

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**POTANSİYEL PROTEAZOM İNHİBİTÖRÜ
BİR GRUP KARBOSİKLİK VE HETEROSİKLİK BİLEŞİĞİN
SENTEZ VE BİYOAKTİVİTE ÇALIŞMALARI**

Farmasötik Kimya Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Arş. Gör. Uzm. Şirin UYSAL

Danışman

Doç. Dr. Zeynep SOYER

İZMİR

2017

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**POTANSİYEL PROTEAZOM İNHİBİTÖRÜ
BİR GRUP KARBOSİKLİK VE HETEROSİKLİK BİLEŞİĞİN
SENTEZ VE BİYOAKTİVİTE ÇALIŞMALARI**

Farmasötik Kimya Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Arş. Gör. Uzm. Şirin UYSAL

Danışman

Doç. Dr. Zeynep SOYER

İZMİR

2017

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan :.....

(Danışman)

Üye :.....

Üye :.....

Üye :.....

Üye :.....

Doktora tezinin kabul edildiği tarih:.....

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının her aşamasında hoşgörü ve sabırla yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, tüm bu süre zarfında çok değerli bilgi ve katkılarıyla bana destek olan danışman hocam **Sayın Doç. Dr. Zeynep SOYER'e**,

Doktora eğitimim süresince her konuda değerli yardım ve desteklerini gördüğüm hocalarım, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Başkanı **Sayın Prof. Dr. Varol PABUÇÇUOĞLU'na** ve **Sayın Prof. Dr. Erçin ERCİYAS'a**,

Biyolojik aktivite çalışmalarının yapılmasındaki katkılarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi **Sayın Doç. Dr. Petek BALLAR KIRMIZIBAYRAK'a** ve **Arş. Gör. Recep İLHAN'a**,

IR, kütle ve elementel analizlerin yapılmasındaki katkılarından dolayı **E.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarı FABAL'a**,

NMR spektrumlarının alınmasındaki katkılarından dolayı **E.Ü. NMR EBİLTEM Uydu Laboratuvarı'na**,

Tez çalışmalarım sırasında desteklerini her zaman hissettiğim **sayın hocalarım ve sevgili çalışma arkadaşlarıma**,

Hayatımın her evresinde sonsuz sevgi ve sabırla yanımda olarak bugünlere gelmemi sağlayan **değerli aileme** ve tez çalışmam süresince hiçbir fedakarlıktan kaçınmayarak sıkıntılarımı paylaşan, bana moral kaynağı olan **Mustafa KARA'ya**, en içten sevgi ve saygılarımı sunar, sonsuz teşekkür ederim...

İzmir, 2017

Şirin UYSAL

Bu tez, E.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (Proje No:14/ECZ/042) ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (Proje No:116S300) tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Potansiyel Proteazom İnhibitörü Bir Grup Karbosiklik Ve Heterosiklik Bileşiğin Sentez ve Biyoaktivite Çalışmaları

Ubikitin proteazom sistemi (UPS) bütün ökaryotik hücrelerin çekirdeğinde ve sitozolünde yer alan ana proteolitik sistemdir. Bu proteolitik sistem, hücre büyümesi, farklılaşması, apoptoz, sinyal iletimi, DNA tamiri, antijen oluşum süreci ve inflamatuvar yanıt oluşumu gibi çok sayıda önemli biyolojik süreçte görev alan birçok proteinin yıkımı için önem taşımaktadır. Ubikitin proteazom sisteminin moleküler ve fonksiyonel özellikleri birçok araştırma grubu tarafından araştırılmış ve bu sistem içindeki bozuklukların başta kanser olmak üzere beyin iskemisi, müsküler rahatsızlıklar, inflamasyon, otoimmün hastalıklar, kistik fibröz, viral enfeksiyonlar, diyabet, felç, nörodejeneratif hastalıklar ve kalp hastalıkları gibi pek çok patolojik durumla ilişkili olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu nedenle, ubikitin proteazom sisteminin bileşenlerini spesifik olarak hedefleyen inhibitörlerin veya indükleyicilerin geliştirilmesi, çok geniş yelpazedeki bu hastalık gruplarının tedavisi için büyük potansiyele sahip uygun bir strateji olarak kabul edilmiştir. Bir multiproteaz enzim kompleksi olan proteazom, UPS'nin temel bileşenidir ve bu yolakta protein yıkımının yürütülmesinde önemli rol oynamaktadır. Terapötik bir hedef olarak proteazomun önemi, proteazom inhibitörü Bortezomib'in klinik başarısıyla gösterilmiştir. Bir dipeptidil boronik asit türevi olan Bortezomib (Velcade® , PS-341), multipl miyelom tedavisinde ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA)'nden onay alan ilk proteazom inhibitörüdür. Bortezomib'in multipl miyelom tedavisindeki klinik yararlarına rağmen, ciddi yan etkileri, kazanılmış ilaç direnci ve yetersiz farmakokinetik özellikleri nedeniyle selektif etkili yeni proteazom inhibitörlerine hala ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu amaçla son zamanlarda birçok araştırma grubu tarafından farklı kimyasal yapıya sahip yeni ve selektif etkili proteazom inhibitörü bileşiklerin keşfine yönelik yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Bu araştırmalar sonucunda, PI-083 kodlu naftokinon türevi bileşik, yakın zamanda proteazom inhibitörü olarak rapor edilmiştir. PI-083 bileşiği Bortezomib ile karşılaştırıldığında, bu bileşiğin daha geniş bir antitümör aktiviteye sahip olduğu, *in vitro* ve *in vivo* olarak normal hücrelere oranla kanserli hücrelere karşı daha yüksek seçicilik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu

nedenle, PI-083 ve bu bileşimin taşıdığı naftokinon iskeleti yeni antiproliferatif ve proteazom inhibitörü bileşiklerin geliştirilmesi için ümit verici yapılar olarak tanımlanmıştır.

Tez çalışmamız kapsamında bu verilerden yola çıkarak, terapötik açıdan etkin ve selektif, yeni proteazom inhibitörü moleküllerin geliştirilmesi amacıyla PI-083 kodlu proteazom inhibitörü bileşik lider moleköl olarak seçilmiş ve bileşik üzerinde daha önce yapılan yapı-etki çalışmaları sonucunda öngörülen hipotetik farmakoforik yapı dikkate alınarak naftokinon çekirdeği taşıyan sülfonamid ve karboksamid türevi 41 adet bileşik tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin yapı teyitleri spektral (IR, ¹H NMR, kütle) ve elementel analiz yöntemleriyle yapılmıştır.

Bileşiklerin antiproteazomal aktivitelerini tespit etmek amacıyla insan meme kanseri hücre hattında (MCF-7) sırasıyla, WST-1 hücre proliferasyon yöntemiyle sitotoksik özellikleri, immüno blotlama tekniğiyle neden oldukları toplam poliubikitine olmuş protein birikim düzeyleri belirlenmiş ve yüksek seviyede poliubikitine olmuş protein birikimine neden olan bileşiklerin proteazom kimotripsin benzeri aktivite inhibisyonları florometrik yöntem ile *in vitro* olarak incelenmiştir

Biyolojik aktivite sonuçlarına göre, sülfonamid ve karboksamid genel yapısına sahip final bileşiklerimizin, değişen oranlarda sitotoksik aktiviteye ve poliubikitine olmuş protein birikimine neden oldukları gözlenmiştir. Yüksek seviyede poliubikitine olmuş protein birikimine neden olan seçili bileşiklerin kimotripsin benzeri aktivite inhibisyonları incelendiğinde ise amit azotunda 2-kloro-3-piridil grubu taşıyan NS26 kodlu sülfonamid türevi bileşimin, lider bileşikten istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05) düzeyde daha yüksek proteazom kimotripsin benzeri aktivite inhibisyonu gösterdiği tespit edilmiştir.

Bu çalışma sonucunda elde ettiğimiz verilerin, yeni proteazom inhibitörü bileşiklerin keşfine yönelik araştırmalar için yol gösterici olacağı ve literatüre önemli katkılar sağlayacağı düşüncesindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Ubikitin proteazom sistemi; proteazom inhibitörleri; naftokinon; sentez.

ABSTRACT

Synthesis and Bioactivity Studies of Some Carbocyclic and Heterocyclic Compounds as Potential Proteasome Inhibitors

The ubiquitin proteasome system (UPS) is the main proteolytic system in the nucleus and cytosol of all eukaryotic cells. This system is important for the destruction of most of the proteins involved in many important biological processes such as cell growth, cell differentiation, apoptosis, signal transduction, DNA repair, antigen process and inflammatory response. The molecular and functional characteristics of the UPS have been investigated and it has been revealed that many disorders within this system are related with many diseases such as brain ischemia, muscular disorders, inflammation, autoimmune diseases, cystic fibrosis, viral infections, diabetes, stroke, neurodegenerative diseases, heart diseases and especially cancer. Therefore, the development of inhibitors specifically targeting the components of the ubiquitin proteasome system has been assumed as a favourable strategy for the treatment of these diseases. Proteasome, a multiprotease enzyme complex, is a major component of the ubiquitin proteasome system and it plays an important role in the protein degradation pathway. Importance of proteasome as a therapeutic target has been proved by the clinical success of Bortezomib. Bortezomib, a dipeptidyl boronic acid derivative, is the first proteasome inhibitor approved by the US Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of multiple myeloma. Despite the clinical benefits of bortezomib in the treatment of multiple myeloma, new selective proteasome inhibitors are still required because of its crucial side effects, drug resistance potential and insufficient pharmacokinetic properties.

For this purpose, research studies for the discovery of new and selective proteasome inhibitors have been going on by many research groups. As a result of these investigations, the naphthoquinone derivative encoded PI-083 has recently been reported as a proteasome inhibitor. It has been shown that PI-083 has a broader antitumor activity and is more selective against cancer cells compared to bortezomib *in vitro* and *in vivo*. Therefore, naphthoquinone scaffold of PI-083 have been acknowledged as promising core structure for the development of new proteasome inhibitors.

In our dissertation, PI-083-encoded proteasome inhibitor was selected as the lead compound in order to develop therapeutically effective and selective new proteasome inhibitors and the hypothetical pharmacophore structure predicted by the structure-activity relationship studies on this compound has been realized. With this purpose 41 compounds of sulfonamide and carboxamide derivatives bearing naphthoquinone core were designed and synthesized. Structural identification of the synthesized compounds were confirmed by spectral (IR, ¹H NMR, MS) and elemental analysis methods.

The antiproteasomal activities of the compounds on the human breast cancer cell line (MCF-7), the cytotoxic properties and the total polyubiquitinated protein accumulation levels of the compounds were determined by WST-1 cell proliferation assay and the immunoblotting technique, respectively. Moreover, inhibition of proteasomal chymotrypsin-like activity of compounds which cause high level of polyubiquitinated protein accumulation has been investigated by fluorometric method *in vitro*.

According to the biological activity results, it has been observed that our compounds with sulfonamide and carboxamide structure cause cytotoxic activity and polyubiquitinated protein accumulation at various ratios. The evaluation of the inhibition of chymotrypsin-like activity of the selected compounds which cause high level of polyubiquitinated protein accumulation has revealed that the sulfonamide derivative bearing 2-chloro-3-pyridyl group on amide nitrogen encoded NS26 exhibited significant ($p < 0.05$) proteasome chymotrypsin-like activity inhibition compared to the lead compound.

We believe that data obtained from this study will significantly contribute for the discovery of novel proteasome inhibitors, as well as provide significant contributions to the literature.

Keywords: Ubiquitin proteasome system; proteasome inhibitors; naphthoquinone; synthesis.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	III
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	8
2.1. İntraselüler Proteoliz ve Ubikitin Proteazom Sistemi.....	8
2.1.1. Ubikitinasyon.....	10
2.1.2. Ubikitinasyon Sistemi Enzimleri.....	12
2.1.3. 26S Proteazom ve Katalitik β Alt Birimleri.....	13
2.1.4. Proteazomun Lokalizasyonu.....	18
2.2. Terapötik Bir Hedef Olarak Proteazom.....	18
2.3. Proteazom ile İlişkili Hastalıklar.....	19
2.3.1. Kanser.....	20
2.3.1.1. Kanser Hücrelerinde Proteazom İnhibisyonu İçin Klinik Hedefler.....	21
2.3.2. İnflamatuar ve Otoimmün Hastalıklar.....	25
2.3.3. Nörodejeneratif Hastalıklar.....	27
2.3.3.1. Alzheimer Hastalığı.....	28
2.3.3.2. Parkinson Hastalığı (PH).....	29
2.3.3.3. Amiyotropik Lateral Skleroz (ALS).....	30
2.3.3.4. Poliglutamin Hastalıkları.....	31
2.3.4. Kardiyovasküler Hastalıklar.....	32
2.3.4.1. Kardiyak İskemi/Reperfüzyon Hasarları.....	33
2.3.4.2. Kardiyak Hipertrofi ve Kalp Yetmezliği.....	34
2.3.4.3. Ateroskleroz.....	34
2.3.4.4. Diyabetik Komplikasyonlar.....	35
2.3.5. Yaşlanma.....	35

2.4. Proteazom İnhibitörleri	36
2.4.1. Kovalent İnhibitörler	38
2.4.1.1. Peptit Aldehitler	39
2.4.1.2. Peptit Vinil Sülfonlar	43
2.4.1.3. Peptit Boronatlar	47
2.4.1.4. Peptit α' , β' -epoksiketonlar	51
2.4.1.5. β -Lakton Türevleri	55
2.4.1.6. Peptit α -ketoaldehitler	61
2.4.1.7. Peptit Vinil Amitler (Sirbaktinler)	62
2.4.1.8. Peptit α -keto-1,3,4-oksadiazoller (Peptit Keto-Oksadiazoller).....	65
2.4.2. Nonkovalent İnhibitörler	68
2.4.2.1. Siklik Peptitler.....	68
2.4.2.2. Nonsiklik Peptitler ve Peptit İzosterleri	73
2.4.2.3. Peptit Yapılı Olmayan İnhibitörler (Nonpeptit İnhibitörler).....	77
2.4.2.4. Nonspesifik Proteazom İnhibitörleri	82
2.4.3. Allosterik İnhibitörler	87
2.4.4. Yöre-Spesifik İnhibitörler	89
2.5. Tedavide Kullanılan Mevcut Proteazom İnhibitörü Bileşikler	93
2.5.1. Bortezomib (PS-341, Velcade [®])	94
2.5.2. Carfilzomib (PR-171, Kyprolis [®])	99
2.5.3. Ixazomib (MLN-9708, MLN-2238, Ninlaro [®])	101
2.6. Klinik Araştırma Aşamasındaki Proteazom İnhibitörü Bileşikler	103
2.6.1. Marizomib (Salinosporamide A, NPI-0052).....	103
2.6.2. Oprozomib (ONX-0912, PR-047).....	106
2.6.3. Delanzomib (CEP-18770).....	108
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	110

3.1. Kimyasal Çalışmalar	110
3.1.1. Materyal	110
3.1.2. Genel Sentez Yöntemleri	110
3.1.2.1. Sülfonamit Türevi Bileşiklerin Sentezi	110
3.1.2.2. Karboksamit Türevi Bileşiklerin Sentezi	111
3.1.3. Analitik Yöntemler.....	111
3.1.3.1. Erime Derecesi Tayini.....	111
3.1.3.2. Kromatografik Analizler	112
3.1.3.3. Spektral Analizler.....	112
3.1.3.4. Elementel Analizler.....	112
3.2. Biyoaktivite Çalışmaları	113
3.2.1. Materyal	113
3.2.2. Biyolojik Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	114
3.2.2.1. Örneklerin Hazırlanması	114
3.2.2.2. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	114
3.2.2.3. SDS-PAGE İşlemi Sırasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	114
3.2.2.4. Western Blotlama Sırasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	115
3.2.3. Hücre Kültürü.....	116
3.2.3.1. Hücre Hattının Seçimi.....	116
3.2.3.2. Pasajlama.....	116
3.2.3.3. İlaç Uygulama	117
3.2.4. WST-1 Hücre Proliferasyon Yöntemi.....	118
3.2.5. Hücre Lizatlanması ve Protein Miktar Tayini Yöntemi.....	118
3.2.5.1. Hücre Lizatlanması	118
3.2.5.2. Protein Miktar Tayini Yöntemi	118
3.2.6. Western Blotlama Yöntemi.....	119

3.2.6.1. Sodyum Dodesilsülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE).....	119
3.2.6.2. Transfer	120
3.2.6.3. Membrandaki Proteinlerin Görülmesi ve Bloklama	121
3.2.7. İmmünoablottlama	121
3.2.7.1. Görüntüleme.....	121
3.2.8. Proteazomun Kimotripsin Benzeri Aktivite İnhibisyonunun Tespit Edilmesi	122
3.2.9. İstatistiksel Analiz.....	123
4. BULGULAR	124
4.1. Sentezi Gerçekleştirilen Bileşiklere Ait Bulgular.....	124
4.1.1. 4-asetamidobenzen-sülfonil klorür (A0)	124
4.1.2. 4-amino- <i>N</i> -fenilbenzen-sülfonamid (A1).....	124
4.1.3. 4-amino- <i>N</i> -(2-etilfenil)benzen-sülfonamid (A2).....	125
4.1.4. 4-amino- <i>N</i> -(2-izopropilfenil)benzen-sülfonamid (A3)	125
4.1.5. 4-amino- <i>N</i> -(4-metoksifenil)benzen-sülfonamid (A9)	126
4.1.6. 4-amino- <i>N</i> -(3-nitrofenil)benzen-sülfonamid (A11)	126
4.1.7. 4-amino- <i>N</i> -(4-nitrofenil)benzen-sülfonamid (A12)	127
4.1.8. 4-amino- <i>N</i> -(2-klorofenil)benzen-sülfonamid (A13)	127
4.1.9. 4-amino- <i>N</i> -(3-klorofenil)benzen-sülfonamid (A14)	128
4.1.10. 4-amino- <i>N</i> -(4-klorofenil)benzen-sülfonamid (A15)	128
4.1.11. 4-amino- <i>N</i> -(4-bromofenil)benzen-sülfonamid (A16)	129
4.1.12. 4-amino- <i>N</i> -(naftalen-1-il)benzen-sülfonamid (A17).....	129
4.1.13. 4-(morfolinosülfonil)anilin (A18).....	130
4.1.14. 4-amino- <i>N</i> -(piridin-2-il)benzen-sülfonamid (A19).....	130
4.1.15. 4-amino- <i>N</i> -(piridin-3-il)benzen-sülfonamid (A20).....	131
4.1.16. 4-amino- <i>N</i> -(piridin-4-il)benzen-sülfonamid (A21).....	131

4.1.17. 4-amino- <i>N</i> -(3-metilpiridin-2-il)benzensulfonamid (A22)	132
4.1.18. 4-amino- <i>N</i> -(4-metilpiridin-2-il)benzensulfonamid (A23)	132
4.1.19. 4-amino- <i>N</i> -(5-metilpiridin-2-il)benzensulfonamid (A24)	133
4.1.20. 4-amino- <i>N</i> -(5-kloropiridin-2-il)benzensulfonamid (A25)	133
4.1.21. 4-amino- <i>N</i> -(2-kloropiridin-3-il)benzensulfonamid (A26)	134
4.1.22. 4-amino- <i>N</i> -(4-metiltiyazol-2-il)benzensulfonamid (A28)	134
4.1.23. 4-amino- <i>N</i> -(pirimidin-2-il)benzensulfonamid (A29).....	135
4.1.24. 4-amino- <i>N</i> -(5-metilizoksazol-3-il)benzensulfonamid (A30).....	135
4.1.25. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)benzoik asit (A31)	136
4.1.26. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -fenilbenzen sulfonamid (NS1).....	137
4.1.27. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(2- etilfenil)benzensulfonamid (NS2).....	138
4.1.28. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(2- izopropil)benzensulfonamid (NS3).....	139
4.1.29. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(4- metoksifenil)benzensulfonamid (NS9)	140
4.1.30. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(3- nitrofenil)benzensulfonamid (NS11)	141
4.1.31. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il) amino)- <i>N</i> -(4- nitrofenil)benzensulfonamid (NS12)	142
4.1.32. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(2- klorofenil)benzensulfonamid (NS13)	143
4.1.33. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(3- klorofenil)benzensulfonamid (NS14)	144
4.1.34. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(4- klorofenil)benzensulfonamid (NS15)	145

4.1.35.	<i>N</i> -(4-bromofenil)-4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)benzensulfonamid (NS16).....	146
4.1.36.	4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(naftalen-1-il)benzensulfonamid (NS17).....	147
4.1.37.	2-kloro-3-((4-(morfolinosulfonil)fenil)amino)naftalen-1,4-dion (NS18)....	148
4.1.38.	4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(piridin-2-il)benzensulfonamid (NS19).....	149
4.1.39.	4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(piridin-3-il)benzensulfonamid (NS20).....	150
4.1.40.	4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(piridin-4-il)benzensulfonamid (NS21).....	151
4.1.41.	4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(3-metilpiridin-2-il)benzensulfonamid (NS22).....	152
4.1.42.	4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(4-metilpiridin-2-il)benzensulfonamid (NS23).....	153
4.1.43.	4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(5-metilpiridin-2-il)benzensulfonamid (NS24).....	154
4.1.44.	4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(5-kloropiridin-2-il)benzensulfonamid (NS25).....	155
4.1.45.	4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(2-kloropiridin-3-il)benzensulfonamid (NS26).....	156
4.1.46.	4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(4-metiltiyazol-2-il)benzensulfonamid (NS28).....	157
4.1.47.	4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(pirimidin-2-il)benzensulfonamid (NS29).....	158
4.1.48.	4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(5-metilizoksazol-3-il)benzensulfonamid (NS30).....	159
4.1.49.	4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -fenilbenzamid (NK1).....	160

4.1.50.	4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(2- etilfenil)benzamid (NK2).....	161
4.1.51.	4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(2- metilfenil)benzamid (NK4).....	162
4.1.52.	4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(3- metilfenil)benzamid (NK5).....	163
4.1.53.	4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(<i>p</i> - tolil)benzamid (NK6).....	164
4.1.54.	4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(2- metoksifenil)benzamid (NK7)	165
4.1.55.	4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(3- metoksifenil)benzamid (NK8)	166
4.1.56.	4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(4- metoksifenil)benzamid (NK9)	167
4.1.57.	4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(3- nitrofenil)benzamid (NK11)	168
4.1.58.	4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(4- nitrofenil)benzamid (NK12)	169
4.1.59.	4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(2- klorofenil)benzamid (NK13).....	170
4.1.60.	4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(3- klorofenil)benzamid (NK14).....	171
4.1.61.	4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(4- klorofenil)benzamid (NK15).....	172
4.1.62.	<i>N</i> -(4-bromofenil)-4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2- il)amino)benzamid (NK16).....	173
4.1.63.	4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(naftalen-1- il)benzamid (NK17)	174
4.1.64.	2-kloro-3-((4-(morfolin-4-karbonil)fenil)amino)naftalen-1,4-dion (NK18)	175

4.1.65.	4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(piridin-1-3-il)benzamid (NK20)	176
4.1.66.	4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)- <i>N</i> -(5-metilizoksazol-3-il)benzamid (NK30)	177
4.2.	Biyolojik Aktivite Bulguları	178
5.	TARTIŞMA	184
5.1.	Bileşiklerin Spektral Bulgularının Değerlendirilmesi.....	187
5.2.	Bileşiklerin Biyolojik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi	193
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	197
7.	KAYNAKLAR	198

ÖZGEÇMİŞ

EKLER

TABLolar VE ŐEKİLLER DİZİNİ

Tablolar Dizini

Tablo 1. SDS-PAGE ayırma (resolving) jeli hazırlanması	120
Tablo 2. SDS-PAGE yığınlama (stacking) jeli hazırlanması	120
Tablo 3. Sülfonamit türevi final bileşiklerin MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktivite sonuçları.....	178
Tablo 4. Karboksamit türevi final bileşiklerin MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktivite sonuçları.....	179
Tablo 5. NS19, NS24, NS26, NS28-29 ve NK30 kodlu final bileşiklerin proteazom kimotripsin benzeri aktivite % inhibisyon sonuçları.....	183

Őekiller Dizini

Şekil 1. Tedavide kullanılan FDA onaylı proteazom inhibitörü bileşikler	4
Şekil 2. Faz I/II klinik deneme aşamasında olan proteazom inhibitörü bileşikler.....	4
Şekil 3. PI-083 kodlu proteazom inhibitörü bileşiğın açık kimyasal yapısı	5
Şekil 4. PI-083 bileşiğinden hareketle öngörölen hipotetik farmakoforik yapı.....	6
Şekil 5. 8 No lu bileşik.....	7
Şekil 6. Ubikitin proteazom sistemi.....	9
Şekil 7. Ubikitin proteazom sistemi tarafından protein yıkımının Şematik gösterimi.....	10
Şekil 8. Ubikitinasyon mekanizmasının Şematik gösterimi.....	12
Şekil 9. 26S proteazomun genel yapısı ve bileşenleri.....	14
Şekil 10. Proteazomal spesifik ceplere bağılı substrat peptit rezidülerinin yerleşimi.....	15
Şekil 11. Proteazomun katalitik mekanizması	16
Şekil 12. İmmünproteazom tipleri ve alt birimleri.....	17
Şekil 13. Peptit aldehit türevi proteazom inhibitörü bileşikler	41
Şekil 14. Peptit aldehit türevi bileşiklerin inhibisyon mekanizması.....	41

Şekil 15. MG115 ve MG132 kodlu bileşiklerin kimyasal yapıları.....	42
Şekil 16. Dipeptit aldehit türevi CEP-1612 kodlu bileşiğin kimyasal yapısı	43
Şekil 17. Peptit vinil sülfon yapılu bileşiklerin inhibisyon mekanizması.....	44
Şekil 18. Peptit vinil sülfon türevi proteazom inhibitörleri	45
Şekil 19. AcPRLN-VS ve AcYLLN-VS kodlu vinil sülfon türevi bileşiklerin kimyasal yapısı.....	46
Şekil 20. Aminoheksanoik asit rezidüleri ile uzatılmış trilösün peptit yapısına sahip vinil sülfon türevi bileşikler	47
Şekil 21. MG262 kodlu bileşiğin kimyasal yapısı	48
Şekil 22. Peptit boronat türevi bileşiklerin inhiibsyon mekanizması	49
Şekil 23. DFLB kodlu bileşiğin kimyasal yapısı	50
Şekil 24. Bortezomib (PS-341, Velcade®) bileşiğinin kimyasal yapısı.....	51
Şekil 25. Epoksomisın ve eponemisın bileşiklerinin kimyasal yapısı	52
Şekil 26. Dihidroeponemisın bileşiğinin kimyasal yapısı	52
Şekil 27. Peptit α,β' -epoksiketon türevi bileşiklerin etki mekanizması	53
Şekil 28. Peptit α,β' -epoksiketon türevi bileşikler	55
Şekil 29. Laktasistin bileşiğinin kimyasal yapısı.....	56
Şekil 30. Laktasistin ön ilacının aktif formu omuralid bileşiğine dönüşümü	56
Şekil 31. Omuralid bileşiğinin etki mekanizması	57
Şekil 32. PS-519 (MLN-519) kodlu bileşiğin kimyasal yapısı.....	58
Şekil 33. Belaktosin A ve C bileşiklerinin kimyasal yapısı.....	59
Şekil 34. Homobelaktosin C bileşiğinin kimyasal yapısı	60
Şekil 35. Peptit α -ketoaldehit türevi proteazom inhibitörü bileşikler.....	61
Şekil 36. Peptit α -ketoaldehitlerin etki mekanizması	62
Şekil 37. Sirbaktin türevi bileşiklerin etki mekanizması	63
Şekil 38. Siringolin A bileşiğinin kimyasal yapısı	64
Şekil 39. Glidobaktin A bileşiğinin kimyasal yapısı	64

Şekil 40. Sepafungin türevi bileşiklerin kimyasal yapısı.....	65
Şekil 41. PSI kodlu bileşikten hareketle peptit α -keto-1,3,4-oksadiazol türevi bileşiklerin gelişimi.....	67
Şekil 42. TMC-95 (A-D) kodlu bileşiklerin kimyasal yapısı	69
Şekil 43. TMC-95A kodlu bileşiğin proteazom aktif yöredeki etkileşimleri.	71
Şekil 44. Arjirin türevi bileşiklerin kimyasal yapısı	72
Şekil 45. Sistonemid A ve B bileşiklerinin kimyasal yapısı.....	73
Şekil 46. Ritonavir bileşiğinin kimyasal yapısı	74
Şekil 47. Benzilstatin peptit I bileşiğinin kimyasal yapısı.....	74
Şekil 48. Capped dipeptit I bileşiğinin kimyasal yapısı.....	75
Şekil 49. Capped dipeptit II bileşiğinin kimyasal yapısı	76
Şekil 50. CVT-659 kodlu bileşiğin kimyasal yapısı	76
Şekil 51. PI-083 kodlu bileşiğin kimyasal yapısı	78
Şekil 52. Şekil PI-083 kodlu bileşiğin kimotripsin benzeri aktif yöredeki etkileşimleri	79
Şekil 53. Naftokinon türevi 8 No lu bileşiğin aktif yöredeki etkileşimleri.....	81
Şekil 54. HU-10 kodlu bileşiğinin kimyasal yapısı	81
Şekil 55. HU-10 kodlu bileşiğin aktif yöredeki etkileşimleri	82
Şekil 56. Tiyostrepton ve Siomisin A bileşiklerinin kimyasal yapısı.....	84
Şekil 57. EGCG bileşiğinin kimyasal yapısı	85
Şekil 58. EGCG bileşiğinin aktif yörede etkileşimleri	85
Şekil 59. Pro-E bileşiğinin kimyasal yapısı	87
Şekil 60. Allosterik etkili proteazom inhibitörü PR-39 ve PR-11 kodlu bileşiklerin peptit dizileri.....	88
Şekil 61. 5AHQ, kliokinol ve klorokin bileşiklerinin kimyasal yapısı.....	89
Şekil 62. Kimotripsin benzeri aktif yöre inhibitörü YU-101, NC-005, NC-005-VS kodlu bileşikler.....	91

Şekil 63. Tripsin benzeri aktif yöre inhibitörü NC-002 ve NC-022 kodlu bileşikler	92
Şekil 64. Kaspaz benzeri aktif yöre inhibitörü YU-102, NC-001 ve LU-001 kodlu bileşikler.....	93
Şekil 65. Tedavide kullanılan proteazom inhibitörleri ve tedaviye giriş yılları	94
Şekil 66. Bortezomib'in kimotripsin benzeri aktif yörede etkileşimlerinin şematik gösterimi.....	98
Şekil 67. İnsan 20S proteazomu ile carfilzomib'in kristal yapısı	100
Şekil 68. Marizomib bileşiğinin etki mekanizması	104
Şekil 69. Sülfonamit türevi final bileşiklerin MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktivitelerinin grafiksel gösterimi	179
Şekil 70. Karboksamit türevi final bileşiklerin MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktivitelerinin grafiksel gösterimi.....	180
Şekil 71. Sülfonamit türevi final bileşiklerin MCF-7 hücre hattında K48 üzerinden sebep oldukları poliubikitine olmuş protein birikim düzeylerinin immünoablota ile görüntülenmesi.....	180
Şekil 72. Sülfonamit türevi NS1-3, NS9, NS11-19 kodlu final bileşiklerin MCF-7 hücre hattında sebep oldukları poliubikitine olmuş protein birikim düzeyleri	181
Şekil 73. Sülfonamit türevi NS19-26, NS28-30 kodlu final bileşiklerin MCF-7 hücre hattında sebep oldukları poliubikitine olmuş protein birikim düzeyleri	181
Şekil 74. NK15, NK18, NK20, NK30 kodlu bileşiklerin MCF-7 hücre hattında K48 üzerinden sebep oldukları poliubikitine olmuş protein birikim düzeylerinin immünoablota ile görüntülenmesi	182
Şekil 75. Karboksamit türevi NK15, NK18, NK20, NK30 kodlu final bileşiklerin MCF-7 hücre hattında sebep oldukları poliubikitine olmuş protein birikim düzeyleri.....	182
Şekil 76. NS19, NS24, NS26, NS28-29 ve NK30 kodlu final bileşiklerin IC ₅₀ ve 2xIC ₅₀ konsantrasyonlardaki proteazom kimotripsin benzeri aktivite inhibisyon düzeyleri.....	183

Şema Dizini

Şema 1. Sulfonamit türevi final bileşiklerin sentez şeması 185

Şema 2. Karboksamit türevi final bileşiklerin sentez şeması 186



KISALTMALAR

UPS: Ubikitin proteazom sistemi

E1: Ubikitin aktive edici enzim

E2: Ubikitin bağlayıcı enzim

E3: Ubikitin protein ligaz

DUB: Deubikitine edici enzim

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi

MM: Multipl miyelom

HTS: High Throughput Screening

MCF-7: İnsan meme kanseri hücre hattı

UBA: Ubikitin aktive edici enzim

UBC: Ubikitin konjuge edici enzim

β 1: Kaspaz benzeri proteolitik aktivite, C-L

β 2: Tripsin benzeri proteolitik aktivite, T-L

β 5: Kimotripsin benzeri proteolitik aktivite, ChT-L

BrAAP: Dallanmış zincirli amino asit tercihli proteolitik aktivite

SNAAP: Küçük nötral amino asit tercihli proteolitik aktivite

SucLLVY-MCA: süksinil-LeuLeuValTyr-7-amido-4-metilkumarin,

Z-GGL-MCA: *N*-karboksibenzil-GlyGlyLeu-MCA

Suc-AAF-MCA: *N*-süksinil-AlaAlaPhe-MCA

Boc-LRR-MCA: *N*-*t*-butiloksikarbonil-LeuArgArg-MCA

Boc-LGR-MCA: *N*-*t*-butiloksikarbonil-LeuGlyArg-MCA

BzVGR-MCA: benzoil-ValGlyArg-MCA

Z-LLE-MCA: *N*-karboksibenzil-LeuLeuGlu-MCA

AcYVAD-MCA: *N*-asetil-TyrValAlaAsp-MCA

IFN- γ : İnterferon- γ

TNF- α : Tümör nekroz faktör- α

i20S: İmmünproteazom 20S çekirdek kısım

β 1i: LMP2, düşük molekül ağırlıklı protein 2, *PSMB9*

β 2i: MECL-1, multikatalitik endopeptidaz kompleks-1, *PSMB10*

β 5i: LMP7, düşük molekül ağırlıklı protein 7, *PSMB8*

MHC-I: Majör histokompatibilite kompleksi sınıf I

NF- κ B: Nükleer faktör kappa B

I κ B: İnhibitör kappa B

Mdm2: Mouse double minute 2; bir tür E3 ubiquitin ligaz

ER: Endoplazmik retikulum

ERAD: Endoplazmik retikulum aracılı yıkım

UPR: Katlanmamış protein yanıtı

ALS: Amiyotropik Lateral Skleroz

NK: Doğal öldürücü hücreler

CH: Crohn hastalığı

İBH: İnflamatuvar bağırsak hastalığı

RA: Romatoid artrit

SLE: Sistemik lupus eritematozus

MS: Multipl skleroz

AH: Alzheimer hastalığı

PH: Parkinson hastalığı

HH: Huntington hastalığı

A β : β amiloid peptit

APP: Amiloid prekürsör protein

SN: Substantia nigra

SOD1: Süperoksit dismutaz 1

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

Kalpain inhibitör I: Ac-Leu-Leu-nLeu-al

Ntn: N terminal nükleofil

Z: Karboksibenzil

MDR: Çoklu ilaç direnci taşıyıcı sistem

Leupeptin: *N*-asetil-Leu-Leu-Arg-al

PSI: Z-Ile-Glu(OtBu)-Ala-Leu-al

PSII: Z-LLF-al

Kalpain inhibitör I: Ac-LLnL-al, ALLN, MG101

Kalpain inhibitör II: Ac-LLM-al, ALLM

MG132: Z-LeuLeuLeu-al

MG115: Z-LLnVa-al

NIP: 3-nitro-4-hidroksi-5-iyodofenilasetat

MG262: Z-Leu-Leu-Leu-boronat, PSIII

DFLB: Dansil-Phe-Leu-boronat

MOE: Molecular Operating Environment

NCI-60: Ulusal Kanser Enstitüsü altmış kanser hücre hattı paneli

Neuro-2a: Fare nöroblastoma hücre kültürü

A-549: İnsan akciğer kanseri epitelyal hücre hattı

5-LOX: 5-lipoksijenaz

EGCG: Epigallokateşin-3-gallat

EGC: Epigallokateşin

ECG: Epikateşin-3-gallat

HPLC: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

5AHQ: 5-amino-8-hidroksikinolin

RRMM: Relapse ve refrakter multipl miyelom

İTK: İnce tabaka kromatografisi

TEMED: *N,N,N',N'*-tetrametiletildiamin

TRIS: Tris(hidroksimetil)aminometan

2-ME: 2-merkaptoetanol

DOC: Deoksikolik asit sodyum tuzu

DMSO: Dimetil sülfoksit

FBS: Fötal sığır serumu (Fetal Bovine Serum)

PBS: Fosfat tamponu çözeltisi (Phosphate Buffer Saline)

RIPA: Radyoimmunopresipitasyon Assay

ATCC: American Type Culture Collection

DMEM: Dulbecco's Modification of Eagle's Medium

BCA: Bikinkoninik asit (bicinchoninic acid)

BSA: Sığır serum albumin proteini

HRP: Horse Radish Peroksidaz

SDS-PAGE: Sodyum dodesilsülfat poliakrilamit jel elektroforezi

1. GİRİŞ

Homeostazın sürdürülmesinde ve çeşitli hücrel fonksiyonların düzenlenmesinde önemli rol oynayan hücrel proteinlerin yıkımı oldukça kompleks bir süreç olup, sıkı bir denetim altında yapılmaktadır (1,2). Endozom-lizozom ve ubiquitin-proteazom yolları, hücrel proteinlerin yıkımı için bugüne kadar tanımlanmış iki ana yolağı oluşturmaktadır (3). Endozom-lizozom yolağı esas olarak hücre dışı ve transmembran proteinlerin nonspesifik olarak yıkımından sorumlu yolak olup, bu yolda görev alan lizozomlar, proteazlar ve hidrolitik enzimlerin hapsedildiği sitoplazmik membrana bağı veziküllerdir (4). Hücre içi proteinlerin %70-80'inin yıkımından sorumlu olan ubiquitin-proteazom yolağı ise 1970'li yılların sonu 1980'li yılların başında bu çalışmalarıyla Nobel ödülü kazanan Aaron Ciechanover, Avram Hershko ve Irwin Rose tarafından keşfedilmiş ve günümüzde ökaryotik hücrelerdeki intraselüler proteinlerin çoğunun bu yolak aracılığıyla yıkıldığı anlaşılmıştır (5,6).

Ubiquitin proteazom sistemi (UPS) hücre büyümesi, farklılaşması, apoptoz, sinyal iletimi, DNA tamiri, antijen oluşum süreci ve inflamatuvar yanıt oluşumu dahil olmak üzere birçok hücrel fonksiyonda ve homeostazın sürdürülmesinde önemli görevleri olan proteinlerin yıkımından sorumlu ana yolaktır (7-11). Bu yolağın ubiquitin, E1 (ubiquitin aktive edici enzim), E2 (ubiquitin bağlayıcı enzim), E3 (ubiquitin protein ligaz), deubikitine edici enzim (DUB) ve katalitik yıkımdan sorumlu ana bileşen proteazom olmak üzere birçok bileşene sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır (7-10,12,13). Ubiquitin-proteazom sistemi aracılığıyla protein yıkımı iki basamakta gerçekleşmektedir. İlk basamakta yıkıma uğrayacak protein E1, E2 ve E3 enzimleri varlığında 26S proteazom tarafından tanınmak üzere en az dört adet ubiquitin molekülü ile etiketlenmektedir. İkinci basamakta ise poliubikittenlenmiş protein, 26S proteazom kompleksi tarafından 3-22 amino asit uzunluğundaki küçük peptitlere yıkılmaktadır (14).

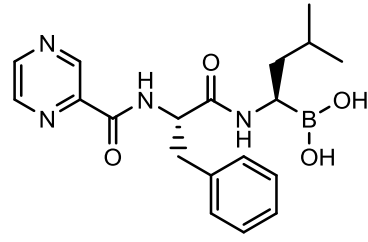
26S proteazom kompleksi bir adet 20S çekirdek kısım ve bu çekirdek kısmın her iki ucunu örten iki adet 19S düzenleyici parçadan oluşmaktadır. 19S düzenleyici kısımlar, kapak (lid) ve taban (base) olmak üzere iki bileşene ayrılmıştır. Yıkılmak üzere poliubikittenlenmiş proteinler, proteazoma girdikten sonra 19S kapak kısmı ile ilişkili olan deubikitine edici enzim (DUB) ailesi tarafından deubikitasyona tabi

tutulmaktadır. 19S taban bileşeni ise substrat proteinin düzleştirilmesinde ve bu düzleştirilmiş deubikitine substrat proteinin 20S gövde kısma iletilmesinde rol oynamaktadır. 20S katalitik gövde kısım dört adet üst üste oturmuş, heptamerik halkadan oluşan silindirik bir şekle sahiptir. İç kısımda yer alan 2 adet "β" halkası β1-β7, dış kısımda kalan 2 adet "α" halkası ise α1-α7 olmak üzere yedi adet alt birimden oluşmaktadır. α halkaları, substrat proteinin halka içine alınmasından ve yıkım ürünlerinin proteazom dışına çıkarılmasından sorumlu iken, β halkaları proteolitik aktiviteden sorumludur. Her iki β halkasında bulunan β1 alt birimler, kaspaz benzeri; β2 alt birimler tripsin benzeri ve β5 alt birimler ise kimotripsin benzeri proteolitik aktiviteden sorumlu katalitik bölgelerdir. Proteolitik yıkım, bu katalitik yörelerin N terminal treonin hidroksil grubu aracılığıyla gerçekleşmektedir (1,4,15–21).

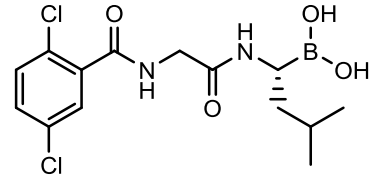
Ubikitin proteazom sisteminin moleküler ve fonksiyonel özellikleri birçok grup tarafından incelenmiştir. Çok yönlü fizyolojik rolü nedeniyle bu sistemin temel bileşeni olan proteazomun çeşitli hastalıklarda ve patolojik durumlarda yer aldığı tespit edilmiştir (22). Başta kanser olmak üzere otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, kalp hastalıkları, müsküler rahatsızlıklar, beyin iskemisi, inflamasyon, kistik fibröz, viral enfeksiyonlar, diyabet ve felç gibi pek çok patolojik durumla proteazomun ilişkili olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu nedenle, ubikitin-proteazom sisteminin bileşenlerini spesifik olarak hedefleyen inhibitörlerin geliştirilmesi, çok geniş yelpazedeki bu hastalıkların tedavisi için potansiyele sahip uygun bir strateji olarak kabul edilmiştir.

Ubikitin proteazom sisteminin ana bileşeni olan proteazomun inhibisyonu sonucunda, hücre içi düzenleyici proteinler hızlı bir şekilde birikerek hücre büyümesi önlenmekte ve apoptotik yolağın indüksiyonuyla hücre ölümü meydana gelmektedir. Kanserli hücrelerin normal hücrelere göre daha yüksek seviyede proteazomal aktiviteye sahip olduğu ve proteazom inhibisyonunun proapoptotik etkilerine karşı daha duyarlı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle proteazom inhibisyonu, terapötik açıdan önem taşıyan yeni antikanser ilaçların geliştirilmesinde ilgi odağı haline gelmiştir. Ayrıca selektif proteazom inhibitörleri inflamasyon, immün hastalıklar ve kalp damar hastalıkları gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde de ümit verici bileşikler olarak yoğun bir şekilde araştırılmaktadır (1,16,17,23–30).

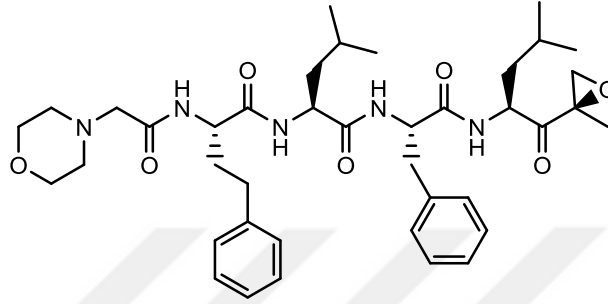
Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından multipl miyelom (MM) ve refrakter mantle hücreli lenfoma tedavisinde kullanılmak üzere onay alan ilk proteazom inhibitörü Bortezomib (Velcade®) bileşiğidir (31). Bortezomib, 20S proteazomun $\beta 5$ alt birimine bağlanarak kimotripsin benzeri aktiviteyi geri dönüşümlü bir şekilde inhibe eden dipeptidil boronik asit türevidir (Şekil 1). Bortezomib'in kemoterapötik bir ajan olarak tedaviye girişiyle önemli bir başarı elde edilmesine rağmen, ilaca karşı direnç gelişimi ve periferik nöropati gibi yan etkilerin gözlenmesi nedeniyle etkinliği artırılmış, toksisitesi azaltılmış ve oral yoldan kullanılabilir olacak ikinci kuşak yeni proteazom inhibitörlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur (4,25,32). İkinci kuşak bir proteazom inhibitörü olan Carfilzomib (Kyprolis®), Bortezomib bileşiğinin etkisiz olduğu multipl miyelom hastalarının tedavisinde kullanılmak üzere 2012 yılında FDA tarafından onay almıştır (Şekil 1). Bu bileşik, proteazomun $\beta 5$ alt birimine yüksek derecede selektivite gösteren tetrapeptid epoksiketon türevidir (33). Multipl miyelom ve lenfoma hastalarının tedavi profillerini önemli ölçüde iyileştiren ancak günümüzde sadece hematolojik kanserlerin tedavisinde kullanılan bu proteazom inhibitörleri (Bortezomib ve Carfilzomib), solid tümörlerin tedavisinde henüz başarılı olamamıştır. Özellikle Bortezomib'in bu tümör tiplerinde etki göstermemesinin sebebi olarak, dokulara yeterince penetre olamadığı için hedeflenen bölgelerde terapötik bakımdan yeterli konsantrasyonlara ulaşamaması olduğu düşünülmektedir (34). Bu nedenle Bortezomib'den farklı fizikokimyasal ve farmakokinetik özelliklere sahip yeni proteazom inhibitörlerin araştırılması sırasında bir diğer dipeptidil boronik asit türevidir olan Ixazomib (Ninlaro®) bileşiği keşfedilmiştir (Şekil 1) (35). Bileşik üzerinde yapılan değerlendirmeler sonunda Ixazomib, en az bir ön tedavi almış MM hastalarının tedavisinde lenalidomid ve deksametazon ile kombinasyon şeklinde kullanılmak üzere 2015 yılında FDA tarafından onay almıştır (36). Bununla birlikte şu anda 20S proteazomun farklı katalitik yörelerine afinite gösteren, dolayısıyla farklı farmakolojik ve farmakodinamik aktivite profili sergileyen çeşitli yapısal sınıflara sahip (peptid epoksiketon, peptid boronat ve β -lakton) ikinci kuşak proteazom inhibitörü Oprozomib, Delanzomib ve Marizomib bileşikleri Faz I/II klinik değerlendirme aşamasındadır (Şekil 2) (1,25,28,37).



Bortezomib (Velcade®)

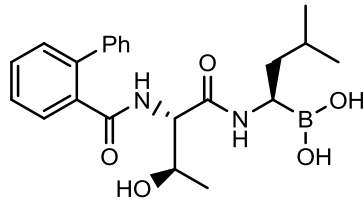


Ixazomib (Ninlaro®)

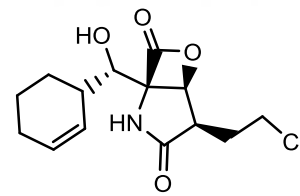


Carfilzomib (Kyprolis®)

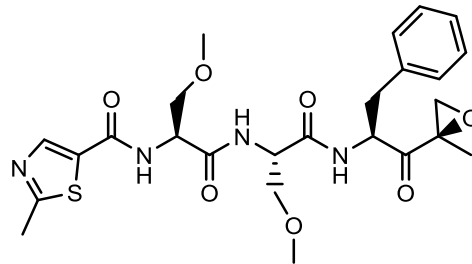
Şekil 1. Tedavide kullanılan FDA onaylı proteazom inhibitörü bileşikler



Delanzomib



Marizomib

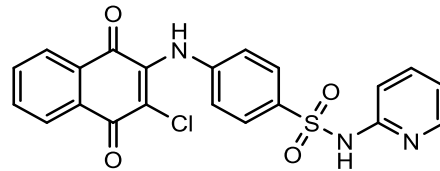


Oprozomib

Şekil 2. Faz I/II klinik deneme aşamasında olan proteazom inhibitörü bileşikler

Tedavide kullanılan ve klinik deneme aşamasında olan bu bileşikler katalitik yöredeki N terminal treonin hidroksil grubu ile kovalent bağ oluşturan reaktif uç gruplar taşımaktadır. İnhibitör aktiviteyi sağlayan bu reaktif uç grupların, aynı zamanda bileşiğin seçiciliğini azaltarak, bileşiğe aşırı reaktivlik dolayısıyla kararsızlık kazandırdığı, *in vivo* proteazom inhibitör etkinliği sınırlandırdığı ve yan etkileri arttırabildiği düşünülmektedir. Bileşiklerde görülen *in vivo* stabilite problemi, olumsuz farmakokinetik özellikler ve yan etkiler, ortak yapı olarak taşıdıkları bu reaktif gruplar ve/veya peptid omurgası ile ilişkilendirilmiştir (38). Bu nedenle son zamanlarda yapılan çalışmalar, kanser tedavisi için peptid iskeleti taşımayan, aktif yöreye reversibl olarak bağlanabilecek küçük molekülü proteazom inhibitörlerinin keşfi ve geliştirilmesi üzerine odaklanmıştır (14,39,40).

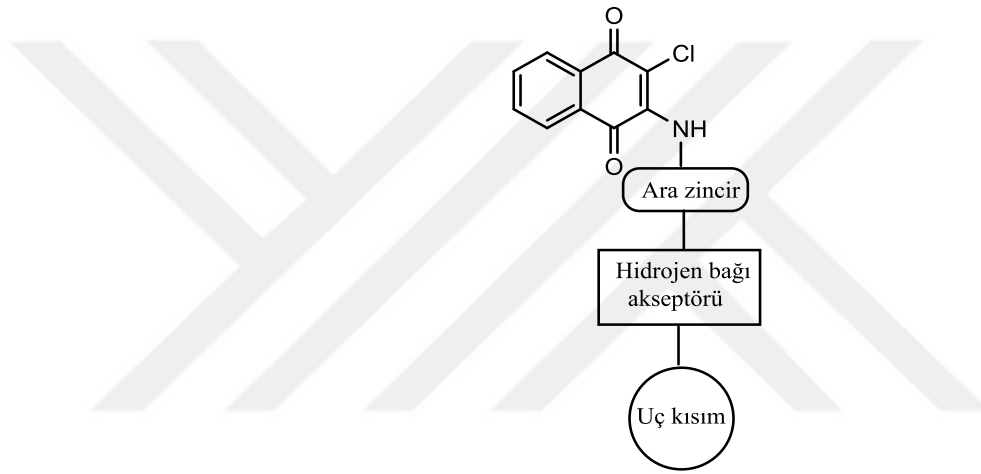
Bu bilgiler doğrultusunda 2009 yılında Kazi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, araştırmacılar High Throughput Screening (HTS) yöntemi ile yeni proteazom inhibitörü olarak belirledikleri PI-083 kodlu bileşiği sentezleyip, farklı kanser hücre hatlarındaki ve normal hücrelerdeki proteazom inhibitör etkinliğini test etmişlerdir (Şekil 3). Çalışma sonuçları, PI-083 bileşiğinin Bortezomib'den daha geniş bir antitümör aktivite sergilediğini, *in vitro* ve *in vivo* olarak normal hücrelere göre kanser hücrelerine karşı daha yüksek selektiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Bileşiğin en yüksek selektivite gösterdiği kanser hücre hattı insan meme kanseri hücre hattı (MCF-7) olarak rapor edilmiştir. Bütün bu olumlu özelliklerinden dolayı, PI-083 bileşiği ve bu bileşiğin taşıdığı naftokinon yapısı yeni proteazom inhibitörü ve antiproliferatif ajanların geliştirilmesi için umut verici yapısal fenotipler olarak tanımlanmıştır (41).



Şekil 3. PI-083 kodlu proteazom inhibitörü bileşiğin açık kimyasal yapısı

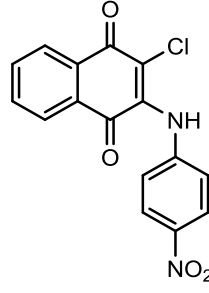
PI-083 kodlu lider (hit) bileşiğin yapı-etki ilişkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için 2010 yılında Lawrence ve arkadaşları, bileşikte bulunan kloronaftokinon, sülfonamid ve piridin yapıları üzerine odaklanarak bir grup bileşik tasarlamış ve

sentezlemiştir. PI-083 bileşiği üzerinde yapılan yapı-etki çalışmaları ve doking sonuçlarına göre 1,4-naftokinon iskeletindeki iki oksijen atomunun, katalitik yöredeki Treonin 21 (Thr21) ve Glisin 47 (Gly47) amino asitleriyle hidrojen bağı oluşturarak proteazom inhibisyonu için önemli olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca PI-083 bileşiğindeki sülfonamid grubu ile proteazomun $\beta 6$ alt birimindeki asparajin 114 (Asp 114) amino asiti arasında hidrojen bağı oluşumu saptanmış ve bu moleküler alanın hidrojen bağı akseptörü bir grubu taşımasının gerekli olduğu öngörülmüştür. Çalışma sonucunda, PI-083 bileşiğinden hareketle tasarlanacak yeni proteazom inhibitörü bileşiklere ilişkin oluşturulan hipotetik farmakofor yapı Şekil 4'te gösterilmektedir (42).



Şekil 4. PI-083 bileşiğinden hareketle öngörülen hipotetik farmakoforik yapı

2012 yılında Xu ve ekibi, bu hipotetik farmakofor yapıyı model olarak 2-kloronaftokinon iskeleti taşıyan, ara zincir olarak fenil ve alifatik yapılara sahip, farklı özellikteki hidrojen bağı akseptörü ve uç gruplardan oluşan 14 adet bileşik sentezlemiş ve proteazom inhibitör etkinliklerini test etmiştir. Sentezlenen bileşiklerin proteazom inhibitör aktiviteleri, PI-083 bileşiğinin aktivitesi ($IC_{50}=18.56 \mu M$) ile karşılaştırıldığında, aşağıda açık kimyasal yapısı verilen 8 No'lu bileşiğin Bortezomib'den daha güçlü kimotripsin benzeri aktif yöre inhibitör etkinliğe ($IC_{50}=3.65 \mu M$) sahip olduğu bildirilmiştir (43) (Şekil 5).



Şekil 5. 8 No'lu bileşik

Bu çalışmalar ışığında, tez çalışmamızda PI-083 kodlu proteazom inhibitörü bileşik lider molekül olarak seçilmiş ve bileşik üzerinde daha önce yapılan yapı-etki çalışmaları sonucunda öngörülen hipotetik farmakofor yapı dikkate alınarak birtakım moleküler modifikasyonların yapılmasına karar verilmiştir. Buna göre yapılan değişikliklerle:

- 1) Lider bileşiğimizde uç kısmı oluşturan piridin halkasının bugüne kadar çalışılmamış farklı elektronik ve sterik özelliklere sahip hidrofilik/hidrofobik süstitüent taşıyan halkalarla değiştirilerek aktiviteye olan katkısı incelenecektir.
- 2) PI-083 kodlu lider bileşikte hidrojen bağı akseptörü olarak tanımlanan sülfonil (O=S=O) grubu, karbonil (C=O) grubu ile değiştirilerek sülfonamid türevi bileşikler karşılık geldikleri karboksamid türevi bileşiklere dönüştürülecektir. Böylece karboksamid işlevsel grubunun proteazom inhibitör aktiviteye olan etkisinin ortaya çıkarılması planlanmıştır.

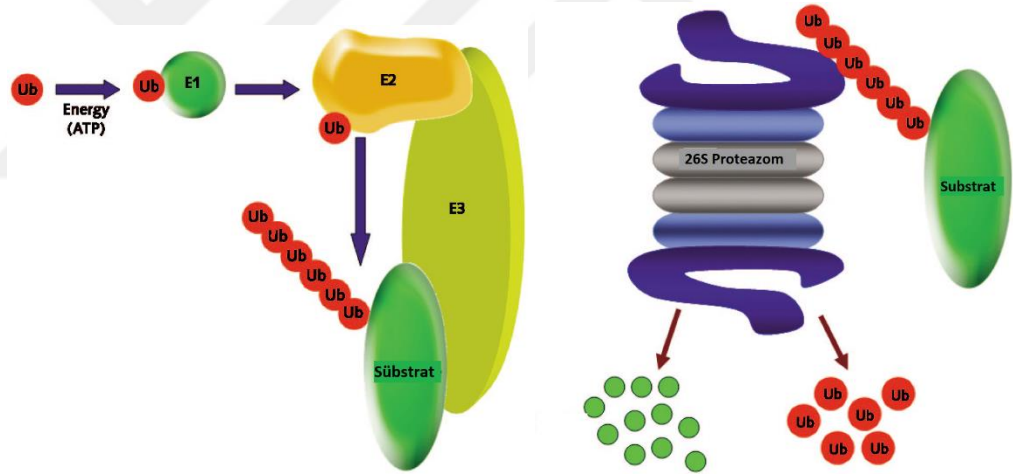
2. GENEL BİLGİLER

2.1. İntraselüler Proteoliz ve Ubikitin Proteazom Sistemi

Canlılar, binlerce protein kodlayıcı gen taşımakta ve çok sayıda protein bu genler yoluyla kodlanmaktadır. Geçtiğimiz yüzyıl boyunca yapılan çok sayıdaki araştırma, protein sentezinin incelenmesi üzerine odaklanmıştır. Ancak son birkaç on yıl boyunca bunun tam tersi süreç olan protein yıkımı, odaklanılan bu araştırma alanlarından farklı bir alana yönelimi sağlamıştır (5). 1930’lu yıllarda Schoenheimer ve birkaç bilim adamı tarafından yapılan yol gösterici çalışmalar sonucunda, oldukça stabil ve dirençli olduğu bilinen hücresel proteinlerin çoğunun devinimsel yıkımı tanımlanmıştır (44). Hücresel proteinlerin yıkımı, hücresel homeostazın sürdürülmesinde ve hücresel fonksiyonların düzenlenmesinde merkezi rol oynayan, sıkı bir şekilde kontrol edilen karmaşık bir süreçtir (1,6). Hücreler, intraselüler protein stabilitesini ve yıkımını düzenlemek için farklı mekanizmalar kullanmaktadır. İntraselüler sitozolik proteinlerin yıkımı için henüz tam olarak aydınlatılmamış ilave mekanizmalar bilindiği halde, esas olarak iki ana yolak tanımlanmıştır; bunlar lizozomlar ve proteazomlardır.

Lizozomlar, proteazları ve diğer hidrolitik enzimleri içeren sitoplazmik membrana bağlı veziküllerdir. Lizozom içerisinde bu proteolitik enzimlerin kompartmanlar şeklinde olması, bu enzimlerin kontrolsüz bir biçimde hücresel proteinleri yıkmasını önlemektedir. Esas olarak, lizozomlar ekstraselüler ve transmembran proteinleri yıkmaktan sorumlu hücresel organeller iken, proteazomlar intraselüler proteinlerin yıkımından sorumlu enzimlerdir (3). 1950’lerde keşfedilen lizozomun, uzun bir süre hücrelere yeterli yıkım kapasitesi sağladığı ve protein yıkımından sorumlu tek merkez olduğu düşünülmüş, ancak kısa yarı ömürlü veya anormal intraselüler proteinlerin yıkımının açığa çıkarılmasıyla birlikte lizozomal proteazların aktivitesinin seçici olmadığı anlaşılmıştır. Ökaryotik hücrelerdeki protein yıkımında farklı enzimlerin görev almasının keşfedilmesi ile bu sürecin yüksek derecede selektif bir süreç olduğu ve enerji kullanımı gerektirdiği Avram Hershko ve çalışma arkadaşı Irwin Rose’un danışmanlığında Aeron Cicehanover tarafından 1980’ler öncesinde yapılan çalışmayla gösterilmiştir (5,7–10). Bu çalışma, “Ubikitin proteazom sistemi”nin keşfini ve bu keşif ile üç bilim adamının 2004 yılında Nobel Kimya ödülünü almasını sağlamıştır (44).

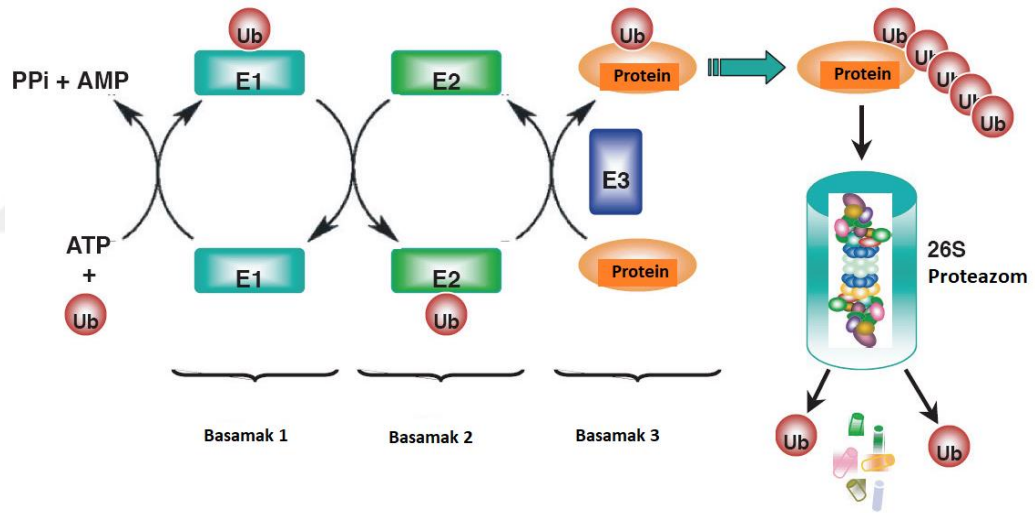
Protein yıkımında kritik öneme sahip bu proteolitik sistem, hücrel proteinlerin (nükleer ve ekstralizozomal sitozolik proteinler) yaklaşık %80-90'ının selektif bir şekilde yıkımından sorumlu olup arka ve ökaryotlarda yaygın olarak bulunmaktadır. Ubikitin proteazom sistemi (UPS), protein kalite kontrolü, antijen oluşum süreci, sinyal iletimi, hücre döngüsünün kontrolü, hücre farklılaşması ve apoptoz gibi sayısız hücrel ve fizyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde görev alan ana yolaktır (1,6,14,18,41,45). Bunun yanısıra UPS, immün dayanıklılık, kas atrofisi, metabolik yolların düzenlenmesi, uzun süreli hafıza kazanımı, sirkadiyen ritimlerin düzenlenmesi ve bitkilerin fotomorfojeninde çok önemli bir role sahiptir (23). Bu yolda görev alan bileşenler, ubikitin, ubikitin aktive edici enzim (E1, UBA), ubikitin bağlayıcı enzim (E2, UBC), ubikitin protein ligaz (E3), deubikitine edici enzim (DUB) ve kritik bir öneme sahip olan proteazomdur(Şekil 6) (7-9,12,13).



Şekil 6. Ubikitin proteazom sistemi (46)

Proteinlerin yıkıma uğraması için öncelikle E1, E2 ve E3 enzimlerinin varlığında ubikitin zinciri ile etiketlenmesi gerekmektedir. Ubikitin proteazom sisteminde çoklu ubikitin moleküllerinin kovalent olarak bağlandığı substrat proteinler, 26S proteazom tarafından yıkılmak üzere işaretlenmektedir. UPS, selektif olarak çok geniş bir aralıktaki substrat proteinleri yıktığı için, bu karmaşık biyokimyasal süreç iki ayrı ve başarılı basamakta gerçekleşmektedir. Bu basamaklar

sırayla, ubikitin konjugasyon kaskadına imkan veren özel bir tanıma işlemi ve proteolitik proteazom çekirdeği tarafından yürütülen rastgele bir yıkım işlemidir. Birinci basamak olan ubikitin konjugasyon kaskadında, E1, E2 ve E3 enzimleri ubikitini taşımakta ve en sonunda ubikitini substrat proteine kovalent bir şekilde bağlamaktadır (Şekil 7). E2 veya E3 enzimlerinden biri veya her ikisinin farklı kombinasyonları sayesinde, her bir substrat için tek olan yıkım sinyali tanınmakta ve böylece farklı substrat proteinlerin ubikitinasyonu için yüksek düzeyde bir spesifiklik sağlanmaktadır. Sonuçta, ubikitinlenmiş birçok protein 26S proteazom tarafından tanınıp katları açılmakta ve ATP aracılı bir yolla 20S proteazom katalitik çekirdeğin içine yıkmak üzere gönderilmektedir. İkinci basamakta ise, proteolitik yıkım başladığında, protein kısmen yıkılmış bile olsa geri dönüş olmamakta ve yıkmakta olan proteinin biyolojik süreçlere katılması önlenmektedir(Şekil 7) (47).



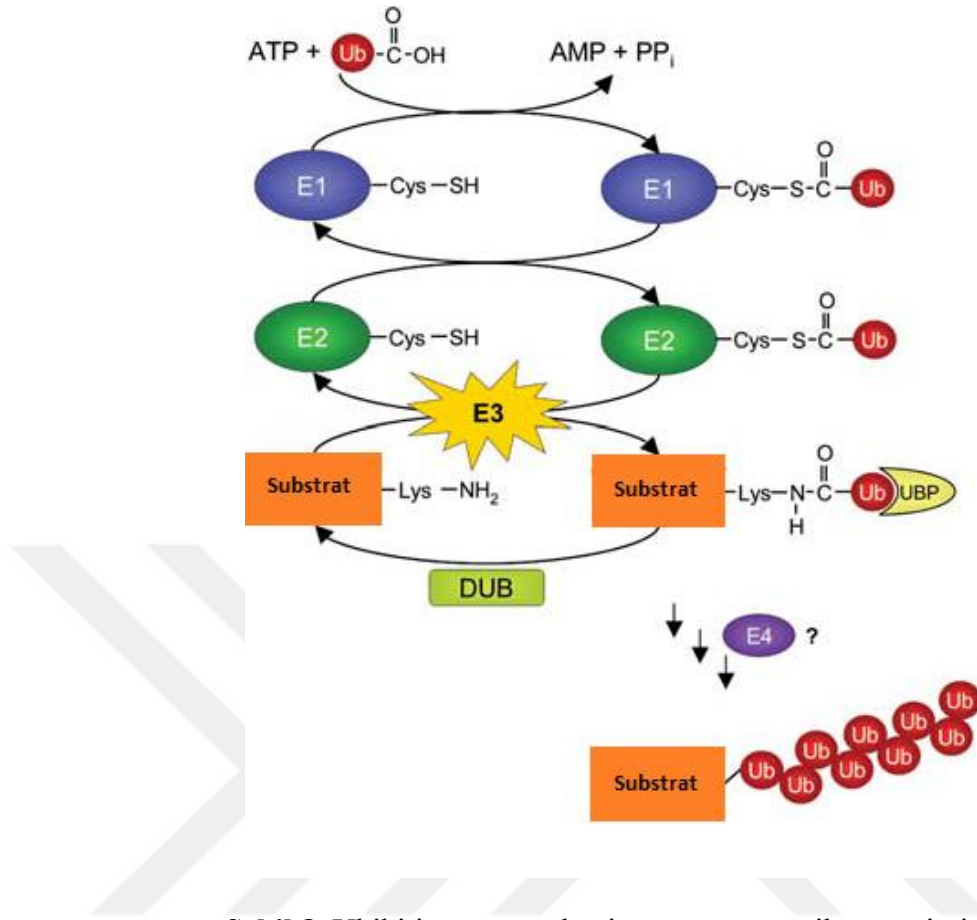
Şekil 7. Ubikitin proteazom sistemi tarafından protein yıkımının şematik gösterimi (48)

2.1.1. Ubikitinasyon

Ubikitin proteazom sistemi hücredeki farklı intraselüler proteinleri tercihli bir şekilde yıkmaktadır. Bu yolaktaki substratların büyük bir kısmı, 8.6 kDa ağırlığında küçük bir protein olan ubikitin moleküllerinin kovalent olarak bağlanmasıyla yıkım için işaretlenmektedir (23). Ubikitin, mayalardan memelilere kadar primer amino asit dizisi çok iyi derecede korunmuş, 76 amino asitten oluşan, sıklıkla dallanmış uzun

izopeptit bağlarına sahip ve ubiquitinasyon sürecinde hedef protein üzerinde oligomerik zincirler oluşturabilme yeteneğine de sahip olan bir polipeptittir. Proteazom tarafından hedef proteinin yıkımı için en az dört adet ubiquitin molekülünün substrat proteine bağlanması gerekmektedir (22,49). X-ışını kırınımı ve proton NMR analizleri, ubiquitin son derece sıkı ve rijit özelliğini ortaya çıkararak tersiyer yapısının saptanmasına olanak sağlamıştır. Ubiquitin molekülünde sadece dört adet karboksi terminal amino asit rezidü açılmış ve katlanmamıştır. Bu rezidülerden biri olan Glisin 76 (Gly76), substrat proteinin internal lizin rezidüsünün ϵ -amino grubu ile ubiquitin ligasyonunu sağlamak üzere aktive olmaktadır. Proteazomal yıkım için diğer önemli rezidü, çoklu ubiquitin zinciri oluşturmak üzere ilave izopeptit bağı oluşumunda, kolay ulaşımı sağlayan ϵ -amino grubuna sahip Lizin 48 (Lys48) amino asitidir (47,50).

Proteazom tarafından tanınacak olan bir proteine öncelikle ubiquitin bağlanmalıdır. Ubiquitin, yıkıma uğrayacak hücrel proteinlere lizin 48 rezidülerinden kovalent bir şekilde konjuge olmakta ve bu işlem 3 adet enzimin sırayla aktivitesine dayanmaktadır. Ubiquitin konjugasyon kaskadının ilk basamağında, ubiquitin 76. konumundaki glisin amino asitinin karboksil grubu, E1 enzimi yoluyla aktiveleştirilmektedir. Bu basamakta, ATP'nin (PP_i 'ye) hidrolizi aracılığıyla ubiquitinil-adenilat ara ürünü E1 enzime bağlanmaktadır. Bu sürecin ardından E1 enziminin aktif yöresindeki sistein rezidüsü yüksek enerjili tiyoester bağıyla ubiquitine bağlanmakta ve beraberinde AMP salınmaktadır. Bir sonraki aktivasyon işlemi, aktive olmuş ubiquitin molekülünün E2 enziminin aktif yöre sistein rezidüsündeki tiyol grubuna transaçilasyon reaksiyonuyla transfer edilmesidir. E2 enzimi, ubiquitin molekülünün Glisin 76 amino asitinin karboksil grubu ve substrat proteinin internal lizin amino asitinin ϵ -amino grubu arasında izopeptit bağı oluşturmak üzere, ubiquitini tek başına ya doğrudan ya da ubiquitin protein ligaz aracılığıyla taşımaktadır. Son basamakta, ilk transfer edilen ubiquitin molekülü, E2 enziminden ubiquitini benzer bir tiyol bağıyla kabul eden E3 enzime ve sonra da substrat proteine taşınmaktadır. Substrat protein bir kere monoubiquitinasyon işlemine uğradığında, yukarıda bahsedildiği gibi ubiquitinasyon kaskadı boyunca poliubiquitin zinciri oluşmaktadır (Şekil 8) (2,46,47,51,52). Sonuçta elde edilen ubiquitine proteinler, 2.5 MDa moleküler ağırlığa sahip bir proteolitik kompleks olan 26S proteazom tarafından tanınıp, yıkım işlemine uğramaktadır (23).



Şekil 8. Ubikitinasyon mekanizmasının şematik gösterimi (51)

2.1.2. Ubikitinasyon Sistemi Enzimleri

Günümüze kadar, bütün modifikasyonlar için gerekli olan ubiquitin aktivasyonundan sorumlu olan yalnızca bir adet E1 enzimi bulunmuştur. Mayalarda bulunan bu enzim, ubiquitin aktive edici aktivitesiyle (UBA1) bilinmektedir. Buna karşın mayalarda en az 13 adet ve insanlarda 20'den fazla olmak üzere, çeşitli protein substratların spesifikliğini sağlamada rol oynayan çok sayıda ubiquitin konjuge edici enzim (E2, UBC) tanımlanmıştır. Bütün E2 enzimlerinde 130 amino asit uzunluğunda korunmuş bir katalitik dizi bulunmaktadır. Bu katalitik kısım, UBC bölgesi olarak isimlendirilir. UBC bölgesinde yer alan sistein rezidü ubiquitin-tyoester ara ürün oluşumu için gerekli olduğundan önem taşımaktadır. E2 enzimleri, E3 enzimlerini tanımak üzere farklı spesifiklikleri yansıtan, birbirinden ayrı primer amino asit dizilerine dayanarak alt gruplara ayrılmaktadır. Bilinen 13 adet (UBC1-13) maya E2 enzimi arasında yalnızca UBC3 ve UBC9 esansiyel genler tarafından

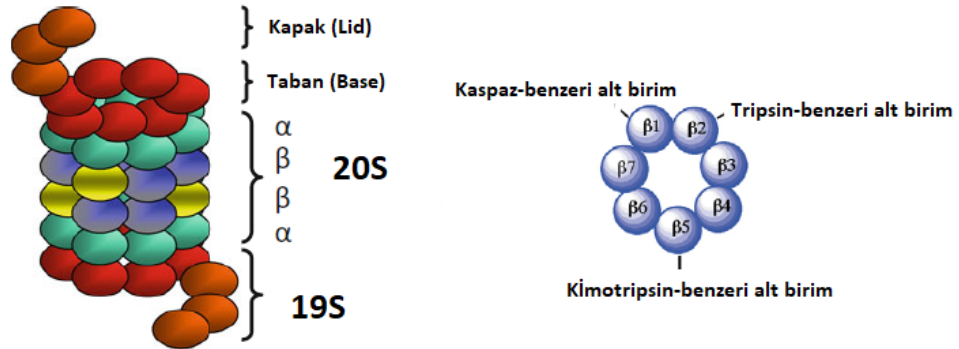
kodlanmakta ve her ikisi de hücre döngüsü sürecinde yer almaktadır. E1 ve E2 enzimlerinin miktarlarıyla karşılaştırıldığında, çok daha fazla sayıda E3 ligaz enzimi bulunmaktadır. E3 ligazlar veya ligaz kompleksleri, substrat peptit ve ubiquitin molekülü arasında izopeptit amit bağı oluşturmak üzere, ubiquitin doğrudan veya dolaylı olarak transferini katalizlemektedir. Yukarıdan da anlaşıldığı gibi sınırlı sayıdaki E2 enzimi ve belirli substrat spesifikliğine sahip çok fazla sayıdaki E3 enziminden oluşan bu hiyerarşik düzen, yüksek derecede özel etkileşimlerle ubiquitinasyon kaskadının normal işleyişini sağlamaktadır (16,22,47).

2.1.3. 26S Proteazom ve Katalitik β Alt Birimleri

Proteazom, intraselüler proteinlerin çoğunun regülasyonu ve yıkımından sorumlu, bütün ökaryotik hücrelerin çekirdeğinde ve sitoplazmasında bulunan ubiquitin proteazom sisteminin önemli bir bileşenidir (41,53). Bu kompleks ilk defa S. Wilk ve M. Orłowski tarafından 1980'lerin öncesinde tanımlanmış ve ardından multikatalitik proteaz kompleksi olarak bildirilmiştir (12). Proteazomun en ilkel formu bir arkebakteri olan *Thermoplasma acidophilum*'da bulunmuştur. 1995 yılında arkebakterilere ait proteazomun kristal yapısının aydınlatılması ile yapısal biyoloji çalışmaları açısından önemli bir adım atılmıştır.

Maya 26S proteazomun tam yapısı, kristalografik çalışmalar, dinamik NMR çalışmaları ve kriyo-elektron mikroskopisi ile yapılan çalışmalarla yakın bir zamanda aydınlatılmıştır (14). Proteazom alt birimleri genellikle farklı Swedberg sedimentasyon değışmezinine (S) göre sınıflandırılmaktadır. Proteazomun en yaygın formu 2.5 MDa moleküler ağırlığa sahip 26S proteazomdur. Fonksiyonel olarak aktif 26S proteazom, çeşitli proteinleri kısa peptitlere ve amino asitlere parçalama yeteneğine sahip proteolitik bir komplekstir. Bu kompleks multikatalitik aktif yöreleri bulunduran 20S gövde kısım ile iki adet 19S düzenleyici kısımdan oluşmaktadır. Aynı zamanda PA700 olarak da bilinen 19S düzenleyici kısım 20S proteazomun her iki ucunda da yer almaktadır (12,15,16,47,50). Proteazom kompleksi tarafından protein yıkımının gerçekleşebilmesi için poliubikitine olmuş proteinlerin tanınması, bağlanması, deubikitine olması ve açılması işleminden sorumlu en az bir adet 19S kısmın bulunması gereklidir (22). 20S katalitik gövde proteolizin meydana geldiği merkezi bir çukur oluşturacak şekilde, aksiyel düzlemde üst üste oturmuş her birinde 7 alt birim bulunan 4 adet halkadan oluşmaktadır. Halkaların üstten alta doğru $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$ düzeninde yerleştiği gösterilmiştir. İki dış

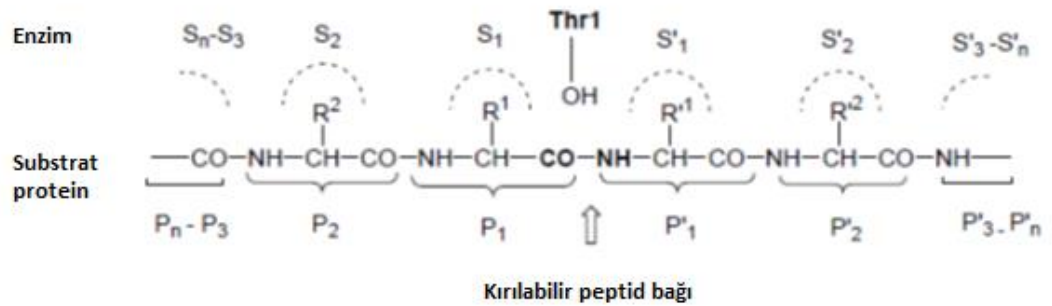
α halka, yalnızca denatüre olmuş substrat polipeptidin geçebileceği küçük bir girişi çevrelerken, merkezi β halka, protein yıkımında birlikte fonksiyon gösteren birden çok proteolitik yöreyi içermektedir (54,55). Bu proteolitik aktif yörelerin 20S gövde kısmının iç kavitesinde sınırlandırılmış olması, hacimli hücresel proteinlerin kontrolsüz bir şekilde yıkımını önlemektedir. 19S düzenleyici kısımlar, substratların proteolitik çekirdeğe girişini kontrol etmektedir. Her bir 19S kısım, kapak (lid) ve taban (base) olmak üzere iki bileşenden oluşmaktadır. En az dokuz polipeptit içeren kapak kısmının, yüksek bir afinite ile ubiquitin zincirine bağlandığı ve substrat proteinden ubiquitin zincirini uzaklaştırdığı düşünülmektedir. Altı adet homolog ATPaz enzimini bulunduran taban kısım ise sekiz polipeptitten oluşmaktadır. Bu ATPazlar, 20S gövdenin proteolitik kısmına polipeptitlerin girişi için, ATP bağımlı kanalların açılmasını sağlayan 20S çekirdekdeki α halkalarıyla doğrudan etkileşmektedir (Şekil 9) (23).



Şekil 9. 26S proteazomun genel yapısı ve bileşenleri

İki β halkasının her biri benzer aktivite veya spesifiklik gösterdiği enzimler nedeniyle, $\beta 1$ (Kaspaz benzeri, C-L), $\beta 2$ (Tripsin benzeri, T-L), $\beta 5$ (Kimotripsin benzeri, ChT-L) olarak isimlendirilen üç proteolitik aktif yöreyi bulundurmaktadır (6,16). İyi anlaşılması bu proteolitik aktivitelerinin yanında 20S proteazomun, dallanmış zincirli amino asit tercihli (BrAAP) ve küçük nötral amino asit tercihli (SNAAP) olarak bilinen diğer iki proteolitik aktiviteyi taşıdığı bilinmektedir (47). Proteolitik aktiviteler, peptit bağının hidrolizi sonrasında florojenik grup açığa çıkarak sentetik peptit modelleriyle kolayca saptanmaktadır. En çok kullanılan

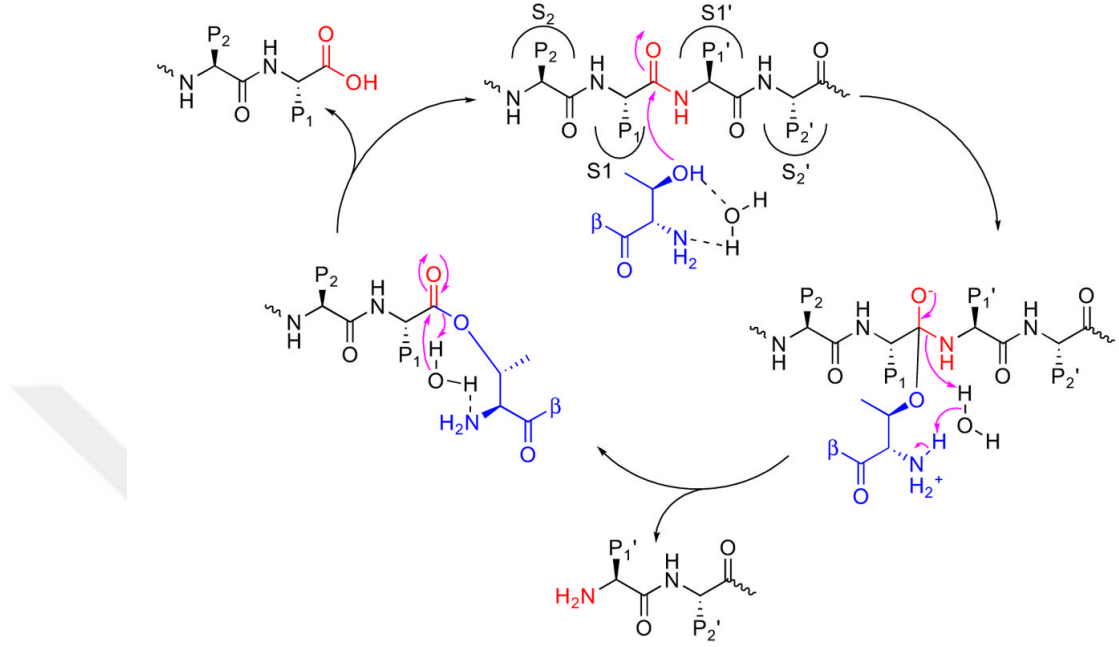
substrat modelleri, kimotripsin benzeri aktivitenin test edilmesinde süksinil-LeuLeuValTyr-7-amido-4-metilkumarin (SucLLVY-MCA), *N*-karboksibenzil-GlyGlyLeu-MCA (Z-GGL-MCA) ve *N*-süksinil-AlaAlaPhe-MCA (Suc-AAF-MCA); tripsin benzeri aktivitenin test edilmesi için, *N*-*t*-butiloksikarbonil-LeuArgArg-MCA (Boc-LRR-MCA), *N*-*t*-butiloksikarbonil-LeuGlyArg-MCA (Boc-LGR-MCA) ve benzoil-ValGlyArg-MCA (BzVGR-MCA) ve post asidik peptidaz aktivite tayini için *N*-karboksibenzil-LeuLeuGlu-MCA (Z-LLE-MCA) veya *N*-asetil-TyrValAlaAsp-MCA (AcYVAD-MCA)'yı içine almaktadır (12). 26S proteazom bütün katalitik yörelerde N terminal treonin rezidülerini kullandığı için treonin proteaz olarak adlandırılan yeni bir tip N terminal nükleofil hidrolazlar sınıfında yer almaktadır (14,56,57). Çeşitli aktif merkezler, temel olarak substrat bağlama ceplerinin düzenine göre belirlenmekte ve aktif merkeze olan uzaklıklarına göre nonprimed (S1, S2, S3...Sn) ve primed (S1', S2', S3'...Sn') olarak isimlendirilmektedir. Spesifik ceplerle etkileşen substrat rezidüleri ise bunlara göre P1, P2, P3...Pn ve P1', P2', P3'...Pn' olarak isimlendirilmektedir (Şekil 10). Proteazomal S1 cebinin yapısı, aktif yörenin yıkım tercihinin saptanmasında önemli bir rol almaktadır.



Şekil 10. Proteazomal spesifik ceplere bağlı substrat peptit rezidülerinin yerleşimi

Proteazom katalitik yörenin N terminal treonin hidroksili tarafından substratın kırılabilir peptit bağında gerçekleşen nükleofilik atak proteazomal hidroliz reaksiyonlarında kritik adımı oluşturmaktadır. Kristalografik çalışmalar, bir su molekülü aracılığıyla N terminal Treonin 1 (Thr1) hidroksil grubunun nükleofilik atak yaptığını göstermiştir (Şekil 11). Dolayısıyla proteazom inhibitörleri öncelikle N terminal treoninin yer aldığı bu aktif yöreyi hedeflemek için geliştirilmiştir (25).

Yıkım sonucunda proteazom tarafından oluşturulan ürünler, 3-22 amino asit uzunluğunda peptitler ve serbest ubiquitin birimleridir (16,49).



Şekil 11. Proteazomun katalitik mekanizması (58)

Tüm doku ve hücrelerde eksprese edilen temel proteazomun (26S proteazom) yanısıra omurgalılar gibi gelişmiş canlılarda, timoproteazom ve immünproteazom gibi, immün tipte iki adet daha proteazom bulunmaktadır. Timoproteazom, özellikle timik-kortikal epitelyal hücrelerde eksprese edilmekte ve $CD8^+$ T hücrelerinin pozitif seçiminde önemli bir rol oynamaktadır. İmmünproteazom ise, daha baskın olarak interferon- γ (IFN- γ), tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ve bakteriyel lipopolisakkaritler gibi bazı stimulan ajanlara maruziyet sonucunda monosit ve lenfositler gibi lenfoid kaynaklı hücrelerde eksprese edilmektedir (59). İmmünproteazomların ekspresyonu dokuya spesifik olup özellikle immün sisteme aracılık eden hücrelerde fazla miktarda gerçekleşmektedir. İmmünproteazom, 26S proteazomdaki $\beta 1$, $\beta 2$ ve $\beta 5$ olarak isimlendirilen proteolitik aktif alt birimlere karşılık gelen, immünproteazom 20S (i20S) çekirdek kısmı oluşturmak üzere eşdeğerleri $\beta 1i$ (LMP2, düşük molekül ağırlıklı protein 2, *PSMB9*), $\beta 2i$ (MECL-1, multikatalitik endopeptidaz kompleks-1, *PSMB10*) ve $\beta 5i$ (LMP7, düşük molekül ağırlıklı protein 7, *PSMB8*) alt birimlerden oluşmaktadır. İmmünproteazomda, temel proteazomda yer alan 19S regülatör başlık

analizlerden elde edilen sonuçlar, $\beta 5i$ alt birimin temel proteazomdaki karşılığına göre kimotripsin benzeri aktivitesinin artışında temel rezidülerdeki konfigürasyonel değişikliklerin sorumlu olabileceğini göstermiştir (61).

Timoproteazom ve immünproteazom olarak nitelendirilen bu iki proteazom izoformunun öncelikli fonksiyonu adaptif immün yanıtlarda görev almak olmasına karşın, henüz fizyolojik rolleri tam olarak anlaşılamamıştır. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, immünproteazomun oksidatif stres sırasında koruyucu bir role sahip olduğu, kanser, nörodejeneratif ve otoimmün hastalıklar gibi birçok patolojik durumda ekspresyonun arttığı bildirilmektedir. Dolayısıyla, bu hastalıklarla bağlantılı bir şekilde immünproteazomun ekspresyonu, bu patolojik süreçlerin belirlenmesinde biyolojik bir belirteç ve potansiyel terapötik bir hedef olarak, immünproteazoma selektif ajanların geliştirilmesi bakımından odak noktası olmuştur (59,62).

2.1.4. Proteazomun Lokalizasyonu

Proteazomlar, tüm ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında ve çekirdeğinde bulunmakla birlikte dağılımları hücre ve doku tipine göre değişmektedir. Farklılaşmış dağılımın önemi günümüzde anlaşılmıştır. Proteazomlar hücre çekirdeği ve sitoplazma arasında hücre döngüsüne spesifik olarak yerleşmiş gibi görünmektedir. Floresansla etiketlenmiş proteazom alt birimlerine sahip canlı hücrelerde yapılan deneyler aktif proteazom komplekslerinin çekirdeğe doğrudan veya mitozdan sonra nükleer çevrenin yeniden oluşumu sırasında girebildiğini göstermiştir. *In vivo* olarak proteazomun ve alt birimlerinin intraselüler yerleşimini düzenleyen sinyal yolları günümüzde hala araştırılmaktadır. Sitoplazmada proteazomlar sentrozomların yakınında, endoplazmik retikulumun diğer yüzeyinde ve sitoskeletal ağda yerleşmiş şekilde bulunmaktadır (3).

2.2. Terapötik Bir Hedef Olarak Proteazom

Proteazom, katalitik N terminal hidrolazlar ve katalitik olmayan alt birimlerin birleşiminden oluşan proteolitik bir enzim kompleksidir. Proteazomun esas fonksiyonu, basit görünmekle birlikte karmaşık bir süreç olan protein yıkımıdır (44). Yaklaşık 30 yıl önce ilk keşfedildiği andan itibaren proteazomun biyolojik ve patofizyolojik rolü hakkında uzun bir yol katedilmiştir (61). Hemen hemen bütün hücre fonksiyonlarında proteazomun doğrudan veya dolaylı olarak önemli bir rolü olduğunun bulunması, proteazomal aktivitenin potansiyel terapötik bir hedef

olabileceği fikrini akla getirmiştir (1,63). Hücredeki hacimli intraselüler proteinlerin yıkımından sorumlu olan proteazom, UPS'nin önemli bir bileşeni olduğu için proteazomun inhibisyonu sayısız sinyal yolağını etkilemektedir (42). UPS substratlarını siklinler ve hücre döngüsü sürecini düzenleyen diğer faktörler; stres yanıtını, immün yanıtı, apoptozu ve farklılaşmayı düzenleyen transkripsiyon faktörleri; hatalı translasyon ürünleri ve stres etkenleri tarafından hasar gören polipeptitler oluşturmaktadır (22,42). Bu oldukça geniş çaptaki hücresel substratlar ve UPS tarafından kontrol edilen süreçler, bu yolağın bileşenlerini terapötik girişimler için ilgi çekici yeni bir hedef haline getirmiştir (47). Proteazomun terapötik bir hedef olarak değerlendirilmesinde en belirgin soru bileşiklerin spesifikliğıdir. Diğer proteazlarla karşılaştırıldığında proteazoma olan spesifiklik, N terminal nükleofilin mümkün olduğunca aktif yöre nükleofil olarak açığa çıkması, dolayısıyla ulaşılması daha kolay bir hedef olmasından kaynaklanmaktadır.

Proteazomal yıkımın en yaygın ürünleri 3-22 amino asit rezidü uzunluktaki kısa peptitlerdir. Proteazom tarafından yürütülen proteolitik protein yıkımında az rastlanan ürünler, olgun proteazom alt birimleri veya NF-κB (nükleer faktör kappa B, inflamasyon veya apoptozu düzenleyen transkripsiyon faktörü) gibi aktif proteinlerdir. Proteazom tarafından yıkılan peptit ürünler, amino asitlere dönüşmek üzere daha ileri yıkıma uğrayabilir veya immün sistem tarafından antijenik MHC-I molekülleri olarak kullanılabilir. Proteazomun, çok yönlü fizyolojik rolü nedeniyle, miktar, aktivite, spesifiklik, altbirim yerleşimi veya intraselüler dağılımdaki spesifik değişikliklerin eşlik ettiği birçok durumdan, doğrudan neden olduğu nadir durumlara kadar birçok hastalığın temelinde yer aldığına şüphe bulunmamaktadır. Normal hücre fonksiyonlarının sürdürülebilmesi için proteazomun hedeflenmesi, başta kanser olmak üzere, otoimmün hastalıklar, kas harabiyeti, inflamasyon, felç ve diğer çeşitli patolojik durumların tedavisinde önerilen stratejilerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır (43,50).

2.3. Proteazom ile İlişkili Hastalıklar

Normal hücresel fonksiyonlardaki öneminden de anlaşıldığı üzere ubiquitin proteazom sistemi, çeşitli hastalıklarda birbirinden farklı ve önemli bir rol oynamaktadır. E1, E2, E3 enzimleri ve deubikitine edici enzimlerin, proteinlerin büyük bir kısmının yıkım işleminden önce görev aldığı bilinmektedir. Ancak hastalıklarla ilişkili olduğu gösterilen çok sayıda proteinin döngüsü proteazom

tarafından kontrol edilmektedir (44). Son yıllarda yapılan çalışmalar, bu enzimde meydana gelen değişikliklerin bir patolojik durum sonucunda oluşabileceğini veya pozitif feedback döngüsü bulunmasına rağmen patolojik durumun daha da kötüleşmesine sebep olabileceğini göstermiştir. Tüm bu bilgiler doğrultusunda proteazomun çeşitli hastalıklarda yer aldığına ilişkin şüphe bulunmamaktadır (22,57). Günümüzde proteazomla ilişkili olduğu tespit edilmiş çeşitli hastalıklar ve patolojik durumlardan aşağıda bahsedilmektedir.

2.3.1. Kanser

Kanser, günümüzde en yaygın görülen ve üzerinde en çok araştırma yapılan, çağımız hastalıklarının başında gelmektedir. Bütün canlılardaki neoplastik hastalıkların oluşumunda genomun dayanıksızlığı esas faktör olup, bozulmuş hücre döngüsü işleyişi ve/veya azalmış apoptoz, hücre ölümüne karşı direnç, immün sistem kontrolünde bozulma veya proliferasyonun devamı gibi kanserle ilişkili birçok durumun, proteazom ve UPS ile tartışmasız bir şekilde ilişkili olduğu bilinmektedir (22,41). Bu süreçlerin düzgün bir şekilde ilerlemesi transkripsiyon, protein sentezi, protein-protein etkileşimi, protein fosforilasyonu ve protein yıkımında görev alan proteazom kompleksi yardımıyla meydana gelmektedir (3). Yaşamını sürdürmek için düşük düzeyde sinyal iletimine ihtiyaç duyan normal hücrelerin aksine, kanser hücreleri genellikle hızlı hücre proliferasyonu, artmış oksidatif stres, artmış sitokin düzeyleri ve büyüme faktörleri nedeniyle yüksek düzeyde proteazomal aktiviteye sahiptir (63). Normal hücrelere göre çok daha fazla proliferasyon yapan kanser hücreleri, kendilerini proteazom inhibisyonuna karşı daha hassas duruma getiren artmış protein sentezine ihtiyaç duymaktadır. Ancak bu mekanizmanın önemi tümör tipine bağlı olup, artmış protein sentezi sırasında oluşan hasarlı proteinlerin aşırı birikimi, bu hücrelerin bir yok etme mekanizması olarak proteazoma bağımlılıklarını arttırmaktadır (1,3,11). Kanser hücresi yaşamında önemli bir yer tutan protein homeostazında, hücre proliferasyonu ve malignitenin diğer faktörlerini düzenleyen proteinlerin üretimi ve yıkımı arasındaki dengenin hedeflenmesi, kanser üzerinde yapılan araştırmaların ana hedefi olarak öngörülmektedir (64). Ayrıca, yüksek proteazomal aktiviteye sahip karaciğer dokusu gibi bazı dokularda, oksidatif stres koşulları altında verilen hücresel yanıt, beyin gibi düşük proteazomal aktiviteye sahip dokularda görülenden çok daha yüksektir (44). Yapılan çalışmalar, kanser hücrelerinde proteazom inhibisyonunun hücre döngüsünü durdurduğunu, çeşitli sinyal

yolaklarıyla ilişkili önemli düzenleyici proteinlerin bozulmasına ve hasarlı proteinlerin artan bir şekilde birikimine sebep olduğunu ve sonuç olarak apoptozun tetiklenmesine yol açtığını göstermiştir (65). Bu çalışmalar, kanser tedavisinin, proteazom inhibitörlerinin sebep olduğu programlı hücre ölümü yoluyla başarıya ulaşabileceğini göstermektedir (3,57).

2.3.1.1. Kanser Hücrelerinde Proteazom İnhibisyonu İçin Klinik Hedefler

Normal hücrelerde hücre döngüsü, hücrenin büyüdüğü, DNA'sının kopyalandığı ve bölüdüğü bir seri karmaşık sinyal yolağı tarafından kontrol edilmektedir. Kanserde genetik mutasyonlar sonucunda, bu düzenleyici süreçteki bozulmalar kontrolsüz hücre proliferasyonu ile sonuçlanmaktadır (66). Dolayısıyla bu yollarda yer alan düzenleyici proteinler, uzun bir süredir antikanser terapötik ajanların keşfi için potansiyel hedefleri oluşturmaktadır (3). Bu yolak üzerinde görev alan siklinler ve kinazlar gibi çeşitli proteinleri hedefleyen mekanizmaların araştırılması, klinik uygulamalar için yeterli niteliklere sahip olan antikanser terapötik ajanları tedaviye sunamamıştır. Bu nedenle, bu proteinlerin uygun şekilde ve doğru zamanda yıkımını sağlayan ubiquitin proteazom sistemi gibi yolların hedeflenmesi, yeni antikanser ilaçların geliştirilmesi için umut vadetmektedir (66). Yapılan çalışmalarda, proteazom inhibisyonuyla proteazom tarafından yıkılmak üzere ubiquitin ile işaretlenmiş hücre döngüsü düzenleyici proteinlerin birikiminin kanser hücrelerinin apoptoza karşı duyarlı hale gelmesine neden olduğu kanıtlanmıştır (3,66). Aynı zamanda proteazom substratları olarak bilinen bu hücre proteinleri, sinyal moleküllerini, tümör baskılayıcıları, hücre döngüsü düzenleyicileri, çeşitli transkripsiyon faktörü molekülleri (ki bunların yıkımı diğer proteinleri aktive eder), antiapoptotik proteinleri (Bcl-2) ve DNA onarım enzimlerini kapsamaktadır (16,61).

NF-κB sinyal yolağı

Proteazom inhibitörlerinin etkisine atfedilen mekanizmalardan ilki, bir transkripsiyon faktörü olan NF-κB'nin, inhibitör proteini olan inhibitör kappa B (IκB)'nin stabilizasyonu aracılığıyla inhibisyonudur. NF-κB, DNA transkripsiyonunun kontrolünde, immün yanıt oluşumunda ve inflamasyonda önemli rol oynamasının yanında, anjiyogenez ve metastaz başlangıcını da içine alan kanser

oluşumu ve ilerlemesinde önemli fonksiyonlar sergilemektedir (17,67). Normal şartlarda, NF- κ B sitoplazmada inhibitörü olan I κ B'ye bağlı bir şekilde inaktif durumdadır. Hücrede oluşan stres, I κ B'nin fosforilasyonu sonrasında ubiquitinasyonuna ve proteazom aracılığıyla yıkımına sebep olmaktadır. Aktif hale geçen NF- κ B hücre çekirdeği içine hareket edip burada spesifik promoter bölgelere bağlanarak antiapoptotik faktörlerle beraber hücre apoptozunun aksine hücre büyümesini aktive etmektedir. Bu nedenle, proteazomal aktivitenin inhibisyonu, I κ B'nin yıkımını ve daha sonra NF- κ B nin çekirdeğe hareketiyle daha alttaki yolların aktive olmasını önlemektedir. NF- κ B esas olarak, geniş yayılıma sahip kanserlerde ve kemoterapötik ajanlara karşı direnç oluşumunda aktif görev almaktadır. Dolayısıyla NF- κ B aktivasyonunun önlenmesi hücre büyümesinin geciktirilmesi için umut vadeci bir stratejidir (1,57).

Hücre döngüsü

Proteazomun, keşfedildiği ilk zamanlarda hasarlı veya yanlış katlanmış proteinlerin geri dönüşümünde görev aldığı düşünülürken, günümüzde bu enzimin hücre döngüsü ve yaşamında kritik bir öneme sahip olduğu bulunmuştur. Esas görevi proteinleri yıkmak olan proteazomun substratları arasında hücre döngüsü düzenleyici proteinler de yer almaktadır (16). Hücre döngüsü, siklinler ve siklin bağımlı kinazlar (CDKs) arasında sıkı bir şekilde kontrol edilen etkileşimle meydana gelmektedir (57). Siklinler ilk kez hücre döngüsü sırasında düzeyleri dalgalanan proteinler olarak tanımlanmıştır. Daha sonra siklinlerdeki bu dalgalanmanın ubiquitin proteazom sistemi tarafından düzenlenen yıkım nedeniyle olduğu bulunmuş ve proteazom aracılı proteoliz, hücre bölünmesi sırasındaki en önemli mekanizma olarak açığa çıkarılmıştır (47). Memelilerde, hücre döngüsünün farklı basamaklarını etkileyen kısa-ömürlü düzenleyici proteinler olarak ifade edilen çeşitli siklinler bulunmaktadır. Siklin D ve E, hücre siklusunun G1 fazında (büyüme fazı) görev alırken, siklin A ve E, S fazı (sentez fazı) için esansiyeldir. Siklin B ise tüm mitoz süresince önem taşımaktadır (57). Bu proteinlerin proteazom aracılı yıkımının bozulması hücre döngüsü kontrolünün kaybına yol açmakta ve onkojenezde önemli bir basamak olarak karşımıza çıkmaktadır. Kanser hücrelerinde, proteazom inhibitörlerinin hücre döngüsünün çeşitli basamaklarında hücre döngüsü düzenleyici proteinlerin ve siklinlerin yıkımını bozmak suretiyle kontrolsüz hücre büyümesinin durmasına sebep olduğu rapor edilmiştir (1,47). Dolayısıyla hücre büyümesini ve proliferasyonunu

durduran siklinlerin regülasyonunun bozulması proteazom inhibisyonuyla sağlanabilir.

p53

Kanserin önlenmesinde önemli bir tümör baskılayıcı transkripsiyon faktörü olan p53, çeşitli stres sinyallerini algılayan farklı işlevlerdeki karmaşık protein örgüsünde önemli bir bütünleştirici olarak görev almaktadır (47,57). Normal şartlar altında, bir E3 ubiquitin ligaz olan MDM2'ye bağlı haldeki p53 düzeyleri düşük olup, bu düzeylerin belirlenmesinden ubiquitin proteazom sistemi sorumludur (57,66). Onkogen ekspresyonu, hipoksi, DNA hasarı gibi çeşitli hücrel sinyaller MDM2 ile etkileşimin azalması sonucunda p53'ün aktivasyonuna yol açmaktadır. Bu aktivasyon DNA hasarına, hücre döngüsünün duraklamasına ve apoptoza neden olmakta dolayısıyla sağlıklı hücrelerin tümör hücrelerine dönüşümleri önlenmektedir (47,57,66). Ancak tümör baskılayıcı p53'ün, birçok kanser tipinde en sık mutasyon geçiren genlerden biri olduğu bulunmuştur (47). Proteazomun inhibisyonu, p53-ubiquitin agregatlarının birikimiyle sonuçlanmakta ve böylece tümör hücresinin apoptozu tetiklenmektedir (1).

Apoptozun düzenlenmesi

Apoptoz, pro-apoptotik ve anti-apoptotik moleküllerin zıt aktivite göstermesi aracılığıyla düzenlenmektedir. Kaspaz olarak adlandırılan sistein proteazlar ailesinin katılımı ile gerçekleştirilen bir seri biyokimyasal olaylar kaskadının sonunda hücrede apoptoz meydana gelmektedir. Özellikle kaspaz-8 ve kaspaz-3'ün bu kaskadta önemli olduğu bulunmuştur. Kanser hücrelerinde, hücre ölümü sırasında yetmişten fazla protein kaspazların doğal substratı olduğundan, kaspaz aktivasyonu ile apoptozun başlatılması hedeflenebilir. Proteazom, hücredeki anti-apoptotik ve pro-apoptotik faktörleri değiştirmek suretiyle apoptozun kontrolünde yer almaktadır. Proteazom inhibisyonu sonucunda anti-apoptotik proteinlerin düzeyi azalırken pro-apoptotik proteinlerin miktarı artmaktadır. Bu bilgilerden yola çıkılarak yapılan çalışmalarda, proteazom inhibitörlerinin tek başına kullanıldıklarında kanser hücrelerinde apoptoza neden olduğu ve diğer kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanıldıklarında ise kanser hücrelerinin bu ajanlara karşı duyarlılığını arttırdığı gösterilmiştir (1,16).

Endoplazmik retikulum (ER) stresi

Yeni sentezlenen proteinler, sitokinler, kemokinler ve immünglobulinler gibi salgı proteinleri ER'ye taşınır. Bu proteinler, burada ER şaperonları tarafından doğru bir şekilde katlanıp karmaşık bir glikoprotein yapının eklenmesiyle ER ve Golgi cisimciğinde olgun proteinler olarak modifikasyon işlemine tabi tutulmaktadır. Katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinler ise, proteazom tarafından yıkılmak üzere ER lümeninde ve sitozolde birikmektedir. Bununla birlikte birikim çok fazla olduğunda proteinler ER'den uzaklaştırılmakta, E2 ve E3 ligazlar aracılığıyla poliubikitine edilerek sitozole gönderilmektedir. Burada proteinler proteazom yoluyla parçalanarak endoplazmik retikulum aracılı yıkıma (ERAD) tabi tutulmaktadır. Proteazom inhibisyonu, yanlış katlanmış proteinlerin ER içinde birikimi ve kümeleşmesi sonucunda ER stresini meydana getirmektedir. ER stresinin bir sonraki aşamasında ise katlanmamış protein yanıtı (UPR) meydana gelmektedir. UPR, öncelikle katlanmamış proteinlerin yanıtını azaltmak ve ER işlevini yenilemek için hayati bir yanıttır; fakat proteazom inhibisyonu kanser hücrelerinde yanlış katlanmış ve ubikitinlenmiş protein yükünü arttırarak, sinyallerin apoptoz yönünde değişmesine, sonuç olarak da ER-stresi aracılı hasar ve DNA hasarı nedeniyle hücre ölümüne yol açmaktadır. Kanser hücreleri normal hücrelere göre daha yüksek miktarda protein sentez hızına sahip olduklarından bu durum, kanser hücrelerini hem protein birikimine hem de proteazom inhibitörleri aracılı apoptoza daha duyarlı hale getirmektedir (1,66,68).

DNA onarımı

Son zamanlardaki araştırmalar UPS'nin DNA onarımı sırasında, nükleotid eksizyon onarımı, post-replikasyon onarımı ve homolog rekombinasyon gibi düzenleyici mekanizmalarda önemli bir rolü olduğunu göstermiştir. Proteazom inhibitörleri, mevcut nükleer ubikitin moleküllerinin tüketilmesi sırasında bu yolları bozmakta ve proteazomal aktivitenin inhibisyonu hücredeki serbest ubikitin miktarının azalmasına yol açan yıkılmamış poliubikitine proteinlerin birikimiyle sonuçlanmaktadır. Serbest ubikitin moleküllerindeki bu tükenme, çekirdekdeki monoubikitine histonların azalmasına neden olup, DNA-hasar yanıtlarını bozmaktadır. Proteazom inhibitörlerinin aynı zamanda radyasyon, kamptotesin ve topoizomeraz inhibitörleri gibi DNA hasarına sebep olan çeşitli antitümör tedavilere karşı tümör hücrelerini duyarlı hale getirdikleri gösterilmiştir (1).

2.3.2. İnflamatuar ve Otoimmün Hastalıklar

Ubikitin proteazom sisteminin, sitokin ve hücre döngüsünün düzenlenmesi, MHC-I aracılı antijen sunumu ve apoptozu da kapsayan birçok hücrel süreçte belirgin bir şekilde rol alması, bu sistemi, inflamatuvar ve otoimmün hastalıkların gelişimi ve ilerlemesinde önemli bir etken haline getirmektedir (22,61). İnsanlarda veya hayvanlarda görülen inflamasyonla ilişkili hastalıkların çoğunda, proteazomun aktivitesinde, alt birimlerinin bileşiminde veya bu bileşenlerin yerleşiminde önemli değişiklikler tespit edilmiştir. Bunlar arasında en çok görülen değişiklik, bir proteazom türü olan immünproteazomların upregülasyonu olup, multipl skleroz ve otoimmün ensefalomyelit gibi hastalıklarda, genel proteazomal aktivitenin azaldığı bulunmuştur. Proteazomal aktivitedeki bu azalma otoimmün etiyolojiye sahip diğer bir hastalık olan, Amiyotropik Lateral Skleroz (ALS)'da da görülmüştür.

İnsanlardaki immün sistem ve immün sistemle ilişkili hastalıklarda proteazomun rolünü anlamak için, öncelikle antijenik peptit üretim mekanizmasından bahsetmek gerekmektedir. İdeal bir biyolojik sistemde, sağlıklı hücrelerde yer almayıp onkojenik veya viral proteinler gibi mutant proteinlerin immünproteazom aracılı yıkımı sonucunda oluşan antijenik peptitler, hücreler tarafından tanınmalı ve bu peptitlerin kaynağı yok edilmelidir. Uygun büyüklükteki hidrofobik veya bazik C-terminale sahip sitozolik peptitler, spesifik olarak tanınıp endoplazmik retikulum lümenine aktarılmaktadır. ER lümeninde MHC-I moleküllerine bağlanan peptitler, MHC komplekslerinin oluşumunu sağlamaktadır. Oluşan MHC molekülleri hücre yüzeyindeki Golgi cisimciğine taşınarak burada önemli bir kontrol işlemine tabi tutulmaktadır. Viral veya mutant protein parçalarından oluşan peptit, eğer sitotoksik T hücreleri tarafından 'hücreye ait' olarak tanımlanmazsa, aktive olmuş sitotoksik T hücreleri, hücreyi yok etmektedir. Normal düzeylerden daha düşük düzeyde peptitle yüklü MHC molekülleri ile işaretlenmiş hücreler, alternatif bir yol olarak doğal öldürücü hücreler (NK) tarafından tanınmakta ve yok edilmektedir. Bu immün mekanizmanın çalışması için gerekli olan antijenik peptit üretimini sağlayan esas yapılar, interferon- γ (IFN- γ) upregülasyonu sonucunda oluşan immünproteazomlardır. İmmünproteazomlar, immün sistemle ilişkili dalak gibi organlarda bol miktarda bulunurken, immün fonksiyona sahip olmayan beyin hücrelerinde immünproteazom düzeylerinin daha düşük olduğu saptanmıştır. İmmünproteazomların antijenik peptit üretmeleri, otoimmün hastalıkların

gelişiminde rol alabileceğini ve bu hastalıkların tedavisinde potansiyel terapötik bir hedef oluşturabileceğini göstermektedir. İmmünproteazomun otoimmün hastalıkların gelişimindeki rolü, nadir bir otoimmün hastalık olan Nakajo-Nishimura Sendromu'nun tanımlanmasıyla ortaya çıkarılmıştır. Bu sendromun meydana gelmesi, immünproteazom $\beta 5i$ alt birimindeki mutasyonla ilişkilendirilmiştir. Hastalığın klinik belirtileri ise, periyodik ateş, deride kızarıklık, lipomüsküler atrofi ve eklemlerde kasılmalar gibi kronik inflamatuvar yanıtları kapsamaktadır. Alt birimdeki mutasyon sonucunda proteazomal aktivitede meydana gelen azalmanın, inflamasyon oluşumuna sebep olduğu düşünülmektedir. Proteazomal aktivitenin azalmasıyla yıkılamamış substrat birikimi, hücresel stresi tetiklemekte ve bu stres sonucunda oluşan hasar hücrede inflamatuvar yolların uyarılmasına neden olmaktadır (69).

Son yıllarda, ülseratif kolit, Crohn hastalığı (CH), inflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH) ve hepatit gibi çok sayıda inflamatuvar ve otoimmün hastalığın patojenezinde artmış immünproteazom düzeyleri bildirilmiştir (60). Bu çalışmalar, insan sağlığı açısından immünproteazomların rolünün daha iyi anlaşılmasına olanak sağlamıştır. İBH patofizyolojisini inceleyen Fitzpatrick ve arkadaşları, bu hastalardan alınan bağırsak doku örneklerini incelediğinde normal dokulara göre yüksek miktarda $\beta 1i$ ve $\beta 2i$ proteininin varlığını tespit etmiştir. Araştırmacılar aynı durumun Crohn hastalarında da söz konusu olduğunu bildirmiştir. $\beta 1i$ alt birimin inflamatuvarlı kolon oluşumuna sebep olduğunu gösteren bir başka çalışmada, dekstran sodyum sülfat ile indüklenen kolit oluşturulmuş farelerde, immünproteazom alt birimlerinden biri çıkartıldığında hastalık belirtilerinin iyileştiği gözlenmiştir. Sonuç olarak, tüm bu bulgular İBH patojenezinde $\beta 1i$ alt birimin önemli bir rol oynadığına işaret etmiştir. Benzer şekilde romatoid artritli (RA) fare modelleri ve $\beta 5i$ alt birimi alınmış transgenik fareler üzerinde yapılan çalışmalar, immünproteazomun patojenik immün yanıt oluşumunda önemli bir rol oynadığına dikkat çekmiştir (60,61).

Volkov ve ekibi, aynı batından doğan kontrol grubu ile azalmış astmatik fenotipe sahip $\beta 5i$ alt birimi alınmış fareler üzerinde yaptığı çalışmada, $\beta 5i$ alt birimi çıkarılmış farelerin bronkoalveolar nemlendirme sıvısında, T yardımcı hücre popülasyonunda, sitokin üretiminde ve inflamatuvar hücrelerin görev alışında kontrol grubuna göre önemli azalmalar saptamıştır. Ayrıca elde edilen bulgular, astımda terapötik bir hedef olarak tek bir immünproteazom alt birimin hedeflenmesini

vurgulamış (bu durumda $\beta 5i$), diğer indüklenebilir alt birimlerin rolünün anlaşılması için daha ileri araştırmalar yapılması gerekliliğine dikkat çekmiştir (70).

Proteazomlar otoimmün hastalıkların tedavisinde oldukça umut verici hedefler olarak düşünülmektedir. Sistemik lupus eritematozus (SLE), multipl skleroz (MS) ve romatoid artrit (RA) gibi otoimmün hastalıklara sahip kişilerin serum örneklerinde, dolaşımdaki proteazomlar ve bunlara karşılık olarak anti-proteazom otoantikörleri saptanmıştır. Bu antikörlerin, 20S proteazom ve 19S düzenleyici kısım arasındaki etkileşimi bozarak proteazomun fonksiyonunu ve fonksiyonel kapasitesini bozduğu düşünülmektedir (71). Dolaşımda saptanan bu 20S proteazomların hem temel proteazom hem de immünproteazom alt birimlerinden oluştuğu saptanmıştır. Bu nedenle bu hastalıkların tespitinde proteazomların, farklı proteazom özelliklerini sergileyen her bir hastalık için potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılabilceği önerilmektedir (72).

Pang ve ekibi, yaptıkları çalışmada influenza virüsü enfeksiyonuna yanıt olarak antijen oluşumu ve T hücresi proliferasyonunda immünproteazomun önemini göstermiştir. Araştırmacılar, farklı alt birimleri çıkarılmış fare türlerinin antijen sunumundaki değişiklikleri ve $CD8^+$ T hücre miktarlarını ölçmüştür. Elde edilen sonuçlar, her bir alt birimin tek başına kaybının, antijen sunumunda farklı özelliklerde değişikliklere sonuçlandığını ve antijen işlenmesi ve sunumunda her bir alt birimin ayrı fonksiyonunun olduğunu ortaya çıkarmıştır. İnfluenza A virüsü enfeksiyonu sırasında immünproteazomların etkilerini çalışan Hensley ve ekibi, enfekte farelerin dalaklarından saflaştırılan B lenfositlerinde immünproteazom ekspresyon edildiğini göstermiştir. Fakat $\beta 1i$ alt birimi kodlayan geni (LMP2 geni) çıkarılmış farelerden elde edilen hücre lisatlarında azalmış sayıda B hücresi ve farklı proteazomlardan oluşan karmaşık bir popülasyonu sergilemişlerdir. Farelerdeki $\beta 1i$ (LMP2) gen kaybı, daha sonrasında lenfositlerin yaşama yeteneğinde azalma ve değişmiş NF- κ B aktivite ile sonuçlanmıştır. Dolayısıyla araştırmacılar, enfeksiyon sırasında immün hücre fonksiyonlarında immünproteazomların önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir (73).

2.3.3. Nörodejeneratif Hastalıklar

Merkezi sinir sistemi hastalıkları çoğunlukla, protein sentezi ve yıkımı arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklanmaktadır (60). Hücrel homeostazın

sürdürülmesi için selektif bir şekilde proteinleri yıkan UPS'de meydana gelen fonksiyonel bozuklukların, Alzheimer hastalığı (AH), Parkinson hastalığı (PH), Huntington hastalığı (HH) ve Amiyotropik Lateral Skleroz (ALS) gibi istenmeyen protein birikimiyle karakterize hastalıkların oluşumunda önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir (74). Bu nedenle, nörodejeneratif hastalıkların patolojisinin anlaşılmasında ubikitin proteazom sistemini inceleyen çalışmalar üzerinde durmak önem arz etmektedir (60,75).

Nörodejeneratif hastalıkların ortak özelliği, yanlış katlanmış ve agregate olmuş proteinlerin birikimidir. Protein birikimi, işlevsel konformasyona ulaşamayan veya bu konformasyonu koruyamayan polipeptit zincirlerinden kaynaklanmaktadır. Protein birikimine sebep olan etkenler, özel mutasyonlar, yanlış işlem görme, çevresel şartlardaki değişiklikler (pH, sıcaklık) veya oksidasyon gibi kimyasal modifikasyonlar olarak sıralanmaktadır. Hasarlı proteinlerden oluşan agregatlar, hücre fonksiyonları üzerine zararlı etkilere sahiptir. Agregasyonun sitoplazmada, çekirdekte veya ekstraselüler alanda meydana geldiği gözlenmiştir. Bu agregatlar hücre bileşenlerinin aktivitesini doğrudan inhibe etmek yoluyla veya bu bileşenlerin fiziksel olarak ayrılmasına bağlı olarak, hücre işlemlerinde bozulmalar aracılığıyla hücre homeostazını olumsuz etkilemektedir. Elde edilen bulgular, toksisitenin esas kaynağının fibriller agregat oluşumu olmadığını, küçük çözülebilir oligomerlerin oluşumu veya anormal proteinlerin birikimi olduğunu göstermiştir. İlk kez 1989 yılında yapılan bir çalışmada, insanlardaki nörodejeneratif hastalıkların genel özelliğinin, ubikitinlenmiş agregatların anormal miktarda birikimi olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen bulguların ardından, bu tip hastalıkların etiolojisinde, ubikitin proteazom sistemindeki fonksiyonel bozuklukların yer aldığı gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır (22,76).

2.3.3.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı (AH) çoğunlukla yetişkinliğin son dönemlerinde görülen merkezi sinir sistemi'nin nörodejeneratif bir rahatsızlığıdır. AH, öğrenme ve hafıza gibi bilişsel fonksiyonların kaybına yol açan, beyin dokusundaki progresif bir bozulmanın eşlik ettiği kronik beyin rahatsızlığı olup hastalığın gelişiminde genel olarak iki biyomolekül hedef olarak gösterilmektedir (47). Bunlardan birisi sekretazların etkisiyle bölünme sırasında sitotoksik β -amiloid parçalarına dönüşen amiloid prekürsör proteindir (APP). Hedeflenen diğer protein, hasarlı proteazomal

yıkım sonunda eşleşmiş sarmal filamentlerin oluşmasına neden olan hiperfosforillenmiş tau proteini olup, bu proteinin miktarıyla bilişsel durumun doğrusal bir ilişkiye sahip olduğu bildirilmektedir (62). Bu proteinlerin anormal birikimi protein yıkım döngüsünde bir uyumsuzluk oluşturmaktadır (74). Elde edilen bulguların çoğu, UPS'deki bozuklukların AH ile bağlantılı olduğunu önermektedir. Tüm bu verilerin yanısıra hipokampus, parahipokampal ve orta temporal girus ve ön pariyetal lob gibi Alzheimer hastalığından etkilenen beyin bölgelerinde azalmış proteazomal aktivite saptanmıştır. Yapılan bir çalışmada, proteazom sisteminin bir proteazom inhibitörü olan MG-132 ile baskılanması, agregozomlarda, 20S proteazom ve ubiquitin molekülleri ile birlikte, APP birikimiyle sonuçlanmıştır. Ayrıca Alzheimer hastalarının, sağlıklı kontrol grubu deneklerle karşılaştırıldığında, aktive olmuş astrositlerinde daha fazla immünproteazoma sahip oldukları görülmüştür. UPS ve Alzheimer hastalığı arasındaki ilişkinin diğer bir belirteci, hastalarda nöron ölümüne sebep olan bozulmuş proteazomal yıkımdır. Çoğunlukla uzun süreli hafıza oluşumunda önemli olan merkezlerde, tau proteininin eşleşmiş sarmal filamentlerinin, proteazom fonksiyonunu bozabildiği gösterilmiştir. Diğer yandan, tau proteininin 26S proteazomun bir substratı olup olmadığı konusunda tartışmalara rağmen, yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, proteazom inhibisyonunun tau birikimi ile sonuçlandığı doğrulanmıştır (22).

2.3.3.2. Parkinson Hastalığı (PH)

Parkinson hastalığı, en yaygın nörolojik hareket bozukluğu olup substantia nigra'da (SN) dopaminerjik nöronların kaybı ile karakterizedir. Substantia nigra'da dopaminerjik nöronların kaybına, çoğunlukla poliubikitinlenmiş-sinükleinlerden oluşmuş Lewy cisimcikleri olarak adlandırılan karakteristik sitoplazmik agregat oluşumu eşlik etmektedir. Hastalığın klinik belirtileri, bradikinezi, postüral dengesizlik, dinlenim titremeleri ve sertlik gibi motorsal sorunlardır. Günümüze kadar Parkinson hastalığı ile ilişkili 16 adet genetik bölge (PARKIN 1-16) tanımlanmıştır. Bunlardan biri olan parkindeki mutasyonların ubiquitin proteazom sistemi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Parkin proteini, bir E3 ubiquitin ligazdır. Parkin proteininin, farklı 19S alt birimler ile etkileştiği, 19S ATPaz ve non-ATPaz altbirimler arasındaki bağlanma afinitesini artırarak 26S proteazomal aktiviteyi geliştirdiği bildirilmiştir. Kalıtsal Parkinson hastalığı olan ailelerin %50'sinde parkin geninde mutasyonlar tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar, parkin proteinini enzimatik

aktivitesinden yoksun bırakmakta ve sonuçta hasarlı proteinlerin birikimine neden olmaktadır. Yapılan son çalışmalarda, parkinin mitokondriyal ubikitinasyonla ve mitofaji yoluyla hasarlı mitokondri uzaklaştırılmasının başlatılmasıyla ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu çalışma sonuçlarına göre, parkin, mitokondrideki substratların ubikitinasyonu aracılığıyla hasarlı mitokondrinin uzaklaştırılmasında önemli bir rol oynamaktadır (71,74).

Ubikitinasyonun otofaji sistemiyle ilişkili olduğunu gösteren son bulgular ise, UPS'nin, Parkinson hastalığında yer alan tek yıkım sistemi olmayacağına işaret etmektedir. Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar, ubikitin proteazom sisteminin Parkinson hastalığı patojenezinden sorumlu olan birkaç faktörden sadece birinin olabileceğinin altını çizmektedir. Branco ve ekibi, yaptıkları çalışmada, mitokondriyal işlevsizliğin, UPS'deki değişikliklerin ve oksidatif stresin, hep birlikte dopaminerjik nöronların ölümünden sorumlu olduklarını önermiştir (22,76).

2.3.3.3. Amiyotropik Lateral Skleroz (ALS)

Amiyotropik lateral skleroz, ciddi belirtilere ve belirtilerin başlangıcından itibaren hızlı bir ilerleyişe sahip, kas atrofisi, güçsüzlük ve nihayetinde solunum kaslarının dejenerasyonu nedeniyle ölümle son bulan motor nöronların dejeneratif bir rahatsızlığıdır (75). ALS'nin belirtisi beyinde ve omurilikte motor nöron kaybına eşlik eden ubikitin-pozitif agregatlarıdır. ALS vakalarının çoğu, bilinmeyen bir etiyojolojiye sahip olup, hastaların %5-10'unda hastalık hücrel antioksidan savunma sistemi için çok önemli bir enzim olan mutasyona uğramış bakır-çinko süperoksit dismutaz 1 (SOD1) enziminin agregatlar oluşturduğu ailesel formda karşımıza çıkmaktadır. Bugüne kadar, 100'den fazla SOD1 mutasyonunun, ALS vakalarının yaklaşık %20'sini oluşturan ailesel ALS ile bağlantılı olduğu bulunmuştur.

Hastalığın ilerleyişi çok hızlı olup çoğu durumda tanıdan sonra 2-3 yıl yaşam süresi öngörülmektedir. ALS'nin en özgün belirtisi ubikitine karşı immün reaktivite gösteren yumak benzeri inklüzyonlardır. Proteazomun MG-132 ile farmakolojik olarak inhibisyonu sonucunda agregatların sayısı önemli oranda azalmaktadır. Dolayısıyla, yanlış katlanmış SOD1 mutantları, özellikle motonöronal hücrelerde proteazomal aktiviteyi doğrudan bozabilmektedir.

SOD1 enzimi, UPS ve ALS hastalığı arasındaki ilişki iyi tanımlanmıştır. Patojenik mutant SOD1, kolaylıkla ubikitine olup UPS yoluyla yıkılmaktadır veya

agregatlar ya da agregozomlar şeklinde çökmektedir. Fakat mutant SOD1'in hücre sel kalite kontrolü karmaşık bir süreçtir. Mutant SOD1, hızlı bir şekilde proteazom tarafından yıkılmaktadır fakat mutant SOD1 bir kere agregatlar oluşturursa oldukça dayanıklı hale dönüşmektedir. Yanlış katlanmış SOD1'in hızlı bir şekilde yıkımı, en sonunda proteazomun aşırı yüklenmesine yol açmaktadır. Dolayısıyla, mutant SOD1'in anormal bir şekilde birikimi ve agregatlar oluşumu tetiklenmektedir. Mutant SOD1 agregatlarının toksik olup olmadığı henüz net olmamakla beraber çok sayıda bulgu, agregasyon süreci sırasında oluşan yanlış katlanmış SOD1 oligomerlerinin toksik olduğunu göstermiştir (22,74,76).

2.3.3.4. Poliglutamin Hastalıkları

Huntington hastalığı (HH), spinoserebellar ataksi (tip 1, 2, 3, 6, 7 ve 17), spinobulbar kassal atrofi ve uzun poliglutamin zincirleri sergileyen mutant proteinlerin sebep olduğu nörodejeneratif hastalıklar, Poliglutamin hastalıkları olarak bilinmektedir. Bu rahatsızlıklarda saptanan ortak özellik, mutant proteinler tarafından nöronlarda oluşturulan intraselüler inklüzyon cisimcikleridir. Poliglutamin rahatsızlıklarında, ubikitin proteazom sisteminin bozulduğunun ilk kanıtı, bu hastalığa sahip kişilerin beyinlerinde bulunan ubikitin ve proteazom immünpozitif inklüzyon cisimlerinin varlığı olmuştur. Huntington hastalığı (HH), poliglutamin rahatsızlıklarının arasında en iyi çalışılan örneği temsil etmektedir. HH, motor disfonksiyon, bilişsel gerileme ve psikoz ile karakterize otozomal baskın bir hastalıktır. Hastalık oluşumuna huntingtin geninde meydana gelen mutasyon sebep olmaktadır. Sağlıklı bireylerin huntingtin proteini 6-35 glutamin içerirken, N terminalde poliglutamin uzaması HH patolojisinin gelişimini tetiklemektedir. Yapısal düzeyde 40 adetten fazla glutamin uzaması fibril oluşumu ve agregasyonla sonuçlanmaktadır. Agrege olmuş mutant huntingtin, nöronlarda intraselüler inklüzyon cisimciklerinde bulunmaktadır. Bu inklüzyon cisimcikleri sayısal ve boyutsal olarak artmıştır. Dolayısıyla nöronların normal fonksiyonu engellenmektedir. Nörotoksisite, yanlış katlanmış proteinlerin çözünebilir ya da agrege formlarına ve agregasyon sürecinin kendisine bağlıdır. Normal huntingtin proteini, transkripsiyonel düzenleme ve aksonal iletim gibi çeşitli hücre sel fonksiyonlarla ilişkili olduğu halde, HH'de agrege olmuş mutant proteinler, fonksiyon kaybına neden olmaktadır. AH ve PH'de olduğu gibi, inklüzyon cisimleri, ubikitinlenmiş proteinler ve proteazom alt birimlerden oluşan mutant huntingtin

proteininden oluşmaktadır. HH'ye sahip hastalardan alınan beyin dokularında, proteazomal aktivitenin azaldığı tespit edilmiştir (22,75,76).

2.3.4. Kardiyovasküler Hastalıklar

Kardiyovasküler hastalıklar, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) raporlarına göre, dünya çapında ölüm ve sakatlıklara sebep olan en önemli hastalıklardan biridir (77). Kalp, fizyolojik şartlar altında sürekli ağır mekanik iş yükü, yüksek metabolik hız, birbirinden farklı nörohormonal düzenlemeler ve çeşitli stres etkenlerine maruz kalan vücuttaki tek organdır. Bir polipeptit için atan bir kalbe ulaşmak ve ilk konformasyonunu sürdürmek oldukça zordur. Sonuç olarak, vücutta yer alan birçok organ arasında kalp, proteotoksik strese çok daha duyarlı olan bir organdır. Bu nedenle, kalpte ubiquitin proteazom sistemi tarafından düzenlenen etkili bir protein kalite kontrolü, kardiyak fizyoloji bakımından hayati bir önem taşımaktadır. Fakat proteazomun kalpteki rolü, protein kalite kontrolünden çok daha fazlasını temsil etmektedir. Proteazomun öncelikli fonksiyonu, kontraktil proteinler gibi fonksiyonel bakımdan önemli kardiyak proteinlerin dengeli döngüsünü sağlamaktır. İkinci olarak, proteazom, G-protein kenetli reseptörler gibi kardiyak fonksiyonu düzenleyen membran reseptörlerini etkilemektedir. Proteazom aracılı yıkım, reseptör iletiminde, sinyal eşleşmesinde ve hatta tek başına reseptör proteinlerin yer aldığı bileşenleri yıkmak suretiyle reseptörlerin fonksiyonel durumlarını etkileyebilmektedir. Üçüncü olarak proteazom fonksiyonu, NF- κ B gibi birçok sinyal iletim yolağının aktivasyonu veya inaktivasyonunda yer almaktadır. Ayrıca, proteazom fonksiyonu gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir yere sahiptir. Artmış proteazomal aktivitenin p53 birikimiyle bağlantılı olduğu ve sağlıklı olmayan kalp dokusunda apoptoz artışına sebep olduğu gösterilmiştir (78).

İnsanda ve deneysel kardiyak hastalıklarda, çok sayıda kanıt UPS'deki değişikliklere dikkat çekmektedir. Kardiyak hastalıkların ortak bir özelliği olan ubiquitine proteinlerin birikimi, UPS'de bozukluğu gösterirken, etkilenen kalplerde proteazomal aktivite, sürekli olarak baskılanmamaktadır. Benzer şekilde, E2 konjuge edici enzim, E3 ubiquitin ligaz veya proteazom alt birimleri gibi UPS bileşenlerinin ekspresyonu, kardiyak hastalıklarda artmış ya da azalmıştır. Diğer yandan, kas dokusuna özgü E3 ligazlar, kardiyomyosit ve kardiyak hipertrofinin her ikisinde de önemli bir rol oynamaktadır (79).

UPS tarafından gerçekleştirilen birçok fonksiyon, UPS'nin çok geniş aralıktaki patolojik süreçlerde yer aldığını açığa çıkarmıştır. Elde edilen bulgular, miyokard iskemisi, kardiyak hipertrofi, kardiyak yetmezlik, ateroskleroz ve diyabetik kardiyovasküler hastalıkların UPS'deki bozulmalarla ilişkili olduğunu göstermiştir. Kardiyak hücrelerde, etkin ve iyi bir şekilde kontrol edilen protein yıkımı, hasarlı ve yanlış katlanmış proteinlerin uzaklaştırılması ve intraselüler protein homeostazının korunması nedeniyle, normal proteinlerin yıkımı dolayısıyla da normal kardiyak fonksiyonun sürdürülmesi için çok önemlidir. Diğer yandan, iskemi, oksidatif stres, inflamasyon ve istenmeyen protein birikimi gibi farklı primer sebepler nedeniyle gelişen çeşitli kalp hastalıklarında artmış veya azalmış proteazomal aktiviteler tespit edilmiştir (22).

2.3.4.1. Kardiyak İskemi/Reperfüzyon Hasarları

Son gözlemler, UPS'deki bozulmaların miyokardiyal iskemi patofizyolojisine katkı sağladığını göstermektedir. *In vivo* çalışmalarda, sol koroner arterin çıkan ön kolunda 30 dakika süren tıkanmanın ardından, kalp dokularında 20S proteazomların tripsin benzeri aktivitelerinde önemli ölçüde azalma görülmüştür. Aktivite kaybının, bazı proteazomal alt birimlerin oksidatif modifikasyonu ve ubikite proteinlerin birikimiyle bağlantılı olduğu bildirilmiştir. Bu bulgular izole perfüze kalp dokusunda da doğrulanmış, okside olmuş ve ubikitine protein düzeylerinin artışına paralel olarak, 20S/26S proteazomal aktivitede azalma gözlenmiştir. İskeminin sebep olduğu proteazom inhibisyonunun altında yatan mekanizmalar net olmamakla beraber, proteazomal aktivitedeki azalmanın nedeninin, iskemik kalp dokusundaki ATP'nin tükenmesi ve reperfüzyon hasarıyla ilişkili oksidatif stres nedeniyle bazı 20S ve 26S alt birimlerin inaktivasyonu olduğu düşünülmektedir (22). Yapılan son çalışmalardan birinde, proteazom disfonksiyonu ve miyokardiyal iskemi/reperfüzyon hasarı gelişimi arasındaki genel ilişki incelenmiştir. Araştırmacılar, kalp dokusunda katalitik olarak inaktif olan $\beta 5$ alt birimin çok düşük düzeyde eksprese edildiği transgenik fare modeli oluşturmuştur. Normal şartlar altında, transgenik hayvanlarda kardiyak değişiklikler gözlenmemiştir. Ayrıca, aynı hayvan modeli, artmış proteazomal aktivitenin iskemi/reperfüzyon hasarını iyileştirdiği hipotezini test etmek için kullanılmıştır. Bu amaçla araştırmacılar, kalpte proteazom aktivatör alt birim PA28 α 'nın aşırı eksprese edildiği transgenik fare modeli oluşturmuş ve artmış proteazomal aktivitenin iskemi/reperfüzyon hasarına karşı bu hayvanları koruduğunu

bulmuşlardır. Tüm bu çalışmalar iskemi/reperfüzyon hasarında proteazomal aktivitenin önemine işaret etmektedir (76).

Bunun yanısıra, son zamanlarda yapılan çok sayıdaki çalışmada, kas dokusuna özgü E3 ligazların miyokard iskemisinde önemli bir role sahip olduğu ve iskemi/reperfüzyon hasarlarında, apoptoz ve bazı hastalıkları düzenlediği gösterilmiştir (79).

2.3.4.2. Kardiyak Hipertrofi ve Kalp Yetmezliği

Kardiyak hipertrofi, fizyolojik ve patolojik strese yanıt olarak kardiyak fonksiyonun sürdürülmesi amacıyla artmış iş yüküne verilen adaptif bir yanıt olarak meydana gelen ventriküler duvar kalınlığında artış ile karakterize patolojik durumdur. Fizyolojik hipertrofi egzersiz sonucunda meydana gelirken, patolojik hipertrofi hacim veya basıncın aşırı artması gibi olaylara, iskemi veya genetik anormalliklere tepki şeklinde gelişmektedir. Uzun süreli kardiyak hipertrofi, kalp yetmezliği gelişimine sebep olmaktadır. Hastalığın gelişiminde proteazomun rolü tam olarak anlaşılammakla birlikte birçok bulgu UPS ve kardiyak hipertrofi arasında ilişkinin varlığını göstermektedir.

Son yapılan çalışmalarda, insan kalp yetmezliğinde, bozulmuş UPS'ye işaret eden ubiquitin proteinlerinin birikimi bildirilmiştir. Deneysel kalp yetmezliği olan fare modellerinde hem artmış ubiquitin protein düzeyleri hem de proteazomal aktivitenin baskılandığı gösterilmiştir. Elde edilen diğer bulgularda ise, kardiyak hipertrofidan kalp yetmezliğine geçiş aşamasında transkripsiyon faktörü p53'ün biriktiği tespit edilmiştir. Bu kanıtlar, kalp yetmezliğinde proteazom tarafından anormal proteinlerin uzaklaştırılmasının yetersiz olduğu hipotezi ile tutarlılık göstermiştir (22,79).

2.3.4.3. Ateroskleroz

Ubikitin proteazom sistemi, hasarlı veya okside proteinleri uzaklaştırmak suretiyle yalnızca hücre kalite kontrolünün sürdürülmesinden sorumlu olmayıp, aynı zamanda aterosklerozda yer alan hücresel mediyatörlerin düzenlenmesinden de sorumludur. Fakat başlangıç aşamasının UPS'deki bozukluklardan mı yoksa oksidatif stresten mi kaynaklandığı konusu net değildir. Aterosklerozun birçok belirtisi, lipidlerin modifikasyonuna, pro-inflamatuar genlerin indüksiyonuna ve endotelial disfonksiyona aracılık eden oksidatif strese dayanmaktadır. İnsanlarda aterosklerotik plaklarda, ubiquitinlenmiş ve okside proteinlerin birikimi ve artmış

oksidatif stresle ilişkili bozulmuş proteazomal aktivite tespit edilmiştir. Reaktif oksijen türlerinin yoğun bir şekilde oluşumunun ateroskleroz patolojisinde primer aşamalardan biri olduğu düşünülmektedir. Bu bulgular, oksidatif stres nedeniyle bozulmuş proteazom fonksiyonunun ateroskleroz oluşumuna katkı sağladığını önermektedir. Ancak, ateroskleroz oluşumunda, *in vivo* olarak ubiquitin proteazom sisteminin rolü hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (22,80).

2.3.4.4. Diyabetik Komplikasyonlar

UPS'nin, insülin reseptörlerinin hücresel içe alımını değiştirerek, insülin reseptörü substrat düzeylerini kontrol ederek ve insülinin kendisini yok etmek suretiyle insülin sinyalini düzenlediği öngörülmektedir. UPS'nin, insülin direnci patojenezine ve ubiquitin mRNA içeriğinde ve proteazomun kimotripsin benzeri aktivitesinde artışa sebep olan diyabetik komplikasyonlara katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Diyabet ve muhtemelen IFN- γ ile uyarılan diğer kardiyomiyopati formlarında proteazomun potansiyel bir rolü olduğunu destekleyen artmış düzeyde 11S ile aktive proteazom miktarı, hiperglisemik kalp dokularında gözlemlenmiştir (22).

2.3.5. Yaşlanma

Yaşlanma, bir hastalık olmayıp organizmanın yaşam süresi boyunca farklı fizyolojik fonksiyonlarında azalmanın eşlik ettiği karmaşık bir süreçtir. Bu ilerleyici ve geri dönüşümsüz süreç, dinamik açıdan hem genetik hem de çevresel faktörler tarafından kontrol edilmektedir (81,82). Hücre/organizma, hücre hasarları ve hücre onarımı/yenilenmesi kapasitesi arasındaki denge korunduğu sürece, fenotip veya fizyolojisinde ölümcül bir değişiklik olmaksızın meydana gelen hasarların üstesinden gelmektedir. Fakat bu denge bir kere bozulduğunda, hasarlı moleküller hızlı bir şekilde birikmekte ve ek hasarlarla sonuçlanan birçok kısır döngü meydana gelmektedir. Sonuç olarak, bozulmuş moleküler yollara ilaveten homeostazda geri dönüşümsüz bir hasar oluşmakta ve nihayetinde yaşlanmaya yol açmaktadır (75).

Yaşlanma sürecini veya yaşlanma sürecindeki hücresel değişiklikleri açıklamaya çalışan birçok teori bulunmaktadır. Yaşlanmaya ilişkin en çok kabul edilen teorilerden biri, protein sentezi ve yıkımı arasındaki dengesizlik yani protein döngüsündeki bozukluk olarak bildirilmektedir (22,83). Ökaryotik hücrelerde düzenlenen protein katabolizmasına eşlik eden iki temel mekanizmadan biri olan

ubikitin proteazom sistemi aracılığıyla protein yıkımı, son zamanlarda yaşlanmaya ilişkin araştırmaların odak noktası haline gelmiştir (84). Çeşitli yaşlanma model sistemleriyle yapılan çalışmalarda, yaşlanma sürecinde proteazomal aktivitenin azaldığına, bu değişikliklerin yaşlanma ve yaşlanma ile ilişkili hastalıklardan kaynaklandığına ilişkin bulgular gün geçtikçe artmaktadır (85). Birçok dokuda gözlenen yaşlanma ile ilgili saptanan ortak özellik, yıkılmak üzere etiketlenmiş fakat etkili bir şekilde yıkılamamış olan ubikitine proteinlerin birikimidir. Bu gibi birikimler Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve diğer nörolojik rahatsızlıklar gibi birçok patolojik durumda karakteristiktir. Yaşlanan hücrelerde ubikitinlenmiş proteinlerin birikimi proteazomun, işlev göstermemesi nedeniyle olabilmektedir (22,81). Proteazom işleyişindeki bu bozulma, proteazom alt birimlerinin azalmış ekspresyonu, proteazom alt birimlerinin değişikliği veya yer değiştirmesi, proteazomların birleşmemesi veya protein agregatlarıyla etkileşerek proteazomun inaktivasyonu gibi farklı şekillerde meydana gelebilmektedir (82). Farklı dokulardan saflaştırılan 20S proteazomların spesifik aktiviteleri hesaplandığında, 20S proteazomdaki intrinsik değişiklikler ve artan yaşlanma arasındaki ilişkiyi destekleyen, kaspaz benzeri, kimotripsin benzeri ve tripsin benzeri aktivitelerde azalma saptanmıştır. Ubikitine protein miktarının da yaşlı doku ve hücrelerde arttığı bulunmuş ve 20S proteazomların yanısıra 26S proteazomal aktivitenin de yaşlanmadan etkilenebileceği gösterilmiştir (84). İnsan epidermal hücrelerinde ve fare miyokard hücrelerinde ise, oksidasyona uğramış protein birikiminin, azalmış proteazomal aktivite ve proteazom bileşimiyle ilişkisi, proteazom ekspresyonunun yaşla beraber azaldığı gösterilerek açıklanmıştır (86). Antioksidan yanıt sistemi gibi yaşlanma sırasında bozulan diğer süreçlerin ürünlerini uzaklaştırmak için gerekli proteazomal aktivitenin azalması kalp kasında, yaşlanmış kalbin iskemi/reperfüzyona toleransını düşürmektedir. Bununla birlikte, göz lensi çekirdeğindeki tüm üç proteazom peptidaz aktivitedeki düşüş nedeniyle oksidatif olarak hasarlı proteinlerin uzaklaştırılmasındaki azalmış kapasitenin yaşlı bireylerde katarakt oluşumunu kolaylaştırdığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (22,81).

2.4. Proteazom İnhibitörleri

Bir proteinin UPS tarafından yıkılmak üzere geçirdiği süreçler göz önünde bulundurulduğunda (lizin artıklarının poliubikitinasyonu, ubikitin aktivasyonu, konjugasyonu ve protein ligasyonu) her bir basamakta sırasıyla görev alan E1, E2 ve

E3 enzimleri potansiyel olarak terapötik bir hedefi oluşturmaktadır (30). UPS'de terapötik olarak hedeflenen ilk bileşen proteazomun kendisidir (5). Yakın tarihteki çalışmalara bakıldığında, proteazom inhibitörlerinin gelişim süreci 40 yıldan daha uzun bir zaman dilimini kapsamaktadır (72). Proteazomal aktivitenin inhibitörleri, proteazomun önemli bir ilaç hedefi olarak düşünülmesine kadar geçen sürede, proteazom fonksiyonunun *in vitro* ve *in vivo* olarak araştırıldığı çalışmalarda kullanılmıştır. Kalpain inhibitör I (Ac-Leu-Leu-nLeu-al) ve bir aktinomiset ürünü olan leupeptin (Ac-Leu-Leu-Arg-al) proteazom aktif yörelerinin biyokimyasını irdelemek için kullanılmış ilk inhibitörlerdir. Bu inhibitörlerin 20S proteazomun peptidaz aktivitelerinden en az birini etkilediği bulunmuştur. Ancak intraselüler proteazların birçoğunu etkiledikleri için bu bileşikler çok az çalışmada *in vivo* kullanılmak üzere tercih edilmiştir (29,50). Bu süreçte önemli bir role sahip olan proteazom üzerinde yapılan çalışmalarda, inhibitörlerin keşfedilmesi ve proteazom aktif yörelerinin kristalografik olarak açığa çıkarılmasının ardından proteazom inhibitörlerinin geliştirilmesi için yapılan çalışmalar hız kazanmıştır (56). Proteazom gibi benzer katalitik aktiviteye sahip proteazları inhibe eden moleküllerin keşfi, oldukça güçlü birinci kuşak sentetik proteazom inhibitörlerinin gelişiminde etkili olmuş, bunun yanısıra proteazomal substratların keşfinde, spesifik biyokimyasal yollarda enzimin yer aldığı doğru bir şekilde saptanmasında ve enzimatik aktivitenin moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasında oldukça faydalı olmuştur (25,50).

Proteazom, hidroliz reaksiyonlarını katalizlemek için alt birimlerinde bulunan N terminal nükleofil grubunu kullanan hidrolazlardan, N terminal nükleofil (Ntn) ailesine mensup bir enzimdir (87,88). Proteazom yapısında, peptit bağlarının hidrolizinde görev alan bu nükleofilin, N terminal treonin hidroksil yan zinciri olduğu saptanmıştır. Bunun yanısıra, proteazomun katalitik β alt biriminin N terminalindeki serbest amin artığının genel baz şeklinde fonksiyon göstererek, proteazomun katalitik yöresinde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. Proteazomal hidroliz reaksiyonlarında, N terminal treonin nükleofili tarafından substrattaki mevcut peptit bağına gerçekleştirilen nükleofilik atak, kritik basamağı oluşturmaktadır. Bu nedenle proteazom inhibitörleri öncelikle bu aktif yöreyi hedeflemek üzere geliştirilmiştir (25).

Günümüze kadar tespit edilen sentetik ve doğal kaynaklı hemen hemen bütün proteazom inhibitörleri 20S proteazomun öncelikle kimotripsin benzeri aktivitesi (β_5) olmak üzere her üç katalitik β alt birimin N terminal aktif yörelerini bloke etmektedir (25,50,59). Genellikle tüm sentetik proteazom inhibitörleri, peptit veya peptit benzeri bir ana yapı ve katalitik β alt birimin N terminal treonin hidroksil yan zinciri aracılığıyla nükleofilik atak mekanizmasında yer alan ilave elektrofilik uç gruplar olmak üzere iki ayrı bölümden oluşmaktadır. Ana yapı proteazomal alt birime bağlanma için gerekli olan afinite ve spesifikliğı sağlarken, elektrofilik uç gruplar oluşturdukları kimyasal bağın gücüne göre, proteazomu reversibl veya irreversibl olarak inhibe etmektedir. Bu gruplar katalitik yörede treonin hidroksil yan zinciri ile reaksiyona girmek suretiyle proteazom fonksiyonu inhibe eden farmakoforik grupları temsil etmektedir (6,25,56). Peptit yapıli inhibitörler yapı, yük ve hidrofobiklik bakımından proteazomun gerçek substratları gibi davranmaktadır (50). Sentetik yaklaşımlar sadece peptit yapıli proteazom inhibitörleri üretirken, doğal kaynaklı ürünler sıradışı farmakoforik yapılara veya peptit olmayan moleküler iskelete sahip proteazom inhibitörlerinin de varlığını ortaya koymaktadır (25).

Proteazom inhibitörleri genel olarak elektrofilik bir uç grup aracılığıyla enzimle etkileşen kovalent inhibitörler ve reaktif uç grup kaynaklı dezavantajlara sahip olmayan, reaktif bir uç grup taşımayan nonkovalent inhibitörler olmak üzere öncelikle iki ana gruba ayrılmaktadır (56,59). Proteazomun aktif yöresiyle etkileşen kovalent inhibitörler taşıdıkları farmakoforik uç gruba göre peptit aldehytler, peptit vinil sülfonlar, peptit boronatlar, peptit α' , β' -epoksiketonlar, peptit α -ketoaldehytler (glioksaller), peptit vinil amitler (sirkaktinler), peptit α -keto-oksadiazoller ve peptit yapıli olmayan β -lakton inhibitörler olarak sınıflandırılmaktadır (30,72).

2.4.1. Kovalent İnhibitörler

Peptit bağlarının kırılması için N terminal treonin, serin ve sistein artıklarını kullanan N terminal nükleofil hidrolazlar ailesinin bir üyesi olan proteazom, nükleofil olarak β alt birimlerin N terminal treonin hidroksilini kullanmaktadır. Kovalent inhibitörler, enzimin aktif yöresindeki bu katalitik treonin hidroksili ile reaksiyona girecek elektrofilik reaktif bir grup taşımaktadır. Farmakofor görevi yapan bu elektrofilik grup, peptit yapısına sahip inhibitörlerin C terminalinde veya peptit yapısı taşımayan inhibitörlerde molekölün içinde yer almaktadır (45). Farmakofor grup, kovalent katım ürünü oluşumuyla beraber katalitik rezidü ile

etkileşirken, peptit kısım spesifik olarak enzimin aktif yöresindeki substrat bağlanma cebi ile etkileşmektedir. Proteazom birden fazla aktif yöre bulundurmasına karşın, protein yıkımının önemli ölçüde azaltılması için bütün aktif yörelerin inhibisyonuna gerek olmadığı tespit edilmiştir (89). Tripsin benzeri veya kaspaz benzeri yörelerin inaktivasyonu tüm proteoliz üzerinde küçük etkilere sahipken, kimotripsin benzeri yörenin inhibisyon veya mutasyon yoluyla inaktivasyonu, tek başına protein yıkım hızında önemli azalmalara sebep olmaktadır. Ayrıca kimotripsin benzeri aktiviteyi inhibe eden bileşiklerin çoğu oldukça hidrofobik olup, yüklü rezidüleri bulunduran tripsin benzeri veya kaspaz benzeri aktivite inhibitörlerine göre hücre içine geçişleri çok daha fazladır. Genellikle tüm sentetik proteazom inhibitörlerinin, baskın olarak kimotripsin benzeri aktiviteyi inhibe etmekle birlikte diğer aktiviteler üzerinde zayıf inhibitör etkiye sahip oldukları bildirilmiştir.

Proteazomların kimotripsin benzeri aktif yöreleri, substratta yer alan hacimli hidrofobik rezidülerden sonraki yıkım işlemini yapmaktadır. Dolayısıyla yüksek selektiviteye sahip peptit yapılı inhibitör bileşiklerin elde edilmesi, inhibitörün sadece peptit kısmının değiştirilmesi ile mümkün olmayacağından inhibitörlerin proteazomun N terminal treonin kısmını tercih eden farmakoforlara sahip olması gerekmektedir. Kovalent proteazom inhibitörleri taşıdıkları bu farmakoforlara göre aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır (56,89):

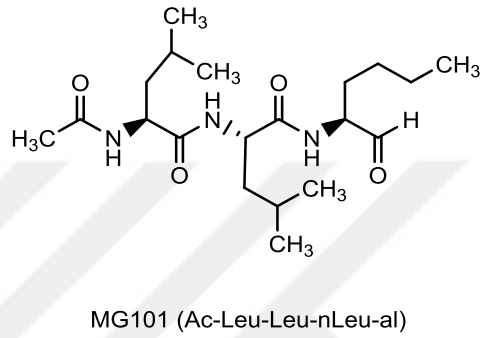
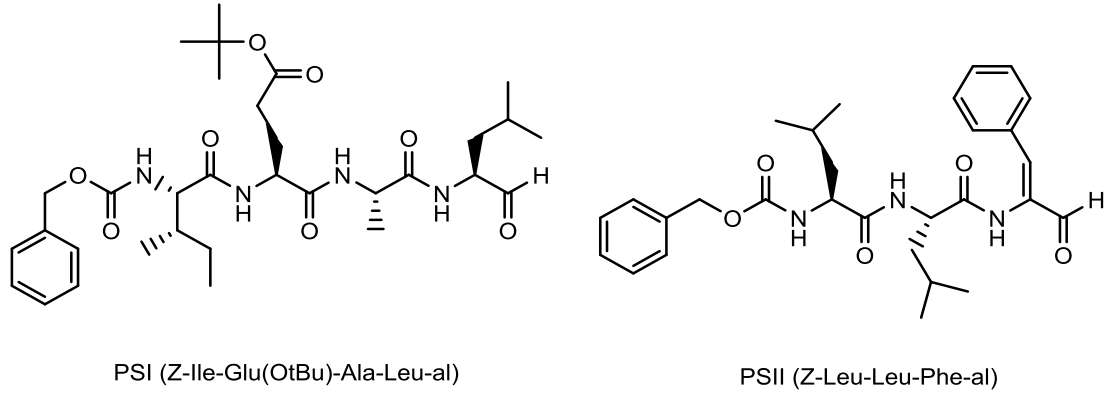
- Peptit aldehitler
- Peptit vinil sülfonlar
- Peptit boronatlar
- Peptit α',β' -epoksiketonlar
- β -laktonlar
- Peptit α -ketoaldehitler
- Peptit vinil amitler
- Peptit α -keto-oksadiazoller

2.4.1.1. Peptit Aldehitler

İncelenen ilk 20S proteazom inhibitörleri, serin ve sistein proteazlara karşı aktivite gösteren kısa peptitlerin aldehit türevleridir. Bu bileşiklerin, aldehit fonksiyonel grubunun aşırı reaktivitesi nedeniyle proteazoma spesifik olmadıkları

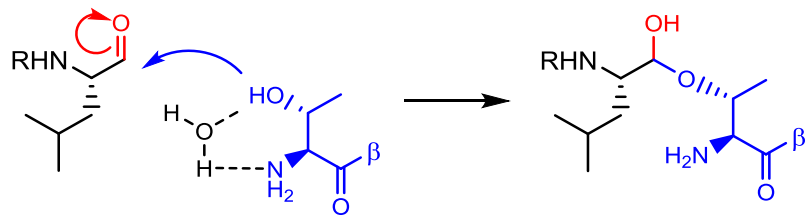
görülmüştür (64). Ancak, *in vitro* olarak iyi etki gücü sergilemeleri ve *in vivo* olarak kabul edilebilir aktiviteye sahip olmaları nedeniyle peptit aldehitler, günümüzde en yaygın kullanılan proteazom inhibitörü sınıfını temsil etmektedir. Peptit aldehitler, yaygın olarak kullanılan model substrat peptitlerin analogları olup, N terminalleri karboksibenzil (Z) gibi hacimli bir grupta kapalı, sonrasında LeuLeuLeu gibi bir tripeptitin takip ettiği ve C terminalinde de aldehit fonksiyonel grubu bulunduran bileşiklerdir (50,89,90). Bu yapıya sahip bileşiklerin kimotripsin benzeri yöreye yavaş bir şekilde bağlandıkları ve hücrelere kolay ve hızlı bir şekilde girip reversibl etki gösterdikleri bulunmuştur (64,89). Bu inhibitörlerin, hızlı dissosiasyona sahip oldukları, hızlı bir şekilde inaktif asit türevlerine dönüştükleri (okside oldukları) ve çoklu ilaç direnci taşıyıcı sistem (MDR) aracılığıyla hücre dışına atıldıkları tespit edilmiştir. Peptit aldehitler, bu özelliklerinden dolayı uzun yıllar boyunca UPS tarafından düzenlenen yolakların ve sinyal moleküllerinin tanımlanmasında, substrat peptit modeli analogları olarak yaygın bir şekilde kullanılmış ve proteazomal aktivitenin anlaşılması amacıyla yapılan çalışmalara önemli katkı sağlamışlardır (20,25,50).

Proteazom inhibitör özellikleri incelenen ilk peptit aldehitler, leupeptin (N-asetil-Leu-Leu-Arg-al), PSI (Z-Ile-Glu(OtBu)-Ala-Leu-al), PSII (Z-LLF-al), Kalpain inhibitör I (Ac-LLnL-al, ALLN, MG101) ve Kalpain inhibitör II (Ac-LLM-al, ALLM) bileşikleridir. M. Orłowski ve çalışma arkadaşları tarafından, proteazom kimotripsin benzeri aktivite inhibitörlerinin afinitesinin araştırılması sırasında keşfedilmiştir (Şekil 13) (90).



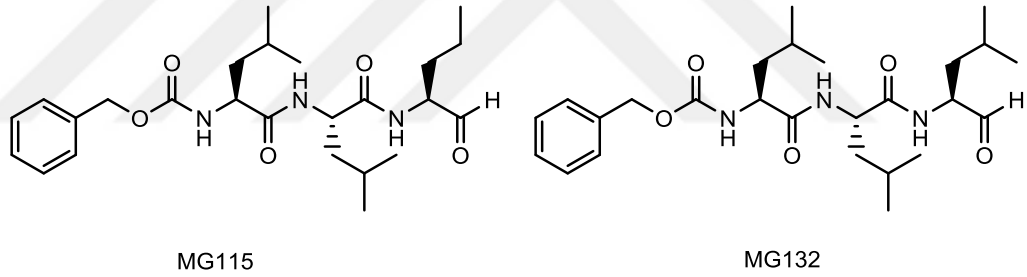
Şekil 13. Peptit aldehit türevi proteazom inhibitörü bileşikler

Kalpain inhibitör I (MG101) ile kompleks haldeki maya proteazomunun kristal yapı analizi çalışmaları, proteazomal aktif yörelerin katalitik mekanizmaları hakkında çok önemli bilgiler sağlamıştır (18). Elde edilen bulgularda proteazomal katalitik $\beta 1$, $\beta 2$ ve $\beta 5$ alt birimlerin N terminal treonin hidroksil veya tiyol grubunun inhibitörün aldehit artığına nükleofilik atak yaptığı ve sonuçta kovalent bir hemi(tiy)asetal katım ürünü oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 14) (20,44,64). Bu tripeptit yapıdaki aldehitin β konformasyonunu seçerek ve enzimin β zinciri arasındaki boşlukları, aktif yöredeki 20, 21 ve 47. rezidülerle hidrojen bağı oluşturmak suretiyle antiparalel β -katlanma ile doldurduğu bildirilmiştir (18,64).



