

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAZI TOPOİZOMERAZ I İNHİBİTÖRLERİ ÜZERİNDE MOLEKÜLER  
MODELLEME ÇALIŞMALARI**

Sanaz ATAEL

Danışman Öğretim Üyesi  
Prof. Dr. İlkay YILDIZ

2010-ANKARA

# **Bazı Topoizomeraz I İnhibitörleri Üzerinde Moleküler Modelleme Çalışmaları**

## **ÖZET**

Ökaryotik topoizomeraz I inhibitörleri olarak etki gösteren bir seri benzoksazin türevi bileşikler üzerinde HypoGen ve HipHop teknikleri kullanılarak farmakofor analiz çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

HypoGen methodu ile uygulanan farmakofor analizinde 38 bileşik kullanılmıştır. Bu yöntem 16 bileşiklik bir çalışma (training) serisi kullanılarak oluşturulmuştur. Oluşturulan farmakofor modelleri 22 bileşikten oluşan test serisi üzerinden değerlendirilmiştir.

Buna ek olarak gerçekleştirilen HipHop methodu ile, 6 adet Topoizomeraz I inhibitörü bileşikten oluşan bir set üzerinden, üç boyutlu farmakofor hipotezleri oluşturulmuştur. Oluşturulan farmakofor modelleri 25 bileşiğin yer aldığı bir test serisi üzerinden haritalanmıştır.

Yapılan çalışmalar sonucunda, topoizomeraz I enzim inhibitörü olabilecek yeni önder bileşiklerin yapıları belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Benzoksazin, Farmakofor analizi, HipHop, HypoGen, Topoizomeraz I

## **Study On Molecular Modeling Of Some Topoisomerase I Inhibitors**

### **ABSTRACT**

Pharmacophore analysis of a series of benzoxazine derivatives having eucaryotic topoisomerase I inhibitory activity were performed via HypoGen and HipHop methods.

At the pharmacophore analysis using HypoGen method 38 compounds were studied. This method performed by a training set including 16 compounds. Pharmacophore models created were evaluated using a test set composed of 22 compounds.

Additionally, three dimensional pharmacophore hypotheses were built by working on six topoisomerase I inhibitors using HipHop method. The formed pharmacophores models were mapped on a test set of 25 compounds.

As a result of studies, the structures of new leading topoisomerase I enzyme inhibitors were determined.

**Key words:** Benzoxazine, Pharmacophore Analysis, HipHop, HypoGen, Topoisomerase I

## ÖNSÖZ

Organizmanın yapısı ve ilaç molekülünün organizmadaki yolculuğunun karmaşıklığı göz önüne alındığında ve pek çok hastalığın nedenleri tam olarak açıklanmaması, ayrıca emek, zaman, yatırım maliyetlerinin çok fazla olması gibi nedenlerle rasyonel biçimde ilaç tasarlama zorunluluğu doğmuştur. Yeni bir teknoloji olan Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı (CADD), mevcut ilaçlara ve hastalıklara ait birikmiş bilgileri diğer sahalardaki disiplinlerarası verilerle kombine halde kullanarak ilaç geliştirme sürecini hızlandırmaktadır. Böylelikle; yeni terapötik etkili bileşiklerin tasarımı, sentez öncesi yeni biyo-aktif moleküllerin etkisinin tahmin edilebilmesi mümkün olabilmektedir.

Türkiye'ye gelmeden önce bugünleri rüyamda bile görseydim inanmazdım. Benim elimden tutup buralara getiren, bilgilerini benden esirgemiyen, kendisinin ve çalışma grubunun sevgi dolu çemberine alan, bilimsel olarak günümüzün en ileri çalışmalarında beni kabul edip yer veren ve benimde bu tecrübeleri yaşamama izin veren, kelimelere dökemediğim dünyalar tatlısı, sevgili, saygılı Prof. Dr. İlkey YILDIZ hocama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bulutun arkasındaki güneş gibi her zaman sıcaklıklarını hissettiğim, çalışmalarımızın her zaman arkasında olup destekleyen hocalarım Sayın Prof. Dr. Esin Akı ve Prof. Dr. İsmail Yalçın'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Benim olmazsa olmazım, tezimin sabır taşı, programlarımın dahisi, yardımlarını unutamayacağım ve karşılığını veremeyeceğim, eşi bulunmayan arkadaşım, sevgili, değerli, sevimli ve şefkatli Uzm. Ecz. Serap Yılmaz'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın sırasında bana her zaman destek ve yardımlarını gördüğüm Uzm. Ecz. Tuğba Ertan Bolelli ve Uzm. Ecz. Kayhan Bolelli'ye teşekkürlerimi sunarım.

X-ışınları kristalografisi çalışmaların yapılmasında yardımcı olan On Dokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Fizik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Orhan Büyükgüngör'e ve araştırma görevlisi Ersin Temel'e teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman ilgi ve desteklerini gördüğüm Farmasötik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi hocalarıma, araştırma görevlisi ve öğrenci arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimi boyunca her zaman bana yol gösteren, büyük emeğe sahip olan, varlığıyla bana güç veren, her zaman yanımda olduğunu bildiğim hayat arkadaşım sevgili ve sevimli eşime sonsuz saygımı ve teşekkürlerimi sunarım. İyi ki varsın Amir.

Uzakda bile olsam her zaman yanımda yüreğimde hissettiğim, beni var eden ve günlere gelmeme sebep olan, en güzel ve kıymetli varlıklarım olan annem ve babam'a ve canım kardeşlerim Sadena, Afshin ve Amir 'e sonsuz teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	ii
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ .....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	viii
SİMGELER DİZİNİ .....	ix
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER.....</b>	<b>4</b>
2.1. İlaç Tasarımında Rasyonel Yaklaşımlar .....	4
2.2. Rasyonel İlaç Etken Madde Tasarımında Moleküler Modelleme Teknikleri .....	6
2.2.1. Ligant Yapısına Dayalı Tasarım .....	16
2.2.1.1. Üç Boyutlu Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri Analizleri (3D-QSAR).....	16
2.2.1.1.1. Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) .....	17
2.2.1.1.2. Comparative Molecular Similarity Indices Analysis (CoMSIA).....	19
2.2.1.2. Farmakofor Analizi .....	20
2.2.1.2.1. HipHop Yöntemi .....	27
2.2.1.2.2. HypoGen Yöntemi .....	28
2.3. Topoizomeraz Enzimleri.....	31
2.3.1. I. Tip Topoizomerazlar .....	32
2.3.2. II. Tip Topoizomerazlar .....	33
2.3.3. Topoizomeraz I Hedefli Kemoterapi .....	34
2.3.3.1. Topoizomeraz I Hedefli İlaçlar ve Bu İlaçlara Karşı Dirençlilik .....	34
2.3.3.1.1. Kamptotesin (CPT) .....	34
2.3.3.1.2. Topotekan ve İrinotekan .....	36
2.3.4. Apoptozis ve Topoizomeraz I - Hedefli İlaç Hasarının Onarımı.....	38
2.4. Benzoksazin ve Türevlerinin Biyolojik Aktiviteleri.....	39
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>42</b>
3.1. Farmakofor Analizi Çalışması .....	42
3.1.1. HypoGen Çalışması .....	42
3.1.2. HipHop Çalışması .....	46
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>49</b>
4.1. HypoGen Metodu İle Farmakofor Modellemesi Çalışması.....	49
4.2. HipHop Metodu İle Farmakofor Modellemesi Çalışması .....	62
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>77</b>
5.1. ÖNERİLER.....	81
KAYNAKLAR .....	86
ÖZGEÇMİŞ.....	96

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Rasyonel ilaç etken madde tasarım yöntemleri .....	5
Şekil 2.2. Kamptotesin .....	35
Şekil 2.3. Topotekan .....	37
Şekil 2.4. İrinotekan .....	37
Şekil 2.5. DIBOA .....	39
Şekil 2.6. DIMBOA .....	39
Şekil 2.7. DIM2BOA .....	39
Şekil 2.8. Ofloksazin .....	40
Şekil 2.9. Kappamensin .....	40
Şekil 2.10. A-62176 .....	41
Şekil 3.1. S3 bileşiğine ait kristalografi sonucu .....	43
Şekil 4.1. Birinci hipotezin korelasyon grafiği .....	51
Şekil 4.2. HypoGen farmakofor modellemesi için uygun bulunan hipotez .....	51
Şekil 4.3. S1 kodlu bileşiğin hipotez ile haritalanması .....	52
Şekil 4.4. Çalışma serisindeki tüm moleküllerin hipotez ile haritalanması .....	53
Şekil 4.5. Kamptotesin bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	55
Şekil 4.6. Topotekan bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	55
Şekil 4.7. İrinotekan bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	56
Şekil 4.8. Luotonin A bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	56
Şekil 4.9. Rosettacin bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	56
Şekil 4.10. Hyroxyacuminatine bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	57
Şekil 4.11. T01 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	57
Şekil 4.12. T02 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	57
Şekil 4.13. T03 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	58
Şekil 4.14. T04 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	58
Şekil 4.15. T05 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	58
Şekil 4.16. T06 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	59
Şekil 4.17. T07 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	59
Şekil 4.18. T08 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	59
Şekil 4.19. T09 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	60
Şekil 4.20. T10 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	60
Şekil 4.21. T11 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	60
Şekil 4.22. T12 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	61
Şekil 4.23. T13 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	61
Şekil 4.24. T14 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	61
Şekil 4.25. T15 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	62
Şekil 4.26. T16 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	62
Şekil 4.27. HipHop farmakofor modellemesi için uygun bulunan hipotez .....	64
Şekil 4.28. Çalışma serisindeki moleküllerin tek tek hipotez ile haritalanması .....	65
Şekil 4.29. Çalışma setindeki tüm moleküllerin hipotez ile haritalanması .....	66
Şekil 4.30. S1 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	68
Şekil 4.31. S2 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	68

Şekil 4.32. S3 bileşiğinin hipotez ile haritalanması.....	68
Şekil 4.33. S5 bileşiğinin hipotez ile haritalanması.....	69
Şekil 4.34. S13 bileşiğinin hipotez ile haritalanması.....	69
Şekil 4.35. S14 bileşiğinin hipotez ile haritalanması.....	69
Şekil 4.36. S15 bileşiğinin hipotez ile haritalanması.....	70
Şekil 4.37. S16 bileşiğinin hipotez ile haritalanması.....	70
Şekil 4.38. S17 bileşiğinin hipotez ile haritalanması.....	70
Şekil 4.39. S18 bileşiğinin hipotez ile haritalanması.....	71
Şekil 4.40. T01 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	71
Şekil 4.41. T02 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	71
Şekil 4.42. T03 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	72
Şekil 4.43. T04 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	72
Şekil 4.44. T05 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	72
Şekil 4.45. T06 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	73
Şekil 4.46. T07 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	73
Şekil 4.47. T08 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	73
Şekil 4.48. T09 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	74
Şekil 4.49. T10 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	74
Şekil 4.50. T11 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	74
Şekil 4.51. T12 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	75
Şekil 4.52. T13 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	75
Şekil 4.53. T14 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	75
Şekil 4.54. T15 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	76
Şekil 4.55. T16 bileşiğinin hipotez ile haritalanması .....	76
Şekil 5.1. TS1 bileşiğinin HypoGen hipotezi ile haritalanması.....	82
Şekil 5.2. TS2 bileşiğinin HypoGen hipotezi ile haritalanması.....	83
Şekil 5.3. TS3 bileşiğinin HypoGen hipotezi ile haritalanması.....	83
Şekil 5.4. TS4 bileşiğinin HypoGen hipotezi ile haritalanması.....	83
Şekil 5.5. TS1 bileşiğinin HipHop hipotezi ile haritalanması .....	84
Şekil 5.6. TS2 bileşiğinin HipHop hipotezi ile haritalanması .....	84
Şekil 5.7. TS3 bileşiğinin HipHop hipotezi ile haritalanması .....	84
Şekil 5.8. TS4 bileşiğinin HipHop hipotezi ile haritalanması .....	85

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. HipHop ve HypoGen yöntemleri arasındaki farklar .....	30
Çizelge 3.1. HypoGen analizinde kullanılan çalışma serisi .....	42
Çizelge 3.2. HypoGen analizinde kullanılan test serisi .....	44
Çizelge 3.3. HipHop analizinde kullanılan çalışma serisi .....	46
Çizelge 3.4. HipHop analizinde kullanılan test serisi .....	47
Çizelge 4.1. HypoGen farmakofor modellemesi için kullanılan çalışma serisi ve biyolojik aktivite değerleri .....	49
Çizelge 4.2. HypoGen farmakofor hipotezlerinin istatistiksel sonuçları.....	50
Çizelge 4.3. Çalışma serisindeki bileşiklerin tahmini biyolojik aktivite sonuçları .....	53
Çizelge 4.4. HypoGen analizinde kullanılan test serisi .....	54
Çizelge 4.5. HipHop farmakofor modellemesi için kullanılan çalışma serisi .....	63
Çizelge 4.6. Konformasyon analizi sonuçları .....	63
Çizelge 4.7. HipHop farmakofor hipotezlerinin sonuçları .....	64
Çizelge 4.8. Çalışma serisinin hipotezle uyum sonuçları .....	66
Çizelge 4.9. HipHop analizinde kullanılan test serisi .....	67
Çizelge 5.1. Çalışmalar sonucunda tasarlanan bileşikler.....	82



## SİMGELER DİZİNİ

2D	İki Boyutlu
3D	Üç Boyutlu
ADME	Absorbsiyon, Dağılım, Metabolizma, Eliminasyon
ATP	Adenozin trifosfat
CADD	Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı
CNPD	Çin Doğal Ürünler Veri Bankası
CoMFA	Karşılaştırmalı Moleküler Alan Analizleri Yöntemi
CoMSIA	Karşılaştırmalı Moleküler Benzerlik İndisleri Analizleri Yöntemi
COX	Siklooksijenaz
CPK	Corey-Pauling-Koltun modeli
CPT	Kamptotesin
DISCO	DIStance COmprasions
DNA	Deoksiribonükleik asit
GASP	Genetik Algorithm Benzerlik Programı
GPCR	G-proteinine bağlı reseptör
GSK-3	Glikojen Sentetaz Kinaz-3
Gyr	Giraz
HBA	Hidrojen bağ akseptörü
HBD	Hidrojen bağ verici
HDAC	Histon deasetilazlar
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virusü
HpAr	Hidrofobik Aromatik
Hyd	Hidrofobik
IC <sub>50</sub>	İnhibitör konsantrasyonu
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
KDR	Kinaz içeren dopamin reseptörü
MAP	Mitogenle aktive olan protein
MLP	Moleküler Lipofilite Potansiyeli
mRNA	Mesajcı Ribonükleik asit
Nf-kB	Nükleer Faktör Kappa B
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
OA	Oktopamin
PLK-1	Polo benzeri kinaz I
PLS	Kısmi En Küçük Kareler Yöntemi
QSAR	Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri
RA	Aromatik halkası
RMS	Karesel Ortalama Değer
RNA	Ribonükleik asit
UV	Mor Ötesi
WDI	Dünya İlaç Dizini

# 1. GİRİŞ

Farmasötik Biyoteknoloji, yaşayan sistemlere ait bilginin, bu sistemleri veya bileşenlerini endüstriyel amaçlar için kullanmaya yönelik bir uygulamasıdır. ‘Biyoteknoloji’ kelimesi ilk kez Macar zirai ekonomist Kark Ereky tarafından 1919 yılında, ‘canlı organizmalar yardımıyla her türlü ürün üretim işi’ anlamında kullanılmıştır. Bu tanım daha sonra biraz daha genişletilerek ürün oluşturulmasında yeni teknolojilerin odaklanılmasını hedeflemiştir. Bugün için biyoteknoloji, yaşayan sistemlere ait bilgilerin uygulamaya dönük kullanımları için bilim ve teknolojinin pragmatik kombinasyonu olarak tanımlanmaktadır (Bains ve ark., 1998).

Farmasötik Biyoteknoloji kapsamında proteomiks çalışmaları yakın zamanda önemli bir alanı oluşturmuştur. Hücredeki fonksiyonel moleküllerden olan proteinler ilaç aksiyonu için majör hedeflerdir. Proteomiks, protein yapısındaki hedeflerin ve hastalık sürecindeki biyokimyasal yolların tanımlanmasında büyük umutlar vaatmektedir. Proteomiks, çok basamaklı ilaç geliştirme işleminde giderek önemi artan bir rol oynamaktadır. Bu işlem hedef tanımlanmasını, validasyonunu, önder bileşik seçimini, küçük moleküllerle tarama ve optimizasyonu ve de toksisite testlerini kapsamaktadır. Bunun ötesinde, bilgisayarlı proteomiks, kimyasal proteomiks, yapısal proteomiks ve topolojik proteomiks gibi alt disiplinler, özellikle bilgisayar destekli ilaç tasarımına belirgin katkılar sunmaktadır. Akılcı ilaç tasarımında, ilk olarak patogeneizde hangi proteinlerin ilaç hedefi olabileceğinin bulunması esastır (Wang ve ark., 2005).

Biyoteknoloji kapsamında biyoinformatik, biyolojik bilginin bilgisayar kullanılarak değerlendirilmesidir (Bioinformatics.org, 2005). Biyoinformatik, bilgi edinilmesi, veritabanı geliştirimi, entegrasyon ve bağlantıların sağlanması, ve analiz olmak üzere dört ana iş bölümünü kapsar (Bains ve ark., 1998).

Kemoinformatik ise, ilaç tasarımı ve geliştirilmesini yönlendirmek için kullanılan kimyasal sentez, biyolojik tarama ve veri araştırma-toplama yaklaşımlarının bir kombinasyonudur (ColorBasePair.com, 2005).

Kemoinformatik terimi ilk kez 1998 yılında, 'bir bilim adamının, temel olarak bir liganttan ilaç molekülüne geçilebilmesi sürecinde özelliklerinin optimize edilmesi için gereksinim duyacağı tüm bilgi ve veri kaynaklarının bir kombinasyonu' anlamında Brown tarafından kullanılmıştır (Brown, 1998). Kemoinformatik başlığı altında toplanan ve bilgisayar teknolojisinin kullanıldığı metotlar aşağıda sıralanmıştır (ColorBasePair.com, 2005):

- Kimyasal verilerin toplanması, analizi ve işlenmesi;
- Veri temsili ve iletişim;
- Veritabanı tasarımı ve organizasyonu;
- Kimyasal yapı ve özelliklerin tahmini;
- Moleküler benzerlik ve çeşitlilik analizi;
- Bileşik veya kütüphane tasarımı ve optimizasyon;
- Veritabanı tasarımı ve sanal tarama;
- Bileşik sınıflandırma ve seçimi;
- Kalitatif ve kantitatif yapı-etki veya yapı-özellik ilişkileri;
- Kimyasal problemlere uygulanan bilgi teorisi;
- Kimyasal tanımlayıcıların istatistiksel modelleri;
- In vivo bileşik karakteristiklerinin tahmini;

Ölümcül hastalıklar içinde kalp hastalıklarından sonra ikinci sırada gelen ve son yıllarda üzerinde en çok araştırma yapılan hastalıklardan biri olan kanser; belirli genlerde oluşan mutasyonlar sonucu gen ifadesinin miktarında veya zamanlamasında meydana gelen değişikliklerle ortaya çıkan hücresel seviyedeki genetik bir bozukluktur. Kanserli hücreler, kontrolsüz bir şekilde bölünerek oluştukları bölgelerden başka bir bölgeye göç ederek bu bölgelerde ikincil tümörleri oluştururlar. Çalışmalar bir taraftan kanserin moleküler biyolojisi üzerinde yoğunlaşırken, diğer taraftan da cerrahi ve radyoterapi gibi uygulamaların yanı sıra kemoterapotik ilaçlarla yapılan tedavi etkili olmaya ve gün geçtikçe bu konudaki araştırmalar hız kazanmaya başlamıştır. Kanser oluşum mekanizmaları moleküler düzeyde aydınlatılmaya çalışılarak, hücre döngüsünün farklı evrelerinde müdahale şansları denenmektedir.

Bu ilaçların en önemli etki şekillerinden biri de kanser hücrelerinde nükleik asit sentezinin inhibe edilmesidir. Bu nedenle pek çok kemoterapötik ilaç, DNA-ilaç kompleksleri meydana getirerek DNA'ya bağımlı RNA polimerazı inhibe ederler (Meyers ve ark., 1976). Tümör hücrelerinde DNA metabolizmasında yer alan enzimlerin sentez hızının yüksek olması nedeniyle antitümör ilaç tasarımında DNA metabolizması ile ilgili enzimler hedef moleküller olarak seçilmektedir.

Topoizomerazlar, hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda DNA replikasyonu, transkripsiyonu, rekombinasyon, kromozom yoğunlaşması ve ayrılması gibi işlemlerde mutlak gerekli olan enzimlerdir. Topoizomerazlar hücrelerdeki bu hayati önemlerinin dışında antimikrobiyal ve antikanser ilaçlar için primer sitotoksik olmaları bakımından da çok önemlidir. Son yıllardaki farmakolojik çalışmalar, genellikle DNA küçük olugundaki özgül dizilere bağlanarak antitümör aktivite gösteren ilaçların, DNA topoizomeraz enzimlerini inhibe ederek de etkili olduğunu göstermiştir. Hücre çoğalmasında gerekli olan topoizomeraz enzimlerinin bu ilaçlar tarafından inhibisyonu, kontrolsüz ve hızlı bir şekilde bölünen kanser hücrelerinin çoğalmasını durdurabileceği düşünülmektedir (Pindur ve Lemster, 1998). Giderek artan çeşitlilikteki topoizomeraz inhibitörleri, antitümör aktiviteye sahip ilaçların tasarımı için yeni bir kaynak oluşturmuştur (Potmesil ve Kohn, 1991; Ralph ve ark., 1994; Osheroff, 2003). Topoizomeraz inhibitör etkisinin araştırılması, yeni ilaç geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntem haline gelmiştir (Pınar, 2005).

Bu çalışmanın amacı, bazı 2H-3,4-dihidro-1,4-benzoksazin-3-on türevlerinin kemoterapötik etkiden sorumlu enzimlerden DNA-topoizomeraz I üzerinde inhibitör aktivitelerinin Moleküler Modelleme teknikleri ile Farmakofor analizleri uygulanarak özgün ilaç etken madde tasarım çalışmalarının oluşturulması ve günümüz bilgisayar teknolojilerinden faydalanılarak DNA topoizomeraz I enzimi inhibitörü ilaç etken maddelerinin rasyonel olarak tasarlanmasına ışık tutmaktadır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

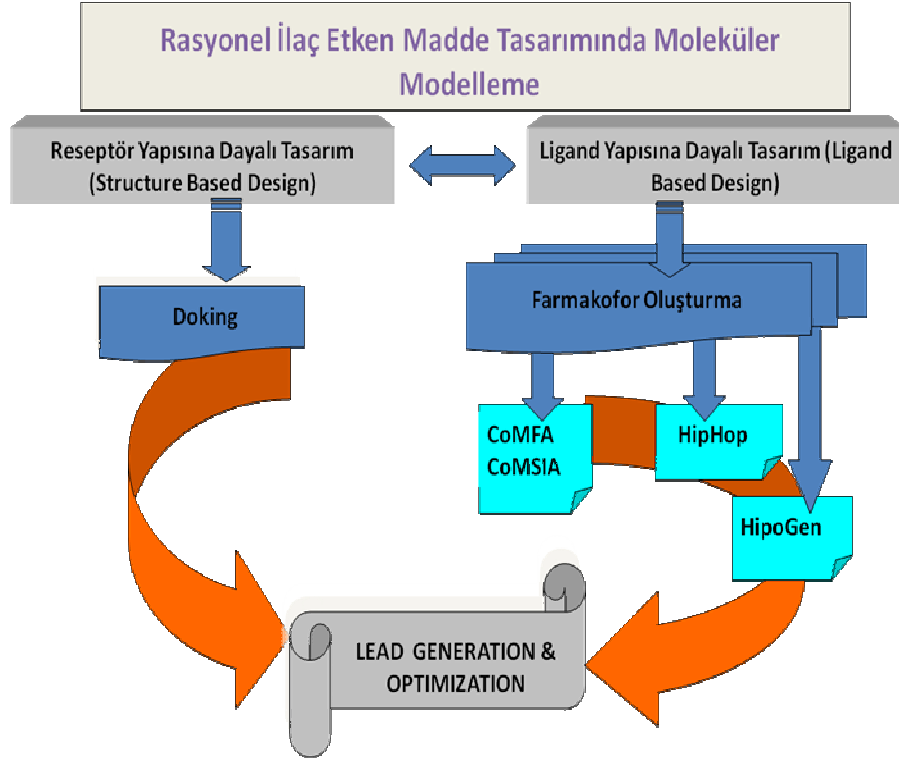
### 2.1. İLAÇ TASARIMINDA RASYONEL YAKLAŞIMLAR

Günümüzde, özgün bir ilacın araştırılması ve geliştirilmesi çalışmalar sırasında harcanan emeği, zamanı ve yatırım maliyetlerini en aza indirgeyebilmek amacıyla bir çok yeni teknik geliştirilmiş durumdadır. Geliştirilen bu teknikler, araştırma harcamalarını daha ekonomik düzeyde tutabilecek yeni yaklaşımların ortaya konulmasına çalışmaktadır. Yeni ilaç etken madde Araştırma-Geliştirme çalışmalarından verimli sonuçlar elde edebilmek için öncelikle gerçekçi ve uygulanabilir hedeflere yönelmek gerekmektedir (Akı-Şener ve Yalçın, 2003).

Gelişmiş ilaç sanayinin en önemli beklenti ve hedefi, yeni etken madde içeren orijinal ilaçlar üretebilmektir (Yalçın ve Şener, 1996). Yürütülen araştırmalar sonucunda yeni ilaç etken maddesi olmaya aday özgün bir kimyasal bileşik ortaya çıktığında, klinik çalışmaların başlatılmasına ancak söz konusu ilaç etken maddesinin etkisi ve emniyeti hakkında yeterli bilgi sağlandığında izin verilmektedir (Akı-Şener ve Yalçın, 2003). Yeni bir teknoloji olan Bilgisayar Detekli İlaç Tasarımı (CADD), mevcut ilaçlara ve hastalıklara ait birikmiş bilgileri diğer sahalardaki disiplinlerarası girdilerle kombine halde kullanarak ilaç geliştirme sürecini hızlandırmaktadır (Carlson ve McCammon, 2000; Street ve Mayo, 1999; Veselovsky ve Ivanov, 2003).

Rasyonel ilaç tasarımı yaklaşımı, ilaç hedefinin moleküler yapısını modelleyerek bu yapıya en uygun ilacı geliştirmeyi amaçlamaktadır. Rasyonel ilaç tasarımında, ilaç hedeflerinin, genellikle de proteinlerin kimyasal yapılarının bilinmesi ya da bulunması şarttır. Roche firmasının bir HIV proteaz inhibitörü olan ilacı Saquinavir, 1996'da onay almış ve tamamen rasyonel ilaç tasarım teknikleri ile 'tasarlanmış' başarılı örneklerden birisidir (Bains, 1998). Temel olarak, ilaç keşif çalışmaları klinik denemeler öncesi 'pre-klinik' basamaklar içerir. Bu basamaklar hedef seçimi, önder bileşik tanımlanması, ve klinik aday bileşik seçimidir (Wang ve ark., 2005).

İlaç tasarımındaki rasyonel yaklaşımlar, ligant yapısına dayalı tasarım ve hedef yapısına dayalı tasarım olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Şekil 2.1). Ligant yapısına dayalı tasarımda etki gösteren moleküllerin yapısından faydalanılarak reseptör yapısının yorumlanması amaçlanmaktadır. Hedef yapısına dayalı tasarımda ise bilinen reseptör yapısından hareketle etki gösterebilecek moleküllerin tasarlanması amaçlanmaktadır.



Şekil 2.1. Rasyonel ilaç etken madde tasarım yöntemleri

Yirminci yüzyılın ikinci yarısından itibaren araştırmacılar, yeni ilaç etken maddesi bileşiklere ulaşabilmek amacıyla kimyasal bileşiklerin moleküler yapıları ile biyolojik etkileri arasındaki ilişkileri tanımlama çalışmalarına yoğunlaşmışlardır. Bu yeni teknikler, yeni ilaç etken maddesi niteliğindeki kimyasal bileşiklerin geliştirilmesi, daha ideal etkili bileşiklere ulaşılması, etki mekanizmalarının tanımlanabilmesi etkinliklerinin yürütülmesinde giderek önemli rol kazanmışlardır (Akı-Şener ve Yalçın, 2003).

### ***Farmasötik Endüstride Mevcut CADD Uygulamalar:***

Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı (CADD), sadece potent bileşiklerin tasarımına değil, 'konseptten kliniğe' giden yoldaki basamakların çoğuna katkı sağlayabilmektedir. Söz

konusu 'keşif süreci' nde yer alan bazı araştırma alanları geleneksel olarak daha çok geliştirilmiştir ve/veya bilgisayar desteğine diğerlerine nazaran daha iyi adapte edilmiştir. Bu işlemler için ciddi bilgisayar desteği gereksinimini artıran çok sayıda yaklaşım mevcuttur. İnterdisipliner bir ilaç keşif ekibi içerisinde sonuçların paylaşılması gerekliliğine ek olarak, tedavinin evde ve hastanede devam etmesi nedeniyle yüklü miktarda veriler bulunmaktadır ve bu veriler kolaylıkla idare edilmektedir. Bu dev veritabanlarını değişik şekillerde analiz edebilmek için, yapı-etki modellerini ortaya çıkartmak için ve yeni önder bileşikler keşfedebilmek için metotlar geliştirilmelidir.

Araştırma grupları arasında artan bir rekabet söz konusudur. Yeni bir araştırma keşfi başararak bunu yeni bir aktif önder bileşiğe çevirebilecek kadar hızlı hareket eden bir araştırma grubu, çok büyük olasılıkla da yeni alanda ilk terapötik ajanı geliştirerek anahtar patentlere sahip olacak olan gruptur. Efektif olarak kullanılan bilgisayar metotları uzman bir ilaç keşif ekibine büyük bir kompetitif avantaj sağlayabilmektedir (Cohen, 1996).

## **2.2. RASYONEL İLAÇ ETKEN MADDE TASARIMINDA MOLEKÜLER MODELLEME TEKNİKLERİ**

Modern moleküler modelleme metotları, geçtiğimiz yüzyılın başlarında nükleer fizikte moleküler yapıların ilk başarılı temsillerinin ortaya çıkmasıyla birlikte önemli bir gelişme göstermiştir (Höltje ve Folkers, 1997).

### ***Moleküler Modellemenin Tarihçesi:***

Hueckel, Mullican ve diğerleri moleküllerin delokalize 'moleküler orbitaller' deki elektron kümeleriyle çevrelenmiş çekirdeklrden oluşmuş olabileceklerini varsayılmışlardır. Bunu takiben Pauling, Roberts, Streitwieser, Pople, Dewar ve diğer araştırmacıların ayrıntılı çalışmaları moleküler yapıların ve özelliklerinin hesaplanması için yeni nesil moleküler orbital programlarına öncülük etmiştir (Cohen, 1996).

Westheimer, Hendrickson, Wiberg, Boyd ve daha birçokları, bağımsız olarak, kızıl ötesi spektral absorbanların açıklanması amacıyla titreşen moleküllerin teorileri üzerine

kurarak, yapıların, konformasyonların, etkileşim enerjilerinin, moleküler dinamiğin ve diğer özelliklerin hesaplanması için mevcut 'klasik mekanik' programları geliştirmişlerdir (Cohen, 1996).

Modern bilimsel bilgisayarlılık ve ticari bilimsel yazılım şirketlerinin 1970'lerin sonuna doğru ortaya çıkışıyla hızlı bir ilerleme yaşanmıştır. Günümüzde moleküler modellemeci şaşırtıcı düzeyde donanım ve yazılım seti seçenekleriyle yüz yüzedir (Cohen, 1996).

Kristalografi, moleküler modellemenin gelişiminde belirgin bir basamaktır. Kristal yapıların karmaşıklığına dair bilgilerin artışı, kağıt üzerindeki iki boyutlu temsillerde bile yoğun hesaplamalar gerektirmiştir. O dönemlerde, moleküler kitlerin kullanımı, kristal yapıların 3D görünümünün eldesi için mümkün olan tek yöntem olmuştur. Dreiding Modelleri, o zamanların yapısal kimya bilgilerinin tamamını içerdiğinden yoğun ilgi görmüştür. Prefabrik modüler elementler, örneğin hibridizasyon durumlarına ve aromatik özelliklere göre doğru bağ sayısına ve açılara sahip farklı azot atomlarıyla, kristal yapıların bire bir 3D modellerinin oluşturulmasına ve dolayısıyla moleküler modellemeye olanak sağlamıştır. Ebatlar doğrusal olarak Angström boyutundan oranlanmıştır. Sübstitüentlerin sterik engelleri, hidrojen bağı etkileşimleri, vb. özellikleri modellerle oldukça iyi bir şekilde temsil edilmiştir. Benzer kalitede bir modelleme, her ne kadar daha az tutarlı olsa da, ancak hacim dolum (space filling), Stuart-Briegleb veya CPK modelleri tarafından sağlanabilmiştir.

Watson ve Crick, baz eşleşmesini ve dolayısıyla DNA çifte sarmallarının ana hatlarını bu tür moleküler kitler yardımıyla açıklamışlardır (Höltje ve Folkers, 1997).

Moleküler modelleme bir bilgisayar bilimi varsayımı değildir. İşlemlerin gelişmesine paralel olarak bilgisayar teknolojisi de sinerjik bir gelişme göstermiştir ve tüm bunların sonucunda günümüzde binlerce atom içeren protein molekülleriyle kolaylıkla başa çıkılabilmektedir (Höltje ve Folkers, 1997).



Bir molekülün ilk yalancı-3D temsili, 1970 yılında, renkli ve rotasyon yapabilen bir biçimde sanal Dreiding modelleri yaratılarak ancak bilgisayar ekranlarında mümkün olabilmıştır (Höltje ve Folkers, 1997).

Bilgisayar teknolojisi olmadan, protein gibi kompleks yapılardan doğan veri yığını ile insan gücünün başa çıkması olanaksızdır (proteinlerin ölçümleri, bilgisayar teknolojisi olmadan X-ışınları kırınımı veya nükleer manyetik rezonans gibi metotlarla gerçekleştirilemezdi. (Höltje ve Folkers, 1997).

