklerin MCF-7 hücre hattına karşı sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, bu bileşikler için gözlenen SIRT inhibisyon değerleri ile sitotoksik etkileri arasında korelasyon bulunmuş, SIRT1 ve SIRT2 inhibisyonundaki artışın, hücre canlılığına karşı etkiden sorumlu olabileceği sonucu çıkarılmıştır.

Sonuç olarak, antikanser ilaç geliştirilmesinde ümit vaat eden bir hedef olarak görülen ve gün geçtikçe ilgi odağı haline gelen SIRT enzimlerine karşı inhibitör etkili yeni bileşikler keşfetmek amacıyla yapılan bu çalışmaya ait sonuçlar, yeni güçlü ve selektif SIRT inhibitörlerinin tasarlanması ve geliştirilmesi için katkı sağlamaktadır.



KAYNAKLAR

1. Sauve, A.A., Wolberger, C., Schramm, V.L., and Boeke, J.D. (2006). The Biochemistry of Sirtuins. *Annual Review of Biochemistry*, 75(1), 435–465.
2. Therrien, E., Larouche, G., Nguyen, N., Rahil, J., Lemieux, A.-M., Li, Z., Fournel, M., Yan, T.P., Landry, A.J., Lefebvre, S., Wang, J.J., MacBeth, K., Heise, C., Nguyen, A., Besterman, J.M., Déziel, R., and Wahhab, A. (2015). Discovery of Bicyclic Pyrazoles as Class III Histone Deacetylase SIRT1 and SIRT2 Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(12), 2514–2518.
3. Zhou, Z., Ma, T., Zhu, Q., Xu, Y., and Zha, X. (2018). Recent Advances in Inhibitors of Sirtuin1/2: An Update and Perspective. *Future Medicinal Chemistry*, 10(8), 907–934.
4. Alcaín, F.J., and Villalba, J.M. (2009). Sirtuin Inhibitors. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 19(3), 283–294.
5. Neugebauer, R.C., Uchiechowska, U., Meier, R., Hruby, H., Valkov, V., Verdin, E., Sippl, W., and Jung, M. (2008). Structure–Activity Studies on Splitomicin Derivatives as Sirtuin Inhibitors and Computational Prediction of Binding Mode. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(5), 1203–1213.
6. Park, E.Y., Woo, Y., Kim, S.J., Kim, D.H., Lee, E.K., De, U., Kim, K.S., Lee, J., Jung, J.H., Ha, K.-T., Choi, W.S., Kim, I.S., Lee, B.M., Yoon, S., Moon, H.R., and Kim, H.S. (2016). Anticancer Effects of a New SIRT Inhibitor, MHY2256, against Human Breast Cancer MCF-7 Cells via Regulation of MDM2-P53 Binding. *International Journal of Biological Sciences*, 12(12), 1555–1567.
7. Panathur, N., Gokhale, N., Dalimba, U., Koushik, P.V., Yogeeswari, P., and Sriram, D. (2015). New Indole–Isoxazolone Derivatives: Synthesis, Characterisation and in Vitro SIRT1 Inhibition Studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(14), 2768–2772.
8. Uciechowska, U., Schemies, J., Scharfe, M., Lawson, M., Wichapong, K., Jung, M., and Sippl, W. (2012). Binding Free Energy Calculations and Biological Testing of Novel Thiobarbiturates as Inhibitors of the Human NAD⁺ Dependent Histone Deacetylase Sirt2. *Medicinal Chemistry Communication*, 3(2), 167–173.
9. Choi, G., Lee, J., Ji, J.Y., Woo, J., Kang, N.S., Cho, S.Y., Kim, H.R., Ha, J.D., and Han, S.-Y. (2013). Discovery of a Potent Small Molecule SIRT1/2 Inhibitor with Anticancer Effects. *International Journal of Oncology*, 43(4), 1205–1211.
10. Eren, G., Bruno, A., Guntekin-Ergun, S., Cetin-Atalay, R., Ozgencil, F., Ozkan, Y., Gozelle, M., Kaya, S.G., and Costantino, G. (2019). Pharmacophore Modeling and Virtual Screening Studies to Identify Novel Selective SIRT2 Inhibitors. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 89, 60–73.
11. Schiedel, M., Rumpf, T., Karaman, B., Lehotzky, A., Oláh, J., Gerhardt, S., Ovádi, J., Sippl, W., Einsle, O., and Jung, M. (2016). Aminothiazoles as Potent and Selective Sirt2