Şekil 14. Peptit aldehit türevi bileşiklerin inhibisyon mekanizması

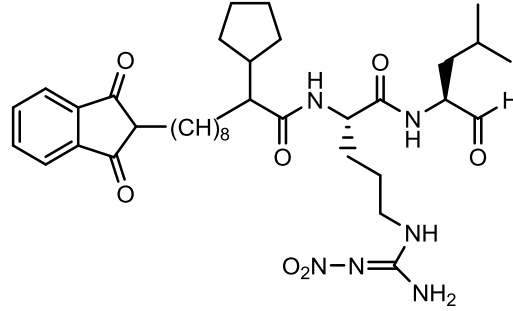
Rock ve ekibi tarafından geliştirilen tripeptit aldehit yapısındaki MG115 (Z-LLnVa-al) ve MG132 (Z-LeuLeuLeu-al) kodlu bileşikler, moleküler problemler olarak *in vivo* hücre kültürü çalışmalarında kullanılan ve orta düzeyde spesifikliğe sahip ilk geniş spektrumlu proteazom inhibitörleridir (Şekil 15) (25,50). Mikromolar miktarlarda MG132 kodlu bileşiğin ($K_i=4$ nM), en yüksek afinite ile kimotripsin benzeri aktif yöreye, en az iki kat daha zayıf etkileşimlerle de kaspaz benzeri ve tripsin benzeri yörelere olmak üzere, proteazomun her üç peptidaz aktivitesinin diğer aldehit türevlerine göre güçlü bir inhibitörü olduğu gösterilmiştir. MG132 kodlu bileşik, sırasıyla $K_i=21$ nM ve $K_i=140$ nM değerlerine sahip MG115 ve MG101 kodlu bileşiklere kıyasla kimotripsin benzeri aktivitenin çok daha güçlü bir inhibitörü olarak rapor edilmiştir. Spesifiklik açısından sınırlılığına rağmen, sentezlenebilir olması ve kullanım rahatlığı bakımından MG132 bileşiği, günümüzde proteazomal aktivitenin test edilmesi çalışmalarında referans bileşik olarak tercih edilmektedir (89).



Şekil 15. MG115 ve MG132 kodlu bileşiklerin kimyasal yapıları

Peptit aldehit türevi proteazom inhibitörlerinin çoğu, *N*-metoksisüksinil-Glu-Val-Lys-Phe-al yapısındaki tetrapeptit aldehit lider bileşiğinin modifikasyonu ile elde edilen bir seri dipeptit aldehit türevi bileşikten oluşmaktadır. Ayrıca, üç veya dört adet peptit rezidü taşıyan türevler de bulunmaktadır (91). En güçlü dipeptit aldehit türevleri olan CEP-1612, CEP-1508 ve CEP-1513 kodlu bileşiklerin, proteazom kimotripsin benzeri aktiviteyi canlı hücrelerde ve *in vitro* ortamda 10 nM'dan daha düşük değerlerde inhibe ettiği bulunmuştur. Bu bileşikler içerisinde en etkili bulunan CEP-1612 kodlu bileşiğin kalpain ve katepsinleri ve hatta tripsin benzeri proteazomal aktiviteyi inhibe etmek için, MG132 kodlu bileşiğe benzer şekilde daha

yüksek konsantrasyonlara ihtiyaç duyduğu gösterilmiştir. CEP-1612 kodlu bileşik, kanser hücrelerinde yapılan apoptoz çalışmalarında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Şekil 16).



Şekil 16. Dipeptit aldehit türevi CEP-1612 kodlu bileşiğin kimyasal yapısı

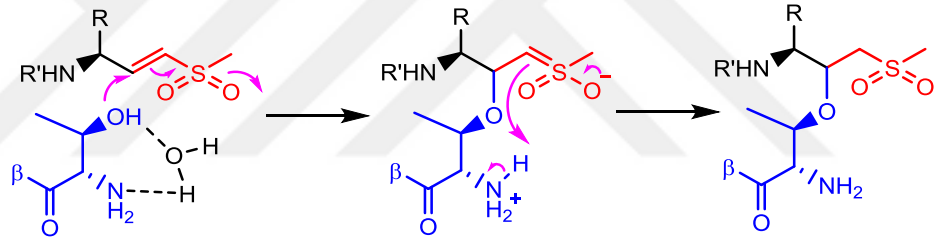
Peptit aldehitler, aldehit uç grubunun aşırı reaktivitesi nedeniyle, serin ve sistein proteazlar gibi diğer proteazları da inhibe etmektedir. Bu bileşiklerin *in vivo* olarak spesifik olmamaları ve orta düzeydeki aktivitelerinden dolayı moleküler prob veya terapötik ajanlar olarak kullanımlarının uygun olmadığı görülmüştür (20,47,59). Dolayısıyla MG132 gibi peptit aldehitler kimotripsin benzeri aktivitenin güçlü ve selektif inhibitörü olmasına karşın, medisinal kimyacılar daha etkili ve spesifik reaktif uç gruplara sahip proteazom inhibitörlerinin geliştirilmesine yönelmiştir (29,30,44).

2.4.1.2. Peptit Vinil Sülfonlar

İlk olarak Bogyo ve ekibi tarafından tanımlanmış peptit vinil sülfonlar, proteazomun katalitik β alt birimlerine kovalent olarak bağlanan bir diğer proteazom inhibitörü sınıfını temsil etmektedir (18,89,92). İlk peptit vinil sülfon türevi proteazom inhibitörü, uzun zamandır proteazom inhibitörü etkinliği bilinen bir peptit çekirdeğe yine uzun zamandır reaktif uç grup olduğu bilinen bir farmakoforum (vinil sülfon grubunun) eklenmesi düşüncesiyle sentezlenerek elde edilmiştir. Uç grup olarak, Micheal akseptörü fonksiyonu bulunduran peptit yapıları proteazom inhibitörleri arasında peptit vinil sülfonlar, ilaç araştırmalarında üzerinde en çok çalışılan kimyasal sınıfı oluşturmaktadır. Biyolojik örneklerde hidrolize uğrayabilen vinil esterler veya vinil amitler gibi vinil bulunduran elektrofilik uç gruplara göre, fizyolojik bakımdan daha stabil olan bu grup bileşiklerin, proteazoma irreversibl bir

şekilde bağlanmalarına karşın aldehit türevlerine göre daha az reaktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir (25,59,64).

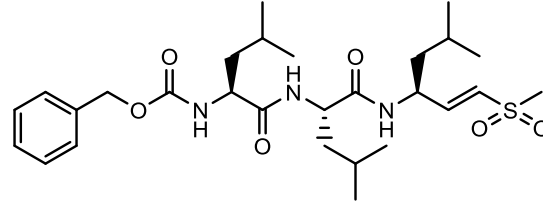
Peptit vinil sülfonlar *in vivo* olarak güçlü proteazom inhibitörleridir. Bununla beraber, peptit vinil sülfonların, peptit aldehitlere benzer bir şekilde, proteazoma yüksek spesifiklik göstermezken katepsin gibi intraselüler sistein proteazları inhibe ettikleri ve sistein proteazların aktif yöresinde yer alan tiyol artığına Micheal akseptörü gibi davranan güçlü irreversible inhibitörler oldukları bulunmuştur (18,50). Bu bileşiklerin inhibisyon mekanizması incelediğinde vinil sülfon farmakoforunun proteazom aktif yöredeki hidroksil grubu ile kovalent bir bağ (eter bağı) oluşturduğu saptanmıştır. M. Groll tarafından yapılan X-ray analizi çalışmalarında, bu kovalent katım ürününün, katalitik yörede yer alan N terminal treonin hidroksili ile vinil sülfon uç grubu arasında gerçekleşen Micheal katımı reaksiyonu sonucunda oluştuğu saptanmıştır (Şekil 17) (89).



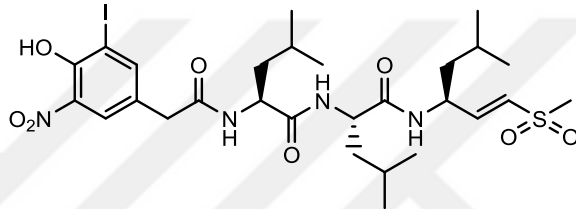
Şekil 17. Peptit vinil sülfon yapıları bileşiklerin inhibisyon mekanizması

Peptit vinil sülfon türevi bileşiklerin en önemli sorunu spesifik inhibisyona sahip olmamalarıdır. Bu inhibitörlerin peptit kısımlarının değiştirilmesi ile inhibisyon selektivitesi sağlanabilmektedir (92). Örneğin, peptit aldehit türevi MG132 kodlu bileşiğin vinil sülfon analogu olan ZLVS (Z-L₃-VS) bileşiğindeki, benziloksikarbonil (Z) grubunun NLVS bileşiğini oluşturmak üzere, 3-nitro-4-hidroksi-5-iyodofenilasetat (NIP) grubu ile yer değiştirilmesi sonucunda, katepsin B ve S gibi sistein proteazların inhibisyonunun önemli oranda azaldığı keşfedilmiştir (Şekil 18). Bunun yanısıra NLVS bileşiğinin nitrofenol türevi olan NIP-LLL-VS kodlu bileşiğin bir serin proteaz olan proteazoma daha iyi inhibitör etki sergilediği gösterilmiştir (Şekil 18). Bir diğer vinil sülfon türevi olan, radyoaktif iyotla işaretlenmiş ¹²⁵I-NIP-LLL-VS kodlu bileşik, peptit vinil sülfonların kovalent bir şekilde tüm üç

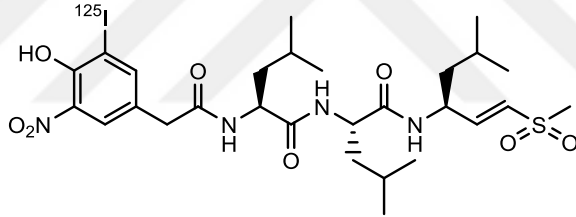
proteazomal merkezi değiştirdiğini kanıtlamak amacıyla sentezlenmiştir (şekil 18). Z-LLL-VS veya nitrofenol türevi olan bileşik, endoplazmik retikulumdan elde edilen proteinlerin yıkımında, proteazoma yardımcı olan alternatif proteolitik yolların keşfinde ve apoptoz çalışmalarında kullanılmaktadır.



Z-LLL-VS



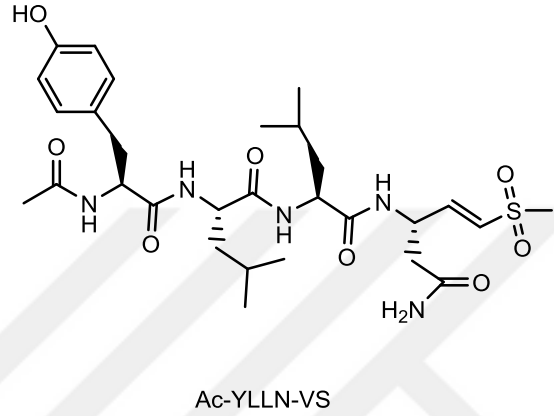
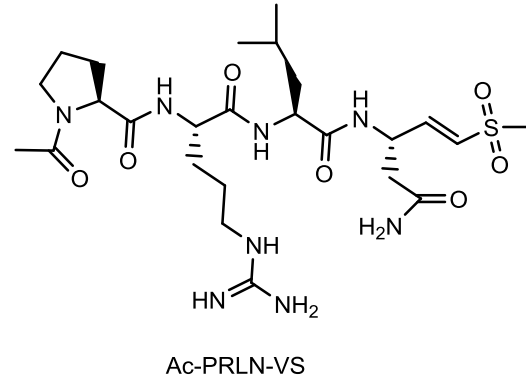
NLVS



¹²⁵I-NIP-L₃-VS

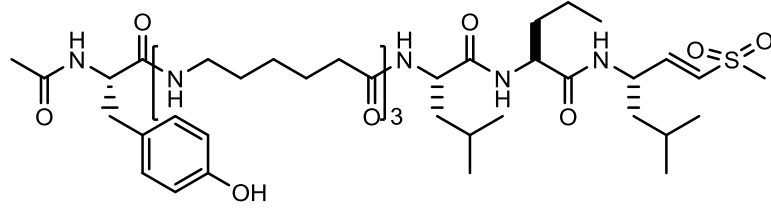
şekil 18. Peptit vinil sülfon türevi proteazom inhibitörleri

Maya 20S proteazomu ile kompleks haldeki iki adet açılmiş tetrapeptit vinil sülfon türevi bileşiğin kristal yapıları aydınlatılmıştır. Bu iki bileşikten AcPRLN-VS kodlu bileşik özellikle proteazomun β 2 alt birimine bağlanırken, AcYLLN-VS kodlu bileşiğin tüm üç katalitik alt birimin treonin hidroksiline kovalent bir şekilde bağlandığı gösterilmiştir (şekil 19) (18).

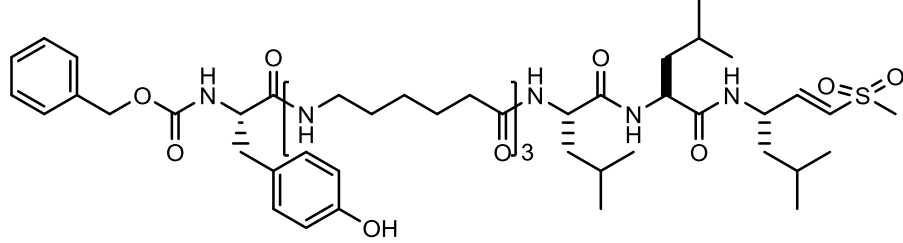


Şekil 19. AcPRLN-VS ve AcYLLN-VS kodlu vinil sülfon türevi bileşiklerin kimyasal yapısı

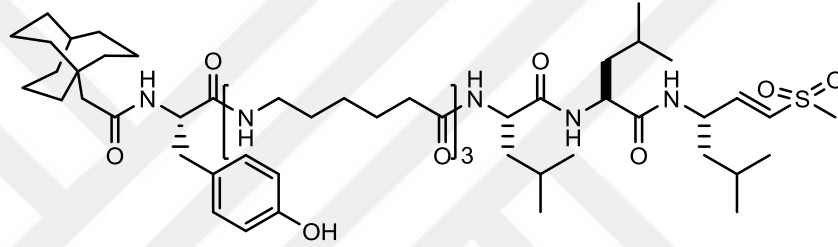
Vinil sülfon elektrofilik uç grubun, sadece tri- veya tetrapeptitlerle değil aynı zamanda protein substratları gibi davranan daha uzun zincirli artıklarla da iyi bir farmakofor olarak kullanılabilirdiği bildirilmiştir. N terminal kısmının çoklu aminoheksanoik asit rezidüleri ile uzatılarak, asetil, benziloksikarbonil veya adamantil(Ada)asetil gruplarının eklenmesiyle oluşturulan ve aşağıda açık kimyasal yapıları verilen L₃-VS serisi vinil sülfon türevi bileşikler, bu yaklaşımın örneklerini oluşturmaktadır (Şekil 20). Bu bileşiklerin, diğer trilösün-yapılı inhibitörlerde olduğu gibi tüm üç peptidaz aktiviteyi de hedeflediği tespit edilmiştir (50).



AcYAhx₃L₃VS



ZYAhx₃L₃VS



AdaYAhx₃L₃VS

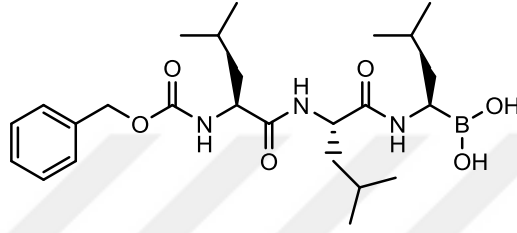
Şekil 20. Aminoheksanoik asit rezidüleri ile uzatılmış trilosin peptit yapısına sahip vinil sülfon türevi bileşikler

Peptit vinil sülfonlar diğer irreversible proteazom inhibitörlerine göre sentezlenmesi daha kolay bileşikler olup, bu kovalent inhibitörlerin avantajı N terminallerine radyoaktif, floresans veya afinite problemlerinin eklenebilmesidir. Bu bileşiklerin uygulama alanları, proteazomal aktivitenin klinik olarak gösterilmesini, inhibitörlerin alt birim spesifikliğini analizini ve canlı hücrelerde proteazom fonksiyonu ve dinamiklerinin analizini kapsamaktadır (56,89).

2.4.1.3. Peptit Boronatlar

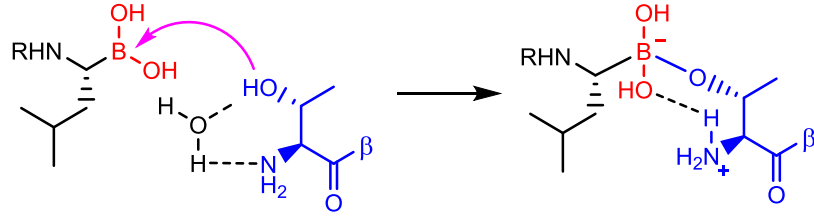
Peptit aldehytlerin, ilk zamanlarda hücrel proteaz inhibitörleri olarak kullanılmasının ardından proteazoma karşı inhibitör etkinliğe sahip oldukları bulunmuş, ancak *in vivo* ve *in vitro* olarak etkinliği tanımlanmış çok az sayıda ajan elde edilmiştir. Peptit aldehyt yapılı bu inhibitörlerin etkili ancak spesifiktikten yoksun proteaz inhibitörleri olduklarının tespit edilmesinin ardından, zayıf stabilite ve biyoyararlanımları da bu moleküllerin terapötik olarak kullanımlarını kısıtlayan

unsurlar olarak belirlenmiştir. Bu moleküllerden hareketle, terapötik olarak etkili proteazom inhibitörlerinin geliştirilmesi amacıyla yapılan çalışmalar fonksiyonel uç grup olarak boronik asitin tanımlanmasıyla sonuçlanmış ve aldehit artığının boronik asit ile değiştirilmesi yüksek oranda güçlü proteazom inhibitörlerini üretmiştir (20,31). MG132 kodlu bileşiğin boronat analogu olan MG262 (Z-Leu-Leu-Leu-boronat, PSIII) bileşiği, 18 pM K_i değeri ile aldehit analogundan 100 kat daha güçlü bulunmuştur (Şekil 21) (89).



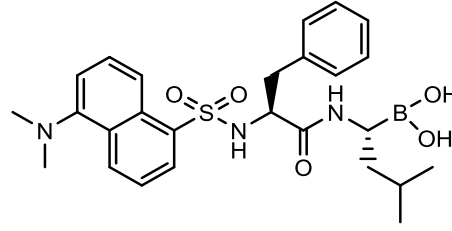
Şekil 21. MG262 kodlu bileşiğin kimyasal yapısı

Bu sınıf inhibitörlerin, karşılık geldikleri aldehit türevleriyle karşılaştırıldıklarında etki gücünde farklılık olmadığı dikkate alındığında, boronik asit yapısına sahip proteazom inhibitörlerinin 20S proteazoma karşı inhibitör etkinliklerinin ve selektivitelerinin oldukça önemli olduğu görülmüştür (47). Bu durumun, bor atomundaki boş *p* orbitaline, proteazomun N terminal treonin hidroksil oksijeninin eşleşmemiş (ortaklanmamış) elektron çiftinin, stabil tetrahedral bir ara ürün (kompleks) oluşturmak üzere geçisinden kaynaklandığı varsayılmaktadır (Şekil 22) (20,47,89). Sistein proteazların tiyol grubundaki kükürt atomu, bor atomu ile göreceli olarak daha zayıf etkileştiğinden, bor ve oksijen atomu arasındaki bu güçlü etkileşim, boronik esterlerin sistein proteazlara göre serin proteazlara karşı daha selektif oluşuna açıklama getirmektedir (25).



Şekil 22. Peptit boronat türevi bileşiklerin inhibisyon mekanizması

Yapılan çalışmalarda boronat-proteazom kompleksinin, aldehit-proteazom kompleksinden daha yavaş bir dissosiasyon hızına sahip olduğu gösterilmiştir. Bu bileşikler, proteazom kimotripsin benzeri aktivitenin reversibl inhibitörleri olarak etki gösterse de bağlanma modlarının yavaş olması nedeniyl irreversibl inhibitörler olarak düşünülmektedir (16,50,59,89). Peptit aldehitlerde gözleendiği gibi, peptit boronatların oksidasyonla inaktive olmadıkları ve MDR sistemi yoluyla hücreden uzaklaştırılmadıkları bildirilmiştir (20,89). Diğer peptit yapıli inhibitörlerde olduğu gibi bloke edici grup olarak en az üç amino asit bulundurma zorunluluğu dipeptit boronat türevi bileşiklerin elde edilmesi ile ortadan kalkmıştır. Bu özellik, bileşiklerin çözünürlük ve membranlardan geçiş gibi potansiyel terapötik bir ajanda olması beklenen pratik avantajlara sahip olmasını sağlamıştır (47,50). Ayrıca dipeptit boronat türevi bileşiklerin, basit sentezleri ve göreceli olarak düşük moleköl ağırlıkları nedeniyle bu sınıf içerisindeki diğer boronatlara göre avantaja sahip oldukları keşfedilmiştir (16). Fizyolojik şartlar altında biyolojik olarak elverişli ve göreceli olarak daha stabil (dayanıklı) olduklarından küçük yapıli bu peptit boronatlar *in vivo* uygulamalar için uygun yapılar olarak bildirilmiştir (59). DFLB (dansil-Phe-Leu-boronat) kodlu bileşik gibi bazı dipeptit boronat türevleri, canlı hücrelerde proteazomal aktivitenin analizini tayin etmek amacıyla floresans problemleri olarak kullanılmıştır (Şekil 23).

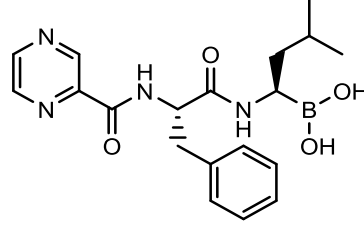


Şekil 23. DFLB kodlu bileşiğin kimyasal yapısı

Peptit boronatlar, peptit vinil sülfonlar ve doğal kaynaklı peptit α,β' -epoksiketonlar gibi diğer çeşitli fonksiyonel elektrofil uç grupların analizlerine, bu bileşiklerin proteazomal aktif bölgelere değişik bağlanma şekillerine ve proteazomun farklı proteolitik aktivitelerini inhibe edebilme yeteneklerinin anlaşılmasına katkı sağlamıştır. Peptit boronatların, aldehit ve vinil sülfonlara göre daha etkili inhibitörler olduğu tespit edilmiştir. Düşük konsantrasyonlardaki boronat bileşiklerinin proteazomal aktivitenin anlamlı ölçüde inhibisyonu için yeterli oldukları bildirilmiştir (64).

Peptit boronik asit türevlerinin, substrat bağlanmasını taklit ederek proteazom kimotripsin benzeri aktif yöresine bağlanmak suretiyle 20S proteazomu inhibe edebileceği öngörülmüştür. Bu amaçla sentezlenen dipeptitil boronik asit türevleri, kimotripsin benzeri yöre için yüksek spesifiklik, yüksek etki ve reversibl aktivite göstermiştir. Bu kapsamda sentezlenmiş bor taşıyan 13 adet bileşik, Ulusal Kanser Enstitüsü altmış kanser hücre hattı (NCI-60) panelinde antikanser aktiviteleri açısından taranmış ve pirazilkarbonil-PheLeu-boronat yapısına sahip bortezomib (PS-341, Velcade®) olarak isimlendirilen türev, proteazomu nM konsantrasyonda inhibe eden en etkili bileşik olarak bulunmuştur (Şekil 24). Bortezomib bileşiğinin, melanom, kolon, merkezi sinir sistemi, over, böbrek, prostat, meme ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerini içine alan çok geniş aralıktaki kanser hücre hatlarına karşı aktivite göstererek Ulusal Kanser Enstitüsü'ne kayıtlı diğer birçok ajan ile karşılaştırıldığında güçlü bir sitotoksiste profiline sahip olduğu tespit edilmiştir. Tüm bu özellikleri nedeniyle 1998 yılında PS-341 kodlu bileşik çok kısa bir sürede birçok ilerlemiş kanser türüne karşı etkinliği incelenmek üzere Faz I klinik çalışmaları için seçilmiş ve 2003 yılında en az bir ön tedavi almış relapse ve refrakter MM hastalarının tedavisinde kullanım için onay almıştır (17,47,50). Bortezomib günümüzde, tek başına veya konvansiyonel kemoterapötik ilaçlarla kombinasyon

halinde çeşitli kanser tipleri üzerindeki aktivitesi bakımından bazı klinik denemelerde değerlendirilmektedir (93).

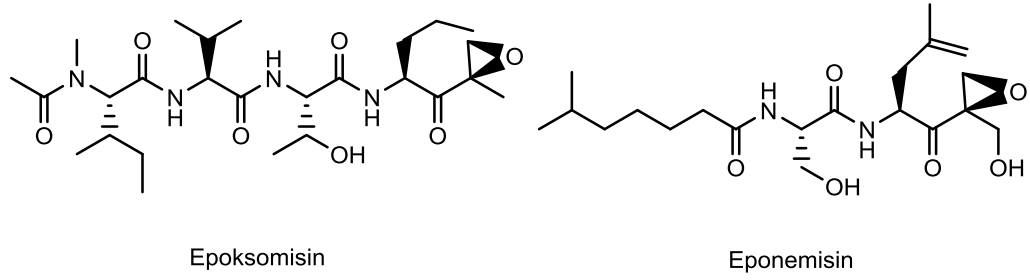


Şekil 24. Bortezomib (PS-341, Velcade®) bileşiğinin kimyasal yapısı

2.4.1.4. Peptit α' , β' -epoksiketonlar

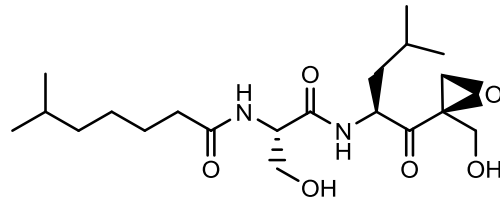
Yeni proteazom inhibitörlerinin geliştirilmesi sürecinde, genellikle doğal bileşiklerden oluşan bir diğer önemli proteazom inhibitör sınıfı, 1999 yılında tanımlanan lineer peptit α' , β' -epoksiketon türevi bileşiklerdir (25,44). Bu bileşiklerin tamamı, en az birini serin veya treonin amino asitinin oluşturduğu, iki veya dört amino asitten meydana gelen bir peptit kısım ile C terminal uç kısmında α' , β' -epoksiketon farmakoforu taşımaktadır. Ayrıca α' , β' -epoksiketon farmakoforunun konfigürasyonu, bileşiklerin aktivitesi için çok önemli olduğundan, bu sınıfın bütün üyelerinde konfigürasyon korunmuştur (94). Peptit α' , β' -epoksiketon türevi, epksomisin ve eponemisin bileşikleri selektif proteazom inhibitörü doğal bileşiklerdir. Bu bileşiklerin selektif proteazom inhibitör etkinliklerinin tanımlanmasının ardından geçen süre zarfında, hedef dışı başka etkinlikleri bulunamamıştır (58,95). Nitekim, peptit α' , β' -epoksiketonlar, günümüze kadar bilinen en spesifik ve en güçlü proteazom inhibitörlerini temsil etmektedir (56).

Solid B16 fare melanom tümör hücrelerine karşı spesifik aktivite gösteren antitümör ajanların araştırılması sırasında keşfedilen ilk doğal peptit α' , β' -epoksiketonlar, *Streptomyces hygrosopicus*'tan elde edilen eponemisin (tripeptit epoksiketon) ve Q996-17 No'lu aktinomiset suşundan elde edilen epksomisin (tetrapeptit epoksiketon) bileşikleridir (Şekil 25) (47,89).



Şekil 25. Epoxsomisin ve eponemisin bileşiklerinin kimyasal yapısı

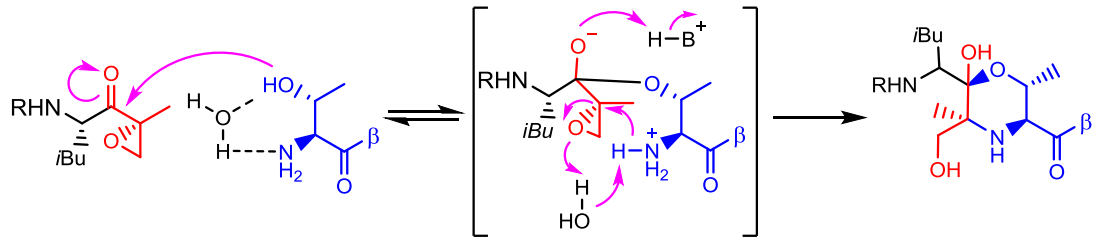
Moleküler bir prob olarak, biotinlenmiş epoxsomisin kullanıldığında, peptit α,β' -epoksiketonların proteazomun aktif alt birimlerine kovalent olarak bağlandığı, sonuçta proteazomal alt birimlerin aktivitelerini inhibe ettiği gösterilmiştir (29,92). Epoxsomisin, hedef spesifikliği göstermeyen diğer proteazom inhibitörü bileşiklerden farklı olarak, kalpain, tripsin, kimotripsin, papain veya katepsin gibi proteazları inhibe etmeyip, 20S proteazoma karşı oldukça spesifiktir (18,47). Epoxsomisin ve sığır eritrosit proteazomu ile yapılan enzimatik deneyler, bu molekülün öncelikle proteazomun kimotripsin benzeri aktivitesini irreversibl bir şekilde inhibe ettiğini göstermiştir (92). Tercihli olarak $\beta 2/\beta 2i$ ve $\beta 5/\beta 5i$ 'ye bağlanan epoxsomisin'in, kimotripsin benzeri aktiviteyi iyi bir şekilde, tripsin benzeri aktiviteyi nispeten zayıf bir şekilde ve kaspaz benzeri aktiviteyi de en az düzeyde inhibe ettiği saptanmıştır (50). Diğer yandan daha az etkili olan eponemisin ve sentetik analogu olan dihidroeponemisinin ise kaspaz benzeri ve kimotripsin benzeri aktiviteleri eşit düzeyde inhibe ettiği tespit edilmiştir (Şekil 26) (44,63).



Şekil 26. Dihidroeponemisin bileşiminin kimyasal yapısı

Epoxsomisin ile kompleks haldeki maya 20S proteazomunun kristal yapısı incelenerek bu grup bileşiklerin etki mekanizmalarının moleküler temeli aydınlatılmıştır (50). Kalpain inhibitör I ile kompleks haldeki proteazomun kristal yapısının, proteazom-epoxsomisin kristal yapısı ile karşılaştırılması, hem peptit

aldehitlerin hem de epoksomisin'in katalitik alt birimlere antiparalel β -katlanma oluşumuyla benzer bir şekilde bağlandığını açığa çıkarmıştır. Bununla beraber, her bir inhibitörün N terminal treonin aracılığıyla kovalent katım ürünü oluşumunda açıkça dikkat çekici bir fark görülmektedir. Peptit aldehitler, treonin hidroksil grubu ile hemiasetal bir bağ oluştururken, epoksomisinin aktif yörede iyi çözülmüş elektron yoğunluğu haritası, altı üyeli bir morfolin halka sisteminin varlığını açığa çıkarmıştır. Bu morfolin halkası, epoksomisin'in α' , β' -epoksiketon farmakoforu ile proteazom aktif yöresindeki treonin hidroksil ve amino nükleofilik grupları arasında gerçekleşen katım reaksiyonu sonucunda oluşmaktadır (Şekil 27). Morfolin halkasının iki basamakta oluştuğu düşünülmektedir. Bu reaksiyonun ilk basamağı için olası iki yolak önerilmektedir. Bu yollardan biri, treonin hidroksilindeki oksijen ile amin azotu arasında köprü kurmak üzere yer alan, genel asit-baz katalizörü görevi yapan bir su molekülünün varlığını öngörürken, diğer yolak bir baz gibi görev alan treonin amino grubunun doğrudan treonin hidroksili ile etkileştiğini öngörmektedir. İlk yoldaki su molekülünün varlığı, treonin hidroksil grubunu aktive ederek beraberinde epoksiketon farmakoforunun karbonil grubuna nükleofilik atak gerçekleşmesine yol açmaktadır. Morfolin halkasının oluşumunun tamamlanması ise C2 atomunun inversiyonuyla sonuçlanan molekül içi yerdeğiştirme aracılığıyla Treonin 1 N terminali tarafından gerçekleşmektedir.

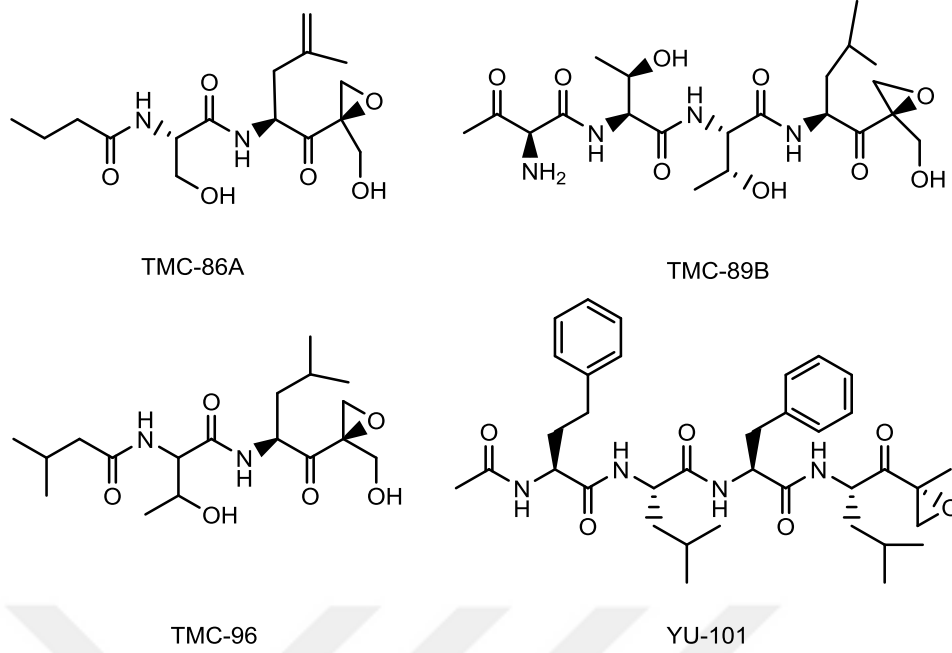


Şekil 27. Peptit α' , β' -epoksiketon türevi bileşiklerin etki mekanizması

Yakın bir zamanda, Zhan ve ekibi, morfolin ara ürününün oluşumu için en uygun reaksiyon yolağının beş basamaktan oluştuğunu ve su molekülünün yardımına gerek olmadığını kanıtlayan kuantum mekaniği hesaplarını bildirmiştir. Bu sonuçlara göre, ilk basamakta treonin hidroksil grubunun nükleofilliğini arttırmak üzere, treonin hidroksilinden treonin azotuna bir protonun transferi olmaktadır. Bu transferle oluşan

zwitterionik yapı, epoksomisinin karbonil grubuna saldırır ve oluşan negatif yük, treonin azotundan alınan bir protonla nötralleştirilir. Önceki bilgilerin aksine, araştırmacılar, treonin azotu ve su tarafından doğrudan aktive edilen treonin hidroksilinin burada yer almadığını açığa çıkarmışlardır. Ardından, treonin azotu, C2 konumunun konfigürasyonunu dönüştürerek intramoleküler siklizasyon yoluyla epoksit halkasını açmaktadır. Treonin azotu ve epoksit oksijeni arasında hidrojen bağı oluşumu, epoksiti aktive etmektedir. Ayrıca katalitik proteazom alt birimindeki Serin129, treonin azotu yanında yer alıp treonin azotunun nükleofilik aktivasyonuna katkıda bulunabilmektedir. Epoksomisinin proteazoma bağlanmasından kaynaklanan morfolin katım ürününün esas önemi, epoksomisinin proteazoma spesifikliğı için yapısal temelini kanıtlamış olmasıdır. Peptit aldehytler, vinil sülfonlar ve boronik asitler gibi birçok proteazom inhibitörünün genel hedefi olan diğer proteazlar, aktif yörelerinin bir parçası olarak N terminallerinde nükleofilik bir rezidüye sahip olmadığı için, epoksomisin bu proteazlarla, proteazomla yaptığı gibi aynı morfolin katım ürününü oluşturamamaktadır. Böylelikle, epoksomisinin proteazomlar için saptanmış selektivitesi için, hem N terminal amino grubuna hem de epoksiketon farmakofor ile katım ürünü oluşumu sağlayan yan zincir nükleofile ihtiyaç duyulduğu doğrulanmıştır (18,63,89,92).

Etki güçleri, yüksek derecede spesifiklikleri ve göreceli olarak kolay sentezlenmeleri nedeniyle bu doğal iskelet yapı, sentetik modifikasyonlar için popüler bir seçenek haline gelmiş ve birçok α,β' -epoksiketon türevi bileşik sentezlenmiştir. Son zamanlarda *Streptomyces* türlerinden elde edilen diğer α,β' -epoksiketon türevi doğal ürünler olan TMC-86A, TMC-89B ve TMC-96 kodlu bileşikler, mikrobiyal metabolitlerden elde edilen bileşenlerin proteazom inhibisyonlarının taranması sırasında izole edilmiştir (Şekil 28). Bunun yanı sıra, proteazomun her üç proteolitik aktivitesine karşı spesifiklik gösteren YU-101 kodlu bileşik gibi, sentetik peptit α,β' -epoksiketon proteazom inhibitörleri de sentezlenmiştir (Şekil 28) (92). Ayrıca peptit parçanın modifikasyonu ile yöreye spesifiklik gösteren birçok inhibitörün ve aktivite-temelli problemlerin gelişimi sağlanmıştır (58,96).



Şekil 28. Peptit α',β' -epoksiketon türevi bileşikler

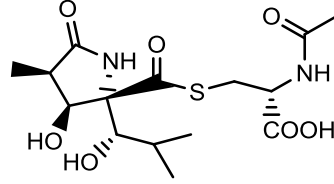
2.4.1.5. β -Lakton Türevleri

Doğal kaynaklı bileşikler, sentetik moleküllerin aksine, çoğunlukla peptit yapısı taşımayan yeni farmakofor gruplara sahip proteazom inhibitörlerinin elde edilmesini sağlamıştır (25). Selektif ve spesifik proteazom inhibitörleri olarak görev alan en küçük bileşik sınıfını temsil eden β -lakton türevi bileşikler, doğal kaynaklı bileşikler olup daha önceden keşfedilmiş küçük molekülü inhibitörlerdeki düzlemsel yapı yerine, lakton halka sistemine benzeyen karbon çatıdan oluşan peptit türevi bir ana yapı taşımaktadır (50,64). Bu sınıfta yer alan bileşiklerin, peptit aldehitlere göre çok daha spesifik olmalarına karşın, α',β' -epoksiketon türevi bileşikler kadar selektif olmadıkları, katepsin A ve tripeptitil peptidaz II gibi bazı serin proteazları da inhibe ettikleri bulunmuştur (30,89).

Laktasistin ve türevleri

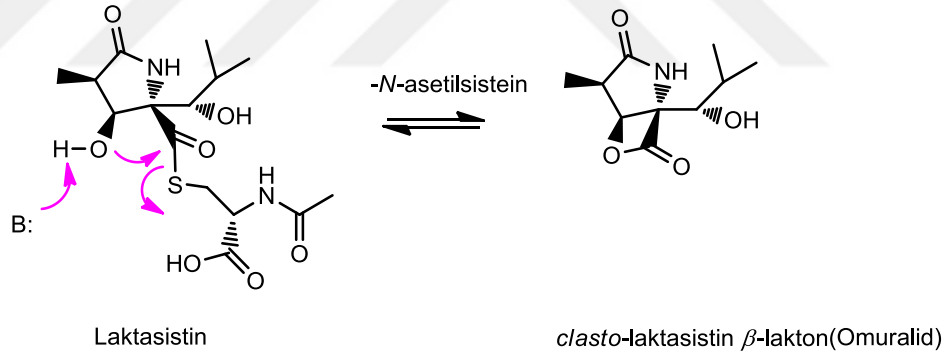
β -lakton sınıfı proteazom inhibitörlerinin ilk üyesi laktasistin, *Streptomyces lactacystinaeus* tarafından üretilen doğal bir bileşik olup, Omura ve çalışma arkadaşları tarafından fare nöroblastoma hücre kültürünün (Neuro-2a) farklılaşmasına sebep olan mikrobiyal metabolitlerin taranması sırasında keşfedilmiştir (Şekil 29) (18,20,29,47,89). Yapılan çalışmalarda, laktasistin'in öncelikli olarak proteazomun $\beta 5$ alt birimine bağlandığı ve kimotripsin benzeri

aktiviteyi etkili ve irreversible bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. Tripsin benzeri ve kaspaz benzeri aktiviteleri ise, daha az oranda ve reversible olarak bloke etmektedir (92).



Şekil 29. Laktasistin bileşiğinin kimyasal yapısı

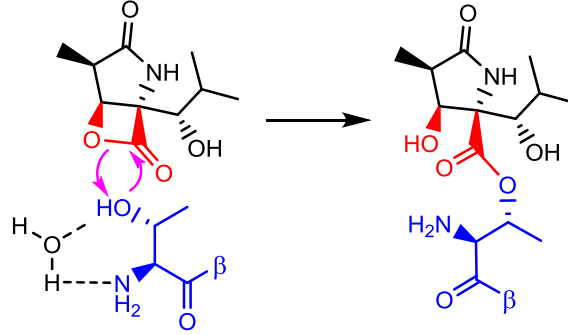
Laktasistin'in *in vitro* çalışmalarda aktivite göstermediği, ancak *in vivo* çalışmalarda bir ön ilaç gibi davranarak *N*-asetilsistein molekülünün eliminasyonu ile beraber omuralid olarak da bilinen biyolojik olarak aktif *clasto*-laktasistin β -lakton türevini oluşturduğu açığa çıkarılmıştır (Şekil 30) (56,58).



Şekil 30. Laktasistin ön ilacının aktif formu omuralid bileşiğine dönüşümü

Yapılan kinetik analizlerde, oluşan bu yeni bileşiğin, proteazomun aktif yöresinde yer alan N terminal treonin katalitik hidroksili ile reaksiyona girerek, β -lakton halkasının açılmasıyla ve stabil kovalent ester katım ürünü oluşumuyla sonuçlandığı gösterilmiştir (89). Omuralid ile oluşan katım ürünüde görüldüğü gibi, ortamdaki su molekülü ile hidrojen bağı yapmış olan N terminal treonin amino grubu, kısmen protonlanmış olduğundan deaçilasyon basamağını katalizleyememektedir. Ayrıca omuralid bileşiğinin yapısında bulunan dimetil

grubunun kimotripsin benzeri aktif yörenin S1 cebi ile nonkovalent hidrofobik etkileşimler yaparak selektivitede önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir (Şekil 31).



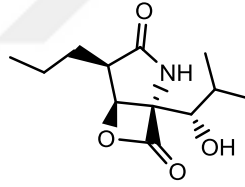
Şekil 31. Omuralid bileşiğinin etki mekanizması

Maya 20S proteazomu-omuralid kompleksinin yapısını aydınlatan kristal yapı analizleri, omuralid molekülündeki γ -laktam halkasının, C-3 ve C-4 bağı ekseninde serbest dönüşü engelleyerek üç numaralı karbon atomundaki hidroksil grubunun stereokimyasının korunduğunu göstermiştir. Nükleofilik atak, protein rezidüleri veya oluşan C3-hidroksil grubu tarafından bloke edilmekte ve N terminal treonin hidroksilinin deaçilasyonunu önlemektedir. Kovalent açıl ester bağının yanısıra, omuralid, çok sayıda hidrojen bağı aracılığıyla proteazomun merkez atomlarına bağlanmaktadır. Fakat bu inhibitörün kimotripsin benzeri yöreye artmış selektivitesinin esas kaynağı, bu yöredeki S1 cebin spesifik apolar özelliğidir. Kimotripsin benzeri yörenin S1 cebindeki nötral yük özelliği, aktif yörede inhibitörün ortalama kalma süresinin uzatılması ve aktif yöreye kovalent bağlanmanın tamamlanması açısından önem arz etmektedir. S1 cebin nötral karakteri, esas olarak, $\beta 5$ alt birimdeki Metiyonin 45 (Met45) amino asiti tarafından sağlanmaktadır. İnhibitör sadece bu yörede stabilize edilmektedir, bunun yanısıra Metiyonin 45 (Met45)'in dimetil yan zinciri *clasto*-laktasistin- β -lakton ve Treonin 1 (Thr1) hidroksili arasında ester bağı oluşumunun tamamlanması için yeteri kadar uzundur. Bu bulgular, ligandlarda yer alan hem fonksiyonel uç grubun hem de yan zincir rezidülerinin, proteazomun tek bir proteolitik aktif yöresine selektif ve spesifik olarak bağlanması açısından önemli bir rolü olduğunu ortaya çıkarmıştır (56,92).

Hücre kültürü çalışmalarının çoğunda laktasistin ve omuralid *in vivo* ve *in vitro* olarak proteazom ile ilgili tüm çalışma alanlarında yaygın ve başarılı bir şekilde

kullanılmaktadır (50). Laktasistin ve analogları, *clasto*-laktasistin- β -lakton, dekarboksilaktasistin, laktasistin amit, fenilasetil laktasistin ve *clasto*-laktasistin trifloroetil esterin sentezleri göreceli olarak daha yavaş ilerlediği ve karmaşık olduğu için, bu durum laktasistin yapısı taşıyan terapötik ajanların geliştirilmesini zorlaştırmıştır (89).

Omuralid, düşük moleküler ağırlığa sahip çok güçlü ve selektif bir proteazom inhibitörü olduğundan, gün geçtikçe artan bir ilgi görmüştür. Yapı-etki ilişkisi bakımından molekülde bulunması gereken özelliklerde yapılan birçok değişiklik, bu bileşiğin aktivitesinde önemli ölçüde azalmaya yol açmıştır. Bileşikteki β -lakton halkası, alkillenmemiş laktam kısım ve bütün stereokimyasal özelliklerin bulunmasının zorunlu olduğu tespit edilmiştir. Omuralid, 20S proteazomun inaktivasyonu için optimal özelliklere sahip bir molekül olup, C-7'deki metil grubunun daha uzun alifatik zincirlerle değiştirilmesiyle inhibitör etkinliğinin arttığı saptanmıştır. Omuralid bileşiğinin C-7 konumunda *n*-propil süstitüenti taşıyan analogu, PS-519 (MLN-519) kodlu bileşiktir (Şekil 32).

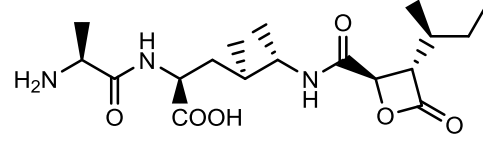


Şekil 32. PS-519 (MLN-519) kodlu bileşiğin kimyasal yapısı

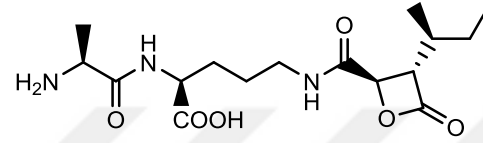
PS-519 kodlu bileşik, 0,3 μ M IC₅₀ değeri ile omuralid'den daha güçlü bir proteazom inhibitörü olarak bildirilmiştir. PS-519 kodlu bileşiğin esas etki gücü, I κ B degradesyonu/NF- κ B aktivasyonunu inhibe etmesinden kaynaklanmaktadır. NF- κ B, hücrede inflamatuvar yanıtları düzenlediği için, bu inhibitörün antiinflamatuvar ajan olarak da kullanılabilmesi öngörülmüştür. Bu bilgilerden hareketle, PS-519 kodlu bileşik, miyokard infarktüsü, felç, astım, artrit, psöriyazis ve otoimmün ensefalomiyelitli hayvan modellerinde ve multipl sklerozlu fare modellerinde etki göstermiş ve akut felç tedavisi için Faz I klinik deneme aşamasına alınmıştır (18,20,56).

Belaktosin ve Türevleri

β -lakton sınıfında yer alan diğer proteazom inhibitörleri bir *Streptomyces* türü olan UCK14'ten izole edilmiş Belaktosin A ve Belaktosin C'dir (Şekil 33) (29).



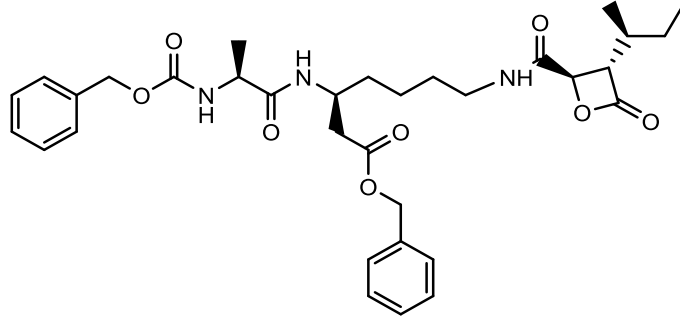
Belaktosin A



Belaktosin C

Şekil 33. Belaktosin A ve C bileşiklerinin kimyasal yapısı

Yapılan çalışmalarda her iki bileşiğin de antitümör aktivite gösterdiği bulunmuştur. Bu türevlerin antitümör aktivitelerinin, serbest amino grubunun açılması, karbonil grubunun esterifikasyonu gibi yapısal modifikasyonlar sonucunda önemli ölçüde arttığı saptanmıştır. Bileşiklerin yüksek antitümör aktivite sergilemeleri, proteazomal aktivitenin inhibisyonuna bağlanmaktadır. Omuralid bileşiğinde saptandığı gibi, kimotripsin benzeri aktif yöredeki treonin hidroksili belaktosinin β -lakton halkasının açılmasıyla açillenmektedir. Omuralid ve bir diğer belaktosin türevi bileşik olan homobelaktosin C, N terminal treonin hidroksili ile benzer bir şekilde etkileşse de, homobelaktosin C'nin yeni oluşan ester bağının kırılmasını önlemek için farklı bir mekanizma izlediği tespit edilmiştir (Şekil 34).

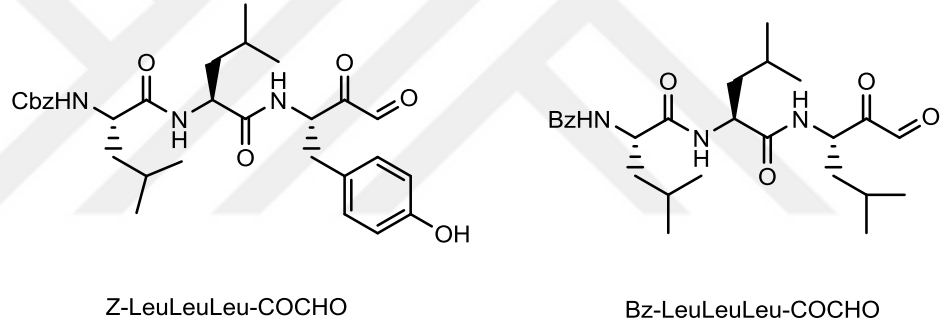


Şekil 34. Homobelaktosin C bileşiğinin kimyasal yapısı

Omuralid molekülünde görüldüğü gibi, enzimle etkileşim sırasında oluşan C3-OH grubu daha önce nükleofilik su molekülünün bulunduğu konuma yerleştiği için enzimin deaçilasyonu önlenmektedir. Omuralid molekülündeki γ -laktam halkasının varlığı, C3-C4 bağı ekseninde serbest dönüşü önlemekte, yeni oluşan C3 hidroksil grubu ise Treonin 1 (Thr1) amino grubu ile hidrojen bağı oluşturmaktadır. Buna karşın, homobelaktosin C'nin C-3 konumunda oluşan hidroksil grubu tam tersi yönde konumlanmakta ve 2.7 \AA uzaklıktaki Arjinin 19 (Arg19) oksijeni ile hidrojen bağı yapmaktadır. Aynı durum, omuralid bileşiğinin C-6 hidroksili tarafından da gerçekleştirilmektedir. Homobelaktosin C'nin 3-aminokarbonil yan zincirindeki amit azotu omuralid C-3 konumundaki hidroksile benzer görev yapmaktadır. Omuralid bileşiğinin kimotripsin benzeri aktif yöreyi spesifik bir şekilde bloke ettiği bulunmuştur, çünkü bu yöredeki S1 cebin yegane nötral yük özelliği, omuralid ve Treonin 1 (Thr1) oksijeni arasında ester bağı oluşumunun sağlanması için ligandı stabilize etmektedir. Enzime bağlı omuralid ve homobelaktosin C'nin yapısal olarak üst üste çakıştırılması ile P1 rezidülerinin çarpıcı ölçüde örtüştüğü görülmüştür. Fakat homobelaktosin C, kaspaz ve tripsin benzeri aktif yörelerle etkileşim için engel oluşturan, yalnızca kimotripsin benzeri aktif yöreye uyum sağlayabilen, sterik açıdan gerekli 3-aminokarbonil yan zincir bulundurmaktadır. Diğer taraftan Belaktosin A'nın benzil ester türevinin ($IC_{50}=48 \text{ nM}$), belaktosin A bileşiğinden beş kat daha etkili olduğu bulunmuştur. Kristalografik veriler, protein rezidüleri ile benzil gruplarının karakteristik hidrofobik etkileşimlerini açığa çıkarmış ve saptanan IC_{50} değerlerine mantıklı bir açıklama getirmiştir (56,92).

2.4.1.6. Peptit α -ketoaldehitler

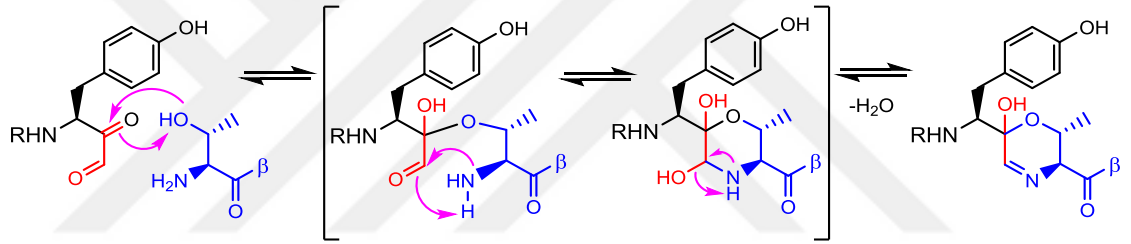
Sentetik proteazom inhibitörleri arasında yer alan diğer bir bileşik sınıfını, etki gücü ve selektiviteyi bakımından peptit aldehitlere benzeyen peptit α -ketoaldehitler (glioksal) oluşturmaktadır (89). Bu bileşik sınıfı, peptit aldehitlerin etki gücünü arttırmak amacıyla yapılan çalışmalar sırasında, aldehit fonksiyonel grubunun α pozisyonuna bir keton işlevsel grubunun eklenmesi düşüncesiyle 1990'lı yıllarda Lynas ve ekibi tarafından keşfedilmiştir (97). İnhibisyon çalışmaları, peptit α -ketoaldehitlerin hücreden geçebildiğini, selektif ve reversibl bir şekilde proteazomun β 5 katalitik alt birimini nM düzeydeki K_i değeri ile bloke ettiğini göstermiştir. Z-LeuLeuTyr-COCHO ve Bz-LeuLeuLeuCOCHO bileşikleri, kimotripsin benzeri aktiviteyi 3-4 nM aralığındaki K_i değerleriyle inhibe eden en etkili türevler olarak tespit edilmiştir (Şekil 35) (50).



Şekil 35. Peptit α -ketoaldehit türevi proteazom inhibitörü bileşikler

Bu bileşiklerin proteazom inhibitörü aktivite gösterdikleri tespit edildikten sonra etki mekanizmalarının daha ayrıntılı olarak aydınlatılması amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Maya proteazomu ile peptit α -ketoaldehit kompleksinin X-ray analizi sonucunda, bu yapıdaki bileşiklerin N terminal katalitik treonin ile etkileşerek altı üyeli heterosiklik bir halka oluşturmak suretiyle inhibisyon gösterdiği ortaya çıkarılmıştır (Şekil 36). Peptit α -ketoaldehitlerin peptit kısmı, peptit aldehit inhibitörler ve epoksomisin bağlanma şekillerine benzer şekilde, aktif yörede β konformasyonu kullanarak proteazomun β katları arasındaki boşlukları doldurmakta ve peptit yapısında yer alan azot atomları ve etrafındaki protein rezidüleri arasında oluşan hidrojen bağlarıyla stabilize edilen antiparalel β -katlanma yapısı ile inhibisyon sağlamaktadır.

Katalitik yörede, inhibitör molekül ile N terminal Treonin 1 (Thr1) hidroksil grubunun etkileşmesi sonucunda oluşan altı üyeli halka, iki basamaklı bir reaksiyonla oluşmaktadır. Bu iki basamaklı mekanizma, epoksomisin ve peptit aldehyitlerin (hemiasetal) bağlanma mekanizmalarına benzer şekilde kovalent bir hemiketal oluşumunu içermektedir. İlk olarak nükleofilik N terminal Treonin 1 (Thr1) hidroksil grubu, inhibitörün α -keto karboniline atak yaparak bir hemiketal oluşmakta ve oluşan hemiketalin hidroksil grubu, aktif yörede bulunan Glisin 47 (Gly47) azot atomuna hidrojen bağı ile bağlanmaktadır. Daha sonra, β 5 alt birimdeki N terminal Treonin 1 (Thr1) azotu, inhibitörün aldehit kısmına nükleofilik atak yaparak karbinolamin ara ürünü oluşturmaktadır. Bu olayı, bir su molekülünün çıkışı ile hemiketal ve imin fonksiyonu (Schiff bazı) bulunduran 5,6-dihidro-2*H*-1,4-oksadiazin yapısındaki altı üyeli heterosiklik halkanın oluşumu takip etmektedir (Şekil 36) (59,98).



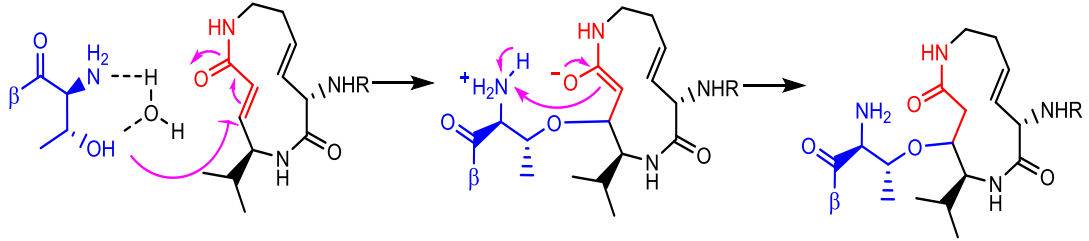
Şekil 36. Peptit α -ketoaldehyitlerin etki mekanizması

Reaksiyon sonucunda oluşan heterosiklik halka, α -ketoaldehyitlerin proteazom dışı etkilerinin bulunmadığını veya çok az miktarda diğer proteazları etkilediğini göstermiştir. Esas olarak, bu bileşikler kimotripsin ve tripsin benzeri aktivitenin bin kat daha güçlü inhibitörleri olarak tespit edilmiştir. Peptit α -ketoaldehyitler, spesifiklik ve hızlı geri dönüşebilirlik gerektiren deneylerde, bir peptit aldehit olan MG132 kodlu bileşiğin yerine geçmek üzere aday bileşikler olarak incelenmektedir (58).

2.4.1.7. Peptit Vinil Amitler (Sirbaktinler)

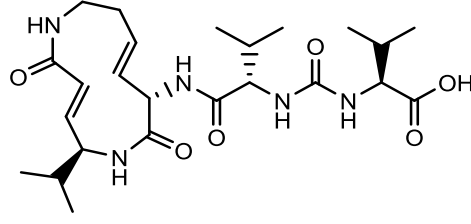
Peptit vinil amitler veya diğer adıyla sirbaktinler, siringolinler (siringolin A-F), glidobaktinler ve sepafunginlerden (cepafungin) oluşan doğal bileşik sınıfını oluşturmaktadır. Bu bileşikler üzerinde yirmi yılı aşkın bir süredir yapılan biyolojik aktivite çalışmaları sonucunda bileşiklerin tamamının proteazom inhibitör aktivite gösterdikleri açığa çıkarılmıştır (20). Bu gruptaki bileşikler peptit zincirine bağlı

α,β -doymamış laktam çekirdeği taşıyan on iki üyeli makrosiklik bir halka yapısına sahiptir. Bileşiklerde bulunan α,β -doymamış laktam yapısı, proteazomun katalitik treonin hidroksili ile Micheal tipi 1,4-katım reaksiyonuna girerek irreversible bir eter bağı oluşturmakta ve inhibisyon bu şekilde sağlanmaktadır (Şekil 37) (64).



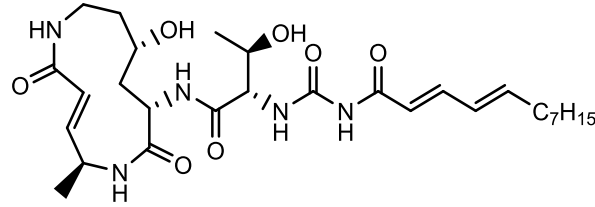
Şekil 37. Sirbaktin türevi bileşiklerin etki mekanizması

Bu bileşik grubunun bir üyesi olan ve *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* isimli bitki patojeninden virülans faktörü olarak izole edilen siringolin A (SylA) bileşiğinin, bitki ve maya proteazomunu inhibe ettiği gösterilmiştir (64) (Şekil 38). *In vitro* biyokimyasal deneylerde, SylA'nın insan eritrosit 20S proteazomunun üç katalitik aktivitesini irreversible olarak inhibe ettiği bulunmakla birlikte, bileşiğin en iyi düzeyde kimotripsin benzeri ($K_i = 843$ nM) ve tripsin benzeri aktiviteyi inhibe ettiği rapor edilmiştir (Şekil 38). Siklik yapıda yer alan (*E*-) konfigürasyonuna sahip iki adet çifte bağı varlığının rijiditeyi sağlayarak muhtemelen SylA'nın proteazomal alt birimlere olan spesifikliğini belirlediği, N terminal peptid uç kısmının ise bileşiğin etki gücünde görev aldığı bildirilmiştir (59). Syl A'nın, aynı zamanda proteazom fonksiyonunu *in vivo* olarak da inhibe etmek suretiyle, over ve nöroblastoma kanser hücrelerine karşı antiproliferatif ve proapoptotik etki gösterdiği bulunmuştur (99).



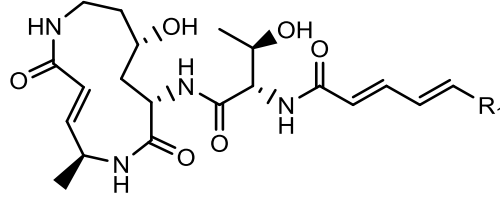
Şekil 38. Siringolin A bileşiğinin kimyasal yapısı

Bu doğal bileşik sınıfının diğer üyeleri olan glidobaktinler (Glidobaktin A-F), *Polyangium brachysporum* sp. nov. No. K481-B101 bakteri suşundan izole edilmiştir. Bu bileşiklerin, çok geniş bir antifungal etki spektrumuna sahip olmalarının yanı sıra, tümör hücre hatlarına karşı sitotoksik etki gösterdikleri gözlenmiştir. Glidobaktin A'nın, irreversibl bir şekilde insan 20S proteazomun kimotripsin ($K_i=49$ nm) ve tripsin benzeri aktivitelerini inhibe ettiği buna karşın, kaspaz benzeri aktiviteyi inhibe etmediği saptanmıştır (63) (Şekil 39). Maya proteazomu-glidobaktin A kompleksinin kristal yapısı üzerindeki çalışmalar, bileşiğin Siringolin A bileşiğine benzer bir şekilde kimotripsin ve tripsin benzeri aktiviteleri inhibe ettiğini açığa çıkarmıştır (56).



Şekil 39. Glidobaktin A bileşiğinin kimyasal yapısı

Pseudomonas türlerinden elde edilen diğer doğal türevler olan sepafunginlerin, maya ve mantar hücrelerinde proteazom inhibitör aktivite gösterdiği, farelerle yapılan çalışmalarda ise P388 lösemi hücrelerine karşı antitümör aktivite sergilediği bildirilmiştir (Şekil 40) (63,100).



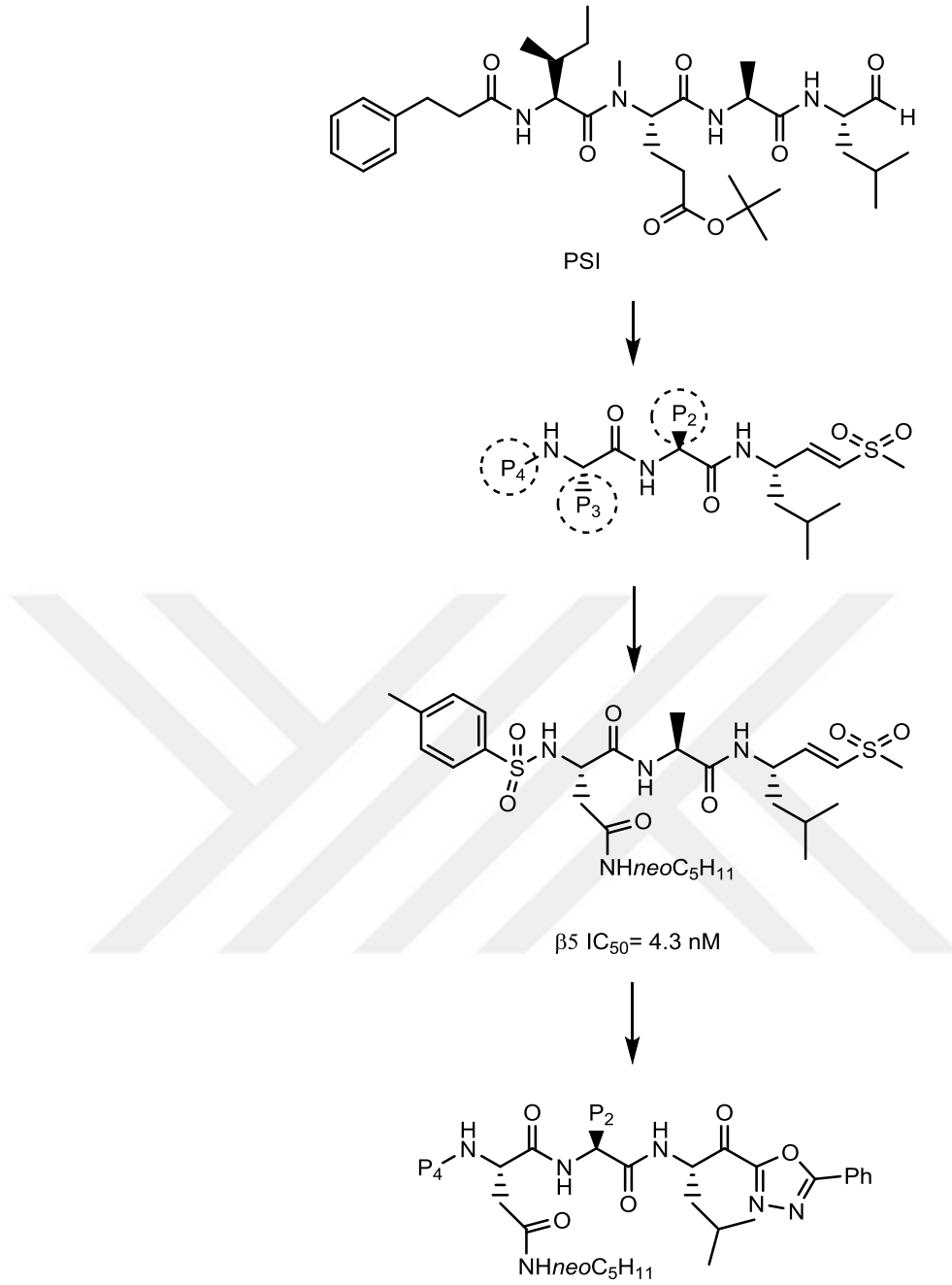
Sepafungin I: $R_1 = C_5H_{10}CH(CH_3)CH_3$
 Sepafungin III: $R_1 = C_3H_6CH(CH_3)CH_3$

Şekil 40. Sepafungin türevi bileşiklerin kimyasal yapısı

2.4.1.8. Peptit α -keto-1,3,4-oksadiazoller (Peptit Keto-oksadiazoller)

Farklı proteazom alt birimlerini hedeflemek amacıyla yapılan çalışmalar sırasında, peptit aldehitlere, farklı uç gruplar eklenmiş, ancak diğer proteazlara karşı selektivite sorunu çözülememiştir. Daha spesifik proteazom inhibitörleri elde etmek amacıyla, Rydzewski ve ekibi tarafından yapılan araştırmalarda elektrofilik α -keto-1,3,4-oksadiazol uç grubu taşıyan peptitler sentezlenmiştir (101). 1990'lı yıllarda keşfedilmiş umut vadeci tetrapeptit yapılı bir aldehit olan PSI kodlu bileşik bu araştırmaların başlangıç noktasını oluşturmaktadır (Şekil 41). İlk aşamada bileşiğin, P1 konumundaki lösin rezidü korunmuş, P2, P3 ve P4 konumlarını incelemek üzere, sentetik olarak daha kolay elde edildikleri için PSI bileşiğine benzer bir seri vinil sülfon türevi bileşik geliştirilmiştir (101–103). Bu seri bileşikler içerisinde, P3 konumunda neopentil-Asparajin süstitüenti taşıyan vinil sülfon yapısındaki bileşik $IC_{50} = 4.3$ nM değeri ile, β_5 alt birime yüksek selektivite ve afinite göstermiştir (59) (Şekil 41). Vinil sülfon türevi bileşiklerden hareketle, vinil sülfon grubu yerine α -keto-1,3,4-oksadiazol uç grubu korunarak optimize edilen P2, P3 ve P4 rezidülerle yeni bir seri bileşik geliştirilmiştir. Elde edilen bileşikler içerisinde yalnızca vinil sülfon uç grubun, α -keto-1,3,4-oksadiazol ile yer değiştirilmesi daha iyi bir inhibitörün elde edilmesiyle sonuçlanmıştır (Şekil 41). P1-Lösin rezidününün 2-aminoizobutirik asit ve P3-neopentil-Asparajin rezidününün benzil-Serin rezidü ile yer değiştirilmesi (özellikle *meta* ve *para* süstitüe) sonucunda etki gücünde önemli bir düşüş meydana gelmiştir. Aksine, P2-Alanin rezidününün *o*-metil-Serin rezidü ile ve P4-*p*-tosil grubununun *m*-tosil grubu ile yer değiştirmesi ile etki gücünde bir değişiklik meydana gelmediği tespit edilmiştir. Bu çalışmada, α -keto-1,3,4-oksadiazol çekirdeğindeki R süstitüentine ilişkin olarak, aromatik halkaların alkil gruplarına göre daha fazla etki gösterdiği belirlenmiştir. α -keto-1,3,4-oksadiazol

türevi, P4 konumunda *p*-tosil, P2 konumunda ise alanin sübstitüe 58a kodlu bileşiğin, *in vitro* insan 20S proteazom kimotripsin benzeri aktivitesinin reversibl, çok güçlü ve selektif inhibitörü olup PC-3 prostat kanser hücrelerinin büyümesini submikromolar konsantrasyonlarda inhibe ettiği tespit edilmiştir (56,59). Bu sınıf bileşikler daha ileri düzeyde araştırılmamış olmalarına karşın, bağlanma mekanizmalarının tam olarak aydınlatılması, günümüzdeki araştırmacıların ilgisini çeken çalışmalar arasında yer almaktadır (104). Bu doğrultuda, bileşiklerin bağlanma mekanizmalarını anlamak için yapılan doking hesaplamaları, sığır proteazomu kimotripsin benzeri aktif yörede MOE (Molecular Operating Environment) programı yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar, hücre ve hayvan çalışmalarında anahtar bileşikler olarak görev alabilen α -keto-1,3,4-oksadiazol yapısındaki reversibl proteazom inhibitörlerinin keşfini sağlamıştır (36).



	P4	P2	β_5 IC ₅₀ (nM)
58a	p-tosil	Ala	0.72
58b	p-tosil	Ser-OMe	0.72
58c	m-tosil	Ala	0.65

Şekil 41. PSI kodlu bileşikten hareketle peptit α -keto-1,3,4-oksadiazol türevi bileşiklerin gelişimi

2.4.2. Nonkovalent İnhibitörler

Günümüzde, klinik araştırmaları devam eden ve literatüre kayıtlı bileşiklerin çoğu, katalitik yörede Treonin 1 (Thr1) hidroksilinin nükleofilik atağına maruz kalarak kovalent reversibl veya irreversibl katım ürünü oluşturan elektrofilik bir fonksiyon (uç grup) ve peptit bir yapı bulunduran bileşikleri kapsamaktadır (64,90,97,98,101,102,105,106). Elektrofilik uç grup ve peptit yapı olmak üzere her iki farmakoforik bileşen, tüm proteazomal aktif yörelerde tek başına etki göstermekte ve çok sayıda serin ve sistein proteazı modifiye etmektedir (107). Bu inhibitörlerin aktif yöre ile etkileşimi sırasında oluşan kovalent bağ, *in vitro* apoptoza ve tümöral hücre ölümüne neden olmaktadır. Ayrıca, reaktif elektrofilik uç grubun, çoğunlukla aşırı reaktivite, dayanıksızlık, sitotoksisite ve yan etkilere sebep olan zayıf selektiviteyle ilişkili olduğu gösterilmiştir.

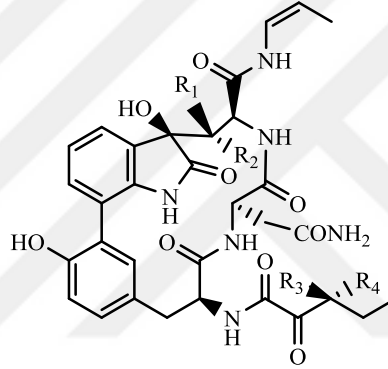
Proteazom inhibitörlerinin sitotoksik etkileri, katalitik yöre ile etkileşimi reversibl hale çevrilerek azaltılabilmekte, etkinlikleri katalitik yöre ile zamanla sınırlı bağlanmaları değiştirenler arttırılabilmektedir. Örneğin yavaş reversibl ve irreversibl inhibitörlerin önemli bir kısmının, eritositlerdeki, vasküler endoteldeki ve karaciğerdeki “en uygun proteazomlara” bağlanabildiği, dolayısıyla solid tümörlere karşı daha düşük etki gösterdikleri tespit edilmiştir. Buradan hareketle günümüzde, nonkovalent ve hızlı reversibl inhibitörler tasarlanmakta ve araştırılmaktadır. Herhangi bir reaktif elektrofilik uç gruba sahip olmayan bu tür bileşiklerin, azalmış yan etki ve gelişmiş farmakokinetik profil gibi terapötik avantajlar sağlaması beklenmektedir. Fakat proteazom aktif yörede, zayıf bağlanma düzeninde etkileşen nonkovalent inhibitörler, kovalent karşılıkları olan bileşiklere göre çok az araştırılmışlardır (14).

Bu bölümde, birbirinden farklı yapılara ve kimyasal özelliklere sahip nonkovalent proteazom inhibitörleri hakkında bilgi verilecektir. Günümüzde üzerinde en çok araştırma yapılan nonkovalent inhibitörler, siklik peptitler, siklik olmayan peptitler, peptit izosterleri, peptit yapılı olmayan inhibitörler ve hidroksiüreler olmak üzere 5 ayrı sınıfta toplanmaktadır (36,58).

2.4.2.1. Siklik Peptitler

Proteazom inhibitörleri olarak laktasistin ve epoksomisin gibi doğal bileşiklerin keşfi ve kullanımını sonucunda, yeni proteazom inhibitörleri bulmak amacıyla sistemik

olarak doğal ürünlerin taranması yoluna gidilmiştir. Bu sistematik tarama sırasında beklenmedik bir şekilde sıradışı yapılara sahip çok sayıda proteazom inhibitörü bileşik tanımlanmıştır (25). Kohno ve ekibi tarafından bu amaçla yürütülen bir çalışmada *Apiospora montagnei* Sacc. (TC1093) fermentasyon ürünlerinden, makrosiklik peptit yapısına sahip TMC-95 kodlu bir seri bileşik izole edilmiştir (108). Daha önceden tanımlanmış proteazom inhibitörlerinin herhangi biri ile benzerlik taşımayan bu bileşikler, modifiye edilmiş amino asitlerden oluşan heterosiklik halka sistemine sahiptir (18). TMC-95A, B, C ve D olarak isimlendirilen ve birbirinin stereoizomeri olan bu dört doğal bileşiğin, proteazomun tüm aktif alt birimlerine bağlandığı tespit edilmiştir (Şekil 42) (56,89).

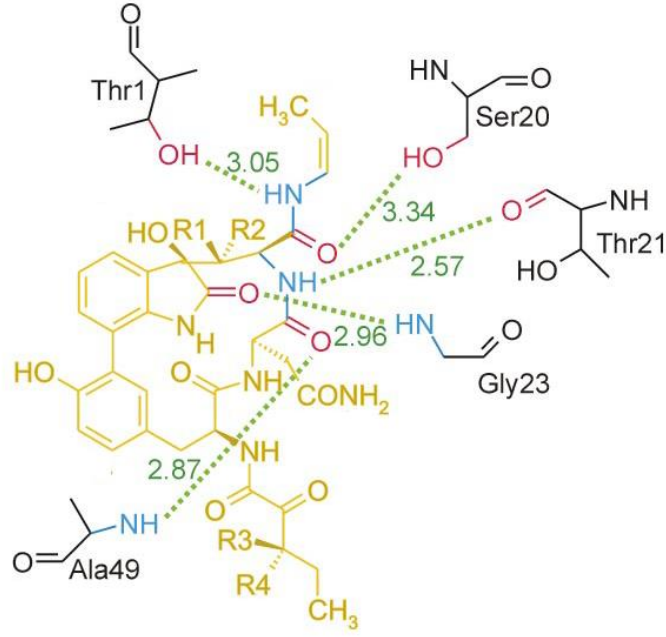


TMC-95	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
A	H	OH	CH ₃	OH
B	H	OH	H	CH ₃
C	OH	H	CH ₃	H
D	H	OH	H	CH ₃

Şekil 42. TMC-95 (A-D) kodlu bileşiklerin kimyasal yapısı

TMC-95A kodlu bileşik, en çok bulunan stereoizomer olup, bu türevler içerisindeki en aktif bileşik olarak bildirilmiştir. TMC-95A bileşiğinin, 20S proteazom kimotripsin benzeri aktivitenin güçlü kompetitif inhibitörü (IC₅₀=5.4 nM) olmasının yanı sıra kaspaz benzeri (IC₅₀=60 nM) ve tripsin benzeri aktiviteleri (IC₅₀=200 nM) de inhibe ettiği rapor edilmiştir (56). Ayrıca, bu bileşiğin 30 µM dozda m-kalpain, L-katepsin ve tripsin gibi diğer proteazları inhibe etmediği dolayısıyla selektif bir etkiye sahip olduğu da açığa çıkarılmıştır (14,25,108).

En çok bilinen inhibitörlerin lineer peptit yapılı bileşikler olduğu göz önüne alındığında makrosiklik peptit yapılı TMC-95 türevlerinin aktif yöreye nasıl uyum sağlayarak etki gösterdiği araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiştir (108). Çalışmalar sonucunda, molekülün siklik yapısından kaynaklanan genel rijiditesinden dolayı katalitik yöre ile optimal uyumu sağladığı ortaya çıkarılmıştır. Maya 20S proteazomu-TMC95A kompleksinin kristalografik analizlerinde, inhibitörün kimotripsin benzeri aktif yöre ile reversibl, kompetitif ve nonkovalent bir şekilde etkileştiği, fakat aktif yöredeki N terminal treonin rezidüde hiçbir kimyasal modifikasyon yapmaksızın sıkı hidrojen bağları örgüsü yoluyla üç proteolitik aktif alt birime bağlandığı saptanmıştır (Şekil 43) (50). Bu nonkovalent etkileşimlerin, S1 ve S3 ceplerindeki amino asit rezidüleri ile TMC-95A kodlu bileşik arasında antiparalel β katlanma oluşumunu sağladığı bildirilmiştir. Aktif yörelerin S1 ve S3 cepleri sırasıyla TMC-95A kodlu bileşiğin Z-propenil grubu (P1 rezidü) ve asparajin amino asidinin yan zinciri (P3 rezidü) tarafından doldurulmaktadır. TMC-95A bileşiği, katalitik yöredeki S2 yöre ile etkileşmezken, bileşiğin tirozin kısmı, enzimin hidrofobik S4 yöresi ile non-polar olarak zayıf bir şekilde etkileşmektedir (14,18). Ayrıca maya proteazomu-TMC-95A kompleksinden elde edilen yapısal veriler, etkili bir ligand bağlanması için bileşiğin C7 konumundaki hidroksil grubunun, aktif yöredeki Treonin 21 (Thr21)'e ait karbonil kısım ile sterik olarak çakışmaması için S konfigürasyonuna sahip olması gerektiğini, buna karşın C36 daki metil grubunun stereokimyasının etkileşim açısından kısıtlayıcı bir unsur olmadığını açığa çıkarmıştır (92).

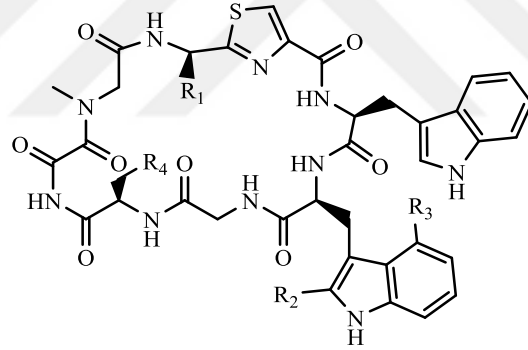


Şekil 43. TMC-95A kodlu bileşiğin proteazom aktif yöredeki etkileşimleri (108).

TMC-95A kodlu bileşiğin enantiomeri olan TMC-95B kodlu bileşik, TMC-95A ile benzer biyolojik aktivite sergilerken, diastereomerleri olan TMC-95C ve TMC-95D kodlu bileşiklerin biyolojik aktivitelerinin 20 ile 150 kat gibi büyük bir oranda azaldığı tespit edilmiştir. Bu durum, güçlü inhibitör aktivite için bileşiğin triptofan kısmında yer alan β karbonun stereokimyasının önemini açıkça ortaya koymuştur (14). TMC-95A kodlu bileşik gerek etki gücü gerekse farklı kimyasal yapısı ve inhibisyon mekanizması nedeniyle organik kimyacıların ilgi odağı haline gelmiştir. Bu kapsamda, TMC-95(A-D) bileşiklerinin total sentezi başarıyla gerçekleştirilmiş ve aktif yöreye spesiflikleri farklı düzeylere sahip bazı sentetik türevler hazırlanmıştır (109). Kimotripsin benzeri yöreye göre, tripsin ve kaspaz benzeri yörelere değişen afinitelere sahip nonkovalent olarak bağlanan daha basit yapılu TMC-95A türevleri hazırlanmıştır (40). TMC-95A bileşiği veya türevlerinin mekanizmalarına bağlı etkileri gösterilmemiş olmasına karşın, TMC-95A bileşiği HCT116 ve HL-60 kanser hücrelerinde sırasıyla 4.4 ve 9.8 μM IC_{50} değerlerinde sitotoksik etki göstermiştir (59).

2002 Yılında Höfle ve ekibi, yeni antibiyotiklerin potansiyel kaynağı olarak myxobakterilerin taranması sırasında *Archangenum gephyra* 'dan Arjirin A-H olarak nitelendirilen bir grup siklik oktapeptit izole etmiştir (Şekil 44) (14,63). Bu

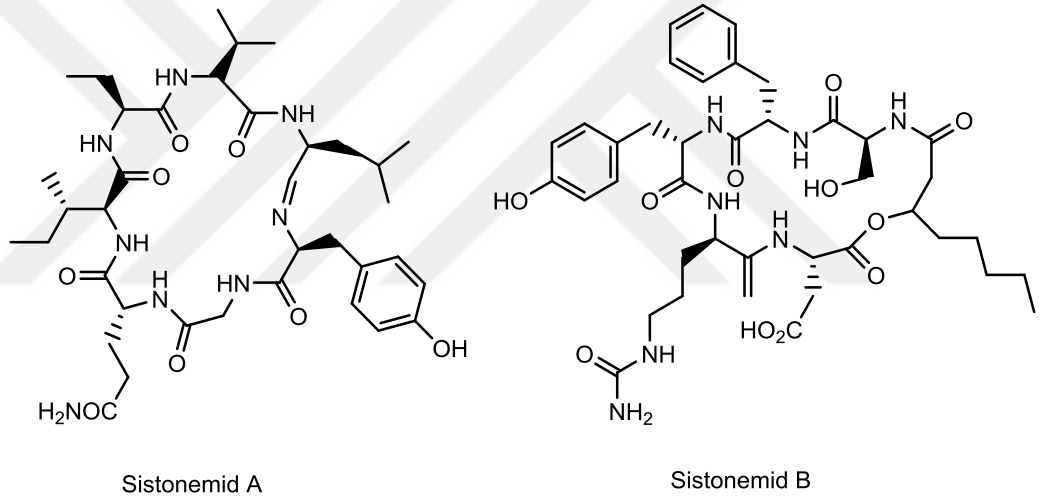
bileşiklerin *Pseudomonas* türlerine karşı etkili antibiyotikler oldukları ve memeli kültür hücrelerinin büyümesini inhibe ettikleri gösterilmiştir (63). Bu seri bileşikler içerisinde Arjirin A'nın, bir peptid boronat olan bortezomib ile karşılaştırılabilir etki gücünde insan proteazomunun kimotripsin, tripsin ve kaspaz benzeri aktivitelerini inhibe ettiği gösterilmiştir (110,111). Arjirin A-proteazom kompleksinin kristallendirilmesine ilişkin bilgiler henüz bildirilmemekle birlikte NMR spektroskopisi ve moleküler doking çalışmaları Arjirin A'nın MG132 ve bortezomib bileşikleri ile aynı kanonik bağlanma yöresini paylaşabileceğini açığa çıkarmıştır (112). Arjirin A, birçok kanser türünde yeterli miktarda eksprese edilmeyen siklin kinaz inhibitörü p27'yi stabilize etmek suretiyle tümör hücrelerinde apoptoza yol açan ve hücre döngüsünün durmasına sebep olan antitümör etkili bir bileşik olarak tanımlanmaktadır (14,58). Arjirin A, E, B ve F bileşikleri ise total sentezlerinin gerçekleştirilmesine beraber, birçok organik kimyacı ve biyolog için ilgi çekici moleküller haline gelmiştir (63).



Arjirin	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
A	CH ₃	H	OCH ₃	H
B	CH ₃	H	OCH ₃	CH ₃
C	CH ₃	CH ₃	OCH ₃	H
D	CH ₃	CH ₃	OCH ₃	CH ₃
E	CH ₃	H	H	H
F	CH ₂ OH	H	OCH ₃	H
G	CH ₂ OH	H	OCH ₃	CH ₃
H	H	H	OCH ₃	H

Şekil 44. Arjirin türevi bileşiklerin kimyasal yapısı

Son olarak, yakın zamanda keşfedilen Sistonemid A ve B bileşikleri, sayısı gün geçtikçe artan doğal proteazom inhibitörleri sınıfına eklenmiştir (58,113). Birçok siyanobakteriyel peptit, çeşitli proteazlara karşı inhibitör özellik gösterdiği için, Orjala ve çalışma arkadaşları, yakın bir zamanda, 20S proteazom inhibisyonu bakımından *Syctonema hofmanni*'den elde edilen siyanobakteriyel ekstraktları incelemelerinin sonucunda Sistonemid A ve B bileşiklerini izole etmiş ve tanımlamışlardır (Şekil 45). Her iki bileşiğin de siklik peptit yapıda olduğu tespit edilmiştir. Sistonemid A bileşiği diğer proteazom inhibitörü bileşiklerden farklı olarak bir imin grubu içerirken, Sistonemid B bileşiği 3-hidroksioktanoik asit kısmı bulundurmaktadır. Sistonemid A bileşiği, 96 nM IC₅₀ değeri ile proteazom kimotripsin benzeri aktivitenin güçlü bir inhibitörü olarak bildirilmiştir (14).

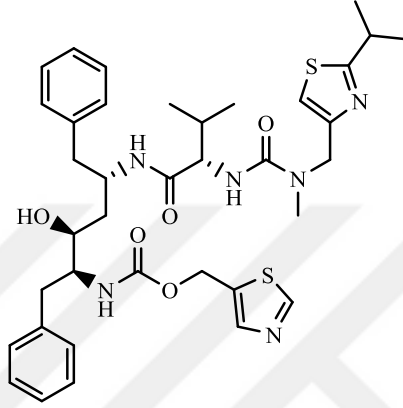


Şekil 45. Sistonemid A ve B bileşiklerinin kimyasal yapısı

2.4.2.2. Nonsiklik Peptitler ve Peptit İzosterleri

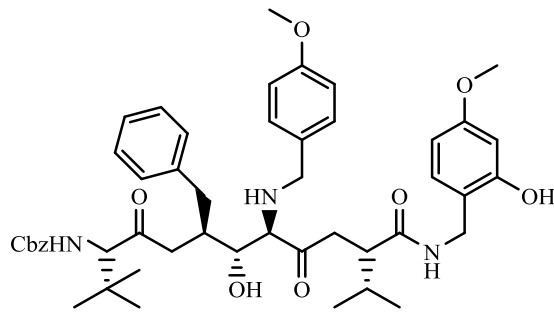
Benzilstatin yapısı taşıyan ritonavir bileşiği, HIV proteaz inhibitörü bir bileşik olup proteazom inhibisyonu oluşturan peptit izosteri bileşiklerin ilk örneğini temsil etmektedir (Şekil 46). Ritonavir ile tedavi edilmiş HIV-1 enfekte hastaların klinik bulgularında, bileşiğin MHC-I molekülleri aracılığıyla meydana gelen epitop sunumunu inhibe ederek antiproteaz etkinlik gösterdiği saptanmıştır (114). Farmakolojik öneminin yanı sıra, proteazomun katalitik mekanizmalarının anlaşılmasında yararlı bir araç olarak kullanılan ritonavir bileşiği, terapötik olarak uygun mikromolar konsantrasyonlarda, hücre kültüründe proteinlerin yıkımını ve

saflaştırılmış 20S proteazomlarda 3 μM IC_{50} değeri ile kimotripsin benzeri aktivitenin peptit substratı Suc-LLVY-AMC'nin yıkımını inhibe etmiştir. Sadece çok yüksek konsantrasyonlarda (100 μM) kaspaz benzeri aktivitenin inhibe edildiği bildirilmiştir. İlginç bir şekilde, 10 μM konsantrasyonda bileşik, tripsin benzeri aktivitede artmaya neden olurken, daha yüksek konsantrasyonlarda aktivitenin daha da arttığı saptanmıştır. Bileşiğin enzimle nonkovalent ve reversibl olarak etkileştiği ortaya çıkarılmıştır (50).



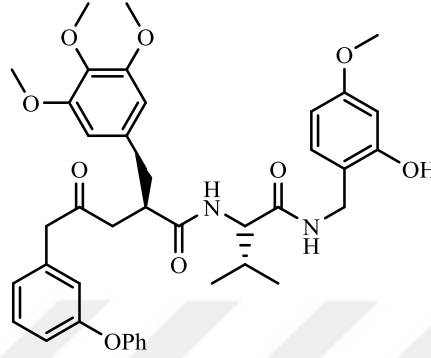
Şekil 46. Ritonavir bileşiğinin kimyasal yapısı

Esas olarak HIV-1 proteazı hedeflemek üzere tasarlanan 2-aminobenzilstatin türevleri, Novartis Pharma firmasında yürütülen HIV proteaz inhibitör projesinde yer alan araştırmacılar tarafından sentezlenmiştir. Bu araştırmada sentezlenen benzilstatin peptit I bileşiğinin insan 20S proteazom kimotripsin benzeri aktiviteyi ($\text{IC}_{50} = 0.09 \mu\text{M}$), tripsin benzeri ve kaspaz benzeri ($\text{IC}_{50} > 20 \mu\text{M}$) aktivitelere göre daha iyi inhibe ettiği tespit edilmiştir (Şekil 47).



Şekil 47. Benzilstatin peptit I bileşiğinin kimyasal yapısı

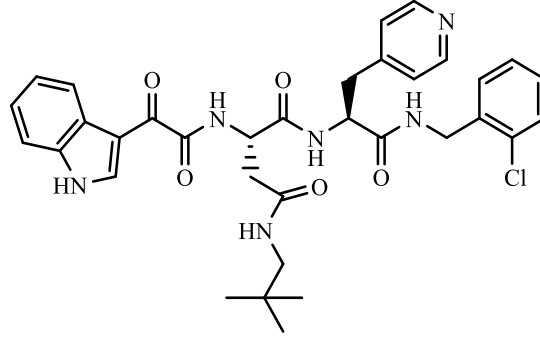
Bu bileşğin optimizasyonu, kimotripsin benzeri aktif yöreye selektivite gösteren çok sayıda inhibitörün elde edilmesini sağlamış ve sonuçta etki gücü yüksek C ve N terminalinde farklı gruplar taşıyan dipeptitlerin (Capped dipeptitler) keşfine yol açmıştır (Şekil 48) (115,116).



Şekil 48. Capped dipeptit I bileşğinin kimyasal yapısı

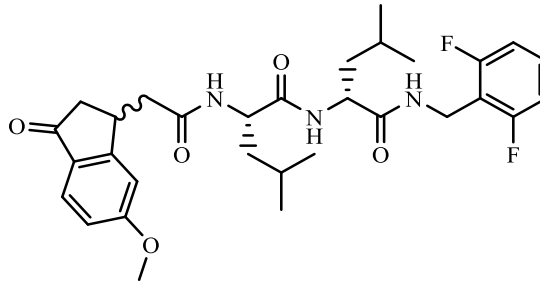
Diğer yandan, Blackburn ve ekibi, proteazom inhibitörleri alanında yeni kimyasal yapıları tanımlamak amacıyla, Millenium Pharmaceuticals kütüphanesini taramıştır. 350.000 bileşik, luminesans yöntemiyle gözlenen ubiquitin-lusiferaz belirtecinin kullanıldığı hücre deneylerinde, potansiyel proteazom inhibitörü bileşikler olmaları göz önüne alınarak test edilmiştir. Doğal yapıli olmayan *S*-homo-fenilalanin amino asiti taşıyan C and N terminalleri kapatılmış tripeptitler, memeli ve maya 20S proteazom kimotripsin benzeri aktivitenin selektif inhibitörleri olarak tanımlanmıştır. Bu seri içerisinde C ve N terminalleri benzil ve pirazinil süstitüentleri ile korunan tripeptit yapısındaki bileşik, tripsin ve kaspaz benzeri aktiviteleri inhibe etmezken, insan 20S proteazom kimotripsin benzeri aktiviteyi 0.5 nM K_i değeri ile (Bortezomib ile karşılaştırılabilir düzeyde) inhibe etmiştir. Maya 20S proteazomu ile bu bileşik kompleksinin kristal yapı analizlerinde bileşğinin kimotripsin benzeri aktiviteyi selektif olarak inhibe ettiği doğrulanmıştır. Bu analiz sonuçlarına dayanarak gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları sonucunda, bir seri dipeptit türevi bileşik sentezlenmiştir. Bu seri içerisinde, C terminali 2-klorobenzil grubu ile korunan, P2 rezidü olarak piridil, P3 rezidü olarak neopentil-asparajin ve P4 rezidü olarak karboksiindolin taşıyan türev (Capped dipeptit II), en güçlü proteazom inhibitörü olarak bildirilmiştir (Şekil 49). Bileşğinin insan 20S protezomu için IC_{50} değeri 1.2 nM olup, potansiyel bir N terminal ketoamit taşıyan bu bileşğinin

maya proteazomuna bağı haldeki X-ray yapısı nonkovalent bir inhibitör olduğunu açığa çıkarmıştır (14,40).



Şekil 49. Capped dipeptid II bileşiğinin kimyasal yapısı

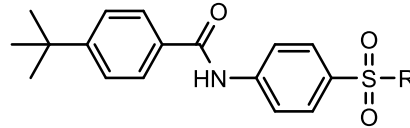
Capped dipeptid türevi diğer bileşikler, Lum ve ekibi tarafından sentezlenmiştir (117). Araştırmacılar, 20S proteazomun kovalent non-selektif inhibitörü peptid aldehit türevi MG101 kodlu bileşikten hareketle, 5-metoksi-1-indanon-dipeptid benzamit yapısına sahip 35 adet analog tasarlamıştır. Sentezlenen bu seri içerisindeki en etkili türevin, 2,6-diflorobenzil grubu taşıyan CVT-659 kodlu bileşik olduğu rapor edilmiştir (Şekil 50). Bileşik, tripsin ve kaspaz benzeri aktivitelere göre kimotripsin benzeri aktiviteye ($IC_{50}=0.14 \mu M$) selektif inhibisyon sergilemiştir (14). Sonuç olarak bu genel yapıya sahip dipeptid türevi bileşiklerin, proteazom inhibitör aktiviteleri, farklı araştırma grupları tarafından incelenmiş ve literatüre kazandırılmıştır.



Şekil 50. CVT-659 kodlu bileşiğin kimyasal yapısı

2.4.2.3. Peptit Yapılı Olmayan İnhibitörler (Nonpeptit İnhibitörler)

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, yapısal olarak peptitlerle benzerlik göstermeyen çok sayıda bileşiğin potansiyel proteazom inhibitör aktiviteye sahip olduğu keşfedilmiştir (14). Potansiyel lider bileşikler tespit etmek amacıyla bileşik kütüphanelerinin taranması yöntemi aralarında proteazomun da yer aldığı birçok hedef için yaygın bir strateji olarak kullanılmaktadır (118). Bu amaçla, orijinal ilaç benzeri yapılara sahip (drug-like scaffold) nonkovalent inhibitörlerin geliştirilmesi amacıyla proteazomun kimotripsin benzeri aktivitenin inhibisyonuna yönelik yapı-temelli sanal tarama sonrasında, sülfonamid sınıfı bazı bileşikler proteazom (kimotripsin benzeri aktivite) inhibitörü bileşikler olarak tespit edilmiştir (38). Bu bileşiklerin *in vitro* HeLa ve HEK-293 hücre hatlarında proteazomun en az bir katalitik aktivitesine karşı μM düzeyde etkili oldukları, reversibl inhibisyon gösterdikleri ve sitotoksik etkinliğe sahip oldukları teyit edilmiştir. Bu seri içerisinde yer alan en umut verici lider (hit) bileşikler olarak sülfanilamid yapısına sahip **74** ve **75** No lu bileşiklerin, sırasıyla 18.9 ve 1.9 μM IC_{50} değerleriyle kimotripsin benzeri aktiviteyi, 8.0 ve 10.0 μM IC_{50} değerleriyle de kaspaz benzeri aktiviteyi inhibe ettikleri bulunmuştur (14).



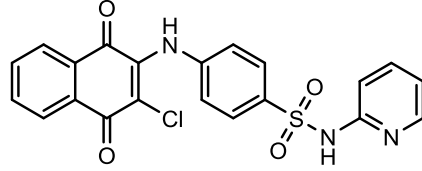
74 R=N(CH₂CH₂CH₃)₂

75 R=N(CH₂CH=CH₂)₂

Aynı zamanda **75** No lu bileşiğin 4.5 μM IC_{50} değeriyle tripsin benzeri aktiviteyi de inhibe ettiği bildirilmiştir. Neticede, bu türevler arasında sülfon grubuna bağlı R konumunda yer alan dallanmış alifatik zincirin aktivite için önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

İlaç benzeri yapıya sahip proteazom inhibitörlerinin bir diğer önemli sınıfı naftokinon türevleridir. Bu bileşik sınıfının ilk temsilcisi, Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) kimyasal kütüphanesinden elde edilen ve aynı zamanda sülfonamid grubu taşıyan PI-083 (NSC-45382) kodlu bileşiktir. 2009 yılında Kazi ve arkadaşları,

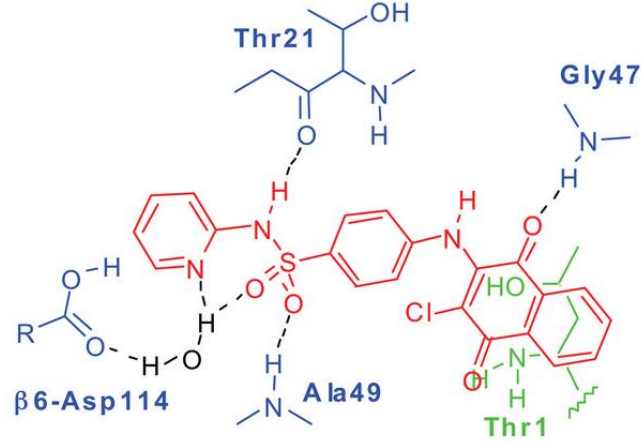
Ulusal Kanser Enstitüsü Diversity, Natural Product, Challenge and Mechanistic setlerinde yer alan 3,229 adet bileşiği, saflaştırılmış 20S proteazom kimotripsin benzeri aktivite inhibitörleri elde etmek amacıyla taramış ve 8 adet lider bileşik tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, tespit edilen bileşikler arasından PI-083 kodlu bileşiği sentezleyerek aktivite çalışmalarında kullanmışlardır (Şekil 51).



Şekil 51. PI-083 kodlu bileşiğin kimyasal yapısı

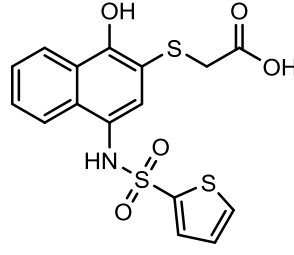
PI-083 kodlu bileşiğin, 20S tavşan proteazomu kimotripsin, tripsin ve kaspaz benzeri aktivitelerini sırasıyla 1.0, 4.5 ve 4.5 μM IC_{50} değerlerinde bortezomib'den daha hızlı bir şekilde bağlanarak inhibe ettiği bildirilmiştir. Bileşiğin, meme, pankreas, over, prostat, akciğer ve multipl miyelom hücre hatlarında ve multipl miyeloma sahip hastalardan alınan kemik iliği hücrelerinde, hücre ölümüne ve apoptoza sebep olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bileşiğin *in vivo* olarak ksenograft fare modellerinde MCF-7 ve A-549 (insan akciğer kanseri epitelyal hücre hattı) tümör hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği bulunmuştur. Aynı zamanda, bortezomib ile karşılaştırıldığında bileşiğin normal hücrelere kıyasla kanser hücrelerine karşı daha selektif olduğu saptanmıştır (41). PI-083 kodlu bileşiğin de etkili bir proteazom inhibitörü olan bortezomibe benzer şekilde A-549 tümör hücre hatlarında siklin bağımlı kinaz inhibitörü p27^{Kip1} düzeylerini arttırdığı yapılan çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır. Kimotripsin benzeri aktif yöre için yapılan *in siliko* bağlanma şekli çalışmaları, PI-083 kodlu bileşiğin etki gücünün, bileşikte yer alan naftokinon çekirdek yapısının aktif yöredeki Glisin 47 (Gly47) rezidü ile, sülfonamid kısmının da Treonin 21 (Thr21), Alanin 49 (Ala49) ve Aspartik asit 114 (Asp114) rezidüleri ile bir su molekülü köprüsü aracılığıyla hidrojen bağı yapmasından kaynaklandığını göstermiştir (Şekil 52). PI-083 kodlu bileşiğin etki göstermesinde önemli rol oynayan kloronaftokinon ve sülfonamid kısımları temel alınarak yeni bileşikler hazırlanmıştır. Bu bileşiklerin aktivite sonuçlarıyla da, kloronaftokinon ve sülfonamid kısımlarının inhibitör aktivite için önemli olduğu teyit edilmiştir. Çalışma sonuçları ayrıca PI-083

kodlu bileşikte yer alan piridil grubunun, aktivitede önemli bir kayıp olmaksızın diğer heterosiklik yapılarla değiştirilebileceğini göstermiştir (104).

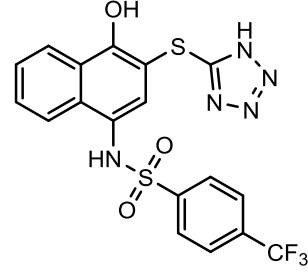


Şekil 52. Şekil PI-083 kodlu bileşiğin kimotripsin benzeri aktif yöredeki etkileşimleri (42)

Naftokinon yapısının olası bir türevi de molekülün hidronaftokinon şeklindedir. Önceki çalışmalarında PI-083 kodlu bileşiği keşfeden aynı araştırma grubu tarafından 2012 yılında, *in vitro* tarama çalışmaları sırasında hidronaftokinon yapısına sahip 79 No'lu aktif bileşik tanımlanmıştır (119). Daha sonra, bu lider bileşikten hareketle 38 adet hidronaftokinon türevi hazırlanarak bileşiklerin kimotripsin ve tripsin benzeri proteazomal aktiviteye karşı inhibitör etkinlikleri test edilmiştir. Bileşiklerin yapı-etki ilişkileri detaylı olarak irdelenmiş ve yapılan tüm değişiklikler içerisinde, yapıya karboksilik asit izosteri olarak tetrazol halkasının eklenmesinin etki gücünü geliştirmede etkili bir strateji olduğu sonucuna varılmıştır. Yapılan hücre çalışmalarının sonucunda elde edilen verilere göre, 79 ve 80 No lu bileşikler, bortezomib ile aynı etki mekanizmasına sahip olmamalarına rağmen irreversible inhibitör olma eğilimi göstermeleri nedeniyle daha ileri çalışmalar için seçilmiştir (14).

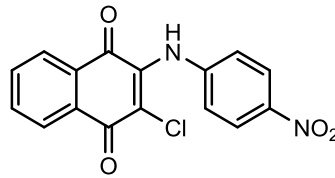


79



80

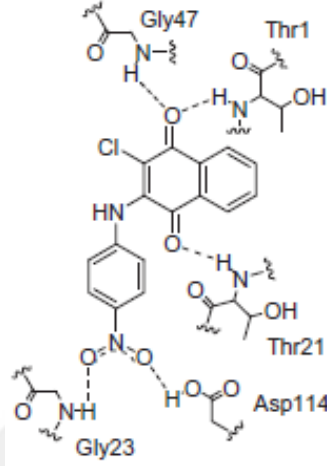
PI-083 kodlu bileşğin keşfinin ardından, bu seri bileşiklerin biyolojik özelliklerini geliştirme çabaları kapsamında sülfonamid grubunun farklı hidrojen bağı oluşturma özelliğine sahip gruplar ile değiştirilmesi yoluyla bazı yeni naftokinon türevleri sentezlenmiş ve inhibitör özellikleri test edilmiştir. Xu ve ekibi tarafından yürütülen bu çalışmada 14 adet bileşik sentezlenmiş ve yapılan hücre temelli deneyler sonucunda bileşiklerden altı tanesinin önemli ölçüde sitotoksik özelliğe sahip olduğu bulunmuştur. *p*-nitroanilin sübstitüentine sahip aşağıda açık kimyasal yapısı gösterilen 8 No lu bileşğin insan 20S proteazomun kimotripsin benzeri aktivitesini 3.65 μM IC_{50} değeri ile PI-083 bileşğinden ($\text{IC}_{50}=18.65 \mu\text{M}$) daha iyi inhibe ettiği rapor edilmiştir (43).



8 No lu bileşik

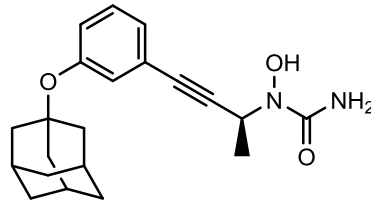
Çalışma kapsamında *in siliko* bağlanma şekli hipotezi kurulmuştur. Araştırmacıların beklediği gibi, bileşikte yer alan naftokinon halkasının PI-083 kodlu bileşiğe benzer bir konformasyonu seçtiği, nitro grubunun ise aynı sülfonamid grubunda olduğu gibi Aspartik asit 114 (Asp114) ile hidrojen bağı oluşturduğu tespit edilmiştir (14,104). Ayrıca, doking hesaplamaları, PI-083 kodlu bileşik ile karşılaştırıldığında 8 No lu bileşğin güçlü ve artmış inhibitör etki gücü göstermesinde, bileşğin 20S proteazomun Treonin 1 (Thr1) ve Glisin 23 (Gly23)

rezidüleri ile ilave iki hidrojen bağı yapmasından kaynaklandığına açıklık getirmiştir (Şekil 53) (36).



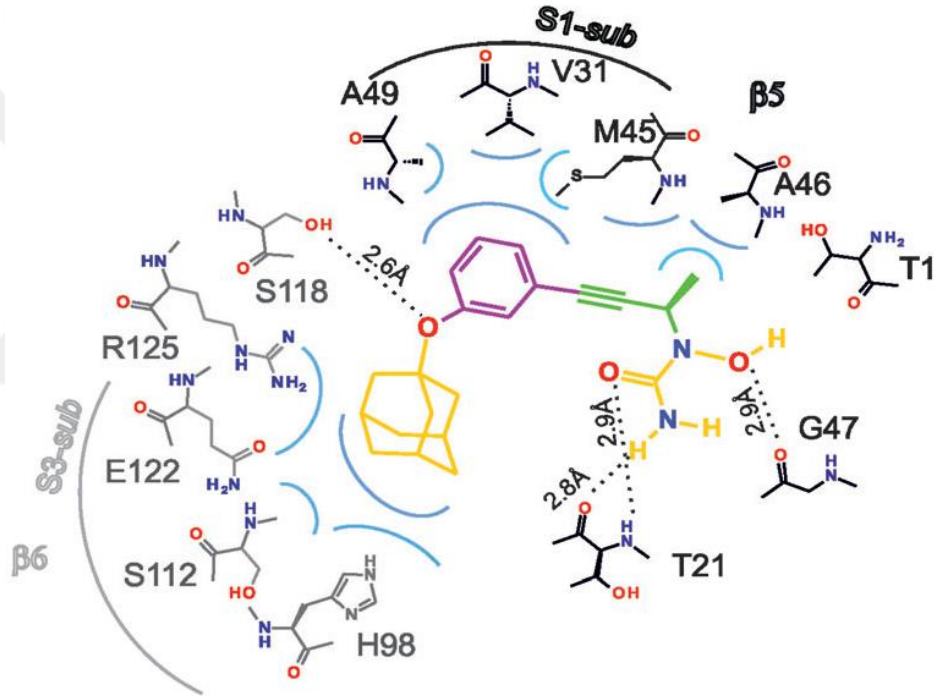
Şekil 53. Naftokinon türevi 8 No'lu bileşiğin aktif yöredeki etkileşimleri (43)

Selektif *in vitro* tarama protokolü aracılığıyla elde edilen diğer proteazom inhibitörü bileşik sınıfı hidroksiüre türevleridir (14). Taramalar sonucunda aynı zamanda 5-lipooksijenaz (5-LOX) inhibitörü olduğu bilinen hidroksiüre türevi lider bileşiğin 20S proteazom kimotripsin benzeri aktiviteyi reversibl ve nonkovalent bir şekilde inhibe ettiği bulunmuştur. Bu bileşik üzerinde yapılan kimyasal modifikasyonlar sonucunda elde edilen bileşikler içerisinde 1-adamantil ve metil sübstitüenti bulunduran HU-10 kodlu bileşik, 34 nM K_i değeri ile 20S proteazom kimotripsin benzeri aktivitenin reversibl ve selektif inhibitörü olarak tespit edilmiştir (Şekil 54) (120).



Şekil 54. HU-10 kodlu bileşiğinin kimyasal yapısı

20S proteazom ile bileşiğin X-ray kristalografik analizlerinde, bileşikte yer alan fenil ve adamantil hacimli hidrofobik gruplarının proteazom aktif yöredeki S1 ve S3 ceplerini doldurduğu, fakat aktif yörede treonin ile doğrudan etkileşmediği açığa çıkarılmıştır (Şekil 55) (118,120). Bu yeni bileşik sınıfının, 20S proteazom için bugüne kadar tanımlanmış en küçük yapı, reversibl ve nonkovalent olarak bağlanan aktif yöreye spesifik inhibitörleri temsil ettiği bildirilmiştir. Ayrıca, fonksiyonel reaktif bir uç grup taşımayan hidroksiüre türevlerinin farmakokinetik bakımdan önemli birçok moleküler özelliğe sahip olması, bu bileşiklerin proteazom inhibitörlerinin geliştirilmesinde yeni bir yol açabileceğini göstermiştir (14,58).



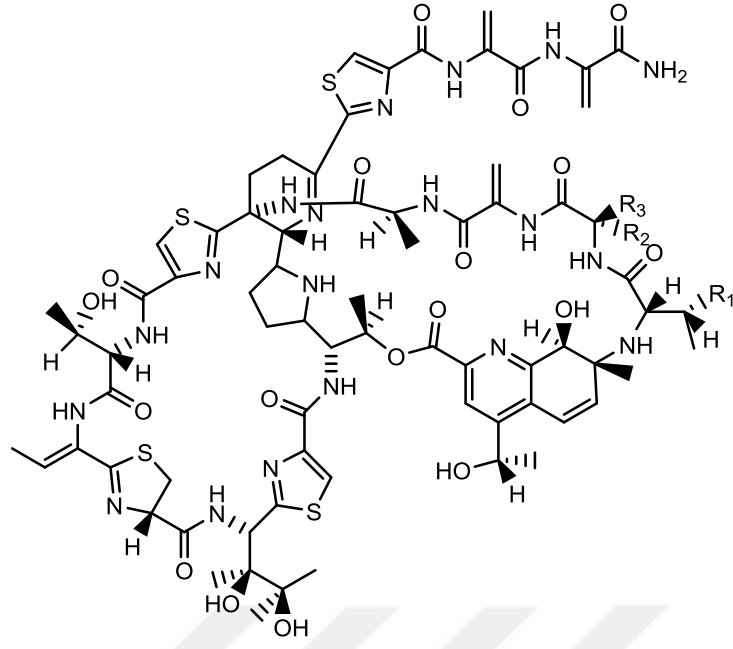
Şekil 55. HU-10 kodlu bileşiğin aktif yöredeki etkileşimleri (120)

2.4.2.4. Nonspesifik Proteazom İnhibitörleri

Bu gruptaki bileşikler, belirli bir hedefe yönelik rasyonel ilaç geliştirme yöntemlerinden biri olan mevcut terapötik ajanların taranması yöntemiyle proteazom inhibitör aktiviteleri tespit edilmiş bileşiklerdir. Bu şekilde tespit edilerek spesifik proteazom inhibitörü olmamakla birlikte proteazom inhibisyonu gösteren çok sayıda bileşik rapor edilmiştir (121). Bu bileşikler arasında tiyostrepton ve siomisin A gibi tiyazol grubu antibiyotikler, yeşil çayda bulunan polifenoller ile bazı triterpenoidler

ve diğ er birçok elektrofilik doç al bileşik ler yer almaktadır (58). Bu bileşik ler antikanser ve antiproliferatif etkilerin de içinde olduğu geniş aktivite profiline sahip olmaları nedeniyle potansiyel proteazom inhibitörleri olarak incelenmek üzere aday bileşik ler olarak seçilmiştir (118). Bileşiklerin daha önce klinik değerlendirmelerinin yapılarak toksisite profillerinin bilinmesi bu bileşiklere avantaj sağlamaktadır.

Potansiyel proteazom inhibitörü bileşikleri araştırma çalışmalarını kapsamında, Schoof ve arkadaşları bir seri makrosiklik peptit yapılı tiyostrepton türevi bileşik sentezlemiş ve bu bileşiklerin etkili antimalaryal ve antibiyotik ajanlar olduklarını açığa çıkarmışlardır (121). Araştırmacılar yaptıkları çalışmada ayrıca, bileşiklerin antimalaryal aktiviteleri ve proteazom inhibisyonu etkileri arasındaki ilişkiyi açığa çıkarmayı hedeflemişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda, tiyostrepton ve siomisin A gibi tiyopeptit yapısındaki bileşiklerin ribozomal protein sentezini translokasyon basamağında bloke ederek etki gösteren antibiyotikler olmalarının yanısıra, proteazomu da inhibe ettikleri tespit edilmiştir (Şekil 56) (122). Bu ajanların kanser hücrelerinde apoptozu tetikledikleri ve FoxM1 inhibitörleri olarak etki gösterdikleri açığa çıkarılmıştır. FoxM1, çok sayıda insan solid tümör hücresinde artışı tespit edilmiş onkojenik bir transkripsiyon faktörü olarak bildirilmektedir. Bu onkojenik faktörün, bir peptit boronat olan bortezomib bileşiğı ve peptit aldehit yapısındaki MG132 ve MG115 kodlu bileşiklerle de inhibe olduğu bulunmuştur (123,124). Çalışmalar sonucunda elde edilmiş tiyopeptit yapısındaki bu antibiyotiklerin 20S proteazom inhibisyonu etkilerinin MG132 ve MG115 kodlu bileşiklere göre daha az olduğu tespit edilmiştir (122). Ayrıca, bileşiklerin 20S proteazomun kimotripsin ve kaspaz benzeri aktivitelerini eşdeğer oranda inhibe ettikleri bildirilmiştir. Tiyostrepton bileşiğı kimotripsin ve kaspaz benzeri aktiviteyi sırasıyla 5.2 μM ve 3.8 μM IC_{50} değerleri ile inhibe ederken MG132 kodlu bileşik 0.02 μM ve 1.3 μM IC_{50} değerleriyle inhibisyon göstermiştir (14,121).

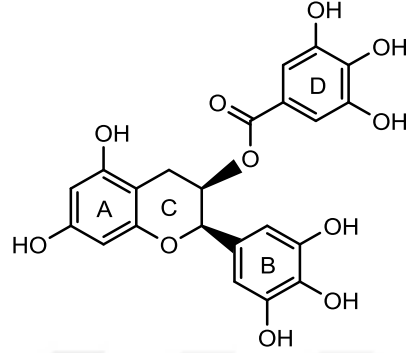


Tiyostrepton, $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$, $R_2 = \text{CH}_3$, $R_3 = \text{H}$
 Siomisin A, $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = R_3 = \text{CH}_2$ (dehidroalanin)

Şekil 56. Tiyostrepton ve Siomisin A bileşiklerinin kimyasal yapısı

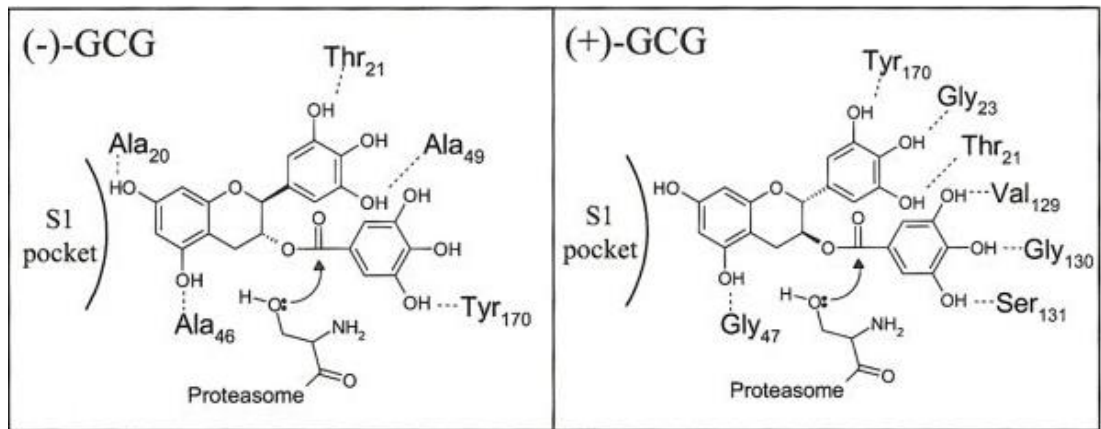
Doğal kaynaklardan yeni proteazom inhibitörlerinin tanınlanması amacıyla yapılan çok sayıda çalışma, antitümör etkileri ve geniş spektrumdaki biyolojik aktiviteleri nedeniyle özellikle yeşil çayda bulunan doğal polifenol bileşikleri üzerine odaklanmıştır. Bu bileşikler hakkında, kanserin önlenmesi ve korunması amacıyla kullanımına ilişkin çok sayıda dokümanın sunulmasıyla birlikte, insanlarda yeşil çayın antikanser etkilerini araştırmak için Faz I-III klinik araştırmaları hala devam etmektedir (50,125,126). Besin olarak tüketilen bitkilerde bulunan bu polifenol sınıfı bileşikler, önemli antitümör, antiinflamatuvar ve antioksidan özelliklere sahip olduklarının kanıtlanmasıyla birlikte oldukça dikkat çekici bileşikler haline gelmiştir (125). Bu sınıf bileşikler içerisinde yer alan epigallokateşin-3-gallat (EGCG), epigallokateşin (EGC), epikateşin-3-gallat (ECG), epikateşin ve epimerleri, proteazomu doğrudan hedeflediklerinin kanıtlanması ve bazı kanser hücrelerinin sayısını azalttıklarına veya büyümesini inhibe ettiklerine dair bulgular nedeniyle yeni potansiyel proteazom inhibitörü ajanlar olarak geniş ölçüde çalışılmaktadır (118,127). Polifenol bileşiklerinin temsilcisi olarak düşünülen epigallokateşin-3-gallat (EGCG) bileşiğinin, 20S proteazom kimotripsin benzeri aktivitenin güçlü bir inhibitörü olduğu gösterilmiştir (Şekil 57). EGCG bileşiğinin, iyi selektiviteyle

birlikte inhibitör etkinliğinin 1-10 μM konsantrasyonlarda apoptoza sebep olduğu bulunmuştur. Bileşik, proteazom inhibitör etkisinin gösterilmesinin ardından antitümör ve antiinflamatuvar aktiviteleri açısından da onaylanmıştır (127,128).



Şekil 57. EGCG bileşiğinin kimyasal yapısı

Bu bileşiklerin yapısında bulunan ester karbonilinin, nükleofilik atağa karşı duyarlı olduğu bildirilmiştir. Yapı-etki ilişkisi çalışmaları, atomik orbital enerji analizleri ve EGCG'nin 20S proteazomla verdiği reaksiyon ürünlerinin (metabolitlerinin) yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) verileri, proteazomun N terminal treonin hidroksili ile bileşiğin ester yapısı arasındaki nükleofilik etkileşim sonucunda inhibisyon gerçekleştiğini göstermiştir (Şekil 58) (89). Dolayısıyla bu bileşiklerin de, elektrofilik ester karbonuna sahip klasto-laktasistin- β -lakton bileşiklerine benzer şekilde aktif yöre treonin hidroksilini açılme yeteneğine sahip oldukları görülmüştür (127,129).



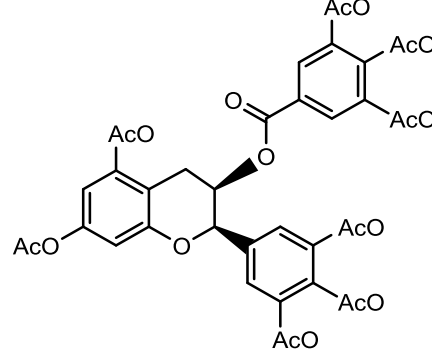
Şekil 58. EGCG bileşiğinin aktif yörede etkileşimleri

İlginç bir şekilde, yeşil çay içen bireylerin vücutlarında, hücre kültüründe saptanabilir antiproteazomal aktivite sergileyen konsantrasyon aralığına giren μM değerlerde polifenol bileşikleri tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin, kanser hücrelerini G1 fazında durdurduğu ve çoğunlukla proteazom inhibisyonu nedeniyle apoptoza sebep oldukları açığa çıkarılmıştır (130).

Elde edilen sonuçlar, araştırmacıları bu bileşiklerin antiproteazomal etki güçlerini optimize etmek amacıyla enantiomerik analoglarını sentezlemeye yöneltmiştir (50). EGCG iskelet yapısı temel alınarak daha etkili ve yeni antikanser ajanlar tasarlamak üzere bazı yapı-etki ilişkisi çalışmaları yapılmıştır (131–135). Bu yapı-etki ilişkisi çalışmaları, ester bağı, bütün halkaların varlığı, fenil halkalarında bulunan hidroksil grubu sayısının güçlü bir inhibitörün esansiyel özellikleri olduğunu, fakat kroman halkasındaki oksijen atomunun metilen ($-\text{CH}_2-$) izosteri ile yer değiştirilebildiğini ortaya çıkarmıştır (56). EGCG bileşiğinin yapısındaki ester fonksiyonunun amit işlevsel grubuna dönüştürülmesi sonucunda oluşan EGCG-amit türevinin inhibitör etki gücünde 3 kat azalma meydana geldiği saptanmıştır (135). Sentetik enantiomerik EGCG analoglarının, proteazomun kimotripsin benzeri aktivitesini ilgili doğal kateşin esterleri kadar güçlü ve selektif bir şekilde *in vivo* ve *in vitro* olarak inhibe ettikleri bulunmuştur. Bu durumun kroman heterosikliliğini oluşturan halkaların kısmi simetrisinden kaynaklandığı öngörülmüştür. Araştırmacılar, *in silico* doking çalışmaları sonucunda, özellikle EGCG bileşiği gibi yapısında ester bağı taşıyan polifenol bileşiklerinin irreversible ve zamana bağlı proteazom kimotripsin benzeri aktivite inhibisyonunun, aktif yöredeki Treonin 1 (Thr1) hidroksilinin açılması ve hidrofobik S1 cebe aromatik halkaların bağlanmasıyla polifenol-proteazom kompleksinin stabilitesinin artmasından kaynaklandığını ortaya koymuşlardır.

EGCG analoglarında kroman halkasına hidrofobik benzil grubunun girişi inhibitör etkide önemli bir değişiklik oluşturmamıştır. EGCG bileşiğinin fizyolojik koşullar altında stabilite sorunu ve zayıf biyoyararlanımı bileşiğin antikanser ajan olarak kullanımını sınırlamıştır. Fakat, perasetillenmiş analogu olan Pro-E bileşiği, daha stabil olması, daha iyi biyoyararlanıma sahip olması ve bazı hücre hatlarının büyümesini doğal EGCG bileşiğine göre 2 kat daha fazla inhibe etmesi nedeniyle potansiyel güçlü bir ön ilaç olarak bildirilmiştir (Şekil 59) (134). Bileşiğin ester karboniline bağlı fenil halkasının para konumundaki hidroksilin amino süstitüenti

ile yerdeğiştirilmesiyle oluşan analogunun da etkili proteazom inhibitörü aktiviteye sahip olduğu ve apoptoza yol açtığı bildirilmiştir (136).



Şekil 59. Pro-E bileşiğinin kimyasal yapısı

Sonuç olarak, proteazom inhibisyonu etkinliklerinin yanısıra düşük toksisiteleri ve antioksidan aktivitelerinin saptanmasıyla birlikte polifenol bileşikleri, günümüzde koruyucu (önleyici) olarak günlük diyete eklenebilir düşük riskteki ajanlar haline gelmiştir (118).

2.4.3. Allosterik İnhibitörler

PR-39 kodlu bileşik, ilk kez domuz bağırsağından izole edilmiş, 39 rezidü uzunlukta pirolin ve arjinine zengin kemik iliği kökenli bir peptittir (Şekil 60) (137). Doğal olarak antibakteriyel aktivitesi bulunan bileşiğin, bakteri hücre duvarını geçip DNA'yı bloke etmek suretiyle protein sentezini bozduğu bulunmuştur. PR-39 kodlu bileşiğin, antibakteriyel aktivite yanında geniş bir biyolojik aktivite spektrumuna sahip olduğu bilinmektedir. Bileşiğin yara iyileşmesi, miyokardiyal-iskemi reperfüzyon hasarında kardiyoprotektif etkileri olduğu bildirilmiştir. Kültür hücrelerinde ve memeli modellerinde PR-39 kodlu bileşiğin, proteazom aracılı İκBα'nın yıkımını ve NFκB'nin aktivasyonunu bloke etmek suretiyle antiinflamatuvar aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (138). Ayrıca bu PR-39 kodlu peptit bileşiğinin, proteazomun katalitik β alt birimleriyle etkileşen diğer proteazom inhibitörlerinden farklı bir şekilde 20S proteazomun α7 alt birimine bağlanarak nonkompetitif ve reversibl bir şekilde, proteolitik aktiviteleri allosterik olarak inhibe ettiği ve 20S gövde kısmı ile 19S düzenleyici alt birimlerin etkileşimini bozduğu ortaya çıkarılmıştır. Aynı zamanda bileşiğin mayalardan insanlara kadar tüm tipteki

proteazomları inhibe ettiğinin bulunmasıyla birlikte güçlü ve geniş spektruma sahip bir proteazom inhibitörü olduğu doğrulanmıştır (139). Bu bileşiğin ilk 11 rezidüsünden oluşan PR-11 kodlu bileşiğin N terminal kısmı, proteazomu inhibe eden en kısa peptid dizisi olarak bildirilmiştir (Şekil 60). PR-11 kodlu bileşiğin, insan kimotripsin benzeri proteazomal aktiviteyi 805 nM IC₅₀ değeri ile inhibe ettiği bulunmuştur (14).

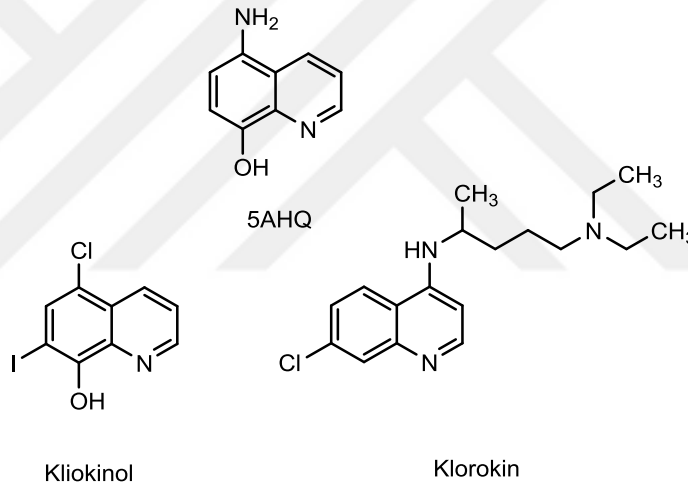
RRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRIPPGFPPRFPPRF	PR-39
RRRPRPPYLPR	PR-11

Şekil 60. Allosterik etkili proteazom inhibitörü PR-39 ve PR-11 kodlu bileşiklerin peptid dizileri

Allosterik bir inhibitör olarak keşfedilen bir diğer bileşik, Li ve ekibinin yaptığı dinamik NMR çalışmaları sonucunda bulunan 5-amino-8-hidroksikinolin (5AHQ) bileşiğidir (Şekil 61). Li ve ekibi daha önce yaptıkları çalışmalarda ortak kinolin farmakoforik yapısına sahip klorokin (chloroquin) ve kliokinol (clioquinol) bileşiklerinin proteazom inhibitör aktivitelerini değerlendirmiştir (Şekil 61) (140,141). 5-kloro-7-iyodo-8-hidroksikinolin yapısındaki kliokinol bileşiği, oral antiparaziter bir ajan olup bağırsak amibiyazisinin önlenmesi ve tedavisi amacıyla 1950-1970 yılları arasında kullanılmıştır (Şekil 61). Chen ve arkadaşları, 2007 yılında yaptıkları çalışmada kliokinol bileşiğinin bakır ile birlikte kullanıldığında, oluşan kliokinol-bakır kompleksinin prostat kanseri hücre hatlarında proteazom inhibitör aktivite gösterdiğini ortaya çıkarmışlardır (142). 2009 yılında Mao X. ve ekibi ise, bu bileşiğin, lösemi ve miyelom hücre hatlarında proteazom inhibitör etkinliklerini değerlendirmiş ve bu hücre hatlarında bileşiğin öncelikle bakır aracılı mekanizma ile hücre ölümüne sebep olduğunu saptamıştır (141). Sprangers ve ekibi ise, yaptıkları NMR çalışmalarıyla klorokin bileşiğinin, lösemi ve miyelom hücrelerinde proteazomun α alt birimlerine nonkompetitif bir şekilde bağlanarak diğer proteazom inhibitörlerinden farklı bir şekilde inhibisyon gerçekleştirdiğini tespit etmişlerdir (140). Ancak araştırmacılar bu çalışmada, klorokin bileşiğinin farmakolojik konsantrasyonlarının üzerinde proteazom inhibitör etkinlik göstermesi nedeniyle, bileşiğin tam (intact) hücrelerde tek başına veya bortezomib bileşiği ile

kombine halde proteazom inhibisyonu üzerine etkilerini araştıramadıklarını bildirmiştir.

Bu bilgilerden hareketle Li ve ekibi, kliokinol ve klorokin bileşiklerinden daha etkili olabileceği dūřünceyiyle, kinolin farmakoforik yapısına sahip 27 adet kimyasal bileşik kütüphanesini taramış ve sonuşta *in vitro* ve ksenograft fare modellerinde 5AHQ bileşiğini en güçlü proteazom inhibitörü bileşik olarak nitelendirmişlerdir. Araştırmacılar, dinamik NMR alışmalarıyla 5AHQ bileşiğinin, proteazom merkez çukurunda yer alan α alt birimlerine bağlanarak düşük mikromolar düzeyde nonkompetitif allosterik bir inhibitör olduğunu göstermiş, ayrıca bileşiğin kültür hücre hatlarında bortezomib direncinin üstesinden gelebilme yeteneği olduğunu bildirmiştir (58,143).



şekil 61. 5AHQ, kliokinol ve klorokin bileşiğlerinin kimyasal yapıları

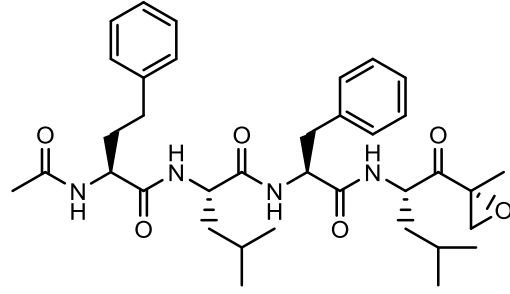
2.4.4. Yöre-Spesifik İnhibitörler

Önceki bölümlerde anlatılan birçok doğal ve sentetik proteazom inhibitörü bileşik, proteazomun kimotripsin benzeri aktivitesi öncelikli olmak üzere, kaspaz ve tripsin benzeri aktivitelerini de inhibe etmektedir. Hücre içi protein yıkımından, büyük oranda proteazomun kimotripsin benzeri aktivitesi sorumlu olduğundan, araştırmacılar özellikle kimotripsin benzeri aktiviteden sorumlu alt birime ve kimotripsin benzeri aktiviteyi bloke eden proteazom inhibitörlerinin gelişimine odaklanmıştır. Her üç aktivitenin de ilaç hedefi olarak düşünülmesi, 2006 yılında Kisselev ve arkadaşlarının, HeLa hücrelerinde protein yıkımını bloke etmek için

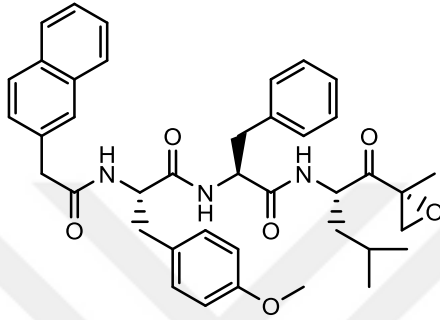
sadece kimotripsin benzeri aktivitenin inhibisyonunun yeterli olmadığını aynı zamanda kaspaz ve tripsin benzeri aktivitelerin de inhibe edilmesi gerektiğini ortaya koymalarıyla başlamıştır (144). Bortezomib bileşiğinin de kaspaz benzeri aktiviteyi bloke ettiğinin bulunmasıyla, antineoplastik aktivitenin sağlanması için kaspaz benzeri aktivitenin de inhibisyonunun gerekliliği konusu gündeme gelmiştir. Çalışmalar sonucunda elde edilen bu bilgiler, her bir aktif yöreye spesifik inhibitörlerin geliştirilmesini sağlamış ve kısa süre içerisinde her üç aktivitenin de aktif yöre problemleri ve hücre geçirgen inhibitörleri geliştirilmiştir.

Günümüze kadar geliştirilen en selektif ve en güçlü kimotripsin benzeri aktivite inhibitörlerinden birisi YU-101 kodlu bileşiktir (145) (Şekil 62). YU-101 kodlu bileşik, medisinal kimya yaklaşımları aracılığıyla epoksomisin'den türevlendirilmiş bir lineer peptid epoksiketondur. Eloffson ve arkadaşları, spesifik ve güçlü kimotripsin benzeri aktivite inhibitörleri geliştirmek için pozisyonel tarama programından faydalanarak, epoksomisin'in her bir konumunu (P1-P4) ayrı ayrı optimize etmiş ve sonuçta tetrapeptid epoksiketon yapısındaki YU-101 bileşiğini elde etmek üzere en uygun grupları birleştirmişlerdir. YU-101 kodlu bileşiğin, proteazomun kimotripsin benzeri aktivitesinin güçlü bir inhibitörü olmasının yanında, çok az düzeyde diğer proteazomal aktiviteleri de inhibe ettiği saptanmıştır (145). Ancak, YU-101 bileşiği sudaki düşük çözünürlüğü nedeniyle günümüzde terapötik bir ajan olarak kullanılamamaktadır.

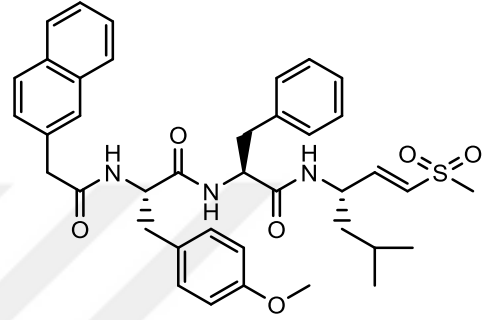
Kimotripsin benzeri alt birime spesifik diğer bir inhibitör olan NC-005 kodlu bileşikteki epoksiketon grubunun vinil sülfon grubu ile yer değiştirilmesi sonucunda elde edilen NC-005-VS kodlu bileşikte kimotripsin benzeri aktif yöreye spesifikliği arttığı bulunmuştur (Şekil 62) (146–148). Kimotripsin benzeri aktif yöreye spesifik bu inhibitörün geliştirilmesi, daha önceki çalışmalarda aktif yöreye spesifikliği belirleyen kısmın inhibitörün peptid kısmı olduğuna ilişkin ortak görüşün doğruluğunun tartışılmasına sebep olmuştur. Ayrıca artmış spesifikliğin HeLa hücrelerine karşı sitotoksiteyi önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir (147).



YU-101



NC-005

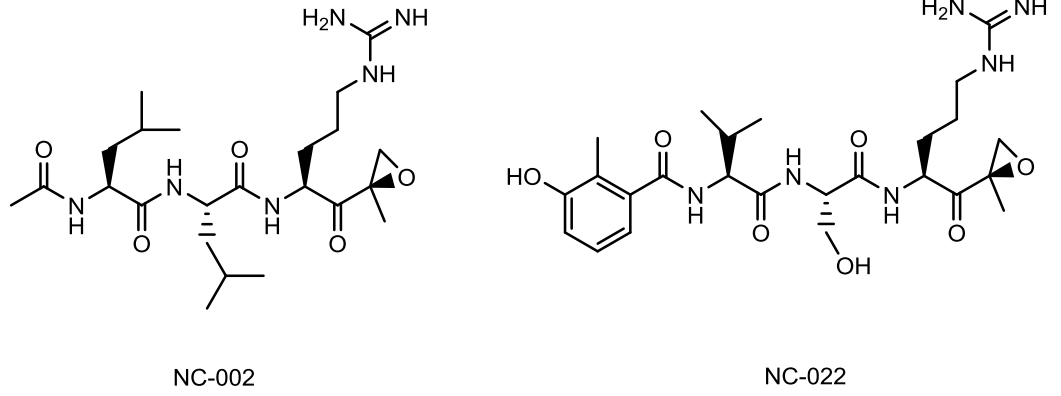


NC-005-VS

Şekil 62. Kimotripsin benzeri aktif yöre inhibitörü YU-101, NC-005, NC-005-VS kodlu bileşikler

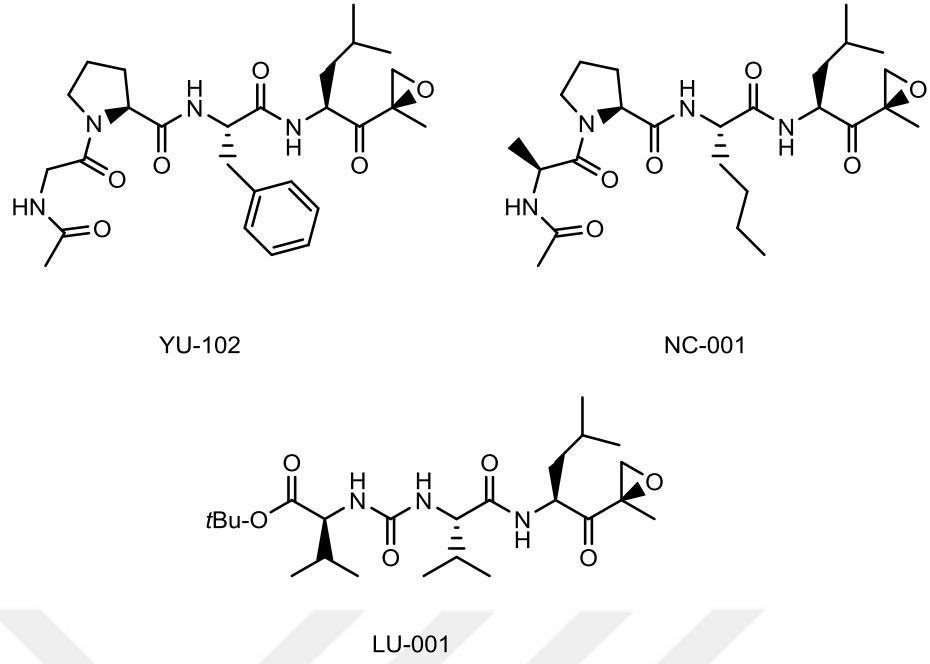
Proteazomun diğer bir alt birimi olan tripsin benzeri aktif yöreye spesifik fakat hücreden geçebilme özelliği olmayan inhibitörler, geçtiğimiz son on yılda farklı araştırma grupları tarafından sentezlenmiş ve incelenmiştir (102,149). İlk defa Marastoni ve çalışma arkadaşları, peptit vinil ester türevi bir grup bileşik sentezlemiş ve bileşiklerin tripsin benzeri aktif yöreye spesifik olduğunu bildirmiştir (150). Ancak daha sonra bu bileşikleri yeniden sentezleyen Screen ve arkadaşları, bu türlerin inhibitör aktiviteye sahip olmadıklarını açığa çıkarmıştır (147).

Son olarak 2011 yılında Mirabella ve arkadaşları, hücreden geçebilme özelliğine sahip peptit epoksiketon yapısında NC-002 ve NC-022 kodlu iki adet bileşik keşfetmiştir (96) (Şekil 63). Tripsin benzeri aktif yöre inhibitörleri olan bu bileşikler ile Britton ve ekibi tarafından sentezlenmiş kaspaz benzeri aktif yöre inhibitörlerinin, multipl miyelom hücrelerini, kimotripsin benzeri yöre inhibitörlerine karşı duyarlı hale getirdiği bulunmuştur (Şekil 63) (146). Ayrıca tripsin benzeri aktif yöre inhibitörlerinin selektif olarak multipl miyelom hücrelerini bortezomib ve carfilzomib bileşiklerine karşı da duyarlı hale getirdikleri ortaya çıkarılmıştır (96).



Şekil 63. Tripsin benzeri aktif yöre inhibitörü NC-002 ve NC-022 kodlu bileşikler

Aralarında YU-102 kodlu bileşiğin de bulunduğu kaspaz benzeri aktif yöre inhibitörü bir seri peptit α,β' -epoksiketon türevi bileşik, Myung ve arkadaşları tarafından farklı katalitik alt birimlerin *in vivo* ve *in vitro* olarak proteazomal yıkımdaki görevlerini anlamak amacıyla sentezlenmiştir (Şekil 64). Bileşikler, canlı hücrelerde yapılan hücre temelli protein yıkımı deneylerinde başarılı bir şekilde uygulanmış, ancak selektif kaspaz benzeri alt birim inhibisyonunun protein yıkımını inhibe etmek için yeterli olmadığı bulunmuştur (47). Kaspaz benzeri alt birime spesifik olduğu tespit edilmiş bir diğer inhibitör, van der Linden ve arkadaşları tarafından 2012 yılında sentezlenen LU-001 kodlu bileşiktir (Şekil 64) (151).



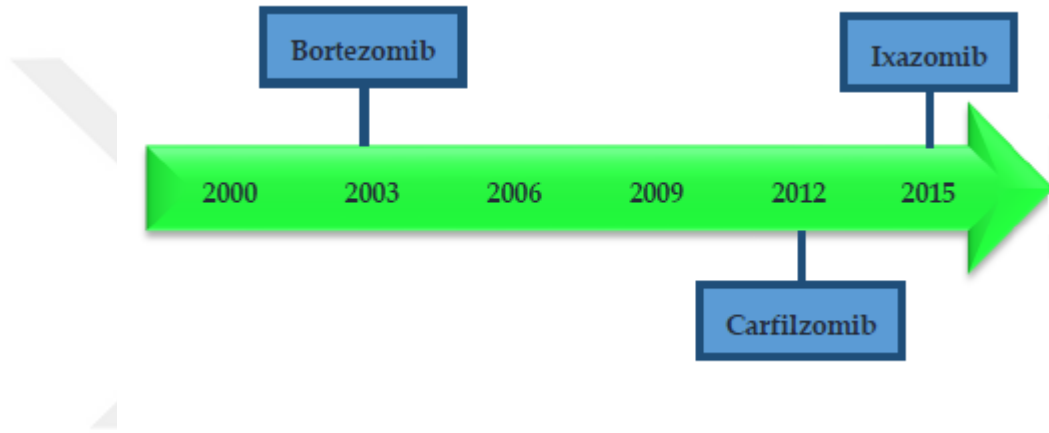
Şekil 64. Kaspaz benzeri aktif yöre inhibitörü YU-102, NC-001 ve LU-001 kodlu bileşikler

Tüm bu çalışmalar sonucunda, kanser tedavisinde kullanılan ajanların esas hedefinin kimotripsin benzeri yöre olmasına karşın, kaspaz ve tripsin benzeri yörelerin de hedeflenmesinin proteazom inhibitörlerinin sitotoksitesini arttırdığı tespit edilmiştir. Alt birimlere spesifik inhibitörlerin son zamanlardaki gelişmelerine karşın, bu bileşiklerin kimotripsin benzeri aktivite dışındaki fonksiyonları ve *in vivo* olarak protein yıkımına ne ölçüde katkı sağladıkları hala saptanamamıştır (25). Sonuç olarak, yöreye spesifik inhibitörler, günümüzde malignan hücreler için maksimal sitotoksite ve en iyi selektiviteye ulaşmak hedefiyle aktif yöre profilini tanımlamak üzere kullanılmaktadır (58).

2.5. Tedavide Kullanılan Mevcut Proteazom İnhibitörü Bileşikler

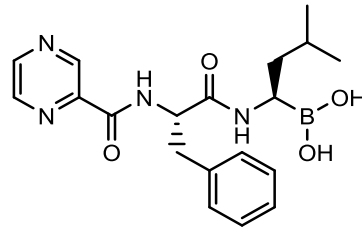
Hücre içi proteinlerin ubiquitine dayalı yıkımına aracılık eden proteazom, önemli antikanser bir hedef olarak bilinmektedir (152). Geçtiğimiz son 20 yıl içinde proteazom inhibisyonunun klinik açıdan kanser tedavisinde etkili terapötik bir yaklaşım olduğunun açığa çıkarılmasıyla birlikte farklı kimyasal sınıflara ve etkinliğe sahip 20S proteazom inhibitörlerinin keşfi için çalışmalar yoğunluk kazanmıştır (36,53). Proteazom inhibitörleri uzun yıllardır araştırmalarda ve klinikte kullanılmalarına rağmen, bugüne kadar yapılan araştırmalar sonucunda bu

multiproteaz kompleksin sadece 3 adet inhibitörü MM tedavisinde kullanılmak üzere FDA onayı almıştır (Şekil 65). Bu inhibitörler, peptit boronik asit yapısındaki bortezomib ve ixazomib ile peptit epoksiketon türevi bir bileşik olan carfilzomib'dir. Henüz terapötik olarak kullanılmayan ve klinik araştırmaları devam eden bileşikler ise β -lakton yapısı taşıyan marizomib, bir diğer peptit boronik asit türevi olan oprozomib ve peptit epoksiketon yapısındaki delanzomib bileşiklerinden oluşmaktadır (152). Bu bölümde yukarıda sözü edilen bileşikler sırayla anlatılacaktır.



Şekil 65. Tedavide kullanılan proteazom inhibitörleri ve tedaviye giriş yılları

2.5.1. Bortezomib (PS-341, Velcade®)



1993 yılında, ubikitin proteazom sistemini inhibe etmek suretiyle protein kütleinin aşırı yıkımını durdurmak ve dolayısıyla kanserin sebep olduğu kaşeksi durumunu önlemek amacıyla, proteazomun kaşifi Alfred Goldberg ve arkadaşları tarafından Myogenics/Proscript firması kurulmuştur. Bu amaçla ProScript firmasında

çalışan bir grup enzimoloji uzmanı, protezomun kimotripsin benzeri aktivitesinin substratlarını taklit ederek inhibitör etki gösteren peptit aldehitleri keşfetmiştir (30). Bu peptit aldehit yapısındaki bileşikler etkili ancak spesifik olmayan proteazom inhibitörleri olarak tespit edilmiştir. Bu moleküllerden hareketle, Millenium Pharmaceuticals şirketinde araştırmalarını sürdüren medisinal kimyacılar, aldehit fonksiyonel grubunun boronik asitle yer değiştirilmesi sonucunda peptit boronatları geliştirmiştir. Bu bileşiklerin aktif yörede serin rezidüye bağlanarak serin proteazları da inhibe ettikleri saptanmıştır. Bu bilgilerden hareketle bileşiklerin kimotripsin benzeri aktif yörede N terminal treonin rezidüye bağlanarak proteazomu da inhibe edebileceği öngörülmüştür. Basit sentezlerinin yanısıra tripeptit boronik asit yapısından internal amino asit rezidünün eliminasyonu, serin proteazlara daha az bağlanıp proteazoma spesifik olan dipeptit boronat türevlerinin elde edilmesini sağlamıştır (26,31). 1995 yılında yürütülen çalışmalarda, elde edilen dipeptit boronat türevleri arasında, pirazinilkarbonil-PheLeu-boronat kimyasal yapısına sahip bortezomib bileşiğinin (PS-341, Velcade®) 0.6 nM K_i değeri ile proteazomun kimotripsin benzeri aktivitesini selektif ve reversibl olarak inhibe ettiği bulunmuştur (22,50).

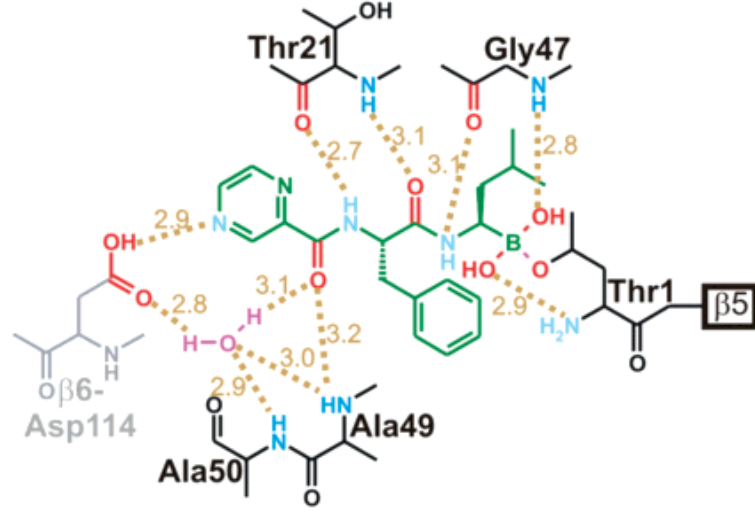
PS-341 bileşiğinin kimotripsin benzeri aktif yörede, treonin rezidüye kompetitif ve reversibl olarak bağlanarak diğer serin proteazlarla karşılaştırıldığında proteazoma karşı üç kat daha yüksek afinite gösterdiği tespit edilmiştir (106). Bortezomib bileşiği üzerinde yapılan çalışmalar, bu bileşiğin umut vadeci biyokimyasal ve farmakolojik özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. Düşük nanomolar konsantrasyonlarda bileşiğin NF κ B aktivasyonunu inhibe ettiği, p53 ve p57 gibi önemli hücre döngüsü düzenleyici proteinleri stabilize ettiği ve özellikle transforme hücrelerin hücre döngüsü işleyişini yavaşlattığı rapor edilmiştir (153). Bortezomib'in de içinde olduğu 13 adet dipeptidil boronat türevi bileşik, Ulusal Kanser Enstitüsünün 60 hücre hattı panelinde (NCI-60), antikanser aktiviteleri açısından taranmıştır. Bu bileşikler arasında bortezomib, kolon, merkezi sinir sistemi, melanom, over, böbrek, prostat, göğüs kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserini kapsayan çok çeşitli tümör tiplerine karşı büyüme inhibisyonu gösteren en güçlü bileşik olarak tespit edilmiştir (17). Ayrıca bortezomib'in kanser hücrelerine penetre olarak 0.1 μ M gibi bir konsantrasyonda uzun-ömürlü proteinlerin proteolizini % 50 oranında inhibe ettiği bulunmuştur (16). Bortezomib'e ilişkin önemli kinetik

parametrelere, NCI-60 kanser hücre hattı paneli çalışmalarıyla desteklenen etkileyici sitotoksik özelliğin eklenmesi, bileşiğin hücre kültürü ve hayvan modellerindeki antikanser aktivitesinin ve ilaca verilen yanıtın araştırılmasına ilişkin daha ileri çalışmalar yapılmasını teşvik etmiştir. Bu çalışmalarda, bortezomibin transforme olmamış hücrelere göre selektif tümör hücresi ölümüne sebep olduğu gösterilmiştir (106).

In vitro olarak çoğu hücre tipine karşı önemli aktivite, pro-apoptotik ve antianjiyojenik aktivite, ilaç direnci yoksunluğu, çoklu ilaç taşıyıcı proteine düşük afinite, radyoterapi ve kemoterapiye duyarlılık gibi olumlu özelliklere sahip olması, bileşiğin 1998 yılında Faz I klinik araştırmalarına erken girmesini sağlamıştır (50). Klinik kullanım için gerekli bortezomib konsantrasyonunu saptamak amacıyla Aghajanian ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen Faz I klinik çalışmalarında, 1.3 mg/m² dozda bortezomib tedavisi aldıktan sonra hastaların proteazom kompleksinin aktivitesinde % 65'lik bir azalma meydana geldiği gösterilmiştir (11). Faz I klinik araştırmalarında, bortezomib'in ilerlemiş hematolojik kanserlere sahip hastalar arasında refrakter miyelomlu hastalara karşı aktif olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca multipl miyeloma sahip dokuz hasta arasında, bir hastadan tam yanıt alınmış hemen hemen tüm hastalarda ise bileşiğin antitümör aktivite sergilediği gözlenmiştir (154). Daha sonra relapse ve refrakter miyeloma sahip 202 hastanın yer aldığı geniş ve çok merkezli Faz II çalışmalarında toplam %35 yanıt oranı elde edilmiştir. Ayrıca derece 3 diğer yan etkilerin yanısıra hastaların %12'sinde periferik nöropati gözlenmiştir (155). Büyük oranda Faz II çalışmalarına dayanarak bortezomib bileşiği, keşfedilmesinin ardından geçen sekiz yıl gibi kısa bir süre sonunda 2003 yılında relapse ve refrakter multipl miyelom (RRMM) tedavisi için Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır (30,93). Bu çalışmaların ardından bortezomib, 2005 yılında en az bir ön tedavi aldıktan sonra yineleyen multipl miyelom tedavisi için FDA'dan onay almıştır. 2006 yılında ise, bileşik, relapse ve refrakter mantle hücreli lenfomaya sahip hastaların ilk basamak tedavisi için onay almıştır (156). Bu aşamadan sonra yapılan çalışmalar esas olarak, mevcut terapötik yaklaşımlara karşı dirençli olan ve hastaların tanı konmasından sonra ortalama yaşam süresinin yaklaşık olarak 5 yıl olarak tespit edildiği multipl miyelom hastalığı üzerine odaklanmıştır. Uluslararası Faz III klinik araştırmaları, 669 hastada yürütülmüştür. Bortezomib'in, 1-3 ön tedavi aldıktan sonra tekrarlayan multipl miyeloma sahip

hastaların tedavisi için yüksek doz deksametazon uygulamasına göre daha etkili olduğu gösterilmiştir (155). Yapılan analizler sonucunda, bortezomib ile tedavi edilen hasta grubunda hastalık gelişim süresi 6.2 ay olarak tespit edilmiş, oysa deksametazon tedavisi uygulanan grupta 3.5 ay olarak bulunmuştur. Dolayısıyla bortezomib'in, önceden deksametazon tedavisi almış bütün hastalara önerilebileceği bildirilmiştir. 23 Temmuz 2008'de ise bileşik, multipl miyelom tanısı konmuş hastaların ilk basamak tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmıştır. Son olarak bortezomib 2012 yılında, onaylanan endikasyonların tedavisinde subkutan uygulamalar için FDA onayı almıştır (6).

In vivo deneyler, bortezomib'in en yüksek afinite ile proteazomun kimotripsin benzeri alt birime veya immünproteazomun β 5i alt birime bağlandığını göstermiştir. Yapılan kristalografik analizlerle de bortezomib'in kimotripsin benzeri alt birime bağlandığı doğrulanmıştır. Bortezomib'in aynı zamanda *in vivo* olarak kaspaz benzeri aktiviteyi de inhibe ettiği görülmüştür. Ancak elde edilen deneysel bulgulara göre, bortezomib'in çok yüksek konsantrasyonlarda bile proteazomun tripsin benzeri aktivitesini inhibe etmediği saptanmıştır. Farklı alt birimlere olan afinite farklılığının, bileşiğin yan zincirlerinin her bir alt birimle farklı etkileşmesinden kaynaklandığı tespit edilmiştir (92). Borissenko ve Groll, yaptıkları çalışmada bortezomib'in, proteazoma bağlandığında antiparalel β katlanma konformasyonunu aldığını göstermiştir. Bileşiğin konformasyonu, β alt birimlerin korunmuş rezidüleri [Glisin 47 (Gly47), Treonin 21 azotu (Thr21N), Treonin 21 oksijeni (Thr21O) ve Alanin 49 oksijeni (Ala49O)] ile bortezomib'in merkez atomları arasında doğrudan oluşan hidrojen bağlarıyla stabilize edilmektedir. Boronik asit farmakoforu, inhibisyonu oluşturan esas kısmı teşkil etmekte ve proteazoma olan spesifikliğin artmasını sağlamaktadır. Bor atomu, nükleofilik Treonin 1 (Thr1) oksijen atomunun ortaklanmamış elektron çiftiyle eşleşirken, Glisin 47 (Gly47) azotu, asidik boronat hidroksil gruplarından birisiyle oluşturulan hidrojen bağı stabilize etmektedir (Şekil 66) (92). Tetrahedral boronat katım ürünü daha sonra, ikinci asidik boronat hidroksili ile katalitik proton akseptörü olarak işlev gösteren N terminal treonin amin azotu arasında hidrojen bağı oluşumuyla stabilize edilmektedir. Ardından oluşan ürün, çok düşük derece dissosiasyon özelliğe sahip olup reversibl bir reaksiyon olsa bile birkaç saat boyunca stabil kalmaktadır (6).

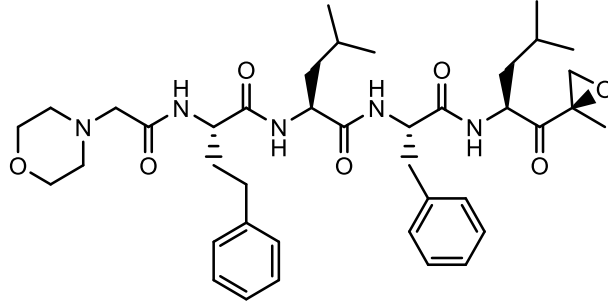


Şekil 66. Bortezomib'in kimotripsin benzeri aktif yörede etkileşimlerinin şematik gösterimi

Bortezomib, multipl miyelom tedavisi için onay alan ilk proteazom inhibitörü bileşik olmakla birlikte, MM hastalarının düşük bir popülasyonu bortezomib tedavisine yanıt vermemiş ve tek ajan olarak veya kombinasyon tedavisi şeklinde bortezomib tedavisinden sonra hastalığın yineleniği bildirilmiştir (28). Ayrıca bortezomib'in kullanımında özellikle periferik nöropati olmak üzere doza bağımlı toksisite, solid tümörlerde sınırlı aktivite, direnç ve sadece intravenöz uygulamayı kapsayan kısıtlamalar bulunmaktadır (14,37). Ancak, multipl miyelom hastalarında bortezomib tedavisiyle elde edilen pozitif klinik çıktılar, daha gelişmiş etki ve güvenlik profiline sahip yeni kuşak proteazom inhibitörlerinin keşfine ve geliştirilmesine katkı sağlamıştır (1).

