



**YENİ İZOKSAZOL TÜREVLERİNİN SENTEZİ, KARACİĞER VE MEME
KANSERİ HÜCRE HATLARINA KARŞI SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Kübra İBİŞ

**DOKTORA TEZİ
FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2020

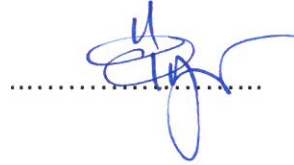
Kübra İBİŞ tarafından hazırlanan "Yeni İzoksazol Türevlerinin Sentezi, Karaciğer ve Meme Kanseri Hücre Hatlarına Karşı Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Erden BANOĞLU
Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

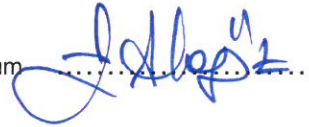
Başkan: Prof. Dr. Mutlu AYTEMİR
Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye: Prof. Dr. Tijen ÖNKOL
Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



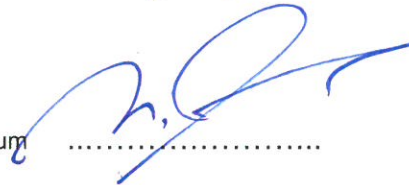
Üye: Prof. Dr. Zeynep ATEŞ ALAGÖZ
Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye: Prof. Dr. Burcu ÇALIŞKAN
Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye: Doç. Dr. Murat ŞÜKÜROĞLU
Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Tez Savunma Tarihi: 31/01/2020

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

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

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

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

Kübra İbiş

31.01.2020

YENİ İZOKSAZOL TÜREVLERİNİN SENTEZİ, KARACİĞER VE MEME KANSERİ
HÜCRE HATLARINA KARŞI SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ
(Doktora Tezi)

Kübra İBİŞ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Ocak 2020

ÖZET

Kanser; genetik ve/veya çevresel koşulların etkisiyle tetiklenen bir takım biyolojik mekanizmalarla kontrolsüz büyüme ve çoğalma özelliği kazanmış hücrelerin vücuttaki farklı doku ve organları istila etmesiyle karakterize bir hastalıktır. Dünya genelinde birçok araştırmacı; kanser hücrelerine karşı seçici, daha az yan etkili ve daha iyi bir yaşam kalitesi sunan tedavi seçenekleri için çalışmaktadır. Yapılan birtakım önemli araştırmalar incelendiğinde, izoksazol halkası içeren bazı bileşiklerin farklı mekanizmalarla antikanser aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, yapılan çalışmalarda dikkate değer bir diğer kimyasal yapı ise piperazin halkasıdır. Bu bilgiler ışığında; araştırma grubumuzun, antikanser etkili olabilecek yeni öncü bileşik keşfi amacıyla yürüttüğü bir tarama çalışmasında izoksazol-piperazin hibrit (BRP29) bir bileşik keşfedilmiştir. Bu bileşik; karaciğer (Huh7, Mahlavu), meme (MCF7) ve kolon (HCT116) kanseri hücre hatlarına karşı test edildiğinde sırasıyla 1,7; 11,7; 2,9 ve 6,0 μM IC₅₀ değeri ile sitotoksikite göstermiştir. Bu tez kapsamında, BRP29'un antikanser etkinliğini geliştirmek üzere tasarlanıp sentezlenen yeni analoglar arasındaki yapı-etki ilişkisi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla BRP29 yapısındaki 4-triflorometilbenzilpiperazin yan zinciri korunurken molekülün benziloksifenil grubu üzerinde yapılan modifikasyonlar ile aktivite arasındaki ilişki incelenmiştir. Sonuçta benzil grubunun 3. konumunda nitril sübstitüsyonu (6i) ile Huh7 karaciğer ve MCF7 meme hücrelerine karşı potent (IC₅₀= 0,1 ve 0,8 μM) fakat daha agresif Mahlavu hücrelerine karşı daha az potent (IC₅₀= 10,6 μM) antikanser aktivite tespit edilmiştir. İleri yapı-etki çalışmalarında 3-siyanobenzil grubu korunurken orta fenil halkası üzerinde 3-F sübstitüsyonu (26c) her üç hücre hattı için de potent antikanser aktivite ortaya çıkarmıştır (IC₅₀= 0,1; 0,38 ve 0,5 μM). Seçilmiş potent türevler ile yapılan moleküler biyoloji çalışmaları bu bileşiklerin hücre döngüsünü farklı fazlarda etkilediği, kanser hücre hatlarında apoptotik hücre sayısını arttırdığı ve hücre içinde apoptotik proteinlerin seviyelerini etkileyerek hücre ölümünü tetiklediğini ortaya çıkarmıştır. Sonuç olarak bu tez kapsamında sentezlenen bileşiklerden en aktif türev olan Bileşik 26c'nin, antikanser ajan olarak daha ileri klinik gelişim potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir.

Bilim Kodu : 1019
Anahtar Kelimeler : Antikanser aktivite, izoksazol, piperazin
Sayfa Adedi : 169
Danışman : Prof. Dr. Erden BANOĞLU

SYNTHESIS OF NEW ISOXAZOLE DERIVATIVES, INVESTIGATION OF
CYTOTOXIC EFFECTS ON LIVER AND BREAST CANCER CELL LINES
(Ph. D. Thesis)

Kübra İBİŞ

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
January 2020

ABSTRACT

Cancer is a disease characterized by metastasis to cells of different tissues and organs that have acquired uncontrolled growth and proliferation by a number of biological mechanisms triggered by the influence of genetic and environmental conditions. Many researchers are working on new therapies that might selectively inhibit the underlying targets for cancer resulting in a better and more complete response with minimal side effects and more improvement on patient's life quality. When some important researches are examined, it is determined that some compounds containing isoxazole ring show anticancer activity by different mechanisms. In addition, another remarkable chemical structure in the studies is the piperazine ring. According to this information, an isoxazole-piperazine hybrid compound (BRP29) was discovered in a screening study conducted by our research group for the discovery of new precursor compounds that may be anticancer effective. When tested against liver (Huh7, Mahlavu), breast (MCF7), and colon (HCT116) cancer cell lines, this compound was 1,7; 11,7; 2,9 and 6,0 μ M IC₅₀ showed cytotoxicity. In this thesis, the structure-activity relationship (SAR) studies between the new analogs designed and synthesized to improve the anticancer activity of BRP29 were carried out. For this purpose, the 4-trifluoromethylbenzylpiperazine side chain in BRP29 was not altered for further SAR approaches while concentrating on modifications of the benzyloxyphenyl group. As a result, 3-nitrile-substituted benzyl derivative (6i) demonstrated improved activity against Huh7 and MCF7 cells (IC₅₀= 0,1 and 0,8 μ M, respectively) while it was less potent against more aggressive cell line, Mahlavu (IC₅₀= 10,6 μ M). Further SAR studies by substitutions on the middle phenyl group, i.e., 3-fluoro derivative (26c), resulted in a compound with potent anticancer activity against all cell lines (IC₅₀= 0,1; 0,38 and 0,5 μ M). Further molecular biological studies with selected active compounds elucidated that these derivatives induced cell death by interfering with the cell cycle at different phases, increasing the apoptotic cell count in tested cancer cells and effecting the levels of apoptotic proteins within cells. As a result, it has been shown that Compound 26c, the most active derivative of the compounds synthesized within the scope of this thesis, has the potential for further clinical development as an anticancer agent.

Science Code : 1019
Key Words : Anticancer activity, isoxazole, piperazine
Page Number : 169
Advisor : Prof. Dr. Erden BANOĞLU

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın gerçekleştirilmesinde ve tüm doktora sürecim boyunca değerli bilgileri ve bilimsel yaklaşımlarıyla ufkumu genişleten, kıymetli zamanını ayırıp faydalı olabilmek adına çok fazla emek sarf eden, öğrencisi olmaktan büyük gurur duyduğum danışmanım ve Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Başkanı saygıdeğer hocam Prof. Dr. Erden BANOĞLU'na; gerek laboratuvar gerekse teorik çalışmalarım esnasında bilgi ve tecrübesiyle bana rehberlik eden, kendisiyle çalışma fırsatı bulduğum için şanslı hissettiğim, çok güçlü ve zeki kadınlara özgü bir enerjisi ve yüksek bir öngörüsü olduğuna inandığım sevgili hocam Prof. Dr. Burcu ÇALIŞKAN'a; aklıma takılan konuları çekinmeden danışabildiğim ve böyle zamanlarda bilgisini esirgemeyerek yol gösteren Dr. Z. Tuğçe GÜR MAZ'a; ofis arkadaşlığı yaptığımız kısa sürede hayata ve bilime bakışımı olumlu anlamda çokça değiştiren Öğr. Gör. Dr. Abdurrahman OLĞAÇ'a ve hocalarımız vesilesiyle, BRG (Banoglu Research Group) ailesinin tüm kıymetli üyelerine katkılarından dolayı teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Aktivite çalışmalarını gerçekleştiren Orta Doğu Teknik Üniversitesi'nden Prof. Dr. Rengül ÇETİN ATALAY ve Esra NALBAT'a, analiz çalışmalarını gerçekleştiren Ankara Üniversitesi'nden Prof. Dr. Hakan GÖKER'e ve yine analiz çalışmalarının tamamlanmasını sağlayan Gazi Üniversitesi'nden Dr. Burcu AYDINER'e ve Anadolu Üniversitesi'nden Öğr. Gör. Serkan LEVENT'e, doktora eğitimim boyunca gerekli çalışma ortamını sağlayan anabilim dalımızın çok değerli öğretim üye ve yardımcılarına, ayrıca bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde verdiği desteklerden ötürü Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK-214S062) ve 100/2000 Doktora Programı kapsamında bursiyeri olduğum Yükseköğretim Kurulu'na, bu bursu kazanmamda ve daha pek çok konuda yakın ilgi ve sevgisini gördüğüm değerli hocam Prof. Dr. Tijen ÖNKOL'a çok teşekkür ediyorum. Doktora çalışmalarım süresince her ihtiyaç duyduğumda yanımda olan, pozitif bakış açılarıyla beni her daim yüreklendiren sevgili dostlarım Deniz Lengerli, Merve ERDOĞAN, Sümeyye TURANLI, Azize Gizem USLU ve Ensar Korkut KILIÇ'a; beni akademisyen olma yolunda sürekli motive eden canım teyzem Sebahat YALÇINKAYA'ya; çok uzun yıllardır hem zor hem güzel anlarımın yegâne şahidi değerli dostum Esra ŞUMLU'ya desteklerinden ötürü içtenlikle teşekkür ediyorum.

Ve bugün genç bir kadın olarak bilimsel konularda çalışmalar ortaya koyabilecek ve umarım ki gelecekte iyi bir bilim insanı olarak ülkeme hizmet verebilecek gücü kendimde bulabiliyor ve kariyerim için uygun koşullara rahatlıkla erişebiliyorsam biliyorum ki bu; mezunu olduğum okulumu da bizzat talimatıyla kurdurmuş olan Gazi M. Kemal ATATÜRK ve onun kahraman arkadaşlarının açtığı aydınlık yol sayesinde. Kendilerini sevgi, saygı ve minnetle anıyorum...

Bu tezi; hayatımın her evresinde beni koşulsuz olarak seven, fedakârlıklarla yetiştirip bugünlere getiren, verdiğim kararlarda hep arkamda durup maddi ve manevi desteklerini asla esirgemeyen, bana hayattaki en değerli hediyem ve yaşam enerjim biricik kardeşim Rana'yı veren, bugüne kadar başarabildiğim ve gelecekte başarabileceğim her ne varsa hepsinin gerçek mimarları canım anneme ve babama ithaf ediyorum...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. Kanser, Tümör Biyolojisi ve İlaç Hedeflerine Genel Bakış.....	7
2.2. Karaciğer ve Meme Kanserleri ile Tedavi Yaklaşımlarına Genel Bakış.....	11
2.3. İlaç Geliştirme Çalışmalarında İzoksazol Halkasının Önemi.....	16
2.4. Antikanser İlaç Geliştirme Çabalarında İzoksazol Türevi Bileşiklerin Yeri.....	19
2.5. İlaç Geliştirme Çalışmalarında Piperazin Halkasının Önemi.....	47
2.6. Antikanser İlaç Geliştirme Çabalarında Piperazin Türevi Bileşiklerin Yeri.....	48
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	55
3.1. Kimyasal Çalışmalar.....	55
3.1.1. Gereçler.....	55
3.1.2. Genel sentez yöntemleri.....	56

	Sayfa
3.2. Analitik Çalışmalar.....	58
3.2.1. Erime derecesi tayini.....	58
3.2.2. ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR spektrumları.....	58
3.2.3. HRMS spektrumları.....	59
3.3. Biyolojik Çalışmalar.....	60
3.3.1. Hücre kültürü.....	60
3.3.2. NCI-60 SRB (Sulforadamin B) ile sitotoksosite tayini.....	60
3.3.3. Gerçek zamanlı hücre analizi (RT-CES, xCELLigence).....	61
3.3.4. Hoechst floresan boyama ile hücre ölümü tespiti.....	61
3.3.5. Western Blot analizi.....	61
4. BULGULAR.....	63
4.1. Kimyasal Bulgular.....	63
4.2. Biyolojik Bulgular.....	131
5. TARTIŞMA.....	135
5.1. Sentez Çalışmaları.....	135
5.1.1. Benzil grubunun (A halkası) modifikasyonu amacıyla gerçekleştirilen sentez çalışmaları.....	136
5.1.2. İzoksazol halkasının 3. konumundaki piperazinil metil motifinin modifikasyonu amacıyla gerçekleştirilen sentez çalışmaları.....	138
5.1.3. Benziloksifenil grubunun (B halkası) modifikasyonu amacıyla gerçekleştirilen sentez çalışmaları.....	140
5.1.4. B Halkası ile izoksazol halkasının 3. konumundaki piperazinil metil motifinin bir arada modifikasyonu amacıyla gerçekleştirilen sentez çalışmaları.....	143
5.1.5. Sentezlenen bileşiklerin yapı aydınlatma çalışmaları ve Bileşik 26c'nin ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR spektrumları.....	144

	Sayfa
5.2. Biyolojik Çalışmalar ve Yapı Etki İlişkileri.....	146
5.2.1. BRP29 ve Bileşik 26c'nin gerçek zamanlı sitotoksosite analizi.....	149
5.2.2. BRP29 ve Bileşik 26c'nin Huh7 karaciğer kanseri hücrele üzerinde oluşturduğu morfolojik etkilerin belirlenmesi.....	150
5.2.3. BRP29 ve Bileşik 26c'nin hücrel yolaklar üzerindeki etkilerinin protein ifade analizi ile incelenmesi.....	151
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	155
KAYNAKLAR.....	157
ÖZGEÇMİŞ.....	169

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 1.1. Tez kapsamında sentezlenen final bileşikler-1 (Bileşik 6a-s).....	4
Çizelge 1.2. Tez kapsamında sentezlenen final bileşikler-2 (Bileşik 7-20).....	5
Çizelge 1.3. Tez kapsamında sentezlenen final bileşikler-3 (Bileşik 26a-d, Bileşik 29-30).....	6
Çizelge 2.1. AUY922 ve lider bileşiğe ait karşılaştırmalı aktivite değerleri.....	22
Çizelge 2.2. Bileşik 9'a ait IC ₅₀ değerleri.....	29
Çizelge 2.3. Bileşik 10'nun CA-4 ile karşılaştırmalı aktivite sonuçları.....	31
Çizelge 2.4. Bileşikler 11 ve 12'ye ait aktivite değerleri.....	33
Çizelge 2.5. Bileşik 18'in MMP'lere karşı IC ₅₀ değerleri.....	38
Çizelge 2.6. Bileşik 19'un sPLA aktivitesi ile ilgili deneysel sonuçlar.....	39
Çizelge 4.1. Bileşik 6a-s'nin IC ₅₀ değerleri.....	131
Çizelge 4.2. Bileşik 7-20'nin IC ₅₀ değerleri.....	132
Çizelge 4.3. Bileşik 26a-d'nin IC ₅₀ değerleri.....	133
Çizelge 4.4. Bileşikler 26c, 14, 19, 29 ve 30'un üç hücre tipi için karşılaştırmalı IC ₅₀ değerleri.....	134
Çizelge 5.1. A halkasında yapılan değişiklikler ile sentezlenen bileşikler (Bileşik 6a-s).....	137
Çizelge 5.2. İzoksazol halkasının 3. konumunda yapılan değişiklikler ile sentezlenen bileşikler (Bileşik 7-20).....	139
Çizelge 5.3. B Halkasında yapılan değişiklikler sonucu sentezlenen bileşikler (Bileşik 26a-d).....	142
Çizelge 5.4. BRP29 ve Bileşik 26c'nin zaman bağımlı IC ₅₀ değerleri.....	149

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Öncü bileşik BRP29'un kimyasal yapısı.....	3
Şekil 1.2. BRP29'dan hareketle yeni ve daha potent analoglarının tasarım stratejileri.....	4
Şekil 2.1. Hanahan ve Weinberg tarafından bildirilen hücresel düzeydeki tümörjenik yetenekler ve bu özellikleri hedefleyen antikanser ajan sınıfları (referans [25]'ten uyarlanmıştır).....	9
Şekil 2.2. Dünya çapında 2018 yılındaki yeni kanser vakalarının ve ölümlerinin kanser tipleri bazındaki yüzdeleri (GLOBOCAN 2018) [18].....	11
Şekil 2.3. İzoksazol, izoksazolin ve izoksazolidin yapıları.....	16
Şekil 2.4. İzoksazol türevi bileşiklerin farklı biyolojik aktiviteleri (referans [59]'dan uyarlanmıştır).....	18
Şekil 2.5. HSP90'nın doğal inhibitörleri.....	20
Şekil 2.6. HSP90 inhibitörleri; VER-49009 ve VER-50589.....	21
Şekil 2.7. AUY922'nin tasarım stratejileri.....	22
Şekil 2.8. Bileşik 1'in kimyasal yapısı.....	23
Şekil 2.9. Bileşik 1'in HSP90'nın aktif bölgesiyle yaptığı etkileşimler.....	23
Şekil 2.10. Bileşik 3'ün HSP90'nın aktif bölgesiyle yaptığı etkileşimler.....	23
Şekil 2.11. NMS-E973 kodlu bileşiğin keşif basamakları.....	24
Şekil 2.12. NMS-E973'ün aktif bölge etkileşimleri.....	25
Şekil 2.13. Bileşik 4 ve aktif bölge ile yaptığı etkileşimler.....	26
Şekil 2.14. Bileşik 8'in geliştirilme aşamaları.....	27
Şekil 2.15. Bileşik 9'un geliştirilme stratejisi.....	28
Şekil 2.16. Kombretastatin A-4 ve ön ilaç formu CA4P.....	30
Şekil 2.17. Bileşik 10'nun geliştirilme süreci.....	31

Şekil	Sayfa
Şekil 2.18. KRIBB3 molekül yapısı.....	32
Şekil 2.19. Bileşik 11 ve 12'nin geliştirilmesi.....	33
Şekil 2.20. Antitübülin aktivite gösteren izoksazol analogu Bileşikler 13 ve 14.....	34
Şekil 2.21. Bileşik 15'in yapısı.....	35
Şekil 2.22. Bileşik 16 ve IC ₅₀ değerleri.....	37
Şekil 2.23. MMP inhibitörü Bileşikler 17 ve 18.....	37
Şekil 2.24. sPLA2 inhibitörü Bileşik 19'un geliştirilmesi.....	39
Şekil 2.25. Vorinostat'ın kimyasal yapısı.....	40
Şekil 2.26. HDAC inhibitörü bileşiklerin genel yapısı (referans [84]'ten uyarlanmıştır).....	40
Şekil 2.27. Spesifik HDAC inhibitörlerinin geliştirilmesi için seçilen öncü bileşikler.....	41
Şekil 2.28. HDAC6'nın selektif inhibitörü olarak geliştirilen Bileşik 20 serisi.....	42
Şekil 2.29. Öncü bileşik 21 ve yeni türevler 22 ve 23'ün geliştirilmesi.....	43
Şekil 2.30. Bileşik 21'in aktif bölge etkileşimleri.....	44
Şekil 2.31. Leflunomid'in kimyasal yapısı.....	46
Şekil 2.32. Piperazin taşıyan FDA onaylı bazı antikanser ilaç molekülleri.....	48
Şekil 2.33. Piperazin türevleri Bileşik 24-27.....	49
Şekil 2.34. Piperazin türevleri Bileşik 28 ve 29.....	50
Şekil 2.35. Piperazin türevleri Bileşik 30 ve 31.....	51
Şekil 2.36. Naftopidil ve Bileşik 32-34.....	52
Şekil 2.37. Piperazin türevleri Bileşik 35 ve 36.....	53
Şekil 5.1. Lider bileşik BRP29 üzerinde yapılan modifikasyonlar.....	135

Şekil	Sayfa
Şekil 5.2. Bileşik 6a-s'nin sentez şeması.....	136
Şekil 5.3. Bileşik 7-20'nin sentez şeması.....	138
Şekil 5.4. Bileşik 26a-c'nin sentez şeması.....	140
Şekil 5.5. Bileşik 26d'nin sentez şeması.....	141
Şekil 5.6. Bileşik 29-30'un sentez şeması.....	143
Şekil 5.7. BRP29 üzerinde yapılan temel yapısal modifikasyonlar.....	146
Şekil 5.8. BRP29 ve Bileşik 26c'nin zamana ve doza bağımlı etkisinin Huh7 hücre hattında RT-CES sistemi ile analizi.....	150

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 5.1. Bileşik 26c'nin ^1H -NMR spektrumu.....	144
Resim 5.2. Bileşik 26c'nin ^{13}C -NMR spektrumu.....	145
Resim 5.3. BRP29 ve Bileşik 26c'nin Huh7 karaciğer kanseri hücrelerinde zamana bağımlı morfolojik etkilerinin Hoechst boyaması ile incelenmesi.....	151
Resim 5.4. BRP29 ile 72 saat inkübe edilen Huh7 hücrelerinde apoptotik yolak proteinlerinin seviyelerinin Western Blot yöntemi ile incelenmesi.....	152
Resim 5.5. BRP29 ile 72 saat inkübe edilen Huh7 hücrelerinde Akt/Erk yolağında proteinlerin seviyelerinin Western Blot yöntemi ile incelenmesi.....	153
Resim 5.6. BRP29 ve Bileşik 26c ile 72 saat inkübe edilen Huh7 hücrelerinde Akt, Erk ve p53 yolağında proteinlerin seviyelerinin Western Blot yöntemi ile incelenmesi.....	153

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklama
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
A2780	İnsan yumurtalık kanseri hücre hattı
A549	İnsan küçük hücreli akciğer kanseri hücre hattı
Calu-6	İnsan akciğer kanseri hücre hattı
COLO205	İnsan kolon kanseri hücre hattı
DC₅₀	%50 oranında degridasyona neden olan konsantrasyon
dk	Dakika
DU-145	İnsan prostat kanseri hücre hattı
ECA-109	İnsan özofagus kanseri hücre hattı
Focus	İnsan hepatoselüler karsinoma hücre hattı
GI₅₀	%50 oranında büyüme inhibisyonuna neden olan doz
HCT116	İnsan kolon kanseri hücre hattı
HeLa	İnsan servikal kanser hücre hattı
HepG2	İnsan hepatoselüler karsinoma hücre hattı
HL60	İnsan lösemi hücre hattı
HT1080	İnsan fibrosarkom hücre hattı
HT29	İnsan kolon kanseri hücre hattı
Huh7	İnsan hepatoselüler karsinoma hücre hattı
IC₁₀₀	%100 oranında ölüme neden letal konsantrasyon
IC₅₀	Maksimum inhibisyonun %50'sini oluşturan ilaç konsantrasyonu
K562	İnsan miyeloid lösemi hücre hattı
Kd	Ayrışma sabiti
L3.6pl	İnsan pankreas kanseri hücre hattı
LNCaP	İnsan prostat kanseri hücre hattı

Mahlavu (MV)	İnsan hepatoselüler karsinoma hücre hattı
MCF7	İnsan meme kanseri hücre hattı
MDA-MB-231	İnsan meme kanseri hücre hattı
MGC-803	İnsan gastrik kanser hücre hattı
MHz, Hz	Megahertz, Hertz
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mmol	Milimol
MV4-11	İnsan akut miyeloid lösemi hücre hattı
NCI-H3122	İnsan akciğer kanseri hücre hattı
NCI-H460	İnsan akciğer kanseri hücre hattı
NCI-N87	İnsan gastrik kanser hücre hattı
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
PC-3	İnsan prostat kanseri hücre hattı
ppm	Parts per million (milyonda bir)
rpm	Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)
SF763T	İnsan küçük hücreli glioblastoma hücre hattı
SGC7901	İnsan gastrik kanser hücre hattı
SMMC-7721	İnsan hepatoselüler karsinoma hücre hattı
SVEC4-10	İnsan glomerüler karsinoma hücre hattı
U87-MG	İnsan primer glioblastoma hücre hattı

Kısaltmalar

Açıklama

17-DMAG	17-Dimetilaminogeldanamisin
7-AAG	7-Allilaminogeldanamisin
AKT	Protein kinaz-B
AR	Androjen reseptörü
ATP	Adenosine triphosphate
BCR-ABL	BCR&ABL füzyon geni
BET	Bromo- & ekstra- terminal domain
BRCA	Breast cancer gene

BRD	Bromodomain
BSA	Bovine serum albumin
CA-4	Combretastatin A4
CA4P	Combretastatin A4 phosphate
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CAS	Chemical Abstracts Service
CDK	Cyclin-dependent kinase
CHK	Check-point kinaz
COX-2	Cyclooxygenase-2
DCM	Dichloromethane
DiEA	N,N-Diizopropil-etilamin
DMEM	Dulbecco's modified eagles medium
DMF	Dimetilformamit
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EA	Etil asetat
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EPAC	Exchange protein activated by cyclic AMP
ER	Estrogen receptor
ERK	Ekstraselüler reseptör kinaz
ESI	Elektrosprey iyonizasyon
FBS	Fetal bovine serum
FDA	Food and Drug Administration
HAT	Histon asetil transferaz
HDAC	Histone deacetylase
HER-2	Human epidermal growth factor receptor 2
HR	Hormon reseptör
HRMS	High resolution mass spectrometry
HSK	Hepatoselüler karsinoma
HSP90	Heat-shock protein 90
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
İTK	İnce tabaka kromatografisi
LPL	Lysophospholipid
MAPK	Mitojenle aktiveleştirilen protein kinaz

MeOH	Metanol
MİK	Minimum inhibitör konsantrasyon
MKI	Multikinaz inhibitörü
MMP	Matriks metalloproteinaz
MMPI	Matriks metalloproteinaz inhibitörü
MÖ/MS	Milattan önce / Milattan sonra
TOF-MS	Time-of-flight mass spectrometry
NCI	National Cancer Institute
NEAA	Non-essential amino acids
NMR	Nükleer manyetik rezonans
NP40	Nonyl phenoxypolyethoxyethanol
p53	Tümör baskılayıcı gen TP53 ile kodlanan protein
PARP	Poli (adenozin difosfat [ADP]-riboz) polimeraz
PBS	Phosphate buffered saline
PKA	Protein kinaz-A
PLA2	Phospholipase A2
PR	Progesteron reseptör
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma
RT-CES	Real-time cell electronic sensing
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforez
SRB	Sulforhodamine B
TBS	Tris-buffered saline
TGX	Tris-glycine extended polyacrylamide gels
THF	Tetrahidrofuran
TNBC	Triple-negative breast cancer
UPLC	Ultra performance liquid chromatography
UV	Ultraviyole
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
WHO	World Health Organization

1. GİRİŞ

Kanser; genetik ve/veya çevresel koşulların etkisiyle tetiklenen birtakım biyolojik mekanizmalarla kontrolsüz büyüme ve çoğalma özelliği kazanmış hücrelerin, öncelikle yakın mesafedeki dokular olmak üzere vücuttaki farklı doku ve organları istila etmesiyle (metastaz) karakterize çok geniş bir grup hastalık için kullanılan genel bir terimdir. Bu metastatik özelliği ile kanser; kendine özgü tedavi stratejileri gerektiren, birçok anatomik ve moleküler alt tipe sahip vücuttaki hemen her bölümü etkileyebilmekte ve ölümcül sonuçlar doğurabilmektedir [1]. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nın verilerine göre dünyada ikinci önde gelen ölüm nedeni olup, dünya çapında 6 ölümden 1 tanesi kanser kaynaklıdır. Bu anlamda 2018 yılında gerçekleşen tahmini 9,6 milyon ölümden sorumludur [2]. 2040 yılında ise bu rakamın tüm dünyada yaklaşık 16,4 milyona ulaşacağı öngörülmektedir [3].

Sayısal verilerdeki korkutucu seviyeye karşılık; hastalığın mevcut klinik tedavileri, düşük başarı oranlarının yanı sıra ciddi birtakım komplikasyonları da beraberinde getirmektedir. Cerrahi, ilaç tedavisi (kemoterapi) ve radyoterapi uygulamaları olarak sınıflandırabileceğimiz bu tedavi yaklaşımları; diğer sağlıklı doku ve organlarda sebep oldukları toksik yan etkiler, hücrelerde çeşitli mekanizmalarla tedaviye karşı gelişen direnç, tedavi sonrası oluşan nüks veya metastazlar sebebiyle kesin bir iyileşmenin görülmesine olanak vermemektedir [4, 5]. Genellikle tümör tipi ve evresine uygun olarak tercih edilen bu tedaviler veya kombinasyonlarının; *seçici olarak hedefleme yeteneğine sahip, daha iyi ve eksiksiz tedavi sağlayabilecek ve aynı zamanda minimum yan etkiler gösterebilecek* yeni yöntemlerle değiştirilmesinin veya desteklenmesinin gerekliliği açıktır. Gelineen noktada malign tümöral oluşumların tedavisinde kemoterapi hâlâ en popüler tedavi yaklaşımı olmakla birlikte; son yıllarda bu alanda elde edilen büyük gelişmelere rağmen kanser tedavisinde henüz istenilen noktaya varılamamıştır [6].

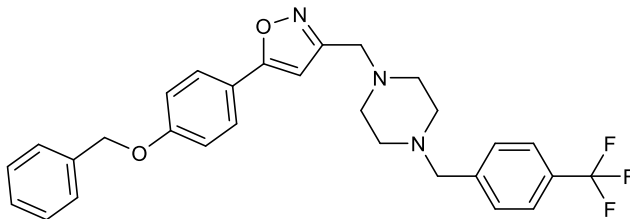
Kanser tedavisi için yeni aday ilaç moleküllerini geliştirmek ve bu alanda bazı yenilikler ortaya koymak amacıyla; tüm dünyada yapılan birtakım önemli araştırmalar incelendiğinde, *izoksazol halkası* içeren bazı bileşiklerin farklı mekanizmalarla antikanser aktivite gösterdikleri birçok başarılı çalışma dikkat

çekmektedir. Yoğun olarak üzerinde çalışılan bu mekanizmalardan biri, moleküler ısı şoku protein veya şaperonlar (heat-shock proteins, HSP) olarak bilinen proteinlerden HSP90'ın inhibisyonudur. HSP90, birçoğu tümör gelişiminde görev alan bazı özel proteinlerin doğru konformasyonunu, stabilizasyonunu, aktivasyonunu ve lokalizasyonunu destekler [7], ki bunlar EGFR, CDK4, AKT ve BCR-ABL gibi birçok kinazın yanı sıra östrojen ve androjen reseptörleri, HIF-1 ve p53 gibi transkripsiyon faktörlerini de içeren bir grup proteindir [8]. HSP90'ın bu özelliği sebebiyle, izoksazol halkası taşıyan bazı inhibitörler antikanser etki için ilaç keşif çalışmalarında kendilerine önemli bir yer edinmişlerdir [9-13].

Antikanser etkili olabilecek aday ilaç molekülü geliştirme hedefiyle yapılan çalışmalar incelendiğinde, dikkate değer bir diğer kimyasal yapı ise; biyolojik aktivite sergileyen bileşiklerde sıklıkla tekrarlanan bir motif olan *piperazin halkası* olmuştur. Piperazin bazlı bileşiklerin çeşitli farmakolojik özellikleri arasında; antikanser, antiviral, antifungal, antidepresan ve serotonin reseptörü antagonist veya agonist aktiviteleri bulunduğu birçok çalışmada ortaya koyulmuş olması, araştırmacılara biyolojik aktivite gösteren moleküllerde piperazin halkasının ayrıcalıklı bir yere sahip olduğunu düşündürmektedir [14]. Bu düşüncenin oluşmasında, çok yönlü bağlanma özelliklerine sahip olması ve iyonlaşabilen piperazin azotuyla birlikte önemli fizyolojik rol oynayan çeşitli protein hedeflerinde bulunan bağlama ceplerinin yapısal gereksinimlerini karşılaması da kuşkusuz etkili olmaktadır [15]. Öte yandan, antikanser etki gösterdiği saptanmış bileşiklerin tasarımına eklenen çeşitli piperazin yapılarının da olumlu sonuçlar vermesi tüm bunları destekler niteliktedir [16].

Güçlü antiproliferatif aktivite gösterdiği bilinen piperazin analoglarının etki mekanizmalarına yönelik olarak yapılan deneylerde; bazı piperazin türevlerinin mikrotübül sentezini, hücre döngüsünün normal işleyişini ve bir tümör hücresinin büyüme ve metastaz yapma yeteneği için kritik olan anjiyogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir. ABD Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) tarafından yapılan bu deneylerde piperazinlerin apoptozisi indükleyerek tümör hücrelerini öldürme kabiliyetleri de ortaya koyulmuştur [17].

Bu noktaya kadar kısaca değinilen literatür taramalarından ve araştırma grubumuzun yıllar içerisinde edindiği tecrübelerden yola çıkılarak; antikanser etkili olabilecek yeni öncü bileşik keşfi amacıyla yürütülen bir tarama çalışması kapsamında 5-(4-(benziloksi)fenil)-3-((4-(4-(triflorometil)benzil)piperazin-1-il)metil)izoksazol kimyasal yapısında bir bileşik keşfedilmiştir (Şekil 1.1). BRP29 koduyla anılan bu bileşik öncelikle karaciğer (Huh7, Mahlavu), meme (MCF7) ve kolon (HCT116) kanseri hücre hatlarına karşı test edildiğinde sırasıyla 1,7; 11,7; 2,9 ve 6,0 μM IC₅₀ (maksimum inhibisyonun %50'sini oluşturan ilaç konsantrasyonu) değerlerinde sitotoksite göstermiştir.



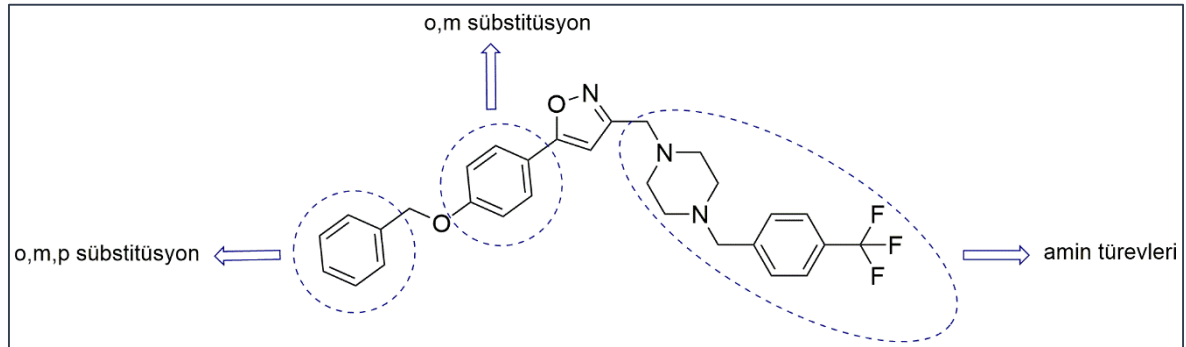
Şekil 1.1. Öncü bileşik BRP29'un kimyasal yapısı

BRP29'un bir hepatoselüler karsinoma (HSK) hücre hattı olan Huh-7'ye karşı yüksek inhibitör aktiviteye sahip olması; BRP29'un daha aktif türevlere ulaşabilmek için bir başlangıç noktası olmasını sağlamıştır. Bu amaçla BRP29'dan hareketle yeni bileşikler tasarlanarak gerçekleştirilen yapı-etki çalışmaları bu tezin kapsamını oluşturmaktadır.

Bu bağlamda 3,5-disüstitüe izoksazol iskeletini ortak olarak taşıyan 38 adet orijinal bileşik tasarlanmış, sentezlenmiş ve farklı kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktiviteleri değerlendirilerek ileri dönem çalışmaların temelini oluşturulması hedeflenmiştir.

Bu tez çalışması özelinde; dünya çapında teşhis sıklığı ve ölüm oranları başlıkları altında oldukça üst sıralarda yer alan meme ve karaciğer kanserleri [18]'ni hedefleyen, ilaç adayı olabilecek BRP29 analogu bileşiklerin sentezleri ve biyolojik aktivite çalışmaları ele alınmaktadır.

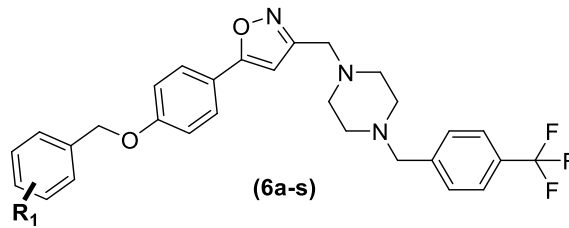
BRP29 ile karaciğer kanseri hücre hatlarına karşı elde edilen ön sonuçlara göre bu tez kapsamında sentezlenen bileşikler ve tasarım stratejileri (Şekil 1.2) üç başlık altında toplanabilir:



Şekil 1.2. BRP29'dan hareketle yeni ve daha potent analoglarının tasarım stratejileri

1. BRP29 bileşiğinin amin kısmında 4-CF₃-benzilpiperazin grubu korunarak, benzil grubunda farklı sübstütüsyonlarla daha aktif ve denenecek hücre hatlarında daha seçici etki gösterebilecek optimum sübstütüsyon paterninin araştırılması için sentezlenen bileşikler:

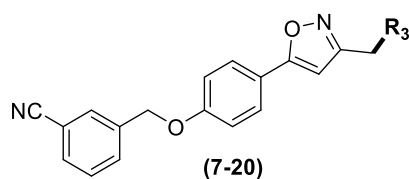
Çizelge 1.1. Tez kapsamında sentezlenen final bileşikler-1 (Bileşik 6a-s)



Bileşik	R ₁	Bileşik	R ₁	Bileşik	R ₁
6a	2-CH ₃	6b	3-CH ₃	6c	4-CH ₃
6d	3,5-diCH ₃	6e	2-Cl	6f	3-Cl
6g	4-Cl	6h	2-CN	6i	3-CN
6j	4-CN	6k	2-F	6l	3-F
6m	4-F	6n	2-OCH ₃	6o	3-OCH ₃
6p	4-OCH ₃	6r	3,5-diOCH ₃	6s	3,4,5-triOCH ₃

2. Benzil halkası üzerindeki optimum sübstitüsyon düzeni belirlendikten sonra, ilgili bileşikte yer alan 4-CF₃-benzilpiperazin grubunun farklı amin türevleri (başka piperazinler veya piperidinler gibi) ile değiştirilmesi sonucu amin gruplarının aktiviteye olumlu veya olumsuz katkılarının incelenmesi amacıyla sentezlenen bileşikler:

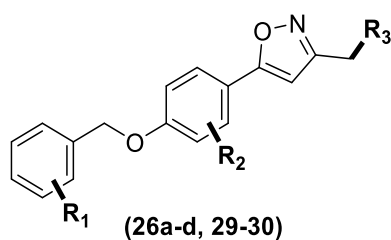
Çizelge 1.2. Tez kapsamında sentezlenen final bileşikler-2 (Bileşik 7-20)



Bileşik	R ₃	Bileşik	R ₃
7		14	
8		15	
9		16	
10		17	
11		18	
12		19	
13		20	

3. İlk iki öncüldeki optimizasyon sonrasında, izoksazol halkasının 5. konumundaki fenil halkası üzerinde farklı sübstitüentlerin (3-CH₃, 2-CH₃, 3-F, 2-F) ve akabinde üç ayrı optimizasyon paternini de barındıran yapıların (Bileşik 29-30) sitotoksik aktiviteye olan etkisinin incelenmesi amacıyla sentezlenen bileşikler:

Çizelge 1.3. Tez kapsamında sentezlenen final bileşikler-3 (Bileşik 26a-d, Bileşik 29-30)



Bileşik	R ₁	R ₂	R ₃
26a	3-CN	3-CH ₃	
26b	3-CN	2-CH ₃	
26c	3-CN	3-F	
26d	3-CN	2-F	
29	3-CN	3-F	
30	3-CN	3-F	

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser, Tümör Biyolojisi ve İlaç Hedeflerine Genel Bakış

Tüm dünyada milyonlarca insanı etkileyerek ölümlerine sebep olan ve klasik tedavi yaklaşımlarının yetersiz kalmasının yanı sıra çoğunlukla kişilerin hayat kalitesini düşürdüğü kanser hastalığının ortaya çıkışı; bilinen insanlık tarihinin oldukça erken dönemlerine rastlamaktadır. Kanser hakkındaki en eski kanıtlara (kemik kanseri) milattan önce (MÖ) 1600'lü yıllara ait olduğu düşünülen eski Mısır'daki antik el yazmalarında rastlanıyor olsa da kanserin bir hastalık terimi olarak kullanılışı ilk kez Hipokrat (MÖ 460-370) tarafından gerçekleştirilmiştir. Tümör etrafında gelişen damarları bir yengecin bacaklarına benzeten Hipokrat; Yunancada yengeç anlamına gelen *karkinos* (*carcinos*) kelimesinden esinlenmiş, daha sonra Romalı bir hekim olan Celsus (MÖ 28-MS 50) bu kez Latince yengeç anlamına gelen *cancer* kelimesini kullanarak hastalığa bugünkü adını vermiştir. Öte yandan Galen (MS 130-200) ise onkoloji (kanser bilimi) teriminin köken aldığı şişlik anlamına gelen *oncos* kelimesini tümöral oluşumları ifade ederken kullanmıştır [19, 20].

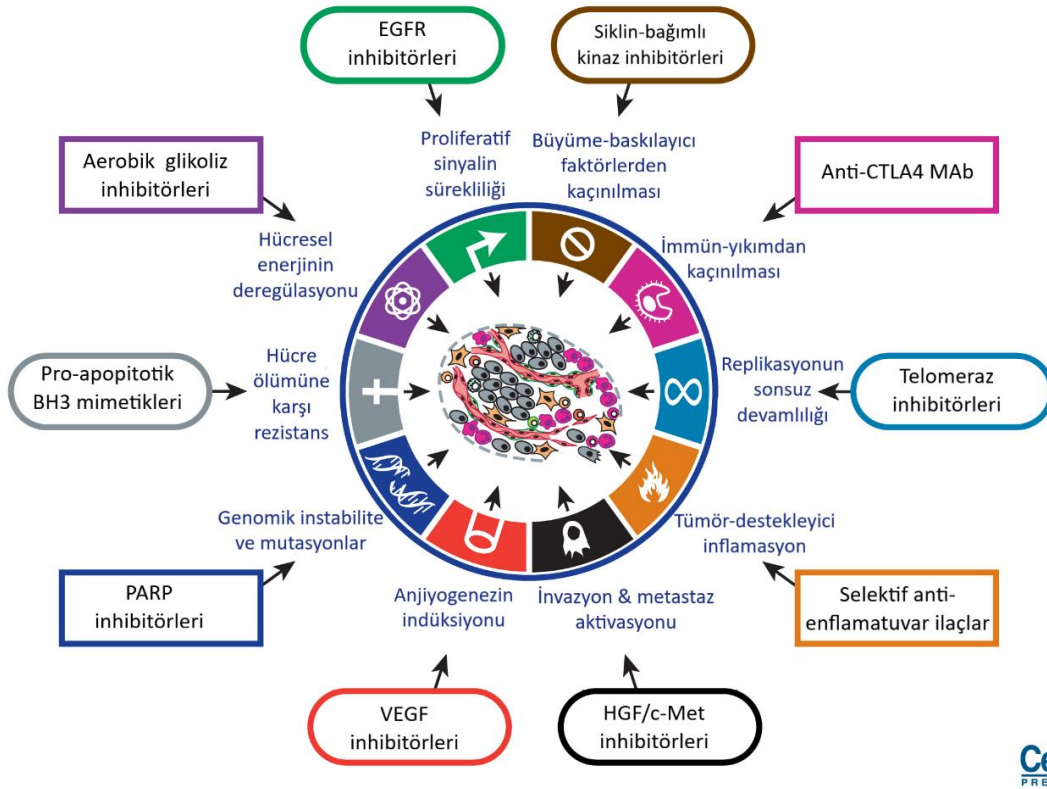
Görüldüğü üzere, kanser hastalığının var oluşu neredeyse insanlık tarihi kadar eskidir. Buna rağmen kanser, günümüz modern toplumlarının en büyük sağlık sorunlarından biri ve belki de en büyüğü olmaya devam etmektedir. Kanserin tedavisinde kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi müdahale en sık başvurulmuş yöntemler olmakla birlikte, hormon terapisi ve biyolojik yöntemlerin kullanılması gibi farklı yaklaşımlar da mevcuttur ve var olan yöntemlere destekleyici ya da tek başlarına tercih edilebilmektedirler [21]. Fakat her yöntemin kendine özgü avantaj ve dezavantajlarının bulunması, kanserin kişiye özgü bir hastalık olması ve dolayısıyla tedavilerinin de kişiden kişiye farklılık gösterebilmesi nedeniyle tek bir kesin tedavi yönteminin varlığından bahsetmek imkânsızdır. Bu yüzden modern tıbbın amacı kanseri oluştuktan sonra tedavi etmektense henüz ortaya çıkmadan engellemektir. WHO'nun verilerine göre, kanser ölümlerinin %30 ile %50'si, tütün ürünlerinden kaçınmak, alkol tüketimini azaltmak, sağlıklı vücut ağırlığını korumak, düzenli egzersiz yapmak ve enfeksiyonla ilgili risk faktörlerini dikkate almak dâhil

olmak üzere bazı kritik etkenleri değiştirerek ve periyodik doktor kontrolleri ile sağlanabilecek erken tanı sayesinde önlenabilmektedir [1].

Profilaktik yaklaşımlar belli bir oranda kanser vakalarında azalmayı gündeme getirirse de kanser hastalığının dünyadaki en büyük ölüm nedenlerinden biri olduğu gerçeğini değiştirememektedir [22]. 2018 yılı itibarıyla dünya çapında 18,1 milyon olduğu düşünülen yeni vaka sayısının 2030 yılında 24 milyona, 2040 yılında ise 29,5 milyon civarına ulaşacağı öngörülmektedir [3]. Şu da bir gerçek ki, hastalığın etkilediği insan sayısını burada belirtilen rakamlarla sınırlandırmak mümkün değildir; zira hastaların yakın çevresindeki kişiler de olayın büyük psikolojik sorunlarından ciddi anlamda etkilenmekte ve hatta zaman zaman palyatif tedavilere bile gereksinim duymaktadırlar. Benzer şekilde hastalığın ekonomik etkileri de yadsınamaz düzeydedir. 2010 yılında kanserin yıllık toplam ekonomik maliyetinin yaklaşık 1,16 trilyon ABD doları olduğu tahmin edilmektedir [2].

Kanser, genetik ve epigenetik faktörlerin kombinasyonu ile çevresel etkenler tarafından organize edilen çok faktörlü bir hastalıktır [23]. Kanser hastalığı, anormal mutasyonlardan etkilenen birçok sinyal yolağının çoklu moleküler lezyonları ve fonksiyonel aşırılığı ile karakterize edilir. Tümör yolaklarının etkili bir şekilde hedeflenmesi, kanser hücrelerinin malign fenotipinin oluşumuna ve korunmasına yol açan moleküler değişikliklerin detaylı bir şekilde anlaşılmasını gerektirir. Tüm onkoproteinler tarafından modüle edilen karmaşık sinyal yollarının ortaya çıkarılması, daha etkili ve daha az toksik antikanser tedavilerinin keşfedilmesine ve geliştirilmesine yardımcı olacaktır [24].

Organizmadaki normal hücrelerden, neoplastik duruma giden ve farklı aşamaları ihtiva eden süreçler; tümör patojenezi olarak adlandırılır. Tümöral oluşumlar, proliferatif kanser hücrelerinin oluşturduğu salt kitlelerden çok daha fazlasını ifade eder. Burada; heterotipik etkileşimlere katılan çok sayıda farklı hücre tipinden oluşan kompleks dokulardan bahsedilmektedir. Bu dokularda kanser hücreleriyle birlikte farklı birçok hücre ve doku tipi bulunmaktadır ve böylece kanserlerin başlamasında, ilerlemesinde ve metastaz gelişiminde önemli rol oynayan ve “kanser mikroçevresi” olarak tanımlanan; kanser hücrelerini çevreleyen ve normal hücrelerden oluşan oldukça kompleks doku tipi ortaya çıkmaktadır [25].



Şekil 2.1. Hanahan ve Weinberg tarafından bildirilen hücresel düzeydeki tümörjenik yetenekler ve bu özellikleri hedefleyen antikanser ajan sınıfları (referans [25]’ten uyarlanmıştır)

Tümör büyümesi, ilerlemesi ve metastazı için gerekli olan hücre düzeyindeki yetenekleri tanımlayan iki önemli derleme; 2000 ve 2011 yıllarında Hanahan ve Weinberg tarafından Cell adlı dergide yayınlanarak, kanser alanında çalışan araştırmacılarca sıklıkla alıntılanan dikkat çekici çalışmalar olarak kaydedilmişlerdir. Araştırmacılar, bu çalışmaların ilkinde tümör biyolojisini anlamak adına sağlam bir temel oluşturacağını düşündükleri 6 farklı özellik bildirmişlerdir. Bu özellikler; hücrelerde proliferatif sinyal sürekliği, büyüme-baskılayıcı faktörlerin engellenmesi, hücre ölümüne karşı direnç oluşumu, replikasyon prosesinin sonsuzluğu, anjiyogenezin indüksiyonu ve invazyon ile metastazın aktivasyonu şeklindedir [26]. Takip eden çalışmada ise araştırmacılar, bu özelliklere farklı mekanistik ilerlemeler ekleyerek Şekil 2.1’de gösterilen son şeklini vermişlerdir.

Bildirilen özellikler içerisinde en temel tümöral yetenek, kronik proliferasyonun sürdürülmesidir. Hücre büyümesi, bölünmesi ve progresyonunu sağlayan hücrel

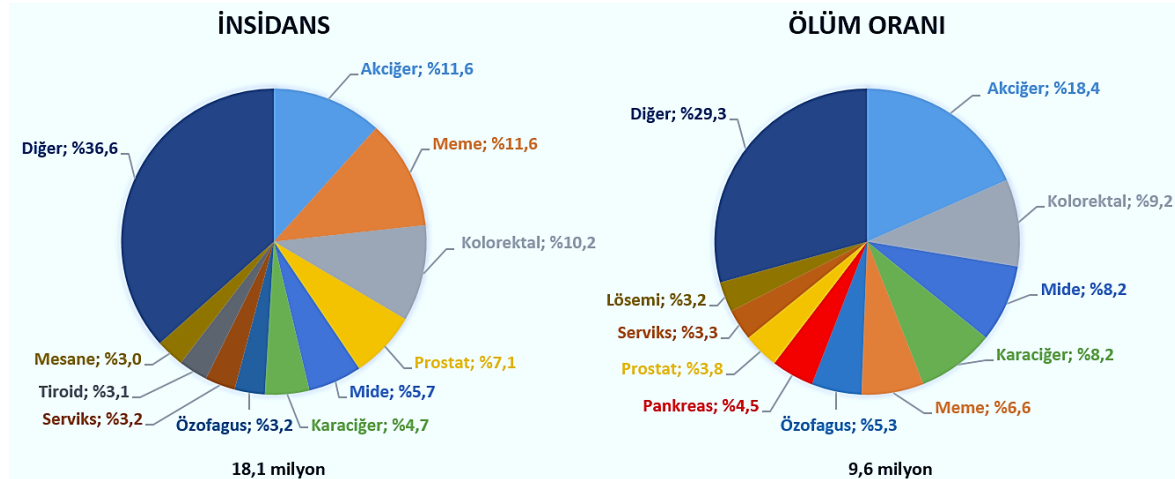
sinyallerin üretimi ve salımı normal hücrelerden farklı olarak kanser hücrelerinde kontrolsüzdür ve büyük ölçüde intrasellüler tirozin kinaz bölgeleri içeren hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanırlar ve akabinde hücre sağkalım ve enerji metabolizması gibi hücresel dinamikleri gerçekleştirirler. Ayrıca kanser hücreleri kendi ürettikleri büyüme faktörü ile ilintili ligantlar ile normal hücreleri uyararak; normal doku mimarisi ve fonksiyonunu koruyan 'hücre sayısının homeostazi'nı bozabilirler [25].