- Inhibitors: A Structure Activity Relationship Study. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(4), 1599–1612.
12. Yang, L.L., Wang, H.L., Zhong, L., Yuan, C., Liu, S.Y., Yu, Z.J., Liu, S., Yan, Y.H., Wu, C., Wang, Y., Wang, Z., Yu, Y., Chen, Q., and Li, G.-B. (2018). X-Ray Crystal Structure Guided Discovery of New Selective, Substrate-Mimicking Sirtuin 2 Inhibitors That Exhibit Activities against Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 155, 806–823.
 13. Klar, A.J., Fogel, S., and Macleod, K. (1979). MAR1a Regulator of the HMa and HM α Loci in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Genetics, Genetics Society America*, 93(1), 37–50.
 14. Rine, J., and Herskowitz, I. (1987). Four Genes Responsible for a Position Effect on Expression from HML and HMR in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Genetics, Genetics Society America*, 116(1), 9–22.
 15. Michan, S., and Sinclair, D. (2007). Sirtuins in Mammals: Insights into Their Biological Function. *Biochemical Journal*, Portland Press, 404(1), 1–13.
 16. Gottlieb, S., and Esposito, R.E. (1989). A New Role for a Yeast Transcriptional Silencer Gene, SIR2, in Regulation of Recombination in Ribosomal DNA. *Cell*, 56(5), 771–776.
 17. Frye, R.A. (1999). Characterization of Five Human CDNAs with Homology to the Yeast SIR2 Gene: Sir2-like Proteins (Sirtuins) Metabolize NAD and May Have Protein ADP-Ribosyltransferase Activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 260(1), 273–279.
 18. Jing, H., and Lin, H. (2015). Sirtuins in Epigenetic Regulation. *Chemical Reviews*, 115(6), 2350–2375.
 19. Frye, R.A. (2000). Phylogenetic Classification of Prokaryotic and Eukaryotic Sir2-like Proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273(2), 793–798.
 20. Tanno, M., Sakamoto, J., Miura, T., Shimamoto, K., and Horio, Y. (2007). Nucleocytoplasmic Shuttling of the NAD⁺ Dependent Histone Deacetylase SIRT1. *Journal of Biological Chemistry*, 282(9), 6823–6832.
 21. Scher, M.B., Vaquero, A., and Reinberg, D. (2007). SirT3 Is a Nuclear NAD⁺ Dependent Histone Deacetylase That Translocates to the Mitochondria upon Cellular Stress. *Genes & Development*, 21(8), 920–928.
 22. Zhou, Z., Ma, T., Zhu, Q., Xu, Y., and Zha, X. (2018). Recent Advances in Inhibitors of Sirtuin1/2: An Update and Perspective. *Future Medicinal Chemistry*, Future Science, 10(8), 907–934.
 23. Giblin, W., and Lombard, D.B. (2016). Sirtuins, Healthspan, and Longevity in Mammals. *Handbook of the Biology of Aging*, 155, 83–132.

