



**BAZI VİSİNAL DİARİL HETEROSİKLİK BİLEŞİKLERİN ANTİKANSER
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sümeyye TURANLI

**DOKTORA TEZİ
FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ARALIK 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.

Sümeyye TURANLI

08.12.2021

BAZI VİSİNAL DİARİL HETEROSİKLİK BİLEŞİKLERİN ANTİKANSER
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

(Doktora Tezi)

Sümeyye TURANLI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2021

ÖZET

Kanser, hücrenin bütünleşik işlevlerinin, çevreyle de etkileşerek patolojik özellikler kazanması ve kontrolsüz bir şekilde çoğalması olarak bilinmektedir. Çeşitli tedavi yaklaşımları geliştirilmiş olmasına rağmen kişilerin yaşam kalitesini ve süresini etkileyen önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Bu nedenle birçok seçkin araştırmacı tarafından kanser hücrelerine selektif, daha az yan etki profili olan ve hastaların yaşam kalitesini arttırayı amaçlayan yeni antikanser ajan geliştirme çalışmaları yapılmaktadır. Dünya Sağlık örgütünün verilerine göre kanser türleri arasında meme ve karaciğer kanserleri en çok tanı alan kanser türleri arasındadır. Karaciğer ve meme kanserine karşı antikanser etkili yeni bileşikler geliştirmek amacıyla araştırma grubumuz tarafından geliştirilen 5-metil-4-(4-klorofenil)-3-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)izoksazol (EB38) öncü bileşiğinden hareketle bu tez kapsamında 33 adet yeni bileşik sentezlenmiştir. Bu bileşiklerin meme ve karaciğer kanseri hücre hatlarına karşı sitotoksik etkileri test edilmiş ve EB38 öncü bileşiğine kıyasla kanser hücrelerinin proliferasyonunu daha potent olarak inhibe eden yeni bileşikler geliştirilmesi hedeflenmiştir. EB38 öncü bileşiğinin benziloksifenil grubu, izoksazol halkasının 4. konumuna bağlı fenil grubu, 5. konumunda yer alan metil grubu ve heterosiklik merkez halka üzerinde yapılan değişikliklerle bu seri bileşiklerde yapı-etki ilişkileri incelenmiştir. Beş üyeli merkezi heterosiklik halka üzerinde yapılan izosterik değişikliklerle ulaşılan bileşiklerin sitotoksikite değerleri incelendiğinde umut vadeden sonuçlar elde edilmiştir. Sentezlenen bileşiklerden 1,5-diarilpirazol merkez halkasını içeren Bileşik 36, öncü bileşik EB38'e kıyasla her üç hücre hattı içinde potent antikanser aktivite ortaya çıkarmıştır (IC₅₀ değerleri (Huh7)= 0.8, (MV)= 3.7 and (MCF7)= 1.5 μ M). Bu sonuçlara göre EB38 yapısındaki izoksazol merkez halkasının yerine pirazol halkasının getirilmesi antikanser aktiviteleri ve farklı kanser hücre hatlarına karşı selektiviteyi önemli derecede etkilediği tespit edilmiştir. Bu sebeple sonraki sentez çalışmalarında pirazol merkez halkası ile devam edilmiş, izoksazol halkası üzerinde yapılan bazı modifikasyon çalışmaları pirazol halkası için de tekrarlanmıştır. Sonuç olarak, 3,4-diaril-izoksazol ve 1,5-diaril-pirazol türevlerinin kanser tedavisi için ileri çalışmalara aday kimyasal yapılar olarak değerleri ortaya konulmuştur.

Bilim Kodu : 1019
Anahtar Kelimeler : Karaciğer kanseri, meme kanseri, pirazol, sitotoksikite
Sayfa Adedi : 166
Danışman : Prof. Dr. Burcu ÇALIŞKAN

INVESTIGATION OF ANTICANCER ACTIVITIES OF SOME VISINAL DIARYL HETEROCYCLIC COMPOUNDS

(Ph. D. Thesis)

Sümeyye TURANLI

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

December 2021

ABSTRACT

Cancer is defined as an uncontrolled cell proliferation, gaining pathological features by interacting with the environment. Although various treatment approaches have been developed, it continues to be an important problem affecting people's quality of life and survival. For this reason, many distinguished researchers have worked on developing new anticancer agents that are selective to cancer cells and have less side-effects aiming to increase the quality of life of the patients. According to the data of WHO, breast and liver cancers are among the most diagnosed cancer types. Based on the lead compound 5-methyl-4-(4-chlorophenyl)-3-(4-((2-methylbenzyl)oxy)phenyl)isoxazole (EB38) developed by our research group, 33 new compounds were synthesized within the scope of this thesis in order to develop new compounds effective against liver and breast cancer. The cytotoxic effects of these compounds against breast and liver cancer cell lines were determined to develop new compounds that more potently inhibit the proliferation of cancer cells as compared to the EB38. The structure-activity relationships in this compound series were developed by changes made on the benzyloxyphenyl group of the EB38, on the phenyl group attached to the 4th position of the isoxazole ring, on the methyl group at the 5th position and on the heterocyclic central ring. As a result, the isosteric changes on the central five-membered heterocyclic ring exemplified by Compound 36 with 1,5-diarylpyrazole ring elicited potent anticancer activity in all three cell lines compared to the lead compound EB38 (value of IC₅₀ (Huh7)= 0.8, (MV)= 3.7 and (MCF7)= 1.5 μ M). According to these results, it was determined that the replacement of the isoxazole center ring in the EB38 with the pyrazole ring significantly affected the anticancer activities and selectivity against different cancer cell lines. For this reason, subsequent synthesis studies continued with the pyrazole central ring, and modifications of the isoxazole derivatives were again introduced to the pyrazole analogues. In conclusion, 3,4-diaryl-isoxazole and 1,5-diaryl-pyrazole derivatives have been demonstrated as candidate compounds for further development as potential cancer therapeutics.

Science Code : 1019

Key Words : Liver cancer, breast cancer, pyrazole, cytotoxicity

Page Number : 166

Supervisor : Prof. Dr. Burcu ÇALIŞKAN

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmaları kapsamında gerçekleştirdiğim akademik serüvenimde azmi, zekası, bilgi ve tecrübesi, bilimsel çalışmaları takip etme hızı, karşılaşılabilecek problemlere çözüm üretme becerisi, bilimsel konulardaki bilgi birikiminin yanında engin öngörülerıyla bana ışık tutan ve yol gösterici bir rehber olan danışmanım sevgili ve saygıdeğer hocam Prof. Dr. Burcu ÇALIŞKAN'a; çalışma grubunda olmaktan gurur; bilgi ve tecrübelerine büyük saygı duyduğum, akademik düşünmeyi öğreten, her türlü yardımı ve desteği hiçbir zaman esirgemeyen Farmasötik Kimya Anabilimda Dalı'nın duayen hocası saygıdeğer hocam Prof. Dr. Erden BANOĞLU'na en içten minnettarlığımı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Orta Doğu Teknik Üniversitesi'nden Prof. Dr. Rengül ÇETİN ATALAY danışmanlığında biyolojik aktivite çalışmalarını titizlikle yürüten Esra NALBAT'a, analiz çalışmalarını gerçekleştiren Ankara Üniversitesi'nden saygıdeğer hocam Prof. Dr. Hakan GÖKER'e, ayrıca bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde verdiği desteklerden ötürü Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK Proje No: 215S015) çok teşekkür ediyorum. Çalışmakla onur duyduğum anabilim dalımızın tüm değerli öğretim üyelerine, yürütmüş olduğum asistanlık görevimde desteğini ve dostluğunu esirgemeyen, çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma, doktoramın ilk yıllarından beri dirsek teması kurup akıl aldığım Dr. Z. Tuğçe GÜR MAZ'a ve hep yanımda olan araştırma grubumuzun (Banoglu Research Group) kıymetli üyelerine, ebediyete yolcu etmekle büyük üzüntü duyduğum, tanıma onuruna eriştiğim için şanslı hissettiğim canım hocam Prof. Dr. Tijen ÖNKOL'a çok teşekkür ediyorum. Doktora sürecim boyunca her zaman varlıkları, dostlukları ve destekleri ile hep yanımda olup bana güç veren ve bu süreçte en büyük kazanımlarımdan olan, dostluğumuzun ömür boyu sürmesini temenni ettiğim değerli arkadaşlarım Dr. Kübra İBİŞ, Dr. Deniz LENGERLİ, Dr. Merve BARDAKKAYA ve Ecz. Azize Gizem ERGÜL'e de en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tezi; sevgisini her daim hissettiğim, hayatım boyunca her adımda beni destekleyip her türlü fedakârlıkla yanımda olan ve bana ben olmayı öğreten anneme, babama, canımdan çok sevdiğim kızkardeşlerime, varlığı ve desteğiyle huzur ve güç veren canım eşim Yasin'e ve sevgili oğlum Muhammed Sinan'a ithaf ediyorum...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. Kanser ve Tümör Olgusu.....	7
2.2. Karaciğer ve Meme Kanserinde Tedavi Yaklaşımları.....	12
2.3. İlaç Geliştirme Çalışmalarında Visinal Diaril Heterosiklik Sistemler....	16
2.4. Visinal Diaril İzoksazol Yapısı Taşıyan Antikanser Ajanlar.....	21
2.5. Visinal Diaril Pirazol Yapısı Taşıyan Antikanser Ajanlar.....	35
2.6. Visinal Diaril Heterosiklik Merkez Taşıyan Diğer Antikanser Ajanlar...	45
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	53
3.1. Kimyasal Çalışmalar.....	53
3.1.1. Gereçler.....	53
3.1.2. Genel sentez yöntemleri.....	54
3.2. Analitik Çalışmalar.....	58
3.2.1. Erime derecesi tayini.....	58
3.2.2. ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR spektrumları.....	58
3.2.3. HRMS spektrumları.....	58
3.2.4. X-ışını kristalografisi.....	58
3.3. Biyolojik Çalışmalar.....	59
3.3.1. Hücre kültürü.....	59
3.3.2. SRB (Sulforadamin B) ile sitotoksosite tayini.....	59
3.3.3. Western blot analizi.....	60
3.3.4. Annexin V ile hücre ölümü mekanizması analizi.....	61

	Sayfa
3.3.5. Hoechst floresan boyama ile hücre ölümü tespiti.....	61
3.3.6. Hücre döngüsü analizi.....	61
3.3.7. Meme ve karaciğer kanseri ksenograft modelinde <i>in vivo</i> antikanser etki tayini.....	62
3.3.8. ADME özelliklerinin tayini ve farmakokinetik analiz.....	62
3.3.9. ABD ulusal kanser enstitüsü tarama programı kapsamında gerçekleştirilen sitotoksisite analizi.....	62
4. BULGULAR.....	63
4.1. Kimyasal Bulgular.....	63
4.2. Biyolojik Bulgular.....	119
5. TARTIŞMA.....	123
5.1. Sentez Çalışmaları.....	123
5.1.1. 4-Klorofenil grubunun (A Halkası) modifikasyonu amacıyla sentezlenen izoksazol türevi bileşiklerin sentez çalışmaları.....	123
5.1.2. 3,4-Diaril-5-aminoizoksazol merkez halkası taşıyan EB38 analoğunun sentez çalışması.....	124
5.1.3. 4,5-Diarilizoksazol merkez halkası taşıyan EB38 analoğunun sentez çalışmaları.....	125
5.1.4. 5-Metil-3,4-diarilizoksazol merkez halkası taşıyan EB38 analoğunun sentez çalışmaları.....	126
5.1.5. 2-Metil-4,5-diariltiazol merkez halkası taşıyan EB38 analoğunun sentez çalışması.....	127
5.1.6. C halkası modifikasyonu amacıyla sentezlenen pirazol türevi bileşiklerin sentez çalışmaları.....	127
5.1.7. A halkası modifikasyonu amacıyla sentezlenen pirazol türevi bileşiklerin sentez çalışmaları.....	128
5.1.8. 3-Metil-1,5-diarilpirazol merkez halkası taşıyan Bileşik 51'in sentez çalışması.....	129
5.1.9. 1,5-Diarilpirazol merkez halkası taşıyan Bileşik 55'in sentez çalışması.....	130

	Sayfa
5.1.10. 3-Metil-1,5-diarilpirazol merkez halkası taşıyan Bileşik 59'un sentez çalışması.....	131
5.1.11. 4,5-Diarilpirazol merkez halkası taşıyan EB38 analoglarının sentez çalışmaları.....	131
5.1.12. B halkası modifikasyonu amacıyla sentezlenen pirazol türevi bileşiklerin sentez çalışmaları.....	132
5.1.13. Sentezlenen bileşiklerin yapı aydınlatma çalışmaları ve bileşik 36'nın ¹ H-nmr ve ¹³ C-nmr spektrumları.....	134
5.1.14. Bileşik 36 ve Bileşik 51'in molekül yapılarının tek kristal X-ışını kırınımı yöntemi ile aydınlatılması.....	136
5.2. Biyolojik Çalışmalar ve Yapı Etki İlişkileri.....	137
5.2.1. Bileşik 36 ile yapılan ileri sitotoksisite analizleri.....	139
5.2.2. ADME özelliklerinin değerlendirilmesi ve farmakokinetik çalışmalar.....	142
5.2.3. Meme ve karaciğer kanseri ksenograft modelinde bileşik 36'nın <i>in vivo</i> antikanser etkilerinin belirlenmesi.....	144
5.2.4. Bileşik 36'nın NCI-60 kanser panelindeki hücre hatlarına sitotoksik etkisi.....	146
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	151
KAYNAKLAR.....	153
ÖZGEÇMİŞ.....	165
EKLER.....	168

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 1.1. Tez kapsamında sentezlenen sonuç bileşikler.....	4
Çizelge 1.1. (devam) Tez kapsamında sentezlenen sonuç bileşikler.....	5
Çizelge 1.1. (devam) Tez kapsamında sentezlenen sonuç bileşikler.....	6
Çizelge 2.1. Bileşik 11'in bazı kanser hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktiviteleri.....	29
Çizelge 2.2. Bileşikler 20 ve 21'e ait aktivite değerleri.....	33
Çizelge 2.3. Selekoksib'in bazı kanser hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktiviteleri.....	42
Çizelge 2.4. Merkezi halkada pirazol içeren TbR-I kinaz inhibitörleri.....	44
Çizelge 2.5. Merkezi halkada imidazol içeren TbR-I kinaz inhibitörleri.....	50
Çizelge 2.5. (devam) Merkezi halkada imidazol içeren TbR-I kinaz inhibitörleri.....	51
Çizelge 4.1. 4-Klorofenil Grubunun (A Halkası) Modifikasyonu Amacıyla Sentezlenen İzoksazol Türevi Bileşiklerin Sitotoksik Aktiviteleri.....	119
Çizelge 4.2. Merkez Halka Modifikasyonu Amacıyla Sentezlenen Bileşiklerin Sitotoksik Aktiviteleri.....	120
Çizelge 4.3. C Halkası Modifikasyonu Amacıyla Sentezlenen Pirazol Türevi Bileşiklerin Sitotoksik Aktiviteleri.....	121
Çizelge 4.4. B Halkası Modifikasyonu Amacıyla Sentezlenen Pirazol Türevi Bileşiklerin Sitotoksik Aktiviteleri.....	122
Çizelge 5.1. Bileşik 36'nın karaciğer ve meme kanseri hücre hatlarındaki IC ₅₀ değerleri.....	139
Çizelge 5.2. Bileşik 36 <i>in vitro</i> ADME özellikleri	143
Çizelge 5.3. Bileşik 36'nın farmakokinetik analiz sonuçları (IV doz; 1 mg/kg ve oral doz; 10 mg/kg).....	144
Çizelge 5.4. Bileşik 36'nın 10 µM tek dozda NCI-60 kanser panelinde yer alan hücre hatlarına karşı sitotoksik etkisi.....	147
Çizelge 5.4. (devam) Bileşik 36'nın 10 µM tek dozda NCI-60 kanser panelinde yer alan hücre hatlarına karşı sitotoksik etkisi.....	148

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Öncü bileşik EB38'in kimyasal yapısı.....	2
Şekil 1.2. EB38 molekülü üzerinden YEİ (yapı-etki ilişkisi) araştırmak amacıyla planlanan modifikasyonlar.....	3
Şekil 2.1. Cinsiyete Göre Türkiye'deki kanser insidansı [7].....	8
Şekil 2.2. Hücresel düzeydeki tümörjenik yetenekler ve bu özellikleri hedefleyen antikanser ajan sınıfları (referans [10, 13]'den uyarlanmıştır).....	10
Şekil 2.3. Meme kanseri alt tipleri, moleküler özellikleri ve meme kanserleri arasındaki yüzde oranları [21].....	13
Şekil 2.4. Visinal heterosiklik bileşiklerin şematik olarak gösterimi.....	16
Şekil 2.5. Visinal diaril heterosiklik yapı içeren klinikte kullanılan ilaçlar.....	18
Şekil 2.6. Dabrafenib ve Encorafenib'in kimyasal yapısı.....	19
Şekil 2.7. İzoksazol halkası içeren bazı ilaçlar.....	21
Şekil 2.8. HSP90'nın doğal inhibitörleri.....	23
Şekil 2.9. HSP90 inhibitörlerinden; VER-49009 ve VER-50589.....	24
Şekil 2.10. AUY-922'nin keşfi ve AUY922'nin HSP90'nın aktif bölgesiyle yaptığı etkileşimler.....	25
Şekil 2.11. Bileşik 7'nin geliştirilme süreci.....	26
Şekil 2.12. Bileşik 9'un geliştirilme süreci.....	27
Şekil 2.13. Bileşik 11'in geliştirilme süreci.....	28
Şekil 2.14. Kombrestatin A-4'ün kimyasal yapısı.....	29
Şekil 2.15. Bileşik 13-15'ün geliştirilmesi.....	31
Şekil 2.16. Bileşik 17'nin geliştirilme aşaması.....	31
Şekil 2.17. Bileşik 18'in geliştirilmesi.....	32
Şekil 2.18. Bileşik 19'un kimyasal yapısı ve IC ₅₀ değerleri.....	32
Şekil 2.19. Bileşik 20 ve 21'in kimyasal yapısı.....	33
Şekil 2.20. Bileşik 22'nin kimyasal yapısı.....	34
Şekil 2.21. Pirazol halkası (A) ve visinal diaril türevleri (B-H).....	35
Şekil 2.22. Bileşik 23 ve 24'ün kimyasal yapıları.....	36
Şekil 2.23. Bileşik 25'in kimyasal yapısı.....	36

Şekil	Sayfa
Şekil 2.24. Bileşik 26'nın kimyasal yapısı.....	37
Şekil 2.25. Kombrestatin A-1(Bileşik 27) ve Bileşik 28'in kimyasal yapıları.	37
Şekil 2.26. Bileşik 29 ve Bileşik 30'un kimyasal yapıları.....	38
Şekil 2.27. Bileşik 31'in kimyasal yapısı.....	39
Şekil 2.28. Bileşik 32 ve Bileşik 33'ün kimyasal yapıları.....	39
Şekil 2.29. Bileşik 34'ün kimyasal yapısı.....	40
Şekil 2.30. Bileşik 35'in kimyasal yapısı.....	40
Şekil 2.31. Bileşik 36'nın kimyasal yapısı.....	41
Şekil 2.32. Bileşik 37'nin kimyasal yapısı.....	43
Şekil 2.33. Bileşik 38a-e ve 39a-c'nin kimyasal yapıları.....	45
Şekil 2.34. Bileşik 40-43'in kimyasal yapıları.....	46
Şekil 2.35. Bileşik 44 ve 45'in kimyasal yapıları.....	47
Şekil 2.36. Bileşik 46'nın kimyasal yapısı.....	47
Şekil 2.37. Bileşik 47 ve 48'in kimyasal yapıları.....	48
Şekil 2.38. Ganetespib (Bileşik 49)'in kimyasal yapısı.....	49
Şekil 2.39. PEN-866 (Bileşik 50)'nın kimyasal yapısı.....	49
Şekil 5.1. EB38 molekülünün optimizasyon çalışmaları.....	123
Şekil 5.2. 2-metilbenziloksi fenil yapısı sabit tutularak izoksazol halkasının 4. konumundan türevlendirilen bileşiklerinin sentezi.....	124
Şekil 5.3. 3,4-diaril-5-aminoizoksazol merkezi halkası taşıyan Bileşik 20'nin sentezi.....	125
Şekil 5.4. 4,5-diarilizoksazol merkezi halkası taşıyan Bileşik 24'ün sentezi.	126
Şekil 5.5. 5-metil-3,4 diarilizoksazol merkez halkası taşıyan Bileşik 27'nin sentezi.....	126
Şekil 5.6. 2-metil-4,5 diariltiyazol merkez halkası taşıyan Bileşik 31'in sentezi.....	127
Şekil 5.7. 4. konumunda 4-klorofenil yapısı sabit tutularak R ₁ modifikasyonları gerçekleştirilen pirazol türevlerinin sentezi.....	128
Şekil 5.8. 1,5-diarilpirazol merkezi halkası taşıyan Bileşik 49'un sentezi.....	129
Şekil 5.9. 3-metil-1,5-diarilpirazol merkezi halkası taşıyan Bileşik 51'in sentezi.....	130

Şekil	Sayfa
Şekil 5.10. 1,5-diarilpirazol merkezi halkası taşıyan Bileşik 55'in sentezi.....	130
Şekil 5.11. 3-metil-1,5-diarilpirazol merkezi halkası taşıyan Bileşik 59'un sentezi.....	131
Şekil 5.12. 4,5-diarilpirazol ve 2-metil-4,5-diarilpirazol merkezi halkası taşıyan Bileşik 62 ve 63'ün sentezi.....	132
Şekil 5.13. 1,5-diarilpirazol merkezi halkası taşıyan Bileşik 66'nın sentezi....	133
Şekil 5.14. 1,5-diarilpirazol merkezi halkası taşıyan Bileşik 69'un sentezi.....	133
Şekil 5.15. Bileşik 36 ve Bileşik 51 moleküllerinin kristal yapısının Ortep çizimi. (Termal elipsoitler %30 olasılık seviyesinde çizilmiştir)...	136
Şekil 5.16. A) Bileşik 36'nın hücre döngüsüne etkisi B) Bileşik 36'nın hücre ölümüne etkisi.....	140
Şekil 5.17. A) Bileşik 36'nın intravenöz IV (1 mg/kg) uygulanişından sonra plazma konsantrasyonu-zaman profili B) Bileşik 36'nın oral (PO) (10 mg/kg) uygulanişından sonra plazma konsantrasyonu-zaman profili.....	144
Şekil 5.18. Atimik tüysüz farelerde geliştirilen epiteliyal meme kanseri ksenograft modelinde Bileşik 36'nın <i>in vivo</i> antikanser etkilerinin gösterilmesi.....	146

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 5.1. Bileşik 36'nın ^1H -NMR spektrumu.....	135
Resim 5.2. Bileşik 36'nın ^{13}C -NMR spektrumu.....	135
Resim 5.3. Bileşik 36'nın Huh7 karaciğer kanseri hücreleri üzerindeki morfolojik etkilerinin floresan boyama ile incelenmesi.....	141
Resim 5.4. Western blot tekniği ile bileşiklerle inkübe edilen Huh7 hücre hatlarında PARP proteininin ifade miktarlarına bakılarak bileşiklerin etkisinin belirlenmesi.....	142

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklama
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
A2780	İnsan yumurtalık kanseri hücre hattı
A549	İnsan küçük hücreli akciğer kanseri hücre hattı
c-KIT	Receptor tyrosine kinase
dk	Dakika
DU-145	İnsan prostat kanseri hücre hattı
ECA-109	İnsan özofagus kanseri hücre hattı
Eq	Ekivalan
Focus	İnsan hepatoselüler karsinoma hücre hattı
GI₅₀	%50 oranında büyüme inhibisyonuna neden olan doz
HCT116	İnsan kolon kanseri hücre hattı
HeLa	İnsan servikal kanser hücre hattı
Hep3B	İnsan karaciğer kanseri hücre hattı
HepG2	İnsan hepatoselüler karsinoma hücre hattı
HL60	İnsan lösemi hücre hattı
HT1080	İnsan fibrosarkom hücre hattı
HT29	İnsan kolon kanseri hücre hattı
Huh7	İnsan hepatoselüler karsinoma hücre hattı
IC₁₀₀	%100 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu
IC₅₀	%50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu
IGROVI	Yumurtalık-karsinom hücre hattı
K562	İnsan miyeloid lösemi hücre hattı
Mahlavu (MV)	İnsan hepatoselüler karsinoma hücre hattı
MCF7	İnsan meme kanseri hücre hattı

Simgeler**Açıklama**

MDA-MB-231	İnsan meme kanseri hücre hattı
MDA-MB-468	İnsan meme kanseri hücre hattı
MGC-803	İnsan gastrik kanser hücre hattı
MHz, Hz	Megahertz, Hertz
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mmol	Milimol
NCI-H3122	İnsan akciğer kanseri hücre hattı
NCI-H460	İnsan akciğer kanseri hücre hattı
NCI-N87	İnsan gastrik kanser hücre hattı
NIH3T3	Fare embriyonik fibroblast hücre hattı
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
PC-3	İnsan prostat kanseri hücre hattı
ppm	Parts per million (milyonda bir)
rpm	Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)
SGC7901	İnsan gastrik kanser hücre hattı
SNU475	İnsan karaciğer kanseri hücre hattı
SMMC-7721	İnsan hepatoselüler karsinoma hücre hattı
SKBR3	İnsan meme kanseri hücre hattı
SVEC4-10	İnsan glomerüler karsinoma hücre hattı
SW620	İnsan kolon kanseri hücre hattı
U87-MG	İnsan primer glioblastoma hücre hattı
ZR75	İnsan meme kanseri hücre hattı

Kısaltmalar**Açıklama**

7-AAG	7-Allilaminogeldanamisin
AGS	Acide gras synthase
AKT	Protein kinaz-B
ATP	Adenosine triphosphate

Kısaltmalar**Açıklama**

AUC	Area under the curve
BCR-ABL	BCR&ABL füzyon geni
BRAF	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
BRCA	Breast cancer gene
BSA	Bovine serum albumin
CA-4	Combretastatin A4
CA4P	Combretastatin A4 phosphate
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CAS	Chemical Abstracts Service
CB1	Cannabinoid receptor type 1
CHK	Check-point kinaz
C_{max}	Maximum concentration
COX-2	Cyclooxygenase-2
DCM	Dichloromethane
DMEM	Dulbecco's modified eagles medium
DMF	Dimetilformamit
DMFDMA	Dimetilformamit dimetilasetal
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EA	Etil asetat
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EML4	Echinoderm microtubule associated protein-like 4
ER	Estrogen receptor
ERK	Ekstraselüler reseptör kinaz
ESI	Elektrosprey iyonizasyon
FBS	Fetal bovine serum
FDA	Food and Drug Administration
HER-2	Human epidermal growth factor receptor 2
Hmg-CoA	β -Hydroxy β -methylglutaryl-CoA
HRMS	High resolution mass spectrometry
HSK	Hepatoselüler karsinoma

Kısaltmalar	Açıklama
HSP90	Heat-shock protein 90
İTK	İnce tabaka kromatografisi
JNK	C-Jun N-terminal kinase
LiHMDS	Lithium bis(trimethylsilyl)amide
LOX	Lipoxygenase
NCS	N-chlorosuccinimide
NSCLC	Non-small cell lung carcinoma
MAPK	Mitojenle aktive edilen protein kinaz
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
MDS	Myelodisplastik sendrom
MeOH	Metanol
MKI	Multikinaz inhibitörü
MMPI	Matriks metalloproteinaz inhibitörü
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NCI	National Cancer Institute
NMR	Nükleer manyetik rezonans
p53	Tümör baskılayıcı gen TP53 ile kodlanan protein
PARP	Poli (adenozin difosfat [ADP]-riboz) polimeraz
PBS	Phosphate buffered saline
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptors
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma
RT-CES	Real-time cell electronic sensing
SAPK	Stress-activated protein kinase
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforez
SRB	Sulforhodamine B
TbR-I	TGFb receptors type 1
TBS	Tris-buffered saline
TGF- β	Transforming growth factor beta

Kısaltmalar**Açıklama**

TGX	Tris-glycine extended polyacrylamide gels
THF	Tetrahidrofuran
T_{max}	Maximum time
TOF-MS	Time-of-flight mass spectrometry
UPLC	Ultra performance liquid chromatography
UV	Ultraviyole
VDHS	Visinal diaril heterosiklik sistem
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
WHO	World Health Organization
YEİ	Yapı etki ilişkisi

1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerin bütünleşik işlevlerinin bozulması ile kontrolsüz bir şekilde bölünmesi ve çoğalmasıyla ortaya çıkan, bulunduğu bölgeyi veya uzak doku ve organları istila edebilen (metastaz), genetik ve çevresel koşullardan etkilenen kompleks bir hastalıktır.

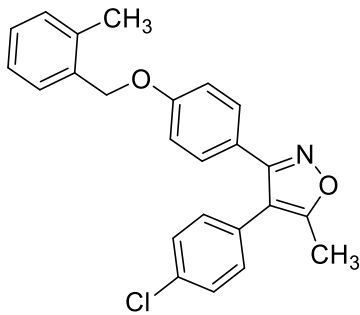
Kanser trilyonlarca hücreden oluşan insan vücudunda hemen hemen her yerden başlayabilir. Normalde büyüyüp ihtiyaç olduğunda bölünen, yaşlandığında veya hasar gördüğünde ölen hücreler, patolojik durumlarda, ölmeleri gerektiğinde hayatta kalır, durmadan bölünebilir ve tümör adı verilen büyümeler oluşturabilir. Tümör dokusu genellikle çevre dokuyu istila eder ve uzak dokulara metastaz gerçekleşebilir. Bu anlamda kanser, vücudun hemen her bölümünü etkileme özelliğine sahiptir ve dolayısıyla her biri kendine özgü tedavi stratejileri gerektiren birçok anatomik ve moleküler alt tipe ayrılır [1, 2].

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre kanser, 2018'de 9,6 milyonun ölümünden sorumlu olup, dünya çapında ikinci önde gelen ölüm nedenidir. Her 6 ölümden 1 tanesi kanser kaynaklıdır. 2040 yılında ise dünya çapındaki kanser vakalarının yaklaşık olarak iki katı (16,4 milyon) kadar artacağı öngörülmektedir [3].

Kanserle mücadelede ilk hayati adım erken tanı olmakla beraber tedavi seçeneklerine bakıldığında kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi müdahale karşımıza çıkmaktadır. Kanser tedavisinde, kemoterapötikler ile diğer sağlıklı doku ve organlara zarar vermeksizin belirli etki mekanizmaları ile yalnızca kanser hücrelerine etki ederek antikanserojen etki göstermeleri ve tedavi sonrasında oluşabilecek nüks ve metastazların önüne geçilmesi temel hedef olarak görülmektedir. Ancak birçok hastalık tablosunda mevcut kemoterapötikler ile tedavide sağlıklı doku ve organlarda toksik etkilerin oluşumu, tedaviye direnç gelişimi, metastaz oluşumu veya tedavi sonrası nüks gelişmesi gibi sebeplerle kesin bir iyileşme söz konusu olamamaktadır. Bu nedenle yalnızca kanserli hücreler hedeflenerek sağlıklı dokularda minimum yan etkiye neden olabilecek yeni ilaç moleküllerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Antikanser aktiviteye sahip tedavide kullanılan veya klinik geliştirilme aşamasında olan kimyasal ajanlar incelendiğinde izoksazol, oksazol, pirazol, imidazol, tiyazol tetrazol gibi 5 üyeli heterosiklik yapılara rastlamak mümkündür. Visinal diaril sübstitüe heterosiklik bileşikler antikanser alanında umut verici potansiyele sahiptir. Özellikle izoksazol ve pirazol heterosiklik merkeze sahip visinal diaril bileşikler tümör gelişiminde önemi olan HSP90 (Heat-shock protein 90)'ı inhibe ederek, tübülün polimerizasyonunu engelleyerek, COX-2 (siklooksijenaz-2 enzimi) inhibisyonu yaparak veya farklı etki mekanizmaları ile antiproliferatif aktivite göstermektedir [4].

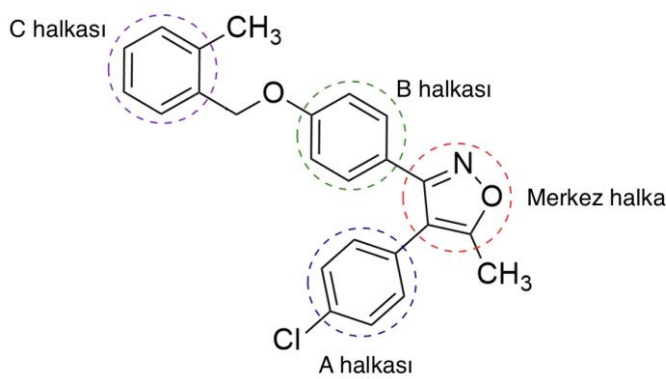
Bu tezin hazırlanmasına temel olan anabilim dalımızda yürütülen bir TÜBİTAK projesi (215S015) kapsamında, araştırma grubumuzca oluşturulan bileşik koleksiyonundaki farklı kemotipler karaciğer ve meme kanseri hücre hatlarına karşı taranmış ve her iki kanser hücre hattında antiproliferatif etkili özgün bir lider molekül olan 5-metil-4-(4-klorofenil)-3-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)izoksazol (EB38)'e ulaşılmıştır (Şekil 1.1). Özgün bileşiğin karaciğer (Huh7 ve Mahlavu) ve meme (MCF7) kanser hücre hatlarına karşı sırasıyla 1,3; 3,2 ve 3,8 μM IC_{50} değerlerinde potent sitotoksisite göstermiştir. Bileşiğin Mahlavu ve Huh7 hatlarında SubG1/G1 fazında hücre birikimine ve parçalanmış PARP (Poli (adenozin difosfat [ADP]-riboz) polimeraz) miktarında artışa dayalı apoptoza yol açtığı tespit edilmiştir. Tüm bu *in vitro* sonuçlara paralel olarak, Mahlavu hücre hattı ile oluşturulan ksenograftlarda oral yoldan verilen EB38'in *in vivo* etkinliği tümör hacmindeki artışın inhibisyonu ile gözlemlenmiştir.



Şekil 1.1. Öncü bileşik EB38'in kimyasal yapısı

Dünya'da görülme sıklığı ve ölüm oranı oldukça yüksek olan karaciğer ve meme kanserine etkili olabilecek moleküller geliştirmek amacıyla EB38 analoglarının sentezi ve biyolojik aktivite çalışmalarının değerlendirilmesi bu tezin konusunu

oluşturmaktadır. Tez kapsamında EB38'den hareketle lider bileşik optimizasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi ile meme ve karaciğer kanseri tedavisi için yeni moleküller tasarlanmış ve geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu bağlamda visinal diaril heterosiklik yapıyı taşıyan 33 adet orijinal bileşik tasarlanmış, sentezlenmiş ve kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktivite değerleri belirlenerek lider molekülden daha aktif moleküllere ulaşılması hedeflenmiş ve ileri aktivite çalışmaları gerçekleştirilerek seçilen molekülün ADME özellikleri ve farmakokinetik parametreleri araştırılmıştır.

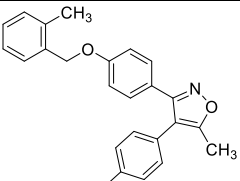
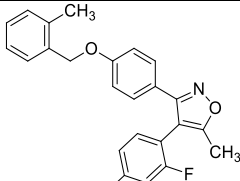
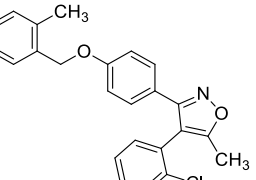
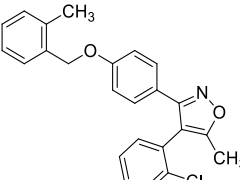
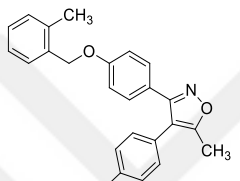
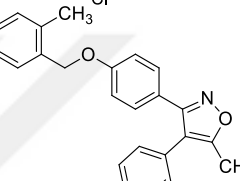
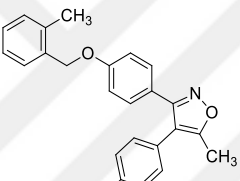
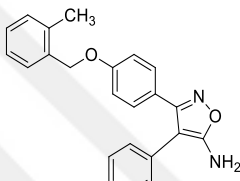
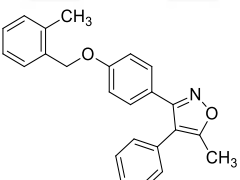
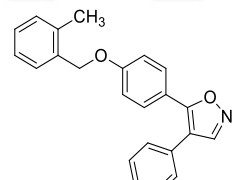
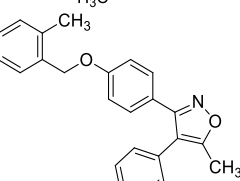
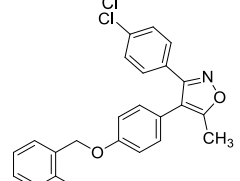
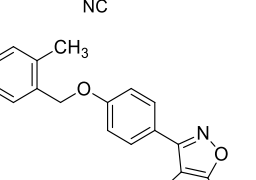
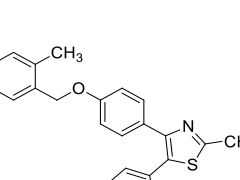
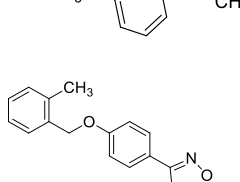
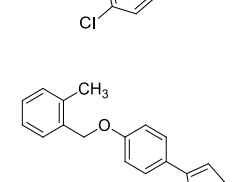


Şekil 1.2. EB38 molekülü üzerinden YEİ (yapı-etki ilişkisi) araştırmak amacıyla planlanan modifikasyonlar

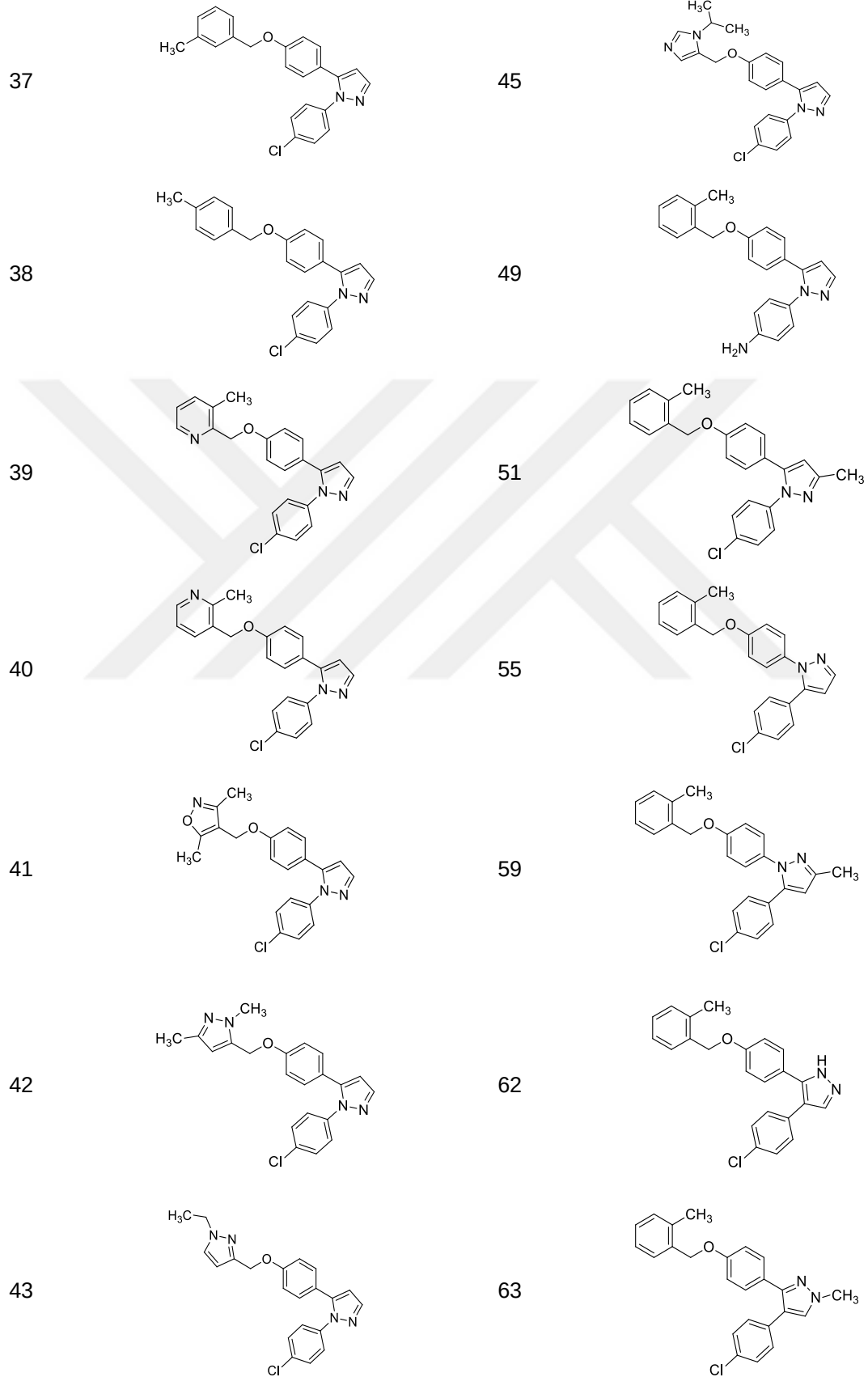
EB38 ile meme ve karaciğer kanseri hücre hatlarına karşı elde edilen ön sonuçlara göre tez kapsamında;

- İzoksazol merkez halkasına 3.konumda bağlı grup korunarak A halkası üzerinde yapılan süstitüsyonların aktiviteye etkisinin araştırılması,
- Merkez halka modifikasyonları ile merkez halkanın aktivite üzerine etkisinin araştırılması,
- EB38 bileşiğinin merkez halkası farklı türevlerinde A halkası korunarak C halkası modifikasyonlarının araştırılması,
- Etkili bulunan türevlerde diğer halkalar sabit tutularak B halkası modifikasyonlarının aktivite üzerinde etkilerinin araştırılması planlanmış ve sürdürülmüştür.

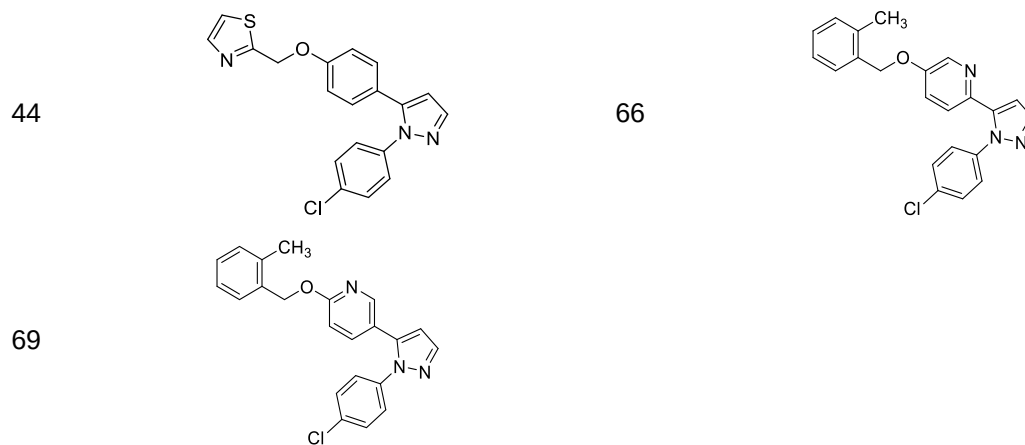
Çizelge 1.1. Tez kapsamında sentezlenen sonuç bileşikler

Bileşik No	Molekül Formülü	Bileşik No	Molekül Formülü
5		13	
6		14	
7		15	
8		20	
9		24	
10		27	
11		31	
12		36	

Çizelge 1.1. (devam) Tez kapsamında sentezlenen sonuç bileşikler



Çizelge 1.1. (devam) Tez kapsamında sentezlenen sonuç bileşikler



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser ve Tümör Olgusu

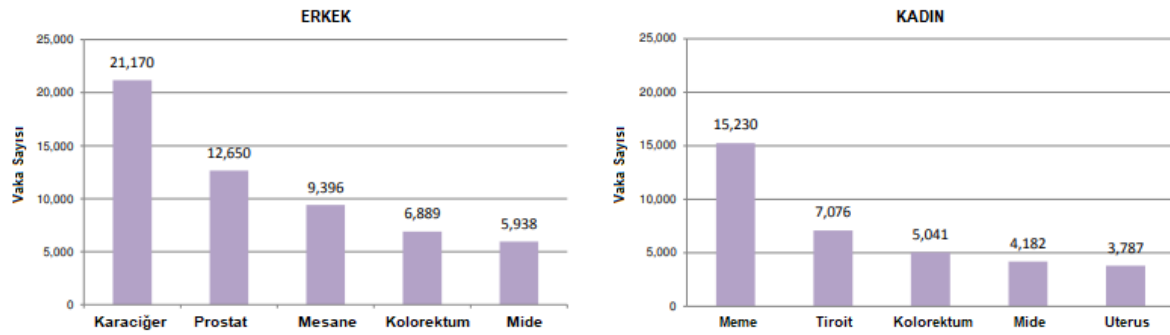
Kanser, bir organ veya dokudaki hücrelerin kontrolsüz ve düzensiz olarak bölünüp çoğalmasıyla meydana gelen, kendisini çevreleyen doku ve organlara yayılan veya daha uzak doku ve organlara göç edip kontrolsüz çoğalmaya ve istila etmeye devam eden kompleks bir hastalıktır.

Geçmiş Hipokrat'a kadar dayanan kanser olgusu, günümüz modern toplumunda da hala en büyük ve ölümcül sağlık sorunudur. Kanser tedavisinde cerrahi müdahale, kemoterapi, radyoterapi en sık kullanılan tedavi seçenekleri olmakla beraber hormon tedavisi gibi bazı biyolojik tedavi yöntemleri de kullanılmaktadır. Var olan yöntemler tek başlarına veya destekleyici tedavi seçenekleri ile kullanılabilir. Her bir tedavi seçeneğinde birtakım avantaj ve dezavantajlar olmakla birlikte her hastada tedaviye yanıt verme uyuncu farklılık gösterebilmektedir. Kanser tedavisinde, hastalık profilinin çeşitliliği, yan etkiler, kanserin kişiye özel bir hastalık olması ve tedaviye verilen yanıtların kişiden kişiye değişiklik göstermesi sebebiyle tedavideki başarıların düşük olması üzerine tıp dünyasının hedefi kanseri tedavi etmek yerine henüz oluşmadan engellemektir. Genetik, çevresel ve davranışsal risk faktörleri belirlenip, tütün ve alkol tüketiminin azaltılması, sağlıklı vücut ağırlığının korunması, düzenli egzersiz yapma, çevre kirliliği-radyasyon-enfeksiyon gibi çevresel risk faktörlerinden kaçınarak özellikle genetik olarak risk taşıyan bireylerin düzenli aralıklar ile doktor kontrolleri sayesinde kanserin oluşmadan önlenmesi sağlanabilmektedir [5].

Günümüzde kanser oluşumunun engellenmesi ve oluşan kanserin tedavisi için birçok yöntem geliştirilmiş olmasına rağmen kanser hastalığı çağımızın en büyük ikinci ölüm nedenidir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nın verilerine göre, 2018'de kanserin 9,6 milyon ölüme neden olduğu belirtilmekle birlikte yeni kanser vakalarının 2030 yılına kadar 23,6 milyona çıkacağı tahmin edilmektedir [2]. Küresel anlamda her 6 ölümden 1'i kanser nedeni ile gerçekleştiğinden ölümlerle sonuçlanan kanser vakalarının psikolojik ve ekonomik boyutu da oldukça ciddi boyuttadır. WHO

verilerine göre 2010 yılında kanserin ekonomik maliyeti yaklaşık 1,16 trilyon ABD doları olduğu tahmin edilmektedir [6].

Türkiye’de kanser görülme oranı Avrupa Birliği ülkeleri ve Amerika Birleşik Devletleri gibi ülkelere kıyasla daha düşüktür. Ülkemizde bir yılda yaklaşık 180 bin kişiye kanser teşhisi konulmaktadır. Cinsiyete göre dağılıma bakıldığında erkeklerde en çok karşılaşılan kanser tipi karaciğer kanseri iken; kadınlarda meme kanseri ilk sırada yer almaktadır (Şekil 2.1) [7].



Şekil 2.1. Cinsiyete Göre Türkiye’deki kanser insidansı [7]

Hali hazırda mevcut olan çok sayıda kemoterapötik ilaca rağmen, tıbbi ihtiyaç hala büyük ölçüde karşılanamamıştır. Bunun nedenleri arasında; seçicilik eksikliği nedeniyle geleneksel ilaçların toksisitesi; hedef bölge dışındaki organlarda erken tümör implantasyonu ile sonuçlanan metastazların yayılması; yaklaşık 100 kanser türünün heterojenik olması; birkaç terapötik döngüden sonra kemoterapiye direnç gelişmesi sıralanabilir. Bu nedenle, yeni antikanser hedeflerinin belirlenmesi ve antikanser ilaçlarının keşfi için büyük çabalar gösterilmektedir. Ayrıca, insan genomunun dizilimine yönelik küresel çapta yapılan çalışmalar, kanser tedavisiyle ilişkili çok sayıda potansiyel hedef olduğunu göstermiştir. Antikanser ilaçlar için hedeflerin ana odağı; kanser hücrelerinin büyümesinin yanı sıra tümör anjiyogenezi ve metastazında yer alan sinyal yollarıdır. Daha yüksek seçiciliğe sahip tümör hücrelerinin malign anormalliklerinin üstesinden gelmek için yeni hedefleri ele alan birçok yenilikçi strateji geliştirilmektedir [8].