Bahsi geçen özelliklerin her birine müdahale eden farklı ilaç sınıflarını da derleyen araştırmacılar; bu ilaçların bazılarının klinik deneylerde veya bazı durumlarda, kanserin belirli formlarının tedavisinde klinik kullanım için onaylanmış durumda olduğunu bildirmişlerdir. Ancak bu noktada; mutasyon, epigenetik yeniden programlanma veya stromal mikroçevrenin yeniden yapılandırılması ile gerçekleştirilebilecek adaptasyonlar, yenilenen tümör büyümesinin ve klinik nüksün mümkün olabileceğine de dikkat çekmişlerdir [25].

Özetle; belirli bir yeteneği destekleyen paralel sinyal yolu sayısının sınırlı olması gerektiğine göre, bu destek yollarının tümünü terapötik olarak hedeflemek ve böylece adaptif direnç gelişimini engellemek mümkün olabilir ki bu da tek bir ilaç hedefinden ziyade kanser araştırmacılarını son yıllarda sıkça meşgul eden, dual veya çoklu hedeflemeyi gündeme getirmektedir. Önceki yıllarda tanımlanmış biyolojik profillere sahip dual/çoklu hedefli inhibitörlerin tasarlanması güç bir süreç iken, biyoinformatik çalışmalardaki en son gelişmeler ve hedef proteinlerin detaylı yapısal bilgilerinin keşfedilmesi bu süreci daha kolay ve rasyonel bir hale getirmiştir. Bu inhibitörlerin tasarımında, aktif olduğu bilinen küçük moleküllerin ortak farmakofor yapılarının ve aktif bölge ile gerçekleşen etkileşimlerinin; gelişen moleküler modelleme teknikleriyle belirlenebilmesi de kuşkusuz büyük katkı sağlamıştır. Kombinasyon terapileri, biyoyararlanım, metabolizma ve ilaç etkileşimleri düzeyinde bazı karmaşık problemleri barındırmakla birlikte gelecek vadede yaklaşımlardır. Bu kombinasyonlar içerisindeki dual inhibisyon stratejileri; HSP90 & tübülün, ERK (ekstrasellüler reseptör kinaz) & PI3K/Akt, EGFR & HER2 ve topoizomerez & HDAC inhibisyonları ile örneklenebilmektedir [24].

2.2. Karaciğer ve Meme Kanserleri ile Tedavi Yaklaşımlarına Genel Bakış

Günümüzde, kanserle ilişkili 500'den fazla genin ve köken aldığı doku veya organın ismiyle anılan 100'den fazla kanser tipinin mevcut olduğu bilinmektedir [27]. Bunlar içerisinde en sık görülen ve en yüksek ölüm oranına sahip olan kanser tipi akciğer kanseridir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Dünya çapında 2018 yılındaki yeni kanser vakalarının ve ölümlerinin kanser tipleri bazındaki yüzdeleri (GLOBOCAN 2018) [18]

Bu tez kapsamında; tüm dünyada obezite ve diyabet gibi risk faktörlerinin artışı ile birlikte görülme sıklığı gittikçe artan ve ölümcül sonuçları olan karaciğer kanseri ile özellikle kadınlardaki kanser sebepli ölümlerin en başında yer alan meme kanseri ele alınmaktadır.

Karaciğerin malign hastalıklarının en yaygını olan primer karaciğer kanseri (hepatosellüler karsinoma, HSK), dünyada en sık görülen altıncı ve en ölümcül dördüncü kanser tipidir (Şekil 2.2) [18]. Hastalığın bilinen en yaygın risk faktörleri; viral enfeksiyonlar (Hepatit B veya C), aflatoksin maruziyeti, aşırı alkol tüketimi ya da obezite orijinli alkolik yağlı karaciğer sendromundan kaynaklı sirozlardır [28, 29].

ABD'de kansere bağlı ölümler içerisinde hızla yükselmekte olan HSK; erken veya orta evrelerde teşhis edildiğinde cerrahi ve/veya sistemik tedavilere başvurulma olanağı vermekle birlikte geç evrede ancak palyatif tedaviler tercih edilebilmektedir.

Öte yandan hastalık bilinen sistemik tedavilere dirençlidir ve hastalığın metastaz riski de oldukça yüksektir [30].

FDA tarafından sırasıyla 2007, 2017 ve 2018 yıllarında hepatoselüler karsinoma tedavisindeki kullanımları onaylanmış olan ve oral multikinaz inhibitörleri (MKIs) olarak bilinen Sorafenib, Regorafenib ve Lenvatinib adlı ilaçlar bugün klinikte kullanılan kemoterapötikleri oluşturmaktadır [30]. Bu bileşiklerin ilk örneği olan Sorafenib, serin/treonin kinaz RAF'ın güçlü inhibisyonu yoluyla hücre proliferasyonunu inhibe etmekte olup ayrıca pro-anjiyojenik VEGF'yi ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörünü de inhibe ettiği gösterilmiştir [31].

Bu ajanlar hayatta kalım süresini mütevazı bir oranda arttırmış olmakla birlikte yeni keşiflerin yolunu açmışlardır. Son on yılda Faz-2 ve Faz-3 aşamalarına gelmiş diğer bazı kinaz inhibitörleri (örn; Cabozantinib), anjiyogenik yolları hedef alan inhibitörler (örn; Sunitinib, Erlotinib) ve immün sistem üzerinden etki gösteren bazı bileşikler (örn; Pembrolizumab, Durvalumab) keşfedilmiş olmasına rağmen araştırmacılar, hayatta kalma süresini uzatma konusunda istedikleri başarıyı elde edememişlerdir [30].

Kuşkusuz istenilen başarının sağlanamamasının birçok sebebi olabilir, fakat HSK'nin morfolojik, immünohistokimyasal ve genetik birçok düzeyde heterojenik bir tümör olması majör bir etken olarak kabul edilmektedir [32].

Bu noktada HSK'nin ortaya çıkışının ve ilerlemesinin biyolojisini anlama gereği doğmuştur. HSK'de meydana gelen genetik değişimler, proto-onkogenlerin aktivasyonu, gen delesyonu veya mutasyonu, telomeraz aktivitesinin artması ve epigenetik değişimleri kapsamaktadır [33]. Fakat tüm bu onkogen teorilerinin hiçbiri HSK'nin gelişimini ve yayılma mekanizmasını yeteri kadar açıklayamamıştır. Bu nedenle de klasik kemoteraplere dirençli HSK için hedefe yönelik ilaç geliştirilmesi, üzerinde çalışılması gereken bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır.

Dünyada en sık görülen kanser tiplerinden bir diğeri ise akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer alan ve en ölümcül beşinci kanser tipi olan meme kanseridir (Bkz. Şekil 2.2). Ayrıca meme kanseri, kadınlarda en sık görülen ve en yüksek ölüm

oranına sahip olan kanser tipidir. Kadınlardaki 4 kanser vakasından 1 tanesi meme kanseri teşhisi ile karşımıza çıkmaktadır [18].

Son yıllarda erken teşhis ile ilgili artan bilinçlenme ve tanı yöntemlerindeki gelişmeler sayesinde; meme kanseri görülme sıklığındaki yükselmeye rağmen hastalığa özgü mortalite gelişmiş ülkelerin çoğunda azalmaktadır. Erken teşhis sonrası uygulanan sistemik tedavilerdeki ilerlemenin de bu olumlu gelişmedeki payı yüksektir [34]. Tıpkı HSK'ye yönelik ilaç geliştirme çalışmalarında olduğu gibi, meme kanserinin moleküler biyolojik temelinin bilinmesi ve tümör biyolojisinin daha iyi anlaşılması, yeni ilaç keşifleri için araştırmacılara olası hedefler sunmaktadır [35].

Meme kanseri, genellikle farklı fenotipik ve morfolojik profilleri kapsayan, heterojenik bir kanser türü olarak kabul edilir ve bu nedenle çok farklı klinik davranışlara sahiptir. Genel olarak meme kanserleri, immünohistokimyasal özelliklerine göre 3 temel tipte tanımlanmaktadır. Bunlar; HR (hormon reseptör) pozitif, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 pozitif (HER-2) ve üçlü negatif meme kanserleridir [36].

HR-pozitif kanserler östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) pozitif olanlardır. Tüm meme kanserlerinin yaklaşık %85'i HR-pozitiftir. Bu tip meme kanserlerinin tedavisinde hormon terapileri tercih edilir. Östrojen reseptörlerini bloke eden Tamoksifen veya östrojenin üretimi durduran aromataz inhibitörleri (Letrozol, Anastrozol vb.) sıklıkla kullanılmaktadır [36].

Meme kanserlerinin yaklaşık %20'si ise HER-2 pozitiftir. Bu tip meme kanserleri; Trastuzumab, Pertuzumab gibi anti-HER-2 (anti-HER-3 aktiviteleri sayesinde dual etki) ilaçlar veya bazı kinaz inhibitörleri (Lapatinib, Neratinib vb.) kullanılarak tedavi edilebilirler [36].

Meme kanseri vakalarının %15'lik kısmını oluşturan üçlü-negatif meme kanserleri (Triple-Negative Breast Cancer; TNBC) ise; ER, PR veya HER-2 reseptörü için ilgili genleri eksprese etmeyen tümör tipi ile karakterizedirler. Meme kanseri türlerinin çoğundan daha hızlı büyür ve yayılırlar. Ayrıca yüksek düzeyde kromozomal instabiliteye ve klinik olarak agresif bir fenotipe sahiptirler. Bu tip kanser hücrelerinde hormon reseptörleri bulunmadığından, hormon tedavisi veya anti-HER-2 ilaçlar

tedavide kullanılmaz. Günümüzde, TNBC için standart tedavi sitotoksik kemoterapidir [37].

Paklitaksel, Doksorubisin, Kapesitabin, Siklofosamid ve Vinflunin gibi klasik sitotoksik kemoterapötik ajanlar DNA sentezini inhibe ederek kanser hücrelerini tahrip ederler; fakat aynı zamanda normal ve sağlıklı hücrelere de zarar verirler. Bu noktada sadece kanserli hücreleri hedefleyen ilaç tasarımı için yapılan çalışmalar başarılı sonuçlar ortaya koymakla birlikte metastatik vakalarda hedefleme mekanizması iyiden iyiye karmaşık hale gelmektedir. Bu da tedaviyi, yalnız sağ kalım süresini arttırmaya yönelik bir çaba haline getirmektedir. Ayrıca metastatik kanserlerde kullanılan ajanlara karşı hızla gelişen bir direnç de söz konusudur [38, 39].

Tümör baskılayıcı genler olarak bilinen BRCA'larda (BRCA1 ve BRCA2) gerçekleşen mutasyonlar da meme kanserinin biyolojik alt yapısının oluşmasında önemli bir role sahiptir. BRCA genleri, sağlıklı hücrelerde DNA'nın onarılmasına yardımcı olur, ancak bu genlerdeki mutasyonlar onarım sistemin bozulmasına sebep olmaktadır [40]. BRCA genleri mutasyona uğradığında, kanser hücreleri alternatif DNA onarımı yöntemlerine yönelirler. Bu alternatif DNA tamir mekanizmalarını hedefleyerek ve inhibe ederek, hücre ölümüne yol açan ikinci bir DNA tamir bozukluğu oluşturmak, hücre döngüsünün durması ve devamında apoptoz (programlanmış hücre ölümü) ile sonuçlanır [41].

Bu alternatif hedeflerden biri; farklı enzimler içeren poli (adenozin difosfat [ADP]-riboz) polimeraz (PARP) protein ailesidir. PARP, DNA transkripsiyon ve onarımından genomik stabiliteye, hücre döngüsünün düzenlemesine, hücre sinyalleşmesine ve programlanmış hücre ölümüne kadar çok sayıda hücre fonksiyonunda rol oynar [42, 43].

BRCA gen mutasyonlarına sahip olan tümör hücrelerinin PARP-1 inhibisyonuna çok duyarlı olduğu bilinmektedir ve bu da PARP inhibitörlerinin meme kanseri tedavisinde kullanımını rasyonel kılmaktadır [44]. Mutasyona uğramış BRCA genine sahip tümör hücreleri zaten hasarlı DNA'yı tamir etmekte zorlandıklarından, PARP proteinlerini bloke etmek genellikle bu hücrelerin ölümüne yol açar. Önceden

kemoterapi almış BRCA mutasyonu olan kadınlarda metastatik ve HER-2 negatif meme kanserini tedavi etmekte kullanımı için 2018 yılında FDA'dan onay alan Olaparib ve Talazoparib, bu grubun en popüler ilaçlarıdır [45, 46].

Meme kanseri tedavisinde son on yılda, özellikle ER pozitif veya HER-2 pozitif metastatik meme kanserinde hedefe yönelik tedaviler için kayda değer ilerleme sağlanmıştır. Bununla birlikte hastalar hala direnç gelişimi, nüks ve metastazdan muzdariptir. TNBC ise oldukça heterojen fenotipinden dolayı henüz hedeflenememiştir [47].

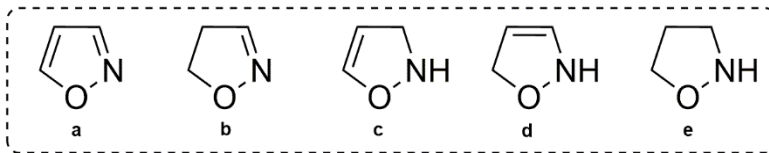
Görüldüğü üzere; tıpkı HSK'ye karşı mücadelede olduğu gibi meme kanserine karşı da farmakolojik aktif yeni moleküllerin geliştirilmesi, hastalarda yaşam süresini arttırmak ve nihayetinde de kesin bir tedaviyi sağlayabilmek adına bu alanda yapılan çalışmaları desteklemek açısından büyük bir önem arz etmektedir.

2.3. İlaç Geliştirme Çalışmalarında İzoksazol Halkasının Önemi

Aromatik ve aromatik olmayan heterosiklik halkalar; biyolojik hedefler ile, daha basit organik motifler kullanılarak mümkün olmayan etkileşimleri sağlayarak, kimya ve yaşam bilimleri arasında bir köprü görevi görmekte ve yeni ilaçların tasarımında medisinal kimyacıların tercih sebebi olmaktadır. Son yıllarda özellikle heteroaromatik beş üyeli halka sistemleri içeren birçok farmakolojik aktif molekül geliştirilmiştir. İndol, triazol, pirol, pirazol, imidazol, oksazol, izoksazol vb. şeklinde örnekleyebileceğimiz bu beş üyeli yapılar; insanlığın yararına sunulmuş olan popüler ilaç moleküllerinin yapısında da sıklıkla karşımıza çıkmaktadır [48, 49].

Araştırılan geniş bir grup heterosiklik arasında farmakolojik olarak önemli birçok molekülün yapısında bulunan izoksazol halkası, medisinal kimya alanında önemli bir rol oynamaktadır [50, 51]. Biyolojik hedefler ile etkileşimde stratejik faydaları olduğu bildirilen [52] azot ve oksijen elementlerini, birbirine bitişik konumlarda içeren izoksazol halkası; dünyadaki birçok araştırmacının çalışmalarında olduğu gibi araştırma ekibimizin moleküler tasarımlarında da yer etmiş ve bu tez çalışmasında geliştirilen moleküllerin de çekirdek yapısını oluşturmuştur.

Bu beş üyeli tamamen doymamış heterosiklikler için “izoksazol” (a) teriminin kullanımı ilk kez Hantzsch tarafından önerilmiştir. İlk keşfedilen izomerin “oksazol” olması sebebiyle bu isim tercih edilmiş, daha sonra IUPAC tarafından da 1,2-oksazol’e muadil olarak kullanıma sunulmuştur. Kısmen doymuş analogları izoksazolin (b-d) ve tamamen doymuş analog ise izoksazolidin (e) olarak adlandırılmıştır (Şekil 2.3) [50].



Şekil 2.3. İzoksazol, izoksazolin ve izoksazolidin yapıları

İzoksazol halkası ve ilgili analogları, modern ilaç keşiflerinde önemli bir farmakofordur [53]. İzoksazolün, moleküler tasarım içerisine dâhil edilmesi; biyolojik etkinliğin artmasına, toksisitenin azalmasına ve farmakokinetik profilin gelişimine katkıda bulunabilmektedir [54].

İzoksazol ana iskeleti ve sübstitüe edilmiş analogları;

- ❖ ibotenik asit gibi bazı doğal bileşiklerin yapılarında bulunmaları,
- ❖ bazı COX-2 inhibitörü ilaç molekülleri ile β -laktamaz dirençli antibiyotikler olan Kloksasilin, Dikloksasilin, Flukloksasilin gibi bilinen birçok ilaç molekülünde bulunmaları,
- ❖ nispeten kolay sentezleri,
- ❖ diğer bazı heteroaromatik halkalara göre daha kolay sübstitüe edilebilmeleri sayesinde kolay türevlendirilebilmeleri,
- ❖ başka heterosikliklerin sentezinde faydalı olabilecek maskelenmiş dikarbonil bileşikleri taşımaları,
- ❖ en önemlisi de biyolojik aktivite düzeyindeki çok yönlülükleri

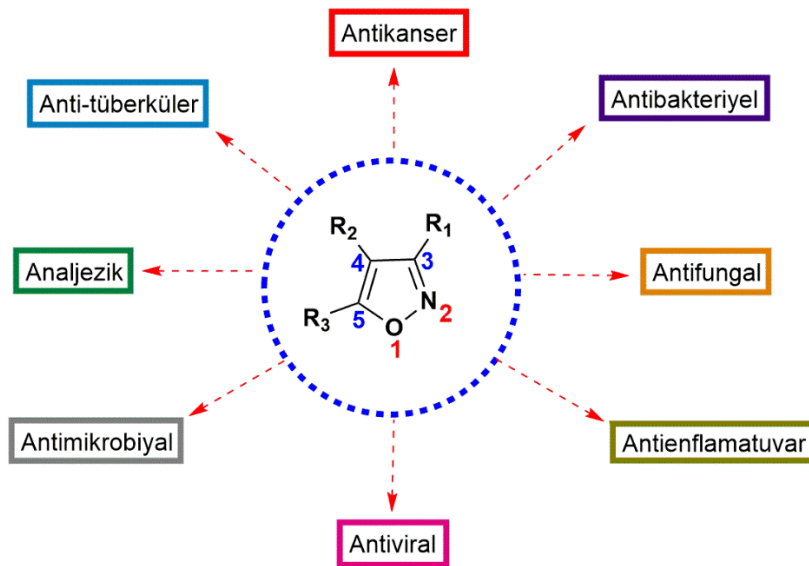
gibi sebeplerle ilaç adayı bileşiklerin tasarımında önemli bir yer edinerek; sayısız bildiri, bilimsel makale, patent ve kitap bölümüne konu olmuşlardır [52, 55-59].

Farklı halka sistemlerine kıyasla beş üyeli izoksazol halkasının farmakodinamik süreçleri etkileyen birçok avantajı da bulunmaktadır. Bunlar;

- ❖ altı üyeli halkalarda güçlkle gözlenebilen bazı etkileşimlerin, beş üyeli halka sisteminin belirli açıları sayesinde aynı hedefle ciddi etkileşimler kurabilmesi,
 - ❖ hetero atomlarının yan yana olması sayesinde hidrofilik etkileşimler geliştirebilmesi veya iyonlarla koordine bağlar yapılabilmesi,
 - ❖ altı üyeli halkalara kıyasla yapısal ve fizikokimyasal özelliklerinin modifikasyonunda onlara üstünlük sağlayan, daha küçük molekül ağırlığına sahip olması,
 - ❖ nispeten küçük boyutlarda olmaları nedeniyle daha az sterik engel oluşması ve böylece belirli hedeflerin küçük bağlanma bölgelerinin hedeflenebilmesi
- şeklinde özetlenebilmektedir [59].

İzoksazol iskeletine sahip literatürdeki moleküller incelendiğinde çeşitli biyoaktif fonksiyonel grupların eklenmesiyle belirli hedefler için; hem etkili hem de seçici moleküller oluşturmanın yanı sıra çoğu durumda, elektronegatif sübstitüent varlığının daha yüksek etki potansiyelleriyle sonuçlandığı gösterilmiştir [60].

Araştırılan bu etki potansiyelleri arasında; di- ve tri-sübstitüe izoksazollerin veya başka bir halka sistemi ile kaynaşmış izoksazol analoglarının; antimikrobiyal, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antitüberküler, antienflamatuvar ve analjezik, antidiyabetik, antiparaziter, antiobezitik, antinöropatik, anti-alzheimer, antioksidatif ve antikanser aktiviteler yer almaktadır [61].



Şekil 2.4. İzoksazol türevi bileşiklerin farklı biyolojik aktiviteleri (referans [59]'dan uyarlanmıştır)

Bundan sonraki bölümde; bu tez çalışması özelinde izoksazol türevi bileşiklerin antikanser ilaç geliştirme çabalarındaki yeri ve önemi, literatürdeki izoksazol halkası taşıyan farmakolojik aktif moleküllerle örneklendirilerek ayrıntılarıyla ele alınmıştır.

2.4. Antikanser İlaç Geliştirme Çabalarında İzoksazol Türevi Bileşiklerin Yeri

Yeni ve etkili bir ilaç molekülünün geliştirilmesi için çalışan medisinai kimyacılar ile kanserin biyolojik ve genetik alt yapısını araştıran moleküler biyologların yakın bir ilişki içerisinde yürüttüğü antikanser ilaç geliştirme çabaları; tüm dünyada popülerliği gittikçe artan, uzun soluklu, çok disiplinli bir çalışma alanıdır. Özellikle son 15-20 yıllık süreçte küçük molekül yapısında antikanser ilaçların geliştirilmesinde önemli bir yol kat edilmiştir. Kişiye özgü olmayan sitotoksik kemoterapiyi vurgulayan bir yaklaşımdan, kanser hücrelerinin belirli genetik bağımlılıklarını ve zayıflıklarını kullanan moleküler hedefli ilaçların geliştirilmesine odaklanan kişiselleştirilmiş bir ilaç stratejisine (personalized medicine) geçilmeye çalışılması bu alanda yeni bir çağ başlatmış ve yıllar içerisinde pek çok molekülün keşfi art arda gerçekleşmiştir. Bununla birlikte özellikle geç evre ve/veya metastatik kanserlerdeki yüksek başarısızlık oranları ve hastalarda gelişen ilaç direnci gibi olumsuzluklar, dünyada antikanser ilaç aday molekülü geliştirmeye çalışan bilim insanlarını daha uzun yıllar meşgul etmeye devam edecek gibi gözükmektedir [62].

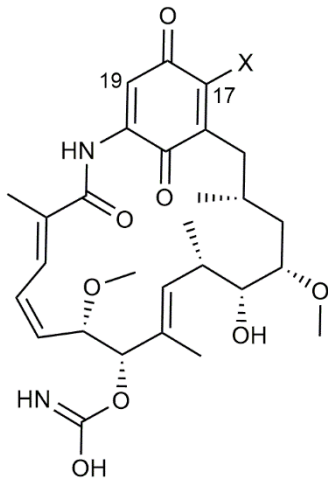
Antikanser etki göstermesi hedeflenen küçük molekül yapısında ilaç adaylarının tasarımında; heterosiklik halkalar sıklıkla yer alır ve 3,4/3,5/4,5-disübstitüe; 3,4,5-trisübstitüe veya başka bir halkayla kaynaşmış halde bulunan izoksazol analogları da bu grup içerisinde kendilerine güçlü bir yer edinmiş durumdadır. Literatürde bu düşünceyi destekleyecek çok sayıda örnek mevcuttur.

Aşağıda bu literatürler güncel örnekleriyle derlenmiş; bilhassa izoksazol çekirdeğine ve bu tez çalışması özelinde de 3,5-disübstitüe izoksazol analogu antikanser etkili ilaç adaylarının keşif süreçlerine dikkat çekmeye çalışılmıştır.

Modern onkolojinin nihai amacı, tümör gelişimine ve ilerlemesine katılan moleküler hedefleri tanımlamak ve bunlara karşı savaşmaktır. Bu hedefler arasında en umut verici terapötik yollardan biri, hücre içerisindeki görevleri oldukça karmaşık olan moleküler şaperon ısı şoku proteini 90'ın (HSP90) inhibisyonudur. Isı şoku proteini 90 (HSP90), kanser hücrelerinin büyümesini ve/veya hayatta kalmasını destekleyen çok sayıda mutasyona uğramış ve aşırı eksprese edici sinyal proteinlerinin stabilitesi ve fonksiyonu için gerekli olan moleküler bir proteindir. HSP90'ın etkileşimde olduğu

sinyal proteinleri arasında mutasyona uğramış p53, BCR-ABL, RAF-1, AKT, ALK ve HIF-1 α (Hipoksi ile indüklenen faktör-1-alfa) bulunmaktadır. HSP90 inhibitörleri, özellikle tek bir moleküler hedefle etkileşime girerek, bu sinyal proteinlerinin kararsız hale gelmesine neden olarak umut verici anti tümöral aktiviteler göstermişlerdir [63].

Esasında HSP90; Geldanamisin, 7-Allilaminogeldanamisin (7-AAG), 17-Dimetilaminogeldanamisin (17-DMAG) gibi doğal inhibitörlerinin (Şekil 2.9) keşfedilmesi ve karakterize edilmesine kadar; bir ilaç hedefi olarak görülmemiştir.



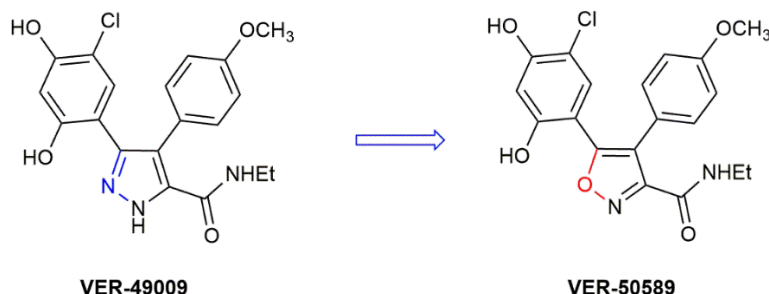
X = OMe; geldanamisin
X = NHCH₂CH=CH₂; 17-AAG
X = NHCH₂CH₂NMe₂; 17-DMAG

Şekil 2.5. HSP90'nın doğal inhibitörleri

Geldanamisin gibi HSP90'nın doğal inhibitörlerinin keşfi ve karakterizasyonu, antikanser ilaçlar için terapötik bir hedef olarak HSP90 üzerine ilgi çekmiştir. Geldanamisin'in, proteinin N-terminal bölgesindeki bir ATP bağlama cebine bağlanarak HSP90 fonksiyonlarını inhibe ettiği gösterilmiştir [10]. Protein ve inhibitörleri arasındaki üç boyutlu bağlanma etkileşimlerinin açıklanabilmesi, ileriki çalışmalarda da ilaç adayı moleküllerin tasarımında oldukça faydalı olmuştur.

HSP90'nın antikanser ilaç hedefi olarak çalışılmaya başlanmasının ardından doğal HSP90 inhibitörlerini inceleyen araştırmacılar, önce bazı pürin analogları ve ardından da pirazol analogları tasarlayıp sentezlemişlerdir. Nihayetinde pirazol

analogları ve devamında geliştirilen izoksazol analogları bu alanda yapılan çalışmalar içerisinde dikkat çekici sonuçlar ortaya çıkartmıştır.

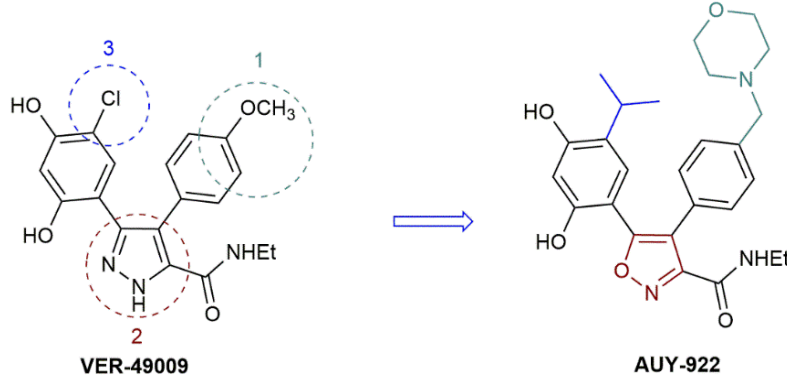


Şekil 2.6. HSP90 inhibitörleri; VER-49009 ve VER-50589

Bu çabalar, doğal inhibitörlerine göre HSP90'nın ATP-bağlanma bölgesine daha güçlü bağlanabilen ve kolon kanseri hücre hattı HCT116'ya karşı oldukça iyi bir aktivite ($GI_{50} = 360$ nM) gösteren pirazol türevi bir bileşiğin (VER-49009) keşfi ile sonuçlanmıştır [64]. Dymock ve arkadaşlarının 2005 yılında bir seri aktif pirazol türevini geliştirerek VER-49009'u keşfetmelerinin ardından, 2007 yılında Sharp ve arkadaşları VER-50589'u geliştirdiler. Moleküller arasındaki tek fark pirazol halkası yerine gelen izoksazol halkasıdır (Şekil 2.6). Bu bileşik, HSP90'nın bağlanma bölgesinde pirazol analoguna benzer bir bağlanma modu göstermesine rağmen daha iyi bir bağlanma entalpisine sahiptir (VER-49009 için, $K_d: 78,0 \pm 10,4$ nmol/L; VER-50589 için, $K_d: 4,5 \pm 2,2$ nmol/L). Ayrıca izoksazol türevinin hücre içerisine alınımının dört kat daha yüksek olmasına ek olarak, insandaki çeşitli kanser tiplerinin hücre hatları için ortalama hücresel antiproliferatif etkisi de pirazol analogundan dokuz kat kadar daha yüksek olarak bulunmuştur (VER-49009 için, $GI_{50}: 78 \pm 15$ nmol/L; VER-50589 için, $GI_{50}: 685 \pm 119$ nmol/L) [13].

Aynı araştırma grubundan Brough ve arkadaşlarının 2008 yılında yine Vernalis firması çatısı altında AUY922 (NVP-AUY922, Luminespib) kodlu izoksazol analogunu tasarlamaları ise oldukça umut verici bir keşif olmuştur. Bu çalışmada; daha önce bildirilen diarilpirazol bileşiklerine kıyasla kanser hücresi proliferasyonunu inhibe etme yeteneklerinde 20 kattan daha fazla bir artışa sahip olan, diarilizoksazol bileşikler sentezlenmiştir. Bu amaçla; daha önceki çalışmalar ve ortaya çıkan yapı-aktivite ilişkileri dâhilinde molekül üzerinde odaklandıkları üç önemli nokta olmuştur. Bunlar; 4-arilpirazol sübstitüentlerine çözünürlüğü arttıracak

bir grubun dâhil edilmesi, merkezi pirazol halkasının modifikasyonu ve rezorsinol halkası üzerinde 5' konumundaki sübstitüentin optimizasyonu şeklindedir.



Şekil 2.7. AUY922'nin tasarım stratejileri

Pirazol halkasının 4. konumundaki benzen halkasının para sübstitüsyonlarının, meta sübstitüentlere oranla daha yüksek aktivite sergilediği ve çözünürlüğe yüksek katkı sağladığı keşfedilmiş; para konumdaki morfolin halkası olumlu sonuçlar vermiştir. Pirazol halkasının izoksazol halkası ile değişimi, izoksazol-HSP90 kompleksinin yüksek stabilitesi nedeniyle aktiviteyi artırırken, rezorsinol halkasının 5' konumundaki izopropil sübstitüsyonu da aktivitede olumlu gelişmelere sebep olmuştur. Çalışma; HSP-90'a lider bileşikten daha yüksek bağlanma afinitesine sahip ve kolon kanseri başta olmak üzere diğer bazı kanser hücre hatlarında daha yüksek aktivite gösteren AUY922 bileşiğinin keşfi ile sonuçlanmıştır [10].

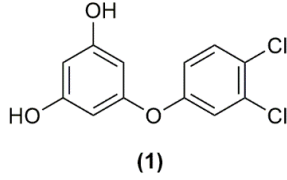
Çizelge 2.1. AUY922 ve lider bileşiğe ait karşılaştırmalı aktivite değerleri

	HSP90-β FP*	HCT116
	IC ₅₀ (μM)	GI ₅₀ (μM)
VER-49009	0,025	0,36
VER-50589	-	0,115
NVP-AUY922	0,021	0,016

*Floresan polarizasyon (FP), çeşitli moleküler etkileşimlerin ve enzim aktivitelerinin hızlı ve kantitatif analizine izin veren bir yöntemdir.

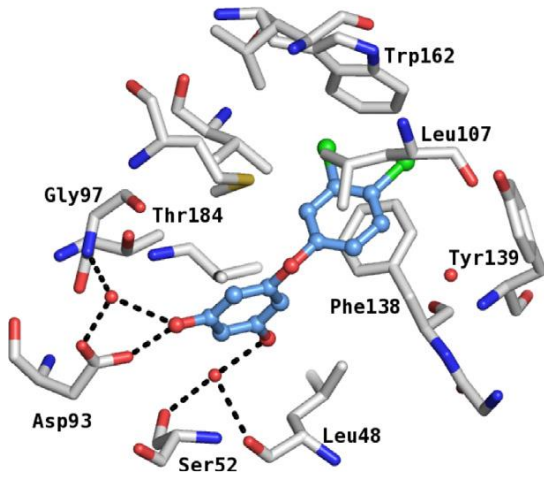
İnsan kolon kanseri ksenograft modellerinde, tümör büyümesini %50 oranında inhibe ettiği gösterilen AUY922, birçok farklı tümör tipine karşı prelinik testlerde ümit verici aktivite göstermiştir [65] ve yıllar içerisinde 28 farklı klinik denemeden geçmiştir; Faz-2 aşamasındaki çalışmalardan bazıları ise hâlâ devam etmektedir

[66]. Ayrıca AUY922 ile çeşitli kanser türlerine karşı farklı klinik ve mekanistik çalışmalar da yürütülmüştür [67-69].

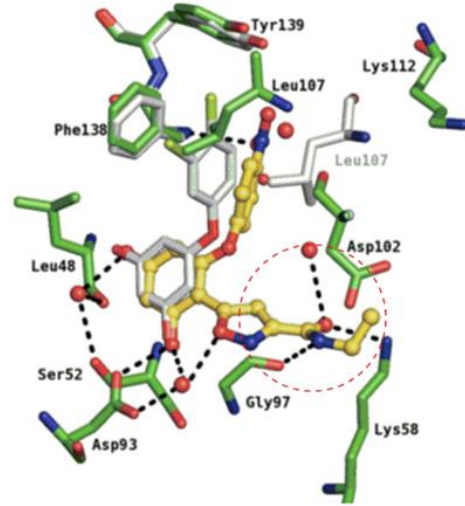


Şekil 2.8. Bileşik 1'in kimyasal yapısı

2013 yılında Brasca ve arkadaşları [70] fragman temelli ilaç keşfi (FBDD: Fragment-Based Drug Discovery) metoduyla yola çıkarak, bazı HSP90 inhibitörü olabilecek bileşikler tasarlayıp sentezlemişler ve biyolojik aktivitelerini incelemişlerdir. Yaptıkları kütüphane taramalarında, insan HSP90 α 'nın N-terminal bölgesine yüksek bağlanma afinitesi gösteren ve rezorsinol yapısı taşıyan Bileşik 1'i başlangıç noktası olarak seçmişlerdir.



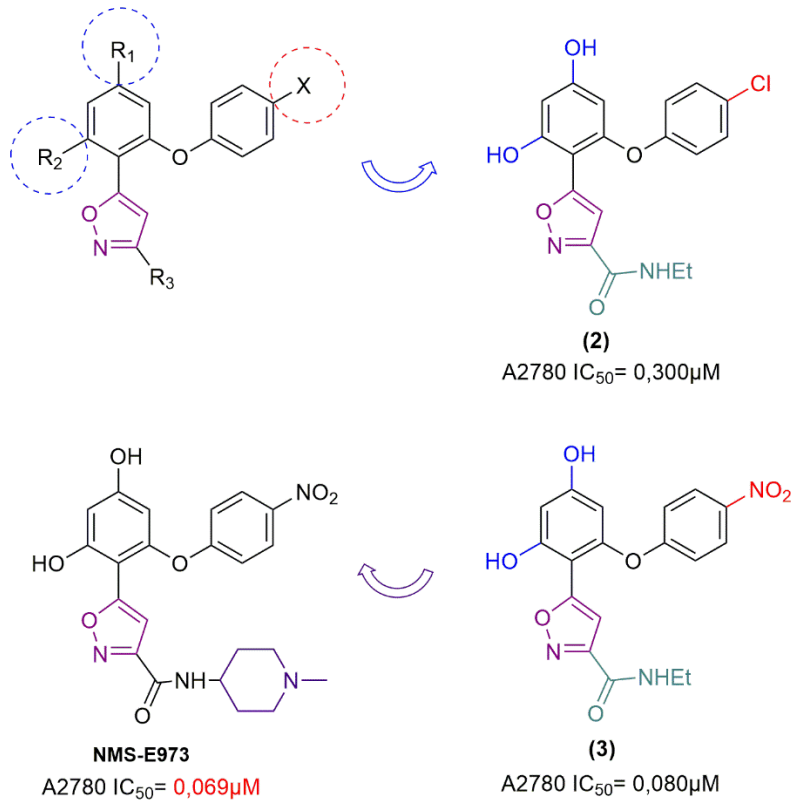
Şekil 2.9. Bileşik 1'in HSP90'nın aktif bölgesiyle yaptığı etkileşimler



Şekil 2.10. Bileşik 3'ün HSP90'nın aktif bölgesiyle yaptığı etkileşimler

Şekil 2.9'da protein yapısı gri renklendirilirken; Bileşik 1 mavi karbon atomlarıyla, su molekülleri kırmızı küreler ve hidrojen bağları da kesikli çizgilerle gösterilmiştir. Bileşiğin fenolik hidroksillerinden biri Asp93 ile diğeri ise Ser52 ve Leu48 ile su molekülleri vasıtasıyla anahtar etkileşimler kurarken; diklorofenil grubu Leu107 ve Phe138 ile yan zincir üzerinden hidrofobik etkileşimler yapmaktadırlar. Başlangıç

bileşiğinde gözlemlenen etkileşimlere ek olarak; VER-4900920 ve NVP-AUY922 gibi bilinen HSP90 inhibitörlerinin de kristal yapıları incelenmiş ve rezorsinol halkasının 4. konumuna yoğunlaşarak, bu konuma getirilecek izoksazol-3-karboksamit gibi bir yapı sayesinde protein ile yakalanacak bir etkileşimin olumlu sonuçlar vereceği tahmin edilmiştir.



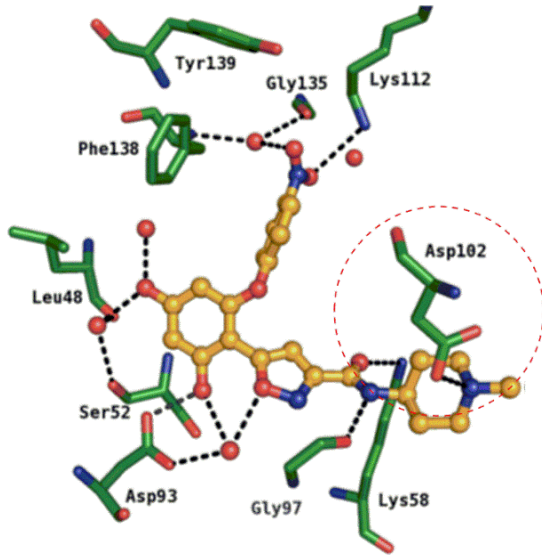
Şekil 2.11. NMS-E973 kodlu bileşiğin keşif basamakları

Nitekim beklendiği gibi de olmuş; 4. konumda izoksazol-3-karboksamit yapısı taşıyan bileşikler (Bileşik 2 ve 3), karboksamit fonksiyonları sayesinde proteinin bağlanma bölgesinde amino asit iskeletiyle (Gly97, Lys58) hidrojen bağları kurarak bağlanmayı güçlendirmişlerdir (Bkz. Şekil 2.10; Bileşik 3 sarı, Bileşik 1 gri, protein yapısı yeşil renkle gösterilmiştir).

Rezorsinol halkasının fenolik OH gruplarının ve 4. konumdaki izoksazol-3-karboksamit yapısının aktivite için şart olduğu; bu yapıların yokluğunda meydana gelen aktivite kayıplarıyla ispatlanmıştır (A2780 IC₅₀ > 10 µM). Cl süstitüenti yerine getirilen NO₂ grubu ise aktivitede dört katlık bir artışa olanak vermiştir. NO₂

grubunun proteinin aktif bölgesinde oluşturduğu ekstra etkileşimlerin gözlemlenmesiyle de bu sonuç desteklenmiştir.

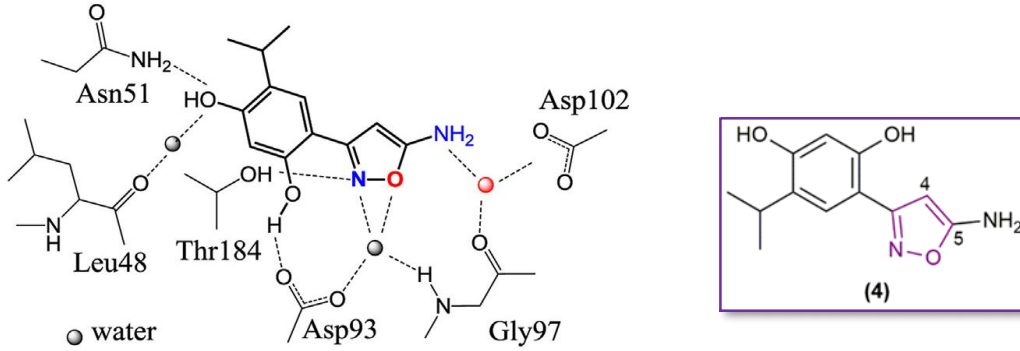
Özetle; R₁, R₂ ve X konumlarında hangi grupların yer alması gerektiğine Bileşik 2 ve 3'ün aktivite sonuçları (Bkz. Şekil 2.11) ile karar verilmesinin ardından R₃ konumunda karboksamit yapısındaki etil grubu yerine daha hacimli grupların, aktivitede oluşturacağı değişimler incelenmek üzere; bir seri bileşiğin sentezi gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin aktiviteleri, yine insan yumurtalık kanseri A2780 hücre hattında değerlendirilmiştir.



Şekil 2.12. NMS-E973'ün aktif bölge etkileşimleri

Sentezlenen bileşikler içerisinde NMS-E973 kodlu 3,5-disüstitüe izoksazol yapısındaki bileşik oldukça umut vericidir. Zira bileşik; nM düzeyde HSP90 afinitesi ($DC_{50} = 10$ nM), insan yumurtalık kanseri A2780 hücre hattındaki yüksek aktivitesi ($IC_{50} = 69$ nM) ve meme kanseri BT-474 hücre hattındaki yüksek Her-2 degradasyonunun ($IC_{50} = 10$ nM) yanı sıra iyi bir farmokokinetik profile de sahiptir. Bileşiğin R₃ konumundaki bazik piperidin azotu, Asp102'nin karboksilik kalıntısı ile ilave bir tuz etkileşimi yapmış ve böylece proteine olan afinite de artmıştır (Şekil 2.12). Ayrıca in vivo ve in vitro çalışmalarla bileşiğin HSP90, AKT, MAPK bağlantılı mekanistik etkinliği de aynı araştırma grubu tarafından ispatlanmıştır.

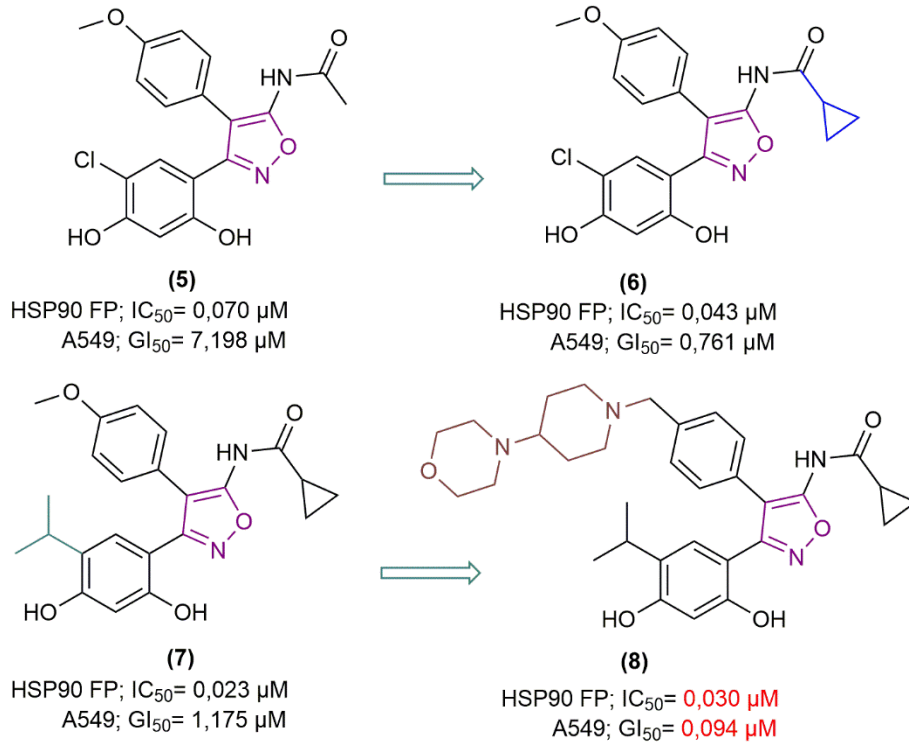
HSP90 inhibitörü olabilecek yeni izoksazol türevi bileşiklerle ilgili çalışmaların; 3,4-diarilizoksazol ana iskeleti taşıyan örnekleri de mevcuttur. Bu çalışmalardan biri Chen ve arkadaşları tarafından 2014 yılında yayınlanmış ve tasarlanan bileşikler adenokarsinomik insan alveoler epitel hücreleri olan A549 hücre hattında test edilmiştir [71].



Şekil 2.13. Bileşik 4 ve aktif bölge ile yaptığı etkileşimler

NVP-AUY922 ile benzer bağlanma özellikleri gösteren ve bileşik kütüphanelerinde yapılan taramalar sonucu elde edilen Bileşik 4, çalışmanın başlangıç noktasını oluşturmuştur. Bu bileşiklerin modelleme çalışmalarında, izoksazol halkasının azot ve oksijen atomları ile 5. konumundaki amin grubu üzerinden yaptığı hidrojen bağı etkileşimleri ve rezorsinol halkası üzerindeki OH gruplarının kurduğu temel etkileşimlerin varlığı ve önemi araştırmacıları izoksazol halkasının 5. konum üzerindeki amin kalıntısında ve 4. konumunda birtakım türevlendirmeler yapmaya sevk etmiştir.

Bilinen bir inhibitör olan NVP-AUY922'nin yapı-etki ilişkilerine dair çalışmalardan hareketle, başlangıç olarak 4. konum için 4-metoksifenil yapısı tercih edilmiş (Bileşik 5) ve burada yüksek bir bağlanma afinitesi yakalanarak çalışmaya bu molekül üzerinden devam edilmiştir.



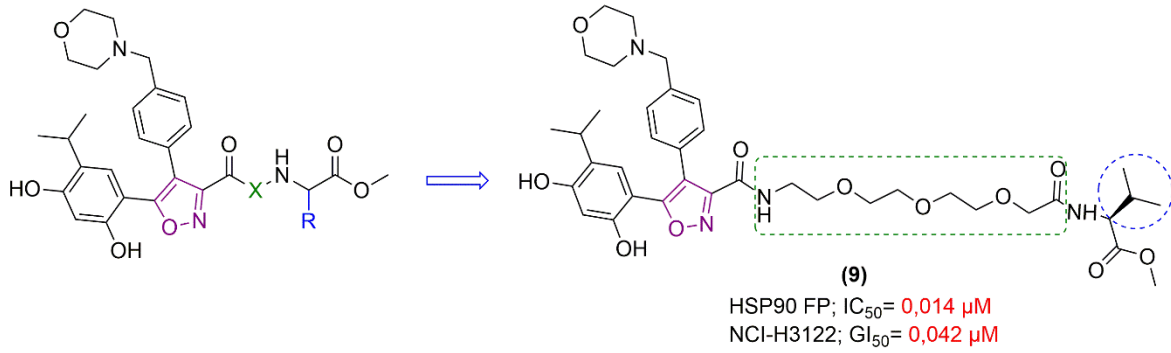
Şekil 2.14. Bileşik 8'in geliştirilme aşamaları

Tasarlanan ve sentezlenen bileşiklerin aktivite değerleri daha önce klinik çalışmalara geçmiş olan NVP-AUY922 bileşiği ile karşılaştırmalı olarak test edilmiştir. İzoksazol halkasının 5. konumundaki amin yapısı üzerinde yapılan türevlendirmelerde en yüksek aktivite siklopropan karbonil motifi (Bileşik 6) ile yakalanmıştır. Başlangıçta sentetik kaygılardan dolayı rezorsinol halkasının 5' konumunda tercih edilen klor sübstitüenti yerine getirilen izopropil grubu (Bileşik 7) ise aktivitede artış getirmemekle birlikte proteine bağlanma afinitesinde yükselmeye katkı sağlamıştır.

Araştırmacılar son olarak; farmakokinetik profili düzenleyebilmek adına 4. konumdaki hidrofobik 4-metoksifenil grubunu aktiviteyi koruyacak şekilde bazı hidrofilik gruplarla değiştirmiş ve sonuçta en aktif türev olan Bileşik 8, 4-morfolino-piperidin motifi ile elde edilmiştir. Bu bileşik hem moleküler hem de hücresel seviyede HSP90'ın güçlü bir inhibitörüdür. Ayrıca bileşiğin, NVP-AUY922'den neredeyse iki kat daha güçlü bir şekilde U87-MG'de (beyin kanseri araştırmalarında yaygın olarak kullanılan bir insan primer glioblastoma hücre hattı) tümör büyümesini inhibe ettiği de in vivo çalışmalarla ispatlanmıştır. Tüm bunlar; referans bileşiğe göre Bileşik 8'deki ters izoksazol halkasının ve farklı yan zincirlerin aktiviteye katkıda

bulunduğunu ve bileşiğin HSP90 inhibitörü olarak ümit verici bir aday olduğunu göstermiştir.

2017 yılına gelindiğinde ise Zhang ve arkadaşlarının, HSP90 inhibitörü yeni 4,5-diaril izoksazol yapısındaki bileşikler üzerine yaptıkları çalışma dikkat çekmektedir [72]. Bu çalışmada da yine NVP-AUY922 kodlu bileşik ve onun HSP90'nın N-terminal bölgesiyle yaptığı bağlanma etkileşimleri çıkış noktası olmuştur. Fakat diğer çalışmalardan farklı olarak burada araştırmacılar, farklı D-amino asitlerden oluşan çeşitli peptit gruplarının eklenmesiyle referans bileşiğin 3-amido parçasının optimizasyonuna ilişkin yeni bir yaklaşım ortaya koymuşlardır.



Şekil 2.15. Bileşik 9'un geliştirilme stratejisi

Bu amaçla doğal veya doğal olmayan bazı aminoasitler (R) süstitüe edilerek aktivite sonuçları incelendiğinde en yüksek aktiviteye D-valin metil ester ile metil-2-amino-3-hidroksi-propanoat türevinde rastlanmakla birlikte, D-lösin metil esterde ortalama bir aktivite gözlemlenmiş ve L-aminoasit türevler ise inaktif olarak kaydedilmiştir. Yine de en aktif türev referans bileşikten 2-3 kat kadar az etkili bulunmuştur. Başka valin esterler, örneğin etil ve tersiyer bütıl ester yapıları, antiproliferatif aktivitede kayıplar meydana getirmiştir. Bu türevlerde ilgi çekici nokta, metil veya etil grubu taşıyan basit amit türevleriyle hem enzimatik hem de antiproliferatif düzeyde yükselen aktivitenin; siklopropilamin, piperazin ve morfolin gibi nispeten hacimli gruplarla düşüşe geçmesidir. İkincil bir aminoasit (fenilalanin, valin, lösin) varlığında yani dipeptit yapılarında ortalama düzeyde bir aktivite oluşurken valin amino asitiyle oluşturulan tripeptit ve tetrapeptit süstitüentleri ilginç bir sonuç ortaya koymaktadır. Buna göre; tripeptit türev tetrapeptit türevden yaklaşık 20 kat daha yüksek antiproliferatif etki göstermektedir (NCI-H3122 IC₅₀ = 0,03-0,063

μM). Bu sonuç araştırmacılara başlangıçta R grubu için uygun buldukları valin sübstitüsünün optimum bir uzaklıkta olduğunda olumlu bir sonuç yaratacağını düşündürmüştür. Fenilalanin metil ester veya valin metil esterin terminal kısım olarak tutulması, ancak çeşitli siklik veya lineer bağlantıların kullanılmasıyla elde edilen bileşiklerden, suda çözünürlüğe katkı sağlayan etilen glikol taşıyan düz zincirli türevlerde hem enzimatik hem de hücresel düzeyde yüksek aktivite sağlayan Bileşik 9 keşfedilmiştir (Bkz. Şekil 2.15).