Günümüzde bortezomib, tek başına veya konvansiyonel kemoterapötik ilaçlarla kombinasyon tedavisi şeklinde farklı kanser tipleri üzerindeki aktivitesi bakımından çeşitli klinik denemelerde değerlendirilmektedir (56).

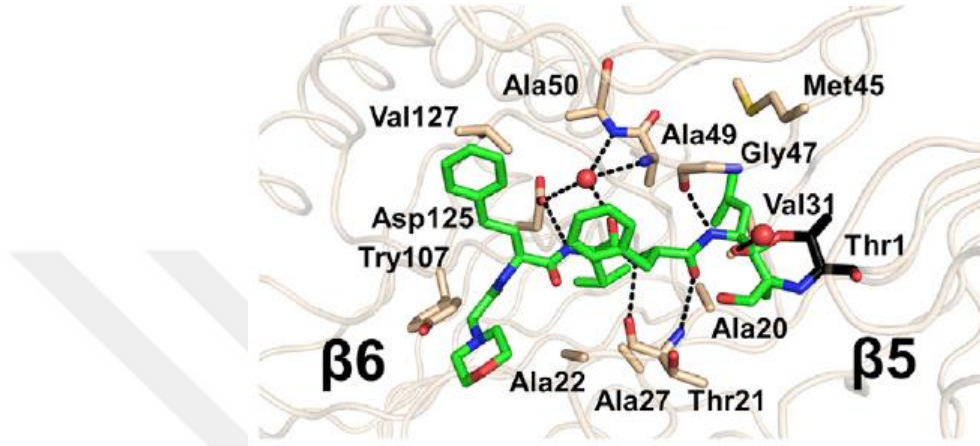
2.5.2. Carfilzomib (PR-171, Kyprolis®)



Peptit boronatlar uzun bir süre oldukça spesifik proteazom inhibitörleri olarak düşünülmesine rağmen, bortezomib ile uzun süren tedavilerin bazı dezavantajlara sahip olduğu ve bortezomib monoterapisine birçok MM hastasının yanıt vermediği veya ilaca karşı direnç geliştiği ortaya çıkarılmıştır (94,157). Ayrıca, bortezomib tedavisinden kaynaklanan istenmeyen yan etkiler, akademi ve ilaç endüstrisini daha az hedef dışı aktiviteye sahip, eşdeğer etki gücünde yeni proteazom inhibitörleri geliştirmeye teşvik etmiştir (94). Bu amaçla yapılan çalışmalar, en umut vaadeden bileşikler arasında yer alan doğal bir bileşik olan epoksomisinin tetrapeptit türevi carfilzomib'in (PR-171, Kyprolis®) gelişimine yol açmıştır (157). *Actinomyces* türlerinden izole edilen epoksomisin bileşiğinin proteazom inhibitör aktiviteye sahip olduğunu saptandıktan kısa bir süre sonra, medisinal kimyacılar, bileşikteki α' , β' -epoksiketon farmakoforunu sabit tutarak bileşiğin P2, P3 ve P4 konumlarında çeşitli amino asitler yardımıyla modifikasyonlar gerçekleştirmiştir (145). Bu modifikasyonlar sonucunda elde edilen bir seri epokosomisin türevi bileşiğin proteazom inhibitörü olarak kullanımı suda çözünürlük problemi nedeniyle sınırlı kalmıştır. Daha ileri modifikasyonlarda, N terminale 2-morfolino asetil grubunun süsbitüsüyonu, daha gelişmiş farmasötik özelliklere sahip, proteazom kimotripsin benzeri alt birimi selektif ve irreversibl olarak inhibe eden carfilzomib bileşiğinin elde edilmesini sağlamıştır (158).

Proteazom-carfilzomib kompleksinin kristal yapı analizlerinde, bileşiğin kimotripsin benzeri alt birimin N terminal treonin kısmına irreversibl bir şekilde bağlanması sonucunda, intramoleküler siklizasyonla 6 üyeli morfolin halkası oluşumu saptanmıştır (159). Bu intramoleküler siklizasyonun iki basamaklı bir

mekanizmayla gerçekleştiği ortaya çıkarılmıştır. İlk basamakta, Treonin 1 (Thr1) hidroksilinin oksijen atomunun epoksiketon karboniline nükleofilik atak yaparak hemiasetal oluşumunu sağladığı, ikinci basamakta ise, Treonin 1 (Thr1) amino grubundaki azot atomunun epoksit halkasındaki C2'ye nükleofilik atağı sonucunda morfolin katım ürünü oluştuğu rapor edilmiştir (Şekil 67) (93,159).



Şekil 67. İnsan 20S proteazomu ile carfilzomib'in kristal yapısı

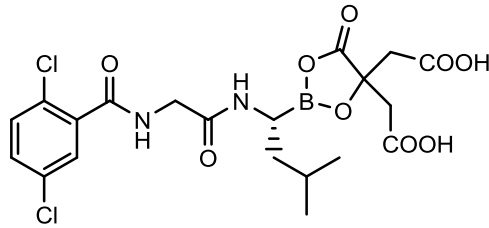
Bileşiğin kısa sürede *in vitro* ve *in vivo* olarak multipl miyelom dahil birçok hematolojik kansere karşı antineoplastik etkinlik gösterdiği açığa çıkarılmıştır (155). Ayrıca bileşiğin proteazoma bortezomib ile aynı etki gücünde bağlanmasına karşın kimotripsin benzeri aktiviteye karşı daha selektif olduğu rapor edilmiştir (49). Carfilzomib'in, bortezomib'e göre daha uzun süren bir proteazom inhibisyonu sağladığı ve bu durumun, carfilzomib etkisinin tersine çevrilmesi için yeni proteazom komplekslerinin sentezine ihtiyaç duyulmasından kaynaklandığı rapor edilmiştir (28).

Hücre kültüründe, her iki bileşiğin aynı konsantrasyonlarda kısa süreli uygulanması sonrasında, carfilzomib bileşiğinin, bortezomib bileşiğinden çok daha toksik olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte hematolojik tümör hücrelerinin, solid tümörler ve transforme olmamış hücre tipleri ile karşılaştırıldığında carfilzomib uygulamasına karşı daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Carfilzomib'in antikanser aktivitesinin, ksenograft insan tümör modellerinde hem doza hem de zamana bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir. 2009 yılında yapılan Faz I klinik araştırmalarında, carfilzomib, güvenlik ve etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla en az iki ön tedavi

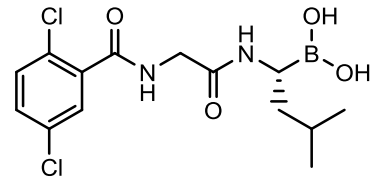
almış relapse ve refrakter hematolojik kanser gelişmiş olan 29 hasta tarafından kullanılmıştır. Carfilzomib'in antitümör aktivitesi 11 mg/m² üzerindeki dozlarda saptanmıştır (49). Hematolojik kanserlere sahip hastalarla yapılan bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar, bileşiğin bortezomib'e göre daha az periferik nöropati sergilediğini ve iyi tolere edildiğini göstermiştir (1). 20 Temmuz 2012 tarihinde carfilzomib, bortezomib ve bir immünmodülatör ajandan oluşan en az iki ön tedavi almış multipl miyelom hastalarının tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmıştır (160). Böylece carfilzomib bileşiği bortezomib'den sonra onay alan ikinci kuşak proteazom inhibitörlerinin ilkinin temsil etmektedir.

MM hastalarında devam eden ve tamamlanmış klinik çalışmaların yanında, carfilzomib ilerlemiş solid tümörlere ve diğer hematolojik kanserlere sahip hastalarda değerlendirilmektedir. Tamamlanan klinik denemelerde carfilzomib'in nötropeni pnömoni, akut renal yetmezlik, pireksi, konjesitif kalp yetmezliği, yorgunluk, sitopeni, mide bulantısı ve dispne gibi yan etkiler sergilediği bildirilmiştir (57). Carfilzomib günümüzde, talidomid, alkilleyici ajanlar ve histon deasetilaz inhibitörleri gibi diğer multipl miyelom ilaçları ile kombinasyon halinde kullanılmak üzere klinik araştırmalar altındadır (155).

2.5.3. Ixazomib (MLN-9708, MLN-2238, Ninlaro®)



Ixazomib sitrat (MLN9708)



Ixazomib (MLN2238)

Bortezomib'in, uzun bir süre multipl miyelom ve mantle hücreli lenfoma tedavisinde klinik olarak başarılı olmasına rağmen, solid tümörlerin tedavisinde güçlü bir aktivite göstermediği saptanmıştır. Bortezomib'in bu tümör tiplerinde etki göstermemesinin sebebi, dokulara yeterince penetre olamadığı için hedeflenen bölgelerde terapötik bakımdan yeterli konsantrasyonlara ulaşamaması olarak düşünülmüştür. Bu nedenle farklı fizikokimyasal ve farmakokinetik özelliklere sahip

proteazom inhibitörlerinin tanımlanmasına ihtiyaç duyulmuştur. Bu bilgilerden hareketle Kuppermann ve arkadaşları, 2010 yılında biyokimyasal ve prelinik verilerle protezom inhibisyonu yaptığını gösterdikleri MLN9708 kodlu bileşiği geliştirmiştir. MLN9708, çok geniş çaptaki kanser türlerinin tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmiş küçük molekül yapısına sahip ikinci kuşak bir proteazom inhibitörüdür (161). Bileşik, bortezomib gibi bor taşıyan bir peptit proteazom inhibitörü olup, farklı fizikokimyasal özelliklere sahip dipeptit boronat yapısındaki proteazom inhibitörleri arasından seçilmiştir (1). Kimyasal olarak bir dipeptidil boronik asit türevi olan bileşiğin, *in vivo* ortamda hızlıca hidroliz olarak aktif formu olan ixazomib'e (MLN2238) dönüştüğü tespit edilmiştir. Aktif metabolit olan MLN2238 bileşiğinin reversibl olarak proteazoma bağlandığı ve bortezomib bileşiğine göre daha hızlı bir şekilde dissosiyeye olduğu gösterilmiştir (61). Prelinik çalışmalarda ixazomib'in doğrudan bortezomib ile karşılaştırılması sonucunda ixazomib'in gelişmiş farmakokinetik, farmakodinamik özelliklere sahip olduğu ve solid tümörler ve hematolojik ksenograft modellerinde üstün bir antitümör aktivite gösterdiği açığa çıkarılmıştır (28,161).

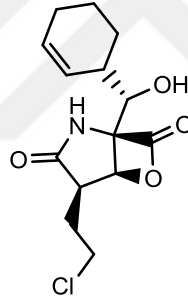
Ixazomib'in tercihen proteazomun kimotripsin benzeri alt birimine bağlanarak 3.4 nM IC₅₀ değeri ile inhibisyon oluşturduğu daha yüksek konsantrasyonlarda ise tripsin ve kaspaz benzeri alt birimleri de inhibe ettiği gösterilmiştir. Ixazomib'in selektivitesi ve etki gücü bortezomib'e benzediği halde, iki molekülün de proteazoma bağlanma kinetiklerinin farklı olduğu bildirilmiştir (28). Hücre canlılık çalışmalarında, bileşiğin çeşitli tümör hücre hatlarına karşı güçlü antiproliferatif etki gösterdiği, insan prostat kanseri ksenograftlarında, kolon kanseri ve lenfoma türlerinde yapılan *in vivo* çalışmalarda ise bileşiğin hem oral hem de intravenöz olarak etkili olduğu bulunmuştur. Bu özellikleri nedeniyle bileşik, lenfoma ve hematolojik olmayan kanserlere sahip hastalarda etkisi değerlendirilmek üzere Faz I çalışmalarına, multipl miyelom hastalarında ise Faz I/II klinik çalışmalarına alınmıştır (1).

Multipl miyelom modellerinde, ixazomib'in kaspaz-8 ve kaspaz-9 aracılığıyla apoptozu aktive ettiği, NF-κB'yi inhibe ederek endoplazmik retikulum stres yanıtına sebep olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bileşik deksametazon ve lenalidomide ile kombinasyon halinde sinerjik anti-tümör aktivite göstermiştir. Tüm bu çalışmaların ardından ixazomib, en az bir ön tedavi almış MM hastalarının tedavisinde

lenalidomid ve deksametazon ile kombinasyonu şeklinde kullanılmak üzere 2015 yılında FDA onayı almıştır (36). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, ixazomib'in osteoblast fonksiyonunu arttırmak için osteoklastojenez ve osteoklast reabsorpsiyonunu inhibe ettiğini göstermiştir. Ixazomib, MM relapse dirençli hastalarda güvenlik ve optimum dozları değerlendirmek için yapılan iki çalışmada tek ajan olarak kullanılmıştır. Yapılan diğer bir çalışmada RRMM hastalarının %59'una deksametazon tedavisi eklenmiştir. Kombinasyon çalışmalarında ixazomib, lenalidomide ve deksametazon kombinasyonu etkili bulunmuştur. Yeni tanı konmuş MM hastalarında ixazomib, lenalidomid ve deksametazon ile plasebo, lenalidomid ve deksametazon kombinasyonlarının karşılaştırıldığı iki adet Faz III çalışması hala devam etmektedir (93).

2.6. Klinik Araştırma Aşamasındaki Proteazom İnhibitörü Bileşikler

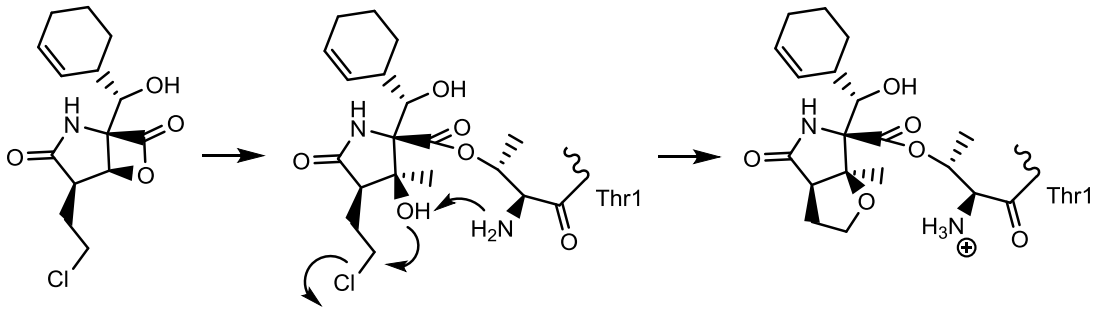
2.6.1. Marizomib (Salinosporamide A, NPI-0052)



Bortezomib ve carfilzomib gibi proteazom inhibitörlerinin, plazmadaki peptidaz ve endojen proteazlar tarafından yıkılarak etkinliklerinin azalmasına sebep olan peptit bir yapıya sahip oldukları bilinmektedir. Bu nedenle araştırmacılar, peptit yapısı taşıyan proteazom inhibitörlerine göre biyolojik olarak daha avantajlı peptit yapılı olmayan proteazom inhibitörlerinin geliştirilmesine odaklanmıştır (28). Bu özelliklere sahip bir bileşik serisi 2003 yılında Feling ve ekibi tarafından, etkili ve yapısal olarak yeni proteazom inhibitörü Salinosporamid A (Marizomib; NPI-0052) bileşiğinin keşfiyle açığa çıkarılmıştır (162). NPI-0052 kod numarası verilen veya Salinosporamide A olarak da bilinen marizomib bileşiği bir deniz bakterisi olan *Salinospira tropica* isimli aktinomiset türünden izole edilmiş ve MM tedavisinde kullanılmak üzere klinik araştırma aşamasına giren ilk doğal kaynaklı proteazom

inhibitörü bileşik olmuştur (163). Yeni ve oldukça güçlü bir proteazom inhibitör özelliğe sahip olan marizomib bileşiği, peptit yapısı taşımamakla diğer proteazom inhibitörlerinden yapısal olarak farklıdır. Bu yapısal farklılık bileşiğin diğer proteazom inhibitörü bileşiklere göre inhibisyon, toksisite ve etkinlik profili açısından uygun özelliklere sahip olmasını sağlamıştır. Marizomib'in, irreversibl bir şekilde proteazomun her üç alt birimini de inhibe etmesi nedeniyle daha stabil ve uzun süren etki gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca bileşiğin kaspaz-9, kaspaz-8, kaspaz-3 aktivasyonunu sağlayarak apoptoza sebep olduğu da ortaya konmuştur (93).

Yapı aydınlatma çalışmalarında, bileşiğin omuralid bileşiğinde olduğu gibi 5 adet komşu stereomerkezi içeren bir bisiklik β -lakton- γ -laktam halka yapısına sahip olduğu açığa çıkarılmıştır. Maya 20S proteazomun çekirdek kısmı ile marizomib kompleksinin kristal yapı analizlerinde, bileşiğin β -lakton halkasının karbonil grubu ile proteazomun N terminal Treonin 1 (Thr1) hidroksili arasında gerçekleşen nükleofilik reaksiyon sonucunda ester bağı olduğu saptanmıştır (19,53). Daha sonra Treonin 1 (Thr1) amino grubunun katalizlediği, klor atomu ve C3 hidroksilinin nükleofilik yer değiştirme tepkimesi sonucunda, irreversibl stabil bir tetrahidrofuran halkası olduğu ve bu halkanın marizomib'in güçlü inhibitör aktivite göstermesini sağladığı gösterilmiştir (Şekil 68).



Şekil 68. Marizomib bileşiğinin etki mekanizması

Yapı-etki çalışmalarında, bileşiğin yapısında yer alan β -lakton halkasının önemli bir farmakoforik yapı olduğu ve aktivitenin sürdürülmesinde tartışılmaz bir rol oynadığı rapor edilmiştir (164,165). Ayrıca yapıda bulunan kloroetil ve siklohekzenil karbinol gruplarının bileşiğin proteazom aktif yörelerdeki etki gücünü ve selektivitesini etkilediği tespit edilmiştir. Enzimin aktif yöresinde klor atomunun,

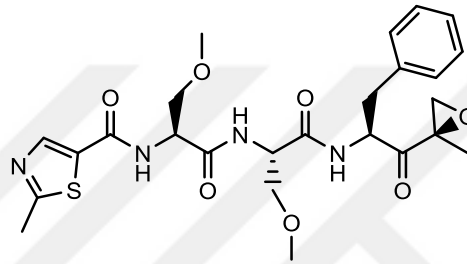
stabil siklik eter (tetrahidrofuran halkası) yapısındaki final ürünü oluşturmak üzere elimine olan ayrılan grup gibi davrandığı, sonrasında inhibitörün β -lakton fonksiyonu aracılığıyla katalitik aktif yöredeki Treonin 1 hidroksilinin (Thr1) açılmasının meydana geldiği açığa çıkarılmıştır. Ayrılan grubun eliminasyonu ile bileşiğin irreversibl bağlanma özelliği kazandığını incelemek amacıyla ayrılan grup potansiyeline sahip farklı P2 süstitüentleri taşıyan bir dizi analog sentezlenmiştir. P2 konumundaki bu süstitüentler halojen ayrılan gruplar, halojen olmayan ayrılan gruplar ve ayrılmayan gruplar olarak seçilmiştir. Saflaştırılmış proteazom ve sentezlenen analog kompleksleri kullanılarak yapılan inhibisyon/toparlanma deneylerinde, ayrılan grup varlığında, irreversibl bir inhibisyon ve proteazom inhibisyon zamanında uzama bulunmuştur. Oysa ayrılan grubu olmayan bileşiklerin, zamanla proteazomal aktiviteyi iyileştirmeleri (geri döndürmeleri) nedeniyle yavaş reversibl inhibitörler oldukları tanımlanmıştır (28,57). Bunun yanısıra marizomib ve proteazomun bağlanma cebi arasındaki etkileşim için sikloheksen halkasının gerekli olduğu tespit edilmiştir. Bu konumda yapılan değişikliklerin, etki gücünde azalmaya ve proteazomun her üç aktif yöresine karşı selektivitede değişikliğe yol açabildiği saptanmıştır. Bu konumdaki süstitüent etkisi incelendiğinde siklopentil, siklopent-2-enil ve (2S,3R)-epoksisikloheksil gibi hacimli alkil gruplarının daha küçük yapıdaki aromatik ve alkil süstitüentlere göre daha uygun olduğu bulunmuştur. Ayrıca, 3 konumundaki metil ve 5 konumundaki hidroksil gruplarının antitümör aktivite için gerekli iki grup olduğu bildirilmiştir (166).

Farmakodinamik çalışmalarda, marizomib'in *in vivo* proteazom inhibisyonunun doz, siklus ve zamana bağlı olduğu gösterilmiştir. Farmakokinetik deneylerde ise, bileşiğin geniş bir dağılım hacmine ve hızlıca uzaklaştırılmasını sağlayan kısa bir yarı-ömre sahip olduğu saptanmıştır (49). Faz I klinik çalışmalarında bileşiğin bortezomib direncinin üstesinden gelebildiği gösterilmesine rağmen kognitif değişiklikler, geçici halüsinasyonlar ve reversibl denge kayıpları gibi doz kısıtlayıcı yan etkiler gösterdiği bildirilmiştir. İlaça bağlı en yaygın advers etkiler, yorgunluk, baş dönmesi, baş ağrısı ve gastrointestinal advers etkiler olarak rapor edilmiştir. Bortezomib tedavisinde gözlenen periferik nöropati veya trombositopeni oluşumuna ilişkin herhangi bir bulgu gözlenmemiştir (37).

Marizomib'in oluşturduğu proteazom inhibisyonunun, bütün dokularda birkaç dakika içinde hızlı bir şekilde meydana geldiği, MM hücre hatlarında ise

inhibisyonun 24 saatten daha az bir sürede oluştuğu bildirilmiştir. Marizomib'in lenalidomide veya bortezomib bileşiğine dirençli MM hastalarında etki gösterdiği gözlenmiştir (93). Bileşiğin hematolojik kanserler ve solid tümörlerde kullanılmak üzere oral formülasyon geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Marizomib, bortezomib'den farklı bir etki mekanizmasına sahip olduğu ve aynı toksik etkileri göstermediği için, bortezomib ile kombinasyon halinde ileride yapılan çalışmalarda kullanılabileceği önerilmiştir (37).

2.6.2. Oprozomib (ONX-0912, PR-047)



Carfilzomib bileşiği, bortezomib direncinin üstesinden gelinmesi açısından yararlı terapötik bir ajan olmasına rağmen, bortezomib gibi düşük biyoyarlanıma sahip olması nedeniyle intravenöz olarak uygulanabilmektedir. Dolayısıyla, daha esnek dozlama ve hastaların daha iyi uyum sağlamasını temin etmek için oral biyoyarlanıma sahip proteazom inhibitörlerinin gelişimine ihtiyaç duyulmuştur. Bu amaçla Proteolix firmasındaki araştırmacılar, etki gücü, selektivite ve antitümör aktivite kaybı olmaksızın oral yoldan kullanılabilecek carfilzomib analoglarının tasarlanmasına odaklanmıştır (167). Araştırmacıların yaptığı sistematik yapı-etki ilişkisi (SAR) optimizasyon çalışması ve *in vivo* farmakodinamik taramalar sonucunda elde edilen dipeptit ve tripeptit epoksiketone yapısındaki bileşikler arasında, dipeptit yapısına sahip olanların proteazom inhibitör etki gücünde düşme gözlenirken, tripeptit epoksiketone yapısına sahip bileşiklerin oral biyoyarlanımlarının korunduğu ve tetrapeptitlerden daha iyi olduğu tespit edilmiştir (57). Daha sonraki çalışmalarda, en iyi aktivite gösteren bu tripeptit epoksiketone yapısındaki bileşiklerin P1, P2, P3 ve N terminal konumlarına farklı süstitüent girişinin, bileşiğin inhibitör aktivitesi üzerine olan etkileri incelenmiştir. N terminalde 5 veya 6 üyeli aromatik veya aromatik yapılmayan heterosiklik

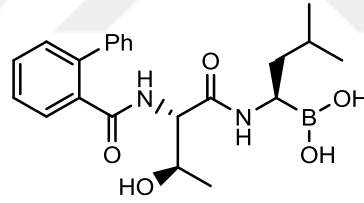
halkalar taşıyan bileşikler test edilmiş ve tarama sonuçları, bu bileşiklerin çoğunun etkin proteazom inhibitör aktivite sergilediğini göstermiştir. N terminalde 5-metil-3-izoksazol halkası taşıyan tripeptit epoksiketon türevi bileşik en gelişmiş etki ve hücrelerden geçiş sergilemiş ve daha ileri düzeyde araştırmalar için seçilmiştir. Bileşiğin P3 konumunda yaklaşık 30 farklı amino asitin etkisi incelenmiş ve metoksimetil (metilserin) amino asidi taşıyan türevin oral alındığında en iyi *in vitro* ve *in vivo* aktivite gösterdiği saptanmıştır. P2 konumuna hacimli amino asitlerin girişiyle, karaciğer mikrozomal deneylerinde dayanıksız bileşikler elde edilmiştir. Küçük yapıli amino asitler bu konuma uygun olduğu metoksimetil süstitentin ise iyi tolere edildiği bildirilmiştir. Bileşiğin P1 konumu ve N terminalinde yeniden yapılan modifikasyonlar sonucunda sırasıyla benzil (fenilalanin) ve 2-metil-5-tiyazol süstitüentleri taşıyan PR-047 kodlu türevin, *in vitro* olarak iyi aktivite gösterdiği ve oral olarak alındığında carfilzomib'e eşdeğer antitümör aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır (167). Optimizasyon çalışmaları sırasında elde edilen bu tripeptit epoksiketon türevi bileşiğin selektif olarak insan proteazomunun kimotripsin benzeri aktivitesini 36 nM IC₅₀ değeri ile inhibe ettiği tespit edilmiştir (56). Daha sonra oprozomib (ONX-0912) adı verilen bu bileşiğin proteazomun kimotripsin benzeri aktivite inhibisyonunun yanı sıra hastalardan elde edilen primer hücrelere veya miyelom hücre hatlarına ilave edildiğinde hücre ölümüne sebep olduğu bildirilmiştir (168). Carfilzomib'in aksine, oprozomib bileşiği normal hematopoetik hücrelere karşı, sitotoksik etki göstermemiştir. Ayrıca, oral yoldan oprozomib uygulanan ksenograft multipl miyelom modellerinde, intravenöz yoldan carfilzomib uygulamasına benzer şekilde tümör büyümesinde gecikme olduğu saptanmıştır (28).

Bileşik hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda antianjiyojenik ve proapoptotik aktiviteler aracılığıyla benzer özellikler sergilemektedir. Oprozomib bileşiğinin kaspaz-8, kaspaz-9, kaspaz-3 aktivasyonuna yol açtığı ve MM hücrelerinin migrasyonunu inhibe ettiği görülmüştür (93,169). Bortezomib tedavisine dirençli MM hücrelerinde bileşiğin apoptoza sebep olduğu gösterilmiştir. Chauhan ve ekibi, oprozomib ile tedavi edilen farelerin azalmış tümör büyümesi ve anjiyojeneze sahip olduğunu göstermiştir. Bileşiğin aynı zamanda bortezomib, lenalidomide ve deksametazon ile birlikte kullanıldığında bu bileşiklerin antimiyelom aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir (170).

Faz I çalışmalarında oprozomib'in doza bağlı yan etkileri hipotansiyon, diyare ve trombositopeni olarak bildirilmiştir. MM hastalarında tek ajan olarak kullanıldığında görülen en yaygın advers etkilerin ise anemi, trombositopeni, baş dönmesi, kusma ve diyare olduğu rapor edilmiştir (169).

RRMM hastaları üzerinde devam eden çalışmaların yanısıra, yeni MM tanısı konmuş fakat kök hücre transplantasyon tedavisi yapılamayan hastalarda oprozomib ile melfalan-prednizon kombinasyonu çalışılan Faz 1b/2 klinik araştırmaları devam etmektedir. Oprozomib-siklofosfamid-deksametazon ve oprozomib-lenalidomide-deksametazon kombinasyonları olmak üzere iki yeni kombinasyonunun değerlendirildiği diğer Faz 1/2 çalışmaları ise yeni tanı konmuş MM hastalarıyla yürütülmektedir. Proteazom inhibitörlerinin MM tedavisinde etkili oldukları bilindiğinden, oprozomib bileşiğinin de MM tedavisinde önemli bir rol göstereceği umut edilmektedir. Diğer proteazom inhibitörü bileşiklere göre oprozomib'in öncelikli avantajı, oral yolla kullanım kolaylığına sahip olmasıdır (169).

2.6.3. Delanzomib (CEP-18770)



Bortezomib'in sahip olduğu yan etki sorununun üstesinden gelmek amacıyla Cephalon Inc. firmasındaki araştırmacılar oral olarak aktif, güçlü ve selektif özellikle yeni boronat yapısındaki bir proteazom inhibitörü CEP-18770 kodlu bileşiği keşfetmiştir (171,172). Dorsey ve ekibi tarafından 11 adet dipeptit boronat yapısındaki bileşiğin insan eritrosit 20S proteazomun kimotripsin benzeri aktivitesi üzerine inhibitör etkileri değerlendirilmiş ve *in vitro* olarak bortezomib'e göre en güçlü bileşiğin CEP18770 kodlu bileşik olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte *in vitro* çalışmalarda bileşiğin NF- κ B aktivitesini ve bazı NF- κ B aşağı akış efektörlerinin ekspresyonunu azalttığı bulunmuştur (172). Bileşiğin, bazı biyolojik ve farmakolojik özellikleri bakımından en iyi türev olduğu bulunmuştur. Bileşiğin hücre içerisine girebildiği ve çok iyi düzeyde enzimatik ($IC_{50}=3.8$ nM), hücresel (insan

lösemi hücre hattı Molt-4 $EC_{50}=13.5$ nM) ve 13.7 nM IC_{50} değeri ile A2780 over kanser hücre hattı üzerinde antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bileşik proteazoma karşı oldukça selektif bulmuştur. Bortezomib ile karşılaştırıldığında bileşiğin oral biyoyararlanımının daha iyi olduğunun anlaşılmasının ardından multipl miyelom ve diğer hematolojik kanserlerin tedavisinde kullanılmak üzere ilaç adayı bir bileşik olarak Faz I klinik araştırmalarına alınmıştır (56). Oprozomib'in bazı hayvan tümör modellerinde antitümör aktiviteye sahip olduğu gösterilmiş, ayrıca bortezomib ve melfalan bileşikleriyle kombinasyon halinde önemli antimiyelom etkiler sergileyebileceği rapor edilmiştir (173). Faz I klinik denemelerinde bileşiğin artan dozla birlikte, solid tümörler ve Hodgkin olmayan lenfoma türlerinde antitümör aktivitesinin arttığı saptanmış ve multipl miyelom tedavisi için faz I/II çalışmalarına alınmıştır (1).

Delanzomib'in prelinik ve klinik çalışmalarda bortezomib ve melfalan bileşikleriyle kombinasyonu halinde uygun bir sitotoksik profile sahip olduğu ve birlikte etkili olduğu gösterilmiştir (174). Bileşiğin ratlarda ve maymunlarda toksik etkilerinin görüldüğü hedef organlar, kemik iliği, karaciğer ve böbrekler olarak bildirilmiştir (28). Ratlarda haftada 3 kez 0.2 mg/kg'dan daha düşük dozlarda advers etkiler gözlenmemiştir. Faz II çalışmalarında bileşiğin RRMM hastalarında oluşturduğu etkinlik ve güvenlik profillerinin değerlendirilmesi sonucunda, yeterli etkinlik göstermediği bulunmuş ve çalışmalara son verilmiştir (175). Bileşiğin deksametazon ile kullanımının RRMM hastalarındaki güvenliği ve etkinliği değerlendirilmiştir. Maksimum tolere edilebilir dozunu saptamak için ise araştırmalar devam etmektedir. Bu ilacın Faz II klinik çalışmaları, RRMM'de etkisinin yetersizliği nedeniyle sonlandırılmıştır (37). Deksametazon ve/veya lenalidomide ile kombinasyon halinde delanzomib uygulandığında, tek başına delanzomib, tek başına deksametazon ve lenalidomide veya her iki ilacın beraber kullanımına göre, üstün bir tümör azalması ve uzamış bir tümör gecikmesiyle sonuçlandığı gözlenmiştir (28). RRMM hastası 61 kişide yapılan faz II çalışmalarında, bileşiğin maksimum tolere edilebilir dozlarda 55 hastada kusma, anoreksi, yorgunluk gibi yan etkiler gözlenmiş, hastaların %23'ün de ise trombositopeni ve nötropeni saptanmıştır. Bileşiğin etkinlik sonuçlarına dayanarak, miyelom tedavisi için faz II çalışmaları sonlandırılmıştır (176).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kimyasal Çalışmalar

3.1.1. Materyal

Çalışmalarında kullanılan çözücülerin hepsi analitik saflıktadır. Bileşiklerin sentezinde kullanılan asetanilit, piridin, etanol, etil asetat, klorosülfonik asit, anilin, 4-metoksianilin ve morfolin Merck; 2-etilanilin, 3-nitroanilin, 4-nitroanilin, 2-kloroanilin, 3-kloroanilin, 4-kloroanilin, 4-bromoanilin, α -naftilamin, 4-aminobenzoik asit ve tiyonil klorür Fluka; 3-aminopiridin, 4-aminopiridin, 2-amino-3-metilpiridin, 2-amino-4-metilpiridin, 2-amino-5-kloropiridin, 3-amino-2-kloropiridin ve 2,3-dikloro-1,4-naftokinon Alfa Aesar; 2-izopropilanilin ve 2-aminopirimidin Aldrich; 2-amino-5-metilpiridin ve 2-amino-4-metiltiyazol ABCR; diklorometan ve aseton VWR; 3-amino-5-metilizoksazol Sigma-Aldrich, 2-aminopiridin TCI ve metanol Sigma firmalarından temin edilmiştir.

3.1.2. Genel Sentez Yöntemleri

3.1.2.1. Sülfonamit Türevi Bileşiklerin Sentezi

4-Asetamidobenzensülfonil klorür Sentezi (A0)

Klorosülfonik asit (0.08 mol, 5.2 ml) yavaş bir şekilde *N*-fenilasetamit (0.015 mol, 2 g) üzerine ilave edilip, 60 °C'de 30 dakika ısıtıldı. Karışım soğutulduktan sonra buzlu su içerisine döküldü. Çöken 4-asetamidobenzensülfonil klorür bileşiği süzülüp bol su ile yıkandı (177).

4-Amino-*N*-süstitüebenzensülfonamit Türevi Ara Ürünlerin Sentezi (A1-A30)

4-asetamidobenzensülfonil klorür bileşiği (0.016 mol, 3.72 g), buz banyosunda piridin (0.129 mol, 10 ml) içerisinde çözülmüş uygun amin üzerine (0.02 mol) porsiyonlar halinde ilave edildi. Reaksiyon karışımı 1 saat buz banyosunda, 3 saat oda sıcaklığında olmak üzere toplam 4 saat karıştırıldıktan sonra buzlu su içerisine döküldü. Çöken katı ürün süzülüp kurutulduktan sonra %10 luk NaOH çözeltisi içerisinde çözüldü. Çözünmeyen kirlilikler süzülerek uzaklaştırıldı. Süzüntü 5 M HCl ile asitlendirilerek pH'sı 3-4'e getirildi. Reaksiyon kabında oluşan çökelti süzüldü ve kurutuldu. Tüm bu temizleme işlemlerinin yapılmasından sonra, 20 ml NaOH (5 M) ve 12 ml metanol içerisinde 70 °C'de 3 saat ısıtılarak karıştırıldı. Süre sonunda 2 M

HCl çözeltisi ile ortamın pH'sı 6'ya ayarlandı. Asit ilavesiyle çöken ham ürün etanol:su (1:1) karışımından kristallendirildi (178).

Sülfonamid Türevi Final Bileşiklerin Sentezi (NS1-NS30)

2,3-dikloro-1,4-naftokinon (0.03 mol, 0.6 g) ve uygun 4-amino-*N*-süstitübenzensülfonamidler (0.03 mol) 15 ml absölü etanol içerisinde 3 gün (72 saat) ısıtılarak karıştırıldı. Süre sonunda oluşan turuncu/kırmızı renkteki çökelti süzülüp, bol etanolle yıkandı. Etanol ile yıkama sonrasında saptanan kirliliklerden uzaklaştırmak için ham ürün etil asetat (5 ml), diklorometan (5-10 ml), metanol (5-10 ml) ve diklorometan:aseton (1:1, 5 mL) karışımıyla yıkandı ve etanolden kristallendirildi (42).

3.1.2.2. Karboksamid Türevi Bileşiklerin Sentezi

4-[(3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino]benzoik Asit Sentezi (A31)

2,3-dikloro-1,4-naftokinon (0.002 mol, 0.5 g) ve *p*-aminobenzoik asit (0.002 mol, 0.3 g), susuz potasyum karbonat (0.0007 mol, 0.1 g) varlığında 20 mL etanol içerisinde 6 saat kaynatıldı. Süre sonunda çöken katı madde süzülüp sırasıyla etanol ve su ile yıkandı. Ham ürün etanolden kristallendirildi (179).

Karboksamid Türevi Final Bileşiklerin Sentezi (NK1-NK30)

Bir önceki basamakta elde edilen 4-[(3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino]benzoik asit, 5 ml tanyonil klorür (SOCl₂) ile 3 saat kaynatıldı. Süre sonunda SOCl₂'ün fazlası rotaevaporatörde uzaklaştırıldı. Kalan bakiye 15 mL diklorometan içinde çözülüp üzerine uygun aminler ilave edilerek önce buz banyosunda yarım saat, daha sonra oda sıcaklığında 3 saat karıştırıldı. Çöken katı bakiye süzülerek diklorometan ile yıkandı. Elde edilen ham ürün uygun çözücülerden (etanol, metanol) kristallendirildi (180).

3.1.3. Analitik Yöntemler

3.1.3.1. Erime Derecesi Tayini

Bileşiklerin erime dereceleri Stuart SMP30 marka erime derecesi cihazı ile tayin edildi ve değerler düzeltilmeden verildi.

3.1.3.2. Kromatografik Analizler

Sentez çalışmaları sırasında tepkimeyi izlemek ve sentezlenen bileşiklerin saflıklarını kontrol etmek amacıyla ince tabaka kromatografisinden (İ.T.K.) yararlanıldı. İ.T.K. için silikajel 60 F₂₅₄ (Merck Art 5715) ile kaplı 0.25 mm kalınlıktaki hazır alüminyum kromatografi plakları kullanıldı. Çalışmalar oda sıcaklığında yapıldı ve sürüklenme işlemi kromatografi tankının çözücü buharlarıyla doyurulmasından sonra gerçekleştirildi. Sürüklenme işleminden sonra açık havada kurutulan plaklar üzerindeki lekelerin belirlenmesinde 254 nm dalga boyundaki UV ışığından yararlanıldı. Çözücü sistemi olarak ara ürünler ve final bileşikler için hekzan: kloroform: metanol (4:4:0.5) kullanıldı. Sentezlenen bileşikler içerisinde NS20 ve NK30 kodlu bileşiğin saflaştırılmasında sütun kromatografisi yönteminden yararlanıldı. Bu yöntemde sabit faz olarak Silica gel 60 (Merck) mobil faz olarak ise hekzan: kloroform: metanol (4:6:1) çözücü sistemi kullanıldı.

3.1.3.3. Spektral Analizler

Sentezini gerçekleştirdiğimiz ara ürünlerin yapılarının aydınlatılmasında, IR ve kütle spektroskopik yöntemlerinden faydalanıldı. Final bileşiklerimizin yapılarının teyit edilmesinde ise IR, ¹H NMR, kütle spektroskopik yöntemlerinden faydalanıldı.

Bileşiklerin IR spektrumları, Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR spektrometresinde Azaltılmış Toplam Yansıma (ATR=Attenuated Total Reflectance) aparatı kullanılarak kaydedildi ve dalga sayısı (cm⁻¹) cinsinden değerlendirildi.

¹H NMR spektrumları, DMSO-*d*₆ çözeltisi içinde Varian AS 400 Mercury Plus NMR spektrometresinde alındı. Kimyasal kayma değerleri (ppm) δ skalasına göre değerlendirildi ve etkileşme değişmezleri Hertz (Hz) olarak verildi.

Kütle spektrumları analitik saflıktaki çözücüler içerisinde Thermo MSQ Plus marka LC-MS cihazında atmosferik basınçta kimyasal iyonlaştırma (APCI=Atmospheric Pressure Chemical Ionization) tekniğiyle alındı.

3.1.3.4. Elementel Analizler

Sentezlenen bileşiklerin elementel analizleri (C, H, N, S), Leco TruSpec Micro model analiz cihazı kullanılarak yapıldı.

3.2. Biyoaktivite Çalışmaları

3.2.1. Materyal

Sentezlenen bileşiklerin biyolojik aktivite çalışmalarında soğutmalı yer tipi santrifüj (KUBOTA 7780), pHmetre (Hanna Instruments HI221), dijital vorteks (IKA MS3), güç kaynağı (Thermo Scientific OWL EC 300 XL), dikey elektroforez (BIO-RAD Mini-PROTEAN Tetra Cell), membran transfer sistemi (Thermo Scientific VEP-2 OWL), CO₂ inkübatörü (Thermo Scientific Model 370), laminer hava akımlı kabin (Thermo Scientific Class II MSC-Advantage), kemiluminesans görüntüleme cihazı (Vilber Lourmat, Fusion FX7), orbital çalkalayıcı (LABNET Orbit 1000), Neubauer hemositometre (Hausser Scientific), şarjlı pipetaj aletleri (Nichiryo, Finnpiette, Gilson), -80°C derin dondurucu (Sanyo), buz makinesi (Hoshizaki), hassas ve kaba analitik teraziler (Denver Instrument), su banyosu (Mommert Universal WNB 7-45), otoklav (Hirayama), manyetik karıştırıcı (Yellowline MAG HS 7), vakum pompası (Major Science), buzdolabı ve -20 °C derin dondurucu (White-Westing House), mikroplaka okuyucu (Molecular Devices VERSAmax Tunable) kullanılmıştır.

Biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılan BCA Protein Assay Kit Pierce, PVDF membran Millipore ve tüm plastik malzemeler ise Corning firmasından temin edilmiştir. Çalışmamızda kullanılan tüm kimyasal maddeler analitik moleküler biyoloji saflığında olup memeli proteaz inhibitör kokteyli, *N,N,N',N'*-tetrametiletildiamin (TEMED), glisin, sodyum klorür, susuz sodyum monohidrojen fosfat (Na₂HPO₄), susuz sodyum dihidrojen fosfat (Na₂HPO₄), sodyum azid, amonyum persülfat, Tween-20, Triton X-100, Nonidet P-40, Ponceau S Stain, gliserol, magnezyum sülfat heptahidrat, tris(hidroksimetil)aminometan (TRIS), 2-merkaptolanol (2-ME), deoksikolik asit sodyum tuzu (DOC), dimetil sülfoksit (DMSO) Amresco firmasından, akrilamit-bisakrilamit solüsyonu ve sodyum dodesil sülfat Serva firmasından, unstained protein molekül ağırlık markırı ise Fermentas firmasından, % 0.05 Tripsin-EDTA, % 0.25 Tripsin-EDTA yüksek glukoz'lu Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM), L-glutamin, tripan mavis ve EZR Mycoplasma kiti Biological Industries'den, West Pico Kemiluminesans görüntüleme kiti Thermo ve WST-1 hücre proliferasyon ajanı Roche firmasından temin edilmiştir. Aktivite çalışmalarında kullanılan proteazom inhibitörü MG132 bileşiği Sigma, sitotoksik doksorubisin bileşiği ise CellSignaling firmasından satın

alınmıştır. Monoklonal fare β -aktin antikoru Sigma'dan, monoklonal fare anti-ubikitin antikoru Santa Cruz'dan, goat anti-mouse antikoru Thermo'dan ve yağsız süt tozu Biolab firmasından temin edilmiştir.

3.2.2. Biyolojik Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.2.2.1. Örneklerin Hazırlanması

Deneyde kullanılacak örnekler DMSO içinde çözündürülerek konsantrasyonları 25 mM'lık olan örnek çözeltileri elde edildi. Kullanılacak konsantrasyonlara göre dilüsyonlar DMSO ile gerçekleştirildi.

3.2.2.2. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Fötal Sığır Serum (Fetal Bovine Serum, FBS) Stoğu

500 ml FBS stok çözeltisine, 50 ml 100X L-Glutamin, 50 ml 100X Pen-Strep ve 17,5 μ l 2-merkaptotanol (2-ME) eklendi ve 0,22 μ m çapındaki filtreden geçirildi.

% 10 FBS içeren DMEM Besiyeri

500 ml DMEM besiyeri içerisine hazırlanan FBS stok çözeltisinden 55,5 ml eklendi. Buzdolabında +4 °C'de saklandı.

3.2.2.3. SDS-PAGE İşlemi Sırasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

10 Kat Konsantre Fosfat Tamponu Çözeltisinin Hazırlanması (Phosphate Buffer Saline, 10X PBS)

87,5 g sodyum klorür, 11,5 g sodyum monohidrojen fosfat, 2,3 g sodyum dihidrojen fosfat tartılarak bir miktar distile suda çözüldü. Çözeltinin pH'sı 7.4'e ayarlandı ve distile su ile 1 litreye tamamlandı. Çözelti 121 °C'de 20 dakika süre ile otoklavlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

Konsantre Fosfat Tamponu Çözeltisinin Hazırlanması (Phosphate Buffer Saline, 1X PBS)

10xPBS'den 100 ml alındı, 1 litreye steril distile su ile tamamlandı. pH 7.4'e ayarlandı. +4 °C'de saklandı.

2X RIPA (Radyoimmunopresipitasyon Assay) Lizatlama Tamponu

40 mg sodyum dodesilsülfat (SDS) ve 200 mg 7-deoksikolik asit (7-DOC) tartılarak bir miktar suda çözüldü. 0,4 ml NP-40 ve 4 ml 10X PBS ilave edilip distile su ile 20 ml'ye tamamlandı ve +4 °C'de saklandı.

SDS-PAGE 4X Ayırma Tamponu

90,855 g Tris-HCl ve 2 g SDS tartılarak bir miktar suda çözüldü. Çözeltiye 2 ml TEMED eklendi ve pH sı 8.9 a ayarlandıktan sonra distile su ile 500 ml'ye tamamlandı ve +4°C'de saklandı.

SDS-PAGE 4X Yığınlama Tamponu (Stacking Buffer)

30,285 g Tris-HCl ve 2 g SDS tartılarak bir miktar suda çözüldü. 2 ml TEMED eklendi ve pH'sı 6.9'a ayarlandıktan sonra distile su ile 500 ml'ye tamamlandı ve +4°C'de saklandı.

4X Protein Yükleme Tamponu

4 g SDS bir mikar suda çözüldü. 10 ml 1 M Tris-HCl (pH=6.8), 2 ml %99'luk gliserol, 2 ml 14.7 M 2-merkaptoetanol (2-ME), 5 ml 0.5 M EDTA ve 40 mg bromofenol mavisi eklendikten sonra distile suda ile 50 ml'ye tamamlandı. 1 ml'lik tüplere bölünüp -20°C'de saklandı.

10X SDS-PAGE Yürütme Tamponu

30,2 g TRIS baz, 144 g glisin, 10 g SDS tartılıp bir miktar distile suda çözüldükten sonra distile su ile 1 L'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

1X SDS-PAGE Yürütme Tamponu

100 ml 10X SDS-PAGE yürütme tamponu distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

%10 Amonyum persülfat (AP) Çözeltisi

1 g amonyum persülfat 10 ml distile suda çözüldü ve 1'er ml olarak tüplere bölünüp -20 °C'de saklandı.

3.2.2.4. Western Blotlama Sırasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

10X Transfer Tamponu

30,33 g TRIS baz ve 144 g glisin tartılıp bir miktar distile suda çözüldükten sonra distile su ile 1 L'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

1X Transfer Tamponu

100 ml 10X transfer tamponu, 700 ml distile su ile seyreltildi ve 200 ml metanol ilave edildi.

1X Yıkama Tamponu

100 ml 10X PBS üzerine 1 ml Tween-20 eklendi. pH'sı 7.4'e ayarlandı ve distile suyla 1 L'ye tamamlandı, oda sıcaklığında saklandı.

%5'lik Yağsız Süt Bloklama Ajanı

5 g yağsız süt tozu bir miktar 1X yıkama tamponu içerisinde çözüldü, pH'sı 7.4'e ayarlandı ve 1X yıkama tamponu ile 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti kullanılacağı zaman taze olarak hazırlandı ve +4°C'de saklandı.

3.2.3. Hücre Kültürü

3.2.3.1. Hücre Hattının Seçimi

Çalışmamızda MCF-7 insan göğüs adenokarsinomu epitelyal hücre hattı kullanıldı. PI-083 kodlu lider bileşiminin proteazom inhibitör aktivitesini MCF-7 hücre hattında göstermesi nedeniyle bu hücre hattı seçilmiştir (41,42). Çalışmada kullanılan hücre hattı American Type Culture Collection'dan (ATCC) temin edildi. MCF-7 hücre hattı, konvansiyonel hücre kültürü şartları olan 37°C'de, %5'lik CO₂ inkübatöründe %10 fötal sığır serumu (FBS) içeren Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) içerisinde büyütüldü. Kullanılan hücrelerin mikoplazma içermediği dönemsel olarak teyit edilmektedir.

3.2.3.2. Pasajlama

100 mm'lik hücre kültürü kaplarında MCF-7 hücre hattı %90 oranında yüzeyi kapladığında, ortamdaki besi yeri vakum pompası yardımı ile uzaklaştırıldı. Hücrelerin kolay bir şekilde ayrıştırılabilmesi için %0.05 Tripsin-EDTA ve ardından %0.25 Tripsin-EDTA ile yıkama işlemleri yapıldı. Uygulanan enzimin optimum aktivasyonu için 37 °C'deki CO₂ inkübatöründe 1 dakika inkübe edildi. Kültür kabında %10 FBS içeren DMEM içerisinde toplanan hücreler 1:8 oranında dilüe edilerek yeni 100 mm'lik hücre kültür kaplarına ekildi.

3.2.3.3. İlaç Uygulama

MCF-7 hücreleri 37 °C’de, %5’lik CO₂ inkübatöründe %10 FBS’li DMEM ile büyütüldü. Hücreler 100 mm’lik hücre kültür plakalarını %90 oranında kaplayacak oranda büyüdüğünde besi ortamı uzaklaştırılıp 1 ml %0.25’lik tripsin-EDTA ile yıkandı ve vakumla tripsin-EDTA uzaklaştırıldı. Hücre kültür plakaları 37 °C’deki CO₂ inkübatöründe 45 saniye bekletildi. Daha sonra 8 ml %10 FBS’li DMEM ile toplanarak steril falkon tüpüne aktarıldı. 10 µl hücre süspansiyonu alınıp üzerine 90 µl tripan-mavisi ilave edildi. Neubauer hemositometresine 10 µl boya-hücre karışımından alınıp sayıldı. Sitotoksisite deneylerinde 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına her kuyucukta 5000 hücre olacak şekilde; total poliubikitin birikim tespit deneylerinde ise 6 kuyucuklu hücre kültür plakalarına 4x10⁵ hücre olacak şekilde ekim yapılarak bir gece inkübe edildi.

Sitotoksisite deneylerinde 10, 7.5, 5, 2.5, 1.25, 0.5 ve 0.25 mM dozlarda hazırlanan stok ilaç çözeltilerinden 2 µl alınıp üzerlerine 48 µl hücre besiyeri eklenerek çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu çalışma çözeltilerinden 10 µl alınıp 96 kuyucuklu hücre plakalarında 190 µl besiyeri varlığında bulunan hücrelerin üzerine eklendi. Böylece ilaç final konsantrasyonları 20, 15, 10, 5, 2.5, 1 ve 0.5 µM olacak şekilde deney kurgulandı. Kontrol hücrelerinde çözgen olarak DMSO kullanıldığı için çalışma çözeltisi hazırlığı sırasında 2 µl DMSO üzerine 48 µl hücre besiyeri eklendi. Hücreler 48 saat boyunca bileşikler ile inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda WST-1 hücre proliferasyon testi yapıldı. Bu deneyde pozitif kontrol olarak doksorubisin bileşiği kullanıldı.

Total poliubikitin birikiminin immünoyblotlama ile tayini amacıyla 2 µl besiyeri bulunan 6 kuyucuklu hücre kültür plakalarında hücrelere 2 µl 10 mM konsantrasyonda ilaç çözeltileri eklenerek final konsantrasyonu 10 µM olacak şekilde ilaç uygulaması gerçekleştirildi. Hücreler 24 saat boyunca ilaçlar ile inkübe edildi. Bu deneyde de negatif kontrol olarak sadece DMSO uygulanırken, pozitif kontrol olarak ise iyi bilinen bir proteazom inhibitörü olan MG132 bileşiği kullanıldı. İnkübasyon süresi sonunda besi ortamları vakumla uzaklaştırıldı ve 750 µl soğuk 1X PBS ile 2 kez yıkanarak +4°C’de 10000 r.p.m’de 1 dakika santrifüj edilerek toplandı.

3.2.4. WST-1 Hücre Proliferasyon Yöntemi

Hücre proliferasyonu ve canlılığı WST-1 hücre proliferasyon ajanı ile gerçekleştirildi. WST-1 ajanı içerisindeki tetrazolyum tuzu (4-(3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolyum)-1,3-benzen disülfonat) hücre proliferasyonu ve hücre canlılığının ölçülmesinde kullanılır. Yöntemin temeli açık kırmızı renkte olan WST-1 reaktifinin, mitokondriyal dehidrogenaz enzimi tarafından indirgenmesi ile koyu bir renk alması ve renk değişiminin 440 nm de spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır. Renk şiddetindeki artış canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır.

Tez çalışmamızda yapılan hücre canlılık ve proliferasyon deneyleri aşağıdaki şekilde yapıldı. MCF-7 hücrelerinin bulunduğu 96 kuyucuklu hücre kültür plakalarından tüm besiyeri dikkatlice uzaklaştırıldı. %10 FBS'li DMEM besi yerinden 15 ml'lik falkon tüpüne aktarıldı. Eklenecek DMEM hacminin %10'u kadar WST-1 solüsyonundan eklenerek homojen hale getirilip steril rezervuara aktarıldı. Her bir kuyucuğa 100 µl WST-1 besiyeri karışımı çok kanallı pipet yardımıyla aktarıldı. Hücreler 37°C'de, %5'lik CO₂ inkübatöre kaldırıldı. İnkübasyonun 1. 2. ve 3. saatlerinin sonunda mikropilaka okuyucu ile 440 nm'de ölçümler alındı. Elde edilen veriler kaydedildikten sonra istatistiksel yöntemlerle analiz edildi (181).

3.2.5. Hücre Lizatlanması ve Protein Miktar Tayini Yöntemi

3.2.5.1. Hücre Lizatlanması

Hücreler, örnek tüpü başına 30 µl 1X PBS ve 30 µl 2X RIPA tamponuna 0.6 µl 100X PIC ekleyerek 5 dakikada bir vortekslemek yoluyla 20 dakika süreyle lizatlandı. Hücreler, lizatları elde edilmesi amacıyla 14.000 r.p.m'de 10 dakika boyunca +4°C'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar temiz ependorflara aktarıldı.

3.2.5.2. Protein Miktar Tayini Yöntemi

BCA-protein deney kiti (Pierce) kullanılarak toplam protein miktarlarına bakıldı. BCA Protein Assay, total proteinin kolorimetrik olarak tayin edilmesi için bikinkoninik asit (bicinchoninic acid, BCA) yöntemine dayanır. Bu metot; bikinkoninik asit içeren özgül bir belirteç kullanılarak bakır katyonunun yüksek duyarlı ve selektif kolorimetrik tespitinin yapıldığı, alkali ortamda Cu⁺²'nin Cu⁺¹e protein aracılı indirgenmesini kombine eder. Bu deneyin pembe renkli reaksiyon

ürünü, bikinkoninik asitin iki molekülünün bir bakır iyonu ile şelasyonu sonucunda oluşur. Suda çözünebilir olan kompleks, geniş çalışma aralığının (20-2000 ug/ml) üstünde, artan protein konsantrasyonları ile 562 nm’de lineer absorbans gösterir. Protein konsantrasyonları, sığır serum albumin (BSA) proteini referans alınarak belirlenmiştir. Hücrelerin lizatlanması sonucu elde edilen her örnek için bu kit kullanılarak total protein miktarları bulunmuş ve immünoablottama çalışmalarında eşit miktar (toplam 40 µg) protein içeren örnekler kullanılabilmiştir.

3.2.6. Western Blotlama Yöntemi

Western blotlama yönteminin esası; elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde göç ettirilen proteinlerin, membrana transferi ile immobilize edilmesi ve membrandaki proteinlerin immünolojik metotlarla tayin edilmesidir. Bu amaçla jel elektroforezi kullanılarak proteinler molekül ağırlıklarına göre birbirinden ayrıştırılır ve PVDF membrana transfer edilir. Membranın yüzeyine spesifik olmayan antikor bağlanmalarını engellemek amacıyla, membran %5’lik süt ile bloklandıktan sonra özgül primer antikor ile muamele edilerek ilgilenilen proteinler ile kompleks oluşturulur. Primer antikora karşı geliştirilmiş Horse Radish Peroksidaz (HRP) enzimi ile işaretlenmiş sekonder antikorlar ile kompleks oluşturulur. WestPico SuperSignal Kiti kullanılarak kemilüminesans görüntüleme yapılır.

3.2.6.1. Sodyum Dodesilsülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Poliakrilamit jel elektroforezi ile ayrıştırılma yöntemi, sodyum dodesilsülfat poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) olarak isimlendirilir.

Tablo 1. SDS-PAGE ayırma (resolving) jeli hazırlanması

Ayrırma Jeli	
Bir jel için (10 ml)	
% 30'luk Akrilamit	2,67 ml
4X Ayrırma Tamponu	2,5 ml
Distile su	4,8 ml
% 10'luk AP	75 µl (Oda sıcaklığında her bir jel)

Tablo 2. SDS-PAGE yığınlama (stacking) jeli hazırlanması

Yığınlama Jeli (%3,5'luk) 3 ml	
% 30'luk Akrilamit	0,35 ml
4X Yığınlama Tamponu	0,75 ml
Distile su	1,9 ml
% 10'luk AP	25µl (Oda sıcaklığında 25 µl)

Jeller Tablo 1 ve 2'de verilen çözeltilere göre ve bu çözeltilerin belirtilen miktarları ile oda sıcaklığında hazırlandı. Yükleme işlemi için örnekler, 4X yükleme tamponu ilavesinden sonra vortekslenip, blok ısıtıcıda 95 °C'de 5 dakika bekletilerek denatüre edildi. Jel hazırlanıp çapraz bağlanma tamamlandıktan sonra, örnekler jel üzerindeki yükleme kuyucuklarına 40 µg protein olacak şekilde yüklendi ve dikey elektroforez tankında 200 V'da yürütüldü.

3.2.6.2. Transfer

SDS-PAGE, jelde ayrılmış proteinlerin elektrik alan içerisinde jelden membrana taşınması temeline dayanmaktadır. Protein taşıyan poliakrilamid jel ile membran doğrudan temas ettirilip iletici bir çözelti içerisinde birleşen iki elektrot arasına yerleştirildi. 200 mA'lık elektrik akımı soğukta 90 dakika uygulandı.

Membran olarak PVDF membran kullanıldı. PVDF membranlar, kullanılmadan önce metanol ile ıslatılarak etkinleştirildi.

3.2.6.3. Membrandaki Proteinlerin Görülmesi ve Bloklama

Transfer işleminin sonunda proteinlerin membrana transfer olduğundan emin olmak için membran, yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra %2'lik Poncaeu kırmızısı ile çalkalanarak boyandı. Kırmızı bantların görülmesi membrana transfer olmuş proteinlerin varlığını gösterdi. Membran, yıkama tamponu ile yıkanarak Poncaeu kırmızısı ortamdan uzaklaştırıldı.

Western blotlamada en önemli nokta incelenen protein ile kullanılan antikolar arasındaki spesifik bağlanmadır. Spesifik olmayan protein bağlanmalarını engellemek için membranın transfer sırasında protein bağlanmayan bölgelerinin bloklanması gerekir. Bunun için deneyde, proteinler spesifik olmayan protein bağlanmalarını engellemek amacıyla membran yıkama çözeltisi ile hazırlanan %5'lik süt ile yarım saat boyunca oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda inkübe edildi.

3.2.7. İmmünoblotlama

Membran, bloklama sonrasında bir kez 1X yıkama tamponu ile 5 dakika boyunca yıkandı. Oda sıcaklığında primer antikor ile orbital çalkalayıcıda bir saat inkübe edildi. Bir saat sonunda üç kez, 5 dakikada bir 1X yıkama tamponu ile yıkandı. Sekonder antikor ile 1 saat oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda inkübe edildi. Sekonder antikolar uzaklaştırılıp, 5 dakikada bir, üç kez 1X yıkama tamponu ile yıkandı ve görüntüleme basamağına geçildi.

Çalışmalarda kullanılan antikorlardan primer antikolar olan monoklonal anti- β -aktin 1:20000 oranında ve K48 ubiquitin antikorunu 1:2000 oranında % 5'lik yağsız sütte hazırlandı, koruyucu olarak 1:1000 oranında sodyum azit çözeltisi eklendi ve +4°C'de saklandı. Sekonder antikor olarak ise goat anti-mouse antikorunu 1:7500 oranında %5'lik yağsız sütte hazırlandı ve kullanıldı.

3.2.7.1. Görüntüleme

HRP enzimi ile işaretlenmiş sekonder antikolar ile inkübe edilmiş membranların görüntülenmesi için SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) kullanılmıştır. SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, immünoblotlar üzerinde HRP'yi tespit etmek için yüksek hassasiyete sahip

olan substrattır. Substrat olarak kullanılan luminol, HRP ve H₂O₂ varlığında okside olur ve uyarılmış ürün olan 3-aminofthalat oluşur. Bu ürün, 425 nm'de ışığa verir. Bu ışık, sadece enzim-substrat reaksiyonu sırasında oluşur. Yani geçici ve kısıtlı süre zarfında gözlemlenebilir.

Çalışma esnasında membranlar, SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate çalışma solüsyonları membran başına 3 ml olacak şekilde 1:1 oranında karıştırılarak taze hazırlandı ve membranla 1 dakika inkübe edildi. Fazla solüsyon uzaklaştırıldıktan sonra, membran protein kısmı yukarı bakacak şekilde streç film ile kaplandı ve Vilber Lourmat Fusion FX-7 Kemigörüntüleme cihazı ile kemiluminesans görüntülemesi yapıldı (182).

3.2.8. Proteazomun Kimotripsin Benzeri Aktivite İnhibisyonunun Tespit Edilmesi

Proteazom inhibisyonu sonucu yüksek derecede poliubikitine olmuş protein birikimine neden olan bileşikler içerisinde proteazom kimotripsin benzeri katalitik alt birim inhibisyonu göstermesi beklenen bileşiklerin tespiti florometrik olarak yapıldı. Bu amaçla MCF-7 hücre pelletini lizatlama için 300 µl lizatlama tamponu ve 0.5 µl 1M DTT hazırlandı, hücre pelleti lizatlama tamponu ile resüspand edildi. Hücre süspansiyonu 15 saniye sıvı azotta, ardından 60 saniye 42 °C su banyosunda bekletildi ve bu işlem üç kez tekrarlandı. +4 °C ve 13400 rpm'de on dakika süreyle santrifüj edildi. İnkübasyon tamponu, DTT ve deiyonize su karışımından oluşan master mix tamponu hazırlandı. Proteazom içeren süpernatant önceden soğutulmuş tüpe aktarıldı ve nonsteril siyah 96 kuyucuklu plakaya, her bir kuyucukta 10 µl olacak şekilde dağıtıldı. Her bir kuyucuğa 90 µl master mix tamponu ilave edildi. Master mix ile hücre lizatı on dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Test edilecek bileşikler (NS19, NS24, NS26, NS29, NK30) DMSO'da çözülerek master mix tamponu içerisinde IC₅₀ değerlerine göre hazırlandı ve her bir kuyucuğa 10 µl olacak şekilde ilave edilerek 37 °C'de bir saat inkübe edildi. Süre sonunda Suc-LLVY-MCA peptidi, her bir kuyucuğa 10 µl olacak şekilde ilave edildi ve ardından 37 °C'de bir saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 360 nm ışık ve 460 nm absorpsiyon olacak şekilde florometrik ölçüm yapıldı (183).

3.2.9. İstatistiksel Analiz

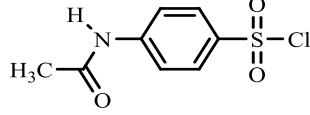
Üç farklı deneyden (n=3) elde edilen sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesi için ortalama \pm ortalama standart hataları (Ort. \pm O.S.H) hesaplandı. Gruplar arasındaki farkın anlamlı olup olmadığını tespit etmek için ANOVA (tek yönlü varyans analizi) testi ve ikili grupların kendi arasında karşılaştırılması için *Student t testi* ile istatistiksel analiz yapıldı. Anlamlılık sınırı olarak $p<0.05$ kabul edildi. Bu işlemlerin tamamı Prism-GraphPad5 paket programı kullanılarak gerçekleştirildi.



4. BULGULAR

4.1. Sentezi Gerçekleştirilen Bileşiklere Ait Bulgular

4.1.1. 4-asetamidobenzensülfonil klorür (A0)



Verim: %66, Erime derecesi: 145 °C

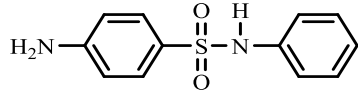
IR (Spektrum No 1)

ν_{maks} (FT/ATR): 3006 (N-H gerilme bandı; aromatik C-H gerilme bandı), 2911 (Alifatik C-H gerilme bandı), 1630 (Amit I bandı), 1598 (Amit II bandı), 1498 (C=C gerilme bandı), 1376 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1171 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 818 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen) cm⁻¹.

MS (APCI) (Spektrum No 2)

m/z (% bağıl bolluk): 126 (55), 168 (64), 198 (100), 232 (4, M-H⁺), 234 (1, M-H+2⁺).

4.1.2. 4-amino-*N*-fenilbenzensülfonamit (A1)



Verim: %66, Erime Derecesi: 192

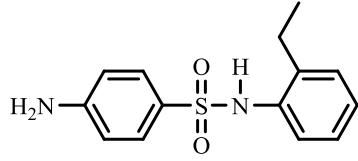
IR (Spektrum No 3)

ν_{maks} (FT/ATR): 3419, 3347, 3248 (Amino ve sülfonamit grubu N-H gerilme bandı), 3100 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1638 (N-H eğilme bandı), 1595, 1492, 1465, 1436 (C=C gerilme bandı), 1317 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1188 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 830 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen) cm⁻¹.

MS (APCI) (Spektrum No 4)

m/z (% bağıl bolluk): 42 (22), 54 (73), 56 (96), 80 (100), 93 (27), 106 (60), 133 (74), 149 (31), 166 (19), 249 (5, M+H⁺).

4.1.3. 4-amino-*N*-(2-etilfenil)benzensülfonamit (A2)



Verim: %42, Erime Derecesi: 129 °C

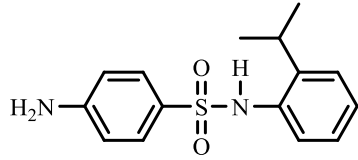
IR (Spektrum No 5)

ν_{maks} (FT/ATR): 3417, 3345, 3116 (Amino ve sülfonamit grubu N-H gerilme bandı), 3080 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1634 (N-H eğilme bandı), 1592, 1533, 1500 (C=C gerilme bandı), 1309 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1149 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 827 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen), 721 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *o*-disüstitüe benzen) cm⁻¹.

MS (APCI) (Spektrum No 6)

m/z (% bağıl bolluk): 42 (100), 56 (26), 83 (31), 277 (1, M+H⁺).

4.1.4. 4-amino-*N*-(2-izopropilfenil)benzensülfonamit (A3)



Verim: %57, Erime Derecesi: 172 °C

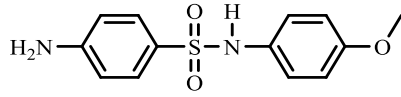
IR (Spektrum No 7)

ν_{maks} (FT/ATR): 3496, 3391, 3226 (Amino ve sülfonamit grubu N-H gerilme bandı), 3066 (Aromatik C-H gerilme bandı), 2966 (Alifatik C-H gerilme bandı), 1625 (N-H eğilme bandı), 1594, 1504, 1490 (C=C gerilme bandı), 1301 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1142 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 832 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen), 755 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *o*-disüstitüe benzen) cm⁻¹.

MS (APCI) (Spektrum No 8)

m/z (% bağıl bolluk): 42 (100), 56 (70), 108(68), 120 (87), 133 (75), 156 (30), 291 (8, M+H⁺).

4.1.5. 4-amino-*N*-(4-metoksifenil)benzensülfonamit (A9)



Verim: %11, Erime Derecesi: 201 °C

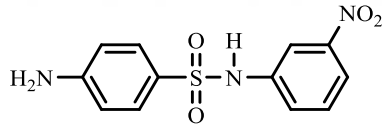
IR (Spektrum No 9)

ν_{maks} (FT/ATR): 3400, 3335, 3261 (Amino ve sülfonamit grubu N-H gerilme bandı), 3016 (Aromatik C-H gerilme bandı), 2962, 2839 (Alifatik C-H gerilme bandı), 1646 (N-H eğilme bandı), 1591, 1510, 1500, 1466, 1452 (C=C gerilme bandı), 1318 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1252 (=C-O-C asimetric gerilme bandı), 1148 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 1032 (=C-O-C simetric gerilme bandı), 821 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen) cm⁻¹.

MS (APCI) (Spektrum No 10)

m/z (% bağıl bolluk): 42 (87), 56 (39), 83 (100), 278 (1, M+H⁺).

4.1.6. 4-amino-*N*-(3-nitrofenil)benzensülfonamit (A11)



Verim: %52, Erime Derecesi: 174 °C

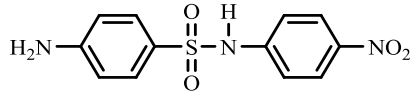
IR (Spektrum No 11)

ν_{maks} (FT/ATR): 3493, 3390, 3296 (Amino ve sülfonamit grubu N-H gerilme bandı), 3085 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1627 (N-H eğilme bandı), 1594, 1504, 1478 (C=C gerilme bandı), 1523 (-NO₂ asimetric gerilme bandı), 1397 (-NO₂ simetric gerilme bandı), 1326 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1147 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 830 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen), 734, 687 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *m*-disüstitüe benzen) cm⁻¹.

MS (APCI) (Spektrum No 12)

m/z (% bağıl bolluk): 42 (97), 56 (84), 83 (100), 294 (1, M+H⁺).

4.1.7. 4-amino-*N*-(4-nitrofenil)benzensülfonamit (A12)



Verim: %35, Erime Derecesi: 167 °C

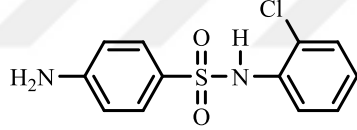
IR (Spektrum No 13)

ν_{maks} (FT/ATR): 3414, 3341, 3123 (Amino ve sülfonamit grubu N-H gerilme bandı), 3071, 2920, 2867 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1629 (N-H eğilme bandı), 1594, 1496 (C=C gerilme bandı), 1517 (-NO₂ asimetrik gerilme bandı), 1345 (-NO₂ simetrik gerilme bandı), 1318 (-SO₂- asimetrik gerilme bandı), 1146 (-SO₂- simetrik gerilme bandı), 845 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen) cm⁻¹.

MS (APCI) (Spektrum No 14)

m/z (% bağıl bolluk): 42 (100), 56 (81), 83 (37), 108 (12), 133 (19), 294 (1, M+H⁺).

4.1.8. 4-amino-*N*-(2-klorofenil)benzensülfonamit (A13)



Verim: %60, Erime Derecesi: 174 °C

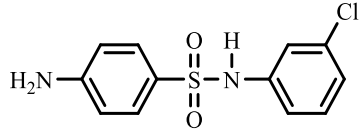
IR (Spektrum No 15)

ν_{maks} (FT/ATR): 3408, 3343, 3170 (Amino ve sülfonamit grubu N-H gerilme bandı), 3085 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1645 (N-H eğilme bandı), 1593, 1497, 1476, 1455 (C=C gerilme bandı), 1318 (-SO₂- asimetrik gerilme bandı), 1151 (-SO₂- simetrik gerilme bandı), 846 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen), 723 (C-H düzlem dışı eğilme, *o*-disüstitüe benzen) cm⁻¹.

MS (APCI) (Spektrum No 16)

m/z (% bağıl bolluk): 42 (100), 56 (52), 83 (68), 108 (34), 127 (53), 133 (48), 166 (30), 283 (12, M+H⁺), 285 (4, M+H+2⁺).

4.1.9. 4-amino-*N*-(3-klorofenil)benzensülfonamit (A14)



Verim: %19, Erime Derecesi: 140 °C

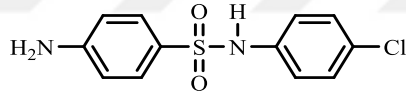
IR (Spektrum No 17)

ν_{maks} (FT/ATR): 3417, 3345, 3114 (Amino ve sülfonamit grubu N-H gerilme bandı), 3071 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1632 (N-H eğilme bandı), 1591, 1499, 1473, 1454, 1434 (C=C gerilme bandı), 1309 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1148 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 845 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen), 760, 722 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *m*-disüstitüe benzen) cm⁻¹.

MS (APCI) (Spektrum No 18)

m/z (% bağıl bolluk): 42 (100), 283 (1, M+H⁺), 285 (0.3, M+H+2⁺).

4.1.10. 4-amino-*N*-(4-klorofenil)benzensülfonamit (A15)



Verim: %20, Erime Derecesi: 192 °C

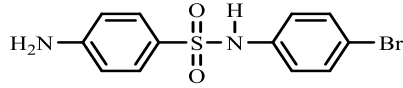
IR (Spektrum No 19)

ν_{maks} (FT/ATR): 3411, 3343, 3238 (Amino ve sülfonamit grubu N-H gerilme bandı), 3099 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1633 (N-H eğilme bandı), 1596, 1491, 1448 (C=C gerilme bandı), 1311 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1147 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 814 (C-H düzlem dışı eğilme, *p*-disüstitüe benzen) cm⁻¹.

MS (APCI) (Spektrum No 20)

m/z (% bağıl bolluk): 42 (70), 56 (72), 83 (100), 93 (56), 106 (24), 127 (48), 133 (42), 149 (21), 166 (60), 283 (6, M+H⁺), 285 (2, M+H+2⁺).

4.1.11. 4-amino-*N*-(4-bromofenil)benzensülfonamit (A16)



Verim: %28, Erime Derecesi: 200 °C

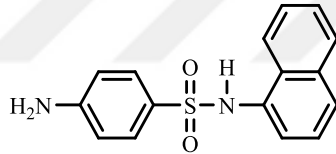
IR (Spektrum No 21)

ν_{maks} (FT/ATR): 3413, 3345, 3114 (Amino ve sülfonamit grubu N-H gerilme bandı), 2952 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1637 (N-H eğilme bandı), 1594, 1489, 1441 (C=C gerilme bandı), 1311 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1149 (-SO₂- simetrik gerilme bandı), 826 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen) cm⁻¹.

MS (APCI) (Spektrum No 22)

m/z (% bağıl bolluk): 42 (20), 56 (100), 80 (16), 83 (25), 108 (57), 133 (39), 149 (27), 173 (20), 327 (10, M+H⁺), 329 (11, M+H+2⁺).

4.1.12. 4-amino-*N*-(naftalen-1-il)benzensülfonamit (A17)



Verim: %44, Erime Derecesi: 195 °C

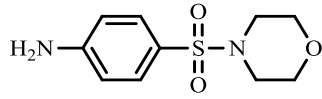
IR (Spektrum No 23)

ν_{maks} (FT/ATR): 3486, 3382, 3235 (Amino ve sülfonamit grubu N-H gerilme bandı), 3066 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1619 (N-H eğilme bandı), 1594, 1503 (C=C gerilme bandı), 1401 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1143 (-SO₂- simetrik gerilme bandı), 829 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen), 798, 773 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, naftalen) cm⁻¹.

MS (APCI) (Spektrum No 24)

m/z (% bağıl bolluk): 108 (100), 130 (37), 143 (89), 158 (13), 299 (3, M+H⁺).

4.1.13. 4-(morfolinosülfonil)anilin (A18)



Verim: %24, Erime Derecesi: 229 °C

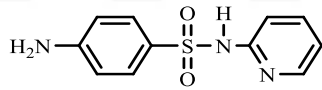
IR (Spektrum No 25)

ν_{maks} (FT/ATR): 3441, 3362, 3238 (Amino ve sülfonamid grubu N-H gerilme bandı), 2985, 2913 (Alifatik C-H gerilme bandı), 1640 (N-H eğilme bandı), 1595, 1502, 1447, 1432 (C=C gerilme bandı), 1340 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1149 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 1106 (C-O-C gerilme bandı, morfolin) 827 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen) cm⁻¹.

MS (APCI) (Spektrum No 26)

m/z (% bağıllık): 54 (43), 56 (100), 83 (34), 108 (29), 133 (64), 149 (37), 156 (28), 243 (12, M+H⁺).

4.1.14. 4-amino-*N*-(piridin-2-il)benzensülfonamid (A19)



Verim: %11, Erime Derecesi: 180 °C

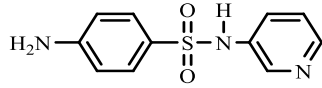
IR (Spektrum No 27)

ν_{maks} (FT/ATR): 3453, 3361, 3236 (Amino ve sülfonamid grubu N-H gerilme bandı), 3046, 2730 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1627 (N-H eğilme bandı), 1592, 1529, 1502, 1461 (C=C gerilme bandı), 1363 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1132 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 830 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen) cm⁻¹.

MS (APCI) (Spektrum No 28)

m/z (% bağıllık): 42 (37), 65 (18), 80 (18), 95 (65), 108 (100), 133 (70), 156 (43), 184 (37), 250 (35, M+H⁺).

4.1.15. 4-amino-*N*-(piridin-3-il)benzensülfonamit (A20)



Verim: %32, Erime Derecesi: 264 °C

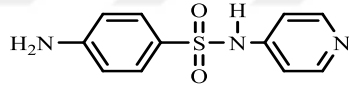
IR (Spektrum No 29)

ν_{maks} (FT/ATR): 3429, 3335, 3251 (Amino ve sülfonamit grubu N-H gerilme bandı), 3071, 2639 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1638 (N-H eğilme bandı), 1585, 1520, 1502, 1480 (C=C gerilme bandı), 1353 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1146 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 830 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen) cm⁻¹.

MS (APCI) (Spektrum No 30)

m/z (% bağıl bolluk): 42 (100), 56 (17), 67 (27), 94 (97), 135 (57), 157 (32), 250 (67, M+H⁺).

4.1.16. 4-amino-*N*-(piridin-4-il)benzensülfonamit (A21)



Verim: %22, Erime Derecesi: 247 °C

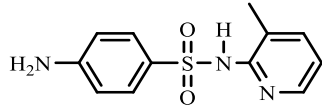
IR (Spektrum No 31)

ν_{maks} (FT/ATR): 3533, 3463, 3367 (Amino ve sülfonamit grubu N-H gerilme bandı), 3084, 2926 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1642 (N-H eğilme bandı), 1596, 1493, 1401 (C=C gerilme bandı), 1354 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1121 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 817 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen) cm⁻¹.

MS (APCI) (Spektrum No 32)

m/z (% bağıl bolluk): 95 (100), 108 (31), 133 (21), 250 (13, M+H⁺).

4.1.17. 4-amino-*N*-(3-metilpiridin-2-il)benzensülfonamit (A22)



Verim: %34, Erime Derecesi: 229 °C

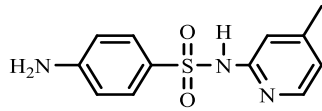
IR (Spektrum No 33)

ν_{maks} (FT/ATR): 3483, 3332, 3259 (Amino ve sülfonamit grubu N-H gerilme bandı), 3161 (Aromatik C-H gerilme bandı), 2952 (Alifatik C-H gerilme bandı), 1628 (N-H eğilme bandı), 1594, 1542, 1500, 1454 (C=C gerilme bandı), 1436, 1391, 1371 (C=C gerilme bandı, piridin), 1343 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1178 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 828 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen) cm⁻¹.

MS (APCI) (Spektrum No 34)

m/z (% bağıl bolluk): 42 (79), 56 (30), 95 (31), 108 (100), 133 (76), 149 (32), 156 (29), 198 (52), 264 (14, M+H⁺).

4.1.18. 4-amino-*N*-(4-metilpiridin-2-il)benzensülfonamit (A23)



Verim: %37, Erime Derecesi: 240 °C

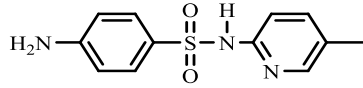
IR (Spektrum No 35)

ν_{maks} (FT/ATR): 3528, 3458, 3358 (Amino ve sülfonamit grubu N-H gerilme bandı), 30240 (Aromatik C-H gerilme bandı), 2900, 2721 (Alifatik C-H gerilme bandı), 1614 (N-H eğilme bandı), 1597, 1518, 1504, 1393 (C=C gerilme bandı), 1321 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1143 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 837 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen) cm⁻¹.

MS (APCI) (Spektrum No 36)

m/z (% bağıl bolluk): 42 (67), 56 (28), 83 (68), 109 (100), 133 (88), 149 (41), 156 (29), 198 (76), 264 (56, M+H⁺).

4.1.19. 4-amino-*N*-(5-metilpiridin-2-il)benzensülfonamit (A24)



Verim: %39, Erime Derecesi: 200 °C

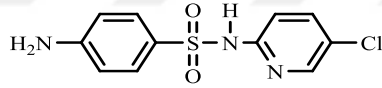
IR (Spektrum No 37)

ν_{maks} (FT/ATR): 3470, 3375, 3213 (Amino ve sülfonamit grubu N-H gerilme bandı), 3057, 2919 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1644 (N-H eğilme bandı), 1591, 1536, 1501, 1440, 1383 (C=C gerilme bandı), 1360 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1152 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 826 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen) cm⁻¹.

MS (APCI) (Spektrum No 38)

m/z (% bağıl bolluk): 92 (32), 109 (100), 133 (9), 156 (10), 198 (10), 264 (22, M+H⁺).

4.1.20. 4-amino-*N*-(5-kloropiridin-2-il)benzensülfonamit (A25)



Verim: %27, Erime Derecesi: 203 °C

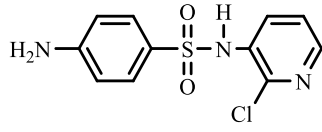
IR (Spektrum No 39)

ν_{maks} (FT/ATR): 3472, 3375, 3239 (Amino ve sülfonamit grubu N-H gerilme bandı), 3076, 2867 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1630 (N-H eğilme bandı), 1591, 1500, 1376 (C=C gerilme bandı), 1317 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1132 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 825 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen) cm⁻¹.

MS (APCI) (Spektrum No 40)

m/z (% bağıl bolluk): 42 (15), 65 (12), 93 (51), 108 (100), 133 (90), 156 (32), 198 (17), 218 (41), 284 (10, M+H⁺), 286 (3, M+H+2⁺).

4.1.21. 4-amino-N-(2-kloropiridin-3-il)benzensülfonamit (A26)



Verim: %18, Erime Derecesi: 146 °C

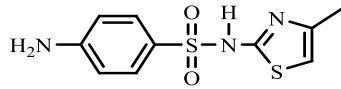
IR (Spektrum No 41)

ν_{maks} (FT/ATR): 3406, 3345, 3238 (Amino ve sülfonamit grubu N-H gerilme bandı), 3127 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1643 (N-H eğilme bandı), 1593, 1496, 1446, 1382 (C=C gerilme bandı), 1317 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1154 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 850 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen) cm⁻¹.

MS (APCI) (Spektrum No 42)

m/z (% bağıllı bolluk): 42 (47), 101 (29), 108 (81), 128 (85), 169 (67), 284 (100, M+H⁺), 286 (27, M+H+2⁺).

4.1.22. 4-amino-N-(4-metiltiyazol-2-il)benzensülfonamit (A28)



Verim: %23, Erime Derecesi: 241 °C

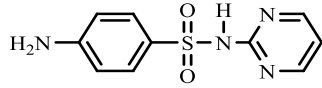
IR (Spektrum No 43)

ν_{maks} (FT/ATR): 3441, 3354, 3239 (Amino ve sülfonamit grubu N-H gerilme bandı), 3097 (Aromatik C-H gerilme bandı), 2914 (Alifatik C-H gerilme), 1644 (N-H eğilme bandı), 1594, 1568, 1524, 1502, 1449, 1409 (C=C gerilme bandı), 1389 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1180 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 896 (C-S gerilme bandı, tiyazol), 830 (C-H düzlem dışı eğilme bandı *p*-disüstitüe benzen), 688 (C-H eğilme bandı, tiyazol) cm⁻¹.

MS (APCI) (Spektrum No 44)

m/z (% bağıllı bolluk): 42 (27), 56 (16), 92 (41), 108 (89), 133 (100) 156 (65), 270 (12, M+H⁺).

4.1.23. 4-amino-*N*-(pirimidin-2-il)benzensülfonamit (A29)



Verim: %15, Erime Derecesi: 265 °C

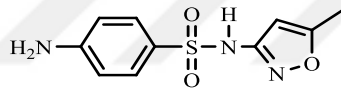
IR (Spektrum No 45)

ν_{maks} (FT/ATR): 3421, 3352, 3258 (Amino ve sülfonamit grubu N-H gerilme bandı), 3036, 2870, 2736 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1651 (N-H eğilme bandı), 1577, 1489, 1439, 1406 (C=C gerilme bandı), 1324 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1147 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 842 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen) cm⁻¹.

MS (APCI) (Spektrum No 46)

m/z (% bağıl bolluk): 42 (48), 108 (68), 133 (100), 156 (18), 251 (5, M+H⁺).

4.1.24. 4-amino-*N*-(5-metilizoksazol-3-il)benzensülfonamit (A30)



Verim: %12, Erime Derecesi: 229 °C

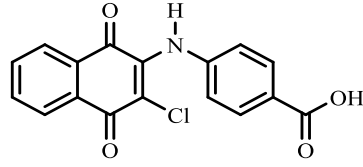
IR (Spektrum No 47)

ν_{maks} (FT/ATR): 3475, 3384, 3280 (Amino ve sülfonamit grubu N-H gerilme bandı), 3080 (Aromatik C-H gerilme bandı), 2989, 2895 (Alifatik C-H gerilme bandı), 1635 (N-H eğilme bandı), 1617, 1594, 1504, 1469 (C=C gerilme bandı), 1328 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1154 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 831 (C-H düzlem dışı eğilme bandı *p*-disüstitüe benzen) cm⁻¹.

MS (APCI) (Spektrum No 48)

m/z (% bağıl bolluk): 42 (10), 56 (14), 65 (18), 80 (17), 93 (36), 108 (90), 133 (100), 149 (40), 156 (25), 254 (7, M+H⁺).

4.1.25. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)benzoik asit (A31)



Verim: % 33, Erime derecesi: 307 °C

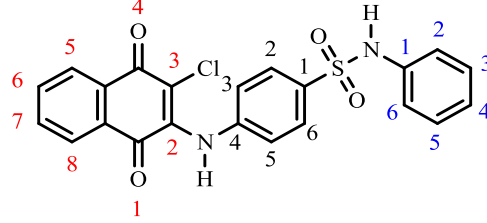
IR (Spektrum No 49)

ν_{maks} (FT/ATR): 3295 (Sekonder amin N-H gerilme bandı), 3075, 2971 (O-H gerilme bandı; Aromatik C-H gerilme bandı), 1664 (C=O gerilme bandı), 1592, 1574, 1519, 1495 (C=C gerilme bandı), 1417 (O-H eğilme bandı), 1284 (C-N gerilme bandı), 857 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disübstitüe benzen) cm^{-1} .

MS (APCI) (Spektrum No 50)

m/z (% bağıl bolluk): 42 (100), 56 (25), 83 (43), 283 (6), 328 (3, $M+H^+$), 330 (1, $M+H+2^+$).

4.1.26. 4-((3-kloro-1,4-dioksa-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-*N*-fenilbenzen sülfonamit (NS1)



Verim: %40, Erime Derecesi: 218 °C; 220-223 °C (42)

IR (Spektrum No 51)

ν_{maks} (FT/ATR): 3299, 3228 (Sekonder amin ve sülfonamit N-H gerilme bandı), 2923 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1667, 1607 (C=O gerilme bandı), 1588, 1574, 1501 (C=C gerilme bandı), 1327 (-SO₂- asimetrik gerilme bandı), 1150 (-SO₂- simetrik gerilme bandı), 849 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen), 746 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *o*-süstitüe benzen) cm⁻¹.

¹H NMR (Spektrum No 52)

400 MHz, DMSO-*d*₆: δ 10.11 (1H, bs, SO₂NH), 9.46 (1H, bs, NH-fenil), 8.02 (1H, dd, *J*=7.6; 1.2 Hz, Naftokinon H-5 veya H-8), 8.01 (1H, dd, *J*=7.6; 1.2 Hz, Naftokinon H-5 veya H-8), 7.86 (1H, td, *J*=7.4; 1.5 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.80 (1H, td, *J*=7.4; 1.5 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.61 (2H, d, *J*=8.8 Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.20 (2H, dd, *J*=8.8; 1.9 Hz, Fenil H-3 ve H-5), 7.14 (2H, d, *J*=8.8 Hz, Benzen H-3 ve H-5), 7.07 (2H, dd, *J*=8.8; 1.2 Hz, Fenil H-2 ve H-6), 7.00 (1H, tt, *J*=7.4; 1.2 Hz, Fenil H-4) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 53)

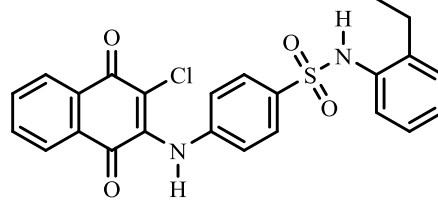
m/z (% bağıl bolluk): 42 (78), 56 (100), 83 (35), 115 (16), 439 (12, M+H⁺), 441 (6, M+H+2⁺).

Elementel Analiz: C₂₂H₁₅ClN₂O₄S.1.3 CH₂Cl₂ için M.A.= 549.29 g/mol

Hesaplanan (%): C, 51.07; H, 3.00; N, 5.11; S, 5.85

Bulunan (%): C, 51.26; H, 3.36; N, 5.19; S, 5.45.

**4.1.27. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(2-
etilfenil)benzensülfonamit (NS2)**



Verim: %13, Erime Derecesi: 258 °C

IR (Spektrum No 54)

ν_{maks} (FT/ATR): 3245, 3227 (Sekonder amin ve sülfonamit N-H gerilme bandı), 3020 (Aromatik C-H gerilme bandı), 2971 (Alifatik C-H gerilme bandı), 1673, 1643 (C=O gerilme bandı), 1591, 1569, 1507 (C=C gerilme bandı), 1329 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1158 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 851 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen), 741 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *o*-süstitüe benzen) cm⁻¹.

¹H NMR (Spektrum No 55)

400 MHz, DMSO-*d*₆: δ 9.52 (1H, bs, SO₂NH), 9.43 (1H, bs, NH-fenil), 8.03 (2H, dd, *J*=7.6; 1.2 Hz, Naftokinon H-5 ve H-8), 7.86 (1H, td, *J*=7.6; 1.2 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.81 (1H, td, *J*=7.6; 1.2 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.52 (2H, d, *J*=8.4 Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.17 (2H, d, *J*=8.4 Hz, Benzen H-3 ve H-5), 7.19-7.11 (2H, m, Fenil H-4 ve H-6), 7.04 (1H, td, *J*=7.6; 1.3 Hz, Fenil H-5), 6.88 (1H, dd, *J*=8.0; 1.2 Hz, Fenil H-3), 2.46 (2H, q, *J*=7.6 Hz, CH₂), 0.98 (3H, t, *J*=7.6 Hz, CH₃) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 56)

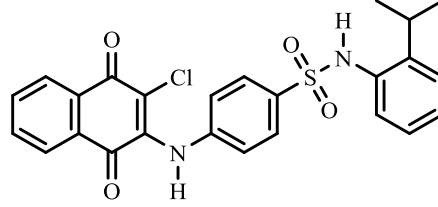
m/z (% bağıl bolluk): 56 (38), 74 (100), 95 (30), 121 (35), 467 (12, M+H⁺), 469 (4, M+H+2⁺).

Elementel Analiz: C₂₄H₂₁ClN₂O₄S için M.A.= 468.95 g/mol

Hesaplanan (%): C, 61.73; H, 4.10; N, 6.10; S, 6.87

Bulunan (%): C, 61.74; H, 4.18; N, 5.73; S, 7.10.

4.1.28. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(2-izopropil)benzensülfonamit (NS3)



Verim: %43, Erime Derecesi: 186 °C

IR (Spektrum No 57)

ν_{maks} (FT/ATR): 3238 (Sülfonamit N-H gerilme bandı), 3085 (Aromatik C-H gerilme bandı), 2968 (Alifatik C-H gerilme bandı), 1672, 1643 (C=O gerilme bandı), 1590, 1567, 1507 (C=C gerilme bandı), 1327 (-SO₂- asimetrik gerilme bandı), 1155 (-SO₂- simetrik gerilme bandı), 850 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen), 738 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *o*-süstitüe benzen) cm⁻¹.

¹H NMR (Spektrum No 58)

400 MHz, DMSO-*d*₆: δ 9.47 (1H, bs, NH-fenil), 8.03 (2H, d, *J*=7.2 Hz, Naftokinon H-5 ve H-8), 7.88-7.79 (2H, m, Naftokinon H-6 ve H-7), 7.53 (2H, d, *J*=8.0 Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.26 (1H, d, *J*=7.6 Hz, Fenil H-6), 7.16 (2H, d, *J*=8.4 Hz, Benzen H-3 ve H-5), 7.19-7.15 (1H, m, Fenil H-4), 7.02 (1H, t, *J*=7.6 Hz, Fenil H-5), 6.82 (1H, d, *J*=7.6 Hz, Fenil H-3), 3.29-3.23 (1H, m, CH(CH₃)₂), 0.98 (6H, d, *J*=6.8 Hz, 2xCH₃) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 59)

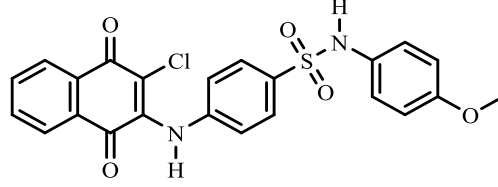
m/z (% bağıl bolluk): 281 (100), 297 (21), 346 (21), 479 (6, M-H⁺), 481 (M-H⁺+2⁺).

Elementel Analiz: C₂₅H₂₁ClN₂O₄S.0.2 H₂O için M.A.= 484.57 g/mol

Hesaplanan (%): C, 61.97; H, 4.45; N, 5.78; S, 6.62

Bulunan (%): C, 61.58; H, 4.07; N, 5.49; S, 6.71.

4.1.29. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(4-metoksifenil)benzensülfonamid (NS9)



Verim: %26, Erime Derecesi: 240 °C (dekompoze); 233-234 °C (42)

IR (Spektrum No 60)

ν_{maks} (FT/ATR): 3296, 3241 (Sekonder amin ve sülfonamid N-H gerilme bandı), 3085 (Aromatik C-H gerilme bandı), 2990 (Alifatik C-H gerilme bandı), 1668, 1607 (C=O gerilme bandı), 1589, 1567, 1575, 1506 (C=C gerilme bandı), 1439 (CH₃ asimetric gerilme bandı), 1391 (CH₃ simetrik gerilme bandı), 1324 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1150 (-SO₂- simetrik gerilme bandı), 1107 (=C-O-C gerilme bandı), 848 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen), 746 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *o*-süstitüe benzen) cm⁻¹.

¹H NMR (Spektrum No 61)

400 MHz, DMSO-*d*₆: δ 9.82 (1H, bs, SO₂NH), 9.48 (1H, bs, NH-fenil), 8.02 (2H, dd, *J*=8.4; 1.6 Hz, Naftokinon H-5 ve H-8), 7.88-7.79 (2H, m, Naftokinon H-6 ve H-7), 7.54 (2H, d, *J*=8.8 Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.13 (2H, d, *J*=8.8 Hz, Benzen H-3 ve H-5), 6.96 (2H, d, *J*=8.8 Hz, Fenil H-2 ve H-6), 6.76 (2H, d, *J*=8.8 Hz, Fenil H-3 ve H-5), 3.65 (3H, s, OCH₃) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 62)

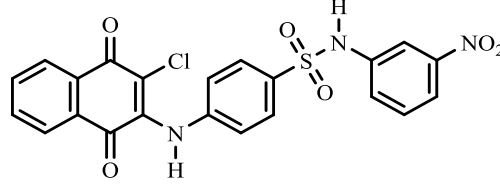
m/z (% bağıl bolluk): 56 (100), 74 (50), 115 (38), 299 (21), 355 (26), 387 (24), 469 (1, M+H⁺), 471 (0.3, M+H+2⁺).

Elementel Analiz: C₂₃H₁₇ClN₂O₅S.1.3 CH₂Cl₂ için M.A.= 579.31 g/mol

Hesaplanan (%): C, 56.11; H, 4.01; N, 5.69; S, 6.51

Bulunan (%): C, 56.26; H, 4.36; N, 5.81; S, 6.45.

4.1.30. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(3-nitrofenil)benzensülfonamit (NS11)



Verim: %59, Erime Derecesi: 268 °C

IR (Spektrum No 63)

ν_{maks} (FT/ATR): 3260, 3257 (Sülfonamit N-H gerilme bandı), 3100 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1677, 1637 (C=O gerilme bandı), 1590, 1562, 1504, (C=C gerilme bandı), 1527 (-NO₂ asimetric gerilme bandı), 1331 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1158 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 852 (C-H düzlem dışı eğilme, *p*-disüstitüe benzen), 801, 788 (C-H, düzlem dışı eğilme bandı, *m*-süstitüe benzen) 739 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *o*-süstitüe benzen) cm⁻¹.

¹H NMR (Spektrum No 64)

400 MHz, DMSO-*d*₆: δ 10.76 (1H, s, SO₂NH), 9.50 (1H, s, NH-fenil), 8.02 (2H, dd, *J*=8.0; 1.6 Hz, Naftokinon H-5 ve H-8), 7.90-7.78 (4H, m, Naftokinon H-6 ve H-7, Fenil H-2 ve H-4), 7.67 (2H, d, *J*=8.8 Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.55-7.50 (2H, m, Fenil H-5 ve H-6), 7.16 (2H, d, *J*=8.8 Hz, Benzen H-3 ve H-5) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 65)

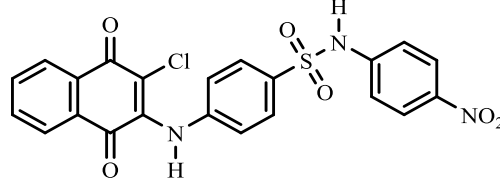
m/z (% bağıl bolluk): 43 (100), 56 (82), 484 (1, M+H⁺), 486 (0.3, M+H+2⁺).

Elementel Analiz: C₂₂H₁₄ClN₃O₆S için M.A.= 483.88 g/mol

Hesaplanan (%): C, 54.61; H, 2.92; N, 8.68; S, 6.63

Bulunan (%): C, 54.59; H, 3.16; N, 8.29; S, 6.86.

4.1.31. 4-((3-kloro-1,4-diookso-1,4-diookso-1,4-dihidronaftalen-2-il) amino)-N-(4-nitrofenil)benzensülfonamit (NS12)



Verim: %21, Erime Derecesi: 271 °C

IR (Spektrum No 66)

ν_{maks} (FT/ATR): 3300, 3252 (Sekonder amin ve sülfonamit N-H gerilme bandı), 2990 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1676, 1639 (C=O gerilme bandı), 1592, 1565, 1491 (C=C gerilme bandı), 1508 (-NO₂ asimetrik gerilme bandı), 1332 (-SO₂- asimetrik gerilme bandı), 1155 (-SO₂- simetrik gerilme bandı), 849, 834 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen), 736 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *o*-süstitüe benzen) cm⁻¹.

¹H NMR (Spektrum No 67)

400 MHz, DMSO-*d*₆: δ 11.10 (1H, bs, SO₂NH), 9.49 (1H, bs, NH-fenil), 8.12 (2H, d, *J*=9.1 Hz, Fenil H-3 ve H-5), 8.02 (2H, dd, *J*=8.0; 1.6 Hz, Naftokinon H-5 ve H-8), 7.86 (1H, td, *J*=7.4; 1.5 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.81 (1H, td, *J*=7.4; 1.5 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.74 (2H, d, *J*=8.8 Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.30 (2H, d, *J*=9.1 Hz, Fenil H-2 ve H-6), 7.18 (2H, d, *J*=8.8 Hz, Benzen H-3 ve H-5) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 68)

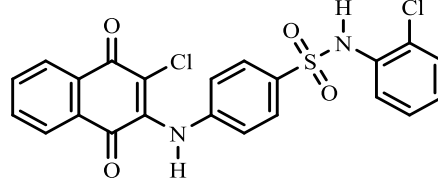
m/z (% bağıl bolluk): 42 (97), 56 (100), 83 (20), 484 (12, M+H⁺), 486 (4, M+H+2⁺).

Elementel Analiz: C₂₂H₁₄ClN₃O₆S için M.A.= 483.88 g/mol

Hesaplanan (%): C, 54.61; H, 2.92; N, 8.68; S, 6.63

Bulunan (%): C, 54.52; H, 3.11; N, 8.54; S, 6.48.

4.1.32. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(2-klorofenil)benzensülfonamid (NS13)



Verim: %8, Erime Derecesi: 254 °C

IR (Spektrum No 69)

ν_{maks} (FT/ATR): 3262 (Sülfonamid N-H gerilme bandı), 3047 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1671, 1645 (C=O gerilme bandı), 1591, 1568, 1504 (C=C gerilme bandı), 1337 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1166 (-SO₂- simetrik gerilme bandı), 850 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen), 741 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *o*-süstitüe benzen) cm⁻¹.

¹H NMR (Spektrum No 70)

400 MHz, DMSO-*d*₆: δ 9.80 (1H, bs, SO₂NH), 9.51 (1H, bs, NH-fenil), 8.03 (2H, dd, *J*=7.6; 1.2 Hz, Naftokinon H-5 ve H-8), 7.88-7.79 (2H, m, Naftokinon H-6 ve H-7), 7.56 (2H, d, *J*=7.6 Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.37 (1H, d, *J*=7.6 Hz, Fenil H-3), 7.26-7.25 (2H, m, Fenil H-5 ve H-6), 7.16-7.14 (3H, m, Fenil H-4, Benzen H-3 ve H-5) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 71)

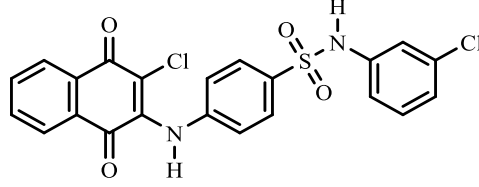
m/z (% bağıl bolluk): 42 (100), 56 (92), 83 (20), 355 (10), 473 (1, M+H⁺), 475 (0.3, M+H+2⁺), 477 (0.1, M+H+4⁺).

Elementel Analiz: C₂₂H₁₄Cl₂N₂O₄S.0.3 H₂O için M.A.= 478.73 g/mol

Hesaplanan (%): C, 55.19; H, 3.07; N, 5.85; S, 6.70

Bulunan (%): C, 55.56; H, 3.25; N, 5.51; S, 6.70.

4.1.33. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(3-klorofenil)benzensülfonamid (NS14)



Verim: %9, Erime Derecesi: 266 °C

IR (Spektrum No 72)

ν_{maks} (FT/ATR): 3254 (Sülfonamid N-H gerilme bandı), 3085 (Aromatik C-H gerilme bandı) 1677, 1636 (C=O gerilme bandı), 1592, 1561, 1506, 1489 (C=C gerilme bandı), 1329 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1156 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 852 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen), 804, 788 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *m*-süstitüe benzen), 738 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *o*-süstitüe benzen) cm⁻¹.

¹H NMR (Spektrum No 73)

400 MHz, DMSO-*d*₆: δ 10.38 (1H, bs, SO₂NH), 9.48 (1H, bs, NH-fenil), 8.02 (2H, dd, *J*=7.6; 1.6 Hz, Naftokinon H-5 ve H-8), 7.87-7.80 (2H, m, Naftokinon H-6 ve H-7), 7.63 (2H, d, *J*=8.0 Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.24 (1H, t, *J*=8.4 Hz, Fenil H-5), 7.16 (2H, d, *J*=8.0 Hz, Benzen H-3 ve H-5), 7.07-7.04 (3H, m, Fenil H-2, H-4 ve H-6) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 74)

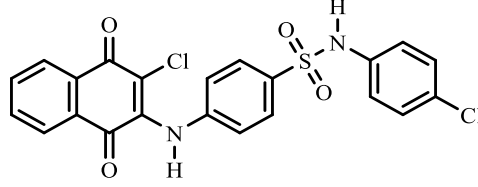
m/z (% bağıl bolluk): 33 (18), 42 (100), 56 (32), 473 (1, M+H⁺), 475 (0.3, M+H+2⁺), 477 (0.1, M+H+4⁺).

Elementel Analiz: C₂₂H₁₄Cl₂N₂O₄S için M.A.= 473.32 g/mol

Hesaplanan (%): C, 55.82; H, 2.98; N, 5.92; S, 6.77

Bulunan (%): C, 55.70; H, 3.23; N, 5.57; S, 6.41.

4.1.34. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(4-klorofenil)benzensülfonamid (NS15)



Verim: %23, Erime Derecesi: 270 °C; 272 °C (dekompoze) (42)

IR (Spektrum No 75)

ν_{maks} (FT/ATR): 3297, 3232 (Sekonder amin ve sülfonamid N-H gerilme bandı), 3066 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1668, 1607 (C=O gerilme bandı), 1589, 1574, 1504 (C=C gerilme bandı), 1322 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1151 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 848 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disübstitüe benzen), 750 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *o*-sübstitüe benzen) cm⁻¹.

¹H NMR (Spektrum No 76)

400 MHz, DMSO-*d*₆: δ 10.27 (1H, bs, SO₂NH), 9.49 (1H, bs, NH-fenil), 8.03 (1H, dd, *J*=7.6; 1.6 Hz, Naftokinon H-5 veya H-8), 8.01 (1H, dd, *J*=7.6; 1.6 Hz, Naftokinon H-5 veya H-8), 7.86 (1H, td, *J*=7.4; 1.5 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.81 (1H, td, *J*=7.4; 1.5 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.60 (2H, d, *J*=8.0 Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.27 (2H, d, *J*=8.0 Hz, Fenil H-2 ve H-6), 7.15 (2H, d, *J*=8.0 Hz, Benzen H-3 ve H-5), 7.07 (2H, d, *J*=8.0 Hz, Fenil H-3 ve H-5) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 77)

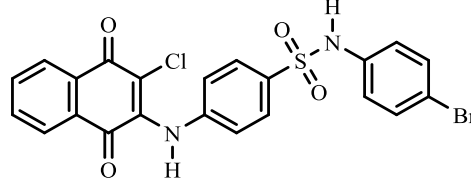
m/z (% bağıl bolluk): 42 (100), 56 (18), 473 (1, M+H⁺), 475 (0.6, M+H+2⁺), 477 (0.1, M+H+4⁺).

Elementel Analiz: C₂₂H₁₄Cl₂N₂O₄S.0.1 C₂H₆O için M.A.= 477.93 g/mol

Hesaplanan (%): C, 55.79; H, 3.08; N, 5.86; S, 6.71

Bulunan (%): C, 55.70; H, 3.13; N, 5.65; S, 6.51.

4.1.35. N-(4-bromofenil)-4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)benzensülfonamit (NS16)



Verim: %59, Erime Derecesi: 276 °C

IR (Spektrum No 78)

ν_{maks} (FT/ATR): 3296, 3229 (Sekonder amin ve sülfonamit N-H gerilme bandı), 3085 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1670, 1646 (C=O gerilme bandı), 1588, 1574, 1507 (C=C gerilme bandı), 1341 (-SO₂- asimetrik gerilme bandı), 1152 (-SO₂- simetrik gerilme bandı), 848 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen), 748 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *o*-süstitüe benzen) cm⁻¹.

¹H NMR (Spektrum No 79)

400 MHz, DMSO-*d*₆: δ 10.29 (1H, s, SO₂NH), 9.49 (1H, s, NH-fenil), 8.03 (1H, dd, *J*=7.6; 1.6 Hz, Naftokinon H-5 veya H-8), 8.02 (1H, dd, *J*=7.6; 1.6 Hz, Naftokinon H-5 veya H-8), 7.86 (1H, td, *J*=7.4; 1.5 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.81 (1H, td, *J*=7.4; 1.5 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.61 (2H, d, *J*=8.8 Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.40 (2H, d, *J*=8.8 Hz, Fenil H-3 ve H-5), 7.15 (2H, d, *J*=8.4 Hz, Benzen H-3 ve H-5), 7.02 (2H, d, *J*=8.8 Hz, Fenil H-2 ve H-6) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 80)

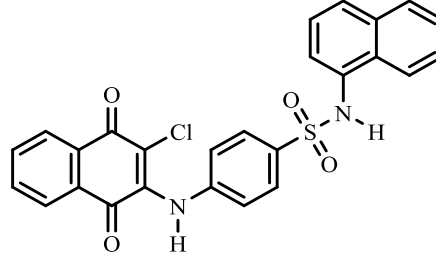
m/z (% bağıl bolluk): 42 (100), 56 (90), 517 (1, M+H⁺), 519 (0.3, M+H+2⁺), 521 (0.2, M+H+4⁺).

Elementel Analiz: C₂₂H₁₄BrClN₂O₄S.0.1 C₂H₆O için M.A.= 522.38 g/mol

Hesaplanan (%): C, 51.04; H, 2.82; N, 5.36; S, 6.14

Bulunan (%): C, 50.79; H, 2.86; N, 4.99; S, 5.74.

4.1.36. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(naftalen-1-il)benzensülfonamid (NS17)



Verim: %47, Erime Derecesi: 291 °C

IR (Spektrum No 81)

ν_{maks} (FT/ATR): 3278, 3225 (Sekonder amin, sülfonamid N-H gerilme bandı), 2990 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1670, 1646 (C=O gerilme bandı), 1588, 1574, 1507 (C=C gerilme bandı), 1341 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1151 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 849 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen), 751 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, monosüstitüe benzen) cm⁻¹.

¹H NMR (Spektrum No 82)

400 MHz, DMSO-*d*₆: δ 10.08 (1H, bs, SO₂NH), 9.46 (1H, bs, NH-fenil), 8.02 (2H, dd, *J*=7.6; 1.2 Hz, Naftokinon H-5 ve H-8), 7.99 (1H, d, *J*=8.0 Hz, Naftalen H-4), 7.86 (1H, td, *J*=7.4; 1.5 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.80 (1H, td, *J*=7.4; 1.5 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.76 (2H, d, *J*=8.0 Hz, Naftalen H-5 ve H-8), 7.53 (2H, d, *J*=8.4 Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.43 (2H, td, *J*=8.0; 1.2 Hz; Naftalen H-6 ve H-7), 7.39 (1H, t, *J*=7.6 Hz, Naftalen H-3), 7.17 (1H, d, *J*=6.8 Hz, Naftalen H-2), 7.09 (2H, d, *J*=8.4 Hz, Benzen H-3 ve H-5) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 83)

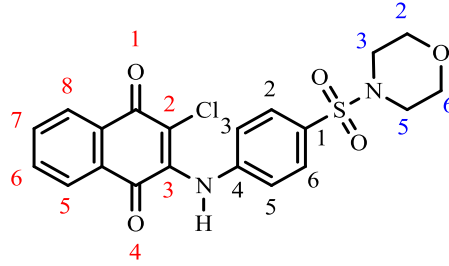
m/z (% bağıl bolluk): 42 (20), 56 (100), 489 (1, M+H⁺), 491 (0.1, M+H+2⁺).

Elementel Analiz: C₂₆H₁₇ClN₂O₄S için M.A.= 488.94 g/mol

Hesaplanan (%): C, 63.87; H, 3.50; N, 5.73; S, 6.56

Bulunan (%): C, 63.74; H, 3.66; N, 5.37; S, 6.39.

4.1.37. 2-kloro-3-((4-(morfolinosülfonil)fenil)amino)naftalen-1,4-dion (NS18)



Verim: %55, Erime Derecesi: 230 °C

IR (Spektrum No 84)

ν_{maks} (FT/ATR): 3281 (Sekonder amin N-H gerilme bandı), 3085 (Aromatik C-H gerilme bandı), 2990, 2876 (Alifatik C-H gerilme bandı), 1682, 1654 (C=O gerilme bandı), 1607, 1588, 1571, 1508 (C=C gerilme bandı), 1405 (-CH₂- gerilme bandı, morfolin), 1344 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1159 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 1134 (C-O-C gerilme bandı, morfolin), 854, 841 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen), 741 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *o*-süstitüe benzen) cm⁻¹.

¹H NMR (Spektrum No 85)

400 MHz, DMSO-*d*₆: δ 9.57 (1H, s, NH-fenil), 8.04 (2H, dd, *J*=7.6; 1.2 Hz, Naftokinon H-5 ve H-8), 7.86 (1H, td, *J*=7.4; 1.5 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.82 (1H, td, *J*=7.4; 1.5 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.62 (2H, d, *J*=8.0 Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.28 (2H, d, *J*=8.0 Hz, Benzen H-3 ve H-5), 3.62 (4H, t, *J*=4.4 Hz, Morfolin CH₂-O-CH₂), 2.85 (4H, t, *J*=4.4 Hz, Morfolin CH₂-N-CH₂) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 86)

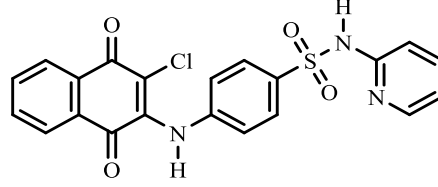
m/z (% bağıl bolluk): 42 (100), 56 (90), 433 (1, M+H⁺), 435 (0.3, M+H+2⁺).

Elementel Analiz: C₂₀H₁₇ClN₂O₅S.0.9 H₂O için M.A.= 449.09 g/mol

Hesaplanan (%): C, 53.49; H, 3.87; N, 6.11; S, 7.00

Bulunan (%): C, 53.14; H, 3.96; N, 5.82; S, 7.02.

4.1.38. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(piridin-2-il)benzensülfonamit (NS19)



Verim: %44, Erime Derecesi: 272 °C; 262 °C (184)

IR (Spektrum No 87)

ν_{maks} (FT/ATR): 3221 (Sülfonamit N-H gerilme bandı), 3085 (Aromatik C-H gerilme bandı) 1683, 1631 (C=O gerilme bandı), 1605, 1574, 1516 (C=C gerilme bandı), 1352 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1135 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 850 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen), 793 (C-H eğilme bandı, piridin) 739 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *o*-süstitüe benzen) cm⁻¹.

¹H NMR (Spektrum No 88)

400 MHz, DMSO-*d*₆: δ 9.44 (1H, bs, NH-fenil), 8.04-8.00 (3H, m, Naftokinon H-5 ve H-8, Piridin H-6), 7.85 (1H, td, *J*=7.4; 1.5 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.80 (1H, td, *J*=7.4; 1.5 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.75 (2H, d, *J*=8.0 Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.72-7.69 (1H, m, Piridin H-5), 7.16 (2H, d, *J*=8.0 Hz, Benzen H-3 ve H-5), 7.17-7.13 (1H, m, Piridin H-3), 6.86 (1H, t, *J*=6.4 Hz, Piridin H-4) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 89)

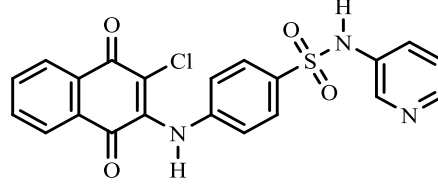
m/z (% bağıl bolluk): 42 (65), 56 (100), 74 (30), 95 (42), 355 (38), 383 (25), 440 (12, M+H⁺), 442 (4, M+H+2⁺).

Elementel Analiz: C₂₁H₁₄ClN₃O₄S.0.3 H₂O için M.A.= 445.27 g/mol

Hesaplanan (%): C, 56.64; H, 3.30; N, 9.44; S, 7.20

Bulunan (%): C, 56.27; H, 3.43; N, 9.30; S, 6.88.

4.1.39. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(piridin-3-il)benzensülfonamit (NS20)



Verim: %10, Erime Derecesi: 267 °C

IR (Spektrum No 90)

ν_{maks} (FT/ATR): 3239 (Sülfonamit N-H gerilme bandı), 3047, 2916, 2850 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1730, 1671 (C=O gerilme bandı), 1650, 1588, 1568, 1508 (C=C gerilme bandı), 1347 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1160 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 850 (C-H düzlem dışı eğilme, *p*-disüstitüe benzen), 807 (C-H eğilme bandı, piridin) cm⁻¹.

¹H NMR (Spektrum No 91)

400 MHz, DMSO-*d*₆: δ 10.37 (1H, bs, SO₂NH), 9.48 (1H, bs, NH-fenil), 8.25-8.21 (1H, m, Piridin H-2), 8.04-8.01 (2H, m, Naftokinon H-5 ve H-8), 7.86 (1H, td, *J*=7.4; 1.5 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.83 (1H, td, *J*=7.4; 1.5 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.79-7.76 (1H, m, Piridin H-6), 7.62 (2H, d, *J*=8.8 Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.50-7.46 (1H, m, Piridin H-4), 7.29-7.25 (1H, m, Piridin H-5), 7.16 (2H, d, *J*=8.8 Hz, Benzen H-3 ve H-5) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 92)

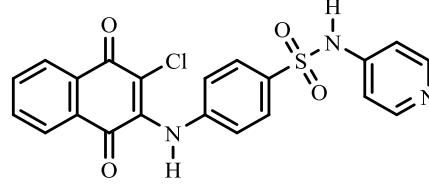
m/z (% bağıl bolluk): 215 (16), 273 (19), 349 (27), 393 (23), 406 (100), 440 (40, M+H⁺), 442 (17, M+H+2⁺).

Elementel Analiz: C₂₁H₁₄ClN₃O₄S.1.1 C₂H₆O için M.A.= 490.55 g/mol

Hesaplanan (%): C, 56.81; H, 4.23; N, 8.57; S, 6.54

Bulunan (%): C, 56.47; H, 4.43; N, 8.30; S, 6.88.

4.1.40. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(piridin-4-il)benzensülfonamit (NS21)



Verim: %8, Erime Derecesi: >300 °C

IR (Spektrum No 93)

ν_{maks} (FT/ATR): 3235 (Sülfonamit N-H gerilme bandı), 3085, 2922, 2852 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1685, 1636 (C=O gerilme bandı), 1605, 1568, 1509 (C=C gerilme bandı), 1349 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1133 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 838 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen), 780 (C-H eğilme bandı, *p*-süstitüe piridin) 739 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *o*-süstitüe benzen) cm⁻¹.

¹H NMR (Spektrum No 94)

400 MHz, DMSO-*d*₆: δ 8.40 (2H, d, *J*=7.2 Hz, Piridin H-2 ve H-6), 7.98 (1H, dd, *J*=7.6; 1.2 Hz, Naftokinon H-5 veya H-8), 7.90 (1H, dd, *J*=7.6; 1.2 Hz, Naftokinon H-5 veya H-8), 7.77 (1H, td, *J*=7.5; 1.4 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.65 (1H, td, *J*=7.5; 1.4 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.62 (2H, d, *J*=8.8 Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.42 (1H, d, *J*=7.2 Hz, Piridin H-3 ve H-5), 6.64 (2H, d, *J*=8.8 Hz, Benzen H-3 ve H-5) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 95)

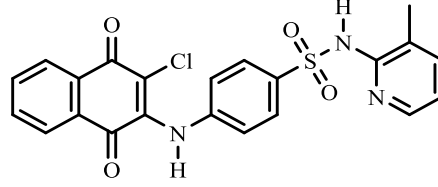
m/z (% bağıl bolluk): 215 (100), 273 (47), 349 (37), 393 (42), 440 (28, M+H⁺), 442 (9, M+H+2⁺).

Elementel Analiz: C₂₁H₁₄ClN₃O₄S. 1.2 C₂H₆O için M.A.= 461.49 g/mol

Hesaplanan (%): C, 56.76; H, 4.32; N, 8.49; S, 6.47

Bulunan (%): C, 56.70; H, 4.23; N, 8.57; S, 6.41.

4.1.41. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(3-metil-piridin-2-il)benzensülfonamit (NS22)



Verim: %54, Erime Derecesi: 284 °C

IR (Spektrum No 96)

ν_{maks} (FT/ATR): 3329, 3259 (Sekonder amin ve sülfonamit N-H gerilme bandı), 2972 (Aromatik C-H gerilme bandı), 2884 (Alifatik C-H gerilme bandı), 1671, 1646 (C=O gerilme bandı), 1607 (C=N gerilme bandı, piridin), 1592, 1568, 1510 (C=C gerilme bandı), 1329 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1163 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 834 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen), 797, 788 (C-H eğilme bandı, 1,2,3-trisüstitüe piridin), 739 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *o*-süstitüe benzen) cm⁻¹.

¹H NMR (Spektrum No 97)

400 MHz, DMSO-*d*₆: δ 9.44 (1H, bs, NH-fenil), 8.03 (1H, dd, *J*=7.6; 1.2 Hz, Naftokinon H-5 veya H-8), 8.02 (1H, dd, *J*=7.6; 1.2 Hz, Naftokinon H-5 veya H-8), 7.86 (1H, td, *J*=7.4; 1.5 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.83-7.78 (1H, m, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.79 (2H, d, *J*=8.0 Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.61-7.59 (2H, m, Piridin H-4 ve H-6), 7.17 (2H, d, *J*=8.0 Hz, Benzen H-3 ve H-5), 6.83-6.75 (1H, m, Piridin H-5), 2.11 (3H, s, CH₃) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 98)

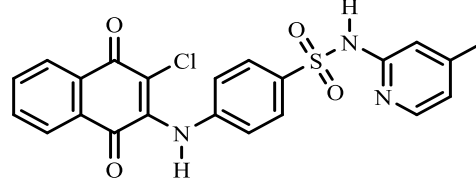
m/z (% bağıl bolluk): 64 (42), 56 (100), 109 (39), 182 (23), 355 (17), 454 (27, M+H⁺), 456 (9, M+H+2⁺).

Elementel Analiz: C₂₂H₁₆ClN₃O₄S.0.55 H₂O için M.A.= 463.81 g/mol

Hesaplanan (%): C, 56.97; H, 3.72; N, 9.06; S, 6.91

Bulunan (%): C, 56.53; H, 3.68; N, 8.70; S, 7.38.

4.1.42. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(4-metilpiridin-2-il)benzensülfonamit (NS23)



Verim: %51, Erime Derecesi: 283 °C

IR (Spektrum No 99)

ν_{maks} (FT/ATR): 3270 (Sülfonamit N-H gerilme bandı), 3047 (Aromatik C-H gerilme bandı), 2917 (Alifatik C-H gerilme bandı), 1681, 1632 (C=O gerilme bandı), 1595, 1567, 1511 (C=C gerilme bandı), 1332 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1145 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 853 (C-H düzlem dışı eğilme, *p*-disüstitüe benzen), 804, 783 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, 1,2,3-trisüstitüe piridin), 745 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *o*-süstitüe benzen) cm⁻¹.

¹H NMR (Spektrum No 100)

400 MHz, DMSO-*d*₆: δ 9.46 (1H, bs, NH-fenil), 8.02 (1H, dd, *J*=7.6; 1.2 Hz, Naftokinon H-5 veya H-8), 8.01 (1H, dd, *J*=7.6; 1.2 Hz, Naftokinon H-5 veya H-8), 7.85 (1H, td, *J*=7.4; 1.5 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.82-7.78 (2H, m, Naftokinon H-6 ve H-7, Piridin H-6), 7.74 (2H, d, *J*=8.4 Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.16 (2H, d, *J*=8.8 Hz, Benzen H-3 ve H-5), 6.97 (1H, s, Piridin H-3), 6.66 (1H, d, *J*=4.8 Hz, Piridin H-5), 2.22 (3H, s, CH₃) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 101)

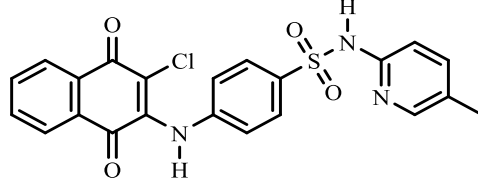
m/z (% bağıl bolluk): 42 (100), 56 (54), 83 (44), 355 (10), 383 (8), 454 (6, M+H⁺), 456 (2, M+H+2⁺).

Elementel Analiz: C₂₂H₁₆ClN₃O₄S.0.6 H₂O için M.A.= 464.71 g/mol

Hesaplanan (%): C, 56.86; H, 3.73; N, 9.04; S, 6.90

Bulunan (%): C, 56.46; H, 3.78; N, 8.61; S, 6.50.

4.1.43. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(5-metilpiridin-2-il)benzensülfonamid (NS24)



Verim: %48, Erime Derecesi: 223 °C

IR (Spektrum No 102)

ν_{maks} (FT/ATR): 3268 (Sülfonamid N-H gerilme bandı), 2985 (Aromatik C-H gerilme bandı), 2907 (Alifatik C-H gerilme bandı), 1679, 1638 (C=O gerilme bandı), 1592, 1561, 1534, 1508 (C=C gerilme bandı), 1365 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1133 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 852 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen), 825 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, 1,2,4-trisüstitüe piridin), 751 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *o*-süstitüe benzen) cm⁻¹.

¹H NMR (Spektrum No 103)

400 MHz, DMSO-*d*₆: δ 9.46 (1H, bs, NH-fenil), 8.02 (1H, dd $J=7.6$; 1.2 Hz, Naftokinon H-5 veya H-8), 8.01 (1H, dd, $J=7.6$; 1.2, Naftokinon H-5 veya H-8), 7.86 (1H, td, $J=7.4$; 1.5 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.88-7.86 (1H, m, Piridin H-6), 7.82 (1H, td, $J=7.4$; 1.5 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.72 (2H, d, $J=8.8$ Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.53 (1H, dd, $J=8.8$; 2.4 Hz, Piridin H-4), 7.15 (2H, d, $J=8.8$ Hz, Benzen H-3 ve H-5), 7.06 (1H, d, $J=8.8$ Hz, Piridin H-3), 2.12 (3H, s, CH₃) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 104)

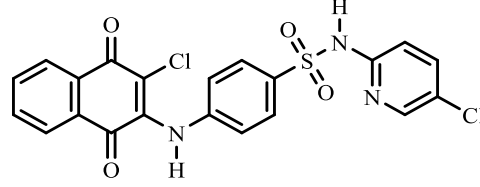
m/z (% bağıl bolluk): 56 (100), 83 (25), 109 (56), 284 (23), 355 (25), 454 (35, M+H⁺), 456 (14, M+H+2⁺).

Elementel Analiz: C₂₂H₁₆ClN₃O₄S için M.A.= 453.90 g/mol

Hesaplanan (%): C, 58.21; H, 3.55; N, 9.26; S, 7.06

Bulunan (%): C, 57.99; H, 3.59; N, 9.21; S, 7.31.

4.1.44. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(5-kloropiridin-2-il)benzensülfonamit (NS25)



Verim: %53, Erime Derecesi: 230 °C

IR (Spektrum No 105)

ν_{maks} (FT/ATR): 3336, 3228 (Sekonder amin ve sülfonamit N-H gerilme bandı), 3039, 2889 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1667, 1608 (C=O gerilme bandı), 1588, 1572 (C=C gerilme bandı), 1335 (-SO₂- asimetrik gerilme bandı), 1159 (-SO₂- simetrik gerilme bandı), 857 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen), 795 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, 1,2,3-trisüstitüe piridin), 738 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *o*-süstitüe benzen) cm⁻¹.

¹H NMR (Spektrum No 106)

400 MHz, DMSO-*d*₆: δ 11.14 (1H, bs, SO₂NH), 9.51 (1H, bs, NH-fenil), 8.20 (1H, d, *J*=2.4 Hz, Piridin H-6), 8.03 (1H, dd, *J*=7.6; 1.2 Hz, Naftokinon H-5 veya H-8), 8.02 (1H, dd, *J*=7.6; 1.2 Hz, Naftokinon H-5 veya H-8), 7.86 (1H, td, *J*=7.4; 1.5 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.83-7.76 (2H, m, Nafokinon H-6 veya H-7, Piridin H-4), 7.77 (2H, d, *J*=8.8 Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.17 (2H, d, *J*=8.8 Hz, Benzen H-3 ve H-5), 7.08 (1H, d, *J*=8.8 Hz, Piridin H-3) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 107)

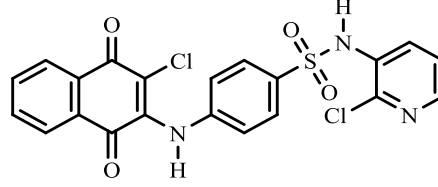
m/z (% bağıl bolluk): 42 (100), 56 (80), 83 (22), 115 (12), 248 (10), 283 (12), 323 (9), 474 (6, M+H⁺), 476 (4, M+H+2⁺), 478 (2, M+H+4⁺).

Elementel Analiz: C₂₁H₁₃Cl₂N₃O₄S.1.05 H₂O.0.51 CH₄O için M.A.= 509.57 g/mol

Hesaplanan (%): C, 50.70; H, 3.39; N, 8.25; S, 6.29

Bulunan (%): C, 50.84; H, 2.91; N, 7.94; S, 5.80.

4.1.45. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(2-kloropiridin-3-il)benzensülfonamit (NS26)



Verim: %51, Erime Derecesi: 282 °C

IR (Spektrum No 108)

ν_{maks} (FT/ATR): 3256 (Sülfonamit N-H gerilme bandı), 3085, 2857 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1670, 1646 (C=O gerilme bandı), 1591, 1567, 1504 (C=C gerilme bandı), 1331 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1163 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 850 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disübstitüe benzen), 811, 791 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, 1,2,3-trisübstitüe piridin), 749 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *o*-sübstitüe benzen) cm⁻¹.

¹H NMR (Spektrum No 109)

400 MHz, DMSO-*d*₆: δ 9.53 (1H, bs, NH-fenil), 8.20 (1H, dd, *J*=4.4; 1.6 Hz, Piridin H-6), 8.03 (2H, dd, *J*=7.8; 1.6 Hz, Naftokinon H-5 ve H-8), 7.86 (1H, td, *J*=7.6; 1.2 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.81 (1H, td, *J*=7.6; 1.2 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.72 (1H, dd, *J*=8.0; 1.6 Hz, Piridin H-4), 7.58 (2H, d, *J*=8.0 Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.4 (1H, dd, *J*=8.0; 4.8 Hz, Piridin H-5), 7.17 (2H, d, *J*=8.0 Hz, Benzen H-3 ve H-5) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 110)

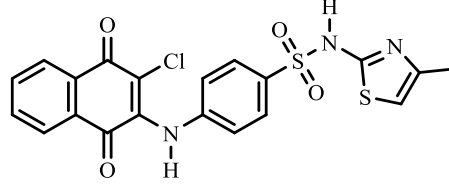
m/z (% bağıl bolluk): 42 (38), 56 (100), 83 (46), 474 (1, M+H⁺), 476 (0.3, M+H+2⁺), 478 (0.6, M+H+4⁺).

Elementel Analiz: C₂₁H₁₃ClN₃O₄S.2 H₂O için M.A.= 510.34 g/mol

Hesaplanan (%): C, 49.42; H, 3.36; N, 8.23; S, 6.28

Bulunan (%): C, 49.47; H, 2.94; N, 7.80; S, 6.24.

4.1.46. 4-((3-kloro-1,4-diyokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(4-metiltiyazol-2-il)benzenesülfonamit (NS28)



Verim: %49, Erime Derecesi: 271 °C

IR (Spektrum No 111)

ν_{maks} (FT/ATR): 3328, 3224 (Sekonder amin ve sülfonamit N-H gerilme bandı), 3085 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1677, 1650 (C=O gerilme bandı), 1571, 1518 (C=C gerilme bandı), 1386 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1140 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 888 (C-H eğilme bandı, tiyazol), 852, 840 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen), 735 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *o*-süstitüe benzen) cm⁻¹.

¹H NMR (Spektrum No 112)

400 MHz, DMSO-*d*₆: δ 12.56 (1H, bs, SO₂NH), 9.45 (1H, s, NH-fenil), 8.02 (2H, dd, *J*= 7.2; 1.2, Naftokinon H-5 ve H-8), 7.86 (1H, td, *J*= 7.4; 1.5 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.81 (1H, td, *J*= 7.4; 1.5 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.67 (2H, d, *J*= 8.8 Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.17 (2H, d, *J*= 8.8 Hz, Benzen H-3 ve H-5), 6.36 (1H, s, Tiyazol H-4), 2.06 (3H, s, CH₃) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 113)

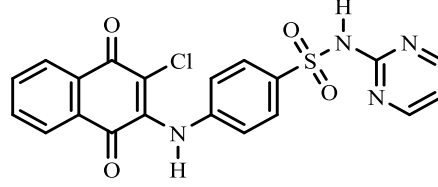
m/z (% bağıl bolluk): 42 (73), 56 (100), 115 (73), 323 (26), 460 (18, M+H⁺), 462 (6, M+H+2⁺)

Elementel Analiz: C₂₀H₁₄ClN₃O₄S₂·0.5 H₂O için M.A.= 468.93 g/mol

Hesaplanan (%): C, 51.23; H, 3.22; N, 8.96; S, 13.68

Bulunan (%): C, 51.20; H, 3.49; N, 8.56; S, 13.40.

4.1.47. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(pirimidin-2-il)benzensülfonamit (NS29)



Verim: %35, Erime Derecesi: >300 °C; 262 (dekompoze) (184)

IR (Spektrum No 114)

ν_{maks} (FT/ATR): 3291 (Sülfonamit N-H gerilme bandı), 3028 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1677, 1651 (C=O gerilme bandı), 1584, 1572, (C=C gerilme bandı), 1337 (-SO₂- asimetrik gerilme bandı), 1151 (-SO₂- simetrik gerilme bandı), 945 (S-N gerilme bandı), 850 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen), 798 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, 1,2,3-trisüstitüe pirimidin), 736 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *o*-süstitüe benzen) cm⁻¹.

¹H NMR (Spektrum No 115)

400 MHz, DMSO-*d*₆: δ 11.63 (1H, bs, SO₂NH), 9.48 (1H, s, NH-fenil), 8.49 (2H, d, *J*=4.8 Hz, Pirimidin H-4 ve H-6), 8.03 (1H, dd, *J*=7.6; 1.2 Hz, Naftokinon H-5 veya H-8), 8.02 (1H, dd, *J*=7.6; 1.2 Hz, Naftokinon H-5 veya H-8), 7.88-7.84 (1H, m, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.85 (2H, d, *J*=8.4 Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.81 (1H, td, *J*=7.6; 1.2 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.19 (2H, d, *J*=8.4 Hz, Benzen H-3 ve H-5), 7.03 (1H, t, *J*=4.8 Hz, Pirimidin H-5) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 116)

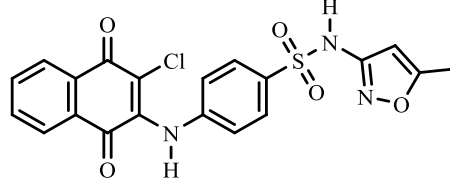
m/z (% bağıl bolluk): 42 (100), 56 (83), 83 (26), 355 (20), 383 (30), 441 (8, M+H⁺), 443 (3, M+H+2⁺)

Elementel Analiz: C₂₀H₁₃ClN₄O₄S.0.65 H₂O için M.A.= 452.57 g/mol

Hesaplanan (%): C, 53.08; H, 3.19; N, 12.38; S, 7.08

Bulunan (%): C, 53.43; H, 3.58; N, 12.70; S, 7.38.

4.1.48. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(5-metilizoksazol-3-il)benzensülfonamid (NS30)



Verim: %6, Erime Derecesi: 223 °C; 215-217 °C (42)

IR (Spektrum No 117)

ν_{maks} (FT/ATR): 3256 (Sülfonamid N-H gerilme bandı), 3066 (Aromatik C-H gerilme bandı), 2971 (Alifatik C-H gerilme bandı), 1672, 1646 (C=O gerilme bandı), 1587, 1567, 1513 (C=C gerilme bandı), 1328 (-SO₂- asimetric gerilme bandı), 1237 (N-O gerilme bandı), 1161 (-SO₂- simetric gerilme bandı), 869 (C-H eğilme bandı, izoksazol), 849 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen), 737 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *o*-süstitüe benzen) cm⁻¹.

¹H NMR (Spektrum No 118)

400 MHz, DMSO-*d*₆: δ 11.27 (1H, bs, SO₂NH), 9.50 (1H, s, NH-fenil), 8.04 (1H, dd, *J*=7.2; 1.6 Hz, Naftokinon H-5 veya H-8), 8.02 (1H, dd, *J*=7.2; 1.6 Hz, Naftokinon H-5 veya H-8), 7.87 (1H, td, *J*=7.4; 1.5 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.82 (1H, td, *J*=7.4; 1.5 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.71 (2H, d, *J*=8.8 Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.20 (2H, d, *J*=8.8 Hz, Benzen H-3 ve H-5), 6.12 (1H, s, İzoksazol H-4), 2.28 (3H, s, CH₃) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 119)

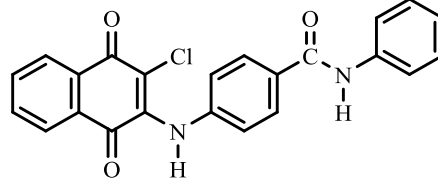
m/z (% bağıl bolluk): 42 (99), 56 (100), 83 (25), 355 (16), 444 (10, M+H⁺), 446 (3, M+H+2⁺)

Elementel Analiz: C₂₀H₁₄ClN₃O₅S.0.3 H₂O için M.A.= 449.26 g/mol

Hesaplanan (%): C, 53.47; H, 3.28; N, 9.35; S, 7.14

Bulunan (%): C, 53.03; H, 3.21; N, 9.33; S, 7.26.

4.1.49. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-*N*-fenilbenzamid
(NK1)



Verim: %40, Erime Derecesi: 304 °C

IR (Spektrum No 120)

ν_{maks} (FT/ATR): 3239 (Sekonder amin ve karboksamid N-H gerilme bandı), 3066 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1673, 1644 (C=O gerilme ve Amit I bandı), 1595, 1569, 1512, 1486 (C=C gerilme bandı ve amit II bandı), 1288 (C-N gerilme bandı), 854 (C-H düzlem dışı eğilme, *p*-disüstitüe benzen), 749 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *o*-süstitüe benzen), 691 (C-H düzlem dışı eğilme, monosüstitüiebenzen) cm^{-1} .

^1H NMR (Spektrum No 121)

400 MHz, DMSO- d_6 : δ 10.12 (1H, s, CONH), 9.46 (1H, s, NH-fenil), 8.04 (2H, dt, $J=8.0$; 1.6 Hz, Naftokinon H-5 ve H-8), 7.90 (2H, d, $J=8.0$ Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.86-7.79 (2H, m, Naftokinon H-6 ve H-7), 7.75 (2H, d, $J=8.0$ Hz, Fenil H-2 ve H-6), 7.32 (2H, t, $J=8.0$ Hz, Fenil H-3 ve H-5), 7.20 (2H, d, $J=8.0$ Hz, Benzen H-3 ve H-5), 7.07 (1H, t, $J=7.6$ Hz, Fenil H-4) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 122)

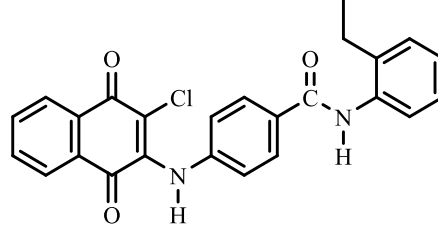
m/z (% bağıl bolluk): 42(100), 56 (38), 310 (52), 403 (25, $\text{M}+\text{H}^+$), 405 (9, $\text{M}+\text{H}+2^+$)

Elementel Analiz: $\text{C}_{23}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O} \cdot 0.5 \text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ için M.A.= 425.87 g/mol

Hesaplanan (%): C, 68.02; H, 3.99; N, 6.84

Bulunan (%): C, 67.75; H, 4.39; N, 6.88.

**4.1.50. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(2-
etilfenil)benzamid (NK2)**



Verim: %34, Erime Derecesi: 279 °C

IR (Spektrum No 123)

ν_{maks} (FT/ATR): 3276, 3211 (Sekonder amin ve karboksamid N-H gerilme bandı), 3047 (Aromatik C-H gerilme bandı), 2967 (Alifatik C-H gerilme bandı), 1676, 1642 (C=O gerilme ve Amit I bandı), 1598, 1569, 1513, 1495 (C=C gerilme bandı ve amit II bandı), 1291 (C-N gerilme bandı), 854 (C-H düzlemdışı eğilme, *p*-disüstitüe benzen), 766 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *o*-süstitüe benzen) cm^{-1} .

^1H NMR (Spektrum No 124)

400 MHz, DMSO- d_6 : δ 9.81 (1H, s, CONH), 9.45 (1H, s, NH-fenil), 8.04 (2H, d, $J=8.0$ Hz, Naftokinon H-5 ve H-8), 7.91 (2H, d, $J=8.0$ Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.89-7.80 (2H, m, Naftokinon H-6 ve H-7), 7.28-7.26 (2H, m, Fenil H-4 ve H-5), 7.22-7.19 (4H, m, Benzen H-3 ve H-5, Fenil H-3 ve H-6), 2.61 (2H, q, $J=7.6$ Hz, -CH₂-), 1.12 (3H, t, $J=7.6$ Hz, CH₃) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 125)

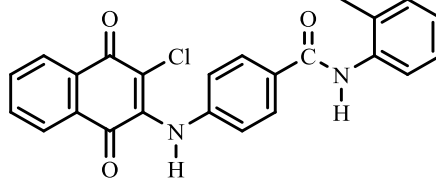
m/z (% bağıl bolluk): 42 (100), 56 (30), 310 (3), 431 (1, $M+H^+$), 433 (0.3, $M+H+2^+$)

Elementel Analiz: C₂₅H₁₉ClN₂O₃.H₂O için M.A.= 448.90 g/mol

Hesaplanan (%): C, 61.73; H, 4.10; N, 6.10

Bulunan (%): C, 61.74; H, 4.18; N, 5.73.

4.1.51. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(2-metilfenil)benzamid (NK4)



Verim: %40, Erime Derecesi: 303 °C

IR (Spektrum No 126)

ν_{maks} (FT/ATR): 3219 (Sekonder amin ve karboksamid N-H gerilme bandı), 3066 (Aromatik C-H gerilme bandı), 2971 (Alifatik C-H gerilme bandı), 1675, 1639 (C=O gerilme ve Amit I bandı), 1598, 1568, 1512, 1493 (C=C gerilme bandı, amit II bandı), 1451, 1407 (CH₃ asimetrik ve simetrik gerilme bandı), 1290 (C-N gerilme bandı), 855 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen), 745 (C-H düzlem dışı eğilme, *o*-süstitüe benzen) cm⁻¹.

¹H NMR (Spektrum No 127)

400 MHz, DMSO-*d*₆: δ 9.79 (1H, s, CONH), 9.45 (1H, s, NH-fenil), 8.04 (2H, d, *J*=8.0 Hz, Naftokinon H-5 ve H-8), 7.92 (2H, d, *J*=8.0 Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.89-7.79 (2H, m, Naftokinon H-6 ve H-7), 7.31 (1H, dd, *J*=7.6; 1.4 Hz, Fenil H-6), 7.25 (1H, dd, *J*=7.2; 1.6 Hz, Fenil H-3), 7.21-7.12 (4H, m, Benzen H-3 ve H-5, Fenil H-4 ve H-5), 2.22 (3H, s, CH₃) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 128)

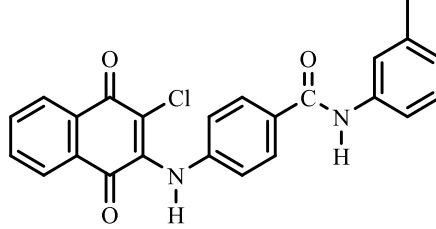
m/z (% bağıl bolluk): 42 (54), 120 (100), 417 (1, M+H⁺), 419 (0.3, M+H+2⁺)

Elementel Analiz: C₂₄H₁₇ClN₂O₃·0.6 H₂O için M.A.= 422.67 g/mol

Hesaplanan (%): C, 67.40; H, 4.29; N, 6.55

Bulunan (%): C, 67.66; H, 4.69; N, 6.51.

4.1.52. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(3-metilfenil)benzamid (NK5)



Verim: %46, Erime Derecesi: 261 °C

IR (Spektrum No 129)

ν_{maks} (FT/ATR): 3227 (Sekonder amin ve karboksamid N-H gerilme bandı), 3066 (Aromatik C-H gerilme bandı), 2971 (Alifatik C-H gerilme bandı), 1674, 1641 (C=O gerilme ve amit I bandı), 1593, 1567, 1530, 1512, 1489 (C=C gerilme bandı ve amit II bandı), 1436, 1407 (CH₃ asimetric ve simetric gerilme bandı), 1288 (C-N gerilme bandı), 851 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen), 785, 775 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *m*-süstitüe benzen) cm⁻¹.

¹H NMR (Spektrum No 130)

400 MHz, DMSO-*d*₆: δ 10.08 (1H, s, CONH), 9.45 (1H, s, NH-fenil), 8.04 (2H, dd, *J*=8.0; 1.2 Hz, Naftokinon H-5 ve H-8), 7.90 (2H, d, *J*=8.0 Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.87-7.79 (2H, m, Naftokinon H-6 ve H-7), 7.61 (1H, s, Fenil H-2), 7.56 (1H, d, *J*=8.0 Hz, Fenil H-6), 7.21-7.17 (1H, m, Fenil H-5), 7.19 (2H, d, *J*=8.0 Hz, Benzen H-3 ve H-5), 6.89 (1H, d, *J*=8.0 Hz, Fenil H-4), 2.28 (3H, s, CH₃) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 131)

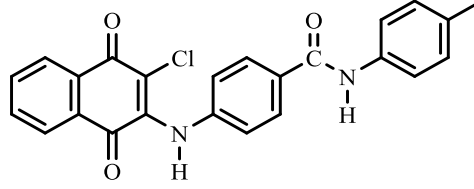
m/z (% bağıl bolluk): 42 (37), 56 (100), 65 (26), 93 (82), 106 (96), 132 (95), 149 (63), 310 (15), 417 (4, M+H⁺), 419 (1, M+H+2⁺)

Elementel Analiz: C₂₄H₁₇ClN₂O₃.1.1 C₂H₆O için M.A.= 467.54 g/mol

Hesaplanan (%): C, 67.31; H, 5.09; N, 5.99

Bulunan (%): C, 67.07; H, 5.49; N, 6.33.

4.1.53. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(p-tolil)benzamid (NK6)



Verim: %20, Erime Derecesi: 261 °C

IR (Spektrum No 132)

ν_{maks} (FT/ATR): 3220 (Sekonder amin ve karboksamid N-H gerilme bandı), 3066 (Aromatik C-H gerilme bandı), 2990 (Alifatik C-H gerilme bandı), 1675, 1640 (C=O gerilme ve amit I bandı), 1594, 1567, 1531, 1511, 1491 (C=C gerilme bandı ve amit II bandı), 1409 (CH₃ simetrik gerilme bandı), 1290 (C-N gerilme bandı), 855 (C-H düzlem dışı eğilme, *p*-disüstitüe benzen) cm⁻¹.

¹H NMR (Spektrum No 133)

400 MHz, DMSO-*d*₆: δ 10.06 (1H, s, CONH), 9.45 (1H, s, NH-fenil), 8.04 (2H, d, *J*=7.6 Hz, Naftokinon H-5 ve H-8), 7.88 (2H, d, *J*=8.4 Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.89-7.79 (2H, m, Naftokinon H-6 ve H-7), 7.63 (2H, d, *J*=8.4 Hz, Fenil H-2 ve H-6), 7.19 (2H, d, *J*=8.4 Hz, Benzen H-3 ve H-5), 7.13 (2H, d, *J*=8.4 Hz, Fenil H-3 ve H-5), 2.26 (3H, s, CH₃) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 134)

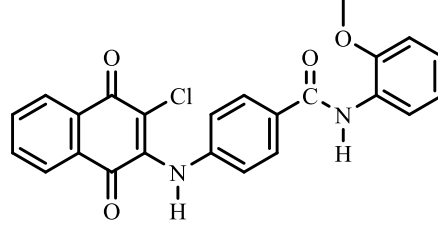
m/z (% bağıl bolluk): 42 (80), 56 (100), 74 (24), 203 (35), 310 (53), 417 (13, M+H⁺), 419 (3, M+H+2⁺)

Elementel Analiz: C₂₄H₁₇ClN₂O₃·0.1 C₂H₆O·2 H₂O için M.A.= 425.07 g/mol

Hesaplanan (%): C, 63.53; H, 4.76; N, 6.12

Bulunan (%): C, 63.68; H, 4.45; N, 6.33.

4.1.54. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(2-metoksifenil)benzamid (NK7)



Verim: %27, Erime Derecesi: 234 °C

IR (Spektrum No 135)

ν_{maks} (FT/ATR): 3214 (Sekonder amin ve karboksamid N-H gerilme bandı), 3000 (Aromatik C-H gerilme bandı), 2838 (Alifatik C-H gerilme bandı), 1675, 1648 (C=O gerilme ve Amit I bandı), 1596, 1567, 1493 (C=C gerilme bandı ve amit II bandı), 1290 (C-N gerilme bandı), 1264 (C-O-C asimetrik gerilme bandı), 857 (C-H düzlemdışı eğilme, *p*-disüstitüe benzen), 765, 748 (C-H düzlem dışı eğilme, *o*-süstitüe benzen) cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (Spektrum No 136)

400 MHz, DMSO- d_6 : δ 9.47 (1H, s, CONH), 9.33 (1H, s, NH-fenil), 8.04 (2H, d, $J=8.0$ Hz, Naftokinon H-5 ve H-8), 7.89 (2H, d, $J=8.4$ Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.87-7.79 (2H, m, Naftokinon H-6 ve H-7), 7.76 (1H, dd, $J=8.0$; 1.6 Hz, Fenil H-6), 7.19 (2H, d, $J=8.4$ Hz, Benzen H-3 ve H-5), 7.15 (1H, td, $J=7.6$; 1.2 Hz, Fenil H-5), 7.07 (1H, d, $J=7.6$ Hz, Fenil H-3), 6.94 (1H, t, $J=7.6$ Hz, Fenil H-4), 3.82 (3H, s, OCH₃) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 137)

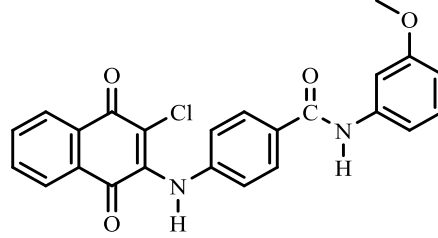
m/z (% bağıl bolluk): 42 (828), 56 (34), 59 (100), 100 (22), 433 (1, M+H⁺), 435 (0.3, M+H+2⁺)

Elementel Analiz (%): C₂₄H₁₇ClN₂O₄.0.05 CH₄O için M.A.= 433.76 g/mol

Hesaplanan (%): C, 66.46; H, 3.97; N, 6.46

Bulunan (%): C, 66.37; H, 4.26; N, 6.11.

4.1.55. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(3-metoksifenil)benzamid (NK8)



Verim: %33, Erime Derecesi: 257 °C

IR (Spektrum No 138)

ν_{maks} (FT/ATR): 3228 (Sekonder amin ve karboksamid N-H gerilme bandı), 3046 (Aromatik C-H gerilme bandı), 2957 (Alifatik C-H gerilme bandı), 1673, 1642 (C=O gerilme ve Amit I bandı), 1592, 1567, 1532, 1511, 1493, 1488 (C=C gerilme bandı ve amit II bandı), 1289 (C-N gerilme bandı), 1253 (C-O-C asimetrik gerilme bandı), 852 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen), 776 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *m*-disüstitüe benzen) cm^{-1} .

^1H NMR (Spektrum No 139)

400 MHz, DMSO- d_6 : δ 10.09 (1H, s, CONH), 9.45 (1H, s, NH-fenil), 8.04 (2H, dd, $J=7.6$; 1.6 Hz, Naftokinon H-5 ve H-8), 7.88 (2H, d, $J=8.0$ Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.85-7.79 (2H, m, Naftokinon H-6 ve H-7), 7.45 (1H, d, $J=2.0$ Hz, Fenil H-2), 7.35 (1H, d, $J=8.4$, Fenil H-6), 7.24-7.19 (1H, m, Fenil H-5), 7.20 (2H, d, $J=8.0$ Hz, Benzen H-3 ve H-5), 6.65 (1H, d, $J=8.0$ Hz, Fenil H-4), 3.73 (3H, s, OCH₃) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 140)

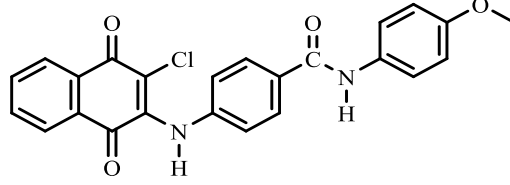
m/z (% bağıl bolluk): 42 (43), 56 (79), 124 (840), 310 (100), 433 (18, M+H⁺), 435 (4, M+H+2⁺)

Elementel Analiz: C₂₄H₁₇ClN₂O₄.0.2 H₂O için M.A.= 436.46 g/mol

Hesaplanan (%): C, 66.54; H, 4.02; N, 6.42

Bulunan (%): C, 65.81; H, 4.41; N, 6.05.

4.1.56. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(4-metoksifenil)benzamid (NK9)



Verim: %29, Erime Derecesi: 254 °C

IR (Spektrum No 141)

ν_{maks} (FT/ATR): 3264, 3221 (Sekonder amin ve karboksamid N-H gerilme bandı), 3047 (Aromatik C-H gerilme bandı), 2952 (Alifatik C-H gerilme bandı), 1675, 1637 (C=O gerilme ve Amit I bandı), 1596, 1566, 1532, 1510, 1492 (C=C gerilme bandı ve Amit II bandı), 1293 (C-N gerilme bandı), 1248 (C-O-C asimetrik gerilme bandı), 827 (C-H düzlem dışı eğilme, *p*-disüstitüe benzen) cm^{-1} .

^1H NMR (Spektrum No 142)

400 MHz, DMSO- d_6 : δ 10.04 (1H, s, CONH), 9.47 (1H, s, NH-fenil), 8.04 (2H, dd, $J=8.0$; 1.0 Hz, Naftokinon H-5 ve H-8), 7.88 (2H, d, $J=8.8$ Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.88-7.81 (2H, m, Naftokinon H-6 ve H-7), 7.65 (2H, d, $J=9.2$ Hz, Fenil H-2 ve H-6), 7.19 (2H, d, $J=8.8$ Hz, Benzen H-3 ve H-5), 6.90 (2H, d, $J=9.2$, Fenil H-3 ve H-5), 3.72 (3H, s, OCH₃) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 143)

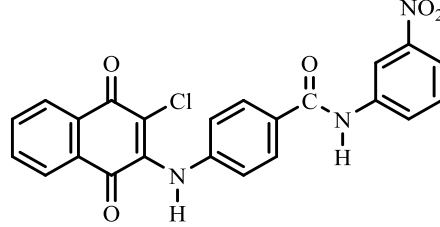
m/z (% bağıl bolluk): 42 (36), 56 (100), 83 (10), 433 (1, $M+H^+$), 435 (0.6, $M+H+2^+$)

Elementel Analiz: C₂₄H₁₇ClN₂O₄.1.8 H₂O için M.A.= 465.29 g/mol

Hesaplanan (%): C, 61.95; H, 4.46; N, 6.02

Bulunan (%): C, 61.73; H, 4.08; N, 5.91.

4.1.57. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(3-nitrofenil)benzamid (NK11)



Verim: %9, Erime Derecesi: 297 °C

IR (Spektrum No 144)

ν_{maks} (FT/ATR): 3390, 3227 (Sekonder amin ve karboksamid N-H gerilme bandı), 3085 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1671, 1648 (C=O gerilme ve Amit I bandı), 1594, 1574, 1545 (C=C gerilme bandı ve Amit II bandı), 1514 (-NO₂ asimetric gerilme bandı), 1331 (-NO₂ simetrik gerilme bandı), 1286, 1242 (C-N gerilme bandı), 852 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen), 758 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *m*-süstitüe benzen) cm⁻¹.

¹H NMR (Spektrum No 145)

400 MHz, DMSO-*d*₆: δ 10.60 (1H, s, CONH), 9.51 (1H, s, NH-fenil), 8.79 (1H, t, *J*=1.2 Hz, Fenil H-2), 8.19 (1H, dd, *J*=8.0; 1.0 Hz, Fenil H-4), 8.05 (2-H, dt, *J*=8.0; 1.4 Hz, Naftokinon H-5 ve H-8), 7.94 (2H, d, *J*=8.0 Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.95-7.91 (1H, m, Fenil H-6), 7.87 (1H, td, *J*=7.6; 1.6 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.82 (1H, td, *J*=7.6; 1.6 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.64 (1H, t, *J*=8.0 Hz, Fenil H-5), 7.23 (2H, d, *J*=8.0 Hz, Benzen H-3 ve H-5) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 146)

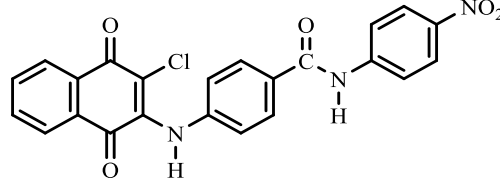
m/z (% bağıl bolluk): 44 (100), 446 (53, M-H⁻), 448 (M-H+2⁻)

Elementel Analiz: C₂₃H₁₄ClN₃O₅·0.68 H₂O için M.A.= 460.08 g/mol

Hesaplanan (%): C, 60.04; H, 3.37; N, 9.13

Bulunan (%): C, 60.17; H, 3.47; N, 8.73.

4.1.58. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(4-nitrofenil)benzamid (NK12)



Verim: %13, Erime Derecesi: >300 °C

IR (Spektrum No 147)

ν_{maks} (FT/ATR): 3206 (Sekonder amin ve karboksamid N-H gerilme bandı), 3028 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1673, 1645 (C=O gerilme ve Amit I bandı), 1594, 1568, 1498 (C=C gerilme bandı ve amit II bandı), 1539 (-NO₂ asimetrik gerilme bandı), 1331 (-NO₂ simetrik gerilme bandı), 1290 (C-N gerilme bandı), 850 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disübstitüe benzen) cm⁻¹.

¹H NMR (Spektrum No 148)

400 MHz, DMSO-*d*₆: δ 10.69 (1H, s, CONH), 9.50 (1H, s, NH-fenil), 8.25 (2H, d, *J*=8.2 Hz, Fenil H-3 ve H-5), 8.05 (2H, d, *J*=8.4 Hz, Fenil H-2 ve H-6), 8.08-8.02 (2H, m, Naftokinon H-5 ve H-8), 7.92 (2H, d, *J*=8.4 Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.89-7.80 (2H, m, Naftokinon H-6 ve H-7), 7.22 (2H, d, *J*=8.4 Hz, Benzen H-3 ve H-5) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 149)

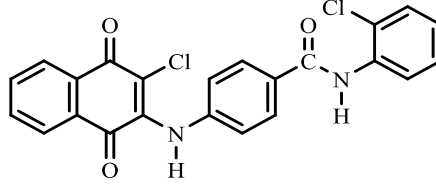
m/z (% bağıl bolluk): 44 (94), 63 (27), 137 (17), 256 (24), 446 (100, M-H⁺), 448 (31, M-H+2⁺)

Elementel Analiz: C₂₃H₁₄ClN₃O₅·0.5 H₂O için M.A.= 456.84 g/mol

Hesaplanan (%): C, 60.00; H, 3.37; N, 9.02

Bulunan (%): C, 60.39; H, 3.46; N, 8.62.

4.1.59. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(2-klorofenil)benzamid (NK13)



Verim: %39, Erime Derecesi: >300 °C

IR (Spektrum No 150)

ν_{maks} (FT/ATR): 3219 (Sekonder amin ve karboksamid N-H gerilme bandı), 3047 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1674, 1644 (C=O gerilme ve Amit I bandı), 1593, 1569, 1515, 1494 (C=C gerilme bandı ve amit II bandı), 1291 (C-N gerilme bandı), 854 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disübstitüe benzen), 766, 746 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *o*-sübstitüe benzen) cm^{-1} .