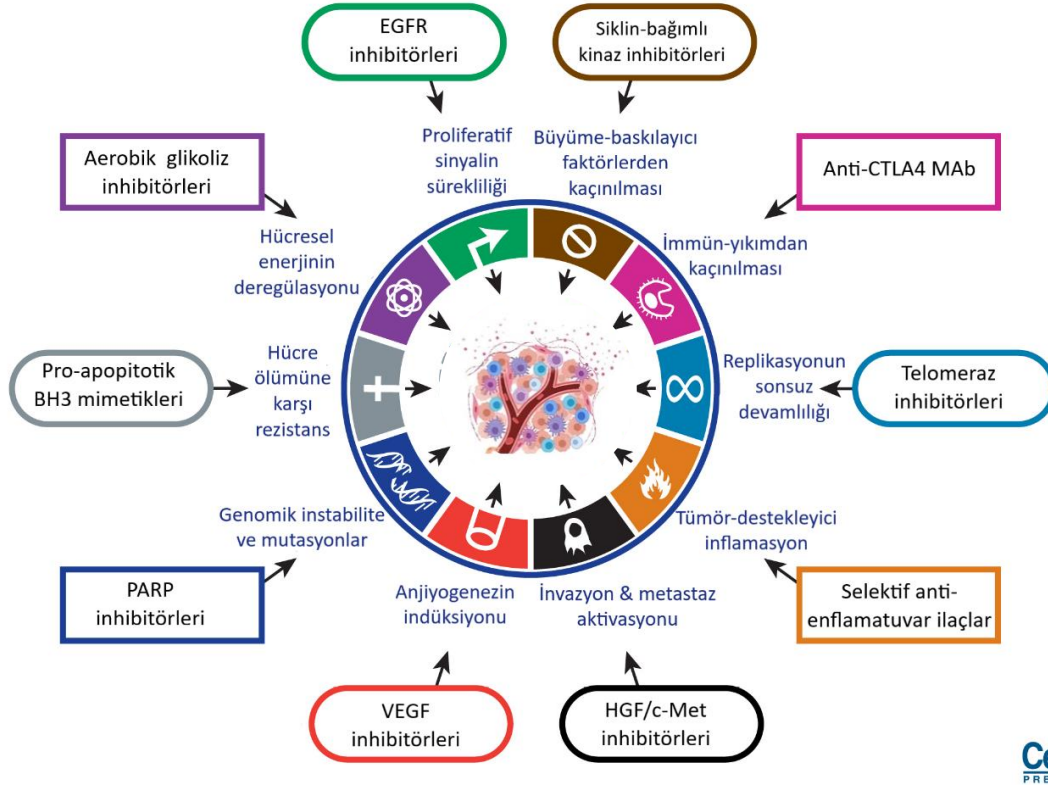
Kanser tek bir hastalık değildir, birçok kanser türü mevcuttur ve şu anki kanser tedavi protokollerine bakıldığında, her doku sadece tek bir kanser türünden etkilenmiş gibi tedavi uygulanır. Sorun, kanseri ve hatta bir tür kanseri oluşturan hastalıkların alt sınıflarını tanımlamaktır. Tümörleri sınıflandırmak için bir dizi farklı yaklaşım (örneğin, mikrodiziler kullanılarak) test edilmektedir. DNA gen ifadeleri incelenerek kanser teşhisi ve tümör bilgisi üzerine çalışmalar yürütülmektedir [9].

Kanser hücrelerinin en temel özelliği, kronik proliferasyonu sürdürme yetenekleridir. Normal dokular, hücrelerin büyüme ve bölünme döngüsüne girmesini ve ilerlemesini bildiren, büyümeyi teşvik eden sinyallerin üretimini ve salınmasını düzenler, hücre sayısını kontrol altına alır ve böylece normal doku mimarisi ve fonksiyonunun korunmasını sağlar. Kanser hücreleri, bu sinyalleri serbest bırakarak hücrelerin kontrol mekanizmalarını devre dışı bırakır ve hücre sayısı sürekli artar. Etkinleştirme sinyalleri, büyük ölçüde, tipik olarak hücre içi tirozin kinaz bölgelerini içeren hücre yüzeyi reseptörlerini bağlayan büyüme faktörleri tarafından iletilir. Bununla birlikte, ilerlemeyi düzenleyen hücre içi sinyal yollarından sinyaller yaymaya devam eder. Hücre döngüsü ve hücre büyümesi (hücre boyutunda artış) ile ilgili bu sinyaller genellikle hücrenin hayatta kalması ve enerji metabolizması gibi diğer biyolojik özelliklerini etkiler [10].

Kanser hastalığı, anormal mutasyonlar nedeniyle birçok sinyal yolağında çoklu moleküler lezyonların ve fonksiyonel fazlalığın görülmesi ile karakterizedir. Tümör yollarının hedeflenebilmesi için kanser hücrelerinin malign fenotipinin oluşumu ve korunmasına yol açan moleküler değişikliklerin anlaşılmasını gerektirir. Tüm onkoproteinler tarafından yönetilen karmaşık sinyal yollarının aydınlatılması, daha etkili ve daha az toksik antikanser tedavilerin keşfini ve geliştirilmesini sağlayacaktır [11].

Hanahan ve Weinberg 2000 yılında yayımladıkları makalede tümör biyolojisini incelemiş ve tümör hakkında 6 farklı özellik bildirmişlerdir. Bu özellikler; hücrelerin proliferatif sinyalinin sürekliliği, hücre ölümüne karşı rezistans gelişmesi, büyüme baskılayıcı faktörlerden kaçınılması, DNA eşlenmesi işleminin sonsuzluğu, anjiyogenezin indüklenmesi ve metastazın aktivasyonu şeklinde belirtilmiştir [12]. 2011 yılında yayımladıkları çalışmada ise araştırmacılar, belirtilen özelliklere yeni

özellikler eklemiş ve bu özellikleri hedef alan antikanser ajan sınıflarını Şekil 2.2'de gösterildiği gibi şematize etmişlerdir [10].



Şekil 2.2 Hücresel düzeydeki tümörjenik yetenekler ve bu özellikleri hedefleyen antikanser ajan sınıfları (referans [10, 13]'den uyarlanmıştır)

İnsan genomu 518'den fazla protein kinazdan oluşmaktadır ve bu protein kinazlar proliferasyon, farklılaşma, yer değiştirme, apoptoz ve anjiyogenez dahil olmak üzere hücresel fonksiyonları düzenleyen birçok sinyal iletim yollarında yer almaktadır. BRAF, BCR-ABL, EML4-ALK, mutant EGFR (Epidermal growth factor receptor) ve tirozin protein kinaz KIT (c-KIT) gibi birçok kinazın onkojenik özellikte olduğu ve inhibe edilmelerinin antikanser tedavide önemli bir rolü olduğu bildirilmektedir [14]. Bununla birlikte, etkili kinaz inhibitörlerinin birden fazla onkojenik kinaz üzerinde sinerjistik etki göstermesi beklenmektedir. Bu anlamda, FDA tarafından onaylanan ilk ilaç olan Sorafenib, bir multikinaz inhibitörü olarak karşımıza çıkmaktadır. Protein kinazların üç üyeli Raf ailesi (a-Raf, b-Raf ve c-Raf) olmak üzere trombosit türevli büyüme faktörü reseptörleri (PDGFR), VEGF (Vascular endothelial growth factor) 2/3 ve c-Kit kinazlar üzerinde etki göstererek çoklu kinaz hedefleme yeteneği ile Sorafenib'in geniş spektrumlu antikanser özellikte olduğu görülmektedir [11].

Sorafenibin yanı sıra, Crizotinib, Cabozantinib, Dabrafenib, Dasatinib, Lenvatinib, Sunitinib, Vandetanib, Vemurafenib gibi klinik olarak onaylanmış diğer inhibitörler, B-RAF, BCR-ABL, c-KIT ve p38 kinazlar gibi tip II kinaz inhibisyonu sağlayarak kanser tedavisinde rol almaktadır.



2.2. Karaciğer ve Meme Kanserinde Tedavi Yaklaşımları

Meme kanseri, diğer kanserlerde de olduğu gibi, genetik ve klinik olarak heterojen bir hastalıktır [15, 16]. Meme kanseri, tüm invaziv kanserlerin %22,9'una (ikinci sırada) ve tüm kadın kanserlerinin %15'ine (birinci sırada) denk gelen bir insidans ile dünya çapında özellikle kadınlarda sıklıkla görülen invaziv kanserdir. Hastalığın yıllık insidansı artarken, erken teşhisi takiben sistemik tedavi yaklaşımı ile mortalite giderek azalmaktadır [17].

Uluslararası meme kanseri insidansı, Doğu Afrika ve Güney Asya gibi daha az gelişmiş bölgelerde en düşük; Kuzey Avrupa, Avustralya ve ABD'de en yüksek olmak üzere önemli ölçüde değişkenlik göstermektedir (Amerikan Kanser Derneği, ABD'de her sekiz kadından birinde yaşamı boyunca meme kanseri gelişeceğini öngörmektedir). Ayrıca, kadın meme kanseri yaşla güçlü bir şekilde ilişkilidir ve vakaların yaklaşık %80'i 50 yaşın üzerindeki kadınlarda teşhis edilir [18].

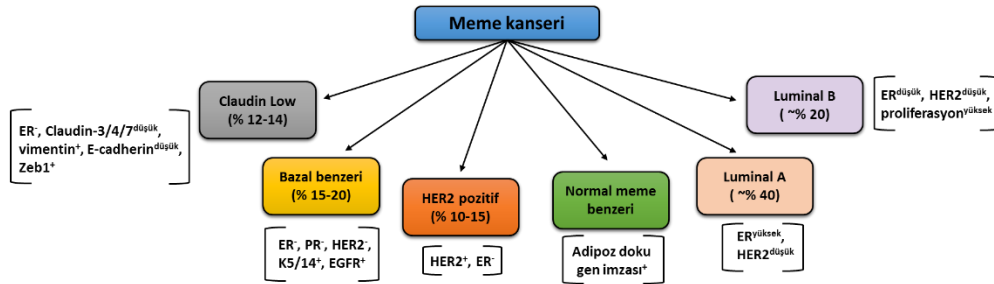
Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, meme kanseri, her yıl 2,1 milyon kadını etkilemektedir ve kadınlar arasında kansere bağlı en fazla ölüme neden olan kanser türü olduğu bilinmektedir. 2018'de 627.000 kadının meme kanserinden öldüğü tahmin edilmektedir. Meme kanseri oranları daha gelişmiş bölgelerdeki kadınlar arasında daha yüksek olmakla birlikte, küresel olarak hemen hemen her bölgede bu oranlar artmaktadır. Dünya çapında kadın meme kanseri insidansının 2050 yılına kadar yaklaşık 3,2 milyon yeni vakaya ulaşacağı da tahmin edilmektedir [19].

Çoğu durumda, meme kanseri etiyolojisi bilinmemektedir. Bununla birlikte, hastalığa yatkınlık gösteren birkaç risk faktörü vardır. Örneğin; kişisel veya ailesel meme kanseri öyküsü, genetik yatkınlık (BRCA1 ve BRCA2 mutasyonu), kadın cinsiyet, ileri yaş, 30 yılı aşan hormonal aktivite (erken ilk adet kanaması ve geç menopoz), hormon replasman tedavisinin uzun süreli kullanımı, geç ilk doğum veya nulliparite (hiç doğum yapmama), bazı kansersiz meme hastalıkları gibi spesifik hormonlar veya üreme ile ilişkili faktörlerle beraber, iyonlaştırıcı radyasyon terapisine maruz kalma, alkol ve sigara tüketimi, stres, fiziksel egzersiz ve özellikle diyet alışkanlıkları gibi genel çevresel faktörlerle de ilişkilidir. Diğer kanserlerde olduğu gibi, başarılı

tedavinin birincil belirleyicisi erken tanıdır. Bununla birlikte, tedavi cerrahi, radyoterapi ve sistemik tedaviyi içeren çok aşamalı bir süreçtir [20].

Meme kanserinin moleküler mekanizmalarına yönelik gittikçe artan bilgi ve yaklaşımlar, meme kanserinin tanısı, prognozu ve tedavisinde kullanılan sistemleri zenginleştirmiş, yeni moleküler bazlı sistemlerin ortaya çıkmasına ve var olan sistemlerle içselleşmesine yol açmıştır. Bu yeni sistemlerden biri olan moleküler sınıflandırma, anatomik/histolojik bulgulara koştut olarak meme kanserlerindeki gen ekspresyonları arasındaki farklılıklara dayanır [21]. Bu bilgiyle oluşturulan sınıflandırmaya göre meme tümörleri, altı ana gruptan oluşmaktadır [21]. Bunlar:

- 1) Luminal A (ER+, PR+/-, HER2-), %40;
- 2) Luminal B (ER+, PR+/-, HER2+), %20;
- 3) Bazal (ER-, PR-, HER2-) (üçlü negatif), %15;
- 4) Claudin-düşük (ER-, PR-, HER2-), %15;
- 5) HER2 (ER-, PR- , HER2+), %15;
- 6) Normal-benzeri'dir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Meme kanseri alt tipleri, moleküler özellikleri ve meme kanserleri arasındaki yüzde oranları [21]

Luminal alt tipine ait meme kanserine karşı en etkili güncel yöntemler ER (Östrojen reseptörü) işlevlerinin önlenmesine yöneliktir. E2 (Östrodiol)'nin yanı sıra, doğal ya da sentetik birçok molekül de yüksek afinitelerle ER'lere bağlanabilmektedir. Örneğin, kliniklerde meme kanseri tedavisinde kullanılan tamoksifen östrojen reseptör antagonisti olup, ER'ye bağlanarak E2 bağlanmasını önler ve böylece ER tarafından düzenlenen transkripsiyonları baskılar. Bu da antagonist tedavisinin moleküler temelini oluşturur [15]. Steroidal yapıda ilaçlar ile tedaviler kimi meme

tümörlerinde tümüyle etkisizdir. HER2-pozitif, üçlü-negatif, Claudin-Low ile örneklenen tümör alt tiplerinde ER gen ekspresyonunun olmayışı ya da tümör süreci sırasında kaybolması endokrin direncinin en önemli nedenidir. Bu tür kanserlerin başlamasına ve ilerlemesine birçok büyüme faktörlerinin ve bunların kinaz reseptörlerinin yüksek düzeyde sentezlenmesinin yol açabildiği düşünülmektedir [22]. Endokrin tedavisi, östrojen reseptörü pozitif meme kanseri için en etkili tedavilerden biridir. Bununla birlikte, çoğu tümör, kanser ilerledikçe endokrin tedaviye direnç geliştirecektir. Endokrin tedavisi gören ER-pozitif meme kanseri hastalarının hemen hemen tümünde, çoğalması baskılanmış tümör hücreleri bir süre sonra kullanılan tedavi ilaçlarına karşı direnç kazanarak yeniden büyümeye başlarlar. Bu endokrin-dirençli kanser fenotiplerinin nasıl ortaya çıktığı bilinmemektedir. Endokrin-dirençli hücre modellerinde büyüme faktör sinyallerinin önlenmesinin, hücrelerin ER ligandlarına yeniden duyarlılık kazanmasına yol açtığı bulgulanmıştır. Bu da, büyüme faktörleri sinyallerindeki anormalliklerin, ER işlevlerini post-translasyon ve/veya promotor karşılıklı etkileşim ile değiştirerek direncin gelişmesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Bu nedenlerle, büyüme faktörü sinyal baskılayıcılarla ER antagonistlerinden oluşan bileşimlerin, endokrin-dirençli meme kanseri tedavilerinde kullanılabileceği düşünülmektedir [23].

Meme kanseri alt tipine göre tedavi şekli ve kullanılacak kemoterapötikler değişkenlik göstermektedir. Tedavide seçilebilecek ilaçlar arasında, antiöstrojenler (tamoksifen); CDK inhibitörleri (palbociclib, ribociclib ve abemaciclib); aromataz inhibitörleri (letrozol, anastrozol ve eksemestan); gonadotropin salgılatıcı hormon agonistleri (goserelin ve buserelin); progestojenler (megestrol asetat); monoklonal antikorlar (atezolizumab, trastuzumab ve bevacizumab); ve medroksiprogesteron asetat bulunmaktadır. Ayrıca küçük molekülü tirozin kinaz inhibitörleri (alpelisip, neratinib, lapatinib, tucatinib, everolimus); PARP inhibitörü (olaparib); pirimidin analogları (5-florourasil ve kapesitabin); folik asit analogları (metotreksat); alkilleyici antineoplastik ajanlar (siklofosfamid); topoizomeraz inhibitörleri (antrasiklinler; epirubisin, doksorubisin) ve mikrotübülü etkileyen ilaçlar (paklitaksel ve dosetaksel gibi taksanlar) da kemoterapide kullanılmaktadır [24-27].

Dünyada en sık görülen altıncı ve en ölümcül dördüncü kanser tipi hepatosellüler karsinoma (primer karaciğer kanseri, HSK), karaciğerin en sık görülen primer malignitesidir [28]. Hastalığa neden olan faktörler arasında; Hepatit B veya C gibi viral enfeksiyonlar, aflatoksin maruziyeti, aşırı alkol tüketimi veya alkolik yağlı karaciğer sendromu kaynaklı sirozlar bulunmaktadır [29, 30]. Değişik çevresel etiyolojiler (hepatit, obezite vb.) sonucunda oluşan hepatosit genomundaki değişiklikler, karaciğer habis tümör başlangıcı ve ilerleyişi için özgün bir mekanizmayla geleneksel tedaviye direnç göstermektedir ayrıca hastalığın metastaz olasılığı oldukça yüksektir.

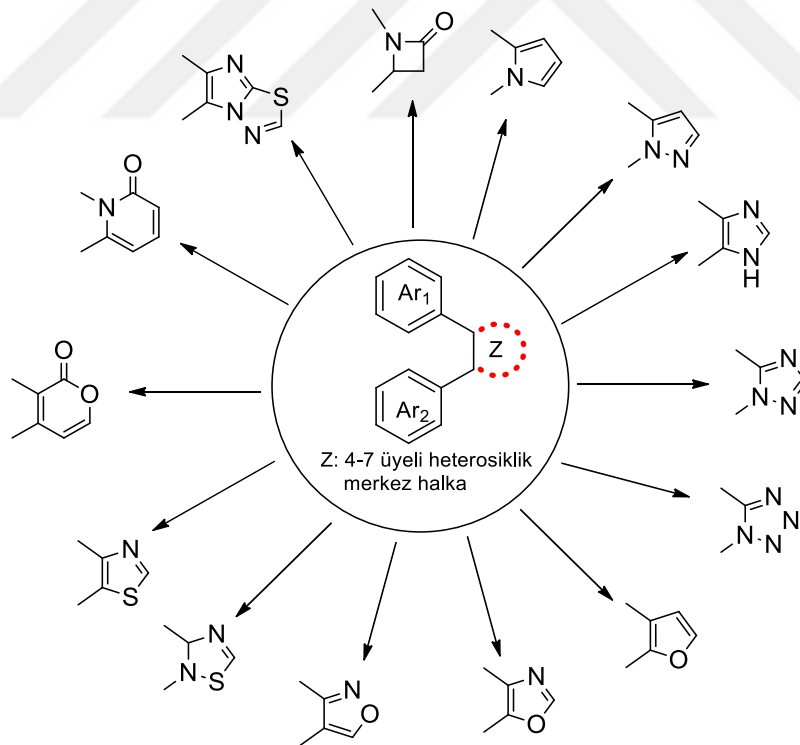
ABD’de kansere bağlı mortalite hızı yükselmekte olan HSK; erken veya orta evrelerde teşhis edildiğinde cerrahi uygulama ve/veya sistemik tedavilere yanıt vermekte ancak geç evrede palyatif tedaviler tercih edilebilmektedir.

HSK’nın tedavisinde, ikisi birinci basamak tedavi seçeneği olarak kullanılmak üzere üç oral multikinaz inhibitörü (MKI) onaylanmıştır. 2007 yılından itibaren serin/treonin kinaz RAF’ın güçlü bir şekilde inhibe ederek hücre proliferasyonunu engelleyen Sorafenib (Nexavar; Bayer), ileri hepatosellüler karsinoma için birinci basamak tedavi standardı olmuştur [31]. Klinik çalışmalardan geçerek FDA onayı alan ve günümüzde karaciğer kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar arasında monoklonal antikorlar (atezolizumab, bevacizumab, nivolumab, ramucirumab, pembrolizumab) ve kinaz inhibitörleri (cabozantinib, lenvatinib, pemigatinib, regorafenib) bulunmaktadır [32]. Ancak son yıllardaki gelişmelere rağmen henüz hayatta kalma süresini uzatmak adına istenilen başarıya ulaşılamamıştır [33]. HSK’nın genetik ve klinik açıdan heterojenik bir tümör olması başarısızlığın temel nedeni olarak düşünülmektedir [34]. HSK’nın gelişimi ve yayılma mekanizması ile ilgili bilinmezlik, klasik kemoterapötiklere dirençli olan HSK için yeni ilaç geliştirilmesi üzerine çalışmaların yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

2.3. İlaç Geliştirme Çalışmalarında Visinal Diaril Heterosiklik Sistemler

Heterosiklik bileşiklere hayatın hemen hemen her alanında rastlanmaktadır. İlaçlar, zirai kimyasallar, boyar maddeler, antioksidanlar, koroziv maddeler maddeler gibi birçok bileşiğin yapısına bakıldığında heterosiklik motifin olduğu görülmektedir. Klinik olarak kullanılan ilaçların %90'ından fazlasının farmakoforik iskelet olarak heterosiklik yapı içerdiği tahmin edilmektedir.

Visinal diaril heterosiklik sistemler (VDHS) merkezi heterosiklik halka sisteminin komşu (visinal) pozisyonları üzerinde iki aril yapısı içeren 4-7 üyeli merkezi heterosiklik halka yapısına sahiptir (Şekil 2.4). Son yıllarda, antikanser, analjezik, antihiperkolesterolemik, antiviral, antimikrobiyal, antienflamatuar, vb. gibi biyolojik aktivitelere sahip çok sayıda visinal diaril heterosiklik bileşik sentezlenmiş ve rapor edilmiştir [4].



Şekil 2.4. Visinal heterosiklik bileşiklerin şematik olarak gösterimi

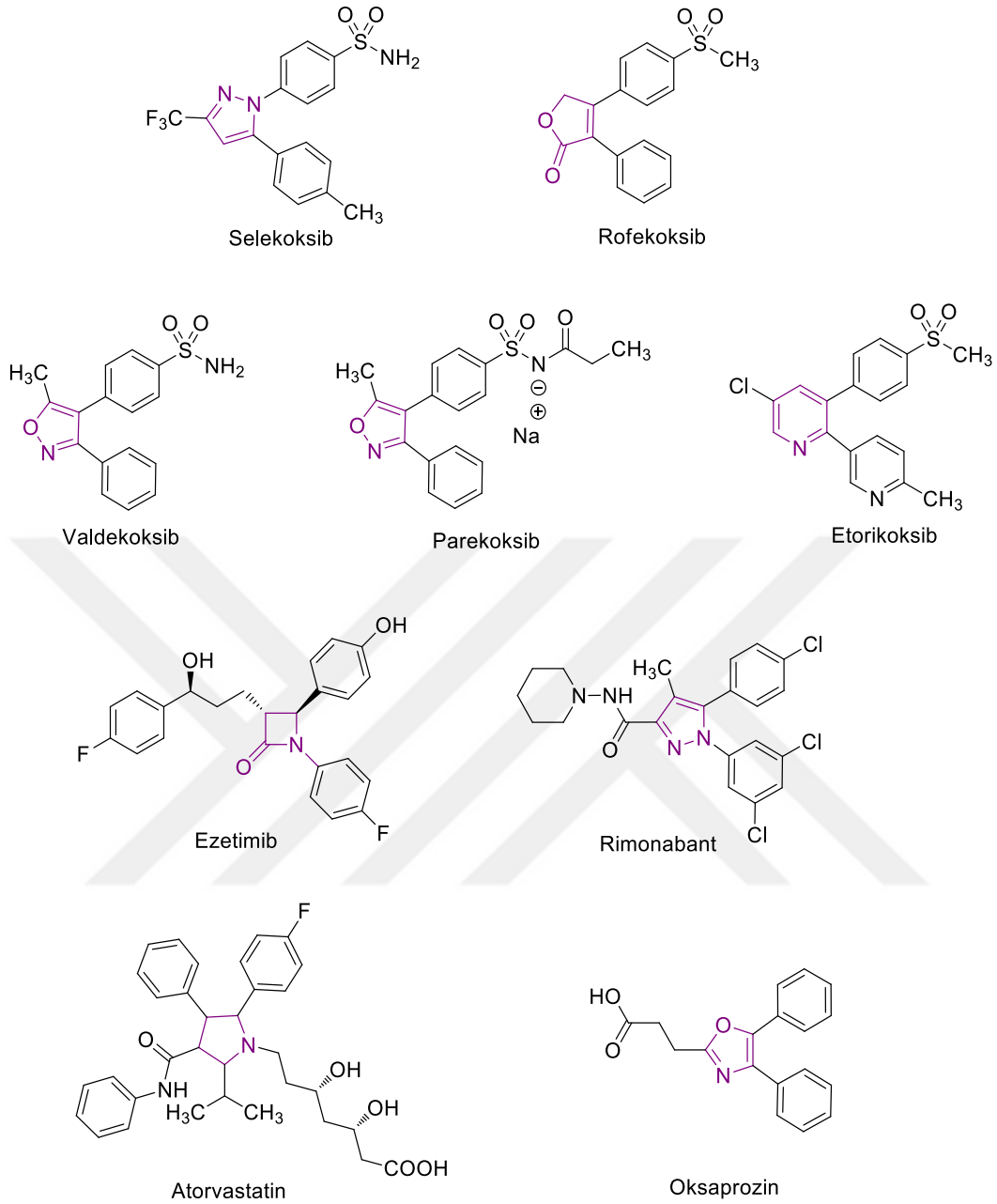
COX-1 ve COX-2 enzimlerini inhibe ederek anitnflamatuar etki gösteren bileşiklerin birçoğu ciddi gastrointestinal yan etkiler nedeniyle dezavantaj oluşturmuş, selektif

COX-2 inhibitörlerin keşfiyle gastrointestinal yan etkiler giderilmiştir. Birinci nesil COX-2 inhibitörlerinden olan Selekoksib, Rofekoksib, Valdekoksib ve Parekoksib; visinal diaril, 5 üyeli heterosiklik merkez halkaya sahiptir ve ikinci nesil COX-2 inhibitörü olarak piyasaya sürülen Etorikoksib yine visinal diaril yapısı bulundurmakla beraber 6 üyeli heterosiklik merkez halkaya sahiptir (Şekil 2.2). Güçlü COX-2 inhibitör aktivitelerine rağmen, Rofekoksib ve Valdeksokib, istenmeyen kardiyovasküler toksisiteleri nedeniyle 2004 ve 2005 yıllarında piyasadan çekilmiştir [35]. Visinal diaril heterosiklik iskelete sahip ancak kardiyovasküler yan etki oluşturmayacak yeni bileşikler üzerinde çalışmalar tüm hızıyla devam ederken Schering-Plough Araştırma Enstitüsü'ndeki araştırmacılar, kolesterol absorpsiyon inhibitörü aktivitesi gösteren yeni visinal diaril azetidin-2-on yapısına sahip türevler üzerinde çalışmışlardır. 2002 yılında ilk kolesterol absorpsiyon inhibitörü olan Ezetimib'i keşfetmiş ve piyasaya sürmüşlerdir [36, 37].

CB1 (Kannabinoid tip 1) reseptör antagonisti olan Rimonabant, Avrupa'da 2006 yılında visinal diaril heterosiklik yapısı içeren sınıfının ilk obezite karşıtı ilacıdır, ancak ciddi psikiyatrik yan etkilerinden dolayı 2008 yılında piyasadan çekilmiştir. Piyasadan çıkarılmasına rağmen, Rimonabant halen, visinal diaril pirazollerini içeren yeni terapötik ajanlar tasarlamak ve geliştirmek için öncü molekül olarak kabul edilmektedir [38, 39].

Atorvastatin, visinal diaril pirol yapısına sahip olan; "statinler" olarak bilinen ilaç sınıfına ait lipit düşürücü bir ilaçtır. Esas olarak düşük yoğunluklu lipoprotein seviyesini azaltan bir HMG-CoA redüktaz inhibitörü olarak işlev gören Atorvastatin 1985'te Michigan'daki Warner-Lambert ilaç şirketinden Roth ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. Keşfedilmesinin ardından 1996'da 'Lipitor' markası altında piyasaya sürülmüş ve 2012'ye kadar tüm zamanların en çok satan ilacı olarak anılmıştır [38, 39]. Turbostatin olarak da adlandırılan Lipitor'un keşfi, visinal diaril heterosiklik bileşiklerin geliştirilmesinde altın bir buluş olarak değerlendirilmiştir.

Bir diğer visinal diaril heterosiklik bileşik, 1992'de FDA tarafından onaylanan osteoartrit ve romatoid artrit tedavisinde kullanılan visinal diaril oksazol yapısında olan Oksaprozin'dir [40] (Şekil 2.5).



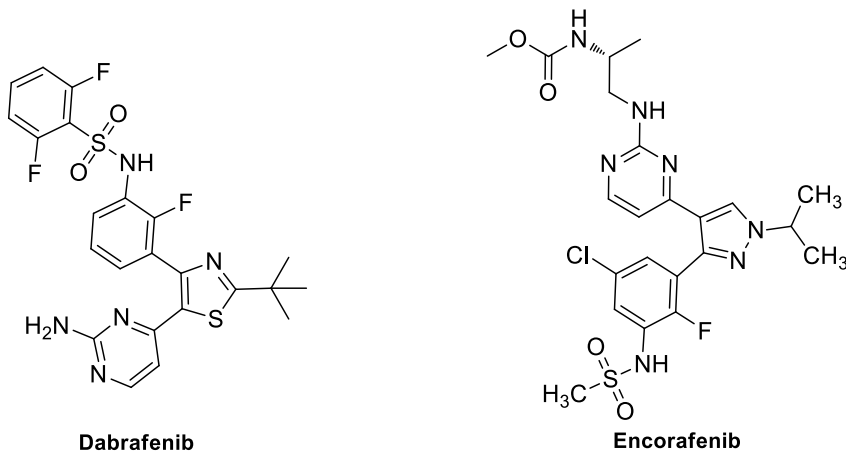
Şekil 2.5. Visinal diaril heterosiklik yapı içeren klinikte kullanılan ilaçlar

MAPK (mitojenle aktive olan protein kinaz) sinyal yolağında bulunan BRAF proteini, hücre büyümesinin yönlendirilmesinde ve hücrelerin içindeki sinyallerin gönderilmesinde rol oynayan bir serin/treonin-protein kinazdır [41]. BRAF'ın onkogenik mutasyonları, kutanöz melanom (%50), papiller tiroit (%46), over tümörleri (%34), safra yolları (%1), kolorektal tümör (%10), küçük olmayan akciğer kanseri (NSCLC; %2) ve tüylü hücre lösemisi (%100) dahil olmak üzere birçok tümör tipinde görülmektedir. BRAF'ın en yaygın mutasyonu sonucu, valinin 600. amino asit pozisyonunda (V600E) glutamik asit ile yer değiştirmesi ile ortaya çıkan 'wild tip

BRAF' olarak nitelendirilen mutant BRAF, aktivitede on kat artışla proteini aktif konformasyonda tutmaktadır. Mutant BRAF, kolorektal kanser, papiller tiroid kanseri ve metastatik melanomda kötü prognoz ile ilişkilidir [42].

Visinal diaril heterosiklik bileşik arasında antikanser ilaçlar ele alındığında Dabrafenib (GSK2118436) karşımıza çıkmaktadır. Visinal diaril tiyazol halkası taşıyan Dabrafenib, BRAF kinazın güçlü bir ATP-yarışmalı inhibitörüdür ve papiller tiroit, kolorektal ve yumurtalık kanseri gibi kanser türlerinde kullanılmak üzere geliştirilen güçlü ve seçici BRAF inhibitörüdür ($IC_{50} = 0,7$ nM). 2013 yılında FDA, Dabrafenib'i cerrahi olarak çıkartılamayan veya metastatik BRAFV600E melanomunun tedavisi için tek ajan olarak onaylamıştır. Aynı zamanda beyindeki metastatik melanomaya karşı aktivite gösteren sınıfının ilk ilacı olarak kabul edilmektedir [43, 44].

Novartis ve Array BioPharma tarafından geliştirilen Encorafenib visinal diaril pirazol halkası içeren, MAPK sinyal yolağındaki anahtar enzimleri hedefleyen BRAF inhibitörüdür [45]. Encorafenib, Haziran 2018'de, cerrahi müdahale ile çıkartılamayan veya metastatik BRAF V600E veya V600K mutasyon pozitif melanomlu hastaların tedavisi için Binimetinib ile birlikte kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmıştır [46].



Şekil 2.6. Dabrafenib ve Encorafenib'in kimyasal yapısı

Klinik olarak kullanılan ilaçların yanı sıra, literatürlerde geniş bir biyolojik aktivite spektrumuna sahip olan visinal diaril heterosiklik yapıya sahip çeşitli bileşikler

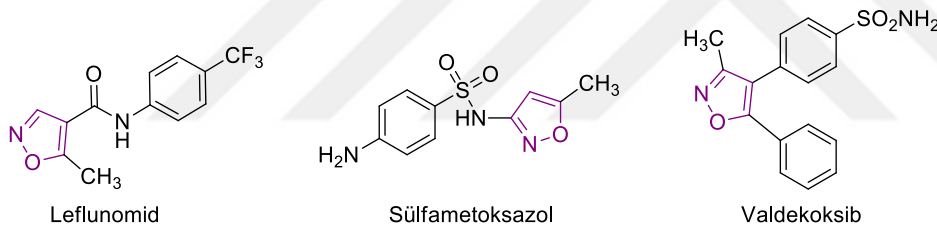
bildirilmiştir. Dünyanın dört bir yanındaki araştırmacılar, merkezi yapı olarak farklı heterosiklik halkaları içeren, hastalıkların/rahatsızlıkların tedavisinde aktif bir yapı iskeleti elde etmek için visinal diaril halkaları kullanarak terapötik olarak potansiyel bileşiklerin geliştirilmesine katkı sağlamışlardır.



2.4. Visinal Diaril İzoksazol Yapısı Taşıyan Antikanser Ajanlar

Azoller, halkada azot atomu dışında başka bir heteroatom daha taşıyan veya birden daha fazla azot atomu içeren beş üyeli heterosiklikler sınıfıdır. Azoller her zaman yeni terapötik ajanların tasarlanmasında tercih edilen bir halka sistemi olarak düşünülmüştür. Oksadiazoller, oksazoller ve izoksazoller gibi çeşitli azot ve oksijen içeren azoller ve pirazol, imidazol, triazol gibi yalnızca azot atomu taşıyan bileşikler biyolojik aktiviteye sahip yeni bileşiklerin tasarlanmasında kullanılmıştır.

İzoksazol halkası, halkada ardışık azot ve oksijen atomlarını taşıyan beş üyeli bir heterosiklik halkadır. İzoksazol, birçok ticari ilacın temel yapısal özelliklerinin bir parçasıdır (Şekil 2.7). Literatürde analjezik, antienflamatuar, antihelmentik, antidepresan, antibakteriyel, antikanser, anksiyolitik, nöroprotektif aktiviteye sahip birçok bileşik rapor edilmiştir [47, 48].



Şekil 2.7. İzoksazol halkası içeren bazı ilaçlar

Aşağıda izoksazol halka sistemi üzerine çalışan bilim insanlarının çalışmalarından güncel örnekler derlenerek bu tez kapsamında visinal diaril izoksazol çekirdeğe sahip antikanser etkili moleküllerin geliştirilme süreçleri üzerinde durulmuştur.

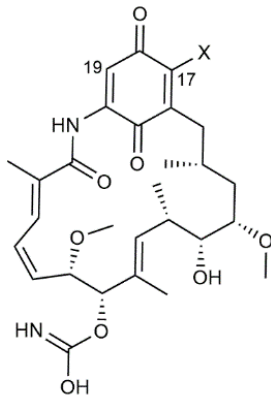
Kanser tedavisi için umut verici potansiyel kemoterapötik ajanlar arasında izoksazol merkez halkası içeren HSP90 moleküler şaperon inhibitörleri bulunmaktadır. Isı şok proteinleri, hücre biyolojisi çalışmasında uzun süredir araştırılmaktadır. Öncelerde, hücreler yüksek sıcaklıklarda çoğaltıldığında seviyeleri önemli ölçüde artan proteinler olarak tanımlanmıştır. Daha sonradan yapılan çalışmalarda, ısı şoku proteinlerinin diğer proteinlerin doğru katlanmasına yardımcı olan veya termal denatürasyon gibi bir stres olayı sırasında ortaya çıkabilen ve böylece aktif yapılarını kaybedebilecek proteinleri korumaya yardımcı olan proteinler olduğu anlaşılmıştır.

Isı şok proteinlerinin ve özellikle HSP90'ın insan tümörlerinde aşırı eksprese edildiği gösterilmiştir ve bu nedenle şaperon proteinleri, kanser tedavisi için heyecan verici yeni bir hedef olarak kabul edilmektedir. Proteotoksik ısı şokuna ve diğer streslere yanıt olarak önemli bir rol oynamanın yanı sıra HSP90, normal hücrel homeostazı sürdürmek için de önemlidir. HSP90, birçok kinaz ve transkripsiyon faktörü dahil olmak üzere seçilen bir dizi anahtar proteinin konformasyonel stabilitesini, şeklini ve işlevini sağlamaktan sorumludur. HSP90, malignite ile ilişkili hücrel stresle uğraşmanın yanı sıra ErbB2 (hücre membranında tirozin kinaz reseptörünü kodlayan bir onkogen), Raf1, Akt / PKB ve mutant p53 gibi bir dizi önemli onkojenik proteinler için de gereklidir. HSP90 inhibitörleri, birçok kanser sinyal yolunu paralel olarak inhibe ederek geniş spektrumlu antitümör aktivite sergiledikleri için oldukça ilgi çekici bir araştırma konusudur [49, 50].

Yapılan ilk deneysel ve birkaç öncü klinik çalışma, HSP90 aktivitesinin bloke edilmesinin, kanser tedavisinde terapötik bir avantaj sağladığını düşündürmektedir [51]. Ancak kanser hücrelerinin fazla miktarda HSP90 üretebilmesinin yanında, normal hücrelerde de bol miktarda HSP90 olması araştırmacılar için büyük bir endişe konusudur. Bu, HSP90'ı hedefleyen ilaçların kabul edilemez derecede toksik olabileceği anlamına gelebilmektedir. Bununla birlikte, ilk HSP90 inhibitörlerinden, 17-allilaminogeldanamisin (17-AAG), umut verici erken sonuçlarla klinik çalışmalara girmiş ve hastalar tarafından iyi tolere edildiği gözlenmiştir. 17-AAG üzerinde araştırmacıların elde ettikleri sonuçlara göre, bu ilacın normal hücrelere göre tümör hücrelerini hedeflediği tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada, 17-AAG'nin klinik kanser biyopsilerinden türetilen HSP90 ile bağlanma affinitesinin normal dokulardaki HSP90 ile olan bağlanma afinitesinden 100 kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir [52]. Proteine bağlanmadaki bu afinite değişikliği, HSP90 diğer şaperon proteinleri ile birleştiğinde ortaya çıkmaktadır, çünkü HSP90, tümörlerde yüksek ATPaz aktivitesine sahip çok fazla komplekslerde bulunurken, normal dokularda HSP90, düşük ATPaz aktivitesi olan serbest bir durumda bulunmaktadır. Bilim insanları tarafından HSP90'ın hücrelerdeki afinite değişiklikleri *in vitro* çalışmalar ile araştırılmıştır. Farklı hücre tiplerinde saptanan bu biyokimyasal değişiklikler, hücrel deneylerde 17-AAG'nin sitotoksik aktivitesi ile korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Tümör hücreleri yavaş yavaş mutant ve aşırı eksprese edilen sinyal proteinlerini biriktirdikçe, HSP90'nın bu proteinleri stabilize etmeye başladığı ve

tümörler hayatta kalmak için bu sinyal proteinlerine bağımlı hale geldikçe, HSP90 aktivitesine de bağımlı hale geldiği gözlemlenmiştir. Prensip olarak onkogen bağımlılığına benzer olan bu bağımlılık, HSP90'ın tüm dokularda geniş ekspresyonuna rağmen tümörlerde spesifik bir hedef haline gelme sebebini açıklamaktadır.

HSP90'nın N-terminalinde ATP'yi bağlayan ve hidrolize eden düzenleyici bir cep bulunmaktadır. HSP90'nın doğal inhibitörlerinden Geldanamisin ve 17-AAG (Şekil 2.8), N-terminal bölgesindeki ATP bağlama cebine bağlanarak HSP90 fonksiyonlarını inhibe ettiği gösterilmiştir [53]. Bu doğal ürünler hücresel etki gösterse de, klinik ajan olarak kullanımları, hepatotoksisite ve yapı kararsızlıkları nedeniyle sınırlıdır. Ansamisin sınıfı olarak da bilinen bu ilaçların karaciğer toksik etkilerinin benzokinon işlevselliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. HSP90'ın antikanser ilaç hedefi olarak çalışılmaya başlanmasının ardından doğal HSP90 inhibitörlerini inceleyen araştırmacılar, benzokinon yapısı yerine bazı pürin analogları, izoksazol analogları ve pirazol analogları içeren yeni bileşikler tasarlayıp sentezlemişlerdir. Sentezlenen bileşikler arasında visinal diaril izoksazol ve visinal diaril pirazol türevi bileşiklerin oldukça iyi inhibitör aktivite sergilediklerini bildirmişlerdir.

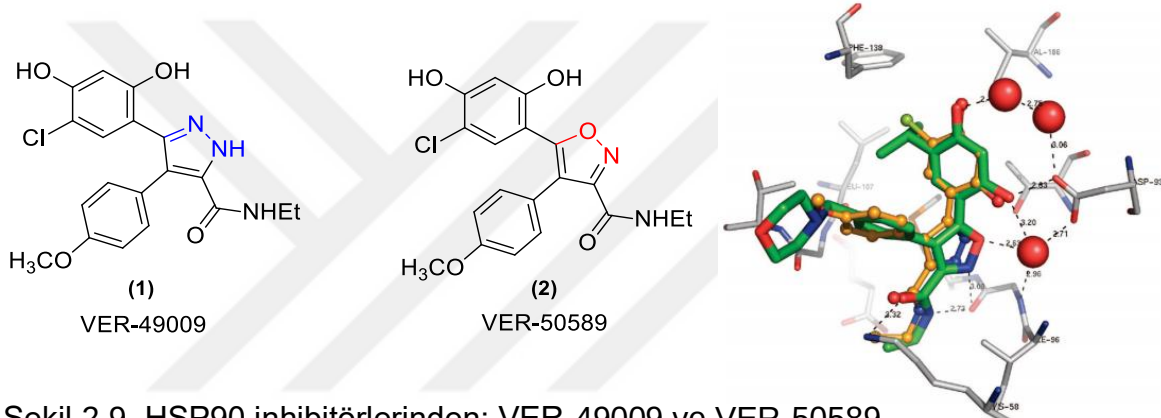


X = OMe; geldanamisin
X = NHCH₂CH=CH₂; 17-AAG
X = NHCH₂CH₂NMe₂; 17-DMAG

Şekil 2.8. HSP90'nın doğal inhibitörleri

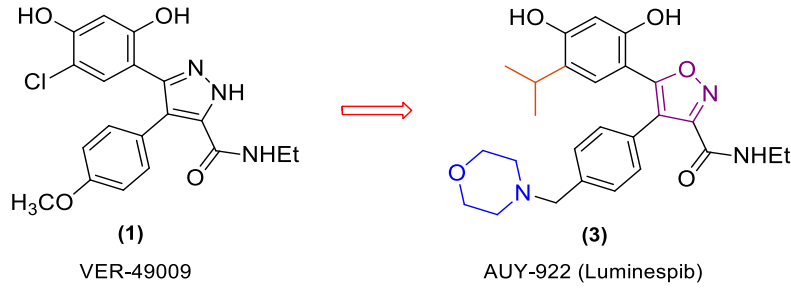
Dymock ve arkadaşları tarafından HSP90 inhibitörü geliştirmek amacıyla hazırlanan pirazol türevleri arasında en potent bileşik olan VER-49009'un (1) keşfedilmesinin

ardından, 2007 yılında Sharp ve arkadaşları VER-50589 (2)'u keşfetmişlerdir. Sharp ve ekibi VER-49009 bileşiğinde yalnızca pirazol halkası yerine izosteri olan izoksazol halkasını kullanmışlardır (Şekil 2.9). Bileşiklerin X-ray ko-kristal yapılarında izoksazol yapısı içeren VER-50589'un pirazol içeren bileşik ile aynı bağlanma moduna sahip olduğunu ancak VER-50589'un daha iyi bir bağlanma entalpisi olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca VER-50589'un hücre içine alımının VER-49009'a göre dört kat daha fazla olması ve çeşitli kanser hücre hatlarında antiproliferatif etkisinin daha fazla olduğu bildirilmiştir. Kanser hücre paneli ortalama değerlerine bakıldığında (VER-49009 için, GI_{50} : 685 ± 119 nmol/L; VER-50589 için, GI_{50} : 78 ± 15 nmol/L) izoksazol türevinin 9 kat daha potent olduğu gösterilmiştir [54].



Şekil 2.9. HSP90 inhibitörlerinden; VER-49009 ve VER-50589

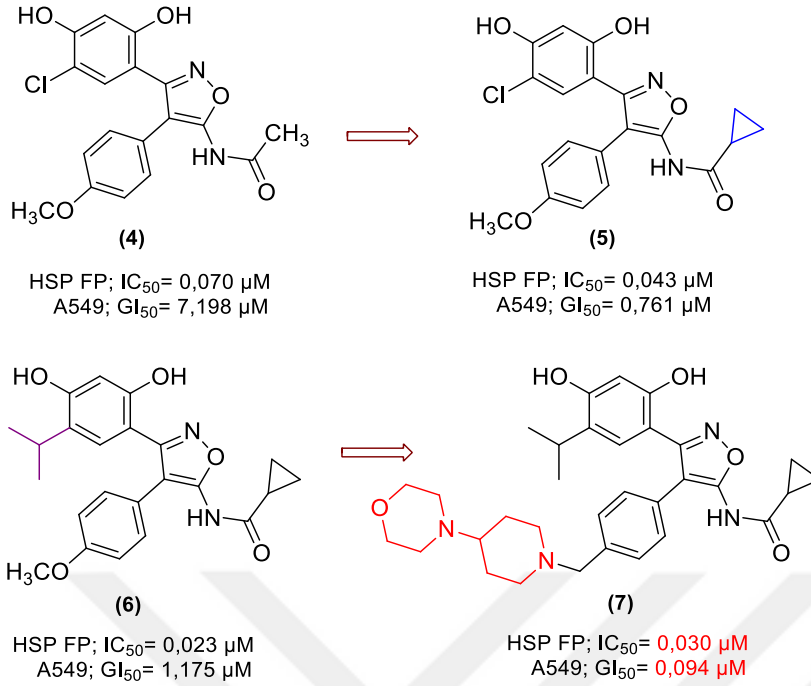
Vernalis firmasından Brough ve arkadaşları 2008 yılında yayınladıkları makalede AU922 (NVP-AU922, Luminespib) kodlu visinal diaril izoksazol analogunun birçok insan kanser hücre hattında ortalama GI_{50} 9 nM değeri ile proliferasyonu inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Ayrıca bu bileşiği, HCT116 kolon kanseri ksenograftlarında IC_{50} = 21 nM değeri ile tümör büyümesini önemli ölçüde azaltan, sentezledikleri serinin en güçlü HSP90 inhibitörü olarak rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, oldukça iyi bir farmakokinetiğe ve farmakodinamiğe sahip olan AU922 ile daha önceden sentezlenen pirazol ve izoksazol analoglarını kıyaslanarak yapı-etki ilişkilerini incelemişlerdir. Her iki halka sistemini içeren bileşiklerde 4. konumda para sübstitüe aril yapısının meta sübstitüe analoglarına göre daha aktif olduğu bildirilmiştir. Rezorsinol halkası üzerinde 5. konumda klor sübstitüenti yerine izopropil motifinin varlığı ve 4. konumdaki fenil halkasının para konumuna getirilen morfolin sübstitüenti ile aktif bölgede ekstra hidrofobik etkileşimler sağlanarak inhibitör aktivitenin neden arttığı açıklanmıştır [55] (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. AUY-922'nin keşfi ve AUY922'nin HSP90'nın aktif bölgesiyle yaptığı etkileşimler

Lider bileşikten daha aktif olan AUY922 bileşiğinin keşfi ile farklı insan tümör ksenograft modellerinde çalışmalar yapılmış ve prelinik testlerde ümit verici aktivitelere ulaşılmıştır. AUY922, Vernalis ve Novartis'in iş birliği ile Faz I çalışmalarını geçmiş ancak Faz II çalışmalarındaki sonuçlarının istenilen düzeyde olmaması sebebiyle faz çalışmalarına ara verilmiştir. Fakat AUY922 bileşiği, HSP90 inhibitörleri alanında yapılan diğer çalışmalarda aktif bölgedeki etkileşimi ve oldukça iyi antiproliferatif etkisi sebebi ile yapı etki ilişkilerini kıyaslamada rol model olarak alınmıştır [56, 57].

Chen ve arkadaşları tarafından 2014'te yayınlanan makalede yapılan fragman bazlı taramanın, sentezin ve detaylı YEİ çalışmalarının tartışıldığı diarilizoksazol bazlı HSP90 inhibitörleri rapor edilmiştir. Rezorsinol süstitüe aminoizoksazol fragmanı üzerinde çalışmış ve referans bileşik olan AUY922'deki amit yapısını ele alarak ters amit içeren analoglar tasarlamış ve sentezlemişlerdir. Sentezledikleri bileşikler arasında izoksazol halkasının 5. konumundaki amin üzerinde siklopropil karbonil bulunan bileşiğin (Bileşik 5) oldukça iyi bir aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca rezorsinol halkasının 5. konumunda klor süstitüsüyonu yerine izopropil süstitüsüyonu ile aktivitenin daha da arttığını gözlemlemişlerdir.

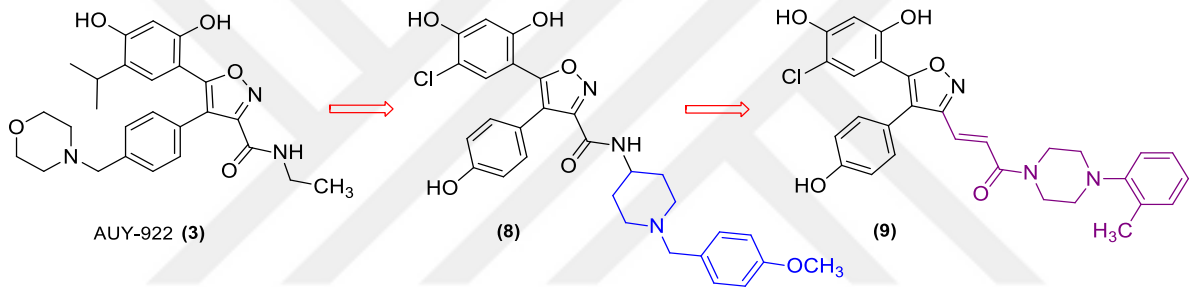


Şekil 2.11. Bileşik 7'nin geliştirilme süreci

Araştırmacılar bir sonraki aşamada, çözünürlüğü arttırmak ve ilaç benzeri özellikler kazandırmak amacıyla farmakokinetik profili düzenlemeye karar vermiş ve Bileşik 6'daki izoksazol halkasının 4. konumundaki fenil üzerinde bulunan metoksifenil grubunu daha hidrofilik sübstitüsyonlar ile değiştirerek bir dizi molekül sentezlemişlerdir. Sentezlenen bileşikler arasında 4-morfolinopiperidin motifi taşıyan Bileşik 7'nin hem moleküler hem de hücresel düzeyde güçlü bir HSP90 inhibitörü olduğu keşfedilmiştir. Birkaç kanser hücre hattında ortalama GI₅₀ değeri 88 nM ile hücre proliferasyonunu etkili bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. Referans bileşik olan NVP-AUY922 ile kıyaslandığında beyin kanseri araştırmalarında yaygın olarak kullanılan insan primer glioblastoma hücre hattı olan U87-MG'de tümör büyümesini iki kat daha güçlü bir şekilde inhibe ettiği de *in vivo* çalışmalarla göstermişlerdir [58] (Şekil 2.11).