Çizelge 2.2. Bileşik 9'a ait IC_{50} değerleri

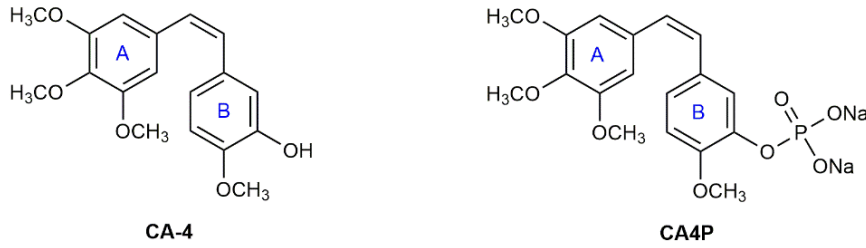
Kanser hücre hattı	IC_{50} (μM)
<i>NCI-H3122 (akciğer)</i>	0,042
A549 (akciğer)	0,351
NCI-H460 (akciğer)	0,247
HCT-116 (kolon)	0,116
<i>BT-474 (meme)</i>	0,057
MDA-MB-231 (meme)	0,130
DU-145 (prostat)	0,239
NCI-N87 (gastrik)	0,564
U87-MG (beyin)	0,109

Bileşiğin yüksek düzeydeki HSP90 inhibisyon kabiliyeti dolayısıyla, geniş bir çeşitlilikteki kanser hücrelerinde etkili olabileceği düşüncesinden yola çıkılarak farklı hücre hatlarındaki antiproliferatif aktivitesi incelenmiş ve en olumlu sonuçlara sırasıyla 42 nM ve 57 nM düzeyindeki değerlerle NCI-H3122 ve BT-474 hücre hatlarında ulaşılmıştır (Çizelge 2.2).

Ek olarak; bileşiğin NCI-H3122 hücrelerindeki HSP90 aktivitesi, bu proteinin inhibisyonunu farmakodinamik düzeyde gösteren HSP70 up-regülasyonu, ALK degradasyonu ve AKT ile ERK fosforilasyonu ile ispatlanmıştır. Bu deneyler referans bileşik AUY-922 ile karşılaştırmalı olarak 3 farklı konsantrasyonda (11,1; 3,3; 100 nM) 24 saat boyunca yapılan incelemelerle gerçekleştirilmiştir.

Moleküler docking çalışmaları ise; merkezi izoksazol halkasının, etilen glikol taşıyan ara zincirin ve terminalindeki D-valin metil esterinin aktivite için kritik etkileşimler sergilediklerini ortaya koymuştur.

Antitümöral ilaç keşif çabalarında ilgi çekici bir başka hedef ise; hücrenin yapısal bütünlüğü, bölünmesi ve intrasellüler transportu dâhil olmak üzere birçok hücresel fonksiyonda önemli bir rol oynayan mikrotübüllerdir. Bu anlamda mikrotübül dinamiğini etkileyen bileşiklerle ilgili çalışmalar önem arz etmektedir. Bunlar arasında doğal bir cis-stilben (cis-1,2-difeniletan) ürünü olan Kombretastatin A-4 (CA-4), tübülünlerin kolşisin bölgesine bağlanarak tübülünleri kuvvetle inhibe eder ve onların polimerizasyonlarını önler.

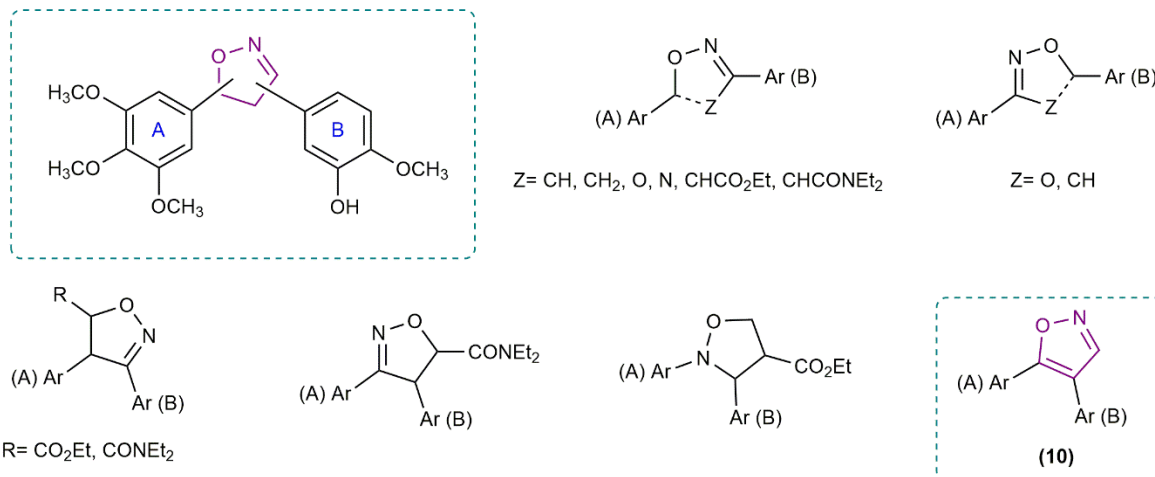


Şekil 2.16. Kombretastatin A-4 ve ön ilaç formu CA4P

CA-4'ün kombine ilaç tedavisine dirençli hücre hatları da dahil olmak üzere çeşitli kanser hücre hatlarına karşı güçlü sitotoksik aktivitesinin yanı sıra tümör vaskülaritesi üzerindeki potent ve selektif etkisinden ötürü bu alandaki çalışmalarda önemli bir yer edinmiştir. Bileşiğin ileri dönem prelinik çalışmalarının yürütülebilmesi için disodyum fosfat ön ilaç formu (CA4P) seçilmiştir [73]. CA4P, sitotoksik kemoterapi ve radyoterapi ile birlikte, çeşitli tiplerdeki tümörlerin tedavisi için faz denemelerinden de geçmiştir [74].

CA4P'nin tübülün afinitesi için temel yapısal faktör, iki aromatik halkanın uygun bir mesafe içinde kalmasını sağlayan çifte bağın veya uygun bir bağlayıcının varlığıdır. Aktif cis formdaki çifte bağın aktif olmayan trans formuna izomerizasyon probleminin üstesinden gelmek için ise eten köprüsü yerine bazı heterosiklik halkalar kullanılmasını öneren Kaffy ve arkadaşları izoksazol halkasını ve diğer oksijen ve azot taşıyan analoglarını kullanarak bir seri molekülün sentezini gerçekleştirmiş ve biyolojik aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Köprü görevi gören halkanın

heteroatomlarının A ve B aromatik halkaları açısından konumlarının, bu analogların antitübülin ve sitotoksik aktiviteleri üzerindeki etkilerini de araştırmışlardır [75].



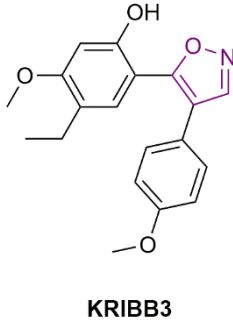
Şekil 2.17. Bileşik 10'nun geliştirilme süreci

İlk seride yalnızca 3,5-diariloksadiazol yapısındaki bileşik, CA4'le karşılaştırılabilir antitübülin aktivite sergilemiş; ancak sitotoksik etkiden yoksun bulunmuştur (IC₅₀ > 50 µM). Bu halka sisteminde A ve B halkalarının yerlerinin değiştirildiği, izoksazolin ya da izoksazolidin halkalarının tercih edildiği diğer serilerde de anlamlı bir aktivite görülememiştir. Yalnız 4,5-diarilizoksazol yapısındaki Bileşik 10, mütevazı antiproliferatif aktivitesine rağmen CA4'e göre daha yüksek antitübülin aktivitesi sergilemiştir.

Çizelge 2.3. Bileşik 10'nun CA-4 ile karşılaştırmalı aktivite sonuçları

	ITP (Tübülin polimerizasyonunun inhibisyonu, IC ₅₀)	HT29 (kolon adenokarsinoma hücre hattı, IC ₅₀)	SVEC4-10 (glomerüler karsinoma hücre hattı, IC ₅₀)
Bileşik 10	0,75 µM	3 µM	8,5 µM
CA-4	1,2 µM	0,47 µM	3 µM

Bu sonuçlar, heterosiklik halkanın kimyasal yapısındaki ufak değişikliklerin ve CA4'ün iki fenil halkasına göre değişen konumun tübülin bağlama özelliklerini büyük ölçüde etkileyebileceğini göstererek yeni keşiflerin yolunu açmıştır.



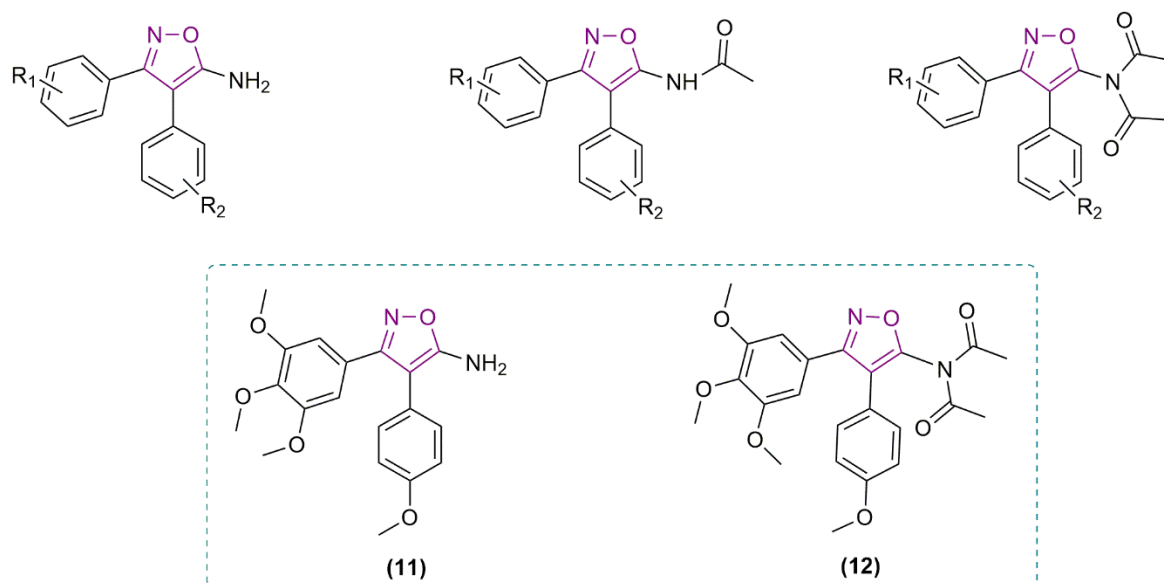
Şekil 2.18. KRIBB3 molekül yapısı

2008 yılına gelindiğinde, Shin ve arkadaşlarının bu alandaki çalışmaları dikkat çekicidir [76]. CA-4'ün heterosiklik halka taşıyan analoglarına oldukça benzer yapıda olan ve çekirdeğinde izoksazol halkası taşıyan KRIBB3 kodlu bir bileşiği, tümör hücrelerinin migrasyonunu önleyen molekülleri tanımlamak için yaptıkları kütüphane taramalarında keşfeden araştırmacılar; çalışmalarında beklenmeyen bir bulgu olarak KRIBB3'ün tümör hücresi büyümesini inhibe ettiğini saptamışlardır. İn vitro çalışmalarda kolon (HCT116; IC_{50} = 0,25 μ M), prostat (PC-3; IC_{50} = 0,48 μ M), meme (MDA-MB-231; IC_{50} = 25 μ M) ve akciğer (A549; IC_{50} =1,2 μ M) gibi çeşitli kanser hücrelerine karşı belirgin aktiviteler gösteren bileşik ayrıca; farelere yapılan intraperitoneal uygulamada, tümör hacmini %49,5 (50 mg/kg) ve %70,3 (100 mg/kg) oranında azaltmıştır.

Mekanizma çalışmaları ise KRIBB3'ün, anti-proliferatif aktivitesini, tübülün polimerizasyonu ve mitotik iğlerin kontrol noktalarındaki aktivasyonu inhibe ederek gerçekleştirdiğini göstermiştir. Flow sitometrik analizler neticesinde, KRIBB3'ün hücre siklüsünü G2/M fazında durdurarak apoptoza yol açtığı gösterilmiştir. KRIBB3'ün bu önemli yapısal ve biyolojik özellikleri potansiyel klinik uygulamalara doğru, daha fazla gelişme için çekici bir ilaç adayı olmasını sağlamıştır ve bileşiğin farklı türevlendirmeleriyle daha aktif moleküllere ulaşma hedefine dair çalışmalar hız kazanmıştır [77].

Liu ve arkadaşları 2009 yılında yayınladıkları bir çalışmada; cis köprü olarak 5-aminoizoksazol halkasını tercih etmiş ve böylelikle CA-4 analoglarının çözünürlüğünü arttırırken sitotoksik aktiviteyi de iyileştirebilmeyi amaçlamışlardır. Ayrıca amin grubu üzerinden asetil türevlerini de tasarladıkları 3,4-diaril-5-

aminoizoksazol yapısındaki bileşiklerin beş tip kanser hücre hattında (insan miyeloid lösemi hücreleri K562, insan özofagus karsinom hücreleri ECA-109, insan küçük hücreli akciğer kanseri hücreleri A549, insan hepatoselüler karsinom hücreleri SMMC-7721 ve insan prostat karsinom hücreleri PC-3) in vitro sitotoksik etkinliklerini CA-4 ile kıyaslamalı olarak değerlendirmişlerdir [73].



Şekil 2.19. Bileşik 11 ve 12'nin geliştirilmesi

3,4-Diaril yapıdaki R₁ ve R₂ süstitüsyon düzenini değiştirerek aktivite için optimum paterni anlamaya çalışan araştırmacılar, izoksazolün 3. konumundaki halkanın 3',4',5'-trimetoksi ve 4. konumundaki halkanın para-metoksi paternlerinin, aktivite için kritik olduğunu bu sistemde getirdikleri yeniliklerle birlikte yaşadıkları aktivite kaybı sonucu ispatlamışlardır. Tasarlanan bileşikler K562 myeloid lösemi hücre hattına karşı, diğer hücre hatlarından daha potent bir sitotoksik aktivite sergilemişlerdir (IC₅₀ 0,022-8,75 µM).

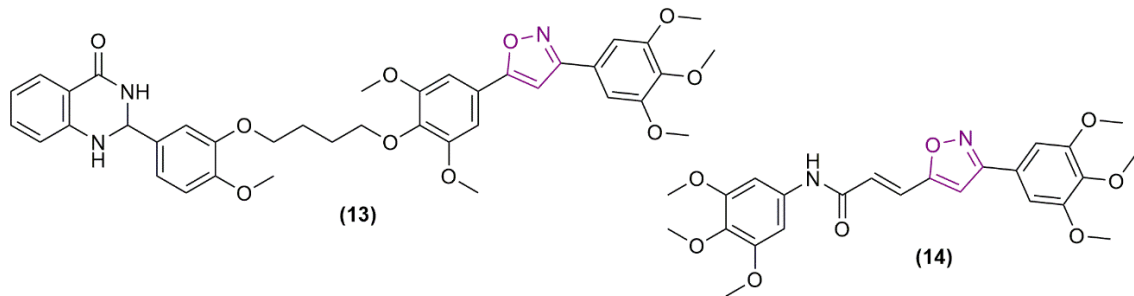
Çizelge 2.4. Bileşikler 11 ve 12'ye ait aktivite değerleri

(IC ₅₀ , µM)	ITP	K562	ECA-109	A549	SMMC-7721	PC-3
Bileşik 11	1,8	0,04	5,84	4,49	12,0	3,03
Bileşik 12	2,1	0,068	0,39	0,43	1,36	0,36
CA-4	1,2	0,046	4,50	0,42	3,22	5,40

Öte yandan Bileşikler 11 ve 12, beş tip kanser hücre hattına karşı önemli sitotoksik değerler göstermelerinin yanı sıra CA-4 ile benzer düzeylerde tübülün polimerizasyonunu inhibe etmişlerdir (Bkz. Çizelge 2.4). Ayrıca Bileşik 12 ile 0,1-1,0 μM konsantrasyonda gerçekleştirilen hücre döngüsü analizlerinde, bileşiğin hücre döngüsünü G2/M veya S fazlarında duraklatarak hücreleri apoptoza sürüklediği ispatlanmıştır.

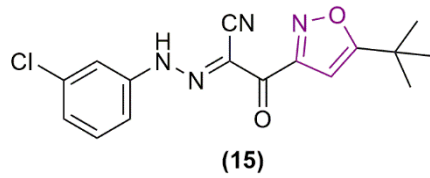
Kamal ve arkadaşları da, CA-4 analoglarının tasarımında beş üyeli heterosiklikler kullanmışlardır [78]. Çeşitli uzunlukta düz zincirli alkan türevleri tarafından kinazolinon halka sistemine bağlanmış 3,5-diarilizoksazolin veya izoksazolden oluşan bu hibrit moleküller farklı kanser hücre hatlarında test edilmişlerdir. Bu serideki en aktif bileşiklerden biri, akciğer kanseri A549 hücre hattına karşı potent sitotoksik aktivitesi ile ($\text{GI}_{50} = 0,18 \mu\text{M}$) Bileşik 13 olmuştur (Doksorubisin $\text{GI}_{50} = 0,13 \mu\text{M}$).

Aynı araştırma grubunun 2015 yılındaki çalışmalarında ise; yine CA-4 benzeri fakat bu kez; aril-sinmamamit konjugatı taşıyan pirazol ve izoksazol türevleri sentezlenmiştir. Bu bileşikler; HeLa, DU-145, A549 ve MDA-MB231 gibi çeşitli kanser hücre hatlarının büyümesini inhibe etme kabiliyetleri bakımından değerlendirilmiş ve çoğu, önemli sitotoksik etkiler sergilemiştir. Bu etkiler, mikrotübüllerin polimerizasyonuna etki eden antineoplastik bir ajan olan Nokodazol ile karşılaştırılabilir bulunmuştur. Bu seride özellikle pirazol türevleri daha yüksek aktivite göstermekle birlikte, izoksazol analogları içerisinde Bileşik 14, meme kanseri hücre hattı MDA-MB231'e karşı gösterdiği 1,8 μM 'lık IC_{50} değeriyle elde edilen en aktif türevlerden biri olmuştur [79].



Şekil 2.20. Antitübülün aktivite gösteren izoksazol analogu Bileşikler 13 ve 14

Siklik adenozin monofosfat (cAMP) birçok biyolojik işlemde önemli rol oynayan ikincil habercidir. cAMP'nin memeli hücrelerindeki ana fizyolojik etkileri, iki adet hücre içi cAMP reseptör ailesi tarafından düzenlenir. Bunlar; klasik protein kinaz A (PKA)/cAMP'ye bağımlı protein kinaz ve daha yakın zamanda keşfedilen, cAMP ile doğrudan aktive edilen değişim proteini (EPAC)/cAMP tarafından düzenlenen guanin nükleotid değişim faktörüdür. PKA'ya benzer şekilde, EPAC evrimsel olarak korunmuş bir cAMP-bağlanma bölgesi içerir ve küçük sinyal molekülleri olan Guanozin trifosfatları yani; Rap1 ve Rap2'yi aktive eder. Ek olarak, EPAC proteinleri belirli hücresel lokasyonlardaki diğer hücresel proteinlerle etkileşimler kurarak hücrede önemli fonksiyonları yerine getirir. Örneğin pankreasın beta hücrelerinde, EPAC-2'nin cAMP aracılı etkileşimleri insülin sekresyonu için kritiktir.



Şekil 2.21. Bileşik 15'in yapısı

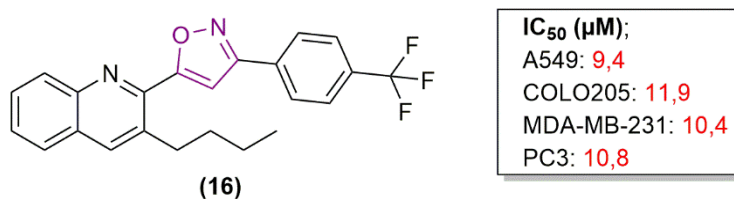
On yıldan uzun süren kapsamlı araştırmalar, daha önce yalnızca PKA tarafından kontrol edileceği düşünülen cAMP ile ilgili birçok hücresel işlemin de EPAC tarafından yönlendirildiğini kesin bir şekilde ortaya koymuştur. Yanı sıra; EPAC1'in insan pankreas duktal adenokarsinoma hücrelerinde aşırı eksprese edildiği fark edilmiştir. Fakat EPAC'a özgü antagonistlerin eksikliği araştırmacıların, bu protein ailesinin fizyolojik işlevlerini ayırt etme ve kanserdeki rollerini anlama yeteneğini büyük ölçüde sınırlamıştır. 2013 yılında Almahariq ve arkadaşları, özellikle EPAC proteinlerini hedef alan yeni kimyasal yapıların keşfi amacıyla yürüttükleri bir sanal tarama çalışmasında; 3,5-disübstitüe izoksazol yapısında (Bileşik 15) yeni bir EPAC spesifik inhibitör keşfetmişlerdir [80].

Bileşik 15'in EPAC proteinine bağlanma afinitesi ($IC_{50} = 10 \mu M$), cAMP'nin sentetik bir analogu olan 8-NBD-cAMP'nin $39 \mu M$ 'lık bağlanma afinitesinden yüksek bulunmuştur. Ayrıca Bileşik 15; $1,4 \mu M$ 'lik IC_{50} değeri ile cAMP aracılı EPAC2-GEF aktivitesini inhibe ederken; benzer şekilde cAMP-aracılı EPAC1-GEF aktivitesini de $3,2 \mu M$ 'lik bir IC_{50} değeri ile baskılamıştır. Bileşik 15'in özgüllüğünü belirlemek için,

tip I ve II PKA enzim aktivitelerini ölçen taramalarda ise bileşiğin EPAC proteinleri için; PKA'dan en az 100 kat daha seçici olduğunu gösterilmiştir. Bu analizlerin yanı sıra; EPAC inhibisyon aktivitesi ile tutarlı olarak, Bileşik 15'in ayrıca Akt fosforilasyonu ve insülin sekresyonu dahil olmak üzere iyi bilinen birkaç EPAC aracılı hücresel fonksiyonu da inhibe ettiği saptanmıştır. Pankreas kanseri hücrelerinin Bileşik 15 ile muamelesi, hücre çoğalmasını ve yaşayabilirliğini önemli ölçüde etkilememesine rağmen, pankreas kanseri hücre hatlarının migrasyon ve invazyonunda önemli düşüşler meydana getirmiştir. Tüm bu veriler, EPAC1'in pankreas kanser hücrelerinin migrasyonu ve invazyonunda önemli bir rol oynadığını ve bu nedenle pankreas kanseri için yeni terapötik stratejiler geliştirmek adına umut verici bir hedefi temsil ettiğini göstermiştir.

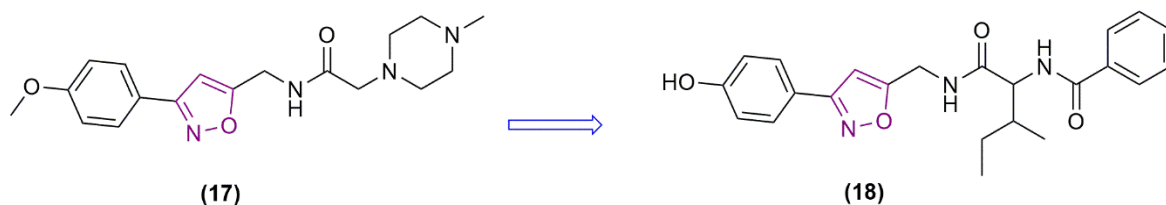
Kinolin ve çeşitli biyolojik aktivitelere sahip türevleri, terapötik maddelerin çok yönlü yapı taşları olarak medisinai kimya alanında önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle, 2-arilkinolinler biyolojik olarak aktiftir ve antitümör ajanların yapısında sıklıkla tercih edilmektedir. Kinolin ve izoksazol halkasını birlikte içeren yapıların önemine ve gelecek vaat eden yeni moleküller geliştirme çabalarına istinaden Rao ve arkadaşları, 2014 yılında yayınlanan çalışmalarının birinde; bir dizi 5-(3-alkilkinolin-2-il)-3-aril izoksazol türevi bileşik sentezlenerek dört tip kanser hücre hattındaki (A549, COLO205, MDA-MB-231 ve PC-3) aktivitelerini değerlendirmişlerdir [81].

Elde edilen yapı-aktivite ilişkisi incelendiğinde, izoksazol halkasının 3. konumunda optimum uzaklıkta bir flor varlığının aktivite için önemli olduğu ve bu uzaklığın en iyi şekilde bir fenil halkasıyla sağlandığı, bu konuma getirilecek triflorometil grubunun ise aktiviteyi arttırdığı, hidrojen veya metil grubunun aktiviteyi arttırmada ek bir avantaja sahip olmadığı; kinolin halkasının 3. konumuna getirilen çeşitli uzunluktaki düz zincirli yapılar içinde de n-bütil'in aktiviteye katkı sağladığı ortaya çıkmıştır. Sonuçta en aktif türev olarak tespit edilen Bileşik 16, tüm hücre hatlarına karşı güçlü sitotoksikite göstermiştir ($IC_{50} < 12 \mu M$).



Şekil 2.22. Bileşik 16 ve IC₅₀ değerleri

Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler); kolajenler, fibronectin, laminin, proteoglisianlar ve elastin dahil olmak üzere ekstraselüler matriks bileşenlerini parçalayan ve kanser metastazı dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların patojenezinde yer alan çinko-bağımlı endopeptidazlardır. Birçok küçük molekül MMP inhibitörü (MMPI), kanserdeki MMP'leri hedef almak üzere tasarlanmıştır. Bunlar arasında; Kawatani ve arkadaşları 2015 yılında yayınladıkları çalışmalarında 3,5-disüstitüe izoksazol türevi yeni MMPI'ler bildirmişlerdir [82]. Sanal bir bileşik kütüphanesi içerisinde insan rekombinant MMP-9 ile etkileşimleri taranan 25 bine yakın küçük molekül arasından 27 tane hit bileşik belirlenmiştir. Daha sonra bu 27 bileşiğin MMP-9 üzerindeki inhibe edici aktivitesini incelemek için in vitro enzim analizleri yapılmış ve bu ikinci elemde ise, MMP-9 enzim aktivitesini inhibe eden bileşiklerin ikisi (izoksazol analogu Bileşik 17 ve naftofloresin adlı bir bileşik) başlangıç bileşikleri olarak seçilmiştir. Çalışmanın devamında daha güçlü MMP-9 inhibitörleri elde edebilmek adına Bileşik 17 analogları incelenmiştir. Bu analoglardan Bileşik 18; 3,8 μM'lık IC₅₀ değeri ile en güçlü inhibitör aktiviteyi göstermiştir ki bu; Bileşik 17 (IC₅₀ = 233 μM) 'den yaklaşık 60 kat daha güçlü bir aktiviteye karşılık gelmektedir. Genel olarak; bir amit, bir sülfonamid içeren analoglar veya bir karbamat yapısının, bileşiklerin enzim inhibisyon potansiyelini arttırdığı gözlemlenmiştir.



Şekil 2.23. MMP inhibitörü Bileşikler 17 ve 18

MMP9'a karşı en yüksek aktiviteyi gösterdiği belirlenen Bileşik 18'in diğer MMP tiplerine karşı da aktiviteleri değerlendirilmiş ve geniş spektrumlu bir MMPI olduğu sonucuna varılmıştır.

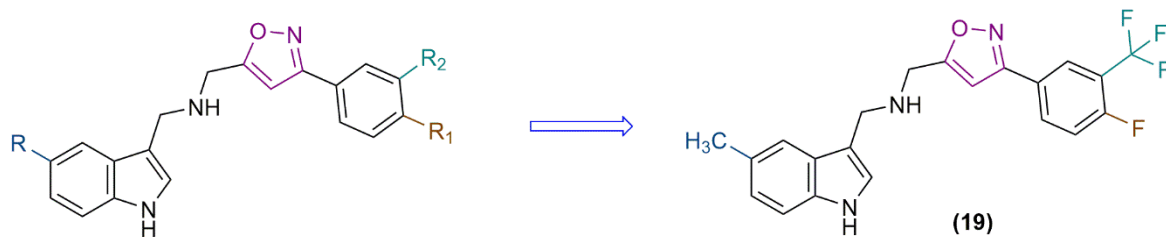
Çizelge 2.5. Bileşik 18'in MMP'lere karşı IC₅₀ değerleri

Enzim	MMP-1	MMP-2	MMP-7	MMP-9	MMP-9/Δ	MMP-12	MMP-13
IC ₅₀ (μM)	>100	2,1	>100	3,8	3,6	3,2	4,3

Bazı MMP'lerin, insan fibrosarkom HT1080 hücrelerinin migrasyonunu inhibe ettiği çalışmaları göz önünde bulunduran araştırmacılar; Bileşik 18'in de hücreler üzerindeki etkisini incelemek adına, Bileşik 18 ile muamele edilmiş HT1080 hücrelerinin migrasyonunu test etmişlerdir. Buna göre bileşik; HT1080 hücrelerinde neredeyse hiç toksisite göstermemekle birlikte hücre göçünü önemli ölçüde inhibe etmiştir.

Fosfolipaz A2 (PLA2); fosfolipidleri parçalayarak özellikle serbest yağ asidi, çoğunlukla araşidonik asit (AA) ve lizofosfolipitlere (LPL'ler) dönüştüren özel bir enzim ailesidir. Dolayısıyla PLA2'nin inhibisyonu, AA ve LPL'lerin açığa çıkmalarını önlemektedir. PLA2'nin birçok izoformu mevcuttur. Bunlar içerisinde sPLA2 (s:secretory) vücuttaki çeşitli enflamatuvar proseslerde görev almaktadır. Özellikle alt tiplerinden Grup-IIA sPLA2 (GIIA sPLA2; artrit, enflamatuvar barsak hastalığı, ateroskleroz, sedef hastalığı ve çeşitli kanserler dahil olmak üzere birçok hastalıkta anahtar rol oynamaktadır [83].

Bu konjonktürde sPLA2 inhibitörü geliştirmek amacıyla yola çıkan Pedada ve arkadaşları 2016 yılında dikkate değer bir çalışma yayınlamışlardır [83]. Araştırmacılar indol ve izoksazol halkalarını birlikte içeren bir seri bileşik sentezleyerek bileşiklerin sPLA2 in vitro inhibitör aktivitelerini, pozitif kontrol ursolik asit ile karşılaştırmalı olarak taramışlardır. Elde ettikleri en aktif türev olan Bileşik 19 ile hem in vivo hayvan modellerinde antienflamatuvar aktivite, hem de meme kanseri (MCF-7) ve prostat kanseri (DU145) hücre hatlarında in vitro antikanser aktivite çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. sPLA2'nin meme ve prostat kanseri hücre hatlarında pro-tümörjenik rol sergilediği bilindiğinden ötürü, ilgili hücre hatları tercih edilmiştir.



Şekil 2.24. sPLA2 inhibitörü Bileşik 19'un geliştirilmesi

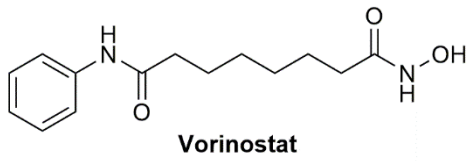
Hem in-siliko hem de in vitro deneysel sonuçlar, Bileşik 19'un diğer 3,5-disüstitüe izoksazol türevlerine kıyasla en aktif türev olduğunu, pozitif kontrol ursolik asit ile karşılaştırılabilir bir sPLA2 inhibe edici aktivite sergilediğini göstermiştir. Yapı-aktivite ilişkisi incelendiğinde; indol halkasında CH₃ gibi elektron salıcı gruplar (R grubu) ve izoksazolün 3. konumundaki fenil halkasında (R₁, R₂ grubu) F, CF₃ ve NO₂ gibi elektron çekici grupların varlığı aktivitede olumlu sonuçlar doğurmaktadır. R₁ ve R₂ = H olduğu durumda ise; aktivite açısından sıralama R = CH₃ > H > Br şeklinde gözlemlenmiştir. Ayrıca, Bileşik 19 ile gerçekleştirilen in vitro antikanser aktivite çalışmalarının pozitif kontrol Doksorubisin ile karşılaştırmalı sonuçları da geliştirilebilir düzeyde bir antikanser aktivitenin mevcut olduğunu göstermektedir (Çizelge 2.6).

Çizelge 2.6. Bileşik 19'un sPLA aktivitesi ile ilgili deneysel sonuçlar

	in-siliko docking skor (-kcal/mol)	in vitro sPLA inhibitör aktivite (IC ₅₀ , µM)	MCF-7 (IC ₅₀ , µM)	DU145 (IC ₅₀ , µM)
Bileşik 19	-129,5	10,23	10,03	14,15
Ursolik asit	-128,8	12,59	-	-
Doksorubisin	-	-	8,02	4,75

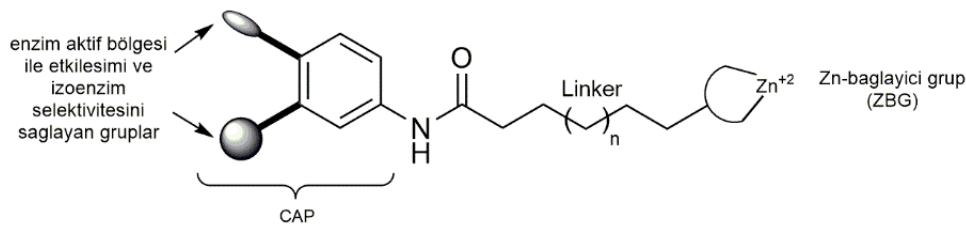
Hücrelerde DNA kromatin iplikçiklerinin translasyon sonrası gerçekleşen asetilasyon reaksiyonları histon asetil transferazlar (HAT) ve histon deasetilazlar (HDAC) adı verilen iki enzim sınıfının kompetitif aktiviteleri ile düzenlenmektedir. Genel olarak HAT'lar asetilasyon ile birlikte aktif kromatin yapılarının oluşumunu sağlarken, HDAC'lar deasetilasyon ile transkripsiyon prosesini baskılama işlevini üstlenirler. Kromatin üzerindeki bu asetilasyon dengesindeki herhangi bir değişim, gen ekspresyon paterninin düzenlenmesinde bazı aksaklıklara sebep olabilmektedir. Bu anlamda; birçok kanser tipi anormal transkripsiyonel aktivite ile ilişkili olduğundan ve HDAC'lar transkripsiyon faktörleri ile gen regülasyonunu

etkileyebildiğinden, bu enzimler kanser tedavisi için ilgi çekici hedefler olarak tanımlanmaktadır. Literatürde, HDAC'ların kimyasal inhibitörlerinin tümör hücresi büyümesini inhibe ettiği ve hücre ölümünü indüklediğini gösteren çalışmalar mevcuttur. HDAC inhibitörleri ayrıca radyasyon ve kemoterapötik ilaçların sitotoksik etkilerini arttırmaktadır [84]. Bir HDAC inhibitörü olan Vorinostat, kutanöz T hücreli lenfoma tedavisinde kullanılmak üzere 2006 yılında FDA'dan onay almıştır [85].



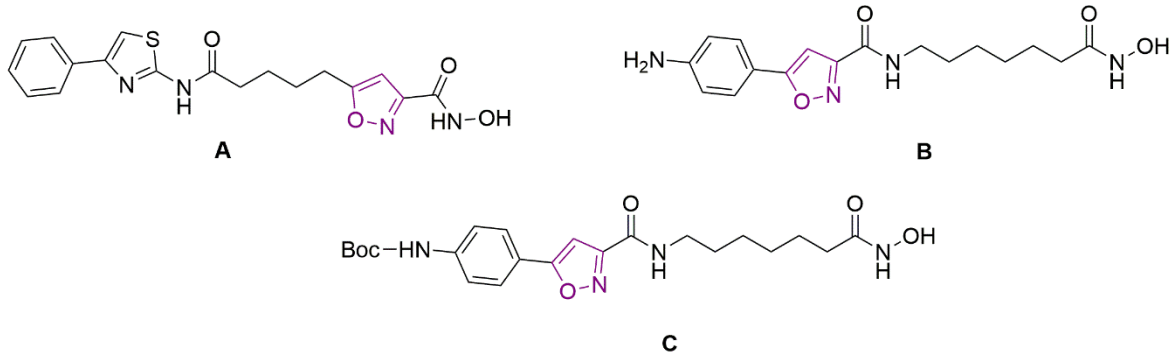
Şekil 2.25. Vorinostat'ın kimyasal yapısı

HDAC enzim ailesinin, 3 ayrı sınıfa ait toplam 11 adet izoformu olduğu bilinmektedir. Bunlar; 1, 2, 3 ve 8'i içeren Sınıf-I; 4, 5, 6, 7, 9 ve 10'u içeren Sınıf- II ve 11'i içeren Sınıf- IV HDAC'lardır. Sınıf I, II ve IV HDAC'ların enzim aktif bölgeleri, histidin ve aspartat kalıntıları ile koordine hâlde iki değerli bir Zn katyonu içeren yüksek oranda korunmuş bir katalitik alan içinde bulunmaktadır. Bilinen HDAC inhibitörleri ve enzim aktif bölgesi ile olan etkileşimleri göz önüne alındığında genel bir inhibitör topoğrafyası çıkarmak mümkün olmuştur (Şekil 2.26) [84].



Şekil 2.26. HDAC inhibitörü bileşiklerin genel yapısı (referans [84]'ten uyarlanmıştır)

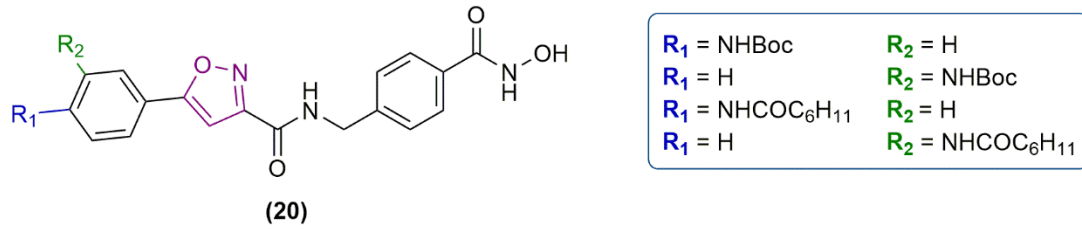
Geçmiş yıllarda geliştirilen HDAC inhibitörlerinin HDAC izoformlarına karşı seçicilikleri ile ilgili bilgilerin sınırlı olması nedeniyle; geliştirilecek olası selektif inhibitörlerin izoenzim tiplerine olan bu selektivitelerinin, apoptotik mekanizmalara ve antiproliferatif aktiviteye olan etkisini araştıran Gaisina ve arkadaşları; HDAC inhibitörü olabilecek bazı 3,5-disüstitüe izoksazol bileşikleri tasarladıkları çalışmalarını, 2016 yılında yayınlamışlardır [86].



Şekil 2.27. Spesifik HDAC inhibitörlerinin geliştirilmesi için seçilen öncü bileşikler

Araştırma grubunun daha önceki yıllarda yaptıkları çalışmalardan elde ettikleri aktif bileşiklerin (A,B,C); pankreas kanseri hücrelerini G1 ve/veya G2 fazında tutarak apoptozu indüklemelerine ek olarak bu HDAC'ların bazılarının, bilinen bir HSP90 bağlantılı protein olan ve hücrede DNA hasarlarının onarımını regüle eden “checkpoint kinaz-Chk1”in inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir [87-89]. İzoenzim analizleri ise, bu inhibitörlerin in vitro olarak HDAC6 ve HDAC3'e karşı yüksek etkinliğini açığa çıkarmıştır. İşte bu noktada amaç; bu öncü bileşiklerin moleküler özelliklerini önemli ölçüde etkilemeyecek bazı basit değişiklikler uygulayarak seçicilik endeksini HDAC6 lehine arttırmak olmuştur. Zira bu tür izoform spesifik bileşiklerin, özellikle de HDAC6 seçici inhibitörlerin kanserdeki rolü hakkında bazı çalışmalar bulunmaktadır [90].

Daha önce sentezlenen ligandların HDAC6'ya karşı seçiciliğini artırma hedefi ile HDAC6 bağlama bölgesinin özelliklerini de dikkate alarak yeni bir seri bileşik tasarlanmıştır. Bu inhibitörler genel yapı olarak; bir izoksazol veya benzen halkasına bağlı çinko bağlayıcı grup olarak bir hidroksamik asit fonksiyonu, farklı işlevsel gruplar taşıyan bir heteroaril yapısı ve bu grupları birbirine bağlayan çeşitli uzunluklardaki bağlayıcıları içermektedir. Böylece ara bağlayıcı uzunluğunun da aktiviteye olan etkisinin araştırılması olanağı doğmuştur. Terminal motiflerin seçimi ise yukarıda bahsedildiği gibi araştırma grubunun önceki çalışmalarından edindiği bilgilerden esinlenerek tasarlanmıştır. Tasarlanan bileşiklerin hepsinin HDAC'ın 11 farklı izoformuna karşı in vitro aktiviteleri (IC₅₀) test edilirken bu sonuçlardan öne çıkan bileşikler de pankreas kanseri hücre hatları BXPC3 ve L3.6pl'ye karşı (GI₅₀) değerlendirilmiştir.

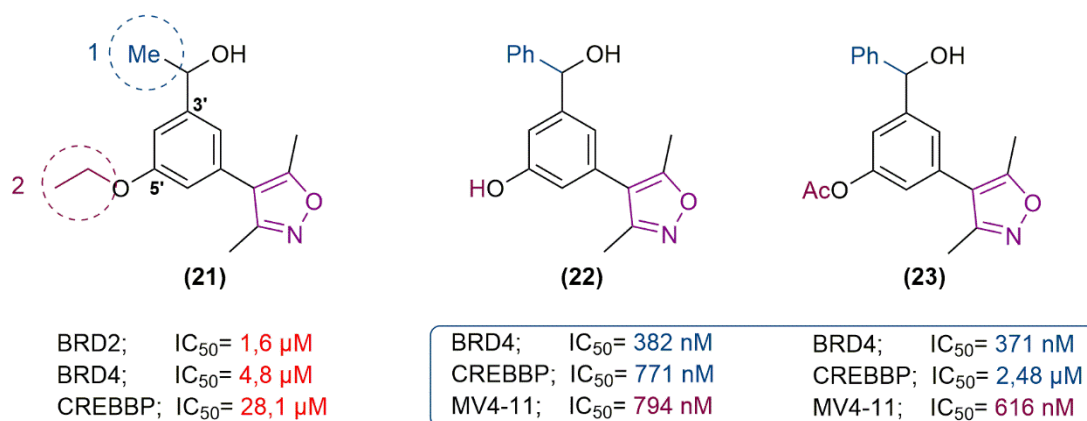


Şekil 2.28. HDAC6'nın selektif inhibitörü olarak geliştirilen Bileşik 20 serisi

Bu bileşikler içerisinde Bileşik 20 serisi, HDAC6 (IC_{50} <10 nM) için HDAC1-3 (Seçicilik > 400 kat) ve HDAC10'a göre çok yüksek potens ve seçicilik gösterirken (bazı bileşikler pikomolar düzeyde aktivite göstermiştir), beklenmedik bir şekilde selektif olmayan analoglarına kıyasla (örneğin molekül C için BXPC3: 0,6 μ M; L3.6pl: 0,1 μ M) hücre büyümesini engellemede çok az etki göstermiştir (Bileşik 20 analogları için IC_{50} değerleri BXPC3: > 8 μ M; L3.6pl: > 50 μ M). Sonuçlar, yalnızca HDAC6 inhibisyonunun, hücre büyümesinin bozulması için yetersiz olduğunu ve Sınıf-I HDAC inhibisyonunun gerekli olduğunu ortaya koymuştur. Aynı zamanda aktif bileşiklerdeki çok küçük kimyasal modifikasyonların enzim selektivitesinde çok yüksek düzeyde değişiklik oluşturabildiği gözlemlenirken böylece ileriki dönem çalışmalar için de farklı bir kapı aralanmıştır. Histonların amino ucundaki lizin aminoasitlerinin asetilasyonu, gen transkripsiyonunun epigenetik düzenlenmesinde rol oynayan en önemli post-translasyonel modifikasyonlardan biridir. Bromodomainler, histonların N-terminal ucundaki asetillenmiş lizin kalıntılarını (KAc) tanıyan yaklaşık 110 amino asitten oluşan protein yapılarıdır. Lizin asetilasyonunun okuyucuları olan bromodomainler, asetillenmiş lizin kalıntıları tarafından taşınan sinyalin dönüştürülmesinden ve bunun çeşitli normal veya anormal fenotiplerle sonuçlanmasından sorumludurlar. Bu etkileşimin kompetitif inhibitörleri ise antiproliferatif ve antienflamatuar özelliklere sahiptir. Çok sayıda bromodomain alt tipi bilinmektedir ve histon-bromodomain etkileşiminin alt tiplerine özgü inhibitörlerinin keşfi büyük önem taşımaktadır. Bu anlamda; kanser tedavisi için epigenetik ilaç keşfi yaklaşımında umut vaat eden gelişmelerden birisi en iyi bilinen bromodomain ailesi olan BET (Bromo- ve Ekstra-Terminal Domain) ailesinin üyeleri olan BRD2, BRD3, BRD4 ve BRDT inhibitörlerinin geliştirilmesidir [91].

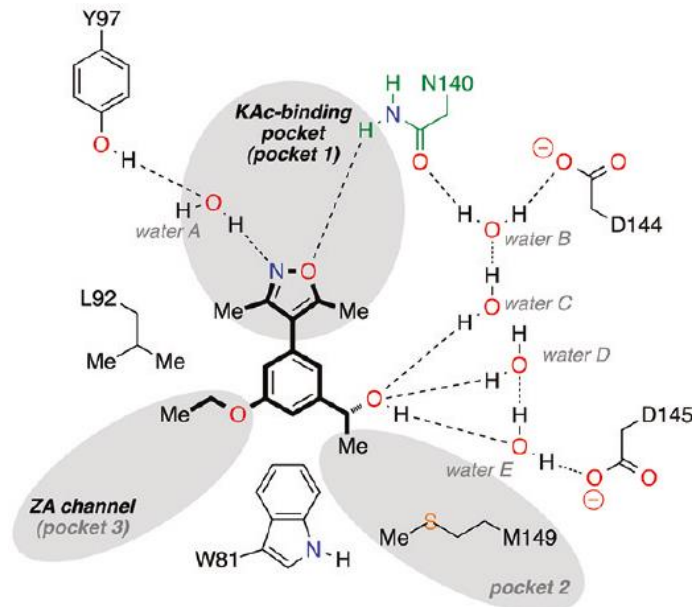
3,5-Dimetilizoksazol motifini; asetillenmiş histon yapılarını taklit ederek ilgili peptitleri bromodomainlerden uzaklaştıran, yeni bir asetillenmiş lizin biyoizosteri olarak tanımlayan Hewings ve arkadaşlarının bu alandaki çalışmaları oldukça ilgi çekicidir. İlk olarak 2011 yılında yayınladıkları çalışmalarında; X-ışını kristalografisi kullanarak 4. konumdan sübstitüe edilmiş 3,5-dimetilizoksazollerin aktivitesini ve seçiciliğini yaratan çeşitli bromodomain yapılarıyla etkileşimleri belirlenmiş ve bu etkileşimlerden faydalanılarak, BRD2 ve BRD4 proteinleri için IC_{50} değerleri $5 \mu M$ 'ın altında olan Bileşik 21 geliştirilmiştir. Ayrıca Bileşik 21, diğer bir bromodomain alt tipi olan CREBBP'e de bağlanarak $28,1 \mu M$ düzeyinde aktivite göstermiştir. (CREBBP bromodomain'in güçlü ligandlarının, hücrelerde DNA hasarına tepki olarak p53 stabilitesini ve işlevini modüle ettiği bilinmektedir) [92].

Bileşik 21'i lider bileşik olarak başlangıç noktası yapan araştırma grubunun, BRD4'e selektif ve daha aktif bileşiklerin eldesi için gerekli optimizasyon çalışmalarını gerçekleştirerek yeni aktif bromodomain inhibitörleri bildirdikleri çalışmaları ise 2013 yılında yayınlanmıştır [93]. X-ray kristalografisi yardımı ile bağlama etkileşimleri belirlenerek uygun sübstitüentleri tayin edilen 3,5-dimetilizoksazol bileşikleri içerisinde BRD4'e en iyi bağlama potansiyeline sahip olduğu keşfedilen Bileşik 22 ve 23; bir sonraki aşamada hücresel aktiviteleri belirlenmek üzere akut miyeloid lösemi hücre hatlarında (MV4-11) biyolojik çalışmalara tabi tutulmuştur. Bileşiklerin bağlanma etkileşimleri üzerinden elde edilen sonuçlara paralel olarak bilinen BET inhibitörlerine kıyasla hücre hatlarında yüksek sitotoksik aktivite sergilediği gözlemlenmiştir.



Şekil 2.29. Öncü bileşik 21 ve yeni türevler 22 ve 23'ün geliştirilmesi

Lider bileşik 21'den hareketle diğer bileşiklerin tasarlanması aşağıda özetlenmiştir. İlk olarak; BRD4 bromodomain alt tipine bağlanan öncü bileşiğin X ışını kristal yapısı, 3' pozisyonundaki metil grubunun aktif bölgedeki WPF shelf olarak adlandırılan sığ bir hidrofobik oluk içine bağlandığını göstermiştir. 5' Pozisyonundaki etoksi sübstitüenti ise Z ve A heliksleri arasındaki ZA kanalı olarak adlandırılan bir kanala yönelerek o bölgede bazı etkileşimler göstermiştir. BRD4 için gelişmiş afiniteye sahip bir bileşik geliştirmek adına bileşiğin bu iki kilit bölgedeki etkileşimlerini arttırmayı düşünen araştırmacılar; ilk olarak WPF shelf bölgesi ile etkileşen sübstitüent motifini optimize etmeyi tercih etmişlerdir. Bu bölgeye getirilecek aromatik halkalar gibi metil grubundan daha büyük bir sübstitüentin, WPF shelf bölgesini daha etkili bir şekilde işgal ederek BRD4 afinitesinde bir artış sağlayacağı varsayılarak tasarlanan bileşiklerle yapılan çalışmaların bu savlarını desteklemesinin yanı sıra bu büyük yapıların (Ph, p-F-Ph, m-F-Ph, p-Cl-Ph, m-Cl-Ph) 3,5-dimetilizoksazol yapısını KAc-bağlanma cebine doğru iterek etkileşimlerini arttırdığı ortaya çıkmıştır. Bileşikler içerisinde non-sübstitüe fenil halkasını içeren türev en yüksek BRD4 aktivitesini gösterdiğinden ($IC_{50} = 640$ nM) bu konumda fenil sübstitüenti tercih edilerek devam edilmiştir. Ayrıca flor sübstitüenti, klora göre daha iyi bir aktivite sergilerken para sübstitüsüyonu da meta sübstitüsyona yeğdir.



Şekil 2.30. Bileşik 21'in aktif bölge etkileşimleri

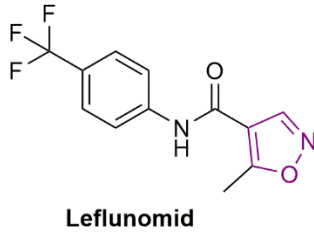
Bir sonraki optimizasyon ise ZA kanal bölgesiyle olan etkileşimleri gerçekleştiren 5' konumundaki etoksi yapısı üzerinde olmuştur. X-ray kristalografileri ile bu bölgede iki su molekülünün varlığını tespit eden fakat etoksi grubunun oksijen atomunun su molekülleriyle uygun pozisyonu yakalayarak hidrojen bağı oluşturamadığını fark eden araştırmacılar; burada sağlanacak hidrojen bağı etkileşiminin afiniteyi arttıracığı hipotezini kurarak bazı bileşikler tasarlamışlardır. Bu bileşiklerden etoksi grubu yerine hidroksi grubu taşıyan (Bileşik 22) ve asetil grubu taşıyan (Bileşik 23) türevler en aktif bileşikler olarak belirlenmiştir. Etilen glikol veya metoksi türevleri ise aktivite azalmaya sebep olmuştur. Ayrıca Bileşik 22'nin R ve S izomerleri de sentezlenerek aktiviteleri incelendiğinde her iki enantiyomerin de benzer aktivitede olduğu ortaya çıkmıştır.

Görüldüğü üzere bu çalışma yalnızca öncü bileşikten daha aktif bileşiklerin elde edilmiş olması bakımından değil; elde edilen X-ışını kristal yapıları sayesinde bir bileşiğin BET bromodomainlerine karşı yüksek afinite göstermesi gereken yapısal özelliklerin gösterilmesi bakımından da önem taşımaktadır. Ayrıca bileşiklerin bromodomain inhibisyonu ile gerçekleştiği kanıtlanan hücresel düzeydeki yüksek sitotoksik aktiviteleri, bu alandaki çalışmalar içerisindeki önemlerini gözler önüne sermektedir.

İzoksazol yapısında olan ve antikanser etkinliği gösterilen bir diğer bileşik halen romatoid artrit tedavisinde kullanılan Leflunomid isimli ilaç molekülüdür. Leflunomid, yetişkinlerde, orta ve şiddetli romatoid artrit tedavisinde kullanılan ve dihidroorotat dehidrojenazı inhibe eden bir pirimidin sentezi inhibitörüdür. Leflunomid immünosüpresif özellikte "hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaç" sınıfı bir bileşiktir. Uzun yarı ömrü, iyi güvenlik profili, yüksek tolere edilebilirliği ve geniş moleküler hedefleri sayesinde Leflunomid; 1998 yılında romatoid artrit tedavisi için onaylanmasının ardından tümöral terapötik uygulamalar için de umut verici bir bileşik olmuştur. Bileşiğin etkinliği çalışılan kanser tipleri içerisinde akciğer kanseri, melanoma, meme ve prostat kanseri gibi farklı kanserlerin yer aldığı bildirilmektedir [94].