^1H NMR (Spektrum No 151)

400 MHz, DMSO- d_6 : δ 9.98 (1H, s, CONH), 9.50 (1H, s, NH-fenil), 8.04 (2H, dd, $J=8.0$; 1.2 Hz, Naftokinon H-5 ve H-8), 7.92 (2H, d, $J=8.4$ Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.89 (1H, td, $J=7.6$; 1.6 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.82 (1H, $J=7.6$; 1.6 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.55 (2H, dd, $J=8.0$; 1.6 Hz, Fenil H-3 ve H-6), 7.37 (1H, td, $J=7.6$; 1.6 Hz, Fenil H-4), 7.27 (1H, td, $J=7.6$; 1.6 Hz, Fenil H-5), 7.20 (2H, d, $J=8.8$ Hz, Benzen H-3 ve H-5) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 152)

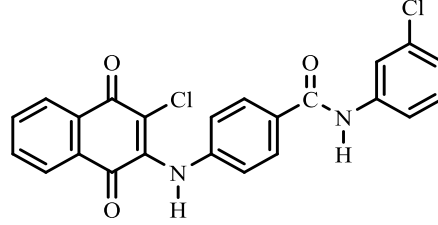
m/z (% bağıl bolluk): 42 (100), 56 (10), 437 (1, $\text{M}+\text{H}^+$), 439 (0.3, $\text{M}+\text{H}+2^+$), 441 (0.15, $\text{M}+\text{H}+4^+$)

Elementel Analiz: $\text{C}_{23}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_3 \cdot 0.14 \text{H}_2\text{O}$ için M.A.= 498.55 g/mol

Hesaplanan (%): C, 59.04; H, 4.52; N, 5.51

Bulunan (%): C, 58.75; H, 4.14; N, 5.29.

4.1.60. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(3-klorofenil)benzamid (NK14)



Verim: %28, Erime Derecesi: 267 °C

IR (Spektrum No 153)

ν_{maks} (FT/ATR): 3230 (Sekonder amin ve karboksamid N-H gerilme bandı), 3028 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1672, 1644 (C=O gerilme ve Amit I bandı), 1592, 1568, 1510 (C=C gerilme bandı ve amit II bandı), 1285 (C-N gerilme bandı), 851 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen), 780 (C-H düzlem dışı eğilme, *m*-süstitüe benzen) cm^{-1} .

¹H NMR (Spektrum No 154)

400 MHz, DMSO-*d*₆: δ 10.36 (1H, s, CONH), 9.47 (1H, s, NH-fenil), 8.03 (2H, dd, $J=7.2$; 1.2 Hz, Naftokinon H-5 ve H-8), 7.97 (1H, d, $J=1.6$ Hz, Fenil H-6), 7.91 (2H, d, $J=7.2$ Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.88-7.79 (2H, m, Naftokinon H-6 ve H-7), 7.72 (1H, d, $J=8.0$, Fenil H-2), 7.35 (1H, td, $J=8.0$; 1.2 Hz, Fenil H-5), 7.20 (2H, d, $J=7.2$ Hz, Benzen H-3 ve H-5), 7.13 (1H, td, $J=8.0$; 1.2 Hz, Fenil H-4) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 155)

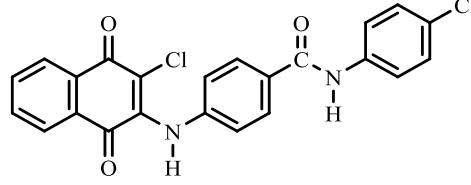
m/z (% bağıl bolluk): 42 (46), 56 (100), 74 (32), 310 (82), 437 (33, $M+H^+$), 439 (11, $M+H+2^+$), 441 (4, $M+H+4^+$)

Elementel Analiz: C₂₃H₁₄Cl₂N₂O₃.0.35 H₂O için M.A.= 479.63 g/mol

Hesaplanan (%): C, 62.28; H, 3.34; N, 6.32

Bulunan (%): C, 62.41; H, 3.14; N, 6.29.

4.1.61. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(4-klorofenil)benzamid (NK15)



Verim: %26, Erime Derecesi: 275 °C

IR (Spektrum No 156)

ν_{maks} (FT/ATR): 3222 (Sekonder amin ve karboksamid N-H gerilme bandı), 3047 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1674, 1640 (C=O gerilme ve Amit I bandı), 1595, 1568, 1511, 1492 (C=C gerilme bandı ve amit II bandı), 1286 (C-N gerilme bandı), 854 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disübstitüe benzen) cm^{-1} .

^1H NMR (Spektrum No 157)

400 MHz, DMSO- d_6 : δ 10.31 (1H, s, CONH), 9.46 (1H, s, NH-fenil), 8.04 (2H, dt, $J=7.6$; 1.6 Hz, Naftokinon H-5 ve H-8), 7.91 (2H, d, $J=8.8$ Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.88-7.83 (2H, m, Naftokinon H-6 ve H-7), 7.82 (2H, d, $J=9.2$, Fenil H-2 ve H-6), 7.38 (2H, d, $J=8.8$ Hz, Fenil H-3 ve H-5), 7.20 (2H, d, $J=8.4$ Hz, Benzen H-3 ve H-5) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 158)

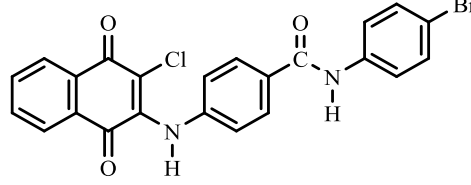
m/z (% bağıl bolluk): 42 (34), 56 (100), 203 (10), 310 (9), 437 (3, $\text{M}+\text{H}^+$), 439 (1, $\text{M}+\text{H}+2^+$), 441 (0.3, $\text{M}+\text{H}+4^+$)

Elementel Analiz: $\text{C}_{23}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_3 \cdot 0.5 \text{C}_2\text{H}_6\text{O} \cdot 0.5 \text{H}_2\text{O}$ için M.A.= 505.37 g/mol

Hesaplanan (%): C, 61.42; H, 3.87; N, 5.97

Bulunan (%): C, 61.66; H, 4.07; N, 5.85.

4.1.62. N-(4-bromofenil)-4-((3-kloro-1,4-dioksa-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)benzamid (NK16)



Verim: %47, Erime Derecesi: >300 °C

IR (Spektrum No 159)

ν_{maks} (FT/ATR): 3224 (Sekonder amin ve karboksamid N-H gerilme bandı), 3066 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1674, 1640 (C=O gerilme ve Amit I bandı), 1595, 1567, 1513, 1492 (C=C gerilme bandı ve amit II bandı), 1286 (C-N gerilme bandı), 854 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disübstitüe benzen) cm^{-1} .

^1H NMR (Spektrum No 160)

400 MHz, DMSO- d_6 : δ 10.27 (1H, s, CONH), 9.48 (1H, s, NH-fenil), 8.03 (2H, d, $J=7.6$ Hz, Naftokinon H-5 ve H-8), 7.87 (2H, d, $J=8.4$ Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.84-7.79 (2H, m, Naftokinon H-6 ve H-7), 7.74 (2H, d, $J=8.8$ Hz, Fenil H-2 ve H-6), 7.50 (2H, d, $J=9.2$ Hz, Fenil H-3 ve H-5), 7.20 (2H, d, $J=8.4$ Hz, Benzen H-3 ve H-5) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 161)

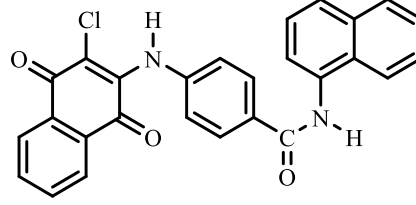
m/z (% bağıl bolluk): 40 (100), 45 (86), 56 (64), 61 (21), 304 (31), 479 (18, $\text{M}+\text{H}^+$), 481 (57, $\text{M}+\text{H}+2^+$), 483 (20, $\text{M}+\text{H}+4^+$).

Elementel Analiz: $\text{C}_{23}\text{H}_{14}\text{BrClN}_2\text{O}_3 \cdot 0.02 \text{H}_2\text{O}$ için M.A.= 482.09 g/mol

Hesaplanan (%): C, 59.04; H, 4.52; N, 5.51

Bulunan (%): C, 58.75; H, 4.14; N, 5.29.

4.1.63. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(naftalen-1-il)benzamid (NK17)



Verim: %42, Erime Derecesi: 264 °C

IR (Spektrum No 162)

ν_{maks} (FT/ATR): 3227 (Sekonder amin ve karboksamid N-H gerilme bandı), 3047 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1674, 1640 (C=O gerilme ve Amit I bandı), 1597, 1569, 1529, 1490 (C=C gerilme bandı ve amit II bandı), 1287 (C-N gerilme bandı), 852 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disübstitüe benzen), 790, 766 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, naftalen) cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (Spektrum No 163)

400 MHz, DMSO- d_6 : δ 10.33 (1H, s, CONH), 9.49 (1H, s, NH-fenil), 8.07-7.95 (5H, m, Naftokinon H-5 ve H-8, Naftalen-H), 7.91-7.81 (3H, m, Naftokinon H-6 ve H-7, Naftalen-H), 7.80-7.71 (1H, m, Naftalen-H), 7.60-7.52 (3H, m, Benzen H-2 ve H-6, Naftalen-H), 7.45-7.36 (1H, m, Naftalen-H), 7.24 (2H, d, $J=8.4$ Hz, Benzen H-3 ve H-5) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 164)

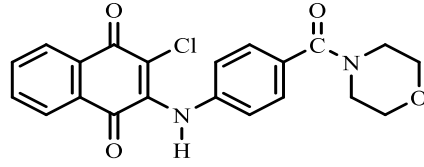
m/z (% bağıl bolluk): 44 (66), 170 (15), 415 (8), 451 (100, M-H⁻), 453 (42, M-H+2⁻)

Elementel Analiz: C₂₇H₁₇ClN₂O₃.0.6 H₂O için M.A.= 463.70 g/mol

Hesaplanan (%): C, 69.94; H, 3.96; N, 6.04

Bulunan (%): C, 69.75; H, 4.14; N, 6.29.

4.1.64. 2-kloro-3-((4-(morfolin-4-karbonil)fenil)amino)naftalen-1,4-dion (NK18)



Verim: %39, Erime Derecesi: 211 °C; 212-217 °C (43)

IR (Spektrum No 165)

ν_{maks} (FT/ATR): 3244 (Sekonder amin ve karboksamid N-H gerilme bandı), 3028 (Aromatik C-H gerilme bandı), 2985, 2842 (Alifatik C-H gerilme bandı,) 1675, 1651, 1639 (C=O gerilme ve Amide I bandı), 1594, 1570, 1516, 1490 (C=C gerilme bandı), 1290 (C-N gerilme bandı), 1141, 1112 (C-O-C ve C-N-C gerilme bandı), 850 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disüstitüe benzen) cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (Spektrum No 166)

400 MHz, DMSO- d_6 : δ 9.36 (1H, s, NH -fenil), 8.02 (2H, dd, $J=7.6$; 1.2 Hz, Naftokinon H-5 ve H-8), 7.85 (1H, td, $J=7.6$; 1.2 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.80 (1H, td, $J=7.6$; 1.2 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.33 (2H, d, $J=8.4$ Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.13 (2H, d, $J=8.4$ Hz, Benzen H-3 ve H-5), 3.62-3.57 (4H, m, Morfolin $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$), 3.52-3.45 (4H, m, Morfolin $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 167)

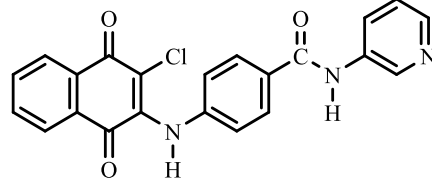
m/z (% bağıl bolluk): 42 (73), 56 (20), 310 (100), 397 (32, $\text{M}+\text{H}^+$), 399 (10, $\text{M}+\text{H}+2$)

Elementel Analiz: $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{ClN}_2\text{O}_4$ için M.A.= 396.83 g/mol

Hesaplanan (%): C, 63.56; H, 4.32; N, 7.06

Bulunan (%): C, 63.38; H, 4.76; N, 7.28.

4.1.65. 4-((3-kloro-1,4-diyokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(piridin-1-3-il)benzamid (NK20)



Verim: %35, Erime Derecesi: 197 °C

IR (Spektrum No 168)

ν_{maks} (FT/ATR): 3213 (Sekonder amin ve karboksamid N-H gerilme bandı), 3100, 2960 (Aromatik C-H gerilme bandı), 1675, 1648 (C=O gerilme ve Amit I bandı), 1599, 1572, 1538, 1513, 1497, 1418 (C=C ve C=N gerilme bandı, fenil ve piridin), 1294 (C-N gerilme bandı), 854 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disübstitüe benzen) cm^{-1} .

^1H NMR (Spektrum No 169)

400 MHz, DMSO- d_6 : δ 10.36 (1H, s, CONH), 9.52 (1H, bs, NH-fenil), 8.92 (1H, d, $J=2.4$ Hz, Piridin H-2), 8.29 (1H, dd, $J=4.4$; 1.4 Hz, Piridin H-6), 8.18 (1H, dt, $J=8.4$; 2.0 Hz, Piridin H-4), 8.04 (2H, dt $J=7.6$; 1.6 Hz, Naftokinon H-5 ve H-8), 7.91 (2H, d, $J=8.8$ Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.87 (1H, td, $J=7.6$; 1.6 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.82 (1H, td, $J=7.6$; 1.6 Hz, Naftokinon H-6 ve H-7), 7.38 (1H, dd, $J=8.4$; 4.8 Hz, Piridin H-5), 7.22 (2H, d, $J=8.8$ Hz, Benzen H-3 ve H-5) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 170)

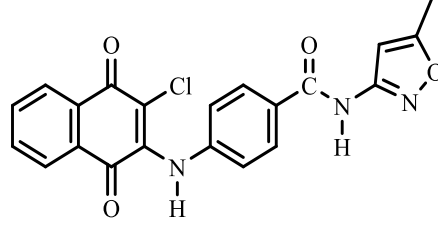
m/z (% bağıl bolluk): 44 (46), 94 (10), 96 (6), 402 (100, M-H⁺), 404 (40, M-H+2⁺)

Elementel Analiz: C₂₂H₁₄ClN₃O₃ 0.3 H₂O için M.A.= 409.23 g/mol

Hesaplanan (%): C, 64.57; H, 3.60; N, 10.27

Bulunan (%): C, 64.38; H, 3.76; N, 10.28.

4.1.66. 4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-N-(5-metilizoksazol-3-il)benzamid (NK30)



Verim: %5, Erime Derecesi: 159°C

IR (Spektrum No 171)

ν_{maks} (FT/ATR): 3284, 3215 (Sekonder amin ve karboksamid N-H gerilme bandı), 3081 (Aromatik C-H gerilme bandı), 2972, 2852 (Alifatik C-H gerilme bandı), 1692, 1668 (C=O gerilme ve Amit I bandı), 1597, 1575, 1528, 1477, 1418 (C=C ve C=N gerilme bandı), 1280 (C-N gerilme bandı), 889 (C-H eğilme bandı, izoksazol), 852 (C-H düzlem dışı eğilme bandı, *p*-disübstitüe benzen) cm^{-1} .

^1H NMR (Spektrum No 172)

400 MHz, DMSO- d_6 : δ 9.49 (1H, bs, NH-fenil), 8.04 (2H, dt $J=7.6$; 1.6 Hz, Naftokinon H-5 ve H-8), 7.90-7.84 (3H, m, Naftokinon H-6 veya H-7, İzoksazol-H), 7.86 (2H, d, $J=8.8$ Hz, Benzen H-2 ve H-6), 7.82 (1H, td, $J=7.6$; 1.6 Hz, Naftokinon H-6 veya H-7), 7.16 (2H, d, $J=8.8$ Hz, Benzen H-3 ve H-5), 3.81 (3H, s, CH₃) ppm.

MS (APCI) (Spektrum No 173)

m/z (% bağıl bolluk): 45 (100), 64 (84), 170 (35), 246 (35), 288 (35), 328 (28), 350 (80), 370 (53), 407 (23, M⁺), 409 (7, M+ 2⁻).

Elementel Analiz: C₂₁H₁₇Cl₂N₂O₄.0.9 C₂H₆O için M.A.= 449.27 g/mol

Hesaplanan (%): C, 60.95; H, 4.35; N, 9.35

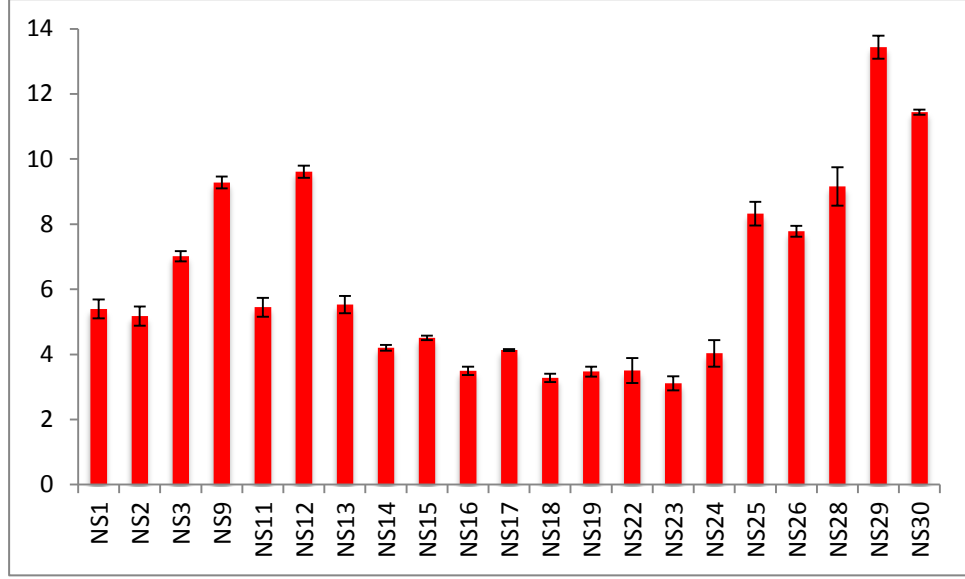
Bulunan (%): C, 61.38; H, 4.76; N, 9.28.

4.2. Biyolojik Aktivite Bulguları

Çalışmamızda, potansiyel proteazom inhibitörü olarak tasarlanan ve sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksik özellikleri Roche firmasının bildirdiği protokole göre WST-1 hücre proliferasyon testi ile, sebep oldukları lizin 48 poliubikitine olmuş protein birikim düzeyleri sitotoksikite gösterdikleri dozlarda immünoyotlama yöntemiyle ve seçili bileşiklerin proteazomun kimotripsin benzeri aktivite inhibisyonları florometrik yöntemle *in vitro* olarak incelenmiştir. Bu biyolojik aktivitelere ait sonuçlar Tablo 3-4 ve Şekil 69-76'da gösterilmiştir.

Tablo 3. Sülfonamid türevi final bileşiklerin MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktivite sonuçları

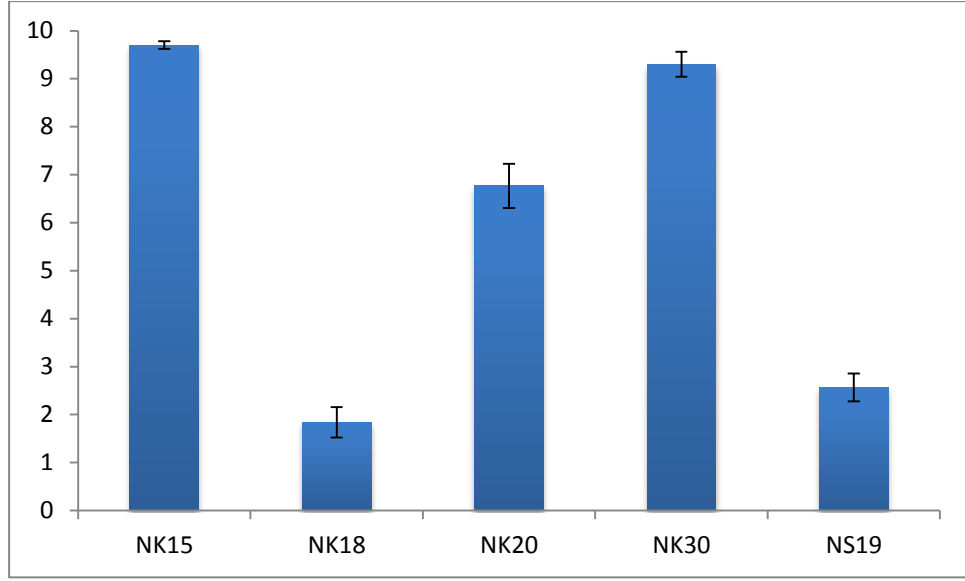
Bileşik Kodu	IC ₅₀ (µM)	Standart Sapma (±)
NS1	5.4	0.29
NS2	5.18	0.29
NS3	7.02	0.16
NS9	9.28	0.18
NS11	5.45	0.29
NS12	9.61	0.19
NS13	5.53	0.26
NS14	4.21	0.09
NS15	4.51	0.07
NS16	3.5	0.13
NS17	4.13	0.03
NS18	3.28	0.13
NS19	3.47	0.16
NS20	>20	-
NS21	>20	-
NS22	3.51	0.39
NS23	3.12	0.22
NS24	4.03	0.41
NS25	8.32	0.37
NS26	7.78	0.17
NS28	9.16	0.59
NS29	13.44	0.35
NS30	11.44	0.08
Doksorubisin	0.97	0.11



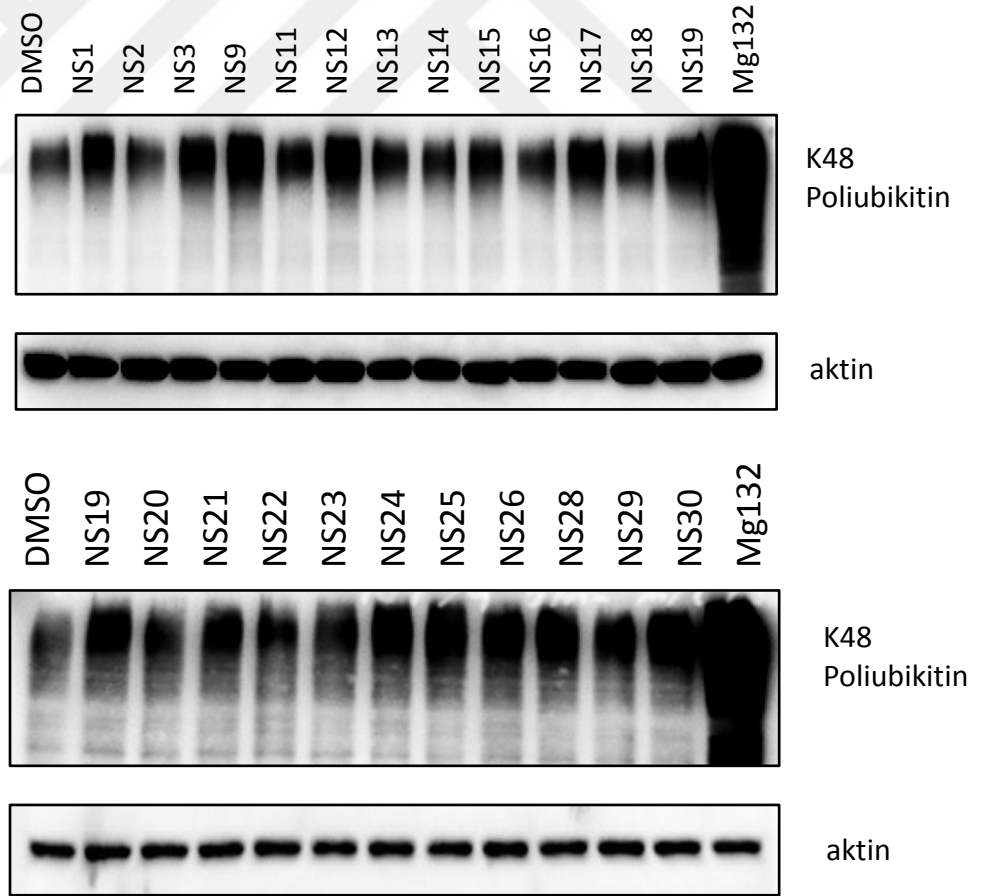
Şekil 69. Sulfonamid türevi final bileşiklerin MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktivitelerinin grafiksel gösterimi

Tablo 4. Karboksamid türevi final bileşiklerin ve NS19 kodlu lider bileşiğin MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktivite sonuçları

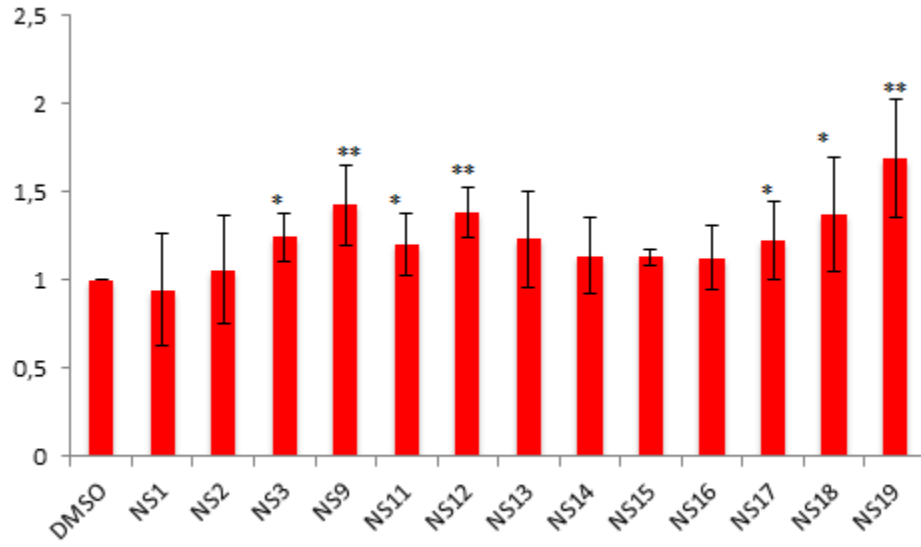
Bileşik Kodu	IC ₅₀ (µM)	Standart Sapma (±)
NK1	>20	-
NK2	>20	-
NK4	>20	-
NK5	>20	-
NK6	>20	-
NK7	>20	-
NK8	>20	-
NK9	>20	-
NK11	>20	-
NK12	>20	-
NK13	>20	-
NK14	>20	-
NK15	9.7	0.08
NK16	>20	-
NK17	>20	-
NK18	1.84	0.32
NK20	6.77	0.46
NK30	9.30	0.26
NS19	2.57	0.29
Doksorubisin	0.97	0.11



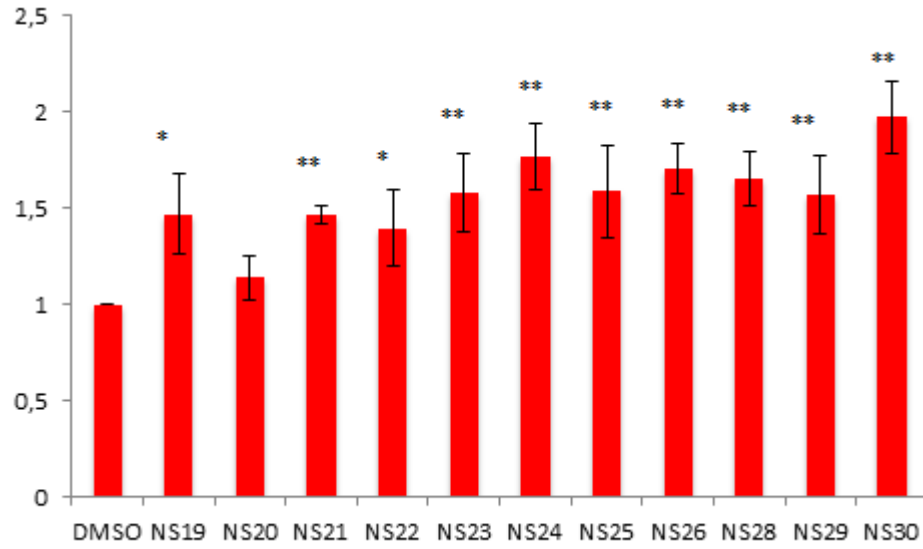
Şekil 70. Karboksamit türevi final bileşiklerin MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktivitelerinin grafiksel gösterimi



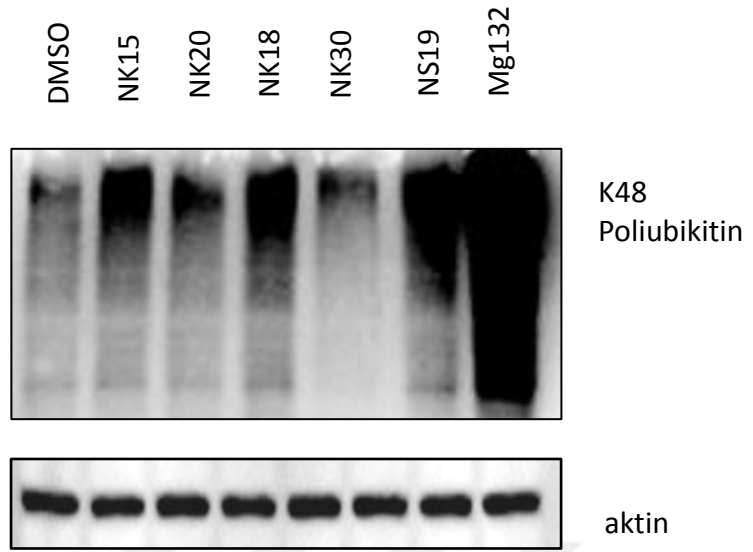
Şekil 71. Sülfonamit türevi final bileşiklerin MCF-7 hücre hattında K48 üzerinden sebep oldukları poliubikitine olmuş protein birikim düzeylerinin immünoblotlama ile görüntülenmesi



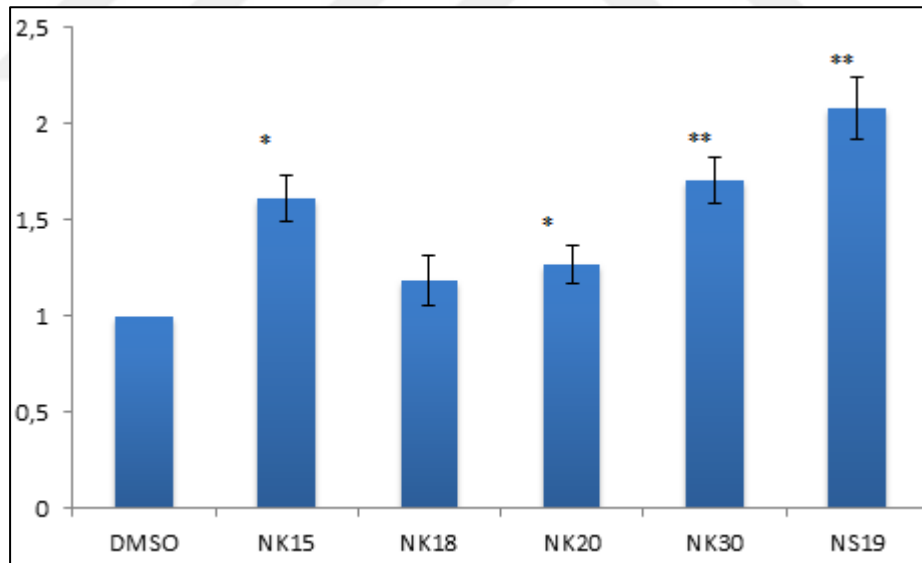
Şekil 72. Sülfonamid türevi NS1-3, NS9, NS11-19 kodlu final bileşiklerin MCF-7 hücre hattında sebep oldukları poliubikitine olmuş protein birikim düzeyleri (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$)



Şekil 73. Sülfonamid türevi NS19-26, NS28-30 kodlu final bileşiklerin MCF-7 hücre hattında sebep oldukları poliubikitine olmuş protein birikim düzeyleri (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$)



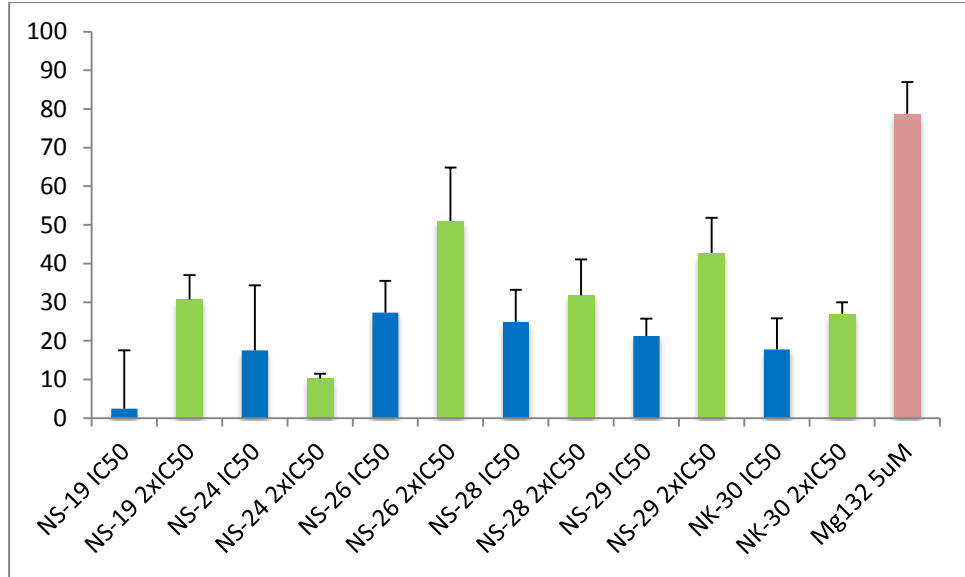
Şekil 74. NK15, NK18, NK20, NK30 kodlu bileşiklerin MCF-7 hücre hattında K48 üzerinden sebep oldukları poliubikitine olmuş protein birikim düzeylerinin immünoiblottama ile görüntülenmesi



Şekil 75. Karboksamit türevi NK15, NK18, NK20, NK30 kodlu final bileşiklerin MCF-7 hücre hattında sebep oldukları poliubikitine olmuş protein birikim düzeyleri (* p<0.05; ** p<0.005)

Tablo 5. NS19, NS24, NS26, NS28-29 ve NK30 kodlu final bileşiklerin proteazom kimotripsin benzeri aktivite % inhibisyon sonuçları

Bileşik (IC ₅₀ , 2xIC ₅₀ ; µM)	% İnhibisyon	Standart Sapma (±)
DMSO	0	-
NS-19 (IC ₅₀)	2.45	15.13
NS-19 (2x IC ₅₀)	30.75	6.28
NS-24 (IC ₅₀)	17.56	16.77
NS-24 (2x IC ₅₀)	10.29	1.24
NS-26 (IC ₅₀)	27.31	8.22
NS-26 (2x IC ₅₀)	51.01	13.80
NS-28 (IC ₅₀)	24.91	8.25
NS-28 (2x IC ₅₀)	31.77	9.29
NS-29 (IC ₅₀)	21.30	4.49
NS-29 (2x IC ₅₀)	42.71	9.17
NK-30 (IC ₅₀)	17.79	8.07
NK-30 (2x IC ₅₀)	27.02	2.94
Mg132 5uM	78.75	8.19



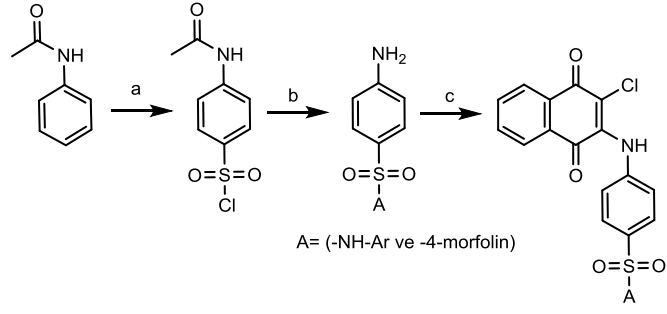
Şekil 76. NS19, NS24, NS26, NS28-29 ve NK30 kodlu final bileşiklerin IC₅₀ ve 2xIC₅₀ konsantrasyonlardaki proteazom kimotripsin benzeri aktivite inhibisyon düzeyleri

5. TARTIŞMA

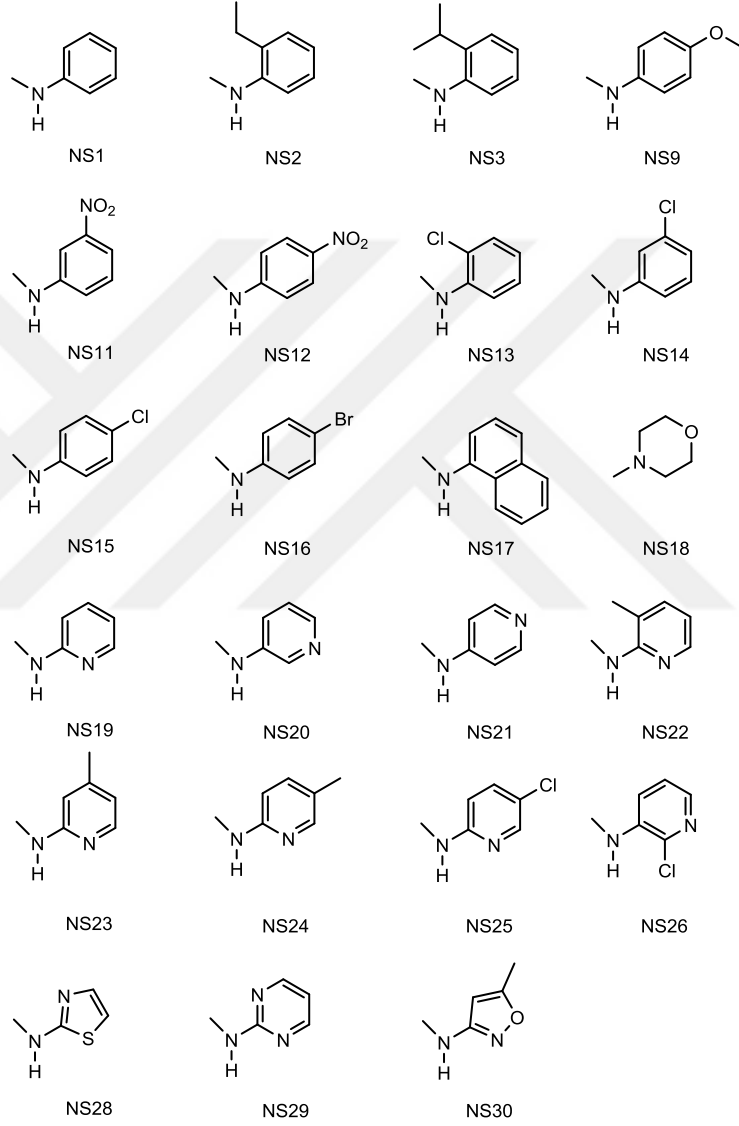
Bu çalışmada, daha güvenli ve daha etkili yeni proteazom inhibitörü ilaçlara duyulan gereksinim dikkate alınarak, proteazom inhibitör aktivite gösterdiği bilinen naftokinon farmakoforu ve sülfonamid işlevsel grubu taşıyan PI-083 kodlu bileşik lider molekül olarak seçilmiş ve üzerinde iki ana moleküler modifikasyon gerçekleştirilerek sülfonamid ve karboksamid türevi toplam 41 adet bileşiğin sentezi gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda sentezi gerçekleştirilen final bileşiklerden NS1, NS9, NS15, NS19-21, NS25, NS29-30 ve NK18 kodlu bileşikler dışında kalan 31 adet bileşik yeni olup, sentezleri ve biyolojik aktiviteleri ilk kez bu çalışmada bildirilmektedir. Literatüre 1813556-71-6, 1813556-72-7, 1813556-73-8, 131245-80-2 CAS numaraları ile kayıtlı olan sırasıyla NS20, NS21, NS25 ve NS29 kodlu bileşiklerin proteazom inhibitör aktiviteleri ilk defa bu çalışmada tespit edilmiştir. Lawrence ve Lee tarafından sentezleri ve proteazom inhibitör aktiviteleri daha önceden rapor edilen NS1, NS9, NS15, NS19, NS30 ve NK18 kodlu bileşikler ise sağlıklı bir yapı-efki irdelemesi yapabilmek amacıyla çalışmamıza dahil edilmiştir (42,43,184,185).

Sülfonamid türevi final bileşiklerimiz üç basamaklı bir sentez yöntemi ile hazırlanmıştır (Şema 1). Buna göre ilk basamakta asetanilit bileşiği klorosülfonik asit ile reaksiyona sokularak 4-asetamidobenzensülfonil klorür bileşiği elde edilmiştir (177). Elde edilen bu bileşik daha sonra uygun aminlerle etkileştirilerek sülfonamid yapısındaki ara ürünlere (A1-A30) dönüştürülmüştür (178). Son basamakta ise bu ara ürünler 2,3-dikloro-1,4-naftokinon halkası ile tepkimeye sokularak final bileşikler sentezlenmiştir (42).



A

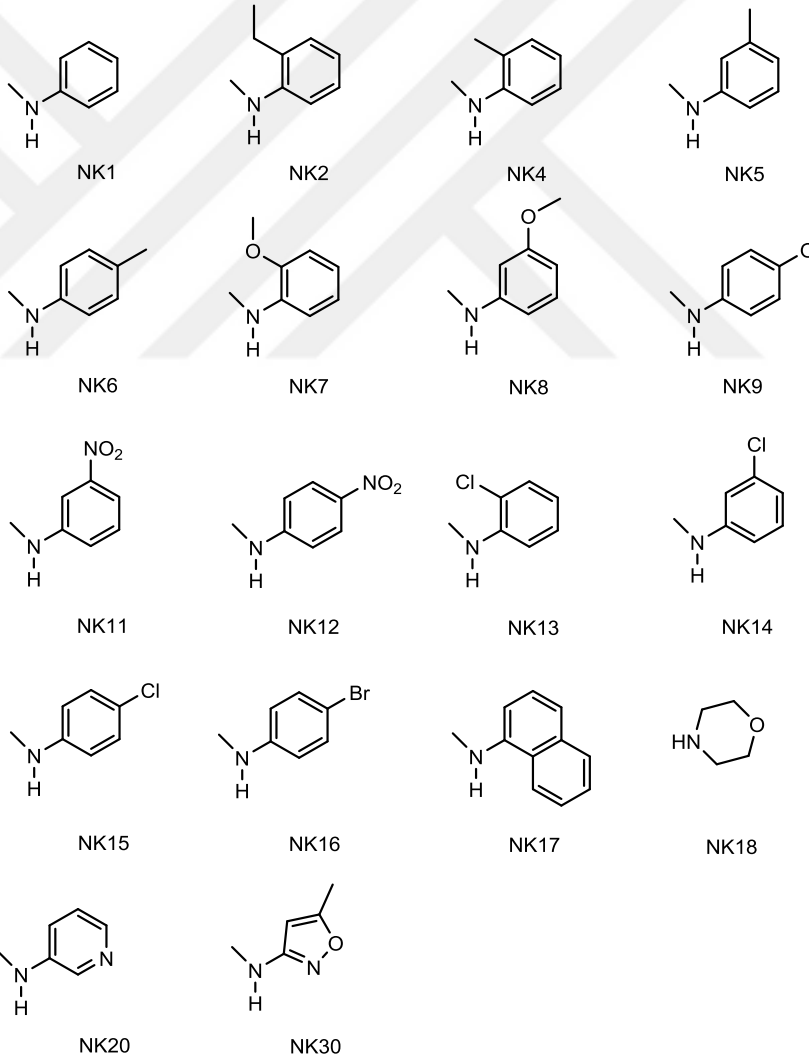
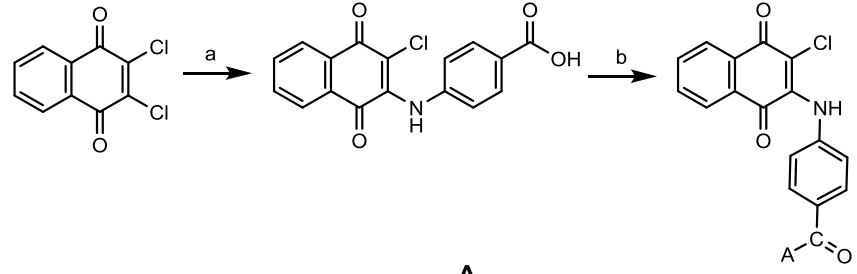


a) Klorosülfonik asit b) amin (NH₂-Ar ve morfolin), piridin; 5 M NaOH, metanol; 2 M HCl
c) 2,3-dikloro-1,4-naftokinon, absolü etanol

Şema 1. Sülfonamit türevi final bileşiklerin sentez şeması

Karboksamit türevi final bileşikler ise iki basamakta sentezlenmiştir (Şema 2). Buna göre 2,3-dikloro-1,4-naftokinon ve *p*-aminobenzoik asit tepkimeye sokulmuş

ve 4-(3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)aminobenzoik asit bileşiği elde edilmiştir (179). İkinci basamakta ise, elde edilen bu bileşik tiyonil klorür ile açıl halojenürüne dönüştürülüp uygun aminlerle tepkimeye sokularak hedef bileşikler oluşturulmuştur (180).



Şema 2. Karboksamit türevi final bileşiklerin sentez şeması

Tüm ara ürünlerin yapı teyitleri IR ve kütle spektroskopik yöntemlerinin kullanılmasıyla yapılmıştır. Final bileşiklerimizin yapı teyitlerinde ise IR, ^1H NMR ve kütle spektroskopik yöntemlerinin yanısıra elementel analiz yönteminden yararlanılmıştır.

Bu bölümde bileşiklerimizin spektral bulguları ve biyolojik aktivite sonuçları ayrı ayrı değerlendirilecektir.

5.1. Bileşiklerin Spektral Bulgularının Değerlendirilmesi

Sülfonamit türevi final bileşiklerin ilk ara ürününü oluşturan 4-asetamidobenzen-sülfonil klorür bileşiğinin IR spektrumunda, amit işlevsel grubuna ait karbonil gerilme bandı 1630 cm^{-1} civarında, N-H gerilme bandı ise 1598 cm^{-1} civarında izlenmiştir. Bileşiğin yapısında yer alan sülfonil klorür grubuna ait sülfonil ($-\text{SO}_2-$) gerilme bantları ise 1376 ve 1171 cm^{-1} değerlerinde tespit edilmiştir.

A1-A30 kodlu sülfonamit türevi ara ürünlerin yapı teyitlerinde IR spektrumları, bileşiklerimizin yapısında yer alan sekonder sülfonamit ve primer aromatik amin işlevsel gruplarının varlığını göstermesi bakımından önem taşımaktadır. Sekonder sülfonamitler IR spektrumunda teşhis açısından iki önemli bant sunmaktadır. Bunlar asimetrik ve simetrik $-\text{SO}_2-$ gerilme bantları ile N-H gerilme bantlarıdır. Sülfonamitlerin sıvı fazda alınan spektrumlarında asimetrik ve simetrik $-\text{SO}_2-$ gerilme bantları $1330-1370\text{ cm}^{-1}$ ve $1160-1180\text{ cm}^{-1}$ arasında şiddetli bantlar şeklinde görülmektedir. Katı fazda alınan spektrumlarda ise bu değerlerde $10-20\text{ cm}^{-1}$ değerinde azalma gözlenebilmektedir. Sekonder sülfonamite ait N-H gerilme bandı ise $3247-3300\text{ cm}^{-1}$ arasında izlenmektedir. Ayrıca primer aromatik amin grubuna ait asimetrik ve simetrik N-H gerilme bantları da teşhis açısından önemli bantlar olup, 3400 cm^{-1} civarında görülmektedir (186–188). Ara ürünlerimizin IR spektrumları incelendiğinde, sülfonamit yapısından kaynaklanan en önemli iki gerilme bandının ve primer aromatik amin grubuna ait N-H gerilme bantlarının literatürde belirtilen değerlerle uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Buna göre, A1-A30 kodlu bileşiklerin spektrumlarında primer aromatik amin grubundan kaynaklanan asimetrik ve simetrik N-H gerilme bantları sırasıyla $3400-3533\text{ cm}^{-1}$ ve $3332-3391\text{ cm}^{-1}$ değerleri arasında izlenmiştir. Sekonder sülfonamit yapısından kaynaklanan $-\text{SO}_2-$ asimetrik ve simetrik gerilme bantları sırasıyla $1301-1401\text{ cm}^{-1}$ ve $1121-1188\text{ cm}^{-1}$ değerleri arasında; N-H gerilme bandı ise $3071-3367\text{ cm}^{-1}$ değerleri arasında izlenmiştir. Spektrumlarda $814-$

850 cm^{-1} arasında görülen bantlar, bileşiklerde yer alan 1,4-disübstitüe benzen halkasındaki komşu iki hidrojene ait C-H düzlem dışı eğilmelerine ait bantlar olarak değerlendirilmiştir. Ara ürünlerimizin yapı teyidi için IR spektrumlarında görülmesi gereken diğer karakteristik bantlar, sülfonamit azotuna bağlı halkalara ve sübstitüentlere ait bantlar olup kaynaklarda belirtilen değerlerle uyumlu olarak beklendiği dalga sayılarında tespit edilmiştir. Değinilen bu IR bulguları ile çalışmamızda sentezlenmesi hedeflenen sülfonamit türevi ara ürünlerin yapıları teyit edilmiştir.

A1-A30 kodlu ara ürünlerin 2,3-dikloro-1,4-naftokinon ile tepkimesi sonucunda hazırlanan NS1-NS30 kodlu sülfonamit türevi hedef bileşiklerimizin oluştuğunu gösteren en önemli IR bulgusu, ara ürünlerin yapısında yer almayıp final bileşiklerimizde bulunan naftokinon halkasının keton karboniline ait gerilme bantlarının varlığıdır. Ayrıca final bileşiklerimizin IR spektrumları, sülfonamit işlevsel grubunun korunduğunun gösterilmesi bakımından da önem taşımaktadır. 1,4-kinon yapısına ait en karakteristik bantların, 1655-1690 cm^{-1} değerleri arasında fermi rezonans etkisiyle çoklu bantlar şeklinde görülen karbonil gerilme titreşim bantları olduğu kaynaklarda belirtilmektedir (186,188). Ayrıca bu tür yapılarda artan konjugasyonla birlikte karbonil grubu absorpsiyonunun 1635-1655 cm^{-1} bölgesine kayabileceği bilgisi de literatürde mevcuttur (188). Bu bilgidен hareketle bileşiklerimizin IR spektrumları değerlendirildiğinde, naftokinon halkasına ait karbonil gerilme titreşimleri 1667-1685 cm^{-1} arasında görülen şiddetli bir bant ile 1607-1654 cm^{-1} arasında şiddeti daha düşük olan banttан oluşan bir dublet olarak saptanmıştır. Bileşiklerimizdeki sülfonamit yapısına ait $-\text{SO}_2-$ asimetric ve simetric gerilme bantları sırasıyla 1322-1386 cm^{-1} ve 1133-1166 cm^{-1} değerleri arasında izlenmiştir. Ayrıca sekonder sülfonamit yapısının diğer önemli bandı olan N-H gerilme titreşimi ise 3221-3270 cm^{-1} alanında gözlenmiştir (188). Sekonder aminlerin IR spektrumunda 3310-3350 cm^{-1} bölgesinde N-H gerilme titreşimlerinden kaynaklanan zayıf bir bant görülmektedir (186,188). NS1-2, NS9, NS12, NS15-18, NS22, NS25 ve NS28-29 kodlu bileşiklerin spektrumlarında bu bantlar 3245-3336 cm^{-1} arasında gözlenmiştir (188).

Karboksamit türevi final bileşiklerimizin ara ürünü olan ve 2,3-dikloro-1,4-naftokinon halkası ile *p*-aminobenzoik asitin tepkimesi sonucunda elde edilen A31 kodlu bileşiğin yapı teyidinde naftokinon halkası, sekonder amin yapısı ve

karboksilik asit fonksiyonuna ait veriler önem taşımaktadır. Bileşiğimizin IR spektrumunda sekonder amin fonksiyonundan kaynaklanan N-H gerilme titreşimi 3296 cm^{-1} değerinde gözlenmiştir. Naftokinon halkası ve karboksilik asit fonksiyonuna ait karbonil gerilmeleri ise 1664 cm^{-1} değerinde şiddetli ve geniş bir bant şeklinde izlenirken karboksilik asit fonksiyonuna ait O-H gerilme bandı 3075 cm^{-1} değerinde gözlenmiştir. Sonuç olarak bileşiğimizin IR spektrumundan elde edilen verilerin mevcut değerlerle uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

Karboksamit türevi final bileşiklerimizin IR spektrumları incelendiğinde sekonder amit işlevsel grubunu teyit eden bulgular elde edilmiştir. Sekonder amit yapısı taşıyan maddeler katı formda 1640 cm^{-1} bölgesinde karbonil gerilmesinden kaynaklanan amit I bantlarını vermektedir (188). Bileşiklerimizin yapısında yer alan naftokinon halkası ve amit fonksiyonuna ait karbonil gerilme bantları sırasıyla $1671-1692\text{ cm}^{-1}$ ve $1637-1668\text{ cm}^{-1}$ dalga sayıları arasında saptanmıştır. Bileşiklerdeki sekonder amin ve karboksamit gruplarından kaynaklanan N-H gerilmeleri ise $3206-3284\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde geniş bantlar şeklinde izlenmiştir. Ayrıca bileşiklerimizin teşhisi açısından önem taşıyan karboksamit azotuna bağlı halkalara ve taşıdıkları süstitüentlere ait titreşim bantları beklenen dalga sayılarında tespit edilmiştir.

Sentezini gerçekleştirdiğimiz gerek sülfonamit gerekse karboksamit türevi final bileşiklerimizin oluştuğuna dair destekleyici en önemli bulgular bileşiklerin ^1H NMR spektrumlarından elde edilmiştir. ^1H NMR spektrumları DMSO- d_6 çözücüsü kullanılarak alınmıştır. Sentezi yapılan bileşiklerin ^1H NMR spektrumları incelendiğinde, yapılarda bulunan proton sayılarına ve kimyasal kayma değerlerine uygun rezonans sinyalleri gözlenmiştir.

Sülfonamit türevi NS1-2, NS9, NS12-15 ve NS20, NS25, NS28-30 kodlu final bileşiklerin spektrumlarında sülfonamit N-H protonuna ait sinyal δ 9.80-12.56 ppm aralığında tek protona karşılık gelen integrasyon değerinde geniş bir singlet; NS11 ve NS16 kodlu bileşiklerde ise singlet olarak gözlenmiştir. Geriye kalan türevlerin spektrumunda bu protona ait sinyal gözlenmemiştir. Karboksamit türevlerinde ise karboksamite ait N-H protonu tüm bileşiklerde δ 9.47-10.69 ppm aralığında tek protonluk singlet sinyal olarak izlenmiştir. Bileşiklerimizin yapısında yer alan sekonder amine ait N-H protonu NS11-12, NS16 kodlu sülfonamit türevlerinde δ 9.49-9.50 ppm aralığında singlet olarak, geriye kalan türevlerde ise δ 9.43-9.57 ppm aralığında geniş singletler olarak izlenmiştir. Karboksamit türevlerinde ise bu

protona ait sinyal δ 9.33-9.52 ppm aralığında singlet sinyaller olarak izlenirken sadece NK30 kodlu bileşikte δ 9.49'da geniş singlet sinyal olarak tespit edilmiştir.

Naftokinon halkasının 5. ve 8. konumlarında yer alan ve keton karboniline yakın olan protonların, 6. ve 7. pozisyonda yer alan protonlara göre daha aşağı alanda rezonans sinyali verdikleri literatürde belirtilmektedir (187). Bu bilgiyle uyumlu olarak gerek sülfonamit gerekse karboksamit türevi bileşiklerdeki bu protonlar beklenen kimyasal kayma değerlerinde gözlenmiştir. Söz konusu protonlar, NS1, NS11, NS15-16, NS21-25 ve NS29-30 kodlu sülfonamit türevi bileşiklerde δ 7.90-8.04 ppm aralığında her biri birer protonluk integrasyona sahip dublet dublet ($J=8.0-7.2$; 1.6-1.2 Hz'lik) sinyaller olarak saptanmıştır. NS2, NS9, NS12-14, NS17-18, NS26, NS28 kodlu bileşiklerde bu protonlar ikişer protonluk integrasyon değerinde δ 8.02-8.04 ppm aralığında ($J=8.0-7.2$; 1.6-1.2 Hz'lik) dublet-dublet olarak izlenirken; NS3 kodlu bileşikte dublet ($J=7.6$ Hz) olarak gözlenmiştir. NS19 ve NS20 kodlu türevlerde ise iki protonluk δ 8.01-8.04 ppm aralığında multipletler olarak tespit edilmiştir.

Buna karşın karboksamit türevlerinde aynı pozisyonda yer alan protonlar, NK2, NK4, NK6-7 ve NK16 kodlu bileşiklerin spektrumlarında δ 8.03-8.04 ppm aralığında iki protona karşılık gelen integrasyon değerinde $J=8.0-7.6$ Hz'lik etkileşme değişmeziyle dublet sinyaller olarak izlenmiş NK1, NK11, NK15, NK20 ve NK30 kodlu bileşiklerde δ 8.04-8.05 ppm aralığında $J=8.0-7.6$; 1.6-1.4 Hz etkileşme değişmezine sahip dublet-triplet sinyaller şeklinde saptanmıştır. NK5, NK8-9, NK13-14 ve NK18 kodlu bileşiklerde ise δ 8.02-8.04 ppm kimyasal kayma değerlerinde $J=8.0-7.2$; 1.2-1.6 Hz aralığındaki etkileşme değişmezlerine sahip dublet-dublet sinyaller şeklinde izlenmiştir. Ayrıca, NK12 ve NK17 kodlu bileşiklerde bu protonlar sırasıyla δ 8.02-8.08 ve δ 7.95-8.07 ppm aralığında multiplet sinyaller olarak tespit edilmiştir.

Buna karşın naftokinon halkasına ait 6 ve 7 no lu protonlar, NS1-2, NS12, NS15-21, NS24, NS26, NS28 ve NS30 kodlu bileşiklerde δ 7.65-7.87 ppm aralığında birer protonluk integrasyon değerine sahip ayrı ayrı triplet-dublet ($J=7.6-7.4$; 1.5-1.2 Hz) sinyaller olarak izlenmiştir. Sülfonamit azotunda sırasıyla 3-metil-2-piridil, 4-metil-2-piridil, 5-kloro-2-piridil ve 2-pirimidil halkalarını taşıyan sırasıyla NS22-23, NS25 ve NS29 kodlu bileşiklerde söz konusu protonlardan biri triplet-dublet ($J=7.6-7.4$; 1.5-1.2 Hz); diğeri ise piridin halkasına ait protonlarla birlikte multiplet sinyal

olarak tespit edilmiştir. Geriye kalan sülfonamid türevi bileşiklerimizde (NS3, NS9, NS11, NS13-14 kodlu bileşikler) bu protonlar multipler sinyaller olarak gözlenmiştir.

Benzer durum karboksamid türevlerinde de gözlenmiştir.

Bileşiklerimizin yapısında yer alan ve yapı teyitlerinde önemli bulgular sağlayan 1,4-disübstitüe benzen halkasının H-2 ve H-6 no lu protonları ile H-3 ve H-5 no lu protonları AA'BB' spin sistemi özelliklerine uygun olarak ikişer protonluk integrasyonda 8.8-7.2 Hz aralığında etkileşme değişmezine sahip iki dublet halinde izlenmiştir. NK17 kodlu bileşikte H-2 ve H-6 no lu protonlar, NS13, NK2 ve NK4 kodlu bileşiklerde ise H-3 ve H-5 no lu protonlar multipler sinyaller içerisinde tespit edilmiştir. Sübstitüentlerin gölgeleme etkileri dikkate alındığında sülfonamid ve karboksamid işlevsel gruplarının bağlı olduğu konuma komşu olan H-2 ve H-6 no lu protonlar, amin işlevsel grubunun bağlı olduğu konuma komşu olan H-3 ve H-5 no lu protonlara göre daha aşağı alanda gözlenmiştir.

Sülfonamid ve karboksamid türevi final bileşiklerimizin ¹H NMR spektrumlarında aromatik alanda izlenmesi gereken diğer sinyaller, sülfonamid ve karboksamid azotuna bağlı halkaların (benzen, naftalen, piridin, pirimidin, 1,3-tiyazol, izoksazol) taşıdığı aromatik protonlara ait sinyaller olacaktır. Bu sinyaller halkaların taşıdığı sübstitüentin cinsine ve sübstitüsyon biçimine uygun olarak beklenen kimyasal kayma değerinde ve bölünme tipinde tespit edilmiştir. Buna göre, sülfonamid azotunda benzen ve naftalen halkası taşıyan NS1-3, NS9, NS11-17 kodlu bileşiklerimizin spektrumunda bu halkalara ait aromatik protonlar δ 6.76-7.99 ppm aralığında $J=9.1-6.8$; 1.9-1.2 Hz'lik etkileşme değişmezlerine sahip dublet, triplet, dublet-dublet, triplet-dublet, triplet-triplet sinyaller ile multipler sinyaller olarak izlenmiştir. Karboksamid türevi NK1-2, NK4-9, NK11-17 kodlu bileşiklerde ise söz konusu protonlar δ 6.65-8.79 ppm aralığında $J=9.2-7.2$; 2.0-1.0 Hz etkileşme değişmezlerinde dublet, triplet, dublet-dublet, triplet-dublet sinyaller ve ayrıca singlet ve multipler sinyaller olarak gözlenmiştir. Sülfonamid azotunda piridin ve pirimidin halkaları taşıyan NS19-26 ve NS29 kodlu bileşiklerimizde bu halkalara ait aromatik protonlar δ 6.66-8.40 ppm kimyasal kayma değerlerinde $J=8.8-4.4$; 2.4-1.2 Hz'lik etkileşme değişmezleri ile görülen dublet, triplet, dublet-dublet sinyallerin yanısıra singlet ve multipler sinyaller olarak izlenmiştir. Aynı konumda 3-piridil halkası taşıyan NK20 kodlu bileşiklerimizde ise bu protonlar δ 7.38-8.92 ppm aralığında dublet, dublet-dublet ve dublet-triplet sinyaller şeklinde $J=8.4-4.4$; 2.4-1.4 Hz

etkileşme değişmezleriyle tespit edilmiştir. NS28 kodlu bileşikteki sülfonamit azotuna bağlı 4-metil-tiyazol-2-il halkasına ait tek aromatik proton δ 6.36 ppm'de bir protonluk singlet şeklinde gözlenmiştir. Sülfonamit/karboksamit azotunda 5-metilizoksazol-3-il halkası taşıyan NS30 ve NK30 kodlu bileşiklerimizde ise söz konusu halkaya ait tek proton sırasıyla δ 6.12 ppm değerinde bir singlet ve δ 7.84-7.90 ppm aralığında multipler sinyal içerisinde tespit edilmiştir.

Alifatik sübstitüentlere (etil, metil, metoksi, izopropil) ait protonlar ile NS18 ve NK18 kodlu bileşiklerin yapısında yer alan morfolin halkasına ait metilen protonlarından kaynaklanan sinyaller, alifatik alanda beklenen kimyasal kayma değerlerinde izlenmiş ve temsil ettikleri proton sayısı ile uyumlu integrasyon değerleri vermiştir. Buna göre, NS2 ve NK2 kodlu bileşiklerimizdeki etil sübstitüentine ait metilen (-CH₂-) protonları sırasıyla δ 2.46 ve 2.61 ppm değerlerinde $J=7.6$ Hz'lik etkileşme değişmezine sahip quartet sinyaller olarak izlenirken, metil (-CH₃) protonları δ 0.98 ve 1.12 ppm kimyasal kayma değerinde yine aynı etkileşme değişmezine sahip triplet sinyaller olarak gözlenmiştir. NS22-24, NS28, NS30, NK4-6 ve NK30 kodlu bileşiklerdeki amit azotuna bağlı aromatik halkalardaki (fenil, piridil, tiyazol ve izoksazol) metil grubuna ait protonlar δ 2.06-3.81 ppm kimyasal kayma değerleri arasında üç protona karşılık gelen integrasyon değerinde singlet sinyaller şeklinde tespit edilmiştir. Benzer şekilde, NS9 ve NK7-9 kodlu bileşiklerde benzen halkasına bağlı metoksi protonları δ 3.65-3.82 ppm kimyasal kayma değerleri arasında üç protonluk integrasyon değerinde singlet sinyaller olarak gözlenmiştir. NS3 kodlu bileşimimizde bulunan izopropil sübstitüentine ait metin (-CH-) protonu δ 3.23-3.29 ppm aralığında multipler sinyal şeklinde izlenirken, metil protonları altı protona karşılık gelen $J=6.8$ Hz'lik etkileşme değişmezine sahip dublet sinyal şeklinde gözlenmiştir. Morfolin halkası taşıyan bileşiklerimizde söz konusu halkaya ait metilen protonları NS18 kodlu bileşikte δ 3.62 ve 2.85 ppm değerlerinde $J=4.4$ Hz etkileşme değişmezine sahip dört protonluk iki quartet sinyal olarak izlenirken, NK18 kodlu bileşikte bu protonlar δ 3.57-3.62 ile δ 3.45-3.52 ppm değerleri arasında yine dörder protonluk integrasyonda iki multipler sinyal olarak saptanmıştır.

Bileşiklerin ileri NMR teknikleri yapılamadığından ¹H NMR bulguları değerlendirilirken protonların kimyasal kaymalarının atanması, protonlara ait

sinyallerin etkileşme biçimleri ve kimyasal çevresinin kaynaklarda belirtilen gölgeleme etkisi dikkate alınarak yapılmıştır. Bu nedenle değerler değişebilir.

Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerimizin kütle spektrumları APCI (Atomik Basınçta Kimyasal İyonlaştırma) yöntemi kullanılarak alınmış ve pozitif/negatif iyonizasyon spektrum verileri bulgular kısmında özetlenmiştir.

Bileşiklerin spektrumlarında $[M+H]^+$ ve $[M-H]^-$ moleküler iyon piklerine ait hesaplanan ve bulunan m/z değerleri beklenen molekül ağırlıklarına uygun olarak farklı bağıllıklarda tespit edilmiştir. A26, NK12 ve NK17 kodlu bileşiklerin spektrumlarında molekül ağırlığına karşılık gelen moleküler iyon pikleri %100 bağıllıkta izlenmiştir.

Tüm final bileşiklerimiz klor atomu taşıdığından spektrumlarda moleküler iyon pikinin yanı sıra beklenildiği üzere $[M+H+2]^+$ izotop piki de gözlenmiştir.

İki klor atomu taşıyan NS13-15, NS25-26 ve NK13-15 kodlu final bileşiklerin spektrumlarında, $[M+H]^+$ moleküler iyon pikine ilave olarak $[M+H+2]^+$ ve $[M+H+4]^+$ izotop pikleri izlenmiştir.

Bir klor ve bir brom atomu içeren NS16 ve NK16 kodlu bileşiklerin spektrumlarında ise benzer şekilde, $[M+H]^+$ moleküler iyon pikinin yanı sıra $[M+H+2]^+$ ve $[M+H+4]^+$ izotop pikleri de kaynaklarda belirtilen bağıllıklarda tespit edilmiştir. Söz konusu bu bulgular bileşiklerin yapılarını teyit eder niteliktedir.

Sentezi yapılan bileşiklerin spektral analizlerine ek olarak elementel analiz sonuçları kabul edilebilir sınırlar (%0.4 ve daha düşük) içinde olup, bileşiklerin yapılarını doğrulamaktadır. Tespit edilen analiz değerleri bulgular bölümünde ayrıntılı olarak verilmiştir.

5.2. Bileşiklerin Biyolojik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin antiproteazomal aktivitelerini tespit etmek amacıyla MCF-7 insan meme kanseri hücre hattında sırasıyla sitotoksik özellikleri, neden oldukları toplam poliubikitine olmuş protein birikim düzeyleri ve proteazom kimotripsin benzeri aktivite inhibisyonları *in vitro* olarak incelenmiştir.

Bileşiklerin MCF-7 hücre hattındaki sitotoksik etkileri WST-1 hücre proliferasyon yöntemi ile değerlendirilmiş ve tüm bileşiklerin kanser hücrelerinin %50'sini öldüren madde konsantrasyonları (IC_{50} ; μM) Tablo 3 ve 4'te verilmiştir.

Sonuçlar incelendiğinde sülfonamid türevlerinin tamamına yakını (NS20 ve NS21 kodlu bileşikler hariç) test edilen hücre hattında değişen değerlerde sitotoksik etki gösterirken; karboksamid türevlerinde sadece NK15, NK18, NK20 ve NK30 kodlu bileşikler sitotoksosite göstermiştir. Bu sonuçlar neticesinde, genel olarak sülfonamid türevlerinin karboksamid türevlerine göre daha sitotoksik özelliğe sahip olduğu söylenebilir. Sitotoksosite gösteren sülfonamid türevi bileşikler içerisinde amit azotunda 4-metil-2-piridil grubu taşıyan NS23 kodlu bileşik $IC_{50}=3.11\pm 0.22 \mu M$ değeri ile bu serinin en sitotoksik bileşiği olup, NS19 kodlu lider bileşikten ($IC_{50}=3.47\pm 0.15 \mu M$) nispeten daha yüksek sitotoksosite göstermiştir. Dolayısıyla piridin halkasının 4 konumuna metil girişi az da olsa aktivitede artışa neden olmuştur. Sülfonamid azotunda sırasıyla 3-piridil ve 4-piridil halkaları taşıyan NS20 ve NS21 kodlu bileşiklerde ise çalışılan en yüksek konsantrasyonda (20 μM) bile hücrelerin çoğunda canlılık gözlenmiş ve bileşiklerin $IC_{50}>20 \mu M$ değerinde sitotoksik özellik göstermediği tespit edilmiştir. Aynı konumda 2-piridil halkasına sahip NS19 kodlu lider bileşiğin sitotoksosite göstermesi, piridin azotunun konumunun sitotoksosite açısından önemli olduğunu düşündürmüştür. Amit azotunda fenil grubu taşıyan türevlerde, *N*-fenil halkasının *orto* pozisyonuna etil sübstitüentinin girişi sitotoksitede zayıf da olsa artışa neden olurken, aynı konuma hacimli izopropil sübstitüentinin girişi ile sitotoksitede düşüş gözlenmiştir. *N*-fenil halkasının *meta* pozisyonuna elektron çeken nitro sübstitüentinin girişiyle sitotoksik aktivitede değişiklik gözlenmezken, *para* pozisyonunda nitro grubu taşıyan NS12 kodlu bileşikte sitotoksitede önemli ölçüde azalma tespit edilmiştir. Benzer durum, *para* konumunda metoksi sübstitüenti taşıyan NS9 kodlu bileşik için de söz konusudur. Bu türevler için aktivitenin *para* konumundaki sübstitüentin elektronik özelliğinden (elektron çekme veya verme) bağımsız olduğu söylenebilir. Aynı pozisyonda klor veya brom gibi elektron çeken halojen atomları içeren bileşiklerde ise sitotoksik aktivitenin arttığı gözlenmiştir. Halojenli türevler kendi aralarında değerlendirildiğinde *N*-fenil halkasına halojen girişi *o*-klor türevi hariç aktivitede artışa neden olurken, *p*-brom türevi en yüksek sitotoksositeyi göstermiştir. Bu türevlerde aktivite *p*-brom>*m*-klor>*p*-klor>*o*-klor sıralaması içinde azalmıştır. Brom atomu taşıyan türevin klor atomu taşıyan türeve göre daha yüksek aktivite sergilemesi brom atomunun atom çapı artışıyla ilişkilendirilebilir. Amit azotundaki *N*-fenil halkasına ikinci bir aromatik benzen yapısının eklenmesiyle oluşturulan *N*-naftil türevi NS17 kodlu bileşiğin sitotoksik aktivitesinde artış gözlenmiştir. Amit

azotunu morfolin içerisinde taşıyan NS18 kodlu bileşikte de *N*-fenil türevine göre sitotoksitede artış görülmüştür. Amit azotunda 2-piridil halkası taşıyan NS19 kodlu lider bileşikte piridin halkasının 3, 4 ve 5 konumlarına metil girişi benzer aktivite ile sonuçlanmıştır. 2-piridil halkasının 5 konumuna klor atomunun girişi ise aktivitede düşüşe neden olmuştur. Aksi bir durum, 3-piridil yapısının 2 konumunda klor atomu taşıyan NS26 kodlu bileşikte, klor atomunun girişi ile sitotoksik etki göstermeyen 3-piridil türevi NS20 kodlu bileşiğe göre sitotoksitede artış gözlenmiştir. Amit azotunda tiyazol, izoksazol ve pirimidin heterosiklik halkaları taşıyan sırasıyla NS28, NS30 ve NS29 kodlu bileşiklerde aktivite 4-metil-tiyazol-2-il>5-metil-izoksazol-3-il>2-pirimidinil sıralaması içerisinde azalmıştır.

Karboksamit türevi bileşiklerin sitotoksite sonuçları kendi içerisinde değerlendirildiğinde, *N*-fenil serisi bileşiklerden sadece *N*-fenil halkasının *para* pozisyonunda elektron çeken klor atomu taşıyan NK15 kodlu bileşiğin sitotoksite gösterdiği tespit edilmiştir. Amit azotunu morfolin halkasının bir üyesi olarak taşıyan NK18 kodlu bileşik ise çalışılan bileşikler içerisinde $IC_{50}=1.84\pm 0.32$ μ M değeri ile en yüksek sitotoksik etkiyi göstermiştir. Amit azotunda 3-piridil halkası taşıyan NK20 kodlu türevin, sülfonamit karşılığının aksine sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır. Yine amit azotunda 5-metil-izoksazol-3-il grubu taşıyan NK30 kodlu bileşiğin, sülfonamit karşılığı olan NS30 kodlu bileşiğe göre daha yüksek sitotoksiteye sahip olduğu görülmüştür.

Çalışmamızın devamında sülfonamit türevlerinin tamamının ve karboksamit türevlerinden ise sadece sitotoksik etki gösteren bileşiklerin sebep oldukları poliubikitine olmuş protein birikim düzeyleri immüno blotlama yöntemi ile incelenmiştir. Sülfonamit türevi *N*-fenil serisi bileşiklerden fenil halkasında sübstituent taşımayan NS1 kodlu türev ile *o*-etil ve halojen sübstitüentleri taşıyan NS2, NS13-16 kodlu türevlerin dışında kalan tüm bileşiklerin (NS3, NS9, NS11-12, NS17 kodlu bileşikler) negatif kontrol olarak kullanılan DMSO bileşiğine göre istatistiksel olarak anlamlı poliubikitine olmuş protein birikimine neden olduğu saptanmıştır. Heterosiklik halka taşıyan türevlerde NS20 kodlu bileşik dışında kalan bileşikler DMSO bileşiğine göre istatistiksel olarak anlamlı poliubikitine olmuş protein birikimine neden olmuştur. Karboksamit türevi bileşiklerde ise, NK18 kodlu bileşik dışında kalan NK15, NK20 ve NK30 kodlu türevlerin yine istatistiksel olarak anlamlı protein birikimini sağladığı gözlenmiştir.

Bileşik sayımızın fazla olması ve sınırlı imkanlarımız nedeniyle poliubikitine olmuş protein birikimine neden olan bileşiklerden sadece istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.005$) en yüksek birikime sebep olan NS24, NS26, NS28, NS29 ve NK30 kodlu türevler seçilip, bu birikimin proteazom kimotripsin benzeri aktivite inhibisyonu sonucunda mı gerçekleştiği araştırılmıştır. Seçilen bileşiklerin MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı üzerindeki kimotripsin benzeri aktivite inhibisyonları, yine aynı hücre hattında sitotoksosite gösterdikleri IC_{50} ve $2xIC_{50}$ olmak üzere iki farklı konsantrasyonda florometrik yöntem ile tayin edilmiştir. Deney sonuçlarına göre, incelenen bileşikler içerisinde amit azotunda 2-kloro-3-piridil grubu taşıyan NS26 kodlu sülfonamid türevi bileşik, kimotripsin benzeri aktivitenin spesifik inhibitörü olan NS19 kodlu lider bileşiğimizden daha yüksek inhibisyon göstermiş ve serinin en aktif bileşiği olarak tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı sonuçlara göre diğer bileşikler kendi içerisinde değerlendirildiğinde, bu bileşiklerin de inhibisyon gösterdikleri ve inhibisyonun $NS29 > NS28 > NK30 > NS24$ sıralaması içinde azaldığı tespit edilmiştir. Sınırlı sayıda madde ile çalışıldığından, elde edilen bu sonuçlarla detaylı bir yapı-etki ilişkisi irdelemesi yapılamamıştır. Ancak proteazom inhibisyonu test edilen az sayıdaki bileşik içerisinde lider molekülden daha yüksek aktiviteye sahip madde bulunması, yeni proteazom inhibitörü bileşiklerin keşfi açısından sülfonamid ve karboksamid genel yapısına sahip bileşiklerimizin umut verici yapılar olduğunu göstermiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, potansiyel proteazom inhibitör aktivite göstermesi beklenen *N*-süstitüe-4-((3-kloro-1,4-diokso-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)benzensülfonamit ve karboksamit genel yapısı ile 2-kloro-3-((4-(morfolinosülfonil)fenil)amino)naftalen-1,4-dion ve 2-kloro-3-((4-(morfolinokarbonil)fenil)amino)naftalen-1,4-dion yapılarına sahip toplam 41 adet bileşiğin sentezi yapılmıştır. Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerden on tanesi literatüre kayıtlı olup, geriye kalan bileşiklerin sentezleri ve proteazom inhibitör aktiviteleri ilk kez bu çalışmada rapor edilmektedir. Sülfonamit türevi bileşikler üç basamaklı, karboksamit türevleri ise iki basamaklı sentez yöntemi ile elde edilmiştir. Sentezlenen bileşiklerin yapıları spektral yöntemler (IR, ¹H NMR, kütle) ve elementel analiz ile teyit edilmiştir.

Bileşiklerimizin proteazom inhibitör aktivitelerini belirlemek üzere öncelikle MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı üzerinde gösterdikleri sitotoksiteleri ve sebep oldukları poliubikitine olmuş protein birikim düzeyleri tespit edilmiştir. Yüksek oranda poliubikitine olmuş protein birikimine neden olan belirli sayıdaki bileşiğin kimotripsin benzeri aktivite inhibisyonları florometrik yöntem kullanılarak *in vitro* olarak tayin edilmiştir. Biyolojik aktivite sonuçlarına göre gerek sülfonamit gerekse karboksamit genel yapısına sahip bileşiklerimizin değişen oranlarda sitotoksiteye ve poliubikitine olmuş protein birikimine neden oldukları tespit edilmiştir. Kimotripsin benzeri aktivite inhibisyonları değerlendirildiğinde ise amit azotunda 2-kloro-3-piridil grubu taşıyan sülfonamit türevi NS26 kodlu bileşiğin aynı konumda 2-piridil grubu taşıyan NS19 kodlu lider bileşikten daha yüksek proteazom inhibisyonu gösterdiği gözlenmiştir. Sınırlı sayıda bileşikle elde edilen bu aktivite sonucu ileride planladığımız çalışmalar için umut verici bir sonuç olarak değerlendirilmiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Crawford LJ, Walker B, Irvine AE. Proteasome inhibitors in cancer therapy. Vol. 5, Journal of Cell Communication and Signaling. 2011. p. 101–10.
2. Zhang W, Sidhu SS. Development of inhibitors in the ubiquitination cascade. FEBS Lett [Internet]. 2014;588(2):356–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2013.11.003>
3. Adams J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. Nat Rev Cancer [Internet]. 2004;4:349–60. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc1361>
4. Cao B, Li J, Mao X. Dissecting bortezomib: Development, application, adverse effects and future direction. Curr Pharm Des [Internet]. 2013;19(18):3190–200. Available from: http://gateway.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=emed11&AN=2013370672%5Cnhttp://sfx.nottingham.ac.uk:80/sfx_local?genre=article&atitle=Dissecting+bortezomib:+Development,+application,+adverse+effects+and+future+direction&title=Current
5. Ahmad N, Anaissie E, Malek MAYA, Driscoll JJ. Targeting the Proteasome Pathway for the Treatment of Solid Tumors. In: Ping Dou Q, editor. Resistance to Proteasome Inhibitors in Cancer [Internet]. Switzerland: Springer International Publishing; 2014. p. 233–48. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-06752-0>
6. Kubiczkova L, Pour L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. Proteasome inhibitors - molecular basis and current perspectives in multiple myeloma. J Cell Mol Med. 2014;18(6):947–61.
7. Ciechanover a, Heller H, Katz-Etzion R, Hershko a. Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981;78(2):761–5.
8. Hershko A, Eytan E, Ciechanover A, Haas AL. Immunochemical analysis of the turnover of ubiquitin-protein conjugates in intact cells. Relationship to the breakdown of abnormal proteins. J Biol Chem. 1982;257(23):13964–70.
9. Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A. Components of Ubiquitin-

- Protein Ligase System. *J Biol Chem*. 1983;258(13):8206–14.
10. Kresge N, Simoni RD, Hill RL. The Discovery of Ubiquitin-mediated Proteolysis by Aaron Ciechanover, Avram Hershko, and Irwin Rose. *J Biol Chem* [Internet]. 1980;281(40):e32-. Available from: <http://www.jbc.org/content/281/40/e32.full>
 11. Gilardini A, Marmiroli P, Cavaletti G. Proteasome Inhibition: A Promising Strategy for Treating Cancer, but What About Neurotoxicity? *Curr Med Chem* [Internet]. 2008;15(29):3025–35. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=15&issue=29&spage=3025>
 12. Orłowski M, Wilk S. Catalytic Activities of the 20 S Proteasome, a Multicatalytic Proteinase Complex. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2000;383(1):1–16. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986100920368>
 13. Shen M, Schmitt S, Buac D, Ping Dou Q. Targeting the ubiquitin - proteasome system for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* [Internet]. 2013;17(9):1091–108. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1349-7006.2008.01013.x/full>
 14. Kaffy J, Bernadat G, Ongeri S. Non-Covalent Proteasome Inhibitors. *Curr Pharm Des*. 2013;19:4115–30.
 15. Unno M, Mizushima T, Morimoto Y, Tomisugi Y, Tanaka K, Yasuoka N, et al. The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. *Structure*. 2002;10:609–18.
 16. Adams J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat Rev* [Internet]. 2003;29:3–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305737203000811>
 17. Adams J. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell*. 2004;5:417–21.
 18. Groll M, Huber R. Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: A structural approach. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2004;1695:33–44.

19. Groll M, Huber R, Potts BCM. Crystal structures of salinosporamide A (NPI-0052) and B (NPI-0047) in complex with the 20S proteasome reveal important consequences of β -lactone ring opening and a mechanism for irreversible binding. *J Am Chem Soc.* 2006;128(15):5136–41.
20. Tsukamoto S, Yokosawa H. Targeting the proteasome pathway. *Expert Opin Ther Targets* [Internet]. 2009;13(5):605–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19397479>
21. Gallastegui N, Groll M. The 26S proteasome: assembly and function of a destructive machine. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2010;35(11):634–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2010.05.005>
22. Jankowska E, Stoj J, Karpowicz P, Osmulski PA, Gaczynska M. The proteasome in health and disease. *Curr Pharm Des.* 2013;19:1010–28.
23. Goldberg AL. Development of proteasome inhibitors as research tools and cancer drugs. *J Cell Biol.* 2012;199(4):583–8.
24. Gartel AL. A new target for proteasome inhibitors: FoxM1. *Expert Opin Investig Drugs.* 2010;19(2):235–42.
25. Wehenkel M, Ho YK, Kim K. Modulation of Protein Stability in Cancer Therapy. In: *Modulation of Protein Stability in Cancer* [Internet]. 2009. p. 99–119. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-69147-3>
26. Adams J, Elliott PJ. New agents in cancer clinical trials. *Oncogene* [Internet]. 2000;19:6687–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11426656>
27. Chen D, Frezza M, Schmitt S, Kanwar J, P. Dou Q. Bortezomib as the First Proteasome Inhibitor Anticancer Drug: Current Status and Future Perspectives. *Curr Cancer Drug Targets* [Internet]. 2011;11(3):239–53. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1568-0096&volume=11&issue=3&spage=239>
28. Allegra A, Alonci A, Gerace D, Russo S, Innao V, Calabrò L, et al. New orally active proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Leuk Res* [Internet]. 2014;38:1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2013.10.018>

29. Moore BS, Eustáquio AS, McGlinchey RP. Advances in and applications of proteasome inhibitors. *Curr Opin Chem Biol*. 2008;12:434–40.
30. Chari A, Mazumder A, Jagannath S. Proteasome inhibition and its therapeutic potential in multiple myeloma. *Biologics*. 2010;4:273–87.
31. Adams J, Kauffman M. Development of the Proteasome Inhibitor Velcade™ (Bortezomib). *Cancer Invest* [Internet]. 2004;22(2):304–11. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1081/CNV-120030218>
32. Kale AJ, Moore BS. Molecular Mechanisms of Acquired Proteasome Inhibitor Resistance. *J Med Chem*. 2012;55(23):10317–27.
33. Kortuem KM, Stewart AK. Carfilzomib. *Blood*. 2013;121(6):893–7.
34. Smith DC, Kalebic T, Infante JR, Siu LL, Sullivan D, Vlahovic G, et al. Phase 1 study of ixazomib, an investigational proteasome inhibitor, in advanced non-hematologic malignancies. *Invest New Drugs*. 2015;33:652–63.
35. Shirley M. Ixazomib: First Global Approval. *Drugs* [Internet]. 2016;76:405–11. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s40265-016-0548-5>
36. Guedes RA, Serra P, Salvador JAR, Guedes RC. Computational approaches for the discovery of human proteasome inhibitors: An overview. *Molecules*. 2016;21(927):1–27.
37. Merin N, Kelly K. Clinical Use of Proteasome Inhibitors in the Treatment of Multiple Myeloma. *Pharmaceuticals* [Internet]. 2014;8:1–20. Available from: <http://www.mdpi.com/1424-8247/8/1/1/>
38. Basse N, Montes M, Maréchal X, Qin L, Bouvier-Durand M, Genin E, et al. Novel organic proteasome inhibitors identified by virtual and in vitro screening. *J Med Chem*. 2010;53(1):509–13.
39. Guédât P, Colland F. Patented small molecule inhibitors in the ubiquitin proteasome system. *BMC Biochem* [Internet]. 2007;8(Suppl 1):1–12. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/8/S1/S14>
40. Blackburn C, Gigstad KM, Hales P, Garcia K, Jones M, Bruzzese FJ, et al. Characterization of a new series of non-covalent proteasome inhibitors with exquisite potency and selectivity for the 20S β 5-subunit. *Biochem J* [Internet].

2010;430:461–76. Available from:
<http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20100383>

41. Kazi A, Lawrence H, Guida WC, McLaughlin ML, Springett GM, Berndt N, et al. Discovery of a novel proteasome inhibitor selective for cancer cells over non-transformed cells. *Cell Cycle*. 2009;8(12):1940–51.
42. Lawrence HR, Kazi A, Luo Y, Kendig R, Ge Y, Jain S, et al. Synthesis and biological evaluation of naphthoquinone analogs as a novel class of proteasome inhibitors. *Bioorganic Med Chem [Internet]*. 2010;18:5576–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2010.06.038>
43. Xu K, Xiao Z, Tang YB, Huang L, Chen CH, Ohkoshi E, et al. Design and synthesis of naphthoquinone derivatives as antiproliferative agents and 20S proteasome inhibitors. *Bioorganic Med Chem Lett [Internet]*. 2012;22:2772–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.02.086>
44. Wehenkel M V. TARGET VALIDATION OF UK-101 AND FUNCTIONAL STUDIES OF β 1i. [Lexington, Kentucky]: University of Kentucky, UKnowledge; 2011.
45. Baldisserotto A, Marastoni M, Trapella C, Gavioli R, Ferretti V, Pretto L, et al. Glutamine vinyl ester proteasome inhibitors selective for trypsin-like (beta2) subunit. *Eur J Med Chem*. 2007;42:586–92.
46. Reinstein E, Ciechanover A. Nature Review: Protein Degradation and Human Diseases: The Ubiquitin Connection. *Ann Intern Med [Internet]*. 2006;145:676–84. Available from: www.annals.org
47. Myung J, Kim KB, Crews CM. The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Med Res Rev [Internet]*. 2001;21(4):245–73. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2556558&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
48. Wang J, Maldonado M a. The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol*. 2006;3(4):255–61.
49. Teicher BA, Tomaszewski JE. Proteasome inhibitors. *Biochem Pharmacol*

- [Internet]. 2015;96:1–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295215002130>
50. Gaczynska M, Osmulski PA. Inhibitor at the gates, inhibitor in the chamber: allosteric and competitive inhibitors of the proteasome as prospective drugs. *Curr Med Chem Immunol, Endocr Metab Agents*. 2002;2(4):279–301.
 51. PASSMORE LA, BARFORD D. Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochem J* [Internet]. 2004;379:513–25. Available from: <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/bj20040198>
 52. Tsukamoto S. The search for inhibitors of the ubiquitin-proteasome system from natural resources for drug development. *J Nat Med*. 2006;60:273–8.
 53. Dick LR, Fleming PE. Building on bortezomib: second-generation proteasome inhibitors as anti-cancer therapy. *Drug Discov Today* [Internet]. 2010;15(5–6):243–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2010.01.008>
 54. Groll M, Ditzel L, Löwe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, et al. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4Å resolution. *Nature* [Internet]. 1997;386(6624):463–71. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/386463a0>
 55. Kisselev AF, Akopian TN, Castillo V, Goldberg AL. Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown. *Mol Cell*. 1999;4(3):395–402.
 56. Genin E, Reboud-Ravaux M, Vidal J. Proteasome inhibitors: recent advances and new perspectives in medicinal chemistry. *Curr Top Med Chem* [Internet]. 2010;10:232–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20166955>
 57. Zhang J, Wu P, Hu Y. Clinical and marketed proteasome inhibitors for cancer treatment. *Curr Med Chem*. 2013;20(20):2537–51.
 58. Kisselev AF, Van Der Linden WA, Overkleeft HS. proteasome Inhibitors: An expanding army Attacking a unique target. *Chem Biol*. 2012;19(1):99–115.
 59. Micale N, Scarbaci K, Troiano V, Ettari R, Grasso S, Zappalà M. Peptide-Based Proteasome Inhibitors in Anticancer Drug Design. *Med Res Rev*. 2014;34(5):1001–69.

60. Kaur G, Batra S. Emerging role of immunoproteasomes in pathophysiology. *Immunol Cell Biol* [Internet]. 2016;94(9):812–20. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/icb.2016.50>
61. Miller Z, Ao L, Kim KB, Lee W. Inhibitors of the immunoproteasome: current status and future directions. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2013;19(22):4140–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23181576>
62. Bellavista E, Andreoli F, Parenti MD, Martucci M, Santoro A, Salvioli S, et al. Immunoproteasome in cancer and neuropathologies: a new therapeutic target? *Curr Pharm Des* [Internet]. 2013;19:702–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23016859>
63. Rentsch A, Landsberg D, Brodmann T, Bülow L, Girbig AK, Kalesse M. Synthesis and pharmacology of proteasome inhibitors. *Angew Chemie - Int Ed*. 2013;52:5450–88.
64. Groll M, Balskus EP, Jacobsen EN. Structural analysis of spiro beta-lactone proteasome inhibitors. *J Am Chem Soc* [Internet]. 2008;130(45):14981–3. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2587002&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
65. Drexler HC. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1997;94(3):855–60. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=19603&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
66. Rastogi N, Mishra DP. Therapeutic targeting of cancer cell cycle using proteasome inhibitors. *Cell Div* [Internet]. 2012;7(1):26. Available from: <http://celldiv.biomedcentral.com/articles/10.1186/1747-1028-7-26>
67. McConkey DJ, Zhu K. Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer. *Drug Resist Updat*. 2008;11:164–79.
68. Ri M. Endoplasmic-reticulum stress pathway-associated mechanisms of action

of proteasome inhibitors in multiple myeloma. Vol. 104, International Journal of Hematology. 2016. p. 273–80.

69. Angeles A, Fung G, Luo H. Immune and non-immune functions of the immunoproteasome. *Front Biosci (Landmark Ed)* [Internet]. 2012;17:1904–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22201844>
70. Volkov A, Hagner S, Löser S, Alnahas S, Raifer H, Hellhund A, et al. $\beta 5i$ Subunit Deficiency of the Immunoproteasome Leads to Reduced Th2 Response in OVA Induced Acute Asthma. *PLoS One*. 2013;8(4):1–11.
71. Bulatov E, Khaiboullina S, dos Reis HJ, Palotás A, Venkataraman K, Vijayalakshmi M, et al. Ubiquitin-Proteasome System: Promising Therapeutic Targets in Autoimmune and Neurodegenerative Diseases. *Bionanoscience* [Internet]. 2016;6(4):341–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12668-016-0233-x>
72. Verbrugge S, Scheper RJ, Lems WF, de Gruijl TD, Jansen G. Proteasome inhibitors as experimental therapeutics of autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2015;17(17):1–10. Available from: <http://arthritis-research.com/content/17/1/17>
73. Pang KC, Sanders MT, Monaco JJ, Doherty PC, Turner SJ, Chen W. Immunoproteasome subunit deficiencies impact differentially on two immunodominant influenza virus-specific CD8⁺ T cell responses. *J Immunol*. 2006;177:7680–8.
74. Ying Z, Wang H, Wang G. The ubiquitin proteasome system as a potential target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2013;19(18):3305–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23151138>
75. Papaevgeniou N, Chondrogianni N. Proteostasis: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*. In: Matthiesen R, editor. New York: Springer-Science Business Media; 2016. p. 1–70. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-3756-1>
76. Schmidt M, Finley D. Regulation of proteasome activity in health and disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2014;1843:13–25. Available

from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488913003108>

77. Pagan J, Seto T, Pagano M, Cittadini A. Role of the ubiquitin proteasome system in the heart. *Circ Res*. 2013;112:1046–58.
78. Li YF, Wang X. The role of the proteasome in heart disease. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech*. 2011;1809(2):141–9.
79. Mearini G, Schlossarek S, Willis MS, Carrier L. The ubiquitin-proteasome system in cardiac dysfunction. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2008;1782:749–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.06.009>
80. Fukai T. Targeting Proteasome worsens atherosclerosis. *Circ Res*. 2007;101:859–61.
81. Dahlmann B. Role of proteasomes in disease. *BMC Biochem* [Internet]. 2007;8(Suppl 1):1–12. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/8/S1/S3>
82. Saez I, Vilchez D. The Mechanistic Links Between Proteasome Activity, Aging and Agerelated Diseases. *Curr Genomics* [Internet]. 2014;15(1):38–51. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2029&volume=15&issue=1&spage=38>
83. Carrard G, Bulteau A-L, Petropoulos I, Friguet B. Impairment of proteasome structure and function in aging. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2002 Nov 1 [cited 2017 Nov 7];34(11):1461–74. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272502000857?via%3Dihub>
84. Löw P. The role of ubiquitin-proteasome system in ageing. *Gen Comp Endocrinol*. 2011;172:39–43.
85. Gomes A V. Genetics of Proteasome Diseases. *Scientifica (Cairo)* [Internet]. 2013;1–30. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/scientifica/2013/637629/>
86. Vernace VA, Schmidt-Glenewinkel T, Figueiredo-Pereira ME. Aging and regulated protein degradation: Who has the UPPer hand? *Aging Cell*.

2007;6:599–606.

87. Brannigan JA, Dodson G, Duggleby HJ, Moody PCE, Smith JL, Tomchick DR, et al. A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature* [Internet]. 1995;378(6555):416–9. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/378416a0>
88. Oinonen C, Rouvinen J. Structural comparison of Ntn-hydrolases. *Protein Sci* [Internet]. 2000;9(12):2329–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11206054> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2144523>
89. Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol* [Internet]. 2001;8(8):739–58. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074552101000564>
90. Vinitzky A, Cardozo C, Sepp-Lorenzino L, Michaud C, Orlowski M. Inhibition of the proteolytic activity of the multicatalytic proteinase complex (proteasome) by substrate-related peptidyl aldehydes. *J Biol Chem*. 1994;269(47):29860–6.
91. Iqbal M, Chatterjee S, Kauer JC, Das M, Messina P, Freed B, et al. Potent Inhibitors of Proteasome. *J Med Chem*. 1995;38(13):2276–7.
92. Borissenko L, Groll M. 20S proteasome and its inhibitors: crystallographic knowledge for drug development. *Chem Rev*. 2007;107(3):687–717.
93. Gozzetti A, Papini G, Candi V, Brambilla CZ, Sirianni S, Bocchia M. Second Generation Proteasome Inhibitors in Multiple Myeloma. 2017;17(7):920–6.
94. Huber EM, Groll M. Inhibitors for the immuno- and constitutive proteasome: Current and future trends in drug development. *Angew Chemie - Int Ed*. 2012;51(35):8708–20.
95. Meng L, Mohan R, Kwok BHB, Elofsson M, Sin N, Crews CM. Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1999;96:10403–8. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.96.18.10403>
96. Mirabella AC, Pletnev AA, Downey SL, Florea BI, Shabaneh TB, Britton M, et al. Specific cell-permeable inhibitor of proteasome trypsin-like sites

- selectively sensitizes myeloma cells to bortezomib and carfilzomib. *Chem Biol* [Internet]. 2011;18:608–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.02.015>
97. Lynas JF, Harriott P, Healy A, McKervey MA, Walker B. Inhibitors of the chymotrypsin-like activity of proteasome based on di- and tri-peptidyl α -keto aldehyde (glyoxals). *Bioorganic Med Chem Lett*. 1998;8:373–8.
98. Gräwert MA, Groll M. Exploiting nature's rich source of proteasome inhibitors as starting points in drug development. *Chem Commun* [Internet]. 2012;48(10):1364–78. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C1CC15273D>
99. Groll M, Schellenberg B, Bachmann AS, Archer CR, Huber R, Powell TK, et al. A plant pathogen virulence factor inhibits the eukaryotic proteasome by a novel mechanism. *Nature* [Internet]. 2008;452(7188):755–8. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature06782>
100. Shoji J, Hino H, Kato T, Hattori T, Hirooka K, Tawara K, et al. Isolation of cepafungins I, II and III from *Pseudomonas* species. *J Antibiot (Tokyo)*. 1990;43(7):783–7.
101. Rydzewski RM, Burrill L, Mendonca R, Palmer JT, Rice M, Tahilramani R, et al. Optimization of subsite binding to the β 5 subunit of the human 20S proteasome using vinyl sulfones and 2-keto-1,3,4-oxadiazoles: Syntheses and cellular properties of potent, selective proteasome inhibitors. *J Med Chem*. 2006;49(10):2953–68.
102. Nazif T, Bogyo M. Global analysis of proteasomal substrate specificity using positional-scanning libraries of covalent inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2001;98(6):2967–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11248015>
103. Groll M, Nazif T, Huber R, Bogyo M. Probing structural determinants distal to the site of hydrolysis that control substrate specificity of the 20S proteasome. *Chem Biol*. 2002;9(5):655–62.
104. Beck P, Dubiella C, Groll M. Covalent and non-covalent reversible proteasome inhibition. *Biol Chem*. 2012;393(10):1101–20.

105. Fenteany G, Standaert R, Lane W, Choi S, Corey E, Schreiber S. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* (80-) [Internet]. 1995;268(5211):726–31. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.7732382>
106. Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, et al. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* [Internet]. 1999;59(11):2615–22. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/59/11/2615.abstract>
107. Lin G, Li D, de Carvalho LPS, Deng H, Tao H, Vogt G, et al. Inhibitors selective for mycobacterial versus human proteasomes. *Nature* [Internet]. 2009;461(7264):621–6. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature08357>
108. Groll M, Koguchi Y, Huber R, Kohno J. Crystal structure of the 20 S proteasome:TMC-95A complex: a non-covalent proteasome inhibitor 1 Edited by I. A. Wilson. *J Mol Biol* [Internet]. 2001;311:543–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283601948697>
109. Groll M, Götz M, Kaiser M, Weyher E, Moroder L. TMC-95-Based Inhibitor Design Provides Evidence for the Catalytic Versatility of the Proteasome. *Chem Biol*. 2006;13(6):607–14.
110. Groll M, Huber R, Moroder L. The persisting challenge of selective and specific proteasome inhibition. *J Pept Sci*. 2009;15:58–66.
111. Bülow L, Nickeleit I, Girbig AK, Brodmann T, Rentsch A, Eggert U, et al. Synthesis and biological characterization of argyrin F. *ChemMedChem*. 2010;5(6):832–6.
112. Stauch B, Simon B, Basile T, Schneider G, Malek NP, Kalesse M, et al. Elucidation of the structure and intermolecular interactions of a reversible cyclic-peptide inhibitor of the proteasome by NMR spectroscopy and molecular modeling. *Angew Chemie - Int Ed*. 2010;49(23):3934–8.
113. Krunić A, Vallat A, Mo S, Lantvit DD, Swanson SM, Orjala J. Scytonemides A and B, cyclic peptides with 20S proteasome inhibitory activity from the cultured cyanobacterium *scytonema hofmannii*. *J Nat Prod*. 2010;73(11):1927–

114. Andre P, Groettrup M, Klenerman P, de Giuli R, Booth BL, Cerundolo V, et al. An inhibitor of HIV-1 protease modulates proteasome activity, antigen presentation, and T cell responses. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1998;95(22):13120–4. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.95.22.13120>
115. Furet P, Imbach P, Noorani M, Koepler J, Laumen K, Lang M, et al. Entry into a new class of potent proteasome inhibitors having high antiproliferative activity by structure-based design. *J Med Chem*. 2004;47(20):4810–3.
116. García-Echeverría C. Recent advances in the identification and development of 20S proteasome inhibitors. *Mini Rev Med Chem*. 2002;2(3):247–59.
117. Lum RT, Nelson MG, Joly A, Horsma AG, Lee G, Meyer SM, et al. Selective inhibition of the chymotrypsin-like activity of the 20S proteasome by 5-methoxy-1-indanone dipeptide benzamides. *Bioorganic Med Chem Lett*. 1998;8(3):209–14.
118. Pevzner Y, Metcalf R, Kantor M, Sagaro D, Daniel K. Recent advances in proteasome inhibitor discovery. *Expert Opin Drug Discov* [Internet]. 2013;8(5):537–68. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17460441.2013.780020> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23547800>
119. Ge Y, Kazi A, Marsilio F, Luo Y, Jain S, Brooks W, et al. Discovery and synthesis of hydronaphthoquinones as novel proteasome inhibitors. *J Med Chem*. 2012;55:1978–98.
120. Gallastegui N, Beck P, Arciniega M, Huber R, Hillebrand S, Groll M. Hydroxyureas as noncovalent proteasome inhibitors. *Angew Chemie - Int Ed*. 2012;51:247–9.
121. Schoof S, Pradel G, Aminake MN, Ellinger B, Baumann S, Potowski M, et al. Antiplasmodial thiostrepton derivatives: Proteasome inhibitors with a dual mode of action. *Angew Chemie - Int Ed*. 2010;49(19):3317–21.
122. Pandit B, Bhat U, Gartel AL. Proteasome inhibitory activity of thiazole antibiotics. *Cancer Biol Ther*. 2011;11(1):43–7.

123. Bhat UG, Halasi M, Gartel AL. Thiazole antibiotics target FoxM1 and induce apoptosis in human cancer cells. *PLoS One*. 2009;4(5).
124. Bhat UG, Halasi M, Gartel AL. FoxM1 is a general target for proteasome inhibitors. *PLoS One*. 2009;4(8).
125. Bonfili L, Cecarini V, Amici M, Cuccioloni M, Angeletti M, Keller JN, et al. Natural polyphenols as proteasome modulators and their role as anti-cancer compounds. Vol. 275, *FEBS Journal*. 2008. p. 5512–26.
126. Dou QP, Landis-Piwowar KR, Chen D, Huo C, Wan SB, Chan TH. Green tea polyphenols as a natural tumour cell proteasome inhibitor. Vol. 16, *Inflammopharmacology*. 2008. p. 208–12.
127. Nam S, Smith DM, Dou QP. Ester Bond-containing Tea Polyphenols Potently Inhibit Proteasome Activity in Vitro and in Vivo. *J Biol Chem*. 2001;276(16):13322–30.
128. Chen MS, Chen D, Dou QP. Inhibition of proteasome activity by various fruits and vegetables is associated with cancer cell death. *In Vivo (Brooklyn)* [Internet]. 2004;18(1):73–80. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15011755
129. Smith DM, Wang Z, Kazi A, Li L-H, Chan T-H, Dou QP. Synthetic analogs of green tea polyphenols as proteasome inhibitors. *Mol Med*. 2002;8(7):382–92.
130. Golden EB, Lam PY, Kardosh A, Gaffney KJ, Cadenas E, Louie SG, et al. Green tea polyphenols block the anticancer effects of bortezomib and other boronic acid-based proteasome inhibitors. *Blood*. 2009;113(23):5927–37.
131. Wan SB, Landis-Piwowar KR, Kuhn DJ, Chen D, Dou QP, Chan TH. Structure-activity study of epi-gallocatechin gallate (EGCG) analogs as proteasome inhibitors. *Bioorganic Med Chem*. 2005;13(6):2177–85.
132. Daniel KG, Landis-Piwowar KR, Chen D, Wan SB, Chan TH, Dou QP. Methylation of green tea polyphenols affects their binding to and inhibitory poses of the proteasome $\beta 5$ subunit. *Int J Mol Med*. 2006;18(4):625–32.
133. Lam WH, Kazi A, Kuhn DJ, Chow LMC, Chan ASC, Ping Dou Q, et al. A

- potential prodrug for a green tea polyphenol proteasome inhibitor: Evaluation of the peracetate ester of (-)-epigallocatechin gallate [(-)-EGCG]. *Bioorganic Med Chem.* 2004;12(21):5587–93.
134. Lambert JD, Sang S, Hong J, Kwon SJ, Lee MJ, Ho CT, et al. Peracetylation as a means of enhancing in vitro bioactivity and bioavailability of epigallocatechin-3-gallate. *Drug Metab Dispos.* 2006;34(12):2111–6.
135. Smith DM, Daniel KG, Wang Z, Guida WC, Chan TH, Dou QP. Docking studies and model development of tea polyphenol proteasome inhibitors: applications to rational drug design. *Proteins* [Internet]. 2004;54(1):58–70. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14705024
136. Osanai K, Huo C, Landis-Piwowar KR, Ping Dou Q, Chan T-H. Synthesis of (2R,3R)-epigallocatechin-3-O-(4-hydroxybenzoate), a novel catechin from *Cistus salvifolius*, and evaluation of its proteasome inhibitory activities. *Tetrahedron.* 2007;63(32):7565–70.
137. AGERBERTH B, LEE J - Y, BERGMAN T, CARLQUIST M, BOMAN HG, MUTT V, et al. Amino acid sequence of PR- 39: Isolation from pig intestine of a new member of the family of proline- arginine- rich antibacterial peptides. *Eur J Biochem.* 1991;202(3):849–54.
138. Gao Y, Lecker S, Post MJ, Hietaranta AJ, Li J, Volk R, et al. Inhibition of ubiquitin-proteasome pathway-mediated I κ B α degradation by a naturally occurring antibacterial peptide. *J Clin Invest.* 2000;106(3):439–48.
139. Gaczynska M, Osmulski PA, Gao Y, Post MJ, Simons M. Proline- and arginine-rich peptides constitute a novel class of allosteric inhibitors of proteasome activity. *Biochemistry.* 2003;42(29):8663–70.
140. Sprangers R, Li X, Mao X, Rubinstein JL, Schimmer AD, Kay LE. TROSY-based NMR evidence for a novel class of 20S proteasome inhibitors. *Biochemistry* [Internet]. 2008;47(26):6727–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18540636>
141. Mao X, Li X, Sprangers R, Wang X, Venugopal A, Wood T, et al. Clioquinol

- inhibits the proteasome and displays preclinical activity in leukemia and myeloma. *Leukemia* [Internet]. 2009;23:585–90. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/leu.2008.232>
142. Chen D, Cui QC, Yang H, Barrea RA, Sarkar FH, Sheng S, et al. Clioquinol, a therapeutic agent for Alzheimer's disease, has proteasome-inhibitory, androgen receptor-suppressing, apoptosis-inducing, and antitumor activities in human prostate cancer cells and xenografts. *Cancer Res.* 2007;67(4):1636–44.
 143. Li X, Wood TE, Sprangers R, Jansen G, Franke NE, Mao X, et al. Effect of noncompetitive proteasome inhibition on bortezomib resistance. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(14):1069–82.
 144. Kisselev AF, Callard A, Goldberg AL. Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J Biol Chem.* 2006;281(13):8582–90.
 145. Elofsson M, Splittgerber U, Myung J, Mohan R, Crews CM. Towards subunit-specific proteasome inhibitors: synthesis and evaluation of peptide α β -epoxyketones. *Chem Biol.* 1999;6(11):811–22.
 146. Britton M, Lucas MM, Downey SL, Screen M, Pletnev AA, Verdoes M, et al. Selective Inhibitor of Proteasome's Caspase-like Sites Sensitizes Cells to Specific Inhibition of Chymotrypsin-like Sites. *Chem Biol.* 2009;16(12):1278–89.
 147. Screen M, Britton M, Downey SL, Verdoes M, Voges MJ, Blom AEM, et al. Nature of pharmacophore influences active site specificity of proteasome inhibitors. *J Biol Chem.* 2010;285(51):40125–34.
 148. Verdoes M, Willems LI, van der Linden WA, Duivenvoorden BA, van der Marel GA, Florea BI, et al. A panel of subunit-selective activity-based proteasome probes. *Org Biomol Chem* [Internet]. 2010;8(12):2719–27. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c001036g>
 149. Loidl G, Groll M, Musiol HJ, Ditzel L, Huber R, Moroder L. Bifunctional inhibitors of the trypsin-like activity of eukaryotic proteasomes. *Chem Biol.* 1999;6(4):197–204.
 150. Marastoni M, Baldisserotto A, Cellini S, Gavioli R, Tomatis R. Peptidyl vinyl

- ester derivatives: New class of selective inhibitors of proteasome trypsin-like activity. *J Med Chem.* 2005;48(15):5038–42.
151. van der Linden WA, Willems LI, Shabaneh TB, Li N, Ruben M, Florea BI, et al. Discovery of a potent and highly β 1 specific proteasome inhibitor from a focused library of urea-containing peptide vinyl sulfones and peptide epoxyketones. *Org Biomol Chem* [Internet]. 2012;10(1):181–94. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C1OB06554H>
152. Carmony K, Lee W, Kim KB. High-Resolution Snapshots of Proteasome Inhibitors in Action Revise Inhibition Paradigms and Inspire Next-Generation Inhibitor Design. *ChemBioChem.* 2016;17:2115–7.
153. Goldberg AL. Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. *Biochem Soc Trans.* 2007;35:12–7.
154. Sánchez-Serrano I. Success in translational research: lessons from the development of bortezomib. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2006;5(2):107–14. Available from: <http://www.nature.com/nrd/journal/v5/n2/abs/nrd1959.html>
155. Kaplan GS, Torcun CC, Grune T, Ozer NK, Karademir B. Proteasome inhibitors in cancer therapy: Treatment regimen and peripheral neuropathy as a side effect. *Free Radic Biol Med.* 2017;103:1–13.
156. Teicher BA, Anderson KC. CCR 20th anniversary commentary: In the beginning, there was PS-341. *Clin Cancer Res.* 2015;21(5):939–41.
157. Obrist F, Manic G, Kroemer G, Vitale I, Galluzzi L. Trial Watch: Proteasomal inhibitors for anticancer therapy. *Mol Cell Oncol* [Internet]. 2014;2(2):1–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27308423>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4904962>
158. Kuhn DJ, Chen Q, Voorhees PM, Strader JS, Shenk KD, Sun CM, et al. Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. *J Cardiovasc Pharmacol* [Internet]. 2007;110(9):3281–90. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0->

159. Harshbarger W, Miller C, Diedrich C, Sacchettini J. Crystal structure of the human 20S proteasome in complex with carfilzomib. *Structure* [Internet]. 2015;23:418–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2014.11.017>
160. Moreau P. The emerging role of carfilzomib combination therapy in the management of multiple myeloma. *Expert Rev Hematol*. 2014;7(2):265–90.
161. Kupperman E, Lee EC, Cao Y, Bannerman B, Fitzgerald M, Berger A, et al. Evaluation of the proteasome inhibitor MLN9708 in preclinical models of human cancer. *Cancer Res*. 2010;70(5):1970–80.
162. Feling RH, Buchanan GO, Mincer TJ, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W. Salinosporamide A: A highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospira*. *Angew Chemie - Int Ed*. 2003;42(3):355–7.
163. Fenical W, Jensen PR, Palladino MA, Lam KS, Lloyd GK, Potts BC. Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). *Bioorganic Med Chem* [Internet]. 2009;17:2175–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2008.10.075>
164. Macherla VR, Mitchell SS, Manam RR, Reed KA, Chao TH, Nicholson B, et al. Structure-activity relationship studies of salinosporamide A (NPI-0052), a novel marine derived proteasome inhibitor. *J Med Chem*. 2005;48(11):3684–7.
165. Manam RR, McArthur KA, Chao TH, Weiss J, Ali JA, Palombella VJ, et al. Leaving groups prolong the duration of 20S proteasome inhibition and enhance the potency of salinosporamides. *J Med Chem*. 2008;51(21):6711–24.
166. Gulder TAM, Moore BS. Salinosporamide Natural Products: Potent 20S proteasome Inhibitors as Promising cancer Chemotherapeutics. *Angew Chemie - Int Ed*. 2010;49(49):9346–67.
167. Zhou H-J, Aujay M, Bennett M, Dajee M, Demo S, Fang Y, et al. Design and Synthesis of PR-047 , an Orally Bioavailable , Selective Proteasome Inhibitor. *J Med Chem*. 2009;52(9):3028–38.
168. Chauhan D, Singh A V., Aujay M, Kirk CJ, Bandi M, Ciccarelli B, et al. A

- novel orally active proteasome inhibitor ONX 0912 triggers in vitro and in vivo cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood*. 2010;116(23):4906–15.
169. Rajan AM, Kumar S. New investigational drugs with single-agent activity in multiple myeloma. *Blood Cancer J* [Internet]. 2016;6(451):1–10. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/bcj.2016.53>
 170. Chauhan D, Hideshima T, Anderson KC. A novel proteasome inhibitor NPI-0052 as an anticancer therapy. *Br J Cancer* [Internet]. 2006;95(8):961–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2360698&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 171. Dorsey B, Iqbal M, Chatterjee S, Menta E, Bernardini R, Bernareggi A, et al. Discovery of a potent, selective, and orally active proteasome inhibitor for the treatment of cancer. *J Med Chem* [Internet]. 2008;51(4):1068–72. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-39749143840&partnerID=40&md5=b0dc0b6c0bf28a4dc56e463820c70fe0>
 172. Piva R, Ruggeri B, Williams M, Costa G, Tamagno I, Ferrero D, et al. CEP-18770: A novel, orally active proteasome inhibitor with a tumor-selective pharmacologic profile competitive with bortezomib. *Blood*. 2008;111(5):2765–75.
 173. Sanchez E, Li M, Steinberg JA, Wang C, Shen J, Bonavida B, et al. The proteasome inhibitor CEP-18770 enhances the anti-myeloma activity of bortezomib and melphalan. *Br J Haematol*. 2010;148:569–81.
 174. Gallerani E, Zucchetti M, Brunelli D, Marangon E, Noberasco C, Hess D, et al. A first in human phase I study of the proteasome inhibitor CEP-18770 in patients with advanced solid tumours and multiple myeloma. *Eur J Cancer*. 2013;49:290–6.
 175. Ocio E, Richardson PG, Palumbo A, Mateos M, Orłowski RZ, Kumar S, et al. New Drugs and Novel Mechanisms of Action in Multiple Myeloma in 2013: A report from the International Myeloma Working Group (IMWG). *Leukemia*. 2014;28(3):525–42.

176. Vogl DT, Martin TG, Vij R, Hari P, Mikhael JR, Siegel D, et al. Phase I/II study of the novel proteasome inhibitor delanzomib (CEP-18770) for relapsed and refractory multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2017;58(8):1872–9. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10428194.2016.1263842>
177. Barbosa MLDC, Lima LM, Tesch R, Sant'Anna CMR, Totzke F, Kubbutat MHG, et al. Novel 2-chloro-4-anilino-quinazoline derivatives as EGFR and VEGFR-2 dual inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2014;71:1–14.
178. Yu S, Zhang L, Yan S, Wang P, Sanchez T, Christ F, et al. Nitrogen-containing polyhydroxylated aromatics as HIV-1 integrase inhibitors: synthesis, structure-activity relationship analysis, and biological activity. *J Enzyme Inhib Med Chem* [Internet]. 2012;27(5):628–40. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/14756366.2011.604851>
179. Mital A, Sonawane M, Bindal S, Mahlavat S, Negi V. Substituted 1,4-naphthoquinones as a new class of antimycobacterial agents. *Der Pharma Chem* [Internet]. 2010;2(3):63–73. Available from: <http://scholarsresearchlibrary.com/ABR-vol1-iss2/ABR-2010-1-2-87-90.pdf>
180. Lima LM, Castro P, Machado AL, Fraga CAM, Lugnier C, De Moraes VLG, et al. Synthesis and anti-inflammatory activity of phthalimide derivatives, designed as new thalidomide analogues. *Bioorganic Med Chem*. 2002;10:3067–73.
181. Istanbulu H, Erzurumlu Y, Kirmizibayrak PB, Erciyas E. Evaluation of alkylating and intercalating properties of mannich bases for cytotoxic activity. *Lett Drug Des Discov*. 2015;11(9).
182. Gülcemal D, Alanku-Çalışkan Ö, Karaalp C, Örs AU, Ballar P, Bedir E. Phenolic Glycosides with antiproteasomal activity from *Centaurea urvillei* DC. subsp. *urvillei*. *Carbohydr Res*. 2010;345(17):2529–33.
183. Sozen E, Karademir B, Yazgan B, Bozaykut P, Ozer NK. Potential role of proteasome on c-jun related signaling in hypercholesterolemia induced atherosclerosis. *Redox Biol* [Internet]. 2014;2:732–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2014.02.007>

184. Calandra JC, Adams EC. The Preparation of Amine Derivatives of 2-Chloro-1,4-naphthoquinone. *J Am Chem Soc* [Internet]. 1950;72(10):4804–4804. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja01166a130>
185. Pingaew R, Prachayasittikul V, Worachartcheewan A, Nantasenamat C, Prachayasittikul S, Ruchirawat S, et al. Novel 1,4-naphthoquinone-based sulfonamides: Synthesis, QSAR, anticancer and antimalarial studies. *Eur J Med Chem*. 2015;103:446–59.
186. Nakanishi K, Solomon PH. *Infrared Absorption Spectroscopy*. San Francisco: Holden Day Inc; 1977.
187. Hesse M, Maier H, Bernd Zeeh. *Spectroscopic methods in organic chemistry*. New York: George Thieme Verlag; 1997.
188. Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. Spectrometric identification of organic compounds 7ed 2005 - Silverstein, Webster & Kiemle.pdf [Internet]. Vol. 21, *Microchemical Journal*. 2005. p. 496. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0026265X76900692>

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Tire’de doğdum. 2004 yılında lisans eğitimime başladığım Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’nden 2008 yılı Temmuz ayında mezun oldum. Aynı yılın Eylül ayında Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü’nün açtığı Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programını kazandım. Kasım ayında ise Farmasötik Kimya Anabilim Dalı’nda açılan sınavı kazanarak Araştırma Görevlisi kadrosuna atandım. 2011 yılı Ocak ayında yüksek lisansımı tamamlayarak Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından açılan Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Doktora Programına kayıtlı oldum. Doktora süreci içerisinde eğitimime, 3 ay süre ile kazanmış olduğum Erasmus-Socrates bursu kapsamında Martin Luther Üniversitesi Halle-Wittenberg Eczacılık Fakültesi, Medisinal Kimya Bölümü’nde devam ettim. Halen Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.

e-posta:sirin.uysal@ege.edu.tr

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**POTANSİYEL PROTEAZOM İNHİBİTÖRÜ
BİR GRUP KARBOSİKLİK VE HETEROSİKLİK BİLEŞİĞİN
SENTEZ VE BİYOAKTİVİTE ÇALIŞMALARI**

Farmasötik Kimya Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Arş. Gör. Uzm. Şirin UYSAL

Danışman

Doç. Dr. Zeynep SOYER

EKLER

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**POTANSİYEL PROTEAZOM İNHİBİTÖRÜ
BİR GRUP KARBOSİKLİK VE HETEROSİKLİK BİLEŞİĞİN
SENTEZ VE BİYOAKTİVİTE ÇALIŞMALARI**

Farmasötik Kimya Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Arş. Gör. Uzm. Şirin UYSAL

Danışman

Doç. Dr. Zeynep SOYER

EKLER

SPEKTRUMLAR

Spektrum 1. A0 kodlu bileşimin IR spektrumu	1
Spektrum 2. A0 kodlu bileşimin kütle spektrumu	2
Spektrum 3. A1 kodlu bileşimin IR spektrumu	3
Spektrum 4. A1 kodlu bileşimin kütle spektrumu	4
Spektrum 5. A2 kodlu bileşimin IR spektrumu	5
Spektrum 6. A2 kodlu bileşimin kütle spektrumu	6
Spektrum 7. A3 kodlu bileşimin IR spektrumu	7
Spektrum 8. A3 kodlu bileşimin kütle spektrumu	8
Spektrum 9. A9 kodlu bileşimin IR spektrumu	9
Spektrum 10. A9 kodlu bileşimin kütle spektrumu	10
Spektrum 11. A11 kodlu bileşimin IR spektrumu	11
Spektrum 12. A11 kodlu bileşimin kütle spektrumu	12
Spektrum 13. A12 kodlu bileşimin IR spektrumu	13
Spektrum 14. A12 kodlu bileşimin kütle spektrumu	14
Spektrum 15. A13 kodlu bileşimin IR spektrumu	15
Spektrum 16. A13 kodlu bileşimin kütle spektrumu	16
Spektrum 17. A14 kodlu bileşimin IR spektrumu	17
Spektrum 18. A14 kodlu bileşimin kütle spektrumu	18
Spektrum 19. A15 kodlu bileşimin IR spektrumu	19
Spektrum 20. A15 kodlu bileşimin kütle spektrumu	20
Spektrum 21. A16 kodlu bileşimin IR spektrumu	21
Spektrum 22. A16 kodlu bileşimin kütle spektrumu	22
Spektrum 23. A17 kodlu bileşimin IR spektrumu	23
Spektrum 24. A17 kodlu bileşimin kütle spektrumu	24
Spektrum 25. A18 kodlu bileşimin IR spektrumu	25

Spektrum 26. A18 kodlu bileşimin kütle spektrumu	26
Spektrum 27. A19 kodlu bileşimin IR spektrumu	27
Spektrum 28. A19 kodlu bileşimin kütle spektrumu	28
Spektrum 29. A20 kodlu bileşimin IR spektrumu	29
Spektrum 30. A20 kodlu bileşimin kütle spektrumu	30
Spektrum 31. A21 kodlu bileşimin IR spektrumu	31
Spektrum 32. A21 kodlu bileşimin kütle spektrumu	32
Spektrum 33. A22 kodlu bileşimin IR spektrumu	33
Spektrum 34. A22 kodlu bileşimin kütle spektrumu	34
Spektrum 35. A23 kodlu bileşimin IR spektrumu	35
Spektrum 36. A23 kodlu bileşimin kütle spektrumu	36
Spektrum 37. A24 kodlu bileşimin IR spektrumu	37
Spektrum 38. A24 kodlu bileşimin kütle spektrumu	38
Spektrum 39. A25 kodlu bileşimin IR spektrumu	39
Spektrum 40. A25 kodlu bileşimin kütle spektrumu	40
Spektrum 41. A26 kodlu bileşimin IR spektrumu	41
Spektrum 42. A26 kodlu bileşimin kütle spektrumu	42
Spektrum 43. A28 kodlu bileşimin IR spektrumu	43
Spektrum 44. A28 kodlu bileşimin kütle spektrumu	44
Spektrum 45. A29 kodlu bileşimin IR spektrumu	45
Spektrum 46. A29 kodlu bileşimin kütle spektrumu	46
Spektrum 47. A30 kodlu bileşimin IR spektrumu	47
Spektrum 48. A30 kodlu bileşimin kütle spektrumu	48
Spektrum 49. A31 kodlu bileşimin IR spektrumu	49
Spektrum 50. A31 kodlu bileşimin kütle spektrumu	50
Spektrum 51. NS1 kodlu bileşimin IR spektrumu	51

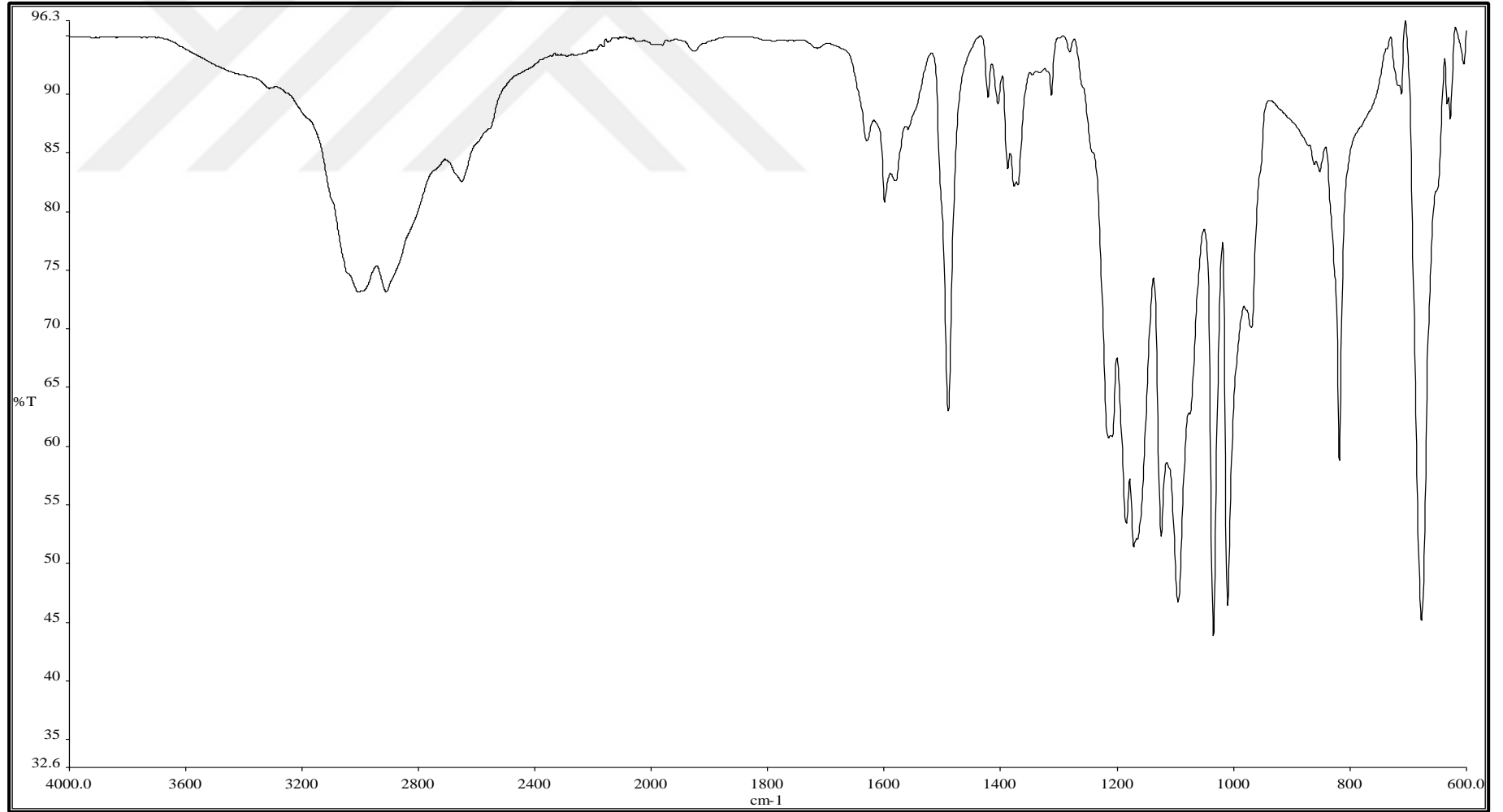
Spektrum 52. NS1 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	52
Spektrum 53. NS1 kodlu bileşiğin kütle spektrumu	53
Spektrum 54. NS2 kodlu bileşiğin IR spektrumu	54
Spektrum 55. NS2 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	55
Spektrum 56. NS2 kodlu bileşiğin kütle spektrumu	56
Spektrum 57. NS1 kodlu bileşiğin IR spektrumu	57
Spektrum 58. NS3 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	58
Spektrum 59. NS3 kodlu bileşiğin kütle spektrumu	59
Spektrum 60. NS9 kodlu bileşiğin IR spektrumu	60
Spektrum 61. NS9 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	61
Spektrum 62. NS9 kodlu bileşiğin kütle spektrumu	62
Spektrum 63. NS11 kodlu bileşiğin IR spektrumu	63
Spektrum 64. NS11 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	64
Spektrum 65. NS11 kodlu bileşiğin kütle spektrumu	65
Spektrum 66. NS12 kodlu bileşiğin IR spektrumu	66
Spektrum 67. NS12 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	67
Spektrum 68. NS12 kodlu bileşiğin kütle spektrumu	68
Spektrum 69. NS13 kodlu bileşiğin IR spektrumu	69
Spektrum 70. NS13 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	70
Spektrum 71. NS13 kodlu bileşiğin kütle spektrumu	71
Spektrum 72. NS14 kodlu bileşiğin IR spektrumu	72
Spektrum 73. NS14 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	73
Spektrum 74. NS14 kodlu bileşiğin kütle spektrumu	74
Spektrum 75. NS15 kodlu bileşiğin IR spektrumu	75
Spektrum 76. NS15 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	76
Spektrum 77. NS15 kodlu bileşiğin kütle spektrumu	77

Spektrum 78. NS16 kodlu bileşiğin IR spektrumu	78
Spektrum 79. NS16 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	79
Spektrum 80. NS16 kodlu bileşiğin kütle spektrumu	80
Spektrum 81. NS17 kodlu bileşiğin IR spektrumu	81
Spektrum 82. NS17 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	82
Spektrum 83. NS17 kodlu bileşiğin kütle spektrumu	83
Spektrum 84. NS18 kodlu bileşiğin IR spektrumu	84
Spektrum 85. NS18 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	85
Spektrum 86. NS18 kodlu bileşiğin kütle spektrumu	86
Spektrum 87. NS19 kodlu bileşiğin IR spektrumu	87
Spektrum 88. NS19 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	88
Spektrum 89. NS19 kodlu bileşiğin kütle spektrumu	89
Spektrum 90. NS20 kodlu bileşiğin IR spektrumu	90
Spektrum 91. NS20 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	91
Spektrum 92. NS20 kodlu bileşiğin kütle spektrumu	92
Spektrum 93. NS21 kodlu bileşiğin IR spektrumu	93
Spektrum 94. NS21 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	94
Spektrum 95. NS21 kodlu bileşiğin kütle spektrumu	95
Spektrum 96. NS22 kodlu bileşiğin IR spektrumu	96
Spektrum 97. NS22 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	97
Spektrum 98. NS22 kodlu bileşiğin kütle spektrumu	98
Spektrum 99. NS23 kodlu bileşiğin IR spektrumu	99
Spektrum 100. NS23 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	100
Spektrum 101. NS23 kodlu bileşiğin kütle spektrumu	101
Spektrum 102. NS24 kodlu bileşiğin IR spektrumu	102
Spektrum 103. NS24 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	103

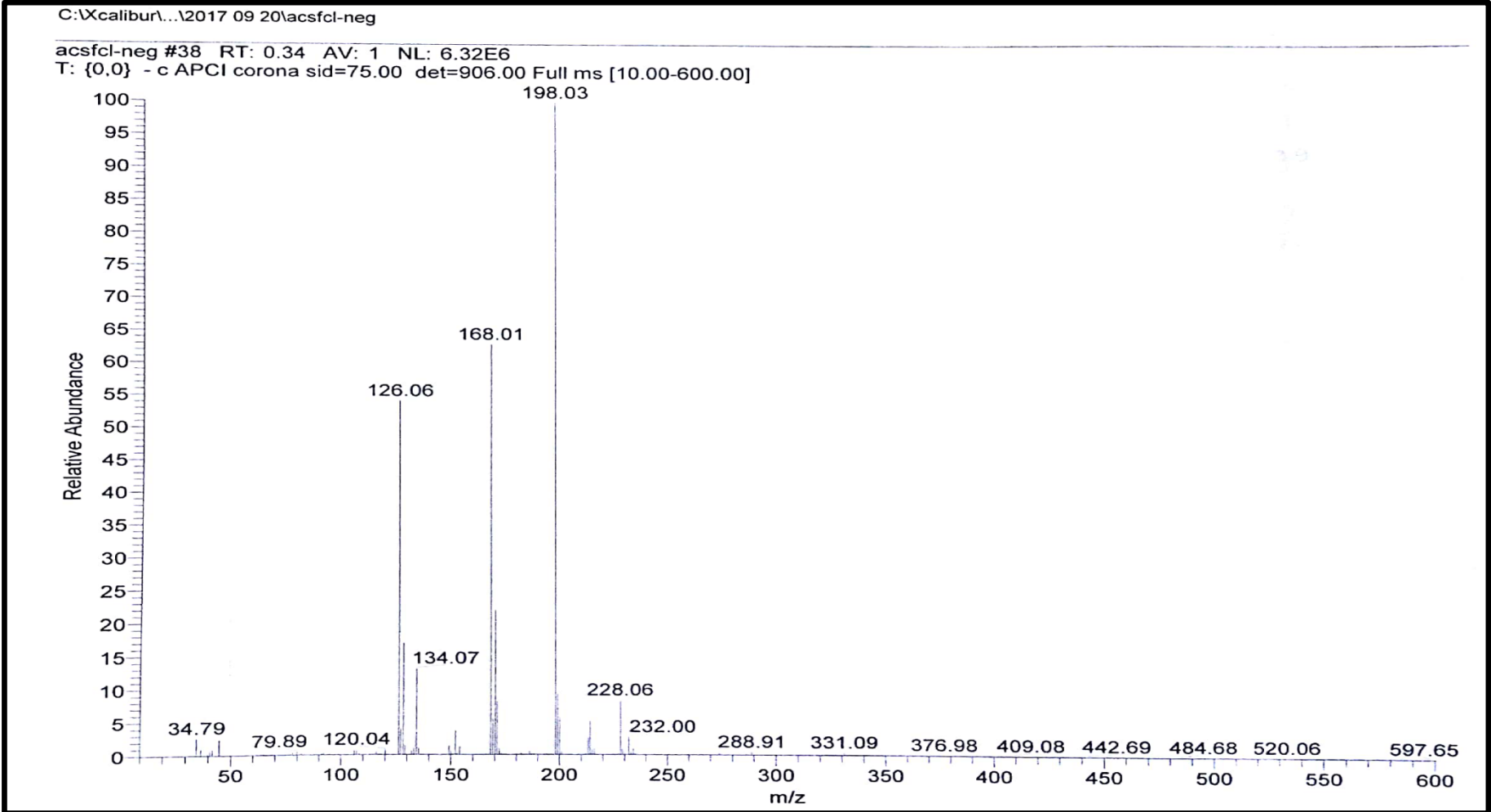
Spektrum 104. NS24 kodlu bileşiğin kütle spektrumu	104
Spektrum 105. NS25 kodlu bileşiğin IR spektrumu	105
Spektrum 106. NS25 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	106
Spektrum 107. NS25 kodlu bileşiğin kütle spektrumu	107
Spektrum 108. NS26 kodlu bileşiğin IR spektrumu	108
Spektrum 109. NS26 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	109
Spektrum 110. NS26 kodlu bileşiğin kütle spektrumu	110
Spektrum 111. NS28 kodlu bileşiğin IR spektrumu	111
Spektrum 112. NS28 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	112
Spektrum 113. NS28 kodlu bileşiğin kütle spektrumu	113
Spektrum 114. NS29 kodlu bileşiğin IR spektrumu	114
Spektrum 115. NS29 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	115
Spektrum 116. NS29 kodlu bileşiğin kütle spektrumu	116
Spektrum 117. NS30 kodlu bileşiğin IR spektrumu	117
Spektrum 118. NS30 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	118
Spektrum 119. NS30 kodlu bileşiğin kütle spektrumu	119
Spektrum 120. NK1 kodlu bileşiğin IR spektrumu.....	120
Spektrum 121. NK1 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	121
Spektrum 122. NK1 kodlu bileşiğin kütle spektrumu.....	122
Spektrum 123. NK2 kodlu bileşiğin IR spektrumu.....	123
Spektrum 124. NK2 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	124
Spektrum 125. NK2 kodlu bileşiğin kütle spektrumu.....	125
Spektrum 126. NK4 kodlu bileşiğin IR spektrumu.....	126
Spektrum 127. NK4 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	127
Spektrum 128. NK4 kodlu bileşiğin kütle spektrumu.....	128
Spektrum 129. NK5 kodlu bileşiğin IR spektrumu.....	129

Spektrum 130. NK5 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu	130
Spektrum 131. NK5 kodlu bileşiğin kütle spektrumu.....	131
Spektrum 132. NK6 kodlu bileşiğin IR spektrumu.....	132
Spektrum 133. NK6 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu	133
Spektrum 134. NK6 kodlu bileşiğin kütle spektrumu.....	134
Spektrum 135. NK7 kodlu bileşiğin IR spektrumu.....	135
Spektrum 136. NK7 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu	136
Spektrum 137. NK7 kodlu bileşiğin kütle spektrumu.....	137
Spektrum 138. NK8 kodlu bileşiğin IR spektrumu.....	138
Spektrum 139. NK8 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu	139
Spektrum 140. NK8 kodlu bileşiğin kütle spektrumu.....	140
Spektrum 141. NK9 kodlu bileşiğin IR spektrumu.....	141
Spektrum 142. NK9 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu	142
Spektrum 143. NK9 kodlu bileşiğin kütle spektrumu.....	143
Spektrum 144. NK11 kodlu bileşiğin IR spektrumu.....	144
Spektrum 145. NK11 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu	145
Spektrum 146. NK11 kodlu bileşiğin kütle spektrumu.....	146
Spektrum 147. NK12 kodlu bileşiğin IR spektrumu.....	147
Spektrum 148. NK12 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu	148
Spektrum 149. NK12 kodlu bileşiğin kütle spektrumu.....	149
Spektrum 150. NK13 kodlu bileşiğin IR spektrumu.....	150
Spektrum 151. NK13 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu	151
Spektrum 152. NK13 kodlu bileşiğin kütle spektrumu.....	152
Spektrum 153. NK14 kodlu bileşiğin IR spektrumu.....	153
Spektrum 154. NK14 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu	154
Spektrum 155. NK14 kodlu bileşiğin kütle spektrumu.....	155

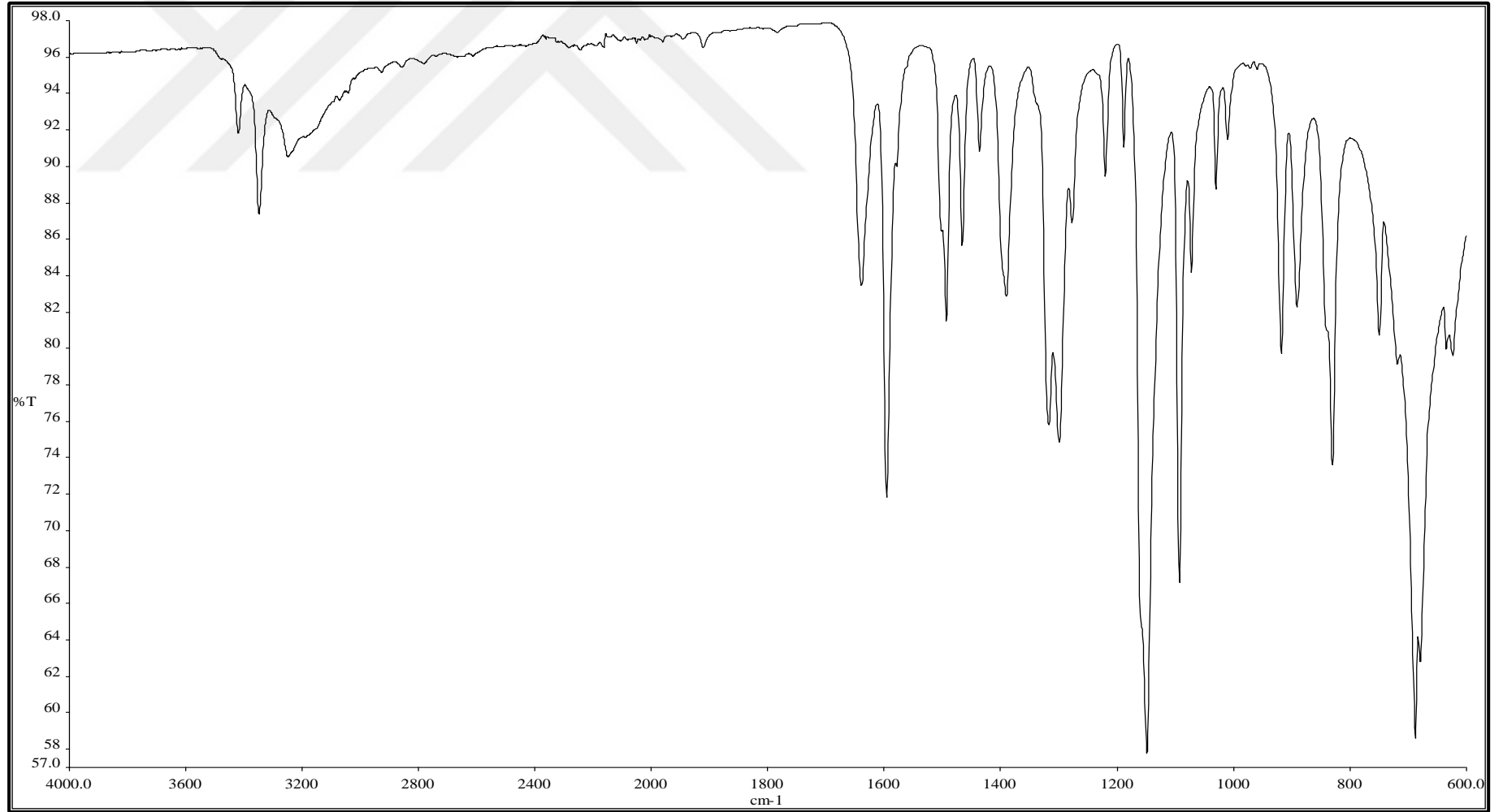
Spektrum 156. NK15 kodlu bileşiğin IR spektrumu.....	156
Spektrum 157. NK15 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	157
Spektrum 158. NK15 kodlu bileşiğin kütle spektrumu.....	158
Spektrum 159. NK16 kodlu bileşiğin IR spektrumu.....	159
Spektrum 160. NK16 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	160
Spektrum 161. NK16 kodlu bileşiğin kütle spektrumu.....	161
Spektrum 162. NK17 kodlu bileşiğin IR spektrumu.....	162
Spektrum 163. NK17 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	163
Spektrum 164. NK17 kodlu bileşiğin kütle spektrumu.....	164
Spektrum 165. NK18 kodlu bileşiğin IR spektrumu.....	165
Spektrum 166. NK18 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	166
Spektrum 167. NK18 kodlu bileşiğin kütle spektrumu.....	167
Spektrum 168. NK20 kodlu bileşiğin IR spektrumu.....	168
Spektrum 169. NK20 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	169
Spektrum 170. NK20 kodlu bileşiğin kütle spektrumu.....	170
Spektrum 171. NK30 kodlu bileşiğin IR spektrumu.....	171
Spektrum 172. NK30 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	172
Spektrum 173. NK30 kodlu bileşiğin kütle spektrumu.....	173



Spektrum 1. A0 kodlu bileşğin IR spektrumu



Spektrum 2. A0 kodlu bileşğin kütle spektrumu

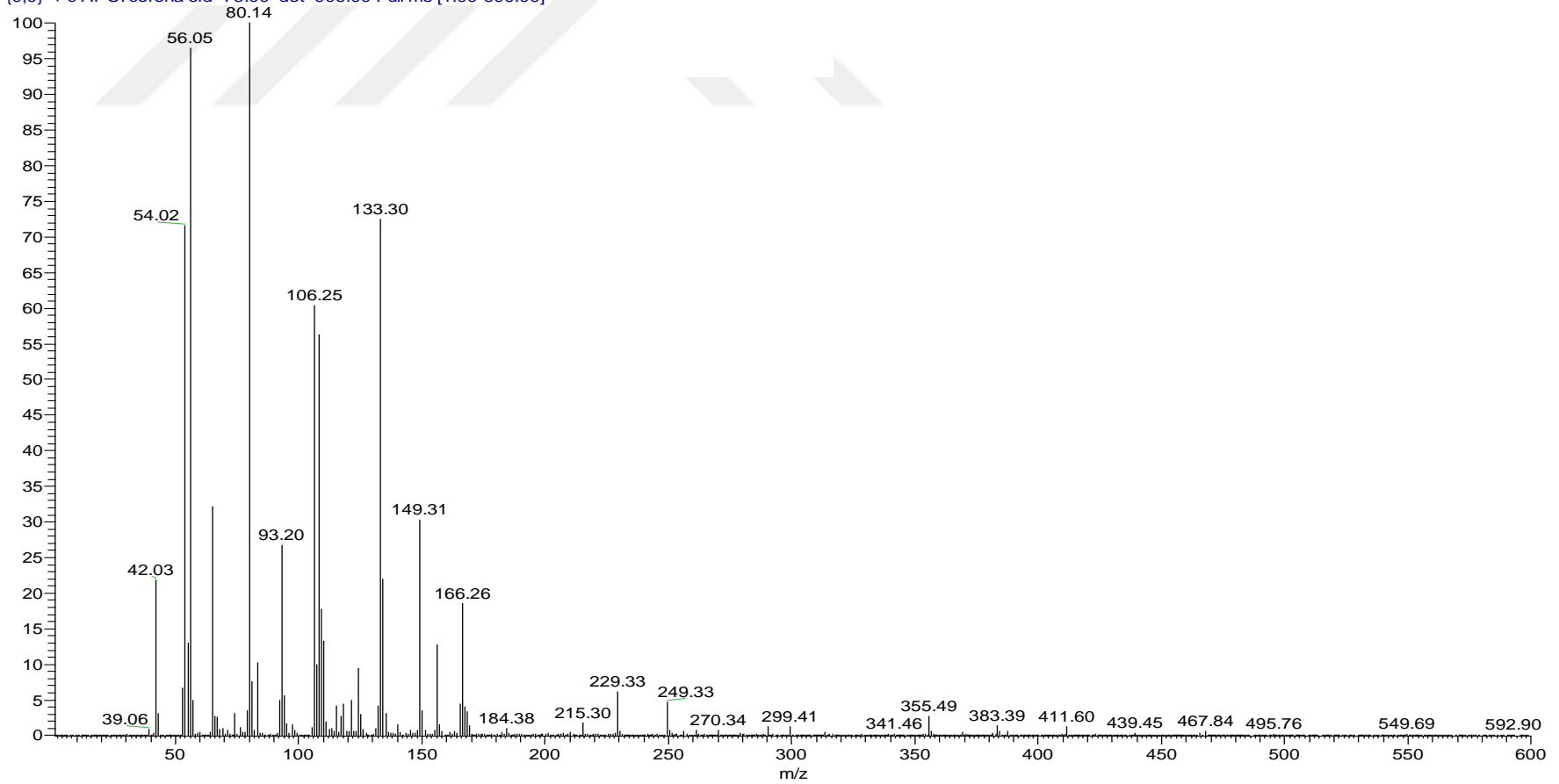


Spektrum 3. A1 kodlu bileşğin IR spektrumu

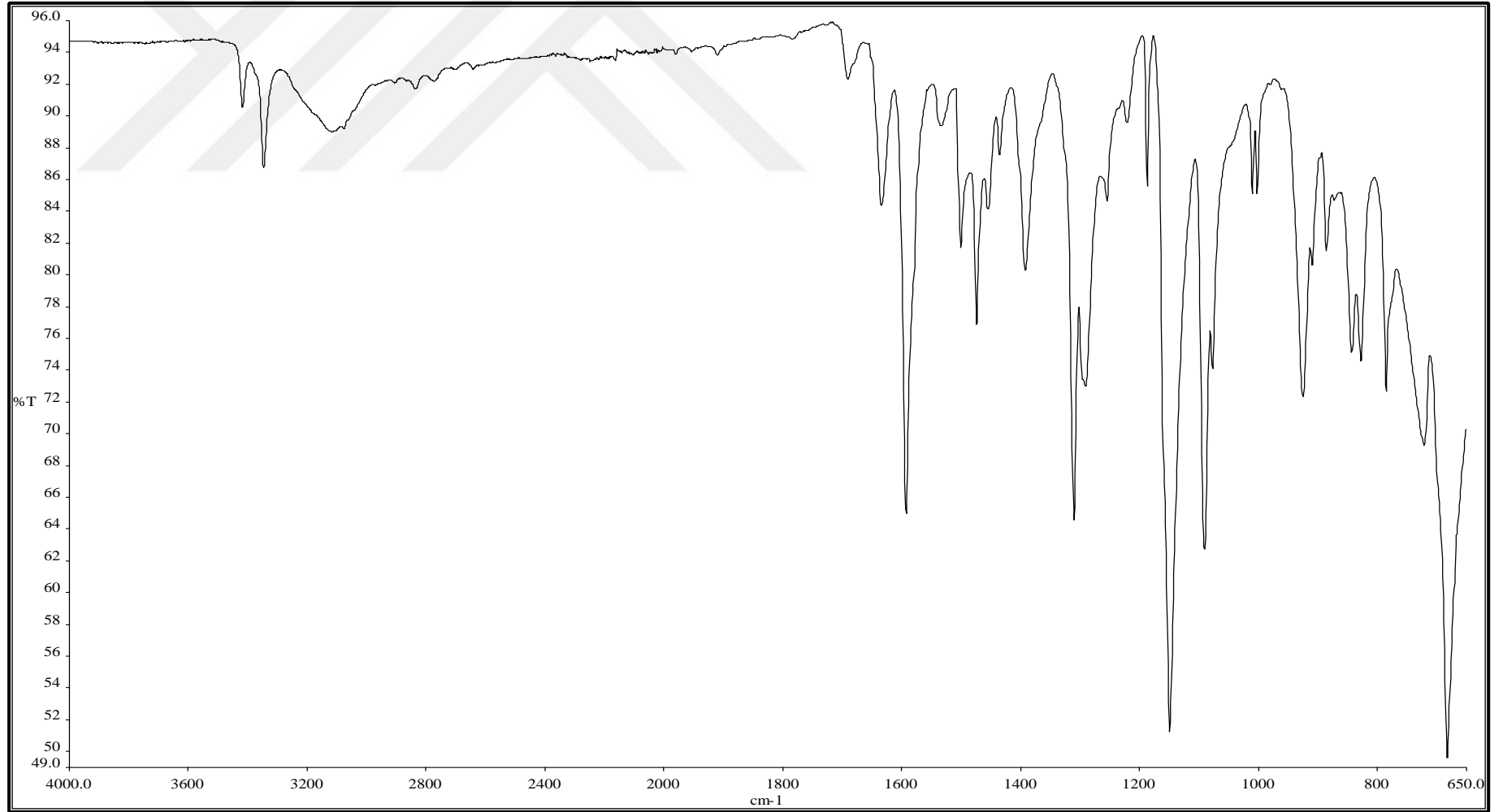
C:\Xcalibur...\2017 11 14A1

11/14/2017 12:08:18 PM

A1 #37 RT: 0.33 AV: 1 NL: 1.83E6
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 4. A1 kodlu bileşğin kütle spektrumu



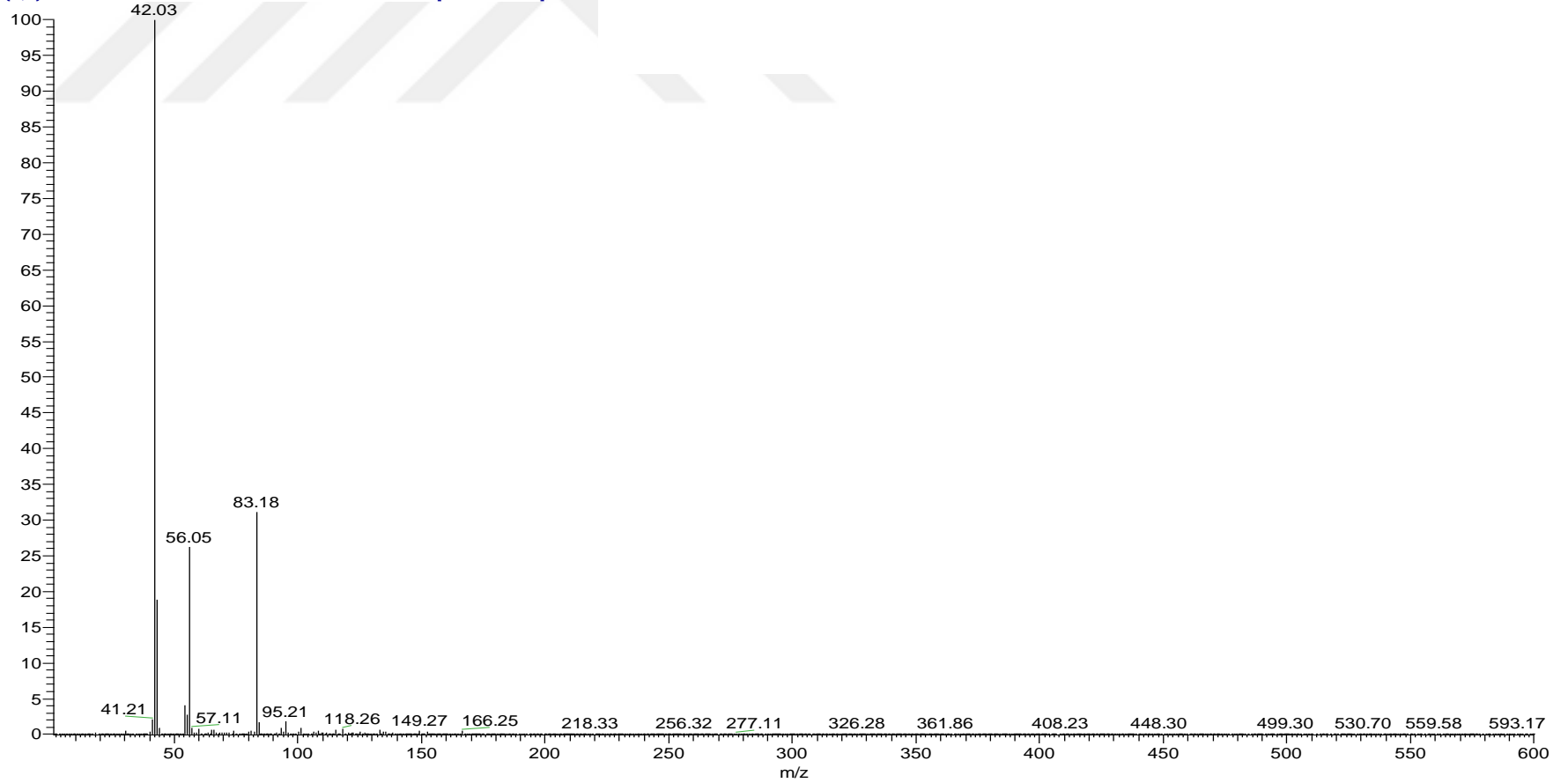
Spektrum 5. A2 kodlu bileşğin IR spektrumu

C:\Xcalibur...\2017 11 14\A2

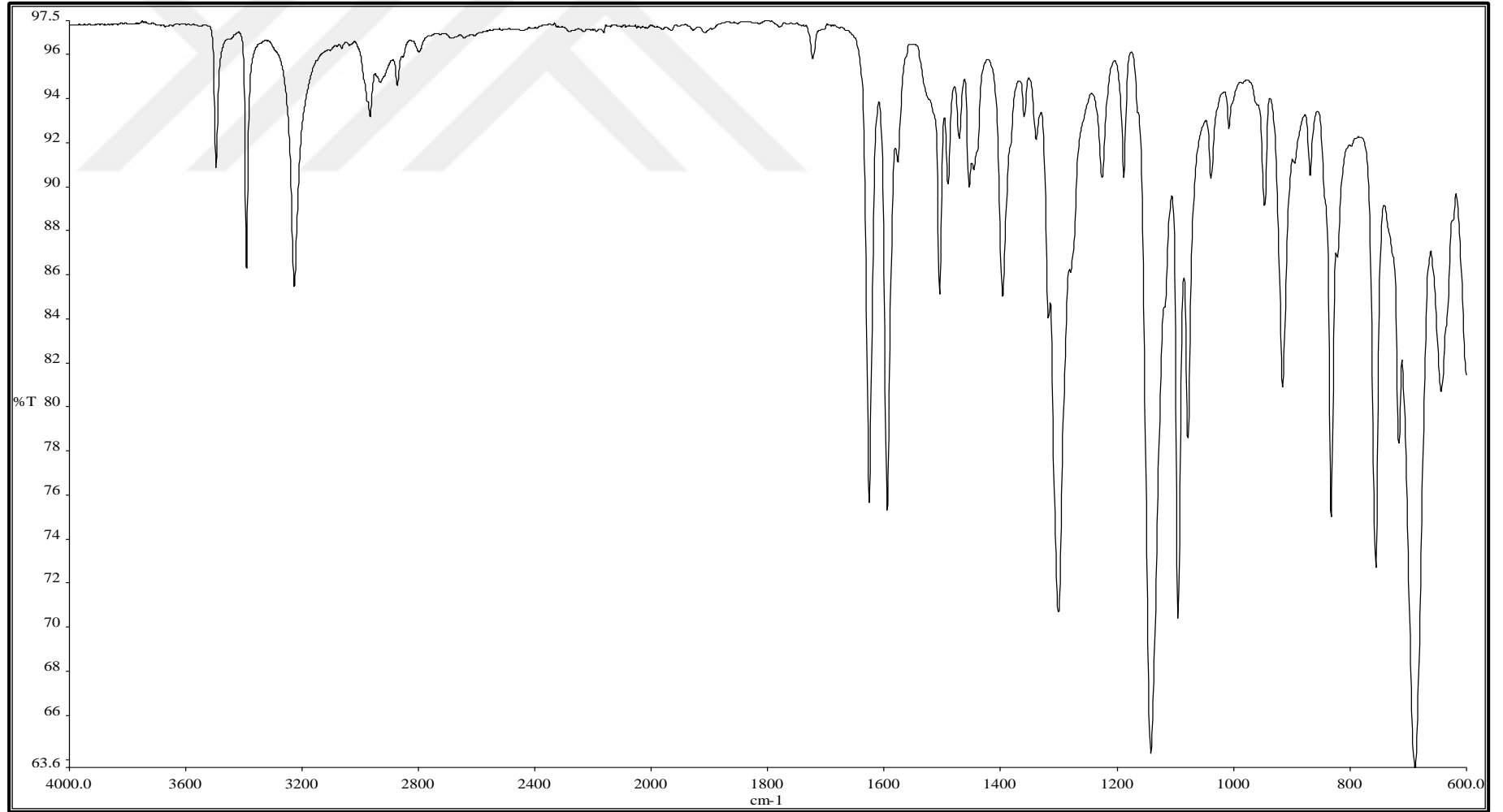
11/14/2017 12:13:25 PM

A2 #92 RT: 0.83 AV: 1 NL: 1.39E6

T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 6. A2 kodlu bileşğin kütle spektrumu