O yıllarda ortaya çıkartılan Monte Carlo Simülasyonu, gaz partiküllerinin fiziksel durumlarının tahmini için uygulanmaktaydı. O zamanlarda, moleküler sistemler üzerine mekanik analogilerin ilk uygulamaları geliştirilmiş; güç alanları kavramı ortaya atılmış, optimize edilmiş ve zamanla inanılmaz bir yeterliliğe kavuşmuştur (Höltje ve Folkers, 1997).

Günümüzde matematiksel teknikler hidrojen atomundan daha büyük sistemlerin kuantum kimyalarına ait hesaplamalarına ve ligand-enzim aktif bölge bağlanış simülasyonlarına olanak sağlamıştır (Höltje ve Folkers, 1997).

Yeni terapötik ajanların tasarımında medisinal kimyacılar için emsalsiz fırsatlar yaratan Moleküler Modelleme, farmasötik araştırmalarda etkinliğini ispatlamış bir disiplin haline gelmiştir. Bilgisayar donanımındaki, yazılımındaki ve teorik medisinal kimyadaki gelişmeler çoğu akademik ve endüstri laboratuvarlarının kapsamındaki bilgisayar çalışmalarına ve grafik araçlara yüksek performans sağlamış, ve böylelikle de rasyonel ilaç tasarımında yararlı yaklaşımların gelişmesine zemin hazırlamıştır (Cohen, 1996).

İlaç tasarımında günümüzde göz önünde bulundurulmuş reseptörlerin varlığı ve anahtar-kilit kavramları P. Erlich (1909) ve E. Fischer (1894) tarafından formüle edilmiştir. Yaşamsal işlemlerde rol alan mekanizmaların detaylarından bazılarını anlamak 1970 'lerde mümkün olmuştur. Protein hedeflerinin saf örnekleri izole edilerek X-ışınları kristalografisi ile de moleküler yapıları günışığına çıkartmıştır.

Üç boyutlu (3D) yapıların yaşamsal işlemlerini nasıl kusursuzca kontrol ettiklerinin öğrenilmesi böylelikle mümkün olabilmektedir. Böylesi bir aşamayı daha ileriye götürebilmek amacıyla farmasötik endüstride ilaç keşfine yönelik akılcı bir yaklaşım ortaya konulmuştur ve bu yaklaşım, moleküler modellemenin tam bir disiplin olarak hızla gelişimine katkıda bulunmuştur. Bu alan, 1980 'lerden bu yana daha da ivme kazanarak moleküler biyolojide ve deneysel/teorik yapısal kimyada ve de bilgisayar teknolojilerinde olağüstü gelişmelere neden olmuştur. Bu gelişmelerin her biri, moleküler modellemenin temelinde önemli bir yere sahiptir. Söz konusu disiplin artık tamamen tanınmış ve araştırma işlemlerine entegre olmuştur (Cohen, 1996).

Moleküler modellemenin amacı, bir molekülün kimyasal ve fiziksel özellikleri arasındaki temel ilişkiyi, kimyasal yapısını ve almış olduğu üç boyutlu (3D) yapıyı anlamaktır. Bu anlayış, bu özelliklerin moleküllerin kimyasal, katalitik veya biyolojik fonksiyonlarıyla ilişkilendirilmesi ve en önemlisi değişen fonksiyona ait moleküllerin rasyonel olarak tasarlanmasına olanak sağlamaktadır. Kimyasal yapı ve fonksiyon arasındaki bu bağlantı, moleküler biyoloji, protein bilimi, ilaç tasarımı, kimyasal kataliz veya materyal ve polimer bilimi gibi birçok bilimsel çaba için hayati önem taşımaktadır (Cohen, 1996).

#### ***Grafik ve Modelleme için Donanım ve Yazılım Gereksinimi:***

Sınırları kesin ayrılmamakla beraber, modelleme çalışmalarında kullanılan üç belirgin bilgisayar sınıfı tanımlanmaktadır:

- Merkezi bölümsel hesap ve dosya sunucuları,
- Yüksek performanslı grafik iş istasyonları,
- Kişisel iş istasyonları.

Moleküler modellemede yazılım gereksinimi kullanıcı arayüzleri ve başlangıç modelinin oluşturulmasında (1 D, 2D veya 3D), oluşturulan modeline refine edilmesi, manipule edilmesi, vektör grafiklerle görselleştirimde ortaya çıkmaktadır.

Modelleme çalışmaları, deneysel bir sistemi veya sonuçlarını anlamak; planlanan bir deneyden türetilecek olan bilginin optimizasyonunu sağlamak; veya bilimsel bir probleme teorik veya yapısal bilginin uygulanması amacıyla yürütülmektedir.

Moleküller inanılmaz derecede küçüktürler, ancak bilim adamları yıllarca moleküler kiralite, halka konformasyonu ve sterik gerginlik gibi yararlı kavramları anlamak için çeşitli mekanik modeller kullanılmışlardır. Molekül kitleri bilgisayar modelleri gibi gerçek yapı hakkında fikir vericidir, ancak bunun ötesinde bilgisayar modelleri çakıştırma, enerji hesaplaması ve titreşimler gibi mekanik modellerle zor veya imkansız olan manipulasyonlara da izin vermektedir.

Bilgisayar modelleme programları, birçok bilim adamının elde hesap yapmakta yetersiz kalacağı sistematik ve yorucu çalışmaların yürütülmesinde de yararlıdır. Ancak, modelin etkisinde kalmanın bir bilim adamının tarafsızlığına gölge düşürmesine neden olabileceği durumu neredeyse her zaman doğrudur. Modeller test edilmek ve kullanılmak içindir, ancak modellere tam olarak güvenilmemelidir (Cohen, 1996).

### ***Moleküler Modellemenin Kullanım Alanları:***

Moleküler modellemenin birçok olası metotları ve uygulamaları mevcuttur. Yapı oluşturma, yapının görüntülenmesi, konformasyon oluşturulması, biyoaktif konformasyonların türevlendirilmesi, moleküler süperpozisyon ve çakıştırma, farmakoforik kalıpların türevlendirilmesi, reseptör haritalandırma, biyolojik aktivitelerin tahmini, moleküler etkileşimler; docking, moleküler özelliklerin hesaplanması, enerji hesapları gibi alanlarda moleküler modellemeden faydalanılmaktadır.

### ***Moleküler Modellemede Temel Kavramlar:***

#### **Reseptör ve Ligant tasarımında Moleküler Tanımlanma:**

Reseptörler, ligatlarını moleküler iskeletler, atom pozisyonları veya bunlar arasındaki bağlantılar olarak değil, ligantın reseptörle olan bağlı veya bağlı olmayan durumları

arasındaki serbest enerji farklılığı olarak algılamaktadırlar. Hedef reseptöre spesifik bağlanmada en önemli faktörler arasında, moleküler şekildeki 3D uyumluluk ve ilaç ile reseptörün ilaç bağlama yöresi arasındaki submoleküler özellikler ön plandadır. Bu, üç boyutlu gereksinimleri yerine getiren moleküllerin reseptörün spesifik ligantı olabileceği anlamına gelmektedir.

### **Aktif Konformasyon:**

Mevcut ilaçların veya ligantların aktif konformasyonlarına ait bilgiler, yeni ilaç moleküllerinin rasyonel tasarımı için yol göstericidir. 3D reseptör yapısı bilinmese bile, tek bir aktif molekülün aktif konformasyonu biliniyorsa veya rijit yapıda tek bir aktif molekül mevcutsa, bilinen ligantların yapıları temel alınarak tasarım çalışması gerçekleştirilir.

Reseptör yapısının bilindiği ve bilinmediği durumlarda 3D yapı-etki ilişkilerini yorumlamak ve yeni aktif yapılar tasarlamak için farklı yaklaşımlar geçerlidir:

### ***Üç Boyutlu Veritabanı Tarama Yaklaşımları:***

Yeni bir önder bileşik, her zaman yeni bir bileşik anlamına gelmemektedir. Dünyada varlığı bilinen birkaç milyon bileşiğin birçoğu bilinmeyen biyolojik aktiviteler gösterebilmektedir. Genel olarak, söz konusu herhangi bir bileşik için mevcut olan deney sistemleriyle sadece birkaç biyolojik aktivite veya fonksiyon test edilmiş durumdadır. Bu nedenle neredeyse bütün bilinen bileşiklerin hemen hemen tüm biyolojik aktiviteleri araştırılmamış haldedir denilebilir. Çeşitli tarama programları, reseptör yöresinde ligant olabilecek bileşikleri bulma adına, bilinen biyoaktif bileşiklerle yapısal yakınlığı olan molekülleri tanımlama özelliğine sahiptir. 3D tarama programlarının çoğunluğu halen ligantların özelliklerine odaklanmış durumdadır. Reseptör yapısı biliniyorsa, molekülleri reseptörle uyumluluk açısından taramak daha rasyonel bir yaklaşımdır.

### ***Otomatikleştirilmiş Yapı Oluşturum Metotları:***

Veritabanı yaklaşımları, çok sayıda toplanmış bileşikleri en iyi şekilde kullanarak yeni önderler bulmak amacıyla oldukça yararlı yaklaşımlar olarak göze çarpmaktadır. Eldeki veya ticari olarak sunulan bileşikler seçildiyse, aktiviteleri de kimyasal senteze gerek kalmaksızın tayin edilebilmektedir. Bileşikler elde edilmiyorsa bile, bileşiklerin sentez basamaklarına veya fiziksel özelliklerine ilişkin önemli bilgiler literatürde yer alabilmektedir. Otomatikleştirilmiş yapı oluşturma metotları, reseptörün bilinen 3D yapısıyla ve bilinmeyen reseptör yapısıyla oluşturma olmak üzere iki sınıftır.

Yapı oluşturma metotlarında molekül içi validasyon ve stabilite, aktif konformasyonun stabilitesi, moleküllerarası stabilite, yapıların seçimi gibi hususlar gözönünde bulundurulmalıdır.

### ***Deneyisel Teknikler ve Veri Bankaları:***

#### **X-Işınlari Kristaligrafisi:**

Biyolojik makromoleküllerin üç boyutlu (3D) yapılarına ait bilgilerin temeli X-Işınlari kristalografik incelemelerinden gelmektedir. Klasik X-ışınları kristalografisinin ardından makromoleküler X-ışınları kristalografisi yöntemi geliştirilmiştir.

#### **Nükleer Manyetik Rezonans (NMR):**

1950 'lerin sonlarından 1980 'lerin ortalarına kadar, X-ışınları kristalografisi bir biyolojik makromolekülün tam 3-D yapısının tayini için tek metot olmuştur. 1980 'lerin ortalarından itibaren, NMR spektroskopisine dayanan teknikler biyolojik makromoleküllerin 3D yapılarının tam olarak aydınlatılmasına atomik detaylarına varana kadar imkan sağlamıştır. NMR, molekülleri kristal halde incelemek yerine çözültide inceler. Bundan dolayı, X-ışınları kristalografisi de kristal yapılar daha statik bir görüntü verirken, NMR yapıların dinamiklerini incelediği için bu iki metot birbirini çok iyi bir şekilde tamamlamaktadır.

Moleküler yapıların modellenmesinde deneysel olarak elde edilen veriler temel oluşturmaktadır. Özellikle de makromoleküllerde deneysel veriler daha da önemli olmaktadır.

X-ışınları kristalografisi ile, makromolekülü oluşturan bloklar, amino asitler ve nükleozitlerin kantiteleri, bağ uzunlukları, bağ açıları, grup planaritesi ve kiralitesine ait hatasız ölçümler alınmaktadır. Proteinlerin alfa heliks ve beta tabakları 1950'lerin ve 1960'ların sonlarında henüz sonuçlar alınmadan tahmin edilmiştir. DNA 'nın çifte sarmal yapısı da, fiber difraksiyon verileri yardımıyla 3D ve deneysel olarak ortaya konulmadan yorumlanmıştır. Makromoleküllerin diğer makromoleküller veya küçük moleküllerle etkileşimleriyle ilgili yorumlamalar da deneysel kanıtlara ulaşılmadan gerçekleştirilmiştir. (Cohen, 1996).

#### **Deneysel Yapıların Protein Modellemesindeki Kullanımları:**

Deneysel yapılardan elde edilen en temel veriler, kimyasal yapıların genel prensipleridir. Küçük molekül kristalografisinden, atomik bağ uzunlukları ve açıları, temas uzaklıkları ve konformasyonel tercihler için kesin değerler saptanmıştır. Bir makromoleküler yapının en net özelliklerinden birisi modellemeciye üzerinde modelleme yapabileceği bir iskelet vermesidir.

#### **Kimyasal bir Veritabanının Bileşenleri:**

Kimyasal veritabanları moleküler ve atomik verilerle birlikte kodlanmış kimyasal yapılar içeren veritabanlarıdır. En genel anlamda, bir veritabanı (veya veritabanı sistemi) üç bileşenden oluşmaktadır; taranabilir formda veri, genel bir tarama makinesi, verinin türüne uygun bir sorgulama dili.

#### ***CADD-Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı***

#### **İlaç Geliştirme İşlemi**

Bir hastalığın tedavisine yönelik kanıtlanmış bir etkinliğe sahip yeni bir kimyasal bileşiğin keşif ve geliştirilmesi yoğun çabalar gerektiren uzun vadeli bir işlemdir.

Endüstriyel istatistikler, tıbbi kullanım için onayı bulunan her bir ilaç için 10,000'e yakın bileşiğin sentezlenerek test edildiğine; bu bileşiklerden sadece 100 kadarının emniyet açısından değerlendirmeye alındığına; ve bunların içerisinde sadece 10 kadarının klinik olarak insanlarda test edilebildiğine işaret etmektedir.

Bir ilacın piyasaya çıkış onayı, başarının garantisi anlamına gelmemektedir. Piyasadaki çoğu ilaç, pratikte yeterli etkinliğe sahip olamadıkları için, veya geniş ölçekli deneyimler sonucunda istenmeyen yan etkileri ortaya çıktığı için keşif ve geliştirilmeleri için harcanmış olan yüksek maliyeti karşılayamamaktadır. Ancak, çok başarılı bir ilaç üretici firmaya ve hissedarlarına çok büyük bir kazanç getirebilmektedir.

İlaç keşif ve geliştirme işlemi üç faza ayrılabilir:

- 1) Yeni önder keşif ve önder bileşiğin optimizasyonu;
- 2) Preklinik ve klinik yönelik önder geliştirilmesi;
- 3) Piyasaya sürülüş sonrası takip.

Bu basamaklar arasında kesin sınırlar bulunmamaktadır. İleriki basamaklarda problemler yaşanması ihtimaline karşı son basamak hariç çalışmalar tipik olarak birden fazla önder bileşik üzerinde yürütülmektedir.

### **İlaç Tasarım Ekipleri**

Rasyonel ilaç tasarımı ve geliştirimi için çalışan ekiplerin kuvvetli bir karakteristiği, onların yetki ve disiplinler açısından genellikle geniş bir spektrum göstermeleridir. Bunun nedeni, aday ilaçların kimyasal ve biyolojik olarak birçok yönden araştırmalar, optimize edilmeleri ve belgelenmeleri gerekliliğidir. Üretken araştırma ekiplerinde eğitim ve teknik dil farklılıkları gibi sorunları kolayca çözülebilmekte, ancak ekip içerisinde etkileşim ve kooperasyonun sağlıklı bir şekilde sürdürülmesi yoğun çabalar gerektirmektedir. Bilgisayar metodları bu etkileşim ve kooperasyona yardımcı olabilmekte ve ekip üretkenliğini yükseltebilmektedir.

## *İlaç-Reseptör Etkileşimlerinin Modellenmesi*

### **Makromoleküler Hedefler:**

İlaçların potansiyel hedefleri organizmayı veya patojen oluşturan moleküler bileşenler kadar fazladır. Bu etki yöreleri; proteinler, nükleik asitler, lipitler ve sakkaritleri içermektedir. Bilinen en yaygın hedefler enzimler, membran-bağlı reseptörler, iyon kanalları, antikor, ve yapısal proteindir. Bir başka yaygın ilaç etkileşim yöresi de nükleer ve mitokondriyal DNA ve mRNA 'nın da dahil olduğu nükleik asitlerdir. Bununla birlikte en yaygın çalışmalarda hedef alınan proteinlerdir.

Proteinlerin katlanmasına neden olan güçlerin göz önünde tutulması, ilaçların proteinlere bağlanmasından hangi güçlerin sorumlu olduğuna dair bir fikir verebilmektedir, çünkü bu iki işlem birçok ortak karakteristik taşımaktadır.

Mevcut bilgilere dayalı olarak, ilaç tasarımında iki belirgin modelleme stratejisi kullanılabilir. İlaç reseptör hedefinin net bir yapısı mevcut değilse, ve de reseptöre bağlanan birden çok kompetitif ligant biliniyorsa, reseptörün yapısı kendisine bağlanan yapılarla dayalı olarak çıkartılabilir. Bu stratejiye reseptör haritalama adı verilmektedir. Öte yandan, net 3D yapı, kristalografi ve NMR çalışmalarından veya homoloji modellemesinden elde edilebilir, veya reseptör yerleştirimi (fitting) kullanılabilir.

### **Sulu ve Susuz Solvan Modelleri:**

Su, biyolojik olayların çoğunu ve ilaçların kendi makromoleküler hedeflerine bağlanmalarını ileri düzeyde etkilemektedir. Sulu ortam, ilaçların ve reseptörlerin konformasyonel tercihlerinin saptanmasında ve de bağlanma partnerleri arasında gözlenen kuvvetlerin modülasyonunda temel bir rol oynamaktadır. Solvan etkilerini hesaba katmak, protein konformasyonları ve dinamiklerinin yorumunda temel oluşturmaktadır.



## **2.2.1. LİGANT YAPISINA DAYALI TASARIM**

### **2.2.1.1. ÜÇ BOYUTLU KANTİTATİF YAPI-ETKİ İLİŞKİLERİ ANALİZLERİ (3D-QSAR)**

Bir moleküler modelleme çalışmasına başlarken yapılması gereken ilk iş, bir kartezyen koordinat seti ile atomların uzaydaki bağlı pozisyonların tanımlayarak molekülün bilgisayarda bir modelinin oluşturulmasıdır. Makul ve güvenilir bir başlangıç geometrisi, bundan sonra yürütülecek temel araştırmaların kalitesini belirler. 3D moleküler yapıları oluşturmak için temel metotlar şunlardır (Höltje ve Folkers,1997):

#### **X-Işını Kristalografik Veritabanlarının Kullanımı:**

Küçük moleküllerle çalışırken kristalografik bilgiler için en önemli veritabanı Cambridge Kristalografik Veritabanı 'dır. Bu veritabanı 500 atoma kadar olan organik ve inorganik bileşiklerin deneysel olarak belirlenmiş atomik koordinatlarını içermektedir ve devamlı olarak güncellenmektedir. Cambridge Kristalografik Veri Merkezi, veritabanının ve hatta veritabanının taramak ve sonuçları analiz etmek için hazırlanmış olan yazılımı kiralamaktadır (leasing). Veritabanı tasarımının çıktısı ilgilenilen molekülün 3D yapısal bilgilerini içeren, basit, okunabilir bir dosyadır. Bu veri dosyası mevcut ticari moleküler modelleme paket programlarının çoğunluğu tarafından açılabilir. Dosya, moleküler modelleme programı tarafından açıldığında, veritabanında listelenmiş olan atomik koordinatlar otomatik olarak kartezyen koordinatlara dönüştürülmektedir. Bunu takiben, yapı, moleküler grafik olarak görüntülenebilmekte ve üç boyutlu yapısıyla çalışılabilir.

#### **Standart Geometrilerle Fragman Kütüphanelerinden Derleme:**

İkinci en yaygın yapı oluşturma yöntemi ise mevcut fragman kütüphanelerinden alınan moleküllerin kullanılmasına dayanmaktadır. Bu metot, kristalografik veritabanlarına ulaşamadığı veya istenilen yapılar için X-ışınları verileri bulunmadığı hallerde tercih edilmektedir. Günümüzde nerdeyse tüm ticari moleküler modelleme programları fragman kütüphaneleri kullanarak molekül oluşturma seçeneğini de sunmaktadır. Fragman kütüphaneleri kolay kullanıma sahip elektronik bir 3D yapısal araç seti gibi

kullanılmaktadır. Fragman havuzundaki önceden optimize edilmiş standart geometriler sayesinde ortaya çıkartılan 3D yapılar kabul edilebilir bir geometriye sahip olmaktadır.

#### **‘Skeç’ Yaklaşımıyla 2D yapıların Basit Çizimi:**

Bu yaklaşımda bilgisayar ekranında fare imleciyle istenilen molekülün 2D formülü çizilir. Bazen kütüphanede yer alan sınırlı sayıdaki küçük moleküler standart fragmanlar bu amaçla başlangıç noktası olarak kullanabilmektedir. Çizim işlemi bitirilirken ekrandaki 2D görüntü 3D bilgilere çevrilmektedir. Bu işlem nedeniyle doğru atom tiplerinin seçimlerine özellikle dikkat etmek gerekmektedir. Skeç yaklaşımı çok basit bir metot olduğundan, elde edilen geometriler genel olarak çok tatmin edici değildir. Bu nedenle moleküler geometriyi rahatlatmak için kabaca bir geometri optimizasyonu her bir basit işlemi sonunda otomatik olarak yapılmaktadır.

#### **2.2.1.1.1. Karşılaştırmalı Moleküler Alan Analizleri Yöntemi (Comparative Molecular Field Analysis) (CoMFA)**

CoMFA yöntemi, 1988 yılında ortaya çıkışından bu yana 3D-QSAR çalışmaları içerisinde en kuvvetli araçlardan birisi olmuştur. CoMFA yöntemi temelde, gözlenen biyolojik özelliklerin, bir set ligant molekülünü çevreleyen non-kovalan alanların uygun sterik (Lennard-Jones) ve elektrostatik (Coulomb) örneklemeyle anlaşılabilmesi ve korele edilebileceği varsayımına dayanmaktadır (Zhao ve ark., 2005).

Benzer etki mekanizmasına sahip biyolojik etki gösteren bir seri moleküle uygulanmakta olan CoMFA yöntemi, 1988 yılında Cramer ve ark. tarafından geliştirilmiştir. CoMFA'nın avantajları, moleküllerin biyolojik etkilerini tahmin edebilmesi ve de sterik/elektrostatik özelliklerle biyolojik etkiler arasındaki ilişkileri kontür haritaları halinde temsil edebilmesidir. CoMFA kontür haritalarının kalitatif bilgileri sadece ligant-reseptör etkileşimleri hakkında değil, aynı zamanda reseptör topolojisi hakkında da önemli özellikleri ortaya koymaktadır. CoMFA'nın kapsamının genişletildiği Gelişmiş CoMFA'da H-bağı ve indikatör alanlar da kullanılarak kompleks QSAR analizleri kolayca yapılabilmektedir. CoMFA'dan farklı olarak CoMSIA, korelasyon için daha iyi sonuçlar üretmektedir. CoMFA ve CoMSIA metotları, yapılan çalışmalarda toksisite mekanizmalarına da açıklık getirmektedir. CoMFA Lennard-Jones ve Coulomb

potansiyellerine göre sterik ve elektrostatik özellikleri hesaplarken, CoMSIA yöntemi ligant bağlanmasından sorumlu majör katkıları ele almak için beş farklı özelliği (sterik, elektrostatik, hidrofobik, ve hidrojen bağı donörü veya akseptörü) göz önünde bulundurmaktadır. CoMFA'dan farklı olarak, CoMSIA'da, CoMFA'nın orijinal versiyonunda kullanılan Lennard-Jones ve Coulomb potansiyellerinin fonksiyonel formlarından kaynaklanan hatalar söz konusu değildir. CoMSIA kontür haritalarına yorum getirmek, varyansın farklı alan tiplerine bölümlendirilmesine izin verildiği için daha kolaydır (Xu ve ark., 2002).

CoMFA yöntemi, üç boyutlu QSAR çalışmalarında yaygın kullanıma sahip bir metottur. Sübstitüent parametrelerine dayalı olan geleneksel Hansch analizinden farklı olarak, CoMFA, bir seri molekülün biyolojik aktivitesini molekül etrafında geniş bir 3-D hacim tanımlayarak sterik ve elektrostatik alanlarıyla ilişkilendirmektedir. CoMFA sütunları (deskriptörleri), her bir molekül için uygun bir prob kullanılarak (genellikle yükü +1 olan bir sp<sup>3</sup> karbon atomu) ayrı ayrı her bir ızgara noktasında hesaplanan sterik (Lennard-Jones) ve elektrostatik (Coulomb) potansiyellerden oluşmaktadır.

CoMFA, sadece standart sterik ve elektrostatik moleküler alanlara dayalı olduğu için, reseptör-ligant etkileşimlerini modellemek için tüm bağlanma kuvvetlerini uygun olarak temsil edemeyebilmektedir. CoMFA, ligant-reseptör etkileşmelerinin sadece entalpi bileşenini temsil etmektedir. Ek bir alan olarak sunulan yeni moleküler lipofilisite potansiyelinin (MLP), CoMFA'nın tahmin gücünü belirgin bir şekilde artırdığı saptanmıştır. MLP, sterik ve elektrostatik alanlarla yeterli olarak tanımlanamayan hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimleri kodlamaktadır ve ayrıca bir entropi bileşeni içermektedir (Barreca ve ark. 1999).

Boeckler ve ark., Dopamin D<sub>3</sub> reseptör agonist serisinin uzantısı olan 3-sübstitüe 7-aminotetrahidroindolizinler üzerinde yaptıkları çalışmalarda CoMFA ve CoMSIA analizlerinde yeni geliştirilen ve çakıştırma seçimini kontrol eden bir program uygulaması (IRAS) kullanmışlardır. CoMFA/CoMSIA katkı haritalarından faydalanarak D<sub>3</sub> reseptörünün daha önceden oluşturulmuş homoloji modelini inaktif durumdan aktif duruma dönüştürmüşlerdir. Bu çalışmanın neticesinde, tamamen ligant yapısına dayalı metotlar olarak CoMFA ve CoMSIA'nın yapıya dayalı homoloji modellemesiyle olan

kombinasyonunun QSAR verilerinin yorumlanabilirliğini ve aktive edilmiş GPCR bağlanma yöresi modellerinin oluşumuna olan katkısını arttırdığı sonucuna varılmıştır. (Boeckler ve ark., 2005)

Genel olarak, CoMFA uygulamalarında, modellerin istatistiksel tahmin yeteneği ve araştırılan ilaç-ligant etkileşiminin fizikokimyasal açıdan yorumlanabilirliği önemli iki husustur. Yapılan çalışmada şans korelasyonlarının olasılığını minimuma indirmek için 3D korelasyonları etkileyecek olan CoMFA parametreleri de incelenmiştir. Standart CoMFA sterik ve elektrostatik alanlarıyla paralel olarak, altta yatan en iyi aktivite ilişkilerini bulabilmek amacıyla hidrofobik alanlar da incelemeye alınmıştır. En iyi korelasyonlar, hidrofobisitenin araştırılan çoklu ilaç dirençliliğini dönüştürücü aktivitedeki rolünü gösteren bu alanlarla bulunmuştur. Modellerle gelen grafiksel sonuçların analizi, yaygın olarak tanımlanan kritik alanlara (polisiklik halka sistemi ve N-süstitüe kısım) paralel olarak hidrofobisitenin moleküler profilinin bu ilaçların aktiviteleri için yapısal açıdan spesifik belirleyiciliğini ortaya çıkartmıştır. CoMFA modellerinde lipofilik alanların kullanıldığı araştırmaların sayısı az olmakla beraber, hidrofobisitenin şimdiye kadar gerçekten tam olarak anlaşamadığı düşünüldüğünden çoğu durumda bu alanların yorumlanması nispeten zor olmaktadır. İlaç-membran etkileşimlerinin çoklu ilaç dirençliliğinin geri dönüşümünde aracılık ettikleri varsayıldığı bu özel durumda hidrofobisitenin temel bir rol oynadığı düşünülmektedir (Pajeva ve Wiese, 1998).

#### **2.2.1.1.2. Karşılaştırmalı Moleküler Benzerlik İndisleri Analizleri Yöntemi (Comparative Molecular Similarity Indices Analysis) (CoMSIA)**

Gerhard Klebe ve araştırma grubu tarafından 1994 yılında geliştirilmiş olan CoMSIA yöntemi, ortak bir hizaya (alignment) getirilmiş olan ilaç moleküllerinin benzerlik indislerine dayalı olarak özellik alanlarının hesaplarının hesaplanması için alternatif bir yaklaşımdır. Farklı fizikokimyasal özelliklerin alanları Gaussian-tipi uzaklık bağılılığına göre kullandığından atomik pozisyonlarda sorun yaşanmamaktadır. Bu nedenle, cutoff limitlerinin keyfi tanımlamalarıyla ve alanın farklı eğimlerinden kaynaklanan eksikliklerle de karşılaşılmamaktadır. Alanlar CoMFA formalizmine benzer bir PLS analizi ile değerlendirilmektedir.

Klebe ve grubunun çalışmasında, kortikosteroid bağlayan globuline bağlanan ve termolizin inhibitörü olan iki steroid veri seti, geleneksel CoMFA yöntemi (Lennard-Jones ve Coulomb potansiyel alanları) ile ve de Karşılaştırmalı Moleküler Benzerlik İndisleri Analizi (CoMFA) yöntemi ile analiz edilmiştir. Karşılaştırmalı istatistiksel önem modelleri elde edilmiş ve farklı modeller için alan katkı haritaları üretilmiştir. CoMFA alanlarındaki kesişimler nedeniyle ve de moleküler yüzeye yakın potansiyellerin dikliği nedeniyle, CoMFA haritaları parçalı ve ayırık bağlanmıştır. Bu durum, yorum yapılmasını zorlaştırmaktadır. CoMSIA yaklaşımıyla elde edilen haritaların yorumlanması ise daha kolaydır. CoMFA haritaları, bölgeleri, varsayılan bir çevre ile etkileşimlerin beklendiği moleküllerden ayrı olarak gösterirken, CoMSIA haritaları aktivite için önemli bir fizikokimyasal özellik gerektiren ligant iskeletlerinin bulunduğu alandaki bölgeleri işaret etmektedir. Yapılan çalışmada özellikle yeni bileşiklerin tasarımı söz konusu olduğunda önemli olan özelliklerin izlenmesinde CoMSIA yönteminin yol göstericiliğinin daha yüksek olduğu saptanmıştır (Klebe ve ark., 1994).

CoMSIA yöntemi, CoMFA yönteminde kullanılan sterik (S) ve elektrostatik (E) alanlara ek olarak hidrofobik (H) ve hidrojen bağı donörü (D) ve akseptörü (A) tanımlayıcılarını da net bir şekilde gösterir. Xu ve ark., yaptıkları bir çalışmada, CoMFA ve CoMSIA metotlarının tahmin güçlerini 20 molekülük bir test setinden faydalanarak karşılaştırmışlardır. CoMFA ve CoMSIA metotlarının her ikisinin de iyi tahmin yetenekleri olduğu sonucuna varırken, PLS istatistiklerinin CoMSIA'nın daha iyi bir metot olduğuna işaret ettiğini de belirtmişlerdir (Thaimattam ve ark., 2004).

### **2.2.1.2. FARMAKOFOR ANALİZİ**

İlaç tasarımında sık karşılaşılan, terapötik olarak söz konusu reseptörün üç boyutlu yapısı bilinmediği durumlarda, moleküler modelleme çalışmalarıyla, ligatların yapıları iyice karakterize edilir ve bazen biyolojik etkide rol oynayan konformasyonları kesin bir biçimde ortaya çıkartılmaktadır. Reseptörün yapısı daha sonra bu tür ligantlardan ortaya çıkartılabilmekte veya 'haritalanabilmektedir'; böylelikle mevcut yapı-etki ilişkilerini rasyonelize etmek ve yeni ilaç adaylarını tasarlamak için kullanabilmektedir. Ligantların biyolojik aktiviteleri için gerekli olan temel fonksiyonel grupların bağlı yönlendirmeleri farmakoforu tanımlamaktadır. Diğer bir ifadeyle farmakofor, belli bir biyolojik aktivite

için gerekli olan yapısal elemanların uzaysal düzenlemesidir. Oluşturulan model bağlanma veya inhibisyon prosesi hakkında bilgi verebilir, daha çok sayıda aktif bileşiğin oluşturulması için bir temel oluşturabilir ve aynı farmakoforu içeren moleküllerin tanımlanmasına yardımcı olabilir. Bir farmakofor, yapısal olarak farklı ligantların ortak bir reseptöre bağlanmasına açıklama getirmektedir (Cohen, 1996).

Bilgisayar kullanılarak gerçekleştirilen yapı-aktivite çalışmalarının ortaya çıkmasının ardından, “*farmakofor*” terimi Farmasötik kimya için oldukça popüler hale gelmiştir. Bununla beraber bilimsel altyapı ve/veya geleneklerine bağlı olarak farklı Farmasötik kimya grupları bu terime çeşitli anlamlar yüklemişlerdir. Bu nedenle öncelikle tarihsel bir perspektif kullanılarak, ardından da Farmasötik kimyacı gözünden bu terim açıklanacaktır.

Pek çok yayımcı biyolojik aktivite gösteren fonksiyonel veya yapısal elementleri tanımlamak üzere “*farmakofor*” terimini kullanmaktadır. Bu IUPAC tarafından benimsenen ve 1998 yılında verilen resmi tanıma pek uymamaktadır; bu tanıma göre “*bir farmakofor, spesifik bir biyolojik hedef ile onu tetiklemek üzere optimal supramoleküler etkileşimin gerçekleşmesi için gerekli olan sterik ve elektronik yapıların toplamıdır*” (Wermuth ve ark., 1998). Bunun sonucunda;

1. Farmakofor terimi uygun bir farmakolojik hedef ile optimal etkileşim için gerekli olan sterik ve elektronik olmak üzere fonksiyon gösteren esansiyel noktaları tanımlamaktadır.
2. Farmakofor gerçek bir molekül veya fonksiyonel grupların gerçek birleşimini temsil etmez, bunun yerine belli bir grup bileşiğin kendisine ait hedef yapısıyla genel moleküler etkileşiminin hesaplanması için sadece soyut bir konsepti kapsamaktadır.
3. Farmakoforlar spesifik fonksiyonel gruplar (örn. sülfonamidler) veya “*molekül parçaları*” (örn. Dihidropiridinler, arilpiperazinler) değildir.

Bir farmakofor, hedef proteinin aynı bölgesi tarafından tanınarak benzer farmakolojik profile sahip olan bir grup molekülün en büyük ortak bölüni olarak

düşünülebilir. Bununla beraber her ne kadar yukarıda resmi tanım ve bazı açıklamalar yapılmış olsa da bazı Farmasötik kimyacılar, özellikle de biyolojik aktivite ile ilişkili oldukları görülen bazı spesifik fonksiyonel grupların farmakofor olduğunu söylemektedirler.