Meng ve çalışma ekibi tarafından, 4,5-diarilisoksazol bazlı HSP90 inhibitörünün (AUY-922) yapısı kullanılarak bazı yeni güçlü piruvat dehidrojenaz kinaz (PDHK) inhibitörleri tasarlanmış ve geliştirilmiştir. İlk olarak, 3-amit sübstitüe diarilizoksazoller sentezlenmiş ve sitotoksik aktiviteleri test edilmiştir. IC₅₀=16 nM değeri ile potent HSP90 inhibitörü olan Bileşik 8 (Şekil 2.12), IC₅₀=17 nM değeri ile en güçlü PDHK1 (piruvat dehidrojenaz kinaz 1) inhibitörü olduğu bildirilmiştir, ancak

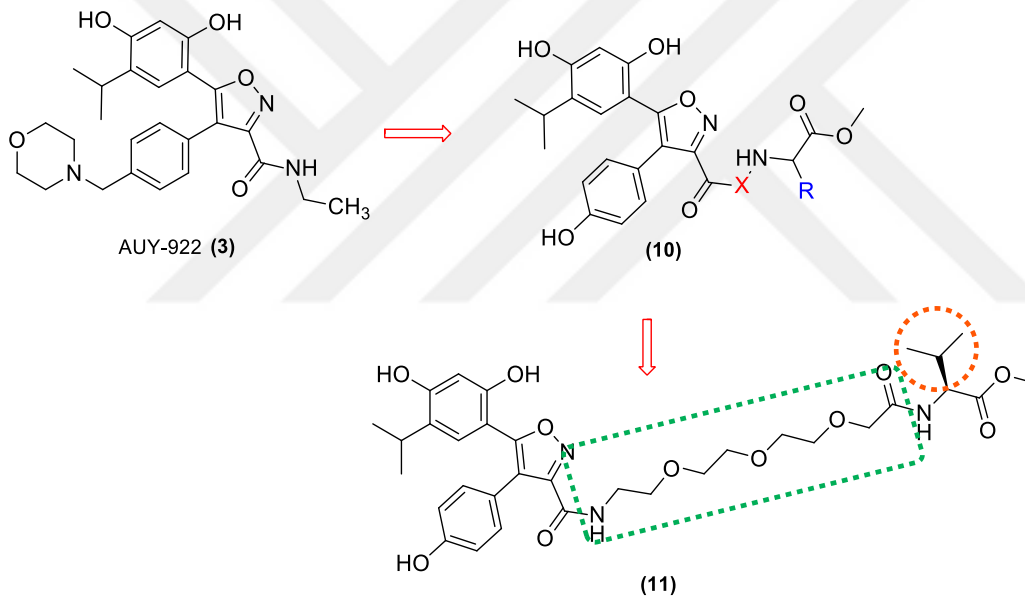
kanser hücrelerinde zayıf aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Araştırmacılar tarafından, zayıf hücresel aktivitenin bileşiğin zayıf geçirgenliğine bağlı olabileceği düşünülmüş ve bileşiğin hücresel aktivitesini ve geçirgenliğini arttırmak için 4,5-diarilizoksazolün 3-vinil analoglarından oluşan yeni bir seri tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Bu bileşiklerin, PDHK1'i belirgin şekilde inhibe ettiği, ancak Bileşik 8 ile karşılaştırıldığında HSP90 inhibisyonunda azalma gösterdiği gözlenmiştir. CCK8 (hücre sayım kiti 8) analizi kullanılarak NCI-H1299 (insan küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu hücre hattı) kanser hücre hattındaki hücresel aktivitede, geliştirilen vinil analoglarından biri olan Bileşik 9'un, artmış hücre geçirgenliği ile hücre proliferasyonunu 9,21 μM IC_{50} değeri ile inhibe eden en etkili bileşik olduğu rapor edilmiştir [59].



Şekil 2.12. Bileşik 9'un geliştirilme süreci

2017 yılında Zhang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada referans bileşik olan AUY922'nin HSP90'nın N-terminal bölgesinde yaptığı bağlanma etkileşimleri incelenerek bu bölgede etkileşimi arttıracak visinal diaril izoksazol türevleri üzerinde çalıştıklarını bildirmişlerdir. Sentezlerini planlarken aktif bölgedeki aminoasit kalıntıları ile daha fazla apolar ve polar etkileşimler yakalayabilmek adına izoksazol halkasının 3. konumundaki amido yapısına çeşitli peptit grupları eklemişlerdir. Doğal veya doğal olmayan aminoasit süstitüsüyonu içeren bileşiklerin aktivitelerini incelediklerinde D-valin metil ester ve metil-2-amino-3-hidroksipropanoat türevinin en yüksek aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca L-aminoasit türevlerde aktivitenin kaybolduğunu, D-aminoasit içeren analoglarda aktiviteye rastlandığını ancak referans bileşiğe kıyasla aktivitenin daha az olduğunu rapor etmişlerdir. Metil veya etil grubu taşıyan basit amit türevlerinde enzimatik ve antiproliferatif aktivitenin yükseldiği ancak örn; siklopropilamin, piperazin ve morfolin gibi hacimli grupların getirilmesi ile aktivitede düşüş olduğu gözlenmiştir. Moleküle ikincil bir aminoasit

(fenilalanin, valin, lösin) eklendiğinde ise orta düzeyde bir aktivite oluşurken valin amino asitiyle oluşturulan tripeptit türevinin tetrapeptit türevinden yaklaşık 20 kat daha yüksek antiproliferatif etki gösterdiği bildirilmiştir (NCI-H3122 IC_{50} = 0,03-0,063 μ M). Araştırmacılar ortaya çıkan bu sonucun valin süstitüsyonunun aktif bölgedeki optimum pozisyonu sağlayabileceği uzaklıkta olduğu için daha iyi bir antiproliferatif etki oluştuğunu düşünmüşlerdir ve bileşiğin terminalinde yine metil esteri sabit tutup çeşitli siklik ve lineer fragmanlar ekleyerek yeni bileşikler elde etmişlerdir. Sentezledikleri bileşikler arasında farmakokinetik parametrelere olumlu yönde katkı sağlayacağını düşündükleri etilen glikol taşıyan düz zincirli türevlerde hücresel (IC_{50} değeri 14nM) ve enzimatik düzeyde oldukça yüksek aktivite gösteren Bileşik 11'e ulaşmışlardır (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. Bileşik 11'in geliştirilme süreci

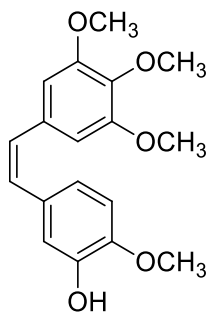
Güçlü bir HSP90 inhibisyonu yapan Bileşik 11'in birçok kanser hücre hattına karşı antiproliferatif aktiviteleri incelenmiş ve özellikle NCI-H3122 ve BT-474 hücre hatlarında sırasıyla 42 ve 57 nM IC_{50} değeriyle oldukça potent antikanser aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir [60]. (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Bileşik 11'in bazı kanser hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktiviteleri

Kanser Hücre Hattı	NCI-H3122 (Akciğer)	A549 (Akciğer)	NCI-H460 (Akciğer)	HCT-116 (Kolon)	BT-474 (Meme)	MDA-MB-231
IC ₅₀ (μM)	0,042	0,351	0,247	0,116	0,057	0,130

Antitümöral ilaç keşif çabalarında ilgi çekici bir başka hedef ise; hücrenin yapısal bütünlüğü, bölünmesi ve intrasellüler transportu dâhil olmak üzere birçok hücresel fonksiyonda önemli bir rol oynayan mikrotübüllerdir.

Mikrotübüller hücrelerin şeklinin korunması, hareketliliği ve intrasellüler geçirgenliği gibi fonksiyonların yanısıra hücrelerin bölünmesinden de sorumlu olan alfa ve beta dimerlerden oluşan silindir şeklindeki yapılardır. Mikrotübüller mitotik evrenin G2-M fazında mitotik iğlere dönüşerek bölünmenin gerçekleşmesini sağlamaktadır. Ancak mikrotübüllerin yapısının bozulması anormol iğ iplikciklerinin oluşmasına sebep olmakta ve hücre bölünmesini engellemektedir. Hücre bölünmesinde oynadığı bu rol sebebi ile mikrotübüller antikanser ilaç araştırmalarında önemli bir hedef haline gelmiştir. Tübülinlerin kolşisin bağlanma bölgesine bağlanarak antitümöral aktivite gösterdiği keşfedilmiş ve doğal bir cis-stilben olan Kombrestatin A-4 (CA-4)'ün bu bölgeye kuvvetli bir şekilde bağlanarak tübülinlerin polimerizasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Şekil 2.14).



Kombrestatin A-4 (CA-4) (12)

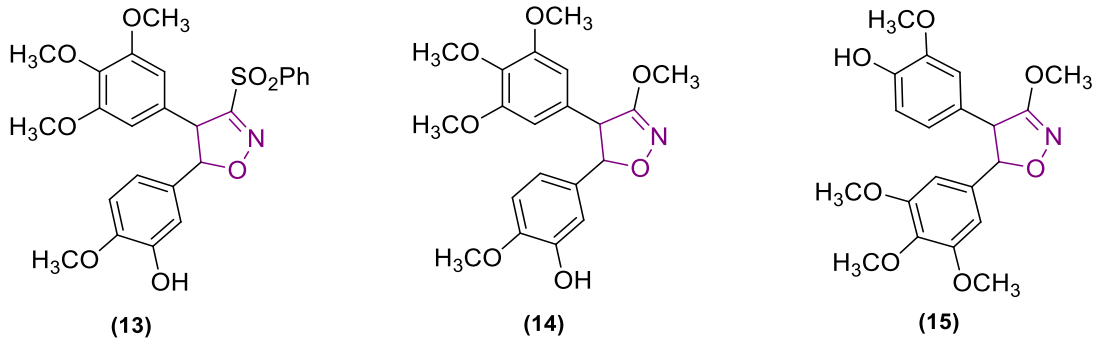
Şekil 2.14. Kombrestatin A-4'ün kimyasal yapısı

CA-4'ün kombine ilaç tedavisine direnç gösteren kanser hücre hatları da dahil olmak üzere birçok kanser hücre hatlarına karşı güçlü antitümöral aktivite gösterdiği kanıtlanırsa da düşük suda çözünürlüğü nedeniyle *in vivo* çalışmalarda inaktif olduğu

bulunmuştur, ancak disodyum fosfat ön ilaç formu (CA4P) ile yapılan *in vivo* çalışmalarda tümör vaskülaritesini azalttığı gösterilmiştir. Bunun üzerine CA4P kemoterapi ve radyoterapi ile tümör tedavisinde kullanılmak üzere faz denemelerinden geçmiştir [61, 62].

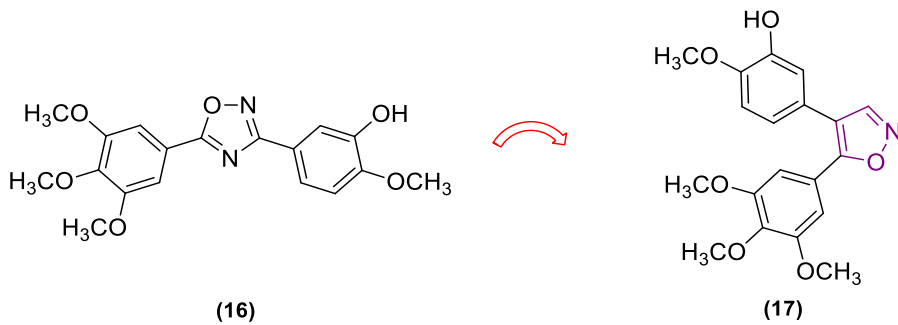
Araştırmacılar, ön ilaç yaklaşımı ile Kombretastatin A-4'ün sudaki çözünürlüğünün geliştirilmesi amacıyla cis-kombretastatin analogları sentezlemiştir [63, 64]. Bununla birlikte, bu bileşikler daha büyük sitotoksik aktivite göstermiş ve tümör bölgesindeki kan akışını durdurarak doku içinde hemorajik nekroza neden olduğu bildirilmiştir. Ek olarak, CA4P'nin antitübülin aktivitesi incelendiğinde iki aromatik halkanın belirli bir mesafede durmasını sağlayan molekül cis konformasyonda tutan bir çiftte bağlı zincirin varlığının aktivite için önemli olduğu trans konformasyona sahip molekülün ise aktivitesinin kaybolduğu keşfedilmiştir. Bunun üzerine bilim insanları tarafından, potens için gerekli komşu aril gruplarının uygun geometrisine sahip kimyasal olarak kararlı cis kısıtlamalı kombretastatinleri geliştirmek için, pirazol, tetrazol, imidazol, furazan (1,2,5-oksadiazol), oksazol, izoksazol, triazol, 1,2,5-tiadiazol ve tiyazol gibi çeşitli beş üyeli heterosikliklerin geliştirilmesiyle yeni türevler elde edilmiştir.

Simoni ve arkadaşları tarafından 2005 yılında yayınlanan makalede yeni bir CA-4 analog serisi, CA-4'ün olefinik köprüsünün beş üyeli (izoksazolin veya izoksazol) ve altı üyeli (piridin veya benzen) heterosikliklerle değiştirilmesi ile elde edilen bileşikler rapor edilmiştir. Sentezlenen bileşikler arasında, izoksazolin türevleri (Bileşik 13-15), HL60 (lösemi) hücre hattına karşı yapılan aktivite testlerinde sırasıyla 2.0, 0.3 ve 0.5 μM IC_{50} değerleriyle güçlü apoptotik aktivite sergilemişlerdir. Bu bileşiklerin (Bileşik 13-15), aynı zamanda sırasıyla 0.9, 0.1 ve 0.25 μM IC_{50} değerleriyle en güçlü antiproliferatif aktiviteye sahip oldukları rapor edilmiştir. CA-4, M fazında hücreleri durdururken bu bileşiklerin çoğu hücreyi G2 fazında bloke ettiği gözlenmiştir. Araştırmacılar, keşfettikleri CA-4 analoglarının mitotik içcikler üzerinden olmayan CA-4'ten farklı bir mekanizma ile sitotoksik etki gösterdiğini bildirilmiştir [65] (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. Bileşik 13-15'ün geliştirilmesi

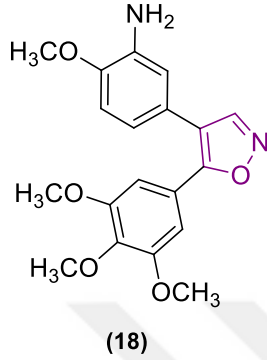
2006 yılında Kaffy ve arkadaşları tarafından halkada oksijen ve azot içeren farklı beş üyeli heterosiklik yapıda yeni CA-4 analogları (izoksazol, izoksazolin ve oksadiazol) tasarlanıp geliştirilmiştir. Araştırmacılar iki farklı α,γ -diaril-heterosiklik grup ve α,β -diaril-heterosiklik türevler sentezleyip, bu bileşiklerin sitotoksik ve antitübülin aktivitelerini test etmişlerdir. α,γ -diaril heterosiklik halka serisinde, 3,5-diaril oksadiazol (Bileşik 16, $IC_{50}=5\ \mu M$) yapısı içeren analogların sadece tubulin sentezini inhibe ettiği ancak sitotoksik aktiviteden yoksun olduğu saptanırken, α,β -diaril heterosiklik serisinde 4,5-diaril izoksazolün (Bileşik 17, $IC_{50}=0,75\ \mu M$), CA-4 ($IC_{50}=1,2\ \mu M$)'ten daha potent antitübülin aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir [66] (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. Bileşik 17'nin geliştirilme aşaması

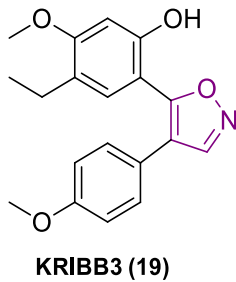
Sun ve ekibi tarafından, CA-4'ün yapısal analogları olarak bazı 4,5-diaril izoksazoller hazırlanıp üç farklı insan kanser hücre hattındaki sitotoksik aktiviteleri değerlendirilmiştir. Bildirilen bileşiklerin hepsi, üç kanser hücre hattına karşı oldukça anlamlı sitotoksik aktivite sergilemiştir. Araştırma ekibi tarafından Bileşik 18'in HeLa

ve HepG2 hücre hatlarına karşı sırasıyla 0,022 ve 0,065 nM IC_{50} değerleri ile CA-4'e kıyasla (sırasıyla 2,75 ve 0,14 nM IC_{50} değerleri) son derece sitotoksik aktivite gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca yaptıkları çalışmada Bileşik 18'in, hücreleri G2/M fazında durdurduğunu bildirmişlerdir [67] (Şekil 2.17).



Şekil 2.17. Bileşik 18'in geliştirilmesi

2008 yılında Shin ve çalışma arkadaşları, KRIBB3, 5-(5-etil-2-hidroksi-4-metoksifenil)-4-(4-metoksifenil) izoksazol (Bileşik 19)'ü, hücre döngüsünü G2/M fazında durdurup bunu apoptozun takip ettiği bir mekanizma ile aktivite gösteren yeni bir mikrotübül inhibitörü olarak rapor etmişlerdir. Bileşiğin antitübülün aktivitesini, *in vitro* polimerizasyon deneyi ve *in vivo* dolaylı immüno Floresan boyaması kullanılarak değerlendirmişlerdir. *In vitro* çalışmalarda çeşitli kanser hücre hatlarında potent aktivite sergilediği bildirilmiştir (Şekil 2.18). *In vivo* çalışmalarda ise, 50 ve 100 mg/kg'lık dozlarda sırasıyla %49,5 ve %70,3 oranında tümör büyümesini inhibe ederek antitümör aktivite gösteren Bileşik 19'un kanser tedavisi için iyi bir klinik aday olabileceği gösterilmiştir [68].



HCT116; IC_{50} = 0,25 μ M (kolon)

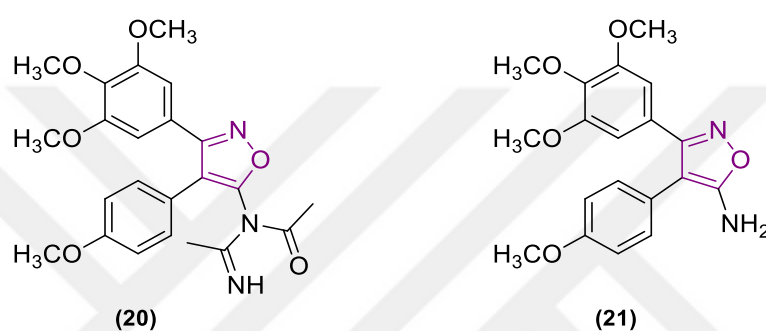
MDA-MB-231; IC_{50} = 25 μ M (meme)

A549; IC_{50} = 1,2 μ M (akciger)

PC-3; IC_{50} = 0,48 μ M (prostat)

Şekil 2.18. Bileşik 19'un kimyasal yapısı ve IC_{50} değerleri

Liu ve arkadaşları tarafından bir dizi 3,4-diaril-5-aminoizoksazol türevi ve bu amino izoksazollerin asetilenmiş analogları sentezlenip, beş farklı insan kanser hücre hattı (insan miyeloid lösemi hücreleri K562, insan özofagus karsinom hücreleri ECA-109, insan küçük hücreli akciğer kanseri hücreleri A549, insan hepatoselüler karsinom hücreleri SMMC-7721 ve insan prostat karsinom hücreleri PC-3) kullanılarak *in vitro* sitotoksik aktiviteleri değerlendirilmiştir. Sentezlenen bileşiklerden Bileşik 20 ve 21, CA-4 ile karşılaştırılabilir tubulin polimerizasyonu önleyici aktivite gösterdiği bildirilmiştir.



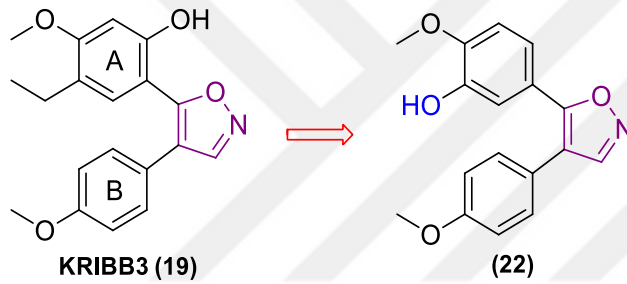
Şekil 2.19. Bileşik 20 ve 21'in kimyasal yapısı

Çizelge 2.2. Bileşikler 20 ve 21'e ait aktivite değerleri

	ITP	K562	ECA-109	A549	SMMC-7721	PC-3
Bileşikler	(IC ₅₀ µM)					
Bileşik 20	1,8	0,04	5,84	4,49	12,0	3,03
Bileşik 21	2,1	0,068	0,39	0,43	1,36	0,36
CA-4	1,2	0,046	4,50	0,42	3,22	5,40

Bileşiklerin (20 ve 21) (Şekil 2.19), serideki tüm insan kanser hücre hatlarına karşı en etkili türevler olduğu gösterilmiştir (Çizelge 2.2). Bileşik 20 ve 21, CA-4 ile karşılaştırılabilir düzeyde tubulin polimerizasyonunu inhibe edici aktivite sergilemiştir. Ayrıca Bileşik 21 ile gerçekleştirilen hücre döngüsü analizlerinde, bölünmenin G2/M veya S fazlarında durdurularak hücreleri apoptoza sürüklediğini göstermişlerdir [61].

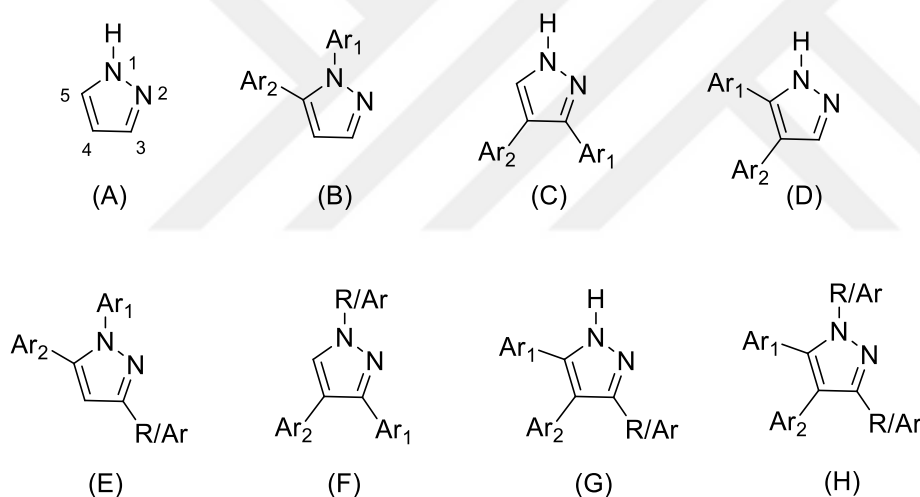
Lee ve ekibi tarafından güçlü bir antimitotik ajan olan KRIBB3'ün bir dizi yapısal analogu sentezlenip, mikrotübül polimerizasyonuna karşı inhibe edici aktiviteleri açısından taranmıştır. Çeşitli değişkenlerin sentezlenmiş bileşiklerin inhibe edici aktivitesi üzerindeki etkisini incelemek için KRIBB3'ün (Bileşik 19) 4,5-diaril gruplarında modifikasyonlar yapılmıştır. YEİ çalışmalarından, A ve B halkaları üzerinde hidroksi ve metoksi sübstitüentleri, etoksi, benziloksi gibi çeşitli eter köprüleri oluşturularak aktiviteleri araştırılmıştır. Referans KRIBB3 ile aynı inhibisyon değerine sahip olan Bileşik 22 ile (A) aril halkası üzerindeki bir metoksi sübstitüsyonu ile birlikte en az bir hidroksi sübstitüsyonunun ve (B) aril halkası üzerindeki 4-metoksi sübstitüsyonunun mikrotübül polimerizasyonunun inhibisyonu için oldukça önemli olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.20) [69].



Şekil 2.20. Bileşik 22'nin kimyasal yapısı

2.5. Visinal Diaril Pirazol Yapısı Taşıyan Antikanser Ajanlar

Biyolojik hedef ile etkileşimde stratejik olarak önemli olan pirazol halkası iki azot atomunu bitişik konumlarda içeren beş üyeli bir halkadır. Bu halkanın bitişik konumlarında iki aril halkasının sübstitüe edildiği yapılar ise visinal diaril pirazoller olarak belirtilmektedir. Heterosiklik bileşikler arasında, visinal diaril pirazoller, klinik olarak yararlı birçok ilacın bulunduğu sınıfı temsil eder. Bu heterosiklik yapı iskeletinin biyolojik profili; antikanser, NSAII (non-steroidal antiinflatuar ilaç)'lar, antidepresan, antiviral, antioksidan gibi geniş bir farmakolojik yelpazeye sahiptir. Özellikle antikanser ajanların geliştirilmesine yönelik araştırmalarda karşımıza çıkan visinal diaril pirazol yapısı bu tez kapsamında araştırılmış olup geliştirilen bazı moleküllerin çekirdek yapısını oluşturmaktadır.

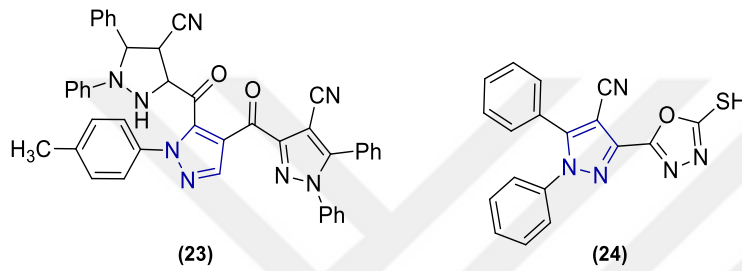


Şekil 2.21. Pirazol halkası (A) ve visinal diaril türevleri (B-H)

Aşağıda pirazol halka sistemi üzerine çalışan bilim insanlarının çalışmalarından güncel örnekler derlenerek visinal diaril pirazol çekirdeğine sahip antikanser etkili moleküllerin geliştirilme süreçleri üzerinde durulmuştur.

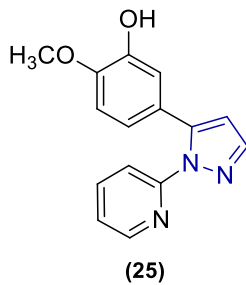
Farag ve çalışma ekibi tarafından antitümör ve antiöstrojenik potansiyeli olan bazı pirazol bazlı hibrit bileşikler rapor edilmiştir. Sentezledikleri bileşikleri insan yumurtalık ve meme kanseri hücre hatlarına karşı antitümör aktivitesini *in vitro* olarak ve antiöstrojenik aktivitesini *in vivo* olarak değerlendirmişlerdir. Biyolojik aktivite verilerini incelediklerinde Bileşik 23'ün MCF7 hücre hattına karşı $GI_{50} = 0,061$

μM değeriyle nanomolar düzeyde sitotoksik aktivite sergilediğini ve standart ilaç olarak kullanılan Letrozolden bir buçuk kat daha aktif olduğunu bildirmişlerdir. Aynı iskeletin üzerinde araştırılmalarını devam ettiren çalışma ekibi, birkaç umut verici pirazol türevi daha sentezlemişlerdir. Östrojen bağımlı tümör hücre hatlarına (meme ve yumurtalık kanseri) karşı *in vivo* antiöstrojenik aktivitelerin değerlendirmeleri sonucunda, IGROVI yumurtalık kanseri hücre hattına karşı antiöstrojenik aktivitesinden dolayı en yüksek sitotoksik aktiviteye sahip en umut verici bileşik olarak Bileşik 24'e (Şekil 2.22) ulaşılmıştır ($\text{GI}_{50} = 0,040 \mu\text{M}$) [70].



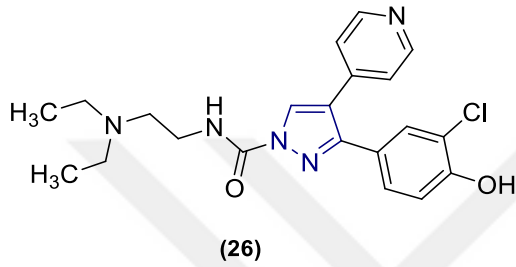
Şekil 2.22. Bileşik 23 ve 24'ün kimyasal yapıları

Yeni antitümör ajanlar sentezlemek amaçlı çalışmalar yürüten Balbi ve arkadaşları 2011'de dirençli tümör hücrelerine karşı etkili olan birkaç yeni pirazol türevi sentezlediklerini bildirmişlerdir. Bileşik 25'in, IC_{50} değerleri sırasıyla 1,22; 52,5 ve $1,56 \mu\text{M}$ olan insan yumurtalık adenokarsinomu A2780, murin lösemi P388 ve insan akciğer karsinomu A549 hücre hatlarına karşı en yüksek antiproliferatif aktiviteyi gösterdiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca hücre döngüsünü G2/M fazında durdurarak ve poliploid hücrelerin oluşumunu kısmi olarak bloke ederek apoptozu indüklediğini kanıtlamışlardır. Docking simülasyon çalışmaları ile de Bileşik 45'in α - ve β -tübüline bağlandığını doğrulamışlardır [71].



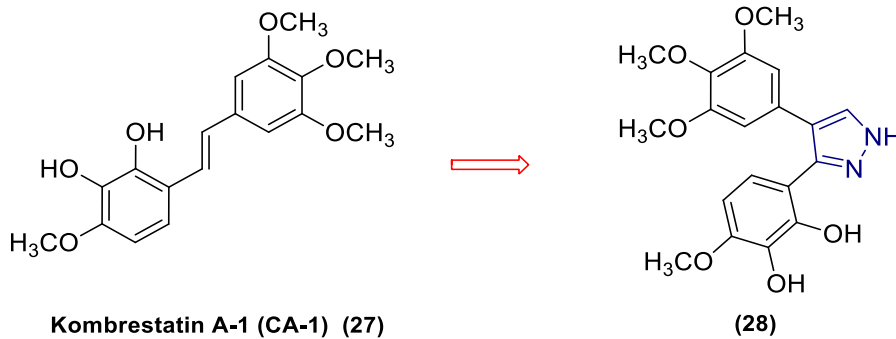
Şekil 2.23. Bileşik 25'in kimyasal yapısı

El-Gamal ve arkadaşları, 3,4-diarilpirazollerin antiproliferatif aktivitesi üzerinde araştırmalar yaparak bir dizi 3-(3-kloro-4-süstitüe fenil)-4-(piridin-4-il)-1*H*-pirazol-1-karboksamit türevlerini tasarlayıp sentezlemişlerdir. Çalışma grubunun sentezlediği bileşiklerin A375 insan melanom hücrelerine karşı antiproliferatif aktiviteleri değerlendirilmiş ve ulaştıkları dört bileşiğin Sorafenib'den ($IC_{50}=12,5 \mu M$) daha yüksek potansiyele sahip olduğu Bileşik 26'nın ($IC_{50}=6,6 \mu M$) ise en potent bileşik olduğu bildirilmiştir [72] (Şekil 2.24).



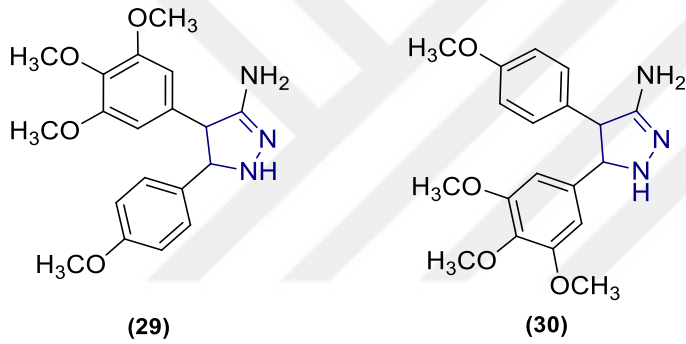
Şekil 2.24. Bileşik 26'nın kimyasal yapısı

Kombretastatinin metabolik olarak dayanıksızlığı ve buna bağlı aktivite kaybını gidermek amacıyla Zaninetti ve arkadaşları tarafından Kombretastatin A-1 (CA-1)'in metabolik olarak stabil, rijitleştirilmiş 3,4-diarilpirazol analogları (Şekil 2.25) sentezlenmiştir. Çalışma grubunun sentezledikleri bileşikler arasında Bileşik 28 nöroblastoma hücre hattında (SH-SY5Y) G2/M fazındaki hücre döngüsünü tübülün inhibisyonu yoluyla durdurarak oldukça potent aktivite göstermiştir ($IC_{50} = 5,4 \text{ nM}$) [73].



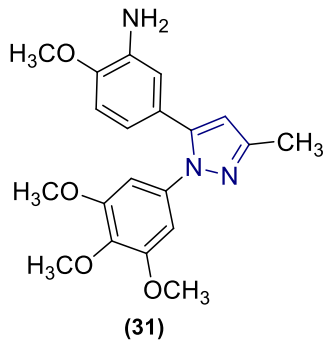
Şekil 2.25. Kombretastatin A-1(Bileşik 27) ve Bileşik 28'in kimyasal yapıları

Kanserin tedavisi için antimitotik ajanların yüksek potansiyeli, Tsyganov ve arkadaşlarının CA-4 analoglarını sentezlemesini sağlamıştır. Bu amaçla bir dizi cis sınırlandırılmış 4,5-polialkoksidiaril-3-aminopirazoller sentezlemiş ve fenotipik deniz kestanesi embriyo analizinde antimitotik ve antitübülin etkilerini *in vivo* olarak araştırmışlardır. Yaptıkları analizler sonucunda, A halkasında 3,4,5-trimetoksi varlığının, etkinliği desteklediğini göstermişlerdir. Bileşik 29 ve 30'un, embriyonik hücre bölünmesini inhibe ederek en yüksek potansiyeli gösteren iki bileşik (sırasıyla 0,01 ve 0,1 μM konsantrasyonda) olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca bu bileşiklerin ilaç tedavisine dirençli yumurtalık kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe etme kabiliyetine sahip olmaları nedeniyle antikanser ajan olma potansiyeli oldukça yüksek bileşikler olarak bildirmişlerdir [74] (Şekil 2.26).



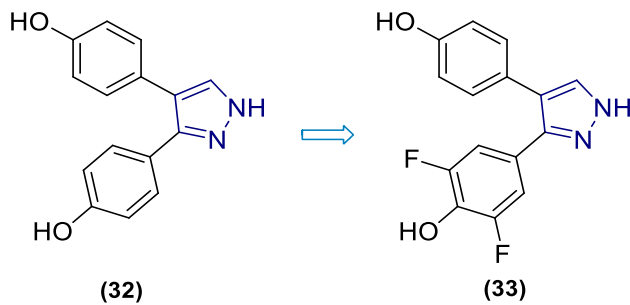
Şekil 2.26. Bileşik 29 ve Bileşik 30'un kimyasal yapıları

Xu ve arkadaşları tarafından 2015'te yayınlanan makalede CA-4'ün analogları olarak bir dizi 3-alkil-1,5-diaril-1*H*-pirazol bileşikleri sentezlendiği ve insan kanser hücresi hatlarına (SGC7901, A549 ve HT1080) karşı tubulin polimerizasyonunun inhibisyonu yoluyla antiproliferatif aktivitelerinin test edildiği bildirilmiştir. Araştırmacılar, yaptıkları çalışmaların sonucunda, sentezlenen bileşikler arasında Bileşik 31'in tübülün ağının bozulmasıyla antiproliferatif etki gösterdiğini (SGC7901, A549 ve HT-1080 hücre hatlarına karşı sırasıyla IC_{50} değerleri; 0,076; 0,122; 0,096 μM) bildirmişlerdir. Docking çalışmaları ile de Bileşik 31'in, mikrotübüllerin kolşisin bağlanma bölgesine, CA-4 ile benzer bir modda bağlandığını göstermişlerdir [75].



Şekil 2.27. Bileşik 31'in kimyasal yapısı

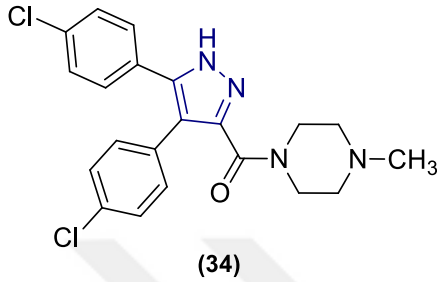
Jain ve arkadaşları, protein kinaz ailesinden olan p90 ribozomal S6 kinaza (RSK) (hücre çoğalması ve apoptozda yer alan bir dizi proteinin fosforilasyonunda rol oynayan enzim) karşı inhibitör aktivite gösteren bir dizi bileşik bildirmişlerdir. Sentezledikleri bileşikleri biyolojik olarak değerlendirdiklerinde 69 kinaz paneline karşı yüksek seçiciliği nedeniyle bis-fenolpirazolün (Bileşik 32) (Şekil 2.28) üzerinde çalışmışlardır. Fenollerden kaynaklanan metabolik stabilite endişesini ortadan kaldırmak amacıyla farklı sübstituentler getirilerek stabilite sorununu iyileştirilmeye çalışılmıştır. Difloro sübstitüe analogu Bileşik 33'ün 6 nM IC_{50} değeri ile oldukça yüksek bir potansiyel teşkil ettiğini bildirmişlerdir [76].



Şekil 2.28. Bileşik 32 ve Bileşik 33'ün kimyasal yapıları

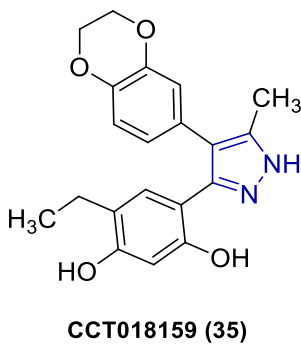
Antitümör ajanlara p53-MDM2 etkileşimlerinin inhibisyonu yoluyla ulaşılabilir. Bu etkileşimin inhibisyonu hücre döngüsünü, apoptozu ve DNA onarımını düzenleyen tümör baskılayıcı p53'ün işlevini yenilemesine neden olur. MDM2'nin rolü ise p53 yolağının negatif yönde regüle etmektir. Hu ve arkadaşları, p53-MDM2 etkileşimlerini inhibe edecek antitümör ajanlar geliştirmek amaçlı bir dizi pirazol türevi bildirmiştir. Araştırmacılar tarafından sentezlenen bileşikler arasında

Bileşik 34 ile floresan polarizasyona dayalı bağlanma deneyi yapıp p53-MDM2 bağlanma afinitesi test edilmiş ve bu bileşiğin sentezlenenler arasında en yüksek potansiyeli ($IC_{50} = 29,22 \mu M$) gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca beş hücre hattına karşı (HCT116, A549, SW620, PC3 ve HL60) umut verici antiproliferatif aktivite ($IC_{50} = 4,09-16,82 \mu M$) gösterdiği rapor edilmiştir [77] (Şekil 2.29).



Şekil 2.29. Bileşik 34'ün kimyasal yapısı

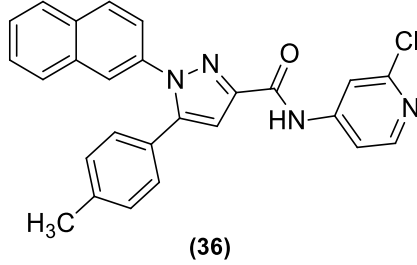
Workman ve arkadaşları, bir HSP90 inhibitörü olan 3,4-diarilpirazol türevi CCT018159'u (Bileşik 35), 60.000 bileşikli kütüphane taramasıyla (HTS ile) keşfetmişlerdir. HSP90 ATPaz aktivitesini ($8,9 \mu M$) inhibe ettiği konsantrasyonlara benzer konsantrasyonlarda insan kolon, yumurtalık ve melanom tümörlerinde HSP90 istemci proteinlerinin tükenmesine ve HSP70'in indüksiyonuna neden olarak tümör hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir [78].



Şekil 2.30. Bileşik 35'in kimyasal yapısı

Pirol ve arkadaşlarının tarafından yapılan çalışmada visinal diaril heterosiklik yapıya sahip bir dizi bileşik sentezlenmiş ve sentezlenen bileşikler arasından en potent bileşik olan Bileşik 36'nın Huh7, MCF7 ve HCT116 hücre hatlarında yapılan

sitotoksosite çalışmalarında sırasıyla 1.6 μ M, 3.3 μ M, 1.1 μ M aktivite değerlerine sahip olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.31) [79].



Şekil 2.31. Bileşik 36'nın kimyasal yapısı

İnflamasyon, patojenler, anormal hücreler veya tahriş edici maddeler gibi çeşitli zararlı uyaranlara yanıt olarak vasküler dokuda meydana gelen karmaşık biyokimyasal cevap ve bağışıklık sürecidir. Fizyolojik olarak, inflamasyonun ana amacı enfeksiyonlara karşı savunma mekanizmalarını uyarmak veya hasardan sonra doku onarımını teşvik etmektir. İnflamasyonun birincil araçlarından biri COX-2 tarafından biyosentezlenen prostaglandin (PG)'lerdir. PG'ler hasarlı bölgede hızla birikirler ve enflamatuar durumun başlamasından ve sürdürülmesinden sorumlu vasküler bir tepkiyi indüklerler [44]. PG'ler ayrıca, mevcut epidemiyolojik çalışmalara dayanarak, karaciğer kanseri ve malign meme kanserinin de aralarında bulunduğu tüm insan malignitelerinin %15'inden fazlasıyla ilişkili olan kronik inflamasyon mekanizmasına katılır.

İnflamasyonun kansere nasıl yol açtığına dair mevcut inanç, lokal enflamatuar odakların, karsinogenez başlatma aşamasında zaten olduğu ve çeşitli genetik değişiklikler için uygun koşulları ürettiği yönündedir. Örneğin, tümör gelişimini ve ilerlemesini kolaylaştıran bir enflamatuar mekanizma, aşırı reaktif oksijen türlerinin ve reaktif azot ara ürünlerinin üretilmesidir. Bu faktörler, genetik mutasyonların birikmesine ve genomun dengesizleşmesine yol açan DNA'nın oksidatif hasarına neden olur. Sonuç olarak, tümör hücreleri ölümsüzlüğün iki temel özelliğini kazanabilir: kontrolsüz proliferasyon ve apoptoza direnç. İnflamasyonun varlığı DNA hasarının yanı sıra, epidermal büyüme faktörü (EGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi büyüme faktörlerinin de tümör mikro ortamına salınmasını sağlar. Bu

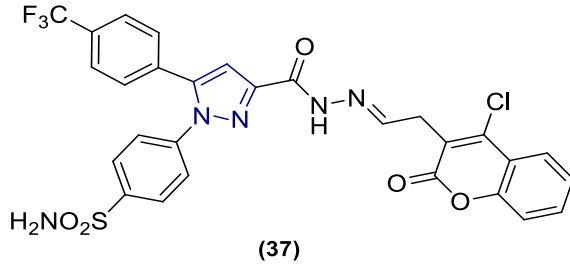
durum da kanser tanısı koymada önemli bir role sahip olan neoplastik proliferasyonu hızlandırır [18].

Meme kanserinin neoplastik hücrelerinde, özellikle metastatik hastalığı olan hastalarda, Prostaglandin E2 (PGE2) ve Tromboksan A2 (TXA2) ekspresyonunun arttığı 1980'lerden beri bilinmekte iken, NSAİI'lerle uzun süreli tedavinin meme kanseri gelişim riskini azalttığı kaydedilmiştir [80]. COX-2 gen ekspresyonunun ileri analizi, meme kanserinde ve ayrıca kolorektal, akciğer, gastrik, mesane, pankreas, endometriyal ve prostat kanseri dahil olmak üzere diğer insan solid tümörlerinde yüksek bir COX-2 mRNA konsantrasyonu göstererek bu gözlemleri doğrulamıştır. Ayrıca COX-2'nin meme epitelinde fizyolojik olarak mevcut olmamasına rağmen, duktal karsinom gibi premalign evre meme kanseri vakalarının %63-85'inde COX-2 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. [81]. Buna bağlı olarak COX-2 inhibisyonu ile antikanser aktivite yakalamak mümkündür. Selekoksib ile yapılan *in vitro* analizler sonucunda elde edilen IC₅₀ değerleri Çizelge 2.3'te verilmiştir [82].

Çizelge 2.3. Selekoksib'in bazı kanser hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktiviteleri

Hücre Hattı	Selekoksib'e ait IC ₅₀ Değerleri (µM)
B16F10 (Melanoma)	57
HCT-15 (Kolorektal Adenokarsinoma)	22,2
4T1 (Meme Kanseri)	49
CACO-2 (Kolorektal Adenokarsinoma)	26,5
SKOV3 (Yumurtalık Kanseri)	25
HEY (Yumurtalık Kanseri)	44
IGROVI (Yumurtalık Kanseri)	55

Son yıllarda, Lu ve arkadaşları tarafından, kanser hücrelerinin büyümesini baskılamada yüksek etkinliği olan COX-2 inhibitörleri üzerinde çalışılmış ve bir dizi kumarin sülfonamid türevi rapor edilmiştir. Sentezlenen bileşikler arasında Bileşik 36 (Şekil 2.32) COX-2 için yüksek selektivite gösterirken (COX-2 için IC₅₀= 0,09 µM iken COX-1 için IC₅₀= 48,2 µM) HeLa'ya karşı güçlü antiproliferatif aktivite (IC₅₀= 0,36 µM) gösterdiği rapor edilmiştir. Ayrıca kanser metastazı için temel hücresel süreçler olan; hücre adezyonunu, göçünü ve istilasını baskıladığını bildirmişlerdir. Çalışma grubunu yaptığı docking çalışmaları ile de COX-2 aktif alanına bağlandığını göstermişlerdir [83].



Şekil 2.32. Bileşik 37'nin kimyasal yapısı

ALK5 (TGF- β R1/dönüştürücü büyüme faktörü β reseptörü I olarak da bilinen aktivin benzeri kinaz 5), çeşitli fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynayan bir serin-treonin kinaz reseptörüdür. TGF- β ligandının fosforillemesi sonucu aktive edilen ALK5 daha sonra reseptörden ayrılan SMAD2/SMAD3 proteinlerini fosforile eder ve SMAD4 ile heteromerik bir kompleks oluşturur. Bu kompleks nihayetinde çekirdeğe taşınır ve hücre büyümesini, farklılaşmasını ve gelişimini kontrol eden gen ekspresyonunu düzenlemek için DNA kofaktörleri ile etkileşime girer. Anormal TGF- β sinyali, fibroz, kardiyovasküler hastalık ve kanser gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilidir. Dolayısıyla, TGF- β sinyal yolu antikanser ajan geliştirmek için potansiyel bir ilaç hedefidir. Çeşitli organik moleküller, TGF- β sinyal yolu inhibitörleri olarak tasarlanmış ve geliştirilmiştir. Geliştirilen ajanların TGF- β ekspresyonunu aşağı yönde regüle ederek veya TGF- β reseptörlerinin kinaz aktivitelerini inhibe ederek işlev görmesi amaçlanmıştır [84].

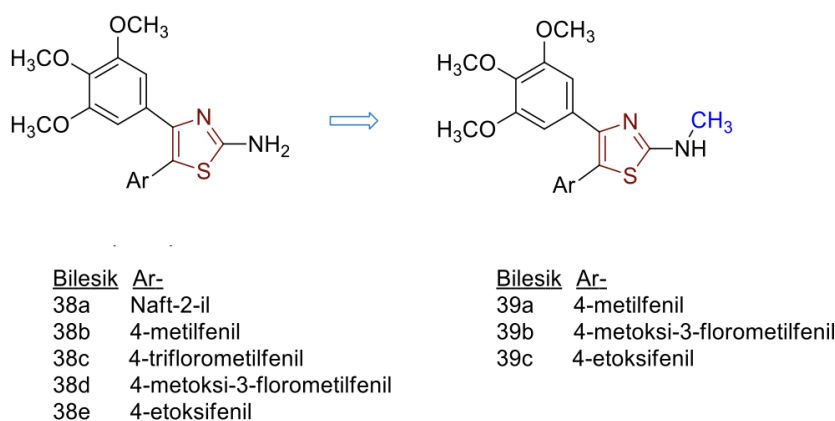
Merkezi halkada pirazol halkası içeren birçok TbR-I kinaz inhibitörü geliştirilmiştir. Bu bileşikler ve aktiviteleri Çizelge 2.4'te verilmiştir [85]. Verilen bileşikler arasında Eli Lilly ve şirketi tarafından geliştirilen LY2157299 (Galunisertib), TGF- β sinyalini bloke eden küçük bir visinal diaril merkeze sahip TbR-I kinaz inhibitörüdür (IC_{50} değeri 56 nM). Galunisertib, MDS (miyelodisplastik sendrom), beyin, karaciğer, pankreas kanseri ve diğer katı tümörlerin tedavisi için gerçekleştirilen klinik çalışmalarda Faz I ve II (tedavi edilecek kanser tipine göre çalışmalar devam etmekte) aşamasındadır. Galunisertib, kanseri başlatan kök hücreleri engelleyebilmektedir ve bu nedenle TGF- β 'ye bağlı tümör hücresi büyümesini ve göçünü önlemektedir [84].

Çizelge 2.4. Merkezi halkada pirazol içeren TbR-I kinaz inhibitörleri

BİLEŞİK ADI	MOLEKÜL FORMÜLÜ	IC ₅₀ (nM)	ŞİRKET ADI
LY2157299 (Galunisertib)		56	Eli Lilly and Company
LY364947		59	Eli Lilly and Company
LY2109761		38	Eli Lilly and Company
R-26871		2.5	Daiichi Sankyo
A-77-01		25	Japanese Foundation for Cancer Research
A-83-01		12	Japanese Foundation for Cancer Research
RepSox		23	GlaxoSmithKline
GW788388		18	GlaxoSmithKline

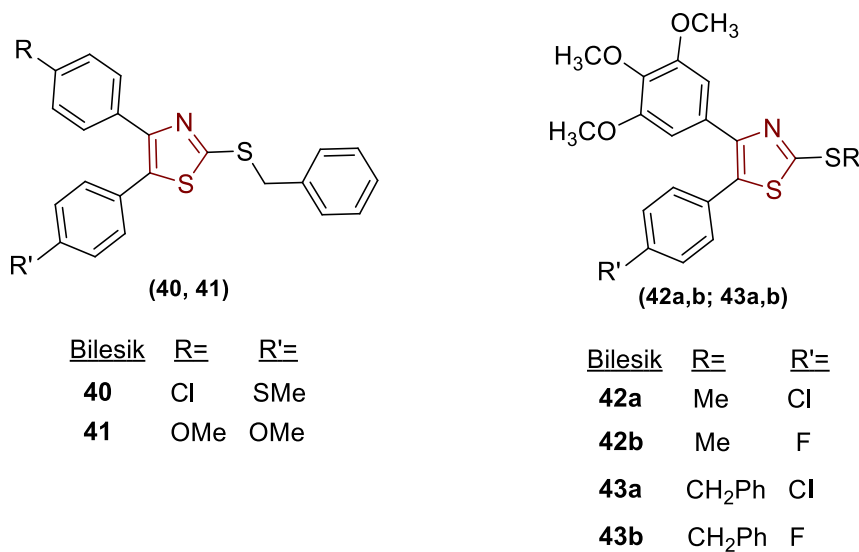
2.6. Visinal Diaril Heterosiklik Merkez Taşıyan Diğer Antikanser Ajanlar

Visinal diaril tiyazol halka sistemi üzerine çalışan Romagnoli ve arkadaşları, tübülün bağlanma afinitesine katkısı olduğu düşünülen trimetoksifenil motifini koruyarak CA-4'e benzer yeni bir 2-amino-4,5-diaril tiyazol (Bileşik 38a-e) serisi (Şekil 2.33) tasarlamışlardır. Tiyazol iskeletinin C-5 pozisyonunun fenil halkası üzerinde, elektron çekici (CF_3) ve elektron salıcı (metil, etil, metoksi ve etoksi) sübstitüentler içeren modifikasyonlar gerçekleştirmişlerdir. Sentezlenen tüm bileşikleri, yedi insan tümör hücre hattında (HeLa, A549, K562, HT29, MCF7, HL60 ve Jurkat) çoğalmaya karşı etkileri açısından değerlendirmişlerdir. Araştırmacıların yaptıkları çalışmalar sonucunda, Bileşik 38a; 2-naftil ve 39b; 4-metilfenil, yedi hücre hattının beşine karşı CA-4'ten daha yüksek antiproliferatif etki gösterdiği bildirilmiştir. Bileşik 38e'nin, HT29 ve MCF7 hariç diğer kanser hücresi hatlarına karşı 0,03 – 0,9 nM arasında değişen IC_{50} değerleri ile en güçlü inhibitör aktiviteyi gösterdiği rapor edilmiştir. IC_{50} değeri 0,4 nM olan Bileşik 38c (4- CF_3)'nin, MCF7 hücrelerinde en etkili olan bileşik olduğu gösterilmiştir. Bileşik 38d (3-F, 4-OMe), IC_{50} = 5,7nM değeriyle HT29 hücrelerine karşı en sitotoksik türev olarak tanımlanmıştır. Bu sonuçlar göz önüne alındığında, araştırmacılar, amino grubunu; N-metilamino, N, N-dimetilamino ve metil grupları gibi farklı sübstitüentlerle değiştirerek tiyazol halkasının C-2 konumunda ileri modifikasyonlar yapmışlardır. C-2'de N-metilamino motifine sahip bileşiklerin (Bileşik 39a-c), antiproliferatif ajan olarak en aktif bileşikler olduğunu ve Bileşik 39c'nin, tübülün polimerizasyonunu (IC_{50} = 0,89 μM) ve kolşisinin tübüline bağlanmasını (% 80 inhibisyon) inhibe ettiğini rapor etmişlerdir [86].



