

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**1,5-DİARİLPİRAZOL-3-PROPANOİK ASİT YAPISI TAŞIYAN
COX/5-LOX DUAL İNHİBİTÖRÜ BİLEŞİKLERİN
SENTEZİ VE *İN VİTRO* İNHİBİTÖR ETKİ
TAYİNLERİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR**

DOKTORA TEZİ

Uzm. Ecz. Burcu ÇALIŞKAN ERGÜN

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Bilge ÇAKIR

Yardımcı Tez Danışmanı

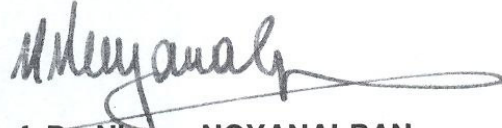
Doç. Dr. Erden BANOĞLU

Ankara
Nisan 2008

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Kimya Ana Bilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 29/4/2008



Prof. Dr. Ningur NOYANALPAN
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı



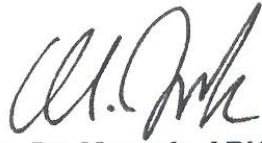
Prof. Dr. Bilge ÇAKIR
Gazi Üniversitesi



Prof. Dr. Hakan GÖKER
Ankara Üniversitesi



Doc. Dr. Erden BANOĞLU
Gazi Üniversitesi



Doç. Dr. Mustafa ARK
Gazi Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Tablolar, Şekiller, Grafikler	iii
Semboller, Kısaltmalar	iv
Önsöz	v
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Araşidonik Asit Metabolizması	5
2.1.1. Siklooksijenaz Yolağı	5
Prostanoidlerin biyolojik etkileri	7
COX enzimleri	8
NSAE ilaçlarla siklooksijenaz inhibisyonu	11
Selektif COX-2 inhibitörleri	13
2.1.2. 5-Lipoksijenaz Yolağı	17
Lökotrienler ve lipoksinlerin biyolojik etkileri	20
5-LOX enzimi	21
Antilökotrien ilaçlar	23
2.1.3. COX/5-LOX Dual İnhibitörler	29
2.1.4. COX veya 5-LOX İnhibitör Etkili Diarilpirazolpropanoik asit Türevleri	43
3. GEREÇ ve YÖNTEM	46
3.1. Kimyasal Çalışmalar	46
3.1.1. Gereçler	46
3.1.2. Genel Sentez Yöntemleri	46
3.2. Analitik Çalışmalar	48
3.2.1. Erime Noktası Tayini	48
3.2.2. İnce Tabaka Kromatografisi ile Yapılan Kontroller	48
3.2.3. Elementel Analizler	48
3.2.4. IR Spektrumları	48
3.2.5. NMR Spektrumları	49
3.2.6. MS spektrumları	49
3.3. Biyolojik Çalışmalar	49
3.3.1. COX İnhibisyonu Tayini	49
3.3.2. 5-LOX İnhibisyonu Tayini	50
3.4. Moleküler Modelleme Çalışmaları	52
3.4.1 COX-2 Aktif Bölgesi ile Etkileşim	52
3.4.2. 5-LOX Aktif Bölgesi ile Etkileşim	53
4. BULGULAR	55
4.1. Kimyasal Bulgular	55
4.2. Biyolojik Bulgular	88
4.3. Moleküler Modelleme Bulguları	92
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	94
6. ÖZET	106
7. SUMMARY	107
8. KAYNAKLAR	108
9. ÖZGEÇMİŞ	131

TABLolar, ŞEKİLLER, GRAFİKLER

	Sayfa
Tablo 1: Sentezi planlanan final bileşikler	4
Tablo 2: Bileşiklerin % COX-2 inhibisyon değerleri	88
Tablo 3: Bileşiklerin % 5-LOX inhibisyon değerleri	91
Tablo 4: Bileşiklerin COX-2 aktif bölgesindeki bağlanma Şekillerinin XP Glide skorları	93
Grafik 1: COX-2 inhibitörlerin selektivitite karşılaştırması	15
Grafik 2: Bileşik 2g'nin COX-2 inhibisyonu IC ₅₀ grafiği	89
Grafik 3: Bileşik 2g'nin COX-1 inhibisyonu IC ₅₀ grafiği	90
Grafik 4: Bileşik 2b ve 2f'nin 5-LOX inhibisyonu IC ₅₀ grafiği	92
Grafik 5: Bileşiklerin % COX-2 inhibisyon grafiği	98
Grafik 6: Bileşiklerin % 5-LOX inhibisyon grafiği	103
Şekil 1: Siklooksijenaz Yolağı ve Prostanoidlerin Oluşumu	6
Şekil 2: Koyun COX-1 enzimi yapısı*	9
Şekil 3: COX-1 ve COX-2'deki önemli aminoasit kalıntıları*	10
Şekil 4: 5-Lipoksijenaz Yolağı ve Lökotrienlerin oluşumu	18
Şekil 5: Lipoksinlerin Oluşumu	19
Şekil 6: Tavşan 15-LOX yapısı ve İnsan 5-LOX homoloji modeli*	22
Şekil 7: İnsan 5-LOX aktif bölgesinin Şematik gösterimi*	23
Şekil 8: Genel sentez Şeması	94
Şekil 9: Selekoksibin COX-2 enzim aktif bölgesine bağlanma Şekli ve Hidrojen bağı etkileşimi	99
Şekil 10: Bileşik 2g'nin COX-2 enzim aktif bölgesine 1. ve 2. bağlanma Şekilleri	100
Şekil 11: Bileşik 5b'nin COX-2 enzim aktif bölgesine bağlanma Şekli ve Hidrojen bağı etkileşimi	101
Şekil 12: Bileşik 2f'nin 5-LOX enzimi aktif bölgesine bağlanma Şekli	104

*Şekil 2 Annual Reviews © 2000, Şekil 3 Macmillan Publishers Ltd. © 2003, Şekil 6 ve 7 American Chemical Society © 2006 izni ile kullanılmıştır.

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

BLAST	The Basic Local Alignment Search Tool
BLT	B lökotrien reseptörü
CFF91	Consistent Force Field
COX	Siklooksijenaz
CVFF	Consistent Valence Force Field
CYP450	Sitokrom P450
CysLT	Sisteinil lökotrien reseptörü
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
EET	Epoksieikosatrienoik asit
EIA	Enzim İmmün testi
ESI	Elektrospray iyonizasyon
DHDMBF	Dihidrodimetilbenzofuran
DMSO	Dimetilsülfoksit
FDA	Food and Drug Administration
FLAP	5-LOX Aktive Edici Protein
GOLD	Genetic Optimisation for Ligand Docking
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit
HETE	Hidroksieikosatetraenoik asit
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HPETE	Hidroperoksieikosatetraenoik asit
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
IC₅₀	% 50 inhibisyon için gerekli inhibitör konsantrasyonu
LOX	Lipoksijenaz
LT	Lökotrien
LX	Lipoksin
MCPBA	<i>m</i> -Kloroperbenzoik asit
mPGES	Mikrozomal veya membran bağlı PGE sentaz
NSAE	Nonsteroidal antienflamatuvar
OPLS-AA	Optimized Potentials for Liquid Simulations/All Atom
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PDB	Protein Veri Bankası
PG	Prostaglandin
PLA₂	Fosfolipaz A ₂
POX	Peroksidaz
PPAR	Peroksizom Proliferasyonu Aktive Edici Reseptör
RIA	Radyoimmün testi
SI	Selektivite indeksi
TrisHCl	Tri(hidroksimetil)aminometan hidroklorür
TX	Tromboksan

ÖNSÖZ

Çalışmalarım boyunca her türlü yardımını, desteğini, sabrını ve bilgisini esirgemeyen yardımcı tez danışmanım Doç. Dr. Erden BANOĞLU'na, COX enzimi ile ilgili biyolojik çalışmaları gerçekleştiren FAES Farma Laboratuvarı'ndan Dr. Aurelio ORJALES ve ekibine, LOX enzimi ile ilgili biyolojik çalışmaları gerçekleştiren Amira Pharmaceuticals'dan Dr. Peppi PRASIT ve ekibine, COX enzimi ile ilgili moleküler modelleme çalışmasını titizlikle yapan ve yorumlarıyla katkı sağlayan Prof. Dr. Antonio ENTRENA ve Prof. Dr. Gabriel COSTANTINO'ya, LOX enzimi ile ilgili moleküler modelleme çalışmasını büyük bir özveriyle yapan Dr. Caroline CHARLIER'e, tez çalışmam boyunca ilgisini eksik etmeyen ve analiz çalışmalarını titizlikle gerçekleştiren Prof. Dr. Hakan GÖKER'e, doktora eğitimim boyunca sundukları destekleyici ortam için Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ningur NOYANALPAN ve tüm öğretim üyelerine, her zaman yanımda olan arkadaşlarım Gökçen EREN ve Yasemin DÜNDAR'a,

Ve tez danışmanlığımı yürüten Prof. Dr. Bilge ÇAKIR'a tez çalışmama yaptıkları katkılardan dolayı teşekkür ederim.

Burcu ÇALIŞKAN ERGÜN

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Prostaglandinler, birçok fizyolojik ve patofizyolojik fonksiyonda yer alan lipid medyatörlerdir. Bu fonksiyonlarının arasında ağrı, ateş ve enflamasyonla ilişkili semptomları indüklemeleri yer almaktadır [1]. Araşidonik asitten prostaglandin (PG) biyosentezindeki anahtar enzim siklooksijenaz (COX), nonsteroidal antienflamatuvar (NSAE) ilaçların ana hedefidir [2]. Bu ilaçların kronik kullanımları sıklıkla gastrointestinal yan etkilere neden olsa da çok sayıda COX inhibitörü bileşik analjezik, antipiretik ve antienflamatuvar etkileri nedeniyle tedavide kullanılmaktadır [3].

COX enziminin, COX-1 ve COX-2 olmak üzere iki ayrı izoformu bulunmaktadır. COX-1'in fizyolojik fonksiyonlardan sorumlu yapısal form, COX-2'nin ise çoğunlukla enflamasyon uyarıcıları ile indüklenen ve enflamasyon bölgesindeki prostaglandinlerin sentezinden sorumlu indüklenebilir form olduğunun bulunması yeni bir hipotezi ortaya çıkarmıştır. Buna göre NSAE ilaçların antienflamatuvar etkisi COX-2 inhibisyonu sonucu, gastrik ve intestinal mukoza hasarı ve renal toksisite gibi istenmeyen yan etkileri ise COX-1 inhibisyonu sonucu ortaya çıkmaktadır. Sonuçta selektif olarak COX-2'yi inhibe edecek ilaçların gastrointestinal toksisiteden yoksun ve daha güvenilir olacağı düşünülmüştür [4]. Bu hipoteze dayanarak birçok selektif COX-2 inhibitörü bileşik sentezlenmiş ve dokuz yıl önce ilk olarak rofekoksib (Vioxx) ve selekoksib (Celebrex) klinikte yerini almıştır [5, 6].

Son yıllarda COX-2 enziminin gastrik mukoza korunması, renal fonksiyonun düzenlenmesi ve endotel prostaglandin I₂ oluşumu gibi fizyolojik rollerine ilişkin bulguların giderek artması, rofekoksib ve valdekoksibin ciddi kardiyovasküler yan etkiler nedeniyle piyasadan çekilmesi COX-2 selektif inhibitörlerin yararlarının sorgulanmasına neden olmuştur [5, 7-12].

Bu gelişmelerden sonra NSAE ilaçlarla ilgili çalışmalar önem kazanmış, bu ilaçların terapötik etkinliğini geliştirmek, daha iyi tolere edilmelerini sağlamak için yeni stratejiler ortaya çıkmıştır. Yeni terapötik yaklaşımlar arasında dual COX

ve 5-LOX inhibitörleri, sentetik lipoksinler ve nitrik oksit (NO) salıcı NSAİE ilaçlar yer almaktadır [12, 13].

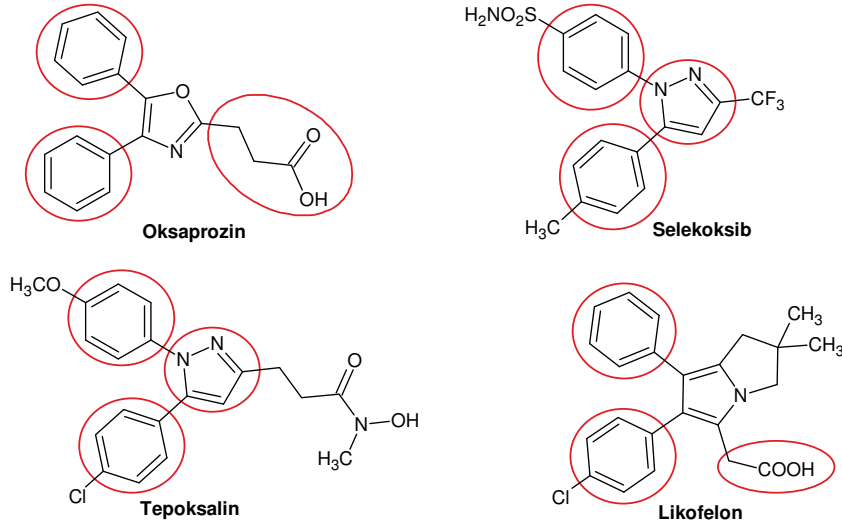
Araşidonik asit metabolizmasındaki diğer önemli yolak lipoksijenaz (LOX) yolağıdır. Lökotrienlerin (LT) oluşumuna neden olan 5-lipoksijenaz (5-LOX) yolağı proenflamatuvar kaskad olarak bilinmektedir [1]. Lökotrienlerin mide hasarı oluşumundaki rollerinin yanı sıra bronşları daraltıcı özellikleri de bulunmaktadır [14]. COX inhibisyonu sonucu vasodilatör ve mide koruyucu prostaglandinlerin sentezi azalırken, lipoksijenaz yolağı ile oluşan lökotrienlerin miktarının arttığı bildirilmiştir [15, 16]. Çeşitli hücrelerde COX inhibisyonu sonucu 5-LOX veya 5-LOX aktive edici proteinin (FLAP) ekspresyonundaki artış araşidonik asit metabolizmasının COX yolağından 5-LOX yolağına kaymasını açıklamaktadır [17, 18].

Bu bulgular temel alınarak prostaglandin ve lökotrienlerin birlikte inhibisyonunun daha güçlü antienflamatuvar etkinlik oluşturacağı ayrıca lökotrienlerin gastrointestinal mukozadaki yan etkileri nedeniyle dual inhibisyonun gastrointestinal güvenilirliği artıracığı düşünülmüştür. Bu amaçla COX ve 5-LOX yolaklarını eş zamanlı inhibe eden ilaçlar tasarlanmış ve dual etkili antienflamatuvarlar olarak adlandırılmıştır [14, 19, 20]. Bununla birlikte dual inhibitörlerin trombozun önlenmesinde ve aterosklerozis tedavisinde de yararlı olacağı düşünülmektedir [21].

Bu dual etkili bileşikler hem enflamatuvar hastalıkların tedavisinde hem de COX ve 5-LOX enzimlerinin rol oynadığı çeşitli kanser tiplerinin ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde umut verici görülmektedir [4, 22-25].

Bugüne kadar değişik yapıda dual inhibitör etkili bileşikler tasarlanmış ve aktiviteleri araştırılmıştır. Ancak tedavide kullanılan dual etkili antienflamatuvar bir ilaç henüz bulunmamaktadır. Bu bileşiklerden en ileri aşamadaki aday likofelon osteoartrit tedavisindeki etkinliğini ve gastrointestinal güvenilirliğini klinik denemelerde kanıtlamıştır [13, 26-28].

Son yıllarda önem kazanan bu yeni strateji esas alınarak tez kapsamında dual COX/5-LOX inhibitör etkili ilaçlar için öncü bileşiklere ulaşmak hedeflenmiştir. Bileşiklerin ana yapısı seçilirken NSAE ilaçlardan oksaprozin, selektif COX-2 inhibitörlerden selekoksib, dual etkili bileşiklerden tepoksalin ve likofelonun yapısal özellikleri göz önünde bulundurularak COX-2 selektif ve dual inhibitörlerin yapısında yer alan diarilpirazol trisiklik halka yapısı ile NSAE ve antilöktrien ilaçlarda yer alan karboksilik asit grubunun aynı molekülde birleştirilmesi düşünülmüştür.



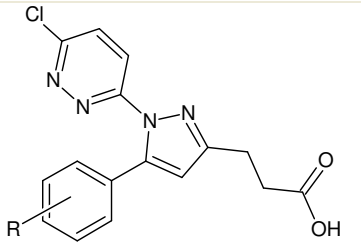
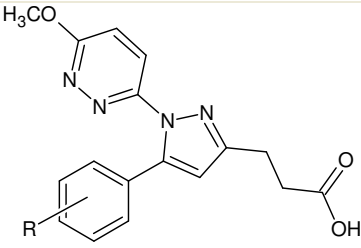
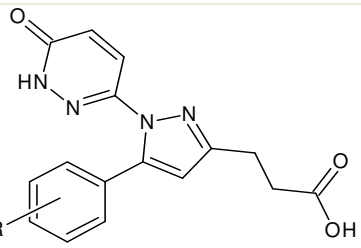
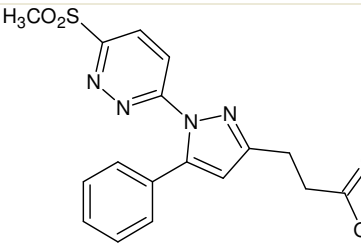
Karboksilik asit grubu birçok NSAE ilaç yapısında bulunmakla birlikte, 5-LOX yolağının inhibisyonunu sağlayan FLAP inhibitörlerinin ve bazı dual inhibitörlerin yapısında da yer almaktadır. 1,5-diarilpirazol yapısı taşıyan selektif COX-2 inhibitörü selekoksibin suda zayıf çözünürlüğü nedeniyle oral biyoyararlanımı düşük bir ilaç olduğu bilinmektedir [29]. Bu sınıf bileşiklerin farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerini iyileştirmek için fenil halkalarından birinin piridin veya piridazin gibi farklı heterosiklik halkalar ile değiştirilmesi araştırmacılar tarafından yaygın kullanılan bir yaklaşımdır [30-35]. Bu amaçla genel yapıda pirazol halkasının 1. konumuna farklı sübstitüentler taşıyan piridazin halkası yerleştirilmiştir.

1,5-diarilpirazol-3-propanoik asit türevlerinin COX veya 5-LOX enzim inhibitör etkileri üzerinde sınırlı sayıda çalışma kayıtlıdır. Bu çalışmalardan Ortho

Pharmaceutical'a ait bir patentte fenil grupları farklı heterosiklik halkalarla değiştirilmiş ancak bu türevlerden piridazin halkası içeren tek bileşik tez kapsamındaki bileşiklerden Bileşik 2c ile sınırlı kalmıştır [36].

Bu bilgilere dayanarak bu tez kapsamında 1,5-diarilpirazol-3-propanoik asit genel yapısına sahip bileşiklerde pirazol halkasının 1. konumunda kloropiridazin, metokspiridazin, piridazinon ve metilsülfonilpiridazin halkalarının, 5. konumdaki fenil halkasında yer alan sübstitüentlerin ve 3. konumda propanoik asit grubunun COX ve 5-LOX inhibisyonuna etkilerinin araştırılması, aktif bileşiklerin COX ve 5-LOX enzimlerinin aktif bölgeleriyle bağlanma etkileşimlerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Sentezi planlanan final bileşiklerin kimyasal yapıları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1: Sentezi planlanan final bileşikler

 <p>Bileşik 2a-i</p>	 <p>Bileşik 3a-h</p>	<p>R</p> <p>4-H 4-F 4-Cl 4-Br 4-OCH₃ 4-CH₃ 4-CF₃ 4-SO₂CH₃ 2-OCH₃</p>
 <p>Bileşik 4a-h</p>	 <p>Bileşik 5b</p>	

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Araşidonik Asit Metabolizması

Eikosanoid biyosentezinin öncüsü olan araşidonik asit (5, 8, 11, 14-eikosatetraenoik asit) fosfolipit hücre membranlarında en sık rastlanan çoklu doymamış yağ asitidir. Membran fosfolipitlerinden fosfolipaz A₂'nin (PLA₂) aktivasyonu ile salınan araşidonik asit yapısında cis pozisyonda dört çifte bağ içermesi nedeniyle oksijenle tepkimeye oldukça yatkındır [23].

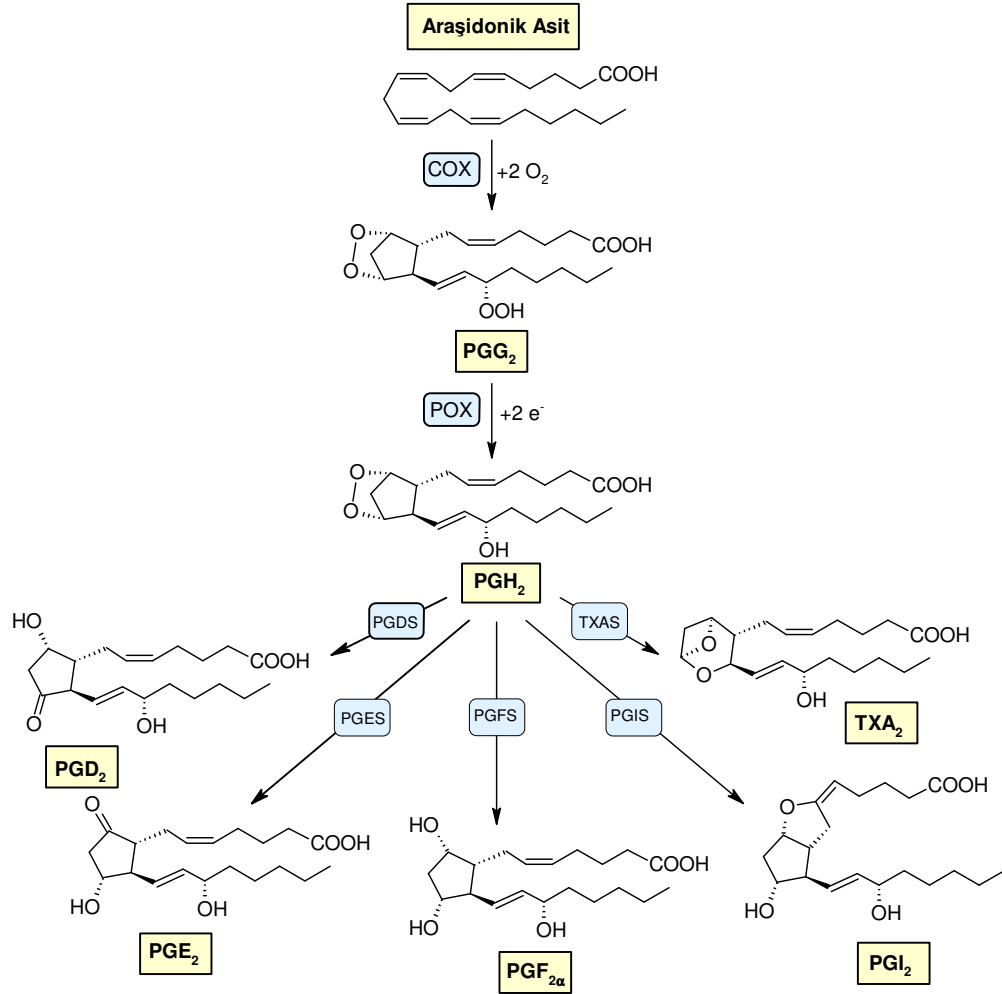
Araşidonik asit üç önemli yolakla, siklooksijenaz (COX), lipoksijenaz (LOX), sitokrom P450 (CYP450) epoksijenaz yolları ile metabolize olur. COX yolağı ile prostaglandinler (PG) ve tromboksanlar (TX), LOX yolağı ile lökotrienler (LT), lipoksinler (LX), hidroksieikosatetraenoik asitler (HETE) ve hepoksilinler, epoksijenaz yolağıyla ise epoksieikosatrienoik asitler (EET) oluşur. COX ve LOX yolları ile oluşan eikosanoidler birçok biyolojik fonksiyonda yer almakla birlikte enflamasyon, ateş, artrit ve kanser gibi çeşitli hastalıklarda da rol oynamaktadır [37].

2.1.1. Siklooksijenaz Yolağı

Siklooksijenaz (prostaglandin endoperoksit H sentaz) enzimleri, siklooksijenaz ve peroksidaz aktivitesi gösteren çift fonksiyonlu proteinlerdir ve araşidonik asitten prostaglandin endoperoksit ara ürünlerinin (PGG₂ ve PGH₂) oluşumunu katalize ederler. Siklooksijenaz reaksiyonunda araşidonik asit iki molekül oksijen eklenmesiyle PGG₂'ye çevrilirken, peroksidaz reaksiyonu ile PGG₂ PGH₂'ye indirgenir [38].

PGH₂ doku spesifik sentazlar tarafından PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ (prostasiklin) ve TXA₂'ye metabolize olmaktadır (Şekil 1). Bu COX ürünlerinin biyosentezi hücre spesifiktir ve prostanoid üreten hücre bu bileşiklerden sadece bir tanesini ana ürün olarak oluşturma eğilimindedir. Örneğin beyin ve mast hücrelerde PGH₂ sitozolik enzim PGD sentaz aracılığıyla PGD₂'ye dönüştürülür. PGF_{2α} esas olarak uterusunda bulunan PGF sentaz aracılığıyla sentezlenir.

Vasküler endotel hücreler PGI sentaz ile PGH₂'den PGI₂ oluştururken, plateletler TX sentaz ile TXA₂ oluşturur. PGI₂ ve TXA₂ dayanıksız olup sırasıyla 6-keto-PGF_{1α} ve TXB₂'ye hidroliz olurlar [39].



Şekil 1: Siklooksijenaz Yolağı ve Prostanoidlerin Oluşumu

Çoğu hücrede sentezlenen PGE₂, PGE sentaz (PGES) aracılığıyla oluşturulmaktadır. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda sitozolik PGES (cPGES), mikrozomal PGES-1 (veya membran bağlı PGES) ve mPGES-2 olmak üzere üç farklı PGES izoformu tanımlanmıştır [40-42]. Mikrozomal PGES indüklenebilen COX-2 ile ilişkili olarak PGE₂ sentezinden sorumlu olması ve COX-2'nin yer aldığı

çeşitli patofizyolojik olaylara katılması nedeniyle yeni bir ilaç hedefi olmaktadır [43, 44].

Prostanoidlerin biyolojik etkileri

Prostanoidler otokrin ve parakrin fonksiyonları olan lipid medyatörlerdir, etkileri hedef hücre membranlarında bulunan özel prostaglandin reseptörlerinin aktivasyonu sonucu oluşur. Bu reseptörler sırasıyla PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂ ve TXA₂'nin bağlandığı EP₁-EP₄, DP₁ ve DP₂, FP_α ve FP_β, IP, TP_α ve TP_β reseptörleridir. DP₂ dışındaki prostaglandin reseptörleri G-protein bağlı reseptör süper ailesinde üç farklı gruba aittir. Prostaglandinler hücre çekirdeğine girebilir ve PPAR-γ (peroksizom proliferasyonu aktive edici reseptör) gibi nükleer hormon reseptörlerini aktive edebilirler [1, 38].

Prostanoidler çok sayıda fizyolojik ve patofizyolojik cevapta rol oynamaktadır. En iyi bilinen fonksiyonları enflamasyonun ağrı, ateş ve şişme gibi belirtilerinin gelişiminde rol oynamalarıdır. PGE₂ ve PGI₂, histamin ya da bradikinin gibi diğer otokoidlerle sinerji içinde hareket eden potent vazodilatörlerdir. Bunların kapillerde birlikte çalışmaları akut enflamasyonlu bölgelerde kızarıklık ve artmış kan akışına neden olur. Vasküler permeabiliteyi artırarak dokuların karakteristik şişliğine neden olurlar. Ayrıca duyu sinirlerin periferik terminallerini duyarlı hale getirerek hiperaljezi yaratırlar. PGE₂ nöronlarda etkilidir ve enflamasyonun ateş, yorgunluk ve ağrı hipersensitivitesi gibi sistemik cevaplarına eşlik eder [45].

Prostanoidler enflamasyon uyarısı, üretilen prostanoid ve prostanoid reseptörüne bağlı olarak hem proenflamatuvar hem de antienflamatuvar etkinlik gösterebilirler. PGE₂'nin güçlü proenflamatuvar etkileri bilinmekle beraber lenfosit proliferasyonunu baskılayıcı ve bazı interlökin ve interferonların oluşumunu engelleyici antienflamatuvar özellikleri de bilinmektedir. Bunun yanında PGD₂'den türeyen siklopentanon türevi prostaglandinlerin de antienflamatuvar etkiye sahip oldukları bilinmektedir [46, 47].

Damar endotelindeki başlıca COX ürünü olan prostasiklin (PGI₂), platelet agregasyonu ve adhezyonunu inhibe eder ayrıca vazodilatör etkiye sahiptir, kan

basıncını düşürür ve damar düz kas hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eder. TXA_2 plateletlerde COX-1 aracılığıyla oluşur ve platelet agregasyonunu artırır. Bu etkisinin yanında kan damarlarında konstrüksiyona neden olur ve damar kas hücrelerinin proliferasyonunu artırır. Bu özelliklerine bağlı olarak PGI_2 ve TXA_2 arasındaki denge kardiyovasküler sistem sağlığı açısından önemlidir [5, 11].

PGE_2 ve PGI_2 asit üretiminin azalması, mukus salgısının artması ve mukozada vazodilatör etki sonucunda gastrik mukoza korunmasına yardımcı olur. Normal fizyolojik koşullarda gastrik mukozada koruyucu prostaglandinlerin oluşumundan COX-1 sorumlu iken, patolojik durumlarda COX-2'nin de mukoza korunmasına katıldığı bilinmektedir [12, 19].

Normal böbrek korteksi başlıca PGI_2 ve PGE_2 az miktarda da TXA_2 üretirken, medulla çoğunlukla PGE_2 üretir ve renal prostaglandinlerin üretildiği majör bölgedir. Renal PGE_2 başlıca COX-1 aracılığıyla sentezlenirken makula densadaki bazal COX-2 aracılığıyla PGI_2 sentezlenmektedir. Normal böbrek fonksiyonu için PG'ler esansiyel değildir ancak fonksiyonu bozulmuş böbrekte önemli rol oynamaktadır [48]. Bunun yanında PG'lerin solunum, üreme, kas iskelet ve merkezi sinir sistemindeki çeşitli rolleri bilinmektedir [49].

COX enzimleri

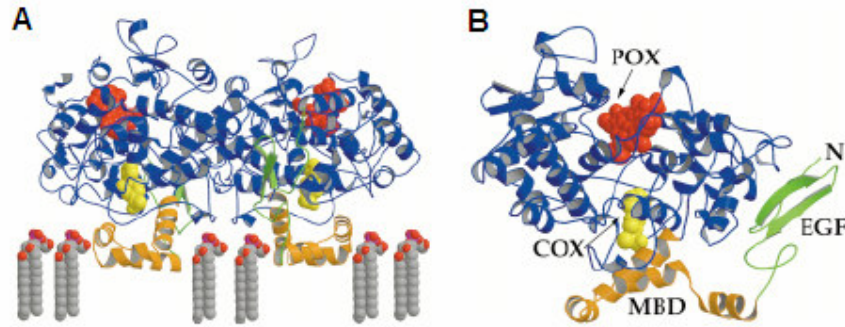
COX-1 ve COX-2 başlıca endoplazmik retikulumda yerleşmiş membran bağlı proteinlerdir. COX-1 ve COX-2 geni sırasıyla kromozom 9 ve 1'de yer alır. İnsan COX-2 geni 8.3 kilobaz, COX-1 geni ise 22 kilobaz büyüklüğündedir. COX-1 ve COX-2 mRNA'ları da büyüklük açısından farklıdır (2.8 ve 4 kilobaz). Bu iki enzimi kodlayan genler ve mRNA'lar farklı olsa da COX-1 ve COX-2 enzimleri amino asit dizilimi, moleküler kütle, hücre içi yerleşim ve enzimatik fonksiyon açısından oldukça benzerdir [6, 11].

COX genlerinin özellikle COX-1'in ek varyantlar ürettiği bilinmektedir. Simmons ve ekibi tarafından köpekte bulunan COX-1 varyantı COX aktivitesi taşıyan tek varyant olması nedeniyle COX-3 olarak adlandırılmıştır. COX-3'ün çoğunlukla serebral kortekste ve kalpte bulunduğu ayrıca bu izoformun

parasetamol, fenasetin, antipirin ve dipiron gibi analjezik/antipiretik ilaçlara duyarlı olduğu bildirilmiştir [50-52].

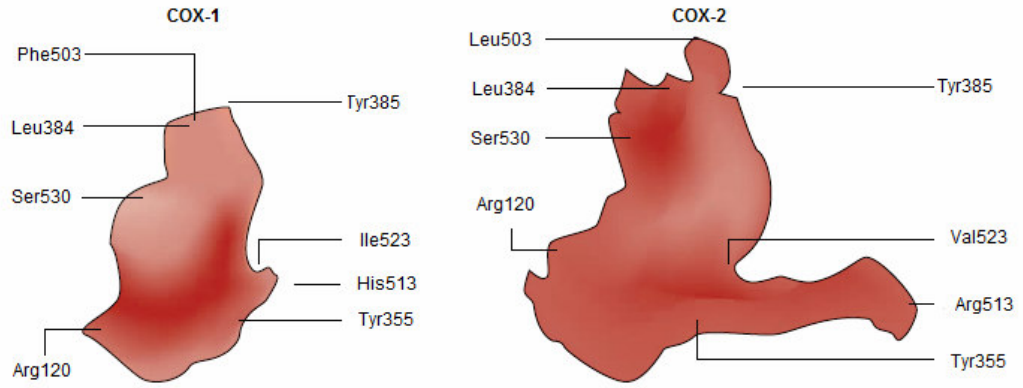
Ancak yapılan diğer çalışmalarda insan, köpek ve kemirgenlerdeki COX-3 proteinlerinin önemli bir homoloji göstermediği bulunmuştur. İnsan ve sıçan COX-3'ü tarafından kodlanan proteinlerin COX-1 ve COX-2'den tamamen farklı amino asit dizilimine sahip olduğu ve COX aktivitesine sahip olmadığı bildirilmiştir. Bu nedenle COX-3 yerine COX-1b olarak adlandırılmasının daha doğru olacağı düşünülmüştür [53, 54].

Çok sayıda türden elde edilmiş COX-1 ve COX-2'nin birincil yapıları bilinmektedir. Olgun memeli COX-1 ve COX-2 enzimleri 576 ve 587 aminoasit içerir. % 60-65 oranında dizilim benzerliği taşırlar. Siklooksijenazlar hem fonsiyonel hem de yapısal olarak homodimer olarak bulunurlar. Her monomer üç yapısal bölge içerir. Bunlar N-terminal epidermal büyüme faktörü (EGF) benzeri bölge, membran bağlanma bölgesi, C-terminal globüler katalitik bölgedir (Şekil 2) [55].



Şekil 2: Koyun COX-1 enzimi yapısı: (A) Membrana bağlı ve aktif bölgede flurbiprofen (sarı) bağlı COX-1 homodimeri (B) Epidermal büyüme faktörü (EGF, yeşil), membran bağlanma bölgesi (MBD, turuncu), globüler katalitik bölge (mavi), hem (kırmızı), peroksidaz bölgesi (POX), siklooksijenaz bölgesi (COX). Kaynak [55]'den Annual Review of Biochemistry'nin izni ile kullanılmıştır. (Reprinted, with permission, from Annual Review of Biochemistry, Volume 69 © 2000 by Annual Reviews www.annualreviews.org)

COX-1 ve COX-2 monomerlerinin her biri membran bağlanma bölgesinden katalitik merkeze uzanan uzun hidrofobik kanal içerir. Peroksidaz reaksiyonu protein yüzeyine yakın hem içeren aktif bölgede, siklooksijenaz reaksiyonu ise enzim içinde hidrofobik kanalda gerçekleşir. NSAİ ilaçların bağlanma bölgesi arjinin 120'den tirozin 385'e kadar, kanalın üst yarısında yerleşmiştir. Hidrofobik siklooksijenaz aktif bölgesinde yirmidört aminoasit kalıntısı bulunmaktadır ve sadece üç aminoasit polardır (Arg120, Ser353, Ser530). Arjinin 120 çoğu NSAİ ilaç ve yağ asitlerinde yer alan karboksilat grubuna bağlanır, serin 530 kanalın ortasında yer alır ve aspirinin asetilleği yerdır [55-59].



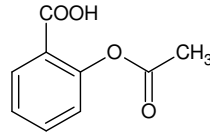
Şekil 3: COX-1 ve COX-2'deki önemli aminoasit kalıntıları. Kaynak [60]'dan Macmillan Publishers Ltd.'nin izni ile kullanılmıştır. (Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY Ref. [60], Copyright 2003)

Siklooksijenaz aktif bölgesi COX-2'de % 20 daha geniştir ve COX-1'den farklı bir şekle sahiptir (Şekil 3). Aktif bölgedeki büyüklük ve şekil farkı COX-1 ve COX-2 arasındaki üç aminoasit farklılığına bağlıdır. COX-1'de 523. konumdaki izölösün yerine COX-2'de valin bulunmaktadır. Bu farklılık kanalda küçük hidrofilik bir yan cep açarak COX-2 aktif bölgesinin hacmini genişletir. Bu yan cep COX-2 inhibitörler tarafından kullanılan yapısal bir özelliktir. Ek olarak COX-1 enziminde 434. konumdaki izölösün yerine COX-2'de valin yer almaktadır. COX-2'deki 523. ve 434. konumlardaki bu değişiklikler fenilalanin 518'de konum değişikliğine neden olur ve yan cep hacmini artırır [57, 61]. Ayrıca COX-1'de 513. konumdaki histidin, COX-2'de arjinin ile yer değiştirmesi yan cebin kimyasal yapısını değiştirir ve polar gruplarla etkileşimi sağlar [57, 60].

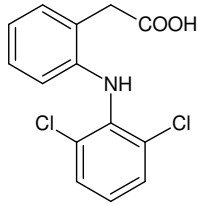
NSAE ilaçlarla siklooksijenaz inhibisyonu

Ağrı ve enflamasyon tedavisinde kullanılan nonsteroidal antiinflamatuvar (NSAE) ilaçlar dünyada en yaygın kullanılan ilaç grubudur. Kimyasal olarak oldukça farklı yapılarda olsalar da ortak özellikleri terapötik etkilerini COX enzimlerini inhibe ederek göstermeleridir. Terapötik yararlarına rağmen kullanımları gastrointestinal yan etkileri nedeniyle sınırlanmaktadır [6].

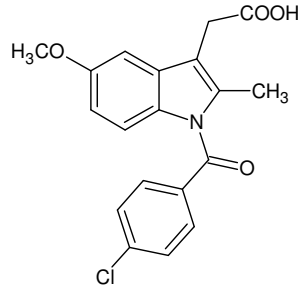
Tarihsel olarak bakıldığında terapötik olarak etkili ilk NSAE ilaç 100 yıldan fazla süredir kullanılan aspirindir [62]. 1940'lı yıllarda fenilbutazon, 50'lerde fenamatlar, 60'larda indometazin, 70'lerde propiyonatlar ve 80'lerde oksikamlar geliştirilmiştir. 1990'lı yıllarda ikinci COX izoformunun keşfiyle yeni selektif izoform inhibitörleri arayışı başlamıştır [60].



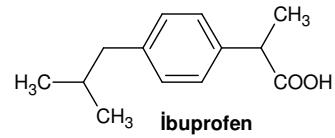
Asetilsalisilik asit



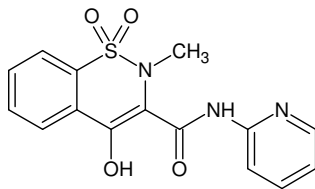
Diklofenak



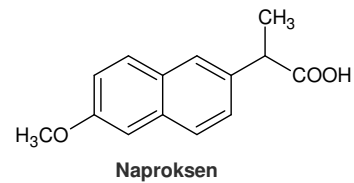
İndometazin



İbuprofen



Piroksikam



Naproksen

Selektif COX-2 inhibitörleri geliştirilmesi için, bileşiklerin her iki enzim üzerindeki inhibitör etkilerini ölçmeye uygun *in vitro* test sistemlerine ihtiyaç duyulmuştur. Bu test yöntemlerinde enzim kaynağı olarak saflaştırılmış enzimler, hücre kültürleri veya insan tam kanı kullanılmaktadır. Çoğu test final ürün

PGE₂'nin RIA, EIA veya HPLC ile ölçümüne dayanır. Her yöntem inhibitörle enzimin 2 dakika ile 15 dakika arasında ön inkübasyonunu gerektirir [62, 63].