### ***İyi Bir Farmakofor Modelin Sahip Olması Gereken Özellikler***

Bir farmakofor modelinin iyi bir araç olarak tanımlanabilmesi için bu modelin yapı-aktivite ilişkilerini araştıran Farmasötik kimyacı için geçerli ve sağlam veriler sunması gerekmektedir.

1. İlk olarak bu modelin hedefle etkileşim içerisinde bulunan fonksiyonel gruplara, non-kovalent bağlanabilir olmalı ve farklı iç yük uzaklıklarına belli bir mesafede olması, gerekmektedir. Dolayısıyla, etkileşim çiftinin moleküler yapılarını göstermeyen yararsız şerit ve spagetti modellerinden kaçınılmalıdır. Modelin aynı zamanda daha etkili olabilecek bileşikler önerme gücünün olması ve daha yeni, iyi bileşiklerin bulunmasına olanak sağlaması gerekir.

2. Geçerli bir farmakofor modeli için ikinci kriter, modelin stereoizomerleri ayırt etmesidir. Stereospesifiklik farmakolojik reseptörlerin temel özelliklerinden bir tanesidir ve ligand ile bağlanma bölgesi arasındaki stereokimyasal uyumluluk yüksek affinite ve seçicilik için de gereklidir.

3. Benzer bir yaklaşımla ideal modelin agonist ve antagonistler arasında da ayırım yapabilmesi gerekmektedir. Antagonistler için bu durumun açıklanması kısmen daha kolaydır; çünkü, antagonistler agonistlerden genellikle ek bağlanma bölgelerinde rolü bulunan fazladan aromatik halkalara sahip olmaları ile farklılaşırlar.

4. Bazen iyi bir farmakofor modeli paradoksik gözlemleri açıklayabilir. Örneğin, sulpirid serilerinin R- ve S- enantiyomerlerinin, N-etil türevlerini N-benzil türevlerine dönüştürürken görülen beklenmeyen ters affinite göstermeleri.

5. Son olarak aktif yapıların bazı analoglarındaki aktivite yokluğunu hesaba katabilmelidir. Aktivitesi son derece düşük olan veya inaktif olan bileşiklerin bu duruma sebep olan yapısal ve elektronik parametrelerinin bilinmesi hem maliyeti düşürür, hem de sentezlenecek bileşik sayısını azaltır.

Günümüzde, bazı bilgisayar programlarında yararlanarak farmakofor hipotezleri oluşturabilmektedirler. Farmakofor oluşturulması amacıyla kullanılan en yaygın programlar:

- DISCO (DIStance COmprasions)
- GASP (Genetic Algorithm Similarity Program)
- Catalyst/HIPHOP
- Catalyst/HypoGen
- Discovery Studio

Bütün bu programlar farklı algoritmalar kullanarak aktif bileşikleri üst üste çakıştırmak suretiyle ortak bileşenlerin belirlenmesi için çalışır.

Hirashima ve ark., 10 adet oktopamin (OA) agonistinden oluşan bir setten üç boyutlu farmakofor hipotezleri geliştirmiştir. Catalyst HipHop programıyla 10 ortak özellikli model ortaya konulmuştur. OA agonistleri üzerinde yapılmış olan bu çalışmalar molekülde lokalize bir HpAr, üç HpAr ve bir HBA1 yörelerine OA-agonist aktivite için temel olduğunu göstermiştir (Hirashima ve ark., 2002).

Tromelin ve Guichard, tat veren bileşikler ve  $\beta$ -lactoglobulin arasındaki etkileşimlerin doğasını açıklamak amacıyla Catalyst yazılımını kullanarak bir 3D-QSAR çalışması gerçekleştirmişlerdir. 35 bileşikten oluşan bir set üzerinden yapılan çalışmada set üç alt sete bölünmüştür. HypoGen yazılımı sayesinde, otomatikleştirilmiş hipotez oluşumuyla kayda değer bir afinite tahmini yapan bir model geliştirilmiştir. Sonuçlar,  $\beta$ -laktoglobulin aroma bağlanışında hem hidrofobik etkileşimlerin hem de hidrojen bağlarının kritik rolü olduğunu göstermiştir (Tromelin ve Guichard, 2003).



Krovat ve Ark., LigandScout ve Catalyst yazımlarını kullanarak insan Xa faktörüne bağlı inhibitörlerin temel farmakofor yapılarını saptamak amacıyla kimyasal özelliklere dayalı bir modelleme yaklaşımı uygulamışlardır. Ortaya çıkarttıkları kimyasal-özelliklere dayalı hipotezler WDI gibi ticari moleküler veritabanlarının sanal aramasında kullanılmıştır. Bunun yanı sıra, Xa faktörü inhibitörleri ve proteinler arasındaki ilgili kimyasal etkileşimleri temsil eden ortak-özellik hipotezleri elde etmek amacıyla ligant yapısına dayalı bir moleküler modelleme yaklaşımı uygulamışlardır. Bir sonraki basamakta ise, bilinen inhibitörlerle benzer kimyasal ve uzaysal özelliklere sahip yeni bileşikler oluşturmak için sanal bir kombinatoriyel kütüphane tasarlamışlardır. De novo olarak türetilmiş olan ve farmakofor kriterlerini yeterli seviyede yerine getirebilen bu moleküler iskeletler, aday bileşiklerin geliştirilmesi için umut verici niteliktedir (Krovat ve ark., 2005).

Deng ve ark., bir seri temsili HIV-I intergaz (IN) konformasyonundan geliştirilmiş olan, IN aktif bölgesinin komplementer özelliklerini temsil eden dinamik ve reseptöre dayalı bir farmakofor modeli geliştirmiştir. Elde ettikleri sonuçlar, aktif inhibitörlerin %72'sinden fazlasının dinamik model olarak başarılı olarak tanımlanabileceğini göstermiştir. Statik farmakofor modellerinin çakıştırımıyla dinamik bir farmakofor modeli elde edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan örnekleme ve farmakofor modeli geliştirme metotları etkin bir şekilde kombine edilmiştir ve yapıya dayalı ilaç tasarımı için başka sistemlere de genişletilebilmektedir (Deng ve ark., 2005).

Schuster ve ark., göğüs kanserinde tedavisinde kullanılmak üzere liganda dayalı tasarım yaparak sitokrom P450 19 (aromataz) inhibitörleri geliştirmeyi hedeflemişlerdir. Bu amaç doğrultusunda Catalyst programı aracılığıyla HipHop ve Hypogen algoritmalarını kullanmışlardır. P450 19 için oluşturulan farmakofor modelinde ortak özellikleri iki aromatik halka ve iki hidrojen bağı alıcısı olarak bulmuşlardır. Oluşturdukları farmakofor modelini NCI veritabanıyla çakıştırarak iki yeni P450 19 inhibitörü olabilecek bileşik keşfetmişlerdir (Schuster ve ark., 2006).

Dessalew ve ark., yeni ve daha etkili glikojen sentetaz kinaz-3 (GSK-3) inhibitörleri geliştirmek amacıyla farklı moleküler yapıya sahip 21 GSK-3 inhibitörü üzerinden farmakofor analiz çalışması gerçekleştirmişlerdir. Catalyst programında

HipHop yöntemini kullanarak oluşturdukları farmaofor modellerin içerisindeki en iyi hipotezin iki hidrofobiklik, bir hidrojen bağı alıcısı ve bir hidrojen bağı vericisi taşıdığını göstermişlerdir. Seçtikleri bu hipotezi NCI2000 veri bankasındaki moleküllerle karşılaştırmışlar ve bu karşılaştırma sonucunda öne çıkan moleküller üzerinden doking çalışması yapmışlar sonucunda da yeni GSK-3 inhibitörü olabilecek bileşikler önermişlerdir (Dessalew ve ark.,2006).

Hu ve ark., KDR kinase inhibitörü olabilecek yeni moleküllerin keşfi amacıyla öncelikle Catalyst programında HipHop yöntemi kullanmışlardır. Elde ettikleri farmakofor modeli bir hidrofobiklik, bir hidrojen bağı alıcısı, bir hidrojen bağı vericisi ve bir aromatik halka olmak üzere dört özelliği barındırmaktadır. Bu hipotezi MayBridge veritabanıyla karşılaştırmışlar sonrasında doking işlemi uygulamışlardır (Hu ve ark., 2007).

Su ve ark., selektif COX 2 inhibitörü olan nimesulid ve analoglarının COX 2 enziminin inhibisyonundan bağımsız olarak aromataz enzim ekspresyonunu azaltmasından yola çıkarak; kombinatoriyal yaklaşımları kullanıp SK-BR-3 göğüs kanser hücrelerinde aromataz aktivitesinin supresyonunu sağlayan çeşitli yeni süstitüe sülfonanilidleri paralel sentezle elde etmişlerdir. Bu bileşiklerden aktivitesi en yüksek olan on bileşiği kullanarak Catalyst HipHop algoritmasında farmakofor modeli oluşturmuşlardır. Bu model içerisinde bir hidrofobiklik, iki hidrojen bağı alıcısı ve bir aromatik halka olmak üzere dört ortak özellik belirlemişlerdir. Bu çalışma sonucunda aromataz aktivitesinin supresyonunu sağlayan yeni bileşiklerin keşfi için sülfonanilid analoglarının önder bileşik olarak kullanılması gerektiğini ortaya koymuşlardır (Su ve ark., 2008).

Kim ve ark., tip 2 diyabet, alzheimer, kanser ve kronik enflamasyonlarda önemli bir terapötik hedef olan Glikojen sentetaz kinaz-3 (GSK-3 $\beta$ ) enzimini inhibe edebilecek yeni kimyasal iskeletleri keşfetmek için Catalyst/HipHop yöntemiyle farmakofor model oluşturmuşlardır. Elde ettikleri hipotezi Prous ve Asinex kütüphanelerindeki moleküllerle karşılaştırmışlardır (Kim ve ark., 2008).

Sarma ve ark., Mitogenle aktif olan protein (MAP) p38 kinaz inhibitörü olarak etki gösteren farklı kimyasal yapılardaki moleküller üzerinden Catalyst/HypoGen yöntemi ile

farmakofor analizini gerçekleştirmişlerdir. En iyi farmakofor modeli bir hidrojen bağı alıcısı, bir hidrojen bağı vericisi, bir hidrofobiklik ve bir aromatik halka özelliği taşıyan, korelasyon katsayısı 0,959 ve RMSD değeri 1,069 olan hipotez olarak seçilmiştir. Test serisindeki 119 bileşik bu hipotez ile karşılaştırılmıştır ve bu bileşiklerle korelasyon katsayısını 0,851 olarak bulmuşlardır. Elde ettikleri hipotez yardımıyla yeni p38 MAP kinaz inhibitörü olabilecek moleküller için önder bileşikleri tanımlayabileceğini ortaya koymaktadırlar (Sarma ve ark., 2008).

Wang ve ark., Polo benzei kinaz 1 (PLK1) inhibitörlerinin, Catalyst programında HipHop ve Hypogen algoritmalarıyla farmakofor modellerini oluşturmuşlardır. Bu modeller arasından en yüksek korelasyon katsayısına sahip olan ve bir hidrojen bağı alıcısı, bir hidrojen bağı vericisi, bir hidrofobiklik ve bir alifatik hidrofobiklik özelliğini taşıyan hipotezi en uygun hipotez olarak seçmişlerdir. Seçtikleri hipotezi Specs, NCI, Maybridge, ve Chinese Nature Product Database (CNPD) veritabanları dahil olmak üzere pek çok veritabanındaki moleküller ile karşılaştırmışlardır. En uygun moleküller arasından Lipinski kurallarına uyan ve docking çalışmalarında öne çıkan yirmi bileşiği seçmişlerdir ve bu bileşikler üzerinden in vivo ve in vitro çalışmalar başlatmışlardır (Wang ve ark., 2008).

Vadivelan ve ark., hematolojik kanserlerin ve solid tümörlerin tedavisinde önemli bir hedef olan Histon deasetilazı (HDAC) inhibe eden yeni bileşikler geliştirmek amacıyla Catalyst programında HypoGen yöntemiyle farmakofor analiz çalışması gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada 3 farklı kimyasal iskeletteki 20 molekül kullanmışlardır. Elde ettikleri hipotezin korelasyon katsayısını 0,897 olarak bulmuşlar ayrıca bu hipotezin bir hidrojen bağı alıcısı, bir alifatik hidrofobiklik ve iki aromatik halka özelliği taşıdığını ortaya koymuşlardır. Seçilen farmakofor modelini 238,819 farklı molekülü içeren NCI veritabanıyla karşılaştırmışlardır. En iyi uyumu sağlayan bileşiklerin birçok kanser hastalığının tedavisi için geliştirilecek olan ilaçlar için önder bileşikler olabileceğini göstermişlerdir (Vadivelan ve ark.,2008).

### 2.2.1.2.1. HipHop Yöntemi

Günümüzde, ortak bir reseptör yöresine yapısal olarak farklı moleküllerin nasıl bağlanabildiğini çözmek, araştırmacılar için zorlu bir görev teşkil etmektedir. Yapısal bilinmeyen bir reseptör göz önüne alındığında, ligant setinin analizi bu moleküllerin hem aktif konformasyon seçimine, hem de birbiriyle olan varsayılan hizamalarına yüksek derecede bağlı olmaktadır. Moleküller farklı bileşik yapı sınıflarına ait olmalarına rağmen, özelliklerin ortak üç boyutlu düzenlenmesini içerebilmektedirler.

HipHop yöntemi, spesifik bir terapötik alanda aktif olarak bilinen bir seri bileşikten biyolojik aktiviteleri göz önünde bulundurmaksızın, ortak özellik farmakofor modelleri oluşturmaktadır. Bu özellikler reseptöre bağlanma için gerekli olan karakteristikleri simüle eden genelleştirilmiş fonksiyonlardan oluşmaktadır. Ortaya çıkartılan üç boyutlu konfigürasyon, diğer olası önder bileşik adaylarını saptamak amacıyla bir 3D veritabanını taramak için tarama sorgusu olarak kullanabilmektedir.

HipHop, moleküllerin konformasyonel modellerini ve bir seri kimyasal özelliklerinden yararlanarak çeşitli standart dosya formatlarında belirli moleküler çakıştırmalar üretmektedir. Bu işlem, bir set molekülde ortak olan özelliklerin konfigürasyonlarının tanımlanması ile başlamaktadır. Bir konfigürasyon 3D uzayda bir set bağlı lokasyonlardan ve buna bağlı özellik çeşitlerinden oluşmaktadır. Bir molekül belirli bir tolerans çerçevesinde ideal konumlardan çakıştırılabilir yapısal özelliklere ve konformasyonlara sahipse konfigürasyonlarla eşleşir.

HipHop, üst üste çakıştırılacak serideki moleküllerin kısmi özelliklerini de haritalamaktadır. Bu, çakıştırma işlemi sırasında “kısmi haritalama” seçeneğini de beraberinde getirmektedir. Kısmi haritalama, farmakofor özelliklerinin hepsini haritalaması gerekmeyen bileşiklerin gözden kaçırılması riski olmaksızın daha büyük, daha çeşitli, daha belirgin hipotezlerin ve çakıştırma modellerinin tanımlanmasına izin vermektedir.

Hiphop yöntemi kullanılarak farmakofor modelinin oluşturulması işleminde öncelikle spesifik bir terapötik alanda biyolojik aktivitesi olduğu bilinen bir seri bileşik programa aktarılır ve moleküllerin konformerleri oluşturulur, sonrasında moleküllerin yapısına göre ortak özellikler belirlenir. Moleküller üst üste çakıştırılır ve seçilen ortak özelliklere göre hipotezler oluşturulur, oluşan hipotezler de skorlarına göre sıralanırlar. Hipotezler arasından en fazla özelliği taşıyan, skoru yüksek olan ve moleküllerle en iyi haritalanmayı sağlayan hipotez seçilir. Seçilen hipotezle test serisi olarak seçilen veya veritabanlarından elde edilen birçok bileşik haritalanarak yeni önder bileşiklerin seçimi yapılabilmektedir.

İdeal bir HipHop çalışması gerçekleştirebilmek için aşağıda verilen kurallara uymak gerekmektedir.

- 2-32 molekülden oluşan bir çalışma serisi oluşturulmalıdır.
  - En ideali 6 molekülden oluşan bir seridir.
- Moleküller özellik bakımından zengin olmalıdır.
- Moleküllerin biyolojik aktiviteleri yüksek olmalıdır.

HipHop yöntemi sayesinde, bilinen bir aktiviteye sahip olan küçük bir bileşik serisinden yola çıkarak bir projenin erken basamaklarında bir farmakofor oluşturulabilmektedir. Oluşturulan farmakofor modeli, veya hipotez, yeni önder adaylarının keşfi için basamaklar halinde daha da optimize edilebilmektedir.

#### **2.2.1.2.2. HypoGen Yöntemi**

HypoGen yöntemi, spesifik bir terapötik alanda biyolojik aktivite değerleri bilinen bir seri bileşikten hareketle, bileşiklerin biyolojik aktiviteleri ile moleküler yapıları arasındaki ilişkiyi tanımlayan farmakofor modelini oluşturur. Ortaya çıkarılan bu farmakofor modeli aracılığıyla ilaç adayı olabilecek önder bileşiklerin tahmini biyolojik aktivite değerleri hesaplanabilir.

İnaktiften aktife doğru değişen çalışma dizisini oluşturan bileşiklerin tamamının ortaya konmasıyla, HypoGen algoritması aktif moleküllerin tamamında bulunan ortak

özellikleri içeren, inaktif moleküllerde bulunan ortak özellikleri ise içermeyen bir hipotez oluşturmak üzere çalışmaya başlar (Li, H., Sutter, J., and Hoffman, R. 2000). Hipotez oluşturulması işlemi üç aşamada gerçekleştirilir:

- Yapı basamağı,
- Çıkarma basamağı
- Optimizasyon basamağı.

Yapı basamağında aktif bileşiklerin tamamında bulunan ortak hipotezler tanımlanır; bu basamak normal bir farmakofor model oluşturulması işlemine oldukça benzemektedir. Çıkarma basamağında ise bir önceki basamakta elde edilen sonuçlardan inaktif bileşiklerin tamamında bulunan ortak hipotezlerin çıkartılması işlemi gerçekleştirilir. Elde edilen sonuç hipotezleri daha sonra model kalitesini daha iyi hale getirmek amacıyla optimize edilir. Tahmini aktiviteleri, ölçülen aktiviteler ile en iyi korelasyonu gösteren ve en basit yapıya sahip olan 10 hipotez değerlendirilir ve sonraki aşamalarda gerçekleştirilecek olan seçme işlemine alınır. Yüksek korelasyon ve tahmini farmakofor elde etmek için geniş bir aralıkta aktiviteye sahip çalışma serileri tercih edilir.

Tahmin edilen ve gözlenen aktivite değerleri arasındaki yapı aktivite korelasyonunun kalitesi,  $r$  değerinden hareketle tahmin edilebilir. Düzenlenen hipotezin istatistiksel önemi, cevap değişkenininin 10 kere permute edilmesi ile belirlenebilir; örneğin, çalışma serisi bileşiklerinin aktivite ve yapılarının 10 defa karıştırılmasıyla her bir değer orijinal molekülden farklı hale gelir. Daha sonra bu 10 çalışma serisinin her biri için Catalyst hipotez oluşturma işlemi tekrarlanır. Oluşan farmakoforların toplam enerjisi, hipotezin kompleksliliği (örneğin, farmakofor yapılarının sayısı) ile eşlenmiş bir şekilde tahmin edilen ve gözlenen aktiviteler arasındaki sapmadan hareketle hesaplanabilir. Normalde ortalamaları çevresinde dağılım gösteren deneysel aktiviteler ve veriler arasında bir ilişki bulunmadığını gösteren bir geçersiz hipotez de hesaplanabilir. Bundan dolayı oluşturulan hipotez ile geçersiz hipotezin enerji değerleri arasındaki fark arttıkça, hipotezin korelasyon gösterme şansı azalmaktadır.

İdeal bir Hypogen çalışması gerçekleştirilebilmek için aşağıda verilen kurallara uymak gerekmektedir.

- 18-25 molekülden oluşan bir çalışma serisi oluşturulmalıdır.
  - İstatistiksel sonuçların doğru olabilmesi için en az 15 molekül gereklidir.
  - Çalışma serisindeki bileşikler arasında hem aktif olan bileşikler hem de inaktif olan bileşikler yer almalıdır.
- Bileşiklerin biyolojik aktivite değerleri 4 log birimlik bir aralığa yayılmış olmalıdır.
  - Her biyolojik aktivite aralığını temsil eden en az 3 bileşik olmalıdır.
  - Yapı-aktivite ilişkisi hakkında HypoGen'in spesifik birşeyleri gösterebilmesi için 4-5 çift içermesi gerekir.
  - Benzer yapı taşıyan bileşiklerin biyolojik aktivite sıralamasına göre aktiviteleri farklı olmalıdır.
  - Benzer aktivite gösteren bileşikler yapısal olarak farklı olmalıdır.

HipHop ve HypoGen yöntemleri arasındaki farklar Çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

**Çizelge 2.1.** HipHop ve HypoGen yöntemleri arasındaki farklar

	<b>HipHop</b>	<b>HypoGen</b>
<b>Bileşik Sayısı</b>	2-32	10'dan fazla
<b>Bileşiklerin aktivitesi</b>	Aktif	Akif ve inaktif
<b>Aktivite değeri</b>	Kullanılmaz	Kullanılır
<b>Farmakofor modelin şekli</b>	Özelliğe dayalı	Tahmini aktiviteye dayalı
<b>Farmakofor modeller arasındaki farklar</b>	Yapısal farklılıklara bağlı	Aktivite değerleri arasındaki büyüklüğe bağlı
<b>Hipotez sayısı</b>	Kullanıcı tanımlı	En fazla 10 hipotez
<b>Tahmini aktivite sonucu</b>	Vermez	Verir

### 2.3. TOPOİZOMERAZ ENZİMLERİ

Topoizomerazlar DNA'nın tersiyer yapısını, nükleotit sekansı ile belirlenmiş olan primer yapısını değiştirmeksizin modifiye (izomerize) edebilen enzimlerdir. Prokaryotlarda ve ökaryotlarda bu enzimlerin yüksek derecede korunmuş olması hücre biyolojisinde önemli bir role işaret etmektedir. İnsanlarda tip I ve tip II olmak üzere iki topoizomeraz sınıfı iyi bir şekilde karakterize edilmiştir. DNA'nın tüm fizyolojik fonksiyonları tersiyer konfigürasyonuna bağlıdır, ve bu nedenle DNA içeren tüm hücreler için topoizomeraz aktivitesi hayati önem taşımaktadır. Yapısı çifte sarmal olduğundan dolayı, DNA bükümsel bir gerginlik altındadır. Replikasyon ve gen ekspresyonu işlemleri için DNA süpersarmalının polimerazlara veya transkripsiyon mekanizmasının bileşenlerinin girişine açık olması gerekmektedir. Bu değişim DNA topoizomerazların gevşeme ve dolaşık DNA ipliklerinin çözülmesi işlemlerini gerçekleştirmesini gerektirmektedir (Kellner ve ark., 2002).

1971 yılında, ilk kez Wang tarafından *E.coli* DNA topoizomeraz I enzimi keşfedildi. Bu enzim, DNA'nın tek iplikçiğinde DNAaz aktivitesi ile kırık oluşturarak herhangi bir enerji gerektirmeden negatif süperkırımlı DNA'nın relaks (gevşemiş) forma dönüşümünü katalizler. *E.coli* DNA topoizomeraz I aynı zamanda yine herhangi bir enerjiye gereksinim duymadan DNA ligaz aktivitesi ile geçici olarak kırılmış fosfodiester bağları arasında yüksek enerjili kovalent bağ oluşturur (Chen ve Liu, 1994).

Liu ve ark. (1979) tarafından *E.coli*'yi enfekte eden T4 bakteriyofajından, T4 DNA topoizomeraz enzimi izole edildi. T4 DNA topoizomeraz, ATP hidrolizini gerektiren bir reaksiyonla hem pozitif hem de negatif süperkırımlı DNA'nın relaks forma dönüşümünü katalizler. T4 DNA topoizomeraz, ökaryotik DNA topoizomeraz II ile aynı enzimatik aktiviteye sahiptir (Miller ve ark., 1981). T4 DNA topoizomerazın kataliz mekanizması üzerindeki çalışmalar, topoizomerazların iki şekilde sınıflandırılmasına yol açmıştır.

I. Tip DNA topoizomerazlar (*E.coli* DNA topoizomeraz I ve ökaryotik topoizomeraz I), geçici olarak tek zincirde DNA kırığı oluşturarak DNA'nın gevşeme hale dönüşümünü katalizler. II. Tip DNA topoizomerazlar (*E.coli* DNA giraz ve ökaryotik DNA topoizomeraz II) ise geçici bir çift zincirli DNA kırığı oluşturarak DNA'da oluşan



topolojik stresin azalmasını katalizler (Gellert, 1981; Chen ve Liu, 1994). Bu iki temel grubunda fonksiyonel ve yapısal özelliklerine göre A ve B olarak adlandırılan alt grupları bulunmaktadır (Mathews ve Van Holde., 1996; Bjornsti ve ark., 1989; Corbett ve Berger, 2004)

### **2.3.1. I. Tip topoizomerazlar**

DNA'nın tek zincirinde geçici olarak bir kırık oluşturup daha sonra uçlardan birini kırılmayan zincir etrafında çevirirler ve kırılan uçları tekrar ligaz aktivitesi ile birleştirerek süperkıvrımlı DNA'yı relaks hale getirirler. Bu işlem için herhangi bir enerjiye gereksinim yoktur. DNA'daki süperkıvrımların kaldırılması enerji açısından uygun bir tepkimedir. Enzim DNA'ya bağlanır ve bir zinciri keser. Kesilmiş DNA zinciri, kesilmemiş DNA zincirinin alt kısmından geçer ve kırılmış olan iplik tekrar kapatılır. Bu işlem sonunda (-) süperkıvrım sayısında bir tane eksilme olur. Bu işlemde sorumlu enzim ailesi I. Tip topoizomerazlar olarak adlandırılır. E. coli topoizomeraz I enzimi, (-) süperkıvrımlı DNA'yı relaks haldeki DNA'ya dönüştürürken, ökaryotik topoizomeraz I enzimleri hem (-) hem de (+) süperkıvrımlı DNA'yı relaks forma dönüştürebilirler (Pindur ve Lemster, 1998).

I. Tip topoizomerazlar kendi içlerinde tip IA ve tip IB olmak üzere 2 alt gruba daha ayrılır;

*Tip IA grubu* topoizomerazlar ilk olarak Wang tarafından (1971) tanımlanmıştır. Tip IA enzimler monomerik olup, tek zincirli DNA'ya bağlanmayı tercih eder, tek zinciri belirli bir bölgeden kopararak negatif süpersarmalları kısmen gevşetirler. Katalizleri sırasında DNA parçalarının 5' ucu ile kovalent fosfotirozin bağı yaparlar. ATP kullanmadan ilgili DNA segmentinden gelen serbest enerji ile reaksiyon ilerlemektedir (Wang, 1971; Champoux and Dulbecco, 1972; Kirkegaard ve ark., 1984; Bjornsti ve ark., 1989).

*Tip IB grubu* enzimler ilk olarak Champoux ve Dulbecco tarafından (1972) tanımlanmıştır. Tip IB enzimler de monomerik olup çift zincirli DNA'ya bağlanmayı tercih eder, tek diziyi kopararak negatif ve pozitif süper sarmalları ATP kullanmadan tamamen gevşetirler. Bu enzimler katalizleri sırasında DNA parçasının 3' ucu ile bağlantı kurar ve kopan dizinin sağlam fosfodiester bağlar etrafında bir veya birden fazla dönüşüne izin verir (Corbett ve Berger, 2004).

Tip I DNA topoizomerazlar, süpersarmallasmayı değiştirmekten başka çentikli dsDNA veya ssDNA halkalarının düğümlerini de çözebilmektedirler ( Tse-Dinh, 1998).

### **2.3.2. II. Tip topoizomerazlar**

DNA'nın her iki zincirini birden kesip yeniden birleştirerek DNA'nın topolojisini değiştirirler. Bu işlem için ATP hidrolizi gereklidir. Tip IIA grubu topoizomerazlar, ilk olarak Gellert ve ark. (1976) tarafından izole edilmiştir. Tip IIA grubu enzimler, ikili DNA sarmalının her iki zincirini geçici olarak kırdıktan sonra ATP harcayarak başka bir ikili heliksi bu aralıktan geçirirler. Bu sırada kullanılan sarmalların her ikisi de aynı DNA parçasına ait ise  $\Delta L$ 'yi +/-2 olarak değiştirir. Tip II grubu enzimler DNA süper sarmal sayısını değiştirebildikleri gibi, çift sarmal DNA'nın halkalarını açabilir veya iç içe sokabilirler (Levine ve ark., 1998; Bjornsti ve Osheroff, 1999; Corbett ve Berger, 2004).

Bu enzimler birden fazla alt birimli proteinler olup, katalitik aktiviteleri için ATP gereklidir. Bu grupta yer alan Tip IIA topoizomerazlardan bakteriyel olanlar heterotetramer, ökaryotik olanlar ise homodimerdirler. E. coli DNA giraz ise 400 kDa ağırlığında olup A2B2 heterotetramer yapıdadır. Saccharomyces cerevisiae (maya) enzimi 320 kDa olup (BA)2 homodimer yapıdadır. Ökaryotik enzimler B-A alt birimlerinin füzyonu olan proteinin homodimeridirler. Girazın B ve A (GyrB ve Gyr A) alt birimleri mayanın sırası ile N- ve C- terminal yarıları ile homologtur (Lynn ve ark., 1986). B alt biriminin N terminal ucu ATP bağlama ve hidroliz aktivitesi gösterir. A alt ünitesi ise DNA'yı kıran aktif bölge tirozini ve oligomerleşmeyi sağlayan dimer ara yüzünü içerir. C terminali ve GyrA birbirinden bağımsızdır, bu bölgenin fosforilasyonu proteinin katalitik aktivitesini düzenler (Ullsperger ve Cozzarelli, 1996; Levine ve ark., 1998).

Tip IIB grubu topoizomerazlar ise Bergerat ve ark. (1994) tarafından tanımlanmıştır. Tip IIA grubu enzimlerden yapısal olarak farklılık göstermektedirler. Tip IIB topoizomerazlar tüm prokaryotik tip II ler gibi heterotetramer (A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>) olup, prototipi arkeal DNA topoizomeraz VI'dır. ATP'ye bağımlı olarak negatif ve pozitif süper sarmalları gevşetirler, süper sarmal oluşturamazlar ve kuvvetli dekatensasyon aktivitesine sahiptirler (Bergerat ve ark., 1997; Corbett ve Berger, 2003).

II. tip topoizomerazlar içinde ilk önce izole edilmiş olan enzim E.coli DNA topoizomeraz II ya da Giraz olarak isimlendirilmiştir. Bu enzim, pozitif süperkıvrımlı DNA'yı önce relaks haldeki DNA'ya, sonra da ATP hidrolizi ile tekrar negatif süperkıvrımlı DNA'ya dönüşümünü katalizlemektedir (Gellert ve ark., 1976; Pindur ve Lemster, 1998). Ökaryotik DNA topoizomeraz II enzimi ise, ATP hidrolizini gerektiren bir reaksiyonla hem pozitif hem de negatif süperkıvrımlı DNA'nın relaks forma dönüşümünü katalizlemektedir. Ökaryotlarda histonların bağlanması, süperkıvrılma potansiyelini arttırabileceği için ökaryotik topoizomeraz II'nin DNA'yı tekrar süperkıvrımlı forma döndürme aktivitesi yoktur. Ökaryotik hücrelerdeki II. tip enzimler hem (+) hem de (-) süpersarmal yapıyı relaks hale getirebilirler. II. tip topoizomerazla her iki DNA zincirini de kesebildikleri için, bu işlem sonunda (-) süperkıvrım sayısında iki tane eksilme olur.

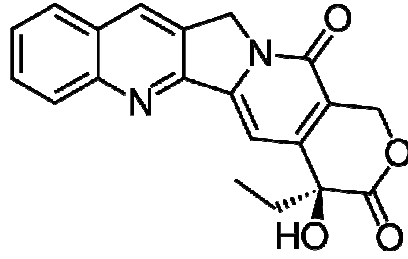
### **2.3.3. Topoizomeraz I Hedefli Kemoterapi**

#### **2.3.3.1. Topoizomeraz I Hedefli İlaçlar ve Bu İlaçlara Dirençlilik**

##### **2.3.3.1.1. Kamptotesin (CPT)**

Son zamanlarda, birçoğu anti-kanser özellik taşıyan ve ökaryotik topoizomeraz I ile etkileşim içinde bulunan birçok ilaç bulunmuştur. Bunlar birçok doğal ürünlerden ve antibiyotiklerden oluşur. Topoizomeraz I ile etkileşim içinde olan ilaçların sayısı her geçen gün artmakta ve her biri yeni bir makalenin ana konusunu oluşturmaktadır (Pommier, 1995; Bailly, 2000).

Şu anda kliniklerde kullanılan topoizomeraz I hedefli ilaçlar CPT türevlidir (Şekil 2.2). Çin’de bulunan *Camptotheca acuminata* ağacından 1966 yılında izole edilen ilacın ilk çalışmalarda anti-kanser özelliklerinin saptanmasına rağmen klinik tartışmalar sonrası, kabul edilemez toksisiteleri olduğu gösterilmiş ve üzerinde çalışılması durdurulmuştur. 1985 yılında topoizomeraz I in CPT’nin moleküler hedefi olduğu keşfedilmiştir (Hsiang ve ark., 1985). Daha sonra yapılan çalışmalarla da topoizomeraz I’ in CPT’ler için tek moleküler hedef olduğu gösterilmiştir (Wall ve Wani, 1996).



Şekil 2.2. Kamptotesin

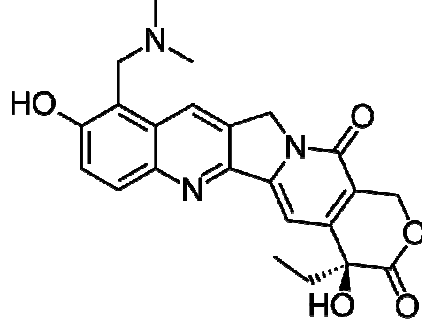
İnsan topoizomeraz I enziminin son kristalografik ve moleküler modelleme çalışmaları, CPT’e karşı oluşan hücresel duyarlılığın, enzimin ortamdaki seviyesine bağlı olduğunu göstermiştir. Topoizomeraz I’in sekans özgüllüğü olmamasına rağmen, CPT genellikle kesik zincirin +1 pozisyonundaki G rezidusuna ilgi gösterir ve DNA dubleksinden 1+G rezidusunu uzaklaştırarak kesimden sonra enzimin DNA ile yeniden birleşmesini engellenmiş olur. CPT’nin DNA ve topoizomeraz I ile etkileşimini açıklayan mekanizma “ilaç yığılım mekanizması” olarak adlandırılır (Fan ve ark., 1998; Stewart ve ark., 1998).

