



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YENİ BAZI PÜRİN ANALOGU BİLEŞİKLERİN SENTEZ, YAPI AYDINLATILMASI VE SİTOTOKSİK AKTİVİTELERİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

Pınar KUL

**FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Meral TUNÇBİLEK**

**ANKARA
2020**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YENİ BAZI PÜRİN ANALOGU BİLEŞİKLERİN SENTEZİ
YAPI AYDINLATILMASI VE SİTOTOKSİK
AKTİVİTELERİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR**

Pınar KUL

**FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Meral TUNÇBİLEK**

**ANKARA
2020**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Yeni Bazı Pürin Analogu Bileşiklerin Sentez, Yapı Aydınlatılması ve Sitotoksik Aktiviteleri Üzerinde Çalışmalar” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Pınar KUL

Tarih: 09.07.2020

İmza:

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Pürinlerin Tarihçesi	8
1.2. Pürinlerin Yapısı	11
1.3. Pürin Türevlerinin Biyolojik Aktiviteleri	12
1.3.1. Antikanser Etkili Pürin Türevleri	12
1.3.1.1. Hsp İnhibitörü Pürin Türevleri	19
1.3.1.1.1. Hsp70 ve Kanseri	20
1.3.1.1.2. Hsp90 ve Kanseri	22
1.3.1.2. Protein Kinaz İnhibitörü Pürin Türevleri	32
1.4. Pürinlerin Genel Sentez Yöntemleri	39
1.4.1. 6. Konumdan Sübstitüe Pürinlerin Sentezi	40
1.4.2. 8. Konumdan Sübstitüe Pürinlerin Sentezi	42
1.4.3. 9. Konumdan Sübstitüe Pürinlerin Sentezi	46
2. GEREÇ VE YÖNTEM	49
2.1. Tasarlanan Türevlerin Sentezleri	49
2.1.1. 6-(4-Sübstitüe fenil amino)-8,9-difenil-pürin Türevlerinin Sentezi	49
2.1.2. 6,9-(4-Sübstitüe difenil)-8-[5-(4-klorofenil)-1,2-oksazol/4-sübstitüe fenil] pürin Türevlerinin Sentezi	51
2.2. Sentezlenen Bileşiklerin Analitik İncelemelerinde Uygulanan Yöntemler	54
2.2.1. Sentezlenen Maddelerin Analitik İncelemelerinde Uygulanan Yöntemler	54
2.2.1. Kromatografik Analizler	54
2.2.2. Erime Noktası Tayinleri	55
2.2.3. Elementel Analiz	55
2.2.4. Spektral Analizler	55
2.3. Sentez İşlemlerinde Kullanılan Kimyasal Maddeler	56
2.4. Sentezlenen Bileşiklerin Antikanser Aktivitelerinin Saptanması	56
2.5. Apoptozisin Flow Sitometri Yöntemi İle Değerlendirilmesi	57
2.6. Moleküler Docking Çalışmaları	58
2.7. Hsp70 Bağlanma Deneyleri	59
2.8. Hsp70 Agregasyon Deneyleri	60
3. BULGULAR	61
3.1. 6-(4-Sübstitüe fenilamino)-8,9-difenil-pürin Türevlerinin Sentezi	61
3.1.1. 5-Amino-4,6-dikloropirimidin (2)	61