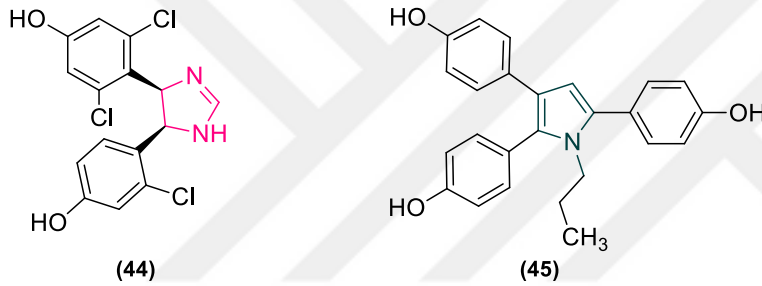
Şekil 2.33. Bileşik 38a-e ve 39a-c'nin kimyasal yapıları

Salehi ve arkadaşları da CA-4'ün cis-olefinik bağı üzerinde heterosiklik yapı içeren bileşikler üzerine çalışmış ve bir dizi 4,5-diaril-tiyazol-2-tiyoalkil analogu (örn., Bileşik 40 ve 41) (Şekil 2.34) geliştirmişlerdir. Sentezledikleri bileşikleri kanser hücre hatlarına (HT29, MCF7 ve AGS) ve fibroblastik hücre hattına (NIH-3T3) karşı test etmişlerdir. Biyolojik testte, HT29 hücre hattına karşı da aktif bulunan, fenil halkaları üzerindeki 4-kloro ve 4-tiyometil sübstitüentini içeren Bileşik 40, MCF7 hücre hattına karşı bileşiklerin geri kalanından daha yüksek sitotoksositeye ($IC_{50}= 7,1 \mu M$) sahip olduğu rapor edilmiştir. İlginç bir şekilde Bileşik 40, CA-4'e kıyasla NIH-3T3 hücrelerine karşı çok düşük toksisite göstermiştir. İki fenil halkası üzerinde metoksi grubu olan Bileşik 40'ın, MCF7 ($IC_{50}= 23,8 \mu M$) ve AGS ($IC_{50}= 23,9 \mu M$) hücre hatlarına karşı orta derecede sitotoksik aktivite sergilediği belirtilmiştir. Bileşik 40 ve 41 ile yapılan docking çalışmalarında, tübülün kolşisin bağlanma bölgesinde, tiyazol halkasının 4. pozisyonundaki fenil grubunun, kolşisinin trimetoksifenil kısmına benzediğini ve α,β -tubulin yapısında Cys249 yakınında bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca, araştırmacılar, bir dizi 2-alkiltiyo-4-(2,3,4-trimetoksifenil)-5-ariltiyazol türevleri (Bileşik 42a,b ve 43a,b) rapor etmiş ve antiproliferatif aktiviteleri açısından değerlendirmişlerdir. Yapılan çalışmada, tiyazol çekirdeğinin C-2 pozisyonundaki bir benziltiyo grubunun (43a,b; $IC_{50}= 8-20 \mu M$), 2-metiltiyo sübstitüenti (42a,b $IC_{50}= 95-100\mu M$) ile yer değiştirilmesi sitotoksosite değerlerinde önemli bir iyileşme ile sonuçlanmıştır [87].



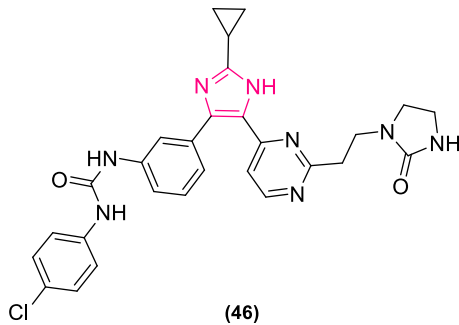
Şekil 2.34. Bileşik 40-43'in kimyasal yapıları

Birkaç seçici östrojen reseptör (ER) modülatörünün, her iki ER'lere (ER α ve ER β) bağlanma afinitesi gösteren, antikanser aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir. Gust ve arkadaşları, aralarında Bileşik 44'ün de bulunduğu visinal diaril imidazolin türevlerini sentezlemişlerdir. Bu bileşiğin lusiferaz enzim deneylerinde 5×10^{-7} M'lik bir konsantrasyonda %112 gen aktivasyonu ile en yüksek bağlanma afinitesine sahip bileşik olduğu gösterilmiştir [88]. Schafer ve çalışma ekibinin yayınladığı bir raporda ise, 2,3,5-triaril pirolün (Bileşik 45), güçlü ER-bağlama afinitesine sahip olduğunu ve ER α ile 20 kat daha güçlü bağlanma gerçekleştirebildiğinden daha spesifik bir bileşik olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Bileşik 45 ile yapılan *in vitro* testlerde MCF7 hücre hattında 3 nM IC₅₀ değeri ile inhibisyon gerçekleştirdiği gösterilmiştir [89].



Şekil 2.35. Bileşik 44 ve 45'in kimyasal yapıları

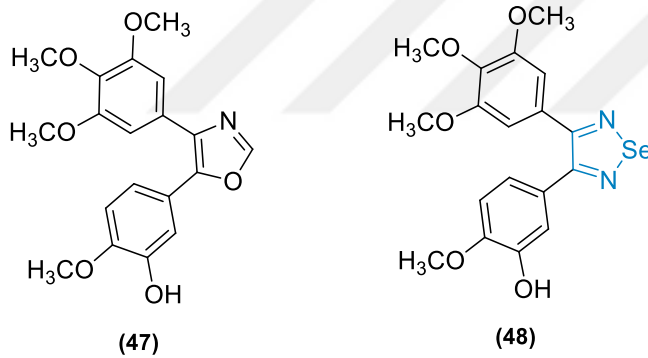
ABD'deki Johnson & Johnson ilaç firmasından Wollin ve arkadaşları, bazı 4,5-diaril imidazollerin BRAF kinaz enzimini inhibe edici aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir. Şekil 2.36'da gösterilen Bileşik 46'nın 7 nM IC₅₀ değeri ile yüksek sitotoksik aktivite sergilediğini bildirmişlerdir [90].



Şekil 2.36. Bileşik 46'nın kimyasal yapısı

Global Farmasötik R & D ve Abbott Laboratuvarındaki bir grup araştırmacı tarafından merkezi halkada imidazol, pirazol ve oksazol gibi heterosiklik halkaları içeren bir dizi farklı visinal diaril heterosiklik bileşik sentezlenmiştir. Sentezledikleri seri arasında 4,5-diaril oksazol (Bileşik 47) bileşiğinin ($IC_{50} = 0,98 \mu M$) güçlü antitübülün aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir [91]. 2005 yılında, Tron ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmalar sonucu kombretafuranzanlar'ın güçlü sitotoksik aktivite gösterdiği ve çalışmaları sonucunda ulaştıkları Bileşik 47 ($IC_{50} = 1,4 nM$)'ün, CA-4'ten ($IC_{50} = 5,8 nM$) dört kat daha etkili bir aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir [92].

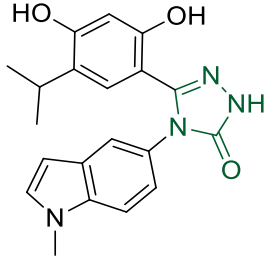
Guan ve arkadaşları, IC_{50} değeri $2,89 \mu M$ olan güçlü antitübülün aktivitesi sergileyen 3,4-diaril-1,2,5-selendiazolü (Bileşik 48) sentezlemiş ve bu bileşiğin ayrıca $8 \mu M$ konsantrasyonda %97 tübülün polimerizasyonu inhibisyonu sergilediğini bildirmişlerdir [93] (Şekil 2.37).



Şekil 2.37. Bileşik 47 ve 48'in kimyasal yapıları

Synta Pharmaceuticals tarafından geliştirilen Ganetesipib (STA-9090) (Şekil 2.38), HSP90 inhibitörlerinin geldanamisin sınıfından farklı bir yapıya sahip, visinal diaril triazolun merkez halkası ve resorsinol substitüenti içeren ikinci nesil HSP90 inhibitörüdür. IC_{50} değeri $14 nM$ olan Ganetesipib, HSP90'a bağlanır ve inhibe eder, bu da onkogenik proteinlerin proteazomal degradasyonu, hücre proliferasyonunun inhibisyonu ve ısı şoku proteini 72 (HSP72)'nin yükselmesiyle sonuçlanır; böylece HSP90'ın varlığına bağlı olarak gerçekleşen c-Kit, EGFR ve Bcr-Abl gibi çoklu kinazların aktivitesi inhibe edilmektedir [94, 95]. Ganetesipib, melanoma, kolon,

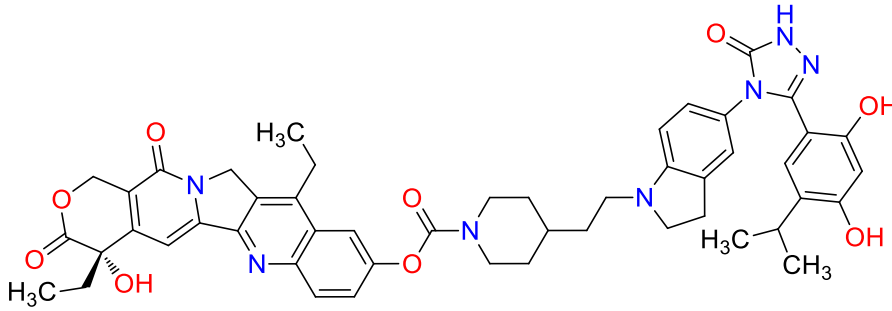
meme, prostat ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri gibi çeşitli tümör tiplerinde klinik deneylerde Faz I/II aşamasındadır [96].



Ganetespi (49)

Şekil 2.38. Ganetespi (Bileşik 49)'in kimyasal yapısı

2017 yılında Bendell ve araştırma ekibi tarafından SN-38 (7-Etil-10-hidroksikamptotesin-topoizomeraz inhibitörü) ile visinal diaril triazolon yapısı taşıyan küçük bir molekül konjuge edilerek sentezlenen PEN-866 (NCT03221400), HSP90 inhibitörü olarak geliştirilmiştir. Adenokarsinomada, akciğer ve mide kanserinde umut vaadeden PEN-866'nın güvenliği, tolere edilebilirliği, farmakokinetiği ve ön etkinliği Faz I/II klinik çalışma kapsamında değerlendirilmiştir. PEN-866'nın ileri klinik çalışmaları yapılmaya devam etmektedir [97, 98].



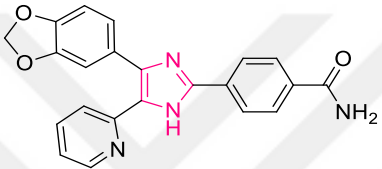
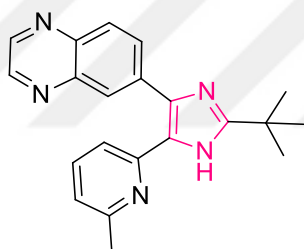
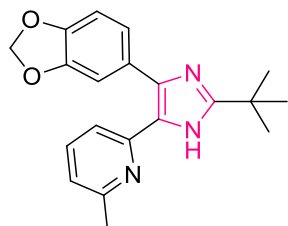
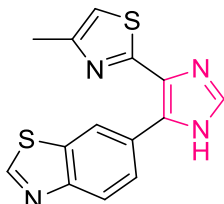
PEN 866/NCT03221400 (50)

Şekil 2.39. PEN-866 (Bileşik 50)'nin kimyasal yapısı

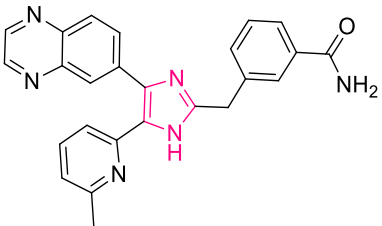
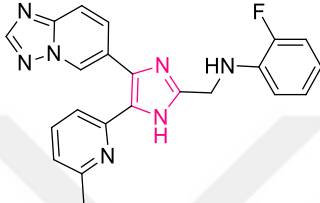
Merkezi çekirdek olarak imidazol halkası içeren bazı bileşikler ATP ile rekabet ederek TbR-I kinaz'a bağlanır ve bu kinazın aktivitesini inhibe ederler. Klinik çalışmaları veya klinik öncesi çalışmaları devam eden 6 bileşik Çizelge 2.5'te aktivite değerleri ile birlikte gösterilmiştir. Bu bileşikler arasında SB-431542, SB-525334 ve SB-505124, GlaxoSmithKline tarafından 2002 yılında geliştirilmiştir ve

SB-431542, pek çok çalışmada yaygın bir pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Kore, MedPacto tarafından geliştirilen EW-7197 (Vactosertib) ise ilk kez 2012 yılında bir konferans özetinde bildirilmiştir. MDS için (NCT02160106) Faz II klinik denemeleri ve katı tümörler için Faz I klinik çalışmaları (NCT03074006) devam eden EW-7197, klinik çalışmalara giren tek imidazol TbR-I inhibitörüdür [85].

Çizelge 2.5. Merkezi halkada imidazol içeren TbR-I kinaz inhibitörleri

Bileşik Adı	Molekül Formülü	IC ₅₀ Değeri (nM)	Şirket Adı
SB-431542		94	GlaxoSmithKline
SB-525334		14,3	GlaxoSmithKline
SB-505124		47	GlaxoSmithKline
TP-0427736		2,72	Taisho Pharmaceutical

Çizelge 2.5. (devam) Merkezi halkada imidazol içeren TbR-I kinaz inhibitörleri

IN-1130		5,3	SK Holdings
EW-7197 (Vactosertib)		11	MedPacto



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kimyasal Çalışmalar

3.1.1. Gereçler

Çalışmada kullanılan çözücüler analitik saflıktadır. Kullanılan kimyasallar Sigma-Aldrich (Almanya), Merck (Almanya), Abcr (Almanya), Acros (Belçika)'dan temin edilmiştir. Kuru ortamda gerçekleştirilen deneyler için çözücü olarak kullanılan THF, Na/benzofenon kullanılarak distillenmiştir.

Flash kromatografi

Sentezlenen bileşiklerin saflaştırma kontrolü ultraviyole (UV) dedektörlü Teledyne ISCO Combiflash® Otomatik Flash Kromatografi Sistemi ile yapıldı. Sabit faz olarak hazır Redisep® silika kolonları ve Redisep Rf Gold® silika kolonları (12 g, 24 g, 40 g), hareketli faz olarak hekzan:etil asetat, diklorometan:etil asetat veya diklorometan:metanol gradiyent çözücü sistemleri kullanıldı. Bileşiklerin saflıkları İTK ve UPLC/TOF-MS analizleri ile kontrol edildi.

Mikrodalga sentez reaktörü

Mikrodalga sentez reaktörlerinde gerçekleştirilen reaksiyonlar için Biotage® Initiator+ Cihazı ve Biotage® Initiator+mikrodalga vialleri kullanıldı. (0,5-2 ml, 2-5 ml, 10-20 ml) kullanıldı. Reaksiyonlar uygun ısı ve koşullarda, çözücü olarak asetonitril, DMF kullanılarak gerçekleştirildi.

Preparatif HPLC

Bileşik 45 ve 51'in saflaştırma işlemi UV dedektörlü Buchi Revelaris® Prep Sistemi ile yapıldı. Sabit faz olarak hazır Buchi Prep HPLC C18 kolon (250x21.2 mm, C18, 10 µm) hareketli faz olarak ise asetonitril:su gradient çözücü sistemi kullanıldı.

İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) ile yapılan kontroller

Kimyasal sentez çalışmalarında ve bileşiklerin saflık kontrollerinde Silikajel GF254 (Merck) hazır plaklar kullanıldı. Çözücü sistemi olarak hekzan:etil asetat (60:40), diklorometan:metanol (90:10) kullanıldı. Lekelerin belirlenmesinde UV ışığından (254 ve 366 nm), dragendorf, ninhidrin ve demir (III) klorür belirteçlerinden yararlanıldı.

3.1.2. Genel sentez yöntemleri

Yöntem 1: Alkilasyon Reaksiyonu ile Elde Eldilen Bileşiklerin Genel Sentez Yöntemi (Bileşik 24, 31, 36-46, 55, 59, 64)

Yöntem 1a: İlgili fenol türevi (1.0 eq), ile uygun benzil bromür/klorür türevi (1.2 eq) ve K_2CO_3 (1.7 eq) asetonitrilde çözülerek (benzilklorür türevleri kullanıldığında solvan olarak DMF tercih edildi) geri çeviren soğutucu altında ısıtıldı. 3 saatin sonunda reaksiyon balonuna buz-su karışımı eklendi ve çöken katı süzüldü ve kurutuldu. Ham ürün petrol eteri ile yıkanıp süzüldü ve kurutuldu.

Yöntem 1b (Bileşik 1, 16, 32, 61 için bu yöntem kullanılmıştır): İlgili fenol türevi (1.0 eq) ile uygun benzil bromür türevi (1.2 eq) ve K_2CO_3 (1.7 eq) mikrodalga viali içerisine alınıp üzerine asetonitril eklendi. Reaksiyon, 120°C'de 20 dakika mikrodalga şartlarında yürütüldü. Reaksiyon içeriği suya alındı, etil asetat ile ekstre edildi, organik faz kurutuldu (susuz Na_2SO_4) ve uçuruldu. Ham ürün petrol eteri ile yıkanıp süzüldü ve kurutuldu.

Yöntem 2: Aldehit Başlangıç Maddelerinden Elde Edilen Oksim Türevi Bileşiklerin Genel Sentez Yöntemi (Bileşik 2, 25)

İlgili aldehit türevi (1.0 eq) etanol:buz:su karışımında çözülerek üzerine $H_2NOH.HCl$ (1.1 eq) eklendi ve NaOH %50 (a/h) çözeltisi (2.5 eq) damla damla ilave edildi. Oda ısısında 2 saat karıştırıldı. Süre sonunda reaksiyon ortamına su eklendi ve derişik HCl ile asitlendirildi. Oluşan çökelek vakum altında süzüldü, kurumaya bırakıldı.

Yöntem 3: Oksim Türevlerinin Klorlanması ile Elde Edilen Bileşiklerin Genel Sentez Yöntemi (Bileşik 3, 26)

İlgili oksim türevi (1.0 eq) DMF içinde çözülerek üzerine NCS (1.0 eq) porsiyonlar halinde eklendi. Reaksiyona katalitik miktarda HCl gazı eklendi. 3 saat oda ısısında karıştırıldı. Reaksiyon karışımı buzlu suya döküldü. Oluşan çökelek vakum altında süzüldü, kurumaya bırakıldı. Ham ürün bir sonraki basamakta kullanıldı.

Yöntem 4: Nitriloksit Ara Ürünü Üzerinden Elde Edilen İzoksazol Türevi Bileşiklerin Genel Sentez Yöntemi (Bileşik 4, 6-15, 27)

İlgili başlangıç maddesi (1.0 eq) dietileter içinde çözüldü. Üzerine Et_3N (1.0 eq) eklendi. Buz banyosunda 2 saat karıştırıldı ve oluşan çökelek süzüldü. Süzüntü vakum altında uçuruldu ve arilnitriloksit elde edildi. Buz banyosunda azot atmosferi altında kuru THF içine NaH (1.6 eq) eklendi. Üzerine ilgili fenilaseton türevi (1.0 eq) yavaş yavaş ilave edildi ve 1 saat karıştırıldı. Süre sonunda arilnitriloksit (1.0 eq) kuru THF içinde çözülerek reaksiyon ortamına eklendi ve gece boyu oda ısısında karıştırıldı. Reaksiyon karışımı sulu amonyum klorür çözeltisi içine alındı ve etil asetat ile ekstre edildi, Na_2SO_4 ile kurutuldu. Etil asetat vakum altında uçuruldu.

Yöntem 5: Nitro Grubunun Redüksiyonu ile Elde Edilen Bileşiklerin Genel Sentez Yöntemi (Bileşik 5, 49)

İlgili nitro türevi (1.0 eq) metanolde çözüldü, üzerine $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5.0 eq) eklenerek gece boyunca geri çeviren soğutucu altında ısıtıldı. Süre sonunda etil asetat ile ekstre edildi, organik faz kurutuldu (susuz Na_2SO_4) ve uçuruldu. Madde sabit faz olarak hazır RediSep Silika kolonları (12g), hareketli faz olarak hekzan:etil asetat (60:40) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı.

Yöntem 6: Demetilasyon ile Elde Edilen Bileşiklerin Genel Sentez Yöntemi (Bileşik 23, 30, 54, 58, 60)

Yöntem 6a: Metoksi grubu içeren ilgili başlangıç maddesi (1.0 eq) azot gazı altında diklorometan içerisinde çözülerek, 1M (diklorometan içerisinde) BBr_3 çözeltisi (3 eq)

damla damla eklendi ve 4 saat oda ısısında karıştırıldı. Ardından 1 ml metanol eklenip diklorometan ile ekstre edildi, organik faz kurutuldu (susuz Na_2SO_4) ve uçuruldu.

Yöntem 6b (Yalnızca Bileşik 60 için bu yöntem kullanılmıştır): İlgili başlangıç maddesi (1.0 eq) asetik asit içerisinde çözülüp üzerine HBr (Hidrobromik asit) (16.5 eq) eklendi. Reaksiyon geri çeviren soğutucu altında gece boyu ısıtıldı. Ertesi gün reaksiyon su buz karışımı içerisinde alındı. 10N NaOH çözeltisi ile pH nötr hale getirildi ve çöken katı süzüldü.

Yöntem 7: DMFDMA Reajanı Kullanılarak Elde edilen Ara Bileşiklerin Genel Sentez Yöntemi (Bileşik 33, 47, 52, 65, 68)

İlgili başlangıç maddesi (1.0 eq), toluen içerisinde alındı üzerine N,N-Dimetilformamit dimetil asetal (DMFDMA) (15.0 eq) eklenerek yağ banyosunda 130 °C'de gece boyu ısıtıldı. Ertesi gün reaksiyon balonundaki çözücü uçuruldu ve ham ürün bir sonraki basamakta kullanıldı.

Yöntem 8: Pirazol Türevi Bileşiklerin Genel Sentez Yöntemi

Yöntem 8a (Bileşik 34, 48, 53, 66, 69 için bu yöntem kullanılmıştır): İlgili başlangıç maddesi (1.0 eq) ve 4-klorofenilhidrazin.HCl (1.0 eq) absolü etanolde çözüldü, 4 saat boyunca geri çeviren soğutucu altında ısıtıldı. Süre sonunda reaksiyon ortamına su eklendi ve diklorometan ile ekstre edildi, organik faz su ile yıkandı. Susuz Na_2SO_4 ile kurutulduktan sonra kuruluğa kadar uçuruldu. Madde sabit faz olarak hazır RediSep Silika kolonları (12g), hareketli faz olarak hekzan: etil asetat (80:20) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı.

Yöntem 8b (Bileşik 62 ve Bileşik 63 için bu yöntem kullanılmıştır): İlgili başlangıç maddesi (1.0 eq) ve DMFDMA (5.0 eq) DMF içerisinde çözülerek gece boyu oda ısısında karıştırıldı. Ertesi gün reaksiyon balonundaki reajan uçuruldu, elde edilen ara ürün ve ilgili hidrazin türevi (1.5 eq) metanolde çözülerek geri çeviren soğutucu altında 2 saat boyunca ısıtıldı. Sonrasında etil asetat ile ekstre edildi ardından organik faz kurutuldu (susuz Na_2SO_4) ve uçuruldu. Madde sabit faz olarak hazır

RediSep Silika kolonları (12g), hareketli faz olarak hekzan: etil asetat kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. (Bileşik 63 için reaksiyon ortamına katalitik miktarda sülfürik asit eklendi.)

Yöntem 8c (Bileşik 51 ve 57 için bu yöntem kullanılmıştır): İlgili başlangıç maddesi (1.0 eq) ve uygun hidrazin türevi (1.1 eq) metanolde çözüldü, üzerine Et₃N (1.0 eq) eklendi. 4 saat boyunca geri çeviren soğutucu altında ısıtıldı. Süre sonunda metanol uçuruldu. Ardından distile su eklenerek etil asetat ile ekstre edildi, organik faz kurutuldu (susuz Na₂SO₄) ve uçuruldu. Madde sabit faz olarak hazır RediSep Silika kolonları (24g), hareketli faz olarak hekzan: etil asetat (70:30) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı.

Yöntem 9: Diketon Türevi Bileşiklerin Genel Sentez Yöntemi (Bileşik 50 ve 56)

İlgili başlangıç maddesi (1.0 eq) ve NaH (4.0 eq) etil asetat içerisinde çözülerek oda ısısında gece boyu karıştırıldı. Ertesi gün reaksiyon balonundaki çözücü uçuruldu ve ham ürünün sodyum tuzu eter ile muamele edilip tekrar süzüldü, ardından su içerisine alınıp asitlendirildi, çöken katı ürün vakumda süzüldü, kurutuldu.

3.2. Analitik Çalışmalar

3.2.1. Erime derecesi tayini

Bileşiklerin erime dereceleri, Stuart SMP40 dijital erime derecesi cihazıyla tayin edildi ve değerler düzeltilmeden verildi.

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

Sentezlenen bileşiklerin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları CDCl_3 ve DMSO-d_6 içindeki çözeltileri ile Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda tetrametilsilan iç standardı ile Varian Mercury-400 Agilent FT-NMR Spektrometresi'nde ^1H -NMR spektrumu için 400 MHz, ^{13}C -NMR spektrumu için 100 MHz frekansta alınıp kayma değerleri (δ) ppm skalasında değerlendirildi. Eşleşme sabitleri ise Hertz (Hz) olarak verildi.

3.2.3. HRMS spektrumları

Sentezlenen bileşiklerin HRMS spektrumları metanol içerisindeki çözeltilerinden pozitif iyon (ESI+) ve negatif iyon (ESI-) elektrosprey iyonizasyon teknikleri ile Waters LCT Premier XE UPLC/MS-TOF sistemi ile MassLynx 4.1 yazılımı kullanılarak alındı. Sabit faz olarak Aquity BEH C18 kolon (2,1*100 mm 1,7 μM , akış hızı: 0,3 ml/dakika) hareketli faz olarak formik asit içeren (% 0,1) $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (% 1-% 90) gradient çözücü sistemi kullanıldı.

3.2.4. X-ışını kristalografisi

Bileşik 36 ve Bileşik 51'in X-Ray kristalografisi Kastamonu Üniversitesi Eğitim Fakültesinde görev yapan Prof.Dr. Abdullah Aydın tarafından BRUKER XRD system (D8 Advance) X-ray diffractometer cihazı ile alınmıştır.

3.3. Biyolojik Çalışmalar

Sentezlenen bileşiklerin biyolojik aktivite çalışmaları Orta Doğu Teknik Üniversitesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Rengül ÇETİN ATALAY danışmanlığındaki araştırma ekibi tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. Hücre kültürü

Hepatoselüler karsinoma (HSK) hücre hatları Huh7 ve Mahlavu; meme kanseri hücre hattı MCF7, MDA-MB-231, içerisinde %10 FBS, 0.1 mM NEAA (esansiyal olmayan amino asitler) ve 100 birim/mL penisilin ve streptomisin bulunan Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM; Gibco) besiyerinde; meme karsinoma hücre hattı ZR-75-1 içerisinde %10 FBS, % 4.5 glukoz, 0.1mM sodyum piruvat ve 100 birim/mL penisilin ve streptomisin bulunan RPMI (Gibco) besiyerinde, tümörjenik olmayan meme epitelyal hücre hattı MCF10A içerisinde, 10 ng/ml EGF, 500 ng/ml hidrokortizon ve 10 µg/ml insülin bulunan DMEM/HAM'S F12 besiyerinde, 37°C %5 CO₂ hücre inkübatörü içerisinde büyütülmüştür.

3.3.2. SRB (Sulforadamin B) ile sitotoksisite tayini

96 kuyulu hücre kültür plağına her bir hücre hattı belirlenen sayılarda hücreler ekildikten 24 saat sonra, hücrelere her bir bileşik 40 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 2.5 µM konsantrasyonlarında verilmiş ve her bileşiğin her bir farklı dozu 3 kez tekrarlanmıştır (IC₅₀ değeri 20 µM'in üzerinde 40 µM'in altında çıkan bileşikler için sonuç IC₅₀ değeri '>20 µM' olarak verilmiş olup daha düşük IC₅₀ değerlerine sahip bileşikler üzerine yoğunlaşıldığından bu bileşikler için tekrar yeni doz aralıkları ile IC₅₀ değeri hesaplanmamıştır). 72 saat inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra, hücreler 1X PBS ile bir kere yıkanıp fiksasyonu için %10 TCA (trikloroasetik asit) kullanılmıştır. 1 saat +4°C de bekletildikten sonra distile su ile en az 3 kere yıkanan hücreler kurutulduktan sonra, boyanmaları için gereken miktarda SRB (0.04 g/10 mL, Sigma-Aldrich) %1 asetik asitte çözülüp her kuyucuğa 50 µl eklenmiştir. Hücreler karanlıkta oda sıcaklığında 10 dk bekletildikten sonra, fazla boyayı hücrelerin üzerinden kaldırmak amacıyla kuyular %1 asetik asit ile birkaç defa yıkanmıştır. SRB boyasının yoğunluğunun (protein yoğunluğu) okunması için

kuyuların üzerine 100µl, 10mM TBS (Trizma baz) eklenmiştir. OD (optik dansite) okuyucu (BioTek, ELx800) cihazında 515 nm dalga boyunda gerçekleştirilen okutmalar sonrasında bileşiklerin etkilerini incelemek için elde edilen değerler $[1 - (\text{inhibitör eklenen kuyucuktaki hücrelerin absorbanısı} \times 100) / (\text{DMSO eklenen kontrol hücrelerinin absorbanısı})]$ formülüne göre hücre ölümü yüzdesine çevrilmiş, doz yanıt eğrileri yardımıyla IC₅₀ (% 50 oranında ölüme neden olan doz) değerleri hesaplanmıştır [99].

3.3.3. Western blot analizi

Bileşik 36 ile IC₅₀ ve IC₁₀₀ konsantrasyonlarında muamele edilen HSK (Mahlavu ve Huh7) hücreleri 48 saat sonrasında (ölü ve canlı) toplanmış elde edilen pelletler lizis solüsyonu (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH=7.6, 1% NP40 (Nonil fenoksipolietoksiletanol), 0.1% SDS, 1x Protease inhibitor kokteyl ve 1x PhosStop) ile 30 dakika boyunca vortekslenerek buzda parçalanmıştır. 13200 rpm`de 20 dakika santrijüj edilip elde edilen hücre lizatlarındaki protein miktarlarının belirlenmesi için BCA (Bicinchoninic acid assay) protein assay uygulanmıştır. Standart eğri elde etmek için bilinen dozlarda BSA (albumin) referans olarak ile spektrofotometrede 562 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Her örnek aynı şekilde BCA solüsyonu ile ölçülerek BSA ile elde edilen standart eğri formülüne göre protein miktarları hesaplanmıştır. Western blot için, 50 µg protein kullanılmıştır. Proteinler 95°C`de 10 dakika inkübe edilerek denatüre edildikten hemen sonra %10 TGX hazır jellerinde (Bio-Rad) SDS-PAGE kullanılarak ayrıştırılmıştır. Transfer işlemi de Trans Blot Turbo Transfer Sistemi (Bio-Rad) ile gerçekleştirilmiştir. Proteinler LF-PVDF membrana transfer edildikten 1 saat Odyssey® Blocking Buffer (TBS) ile inkübe edilmiştir. Daha sonra membranlar, oda sıcaklığında damlatma yöntemiyle 2 saat primer antikor ile inkübe edilip 30 dakika boyunca bağlanmayan antikorlar 1xTBS-T(0.1% tween) ile yıkanmıştır. Ardından ikinci antikor 1 saat boyunca karanlık ortamda oda sıcaklığında membrana uygulanmıştır. 30 dakika yıkamadan sonra membranlardan Odyssey CLx- LICOR görüntüleme sistemi ile görüntü alınmıştır. Kullanılan primer antikor; PARP (#9532S, Cell Signaling) 1:500 oranlarında ve eşit yükleme kontrolü olarak beta-Aktin (#A5441, Sigma) 1:1000 oranında kullanılmıştır.

3.3.4. Annexin V ile hücre ölümü mekanizması analizi

Huh7 hücreleri 6 kuyucuklu tabaklara ekilmiştir. 24 saat sonrasında, hücreler Bileşik 36 molekülü ile 48 saat muamele edilmiştir. Bileşik 36'nın sebep olduğu ölüm mekanizmasının açığa çıkartılması için, kit önerisindeki protokole göre Annexin V ile boyanmıştır. Hücreler akış sitometrisi cihazında (MUSE, Millipore) okutulmuş ve analiz edilmiştir (MUSE Annexin V kit, Millipore).

3.3.5. Hoechst floresan boyama ile hücre ölümü tespiti

Bileşik 36 ile 24, 48 ve 72 saat boyunca IC_{50} konsantrasyonu ile muamele edilen Huh7 hücreleri üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra, 2 kere 1XPBS (soğuk) ile yıkanmış, %100 soğuk metanol ile 10 dakika boyunca sabitlenmiştir. Tekrar soğuk 1xPBS ile yıkanan hücrelerin üzerilerine, 1XPBS'de hazırlanmış 1µg/ml Hoechst boyası (#33258, Sigma) eklenmiş ve 10 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Fazla boyadan kurtulmak için, hücreler 1XPBS ile 5 dakika oda sıcaklığında yıkanmıştır. Boyanan hücreleri görüntülemek amacıyla floresan mikroskopta (Nikon Eclipse 55i) mavi filtre (340-380 nm) kullanılmıştır.

3.3.6. Hücre döngüsü analizi

100mm hücre kültürü tabaklarına ekilen Huh7 hücreleri, 24 saat sonra Bileşik 36 ile 5 µM konsantrasyonunda muamele edildikten 48 saat sonra ölü ve canlı hücreler toplanmış ve 5 dakika boyunca 1800 rpm hızında santrifüj ile çöktürülmüştür. Çöken hücrelerin üzerindeki süpernatant alındıktan sonra, hücreler 1ml 1X PBS ile tekrar süspansiyon hale getirilip vortex ile karıştırılmıştır. Karıştırma sırasında fiksasyon işlemi için hücrelerin üzerine 1 ml (önceden soğutulmuş) %70 etanol eklenmiş ve 3 saat boyunca -20 °C de fikse olmak üzere bekletilmiştir. Fiksasyonu tamamlanmış hücreler 1X PBS ile 5 dakika yıkanmış ve hücreler PI-boyama solüsyonu (MUSE Cell Cycle kit, Millipore) içerisinde 30 dk boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Hücreler akış sitometrisi cihazında (MUSE, Millipore) okutulmuş ve analiz edilmiştir.

3.3.7. Meme ve karaciğer kanseri ksenograft modelinde *in vivo* antikanser etki tayini

Atimik tüysüz farelere hücre implantı için, Mahlavu ve MDA-MB-231 hücreleri kültür kaplarında büyütülüp tüpler içerisinde toplanmıştır. Daha sonra Mahlavu hücreleri 150 µL hacimde 10.000.000 sayısında olacak şekilde dorsal cilt altı enjekte edilip ksenograft tümör büyümeleri takip edilmiştir. MDA-MB-231 hücreleri ise farenin üstten 2. meme bezinin altına 2.000.000 hücre matrigel içerisinde 1:1 oranında toplam hacim 100 µL olacak şekilde hazırlanıp enjekte edilmiştir. Daha sonra fareler ksenograft tümörler büyüyene kadar gözlemlenmiş, tümörlerin boyutları her hafta iki kere ölçülmüştür ve 150 mm³ hacime geldiklerinde Bileşik 36 ile 40 mg/kg dozda dört hafta boyunca haftada iki kez farelere verilmiştir. Moleküller karboksi metil selüloz içinde süspande edilmiş ya da kendinden emülsifiye olabilen çözücü sisteminde çözülmüş ve farelere oral gavaj yoluyla verilmiştir. Kemoterapinin sürecinde ve sonunda farelerdeki tümörlerin durumu gözlenmiş ve ilaç verilmeyen kontrol grubu ile karşılaştırılarak bileşiğin antikanser hücre etkisi belirlenmiştir (ODTÜ Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Karar No: 12, Tarih: 25.06.2015).

3.3.8. ADME özelliklerinin tayini ve farmakokinetik analiz

Bileşik 36 için ADME özelliklerinin (suda kinetik çözünürlük, fizyolojik pH'da partiyon katsayısı, insan ve fare karaciğer mikrozomal stabilite, sitokrom P450 izoformlarına karşı inhibitör potansiyeli, hücre permetabilitesi, insan plazma proteinlerine bağlanma) *in vitro* olarak tayini ve farmakokinetik çalışmaları Syngene International (Hindistan)'da yaptırılmıştır.

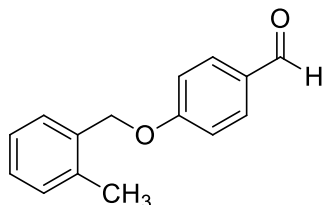
3.3.9. ABD ulusal kanser enstitüsü tarama programı kapsamında gerçekleştirilen sitotoksisite analizi

Bileşik 36 Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Kanser Enstitüsü NCI-60 insan tümör hatları tarama programı kapsamında taratılmıştır. NCI-60 programı tümör hücre hatlarının proliferasyonunu inhibe eden yeni bileşikler tanımlamak ve karakterize etmek için 9 ayrı kanser türüne ait 60 farklı insan tümör hücresi hattını kullanan bir programdır.

4. BULGULAR

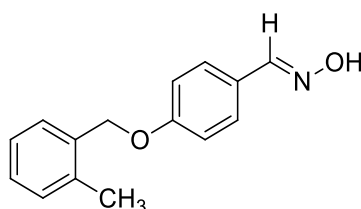
4.1. Kimyasal Bulgular

4-((2-Metilbenzil)oksi)benzaldehit (Bileşik 1)

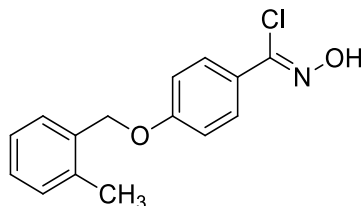


4-Hidroksibenzaldehitten (10 mmol) hareketle benzil klorür kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **1b**'ye göre sentezlendi (Verim: %80). CAS: 400825-69-6. Erime noktası: 60,6-61,5 °C. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.31 (3H, s), 5.20 (2H, s), 7.17-7.27 (5H, m), 7.40 (1H, d, J=7.6 Hz), 7.87 (2H, d, J=9.2 Hz), 9.86 (1H, s). C₁₅H₁₄O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 227,1067; bulunan: 227,1072.

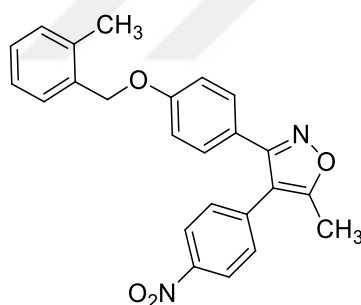
4-((2-Metilbenzil)oksi)benzaldehit oksim (Bileşik 2)



4-((2-Metilbenzil)oksi)benzaldehit (Bileşik 1) (7,5 mmol)'ten hareketle 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **2**'ye göre sentezlendi (Verim: %96). CAS:1331635-71-2. Erime noktası: 108,9-109,5 °C. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.30 (3H, s), 5.09 (2H, s), 7.03 (2H, d, J=8.6 Hz), 7.16-7.25 (3H, m), 7.39 (1H, d, J=6.8 Hz), 7.51 (2H, d, J=8.6 Hz), 8.05 (1H, s), 10.95 (1H, s). C₁₅H₁₆NO₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 242,1173; bulunan: 242,1181.

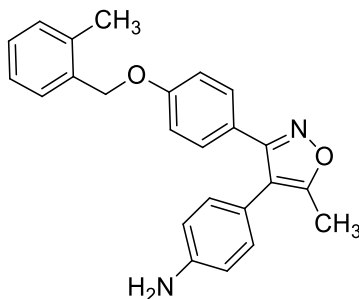
N-hidroksi-4-((2-metilbenzil)oksi)benzimidoil klorür (Bileşik 3)

4-((2-Metilbenzil)oksi)benzaldehit oksim (Bileşik 2) (7,0 mmol)'den hareketle 3.1.2'de verilen sentez yöntemi 3'e göre sentezlendi (Verim: %97). Erime noktası: 115,8-117,7 °C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 2.31 (3H, s), 5.12 (2H, s), 7.10 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.16-7.26 (3H, m), 7.39 (1H, d, $J=7.2$ Hz), 7.71 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 12.14 (1H, s). $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{ClNO}_2$ için; HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ hesaplanan: 276,0791; bulunan: 276,0784.

5-Metil-4-(4-nitrofenil)-3-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 4)

N-hidroksi-4-((2-metilbenzil)oksi)benzimidoil klorür (Bileşik 3) (1,5 mmol)'den hareketle 4-nitrofenilaseton kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi. Oluşan ham ürün sabit faz olarak RediSep Silika kolonları (12 g), hareketli faz olarak hekzan:etil asetat (70:30) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (Verim: %24). Erime derecesi: 119,4-121,1 °C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 2.29 (3H, s), 2.46 (3H, s), 5.08 (2H, s), 7.06 (2H, d, $J=8.4$ Hz), 7.16-7.29 (5H, m), 7.38 (1H, d, $J=7.2$ Hz), 7.50 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 8.25 (2H, d, $J=8.8$ Hz). $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$ için; HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ hesaplanan: 401,1501; bulunan: 401,1493.

4-(5-metil-3-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)izoksazol-4-il)anilin (Bileşik 5)



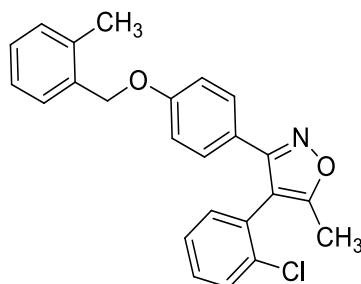
5-Metil-4-(4-nitrofenil)-3-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 4) (0,4 mmol)'den hareketle 3.1.2'de verilen sentez yöntemi 5'e göre sentezlendi. Ham ürün hekzan:EtOAc (60:40) solvan sistemi kullanılarak otomatik flash kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı (Verim: %71).

Erime noktası: 149,5-151,3°C.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.37 (3H, s), 2.41 (3H, s), 5.03 (2H, s), 6.74 (2H, d, J=8.8 Hz), 6.93 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.00 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.21-7.27 (3H, m), 7.39-7.42 (1H, m), 7.43 (2H, d, J=8.8 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 11.51, 18.89, 68.55, 114.66, 115.38, 115.68, 120.97, 122.07, 126.05, 128.35, 128.63, 129.71, 130.42, 130.90, 134.51, 136.69, 144.98, 159.71, 160.70, 166.04.

C₂₄H₂₃N₂O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 371,1760; bulunan: 371,1759.

5-Metil-4-(2-klorofenil)-3-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 6)

N-hidroksi-4-((2-metilbenzil)oksi)benzimidazol klorür (Bileşik 3) (1,0 mmol)'den hareketle 2-klorofenilaseton kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi. Ham ürün hekzan:EtOAc (75:25) solvan sistemi kullanılarak otomatik flash kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı (Verim: %42).

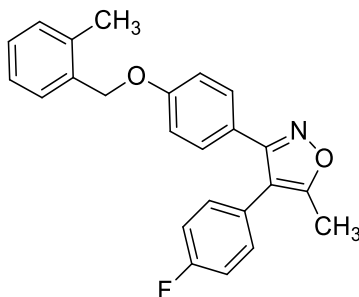
Erime noktası: 103,8-104,4 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 2.33 (3H, s), 2.35 (3H, s), 5.00 (2H, s), 6.89 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.18-7.38 (9H, m), 7.50 (1H, dd, $J=8.4, 0.8$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 11.68, 18.87, 68.53, 113.13, 114.79, 121.92, 126.03, 127.05, 128.34, 128.59, 129.01, 129.75, 129.82, 129.98, 130.40, 132.58, 134.45, 134.98, 136.66, 159.84, 160.70, 167.46.

$\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{ClNO}_2$ için; HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ hesaplanan: 390,1261; bulunan: 390,1249.

5-Metil-4-(4-florofenil)-3-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 7)



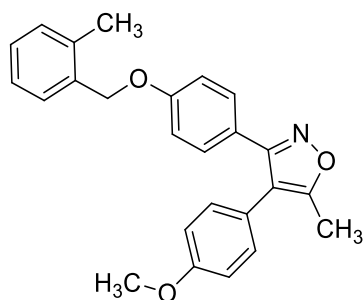
N-hidroksi-4-((2-metilbenzil)oksi)benzimidazol klorür (Bileşik 3) (1,0 mmol)'den hareketle 4-florofenilaseton kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi. Ham ürün hekzan:EtOAc (70:30) solvan sistemi kullanılarak otomatik flash kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı (Verim: %31).

Erime noktası: 119,0-120,5 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 2.37 (3H, s), 2.42 (3H, s), 5.03 (2H, s), 6.93 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.08 (2H, t, $J=8.8$ Hz), 7.14-7.28 (5H, m), 7.35-7.39 (3H, m).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 11.50, 18.87, 68.57, 114.65, 114.79, 115.82 (d, $^2J_{\text{C-F}}=21.4$ Hz), 121.55, 126.05, 126.55 (d, $^4J_{\text{C-F}}=3.8$ Hz), 128.38, 128.62, 129.71, 130.43, 131.55 (d, $^3J_{\text{C-F}}=8.4$ Hz), 134.41, 136.69, 159.86, 160.64, 162.28 (d, $^1J_{\text{C-F}}=245.4$ Hz), 166.44.

$\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{FNO}_2$ için; HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ hesaplanan: 374,1556; bulunan: 374,1559.

5-Metil-4-(4-metoksifenil)-3-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 8)

N-hidroksi-4-((2-metilbenzil)oksi)benzimidazol klorür (Bileşik 3) (1,0 mmol)'den hareketle 4-metoksifenilaseton kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi. Ham ürün hekzan:EtOAc (70:30) solvan sistemi kullanılarak otomatik flash kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı (Verim: %43).

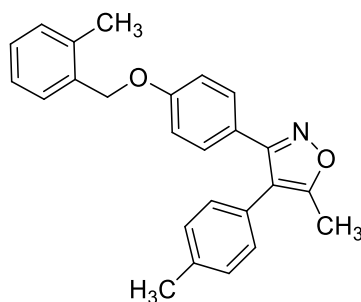
Erime noktası: 121,3-122,7 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 2.36 (3H, s), 2.41 (3H, s), 3.84 (3H, s), 5.02 (2H, s), 6.92 (2H, d, $J=9.2$ Hz), 6.93 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.11 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.19-7.26 (3H, m), 7.38-7.42 (3H, m).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 15.44, 22.81, 59.17, 72.49, 118.12, 118.64, 110.09, 125.85, 126.65, 129.98, 132.29, 132.55, 133.65, 134.35, 134.96, 138.42, 140.62, 163.00, 163.69, 164.62, 170.13.

$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{NO}_3$ için; HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ hesaplanan: 386,1756; bulunan: 386,1753.

5-Metil-4-(4-metilfenil)-3-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 9)



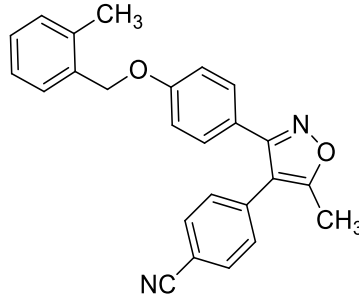
N-hidroksi-4-((2-metilbenzil)oksi)benzimidazol klorür (Bileşik **3**) (1,0 mmol)'den hareketle 4-metilfenilaseton kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **4**'e göre sentezlendi. Ham ürün hekzan:EtOAc (70:30) solvan sistemi kullanılarak otomatik flash kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı (Verim: %34).

Erime noktası: 130,8-131,8 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 2.37 (3H, s), 2.39 (3H, s), 2.42 (3H, s), 5.03 (2H, s), 6.93 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.08 (2H, d, $J=8.4$ Hz), 7.18-7.28 (5H, m), 7.38-7.43 (3H, m).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 11.53, 18.88, 21.26, 68.55, 114.69, 115.44, 121.90, 126.04, 127.53, 128.35, 128.62, 129.42, 129.71, 129.74, 130.41, 134.49, 136.68, 137.36, 159.76, 160.69, 166.28.

$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{NO}_2$ için; HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ hesaplanan: 370,1807; bulunan: 370,1796.

4-(5-Metil-3-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)izoksazol-4-il)benzonitril (Bileşik 10)

N-hidroksi-4-((2-metilbenzil)oksi)benzimidoil klorür (Bileşik 3) (1,0 mmol)'den hareketle 4-siyanofenilaseton kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi. Ham ürün hekzan:EtOAc (60:40) solvan sistemi kullanılarak otomatik flash kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı (Verim: %34).

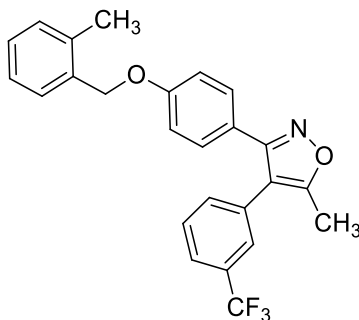
Erime noktası: 135,3-137,1 °C.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.37 (3H, s), 2.47 (3H, s), 5.04 (2H, s), 6.95 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.19-7.33 (7H, m), 7.33-7.39 (1H, m), 7.67 (2H, d, J=8.4 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 11.74, 18.89, 68.63, 111.46, 114.28, 114.98, 118.53, 120.87, 126.07, 128.45, 128.62, 129.83, 130.35, 130.47, 132.50, 134.29, 135.68, 136.69, 160.10, 160.60, 167.08.