24. Moniot, S., Weyand, M., and Steegborn, C. (2012). Structures, Substrates, and Regulators of Mammalian Sirtuins—Opportunities and Challenges for Drug Development. *Frontiers in Pharmacology*, *Frontiers*, 3, 16.
25. Sanders, B.D., Jackson, B., and Marmorstein, R. (2010). Structural Basis for Sirtuin Function: What We Know and What We Don't. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1804(8), 1604–1616.
26. Martínez-Redondo, P., and Vaquero, A. (2013). The Diversity of Histone versus Non-histone Sirtuin Substrates. *Genes & Cancer*, 4(3-4), 148–163.
27. Teixeira, C.S.S., Cerqueira, N.M.F.S.A., Gomes, P., and Sousa, S.F. (2020). A Molecular Perspective on Sirtuin Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8609.
28. Bheda, P., Jing, H., Wolberger, C., and Lin, H. (2016). The Substrate Specificity of Sirtuins. *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), 405–429.
29. Langley, B., and Sauve, A. (2013). Sirtuin Deacetylases as Therapeutic Targets in the Nervous System. *Neurotherapeutics*, 10(4), 605–620.
30. Morigi, M., Perico, L., and Benigni, A. (2018). Sirtuins in Renal Health and Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 29(7), 1799–1809.
31. Chang, H.C., and Guarente, L. (2014). SIRT1 and Other Sirtuins in Metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 25(3), 138–145.
32. Panathur, N., Gokhale, N., Dalimba, U., Koushik, P.V., Yogeeswari, P., and Sriram, D. (2015). New Indole–Isoxazolone Derivatives: Synthesis, Characterisation and in Vitro SIRT1 Inhibition Studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(14), 2768–2772.
33. Park, E.Y., Woo, Y., Kim, S.J., Kim, D.H., Lee, E.K., De, U., Kim, K.S., Lee, J., Jung, J.H., and Ha, K.T. (2016). Anticancer Effects of a New SIRT Inhibitor, MHY2256, against Human Breast Cancer MCF-7 Cells via Regulation of MDM2-P53 Binding. *International Journal of Biological Sciences*, 12(12), 1555.
34. Chen, Y.-P., Catbagan, C.C., Bowler, J.T., Gokey, T., Goodwin, N.D., Guliaev, A.B., Wu, W., and Amagata, T. (2014). Evaluation of Benzoic Acid Derivatives as Sirtuin Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(1), 349–352.
35. Hubbard, B.P., and Sinclair, D.A. (2014). Small Molecule SIRT1 Activators for the Treatment of Aging and Age-Related Diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35(3), 146–154.
36. Hu, J., Jing, H., and Lin, H. (2014). Sirtuin Inhibitors as Anticancer Agents. *Future Medicinal Chemistry*, 6(8), 945–966.

37. Zhao, X., Allison, D., Condon, B., Zhang, F., Gheyi, T., Zhang, A., Ashok, S., Russell, M., MacEwan, I., Qian, Y., Jamison, J.A., and Luz, J.G. (2013). The 2.5 Å Crystal Structure of the SIRT1 Catalytic Domain Bound to Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD⁺) and an Indole (EX527 Analogue) Reveals a Novel Mechanism of Histone Deacetylase Inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(3), 963–969.
38. Suzuki, T., Khan, M.N.A., Sawada, H., Imai, E., Itoh, Y., Yamatsuta, K., Tokuda, N., Takeuchi, J., Seko, T., Nakagawa, H., and Miyata, N. (2012). Design, Synthesis, and Biological Activity of a Novel Series of Human Sirtuin-2-Selective Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(12), 5760–5773.
39. Green, K.N., Steffan, J.S., Martinez-Coria, H., Sun, X., Schreiber, S.S., Thompson, L.M., and LaFerla, F.M. (2008). Nicotinamide Restores Cognition in Alzheimer's Disease Transgenic Mice via a Mechanism Involving Sirtuin Inhibition and Selective Reduction of Thr231-Phosphotau. *Journal of Neuroscience*, 28(45), 11500–11510.
40. Outeiro, T.F., Kontopoulos, E., Altmann, S.M., Kufareva, I., Strathearn, K.E., Amore, A.M., Volk, C.B., Maxwell, M.M., Rochet, J.C., McLean, P.J., Young, A.B., Abagyan, R., Feany, M.B., Hyman, B.T., and Kazantsev, A.G. (2007). Sirtuin 2 Inhibitors Rescue - Synuclein-Mediated Toxicity in Models of Parkinson's Disease. *Science*, 317(5837), 516–519.
41. Luthi-Carter, R., Taylor, D.M., Pallos, J., Lambert, E., Amore, A., Parker, A., Moffitt, H., Smith, D.L., Runne, H., Gokce, O., Kuhn, A., Xiang, Z., Maxwell, M.M., Reeves, S.A., Bates, G.P., Neri, C., Thompson, L.M., Marsh, J.L., and Kazantsev, A.G. (2010). SIRT2 Inhibition Achieves Neuroprotection by Decreasing Sterol Biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(17), 7927–7932.
42. Taylor, D.M., Balabadra, U., Xiang, Z., Woodman, B., Meade, S., Amore, A., Maxwell, M.M., Reeves, S., Bates, G.P., Luthi-Carter, R., Lowden, P.A.S., and Kazantsev, A.G. (2011). A Brain-Permeable Small Molecule Reduces Neuronal Cholesterol by Inhibiting Activity of Sirtuin 2 Deacetylase. *American Chemical Society Chemical Biology*, 6(6), 540–546.
43. Jin, Y.H., Kim, Y.J., Kim, D.W., Baek, K.H., Kang, B.Y., Yeo, C.Y., and Lee, K.Y. (2008). Sirt2 Interacts with 14-3-3 β/γ and down-Regulates the Activity of P53. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368(3), 690–695.
44. He, X., Nie, H., Hong, Y., Sheng, C., Xia, W., and Ying, W. (2012). SIRT2 Activity Is Required for the Survival of C6 Glioma Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 417(1), 468–472.
45. Jing, H., Hu, J., He, B., Negrón Abril, Y.L., Stupinski, J., Weiser, K., Carbonaro, M., Chiang, Y.L., Southard, T., Giannakakou, P., Weiss, R.S., and Lin, H. (2016). A SIRT2-Selective Inhibitor Promotes c-Myc Oncoprotein Degradation and Exhibits Broad Anticancer Activity. *Cancer Cell*, 29(3), 297–310.