3.1.2. 5-Amino-4-(fenil)amino-6-kloropirimidin (3)	63
3.1.3. 6-Kloro-8,9-difenil-pürin (4)	65
3.1.4 6-(4-Süstitüe fenilamino)-8,9-difenil-pürin Türevlerinin (5-12) Genel Sentez Yöntemi	68
3.1.4.1. 6-(Phenylamino)-8,9-difenil-9H-pürin (5)	68
3.1.4.2. 6-(4-Klorofenilamino)-8,9-difenil-9H-pürin (6)	71
3.1.4.3. 6-(4-İzopropilfenilamino)-8,9-difenil-9H-pürin (7)	74
3.1.4.4. 6-(4-Hidroksifenilamino)-8,9-difenil-9H-pürin (8)	77
3.1.4.5. 6-(4-Benziloksifenilamino)-8,9-difenil-9H-pürin (9)	80
3.1.4.6. 6-(4-Difluorometoksifenilamino)-8,9-difenil-9H-pürin (10)	83
3.1.4.7. 6-(4-Metiltiyofenilamino)-8,9-difenil-9H-pürin (11)	86
3.1.4.8. 6-(4-Morfolinefenilamino)-8,9-difenil-9H-pürin (12)	89
3.2. 6,9-(4-Süstitüe difenil)-8-[5-(4-klorofenil)-1,2-oksazol/4-süstitüe fenil] pürin Türevlerinin Sentezi	92
3.2.1. 5-Amino-4-(4-klorofenil)amino-6-kloropirimidin (13)	92
3.2.2. 5-Amino-4-(4-benziloksifenil)amino-6-kloropirimidin (14)	94
3.2.3. 6-Kloro-8-[5-(4-klorofenil)izoksazol-3-il]-9-(4-klorofenil)-pürin (15)	97
3.2.4. 6-Kloro-8-(4-klorofenil)-9-fenil-pürin (16)	100
3.2.5. 6-Kloro-8-(4-metoksifenil)-9-fenil-pürin (17)	103
3.2.6. 6-Kloro-8-(4-fenoksifenil)-9-(4-klorofenil)-pürin (18)	106
3.2.7. 6-Kloro-8-[(4-piperidin-1-il)fenil]-9-(4-benziloksifenil)-pürin (19)	109
3.2.8. 6-[4-(süstitüe)fenil]-8,9-(4-süstitüe difenil)pürin (20-24) Genel Sentez Yöntemi	112
3.2.8.1. 6-[4-(triflorometil)fenil]-8-[5-(4-klorofenil)izoksazol-3-il]-9-(4-klorofenil)-pürin (20)	112
3.2.8.2. 6-[4-(triflorometil)fenil]-8-[5-(4-klorofenil)izoksazol-3-il]-9-(4-klorofenil)-pürin (21)	115
3.2.8.3. 6-[4-(triflorometil)fenil]-8-[5-(4-klorofenil)izoksazol-3-il]-9-(4-klorofenil)-pürin (22)	118
3.2.8.4. 6-[4-(triflorometil)fenil]-8-[5-(4-klorofenil)izoksazol-3-il]-9-(4-klorofenil)-pürin (23)	121
3.2.8.5. 6-[4-(triflorometil)fenil]-8-[5-(4-klorofenil)izoksazol-3-il]-9-(4-klorofenil)-pürin (24)	124
3.3. Sentezlenen Türevlerin Sitotoksik Etkilerinin Saptanması	127
3.4. Moleküler Docking Çalışmaları	130
3.5. Hsp70 Bağlanma Deneyleri	135
3.6. Hsp70 Agregaasyon Deneyleri	136
4. TARTIŞMA	137
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	141
ÖZET	143
SUMMARY	144
KAYNAKLAR	145
ÖZGEÇMİŞ	154

ÖNSÖZ

Doktora tezimin hazırlanması ve çalışmalarım sırasında engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren, her konuda desteğini ve sevgisini hep hissettiğim, çok değerli danışmanım, canım hocam Sayın Prof. Dr. Meral TUNÇBİLEK'e tüm içtenliğimle sonsuz minnet ve en içten teşekkürlerimi sunarım.

Sentezlediğim bileşiklerin ^1H NMR, ^{13}C NMR ve Kütle spektral analizlerinin yapılmasında yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Hakan GÖKER'e ve elementel analizlerimin yapılmasında gösterdiği titizlikten dolayı Sayın Doç. Dr. Mehmet ALP'e,

Moleküler docking ve Hsp70 bağlanma ve agregasyon deneysel çalışmalarının yapılmasını sağlayan Sağlık Bilimleri Üniversitesi Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Yusuf TUTAR'a ve Doktora öğrencisi Ezgi Nurdan YENİLMEZ'e

Sitotoksik aktivite çalışmalarının yapılmasında yardımcı olan Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Öğretim Üyesi Sayın Dr. Mustafa ERGÜL'e

Her zaman bilgi ve deneyimleriyle yardımcı olan başta Farmasötik Kimya Anabilim Dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Gülgün AYHAN KILCIGİL olmak üzere öğretim üyelerine ve çalışmalarım sırasında yanımda olan araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve tüm Anabilim Dalı çalışanlarına,

Ailemden uzakta bana aile olan, desteklerini asla esirgemeyen, varlıklarıyla kendimi çok şanslı hissettiğim kıymetli dostlarım Merve GÜVEN ve Dilara ÇALIŞKAN'a