C₂₅H₂₁N₂O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 381,1603; bulunan: 381,1600.

5-Metil-4-(3-triflorofenil)-3-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 11)



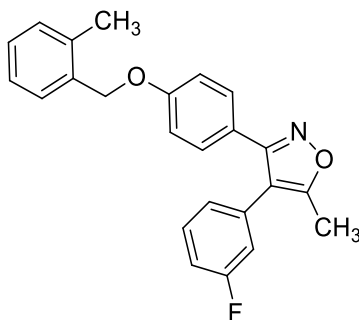
N-hidroksi-4-((2-metilbenzil)oksi)benzimidazol klorür (Bileşik 3) (1,0 mmol)'den hareketle 3-(triflorometil)fenilaseton kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi. Ham ürün hekzan:EtOAc (70:30) solvan sistemi kullanılarak otomatik flash kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı (Verim: %43).

Erime noktası: 120,7-123,4 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 2.36 (3H, s), 2.46 (3H, s), 5.03 (2H, s), 6.94 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.19-7.28 (3H, m), 7.33-7.39 (4H, m), 7.48-7.52 (2H, m), 7.62 (1H, d, $J=8.0$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 11.60, 18.85, 68.61, 114.42, 114.90, 121.15, 123.84 (q, $^1J_{\text{C-F}}=271.2$ Hz), 124.43 (q, $^3J_{\text{C-F}}=3.6$ Hz), 126.05, 126.41 (q, $^3J_{\text{C-F}}=3.8$ Hz), 128.39, 128.60, 129.23, 129.75, 130.43, 131.23 (q, $^2J_{\text{C-F}}=32.1$ Hz), 131.60, 133.20, 134.37, 136.68, 160.00, 160.60, 166.88.

$\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{NO}_2$ için; HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ hesaplanan: 424,1524; bulunan: 424,1523.

5-Metil-4-(3-florofenil)-3-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 12)

N-hidroksi-4-((2-metilbenzil)oksi)benzimidazol klorür (Bileşik 3) (1,0 mmol)'den hareketle 3-florofenilaseton kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi. Ham ürün hekzan:EtOAc (75:25) solvan sistemi kullanılarak otomatik flash kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı (Verim: %43).

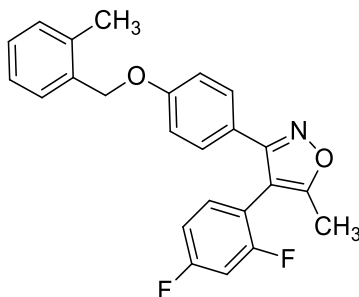
Erime noktası: 89,3-91,2 °C.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.37 (3H, s), 2.44 (3H, s), 5.03 (2H, s), 6.89-6.99 (4H, m), 7.05 (1H, td, J=8.4, 2.4 Hz), 7.20-7.28 (3H, m), 7.32-7.40 (4H, m).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 11.58, 18.88, 68.58, 114.66 (d, ²J_{C-F} = 20.5 Hz), 114.83, 116.74 (d, ²J_{C-F} = 21.4 Hz), 121.35, 125.63, 125.64, 126.05, 128.38, 128.64, 129.74, 130.27 (d, ³J_{C-F} = 8.3 Hz), 130.42, 132.81 (d, ³J_{C-F} = 8.4 Hz), 134.41, 136.70, 159.93, 160.61, 162.79 (d, ¹J_{C-F} = 245.4 Hz), 166.70.

C₂₄H₂₁FNO₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 374,1556; bulunan: 374,1563.

5-Metil-4-(2,4-diflorofenil)-3-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 13)



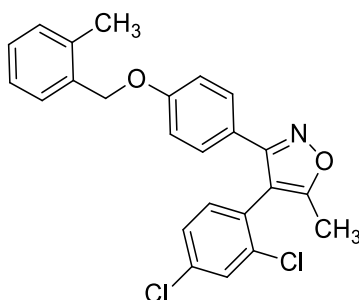
N-hidroksi-4-((2-metilbenzil)oksi)benzimidazol klorür (Bileşik 3) (1,0 mmol)'den hareketle 2,4-diflorofenilaseton kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi. Ham ürün hekzan:EtOAc (70:30) solvan sistemi kullanılarak otomatik flash kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı (Verim: %34).

Erime noktası: 116,1-117,4 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 2.37 (3H, s), 2.39 (3H, s), 5.03 (2H, s), 6.90-6.96 (4H, m), 7.10-7.15 (1H, m), 7.20-7.27 (3H, m), 7.35-7.40 (3H, m).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 11.61 (d, $^5J_{\text{C-F}}=1.9$ Hz), 18.88, 68.58, 104.63 (t, $^2J_{\text{C-F}}=25.3$ Hz), 108.60, 111.83 (dd, $^2J_{\text{C-F}}=21.8$, $^4J_{\text{C-F}}=3.8$ Hz), 114.43 (dd, $^2J_{\text{C-F}}=21.8$, $^4J_{\text{C-F}}=3.8$ Hz), 114.86, 121.58, 126.06, 128.40, 128.63, 129.21, 130.44, 133.01 (dd, $^3J_{\text{C-F}}=9.6$, $^3J_{\text{C-F}}=3.8$ Hz), 134.40, 136.69, 159.94, 160.29 (d, $^1J_{\text{C-F}}=248.4$ Hz, $^3J_{\text{C-F}}=11.8$ Hz), 160.94, 162.84 (dd, $^1J_{\text{C-F}}=248.8$, $^3J_{\text{C-F}}=11.5$ Hz), 167.74.

$\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{F}_2\text{NO}_2$ için; HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ hesaplanan: 392,1462; bulunan: 392,1468.

5-Metil-4-(2,4-diklorofenil)-3-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 14)

N-hidroksi-4-((2-metilbenzil)oksi)benzimidoil klorür (Bileşik 3) (1,0 mmol)'den hareketle 2,4-diklorofenilaseton kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi. Ham ürün hekzan:EtOAc (70:30) solvan sistemi kullanılarak otomatik flash kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı (Verim: %40).

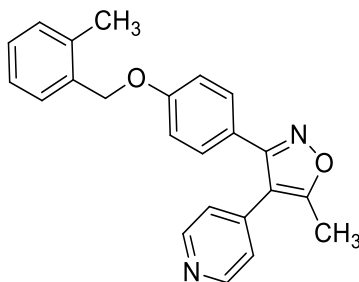
Erime noktası: 98,0-98,4°C.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.33, (3H, s), 2.35, (3H, s), 5.01 (2H, s), 6.91, (2H, d, J=8.8 Hz), 7.13 (1H, d, J=8.0 Hz), 7.18-7.26 (3H, m), 7.28 (1H, dd, J=8.0, 2.4 Hz), 7.32 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.36-7.38 (1H, m), 7.53 (1H, d, J=2.4 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 11.66, 18.87, 68.55, 112.15, 114.89, 121.61, 126.05, 127.52, 128.37, 128.45, 128.59, 128.98, 129.93, 130.42, 133.25, 134.39, 135.04, 135.74, 136.67, 159.94, 160.65, 167.63.

C₂₄H₂₀Cl₂NO₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 424,0871; bulunan: 424,0870.

5-Metil-3-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)-4-(piridin-4-il)izoksazol (Bileşik 15)



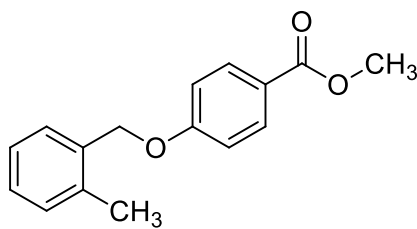
N-hidroksi-4-((2-metilbenzil)oksi)benzimidazol klorür (Bileşik 3) (1,0 mmol)'den hareketle 1-(5-metilpiridin-2-il)aseton kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi. Ham ürün DCM:EtOAc (70:30) solvan sistemi kullanılarak otomatik flash kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı (Verim: %30).

Erime noktası: 128,5-129,3 °C.

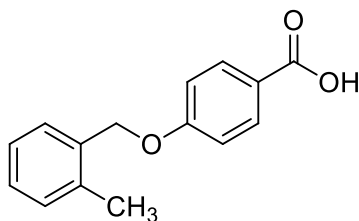
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 2.37 (3H, s), 2.50 (3H, s), 5.04 (2H, s), 6.96 (2H, d, $J=8.6$ Hz), 7.13 (2H, d, $J=6.2$ Hz), 7.19-7.28 (3H, m), 7.34 (2H, d, $J=8.6$ Hz), 7.38-7.40 (1H, m), 8.62 (2H, d, $J=6.2$ $J=9.2$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 11.79, 18.88, 68.63, 113.36, 114.99, 120.81, 124.35, 126.07, 128.44, 128.64, 129.86, 130.46, 134.29, 136.70, 139.25, 149.96, 160.13, 160.62, 167.40.

$\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2$ için; HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ hesaplanan: 357,1603; bulunan: 357,1593.

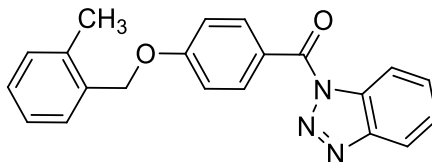
Metil 4-((2-metilbenzil)oksi)benzoat (Bileşik 16)

Metil 4-hidroksibenzoat (3,3 mmol)'tan hareketle 2-metilbenzilbromür kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **1b**'ye göre sentezlendi. Ham ürün petrol eteri ile yıkanıp süzöldü ve kurutuldu (Verim: %69). CAS: 667433-10-5. Erime noktası: 52,4-53,6 °C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 3.31 (3H, s), 3.80 (3H, s), 5.16 (2H, s), 7.13 (2H, d, $J=9.0$ Hz), 7.17-7.27 (3H, m), 7.39 (1H, d, $J=8.0$ Hz), 7.91 (2H, d, $J=9.0$ Hz). $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_3$ için; HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ hesaplanan: 257,1177; bulunan: 257,1178.

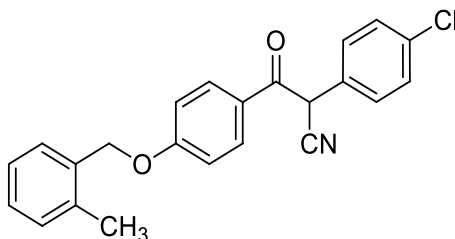
4-((2-Metilbenzil)oksi)benzoik asit (Bileşik 17)

Metil 4-((2-metilbenzil)oksi)benzoat (Bileşik **16**) (1.56 mmol), $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (3,91 mmol) metanol:su (7,5 ml:2,5 ml) içerisinde çözülerek geri çeviren soğutucu altında 2 saat ısıtıldı, ardından reaksiyon ortamı soğutulduktan sonra derişik HCl ile asitlendirildi, çöken katı alçak basınç altında süzöldü (Verim: %96). CAS: 149289-01-0. Erime noktası: 171,2-173,2°C [169 °C]^[100]. $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{O}_3$ için; HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ hesaplanan: 243,1021; bulunan: 243,1017.

(1*H*-Benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)metanon (Bileşik 18)



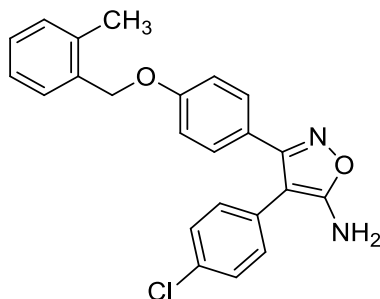
Bileşik **17** (1,24 mmol), diklorometanda (15 ml) çözüldü, azot atmosferi altında okzalil klorür (2,48 mmol) ve katalitik miktarda DMF eklendi. 1 saat oda ısısında karıştırıldı, süre sonunda reaksiyon ortamındaki solvan alçak basınç altında uçuruldu. Ardından benzo[1,2,3]triazol (3.72 mmol) ve diklorometan (12 ml) eklenerek oda ısısında gece boyu karıştırıldı. Ertesi gün K_2CO_3 çözeltisi içerisine alındı, çöken katı alçak basınç altında süzüldü (Verim: %96). Erime noktası: 131,4-132,6 °C. ^1H -NMR ($CDCl_3$): δ 2.34 (3H, s), 5.25 (2H, s), 7.19-7.29 (5H, m), 7.44 (1H, d, $J=6.8$ Hz), 7.63 (1H, t, $J=7.6$ Hz), 7.80 (1H, t, $J=7.6$ Hz), 8.16 (2H, d, $J=9.2$ Hz), 8.28 (1H, dd, $J=7.6, 6$ Hz). $C_{21}H_{18}N_3O_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 344,1393; bulunan: 344,1399.

2-(4-Klorofenil)-3-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)-3-oksopropannitril (Bileşik 19)

4-Klorofenilasetonitril (1,0 mmol), kuru buz banyosunda (-70°C) azot atmosferi altında kuru THF (4 ml) içerisinde çözüldü, üzerine Lityum bis(trimetilsilil)amit (2,5 mmol) eklendi, yarım saat karıştırıldıktan sonra Bileşik **18** (1.0 mmol)'in kuru THF'deki çözeltisi reaksiyon ortamına şırınga yardımı ile yavaşça eklendi. Ekleme sonrasında reaksiyon oda ısısına alındı ve gece boyu karıştırıldı. Ertesi gün reaksiyon 2M HCl çözeltisine alındı ve ardından diklorometan ile ekstre edildi, organik faz kurutuldu (susuz Na₂SO₄) ve uçuruldu. Ardından Na₂CO₃ çözeltisine alınıp tekrar diklorometan ile ekstre edildi, organik faz susuz Na₂SO₄ ile kurutuldu. Oluşan ham ürün sabit faz olarak RediSep Silika kolonları (12 g), hareketli faz olarak hekzan:EtOAc (50:50) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (Verim: %55). Erime noktası: 117,2-119,2 °C.

C₂₃H₁₇ClNO₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 374,0948; bulunan: 374,0916.

4-(4-Klorofenil)-3-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)izoksazol-5-amin (Bileşik 20)



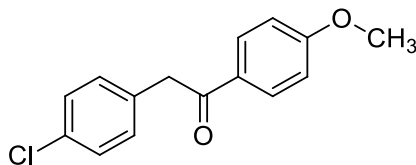
Bileşik **19** (0,43 mmol), ve $\text{H}_2\text{NOH.HCl}$ (0,64 mmol) etanolde (10 ml) çözülerek 4,5 saat geri çeviren soğutucu altında ısıtıldı. Süre sonunda reaksiyon ortamı soğutulduğunda oluşan çökelek alçak basınç altında süzüldü, kurutuldu. Oluşan ham ürün sabit faz olarak RediSep Silika kolonları (12 g), hareketli faz olarak hekzan:EtOAc (50:50) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (Verim: %75).

Erime noktası: 163,1-165,6 °C.

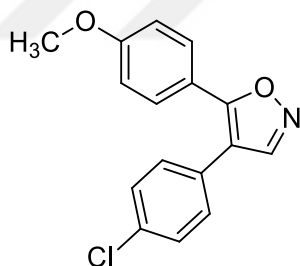
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 2.37 (3H, s), 5.03 (2H, s), 6.94 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.14 (2H, d, $J=8.4$ Hz), 7.19-7.29 (3H, m), 7.33 (2H, d, $J=8.4$ Hz), 7.36-7.39 (3H, m).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 18.88, 68.59, 93.16, 114.80, 121.57, 126.05, 128.39, 128.64, 129.25, 129.32, 129.70, 130.43, 130.54, 132.91, 134.40, 136.70, 159.98, 161.38, 165.48.

$\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{ClN}_2\text{O}_2$ için; HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ hesaplanan: 391,1213; bulunan: 391,1207.

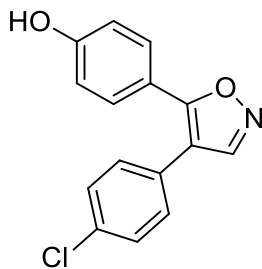
2-(4-Klorofenil)-1-(4-metoksifenil)etanon (Bileşik 21)

4-Klorofenil asetik asit (2,93 mmol) ve anisol (3,52 mmol) reaksiyon balonuna koyulup buz banyosunda, üzerine fosforik asit (H_3PO_4) (3,52 mmol) eklendi ardından trifloroasetik anhidrit (11,72 mmol) eklenerek karıştırıldı, 5 dakikanın sonunda reaksiyon balonuna buz-su karışımı eklendi çöken beyaz katı süzüldü (Verim: %95). CAS: 52578-11-7. Erime noktası: 131,7-133,2°C [137,5 °C]^[101]. $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{ClO}_2$ için; HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ hesaplanan: 261,0682; bulunan: 261,0680.

4-(4-Klorofenil)-5-(4-metoksifenil)izoksazol (Bileşik 22)

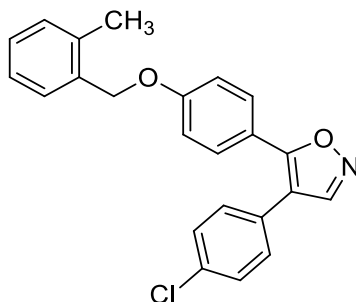
2-(4-Klorofenil)-1-(4-metoksifenil)etanon (Bileşik 21) (1.17 mmol) dimetoksimetildimetilamin (DMFDMA) (5.86 mmol) DMF (500 μl) içerisinde çözülerek gece boyu oda ısısında karıştırıldı. Ertesi gün reaksiyon balonundaki çözücü uçuruldu, elde edilen 2-(4-klorofenil)-3-(dimetilamino)-1-(4-metoksifenil)prop-2-en-1-on ve $\text{H}_2\text{NOH}\cdot\text{HCl}$ (1,46 mmol) absolü etanol (6 ml) içerisinde çözülerek geri çeviren soğutucu altında 1 saat 15 dakika ısıtıldı. Süre sonunda etanol uçuruldu ardından diklorometan ile ekstre edildi, organik faz kurutuldu (susuz Na_2SO_4) ve uçuruldu (Verim: %62). Erime noktası: 96,2-97,5 °C. ^1H -NMR (CDCl_3): δ 3.79 (3H, s), 7.03 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.43 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.47-7.51 (4H, m), 8.85 (1H, s). $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{ClNO}_2$ için; HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ hesaplanan: 286,0628; bulunan: 286,0635.

4-(4-(4-Klorofenil)izoksazol-5-il)fenol (Bileşik 23)



4-(4-Klorofenil)-5-(4-metoksifenil)izoksazol (Bileşik 22) (0,35 mmol)'den 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **6a**'ya göre sentezlendi. (Verim: %97). Erime noktası: 185,9-187,1°C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 6.83 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.36-7.48 (6H, m), 8.82 (1H, s), 10.07 (1H, s). $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClNO}_2$ için; HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ hesaplanan: 272,0482; bulunan: 272,0478.

4-(4-Klorofenil)-5-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 24)



4-(4-(4-Klorofenil)izoksazol-5-il)fenol (Bileşik **23**) (0,34 mmol)'den hareketle 2-metilbenzil bromür kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **1a**'ya göre sentezlendi. Madde sabit faz olarak hazır RediSep Silika kolonları (12g), hareketli faz olarak hekzan:EtOAc (80:20) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (Verim: %47).

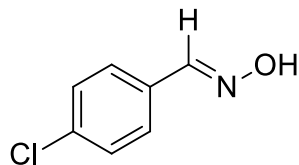
Erime noktası: 115,3-117,3 °C.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.38 (3H, s), 5.07 (2H, s), 7.00 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.23-7.28 (3H, m), 7.32 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.36-7.40 (3H, m), 7.56 (2H, d, J=8.8 Hz), 8.31 (1H, s).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 18.89, 68.70, 113.93, 115.11, 120.10, 126.11, 128.53, 128.65, 128.85, 128.88, 129.26, 129.93, 130.51, 133.91, 134.15, 136.72, 151.55, 160.37, 164.36.

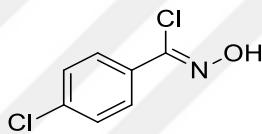
C₂₃H₁₉ClNO₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 376,1104; bulunan: 376,1102.

4-Klorobenzaldehit oksim (Bileşik 25)



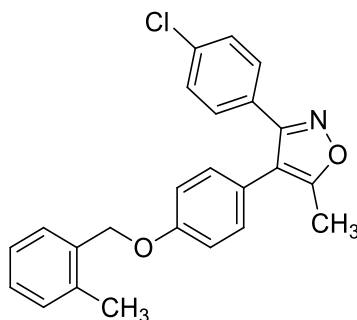
4-Klorobenzaldehit (4,3 mmol)'ten hareketle 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **2**'ye göre sentezlendi (Verim: %91). CAS: 3848-36-0. Erime noktası: 106,1-108,3 °C [110 °C]^[102]. C₇H₇ClNO için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 156,0216; bulunan: 156,0210.

N-hidroksi-4-klorobenzimidoyl klorür (Bileşik 26)



4-Klorobenzaldehit oksim (Bileşik **25**) (2,9 mmol)'den hareketle 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **3**'e göre sentezlendi (Verim: %93). CAS: 28123-63-9. Erime noktası: 73,0-74,1 °C [76-77 °C]^[103].

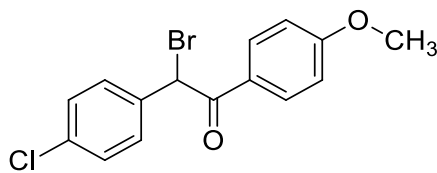
3-(4-Klorofenil)-5-metil-4-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 27)



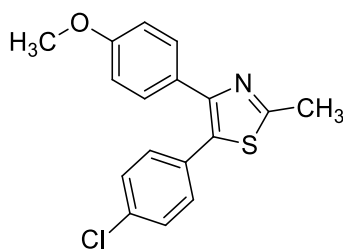
N-hidroksi-4-klorobenzimidazol klorür (Bileşik 26) (1.16 mmol)'den hareketle 4-((2-metilbenzil)oksi)fenilaseton kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi 4'e göre 3-(4-klorofenil)-5-metil-4-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)-4,5-dihidroizoksazol-5-ol ara ürünü sentezlendi. Oluşan ham ürün sabit faz olarak RediSep Silika kolonları (24 g), hareketli faz olarak hekzan:EtOAc (70:30) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı, metanol ile yıkandı (Verim %40). $C_{24}H_{23}ClNO_3$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 408,1366; bulunan: 408,1360.

İzoksazolin halkası içeren bileşik (3-(4-klorofenil)-5-metil-4-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)-4,5-dihidroizoksazol-5-ol) (0,2 mmol) metanol:su (4 ml:2 ml) içinde çözüldü, üzerine Na_2CO_3 (0,41 mmol) ilave edildi $90^\circ C$ 'de geri çeviren soğutucu altında 2,5 saat karıştırıldı. Süre sonunda metanol uçurulup ve etil asetat ile ekstre edildi, organik faz Na_2SO_4 ile kurutuldu. Etil asetat alçak basınç altında uçuruldu. Oluşan ham ürün sabit faz olarak RediSep Silika kolonları (12 g), hareketli faz olarak hekzan:EtOAc (90:10) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (Verim: % 76). Erime noktası: $84,5-86,5^\circ C$. ^1H -NMR ($CDCl_3$): δ 2.41 (3H, s), 2.43 (3H, s), 5.06 (2H, s), 7.01 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.09 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.22-7.32 (5H, m), 7.38-7.44 (3H, m). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$): δ 11.52, 18.91, 68.65, 115.13, 115.28, 122.39, 126.08, 127.78, 128.43, 128.70, 128.76, 129.68, 130.47, 130.96, 134.49, 135.42, 136.73, 158.57, 160.16, 166.65. $C_{24}H_{21}ClNO_2$ için; HRMS (m/z) $[M+H]^+$ hesaplanan: 390,1261; bulunan: 390,1251.

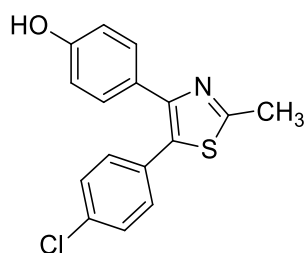
2-Bromo-2-(4-klorofenil)-1-(4-metoksifenil)etanon (Bileşik 28)



2-(4-Klorofenil)-1-(4-metoksifenil)etanon (Bileşik **21**) (2,04 mmol) glasiyel asetik asit (5 ml) içersine alınarak üzerine damla damla brom (2,45 mmol) eklendi. Reaksiyon oda ısısında gece boyu karıştırıldı. Ertesi gün reaksiyon içeriği sodyum metabisülfite çözeltisine alınarak diklorometan ile ekstre edildi. Organik faz Na_2SO_4 ile kurutuldu, diklorometan alçak basınç altında uçuruldu. Oluşan ham ürün sabit faz olarak RediSep Silika kolonları (24 g), hareketli faz olarak hekzan:EtOAc (85:15) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (Verim: %65). CAS: 42445-05-6. Erime noktası: 106,8-108,0 °C [106,5 °C]^[104]. $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{BrClO}_2$ için; HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ hesaplanan: 338,9787; bulunan: 338,9789.

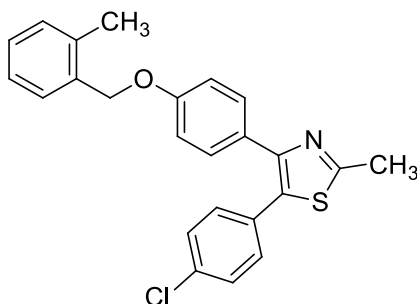
5-(4-Klorofenil)-4-(4-metoksifenil)-2-metiltiyazol (Bileşik 29)

2-Bromo-2-(4-klorofenil)-1-(4-metoksifenil)etanon (Bileşik 28) (1,2 mmol) ve tiyoasetamit (1,44 mmol) etanol (10 ml) içerisinde çözünerek geri çeviren soğutucu altında 5 saat ısıtıldı. Süre sonunda reaksiyon ortamından fazla etanol uçuruldu, etil asetat ile ekstre edildi, Na₂SO₄ ile kurutuldu. Etil asetat alçak basınç altında uçuruldu. Oluşan ham ürün sabit faz olarak RediSep Silika kolonları (24 g), hareketli faz olarak hekzan:EtOAc (88:12) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (Verim: %66). Erime noktası: 111,7-113,4 °C. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.67 (3H, s), 3.73 (3H, s), 6.44 (2H, d, J=9.2 Hz), 7.29 (2H, d, J=8.4 Hz), 7.32 (2H, d, J=9.2 Hz), 7.42 (2H, d, J=8.4 Hz). C₁₇H₁₅ClNOS için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 316,0563; bulunan: 316,0555.

4-(5-(4-Klorofenil)-2-metiltiyazol-4-il)fenol (Bileşik 30)

5-(4-Klorofenil)-4-(4-metoksifenil)-2-metiltiyazol (Bileşik 29) (0,6 mmol)'den 3.1.2'de verilen sentez yöntemi 6a'ya göre sentezlendi. Oluşan ham ürün sabit faz olarak RediSep Silika kolonları (24 g), hareketli faz olarak hekzan:EtOAc (60:40) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (Verim: %68). Erime noktası: 203,6-204,8 °C. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.66 (3H, s), 6.68 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.21 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.29 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.41 (2H, d, J=8.8 Hz), 9.58, (1H, s). C₁₆H₁₃ClNOS için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 302,0406; bulunan: 302,0396.

5-(4-Klorofenil)-2-metil-4-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)tiyazol (Bileşik 31)



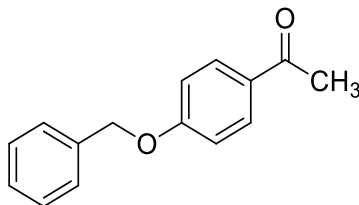
4-(5-(4-Klorofenil)-2-metiltiyazol-4-il)fenol (Bileşik **30**) (0,34 mmol)'den hareketle 2-metilbenzil bromür kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **1a**'ya göre sentezlendi. Madde sabit faz olarak hazır RediSep Silika kolonları (12g), hareketli faz olarak hekzan:EtOAc (70:30) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (Verim: %52).

Erime noktası: 90,5-92,1 °C.

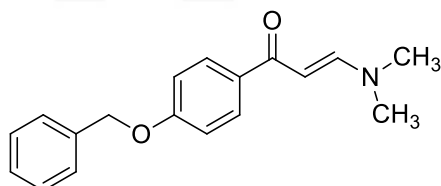
¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.37, (3H, s), 2.73 (3H, m), 5.03 (2H, s), 6.91 (2H, d, *J*=8.8 Hz), 7.21-7.30 (7H, m), 7.39-7.43 (3H, m).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 18.89, 19.20, 68.55, 114.70, 126.01, 127.37, 128.28, 128.61, 128.93, 129.75, 130.25, 130.38, 130.77, 130.91, 133.77, 134.65, 136.65, 149.57, 158.65, 163.98.

C₂₄H₂₁ClNOS için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 406,1032; bulunan: 406,1028.

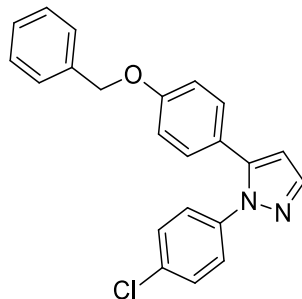
1-(4-(Benziloksi)fenil)etanon (Bileşik 32)

1-(4-Hidroksifenil)etanon (8,82 mmol)'dan hareketle benzilbromür kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **1b**'ye göre sentezlendi. Madde sabit faz olarak hazır RediSep Silika kolonları (40g), hareketli faz olarak hekzan:EtOAc (40:60) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (Verim: %88). CAS: 54696-05-8. Erime noktası: 92,7-93,7 °C [93 °C]^[105]. C₁₅H₁₅O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 227,1072; bulunan: 227,1062.

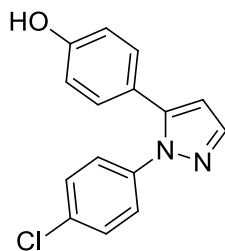
1-(4-(Benziloksi)fenil)-3-(dimetilamino)prop-2-en-1-on (Bileşik 33)

1-(4-(Benziloksi)fenil)etanon (Bileşik **32**) (7,08 mmol)'dan hareketle 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **7**'ye göre sentezlendi (Verim: %98). CAS: 142557-23-1. Erime noktası: 140,3-141,2 °C. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.87, (3H, bs), 3.10 (3H, bs), 5.15 (2H, s), 5.78 (1H, d, J=12.2 Hz), 7.02 (2H, d, J=8.6 Hz), 7.30-7.45 (5H, m), 7.63 (1H, d, J=12.2 Hz), 7.85 (2H, d, J=8.6 Hz). C₁₈H₂₀NO₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 282,1494; bulunan: 282,1495.

5-(4-(Benziloksi)fenil)-1-(4-klorofenil)-1H-pirazol (Bileşik 34)

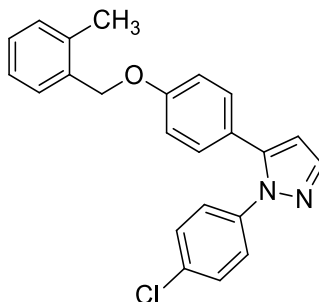


1-(4-(Benziloksi)fenil)-3-(dimetilamino)prop-2-en-1-on (Bileşik **33**) (6,51 mmol)'dan hareketle 4-klorofenilhidrazin.HCl kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **7**'ye göre sentezlendi. Madde sabit faz olarak hazır RediSep Silika kolonları (40g), hareketli faz olarak hekzan:EtOAc (60:40) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (Verim: %74). Erime noktası: 148,8-150,7 °C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 5.08 (2H, s), 6.57 (1H, d, $J=1.8$ Hz), 7.00 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.15 (2H, d, $J=8.4$ Hz), 7.26 (2H, d, $J=8.4$ Hz), 7.30-7.33 (1H, m), 7.36-7.39 (2H, m), 7.42-7.48 (4H, m), 7.72 (1H, d, $J=1.8$ Hz). $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{ClN}_2\text{O}$ için; HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ hesaplanan: 361,1108; bulunan: 361,1095.

4-(1-(4-Klorofenil)-1H-pirazol-5-il)fenol (Bileşik 35)

5-(4-(Benziloksi)fenil)-1-(4-klorofenil)-1H-pirazol (Bileşik **34**) (3,68 mmol) etil asetat (10ml) içinde çözüldü. Üzerine derişik HCl (1220 µl) ilave edildi ve Pd/C (%10 a/a) Bileşik **34** miktarının %10'u oranında eklendi ve H₂ (Hidrojen) atmosferi altında 6 saat karıştırıldı. Reaksiyon karışımı selitten süzöldü ve süzülen etil asetat fazı su ile ekstre edildi, organik faz kurutuldu (susuz Na₂SO₄) ve alçak basınç altında uçuruldu. Oluşan ham ürün sabit faz olarak RediSep Silika kolonları (24 g), hareketli faz olarak hekzan:EtOAc (70:30) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (Verim: %73). Erime noktası: 186,0-188,0 °C. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 6.51 (1H, d, J=1.8 Hz), 6.73 (2H, d, J=8.4 Hz), 7.02 (2H, d, J=8.4 Hz), 7.25 (2H, d, J=9.2 Hz), 7.45 (2H, d, J=9.2 Hz), 7.70 (1H, d, J=1.8 Hz), 9.71 (1H, bs). C₁₅H₁₂ClN₂O için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 271,0638; bulunan: 271,0629.

1-(4-Klorofenil)-5-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)-1H-pirazol (Bileşik 36)



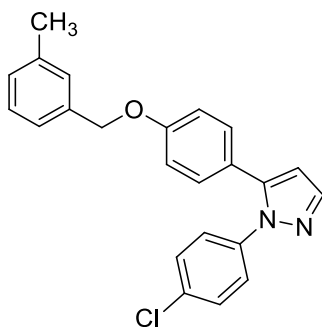
4-(1-(4-Klorofenil)-1H-pirazol-5-il)fenol (Bileşik **35**) (0,34 mmol)'den hareketle 2-metilbenzil bromür kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **1a**'ya göre sentezlendi. Ham ürün sabit faz olarak hazır RediSep Silika kolonları (12g), hareketli faz olarak hekzan:EtOAc (80:20) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (Verim: %61).

Erime noktası: 146,0-147,9 °C.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.38 (3H, s), 5.04 (2H, s), 6.45 (1H, d, J=2.0 Hz), 6.94 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.16 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.21-7.29 (5H, m), 7.32 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.38-7.41 (1H, m), 7.71 (1H, d, J=2.0 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 18.90, 68.65, 107.72, 114.88, 122.87, 126.08, 126.27, 128.45, 128.66, 129.05, 130.08, 130.47, 132.98, 134.36, 136.70, 138.68, 140.49, 142.91, 159.04.

C₂₃H₂₀ClN₂O için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 375,1264; bulunan: 375,1263.

1-(4-Klorofenil)-5-(4-((3-metilbenzil)oksi)fenil)-1H-pirazol (Bileşik 37)

4-(1-(4-Klorofenil)-1H-pirazol-5-il)fenol (Bileşik **35**) (0,34 mmol)'den hareketle 3-metilbenzil bromür kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **1a**'ya göre sentezlendi. Ham ürün sabit faz olarak hazır RediSep Silika kolonları (12g), hareketli faz olarak hekzan:EtOAc (75:25) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (Verim: %61).

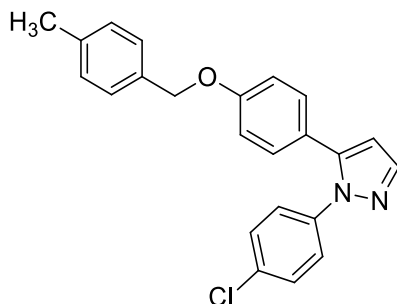
Erime noktası: 110,0-111,9 °C.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.38, (3H, s), 5.04 (2H, s), 6.44 (1H, d, *J*=1.8 Hz), 6.93 (2H, d, *J*=8.8 Hz), 7.13-7.16 (3H, m), 7.21-7.32 (7H, m), 7.70 (1H, d, *J*=1.8 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 21.40, 70.14, 107.68, 114.94, 122.85, 124.63, 126.23, 128.28, 128.54, 128.91, 129.02, 130.07, 132.93, 136.43, 138.36, 138.71, 140.51, 142.90, 158.97.

C₂₃H₂₀ClN₂O için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 375,1264; bulunan: 375,1246.

1-(4-Klorofenil)-5-(4-((4-metilbenzil)oksi)fenil)-1H-pirazol (Bileşik 38)



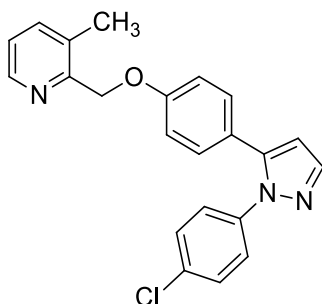
4-(1-(4-Klorofenil)-1H-pirazol-5-il)fenol (Bileşik 35) (0,34 mmol)'den hareketle 4-metilbenzil bromür kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **1a**'ya göre sentezlendi. Ham ürün sabit faz olarak hazır RediSep Silika kolonları (12g), hareketli faz olarak hekzan:EtOAc (75:25) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (Verim: %61).

Erime noktası: 126,8-127,8 °C.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.37, (3H, s), 5.02 (2H, s), 6.44 (1H, d, J=2.0 Hz), 6.92 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.14 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.19-7.33 (8H, m), 7.69 (1H, d, J=2.0 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 21.20, 70.01, 107.68, 114.95, 122.81, 126.23, 127.66, 129.02, 129.31, 130.05, 132.92, 133.48, 137.96, 138.72, 140.51, 142.90, 158.97.

C₂₃H₂₀ClN₂O için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 375,1264; bulunan: 375,1250.

2-((4-(1-(4-Klorofenil)-1H-pirazol-5-il)fenoksi)metil)-3-metilpiridin (Bileşik 39)

4-(1-(4-Klorofenil)-1H-pirazol-5-il)fenol (Bileşik **35**) (0,34 mmol)'den hareketle 2-(klorometil)-3-metilpiridin kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **1a**'ya göre sentezlendi. Ham ürün sabit faz olarak hazır RediSep Silika kolonları (12g), hareketli faz olarak hekzan:EtOAc (50:50) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (Verim: %72).

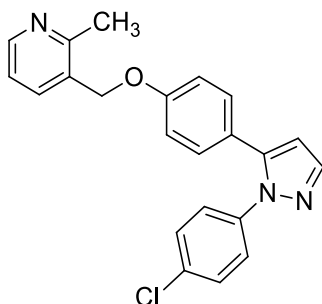
Erime noktası: 103,8-105,3 °C.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.43, (3H, s), 5.21 (2H, s), 6.43 (1H, d, J=2.0 Hz), 6.98 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.13 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.19-7.28 (3H, m), 7.30 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.53 (1H, dd, J=8.0, 0.8 Hz), 7.68 (1H, d, J=2.0 Hz), 8.45 (1H, dd, J=5.2, 0.8 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 18.16, 70.81, 107.68, 115.01, 122.99, 123.59, 126.22, 129.00, 130.02, 132.90, 133.30, 138.56, 138.73, 140.53, 142.85, 146.57, 153.88, 158.86.

C₂₂H₁₉ClN₃O için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 376,1217; bulunan: 376,1203.

3-((4-(1-(4-Klorofenil)-1H-pirazol-5-il)fenoksi)metil)-2-metilpiridin (Bileşik 40)



4-(1-(4-Klorofenil)-1H-pirazol-5-il)fenol (Bileşik **35**) (0,34 mmol)'den hareketle 3-(klorometil)-2-metilpiridin kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **1a**'ya göre sentezlendi. Ham ürün sabit faz olarak hazır RediSep Silika kolonları (12g), hareketli faz olarak DCM:EtOAc (40:60) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (Verim: %73).

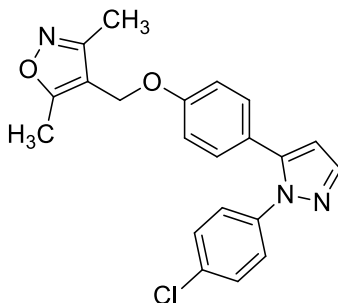
Erime noktası: 137,6-139,3 °C.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.57, (3H, s), 5.04 (2H, s), 6.45 (1H, d, J=2.0 Hz), 6.93 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.15-7.19 (3H, m), 7.25 (2H, d, J=9.2 Hz), 7.31 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.69 (1H, d, J=2.0 Hz), 7.72 (1H, dd, J=7.2, 1.6 Hz), 8.48 (1H, dd, J=4.8, 1.6 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 21.93, 67.43, 107.77, 114.86, 121.33, 123.41, 126.25, 129.04, 130.01, 130.18, 132.98, 135.92, 138.70, 140.57, 142.67, 148.52, 156.61, 158.53.

C₂₂H₁₉ClN₃O için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 376,1217; bulunan: 376,1223.

**4-((4-(1-(4-Klorofenil)-1H-pirazol-5-il)fenoksi)metil)-3,5-dimetilizoksazol
(Bileşik 41)**



4-(1-(4-Klorofenil)-1H-pirazol-5-il)fenol (Bileşik 35) (0,34 mmol)'den hareketle 4-(klorometil)-3,5-dimetilizoksazol kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **1a**'ya göre sentezlendi. Ham ürün sabit faz olarak hazır RediSep Silika kolonları (12g), hareketli faz olarak hekzan:EtOAc (60:40) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (Verim: %77).

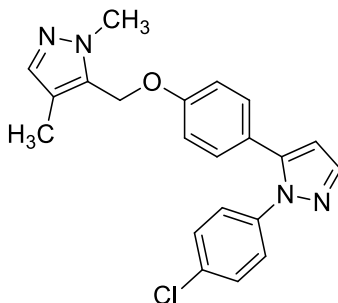
Erime noktası: 122,2-124,2 °C.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.29 (3H, s), 2.41 (3H,s), 4.78 (2H, s), 6.45 (1H, d, $J=2.0$ Hz), 6.89 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.17 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.25 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.31 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.70 (1H, d, $J=2.0$ Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 10.15, 11.16, 59.51, 107.80, 109.97, 114.85, 123.47, 126.28, 129.05, 130.16, 133.01, 138.68, 140.57, 142.64, 158.40, 159.67, 167.56.

C₂₁H₁₉ClN₃O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 380,1166; bulunan: 380,1157.

**5-((4-(1-(4-Klorofenil)-1H-pirazol-5-il)fenoksi)metil)-1,4-dimetil-1H-pirazol
(Bileşik 42)**



4-(1-(4-Klorofenil)-1H-pirazol-5-il)fenol (Bileşik 35) (0,34 mmol)'den hareketle 5-(klorometil)-1,4-dimetil-1H-pirazol kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **1a**'ya göre sentezlendi. Ham ürün sabit faz olarak hazır RediSep Silika kolonları (12g), hareketli faz olarak hekzan:EtOAc (60:40) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (Verim: %83).

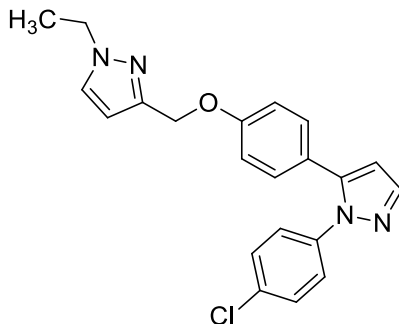
Erime noktası: 148,8-150,0 °C.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.25, (3H, s), 3.84 (3H, s), 4.98 (2H, s), 6.09 (1H, s), 6.44 (1H, d, J=1.8 Hz), 6.91 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.16 (2H, d, J=9.2 Hz), 7.24 (2H, d, J=9.2 Hz), 7.30 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.69 (1H, d, J=1.8 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 13.37, 36.46, 60.52, 106.83, 107.79, 114.85, 123.56, 126.25, 129.05, 130.14, 133.00, 137.45, 138.68, 140.57, 142.61, 147.33, 158.11.

C₂₁H₂₀ClN₄O için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 379,1326; bulunan: 379,1309.

1-(4-Klorofenil)-5-(4-((1-etil-1H-pirazol-3-il)metoksi)fenil)-1H-pirazol (Bileşik 43)



4-(1-(4-Klorofenil)-1H-pirazol-5-il)fenol (Bileşik 35) (0,34 mmol)'den hareketle 3-(klorometil)-1-etil-1H-pirazol kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **1a**'ya göre sentezlendi. Ham ürün sabit faz olarak hazır RediSep Silika kolonları (12g), hareketli faz olarak hekzan:EtOAc (40:60) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (Verim: %87).

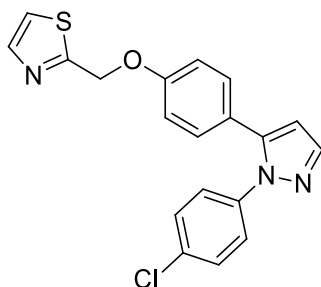
Erime noktası: 86,2-87,6 °C.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.50, (3H, t, $J=7.2$ Hz), 4.18 (2H, q, $J=7.2$ Hz), 5.08 (2H, s), 6.34 (1H, d, $J=2.0$ Hz), 6.44 (1H, d, $J=1.6$ Hz), 6.96 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.14 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.24 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.30 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.39 (1H, d, $J=2.0$ Hz), 7.69 (1H, d, $J=1.6$ Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 15.56, 47.03, 64.23, 105.15, 107.65, 114.95, 122.79, 126.22, 128.99, 129.43, 130.00, 132.88, 138.79, 140.52, 142.95, 147.71, 158.89.

C₂₁H₂₀ClN₄O için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 379,1326; bulunan: 379,1316.

2-((4-(1-(4-Klorofenil)-1H-pirazol-5-il)fenoksi)metil)tiyazol (Bileşik 44)



4-(1-(4-Klorofenil)-1H-pirazol-5-il)fenol (Bileşik **35**) (0,34 mmol)'den hareketle 2-(klorometil)-1,3-tiyazol kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **1a**'ya göre sentezlendi. Ham ürün sabit faz olarak hazır RediSep Silika kolonları (12g), hareketli faz olarak hekzan:EtOAc (60:40) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (Verim: %74).

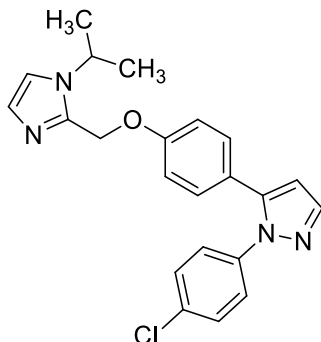
Erime noktası: 105,5-106,5 °C.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 5.39 (2H, s), 6.45 (1H, d, J=1.8 Hz), 6.97 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.16 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.23 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.30 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.39 (1H, d, J=3.0 Hz), 7.69 (1H, d, J=1.8 Hz), 7.81 (1H, d, J=3.0 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 67.29, 107.81, 115.07, 120.05, 123.80, 126.25, 129.05, 130.19, 133.02, 138.65, 140.56, 142.62, 157.97, 166.45.

C₁₉H₁₅ClN₃OS için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 368,0624; bulunan: 368,0609.

**1-(4-Klorofenil)-5-(4-((1-izopropil-1H-imidazol-2-il)metoksi)fenil)-1H-pirazol
(Bileşik 45)**



4-(1-(4-Klorofenil)-1H-pirazol-5-il)fenol (Bileşik 35) (0,34 mmol)'den hareketle 2-(klorometil)-1-izopropil-1H-imidazol kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **1a**'ya göre sentezlendi. Ham ürün sabit faz olarak hazır RediSep Silika kolonları (12g), hareketli faz olarak DCM:MeOH (95:5) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi yapıldı. Ardından sabit faz olarak Reveleris® C18 ters faz kolonu, hareketli faz olarak asetronitril:su (50:50) kullanılarak preparatif kromatografi yöntemiyle saflaştırıldı. (Verim: %70).

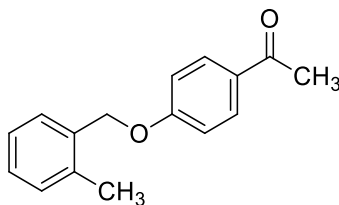
Erime noktası: 46,8-48,0 °C.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.47 (6H, d, J=6.4 Hz), 4.57-4.63 (1H, m), 5.20 (2H, s), 6.44 (1H, d, J=1.6 Hz), 7.00 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.05 (1H, s), 7.07 (1H, s), 7.15 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.24 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.35 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.69 (1H, d, J=1.6 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 23.80, 48.13, 62.38, 107.75, 114.98, 116.88, 123.48, 126.27, 127.96, 129.04, 130.13, 133.00, 138.70, 140.70, 141.83, 142.70, 158.14.

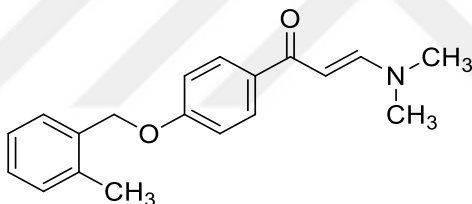
C₂₂H₂₂ClN₄O için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 393,1482; bulunan: 393,1487.

1-(4-((2-Metilbenzil)oksi)fenil)etanon (Bileşik 46)

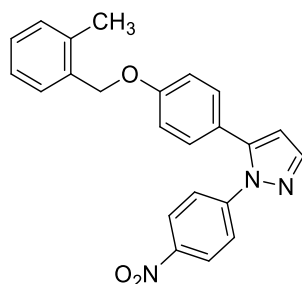


1-(4-Hidroksifenil)etanon (7,35 mmol)'dan hareketle 2-metilbenzilbromür kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **1a**'ya göre sentezlendi (Verim: %91). CAS: 72293-94-8. Erime noktası: 95,8-98,2 °C. [97-99 °C]^[106] C₁₆H₁₇O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 241,1223, bulunan: 241,1229.

3-(Dimetilamino)-1-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)prop-2-en-1-on (Bileşik 47)

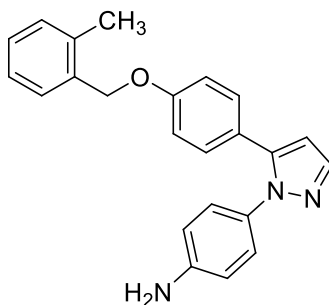


1-(4-((2-Metilbenzil)oksi)fenil)etanon (Bileşik **46**) (3,125 mmol)'dan hareketle 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **7**'ye göre sentezlendi (Verim: %95). Erime noktası: 139,8-141,8 °C. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.31 (3H, s), 2.88 (3H, bs), 3.10 (3H, bs), 5.12 (2H, s), 5.79 (1H, d, J=12.0 Hz), 7.04 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.16-7.26 (3H, m), 7.40 (1H, d, J=7.2 Hz), 7.64 (1H, d, J=12.0 Hz), 7.87 (2H, d, J=8.8 Hz). C₁₉H₂₂NO₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 296,1638; bulunan: 296,1651.

1-(4-Nitrofenil)-5-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)-1H-pirazol (Bileşik 48)

3-(Dimetilamino)-1-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)prop-2-en-1-on (Bileşik 47) (0,85 mmol)'dan hareketle 4-nitrofenilhidrazin kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **8a**'ya göre sentezlendi. Madde sabit faz olarak hazır RediSep Silika kolonları (24g), hareketli faz olarak hekzan:EtOAc (70:30) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (Verim: %73). Erime noktası: 187,3-188,4 °C. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.39 (3H, s), 5.06 (2H, s), 6.49 (1H, d, $J=1.4$ Hz), 6.98 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.16-7.29 (5H, m), 7.40 (1H, d, $J=7.2$ Hz), 7.50 (2H, d, $J=9.2$ Hz), 7.77 (1H, d, $J=1.4$ Hz), 8.20 (2H, d, $J=9.2$ Hz). C₂₃H₂₀N₃O₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 386,1505; bulunan: 386,1518.