Bu mekanizmaya göre CPT, topoizomeraz I ve +1 purin ile etkileşime girmektedir. CPT; enzim ile spesifik etkileşimini, yapısında içerdiği lakton E halkası ve S izomerik konfigürasyonundaki 20. hidroksil grubu ile sağlamaktadır. Ayrıca enzim aktivitesini ve ilaç direncini etkilediği bilinen topoizomeraz I genindeki mutasyonlar, aktif bölgeyi çevreleyen amino asit rezidularını da etkilemektedir. Böylece CPT, kesimden sonra enzimin yeniden birleştirme aktivitesini engelleyerek nick atılmış DNA’nın yarı ömrünü uzatır. Bu olay tek başına hücre ölümüne sebep olmaz fakat ilacın stabilize ettiği DNA kırığı, bir replikasyon çatalı ile karşılaştığı zaman DNA zincir kırığı hücre ölümüne sebep

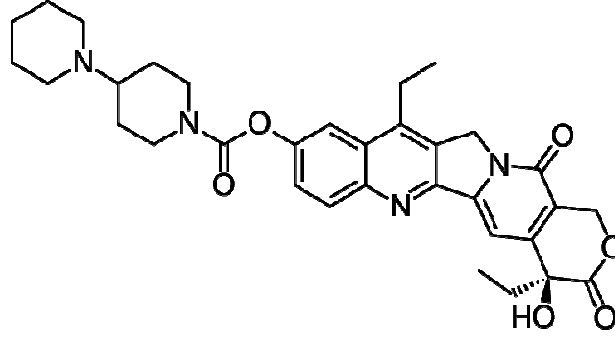
olabilen çift zincir kırığına yol açar. CPT molekülü tarafından indüklenmiş DNA tek zincir kırıkları, replikasyon sırasında sadece kesiksiz zincirde oluşursa muhtemelen çift zincir kırıklarına dönüşürler. Böylece; bu tip ilaçlar topoizomeraz I molekülünü DNA'ya hasar veren bir ajan haline çevirmiş olurlar. Bu duruma “stokiyometrik etkileşim” denilmektedir (Nitiss ve Wang, 1996). Sonuç olarak, bir topoizomeraz I molekülü ile bir CPT molekülünün birleşimi her zaman bir DNA kırığı ile sonuçlanmaktadır ve bu durum hücrede her bir topoizomeraz I molekülü için bir DNA kırığı potansiyelinin olmasının ve hücrelerin CPT'ye olan duyarlılığının neden topoizomeraz I'in yüksek seviyesine bağlı olduğunun kanıtı olmaktadır. Yani daha fazla topoizomeraz I, daha fazla DNA hasarı ve daha fazla hücreyi öldürme şansındır (Strumberg ve ark., 2000).

#### **2.3.3.1.2. Topotekan ve İrinotekan**

Topotekan (Şekil 2.3.) ve İrinotekan (Şekil 2.4.) suda çözülebilen CPT analoglarıdır. CPT molekülünün lakton halkası, enzimin aktif bölgesi ile tam olarak etkileşebilmesi için gereklidir. Fizyolojik pH'da lakton halkası, inaktif olan karboksilat formuna çevrilmeye üzere hidrosillenir ve ayrıca en önemlisi CPT yüksek oranda çözünmez durumdadır. Topotekan ve irinotekan ise CPT'den daha çözünür halde ve lakton formları serumda daha kararlı durumdadır. Farklı süstitüentlerin değişik pozisyonlarda yapıya eklenmesi ile karboksilat formlarının insan serum albuminine bağlanması engellenmektedir (Mi ve Burke, 1995; Burke, 1996). İnsan serum albumini, tercihen CPT'nin karboksilat formuna bağlanır. Böylece serumda lakton-karboksilat dengesinin, inaktif karboksilat molekülü lehine değişimi sağlanmış olur. İnsan serum albuminine, irinotekan ve topotekan molekülünün bağlanması ile oluşan direnç sonucu serumda yüksek oranda aktif lakton formu oluşmaktadır. Ayrıca florourasil dirençli metastatik kolektoral kanser hastaları için irinotekan tedavisi, daha kaliteli bir hayat ve destekleyici tedavilerle karşılaştırıldığında daha uzun bir yaşam süresi sağladığı görülmüştür. Ayrıca irinotekanın inaktif olduğu malignansilerde SN-38 isimli aktif metaboliti oluşturularak daha etkili bir tedavi sağlanmaktadır (Cunningham ve ark., 1998; Rougier ve ark., 1998; Saltz ve ark., 2000).



Şekil 2.3. Topotekan



Şekil 2.4. İrinotekan

Bu bileşiklerin son zamanlarda glisinat esterleri sentezlenmektedir. Bu esterler CPT'nin aksine bileşiklerin suda çözünürlüklerini artırmakta, fizyolojik pH'da aktif ilaçlara hidrolize edilebilmekte ve daha az miktarda asetilkolin esteraz inhibisyonu göstermektedirler. Bu bileşiklerle yapılacak tedavi, tümör hücrelerinde DNA kırıklarının birikimini sağlayarak tümörlü hücrenin ölümünü kolaylaştırmaktadır (Wadkins ve ark., 1999).

Bu konu üzerine yapılan çalışmalar; topoizomeraz I enziminin mayada ifade edilebilmesi hücre duyarlılığı ile, enzim ifadesinin engellenmesi ise ilaca karşı direnç ile sonuçlandığını göstermiştir (Bjornsti ve ark., 1989). Topoizomeraz I geninde meydana gelebilecek mutasyonlar ilaca karşı direnci başlatır (Benedetti ve ark., 1993; Pommier ve ark., 1999).

### 2.3.4. Apoptozis ve Topoizomeraz I - Hedefli İlaç Hasarının Onarımı

Topoizomeraz I hedefli ilaçların oluşturduğu DNA hasarının, hücrenin ölümü üzerinde izlediği yolun işleyiş mekanizması daha tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen apoptosis yolu kullanılarak yapıldığı düşünülmektedir (Pantazis ve ark., 1999; Zhang ve ark., 1999). Bu yol için, p53 tümör süpresör geninin olması gerektiği düşünülmekte ve p53 proteini anti-kanser ilaçla indüklenen DNA hasarını apoptotik yol aracılığı ile hücre ölümüne yönlendirmektedir. p53 geninde mutasyon taşıyan kanserli hastaların da topoizomeraz I hedefli kemoterapiye dirençli duruma geldiği bilinmektedir. Topoizomeraz I'e karşı yürütülen ilaç tedavisinde hücre ölümünün p53'den bağımsız başka mekanizmalar tarafından da olabileceği belirtilmektedir (Lowe ve ark., 1993; McDonald ve Brown, 1998).

Yapılan bir çalışmada; topoizomeraz I ve DNA kovalent kompleksini tanıyabilen olası bir enzim aktivitesinin varlığı belirtilmiştir. Bu aktiviteyle topoizomeraz I hedefli ilaçlarla oluşmuş hasarların tanınıp onarıldığı düşünülmektedir. Bu enzim topoizomeraz I üzerindeki aktif bölge tirozini ile kırık DNA zinciri arasında 3' fosfodiester tirozin bağı oluşturan tirozil-DNA fosfodiesterazdır. Bu topoizomeraz I-DNA kompleksi, CPT analogları ile muamele edilen hücrelerde olması beklenen bir yapıdır. Bu enzimi kodlayan RAD9 geni mayadan izole edilmistir. Çalışma sonucunda; RAD9 geninde mutasyon taşıyan ve ilaç indüklü DNA onarım mekanizmasına sahip olmayan mayaların, topoizomeraz I hedefli ilaçlara karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. RAD9 gen aktivitesinin artması ile gözlenen bu durum, topoizomeraz I hedefli ilaç tedavisine karşı oluşan olası bir direnç mekanizmasının varlığına işaret etmektedir (Pouliot ve ark., 1999).

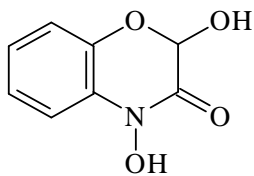
Topoizomeraz I hedefli ilaç toksisitesine dirençli olabileceği düşünülen başka bir mekanizma da CPT ile muamele edilen hücrelerin NF-kB (nükleer faktör kappa B)'yi aktive etmesidir. NF-kB transkripsiyon faktörü olan bir protein kompleksi olup tüm hücrelerde bulunur ve oksidatif stres, serbest radikaller, sitokinler, UV. vb. etkilere karşı hücrel cevapta ve immün cevabın düzenlenmesinde önemli görevleri vardır. Ayrıca retroviral onkoproteinlerle aynı homolojide olan bu kompleksin gen ifadesinin düzenlenmesi bozulduğunda kanserleşme ile ilgisi olabileceği düşünülmektedir (Albensi ve Mattson, 2000; Gilmore, 2006). NF-kB' nin aktivasyonu; tüm antiapoptotik etkileri olan

genlerin ifadesini arttırır. Bu durumun, CPT-indüklü apoptozise karşı bir hücrenin doğal direnci olabileceği ve böylece tümör hücresinin topoizomeraz I hedefli kemoterapiye karşı aşırı duyarlı hale gelebileceği belirtilmiştir (Wang ve ark., 1999).

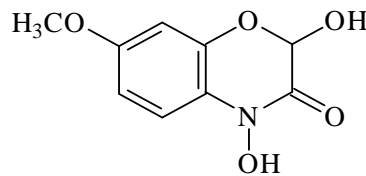
Topoizomeraz I hedefli anti-kanser ilaç tedavisine karşı kanser hücrelerinin oluşturacağı dirençleri araştırmada çok çeşitli mekanizmalar önemli roller oynamaktadır. İnsan kanserleri bazı konularda fare ksenograftlarından daha komplekstir. Ama her gün bir yenisi sentezlenen bu tip anti-kanser ilaçların topoizomeraz I e aktif bir şekilde hedeflenebildiği gibi insan malignansilerine karşı da etkili oldukları kayda değer ve kanser tedavisinde umut verici bir durumdur. Topoizomeraz I hedefli ilaçlar sadece laboratuvar çalışmalarında değil, tespit edilen etkili mekanizmalarından dolayı klinikte de yaygın bir şekilde kullanılmaya başlamıştır (Chen ve ark., 1999).

#### 2.4. BENZOKSAZİN VE TÜREVLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ

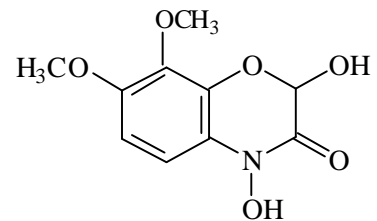
Virtanen ve Hietala tarafından çavdar bitkisinden izole edilen glikozitin enzimatik parçalanması sonucunda 1,4-benzoksazin-3-on halkası taşıyan DIBOA (2,4-dihidroksi-1,4-benzoksazin-3-on) (Şekil 2.5.) bileşiği elde edilmiştir (Virtanen ve Hietala, 1960). Daha sonra Gramineae familyasında yer alan buğday ve mısır bitkilerinde de aynı bisiklik halka sistemini içeren bileşiklere rastlanılmıştır. 1,4-benzoksazin-3-on yapısı taşıyan bu türevlerin buğday bitkisinde DIMBOA (2,4-dihidroksi-7-metoksi-1,4-benzoksazin-3-on) (Şekil 2.6.) ve mısır bitkisinde DIM<sub>2</sub>BOA (2,4-dihidroksi-7,8-dimetoksi-1,4-benzoksazin-3-on) (Şekil 2.7.) oldukları belirlenmiştir (Niemeyer, 1988; Otsuka et al., 1988).



Şekil 2.5. DIBOA



Şekil 2.6. DIMBOA

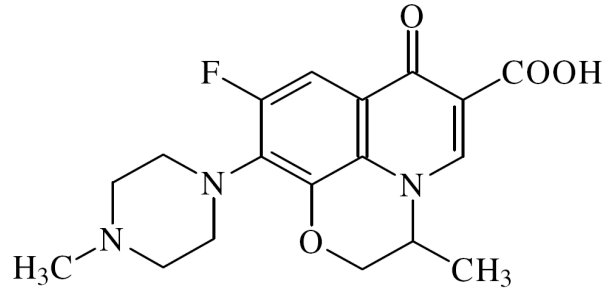


Şekil 2.7. DIM<sub>2</sub>BOA



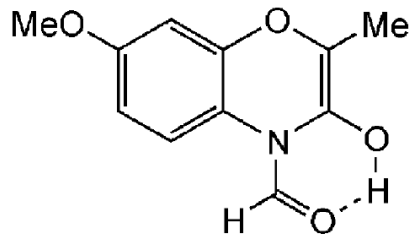
Bu bileşikler üzerinde yapılan biyolojik etki çalışmaları sonucunda ise DIBOA ve DIMBOA bileşiklerinin insektisit gibi etki gösterdikleri belirtilmiştir (Virtanen, 1961; Barria et al., 1992). Ayrıca bu bileşiklerin tahıllara karşı yumuşak çürütücü olarak etki gösteren bazı mikroorganizma türlerine karşı antibakteriyel ve/veya antifungal etki gösterdikleri de belirlenmiştir (Corcuera et al., 1978).

Daha sonraki yıllarda, yapısında 1,4-benzoksazin halka sistemi içeren ve antibakteriyel etkili bir ilaç olan ofloksazinin ortaya çıkışı ile araştırmacıların benzoksazin türevlerine olan ilgisi artmıştır (Şekil 2.8) (Hayakawa et al., 1986). 1,4-benzoksazin halka sistemine sahip ofloksazin molekülü klinik olarak kullanılan diğer antimikrobiyal ilaçlardan daha avantajlı bir yapı olarak ortaya çıktığı saptanmış ve bu bileşiğin DNA giraz inhibitörü olduğu belirlenmiştir (Osada et al., 1987; Willmott and Maxwell, 1993).



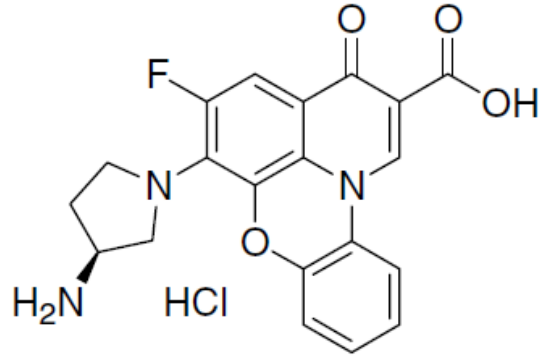
Şekil 2.8. Ofloksazin

Wu ve ark., *Capparis sikkimensis* subsp. *formosana* bitkisinden 1,4-benzoksazin yapısındaki kappamensin bileşiğini (Şekil 2.9.) izole etmişlerdir. Bileşiğin yapısını 2D NMR teknikleri kullanarak aydınlatmışlardır. Bileşiğin over, akciğer, ilyum, meme, nazofarengal ve vinkristine dirençli tümör hücrelerine karşı yapılan in vitro çalışmalarda yüksek aktivite gösterdiğini saptamışlardır (Wu ve ark., 2003).



Şekil 2.9. Kappamensin

Da-Hye Kang ve ark., yaptıkları bir çalışmada antitümör aktiviteye sahip A-62176 (Şekil 2.10) bileşiğinden hareketle kinofenoksazin yapısı taşıyan bileşikler sentezlemeyi ve topoizomeraz enzimlerine karşı etkilerini incelemeyi amaçlamışlardır.



Şekil 2.10. A-62176

Bu amaç doğrultusunda antimikrobiyal aktiviteye sahip florokinolon türevlerinden siprofloksazin ve norfloksazin bileşiklerini kinofenoksazin yapısı oluşturacak şekilde genişleterek 6 bileşik elde etmişlerdir. Elde ettikleri kinofenoksazin türevi bileşiklerin topoizomeraz I ve II enzimlerine karşı inhibitör ve sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda benzoksazin grubuna fenil halkasının bağlı olduğu türevlerin topoizomeraz I ve II enzimlerine karşı daha iyi aktivite sonuçları verdiklerini saptamışlardır (Da-Hye Kang ve ark., 2007) .

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

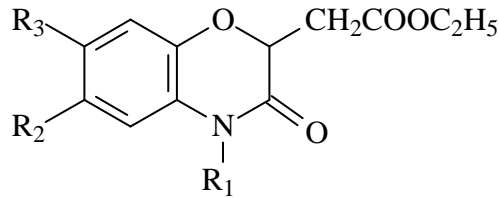
Hypogen farmakofor modelleme analizinde veri setinden hipotez oluşturulması IRIX 6.5 işletim sistemine sahip bir Silicon Graphics O2 iş istasyonu üzerinden Accelrys Catalyst/HypoGen (versiyon 4.9) programı kullanılarak, HipHop farmakofor modelleme analizinde veri setinden hipotez oluşturulması ise PC versiyonlu Accelrys Discovery Studio 2.1 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1. FARMAKOFOR ANALİZİ ÇALIŞMASI

##### 3.1.1. HypoGen Çalışması

HypoGen farmokofor modeli için Accelrys Catalyst/HypoGen (versiyon 4.9) programı kullanılmıştır. HypoGen analizinde çalışma serisi olarak Çizelge 3.1’de verilen 16 adet 2H-3,4-dihidro-1,4-benzoksazin-3-on türevi bileşik seçilmiştir. Bileşiklerin topoizomeraz I enzim inhibisyonları Foto tarafından ölçülmüş ve IC<sub>50</sub> değerleri 1,61-9304,15µg/µL arasında bulunmuştur (Foto, 2007).

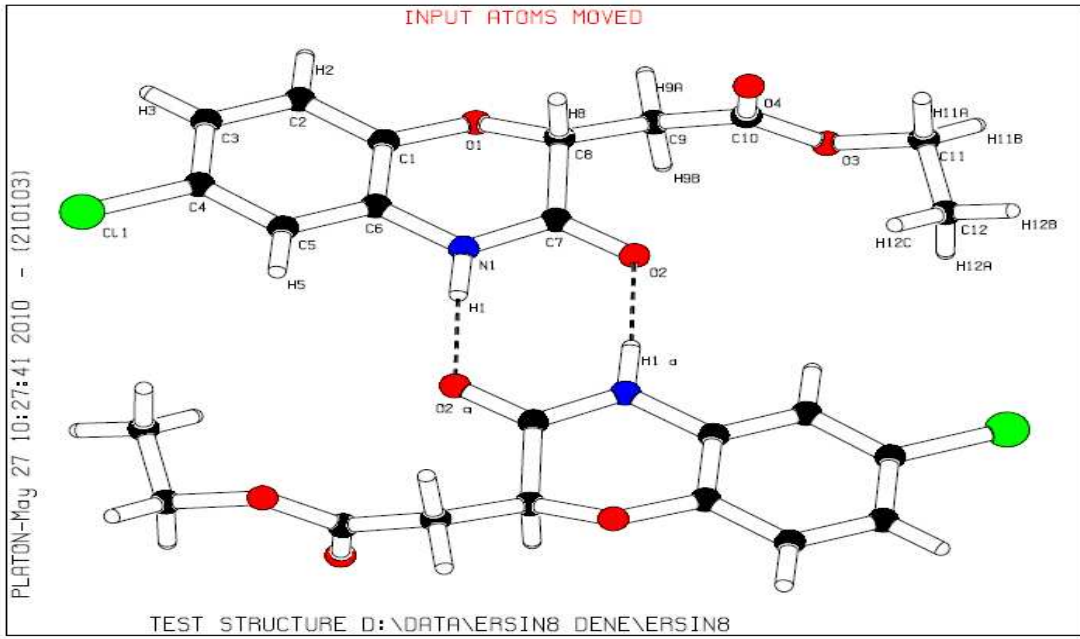
Çizelge 3.1 HypoGen analizinde kullanılan çalışma serisi



Bileşik Kodu	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	IC <sub>50</sub>
S1	-H	-H	-H	1,96
S2	-H	-CH <sub>3</sub>	-H	7,97
S3	-H	-Cl	-H	8,95
S4	-H	-COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-H	24,84
S5	-H	-H	-NO <sub>2</sub>	4,96
S6	-H	-H	-NH <sub>2</sub>	1058,49
S7	-H	-Cl	-NO <sub>2</sub>	9304,15
S8	-CH <sub>3</sub>	-H	-H	17,31
S9	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-H	16,18
S11	-CH <sub>3</sub>	-COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-H	532,58
S12	-CH <sub>3</sub>	-H	-NO <sub>2</sub>	11,29
S13	-CH <sub>3</sub>	-Cl	-NO <sub>2</sub>	6,46

S14	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-H	-H	5,17
S15	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-Cl	-H	6,16
S16	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-H	-NO <sub>2</sub>	3,63
S17	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-Cl	-NO <sub>2</sub>	3,71

Çalışmamızda kullanılan 2H-3,4-dihidro-1,4-benzoksazin-3-on türevi bileşiklerin sentezi grubumuz tarafından gerçekleştirilmiştir. (Yalçın ve ark., 2003; Alper-Hayta ve ark., 2006). Farmakofor analizi çalışmalarında kullandığımız bu bileşiklerin ikinci konumunda asimetrik karbon atomu bulunmaktadır. Bu nedenle 19 Mayıs Üniversitesinde, Fizik bölümünde Ersin Temel tarafından X-ışınları kristalografisi kullanılarak S3 bileşiğinin yapısı tam olarak aydınlatılmıştır. Bileşiğin bir rasemik karışım olmadığı S izomeri yapısında olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla, çalışmada kullanılan tüm 2H-3,4-dihidro-1,4-benzoksazin-3-on türevleri S izomeri olarak ele alınmıştır.



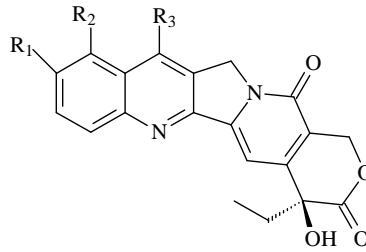
Şekil 3.1. S3 bileşiğine ait kristalografi sonucu

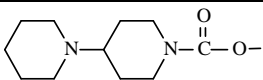
Bileşikler, Catalyst programında bulunan dahili 2D/3D görselleştirici kullanılarak hazırlanmıştır. Tüm bileşikler S konfigürasyonunda çizilmiştir. Catalyst programı, her bir bileşik için konformasyonel modelleri Poling Algoritması (Smellie, 1995) kullanarak otomatik bir şekilde oluşturmuştur. “En iyi konformer oluşturulması” işlemi global minimumdan 0-20 kcal/mol’lük bir sınır içerisinde, maksimum sayıda konformer oluşumu için varsayılan olarak 250 seçilerek uygulanmıştır.

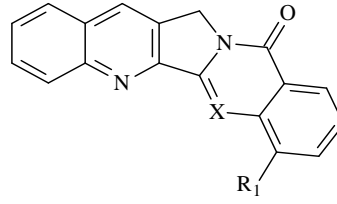
Oluşturulan konformasyonlar ortak moleküler özellikleri çakıştırmak ve farmakofor hipotezi oluşturmak için kullanılmıştır. HypoGen programı, çalışılan setteki moleküllerde ortak olan ve kimyasal açıdan önem taşıyan fonksiyonel grupları çakıştırmak konformasyonlardan yararlanmıştır. Bu çakıştırılan yapılar üzerinden farmakoforik bir hipotez ortaya konulmuştur.

Farmakofor hipotezinin oluşturulmasında; daha önceden Topoizomeraz I enzimine karşı aktivitesi test edilmiş bazı sübstitüe 2H-3,4-dihidro-1,4-benzoksazin-3-on türevi bileşiklere ait aktivite değerleri  $\mu\text{g/ml}$  cinsinden  $\text{IC}_{50}$  olarak, moleküllere ait ortak özellikleri ortaya koymak için hidrojen bağı alıcısı (HBA), hidrofobik özellik (Hyd) ve aromatik halka (RA) özellikleri seçilmiştir. Bu çalışma sonucunda 10 adet hipotez elde edilmiştir. Bu hipotezler içerisinde istatistiksel parametreleri en uygun olarak gördüğümüz bir numaralı hipotez ile çalışmalar yürütülmüştür. Seçilen hipotez Çizelge 3.2.'de görülen 24 bileşikten oluşan test serisine uygulanmıştır. Bu çizelgede görülen ilk 6 bileşik Topoizomeraz I'e karşı etkili bileşiklerdir. Diğer moleküller ise daha önceden antimikrobiyal aktiviteleri test edilmiş bileşiklerdir (Yalçın ve ark., 2000; Ören ve ark., 2002; Cagir ve ark., 2003; Yıldız ve ark., 2004; Cheng ve ark., 2004; Xiao ve ark., 2006; Tekiner ve ark., 2008; Ertan, 2005; Bolelli, 2007; Yılmaz, 2008).

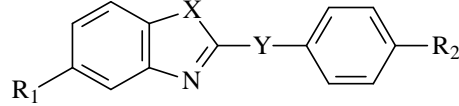
**Çizelge 3.2.** HypoGen analizinde kullanılan test serisi



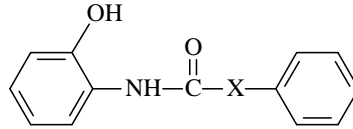
Bileşikler	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Kamptotesin	-H	-H	-H
Topotekan	-OH	-CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-H
İrinotekan		-H	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>



Bileşikler	X	R <sub>1</sub>	
Luotonin A	-N-	-H	Çagır ve ark., 2003
Rosettasin	-CH-	-H	Cheng ve ark., 2004
Hidroksiakuminat	-CH-	-CH <sub>2</sub> OH	Xiao ve ark., 2006



Bileşik Kodu	X	Y	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	
T01	-O-	-CH <sub>2</sub> -	-H	-H	Yalçın ve ark., 2000
T02	-O-	-	-H	-H	Yalçın ve ark., 2000
T03	-NH-	-CH <sub>2</sub> -	-H	-H	Yalçın ve ark., 2000
T04	-NH-	-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -	-H	-H	Yıldız ve ark., 2004
T05	-S-	-CH <sub>2</sub> O-	-H	-H	Yıldız ve ark., 2004
T06	-S-	-CH <sub>2</sub> O-	-H	-Cl	Yıldız ve ark., 2004
T07	-O-	-CH <sub>2</sub> S-	-H	-H	Yıldız ve ark., 2004
T08	-S-	-CH <sub>2</sub> S-	-H	-H	Yıldız ve ark., 2004
T09	-NH-	-CH <sub>2</sub> S-	-H	-H	Yıldız ve ark., 2004
T10	-S-	-CH <sub>2</sub> -	-H		Yılmaz, 2008
T11	-S-	-CH <sub>2</sub> -	-H		Yılmaz, 2008
T12	-S-	-	-H		Bolelli, 2007;
T13	-S-	-	-H		Bolelli, 2007;

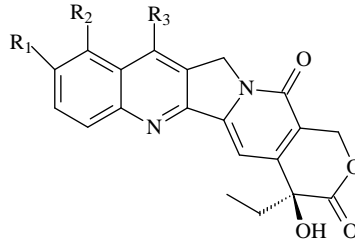


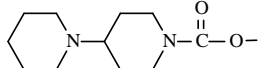
Bileşik Kodu	X	
T14	-	Ertan, 2005
T15	-CH <sub>2</sub> -	Ertan, 2005
T16	-CH <sub>2</sub> S-	Ertan, 2005

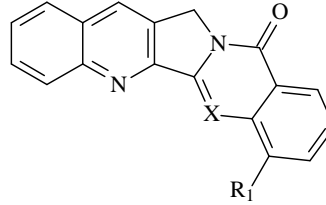
### 3.1.2. HipHop Çalışması

HipHop farmokofor modeli için Accelrys Discovery Studio 2.1. programı kullanılmıştır. HipHop analizinde çalışma serisi olarak Çizelge 3.3’de (Cinelli ve ark., 2009) verilen 6 bileşik seçilmiştir. Bileşikler programda çizildikten sonra ‘clean geometry’ işlemi ile minimize edilmiştir. Bileşikler içerisinde topotekan referans bileşik olarak seçilmiş ve bu bileşiğin MaxOmitFeat değeri 0, Principal değeri 2 olarak girilmiştir. Diğer bileşiklerin ise MaxOmitFeat değerleri 2, Principal değerleri 1 olarak girilmiştir.

**Çizelge 3.3.** HipHop analizinde kullanılan çalışma serisi



Bileşikler	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Kamptotesin	-H	-H	-H
Topotekan	-OH	-CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-H
İrinotekan		-H	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>



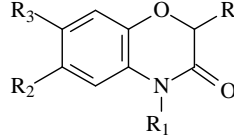
Bileşikler	X	R <sub>1</sub>
Luotonin A	-N-	-H
Rosettasin	-CH-	-H
Hidroksiakuminat	-CH-	-CH <sub>2</sub> OH

Bileşiklerin konformerleri Discovery Studio 2.1. ile belirlenmiştir. “En iyi konformer oluşturulması” işlemi enerji değeri 0-20 kcal/mol’lük bir sınır içerisinde, maksimum sayıda konformer oluşumu için önerilen 255 değeri seçilerek uygulanmıştır

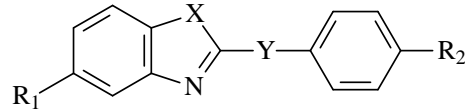
Farmakofor hipotezinin oluşturulması için hidrojen bağı alıcısı (HBA), hidrojen bağı vericisi (HBD), hidrofobik özellik ve aromatik halka özellikleri seçilmiştir ve bu

işlem sırasında tüm konformerler kullanılmıştır. Sonuçta elde edilen 5 hipotezden en uygun olanı 1 nolu hipotez olarak belirlenmiştir. Seçilen hipotez test serisindeki 28 bileşik (Çizelge 3.4) karşılaştırılarak kontrol edilmiştir.

**Çizelge 3.4.** HipHop analizinde kullanılan test serisi

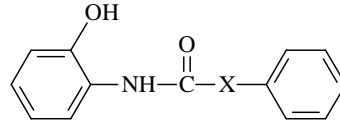


Bileşik Kodu	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R
S1	H	H	H	CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
S2	H	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
S3	H	Cl	H	CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
S5	H	H	NO <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
S13	CH <sub>3</sub>	Cl	NO <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
S14	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	H	CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
S15	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Cl	H	CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
S16	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	NO <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
S17	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Cl	NO <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
S18	H	H	H	OH



Bileşik Kodu	X	Y	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
T01	-O-	-CH <sub>2</sub> -	-H	-H
T02	-O-	-	-H	-H
T03	-NH-	-CH <sub>2</sub> -	-H	-H
T04	-NH-	-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -	-H	-H
T05	-S-	-CH <sub>2</sub> O-	-H	-H
T06	-S-	-CH <sub>2</sub> O-	-H	-Cl
T07	-O-	-CH <sub>2</sub> S-	-H	-H
T08	-S-	-CH <sub>2</sub> S-	-H	-H
T09	-NH-	-CH <sub>2</sub> S-	-H	-H
T10	-S-	-CH <sub>2</sub> -	-H	
T11	-S-	-CH <sub>2</sub> -	-H	
T12	-S-	-	-H	
T13	-S-	-	-H	





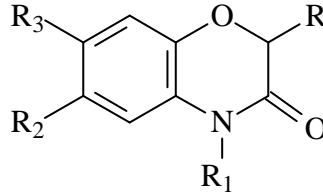
<b>Bileşik Kodu</b>	<b>X</b>
T14	-
T15	-CH <sub>2</sub> -
T16	-CH <sub>2</sub> S-

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. HypoGen METODU İLE FARMAKOFOR MODELLEMESİ ÇALIŞMASI

Bu çalışmada Topoizomeraz I enzimi üzerinde biyolojik aktivitesi tayin edilmiş 16 adet 2H-3,4-dihidro-1,4-benzoksazin-3-on türevi bileşikten oluşan çalışma serisinden hareketle (Çizelge 4.1.) üç boyutlu farmakofor hipotezleri oluşturulmuştur. Bileşiklerin topoizomeraz I enzim inhibisyon değerleri IC<sub>50</sub> olarak µg/µL cinsinden kullanılmıştır.

**Çizelge 4.1.** HypoGen farmakofor modellemesi için kullanılan çalışma serisi ve biyolojik aktivite değerleri



Bileşik Kodu	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	IC <sub>50</sub>
S1	-H	-H	-H	1,96
S2	-H	-CH <sub>3</sub>	-H	7,97
S3	-H	-Cl	-H	8,95
S4	-H	-COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-H	24,84
S5	-H	-H	-NO <sub>2</sub>	4,96
S6	-H	-H	-NH <sub>2</sub>	1058,49
S7	-H	-Cl	-NO <sub>2</sub>	9304,15
S8	-CH <sub>3</sub>	-H	-H	17,31
S9	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-H	16,18
S11	-CH <sub>3</sub>	-COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-H	532,58
S12	-CH <sub>3</sub>	-H	-NO <sub>2</sub>	11,29
S13	-CH <sub>3</sub>	-Cl	-NO <sub>2</sub>	6,46
S14	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-H	-H	5,17
S15	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-Cl	-H	6,16
S16	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-H	-NO <sub>2</sub>	3,63
S17	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-Cl	-NO <sub>2</sub>	3,71

HypoGen farmokofor modelinin eldesi için Accelrys'in Catalyst/HypoGen (versiyon 4.9) programı kullanılmıştır. Bileşikler Catalyst programında bulunan dahili 2D/3D görselleştirici kullanılarak hazırlanmıştır. Catalyst programı, her bir bileşik için

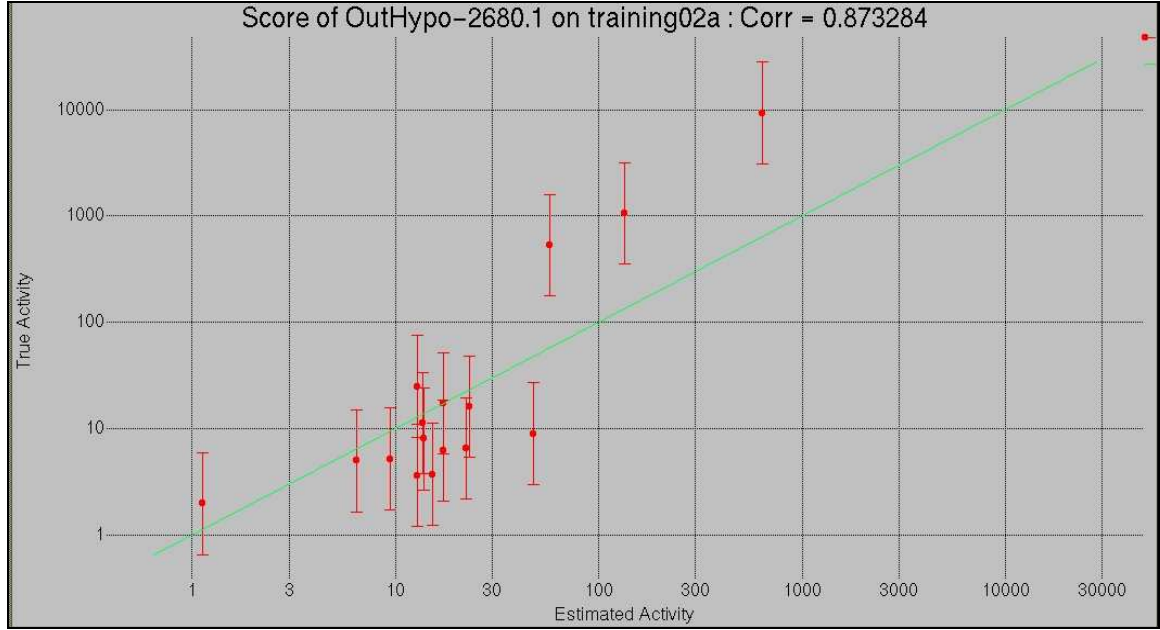
konformasyonel modelleri Poling Algoritması (Smellie, 1995) kullanarak otomatik bir şekilde oluşturmuştur. “En iyi konformer oluşturulması” işlemi enerji değeri 0-20 kcal/mol’lük bir sınır içerisinde, maksimum sayıda konformer oluşumu için önerilen 250 değeri seçilerek uygulanmıştır.