Büyük fedakarlıklar göstererek bugünlere gelmemi sağlayan, yaşam boyu öğretmenlerim ve en büyük destekçilerim canım aileme, annem Muazzez KUL, babam Musa KUL, abim Çetin KUL ve ablam Ceren KUL'a,

İçtenlikle teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	ATP bağlanma terminali
Abl	Abelson Murin Lösemi Füzyon Proteini (Abelson Murine Leukemia)
Akt	Protein Kinaz B
ALL	Akut Lenfoblastik Lösemi
ATP	Adenozin trifosfat
ATPaz	Adenozin trifosfataz
cAMP	Siklik Adenozin Mono Fosfat
Cdk	Siklin Bağımlı Kinaz (Cyclin-Dependent Kinase)
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EC50	%50'sine etki eden konsantrasyon değeri (Half Maximal Effective Concentration)
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (Epidermal Growth Factor Receptor)
ESCC	Özofagus skuamöz hücreli karsinom (Esophageal squamous cell carcinoma)
FAD	Flavin Adenin Dinükleotit
Fak	Fokal Adezyonkinaz
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration)
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü (Fibroblast Growth Factor)
GI50	Hücre büyümesinin %50'sini inhibe eden konsantrasyon değeri (Concentration for 50% of maximal inhibition of cell proliferation)
Her2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü 2 (Human Epidermal Growth Factor 2)
Hsp	Isı Şok Protein (Heat Shock Protein)
IC50	%50'sini inhibe eden konsantrasyon değeri (Half Maximal Inhibitory Concentration)
Jak	Janus Ailesi Kinazı (Janus Family Kinase)
KML	Kronik Miyeloid Lösemi
MAPK	Mitojenle Etkinleşen Protein Kinaz (Mitogen-Activated Protein Kinase)

NAD+	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NRTK	Non-Reseptör Tirozinkinaz
PBD	Peptid Bağlanma Terminali
PDB	Protein Data Bank
PDGF	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (Platelet-Derived Growth Factor)
PNA	Pürin Nükleozit Analogları
Raf-1	Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1
RNA	Ribonükleik Asit
RTK	Reseptör Tirozinkinaz
Src	Sarkoma Tirozinkinaz
TNF	Tümör Nekroz Faktör (Tumor Necrosis Factor)
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor)
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)
XTT	2,3-Bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)karbonil]-2H-tetrazolyum hidroksit

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Antikanser pürin türevleri	2
Şekil 1.2.	Antikanser aktivite gösteren bazı pürin nükleozit analogları	3
Şekil 1.3.	Pürin yapıdaki bazı Hsp90 inhibitörleri	5
Şekil 1.4.	Pürin yapıdaki bazı Src inhibitörleri	6
Şekil 1.5.	Pürin yapıdaki bazı Cdk inhibitörleri	7
Şekil 1.6.	Sentezlenen pürin türevleri	8
Şekil 1.7.	Ürik asit	8
Şekil 1.8.	Pürin halkası taşıyan bazı yapılar	9
Şekil 1.9.	Pürin sentezi	10
Şekil 1.10.	Adenozin monofosfat ve Adenozin Kimyasal Yapıları	10
Şekil 1.11.	Pürin halkası rezonans limit formülleri	11
Şekil 1.12.	8-Azaguanin	13
Şekil 1.13.	6-Merkaptopürin ve 6-Tiyoguanin Kimyasal Yapıları	13
Şekil 1.14.	Fludarabin	14
Şekil 1.15.	Kladribin	14
Şekil 1.16.	Klofarabin	15
Şekil 1.17.	Nelarabin	15
Şekil 1.18.	Forodesin	15
Şekil 1.19.	8-Kloroadenozin	16
Şekil 1.20.	SGI-110	16
Şekil 1.21.	6-(2,3,4-X-Süstitüe fenil)pürin ribonükleozit türevleri	17
Şekil 1.22.	C5'-N-siklopropilkarboksamido-C6-amino-C2-alkillenmiş pürin nükleozit türevleri	17
Şekil 1.23.	2-Süstitüe-6-[(4-(4-triflorometil)fenil)piperazin-1-il] -9-(β -D-ribofuranozil)pürin	18
Şekil 1.24.	6-(2-Siklohekzeniletil)amino-9-(β -D-ribofuranozil)pürin	18
Şekil 1.25.	2,6,9-Trisüstitüe pürin türevleri	19
Şekil 1.26.	15-Deoksispergualin ve PES-Cl	21
Şekil 1.27.	MKT-077 ve Ver-155008	21
Şekil 1.28.	8,9-Disüstitüe adenozin türevleri	22