Çoğunlukla enzim selektivitesi tayini için kullanılan parametre bileşiklere ait COX-1/COX-2 IC₅₀ değerleri oranıdır. IC₅₀ değerleri test sistemlerine göre farklılık gösterebilir. Bu nedenle iki bileşiğin selektivite değerleri ancak aynı test sistemi kullanıldığında karşılaştırılabilir [62, 63].

NSAE ilaçlar dört farklı inhibisyon kinetiğinden birini sergilemektedir: (1) basit yarışmalı inhibisyon, ör. ibuprofen (2) sıkı bağlanma, zamana bağlı inhibisyon ör. indometazin (3) zayıf bağlanma, karışık inhibisyon ör. naproksen, oksikamlar (4) kovalan inhibisyon ör. aspirin [63].

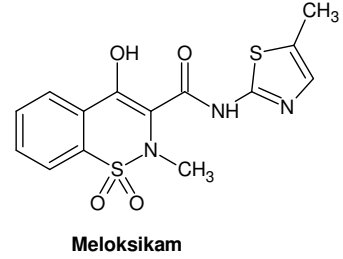
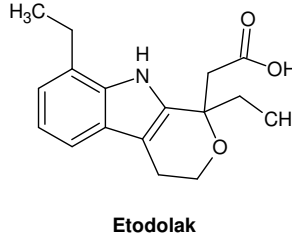
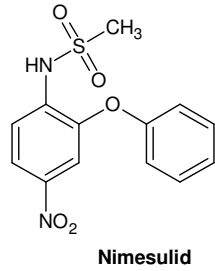
Bazı NSAE ilaçlar her iki enzim inhibisyonunda aynı mekanizmayı sergilerken bazıları ayrı iki mekanizmayla etki gösterir. Zayıf bağlanan inhibitörler enzim testlerinde değişken davranış sergiler ve inhibitör etkinlikleri deney koşullarından belirgin şekilde etkilenir. NSAE ilaçların her bir enzim izoformunun inhibisyonunda gösterdiği bu kinetik farklılıklar COX-1 ve COX-2 enzim inhibitör aktivitelerinin karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır [55, 63].

Selektif COX-2 inhibitörler COX-2'yi zamana bağlı psödo geri dönüşümsüz mekanizma ile inhibe ederken, COX-1'i yarışmalı geri dönüşümlü olarak inhibe etmektedir [55]. Zamana bağlı inhibisyonun etkinliği, enzim ve inhibitörün ön inkübasyon süresi ile belirgin şekilde artış göstermektedir. Bu inhibisyon tipi kovalan olmayan ancak çok sıkı bağlanmayla karakterizedir ve ancak yavaş şekilde geri dönüşümlüdür [63].

Genel olarak NSAE ilaçlar iki sınıfta toplanabilir: (a) klasik NSAE ilaçlar (b) selektif COX-2 inhibitörleri. Klasik NSAE ilaçlar hem COX-1'i hem COX-2'yi inhibe ederler ancak genel olarak COX-1'e daha sıkı bağlanırlar, COX-2 inhibitörler ise doğal olarak COX-2'ye selektivite gösterirler [55].

NSAE ilaçların kimyasal yapılarındaki farklılıklarına rağmen uzun süre karboksilik asit grubunun etki için ön koşul olduğu düşünülmüştür. Bugün

indometazin ve flurbiprofende bu grubun COX-2 aktif bölgesinin alt kısmında yer alan arjinin 120 guanidinyum grubu ile tuz köprüsü oluşturduğu bilinmektedir [57]. Diklofenak ise karboksilik asit grubu ile aktif bölgenin üst kısmında bulunan tirozin 385 ve serin 530 ile hidrojen bağı yaparak diğerlerine göre ters konformasyonda bağlanmaktadır [64]. Aspirin COX aktif bölgesindeki serini (insan COX-1'de serin 529, COX-2'de serin 516) asetilleyerek geri dönüşümsüz enzim inhibisyonuna neden olmaktadır [6].



Hem COX-1 hem de COX-2'yi inhibe eden klasik NSAE ilaçların selektiviteden yoksun olmaları kronik kullanımları sonucu gastrik ülserasyon ve diğer yan etkilerde artışa neden olmaktadır [63]. NSAE ilaçlar arasında düşük ülserojenik aktiviteye sahip etodolak, meloksikam ve nimesulidin tercihen COX-2'yi inhibe ettikleri COX-2 geninin tanımlanmasından sonra anlaşılmıştır [48].

Selektif COX-2 inhibitörleri

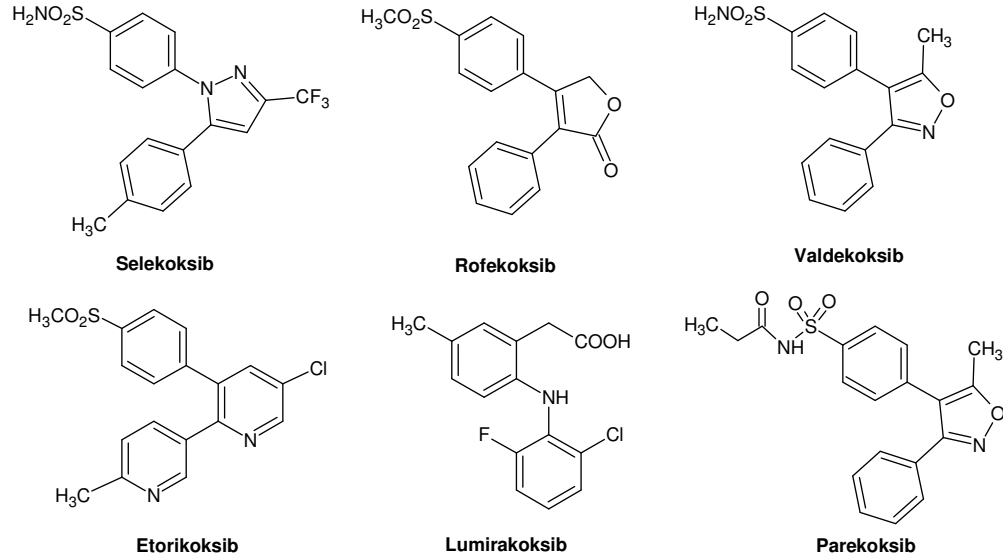
COX izoformlarının tanımlanmasından sonra yapılan çalışmalar, enflamasyonla ilişkili prostaglandinlerin oluşumuna indüklenebilen COX-2'nin, gastrik mukoza korunması gibi yapısal fonksiyonlardan sorumlu prostaglandinlerin oluşumuna ise COX-1'in aracılık ettiğini işaret etmiştir [6]. Bu teoriyi esas alan ilaç endüstrisi hızlı bir şekilde selektif COX-2 inhibitörleri geliştirmeyi amaçlamıştır.

Hızla gelişen bu alanda COX-2 selektiviteye sahip birçok bileşik sentezlenmiştir. Bu bileşiklerin büyük çoğunluğu merkezde karbosiklik veya heterosiklik bir halkaya bağlı visinal aril grupları taşımaktadır. Genellikle aromatik

halkalardan birinin para konumunda metilsülfonil veya sülfonamit grubu bulunmaktadır ve bu gruplar COX-2 aktif bölgesinde yer alan yan cebe bağlanarak bileşiğe selektivite kazandırır [62]. Daha önce belirtildiği gibi COX-2 enziminde 513. konumda arjinin bulunması yan cep merkezinde polar gruplarla etkileşebilen stabil pozitif bir yük oluşturmaktadır [45, 55, 57].

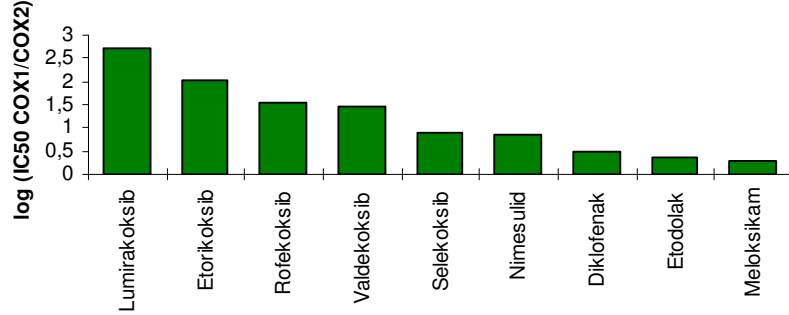
Selekoksib (Celebrex) ve rofekoksib (Vioxx) piyasaya ilk olarak çıkan selektif COX-2 inhibitörlerdir. Daha sonra yüksek COX-2 selektiviteye sahip valdekoksisib (Bextra), parekoksisib, etorikoksib (Arcoxia) ve lumirakoksib (Prexige) geliştirilmiştir [5].

Bu grup bileşikler değişik kimyasal yapılara ve farklı farmakokinetik özelliklere sahiptir. Selekoksib ve valdekoksisib sülfonilamit grubu taşıırken, rofekoksib ve etorikoksib metilsülfon yapısı taşımaktadır. Parekoksisib, valdekoksisibin ön ilacı olup sodyum tuzu halinde enjektabl olarak kullanılmak üzere hazırlanmıştır [12, 29].



Diklofenak analogu olmasıyla yapısal olarak diğerlerinden farklılaşan lumirakoksib bu ilaçlar içinde en yüksek selektiviteye sahiptir (Grafik 1). Karboksilik asit grubu ve lipofilik gruplar amfifilik bir molekül olmasını sağlar. Bazı deneysel

sonuçlar enflamasyon bölgesine diğerkoksiblerden daha hızlı dağıldığını göstermektedir [29, 38].



Grafik 1: COX-2 inhibitörlerin selektivite karşılaştırması. İnsan tam kan testi sonuçlarından elde edilen IC₅₀ değerleri Kaynak [65] ve [66]'dan alınmıştır. COX1/COX2 IC₅₀ değerleri oranı logaritmik olarak belirtilmiştir.

Bu bileşikler akut ağrı durumlarında, osteoartrit ve romatoid artrit tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Bu ilaçların klasik NSAİE ilaçlar kadar etkin oldukları ve gastrointestinal güvenilirliklerinin gelişmiş olduğu görülmüştür.

FitzGerald ve ekibi tarafından sağlıklı bireylerde yapılan çalışmalarda selekokoksib ve rofekoksibin prostasiklin biyosentezinin işareti olan üriner prostasiklin metabolitini (2,3-dinor-6-keto PGF_{1α}) önemli ölçüde azalttığı görülmüş, bu nedenle sağlıklı bireylerde COX-2'nin sistemik prostasiklin biyosentezinde majör kaynak olduğu söylenmiştir. Bu bileşiklerin tromboksan sentezini etkilemeden prostasiklin sentezini baskılamaları, risk taşıyan bireylerde tromboz riskini artıracakları hipotezini ortaya çıkarmıştır [38, 67-70].

Bu sırada selektif COX-2 inhibitörleri geniş klinik araştırmalar altında incelenmiştir [71-77]. Rofekoksib bu araştırmalarda trombotik olaylarda artış göstermesi nedeniyle Ekim 2004'de piyasadan çekilmiş ve selektif COX-2 inhibitörlerinin geleceği ile ilgili şüpheler artmıştır [8, 9, 67, 68, 78]. 2003 yılında FDA tarafından onaylanan valdekoksib Nisan 2005'te kardiyovasküler yan etkiler ve cilt reaksiyonları nedeniyle piyasadan çekilmiştir [79]. FDA tarafından onay alamayan parekoksib, etorikoksib ve lumirakoksib Avrupa'da ve bazı ülkelerde kullanılmaktadır. Ancak Kasım 2006'da Avrupa Birliği ülkelerinde satışı

onaylanan lumirakoksib ciddi karaciğer yan etkileri nedeniyle Aralık 2007'de piyasadan çekilmiştir [80].

Bu gelişmelerle birlikte selektif COX-2 inhibitörler ve kardiyovasküler yan etkileriyle ilgili bir çok çalışma yapılmış değişik görüşler ortaya çıkmıştır. Ancak kardiyovasküler yan etkilerden sorumlu mekanizma halen tam olarak anlaşılammıştır.

Selektif COX-2 inhibisyonunun kardiyovasküler hasara yol açma mekanizmasının en basit açıklaması COX-2 inhibisyonunun, tromboksan seviyesinde değişiklik yapmadan prostasiklin oluşumunu azaltması sonucu tromboz, hipertansiyon ve aterosklerozise eğilimi artıran bir durum oluşturmasıdır [5].

Endotel hücrelerde prostasiklin sentaz, plateletlerde ise tromboksan sentaz fazla miktarda eksprese edilmektedir. Prostrasiklinin vazodilatör ve platelet agregasyonunu inhibe edici özellikleri bilinmektedir. Tersine TXA₂ vazokonstrüktör özelliğe sahiptir ve platelet agregasyonunu artırır [11, 67]. Bu karşıt biyolojik fonksiyonları nedeniyle endotel hücreler tarafından oluşturulan PGI₂ ve plateletler tarafından oluşturan TXA₂ arasındaki dengenin kardiyovasküler sistem için önemi otuz yıl önce belirtilmiştir [5, 81, 82].

Sağlıklı bireylerde selekoksib ve rofekoksibin prostasiklin metabolitinin atılımını azaltması COX-2'nin vasküler endotelde baskın izoform olduğunu düşündürmüştür [5, 68]. Ancak immünohistokimya çalışmaları vasküler hastalık olmadığına kan damarlarında çoğunlukla COX-1 izoformunun bulunduğunu göstermektedir [5, 6]. Endotel kültür hücrelerinde statik durumlarda sadece COX-1 eksprese edildiği bilinmekle birlikte, laminar kan akışı baskısı bu hücrelerde COX-2 ekspresyonunu indükleyebilir. Bu nedenle *in vivo* endotel hücrelerde hemodinamik olarak COX-2'nin indüklenebileceği hipotezi oluşmuştur [38, 67].

Selektif COX-2 inhibitörler genel olarak diaril heterosiklik yapıda olsalar da her biri ayrı kimyasal, farmakodinamik ve farmakokinetik özelliklere sahiptir. Sülfon yapısı taşıyan inhibitörlerin membran fosfolipitleriyle farklı şekilde etkileştikleri ve biyolojik lipidlerin oksidatif hasara yatkınlığını enzimatik olmayan

bir işlemle artırdıkları belirtilmiş, bu sonuçların kardiyovasküler hasarla ilişkili olabileceği düşünülmüştür [83, 84].

Griffoni ve ekibi tarafından yapılan çalışmada rofekoksibin prostasiklin sentaz aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir [85]. Sud'ına ve ekibinin 2008 yılında yayınladıkları çalışmada ise selekoksibin hem insan polimorfonükleer lökositlerinde hem de insan tam kan deneyinde 5-LOX enzim inhibisyonu gösterdiği bulunmuştur [86]. Bu çalışmalar her bileşiğin farklı farmakodinamik özelliklere sahip olduğunu yan etkilerine veya güvenilirliklerine bu mekanizmaların eşlik edebileceğini göstermektedir.

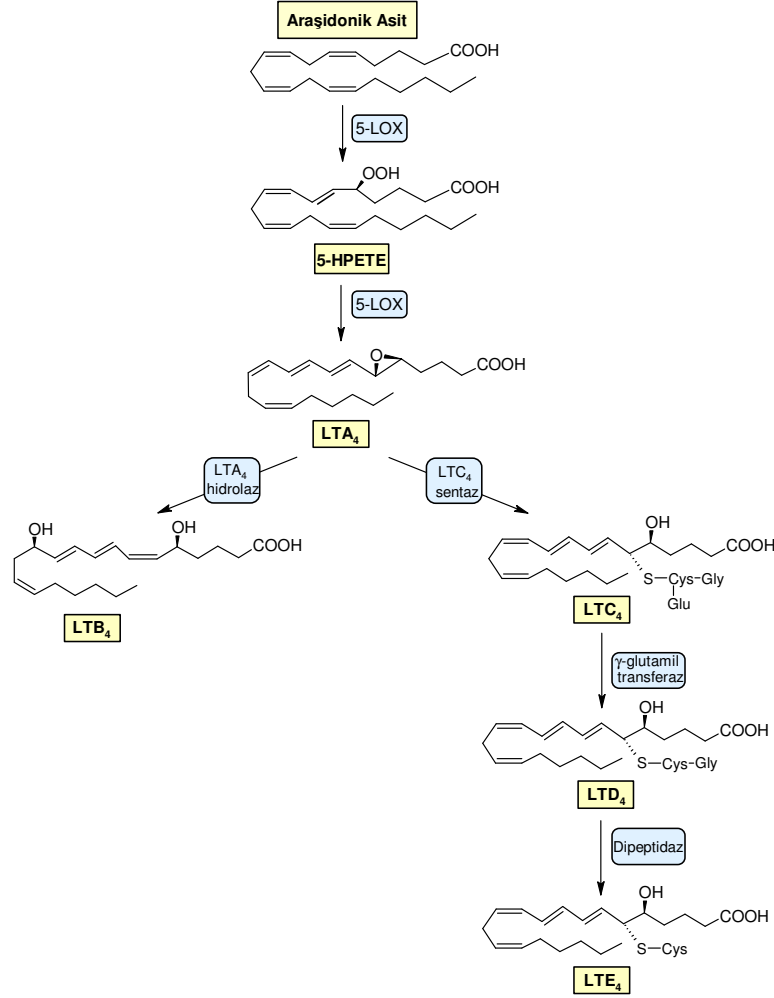
COX-2 inhibisyonun araşidonik asit metabolizmasının LOX yolağına kaymasına neden olması ve LOX yolağının kardiyovasküler hastalıklarda rol alması nedeniyle selektif COX-2 inhibitörlerin kardiyovasküler yan etkilerine bu mekanizmanın aracılık edebileceği de düşünülmektedir [87].

2.1.2. 5-Lipoksijenaz Yolağı

Lipoksijenazlar, (Z,Z)-1,4-pentadien yapısı taşıyan çoklu doymamış yağ asitlerine, stereo ve regiospesifik oksijen katılmasını katalizleyerek, hidroperoksi türevleri oluşturan dioksijenazlardır. Her molekül için hem yapısında olmayan bir demir atomuna gerek duyarlar [88, 89]. Memelilerde majör olarak üç farklı lipoksijenaz izoformu 5-LOX, 12-LOX ve 15-LOX bulunmaktadır. Bu enzimler araşidonik asitin 5, 12 ve 15. konumlarına oksijen katarlar ve sırasıyla 5-, 12- ve 15-HPETE (hidroperoksiieikosatetraenoik asit) oluştururlar [4].

5-LOX araşidonik asiti 5-HPETE'ye dönüştürerek lökotrien biyosentezinin başlangıç basamağını katalizler. 5-HPETE daha sonra aynı enzim aracılığıyla dayanıksız epoksit LTA₄'e dönüştürülür (Şekil 4). LTA₄'ün LTB₄'e dönüşümü LTA₄ hidrolaz enzimi aracılığıyla gerçekleşir. LTC₄ sentaz enzimi LTA₄ ve indirgenmiş glutatyonun konjugasyonunu katalizler ve LTC₄ oluşur. γ -Glutamiltransferaz enzimi aracılığıyla ve konjuge tripeptit glutatyonun, konjuge dipeptit sisteinilglisine çevrilmesiyle LTC₄ LTD₄'e dönüştürülür. Dipeptidaz enzimi LTD₄'ü

LTE₄'e dönüştürür. LTC₄, LTD₄ ve LTE₄ peptidolökotrienler ya da sisteinil lökotrienler olarak adlandırılır [90].



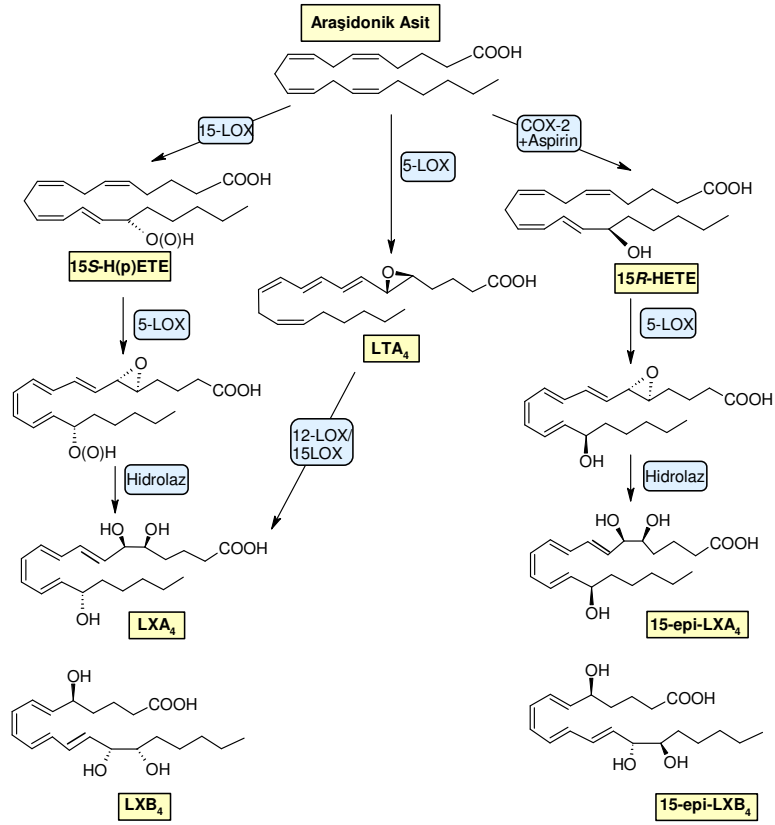
Şekil 4: 5-Lipoksijenaz Yolağı ve Lökotrienlerin oluşumu

Araşidonik asit metabolizmasında lipoksijenaz yolağıyla oluşan bir diğer lipid medyatör grubu lipoksinlerdir. Lipoksin A₄ ve B₄ ilk defa 1984 yılında Serhan ve grubu tarafından tanımlanmıştır [91].

Lipoksinler araşidonik asitle iki ya da daha fazla lipoksijenazın transselüler bir dizi etkşimi sonucu oluşmaktadır. Araşidonik asitten 15-LOX enzimi ile oluşan 15-HPETE daha sonra 5-LOX ile etkileşerek lipoksinleri oluşturmaktadır. Ayrıca

5-LOX aracılığıyla oluşan LTA_4 'ün platelet 12-LOX veya epitelyal 15-LOX enzimlerinin lipoksijenaz reaksiyonu sonucunda lipoksinleri oluşturduğu bilinmektedir (Şekil 5) [92, 93].

Yakın zamanda keşfedilen ve aspirinin aracılık ettiği bir yolakla lipoksin epimerleri oluşmaktadır. Aspirinin geri dönüşümsüz olarak asetilleştiği COX-2 enzimi araşidonik asiti substrat olarak kullanabilir ve 15(*R*)-HETE oluşturur. 15(*R*)-HETE 5-LOX aracılığı ile transselüler biyosentez sonucu 15-epi-lipoksinlere (15-epi-LX) çevrilir (Şekil 5). Bunlar aspirinin tetiklediği lipoksinler (ATL) olarak bilinmektedir [94].



Şekil 5: Lipoksinlerin Oluşumu

Lökotrienler ve lipoksinlerin biyolojik etkileri

Lökotrienler başlıca astım olmak üzere romatoid artrit, enflamatuvar barsak hastalığı, psöriazis, allerjik rinit gibi çeşitli enflamatuvar ve allerjik reaksiyonlarda rol oynayan medyatörlerdir [90]. Yakın zamanda 5-LOX yolağı, aterosklerozis ve belirli kanser tipleriyle de ilişkilendirilmiştir [90, 95].

LTB₄ nötrofil, makrofaj ve eisonofiller için potent kemotaktik etkinlik gösteren bir maddedir. Enflamasyon bölgesine doğru lökosit göçüne neden olur. LTB₄ enzim salınması ve süperoksit oluşumu ile ilişkili olarak nötrofil degranülasyonunu artırır. Lökositlerin damar endoteline yapışmalarını ve doku içine sızmalarını artırır. Son olarak makrofajlardan ve lenfositlerden proenflamatuvar sitokinlerin salınımını artırarak, immün reaksiyonlarda önemli rol oynar [45, 93, 96].

Sisteinil lökorianler bronşlarda daraltıcı etkiye, mukus salgılanmasına ve ödeme neden olurlar. Bugün sisteinil lökotrienlerin astımda ve hipersensitivite reaksiyonlarında önemli rol oynadıkları bilinmektedir. Gastrik mukozada damar daraltıcı etkileri kan akışını azaltarak sisteinil lökotrienlerin ülserojenik etkilerine neden olmaktadır [4, 20, 90]. Endotel hücrelerde vasküler permeabiliteyi ve trombozisi artırır [96].

Lökotrienler etkilerini spesifik reseptörlerine bağlanarak gösterirler. Sisteinil lökotrienler için tip 1 ve tip 2 sisteinil lökotrien reseptörleri (CysLT₁ ve CysLT₂) bilinmektedir. CysLT₁ bronş daralması, mukus sekresyonu ve ödeme aracılık eder. Selektif CysLT₁ antagonistleri astım tedavisi için kullanılmaktadır. CysLT₂ bronş daralmasına katılmaz ancak enflamasyon, damar geçirgenliği ve doku fibrozuna eşlik eder [96].

B lökotrien reseptör 1 (BLT₁) LTB₄ için yüksek afinite gösterir, kemoatraktant ve proenflamatuvar etkiye aracılık eder. B lökotrien reseptör 2 (BLT₂) LTB₄ için daha düşük afiniteye sahiptir ve diğer lipoksijenaz ürünlerine de bağlanır ve fizyolojik fonksiyonu hakkında bilgi azdır [97].

5-LOX yolağı ile oluşan ve kardiyovasküler dokularda güçlü proenflamatuvar özellik gösteren lökotrienlerin kardiyovasküler hastalıklardaki rolü uzun zamandır bilinmektedir. Ancak son yıllarda yapılan birkaç yeni çalışma 5-LOX ve astım üzerine yoğunlaşan ilgiyi kardiyovasküler hastalıklara çekmiştir [96, 98]. Aterosklerotik lezyonlarda 5-LOX, 5-LOX aktive edici protein (FLAP) ve LTA₄ hidrolaz mRNA seviyelerinin oldukça artmış olduğu gözlenmiştir [99, 100].

Son yıllarda yapılan genetik çalışmalar özellikle 5-LOX (*ALOX5*) ve FLAP (*ALOX5AP*) genlerindeki polimorfizmin aterosklerozis ve miyokardiyal enfarktüs riskiyle korelasyonu olduğunu göstermiştir [101, 102]. Değişik popülasyonlarda yapılan çalışmalar incelendiğinde kardiyovasküler hastalıklarda 5-LOX yolağındaki genetik polimorfizmin etkisinin popülasyona özđü olduğu düşünölmüştür [96, 103-107].

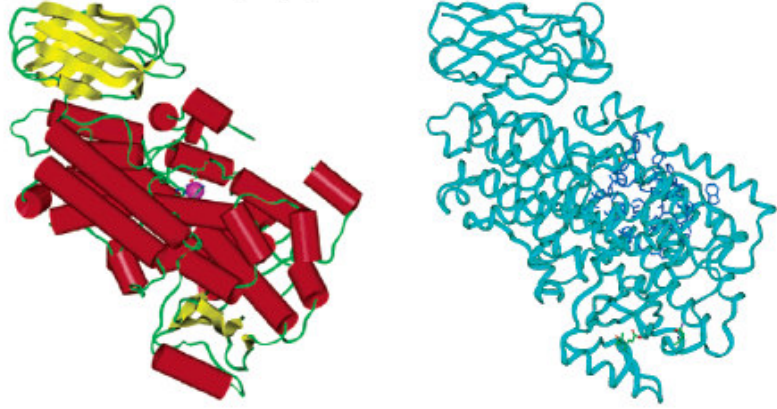
Lipoksinler ve aspirinin tetiklediği karbon-15 epimerleri antienflamatuvar etkiye sahip ve enflamasyon çözümlenmesinde rol oynayan medyatörlerdir. Spesifik uyaranlara cevap olarak sentezlenip lokal olarak etki gösterirler ve hızla enzimatik olarak inaktive edilirler. Monositler ve enflamasyon bölgesindeki diğer hücreler tarafından hızla transformasyona ve inaktivasyona uğramaları nedeniyle son yıllarda metabolizmaya dayanıklı sentetik lipoksin analogları hazırlanması enflamasyon tedavisinde yeni bir alternatif sunmaktadır [92, 94, 108].

5-LOX enzimi

5-LOX esas olarak lökositlerde bulunur. Granülositler, monositler/makrofajlar, mast hücreleri, dentrik hücreler ve B lenfositler 5-LOX eksprese edebilir. Deride Langerhans hücreleri 5-LOX eksprese etmektedir [109]. Memeli 5-LOX enzimi 672 veya 673 amino asit içermektedir. Üç boyutlu yapısı halen tanımlanamamış olsa da % 38 dizilim benzerliği gösteren tavşan 15-LOX enzimi kullanılarak homoloji modeli oluşturulabilir (şekil 6) [110, 111].

Amino asit dizilim benzerliği düşük olmasına rağmen farklı LOX enzimleri iki farklı birimden oluşan aynı katlanmış yapıyı paylaşırlar. Bunlar küçük N-

terminali β -sandviç bölgesi ve daha geniş C-terminal katalitik bölgedir. Katalitik bölge demir ve substrat bağlanma bölgelerini içerir. Demir lipoksijenazların katalitik aktivitesi için esansiyeldir, Fe^{2+} ve Fe^{3+} arasında gidip gelir [90, 111].

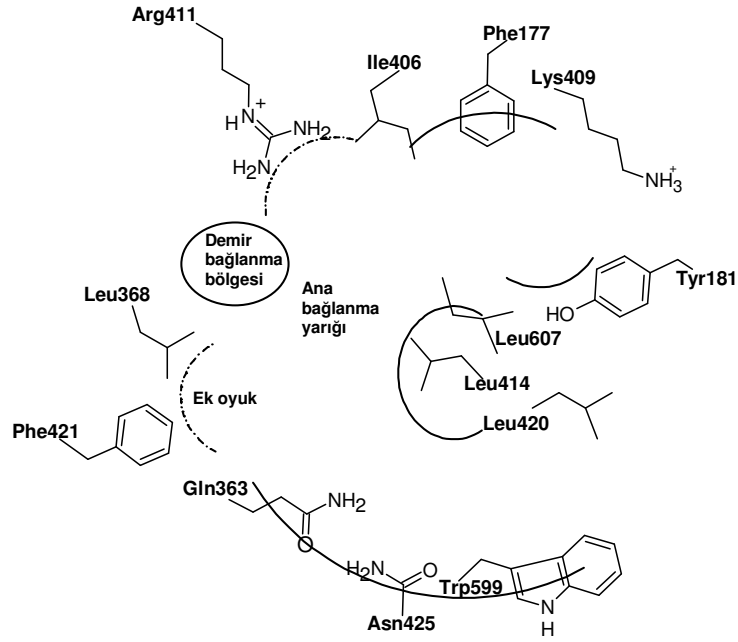


Şekil 6: Tavşan 15-LOX yapısı (solda) İnsan 5-LOX homoloji modeli (sağda) Kaynak [111]'den American Chemical Society'nin izni ile kullanılmıştır. (Reprinted with permission from reference [111] Copyright 2006 American Chemical Society)

Dinlenme halindeki hücrelerde 5-LOX sitozolde, bazı hücre tiplerinde ise çekirdekte yer alır. Genel olarak, hücresel uyarılma sonucunda 5-LOX ve sitozolik PLA_2 ($cPLA_2$) nükleer membrana göç eder ve $cPLA_2$ fosfolipitlerden araşidonik asiti serbest bırakır. 5-LOX aktive edici protein (FLAP) araşidonik asitin 5-LOX'a transferine aracılık eder [90].

5-LOX aktivitesinin düzenlenmesi oldukça komplekstir. Hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonu, protein kinaz ve/veya diaçilgliserol bağlanması, fosforilasyon, hücresel peroksit tonusu, hücresel yer değiştirme ve FLAP ile etkileşim 5-LOX aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynar [90, 112].

5-LOX aktif bölgesindeki önemli aminoasitler Şekil 7'de görülmektedir. Ana bağlanma yarığı, üst kısımda fenilalanin 177 ve tirozin 181'den alt kısımda triptofan 599 ve lösin 420'ye kadar uzanır. 5-LOX aktif bölgesi ve inhibitörlerle yapılan moleküler modelleme ve farmakofor modelleme sonuçları etkileşme bölgelerini aydınlatmıştır [111].



Şekil 7: İnsan 5-LOX aktif bölgesinin şematik gösterimi. Kaynak [111]'den American Chemical Society'nin izni ile kullanılmıştır. (Reprinted with permission from referece [111] Copyright 2006 American Chemical Society)

Charlier ve ekibinin 2006 yılında yayınladıkları bu çalışma sonuçlarına göre, yarığın ortasında lösin 414 aromatik halkalar ile etkileşmektedir. Aktif bölgede iki hidrofobik grup etkileşim bölgesi yer almaktadır. Birinci hidrofobik bölge fenilalanin 421 ve lösin 368'i içeren küçük hidrofobik yan cep, diğeri ise bağlanma bölgesinin üst kısmında izolösin 406 ve lösin 607'ye oldukça yakın bir bölgedir. İki hidrojen bağı akseptör bölgesinden biri aktif bölge girişindeki tirozin 181 diğeri asparajin 425'e yakın bölgedir. Bu etkileşimlere ek olarak arjinin 411'in asidik gruplarla etkileştiği gözlenmiştir [111].

Antilökotrien ilaçlar

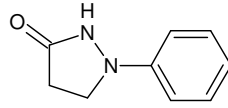
Lökotrienlerin önemli biyolojik özelliklerine bağlı olarak, ilaç endüstrisi özellikle lökotrien biyosentezini engelleyen bileşikler ve reseptör antagonistleri geliştirilmesi üzerinde çalışmıştır. Bu çalışmalar lökotrien modifiye edici veya antilökotrienler olarak bilinen birçok sayıda bileşiğin bulunmasıyla sonuçlanmıştır. Bu bileşiklerden bazıları günümüzde astım tedavisi için kullanılmaktadır. Son

zamanlarda lökotrienlerin kardiyovasküler hastalıklardaki rollerine ilişkin yapılan çalışmalar ilgiyi yeniden 5-LOX yolağına çekmiştir [98]. Antilökotrien ilaçlar genellikle 5-LOX inhibitörleri, FLAP inhibitörleri ve lökotrien reseptör antagonistleri olarak gruplandırılır.

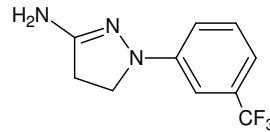
5-LOX inhibitörleri

5-LOX inhibitörleri üç ana grupta toplanır: redoks inhibitörleri, demirle kelat yapan bileşikler ve redoks aktivitesi olmayan bileşikler [113]. 5-LOX enziminin katalitik siklusa girmesi için gerekli olan Fe^{3+} , hidroperoksitlerin Fe^{2+} 'yı (inaktif form) Fe^{3+} 'ya (aktif form) yükseltmesi sonucu elde edilir. Çoğu 5-LOX inhibitör etkili sentetik ve doğal kaynaklı bileşik demiri redükleyerek veya kelat yaparak etkisini göstermektedir [114].

Redoks inhibitörleri aktif bölgedeki demir atomunu indirgeyerek etki gösterirler. Bu sınıfın prototipi fenidon ve BW755C kodlu bileşiklerdir. Selektif olmayan antioksidan etkileri nedeniyle diğer biyolojik redoks sistemleriyle etkileşirler ve methemoglobin oluşumuna neden olurlar. Bu sınıf bileşiklerin çoğu oral biyoyararlanımdan yoksundur, zayıf selektiviteleri ve ciddi yan etkileri nedeniyle ileri aşamalara geçememiştir [90, 93, 113].

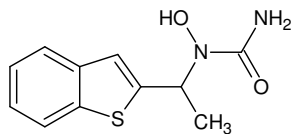


Fenidon

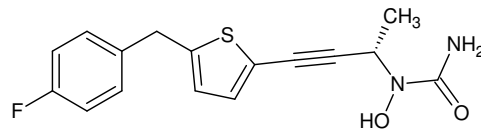


BW-755C

Demirle kelat yapan bileşikler hidroksamik asit ya da N-hidroksiüre türevleridir. Bu gruptan astım tedavisinde kullanılan zileuton piyasada yer alan ilk ve tek 5-LOX enzim inhibitörü bileşiktir. Atreleuton gibi ikinci jenerasyon 5-LOX inhibitör bileşikler hazırlanarak geniş ön klinik testlerden geçmiştir ancak reseptör antagonistlerinin piyasada yerlerini almasıyla geliştirilmeleri sonlandırılmıştır [98].



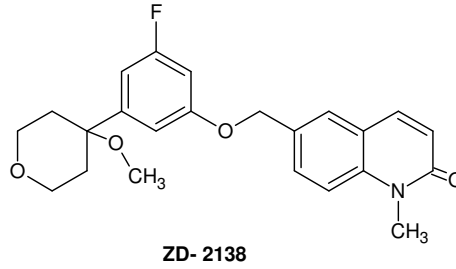
Zileuton



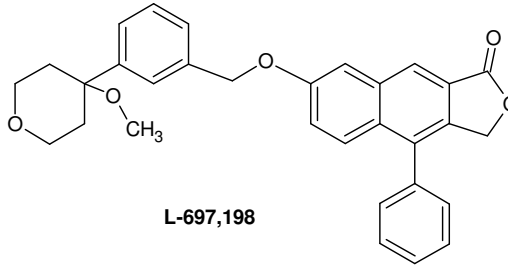
Atreleuton

Redoks inhibitörleri ve demirle kelat yapan bu iki sınıfın diğer redoks reaksiyonlarına katılma ve zayıf biyoyararlanım gibi dezavantajları nedeniyle redoks ve kelat yapma aktivitesi olmayan enzim inhibitörleri geliştirilmiştir [115]. Bu sınıf yapısal olarak oldukça farklı molekülleri kapsar.

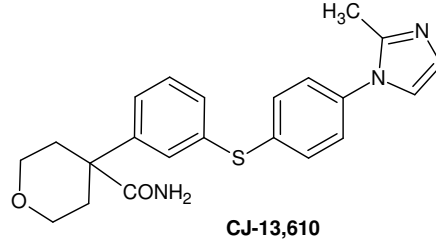
Öncü yapıların optimizasyonu ile ulaşılan ZD-2138 selektif ve oral olarak aktif 5-LOX enzim inhibitörüdür [116]. Çeşitli *ex vivo* ve *in vitro* test sistemlerinde yüksek aktivitesine rağmen kronik enflamasyon yöresinde bu etkinlik görülememiştir [113].



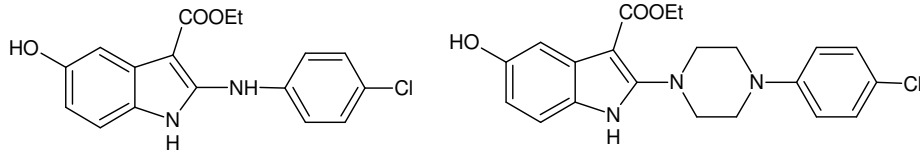
Daha ileri araştırmalar metoksitetrahidropiran yapısı ve doğal ürünlerin hibrit moleküllerini vermiştir. Bu bileşiklerden biri olan L-697,198 insan polimorfonükleer lökositlerde LTB₄ oluşumunu IC₅₀=1.5 nM ile inhibe etmektedir [117].