Farmakofor hipotezinin oluşturulması için hidrojen bağı alıcısı (HBA), hidrojen bağı vericisi (HBD), hidrofobik özellik ve aromatik halka özellikleri seçilmiştir ve tüm bileşikler için uncert değeri 3 olarak girilmiştir. Sonuçta elde edilen 10 hipotezden en uygun olanı istatistiksel parametrelere (Çizelge 4.2.) bakılarak belirlenmiştir.

**Çizelge 4.2.** HypoGen farmakofor hipotezlerinin istatistiksel sonuçları

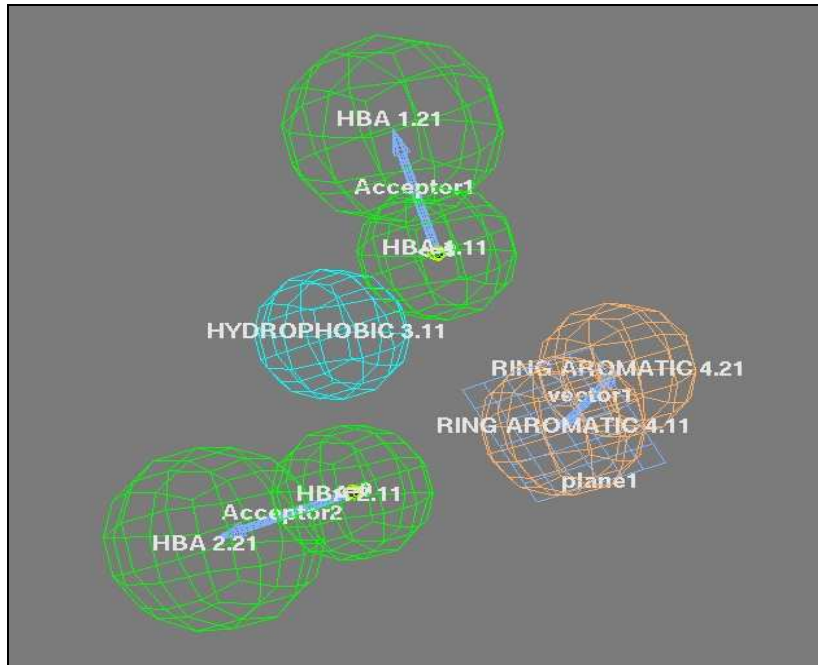
	<b>Maksimum uyum</b>	<b>Totalcoast</b>	<b>RMS</b>	<b>Korelasyon katsayısı</b>
<b>Hipotez 1</b>	11,0892	84,4311	1,18083	0,873271
<b>Hipotez 2</b>	0	88,5201	2,08274	0
<b>Hipotez 3</b>	10,2255	88,8848	1,4655	0,741578
<b>Hipotez 4</b>	8,63568	91,6012	1,6377	0,619631
<b>Hipotez 5</b>	8,85076	91,6126	1,63395	0,623686
<b>Hipotez 6</b>	8,90474	91,8293	1,64098	0,620078
<b>Hipotez 7</b>	8,73163	92,0413	1,65271	0,611186
<b>Hipotez 8</b>	8,95092	92,371	1,66038	0,608894
<b>Hipotez 9</b>	9,67338	92,6965	1,64814	0,635327
<b>Hipotez 10</b>	8,03908	93,006	1,5995	0,761059

En uygun hipotez; korelasyon katsayısı ve uyum değerleri en yüksek, aynı zamanda RMS değeri en düşük olan birinci hipotez olarak belirlenmiştir. Hipotezin korelasyon grafiği Şekil 4.1.’de verilmiştir.



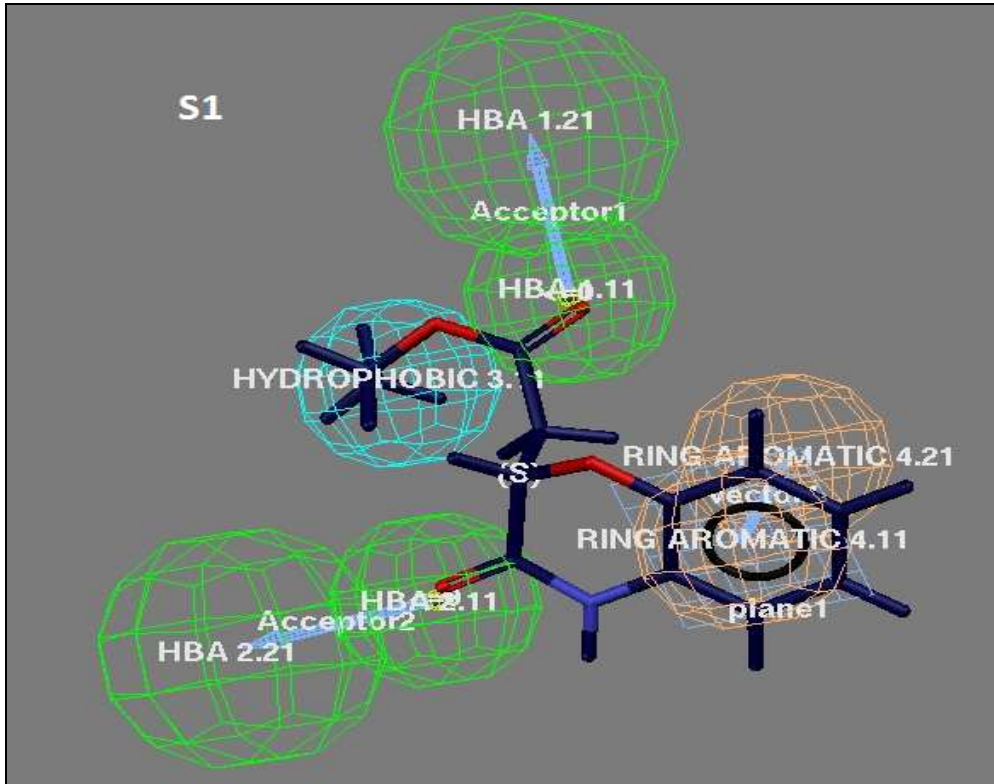
**Şekil 4.1.** Birinci hipotezin korelasyon grafiği

En uygun olarak seçilen birinci hipotezde (Şekil 4.2.) yeşil ile gösterilenler hidrojen bağı alıcısı, mavi ile gösterilenler hidrofobik özellik, turuncu ile gösterilenler aromatik halka özelliklerini tanımlamaktadır.



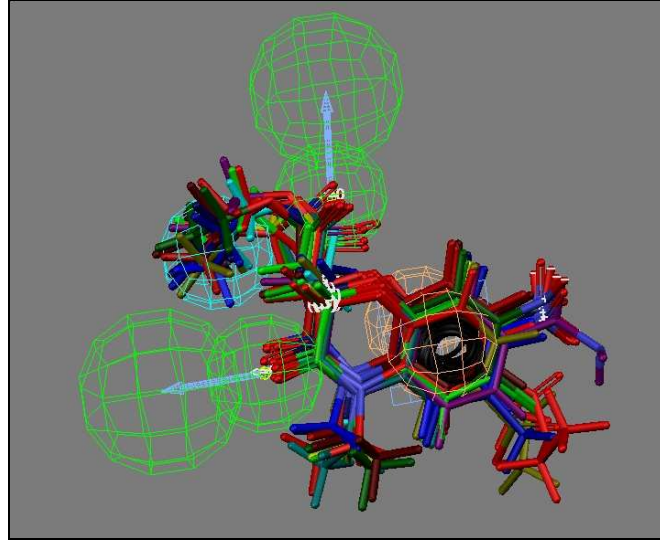
**Şekil 4.2.** HypoGen farmakofor modellemesi için uygun bulunan hipotez

Çalışma serisindeki moleküllerden biyolojik aktivitesi en yüksek olan S1 kodlu bileşik seçilen hipotez ile haritalanmıştır (Şekil 4.3). S1 kodlu molekül, hipotezin 2 hidrojen bağı alıcısı (HBA), 1 hidrofobik özellik (Hyd) ve 1 aromatik halka (RA) özellikleriyle iyi bir şekilde haritalanmaktadır. Hipotezde görülen her iki HBA da karbonil oksijenleri ile tam olarak haritalanmıştır. Hyd özellik 2H-3,4-dihidro-1,4-benzoksazin-3-on yapısının ikinci konumunda bulunan etil zincirine konulanmıştır. RA özelliği ise 2H-3,4-dihidro-1,4-benzoksazin-3-on yapısının benzen halkası ile haritalanmıştır.



Şekil 4.3. S1 kodlu bileşiğin hipotez ile haritalanması

Çalışma serisindeki tüm bileşikler seçilen hipotez ile üst üste haritalandırılmıştır (Şekil 4.4.). Tüm bileşiklerin hipotezde görülen dört özelliği ile oldukça iyi bir şekilde çakıştığı görülmüştür. Oluşturulan hipotez ile biyolojik aktiviteleri arasındaki korelasyona göre bileşiklerin tahmini aktivite sonuçları hesaplanmıştır. Tahmini biyolojik aktivite sonuçları Çizelge 4.3.'de verilmiştir.



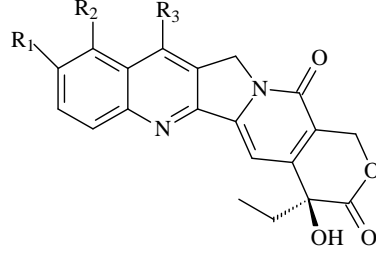
Şekil 4.4. Çalışma serisindeki tüm moleküllerin hipotez ile haritalanması

Çizelge 4.3. Çalışma serisindeki bileşiklerin tahmini biyolojik aktivite sonuçları

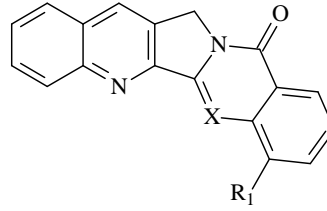
Row	Name	Activ	Uncert	Color	Estimate	Error	MolWt	Principal
1	S11a	532.58	3.0	Red	58	-9.2	321.329	
2	S07a	9304.15	3.0	Green	640	-15	314.682	
3	S08a	17.31	3.0	Blue	17	-1	249.266	
4	S12a	11.29	3.0	Yellow	14	1.2	294.263	
5	S05a	4.96	3.0	Cyan	6.4	1.3	280.237	
6	S04a	24.84	3.0	Olive	13	-1.9	307.302	
7	S06a	1058.49	3.0	Purple	130	-7.8	264.28	
8	S16a	3.63	3.0	Teal	13	3.5	308.29	
9	S15a	6.16	3.0	Red	17	2.8	297.738	
10	S13a	6.46	3.0	Green	22	3.5	328.709	
11	S09a	16.18	3.0	Blue	23	1.4	263.293	
12	S14a	5.17	3.0	Brown	9.4	1.8	263.293	
13	S17a	3.71	3.0	Dark Green	15	4.1	342.735	
14	S01a	1.96	3.0	Dark Blue	1.1	-1.7	235.239	
15	S02a	7.97	3.0	Red	14	1.7	249.266	
16	S03a	8.95	3.0	Green	48	5.3	269.684	

Belirlenen hipotez üzerinde test serisindeki (Çizelge 4.4.) bileşikler teker teker haritalanmış ve tahmini biyolojik aktivite sonuçları hesaplanmıştır.

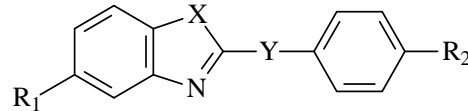
**Çizelge 4.4.** HypoGen analizinde kullanılan test serisi



Bileşikler	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Kamptotesin	-H	-H	-H
Topotekan	-OH	- CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-H
İrinotecan		-H	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>

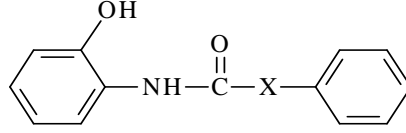


Bileşikler	X	R <sub>1</sub>
Luotonin A	-N-	-H
Rosettasin	-CH-	-H
Hidroksiakuminat	-CH-	-CH <sub>2</sub> OH



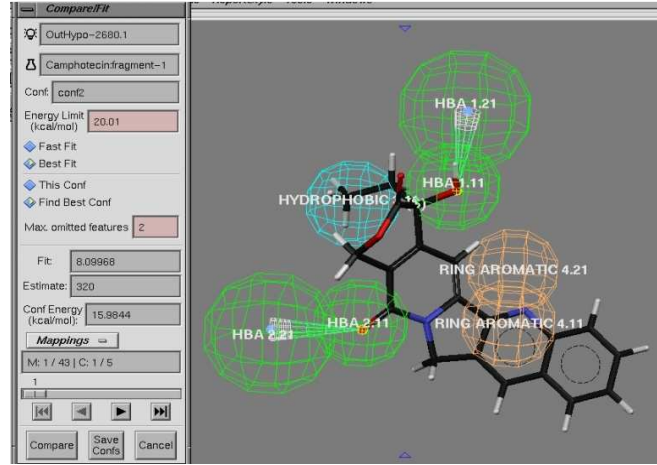
Bileşik Kodu	X	Y	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
T01	-O-	-CH <sub>2</sub> -	-H	-H
T02	-O-	-	-H	-H
T03	-NH-	-CH <sub>2</sub> -	-H	-H
T04	-NH-	-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -	-H	-H
T05	-S-	-CH <sub>2</sub> O-	-H	-H
T06	-S-	-CH <sub>2</sub> O-	-H	-Cl
T07	-O-	-CH <sub>2</sub> S-	-H	-H
T08	-S-	-CH <sub>2</sub> S-	-H	-H
T09	-NH-	-CH <sub>2</sub> S-	-H	-H
T10	-S-	-CH <sub>2</sub> -	-H	
T11	-S-	-CH <sub>2</sub> -	-H	

<b>T12</b>	-S-	-	-H	
<b>T13</b>	-S-	-	-H	



Bileşi Kodu	X
<b>T14</b>	-
<b>T15</b>	-CH <sub>2</sub> -
<b>T16</b>	-CH <sub>2</sub> S-

### Kamptotesin



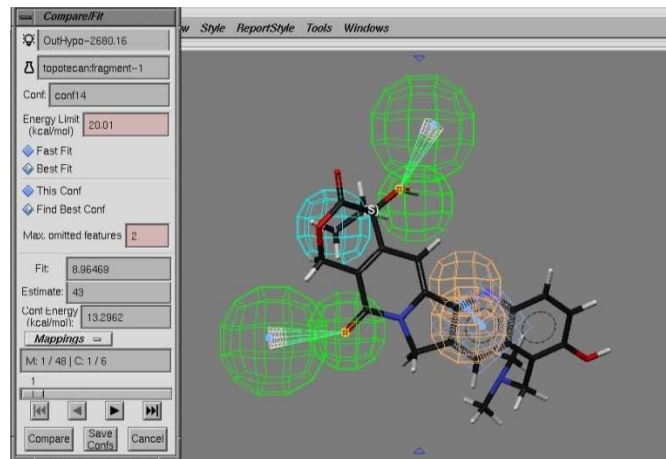
Uyum değeri: 8,09968

Tahmini biyolojik aktivitesi: 320

2 hidrojen bağı alıcısı, 1 hidrofobik ve 1 aromatik halka özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.5. Kamptotesin bileşiğinin hipotez ile haritalanması

### Topotekan



Uyum değeri: 8,96469

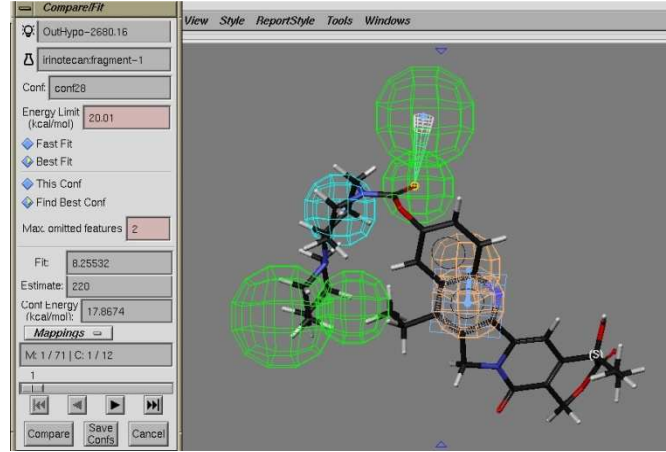
Tahmini biyolojik aktivitesi: 43

2 hidrojen bağı alıcısı, 1 hidrofobik ve 1 aromatik halka özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.6. Topotekan bileşiğinin hipotez ile haritalanması



## İrinotekan



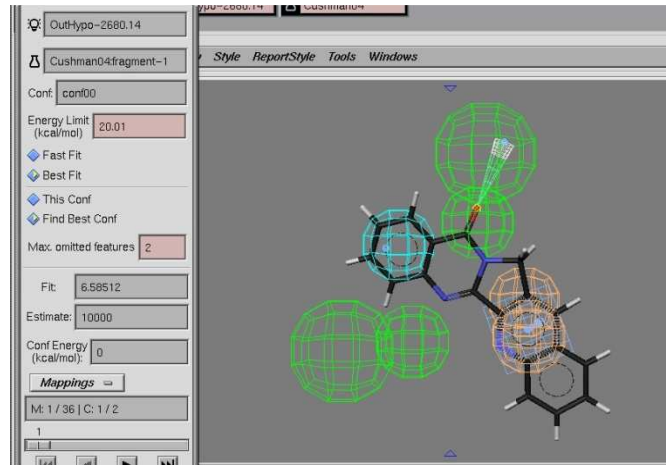
Uyum değeri: 8,25532

Tahmini biyolojik aktivitesi: 220

2 hidrojen bağı alıcısı, 1 hidrofobik ve 1 aromatik halka özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.7. İrinotekan bileşiminin hipotez ile haritalanması

## Luotonin A



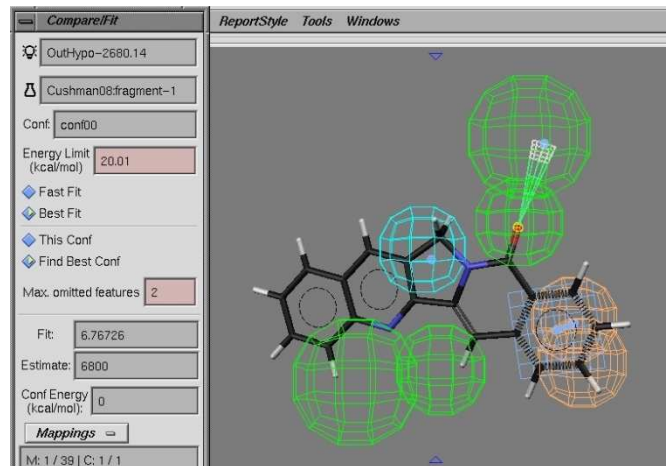
Uyum değeri: 6,58512

Tahmini biyolojik aktivitesi: 10000

2 hidrojen bağı alıcısı, 1 hidrofobik ve 1 aromatik halka özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.8. Luotonin A bileşiminin hipotez ile haritalanması

## Rosettasin



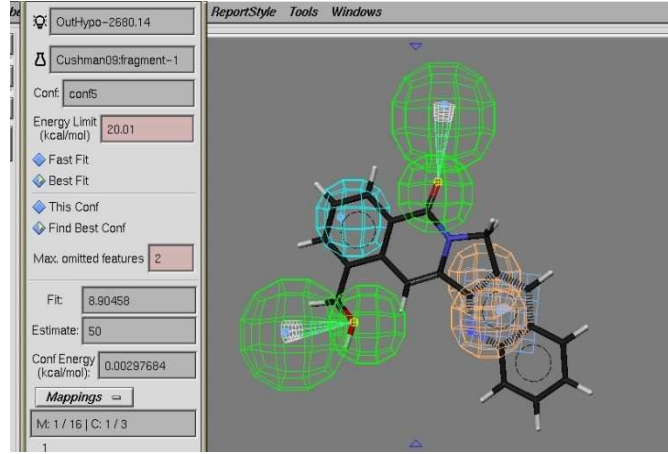
Uyum değeri: 6,76726

Tahmini biyolojik aktivitesi: 6800

2 hidrojen bağı alıcısı, 1 hidrofobik ve 1 aromatik halka özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.9. Rosettasin bileşiminin hipotez ile haritalanması

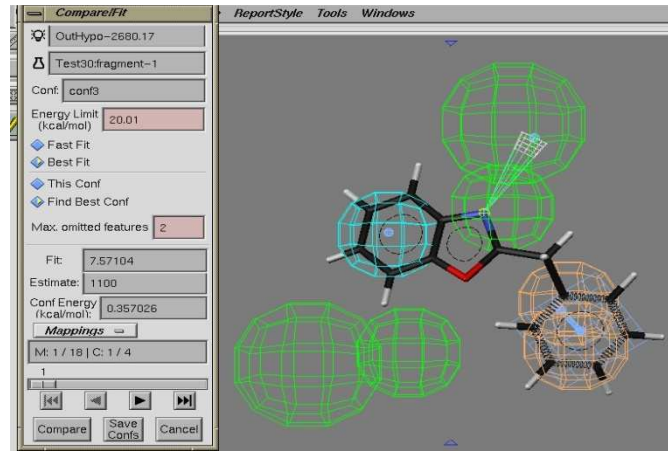
## Hidroksi-akuminat



Uyum değeri: 8,90458  
Tahmini biyolojik aktivitesi: 50  
2 hidrojen bağı alıcısı, 1 hidrofobik ve 1 aromatik halka özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.10. Hidroksiakuminat bileşiğinin hipotez ile haritalanması

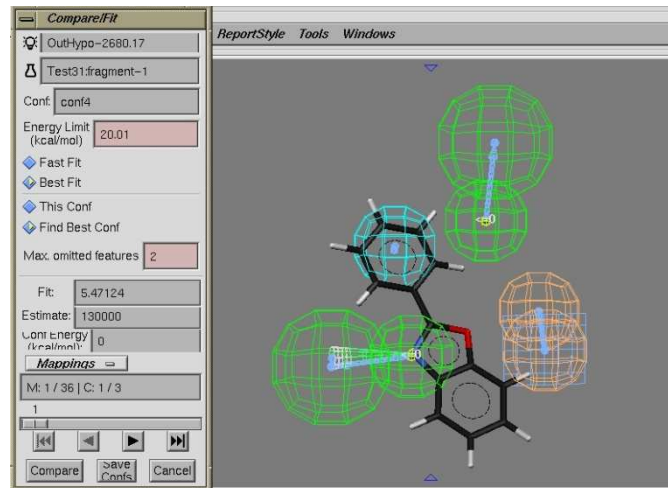
## T01



Uyum değeri: 7,57104  
Tahmini biyolojik aktivitesi: 1100  
1 hidrojen bağı alıcısı, 1 hidrofobik ve 1 aromatik halka özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.11. T01 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

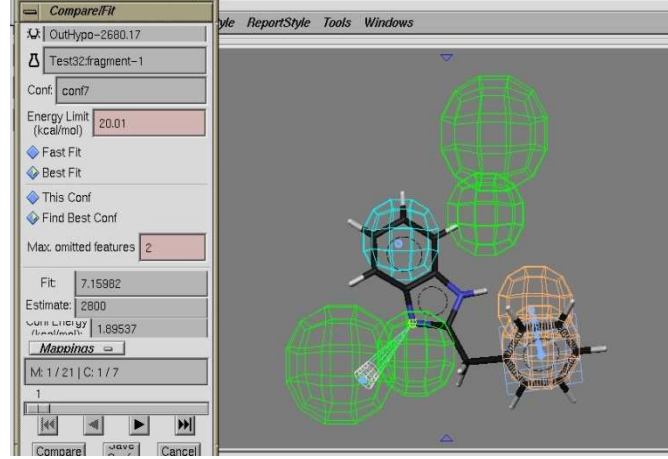
## T02



Uyum değeri: 5,42124  
Tahmini biyolojik aktivitesi: 130000  
1 hidrojen bağı alıcısı, 1 hidrofobik ve 1 aromatik halka özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.12. T02 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

T03



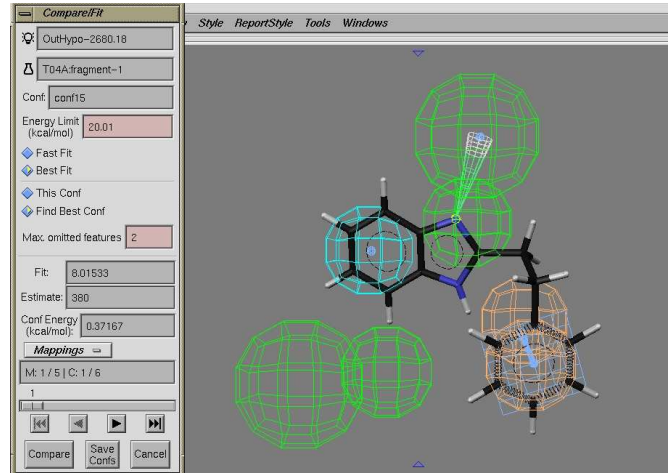
Uyum değeri: 7,15982

Tahmini biyolojik aktivitesi: 2800

1 hidrojen bağı alıcısı, 1 hidrofobik ve 1 aromatik halka özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.13. T03 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

T04



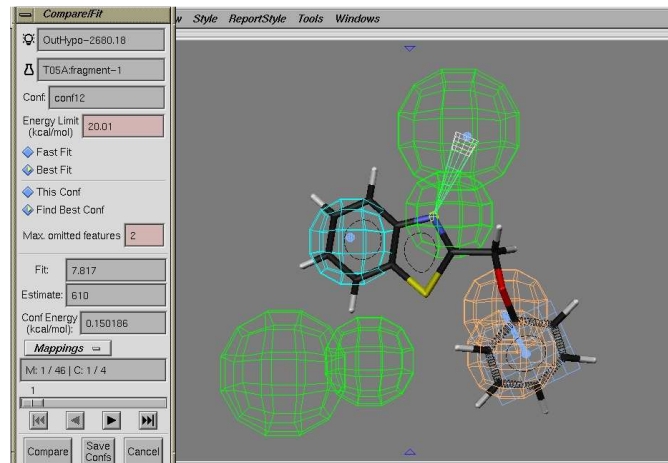
Uyum değeri: 8,01533

Tahmini biyolojik aktivitesi: 360

1 hidrojen bağı alıcısı, 1 hidrofobik ve 1 aromatik halka özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.14. T04 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

T05



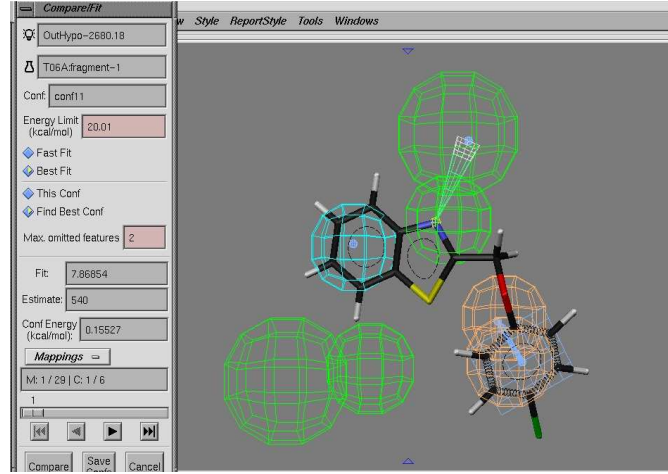
Uyum değeri: 7,817

Tahmini biyolojik aktivitesi: 610

1 hidrojen bağı alıcısı, 1 hidrofobik ve 1 aromatik halka özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.15. T05 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

**T06**



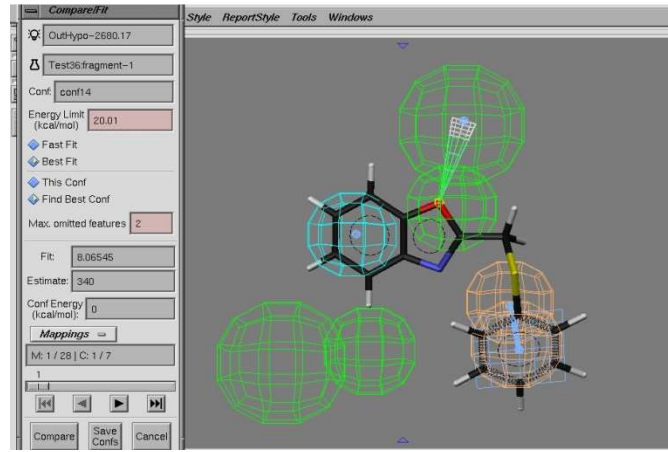
Uyum değeri: 7,86854

Tahmini biyolojik aktivitesi: 540

1 hidrojen bağı alıcısı, 1 hidrofobik ve 1 aromatik halka özelliği ile haritalanmaktadır.

**Şekil 4.16.** T06 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

**T07**



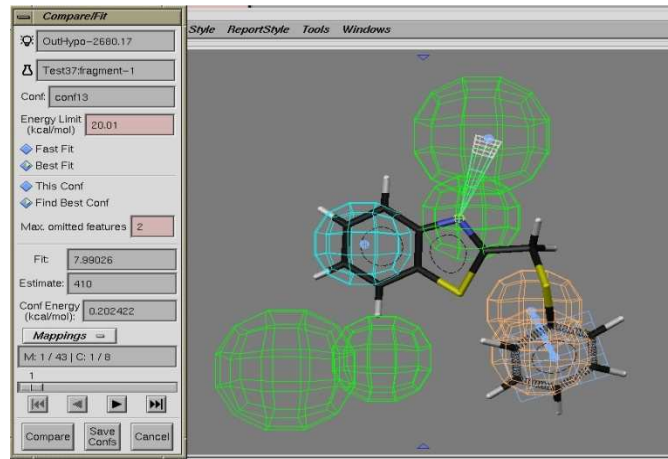
Uyum değeri: 8,06545

Tahmini biyolojik aktivitesi: 340

1 hidrojen bağı alıcısı, 1 hidrofobik ve 1 aromatik halka özelliği ile haritalanmaktadır.

**Şekil 4.17.** T07 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

**T08**



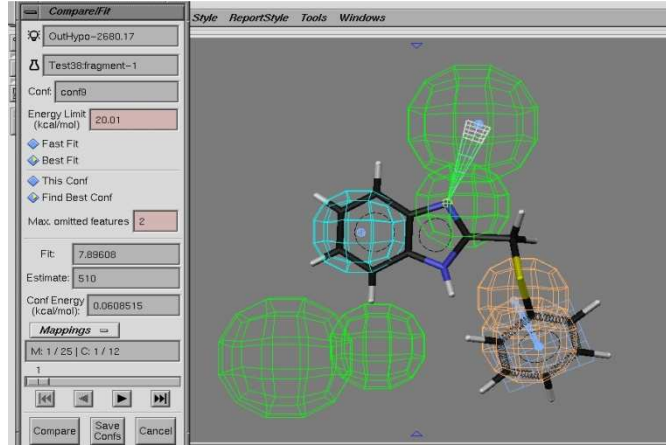
Uyum değeri: 7,99026

Tahmini biyolojik aktivitesi: 410

1 hidrojen bağı alıcısı, 1 hidrofobik ve 1 aromatik halka özelliği ile haritalanmaktadır.