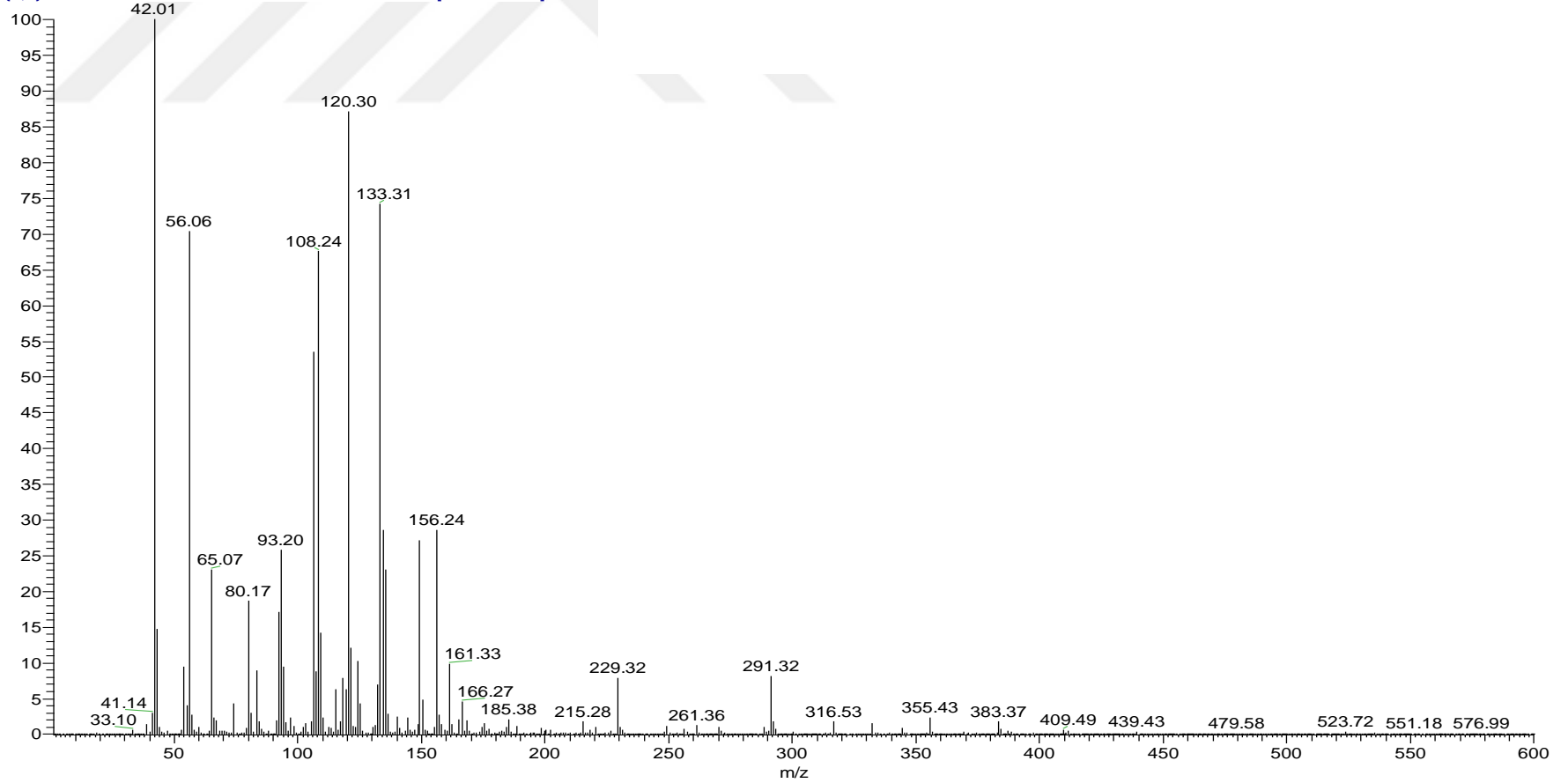
Spektrum 7. A3 kodlu bileşğin IR spektrumu

C:\Xcalibur...\2017 11 16A3

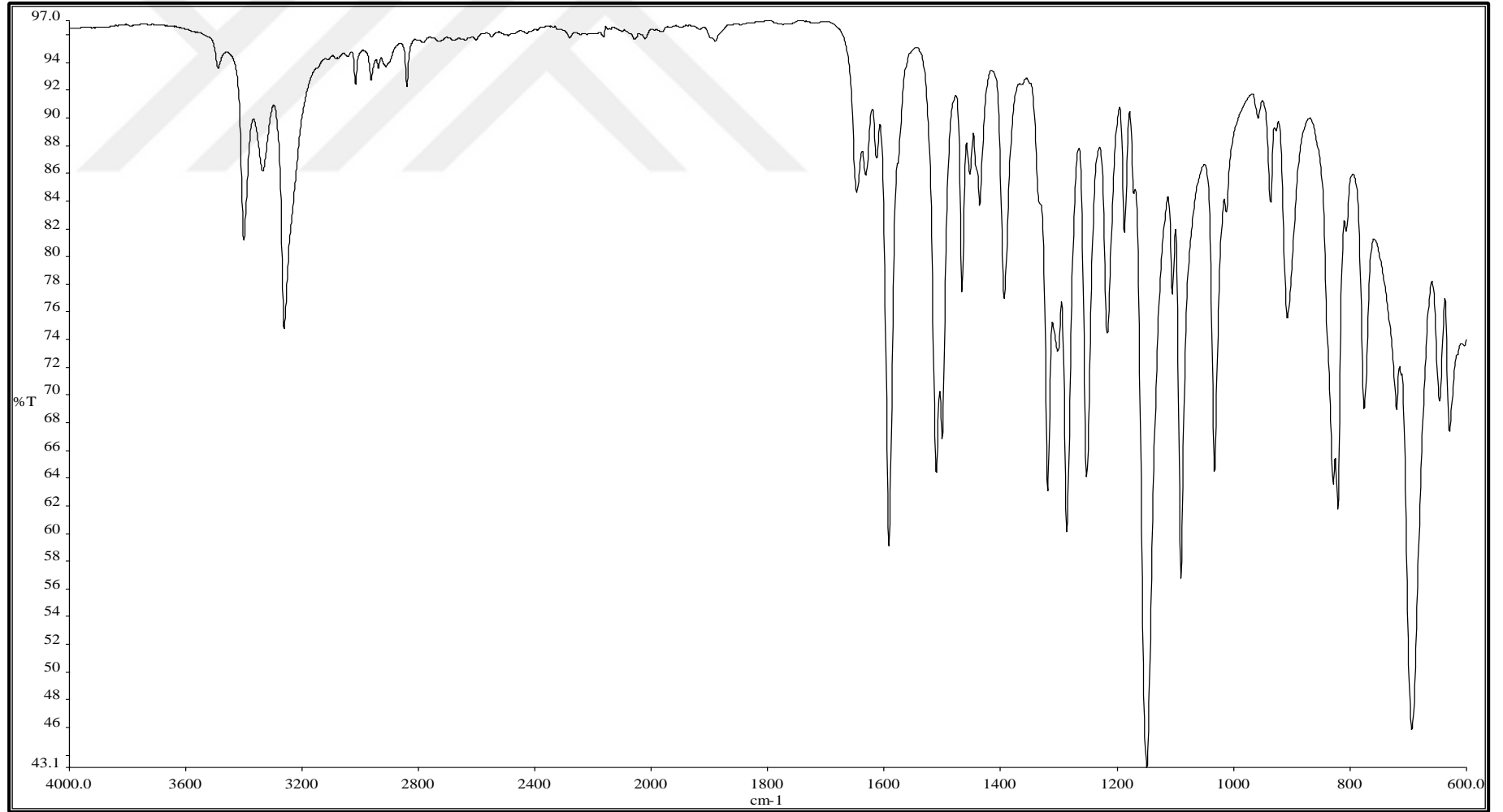
11/16/2017 9:55:02 AM

A3 #39 RT: 0.35 AV: 1 NL: 2.49E6

T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 8. A3 kodlu bileşğin kütle spektrumu



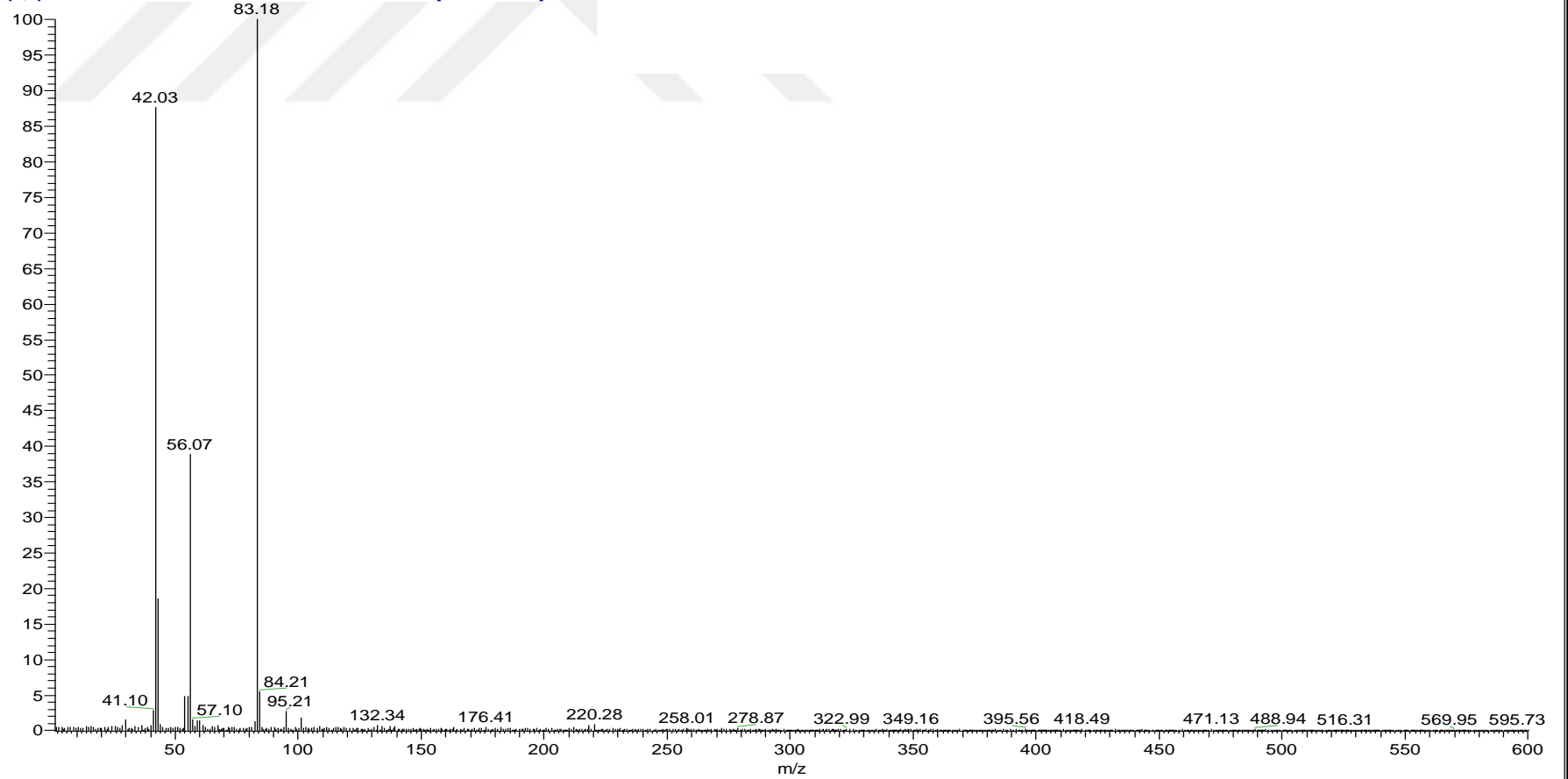
Spektrum 9. A9 kodlu bileşğin IR spektrumu

C:\Xcalibur...\2017 11 14\A9

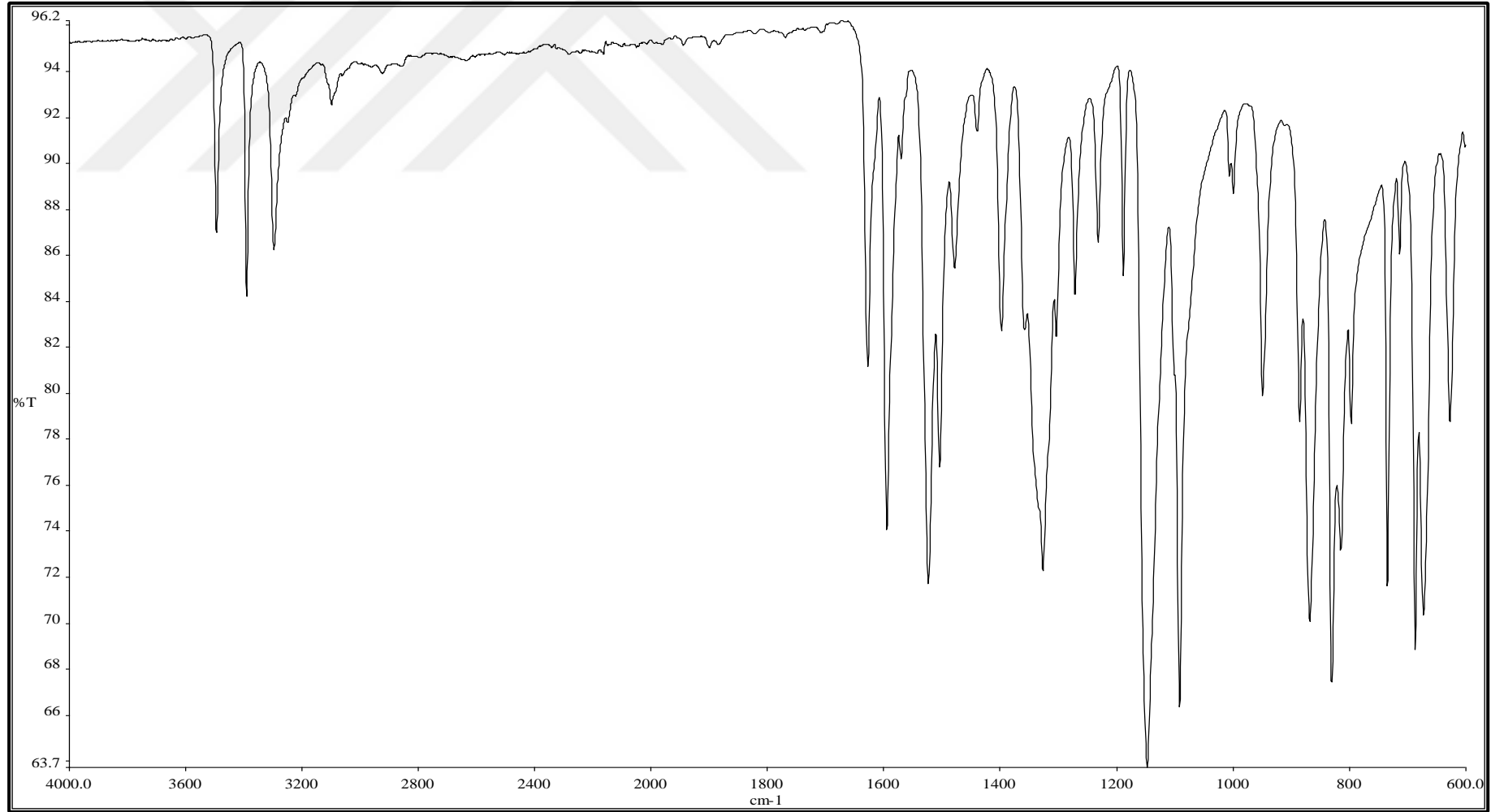
11/14/2017 12:18:23 PM

A9 #10 RT: 0.08 AV: 1 NL: 2.95E5

T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 10. A9 kodlu bileşigin kütle spektrumu

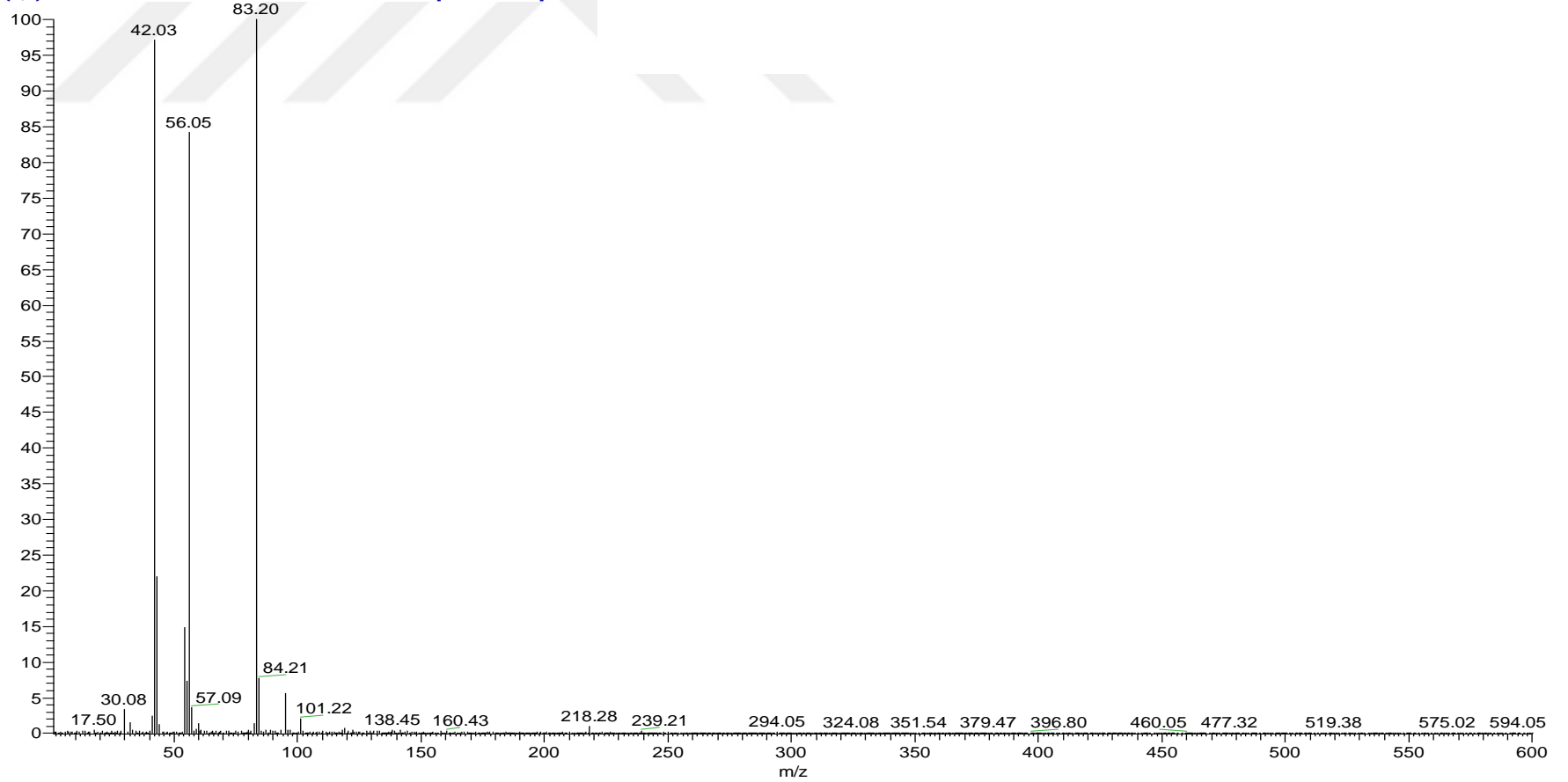


Spektrum 11. A11 kodlu bileşğin IR spektrumu

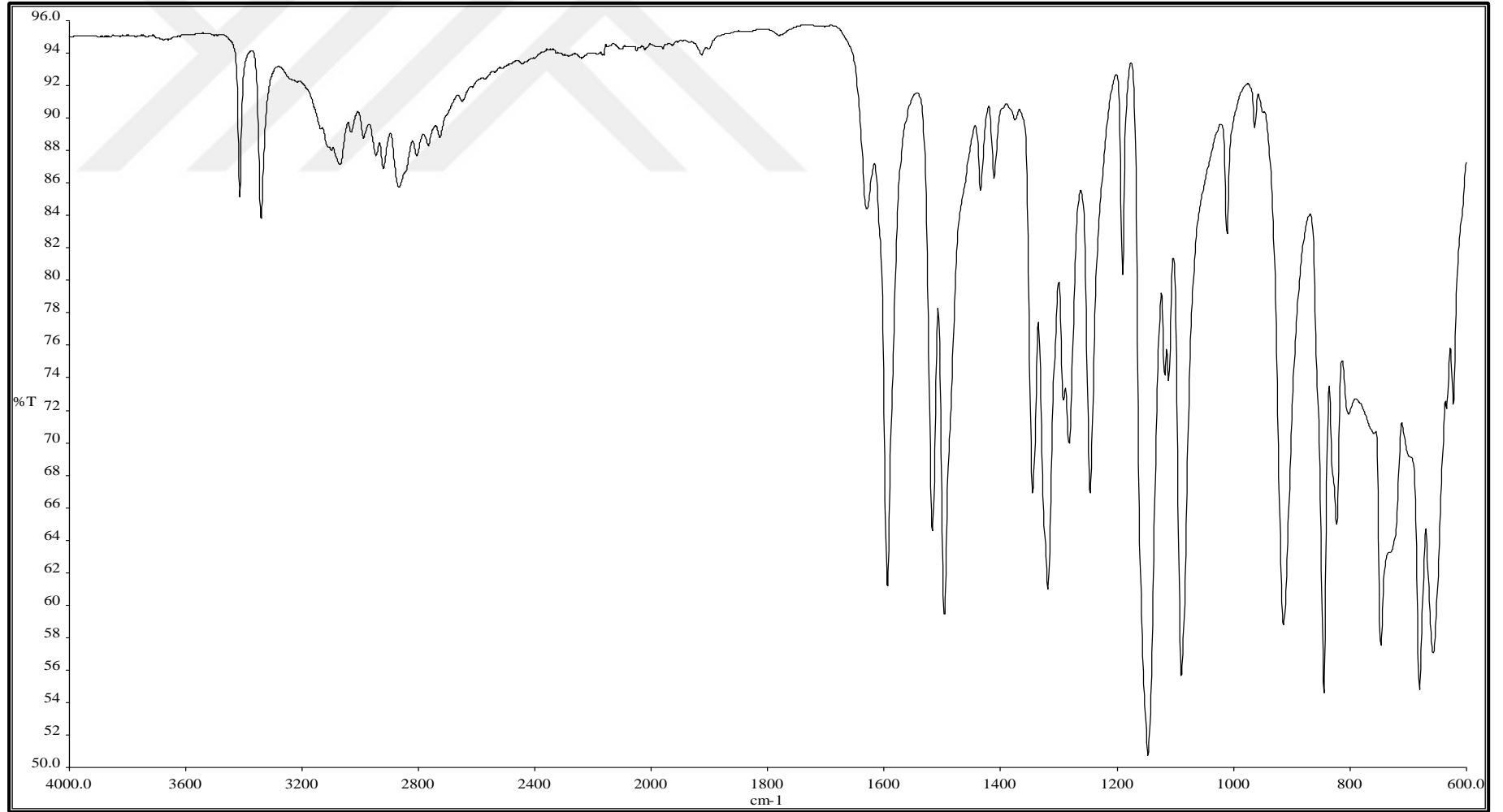
C:\Xcalibur\...2017 11 14\A11

11/14/2017 12:23:19 PM

A11 #96 RT: 0.87 AV: 1 NL: 4.06E5
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]

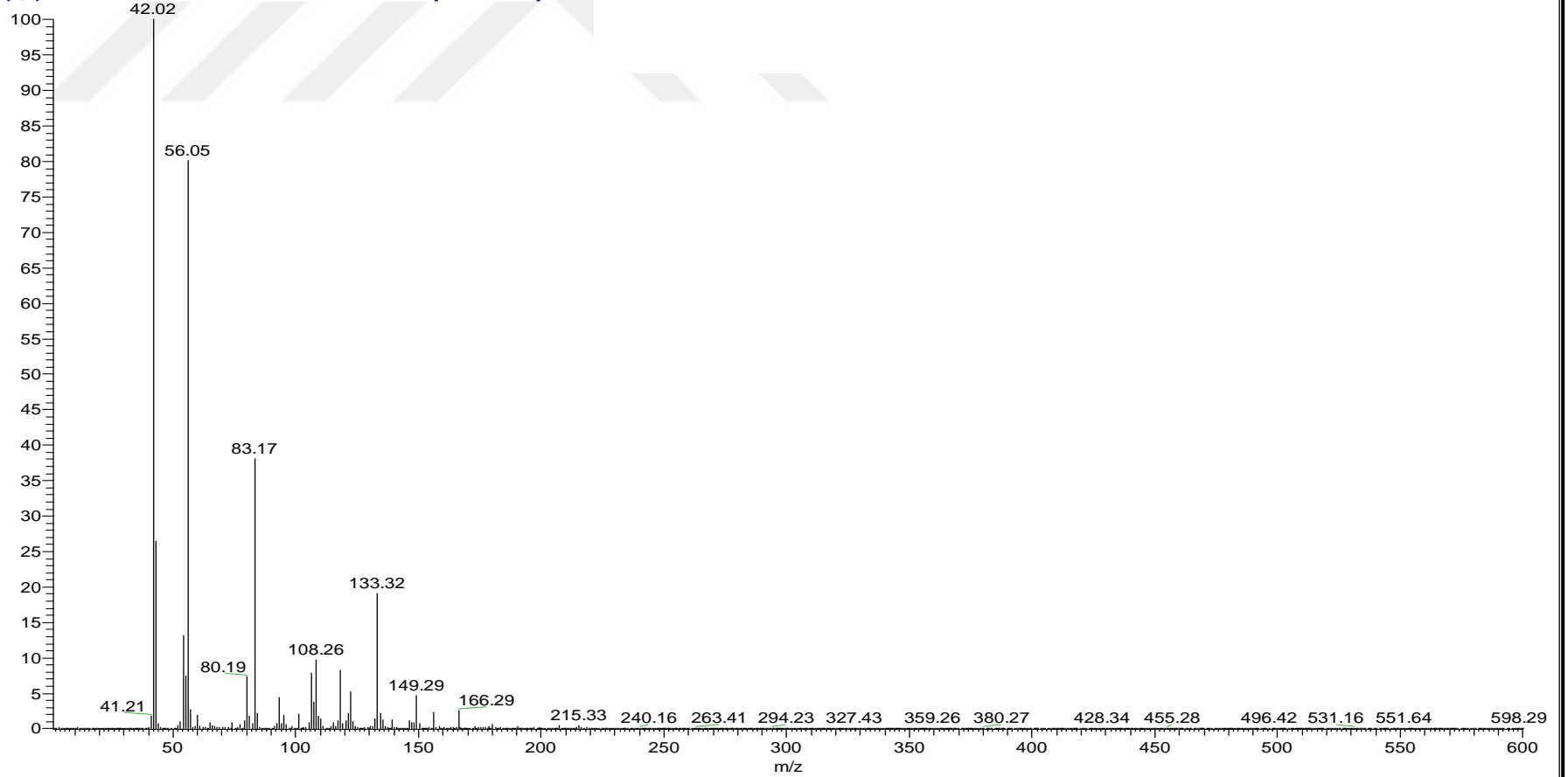


Spektrum 12. A11 kodlu bileşğin kütle spektrumu

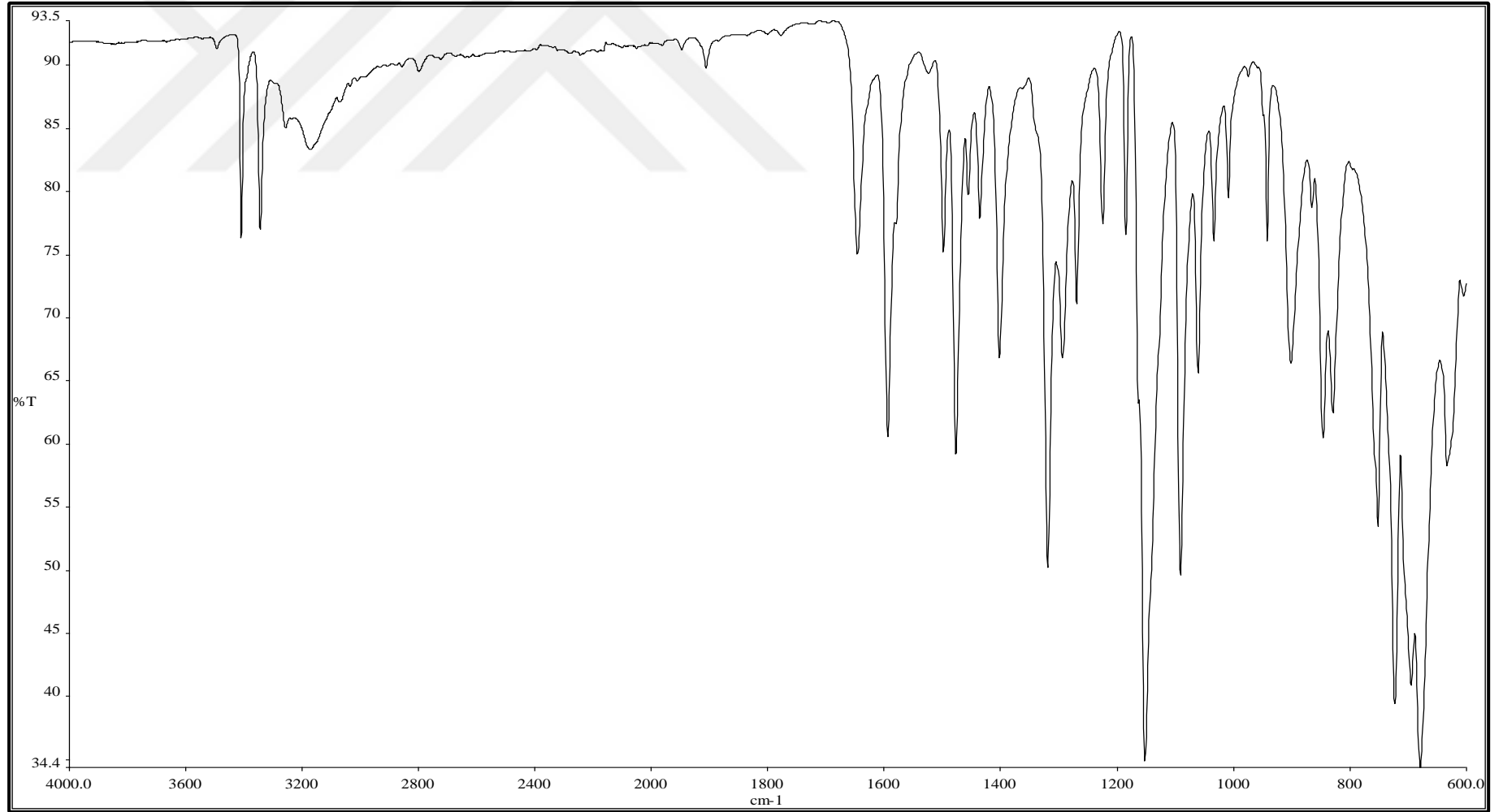


Spektrum 13. A12 kodlu bileşğin IR spektrumu

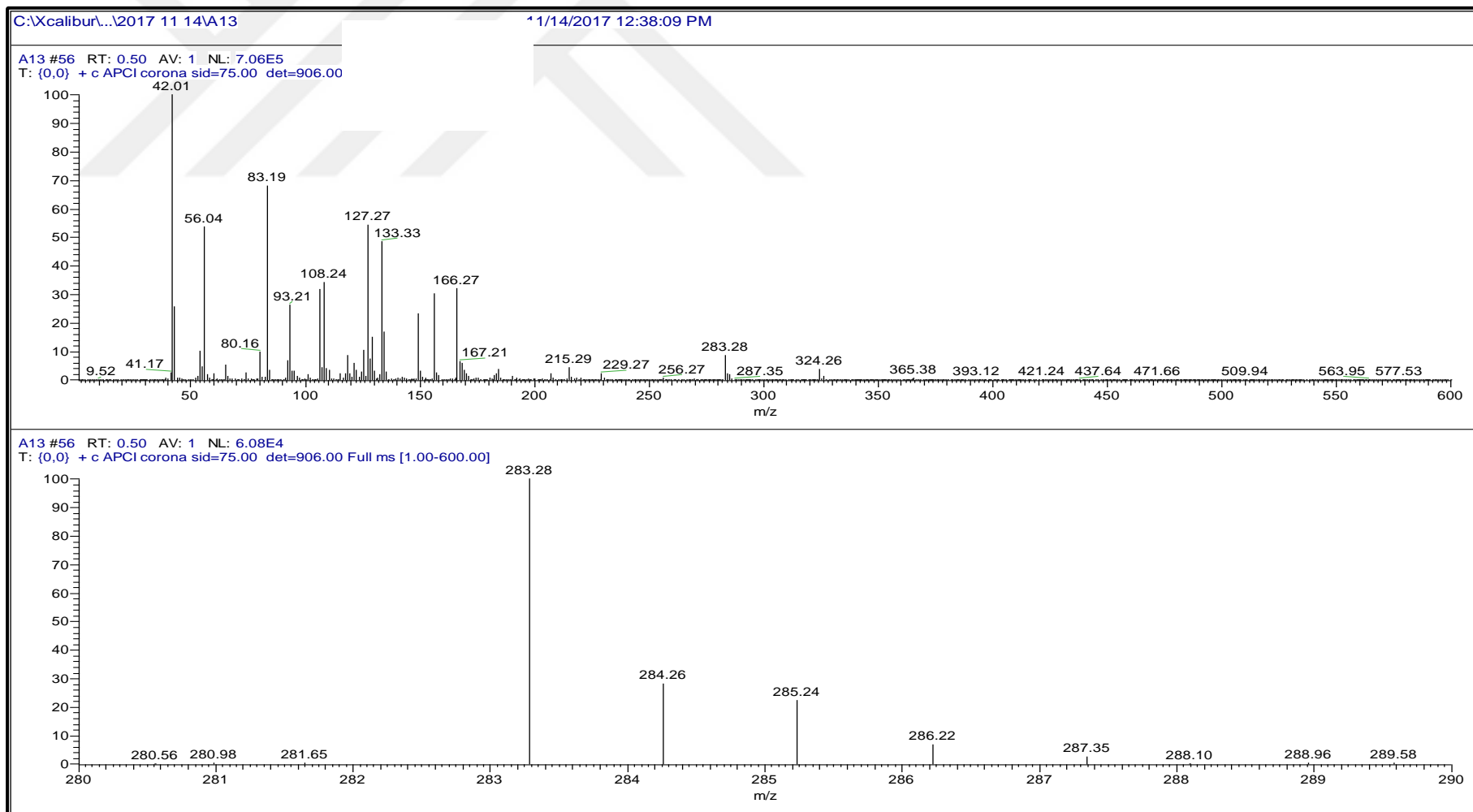
A12ULTRA #57 RT: 0.51 AV: 1 NL: 1.19E6
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



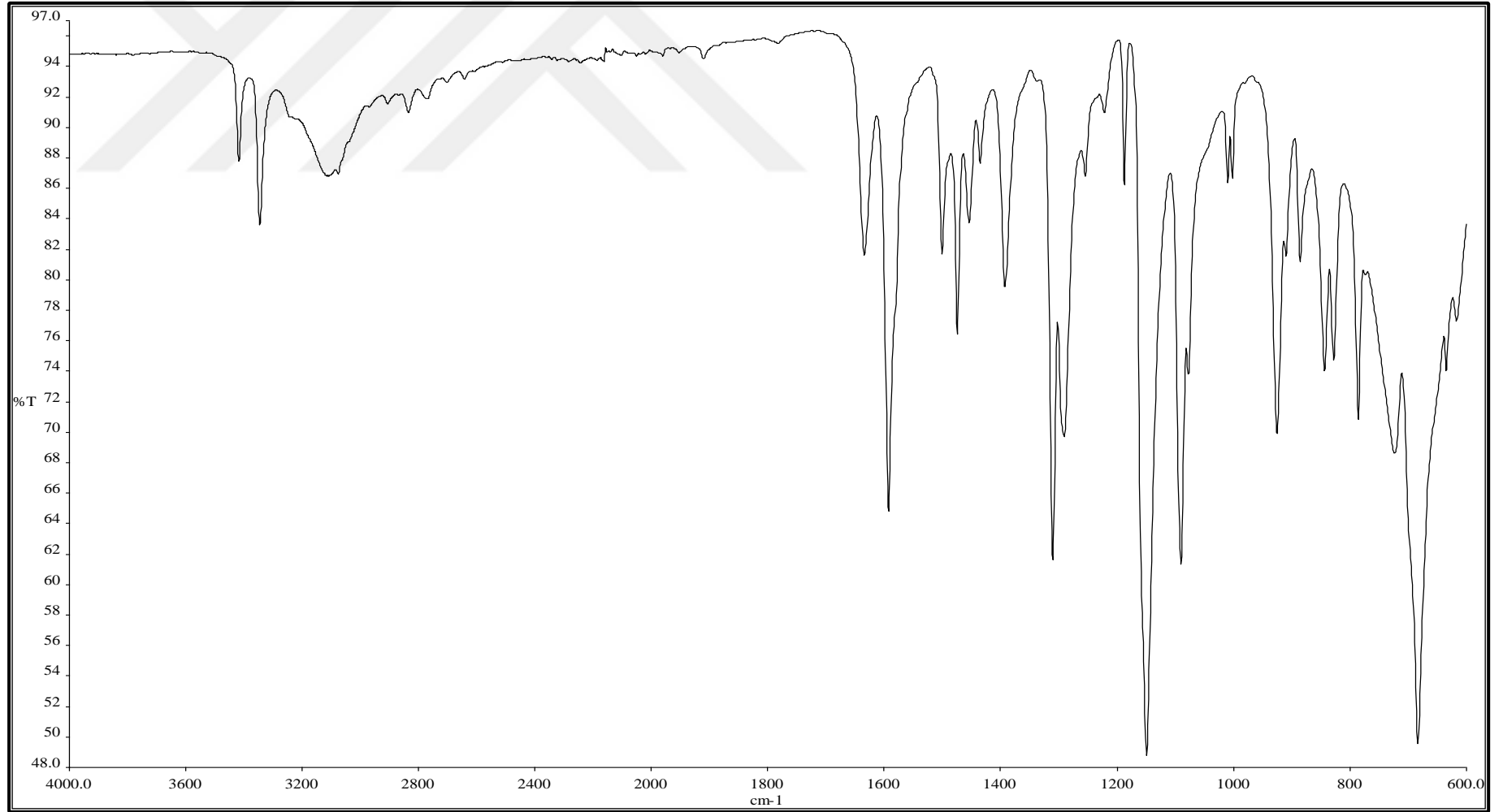
Spektrum 14. A12 kodlu bileşigin kütle spektrumu



Spektrum 15. A13 kodlu bileşğin IR spektrumu



Spektrum 16. A13 kodlu bileşimin kütle spektrumu

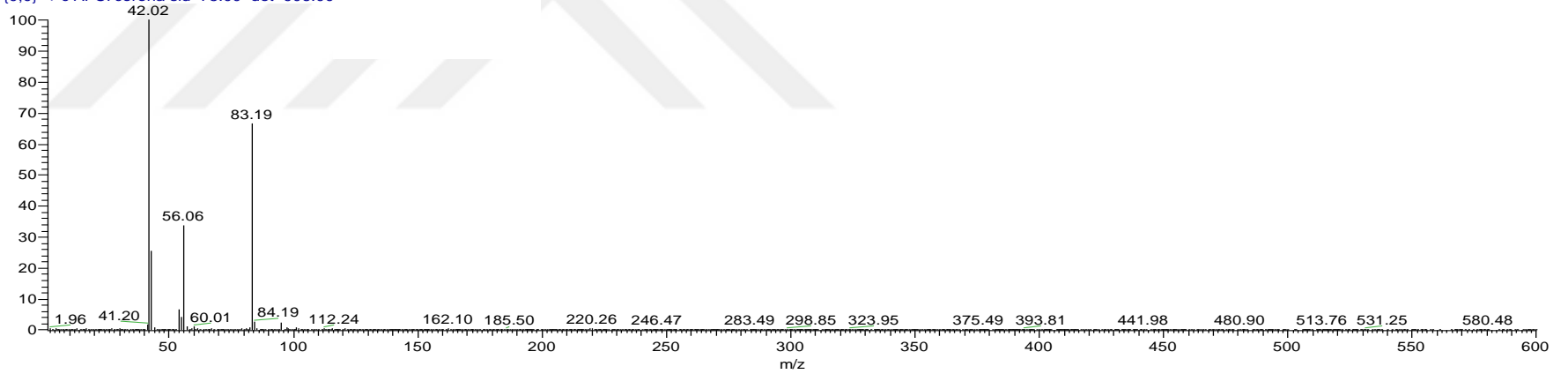


Spektrum 17. A14 kodlu bileşğin IR spektrumu

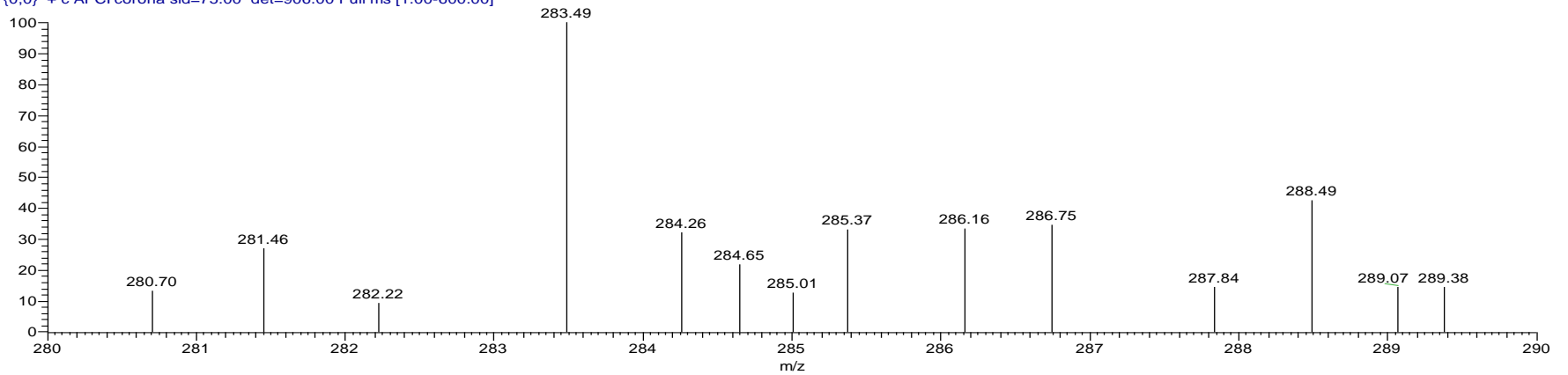
C:\Xcalibur\...\2017 11 14\A14

11/14/2017 12:43:07 PM

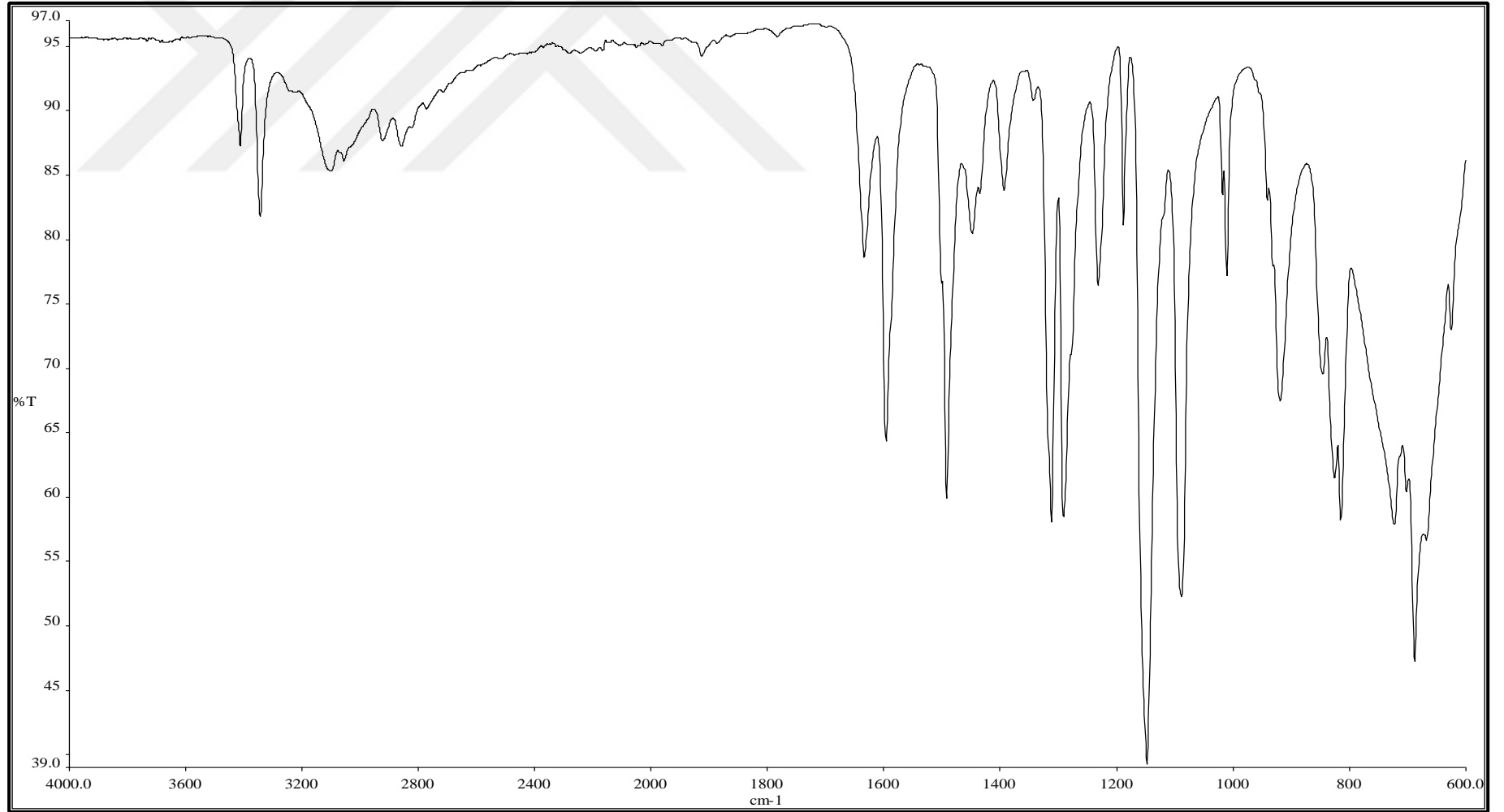
A14 #25 RT: 0.22 AV: 1 NL: 4.64E5
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00



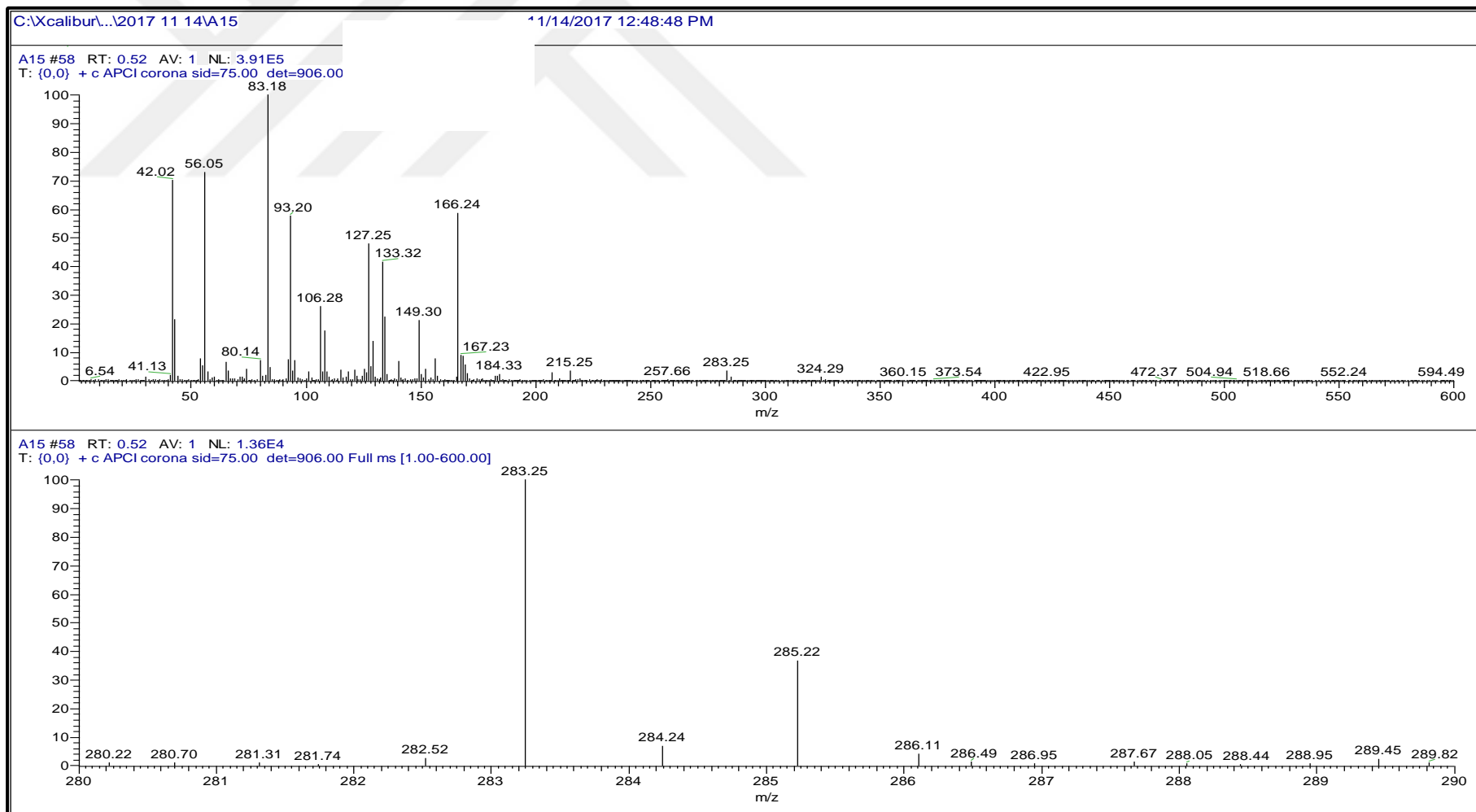
A14 #25 RT: 0.22 AV: 1 NL: 7.59E2
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



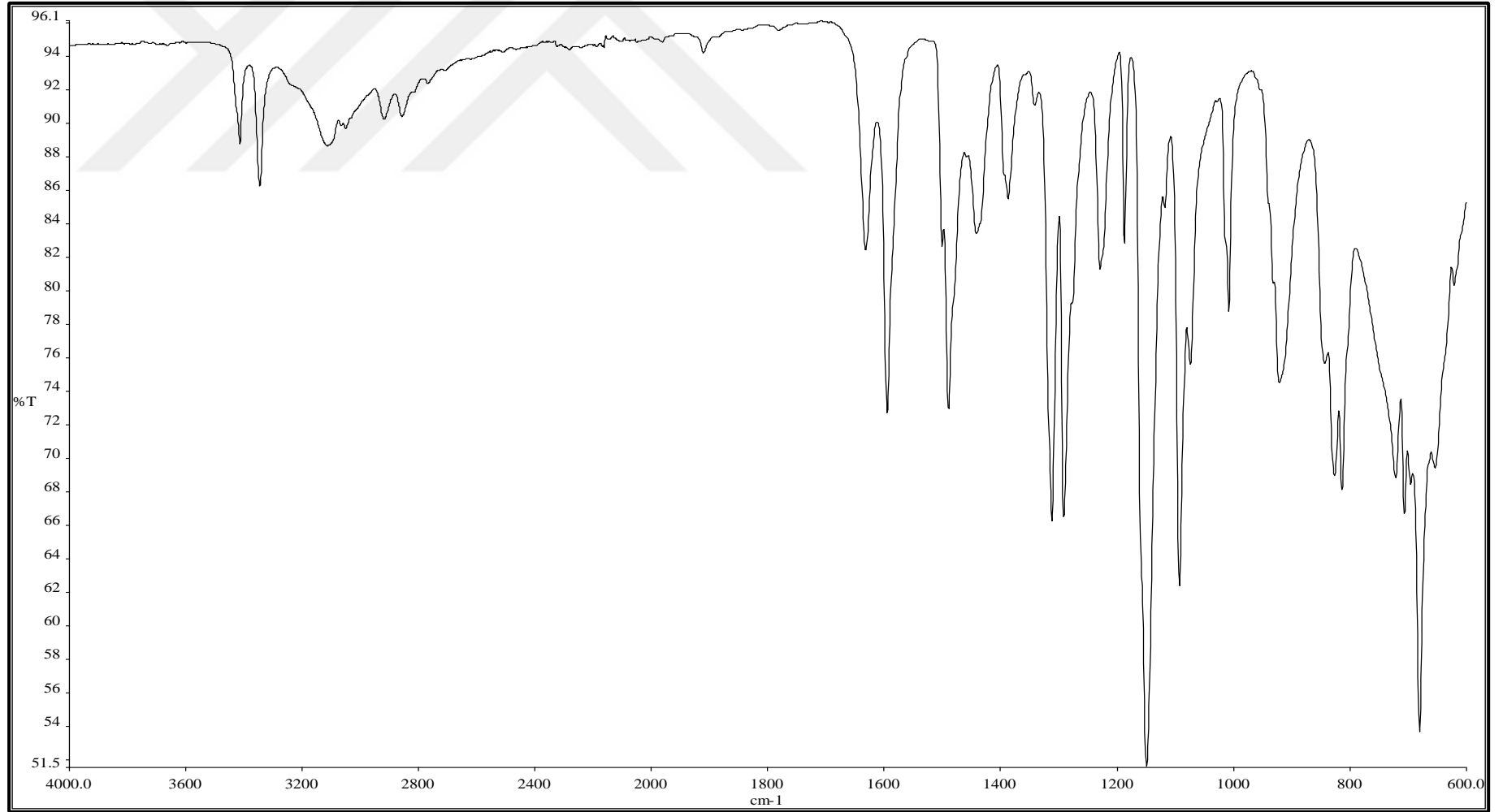
Spektrum 18. A14 kodlu bileşimin kütle spektrumu



Spektrum 19. A15 kodlu bileşğin IR spektrumu



Spektrum 20. A15 kodlu bileşğin kütle spektrumu

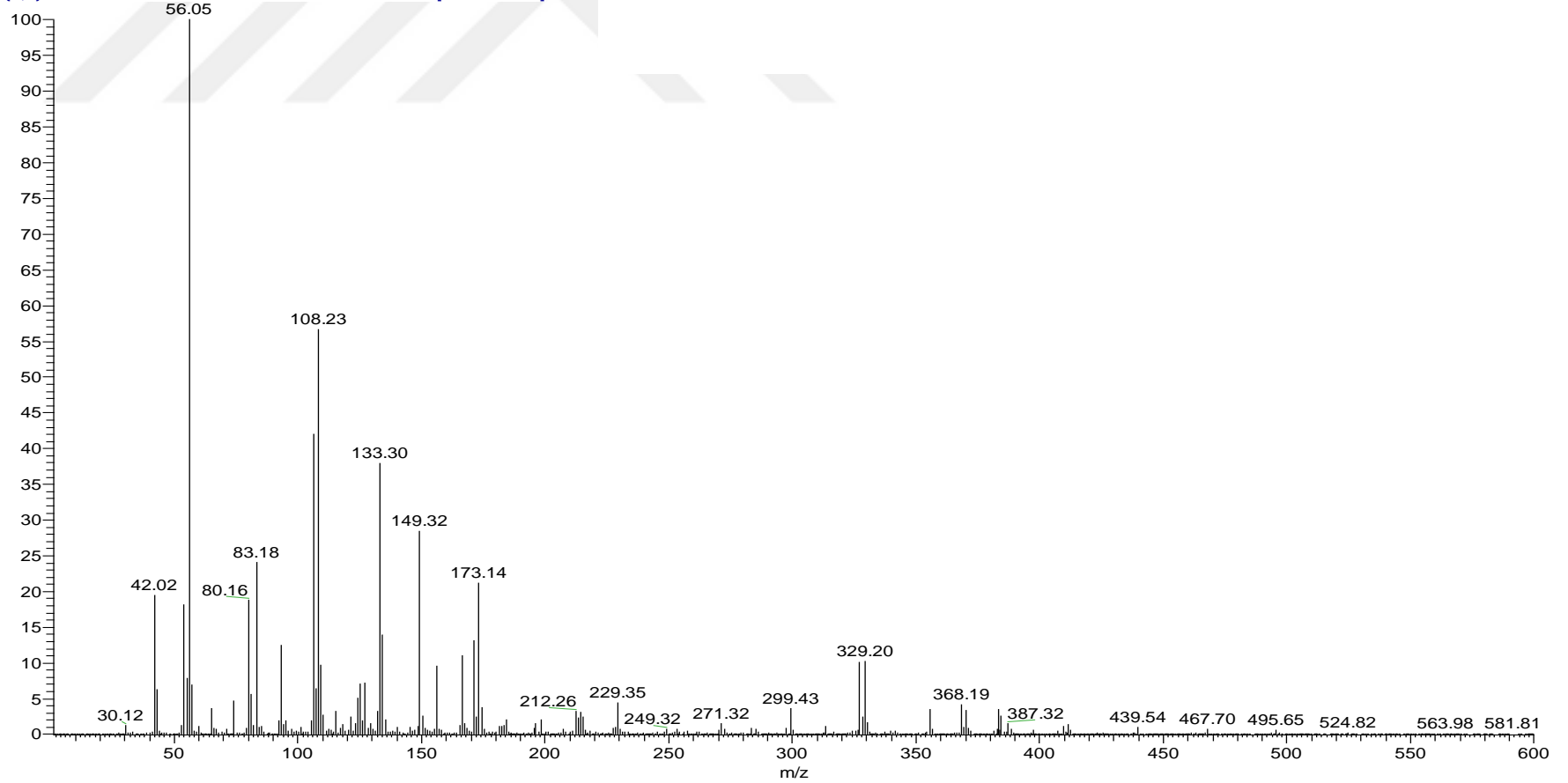


Spektrum 21. A16 kodlu bileşğin IR spektrumu

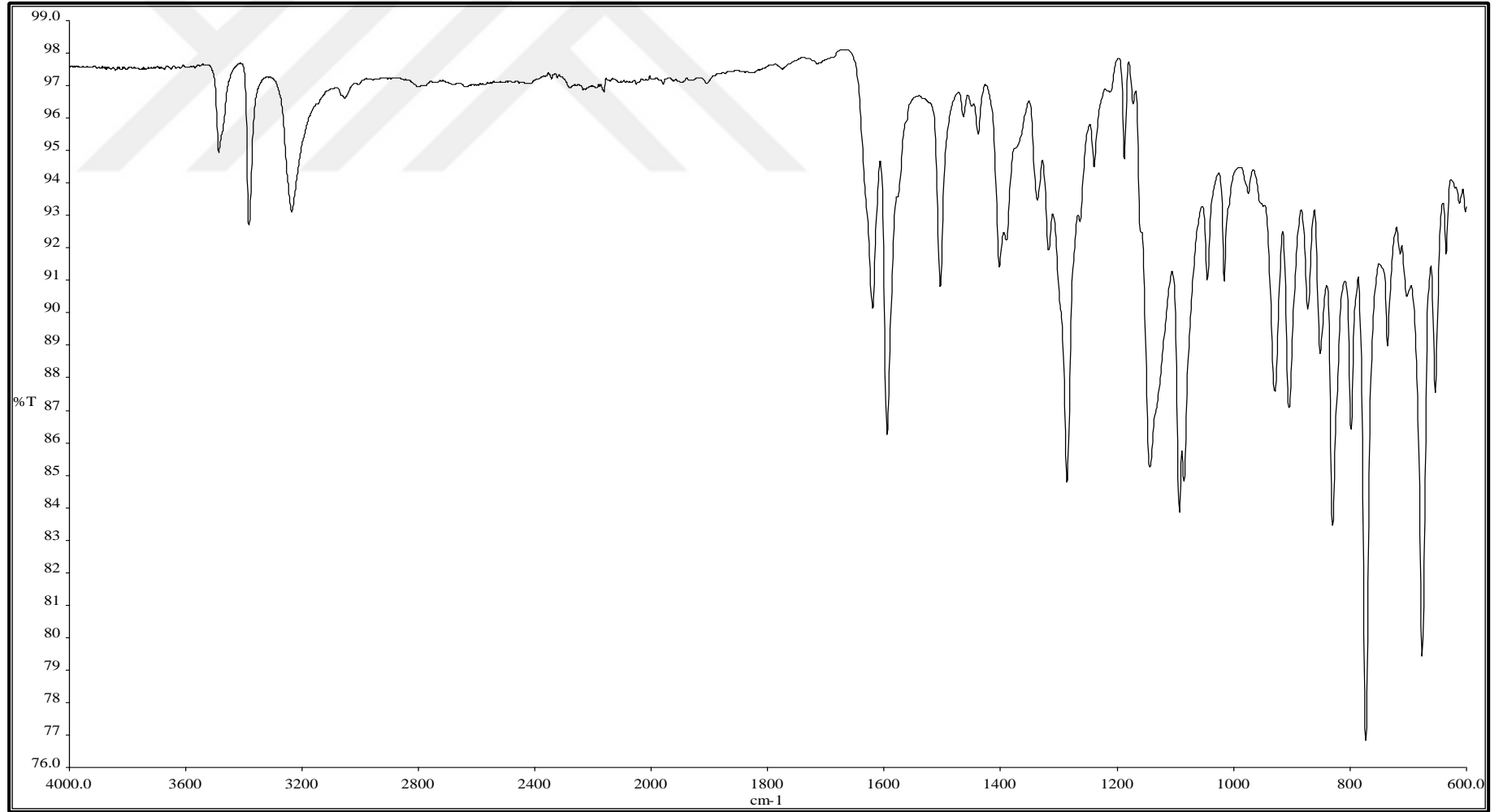
C:\Xcalibur...\2017 11 14\A16

11/14/2017 12:53:55 PM

A16 #39 RT: 0.35 AV: 1 NL: 1.45E6
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 22. A16 kodlu bileşğin kütle spektrumu



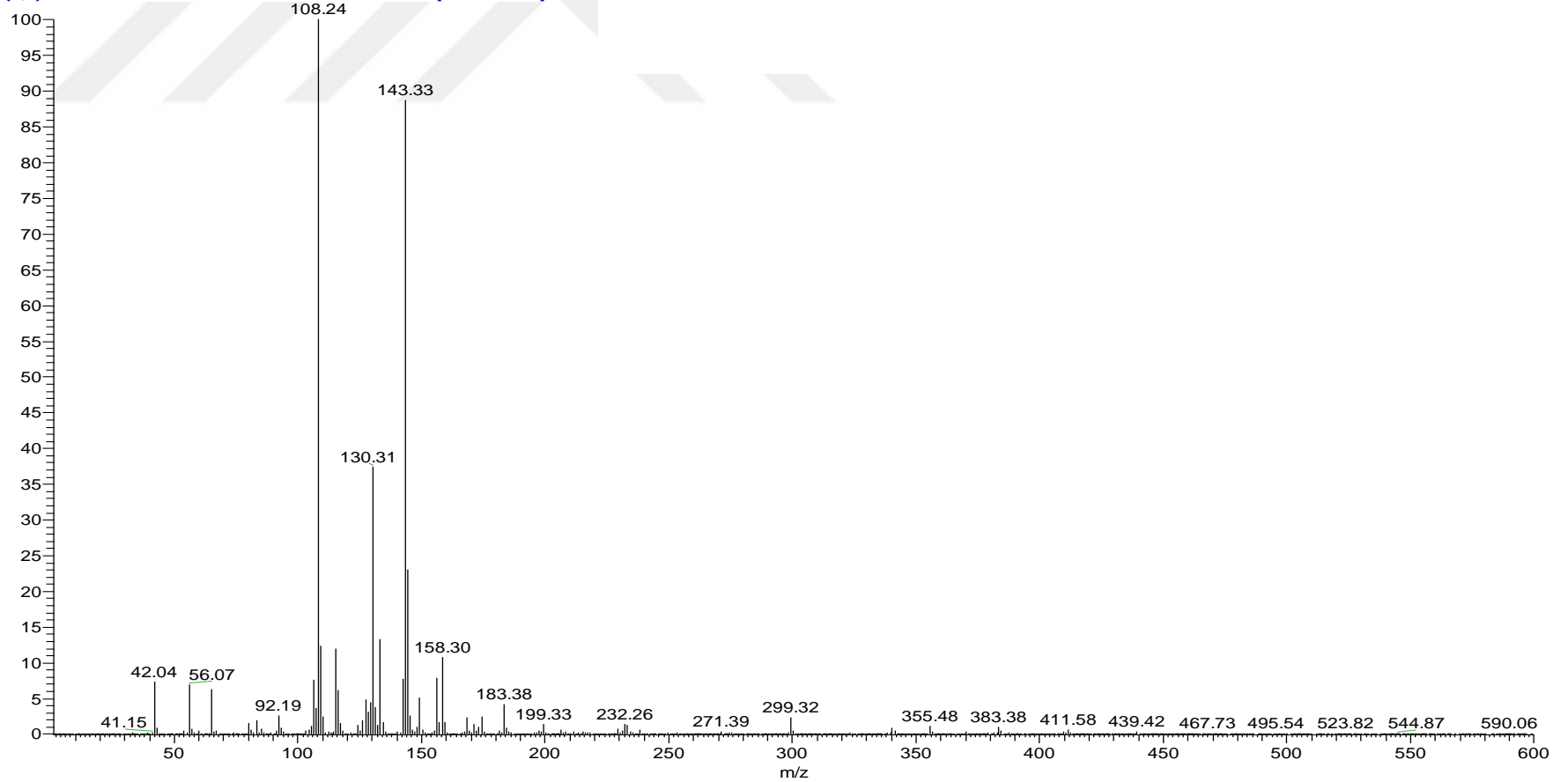
Spektrum 23. A17 kodlu bileşigin IR spektrumu

C:\Xcalibur\...2017 11 14\A17

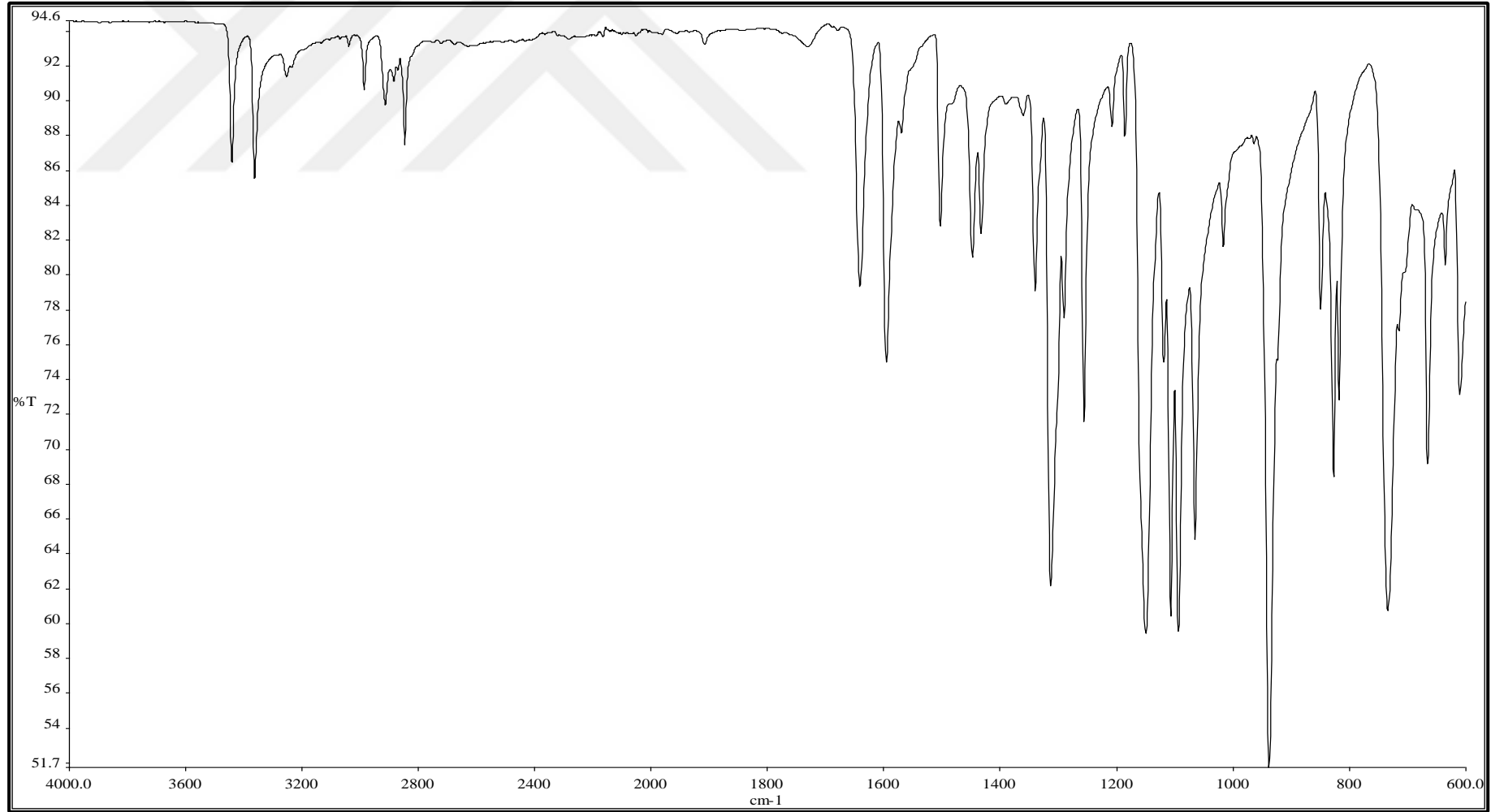
11/14/2017 12:58:53 PM

A17 #40 RT: 0.36 AV: 1 NL: 1.10E7

T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 24. A17 kodlu bileşğin kütle spektrumu

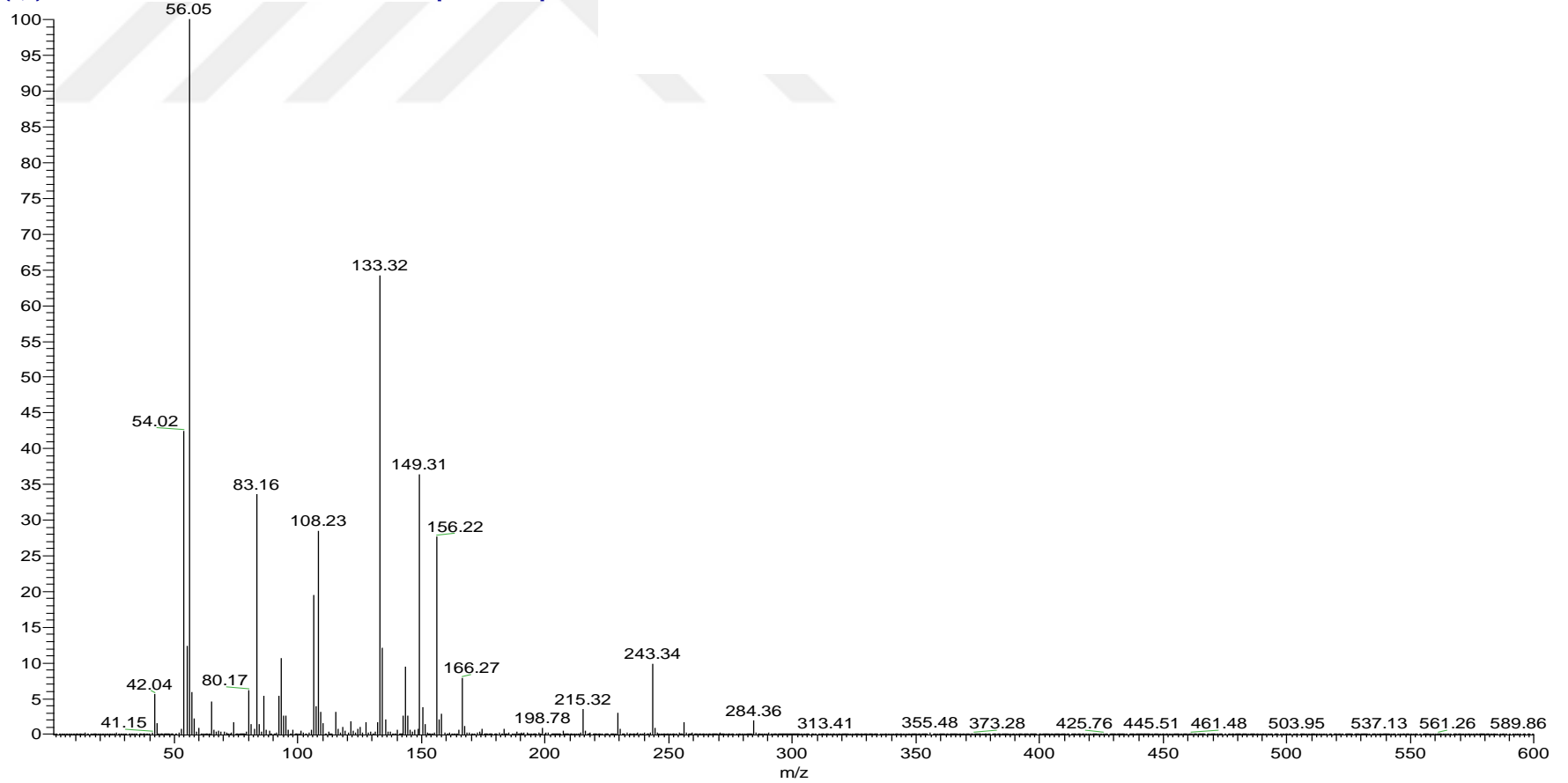


Spektrum 25. A18 kodlu bileşğin IR spektrumu

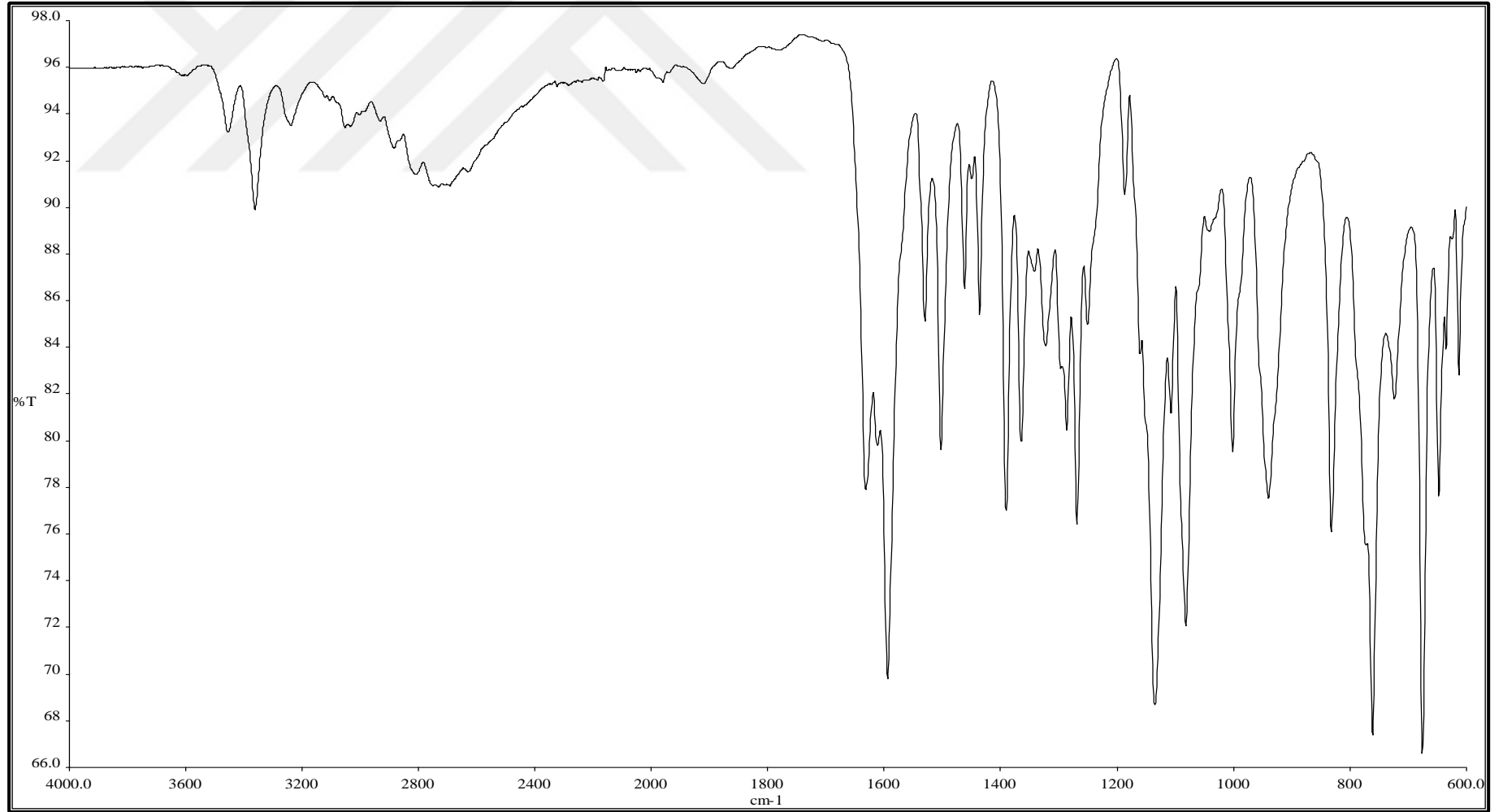
C:\Xcalibur\...2017 11 14\A18

11/14/2017 1:03:49 PM

A18 #39 RT: 0.35 AV: 1 NL: 1.14E6
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 26. A18 kodlu bileşğin kütle spektrumu

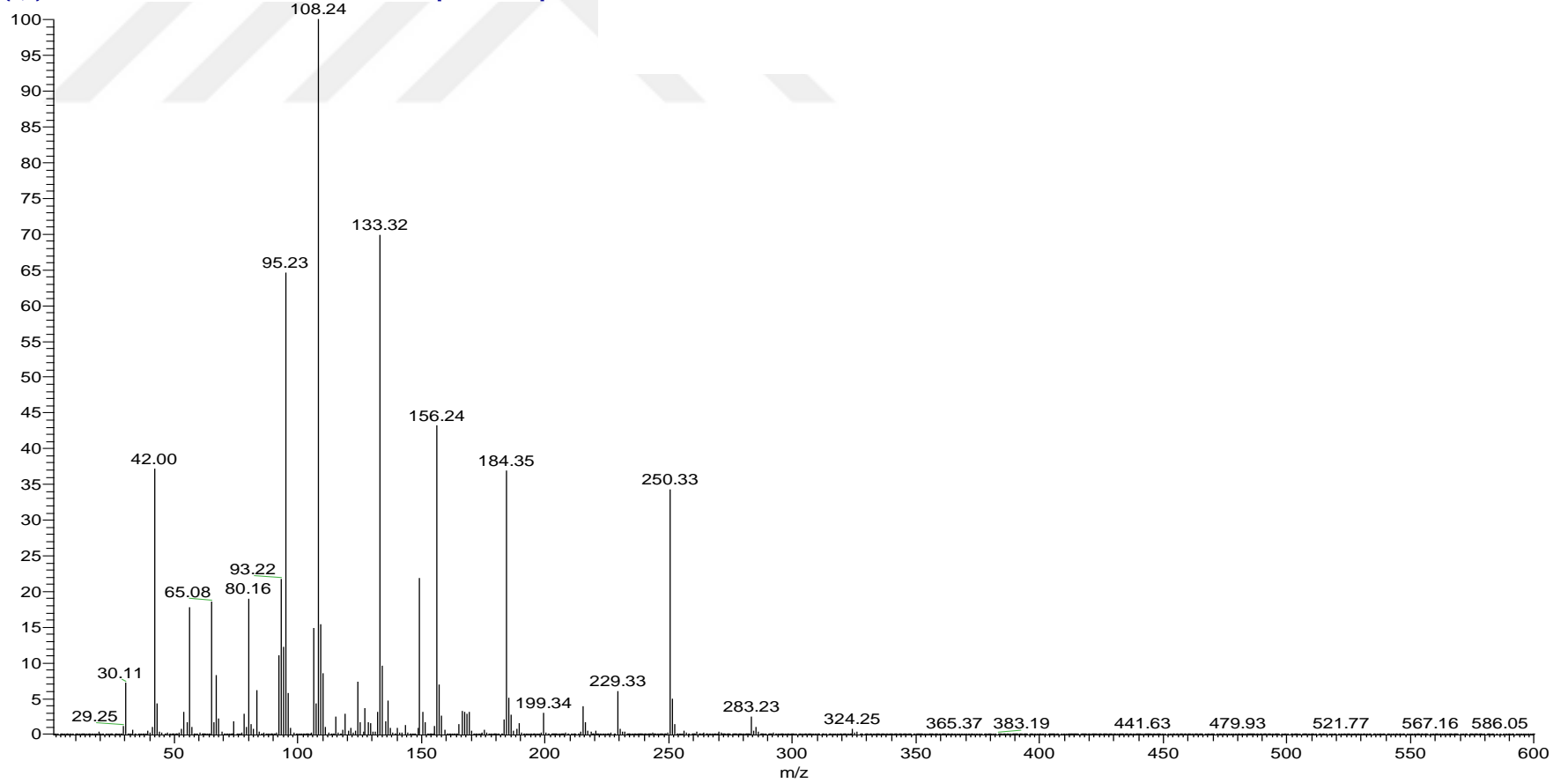


Spektrum 27. A19 kodlu bileşğin IR spektrumu

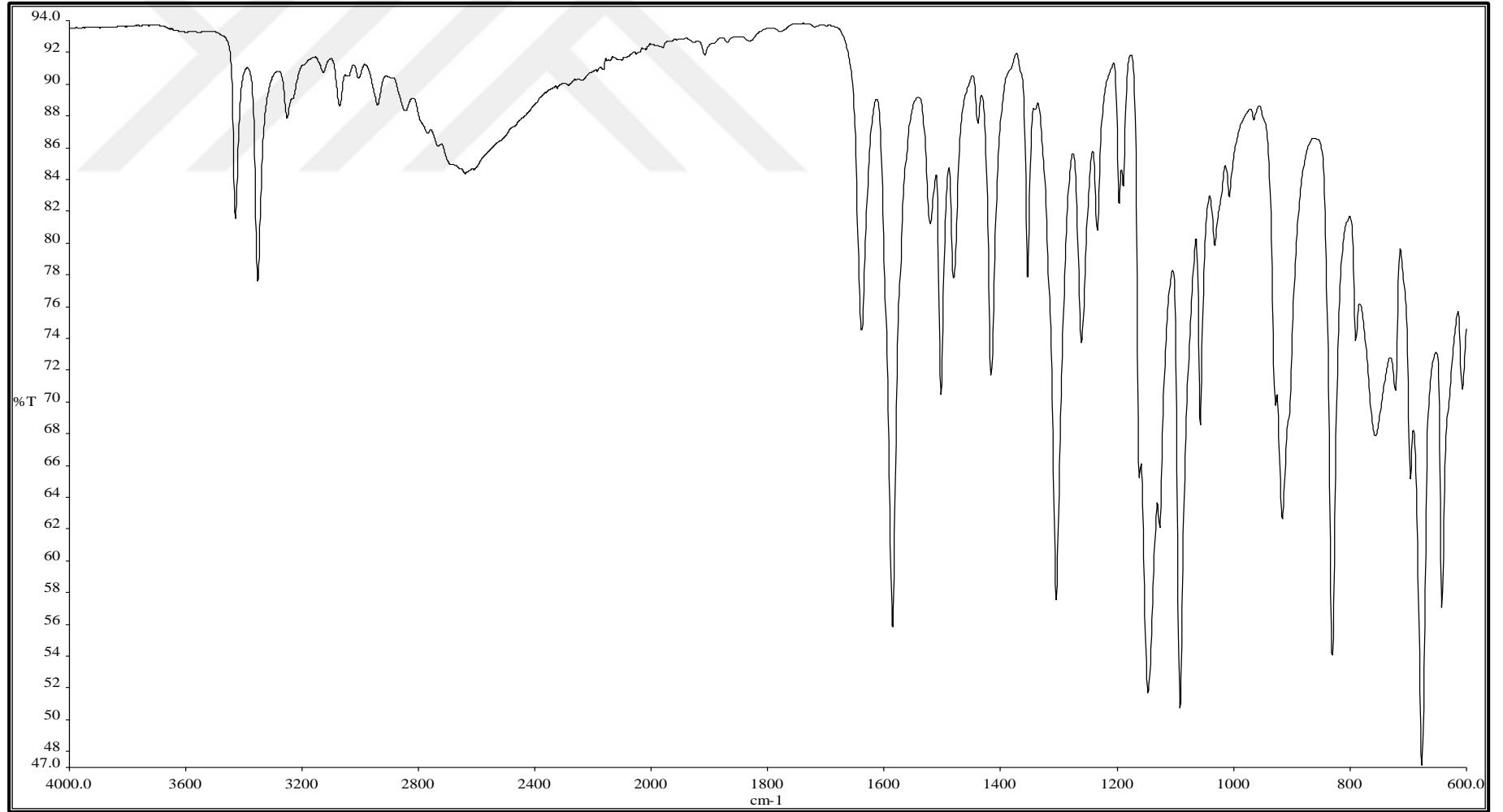
C:\Xcalibur...\2017 11 14\A19

11/14/2017 1:08:47 PM

A19 #42 RT: 0.37 AV: 1 NL: 3.11E6
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]

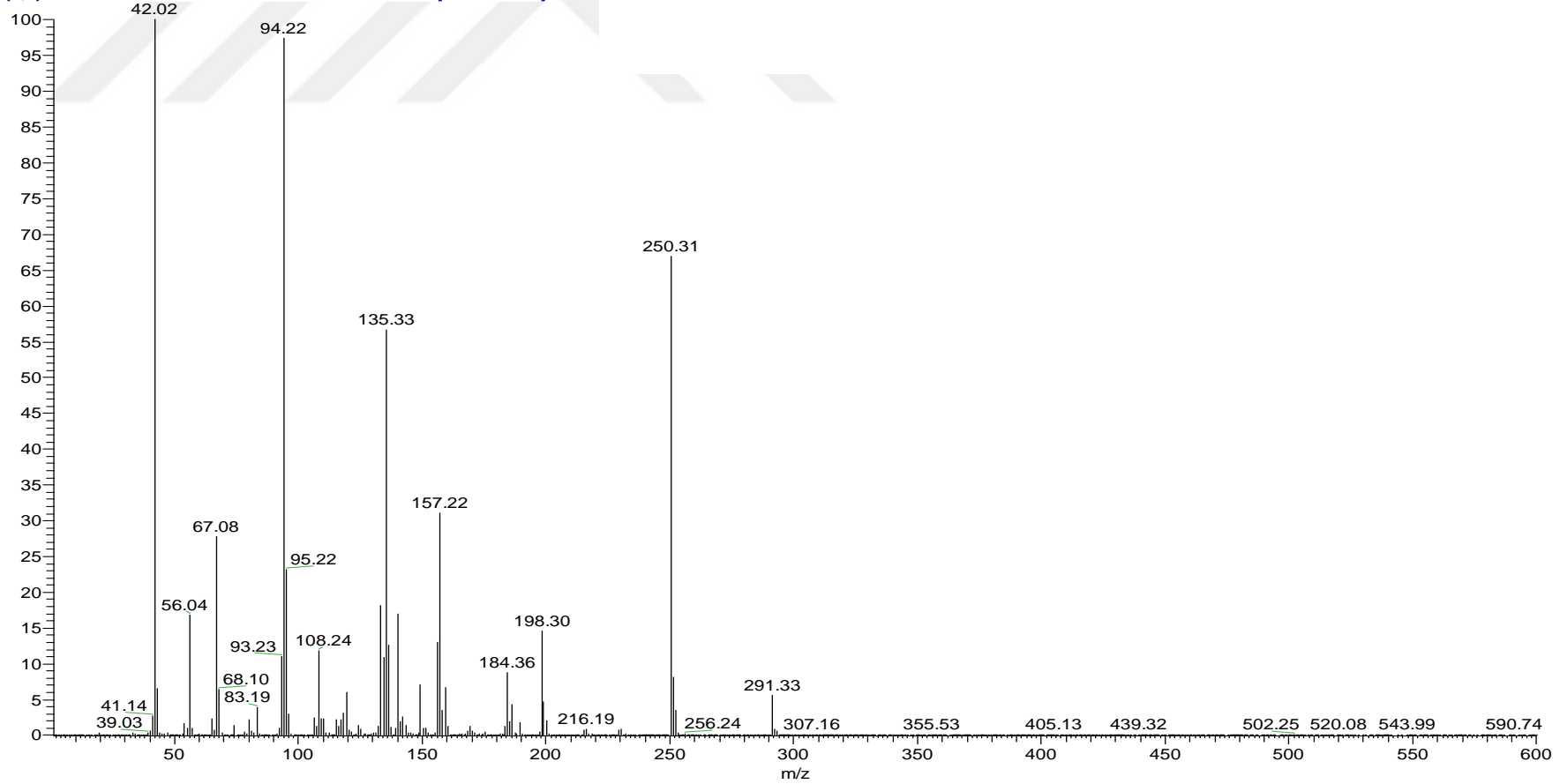


Spektrum 28. A19 kodlu bileşğin kütle spektrumu

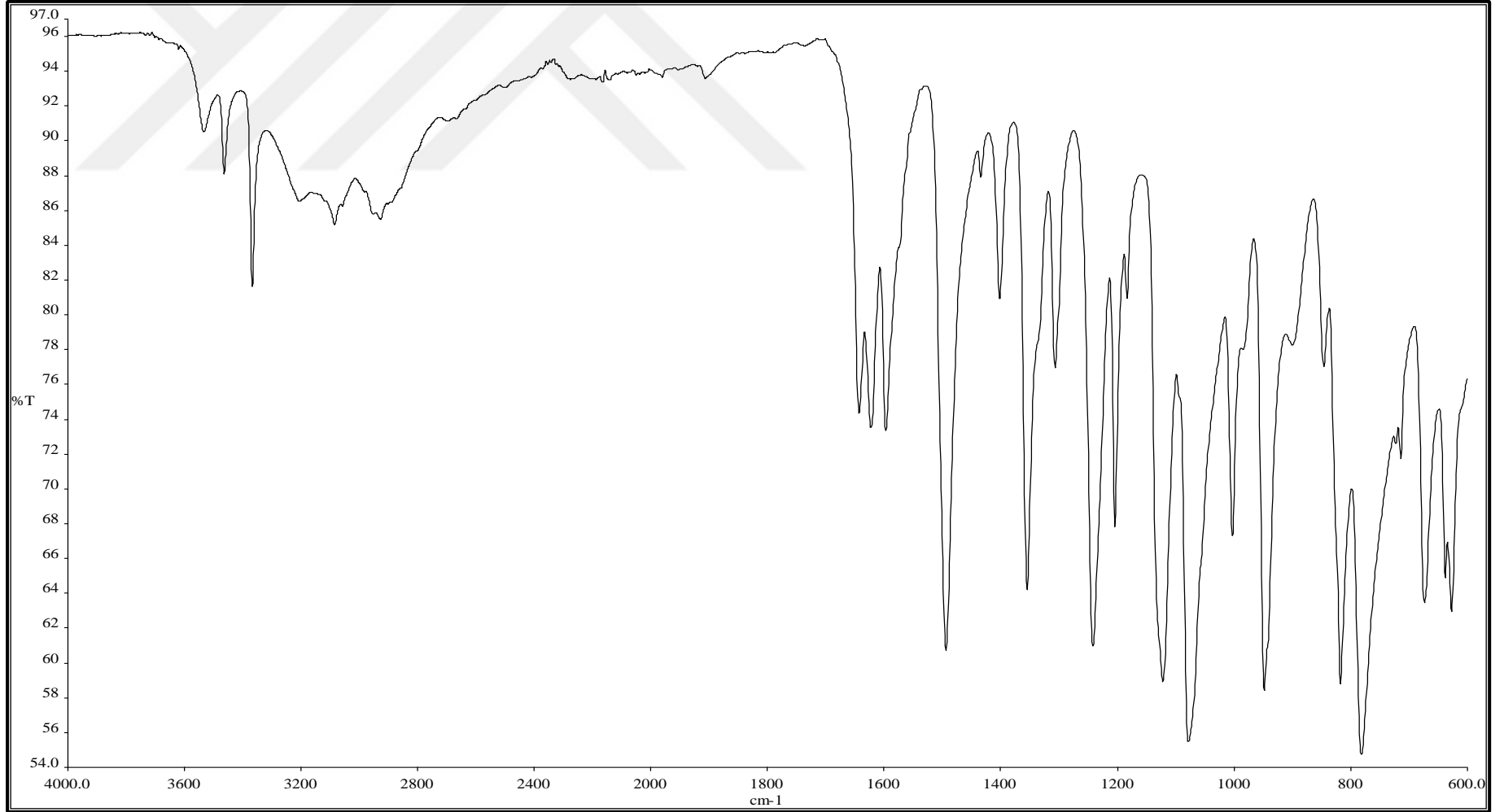


Spektrum 29. A20 kodlu bileşğin IR spektrumu

A20 #45 RT: 0.40 AV: 1 NL: 2.28E6
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 30. A20 kodlu bileşigin kütle spektrumu

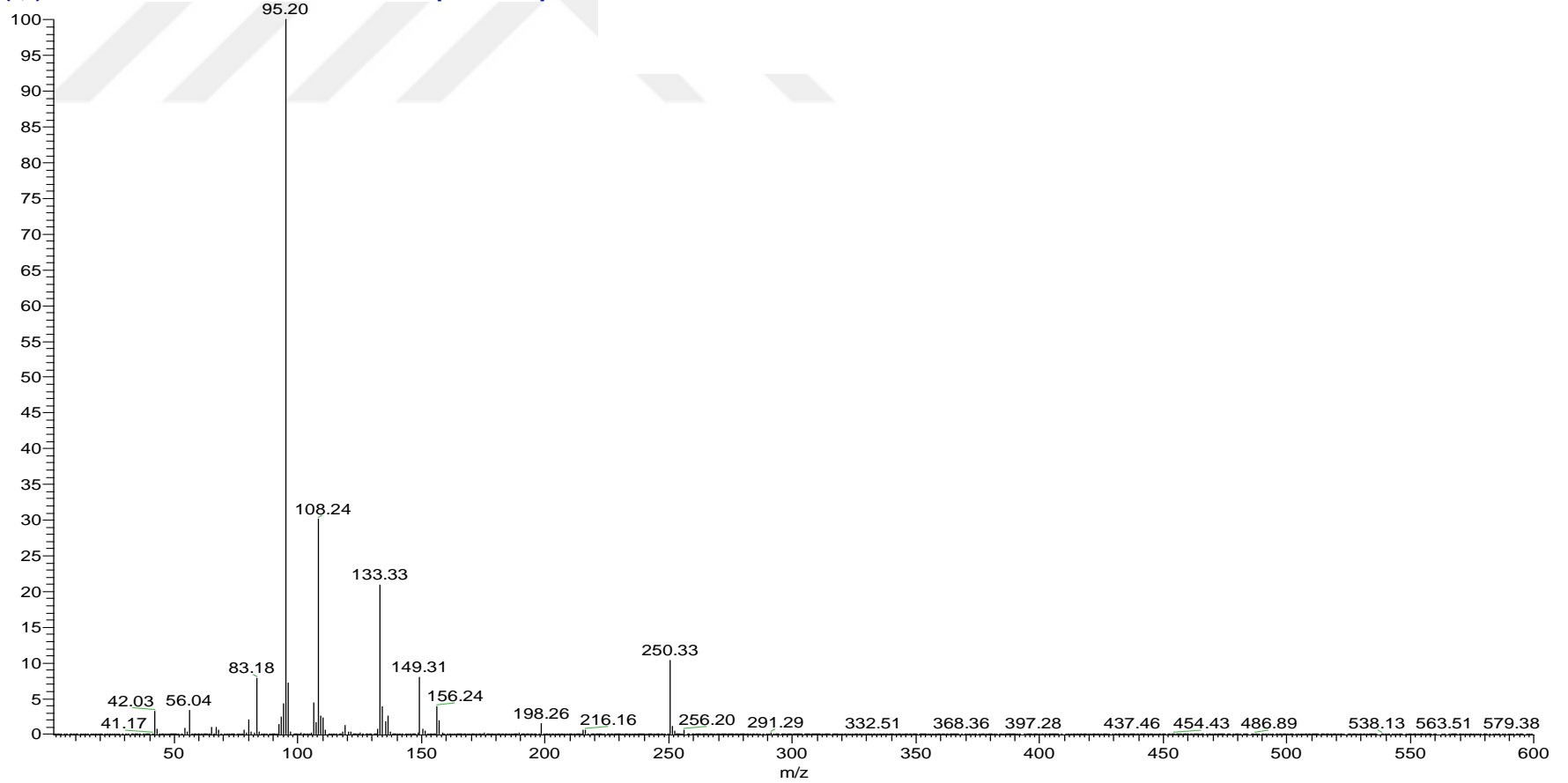


Spektrum 31. A21 kodlu bileşğin IR spektrumu

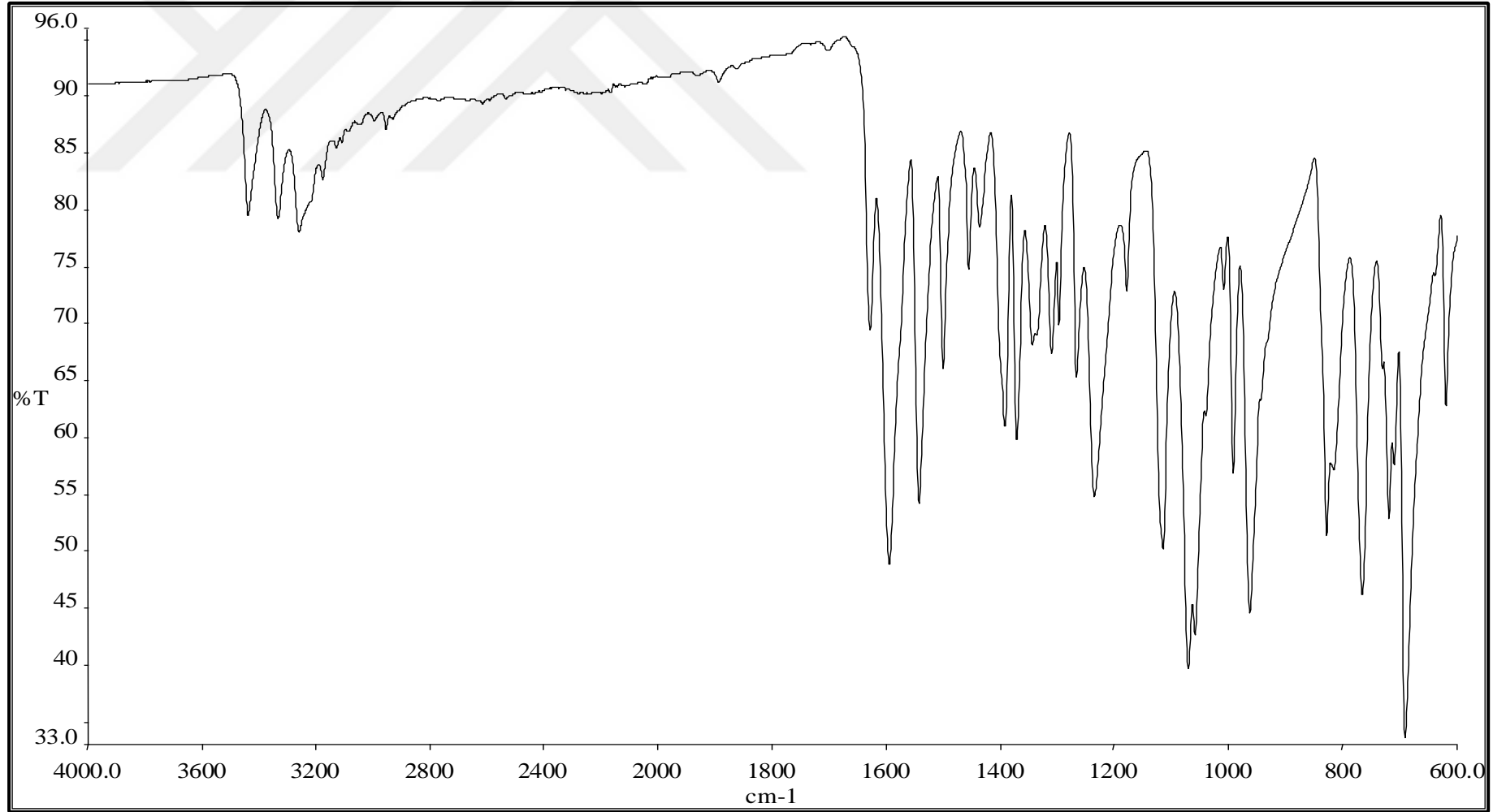
C:\Xcalibur\...2017 11 14\A21

11/14/2017 1:28:37 PM

A21 #38 RT: 0.34 AV: 1 NL: 4.59E6
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 32. A21 kodlu bileşğin kütle spektrumu

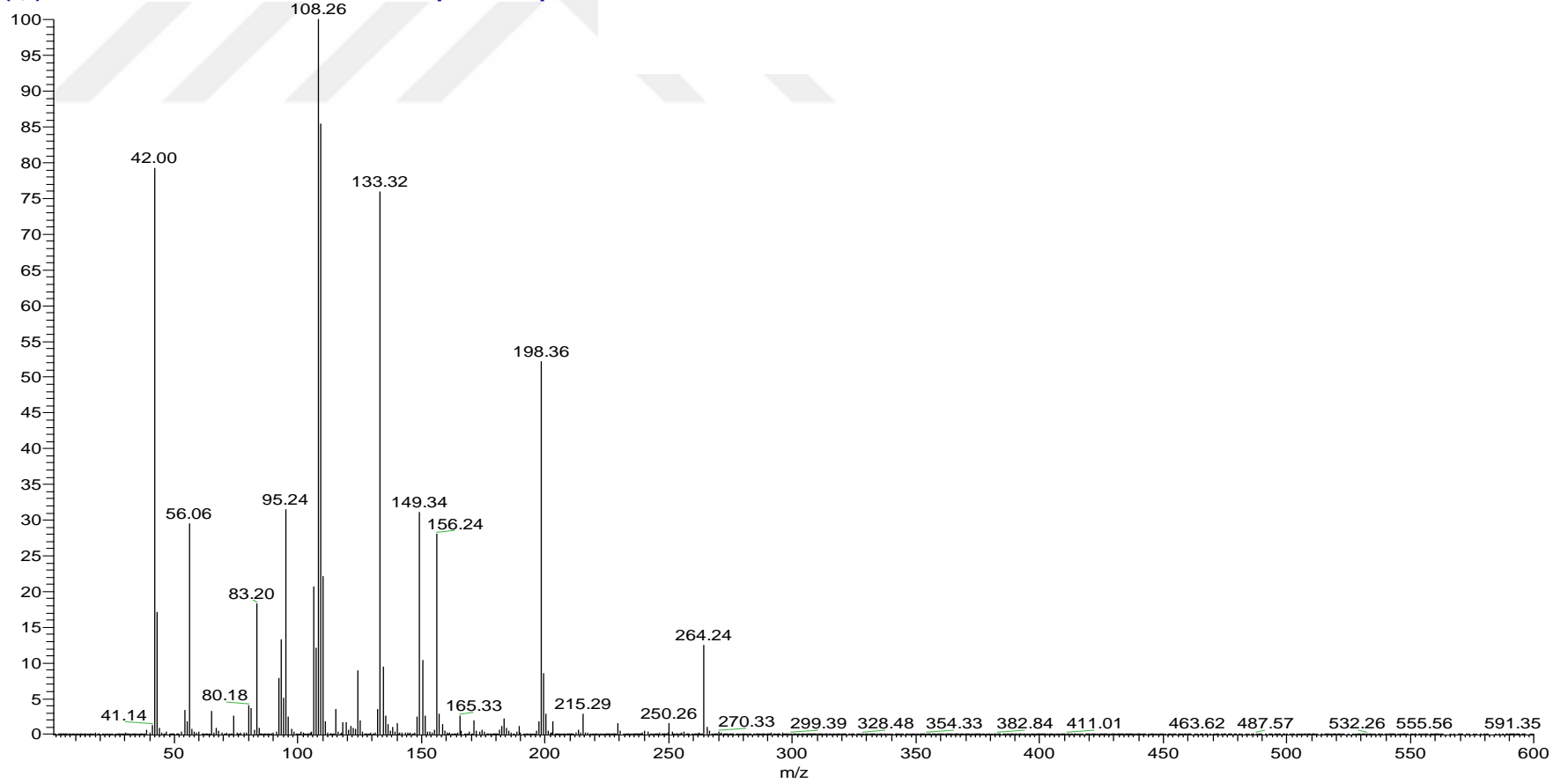


Spektrum 33. A22 kodlu bileşğin IR spektrumu

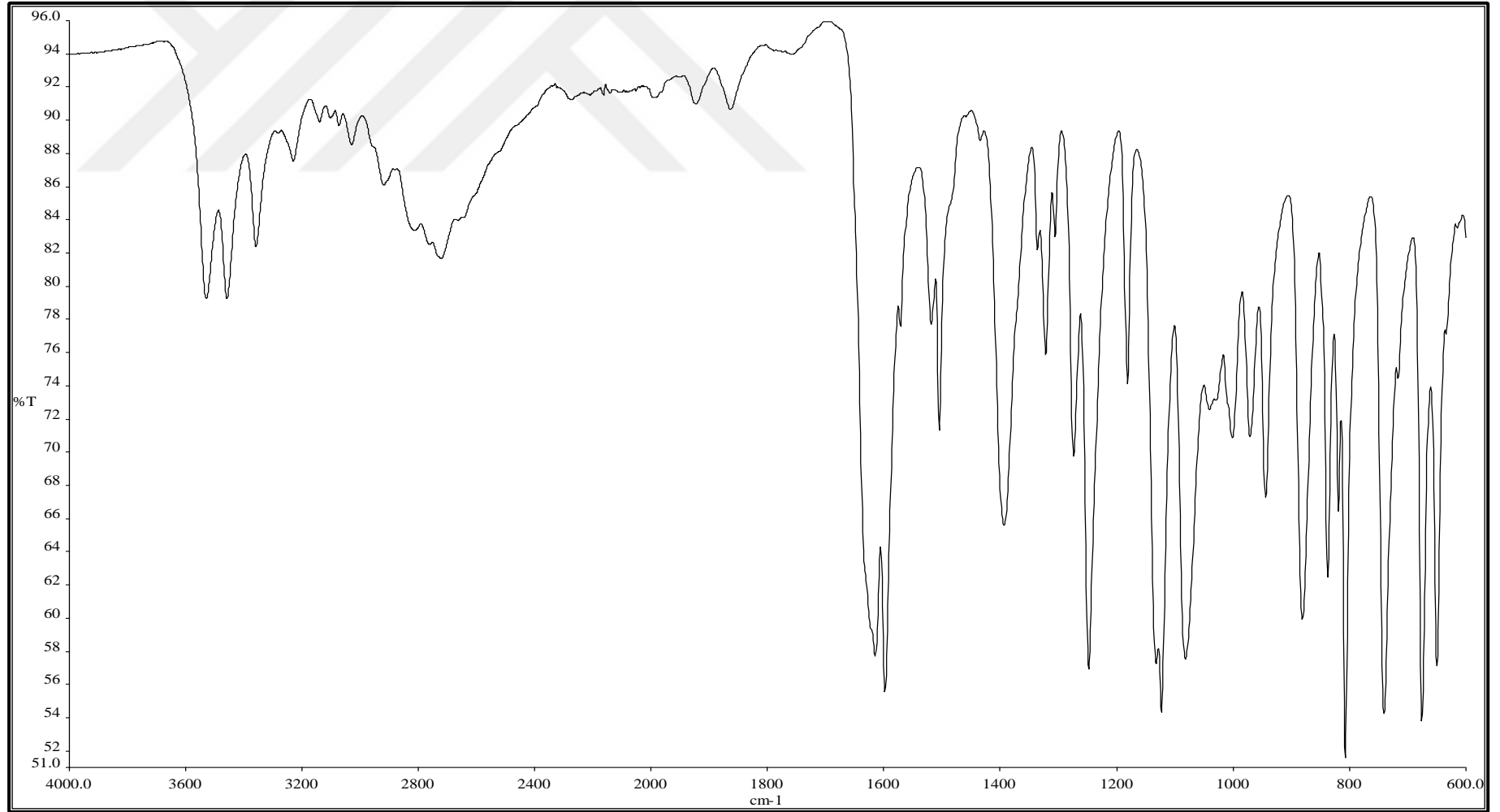
C:\Xcalibur\...2017 11 14\A22

11/14/2017 1:33:35 PM

A22 #49 RT: 0.44 AV: 1 NL: 1.19E6
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 34. A22 kodlu bileşigin kütle spektrumu

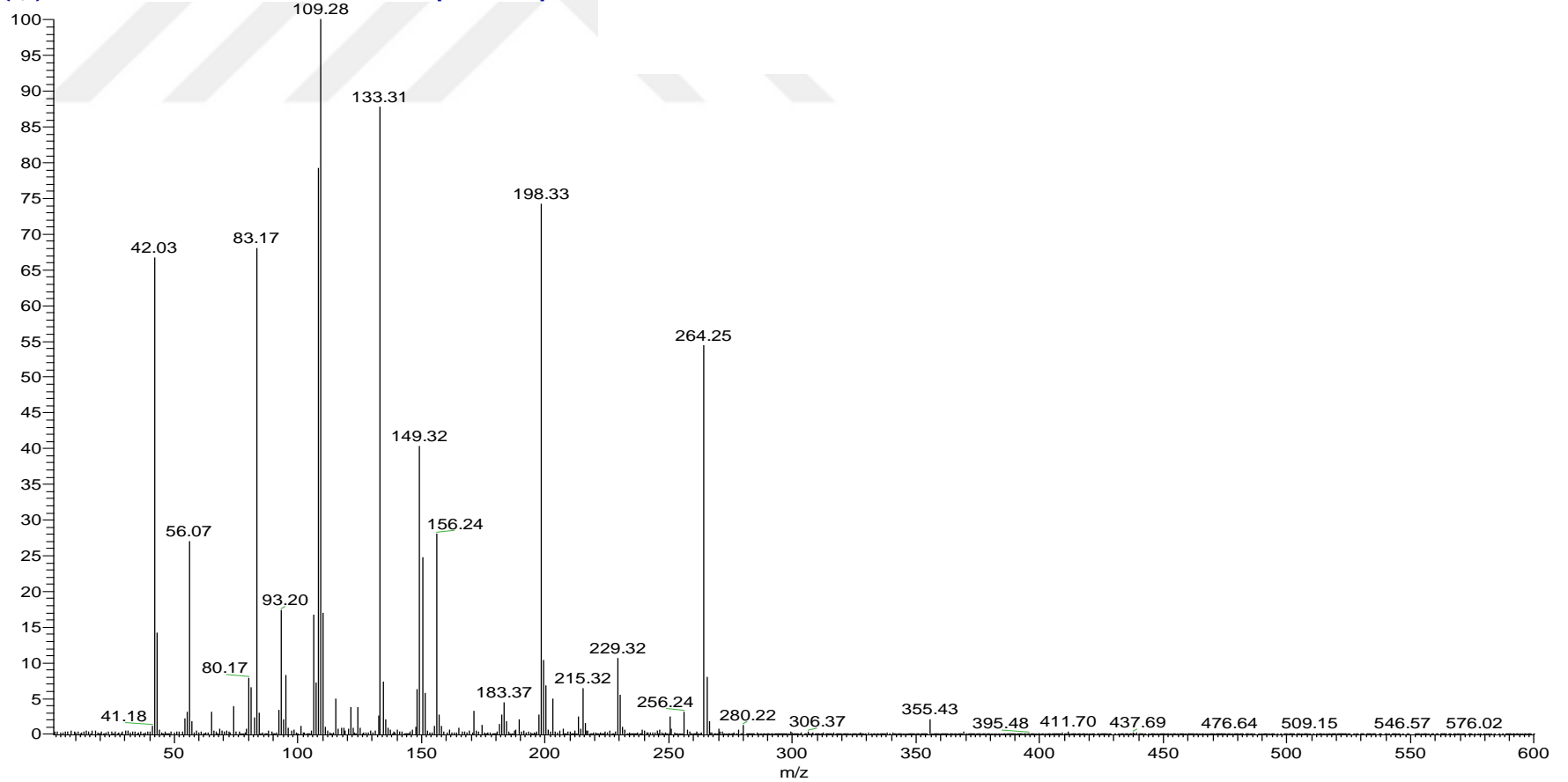


Spektrum 35. A23 kodlu bileşğin IR spektrumu

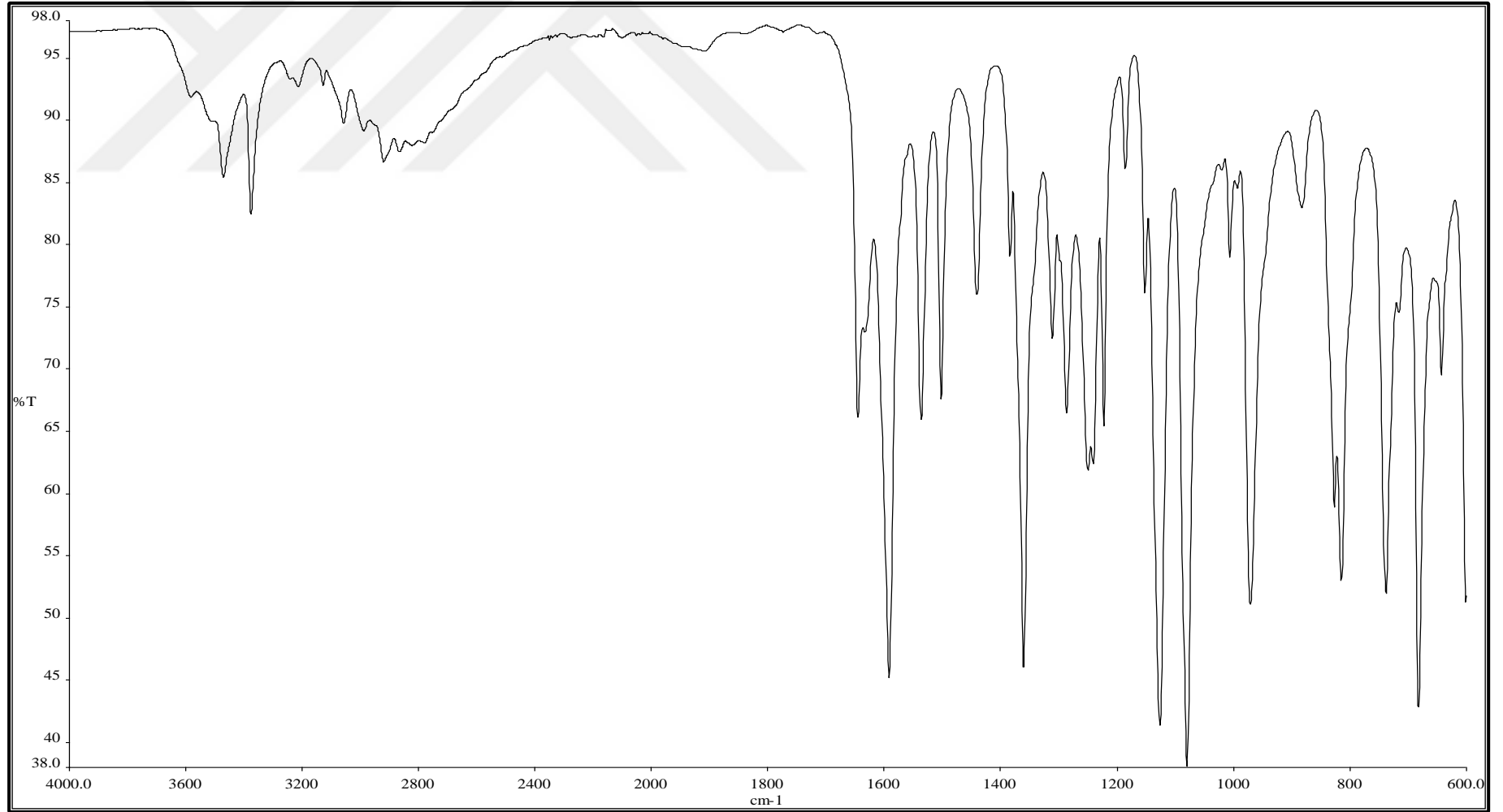
C:\Xcalibur...\2017 11 14\A23

11/14/2017 1:38:31 PM

A23 #40 RT: 0.36 AV: 1 NL: 4.19E5
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 36. A23 kodlu bileşğin kütle spektrumu



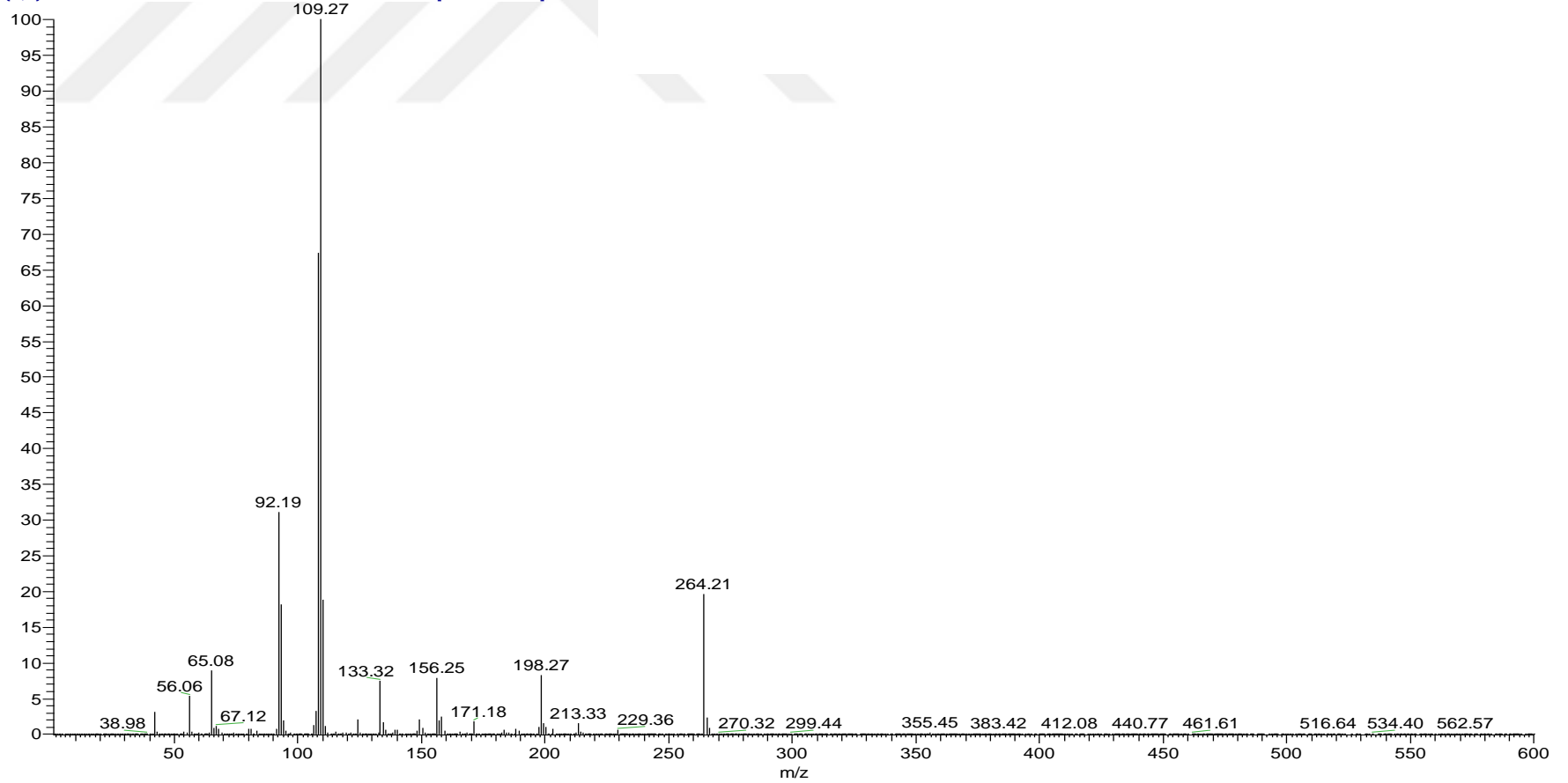
Spektrum 37. A24 kodlu bileşğin IR spektrumu

C:\Xcalibur\...2017 11 14\A24

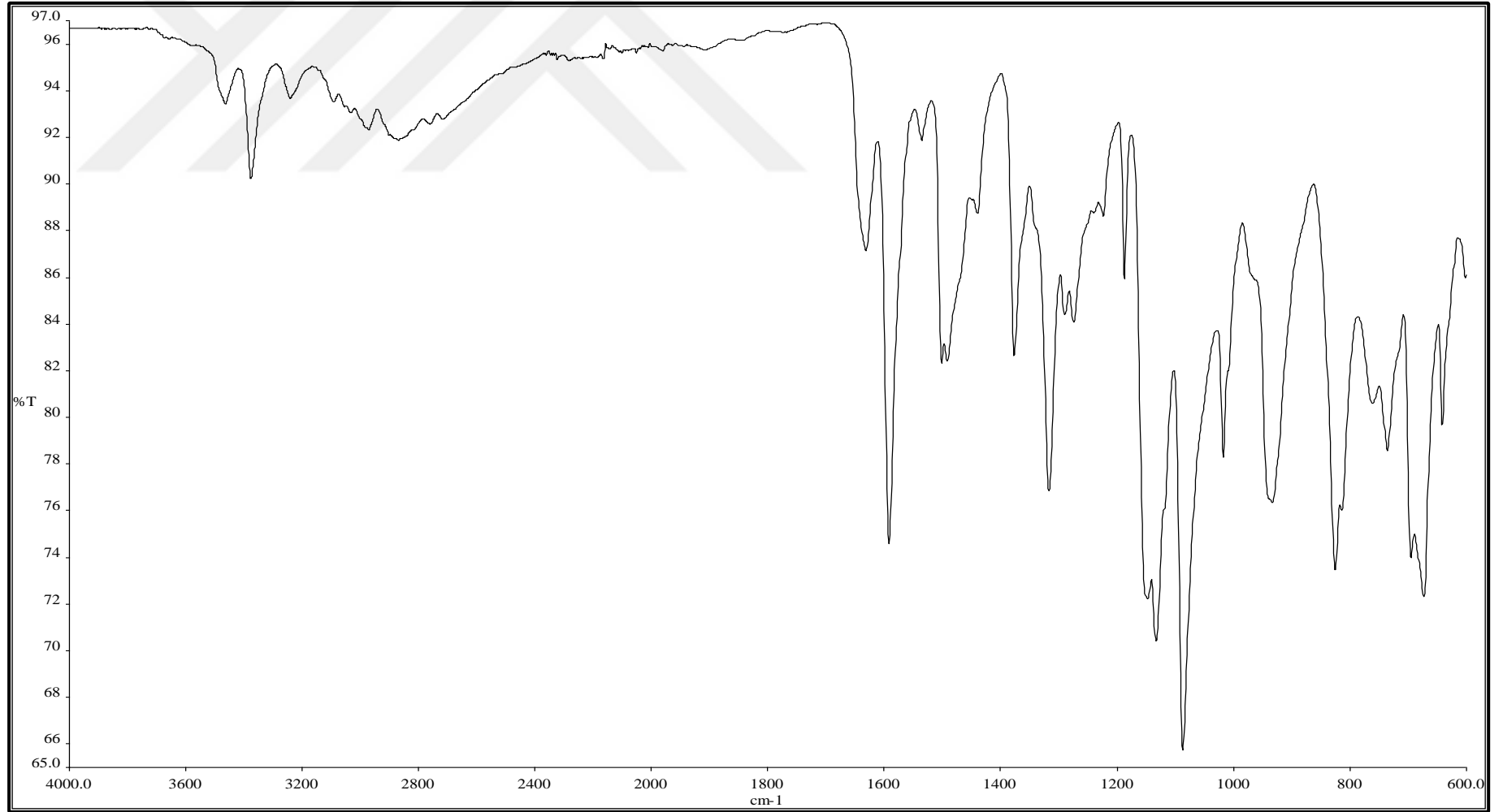
11/14/2017 1:43:29 PM

A24 #42 RT: 0.37 AV: 1 NL: 1.46E7

T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 38. A24 kodlu bileşimin kütle spektrumu

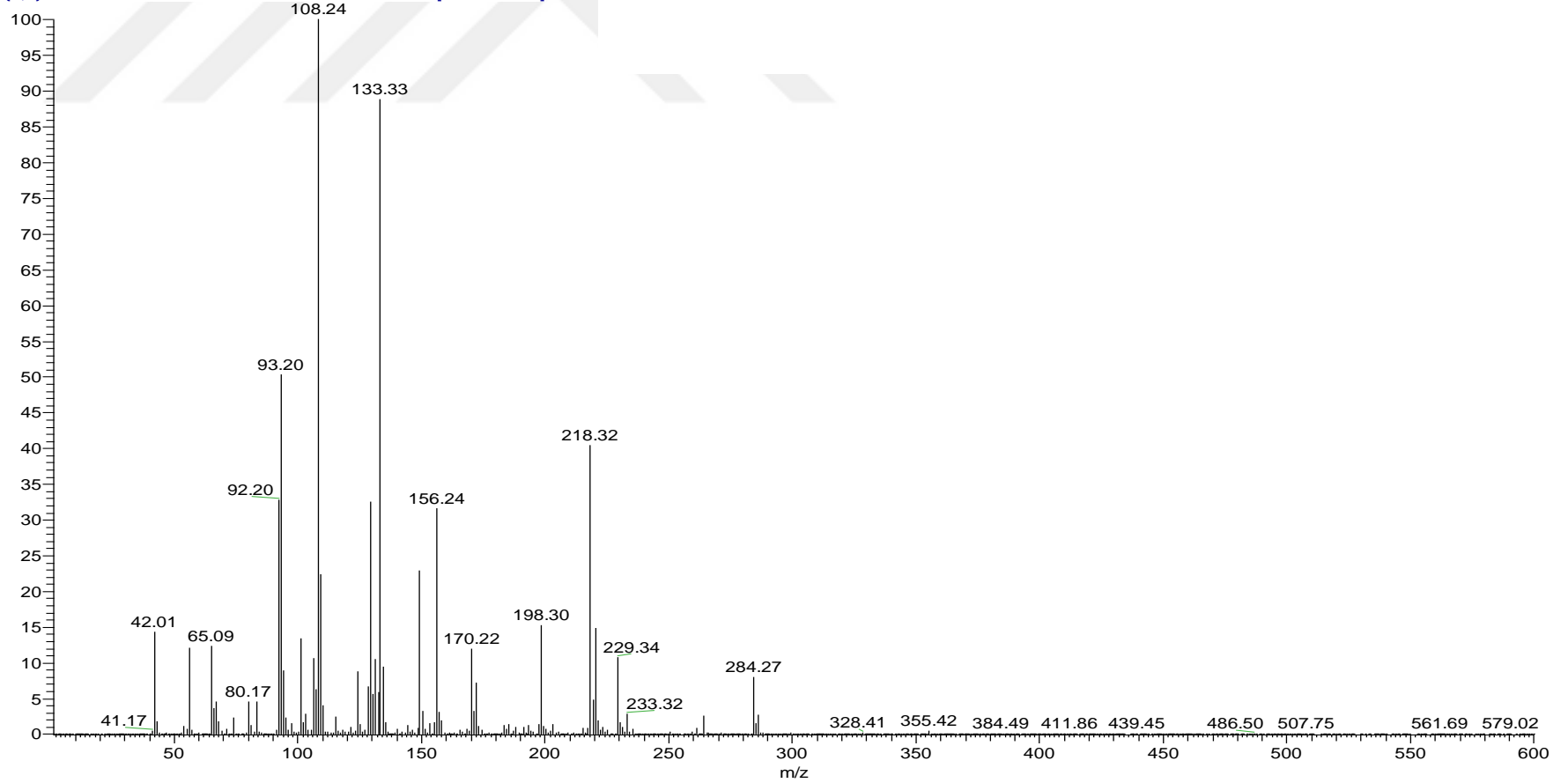


Spektrum 39. A25 kodlu bileşğin IR spektrumu

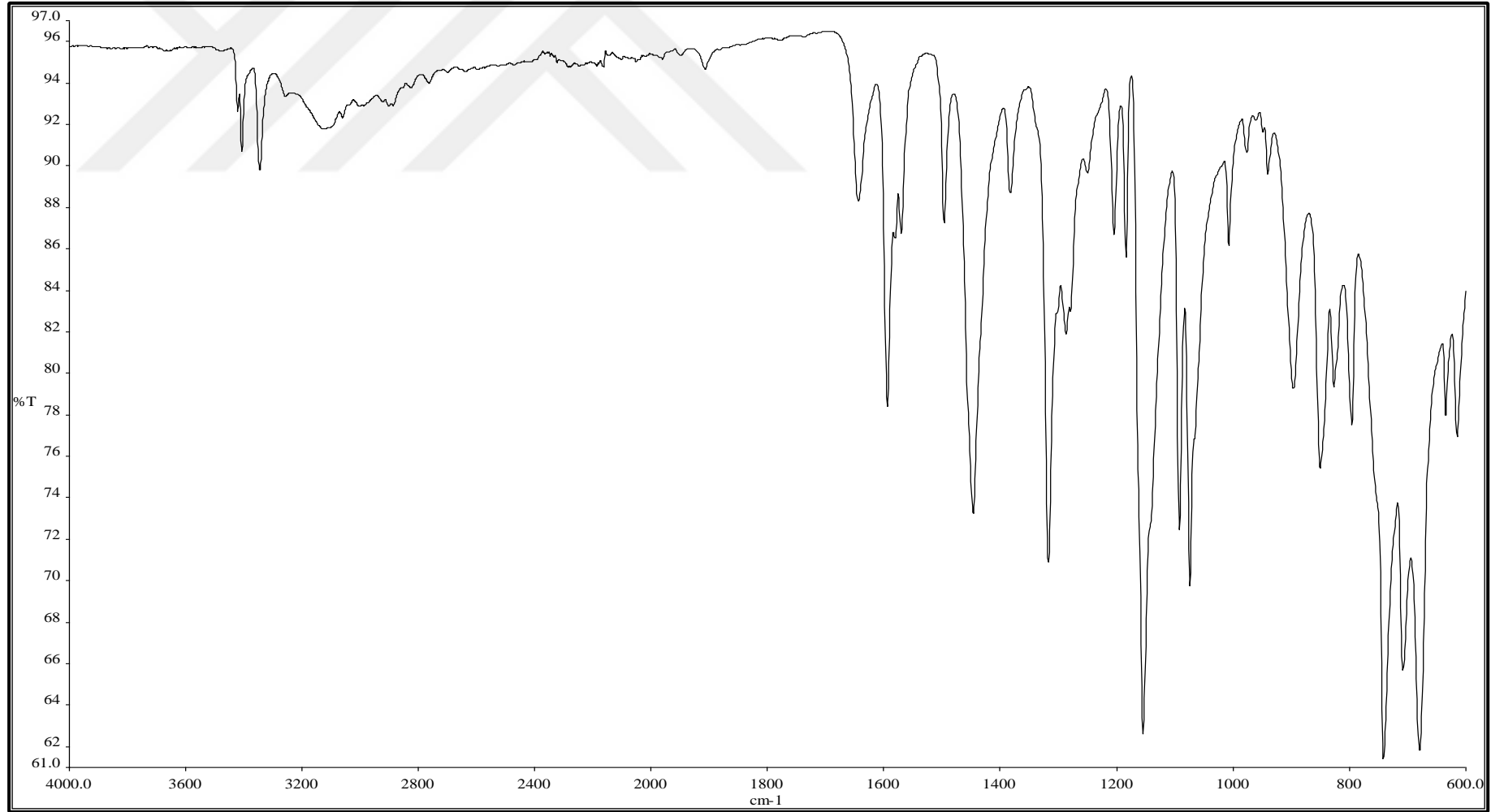
C:\Xcalibur...\2017 11 14\A25

11/14/2017 1:48:31 PM

A25 #41 RT: 0.36 AV: 1 NL: 3.19E6
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 40. A25 kodlu bileşğin kütle spektrumu

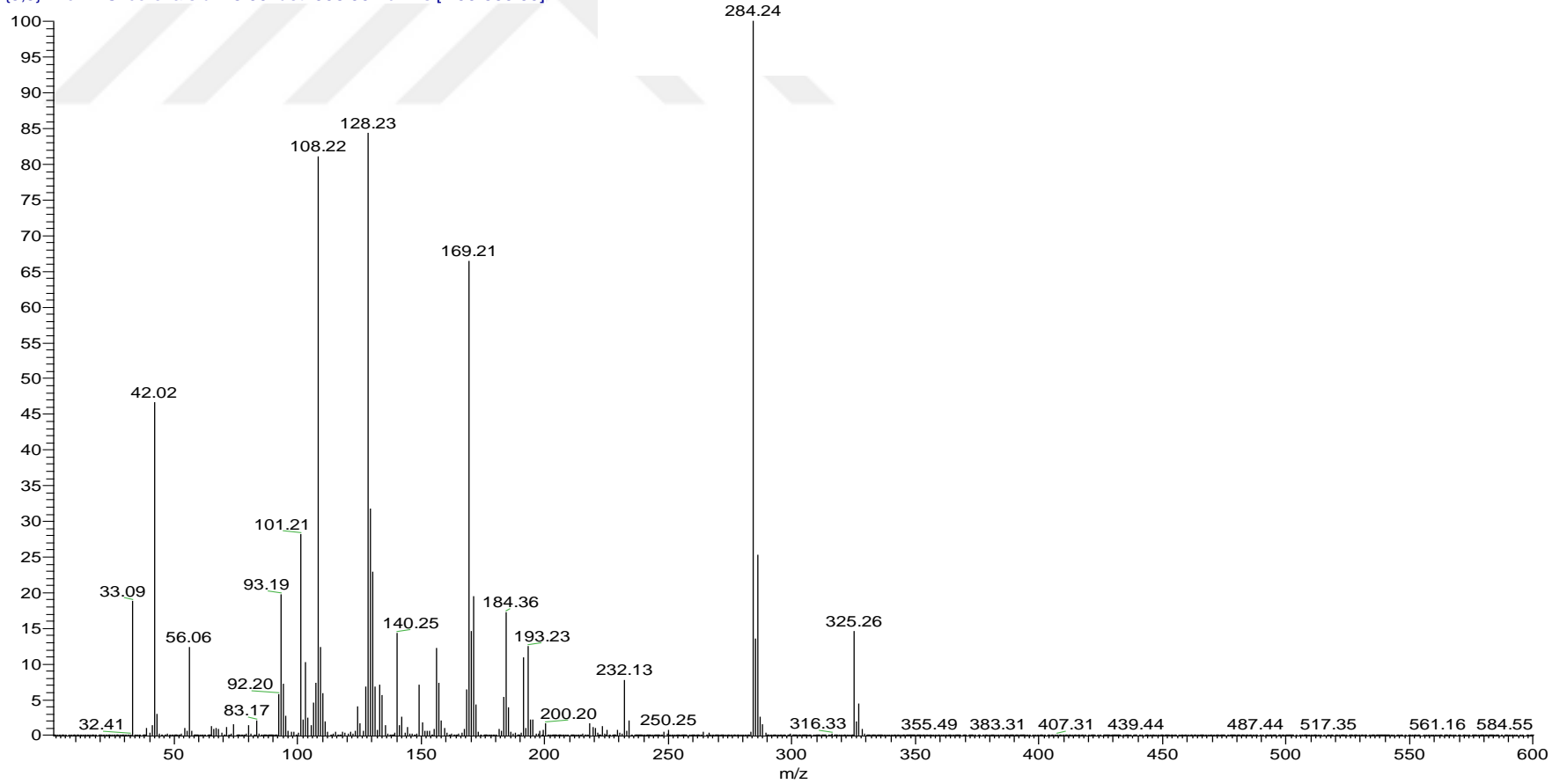


Spektrum 41. A26 kodlu bileşğin IR spektrumu

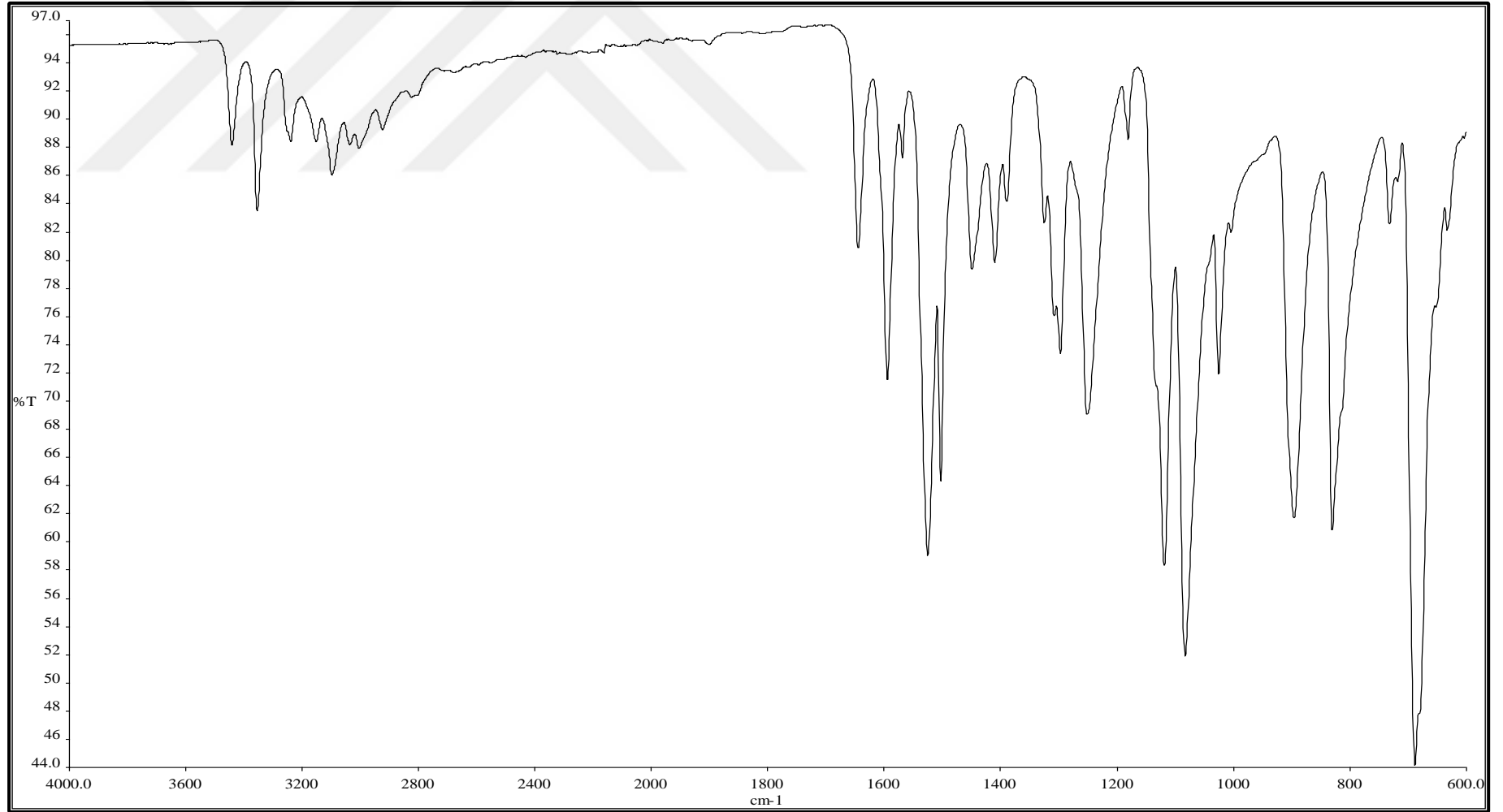
C:\Xcalibur...\2017 11 14\A26

11/14/2017 1:53:33 PM

A26 #42 RT: 0.37 AV: 1 NL: 3.27E6
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 42. A26 kodlu bileşğin kütle spektrumu

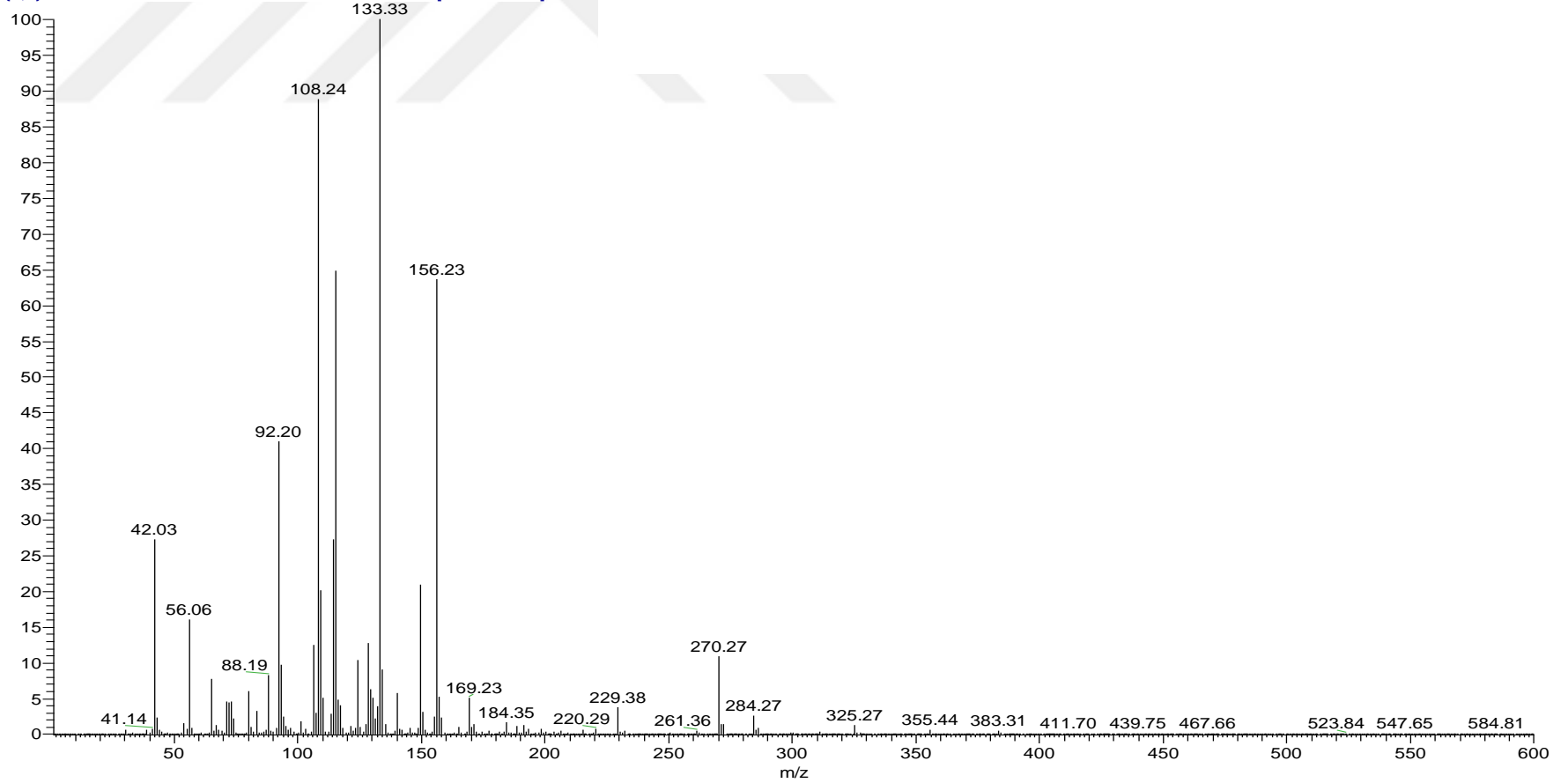


Spektrum 43. A28 kodlu bileşğin IR spektrumu

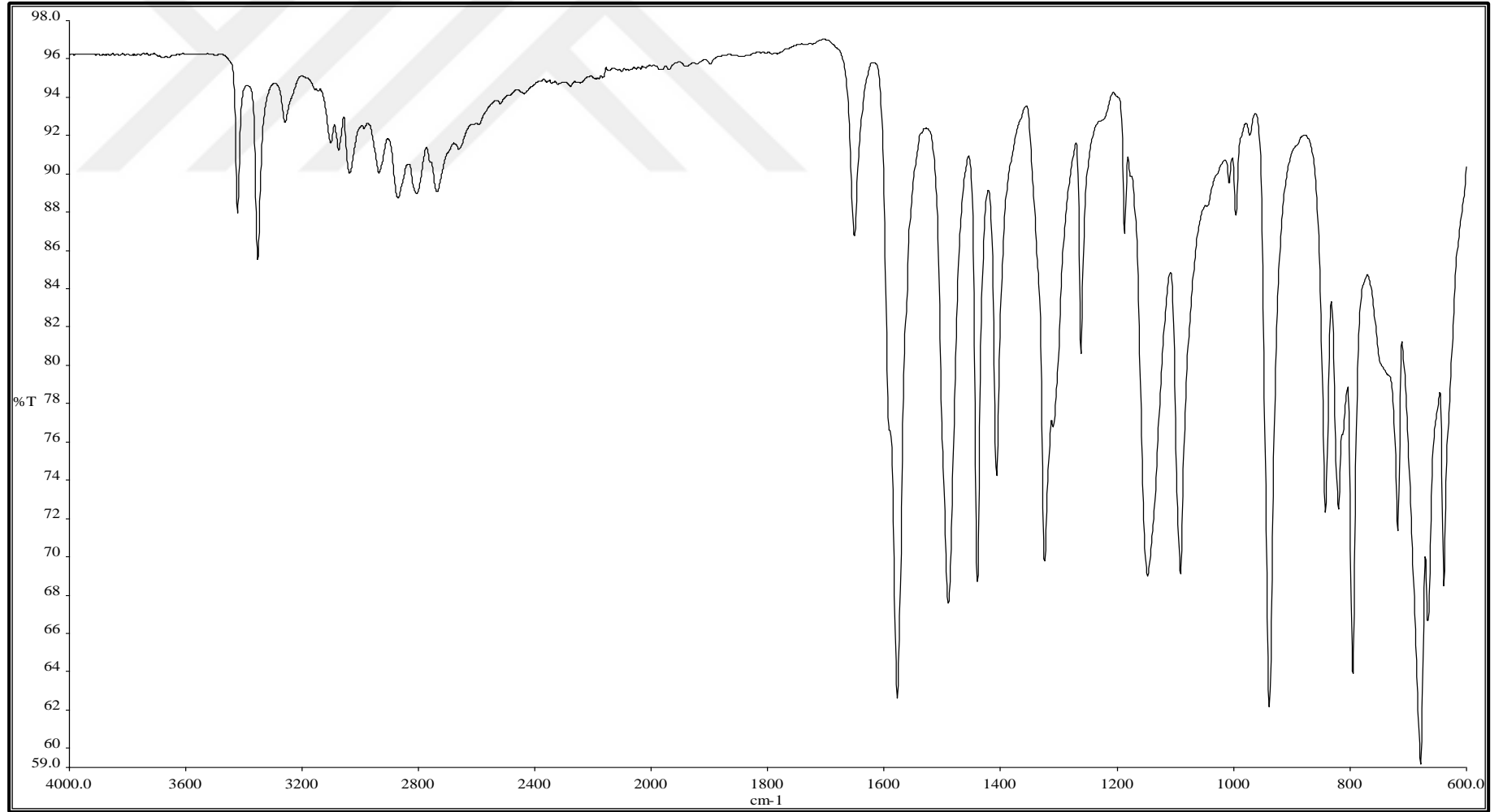
C:\Xcalibur...\2017 11 14\A28

11/14/2017 1:58:37 PM

A28 #41 RT: 0.36 AV: 1 NL: 3.63E6
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 44. A28 kodlu bileşğin kütle spektrumu

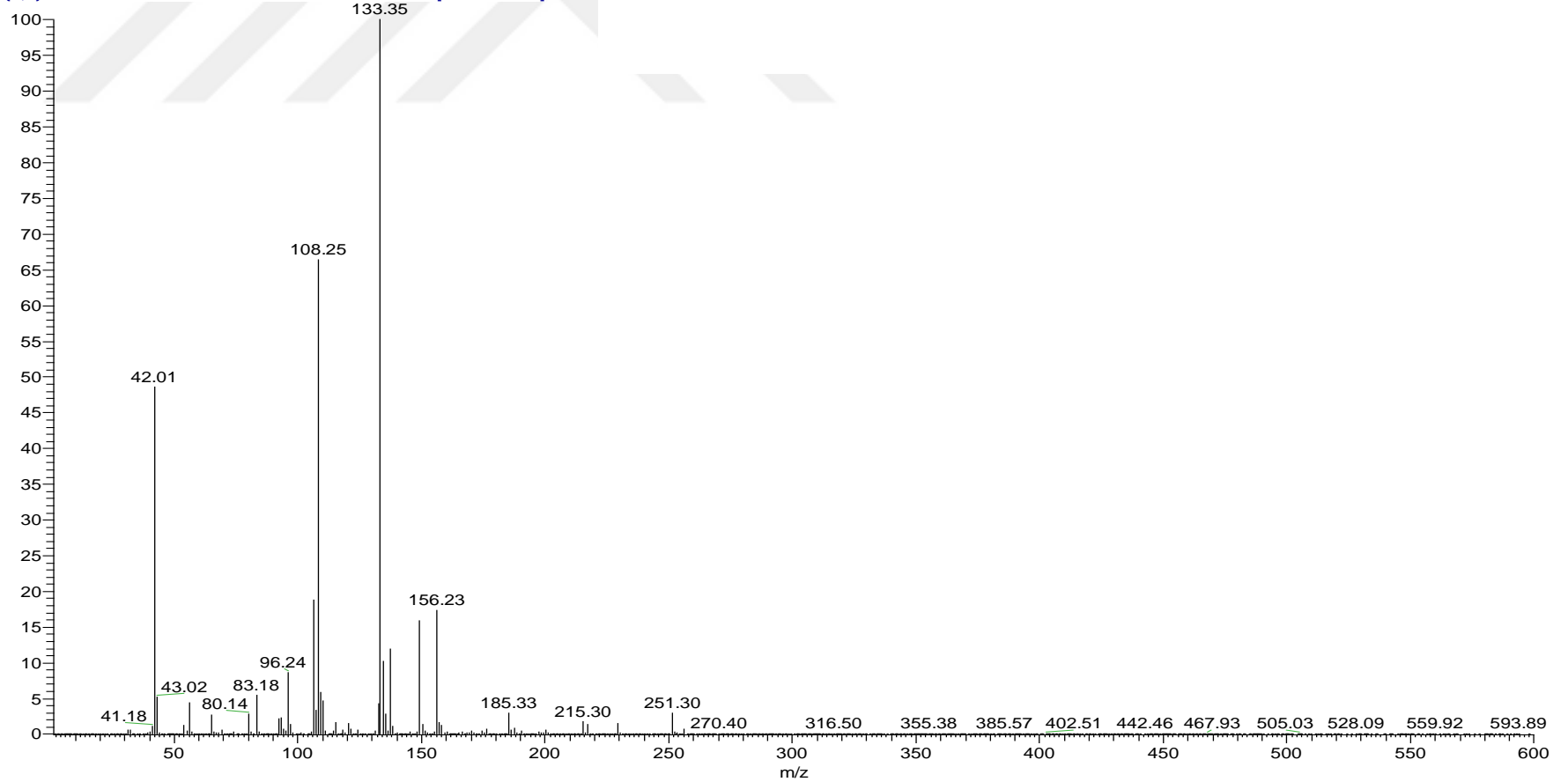


Spektrum 45. A29 kodlu bileşğin IR spektrumu

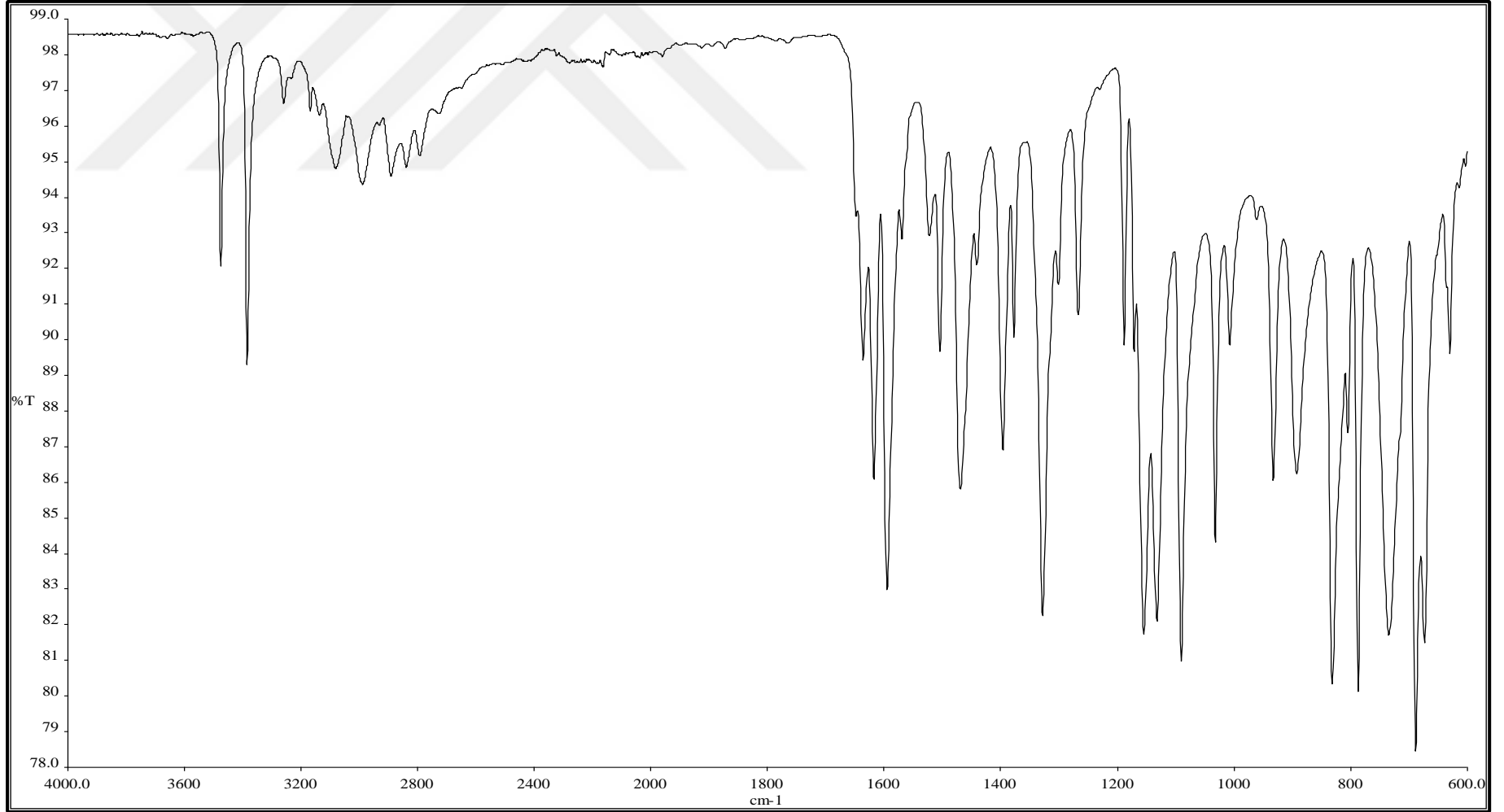
C:\Xcalibur...\2017 11 14\A29

11/14/2017 2:03:39 PM

A29 #39 RT: 0.35 AV: 1 NL: 4.97E6
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 46. A29 kodlu bileşimin kütle spektrumu

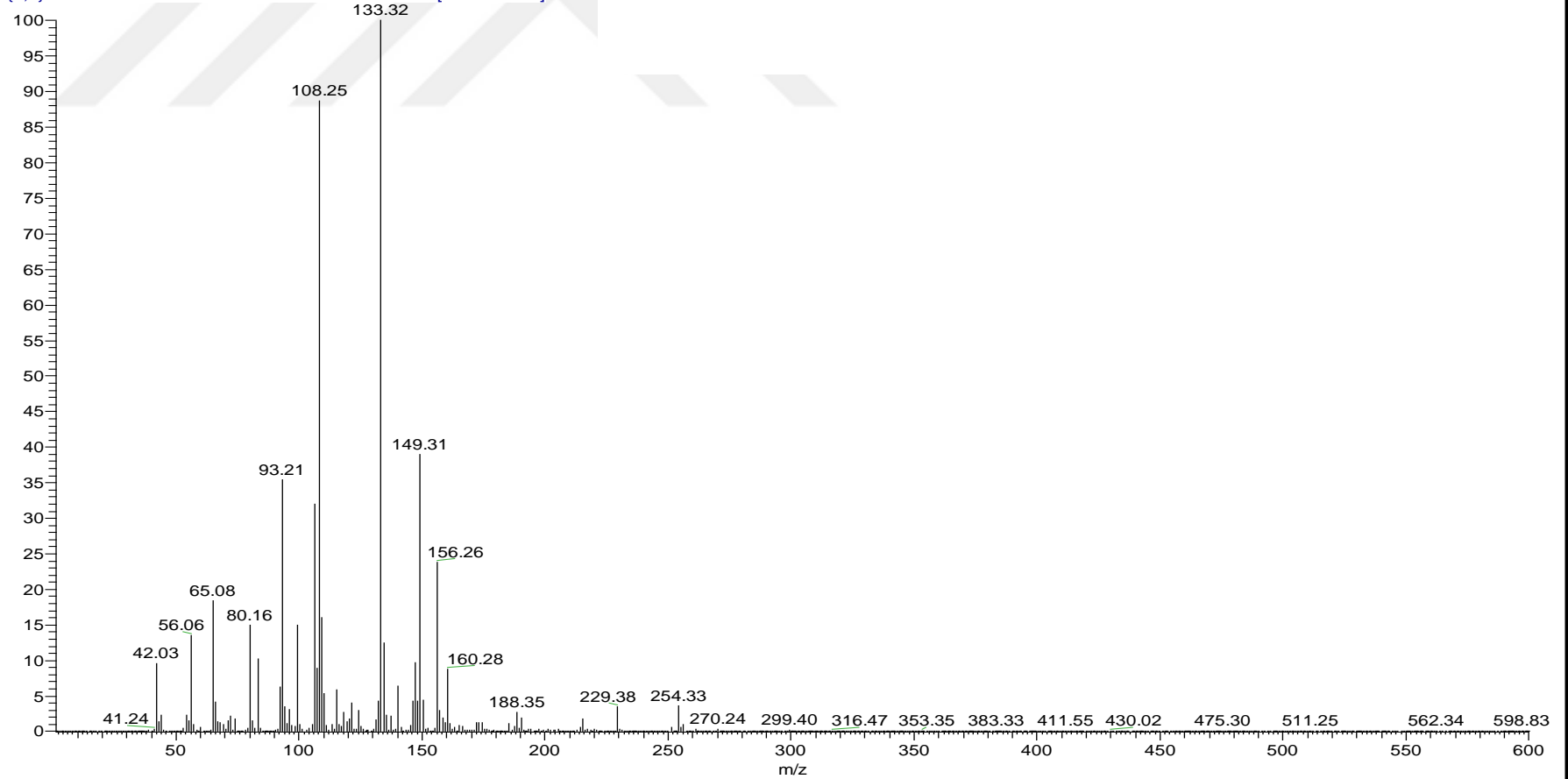


Spektrum 47. A30 kodlu bileşğin IR spektrumu

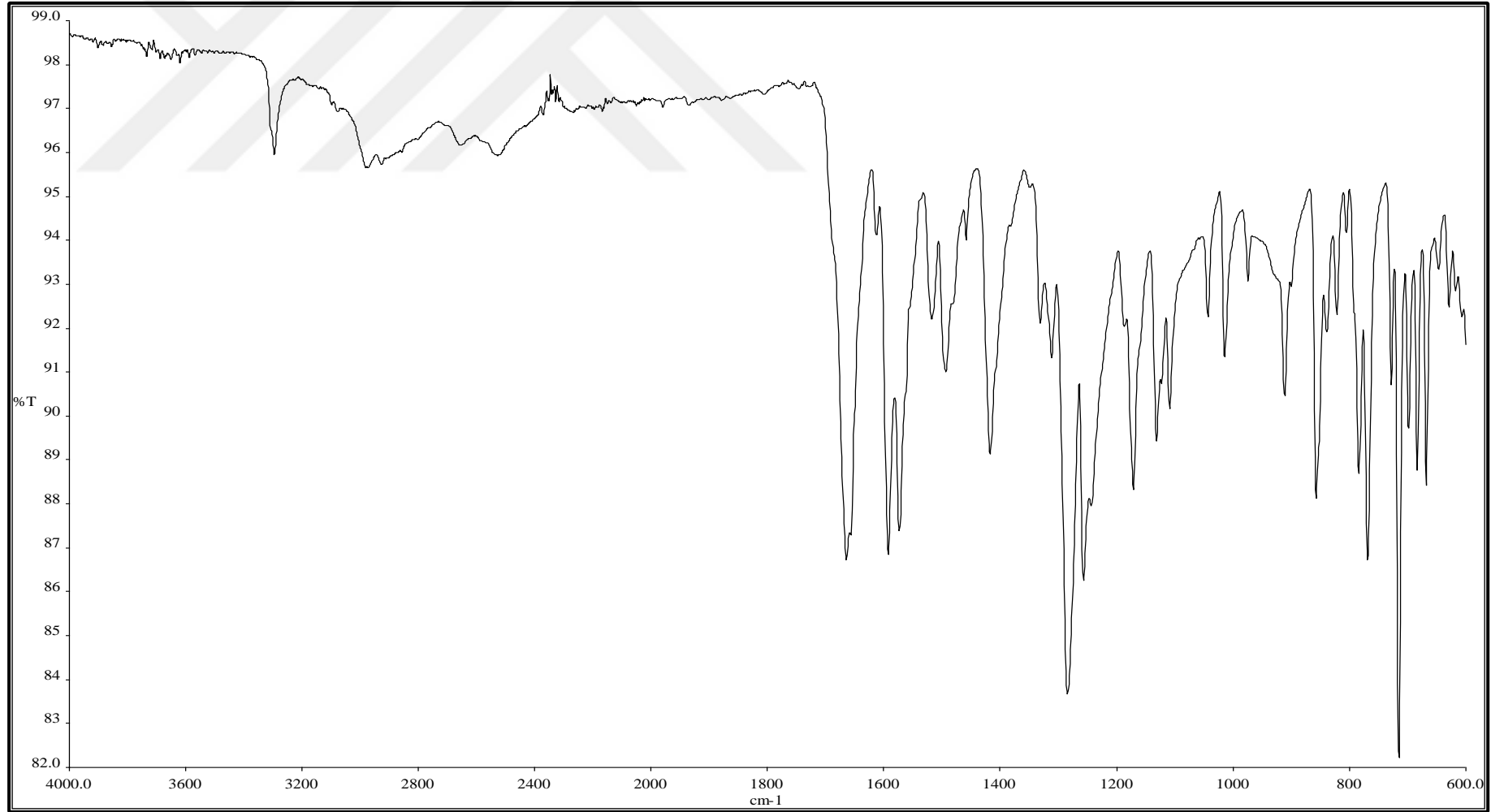
C:\Xcalibur...\2017 11 14\A30

11/14/2017 2:08:37 PM

A30 #40 RT: 0.36 AV: 1 NL: 1.60E6
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 48. A30 kodlu bileşğin kütle spektrumu