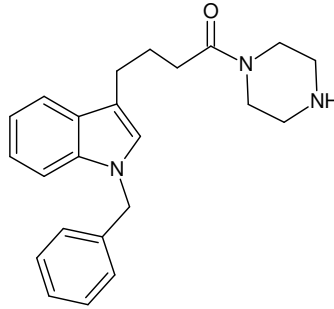
Mano ve ekibi tarafından yapılan çalışmalarda, ZD-2138'de yer alan dihidrokinolinon grubu imidazolifenil grubuyla, metoksi grubu ise karboksamit ile değiştirilmiştir. Bu optimizasyon çalışmaları sonunda metil eter kükürtle değiştirilerek farmakokinetik özellikleri geliştirilmiş klinik olarak aday CJ-13,610 kodlu bileşiğe ulaşılmıştır [118-121].



Landwehr ve ekibinin 2-amino-5-hidroksiindol türevleri ile yaptığı çalışmada 2. konumda fenil/feniletilamino ve fenilpiperazin taşıyan türevlerden klorofenil grubu taşıyan iki bileşiğin en etkili türevler olduğu bildirilmiştir [122].



İndol türevleri üzerinde Zheng ve ekibi tarafından yapılan çalışmada rat peritonal lökositlerindeki 5-LOX inhibitör etkileri güçlü, IC₅₀ değerleri 1µM'dan düşük türevler elde edilmiştir [123].

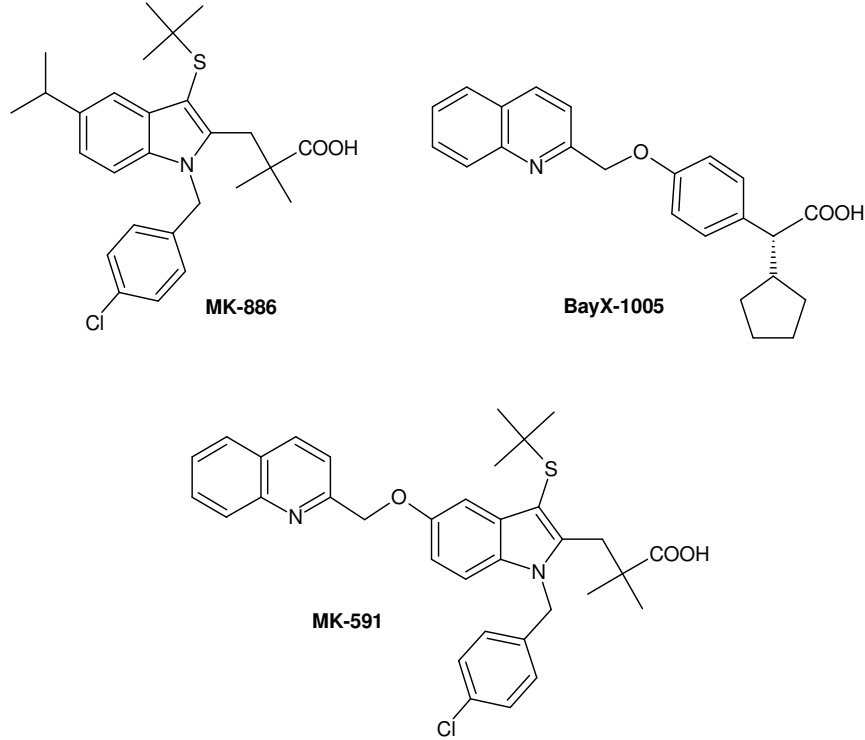


FLAP inhibitörleri

Merck araştırmacıları tarafından indol sınıfı MK-886 kodlu bileşiğin *in vitro* ve *in vivo* lökatrien oluşumunu 5-LOX, fosfolipazlar veya diğer selektif olmayan mekanizmaları etkilemeden inhibe ettiği bulunmuştur. MK-886 tam hücrelerde 5-LOX aktivitesini etkili bir şekilde inhibe ederken, hücre homojenatlarında bu etkiyi göstermemektedir. Bu bileşiğin etki mekanizmasını keşfetmek için yapılan çalışmalar, 5-lipoksijenaz aktive edici protein (FLAP) olarak adlandırılan proteinin keşfine yol açmıştır. MK-886 konsantrasyona bağlı olarak araşidonik asitin FLAP'a bağlanmasını önlemekte ayrıca daha yüksek konsantrasyonda FLAP ve 5-LOX etkileşmesini inhibe etmektedir [98, 124, 125].

Kinolin-indol hibrit molekülü MK-591 bu sınıfa ait bir diğer bileşiktir, astım tedavisi için faz II denemelerde etkili olsa da ileri aşamalara geçmemiştir [124].

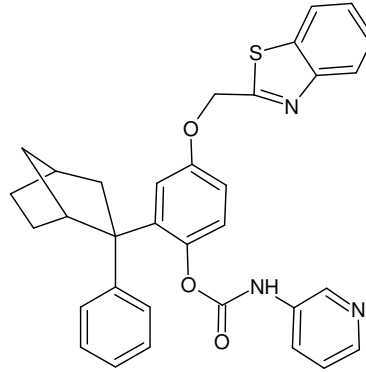
Bayer araştırmacıları tarafından bulunan bir diğer FLAP inhibitörü kinolin sınıfı BAY-X-1005 (DG031) kodlu bileşiktir. Astım tedavisi için faz II denemeleri tamamlanmıştır ancak bu konuda ileri çalışmalara devam edilmemiştir [98, 124]. deCODE genetics tarafından İzlandada yapılan çalışmada, dört hafta DG031 alan miyokardiyal enfarktüs geçirmiş, FLAP veya LTA₄ hidrolaz kodlayan varyant genlerden birini taşıyan hastalarda bu ilacın LTB₄ seviyesini azalttığı görülmüştür [126]. DG031 miyokardiyal enfarktüsü önlemek için kullanılmak üzere faz III klinik denemelere hazırlanmaktadır [127].



Ferguson ve ekibi tarafından 2007 yılında insan FLAP üç boyutlu yapısı MK-591 ile kompleks halinde tayin edilmiştir [125]. MK-591'in FLAP ile etkileşiminde anahtar bölgelerin kinolin, tersiyer bütül ve benzil grupları olduğu bildirilmiştir [124].

FLAP inhibitörlerinin kardiyovasküler hastalıklarla olan ilişkisi ilaç endüstrisinin ilgisini çekmiş, son zamanlarda bu konuya olan ilgi artmıştır. Amira Pharmaceuticals tarafından geliştirilen indol sınıfı AM103 kodlu bileşiğin Kasım 2007'de astım tedavisi için faz I klinik çalışmaları tamamlanmış, Şubat 2008'de ise solunum ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisi için GlaxoSmithKline ile ortak bir programa alınmıştır [128].

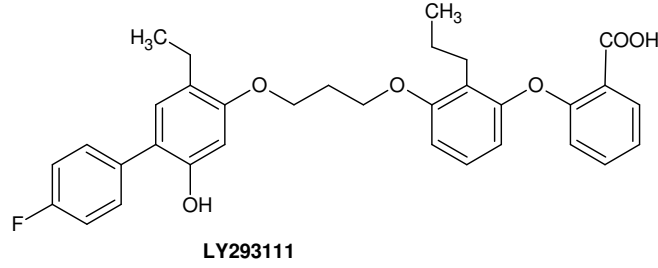
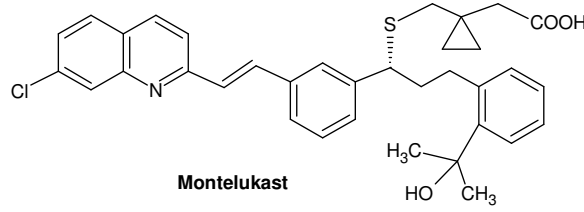
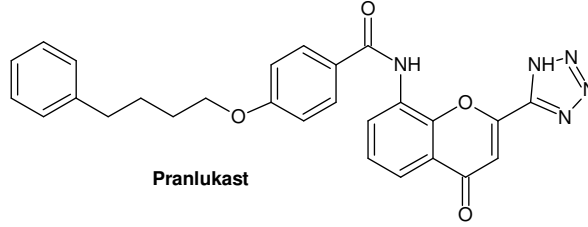
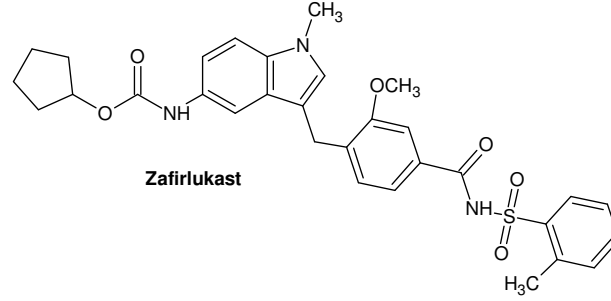
Merck Frosst tarafından 2008 yılında yayınlanan çalışmada 2,2-bisaryl-bisikloheptan türevlerinin FLAP inhibitör aktiviteleri araştırılmış, 5-benzotiyazolilmetoksi-2-piridinilkarbammat türevi en aktif türev (FLAP IC₅₀=2.8 nm) olarak bildirilmiştir [129].



Lökotrien reseptör antagonistleri

Sisteinil lökotrien reseptörlerini hedef alan selektif antagonistlerin geliştirilmesinde oldukça başarılı olunmuştur. CysLT₁ antagonistleri zafirlukast, montelukast ve pranlukast astım tedavisi için piyasada yer almaktadır [96, 98].

Sisteinil reseptör antagonistlerinin aksine LTB₄ reseptör antagonistlerinden kliniğe geçen ilaç olmamıştır. Bu alandaki en gelişmiş aday bileşik faz II denemelerdeki LY293111 kodlu bileşiktir. LY293111'in *in vitro* ve *in vivo* insan pankreatik kanser hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiği ve apoptozisi indüklediği bildirilmiştir [130-132].



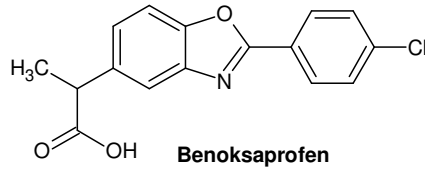
2.1.3. COX/5-LOX Dual İnhibitorler

Klasik NSAİ ilaçlar ve selektif COX-2 inhibitörler etkilerini enflamasyon durumunda prostaglandin üretimini azaltarak göstermektedirler. Lökotrienlerin enflamatuvar özellikleri göz önüne alındığında COX/5-LOX enzimatik yolların her ikisini inhibe eden bileşiklerin daha iyi antiinflamatuvar etkinliğe sahip olacağı ayrıca lökotrienlerin gastrointestinal mukozadaki yan etkileri nedeniyle dual inhibisyonun gastrointestinal güvenilirliği artıracığı düşünülmüştür [14, 19, 20, 133]. Bu iki avantajın yanında COX-1, COX-2 ve 5-LOX enzimlerinin birlikte

inhibisyonunun, platelet TXA₂ oluşumunu, vasküler enflamasyonu, lökositlerin enflamatuvar ve trombotik özelliklerini önlemesi sonucu kardiyoprotektif etki sağlayabileceği de düşünülmektedir [21].

Bu dual etkili bileşikler enflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği gibi COX ve 5-LOX enzimlerinin rol oynadığı çeşitli kanser tiplerinin ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde de umut verici görülmektedir [4, 22-25].

Otuz yıl önce ilk COX/5-LOX inhibitör etkili bileşik benoksaprofen piyasada yerini almış, klasik NSAE ilaçlarla kıyaslandığında daha iyi gastrointestinal güvenilirliğe sahip olduğu görülmüştür. Ancak bu bileşik hepatotoksik etkisi ve ışığa duyarlılığa bağlı yan etkileri nedeniyle piyasadan çekilmiştir [26, 134].

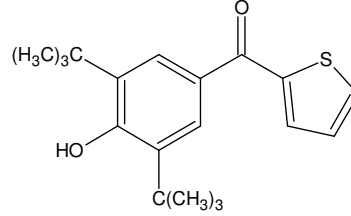


Seksenli yılların sonunda çeşitli ilaç şirketleri dual COX/5-LOX inhibitörü ilaç geliştirme programları başlatmıştır. Yapılan araştırmalarda COX ve 5-LOX yollarının dual inhibisyonu ile antienflamatuvar etkinlik, analjezik aktivite, gastrointestinal güvenilirlik açısından olumlu sonuçlar elde edilmiştir [26]. Bu alanda yapılan çalışmalar kimyasal yapılarındaki farklılıklara göre sınıflandırılabilir.

Di-terciyer-Bütülfenoller

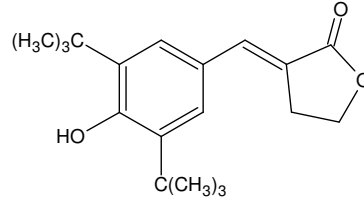
2,6-Di-terciyer-bütülfenoller antienflamatuvar fenolik bileşikler içinde antioksidan özellikleri ile prostaglandin ve lökotrien sentezini inhibe eden önemli bir gruptur. Çok sayıda di-terciyer-bütülfenol türevi bileşik sentezlenmiş, COX/5-LOX enzim inhibisyonları ve yapı-etki ilişkileri araştırılmıştır. Bu bileşiklerin antioksidan ve radikal süpürücü özellikleri nedeniyle Alzheimer hastalığı, kanser gibi hastalıklarda da etkili olacağı düşünülmüştür [135].

Bu sınıf bileşiklerden 2,6-di-ter-butil-4-(2'-tiyenoil)fenolün (R-830) kobay akciğer lipoksijenazı ve sığır seminal vezikül siklooksijenazını inhibe ettiği bildirilmiştir [136].



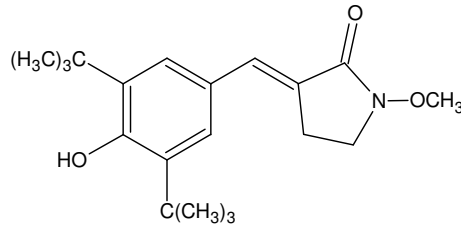
R-830

Hidaka ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda di-ter-bütilfenol yapısındaki alfa-(3,5-di-ter-bütil-4-hidroksibenziliden)-gamma-bütrolaktonun (KME-4) COX/5-LOX inhibisyon etkisi bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar tarafından yayınlanan çalışmalarda bileşiğin analjezik ve antienflamatuvar etkileri görülmüştür [137-141].



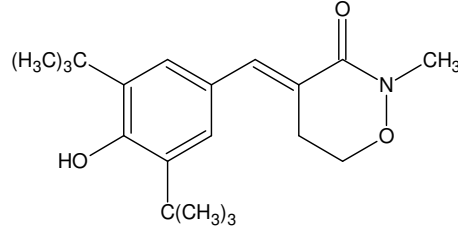
KME-4

N-metoksi-3-(3,5-di-ter-bütil-4-hidroksibenziliden)-2-pirolidonun (E-5110) rat sinoviyal hücre kültüründe PGE₂ oluşumunu ve kalsiyum iyonoforla stimüle edilmiş insan nötrofillerinde LTB₄ ve süperoksit oluşumunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Analjezik etkisi indometazin ve piroksikama benzer, antipiretik etkisi bu ilaçlardan daha fazla, ülserojenik etkisi ise her iki ilaçtan daha az bulunmuştur [142-147].



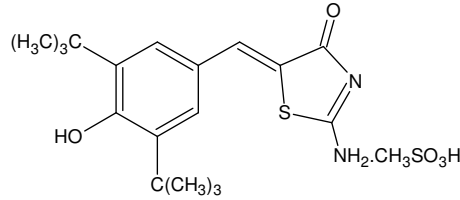
E-5110

Biofor 389 (BF-389) adlı bileşiğin oldukça etkili *in vitro* COX enzim inhibitörü olmasının yanında 5-LOX inhibitör etkisinin olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda bileşiğin antienflamatuvar etkinliği ve ülserojenik etkisi arasında geniş bir güven aralığı bulunmaktadır [148, 149].



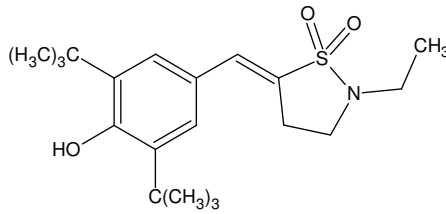
BF-389

Oksadiazol, tiyadiazol, tiyazol, oksazol ve imidazol türevi di-ter-bütilfenoller üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda 5-LOX ve COX enzim yollarının dengeli inhibisyonunu sağlayan darbufelon mesilat (CI-1004) bileşiğine ulaşılmıştır [150-152].

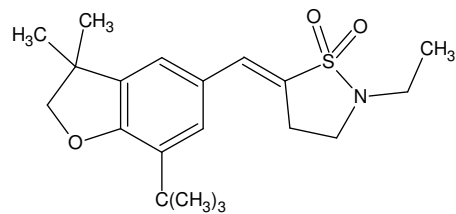


Darbufelon mesilat

Inagaki ve arkadaşları tarafından hazırlanan γ -sultam yapısına sahip S-2474 kodlu bileşiğin COX-2 ve 5-LOX enzim inhibisyonu etkisi bildirilmiş, antiartritik ilaç adayı olarak klinik denemelere alınmıştır [153, 154]. Bileşiğin metabolizasyon çalışmalarında, antioksidan etkisi olmayan 2,3-dihidrobenzofuran türevi oksidatif metabolitin güçlü PGE₂ oluşum inhibitörü olduğu bulunmuştur [155]. Yagami ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda S-2474 kodlu bileşiğin nöroprotektif etkisi olduğu bildirilmiştir [156, 157].

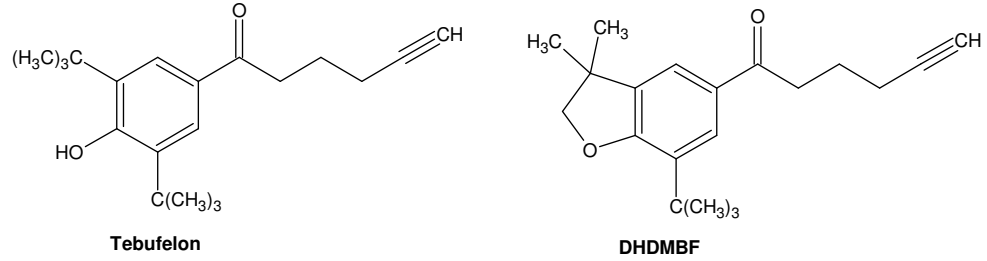


S-2474



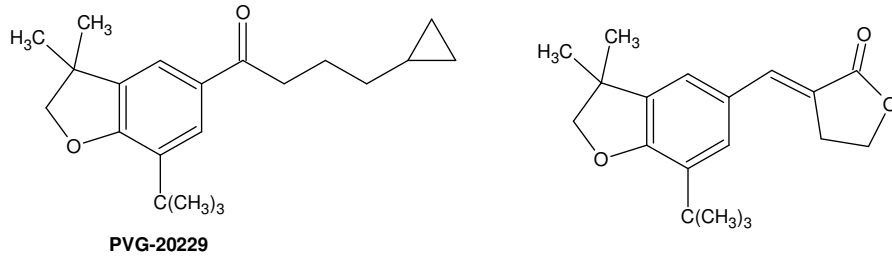
Dihidrobenzofuran türevi metabolit

Tebufelonun (NE-11740) dual inhibitör etkisinin bildirilmesinden sonra dihidrodimetilbenzofuran (DHDMBF) türevi metabolitinin de dual inhibitör etkili olduğu bildirilmiştir. Bu sonuç üzerine çok sayıda DHDMBF türevi bileşiğin sentezi yapılarak farmakolojik etkileri ve yapı etki ilişkileri araştırılmıştır [158-160].



Dihidrodimetilbenzofuran Türevleri

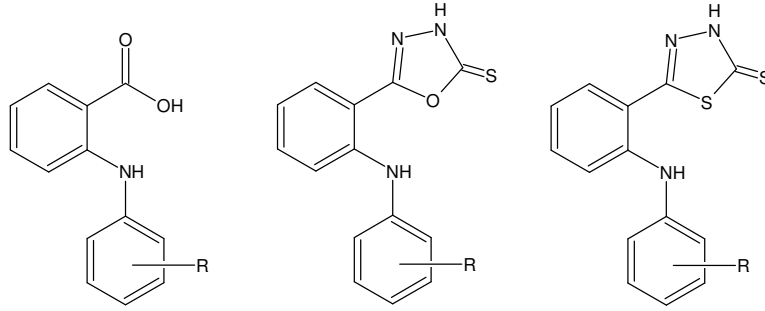
Janusz ve ekibi tarafından yapılan çalışmalarda, dihidrodimetilbenzofuran sınıfı bileşikler üzerinde 5. konumda amit, amidin, üre, guanidin, amin ve hetetosiklik halka içeren türevler hazırlanmış, dihidrobenzofuran halkası üzerinde değişiklikler yapılarak COX/5-LOX enzim inhibisyonları araştırılmıştır. Tebufelon ve metaboliti DHDMBF'in terminal doymamışlık nedeniyle karaciğer enzimlerini inhibe etme potansiyelleri göz önüne alınarak 5-keto grubu üzerinden de modifikasyonlar yapılmıştır. Bu bileşikler içinde en aktif bileşikler terminalde siklopropil grubu ve bütirolakton taşıyan türevlerdir [160-162].



Zheng ve arkadaşları tarafından dihidrodimetilbenzofuran türevi yirmiyedi bileşik üzerinde moleküler modelleme ve üç boyutlu yapı-etki ilişkisi çalışması yapılmıştır. Modelleme sonuçları bu türevlerin COX-2 ve 5-LOX enzimlerine bağlanma modlarını açıklamaktadır [110].

Fenamat Türevleri

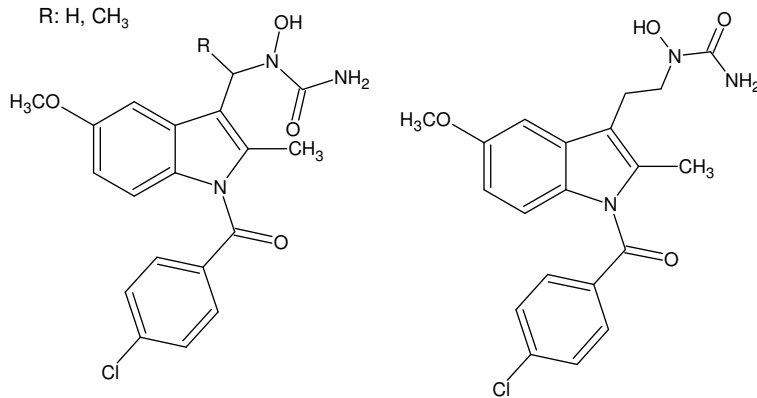
Juby ve arkadaşları çeşitli fenamat türevlerinde karboksilik asit grubunun tetrazol halkasıyla değiştirilmesinin bileşiğe 5-LOX inhibisyonu kattığını bildirmişlerdir. Bu bilgiye dayanarak Boschelli ve ekibi tarafından yapılan çalışmada, meklofenamik asit, flufenamik asit ve mefenamik asit gibi fenamat türevi NSAE ilaçlarda, karboksilik asit grubu oksadiazol, tiyadiazol ve triazol gruplarıyla yer değiştirilmiştir. Hazırlanan bileşikler içinde 1,3,4-oksadiazol-2-tyon ve 1,3,4-tiyadiazol-2-tyon halkası taşıyan türevlerin *in vitro* güçlü COX/5-LOX dual inhibitör etkileri bildirilmiştir [163].



Meklofenamik asit R: 2,6-di-Cl, 3-CH₃
Flufenamik asit R :3-CF₃
Mefenamik asit R:2,3-di-CH₃

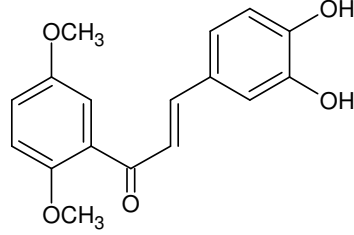
İndometazin Türevleri

İndometazinin karboksilik asit grubunun N-hidroksiüre grubuyla yer değiştirmesiyle COX enzimlerine karşı inhibitör etkinliklerinin yanı sıra 5-LOX inhibisyonu olan türevler elde edilmiştir [164, 165].

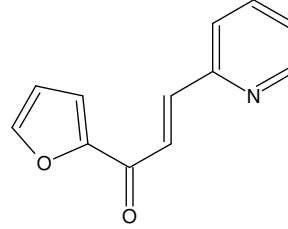


Kalkon türevleri

3,4-dihidroksikalkon türevlerinin 5-LOX ve COX inhibitör etkinlikleri araştırılmış bu türevler içinde 2',5'-dimetoksi türevi optimal COX/5-LOX inhibitör etkiye sahip bulunmuştur [166].

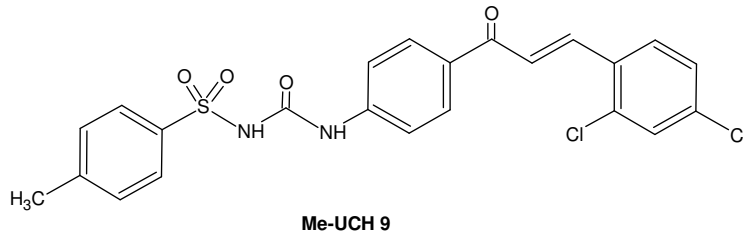


Jahng ve ekibi tarafından yapılan çalışmada propenon yapısı esas alınarak basit aromatik bileşikler hazırlanmıştır. Fenil, piridil, tiyenil ve furil grupları içeren propenon türevlerinden C15 kodlu bileşiğin COX-2 ve 5-LOX inhibitör etkiye sahip olduğu bildirilmiştir [167].



C15

Araico ve ekibi tarafından fenilsülfonil ürenil kalkon türevlerinin (UCH) COX-2 ve 5-LOX enzim inhibitör etkileri bildirilmiştir [168]. Bu türevlerden Me-UCH 9 kodlu bileşiğin *in vivo* antienflamatuvar ve analjezik etkisi araştırılmıştır [2].

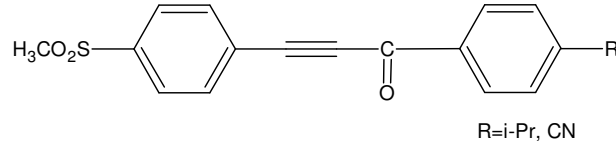


Me-UCH 9

1,3-Diarilprop-2-in-1-on Türevleri

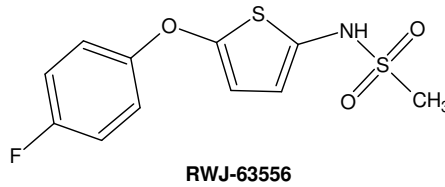
Rao ve ekibi tarafından yayınlanan çalışmada bir grup 1,3-difenilprop-2-in-1-on yapısında bileşik sentezlenmiş, merkezde propinon yapısının dual COX/LOX inhibitörleri geliştirilmesinde uygun bir yapı olduğu bildirilmiştir [169].

Aynı ekip tarafından bu yeni sınıf COX/LOX inhibitörlerin tasarımı, sentezi ve geniş yapı-etki ilişkileri bildirilmiştir. 1,3-diarilprop-2-in-1-on grubu bileşiklerde 3. konumundaki fenil halkasındaki *p*-metilsülfonil grubunun COX-2 selektivitesi için gerekli olduğu, 1. konumdaki fenil halkasındaki grubun elektronik ve sterik özelliklerinin değişmesiyle dual COX/LOX enzim inhibisyonu sağlanabileceği gösterilmiştir. R grubu yerinde izo-propil ve siyano grubu taşıyan bileşiklerin uygun kombinasyonda COX/LOX enzim inhibisyonu yanında oral antienflamatuvar ve analjezik etkileri bildirilmiştir [170].



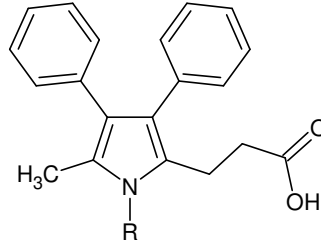
Tiyofen Türevleri

Bu sınıf bileşiklere örnek, Beers ve ekibi tarafından hazırlanan ve yapısal olarak nimesulide benzeyen RWJ-63556 kodlu bileşiktir. Bileşiğin güçlü COX-2 (IC₅₀=1.86 µM) ve 5-LOX (IC₅₀=0.13 µM) enzim inhibisyonuna sahip olduğu bildirilmiştir [171, 172].



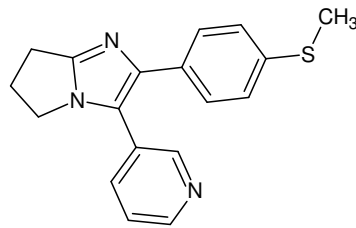
Pirol Türevleri

Dannhardt ve Lehr tarafından yapılan çalışmada N-alkildifenilpirol asetik asit ve propanoik asit türevlerinden azota bağlı alkil grupları iki karbondan fazla olan propanoik asit türevleri yüksek COX/5-LOX inhibitör etkiye sahip bulunmuştur [173].

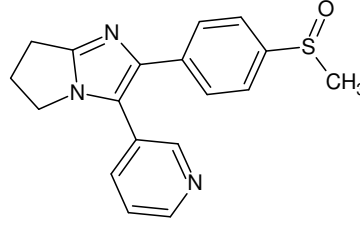


Pirolimidazol türevleri

Smith Kline ve French Laboratuvarları tarafından tasarlanan ve sentezlenen piridinilpirolimidazol türevlerinden SK&F 105561 ve bu bileşiğin ön ilacı olan SK&F 105809 dual COX/5-LOX inhibitör etkiye sahip bulunmuştur [174-176].



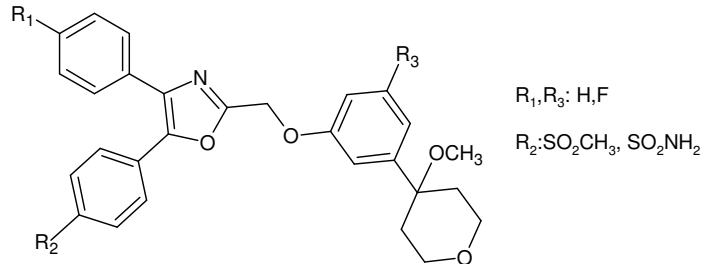
SK&F 105561



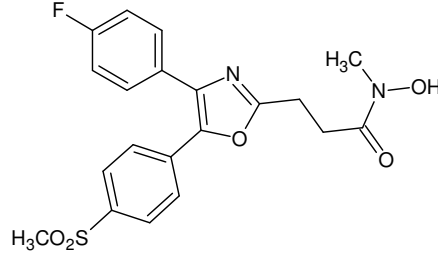
SK&F 105809

İzoksazol türevleri

Searle (Pharmacia) araştırma grubu dual inhibitörlere ulaşmak için COX-2 ve 5-LOX inhibitörlerin farmakofor gruplarını aynı molekülde birleştirerek *in vitro* aktif bileşiklere ulaşmıştır [177].

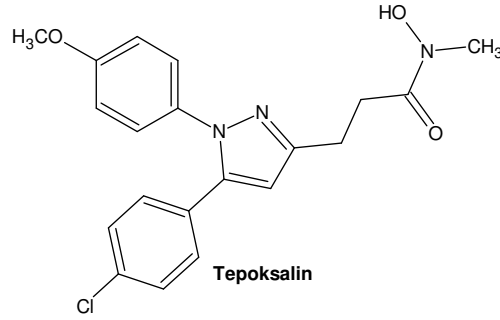


Pharmacia araştırma grubuna ait bir diğer patentte oksazol hidroksamik asit türevlerinden aşağıda formülü verilen bileşiğin, COX-2 enzimini $IC_{50}=5.1\mu M$, 5-LOX enzimini $IC_{50}=0.05\mu M$ değerleri ile inhibe ettiği bildirilmiştir [178].

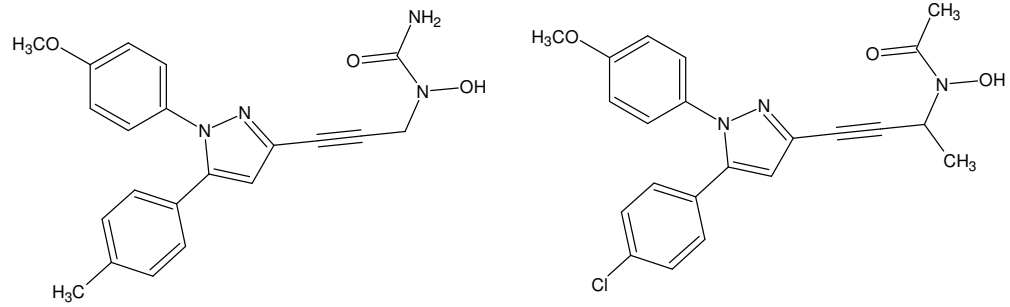


Pirazol türevleri

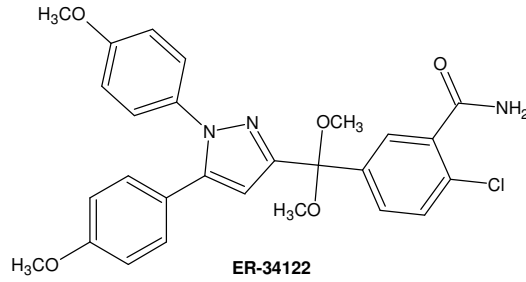
Dual etkili bileşiklere ilk örneklerden biri pirazol halkası içeren hidroksamik asit türevi tepoksalin'dir [179, 180]. Tepoksalin ve asit metabolitinin sinoviyal dokuda doz bağımlı dual inhibitör etkisi literatürde bildirilmiştir [181]. Tepoksalin halen köpeklerde artrit tedavisinde kullanılmaktadır [182].



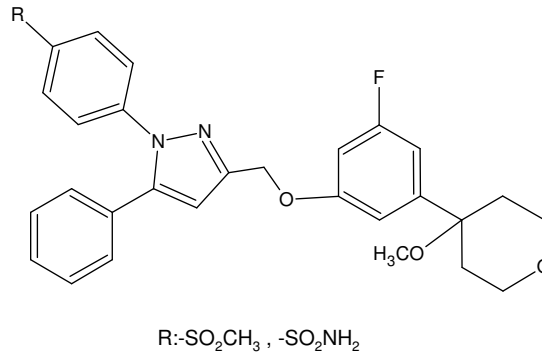
Connolly ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, dual inhibitör tepoksalin ve 5-LOX inhibitörü atreleutonun (ABT-761) yapısal özelliklerini taşıyan N-hidroksiüre ve hidroksamik asit türevi bileşikler sentezlenmiş ve COX/LOX inhibitör aktiviteleri araştırılmıştır. Bu bileşiklerin *in vitro* dual inhibitör etkiye sahipken *ex vivo* testlerde 5-LOX inhibitör etki süresi açısından tepoksaline göre üstünlükleri olmadığı gözlenmiştir [183].



Horizoe ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda ER-34122 kodlu pirazol türevi bileşiğin *in vitro*, *ex vivo* ve *in vivo* testlerde COX ve LOX enzim ürünleri oluşumunu inhibe ettiği bildirilmiştir [184, 185].

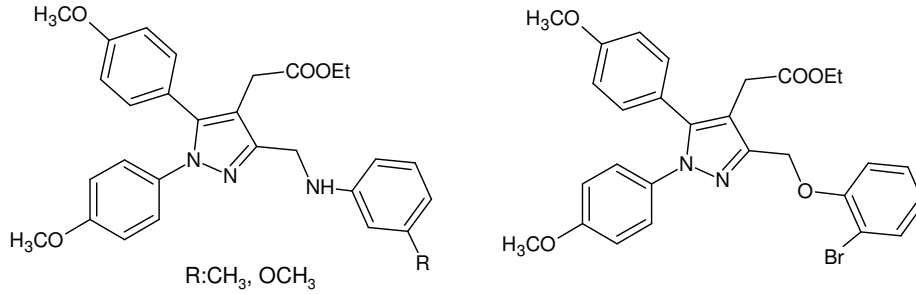


Barbey ve ekibi dual inhibitör geliştirmek için daha önce Searle tarafından uygulanan farmakoforik kombinasyon yöntemi ile yeni bir dual inhibitör geliştirmiştir. Bileşikte selektif COX-2 inhibitörlerinin trisiklik metansülfon yapısı ve 5-LOX inhibitörü ZD-2138'in 4-metoksitetrahidropiran grubu kombine edilmiştir. Bileşiğin *in vitro* ve *in vivo* yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmüştür [186].

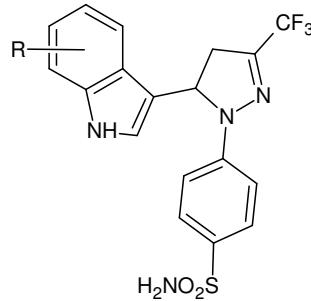


Aynı ekip tarafından daha sonra yapılan çalışmada bu bileşiğin yapısı esas alınarak yeni COX-2/5-LOX inhibitörü diarilpirazol türevleri sentezlenmiş, aminosülfonil grubu taşıyan bileşiğin insan prostatik kanser hücrelerinde apoptozisi indüklediği bulunmuştur [25].

Kawano ve ekibine ait bir patente pirazol-4-alkanoik asit türevlerinin aktiviteleri araştırılmış güçlü PGE₂ ve LTB₄ inhibisyonu gösteren türevler elde edilmiştir [187].



Reddy ve ekibinin 1-(4-sulfamoilfenil)-3-triflorometil-5-indolil pirazolinlerle yaptıkları çalışmada COX-2 ve LOX inhibitör aktiviteye sahip türevlere ulaşılmış, kiral merkeze sahip bu türevlerden iki bileşiğin (R:H ve 7-Cl) enantiyomerleri ayrılarak λ -izomerlerin daha yüksek COX aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. İndol halkasında sübstituent taşımayan türevin aromatisasyonu COX-2 aktivitenin kaybına yol açmıştır [188].

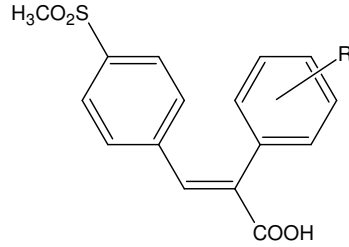


Hibrit bileşikler

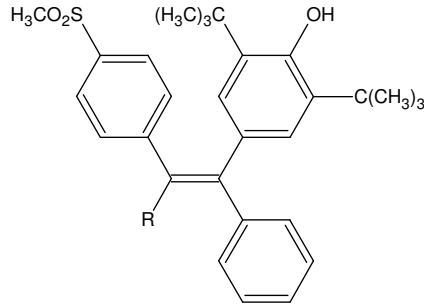
Uddin ve ekibi tarafından yapılan çalışmalarda triaril (Z)-eten yapısında, fenil halkasının para konumunda sülfonilmetil COX-2 farmakoforu taşıyan asiklik

rofekoksib analogları sentezlenerek selektif COX-2 inhibisyonları bildirilmiştir [189, 190]. Charlier ve ekibi tarafından ise redoks inhibitörü olmayan bileşiklerin insan 5-LOX enzimi aktif bölgesine bağlanma modeli açıklanarak likofelonun karboksil grubunun 5-LOX aktif bölgesinde arjinin 411 ile elektrostatik etkileşimi olabileceği bildirilmiştir [111].

Bu bilgilere dayanarak Moreau ve ekibi tarafından karboksil grubu taşıyan asiklik rofekoksib analogları sentezlenerek, *in vitro* COX/LOX inhibitör etkileri ve *in vivo* antienflamatuvar ve analjezik etkileri araştırılmıştır. COX-2 ve 15-LOX enzimleri aktif bölgeleri ile yapılan modelleme çalışmalarında süstitüent hacmi, konumu ve elektronik parametrelerin ligant-enzim bağlanma modlarını değiştirdiği bildirilmiştir [191].