Şekil 1.29.	Geldanamisin ve Herbimisin	23
Şekil 1.30.	17-AAG	24
Şekil 1.31.	PU3	24
Şekil 1.32.	PU24FCI	25
Şekil 1.33.	8-Sülfonil adenin türevi bileşik	25
Şekil 1.34.	6-Amino- 8-(2-iyodo-5-metoksifeniltiyo)-9-[3-(tert-butilamino)propil]-9H-pürin	26
Şekil 1.35.	6-Amino- 8-(2-iyodo-5-metoksifeniltiyo)-9-[2-(neopentilamino)etil]-9H-pürin	26
Şekil 1.36.	MPC-3100 ve MPC-0767	27
Şekil 1.37.	PU-H71	28
Şekil 1.38.	BIIB021	28
Şekil 1.39.	BIIB028	29
Şekil 1.40.	Debio 0932 (CUDC-305)	29
Şekil 1.41.	9-(Pent-4-inil)-8-arilsülfanil adenin türevleri	30
Şekil 1.42.	8-(7'-Cl-benzotiyazolo)sülfanil-9-(sübstitüe alkil)) adenin türevleri	30
Şekil 1.43.	8-((2-İyodo-5-metoksifenil)sülfanil)-9-(sübstitüe-alkil) adenin	31
Şekil 1.44.	2-Amino-6-kloro-9-(sübstitüe-piridin-2-il-metil)pürin türevleri	31
Şekil 1.45.	NVP-AAK980	34
Şekil 1.46.	CGP79883	34
Şekil 1.47.	AP-23464	35
Şekil 1.48.	Molekül 101 ve AP23236	35
Şekil 1.49.	AP23451	36
Şekil 1.50.	6-Dimetilaminopürin ve İzopenteniladenin	37
Şekil 1.51.	Olomousin	37
Şekil 1.52.	Roskovitin	37
Şekil 1.53.	Purvalanol A ve Purvalanol B	38
Şekil 1.54.	Amino-purvalanol	38
Şekil 1.55.	OL567	38
Şekil 1.56.	İnosinden hareketle 6-aminopürin sentezi	40

Şekil 1.57.	C-6-Arılürin-2'-deoksiriboz türevlerinin sentezi	41
Şekil 1.58.	6-[4-(Piridazin-3(2H)-on-6-il)pipezin-1-il]-9H-pürin sentezi	41
Şekil 1.59.	6-[2-(Ftalazin-1(2H)-on-2-il)-aminoetil]-9H-pürin sentezi	41
Şekil 1.60.	2-Amino-6-süstitüe pürin türevlerinin sentezi	42
Şekil 1.61.	2-Amino-6-kloro/bromo-8-(süstitüe fenil) pürin türevleri	42
Şekil 1.62.	8-Fenilteofilin eldesi	43
Şekil 1.63.	8-Süstitüe pürin türevlerinin sentezi	43
Şekil 1.64.	6-Amino-2-fluoro-9-alkil-8-arilsülfanil-pürin türevlerinin sentezi	44
Şekil 1.65.	6,8-Diaminopürinin sentezi	45
Şekil 1.66.	9-Butil-6-amino-8-(2,5-dimetoksibenzil)-9-H-pürin sentezi	45
Şekil 1.67.	9-Butil-6-amino-8-(2-kloro/bromo/iyodo-3-metoksibenzil)-9H-pürin sentezi	46
Şekil 1.68.	6-Süstitüe-9-aril/fenil analoglarının sentezi	47
Şekil 1.69.	9-Alkil-6-kloropürin sentezi	47
Şekil 1.70.	9-Alkil pürin türevlerinin sentezi	48
Şekil 2.1.	6-(Süstitüe anilino)-8,9-difenil-pürin türevlerinin sentezi	63
Şekil 2.2.	6-(Süstitüe fenil)-8,9-(4-süstitüe difenil)pürin türevlerinin sentezi	52
Şekil 2.3.	Bileşik 7'nin IC ₅₀ grafiğı	57
Şekil 2.4.	Canlı, erken/geç dönem apoptotik hücrelerin ve ölü hücrelerin gösterilmesi	58
Şekil 3.1.	Bileşik 2'nin Kütle spektrumu	62
Şekil 3.2.	Bileşik 3'ün ¹ H-NMR spektrumu	64
Şekil 3.3.	Bileşik 3'ün Kütle spektrumu	64
Şekil 3.4.	Bileşik 4'ün ¹ H-NMR spektrumu	66
Şekil 3.5.	Bileşik 4'ün ¹³ C-NMR spektrumu	66
Şekil 3.6.	Bileşik 4'ün Kütle spektrumu	67
Şekil 3.7.	Bileşik 5'in ¹ H-NMR spektrumu	69
Şekil 3.8.	Bileşik 5'in ¹³ C-NMR spektrumu	70
Şekil 3.9.	Bileşik 5'in Kütle spektrumu	70
Şekil 3.10.	Bileşik 6'nın ¹ H-NMR spektrumu	72