Leflunomid'in Karmustin ile kombinasyonu, küçük hücreli glioblastoma (SF763T), akciğer (Calu-6) veya baş ve boyun kökenli ksenograftları taşıyan farelerde

incelendiğinde hücre büyümesinde sırasıyla %74, %75 ve %69'luk inhibisyon değerleri elde edilmiştir. Ayrıca Leflunomid'in melanoma ve meme kanseri tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı oluşan direnç durumunda bazı sitotoksik ajanlarla birlikte etkili olacağı düşünülmektedir. Leflunomidin antitümör etkisine aracılık eden bazı mekanizmalar bildirilmiştir. Örneğin; aktif metaboliti olan Teriflunomid, antiproliferatif ve pro-apoptotik etkiler göstererek çoklu sinyal yollarını (hücre döngüsü, apoptoz, p53 sinyal yolu gibi) ve hücresel süreçleri (sinyal iletimi, transkripsiyon gibi) modüle ederek meme kanseri hücrelerinde Tamoksifen direncini tersine çevirmektedir. Bir diğer mekanizma ise çeşitli tümörlerin tedavisi için yapılan çalışmalarda gösterilen tirozin kinazların PDGFR aracılı fosforilasyonunu bloke eden etkisidir [94]. Leflunomid bileşiği ile ilgili yürütülen çok sayıda Faz II çalışması içerisinde çeşitli kanser tiplerini konu alan birçok onkolojik çalışma mevcuttur [95].



Şekil 2.31. Leflunomid'in kimyasal yapısı

2.5. İlaç Geliştirme Çalışmalarında Piperazin Halkasının Önemi

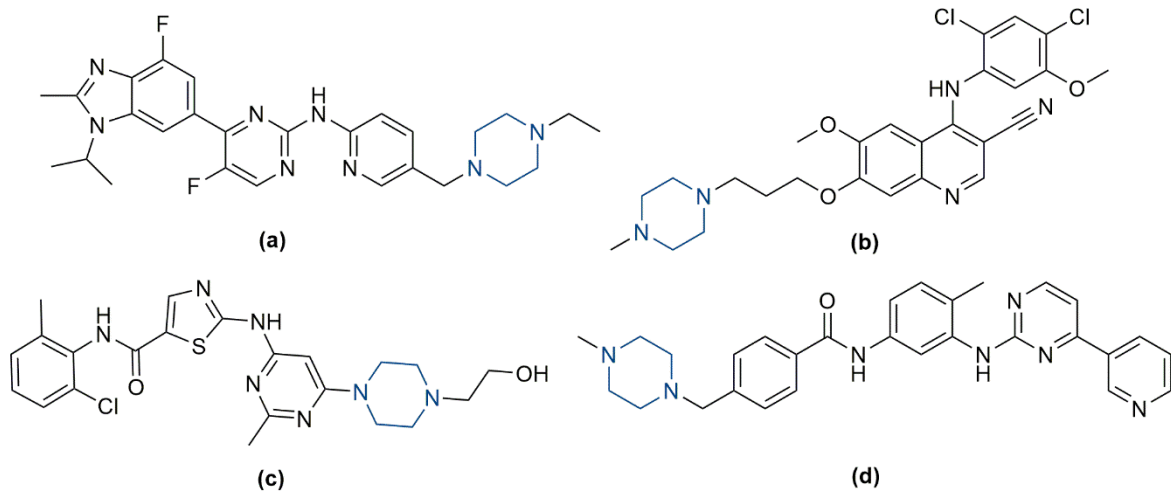
Azot içeren heterosiklikler, çok çeşitli ve yüksek terapötik etkinlikleri nedeniyle son birkaç on yılda medisinal kimyacıların ilaç tasarım çalışmalarında sıklıkla tercih ettiği yapılardır. Taşıdıkları iki adet azot atomu ile birlikte altı üyeli bir heterosiklik olan piperazin halkası, ilaç aday moleküllerinin rasyonel tasarımları için büyük bir öneme sahiptir. Yapılarında bulunan bu iki azot atomu, uygun pKa değerlerine ulaşmayı kolaylaştırmakta, suda çözünürlüğe katkı sağlamakta ve biyoyararlanımı olumlu anlamda etkileyerek molekülün tamamının farmakokinetik (FK) profilini değiştirebilmektedir. Hem piperazin halkasının kendisi hem de üzerinde oluşturulan sübstitüsyon paterninin; moleküllerin farmakodinamik (FD) profillerine olan katkısı da oldukça dikkat çekicidir. Bu bakış açısıyla literatürler incelendiğinde; elektron çekici veya elektron salıcı atomların direkt olarak veya bir fenil/benzil halkası vasıtasıyla piperazin azotuna bağlanmasının, ilgili biyolojik etkinin farklılaşmasına sebep olduğunu bildiren birçok çalışmaya rastlanmaktadır. Piperazin iskeleti ek olarak çok yönlü bağlanma özelliklerine sahiptir ve bir dizi farklı biyolojik hedef için güçlü ve seçici etkileşimler sağlayabilmektedir [96, 97].

Görüldüğü üzere; ilaç keşfindeki iki önemli profile (FK, FD) olan katkısı nedeniyle, piperazin halkasının ilaç tasarımında stratejik bir önemi bulunmaktadır. Bu motif; antipsikotik, antihistaminik, antianjinal, antidepresan, antiviral, antienflamatuvar, kardiyak koruyucu ajanlar, görüntüleme ajanları ve antikanser ajanlar gibi çeşitli terapötik kullanımlara sahip iyi bilinen ilaç moleküllerinin birçoğunda bulunmakta; ayrıca piperazin yapısına sahip moleküller, çoklu farmakolojik aktiviteleri hedeflemek için de faydalı olmaktadır [98, 99].

Yukarıda bahsi geçen çok çeşitli aktivite tipleri arasında, antikanser etkili molekül geliştirme süreçlerine bakıldığında farklı kanser tiplerine karşı farklı sübstitüsyon paternine sahip piperazinlerin, farklı mekanizmalarla etki gösterebildiği görülmektedir [100]. Aşağıda, bu tez çalışmasının öncü molekülünde ve sentezlenen diğer yeni ve aktif bileşiklerin yapısında da bulunan piperazin halkasının; antikanser etkinliğini ortaya koyan çalışmalar ele alınmıştır.

2.6. Antikanser İlaç Geliştirme Çabalarında Piperazin Türevi Bileşiklerin Yeri

Çeşitli kanser türleri ile olan mücadelede, tüm dünyada devam eden yenilikçi tasarım yaklaşımları çerçevesinde ilaç adayı olabilecek moleküllerin yapısında, N taşıyan farklı iskeletlerin varlığına ihtiyaç duyan medisinal kimyacılar; piperazin halkasını sıklıkla tercih etmektedirler. Piperazin analogu bileşiklerin, özellikle de N atomları üzerinden disüstitüe olanlarının veya N-aril yapısı taşıyanların; kolon, prostat, lösemi, akciğer ve meme kanserlerine karşı güçlü antiproliferatif aktivite gösterdiğini bildiren ABD Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI); gerçekleştirdikleri hayvan deneylerinde, piperazinlerin tümöral oluşumları bastırma ve yok etme kabiliyetlerini göstermişlerdir. Mekanistik değerlendirmeler piperazinlerin mikrotübül sentezini, hücre döngüsünü ve bir tümör hücresinin büyüme ve metastaz yapma yeteneği için kritik olan anjiyogenezi inhibe ettiğini ortaya koymuştur. Ayrıca piperazinlerin tümör hücrelerini doğrudan apoptoz indüksiyonu yoluyla yok edebildiği bildirilmiştir. Piperazin analoglarının antitümör etki tarzları uzun yıllardır bilinen bir sitotoksik ajan olan Taksol'den oldukça farklıdır. Bu ilaca kıyasla piperazin analogu bileşiklerin çok daha güçlü ve farklı tümör tiplerine karşı aktivite gösterdikleri ve oral biyoyararlanımlarının da daha başarılı olduğu bildirilmektedir [17].



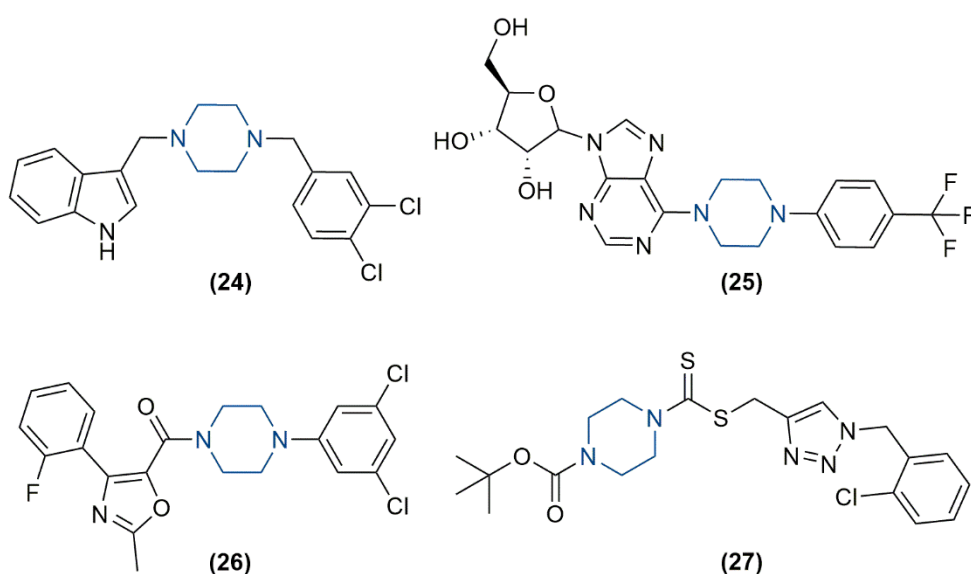
Şekil 2.32. Piperazin taşıyan FDA onaylı bazı antikanser ilaç molekülleri

FDA onaylı 200'den fazla antikanser ajanının kimyasal yapılarında piperazin halkasının bulunduğu bilinmektedir. Bu ilaçlar arasında; farklı kanser tiplerini tedavi etmede etkili bir D-siklin bağımlı kinaz (CDK4/6) inhibitörü *Abemasiklib* (a), meme

kanserinin tedavisinde etkili *Bosutinib* (b), kronik miyeloid lösemi ve akut lenfoblastik lösemi tedavisi için oral olarak aktif *Dasatinib* (c) ve protein kinaz inhibitörü *Imatinib* (d) öne çıkan örneklerden bazılarıdır (Bkz. Şekil 2.32) [101].

Akkoç ve arkadaşları 2012 yılında yayınladıkları çalışmalarında, güçlü sitotoksik aktiviteleri bilinen iki halka sistemini içeren indol-piperazin hibrit bileşikler sentezleyerek; 5-florourasil ile karşılaştırmalı olarak meme (MCF7), karaciğer (HUH7) ve kolon (HCT116) kanseri hücre hatlarında tarama çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Piperazin halkasının 4. konumunda F, Cl, CH₃, OCH₃, CN, NO₂ gibi süstitüentleri farklı konumlarda taşıyan benzil ve fenil halkaları getirilerek türevlendirilen seride, en aktif türev her hücre hattına karşı da yüksek sitotoksik aktivite sergileyen Bileşik 24 (IC₅₀ = 2,92-9,33 µM) olarak belirlenmiştir [102].

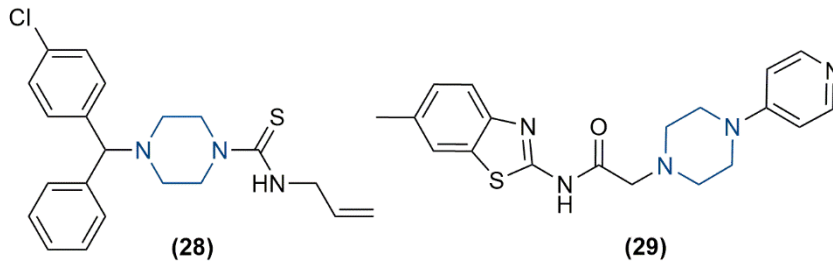
Aynı yıl, Tunçbilek ve arkadaşları ise N⁶ konumunda 4. konumundan süstitüe edilmiş bir piperazin içeren, yeni pürin ribonükleozit analogları sentezleyerek; Huh7, HepG2, FOCUS, Mahlavu, MCF7 ve HCT116 kolon kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksiteleri açısından değerlendirmişlerdir. Türevlendirmeler yine piperazinin 4. konumu üzerinden yapılarak en aktif türev olan Bileşik 25'e (IC₅₀ = 5,2-9,2 µM) ulaşılmıştır. Araştırmacılar Bileşik 25'in, bazı kinaz proteinlerinin inhibisyonu yoluyla senesens bağlantılı hücre ölümünü indüklediğini bildirmişlerdir [103].



Şekil 2.33. Piperazin türevleri Bileşik 24-27

Choi ve arkadaşları 2013 yılında yayınladıkları bir çalışmada; aril-oksazol, aril-tiyazol veya aril-izoksazol halkasının piperazin halkasıyla hibrit haldeki türevlerini sentezleyerek, HL60 lösemi hücre hatlarındaki antiproliferatif aktiviteleri ile insan endotel hücrelerindeki vaskülerizasyonu inhibe etme özelliklerini incelemişlerdir. Sentezlenen bileşiklerin birçoğu önemli derecede antiproliferatif aktivite göstermiştir ve aktif olarak seçilenler metabolik stabilite ve tübülün polimerizasyonunun inhibisyonu açısından da değerlendirilmiştir. Tüm bu parametreler dikkate alınarak arilpiperazinil oksazol yapısındaki Bileşik 26 ($IC_{50} = 60,2$ nM) in-vivo çalışmalar için uygun bulunmuştur. Tümör taşıyan farelerle yapılan deneylerde Bileşik 26'nın, 100 mg/kg'da tümör büyümesini %42,3 oranında azalttığı tespit edilmiştir. Bileşik hem yüksek metabolik stabilitesi ve dolayısıyla iyi derecedeki in vivo sonuçları, hem de yüksek derecedeki antimitotik ve antitübülün etkileri sebebiyle ileri çalışmalar için lider bileşik olarak çalışma grubu tarafından umut verici olarak bulunmuştur [104].

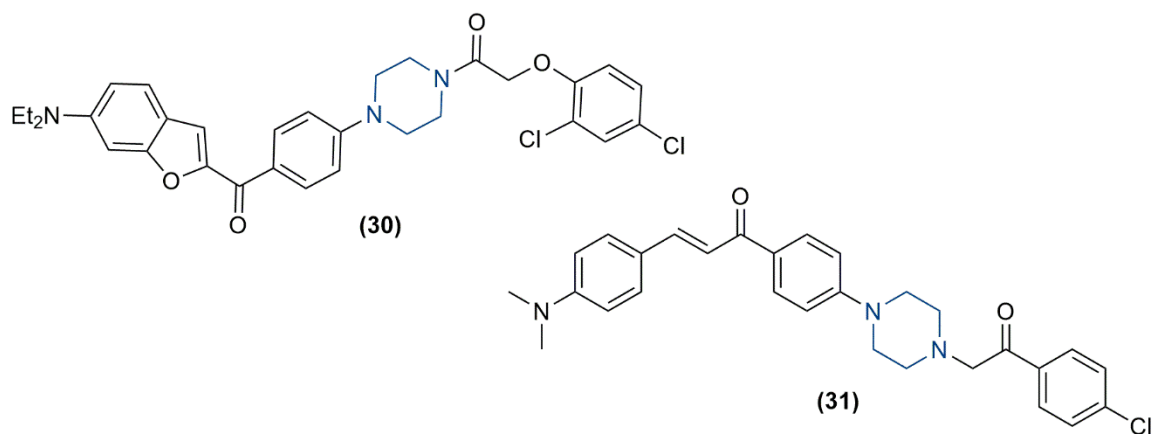
Aynı yıl Duan ve arkadaşları triazol-ditiyokarbamat-piperazin hibrit bileşikler sentezleyerek; MGC-803 (gastrik), MCF-7 (meme), PC-3 (prostat) ve EC-109 (yemek borusu) kanseri hücre hatlarındaki aktivitelerini, 5-florourasil ile karşılaştırmalı olarak değerlendirmişlerdir. Ekseriyetle bileşikler, MGC-803 ve MCF-7'ye karşı yüksek aktivite sergilemiş; serinin en aktif bileşiklerinden Bileşik 27 ($IC_{50} = 0,49-12,45$ μ M) ile yapılan sitokiyometrik analizler sonucu MGC-803 hücrelerinde hücre döngüsünü G2/M fazında durdurduğu belirlenmiştir [105].



Şekil 2.34. Piperazin türevleri Bileşik 28 ve 29

2014 ve 2015 yıllarına gelindiğinde ise Gürdal ve arkadaşlarının çalışmaları dikkat çekicidir [106, 107]. Araştırmacılar bir yıl arayla yayınladıkları iki çalışmadan birinde benzhidril-piperazin hibritleri, diğerinde ise benzotiyazol-piperazin hibrit bileşiklerini sentezleyerek; her iki serinin bileşiklerini de HUH-7, MCF-7 ve HCT-116 kanser

hücre hatlarına karşı sitotoksik aktiviteleri açısından 5-florourasil ile karşılaştırmalı olarak değerlendirmişlerdir. Serilerdeki bileşikler üç hücre hattına karşı genellikle iyi derecede sitotoksik aktiviteler sergilerken nispeten en aktif moleküller; Bileşik 28 ($IC_{50} = 4,9-9,9 \mu M$) ve Bileşik 29 ($IC_{50} = 3,1-9,2 \mu M$) olarak kaydedilmiştir. Ayrıca Bileşik 29 ile yapılan mekanistik çalışmalar, bileşiğin sub-G1 fazında hücre döngüsünü durdurması sonucu apoptozise neden olduğunu ortaya koymuştur.



Şekil 2.35. Piperazin türevleri Bileşik 30 ve 31

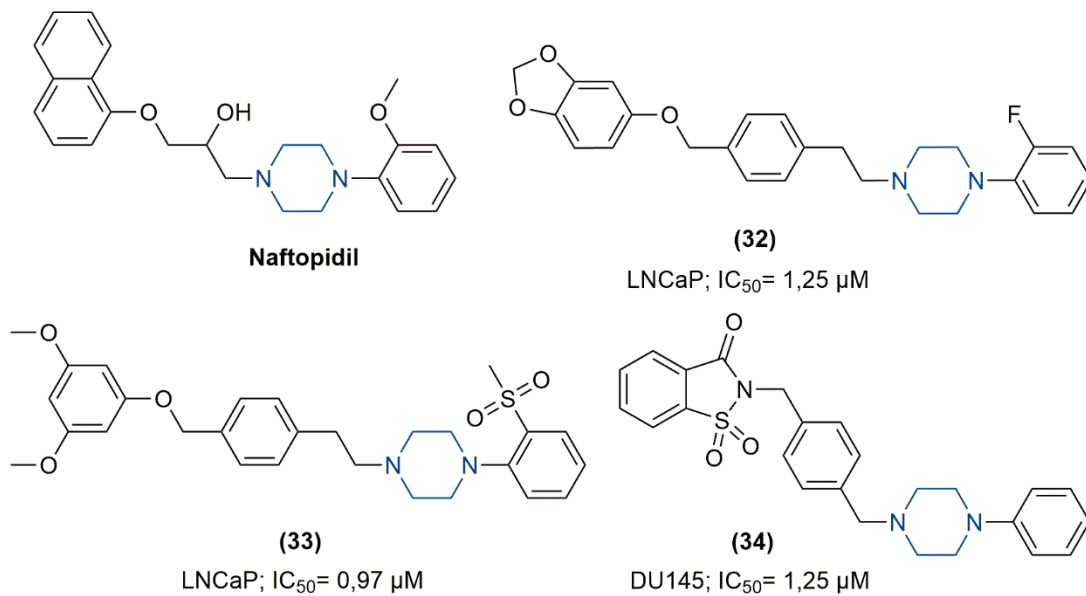
Diğer yandan 2016 yılı içerisinde yayınladıkları iki ayrı makalede Mao ve arkadaşları molekül tasarımlarında ortak olarak N-aril piperazin yapısını tercih ederken; çalışmaların birinde benzofuran halka sistemi diğerinde ise kalkon yapılarının piperazinlere eşlik ettiği görülmektedir [108, 109]. Bileşiklerin sitotoksik aktivitelerinin Sisplatin ile karşılaştırmalı olarak incelendiği paneller ise A549 (akciğer), HeLa (servikal), MCF-7 (meme) ve SGC7901 (gastrik) kanseri hücre hatlarından oluşmaktadır. Benzofuran-piperazin hibrit bileşikler içerisinde benzen halkasının klor veya triflorometil sübstitüenti taşıyan türevleri en güçlü bileşikler olarak kaydedilirken; Bileşik 30'un, dört tümör hücre hattına karşı en güçlü etkiyi gösterdiği ve seçici olarak HeLa'ya ($0,03 \mu M$) karşı yüksek sitotoksosite sergilediği belirlenmiştir. Güçlü antitümör aktivite sergilediği bilinen kalkon yapısını taşıyan serideki türevler arasındaki yapı-etki ilişkisine bakıldığında ise piperazin azotu üzerinden yapıya dâhil edilen asetofenon yapısının ve 4. konumundaki klor atomunun, aktiviteyi arttırdığı görülmüştür. Bu anlamda serinin en aktif bileşiği olarak bildirilen Bileşik 31 (A549, Hela ve SGC7901 için sırasıyla; $IC_{50} = 5,24 \mu M$;

0,19 μ M ve 0,41 μ M) ile yapılan in vivo çalışmalar, bileşiğin tümör büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiğini göstererek in vitro sonuçları desteklemiştir.

Aril-piperazin motifi ile ilgili dikkat çekici kanser araştırmaları arasında; iyi bilinen bir α -adrenerjik reseptör antagonisti olan bir arilpiperazin türevi Naftopidil ile ilgili çalışmalar ve prostat kanserinin tedavisinde etkili olacağı düşünülen moleküllerin tasarlandığı Chen ve arkadaşlarına ait bir dizi çalışma sayılabilir (Şekil 2.36).

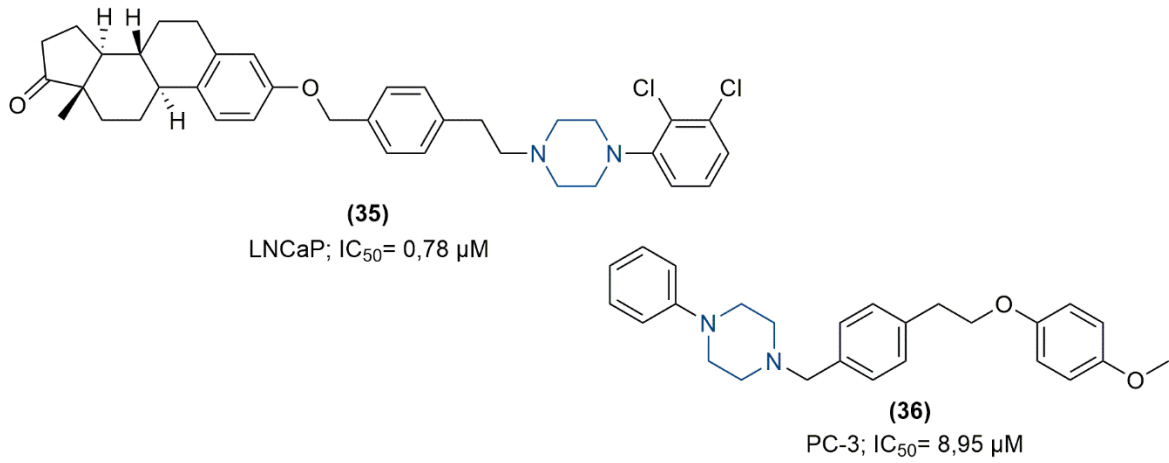
Hori ve arkadaşlarının Naftopidil ile gerçekleştirdikleri in vitro ve in vivo çalışmalar, bileşiğin prostat kanseri hücrelerinde, hücre döngüsünün G1 fazına müdahale ederek antiproliferatif etkiler sergilediğini göstermiştir. Ayrıca bileşiğin oral kullanımının hücrelerde α_1 -AR (androjen reseptör) alt tipi seçiciliği göstererek tümör büyümesini baskıladığı ispatlanmıştır [110].

Chen ve arkadaşları ise; 2014, 2015 ve 2017 yıllarında peş peşe yayınladıkları çalışmalarında elde ettikleri bazı arilpiperazin türevi bileşikler (Bileşik 32-34), prostat kanseri hücrelerine (PC-3, LNCaP ve DU145) karşı önemli sitotoksikite göstermiştir [111-113].



Şekil 2.36. Naftopidil ve Bileşik 32-34

Kazandıkları bu nosyondan hareketle aynı araştırma grubu, 2018 ve 2019 yıllarında da iki yeni çalışma daha yayınlayarak, literatüre bu anlamda katkı sağlamaya devam etmişlerdir [114, 115]. Bu çalışmaların ilkinde estron-piperazin hibrit türevler, diğerinde arilpiperazin türevler sentezlenmiş; önceki çalışmalardan farklı olarak prostat kanseri hücre hatlarıyla yapılan in vitro çalışmaların akabinde aktif bileşiklerin androjen reseptörü (AR) antagonizmaları incelenmiştir. Örneğin estron-piperazin hibrit serisinin en aktif bileşiklerinden biri olan Bileşik 35 ($a_{1B}/a_{1A} = 14,7$) iyi bir a_1 -AR alt tipi seçiciliği göstermiştir. Benzer şekilde diğer serinin aktif bileşiklerinden Bileşik 36 ise reseptöre bağlanma afinitesi ($IC_{50} = 1,15 \mu M$) ve antagonistik aktivite (%67,1 inhibisyon) anlamında diğer bileşiklere göre daha fazla öne çıkmıştır.



Şekil 2.37. Piperazin türevleri Bileşik 35 ve 36

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kimyasal Çalışmalar

3.1.1. Gereçler

Sentez çalışmalarında kullanılan çözücüler analitik saflıktadır. Kullanılan kimyasallar Sigma-Aldrich & Merck (Almanya) ve ABCR (Almanya)'dan temin edildi. Kuru ortamda gerçekleştirilen deneyler için çözücü olarak kullanılan THF, Na/benzofenon kullanılarak distillendi.

Mikrodalga sentez reaktörü

Mikrodalga şartlarında gerçekleştirilen reaksiyonlar için, Biotage® Initiator+ Mikrodalga Sentez Sistemi ve uygun mikrodalga vialleri (0,5-2 ml, 2-5 ml ve 10-20 ml) kullanıldı. Reaksiyonlarda uygun ısı ve koşullarda, çözücü olarak; DMF ve asetronitril tercih edildi.

İnce tabaka kromatografisi (İTK) ile yapılan kontroller

Kimyasal sentez çalışmalarında ve bileşiklerin saflık kontrollerinde Silikajel GF254 (Merck) hazır plaklar kullanıldı. Çözücü sistemi olarak; hekzan:etil asetat (60:40), diklorometan:etil asetat (80:20) ve diklorometan:metanol (96:4) tercih edildi. Lekelerin belirlenmesinde ultraviyole (UV)ışığından (254 ve 280 nm), dragendorf ve demir (III) klorür belirteçlerinden yararlanıldı.

Flash kromatografi

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

3.1.2. Genel sentez yöntemleri

Yöntem 1: Diketoester türevi bileşiklerin genel sentez yöntemi (Bileşik 1, Bileşik 21a-c, Bileşik 27)

Sodyum (80 mmol) ve susuz etanol ile azot atmosferi altında hazırlanan sodyum etoksit çözeltisi üzerine ilgili asetofenon türevi (20 mmol) ve dietil oksalat (60 mmol) 0°C'de eklendi. 5 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Çökelek süzülerek etanol ve eterle yıkandı. Elde edilen sodyum enolat suya alınarak derişik hidroklorik asit çözeltisi ile asitlendirildi. Oluşan çökelek vakum altında süzüldü ve kurutuldu. (Bileşik 27 için asetofenon:dietil oksalat:sodyum oranı 1:3,5:4,5'tir).

Yöntem 2: İzoksazol ester türevi bileşiklerin genel sentez yöntemleri (Bileşik 2, Bileşik 22a-d, Bileşik 28)

Yöntem 2a: Yöntem 1 ile sentezlenmiş ilgili diketoester türevi bileşik (19,3 mmol) ve hidroksilamin hidroklorür (24 mmol), etanol içinde 4 saat geri çeviren soğutucu altında ısıtıldı. Süre sonunda reaksiyon ortamı soğutulduğunda oluşan çökelek vakum altında süzüldü ve kurutuldu (Bileşik 2, Bileşik 22a-c, Bileşik 28).

Yöntem 2b: Etil 5-(2-floro-4-metoksifenil)izoksazol-3-karboksilat (Bileşik 28; 0,56 mmol), azot atmosferi altında diklorometan içerisinde çözöldü ve buz banyosunda karıştırılmaya başlandı. Daha sonra BBr₃ (1,69 mmol) ilave edildi. 5 saat boyunca karıştırıldı. 5 saatin sonunda reaksiyon ortamına 2 ml etanol ilave edilerek ortamdaki BBr₃'ün fazlası etkisiz hale getirildi. Daha sonra reaksiyon ortamına su eklendi ve diklorometan (2x50 ml) ile ekstre edildi, organik faz su (2x50 ml) ile yıkandı. Susuz Na₂SO₄ ile kurutulduktan sonra kuruluğa kadar uçuruldu (Bileşik 22d).

Yöntem 3: Alkol türevi ara başlangıç maddelerinin genel sentez yöntemi (Bileşik 3, Bileşik 23a-d)

Yöntem 2 ile sentez edilmiş ilgili izoksazol ester türevi (2,43 mmol), THF (distillenmiş) içerisinde oda sıcaklığında azot atmosferi altında çözöldü. Üzerine LiAlH₄ (4,13 mmol) porsiyonlar halinde eklendi. 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı.

Reaksiyon ortamına NH_4Cl eklendi ve etil asetat (3x100 ml) ile ekstre edildi, organik faz su (3x100 ml) ile yıkandı. Susuz Na_2SO_4 ile kurutulduktan sonra kuruluğa kadar uçuruldu. Uygun çözücüler ile kristallendirilerek saflaştırıldı.

Yöntem 4: Alkilasyon reaksiyonu ile elde edilen alkol türevi ara başlangıç maddelerinin genel sentez yöntemi (Bileşik 4a-s, Bileşik 24a-d)

Yöntem 3 ile sentez edilmiş ilgili alkol türevi (1,56 mmol), ilgili benzil bromür veya benzil klorür türevi (2,03 mmol) ve K_2CO_3 (2,66 mmol) mikrodalga viali içerisine alınıp üzerine asetonitril eklendi. (Benzil klorür türevleri kullanıldığında solvan olarak DMF kullanıldı). Reaksiyon, 120°C 'de (solvan DMF ise 80°C 'de) 20 dakika mikrodalga şartlarında yürütüldü. Reaksiyon içeriği suya alındı. Oluşan çökelek vakum altında süzüldü, hekzan:etilasetat karışımından kristallendirilerek saflaştırıldı.

Yöntem 5: Halojenür türevi ara başlangıç maddelerinin genel sentez yöntemleri (Bileşik 5a-s, Bileşik 25a-d)

Yöntem 5a: Yöntem 4 ile sentezlenmiş ilgili alkol türevi (0,47 mmol) ve CBr_4 (0,56 mmol) DCM içerisinde buz banyosunda karıştırılmaya başlandı. Üzerine PPh_3 (0,70 mmol) porsiyonlar halinde eklendi. Açık sarı renkte bir çözelti oluştu. 1,5 saatin sonunda reaksiyon tamamlandı. Diklorometan uçuruldu ve elde edilen ham ürün, hekzan:etil asetat (60:40) solvan sistemi kullanılarak otomatik flash kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı (Bileşik 5a-s, Bileşik 25c-d).

Yöntem 5b: Yöntem 4 ile sentezlenmiş ilgili alkol türevi (1,26 mmol), DCM içerisinde oda sıcaklığında azot atmosferi altında çözüldü. Üzerine SOCl_2 (5,04 mmol) ve katalitik miktarda DMF ilave edildi. Bir gece boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Reaksiyon ortamı buzlu su içerisine alınıp, NaHCO_3 ile nötralize edildiğinde oluşan çökelek vakum altında süzüldü ve kurutuldu (Bileşik 25a-b).

Yöntem 6: 3,5-Disübstitüe izoksazol türevi final bileşiklerin genel sentez yöntemi (Bileşik 6a-s, Bileşik 7-20, Bileşik 26a-d, Bileşik 29-30)

İlgili 3-(bromometil)-5-fenilizoksazol türevi (0,30 mmol), uygun amin türevi (0,37 mmol) ve diizopropiletil amin (0,61 mmol) mikrodalga vialine alınarak DMF içerisinde 80°C'de 15 dakika mikrodalga reaktöründe ısıtıldı. Deney içeriği buzlu suya alınıp, madde çöktürüldü. Çöken madde vakum altında süzüldü. Madde sabit faz olarak hazır RediSep Silika kolonları (12g), hareketli faz olarak diklorometan:metanol (90:10) kullanılarak otomatik flash kolon kromatografisi ile saflaştırıldı ve metanolden kristallendirildi.

3.2. Analitik Çalışmalar

3.2.1. Erime derecesi tayini

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

3.2.2. ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları

Sentezlenen final ürünlerin ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları CDCl₃, DMSO-d₆ içindeki çözeltileri ile Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda tetrametilsilan iç standartı ile Varian Mercury 400 Digital FT-NMR Spektrometresi'nde ¹H-NMR spektrumu için 400 MHz, ¹³C-NMR spektrumu için 100 MHz frekansta alındı. Farklı olarak, final bileşiklerden 26a ve 26c'nin ¹³C-NMR spektrumları Eskişehir Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde Bruker Ultrashield 300 MHz Sıvı NMR Spektrometresi'nde ¹H-NMR spektrumu için 300 MHz frekansta alındı.

Sentezlenen ara ürünlerin ¹H-NMR spektrumları ise; CDCl₃, DMSO-d₆ içindeki çözeltileri ile Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Merkez Laboratuvarı'nda Bruker Ultrashield 300 MHz Sıvı NMR Spektrometresi'nde ¹H-NMR spektrumu için 300 MHz frekansta alındı.

Kimyasal kayma değerleri ppm (δ) skalasında deęerlendirildi. Eęleme sabitleri ise Hertz (Hz) olarak verildi.

3.2.3. HRMS spektrumları

Sentezlenen bileğiklerin HRMS spektrumları metanol içerisindeki çözeltilerinden pozitif iyon (ESI+) ve negatif iyon (ESI-) elektrosprey iyonizasyon teknikleri ile Waters LCT Premier XE UPLC/MS-TOF sistemi ile MassLynx 4.1 yazılımı kullanılarak alındı. Sabit faz olarak Aquity BEH C18 kolon (2,1 *100 mm 1,7 μ M, akış hızı: 0,3 ml/dakika) hareketli faz olarak formik asit içeren (%0,1) CH₃CN:H₂O (%1-%90) gradient çözücü sistemi kullanıldı.

3.3. Biyolojik Çalışmalar

Sentezlenen bileşiklerin biyolojik aktivite çalışmaları Orta Doğu Teknik Üniversitesi'nde Prof. Dr. Rengül Çetin-Atalay danışmanlığındaki araştırma ekibi tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. Hücre kültürü

Hepatoselüler karsinoma (HSK) hücre hatları Huh7 ve Mahlavu; meme kanseri hücre hattı MCF7, içerisinde %10 FBS, 0,1 mM NEAA ve 100 birim/mL penisilin ve streptomisin bulunan Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM; Gibco) besiyerinde 37°C, %5 CO₂ hücre inkübatörü içerisinde büyütülmüştür.

3.3.2. NCI-60 SRB (Sulforadamin B) ile sitotoksosite tayini

96 kuyulu hücre kültür plağına her bir hücre belirlenen sayılarda (Huh7 ve MCF7 2500; Mahlavu 1000 hücre/kuyucuk) ekilmiştir. 24 saat sonra hücrelere her bir bileşik 40 µM; 20 µM; 10 µM; 5 µM; 2,5 µM konsantrasyonlarında verilmiş ve her bileşiğin her bir farklı dozu 3 kez tekrarlanmıştır. 72 saat inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra hücreler 1XPBS ile bir kere yıkanıp fiksasyonu için %10 TCA (trikloroasetik asit) kullanılmıştır. 1 saat +4°C'de bekletildikten sonra distile su ile en az 3 kere yıkanan hücreler kurutulduktan sonra, boyanmaları için gereken miktarda SRB (0,04 g/10 mL, Sigma-Aldrich) %1 asetik asitte çözülüp her kuyucuğa 50 µl eklenmiştir. Hücreler karanlıkta oda sıcaklığında 10 dk bekletildikten sonra fazla boyayı hücrelerin üzerinden kaldırmak amacıyla kuyular %1 asetik asit ile birkaç defa yıkanmıştır. SRB boyasının yoğunluğunun (protein yoğunluğu) okunması için kuyuların üzerine 100 µl, 10 mM TBS (trizma baz) eklenmiştir. OD (optik dansite) okuyucu (BioTek, ELx800) cihazında 515 nm dalga boyunda gerçekleştirilen okutmalar sonrasında bileşiklerin etkilerini incelemek için elde edilen değerler $(1 - (\text{inhibitör eklenen kuyucuktaki hücrelerin absorbanansı} \times 100) / (\text{DMSO eklenen kontrol hücrelerinin absorbanansı}))$ formülüne göre hücre ölümü yüzdesine çevrilmiş, doz yanıt eğrileri yardımıyla IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır [116].

3.3.3. Gerçek zamanlı hücre analizi (RT-CES, xCELLigence)

Huh7 karaciğer kanseri hücreleri 96 kuyucuklu RT-CES tabağına 2500 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. RT-CES sistemi ile hücrelerin her 30 dakikada bir hücre indeksi değerleri takip edilmiştir. Hücreler büyüme fazına ulaştıklarında (log fazı) BRP29 ve Bileşik 26c farklı ilaç konsantrasyonlarında (10 μ M; 5 μ M; 2,5 μ M) muamele edilmiştir. Hücreler 120 saat boyunca gerçek zamanlı takip edilmiş ve elde edilen hücre indeks değerleri DMSO kontrol grubuna göre normalize edildikten sonra büyüme grafikleri elde edilmiştir [116].

3.3.4. Hoechst floresan boyama ile hücre ölümü tespiti

Seçilen bileşikler ile 72 saat boyunca IC_{50} konsantrasyonu ile muamele edilen Huh7 hücreleri üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra 2 kere 1XPBS (soğuk) ile yıkanmış, %100 soğuk metanol ile 10 dk boyunca fikse edilmiştir. Tekrar soğuk 1xPBS ile yıkanan hücrelerin üzerilerine 1XPBS’de hazırlanmış 1 μ g/ml Hoechst boyası (#33258, Sigma) eklenmiş ve 10 dk boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Fazla boyadan kurtulmak için hücreler 1XPBS ile 5 dk oda sıcaklığında yıkanmıştır. Boyanan hücreleri görüntülemek amacıyla floresan mikroskopta (Nikon Eclipse 55i) mavi filtre (340-380 nm) kullanılmıştır [116].

3.3.5. Western Blot analizi

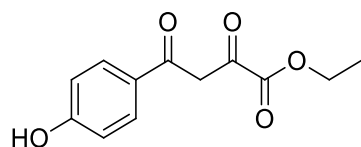
Seçilen bileşikler ile IC_{50} konsantrasyonunda muamele edilen Huh7 hücreleri 72 saat sonrasında (ölü ve canlı) toplanmış elde edilen pelletler lizis solüsyonu (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH=7,6; %1 NP40, %0,1 SDS, 1xProtease inhibitör kokteyl ve 1x PhosStop) ile 30 dk boyunca vortekslenerek buzda parçalanmıştır. 13200 rpm’de 30 dk santrifüj edilip elde edilen hücre lizatlarındaki protein miktarlarının belirlenmesi için Bradford protein assay uygulanmıştır. Standart eğri elde etmek için bilinen dozlarda BSA (albumin) referans olarak Bradford ile spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Her örnek aynı şekilde Bradford ile ölçülerek BSA ile elde edilen standart eğri formülüne göre protein miktarları hesaplanmıştır. Western blot için 20-40 μ g protein kullanılmıştır. Proteinler 95°C’de 5 dk bekletilerek denatüre edildikten hemen sonra %12 veya

%10 TGX hazır jellerinde (Bio-Rad) Mini-PROTEAN® Tetra Hücre Sistemleri için üretici protokolü takip edilerek protein elektroforezleri gerçekleştirilmiştir. Transfer işlemi de Trans Blot Turbo Transfer Sistemi (Bio-Rad) ile gerçekleştirilmiştir. Proteinler PVDF membrana transfer edilmiş ve bloklamaya yapılmıştır. Bloklama solüsyonunda (%5 süt tozu 1xTBS-T(0.1%tween)) +4°C`de gece boyunca bırakılan membranlar daha sonra, oda sıcaklığında 1 ya da 2 saat primer antikor ile inkübe edilip 30 dk boyunca bağlanmayan antikorlar 1xTBS-T(0.1%tween) ile yıkanmıştır. Ardından ikinci antikor 1 saat boyunca oda sıcaklığında membrana uygulanmıştır. 30 dk yıkamadan sonra ECL-Plus ile proteinler C-Digit görüntüleme sistemi (LI-COR) ile görüntülenmiştir. Bir diğer kısım proteinler LF-PVDF membrana transfer edilmiş ve Odyssey bloklama solusyonu (TBS) kullanılarak bloklamaya yapılmıştır. Oda sıcaklığında 1 saat bloklama için tutulan membranlar daha sonra, gece boyunca +4°C`de primer antikor ile inkübe edilip 30 dk boyunca bağlanmayan antikorlar 1xTBS-T (0.1%tween) ile yıkanmıştır. Ardından ikinci antikor 1 saat boyunca oda sıcaklığında karanlık bir ortamda membrana uygulanmıştır. 30 dk yıkamadan sonra proteinler Odyssey CLx-LI-COR görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir. Kullanılan primer antikorlar; PARP (#9532S, Cell Signaling), , p53 (#05-224, Millipore), fosfo-Akt Ser473 (Cell Signaling, #9271), AKT (#9272, Cell Signaling), Kesilmiş Kaspaz 3 (#9661, Cell signaling), fosfo-ERK (sc16982, Santa Cruz), ve ERK (sc-135900, Santa Cruz) 1:100 ile 1:500 oranlarında ve eşit yükleme kontrolü olarak β -aktin (#A5441, Sigma) 1:1000 oranında ve ikincil antikor olarak 1:20000 oranında (IRDye 680RD Goat Anti Mouse (Li-cor, # 92668070), IRDye-800CW Goat Anti Rabbit (Licor, # 926-32211)).

4. BULGULAR

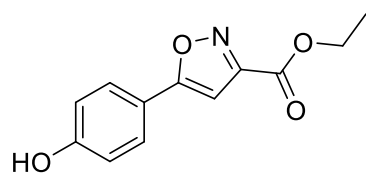
4.1. Kimyasal Bulgular

Etil 4-(4-hidroksifenil)-2,4-dioksobütanoat (Bileşik 1)



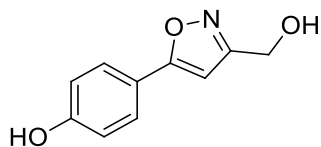
4-Hidroksi asetofenondan hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 1'e göre sentezlendi (Verim: % 96,3). CAS: 39974-01-1. Erime derecesi: 148,0-149,7 °C [Lit. E.D: 150-152 °C]^[117]. C₁₂H₁₃O₅ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 237,0763; bulunan: 237,0767.

Etil 5-(4-hidroksifenil)izoksazol-3-karboksilat (Bileşik 2)



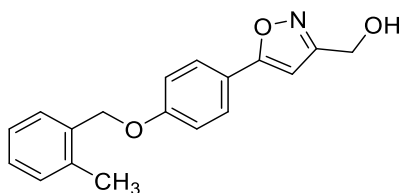
Etil 4-(4-hidroksifenil)-2,4-dioksobütanoat (Bileşik 1)'tan hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 2a'ya göre sentezlendi (Verim: % 89,3). CAS: 1352896-92-4. Erime derecesi: 180,3-181,4 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO-d₆): δ 1.44 (3H, t, J = 7.0 Hz), 4.47 (2H, q, J = 7.0 Hz), 5.29 (1H, s), 6.80 (1H, s), 6.94 (2H, d, J = 9.0 Hz), 7.71 (2H, d, J = 9.0 Hz). C₁₂H₁₂NO₄ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 234,0766; bulunan: 234,0772.

4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenol (Bileşik 3)



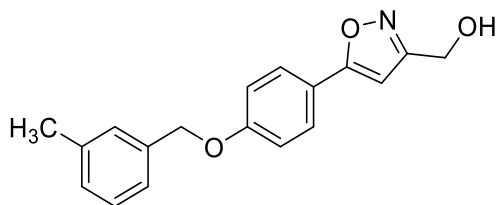
Etil 5-(4-hidroksifenil)izoksazol-3-karboksilat (Bileşik 2)'tan hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 3'e göre sentezlendi (Verim: % 90,2). CAS: 2091378-04-8. Erime derecesi: 207,7-209,1 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO-d₆): δ 4.51 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 5.49 (1H, t, *J* = 6.0 Hz), 6.75 (1H, s), 6.88 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.68 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 10.04 (1H, s). C₁₀H₁₀NO₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 192,0661; bulunan: 192,0663.

(5-(4-((2-Metilbenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metanol (Bileşik 4a)



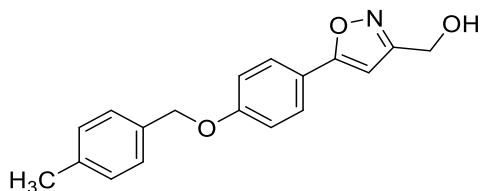
4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenol (Bileşik 3) ve 2-metilbenzil bromürden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi (Verim: % 67). Erime derecesi: 116,4-117,7 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 2.12 (1H, yayvan s), 2.39 (3H, s), 4.80 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 5.09 (2H, s), 6.47 (1H, s), 7.06 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.23-7.28 (3H, m), 7.40 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.72 (2H, d, *J* = 9.0 Hz). C₁₈H₁₈NO₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 296,1287; bulunan: 296,1287.

(5-(4-((3-Metilbenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metanol (Bileşik 4b)



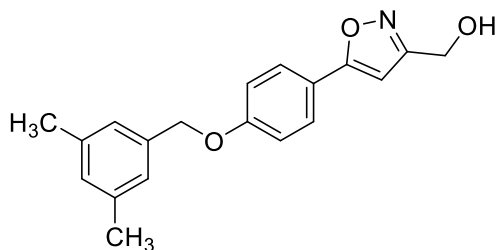
4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenol (Bileşik 3) ve 3-metilbenzil bromürden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi (Verim: % 77,1). Erime derecesi: 125,5-126,3 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 2.02 (1H, t, J = 6.0 Hz), 2.38 (3H, s), 4.80 (2H, d, J = 6.0 Hz), 5.08 (2H, s), 6.46 (1H, s), 7.05 (2H, d, J = 7.5 Hz), 7.15-7.32 (4H, m), 7.71 (2H, d, J = 7.5 Hz). C₁₈H₁₈NO₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 296,1287; bulunan: 296,1288.

(5-(4-((4-Metilbenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metanol (Bileşik 4c)



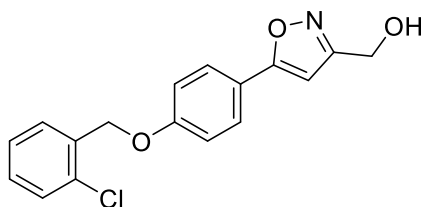
4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenol (Bileşik 3) ve 4-metilbenzil bromürden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi (Verim % 71.) Erime derecesi: 150,5-152,3 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 2.07 (1H, t, J = 6.0 Hz), 2.37 (3H, s), 4.80 (2H, d, J = 6.0 Hz), 5.07 (2H, s), 6.45 (1H, s), 7.03 (2H, d, J = 9.0 Hz), 7.20 (2H, d, J = 9.0 Hz), 7.32 (2H, d, J = 9.0 Hz), 7.70 (2H, d, J = 6.0 Hz). C₁₈H₁₈NO₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 296,1287; bulunan: 296,1288.

(5-(4-((3,5-Dimetilbenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metanol (Bileşik 4d)



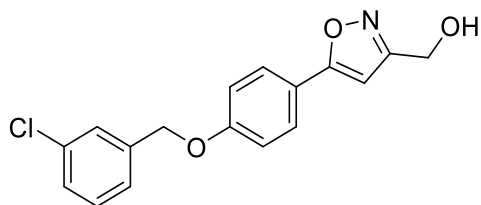
4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenol (Bileşik 3) ve 3,5-dimetilbenzil bromürden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi (Verim: % 77,8). Erime derecesi: 127,6-128,7 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 2.16 (1H, t, *J* = 6.0 Hz), 2.34 (6H, s), 4.79 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 5.03 (2H, s), 6.45 (1H, s), 6.98 (1H, s), 7.02-7.07 (4H, m), 7.70 (2H, d, *J* = 9.0 Hz). C₁₉H₂₀NO₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 310,1443; bulunan: 310,1437.

(5-(4-((2-Klorobenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metanol (Bileşik 4e)



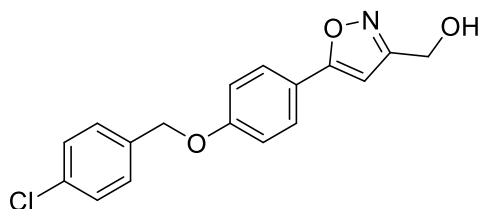
4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenol (Bileşik 3) ve 2-klorobenzil bromürden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi (Verim: % 95). Erime derecesi: 112,3-113,4 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 2.40 (1H, yayvan s), 4.80 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 5.22 (2H, s), 6.47 (1H, s), 7.05 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.28-7.33 (2H, m), 7.41-7.44 (1H, m), 7.53-7.56 (1H, m), 7.72 (2H, d, *J* = 9.0 Hz). C₁₇H₁₅ClNO₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 316,0740; bulunan: 316,0747.

(5-(4-((3-Klorobenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metanol (Bileşik 4f)



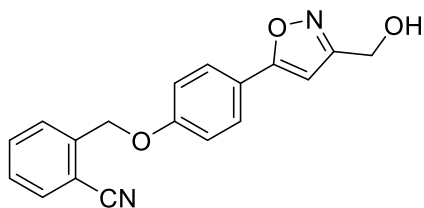
4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenol (Bileşik 3) ve 3-klorobenzil bromürden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi (Verim: % 71,4). Erime derecesi: 108,7-109,3 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 2.29 (1H, yayvan s), 4.80 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 5.09 (2H, s), 6.47 (1H, s), 7.03 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.31-7.33 (3H, m), 7.45 (1H, s), 7.71 (2H, d, *J* = 9.0 Hz). C₁₇H₁₅ClNO₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 316,0740; bulunan: 316,0738.

(5-(4-((4-Klorobenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metanol (Bileşik 4g)



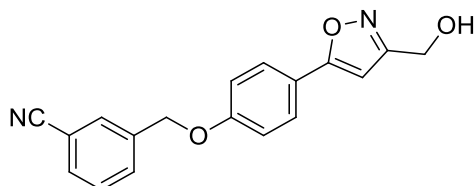
4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenol (Bileşik 3) ve 4-klorobenzil bromürden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi (Verim: % 85). Erime derecesi: 144,3-146,6 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 1.96 (1H, t, *J* = 6.0 Hz), 4.80 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 5.09 (2H, s), 6.47 (1H, s), 7.02 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.38 (4H, s), 7.71 (2H, d, *J* = 9.0 Hz). C₁₇H₁₅ClNO₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 316,0740; bulunan: 316,0736.

2-((4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 4h)



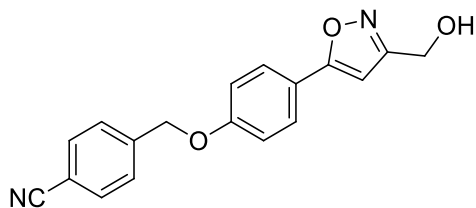
4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenol (Bileşik 3) ve 2-siyanobenzil bromürden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi (Verim: % 78,4). Erime derecesi: 138,7-139,1 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 2.09 (1H, yayvan s), 4.80 (2H, d, *J* = 3.0 Hz), 5.32 (2H, s), 6.48 (1H, s), 7.08 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.46 (1H, t, *J* = 7.5 Hz), 7.62-7.68 (3H, m), 7.73 (2H, d, *J* = 9.0 Hz). C₁₈H₁₅N₂O₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 307,1083; bulunan: 307,1082.