46. Xie, H.J., Jung, K.H., and Nam, S.W. (2011). Overexpression of SIRT2 Contributes Tumor Cell Growth in Hepatocellular Carcinomas. *Molecular & Cellular Toxicology*, 7(4), 367–374.
47. Hoffmann, G., Breitenbücher, F., Schuler, M., and Ehrenhofer-Murray, A.E. (2014). A Novel Sirtuin 2 (SIRT2) Inhibitor with P53-Dependent Pro-Apoptotic Activity in Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 289(8), 5208–5216.
48. Xu, J., Kitada, M., and Koya, D. (2020). The Impact of Mitochondrial Quality Control by Sirtuins on the Treatment of Type 2 Diabetes and Diabetic Kidney Disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1866(6), 165756.
49. Shanmugam, M.K., Rangappa, S., Metri, P.K., Mohan, S., and Rangappa, K.S. (2020). Exploring the Newer Oxadiazoles as Real Inhibitors of Human SIRT2 in Hepatocellular Cancer Cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 30(16), 127330.
50. Rumpf, T., Schiedel, M., Karaman, B., Roessler, C., North, B.J., Lehotzky, A., Oláh, J., Ladwein, K.I., Schmidtkunz, K., Gajer, M., Pannek, M., Steegborn, C., Sinclair, D.A., Gerhardt, S., Ovádi, J., Schutkowski, M., Sippl, W., Einsle, O., and Jung, M. (2015). Selective Sirt2 Inhibition by Ligand-Induced Rearrangement of the Active Site. *Nature Communications*, 6(1), 6263.
51. Schiedel, M., Robaa, D., Rumpf, T., Sippl, W., and Jung, M. (2018). The Current State of NAD⁺ Dependent Histone Deacetylases (Sirtuins) as Novel Therapeutic Targets. *Medicinal Research Reviews*, 38(1), 147–200.
52. Lawson, M., Uciechowska, U., Schemies, J., Rumpf, T., Jung, M., and Sippl, W. (2010). Inhibitors to Understand Molecular Mechanisms of NAD⁺ Dependent Deacetylases (Sirtuins). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1799(10-12), 726–739.
53. Heltweg, B., Gatabonton, T., Schuler, A.D., Posakony, J., Li, H., Goehle, S., Kollipara, R., DePinho, R.A., Gu, Y., Simon, J.A., and Bedalov, A. (2006). Antitumor Activity of a Small-Molecule Inhibitor of Human Silent Information Regulator 2 Enzymes. *Cancer Research*, 66(8), 4368–4377.
54. Figuera-Losada, M., Stathis, M., Dorskind, J.M., Thomas, A.G., Bandaru, V.V.R., Yoo, S.-W., Westwood, N.J., Rogers, G.W., McArthur, J.C., Haughey, N.J., Slusher, B.S., and Rojas, C. (2015). Cambinol, a Novel Inhibitor of Neutral Sphingomyelinase 2 Shows Neuroprotective Properties. *PLOS ONE*, 10(5), e0124481.
55. Pagans, S., Pedal, A., North, B.J., Kaehlcke, K., Marshall, B.L., Dorr, A., Hetzer-Egger, C., Henklein, P., Frye, R., McBurney, M.W., Hruby, H., Jung, M., Verdin, E., and Ott, M. (2005). SIRT1 Regulates HIV Transcription via Tat Deacetylation. *PLOS Biology*, 3(2), e41.
56. Lara, E., Mai, A., Calvanese, V., Altucci, L., Lopez-Nieva, P., Martinez-Chantar, M.L.,