1-(4-Aminofenil)-5-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)-1H-pirazol (Bileşik 49)



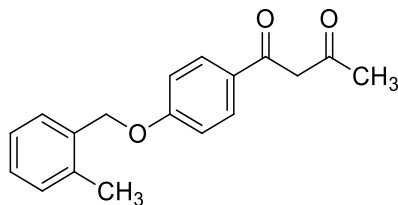
1-(4-Nitrofenil)-5-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)-1H-pirazol (Bileşik 48) (0,57 mmol)'den hareketle 3.1.2'de verilen sentez yöntemi 5'e göre sentezlendi. Madde sabit faz olarak hazır RediSep Silika kolonları (12g), hareketli faz olarak hekzan:EtOAc (65:35) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (Verim: %52).

Erime noktası: 176,8-178,8 °C.

¹H-NMR (CDCl₃): 2.37 (3H, s), 5.01 (2H, s), 6.42 (1H, d, *J*=1.6 Hz), 6.67 (2H, d, *J*=8.8 Hz), 6.91 (2H, d, *J*=8.8 Hz), 7.10 (2H, d, *J*=8.8 Hz), 7.17 (2H, d, *J*=8.8 Hz), 7.19-7.26 (3H, m), 7.38-7.40 (1H, m), 7.65 (1H, d, *J*=1.6 Hz).

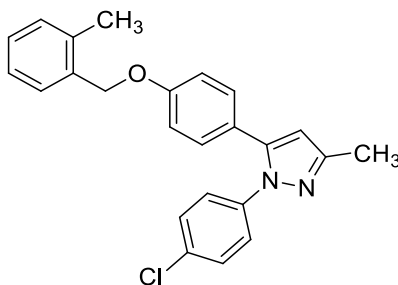
¹³C-NMR (CDCl₃): δ 18.88, 68.58, 106.55, 114.63, 115.48, 123.37, 126.05, 126.63, 128.38, 128.64, 129.95, 130.43, 132.10, 134.49, 136.70, 139.64, 142.63, 144.99, 158.69.

C₂₃H₂₂N₃O için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 356,1763; bulunan: 356,1747.

1-(4-((2-Metilbenzil)oksi)fenil)bütan-1,3-dion (Bileşik 50)

1-(4-((2-Metilbenzil)oksi)fenil)etanon (Bileşik **46**) (2,5 mmol)'dan hareketle 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **9**'a göre sentezlendi (Verim: %72). Erime noktası: 111,2-113,1 °C. ¹H-NMR (CDCl₃): 2.17 (3H, s), 2.38 (3H, s), 5.10 (2H, s), 6.12 (1H, s), 7.03 (2H, d, *J*=9.0 Hz), 7.21-7.29 (3H, m), 7.39 (1H, d, *J*=6.8 Hz), 7.88 (2H, d, *J*=9.0 Hz). C₁₈H₁₉O₃ için; HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ hesaplanan: 283,1334; bulunan: 283,1341.

1-(4-Klorofenil)-3-metil-5-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)-1H-pirazol (Bileşik 51)



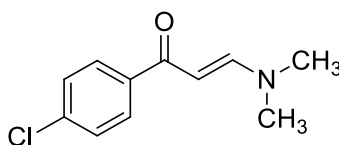
1-(4-((2-Metilbenzil)oksi)fenil)bütan-1,3-dion (Bileşik 50) (1 mmol)'dan hareketle 4-klorofenilhidrazin kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **8c**'ye göre sentezlendi. Ardından sabit faz olarak Reveleris® C18 ters faz kolonu, hareketli faz olarak asetonitril:su (60:40) kullanılarak preparatif kromatografi yöntemiyle saflaştırıldı (Verim: %54).

Erime noktası: 111,8-113,6 °C.

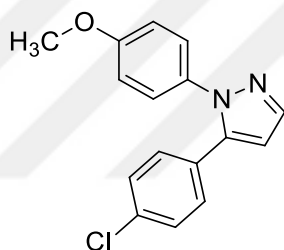
¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.37 (3H, s), 2.38 (3H, s), 5.03 (2H, s), 6.25 (1H, s), 6.93 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.14 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.21-7.30 (7H, m), 7.38-7.41 (1H, m).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 13.52, 18.89, 68.63, 107.68, 114.83, 123.04, 126.06, 126.16, 128.43, 128.65, 128.98, 129.96, 130.46, 132.59, 134.38, 136.70, 138.68, 143.61, 149.71, 158.96.

C₂₄H₂₂ClN₂O için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 389,1421; bulunan: 389,1413.

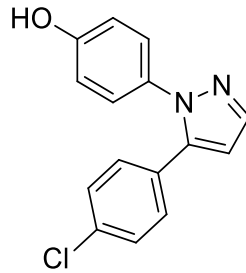
1-(4-Klorofenil)-3-(dimetilamino)prop-2-en-1-on (Bileşik 52)

4-Kloroasetofenon (3 mmol)'dan hareketle 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **7**'ye göre sentezlendi (Verim: %82). CAS: 28587-05-5. Erime noktası: 81,8-83,8 °C [79-81 °C]^[107]. C₁₁H₁₃ClNO için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 210,0686; bulunan: 210,0678.

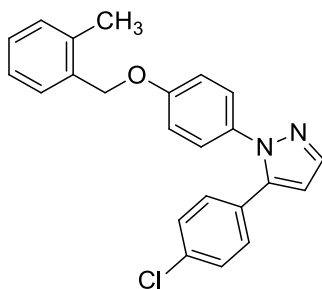
5-(4-Klorofenil)-1-(4-metoksifenil)-1H-pirazol (Bileşik 53)

1-(4-Klorofenil)-3-(dimetilamino)prop-2-en-1-on (Bileşik **52**) (1,5 mmol)'dan hareketle 4-klorofenilhidrazin kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **8a**'ya göre sentezlendi ve saflaştırıldı. (Verim: %58). Erime noktası: 111,2-112,2 °C. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 3.76 (3H, s), 6.64 (1H, d, J=2.0 Hz), 6.95 (2H, d, J=9.2 Hz), 7.17 (2H, d, J=9.2 Hz), 7.21 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.40 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.70 (1H, d, J=2.0 Hz). C₁₆H₁₄ClN₂O için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 285,0795; bulunan: 285,0789.

4-(5-(4-Klorofenil)-1H-pirazol-1-il)fenol (Bileşik 54)



5-(4-Klorofenil)-1-(4-metoksifenil)-1H-pirazol (Bileşik **53**) (0,69 mmol) 'den 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **6a**'ya göre sentezlendi. Madde sabit faz olarak hazır RediSep Silika kolonları (12g), hareketli faz olarak hekzan:EtOAc (30:70) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (Verim: %38). Erime noktası: 185,9-187,1°C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 6.63 (1H, m), 6.76 (2H, d, $J=7.6$ Hz), 7.04 (2H, d, $J=7.6$ Hz), 7.20 (2H, d, $J=7.6$ Hz), 7.39 (2H, d, $J=7.6$ Hz), 7.66 (1H, s), 9.75 (1H, s). $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}$ için; HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ hesaplanan: 271,0638; bulunan: 271,0634.

5-(4-Klorofenil)-1-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)-1H-pirazol (Bileşik 55)

4-(5-(4-Klorofenil)-1H-pirazol-1-il)fenol (Bileşik **54**) (0,23 mmol)'den hareketle 2-metilbenzil bromür kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **1a**'ya göre sentezlendi. Madde sabit faz olarak hazır RediSep Silika kolonları (12g), hareketli faz olarak hekzan:EtOAc (60:40) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (Verim: %85).

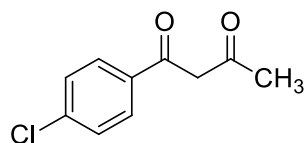
Erime noktası: 145,2-146,4 °C.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.38 (3H, s), 5.04 (2H, s), 6.50 (1H, d, J=2.0 Hz), 6.96 (2H, d, J=9.2 Hz), 7.17 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.20-7.26 (5H, m), 7.28 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.39-7.41 (1H, m), 7.70 (1H, d, J=2.0 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 18.89, 68.87, 107.44, 115.11, 126.06, 126.66, 128.43, 128.63, 128.74, 128.95, 129.92, 130.45, 133.14, 134.23, 134.32, 136.68, 139.91, 141.81, 158.31.

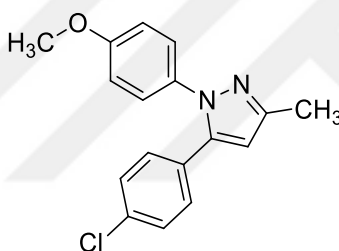
C₂₃H₂₀ClN₂O için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 375,1264; bulunan: 375,1262.

1-(4-Klorofenil)bütan-1,3-dion (Bileşik 56)

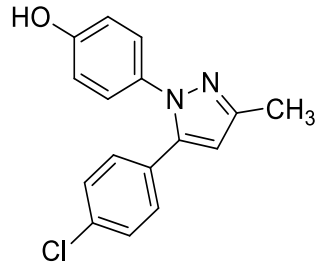


4-Kloroasetofenon (4,9 mmol)'dan hareketle 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **9'a** göre sentezlendi (Verim: %37). CAS: 6302-55-2. Erime noktası: 68,1-69,1 °C [73-74 °C]^[108]. C₁₀H₁₀ClO₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 197,0369; bulunan: 197,0372.

5-(4-Klorofenil)-1-(4-metoksifenil)-3-metil-1H-pirazol (Bileşik 57)

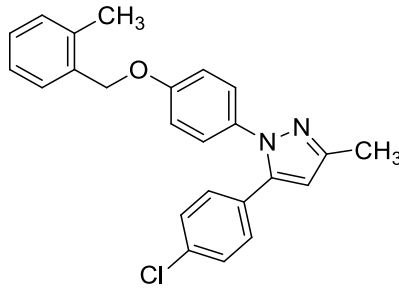


1-(4-Klorofenil)bütan-1,3-dion (Bileşik **56**) (1,53 mmol)'dan hareketle 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **8c'**ye göre sentezlendi ve saflaştırıldı (Verim: %78). Erime noktası: 113,2-114,8 °C. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.23 (3H, s), 3.74 (3H, s), 6.43 (1H, s), 6.92 (2H, d, J=9.2 Hz), 7.13 (2H, d, J=9.2 Hz), 7.18 (2H, d, J=8.6 Hz), 7.38 (2H, d, J=8.6 Hz). C₁₇H₁₆ClN₂O için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 299,0951; bulunan: 299,0945.

4-(5-(4-Klorofenil)-3-metil-1H-pirazol-1-il)fenol (Bileşik 58)

5-(4-Klorofenil)-1-(4-metoksifenil)-3-metil-1H-pirazol (Bileşik 57) (0,97 mmol)'den hareketle 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **6a**'ya göre sentezlendi (Verim: %65). CAS: 1397184-54-1. Erime noktası: 205,6-207,6 °C. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.22 (3H, s), 6.41 (1H, s), 6.73 (2H, d, J=8.4 Hz), 7.00 (2H, d, J=9.0 Hz), 7.17 (2H, d, J=8.4 Hz), 7.37 (2H, d, J=9.0 Hz), 9.70 (1H, s). C₁₆H₁₄ClN₂O için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 285,0795; bulunan: 285,0787.

5-(4-Klorofenil)-1-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)-1H-pirazol (Bileşik 59)



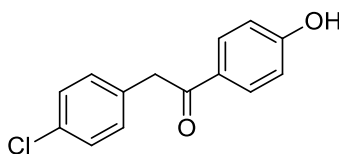
4-(5-(4-Klorofenil)-3-metil-1H-pirazol-1-il)fenol (Bileşik **58**) (0,47 mmol)'den hareketle 2-metilbenzil bromür kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **1a**'ya göre sentezlendi. Madde sabit faz olarak hazır RediSep Silika kolonları (12g), hareketli faz olarak hekzan:EtOAc (60:40) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (Verim: %83).

Erime noktası: 103,4-105,2 °C.

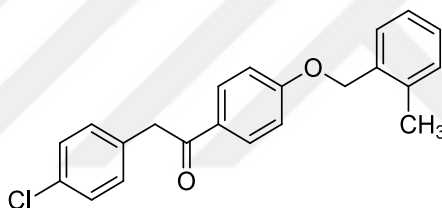
¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.37 (3H, s), 2.38 (3H, s), 5.03 (2H, s), 6.29 (1H, s), 6.94 (2H, d, J=8.4 Hz), 7.15 (2H, d, J=8.4 Hz), 7.18 (2H, d, J=8.4 Hz), 7.21-7.28 (5H, m), 7.39 (1H, m).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 13.48, 18.89, 68.85, 107.25, 115.11, 126.04, 126.63, 128.38, 128.59, 128.68, 129.10, 129.78, 130.43, 133.24, 134.06, 134.38, 136.65, 142.49, 149.13, 158.10.

C₂₄H₂₂ClN₂O için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 389,1421; bulunan: 389,1416.

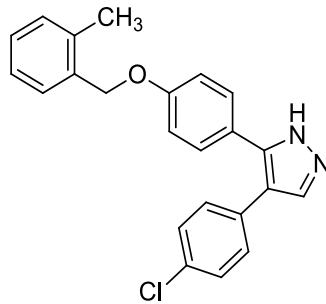
2-(4-Klorofenil)-1-(4-hidroksifenil)etanon (Bileşik 60)

2-(4-Klorofenil)-1-(4-metoksifenil)etanon (Bileşik **21**) (1,92 mmol) 'dan hareketle 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **6b**'ye göre sentezlendi (Verim: %72). CAS: 54419-40-8. Erime noktası: 196,5-198,2 °C [198 °C]^[109]. C₁₄H₁₂ClNO₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 247,0526; bulunan: 247,0524.

2-(4-Klorofenil)-1-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)etanon (Bileşik 61)

2-(4-Klorofenil)-1-(4-hidroksifenil) etanon (Bileşik **60**) (1 mmol) 'dan hareketle 2-metilbenzil bromür kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **1b**'ye göre sentezlendi (Verim: %73). Erime noktası: 139,0-141,0 °C. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.31 (3H, s), 4.33 (2H, s), 5.18 (2H, s), 7.13-7.27 (7H, m), 7.36-7.40 (3H, m), 8.01 (2H, d, J=8.4 Hz). C₂₂H₂₀ClO₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 351,1161; bulunan: 351,1152.

4-(4-Klorofenil)-5-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)-1H-pirazol (Bileşik 62)



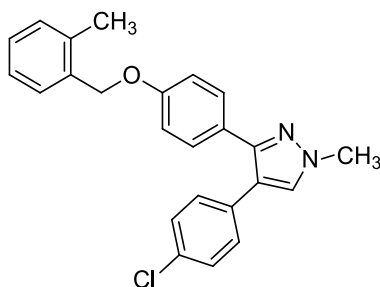
2-(4-Klorofenil)-1-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil) etanon (Bileşik **61**) (0,38 mmol)'dan hareketle hidrazin hidrat kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **8b**'ye göre sentezlendi. Madde sabit faz olarak hazır RediSep Silika kolonları (12g), hareketli faz olarak hekzan:EtOAc (70:30) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (Verim: %88).

Erime noktası: 127,8-129,8 °C.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.38 (3H, s), 5.05 (2H, s), 6.98 (2H, d, J=8.4 Hz), 7.22-7.30 (7H, m), 7.36-7.41 (3H, m), 7.65 (1H, s).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 18.90, 68.65, 115.10, 118.41, 123.08, 126.07, 128.42, 128.64, 128.97, 129.48, 129.58, 130.46, 131.51, 132.50, 134.42, 135.57, 136.69, 142.98, 159.24.

C₂₃H₂₀ClN₂O için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 375,1264; bulunan: 375,1266.

4-(4-Klorofenil)-1-metil-3-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)-1H-pirazol (Bileşik 63)

2-(4-Klorofenil)-1-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil) etanon (Bileşik **61**) (0,59 mmol)'dan hareketle metilhidrazin kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **8b**'ye göre sentezlendi (reaksiyon ortamına katalitik miktarda sülfürik asit (15 μ l) eklenmiştir). Madde sabit faz olarak hazır RediSep Silika kolonları (12g), hareketli faz olarak hekzan:EtOAc (55:45) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (Verim:%56).

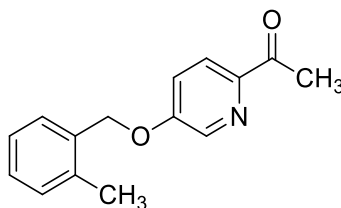
Erime noktası: 142,2-143,4 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 2.41 (3H, s), 3.78 (3H, s), 5.08 (2H, s), 7.06 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.11 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.18 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.21 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.23-7.31 (3H, m), 7.42-7.44 (1H, m), 7.70 (1H, s).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 18.92, 37.21, 68.70, 115.28, 119.81, 122.30, 126.10, 128.52, 128.59, 128.72, 130.50, 131.36, 131.76, 131.77, 134.32, 136.75, 137.19, 139.89, 159.41.

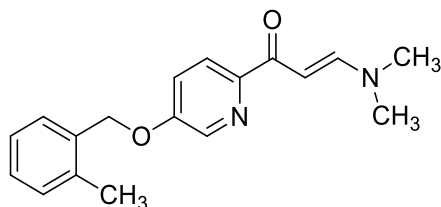
$\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{ClN}_2\text{O}$ için; HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ hesaplanan: 389,1421; bulunan: 389,1429.

1-(5-((2-Metilbenzil)oksi)piridin-2-il)etanon (Bileşik 64)

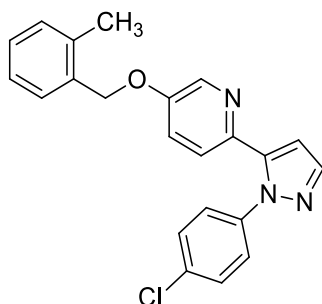


1-(5-Hidroksipiridin-2-il)etanon (1,8 mmol)'dan hareketle 2-metilbenzil bromür kullanılarak 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **1a**'ya göre sentezlendi (Verim: %82). Erime noktası: 49,5-51,3 °C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 2.32 (3H, s), 2.56 (3H, s), 5.26 (2H, s), 7.18-7.28 (3H, m), 7.42 (1H, d, $J=7.6$ Hz), 7.63 (1H, dd, $J=8.8, 2.8$ Hz), 7.96 (1H, d, $J=8.8$ Hz), 8.46 (1H, d, $J=2.8$ Hz). $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{NO}_2$ için; HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ hesaplanan: 242,1181; bulunan: 242,1173.

3-(Dimetilamino)-1-(5-((2-metilbenzil)oksi)piridin-2-il)prop-2-en-1-on (Bileşik 65)



1-(5-((2-Metilbenzil)oksi)piridin-2-il)etanon (Bileşik **64**) (1,0 mmol)'dan hareketle 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **7**'ye göre sentezlendi (Verim: %91). Erime noktası: 153,6-155,1 °C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 2.32 (3H, s), 2.87 (3H, bs), 3.13 (3H, bs), 5.21 (2H, s), 6.32 (1H, d, $J=12.8$ Hz), 7.17-7.26 (3H, m), 7.41 (1H, d, $J=7.6$ Hz), 7.56 (1H, dd, $J=8.4, 3.2$ Hz), 7.72 (1H, d, $J=12.8$ Hz), 7.96 (1H, d, $J=8.4$ Hz), 8.36 (1H, d, $J=3.2$ Hz). $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2$ için; HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ hesaplanan: 297,1603; bulunan: 297,1591.

2-(1-(4-Klorofenil)-1H-pirazol-5-il)-5-((2-metilbenzil)oksi)piridin (Bileşik 66)

3-(Dimetilamino)-1-(5-((2-metilbenzil)oksi)piridin-2-il)prop-2-en-1-on (Bileşik 65) (0,68 mmol)'dan hareketle 3.1.2'de verilen sentez yöntemi **8a**'ya göre sentezlendi ve saflaştırıldı (Verim: %84).

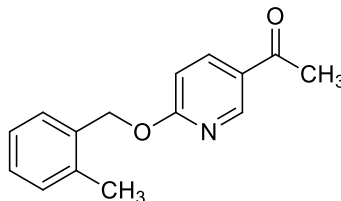
Erime noktası: 108,4-110,4 °C.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.38, (3H, s), 5.09 (2H, s), 6.68 (1H, d, J=1.4 Hz), 7.17 (1H, d, J=8.8 Hz), 7.21-7.34 (8H, m), 7.38 (1H, d, J=7.6 Hz), 7.72 (1H, d, J=1.4Hz), 8.34 (1H, d, J=2.4 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 18.90, 69.11, 108.55, 121.68, 124.11, 126.16, 126.38, 128.72, 128.80, 128.97, 130.61, 133.12, 133.58, 136.76, 137.99, 139.06, 140.53, 141.91, 142.00, 154.36.

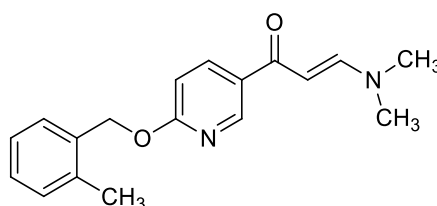
C₂₂H₁₉ClN₃O için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 376,1217; bulunan: 376,1207.

1-(6-((2-Metilbenzil)oksi)piridin-3-il)etanon (Bileşik 67)

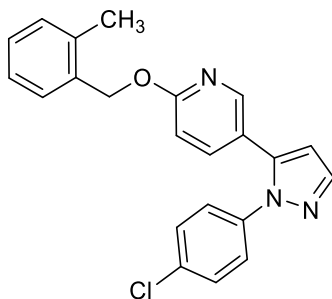


2-Metilbenzil alkol ve NaH, azot atmosferi altında kuru THF içerisinde çözülerek buz banyosunda 1 saat karıştırıldı. Sonra reaksiyon ortamına 1-(6-kloro-3-piridinil)-1-etanon'un THF içindeki çözeltisi ilave edilerek oda ısısında gece boyu karıştırıldı. Ertesi gün THF uçurulup reaksiyon içeriği sulu amonyum klorür çözeltisi içine alındı ve diklorometan ile ekstre edildi, Na₂SO₄ ile kurutuldu. Diklorometan vakum altında uçuruldu. Oluşan ham ürün sabit faz olarak RediSep Silika kolonları (12 g), hareketli faz olarak hekzan:etil asetat (70:30) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (Verim: %18). Erime derecesi: 56,4-58,0°C. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.31 (3H, s), 2.54 (3H, s), 5.42 (2H, s), 6.96 (1H, d, J=8.6 Hz), 7.15-7.25 (3H, m), 7.38 (1H, d, J=7.2 Hz), 8.17 (1H, dd, J=8.6, 2.6 Hz), 8.82 (1H, d, J=2.6 Hz). C₁₅H₁₆NO₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 242,1181; bulunan: 242,1183.

3-(Dimetilamino)-1-(6-((2-metilbenzil)oksi)piridin-3-il)prop-2-en-1-on (Bileşik 68)



1-(6-((2-Metilbenzil)oksi)piridin-3-il)etanon (Bileşik 67)'dan hareketle 3.1.2'de verilen sentez yöntemi 7'ye göre sentezlendi (Verim: %71). Erime derecesi: 109,3-111,4°C. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.31 (3H, s), 2.89 (3H, bs), 3.12 (3H, bs), 5.38 (2H, s), 5.80 (1H, d, J=12.2 Hz), 6.88 (1H, d, J=8.6 Hz), 7.15-7.25 (3H, m), 7.38 (1H, d, J=7.6 Hz), 7.69 (1H, d, J=12.2 Hz), 8.16 (1H, dd, J=8.6, 2.4 Hz), 8.74 (1H, d, J=2.4 Hz). C₁₈H₂₁N₂O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 297,1603; bulunan: 297,1591.

5-(1-(4-Klorofenil)-1H-pirazol-5-il)-2-((2-metilbenzil)oksi)piridin (Bileşik 69)

3-(Dimetilamino)-1-(6-((2-metilbenzil)oksi)piridin-3-il)prop-2-en-1-on (Bileşik 68)'dan hareketle 3.1.2'de verilen sentez yöntemi 8a'ya göre sentezlendi ve saflaştırıldı (Verim: %37).

Erime derecesi: 126,5-127,8°C.

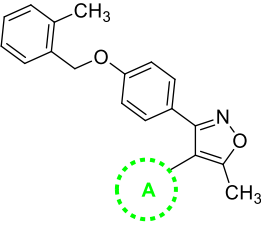
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 2.41 (3H, s), 5.38 (2H, s), 6.50 (1H, d, $J=1.8$ Hz), 6.74 (1H, d, $J=8.8$ Hz), 7.22- 7.28 (5H, m), 7.33-7.37 (3H, m), 7.42-7.44 (1H, m), 7.73 (1H, $J=1.8$ Hz), 8.14 (1H, d, $J=2.0$ Hz).

^{13}C -NMR spektrumu (CDCl_3): δ 18.98, 66.45, 108.07, 111.13, 119.83, 125.96, 126.33, 128.32, 129.09, 129.31, 130.35, 133.44, 134.77, 137.01, 138.35, 138.77, 139.90, 140.74, 146.58, 163.49.

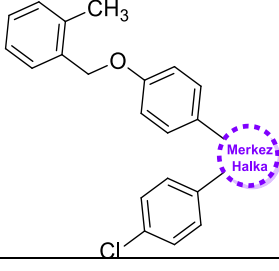
$\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{ClN}_3\text{O}$ için; HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ hesaplanan: 376,1217; bulunan: 376,1213.

4.2. Biyolojik Bulgular

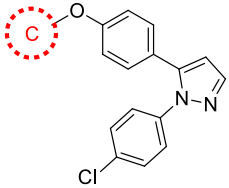
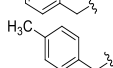
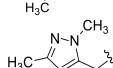
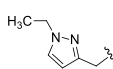
Çizelge 4.1. 4-Klorofenil Grubunun (A Halkası) Modifikasyonu Amacıyla Sentezlenen İzoksazol Türevi Bileşiklerin Sitotoksik Aktiviteleri

				
Bileşik No	A Halkası	IC ₅₀ µM		
		Huh7	MV	MCF7
EB38	4-Cl-Ph	1.3	3.2	3.8
5	4-NH ₂ -Ph	16.9	14.0	19.7
6	2-Cl-Ph	24.2	>20	9.9
7	4-F-Ph	16.7	>20	49.9
8	4-OMe-Ph	8.9	>20	12.8
9	4-Me-Ph	1.8	9.4	4.7
10	4-CN-Ph	6.7	>20	41.4
11	3-CF ₃ -Ph	19.0	>20	35.0
12	3-F-Ph	15.0	>20	33.0
13	2,4-diF-Ph	15.0	>20	31.0
14	2,4-diCl-Ph	8.2	>20	19.2
15	4-piridinil	>20	>20	>20

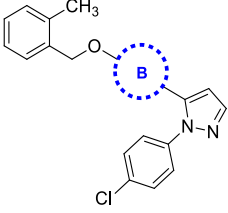
Çizelge 4.2. Merkez Halka Modifikasyonu Amacıyla Sentezlenen Bileşiklerin Sitotoksik Aktiviteleri

				
Bileşik No	Merkez Halka	IC ₅₀ µM		
		Huh7	MV	MCF7
EB38		1.3	3.2	3.8
20		2.04	3.88	3.6
24		1.5	20.1	86.2
27		>20	>20	>20
31		>20	>20	>20
36		0.8	3.71	1.5
51		2.8	9.2	11.9
55		20.4	>20	>20
59		3.94	9.6	11.8
62		8.36	11.0	17.5
63		6.7	12.0	14.4

Çizelge 4.3. C Halkası Modifikasyonu Amacıyla Sentezlenen Pirazol Türevi Bileşiklerin Sitotoksik Aktiviteleri

				
Bileşik No	C Halkası	IC ₅₀ µM		
		Huh7	MV	MCF7
36		0.8	3.71	1.5
37		>20	>20	>20
38		>20	>20	>20
39		>20	>20	>20
40		>20	>20	>20
41		>20	>20	>20
42		>20	>20	>20
43		>20	>20	>20
44		>20	>20	>20
45		>20	>20	>20

Çizelge 4.4. B Halkası Modifikasyonu Amacıyla Sentezlenen Pirazol Türevi Bileşiklerin Sitotoksik Aktiviteleri

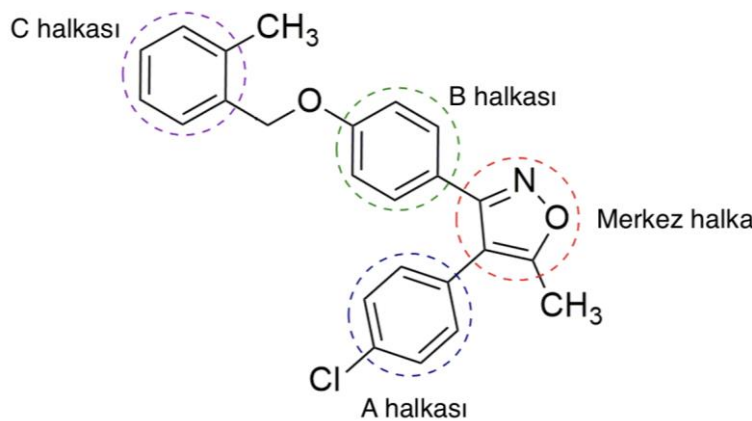
				
Bileşik No	B Halkası	IC ₅₀ µM		
		Huh7	MV	MCF7
36		0.8	3.71	1.5
66		2.04	7.12	21.7
69		>20	>20	>20

5. TARTIŞMA

5.1. Sentez Çalışmaları

EB38 öncü bileşiğinin optimizasyonu ile ilgili tez kapsamında elde edilen bileşiklerin sentez çalışmaları genel hatlarıyla 4 ana bölümden oluşmaktadır (Şekil 5.1):

1. A halkası (fenil grubu) modifikasyonları
2. Merkez halka modifikasyonları
3. Merkezde pirazol halkası içeren analogun C halkası modifikasyonları
4. Merkezde pirazol halkası içeren analogun B halkası modifikasyonları

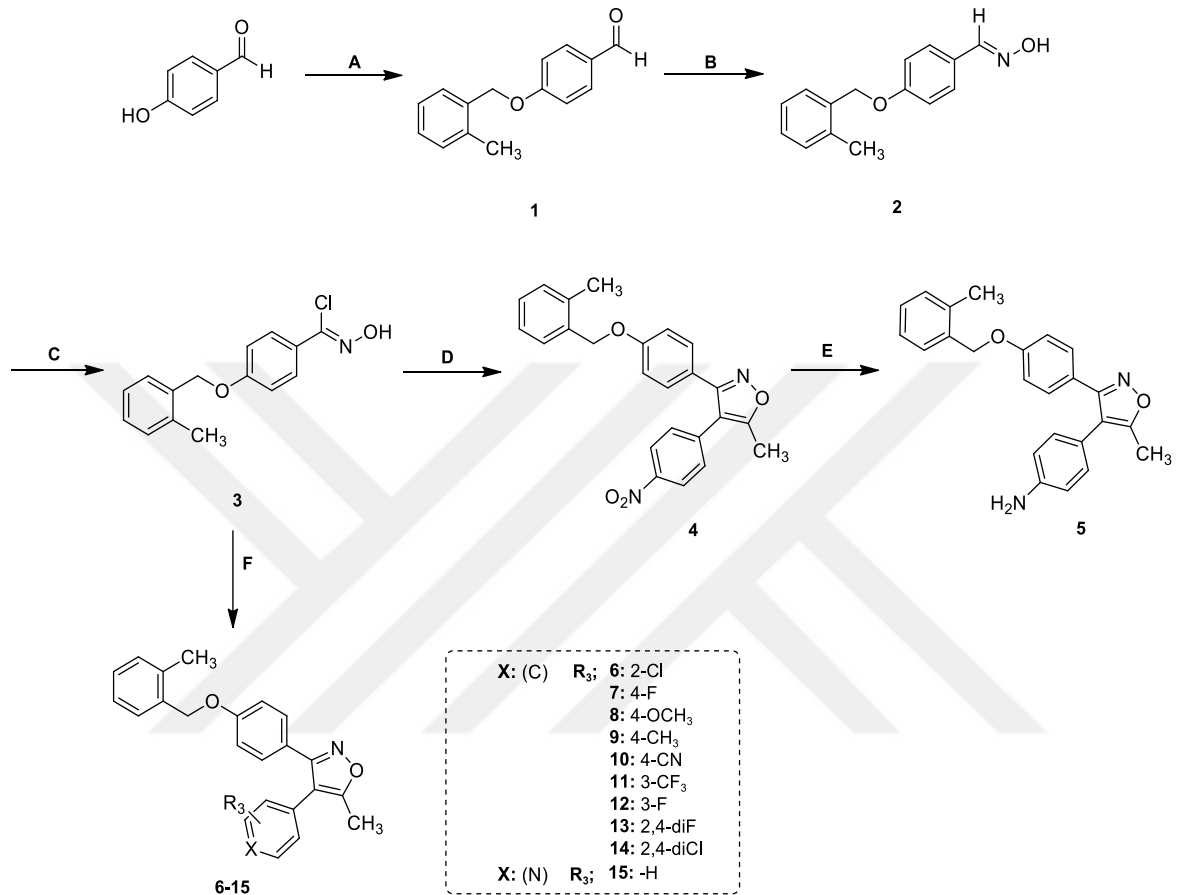


Şekil 5.1. EB38 molekülünün optimizasyon çalışmaları

5.1.1. 4-Klorofenil grubunun (A halkası) modifikasyonu amacıyla sentezlenen izoksazol türevi bileşiklerin sentez çalışmaları

Molekül üzerinde 4-klorofenil grubunun (A halkası) modifikasyonları için uygulanan sentez prosedürü Şekil 5.2’de gösterilmiştir. 4-hidroksibenzaldehitin, 2-metilbenzil bromür ile yer değiştirme reaksiyonu sonucu Bileşik 1 elde edilmiştir. Bileşik 1’in hidroksil aminle reaksiyonu ile oksim türevi Bileşik 2 oluşmuştur. Oksim türevinin N-klorosüksinimit aracılığı ile klorlanması sonucu Bileşik 3 elde edilmiştir. Bileşik 3 trietilamin ile eter içinde reaksiyona sokularak nitriloksit ara ürünü elde edilmiş ve oldukça reaktif ve dayanıksız olan bu ara ürün doğrudan bir sonraki basamakta kullanılmıştır. Nitriloksit bileşiği ile fenilaseton türevlerinin sodyum hidrür varlığında

kuru tetrahidrofuran (THF) içindeki reaksiyonu sonucunda izoksazol halkası kapanmış ve Bileşik 4, 6-15 elde edilmiştir. Bileşik 4'ün $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ile redüksiyonu ile Bileşik 5 elde edilmiştir (Şekil 5.2).



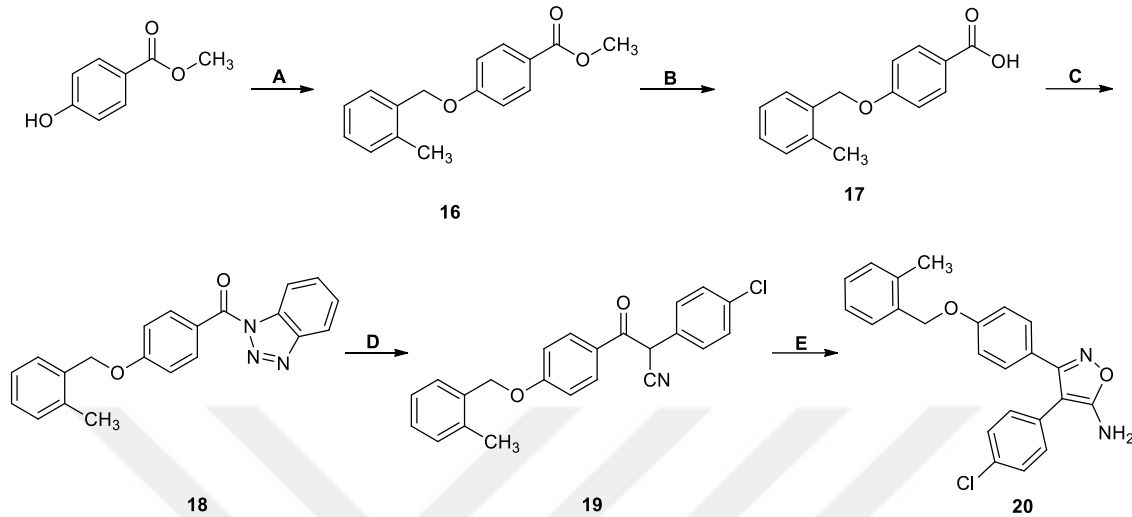
(A) 2-metilbenzil bromür, K_2CO_3 , MeCN, 120°C; (B) $\text{H}_2\text{NOH} \cdot \text{HCl}$, NaOH, H_2O , EtOH; (C) NCS, DMF; (D) i. Et_3N , dietileter ii. 4-nitrofenilaseton, NaH, THF, 0°C; (E) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, EtOH, reflaks; (F) i. Et_3N , dietileter ii. Fenilaseton türevleri, NaH, THF, 0°C

Şekil 5.2. 2-metilbenziloksi fenil yapısı sabit tutularak izoksazol halkasının 4. konumundan türevlendirilen bileşiklerinin sentezi

5.1.2. 3,4-Diaril-5-aminoizoksazol merkez halkası taşıyan EB38 analogunun sentez çalışması

Öncü bileşikte merkezi halka üzerindeki 5-metil grubu yerine 5-amino grubu taşıyan analogun sentezi için 4-hidroksimetil benzoat 2-metilbenzil bromürle alkilenmiş (Bileşik 16) ve daha sonra hidroliz edilerek asit türevi (Bileşik 17) elde edilmiştir. Asit türevinin benzotriazol ile reaksiyonu sonucunda Bileşik 18 elde edilmiştir. Daha sonra bu bileşiğin lityum bis(trimetilsilil)amit (LiHMDS) varlığında 4-

klorofenilasetonitril ile reaksiyonu ile Bileşik 19 elde edilmiştir. Bileşik 19 hidroksilamin ile kaynatılarak Bileşik 20'ye ulaşılmıştır (Şekil 5.3).

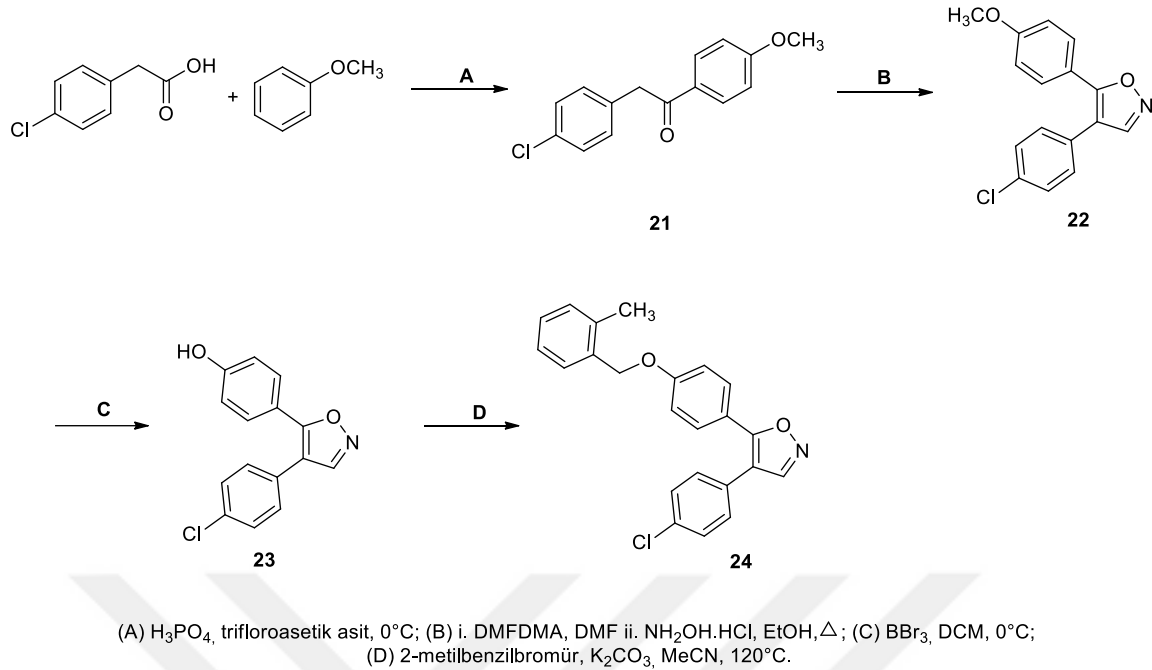


(A) 2-metilbenzilbromür, MeCN, 120°C; (B) LiOH.H₂O, MeOH:H₂O, reflaks; (C) i) okzalil klorür, kat. DMF ii) benzotriazol, DCM; (D) 4-klorofenilasetonitril, LHDMS, THF, -70°C; (E) H₂NOH.HCl, EtOH, Δ

Şekil 5.3. 3,4-diaril-5-aminoizoksazol merkezi halkası taşıyan Bileşik 20'nin sentezi

5.1.3. 4,5-Diarilizoksazol merkez halkası taşıyan EB38 analogunun sentez çalışmaları

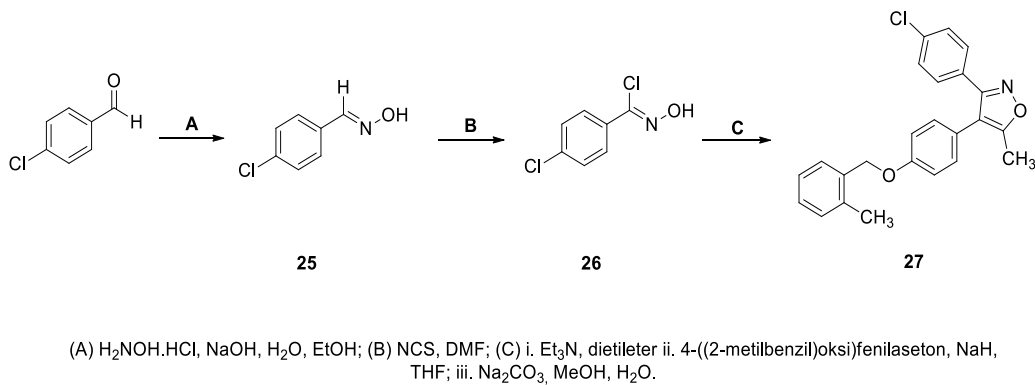
Öncü bileşikten farklı olarak merkezi halkada metil taşımayan 4,5-diarilizoksazol türevi Bileşik 24'ün sentezi için Bileşik 21'den başlanmıştır. 4-klorofenil asetik asit ve anisolün fosforik asit ve trifloroasetik anhidriti içeren ortamda reaksiyonu ile Bileşik 21 elde edilmiştir. Bileşik 21'in DMFDMA ile reaksiyonu ardından hidroksil aminle reaksiyonu sonucu Bileşik 22 elde edilmiştir. BBr₃ rejanı ile eter hidrolizi gerçekleştirilip fenolik hidroksilin alkilasyonu sonucunda ise Bileşik 24'e ulaşılmıştır (Şekil 5.4).



Şekil 5.4. 4,5-diarilizoksazol merkezi halkası taşıyan Bileşik 24'ün sentezi

5.1.4. 5-Metil-3,4-diarilizoksazol merkez halkası taşıyan EB38 analogunun sentez çalışmaları

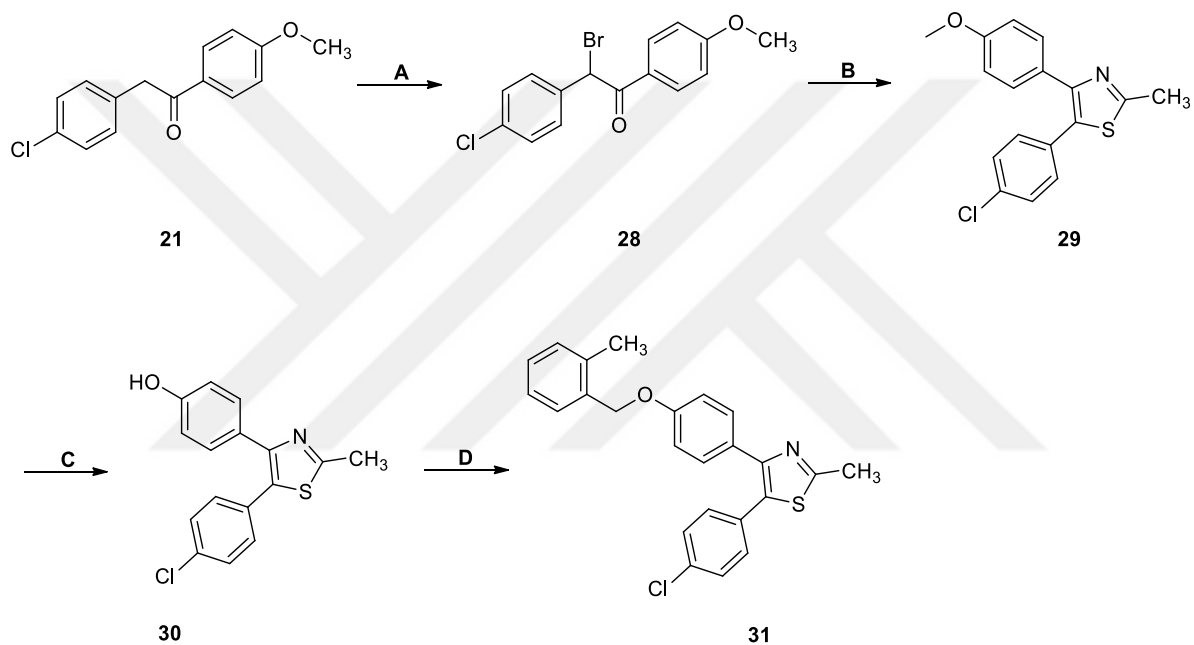
EB38'e göre A ve C halkası konumları farklı olan analogu sentezlemek amacıyla 4-klorobenzaldehitten hareketle hidroksilamin varlığında Bileşik 25 elde edilmiştir. Ardından N-klorosüksinimit ile muamele edilip Bileşik 26 sentezlenmiştir. Bileşik 26'dan elde edilen nitril oksit türevi 4-((2-metilbenzil)oksi)fenilaseton ile reaksiyona sokularak aromatzasyon reaksiyonu sonucunda Bileşik 27'ye ulaşılmıştır (Şekil 5.5).



Şekil 5.5. 5-metil-3,4 diarilizoksazol merkez halkası taşıyan Bileşik 27'nin sentezi

5.1.5. 2-Metil-4,5-diariltiyazol merkez halkası taşıyan EB38 analogunun sentez çalışması

Merkezi halkada 2-metil-4,5-diariltiyazol taşıyan türevin sentezi için Bileşik 21 asetik asit içinde bromlanmış ve Bileşik 28 elde edilmiştir. Elde edilen bileşiğin tiyoasetamit ile reaksiyonu sonucunda halka kapatılarak Bileşik 29'a ulaşılmıştır. Bileşik 29'daki metil eter yapısı hidroliz edilerek sentezlenen Bileşik 30'un 2-metilbenzil bromürle muamelesi sonucunda Bileşik 31 elde edilmiştir (Şekil 5.6).



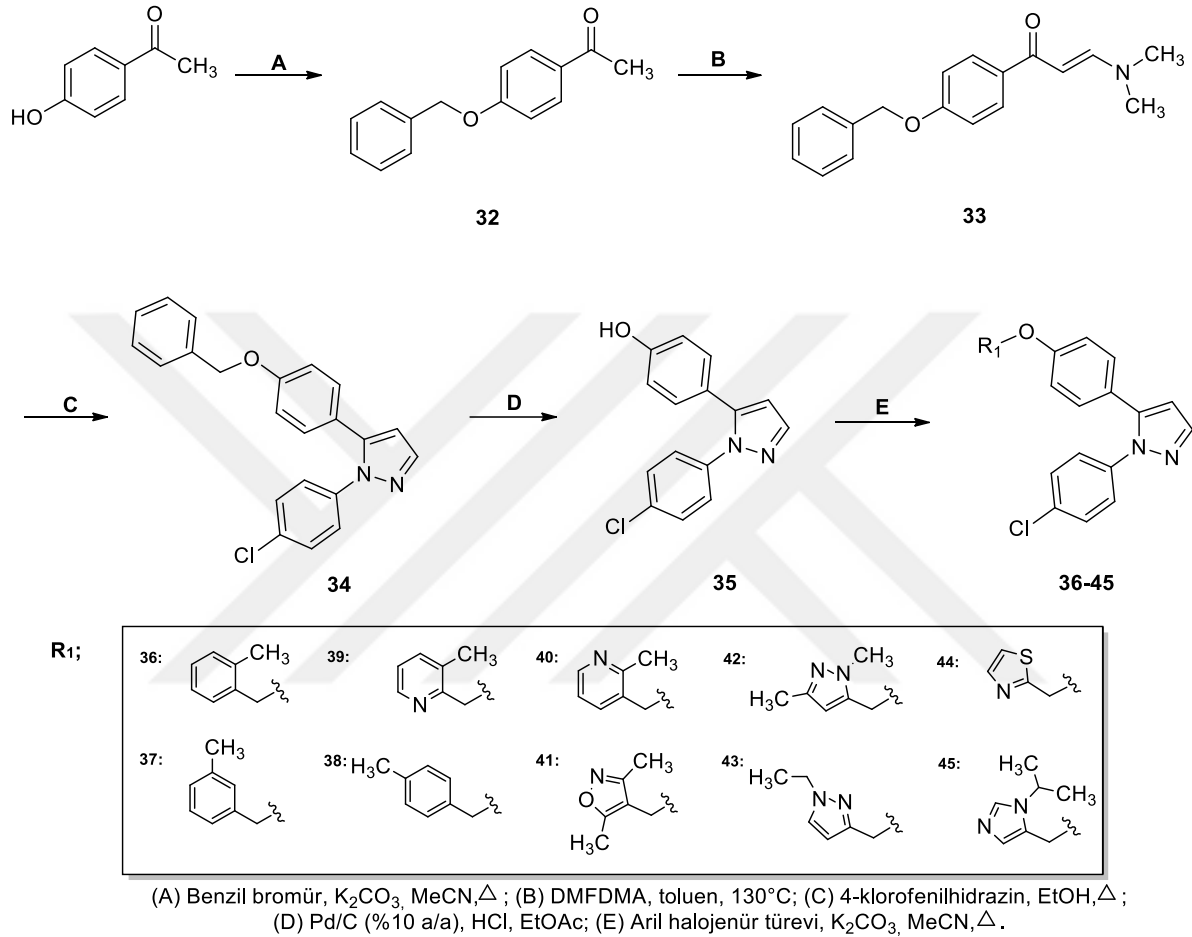
(A) Br₂, AcOH; (B) tiyoasetamit, EtOH, Δ ; (C) BBr₃, DCM, 0°C; (D) 2-metilbenzil bromür, K₂CO₃, MeCN, Δ .