**Şekil 4.18.** T08 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

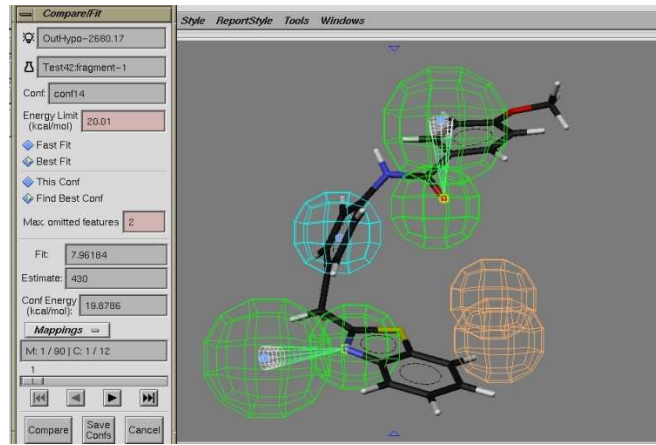
**T09**



Uyum değeri: 7,89608  
Tahmini biyolojik aktivitesi: 510  
1 hidrojen bağı alıcısı, 1 hidrofobik ve 1 aromatik halka özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.19. T09 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

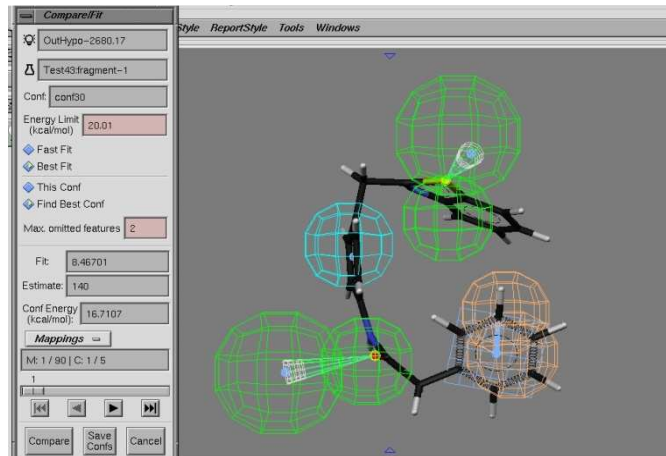
**T10**



Uyum değeri: 7,96184  
Tahmini biyolojik aktivitesi: 430  
2 hidrojen bağı alıcısı, 1 hidrofobik özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.20. T10 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

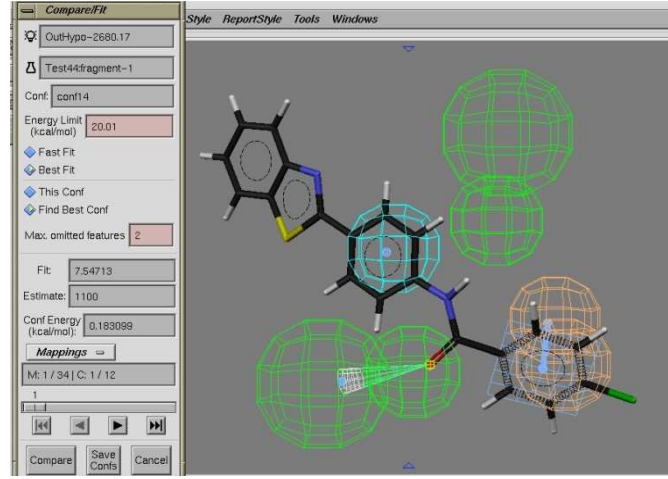
**T11**



Uyum değeri: 8,46701  
Tahmini biyolojik aktivitesi: 140  
2 hidrojen bağı alıcısı, 1 hidrofobik ve 1 aromatik halka özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.21. T11 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

T12



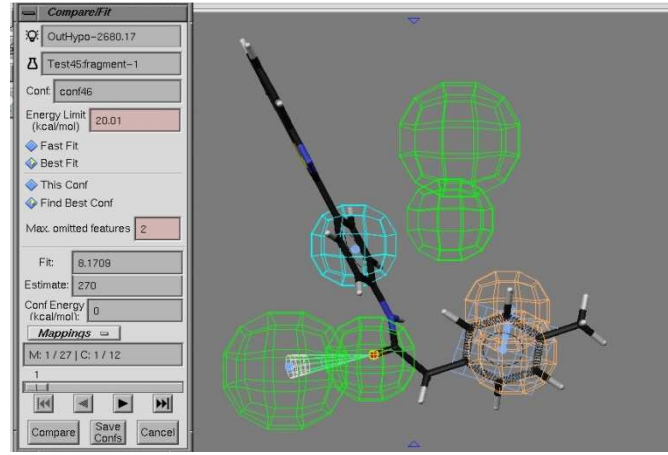
Uyum değeri: 7,54713

Tahmini biyolojik aktivitesi: 1100

1 hidrojen bağı alıcısı, 1 hidrofobik ve 1 aromatik halka özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.22. T12 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

T13



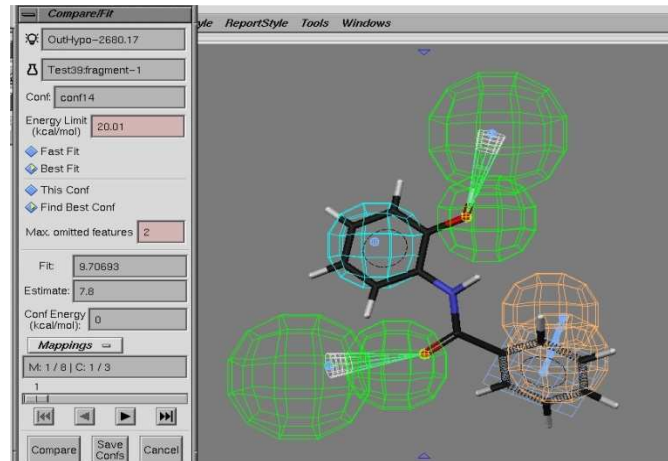
Uyum değeri: 8,1709

Tahmini biyolojik aktivitesi: 270

1 hidrojen bağı alıcısı, 1 hidrofobik ve 1 aromatik halka özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.23. T13 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

T14



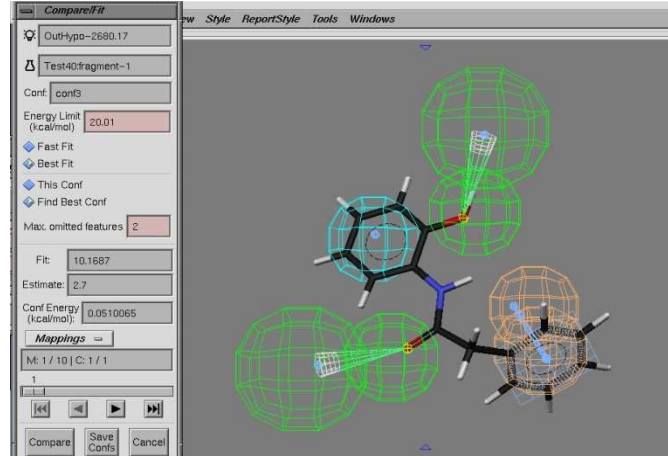
Uyum değeri: 9,70693

Tahmini biyolojik aktivitesi: 7,8

2 hidrojen bağı alıcısı, 1 hidrofobik ve 1 aromatik halka özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.24. T14 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

**T15**



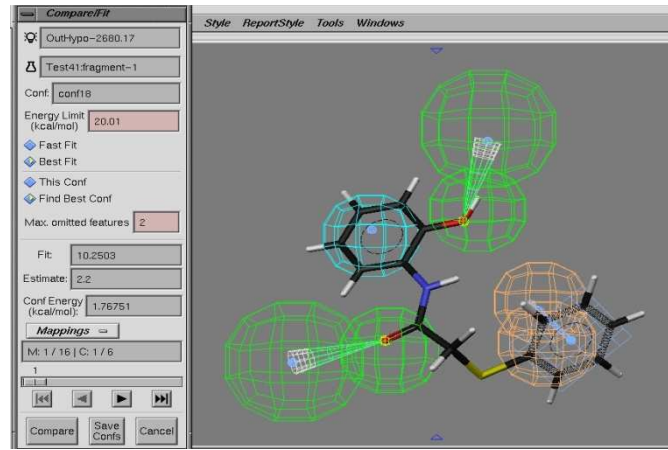
Uyum değeri: 10,1687

Tahmini biyolojik aktivitesi: 2,7

2 hidrojen bağı alıcısı, 1 hidrofobik ve 1 aromatik halka özelliği ile haritalanmaktadır.

**Şekil 4.25.** T15 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

**T16**



Uyum değeri: 10,2503

Tahmini biyolojik aktivitesi: 2,2

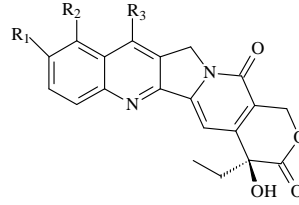
2 hidrojen bağı alıcısı, 1 hidrofobik ve 1 aromatik halka özelliği ile haritalanmaktadır.

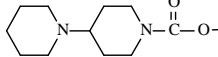
**Şekil 4.26.** T16 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

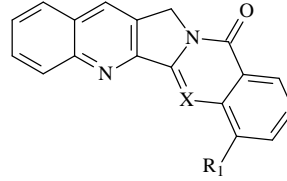
## 4.2. HipHop METODU İLE FARMAKOFOR MODELLEME ÇALIŞMASI

Bu çalışmada Topoizomeraz I enzim inhibitörlerinin spesifikliğini açıklamak üzere topoizomeraz I enziminin inhibisyonundan sorumlu 6 bileşik (Çizelge 4.5.) üzerinden (çalışma serisi) üç boyutlu farmakofor hipotezleri oluşturulmuştur. Çalışma serisindeki 6 molekül içerisinde yapılan HypoGen farmakofor modellemesi analizinde en etkili sonucu veren Topotekan bileşiği referans olarak seçilmiştir.

**Çizelge 4.5.** HipHop farmakofor modellemesi için kullanılan çalışma serisi



Bileşikler	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>Kamptotesin</b>	-H	-H	-H
<b>Topotekan</b>	-OH	-CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-H
<b>İrinotecan</b>		-H	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>



Bileşikler	X	R <sub>1</sub>
<b>Luotonin A</b>	-N-	-H
<b>Rosettasin</b>	-CH-	-H
<b>Hidroksiakuminat</b>	-CH-	-CH <sub>2</sub> OH

Referans olarak seçilen topotekan bileşiğinin MaxOmitFeat değeri 0, Principal değerini 2 olarak girilmiştir. Diğer bileşiklerin ise MaxOmitFeat değerleri 2, Principal değerleri 1 olarak girilmiştir.

Bileşiklerin konformerleri Discovery Studio 2.1. ile belirlenmiştir. “En iyi konformer oluşturulması” işlemi enerji değeri 0-20 kcal/mol’lük bir sınır içerisinde, maksimum sayıda konformer oluşumu için önerilen olarak 255 seçilerek uygulanmıştır. Çizelge 4.6.’de moleküllerin konformasyon analizi sonucunda elde edilen sonuçlar verilmiştir.

**Çizelge 4.6.** Konformasyon analizi sonuçları

Bileşikler	Konformer sayısı	Absolut Enerji	MaxOmitFeat	Principal	Rölatif Enerji
<b>Kamptotesin</b>	5	60,211 – 76,184	2	1	0 – 15,973
<b>Topotekan</b>	30	64,442 – 83,686	0	2	0 – 19,243
<b>İrinotekan</b>	69	72,165 – 91,833	2	1	0 – 19,669
<b>Luotonin A</b>	1	70,173	2	1	0
<b>Rosettasin</b>	1	57,400	2	1	0
<b>Hidroksiakuminat</b>	3	65,113 – 67,534	2	1	0 – 2,422



Farmakofor hipotezinin oluşturulması için hidrojen bağı alıcısı (HBA), hidrojen bağı vericisi (HBD), hidrofobiklik ve aromatik halka özellikleri seçilmiştir. Sonuçta elde edilen 5 hipotezden bir numaralı hipotez bu çalışmada kullanılmıştır. (Çizelge 4.7).

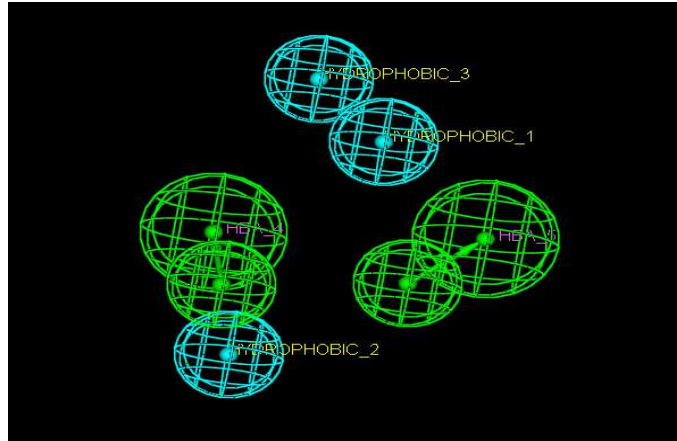
**Çizelge 4.7.** HipHop farmakofor hipotezlerinin sonuçları

1 HHHAA Rank: 59.370 DH: 101111 PH: 010000 Max Fit: 5
2 HHHAA Rank: 59.353 DH: 101111 PH: 010000 Max Fit: 5
3 HHAA Rank: 53.041 DH: 111111 PH: 000000 Max Fit: 4
4 HHAA Rank: 51.793 DH: 111111 PH: 000000 Max Fit: 4
5 RHAA Rank: 51.733 DH: 111111 PH: 000000 Max Fit: 4
Halted normally.
CPU time = 3 s System time = 0 s

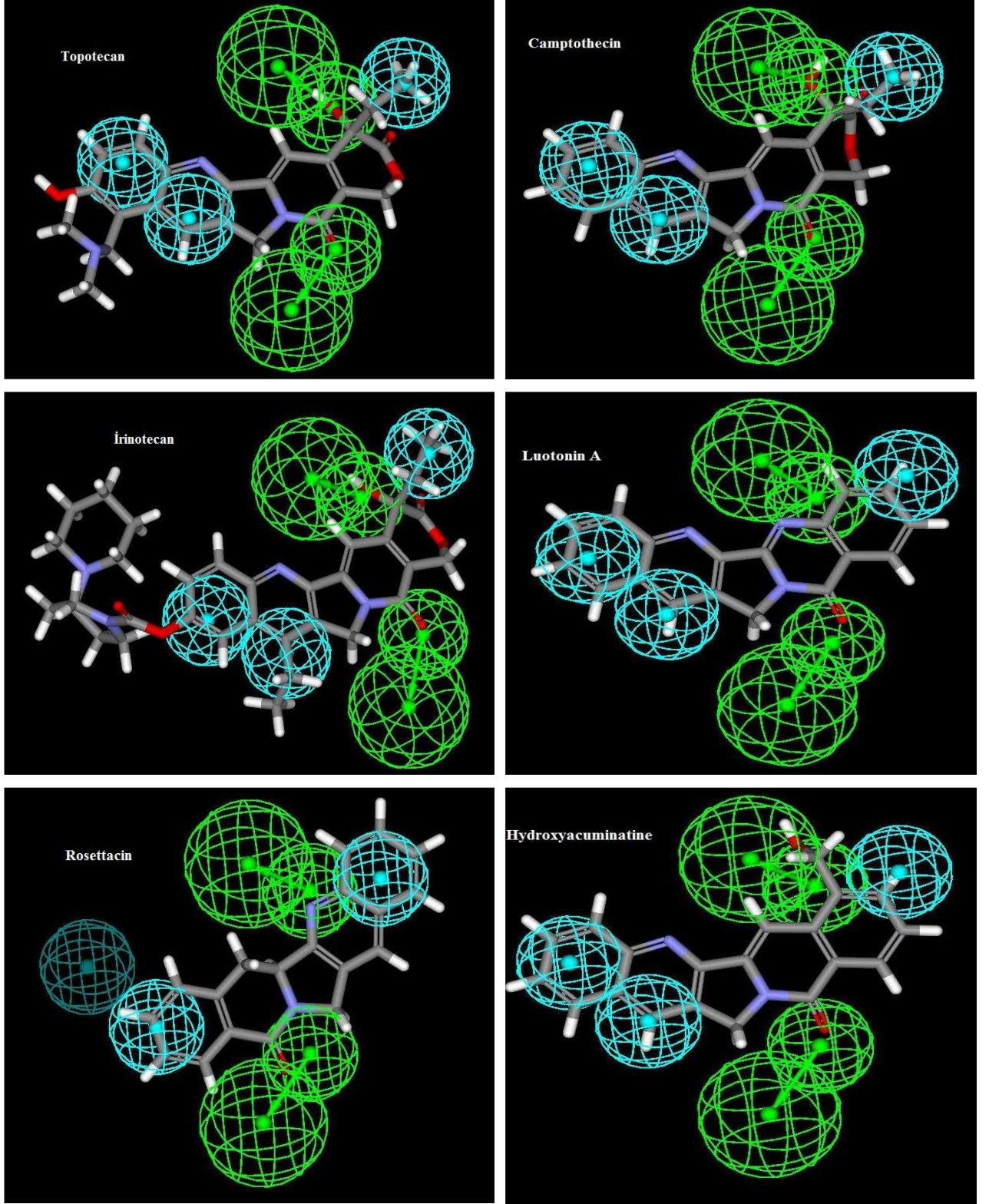
H, Hidrofobik; A, Hidrojen bağı alıcısı; R, Aromatik Halka

DH (Direkt hit) Hipotezin tüm özellikleri haritalanmıştır. Direkt Hit = 1 evet anlamına gelmektedir; PH (Kısmi Hit) hipotezin kısmi olarak haritalandığına işaret eder. Kısmi Hit = 0 hayır anlamına gelmektedir. Her numara aynı sıra ile Çizelge 3.1.'deki bir moleküle karşılık gelmektedir.

Hipotezler 59,370 – 51,733 arasında değişen skora sahip dört veya beş özellik içermektedir. Birinci ve ikinci hipotezlerde 2 Hidrojen bağı alıcısı ve 3 Hidrofobiklik olmak üzere 5 özellik ortaya çıkarken üçüncü ve dördüncü hipotezlerde 2 Hidrojen bağı alıcısı ve 2 Hidrofobik özellik olmak üzere 4 özellik ortaya çıkmıştır. Beşinci hipotezde ise 2 Hidrojen bağı alıcısı, 1 Hidrofobik özellik ve 1 aromatik halka özelliği tanımlanmıştır. Bu çalışmada bir numaralı hipotez seçilmiştir. Seçilen hipotezde (Şekil 4.27.) yeşil ile gösterilenler hidrojen bağı alıcısı, mavi ile gösterilenler hidrofobik özellik özelliklerini tanımlamaktadır.



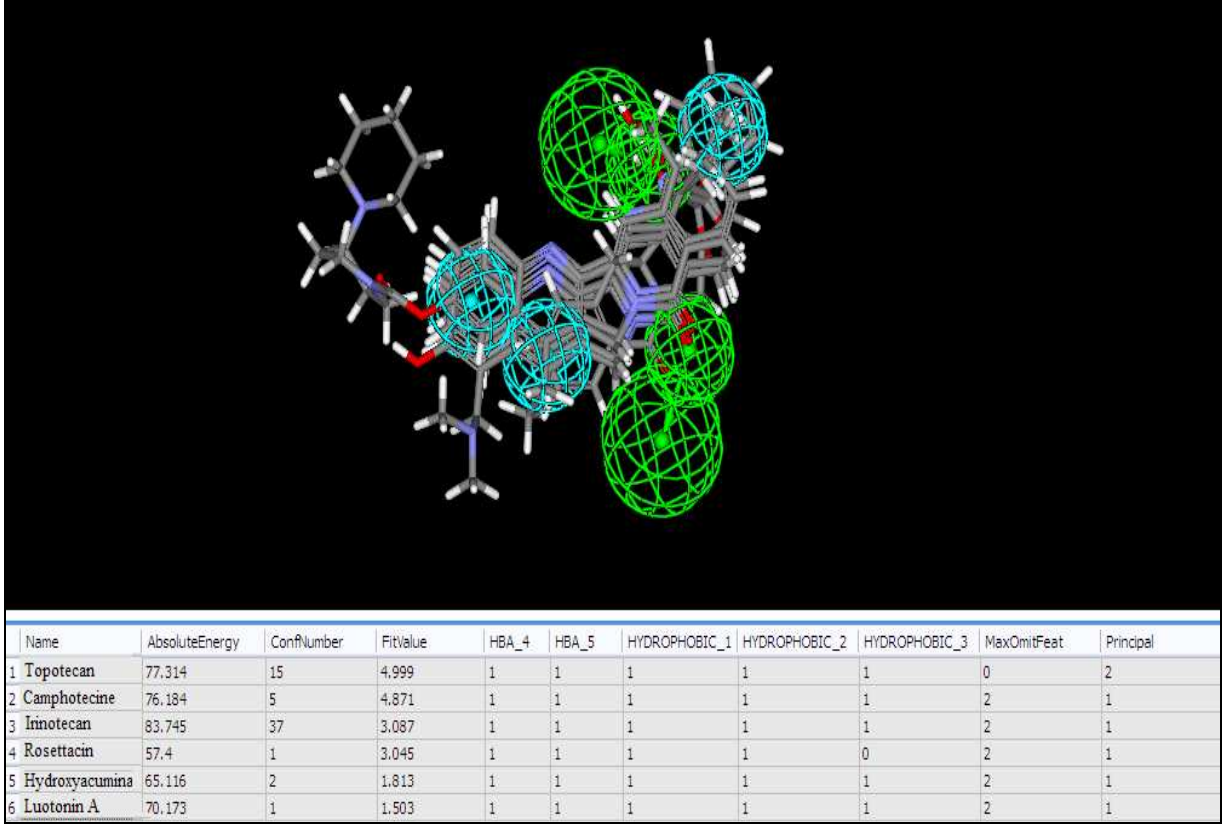
**Şekil 4.27.** HipHop farmakofor modellemesi için uygun bulunan hipotez



**Şekil 4.28.** Çalışma serisindeki moleküllerin tek tek hipotez ile haritalanması

Şekil 4.28. ve Şekil 4.29’da çalışma serisindeki tüm yapıların seçilen hipotez ile haritalanışlarını göstermektedir. Referans olarak seçilen Topotecan molekülü hipotezin beş özelliğini de iyi bir şekilde haritalamaktadır. Kamptotesin bileşiminde 1 hidrofobik;

irinotekan bileşiğinde 2 hidrojen bağı alıcısı; Luotonin A, Rosettasin ve Hidroksiakuminat bileşiklerinde ise 1 hidrofobik özellik ve 1 hidrojen bağı alıcısı haritalanamamaktadır.



Şekil 4.29. Çalışma setindeki tüm moleküllerin hipotez ile haritalanması

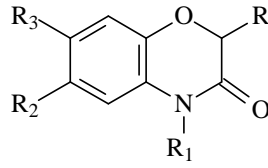
Çalışma serisinde verilen moleküllerin uyum değerleri çizelge 4.8.'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Çalışma serisinin hipotezle uyum sonuçları

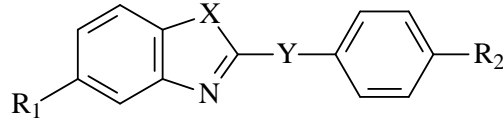
Bileşikler	Uyum Değeri
<b>Topotekan</b>	4,999
<b>Kamptotesin</b>	4,871
<b>Irinotekan</b>	3,0873
<b>Rosettasin</b>	3,045
<b>Hidroksiakuminat</b>	1,813
<b>Luotonin A</b>	1,503

Seçilen hipotez ile Çizelge 4.9 da gösterilen test serisindeki bileşiklerde çakıştırılarak haritalandırılmıştır.

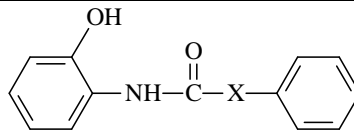
Çizelge 4.9. HipHop analizinde kullanılan test serisi



Bileşik Kodu	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R
S1	H	H	H	CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
S2	H	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
S3	H	Cl	H	CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
S5	H	H	NO <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
S13	CH <sub>3</sub>	Cl	NO <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
S14	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	H	CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
S15	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Cl	H	CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
S16	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	NO <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
S17	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Cl	NO <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
S18	H	H	H	OH

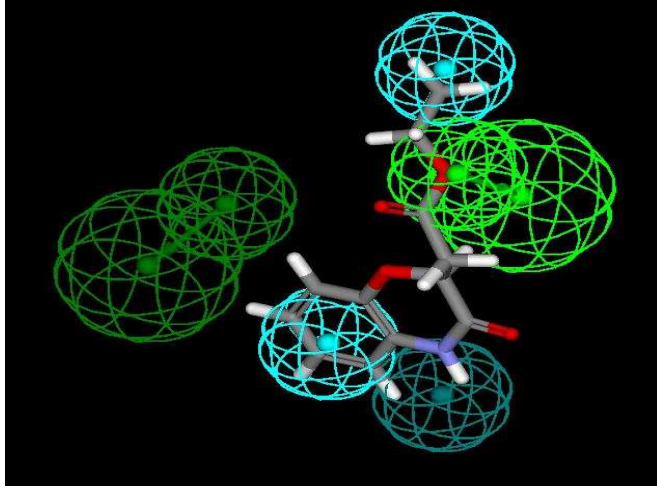


Bileşik Kodu	X	Y	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
T01	-O-	-CH <sub>2</sub> -	-H	-H
T02	-O-	-	-H	-H
T03	-NH-	-CH <sub>2</sub> -	-H	-H
T04	-NH-	-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -	-H	-H
T05	-S-	-CH <sub>2</sub> O-	-H	-H
T06	-S-	-CH <sub>2</sub> O-	-H	-Cl
T07	-O-	-CH <sub>2</sub> S-	-H	-H
T08	-S-	-CH <sub>2</sub> S-	-H	-H
T09	-NH-	-CH <sub>2</sub> S-	-H	-H
T10	-S-	-CH <sub>2</sub> -	-H	
T11	-S-	-CH <sub>2</sub> -	-H	
T12	-S-	-	-H	
T13	-S-	-	-H	



Bileşik Kodu	X
T14	-
T15	-CH <sub>2</sub> -
T16	-CH <sub>2</sub> S-

S1

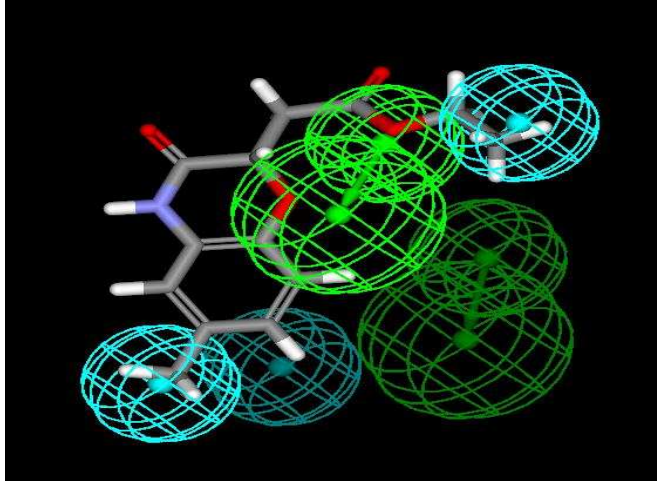


Uyum değeri: 2,577

1 hidrojen bağı alıcısı, 2 hidrofobik özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.30. S1 bileşinin hipotez ile haritalanması

S2

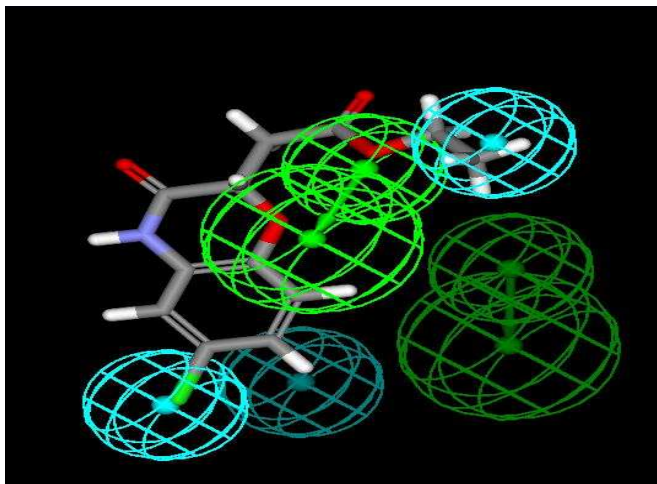


Uyum değeri: 2,737

1 hidrojen bağı alıcısı, 2 hidrofobik özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.31. S2 bileşinin hipotez ile haritalanması

S3

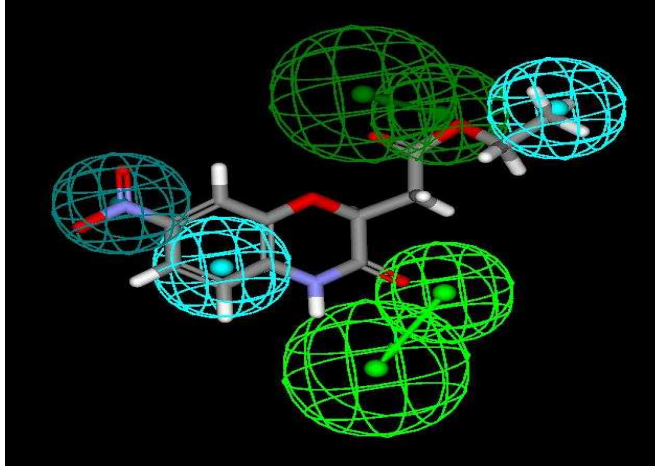


Uyum değeri: 2,769

1 hidrojen bağı alıcısı, 2 hidrofobik özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.32. S3 bileşinin hipotez ile haritalanması

S5

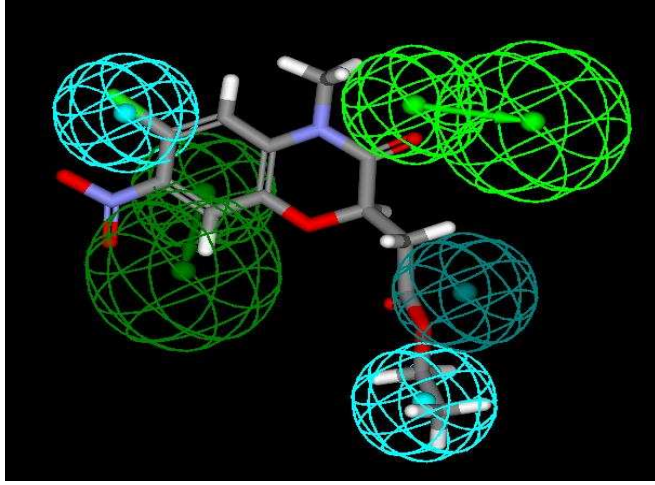


Uyum değeri: 2,694

1 hidrojen bağı alıcısı, 2 hidrofobik özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.33. S5 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

S13

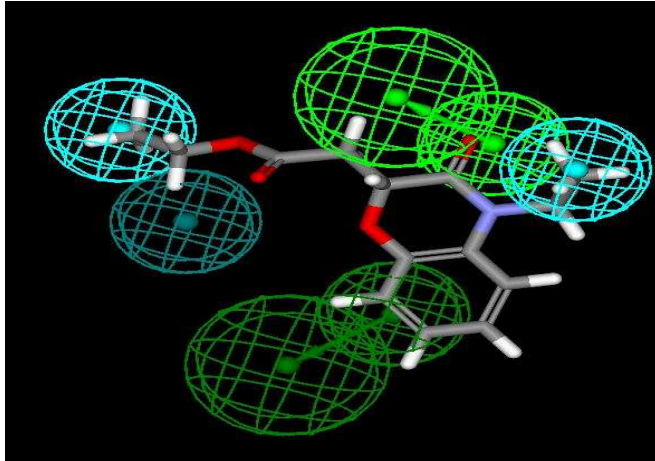


Uyum değeri: 2,565

1 hidrojen bağı alıcısı, 2 hidrofobik özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.34. S13 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

S14

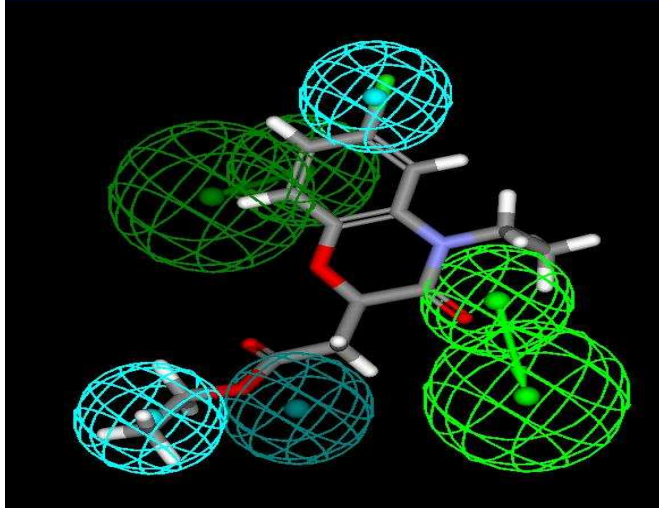


Uyum değeri: 2,599

1 hidrojen bağı alıcısı, 2 hidrofobik özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.35. S14 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

S15

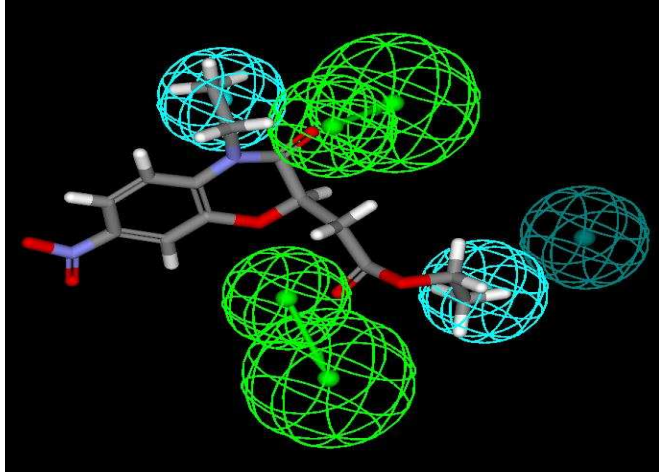


Uyum değeri: 2,642

1 hidrojen bağı alıcısı, 2 hidrofobik özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.36. S15 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

S16

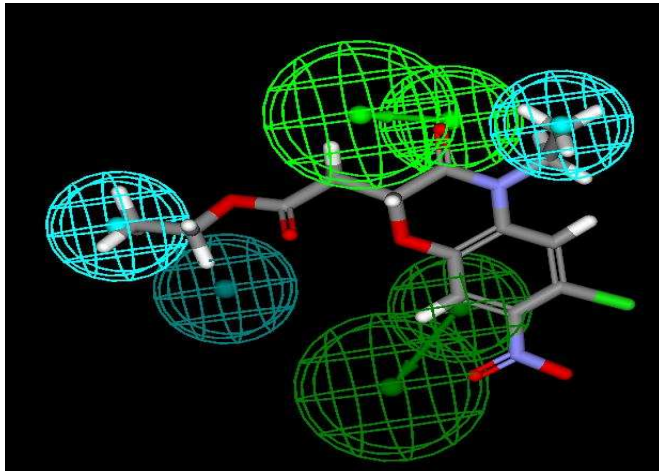


Uyum değeri: 2,576

2 hidrojen bağı alıcısı, 2 hidrofobik özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.37. S16 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