Şekil 3.11.	Bileşik 6'nın ^{13}C -NMR spektrumu	72
Şekil 3.12.	Bileşik 6'nın Kütle spektrumu	73
Şekil 3.13.	Bileşik 7'nin ^1H -NMR spektrumu	75
Şekil 3.14.	Bileşik 7'nin ^{13}C -NMR spektrumu	75
Şekil 3.15.	Bileşik 7'nin Kütle spektrumu	76
Şekil 3.16.	Bileşik 8'in ^1H -NMR spektrumu	78
Şekil 3.17.	Bileşik 8'in ^{13}C -NMR spektrumu	78
Şekil 3.18.	Bileşik 8'in Kütle spektrumu	79
Şekil 3.19.	Bileşik 9'un ^1H -NMR spektrumu	81
Şekil 3.20.	Bileşik 9'un ^{13}C -NMR spektrumu	81
Şekil 3.21.	Bileşik 9'un Kütle spektrumu	82
Şekil 3.22.	Bileşik 10'un ^1H -NMR spektrumu	84
Şekil 3.23.	Bileşik 10'in ^{13}C -NMR spektrumu	84
Şekil 3.24.	Bileşik 10'un Kütle spektrumu	85
Şekil 3.25.	Bileşik 11'in ^1H -NMR spektrumu	87
Şekil 3.26.	Bileşik 11'in ^{13}C -NMR spektrumu	87
Şekil 3.27.	Bileşik 11'in Kütle spektrumu	88
Şekil 3.28.	Bileşik 12'nin ^1H -NMR spektrumu	90
Şekil 3.29.	Bileşik 12'nin ^{13}C -NMR spektrumu	90
Şekil 3.30.	Bileşik 12'nin Kütle spektrumu	91
Şekil 3.31.	Bileşik 13'ün ^1H -NMR spektrumu	93
Şekil 3.32.	Bileşik 13'ün Kütle spektrumu	93
Şekil 3.33.	Bileşik 14'ün ^1H -NMR spektrumu	95
Şekil 3.34.	Bileşik 14'ün ^{13}C -NMR spektrumu	95
Şekil 3.35.	Bileşik 14'ün Kütle spektrumu	96
Şekil 3.36.	Bileşik 15'in ^1H -NMR spektrumu	98
Şekil 3.37.	Bileşik 15'in ^{13}C -NMR spektrumu	98
Şekil 3.38.	Bileşik 15'in Kütle spektrumu	99
Şekil 3.39.	Bileşik 16'nın ^1H -NMR spektrumu	101
Şekil 3.40.	Bileşik 16'nın ^{13}C -NMR spektrumu	101
Şekil 3.41.	Bileşik 16'nın Kütle spektrumu	102
Şekil 3.42.	Bileşik 17'nin ^1H -NMR spektrumu	104