- Varela-Rey, M., Rotili, D., Nebbioso, A., Roperio, S., Montoya, G., Oyarzabal, J., Velasco, S., Serrano, M., Witt, M., Villar-Garea, A., Inhof, A., Mato, J.M., Esteller, M., and Fraga, M.F. (2009). Salermide, a Sirtuin Inhibitor with a Strong Cancer-Specific Proapoptotic Effect. *Oncogene*, 28(6), 781–791.
57. McCarthy, A.R., Sachweh, M.C., Higgins, M., Campbell, J., Drummond, C.J., van Leeuwen, I.M., Pirrie, L., Ladds, M.J., Westwood, N.J., and Laín, S. (2013). Tenovin-D3, a Novel Small-Molecule Inhibitor of Sirtuin SirT2, Increases P21 (CDKN1A) Expression in a P53-Independent Manner. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(4), 352–360.
 58. Napper, A.D., Hixon, J., McDonagh, T., Keavey, K., Pons, J.F., Barker, J., Yau, W.T., Amouzegh, P., Flegg, A., and Hamelin, E. (2005). Discovery of Indoles as Potent and Selective Inhibitors of the Deacetylase SIRT1. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(25), 8045–8054.
 59. Süßmuth, S.D., Haider, S., Landwehrmeyer, G.B., Farmer, R., Frost, C., Tripepi, G., Andersen, C.A., Bacco, M.D., Lamanna, C., Diodato, E., Massai, L., Diamanti, D., Mori, E., Magnoni, L., Dreyhaupt, J., Schiefele, K., Craufurd, D., Saft, C., Rudzinska, M., Ryglewicz, D., Orth, M., Brzozy, S., Baran, A., Pollio, G., Andre, R., Tabrizi, S.J., Darpo, B., and Westerberg, G. (2015). An Exploratory Double-Blind, Randomized Clinical Trial with Selisistat, a SirT1 Inhibitor, in Patients with Huntington's Disease. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 79(3), 465–476.
 60. Disch, J.S., Evindar, G., Chiu, C.H., Blum, C.A., Dai, H., Jin, L., Schuman, E., Lind, K.E., Belyanskaya, S.L., Deng, J., Coppo, F., Aquilani, L., Graybill, T.L., Cuzzo, J.W., Lavu, S., Mao, C., Vlasuk, G.P., and Perni, R.B. (2013). Discovery of Thieno[3,2-d]Pyrimidine-6-Carboxamides as Potent Inhibitors of SIRT1, SIRT2, and SIRT3. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(9), 3666–3679.
 61. Trapp, J., Jochum, A., Meier, R., Saunders, L., Marshall, B., Kunick, C., Verdin, E., Goekjian, P., Sippl, W., and Jung, M. (2006). Adenosine Mimetics as Inhibitors of NAD⁺-Dependent Histone Deacetylases, from Kinase to Sirtuin Inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(25), 7307–7316.
 62. Tan, Y.J., Lee, Y.T., Yeong, K.Y., Petersen, S.H., Kono, K., Tan, S.C., and Oon, C.E. (2018). Anticancer Activities of a Benzimidazole Compound through Sirtuin Inhibition in Colorectal Cancer. *Future Medicinal Chemistry*, 10(17), 2039–2057.
 63. Wössner, N., Alhalabi, Z., González, J., Swyter, S., Gan, J., Schmidtkunz, K., Zhang, L., Vaquero, A., Ovaa, H., Einsle, O., Sippl, W., and Jung, M. (2020). Sirtuin 1 Inhibiting Thiocyanates (S1th)—A New Class of Iso-type Selective Inhibitors of NAD⁺ Dependent Lysine Deacetylases. *Frontiers in Oncology*, 10, 657.
 64. Ma, D., and Cai, Q. (2003). *N,N*-Dimethyl Glycine-Promoted Ullmann Coupling Reaction of Phenols and Aryl Halides. *Organic Letters*, 5(21), 3799–3802.
 65. Zhang, Y., Ni, G., Li, C., Xu, S., Zhang, Z., and Xie, X. (2015). The Coupling Reactions of