3-((4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 4i)



4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenol (Bileşik 3) ve 3-siyanobenzil bromürden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi (Verim: % 84,6). Erime derecesi: 145,2-146,9 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 2.06 (1H, t, *J* = 6.0 Hz), 4.81 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 5.15 (2H, s), 6.48 (1H, s), 7.03 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.52 (1H, t, *J* = 7.5 Hz), 7.63-7.69 (3H, m), 7.73 (2H, d, *J* = 9.0 Hz). C₁₈H₁₅N₂O₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 307,1083; bulunan: 307,1077.

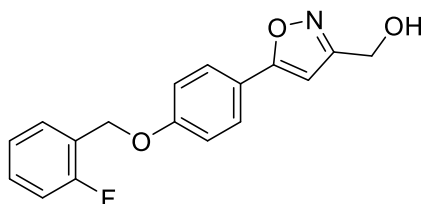
4-((4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 4j)



4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenol (Bileşik 3) ve 4-siyanobenzil bromürden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi (Verim: % 57).

Erime derecesi: 115,9-116,7 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 2.80 (1H, t, J = 6.0 Hz), 4.80 (2H, d, J = 6.0 Hz), 5.18 (2H, s), 6.48 (1H, s), 7.02 (2H, d, J = 9.0 Hz), 7.55 (2H, d, J = 9.0 Hz), 7.69-7.75 (4H, m). C₁₈H₁₅N₂O₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 307,1083; bulunan: 307,1086.

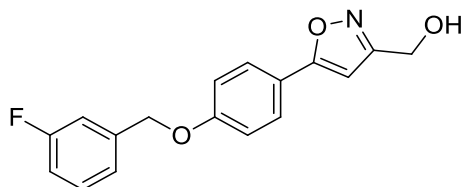
(5-(4-((2-Florobenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metanol (Bileşik 4k)



4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenol (Bileşik 3) ve 2-florobenzil bromürden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi (Verim: % 85).

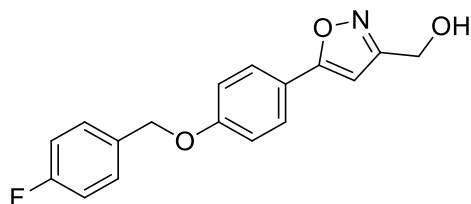
Erime derecesi: 106,3-107,2 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 2.13 (1H, yayvan s), 4.80 (2H, s), 5.19 (2H, s), 6.46 (1H, s), 7.06 (2H, d, J = 9.0 Hz), 7.10-7.21 (2H, m), 7.30-7.38 (1H, m), 7.48-7.53 (1H, m), 7.72 (2H, d, J = 9.0 Hz), C₁₇H₁₅FNO₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 300,1036; bulunan: 300,1032.

(5-(4-((3-Florobenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metanol (Bileşik 4l)



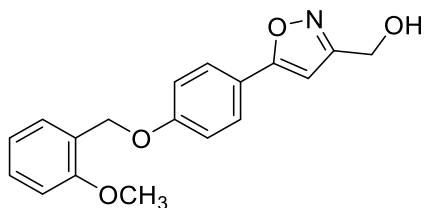
4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenol (Bileşik 3) ve 3-florobenzil bromürden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi (Verim: % 85,4). Erime derecesi: 120,6-122,3 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 2.22 (1H, t, J = 6.0 Hz), 4.80 (2H, d, J = 6.0 Hz), 5.11 (2H, s), 6.40 (1H, s), 7.00-7.06 (3H, m), 7.14-7.21 (2H, m), 7.33-7.40 (1H, m), 7.71 (2H, d, J = 6.0 Hz). C₁₇H₁₅FNO₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 300,1036; bulunan: 300,1036.

(5-(4-((4-Florobenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metanol (Bileşik 4m)



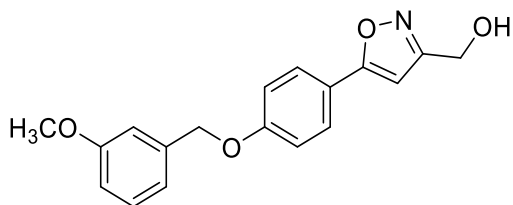
4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenol (Bileşik 3) ve 4-florobenzil bromürden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi (Verim: % 80,5). Erime derecesi: 132,7-133,5 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 2.36 (1H, t, J = 6.0 Hz), 4.79 (2H, d, J = 6.0 Hz), 5.07 (2H, s), 6.46 (1H, s), 7.02 (2H, d, J = 9.0 Hz), 7.09 (2H, d, J = 9.0 Hz), 7.41 (2H, d, J = 9.0 Hz), 7.70 (2H, d, J = 9.0 Hz). C₁₇H₁₅FNO₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 300,1036; bulunan: 300,1028.

(5-(4-((2-Metoksibenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metanol (Bileşik 4n)



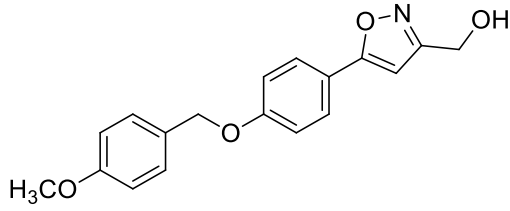
4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenol (Bileşik 3) ve 2-metoksibenzil klorürden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi (Verim: % 79). Erime derecesi: 115,9-117,2 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 2.14 (1H yayvan s), 3.88 (3H, s), 4.79 (2H, s), 5.17 (2H, s), 6.45 (1H, s), 6.91-7.01 (2H, m), 7.06 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.29-7.35 (1H, m), 7.42-7.46 (1H, m), 7.71 (2H, d, *J* = 9.0 Hz). C₁₈H₁₈NO₄ için; HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ hesaplanan: 312,1236; bulunan: 312,1232.

(5-(4-((3-Metoksibenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metanol (Bileşik 4o)



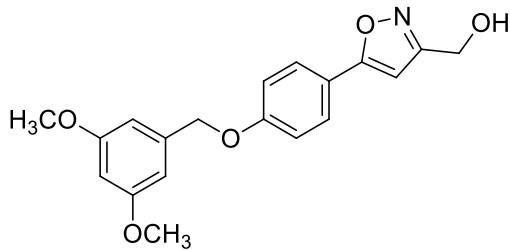
4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenol (Bileşik 3) ve 3-metoksibenzil bromürden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi (Verim: % 76). Erime derecesi: 100,1-101,7 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 2.02 (1H, t, *J* = 6.0 Hz), 3.83 (3H, s), 4.80 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 5.10 (2H, s), 6.46 (1H, s), 6.88 (1H, dd, *J* = 9.0 Hz, 3.0 Hz), 7.00 (2H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.05 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.32 (1H, t, *J* = 7.5 Hz), 7.70 (2H, d, *J* = 9.0 Hz). C₁₈H₁₈NO₄ için; HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ hesaplanan: 312,1236; bulunan: 312,1247.

(5-(4-((4-Metoksibenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metanol (Bileşik 4p)



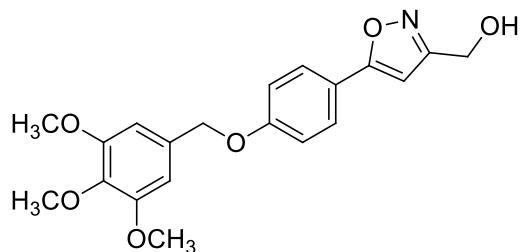
4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenol (Bileşik 3) ve 4-metoksibenzil klorürden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi (Verim: % 60). Erime derecesi: 153,6-155,0 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 2.11 (1H yayvan s), 3.82 (3H, s), 4.79 (2H, s), 5.04 (2H, s), 6.45 (1H, s), 6.93 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.03 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.36 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.71 (2H, d, *J* = 9.0 Hz). C₁₈H₁₈NO₄ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 312,1236; bulunan: 312,1235.

(5-(4-((3,5-Dimetoksibenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metanol (Bileşik 4r)



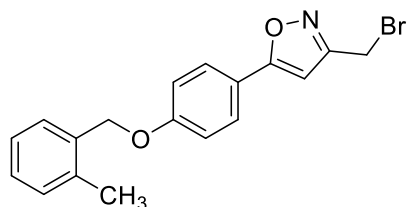
4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenol (Bileşik 3) ve 3,5-dimetoksibenzil bromürden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi (Verim: % 81). Erime derecesi: 131,4-133,5 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 2.02 (1H, t, *J* = 6.0 Hz), 3.80 (6H, s), 4.80 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 5.06 (2H, s), 6.42 (1H, t, *J* = 3.0 Hz), 6.46 (1H, s), 6.59 (2H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.03 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.71 (2H, d, *J* = 9.0 Hz). C₁₉H₂₀NO₅ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 342,1341; bulunan: 342,1331.

(5-(4-((3,4,5-Trimetoksibenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metanol (Bileşik 4s)



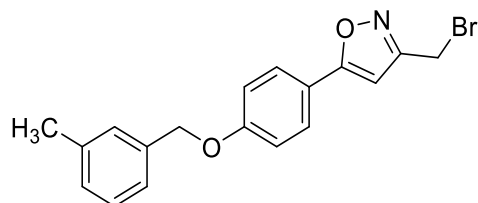
4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenol (Bileşik 3) ve 3,4,5-trimetoksibenzil klorürden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi (Verim: % 56). Erime derecesi: 96,7-98,6 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 2.15 (1H yayvan s), 3.86 (3H, s), 3.89 (6H, s), 4.80 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 5.04 (2H, s), 6.47 (1H, s), 6.66 (2H, s), 7.06 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.72 (2H, d, *J* = 9.0 Hz). C₂₀H₂₂NO₅ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 372,1447; bulunan: 372,1444.

3-(Bromometil)-5-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 5a)



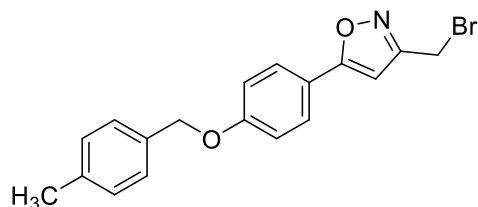
(5-(4-((2-Metilbenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metanol (Bileşik 4a)'den hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 85,4). Erime derecesi: 139,4-140,0 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 2.39 (3H, s), 4.45 (2H, s), 5.09 (2H, s), 6.49 (1H, s), 7.05 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.20-7.30 (3H, m), 7.40 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.72 (2H, d, *J* = 9.0 Hz). C₁₈H₁₇BrNO₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 358,0443; bulunan: 358,0440.

3-(Bromometil)-5-(4-((3-metilbenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 5b)



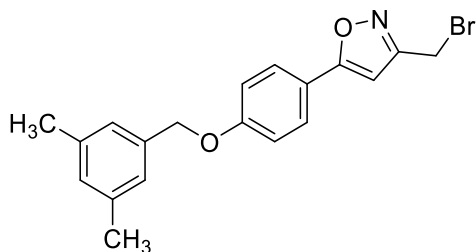
(5-(4-((3-Metilbenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metanol (Bileşik 4b)'den hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 95). Erime derecesi: 115,5-117,8 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 2.38 (3H, s), 4.45 (2H, s), 5.08 (2H, s), 6.48 (1H, s), 7.04 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.16 (1H, d, *J* = 6.0 Hz), 7.22-7.32 (3H, m), 7.70 (2H, d, *J* = 9.0 Hz). C₁₈H₁₇BrNO₂ için; HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ hesaplanan: 358,0443; bulunan: 358,0428.

3-(Bromometil)-5-(4-((4-metilbenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 5c)



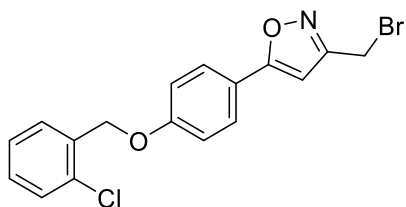
(5-(4-((4-Metilbenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metanol (Bileşik 4c)'den hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 82). Erime derecesi: 144,3-145,0 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 2.37 (3H, s), 4.45 (2H, s), 5.08 (2H, s), 6.48 (1H, s), 7.04 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.21 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 7.33 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 7.71 (2H, d, *J* = 9.0 Hz). C₁₈H₁₇BrNO₂ için; HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ hesaplanan: 358,0443; bulunan: 358,0444.

3-(Bromometil)-5-(4-((3,5-dimetilbenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 5d)



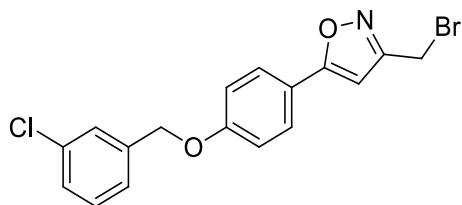
(5-(4-((3,5-Dimetilbenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metanol (Bileşik 4d)'den hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 91,5). Erime derecesi: 120,0-122,6 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 2.34 (6H, s), 4.45 (2H, s), 5.04 (2H, s), 6.48 (1H, s), 6.99 (1H, yayvan s), 7.02-7.07 (4H, m), 7.70 (2H, d, *J* = 9.0 Hz). C₁₉H₁₉BrNO₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 372,0599; bulunan: 372,0588.

3-(Bromometil)-5-(4-((2-klorobenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 5e)



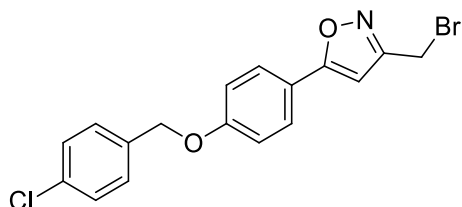
(5-(4-((2-Klorobenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metanol (Bileşik 4e)'den hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 82,4). Erime derecesi: 121,5-123,6 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 4.45 (2H, s), 5.23 (2H, s), 6.50 (1H, s), 7.06 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.28-7.34 (2H, m), 7.41-7.44 (1H, m), 7.53-7.56 (1H, m), 7.72 (2H, d, *J* = 9.0 Hz). C₁₇H₁₅BrClNO₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 377,9896; bulunan: 377,9913.

3-(Bromometil)-5-(4-((3-klorobenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 5f)



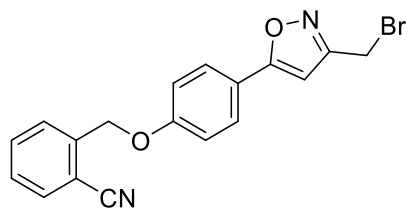
(5-(4-((3-Klorobenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metanol (Bileşik 4f)'den hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 82). Erime derecesi: 109,2-110,8°C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 4.45 (2H, s), 5.10 (2H, s), 6.50 (1H, s), 7.03 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.31-7.35 (3H, m), 7.44-7.45 (1H, m), 7.72 (2H, d, *J* = 9.0 Hz). C₁₇H₁₄BrClNO₂ için; HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ hesaplanan: 377,9896; bulunan: 377,9894.

3-(Bromometil)-5-(4-((4-klorobenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 5g)



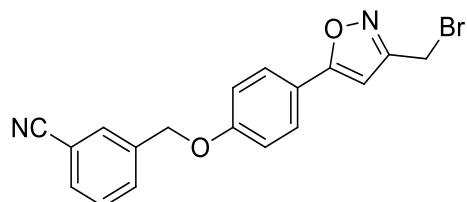
(5-(4-((4-Klorobenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metanol (Bileşik 4g)'den hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 76). Erime derecesi: 170,0-172,5 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 4.45 (2H, s), 5.09 (2H, s), 6.49 (1H, s), 7.02 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.37 (4H, s), 7.71 (2H, d, *J* = 9.0 Hz). C₁₇H₁₄BrClNO₂ için; HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ hesaplanan: 377,9896; bulunan: 377,9898.

2-((4-(3-(Bromometil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 5h)



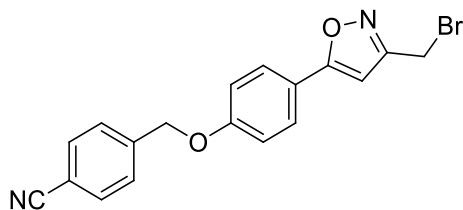
2-((4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 4h)'den hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 66). Erime derecesi: 171,3-172,0 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 4.46 (2H, s), 5.32 (2H, s), 6.51 (1H, s), 7.08 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.46 (1H, t, *J* = 7.5 Hz), 7.64 (1H, dd, *J* = 9.0 Hz, 3.0 Hz), 7.67-7.68 (1H, m), 7.75 (2H, d, *J* = 9.0 Hz). C₁₈H₁₄BrN₂O₂ için; HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ hesaplanan: 369,0239; bulunan: 369,0237.

3-((4-(3-(Bromometil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 5i)



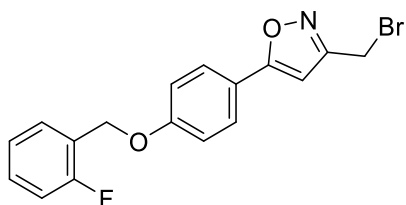
3-((4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 4i)'den hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 51,8). Erime derecesi: 155,4-155,7 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 4.46 (2H, s), 5.15 (2H, s), 6.51 (1H, s), 7.04 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.52 (1H, t, *J* = 7.5 Hz), 7.63-7.70 (2H, m), 7.71-7.76 (3H, m). C₁₈H₁₄BrN₂O₂ için; HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ hesaplanan: 369,0239; bulunan: 369,0238.

4-((4-(3-(Bromometil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 5j)



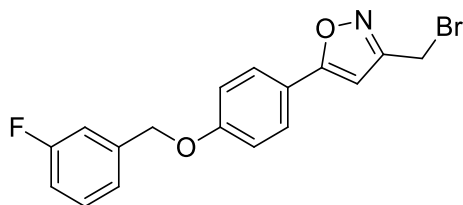
4-((4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 4j)'den hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 90,4). Erime derecesi: 157,6-158,6 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 4.45 (2H, s), 5.18 (2H, s), 6.51 (1H, s), 7.03 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.56 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 7.69-7.75 (4H, m). C₁₈H₁₄BrN₂O₂ için; HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ hesaplanan: 369,0239; bulunan: 369,0235.

3-(Bromometil)-5-(4-((2-florobenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 5k)



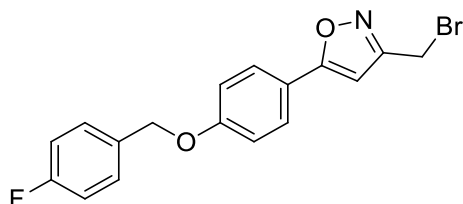
(5-(4-((2-Florobenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metanol (Bileşik 4k)'den hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 94,7). Erime derecesi: 106,1-107,7 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 4.45 (2H, s), 5.19 (2H, s), 6.49 (1H, s), 7.06 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.10-7.21 (2H, m), 7.30-7.38 (1H, m), 7.48-7.53 (1H, m), 7.72 (2H, d, *J* = 9.0 Hz). C₁₇H₁₄FBrN₂O₂ için; HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ hesaplanan: 362,0192; bulunan: 362,0197.

3-(Bromometil)-5-(4-((3-florobenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 5l)



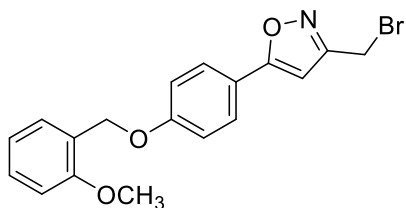
(5-(4-((3-Florobenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metanol (Bileşik 4l)'den hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 80). Erime derecesi: 113,4-114,4 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 4.45 (2H, s), 5.12 (2H, s), 6.49 (1H, s), 7.00-7.07 (3H, m), 7.14-7.22 (2H, m), 7.33-7.40 (1H, m), 7.71 (2H, d, *J* = 9.0 Hz). C₁₇H₁₄FBrN₂O₂ için; HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ hesaplanan: 362,0192; bulunan: 362,0199.

3-(Bromometil)-5-(4-((4-florobenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 5m)



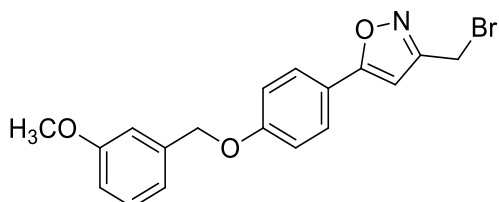
(5-(4-((4-Florobenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metanol (Bileşik 4m)'den hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 89,5). Erime derecesi: 122,5-123,8 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 4.45 (2H, s), 5.08 (2H, s), 6.49 (1H, s), 7.03 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.10 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.42 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.71 (2H, d, *J* = 9.0 Hz). C₁₇H₁₄FBrN₂O₂ için; HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ hesaplanan: 362,0192; bulunan: 362,0194.

3-(Bromometil)-5-(4-((2-metoksibenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 5n)



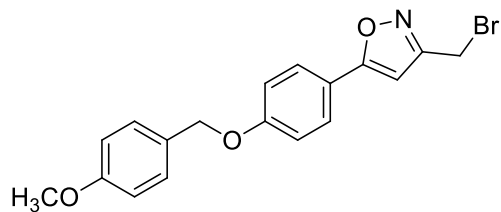
(5-(4-((2-Metoksibenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metanol (Bileşik 4n)'den hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 85,6). Erime derecesi: 119,0-119,9 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 3.88 (3H, s), 4.45 (2H, s), 5.17 (2H, s), 6.48 (1H, s), 6.91-7.01 (2H, m), 7.06 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.29-7.35 (1H, m), 7.42-7.46 (1H, m), 7.70 (2H, d, *J* = 9.0 Hz). C₁₈H₁₇BrNO₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 374,0392; bulunan: 374,0398.

3-(Bromometil)-5-(4-((3-metoksibenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 5o)



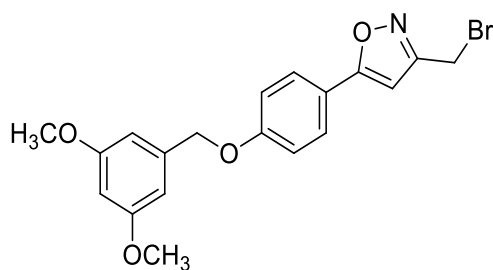
(5-(4-((3-Metoksibenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metanol (Bileşik 4o)'den hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 94,6). Erime derecesi: 105,7-107,9 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 3.82 (3H, s), 4.45 (2H, s), 5.10 (2H, s), 6.49 (1H, s), 6.86-6.90 (1H, m), 6.98-7.00 (1H, m), 7.04 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.31 (1H, t, *J* = 7.5 Hz), 7.71 (2H, d, *J* = 9.0 Hz) C₁₈H₁₇BrNO₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 374,0392; bulunan: 374,0398.

3-(Bromometil)-5-(4-((4-metoksibenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 5p)



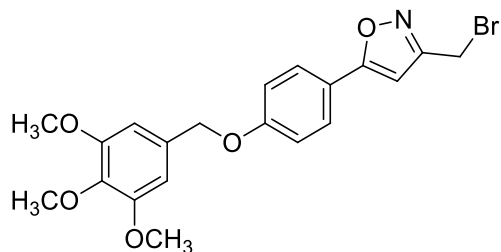
(5-(4-((4-Metoksibenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metanol (Bileşik 4p)'den hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 66). Erime derecesi: 141,8-142,9 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 3.82 (3H, s), 4.45 (2H, s), 5.04 (2H, s), 6.48 (1H, s), 6.92 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.04 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.36 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.71 (2H, d, *J* = 9.0 Hz). C₁₈H₁₇BrNO₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 374,0392; bulunan: 374,0397.

3-(Bromometil)-5-(4-((3,5-dimetoksibenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 5r)



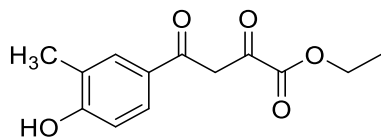
(5-(4-((3,5-Dimetoksibenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metanol (Bileşik 4r)'den hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 87). Erime derecesi: 129,1-130,3 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 3.80 (6H, s), 4.45 (2H, s), 5.06 (2H, s), 6.43 (1H, t, *J* = 3.0 Hz), 6.49 (1H, s), 6.59 (2H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.04 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.71 (2H, d, *J* = 9.0 Hz). C₁₉H₁₉BrNO₄ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 404,0497; bulunan: 404,0497.

3-(Bromometil)-5-(4-((3,4,5-trimetoksibenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 5s)



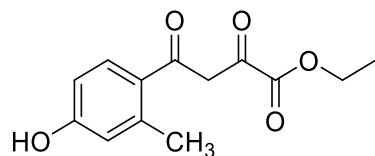
(5-(4-((3,4,5-Trimetoksibenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metanol (Bileşik 4s)'den hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 92). Erime derecesi: 137,1-138,4 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 3.86 (3H, s), 3.88 (6H, s), 4.45 (2H, s), 5.04 (2H, s), 6.50 (1H, s), 6.67 (2H, s), 7.06 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.73 (2H, d, *J* = 9.0 Hz). C₂₀H₂₁BrNO₅ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 434,0603; bulunan: 434,0600.

Etil 4-(4-hidroksi-3-metilfenil)-2,4-dioksobütanoat (Bileşik 21a)



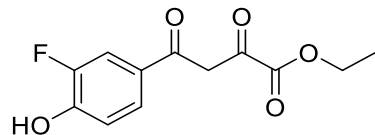
4-Hidroksi-3-metil asetofenondan hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 1'e göre sentezlendi (Verim: % 82,3). CAS: 1260804-82-7. Erime derecesi: 142,8-143,0 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 1.41 (3H, t, *J* = 7.5 Hz), 2.32 (3H, s), 4.41 (2H, q, *J* = 7.0 Hz), 5.69 (1H, yayvan s), 6.87 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.02 (1H, s), 7.79 (1H, dd, *J* = 9.0 Hz, 3.0 Hz), 7.83 (1H, s), 15.48 (1H, yayvan s). C₁₃H₁₅O₅ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 251,0919; bulunan: 251,0912.

Etil 4-(4-hidroksi-2-metilfenil)-2,4-dioksobütanoat (Bileşik 21b)

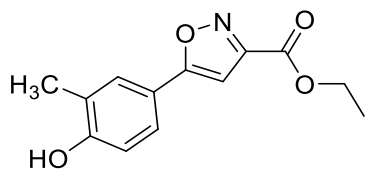


4-Hidroksi-2-metil asetofenondan hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 1'e göre sentezlendi (Verim: % 70,6). CAS: 1260784-99-3. Erime derecesi: 96,1-96,8 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 1.40 (3H, t, *J* = 7.5 Hz), 2.57 (3H, s), 4.39 (2H, q, *J* = 7.0 Hz), 5.38 (1H, yayvan s), 6.74 (1H, s), 6.76 (1H, s), 6.86 (1H, s), 7.65 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 15.30 (1H, yayvan s). C₁₃H₁₅O₅ için; HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ hesaplanan: 251,0919; bulunan: 251,0912.

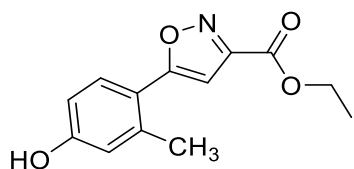
Etil 4-(3-floro-4-hidroksifenil)-2,4-dioksobütanoat (Bileşik 21c)



3-Floro-4-hidroksi asetofenondan hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 1'e göre sentezlendi (Verim: % 80). CAS: 1562210-70-1. Erime derecesi: 126,7-128,7 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 1.42 (3H, t, *J* = 7.5 Hz), 4.41 (2H, q, *J* = 7.0 Hz), 5.79 (1H, yayvan s), 6.99 (1H, s), 7.11 (1H, t, *J* = 9.0 Hz), 7.74-7.81 (2H, m), 15.23 (1H, yayvan s). C₁₂H₁₂FO₅ için; HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ hesaplanan: 255,0669; bulunan: 255,0666.

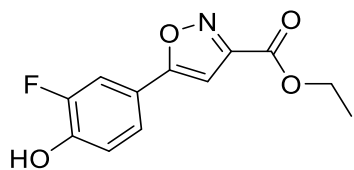
Etil 5-(4-hidroksi-3-metilfenil)izoksazol-3-karboksilat (Bileşik 22a)

Etil 4-(4-hidroksi-3-metilfenil)-2,4-dioksobütanoat (Bileşik 21a)'tan hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 2a'ya göre sentezlendi (Verim: % 92,3). CAS: 2115514-70-8. Erime derecesi: 184,4-185,5 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 1.44 (3H, t, J = 6.0 Hz), 2.32 (3H, s), 4.47 (2H, q, J = 6.0 Hz), 5.12 (1H, s), 6.79 (1H, s), 6.86 (1H, d, J = 9.0 Hz), 7.55 (1H, dd, J = 9.0 Hz, 3.0 Hz), 7.59 (1H, yayvan s). C₁₃H₁₄NO₄ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 248,0923; bulunan: 248,0910.

Etil 5-(4-hidroksi-2-metilfenil)izoksazol-3-karboksilat (Bileşik 22b)

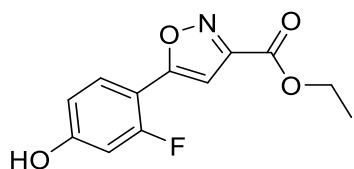
Etil 4-(4-hidroksi-2-metilfenil)-2,4-dioksobütanoat (Bileşik 21b)'tan hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 2a'ya göre sentezlendi (Verim: % 95). CAS: 2113489-68-0. Erime derecesi: 149,1-149,8 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 1.44 (3H, t, J = 6.0 Hz), 2.48 (3H, s), 4.48 (2H, q, J = 6.0 Hz), 5.38 (1H, yayvan s), 6.47 (1H, s), 6.78-6.82 (2H, m), 7.63-7.66 (1H, m). C₁₃H₁₄NO₄ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 248,0923; bulunan: 248,0919.

Etil 5-(3-Floro-4-hidroksifenil)izoksazol-3-karboksilat (Bileşik 22c)



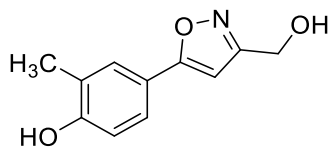
Etil 4-(3-floro-4-hidroksifenil)-2,4-dioksobütanoat (Bileşik 21c)'tan hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 2a'ya göre sentezlendi (Verim: % 86). CAS: 2116817-81-1. Erime derecesi: 173,9-174,5 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 1.44 (3H, t, *J* = 7.5 Hz), 4.47 (2H, q, *J* = 7.0 Hz), 5.53 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 6.82 (1H, s), 7.12 (1H, t, *J* = 9.0 Hz), 7.51 (1H, d, *J* = 6.0 Hz), 7.56 (1H, dd, *J* = 9.0 Hz, 3.0 Hz). C₁₂H₁₁FNO₄ için; HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ hesaplanan: 252,0672; bulunan: 252,0669.

Etil 5-(2-floro-4-hidroksifenil)izoksazol-3-karboksilat (Bileşik 22d)



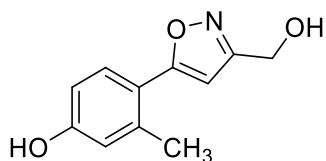
Etil 5-(2-floro-4-metoksifenil)izoksazol-3-karboksilat (Bileşik 28)'tan hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 2b'ye göre sentezlendi (Verim: % 87,3). CAS: 2122483-37-6. Erime derecesi: 161,0-161,9 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 1.44 (3H, t, *J* = 6.0 Hz), 4.47 (2H, q, *J* = 6.0 Hz), 5.80 (1H, yayvan s), 6.72-6.81 (2H, m), 6.98 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.86 (1H, t, *J* = 9.0 Hz). C₁₂H₁₁FNO₄ için; HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ hesaplanan: 252,0672; bulunan: 252,0669.

4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)-2-metilfenol (Bileşik 23a)



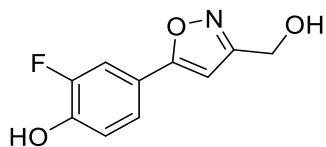
Etil 5-(4-hidroksi-3-metilfenil)izoksazol-3-karboksilat (Bileşik 22a)'tan hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 3'e göre sentezlendi (Verim: % 54). Erime derecesi: 168,5 °C (dekompoze). ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO-d₆): δ 2.18 (3H, s), 4.51 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 5.48 (1H, t, *J* = 6.0 Hz), 6.71 (1H, s), 6.88 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.51 (1H, dd, *J* = 9.0 Hz, 3.0 Hz), 7.59 (1H, s), 9.94 (1H, s). C₁₁H₁₂NO₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 206,0817; bulunan: 206,0810.

4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)-3-metilfenol (Bileşik 23b)



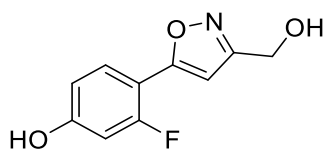
Etil 5-(4-hidroksi-2-metilfenil)izoksazol-3-karboksilat (Bileşik 22b)'tan hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 3'e göre sentezlendi (Verim: % 90). Erime derecesi: 173,1-174,8 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO-d₆): δ 2.38 (3H, s), 4.54 (2H, d, *J* = 3.0 Hz), 5.49 (1H, t, *J* = 6.0 Hz), 6.57 (1H, s), 6.72 (2H, s), 6.75 (1H, s), 9.91 (1H, s). C₁₁H₁₂NO₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 206,0817; bulunan: 206,0812.

2-Floro-4-(3-(hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenol (Bileşik 23c)



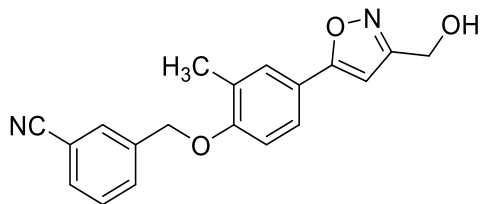
Etil 5-(3-Floro-4-hidroksifenil)izoksazol-3-karboksilat (Bileşik 22c)'tan hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 3'e göre sentezlendi (Verim: % 66,1). Erime derecesi: 178,4-179,0 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO-d₆): δ 4.52 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 5.52 (1H, t, *J* = 6.0 Hz), 6.86 (1H, s), 7.07 (1H, t, *J* = 9.0 Hz), 7.50-7.54 (1H, m), 7.68 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 10.53 (1H, s). C₁₀H₉FNO₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 210,0566; bulunan: 210,0565.

2-Floro-4-(3-(hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenol (Bileşik 23d)



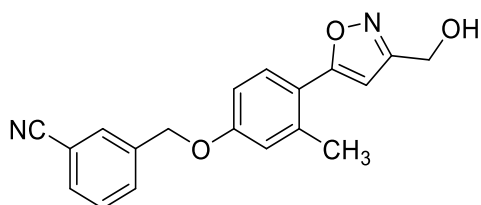
Etil 5-(2-floro-4-hidroksifenil)izoksazol-3-karboksilat (Bileşik 22d)'tan hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 3'e göre sentezlendi (Verim: % 71). Erime derecesi: 209,6-210,2 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, DMSO-d₆): δ 4.51 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 5.49 (1H, t, *J* = 6.0 Hz), 6.60 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 6.71-6.76 (2H, m), 7.70 (1H, t, *J* = 9.0 Hz), 10.55 (1H, s). C₁₀H₉FNO₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 210.0566, bulunan: 210.0569.

3-((4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)-2-metilfenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 24a)



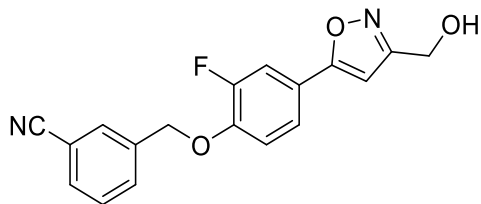
4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)-2-metilfenol (Bileşik 23a) ve 3-siyanobenzil bromürden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi (Verim: % 95). Erime derecesi: 131,8-132,2 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 2.18 (1H, t, J = 6.0 Hz), 2.34 (3H, s), 4.80 (2H, d, J = 6.0 Hz), 5.15 (2H, s), 6.47 (1H, s), 6.89 (1H, d, J = 9.0 Hz), 7.50-7.76 (6H, m). C₁₉H₁₇N₂O₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 321,1239; bulunan: 321,1238.

3-((4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)-3-metilfenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 24b)



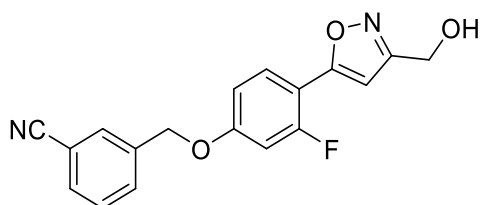
4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)-3-metilfenol (Bileşik 23b) ve 3-siyanobenzil bromürden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi (Verim: % 91). Erime derecesi: 140,0-141,8 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 1.98 (1H, t, J = 6.0 Hz), 2.50 (3H, s), 4.83 (2H, d, J = 6.0 Hz), 5.14 (2H, s), 6.41 (1H, s), 6.86-6.91 (2H, m), 7.52 (1H, t, J = 9.0 Hz), 7.66 (3H, t, J = 9.0 Hz), 7.76 (1H, yayvan s). C₁₉H₁₇N₂O₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 321,1239; bulunan: 321,1238.

3-((2-Floro-4-(3-(hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 24c)



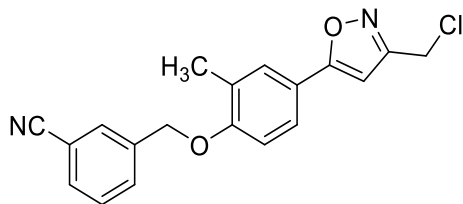
2-Floro-4-(3-(hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenol (Bileşik 23c) ve 3-siyanobenzil bromürden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi (Verim: % 84,2). Erime derecesi: 134,6-135,7 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 1.78 (1H, yayvan s), 4.80 (2H, s), 5.21 (2H, s), 6.50 (1H, s), 7.05 (1H, t, *J* = 9.0 Hz), 7.49-7.55 (3H, m), 7.63-7.71 (2H, m), 7.76 (1H, s). C₁₈H₁₅FN₂O₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 325,0988; bulunan: 325,0982.

3-((3-Floro-4-(3-(hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 24d)



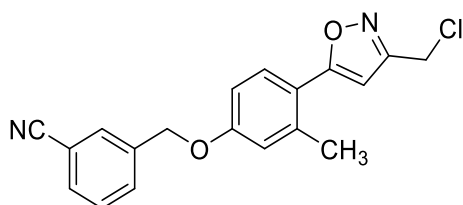
2-Floro-4-(3-(hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenol (Bileşik 23d) ve 3-siyanobenzil bromürden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 4'e göre sentezlendi (Verim: % 66). Erime derecesi: 143,6-145,8 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 2.03 (1H, t, *J* = 6.0 Hz), 4.83 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 5.14 (2H, s), 6.67 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 6.80 (1H, dd, *J* = 9.0 Hz, 3.0 Hz), 6.88 (1H, dd, *J* = 9.0 Hz, 3.0 Hz), 7.53 (1H, t, *J* = 7.5 Hz), 7.65-7.69 (2H, m), 7.75 (1H, s), 7.89 (1H, t, *J* = 9.0 Hz). C₁₈H₁₅FN₂O₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 325,0988; bulunan: 325,0986.

3-((4-(3-(Klorometil)izoksazol-5-il)-2-metilfenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 25a)



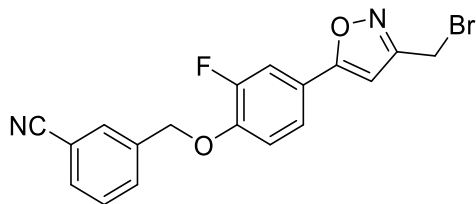
3-((4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)-2-metilfenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 24a)'den hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 5b'ye göre sentezlendi (Verim: % 82,3). Erime derecesi: 144,4-145,0 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 2.35 (3H, s), 4.62 (2H, s), 5.10 (2H, s), 6.52 (1H, s), 6.90 (1H, d, J = 9.0 Hz), 7.53 (1H, t, J = 7.5 Hz), 7.59-7.70 (4H, m), 7.76 (1H, s). C₁₉H₁₆ClN₂O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 339,0900; bulunan: 339,0892.

3-((4-(3-(Klorometil)izoksazol-5-il)-3-metilfenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 25b)



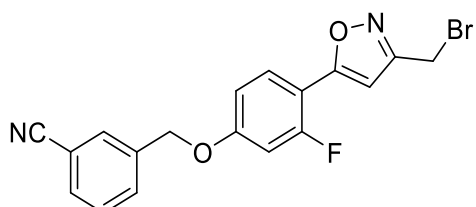
3-((4-(3-(Hidroksimetil)izoksazol-5-il)-3-metilfenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 24b)'den hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 5b'ye göre sentezlendi (Verim: % 92). Erime derecesi: 138,2-139,3 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 2.50 (3H, s), 4.65 (2H, s), 5.13 (2H, s), 6.45 (1H, s), 6.87 (1H, d, J = 3.0 Hz), 6.90 (2H, s), 7.52 (1H, t, J = 7.5 Hz), 7.66 (2H, t, J = 9.0 Hz), 7.76 (1H, s). C₁₉H₁₆ClN₂O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 339,0900; bulunan: 339,0899.

3-((4-(3-(Bromometil)izoksazol-5-il)-2-florofenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 25c)

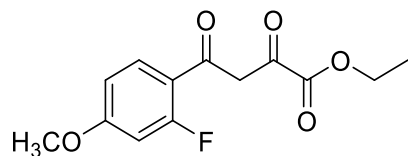


3-((2-Floro-4-(3-(hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 24c)'den hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 52). Erime derecesi: 164,3-165,7 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 4.45 (2H, s), 5.22 (2H, s), 6.53 (1H, s), 7.06 (1H, t, J = 9.0 Hz), 7.49-7.56 (3H, m), 7.64-7.72 (2H, m), 7.77 (1H, s). C₁₈H₁₃BrFN₂O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 387,0144; bulunan: 387,0146.

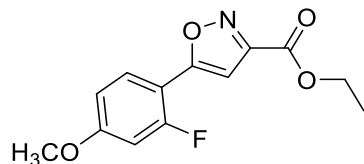
3-((4-(3-(Bromometil)izoksazol-5-il)-3-florofenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 25d)



3-((3-Floro-4-(3-(hidroksimetil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 24d)'den hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 5a'ya göre sentezlendi (Verim: % 89). Erime derecesi: 166,6-167,4 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 4.47 (2H, s), 5.14 (2H, s), 6.69 (1H, d, J = 6.0 Hz), 6.81 (1H, dd, J = 9.0 Hz, 3.0 Hz), 6.88 (1H, dd, J = 9.0 Hz, 3.0 Hz), 7.54 (1H, t, J = 7.5 Hz), 7.65-7.68 (2H, m), 7.75 (1H, s), 7.89 (1H, t, J = 7.5 Hz). C₁₈H₁₃BrFN₂O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 387,0144; bulunan: 387,0138.

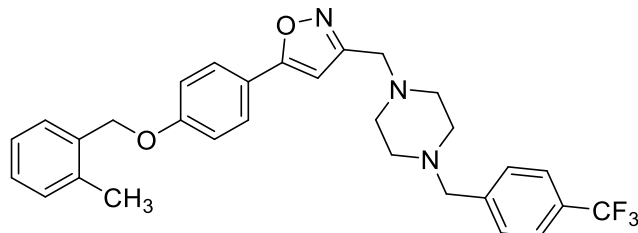
Etil 4-(2-floro-4-metoksifenil)-2,4-dioksobütanoat (Bileşik 27)

2-Floro-4-metoksi asetofenondan hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 1'e göre sentezlendi (Verim % 91,2). CAS: 1667751-32-7. Erime derecesi: 81,3-82,2 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 1.40 (3H, t, *J* = 7.5 Hz), 3.89 (3H, s), 4.39 (2H, q, *J* = 7.0 Hz), 6.65 (1H, dd, *J* = 9.0 Hz, 3.0 Hz), 6.81 (1H, dd, *J* = 9.0 Hz, 3.0 Hz), 7.09 (1H, s), 7.96 (1H, t, *J* = 9.0 Hz), 15.33 (1H, yayvan s). C₁₃H₁₄FO₅ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 269,0825; bulunan: 269,0820.

Etil 5-(2-floro-4-metoksifenil)izoksazol-3-karboksilat (Bileşik 28)

Etil 4-(2-floro-4-metoksifenil)-2,4-dioksobütanoat (Bileşik 27)'tan hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 2a'ya göre sentezlendi (Verim % 85,3). CAS: 1126636-60-9. Erime derecesi: 101,7-102,5 °C. ¹H-NMR Spektrumu (300 MHz, CDCl₃): δ 1.44 (3H, t, *J* = 7.5 Hz), 3.87 (3H, s), 4.47 (2H, q, *J* = 6.0 Hz), 6.75 (1H, dd, *J* = 12.0 Hz, 3.0 Hz), 6.83 (1H, dd, *J* = 9.0 Hz, 3.0 Hz), 6.98 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.89 (1H, t, *J* = 9.0 Hz). C₁₃H₁₃FNO₄ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 266,0829; bulunan: 266,0836.

5-(4-((2-Metilbenzil)oksi)fenil)-3-((4-(4-(triflorometil)benzil)piperazin-1-il)metil)izoksazol (Bileşik 6a)



3-(Bromometil)-5-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 5a) ve 4-(triflorometil)benzil piperazinden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: % 49).

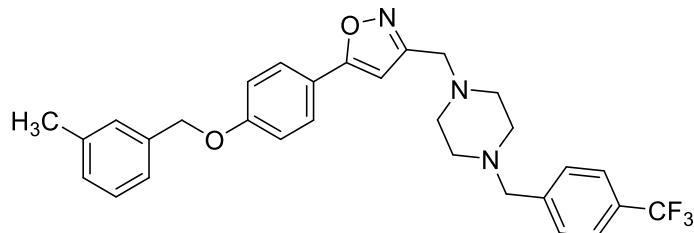
Erime derecesi: 124,6-126,2 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 2.38 (3H, s), 2.50 (4H, yayvan s), 2.57 (4H, yayvan s), 3.56 (2H, s), 3.64 (2H, s), 5.08 (2H, s), 6.43 (1H, s), 7.05 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.22-7.27 (3H, m), 7.39-7.45 (3H, m), 7.56 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.71 (2H, d, J = 8.6 Hz).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 18.90, 52.98, 53.08, 53.40, 62.36, 68.74, 98.32, 115.19, 120.61, 124.25 (q, ¹J_{C-F} = 269,9 Hz), 125.16 (q, ³J_{C-F} = 3.8 Hz), 126.11, 127.41, 128.50, 128.63, 129.18, 129.34 (q, ²J_{C-F} = 31.5 Hz), 130.52, 134.23, 136.71, 142.46, 160.34, 161.77, 169.88.

C₃₀H₃₁F₃N₃O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 522,2368; bulunan: 522,2374.

5-(4-((3-Metilbenzil)oksi)fenil)-3-((4-(4-(triflorometil)benzil)piperazin-1-il)metil)izoksazol (Bileşik 6b)



3-(Bromometil)-5-(4-((3-metilbenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 5b) ve 4-(triflorometil)benzil piperazinden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: % 74,5).

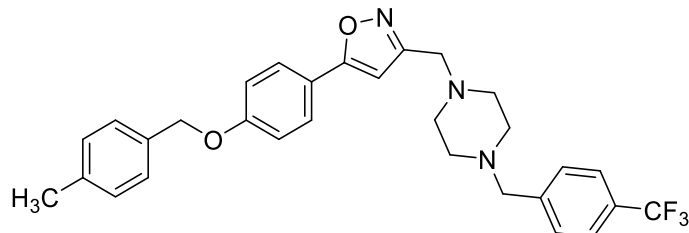
Erime derecesi: 131,5-133,4 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 2.38 (3H, s), 2.50 (4H, yayvan s), 2.57 (4H, yayvan s), 3.56 (2H, s), 3.63 (2H, s), 5.07 (2H, s), 6.43 (1H, s), 7.03 (2H, d, *J* = 9.2 Hz), 7.15 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.22-7.31 (3H, m), 7.43 (2H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.56 (2H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.70 (2H, d, *J* = 9.2 Hz).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 21.41, 52.98, 53.07, 53.39, 62.35, 70.18, 98.29, 115.26, 150.55, 124.25 (q, ¹*J*_{C-F} = 269.8 Hz), 124.58, 125.15 (q, ³*J*_{C-F} = 3.8 Hz), 127.37, 128.22, 128.58, 128.95, 129.18, 129.33 (q, ²*J*_{C-F} = 30.5 Hz), 136.30, 138.41, 142.45, 160.27, 161.76, 169.88.

C₃₀H₃₁F₃N₃O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 522,2368; bulunan: 522,2365.

5-(4-((4-Metilbenzil)oksi)fenil)-3-((4-(4-(triflorometil)benzil)piperazin-1-il)metil)izoksazol (Bileşik 6c)



3-(Bromometil)-5-(4-((4-metilbenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 5c) ve 4-(triflorometil)benzil piperazinden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: % 39).

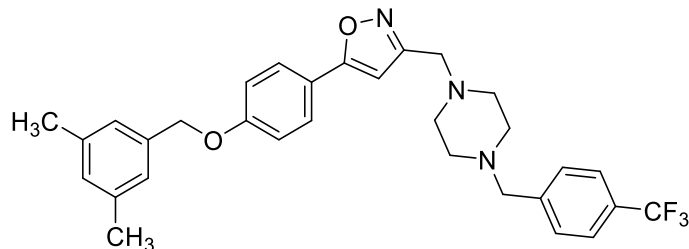
Erime derecesi: 159,2-169,0 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 2.36 (3H, s), 2.50 (4H, yayvan s), 2.57 (4H, yayvan s), 3.56 (2H, s), 3.63 (2H, s), 5.07 (2H, s), 6.42 (1H, s), 7.03 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.20 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.32 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.43 (2H, d, J = 7.8 Hz), 7.56 (2H, d, J = 7.8 Hz), 7.69 (2H, d, J = 8.8 Hz).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 21.18, 52.94, 53.04, 53.36, 62.32, 70.04, 98.27, 115.25, 120.47, 124.23 (q, ¹J_{C-F} = 270.5 Hz), 125.15 (q, ³J_{C-F} = 3.5 Hz), 127.35, 127.60, 129.18, 129.32 (q, ²J_{C-F} = 31.5 Hz), 129.34, 133.34, 138.00, 142.39, 160.26, 161.70, 169.89.

C₃₀H₃₁F₃N₃O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 522,2368; bulunan: 522,2363.

5-(4-((3,5-Dimetilbenzil)oksi)fenil)-3-((4-(4-(triflorometil)benzil)piperazin-1-il)metil)izoksazol (Bileşik 6d)



3-(Bromometil)-5-(4-((3,5-dimetilbenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 5d) ve 4-(triflorometil)benzil piperazinden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: % 86).

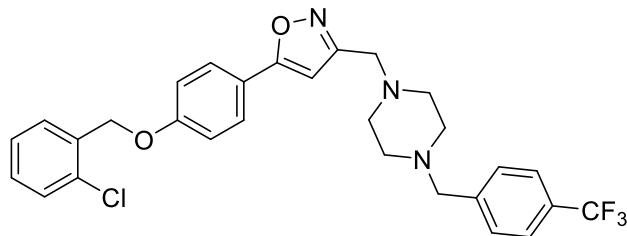
Erime derecesi: 111,8-112,8 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 2.33 (6H, s), 2.49 (4H, yayvan s), 2.57 (4H, yayvan s), 3.56 (2H, s), 3.63 (2H, s), 5.03 (2H, s), 6.42 (1H, s), 6.98 (1H, s), 7.02-7.04 (4H, m), 7.43 (2H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.56 (2H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.70 (2H, d, *J* = 8.8 Hz).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 21.29, 52.99, 53.08, 53.40, 62.36, 70.26, 98.28, 115.25, 150.50, 124.20 (q, ¹*J*_{C-F} = 270.0 Hz), 125.16 (q, ³*J*_{C-F} = 3.8 Hz), 125.39, 127.38, 129.18, 129.70 (q, ²*J*_{C-F} = 31.5 Hz), 129.86, 136.24, 138.32, 142.46, 160.35, 161.77, 169.91.

C₃₁H₃₂F₃N₃O₂ için; HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ hesaplanan: 536,2525; bulunan: 536,2534.

5-(4-((2-Klorobenzil)oksi)fenil)-3-((4-(4-(triflorometil)benzil)piperazin-1-il)metil)izoksazol (Bileşik 6e)



3-(Bromometil)-5-(4-((2-klorobenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 5e) ve 4-(triflorometil)benzil piperazinden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: % 59).

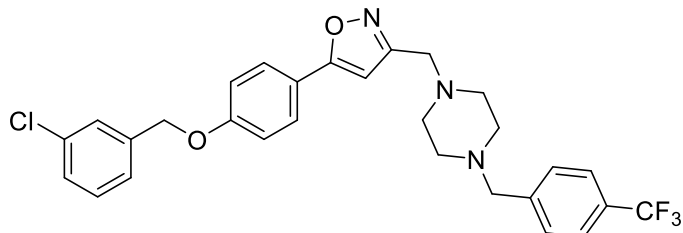
Erime derecesi: 127,9-128,5 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 2.50 (4H, yayvan s), 2.57 (4H, yayvan s), 3.56 (2H, s), 3.64 (2H, s), 5.22 (2H, s), 6.44 (1H, s), 7.04 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.27-7.32 (2H, m), 7.40-7.44 (3H, m), 7.53-7.57 (3H, m), 7.71 (2H, d, J = 8.6 Hz).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 52.99, 53.08, 53.39, 62.36, 67.22, 98.42, 115.28, 120.86, 124.25 (q, ¹J_{C-F} = 270.0 Hz), 125.17 (q, ³J_{C-F} = 3.6 Hz), 127.04, 127.45, 128.77, 128.19, 129.21, 129.34 (q, ²J_{C-F} = 30.8 Hz), 129.49, 132.66, 134.16, 142.47, 159.91, 161.79, 169.79.