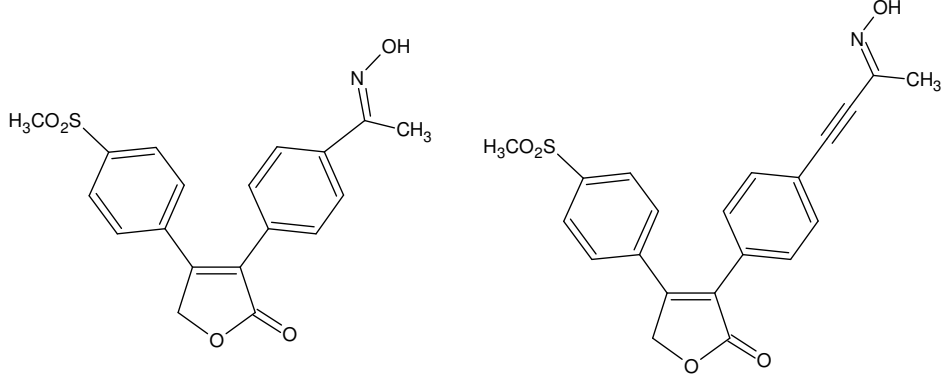


Moreau ve ekibi tarafından yapılan diğer bir çalışmada rofekoksibin asiklik analogu olan ve COX-2 selektif inhibitör aktiviteye sahip triaril (Z)-olefin yapısındaki bileşiklere, di-ter-bütilfenol farmakoforu yerleştirilerek COX/LOX inhibitörü bileşikler elde edilmiştir. Bu bileşikler içinde optimum etkiye sahip bileşik 1-hekzen (R=n-bütil) yapısı taşımaktadır [192].

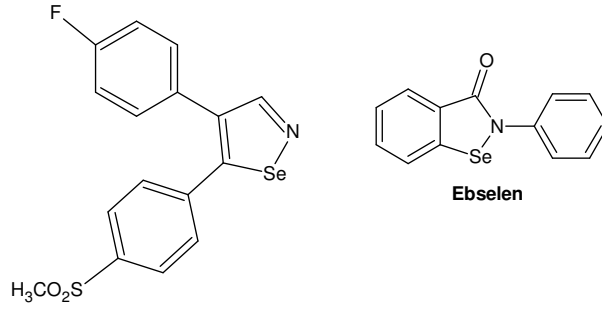


Hibrit bileşiklere ait diğer bir sınıf, selektif COX-2 inhibitör rofekoksibe 5-LOX inhibitörlerinde bulunan oksim ya da N-hidroksikarbamat gruplarının yerleştirilmesiyle elde edilmiştir. *In vitro* enzim inhibisyonları ve *in vivo*

antienflamatuvar, analjezik etkileri incelendiğinde 3. konumundaki fenil halkasında *p*-oksim grubu taşıyan türevler dual COX/LOX enzim inhibitörleri tasarımı için uygun bir model oluşturmaktadır [193].



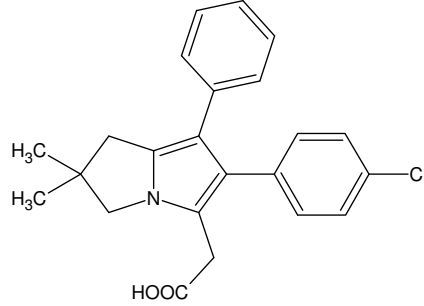
Scholz ve arkadaşları tarafından, antioksidan ebselenin karakteristik yapısı ile diaril heterosiklik halka grubu birleştirilerek 4,5-diaril isoselenazol yapısında dual inhibitör etkili bileşiklere ulaşılmıştır. Bu bileşiklerden flor ve sülfonilmetil grubu taşıyan türevin COX-2 ve 5-LOX inhibitör etkisinin yanında zayıf hidroksil radikali süpürücü etkisi de bildirilmiştir [194].



Pirolizin türevleri

Diarpilolizin türevlerinin COX-1, COX-2 ve 5-LOX enzim inhibitör etkileri geniş şekilde araştırılmıştır [195-200]. Merckle tarafından yapılan çalışmalar osteoartrit tedavisi için faz III klinik denemelere alınan likofelonun (ML3000) keşfine yol açmıştır. Likofelonun COX1/2 (IC₅₀=0.16-3.9µM) ve 5-LOX (IC₅₀=0.23-3.8 µM) inhibitör aktivitesi *in vitro* hücresel testlerde gösterilmiştir [28]. Likofelonun hayvan testlerinde analjezik, antienflamatuvar ve antitrombotik

etkilere sahip olduğu ve gastrointestinal yan etkilere yol açmadığı bildirilmiştir [13]. İnsan klinik denemelerinde osteoartrit tedavisinde etkinliğini ve gastrointestinal güvenilirliğini kanıtlamıştır [26]. Ancak likofelon ile ilgili geniş çapta klinik denemelere ihtiyaç duyulmaktadır.



Likofelon

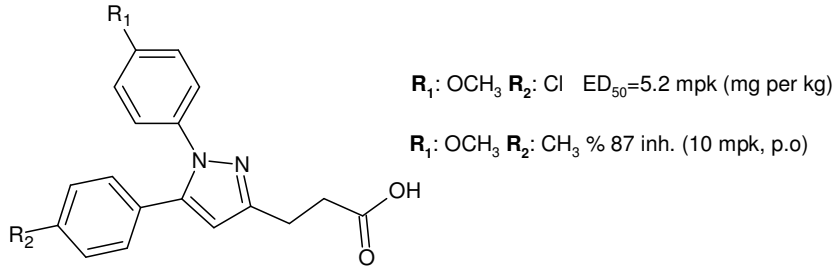
Son yıllarda likofelon ile yapılan çalışmalar bilinen farmakodinamik etkilerinin yanında farklı özelliklere de sahip olduğunu göstermektedir. Likofelonun endotele lökosit adhezyonunu önlediği, fonksiyonel ve metabolik platelet-lökosit etkileşimlerini, platelet fonksiyonunu ve nötrofil aktivasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir [201-204].

Fischer ve ekibi tarafından yapılan çalışmada likofelonun hücresele 5-LOX ürünleri oluşumunu etkili bir şekilde inhibe ettiği ancak saflaştırılmış 5-LOX enzimi veya hücre homojenatlarında zayıf etki gösterdiği gözlenmiştir. Ayrıca yapılan testlerde likofelon FLAP inhibitörü MK-886 ile benzer özellikler sergilemiştir. Bu çalışma sonuçlarına göre likofelonun FLAP aracılığıyla 5-LOX ürünleri oluşumunu inhibe ettiği düşünülmektedir [205].

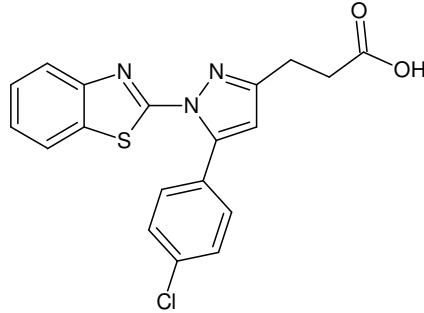
2.1.4. COX veya 5-LOX İnhibitör Etkili Diarilpirazolpropanoik asit Türevleri

Antienflamatuvar ve COX-2 veya 5-LOX enzim inhibitörü etkileri araştırılmak üzere hazırlanan 1,5-diaril-3-sübstitüe pirazol türevlerinden 3. konumda propanoik asit taşıyan türevleri içeren çalışmalar ve bu bileşiklerin biyolojik etkileri aşağıda özetlenmiştir.

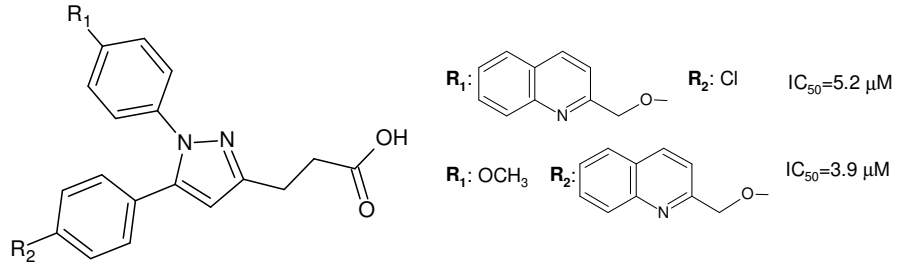
Ortho Pharmaceutical tarafından yapılan araştırmalarda 1,5-diaril-3-sübstitüe pirazol türevlerinin antienflamatuvar etkinlikleri araştırılmış bu çalışmalar sonucunda dual etkili tepoksalin bileşiğine ulaşılmıştır. Ancak hidrokamik asit türevlerinin demirle kelat oluşturarak 5-LOX enzim inhibisyonu sağladığı bilinmektedir. Bu türevlerden antienflamatuvar etkiye sahip 1,5-diarilpirazol-3-propanoik asit türevlerinin rat pençe ödemi testinde gösterdikleri inhibisyon oranları veya ED₅₀ değerleri verilmiştir [206].



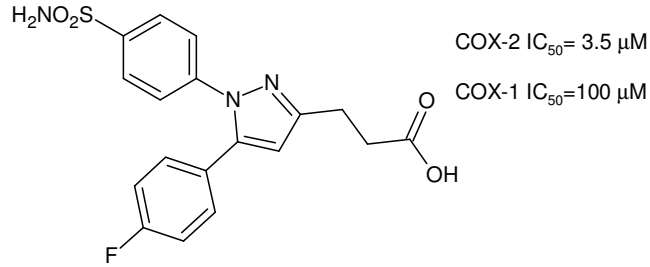
Fenil gruplarının farklı heterosiklik halkalarla değiştirilmesiyle elde edilen türevlerden benzotiyazol halkası içeren bileşik rat pençe ödemi testinde 15 miligram per kilogram dozda % 60 inhibisyon göstermiştir [36].



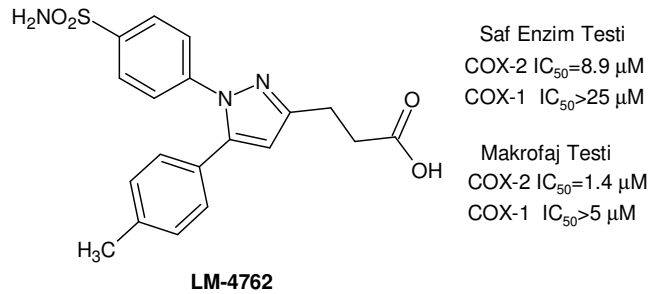
Aynı grup tarafından yapılan bir başka çalışmada fenil halkaları FLAP inhibitörleri yapısında yer alan kinolin grubu ile sübstitüe edilerek 5-HETE oluşumunu inhibe eden türevler elde edilmiştir. Bu bileşiklerin inhibitör etkileri tam hücrelerde ve izole enzimde araştırılmış bileşikler hücresel testte daha yüksek aktivite göstermiştir [207].



Pirazol halkasının birinci konumundaki fenil halkasında sülfonamid grubu taşıyan bileşikler geniş şekilde araştırılmış bu bileşiklerden selekoksib COX-2 selektif inhibitör etkili ilk ilaçlardan biri olarak tedavide yerini almıştır. Bu çalışmalarda flor sübstitüenti taşıyan 1,5-diarilpirazol-3-propanoik asit türevinin COX-2 inhibitör etkisi bildirilmiştir [208].



Birkaç ay önce yayınlanan patentli çalışmada selekoksibde yer alan triflorometil grubu alkilkarboksilik asit grubuyla değiştirilerek COX-2 enzim inhibitör etkili türevlere ulaşılmıştır [209].



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kimyasal Çalışmalar

3.1.1. Gereçler

Çalışmada kullanılan çözücüler analitik niteliktedir. Dimetilformamit distillendi veya Aldrich firmasından temin edilen susuz dimetilformamit kullanıldı. Asetofenon ve türevleri, potasyum tersiyer bütoksit, süksinik anhidrit, 3,6-dikloropiridazin, hidrazin hidrat ve *m*-kloroperbenzoik asit Aldrich firmasından; trietilamin, hidroklorik asit, sülfürik asit, asetik asit, sodyum asetat, sodyum tiyometoksit, metalik sodyum Merck firmasından temin edildi.

3.1.2. Genel Sentez Yöntemleri

6-Fenil-4,6-dioksohekzanoik asit türevleri

Potasyum tersiyer bütoksit (7.08 g, 0.06 mol) susuz dimetilformamit (20 ml) içinde çözülerek argon atmosferi altında 0°C'ye soğutulur. Bu çözeltiliye asetofenon türevinin (0.03 mol) dimetilformamit (15 ml) içindeki çözeltisi damla damla 45 dakika içinde eklenir ve 0°C'de 30 dakika karıştırılır. Süksinik anhidrit (3g, 0.03 mol) dimetilformamit (15 ml) içinde oda ısısında çözülerek balondaki enolat çözeltisine 80 dakikada 0-5°C'de eklenir. Reaksiyon karışımı bu sıcaklıkta 30 dakika daha karıştırıldıktan sonra 55°C'de 45 dakika ısıtılır. Süre sonunda reaksiyon karışımına su (200 ml) eklenerek, konsantre hidroklorik asit ile asitlendirilir. Karışım soğutulularak karıştırılır, çöken madde süzülerek alınır, su (100 ml) ile yıkanır. Sudan büyük ölçüde arandıktan sonra toluen (15 ml) ile yıkanır. Uygun çözücüden kristallendirilir [210].

3-Kloro-6-hidrazinopiridazin hidroklorür

3,6-Dikloropiridazin (40 g, 0.27 mol) üzerine hidrazin hidrat (30 ml, 0.6 mol) 0°C'de argon atmosferi altında eklenerek karıştırılır. Balon içeriği bir gece bekletilerek oluşan beyaz çökelek sudan kristallendirilir, süzülür, kurutulur (E.N: 137°C). Elde edilen 3-kloro-6-hidrazinopiridazin metanolde çözülür, çözeltiden gaz hidroklorik asit geçirilerek elde edilen 3-kloro-6-hidrazinopiridazin hidroklorür süzülerek alınır (E.N: 250°C dec.) [211].

3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-fenil-1*H*-pirazol-3-il]propanoik asit türevleri

6-Fenil-4,6-dioksoheksanoik asit türevi (0.008 mol), metanol (50 ml) ve trietilamin (2.2 ml, 0.016 mol) oda ısısında argon atmosferi altında karıştırılır. 3-Kloro-6-hidrazinopiridazin hidroklorür (1.81 g, 0.01 mol) eklenerek geri çeviren soğutucu altında 6 saat ısıtılır. Sonuç çözelti vakum altında kuruluğa kadar uçurularak kalan artık kloroform (100 ml) ile alınır. Kloroform, 1N hidroklorik asit (100 ml) ve su (100 ml) ile yıkanır, susuz sodyum sülfat ile kurutulur, vakum altında kuruluğa kadar uçurularak. Elde edilen katı uygun çözücünden kristallendirilir.

3-[1-(6-metokspiridazin-3-il)-5-fenil-1*H*-pirazol-3-il]propanoik asit türevleri

Sodyum (0.009 mol, 0.207 g) ve susuz metanolden (20 ml) hazırlanan sodyum metoksit çözeltisi 3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-fenil-1*H*-pirazol-3-il]propanoik asit türevinin (0.003 mol) metanol (30 ml) içindeki çözeltisi üzerine eklenir. Reaksiyon karışımı geri çeviren soğutucu altında 6 saat ısıtılır. Reaksiyon karışımına su (100 ml) eklenir ve 6N hidroklorik asit ile asitlendirilir. Çöken katı madde süzülerek alınır. Uygun çözücünden kristallendirilir.

3-[1-(6-okso-1,6-dihidropiridazin-3-il)-5-fenil-1*H*-pirazol-3-il]propanoik asit türevleri

3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-fenil-1*H*-pirazol-3-il]propanoik asit türevi (0.003 mol) ve sodyum asetat trihidrat (0.006 mol, 0.816 g) glasiyel asetik asit (50 ml) içinde geri çeviren soğutucu altında 10 saat ısıtılır. Reaksiyon karışımı oda ısısına geldikten sonra buzlu su (100 ml) üzerine dökülür. Çöken katı madde süzülerek alınır. Uygun çözücünden kristallendirilir.

3-[1-[6-(metiltiyo)piridazin-3-il]-5-fenil-1*H*-pirazol-3-il]propanoik asit

3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-fenil-1*H*-pirazol-3-il]propanoik asit (0.003 mol, 0.98 g) ve sodyum tiyometoksit (0.009 mol, 0.63 g) dimetilformamit (40 ml) içinde argon atmosferi altında 50°C'de 5 saat ısıtılır. Bir gece oda ısısında karıştırıldıktan sonra reaksiyon karışımına su (100 ml) eklenir. 6N hidroklorik asit ile asitlendirilir. Çöken katı madde süzülerek alınır. Asetondan kristallendirilir.

3-{1-[6-(metilsülfolil)piridazin-3-il]-5-fenil-1*H*-pirazol-3-il}propanoik asit

3-[1-(6-tiyometilpiridazin-3-il)-5-fenil-1*H*-pirazol-3-il]propanoik asit (0.0006 mol, 0.2 g) diklorometan (15 ml) ve metanol (3 ml) karışımında çözülür. Bu çözelti üzerine *m*-kloroperbenzoik asit (%70, 0.0016 mol, 0.39 g) porsiyonlar halinde 0°C'de eklenir. Reaksiyon karışımı 20 dakika 0°C'de karıştırıldıktan sonra oda ısısında bir gece karıştırılır. Vakum altında kuruluğa kadar uçurulur, kalan artık eterle (50 ml) karıştırılır, süzülür.

3.2. Analitik Çalışmalar

3.2.1. Erime Noktası Tayini

Bileşiklerin erime noktaları, Electrothermal 9300 erime derecesi cihazı ile tayin edildi ve değerler düzeltilmeden verildi.

3.2.2. İnce Tabaka Kromatografisi ile Yapılan Kontroller

Kimyasal sentez çalışmalarında ve bileşiklerin saflık kontrollerinde Silikajel 60 F₂₅₄ (Merck) hazır alüminyum plaklar kullanıldı. Çözücü sistemi olarak Toluen:Metanol (80:20), Kloroform:Metanol (90:10), Hekzan:Aseton:Asetik asit (60:40:2 damla) kullanıldı. Lekelerin belirlenmesinde UV ışığından (254 ve 366 nm) ve demir (III) klorür reaktifinden yararlanıldı.

3.2.3. Elementel Analizler

Sentezlenen bileşiklerin elementel analizleri (C, H, N, S) Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda CHNS-932 (LECO) Elementel Analiz Cihazı kullanılarak yapıldı.

3.2.4. IR Spektrumları

Sentezlenen bileşiklerin IR spektrumları, potasyum bromür (Merck) ile hazırlanan, yaklaşık %1 oranında madde içeren pelletler kullanılarak, Bruker Vector 22 (Opus Spectroscopic Software Version 2.0) IR Spektrometresi'nde alındı ve dalga sayısı (cm⁻¹) cinsinden değerlendirildi.

3.2.5. NMR Spektrumları

Sentezlenen bileşiklerin ^1H ve ^{13}C -NMR spektrumları, DMSO- d_6 veya CDCl_3 içindeki çözeltileri ile Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda Varian Mercury 400, 400 MHz High Performance Digital FT-NMR Spektrometresi'nde alınıp kayma değerleri δ (ppm) skalasında değerlendirildi. Eşleşme sabitleri Hz (Hertz) olarak verildi.

3.2.6. MS Spektrumları

Mass spektrumları, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda Waters 2695 Alliance ZQ Micromass LC/MS Spektrometresi'nde elektrospay iyonizasyon (ESI) yöntemi kullanılarak alındı.

3.3. Biyolojik Çalışmalar

3.3.1. COX İnhibisyonu Tayini

Gereçler

Sentezlenen bileşiklerin *in vitro* COX-1 ve COX-2 etkileri saflaştırılmış enzim testi [160, 212] ile Faes Farma (İspanya) Farmakoloji Bölümü laboratuvarlarında yapıldı.

In vitro COX-1 ve COX-2 inhibitör etki tayini için koyun COX-1 ve COX-2 enzimleri (Cayman Chemical) kullanıldı. PGE₂ miktarı Enzim İmmün Testi (EIA) (Amersham Biosciences) ile ölçüldü.

Bütün bileşikler 10 μM final konsantrasyonda test edildi. Taşıyıcı olarak %1'lik DMSO kullanıldı. Referans bileşik olarak rofekoksib COX-1 inhibitör aktivitesi için 100 μM , COX-2 inhibitör aktivitesi için 1 μM konsantrasyonda, indometazin ise 10 μM konsantrasyonda kullanıldı.

COX İnhibisyonu Test Yöntemi

Bir ünite COX-1 veya COX-2 enzimi içeren 50 μl çözelti, kofaktör olarak hematin (1 μM) ve fenol (2 mM), EDTA (5 mM) içeren 0.35 ml pH 8 Tris-HCl

tamponu (100 mM) ile süspanse edilir. Reaksiyon ortamı 50 µl test bileşiği (10 µM), referans bileşik ya da taşıyıcı eklenerek 37 °C'de 15 dakika süreyle inkübe edilir. Enzimatik reaksiyon, 50 µl araşidonik asit substratı (100 µM) eklenerek başlatılır. 37 °C'de 5 dakika inkübasyon sonunda reaksiyon 50 µl 1N hidroklorik asit ilavesi ile durdurulur ve reaksiyon ortamı 50 µl Tris-baz (1 M) ile nötralize edilir.

50 µl final çözelti immünoenzimatik test tamponu ile 1:10 oranında seyreltilir. Seyreltilmiş çözülden 50 µl alınarak Enzim İmmün testi (EIA) ile PGE₂ miktarı tayin edilir. Ölçümler mikropłaka okuyucusu ile (Labsystems multiscan MS) 450 nm dalga boyunda yapılır. Veriler GENESIS-LITE programı (Mikropłaka Yazılımı) kullanılarak elde edilir. Sonuçlar, taşıyıcıyla karşılaştırmalı olarak % COX-1 veya COX-2 inhibisyon şeklinde ifade edilip aşağıda verilen denkleme göre hesaplanır.

$$\% \text{ COX İnhibisyon} = ([\text{PGE}_2]_{\text{taşıyıcı}} - [\text{PGE}_2]_{\text{test bileşiği}}) \times 100 / [\text{PGE}_2]_{\text{taşıyıcı}}$$

Test edilen bileşiklerden COX-2 inhibisyonu % 50'den büyük olanlar % COX-1 inhibisyonu ve IC₅₀ değerleri hesaplanmak üzere tekrar değerlendirilir. IC₅₀ değerleri, PRISM programında (GraphPad) non-lineer regresyon yöntemi uygulanarak, selektivite indeksleri (SI) ise aşağıda verilen oran kullanılarak hesaplanır.

$$\text{SI} = [\text{IC}_{50}(\text{COX-1}) / \text{IC}_{50}(\text{COX-2})]$$

3.3.2. 5-LOX İnhibisyonu Tayini

Gereçler

Sentezlenen bileşiklerin 5-LOX inhibitör etkileri, insan lökosit LTB₄ inhibisyon testi [213] ile Amira Pharmaceuticals (San Diego, Kaliforniya) laboratuvarlarında yapıldı. LTB₄ miktarı Enzim İmmün Testi (EIA) (Assay Designs) ile ölçüldü.

Lökosit izolasyonu için insan kanı Heparin Vacutainer™ tüpler içine toplandı ve 2 saat içinde kullanıldı. % 3'lük Dekstran çözeltisi, fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile hazırlandı. HBSS/HEPES 100 ml Hank's Buffered Salt Solution (Invitrogen, Carlsbad, CA) üzerine 1.5 ml 1M HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetsülfonik asit) eklenerek hazırlandı. Kalsiyum iyonofor (A23187) DMSO içerisinde 50 mM (26.18 mg/ml) konsantrasyonda hazırlandı, ışıktan korunarak -20°C'de saklandı. Sentezlenen bileşikler 30, 10, 3 ve 1 µM konsantrasyonda DMSO ile seyreltilerek test edildi.

5-LOX İnhibisyonu Test Yöntemi

İnsan Lökosit İzolasyonu

20 ml insan kanı 50 ml'lik bir tübe aktarılarak 7 ml % 3'lük dekstran çözeltisi eklenir. Oda ısısında 45 dakika bekletilerek kırmızı kan hücrelerinin dibine çökmesi sağlanır. Süpernatant alınarak HBSS/HEPES ile 40 ml'ye tamamlanır. Oda ısısında 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. Hücre çökelekleri 30 ml kırmızı kan hücresi parçalama çözeltisi ile süspansiyon edilir ve 37°C'de 5 dakika inkübe edilir. Daha sonra oda ısısında 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. Elde edilen çökelek 40 ml HBSS/HEPES ile yıkanır. Oda ısısında 1200 rpm'de 5 dakika daha santrifüj edilir. Çökelek 25 ml önceden 37 °C'ye getirilmiş HBSS/HEPES (Ca⁺² ve Mg⁺² içeren) ile süspansiyon edilir. Triptan mavisi ve hemositometre kullanarak sayılır.

Test Yöntemi

Lökositler HBSS/HEPES (Ca⁺² ve Mg⁺² içeren) ile 1.25x10⁵/ml'ye seyreltilir. 1 µl test bileşiği ya da DMSO, 96 kuyucuklu polipropilen mikropalakaya aktarılır. Her kuyucuğa 250 µl seyreltilmiş lökosit eklenir. 10 saniye plaka karıştırıcıda çalkalanır. 37°C'de 5 dakika inkübe edilir. İnkübasyon sırasında 40 µl A23187 (50 mM stok çözeltisi), 4 ml HBSS (Ca⁺² ve Mg⁺² içeren) içine eklenerek karıştırılır. Her kuyucuğa 5 µl seyreltilmiş A23187 eklenir (Final konsantrasyon 10 µM). Plaka 10 saniye çalkalanır. 37°C'de 5 dakika inkübe edilir. Plaka 4°C'de 1200 rpm'de 10 dakika hücrelerin çökmesi için santrifüj edilir. 150 µl süpernatant temiz bir plakaya aktarılır. Süpernatant 1:4 oranında seyreltilerek LTB₄ miktarı Enzim İmmün Testi (EIA) (Assay Designs) ile ölçülür. Test bileşiği yerine taşıyıcı

içeren ve A23187 içeren kuyucuklar =Total bağlanma (TB), test bileşiği yerine taşıyıcı içeren ancak A23187 içermeyen kuyucuklar=Nonspesifik bağlanma (NSB) olarak değerlendirilir. Sonuçlar, % 5-LOX inhibisyon şeklinde ifade edilip aşağıda verilen denkleme göre hesaplanır.

$$\% \text{ 5-LOX İnhibisyon} = \frac{([LTB_4]_{TB} - [LTB_4]_{\text{test bileşiği}})}{([LTB_4]_{TB} - [LTB_4]_{NSB})} \times 100$$

30 µM konsantrasyonda 5-LOX inhibisyonu % 50'den büyük olanlar IC₅₀ değerleri hesaplanmak üzere 30, 10, 3.3, 1.1, 0.370, 0.123 ve 0.041 µM konsantrasyonda test edilerek non-lineer regresyon yöntemi (Graphpad Prism) kullanılarak IC₅₀ değerleri hesaplanır.

3.4 Moleküler Modelleme Çalışmaları

3.4.1 COX-2 Aktif Bölgesi ile Etkileşim

Bileşiklerin COX-2 aktif bölgesi ile etkileşim çalışması (docking) Prof. Dr. Antonio Entrena (Granada Üniversitesi, İspanya) ve Prof. Dr. Gabriele Costantino (Parma Üniversitesi, İtalya) tarafından gerçekleştirildi.

Proteinin hazırlanmasında Maestro programı ve COX-2 enziminin selektif inhibitör SC-558 ile kompleks halindeki X-ray yapısı kullanıldı (PDB kodu:1cx2). Bütün iyonize olabilen kalıntılar iyonize halde bırakıldı. Protein yapısındaki su, hidroksil ve tiyollerdeki protonların pozisyonları, ayrıca histidin, asparajin ve glutaminin rotamer ve tautomer durumlarını oluşturan yan zincir torsiyon açıları sabitlendi. Protein yapısında iyileştirme öncesinde su molekülleri silinmedi. Ligand merkezleri hesaplanan bölge içine yerleşecek şekilde segmentler hesaplandı. Moleküler etkileşim çalışmaları (docking) Glide programı ile yapıldı. Glide algoritması, bir seri hiyerarşik filtreler aracılığıyla protein bağlanma cebinde ligandın pozisyon, oryantasyon ve konformasyonlarının sistematik tahminini gerçekleştirir [214]. Reseptörün şekli ve özellikleri, farklı alan setleri ile gösterilir bu sayede ligand duruşunun değerlendirilmesinde daha hassas sonuçlar sağlanır. Bu alanlar aktif bölge ile etkileşim çalışması öncesinde hesaplandı. Bağlanma bölgesi ligand merkezinin çevrilmesini sınırlandırmak için dikdörtgen

bir kutu ile tanımlandı. Bir seri başlangıç ligand konformasyonu en küçük torsiyon açısının ayrıntılı taraması ile oluşturuldu ve konformerler kombinatoryal şekilde gruplandı. Ligand merkezinin ortak konformasyonu ve ayrıntılı yan zincir konformasyonları ile karakterize edilen her bir grup tek bir nesne olarak değerlendirilip aktif bölge ile etkileşimi başlatıldı. Tarama kaba bir pozisyonlama ve değerlendirme fazı ile başlamaktadır, bu şekilde önemli ölçüde tarama alanı sınırlanır ve değerlendirilecek olan duruş sayısı azaltılır. Bir sonraki basamakta, seçilen duruşlar reseptör için OPLS-AA (Optimized Potentials for Liquid Simulations/All Atom) kuvvet alanı ile önceden hesaplanan segmentlere minimize edilir. Son basamakta, bu şekilde elde edilen 5-10 en düşük enerjili duruş, ligandın çevresindeki grupların minimum torsiyon açılarını inceleyen ve bu grupların oryantasyonlarını iyileştiren Monte Carlo metodu ile değerlendirilir. Minimize edilen duruşlar Extra Precision (XP) Glide Score fonksiyonu ile tekrar değerlendirilir. Bu işlem suyun desolvasyon enerjilerini ve daha gelişmiş bağlanma afinitesi sağlayan protein-ligand yapısal modellerini içerir. Bu çalışmada aday liganların reseptörün spesifik konformasyonuna bağlanmasının yarı kantitatif sınıflandırılmasını amaçlayan XP Glide metodu kullanılmıştır [214].

3.4.2. 5-LOX Aktif Bölgesi ile Etkileşim

5-LOX inhibitör bileşiklerin insan 5-LOX enzimi aktif bölgesi ile etkileşim (docking) çalışması Dr. Caroline Charlier tarafından (Namur Üniversitesi, Belçika) gerçekleştirildi. İnsan 5-LOX enzimi 3 boyutlu modeli homoloji modelleme ile elde edildi.

Homoloji Modelleme

İnsan 5-LOX enzim amino asit dizini Swiss-Prot veri tabanından alındı. Protein Veri Bankasında (PDB) dizilim analizi BLAST kullanılarak gerçekleştirildi. En uygun kalıp olarak insan 5-LOX ile dizilim benzerliği % 30'dan fazla olan tavşan 15-LOX (PDB kodu 1LOX) enzimi seçildi. Kalıp ve hedef aminoasit dizimleri EsyPred3D programı ile sıralandı. 3 boyutlu yapı InsightII Homology paket programı ile yapılandırıldı. Sonuç modelin enerjisi CVFF (Consistent Valence Force Field) kuvvet alanı kullanılarak minimize edildi. Optimizasyon sırasında demir-ligand kalıntıları sabit tutularak metal bağlanma bölgesinin

oktahedral geometrisi korundu. Modelin doğrulaması Procheck 3.0 programı ile yapıldı [111].

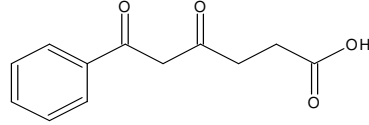
İnhibitör-enzim etkileşimi

Ligandlar InsightII Builder modül kullanılarak modellendi, geometrileri CFF91 (Consistent Force Field) kuvvet alanı ile moleküler mekanik yöntemle optimize edildi. İnhibitörlerin 5-LOX aktif bölgesi ile etkileşimi genetik algoritma kullanan GOLD version 3.1 ile yapıldı. Bu program fleksibl ligandların, aktif bölge çevresinde kısmi fleksibilite gösteren proteinlerle etkileşimini gerçekleştirir [215]. Serin, treonin, ve tirozin hidroksil grupları, ayrıca lizin amonyum grubu işlem sırasında hidrojen bağı oluşumu tercih edilecek şekilde optimize edildi. Generik algoritma parametreleri olarak GOLD programının varsayılan ayarları kullanıldı. Farklı çözümler ligandın reseptöre uyumunu gösteren GOLDScore fonksiyonu ile değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1 Kimyasal Bulgular

4,6-Diokso-6-fenilhekzanoik asit (Bileşik 1a)



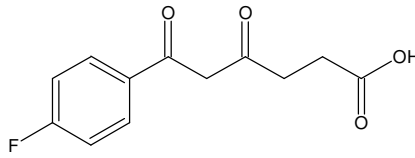
Asetofenon (0.03 mol, 3.5 ml), potasyum tersiyer bütoksit (7.08 g, 0.06 mol) ve süksinik anhidritten (3 g, 0.03 mol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlendi. 2.12 g (verim % 32) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 105-106 °C (Lit. 103-105°C [216])

IR spektrumu (KBr): 3300-2500 cm^{-1} (geniş O-H gerilimi), 1702 cm^{-1} (C=O gerilimi), 1613 cm^{-1} (C=C gerilimi)

$^1\text{H-NMR}$ spektrumu (CDCl_3) : (enol) 2.76 (2H, m), 2.84 (2H, m), 6.2 (1H, s), 7.44-7.87 (5H, m)

4,6-Diokso-6-(4-florofenil)hekzanoik asit (Bileşik 1b)



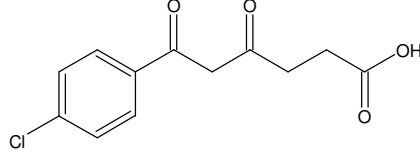
4-Floroasetofenon (0.03 mol, 3.6 ml), potasyum tersiyer bütoksit (7.08 g, 0.06 mol) ve süksinik anhidritten (3 g, 0.03 mol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlendi. 3.09 g (verim % 43) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 122-123°C (Lit. 120-122°C [217])

IR spektrumu (KBr): 3300-2500 cm^{-1} (geniş O-H gerilimi), 1699 cm^{-1} (C=O gerilimi), 1605 cm^{-1} (C=C gerilimi)

$^1\text{H-NMR}$ spektrumu (CDCl_3): 2.75 (2H, m), 2.82 (2H, m), 6.15 (1H, s), 7.13 (2H, m), 7.88 (2H, m)

4,6-Diokso-6-(4-klorofenil)hekzanoik asit (Bileşik 1c)



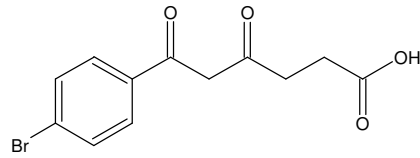
4-Kloroasetofenon (0.03 mol, 3.9 ml), potasyum tersiyer bütoksit (7.08 g, 0.06 mol) ve süksinik anhidritten (3 g, 0.03 mol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlendi. 3.80 g (verim % 50) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 144-145 °C (Lit.137-139°C [216])

IR spektrumu (KBr): 3300-2500 cm^{-1} (geniş O-H gerilimi), 1703 cm^{-1} (C=O gerilimi), 1625 cm^{-1} (C=C)

$^1\text{H-NMR}$ spektrumu (DMSO- d_6): 2.5:1 enol:keto tautomer karışımı (Enol) 2.59 (2H, t, J=6.8 Hz), 2.77 (2H, t, J=6.8 Hz), 6.62 (1H, s), 7.60 (2H, d, J=8.4 Hz) 7.97 (2H, d, J=8.4 Hz): (Keto) 2.44 (2H, t, J=6.8 Hz), 2.83 (2H, t, J=6.8 Hz), 4.32 (2H, s), 7.60 (2H, d, J=8.4 Hz), 7.97 (2H, d, J=8.4 Hz)

4,6-Diokso-6-(4-bromofenil)hekzanoik asit (Bileşik 1d)



4-Bromoasetofenon (0.03 mol, 5.97 g), potasyum tersiyer bütoksit (7.08 g, 0.06 mol) ve süksinik anhidritten (3 g, 0.03 mol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlendi. Etanol-su ile kristallendirildi. 3.78 g (verim % 42) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 163-164 °C

IR spektrumu (KBr): 3300-2500 cm^{-1} (geniş O-H gerilimi), 1705 cm^{-1} (C=O gerilimi), 1589 cm^{-1} (C=C gerilimi)

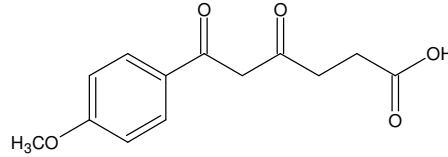
¹H-NMR spektrumu (DMSO-d₆): 1.5:1 enol:keto tautomer karışımı (Enol) 2.57 (2H, t, J=6.6 Hz), 2.75 (2H, t, J=6.6 Hz), 6.60 (1H, s), 7.73 (2H, d, J=8.0 Hz), 7.86 (2H, d, J=8.0 Hz): (Keto) 2.42 (2H, t, J=6.4 Hz), 2.82 (2H, t, J=6.4 Hz), 4.30 (2H, s), 7.73 (2H, d, J=8.0 Hz), 7.86 (2H, d, J=8.0 Hz)

Elementel analiz C₁₂H₁₁BrO₄ için

Hesaplanan % C: 48.18 H: 3.71

Bulunan % C: 47.84 H: 3.59

4,6-Diokso-6-(4-metoksifenil)hekzanoik asit (Bileşik 1e)



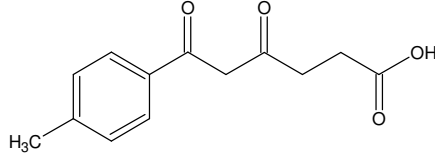
4-Metoksiasetofenon (0.03 mol, 5.97 g), potasyum tersiyer bütoksit (7.08 g, 0.06 mol) ve süksinik anhidritten (3 g, 0.03 mol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlendi. Etanol-su ile kristallendirildi. 2.02 g (verim % 27) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 131 °C

IR spektrumu (KBr): 3300-2500 cm⁻¹ (geniş O-H gerilimi), 1701 cm⁻¹ (C=O gerilimi), 1603 cm⁻¹ (C=C gerilimi)

¹H-NMR spektrumu (DMSO-d₆): 1.5:1 enol:keto tautomer karışımı (Enol) 2.57 (2H, t, J=6.8 Hz), 2.71 (2H, t, J=6.8 Hz), 3.84 (3H, s), 6.51 (1H, s), 7.06 (2H, m), 7.93 (2H, m) (Keto): 2.42 (2H, t, J=6.4 Hz), 2.82 (2H, t, J=6.4 Hz), 3.84 (3H, s), 4.23 (2H, s), 7.06 (2H, m), 7.93 (2H, m)

4,6-Diokso-6-(4-metilfenil)hekzanoik asit (Bileşik 1f)



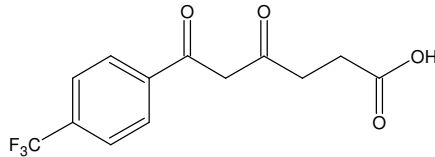
4-Metilasetofenon (0.03 mol, 4 ml), potasyum tersiyer bütoksit (7.08 g, 0.06 mol) ve süksinik anhidritten (3 g, 0.03 mol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlendi. 3.16 g (verim % 45) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 138-139°C (Lit. 139-141°C [206])

IR spektrumu (KBr): 3300-2500 cm⁻¹ (geniş O-H gerilimi), 1698 cm⁻¹(C=O gerilimi), 1611 cm⁻¹(C=C gerilimi)

¹H-NMR spektrumu (DMSO-d₆): (enol) 2.38 (3H, s), 2.58 (2H, t, J=6.6 Hz), 2.74 (2H, t, J=6.6 Hz), 6.54 (1H, s), 7.34 (2H, d, J=8.4 Hz), 7.85 (2H, d, J=8.4 Hz)

4,6-Diokso-6-(4-triflorometilfenil)hekzanoik asit (Bileşik 1g)



4-Triflorometilasetofenon (0.03 mol, 5.64 g), potasyum tersiyer bütoksit (7.08 g, 0.06 mol) ve süksinik anhidritten (3 g, 0.03 mol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlendi. Eter-petrol eteri ile kristallendirildi. 3.45 g (verim %40) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 127°C