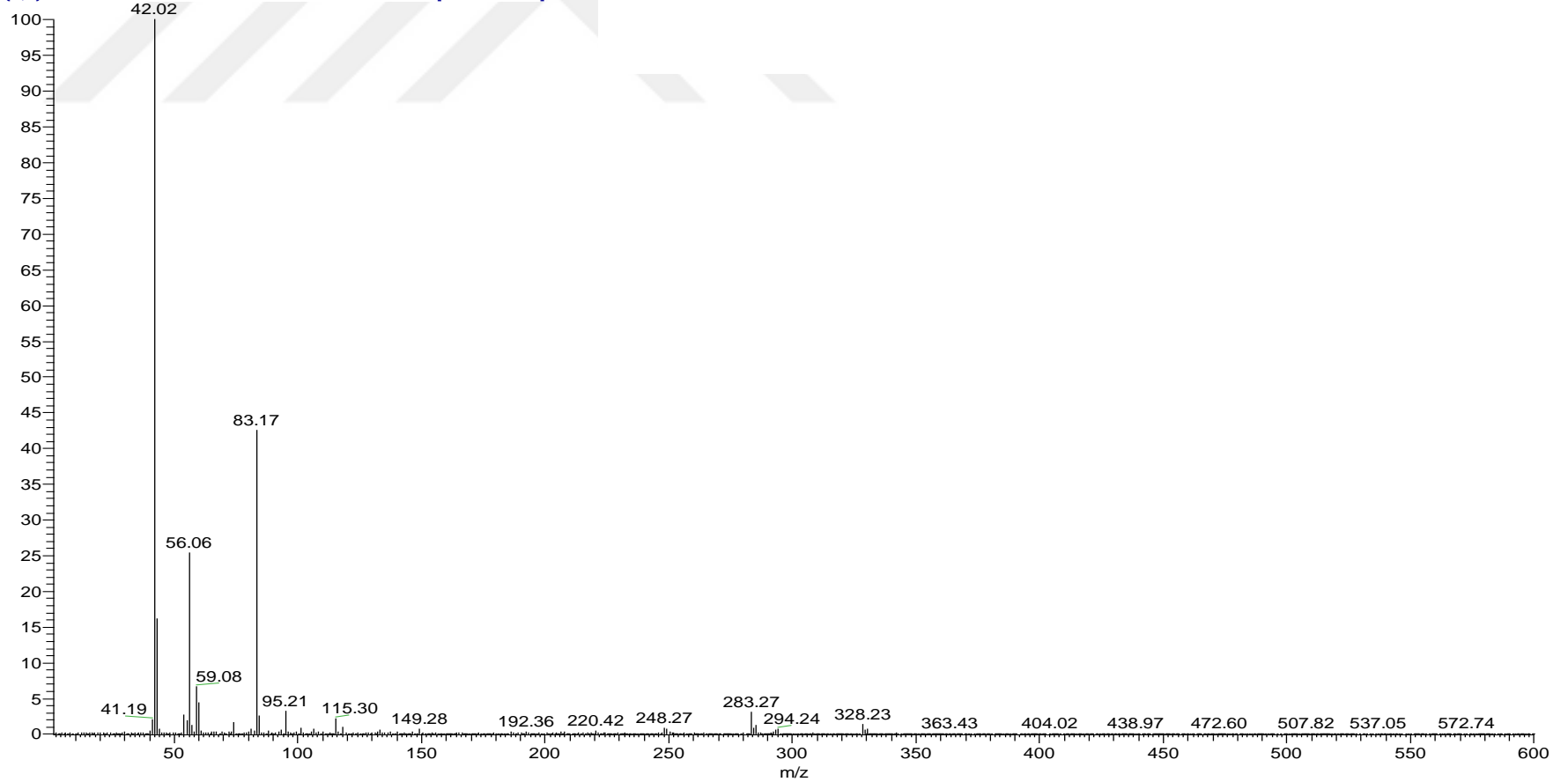
Spektrum 49. A31 kodlu bileşğin IR spektrumu

C:\Xcalibur\...2017 11 14\A31

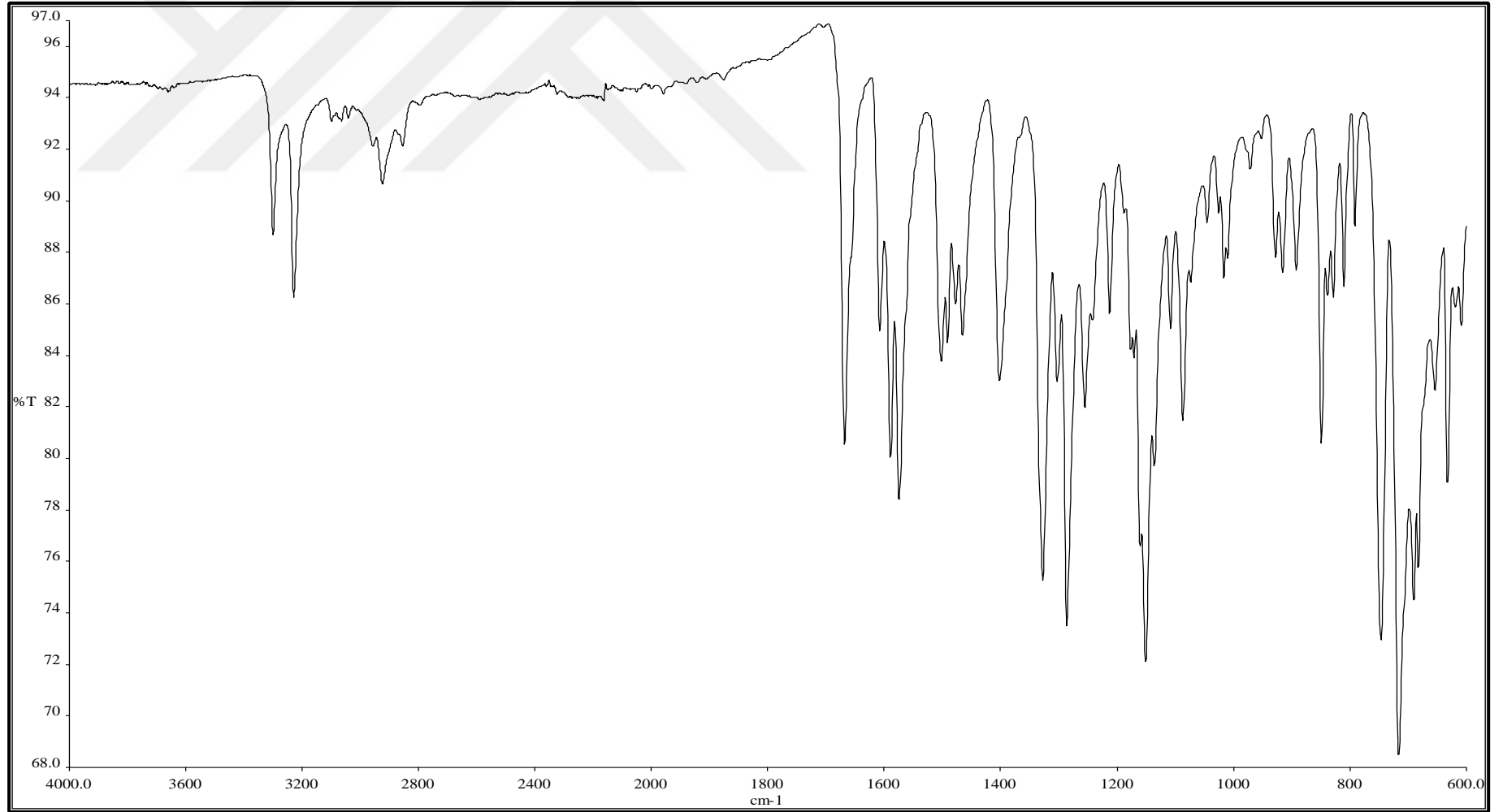
11/14/2017 2:13:39 PM

A31 #66 RT: 0.59 AV: 1 NL: 7.22E5

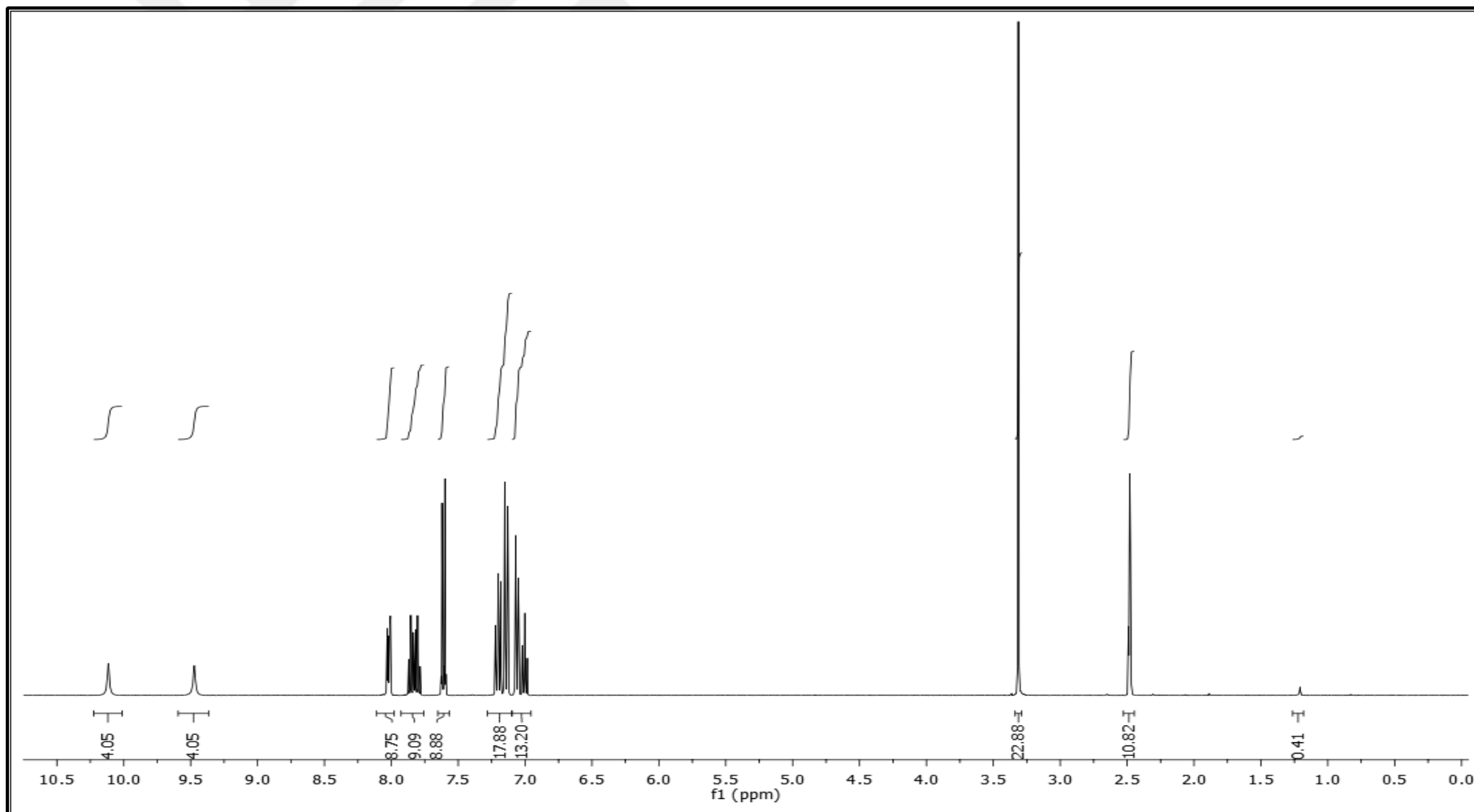
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 50. A31 kodlu bileşigin kütle spektrumu



Spektrum 51. NS1 kodlu bileşğin IR spektrumu

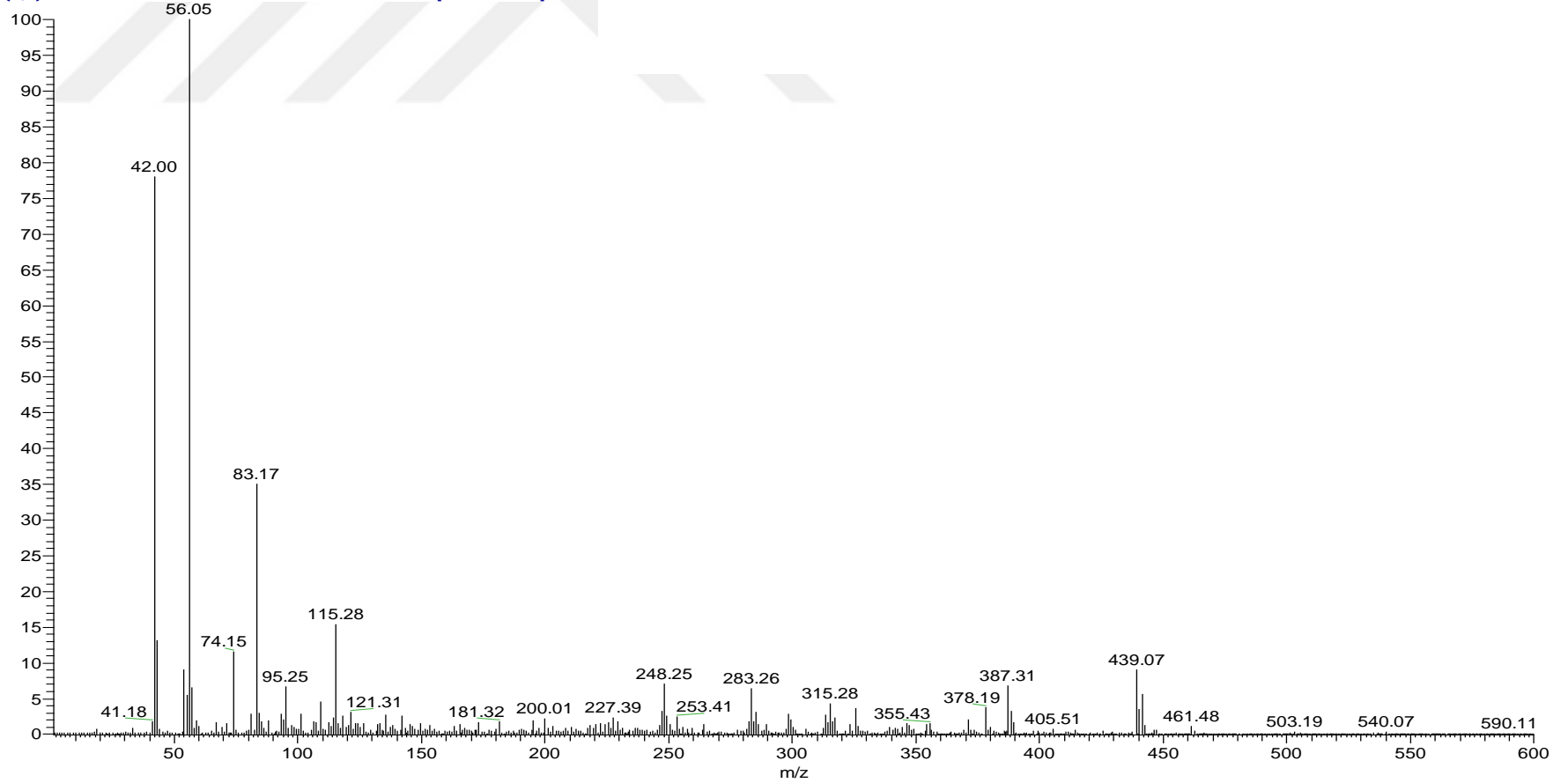


Spektrum 52. NS1 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu

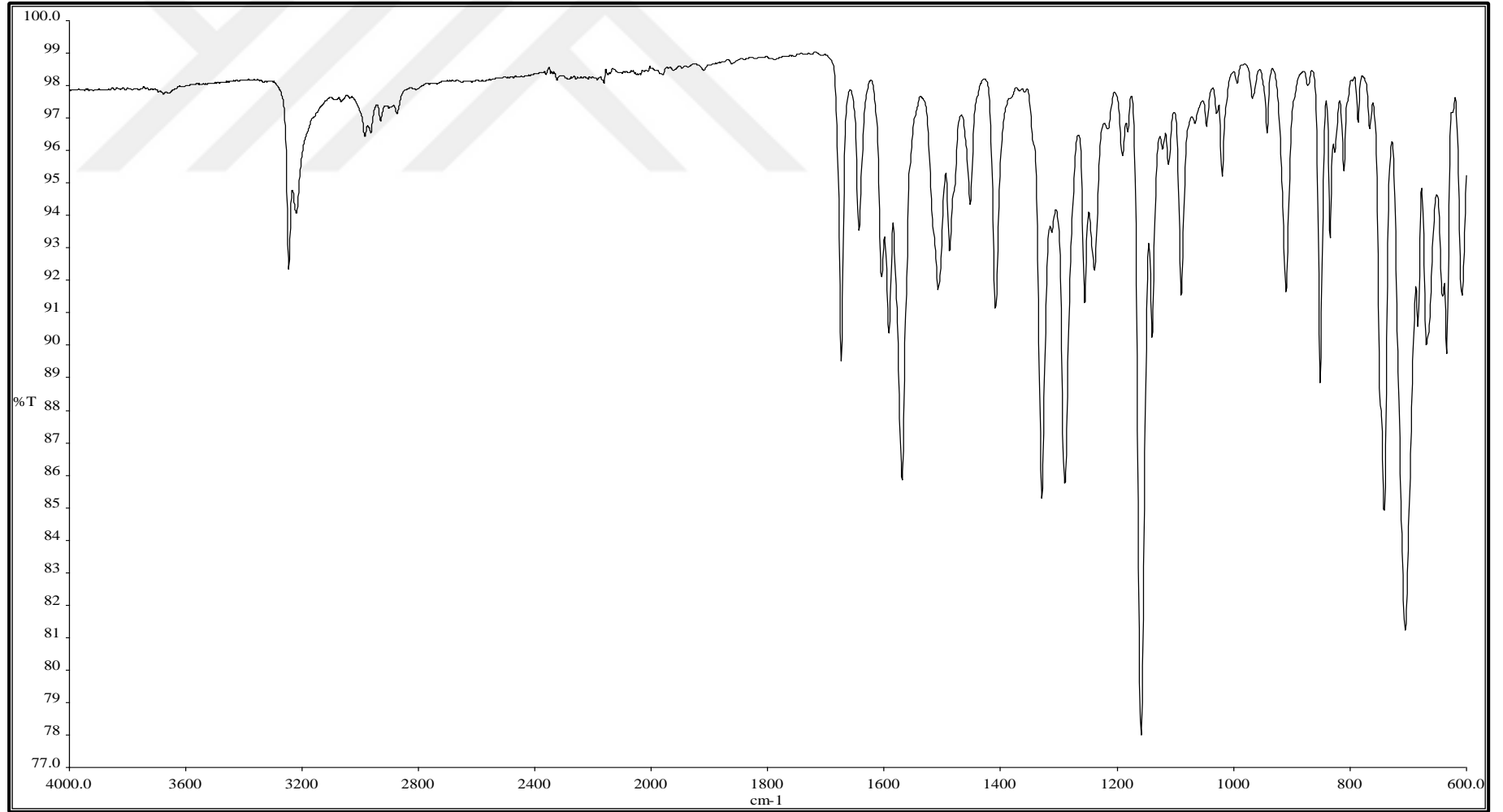
C:\Xcalibur\...2017 11 14\NS1

11/14/2017 10:18:58 AM

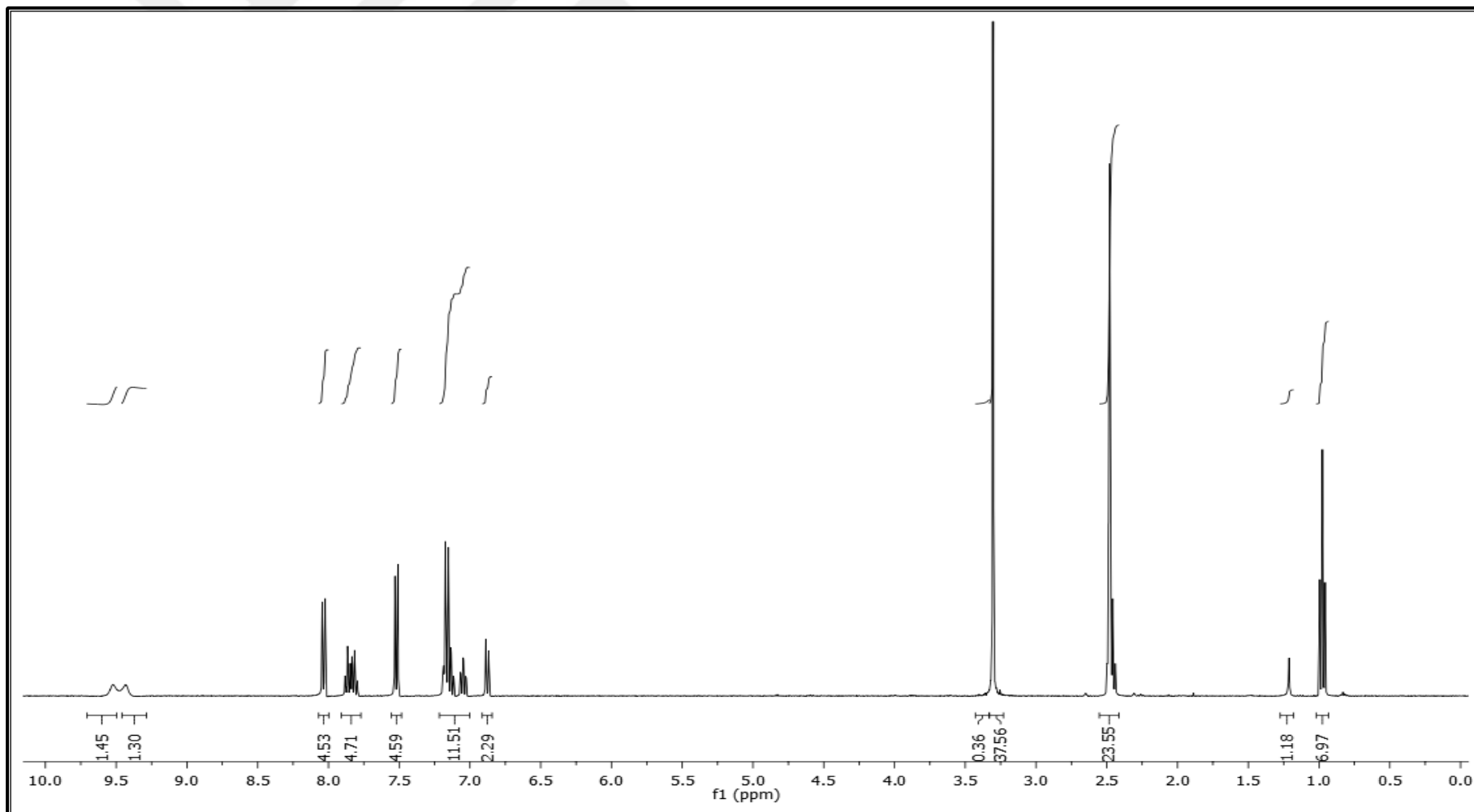
NS1 #38 RT: 0.34 AV: 1 NL: 7.76E5
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 53. NS1 kodlu bileşimin kütle spektrumu



Spektrum 54. NS2 kodlu bileşğin IR spektrumu

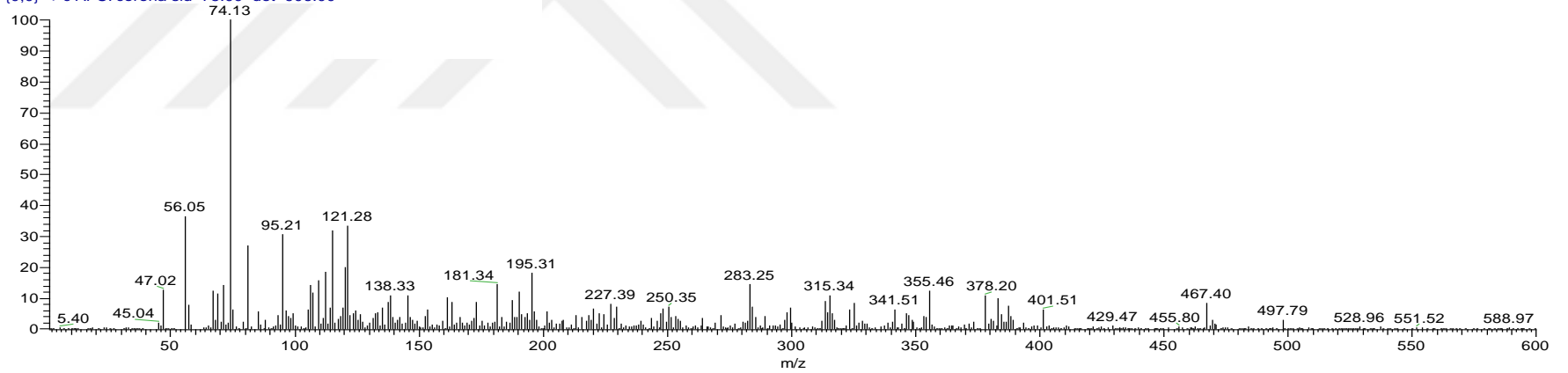


Spektrum 55. NS2 kodlu bileşigin ^1H NMR spektrumu

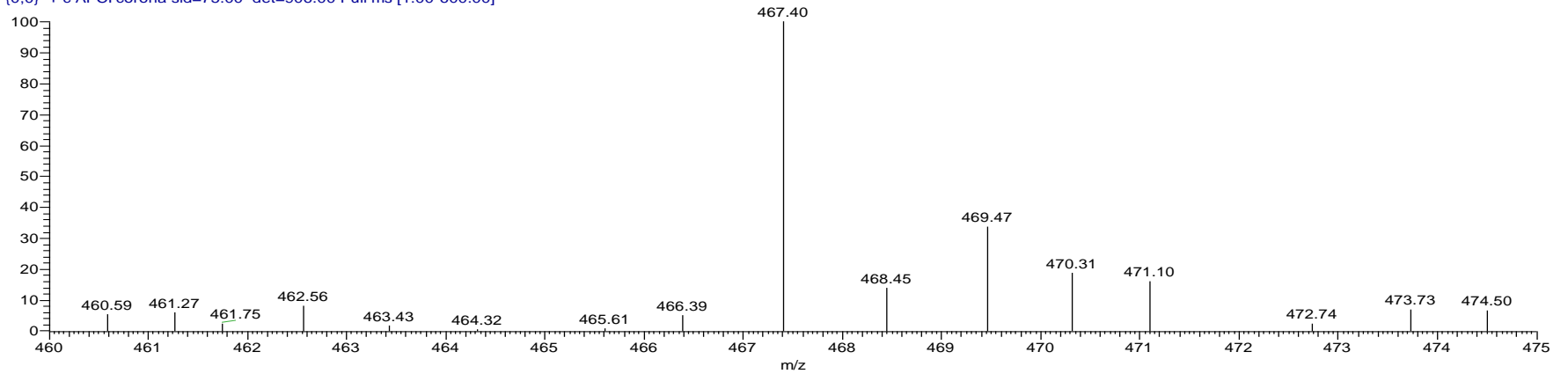
C:\Xcalibur\...\2017 11 14\NS2

11/14/2017 10:24:05 AM

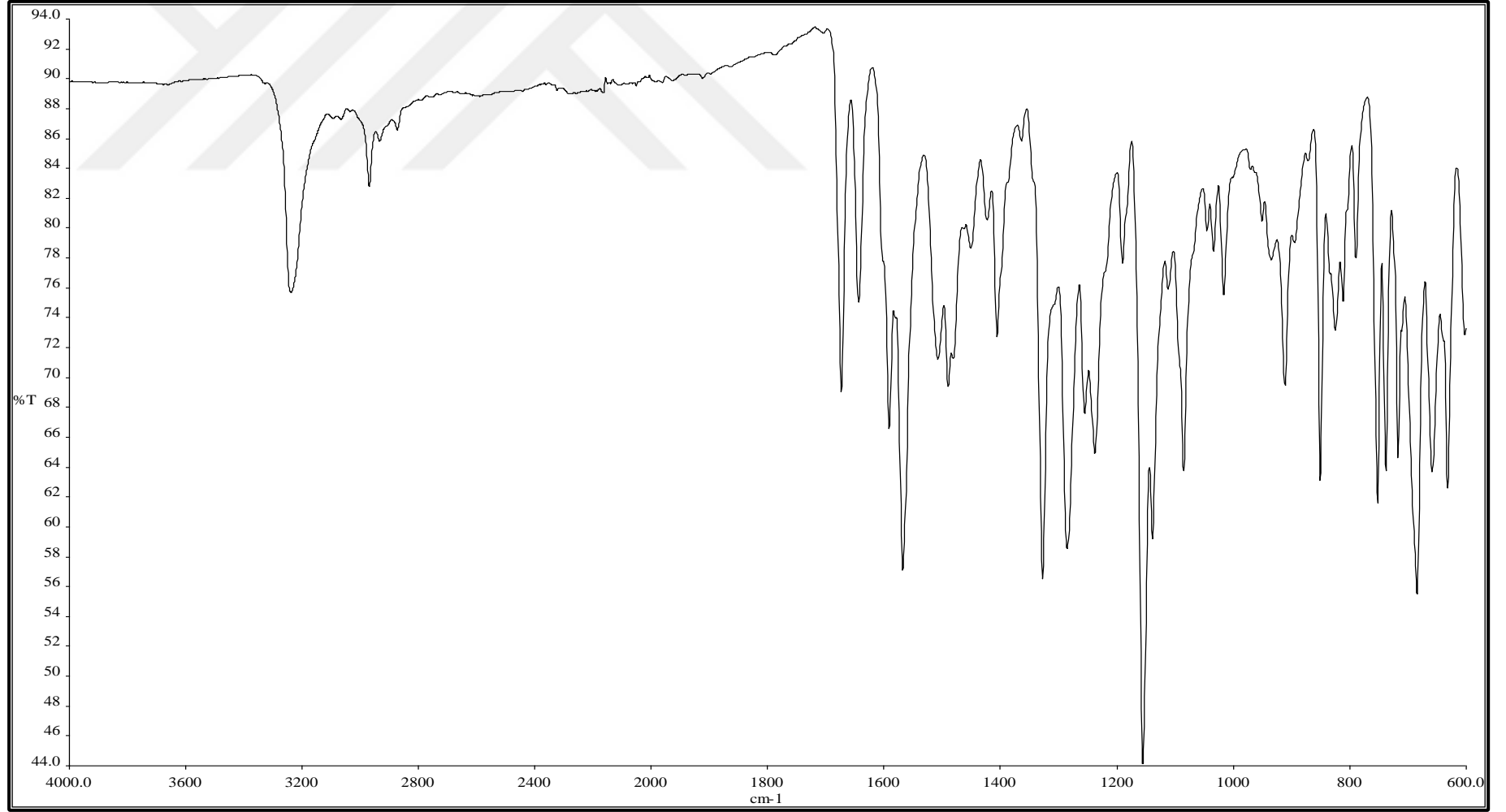
NS2 #41 RT: 0.36 AV: 1 SB: 382 0.53-4.00
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00



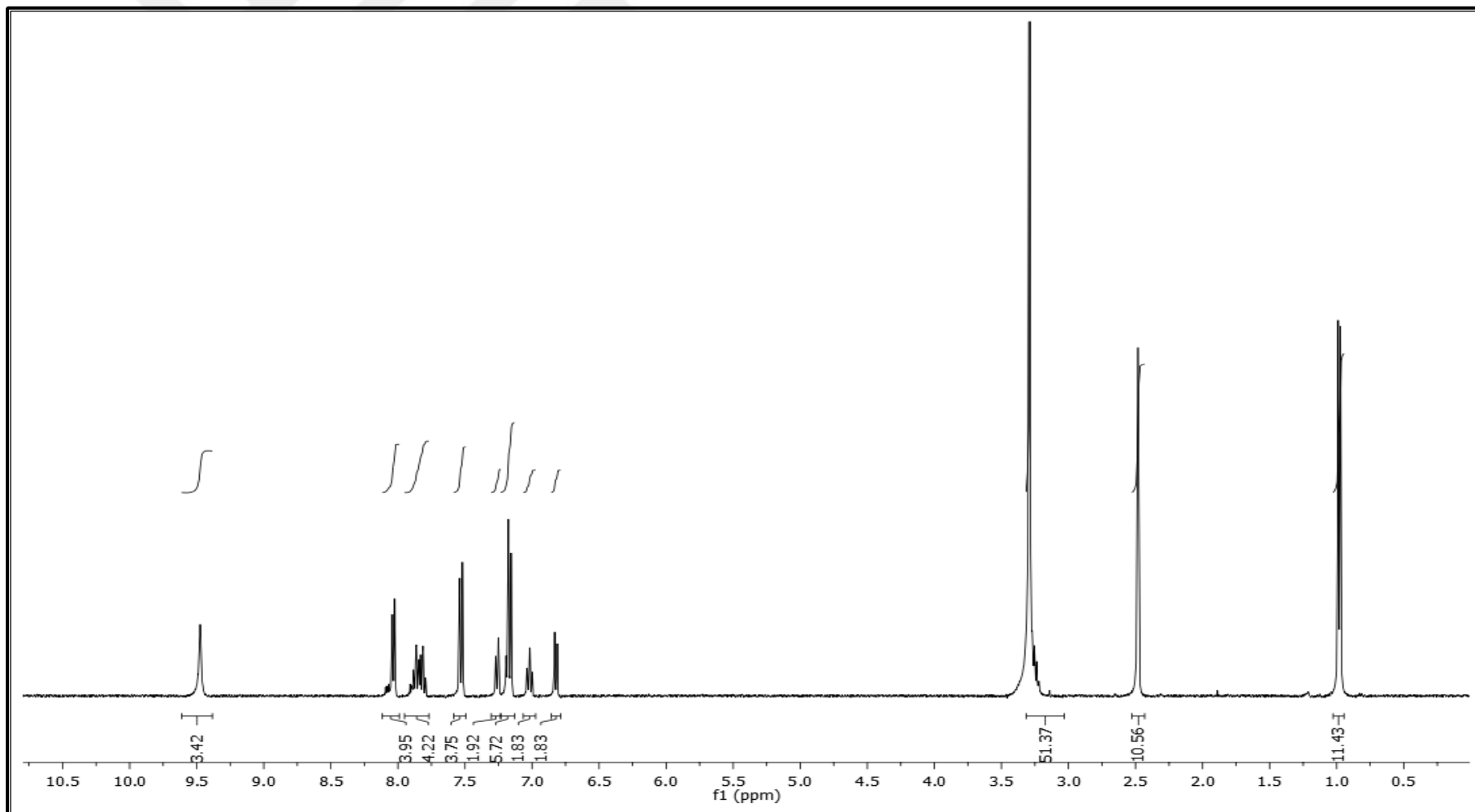
NS2 #41 RT: 0.36 AV: 1 SB: 382 0.53-4.00 NL: 1.40E4
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 56. NS2 kodlu bileşimin kütle spektrumu



Spektrum 57. NS3 kodlu bileşiğin IR spektrumu

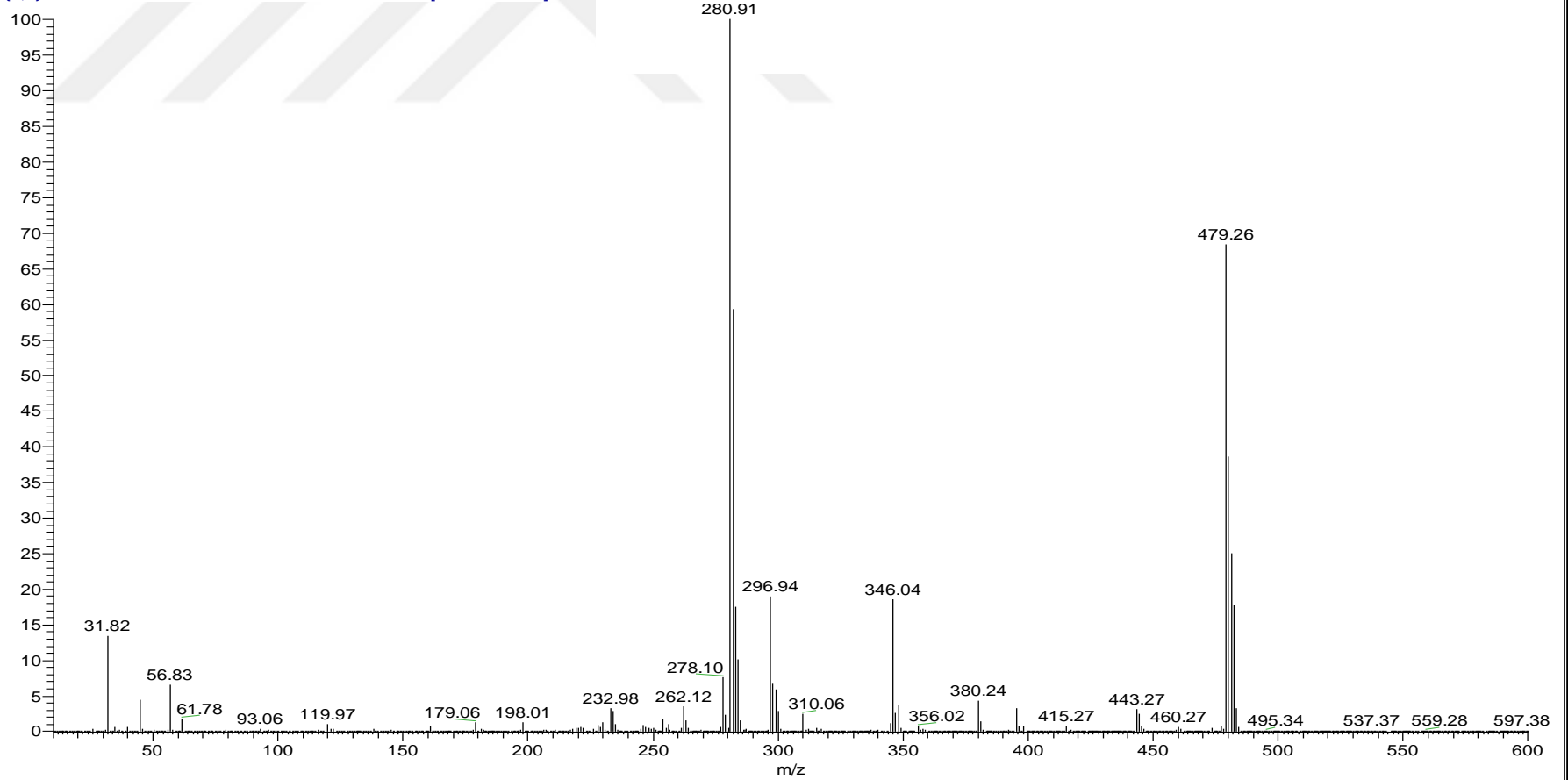


Spektrum 58. NS3 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu

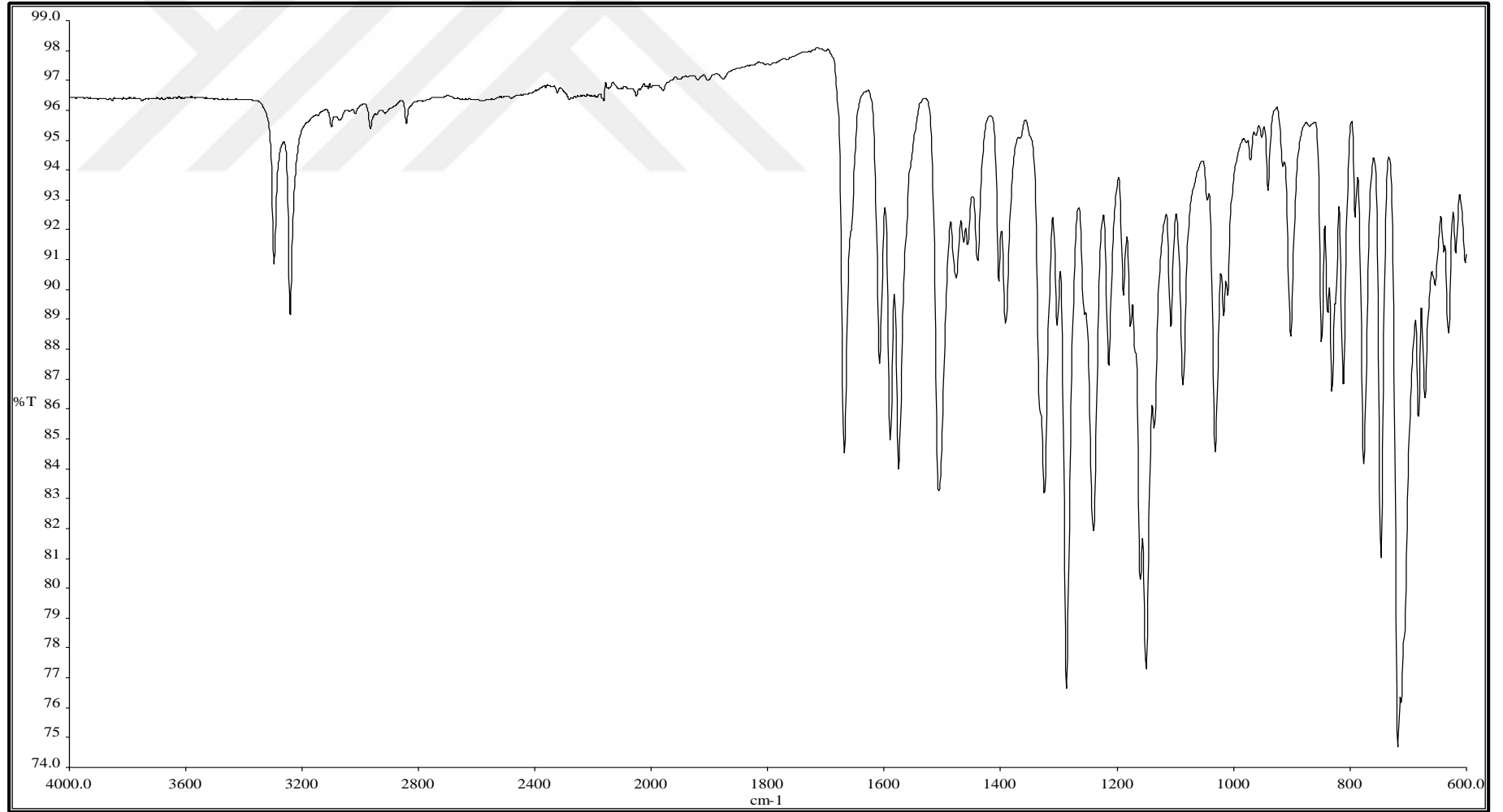
C:\Xcalibur\...\APCIns2isop-neg

9/27/2017 10:49:49 AM

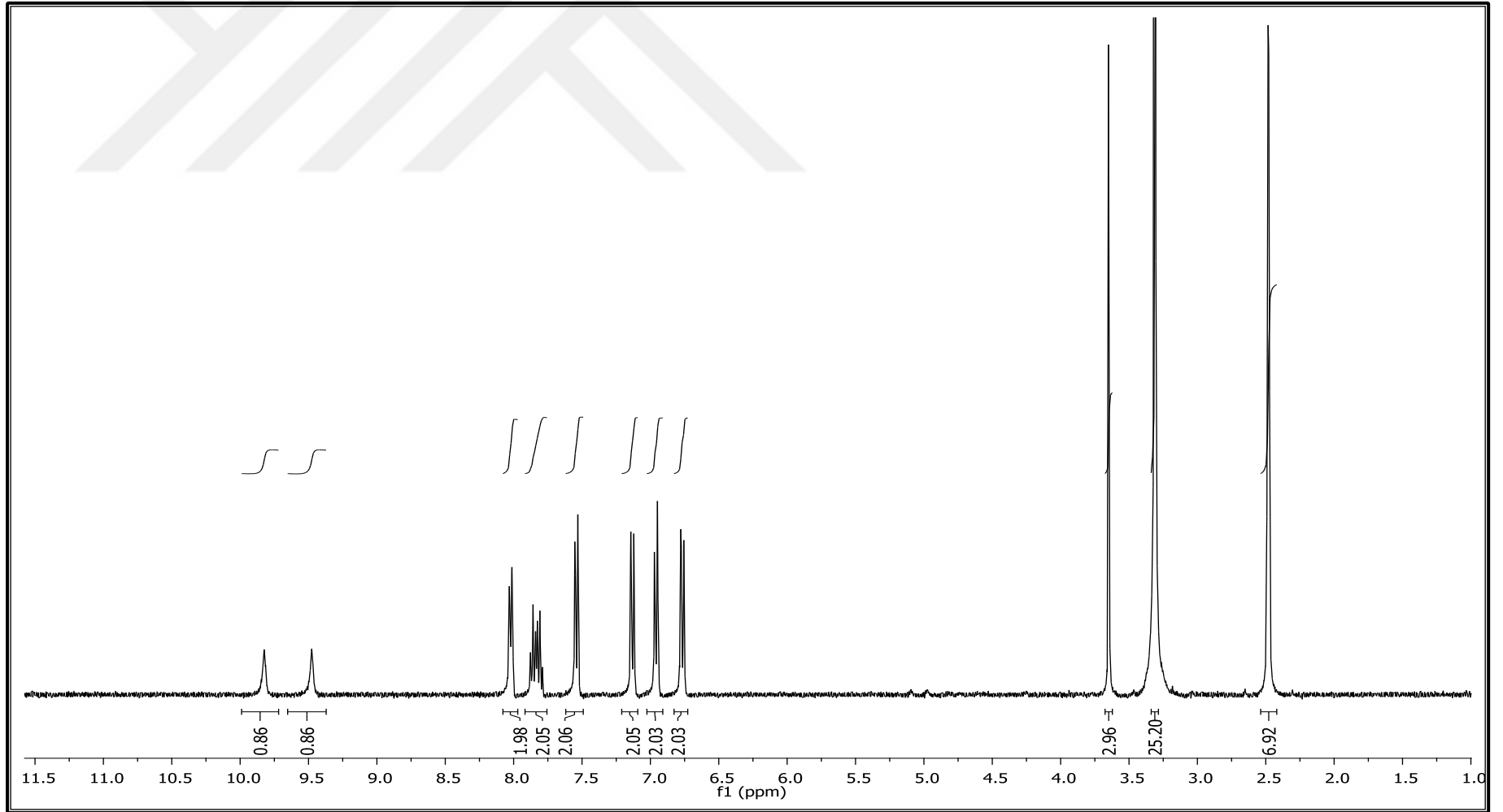
ns2isop-neg #38 RT: 0.34 AV: 1 NL: 1.54E6
T: {0,0} - c APC1 corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [10.00-600.00]



Spektrum 59. NS3 kodlu bileşimin kütle spektrumu



Spektrum 60. NS9 kodlu bileşğin IR spektrumu

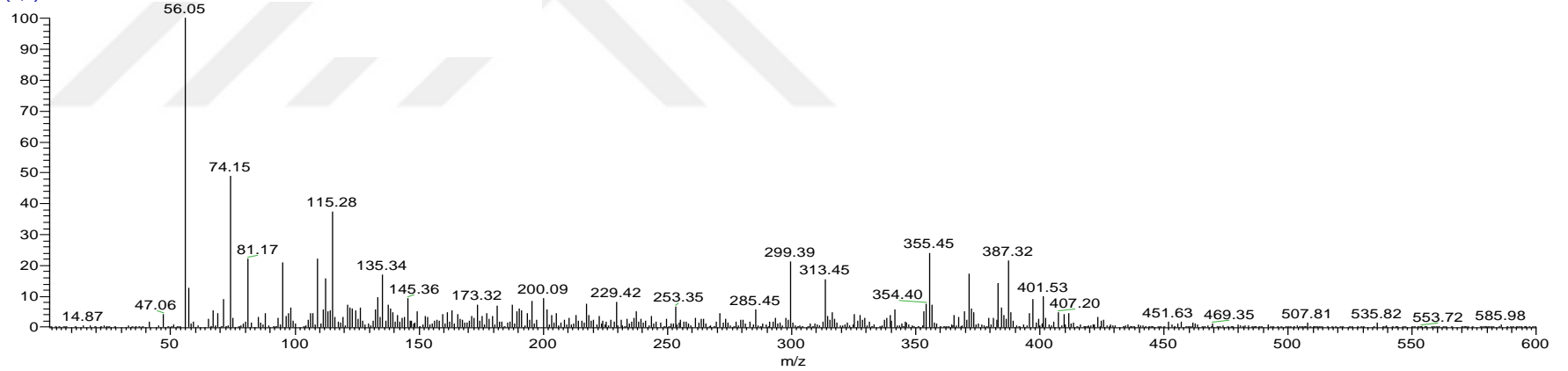


Spektrum 61. NS9 kodlu bileşigin ^1H NMR spektrumu

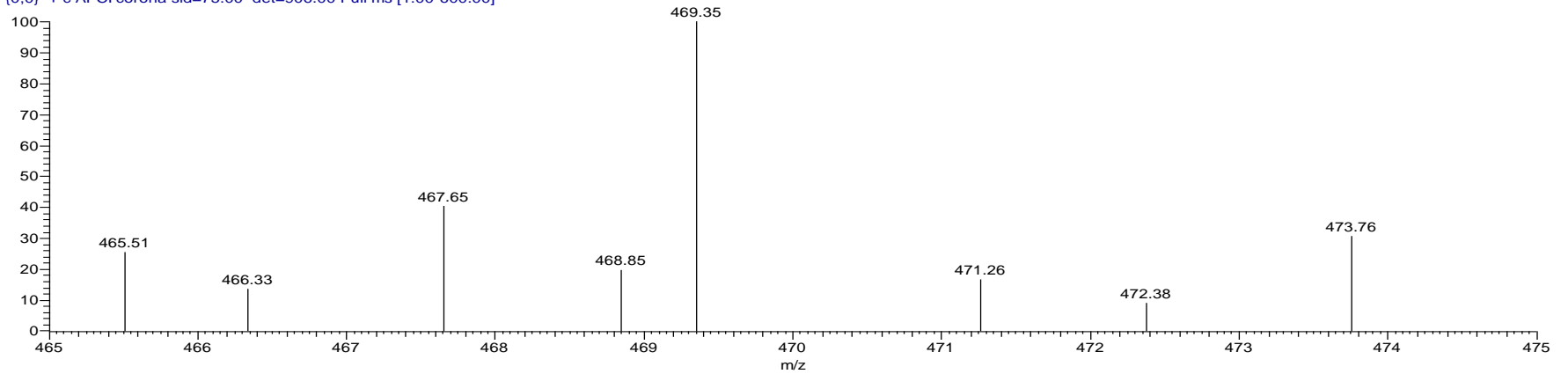
C:\Xcalibur...\2017 11 14\NS9

11/14/2017 10:29:03 AM

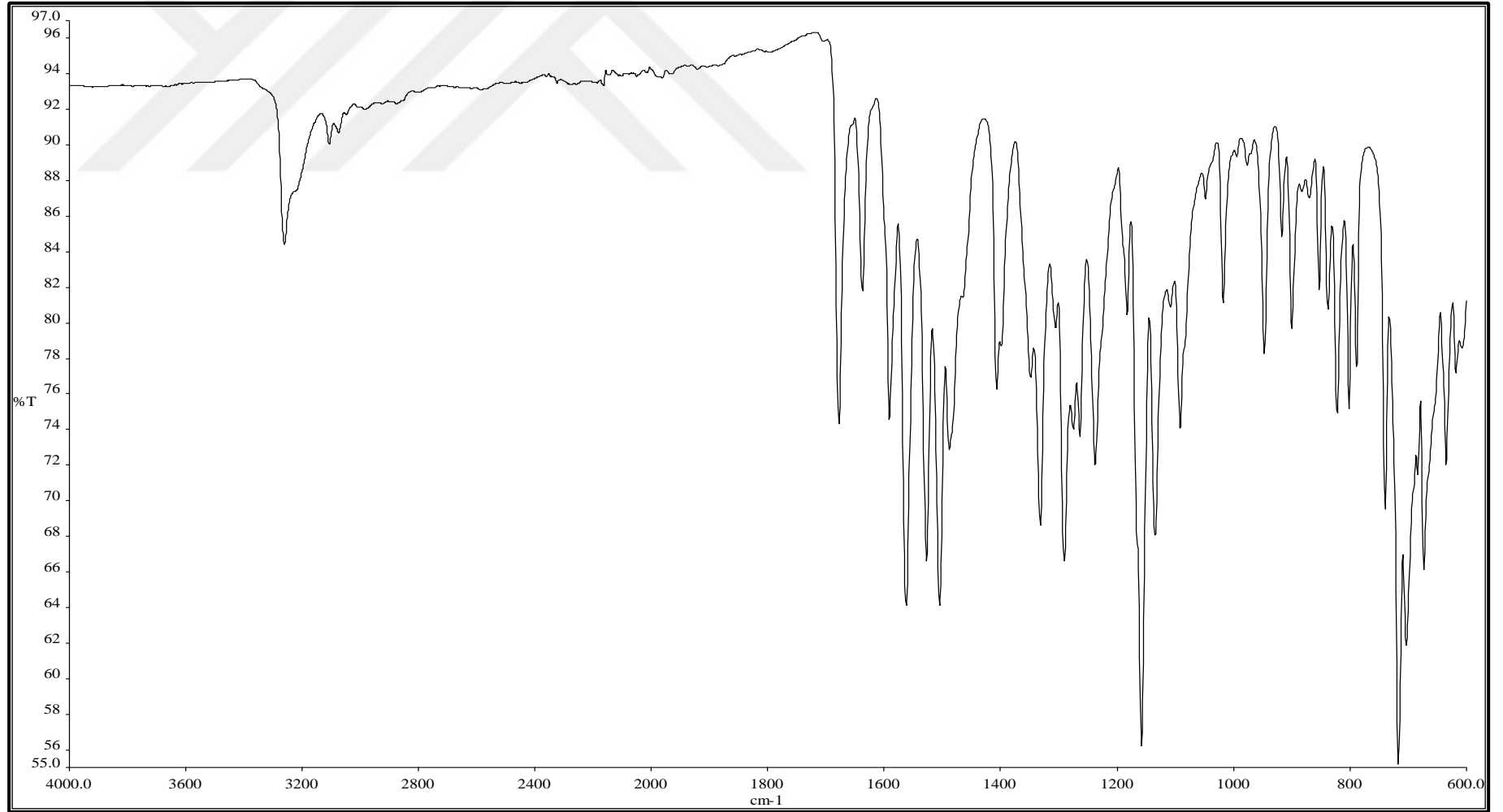
NS9 #39 RT: 0.35 AV: 1 SB: 33 0.00-0.28 , (T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00



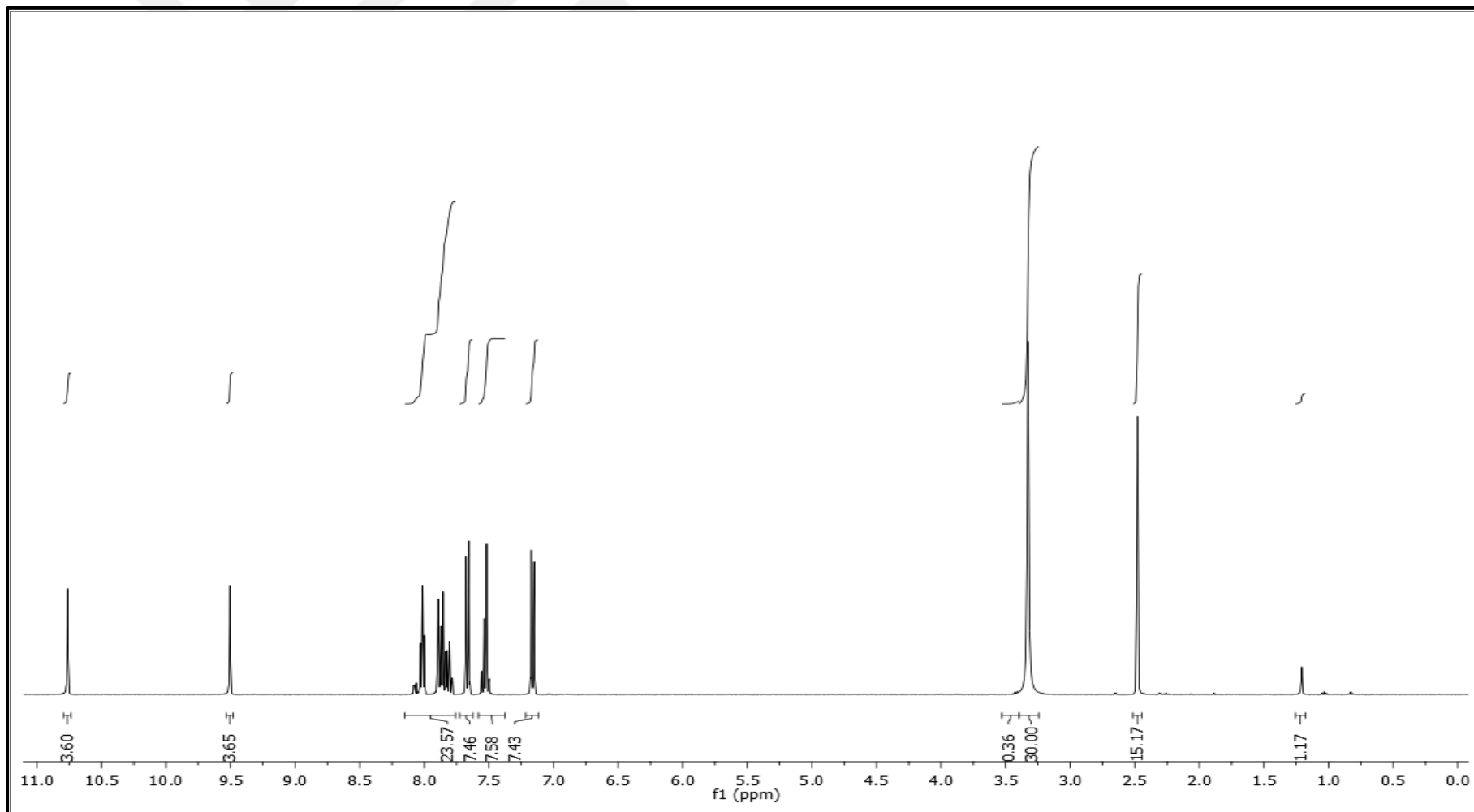
NS9 #39 RT: 0.35 AV: 1 SB: 33 0.00-0.28 , 0.35 NL: 1.76E3
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 62. NS9 kodlu bileşimin kütle spektrumu



Spektrum 63. NS11 kodlu bileşiğin IR spektrumu

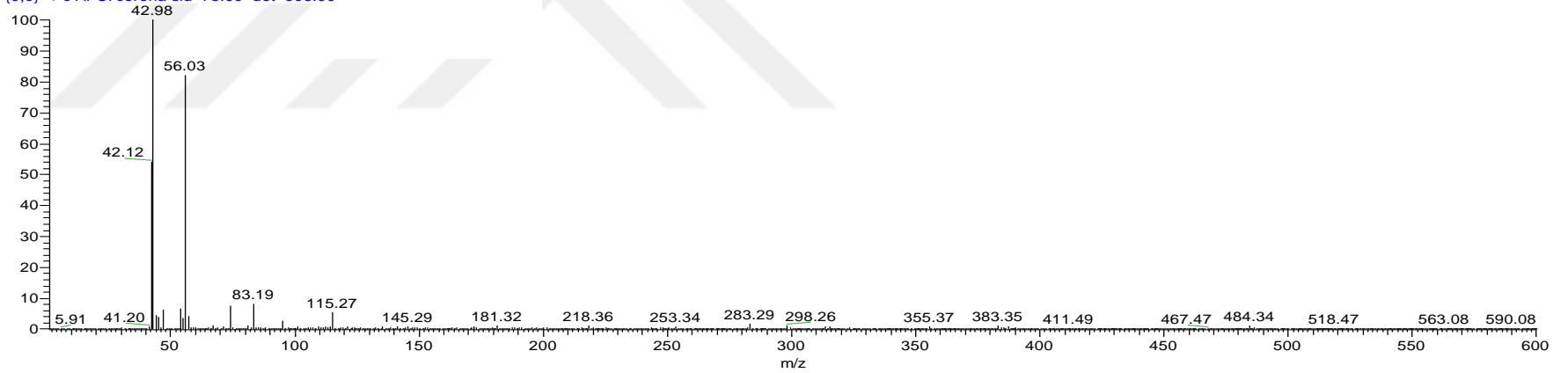


Spektrum 64. NS11 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu

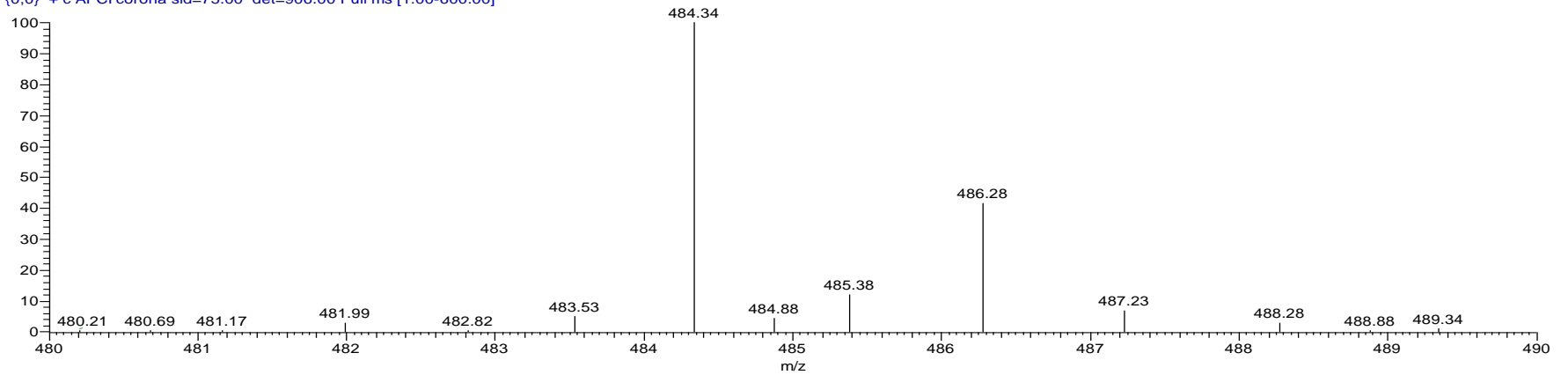
C:\Xcalibur\...2017 11 14\NS11

11/14/2017 10:34:05 AM

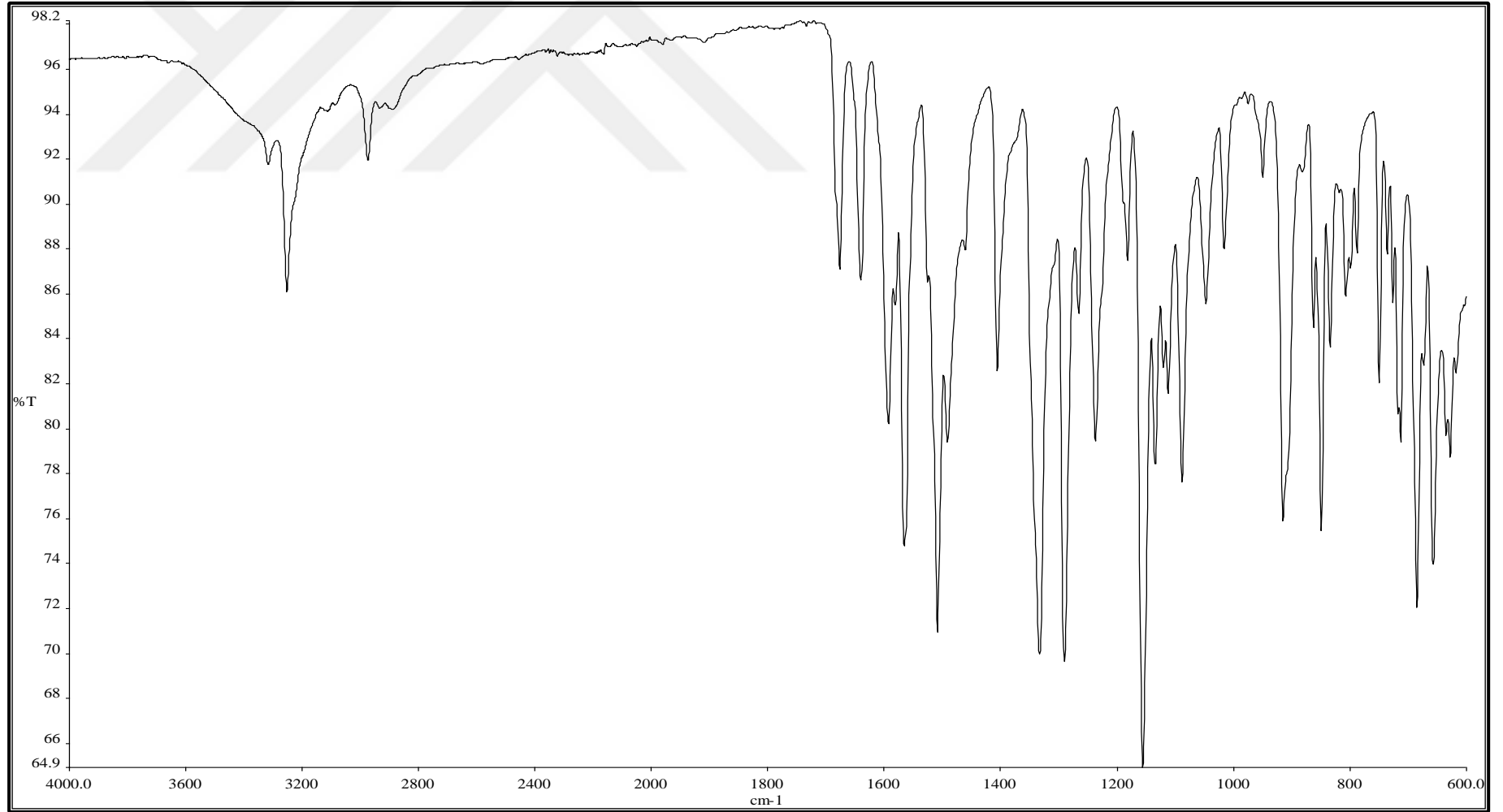
NS11 #43 RT: 0.38 AV: 1 NL: 1.21E6
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00



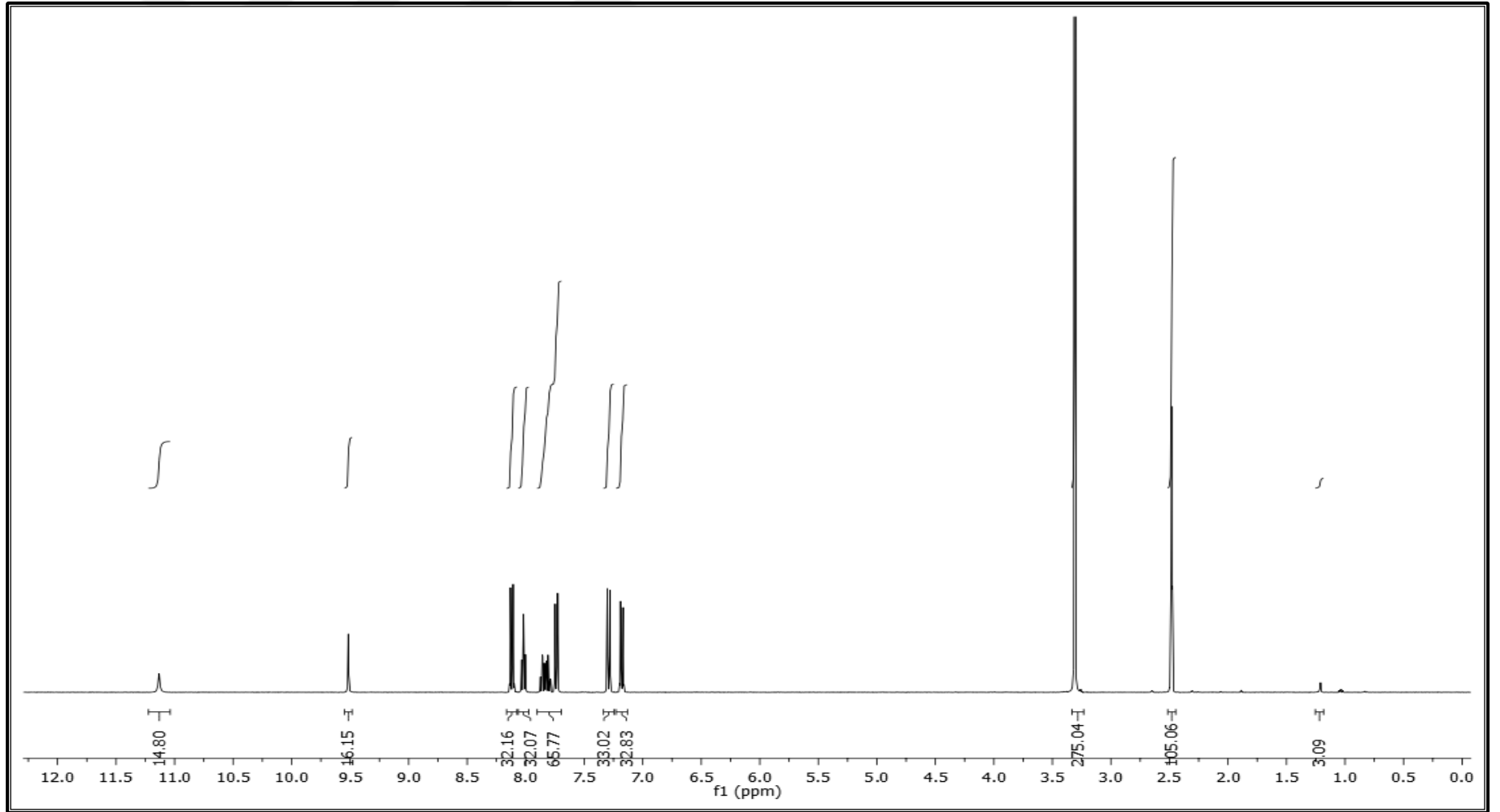
NS11 #43 RT: 0.38 AV: 1 NL: 1.25E4
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 65. NS11 kodlu bileşimin kütle spektrumu



Spektrum 66. NS12 kodlu bileşigin IR spektrumu

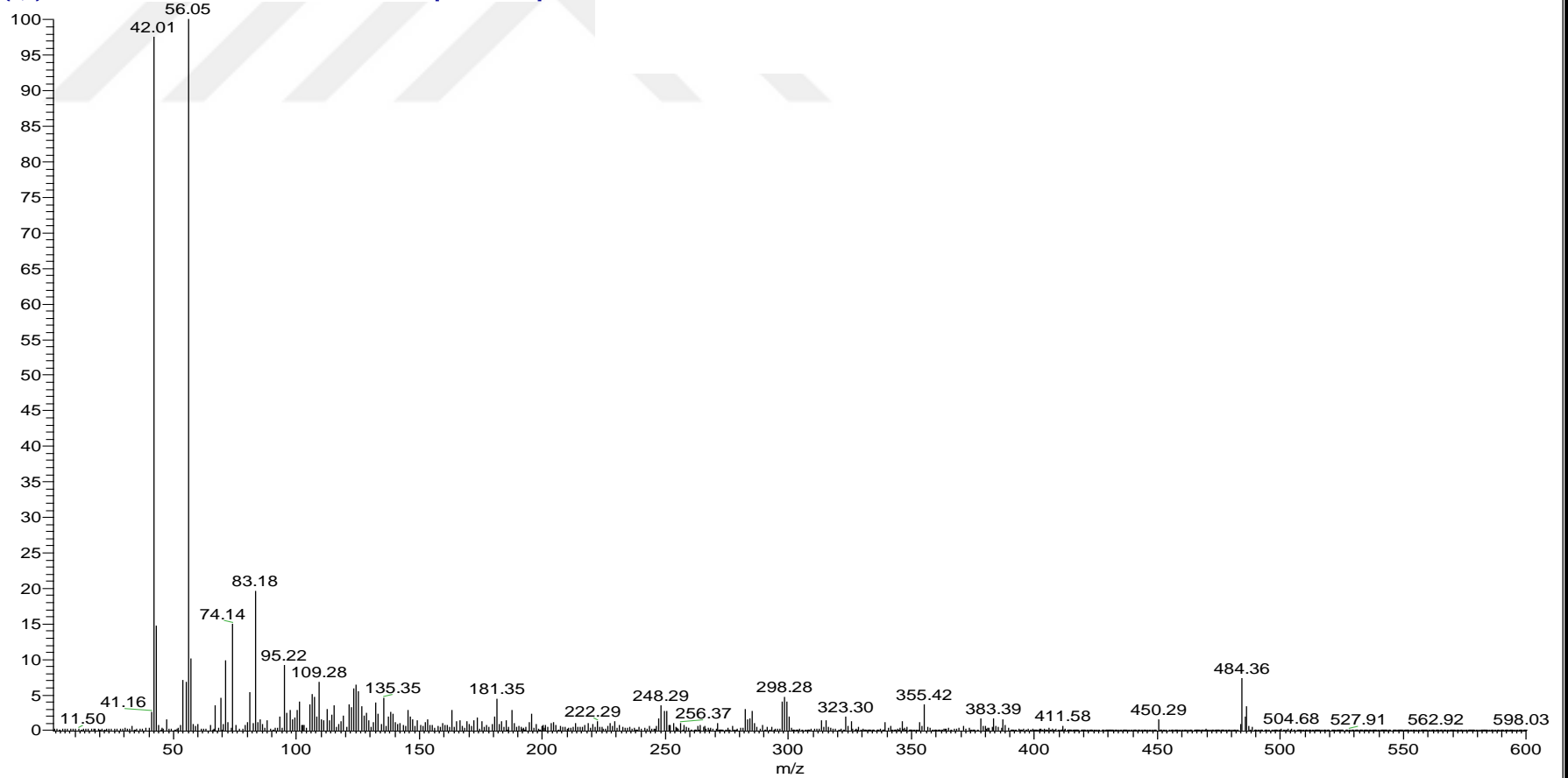


Spektrum 67. NS12 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu

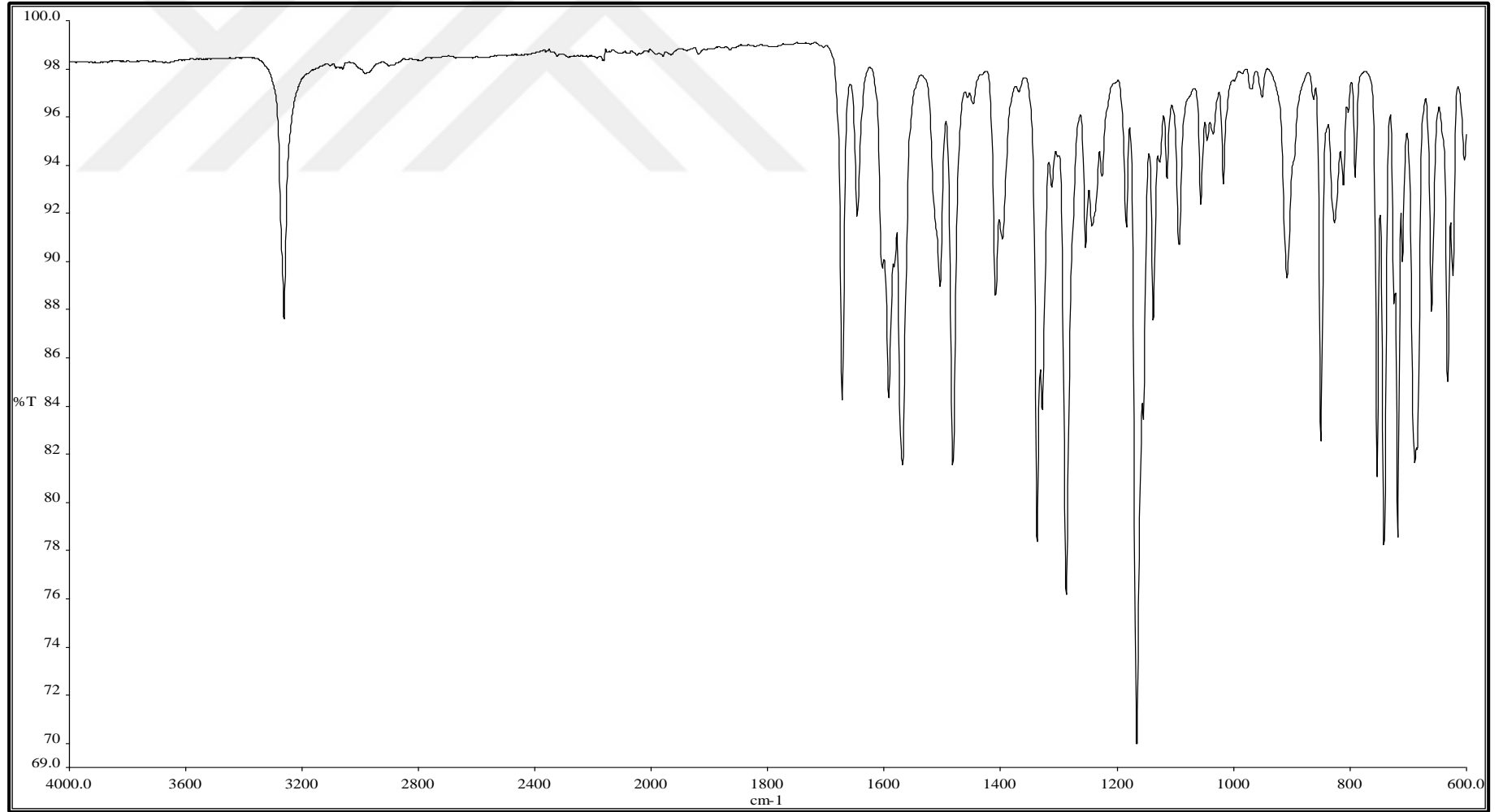
C:\Xcalibur...\2017 11 14\NS12

11/14/2017 10:39:01 AM

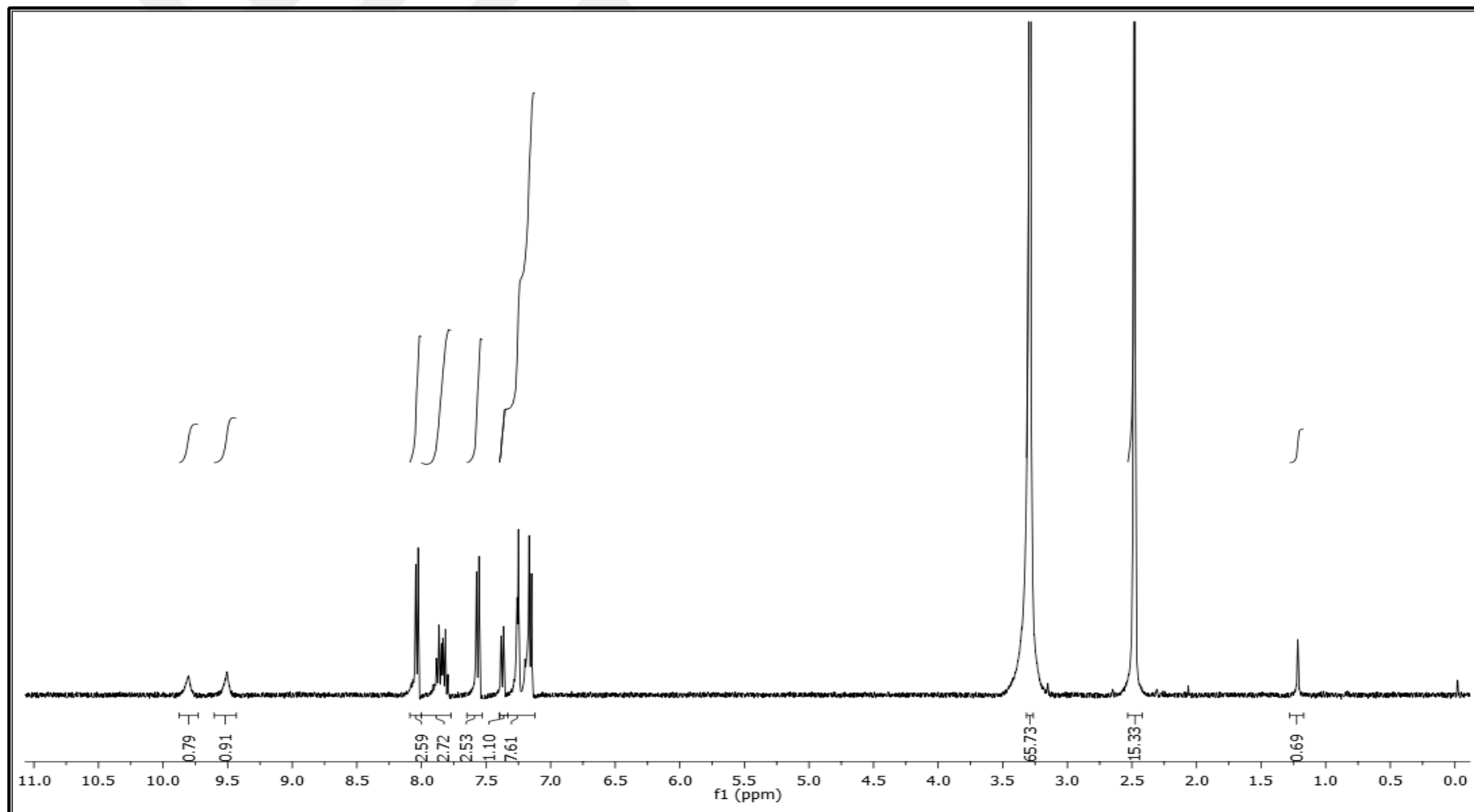
NS12 #42 RT: 0.37 AV: 1 NL: 8.43E5
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



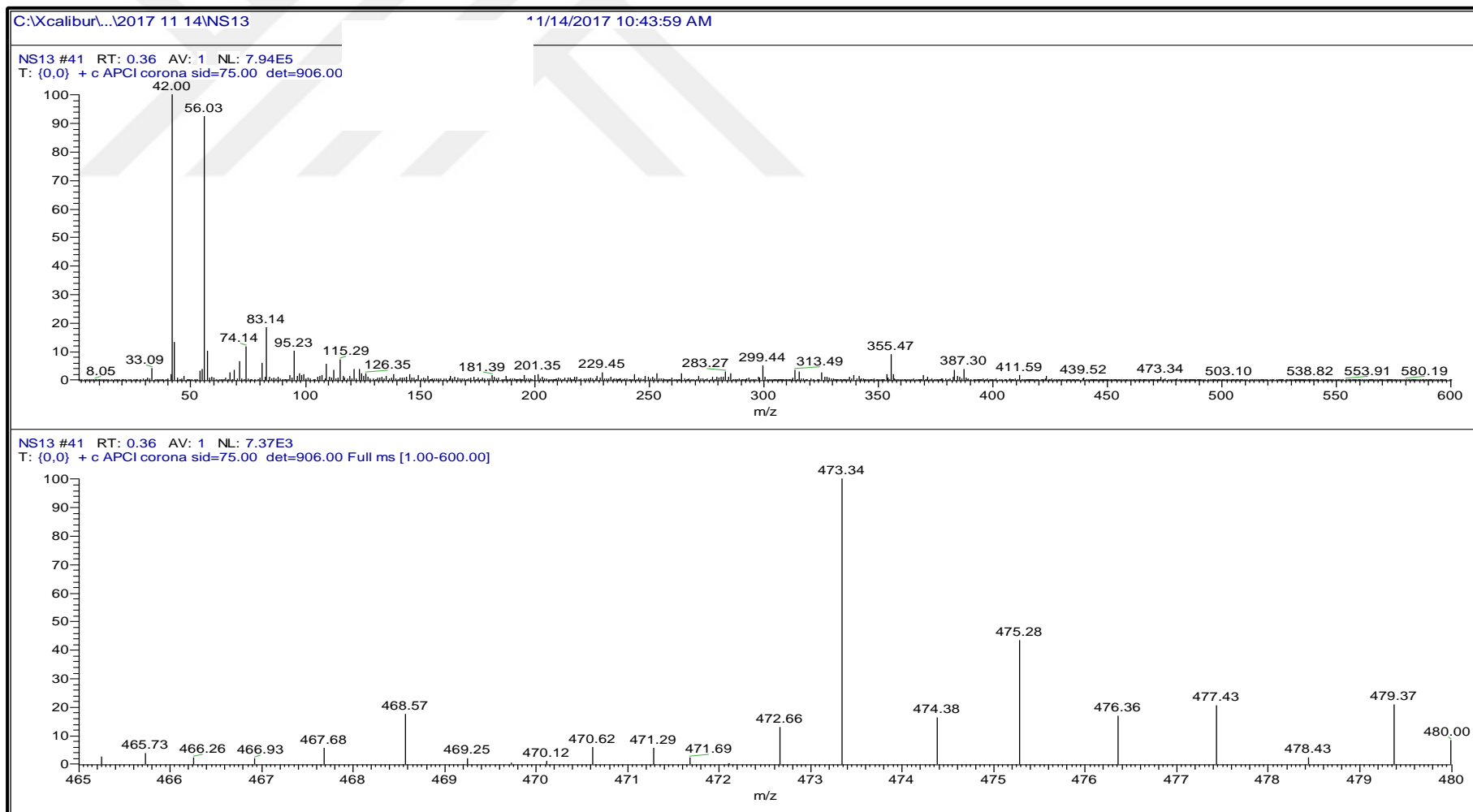
Spektrum 68. NS12 kodlu bileşğin kütle spektrumu



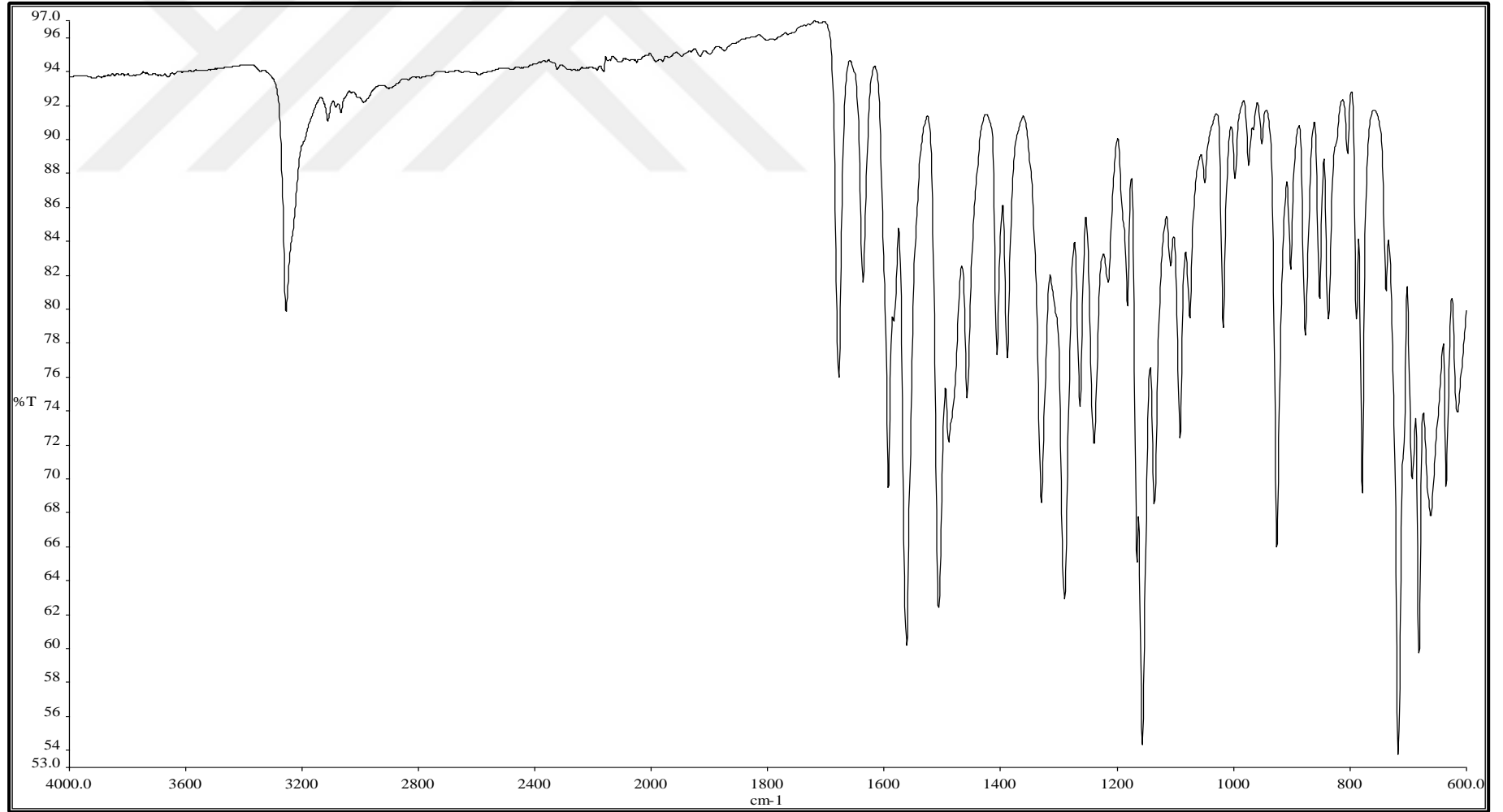
Spektrum 69. NS13 kodlu bileşiğin IR spektrumu



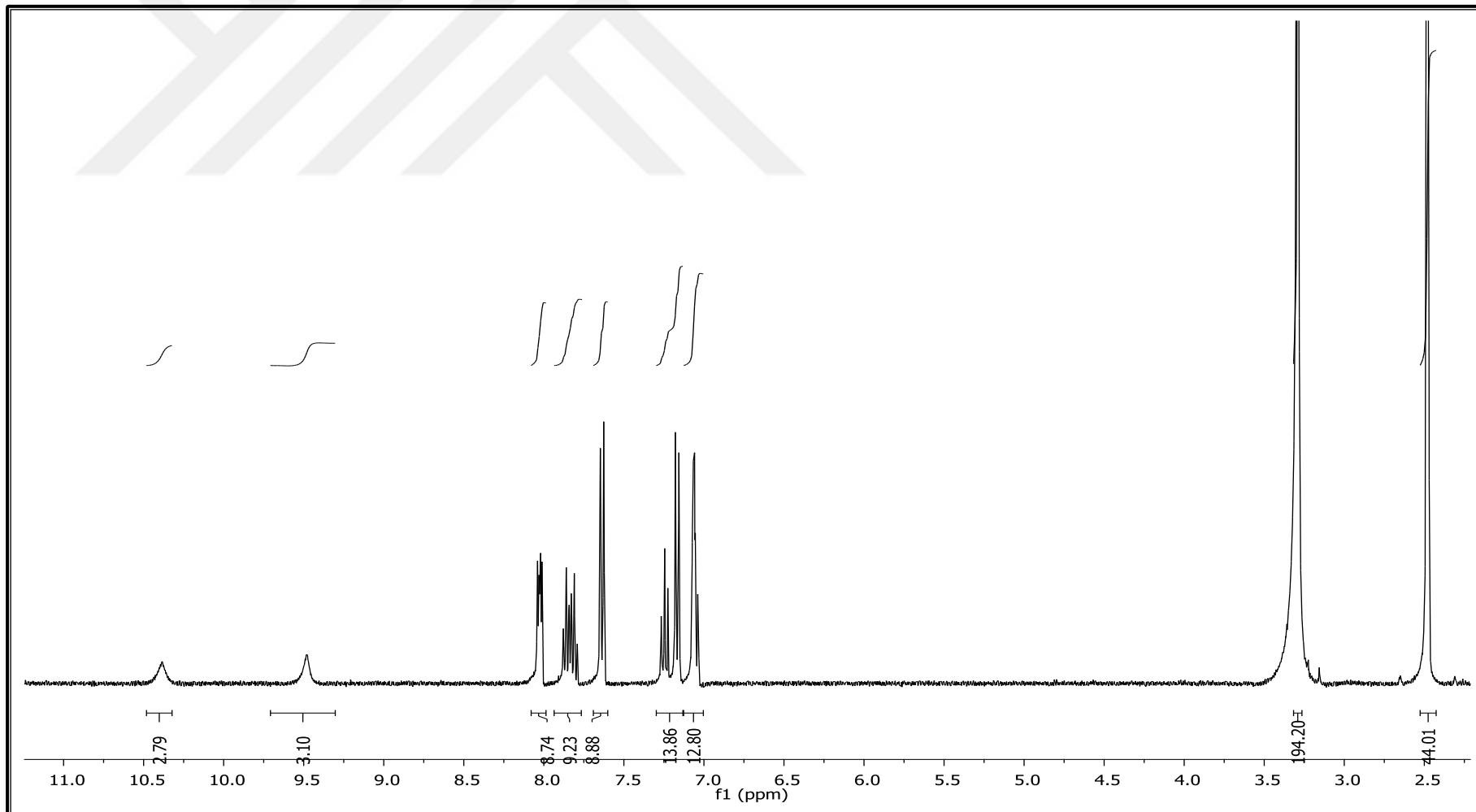
Spektrum 70. NS13 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu



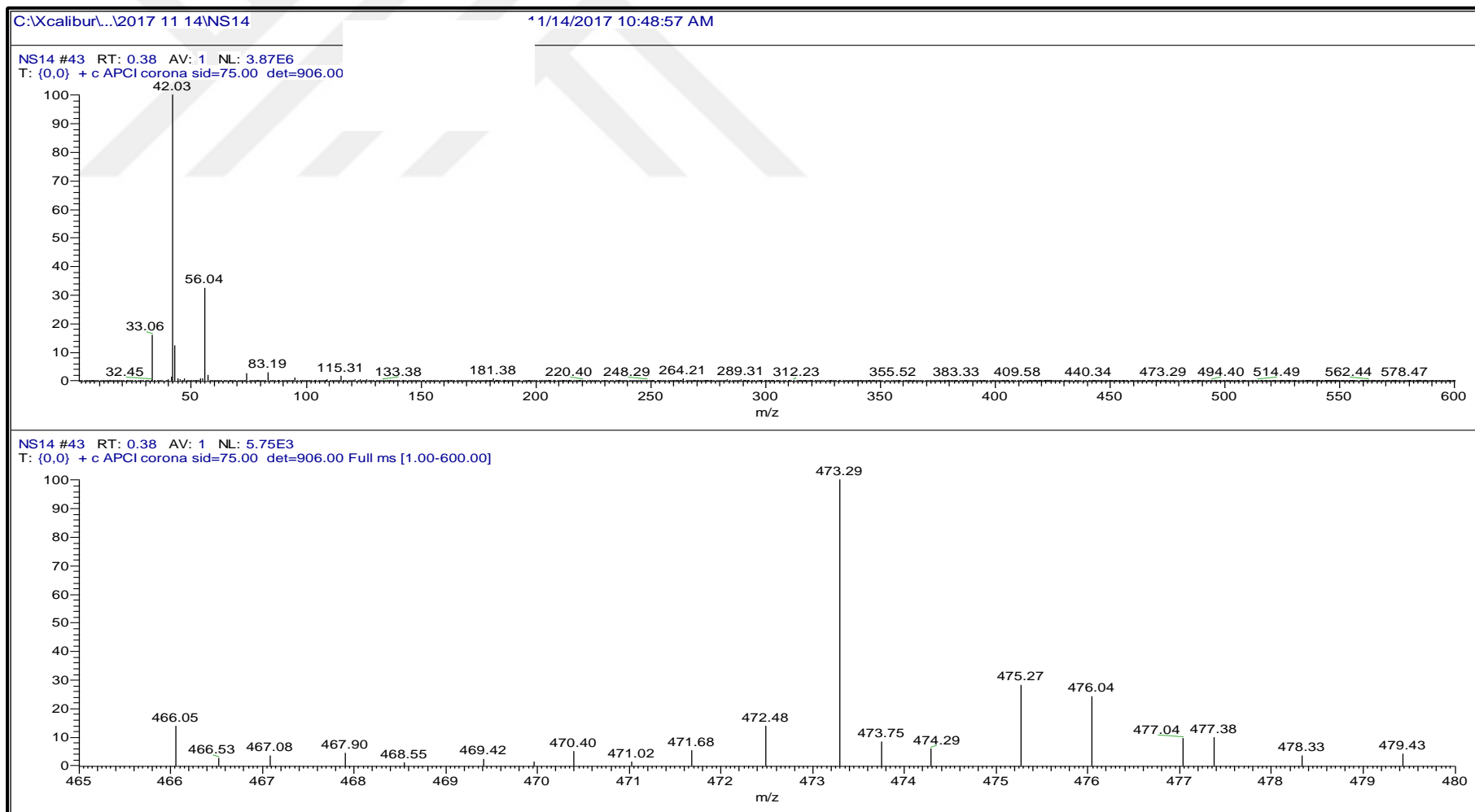
Spektrum 71. NS13 kodlu bileşğin kütle spektrumu



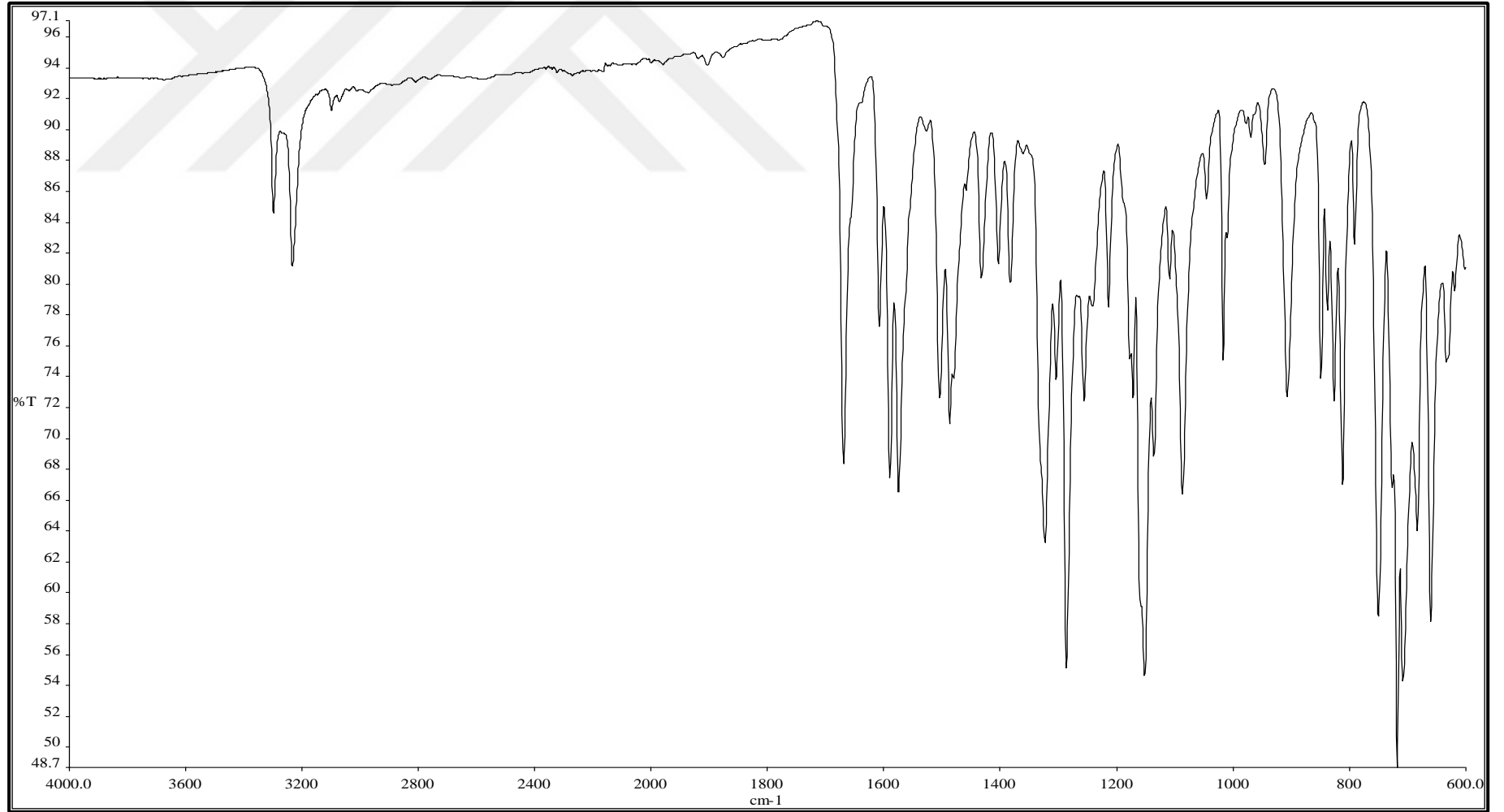
Spektrum 72. NS14 kodlu bileşiğin IR spektrumu



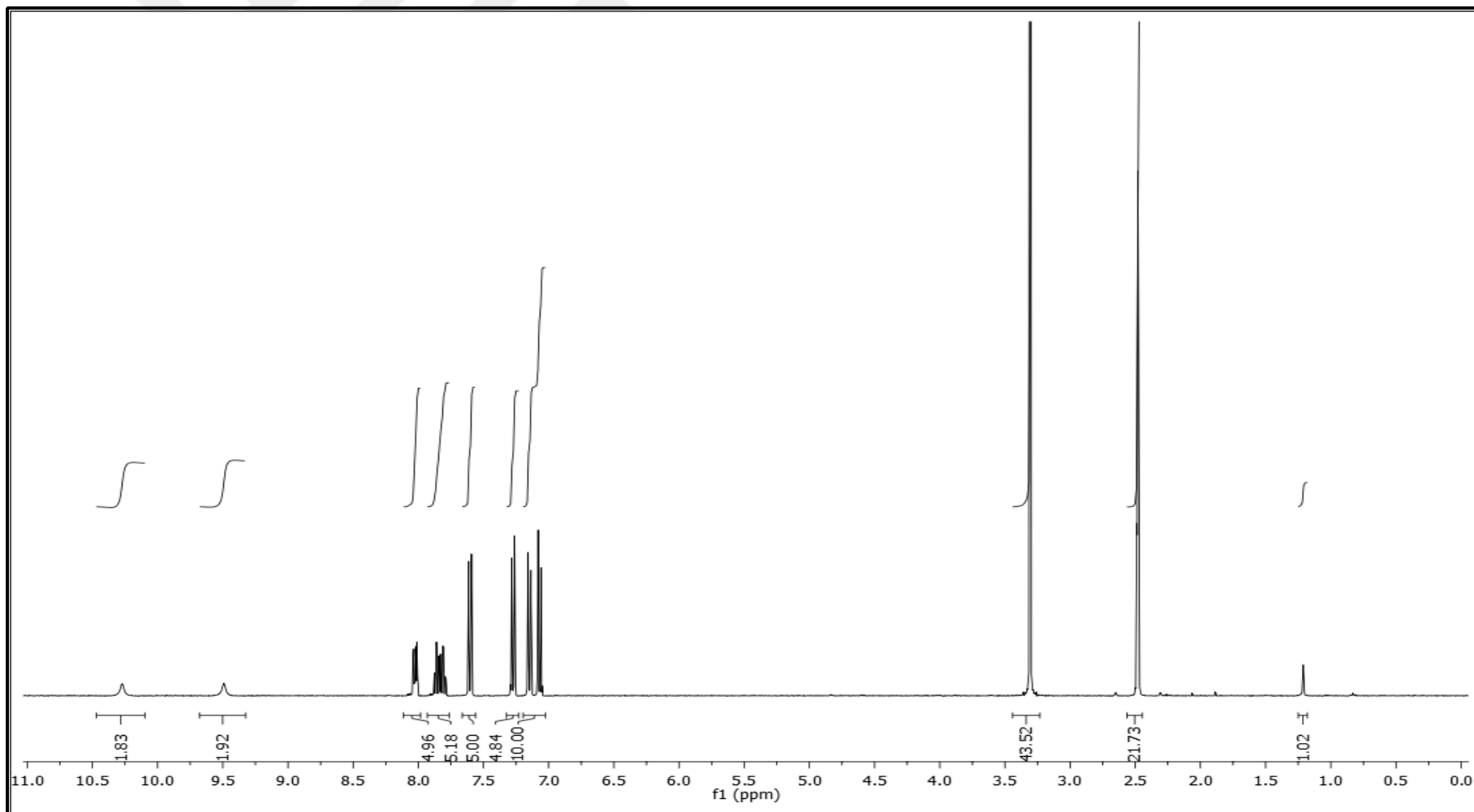
Spektrum 73. NS14 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu



Spektrum 74. NS14 kodlu bileşimin kütle spektrumu



Spektrum 75. NS15 kodlu bileşigin IR spektrumu

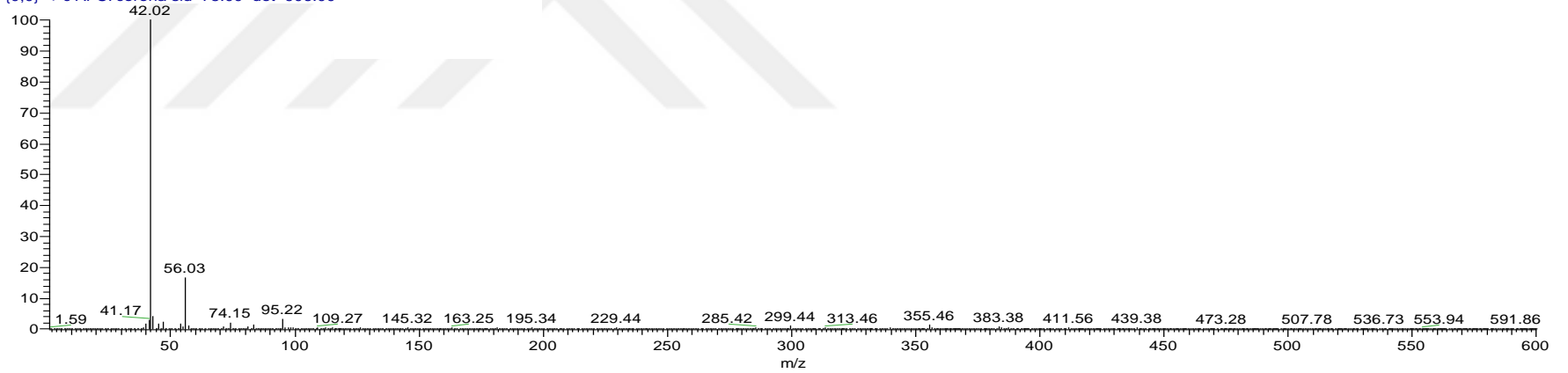


Spektrum 76. NS15 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu

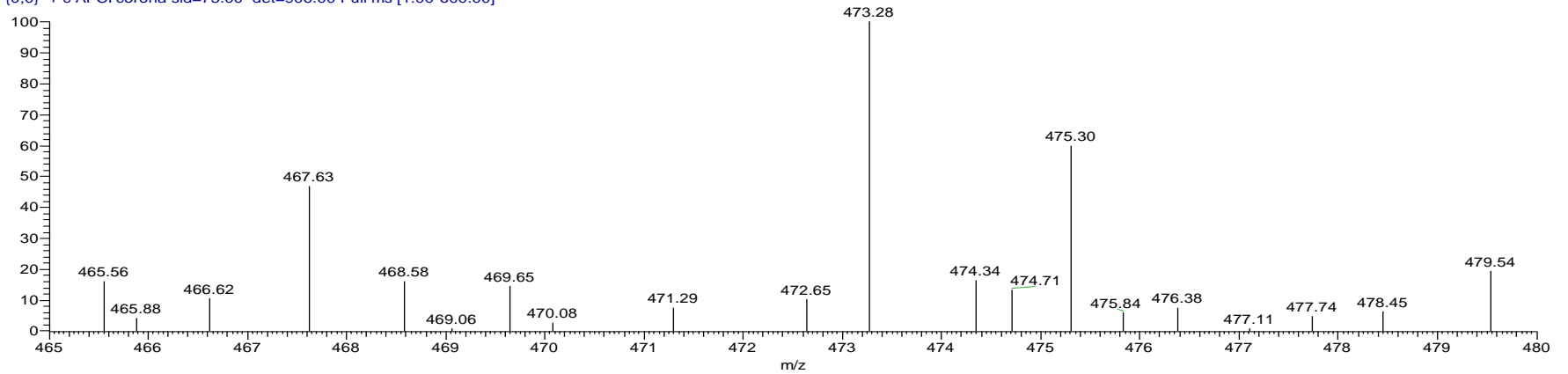
C:\Xcalibur...\2017 11 14\NS15

11/14/2017 10:53:53 AM

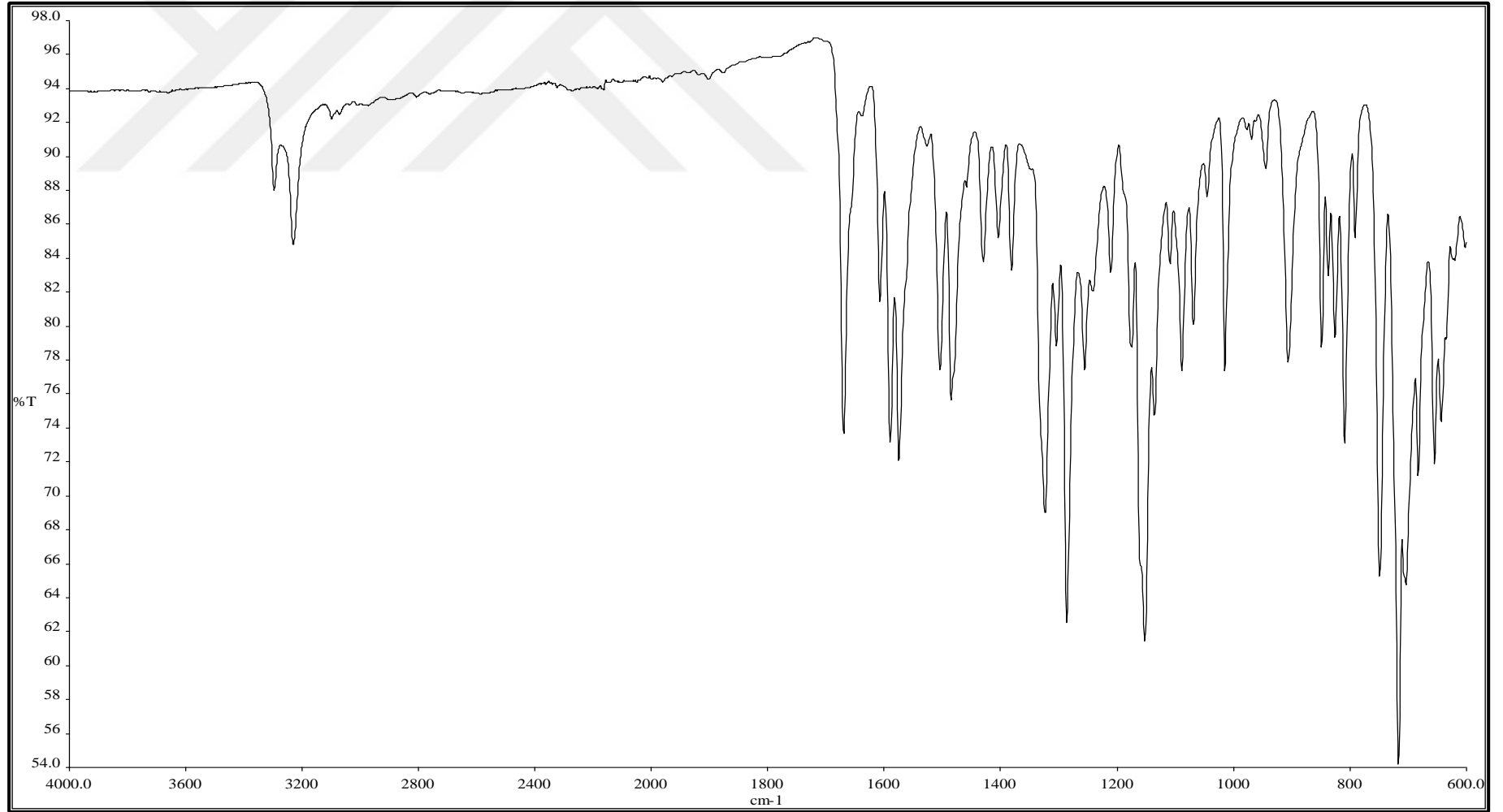
NS15 #40 RT: 0.36 AV: 1 NL: 9.75E6
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00



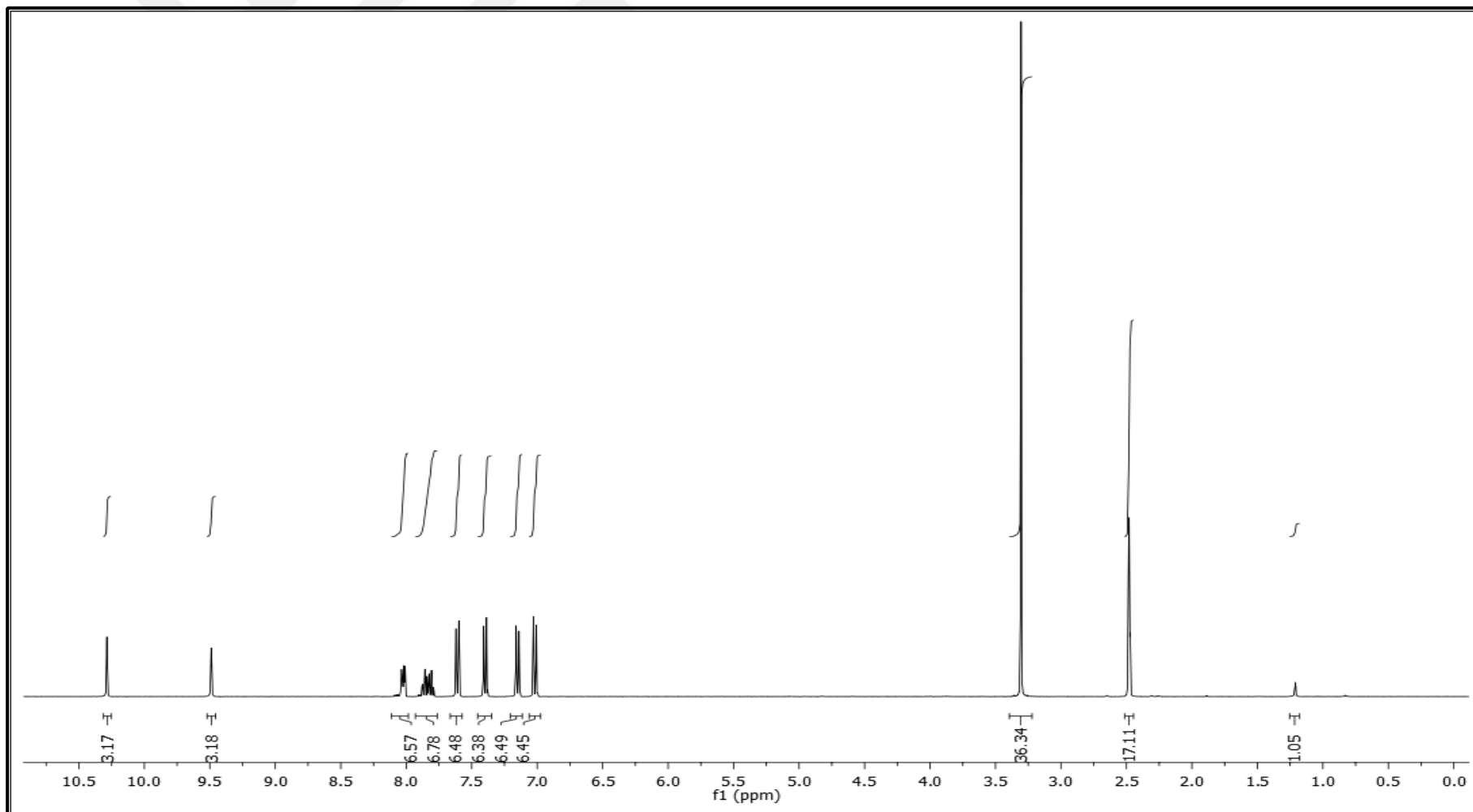
NS15 #40 RT: 0.36 AV: 1 NL: 1.42E4
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



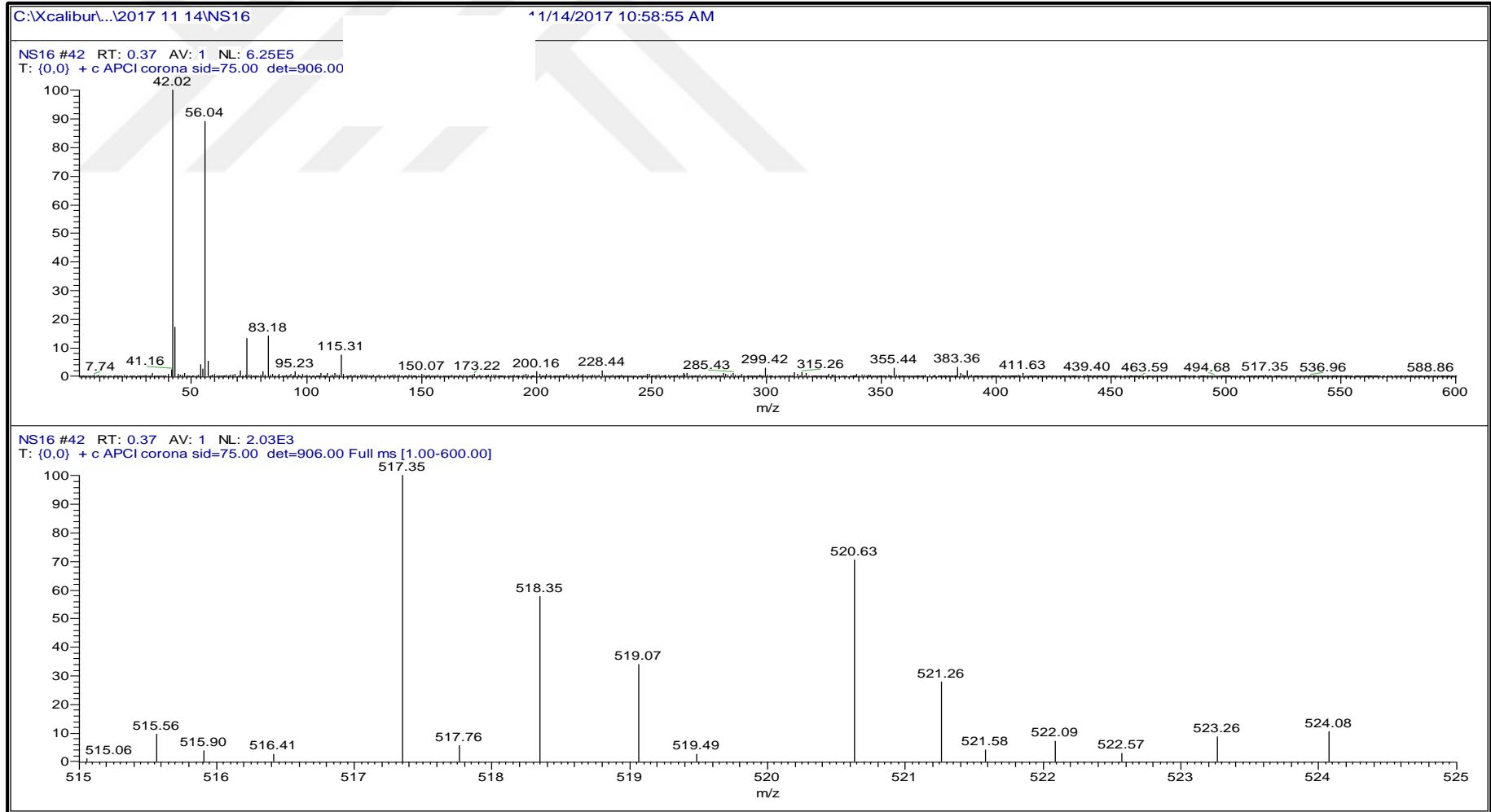
Spektrum 77. NS15 kodlu bileşğin kütle spektrumu



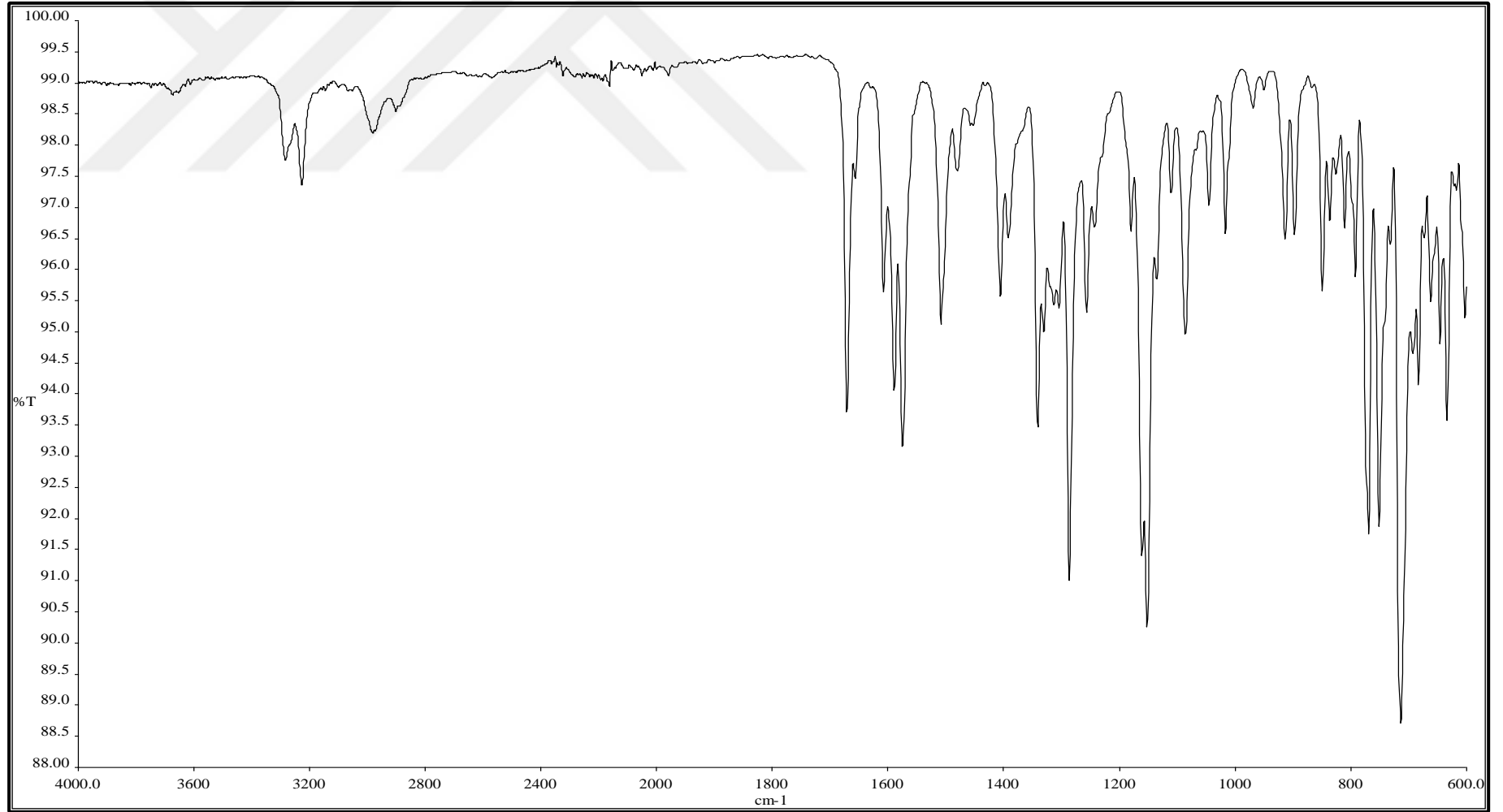
Spektrum 78. NS16 kodlu bileşiğin IR spektrumu



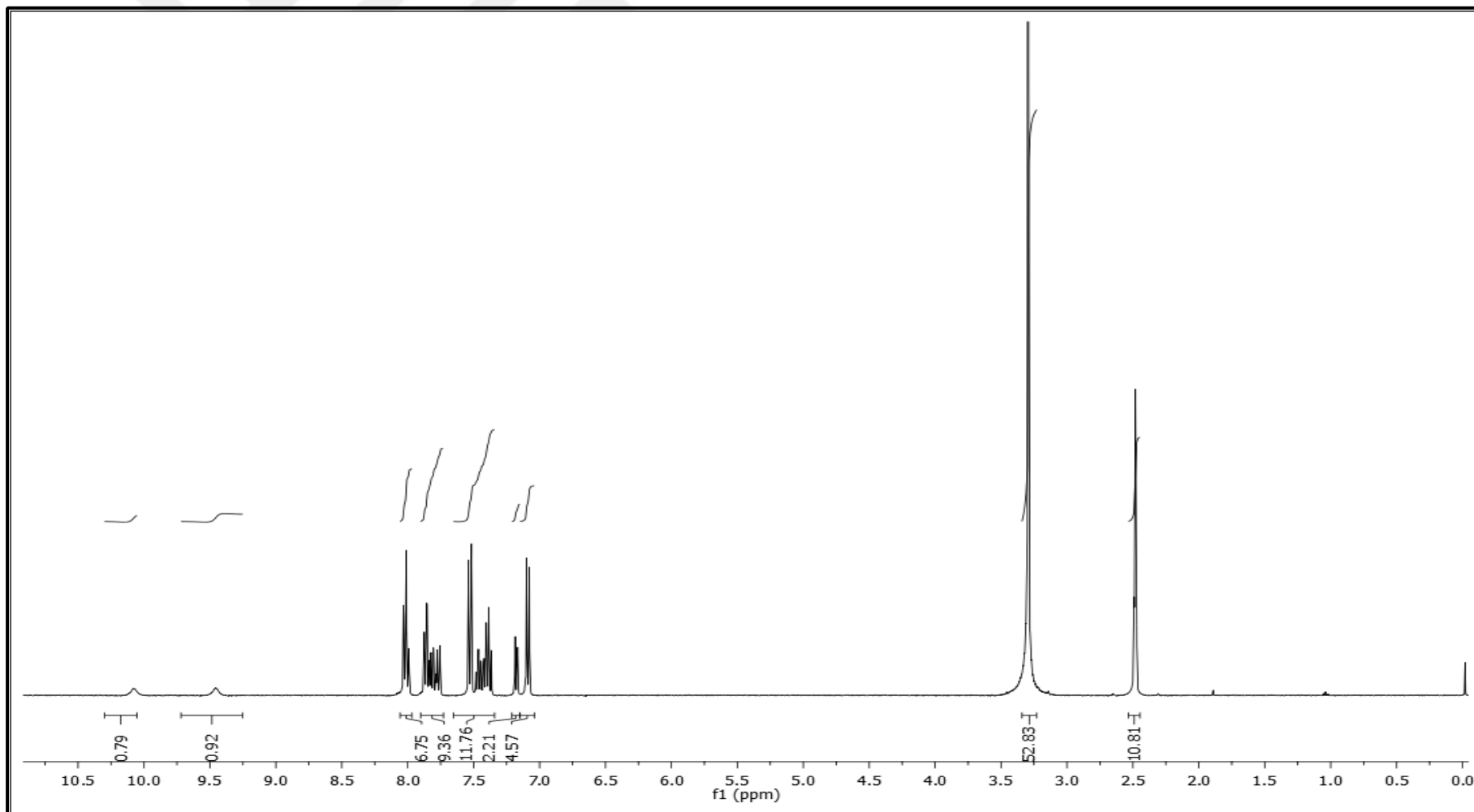
Spektrum 79. NS16 kodlu bileşğin ^1H NMR spektrumu



Spektrum 80. NS16 kodlu bileşigin kütle spektrumu



Spektrum 81. NS17 kodlu bileşiğin IR spektrumu

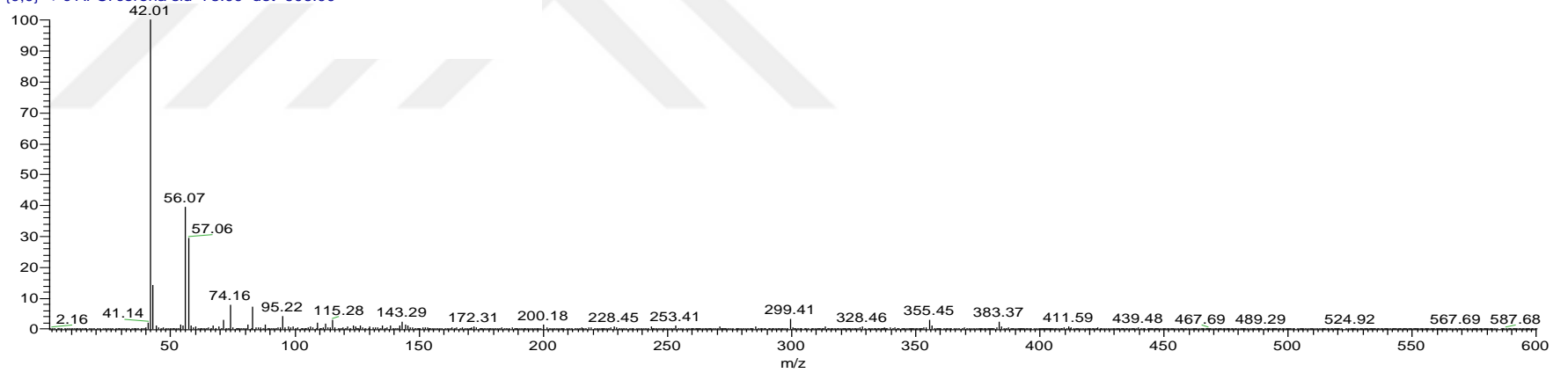


Spektrum 82. NS17 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu

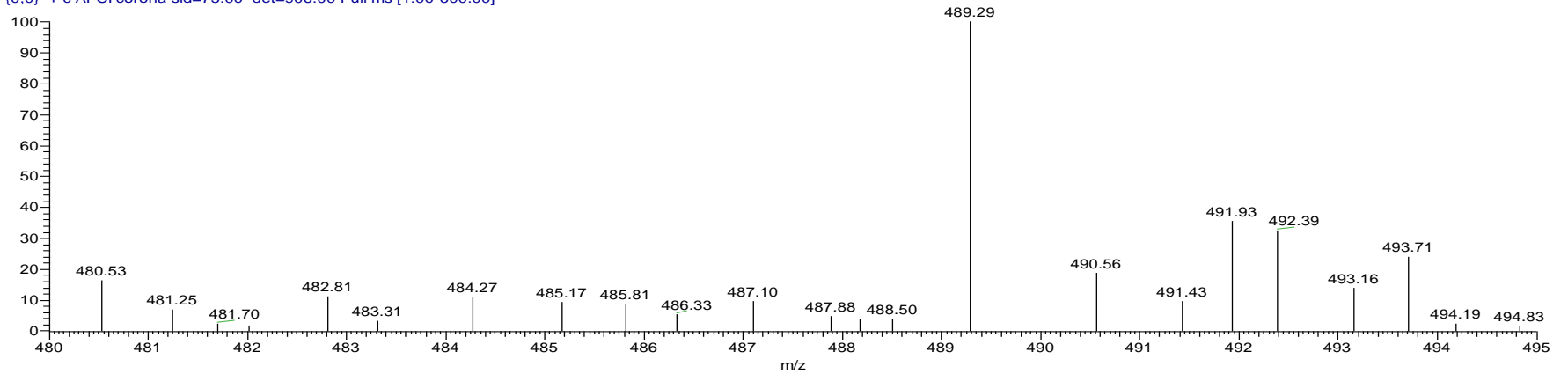
C:\Xcalibur...\2017 11 14\NS17

11/14/2017 11:03:53 AM

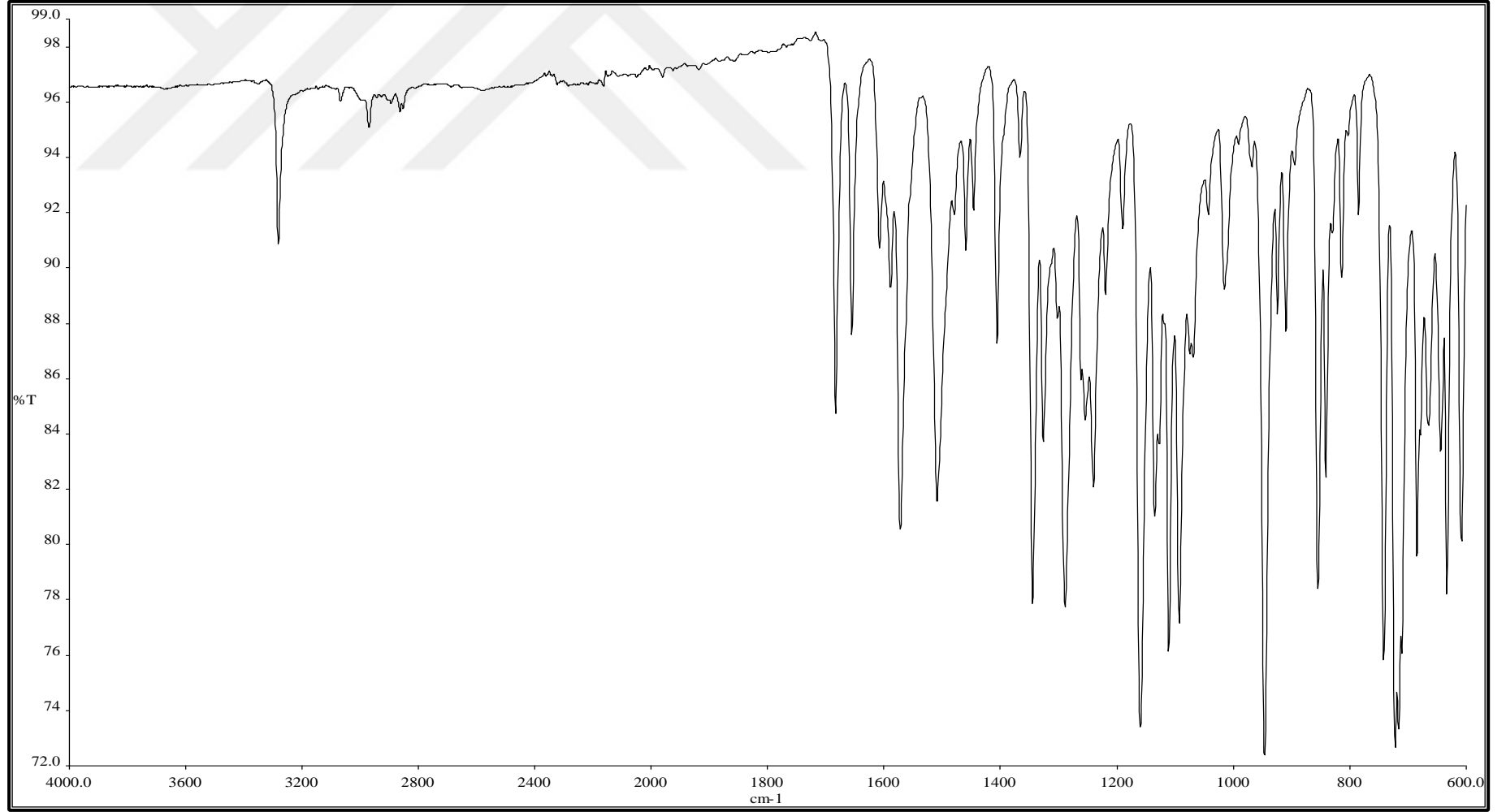
NS17 #41 RT: 0.36 AV: 1 NL: 1.63E6
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00



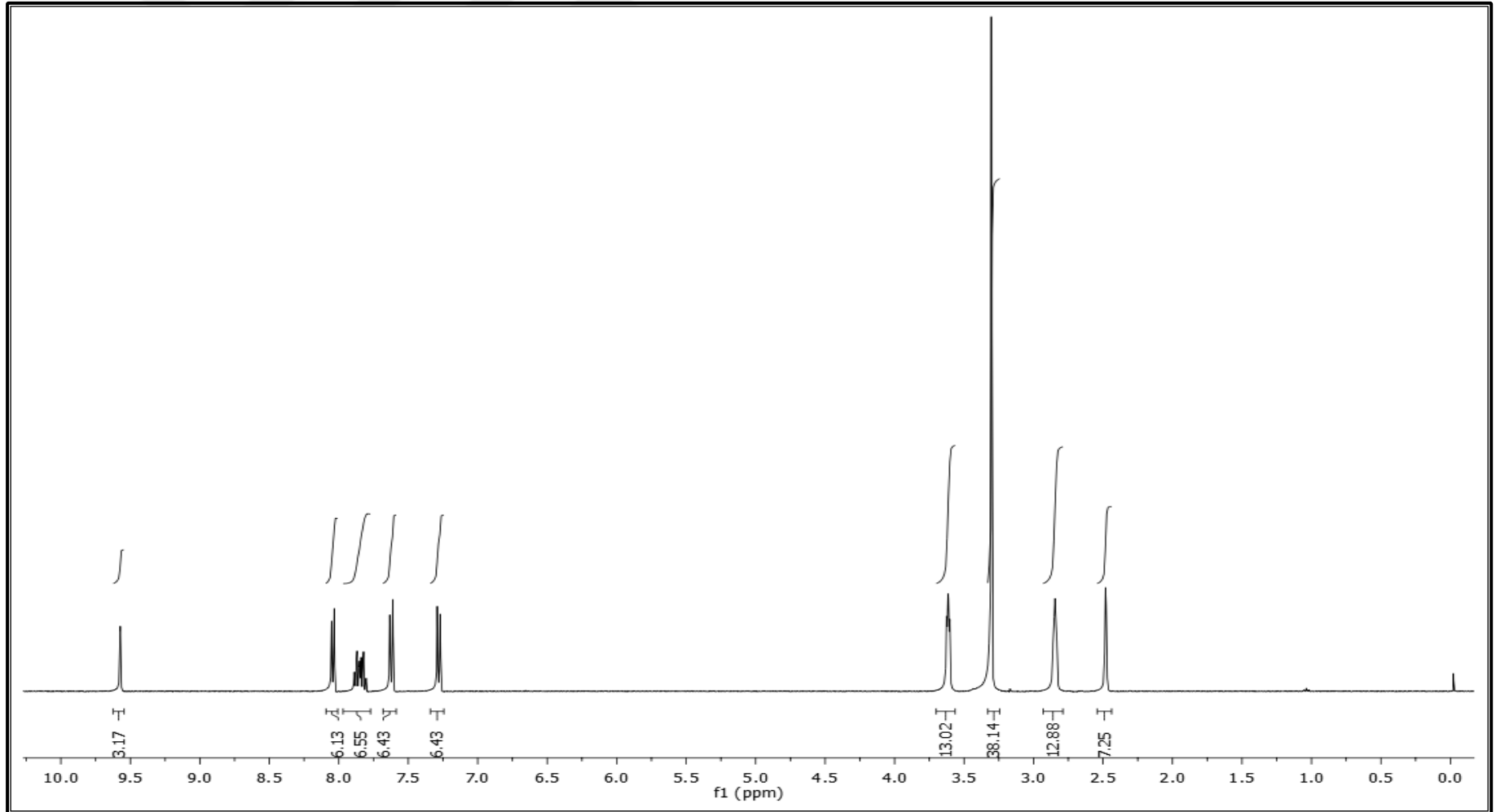
NS17 #41 RT: 0.36 AV: 1 NL: 2.52E3
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 83. NS17 kodlu bileşğin kütle spektrumu



Spektrum 84. NS18 kodlu bileşigin IR spektrumu

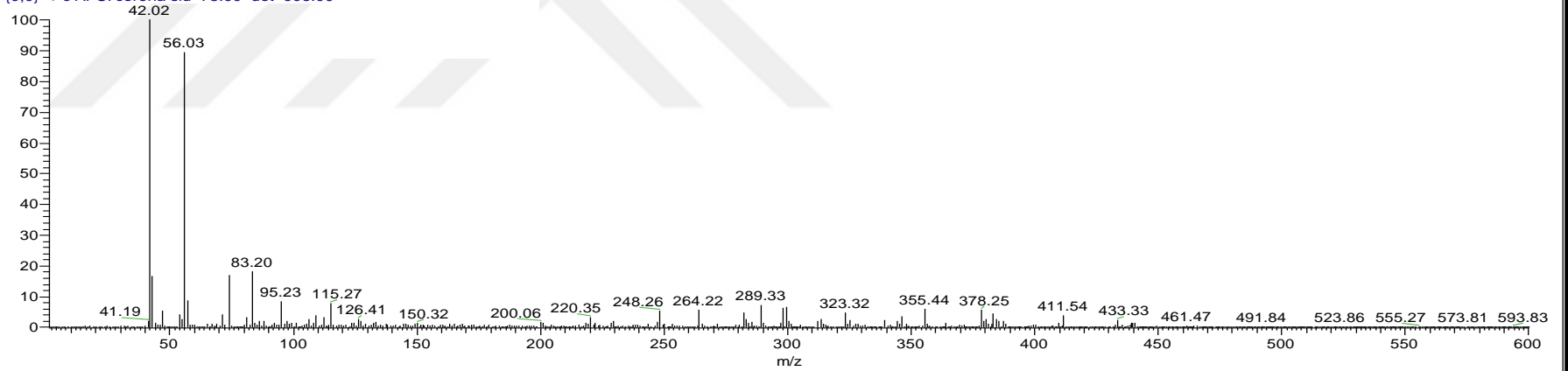


Spektrum 85. NS18 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu

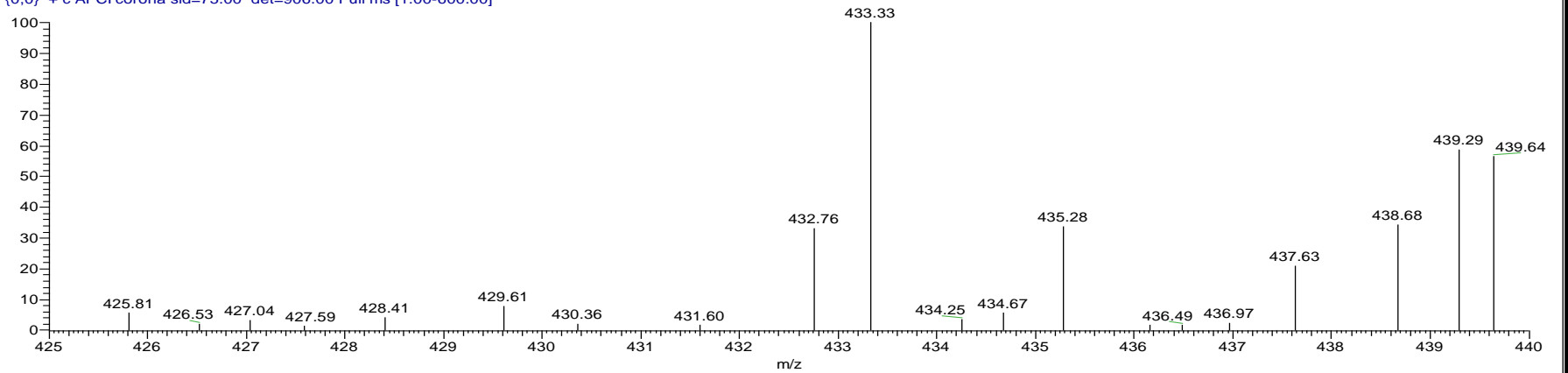
C:\Xcalibur\...\2017 11 14\NS18

11/14/2017 11:08:49 AM

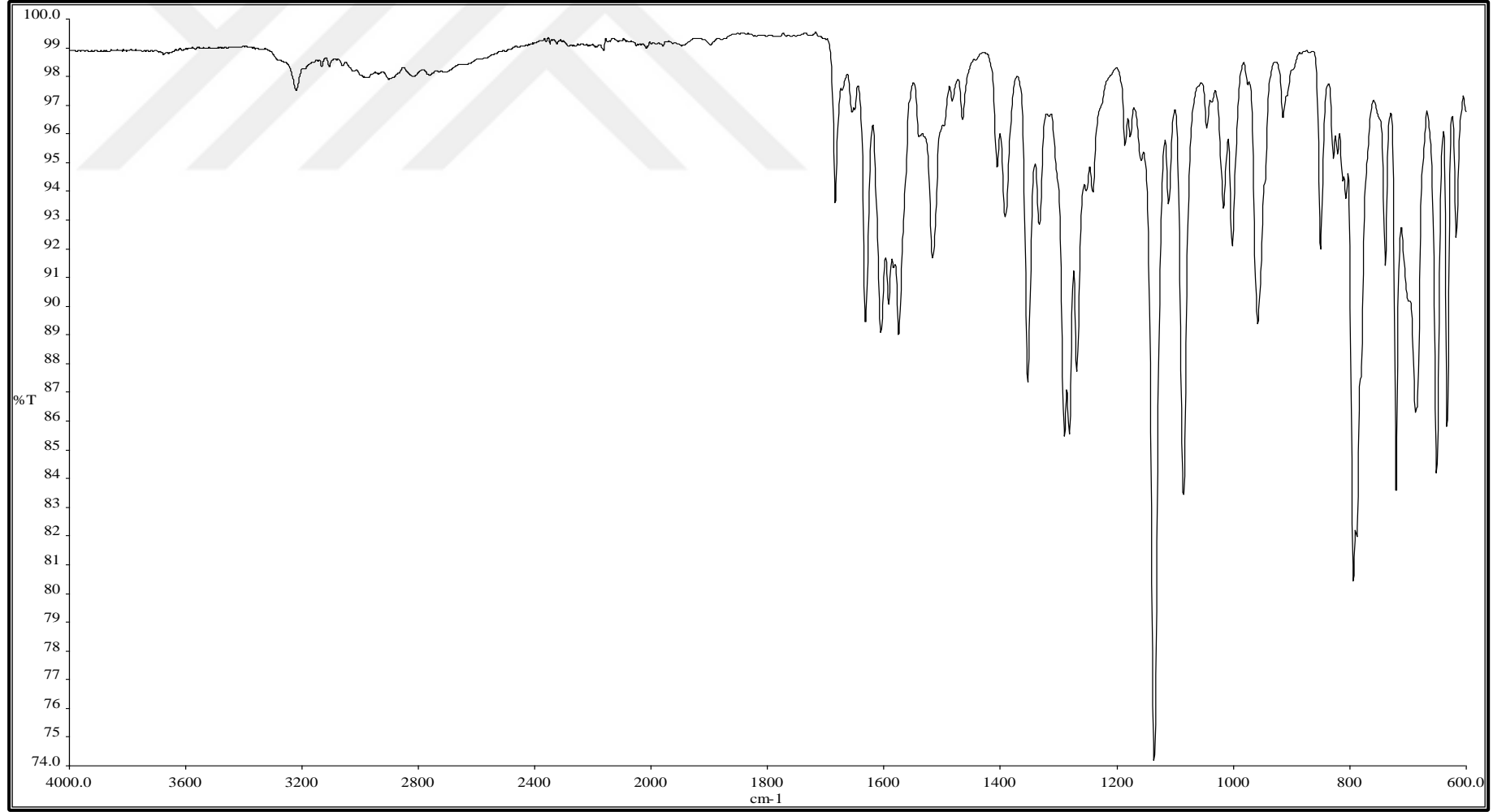
NS18 #42 RT: 0.37 AV: 1 NL: 6.04E5
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00



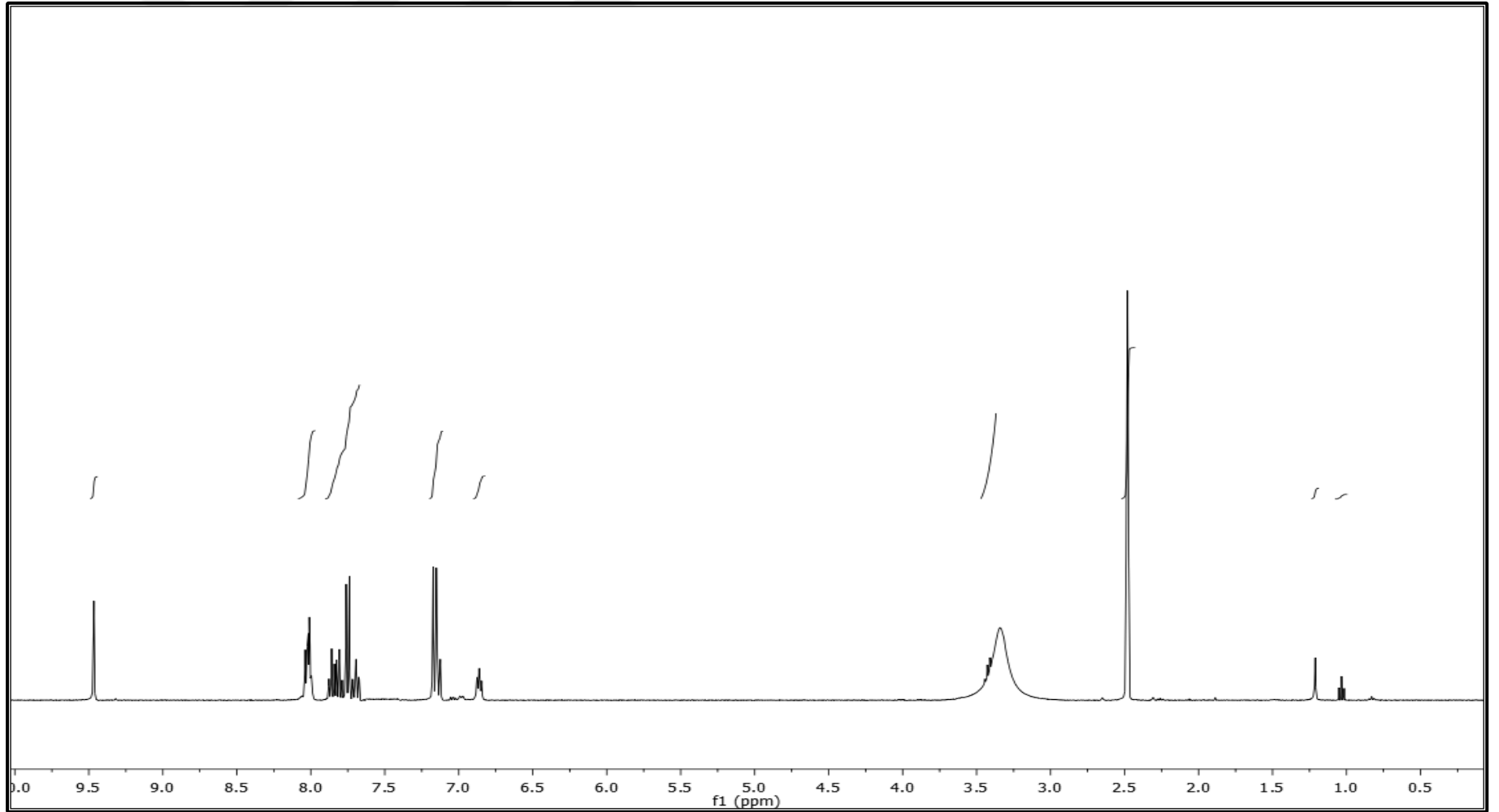
NS18 #42 RT: 0.37 AV: 1 NL: 1.31E4
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 86. NS18 kodlu bileşğin kütle spektrumu



Spektrum 87. NS19 kodlu bileşğin IR spektrumu

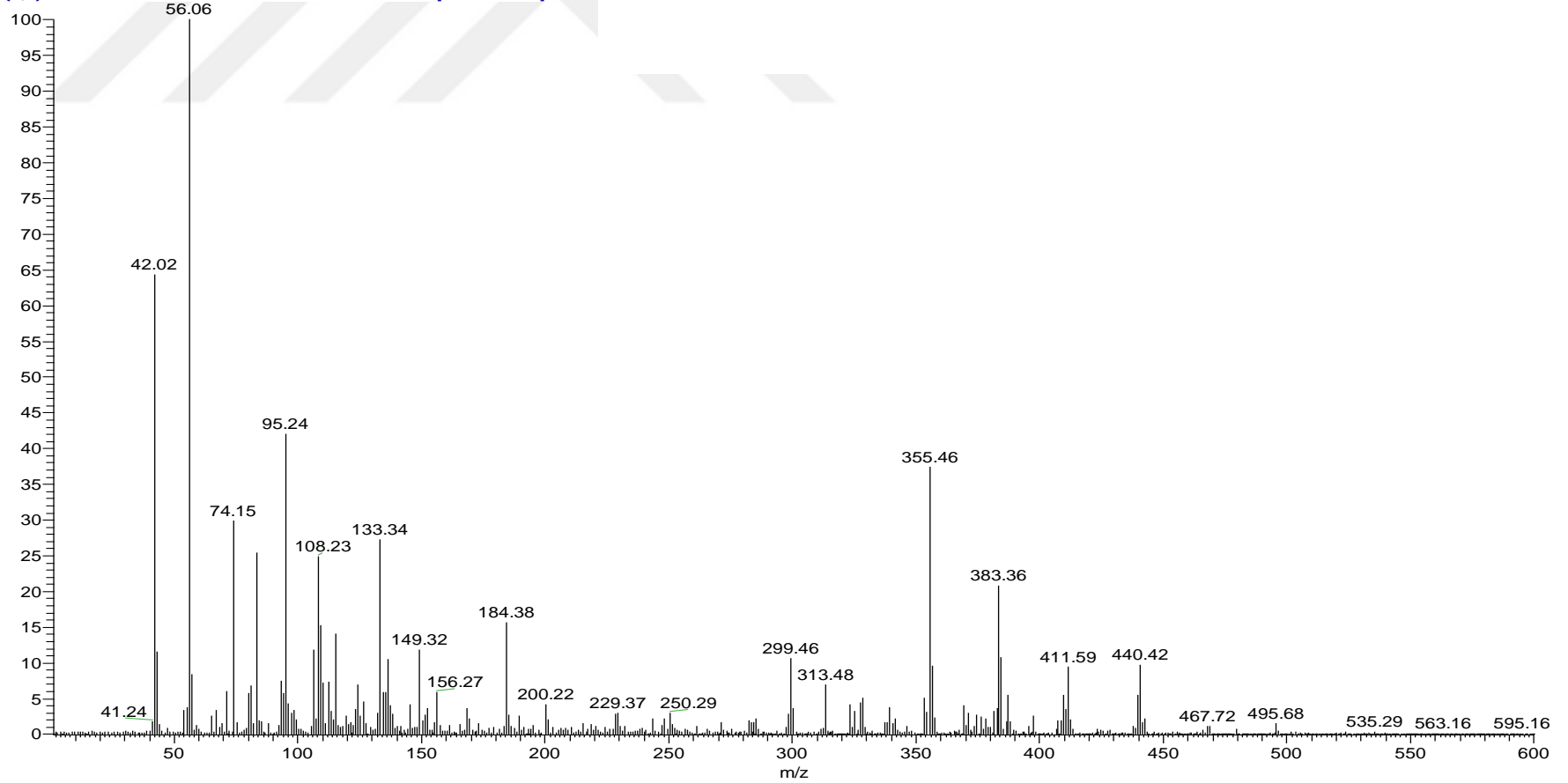


Spektrum 88. NS19 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu

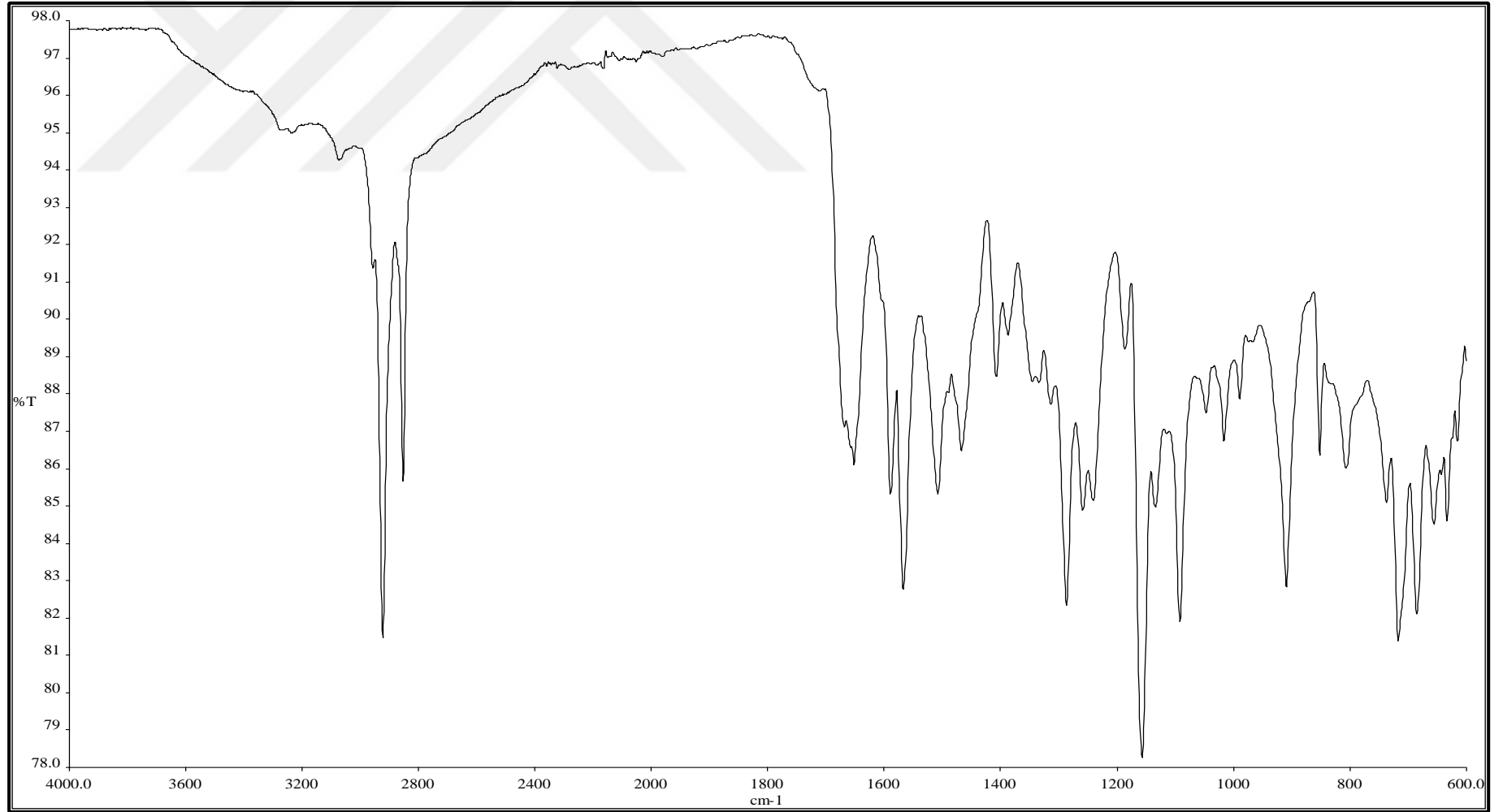
C:\Xcalibur\...2017 11 14\NS19

11/14/2017 11:13:47 AM

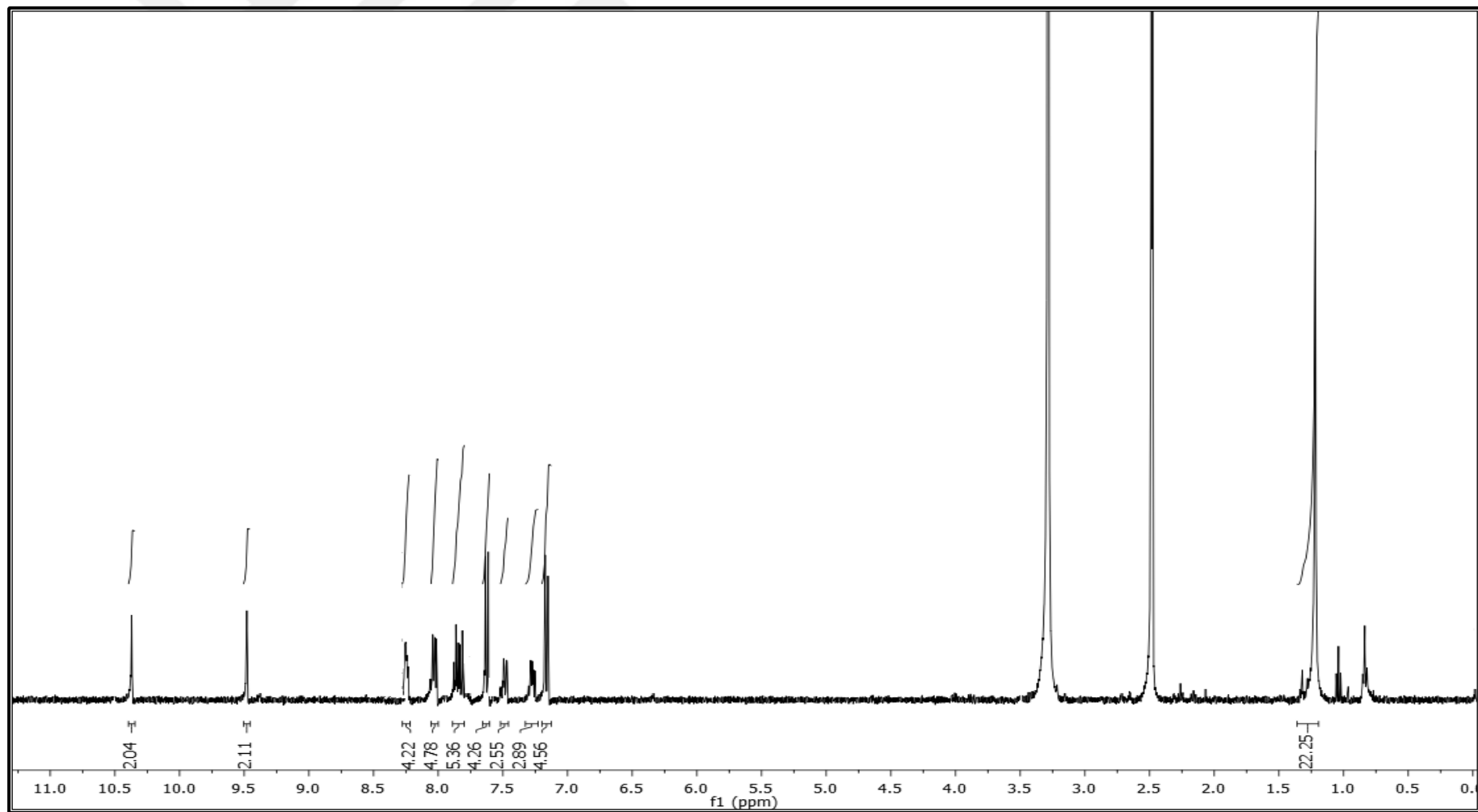
NS19 #40 RT: 0.35 AV: 1 NL: 4.65E5
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 89. NS19 kodlu bileşğin kütle spektrumu