C₂₉H₂₈ClF₃N₃O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 542,1822; bulunan: 542,1813.

5-(4-((3-Klorobenzil)oksi)fenil)-3-((4-(4-(triflorometil)benzil)piperazin-1-il)metil)izoksazol (Bileşik 6f)



3-(Bromometil)-5-(4-((3-klorobenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 5f) ve 4-(triflorometil)benzil piperazinden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: % 84,2).

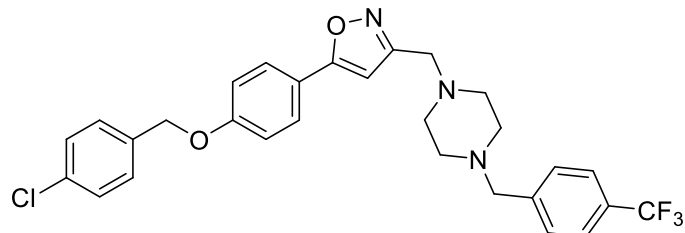
Erime derecesi: 117,4-118,0 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 2.50 (4H, yayvan s), 2.57 (4H, yayvan s), 3.56 (2H, s), 3.63 (2H, s), 5.09 (2H, s), 6.43 (1H, s), 7.02 (2H, d, J = 9.0 Hz), 7.31-7.32 (3H, m), 7.42-7.44 (3H, m), 7.56 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.71 (2H, d, J = 9.0 Hz).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 52.97, 53.07, 53.37, 62.35, 69.22, 98.43, 115.24, 120.87, 124.24 (q, ¹J_{C-F} = 269.9 Hz), 125.19 (q, ³J_{C-F} = 3.6 Hz), 125.33, 127.41, 127.44, 128.30, 129.18, 129.33 (q, ²J_{C-F} = 30.7 Hz), 129.95, 134.63, 138.48, 142.44, 159.84, 161.79, 169.73.

C₂₉H₂₈ClF₃N₃O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 542,1822; bulunan: 542,1836.

5-(4-((4-Klorobenzil)oksi)fenil)-3-((4-(4-(triflorometil)benzil)piperazin-1-il)metil)izoksazol (Bileşik 6g)



3-(Bromometil)-5-(4-((4-klorobenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 5g) ve 4-(triflorometil)benzil piperazinden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: % 62,1).

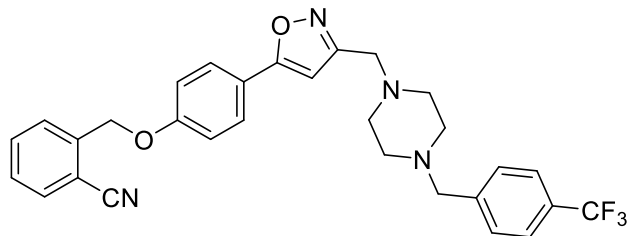
Erime derecesi: 158,8-159,0 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 2.50 (4H, yayvan s), 2.57 (4H, yayvan s), 3.55 (2H, s), 3.63 (2H, s), 5.07 (2H, s), 6.43 (1H, s), 7.01 (2H, d, J = 9.0 Hz), 7.36 (4H, s), 7.43 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.56 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.70 (2H, d, J = 9.0 Hz).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 52.94, 53.05, 53.36, 63.33, 69.29, 98.40, 115.23, 120.79, 124.23 (q, ¹J_{C-F} = 270.1 Hz), 125.15 (q, ³J_{C-F} = 3.9 Hz), 127.41, 128.75, 128.85, 129.17, 129.33 (q, ²J_{C-F} = 32.0 Hz), 133.99, 134.89, 142.40, 159.89, 161.75, 169.74.

C₂₉H₂₈ClF₃N₃O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 542,1822; bulunan: 542,1827.

2-((4-(3-((4-(4-(Triflorometil)benzil)piperazin-1-il)metil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 6h)



2-((4-(3-(Bromometil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 5h) ve 4-(triflorometil)benzil piperazinden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: % 75,9).

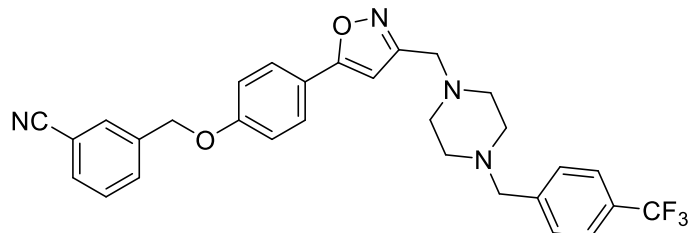
Erime derecesi: 148,9-151,2 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 2.50 (4H, yayvan s), 2.57 (4H, yayvan s), 3.56 (2H, s), 3.64 (2H, s), 5.31 (2H, s), 6.45 (1H, s), 7.07 (2H, d, J = 9.0 Hz), 7.42-7.48 (3H, m), 7.56 (2H, d, J = 7.6 Hz), 7.62-7.69 (3H, m), 7.73 (2H, d, J = 9.0 Hz).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 52.99, 53.09, 53.38, 62.36, 67.63, 98.59, 111.24, 115.32, 116.98, 121.28, 124.26 (q, ¹J_{C-F} = 270.6 Hz), 125.16 (q, ³J_{C-F} = 3.9 Hz), 127.52, 128.46, 129.19, 129.34 (q, ²J_{C-F} = 29.5 Hz), 132.99, 133.15, 140.01, 142.46, 142.48, 159.51, 161.83, 169.64.

C₃₀H₂₈F₃N₄O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 533,2164; bulunan: 533,2161.

3-((4-(3-((4-(4-(Triflorometil)benzil)piperazin-1-il)metil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 6i)



3-((4-(3-(Bromometil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 5i) ve 4-(triflorometil)benzil piperazinden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: % 85).

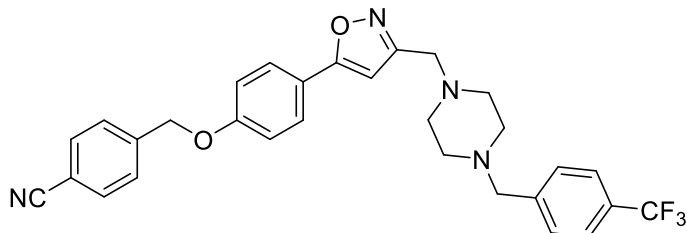
Erime derecesi: 164,9-166,0 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 2.50 (4H, yayvan s), 2.57 (4H, yayvan s), 3.56 (2H, s), 3.64 (2H, s), 5.15 (2H, s), 6.45 (1H, s), 7.03 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.44 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.50-7.54 (1H, m), 7.56 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.64-7.69 (2H, m), 7.73 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.75 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 52.96, 53.07, 53.36, 62.34, 68.72, 98.56, 112.90, 115.20, 118.52, 121.16, 124.30 (q, ¹J_{C-F} = 270.0 Hz), 125.15 (q, ³J_{C-F} = 3.9 Hz), 127.51, 129.18, 129.34 (q, ²J_{C-F} = 32.0 Hz), 129.50, 130.69, 131.45, 131.75, 138.09, 142.43, 159.52, 161.82, 169.59.

C₃₀H₂₈F₃N₄O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 533,2164; bulunan: 533,2158.

4-((4-(3-((4-(4-(Triflorometil)benzil)piperazin-1-il)metil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 6j)



4-((4-(3-(Bromometil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 5j) ve 4-(triflorometil)benzil piperazinden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: % 75,3).

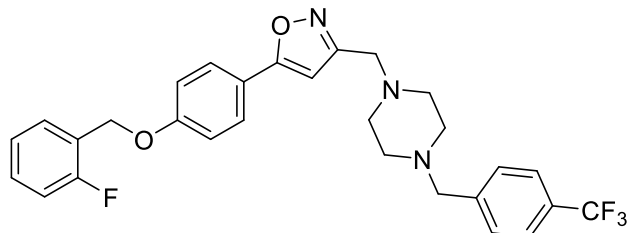
Erime derecesi: 140,2-141,8 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 2.50 (4H, yayvan s), 2.57 (4H, yayvan s), 3.56 (2H, s), 3.63 (2H, s), 5.17 (2H, s), 6.44 (1H, s), 7.01 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.43 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.54-7.56 (4H, m), 7.68-7.73 (4H, m).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 53.16, 53.28, 53.57, 62.55, 69.17, 98.76, 112.18, 115.41, 118.77, 121.37, 124.44 (q, ¹J_{C-F} = 270.0 Hz), 125.36 (q, ³J_{C-F} = 3.8 Hz), 127.71, 127.77, 129.38, 129.54 (q, ²J_{C-F} = 31.5 Hz), 132.69, 142.05, 142.62, 159.73, 162.02, 169.78.

C₃₀H₂₈F₃N₄O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 533,2164; bulunan: 533,2177.

5-(4-((2-Florobenzil)oksi)fenil)-3-((4-(4-(triflorometil)benzil)piperazin-1-il)metil)izoksazol (Bileşik 6k)



3-(Bromometil)-5-(4-((2-florobenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 5k) ve 4-(triflorometil)benzil piperazinden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: % 79,5).

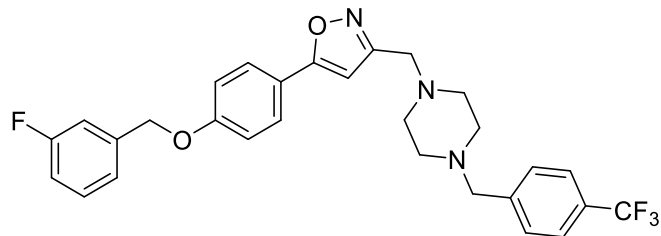
Erime derecesi: 137,6-138,0 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 2.50 (4H, yayvan s), 2.57 (4H, yayvan s), 3.56 (2H, s), 3.63 (2H, s), 5.18 (2H, s), 6.43 (1H, s), 7.05 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.07-7.13 (1H, m), 7.15-7.19 (1H, m), 7.30-7.36 (1H, m), 7.43 (2H, d, J = 7.6 Hz), 7.50 (1H, td, J = 7.6 Hz, 1.6 Hz), 7.55 (2H, d, J = 7.6 Hz), 7.72 (2H, d, J = 8.8 Hz).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 52.98, 53.07, 53.38, 62.35, 63.79 (d, ³J_{C-F} = 4.4 Hz), 98.39, 115.21, 115.44 (d, ²J_{C-F} = 20.5 Hz), 120.80, 123.59 (d, ²J_{C-F} = 14.1 Hz), 124.24 (q, ¹J_{C-F} = 270.6 Hz), 124.33 (d, ⁴J_{C-F} = 3.9 Hz), 125.15 (q, ³J_{C-F} = 3.6 Hz), 127.41, 129.18, 129.33 (q, ²J_{C-F} = 30.7 Hz), 129.67 (d, ⁴J_{C-F} = 3.9 Hz), 129.95 (d, ³J_{C-F} = 8.4 Hz), 142.45, 159.94, 160.50 (d, ¹J_{C-F} = 245.5 Hz), 161.73 (d, ³J_{C-F} = 8.4 Hz), 169.79.

C₂₉H₂₈F₄N₃O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 526,2118; bulunan: 526,2123.

5-(4-((3-Florobenzil)oksi)fenil)-3-((4-(4-(triflorometil)benzil)piperazin-1-il)metil)izoksazol (Bileşik 6I)



3-(Bromometil)-5-(4-((3-florobenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 5I) ve 4-(triflorometil)benzil piperazinden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: % 71,2).

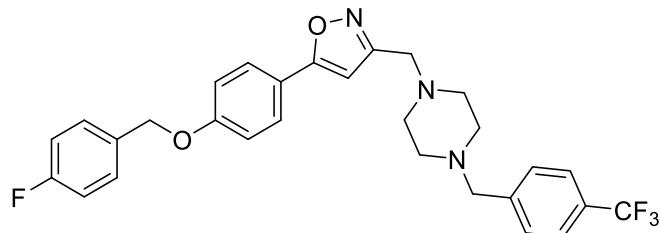
Erime derecesi: 112,6-113,1 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 2.50 (4H, yayvan s), 2.57 (4H, yayvan s), 3.56 (2H, s), 3.63 (2H, s), 5.11 (2H, s), 6.43 (1H, s), 7.00-7.04 (3H, m), 7.15-7.21 (2H, m), 7.33-7.39 (1H, m), 7.43 (2H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.56 (2H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.70 (2H, d, *J* = 8.8 Hz).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 52.96, 53.06, 53.37, 62.34, 69.24 (d, ⁴*J*_{C-F} = 1.5 Hz), 98.42, 114.21 (d, ²*J*_{C-F} = 22.1 Hz), 115.02 (d, ²*J*_{C-F} = 21.3 Hz), 115.24, 120.84, 122.69 (d, ⁴*J*_{C-F} = 2.3 Hz), 124.24 (q, ¹*J*_{C-F} = 269.8 Hz), 125.15 (q, ³*J*_{C-F} = 3.8 Hz), 127.43, 129.18, 129.33 (q, ²*J*_{C-F} = 30.5 Hz), 130.23 (d, ³*J*_{C-F} = 7.6 Hz), 139.01 (d, ³*J*_{C-F} = 6.8 Hz), 142.43, 159.86, 161.77, 163.00 (d, ¹*J*_{C-F} = 246.1 Hz), 169.74.

C₂₉H₂₈F₄N₃O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 526,2118; bulunan: 526,2113.

5-(4-((4-Florobenzil)oksi)fenil)-3-((4-(4-(triflorometil)benzil)piperazin-1-il)metil)izoksazol (Bileşik 6m)



3-(Bromometil)-5-(4-((4-florobenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 5m) ve 4-(triflorometil)benzil piperazinden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: % 84,2).

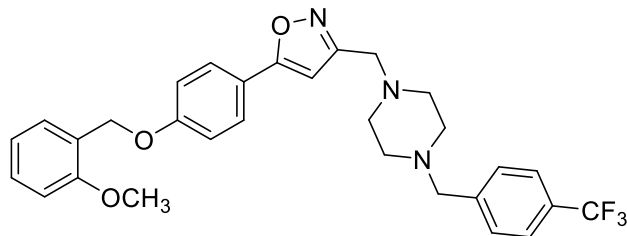
Erime derecesi: 155,7-156,1 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 2.50 (4H, yayvan s), 2.57 (4H, yayvan s), 3.56 (2H, s), 3.63 (2H, s), 5.06 (2H, s), 6.43 (1H, s), 7.02 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.08 (2H, t, *J* = 8.6 Hz), 7.39-7.44 (4H, m), 7.56 (2H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.70 (2H, d, *J* = 8.8 Hz).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 52.94, 53.05, 53.36, 62.33, 69.42, 98.38, 115.22, 115.59 (d, ²*J*_{C-F} = 21.8 Hz), 120.72, 124.23 (q, ¹*J*_{C-F} = 270.6 Hz), 125.15 (q, ³*J*_{C-F} = 3.9 Hz), 127.40, 129.18, 129.32 (q, ²*J*_{C-F} = 32.0 Hz), 129.34 (d, ³*J*_{C-F} = 8.3 Hz), 132.15 (d, ⁴*J*_{C-F} = 3.2 Hz), 142.40, 159.99, 161.74, 162.59 (d, ¹*J*_{C-F} = 245.6 Hz), 169.77.

C₂₉H₂₈F₄N₃O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 526,2118; bulunan: 526,2112.

5-(4-((2-Metoksibenzil)oksi)fenil)-3-((4-(4-triflorometilbenzil)piperazin-1-il)metil)izoksazol (Bileşik 6n)



3-(Bromometil)-5-(4-((2-metoksibenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 5n) ve 4-(triflorometil)benzil piperazinden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: % 91).

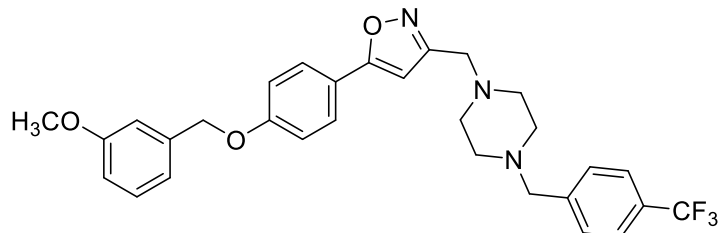
Erime derecesi: 113,2-113,9 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 2.50 (4H, yayvan s), 2.57 (4H, yayvan s), 3.56 (2H, s), 3.63 (2H, s), 3.87 (3H, s), 5.16 (2H, s), 6.42 (1H, s), 6.92 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 6.98 (1H, td, *J* = 8.0 Hz, 0.8 Hz), 7.05 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.31 (1H, td, *J* = 8.0 Hz, 2.0 Hz), 7.42-7.44 (3H, m), 7.56 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.69 (2H, d, *J* = 8.6 Hz).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-d₆): δ 52.45, 52.49, 55.46, 61.22, 64.82, 99.04, 110.96, 115.27, 119.73, 120.31, 124.16, 124.35 (q, ¹*J*_{C-F} = 270.5 Hz), 125.02 (q, ³*J*_{C-F} = 3.8 Hz), 127.28, 127.57 (q, ²*J*_{C-F} = 31.2 Hz), 129.29, 129.35, 129.58, 143.27, 157.00, 159.99, 161.75, 168.90.

C₃₀H₃₁F₃N₃O₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 538,2318; bulunan: 538,2319.

5-(4-((3-Metoksibenzil)oksi)fenil)-3-((4-(4-triflorometilbenzil)piperazin-1-il)metil)izoksazol (Bileşik 6o)



3-(Bromometil)-5-(4-((3-metoksibenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 5o) ve 4-(triflorometil)benzil piperazinden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: % 82).

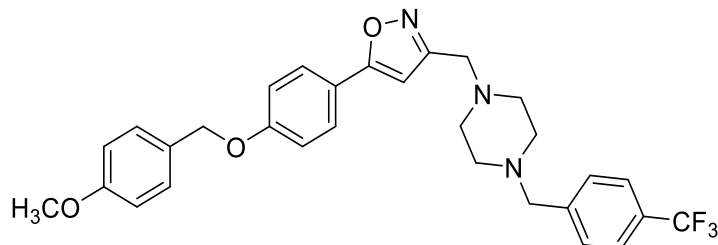
Erime derecesi: 100,8-110,1 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 2.50 (4H, yayvan s), 2.57 (4H, yayvan s), 3.56 (2H, s), 3.63 (2H, s), 3.82 (3H, s), 5.09 (2H, s), 6.42 (1H, s), 6.87 (1H, dd, *J* = 8.4 Hz, 2.0 Hz), 6.98-7.04 (4H, m), 7.31 (1H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.43 (2H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.56 (2H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.70 (2H, d, *J* = 8.8 Hz).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 98.32, 112.94, 113.59, 115.27, 119.58, 120.62, 124.24 (q, ¹*J*_{C-F} = 270.6 Hz), 125.15 (q, ³*J*_{C-F} = 3.6 Hz), 127.38, 129.18, 129.33 (q, ²*J*_{C-F} = 30.7 Hz), 129.74, 138.00, 142.45, 159.90, 160.14, 161.76, 169.85.

C₃₀H₃₁F₃N₃O₃ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 538,2318; bulunan: 538,2322.

5-(4-((4-Metoksibenzil)oksi)fenil)-3-((4-(4-triflorometilbenzil)piperazin-1-il)metil)izoksazol (Bileşik 6p)



3-(Bromometil)-5-(4-((4-metoksibenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 5p) ve 4-(triflorometil)benzil piperazinden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: % 82).

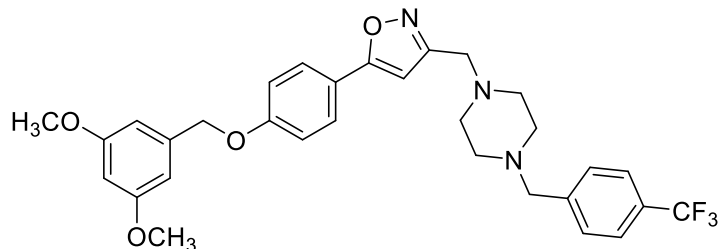
Erime derecesi: 161,9-162,7 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 2.50 (4H, yayvan s), 2.57 (4H, yayvan s), 3.56 (2H, s), 3.63 (2H, s), 3.82 (3H, s), 5.04 (2H, s), 6.42 (1H, s), 6.93 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.03 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.36 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.43 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.56 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.69 (2H, d, *J* = 9.0 Hz).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 52.97, 53.06, 53.38, 55.30, 62.34, 69.91, 98.27, 114.08, 115.26, 120.48, 124.23 (q, ¹*J*_{C-F} = 270.5 Hz), 125.14 (q, ³*J*_{C-F} = 3.8 Hz), 127.34, 128.38, 129.16, 129.25, 129.31 (q, ²*J*_{C-F} = 31.0 Hz), 142.44, 159.61, 160.26, 161.75, 169.88.

C₃₀H₃₁F₃N₃O₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 538,2318; bulunan: 538,2318.

5-(4-((3,5-Dimetoksibenzil)oksi)fenil)-3-((4-(4-(triflorometil)benzil)piperazin-1-il)metil)izoksazol (Bileşik 6r)



3-(Bromometil)-5-(4-((3,5-dimetoksibenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 5r) ve 4-(triflorometil)benzil piperazinden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: % 76).

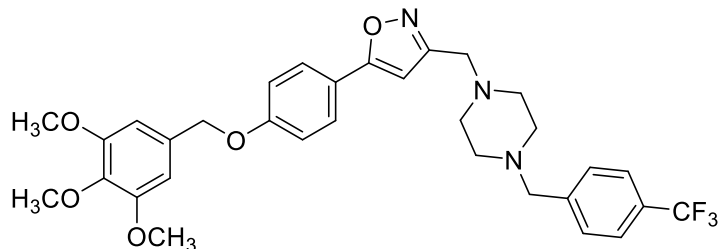
Erime derecesi: 111,3-113,8 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 2.50 (4H, yayvan s), 2.57 (4H, yayvan s), 3.56 (2H, s), 3.63 (2H, s), 3.80 (6H, s), 5.05 (2H, s), 6.41-6.43 (2H, m), 6.58 (2H, d, *J* = 2.4 Hz), 7.02 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.43 (2H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.56 (2H, d, *J* = 7,8 Hz), 7.69 (2H, d, *J* = 9.0 Hz).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 52.97, 53.07, 53.38, 55.36, 62.34, 70.03, 98.33, 99.94, 105.19, 115.28, 120.63, 124.25 (q, ¹*J*_{C-F} = 270.0 Hz), 125.15 (q, ³*J*_{C-F} = 3.9 Hz), 127.37, 129.18, 129.33 (q, ²*J*_{C-F} = 30.7 Hz), 138.79, 142.44, 160.11, 161.09, 161.75, 169.84.

C₃₁H₃₂F₃N₃O₄ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 568,2423; bulunan: 568,2411.

5-(4-((3,4,5-Trimetoksibenzil)oksi)fenil)-3-((4-(4-(triflorometil)benzil)piperazin-1-il)metil)izoksazol (Bileşik 6s)



3-(Bromometil)-5-(4-((3,4,5-trimetoksibenzil)oksi)fenil)izoksazol (Bileşik 5s) ve 4-(triflorometil)benzil piperazinden hareketle 3.1.2.'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: % 81).

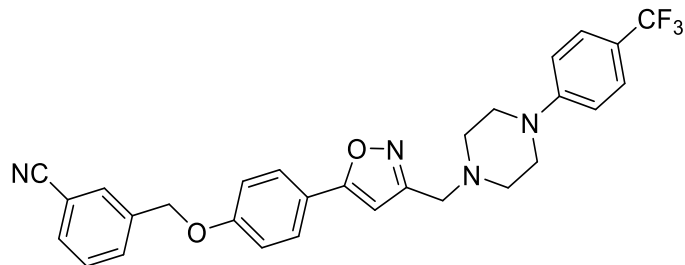
Erime derecesi: 95,9-97,8 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 2.50 (4H, yayvan s), 2.57 (4H, yayvan s), 3.56 (2H, s), 3.64 (2H, s), 3.85 (3H, s), 3.88 (6H, s), 5.03 (2H, s), 6.43 (1H, s), 6.66 (2H, s), 7.04 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.43 (2H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.55 (2H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.71 (2H, d, *J* = 8.8 Hz).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 52.97, 53.07, 53.37, 56.15, 60.85, 62.34, 70.40, 98.37, 104.64, 115.24, 120.72, 124.24 (q, ¹*J*_{C-F} = 270.6 Hz), 125.15 (q, ³*J*_{C-F} = 3.9 Hz), 127.40, 129.17, 129.32 (q, ²*J*_{C-F} = 32.5 Hz), 131.91, 137.88, 142.43, 153.51, 160.11, 161.78, 169.78.

C₃₂H₃₅F₃N₃O₅ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 598,2529; bulunan: 598,2519.

3-((4-(3-((4-(4-(Triflorometil)fenil)piperazin-1-il)metil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 7)



3-((4-(3-(Bromometil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 5i) ve 4-(triflorometil)fenilpiperazinden hareketle 3.1.2'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: % 89,4).

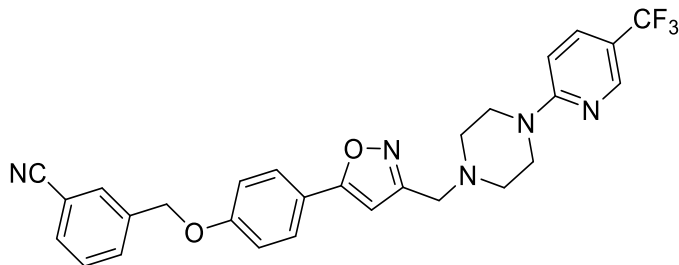
Erime derecesi: 159,5-160,3 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 2.69 (4H, t, *J* = 4.8 Hz), 3.31 (4H, t, *J* = 4.8 Hz), 3.70 (2H, s), 5.15 (2H, s), 6.50 (1H, s), 6.92 (2H, d, *J* = 9.2 Hz), 7.04 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.46-7.54 (3H, m), 7.63-7.69 (2H, m), 7.74 (3H, d, *J* = 8.8 Hz).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 47.90, 52.80, 53.37, 68.74, 98.52, 112.92, 114.59, 115.23, 118.51, 120.61 (q, ²*J*_{C-F} = 32.0 Hz), 121.06, 124.70 (q, ¹*J*_{C-F} = 269.1 Hz), 126.39 (q, ³*J*_{C-F} = 3.8 Hz), 127.55, 129.50, 130.70, 131.44, 131.76, 138.06, 153.18, 159.60, 161.57, 169.84.

C₂₉H₂₆F₃N₄O₂ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 519,2008; bulunan: 519,2003.

3-((4-(3-((4-((5-(Triflorometil)piridin-2-il)metil)piperazin-1-il)metil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 8)



3-((4-(3-(Bromometil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 5i) ve 1-(5-(triflorometil)piridin-2-il)piperazinden hareketle 3.1.2'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: % 89).

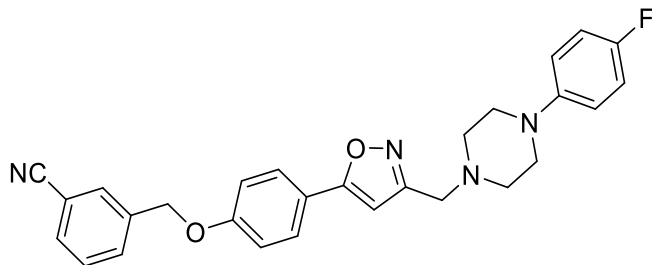
Erime derecesi: 156,2-157,3 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 2.65 (4H, t, *J* = 4.8 Hz), 3.68 (4H, t, *J* = 4.8 Hz), 3.70 (2H, s), 5.15 (2H, s), 6.50 (1H, s), 6.63 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.04 (2H, d, *J* = 9.2 Hz), 7.52 (1H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.60-7.69 (3H, m), 7.75 (3H, d, *J* = 9.2 Hz), 8.39 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 44.59, 52.73, 53.43, 68.74, 98.52, 105.58, 112.91, 115.08, 115.23, 115.41, 118.53, 121.05, 127.30 (q, ¹*J*_{C-F} = 268.3 Hz), 127.56, 129.51, 130.70, 131.30 (q, ²*J*_{C-F} = 31.3 Hz), 134.48 (q, ³*J*_{C-F} = 3.1 Hz), 138.06, 145.72 (q, ³*J*_{C-F} = 4.3 Hz), 159.60, 160.31, 161.56, 169.84.

C₂₈H₂₅F₃N₅O₂ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 520,1960; bulunan: 520,1962.

3-((4-(3-((4-(4-Florofenil)piperazin-1-il)metil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 9)



3-((4-(3-(Bromometil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 5i) ve 1-(4-florofenil)piperazinden hareketle 3.1.2'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: % 51,3).

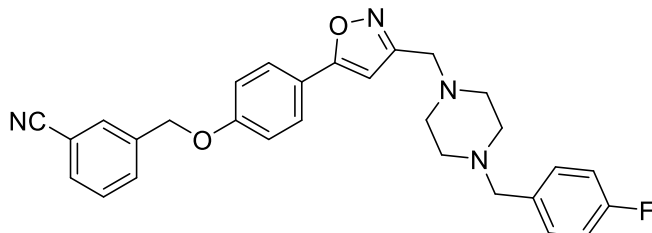
Erime derecesi: 141,6-142,0 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 2.71 (4H, t, *J* = 4.8 Hz), 3.15 (4H, t, *J* = 4.8 Hz), 3.70 (2H, s), 5.15 (2H, s), 6.50 (1H, s), 6.86-6.89 (2H, m), 6.94-6.98 (2H, m), 7.04 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.52 (1H, t, *J* = 8.2 Hz), 7.66 (2H, q, *J* = 8.4 Hz), 7.76 (3H, t, *J* = 8.4 Hz).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 50.09, 53.14, 53.40, 68.74, 99.55, 112.91, 115.22, 115.52 (d, ²*J*_{C-F} = 22.1 Hz), 117.91 (d, ³*J*_{C-F} = 7.6 Hz), 118.53, 121.11, 127.55, 129.51, 130.70, 131.46, 131.77, 138.07, 147.88 (d, ⁴*J*_{C-F} = 2.3 Hz), 157.21 (d, ¹*J*_{C-F} = 235.1 Hz), 159.56, 161.74, 169.75.

C₂₈H₂₆FN₄O₂ için; HRMS (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ hesaplanan: 469,2040; bulunan: 469,2056.

3-((4-(3-((4-(4-Florobenzil)piperazin-1-il)metil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 10)



3-((4-(3-(Bromometil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 5i) ve 1-(4-florobenzil)piperazinden hareketle 3.1.2’de verilen genel sentez yöntemi 6’ya göre sentezlendi (Verim: % 76,5).

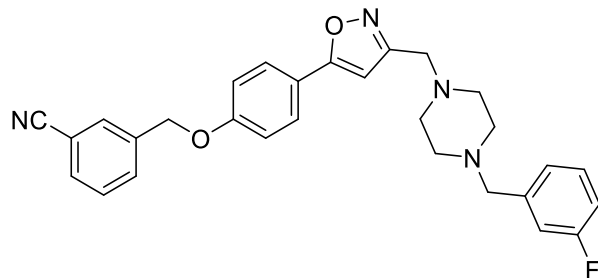
Erime derecesi: 128,5-129,5 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): 2.50 (4H, yayvan s), 2.57 (4H, yayvan s), 3.49 (2H, s), 3.64 (2H, s), 5.14 (2H, s), 6.45 (1H, s), 6.97-7.04 (4H, m), 7.25-7.29 (2H, m), 7.50-7.54 (1H, m), 7.63-7.76 (5H, m).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 52.79, 53.02, 53.34, 62.08, 68.73, 98.58, 112.91, 115.01 (q, ²J_{C-F} = 21.4 Hz), 115.19, 118.52, 121.16, 127.51, 129.49, 130.59, 130.70, 131.45, 131.76, 138.09, 159.51, 161.80, 162.02 (q, ¹J_{C-F} = 243.8 Hz), 169.58.

C₂₉H₂₈FN₄O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 483,2196; bulunan: 483,2183.

3-((4-(3-((4-(3-Florobenzil)piperazin-1-il)metil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 11)



3-((4-(3-(Bromometil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 5i) ve 1-(3-florobenzil)piperazinden hareketle 3.1.2'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: % 55).

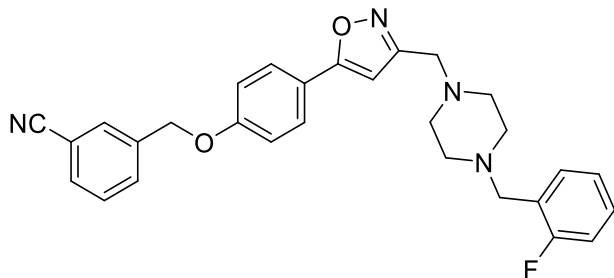
Erime derecesi: 111,1-112,0 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 2.51 (4H, yayvan s), 2.60 (4H, yayvan s), 3.52 (2H, s), 3.64 (2H, s), 5.14 (2H, s), 6.46 (1H, s), 6.91-6.96 (1H, m), 7.01-7.09 (4H, m), 7.23-7.29 (1H, m), 7.50-7.54 (1H, m), 7.63-7.76 (5H, m).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 52.86, 53.03, 53.34, 62.30, 68.73, 98.59, 112.91, 113.96 (d, ²J_{C-F} = 21.3 Hz), 115.20, 115.75 (d, ²J_{C-F} = 21.3 Hz), 118.53, 121.17, 124.54, 127.53, 129.50, 129.58, 129.67, 130.70, 131.45, 131.76, 138.10, 159.51, 161.77, 162.93 (d, ¹J_{C-F} = 243.8 Hz), 169.60.

C₂₉H₂₈FN₄O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 483,2196; bulunan: 483,2174.

3-((4-(3-((4-(2-Florobenzil)piperazin-1-il)metil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 12)



3-((4-(3-(Bromometil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 5i) ve 1-(2-florobenzil)piperazinden hareketle 3.1.2'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: % 73,3).

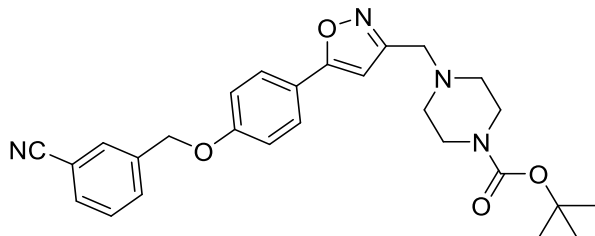
Erime derecesi: 104,6-105,1 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 2.55-2.59 (8H, m), 3.63 (4H, s), 5.14 (2H, s), 6.45 (1H, s), 6.99-7.04 (3H, m), 7.09 (1H, t, *J* = 7.2 Hz), 7.21-7.25 (1H, m), 7.37 (1H, t, *J* = 7.2 Hz), 7.52 (1H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.63-7.58 (5H, m).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 52.54, 52.99, 53.33, 54.04, 68.72, 98.58, 112.90, 115.18, 115.24 (d, ²*J*_{C-F} = 22.1 Hz), 118.52, 121.16, 123.86 (d, ⁴*J*_{C-F} = 3.8 Hz), 127.51, 128.87 (d, ³*J*_{C-F} = 7.6 Hz), 129.49, 130.70, 131.45, 131.66, 131.69, 131.75, 138.09, 59.50, 161.32, 161.41 (d, ¹*J*_{C-F} = 244.0 Hz), 169.58.

C₂₉H₂₈FN₄O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 483,2196; bulunan: 483,2168.

Ter-bütil-4-((5-(4-((3-siyanobenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metil)piperazin-1-karboksilat (Bileşik 13)



3-((4-(3-(Bromometil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 5i) ve ter-bütil-piperazin-1-karboksilattan hareketle 3.1.2’de verilen genel sentez yöntemi 6’ya göre sentezlendi (Verim: % 61,3).

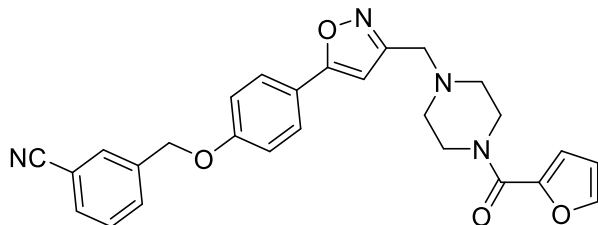
Erime derecesi: 132,2-132,6 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 1.45 (9H, s), 2.48 (4H, yayvan s), 3.45 (4H, yayvan s), 3.64 (2H, s), 5.14 (2H, s), 6.45 (1H, s), 7.03 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.51 (1H, t, J = 8.4 Hz), 7.62-7.75 (5H, m).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 28.39, 52.85, 53.43, 68.72, 79.73, 98.49, 112.90, 115.20, 118.51, 121.06, 127.53, 129.49, 130.69, 131.44, 131.76, 138.06, 154.68, 159.55, 161.55, 169.75.

C₂₇H₃₁N₄O₄ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 475,2345; bulunan: 475,2334.

3-((4-(3-((4-(Furan-2-karbonil)piperazin-1-il)metil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 14)



3-((4-(3-(Bromometil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 5i) ve furan-2-il(piperazin-1-il)metanondan hareketle 3.1.2’de verilen genel sentez yöntemi 6’ya göre sentezlendi (Verim: % 68,7).

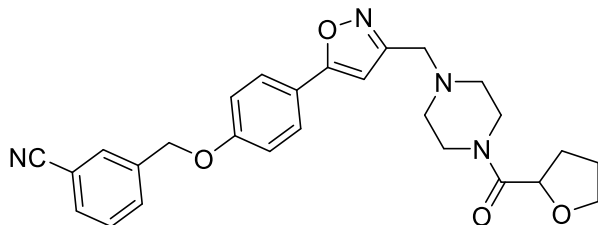
Erime derecesi: 118,7-119,9 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 2.60 (4H, yayvan s), 3.67 (2H, s), 3.83 (4H, yayvan s), 5.14 (2H, m), 6.46-6.47 (2H, m), 6.98-7.05 (3H, m), 7.46-7.53 (2H, m), 7.62-7.68 (2H, m), 7.72-7.75 (3H, m).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 53.20, 53.28, 68.74, 98.45, 111.26, 112.92, 115.23, 116.42, 118.57, 121.03, 127.55, 129.48, 130.69, 131.43, 131.75, 138.06, 143.64, 147.90, 159.06, 159.60, 161.37, 169.86.

C₂₇H₂₅N₄O₄ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 469,1876; bulunan: 469,1870.

3-((4-(3-((4-(Tetrahidrofuran-2-karbonil)piperazin-1-il)metil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 15)



3-((4-(3-(Bromometil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 5i) ve piperazin-1-il(tetrahidrofuran-2-il)metanondan hareketle 3.1.2'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: % 60,1).

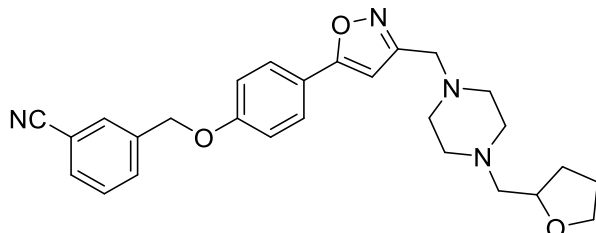
Erime derecesi: 109,8-111,2 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 1.86-2.04 (3H, m), 2.24-2.28 (1H, m), 2.53 (4H, s), 3.55-3.65 (6H, m), 3.80-3.95 (2H, m), 4.58 (1H, t, J = 6.9 Hz), 5.14 (2H, s), 6.46 (1H, s), 7.02 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.51 (1H, t, J = 7.6 Hz), 7.63 (1H, d, J = 7.6 Hz), 7.67 (1H, d, J = 7.6 Hz), 7.72 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.75 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 25.70, 28.39, 41.83, 45.21, 52.79, 53.14, 53.27, 68.72, 69.06, 75.84, 98.46, 112.90, 115.22, 118.50, 121.00, 127.55, 129.49, 130.69, 131.44, 131.76, 138.04, 159.59, 169.80, 169.86.

C₂₇H₂₉N₄O₄ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 473,2189; bulunan: 473,2181.

3-((4-(3-((4-((Tetrahidrofuran-2-il)metil)piperazin-1-il)metil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 16)



3-((4-(3-(Bromometil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 5i) ve 1-((tetrahidrofuran-2-il)metil)piperazinden hareketle 3.1.2'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: % 35).

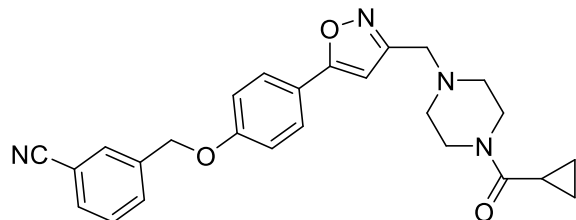
Erime derecesi: 90,8-91,8 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 1.43-1.52 (1H, m), 1.80-1.90 (2H, m), 1.93-2.04 (1H, m), 2.40-2.59 (10H, m), 3.62 (2H, s), 3.70-3.75 (1H, m), 3.84-3.89 (1H, m), 3.98-4.05 (1H, m), 5.13 (2H, s), 6.45 (1H, s), 7.02 (2H, d, *J* = 7.2 Hz), 7.51 (1H, t, *J* = 7.2 Hz), 7.62-7.75 (5H, m).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 25.37, 30.36, 52.97, 53.37, 53.63, 63.26, 68.12, 68.72, 98.61, 112.89, 115.17, 118.52, 121.20, 127.50, 129.48, 130.69, 131.45, 131.74, 138.09, 159.47, 161.90, 169.52.

C₂₇H₃₁N₄O₃ için; HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ hesaplanan: 459,2396; bulunan: 459,2393.

3-((4-(3-((4-(Siklopropankarbonil)piperazin-1-il)metil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 17)



3-((4-(3-(Bromometil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 5i) ve siklopropill(piperazin-1-il)metanondan hareketle 3.1.2'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: % 66,6).

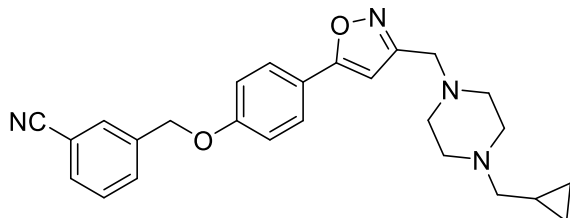
Erime derecesi: 125,8-126,8 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 0.72-0.77 (2H, m), 0.95-0.99 (2H, m), 1.68-1.74 (1H, m), 2.55 (4H, s), 3.66 (6H, s), 5.14 (2H, s), 6.46 (1H, s), 7.03 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.51 (1H, t, J = 8.4 Hz), 7.62-7.75 (5H, m).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 7.41, 10.89, 41.99, 45.32, 52.84, 53.14, 53.32, 68.73, 98.47, 112.90, 115.22, 118.51, 121.02, 127.55, 129.50, 130.70, 131.44, 138.05, 159.59, 161.44, 169.83, 171.95.

C₂₆H₂₇N₄O₃ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 443,2083; bulunan: 443,2078.

3-((4-(3-((4-(Siklopropilmetil)piperazin-1-il)metil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 18)



3-((4-(3-(Bromometil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 5i) ve 1-(siklopropilmetil)piperazinden hareketle 3.1.2’de verilen genel sentez yöntemi 6’ya göre sentezlendi (Verim: % 48).

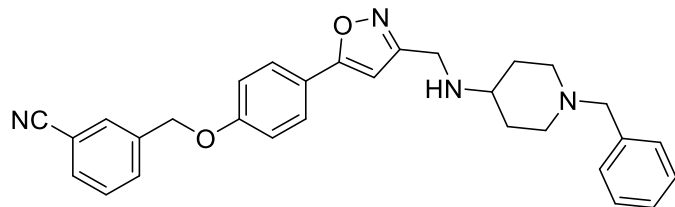
Erime derecesi: 98,7-99,3 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 0.07-0.11 (2H, m), 0.48-0.51 (2H, m), 0.84-0.87 (1H, m), 2.26 (2H, d, J = 6.8 Hz), 2.60 (8H, s), 3.64 (2H, s), 5.14 (2H, s), 6.45 (1H, s), 7.02 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.51 (1H, t, J = 8.3 Hz), 7.62-7.75 (5H, m).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 3.87, 8.28, 53.05, 53.10, 53.41, 63.68, 68.72, 98.60, 112.90, 115.18, 118.51, 121.19, 127.50, 129.48, 130.69, 131.44, 131.75, 138.09, 159.48, 161.86, 169.54.

C₂₆H₂₉N₄O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 429,2291; bulunan: 429,2289.

3-((4-(3-(((1-Benzilpiperidin-4-il)amino)metil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 19)



3-((4-(3-(Bromometil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 5i) ve 1-benzilpiperidin-4-aminden hareketle 3.1.2'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: % 44,7).

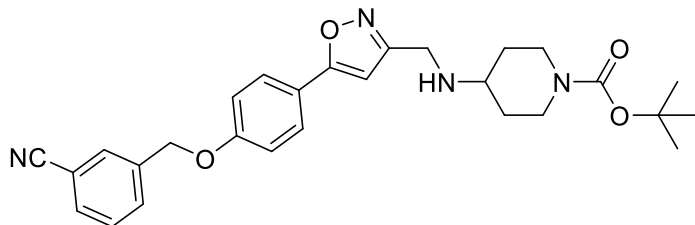
Erime derecesi: 93,7-94,8 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 1.40-1.50 (2H, m), 1.72 (1H, s), 1.88-1.91 (2H, m), 2.01-2.07 (2H, m), 2.53-2.56 (1H, m), 2.84-2.87 (2H, m), 3.50 (2H, s), 3.91 (1H, s), 5.13 (2H, s), 6.42 (1H, s), 7.00-7.04 (2H, m), 7.23-7.31 (6H, m), 7.49-7.53 (1H, m), 7.62-7.75 (5H, m).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 32.40, 42.03, 52.17, 54.25, 62.98, 68.72, 97.86, 112.90, 115.18, 118.52, 121.17, 127.00, 127.52, 128.18, 129.15, 129.49, 130.70, 131.44, 131.76, 138.09, 159.50, 163.92, 169.55.

C₃₀H₃₁N₄O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 479,2447; bulunan: 479,2451.

Ter-bütil-4-(((5-(4-((3-siyanobenzil)oksi)fenil)izoksazol-3-il)metil)amino)piperidin-1-karboksilat (Bileşik 20)



3-((4-(3-(Bromometil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 5i) ve ter-bütil-4-aminopiperidin-1-karboksilattan hareketle 3.1.2’de verilen genel sentez yöntemi 6’ya göre sentezlendi (Verim: % 72,2).

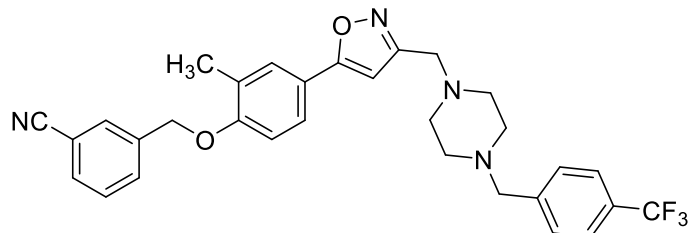
Erime derecesi: 145,3-146,3 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 1.25-1.45 (3H, m), 1.44 (9H, s), 1.86-1.90 (3H, m), 2.69-2.83 (3H, m), 3.93 (2H, m), 4.01 (1H, yayvan s), 5.14 (2H, s), 6.43 (1H, s), 7.01-7.04 (2H, m), 7.49-7.53 (1H, m), 7.62-7.75 (5H, m).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 28.43, 32.23, 41.90, 54.24, 68.74, 79.44, 97.80, 112.92, 115.21, 118.49, 121.09, 127.53, 129.48, 130.68, 131.42, 131.74, 138.07, 154.78, 159.57, 163.52, 169.72.

C₂₈H₃₃N₄O₄ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 489,2502; bulunan: 489,2508.

3-((2-Metil-4-(3-((4-(4-(triflorometil)benzil)piperazin-1-il)metil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 26a)



3-((4-(3-(Klorometil)izoksazol-5-il)-2-metilfenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 25a) ve 4-(triflorometil)benzil piperazinden hareketle 3.1.2'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: % 19).

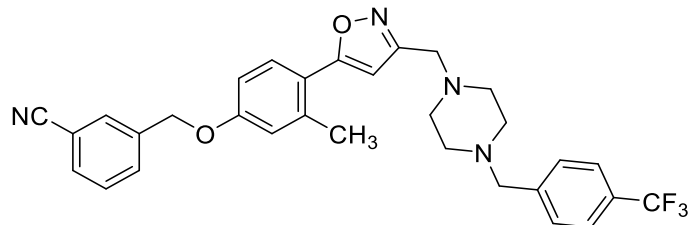
Erime derecesi: 124,3-125,0 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 2.33 (3H, s), 2.58 (4H, yayvan s), 2.66 (4H, yayvan s), 3.61 (2H, s), 3.69 (2H, s), 5.15 (2H, s), 6.50 (1H, s), 6.87-6.90 (1H, m), 7.45-7.69 (9H, m), 7.75 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (75 MHz, DMSO-d₆): δ 16.50, 52.93, 61.69, 68.60, 99.50, 111.93, 112.55, 119.16, 120.13, 124.81 (q, ¹J_{C-F} = 270.0 Hz), 125.24, 125.48 (q, ³J_{C-F} = 3.7 Hz), 127.55, 128.03 (q, ²J_{C-F} = 31.5 Hz), 128.41, 129.82, 130.28, 131.22, 132.15, 132.62, 139.17, 143.72, 157.98, 162.21, 169.46.

C₃₁H₃₀F₃N₄O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 547,2321; bulunan: 547,2330.

3-((3-Metil-4-(3-((4-(4-(triflorometil)benzil)piperazin-1-il)metil)izoksazol-5-il)fenoksi) metil)benzonitril (Bileşik 26b)



3-((4-(3-(Klorometil)izoksazol-5-il)-3-metilfenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 25b) ve 4-(triflorometil)benzil piperazinden hareketle 3.1.2'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: % 32).

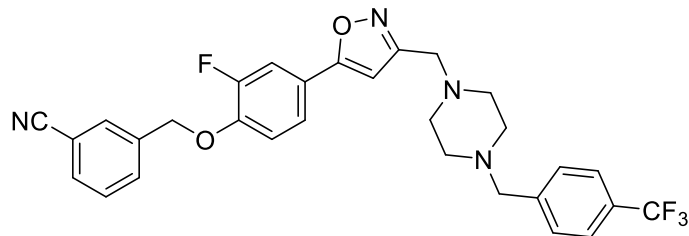
Erime derecesi: 122,3-123,6 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 2.49 (3H, s), 2.58 (4H, yayvan s), 2.66 (4H, yayvan s), 3.61 (2H, s), 3.71 (2H, s), 5.12 (2H, s), 6.42 (1H, s), 6.85-6.88 (2H, m), 7.26 (1H, s), 7.45-7.68 (7H, m), 7.74 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 16.57, 53.95, 62.79, 68.63, 99.55, 111.87, 112.63, 120.17, 120.53, 124.62 (q, ¹J_{C-F} = 270.3 Hz), 125.25, 125.52 (q, ³J_{C-F} = 3.8 Hz), 126.45, 128.12 (q, ²J_{C-F} = 30.5 Hz), 128.52, 129.96, 130.28, 132.24, 132.22, 132.58, 140.25, 144.52, 158.67, 163.10, 170.58.

C₃₁H₃₀F₃N₄O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 547,2321; bulunan: 547,2325.

3-((2-Floro-4-(3-((4-(4-(triflorometil)benzil)piperazin-1-il)metil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 26c)



3-((4-(3-(Bromometil)izoksazol-5-il)-2-florofenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 25c) ve 4-(triflorometil)benzil piperazinden hareketle 3.1.2'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: 59,5).

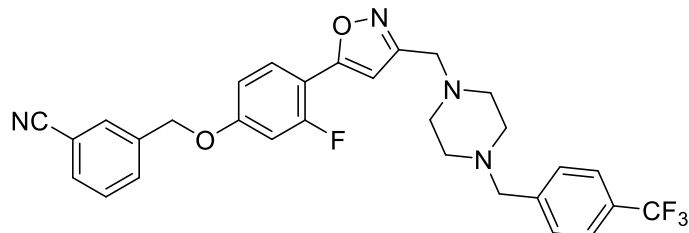
Erime derecesi: 143,2-144,0 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 2.54 (4H, yayvan s), 2.61 (4H, yayvan s), 3.59 (2H, s), 3.66 (2H, s), 5.20 (2H, s), 6.50 (1H, s), 7.04 (1H, t, J = 8.4 Hz), 7.44-7.57 (7H, m), 7.64 (1H, d, J = 7.8 Hz), 7.69 (1H, d, J = 7.8 Hz), 7.76 (1H, s).