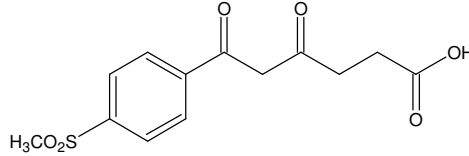
IR spektrumu : 3300-2600 cm⁻¹ (geniş O-H gerilimi), 1705 cm⁻¹ (C=O gerilimi), 1624 cm⁻¹ (C=C gerilimi)

¹H-NMR spektrumu (DMSO-d₆): 4:1 enol:keto tautomer karışımı (Enol) 2.57 (2H, t, J=6.6 Hz), 2.78 (2H, t, J=6.6 Hz), 6.69 (1H, s), 7.87 (2H, d, J=8.4 Hz) 8.11 (2H,

d, $J=8.4$ Hz): (Keto) 2.41 (2H, t, $J=6.6$ Hz), 2.83 (2H, t, $J=6.6$ Hz), 4.37 (2H, s), 7.87 (2H, d, $J=8.4$ Hz), 8.11 (2H, d, $J=8.4$ Hz)

Elementel analiz $C_{13}H_{11}F_3O_4$ için
Hesaplanan % C: 54.17 H: 3.85
Bulunan % C: 53.65 H: 3.85

4,6-Diokso-6-[4-(metilsülfonil)fenil]hekzanoik asit (Bileşik 1h)



4-(Metilsülfonil)asetofenon (0.03 mol, 5.95 g), potasyum tersiyer bütoksit (7.08 g, 0.06 mol) ve süksinik anhidritten (3g, 0.03 mol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlendi. Etilasetat-hekzan ile kristallendirildi. 2.68 g (verim % 30) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 160 °C

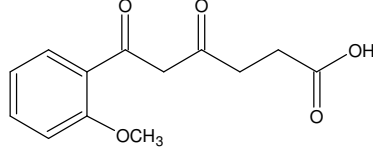
IR spektrumu : 3300-2500 cm^{-1} (geniş O-H gerilimi), 1701 cm^{-1} (C=O gerilimi), 1609 cm^{-1} (C=C gerilimi), 1292 ve 1147 cm^{-1} (asimetrik ve simetrik SO_2 gerilimi)

1H -NMR spektrumu (DMSO- d_6): 4:1 enol:keto tautomer karışımı (Enol) 2.57 (2H, t, $J=6.6$ Hz), 2.78 (2H, t, $J=6.6$ Hz), 3.27 (3H, s) 6.70 (1H, s), 8.04 (2H, d, $J=8.4$ Hz), 8.15 (2H, d, $J=8.4$ Hz): (Keto) 2.41 (2H, t, $J=6.6$ Hz), 2.83 (2H, t, $J=6.6$ Hz), 3.27 (3H, s), 4.38 (2H, s), 8.04 (2H, d, $J=8.4$ Hz), 8.15 (2H, d, $J=8.4$ Hz)

Elementel analiz $C_{13}H_{14}O_6S$ için
Hesaplanan % C: 52.34 H: 4.73 S: 10.75
Bulunan % C: 51.85 H: 4.69 S: 10.77

MS (ES-) spektrumu: 297.06 [M-H]

4,6-Diokso-6-(2-metoksifenil)hekzanoik asit (Bileşik 1i)



2-metoksiasetofenon (0.03 mol, 4.13 ml), potasyum tersiyer bütoksit (7.08 g, 0.06 mol) ve süksinik anhidritten (3 g, 0.03 mol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlendi. Reaksiyon sonunda reaksiyon karışımı su (200 ml) ile seyreltildi ve konsantre HCl ile asitlendirildi. Ayrılan yağimsı kısım kloroformda (100 ml) çözülerek % 10'luk NaHCO₃ çözeltisi (3x50 ml) ile ekstre edildi. Sulu fazlar birleştirilip konsantre HCl ile asitlendirildi. Çöken katı madde süzülerek alındı. 2.25 g (verim % 30) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 116-117 °C

IR spektrumu (KBr): 3400-2500 cm⁻¹ (geniş O-H gerilimi), 1711 cm⁻¹ (C=O gerilimi), 1624 cm⁻¹ (C=C gerilimi)

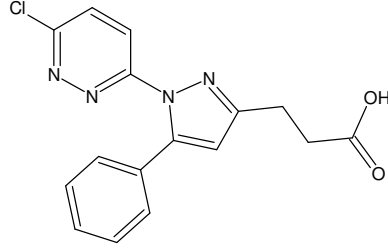
¹H-NMR spektrumu (DMSO-d₆): 1.5:1 enol:keto tautomer karışımı (Enol) 2.52 (2H, t, *J*=6.6 Hz), 2.71 (2H, t, *J*=6.6 Hz), 3.84 (3H, s) 6.52 (1H, s), 7.0-7.7 (4H, m): (Keto) 2.39 (2H, t, *J*=6.6 Hz), 2.76 (2H, t, *J*=6.6 Hz), 3.87 (3H, s), 4.07 (2H, s), 7.0-7.7 (4H, m)

Elementel analiz C₁₃H₁₄O₅ için

Hesaplanan % C: 62.39 H: 5.64

Bulunan % C: 62.17 H: 5.71

3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-fenil-1H-pirazol-3-il]propanoik asit (Bileşik 2a)



4,6-Diokso-6-fenilhekzanoik asit (0.008 mol, 1.76 g), trietilamin (2.23 ml, 0.016 mol) ve 3-kloro-6-hidrazinopiridazin hidroklorürden (1.81 g, 0.01 mol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenip, etanol-su ile kristallendirildi. 1.81 g (verim % 69) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 156 °C

IR spektrumu (KBr): 3300-2500 cm^{-1} (geniş O-H gerilimi), 1713 cm^{-1} (C=O gerilimi)

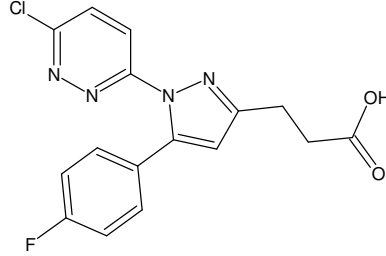
$^1\text{H-NMR}$ spektrumu (DMSO- d_6) δ : 2.69 (2H, t, $J=7.4$ Hz, CH_2COOH), 2.91 (2H, t, $J=7.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 6.64 (1H, s, pirazol H-4), 7.29-7.37 (5H, m, fenil), 8.09 (1H, d, $J=9.2$ Hz, piridazin H-4), 8.13 (1H, d, $J=9.2$ Hz, piridazin H-5), 12.20 (1H, s, COOH)

Elementel analiz $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{ClN}_4\text{O}_2$ için

Hesaplanan % C: 58.45 H: 3.99 N: 17.04

Bulunan % C: 58.68 H: 3.93 N: 17.03

**3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-(4-florofenil)-1H-pirazol-3-il]propanoik asit
(Bileşik 2b)**



4,6-Diokso-6-(4-florofenil)hekzanoik asit (0.008 mol, 1.91 g), trietilamin (2.23 ml, 0.016 mol) ve 3-kloro-6-hidrazinopiridazin hidroklorürden (1.81 g, 0.01 mol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenip, etanol-su ile kristallendirildi. 2.33 g (verim % 84) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 149 °C

IR spektrumu (KBr): 3300-2500 cm^{-1} (geniş O-H gerilimi), 1725 cm^{-1} (C=O gerilimi)

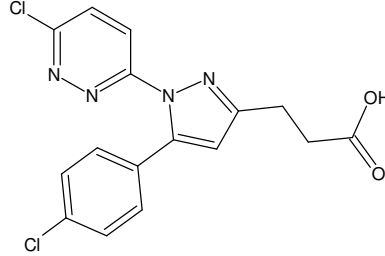
$^1\text{H-NMR}$ spektrumu (DMSO- d_6) δ : 2.66 (2H, t, $J=7.4$ Hz, CH_2COOH), 2.88 (2H, t, $J=7.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 6.61 (1H, s, pirazol H-4), 7.18 (2H, t, $J=8.8$ Hz, fenil H-3, 5), 7.34 (2H, dd, $J= 8.8$ ve 5.6 Hz, fenil H-2, 6), 8.06 (1H, d, $J=9.2$ Hz, piridazin H-5), 8.11 (1H, d, $J=9.2$ Hz, piridazin H-4), 12.20 (1H, s, COOH)

Elementel analiz $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{ClFN}_4\text{O}_2$

Hesaplanan % C: 55.42 H: 3.49 N: 16.16

Bulunan % C: 55.43 H: 3.52 N: 16.14

**3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-(4-klorofenil)-1H-pirazol-3-il]propanoik asit
(Bileşik 2c)**



4,6-Diokso-6-(4-klorofenil)hekzanoik asit (0.008 mol, 2.04 g), trietilamin (2.23 ml, 0.016 mol) ve 3-kloro-6-hidrazinopiridazin hidroklorürden (1.81 g, 0.01 mol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenip, etanol-su ile kristallendirildi. 2.44 g (verim % 84) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 164 °C

IR spektrumu (KBr): 3250-2500 cm^{-1} (geniş O-H gerilimi), 1717 cm^{-1} (C=O gerilimi)

$^1\text{H-NMR}$ spektrumu (DMSO- d_6) δ : 2.66 (2H, t, $J=7.6$ Hz, CH_2COOH), 2.89 (2H, t, $J=7.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 6.65 (1H, s, pirazol H-4), 7.32 (2H, d, $J=8.8$ Hz fenil H-2, 6), 7.42 (2H, d, $J=8.8$ Hz, fenil H-3, 5), 8.08 (1H, d, $J=9.2$ Hz, piridazin H-5), 8.13 (1H, d, $J=9.2$ Hz, piridazin H-4), 12.20 (1H, s, COOH)

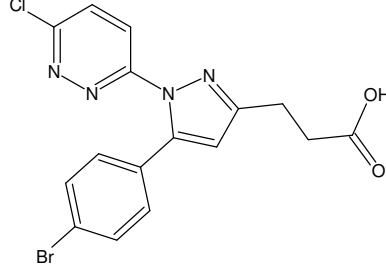
$^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu (DMSO- d_6) δ : 23.83, 33.12, 110.69, 126.41, 129.03, 130.10, 130.89, 132.07, 133.85, 144.19, 155.10, 155.38, 155.81, 174.35

Elementel analiz $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_2$

Hesaplanan % C: 52.91 H: 3.33 N: 15.43

Bulunan % C: 52.82 H: 3.43 N: 15.41

**3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-(4-bromofenil)-1H-pirazol-3-il]propanoik asit
(Bileşik 2d)**



4,6-Diokso-6-(4-bromofenil)hekzanoik asit (0.008 mol, 2.39 g), trietilamin (2.23 ml, 0.016 mol) ve 3-kloro-6-hidrazinopiridazin hidroklorürden (1.81 g, 0.01 mol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenip, etanol-su ile kristallendirildi. 2.48 g (verim % 76) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 169 °C

IR spektrumu (KBr): 3250-2500 cm^{-1} (O-H gerilimi), 1697 cm^{-1} (C=O gerilimi)

$^1\text{H-NMR}$ spektrumu (DMSO- d_6) δ : 2.66 (2H, t, $J=7.6$ Hz, CH_2COOH), 2.89 (2H, t, $J=7.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 6.65 (1H, s, pirazol H-4), 7.25 (2H, d, $J=8.4$ Hz fenil H-2, 6), 7.54 (2H, d, $J=8.8$ Hz, fenil H-3, 5), 8.07 (1H, d, $J=9.2$ Hz, piridazin H-5), 8.13 (1H, d, $J=9.2$ Hz, piridazin H-4), 12.20 (1H, s, COOH)

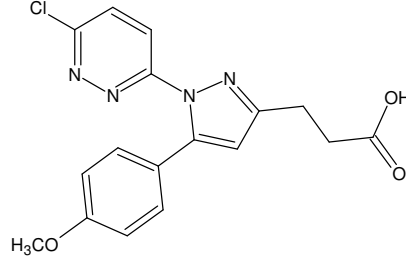
$^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu (DMSO- d_6) δ : 23.81, 33.13, 110.65, 122.47, 126.39, 130.45, 131.13, 131.92, 132.05, 141.23, 155.09, 155.38, 155.79, 174.32

Elementel analiz $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{BrClN}_4\text{O}_2$ için

Hesaplanan % C: 47.14 H: 2.97 N: 13.74

Bulunan % C: 47.15 H: 2.91 N: 13.75

**3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-(4-metoksifenil)-1H-pirazol-3-il]propanoik asit
(Bileşik 2e)**



4,6-Diokso-6-(4-metoksifenil)hekzanoik asit (0.008 mol, 2.00 g), trietilamin (2.23 ml, 0.016 mol) ve 3-kloro-6-hidrazinopiridazin hidroklorürden (1.81 g, 0.01 mol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenip, etanol-su ile kristallendirildi. 1.73 g (verim % 60) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 140-141 °C

IR spektrumu (KBr): 3300-2500 cm^{-1} (geniş O-H gerilimi), 1711 cm^{-1} (C=O gerilimi)

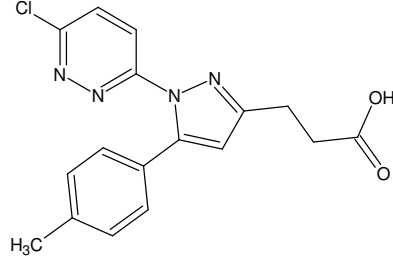
$^1\text{H-NMR}$ spektrumu (DMSO- d_6) δ : 2.68 (2H, t, $J=7.6$ Hz, CH_2COOH), 2.90 (2H, t, $J=7.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 3.77 (3H, s, OCH_3) 6.56 (1H, s, pirazol H-4), 6.92 (2H, d, $J=8.8$ Hz, fenil H-3, 5), 7.22 (2H, d, $J=8.8$ Hz, fenil H-2, 6), 8.08 (2H, s, piridazin H-4, 5)

Elementel analiz $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{ClN}_4\text{O}_3$ için

Hesaplanan % C: 56.91 H: 4.21 N: 15.62

Bulunan % C: 56.96 H: 4.19 N: 15.47

**3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-(4-metilfenil)-1H-pirazol-3-il]propanoik asit
(Bileşik 2f)**



4,6-Diokso-6-(4-metilfenil)hekzanoik asit (0.008 mol, 1.87 g), trietilamin (2.23 ml, 0.016 mol) ve 3-kloro-6-hidrazinopiridazin hidroklorürden (1.81 g, 0.01 mol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenip, etanol-su ile kristallendirildi. 2.00 g (verim % 73) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 171 °C

IR spektrumu (KBr): 3300-2500 cm^{-1} (geniş O-H gerilimi), 1714 cm^{-1} (C=O gerilimi)

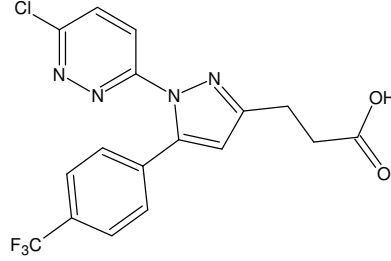
$^1\text{H-NMR}$ spektrumu (DMSO- d_6) δ : 2.31 (3H, s, CH_3) 2.68 (2H, t, $J=7.4$ Hz, CH_2COOH), 2.90 (2H, t, $J=7.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 6.59 (1H, s, pirazol H-4), 7.17 (4H, s, fenil), 8.09 (2H, s, piridazin H-4, 5), 12.20 (1H, s, COOH)

Elementel analiz $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{ClN}_4\text{O}_2$ için

Hesaplanan % C: 59.57 H: 4.41 N: 16.34

Bulunan % C: 59.71 H: 4.40 N: 16.25

3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-(4-triflorometilfenil)-1H-pirazol-3-il]propanoik asit (Bileşik 2g)



4,6-Diokso-6-(4-triflorometilfenil)hekzanoik asit (0.008 mol, 2.30 g), trietilamin (2.23 ml, 0.016 mol) ve 3-kloro-6-hidrazinopiridazin hidroklorürden (1.81 g, 0.01 mol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlendi. Etilasetat-hekzan ile kristallendirildi. 1.77 g (verim % 56) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 163 °C

IR spektrumu (KBr): 3300-2500 cm⁻¹ (geniş O-H gerilimi), 1712cm⁻¹ (C=O gerilimi)

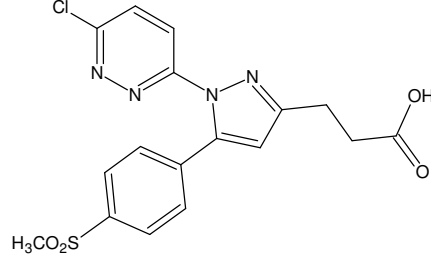
¹H-NMR spektrumu (DMSO-d₆) δ: 2.67 (2H, t, *J*=7.4 Hz, CH₂COOH), 2.91 (2H, t, *J*=7.4 Hz, CH₂CH₂COOH), 6.75 (1H, s, pirazol H-4), 7.54 (2H, d, *J*=8.4 Hz, fenil H-2, 6), 7.72 (2H, d, *J*=8.4 Hz, fenil H-3, 5), 8.10 (1H, d, *J*=9.2 Hz, piridazin H-5), 8.18 (1H, d, *J*=9.2 Hz, piridazin H-4)

Elementel analiz C₁₇H₁₂ClF₃N₄O₂ için

Hesaplanan % C: 51.46 H: 3.05 N: 14.12

Bulunan % C: 51.04 H: 3.26 N: 14.08

3-{1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-[4-(metilsülfonil)fenil]-1*H*-pirazol-3-il} propanoik asit (Bileşik 2h)



4,6-Diokso-6-[4-(metilsülfonil)fenil]hekzanoik asit (0.008 mol, 2.38 g), trietilamin (2.23 ml, 0.016 mol) ve 3-kloro-6-hidrazinopiridazin hidroklorürden (1.81 g, 0.01 mol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenip, eter ile kristallendirildi. 1.95 g (verim % 60) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 176-177 °C

IR spektrumu (KBr): 3300-2750 cm^{-1} (geniş O-H gerilimi), 1740 cm^{-1} (C=O gerilimi), 1302 ve 1153 cm^{-1} (asimetrik ve simetrik SO_2 gerilimi)

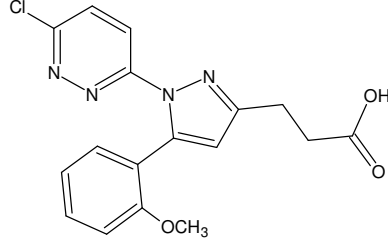
$^1\text{H-NMR}$ spektrumu (DMSO- d_6) δ : 2.68 (2H, t, $J=7.4$ Hz, CH_2COOH), 2.91 (2H, t, $J=7.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 3.25 (3H, s, SO_2CH_3), 6.77 (1H, s, pirazol H-4), 7.59 (2H, d, $J=8.4$ Hz, fenil H-2, 6), 7.89 (2H, d, $J=8.4$ Hz, fenil H-3, 5), 8.10 (1H, d, $J=9.2$ Hz, piridazin H-5), 8.19 (1H, d, $J=9.2$ Hz, piridazin H-4)

Elementel analiz $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{ClN}_4\text{O}_4\text{S}$ için

Hesaplanan % C: 50.19 H: 3.72 N: 13.77 S: 7.88

Bulunan % C: 50.06 H: 3.71 N: 13.68 S: 8.06

**3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-(2-metoksifenil)-1H-pirazol-3-il]propanoik asit
(Bileşik 2i)**



4,6-Diokso-6-(2-metoksifenil)hekzanoik asit (0.008 mol, 2.00 g), trietilamin (2.23 ml, 0.016 mol) ve 3-kloro-6-hidrazinopiridazin hidroklorürden (1.81 g, 0.01 mol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenip, etanol-su ile kristallendirildi. 2.09 g (verim % 73) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 136°C

IR spektrumu (KBr): 3300-2500 cm^{-1} (geniş O-H gerilimi), 1700 cm^{-1} (C=O gerilimi)

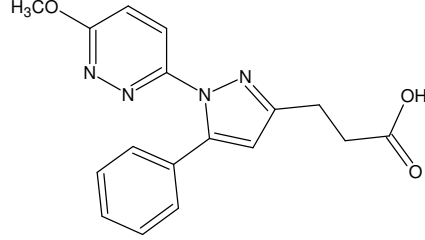
$^1\text{H-NMR}$ spektrumu (DMSO- d_6) δ : 2.66 (2H, t, $J=7.4$ Hz, CH_2COOH), 2.88 (2H, t, $J=7.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 3.24 (3H, s, OCH_3) 6.48 (1H, s, pirazol H-4), 6.90 (1H, d, $J=8.4$ Hz fenil H-3), 7.00 (1H, t, $J=7.2$ Hz fenil H-5), 7.35 (2H, m, fenil H-4, 6), 8.04 (2H, s, piridazin H-4, 5), 12.20 (1H, s, COOH)

Elementel analiz $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{ClN}_4\text{O}_3$ için

Hesaplanan % C: 56.91 H: 4.21 N: 15.62

Bulunan % C: 56.92 H: 4.31 N: 15.39

**3-[1-(6-metoksipiridazin-3-il)-5-fenil-1*H*-pirazol-3-il]propanoik asit
(Bileşik 3a)**



3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-fenil-1*H*-pirazol-3-il]propanoik asit (0.003 mol, 0.98 g) ve sodyum metoksitten (0.009 mol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlendi. Eter ile kristallendirildi. 0.79 g (verim % 82) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 172 °C

IR spektrumu (KBr): 3200-2700 cm⁻¹ (O-H gerilimi), 1696 cm⁻¹ (C=O gerilimi)

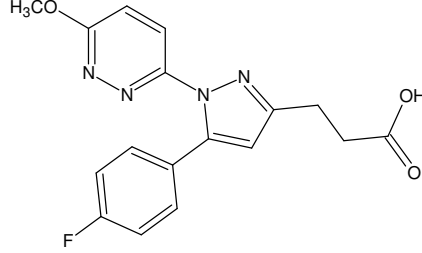
¹H-NMR spektrumu (DMSO-d₆) δ: 2.66 (2H, t, *J*=7.6 Hz, CH₂COOH), 2.88 (2H, t, *J*=7.6 Hz, CH₂CH₂COOH), 3.98 (3H, s, OCH₃) 6.57 (1H, s, pirazol H-4), 7.22-7.43 (5H, m, fenil), 7.42 (1H, d, *J*=8.8 Hz, piridazin H-5), 7.91 (1H, d, *J*=9.2 Hz, piridazin H-4), 12.20 (1H, s, COOH)

Elementel analiz C₁₇H₁₆N₄O₃ için

Hesaplanan % C: 62.95 H: 4.97 N: 17.27

Bulunan % C: 62.70 H: 5.17 N: 17.12

**3-[1-(6-metoksipiridazin-3-il)-5-(4-florofenil)-1H-pirazol-3-il]propanoik asit
(Bileşik 3b)**



3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-(4-florofenil)-1H-pirazol-3-il]propanoik asit (0.003 mol, 1.04 g) ve sodyum metoksitten (0.009 mol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlendi. Etilasetat-hekzan ile kristallendirildi. 0.63 g (verim % 61) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 146 °C

IR spektrumu (KBr): 3250-2500 cm^{-1} (geniş O-H gerilimi), 1703 cm^{-1} (C=O gerilimi)

$^1\text{H-NMR}$ spektrumu (DMSO- d_6) δ : 2.64 (2H, t, $J=7.6$ Hz, CH_2COOH), 2.86 (2H, t, $J=7.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 3.96 (3H, s, OCH_3), 6.55 (1H, s, pirazol H-4), 7.17 (2H, t, $J=8.8$ Hz, fenil H-3, 5), 7.28 (2H, dd, $J=9.2$ Hz ve 5.6 Hz, fenil H-2, 6), 7.40 (1H, d, $J=9.6$ Hz piridazin H-5), 7.91 (1H, d, $J=9.6$ Hz, piridazin H-4)

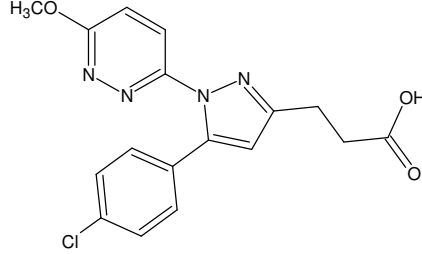
Elementel analiz $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{FN}_4\text{O}_3$ için

Hesaplanan % C: 59.65 H: 4.42 N: 16.37

Bulunan % C: 59.55 H: 4.65 N: 16.25

MS (ES $^+$) spektrumu: 343.20 [M+H], 365.18 [M+Na]

**3-[1-(6-metoksipiridazin-3-il)-5-(4-klorofenil)-1H-pirazol-3-il]propanoik asit
(Bileşik 3c)**



3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-(4-klorofenil)-1H-pirazol-3-il]propanoik asit (0.003 mol, 1.09 g) ve sodyum metoksitten (0.009 mol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlendi. Eter-petrol eteri ile kristallendirildi. 0.76 g (verim % 71) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 164 °C

IR spektrumu (KBr): 3250-2500 cm^{-1} (geniş O-H gerilimi), 1698 cm^{-1} (C=O gerilimi)

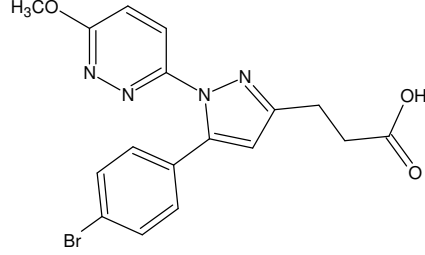
$^1\text{H-NMR}$ spektrumu (DMSO- d_6) δ : 2.66 (2H, t, $J=7.4$ Hz, CH_2COOH), 2.88 (2H, t, $J=7.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 3.98 (3H, s, OCH_3) 6.60 (1H, s, pirazol H-4), 7.27 (2H, d, $J=8.4$ Hz, fenil H-2, 6), 7.42 (2H, d, $J=8.8$, fenil H-3, 5), 7.43 (1H, d, $J=9.2$ Hz, piridazin H-5), 7.94 (1H, d, $J=9.2$ Hz, piridazin H-4)

Elementel analiz $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{ClN}_4\text{O}_3$ için

Hesaplanan % C: 56.91 H: 4.21 N: 15.62

Bulunan % C: 56.74 H: 4.35 N: 15.63

**3-[1-(6-metoksipiridazin-3-il)-5-(4-bromofenil)-1H-pirazol-3-il]propanoik asit
(Bileşik 3d)**



3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-(4-bromofenil)-1H-pirazol-3-il]propanoik asit (0.003 mol, 1.22 g) ve sodyum metoksitten (0.009 mol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlendi. Eter-petrol eteri ile kristallendirildi. 0.65 g (verim % 54) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 161 °C

IR spektrumu (KBr): 3250-2500 cm^{-1} (geniş O-H gerilimi), 1698 cm^{-1} (C=O gerilimi)

$^1\text{H-NMR}$ spektrumu (DMSO- d_6) δ : 2.66 (2H, t, $J=7.4$ Hz, CH_2COOH), 2.88 (2H, t, $J=7.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 3.98 (3H, s, OCH_3) 6.60 (1H, s, pirazol H-4), 7.20 (2H, d, $J=8.8$ Hz, fenil H-2, 6), 7.43 (1H, d, $J=9.2$ Hz, piridazin H-5), 7.55 (2H, d, $J=8.8$, fenil H-3, 5), 7.94 (1H, d, $J=9.2$ Hz, piridazin H-4)

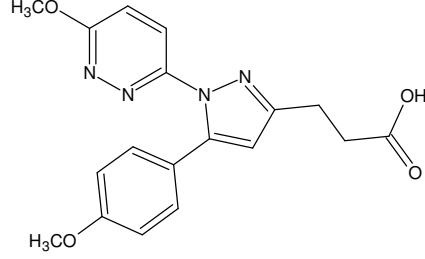
Elementel analiz $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{BrN}_4\text{O}_3$ için

Hesaplanan % C: 50.64 H: 3.75 N: 13.89

Bulunan % C: 50.67 H: 3.94 N: 13.82

MS (ES+) spektrumu: 403.15, 405.14 $[\text{M}+\text{H}]$, 425.14, 427.14 $[\text{M}+\text{Na}]$

**3-[1-(6-metoksipiridazin-3-il)-5-(4-metoksifenil)-1H-pirazol-3-il]propanoik asit
(Bileşik 3e)**



3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-(4-metoksifenil)-1H-pirazol-3-il]propanoik asit (0.003 mol, 1.07 g) ve sodyum metoksitten (0.009 mol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlendi. Karbontetraklorür ile kristallendirildi. 0.70 g (verim % 66) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 122-123 °C

IR spektrumu (KBr): 3300-2500 cm^{-1} (geniş O-H gerilimi), 1699 cm^{-1} (C=O gerilimi)

$^1\text{H-NMR}$ spektrumu (DMSO- d_6) δ : 2.65 (2H, t, $J=7.4$ Hz, CH_2COOH), 2.87 (2H, t, $J=7.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 3.74 (3H, s, OCH_3), 3.99 (3H, s, OCH_3) 6.48 (1H, s, pirazol H-4), 6.89 (2H, d, $J=8.4$ Hz, fenil H-3, 5), 7.16 (2H, d, $J=8.8$ Hz, fenil H-2, 6), 7.40 (1H, d, $J=9.6$ Hz, piridazin H-5), 7.86 (1H, d, $J=9.2$ Hz, piridazin H-4), 12.20 (1H, s, COOH)

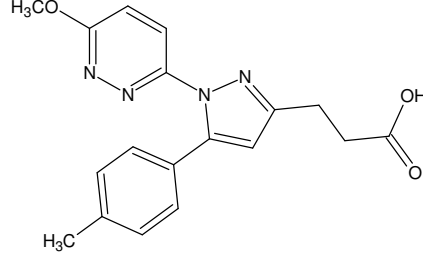
Elementel analiz $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4 \cdot 0.5 \text{CCl}_4$ için

Hesaplanan % C: 51.52 H: 4.20 N: 12.99

Bulunan % C: 51.85 H: 4.17 N: 13.12

MS (ES+) spektrumu: 355.18 [M+H], 377.18 [M+Na]

**3-[1-(6-metoksipiridazin-3-il)-5-(4-metilfenil)-1H-pirazol-3-il]propanoik asit
(Bileşik 3f)**



3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-(4-metilfenil)-1H-pirazol-3-il]propanoik asit (0.003 mol, 1.03 g) ve sodyum metoksitten (0.009 mol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlendi. 0.95 g (verim % 94) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 151 °C

IR spektrumu (KBr): 3300-2500 cm^{-1} (geniş O-H gerilimi), 1699 cm^{-1} (C=O gerilimi)

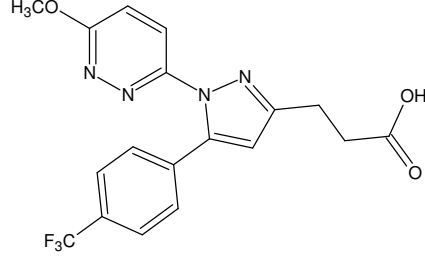
$^1\text{H-NMR}$ spektrumu (DMSO- d_6) δ :2.28 (3H, s, CH_3), 2.65 (2H, t, $J=7.6$ Hz, CH_2COOH), 2.87 (2H, t, $J=7.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 3.98 (3H, s, OCH_3) 6.52 (1H, s, pirazol H-4), 7.10 (2H, d, $J=8.0$ Hz, fenil H-3, 5), 7.15 (2H, d, $J=8.0$ fenil H-2, 6), 7.41 (1H, d, $J=9.2$ Hz, piridazin H-5), 7.88 (1H, d, $J=9.2$ Hz, piridazin H-4), 12.20 (1H, s, COOH)

Elementel analiz $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3$ için

Hesaplanan % C: 63.89 H: 5.36 N: 16.56

Bulunan % C: 63.88 H: 5.42 N: 16.49

3-[1-(6-metoksipiridazin-3-il)-5-(4-triflorometilfenil)-1H-pirazol-3-il]propanoik asit (Bileşik 3g)



3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-(4-triflorometilfenil)-1H-pirazol-3-il]propanoik asit (0.003 mol, 1.19 g) ve sodyum metoksitten (0.009 mol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlendi. Aseton-hekzan ile kristallendirildi. 0.94 g (verim % 80) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 179 °C

IR spektrumu (KBr): 3250-2500 cm^{-1} (geniş O-H gerilimi), 1723 cm^{-1} (C=O gerilimi)

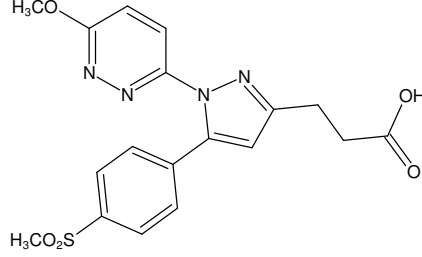
$^1\text{H-NMR}$ spektrumu (DMSO- d_6) δ : 2.67 (2H, t, $J=7.6$ Hz, CH_2COOH), 2.90 (2H, t, $J=7.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 3.97 (3H, s, OCH_3) 6.69 (1H, s, pirazol H-4), 7.45 (1H, d, $J=9.2$ Hz, piridazin H-5), 7.48 (2H, d, $J=8.4$ Hz, fenil H-2, 6), 7.72 (2H, d, $J=8.4$ Hz, fenil H-3, 5), 8.00 (1H, d, $J=9.2$ Hz, piridazin H-4), 12.20 (1H, s, COOH)

Elementel analiz $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3$ için

Hesaplanan % C: 55.10 H: 3.85 N: 14.28

Bulunan % C: 54.71 H: 3.75 N: 14.07

3-{1-(6-metokspiridazin-3-il)-5-[4-(metilsülfonil)fenil]-1*H*-pirazol-3-il} propanoik asit (Bileşik 3h)



3-{1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-[4-(metilsülfonil)fenil]-1*H*-pirazol-3-il}propanoik asit (0.003 mol, 1.22 g) ve sodyum metoksitten (0.009 mol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlendi. Aseton-hekzan ile kristallendirildi. 0.65 g (verim % 54) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 213-214 °C

IR spektrumu (KBr): 3300-2500 cm⁻¹ (geniş O-H gerilimi), 1716 cm⁻¹ (C=O gerilimi), 1304 ve 1150 cm⁻¹ (asimetrik ve simetrik SO₂ gerilimi)

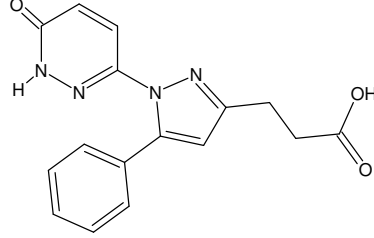
¹H-NMR spektrumu (DMSO-d₆) δ: 2.68 (2H, t, *J*=7.4 Hz, CH₂COOH), 2.91 (2H, t, *J*=7.4 Hz, CH₂CH₂COOH), 3.26 (3H, s, SO₂CH₃), 3.98 (3H, s, OCH₃), 6.72 (1H, s, pirazol H-4), 7.47 (1H, d, *J*=9.2 Hz piridazin H-5), 7.54 (2H, d, *J*=8.8 Hz, fenil H-2, 6), 7.90 (2H, d, *J*=8.4, fenil H-3, 5), 8.01 (1H, d, *J*=9.2 Hz, piridazin H-4)

Elementel analiz C₁₈H₁₈N₄O₅S için

Hesaplanan % C: 53.72 H: 4.51 N: 13.92 S: 7.97

Bulunan % C: 53.85 H: 4.70 N: 13.70 S: 7.99

**3-[1-(6-okso-1,6-dihidropiridazin-3-il)-5-fenil-1H-pirazol-3-il]propanoik asit
(Bileşik 4a)**



3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-fenil-1H-pirazol-3-il]propanoik asit (0.003 mol, 0.98 g) ve sodyum asetat trihidrattan (0.006 mol, 0.816 g) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlendi. 0.77 g (verim % 83) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 223-224 °C

IR spektrumu (KBr): 3300-2500 cm^{-1} (geniş O-H gerilimi), 1729, 1709 cm^{-1} (asit C=O gerilimi), 1652 cm^{-1} (laktam C=O gerilimi)

$^1\text{H-NMR}$ spektrumu (DMSO- d_6) δ : 2.63 (2H, t, $J=7.4$ Hz, CH_2COOH), 2.85 (2H, t, $J=7.8$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 6.53 (1H, s, pirazol H-4), 7.03 (1H, d, $J=10.4$ Hz, piridazin H-5), 7.28-7.37 (5H, m, fenil), 7.71 (1H, d, $J=10.0$ Hz, piridazin H-4), 12.80 (1H, s, NH)

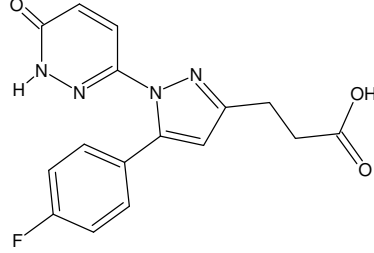
$^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu (DMSO- d_6) δ : 23.79, 33.32, 108.37, 128.74, 129.03, 129.27, 130.52, 132.00, 132.62, 142.03, 144.76, 153.90, 160.52, 174.42

Elementel analiz $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3$ için

Hesaplanan % C: 61.93 H: 4.55 N: 18.06

Bulunan % C: 61.88 H: 4.46 N: 17.83

3-[1-(6-okso-1,6-dihidropiridazin-3-il)-5-(4-florofenil)-1H-pirazol-3-il]propanoik asit (Bileşik 4b)



3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-(4-florofenil)-1H-pirazol-3-il]propanoik asit (0.003 mol, 1.04 g) ve sodyum asetat trihidrattan (0.006 mol, 0.816 g) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlendi. Kloroform ile yıkanıp etanol ile kristallendirildi. 0.68 g (verim % 69) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 258-259 °C

IR spektrumu (KBr): 3300-2500 cm^{-1} (geniş O-H gerilimi), 1695 cm^{-1} (asit C=O gerilimi), 1653 cm^{-1} (laktam C=O gerilimi)

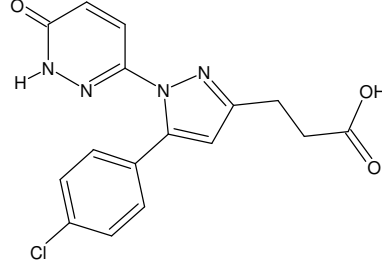
$^1\text{H-NMR}$ spektrumu (DMSO- d_6) δ : 2.63 (2H, t, $J=7.6$ Hz, CH_2COOH), 2.85 (2H, t, $J=7.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 6.53 (1H, s, pirazol H-4), 7.03 (1H, d, $J=10.4$ Hz, piridazin H-5), 7.22 (2H, t, $J=8.8$ Hz, fenil H-3, 5), 7.36 (2H, dd, $J=8.4$ Hz ve 5.6 Hz, fenil H-2, 6), 7.72 (1H, d, $J=10.0$ Hz, piridazin H-4), 12.18 (1H, s, COOH), 12.79 (1H, s, NH)

Elementel analiz $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{FN}_4\text{O}_3$ için

Hesaplanan % C: 58.54 H: 3.99 N: 17.07

Bulunan % C: 58.44 H: 3.98 N: 16.90

3-[1-(6-okso-1,6-dihidropiridazin-3-il)-5-(4-klorofenil)-1H-pirazol-3-il]propanoik asit (Bileşik 4c)



3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-(4-klorofenil)-1H-pirazol-3-il]propanoik asit (0.003 mol, 1.09 g) ve sodyum asetat trihidrattan (0.006 mol, 0.816 g) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlendi. Etanol ile kristallendirildi. 0.82 g (verim % 79) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 238-239 °C

IR spektrumu (KBr): 3300-2500 cm^{-1} (geniş O-H gerilimi), 1705 cm^{-1} (asit C=O gerilimi), 1649 cm^{-1} (laktam C=O gerilimi)