S17

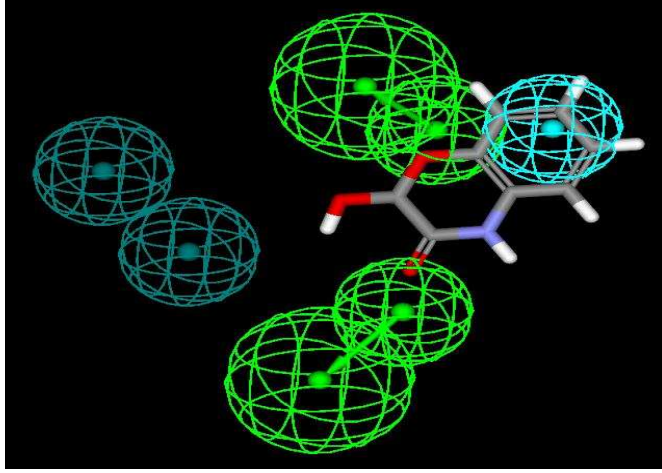


Uyum değeri: 2,614

1 hidrojen bağı alıcısı, 2 hidrofobik özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.38. S17 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

S18

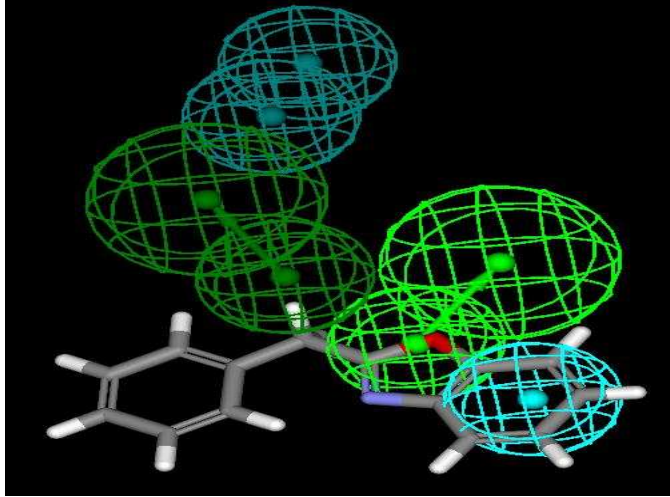


Uyum değeri: 2,044

2 hidrojen bağı alıcısı, 1 hidrofobik özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.39. S18 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

T01

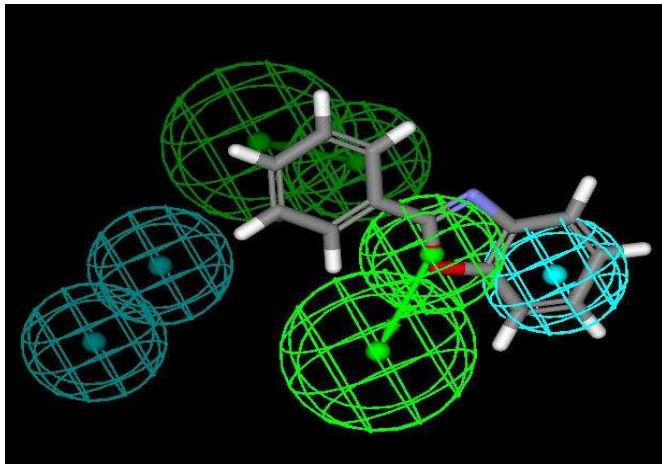


Uyum değeri: 1,917

hidrojen bağı alıcısı, 1 hidrofobik özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.40. T01 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

T02



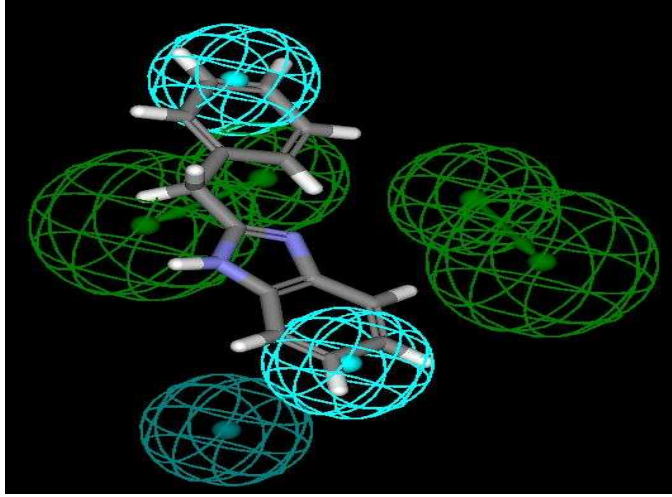
Uyum değeri: 1,91

1 hidrojen bağı alıcısı, 1 hidrofobik özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.41. T02 bileşiğinin hipotez ile haritalanması



T03

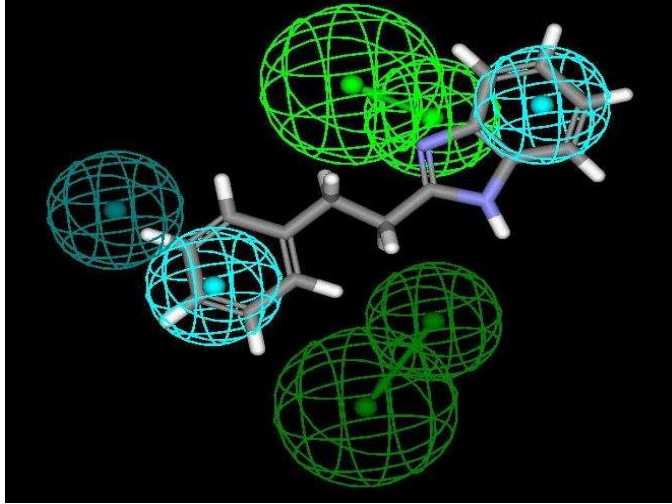


Uyum değeri: 1,166

2 hidrofobik özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.42. T03 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

T04

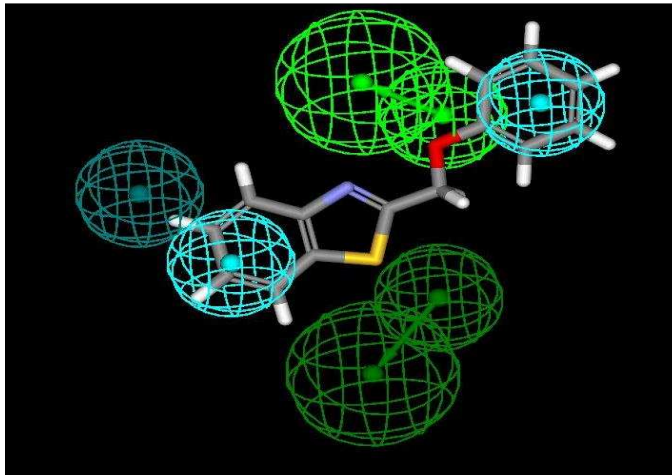


Uyum değeri: 2,32

1 hidrojen bağı alıcısı, 2 hidrofobik özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.43. T04 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

T05

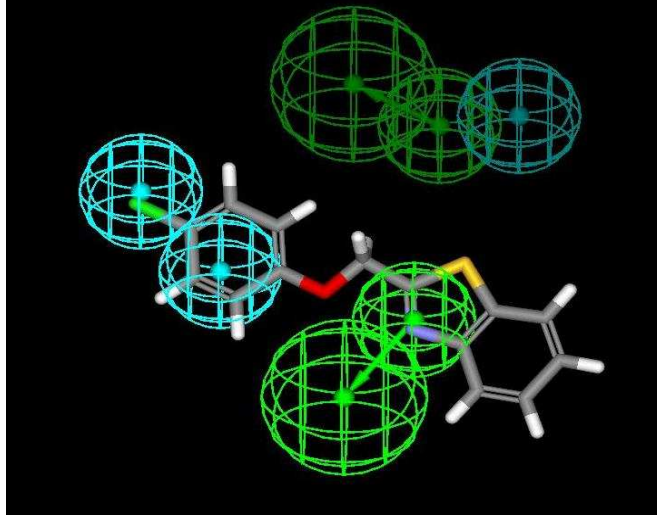


Uyum değeri: 2,256

1 hidrojen bağı alıcısı, 2 hidrofobik özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 4.44. T05 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

T06

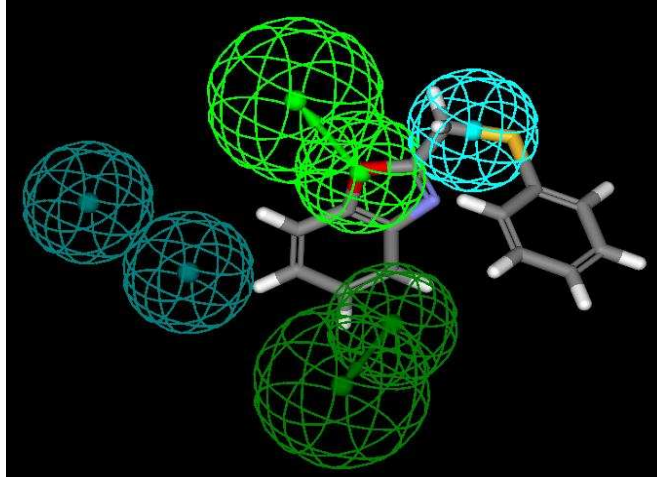


Uyum değeri: 2,808

1 hidrojen bağı alıcısı, 2  
hidrofobik özelliği ile  
haritalanmaktadır.

Şekil 4.45. T06 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

T07

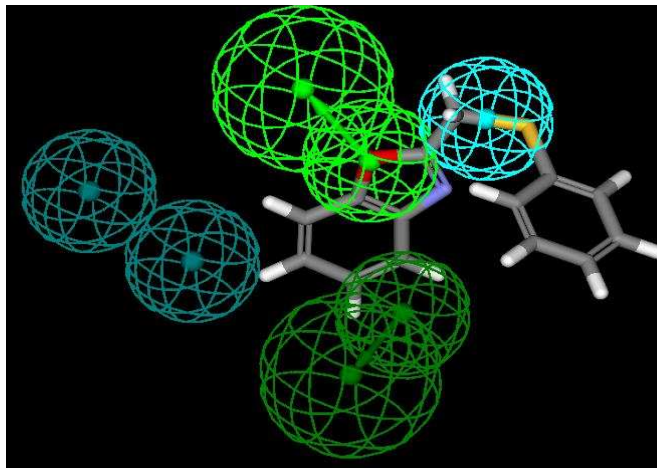


Uyum değeri: 1,989

1 hidrojen bağı alıcısı, 1  
hidrofobik özelliği ile  
haritalanmaktadır.

Şekil 4.46. T07 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

T08

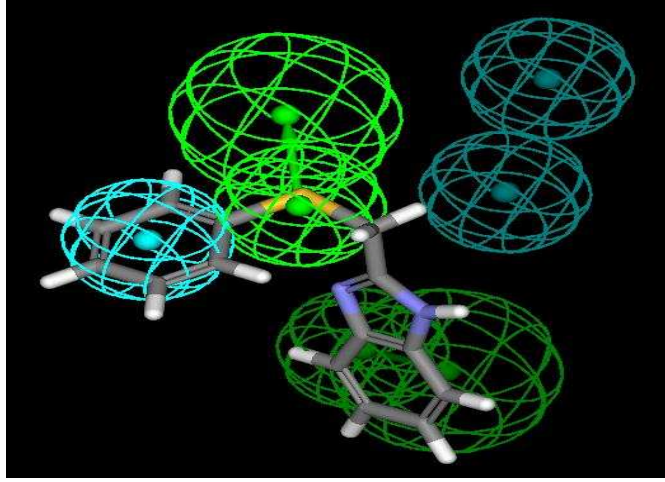


Uyum değeri: 1,00

1 hidrojen bağı alıcısı, 1  
hidrofobik özelliği ile  
haritalanmaktadır.

Şekil 4.47. T08 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

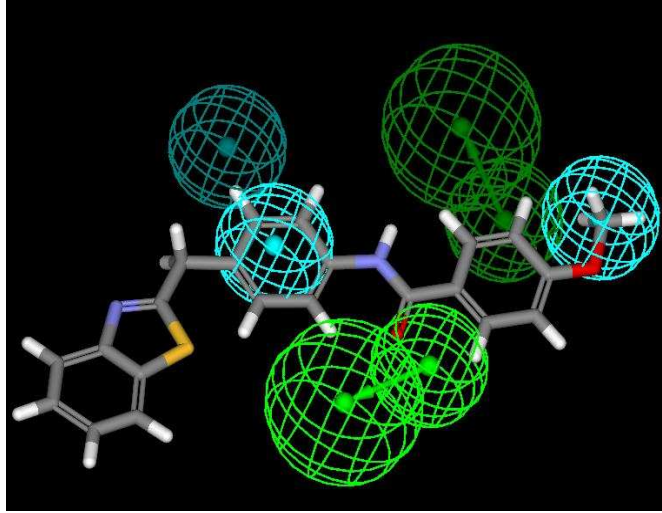
**T09**



Uyum değeri: 1,865  
1 hidrojen bağı alıcısı,  
1 hidrofobik özelliği ile  
haritalanmaktadır.

**Şekil 4.48.** T09 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

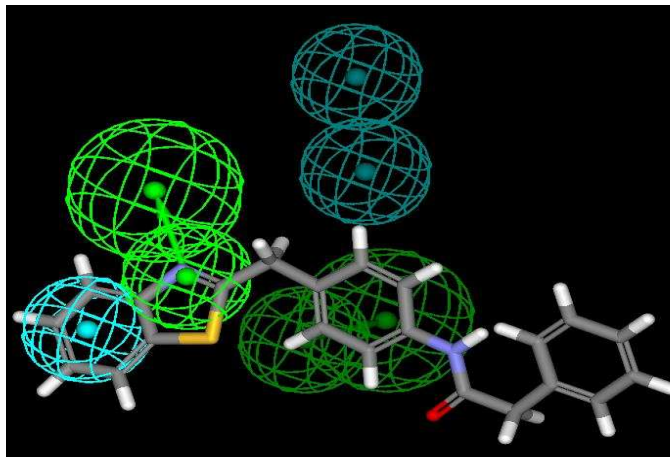
**T10**



Uyum değeri: 2,602  
1 hidrojen bağı alıcısı, 2  
hidrofobik özelliği ile  
haritalanmaktadır.

**Şekil 4.49.** T10 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

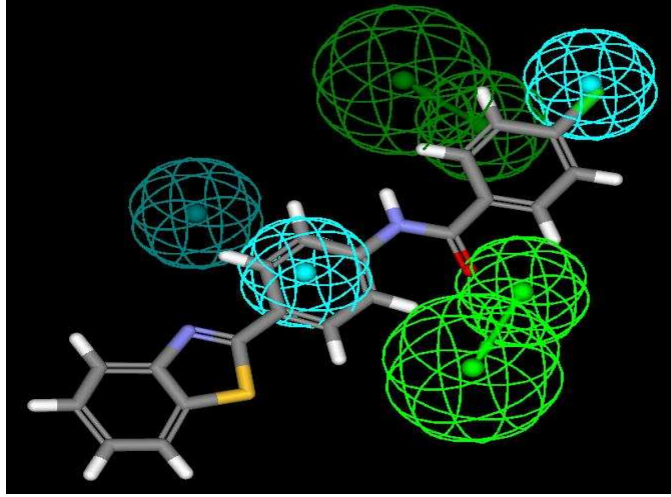
**T11**



Uyum değeri: 1,925  
1 hidrojen bağı alıcısı, 1  
hidrofobik özelliği ile  
haritalanmaktadır.

**Şekil 4.50.** T11 bileşiğinin hipotez ile haritalanması

**T12**

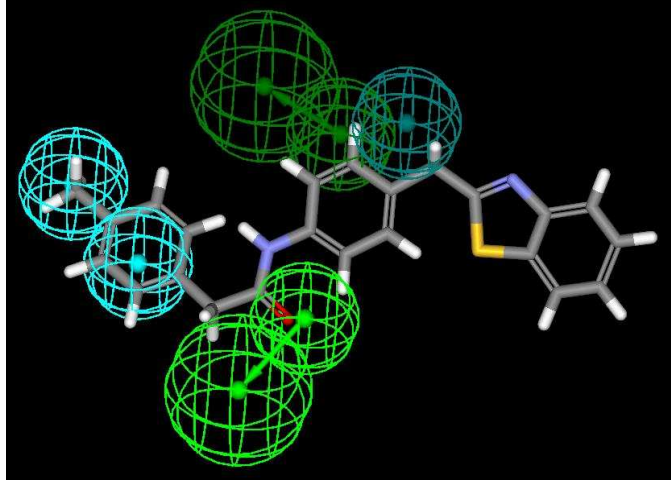


Uyum değeri: 2,417

1 hidrojen bağı alıcısı, 2  
hidrofobik özelliği ile  
haritalanmaktadır.

**Şekil 4.51.** T12 bileşinin hipotez ile haritalanması

**T13**

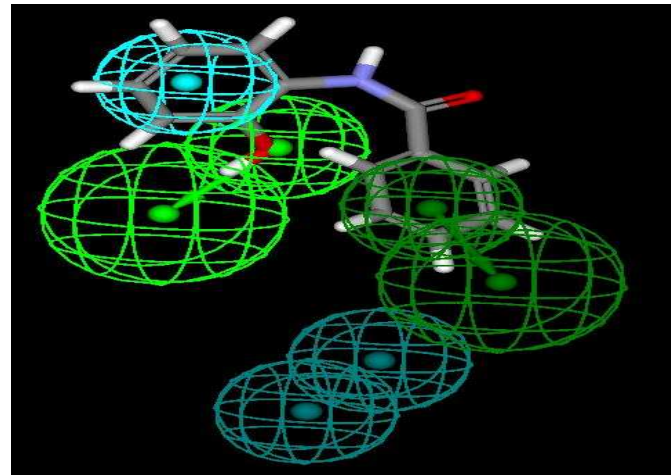


Uyum değeri: 2,767

1 hidrojen bağı alıcısı,  
2 hidrofobik özelliği ile  
haritalanmaktadır.

**Şekil 4.52.** T13 bileşinin hipotez ile haritalanması

**T14**

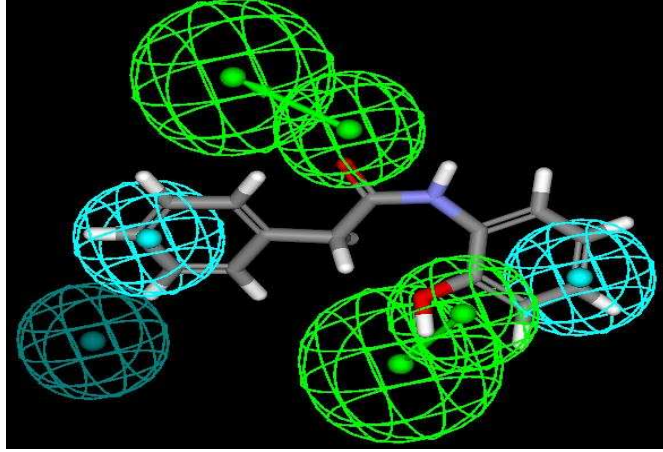


Uyum değeri: 1,978

1 hidrojen bağı alıcısı, 1  
hidrofobik özelliği ile  
haritalanmaktadır.

**Şekil 4.53.** T14 bileşinin hipotez ile haritalanması

**T15**

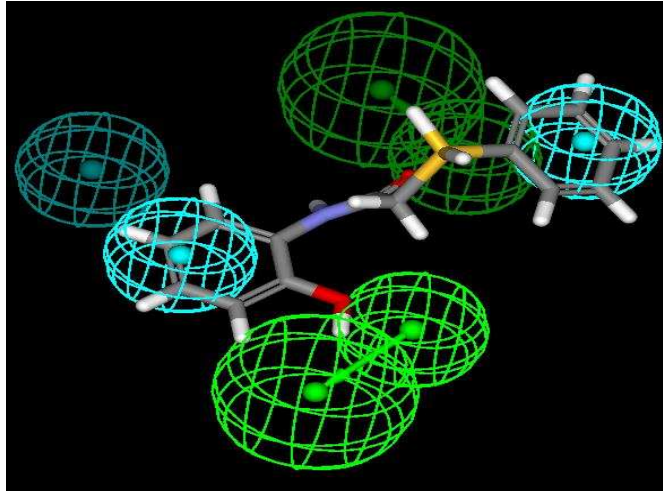


Uyum değeri: 2,503

2 hidrojen bağı alıcısı, 2  
hidrofobik özelliği ile  
haritalanmaktadır.

**Şekil 4.54.** T15 bileşinin hipotez ile haritalanması

**T16**



Uyum değeri: 2,119

1 hidrojen bağı alıcısı, 2  
hidrofobik özelliği ile  
haritalanmaktadır.

**Şekil 4.51.** T16 bileşinin hipotez ile haritalanması

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Geçtiğimiz 25 yıl süresince, ilaç keşif işlemleri ve bilgi teknolojilerinin önemli bir bölümü, basit araştırmalarla başlayan ve daha sonra hastalığa özgün ilaçlarla sonuçlanan bir sürecin ayrılmaz parçaları haline gelmişlerdir. Bilgisayar teknolojisindeki gelişmeler yeni bir *in silico* biyoloji uygulama sınıfının gelişimine önayak olmuştur. Bu çalışmalarda en büyük hedef bir hastalığı moleküler seviyede modelleyerek, genetik olarak belirli bir hasta popülasyonunun tedavisine en uygun kimyasal bileşiğin bulunması, bu bileşiğin tüm bağlanma deneylerinin *in silico* olarak gerçekleştirilmesi ve de bileşiğin ADME özelliklerinin kesin olarak tahmin edilebilmesidir. Bu hedefleri *in silico* olarak başarmak ilaç keşif işlemini inanılmaz derecede hızlandıracak, emek kaybı ve masrafı engelleyecektir. Hastayı ve hastalığı moleküler düzeyde, mekanizma bazında anlayabilen kişiselleştirilmiş tıbbi giden yolu da sağlamlaştıracaktır. Deneysel olarak yapıları aydınlatılamayan proteinlerin çok büyük bir bölümü için 3D bilgi sağlayabildikleri için bilgisayarlı yapı tahmin teknikleri çok büyük bir önem taşımaktadır. Yakın bir gelecekte hedefler genetik ve metabolik işlemlerin modellenmesiyle keşfedilecek ve de önder bileşikler neredeyse tamamen *in silico* olarak sentezlenip test edilebilecektir. *In silico* ADME modellemesi de klinik denemelerin önüne geçerek ilacın metabolik özelliklerinin tahmininde kullanılacaktır. Geleceğin ilaç firmaları, günümüz ilaç firmalarından çok farklı olacaktır. Bilgi teknolojisi altyapısı, biyoinformatik araçlarının etkin kullanımı ve bilgisayar gücünü biyokimyasal ve genetik anlayışa karşı yarıştıracak olan firmalar fark yaratacaklardır (Augen, 2002).

Moleküler modelleme farmasötik araştırmada 1980'lerden itibaren hızla gelişmiş yeni bir disiplin haline almıştır ve yeni öncü bileşiklerin keşfine katkıda bulunmuştur. Bu disiplinin evrimi giderek çözülmekte ve ilaç tasarımında daha akılcı yaklaşımlar çağına öncülük etmektedir. Bu emsalsiz çabaların sonucunda yeni yararlı terapötik ajan sınıflarının ortaya çıkması beklenmektedir (Cohen, 1996).

Ligantların biyolojik aktiviteleri için gerekli olan temel fonksiyonel grupların bağlı yönlendirimleri farmakoforu tanımlamaktadır. Bir farmakofor, yapısal olarak farklı ligantların ortak bir reseptöre bağlanmasına açıklama getirmektedir. Günümüzde, ortak bir

reseptör yöresine yapısal olarak farklı moleküllerin nasıl bağlanabildiğini çözmek amacıyla farmakofor analiz yöntemlerinden faydalanılmaktadır. Farmakofor analizi içerisinde yer alan HypoGen yönteminde, spesifik bir terapötik alanda biyolojik aktivite değerleri bilinen bir seri bileşikten hareketle, bileşiklerin biyolojik aktiviteleri ile moleküler yapıları arasındaki ilişkiyi tanımlayan farmakofor modelleri oluşturur. Diğer bir farmakofor analiz yöntemi olan HipHop'da ise spesifik bir terapötik alanda aktif olarak bilinen bir seri bileşikten ortak özellikli farmakofor modelleri oluşturmaktadır.

Bu çalışmada, ökaryotik topoizomerez I inhibitörleri olarak etki gösteren bir seri 2H-3,4-dihidro-1,4-benzoksazin-3-on türevi bileşikler üzerinden HypoGen ve HipHop teknikleri kullanılarak farmakofor analiz çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

HypoGen yöntemi kullanılarak farmakofor modelin oluşturulması işleminde kullanılan bileşiklerden bazılarının oldukça aktif, bazılarının orta derecede aktif, bazılarının ise inaktif olması gerekmektedir. Doğru ve korelasyon değeri 1'e yakın bir hipotez oluşturabilmek için biyolojik aktiviteler arasındaki fark matematiksel olarak yaklaşık 4 logaritmik birim olmalıdır. Bileşiklerin biyolojik aktivite değerleri ile elde edilen hipotezin korelasyonundan hareketle; kullanılan bileşiklerin ve daha sonrasında tasarlanan bileşiklerin biyolojik aktiviteleri tahmini olarak hesaplanabilir. HypoGen yöntemi kullanılarak oluşturulan hipotezlerden ve tahmin edilen aktivite sonuçlarından yararlanılarak belli bir terapötik alanda aktif olabileceği düşünülen yeni önder bileşikler olarak tasarlanabilir.

HypoGen farmokofor modelinin eldesi için Accelrys'in Catalyst/HypoGen (versiyon 4.9) programı kullanılmıştır. Yapılan HypoGen çalışmasında topoizomerez I inhibisyonu gösteren 16 adet 2H-3,4-dihidro-1,4-benzoksazin-3-on türevi üzerinden bir farmokofor modeli geliştirilmiş ve test serisini oluşturan 22 bileşik bu model ile haritalanmıştır. Elde edilen hipotezlerden en uygunu korelasyon katsayısı 0,873271 ve RMS değeri 1,18083 olan birinci hipotez olarak belirlenmiştir. En uygun olarak seçilen birinci hipotez; iki hidrojen bağı alıcısı, bir hidrofobiklik ve bir aromatik halka özellikleri olmak üzere toplam 5 adet özelliği tanımlamaktadır. Oluşturulan hipotez ile biyolojik aktiviteleri arasındaki korelasyona göre bileşiklerin tahmini aktivite sonuçları hesaplanmıştır.

Çalışma serisindeki moleküllerden biyolojik aktivitesi en yüksek olan S1 kodlu bileşik seçilen hipotez ile haritalanmıştır. S1 kodlu molekül, hipotezin 2 hidrojen bağı alıcısı (HBA), 1 hidrofobik özellik (Hyd) ve 1 aromatik halka (RA) özellikleriyle iyi bir şekilde haritalanmaktadır. Hipotezde görülen her iki HBA da karbonil oksijenleri ile tam olarak haritalanmıştır. Hyd özellik 2H-3,4-dihidro-1,4-benzoksazin-3-on yapısının ikinci konumunda bulunan etil zincirine konulanmıştır. RA özelliği ise 2H-3,4-dihidro-1,4-benzoksazin-3-on yapısının benzen halkası ile haritalanmıştır. Çalışma serisindeki diğer bileşikler de hipotezde görülen dört özellikle oldukça iyi bir şekilde karşılaştığı görülmüştür.

Uygun olarak seçilen hipotez test serisindeki bileşikler ile haritalanmış ve tahmini biyolojik aktivite sonuçları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre amid yapısı taşıyan T16, T15 ve T14 bileşiklerinin tahmini aktivite değerleri sırasıyla 2.2; 2.7; 7.8 olarak oldukça iyi sonuç vermiştir. Diğer taraftan Topotekan ve Hidroksiakuminat bileşiklerinin de aktiviteleri sırasıyla 43 ve 50 olarak tahmin edilmiştir.

Topoizomeraz inhibitörü olarak oldukça aktif olan Kamptotesin ve Irinotekan bileşiklerinin de tahmini biyolojik aktiviteleri sırasıyla 320 ve 220 olarak belirlenmiştir. Test serisindeki benzoksazol / benzimidazol / benzotiyazol türevlerinden T11, T13, T07, T04, T08, T10, T09, T06 ve T05 bileşikleri sırasıyla 140, 270, 340, 360, 410, 430, 510, 540 ve 610 tahmini biyolojik aktivite sonuçları vermiştir. Topoizomeraz enzim inhibisyonunda oldukça aktif olan Kamptotesin ve Irinotekan bileşiklerinin tahmini biyolojik aktiviteleriyle karşılaştırıldığında test serisindeki bu bileşiklerin, topoizomeraz enzimine karşı etkili olabilecekleri düşünülmektedir.

Test serisindeki bileşiklerden T01, T12, T03, Rosettasin, Luotonin A ve T02; 1100 ila 130000 arasında değişen tahmini biyolojik aktivite sonuçları vermiştir.

Elde edilen sonuçlara bakıldığında zaman molekülde lokalize olan iki HBA ve bir hidrofobiklik ve bir aromatik halkasının Topoizomeraz I inhibisyonu için temel olduğu sonucuna varılmaktadır.



Spesifik bir alanda terapötik etkinliği olduğu bilinen aktif moleküllerden hareketle HipHop yöntemi kullanılarak farmakofor model oluşturulabilir. Bu yöntemde biyolojik aktivite değerlerinin bir önemi yoktur ancak kullanılan bileşiklerin hepsinin aynı terapötik alanda yüksek aktivite göstermeleri gerekmektedir. Çalışılan serideki moleküllerin ortak olan ve kimyasal açıdan önem taşıyan fonksiyonel grupları karşılaştırılırken, bileşiklerin konformasyonlarından yararlanmaktadır ve karşılaştırılan bu yapılar üzerinden farmakoforik hipotezler ortaya konulmaktadır. Elde edilen hipotezler tasarlanan veya birçok veri bankasında bulunan bileşikler ile karşılaştırılarak ortak özellik gösteren moleküller belirlenebilir. Bu moleküller de belli bir terapötik alanda yeni ilaç etken maddesi olabilecek bileşiklerin tasarlanmasında kullanılan önder bileşikler olabilir.

HipHop farmokofor modelinin eldesi için Discovery Studio 2.1. programı kullanılmıştır. Bu çalışmada topoizomeras I inhibisyonu gösteren Kamptotesin analogu 6 bileşik üzerinden bir farmokofor modeli geliştirilmiş ve test serisini oluşturan 26 bileşik bu model ile haritalanmıştır.

Hypogen yöntemiyle farmakofor analizinin sonuçları incelendiğinde Kamptotesin analoglarından Topotekanın tahmini biyolojik aktivitesinin en yüksek olduğu saptanmıştır. Bu verilerden yola çıkarak Topotekan bileşiği referans alınarak HipHop farmakofor modellemesi yapılması uygun bulunmuştur. Bu amaç doğrultusunda topoizomeras enzim inhibisyonu yüksek olduğu saptanan 6 bileşik (Kamptotesin, Topotekan, Irinotekan, Luotonin A, Rosettasin ve Hidroksiakuminat) üzerinden HipHop çalışması gerçekleştirilmiştir.

Topotekan bileşiği referans alınarak gerçekleştirilen bu çalışmada elde edilen hipotezde iki hidrojen bağı alıcısı ve üç hidrofobiklik özellikleri ortaya çıkmıştır. Çalışma serisinde kullandığımız 6 bileşikten Kamptotesin, Topotekan, Irinotekan, Luotonin A ve Hidroksiakuminat elde edilen hipotezdeki özellikler ile bire bir haritalanırken, Rosettasin bileşiği iki hidrojen bağı alıcısı ve iki hidrofobiklik özellikleri ile haritalanabilmiştir.

Uygun bulunan hipotez test serisindeki bileşiklerle de teker teker haritalandırılmıştır. Bu bileşiklerden 2H-3,4-dihidro-1,4-benzoksazin-3-on türevi olan S16

ve amid yapısı taşıyan T15 bileşikleri iki hidrojen bağı alıcısı ve iki hidrofobiklik özellikleri olmak üzere hipotezdeki dört özellikle iyi derecede haritalanabilmiştir.

2H-3,4-dihidro-1,4-benzoksazin-3-on türevi olan S1, S2, S3, S5, S13, S14, S15, S17; amid yapısı taşıyan T16, benzimidazol yapısındaki T04 ve benzotiyazol yapısındaki T05, T06, T10, T12, T13 bileşikleri bir hidrojen bağı alıcısı ve iki hidrofobik özellikleri olmak üzere hipotezdeki üç özellikle haritalanabilmişlerdir. 2H-3,4-dihidro-1,4-benzoksazin-3-on yapısındaki S18 bileşiği ise iki hidrojen bağı alıcısı ve bir hidrofobiklik özellikleri olmak üzere hipotezdeki üç özellikle haritalanabilmiştir.

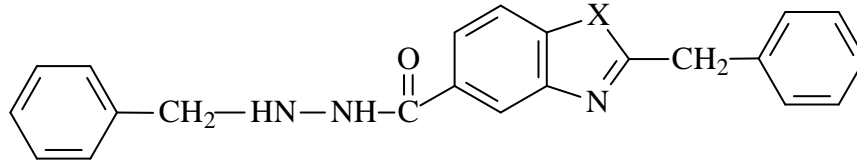
Test serisindeki benzoksazol / benzimidazol / benzotiyazol türevlerinden T01, T02, T07, T08, T09, T11 ve amid yapısındaki T14 bileşikleri bir hidrojen bağı alıcısı ve bir hidrofobik özellikleri olmak üzere hipotezdeki iki özellikle haritalanabilmişlerdir. Benzimidazol türevlerinden T03 bileşiği ise hipotezdeki iki hidrofobik özelliği ile haritalanabilmiştir.

## 5.1. ÖNERİLER

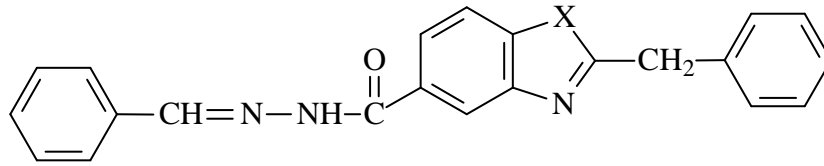
Sentezleri daha önceden grubumuz tarafından gerçekleştirilmiş olan ve test serisi olarak kullanılan bileşiklerden HypoGen çalışmasına göre aktiviteleri yüksek bulunan ve HipHop değerlendirmesine göre ortaya çıkan sonuçlar doğrultusunda, bazı bileşiklerin Topoizomeraz I enzimi üzerinde inhibisyonunun kayda değer bir çalışma olacağı sonucuna varılarak, ileriye dönük bir çalışma olarak planlanmıştır.