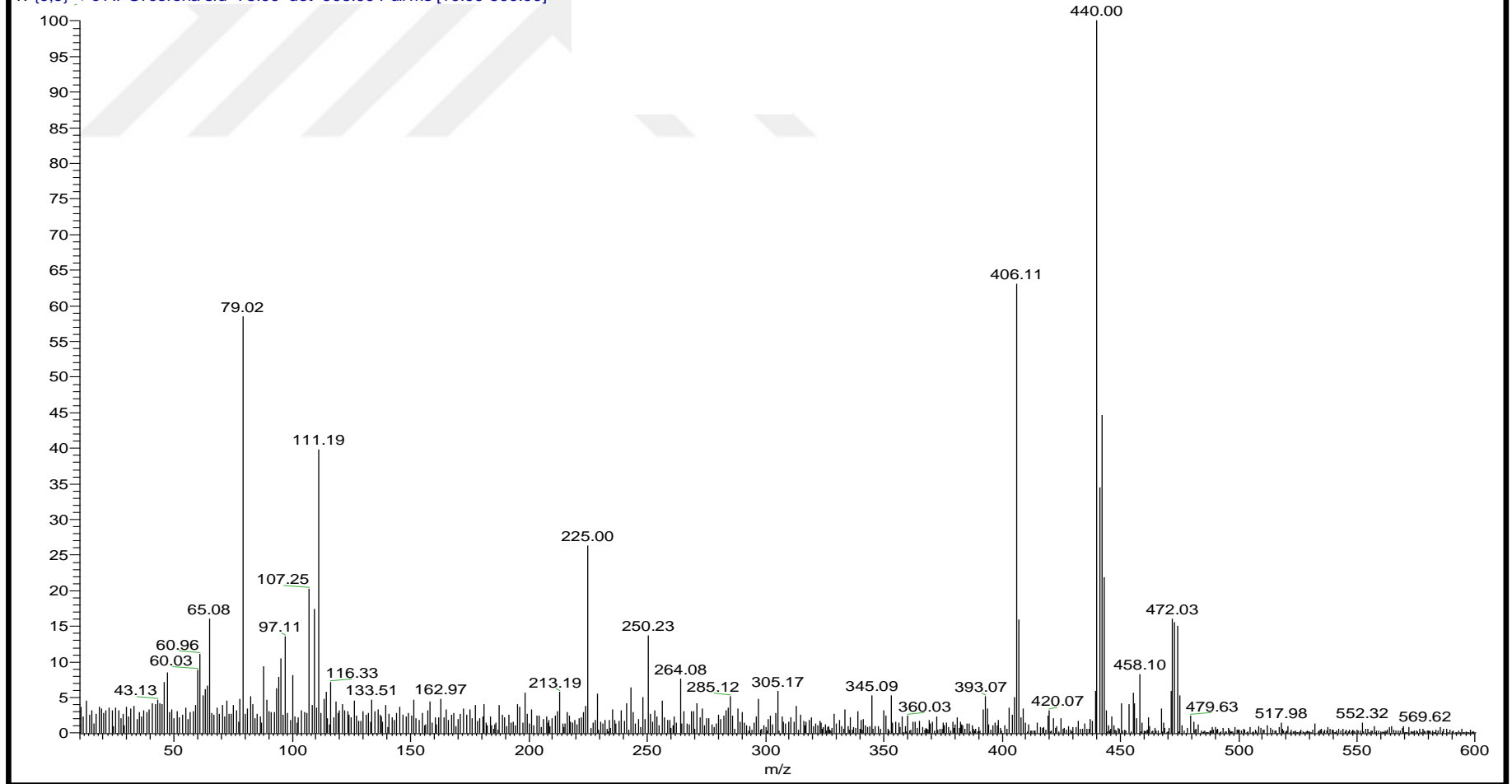


Spektrum 90. NS20 kodlu bileşigin IR spektrumu

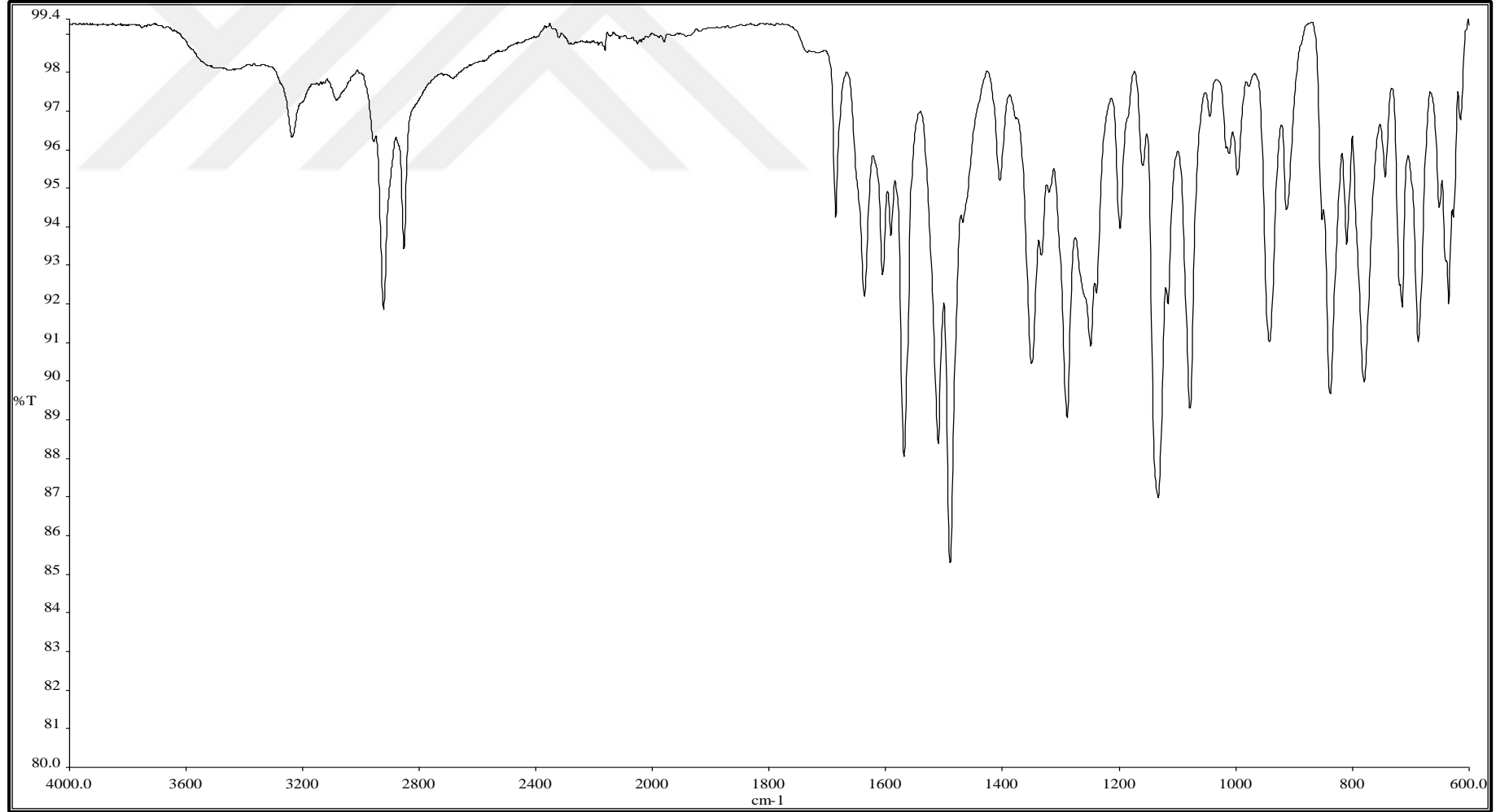


Spektrum 91. NS20 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu

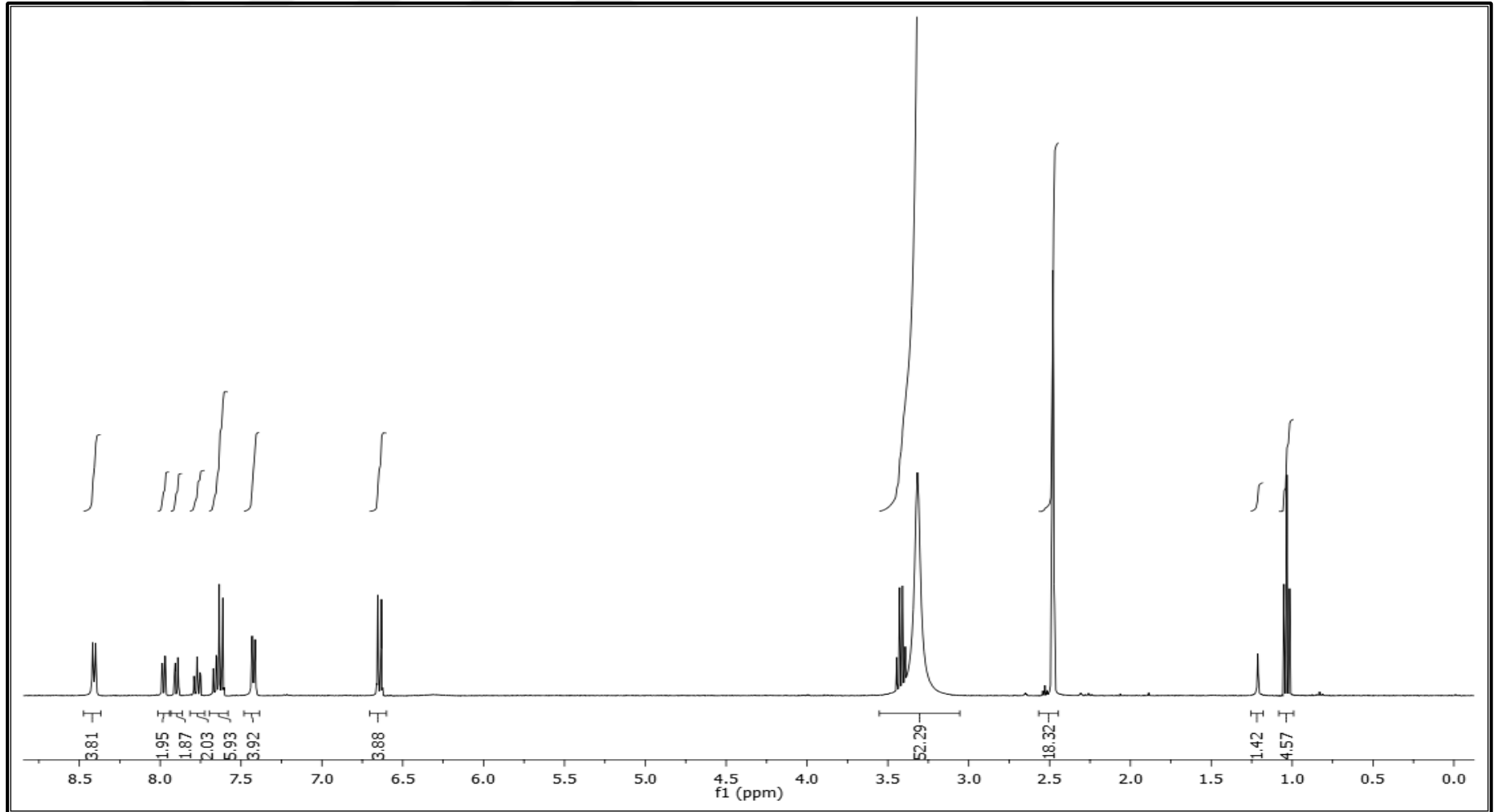
NS3AP-_151209151406 #181 RT: 1.64 AV: 1 NL: 4.53E4
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [10.00-600.00]



Spektrum 92. NS20 kodlu bileşğin kütle spektrumu

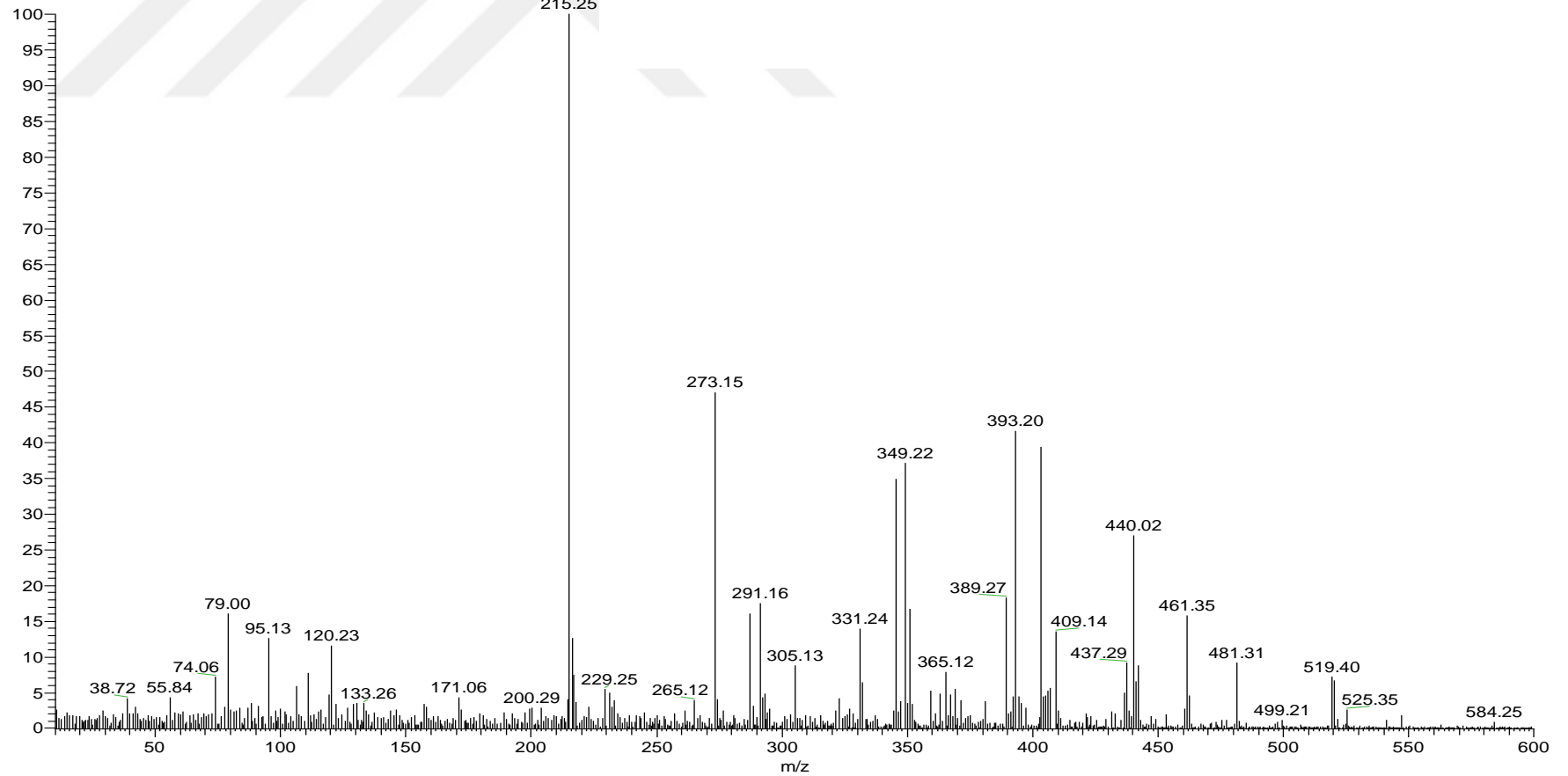


Spektrum 93. NS21 kodlu bileşigin IR spektrumu

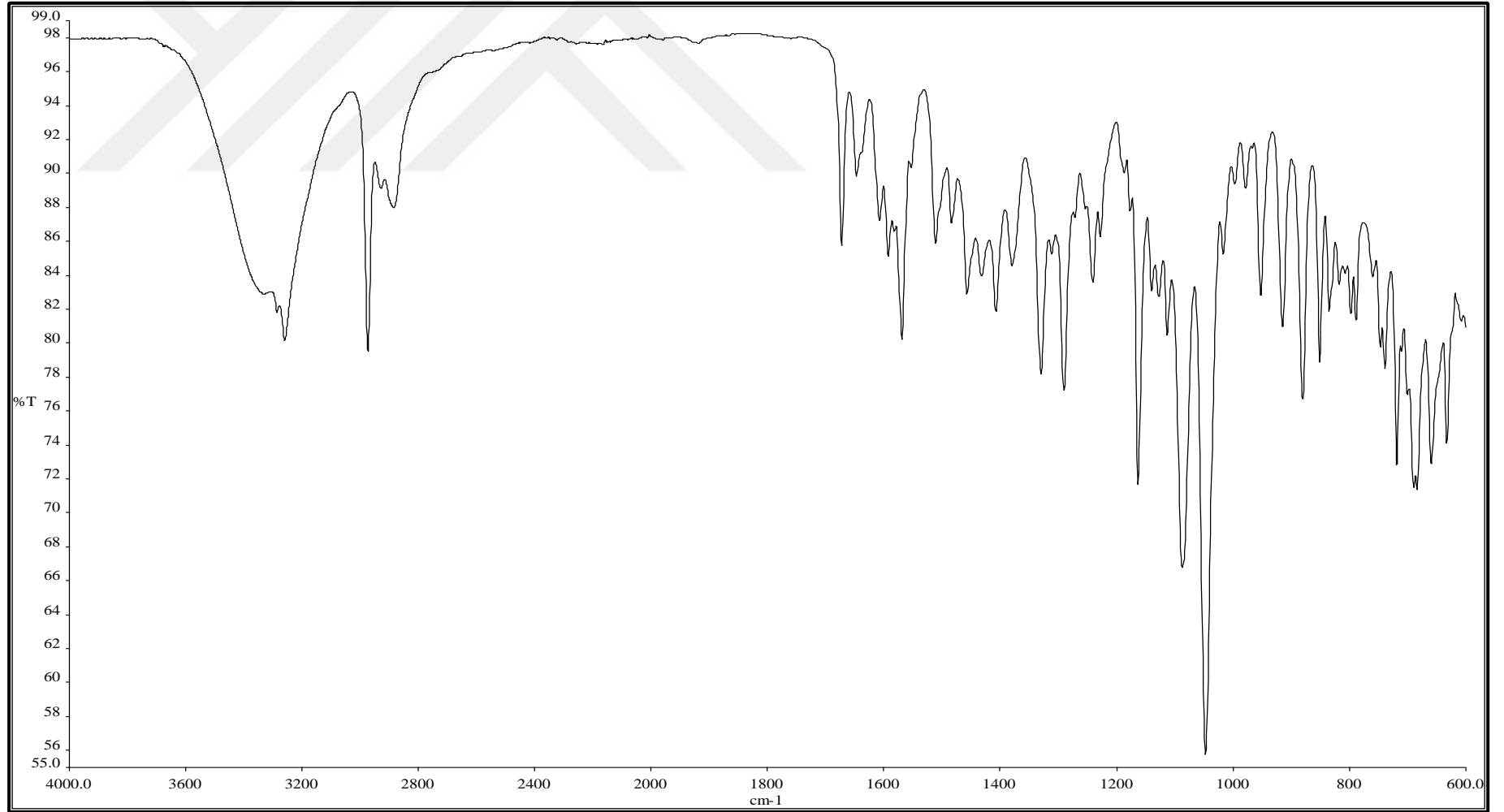


Spektrum 94. NS21 kodlu bileşiğin ¹H NMR spektrumu

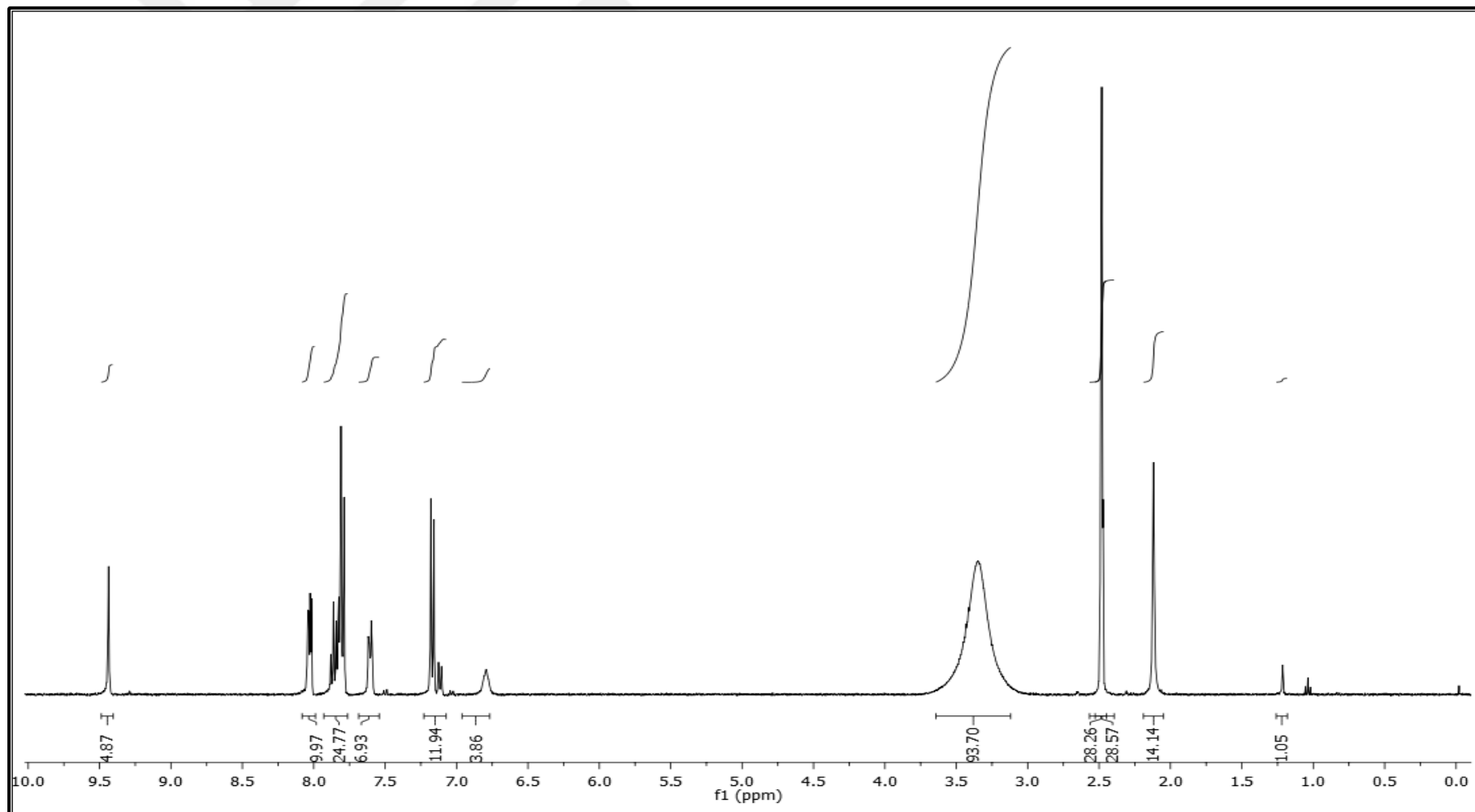
NS_4AP #44 RT: 0.39 AV: 1 NL: 7.79E4
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [10.00-600.00]



Spektrum 95. NS21 kodlu bileşğin kütle spektrumu



Spektrum 96. NS22 kodlu bileşigin IR spektrumu

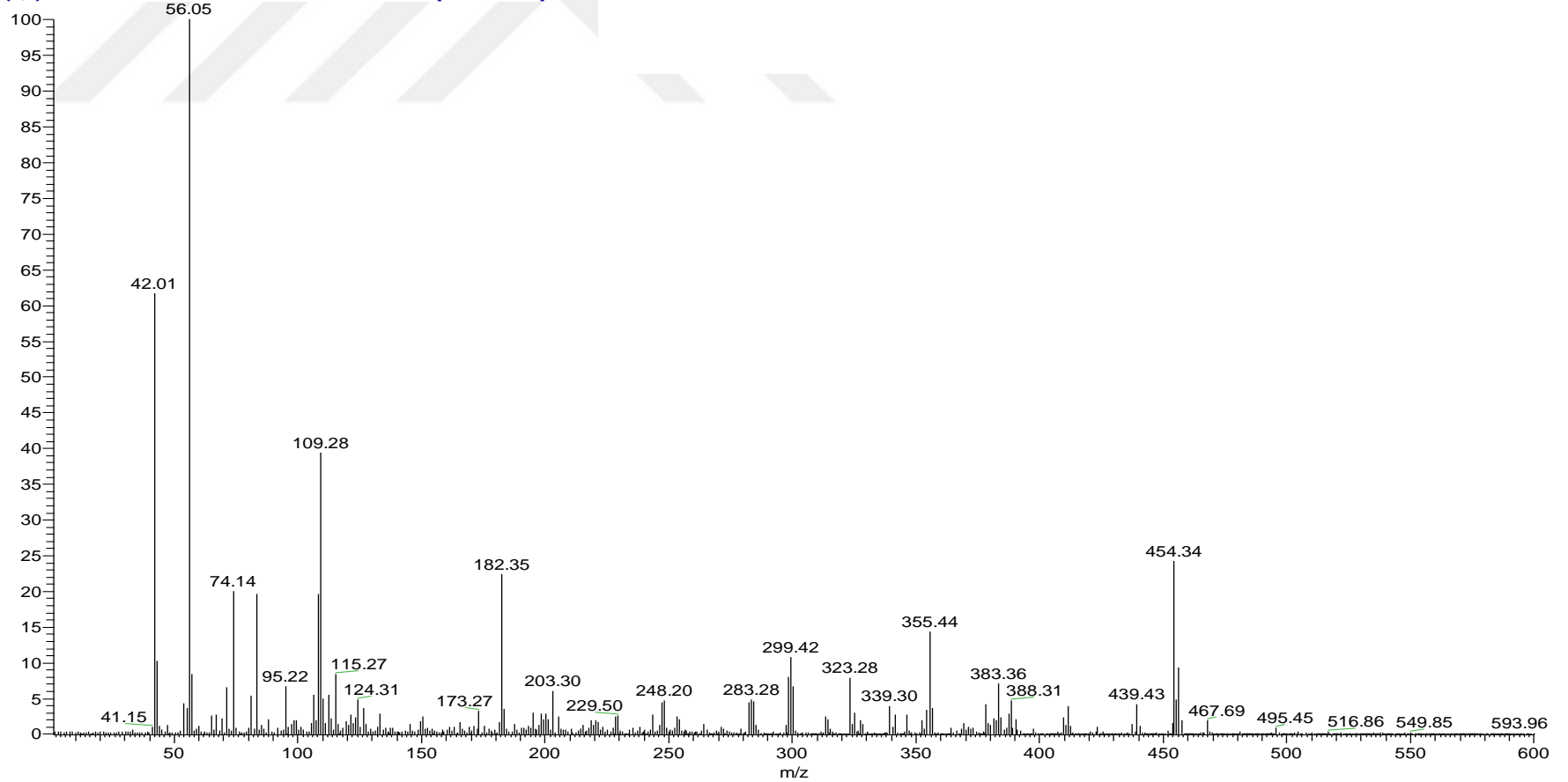


Spektrum 97. NS22 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu

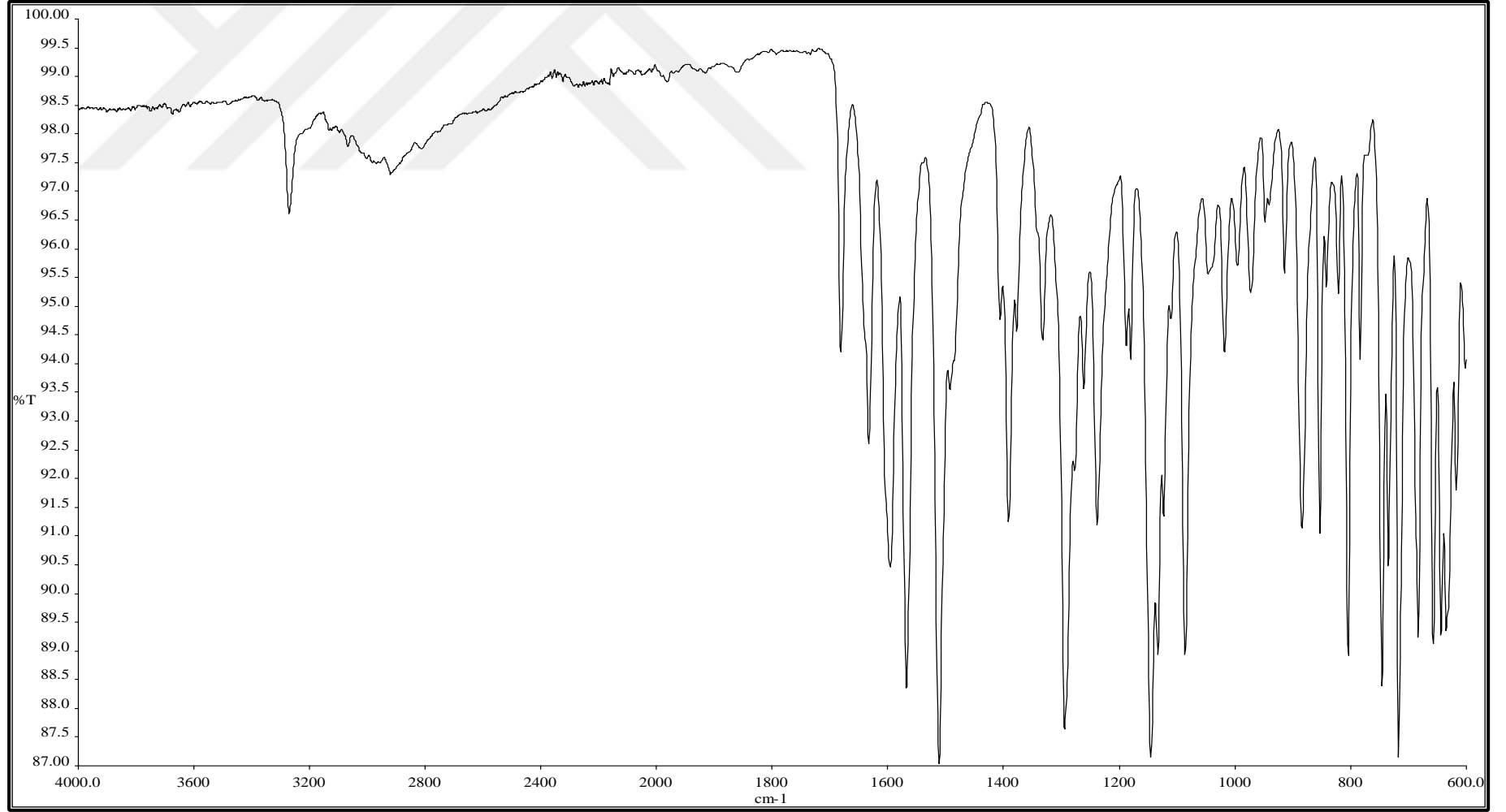
C:\Xcalibur\...2017 11 14\NS22

11/14/2017 11:18:49 AM

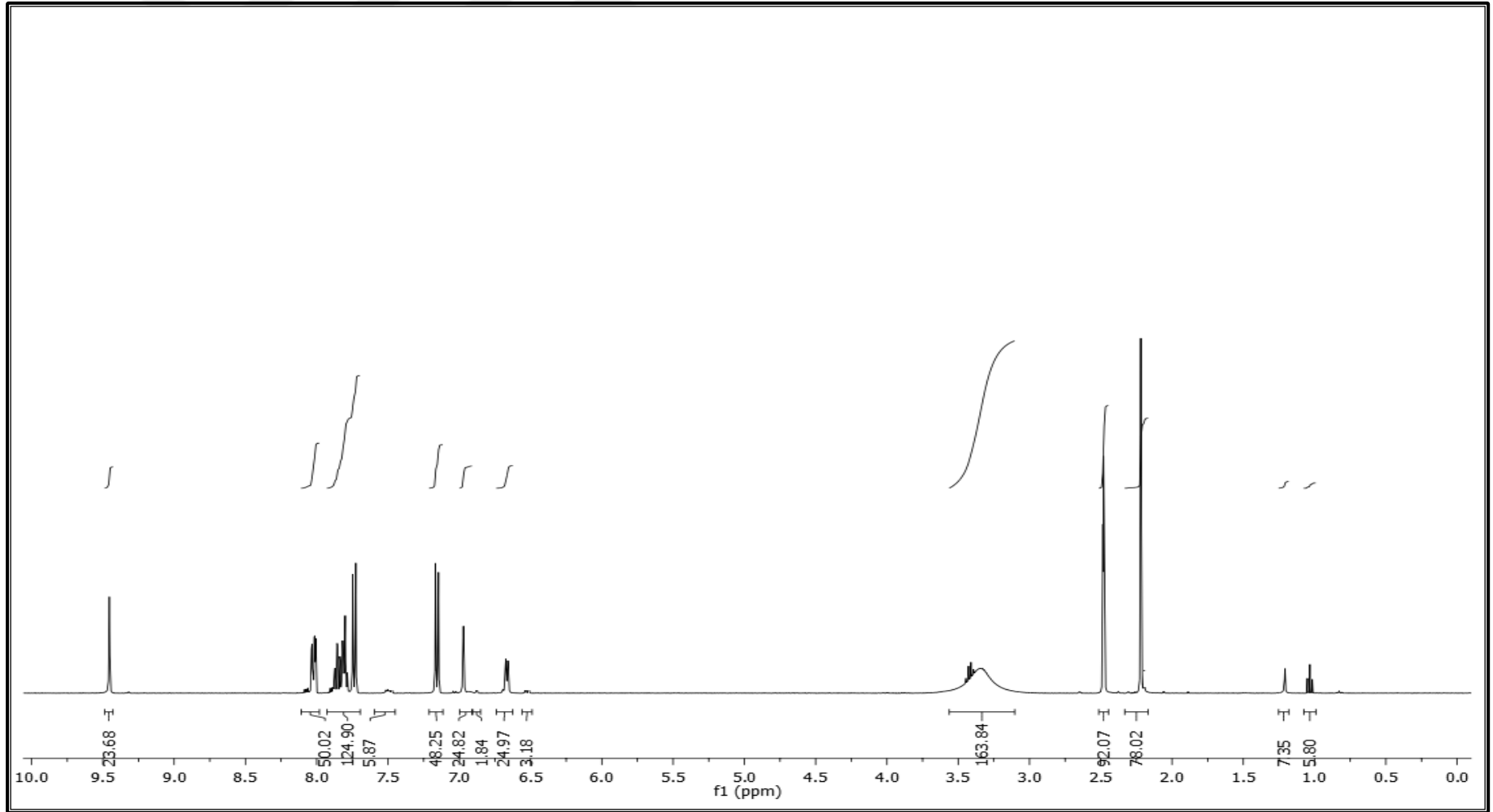
NS22 #41 RT: 0.36 AV: 1 NL: 5.37E5
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



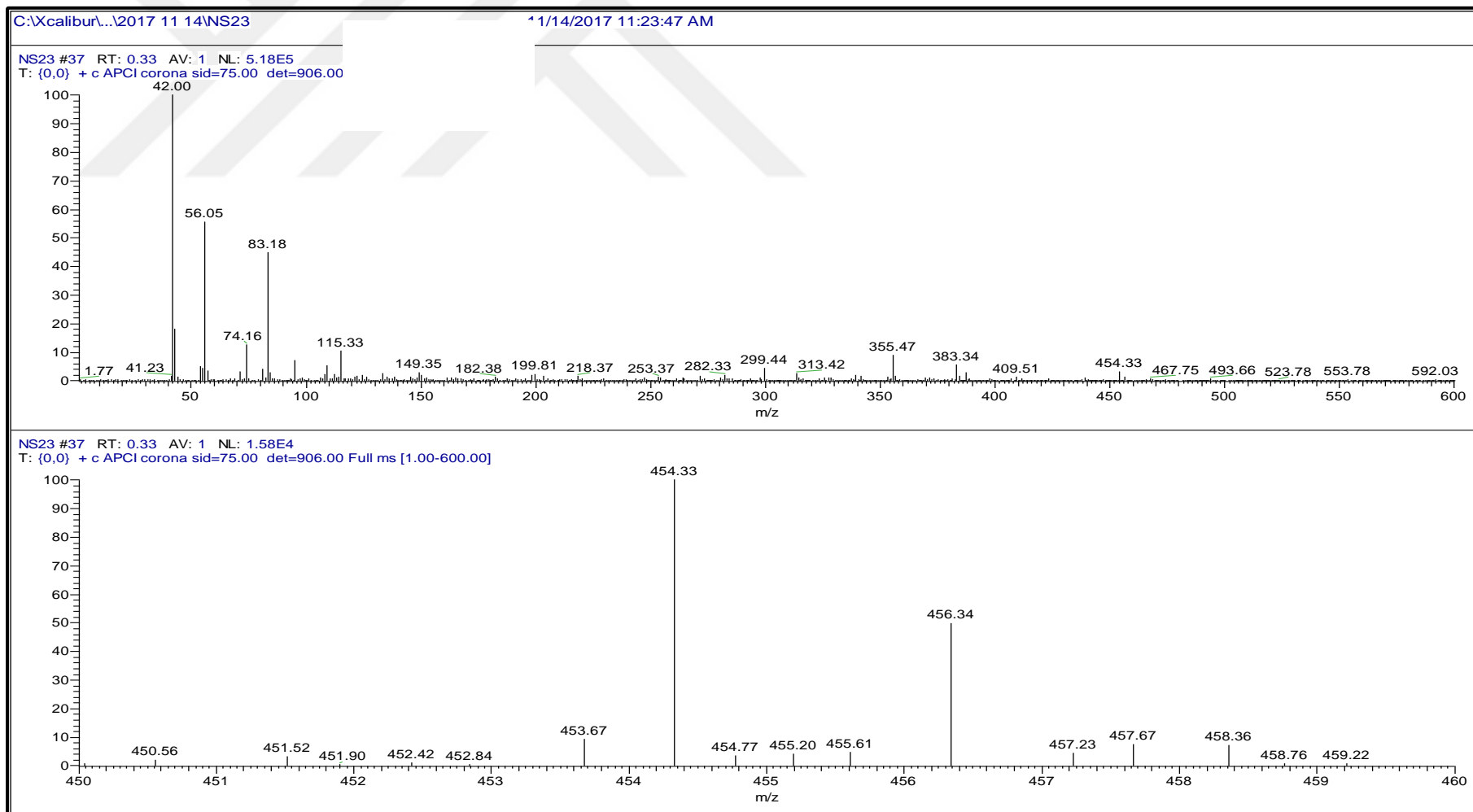
Spektrum 98. NS22 kodlu bileşğin kütle spektrumu



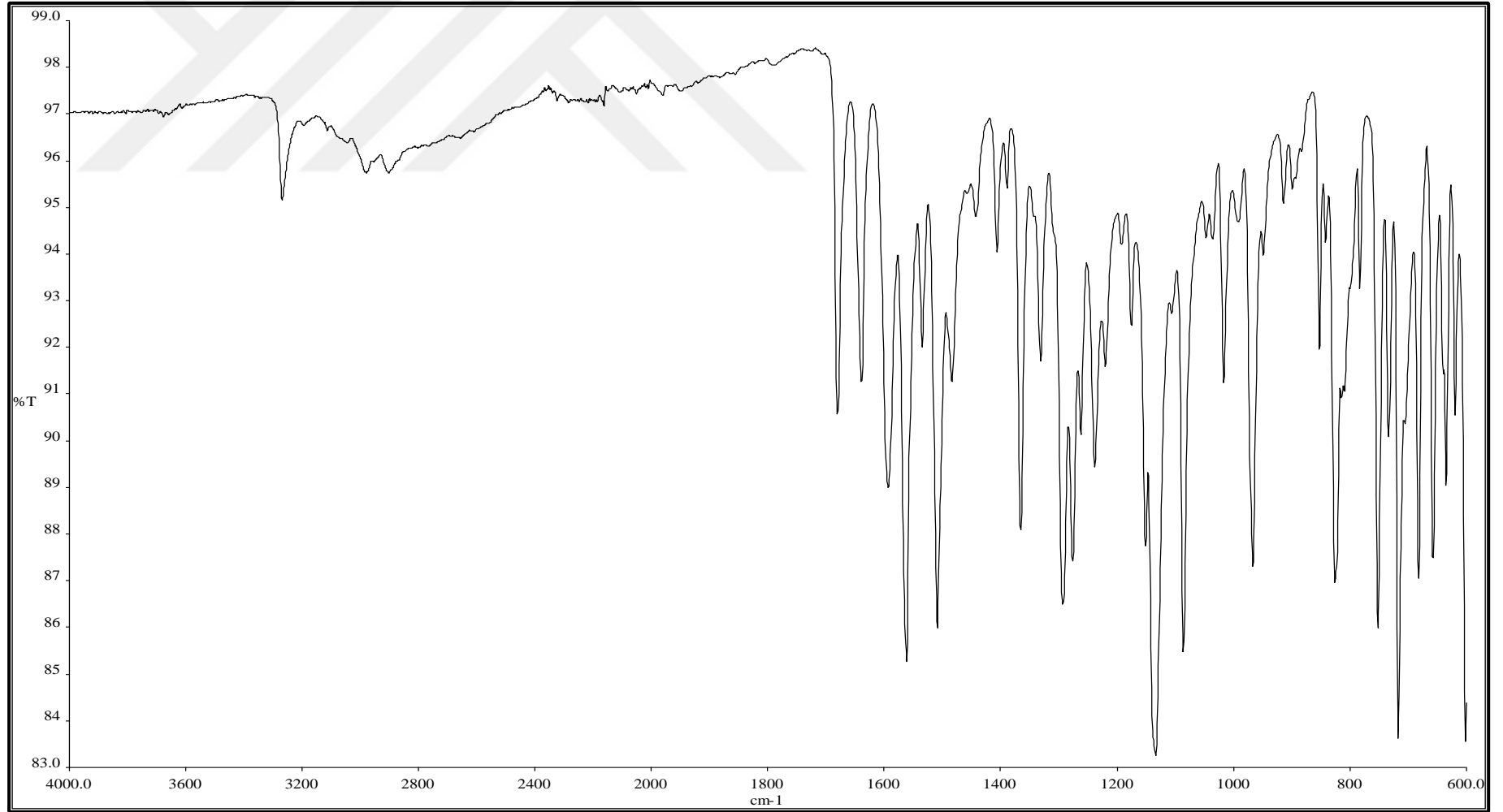
Spektrum 99. NS23 kodlu bileşiğin IR spektrumu



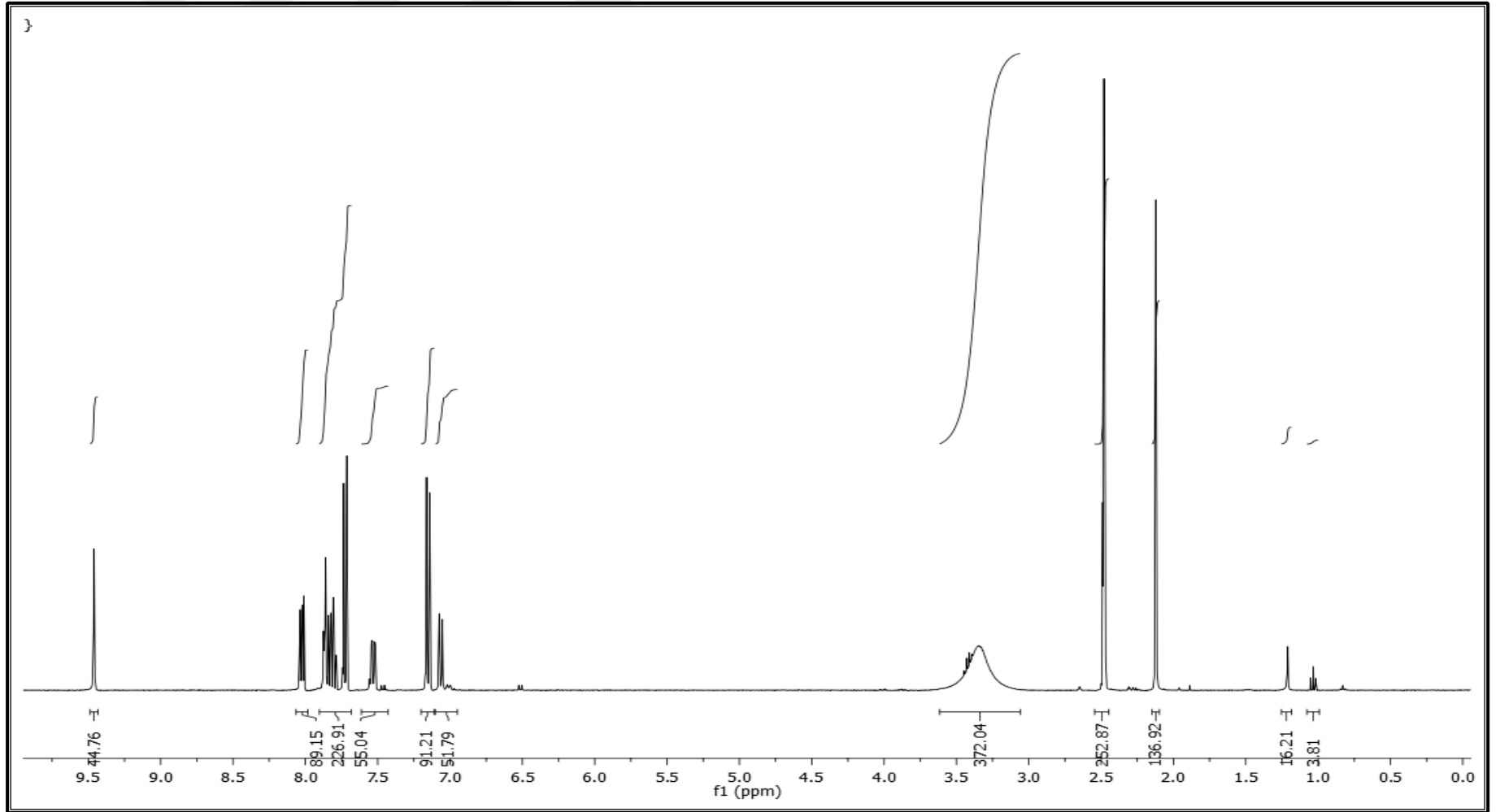
Spektrum 100. NS23 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu



Spektrum 101. NS23 kodlu bileşiğin kütle spektrumu



Spektrum 102. NS24 kodlu bileşğin IR spektrumu

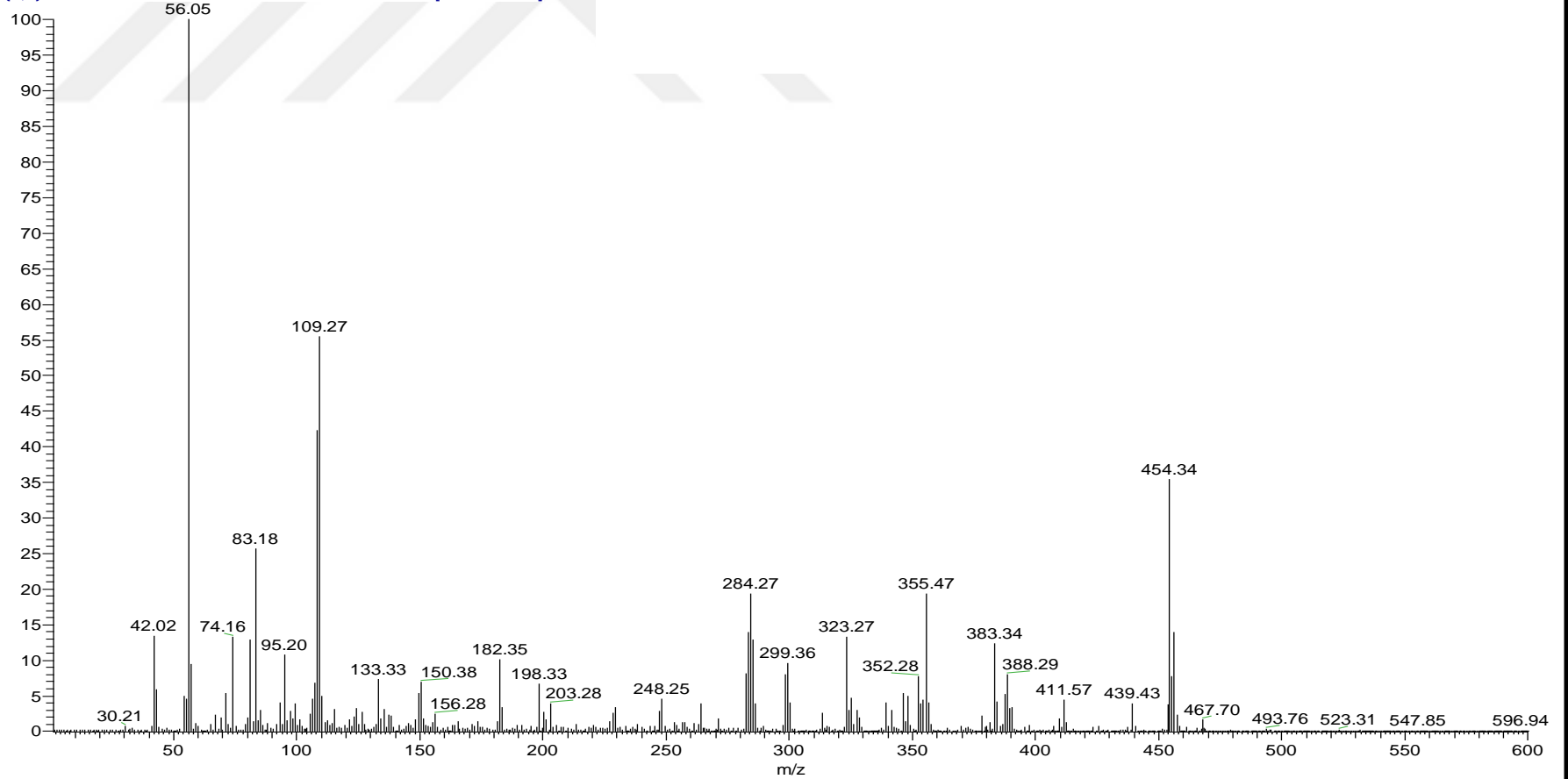


Spektrum 103. NS24 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu

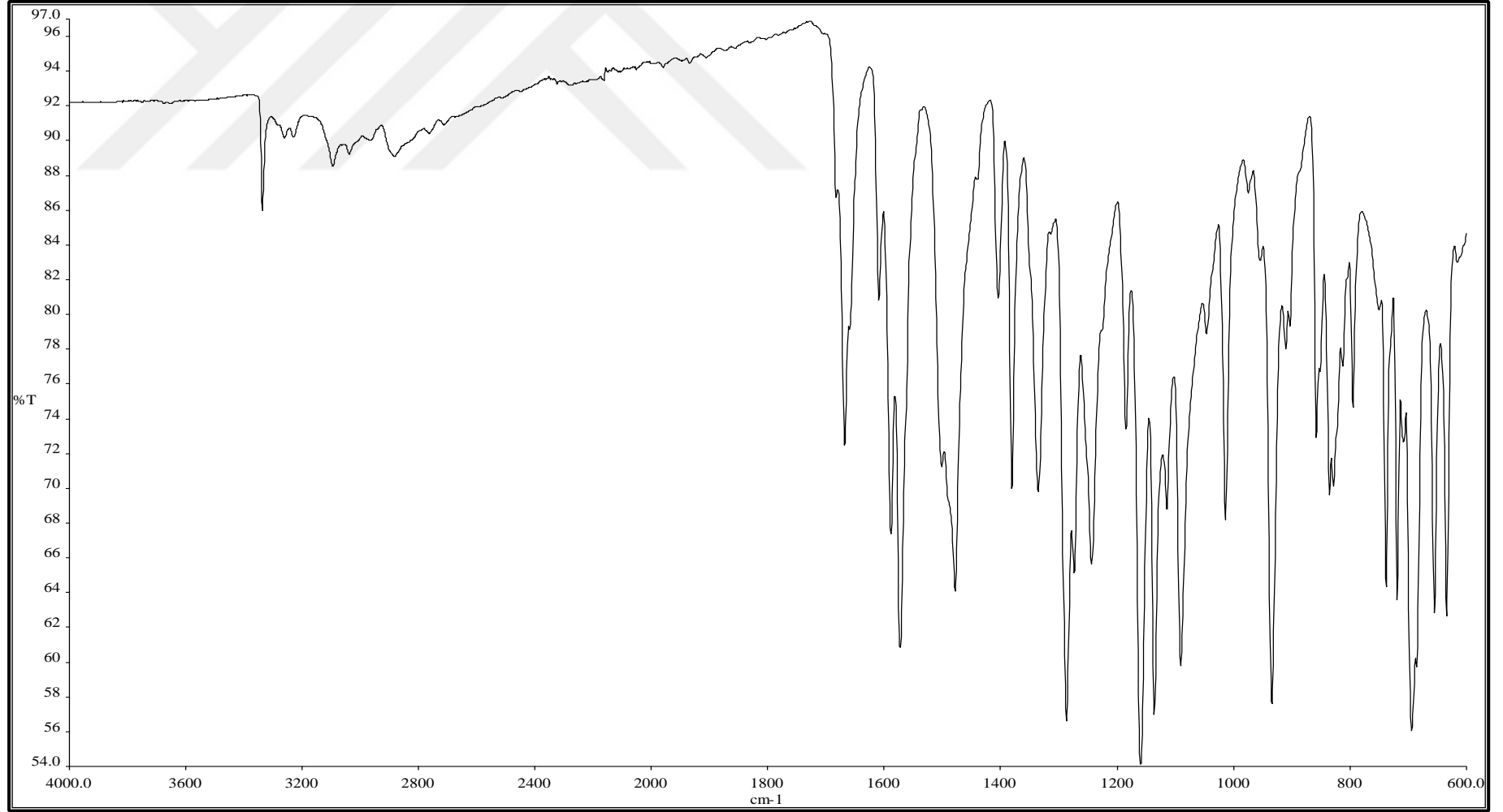
C:\Xcalibur\...2017 11 14\NS24

11/14/2017 11:28:43 AM

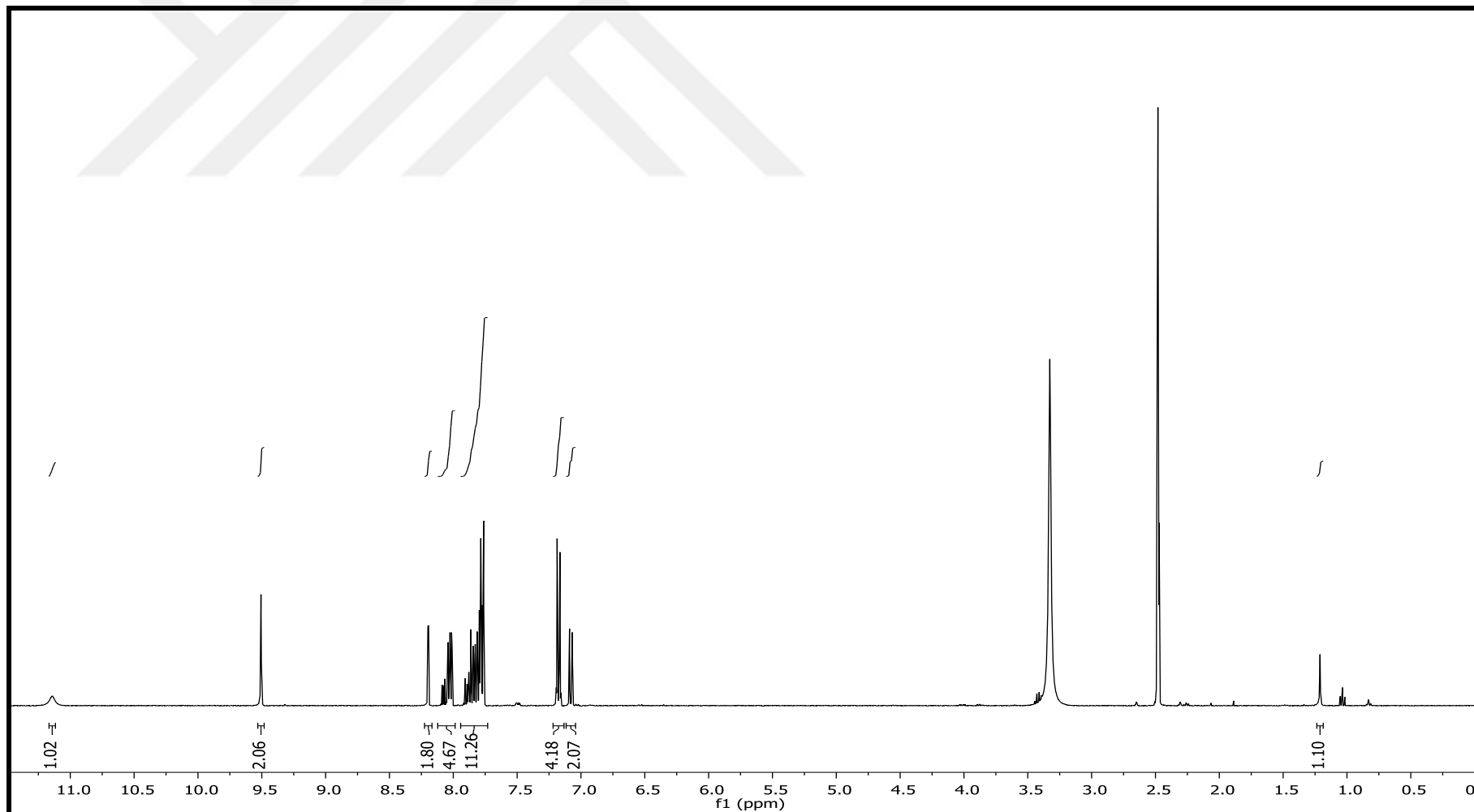
NS24 #40 RT: 0.36 AV: 1 NL: 7.57E5
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 104. NS24 kodlu bileşiğin kütle spektrumu



Spektrum 105. NS25 kodlu bileşigin IR spektrumu

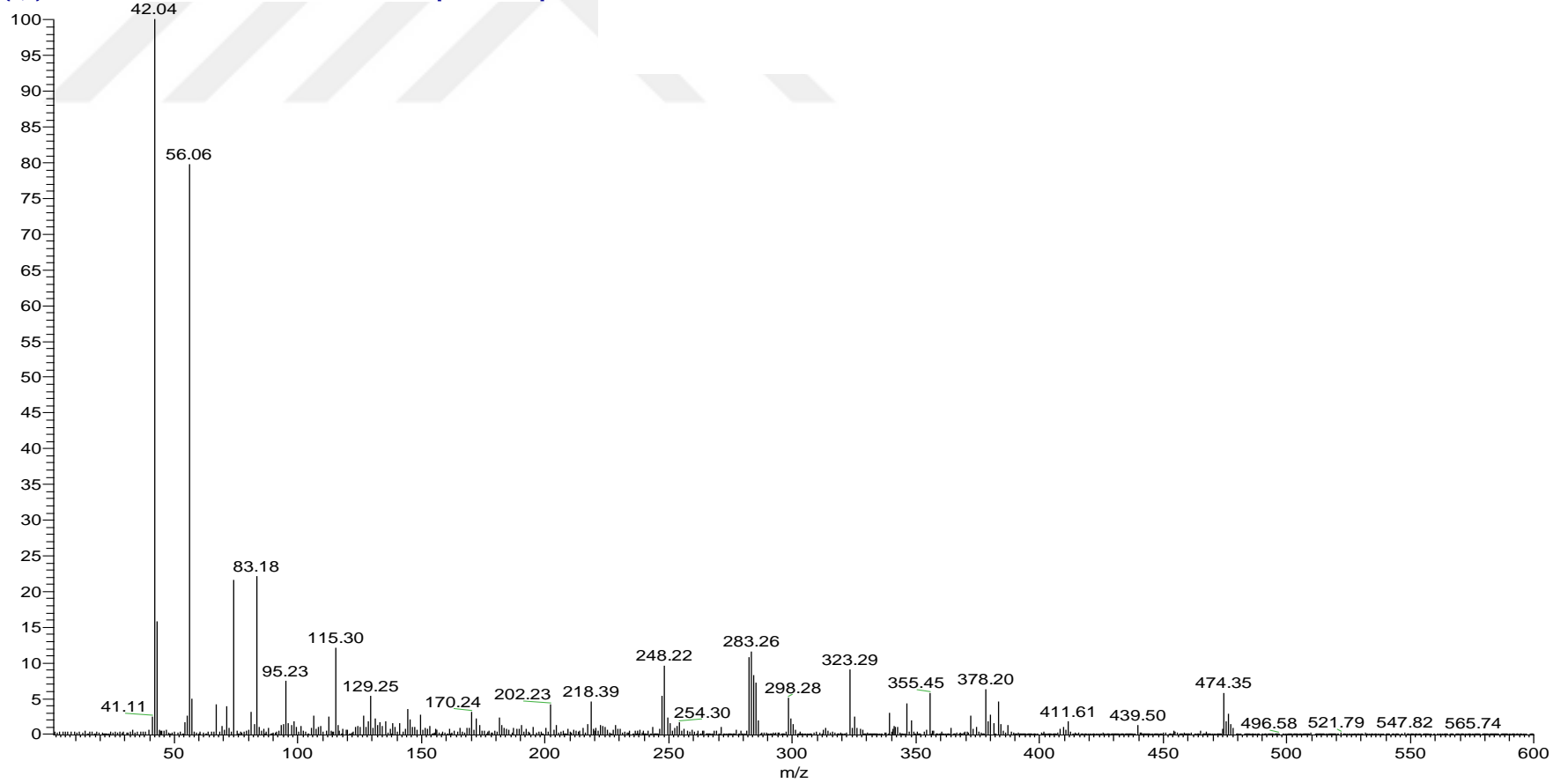


Spektrum 106. NS25 kodlu bileşğin ^1H NMR spektrumu

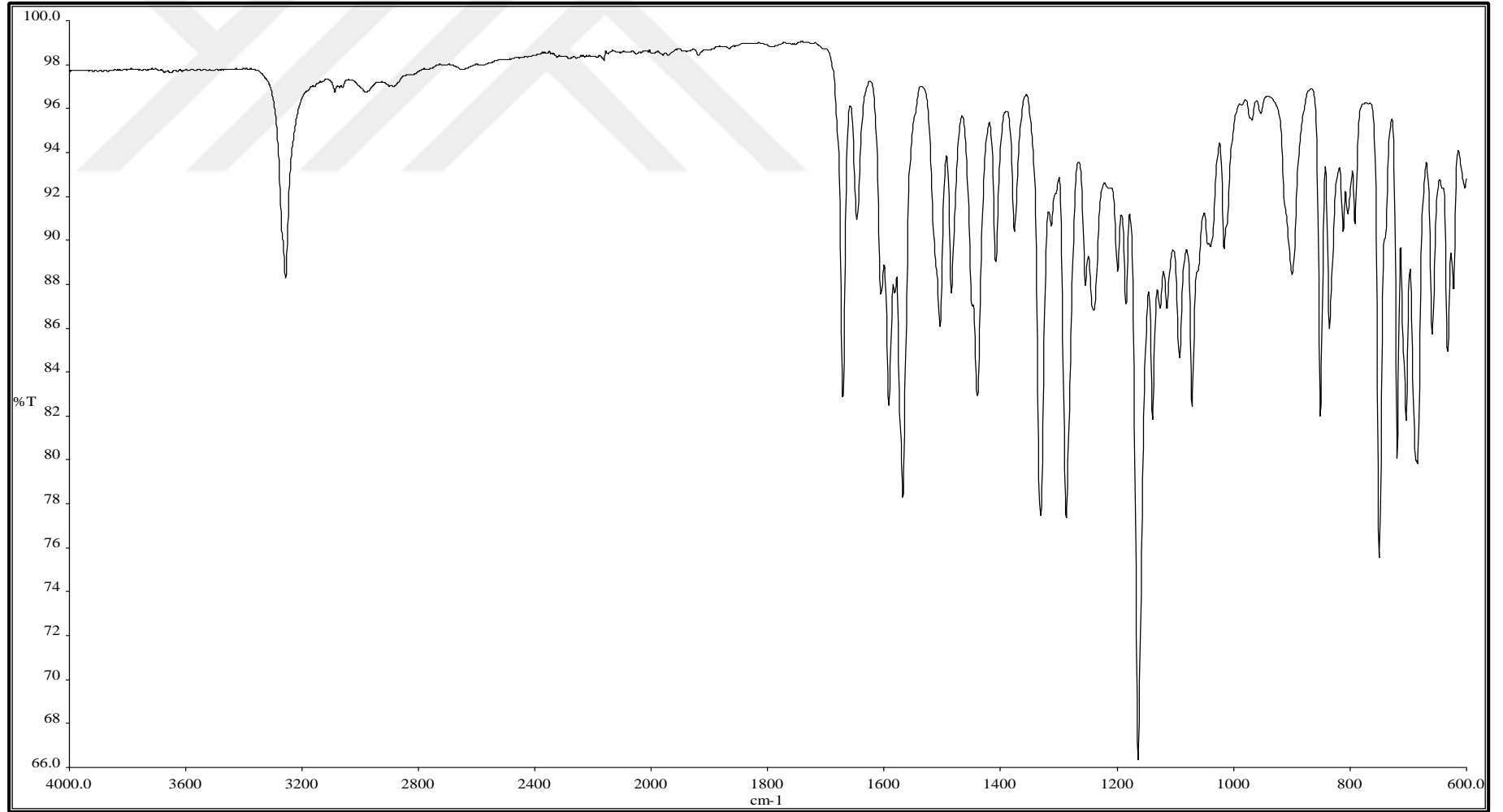
C:\Xcalibur...\2017 11 14\NS25

11/14/2017 11:33:41 AM

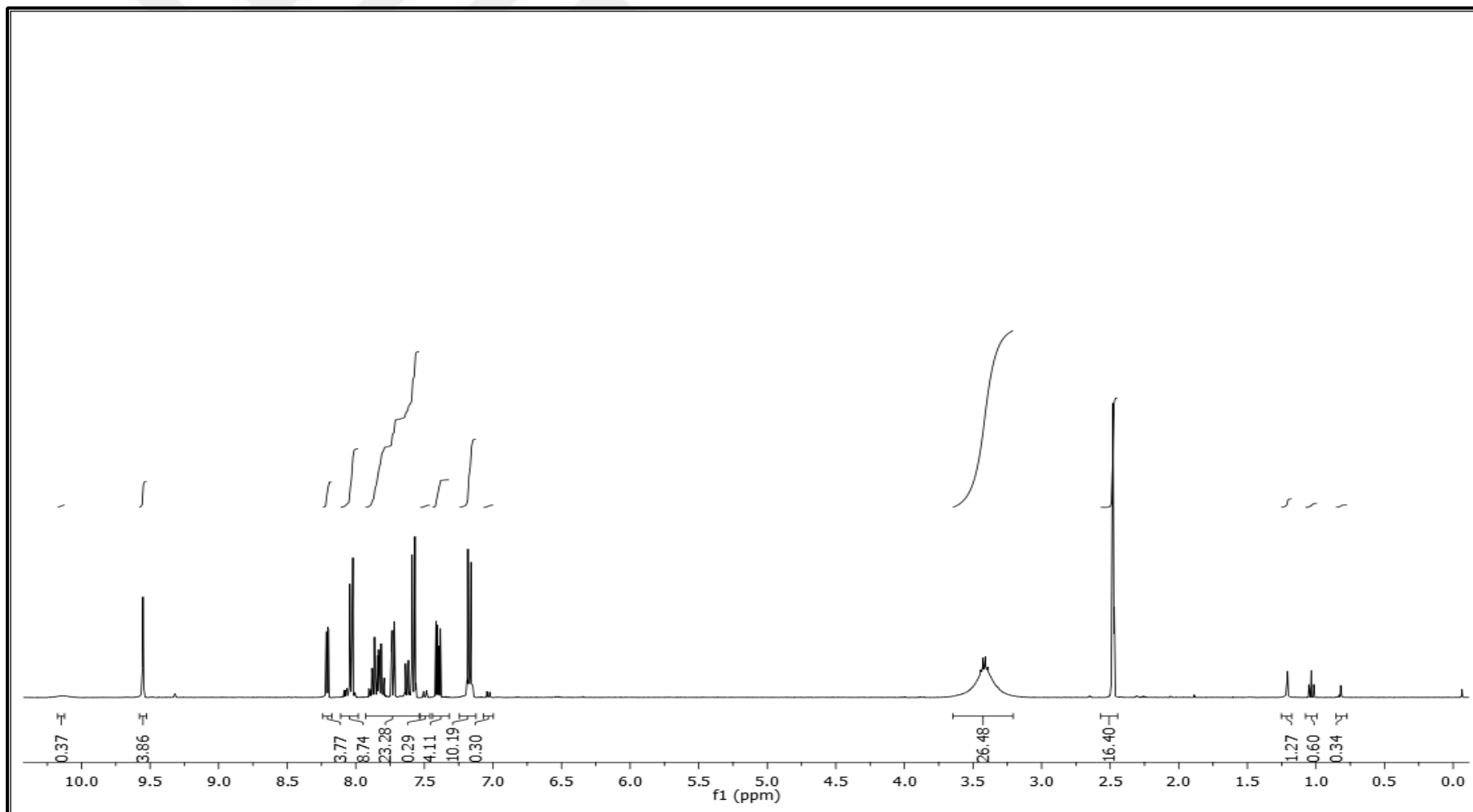
NS25 #42 RT: 0.37 AV: 1 NL: 4.17E5
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



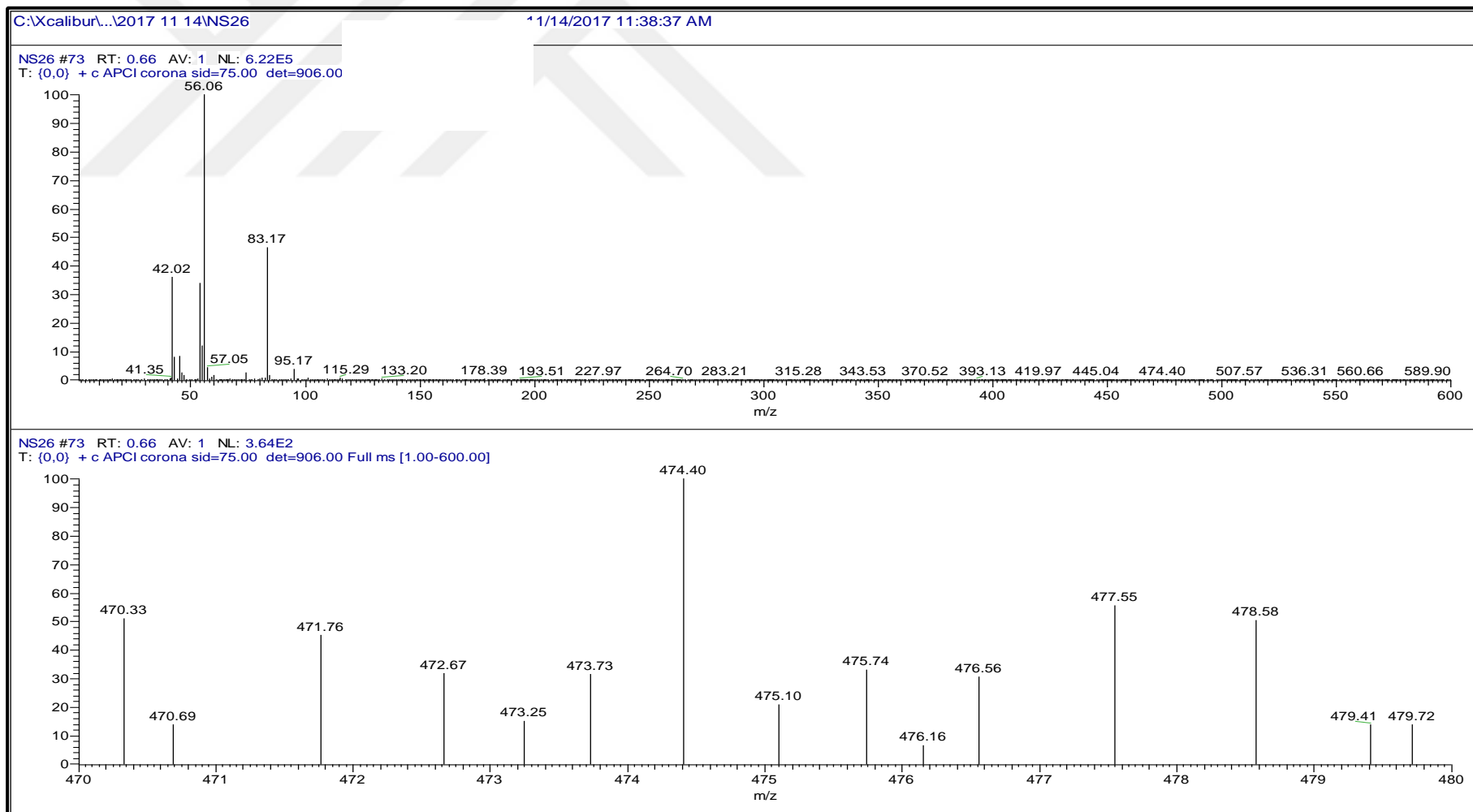
Spektrum 107. NS25 kodlu bileşğin kütle spektrumu



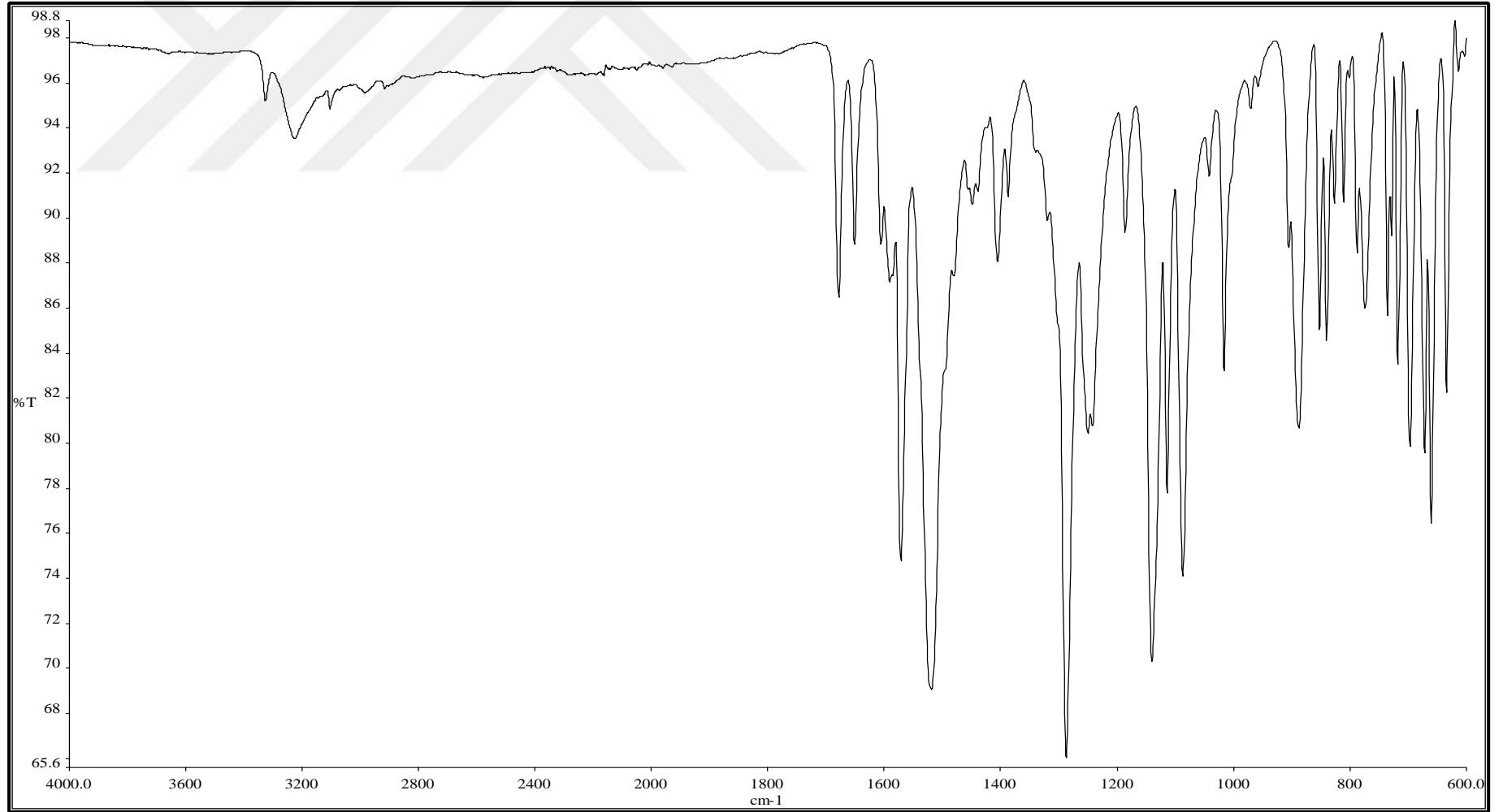
Spektrum 108. NS26 kodlu bileşiğin IR spektrumu



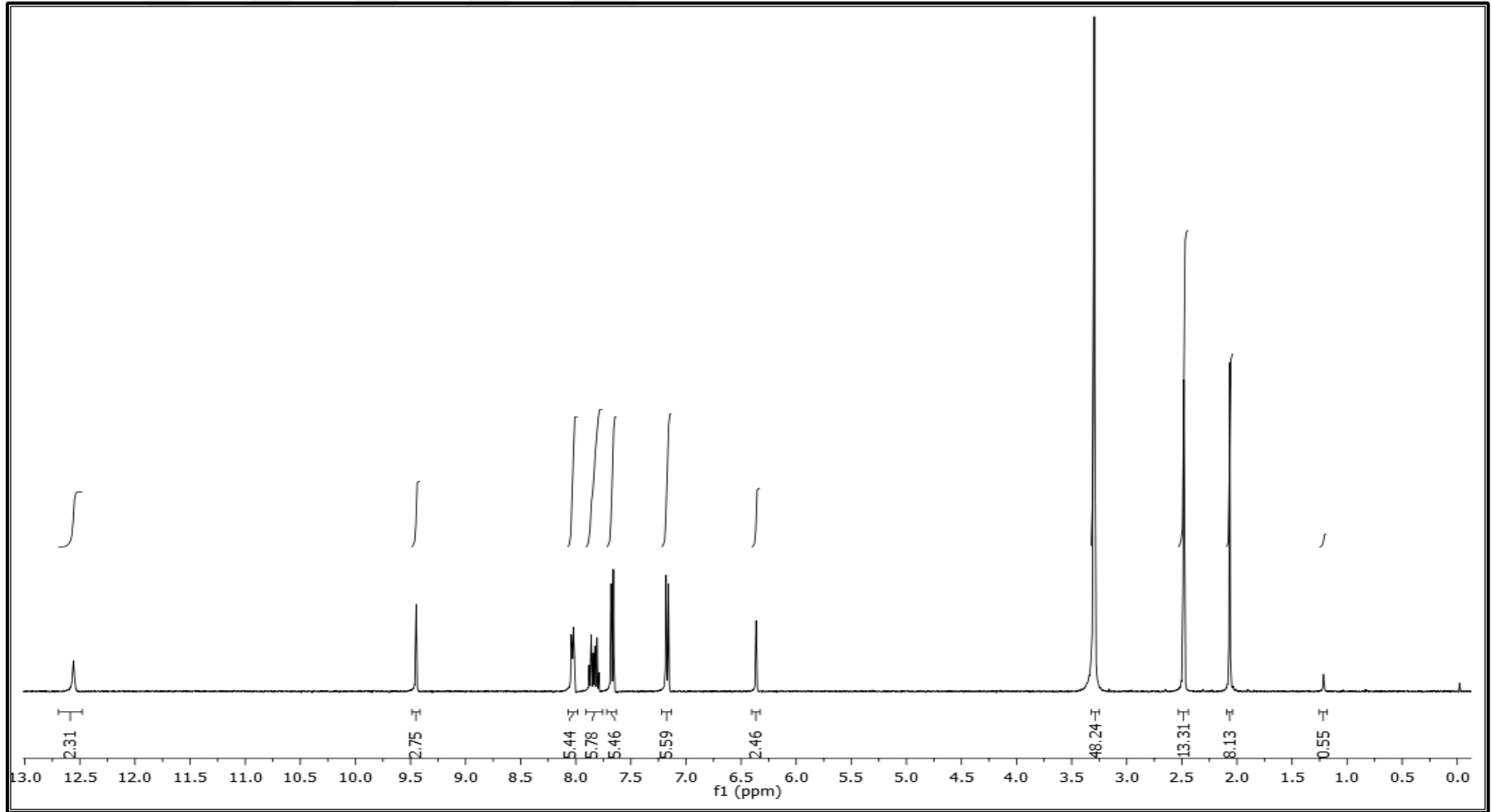
Spektrum 109. NS26 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu



Spektrum 110. NS26 kodlu bileşğin kütle spektrumu



Spektrum 111. NS28 kodlu bileşğin IR spektrumu

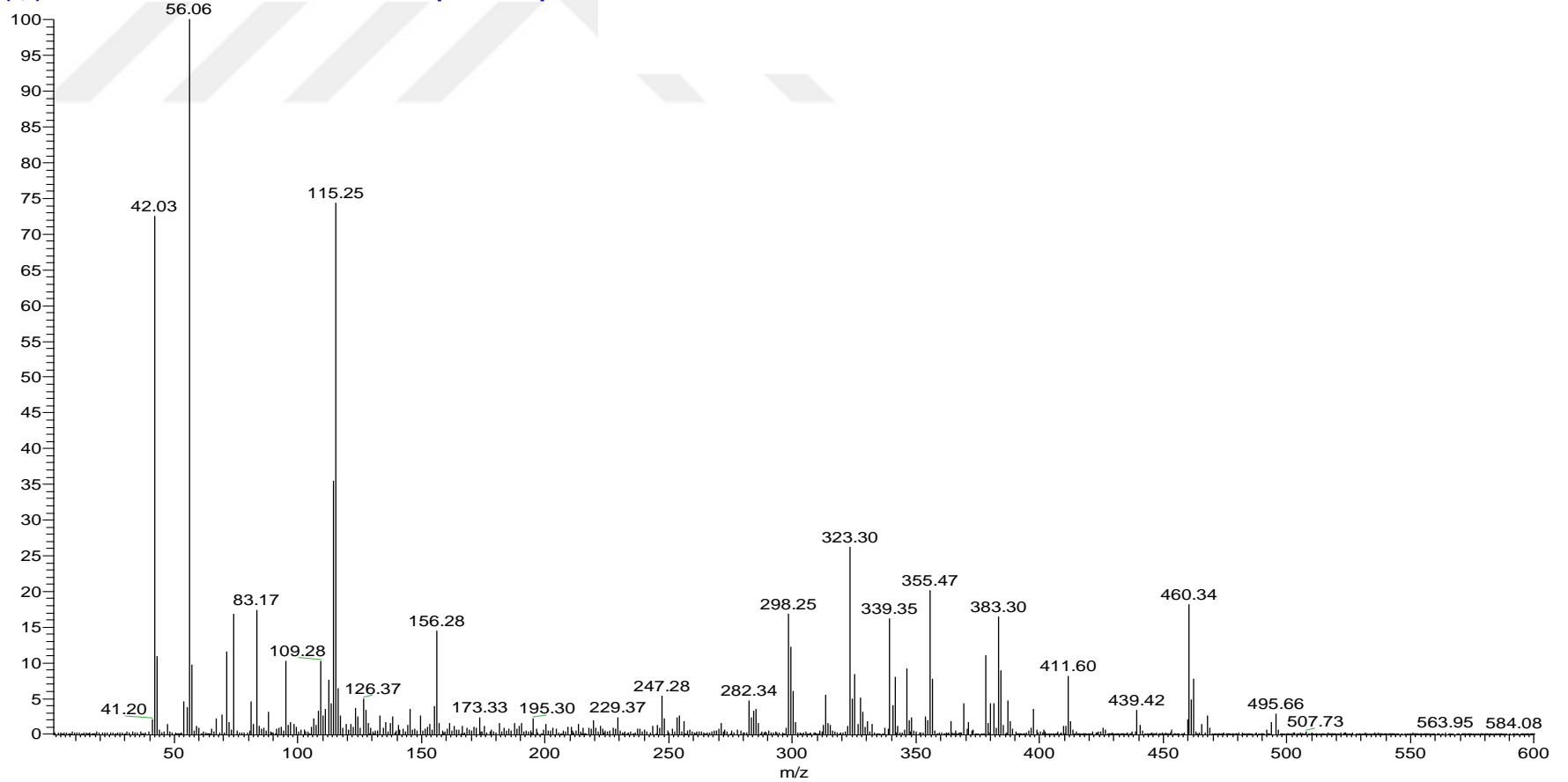


Spektrum 112. NS28 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu

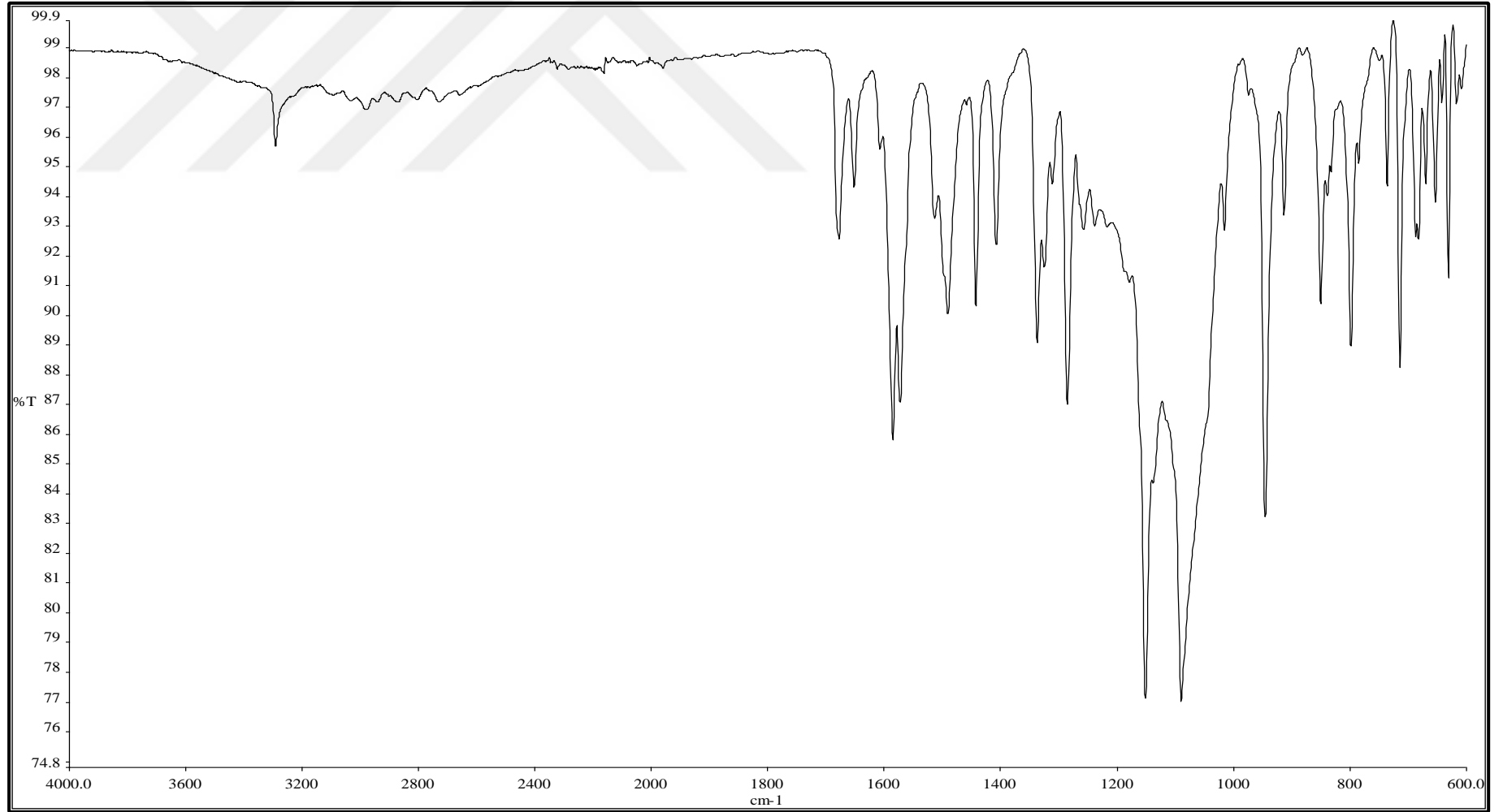
C:\Xcalibur...\2017 11 14\NS28

11/14/2017 11:43:35 AM

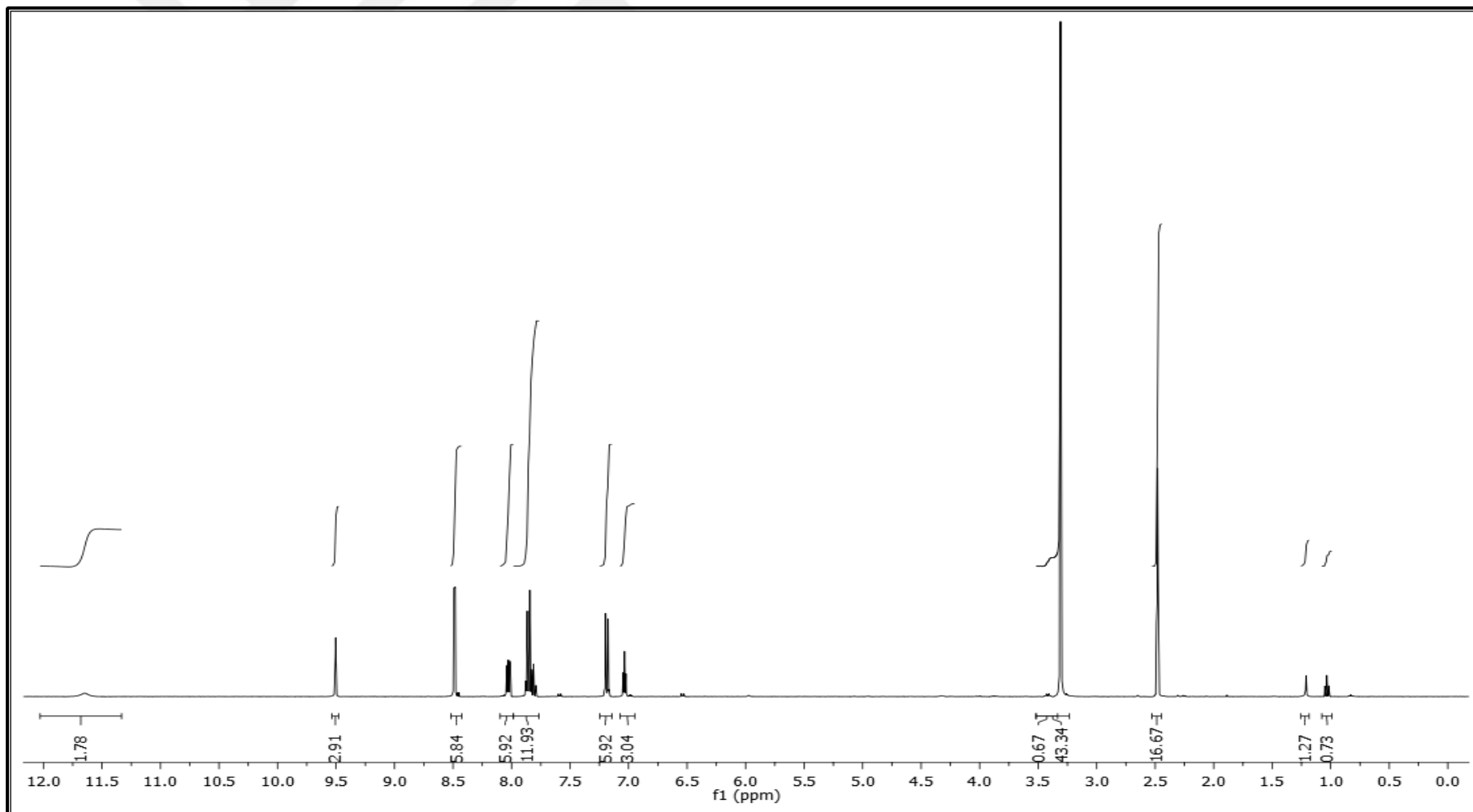
NS28 #40 RT: 0.36 AV: 1 NL: 6.02E5
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 113. NS28 kodlu bileşğin kütle spektrumu



Spektrum 114. NS29 kodlu bileşigin IR spektrumu

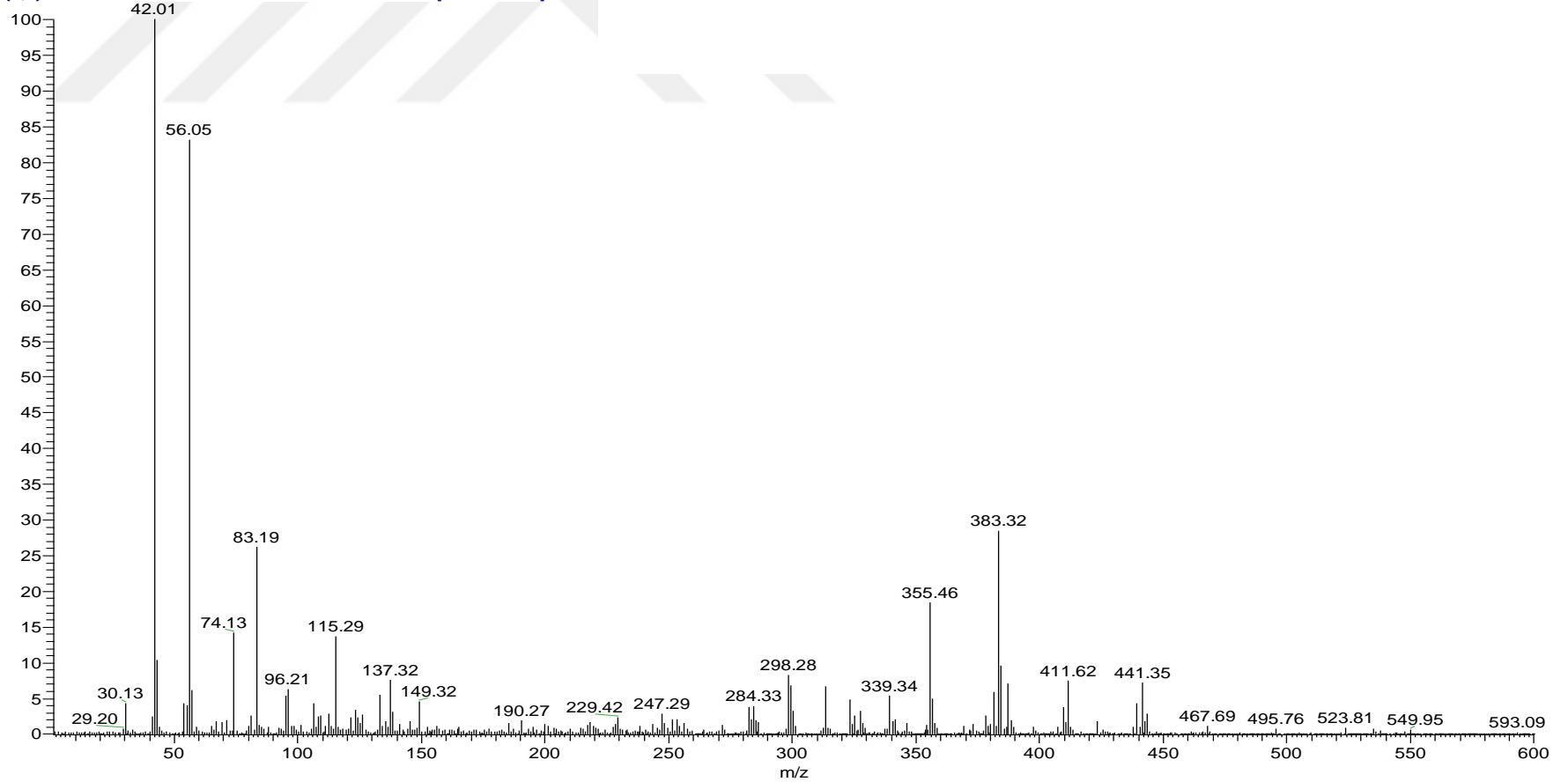


Spektrum 115. NS29 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu

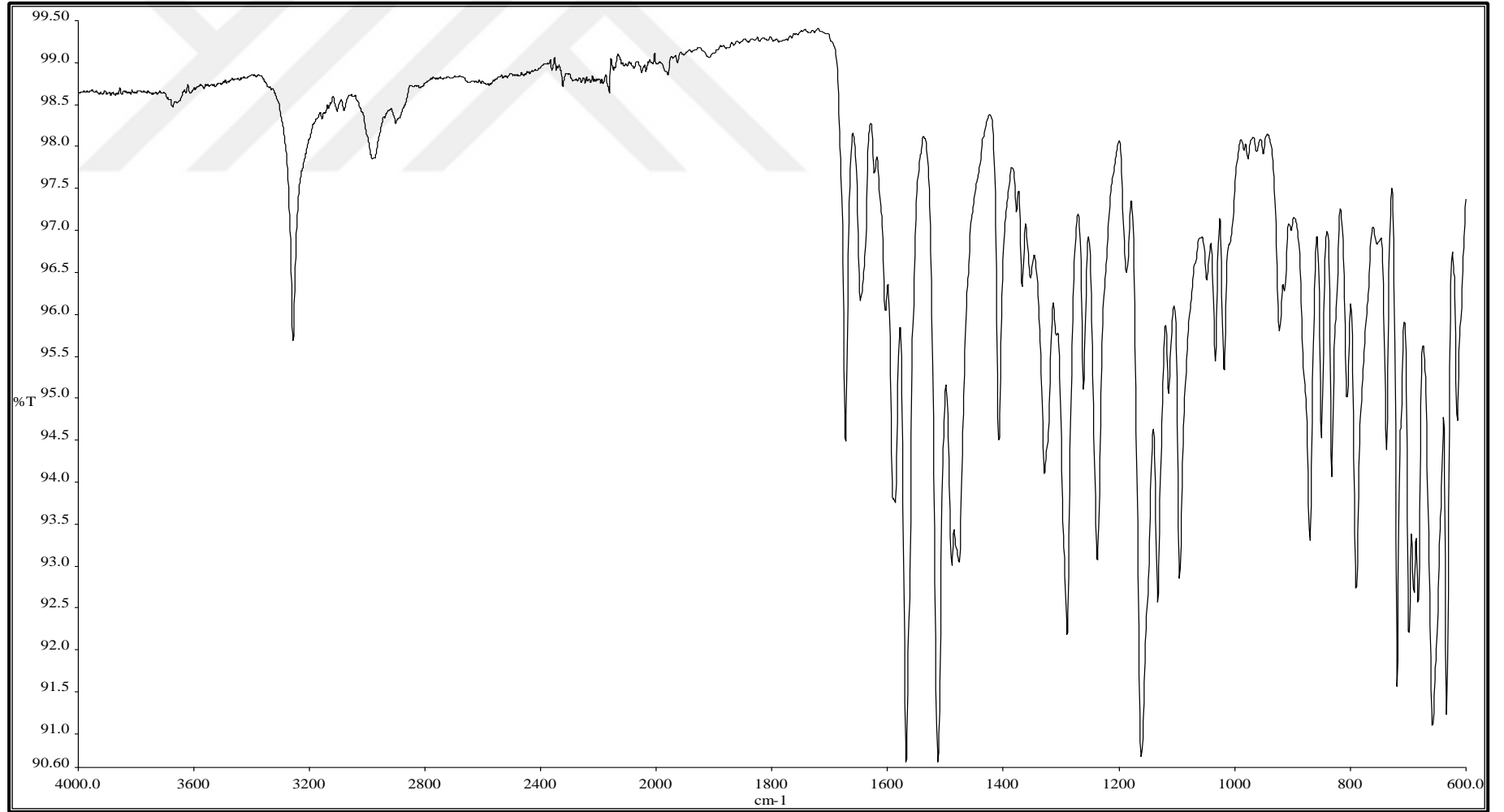
C:\Xcalibur...\2017 11 14\NS29

11/14/2017 11:48:37 AM

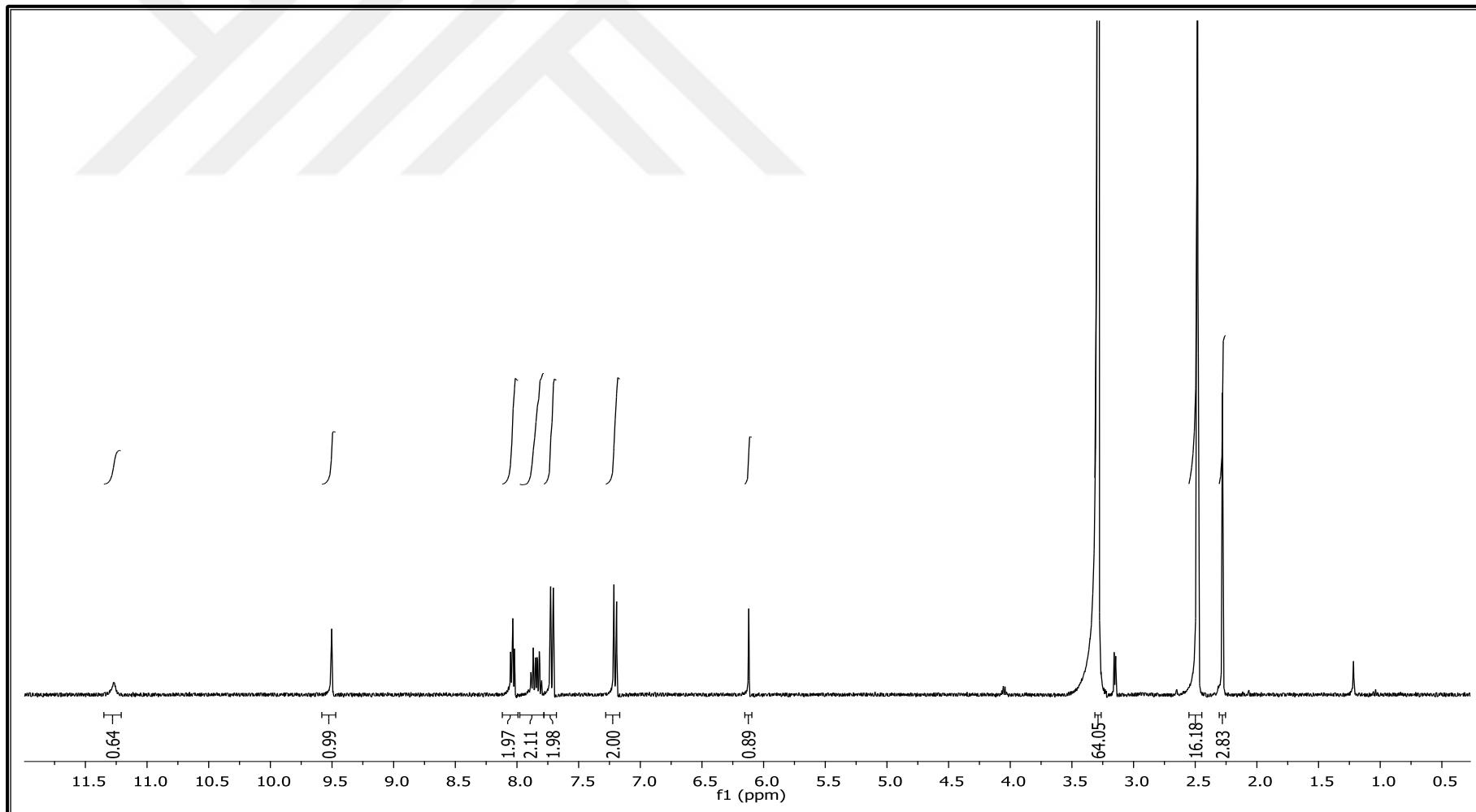
NS29 #39 RT: 0.35 AV: 1 NL: 5.54E5
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 116. NS29 kodlu bileşiğin kütle spektrumu



Spektrum 117. NS30 kodlu bileşğin IR spektrumu

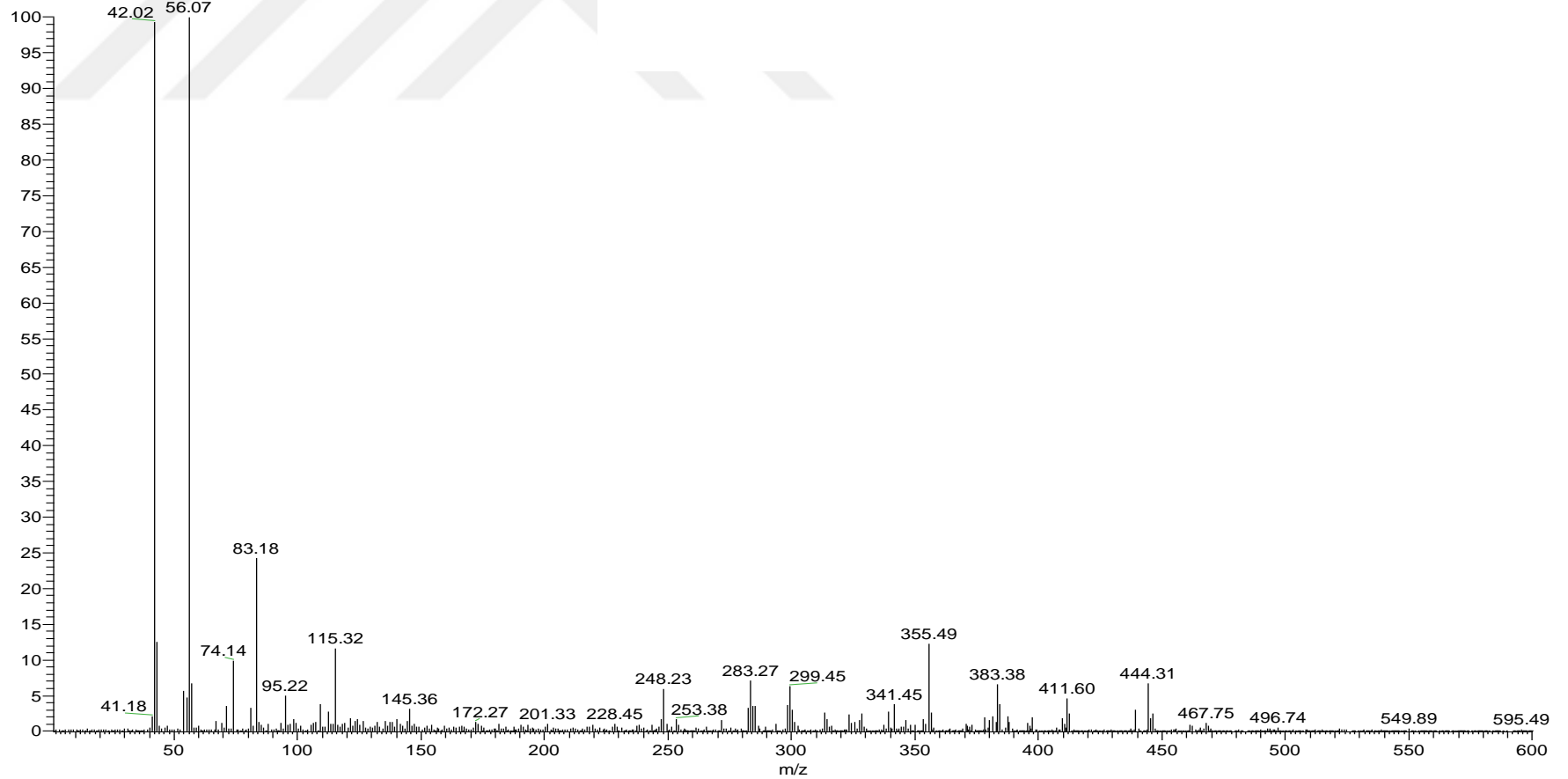


Spektrum 118. NS30 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu

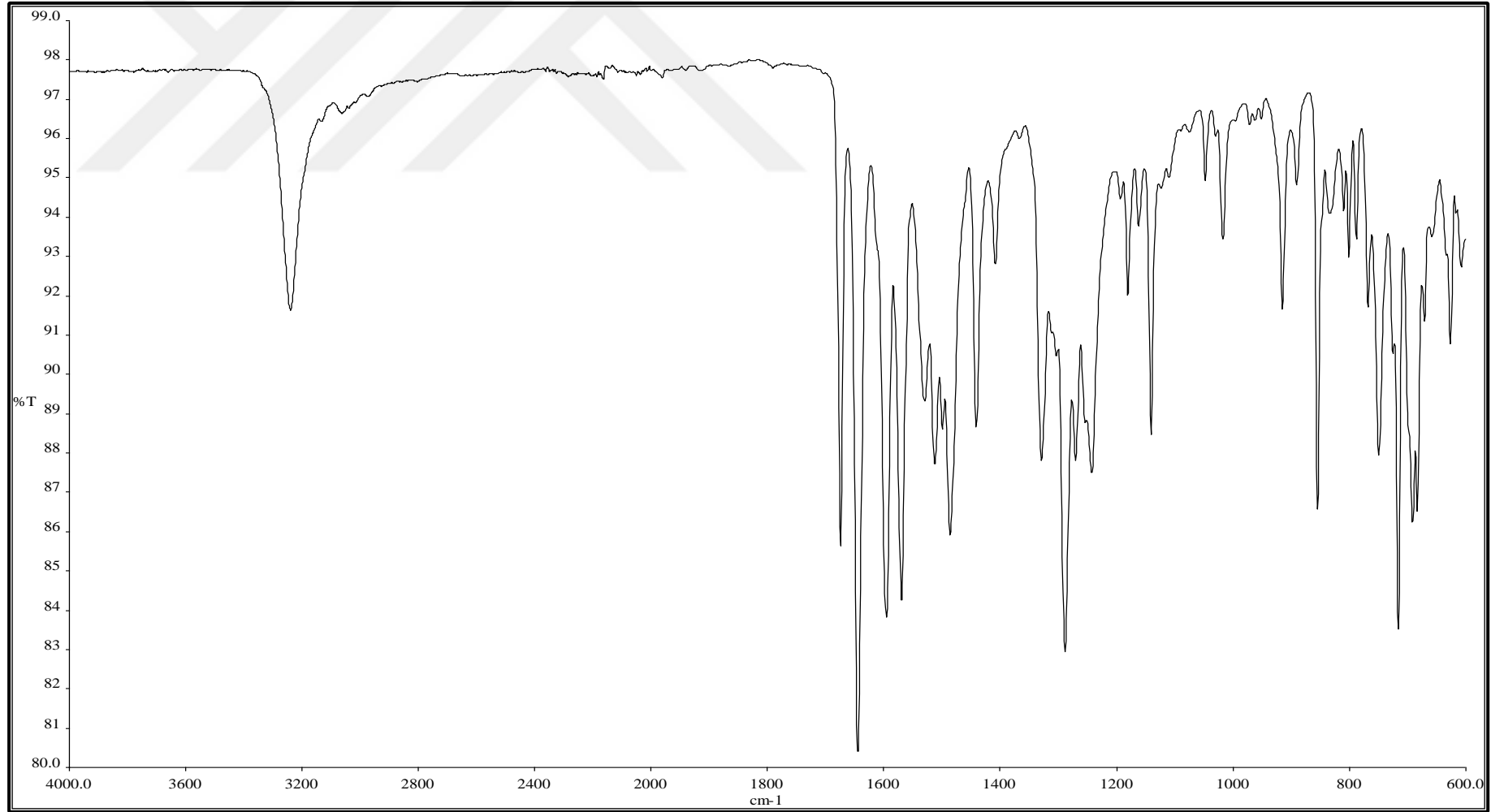
C:\Xcalibur\...\2017 11 14\NS30

11/14/2017 11:53:39 AM

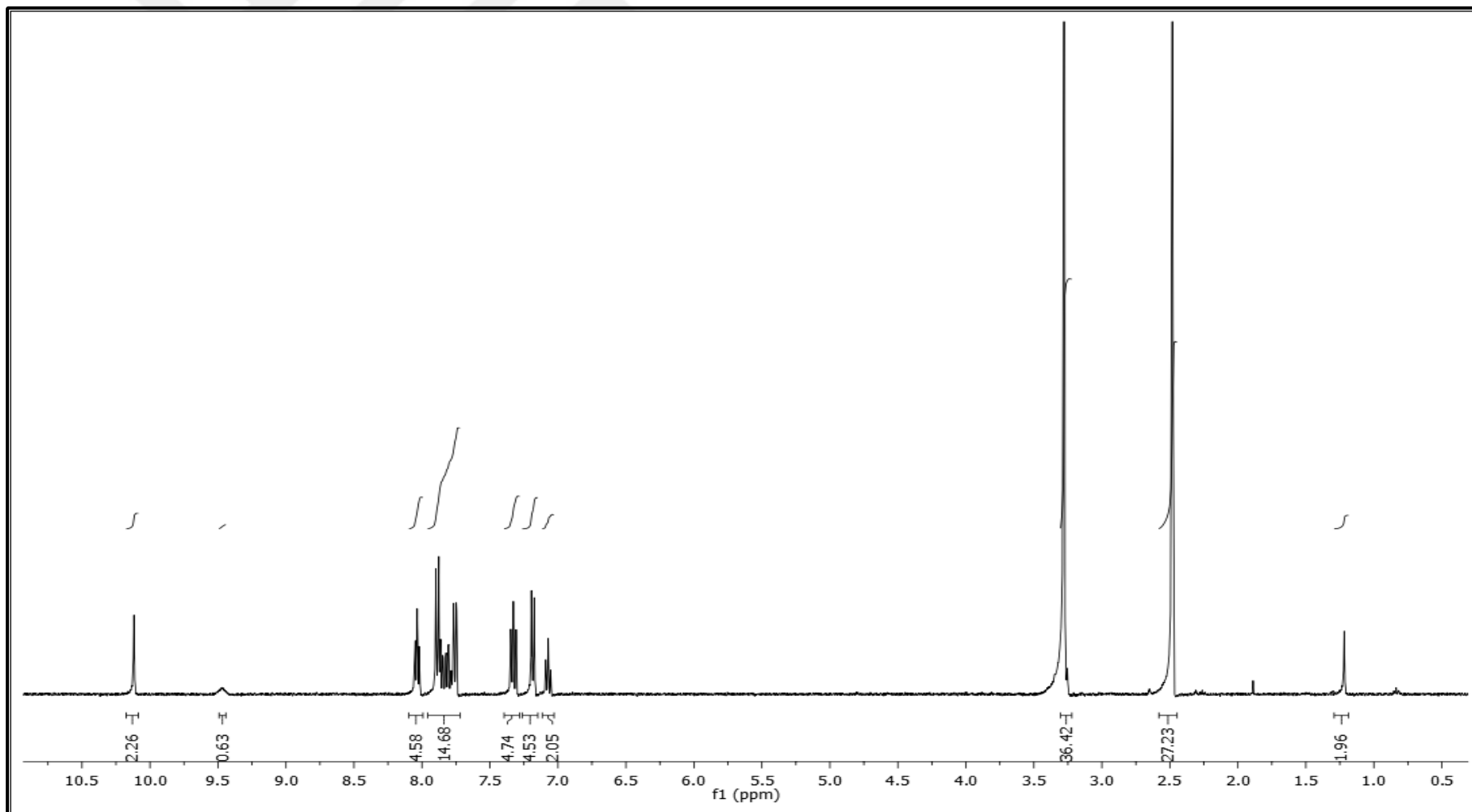
NS30 #38 RT: 0.34 AV: 1 NL: 6.79E5
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 119. NS30 kodlu bileşğin kütle spektrumu



Spektrum 120. NK1 kodlu bileşigin IR spektrumu

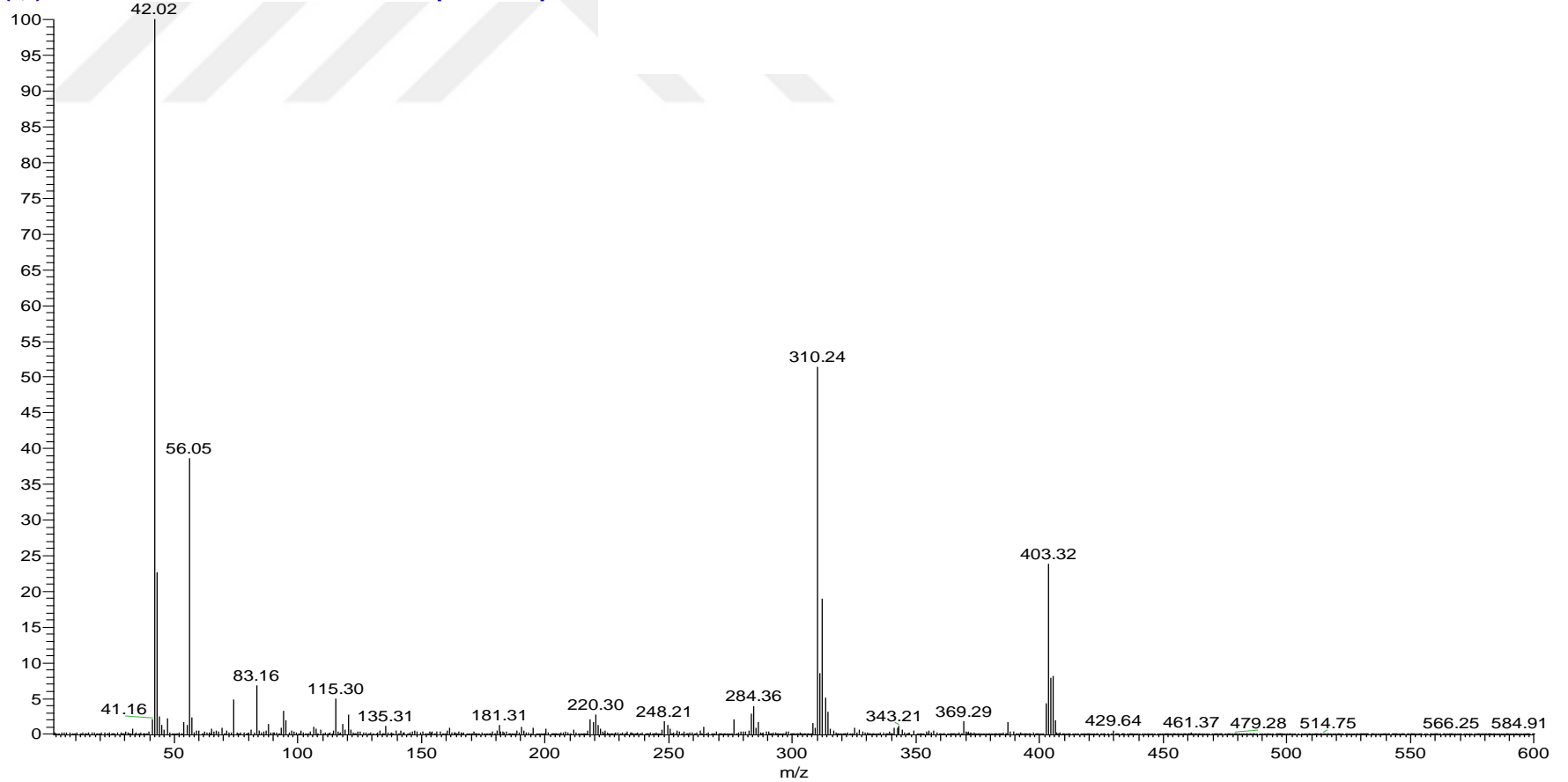


Spektrum 121. NK1 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu

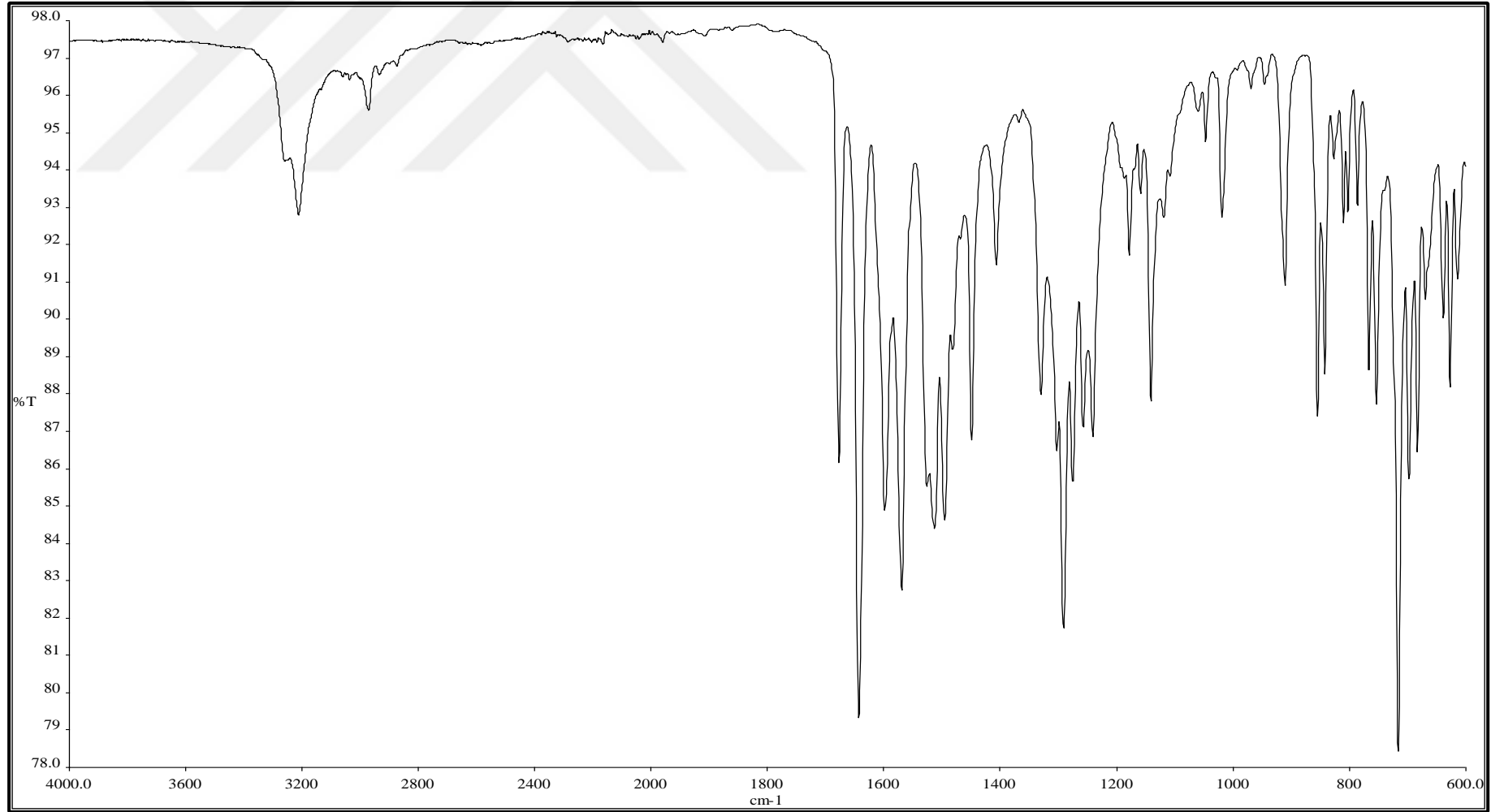
C:\Xcalibur\...2017 11 14\NK1

11/14/2017 9:14:11 AM

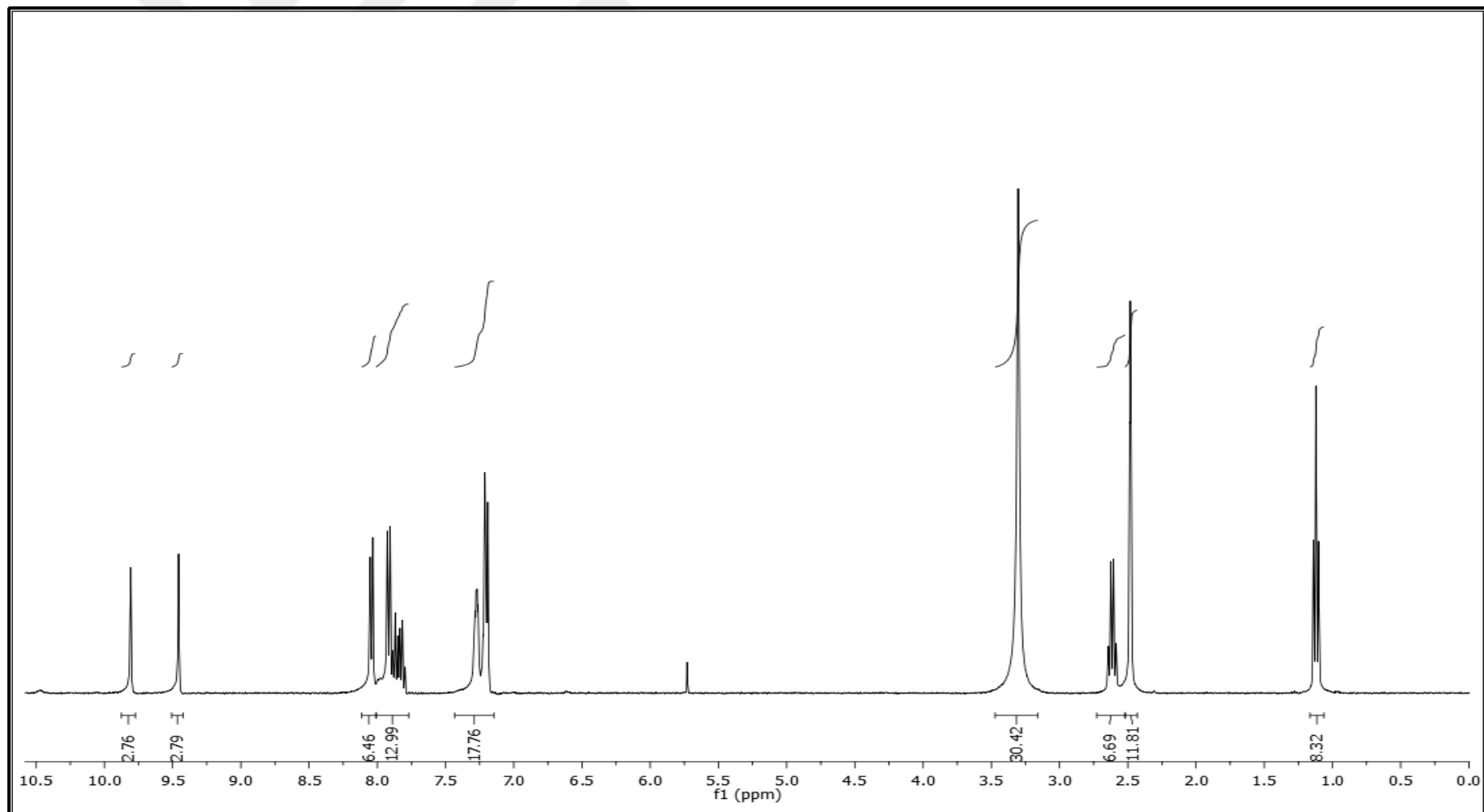
NK1 #40 RT: 0.36 AV: 1 NL: 8.88E5
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 122. NK1 kodlu bileşğin kütle spektrumu



Spektrum 123. NK2 kodlu bileşigin IR spektrumu

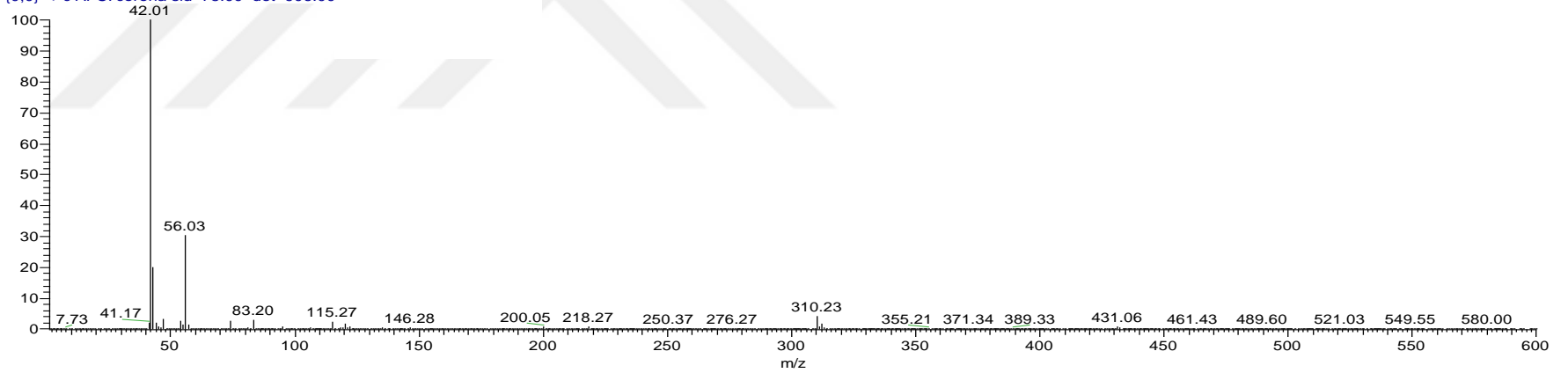


Spektrum 124. NK2 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu

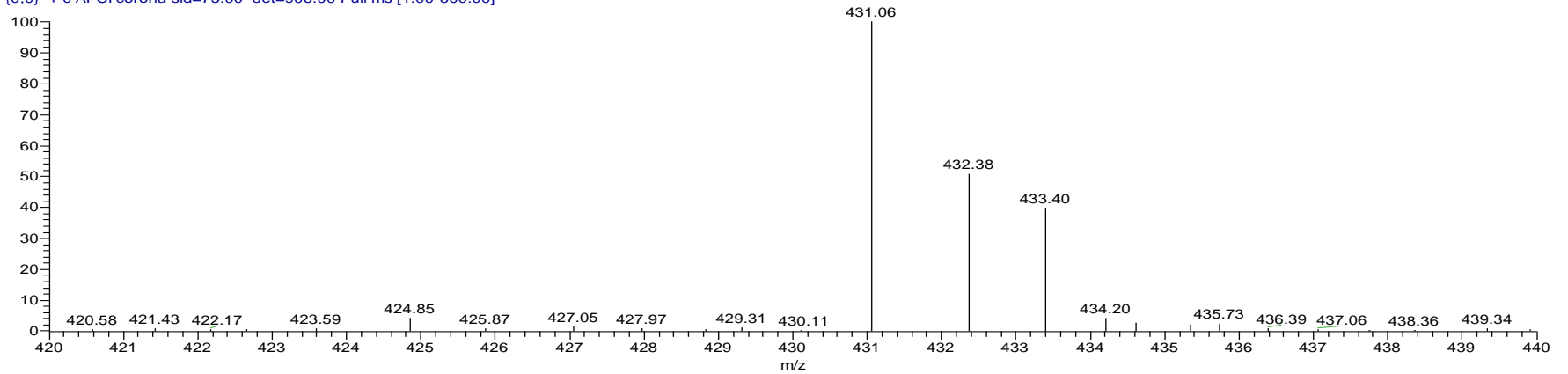
C:\Xcalibur\...\2017 11 14\NK2

11/14/2017 9:19:09 AM

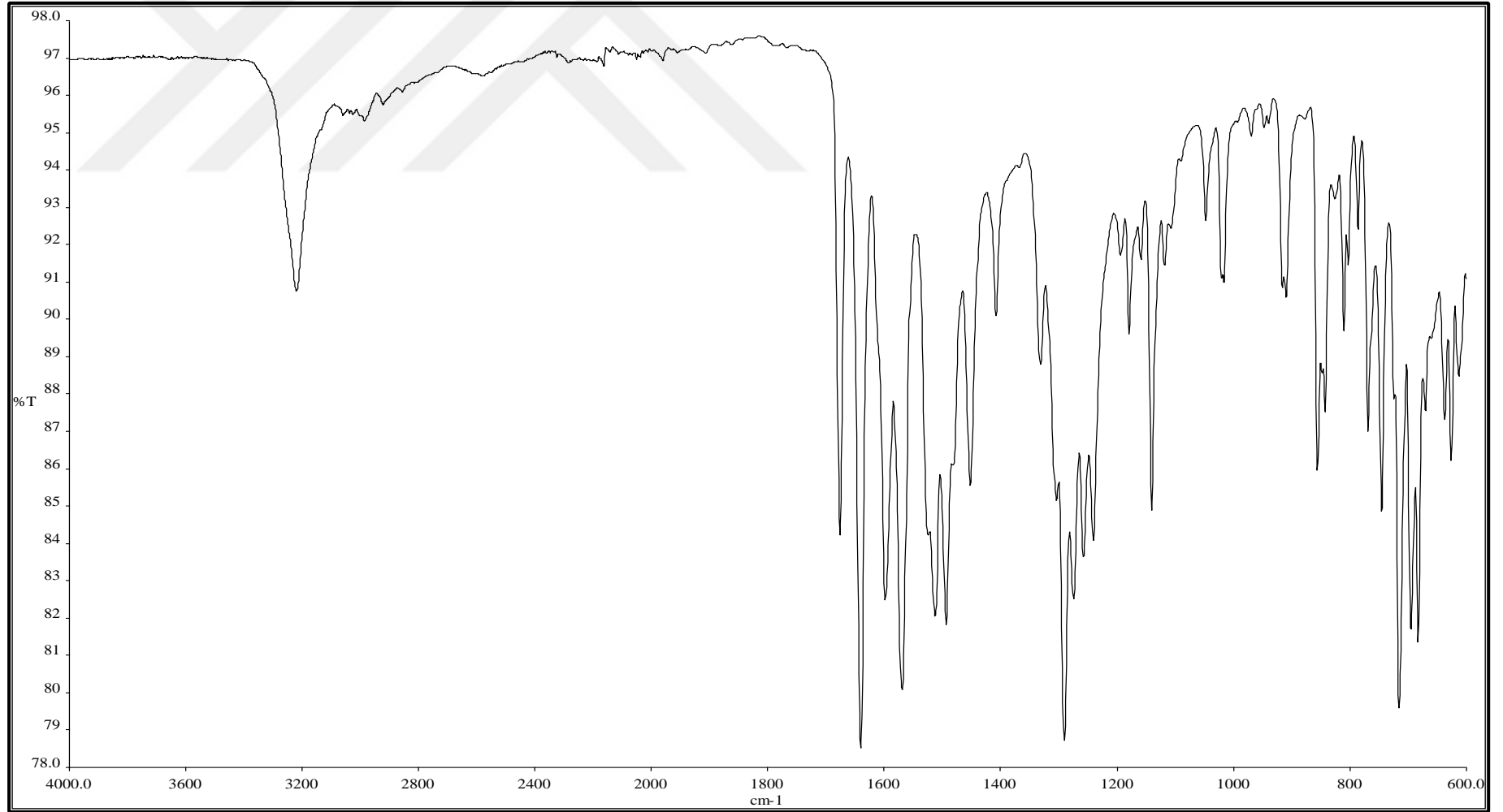
NK2 #42 RT: 0.37 AV: 1 NL: 3.33E6
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00



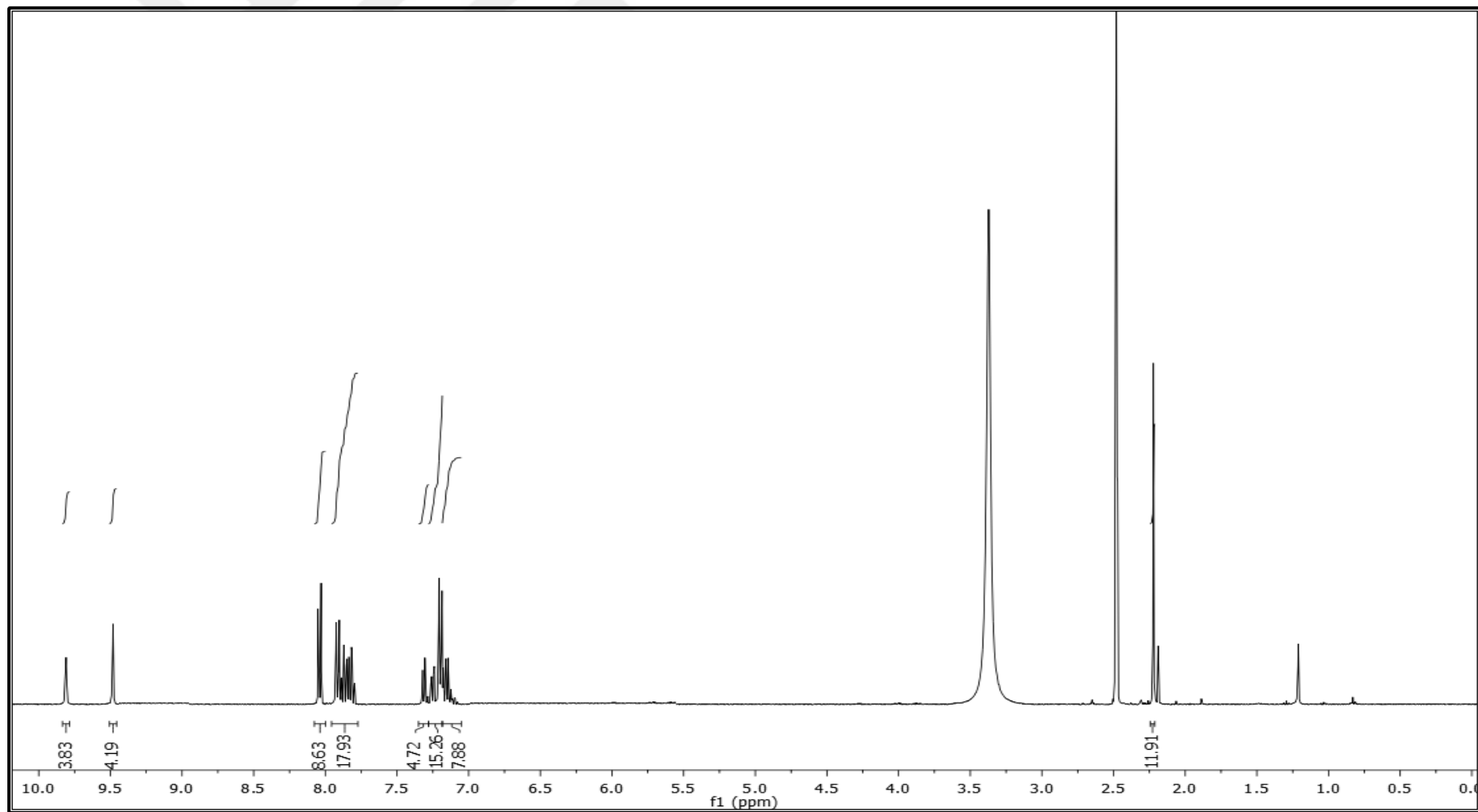
NK2 #42 RT: 0.37 AV: 1 NL: 2.49E4
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 125. NK2 kodlu bileşigin kütle spektrumu



Spektrum 126. NK4 kodlu bileşigin IR spektrumu

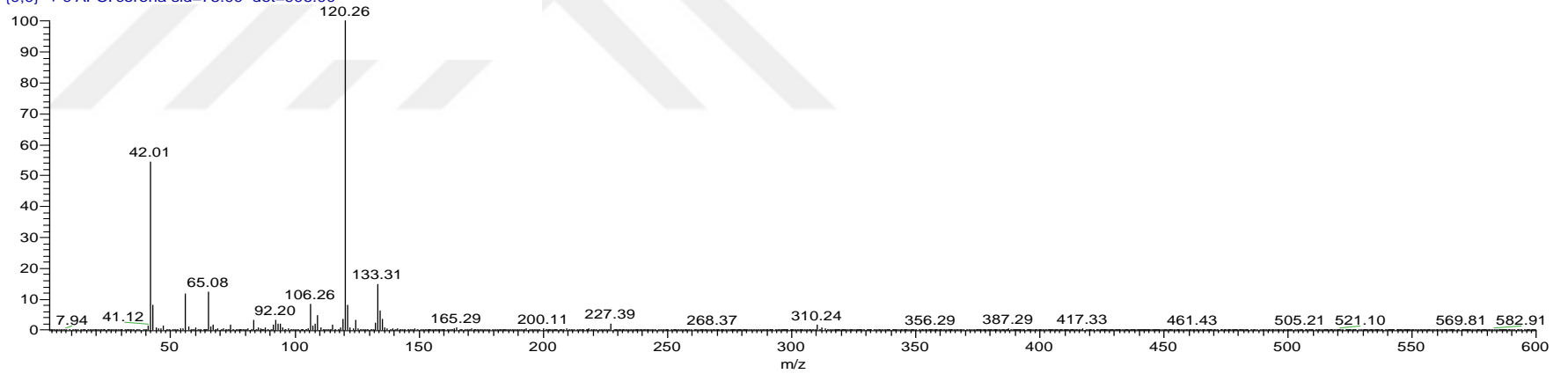


Spektrum 127. NK4 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu

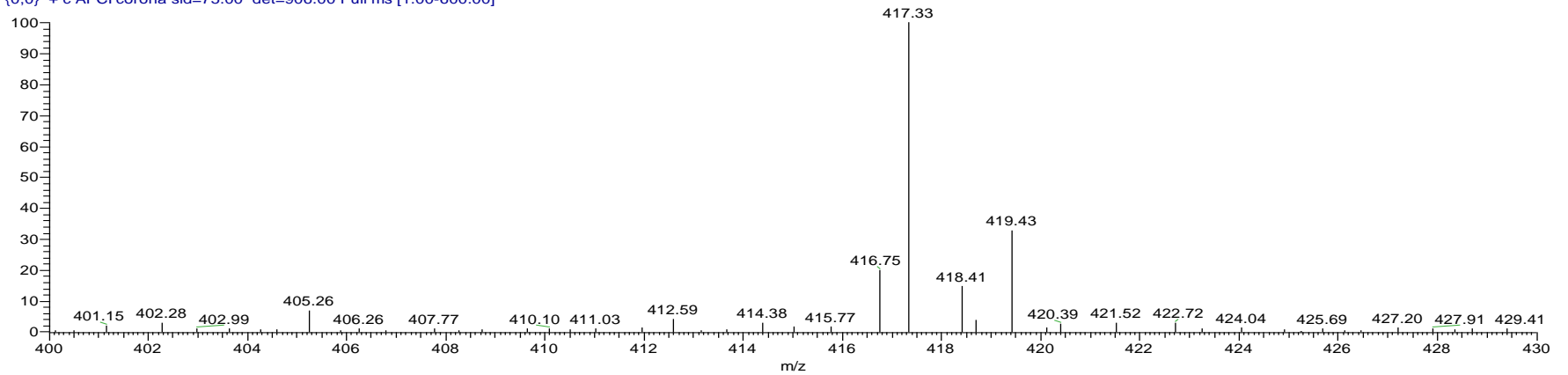
C:\Xcalibur\...\2017 11 14\NK4

11/14/2017 9:24:05 AM

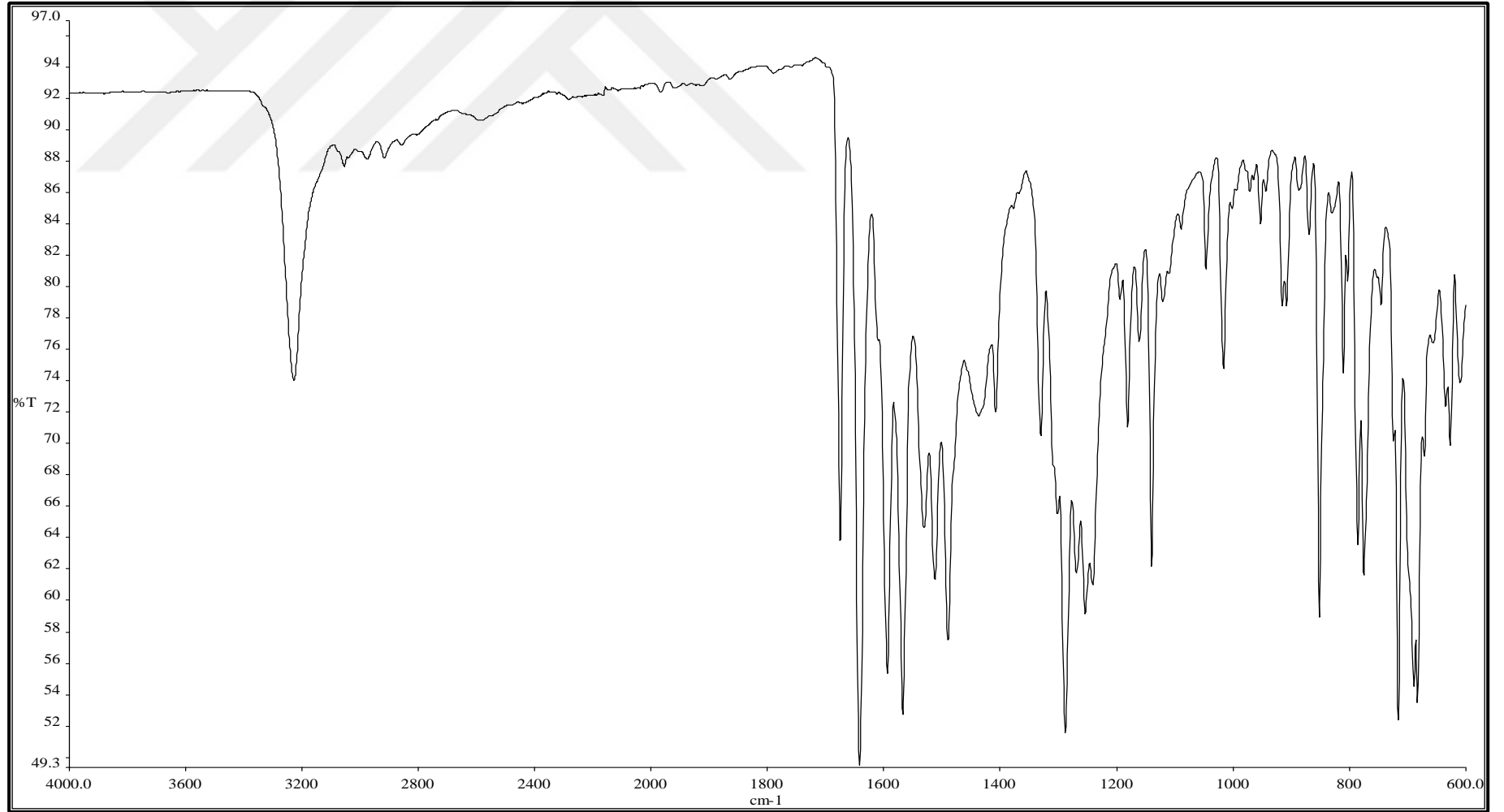
NK4 #41 RT: 0.36 AV: 1 NL: 3.30E6
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00



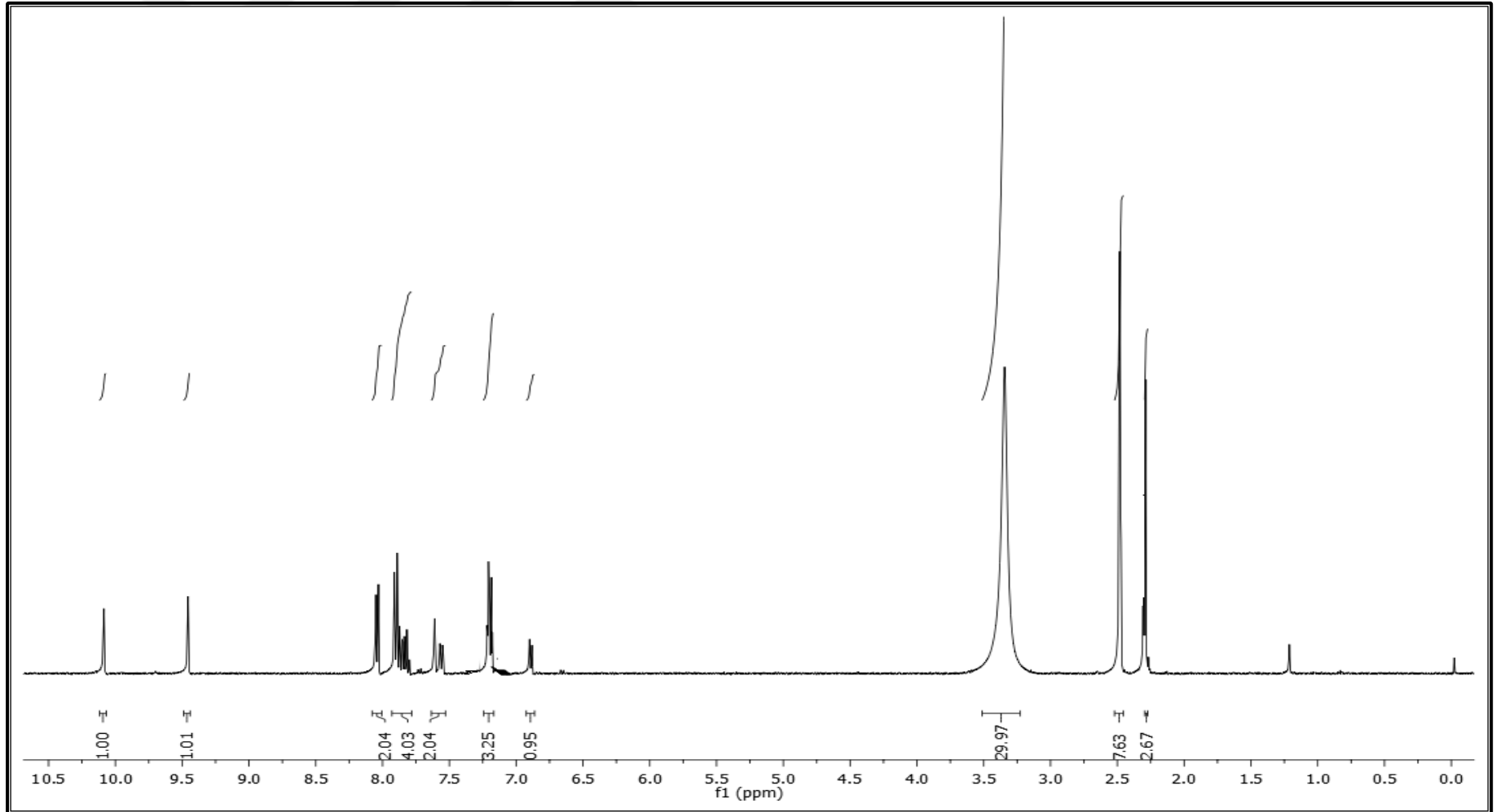
NK4 #41 RT: 0.36 AV: 1 NL: 1.53E4
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 128. NK4 kodlu bileşğin kütle spektrumu



Spektrum 129. NK5 kodlu bileşigin IR spektrumu



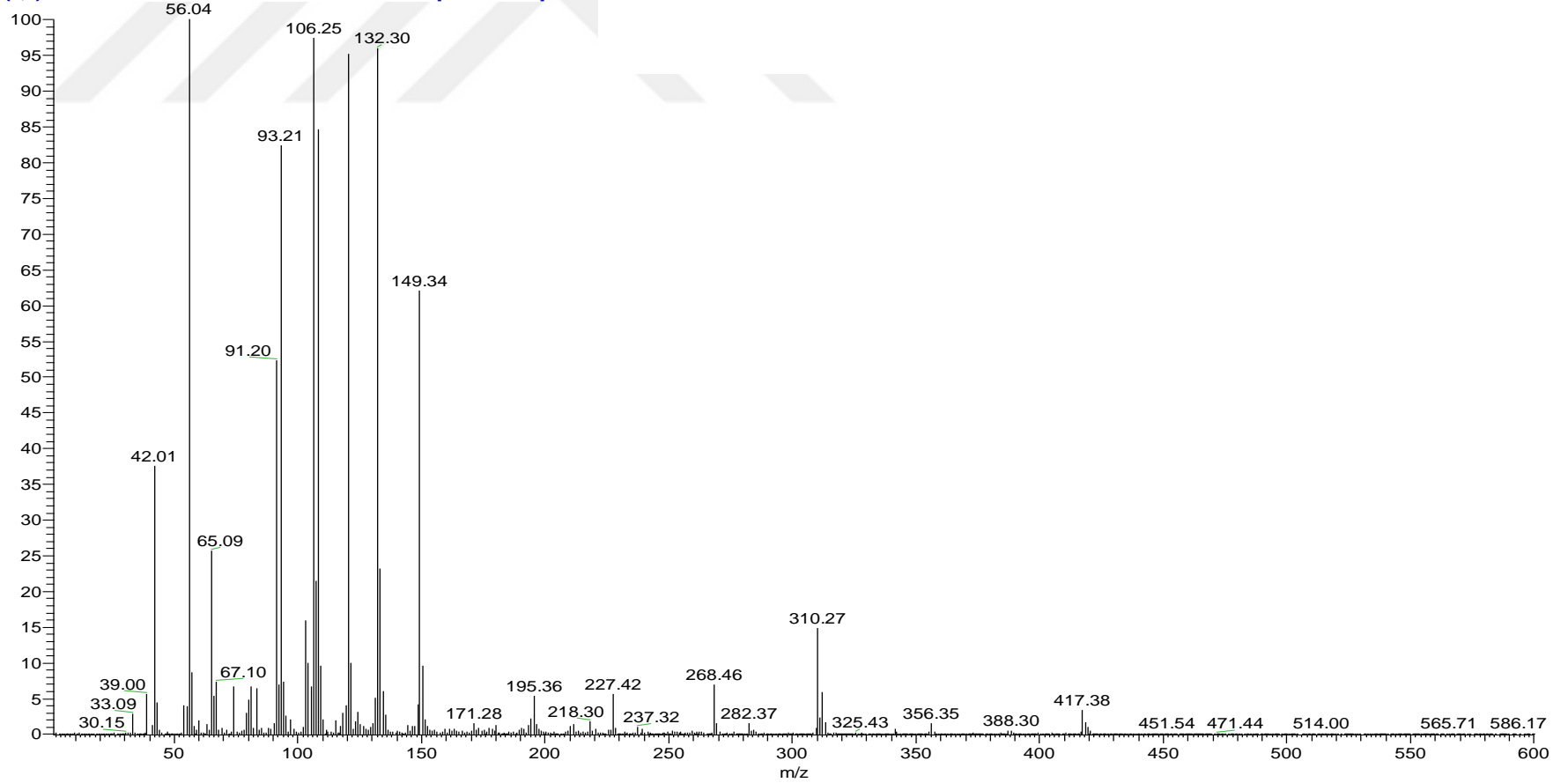
Spektrum 130. NK5 kodlu bileşiğin ¹H NMR spektrumu