¹³C-NMR Spektrumu (75 MHz, DMSO-d₆): δ 52.89, 52.94, 61.68, 69.60, 100.70, 111.99, 114.05 (q, ²J_{C-F} = 20.2 Hz), 116.26, 119.06, 120.92 (d, ³J_{C-F} = 7.5 Hz), 122.88 (d, ⁴J_{C-F} = 3.0 Hz), 124.81 (q, ¹J_{C-F} = 270.0 Hz), 125.49 (q, ³J_{C-F} = 3.0 Hz), 128.03 (d, ²J_{C-F} = 30.7 Hz), 129.82, 130.36, 131.78, 132.48, 133.13, 138.31, 143.71, 147.84 (d, ²J_{C-F} = 10.5 Hz), 152.18 (d, ¹J_{C-F} = 243.7 Hz), 162.43, 168.14 (d, ⁴J_{C-F} = 2.2 Hz).

C₃₀H₂₇F₄N₄O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 551,2070; bulunan: 551,2066.

3-((3-Floro-4-(3-((4-(4-(triflorometil)benzil)piperazin-1-il)metil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 26d)



3-((4-(3-(Bromometil)izoksazol-5-il)-3-florofenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 25d) ve 4-(triflorometil)benzil piperazinden hareketle 3.1.2’de verilen genel sentez yöntemi 6’ya göre sentezlendi (Verim: % 60).

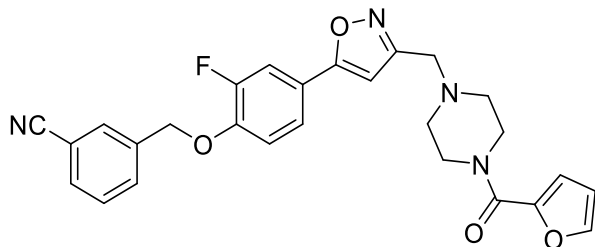
Erime derecesi: 109,7-110,8 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 2.51 (4H, yayvan s), 2.58 (4H, yayvan s), 3.57 (2H, s), 3.67 (2H, s), 5.13 (2H, s), 6.62 (1H, d, *J* = 4.0 Hz), 6.78 (1H, dd, *J* = 12.4 Hz, 2.8 Hz), 6.87 (1H, dd, *J* = 9.2 Hz, 2.4 Hz), 7.44 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.52 (1H, d, *J* = 7.2 Hz), 7.56 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.64-7.67 (2H, m), 7.74 (1H, s), 7.87 (1H, t, *J* = 8.6 Hz).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 52.90, 53.28, 62.29, 69.08, 102.39 (d, ²*J*_{C-F} = 10.2 Hz), 103.14 (d, ³*J*_{C-F} = 25.0 Hz), 109.57 (d, ²*J*_{C-F} = 12.8 Hz), 111.21 (d, ⁴*J*_{C-F} = 3.2 Hz), 113.01, 118.42, 124.21 (q, ¹*J*_{C-F} = 270.0 Hz), 125.17 (q, ³*J*_{C-F} = 3.8 Hz), 128.57 (d, ⁴*J*_{C-F} = 3.8 Hz), 129.4 (q, ²*J*_{C-F} = 35.0 Hz), 130.69, 131.44, 131.93, 137.49, 160.00 (d, ¹*J*_{C-F} = 252.0 Hz), 160.55 (d, ²*J*_{C-F} = 10.9 Hz), 161.84, 163.66 (d, ⁴*J*_{C-F} = 3.2 Hz).

C₃₀H₂₇F₄N₄O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 551,2070; bulunan: 551,2073.

3-((2-Floro-4-(3-((4-(furan-2-karbonil)piperazin-1-il)metil)izoksazol-5-il)fenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 29)



3-((4-(3-(Bromometil)izoksazol-5-il)-2-florofenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 25c) ve furan-2-il(piperazin-1-il)metanondan hareketle 3.1.2'de verilen genel sentez yöntemi 6'ya göre sentezlendi (Verim: % 83).

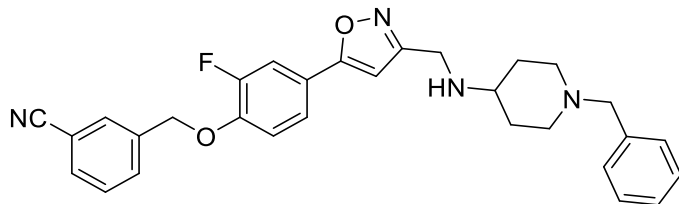
Erime derecesi: 129,9-131,2 °C.

¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 2.61 (4H, yayvan s), 3.69 (2H, s), 3.84 (4H, yayvan s), 5.21 (2H, s), 6.47 (1H, q, J = 3.6 Hz), 6.51 (1H, s), 6.99 (1H, d J = 3.6 Hz), 7.05 (1H, t, J = 8.4 Hz), 7.46-7.55 (4H, m), 7.64-7.71 (2H, m), 7.76 (1H, yayvan s).

¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 53.10, 53.23, 70.04, 99.28, 111.28, 112.96, 114.20 (d, ²J_{C-F} = 20.5 Hz), 115.66 (d, ⁴J_{C-F} = 2.0 Hz), 116.47, 118.45, 121.61 (d, ³J_{C-F} = 7.7 Hz), 122.22 (d, ⁴J_{C-F} = 3.9 Hz), 129.59, 130.70, 131.50, 131.96, 137.55, 143.67, 147.74, 147.75 (d, ²J_{C-F} = 23.8 Hz), 152.72 (d, ¹J_{C-F} = 246.8 Hz), 159.06, 161.60, 168.65 (d, ⁴J_{C-F} = 2.6 Hz).

C₂₇H₂₄FN₄O₄ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 487,1782; bulunan: 487,1781.

3-((4-(3-(((1-Benzilpiperidin-4-il)amino)metil)izoksazol-5-il)-2-florofenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 30)



3-((4-(3-(Bromometil)izoksazol-5-il)-2-florofenoksi)metil)benzonitril (Bileşik 25c) ve 1-benzilpiperidin-4-aminden hareketle 3.1.2’de verilen genel sentez yöntemi 6’ya göre sentezlendi (Verim: % 68,5).

Erime derecesi: 78.1-79.5 °C.

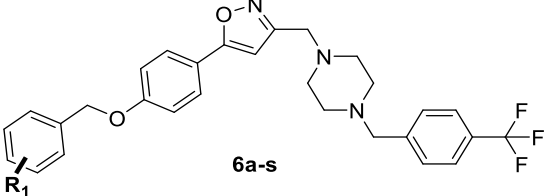
¹H-NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl₃): δ 1.49 (2H, yayvan s), 1.92 (2H, yayvan s), 2.09 (2H, yayvan s), 2.57 (1H, yayvan s), 2.89 (2H, yayvan s), 3.55 (2H, s), 3.91 (2H, s), 5.20 (2H, s), 6.44 (1H, s), 7.04 (1H, t, *J* = 8.4 Hz), 7.29-7.33 (5H, m), 7.47-7.54 (3H, m), 7.37-7.71 (2H, m), 7.76 (1H, s).

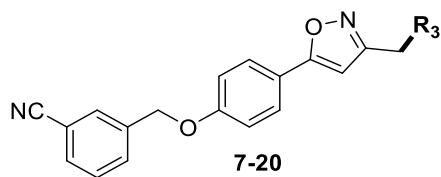
¹³C-NMR Spektrumu (100 MHz, CDCl₃): δ 32.63, 42.01, 52.26, 54.41, 63.06, 70.06, 98.74, 112.97, 114.18 (d, ²*J*_{C-F} = 20.5 Hz), 115.65 (d, ⁴*J*_{C-F} = 1.9 Hz), 118.46, 121.81 (d, ³*J*_{C-F} = 7.1 Hz), 122.18 (d, ⁴*J*_{C-F} = 3.2 Hz), 126.93, 128.16, 129.09, 129.59, 130.71, 131.50, 131.96, 137.60, 138.53, 147.59 (d, ³*J*_{C-F} = 10.9 Hz), 152.72 (d, ¹*J*_{C-F} = 246.2 Hz), 164.14, 168.35.

C₃₀H₃₀FN₄O₂ için; HRMS (m/z) [M+H]⁺ hesaplanan: 497,2353; bulunan: 497,2352.

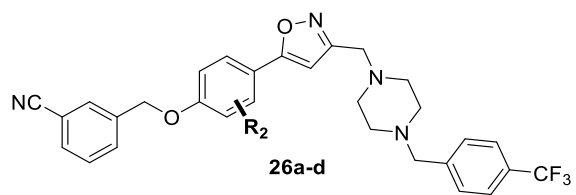
4.2. Biyolojik Bulgular

Çizelge 4.1. Bileşik 6a-s'nin IC₅₀ değerleri

				
Bileşik	R ₁	IC ₅₀ (μM)		
		MCF7	Huh7	MV
BRP29	H	2,9	1,7	11,7
6a	2-CH ₃	3,7	1,2	6,8
6b	3-CH ₃	4,0	5,0	2,5
6c	4-CH ₃	1,2	1,5	7,5
6d	3,5-diCH ₃	1,6	0,6	6,0
6e	2-Cl	2,8	1,0	3,2
6f	3-Cl	1,4	0,2	4,1
6g	4-Cl	6,7	4,0	3,7
6h	2-CN	4,0	5,0	3,5
6i	3-CN	0,8	0,1	10,6
6j	4-CN	0,1	1,0	4,3
6k	2-F	3,0	1,5	3,1
6l	3-F	2,5	1,3	2,9
6m	4-F	7,9	2,0	3,1
6n	2-OCH ₃	0,3	0,9	3,9
6o	3-OCH ₃	2,0	0,8	1,4
6p	4-OCH ₃	1,3	3,2	4,9
6r	3,5-diOCH ₃	0,1	1,5	4,3
6s	3,4,5-triOCH ₃	1,8	0,5	5,8

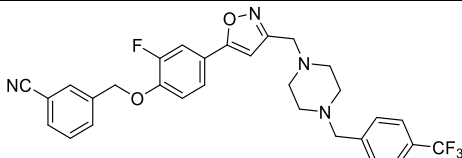
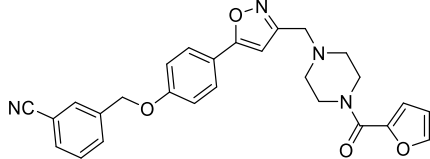
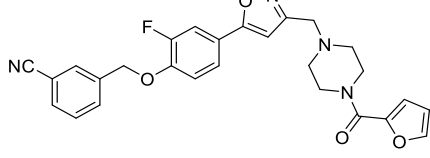
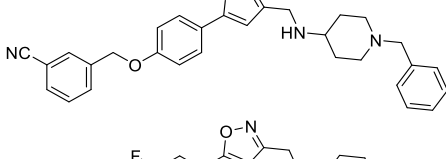
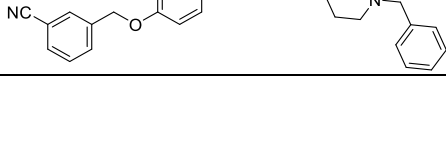
Çizelge 4.2. Bileşik 7-20'nin IC₅₀ değerleri

Bileşik	R ₃	IC ₅₀ (μM)		
		MCF7	Huh7	MV
6i		0,8	0,1	10,6
7		2,0	2,2	2,7
8		1,4	1,7	1,3
9		2,4	1,5	2,2
10		1,8	1,6	1,5
11		1,4	2,4	2,3
12		2,4	2,7	2,6
13		3,8	6,1	5,6
14		1,9	2,0	2,2
15		3,8	2,2	4,1
16		8,4	4,2	4,8
17		7,6	2,8	4,4
18		3,5	2,9	3,2
19		2,5	2,5	2,1
20		2,8	1,5	3,0

Çizelge 4.3. Bileşik 26a-d'nin IC₅₀ değerleriIC₅₀ (μM)

Bileşik	R ₂	MCF7	Huh7	MV
6i	H	0,8	0,1	10,6
26a	3-CH ₃	0,7	0,6	0,45
26b	2-CH ₃	0,4	1,5	0,5
26c	3-F	0,38	0,09	0,5
26d	2-F	1,2	0,38	0,39

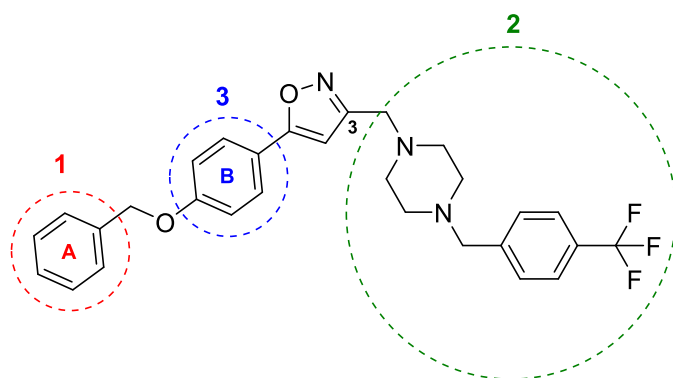
Çizelge 4.4. Bileşikler 26c, 14, 19, 29 ve 30'un üç hücre tipi için karşılaştırmalı IC₅₀ değerleri

Bileşik		IC ₅₀ (μM)		
		MCF7	Huh7	MV
26c		0,38	0,09	0,5
14		1,9	2,0	2,2
29		1,5	8,1	3,6
19		2,5	2,5	2,1
30		2,7	2,3	2,7

5. TARTIŞMA

5.1. Sentez Çalışmaları

Bu tez çalışması kapsamında; BRP29 öncü bileşiğinden yola çıkılarak daha potent bileşikler elde etmek amacıyla planlanan kimyasal sentezler, genel hatlarıyla 3 ana bölümden oluşmaktadır (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. Lider bileşik BRP29 üzerinde yapılan modifikasyonlar

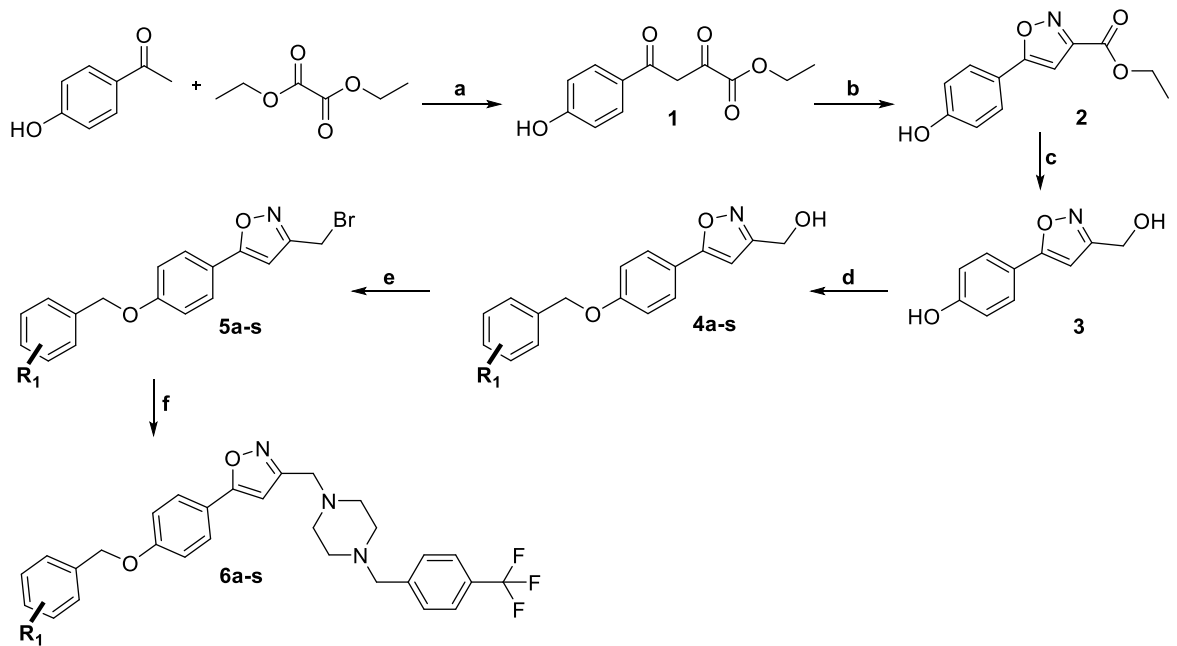
- I. A halkası (benzil grubu) modifikasyonları
- II. İzoksazol halkasının 3. konumundaki amin yapısının modifikasyonları
- III. B halkası modifikasyonları

Sentez çalışmalarında izlenen strateji; her bir basamakta olumlu biyolojik sonuç elde edilen sübstituent paternlerini koruyup bir sonraki basamağa uygulamak ve paralelinde de ilaç olabilirliği yüksek ve hedef üç hücre tipine (MCF7, Huh7, Mahlavu) karşı aktif bir aday bileşiğe ulaşmak olmuştur.

Gelinen noktada en anlamlı sonuçları aldığımız komponentler; A halkası için 3-CN sübstitüsyonu olurken, B halkasında 3-F sübstitüsyonu olmuştur. İzoksazol halkasının 3. konumunda ise öncü bileşik BRP29'un da taşımakta olduğu 4-triflorometilbenzil piperazin grubu ile iyi bir aktivite elde edilerek, bu tez çalışmasının en aktif serisi olan Bileşik 26a-d'ye ulaşılmıştır.

5.1.1. Benzil grubunun (A halkası) modifikasyonu amacıyla gerçekleştirilen sentez çalışmaları

BRP29'un A halkası üzerindeki sübstitüent düzeninin ve sübstitüentlerin sterik ve elektronik etkilerinin, aktiviteye katkısının değerlendirilmesi amacıyla; sübstitüentleri o, m veya p konumlarında (mono, di veya tri-sübstitüe) taşıyan bir seri bileşik tasarlanmış ve bu final bileşiklerin sentezi Şekil 5.2'deki sentez şemasına göre yapılmıştır.



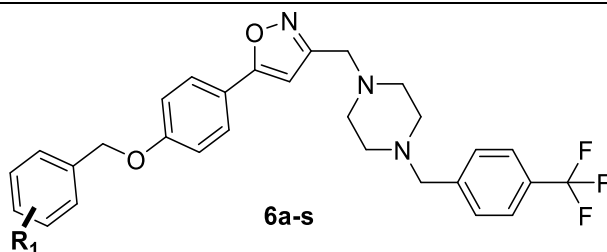
(a) NaOEt, EtOH; (b) $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, EtOH; (c) LiAlH_4 , THF; (d) Benzil halojenür türevleri, K_2CO_3 , $\text{CH}_3\text{CN}/\text{DMF}$; (e) CBr_4 , PPh_3 , DCM; (f) 4- CF_3 -benzilpiperazin, DIEA, DMF

Şekil 5.2. Bileşik 6a-s'nin sentez şeması

Bileşik 6a-s'nin sentezi amacıyla öncelikle; 4-hidroksiasetofenon ve dietil oksalattan hareketle diketoester türevi (Bileşik 1) elde edilmiş; Bileşik 1'in hidrosilamin hidroklorür ile reaksiyonu sonucunda izoksazol halkası kapanmıştır (Bileşik 2). Daha sonra, Bileşik 2'deki ester grubunun LiAlH_4 ile redüksiyonu sonucu alkol türevi ara başlangıç maddesi olan Bileşik 3 elde edilmiştir. Bileşik 3, uygun sübstitüe benzil bromür/klorür türevleri ile mikrodalga reaktöründe alkilasyon reaksiyonuna sokularak Bileşik 4a-s elde edilmiştir. Alkol türevlerinin PPh_3 varlığında CBr_4 ile bromlanması sonucunda (Appel reaksiyonu) bromür türevlerine (Bileşik 5a-s)

geçilmiştir. Son basamakta ise bromür türevlerinin 4-triflorometilbenzil piperazin ile reaksiyonu sonucunda Çizelge 5.1'de gösterilen final bileşikler elde edilmiştir.

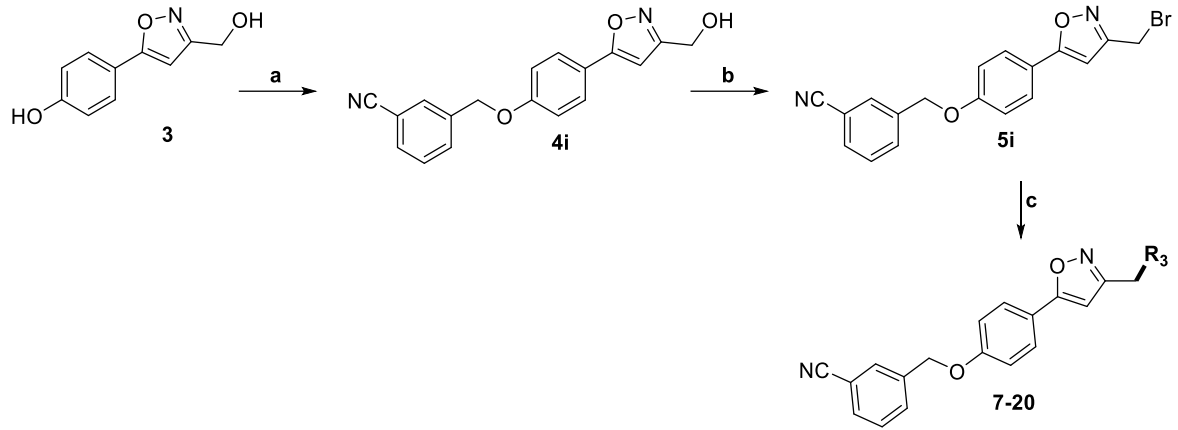
Çizelge 5.1. A halkasında yapılan değişiklikler ile sentezlenen bileşikler (Bileşik 6a-s)



- | | | | | | |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------------|
| a) 2-CH ₃ | b) 3-CH ₃ | c) 4-CH ₃ | d) 3,5-diCH ₃ | e) 2-Cl | f) 3-Cl |
| g) 4-Cl | h) 2-CN | i) 3-CN | j) 4-CN | k) 2-F | l) 3-F |
| m) 4-F | n) 2-OCH ₃ | o) 3-OCH ₃ | p) 4-OCH ₃ | r) 3,5-diOCH ₃ | s) 3,4,5-triOCH ₃ |

5.1.2. İzoksazol halkasının 3. konumundaki piperazinil metil motifinin modifikasyonu amacıyla gerçekleştirilen sentez çalışmaları

İzoksazol halkasının 3. konumunda yer alan 4-CF₃-benzilpiperazin grubunun farklı amin türevleriyle değiştirilmesi sonucu, amin gruplarının biyoaktivitede oluşturacağı olumlu veya olumsuz etkileri belirlemek amacıyla Bileşik 7-20 tasarlanmıştır. Elde edilecek sonuçlar dikkate alınarak olası aktif türevlerdeki amin motiflerinin, diğer aktif final bileşiklere de uygulanması düşünülmüştür. Söz konusu final bileşiklerin sentezi Şekil 5.3'e göre yapılmıştır.

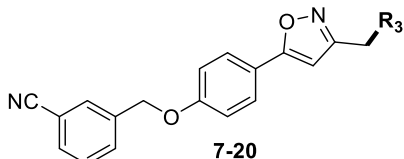
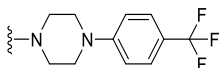
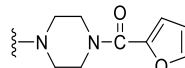
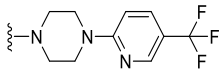
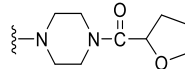
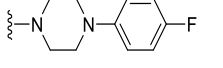
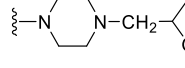
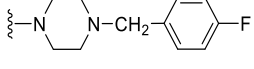
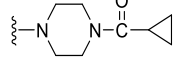
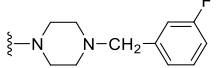
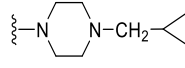
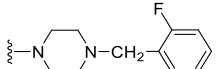
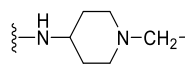
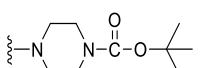
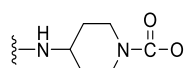


(a) 3-CN-benzilbromür, K₂CO₃, CH₃CN; (b) CBr₄, PPh₃, DCM; (c) Amin türevleri, DIEA, DMF

Şekil 5.3. Bileşik 7-20'nin sentez şeması

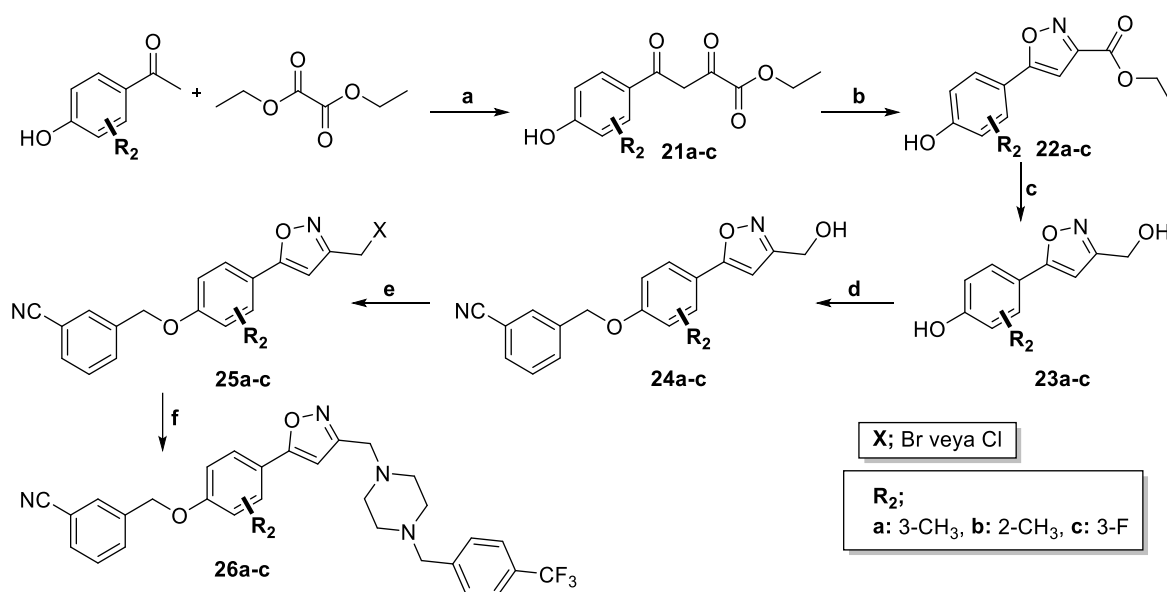
Öncelikle Bileşik 3, 3-siyanobenzil bromür türevi ile mikrodalga reaktöründe reaksiyona sokularak alkol türevi Bileşik 4i elde edilmiştir. Daha sonra alkol türevi Bileşik 4i'nin CBr₄/PPh₃ ile reaksiyonu sonucu bromür türevi ara başlangıç maddesi (Bileşik 5i) elde edilmiştir. Son basamakta bromür türevinin 14 farklı amin türevi ile reaksiyonu sonucunda Çizelge 5.2'de gösterilen final bileşikler sentezlenmiştir.

Çizelge 5.2. İzoksazol halkasının 3. konumunda yapılan değişiklikler ile sentezlenen bileşikler (Bileşik 7-20)

			
	R ₃	R ₃	
7		14	
8		15	
9		16	
10		17	
11		18	
12		19	
13		20	

5.1.3. Benziloksifenil grubunun (B halkası) modifikasyonu amacıyla gerçekleştirilen sentez çalışmaları

Sentez çalışmalarının bu bölümünde Bileşik 6'nin izoksazol halkasının 5. konumunda bulunan unsüstitüe fenil grubu (B halkası)'na yoğunlaştırılmıştır. Benziloksifenil grubunun optimizasyonu için tasarlanan final bileşiklerden Bileşik 26a-c, Şekil 5.4'e göre sentezlenmiştir.

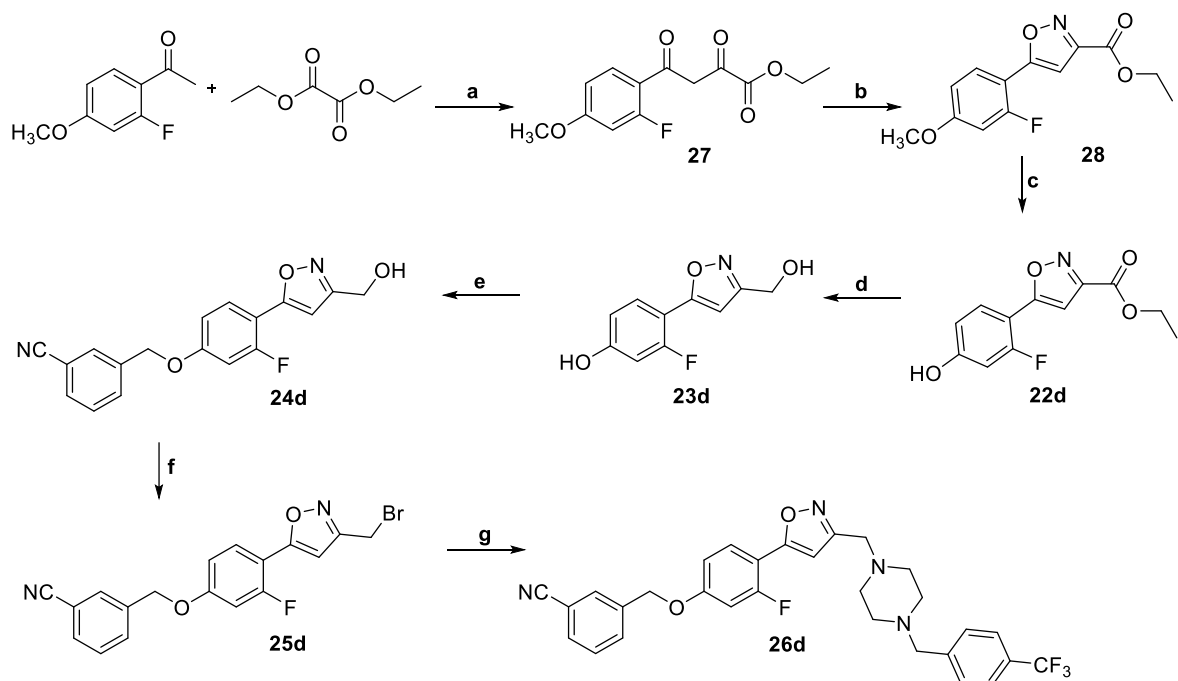


(a) NaOEt, EtOH; (b) NH₂OH.HCl, EtOH; (c) LiAlH₄, THF; (d) 3-CN-benzilbromür, K₂CO₃, CH₃CN; (e) CBr₄, PPh₃/SOCl₂, DCM; (f) 4-CF₃-benzilpiperazin, DIEA, DMF

Şekil 5.4. Bileşik 26a-c'nin sentez şeması

İlk olarak, uygun o- veya m-süstitüe 4-hidroksiasetofenon türevi ve dietil oksalattan hareketle diketoester türevi Bileşik 21a-c elde edilmiştir. Bileşik 21a-c'nin hidroksilamin hidroklorür ile reaksiyonu sonucunda izoksazol halkası kapanmıştır (Bileşik 22a-c). Bileşik 22a-c'nin ester gruplarının LiAlH₄ ile redüksiyonu sonucu ara alkol türevleri Bileşik 23a-c elde edilmiştir. Bileşik 23a-c'nin 3-siyano-benzil bromür ile alkilasyon reaksiyonu sonucunda Bileşik 24a-c elde edilmiştir. Alkillenmiş alkol türevlerinin (Bileşik 24a-c) CBr₄/PPh₃ veya SOCl₂ varlığında reaksiyonu sonucu bromür veya klorür türevlerine (Bileşik 25a-c) geçilmiştir. Son basamakta bromür/klorür türevlerinin 4-triflorometilbenzil piperazin ile reaksiyonu sonucunda final bileşikler (Bileşik 26a-c) sentezlenmiştir.

Aynı serinin son maddesi olan ve B halkasının 2. konumunda flor taşıyan Bileşik 26d'nin sentezi ise yukarıda bahsedilen sentez yolağı ile gerçekleştirilemediğinden; diğer türevlerin elde edilmiş şemasından ufak farklılıklar içeren bir sentez yolu izlenmiş ve Şekil 5.5'te gösterildiği gibi 4. konumunda metoksi taşıyan (diğer türevlerde hidroksi) 2-floro asetofenon türevinden başlayarak takip edilen sentez basamakları sonucunda istenilen madde (Bileşik 26d) elde edilmiştir.

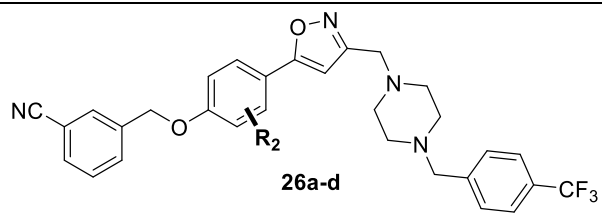


(a) NaOEt, EtOH; (b) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, EtOH; (c) BBr_3 , DCM; (d) LiAlH_4 , THF; (e) 3-CN-benzilbromür, K_2CO_3 , CH_3CN ; (f) CBr_4 , PPh_3 , DCM; (g) 4- CF_3 -benzilpiperazin, DIEA, DMF

Şekil 5.5. Bileşik 26d'nin sentez şeması

Öncelikle, 2-floro-4-metoksi asetofenon ve dietil oksalattan hareketle diketoester türevi Bileşik 27 elde edilmiştir. Bileşik 27'nin hidroksilamin hidroklorür ile reaksiyonu sonucunda izoksazol halkası kapanmıştır (Bileşik 28). Bileşik 28'deki metoksi grubunun BBr_3 varlığında demetilasyonu sonucu Bileşik 22d elde edilmiştir. Bileşik 22d'deki ester gruplarının LiAlH_4 ile redüksiyonu sonucu ara alkol türevi Bileşik 23d elde edilmiştir. Bileşik 23d'nin 3-siyano benzil bromür ile alkilasyon reaksiyonu sonucunda ise Bileşik 24d elde edilmiştir. Alkillenmiş alkol türevinin (Bileşik 24d) PPh_3 varlığında CBr_4 ile reaksiyonu sonucu bromür türevine (Bileşik 25d) geçilmiştir. Son basamakta bromür türevinin 4-triflorometilbenzil piperazin ile reaksiyonu sonucunda final bileşik (Bileşik 26d) sentezlenmiştir.

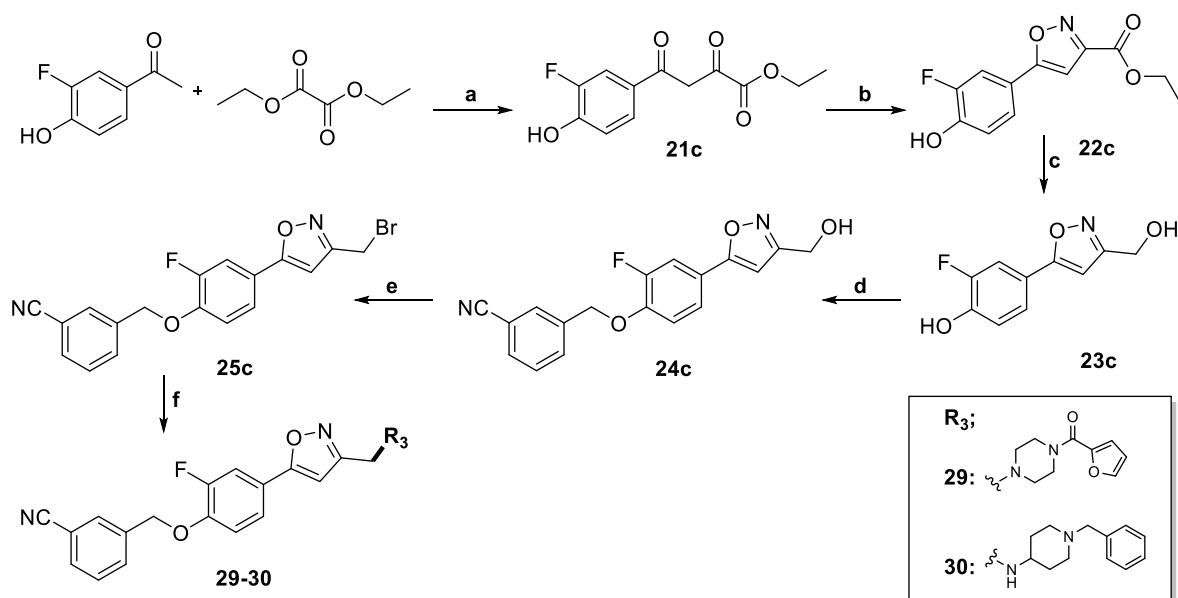
Çizelge 5.3. B Halkasında yapılan değişiklikler sonucu sentezlenen bileşikler (Bileşik 26a-d)



	R ₂		R ₂
26a	3-CH ₃	26b	2-CH ₃
26c	3-F	26d	2-F

5.1.4. B Halkası ile izoksazol halkasının 3. konumundaki piperazinil metil motifinin bir arada modifikasyonu amacıyla gerçekleştirilen sentez çalışmaları

Bileşik 6i üzerinden yapılan B halkası modifikasyonlarından uygun olan sübstitüent ve izoksazol halkasının 3. konumunda daha önceden sübstitüe edilmiş farklı iki amin grubu seçilerek yeni iki molekül (Bileşik 29-30) tasarlanmış ve sentez çalışmaları Şekil 5.6'daki gibi gerçekleştirilmiştir. Buna göre daha önceki final bileşiklerden Bileşik 26c'nin sentezi için elde edilen Bileşik 25c, seçilen uygun amin türevleriyle mikrodalga reaktöründe reaksiyona sokulmuş, böylece Bileşik 29-30 elde edilmiştir.



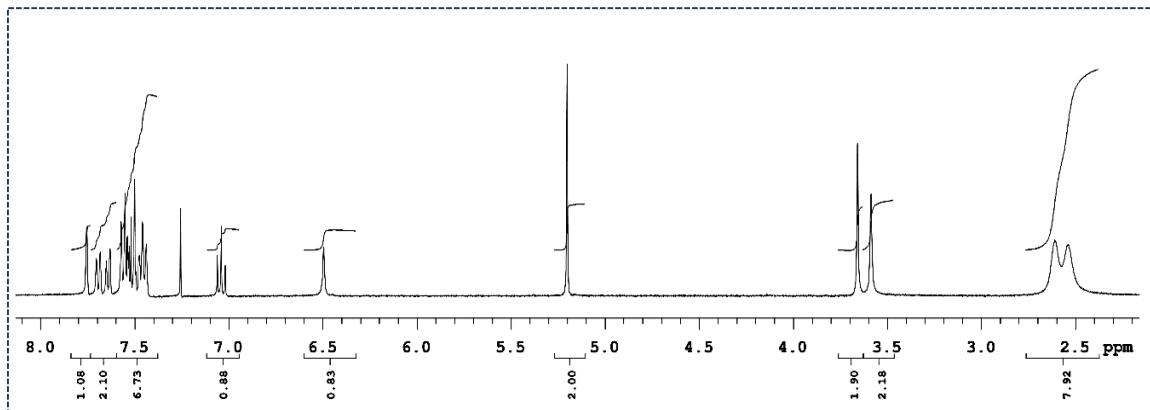
(a) NaOEt, EtOH; (b) NH₂OH.HCl, EtOH; (c) LiAlH₄, THF; (d) 3-CN-benzilbromür, K₂CO₃, CH₃CN; (e) CBr₄, PPh₃, DCM; (f) Amin türevleri, DIEA, DMF

Şekil 5.6. Bileşik 29-30'un sentez şeması

5.1.5. Sentezlenen bileşiklerin yapı aydınlatma çalışmaları ve Bileşik 26c'nin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

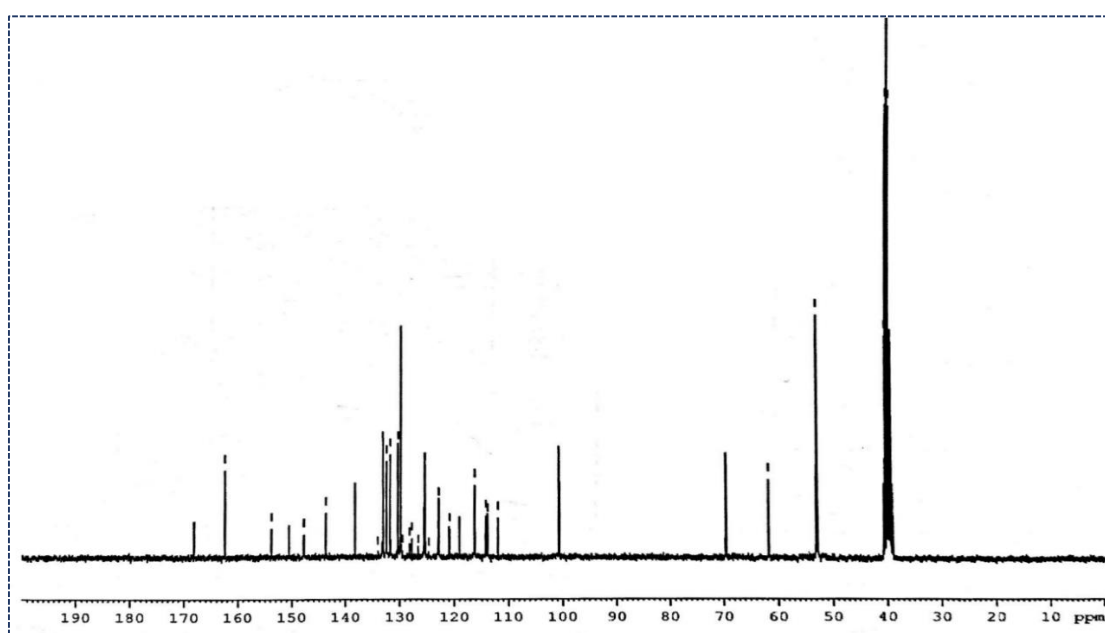
Bu tez kapsamında gerçekleştirilen sentez çalışmaları sonucunda; 48 tanesi orijinal olmak üzere 60 tane ara bileşiğin ve tamamı orijinal 38 tane final bileşiğin sentezleri tamamlanmış, bileşiklerin kimyasal yapıları uygun analitik yöntemlerle açıklanmıştır.

Sentezlenen ara ürünlerin yapılarının aydınlatılmasında ^1H -NMR spektrumları ve HRMS sonuçları kullanılmış, final bileşiklerin yapıları ise ^1H -NMR, ^{13}C -NMR spektrumları ve HRMS sonuçları ile aydınlatılmıştır. Bu amaçla tez çalışmasının en aktif bileşiği olan Bileşik 26c'nin 400 MHz frekansta ve CDCl_3 (dötero kloroform) içerisinde alınan ^1H -NMR spektrumunda; piperazin yapısına ait $-\text{CH}_2-$ gruplarının 2.54 ve 2.61 ppm'de, her biri 4H değerinde yayvan birer singlet verdikleri gözlemlenmiştir. Yine nispeten düşük alanda gözlenmesi beklenen elektronegatif oksijen ve azot atomlarına doğrudan bağlı $-\text{CH}_2-$ gruplarının protonları da 3.59, 3.66 ve 5.20 ($\text{O}-\text{CH}_2-$ grubunun protonları) ppm'de 2H değerinde birer singlet olarak sinyal vermişlerdir. İzoksazol halkasının 4. konumundaki tek bir proton ise 6.50 ppm'de singlet olarak gözlemlenmiştir. Aromatik saha incelendiğinde; triflorometil grubunun ve flor atomunun bağlı olduğu benzen halkalarının aromatik protonlarının 7.44-7.57 ppm aralığında multipet (7H) olarak sinyal verdikleri görülmektedir. Siyano benzil halkasının 5' protonu 7.64 ppm'de triplet ($J= 8.4$ Hz), 4' ve 6' protonları dublet ($J= 7.8, 7.6$ Hz) ve 2' protonu ise 7.76 ppm'de singlet olarak sinyal vermişlerdir. 7.26 ppm'de gözlemlenen sinyal ise kullanılan NMR solvanına ait piktir (Resim 5.1).



Resim 5.1. Bileşik 26c'nin ^1H -NMR spektrumu

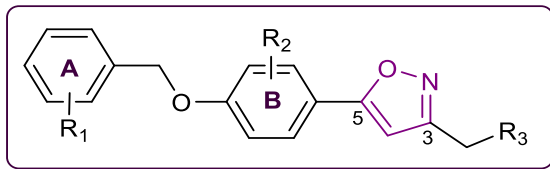
Bileşik 26c'nin 300 MHz frekansta ve DMSO-d₆ içerisinde alınan ¹³C-NMR spektrumunda; moleküldeki 4 farklı (piperazinin tüm karbonları eşdeğer davranarak tek bir sinyal vermiş) alifatik karbon atomuna ait sinyaller 52.89, 52.94, 61.68 ve 69.60 ppm değerlerinde gözlemlenmiştir. Aromatik sahaya bakıldığında ise, moleküldeki F ve CF₃ gruplarına komşu karbon atomlarının sinyallerinde yarılmalara görülmektedir. CF₃ grubunun karbon atomu 124.81 ppm'de kuartet ($^1J_{C-F} = 270.0$ Hz) olarak sinyal verirken; bağlı bulunduğu benzen halkasındaki 1' karbon atomu 128.03 ppm'de kuartet ($^2J_{C-F} = 30.7$ Hz), 2 ve 2' karbon atomları ise 125.49 ppm'de kuartet ($^3J_{C-F} = 3.0$ Hz) olarak gözlemlenmişlerdir. Floro benzen halkasının flor atomuna direkt bağlı 1' karbonu 152.18 ppm'de dublet ($^1J_{C-F} = 243.7$ Hz), 2' karbonlarından biri ve aynı zamanda oksijen atomuna komşu olanı 147.84 ppm'de dublet ($^2J_{C-F} = 10.5$ Hz), diğeri ise 114.05 ppm'de dublet ($^2J_{C-F} = 20.2$ Hz) olarak gözlemlenmiştir. 3' karbonlarından biri 120.92 ppm'de dublet ($^3J_{C-F} = 7.5$ Hz) olarak sinyal verirken diğerrinin dublet yarılması gözlemlenememiştir. Aynı halkada son olarak 4' karbonu 122.88 ppm'de dublet ($^4J_{C-F} = 3.0$ Hz) olarak sinyal vermiştir. Ek olarak, izoksazol halkasının 4 numaralı karbonu 100.70 ppm'de ve flor atomuna 4 bağ uzaklıkta bulunan izoksazol halkasının 5 numaralı karbonu 168.14 ppm'de dublet ($^4J_{C-F} = 2.2$ Hz) olarak tespit edilmiştir. Nitril karbonu ise 119.06 ppm'de sinyal vermiştir. 39.09-40.76 ppm aralığında gözlemlenen multipler ise kullanılan NMR solvanına ait piklerdir (Resim 5.2).



Resim 5.2. Bileşik 26c'nin ¹³C-NMR spektrumu

5.2. Biyolojik Çalışmalar ve Yapı Etki İlişkileri

Bu tez çalışması kapsamında BRP29 lider bileşiği üzerinde yapılan birtakım modifikasyonlar ile tasarlanarak sentezlenen izoksazol türevi final bileşiklerin; karaciğer (Huh7, MV) ve meme (MCF-7) kanseri hücre hatlarındaki sitotoksik aktiviteleri Sulforadamin B (SRB) testi ile değerlendirilmiştir [118]. Bileşiklerin hepatoselüler karsinomaya karşı etkinliğini değerlendirmek için; PTEN delesyonlu ve kötü huylu mezenkimal Mahlavu ve normal PTEN aktiviteli Huh7 hücrelerinde, ilgili analizler gerçekleştirilerek sonuçlar; IC₅₀ değerleri ile ifade edilmiştir. Elde edilen biyolojik aktivite değerlerinin, bileşiklerin kimyasal yapılarıyla ilişkilendirilmesi sonucu ortaya çıkan “yapı-etki ilişkileri (YEİ)” ise tez çalışmasının bu bölümünde açıklanmaya çalışılmıştır.



Şekil 5.7. BRP29 üzerinde yapılan temel yapısal modifikasyonlar

BRP29 lider bileşiğindeki 3,5-disüstitüe izoksazol çekirdeği üzerinde yapılarak, kanser hücre proliferasyonunun inhibisyonu üzerindeki etkilerinin araştırıldığı temel yapısal değişiklikleri (Şekil 5.7) ve elde edilen molekül serilerini aşağıdaki gibi sıralamak mümkündür:

- I. İzoksazol halkasının 5. konumundaki benziloksifenil yan zincirinin A halkasına, farklı konumlandırılmış çeşitli süstitüentlerin (R₁) getirilmesi ile oluşan Bileşik (6a-s) serisi.
- II. İzoksazol halkasının 3. konumuna çeşitli piperazin ve amin gruplarının (R₃) getirilmesi ile oluşan Bileşik (7-20) serisi.
- III. Benziloksifenil yan zincirinin B halkası üzerine o veya m konumlarından metil veya flor süstitüentlerinin (R₂) getirilmesi ile oluşan Bileşik (26a-d) serisi.
- IV. İlk üç modifikasyon sonucu aktiviteye katkısının yüksek olduğu düşünülen komponentleri, uygun konumlarda bir arada içeren Bileşik (29-30) serisi.

İlk olarak, BRP29'un benziloksifenil grubunun A halkası üzerindeki sübstitüsyon düzeninin aktivite üzerine olan etkisini araştırmak amacıyla Bileşik 6a-s serisi sentezlenerek IC_{50} değerleri belirlenmiştir. Daha önceki bölümlerde de belirtildiği üzere A halkasında herhangi bir sübstitüsyon içermeyen öncü bileşik BRP29, Mahlavu hücre hatlarında ($IC_{50} = 11,7 \mu M$) nispeten daha az sitotoksik aktivite gösterirken, Huh7 ve MCF7'ye karşı (sırasıyla $IC_{50} = 1,7$ ve $2,9 \mu M$) daha potent sitotoksik aktiviteler sergilemiştir. Bu anlamda, A halkasına getirilen farklı sübstitüentler ile bu aktivite değerlerinde bir iyileşme ve/veya selektivite yakalanması amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar; A halkasındaki farklı sübstitüentler bariz bir yapı-aktivite ilişkisi (YEİ) sergilemeseler de, test edilen tüm hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktivite üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Örneğin, klor analogları 6e-g içerisinde, 3-kloro-benzil grubu taşıyan 6f analogu, Huh7'ye karşı oldukça aktif bileşik ($IC_{50} = 0,2 \mu M$) olarak belirlenmiştir. Bundan başka, nitril taşıyan 6h-j ve metoksi taşıyan 6n-s analoglar Huh7 ve MCF7 hücre hatlarının biri veya ikisi için kayda değer bir antiproliferatif aktivite sergilemişlerdir. Bu türevler arasında, 3-siyano-benzil grubu taşıyan 6i ve 2-metoksi-benzil grubu taşıyan 6n, hem Huh7 (sırasıyla $IC_{50} = 0,1$ ve $0,8 \mu M$) hem de MCF7 (sırasıyla $IC_{50} = 0,8$ ve $0,3 \mu M$) hücrelerine karşı potent aktivite ve seçicilik göstermekle birlikte Mahlavu hücrelerine karşı belirgin bir aktivite sergilememişlerdir. Selektivite açısından bakılacak olursa, hem 4-siyano benzil grubu taşıyan 6j hem de 3,5-dimetoksi benzil grubu taşıyan 6r, MCF7 hücre hatlarında sergiledikleri $0,1 \mu M$ 'lık IC_{50} değerleriyle bu hücre hattına karşı net bir seçicilik göstermişlerdir. Huh7 hücre hattına karşı ise sırasıyla $0,6$; $0,8$; $0,5 \mu M$ 'lık IC_{50} değerleriyle 6d (3,5-dimetil), 6o (3-metoksi) ve 6s (3,4,5-trimetoksi) seçici ve potent aktiviteler sergilemişlerdir. Bununla birlikte, bu serideki analogların hiçbiri Huh7 ve MCF7 hücre hatları için olduğu gibi Mahlavu hücre hatlarına karşı önemli bir aktivite gösterememişlerdir.

Benzil halkasının 3. konumuna getirilen siyano sübtitüsyonu ile elde edilen 6i bileşiğinin BRP29'a ve sentezlenen diğer türevlere kıyasla özellikle Huh7 ve MCF7 hücre tiplerine karşı sitotoksik aktivitesinde olumlu katkıda bulunduğu belirlenmiştir ($IC_{50} < 1 \mu M$). Bununla beraber 6i, daha agresif bir karaciğer kanseri türü olan Mahlavu hücrelerine karşı halen daha az etkilidir. Esasında, moleküllerden 2- ve 3-metoksi türevler de her 3 hücre hattına karşı potent sitotoksikite göstermişlerdir.

Fakat oldukça lipofilik karakterde olan bu moleküllerde; hem aktivite açısından hem de lipofilikliği dengelemesi açısından ve metoksi gruplarının metabolik dayanaksızlığı nedeniyle 3-siyano içeren 6i molekülünün benzil kısmında korunarak ileri YEİ çalışmalarının planlanmasının daha anlamlı olacağı düşünülmüş ve bir sonraki aşamada 4-CF₃-benzilpiperazin yan zincir modifikasyonlarının aktivite ve özellikle Mahlavu hücrelerine karşı etkisi araştırılmıştır.