Ayrıca, çalışmamızda doktora tezine yönelik olmak üzere kağıt üzerinde tasarladığımız bir seri benzoksazol ve benzimidazol türevi bileşikleri HypoGen ve HipHop yöntemleri ile elde edilen hipotezlerle haritalandırılarak, topoizomeraz I enzimine karşı inhibitör olarak yararlanılabilecek bileşikler olup olmayacağı ortaya konmaya çalışılmıştır. Bu çalışmaya göre tasarlanmış bileşiklerden sadece Çizelge 5.1.' de gösterilen benzoksazol ve benzimidazol türevi bileşiklerin kayda değer sonuçlar verebileceği düşünülmektedir.

**Çizelge 5.1.** Çalışmalar sonucunda tasarlanan bileşikler



		<b>X</b>
<b>TS1</b>	N',2-dibenzilbenzo[d]oksazol-5-karbohidrazid	<b>O</b>
<b>TS2</b>	N',2-dibenzil-1H-benzo[d]imidazol-5- karbohidrazid	<b>N</b>

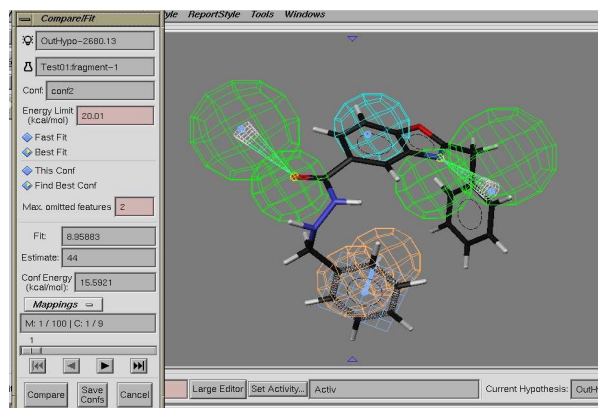


		<b>X</b>
<b>TS3</b>	2-benzil-N'-benzilidenbenzo[d]oxazol-5- karbohidrazid	<b>O</b>
<b>TS4</b>	2-benzil-N'-benziliden-1H-benzo[d]imidazol-5- karbohidrazid	<b>N</b>

Tasarlanan bu bileşikler HypoGen ve HipHop çalışmaları sonucunda elde edilen hipotezlerle ortaya konmuş haritaları Şekil 5.1 – Şekil 5.8 arasında gösterilmiştir.

HypoGen hipotezi ile tasarlanan bileşiklerin haritalanması:

**TS1**



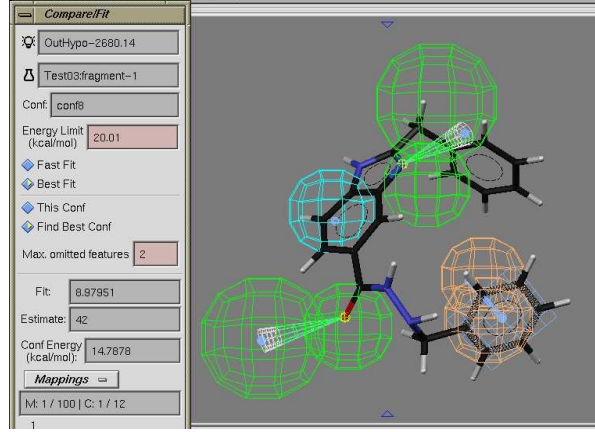
Uyum değeri: 8,95883

Tahmini biyolojik aktivitesi:44

2 hidrojen bağı alıcısı, 1 hidrofobik ve 1 aromatik halka özelliği ile haritalanmaktadır.

**Şekil 5.1.** TS1 bileşiminin HypoGen hipotezi ile haritalanması

TS2

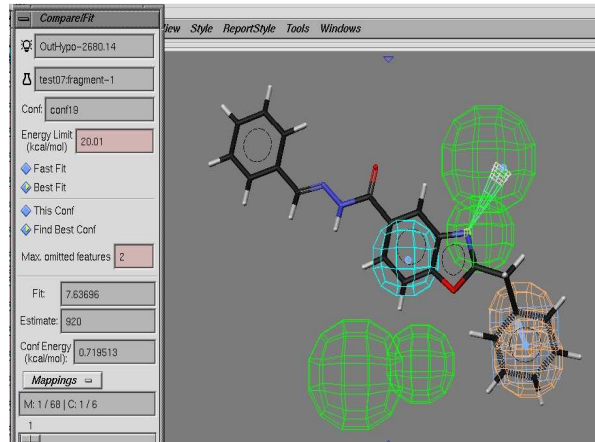


Uyum değeri: 8,97951  
Tahmini biyolojik aktivitesi: 42

2 hidrojen bağı alıcısı, 1 hidrofobik ve 1 aromatik halka özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 5.2. TS2 bileşiminin HypoGen hipotezi ile haritalanması

TS3

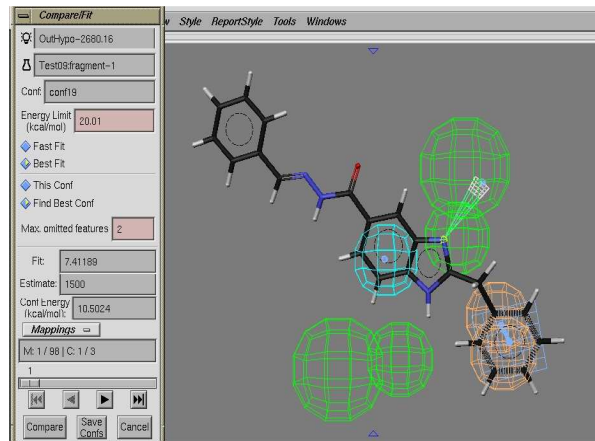


Uyum değeri: 7,63696  
Tahmini biyolojik aktivitesi: 920

1 hidrojen bağı alıcısı, 1 hidrofobik ve 1 aromatik halka özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 5.3. TS3 bileşiminin HypoGen hipotezi ile haritalanması

TS4



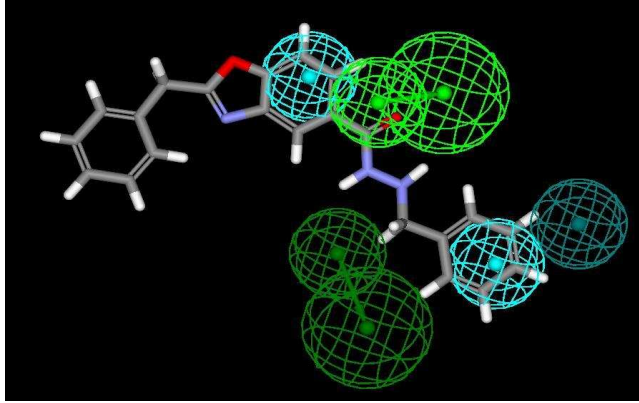
Uyum değeri: 7,41189  
Tahmini biyolojik aktivitesi: 1500

1 hidrojen bağı alıcısı, 1 hidrofobik ve 1 aromatik halka özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 5.4. TS4 bileşiminin HypoGen hipotezi ile haritalanması

Hiphop hipotezi ile tasarlanan bileşiklerin haritalanması:

TS1

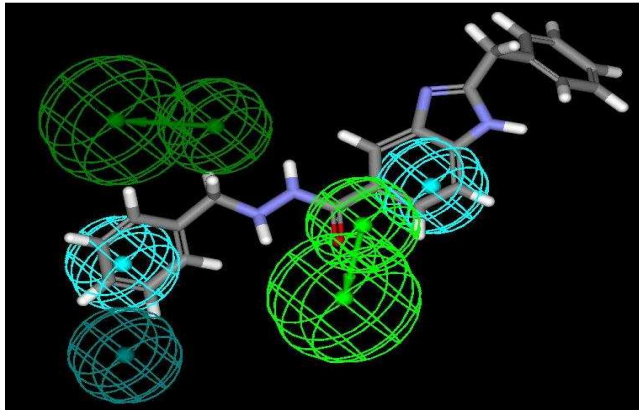


Uyum değeri: 2,317

1 hidrojen bağı alıcısı, 2 hidrofobiklik özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 5.5. TS1 bileşiğinin HipHop hipotezi ile haritalanması

TS2

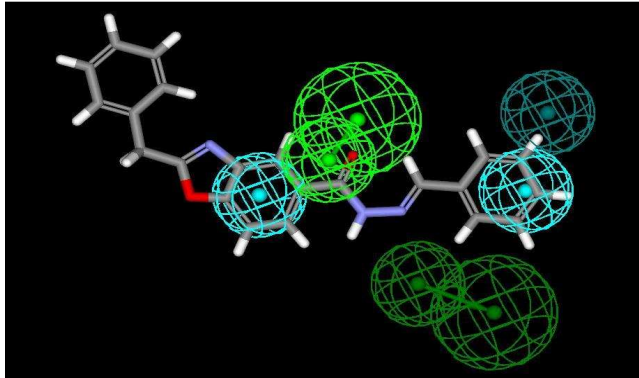


Uyum değeri: 2,321

1 hidrojen bağı alıcısı, 2 hidrofobik özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 5.6. TS2 bileşiğinin HipHop hipotezi ile haritalanması

TS3

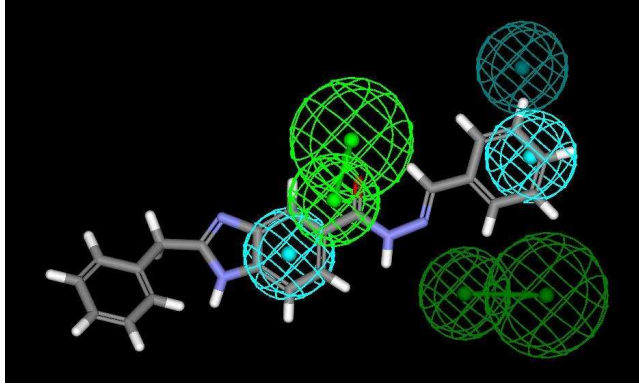


Uyum değeri: 1,958

1 hidrojen bağı alıcısı, 2 hidrofobik özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 5.7. TS3 bileşiğinin HipHop hipotezi ile haritalanması

TS4



Uyum değeri: 1,986

1 hidrojen bağı alıcısı, 2 hidroforik özelliği ile haritalanmaktadır.

Şekil 5.8. TS4 bileşiminin HipHop hipotezi ile haritalanması

Sonuç olarak; tasarlanan bileşiklerin HypoGen ve HipHop çalışmalarında elde edilen hipotezlerle karşılaştırılması sonucunda, bu bileşiklerin topoizomerez I enzimini inhibe edebilecek etkili moleküller olabileceği düşünölmektedir. Bu verilere dayanarak tasarlanan bu bileşikler ve bunların türevlerinin sentezlenmesi topoizomerez I enzimi üzerine aktivitelerinin kemoinformatik ve biyoinformatik verilerle incelenmesi doktora tezi çalışması olarak planlanmıştır.

## KAYNAKLAR

- Aki-Şener, E., Yalçın, İ. 2003. Farmasötik/Medisinal Kimya'da İlaç Etken Madde Tasarım Yöntemleri-I, Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri Analizleri (QSAR), Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara Üniversitesi Basımevi, 86: III.
- Aki-Şener, E., Yalçın, İ. 2003. Farmasötik/Medisinal Kimya'da İlaç Etken Madde Tasarım Yöntemleri-I, Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri Analizleri (QSAR), Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara Üniversitesi Basımevi, 86: 2.
- Albensi, B.C., Mattson, M.P. 2000. Evidence for the involvement of TNF and NFkappaB in hippocampal synaptic plasticity, *Synapse*, 35,2: 151-9.
- Alper-Hayta, S., Aki-Sener, E., Tekiner-Gulbas, B., Yildiz, I., Temiz-Arpaci, O., Yalcin, I., Altanlar, N. 2006. "Synthesis, Antimicrobial Activity and QSARs of New Benzoxazine-3-ones", *Eur. J. Med. Chem.*, 41(12), 1398-1404.
- Bains, W. 1998. *Biotechnology from A to Z*, 2nd Edition, Oxford University Press, 45-47.
- Bains, W. 1998. *Biotechnology from A to Z*, 2nd Edition, Oxford University Press, 66-67.
- Bains, W. 1998. *Biotechnology from A to Z*, 2nd Edition, Oxford University Press, 328.
- Bains, W. 1998. *Biotechnology from A to Z*, 2nd Edition, Oxford University Press, 328.
- Bailly, C. 2000. Topoisomerase I Poisons and Suppressors as Anticancer Drugs *Curr. Med. Chem.*, 7, 39.
- Barreca, M. L., Carotti, A., Carrieri, A., Chimirri, A., Monforte, A. M., Pellegrini Calace, M., Rao, A. 1999. Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) and Docking Studies of Non-nucleoside HIV-1 RT Inhibitors (NNIs). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 7: 2283-2292.
- Barrett, J. F., Sutcliffe, J. A., Gootz, T. D. 1990. *In vitro* Assays used to Measure the Activity of Topoisomerases. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 34: 1-7
- Barria, B.N., Copaja, S.V., Niemeyer, H.M., (1992). Occurrence of DIBOA in wild *Hordeum* species and its relation to aphid resistance. *Phytochemistry*, 31(1): 89-91.
- Benedetti, P., Fiorani, P., Capuani, L., Wang, J.C. 1993. Camptothecin resistance from a single mutation changing glycine 363 of human DNA topoisomerase I to cysteine, *Cancer Res.*, 53, 4343.

Bioinformatics.org FAQ (20.06.2005),

Erişim: [<http://fbioinformatics.org/faq/idefinitions>]

Bjornsti, M.A., Benedetti, P., Viglianti, G.A., Wang, J.C. 1989. Expression of human DNA topoisomerase I in yeast cells lacking yeast DNA topoisomerase I: restoration of sensitivity of the cells to the antitumor drug camptothecin, *Cancer Res.*, 49, 6318.

Bjornsti, M.A., Osheroff, N. 1999. Introduction to DNA topoisomerases, "DNA topoisomerase protocols. DNA topology and enzymes" de Ed. Bornsti, M.A. and Osheroff N, Humana Pres, New Jersey, 1-8.

Boeckler, F., Ohnmacht, U., Lehmann, T., Utz, W., Hübner, H., Gmeiner, P. 2005. CoMFA and CoMSIA Investigations Revealing Novel Insights into the Binding Modes of Dopamine D3 Receptor Agonists. *J. Med. Chem.*, 48: 2493-2508.

Brown, F. K. 1998. Chemoinformatics: What is it and How Does it Impact Drug Discovery. *Ann. Rep. Med. Chem.*, 33: 375-384.

Burke, T.B. 1996. Chemistry of the camptothecins in the bloodstream. Drug stabilization and optimization of activity, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 803, 29.

Cagir, A.; Jones, S. H.; Gao, R.; Eisenhauer, B. M.; Hecht, S. M. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 13628.

Carlson, H. A., McCAM). 2003. *Mol. Pharmacol.*, 57: 213-218. MON, J. A.

Champoux, J.J., Dulbecco, R. 1972. An activity from mammalian cells that untwists superhelical DNA-a possible swivel for DNA replication, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69,143-146.

Chen, A.Y. and Liu, L.F. 1994. DNA Topoisomerases: Essential Enzymes and Lethal Targets, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 34, 191-218.

Chen, A.Y., Choy, H., Rothenberg, M.L. 1999. DNA topoisomerase I-targeting drugs as radiation sensitizers, *Oncology*, 13 (10 suppl 5), 39.

Cheng, K.; Rahier, N. J.; Eisenhauer, B. M.; Gao, R.; Thomas, S. J.; Hecht, S. M. *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 838.

Clement, O. O., and Mehl, A. T. 2000. HipHop: Pharmacophore based on multiple common-feature alignments, in *Pharmacophore perception, development, and use in drug design* (Guner, O. F., Ed.) pp 69-84, IUL, San Diego.



- Cohen, N. C. 1996. Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design. Academic Press Inc., (Edited)XIII.
- Cohen, N. C. 1996. Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design. Academic Press Inc., (Edited)17.
- Cohen, N. C. 1996. Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design. Academic Press Inc., (Edited)25-315.
- ColorBasePair.com (20.06.2005),  
Eriřim:[[http://www.colorbasepair.com/what\\_is\\_bioinformatics.html](http://www.colorbasepair.com/what_is_bioinformatics.html)]
- Corcuera, L.J., Woodward, M.D., Helgeson, J.P., Kelman, A., Upper, C.D., (1978). 2,3-Dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one, an inhibitor from *Zea mays* with differential activity against soft rotting *Erwinia* species. *Plant. Physiol.*, 61(5): 791-795, Ref: CA: 89, 39429j (1978)
- Corbett, K.D., Berger J.M. 2004. Structure, molecular mechanisms and evolutionary relationships in DNA topoisomerases, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 33, 95-118.
- Corbett, K.D., Berger, J.M. 2003. Structure of the topoisomerase VI-B subunit: implications for type II topoisomerase mechanism and evolution, *EMBO J.*, 22, 151-163.
- Cunningham, D., Pyrhonen, S., James, R.D., Punt, C.J., Hickish, T.G., Heikkila, R., Johannesen, T.B., Starkhammar, H., Topham, C.A., Awad, L., Jacques, C., Herait, P. 1998. *Lancet*, 352, 1413.
- Da-Hye,K., Jung-Sook, K., Mi-Ja, J., Eung-Seok, L., Yurngdong, J., Youngjoo, K., and Younghwa, N. 2008. New insight for fluoroquinolone derivatives as possibly new potent topoisomerase I inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18 :1520–1524
- Deng, J., Lee, K. W., Sanchez, T., Cui, M., Neamati, N., Briggs, J. M. 2005. Dynamic Receptor-Based Pharmacophore Model Development and Its Application in Designing Novel HIV-1 Integrase Inhibitors. *J. Med. Chem.*, 48: 1496-1505.
- Dessalew, N., Bharatam, P., V. 2006. Investigation of Potential Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibitors Using Pharmacophore Mapping and Virtual Screening. *Chem Biol Drug Des* 68: 154–165.

- Fan, Y., Weinstein, J. N., Kohn, K. W., Shi, L. M., Pommier, Y., 1998. Molecular modeling studies of the DNA - topoisomerase I ternary cleavable complex with camptothecin, *J. Med. Chem.*, 41, 2216.
- Gellert, M., 1981. DNA topoisomerases, *Annu. Rev. Biochem.*, 50, 879-910.
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M.H., Nash, H.A., 1976. An enzyme that introduces superhelical turns into DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7024-7027.
- Gilmore, T.D., 2006. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives, *Oncogen*, 30, 25 (51): 6680-4.
- Hayakawa, I., Atarashi, S., Yokohama, S., Imamura, M., Sakano, K., Fukawa, M., (1986). Synthesis and antibacterial activities of optically active Ofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother*, 29(1): 163-164, Ref: CA: 104, 126370e (1986)
- Hirashima, A., Morimoto, M., Ohta, H., Kuwano, E., Taniguchi, E., Eto, M. 2002. Three-Dimensional Common-Feature Hypotheses for Octopamine Agonist 1-Arylimidazolidine-2-Thiones. *International Journal of Molecular Sciences*, 3: 56-68.
- Höltje, H. D., Folkers, G. 1997. *Molecular Modeling – Basic Principles and Applications*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, 5: 2.
- Höltje, H. D., Folkers, G. 1997. *Molecular Modeling – Basic Principles and Applications*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, 5: 9-12.
- Hsiang, Y.H., Hertzberg, R., Hecht, S., Liu, L.F., 1985. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I, *J. Biol. Chem.*, 260, 14873.
- Huang, W., Haiping, Yu., Sheng, R., Li, J., Yongzhou, Hu. 2008. Identification of pharmacophore model, synthesis and biological evaluation of N-phenyl-1-arylamide and N phenylbenzene sulfonamide derivatives as BACE 1 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16 : 10190–10197.
- Kellner, U., Sehested, M., Jensen, P.B., Gieseler, F. and Rudolph, P., 2002. Culprit and victim- DNA topoisomerase II, *Lancet Oncol.*, 3, 235-43.
- Kellner, U., Sehested, M., Jensen, P. B., Gieseler, F., Rudolph, P. 2002. Culprit and victim – DNA topoisomerase II. *Lancet Oncol*, 3: 235–243.

- Kim, H. J., Choo, H., Cho, Y. S., No, K. T., and Pae, A. N. 2008. Novel GSK-3b inhibitors from sequential virtual screening. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16 : 636–643.
- Kirkegaard, K., Pflugfelder, G., Wang, J.C., 1984, The cleavage of DNA by type-I DNA topoisomerases, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 49, 411.
- Klebe, G., Abraham, U., Mietzner, T. 1994. Molecular Similarity Indices in a Comparative Analysis (CoMSIA) of Drug Molecules to Correlate and Predict Their Biological Activity. *J. Med. Chem.*, 37: 4130-4146.
- Kochi, A. 1991. The Global Tuberculosis Situation and the New Control Strategy of the World Health Organization. *Tubercule.*, 72: 1-6.
- Kristam, R., Gillet, V. J., Lewis, R. A., and Thorner, D. 2005. Comparison of conformational analysis techniques to generate pharmacophore hypotheses using catalyst. *J Chem Inf Model* 45, 461-76.
- Krovat, E. M., Frühwirth K. H., Langer, T. 2005. Pharmacophore Identification, *in silico* Screening, and Virtual Library Design for Inhibitors of the Human Factor Xa. *J. Chem. Inf. Model*, 45: 146-159.
- Levine, C., Hiasa, H., Marians, K.J. 1998. DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication and drug sensitivities., *Biochim. Biophys. Acta.*1400, 29-43.
- Li H, Sutter J, Hoffman R. 2000. HypoGen: An automated system for generating 3D predictive pharmacophore models. In: Guner OF, editor. *Pharmacophore perception, development, and use in drug design*. San Diego: IUL. pp. 173-189
- Li, H., Sutter, J., and Hoffman, R. 2000. HypoGen: An automated system for generating 3D predictive pharmacophore models, in *Pharmacophore perception, development, and use in drug design* (Guner, O. F., Ed.) pp 173-189, IUL, San Diego.
- Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T., Housman, D.E. 1993. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents, *Cell*, 74, 957.
- Lynn, R., Giaever, G., Swanberg, S.L., Wang, J.C. 1986. Tandem regions of yeast DNA topoisomerase II share homology with different subunits of bacterial gyrase., *Science*, 233, 647-649.
- Mathews, C.K., Van Holde, K.E. 1996. *Nucleic acids, "biochemistry" de second edition*, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.

- McDonald, A.C., Brown, R., 1998. Induction of p53-dependent and p53-independent cellular responses by topoisomerase 1 inhibitors, *Br. J. Cancer*, 78, 745.
- Meyers, F.H., Jawetz, E. and Goldfien, A. 1976. Part VII. Chemotherapeutic agents, *Review of Medical Pharmacology*, 5 th ed. pp. 470-522.
- Mi. Z., Burke, T.G. 1995. Reduced Albumin Binding Promotes the Stability and Activity of Topotecan in Human Blood, *Biochemistry*, 34, 13722.
- Miller, K.G., Liu, L.F., Englund P.T. 1981. A homogeneous type II DNA topoisomerase from HeLa cell nuclei, *J. Biol. Chem.*, 256, 9334-9339.
- Nagaraja, V., Sikder, D., Jain, P. 2002. DNA Topoisomerase I from Mycobacteria-A Potential Drug Target. *Curr. Pharm. Des.*, 8: 1995-2007.
- Niemeyer, H.M., (1988). Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), Defence chemicals in the Gramineae. *Phytochemistry*, 27(11): 3349-3358
- Nitiss, J.L, Wang, J.C. 1996. Mechanisms of cell killing by drugs that trap covalent complexes between DNA topoisomerases and DNA, *Mol. Pharmacol.*, 50, 1095.
- Nuernberger, E., Grosset, J. 2004. Pharmacocinetic and Pharmacodynamic Issues in the Treatment of Mycobacterial Infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 23: 243-255.
- Osada Y., Imamura, M., S. Shibamura, I. Hayakawa, 1987, Inhibition of DNA gyrase by optically active ofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother*, 31: 325– 327.
- Osheroff, N. 2003. DNA Topology, Topoisomerases and Chemotherapy, IGP, Autumn.
- Otsuka, H., Hirai, Y., Nagao, T., Yamasaki, K., (1988). Antienflamatory activity of benzoxazinoids from roots of Coix Lacryma-Jobi Var. Ma-Yuen. *Journal of Natural Products*, 51(1): 74-79
- Pajeva, I., Wiese, M. 1998. Molecular Modeling of Phenothiazines and Related Drugs As MultiDrug Resistance Modifiers: A Comparative Molecular Field Analysis Study. *J. Med. Chem.*, 41: 1815-1826.
- Pantazis, P., Chatterjee, D., Han, Z., Wyche, J. 1999. Differentiation of human malignant melanoma cells that escape apoptosis following treatment with 9-nitrocamptothecin, *Neoplasia*, 1, 231.

- Pinar, A. 2005. Topoizomeraz I'in Saflaştırılması ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Pindur, U. and Lemster, T. 1998. Antitumor drug design: DNA-binding ligands, which inhibit the topoisomerase I, *Pharmazie*, 53,2, 79-86.
- Pommier, Y. 1995. Diversity of DNA topoisomerases I and inhibitors, *Biochimie*, 80, 255.
- Pommier, Y., Pourquier, P., Urasaki, Y., Wu, J., Laco, G. 1999. Topoisomerase I inhibitors: selectivity and cellular resistance, *Drug Resistance Update.*, 2, 307.
- Potmesil, M., Kohn, K.W. 1991. DNA topoisomerase in cancer, Oxford University Press, New York.
- Pouliot, J.J., Yao, K.C., Robertson, C.A., Nash, H.A.. 1999. Yeast gene for a Tyr-DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase I complex, *Science*, 286, 552.
- Ralph, R.K., Judd, W., Pommier, Y., Kohn, K.W., Neidle, S., Waring, M.J. (eds). 1994. DNA topoisomerases in molecular aspects and anticancer drug- DNA interaction. Vol. 2, p.1. Macmillan, London.
- Rougier, P., Van Cutsem, E., Bajetta, E., Niederle, N., Possinger, K., Labianca, R., Navarro, M., Morant, R., Bleiberg, H., Wils, J., Awad, L., Herait, P., Jacques, C. 1998. *Lancet*, 352, 1407.
- Saltz, L.B., Cox, J.V., Blanke, C., Rosen, L.S., Fehrenbacher, L., Moore, M.J., Maroun, J.A., Ackland, S.P., Locker, P.K., Pirota, N., Elfring, G.L., Miller, L.L. 2000. *N. Engl. J. Med.*, 343, 905.
- Sarma, R., Sinha, Sh., Ravikumar, M., Kumar, M. K., Mahmood, S. K. 2008. Pharmacophore modeling of diverse classes of p38 MAP kinase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 43 : 2870e2876.
- Schuster, D., Laggner, Ch., Steindl, T, M., Paluszczak, A., Hartmann, R, W., and Langer, T. 2006. Pharmacophore Modeling and in Silico Screening for New P450 19 (Aromatase) Inhibitors. *J. Chem. Inf. Model.* 46: 1301-1311.
- Stewart, L., Hampoux, J. J. 2001. Assaying DNA Topoisomerase I Relaxation Activity. *DNA Topoisomerase Protocols. Enzymology and Drugs*, Humana Press, 1-11.
- Stewart, L., Redinbo, M.R., Qiu, X., Hol, W.G.J., Champoux, J.J. 1998. A model for the mechanism of human topoisomerase I, *Science*, 279,1534-1541.
- STreet, A. G., Mayo, S. L. 1999. *Structure Fold Des.*, 7: R105-109.

- Strumberg, D., Pilon, A.A., Smith, M., Hickey, R., Malkas, L., Pommier, Y. 2000. Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal DNA into 5'phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff, *Mol. Cell. Biol.*, 20, 3977.
- Su, B., Tian, R., Darby, M, V., and Brueggemeier, R, W. 2008. Novel Sulfonanilide Analogs Decrease Aromatase Activity in Breast Cancer Cells: Synthesis, Biological Evaluation, and Ligand-Based Pharmacophore Identification. *J. Med. Chem.* 51; 1126–1135.
- Thaimattam, R., Daga, P., Rajjak, S. A., Banerjee, R., Iqbal, J. 2004. 3D-QSAR CoMFA, CoMSIA Studies on Substituted Ureas as Raf-1 Kinase Inhibitors and its Confirmation with Structure-Based Studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12: 6415–6425.
- Tromelin, A., Guichard, E. 2003. Use of Catalyst in a 3D-QSAR Study of the Interactions between Flavor Compounds and  $\beta$ -Lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 1977-1983.
- Tse-Dinh, Y.C. 1998. Bacterial and archeal type I topoisomerases, 1400,19-27.
- Ullsperger, C., Cozzarelli, N.R. 1996. Contrasting enzymatic activities of topoisomerase IV and DNA gyrase from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, 271, 549-555.
- Vadivelan, S., Sinha, B. N., Rambabu, G., Boppana, K., Jagarlapudi, S. A. R. P. 2008. Pharmacophore modeling and virtual screening studies to design some potential histone deacetylase inhibitors as new leads. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 26 : 935–946.
- Veselovsky, A. V., Ivanov, A. S. 2003. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.*, 3: 33-40.
- Virtanen, A.I., Hietala, P. K., (1960).Precursor of benzoxazolinon in rye plants I. Precursor II The Aglucone. *Acta. Chem. Scand.* 14(2): 499-502
- Virtanen, A.I., (1961). Some aspects of factors in the corn plant with toxic effects on insect larvae. *Suomen Kemisti Illeth*: 34B: 29-31 (1961), cf. *Acta Chern. Scandn.*, 14: 1214 Ref: CA: 55, 17771f
- Wadkins, R.M., Potter, P.M., Vladu, B., Marty, J., Mangold, G., Weitman, S., Manikumar, G., Wani, M.C., Wall, M.E., Von Hoff, D.D. 1999. Water soluble 20 (S)-glycinate esters of 10, 11, methylene dioxycamptothecins are highly active against human breast cancer xenografts, *Cancer Res.*, 59, 3424.

- Wall, M.E., Wani, M. 1996. Camptothecin. Discovery to clinic, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 803, 1.
- Wang, C.Y., Cusack, J.C., Liu, R., Baldwin, A.S. 1999. Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF- $\kappa$ B, *Nat. Med.*, 5, 412.
- Wang, H. Y., Cao, Z. X., Lin-Li Li, L. L., Jiang, P. D., Zhao, Y. L., Luo, S. D., Yang, L., Wei, Y. Q., Yang, S. Y. 2008. Pharmacophore modeling and virtual screening for designing potential PLK1 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18 : 4972–4977.
- Wang, J. C. 1996. DNA Topoisomerases. *Ann. Rev. Biochem.*, 65: 635-692.
- Wang, J.C. 1971. Interaction between DNA and an Escherichia coli Protein w.j., *Mol. Biol.*, 55, 523-533.
- Wang, Y., Chiu, J. F., He, Q. Y. 2005. Proteomics in Computer Aided Drug Design. *Current Computer-Aided Drug Design*, 1: 43-52.
- Wermuth, C. G., Ganellin C. R., Lindberg, P., Mitscher, L.A. 1998. Glossary of Terms Used in Medicinal Chemistry. *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 70, No.5, pp.1129-1143.
- Willmott, C. J., and Maxwell, A., 1993, A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37: 126–127.
- Wu, J. H., Chang, F.R., Hayashi, K. I., Shiraki, H., Liaw, C.C., Nakanishi, Y., Bastow, K.F., Yu, D., Chen, I.S., Lee, K.H. 2003. Antitumor agents. Part218: Cappamensin A, a New In Vitro Anticancer Principle, from Capparis sikimensis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13, 2223-2225.
- Xiao, X.; Antony, S.; Pommier, Y.; Cushman, M. J. *Med. Chem.* 2006. 49, 1408.
- Xu, M., Zhang, A., Han, S., Wang, L. 2002. Studies of 3D-Quantitative Structure–Activity Relationships on a Set of Nitroaromatic Compounds: CoMFA, Advanced CoMFA and CoMSIA. *Chemosphere*, 48: 707–715.
- Yalcin, I., Oren, I., Temiz, O., Sener, E. 2000. QSARs of some novel isosteric heterocyclics with antifungal activity. *Acta Biochimica Polonica* 47(2), 481-486.

- Yalçın, İ., Tekiner, B.P., Ören-Yildiz, İ., Temiz-Arpaci, Ö., Aki-Şener, E., Altanlar, N. 2003. "Synthesis and Antimicrobial Activity of Some Novel 2,6,7-trisubstituted-2H-3,4-dihydro-1,4-benzoxazin-3-one Derivatives", *Indian Journal of Chemistry*, 42B, 905-909.
- Yalçın, İ., Şener, E. 1996. *ESİS Aylık Rapor*, 4: 99-101.
- Yildiz-Oren, I., Yalcin, I., Aki-Sener, E., Ucarturk, N. 2004. Synthesis and structure-activity relationships of new antimicrobial active multi-substituted benzazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 39(3), 291-298.
- Zhang, X.W., Qing, C., Xu, B. 1999. cellular, animal and clinical studies. *J Steroid Biochem Mol. Biol.* Apoptosis induction and cell cycle perturbation in human hepatoma hep G2 cells by 10 hydrox-ycamptothecin, *Anticancer Drugs*, 10, 569.
- Zhaoa, W. N., Yua, Q. S., Zoua, J. W., Mab, M., Zhenga, K. W. 2005. Three-Dimensional Quantitative Structure–Activity Relationship Study for Analogues of TQXs Using CoMFA and CoMSIA. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 723: 69–78.



## ÖZGEÇMİŞ

### I. Bireysel Bilgiler

Adı: Sanaz

Soyadı: Ataei

Doğum yeri ve tarihi: İran-21.09.1980

Uyruğu: İran

Medeni durumu: Evli

İletişim adresi: Kocatepe Mah. Bağış Sok. No:9/7 Çankaya, Ankara

Telefonu: 0534 983 65 78

### II. Eğitimi

Lisans: Tabriz Üniversitesi, Kimya Fakültesi (1999-2004)

Lise: Effatiyyeh Lisesi (1994-1998)

Ortaokul: Emam Hasan Asghari School (1991-1994)

İlkokul: Parvaz School (1987-1991)

Yabancı dili: İngilizce, Farsça, Türkçe

### III. Ünvanları

Kimyager- 2004

### IV. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı ve Geliştirme Derneği

### V. Verdiği Seminerler

İlaç Etken Madde Tasarımında Farmakofor Analizi

### VI. Sempozyumlar- Sertifikalar

2nd Workshop on Computer Aided Drug Design & Development – Molecular Modelling (WCADD-2), 26-29 June 2008, Ankara/Turkey

Fifth International Symposium on Computational Methods in Toxicology and Pharmacology Integrating Internet Resources (CMTPI), 04-08 July 2009, Istanbul/Turkey