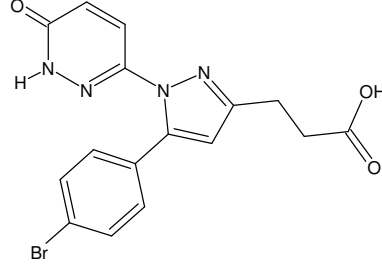
$^1\text{H-NMR}$ spektrumu (DMSO- d_6) δ : 2.67 (2H, t, $J=7.4$ Hz, CH_2COOH), 2.88 (2H, t, $J=7.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 6.61 (1H, s, pirazol H-4), 7.08 (1H, d, $J=10.0$ Hz, piridazin H-5), 7.37 (2H, m, fenil H-2, 6), 7.48 (2H, m, fenil H-3, 5), 7.78 (1H, d, $J=10.0$ Hz, piridazin H-4), 12.21 (1H, s, COOH), 12.83 (1H, s, NH)

Elementel analiz $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{ClN}_4\text{O}_3$ için

Hesaplanan % C: 55.74 H: 3.80 N: 16.25

Bulunan % C: 55.36 H: 3.82 N: 16.15

3-[1-(6-okso-1,6-dihidropiridazin-3-il)-5-(4-bromofenil)-1*H*-pirazol-3-il]propanoik asit (Bileşik 4d)



3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-(4-bromofenil)-1*H*-pirazol-3-il]propanoik asit (0.003 mol, 1.22 g) ve sodyum asetat trihidrattan (0.006 mol, 0.816 g) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlendi. Kloroform ile yıkandı. Etanol ile kristallendirildi. 0.88 g (verim % 76) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 227-228 °C

IR spektrumu (KBr): 3300-2500 cm^{-1} (geniş O-H gerilimi), 1706 cm^{-1} (asit C=O gerilimi), 1649 cm^{-1} (laktam C=O gerilimi)

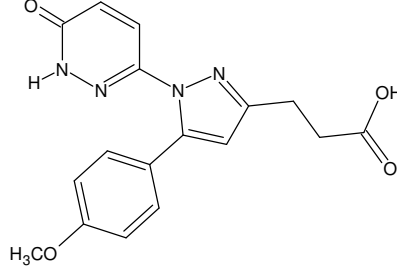
$^1\text{H-NMR}$ spektrumu (DMSO- d_6) δ : 2.63 (2H, t, $J=7.6$ Hz, CH_2COOH), 2.85 (2H, t, $J=7.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 6.57 (1H, s, pirazol H-4), 7.04 (1H, d, $J=10.4$ Hz, piridazin H-5), 7.27 (2H, d, $J=8.4$ Hz, fenil H-2, 6), 7.58 (2H, d, $J=8.8$ Hz, fenil H-3, 5), 7.74 (1H, d, $J=10.0$ Hz, piridazin H-4), 12.23 (1H, s, COOH), 12.79 (1H, s, NH)

Elementel analiz $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{BrN}_4\text{O}_3$ için

Hesaplanan % C: 49.38 H: 3.37 N: 14.40

Bulunan % C: 49.30 H: 3.30 N: 14.39

3-[1-(6-okso-1,6-dihidropiridazin-3-il)-5-(4-metoksifenil)-1H-pirazol-3-il]propanoik asit (Bileşik 4e)



3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-(4-metoksifenil)-1H-pirazol-3-il]propanoik asit (0.003 mol, 1.07 g) ve sodyum asetat trihidrattan (0.006 mol, 0.816 g) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlendi. 0.91 g (verim % 89) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 222-223 °C

IR spektrumu (KBr): 3300-2500 cm^{-1} (geniş O-H gerilimi), 1733,1707 cm^{-1} (asit C=O gerilimi), 1653 cm^{-1} (laktam C=O gerilimi)

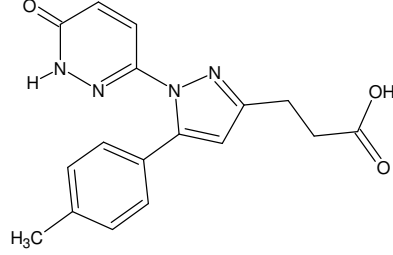
$^1\text{H-NMR}$ spektrumu (DMSO- d_6) δ : 2.61 (2H, t, $J=7.6$ Hz, CH_2COOH), 2.83 (2H, t, $J=7.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 3.74 (3H, s, OCH_3), 6.44 (1H, s, pirazol H-4), 6.93 (2H, d, $J=8.8$ Hz, fenil H-3, 5), 7.01 (1H, d, $J=9.6$ Hz, piridazin H-5), 7.21 (2H, d, $J=8.4$ Hz, fenil H-2, 6), 7.66 (1H, d, $J=10.0$ Hz, piridazin H-4), 12.80 (1H, s, NH)

Elementel analiz $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_4$ için

Hesaplanan % C: 59.99 H: 4.74 N: 16.46

Bulunan % C: 59.66 H: 4.68 N: 16.08

3-[1-(6-okso-1,6-dihidropiridazin-3-il)-5-(4-metilfenil)-1H-pirazol-3-il]propanoik asit (Bileşik 4f)



3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-(4-metilfenil)-1H-pirazol-3-il]propanoik asit (0.003 mol, 1.03 g) ve sodyum asetat trihidrattan (0.006 mol, 0.816 g) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlendi. 0.63 g (verim % 65) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 231-232 °C

IR spektrumu (KBr): 3300-2500 cm^{-1} (geniş O-H gerilimi), 1712 cm^{-1} (asit C=O gerilimi), 1652 cm^{-1} (laktam C=O gerilimi)

$^1\text{H-NMR}$ spektrumu (DMSO- d_6) δ : 2.25 (3H, s, CH_3), 2.37 (2H, t, $J=7.4$ Hz, CH_2COOH), 2.81 (2H, t, $J=7.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 6.45 (1H, s, pirazol H-4), 6.97 (1H, d, $J=9.6$ Hz, piridazin H-5), 7.14 (4H, s, fenil), 7.64 (1H, d, $J=9.6$ Hz, piridazin H-4)

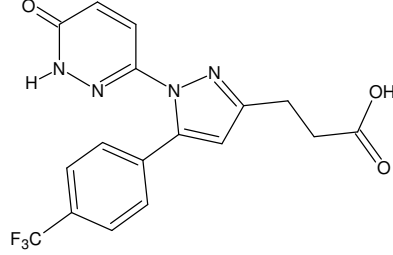
Elementel analiz $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_3$ için

Hesaplanan % C: 62.95 H: 4.97 N: 17.27

Bulunan % C: 62.63 H: 5.11 N: 16.99

MS (ES+) spektrumu : 325.19 [M+H]

3-[1-(6-okso-1,6-dihidropiridazin-3-il)-5-(4-triflorometilfenil)-1H-pirazol-3-il]propanoik asit (Bileşik4g)



3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-(4-triflorometilfenil)-1H-pirazol-3-il]propanoik asit (0.003 mol, 1.19 g) ve sodyum asetat trihidrattan (0.006 mol, 0.816 g) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlendi. Aseton ile kristallendirildi. 0.68 g (verim % 60) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 251 °C

IR spektrumu (KBr): 3250-2500 cm^{-1} (geniş O-H gerilimi), 1699 cm^{-1} (asit C=O gerilimi), 1646 cm^{-1} (laktam C=O gerilimi)

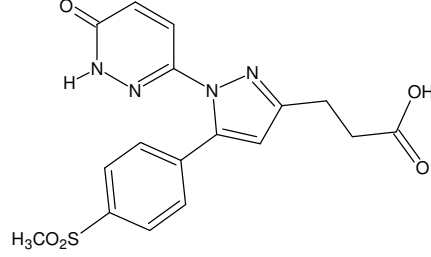
$^1\text{H-NMR}$ spektrumu (DMSO- d_6) δ : 2.65 (2H, t, $J=7.4$ Hz, CH_2COOH), 2.88 (2H, t, $J=7.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 6.68 (1H, s, pirazol H-4), 7.08 (1H, d, $J=10.4$ Hz, piridazin H-5), 7.56 (2H, d, $J=8.0$ Hz, fenil H-2, 6), 7.76 (2H, d, $J=8.0$ Hz, fenil H-3, 5), 7.81 (1H, d, $J=10.0$ Hz, piridazin H-4), 12.20 (1H, s, COOH), 12.80 (1H, s, NH)

Elementel analiz $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3$ için

Hesaplanan % C: 53.97 H: 3.46 N: 14.81

Bulunan % C: 53.84 H: 3.41 N: 14.61

3-[1-(6-okso-1,6-dihidropiridazin-3-il-5-[4-(metilsülfonil)fenil]-1H-pirazol-3-il} propanoik asit (Bileşik 4h)



3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-[4-(metilsülfonil)fenil]-1H-pirazol-3-il]propanoik asit (0.003 mol, 1.22) ve sodyum asetat trihidrattan (0.006 mol, 0.816 g) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlendi. Aseton ile kristallendirildi. 0.85 g (verim % 73) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 257-258 °C

IR spektrumu (KBr): 3300-2500 cm⁻¹ (geniş O-H gerilimi), 1699 cm⁻¹ (asit C=O gerilimi), 1646 cm⁻¹ (laktam C=O gerilimi), 1306 ve 1147 cm⁻¹ (asimetrik ve simetrik SO₂ gerilimi)

¹H-NMR spektrumu (DMSO-d₆) δ: 2.66 (2H, t, *J*=7.2 Hz, CH₂COOH), 2.89 (2H, t, *J*=7.0 Hz, CH₂CH₂COOH), 3.26 (3H, s, SO₂CH₃), 6.71 (1H, s, pirazol H-4), 7.10 (1H, d, *J*=9.6 Hz, piridazin H-5), 7.62 (2H, d, *J*=8.4 Hz, fenil H-2, 6), 7.83 (1H, d, *J*=10.0 Hz, piridazin H-4), 7.94 (2H, d, *J*=8.4 Hz, fenil H-3, 5), 12.80 (1H, s, NH)

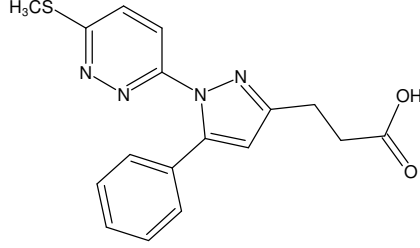
Elementel analiz C₁₇H₁₆N₄O₅S için

Hesaplanan % C: 52.57 H: 4.15 N: 14.43 S: 8.26

Bulunan % C: 52.24 H: 4.24 N: 14.24 S: 8.35

MS (ES+) spektrumu: 389.13 [M+H]

**3-[1-[6-(metiltiyo)piridazin-3-il]-5-fenil-1*H*-pirazol-3-il]propanoik asit
(Bileşik 5a)**



3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-fenil-1*H*-pirazol-3-il]propanoik asit (0.003 mol, 0.98 g) ve sodyum tiyometoksitten (0.009 mol, 0.63 g) hareketle genel sentez yöntemine göre elde edilip aseton ile kristallendirildi. 0.88 g (verim % 87) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 195 °C

IR spektrumu (KBr): 3300-2500 cm⁻¹ (geniş O-H gerilimi), 1695 cm⁻¹ (C=O gerilimi)

¹H-NMR spektrumu (CDCl₃) δ: 2.66 (3H, s, SCH₃), 2.86 (2H, t, *J*=7.6 Hz, CH₂COOH), 3.08 (2H, t, *J*=7.6 Hz, CH₂CH₂COOH), 6.40 (1H, s, pirazol H-4), 7.26-7.34 (5H, m, fenil), 7.38 (1H, d, *J*=9.2 Hz, piridazin H-5), 7.58 (1H, d, *J*=9.2 Hz, piridazin H-4)

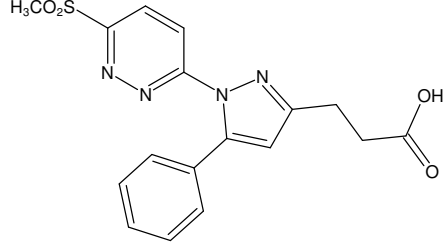
Elementel analiz C₁₇H₁₆N₄O₂S için

Hesaplanan % C: 59.98 H: 4.74 N: 16.46 S: 9.42

Bulunan % C: 59.80 H: 4.69 N: 16.38 S: 8.99

MS (ES+) spektrumu: 341.15 [M+H]

**3-{1-[6-(metilsülfolil)piridazin-3-il]-5-fenil-1*H*-pirazol-3-il}propanoik asit
(Bileşik 5b)**



3-{1-[6-(metiltiyo)piridazin-3-il]-5-fenil-1*H*-pirazol-3-il}propanoik asit (0.0006 mol, 0.2 g) ve *m*-kloroperbenzoik asitten (%70, 0.0016 mol, 0.39 g) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlendi. 0.15 g (verim % 69) ürün elde edildi.

Erime derecesi: 184-185 °C

IR spektrumu (KBr): 3300-2600 cm⁻¹ (geniş O-H gerilimi), 1700 cm⁻¹ (C=O gerilimi), 1315 ve 1166 cm⁻¹ (asimetrik ve simetrik SO₂ gerilimi)

¹H-NMR spektrumu (DMSO-d₆) δ: 2.68 (2H, t, *J*=7.6 Hz, CH₂COOH), 2.91 (2H, t, *J*=7.6 Hz, CH₂CH₂COOH), 3.40 (3H, s, SO₂CH₃), 6.66 (1H, s, pirazol H-4), 7.36 (5H, m, fenil), 8.36 (1H, d, *J*=10.4 Hz, piridazin H-5), 8.41 (1H, d, *J*=10.4 Hz, piridazin H-4), 12.20 (1H, s, COOH)

Elementel analiz C₁₇H₁₆N₄O₄S için

Hesaplanan % C: 54.83 H: 4.33 N: 15.04 S: 8.61

Bulunan % C: 54.36 H: 4.32 N: 14.79 S: 8.57

MS (ES+) spektrumu: 373.20 [M+H]

3.2. Biyolojik Bulgular

Bileşiklerin % COX-2 inhibisyonu 10 µM final konsantrasyonda test edildi. Referans olarak indometazin 10 µM, rofekoksib 1 µM final konsantrasyonda kullanıldı. Elde edilen COX-2 inhibisyon değerleri % inhibisyon ± standart hata (n=4) şeklinde Tablo 2’de verildi.

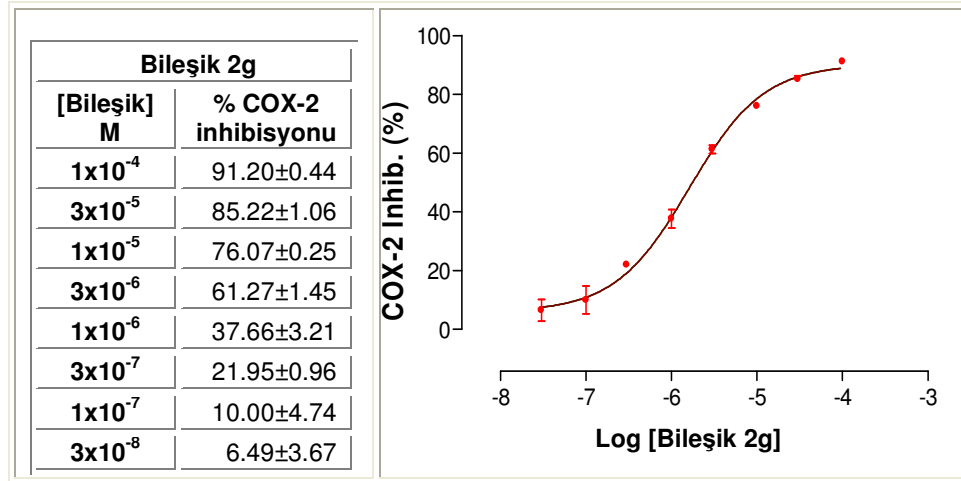
Tablo 2: Bileşiklerin % COX-2 inhibisyon değerleri

Bileşik kodu	R ₁	R ₂	% COX-2 inhibisyonu
2a	6-kloropiridazin-3-il	4-H	16.29±1.13
2b	6-kloropiridazin-3-il	4-F	9.79±1.96
2c	6-kloropiridazin-3-il	4-Cl	27.05±2.73
2d	6-kloropiridazin-3-il	4-Br	11.22±3.84
2e	6-kloropiridazin-3-il	4-OCH ₃	6.33±2.20
2f	6-kloropiridazin-3-il	4-CH ₃	8.23±3.73
2g	6-kloropiridazin-3-il	4-CF ₃	73.93±0.49
2h	6-kloropiridazin-3-il	4-SO ₂ CH ₃	13.56±4.28
2i	6-kloropiridazin-3-il	2-OCH ₃	6.28±2.55
3a	6-metoksipiridazin-3-il	4-H	8.21±4.04
3b	6-metoksipiridazin-3-il	4-F	3.81±1.86
3c	6-metoksipiridazin-3-il	4-Cl	18.50±3.19
3d	6-metoksipiridazin-3-il	4-Br	13.30±2.52
3e	6-metoksipiridazin-3-il	4-OCH ₃	-1.88±1.63
3f	6-metoksipiridazin-3-il	4-CH ₃	1.73±2.00
3g	6-metoksipiridazin-3-il	4-CF ₃	17.20±1.74
3h	6-metoksipiridazin-3-il	4-SO ₂ CH ₃	8.62±4.93
4a	6-okso-1,6-dihidropiridazin-3-il	4-H	10.09±3.72
4b	6-okso-1,6-dihidropiridazin-3-il	4-F	8.10±4.00
4c	6-okso-1,6-dihidropiridazin-3-il	4-Cl	9.42±1.62
4d	6-okso-1,6-dihidropiridazin-3-il	4-Br	7.97±4.94
4e	6-okso-1,6-dihidropiridazin-3-il	4-OCH ₃	-3.63±6.30
4f	6-okso-1,6-dihidropiridazin-3-il	4-CH ₃	6.80±3.95
4g	6-okso-1,6-dihidropiridazin-3-il	4-CF ₃	15.17±3.60
4h	6-okso-1,6-dihidropiridazin-3-il	4-SO ₂ CH ₃	11.69±5.81
5b	6-(metilsülfonil)piridazin-3-il	4-H	-11.84±4.16
İndometazin			89.94±0.29
Rofekoksib			59.64±3.39

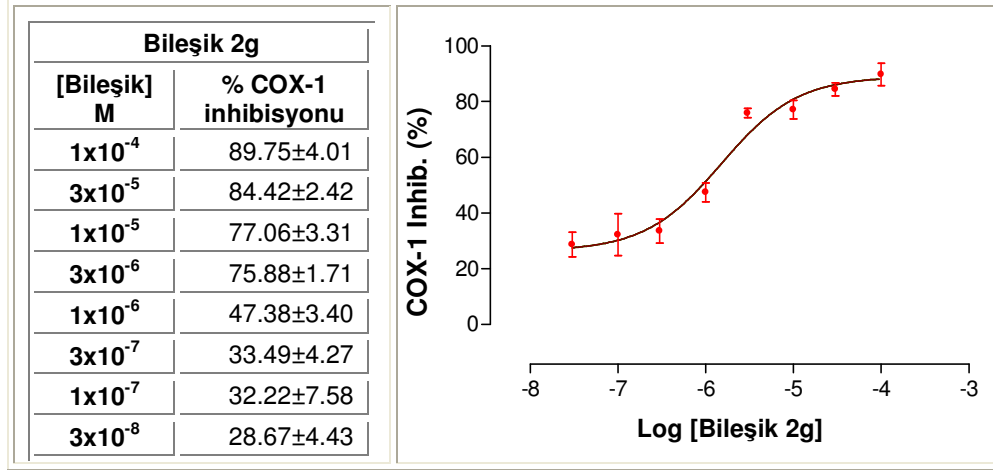
Bileşik 2g'nin 10 µM konsantrasyonda COX-2 enzim inhibisyonu % 73.93 olarak saptandı. Bileşik 2g ve indometazin 10 µM, rofekoksib 100 µM final konsantrasyonda % COX-1 inhibisyonu için test edildi. Elde edilen COX-1 inhibisyon değerleri % inhibisyon ± standart hata (n=4) şeklinde görülmektedir.

Bileşik kodu	%COX-1 inhibisyonu
2g	68.87±5.88
İndometazin	71.89±6.31
Rofekoksib	13.66±6.66

Bileşik 2g'nin COX-1 ve COX-2 enzim inhibisyonu için IC₅₀ değerlerinin hesaplanmasında kullanılan final konsantrasyonlar, % inhibisyon değerleri ve IC₅₀ grafiği Grafik 2 ve 3'te verilmiştir.



Grafik 2: Bileşik 2g'nin COX-2 inhibisyonu IC₅₀ grafiği



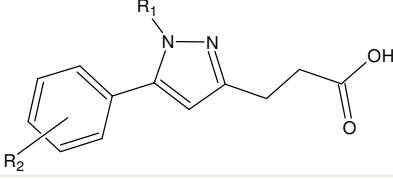
Grafik 3: Bileşik 2g'nin COX-1 inhibisyonu IC₅₀ grafiği

Bileşik 2g, indometazin ve rofekoksib'in COX-1 ve COX-2 enzim inhibisyonu için hesaplanan IC₅₀ değerleri ve selektivite indeksleri (SI) aşağıda görülmektedir.

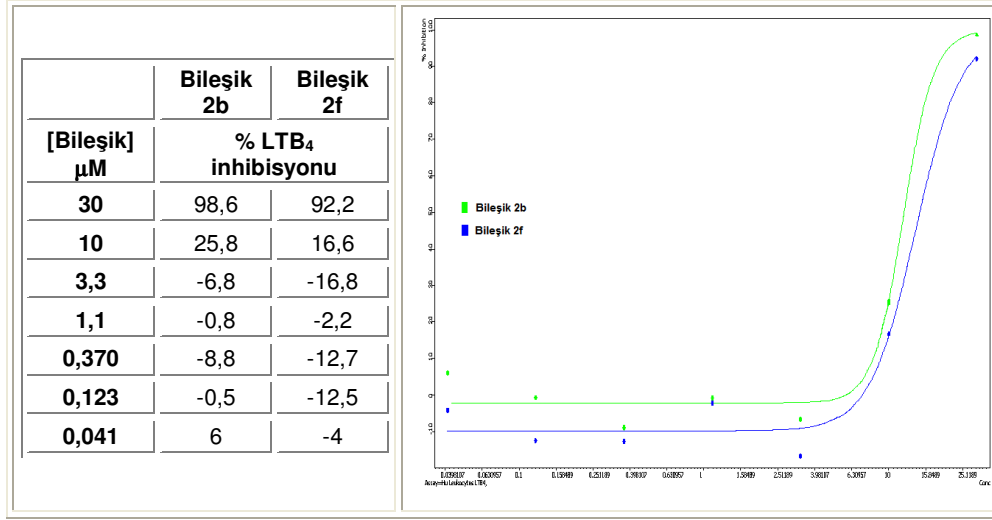
Bileşik kodu	COX-1 IC ₅₀ (μM)	COX-2 IC ₅₀ (μM)	SI
2g	1.506	1.615	0.93
İndometazin	0.123	0.565	0.22
Rofekoksib	>100	0.294	340

Sentezlenen bileşiklerin % 5-LOX inhibisyonu 30, 10, 3 ve 1 μM final konsantrasyonda test edildi. Elde edilen 5-LOX inhibisyon değerleri % inhibisyon şeklinde Tablo 3'te verildi. Referans olarak Amira Pharmaceuticals'a ait IC₅₀ değeri 0.014 μM olan AP-100088-3B kodlu bileşik kullanıldı.

Tablo 3: Bileşiklerin % 5-LOX inhibisyon değerleri

						
Bileşik kodu	R ₁	R ₂	% 5-LOX inhibisyonu			
			İnhibitör kons. (µM)			
			30	10	3	1
2a	6-kloropiridazin-3-il	4-H	8.6	1.9	5.9	14
2b	6-kloropiridazin-3-il	4-F	96.0	33.5		3.9
2c	6-kloropiridazin-3-il	4-Cl	8.1	0.8	4.4	11.6
2d	6-kloropiridazin-3-il	4-Br	21.9	0.1		-0.5
2e	6-kloropiridazin-3-il	4-OCH ₃	21.6	7.0	8.6	22.5
2f	6-kloropiridazin-3-il	4-CH ₃	62.7	15.9		9.2
2g	6-kloropiridazin-3-il	4-CF ₃	11.2	3.9	6.1	7.1
2h	6-kloropiridazin-3-il	4-SO ₂ CH ₃	4.9	-1.5	4.9	15.8
2i	6-kloropiridazin-3-il	2-OCH ₃	-1.5	-1.2	8.8	6.0
3a	6-metoksipiridazin-3-il	4-H	26.4	3.6	11.2	18.9
3b	6-metoksipiridazin-3-il	4-F	13.2	1.6		-3.2
3c	6-metoksipiridazin-3-il	4-Cl	-2.4	-5.2	0.5	2.7
3d	6-metoksipiridazin-3-il	4-Br	14.4	3.4		-1.4
3e	6-metoksipiridazin-3-il	4-OCH ₃	-1.8	3.8	12.4	11.5
3f	6-metoksipiridazin-3-il	4-CH ₃	14.6	9.2		4.1
3g	6-metoksipiridazin-3-il	4-CF ₃	0.1	1.2	8.9	7.5
3h	6-metoksipiridazin-3-il	4-SO ₂ CH ₃	-1.1	4.0	5.0	14.9
4a	6-okso-1,6-dihidropiridazin-3-il	4-H	-2.8	-5.2	-1.0	14
4b	6-okso-1,6-dihidropiridazin-3-il	4-F	19.3	6.8		-2.7
4c	6-okso-1,6-dihidropiridazin-3-il	4-Cl	2.4	-4.4	1.4	7.6
4d	6-okso-1,6-dihidropiridazin-3-il	4-Br	18.9	9.6		5.6
4e	6-okso-1,6-dihidropiridazin-3-il	4-OCH ₃	5.8	0.4	2.7	10.7
4f	6-okso-1,6-dihidropiridazin-3-il	4-CH ₃	23.2	9.6		1.1
4g	6-okso-1,6-dihidropiridazin-3-il	4-CF ₃	5.9	0.9	0.3	9.0
4h	6-okso-1,6-dihidropiridazin-3-il	4-SO ₂ CH ₃	-0.7	-2.2	3.5	9.3
5b	6-(metilsülfonil)piridazin-3-il	4-H	3.7	3.2	-0.5	7.3

Bileşik 2b ve Bileşik 2f'nin 30 μM konsantrasyonda 5-LOX enzim inhibisyonu sırasıyla % 96.0 ve % 62.7 olarak saptandı. Bu bileşiklere ait 5-LOX enzim inhibisyonu için IC_{50} değerlerinin hesaplanmasında kullanılan final konsantrasyonlar, % inhibisyon değerleri ve IC_{50} grafikleri Grafik 4'te verilmiştir. Bileşik 2b ve 2f'nin 5-LOX inhibisyonu IC_{50} değerleri 12 ve 14 μM olarak belirlenmiştir.



Grafik 4: Bileşik 2b ve 2f'nin 5-LOX inhibisyonu IC_{50} grafiği

3.3 Moleküler Modelleme Bulguları

Bileşik 2b ve 2f'nin 5-LOX aktif bölgesi ile moleküler etkileşim çalışması sonucu her bir bileşik için 20 çözüm elde edilmiştir. Bileşik 2f için bu 20 çözümden 19'u aynı bağlanma şekline sahip, GOLD skoru 55.28 olan ilk sıradaki çözüm olarak belirlenmiştir. Bileşik 2b için ise 20 çözümden 8'i Bileşik 2f ile aynı bağlanma şekline sahiptir ve GOLD skoru 49.66 olarak bulunmuştur. Diğer 12 çözümden önemli bir gruplaşma olmamıştır.

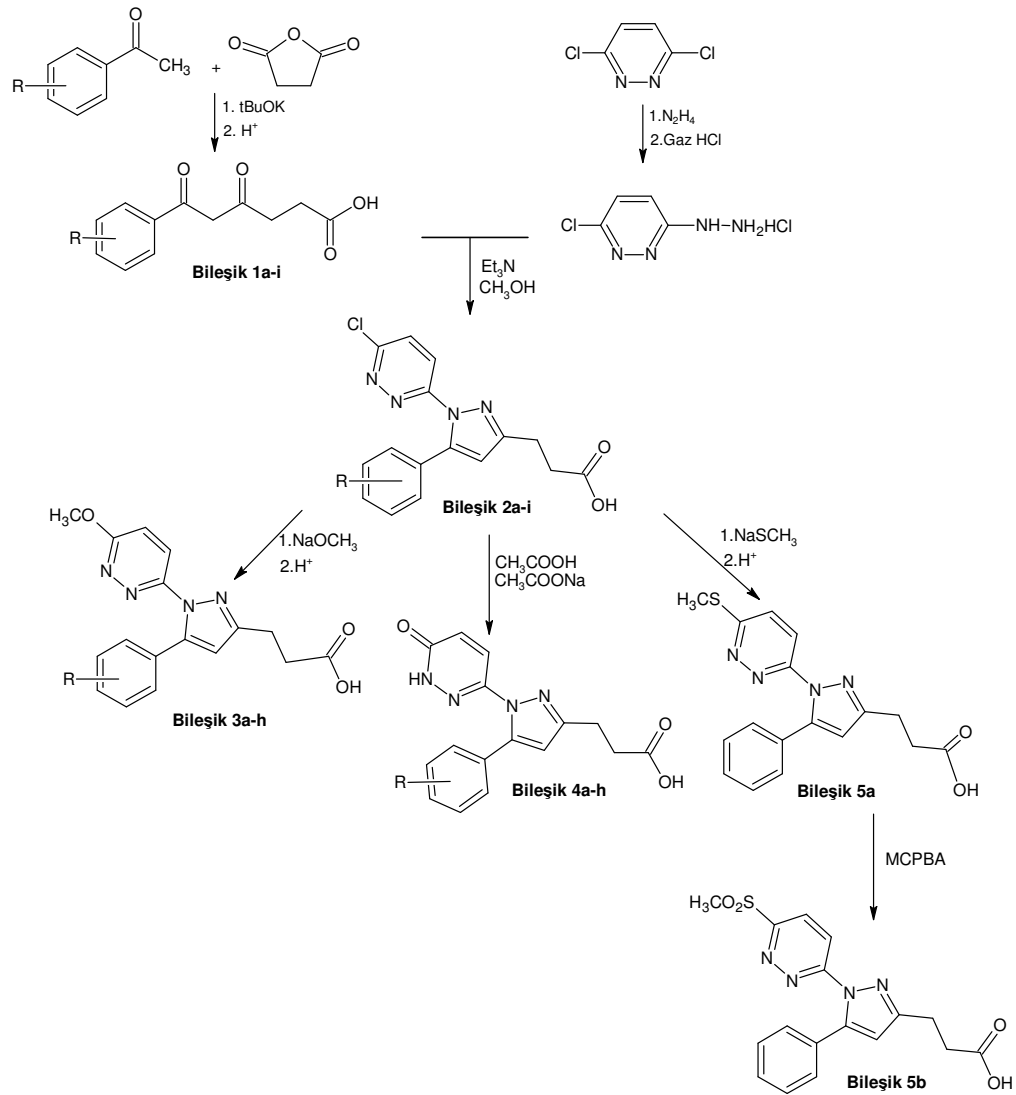
Bileşik 2a-h, Bileşik 3a-h, Bileşik 4a-h, Bileşik 5b ve selekoksibin COX-2 aktif bölgesi ile moleküler etkileşim çalışması sonucu elde edilen bağlanma şekillerinin Glide skorları Tablo 4'te verilmiştir.

**Tablo 4 : Bileşiklerin COX-2 aktif bölgesindeki bağlanma şekillerinin
XP Glide skorları (kcal/mol)**

Bileşik kodu	Bağlanma şekli			
	1	2	3	4
2a		-14.52	-9.31	
2b		-15.92	-9.54	-10.33
2c		-15.11	-9.20	-10.08
2d	-12.87	-14.16	-8,83	-9.11
2e	-14.24	-14.35	-9.23	
2f	-14.67	-15.46	-9.12	-9.69
2g	-14.36	-11.16		
2h	-15.57			
3a	-12.45	-14.61	-8,02	-8.53
3b	-10.04	-14.97	-8,42	-10.03
3c		-15.40		-9.31
3d	-13.03	-15.59		
3e	-9.73	-14.71		
3f		-15.65		-9.61
3g	-13.97			-10,76
3h	-13.86			
4a		-13.69	-8.05	-7.90
4b		-14.74	-8.33	-9.49
4c	-12.37	-14.88	-8.16	
4d	-15.52	-14.49		
4e	-12.37	-14.51		
4f	-13.22	-14.97	-7.88	-9.07
4g	-16.17	-15.15		
4h	-16.02			
5b		-14.58		
Selekoksib		-13.64		

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

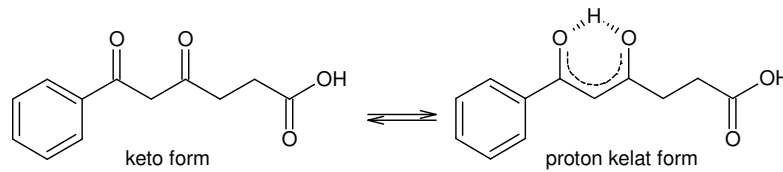
Bu çalışmada 1,5-diaril-3-pirazolpropanoik asit genel yapısına sahip öncü bileşiklerin sentezi, COX/5-LOX inhibisyon etkilerinin saptanması ve aktif bileşiklerin enzimlerle bağlanma şekillerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bileşiklerin genel sentez şeması Şekil 8'de görülmektedir.



Şekil 8: Genel sentez şeması

Asetofenon türevleri, potasyum tersiyer bütoksit ile tepkimesinin ardından süksinik anhidritle literatürde kayıtlı yöntemle göre tepkimeye sokularak 4,6-diokso-6-fenilhekzanoik asit türevleri elde edilmiştir [210]. Dokuz adet başlangıç bileşiğinden beş bileşik literatürde kayıtlıdır [206, 216-218]. Literatürde kayıtlı bileşiklerin erime noktaları, IR ve ¹H-NMR spektrumları alınarak yapıları aydınlatılmış literatür verileriyle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. 4,6-diokso-6-fenilhekzanoik asit türevlerinden dört bileşik literatürde kayıtlı olmayan orijinal bileşiklerdir (Bileşik 1d, 1g, 1h, 1i). Bu bileşiklerin yapıları IR, ¹H-NMR spektrumları ve elementel analiz verileriyle aydınlatılmıştır.

4,6-diokso-6-fenilhekzanoik asit türevleri keto-enol tautomerisi göstermektedir. Bu bileşiklerin çoğu durumda katı fazda proton kelat formda olduğu bilinmektedir. Bu durum IR spektrumlarında (KBr) açıkça görülmektedir [216]. CDCl₃ içindeki çözeltilerinde çoğunlukla proton kelat form tercih edilmektedir. DMSO-d₆ içindeki çözeltilerinde ise proton kelat formu oranı fazla olmakla birlikte keto formuna da rastlanmaktadır. Bileşiklerin CDCl₃ içinde DMSO-d₆'ya göre daha fazla enolize oldukları bildirilmiştir [216]. Keto-enol oranı proton NMR spektrumlarından elde edilebilmektedir. 5. konumdaki protonlar keto formunda δ 4.07-4.38 arasında, enol formunda δ 6.15-6.70 arasında rezonans olmaktadır.

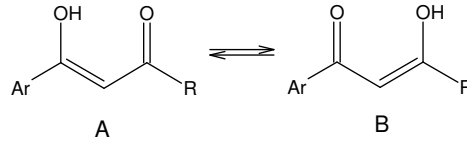


6-Hidrazino-3-kloropiridazin, 3,6-dikloropiridazin ve hidrazin hidratın tepkimesinden elde edilmiştir [211, 219]. 6-Hidrazino-3-kloropiridazin hidroklorür 6-Hidrazino-3-kloropiridazinin metanol içindeki çözeltilisinden gaz hidroklorik asit geçirilerek hazırlanmıştır.

Pirazoller β-dikarbonil bileşikleri ile hidrazinin reaksiyonuyla elde edilmektedir. Hidrazin türevinin sübstitüent taşıdığı durumlarda farklı iki izomer oluşumu söz konusudur [217].

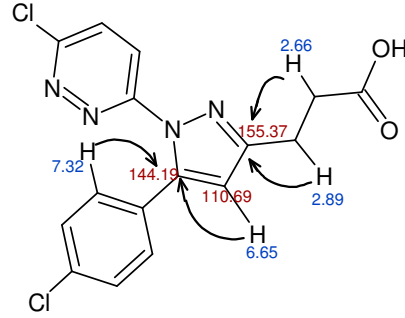
Murray ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda, 4,6-diokso-6-arilhekzanoik asit türevleri arilhidrazin hidroklorürleri ile trietilamin varlığında metanol içinde tepkimeye sokulduğunda tepkime regioselektif olarak yürümüş ve 3-(1,5-diaril-3-pirazolil)propanoik asit türevleri elde edilmiştir [206, 217, 218].

Regioselektif 1,5-diarilpirazol sentezinin ilk basamağının 1-aril-1,3-diketon bileşiğinin 3. konumdaki karbonil grubu üzerinden hidrazon oluşumu olduğu bildirilmiştir. Singh ve ekibi tarafından yapılan çalışmada elektron çekici gruplar ($R=CF_3$, piridin) içeren 1-aril-1,3-diketon bileşiklerinin asidik veya nötral koşullarda çoğunlukla enolik form A şeklinde bulunduğu, elektron salıcı gruplar ($R=CH_3$, $n-C_3H_7$) içeren bileşiklerde ise bu formun ancak nötral veya bazik tepkime koşullarında bulunduğu ve bu koşullarda 1,5-diarilpirazollerini oluşturdukları bildirilmiştir [220].



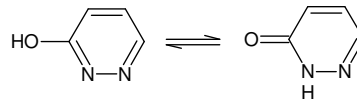
Bu bilgilere dayanarak 4,6-diokso-6-fenilhekzanoik asit türevleri trietilamin varlığında metanol içinde 6-hidrazino-3-kloropiridazin hidroklorür ile tepkimeye sokularak kloropiridazin halkası taşıyan Bileşik 2 türevleri elde edilmiştir. Bileşiklerin yapıları spektral verilerle ve elementel analiz sonuçları ile kanıtlanmıştır. Patentli bir çalışmada kayıtlı Bileşik 2c ile ilgili herhangi bir veri bulunmaması nedeniyle bu türev de değerlendirmeye alınmıştır.

1,5-izomerlerin eldesinde regioselektif 1,5-diarilpirazol sentez yöntemi kullanılmış ayrıca Bileşik 2c'nin HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) spektrumunda bu izomerin elde edildiği görülmüştür. HMBC spektrumunda propanoik asit yan zincirindeki protonların (δ 2.66 ve 2.89) pirazol C-3 (δ 155.37) ile etkileşimi, fenil H-2 ve H-6'nın (δ 7.32) ise pirazol C-5 (δ 144.19) ile etkileşimi görülmektedir. Bu etkileşimler bileşiğin 1,5-diaril izomer olduğunu kanıtlamaktadır. Bileşiğin tek bağ 1H - ^{13}C etkileşimleri HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) spektrumu ile belirlenmiştir.



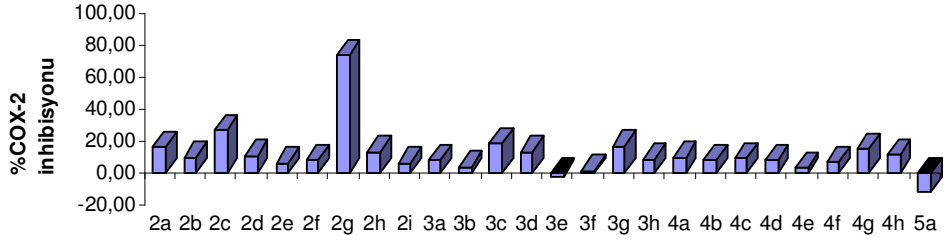
Kloropiridazin halkasının nükleofilik yer değiştirme reaksiyonuyla metokspiridazin halkası içeren Bileşik 3 türevleri elde edilmiştir. Bu türevler literatürde kayıtlı yöntemlere göre Bileşik 2 türevlerinin sodyum metoksitle tepkimesi sonucu elde edilmiştir [221-223].