- Aryl Halides and Phenols Catalyzed by Palladium and MOP-Type Ligands. *Tetrahedron*, 71(30), 4927–4932.
66. Friesner, R.A., Murphy, R.B., Repasky, M.P., Frye, L.L., Greenwood, J.R., Halgren, T.A., Sanschagrin, P.C., and Mainz, D.T. (2006). Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein–Ligand Complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(21), 6177–6196.
 67. Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55–63.
 68. Kuźma, Ł., Wysokińska, H., Różalski, M., Krajewska, U., and Kisiel, W. (2012). An Unusual Taxodione Derivative from Hairy Roots of *Salvia Austriaca*. *Fitoterapia*, 83(4), 770–773.
 69. Yang, Y., Wang, Z., Yang, J., Yang, T., Pi, W., Ang, W., Lin, Y., Liu, Y., Li, Z., Luo, Y., and Wei, Y. (2012). Design, Synthesis and Evaluation of Novel Molecules with a Diphenyl Ether Nucleus as Potential Antitubercular Agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(2), 954–957.
 70. Hemmi, K.D., Shimazaki, N., Watanabe, S., and Sawada, A. (1996). Preparation of Heterobicyclic Derivatives as Phosphodiesterase IV Inhibitors and Tumor Necrosis Factors. *The Patent Cooperation Treaty Int. Application*, WO 9601825 A1 19960125 n.d.
 71. Huang, Z.N., Liang, H., Qiao, H., Wang, B.R., Qu, N., Li, H., Zhou, R.R., Wang, L.J., Li, S.H., and Li, F.N. (2018). Synthesis and Structure–Activity Relationship of N-(Piperidin-4-Yl)Benzamide Derivatives as Activators of Hypoxia-Inducible Factor 1 Pathways. *Archives of Pharmacal Research*, 41(12), 1149–1161.
 72. Liu, K.-C., Shelton, B.R., and Howe, R.K. (1980). A Particularly Convenient Preparation of Benzohydroximinoyl Chlorides (Nitrile Oxide Precursors). *The Journal of Organic Chemistry*, 45(19), 3916–3918.
 73. Sinha, S., Sharma, S., Vora, J., and Shrivastava, N. (2020). Emerging Role of Sirtuins in Breast Cancer Metastasis and Multidrug Resistance: Implication for Novel Therapeutic Strategies Targeting Sirtuins. *Pharmacological Research*, 158, 104880.
 74. Jin, X., Wei, Y., Xu, F., Zhao, M., Dai, K., Shen, R., Yang, S., and Zhang, N. (2018). SIRT1 Promotes Formation of Breast Cancer through Modulating Akt Activity. *Journal of Cancer*, 9(11), 2012–2023.
 75. Zhang, L., Kim, S., and Ren, X. (2020). The Clinical Significance of SIRT2 in Malignancies: A Tumor Suppressor or an Oncogene. *Frontiers in Oncology*, 10, 1721.
 76. Shah, A.A., Ito, A., Nakata, A., and Yoshida, M. (2016). Identification of a Selective SIRT2 Inhibitor and Its Anti-Breast Cancer Activity. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 39(10), 1739–1742.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : YAĞCI, Semih
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi, yeri : 09.03.1993, Samsun
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 0530 936 3836
 E-posta : smhygc55@gmail.com



Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Kimya ABD	Devam ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2017
Lise	Samsun Yeşilkent Anadolu Lisesi	2011
İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2018-devam ediyor	Hitit Üniversitesi Çorum Erol Olçok E.A.H.	Eczacı
2017-2018	Özel Bilgi Hastanesi	Eczacı

Yabancı Dili

İngilizce

Eserler

1. YAGCI S., GOZELLE M., KAYA S.G., EREN G. (2019). Design and Synthesis of Aryloxy Benzamide Derivatives with Potential Inhibitory Effect against SIRT2. *EFMC-YMCS, 6th EFMC Young Medicinal Chemist Symposium*, September 5-6, Athens, Greece (Poster bildirisi).
2. YAGCI S., GOZELLE M., KAYA S.G., OZKAN Y., AKSEL A.B., BAKAR-ATES F., DUNDAR Y., EREN G. (2020). Hit-to-lead Optimization on Aryloxybenzamide Derivative Virtual Screening Hit against SIRT. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 30, 115961 (2021) .



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR...