Bu amaçla, farklı sübstitüsyonlar içeren benzil/fenil piperazinler ve çeşitli amino piperidin grupları R₃ pozisyonuna getirilmiş ve Bileşik 7-20 serisi sentezlenerek IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, sübstitüe benzil veya fenil piperazin taşıyan türevlerin (Bileşik 7-18; MCF7 için 1,4-8,4 µM ve Huh7 için 1,5-6,1 µM), 4-CF₃-benzilpiperazin taşıyan 6i (MCF7 için 0,8 µM ve Huh7 için 0,1 µM)'ye kıyasla orta düzeyde sitotoksik aktivite sergilediklerini göstermiştir. Bileşiklerin Mahlavu hücreleri üzerinde gösterdikleri sitotoksitede ise nispeten olumlu bir gelişme gözlemlenmiştir (1,3-5,6 µM). Test edilen aminopiperidin türevlerinin (Bileşik 19-20) aktiviteleri de piperazin türevlerine benzer şekilde, her hücre hattına karşı da orta düzeyde olmuştur (2,1-3,0 µM). Sonuçta R₃ konumunun türevlendirildiği bu serideki tüm bileşiklerin aktiviteleri Mahlavu hücre hattı üzerindeki aktivitede ılımlı bir gelişmeye sebep olmakla birlikte; bu bileşikler, MCF7 ve Huh7 hücre hatlarına karşı Bileşik 6i'den daha iyi bir aktivite gösterememişlerdir. Aktivitede istenilen düzeyde bir iyileşmenin bu modifikasyonlarla sağlanamaması sebebiyle; bundan sonraki aşamada R₃ pozisyonunda, 4-CF₃-benzilpiperazin motifiyle devam edilmesinin daha anlamlı olacağı düşünülmüş ve bundan sonraki aşamada Bileşik 6i'nin B halkasının aktiviteye katkısı araştırılmıştır.

B halkasındaki türevlendirmeler ile sentezleri gerçekleştirilen türevlerin (Bileşik 26a-d) sitotoksitede değerleri, Bileşik 6i ile kıyaslanabilir düzeyde potent olmakla birlikte bu modifikasyonların en önemli sonucu; daha dirençli mezenkimal karaciğer kanser hücre hattı Mahlavu'ya karşı şimdiye kadarki en düşük µM düzeylerdeki, yani en aktif bileşiklerin elde edilmiş olmasıdır (0,4-0,5 µM). Ayrıca B halkasının 3 numaralı pozisyonunda metil ve flor taşıyan Bileşik 26a ve 26c, her üç hücre hattı üzerinde de Bileşik 6i'den daha iyi sonuçlar vermiştir (0,09-0,5 µM). Serinin en aktif bileşiği olarak ise B halkasının 3 numaralı konumunda flor içeren Bileşik 26c olarak belirlenmiştir.

Bu sonuçlar daha geniş spektrumda sitotoksik aktivite değerleri için B halkasının önemini ortaya çıkarmıştır. Sentez çalışmalarının son adımında ise; B halkasındaki 3-flor sübstitüsyonu korunarak, izoksazol halkasının 3. konumundaki amin kısmında yapılacak değişikliklerin aktivitede ne gibi sonuçlar doğuracağını anlamak amacıyla iki farklı bileşik sentez edilerek, sitotoksikite değerleri incelenmiştir. Daha önce izoksazol halkasının 3. konumundaki amin gruplarının türevlendirildiği seride (Bileşik 7-20) olumlu sonuçlar alınmış olan Bileşik 14 ve 19'daki amin motifleri Bileşik 26c'ye uygulanmıştır. Bununla beraber 4-CF₃-benzilpiperazin yerine getirilen bu amin grupları beklenen aktivite artışını sağlayamamıştır. Bu nedenle, bu tez kapsamında elde edilen yapı-etki ilişkileri sonucunda biyolojik çalışmalar için Bileşik 26c seçilmiş ve öncü bileşik BRP29 ile kıyaslamalı olarak bileşiklerin moleküler etki mekanizmasına yönelik çalışmalar planlanmıştır.

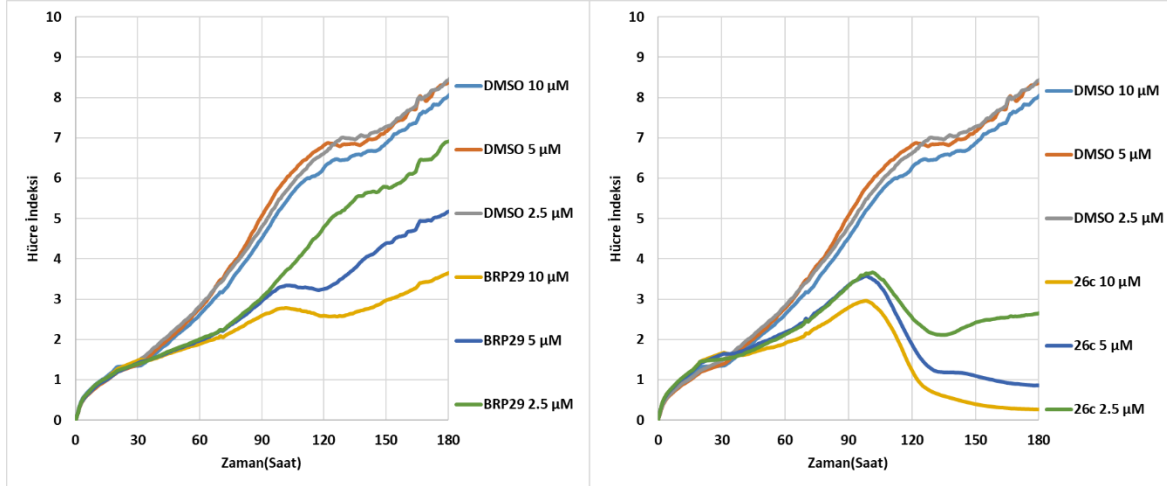
5.2.1. BRP29 ve Bileşik 26c'nin gerçek zamanlı sitotoksikite analizi

BRP29 ve Bileşik 26c'nin Huh7 karaciğer hücre hattına karşı olan sitotoksikite analizi gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda 96-kuyucuklu E-96 kültür kaplarına ekilen hücrelerde gerçek zamanlı hücre çoğalmasının takip edildiği RT-CES sistemi kullanılarak sitotoksik etki zamana bağlı olarak 30 dakika aralıklarla uygulanan bileşik konsantrasyonlarında incelenmiştir. Deney sonucunda bileşiklerin Huh7 karaciğer kanseri hücre hattında büyüme üzerindeki etkileri ve IC₅₀ değerleri belirlenmiştir.

Çizelge 5.4. BRP29 ve Bileşik 26c'nin zaman bağımlı IC₅₀ değerleri

	BRP29					26c				
	24s	48s	72s	96s	120s	24s	48s	72s	96s	120s
Huh7	5,2	3,7	5,4	6	7,5	2,7	2,4	2,7	0,4	0,8

Gerçek zamanlı sitotoksikite analiz sonuçlarına göre; BRP29 ve Bileşik 26c karaciğer kanseri hücre hattı olan Huh7'de oldukça sitotoksik bulunmuştur. Bu etkilerin BRP29 ile 24. saatten sonra başladığı ve zamana bağımlı olarak gittikçe arttığı; Bileşik 26c ile ise 96. saatte en yüksek sitotoksikite noktasına eriştiği gösterilmiştir (Çizelge 5.4).

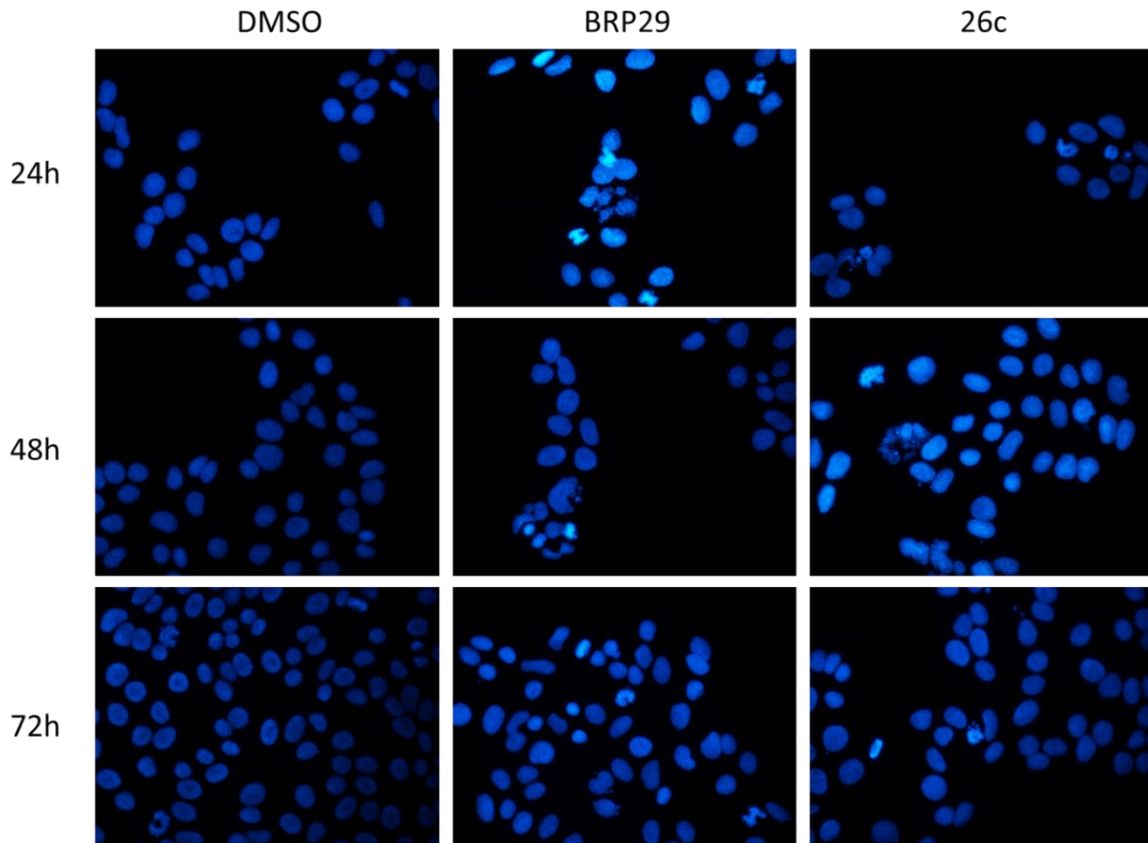


Şekil 5.8. BRP29 ve Bileşik 26c'nin zamana ve doza bağımlı etkisinin Huh7 hücre hattında RT-CES sistemi ile analizi

Çalışmada sırasıyla 10; 5 ve 2,5 µM dozlarında BRP29 ve Bileşik 26c ile hücreler muamele edilmiş ve gerçek zamanlı sitotoksosite analizi hücre indeksindeki artış ile takip edilmiştir. DMSO kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

5.2.2. BRP29 ve Bileşik 26c'nin Huh7 karaciğer kanseri hücreleri üzerinde oluşturduğu morfolojik etkilerin belirlenmesi

Huh7 karaciğer kanseri hücre hattında BRP29 ve Bileşik 26c RT-CES deneyi sonucundaki IC₅₀ değerlerine göre hücrelere uygulanmıştır. 24, 48 ve 72 saat sonunda hücreler Hoechst 33258 (Sigma) ile boyanarak floresan mikroskopu altında incelenmiştir. BRP29'un hücreler üzerinde apoptotik özellikte değişiklikler oluşmasına sebep olduğu belirlenmiştir (Bkz. Resim 5.3; IC₅₀ değerlerine göre bileşiklerle muamele edilen hücreler, inkübasyon süresi bitiminde metanol ile fikslenip hoechst ile boyandıktan sonra Nikon Eclipse 55i floresan mikroskopunda (40X) görüntüleri elde edilmiştir).

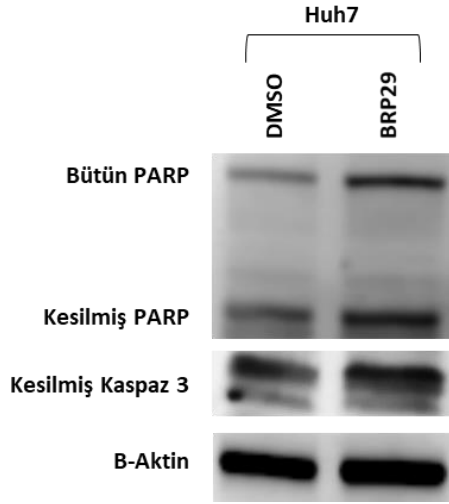


Resim 5.3. BRP29 ve Bileşik 26c'nin Huh7 karaciğer kanseri hücresinde zamana bağımlı morfolojik etkilerinin Hoechst boyaması ile incelenmesi

Resim 5.3'te de görüldüğü gibi BRP29 ve Bileşik 26c ile inkübe edilen hücrelerin çekirdeklerinde, DNA parçalanması ve çekirdek yoğunlaşmasının arttığı gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra artan apoptotik parçacıklar bu bileşiklerle inkübe edilen hücrelerde apoptozun aktif hale geldiğini göstermektedir. Her iki molekülün artan inkübasyon saatlerinde apoptotik etkileri de artırdığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar SRB ve RT-CES sonuçlarını da desteklemektedir.

5.2.3. BRP29 ve Bileşik 26c'nin hücresel yolaklar üzerindeki etkilerinin protein ifade analizi ile incelenmesi

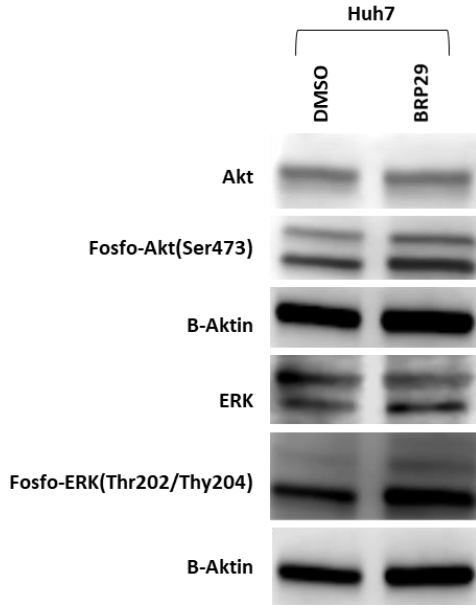
İyi huylu epiteliyal olan Huh7 karaciğer kanseri hücreleri, BRP29 ve Bileşik 26c ile RT-CES deneyi sonucunda belirlenen IC_{50} değerlerine göre inkübe edilip hücre içi protein ifade seviyeleri Western Blot yöntemi ile incelenmiştir (B-Aktin ve Kalneksin eşit yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır).



Resim 5.9. BRP29 ile 72 saat inkübe edilen Huh7 hücrelerinde apoptotik yolak proteinlerinin seviyelerinin Western Blot yöntemi ile incelenmesi

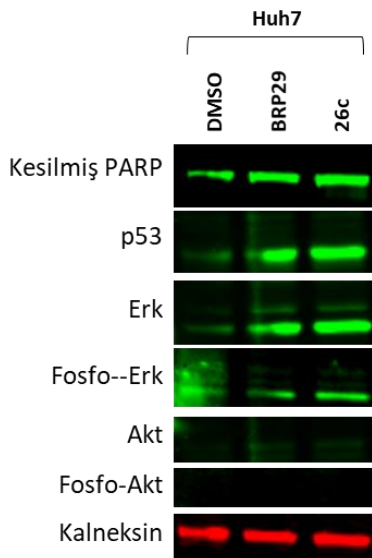
Poli (ADP-riboz) polimerazlar (PARP'lar) DNA'ya bağımlı nükleer enzimlerdir ve DNA hasarındaki rolü nedeniyle kanserde kullanılan hedef protein olarak görülürler ve hücreler apoptoza uğradıklarında hücre içerisindeki kesilmiş PARP miktarında artış gözlemlenir [119]. Kaspazlar sistein proteazlarıdır ve hücrede normalde inaktif halde bulunurlar, bu durum proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirerek son bulur ve farklı hedef proteinleri aktif hale getirerek apoptoza sebep olurlar. Özellikle DNA hasar tamiri ve replikasyonu için önemli enzimleri inaktif hale getirirler. Hücre iskeletinde önemli görevleri olan proteinleri keserek hücre zarında tomurcuklanmaya ve bu parçaların zardan koparak hücre içerisinde yıkılmasına sebep olurlar [120-122]. Resim 5.4'te de görüldüğü üzere BRP29, Huh7 hücrelerinde hem kesilmiş yani aktif hale getirilmiş PARP'ın hem de kesilmiş kaspaz 3'ün yolağında artışa sebep olarak, bu molekülün hücre ölümüne yol açtığını göstermiştir.

Akt proteininin birçok tümörde fazlaca aktive olarak, hücre yaşamı ve tümör terapisine karşı dirence sebep olduğu gösterilmiştir [123]. Bu verilere paralel olarak yaşam yolağı olarak bilinen Akt yolağında önemli bir değişiklik olmaksızın BRP29 ile inkübe edilen hücrelerde Erk proteininin seviyesinde de artış olduğu da gözlemlenmiştir (Bkz. Resim 5.5). Bu sonuçlar Hoechst ile boyanan hücrelerde fazlaca artan DNA parçalanması ve yoğunlaşması bulgularını desteklemiştir.



Resim 5.5. BRP29 ile 72 saat inkübe edilen Huh7 hücrelerinde Akt/Erk yolağında proteinlerin seviyelerinin Western Blot yöntemi ile incelenmesi

Sitotoksitite deneylerinde BRP29 ile benzer sonuçlar veren Bileşik 26c, Huh7 hücrelerinde inkübasyona bırakılarak protein seviyesindeki etkileri gözlemlenmiş ve yine aynı şekilde BRP29 gibi apoptotik p53 ve kesilmiş PARP proteininin seviyesini ve Erk artırırken, Akt yolağında önemli bir değişikliğe yol açmadığı gösterilmiştir (Resim 5.6).



Resim 5.6. BRP29 ve Bileşik 26c ile 72 saat inkübe edilen Huh7 hücrelerinde Akt, Erk ve p53 yolağında proteinlerin seviyelerinin Western Blot yöntemi ile incelenmesi

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak elde edilen olumlu bulgular, benziloksifenilizoksazol ve benzil/fenilpiperazin gruplarının birleştirilmesi ile oluşturulan hibrit yapının antikanser etki açısından özgün bir kimyasal iskelet olduğunu ve daha ileri klinik gelişim potansiyeline sahip olabileceğini göstermektedir. Bu kimyasal iskelet üzerinde gerçekleştirilen modifikasyonlar ile 38 adet sonuç bileşik sentezi gerçekleştirilmiş ve meme ve karaciğer kanseri hücre hatlarına karşı antiproliferatif etkileri incelenerek yapı-etki ilişkileri belirlenmiştir. Elde edilen yapı-etki ilişkisi sonuçlarına göre; genel olarak bu bileşik yapısına sahip bütün türevlerde önemli derecede sitotoksik etki gözlemlenmiş olup, benziloksi, orta fenil ve piperazin grupları üzerindeki değişikliklerin test edilen kanser hücre hatlarına karşı aktiviteyi ve seçiciliği etkilediği ortaya çıkarılmıştır. Özellikle orta fenil halkası üzerindeki sübstitüsyonların test edilen her 3 hücre hattına karşıda potent sitotoksik etkinin ortaya çıkması açısından önem arz ettiği gösterilmiştir. Bu bakımdan Bileşik 26c daha ileri geliştirme çalışmaları açısından lider bileşik olarak belirlenmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında geliştirilen bileşikler arasında yer alan en aktif türev olan Bileşik 26c ile ileri biyolojik çalışmaların planlanarak, antikanser etkinin oluşmasındaki biyolojik mekanizmaların araştırılmasına yönelik faaliyetlerin geliştirilmesi yerinde olacaktır. Bu amaçla bu tez kapsamında bilimsel iş birliği içerisinde olduğumuz Prof. Dr. Rengül Çetin-Atalay'ın danışmanlığında Esra Nalbat'ın doktora tezi kapsamında BRP29 ve Bileşik 26c'nin moleküler etki mekanizmalarının araştırılmasına yönelik biyolojik çalışmalar başlatılmıştır. Bu çalışmaların ilk bulgularına göre her iki bileşiğin de özellikle karaciğer kanser kök hücrelerine karşı apoptotik ve sitotoksik etkili olduğu ortaya konmuştur. Bu çalışmalar halen ilerleme aşamasında olup, bu tez kapsamında geliştirilen bileşiklerin yeni kanser tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından önemini bir kez daha ortaya koymuştur.

Bunun yanısıra, Bileşik 26c ile in vitro ADME (suda çözünürlük, LogD, hücre permeabilitesi, plazma proteinlerine bağlanma, mikrozomal stabilite) ve farede in vivo farmakokinetik çalışmaların gerçekleştirilmesi planlanmaktadır. Bu çalışma

sonuçlarına göre bileşiğin in vivo fare ksenograft deneyleri için uygun olup olmadığı tespit edilebilecektir. Bu sonuçlara göre gerektiği takdirde ADME özelliklerinin optimizasyonuna yönelik çalışmalar planlanabilecektir. En nihayetinde, Bileşik 26c veya optimize edilmiş analogu ile insan meme ve karaciğer kanseri hücre hatları ile elde edilecek ksenograft fare modelinde bileşiklerin in vivo etkinlikleri değerlendirilebilecek ve ön klinik çalışmalara aday bileşik geliştirme yolunda önemli bir noktaya gelinmiş olacaktır.

KAYNAKLAR

1. İnternet: World Health Organization. (2018). *What is cancer?, cancer prevention and cancer management*. Retrieved from Web: <https://www.who.int/cancer/en/>, Son Erişim Tarihi:27.07.2018.
2. İnternet: World Health Organization. (2018). *Key facts about cancer*. Retrieved from Web: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>, Son Erişim Tarihi:12.09.2018.
3. İnternet: Global Cancer Observatory. (2018). *Global cancer statistics*. Retrieved from Web: <http://gco.iarc.fr/>, Son Erişim Tarihi:13.09.2018.
4. Islam, M. S., Wang, C., Zheng, J., Paudyal, N., Zhu, Y., and Sun, H. (2019). The potential role of tubeimosides in cancer prevention and treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 162, 109-121.
5. Liang, X. J., Chen, C., Zhao, Y., and Wang, P. C. (2010). Circumventing tumor resistance to chemotherapy by nanotechnology. *Methods in Molecular Biology*, 596, 467-488.
6. Toloudi, M., Apostolou, P., Chatziioannou, M., Kourtidou, E., Vlachou, I., Mimikakou, G., Chlichlia, A., and Papasotiriou, I. (2014). Recent developments in cancer treatment: A review. *Pharmaceutical Regulatory Affairs*, 1(1), 1-4.
7. Eccles, S. A., Massey, A., Raynaud, F. I., Sharp, S. Y., Box, G., Valenti, M., Patterson, L., Brandon, A. D., Gowan, S., Boxall, F., Aherne, W., Rowlands, M., Hayes, A., Martins, V., Urban, F., Boxall, K., Prodromou, C., Pearl, L., James, K., Matthews, T. P., Cheung, K. M., Kalusa, A., Jones, K., Mcdonald, E., Barril, X., Brough, P. A., Cansfield, J. E., Dymock, B., Drysdale, M. J., Finch, H., Howes, R., Hubbard, R. E., Surgenor, A., Webb, P., Wood, M., Wright, L., and Workman, P. (2008). Nvp-auy922: A novel heat shock protein 90 inhibitor active against xenograft tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Cancer Research*, 68(8), 2850-2860.
8. Workman, P., Burrows, F., Neckers, L., and Rosen, N. (2007). Drugging the cancer chaperone hsp90 combinatorial therapeutic exploitation of oncogene addiction and tumor stress. *Stress Responses in Biology and Medicine*, 1113, 202-216.
9. Baruchello, R., Simoni, D., Grisolia, G., Barbato, G., Marchetti, P., Rondanin, R., Mangiola, S., Giannini, G., Brunetti, T., Alloatti, D., Gallo, G., Ciacci, A., Vesci, L., Castorina, M., Milazzo, F. M., Cervoni, M. L., Guglielmi, M. B., Barbarino, M., Fodera, R., Pisano, C., and Cabri, W. (2011). Novel 3,4-isoxazolidiamides as potent inhibitors of chaperone heat shock protein 90. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(24), 8592-8604.
10. Brough, P. A., Aherne, W., Barril, X., Borgognoni, J., Boxall, K., Cansfield, J. E., Cheung, K. M. J., Collins, I., Davies, N. G. M., Drysdale, M. J., Dymock, B., Eccles, S. A., Finch, H., Fink, A., Hayes, A., Howes, R., Hubbard, R. E., James, K., Jordan, A. M., Lockie, A., Martins, V., Massey, A., Matthews, T. P.,

- Mcdonald, E., Northfield, C. J., Pearl, L. H., Prodromou, C., Ray, S., Raynaud, F. I., Roughley, S. D., Sharp, S. Y., Surgenor, A., Walmsley, D. L., Webb, P., Wood, M., Workman, P., and Wrightt, L. (2008). 4,5-diarylisoazole hsp90 chaperone inhibitors: Potential therapeutic agents for the treatment of cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(2), 196-218.
11. Drysdale, M., Dymock, B., and Finch, H. (2004). Isoxazole compounds as inhibitors of heat shock proteins. European Patent. WO 2004/072051 A1.
 12. Meng, T., Zhang, D. D., Xie, Z. Q., Yu, T., Wu, S. C., Wyder, L., Regenass, U., Hilpert, K., Huang, M., Geng, M. Y., and Shen, J. K. (2014). Discovery and optimization of 4,5-diarylisoazoles as potent dual inhibitors of pyruvate dehydrogenase kinase and heat shock protein 90. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(23), 9832-9843.
 13. Sharp, S. Y., Prodromou, C., Boxall, K., Powers, M. V., Holmes, J. L., Box, G., Matthews, T. P., Cheung, K. M., Kalusa, A., James, K., Hayes, A., Hardcastle, A., Dymock, B., Brough, P. A., Barril, X., Cansfield, J. E., Wright, L., Surgenor, A., Foloppe, N., Hubbard, R. E., Aherne, W., Pearl, L., Jones, K., Mcdonald, E., Raynaud, F., Eccles, S., Drysdale, M., and Workman, P. (2007). Inhibition of the heat shock protein 90 molecular chaperone in vitro and in vivo by novel, synthetic, potent resorcinylic pyrazole/isoxazole amide analogues. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(4), 1198-1211.
 14. Fytas, C., Zoidis, G., Tsotinis, A., Fytas, G., Khan, M. A., Akhtar, S., Rahman, K. M., and Thurston, D. E. (2015). Novel 1-(2-aryl-2-adamantyl)piperazine derivatives with antiproliferative activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 93, 281-290.
 15. Handzlik, J., Bojarski, A. J., Satala, G., Kubacka, M., Sadek, B., Ashoor, A., Siwek, A., Wiecek, M., Kucwaj, K., Filipek, B., and Kiec-Kononowicz, K. (2014). Sar-studies on the importance of aromatic ring topologies in search for selective 5-HT₇ receptor ligands among phenylpiperazine hydantoin derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 78, 324-339.
 16. Kumar, K. S. S., Hanumappa, A., Hegde, M., Narasimhamurthy, K. H., Raghavan, S. C., and Rangappa, K. S. (2014). Synthesis and antiproliferative effect of novel 4-thiazolidinone-, pyridine- and piperazine-based conjugates on human leukemic cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 81, 341-349.
 17. Yarim, M., Koksall, M., Durmaz, I., and Atalay, R. (2012). Cancer cell cytotoxicities of 1-(4-substitutedbenzoyl)-4-(4-chlorobenzhydryl)piperazine derivatives. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8071-8085.
 18. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424.

19. Sudhakar, A. (2009). History of cancer, ancient and modern treatment methods. *Journal of Cancer Science and Therapy*, 1(2), 1-4.
20. İnternet: The American Cancer Society. *Origin of the word cancer*. Retrieved from Web: <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/history-of-cancer/what-is-cancer.html>, Son Erişim Tarihi:04.01.2018.
21. İnternet: National Cancer Institute. *Types of cancer treatment*. Retrieved from Web: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>, Son Erişim Tarihi:06.04.2017.
22. İnternet: Stewart, B. W., and Wild, C. P. (2014). *World cancer report 2014. IARC Nonserial Publication*. Retrieved from Web: https://www.who.int/cancer/publications/WRC_2014/en/, Son Erişim Tarihi:07.04.2015.
23. Caliskan, B., Sinoplu, E., Ibis, K., Guzelcan, E. A., Cetin-Atalay, R., and Banoglu, E. (2018). Synthesis and cellular bioactivities of novel isoxazole derivatives incorporating an arylpiperazine moiety as anticancer agents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 33(1), 1352-1361.
24. Raghavendra, N. M., Pingili, D., Kadasi, S., Mettu, A., and Prasad, S. (2018). Dual or multi-targeting inhibitors: The next generation anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 1277-1300.
25. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
26. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
27. Pavlopoulou, A., Spandidos, D. A., and Michalopoulos, I. (2015). Human cancer databases (review). *Oncology Reports*, 33(1), 3-18.
28. Baffy, G., Brunt, E. M., and Caldwell, S. H. (2012). Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: An emerging menace. *Journal of Hepatology*, 56(6), 1384-1391.
29. Sun, B., and Karin, M. (2012). Obesity, inflammation, and liver cancer. *Journal of Hepatology*, 56(3), 704-713.
30. Dawkins, J., and Webster, R. M. (2019). The hepatocellular carcinoma market. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(1), 13-14.
31. Wilhelm, S. M., Adnane, L., Newell, P., Villanueva, A., Llovet, J. M., and Lynch, M. (2008). Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both raf and vegf and pdgf receptor tyrosine kinase signaling. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(10), 3129-3140.
32. Reeves, H. L., and Zaki, M. Y. (2016). The genetic heterogeneity of hepatocellular carcinoma and the implications for personalised medicine. *Translational Cancer Research*, 5(1), 1-4.

33. Ersahin, T., Ozturk, M., and Cetin-Atalay, R. (2015). Molecular biology of liver cancer. *Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine*, 1(2), 206-243.
34. Guarneri, V., and Conte, P. F. (2004). The curability of breast cancer and the treatment of advanced disease. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 31(1), 149-161.
35. Hassan, M. S., Ansari, J., Spooner, D., and Hussain, S. A. (2010). Chemotherapy for breast cancer (review). *Oncology Reports*, 24(5), 1121-1131.
36. Tang, Y., Wang, Y., Kiani, M. F., and Wang, B. (2016). Classification, treatment strategy, and associated drug resistance in breast cancer. *Clinical Breast Cancer*, 16(5), 335-343.
37. Wein, L., and Loi, S. (2017). Mechanisms of resistance of chemotherapy in early-stage triple negative breast cancer (tnbc). *The Breast*, 34(1), 27-S30.
38. Demichele, A. (2017). Current and emerging role of parp inhibitors in breast cancer. *American Journal of Hematology-Oncology*, 13(9), 37-44.
39. Jin, S., and Ye, K. (2013). Targeted drug delivery for breast cancer treatment. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 8(2), 143-153.
40. Winters, S., Martin, C., Murphy, D., and Shokar, N. K. (2017). Breast cancer epidemiology, prevention, and screening. *Approaches to Understanding Breast Cancer*, 151, 1-32.
41. Zhang, D., Wang, H. B., Brinkman, K. L., Han, S. X., and Xu, B. (2012). Strategies for targeting the DNA damage response for cancer therapeutics. *Chinese Journal of Cancer*, 31(8), 359-363.
42. Anwar, M., Aslam, H. M., and Anwar, S. (2015). Parp inhibitors. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, 13(1), 4.
43. Benafif, S., and Hall, M. (2015). An update on parp inhibitors for the treatment of cancer. *Onco Targets and Therapy*, 8, 519-528.
44. Giannini, G., Battistuzzi, G., Vesci, L., Milazzo, F. M., De Paolis, F., Barbarino, M., Guglielmi, M. B., Carollo, V., Gallo, G., Artali, R., and Dallavalle, S. (2014). Novel parp-1 inhibitors based on a 2-propanoyl-3h-quinazolin-4-one scaffold. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 24(2), 462-466.
45. İnternet: The American Cancer Society. *About breast cancer*. Retrieved from Web: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about.html>, Son Erişim Tarihi:29.05.2019.
46. Zimmer, A. S., Gillard, M., Lipkowitz, S., and Lee, J. M. (2018). Update on parp inhibitors in breast cancer. *Current Treatment Options in Oncology*, 19(5), 21.
47. Gu, G., Dustin, D., and Fuqua, S. A. (2016). Targeted therapy for breast cancer and molecular mechanisms of resistance to treatment. *Current Opinion in Pharmacology*, 31, 97-103.

48. Baumann, M., Baxendale, I. R., Ley, S. V., and Nikbin, N. (2011). An overview of the key routes to the best selling 5-membered ring heterocyclic pharmaceuticals. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 7, 442-495.
49. Hossain, M., and Nanda, A. K. (2018). A review on heterocyclic: Synthesis and their application in medicinal chemistry of imidazole moiety. *Science Journal of Chemistry*, 6(5), 83-94.
50. Chikkula, K. V., and Raja, S. (2017). Isoxazole—a potent pharmacophore. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 9(7), 13-24.
51. Cordero, F. M., Giomi, D., and Lascialfari, L. (2013). Five-membered ring systems: With o and n atoms. *Progress in Heterocyclic Chemistry*, 25, 291-317.
52. Hu, F., and Szostak, M. (2015). Recent developments in the synthesis and reactivity of isoxazoles: Metal catalysis and beyond. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 357(12), 2583-2614.
53. Ajay Kumar, K., and Jayaroopa, P. (2013). Isoxazoles molecules with potential medicinal properties. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 3(2), 294-304.
54. Anand, P., and Singh, B. (2014). Pyrrolo-isoxazole: A key molecule with diverse biological actions. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 14(7), 623-627.
55. Manna, K., Banik, U., Ghosh, P. S., and Das, M. (2014). A review on synthesis and pharmacological diversity of isoxazoles & pyrazolines. *Nirma University Journal of Pharmaceutical Science*, 1(1), 37-49.
56. Sysak, A., and Obminska-Mrukowicz, B. (2017). Isoxazole ring as a useful scaffold in a search for new therapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 137, 292-309.
57. Vitale, P., and Scilimati, A. (2017). Recent developments in the chemistry of 3-arylisoaxazoles and 3-aryl-2-isoxazolines. *Advances in Heterocyclic Chemistry*, 122, 1-41.
58. Zhang, H. Z., Zhao, Z. L., and Zhou, C. H. (2018). Recent advance in oxazole-based medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 144, 444-492.
59. Zhu, J., Mo, J., Lin, H. Z., Chen, Y., and Sun, H. P. (2018). The recent progress of isoxazole in medicinal chemistry. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 26(12), 3065-3075.
60. Barmade, M. A., Murumkar, P. R., Sharma, M. K., and Yadav, M. R. (2016). Medicinal chemistry perspective of fused isoxazole derivatives. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(26), 2863-2883.
61. Agrawal, N., and Mishra, P. (2018). The synthetic and therapeutic expedition of isoxazole and its analogs. *Medicinal Chemistry Research*, 27(5), 1309-1344.

62. Hoelder, S., Clarke, P. A., and Workman, P. (2012). Discovery of small molecule cancer drugs: Successes, challenges and opportunities. *Molecular Oncology*, 6(2), 155-176.
63. Neckers, L. (2002). Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Trends in Molecular Medicine*, 8(4), 55-61.
64. Dymock, B. W., Barril, X., Brough, P. A., Cansfield, J. E., Massey, A., McDonald, E., Hubbard, R. E., Surgenor, A., Roughley, S. D., Webb, P., Workman, P., Wright, L., and Drysdale, M. J. (2005). Novel, potent small-molecule inhibitors of the molecular chaperone hsp90 discovered through structure-based design. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(13), 4212-4215.
65. Voruganti, S., Lacroix, J. C., Rogers, C. N., Rogers, J., Matts, R. L., and Hartson, S. D. (2013). The anti-cancer drug auy922 generates a proteomics fingerprint that is highly conserved among structurally diverse hsp90 inhibitors. *Journal of Proteome Research*, 12(8), 3697–3706.
66. İnternet: National Library of Medicine. (2018). *Clinical studies of the auy922*. Retrieved from Web: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=auy922%20&%20Search=Search>., Son Erişim Tarihi:31.08.2019.
67. Gaspar, N., Sharp, S. Y., Eccles, S. A., Gowan, S., Popov, S., Jones, C., Pearson, A., Vassal, G., and Workman, P. (2010). Mechanistic evaluation of the novel hsp90 inhibitor nvp-auy922 in adult and pediatric glioblastoma. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(5), 1219-1233.
68. Okui, T., Shimo, T., Hassan, N. M., Fukazawa, T., Kurio, N., Takaoka, M., Naomoto, Y., and Sasaki, A. (2011). Antitumor effect of novel hsp90 inhibitor nvp-auy922 against oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Research*, 31(4), 1197-1204.
69. Park, K. S., Hong, Y. S., Choi, J., Yoon, S., Kang, J., Kim, D., Lee, K. P., Im, H. S., Lee, C. H., Seo, S., Kim, S. W., Lee, D. H., and Park, S. R. (2018). Hsp90 inhibitor, auy922, debilitates intrinsic and acquired lapatinib-resistant her2-positive gastric cancer cells. *BMB Reports*, 51(12), 660-665.
70. Brasca, M. G., Mantegani, S., Amboldi, N., Bindi, S., Caronni, D., Casale, E., Ceccarelli, W., Colombo, N., De Ponti, A., Donati, D., Ermoli, A., Fachin, G., Felder, E. R., Ferguson, R. D., Fiorelli, C., Guanci, M., Isacchi, A., Pesenti, E., Polucci, P., Riceputi, L., Sola, F., Visco, C., Zuccotto, F., and Fogliatto, G. (2013). Discovery of nms-e973 as novel, selective and potent inhibitor of heat shock protein 90 (hsp90). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(22), 7047-7063.
71. Chen, D., Shen, A., Li, J., Shi, F., Chen, W., Ren, J., Liu, H., Xu, Y., Wang, X., Yang, X., Sun, Y., Yang, M., He, J., Wang, Y., Zhang, L., Huang, M., Geng, M., Xiong, B., and Shen, J. (2014). Discovery of potent n-(isoxazol-5-yl)amides as hsp90 inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 87, 765-781.

72. Zhang, C., Wang, X., Liu, H. C., Zhang, M. M., Geng, M. Y., Sun, L. P., Shen, A. J., and Zhang, A. (2017). Design, synthesis and pharmacological evaluation of 4,5-diarylisoaxazols bearing amino acid residues within the 3-amido motif as potent heat shock protein 90 (hsp90) inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 125, 315-326.
73. Liu, T., Dong, X., Xue, N., Wu, R., He, Q., Yang, B., and Hu, Y. (2009). Synthesis and biological evaluation of 3,4-diaryl-5-aminoisoazole derivatives. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 17(17), 6279-6285.
74. İnternet: National Library of Medicine. (2018). *Clinical trials of ca4p*. Retrieved from Web: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=CA4P&cntry=&state=&city=&list=>, Son Erişim Tarihi:18.10.2019.
75. Kaffy, J., Pontikis, R., Carrez, D., Croisy, A., Monneret, C., and Florent, J. C. (2006). Isoxazole-type derivatives related to combretastatin a-4, synthesis and biological evaluation. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 14(12), 4067-4077.
76. Shin, K. D., Yoon, Y. J., Kang, Y. R., Son, K. H., Kim, H. M., Kwon, B. M., and Han, D. C. (2008). Kribb3, a novel microtubule inhibitor, induces mitotic arrest and apoptosis in human cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 75(2), 383-394.
77. Lee, S., Kim, J. N., Lee, H. K., Yoon, K. S., Shin, K. D., Kwon, B. M., and Han, D. C. (2011). Biological evaluation of kribb3 analogs as a microtubule polymerization inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21(3), 977-979.
78. Kamal, A., Bharathi, E. V., Reddy, J. S., Ramaiah, M. J., Dastagiri, D., Reddy, M. K., Viswanath, A., Reddy, T. L., Shaik, T. B., Pushpavalli, S. N. C. V. L., and Bhadra, M. P. (2011). Synthesis and biological evaluation of 3,5-diaryl isoxazoline/isoxazole linked 2, 3-dihydroquinazolinone hybrids as anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(2), 691-703.
79. Kamal, A., Shaik, A. B., Rao, B. B., Khan, I., Kumar, G. B., and Jain, N. (2015). Design and synthesis of pyrazole/isoxazole linked arylcinnamides as tubulin polymerization inhibitors and potential antiproliferative agents. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 13(40), 10162-10178.
80. Almahariq, M., Tsalkova, T., Mei, F. C., Chen, H., Zhou, J., Sastry, S. K., Schwede, F., and Cheng, X. (2013). A novel epac-specific inhibitor suppresses pancreatic cancer cell migration and invasion. *Molecular Pharmacology*, 83(1), 122-128.
81. Rao, P. S., Kurumurthy, C., Veeraswamy, B., Poornachandra, Y., Kumar, C. G., and Narsaiah, B. (2014). Synthesis of novel 5-(3-alkylquinolin-2-yl)-3-aryl isoxazole derivatives and their cytotoxic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(5), 1349-1351.

82. Kawatani, M., Fukushima, Y., Kondoh, Y., Honda, K., Sekine, T., Yamaguchi, Y., Taniguchi, N., and Osada, H. (2015). Identification of matrix metalloproteinase inhibitors by chemical arrays. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 79(10), 1597-1602.
83. Pedada, S. R., Yarla, N. S., Tambade, P. J., Dhananjaya, B. L., Bishayee, A., Arunasree, K. M., Philip, G. H., Dharmapuri, G., Aliev, G., Putta, S., and Rangaiah, G. (2016). Synthesis of new secretory phospholipase a2-inhibitory indole containing isoxazole derivatives as anti-inflammatory and anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 112, 289-297.
84. Kozikowski, A. P., Chen, Y., Gaysin, A. M., Savoy, D. N., Billadeau, D. D., and Kim, K. H. (2008). Chemistry, biology, and qsar studies of substituted biaryl hydroxamates and mercaptoacetamides as hdac inhibitors—nanomolar-potency inhibitors of pancreatic cancer cell growth. *Chemmedchem*, 3, 487–501.
85. İnternet: Food and Drug Administration. (2006). *Drug approval package*. Retrieved from Web: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2006/021991s000_zolin_zatoc.cfm, Son Erişim Tarihi:20.11.2016.
86. Gaisina, I. N., Tueckmantel, W., Ugolkov, A., Shen, S., Hoffen, J., Dubrovskiy, O., Mazar, A., Schoon, R. A., Billadeau, D., and Kozikowski, A. P. (2016). Identification of hdac6-selective inhibitors of low cancer cell cytotoxicity. *Chemmedchem*, 11(1), 81-92.
87. He, R., Chen, Y., Chen, Y., Ougolkov, A. V., Zhang, J. S., Savoy, D. N., Billadeau, D. D., and Kozikowski, A. P. (2010). Synthesis and biological evaluation of triazol-4-ylphenyl-bearing histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(3), 1347-1356.
88. Kozikowski, A. P., Tapadar, S., Luchini, D. N., Kim, K. H., and Billadeau, D. D. (2008). Use of the nitrile oxide cycloaddition (noc) reaction for molecular probe generation: A new class of enzyme selective histone deacetylase inhibitors (hdacis) showing picomolar activity at hdac6. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(15), 4370-4373.
89. Tapadar, S., He, R., Luchini, D. N., Billadeau, D. D., and Kozikowski, A. P. (2009). Isoxazole moiety in the linker region of hdac inhibitors adjacent to the zn-chelating group: Effects on hdac biology and antiproliferative activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(11), 3023-3026.
90. Woan, K. V., Lienlaf, M., Perez-Villaroel, P., Lee, C., Cheng, F., Knox, T., Woods, D. M., Barrios, K., Powers, J., Sahakian, E., Wang, H. W., Canales, J., Marante, D., Smalley, K. S. M., Bergman, J., Seto, E., Kozikowski, A., Pinilla-Ibarz, J., Sarnaik, A., Celis, E., Weber, J., Sotomayor, E. M., and Villagra, A. (2015). Targeting histone deacetylase 6 mediates a dual anti-melanoma effect: Enhanced antitumor immunity and impaired cell proliferation. *Molecular Oncology*, 9(7), 1447-1457.

91. İnternet: Wikipedia. (2018). *Bromodomain*. Retrieved from Web: <https://en.wikipedia.org/wiki/Bromodomain>, Son Erişim Tarihi:18.09.2018.
92. Hewings, D. S., Wang, M. H., Philpott, M., Fedorov, O., Uttarkar, S., Filippakopoulos, P., Picaud, S., Vuppasetty, C., Marsden, B., Knapp, S., Conway, S. J., and Heightman, T. D. (2011). 3,5-dimethylisoxazoles act as acetyl-lysine-mimetic bromodomain ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(19), 6761-6770.
93. Hewings, D. S., Fedorov, O., Filippakopoulos, P., Martin, S., Picaud, S., Tumber, A., Wells, C., Olcina, M. M., Freeman, K., Gill, A., Ritchie, A. J., Sheppard, D. W., Russell, A. J., Hammond, E. M., Knapp, S., Brennan, P. E., and Conway, S. J. (2013). Optimization of 3,5-dimethylisoxazole derivatives as potent bromodomain ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(8), 3217-3227.
94. Zhang, C. Y., and Chu, M. L. (2018). Leflunomide: A promising drug with good antitumor potential. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 496(2), 726-730.
95. İnternet: National Library of Medicine. (2018). *Clinical studies of the leflunomide*. Retrieved from Web: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=Leflunomide&cntry=&state=&city=&dist=>, Son Erişim Tarihi:07.08.2019.
96. Patel, R. V., and Park, S. W. (2013). An evolving role of piperazine moieties in drug design and discovery. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 13(11), 1579-1601.
97. Rath, A. K., Syed, R., Shin, H. S., and Patel, R. V. (2016). Piperazine derivatives for therapeutic use: A patent review (2010-present). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 26(7), 777-797.
98. Al-Ghorbani, M., Begum, B., Zabiulla, A., Mamatha, S. V., and Khanum, S. A. (2015). Piperazine and morpholine: Synthetic preview and pharmaceutical applications. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(5), 281-301.
99. Asif, M. (2015). Piperazine and pyrazine containing molecules and their diverse pharmacological activities. *International Journal of Advances in Scientific Research*, 1(01), 05-11.
100. Saab, A. M., Dobmeier, M., Koenig, B., Fabri, E., Finotti, A., Borgatti, M., Lampronti, I., Bernardi, F., Efferth, T., and Gambari, R. (2013). Antiproliferative and erythroid differentiation of piperazine and triphenyl derivatives against k-562 human chronic myelogenous leukemia. *Anticancer Research*, 33(8), 3027-3032.
101. Walayat, K., Mohsin, N., Aslam, S., and Ahmad, M. (2019). An insight into the therapeutic potential of piperazine-based anticancer agents. *Turkish Journal of Chemistry*, 43, 1-23.

102. Akkoc, M. K., Yuksel, M. Y., Durmaz, I., and Atalay, R. C. (2012). Design, synthesis, and biological evaluation of indole-based 1,4-disubstituted piperazines as cytotoxic agents. *Turkish Journal of Chemistry*, 36(4), 515-525.
103. Tuncbilek, M., Guven, E. B., Onder, T., and Atalay, R. C. (2012). Synthesis of novel 6-(4-substituted piperazine-1-yl)-9-(beta-d-ribofuranosyl)purine derivatives, which lead to senescence-induced cell death in liver cancer cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(7), 3058-3065.
104. Choi, M. J., No, E. S., Thorat, D. A., Jang, J. W., Yang, H., Lee, J., Choo, H., Kim, S. J., Lee, C. S., Ko, S. Y., Lee, J., Nam, G., and Pae, A. N. (2013). Synthesis and biological evaluation of aryloxazole derivatives as antimitotic and vascular-disrupting agents for cancer therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(22), 9008-9018.
105. Duan, Y. C., Ma, Y. C., Zhang, E., Shi, X. J., Wang, M. M., Ye, X. W., and Liu, H. M. (2013). Design and synthesis of novel 1,2,3-triazole-dithiocarbamate hybrids as potential anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 62, 11-19.
106. Gurdal, E. E., Durmaz, I., Cetin-Atalay, R., and Yarim, M. (2014). Synthesis and cytotoxicity studies of novel benzhydrylpiperazine carboxamide and thioamide derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 29(2), 205-214.
107. Gurdal, E. E., Durmaz, I., Cetin-Atalay, R., and Yarim, M. (2015). Cytotoxic activities of some benzothiazole-piperazine derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30(4), 649-654.
108. Mao, Z. W., Zheng, X., Lin, Y. P., Hu, C. Y., Wang, X. L., Wan, C. P., and Rao, G. X. (2016). Design, synthesis and anticancer activity of novel hybrid compounds between benzofuran and n-aryl piperazine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26(15), 3421-3424.
109. Mao, Z. W., Zheng, X., Qi, Y., Zhang, M. D., Huang, Y., Wan, C. P., and Rao, G. X. (2016). Synthesis and biological evaluation of novel hybrid compounds between chalcone and piperazine as potential antitumor agents. *Royal Society of Chemistry Advances*, 6(10), 7723-7727.
110. Hori, Y., Ishii, K., Kanda, H., Iwamoto, Y., Nishikawa, K., Soga, N., Kise, H., Arima, K., and Sugimura, Y. (2011). Naftopidil, a selective α_1 -adrenoceptor antagonist, suppresses human prostate tumor growth by altering interactions between tumor cells and stroma. *Cancer Prevention Research*, 4(1), 87-96.
111. Chen, H., Liang, X., Xu, F., Xu, B., He, X., Huang, B., and Yuan, M. (2014). Synthesis and cytotoxic activity evaluation of novel arylpiperazine derivatives on human prostate cancer cell lines. *Molecules*, 19(8), 12048-12064.
112. Chen, H., Xu, B. B., Sun, T., Zhou, Z., Ya, H. Y., and Yuan, M. (2017). Synthesis and antitumor activity of novel arylpiperazine derivatives containing the saccharin moiety. *Molecules*, 22(11).

113. Chen, H., Xu, F., Liang, X., Xu, B. B., Yang, Z. L., He, X. L., Huang, B. Y., and Yuan, M. (2015). Design, synthesis and biological evaluation of novel arylpiperazine derivatives on human prostate cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(2), 285-287.
114. Chen, H., Liang, X., Sun, T., Qiao, X., Zhan, Z., Li, Z., He, C., Ya, H., and Yuan, M. (2018). Synthesis and biological evaluation of estrone 3-o-ether derivatives containing the piperazine moiety. *Steroids*, 134, 101-109.
115. Chen, H., Yu, Y. Z., Tian, X. M., Wang, C. L., Qian, Y. N., Deng, Z. A., Zhang, J. X., Lv, D. J., Zhang, H. B., Shen, J. L., Yuan, M., and Zhao, S. C. (2019). Synthesis and biological evaluation of arylpiperazine derivatives as potential anti-prostate cancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 27(1), 133-143.
116. Durmaz, I., Guven, E. B., Ersahin, T., Ozturk, M., Calis, I., and Cetin-Atalay, R. (2016). Liver cancer cells are sensitive to lanatoside c induced cell death independent of their pten status. *Phytomedicine*, 23(1), 42-51.
117. Tabrizi, M. A., Baraldi, P. G., Ruggiero, E., Saponaro, G., Baraldi, S., Romagnoli, R., Martinelli, A., and Tuccinardi, T. (2015). Pyrazole phenylcyclohexylcarbamates as inhibitors of human fatty acid amide hydrolases (faah). *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 289-305.
118. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., and Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), 1107-1112.
119. Weaver, A. N., and Yang, E. S. (2013). Beyond DNA repair: Additional functions of parp-1 in cancer. *Frontiers in Oncology*, 3, 290.
120. Adams, J. M., and Cory, S. (2001). Life-or-death decisions by the bcl-2 protein family. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(1), 61-66.
121. Adrain, C., and Martin, S. J. (2001). The mitochondrial apoptosome: A killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(6), 390-397.
122. Spierings, D. C., De Vries, E. G., Vellenga, E., Van Den Heuvel, F. A., Koornstra, J. J., Wesseling, J., Hollema, H., and De Jong, S. (2004). Tissue distribution of the death ligand trail and its receptors. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 52(6), 821-831.
123. Nogueira, V., Park, Y., Chen, C. C., Xu, P. Z., Chen, M. L., Tonic, I., Unterman, T., and Hay, N. (2008). Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. *Cancer Cell*, 14(6), 458-470.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : İBİŞ, Kübra
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 26/06/1992, İstanbul
 Medeni hali : Bekâr
 Telefon : 0 (539) 730 43 31
 e-posta : kub.ibis1992@gmail.com



Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Kimya Anabilim Dalı	Devam Ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Eczacılık Fakültesi	2015
Lise	Yalova Şehit Osman Altınkuyu Anadolu Lisesi	2010

Yabancı Dili

İngilizce

Yayınlar

1. Çalışkan, B., Sinoplu, E., İbiş, K., Akhan Güzelcan, E., Çetin Atalay, R., and Banoglu, E. (2018). Synthesis and cellular bioactivities of novel isoxazole derivatives incorporating an arylpiperazine moiety as anticancer agents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 33(1), 1352-1361.

Patentler

1. Antikanser Aktiviteye Sahip Yeni İzoksazol Türevleri (Ulusal Patent, Patent No: TR 2017019951)
2. Antikanser Aktiviteye Sahip Yeni Visinal Diaril Heterosiklik Bileşik Türevler (Ulusal Patent, Ref No: P18/0351)



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..