Bileşik 2 türevleri, literatürde kayıtlı yöntemlere göre sodyum asetat varlığında asetik asit içinde tepkimeye sokularak Bileşik 4 türevleri elde edilmiştir [219]. Bu türevlerde yer alan hidrokspiridazin halkası laktam-laktim tautomerisi göstermektedir. Hidrokspiridazinler ile yapılan çalışmalar hem katı fazda hem de çözeltilerde sadece okso formun bulunduğunu göstermektedir [224, 225]. Bu çalışmada sentezlenen Bileşik 4 türevlerinin IR spektrumlarında karboksilik asit karbonili dışında $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ 'de piridazinon halkasına ait laktam karbonil gerilimi bulunmaktadır. Ayrıca Bileşik 4a'nın DMSO- d_6 içinde alınan ^{13}C -NMR spektrumu piridazinon yapısıyla uyumlu sonuç vermektedir. Bu veriler belirtilen koşullarda piridazinon yapısının tercih edildiğini göstermektedir.



Tiyometilpiridazin halkası taşıyan Bileşik 5a, Bileşik 2a'nın sodyum metantiyolatla tepkimesi ile elde edilmiştir. Piridazin halkasında metilsülfol grubu taşıyan Bileşik 5b tiyometil türevinin *m*-kloroperbenzoik asitle oksidasyonu sonucu elde edilmiştir. Bu bileşiklerin sentezinde literatürde benzer bileşikler için kullanılan yöntemler uygulanmıştır [226, 227].

Sentezlenen yirmi altı final bileşik 10 μ M konsantrasyonda COX-2 enzim inhibisyonları tayini için saflaştırılmış enzim ile 100 μ M araziidonik asit substrat olarak kullanılarak test edilmiştir. Aktivite sonuçları Grafik 5'te % inhibisyon olarak görülmektedir.



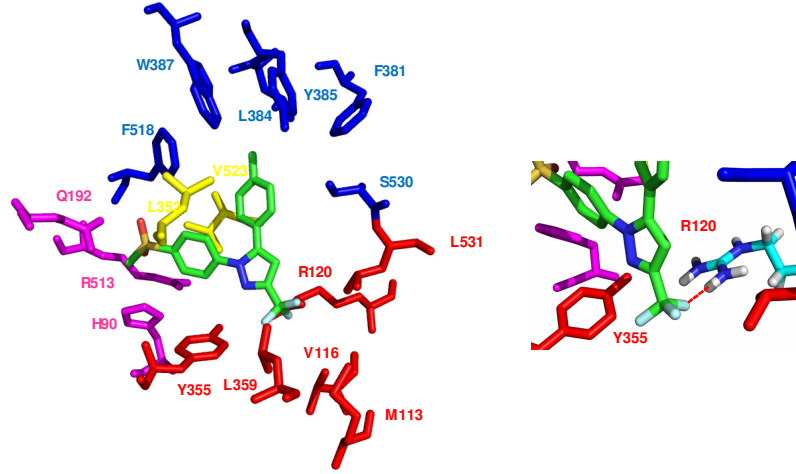
Grafik 5: Bileşiklerin % COX-2 inhibisyon grafiği

Elde edilen 1,5-diarilpirazol-3-propanoik asit türevlerinden yüksek COX-2 inhibitör etkiye sahip tek türev kloropiridazin ve triflorometilfenil taşıyan ve % 73.93 COX-2 enzim inhibisyonu gözlenen Bileşik 2g'dir. Bileşik 2g'nin COX-1 inhibisyonu 10 μ M konsantrasyonda test edilerek inhibisyon değeri % 68.87 olarak bulunmuştur. COX-1 ve COX-2 IC₅₀ değerleri ise sırasıyla 1.506 μ M ve 1.615 μ M olarak saptanmıştır.

Kloropiridazin taşıyan ve Bileşik 2g ile aynı seride yer alan diğer türevlerde ise önemli bir COX-2 inhibisyonu görülmemektedir. Aynı şekilde metokspiridazin ve piridazinon taşıyan triflorometilfenil süstitüe türevlerde de inhibisyon oranı düşüktür. 1,5-diarilpirazol-3-propanoik asit genel yapısına sahip üç seri bileşiklerde sadece tek türevin aktivite göstermesini aydınlatmak amacıyla moleküler modelleme çalışması yapılmıştır.

NSAE ilaçlarla COX-2 enzimin etkileşiminde deneysel olarak en az üç farklı bağlanma şekli görülmektedir. Birincisi indometazin ve flurbiprofende gözlenen, karboksilik asit grubunun arjinin 120 guanidinyum grubu ile tuz köprüsü oluşturduğu şekildir [57]. Karboksilik asit grubu taşıyan diklofenak ve lumirakoksib ise tamamen farklı bir bağlanma şekli sergilemektedir. Bu bileşiklerde karboksilik asit grubu aktif bölge üst kısmında serin 530 ve tirozin 385

ile hidrojen bağı yapmaktadır [64, 228]. Son olarak klasik diaril heterosiklik yapıdaki koksiblerde ise beş üyeli halkada polar kısım arjinin 120/tirozin 355'e doğru yönlenebilir, sülfonilmetil veya sülfonamid grubu ise histidin 90, arjinin 513, glutamin 192, fenilalanin 518 ve valin 523'ün yer aldığı cebe yerleşmektedir [57] (Şekil 9).



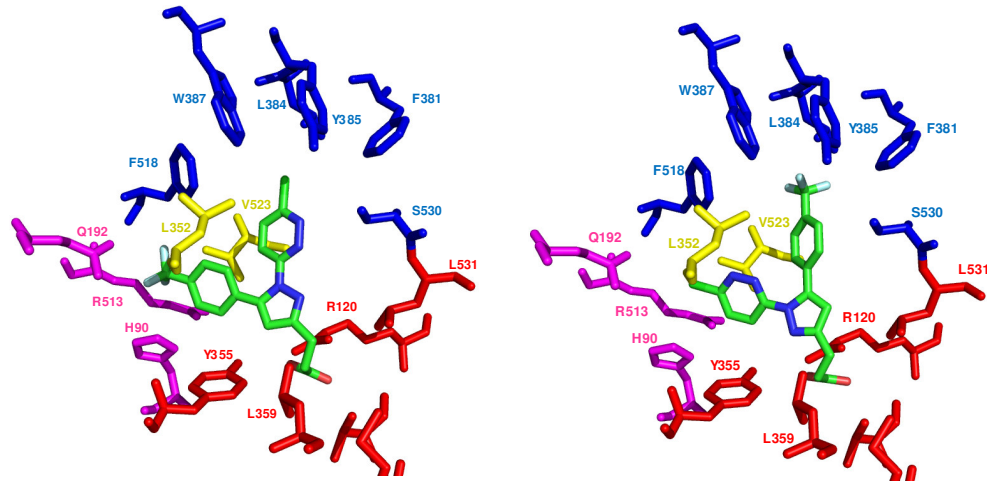
Şekil 9: Selekoksibin COX-2 enzim aktif bölgesine bağlanma şekli ve Hidrojen bağı etkileşimi

Moleküler modelleme çalışmasında kullanılan yöntemin etkinliği deneysel bağlanma şekilleri bilinen ligandların moleküler etkileşim çalışmaları yapılarak test edilebilir. Bu amaçla protein-ligand kompleksinin X-ışını yapısından ligand çıkarılarak bağlanma bölgesine tekrar yerleştirilir ve elde edilen bağlanma şekli deneysel verilerle karşılaştırılır [229].

Bu çalışmada yöntemi test etmek için COX-2 enzimi aktif bölgesi ile kompleks halindeki SC-558 (PDB kodu 1cx2, 6cox), diklofenak (PDB kodu 1pxx) ve indometazin (PDB kodu 4cox) X-ışını yapısından çıkarılarak bağlanma bölgesine tekrar yerleştirildi. Bağlanma şekilleri deneysel olarak bilinen bu bileşiklerle yapılan çalışma sonucunda elde edilen birinci sıradaki bağlanma şeklinin kompleks X-ışını yapısı ile uyumlu olduğu belirlendi. Ancak göz önünde bulundurulması gereken önemli nokta, eğer protein ve ligand yapıları değiştirilirse aynı sonuçların alınamamış olmasıdır. Örneğin eğer 6cox.pdb'nin aktif bölgesinden SC-558 kaldırıldıktan sonra diklofenak ile aktif bölge etkileşimi çalışılırsa birinci sıradaki bağlanma şekli karboksilik asit grubunun serin 530'a

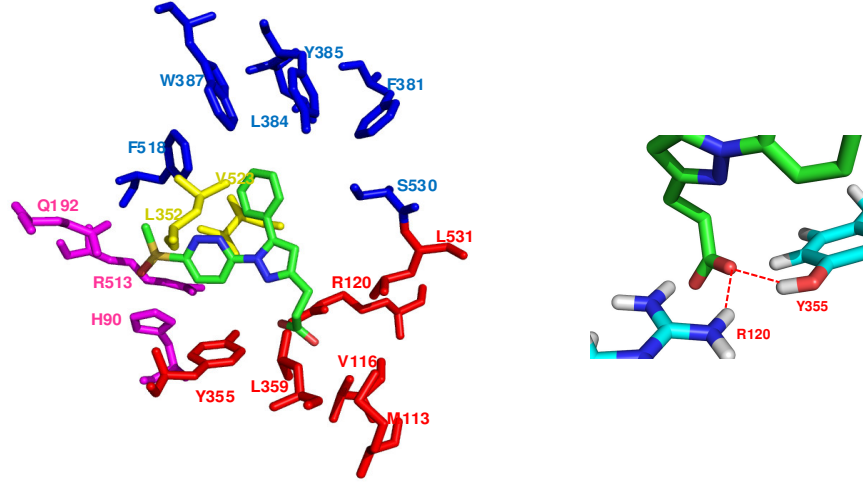
değil arjinin 120'ye bağlandığı şekil olmaktadır. Bu durum kullanılan kristal yapılarda indüklenmiş uyum etkilerinin olduğunu göstermektedir. Örneğin karşılaştırma yapmak için bakıldığında 1pxx.pdb veya 6cox.pdb protein yapılarında yan zincirde arjinin 120 veya histidin 90'da önemli yer değişikliği bulunmaktadır.

Bu çalışmada indüklenmiş uyumun getirdiği sınırlama göz önünde bulundurularak 1cx2.pdb protein yapısı moleküler etkileşim çalışmasında başlangıç yapısı olarak seçildi. Tablo 4'te özetlenen sonuçlara bakıldığında tüm serilerdeki bileşiklerde temel olarak iki bağlanma şekli gözlenmiştir. Her iki bağlanma şekli de karboksilik asit grubunun arjinin 120 ile etkileşimiyle karakterizedir. Birinci bağlanma şeklinde piridazin halkası triptofan 387, tirozin 385 ve fenilalanin 518'e doğru yönelmiştir. İkinci şekilde ise, piridazin halkası arjinin 513, valin 523 ve histidin 90'ın yer aldığı bölgeye yönelmiştir (Şekil 10). Tüm bileşikler için her iki bağlanma şekline ait ligandların reseptöre bağlanma afinitelerini tahmin eden XP Glide skorları referans bileşik selekoksible karşılaştırmalı incelendiğinde bileşiklerin oldukça aktif olmaları beklenmektedir.



Şekil 10: Bileşik 2g'nin COX-2 enzim aktif bölgesine 1. ve 2. bağlanma şekli

Özellikle Bileşik 5b için bağlanma şekli incelendiğinde bileşikte yer alan metilsülfonil grubu selekoksib ve SC-558'deki sülfonamid yapısıyla tam olarak çakışmakta, propanoik asit yan zinciri ise arjinin 120 ve tirozin 355 ile etkileşerek selekoksibdeki triflorometil grubu etkileşimini taklit etmektedir (Şekil 11).



Şekil 11: Bileşik 5b'nin COX-2 enzim aktif bölgesine bağlanma şekli ve Hidrojen bağı etkileşimi

Saflaştırılmış COX-2 enzim testinde yalnızca Bileşik 2g'nin IC_{50} 1.6 μM değeri ile inhibitör etki göstermesinin nedeni tam olarak açıklanamamaktadır. Tablo 4'te XP Glide skorları incelendiğinde Bileşik 2g'nin iki bağlanma şeklinden birinci bağlanma şeklini tercih ettiği görülmektedir. Bu bağlanma şeklinde piridazin halkası triptofan 387, tirozin 385 ve fenilalanin 518'e doğru yönelmiştir. Triflorometil grubu selekoksibdeki sülfonamid grubuyla aynı cebe yerleşmektedir. Ancak bu bağlanma şeklinin tüm seriler içinde sadece Bileşik 2g'ye inhibitör etkinlik katması tam olarak anlaşılabilir değildir. Fenil halkasında metilsülfonil grubu ile karakterize 2h, 3h ve 4h kodlu bileşiklerin de birinci bağlanma şeklini tercih ettikleri görülmektedir. Piridazin halkasında metilsülfonil taşıyan Bileşik 5b ise selekoksible aynı bağlanma şekline sahiptir. Ancak bu bileşiklerde önemli COX-2 inhibitör etki gözlenmemiştir.

Moleküler modelleme çalışmasında 1cx2 protein yapısı kullanıldığında, elde edilen bileşiklerin çoğunun selekoksible kıyaslanabilir bağlanma şekline ve oldukça iyi XP Glide skoruna sahip oldukları görülmektedir. Bileşik 2g dışındaki

bileşiklerin inaktif olmaları başka bir nedene bağlı olabileceği gibi moleküler modelleme çalışması da bu durumu aydınlatmada yetersiz kalmış olabilir. Modelleme çalışmalarında XP Glide skoru ve deneysel IC₅₀ değerleri arasında her zaman korelasyon görülmeyebilir ve bu durumun da göz önünde bulundurulması gerekmektedir [230].

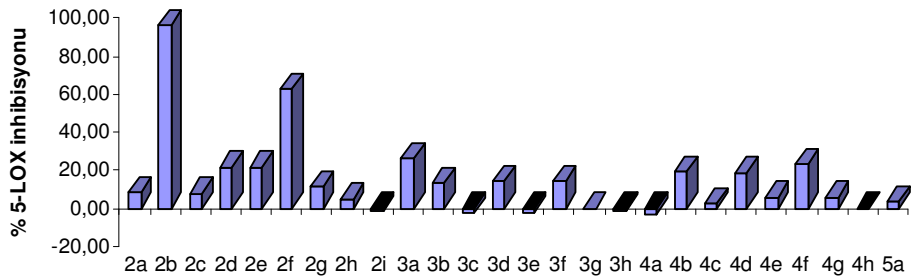
Bilindiği gibi NSAIE ilaçlar COX enzim inhibisyonunda farklı inhibisyon kinetiği gösterirler. Zayıf bağlanan inhibitörlerin etkinlikleri deney koşullarından belirgin şekilde etkilenir [63]. Bununla birlikte bazı COX inhibitörleri saflaştırılmış enzim testlerinde zayıf inhibitör etkinlik gösterirken hücre kullanılan testlerde daha yüksek aktivite göstermektedir. Genel bilgiler bölümünde formülü belirtilen LM-4762 kodlu selekoksib propanoik asit analogu bileşik saflaştırılmış enzim testinde 6 kat daha az etkinlik göstermiştir [209].

Tam kan testlerinde yüksek COX-2 selektiviteye sahip arilasetik asit sınıfı lumirakoksible yapılan çalışmada bileşik saflaştırılmış enzim testinde 50 µM araşidonik asit kullanıldığında fare ve insan COX-2 enzimine karşı zayıf inhibitör etki göstermiştir. Substrat konsantrasyonunun enzim inhibisyonuna etkisi araştırıldığında insan COX-2 enzimi ile yapılan çalışmada lumirakoksib 50 µM araşidonik asit substratıyla yarışmakta fakat yaklaşık % 100 inhibisyon ancak yüksek inhibitör ve düşük araşidonik asit konsantrasyonunda görülmektedir. Lumirakoksib fare COX-2 enzimi için daha zayıf inhibitör etkinlik göstermekle birlikte yüksek inhibitör ve düşük araşidonik asit konsantrasyonunda bile tamamen inhibisyon gösterememektedir. Enzim kinetiği çalışması lumirakoksibin iki basamaklı inhibisyon mekanizması gösterdiğini ve disosiyasyon hızının fare COX-2 enzimi için daha yüksek olduğunu göstermiştir [228].

Bu tez çalışmasında saflaştırılmış enzim testinde koyun COX enzimi ve 100 µM araşidonik asit konsantrasyonu kullanılmıştır. Bu substrat konsantrasyonu enzimin doygunluk seviyesinin oldukça üstünde ($K_M=2-5$ µM) yer almaktadır. Bu nedenle bileşikler eğer COX-2 enziminin hızlı geri dönüşümlü inhibitörü ise yüksek substrat konsantrasyonunda COX-2 aktivitesini güçlü bir şekilde inhibe etmeleri beklenemez. Bu nedenle normal substrat konsantrasyonu

ve insan tam kan testi ile bileşiklerin COX enzim inhibitör aktiviteleri tekrar değerlendirilerek daha güvenilir sonuçlar alınabilir.

Sentezlenen bileşiklerin 30 µM konsantrasyonda 5-LOX enzim inhibitör etkileri insan lökosit LTB₄ inhibisyon testi kullanılarak test edilmiştir. Aktivite sonuçları Grafik 6'da % inhibisyon olarak görülmektedir.



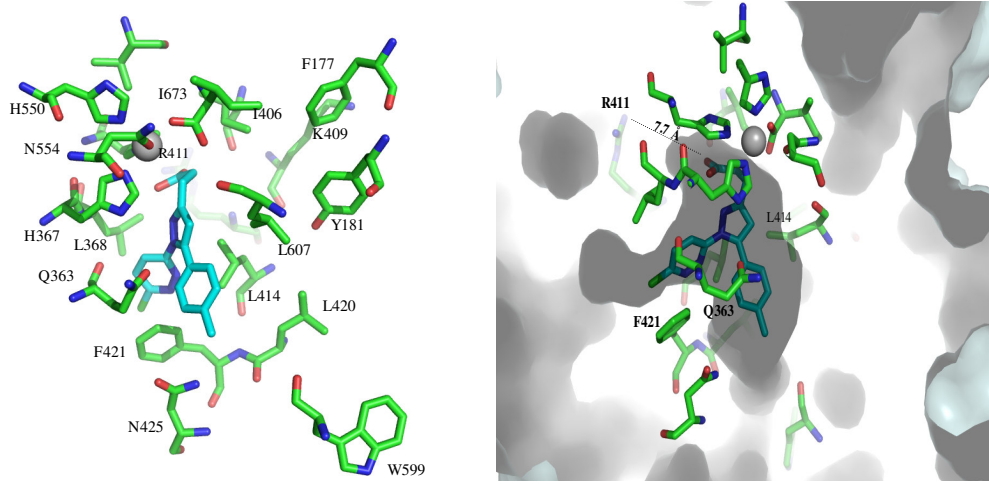
Grafik 6: Bileşiklerin % 5-LOX inhibisyon grafiği

Elde edilen 1,5-diarilpirazol-3-propanoik asit türevlerinden Bileşik 2b ve 2f sırasıyla % 96.0 ve % 62.7 LTB₄ inhibisyonu göstermiştir. Bu bileşiklere ait 5-LOX enzim inhibisyonu IC₅₀ değerleri 12 ve 14 µM olarak saptanmıştır. Bileşik 2b flor süstitüe Bileşik 2f ise metil süstitüe fenil halkası taşımaktadır. Her ikisi de pirazol halkası birinci konumunda kloropiridazin halkası taşıyan bu bileşiklerin 5-LOX enzimi ile etkileşimleri moleküler modelleme çalışmasıyla incelenmiştir.

5-LOX enzimi kristal yapısının halen aydınlatılmamış olması nedeniyle insan 5-LOX homoloji modeli ile çalışılmıştır. 5-LOX aktif bölgesi tirozin 181'den triptofan 599'a kadar uzanan kıvrık bir yarıktan oluşmaktadır. Bağlanma yarığında önemli noktalar, hidrojen bağı akseptörlerinin etkileştiği aktif bölge girişindeki tirozin 181 ve yarığın alt kısmında yer alan asparajin 425, yarığın merkezinde aromatik halkaların etkileşim gösterdiği lösin 414, hidrofobik grupların etkileştiği lipofilik yan cepte yer alan fenilalanin 421 ve asidik grupların etkileştiği arjinin 411 olarak bilinmektedir [111].

5-LOX enzimi için IC₅₀ değerleri birbirine oldukça yakın olan Bileşik 2b ve 2f, 5-LOX enzimi aktif bölgesinde majör olarak aynı bağlanma şeklini

sergilemektedir. Bileşik 2f için bağlanma şeklinin gösterildiği Şekil 12’de görüldüğü gibi pirazol halkası aktif bölge merkezinde yer almakta ve lösin 414 ile C-H... π etkileşimi göstermektedir. Kloropiridazin halkası fenilalanin 421 ile etkileşime uygun şekilde fenilalanin 421, glutamin 363 ve lösin 368’in yer aldığı ek hidrofobik oyuğa yerleşmiştir. Metil sübstitüe fenil halkası ise ana yarığın alt kısmını doldurmaktadır. Karboksilik asit grubu arjinin 411’e doğru yönelmiştir (O...N uzaklık= 7.7Å) ve bileşiklerin 5-LOX enzim aktif bölgesine yerleşimleri Charlier ve ekibi tarafından önerilen etkileşim modeliyle uyum göstermektedir.



Şekil 12: Bileşik 2f'nin 5-LOX enzimi aktif bölgesine bağlanma şekli

COX/5-LOX dual inhibitör etkili öncü bileşiklere ulaşmayı hedefleyen bu tez çalışmasında COX enzim inhibitör etkili Bileşik 2g ve 5-LOX enzim inhibitör etkili Bileşik 2b ve 2f türevlerine ulaşılmıştır. 1,5-diarilpirazol-3-propanoik asit genel yapısına sahip bileşiklerden pirazol halkasının 1. konumunda kloropiridazin taşıyan türevlerde aktivite gözlenmesi bu halkanın metokspiridazin ve piridazinon halkalarına göre COX veya 5-LOX inhibitör etki için daha uygun olduğunu göstermektedir.

Moleküler modelleme çalışmaları değerlendirildiğinde piridazin halkasında metilsülfonil taşıyan Bileşik 5b COX-2 enzimi aktif bölgesinde selekoksibe benzer bağlanma şekline sahip olmasına rağmen inaktiftir. Her ne kadar bu sonuç beklenmedik olsa da yakın zamanda yapılan bir çalışmada da selekoksib propanoik asit analogu (LM-4762) COX-2 inhibitör etkili iken bu türevin

metilsülfonil analogu inaktif bulunmuştur [209]. Bu nedenle bileşiklerde ileri modifikasyonlarda piridazin halkasında sülfonamit grubu taşıyan türevin hazırlanması ayrıca metilsülfonilpiridazin ve triflorometil sübstitüe fenil halkalarının aynı bileşikte birleştirilmesi düşünülebilir.

2008 yılında yayınlanan iki ayrı çalışmada selekoksibin 5-LOX enzim inhibisyonu etkisinin bulunması bu tez çalışması için seçilen genel yapının bu aktivite için uygunluğunu desteklemektedir [86, 188]. Selekoksib gibi metil sübstitüe fenil halkası taşıyan Bileşik 2f'nin 5-LOX enzim aktif bölgesinin alt kısmına yerleştiği görülmektedir. Asetik asit yan zinciri taşıyan ve 5-LOX enzim inhibitör etkisi bilinen bileşiklerde arjinin 411 azotu ile olan uzaklık ~8.5 Å iken propanoik asit yan zinciri taşıyan Bileşik 2f için bu uzaklığın azaldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte daha uzun yan zincirin daha güçlü etkileşim sağlayabileceği de düşünülebilir.

Bileşiklerin 5-LOX enzimi aktif bölge girişindeki hidrojen bağı akseptörü tirozin 181 ile etkileşim gösteremedikleri görülmektedir. Bu nedenle daha yüksek inhibitör etki için bu bölgeyle hidrojen bağı etkileşimi sağlayacak yapısal modifikasyonlar yapılabilir. Özellikle karboksilik asit grubundan yapılacak türevlendirmeler ile nonredoks 5-LOX inhibitörleri yapısında yer alan farmakoforik gruplar bileşiğe kazandırılabilir.

Sonuç olarak bileşiklerin kimyasal yapıları ve moleküler modelleme çalışmaları göz önüne alındığında seçilen genel yapının dual etki profili için uygun olduğu görülmektedir. Kloropiridazin halkası taşıyan Bileşik 2b, 2f ve 2g'nin öncülüğünde ileri çalışmalarla aynı bileşikte COX/5-LOX dual etkinin elde edilmesi mümkün görülmektedir.

6. ÖZET

1,5-DİARİLPİRAZOL-3-PROPANOİK ASİT YAPISI TAŞIYAN COX/5-LOX DUAL İNHİBİTÖRÜ BİLEŞİKLERİN SENTEZİ VE *İN VİTRO* İNHİBİTÖR ETKİ TAYİNLERİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

Araşidonik asit metabolizmasının iki önemli yolağı siklooksijenaz (COX) ve 5-lipoksijenaz (5-LOX) yolaklarının birlikte inhibisyonunu sağlayan ilaçların daha güçlü antienflamatuvar etkinlikte birlikte, daha iyi gastrointestinal ve kardiyovasküler güvenilirlik sağlayacağı düşünülmektedir. Bu yaklaşım esas alınarak bu çalışmada COX ve 5-LOX enzim yolaklarının birlikte inhibisyonunu sağlayan öncü bileşiklere ulaşmak hedeflenmiştir. Bu amaçla, 1,5-diarilpirazol-3-propanoik asit genel yapısındaki bileşiklerde pirazol halkasının 1. konumunda kloropiridazin, metokspiridazin ve piridazinon halkaları taşıyan türevler hazırlanmıştır. Bu üç seride yer alan bileşikler pirazol halkasının 5. konumunda nonsüstitüe fenil ve F, Cl, Br, OCH₃, CH₃, CF₃, SO₂CH₃ süstitüe fenil halkaları taşımaktadır. Bu bileşiklere ek olarak piridazin halkasında metilsülfonil grubu ve nonsüstitüe fenil taşıyan 1,5-diarilpirazol türevi de hazırlanmıştır. Bu çalışmada literatürde kayıtlı olmayan otuz yeni bileşiğin sentezi gerçekleştirilmiş, yapıları spektral veriler ve elementel analiz sonuçlarıyla kanıtlanmıştır.

Elde edilen yirmialtı final bileşiğin COX ve 5-LOX enzim inhibitör etkileri araştırılmıştır. Sentezlenen türevlerden 3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-(4-triflorometil fenil)-1*H*-pirazol-3-il]propanoik asit (2g) COX-1 ve COX-2 enzimlerini sırasıyla 1.5 ve 1.6 µM IC₅₀ değerleri ile inhibe etmiştir. Bunun yanında, 3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-(4-florofenil)-1*H*-pirazol-3-il]propanoik asit (2b) ve 3-[1-(6-kloropiridazin-3-il)-5-(4-metilfenil)-1*H*-pirazol-3-il]propanoik asit (2f) türevlerinin 5-LOX enzimi inhibitör etkileri için IC₅₀ değerleri 12 ve 14 µM olarak saptanmıştır. Moleküler modelleme çalışmaları ile inhibitör bileşiklerin enzim aktif bölgesiyle önerilen bağlanma şekilleri belirlenerek daha ileri araştırmalar için ipuçları elde edilmiştir.

Sonuç olarak, kloropiridazin halkası taşıyan Bileşik 2b, 2f ve 2g'in öncülüğünde ileri çalışmalarla aynı bileşikte COX/5-LOX dual etkinin elde edilmesi mümkün görülmektedir.

7. SUMMARY

SYNTHESIS AND *IN VITRO* INHIBITORY ACTIVITIES OF DUAL COX/5-LOX INHIBITOR 1,5-DIARYLPYRAZOLE-3-PROPANOIC ACID DERIVATIVES

Drugs are able to inhibit cyclooxygenase (COX) and 5-lipoxygenase (5-LOX) enzymes, two major pathways of arachidonic acid metabolism, are thought to have powerful anti-inflammatory activity as well as better tolerability with respect to gastrointestinal and cardiovascular safety. Based on this therapeutic approach, the aim of this study was to obtain compounds with dual COX and 5-LOX inhibitory activities, which can be used as leads for design of novel anti-inflammatory drugs. For this purpose, three groups of 1,5-diarylpyrazol-3-propanoic acid derivatives characterized by the presence of chloropyridazine, methoxypyridazine and pyridazinone rings at 1-position of the pyrazole nucleus were prepared. This series also included differently substituted phenyl ring at 5 position of pyrazole. In addition, one derivative with sulfonylmethylpyridazine and nonsubstituted phenyl rings about the central pyrazole was prepared. The structures of thirty newly synthesized compounds were fully elucidated using spectral techniques and elemental analysis.

The obtained twenty-six final compounds reported herein were evaluated for their ability to inhibit COX and 5-LOX enzymes. IC_{50} values for 3-[1-(6-chloropyridazin-3-yl)-5-(4-trifluoromethylphenyl)-1*H*-pyrazol-3-yl]propanoic acid (2g) were determined as 1.5 μ M and 1.6 μ M for COX-1 and COX-2, respectively. In addition, in the same series, compounds 2b (4-fluorophenyl derivative) and 2f (4-methylphenyl derivative) inhibited 5-LOX product synthesis with IC_{50} values 12 μ M and 14 μ M, respectively. Molecular modeling studies were also carried out to further investigate the predicted binding modes of the active compounds with enzymes active site.

In summary, the preliminary *in vitro* activity results of this class of compounds (especially compounds 2b, 2f and 2g) may possess potential for further studies to develop dual inhibitors of COX/5-LOX.

8. KAYNAKLAR

1. Funk CD, Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, 2001. 294(5548): 1871-5.
2. Araico A, Terencio MC, Alcaraz MJ, Dominguez JN, Leon C, et al., Evaluation of the anti-inflammatory and analgesic activity of Me-UCH9, a dual cyclooxygenase-2/5-lipoxygenase inhibitor. *Life Sci*, 2007. 80(23): 2108-17.
3. Leval X, Julemont F, Delarge J, Pirotte B, Dogne JM, New trends in dual 5-LOX/COX inhibition. *Curr Med Chem*, 2002. 9(9): 941-62.
4. Leone S, Ottani A, Bertolini A, Dual acting anti-inflammatory drugs. *Curr Top Med Chem*, 2007. 7(3): 265-75.
5. Funk CD, Fitzgerald GA, COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007. 50(5): 470-9.
6. Mitchell JA, Warner TD, COX isoforms in the cardiovascular system: understanding the activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. 5(1): 75-86.
7. Peskar BM, Maricic N, Gretzera B, Schuligoi R, Schmassmann A, Role of cyclooxygenase-2 in gastric mucosal defense. *Life Sci*, 2001. 69(25-26): 2993-3003.
8. Antman EM, Bennett JS, Daugherty A, Furberg C, Roberts H, et al., Use of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update for clinicians: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 2007. 115(12): 1634-42.
9. Grosser T, Fries S, Fitzgerald GA, Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *J Clin Invest*, 2006. 116(1): 4-15.
10. Zarraga IG, Schwarz ER, Coxibs and heart disease: what we have learned and what else we need to know. *J Am Coll Cardiol*, 2007. 49(1): 1-14.
11. Warner TD, Mitchell JA, Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *Faseb J*, 2004. 18(7): 790-804.
12. Coruzzi G, Venturi N, Spaggiari S, Gastrointestinal safety of novel nonsteroidal antiinflammatory drugs: selective COX-2 inhibitors and beyond. *Acta Biomed*, 2007. 78(2): 96-110.

13. Kulkarni SK, Singh VP, Licofelone--a novel analgesic and anti-inflammatory agent. *Curr Top Med Chem*, 2007. 7(3): 251-63.
14. Bertolini A, Ottani A, Sandrini M, Dual acting anti-inflammatory drugs: a reappraisal. *Pharmacol Res*, 2001. 44(6): 437-50.
15. Paredes Y, Massicotte F, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Laufer S, et al., Study of the role of leukotriene B(4) in abnormal function of human subchondral osteoarthritis osteoblasts: effects of cyclooxygenase and/or 5-lipoxygenase inhibition. *Arthritis Rheum*, 2002. 46(7): 1804-12.
16. Rainsford KD, Leukotrienes in the pathogenesis of NSAID-induced gastric and intestinal mucosal damage. *Agents Actions*, 1993. 39 Spec No: C24-6.
17. Martel-Pelletier J, Mineau F, Fahmi H, Laufer S, Reboul P, et al., Regulation of the expression of 5-lipoxygenase-activating protein/5-lipoxygenase and the synthesis of leukotriene B(4) in osteoarthritic chondrocytes: role of transforming growth factor beta and eicosanoids. *Arthritis Rheum*, 2004. 50(12): 3925-33.
18. Maxis K, Delalandre A, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Duval N, et al., The shunt from the cyclooxygenase to lipoxygenase pathway in human osteoarthritic subchondral osteoblasts is linked with a variable expression of the 5-lipoxygenase-activating protein. *Arthritis Res Ther*, 2006. 8(6): R181.
19. Celotti F, Laufer S, Anti-inflammatory drugs: new multitarget compounds to face an old problem. The dual inhibition concept. *Pharmacol Res*, 2001. 43(5): 429-36.
20. Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Reboul P, Pelletier JP, Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Ann Rheum Dis*, 2003. 62(6): 501-9.
21. de Gaetano G, Donati MB, Cerletti C, Prevention of thrombosis and vascular inflammation: benefits and limitations of selective or combined COX-1, COX-2 and 5-LOX inhibitors. *Trends Pharmacol Sci*, 2003. 24(5): 245-52.
22. Klegeris A, McGeer PL, Cyclooxygenase and 5-lipoxygenase inhibitors protect against mononuclear phagocyte neurotoxicity. *Neurobiol Aging*, 2002. 23(5): 787-94.

23. Claria J, Romano M, Pharmacological intervention of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways. Impact on inflammation and cancer. *Curr Pharm Des*, 2005. 11(26): 3431-47.
24. Ye YN, Wu WK, Shin VY, Bruce IC, Wong BC, et al., Dual inhibition of 5-LOX and COX-2 suppresses colon cancer formation promoted by cigarette smoke. *Carcinogenesis*, 2005. 26(4): 827-34.
25. Pommery N, Taverne T, Telliez A, Goossens L, Charlier C, et al., New COX-2/5-LOX inhibitors: apoptosis-inducing agents potentially useful in prostate cancer chemotherapy. *J Med Chem*, 2004. 47(25): 6195-206.
26. Albrecht W, Unger A, Nuessler AK, Laufer S, In vitro metabolism of Licofelone (ML3000), an Inhibitor of Cyclooxygenases-1 and -2 and 5-Lipoxygenase. *Drug Metab Dispos*, 2008(doi:10.1124/dmd.108.020347).
27. Tries S, Laufer S, Radziwon P, Breddin HK, Antithrombotic and platelet function inhibiting effects of ML3000, a new antiinflammatory drug with Cox/5-LOX inhibitory activity. *Inflamm Res*, 2002. 51(3): 129-34.
28. Tries S, Neupert W, Laufer S, The mechanism of action of the new antiinflammatory compound ML3000: inhibition of 5-LOX and COX-1/2. *Inflamm Res*, 2002. 51(3): 135-43.
29. Shi S, Klotz U, Clinical use and pharmacological properties of selective COX-2 inhibitors. *Eur J Clin Pharmacol*, 2008. 64(3): 233-52.
30. Ando K, Kawamura K, Sulfamoylheteroaryl pyrazole compounds as anti-inflammatory/analgesic agents. EP1104760A1, 2001.
31. Ando K, Kawamura K, Kato T, Heteroaryl phenyl pyrazole compounds as anti-inflammatory/analgesic agents. EP1104759A1, 2001.
32. Cheng H, Lundy DeMello KM, Li J, Sakya SM, Ando K, et al., Synthesis and SAR of heteroaryl-phenyl-substituted pyrazole derivatives as highly selective and potent canine COX-2 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006. 16(8): 2076-80.
33. Unlu S, Banoglu E, Ito S, Niiya T, Eren G, et al., Synthesis, characterization and preliminary screening of regioisomeric 1-(3-pyridazinyl)-3-arylpyrazole and 1-(3-pyridazinyl)-5-arylpyrazole derivatives towards cyclooxygenase inhibition. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2007. 22(3): 351-61.

34. Sondhi SM, Dinodia M, Singh J, Rani R, Heterocyclic Compounds as Anti-Inflammatory Agents. *Current Bioactive Compounds*, 2007. 3: 91-108.
35. da Cunha EF, Ramalho TC, Josa D, Caetano MS, de Sazua TC, Targeting Inhibition of COX-2: A Review of Patents, 2002-2006. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 2007. 1: 108-23.
36. Wachter M, Murray W, Pharmacologically Active N-1 and C-5 Heterocyclic Pyrazoles and Method for Synthesizing The Same. US 5242940, 1993.
37. Nie D, Che M, Grignon D, Tang K, Honn KV, Role of eicosanoids in prostate cancer progression. *Cancer Metastasis Rev*, 2001. 20(3-4): 195-206.
38. FitzGerald GA, COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nat Rev Drug Discov*, 2003. 2(11): 879-90.
39. Gonzalez-Periz A, Claria J, New approaches to the modulation of the cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways. *Curr Top Med Chem*, 2007. 7(3): 297-309.
40. Tanioka T, Nakatani Y, Semmyo N, Murakami M, Kudo I, Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biol Chem*, 2000. 275(42): 32775-82.
41. Jakobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R, Samuelsson B, Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(13): 7220-5.
42. Tanikawa N, Ohmiya Y, Ohkubo H, Hashimoto K, Kangawa K, et al., Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 291(4): 884-9.
43. Murakami M, Nakatani Y, Tanioka T, Kudo I, Prostaglandin E synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2002. 68-69: 383-99.
44. Gudis K, Tatsuguchi A, Wada K, Hiratsuka T, Futagami S, et al., Clinical significance of prostaglandin E synthase expression in gastric cancer tissue. *Hum Pathol*, 2007. 38(12): 1826-35.

45. Charlier C, Michaux C, Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Eur J Med Chem*, 2003. 38(7-8): 645-59.
46. Yedgar S, Krinsky M, Cohen Y, Flower RJ, Treatment of inflammatory diseases by selective eicosanoid inhibition: a double-edged sword? *Trends Pharmacol Sci*, 2007. 28(9): 459-64.
47. Samad TA, Sapirstein A, Woolf CJ, Prostanoids and pain: unraveling mechanisms and revealing therapeutic targets. *Trends Mol Med*, 2002. 8(8): 390-6.
48. Botting RM, Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927-2004). *Journal of Thermal Biology*, 2006. 31: 208-19.
49. Türker RK, Melli M, Kayaalp SO, 89. Bölüm: Eikozanoidler ve Diğer Otokoidler, Kayaalp O, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 10. Baskı, Ankara, 2002, 1439-63.
50. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, et al., COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(21): 13926-31.
51. Simmons DL, Botting RM, Hla T, Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev*, 2004. 56(3): 387.
52. Simmons DL, Chandrasekharan NV, Hu D, Roos KL, Tomsik J, Comments on "acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties". *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. 315(3): 1412-4; author reply 15-6.
53. Snipes JA, Kis B, Shelness GS, Hewett JA, Busija DW, Cloning and characterization of cyclooxygenase-1b (putative cyclooxygenase-3) in rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. 313(2): 668-76.
54. Kis B, Snipes JA, Busija DW, Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. 315(1): 1-7.
55. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM, Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*, 2000. 69: 145-82.
56. Picot D, Loll PJ, Garavito RM, The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature*, 1994. 367(6460): 243-9.

57. Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, et al., Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, 1996. 384(6610): 644-8.
58. Rieke CJ, Mulichak AM, Garavito RM, Smith WL, The role of arginine 120 of human prostaglandin endoperoxide H synthase-2 in the interaction with fatty acid substrates and inhibitors. *J Biol Chem*, 1999. 274(24): 17109-14.
59. Mancini JA, Riendeau D, Falgoutyret JP, Vickers PJ, O'Neill GP, Arginine 120 of prostaglandin G/H synthase-1 is required for the inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs containing a carboxylic acid moiety. *J Biol Chem*, 1995. 270(49): 29372-7.
60. Flower RJ, The development of COX2 inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 2003. 2(3): 179-91.
61. Luong C, Miller A, Barnett J, Chow J, Ramesha C, et al., Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nat Struct Biol*, 1996. 3(11): 927-33.
62. Dannhardt G, Kiefer W, Cyclooxygenase inhibitors--current status and future prospects. *Eur J Med Chem*, 2001. 36(2): 109-26.
63. Gierse JK, Koboldt CM, Walker MC, Seibert K, Isakson PC, Kinetic basis for selective inhibition of cyclo-oxygenases. *Biochem J*, 1999. 339 (Pt 3): 607-14.
64. Rowlinson SW, Kiefer JR, Prusakiewicz JJ, Pawlitz JL, Kozak KR, et al., A novel mechanism of cyclooxygenase-2 inhibition involving interactions with Ser-530 and Tyr-385. *J Biol Chem*, 2003. 278(46): 45763-9.
65. Riendeau D, Percival MD, Brideau C, Charleson S, Dube D, et al., Etoricoxib (MK-0663): preclinical profile and comparison with other agents that selectively inhibit cyclooxygenase-2. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001. 296(2): 558-66.
66. Esser R, Berry C, Du Z, Dawson J, Fox A, et al., Preclinical pharmacology of lumiracoxib: a novel selective inhibitor of cyclooxygenase-2. *Br J Pharmacol*, 2005. 144(4): 538-50.
67. FitzGerald GA, Patrono C, The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med*, 2001. 345(6): 433-42.

68. Fitzgerald GA, Coxibs and cardiovascular disease. *N Engl J Med*, 2004. 351(17): 1709-11.
69. Catella-Lawson F, McAdam B, Morrison BW, Kapoor S, Kujubu D, et al., Effects of specific inhibition of cyclooxygenase-2 on sodium balance, hemodynamics, and vasoactive eicosanoids. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999. 289(2): 735-41.
70. McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, et al., Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(1): 272-7.
71. Group AR, Lyketsos CG, Breitner JC, Green RC, Martin BK, et al., Naproxen and celecoxib do not prevent AD in early results from a randomized controlled trial. *Neurology*, 2007. 68(21): 1800-8.
72. Bombardier C, Laine L, Burgos-Vargas R, Davis B, Day R, et al., Response to expression of concern regarding VIGOR study. *N Engl J Med*, 2006. 354(11): 1196-9.
73. Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, et al., Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med*, 2000. 343(21): 1520-8, 2 p following 28.
74. Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, Bolognese JA, Oxenius B, et al., Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med*, 2005. 352(11): 1092-102.
75. Cannon CP, Curtis SP, FitzGerald GA, Krum H, Kaur A, et al., Cardiovascular outcomes with etoricoxib and diclofenac in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis in the Multinational Etoricoxib and Diclofenac Arthritis Long-term (MEDAL) programme: a randomised comparison. *Lancet*, 2006. 368(9549): 1771-81.
76. Schnitzer TJ, Burmester GR, Mysler E, Hochberg MC, Doherty M, et al., Comparison of lumiracoxib with naproxen and ibuprofen in the Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial (TARGET), reduction in ulcer complications: randomised controlled trial. *Lancet*, 2004. 364(9435): 665-74.

77. Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, Simon LS, Pincus T, et al., Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *Jama*, 2000. 284(10): 1247-55.
78. Krumholz HM, Ross JS, Presler AH, Egilman DS, What have we learnt from Vioxx? *Bmj*, 2007. 334(7585): 120-3.
79. FDA, [internet] <http://www.fda.gov/cder/drug/InfoSheets/HCP/valdecoxibHCP.htm>, 2005.
80. European Medicines Agency, [internet] http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/press/pr/QA/_Lumiracoxib_53636307en.pdf, 2007.
81. Bunting S, Moncada S, Vane JR, The prostacyclin--thromboxane A₂ balance: pathophysiological and therapeutic implications. *Br Med Bull*, 1983. 39(3): 271-6.
82. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR, An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, 1976. 263(5579): 663-5.
83. Walter MF, Jacob RF, Day CA, Dahlborg R, Weng Y, et al., Sulfone COX-2 inhibitors increase susceptibility of human LDL and plasma to oxidative modification: comparison to sulfonamide COX-2 inhibitors and NSAIDs. *Atherosclerosis*, 2004. 177(2): 235-43.
84. Mason RP, Walter MF, McNulty HP, Lockwood SF, Byun J, et al., Rofecoxib increases susceptibility of human LDL and membrane lipids to oxidative damage: a mechanism of cardiotoxicity. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006. 47 Suppl 1: S7-14.
85. Griffoni C, Spisni E, Strillacci A, Toni M, Bachschmid MM, et al., Selective inhibition of prostacyclin synthase activity by rofecoxib. *J Cell Mol Med*, 2007. 11(2): 327-38.
86. Sud'ina GF, Pushkareva MA, Shephard P, Klein T, Cyclooxygenase (COX) and 5-lipoxygenase (5-LOX) selectivity of COX inhibitors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2008. 78(2): 99-108.
87. Antman EM, DeMets D, Loscalzo J, Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. *Circulation*, 2005. 112(5): 759-70.

88. Brash AR, Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem*, 1999. 274(34): 23679-82.
89. Kuhn H, Structural basis for the positional specificity of lipoxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2000. 62(3): 255-70.
90. Werz O,Steinhilber D, Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors. *Pharmacol Ther*, 2006. 112(3): 701-18.
91. Serhan CN, Hamberg M,Samuelsson B, Trihydroxytetraenes: a novel series of compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984. 118(3): 943-9.
92. Gilroy DW, Lawrence T, Perretti M,Rossi AG, Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2004. 3(5): 401-16.
93. Pommery N, Massingham R,Henichart J-P, 5-Lipoxygenase inhibitors- patent ans literature activity during 2001-2004. *Expert Opin. Ther. Patents*, 2006. 16(1): 13-26.
94. Serhan CN, Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2005. 73(3-4): 141-62.
95. Radmark O,Samuelsson B, 5-lipoxygenase: regulation and possible involvement in atherosclerosis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2007. 83(3): 162-74.
96. Peters-Golden M,Henderson WR, Jr., Leukotrienes. *N Engl J Med*, 2007. 357(18): 1841-54.
97. Tager AM,Luster AD, BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2003. 69(2-3): 123-34.
98. Funk CD, Leukotriene modifiers as potential therapeutics for cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov*, 2005. 4(8): 664-72.
99. Qiu H, Gabrielsen A, Agardh HE, Wan M, Wetterholm A, et al., Expression of 5-lipoxygenase and leukotriene A4 hydrolase in human atherosclerotic lesions correlates with symptoms of plaque instability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(21): 8161-6.
100. Spanbroek R, Grabner R, Lotzer K, Hildner M, Urbach A, et al., Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial

- wall during human atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(3): 1238-43.
101. Helgadottir A, Manolescu A, Thorleifsson G, Gretarsdottir S, Jonsdottir H, et al., The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat Genet*, 2004. 36(3): 233-9.
 102. Dwyer JH, Allayee H, Dwyer KM, Fan J, Wu H, et al., Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis. *N Engl J Med*, 2004. 350(1): 29-37.
 103. Helgadottir A, Gretarsdottir S, St Clair D, Manolescu A, Cheung J, et al., Association between the gene encoding 5-lipoxygenase-activating protein and stroke replicated in a Scottish population. *Am J Hum Genet*, 2005. 76(3): 505-9.
 104. Helgadottir A, Manolescu A, Helgason A, Thorleifsson G, Thorsteinsdottir U, et al., A variant of the gene encoding leukotriene A4 hydrolase confers ethnicity-specific risk of myocardial infarction. *Nat Genet*, 2006. 38(1): 68-74.
 105. Kajimoto K, Shioji K, Ishida C, Iwanaga Y, Kokubo Y, et al., Validation of the association between the gene encoding 5-lipoxygenase-activating protein and myocardial infarction in a Japanese population. *Circ J*, 2005. 69(9): 1029-34.
 106. Kaushal R, Pal P, Alwell K, Haverbusch M, Flaherty M, et al., Association of ALOX5AP with ischemic stroke: a population-based case-control study. *Hum Genet*, 2007. 121(5): 601-7.
 107. Zee RY, Cheng S, Hegener HH, Erlich HA, Ridker PM, Genetic variants of arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein, and risk of incident myocardial infarction and ischemic stroke: a nested case-control approach. *Stroke*, 2006. 37(8): 2007-11.
 108. Bannenberg G, Moussignac RL, Gronert K, Devchand PR, Schmidt BA, et al., Lipoxins and novel 15-epi-lipoxin analogs display potent anti-inflammatory actions after oral administration. *Br J Pharmacol*, 2004. 143(1): 43-52.
 109. Radmark O, Werz O, Steinhilber D, Samuelsson B, 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. *Trends Biochem Sci*, 2007. 32(7): 332-41.

110. Zheng M, Zhang Z, Zhu W, Liu H, Luo X, et al., Essential structural profile of a dual functional inhibitor against cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX): molecular docking and 3D-QSAR analyses on DHDMBF analogues. *Bioorg Med Chem*, 2006. 14(10): 3428-37.
111. Charlier C, Henichart JP, Durant F, Wouters J, Structural insights into human 5-lipoxygenase inhibition: combined ligand-based and target-based approach. *J Med Chem*, 2006. 49(1): 186-95.
112. Radmark O, Arachidonate 5-lipoxygenase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2002. 68-69: 211-34.
113. Werz O, Steinhilber D, Development of 5-lipoxygenase inhibitors--lessons from cellular enzyme regulation. *Biochem Pharmacol*, 2005. 70(3): 327-33.
114. Werz O, Inhibition of 5-lipoxygenase product synthesis by natural compounds of plant origin. *Planta Med*, 2007. 73(13): 1331-57.
115. Steinhilber D, 5-Lipoxygenase: a target for antiinflammatory drugs revisited. *Curr Med Chem*, 1999. 6(1): 71-85.
116. Crawley GC, Dowell RI, Edwards PN, Foster SJ, McMillan RM, et al., Methoxytetrahydropyrans. A new series of selective and orally potent 5-lipoxygenase inhibitors. *J Med Chem*, 1992. 35(14): 2600-9.
117. Ducharme Y, Brideau C, Dube D, Chan CC, Falgout JP, et al., Naphthalenic lignan lactones as selective, nonredox 5-lipoxygenase inhibitors. Synthesis and biological activity of (methoxyalkyl)thiazole and methoxytetrahydropyran hybrids. *J Med Chem*, 1994. 37(4): 512-8.
118. Mano T, Okumura Y, Sakakibara M, Okumura T, Tamura T, et al., 4-[5-Fluoro-3-[4-(2-methyl-1H-imidazol-1-yl)benzyloxy]phenyl]-3,4,5,6-tetrahydro-2H-pyran-4-carboxamide, an orally active inhibitor of 5-lipoxygenase with improved pharmacokinetic and toxicology characteristics. *J Med Chem*, 2004. 47(3): 720-5.
119. Mano T, Stevens RW, Ando K, Kawai M, Kawamura K, et al., Optimization of imidazole 5-lipoxygenase inhibitors and selection and synthesis of a development candidate. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2005. 53(8): 965-73.

120. Mano T, Stevens RW, Ando K, Nakao K, Okumura Y, et al., Novel imidazole compounds as a new series of potent, orally active inhibitors of 5-lipoxygenase. *Bioorg Med Chem*, 2003. 11(18): 3879-87.
121. Mano T, Stevens RW, Okumura Y, Kawai M, Okumura T, et al., 5-Lipoxygenase inhibitors: convenient synthesis of 4-[3-(4-heterocyclylphenylthio)phenyl]-3,4,5,6-tetrahydro-2H-pyran-4-carboxamide analogues. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005. 15(10): 2611-5.
122. Landwehr J, George S, Karg EM, Poeckel D, Steinhilber D, et al., Design and synthesis of novel 2-amino-5-hydroxyindole derivatives that inhibit human 5-lipoxygenase. *J Med Chem*, 2006. 49(14): 4327-32.
123. Zheng M, Ye D, Deng Y, Qiu S, Luo X, et al., Indole derivatives as potent inhibitors of 5-lipoxygenase: design, synthesis, biological evaluation, and molecular modeling. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007. 17(9): 2414-20.
124. Evans JF, Ferguson AD, Mosley RT, Hutchinson JH, What's all the FLAP about?: 5-lipoxygenase-activating protein inhibitors for inflammatory diseases. *Trends Pharmacol Sci*, 2008. 29(2): 72-8.
125. Ferguson AD, McKeever BM, Xu S, Wisniewski D, Miller DK, et al., Crystal structure of inhibitor-bound human 5-lipoxygenase-activating protein. *Science*, 2007. 317(5837): 510-2.
126. Hakonarson H, Thorvaldsson S, Helgadóttir A, Gudbjartsson D, Zink F, et al., Effects of a 5-lipoxygenase-activating protein inhibitor on biomarkers associated with risk of myocardial infarction: a randomized trial. *Jama*, 2005. 293(18): 2245-56.
127. deCODEgenetics, DG031 and DG051 for the prevention of heart attack (myocardial infarction). [internet] <http://www.decode.com/Pipeline/Index.php> [internet].
128. Amira Pharmaceuticals and GlaxoSmithKline enter global agreement for FLAP inhibitor program [internet], <http://www.amirapharm.com/articles/Amira%20GSK%20Announcement%202-4-08.pdf>. 2008.
129. Macdonald D, Brideau C, Chan CC, Falgueyret JP, Frenette R, et al., Substituted 2,2-bisaryl-bicycloheptanes as novel and potent inhibitors of 5-lipoxygenase activating protein. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008. 18(6): 2023-7.

130. Baetz T, Eisenhauer E, Siu L, MacLean M, Doppler K, et al., A phase I study of oral LY293111 given daily in combination with irinotecan in patients with solid tumours. *Invest New Drugs*, 2007. 25(3): 217-25.
131. Ding XZ, Talamonti MS, Bell RH, Jr.,Adrian TE, A novel anti-pancreatic cancer agent, LY293111. *Anticancer Drugs*, 2005. 16(5): 467-73.
132. Tong WG, Ding XZ, Talamonti MS, Bell RH,Adrian TE, Leukotriene B4 receptor antagonist LY293111 induces S-phase cell cycle arrest and apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Anticancer Drugs*, 2007. 18(5): 535-41.
133. Fiorucci S, Meli R, Bucci M,Cirino G, Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? *Biochem Pharmacol*, 2001. 62(11): 1433-8.
134. Benoxaprofen. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1982. 285(6340): 459-60.
135. Ruiz J, Perez C,Pouplana R, QSAR study of dual cyclooxygenase and 5-lipoxygenase inhibitors 2,6-di-tert-butylphenol derivatives. *Bioorg Med Chem*, 2003. 11(19): 4207-16.
136. Moore GG,Swingle KF, 2,6-Di-tert-butyl-4-(2'-thenoyl)phenol(R-830): a novel nonsteroidal anti-inflammatory agent with antioxidant properties. *Agents Actions*, 1982. 12(5-6): 674-83.
137. Hidaka T, Hosoe K, Ariki Y, Takeo K, Yamashita T, et al., Pharmacological properties of a new anti-inflammatory compound, alpha-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzylidene)-gamma-butyrolactone (KME-4), and its inhibitory effects on prostaglandin synthetase and 5-lipoxygenase. *Jpn J Pharmacol*, 1984. 36(1): 77-85.
138. Hidaka T, Takeo K, Hosoe K, Katsumi I, Yamashita T, et al., Inhibition of polymorphonuclear leukocyte 5-lipoxygenase and platelet cyclooxygenase by alpha-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzylidene)-gamma-butyrolactone (KME-4), a new anti-inflammatory drug. *Jpn J Pharmacol*, 1985. 38(3): 267-72.
139. Hidaka T, Hosoe K, Katsumi I, Yamashita T,Watanabe K, The effect of alpha-(3,5-di-t-butyl-4-hydroxybenzylidene)-gamma-butyrolactone (KME-4), a new anti-inflammatory drug, on leucocyte migration in rat carrageenan pleurisy. *J Pharm Pharmacol*, 1986. 38(3): 244-7.

140. Hidaka T, Hosoe K, Yamashita T, Watanabe K, Hiramatsu Y, et al., Analgesic and anti-inflammatory activities in rats of alpha-(3,5-di-*t*-butyl-4-hydroxybenzylidene)-gamma-butyrolactone (KME-4), and its intestinal damage. *J Pharm Pharmacol*, 1986. 38(10): 748-53.
141. Hidaka T, Hosoe K, Yamashita T, Watanabe K, Effect of alpha-(3,5-di-*t*-butyl-4-hydroxybenzylidene)-gamma-butyrolactone (KME-4), a new anti-inflammatory drug, on the established adjuvant arthritis in rats. *Jpn J Pharmacol*, 1986. 42(2): 181-7.
142. Shirota H, Goto M, Hashida R, Yamatsu I, Katayama K, Inhibitory effects of E-5110 on interleukin-1 generation from human monocytes. *Agents Actions*, 1989. 27(3-4): 322-4.
143. Shirota H, Katayama K, Ono H, Chiba K, Kobayashi S, et al., Pharmacological properties of N-methoxy-3-(3,5-di-*t*-butyl-4-hydroxybenzylidene)-2-pyrrolidone (E-5110), a novel nonsteroidal antiinflammatory agent. *Agents Actions*, 1987. 21(3-4): 250-2.
144. Shirota H, Chiba K, Ono H, Yamamoto H, Kobayashi S, et al., Pharmacological properties of the novel non-steroidal antiinflammatory agent N-methoxy-3-(3,5-di-*t*-butyl-4-hydroxybenzylidene)pyrrolidin-2-one. *Arzneimittelforschung*, 1987. 37(8): 930-6.
145. Shirota H, Kobayashi S, Terato K, Sakuma Y, Yamada K, et al., Effect of the novel non-steroidal antiinflammatory agent N-methoxy-3-(3,5-di-*t*-butyl-4-hydroxybenzylidene)pyrrolidin-2-one on in vitro generation of some inflammatory mediators. *Arzneimittelforschung*, 1987. 37(8): 936-40.
146. Katayama K, Shirota H, Kobayashi S, Terato K, Ikuta H, et al., In vitro effect of N-methoxy-3-(3,5-di-*t*-butyl-4-hydroxybenzylidene)-2-pyrrolidone (E-5110), a novel nonsteroidal antiinflammatory agent, on generation of some inflammatory mediators. *Agents Actions*, 1987. 21(3-4): 269-71.
147. Ikuta H, Shirota H, Kobayashi S, Yamagishi Y, Yamada K, et al., Synthesis and antiinflammatory activities of 3-(3,5-di-*t*-butyl-4-hydroxybenzylidene)pyrrolidin-2-ones. *J Med Chem*, 1987. 30(11): 1995-8.

148. Wong S, Lee SJ, Frierson MR, 3rd, Proch J, Miskowski TA, et al., Antiarthritic profile of BF-389--a novel anti-inflammatory agent with low ulcerogenic liability. *Agents Actions*, 1992. 37(1-2): 90-8.
149. Bendele AM, Benslay, D. N., Hom JT, Spaethe SM, Ruterbories KJ, Lindstrom TD, et al., Anti-inflammatory activity of BF389, a Di-T-butylphenol, in animal models of arthritis. *J Pharmacol Exp Ther*, 1992. 260(1): 300-5.
150. Unangst PC, Shrum GP, Connor DT, Dyer RD, Schrier DJ, Novel 1,2,4-oxadiazoles and 1,2,4-thiadiazoles as dual 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitors. *J Med Chem*, 1992. 35(20): 3691-8.
151. Unangst PC, Connor DT, Cetenko WA, Sorenson RJ, Kostlan CR, et al., Synthesis and biological evaluation of 5-[[3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxyphenyl]methylene]oxazoles, -thiazoles, and -imidazoles: novel dual 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitors with antiinflammatory activity. *J Med Chem*, 1994. 37(2): 322-8.
152. Johnson AR, Marletta MA, Dyer RD, Slow-binding inhibition of human prostaglandin endoperoxide synthase-2 with darbufelone, an isoform-selective antiinflammatory di-tert-butyl phenol. *Biochemistry*, 2001. 40(25): 7736-45.
153. Inagaki M, Tsuru T, Jyoyama H, Ono T, Yamada K, et al., Novel antiarthritic agents with 1,2-isothiazolidine-1,1-dioxide (gamma-sultam) skeleton: cytokine suppressive dual inhibitors of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase. *J Med Chem*, 2000. 43(10): 2040-8.
154. Kato M, Nishida S, Kitasato H, Sakata N, Kawai S, Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: investigation using human peripheral monocytes. *J Pharm Pharmacol*, 2001. 53(12): 1679-85.
155. Inagaki M, Jyoyama H, Ono T, Yamada K, Kobayashi M, et al., Synthesis and activities of oxidative metabolites of the anti-arthritis drug candidate S-2474. *Bioorg Med Chem*, 2003. 11(11): 2415-9.
156. Yagami T, Ueda K, Asakura K, Sakaeda T, Kuroda T, et al., Effects of S-2474, a novel nonsteroidal anti-inflammatory drug, on amyloid beta protein-induced neuronal cell death. *Br J Pharmacol*, 2001. 134(3): 673-81.

157. Yagami T, Ueda K, Hata S, Kuroda T, Itoh N, et al., S-2474, a novel nonsteroidal anti-inflammatory drug, rescues cortical neurons from human group IIA secretory phospholipase A(2)-induced apoptosis. *Neuropharmacology*, 2005. 49(2): 174-84.
158. Weisman SM, Doyle MJ, Wehmeyer KR, Hynd BA, Eichhold TH, et al., Effects of tebufelone (NE-11740), a new anti-inflammatory drug, on arachidonic acid metabolism. *Agents Actions*, 1994. 41(3-4): 156-63.
159. Sietsema WK, Kelm GR, Deibel RM, Doyle MJ, Loomans ME, et al., Absorption, bioavailability, and pharmacokinetics of tebufelone in the rat. *J Pharm Sci*, 1993. 82(6): 610-2.
160. Janusz JM, Young PA, Ridgeway JM, Scherz MW, Enzweiler K, et al., New cyclooxygenase-2/5-lipoxygenase inhibitors. 1. 7-tert-butyl-2,3-dihydro-3,3-dimethylbenzofuran derivatives as gastrointestinal safe antiinflammatory and analgesic agents: discovery and variation of the 5-keto substituent. *J Med Chem*, 1998. 41(7): 1112-23.
161. Janusz JM, Young PA, Scherz MW, Enzweiler K, Wu LI, et al., New cyclooxygenase-2/5-lipoxygenase inhibitors. 2. 7-tert-butyl-2,3-dihydro-3,3-dimethylbenzofuran derivatives as gastrointestinal safe antiinflammatory and analgesic agents: variations of the dihydrobenzofuran ring. *J Med Chem*, 1998. 41(7): 1124-37.
162. Janusz JM, Young PA, Ridgeway JM, Scherz MW, Enzweiler K, et al., New cyclooxygenase-2/5-lipoxygenase inhibitors. 3. 7-tert-butyl-2, 3-dihydro-3,3-dimethylbenzofuran derivatives as gastrointestinal safe antiinflammatory and analgesic agents: variations at the 5 position. *J Med Chem*, 1998. 41(18): 3515-29.
163. Boschelli DH, Connor DT, Bornemeier DA, Dyer RD, Kennedy JA, et al., 1,3,4-Oxadiazole, 1,3,4-thiadiazole, and 1,2,4-triazole analogs of the fenamates: in vitro inhibition of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase activities. *J Med Chem*, 1993. 36(13): 1802-10.
164. Kolasa T, Brooks CD, Rodriques KE, Summers JB, Dellaria JF, et al., Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as scaffolds for the design of 5-lipoxygenase inhibitors. *J Med Chem*, 1997. 40(5): 819-24.
165. Kramer JB, Boschelli DH, Connor DT, Kostlan CR, Flynn DL, et al., Synthesis of reversed hydroxamic acids of indomethacin: dual inhibitors of

- cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1992. 2(12): 1655-60.
166. Sogawa S, Nihro Y, Ueda H, Izumi A, Miki T, et al., 3,4-Dihydroxychalcones as potent 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitors. *J Med Chem*, 1993. 36(24): 3904-9.
 167. Jahng Y, Zhao LX, Moon YS, Basnet A, Kim EK, et al., Simple aromatic compounds containing propenone moiety show considerable dual COX/5-LOX inhibitory activities. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004. 14(10): 2559-62.
 168. Araico A, Terencio MC, Alcaraz MJ, Dominguez JN, Leon C, et al., Phenylsulphonyl urenyl chalcone derivatives as dual inhibitors of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase. *Life Sci*, 2006. 78(25): 2911-8.
 169. Rao PN, Chen QH, Knaus EE, Synthesis and biological evaluation of 1,3-diphenylprop-2-yn-1-ones as dual inhibitors of cyclooxygenases and lipoxygenases. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005. 15(21): 4842-5.
 170. Rao PN, Chen QH, Knaus EE, Synthesis and structure-activity relationship studies of 1,3-diarylprop-2-yn-1-ones: dual inhibitors of cyclooxygenases and lipoxygenases. *J Med Chem*, 2006. 49(5): 1668-83.
 171. Beers SA, Malloy EA, Wu W, Wachter M, Ansell J, et al., N-(5-substituted) thiophene-2-alkylsulfonamides as potent inhibitors of 5-lipoxygenase. *Bioorg Med Chem*, 1997. 5(4): 779-86.
 172. Kirchner T, Argentieri DC, Barbone AG, Singer M, Steber M, et al., Evaluation of the antiinflammatory activity of a dual cyclooxygenase-2 selective/5-lipoxygenase inhibitor, RWJ 63556, in a canine model of inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997. 282(2): 1094-101.
 173. Dannhardt G, Lehr M, Nonsteroidal antiinflammatory agents, XVII: Inhibition of bovine cyclooxygenase and 5-lipoxygenase by N-alkyldiphenyl-pyrrolyl acetic and propionic acid derivatives. *Arch Pharm (Weinheim)*, 1993. 326(3): 157-62.
 174. Hanna N, Marshall PJ, Newton J, Jr., Schwartz L, Kirsh R, et al., Pharmacological profile of SK&F 105809, a dual inhibitor of arachidonic acid metabolism. *Drugs Exp Clin Res*, 1990. 16(4): 137-47.
 175. Marshall PJ, Griswold DE, Breton J, Webb EF, Hillegass LM, et al., Pharmacology of the pyrroloimidazole, SK&F 105809--I. Inhibition of inflammatory cytokine production and of 5-lipoxygenase- and

- cyclooxygenase-mediated metabolism of arachidonic acid. *Biochem Pharmacol*, 1991. 42(4): 813-24.
176. Griswold DE, Marshall PJ, Lee JC, Webb EF, Hillegass LM, et al., Pharmacology of the pyrroloimidazole, SK&F 105809--II. Antiinflammatory activity and inhibition of mediator production in vivo. *Biochem Pharmacol*, 1991. 42(4): 825-31.
 177. Rogers RST, John J.; Sikorski, James A.; Devadas, Balekudru; Graneto, Matthew J.; Carter, Jeffery S.; Norman, Bryan H.; Lu, Hwang-fun; Brown, David L.; Nagarajan, Srinivasan., Substituted sulfonylphenylheterocycles as cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase inhibitors. *PCT Int. Appl. WO 9638442 A1*, 1996.
 178. Talley JJ, Sikorski JA, Graneto MJ, Carter JS, Norman BH, et al., Preparation of heterocyclo substituted hydroxamic acid derivatives as cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase inhibitors. *US2002058810 A1*, 2002.
 179. Argentieri DC, Ritchie DM, Ferro MP, Kirchner T, Wachter MP, et al., Tepoxalin: a dual cyclooxygenase/5-lipoxygenase inhibitor of arachidonic acid metabolism with potent anti-inflammatory activity and a favorable gastrointestinal profile. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994. 271(3): 1399-408.
 180. Kirchner T, Aparicio B, Argentieri DC, Lau CY, Ritchie DM, Effects of tepoxalin, a dual inhibitor of cyclooxygenase/5-lipoxygenase, on events associated with NSAID-induced gastrointestinal inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1997. 56(6): 417-23.
 181. Willburger RE, Wittenberg RH, Kleemeyer KS, Hoos R, Brunner-Ferber FL, et al., Inhibition of eicosanoid release from synovial organ culture by incubation with tepoxalin and its acid metabolite. *Prostaglandins*, 1996. 52(4): 327-38.
 182. Matthews NS, Belz KM, Fosgate GT, Pappas C, Jr., Effect of preoperative administration of tepoxalin on induction dose of injectable anesthetics in dogs. *Vet Ther*, 2007. 8(1): 5-17.
 183. Connolly PJ, Wetter SK, Beers KN, Hamel SC, Chen RH, et al., N-hydroxyurea and hydroxamic acid inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. *Bioorg Med Chem Lett*, 1999. 9(7): 979-84.

184. Horizoe T, Nagakura N, Chiba K, Shirota H, Shinoda M, et al., ER-34122, a novel dual 5-lipoxygenase/cyclooxygenase inhibitor with potent anti-inflammatory activity in an arachidonic acid-induced ear inflammation model. *Inflamm Res*, 1998. 47(10): 375-83.
185. Horizoe T, Nagakura N, Chiba K, Shirota H, Shinoda M, et al., Effects of ER-34122, a novel dual 5-lipoxygenase/cyclooxygenase inhibitor, on indices of early articular lesion in MRL/MpJ-lpr/lpr mice. *Inflamm Res*, 1999. 48(8): 432-6.
186. Barbey S, Goossens L, Taverne T, Cornet J, Choessel V, et al., Synthesis and activity of a new methoxytetrahydropyran derivative as dual cyclooxygenase-2/5-lipoxygenase inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett*, 2002. 12(5): 779-82.
187. Kawano K, Taniguchi M, Pyrazole-4-Alkanoate Derivatives Inhibiting Cyclooxygenase and 5-Lipoxygenase. PCT. Int. Appl., WO2004037793, 2004.
188. Reddy MV, Billa VK, Pallela VR, Mallireddigari MR, Boominathan R, et al., Design, synthesis, and biological evaluation of 1-(4-sulfamylphenyl)-3-trifluoromethyl-5-indolyl pyrazolines as cyclooxygenase-2 (COX-2) and lipoxygenase (LOX) inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 2008(doi:10.1016/j.bmc.2008.01.047).
189. Uddin MJ, Praveen Rao PN, McDonald R, Knaus EE, A new class of acyclic 2-alkyl-1,1,2-triaryl (Z)-olefins as selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *J Med Chem*, 2004. 47(24): 6108-11.
190. Uddin MJ, Rao PN, Knaus EE, Design and synthesis of acyclic triaryl (Z)-olefins: a novel class of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 2004. 12(22): 5929-40.
191. Moreau A, Chen QH, Praveen Rao PN, Knaus EE, Design, synthesis, and biological evaluation of (E)-3-(4-methanesulfonylphenyl)-2-(aryl)acrylic acids as dual inhibitors of cyclooxygenases and lipoxygenases. *Bioorg Med Chem*, 2006. 14(23): 7716-27.
192. Moreau A, Rao PN, Knaus EE, Synthesis and biological evaluation of acyclic triaryl (Z)-olefins possessing a 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl pharmacophore: dual inhibitors of cyclooxygenases and lipoxygenases. *Bioorg Med Chem*, 2006. 14(15): 5340-50.

193. Chen QH, Rao PN, Knaus EE, Synthesis and biological evaluation of a novel class of rofecoxib analogues as dual inhibitors of cyclooxygenases (COXs) and lipoxygenases (LOXs). *Bioorg Med Chem*, 2006. 14(23): 7898-909.
194. Scholz M, Ulbrich HK, Dannhardt G, Investigations concerning the COX/5-LOX inhibiting and hydroxyl radical scavenging potencies of novel 4,5-diaryl isoselenazoles. *Eur J Med Chem*, 2007.
195. Dannhardt G, Lehr M, [Anti-inflammatory 2,3-dihydro-1H-pyrrolizine. 13. Isomeric (diaryl-dihydropyrroliziny)acetic acids and 2-(diaryldihydropyrroliziny)-ethanols]. *Arch Pharm (Weinheim)*, 1988. 321(3): 159-62.
196. Dannhardt G, Lehr M, [Antiphlogistic 2,3-dihydro-1H-pyrrolizines. 14. Isomer arrangement of diaryldihydropyrroliziny-formic and -propionic acids]. *Arch Pharm (Weinheim)*, 1988. 321(9): 545-9.
197. Laufer S, Striegel HG, Neher K, Zechmeister P, Donat C, et al., Synthesis and evaluation of a novel series of pyrrolizine derivatives as dual cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase inhibitors. *Arch Pharm (Weinheim)*, 1997. 330(9-10): 307-12.
198. Laufer S, Tries S, Augustin J, Dannhardt G, Pharmacological profile of a new pyrrolizine derivative inhibiting the enzymes cyclo-oxygenase and 5-lipoxygenase. *Arzneimittelforschung*, 1994. 44(5): 629-36.
199. Laufer SA, Augustin J, Dannhardt G, Kiefer W, (6,7-Diaryldihydropyrrolizin-5-yl)acetic acids, a novel class of potent dual inhibitors of both cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. *J Med Chem*, 1994. 37(12): 1894-7.
200. Ulbrich H, Fiebich B, Dannhardt G, Cyclooxygenase-1/2 (COX-1/COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) inhibitors of the 6,7-diaryl-2,3-1H-dihydropyrrolizine type. *Eur J Med Chem*, 2002. 37(12): 953-9.
201. Ulbrich H, Soehnlein O, Xie X, Eriksson EE, Lindbom L, et al., Licofelone, a novel 5-LOX/COX-inhibitor, attenuates leukocyte rolling and adhesion on endothelium under flow. *Biochem Pharmacol*, 2005. 70(1): 30-6.
202. Rotondo S, Dell'Elba G, Krauze-Brzosko K, Manarini S, Martelli N, et al., Licofelone, a dual lipoxygenase-cyclooxygenase inhibitor, downregulates

- polymorphonuclear leukocyte and platelet function. *Eur J Pharmacol*, 2002. 453(1): 131-9.
203. Rotondo S, Dell'Elba G, Manarini S, Cerletti C, Evangelista V, The lipoxygenase-cyclooxygenase inhibitor licofelone prevents thromboxane A₂-mediated cardiovascular derangement triggered by the inflammatory peptide fMLP in the rabbit. *Eur J Pharmacol*, 2006. 546(1-3): 95-101.
204. Rotondo S, Krauze-Brzosko K, Manarini S, Evangelista V, Cerletti C, Licofelone, an inhibitor of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase, specifically inhibits cyclooxygenase-1-dependent platelet activation. *Eur J Pharmacol*, 2004. 488(1-3): 79-83.
205. Fischer L, Hornig M, Pergola C, Meindl N, Franke L, et al., The molecular mechanism of the inhibition by licofelone of the biosynthesis of 5-lipoxygenase products. *Br J Pharmacol*, 2007. 152(4): 471-80.
206. Wachter MP, Ferro MP, Pharmacologically active 1,5-diaryl-3-substituted-pyrazoles and method for synthesizing the same. EP0248594A2, 1987.
207. Ferro MP, Wachter MP, Arylpyrazoles as Leukotriene Inhibitors. US 5843958, 1998.
208. Isakson PC, Talley JJ, Substituted Pyrazolyl Benzenesulfonamides for Use in Veterinary Therapies as Antiinflammatory Agents. WO9711704, 1997.
209. Marnett LJ, Uddin MJ, Crews BC, Methods and Compositions for Diagnostic and Therapeutic Targeting of COX-2. WO2007149456A2, 2007.
210. Abdel-magid AF, Harris BD, Maryanoff CA, Process for preparing 1,5-diaryl-3-substituted pyrazoles. US 6384233B1, 2002.
211. Druery J, Meier K, Eichenberger K, Chemotherapeutic studies in the heterocyclic series. IV. Pyridazines. 1. Cyclic maleic and citraconic hydrazides. *Helvetica Chimica Acta*, 1954. 37: 121-33.
212. Futaki N, Takahashi S, Yokoyama M, Arai I, Higuchi S, et al., NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity in vitro. *Prostaglandins*, 1994. 47(1): 55-9.
213. Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV, Shipley ME, Smith MJ, Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance

- released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature*, 1980. 286(5770): 264-5.
214. Friesner RA, Murphy RB, Repasky MP, Frye LL, Greenwood JR, et al., Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J Med Chem*, 2006. 49(21): 6177-96.
 215. Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R, Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol*, 1997. 267(3): 727-48.
 216. Murray W, Wachter MP, Synthesis and Properties of Aryl-1,3-dioxo Carboxylic Acids. *J. Org. Chem.*, 1990. 55(10): 3424-26.
 217. Murray W, Wachter MP, Regioselective Synthesis of 1,5-Disubstituted Pyrazoles. EP0293221A2, 1988.
 218. Murray W, Wachter M, Barton D, Forero-Kelly Y, The Regioselective Synthesis of Tepoxalin, 3-[5-(4-Chlorophenyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-pyrazolyl]-N-hydroxy-N-propanamide and Related 1,5-Diarylpyrazole Anti-inflammatory Agents. *Synthesis*, 1991. 1: 18-20.
 219. Banoglu E, Akoglu C, Unlu S, Kupeli E, Yesilada E, et al., Amide derivatives of [6-(5-methyl-3-phenylpyrazole-1-yl)-3(2H)-pyridazinone-2-yl]acetic acids as potential analgesic and anti-inflammatory compounds. *Arch Pharm (Weinheim)*, 2004. 337(1): 7-14.
 220. Singh SK, Reddy MS, Shivaramakrishna S, Kavitha D, Vasudev R, et al., Modified reaction conditions to achieve high regioselectivity in the two component synthesis of 1,5-diarylpyrazoles. *Tetrahedron Lett.*, 2004. 45: 7679-82.
 221. Maes B, Lemiere G, Dommissie R, Haemers A, A revision of The Alcoholysis and Alkanethiolysis of 3-Amino-6-chloropyridazine. *J. Heterocyclic Chem.*, 2001. 38: 1215-18.
 222. Lee J, Park H, Yun YS, Kwon SK, An Efficient Synthesis of 3-Alkoxy-6-allylthiopyridazines. *J. Korean Chemical Society*, 2001. 45(4): 386-90.
 223. Turck A, Ple N, Pollet P, Queguiner G, Metalation of t-Butyl Sulfoxides, Sulfones and Sulfonamides of Pyridazine and Pyrazine, Metalation of Diazines. XX. *J. Heterocyclic Chem.*, 1998. 35: 429-36.

224. Matrai E, Infrared Spectroscopic Studies on Polarity and Tautomerism of 3(2H)-pyridazinone derivatives. *Journal of Molecular Structure*, 1997. 408/409: 467-72.
225. Katrusiak A, Katrusiak A, Polymorph-specific chlorination of maleic hydrazide. *Journal of Molecular Structure*, 2003. 647: 203-10.
226. Li J, Lynch MP, Demello KL, Sakya SM, Cheng H, et al., In vitro and in vivo profile of 2-(3-di-fluoromethyl-5-phenylpyrazol-1-yl)-5-methanesulfonylpyridine, a potent, selective, and orally active canine COX-2 inhibitor. *Bioorg Med Chem*, 2005. 13(5): 1805-9.
227. Cho IH, Park HJ, Noh JY, Ryu HC, Park SW, et al., 1,2,4-Triazole Derivative, Method for Preparing the Same and Pharmaceutical Composition Containing the Same. WO2004014878, 2004.
228. Blobaum AL, Marnett LJ, Molecular determinants for the selective inhibition of cyclooxygenase-2 by lumiracoxib. *J Biol Chem*, 2007. 282(22): 16379-90.
229. Verdonk ML, Cole JC, Hartshorn MJ, Murray CW, Taylor RD, Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins*, 2003. 52(4): 609-23.
230. Enyedy IJ, Egan WJ, Can we use docking and scoring for hit-to-lead optimization? *J Comput Aided Mol Des*, 2008. 22(3-4): 161-8.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı:	Burcu ÇALIŞKAN ERGÜN
Doğum Yeri ve Tarihi:	Ankara, 1979
Eğitim:	<i>Yüksek Lisans</i> Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı (2004) <i>Lisans</i> Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2001)
İş tecrübesi:	Araştırma görevlisi (Aralık 2002- devam ediyor) Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı
Yabancı dili :	İngilizce