Şekil 5.6. 2-metil-4,5 diariltiyazol merkez halkası taşıyan Bileşik 31'in sentezi

5.1.6. C halkası modifikasyonu amacıyla sentezlenen pirazol türevi bileşiklerin sentez çalışmaları

Merkez halkada izoksazol halkası yerine pirazol halkasının izosterik değişiminin aktiviteye nasıl yansıtacağını görmek amacıyla merkez halkada pirazol içeren bileşikler sentezlenmiştir. Pirazol merkez halkası taşıyan analogun C halkasında modifikasyon yapmak amacıyla 4-hidroksiasetofenon öncelikle benzil bromürle reaksiyona sokulmuş, elde edilen Bileşik 32'nin DMFDMA ile muamelesi sonucu Bileşik 33'e ulaşılmıştır. Bileşik 33'ün 4-klorofenilhidrazin ile reaksiyonu sonucu

pirazol halkası kapanmış ve Bileşik 34'e ulaşılmıştır. Yapılacak türevlendirmeler için benzil grubunun katalitik hidrojenasyon ile uzaklaştırılmasıyla elde edilen Bileşik 35'in çeşitli aril halojenür türevleri ile reaksiyonu ile final bileşikler (Bileşik 36-45) sentezlenmiştir (Şekil 5.7).

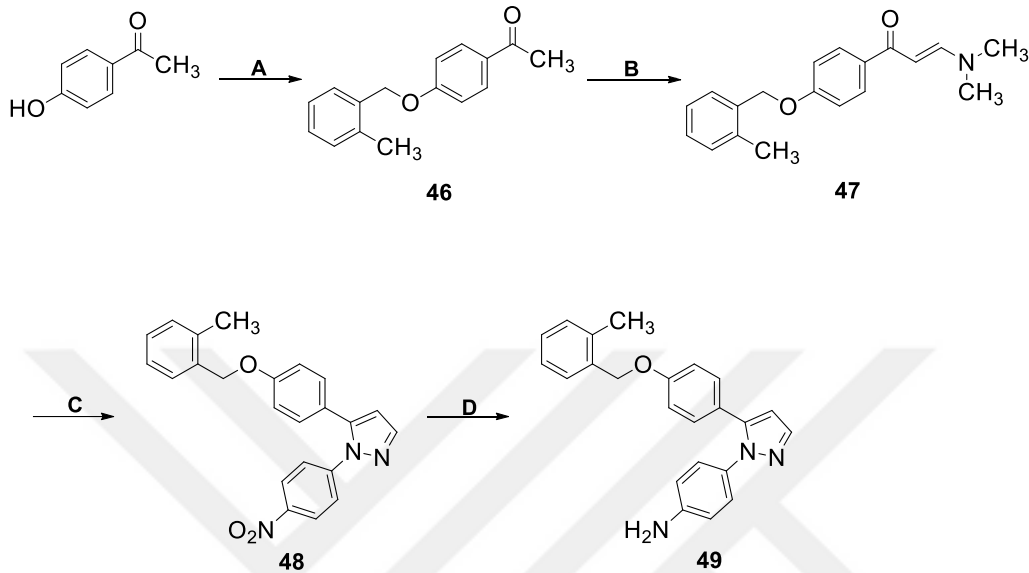


Şekil 5.7. 4. konumunda 4-klorofenil yapısı sabit tutularak R₁ modifikasyonları gerçekleştirilen pirazol türevlerinin sentezi

5.1.7. A halkası modifikasyonu amacıyla sentezlenen pirazol türevi bileşiklerin sentez çalışmaları

Pirazol merkez halkası taşıyan analogun A halkasında 4-klorofenil grubundaki halojen atomu klorun yerine hidrojen bağı yapma kapasitesi olan ve bileşiğe elektronik açıdan farklı bir özellik kazandırmak ve bu modifikasyonun aktiviteye olan etkisini incelemek amacıyla 4-aminofenil motifi içeren Bileşik 49 sentezlenmiştir. Sentez için öncelikle 4-hidroksiasetofenon 2-metilbenzil bromürle reaksiyona sokulmuş, elde edilen Bileşik 46'nın DMFDMA ile muamelesi sonucu Bileşik 47 elde

edilmiştir. Ardından 4-nitrofenilhidrazin ile yapılan halka kapama reaksiyonu sonucu Bileşik 48'e ulaşılmıştır. Nitro grubunun redüksiyonu ile 4-aminofenil grubu içeren Bileşik 49 sentezlenmiştir (Şekil 5.8).

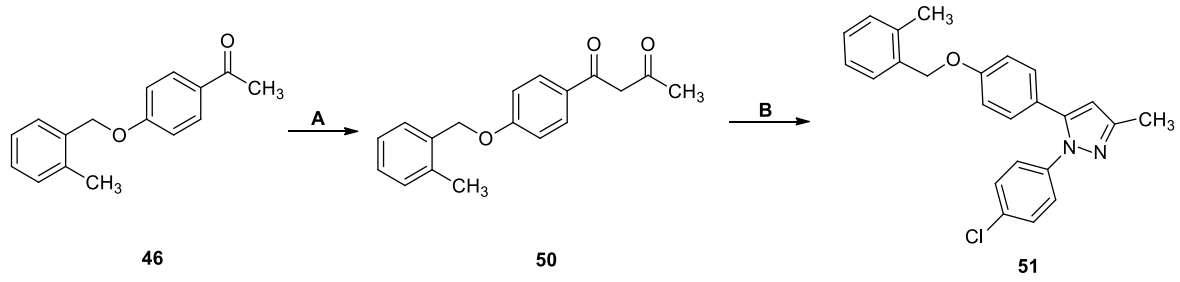


(A) 2-metilbenzil bromür, K₂CO₃, MeCN (B) DMFDMA, toluen, 130°C; (C) 4-nitrofenilidrazin, EtOH, Δ; (D) SnCl₂·2H₂O, EtOH, Δ.

Şekil 5.8. 1,5-diarilpirazol merkezi halkası taşıyan Bileşik 49'un sentezi

5.1.8.3-Metil-1,5-diarilpirazol merkez halkası taşıyan Bileşik 51'in sentez çalışması

3-metil-1,5-diarilpirazol içeren final bileşiğini elde etmek amacıyla başlangıç maddesi olan Bileşik 46'nın NaH varlığında EtOAc ile reaksiyonu sonucunda Bileşik 50 sentezlenmiştir. Bileşik 50 metanol içinde Et₃N varlığında 4-klorofenilhidrazin.HCl ile reaksiyona sokularak pirazol halkası kapanmış ve Bileşik 51 elde edilmiştir (Şekil 5.9).

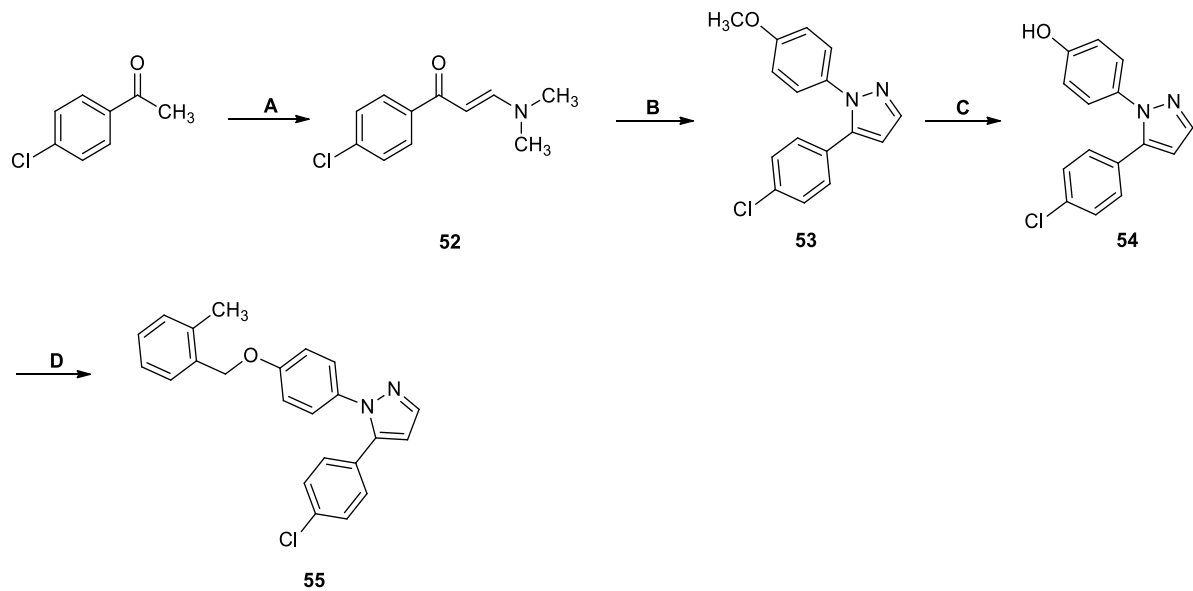


(A) NaH, EtOAc; (B) 4-klorofenilhidrazin.HCl, Et₃N, MeOH, Δ.

Şekil 5.9. 3-metil-1,5-diarilpirazol merkezi halkası taşıyan Bileşik 51'in sentezi

5.1.9. 1,5-Diarilpirazol merkez halkası taşıyan Bileşik 55'in sentez çalışması

Merkez halkada pirazol halkası taşıyan EB38 analogu Bileşik 36'nın A ve C halkası konumları farklı olan türevini sentezlemek amacıyla 4-klorofenilasetonun DMFDMA ile reaksiyonu ile Bileşik 52 elde edilmiştir. Bu bileşiğin 4-metoksifenilhidrazin ile reaksiyonunu ile Bileşik 53 elde edilmiş, sonrasında BBr₃ ile eter hidrolizi gerçekleştirilmiştir. Ardından fenolik hidroksilin (Bileşik 54) alkilasyonu sonucunda Bileşik 55'e ulaşılmıştır (Şekil 5.10).

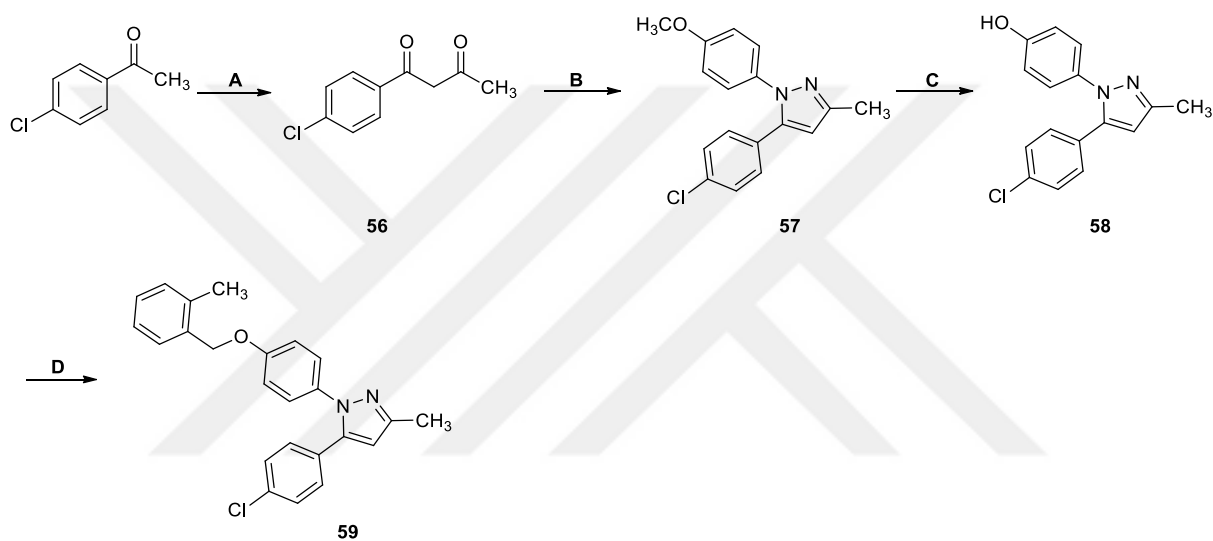


(A) DMFDMA, toluen, 130°C; (B) 4-metoksifenilhidrazin.HCl, EtOH, Δ; (C) BBr₃, DCM, 0°C;
(D) 2-metilbenzilbromür, K₂CO₃, MeCN, 120°C

Şekil 5.10. 1,5-diarilpirazol merkezi halkası taşıyan Bileşik 55'in sentezi

5.1.10. 3-Metil-1,5-diarilpirazol merkez halkası taşıyan Bileşik 59'un sentez çalışması

Bileşik 55'in pirazol halkasının 3. konumunda metil taşıyan türevinin sentezi için, 4-klorofenilasetondan NaH ve etilasetat varlığında elde edilen diketonun (Bileşik 56), 4-metoksifenilhidrazin ile reaksiyonu ile Bileşik 57 elde edilmiştir. Bu bileşiğin BBr₃ ile eter hidrolizi gerçekleştirilip fenolik hidroksilin alkilasyonu sonucunda Bileşik 59'a ulaşılmıştır (Şekil 5.11).

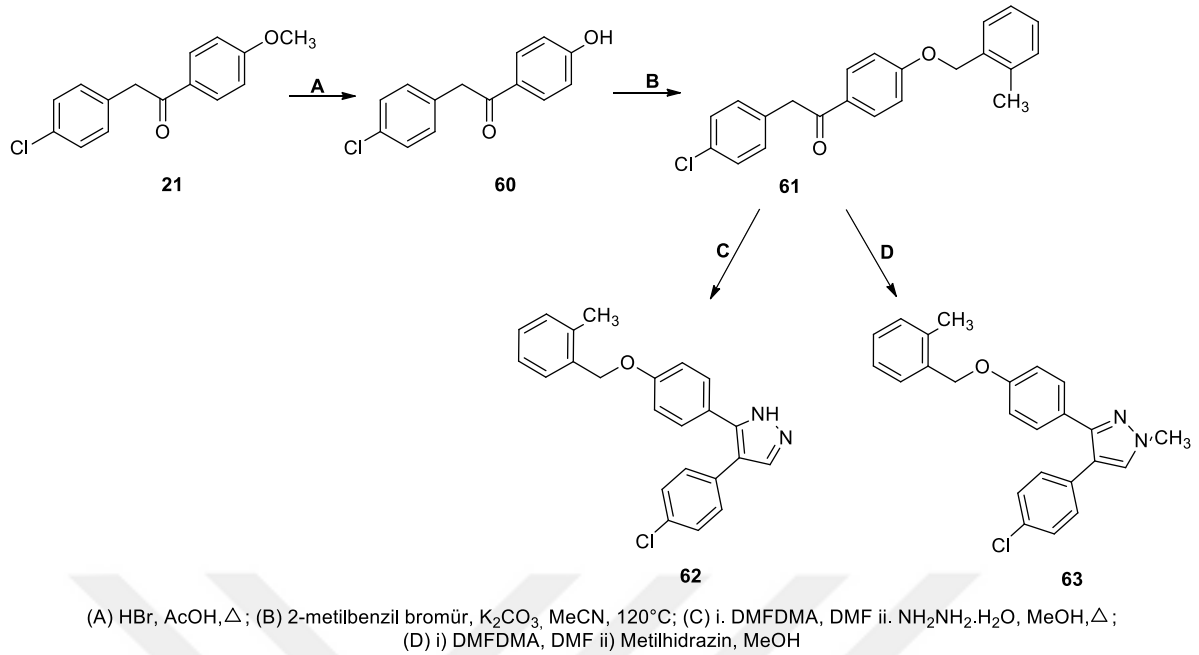


(A) NaH, EtOAc; (B) 4-metoksifenilhidrazin.HCl, Et₃N, MeOH, Δ; (C) BBr₃, DCM, 0°C; (D) 2-metilbenzilbromür, K₂CO₃, MeCN, 120°C

Şekil 5.11. 3-metil-1,5-diarilpirazol merkezi halkası taşıyan Bileşik 59'un sentezi

5.1.11. 4,5-Diarilpirazol merkez halkası taşıyan EB38 analoglarının sentez çalışmaları

Merkez halkada pirazol halkası taşıyan ancak aril süstitüsyonlarını farklı konumlarda içeren bileşikler sentezlemek amacıyla başlangıç maddesi olan Bileşik 21'in eter grubunun BBr₃ rejanı kullanılarak hidrolizi ile fenol türevi (Bileşik 60) elde edilmiş, bu bileşiğin 2-metilbenzil bromürle alkilasyonu sonucunda Bileşik 61 sentezlenmiştir. Bileşik 61 DMFDMA ile reaksiyona sokularak bir ara ürün (2-(4-klorofenil)-3-(dimetilamino)-1-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)prop-2-en-1-on) elde edilmiştir. Bu ara ürünün hidrazin hidrat ile reaksiyonu sonucunda Bileşik 62'ye; metilhidrazin ile reaksiyonu sonucunda ise Bileşik 63'e ulaşılmıştır (Şekil 5.12).

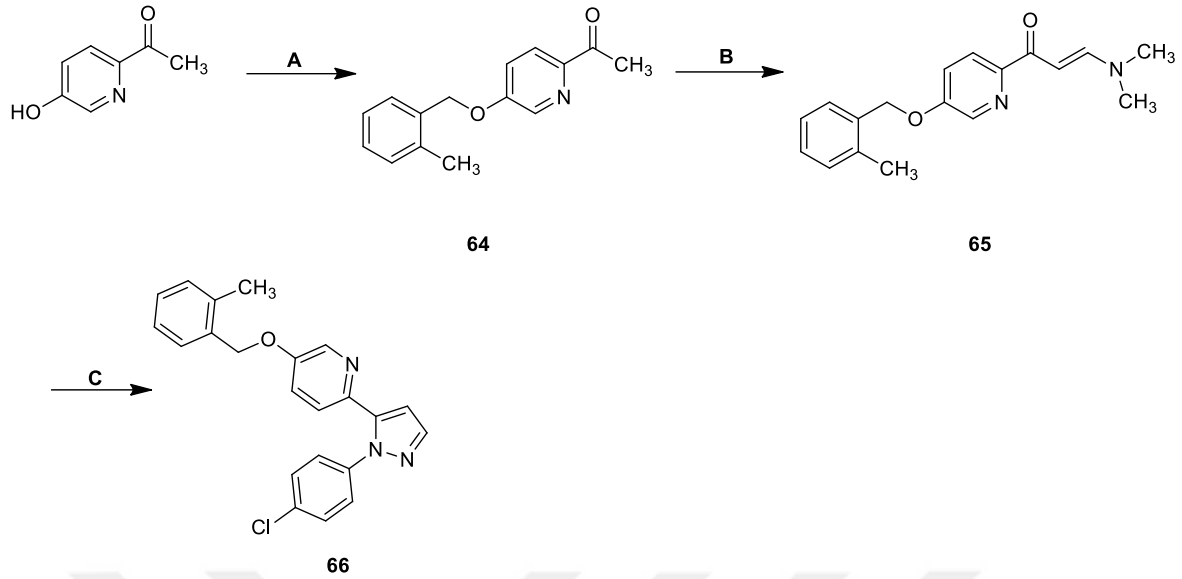


Şekil 5.12. 4,5-diarilpirazol ve 2-metil-4,5-diarilpirazol merkezi halkası taşıyan Bileşik 62 ve 63'ün sentezi

5.1.12. B halkası modifikasyonu amacıyla sentezlenen pirazol türevi bileşiklerin sentez çalışmaları

Pirazol merkez halkası taşıyan Bileşik 36'nın B halkasında fenil yerine piridin izosteri getirilerek molekülün lipofilitesini iyileştirme hedeflenmiştir. Bileşik 66 ve 69 bu amaçla sentezlenen bileşiklerdir.

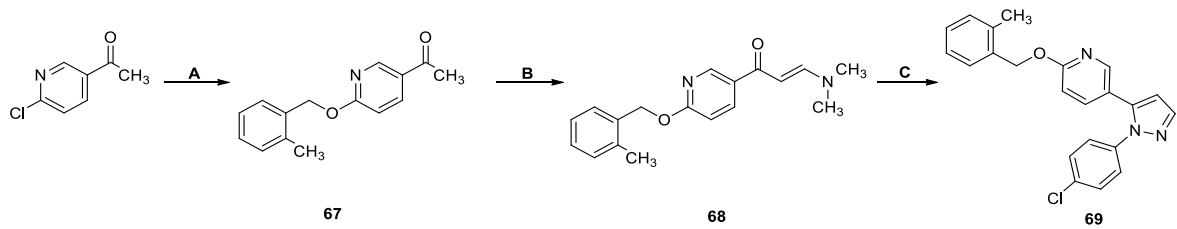
Başlangıç maddesi olarak 5-hidroksipiridin etanon'un 2-metilbenzil bromürle reaksiyonu sonucu Bileşik 64 elde edilmiştir. Bir sonraki basamakta ise Bileşik 64, DMFDMA ile muamele edilip Bileşik 65 sentezlenmiş ve 4-klorofenilhidrazinle halka kapama reaksiyonu sonucu Bileşik 66'ya ulaşılmıştır (Şekil 5.13).



(A) 2-metilbenzilbromür, K_2CO_3 , MeCN, 120°C; (B) DMFDMA, toluen, 130°C; (C) 4-klorofenilhidrazin, EtOH, Δ .

Şekil 5.13. 1,5-diarilpirazol merkezi halkası taşıyan Bileşik 66'nın sentezi

Bir diğer pirazol merkez halkası taşıyan ve B halkasında piridin motifi içeren Bileşik 69'un sentezi için başlangıç maddesi olarak 1-(6-kloropiridin-3-il)etanon 2-metilbenzilalkol ile NaH varlığında kuru THF içerisinde reaksiyona sokularak Bileşik 67 sentezlenmiş ardından bu bileşik DMFDMA ile muamele edilip Bileşik 68 elde edilmiştir. Bileşik 68 ile 4-klorofenilhidrazinin halka kapama reaksiyonu sonucu Bileşik 69'a ulaşılmıştır (Şekil 5.14).



(A) 2-metilbenzilalkol, NaH, kuru THF 0°C; (B) DMFDMA, toluen, 130°C; (C) 4-klorofenilhidrazin, EtOH, Δ .

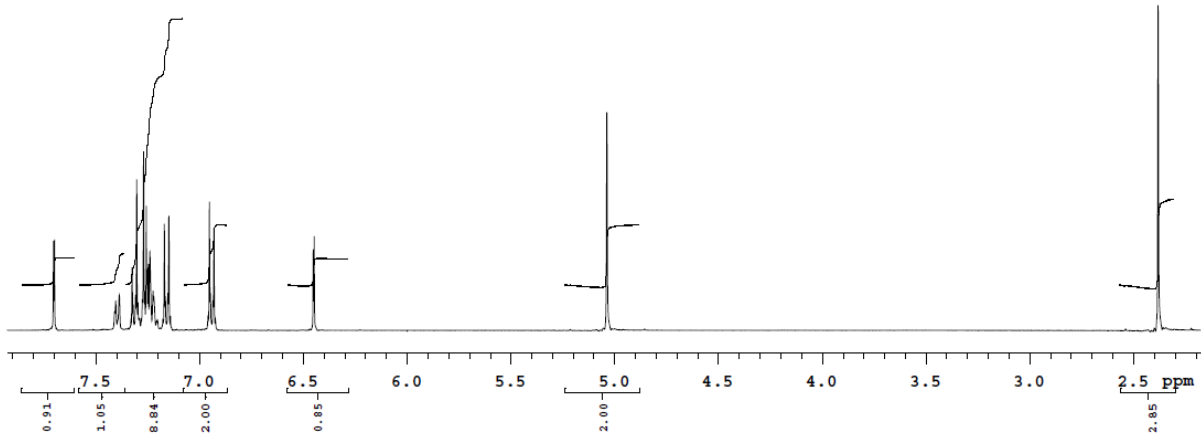
Şekil 5.14. 1,5-diarilpirazol merkezi halkası taşıyan Bileşik 69'un sentezi

5.1.13. Sentezlenen bileşiklerin yapı aydınlatma çalışmaları ve Bileşik 36'nın ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen sentez çalışmaları sonucunda; 21 tanesi orijinal olmak üzere 36 tane ara bileşiğin ve tamamı orijinal 33 tane final bileşiğin sentezleri tamamlanmış, bileşiklerin kimyasal yapıları uygun analitik yöntemlerle açıklanmıştır.

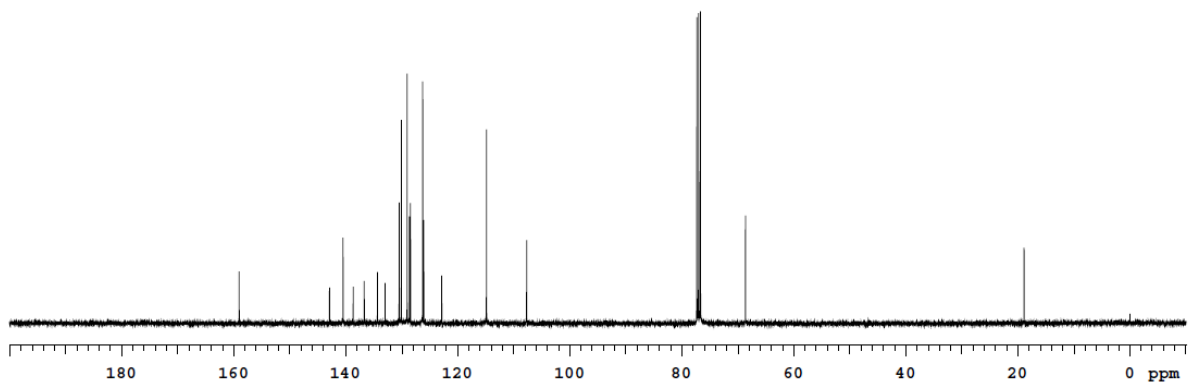
Sentezlenen ara ürünlerin yapılarının aydınlatılmasında ^1H -NMR spektrumları ve HRMS sonuçları kullanılmış, final bileşiklerin yapıları ise ^1H -NMR, ^{13}C -NMR spektrumları ve HRMS sonuçları ile aydınlatılmıştır.

Bu amaçla tez çalışmasının en aktif bileşiği olan Bileşik 36'nın 400 MHz frekansta ve CDCl_3 (dötero kloroform) içerisinde alınan ^1H -NMR spektrumunda; 2-metilbenzil halkasına bağlı $-\text{CH}_3$ protonları 2.38 ppm'de 3H değerinde, $-\text{CH}_2$ -protonları ise 5.04 ppm'de 2H değerinde singlet olarak gözlenmiştir. Aromatik sahadaki protonlar incelendiğinde pirazol halkasının 4. konumundaki protonun 6.4 ppm'de $J= 2.0$ Hz etkileşim sabiti ile dublet sinyal verdiği gözlenmiştir. 6.94 ve 7.16 ppm'de 2-metilbenzil ve pirazol halkalarına köprü olan p-süstitüe benzene ait protonların $J=8.8$ Hz etkileşim sabiti ile 2H değerinde birer dublet sinyal verdiği gözlenmiştir. 7.21-7.29 ppm aralığında 2-metilbenzilin aromatik protonları ve 4-klorofenilin bazı protonları multipet (5H) olarak sinyal verdikleri görülmektedir. Diğer bir p-disüstitüe benzene ait 2H değerindeki protonların 7.32 ppm'de $J=8.8$ Hz etkileşim sabiti ile bir dublet sinyal verdiği gözlenmiştir. 7.38-7.41 ppm aralığında yine 2-metilbenzil yapısının bir protonu multipet sinyal vermiştir. 7.71 ppm'de ise pirazol halkasının 3. konumundaki protonun $J= 2.0$ Hz etkileşim sabiti ile dublet sinyal verdiği gözlenmiştir (Resim 5.1).



Resim 5.1. Bileşik 36'nın ^1H -NMR spektrumu

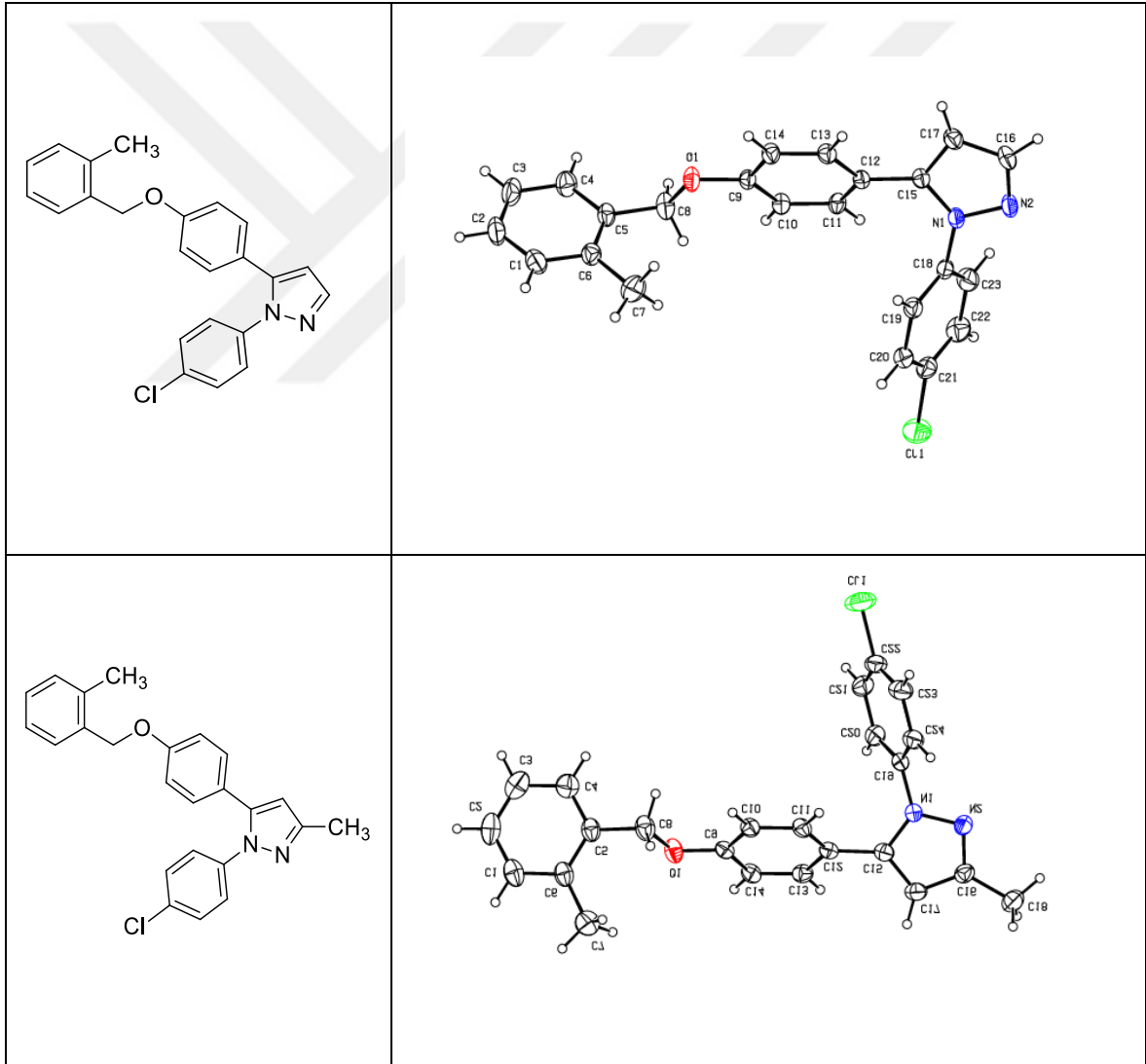
Bileşik 36'nın CDCl_3 içinde alınan ^{13}C -NMR spektrumunda; moleküldeki metil karbona ait sinyal 18.90, oksijene komşu metilene ait sinyal 68.65 ppm değerlerinde gözlemlenmiştir. Aromatik sahadaki karbonlara ait pikler ise 107-159 ppm'ler arasında gözlenmiştir. Bu pikler arasında 107.72 ppm'deki sinyalin pirazol halkasının 4.konumundaki karbona ait olduğu, 159.04 ppm'deki sinyalin ise 2-metilbenziloksi süstitüentinin bağlandığı fenil karbonuna ait olduğu düşünülmektedir (Resim 5.2).



Resim 5.2. Bileşik 36'nın ^{13}C -NMR spektrumu

5.1.14. Bileşik 36 ve Bileşik 51'in moleköl yapılarının tek kristal X-ışını kırınımı yöntemi ile aydınlatılması

Merkezi heterosiklik halka üzerinde visinal konumlarda aril grupları içeren Bileşik 36 ve Bileşik 51'in daha ileri geliştirme çalışmalarına aday bileşikler olması nedeniyle bu bileşiklerin moleköl yapıları tek kristal x-ışını difraktometresi ile tayin edilmiş ve yapıların doğruluğu kanıtlanmıştır (Şekil 5.15) [110, 111]. Bu sayede daha ileri YEİ çalışmalarına ışık tutmak üzere bileşik üzerindeki grupların konfigürasyonu doğru olarak belirlenmiştir.



Şekil 5.15. Bileşik 36 ve Bileşik 51 moleküllerinin kristal yapısının Ortep çizimi. (Termal elipsoitler %30 olasılık seviyesinde çizilmiştir)

5.2. Biyolojik Çalışmalar ve Yapı Etki İlişkileri

Bu tez çalışması kapsamında EB38 öncü bileşiğinden hareketle çeşitli modifikasyonlar sonucu elde edilen visinal diaril heterosiklik bileşiklerin; karaciğer kanseri hücre hatları olan Huh7 ve Mahlavu (MV); meme kanseri hücre hattı olan MCF-7'de sitotoksik aktiviteleri Sulforadamin B (SRB) testi ile değerlendirilmiştir.

Öncü bileşik EB38'de bulunan 4-klorofenil grubunun (A Halkası) modifikasyonu amacıyla sentezlenen izoksazol türevi bileşiklerin Huh7 hücre hattındaki aktivite sonuçlarına bakıldığında klor yerine metil (Bileşik 9) getirildiğinde EB38 (1.3 μ M) ile kıyaslanabilir aktivite (1,8 μ M) elde edilmiştir. Klor atomunu 2. konumda (Bileşik 6) (24.2 μ M) veya hem dördüncü hem ikinci konumda taşıyan (Bileşik 14) (8.2 μ M) bileşiklerde ise aktivitede düşüş gözlenmiştir. Bunun yanı sıra A halkasında klor yerine amino, metoksi, siyano gibi (Bileşik 5, Bileşik 8, Bileşik 10) daha polar grupların getirilmesi de aktivitenin azalmasına neden olmuştur. EB38 bileşiğinde A halkasında piridin taşıyan türev ise (Bileşik 15) inaktif bulunmuştur.

MV ve MCF7 hücre hatlarındaki sonuçlar incelendiğinde A halkasında klor taşıyan EB38 (sırasıyla IC₅₀ değerleri 3.2 ve 3.8 μ M) bileşiği ile kıyaslanabilir aktivite 4. konumda metil taşıyan türevde (sırasıyla IC₅₀ değerleri 9.4 ve 4.7 μ M) gözlenmiştir. Diğer bileşiklerde ise bu hücre hatlarında aktivitede kayıp söz konusudur. Bu nedenle diğer modifikasyonlarda A halkasında 4-klorofenil grubu sabit tutulmuştur.

EB38 bileşiğinin 3,4-diarilizoksazol merkez halkasında 5.konumda hidrofobik metil grubu yerine daha polar, H-bağı donör ve akseptör olarak hareket edebilen amin (NH₂) grubu taşıyan Bileşik 20, öncü bileşik ile kıyaslanabilir aktivite göstermiştir (Huh7, MV ve MCF7 için sırasıyla IC₅₀ değerleri 2,04; 3,8 ve 3,6 μ M). 3,4-diarilizoksazol türevi ancak A ve B halkaları ters konumlanmış Bileşik 27'de ise üç hücre hattında da aktivitenin kaybolduğu gözlenmiştir. 4,5 diarilizoksazol türevi olan ve izoksazol halkasında metil taşımayan türev Bileşik 24 ise Huh 7 hücre hattında EB38 ile kıyaslanabilir aktivite göstermiştir.

Merkez halkada izoksazol halkası yerine tiyazol halkası içeren Bileşik 31'in sitotoksosite değerlerinin incelenmesi sonucunda tiyazol merkez halkasının umut vaadedici olmadığı gözlenmiştir.

İzoksazol ve tiyazol halkasında yapılan türevlendirmelerin sonrasında bir diğer 5 üyeli heterosiklik halka olan pirazol halkası üzerine çalışmalarımız devam etmiştir. Merkezi halka üzerinde yapılan değişiklikler sonucunda elde edilen analoglar arasında Bileşik 36 her üç hücre hattına karşı oldukça potent aktivite göstermiştir (Huh7, MV ve MCF7 için IC_{50} değerleri sırasıyla 0,8; 3,71 ve 1,5 μM).

EB38 öncü bileşiğinden daha potent olan 1,5-diarilpirazol türevi Bileşik 36 ile pirazol halka yapısını taşıyan diğer türevler kıyaslandığında azot atomunun konumunun, proton taşıyıp taşıyamamasının ve halkaya metil sübstitüsyonunun aktivite üzerine etkili olduğu gözlenmektedir. Bileşik 36'da A ve B halkalarının ters konumlanması (Bileşik 55), izoksazol halkası taşıyan bileşiklerde olduğu gibi aktivite kaybına yol açmıştır. Ancak Bileşik 55'in metil taşıyan türevi olan Bileşik 59 ise Bileşik 36'ya göre daha az aktif olmakla birlikte metilsiz türevden daha aktiftir. (Huh7, MV ve MCF7 için IC_{50} değerleri sırasıyla 3,94; 9,6 ve 11,8 μM).

Bileşik 36'nın pirazol halkasında metil taşıyan türevi Bileşik 51 incelendiğinde özellikle MV ve MCF7 hücre hatlarında aktivitede düşüş olduğu gözlenmiştir (Huh7, MV ve MCF7 için IC_{50} değerleri sırasıyla 2,8; 9,2 ve 11,9 μM).

Pirazol halkasının azot atomunun üzerinde proton taşıyan 3,4-diaril pirazol türevi Bileşik 62, Bileşik 36'ya kıyasla daha az aktiftir. (Huh7, MV ve MCF7 için IC_{50} değerleri sırasıyla 8,36; 11,0 ve 17,5 μM). Bileşik 62'nin pirazol halkasında metil taşıyan analogu Bileşik 63 ise Bileşik 62 ile kıyaslanabilir aktiviteye sahiptir (Huh7, MV ve MCF7 için IC_{50} değerleri sırasıyla 6,7; 12,0 ve 14,4 μM).

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde merkez halka modifikasyonları sonucunda keşfedilen EB38 öncü bileşiğinden daha aktif olan Bileşik 36'nın içerdiği 1,5-diarilpirazol halkası bundan sonraki modifikasyon çalışmalarında *merkez halka* olarak belirlenmiştir.

C halkası modifikasyonu amacıyla sentezlenen pirazol türevi bileşiklerde benzil grubu üzerinde 3 veya 4. konumda metil taşıyan türevlerde aktivite kaybı gözlenmiştir (Bileşik 37 ve Bileşik 38). C halkasında fenil yerine küçük alkil grupları taşıyan 5 veya 6 üyeli çeşitli heteroksiklik halkalar getirilerek aktiviteleri incelenmiş ancak bu çalışmalar sonucu elde edilen bileşiklerde aktivite gözlenmemiştir (Çizelge 4.3).

Son olarak Bileşik 36'nın B halkasında yapılan değişiklikler sonucunda fenil yerine piridin taşıyan Bileşik 66 ve Bileşik 69 elde edilmiştir. Bu analoglardan Bileşik 69'da aktivite gözlenmezken Bileşik 66'da aktivitenin devam ettiği ancak özellikle MV ve MCF7 hücre hatlarında Bileşik 36'ya kıyasla daha düşük olduğu gözlenmiştir.

Bu çalışmalar sonucunda EB38 öncü bileşiğinden daha aktif olan Bileşik 36 ile ileri biyolojik çalışmalar yapılmıştır.

5.2.1. Bileşik 36 ile yapılan ileri sitotoksik analizleri

Bileşik 36, sitotoksik etki spektrumunun daha iyi belirlenebilmesi amacıyla karaciğer (HepG2) ve meme (MDA-MB231, MDA-MB468, SKBR3, ZR75 ve MCF10A hücreleri) kanser hücre hatlarında tekrar değerlendirilmiştir.

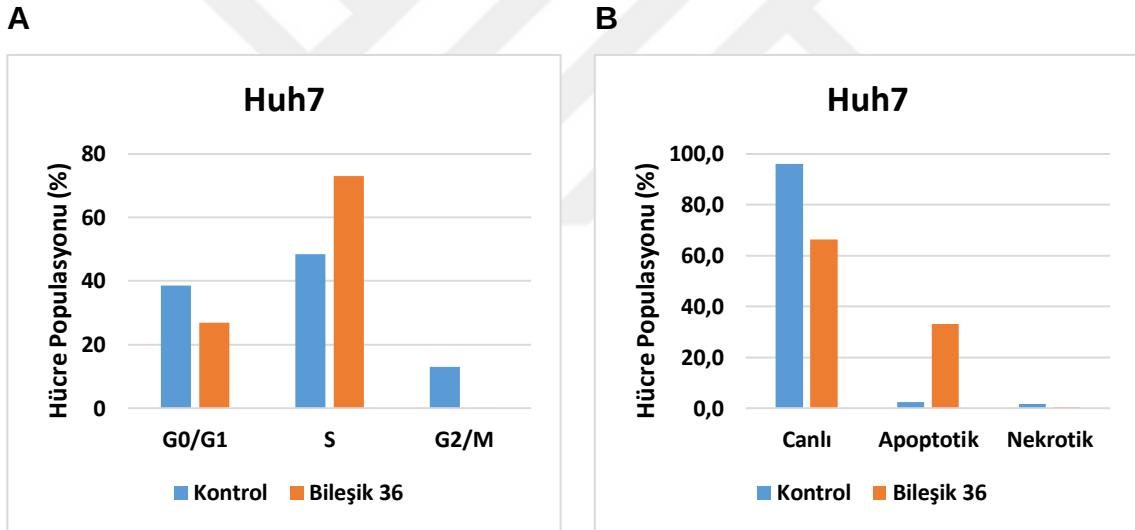
Çizelge 5.1. Bileşik 36'nın karaciğer ve meme kanseri hücre hatlarındaki IC₅₀ değerleri

<i>Meme</i>	IC ₅₀ (μM)	<i>Karaciğer</i>	IC ₅₀ (μM)
MDA-MB231	0,97	HepG2	0,77
MDA-MB468	1,04		
SKBR3	1,75		
ZR75	5,54		
MCF10A	7,62		

Bileşik 36'nın karaciğer kanser hücre hatlarındaki (Huh7, MV, HepG2) sitotoksik aktivitesi değerlendirildiğinde IC₅₀ değerlerinin 0.77-3.71 μM arasında değiştiği gözlenmiştir. Bileşiğin meme kanseri hücre hatlarındaki (MCF7, MDA-MB231, MDA-MB468, SKBR3, ZR75) sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde ise IC₅₀ değerleri 0.97-

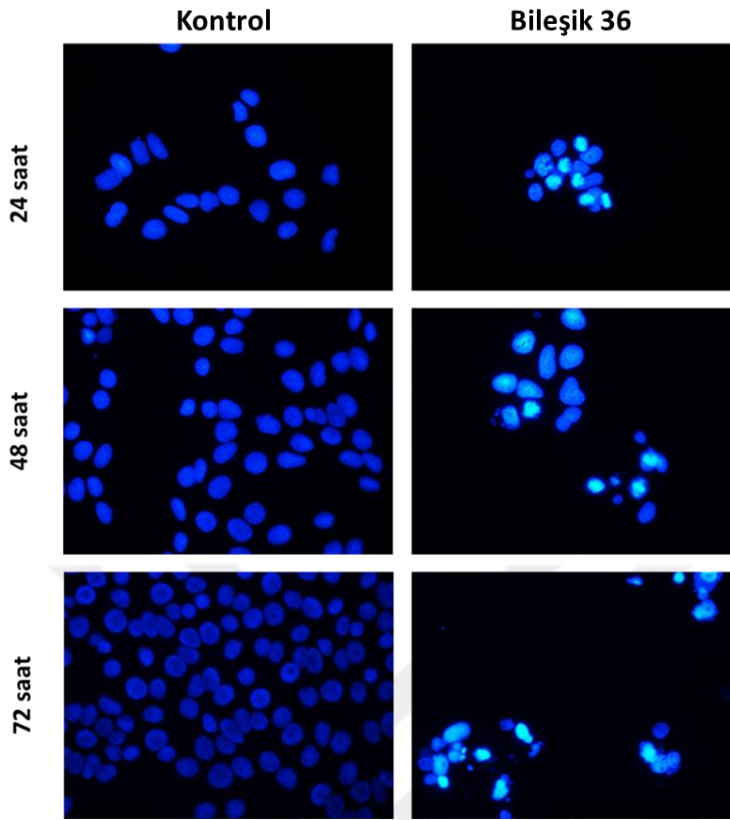
5.5 μ M arasında tespit edilmiştir. Bileşik 36'nın etkisi normal transforme meme hücre hattı olan MCF10A (IC_{50} : 7.62) hücrelerinde de test edilmiş ve kanser hücre hattına kıyasla bu hücre hattında daha az sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur.

Bileşik 36'nın hücre döngüsüne etkisini belirlemek amacıyla Huh7 hücreleri akış sitometrisi kullanılarak incelenmiştir. Bileşik 36'nın IC_{50} dozu ile 48 saat inkübe edilen hücrelerde S fazında hücre popülasyonunu artırdığı ve hücre döngüsünü bu evrede durdurduğu saptanmıştır (Şekil 5.16 A). Bileşik 36 ile indüklenen hücre ölüm mekanizmasının karakterize edilmesi için Huh7 hücreleri Annexin V kullanılarak akış sitometrisi ile incelenmiştir. Bileşik 36'nın IC_{50} konsantrasyonunda 48. saatte hücre canlılığını azalttığı ve apoptotik hücre popülasyonunu artırdığı gözlenmiştir. (Şekil 5.16 B)



Şekil 5.16. A) Bileşik 36'nın hücre döngüsüne etkisi B) Bileşik 36'nın hücre ölümüne etkisi

Kanser hücreleri üzerinde oluşan morfolojik etkinin belirlenmesi amacıyla Bileşik 36 IC_{50} konsantrasyonunda Huh7 hücrelerine uygulanmıştır ve 24, 48 ve 72. saatlerin sonunda, hücreler Hoechst 33258 ile boyanarak floresan mikroskobu altında incelenmiştir (Görüntüler floresan mikroskobu ile elde edilmiştir (40X)) (Resim 5.3).

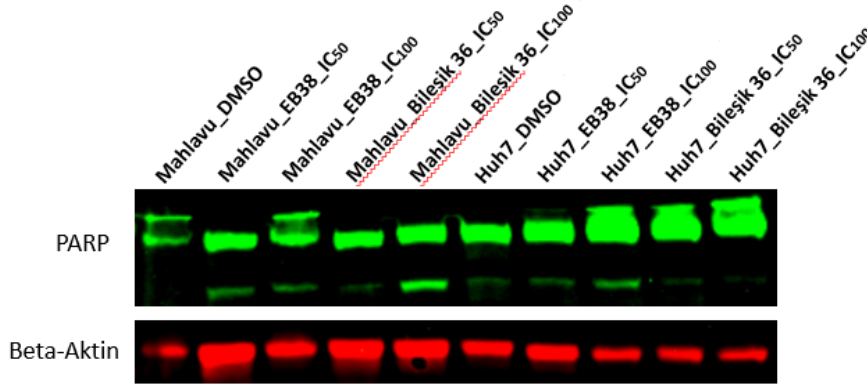


Resim 5.3. Bileşik 36'nın Huh7 karaciğer kanseri hücreleri üzerindeki morfolojik etkilerinin floresan boyama ile incelenmesi

Bileşik 36 ile inkübe edilen hücre çekirdeklerinde, DNA parçalanması ve çekirdek yoğunlaşmasının arttığı ve bu etkinin 24. saatten sonra daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bunun yanısıra, artan apoptotik parçacıklar bu bileşik ile inkübe edilen hücrelerde apoptozun aktif hale geldiğini göstermektedir. Bu sonuçlar Annexin V kullanılarak yapılan akış sitometrisi deneyi sonuçları ile uyumludur.

Poli(ADP-riboz) polimeraz (PARP) proteini; hücresel apoptoz ve DNA hasarı ile ilgili bilgi veren, antikanser bileşikler geliştirilirken hedef protein olarak analiz edilen bir proteindir. Apoptoz esnasında PARP proteinlerinin parçalanması sonucu ortaya çıkan 'parçalanmış PARP' miktarındaki artış western blot tekniği ile incelenebilmektedir. Bileşik 36'nın, hücre ölümü üzerine etkisinin protein seviyesinde doğrulanması için parçalanmış PARP proteinlerinin seviyeleri Mahlavu ve Huh7 kanser hücrelerinde incelenmiştir. Bu amaçla öncü bileşik EB38 ve Bileşik 36, IC₅₀ ve IC₁₀₀ konsantrasyonunda test edilmiştir.

Parçalanmış PARP proteinlerinin seviyelerindeki artış, bu bileşiklerin 48. saatte apoptoz yolağını aktiveştirerek Mahlavu ve Huh7 hücrelerinde hücre ölümüne yol açtıklarını göstermiştir (Resim 5.4).



Resim 5.4. Western blot tekniği ile bileşiklerle inkübe edilen Huh7 hücre hatlarında PARP proteininin ifade miktarlarına bakılarak bileşiklerin etkisinin belirlenmesi

5.2.2. ADME özelliklerin değerlendirilmesi ve farmakokinetik çalışmalar

Bileşik 36'nın *in vitro* ADME özelliklerinin değerlendirilmesi ve farmakokinetik parametrelerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar Syngene International Ltd., Hindistan'da yaptırılmıştır.

Bileşik 36'nın *in vitro* ADME özelliklerinin belirlenmesi için yapılan suda çözünürlük, LogD tayini, insan ve fare karaciğer mikrozomlarında stabilite testi, insan plazma proteinlerine bağlanma ve CYP450 enzim inhibisyonu testlerinin sonuçları Çizelge 5.2'de verilmiştir. Bileşik 36 pH 7.4'te düşük çözünürlüğe ve yüksek LogD değerine sahiptir. Bileşik 36 fare karaciğer mikrozomlarında NADPH varlığında hızlı klirens uğramaktadır, bu sonuç oksidasyonla biyotransformasyona uğrama ihtimalini göstermektedir. İnsan karaciğer mikrozomlarında ortalama bir klirens sahiptir ve bu durum türe bağımlı metabolizma olasılığına işaret etmektedir. Bileşik 36 insan plazma proteinlerine çok yüksek oranda bağlanmıştır. Major CYP450 isoformları olan 2C9, 2D6, 3A4 isoformlarını 10 µM konsantrasyonda önemli derecede inhibe

etmemiştir. Bileşik düşük permeabiliteye sahiptir ancak, Pgp'ye dayalı efluks substratı değildir.