C:\Xcalibur...\2017 11 14\NK5

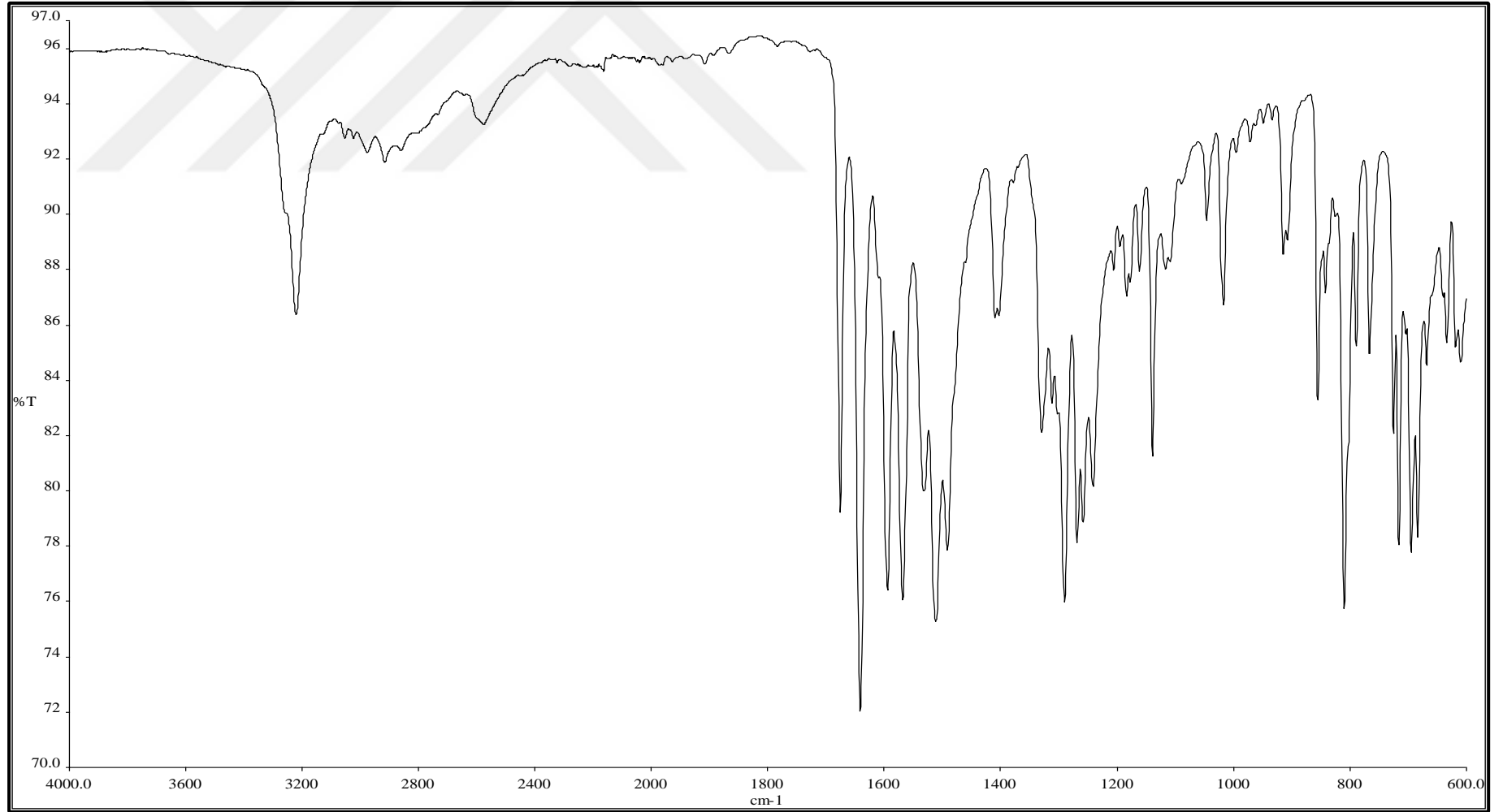
11/14/2017 9:29:03 AM

NK5 #41 RT: 0.36 AV: 1 NL: 1.14E6

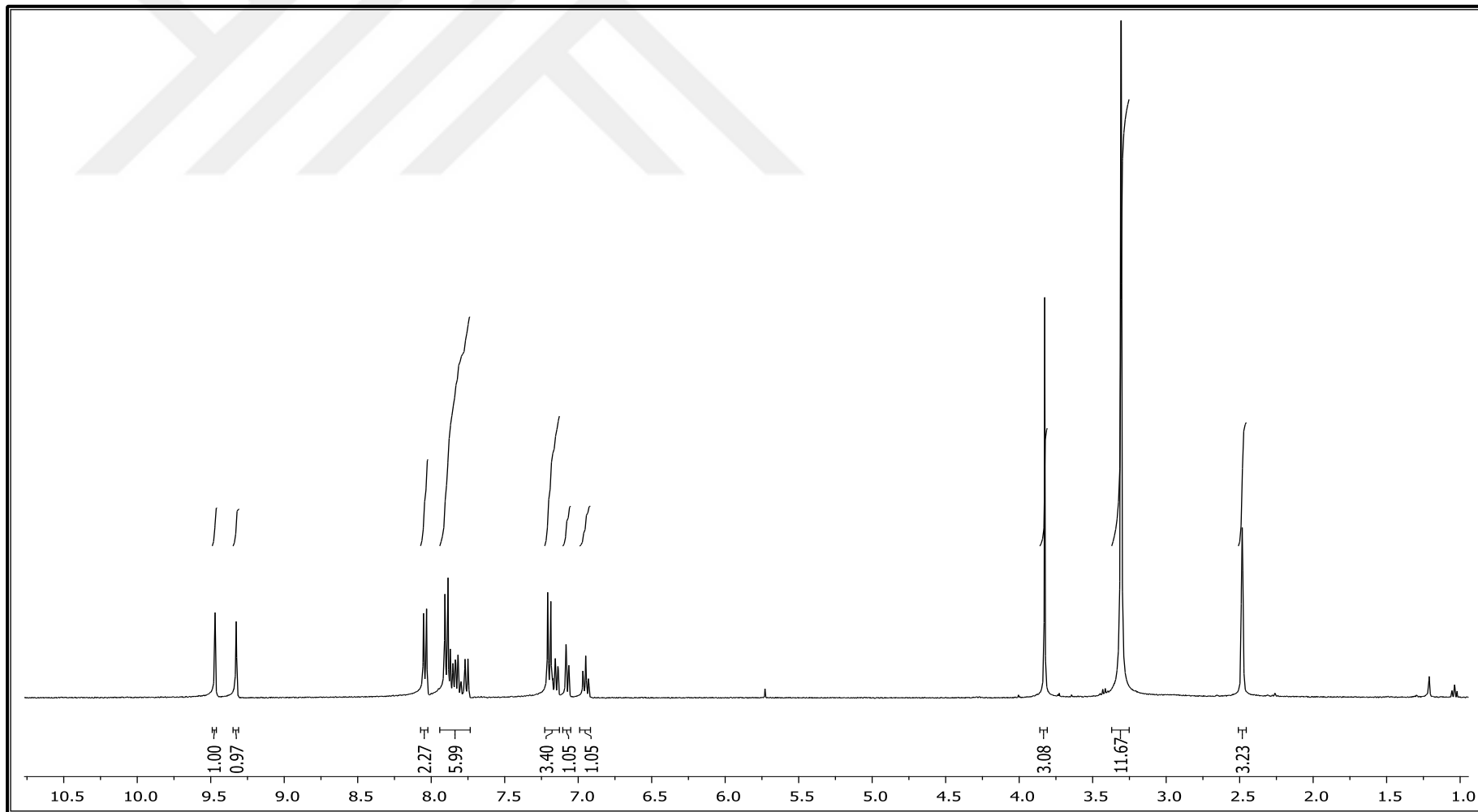
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 131. NK5 kodlu bileşğin kütle spektrumu



Spektrum 132. NK6 kodlu bileşigin IR spektrumu

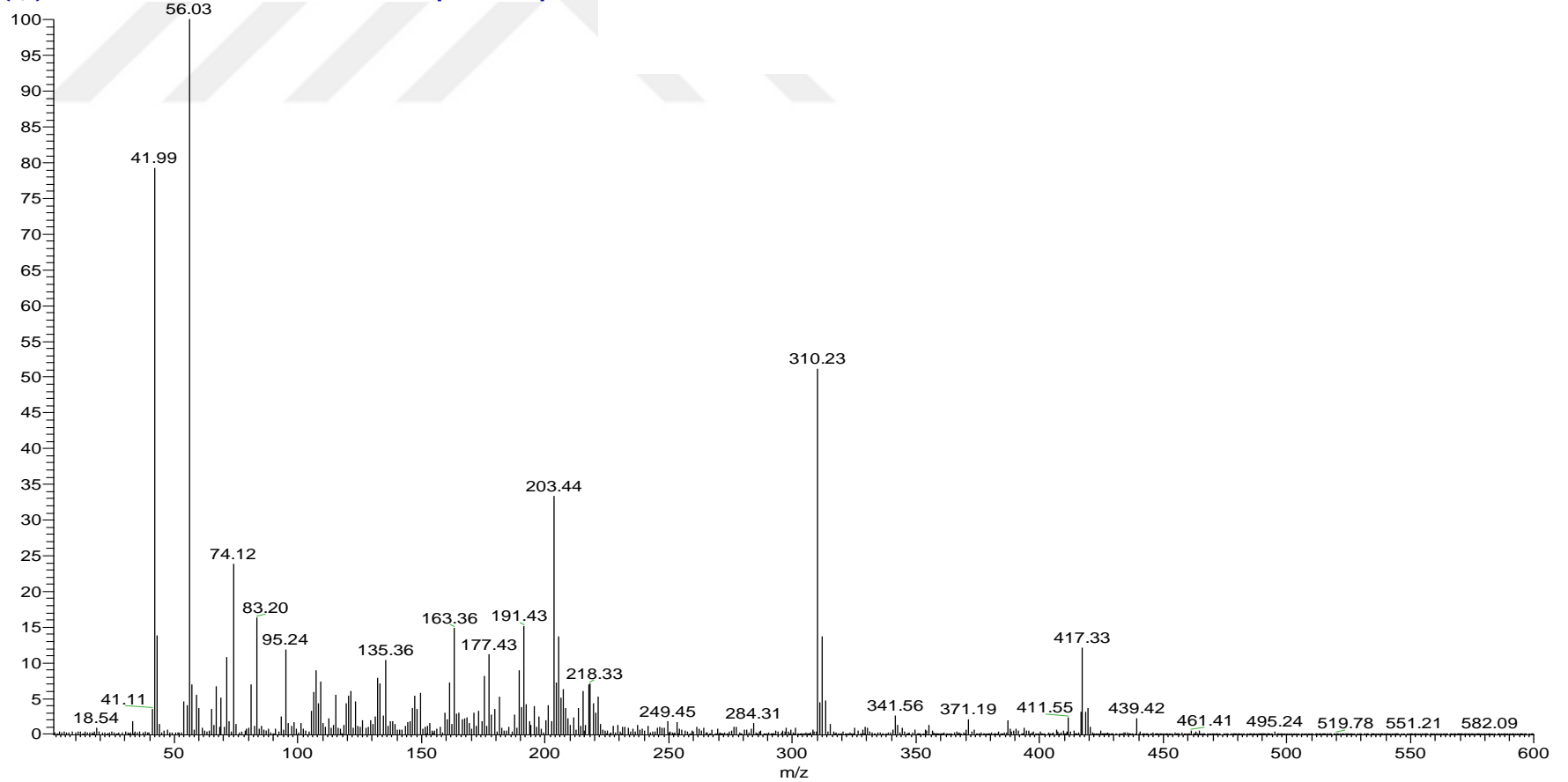


Spektrum 133. NK6 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu

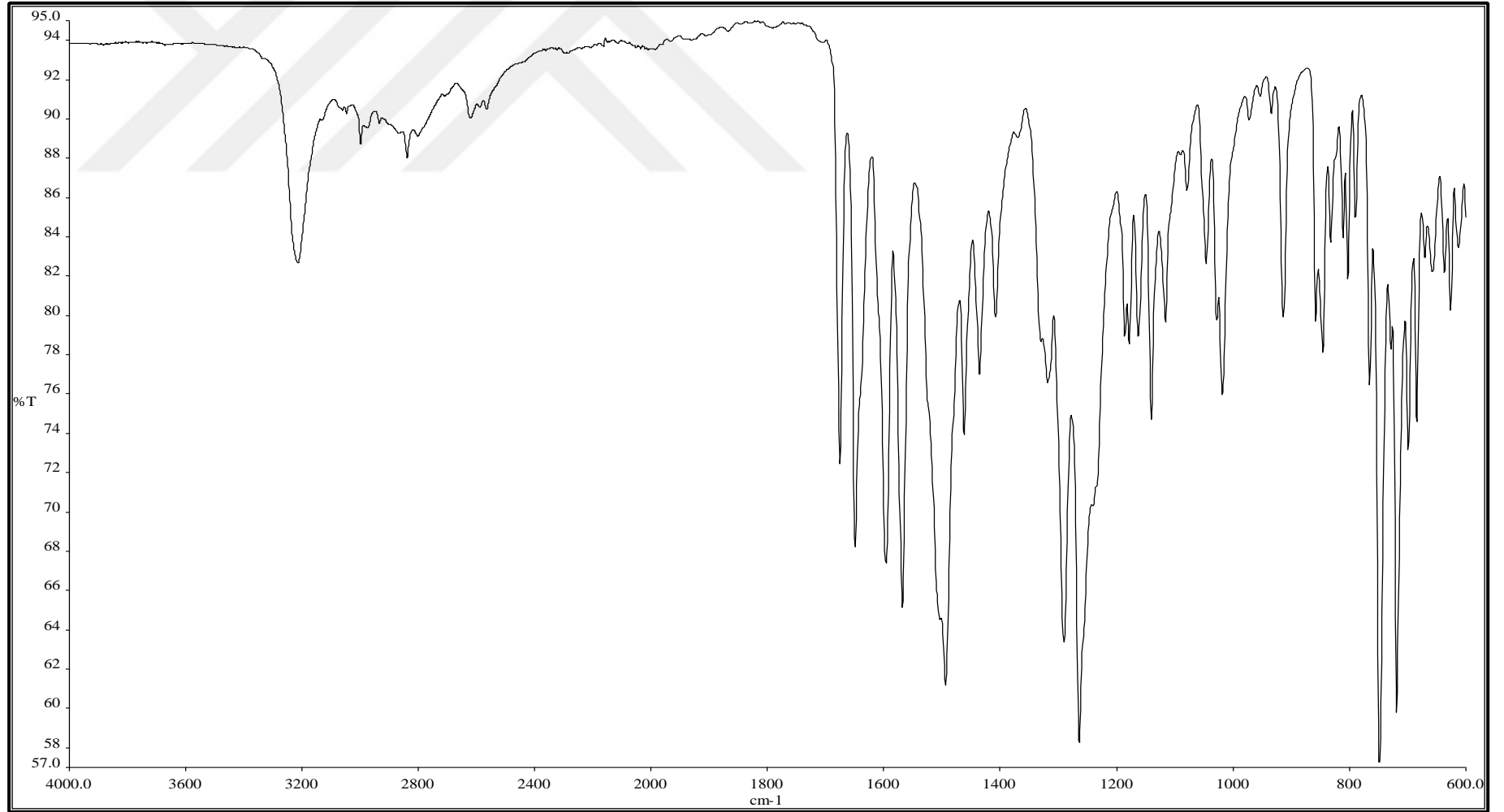
C:\Xcalibur\...2017 11 14\NK6

11/14/2017 9:34:01 AM

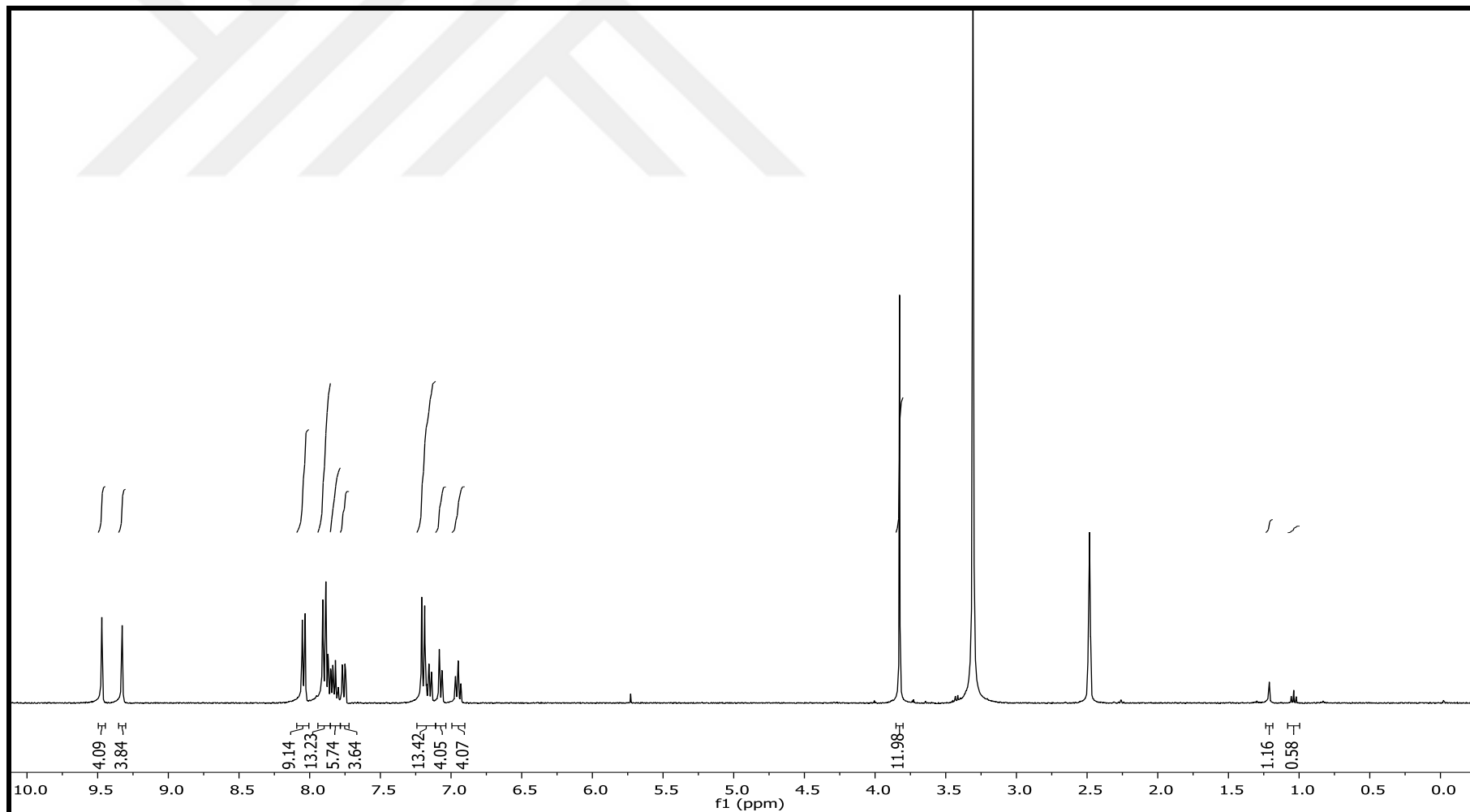
NK6 #40 RT: 0.36 AV: 1 NL: 5.23E5
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 134. NK6 kodlu bileşğin kütle spektrumu



Spektrum 135. NK7 kodlu bileşigin IR spektrumu

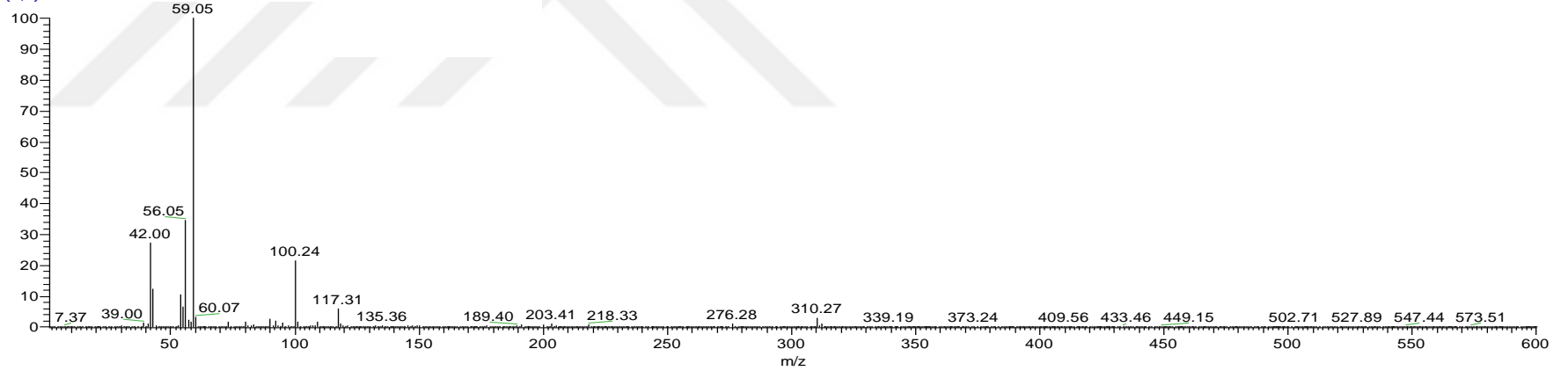


Spektrum 136. NK7 kodlu bileşiğin ¹H NMR spektrumu

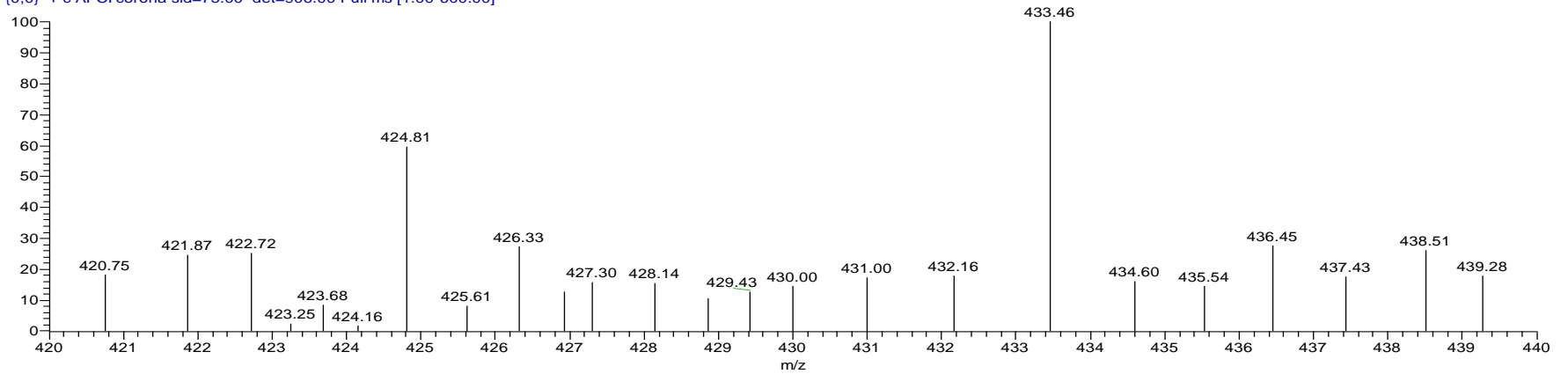
C:\Xcalibur...\2017 11 14\NK7

11/14/2017 9:38:57 AM

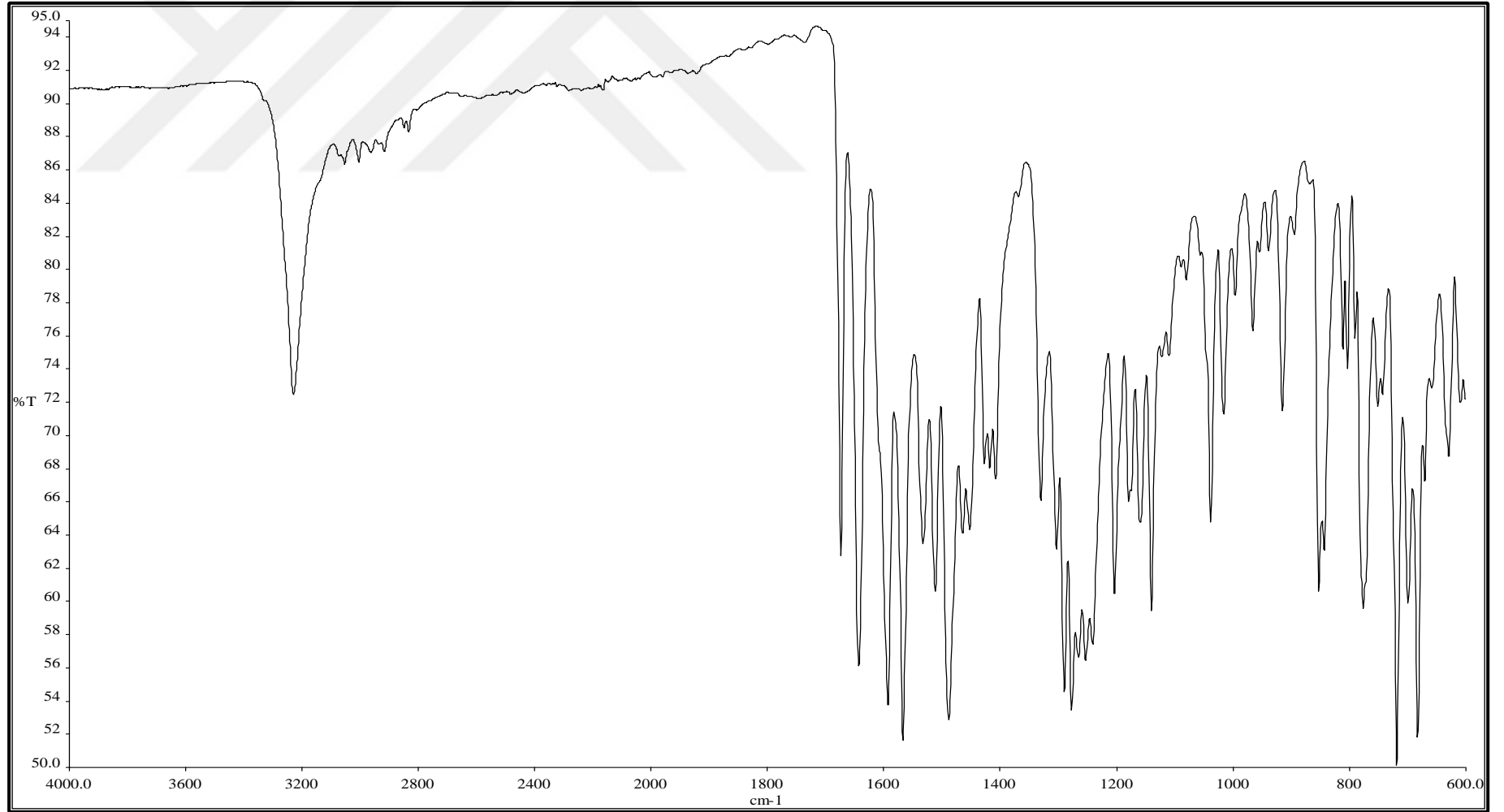
NK7 #58 RT: 0.52 AV: 1 NL: 2.82E6
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00



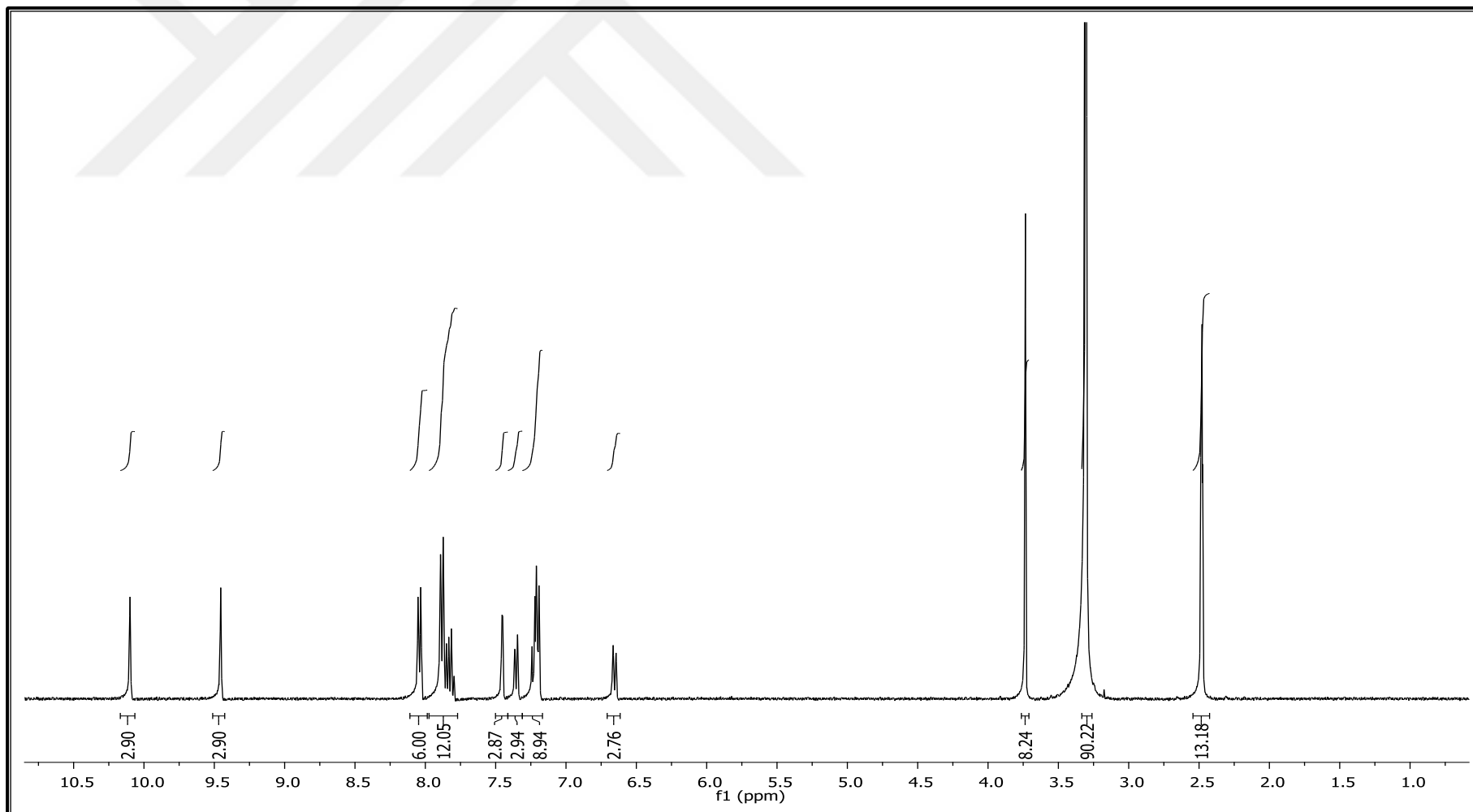
NK7 #58 RT: 0.52 AV: 1 NL: 1.73E3
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 137. NK7 kodlu bileşigin kütle spektrumu



Spektrum 138. NK8 kodlu bileşigin IR spektrumu

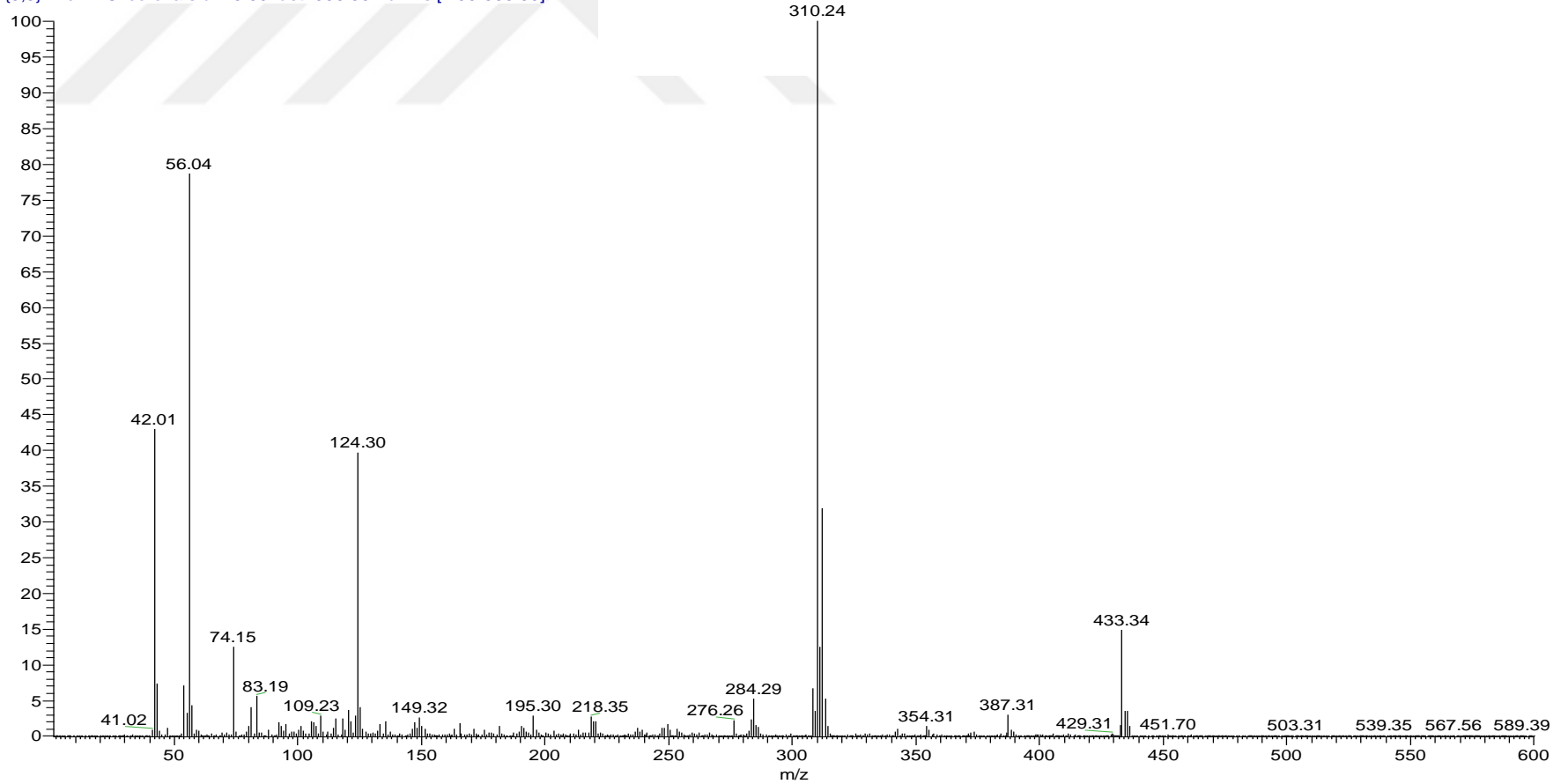


Spektrum 139. NK8 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu

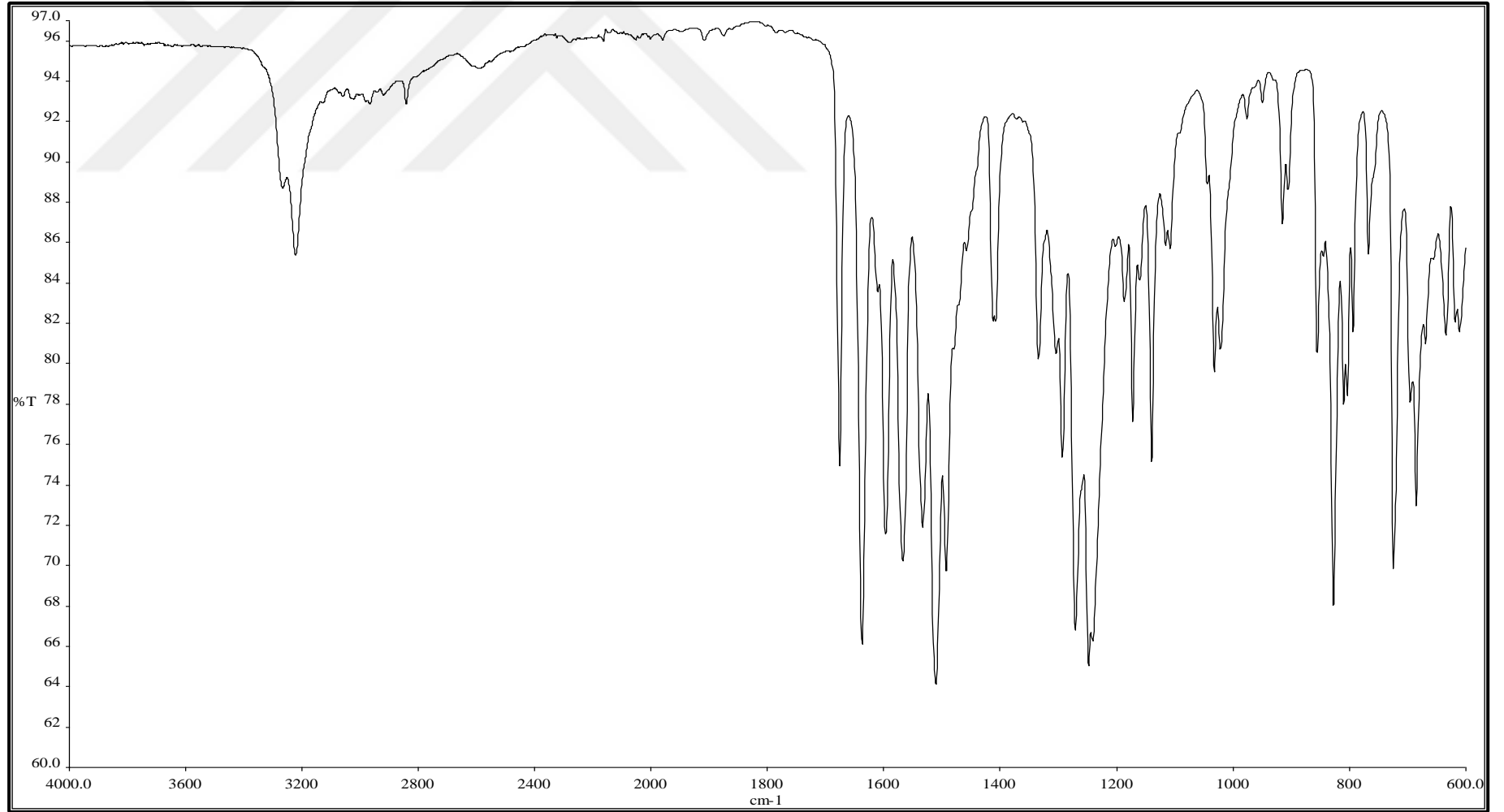
C:\Xcalibur\...2017 11 14\NK8

11/14/2017 9:43:55 AM

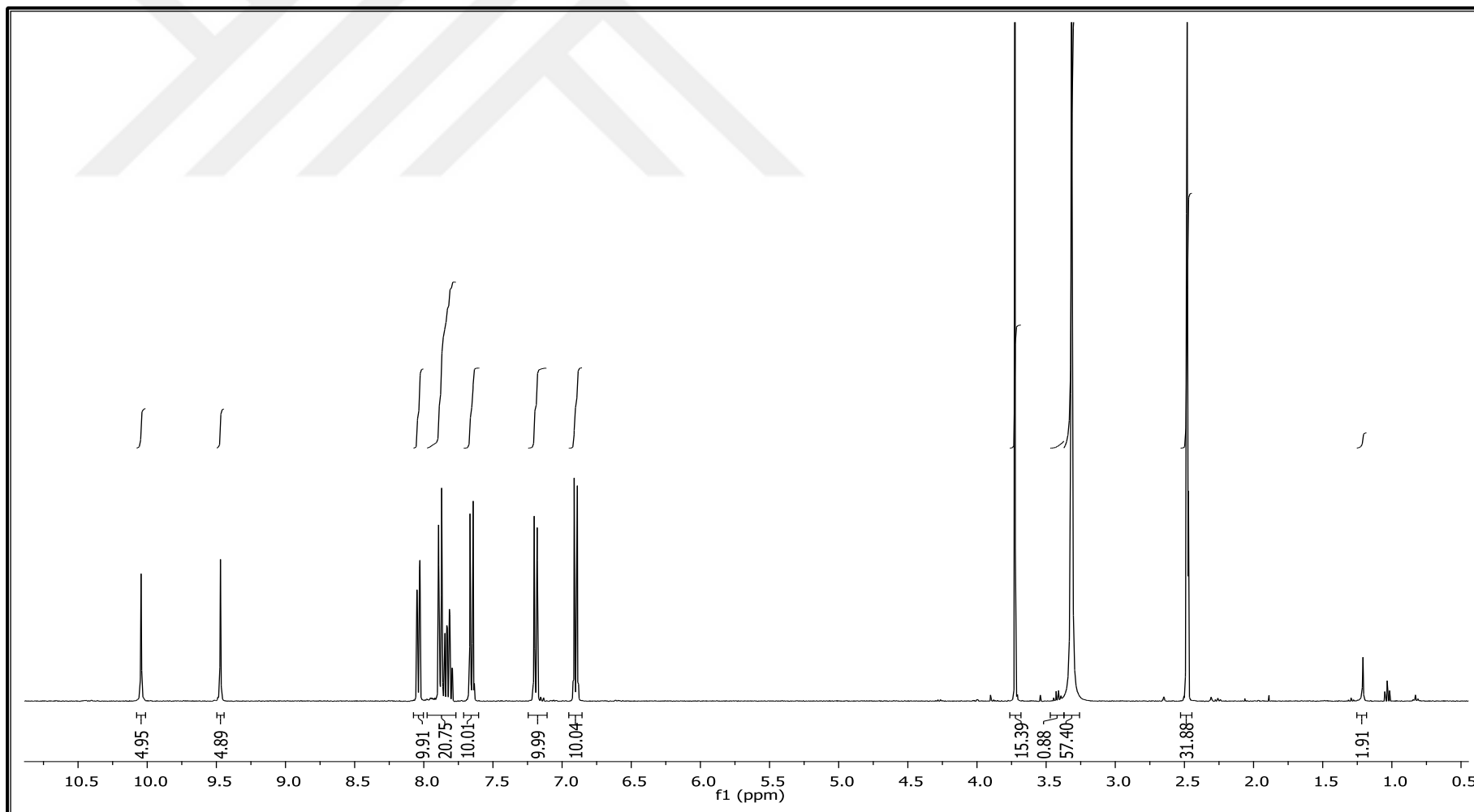
NK8 #41 RT: 0.36 AV: 1 NL: 1.72E6
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



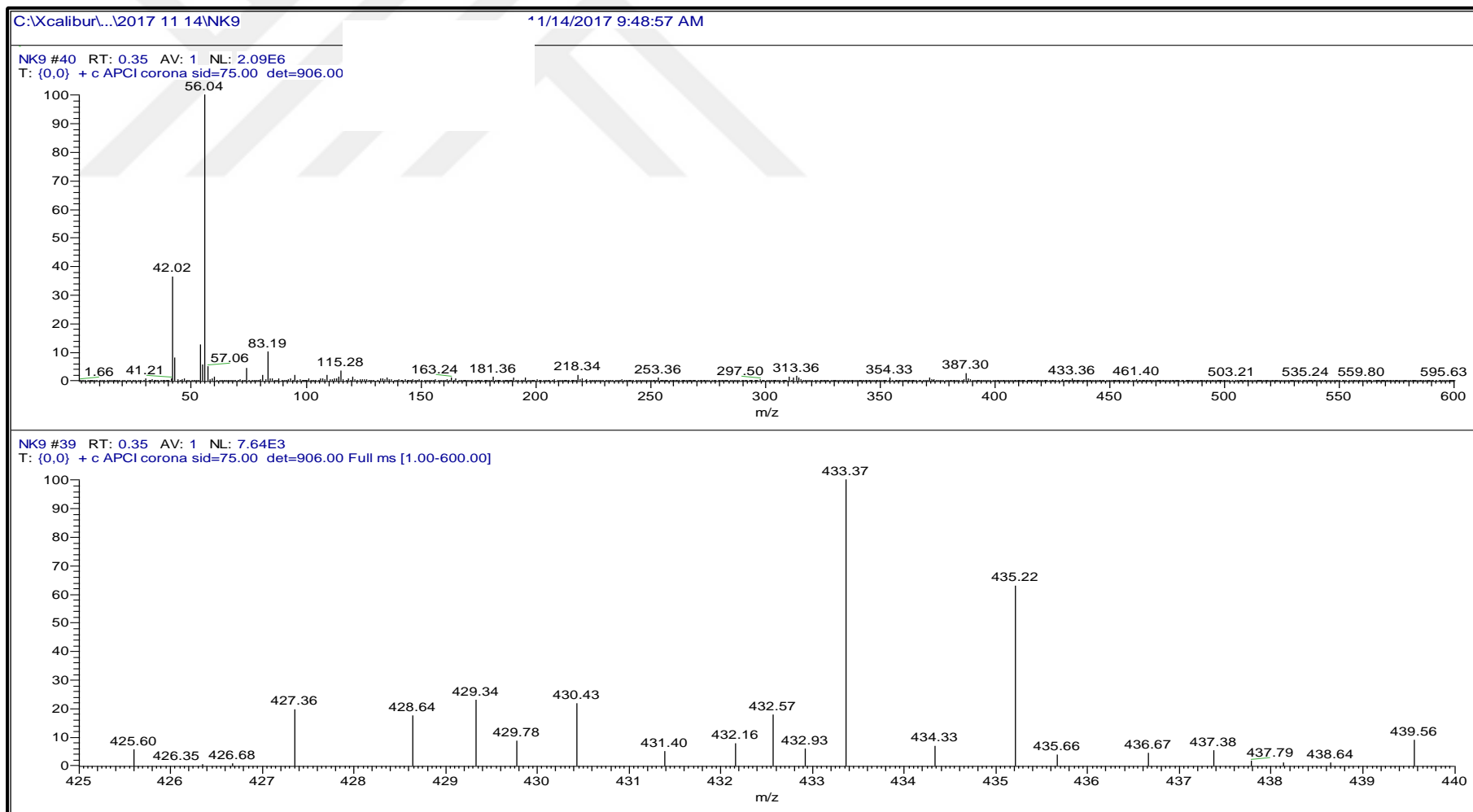
Spektrum 140. NK8 kodlu bileşğin kütle spektrumu



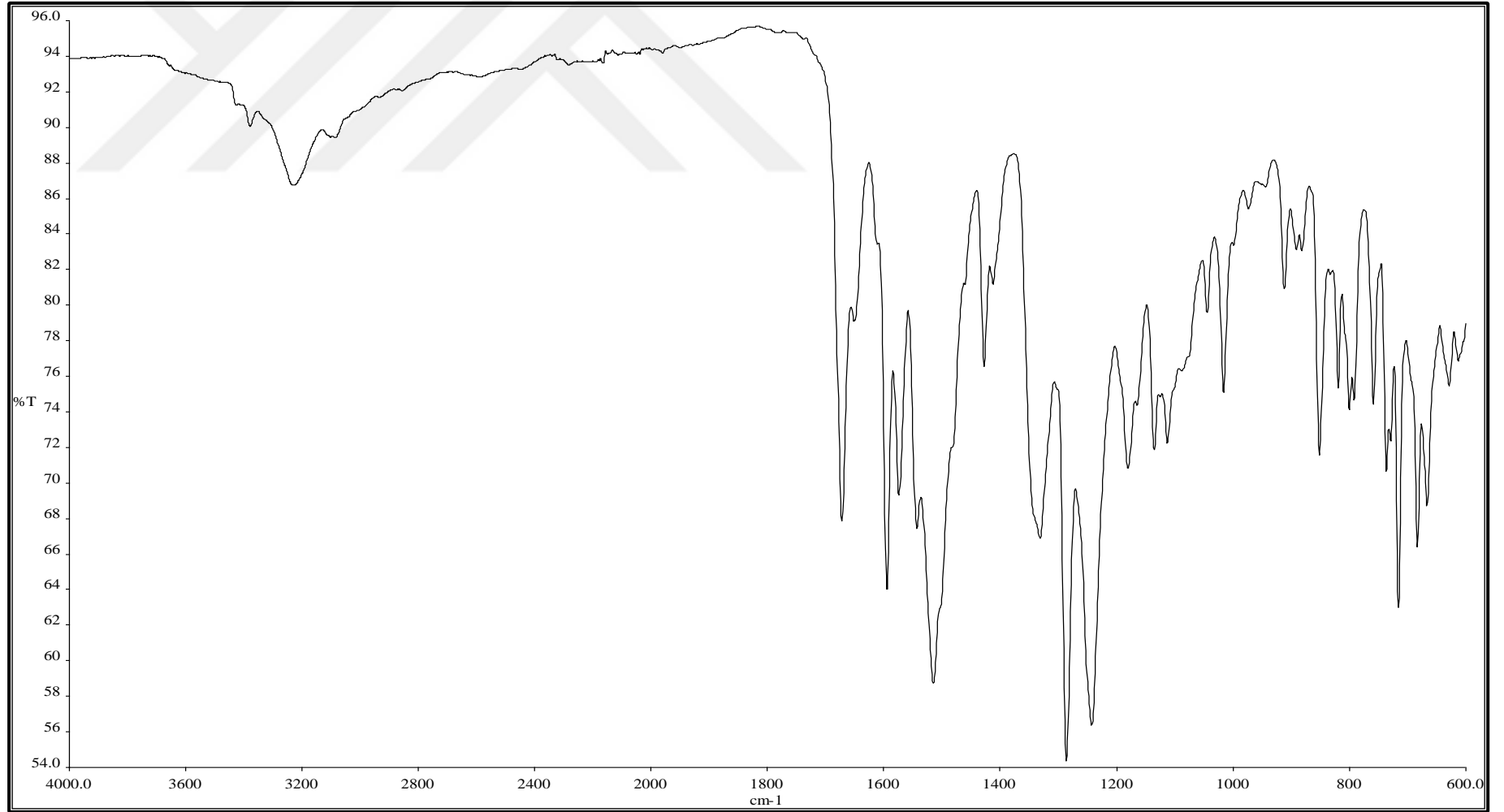
Spektrum 141. NK9 kodlu bileşigin IR spektrumu



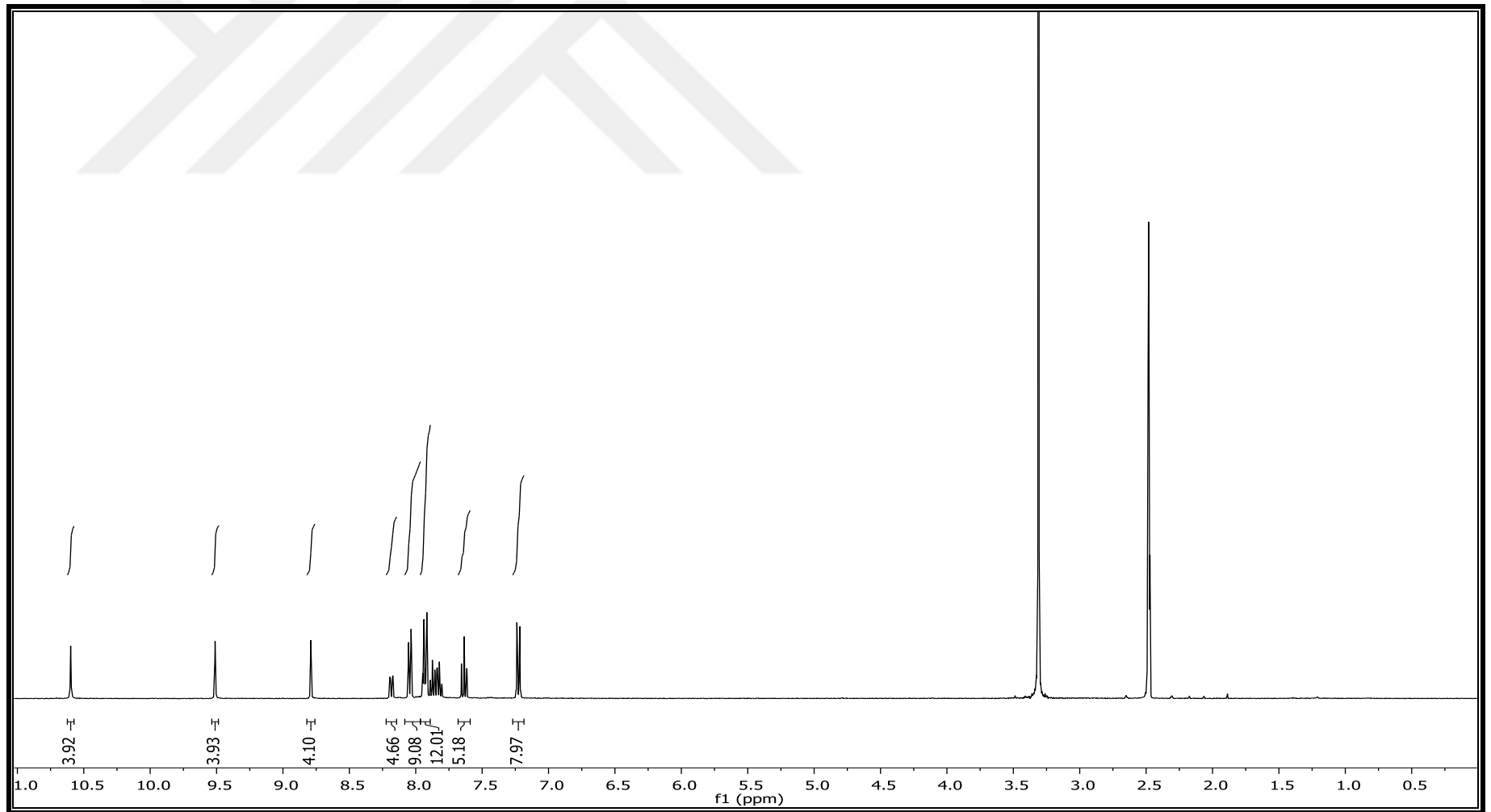
Spektrum 142. NK9 kodlu bileşiğin ¹H NMR spektrumu



Spektrum 143. NK9 kodlu bileşimin kütle spektrumu

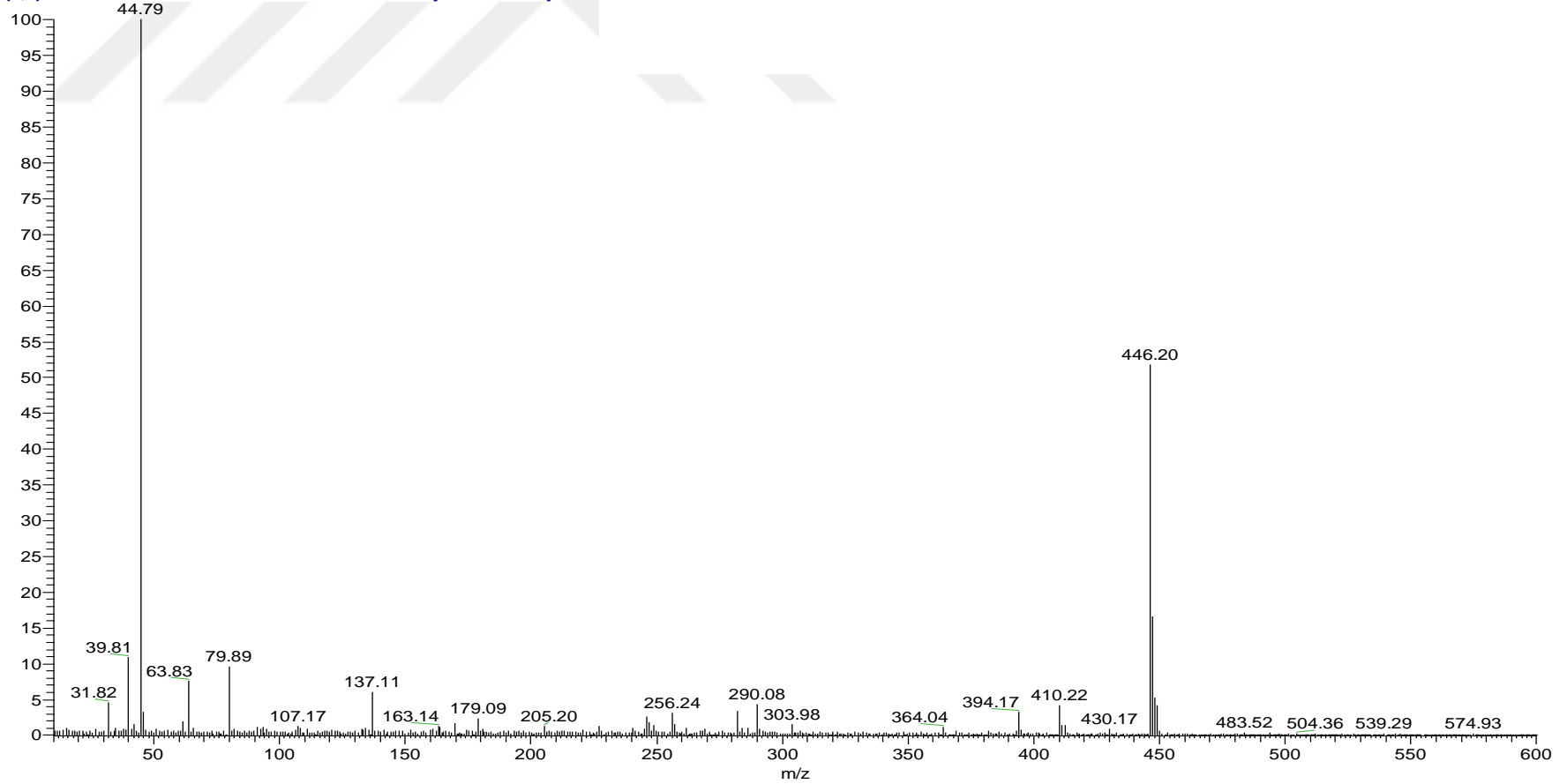


Spektrum 144. NK11 kodlu bileşğin IR spektrumu

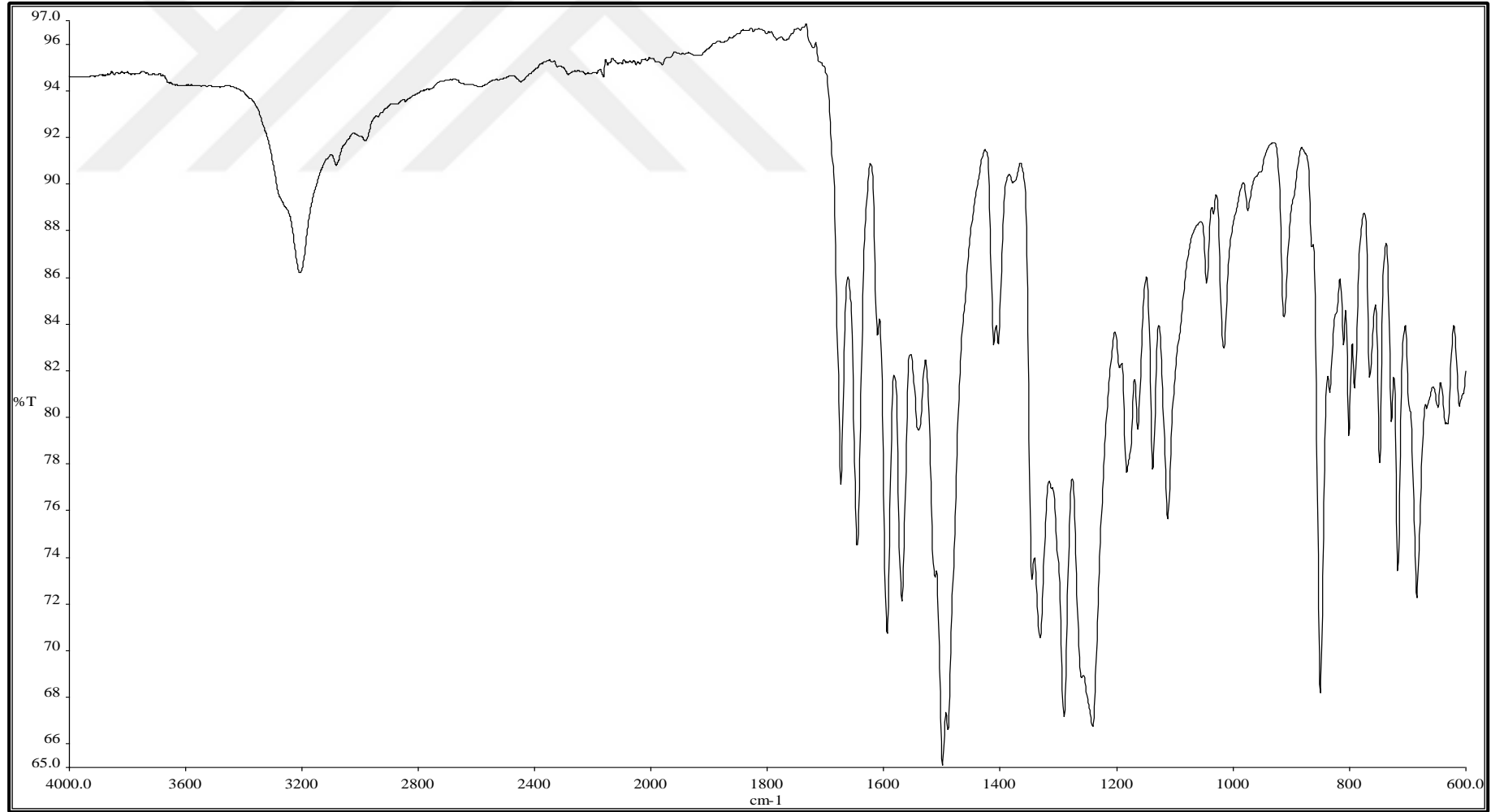


Spektrum 145. NK11 kodlu bileşigin ^1H NMR spektrumu

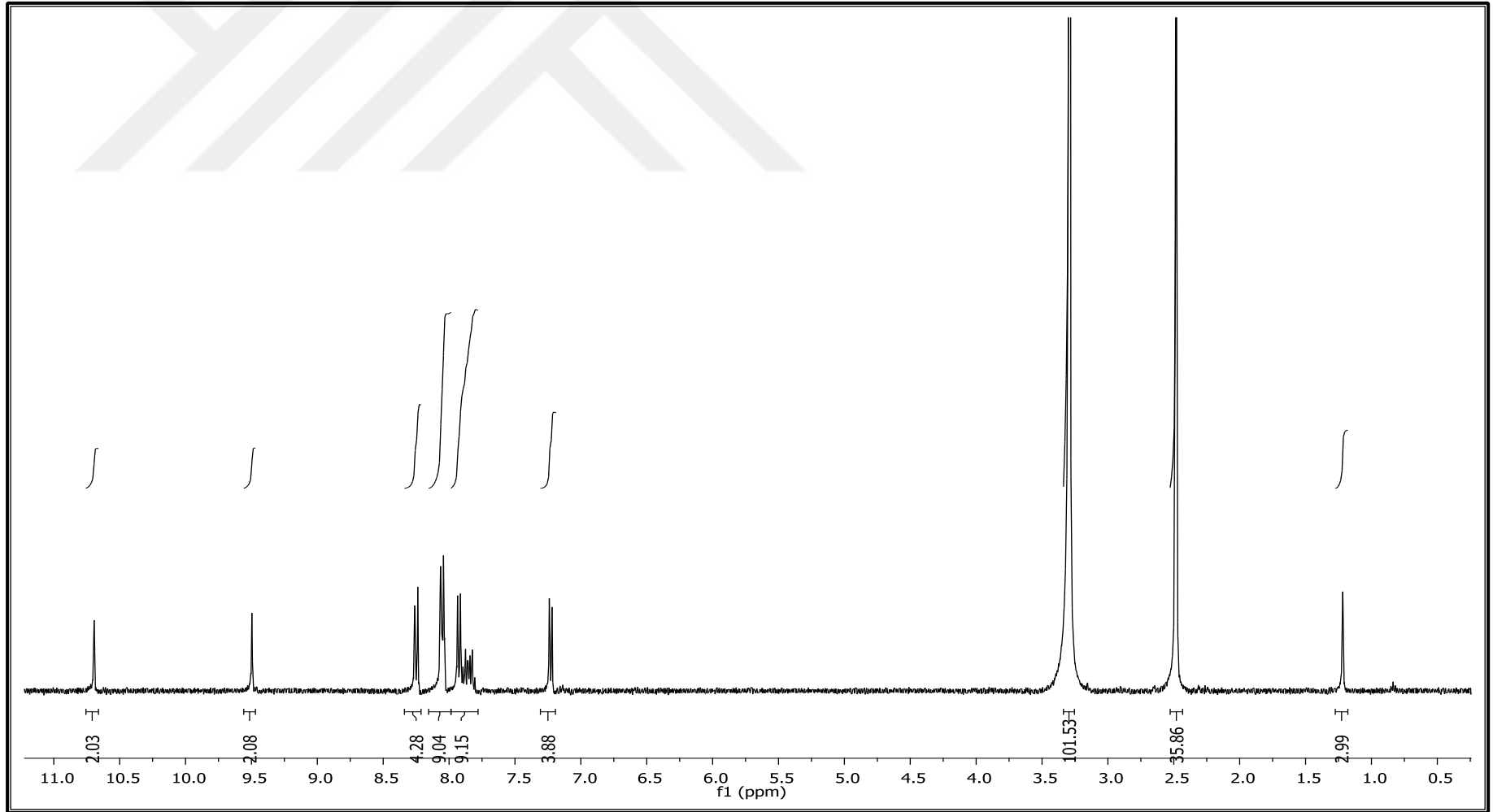
nK3_NITRO--neg #41 RT: 0.36 AV: 1 NL: 2.49E5
T: {0,0} - c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [10.00-600.00]



Spektrum 146. NK11 kodlu bileşğin kütle spektrumu



Spektrum 147. NK12 kodlu bileşğin IR spektrumu

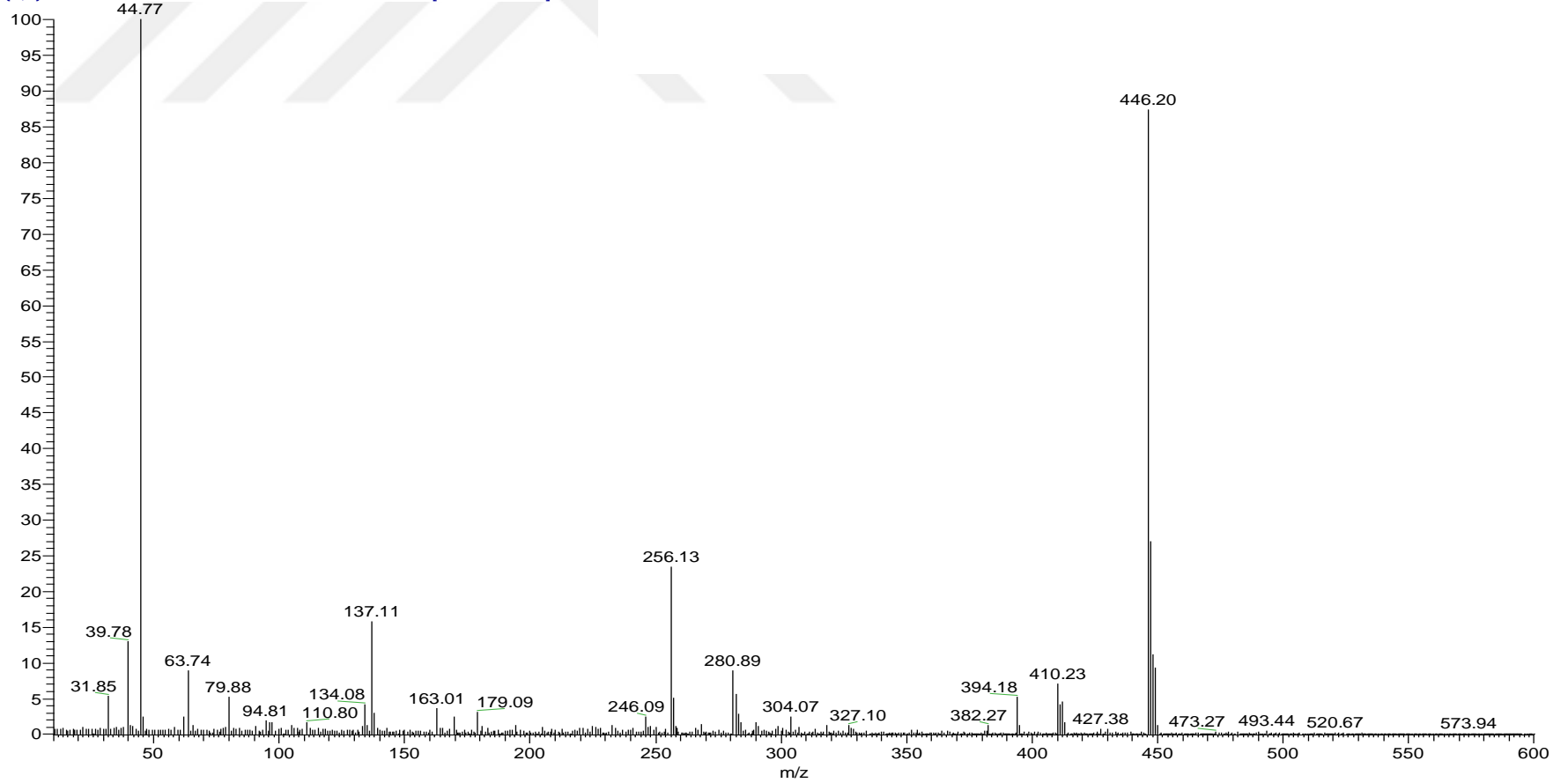


Spektrum 148. NK12 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu

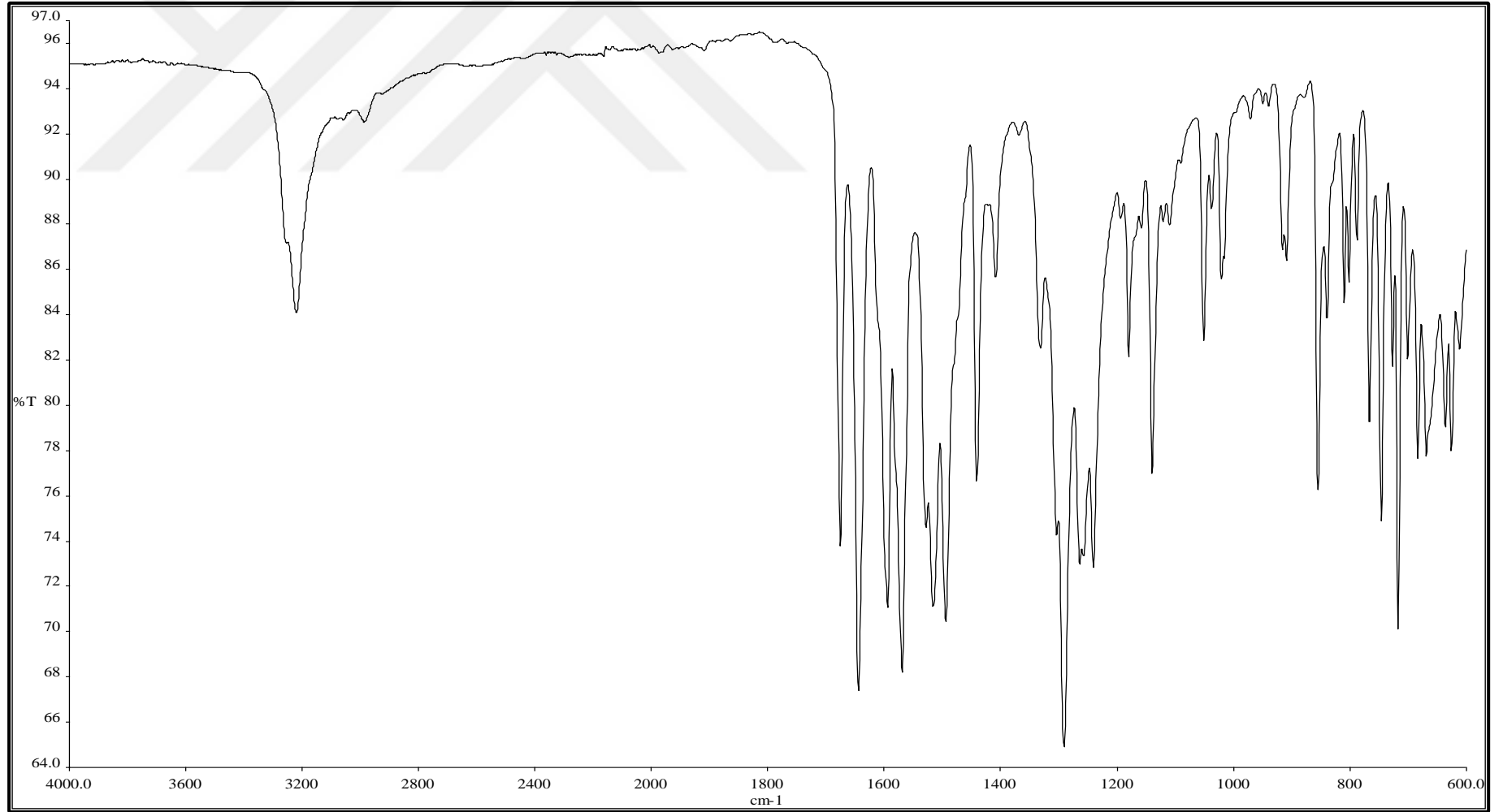
C:\Xcalibur\...\APCI\nK4_NITRO--neg

9/13/2017 2:57:19 PM

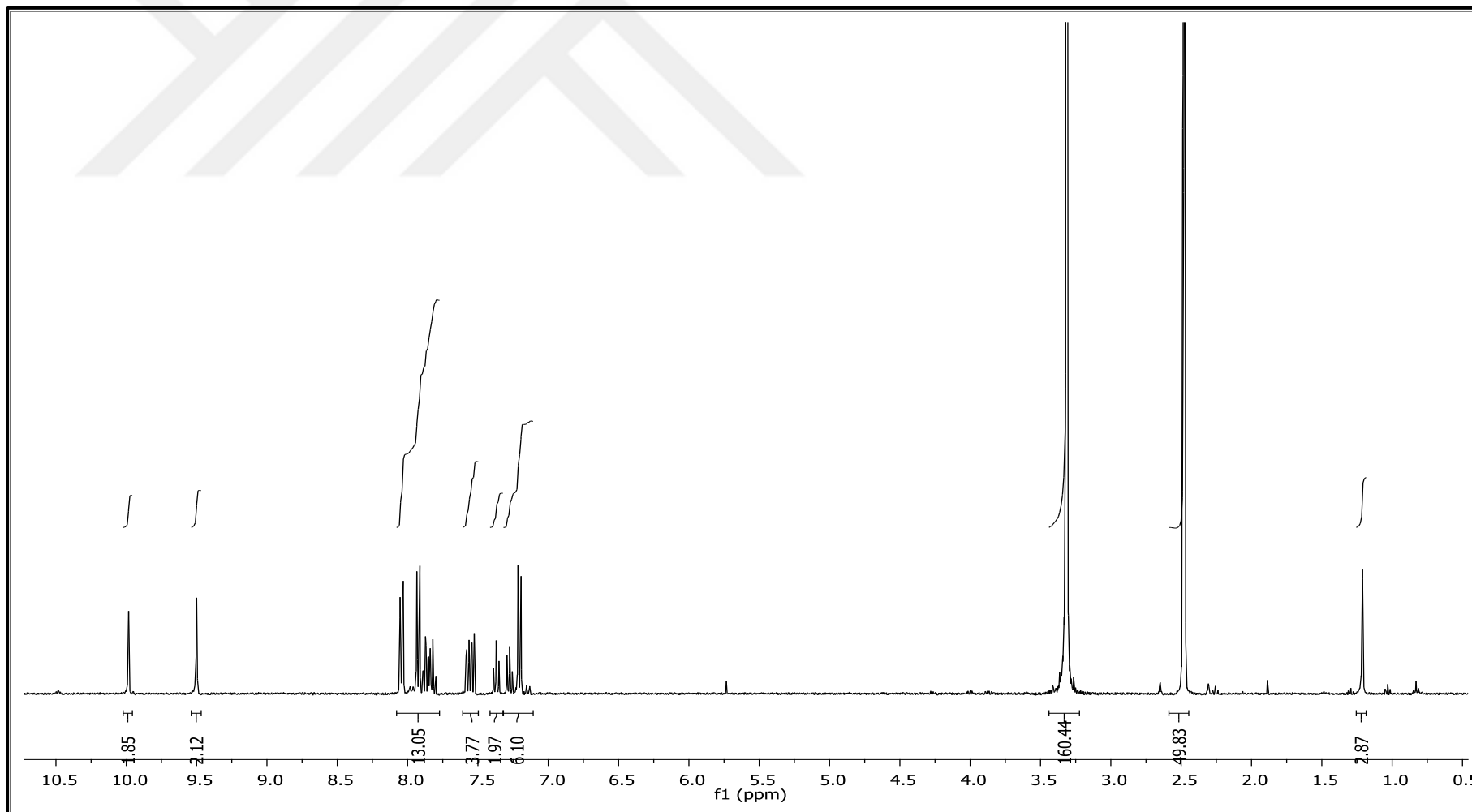
nK4_NITRO--neg #39 RT: 0.35 AV: 1 NL: 2.13E5
T: {0,0} - c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [10.00-600.00]



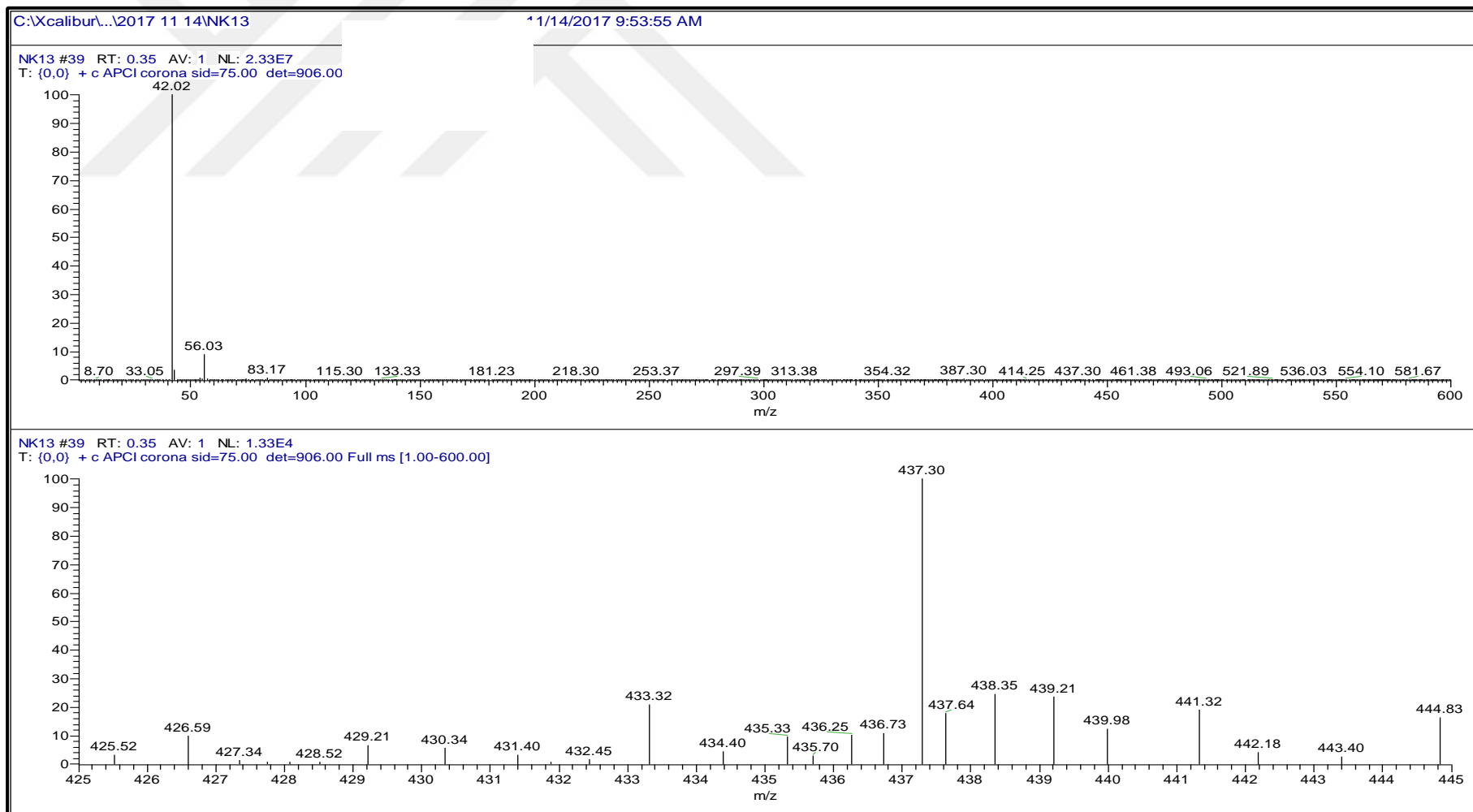
Spektrum 149. NK12 kodlu bileşğin kütle spektrumu



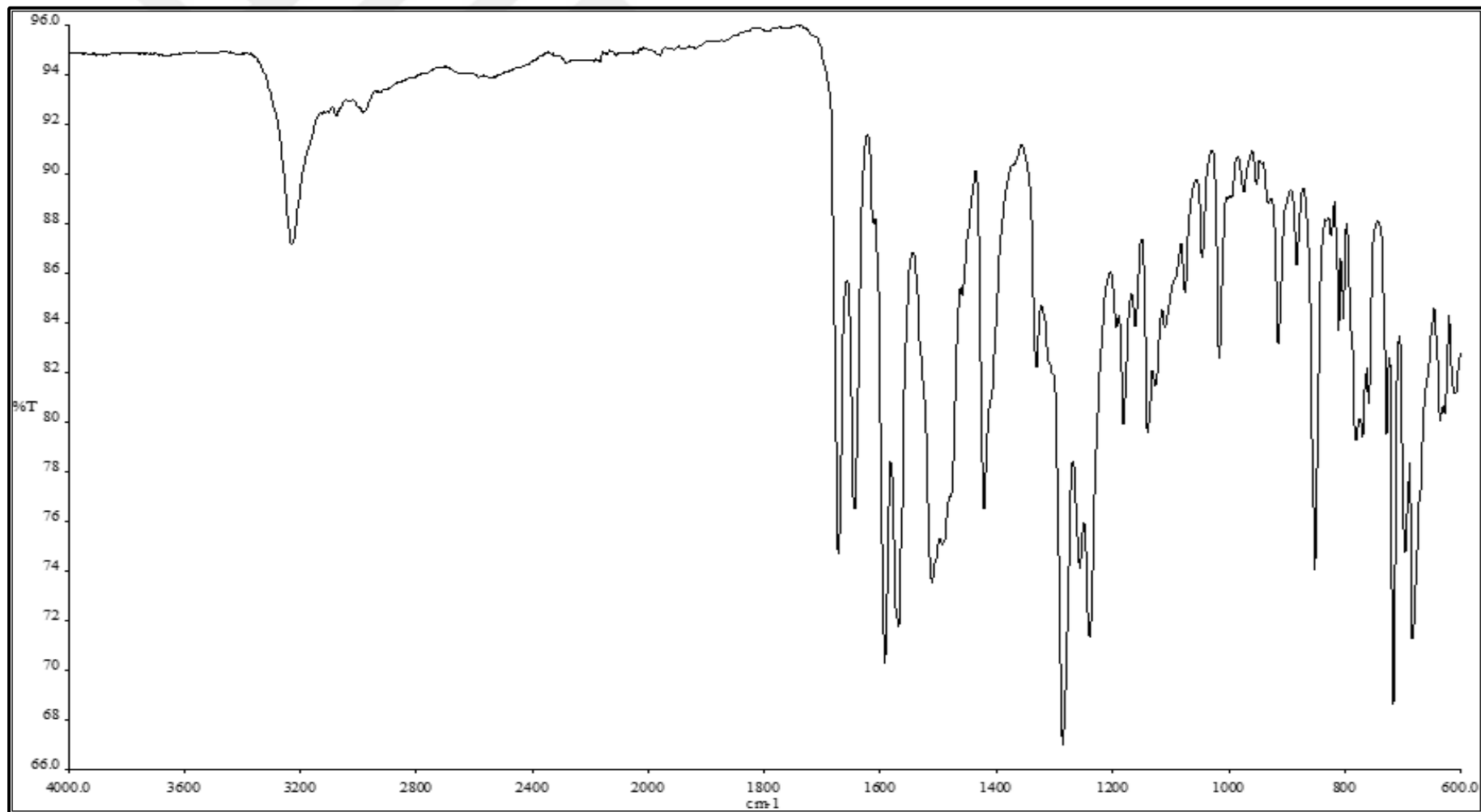
Spektrum 150. NK13 kodlu bileşğin IR spektrumu



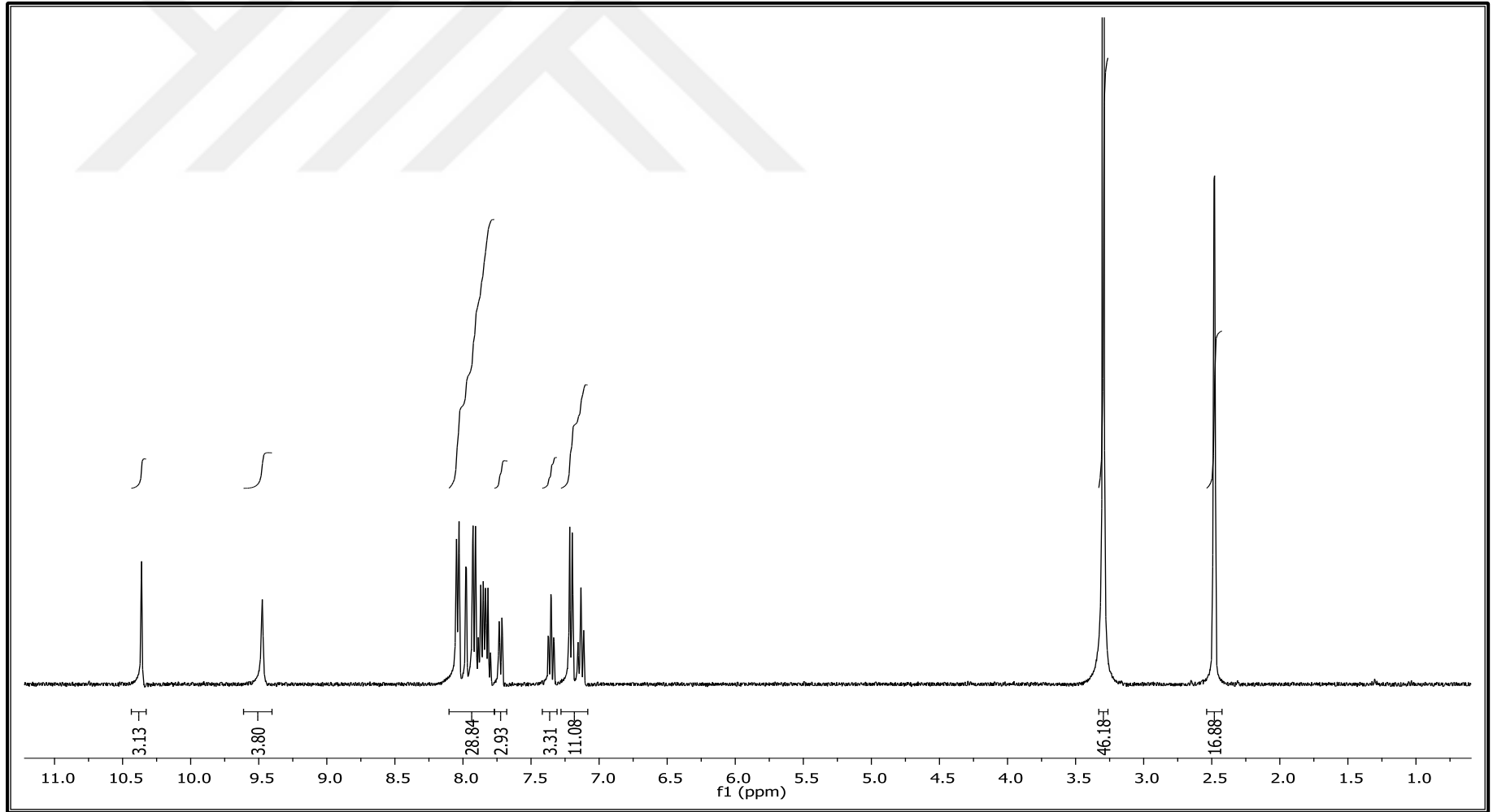
Spektrum 151. NK13 kodlu bileşiğin ¹H NMR spektrumu



Spektrum 152. NK13 kodlu bileşğin kütle spektrumu



Spektrum 153. NK14 kodlu bileşğin IR spektrumu

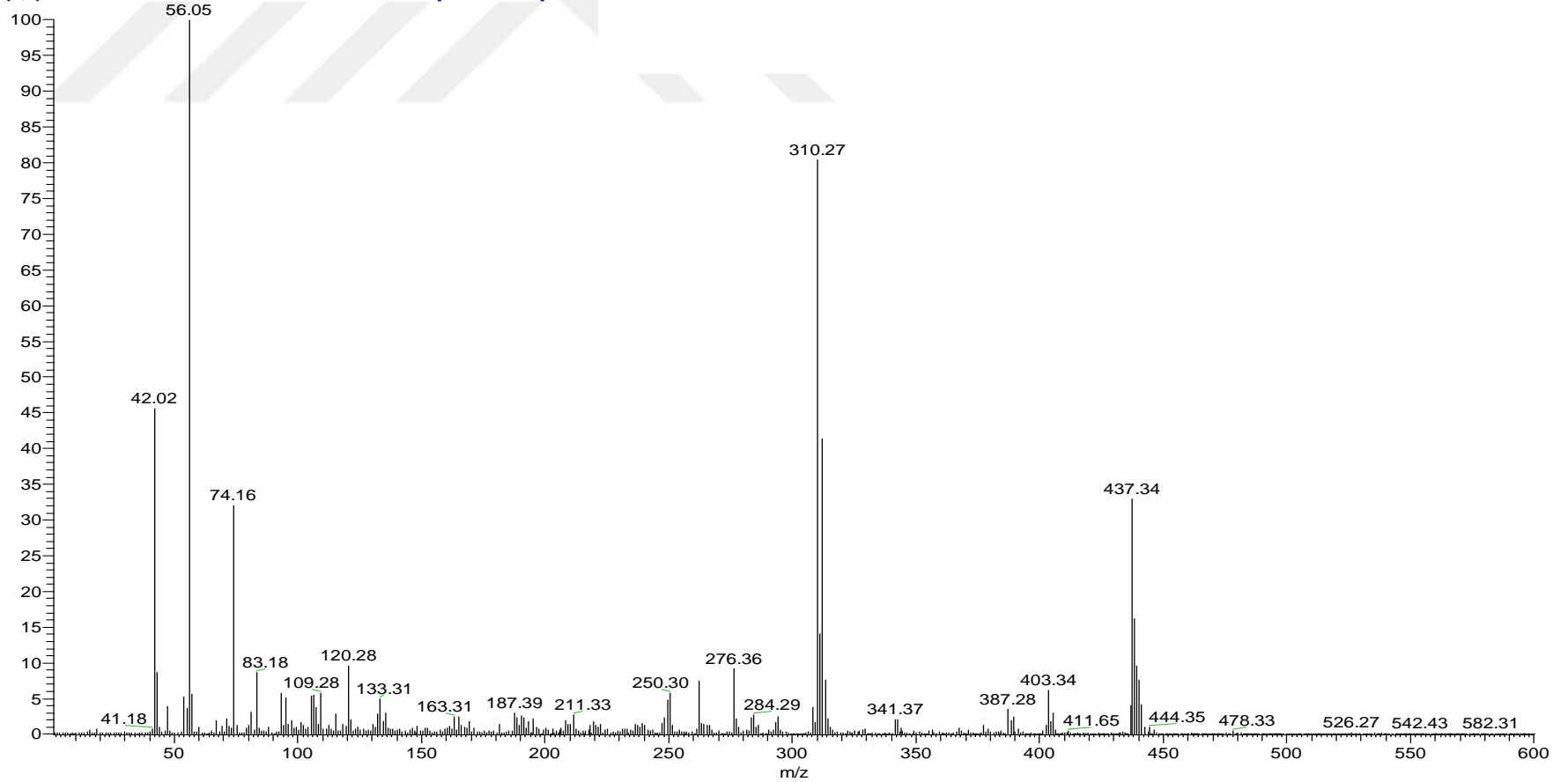


Spektrum 154. NK14 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu

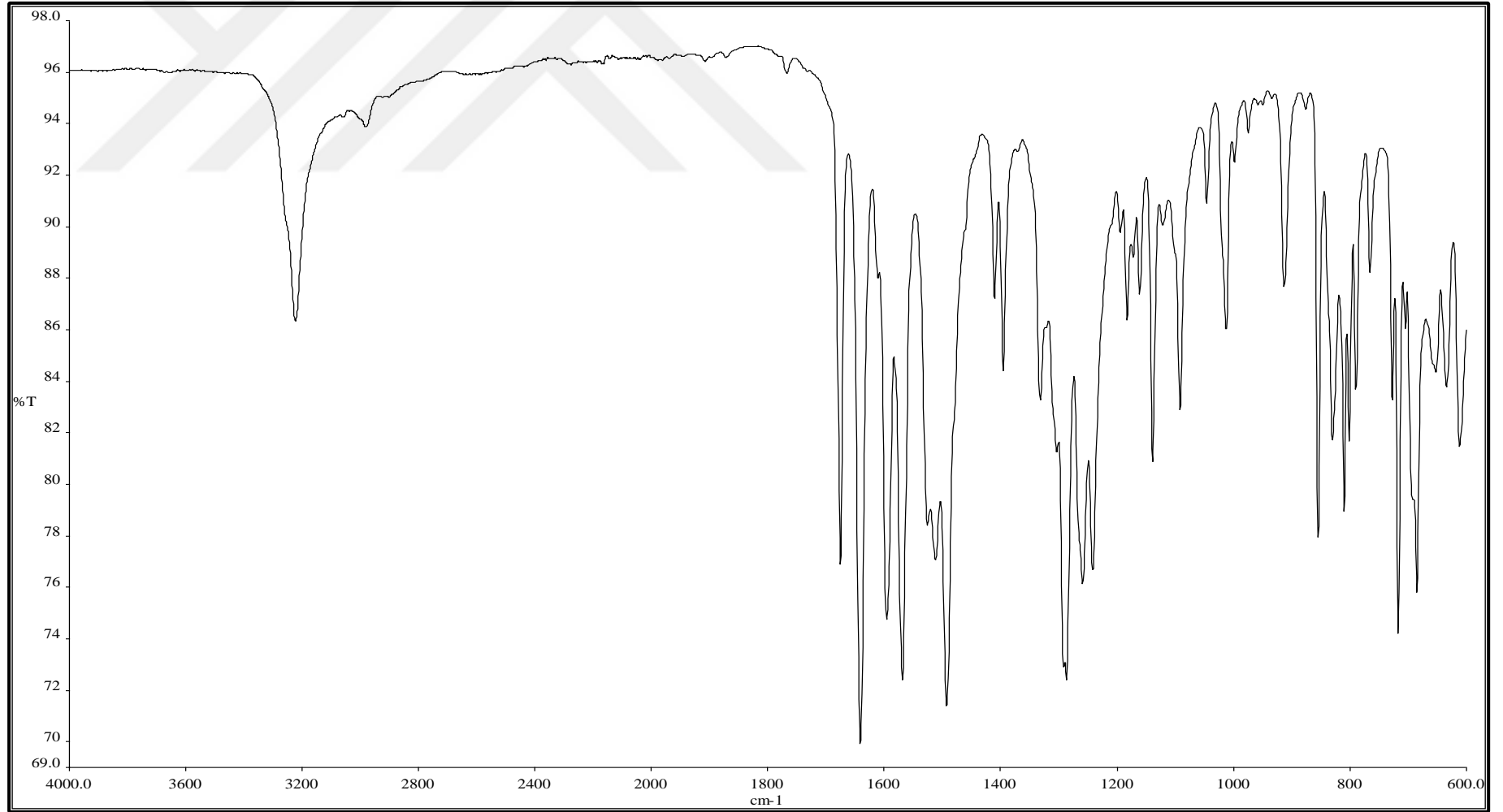
C:\Xcalibur\...2017 11 14\NK14

11/14/2017 9:58:51 AM

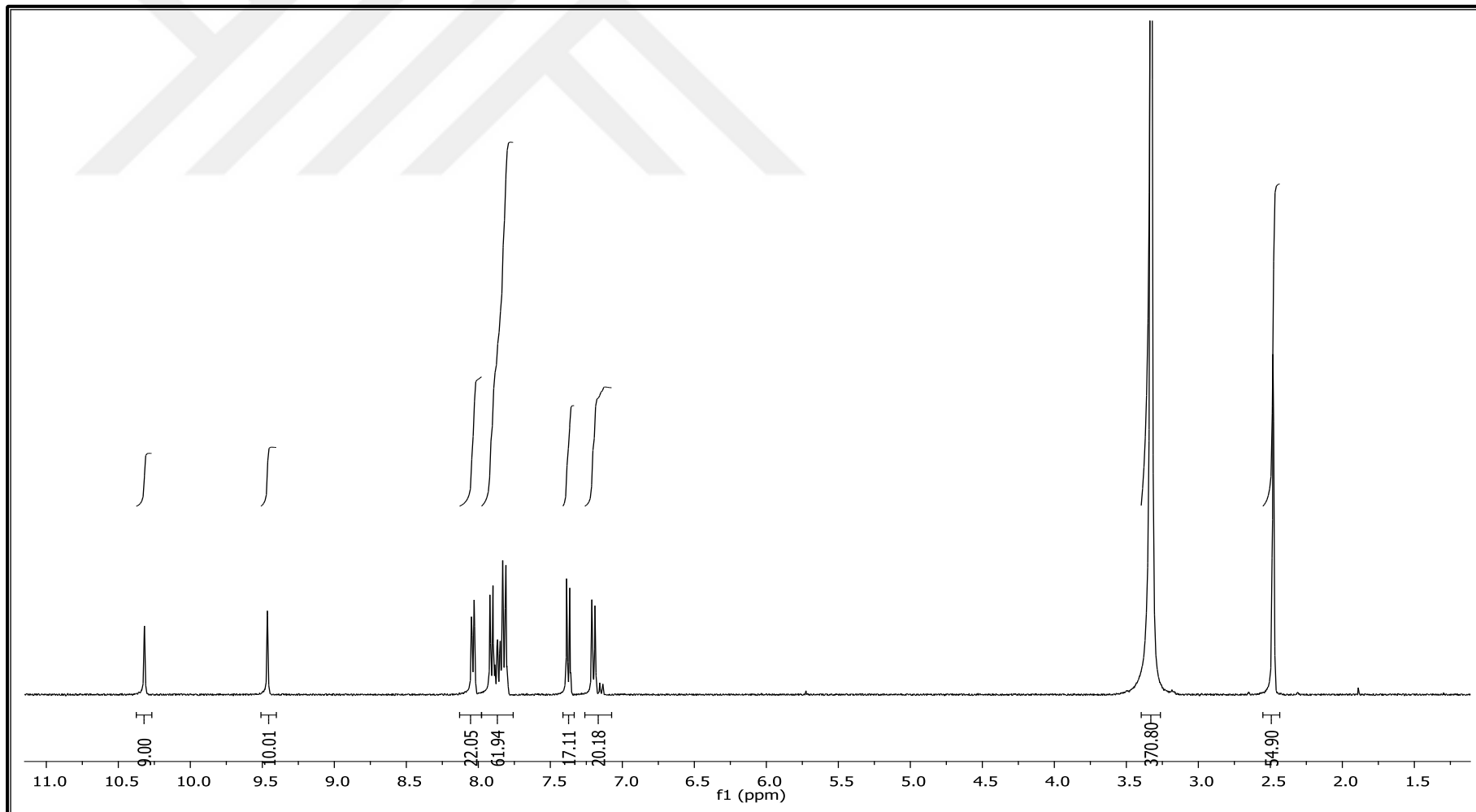
NK14 #42 RT: 0.37 AV: 1 NL: 8.51E5
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



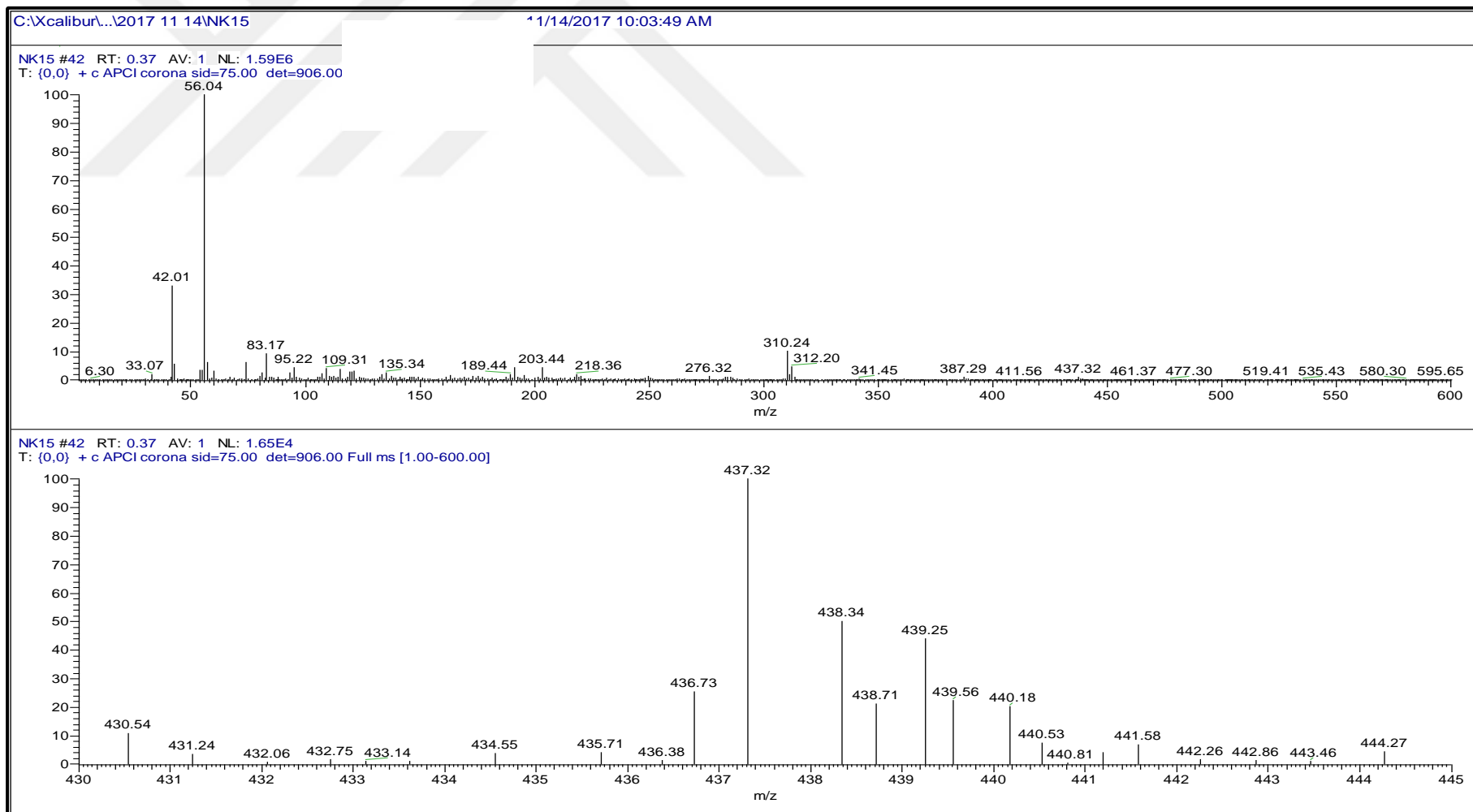
Spektrum 155. NK14 kodlu bileşğin kütle spektrumu



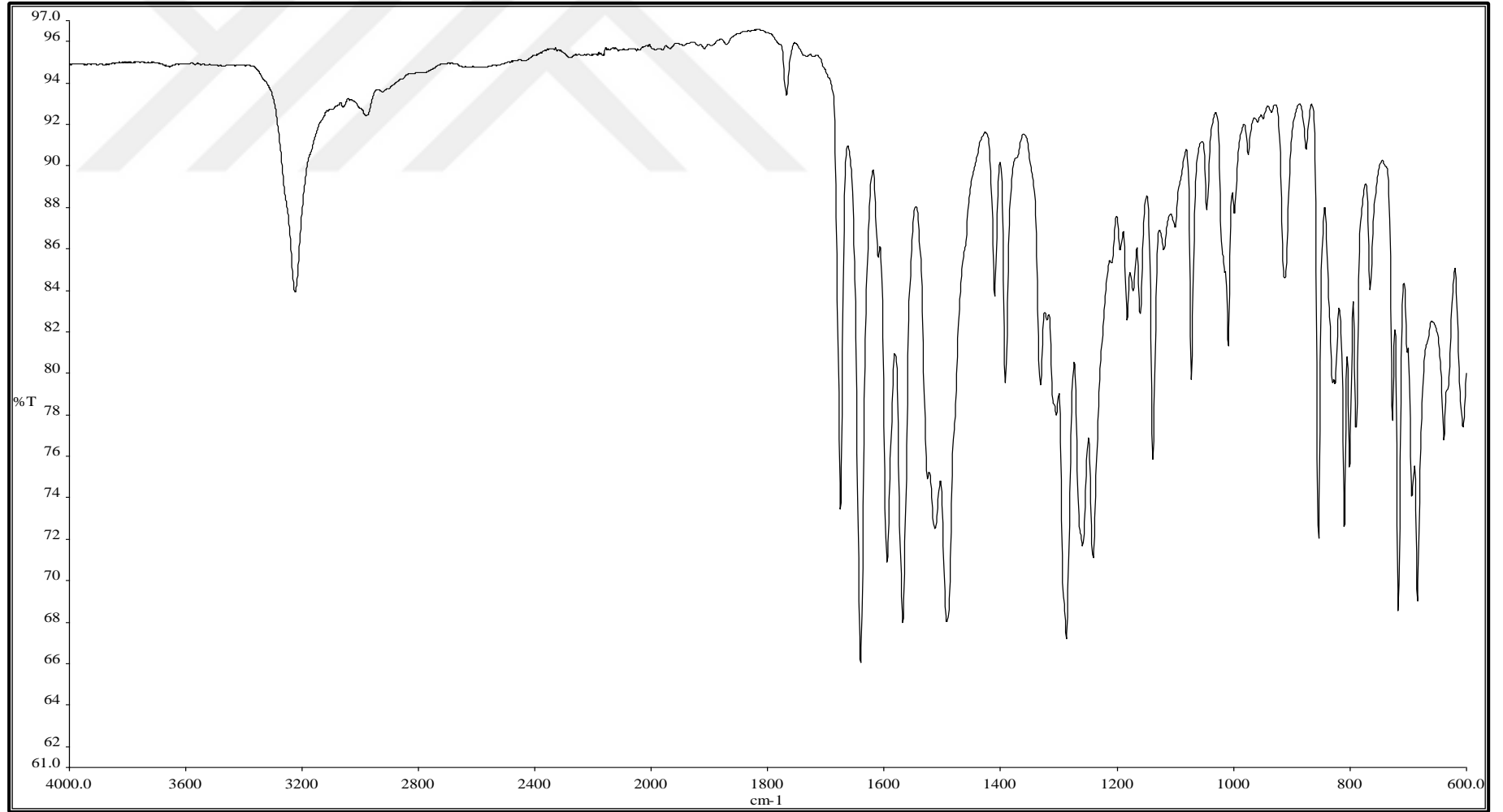
Spektrum 156. NK15 kodlu bileşğin IR spektrumu



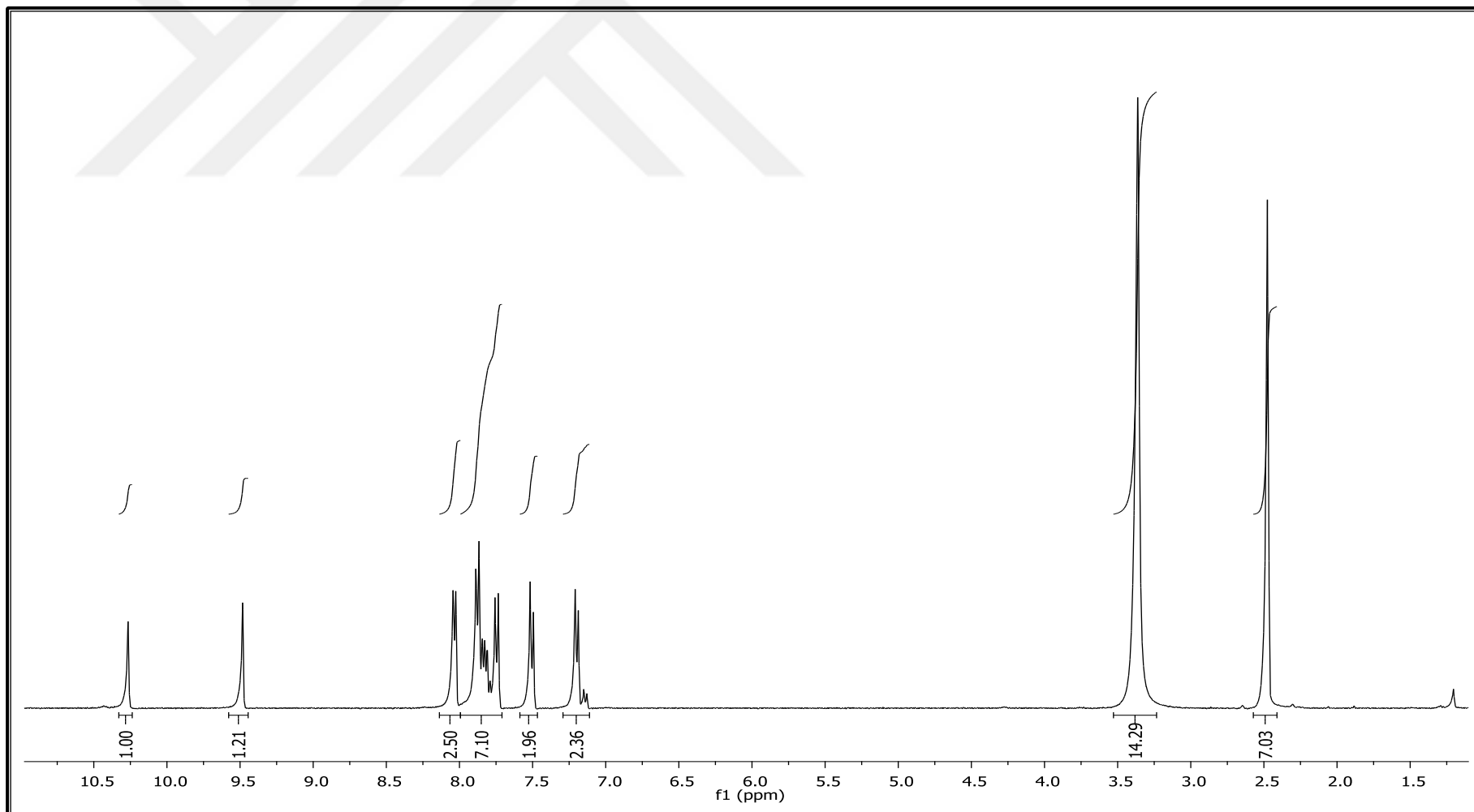
Spektrum 157. NK15 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu



Spektrum 158. NK15 kodlu bileşğin kütle spektrumu



Spektrum 159. NK16 kodlu bileşğin IR spektrumu

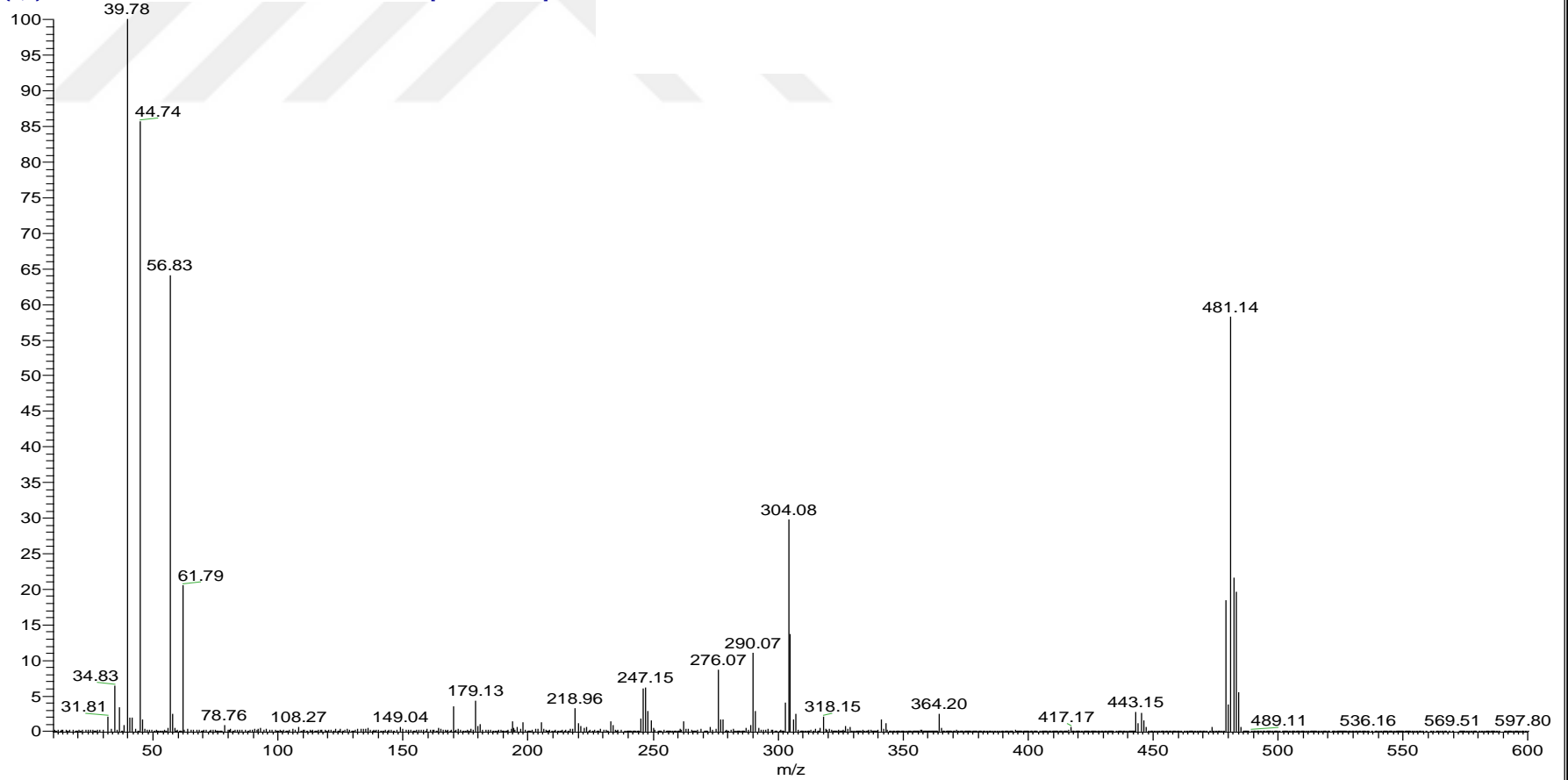


Spektrum 160. NK16 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu

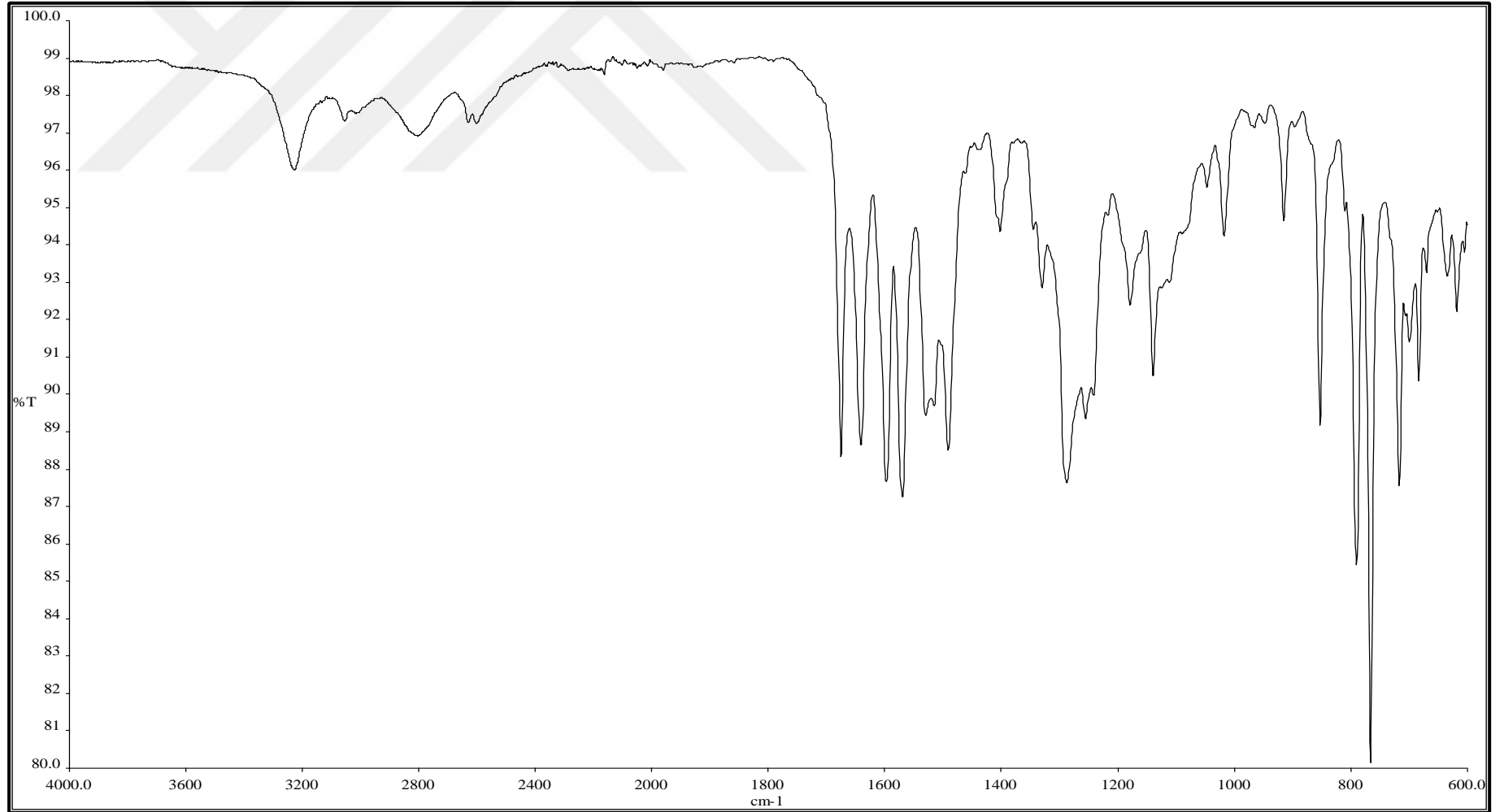
C:\Xcalibur\...\APCInkpbrom-neg

9/27/2017 11:01:47 AM

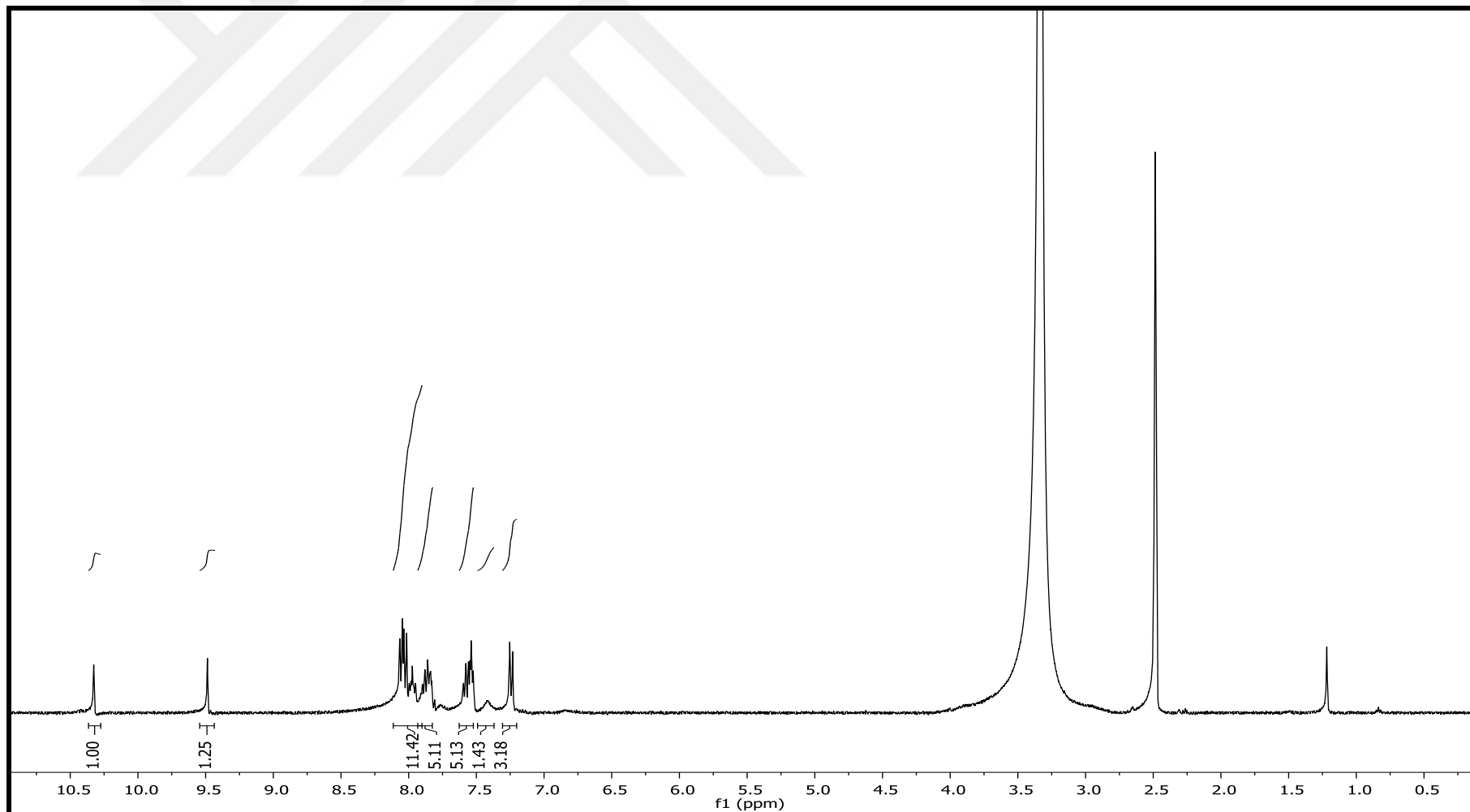
nkpbrom-neg #41 RT: 0.36 AV: 1 NL: 5.93E5
T: {0,0} - c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [10.00-600.00]



Spektrum 161. NK16 kodlu bileşğin kütle spektrumu



Spektrum 162. NK17 kodlu bileşğin IR spektrumu

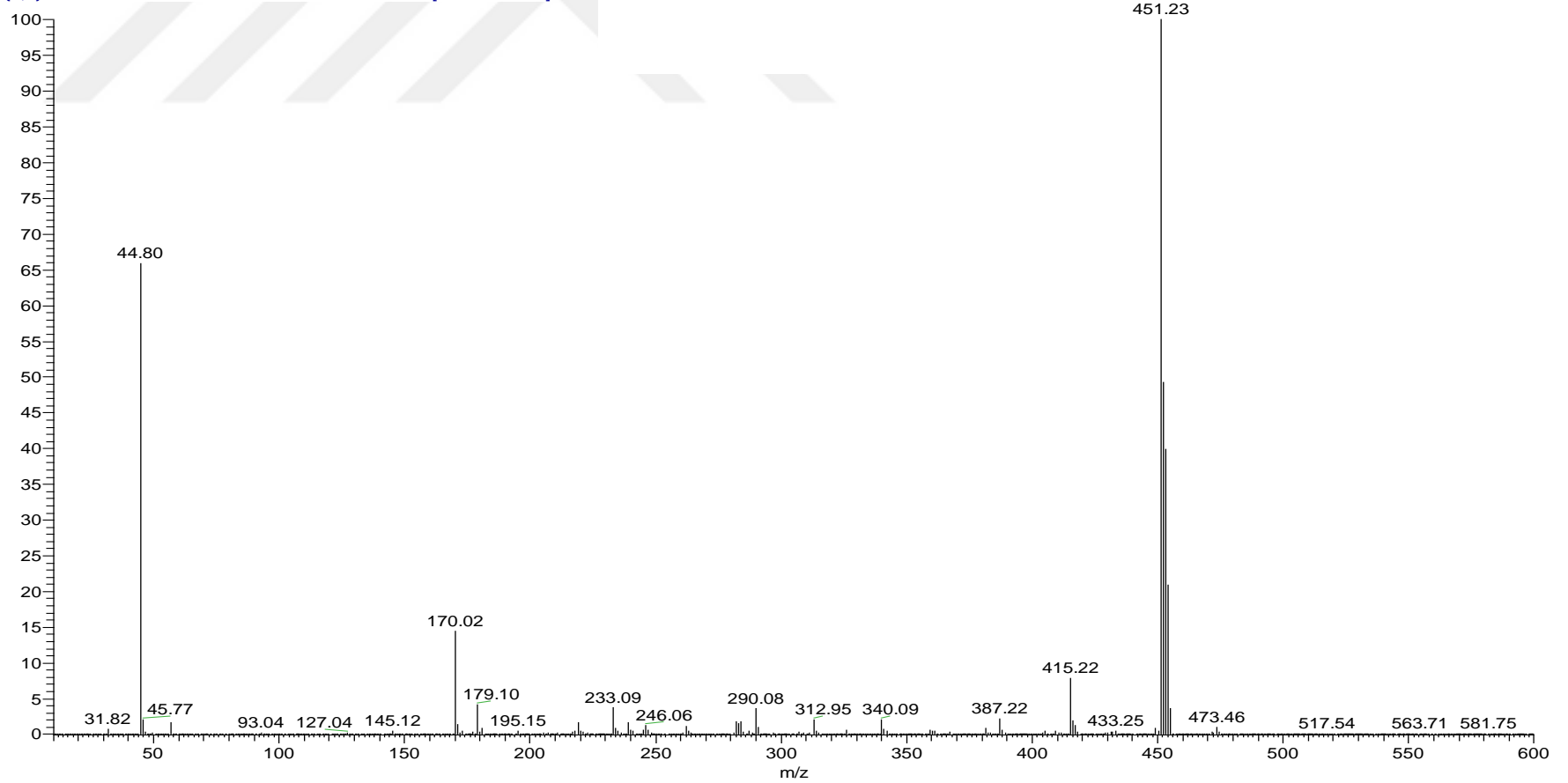


Spektrum 163. NK17 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu

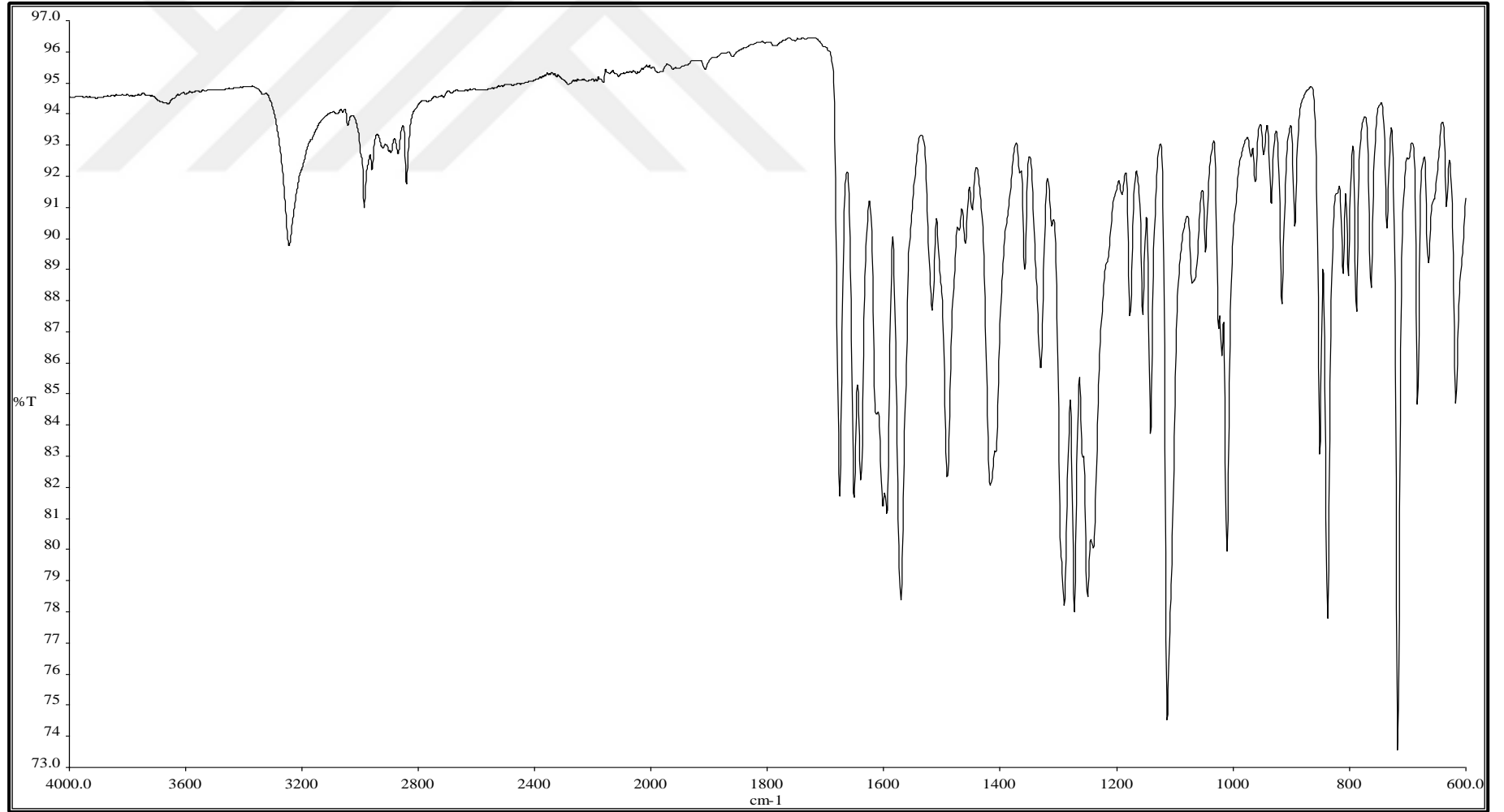
C:\Xcalibur...\2017 09 22\NK17

9/22/2017 11:26:59 AM

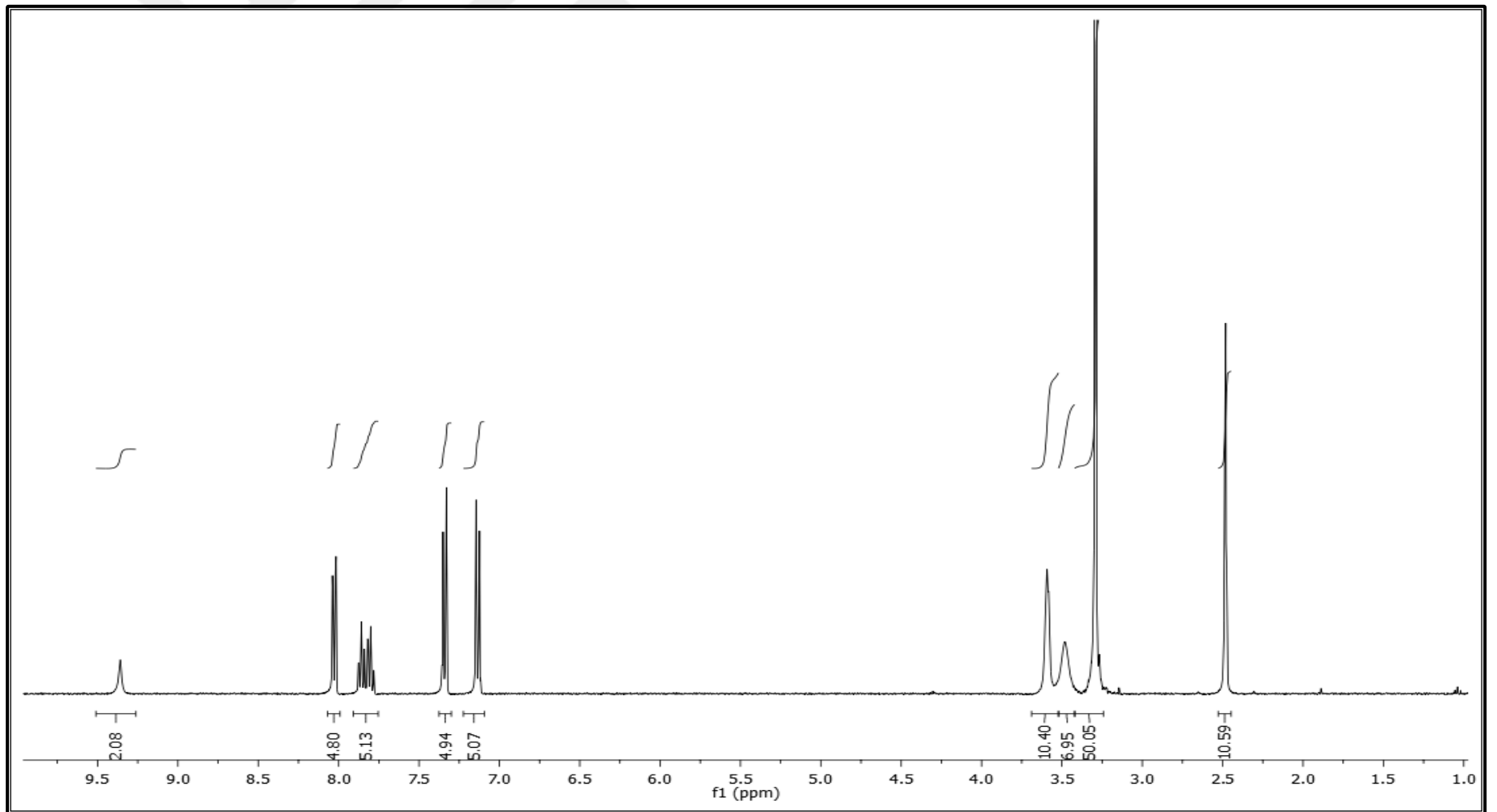
NK17 #40 RT: 0.35 AV: 1 NL: 7.87E6
T: {0,0} - c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [10.00-600.00]



Spektrum 164. NK17 kodlu bileşiğin kütle spektrumu



Spektrum 165. NK18 kodlu bileşğin IR spektrumu

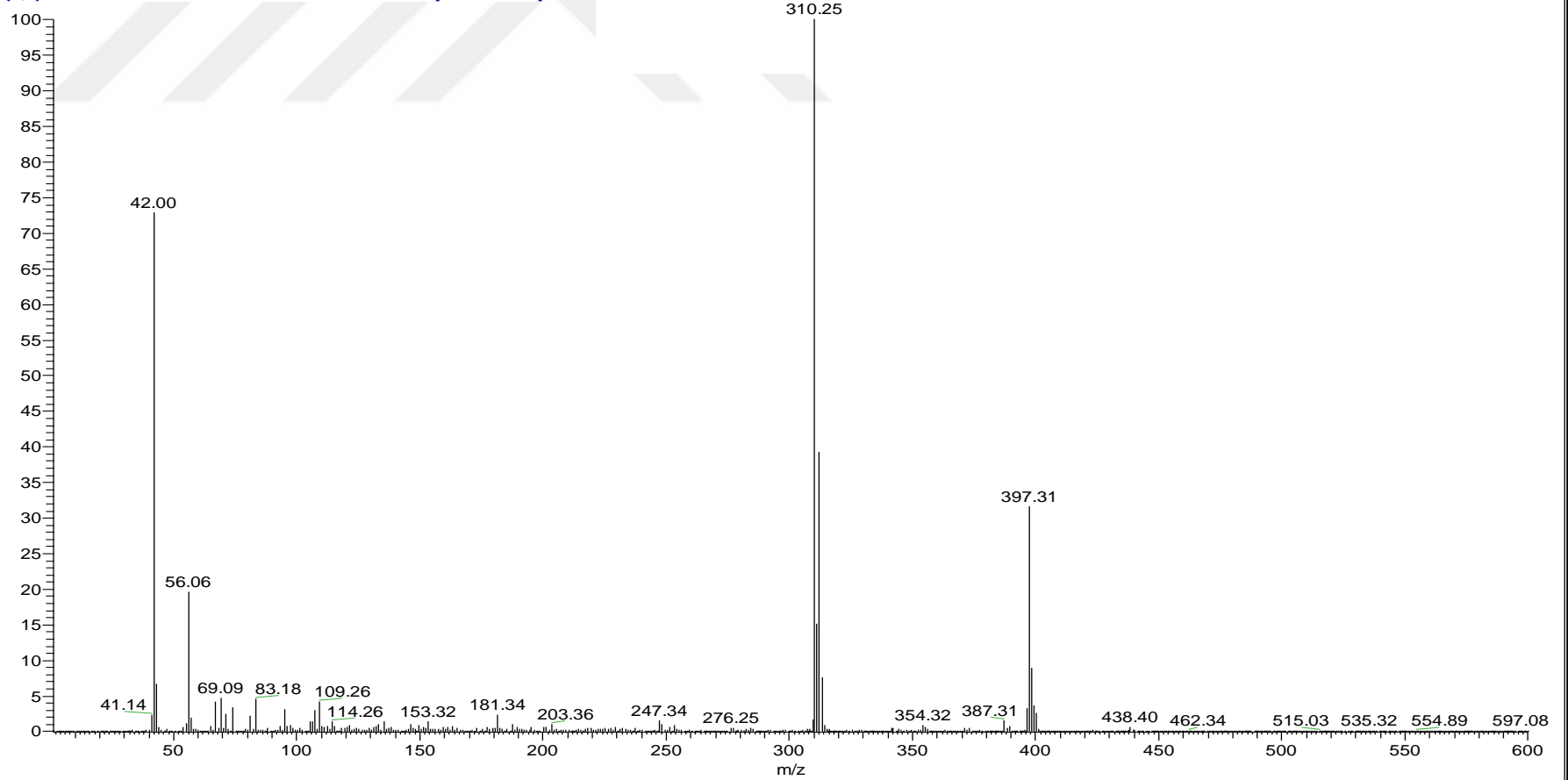


Spektrum 166. NK18 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu

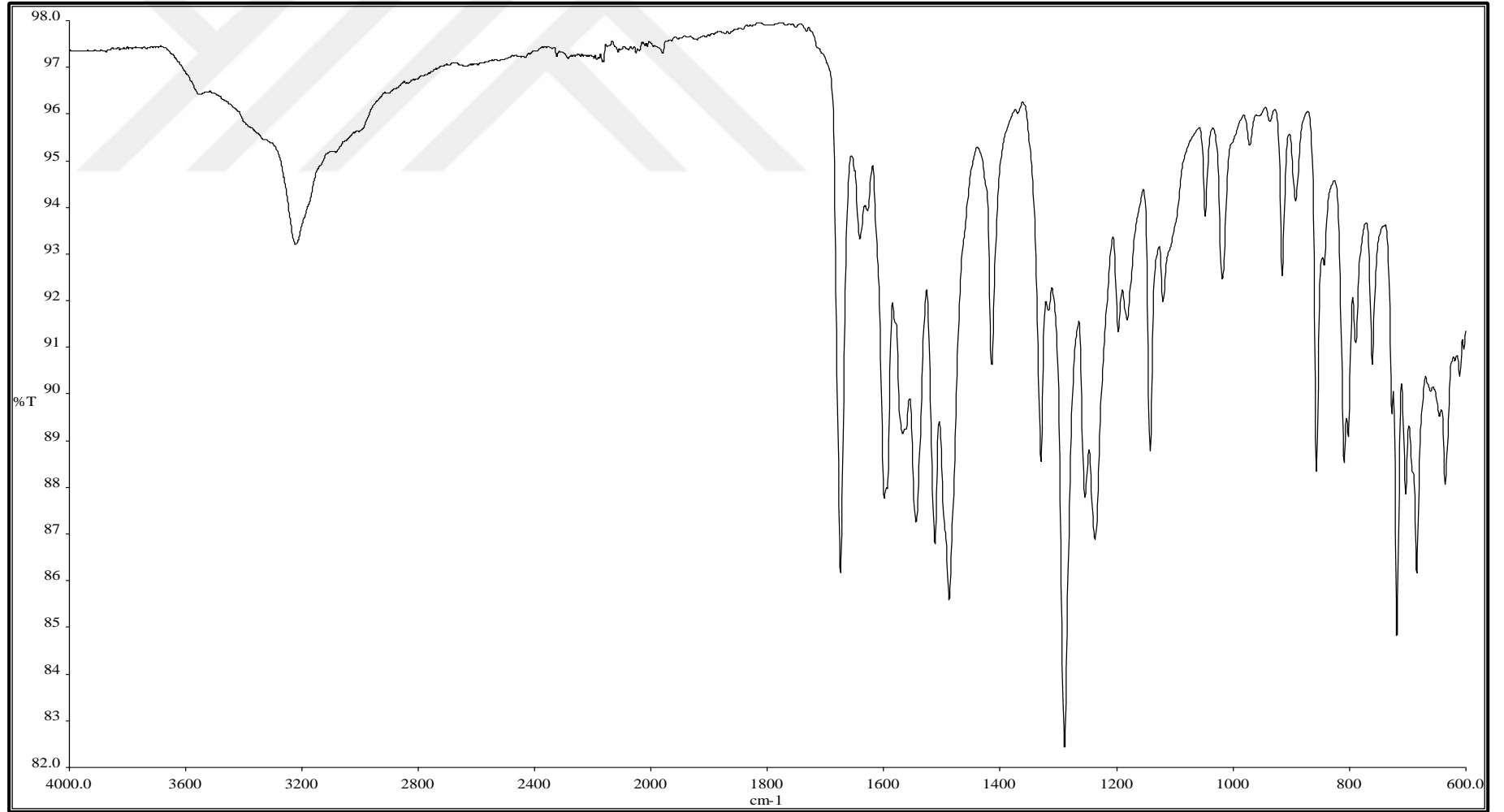
C:\Xcalibur\...2017 11 14\NK18

11/14/2017 10:08:51 AM

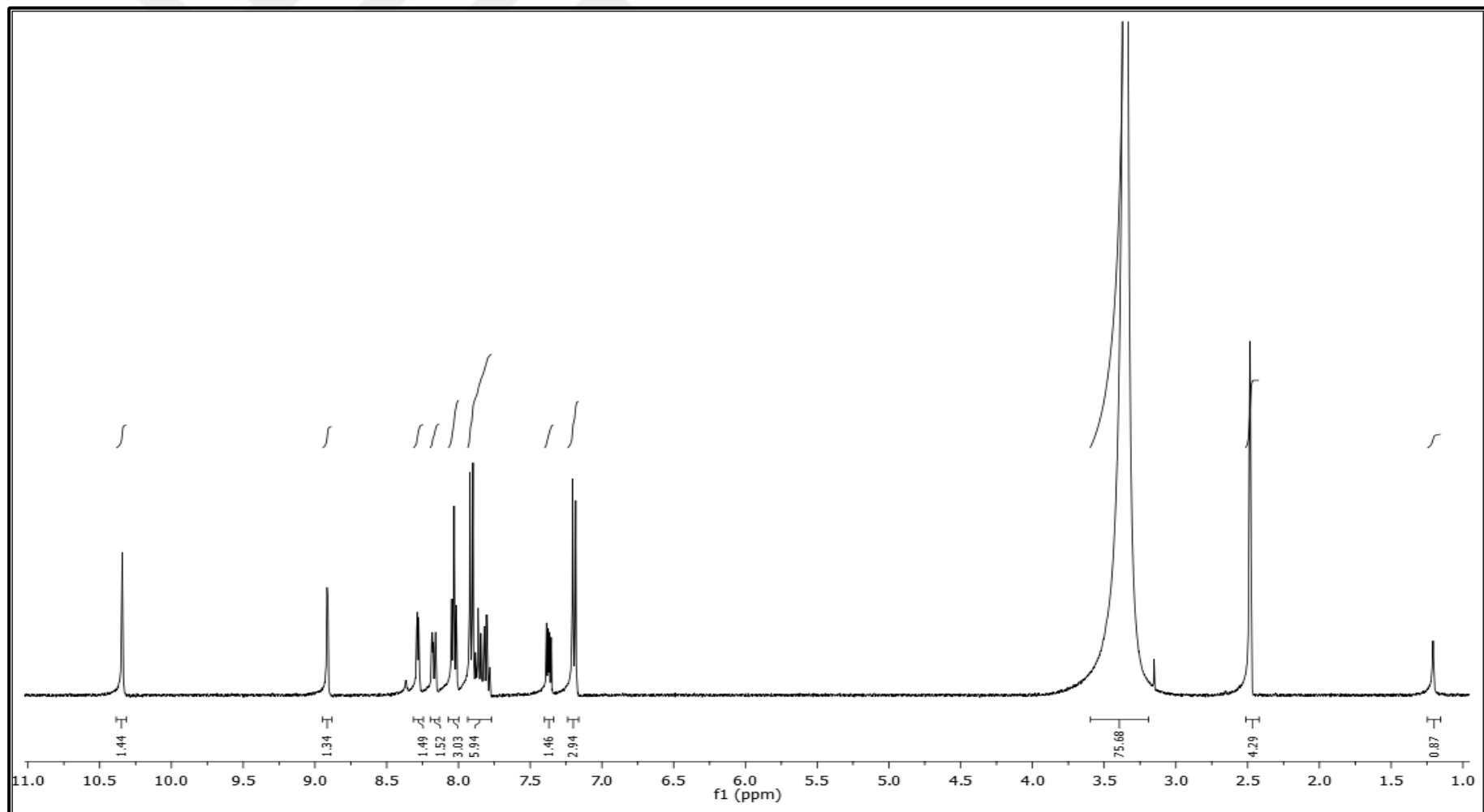
NK18 #39 RT: 0.35 AV: 1 NL: 2.95E6
T: {0,0} + c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [1.00-600.00]



Spektrum 167. NK18 kodlu bileşğin kütle spektrumu



Spektrum 168. NK20 kodlu bileşigin IR spektrumu

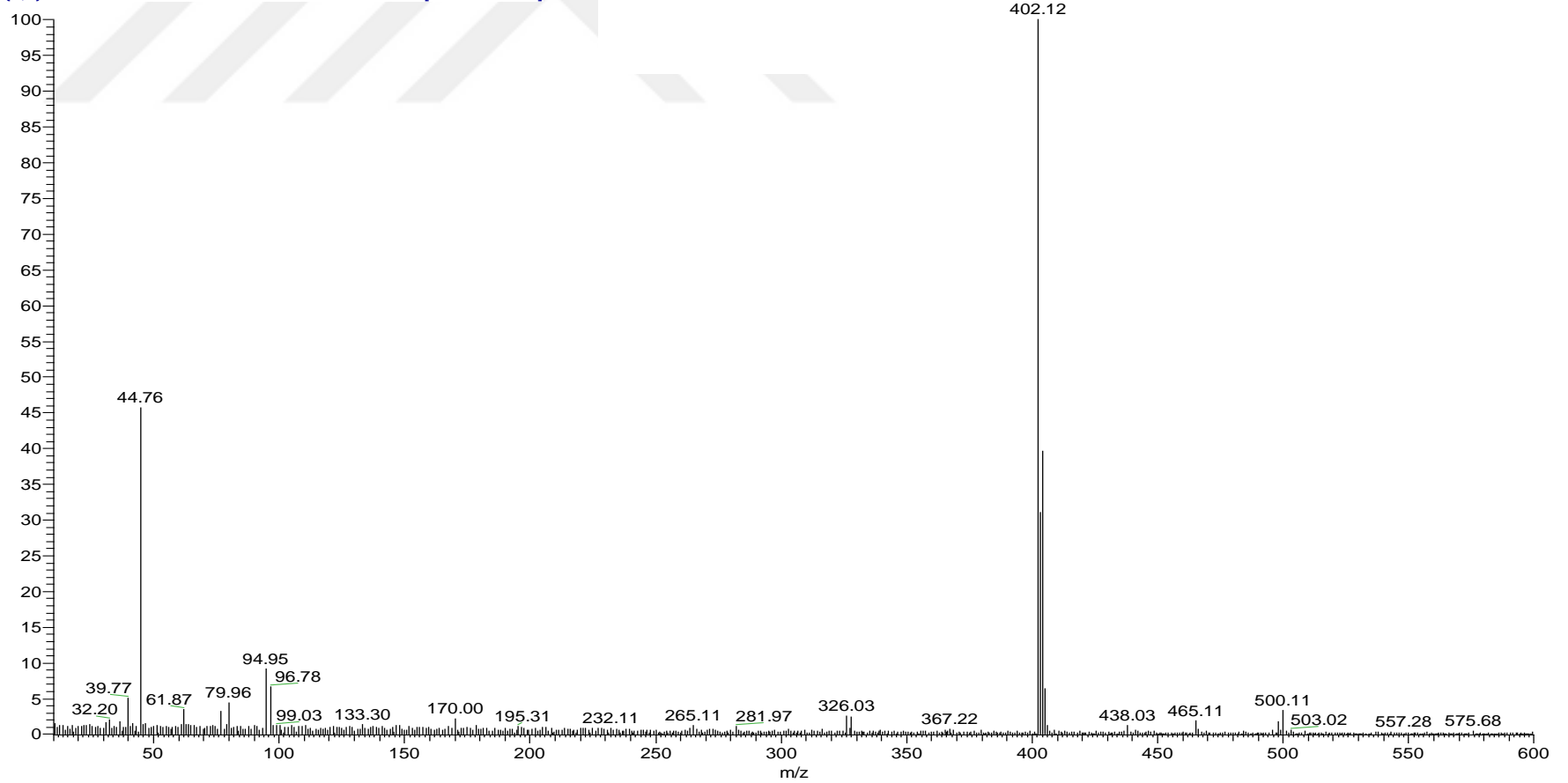


Spektrum 169. NK20 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu

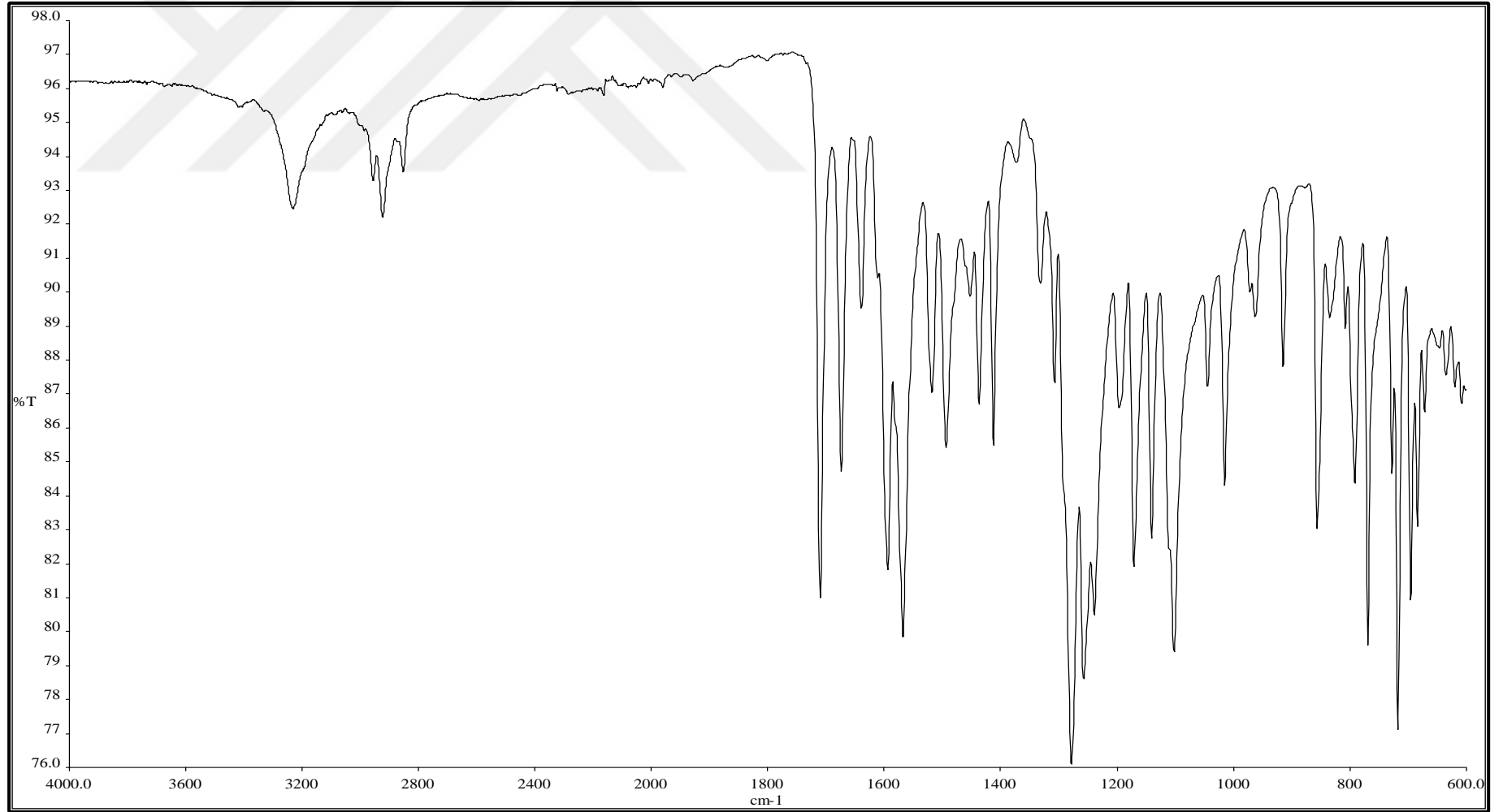
C:\Xcalibur...\2017 03 24\ESI\NK3AP-neg

3/24/2017 1:23:10 PM

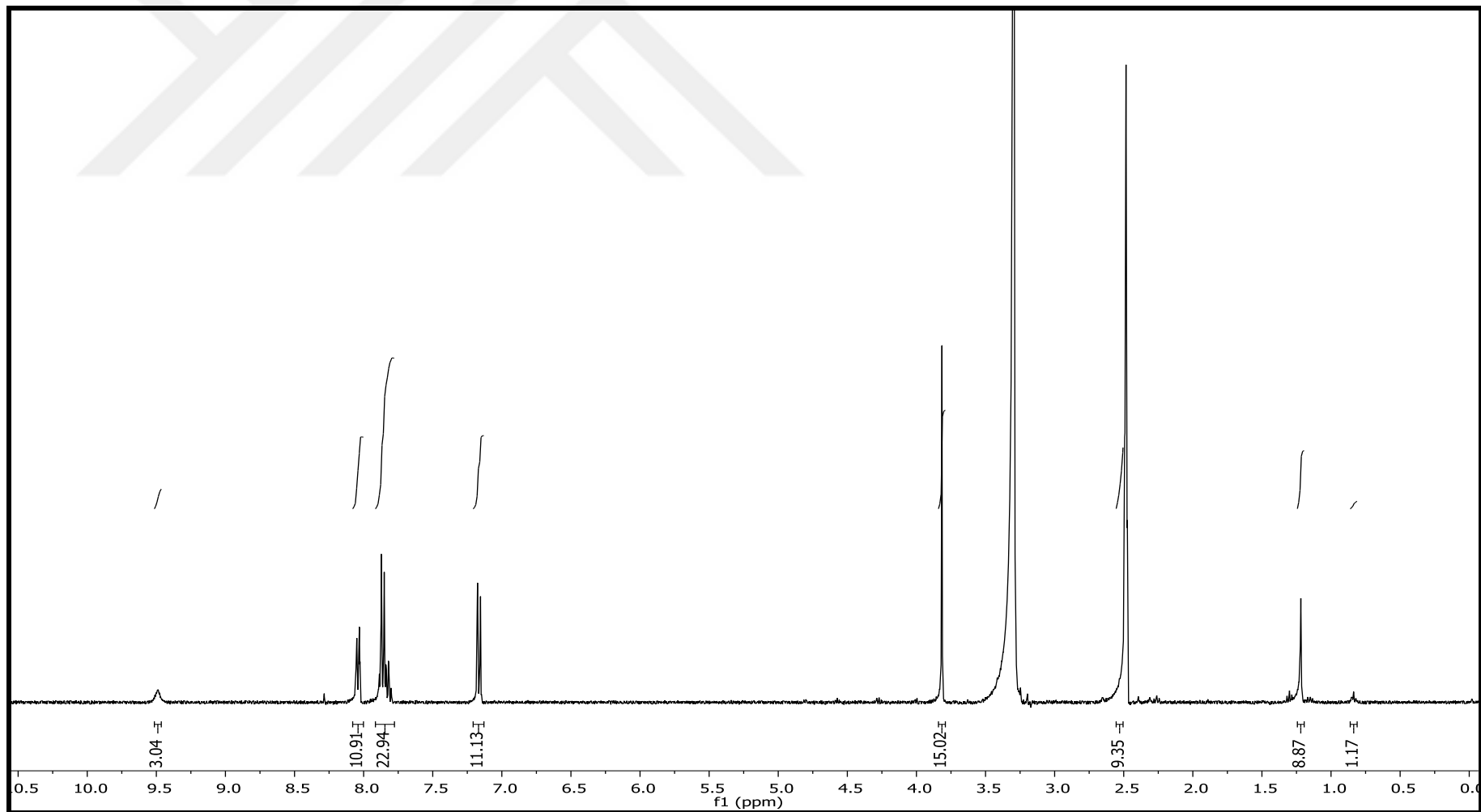
NK3AP-neg #69 RT: 0.62 AV: 1 NL: 1.30E5
T: {0,0} - c ESI !corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [10.00-600.00]



Spektrum 170. NK20 kodlu bileşğin kütle spektrumu



Spektrum 171. NK30 kodlu bileşğin IR spektrumu

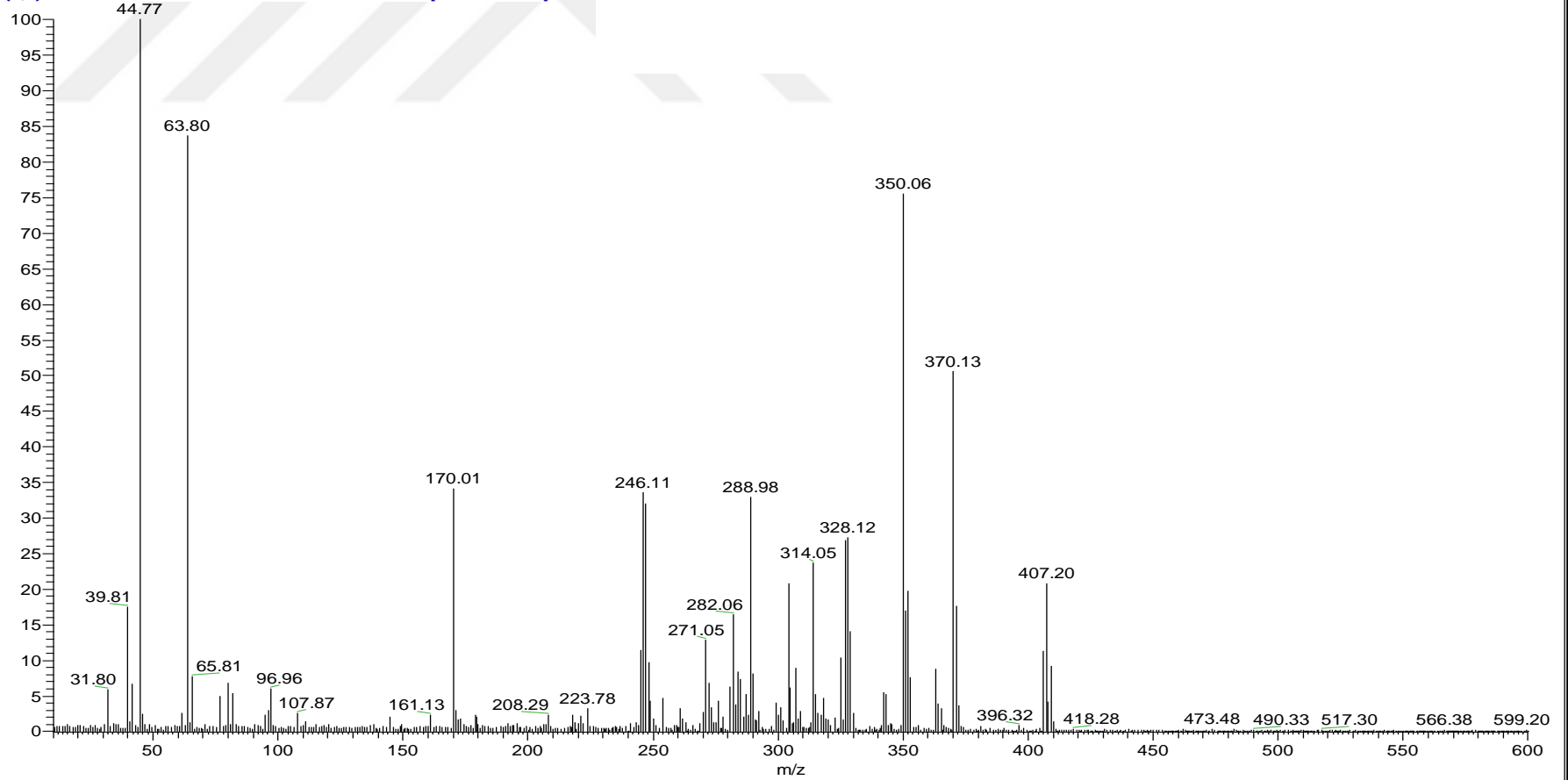


Spektrum 172. NK30 kodlu bileşğin ^1H NMR spektrumu

C:\Xcalibur\...\NK30-neg_170915142204

9/15/2017 2:22:04 PM

NK30-neg_170915142204 #40 RT: 0.35 AV: 1 NL: 1.86E5
T: {0,0} - c APCI corona sid=75.00 det=906.00 Full ms [10.00-600.00]



Spektrum 173. NK30 kodlu bileşğin kütle spektrumu