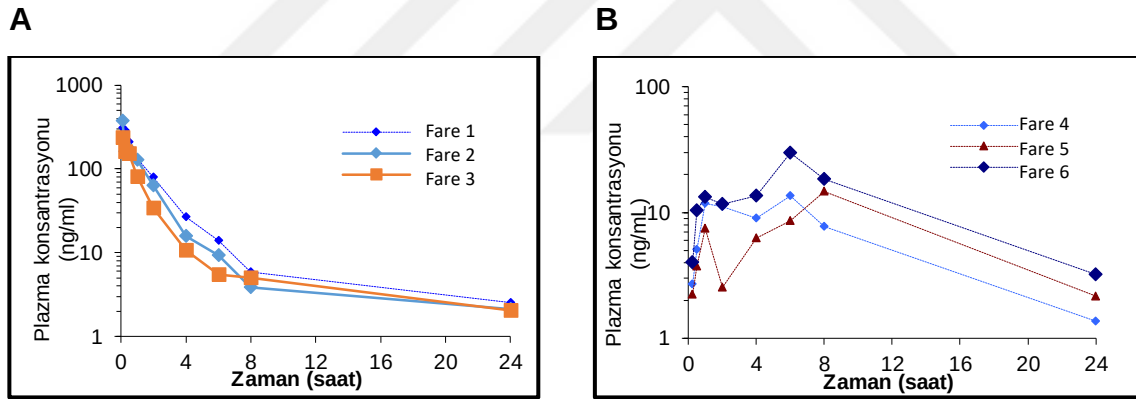
Çizelge 5.2. Bileşik 36 *in vitro* ADME özellikleri

CYP450 inhibisyonu (10 µM konsantrasyonda)	
• CYP2C9	%7,3 inhibisyon
• CYP2D6	%22,2 inhibisyon
• CYP3A4	İnhibisyon gözlenmedi
Metabolik Stabilité	
• $t_{1/2}$, insan karaciğer mikrozomları	50.19 dk
• CL _{int} , insan karaciğer mikrozomları	27 µL/dk/mg protein
• $t_{1/2}$, fare karaciğer mikrozomları	12.36 dk
• CL _{int} , fare karaciğer mikrozomları	112 µL/dk/mg protein
Fizikokimyasal Parametreler	
• pH 7.4 PBS çözünürlük	<1 µM
• LogD pH 7.4	>4
• İnsan Plazma Proteinlerine Bağlanma	%100
• Caco-2 permeabilitesi	P _{app} A>B 0.1 P _{app} B>A 0.1 (10 ⁻⁶ cm/s) Efluks oranı 0.7

Bileşik 36, 1 mg/kg dozda IV, 10 mg/kg tek dozda oral olarak CD-1 erkek farelere uygulandığında elde edilen farmakokinetik parametreler aşağıda Çizelge 5.3'te verilmiştir. IV ve oral uygulamadan sonra farelerde herhangi bir gözle görülen yan etki saptanmamıştır. IV uygulamadan sonra Bileşik 36 yarılanma ömrü 3,85 saat ve klirensi 2.33 L/s/kg olarak gözlenmiştir. Tek doz oral 10 mg/kg Bileşik 36 uygulaması sonrası AUC ve C_{max} değerleri göz önüne alındığında oldukça zayıf maruziyet gözlenmiş, oral biyoyararlanım (F) düşük olarak (%4.4) bulunmuştur. Bunun en önemli nedenleri farelerde metabolik klirensin yüksek olması, bileşiğin yağda çözünürlüğünün yüksek ve suda çözünürlüğünün düşük ve dolayısıyla hücre permeabilitesinin düşük olması olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 5.3. Bileşik 36'nın farmakokinetik analiz sonuçları (IV doz; 1 mg/kg ve oral doz; 10 mg/kg)

PK Parametreleri	Ortalama $\pm$ SD	
	IV (1 mg/kg)	PO (10 mg/kg)
C ₀ (ng/ml)	392.4 $\pm$ 152.1	
C _{max} (ng/ml)		19.3 $\pm$ 9.1
T _{max} (saat)		6.67 $\pm$ 1.2
AUC _{last} (sa*ng/ml)	435.9 $\pm$ 111.1	191.8 $\pm$ 73.6
V _d (L/kg)	13.2 $\pm$ 4.9	
CL _p (L/sa/kg)	2.33 $\pm$ 0.6	
V _{dss} (L/kg)	9.66 $\pm$ 3.7	
t _{1/2} (saat)	3.85 $\pm$ 0.43	6.67 $\pm$ 1.2
Biyoyararlanım	4.4 $\pm$ 1.6	



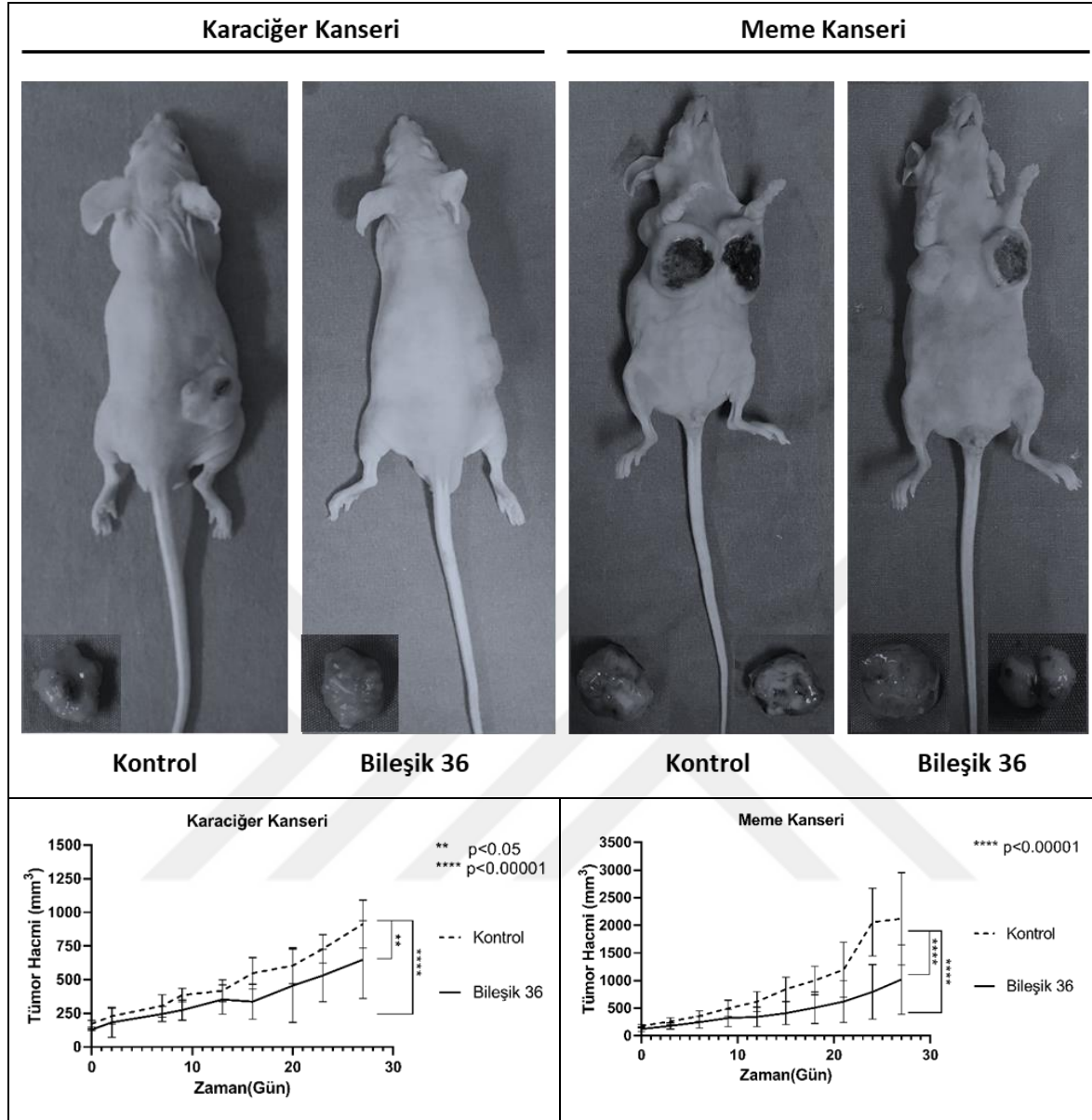
Şekil 5.17. A) Bileşik 36'nın intravenöz IV (1 mg/kg) uygulandıktan sonra plazma konsantrasyonu-zaman profili B) Bileşik 36'nın oral (PO) (10 mg/kg) uygulandıktan sonra plazma konsantrasyonu-zaman profili

5.2.3. Meme ve karaciğer kanseri ksenograft modelinde bileşik 36'nın *in vivo* antikanser etkilerinin belirlenmesi

Epitelyal karaciğer ve meme kanseri hücre hatları üzerinde *in vitro* yöntemler ile etkileri belirlenen Bileşik 36'nın bu etkilerini *in vivo* deneyler ile doğrulamak amacıyla atimik farelerde ksenograft tümör modeli ile deneyler Orta Doğu Teknik Üniversitesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Rengül ÇETİN ATALAY danışmanlığındaki araştırma ekibi

tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla farelere karaciğer ve meme kanseri hücreleri implant edilmiş ve Bileşik 36 ile muamelesi sonrası tümör boyutundaki değişikliklerin gözlenmesi hedeflenmiştir. Her bir epitelyal kanser türü (karaciğer ve meme) için iki ayrı grup fare (Kontrol ve Bileşik 36) çalışmaya dahil edilmiştir ve her bir grup için 6 fare kullanılmıştır. Mahlavu ve MDA-MB-231 hücreleri enjekte edilen farelerin 40 mg/kg dozda 4 hafta boyunca haftada iki kez Bileşik 36'nın uygulanması sonucu farelerin görünümü ve tümör hacimlerinin büyümesinin karşılaştırılması yapılmıştır.

Mahlavu karaciğer kanseri hücreleri ile tümör oluşturulan ve Bileşik 36 ile uygulanan farelerde, tümör büyümesi kontrol ile karşılaştırıldığında, Bileşik 36 ile muamele edilen farelerin tümörlerinin boyutunda anlamlı bir küçülme olduğu görülmektedir (Şekil 5.18). Bileşik 36'nın, MDA-MB-231 meme kanseri hücresi enjekte edilen farelerde de anlamlı boyutta tümör boyutunu azalttığı gözlemlenmiştir (Şekil 5.18). Ayrıca her iki tümör türünde de tümör hacimleri ölçülmüş ve bunların kontrol grubundaki farelerin tümörleri ile karşılaştırılması sağlanarak analiz edilmiştir. Sekiz doz Bileşik 36 uygulanması sonrasında, karaciğer kanserinde kontrol grubundaki tümörlerin ortalama hacmi yaklaşık olarak 1000 mm³'e ulaşırken, Bileşik 36 ile tedavi edilen farelerde tümör hacmi 600 mm³ civarında olduğu bulgulanmıştır. Meme kanseri verilen farelerde, kontrol gurubu 2000 mm³'e yaklaşırken, Bileşik 36 verilen farelerde tümör hacmi 1000 mm³'ün altında kalmıştır (Şekil 5.18). Tümör ölçümlerinin istatistiksel analizi iki yönlü ANOVA yöntemi ile GraphPad Prismde hesaplanmıştır ($p < 0,05$ and $p < 0,00001$).



Şekil 5.18. Atimik tüysüz farelerde geliştirilen epitelyal karaciğer kanseri ksenograft modelinde Bileşik 36'nın *in vivo* antikanser etkilerinin gösterilmesi.

5.2.4. Bileşik 36'nın NCI-60 kanser panelindeki hücre hatlarına sitotoksik etkisi

Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Kanser Enstitüsü NCI-60 insan tümör hatları tarama programı kapsamında yapılan çalışmalarda Bileşik 36, 10 μ M tek dozda 60 kanser hücre hattına karşı tarandığında, 20 tane hücre hattının proliferasyonunu %50 veya daha fazla oranda inhibe eder bulunmuştur (Çizelge 5.6). Elde edilen

sonuçlar Bileşik 36'nın ileri optimizasyonu ile farklı kanser türlerine karşı aday moleküllerinin geliştirilebilme potansiyelini ortaya koymaktadır.

Çizelge 5.4. Bileşik 36'nın 10 μ M tek dozda NCI-60 kanser panelinde yer alan hücre hatlarına karşı sitotoksik etkisi

Panel	Hücre Hattı	% Büyüme inhibisyonu (%GI)
Lösemi	CCRF-CEM	57.64
	HL-60 (TB)	86.68
	K-562	86.33
	MOLT-4	73.70
	RPMI-8226	22.65
	SR	66.23
Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri	A549/ATCC	50.45
	EKVX	22.95
	HOP-62	50.69
	HOP-92	25.83
	NCI-H226	29.68
	NCI-H23	23.40
	NCI-H322M	3.12
	NCI-H460	41.69
	NCI-H522	70.91
	COLO 205	28.76
Kolon kanseri	HCC-2998	10.87
	HCT-116	61.92
	HCT-15	60.08
	HT29	82.41
	KM12	49.31
	SW-620	70.35

Çizelge 5.4. (devam) Bileşik 36'nın 10 µM tek dozda NCI-60 kanser panelinde yer alan hücre hatlarına karşı sitotoksik etkisi

MSS Kanseri	SF-268	19.50
	SF-295	46.90
	SF-539	28.17
	SNB-19	37.98
	SNB-75	39.28
	U251	54.02
Melanoma	LOX-IMVI	35.73
	MALME-3M	32.80
	M14	61.01
	MDA-MB-435	99.19
	SK-MEL-2	60.82
	SK-MEL-28	30.64
	SK-MEL-5	33.38
	UACC-257	24.32
Over kanseri	UACC-62	39.32
	IGROV1	42.48
	OVCAR-3	73.38
	OVCAR-4	14.28
	OVCAR-5	8.29
	OVCAR-8	24.75
	NCI/ADR-RES	62.00
Renal kanser	SK-OV-3	36.32
	786-0	17.20
	A498	42.45
	ACHN	22.37
	CAKI-1	40.28
	RXF 393	39.71
	SN12C	32.4
	TK-10	16.23
Prostat kanseri	UO-31	25.63
	DU-145	11.90

Çizelge 5.4. (devam) Bileşik 36'nın 10 µM tek dozda NCI-60 kanser panelinde yer alan hücre hatlarına karşı sitotoksik etkisi

Meme kanseri	MCF7	68.10
	MDA-MB-231/ATCC	15.75
	HS 578T	39.09
	BT-549	25.02
	T-47D	34.63
	MDA-MB-468	58.87



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında, karaciğer ve meme kanserine karşı etki potansiyeli yüksek moleküllerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla EB38 öncü bileşiğinden hareketle sentezlenen 33 adet orijinal bileşik serisi ile kimyasal yapı ile biyolojik aktivite arasındaki ilişki açıklanmaya çalışılmıştır. 5 üyeli bir merkezi heterosiklik halka üzerinde visinal diaril sübstitüsyonu taşıyan genel yapıya sahip tez bileşiklerinde merkezi heterosiklik halka değişikliklerinin aktivite açısından olumlu sonuçlandığı bulgulanmıştır. Bununla beraber, visinal diaril grupları üzerinde gerçekleştirilen yapısal modifikasyonlar genelde aktivite kaybı ile sonuçlanmıştır. Bu gruplardan 2-metilbenzil yapısının aktivite açısından oldukça önem arz ettiği, benzil grubu üzerinde farklı konumlarda ve karakterde sübstitüsyonların bileşiğin aktivitesini azalttığı bulunmuştur.

EB38'den yola çıkılarak geliştirilen 1,5-diarilpirazol türevi Bileşik 36 farklı hücre hatlarında oldukça sitotoksik etkili bulunmuştur ve ileri *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir. Bileşik 36 ile muamele edilen kanser hücrelerinde, bileşiğin hücre döngüsünü durdurduğu ve böylece hücreleri apoptoza sürüklediklerine yönelik bulgular elde edilmiştir. Atimik farelerde meme ve karaciğer kanseri ksenograft tümör modelinde 4 hafta boyunca haftada iki kez 40 mg/kg dozda uygulanmış olan Bileşik 36'nın tümör hacmini azalttığı saptanmıştır. NCI-60 insan tümör hatları tarama programı kapsamında yapılan çalışmalarda ise Bileşik 36'nın 10 µM konsantrasyonda 20 kanser hücre hattında %50 veya daha fazla oranda büyümeyi inhibe ettiği görülmüştür.

Bileşik 36'nın pH 7.4'de düşük çözünürlüğe ve yüksek LogD değerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca insan karaciğer mikrozomlarındaki stabilitesi kabul edilebilir olmasına rağmen fare karaciğer mikrozomlarındaki hızlı klirensi, düşük çözünürlük ve yüksek LogD değeri ile birlikte farmakokinetik çalışmalarda oral biyoyararlanımı azaltmaktadır.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde bundan sonra Bileşik 36'nın moleküler etki mekanizmasının belirlenmesi için ileri biyolojik çalışmalar planlanmaktadır.

215S015 kodlu TÜBİTAK 1003 projemizin, Prof. Dr. Rengül Çetin Atalay ve Prof. Dr. Mesut Muyan danışmanlığında yürütülen çalışmalarında, EB38 öncü bileşiğinin ve Bileşik 36'nın PI3K/Akt/mTOR sinyal yolunun merkezinde yer alan Akt proteininin fosforilasyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir. EB38 ve Bileşik 36 ile muamele edilen Huh7, Mahlavu, MCF7 ve MDA-MB-231 epitelyal kanser hücrelerinde 770 kanser geninin ifadesine etkisi, Nanostring teknolojisi ile incelenmiştir. EB38 ve Bileşik 36'nın biyotinli türevleri hazırlanarak hedef proteini tespit etmeye yönelik çalışmalar devam etmektedir.

Bileşiğin moleküler etki mekanizmasının belirlenmesi ve ADME özelliklerinin optimizasyonu ile Bileşik 36'nın yeni moleküllerin geliştirilmesi için öncü olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. İnternet: National Cancer Institute. (2015). *What is the cancer*. Retrieved from Web: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>, Son Erişim Tarihi: 9 Şubat 2015.
2. İnternet: World Health Organization. (2018). *What is cancer?, cancer prevention and cancer management*. Retrieved from Web: <https://www.who.int/cancer/en/>, Son Erişim Tarihi: 25/03/2019.
3. İnternet: International Agency for Research on Cancer. (2018). *Cancer tomorrow*. Retrieved from Web: <https://qco.iarc.fr/tomorrow/graphic-isotype>, Son Erişim Tarihi: 25/03/2019.
4. Yadav, M., Murumkar, P. R., and Ghuge, R. B., *Vicinal diaryl substituted heterocycles: A gold mine for the discovery of novel therapeutic agents*. 2018: Elsevier, .
5. İnternet: National Cancer Institute. (2019). *Research on causes of cancer*. Retrieved from Web: <https://www.cancer.gov/research/areas/causes>, Son Erişim Tarihi:25/03/2019.
6. İnternet: World Health Organization. (2018). *Key facts*. Retrieved from Web: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>, Son Erişim Tarihi:12/09/2018.
7. İnternet: World Health Organization. (2014). *Cancer country profiles*. Retrieved from Web: https://www.who.int/cancer/country-profiles/tur_en.pdf?ua=1, Son Erişim Tarihi:17/02/2020.
8. Li, Q., and Xu, W. (2005). Novel anticancer targets and drug discovery in post genomic age. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 5(1), 53-63.
9. Weinmann, H., and Ottow, E. (2006). Recent development in novel anticancer therapies. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, 7, 221-251.
10. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
11. Raghavendra, N. M., Pingili, D., Kadasi, S., Mettu, A., and Prasad, S. (2018). Dual or multi-targeting inhibitors: The next generation anticancer agents. *Eur J Med Chem*, 143, 1277-1300.
12. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
13. İbiş, K. (2020). *Yeni İzoksazol türevlerinin sentezi, karaciğer ve meme kanseri hücre hatlarına karşı sitotoksik etkilerinin İncelenmesi*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

14. Traxler, P. (2003). Tyrosine kinases as targets in cancer therapy–successes and failures. *Expert opinion on therapeutic targets*, 7(2), 215-234.
15. Huang, J., Li, X., Hilf, R., Bambara, R. A., and Muyan, M. (2005). Molecular basis of therapeutic strategies for breast cancer. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 5(4), 379-396.
16. Polyak, K. (2007). Breast cancer: Origins and evolution. *J Clin Invest*, 117(11), 3155-3163.
17. Desantis, C. E., Ma, J. M., Gaudet, M. M., Newman, L. A., Miller, K. D., Sauer, A. G., Jemal, A., and Siegel, R. L. (2019). Breast cancer statistics, 2019. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, 69(6), 438-451.
18. Regulski, M., Regulska, K., Prukala, W., Piotrowska, H., Stanis, B., and Murias, M. (2016). Cox-2 inhibitors: A novel strategy in the management of breast cancer. *Drug Discov Today*, 21(4), 598-615.
19. İnternet: World Health Organization. (2020). *Breast cancer*. Retrieved from Web: <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>, Son Erişim Tarihi:31/03/2020.
20. Iacoviello, L., Bonaccio, M., De Gaetano, G., and Donati, M. B. (2021). Epidemiology of breast cancer, a paradigm of the "common soil" hypothesis. *Semin Cancer Biol*, 72, 4-10.
21. Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H., and Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther*, 10(10), 955-960.
22. Prat, A., and Perou, C. M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*, 5(1), 5-23.
23. Hartkopf, A. D., Grischke, E. M., and Brucker, S. Y. (2020). Endocrine-resistant breast cancer: Mechanisms and treatment. *Breast Care*, 15(4), 347-354.
24. García-Aranda, M., and Redondo, M. (2017). Protein kinase targets in breast cancer. *International journal of molecular sciences*, 18(12), 2543.
25. Mckenna, M., McGarrigle, S., and Pidgeon, G. P. (2018). The next generation of pi3k-akt-mtor pathway inhibitors in breast cancer cohorts. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 1870(2), 185-197.
26. İnternet: National Cancer Institute. (2020). *Drugs approved for breast cancer*. Retrieved from Web: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/breast>, Son Erişim Tarihi:04/03/2020.
27. Roskoski, R., Jr. (2019). Properties of fda-approved small molecule protein kinase inhibitors. *Pharmacol Res*, 144, 19-50.

28. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424.
29. Baffy, G., Brunt, E. M., and Caldwell, S. H. (2012). Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: An emerging menace. *Journal of Hepatology*, 56(6), 1384-1391.
30. Sun, B., and Karin, M. (2012). Obesity, inflammation, and liver cancer. *Journal of Hepatology*, 56(3), 704-713.
31. Wilhelm, S. M., Adnane, L., Newell, P., Villanueva, A., Llovet, J. M., and Lynch, M. (2008). Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both raf and vegf and pdgf receptor tyrosine kinase signaling. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(10), 3129-3140.
32. İnternet: Institute, N. C. (2020). *Drugs approved for liver cancer*. Retrieved from Web: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/liver>, Son Erişim Tarihi:09/03/2020.
33. Dawkins, J., and Webster, R. M. (2019). The hepatocellular carcinoma market. *Nat Rev Drug Discov*, 18(1), 13-14.
34. Reeves, H. L., and Zaki, M. Y. (2016). The genetic heterogeneity of hepatocellular carcinoma and the implications for personalised medicine. *Translational Cancer Research*, 5(1), 1-4.
35. Rao, P., and Knaus, E. E. (2008). Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (nsaids): Cyclooxygenase (cox) inhibition and beyond. *J Pharm Pharm Sci*, 11(2), 81-110.
36. Burnett, D. A., Caplen, M. A., Davis, H. R., Jr., Burrier, R. E., and Clader, J. W. (1994). 2-azetidinones as inhibitors of cholesterol absorption. *J Med Chem*, 37(12), 1733-1736.
37. Rosenblum, S. B., Huynh, T., Afonso, A., Davis, H. R., Jr., Yumibe, N., Clader, J. W., and Burnett, D. A. (1998). Discovery of 1-(4-fluorophenyl)-(3r)-[3-(4-fluorophenyl)-(3s)-hydroxypropyl]-(4s)-(4 -hydroxyphenyl)-2-azetidinone (sch 58235): A designed, potent, orally active inhibitor of cholesterol absorption. *J Med Chem*, 41(6), 973-980.
38. Roth, B. D. (2002). The discovery and development of atorvastatin, a potent novel hypolipidemic agent. *Prog Med Chem*, 40, 1-22.

39. Roth, B. D., Blankley, C. J., Chucholowski, A. W., Ferguson, E., Hoefle, M. L., Ortwine, D. F., Newton, R. S., Sekerke, C. S., Sliskovic, D. R., Stratton, C. D., and Et Al. (1991). Inhibitors of cholesterol biosynthesis. 3. Tetrahydro-4-hydroxy-6-[2-(1h-pyrrol-1-yl)ethyl]-2h-pyran-2-one inhibitors of hmg-coa reductase. 2. Effects of introducing substituents at positions three and four of the pyrrole nucleus. *J Med Chem*, 34(1), 357-366.
40. Greenblatt, D. J., Matlis, R., Scavone, J. M., Blyden, G. T., Harmatz, J. S., and Shader, R. I. (1985). Oxaprozin pharmacokinetics in the elderly. *Br J Clin Pharmacol*, 19(3), 373-378.
41. Sithanandam, G., Druck, T., Cannizzaro, L. A., Leuzzi, G., Huebner, K., and Rapp, U. R. (1992). B-raf and a b-raf pseudogene are located on 7q in man. *Oncogene*, 7(4), 795-799.
42. Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., Mould, C., Parker, A., Stevens, C., Watt, S., Hooper, S., Wilson, R., Jayatilake, H., Gusterson, B. A., Cooper, C., Shipley, J., Hargrave, D., Pritchard-Jones, K., Maitland, N., Chenevix-Trench, G., Riggins, G. J., Bigner, D. D., Palmieri, G., Cossu, A., Flanagan, A., Nicholson, A., Ho, J. W., Leung, S. Y., Yuen, S. T., Weber, B. L., Seigler, H. F., Darrow, T. L., Paterson, H., Marais, R., Marshall, C. J., Wooster, R., Stratton, M. R., and Futreal, P. A. (2002). Mutations of the braf gene in human cancer. *Nature*, 417(6892), 949-954.
43. Falchook, G. S., Long, G. V., Kurzrock, R., Kim, K. B., Arkenau, T. H., Brown, M. P., Hamid, O., Infante, J. R., Millward, M., Pavlick, A. C., O'day, S. J., Blackman, S. C., Curtis, C. M., Lebowitz, P., Ma, B., Ouellet, D., and Kefford, R. F. (2012). Dabrafenib in patients with melanoma, untreated brain metastases, and other solid tumours: A phase 1 dose-escalation trial. *The Lancet*, 379(9829), 1893-1901.
44. Ryu, S., Youn, C., Moon, A. R., Howland, A., Armstrong, C. A., and Song, P. I. (2017). Therapeutic inhibitors against mutated braf and mek for the treatment of metastatic melanoma. *Chonnam Med J*, 53(3), 173-177.
45. Koelblinger, P., Thuerigen, O., and Dummer, R. (2018). Development of encorafenib for braf-mutated advanced melanoma. *Curr Opin Oncol*, 30(2), 125-133.
46. İnternet: Fda. (2018). *Fda approves encorafenib and binimetinib in combination for unresectable or metastatic melanoma with braf mutations*. Retrieved from Web: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-encorafenib-and-binimetinib-combination-unresectable-or-metastatic-melanoma-braf>, Son Erişim Tarihi:10/03/2020.

47. Barmade, M. A., Murumkar, P. R., Sharma, M. K., and Yadav, M. R. (2016). Medicinal chemistry perspective of fused isoxazole derivatives. *Curr Top Med Chem*, 16(26), 2863-2883.
48. Chalyk, B. A., Kandaurova, I. Y., Hrebeniuk, K. V., Manoilenko, O. V., Kulik, I. B., Iminov, R. T., Kubyshev, V., Tverdokhlebov, A. V., Ablialimov, O. K., and Mykhailiuk, P. K. (2016). A base promoted multigram synthesis of aminoisoxazoles: Valuable building blocks for drug discovery and peptidomimetics. *RSC Advances*, 6(31), 25713-25723.
49. Chiosis, G., Vilenchik, M., Kim, J., and Solit, D. (2004). Hsp90: The vulnerable chaperone. *Drug Discovery Today*, 9(20), 881-888.
50. Workman, P. (2004). Combinatorial attack on multistep oncogenesis by inhibiting the hsp90 molecular chaperone. *Cancer Lett*, 206(2), 149-157.
51. Golsteyn, R. M. (2004). Recent advances in cancer research. *Drug news & perspectives*, 17(6), 405-416.
52. Kamal, A., Thao, L., Sensintaffar, J., Zhang, L., Boehm, M. F., Fritz, L. C., and Burrows, F. J. (2003). A high-affinity conformation of hsp90 confers tumour selectivity on hsp90 inhibitors. *Nature*, 425(6956), 407-410.
53. Neckers, L., Schulte, T. W., and Mimnaugh, E. (1999). Geldanamycin as a potential anti-cancer agent: Its molecular target and biochemical activity. *Invest New Drugs*, 17(4), 361-373.
54. Sharp, S. Y., Prodromou, C., Boxall, K., Powers, M. V., Holmes, J. L., Box, G., Matthews, T. P., Cheung, K. M., Kalusa, A., James, K., Hayes, A., Hardcastle, A., Dymock, B., Brough, P. A., Barril, X., Cansfield, J. E., Wright, L., Surgenor, A., Foloppe, N., Hubbard, R. E., Aherne, W., Pearl, L., Jones, K., McDonald, E., Raynaud, F., Eccles, S., Drysdale, M., and Workman, P. (2007). Inhibition of the heat shock protein 90 molecular chaperone in vitro and in vivo by novel, synthetic, potent resorcinylic pyrazole/isoxazole amide analogues. *Mol Cancer Ther*, 6(4), 1198-1211.
55. Brough, P. A., Aherne, W., Barril, X., Borgognoni, J., Boxall, K., Cansfield, J. E., Cheung, K. M., Collins, I., Davies, N. G., Drysdale, M. J., Dymock, B., Eccles, S. A., Finch, H., Fink, A., Hayes, A., Howes, R., Hubbard, R. E., James, K., Jordan, A. M., Lockie, A., Martins, V., Massey, A., Matthews, T. P., McDonald, E., Northfield, C. J., Pearl, L. H., Prodromou, C., Ray, S., Raynaud, F. I., Roughley, S. D., Sharp, S. Y., Surgenor, A., Walmsley, D. L., Webb, P., Wood, M., Workman, P., and Wright, L. (2008). 4,5-diarylisoazole hsp90 chaperone inhibitors: Potential therapeutic agents for the treatment of cancer. *J Med Chem*, 51(2), 196-218.
56. Okui, T., Shimo, T., Hassan, N. M., Fukazawa, T., Kurio, N., Takaoka, M., Naomoto, Y., and Sasaki, A. (2011). Antitumor effect of novel hsp90 inhibitor nvp-auy922 against oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*, 31(4), 1197-1204.

57. Park, K. S., Hong, Y. S., Choi, J., Yoon, S., Kang, J., Kim, D., Lee, K. P., Im, H. S., Lee, C. H., Seo, S., Kim, S. W., Lee, D. H., and Park, S. R. (2018). Hsp90 inhibitor, auy922, debilitates intrinsic and acquired lapatinib-resistant her2-positive gastric cancer cells. *BMB Rep*, 51(12), 660-665.
58. Chen, D., Shen, A., Li, J., Shi, F., Chen, W., Ren, J., Liu, H., Xu, Y., Wang, X., Yang, X., Sun, Y., Yang, M., He, J., Wang, Y., Zhang, L., Huang, M., Geng, M., Xiong, B., and Shen, J. (2014). Discovery of potent n-(isoxazol-5-yl)amides as hsp90 inhibitors. *Eur J Med Chem*, 87, 765-781.
59. Meng, T., Zhang, D., Xie, Z., Yu, T., Wu, S., Wyder, L., Regenass, U., Hilpert, K., Huang, M., Geng, M., and Shen, J. (2014). Discovery and optimization of 4,5-diarylisoaxazoles as potent dual inhibitors of pyruvate dehydrogenase kinase and heat shock protein 90. *J Med Chem*, 57(23), 9832-9843.
60. Zhang, C., Wang, X., Liu, H., Zhang, M., Geng, M., Sun, L., Shen, A., and Zhang, A. (2017). Design, synthesis and pharmacological evaluation of 4,5-diarylisoaxazols bearing amino acid residues within the 3-amido motif as potent heat shock protein 90 (hsp90) inhibitors. *Eur J Med Chem*, 125, 315-326.
61. Liu, T., Dong, X., Xue, N., Wu, R., He, Q., Yang, B., and Hu, Y. (2009). Synthesis and biological evaluation of 3,4-diaryl-5-aminoisoxazole derivatives. *Bioorg Med Chem*, 17(17), 6279-6285.
62. İnternet: National Cancer Institute. (2018). *National library of medicine*. Retrieved from Web: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=CA4P&cntry=&state=&city=&dist>, Son Erişim Tarihi:13/02/2020.
63. Ohsumi, K., Hatanaka, T., Fujita, K., Nakagawa, R., Fukuda, Y., Nihei, Y., Suga, Y., Morinaga, Y., Akiyama, Y., and Tsuji, T. (1998). Syntheses and antitumor activity of cis-restricted combretastatins: 5-membered heterocyclic analogues. *Bioorg Med Chem Lett*, 8(22), 3153-3158.
64. Pettit, G. R., Temple, C., Jr., Narayanan, V. L., Varma, R., Simpson, M. J., Boyd, M. R., Rener, G. A., and Bansal, N. (1995). Antineoplastic agents 322. Synthesis of combretastatin a-4 prodrugs. *Anticancer Drug Des*, 10(4), 299-309.
65. Simoni, D., Grisolia, G., Giannini, G., Roberti, M., Rondanin, R., Piccagli, L., Baruchello, R., Rossi, M., Romagnoli, R., Invidiata, F. P., Grimaudo, S., Jung, M. K., Hamel, E., Gebbia, N., Crosta, L., Abbadessa, V., Di Cristina, A., Dusonchet, L., Meli, M., and Tolomeo, M. (2005). Heterocyclic and phenyl double-bond-locked combretastatin analogues possessing potent apoptosis-inducing activity in hl60 and in mdr cell lines. *J Med Chem*, 48(3), 723-736.
66. Kaffy, J., Pontikis, R., Carrez, D., Croisy, A., Monneret, C., and Florent, J. C. (2006). Isoxazole-type derivatives related to combretastatin a-4, synthesis and biological evaluation. *Bioorg Med Chem*, 14(12), 4067-4077.

67. Sun, C. M., Lin, L. G., Yu, H. J., Cheng, C. Y., Tsai, Y. C., Chu, C. W., Din, Y. H., Chau, Y. P., and Don, M. J. (2007). Synthesis and cytotoxic activities of 4,5-diarylisoaxazoles. *Bioorg Med Chem Lett*, 17(4), 1078-1081.
68. Shin, K. D., Yoon, Y. J., Kang, Y. R., Son, K. H., Kim, H. M., Kwon, B. M., and Han, D. C. (2008). Kribb3, a novel microtubule inhibitor, induces mitotic arrest and apoptosis in human cancer cells. *Biochem Pharmacol*, 75(2), 383-394.
69. Lee, S., Kim, J. N., Lee, H. K., Yoon, K. S., Shin, K. D., Kwon, B. M., and Han, D. C. (2011). Biological evaluation of kribb3 analogs as a microtubule polymerization inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett*, 21(3), 977-979.
70. Farag, A. M., Ali, K. A., El-Debss, T. M., Mayhoub, A. S., Amr, A. G., Abdel-Hafez, N. A., and Abdulla, M. M. (2010). Design, synthesis and structure-activity relationship study of novel pyrazole-based heterocycles as potential antitumor agents. *Eur J Med Chem*, 45(12), 5887-5898.
71. Balbi, A., Anzaldi, M., Maccio, C., Aiello, C., Mazzei, M., Gangemi, R., Castagnola, P., Miele, M., Rosano, C., and Viale, M. (2011). Synthesis and biological evaluation of novel pyrazole derivatives with anticancer activity. *Eur J Med Chem*, 46(11), 5293-5309.
72. El-Gamal, M. I., and Oh, C.-H. (2011). Design and synthesis of 3-(3-chloro-4-substituted phenyl)-4-(pyridin-4-yl)-1hpyrazole- 1-carboxamide derivatives and their antiproliferative activity against melanoma cell line. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 32(3), 821-828.
73. Zaninetti, R., Cortese, S. V., Aprile, S., Massarotti, A., Canonico, P. L., Sorba, G., Grosa, G., Genazzani, A. A., and Pirali, T. (2013). A concise synthesis of pyrazole analogues of combretastatin a1 as potent anti-tubulin agents. *ChemMedChem*, 8(4), 633-643.
74. Tsyganov, D. V., Konyushkin, L. D., Karmanova, I. B., Firgang, S. I., Strelenko, Y. A., Semenova, M. N., Kiselyov, A. S., and Semenov, V. V. (2013). Cis-restricted 3-aminopyrazole analogues of combretastatins: Synthesis from plant polyalkoxybenzenes and biological evaluation in the cytotoxicity and phenotypic sea urchin embryo assays. *J Nat Prod*, 76(8), 1485-1491.
75. Xu, Q., Qi, H., Sun, M., Zuo, D., Jiang, X., Wen, Z., Wang, Z., Wu, Y., and Zhang, W. (2015). Synthesis and biological evaluation of 3-alkyl-1,5-diaryl-1h-pyrazoles as rigid analogues of combretastatin a-4 with potent antiproliferative activity. *PLoS One*, 10(6), 0128710.
76. Jain, R., Mathur, M., Lan, J., Costales, A., Atallah, G., Ramurthy, S., Subramanian, S., Setti, L., Feucht, P., Warne, B., Doyle, L., Basham, S., Jefferson, A. B., Lindvall, M., Appleton, B. A., and Shafer, C. M. (2015). Discovery of potent and selective rsk inhibitors as biological probes. *J Med Chem*, 58(17), 6766-6783.

77. Hu, C., Gao, Y., and Du, W. (2016). Design, synthesis, and biological evaluation of pyrazole derivatives. *Chem Biol Drug Des*, 87(5), 673-679.
78. Rowlands, M. G., Newbatt, Y. M., Prodromou, C., Pearl, L. H., Workman, P., and Aherne, W. (2004). High-throughput screening assay for inhibitors of heat-shock protein 90 atpase activity. *Anal Biochem*, 327(2), 176-183.
79. Cankara Pirol, Ş., Çalışkan, B., Durmaz, I., Atalay, R., and Banoglu, E. (2014). Synthesis and preliminary mechanistic evaluation of 5-(p-tolyl)-1-(quinolin-2-yl)pyrazole-3-carboxylic acid amides with potent antiproliferative activity on human cancer cell lines. *Eur J Med Chem*, 87, 140-149.
80. Bennett, A., Stamford, I. F., Berstock, D. A., Dische, F., Singh, L., and A'hern, R. P. (1989). Breast cancer, prostaglandins and patient survival. *Br J Cancer*, 59(2), 268-275.
81. Yoshinaka, R., Shibata, M. A., Morimoto, J., Tanigawa, N., and Otsuki, Y. (2006). Cox-2 inhibitor celecoxib suppresses tumor growth and lung metastasis of a murine mammary cancer. *Anticancer Res*, 26(6B), 4245-4254.
82. Saxena, P., Sharma, P. K., and Purohit, P. (2020). A journey of celecoxib from pain to cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 147, 106379.
83. Lu, X. Y., Wang, Z. C., Ren, S. Z., Shen, F. Q., Man, R. J., and Zhu, H. L. (2016). Coumarin sulfonamides derivatives as potent and selective cox-2 inhibitors with efficacy in suppressing cancer proliferation and metastasis. *Bioorg Med Chem Lett*, 26(15), 3491-3498.
84. Sabat, M., Wang, H., Scorch, N., Lawson, J. D., Atienza, J., Kamran, R., Hixon, M. S., and Dougan, D. R. (2017). Design, synthesis and optimization of 7-substituted-pyrazolo[4,3-b]pyridine alk5 (activin receptor-like kinase 5) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 27(9), 1955-1961.
85. Wang, H., Chen, M., Sang, X., You, X., Wang, Y., Paterson, I. C., Hong, W., and Yang, X. (2020). Development of small molecule inhibitors targeting tgfbeta ligand and receptor: Structures, mechanism, preclinical studies and clinical usage. *Eur J Med Chem*, 191, 112154.
86. Romagnoli, R., Baraldi, P. G., Salvador, M. K., Camacho, M. E., Preti, D., Tabrizi, M. A., Bassetto, M., Brancale, A., Hamel, E., Bortolozzi, R., Basso, G., and Viola, G. (2012). Synthesis and biological evaluation of 2-substituted-4-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)-5-aryl thiazoles as anticancer agents. *Bioorg Med Chem*, 20(24), 7083-7094.
87. Salehi, M., Amini, M., Ostad, S. N., Riazi, G. H., Assadieskandar, A., Shafiei, B., and Shafiee, A. (2013). Synthesis, cytotoxic evaluation and molecular docking study of 2-alkylthio-4-(2,3,4-trimethoxyphenyl)-5-aryl-thiazoles as tubulin polymerization inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 21(24), 7648-7654.

88. Gust, R., Keilitz, R., and Schmidt, K. (2001). Investigations of new lead structures for the design of selective estrogen receptor modulators. *J Med Chem*, 44(12), 1963-1970.
89. Schafer, A., Wellner, A., Strauss, M., Schafer, A., Wolber, G., and Gust, R. (2012). Influence of chlorine or fluorine substitution on the estrogenic properties of 1-alkyl-2,3,5-tris(4-hydroxyphenyl)-1h-pyrroles. *J Med Chem*, 55(22), 9607-9618.
90. Wolin, R. L., Bembenek, S. D., Wei, J., Crawford, S., Lundeen, K., Brunmark, A., Karlsson, L., Edwards, J. P., and Blevitt, J. M. (2008). Dual binding site inhibitors of b-raf kinase. *Bioorg Med Chem Lett*, 18(9), 2825-2829.
91. Wang, L., Woods, K. W., Li, Q., Barr, K. J., McCroskey, R. W., Hannick, S. M., Gherke, L., Credo, R. B., Hui, Y. H., Marsh, K., Warner, R., Lee, J. Y., Zielinski-Mozng, N., Frost, D., Rosenberg, S. H., and Sham, H. L. (2002). Potent, orally active heterocycle-based combretastatin a-4 analogues: Synthesis, structure-activity relationship, pharmacokinetics, and in vivo antitumor activity evaluation. *J Med Chem*, 45(8), 1697-1711.
92. Tron, G. C., Pagliai, F., Del Grosso, E., Genazzani, A. A., and Sorba, G. (2005). Synthesis and cytotoxic evaluation of combretafurazans. *J Med Chem*, 48(9), 3260-3268.
93. Guan, Q., Yang, F., Guo, D., Xu, J., Jiang, M., Liu, C., Bao, K., Wu, Y., and Zhang, W. (2014). Synthesis and biological evaluation of novel 3,4-diaryl-1,2,5-selenadiazol analogues of combretastatin a-4. *Eur J Med Chem*, 87, 1-9.
94. Jhaveri, K., and Modi, S. (2015). Ganetespib: Research and clinical development. *Onco Targets Ther*, 8, 1849-1858.
95. Ying, W., Du, Z., Sun, L., Foley, K. P., Proia, D. A., Blackman, R. K., Zhou, D., Inoue, T., Tatsuta, N., Sang, J., Ye, S., Acquaviva, J., Ogawa, L. S., Wada, Y., Barsoum, J., and Koya, K. (2012). Ganetespib, a unique triazolone-containing hsp90 inhibitor, exhibits potent antitumor activity and a superior safety profile for cancer therapy. *Mol Cancer Ther*, 11(2), 475-484.
96. Internet: Clinicaltrials.Gov. (2020). *Ganetespib's clinical trials*. Retrieved from Web: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=ganetespib&cntry=&state=&city=&dist=>, Son Erişim Tarihi:13/03/2020.
97. Bendell, J. C., Falchook, G., Sen, S., Johnson, M. L., Jerkovic, G., Sarapa, N., Vilimas, R., Kriksciukaite, K., Mei, L., Wooster, R., Bloss, J., and Thomas, A. (2019). First in human phase i/ia study of pen-866, a heat shock protein 90 (hsp90) ligand – sn38 conjugate for patients with advanced solid tumours: Phase i results. *Annals of Oncology*, 30, 172-173.

98. İnternet: Clinicaltrials.Gov. (2020). *Pen-866 in patients with advanced solid malignancies*. Retrieved from Web: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03221400>, Son Erişim Tarihi:12/03/2020.
99. Durmaz, I., Guven, E. B., Ersahin, T., Ozturk, M., Calis, I., and Cetin-Atalay, R. (2016). Liver cancer cells are sensitive to lanatoside c induced cell death independent of their pten status. *Phytomedicine*, 23(1), 42-51.
100. Jones, B. (1935). 426. The halogenation of phenolic ethers and anilides. Part v. Alkyl and ω -substituted-alkyl ethers. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*(0), 1831-1835.
101. Khider, A. K., Hawaiz, F. E., Taha, S. O., and Ahmed, M. S. (2011). Synthesis and antimicrobial ctivity of 3-(4-(4-chlorobenzyloxy) phenyl)-1-phenyl-5-(2-chlorophenyl) pyrazoline (3) on" e. Coli" in mice. *Asian Journal of Medical Sciences*, 3(4), 158-163.
102. Celik, H., Ekmekci, G., Ludvik, J., Picha, J., and Zuman, P. (2006). Electroreduction of aromatic oximes: Diprotonation, adsorption, imine formation, and substituent effects. *J Phys Chem B*, 110(13), 6785-6796.
103. Ismail, T., Shafi, S., Singh, P. P., Qazi, N. A., Sawant, S. D., Ali, I., Khan, I. A., Kumar, H., Qazi, G. N., and Alam, M. S. (2008). Biologically active hydroxymoyl chlorides as antifungal agents, *Indian Journal of Chemistry*, 740-747.
104. Jenkins, S. S. (1934). The grignard reaction in the synthesis of ketones. V. The preparation of the isomeric p-chlorobenzanisoin. *Journal of the American Chemical Society*, 56(5), 1137-1138.
105. Fossey, C., Vu, A.-H., Vidu, A., Zarafu, I., Laduree, D., Schmidt, S., Laumond, G., and Aubertin, A.-M. (2007). Synthesis of prodrug-type anti-hiv agents conjugating a reverse transcriptase inhibitor to a hiv-1 integrase inhibitor by a spontaneously cleavable linker. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 22(5), 591-607.
106. Wang, Z.-M., Li, X.-M., Xu, W., Li, F., Wang, J., Kong, L.-Y., and Wang, X.-B. (2015). Acetophenone derivatives: Novel and potent small molecule inhibitors of monoamine oxidase b. *MedChemComm*, 6(12), 2146-2157.
107. Lin, Y.-I., and Lang Jr, S. A. (1980). New synthesis of isoxazoles and isothiazoles. A convenient synthesis of thioenaminones from enamminones. *The Journal of Organic Chemistry*, 45(24), 4857-4860.
108. Rosenberg, D., and Strehlike, P. (1976). Chemotherapeutische nitroheterocyclen, xxvi. 5-nitro-2-thiazolyipyrazole und 5-nitro-2-thiazolylisoxazole aus 1,3-dicarbonylverbindungen der nitrothiazolreihe. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 1976(1), 13-21.

109. Mohan, A., Raghava, G., and Vidavalur, S. (2017). Design and synthesis of 4,5-diaryl/heteroarylthiophene-2-carboxylic acid derivatives and evaluation of their biological activities. *Heterocyclic Communications*, 23, 9-14.
110. Aydin, A., Akkurt, M., Turanli, S., Banoglu, E., and Ozcelik, N. (2021). Crystal structure and hirshfeld surface analysis of 1-(4-chlorophenyl)-5-{4-[(2-methylphenyl) methoxy] phenyl}-1h-pyrazole. *X-ray Structure Analysis Online*, 37, 77-79.
111. Aydin, A., Akkurt, M., Turanli, S., Lengerli, D., Banoglu, E., and Ozcelik, N. D. (2021). Crystal structure and hirshfeld surface analysis of 4-(4-chlorophenyl)-5-methyl-3-{4-[(2-methylphenyl) methoxy] phenyl}-1, 2-oxazole. *Acta Crystallographica Section E: Crystallographic Communications*, 77(4), 346-350.
112. Nogueira, V., Park, Y., Chen, C. C., Xu, P. Z., Chen, M. L., Tonic, I., Unterman, T., and Hay, N. (2008). Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. *Cancer Cell*, 14(6), 458-470.
113. Buontempo, F., Ersahin, T., Missiroli, S., Senturk, S., Etro, D., Ozturk, M., Capitani, S., Cetin-Atalay, R., and Neri, M. L. (2011). Inhibition of akt signaling in hepatoma cells induces apoptotic cell death independent of akt activation status. *Invest New Drugs*, 29(6), 1303-1313.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : TURANLI, Sümeyye :

Uyruğu :Türkiye Cumhuriyeti

Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Kimya Ana Bilim Dalı	Devam ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Eczacılık Fakültesi	2014
Lise	İskenderun Cumhuriyet Anadolu Lisesi	2009
İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2015-devam ediyor	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dili

İngilizce

Yayınlar

- Özdemir, A., **Turanli, S.**, Çaliskan B., Arka M., and Banoglu, E. (2020). Evaluation of cytotoxic activity of new benzimidazole-piperazine hybrids against human MCF-7 and A549 cancer cells. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 53, 11, 1036-1046
- Aydin A., Akkurt M., **Turanli S.**, Lengerli D., Banoğlu E., Ozcelik N.D. (2021) Crystal structure and Hirshfeld surface analysis of 4-(4-chlorophenyl)-5-methyl-3-{4-[(2-methylphenyl)methoxy]phenyl}-1,2-oxazole. *Acta Crystallographica SectionE: Crystallographic Communications*, 77,34, 6-350
- Turanli S.**, Uslu A. G., Özdemir A. (2020). Synthesis of novel potential ROCK inhibitors and their antimigratory effects. *Organic Communications*, 13, 4, 165-174

4. Aydın, A., Akkurt, M., **Turanlı, S.**, Banoglu, E., & Ozcelik, N. (2021). Crystal Structure and Hirshfeld Surface Analysis of 1-(4-Chlorophenyl)-5-{4-[(2-methylphenyl) methoxy] phenyl}-1H-Pyrazole. X-ray Structure Analysis Online, 37, 77-79

Patentler

1. Antikanser Aktiviteye Sahip Yeni Visinal Diaril Heterosiklik Bileşik Türevler (Ulusal Patent, Başvuru Numarası: 2019/14610)



EKLER**EK-1. Etik kurul kararı**

ORTA DOĞU TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARLARI

KARAR SAYISI : 12	KARAR TARİHİ: 25.06.2015
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Erden Banoğlu ile ODTÜ FEF Biyolojik Bilimler Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Mesut Muyan'ın' Etik-2015/12 no'lu "Meme ve Karaciğer Kanserinin Tedavisi için PI3K/Akt Sinyal Yolunu Hedefleyen Yeni Aday İlaç Molekülü Geliştirme ve Ön Klinik Çalışmaları" başlıklı araştırma projesinin etik başvurusu değerlendirilmiştir. Etik Kurul'un sayı ve kullanım amaçlarının ve projenin deney hayvanlarına ilişkin yönlerinin O.D.T.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesinde belirtilen "Hayvan Deneyleri ile İlgili Etik İlkeler" dikkate alınarak hazırlandığı saptanmıştır. Bu değerlendirme sonucu çalışmanın yapılmasının hayvan etiği açısından uygun olduğu oy çokluğu/oy birliği ile onaylanmıştır.	
Prof. Dr. Gülay Özcengiz Başkan	Doç. Dr. Mesut Muyan Başkan Vekili
Prof. Dr. Orhan Adalı Üye	Prof. Dr. Vasıf Hasırcı Üye
Prof. Dr. İnci Togan Üye	Nilüfer Golar Sivil Üye
Prof. Dr. Ayşen Tezcaner Üye	Doç. Dr. Barış Parkan Üye
Doç. Dr. Sreeparna Banerjee Üye	Şakir Yıldırım Vet. Hekim, Üye



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..