Şekil 3.43.	Bileşik 17'nin ^{13}C -NMR spektrumu	104
Şekil 3.44.	Bileşik 17'nin Kütle spektrumu	105
Şekil 3.45.	Bileşik 18'in ^1H -NMR spektrumu	107
Şekil 3.46.	Bileşik 18'in ^{13}C -NMR spektrumu	107
Şekil 3.47.	Bileşik 18'in Kütle spektrumu	108
Şekil 3.48.	Bileşik 19'un ^1H -NMR spektrumu	110
Şekil 3.49.	Bileşik 19'un ^{13}C -NMR spektrumu	110
Şekil 3.50.	Bileşik 19'un Kütle spektrumu	111
Şekil 3.51.	Bileşik 20'nin ^1H -NMR spektrumu	113
Şekil 3.52.	Bileşik 2'nin ^{13}C -NMR spektrumu	114
Şekil 3.53.	Bileşik 20'nin Kütle spektrumu	114
Şekil 3.54.	Bileşik 21'in ^1H -NMR spektrumu	116
Şekil 3.55.	Bileşik 21'in ^{13}C -NMR spektrumu	116
Şekil 3.56.	Bileşik 21'in Kütle spektrumu	117
Şekil 3.57.	Bileşik 22'nin ^1H -NMR spektrumu	119
Şekil 3.58.	Bileşik 22'nin ^{13}C -NMR spektrumu	119
Şekil 3.59.	Bileşik 22'nin Kütle spektrumu	120
Şekil 3.60.	Bileşik 23'ün ^1H -NMR spektrumu	122
Şekil 3.61.	Bileşik 23'ün ^{13}C -NMR spektrumu	122
Şekil 3.62.	Bileşik 23'ün Kütle spektrumu	123
Şekil 3.63.	Bileşik 24'ün ^1H -NMR spektrumu	125
Şekil 3.64.	Bileşik 24'ün ^{13}C -NMR spektrumu	125
Şekil 3.65.	Bileşik 24'ün Kütle spektrumu	126
Şekil 3.66.	Bileşik 7'nin, MCF7 meme kanser hücre hattındaki % inhibisyon grafiği. $**P < 0.01$.	129
Şekil 3.67.	Bileşik 7'nin 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda MCF7 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi	130
Şekil 3.68.	Bileşik 23'ün Hsp70 ATPaz bağlanma cebindeki görünümü	131
Şekil 3.69.	Bileşik 6'nın Hsp90 α bağlanma cebindeki görünümü	132
Şekil 3.70.	Bileşik 24'ün Hsp90 α bağlanma cebindeki görünümü	132
Şekil 3.71.	Bileşik 5'in Hsp90 β bağlanma cebindeki görünümü	132
Şekil 3.72.	Bileşik 24'ün Hsp90 β bağlanma cebindeki görünümü	133

Şekil 3.73.	ChemSketch programıyla çizilen bileşik 7'nin Pymol programında görüntülenmesi.	133
Şekil 3.74.	(a) 1yc4 ile bileşik 7'nin etkileşimi (b) 6n8y ile bileşik 7'nin etkileşimi (c) 1s3x ile bileşik 7'nin etkileşimi (d) 4wv5 ile bileşik 7'nin etkileşimi	134
Şekil 3.75.	(a) 1yc4 ile PES etkileşimi (b) 6n8y ile PES etkileşimi (c) 1s3x ile PES etkileşimi (d) 4wv5 ile PES etkileşimi	134
Şekil 3.76.	Bileşik 7'in 1 μ M ATP varlığında, Hsp70'e bağlanma grafiği. Bağlanma sabiti KBR1307 ve ticari olarak kullanılan PES ile karşılaştırılması.	135
Şekil 3.78.	Bileşik 7'nin % agregasyon grafiği.	136

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1.	Sentezlenen 6-(4-süstitüe anilino)-8,9-difenil-pürin türevi sonuç bileşikler	53
Çizelge 2.2.	Sentezlenen 6-[4-(triflorometil)fenil]-8,9-(4-süstitüe difenil)pürin türevi sonuç bileşikler (20-24)	54
Çizelge 2.3.	İTK çalışmalarında kullanılan solvan sistemleri	55
Çizelge 3.1.	6-(4-Süstitüe fenil amino)-8,9-difenil pürin türevlerinin (5-12) sitotoksik aktiviteleri	128
Çizelge 3.2	6-[4-(Triflorometil)fenil]-8,9-(4-süstitüe difenil)pürin türevlerinin (20-24) sitotoksik aktiviteleri	129
Çizelge 3.3.	Bileşik 7'nin bağlanma sabitinin KBR1307 ve ticari olarak kullanılan PES ile karşılaştırılması.	136

1. GİRİŞ

Kanser, hücresel fonksiyonlarını yerine getiremeyen anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve yayılması ile karakterize, yayılmanın kontrol edilemediği durumlarda ölümcül olabilen bir dizi hastalık grubu için kullanılan genel bir terimdir (American Cancer Society, 2020). Genellikle lezyondan tümöre ilerleyen çok aşamalı bir süreç içerisinde, normal hücrelerin tümör hücrelerine dönüşümünden kaynaklanır. Bu dönüşüme, kişinin genetik faktörlerinin fiziksel, kimyasal veya biyolojik karsinojen maddeler ile etkileşimi sebep olur (Plummer ve ark., 2016). Dünyadaki en ciddi klinik sorunlardan biri olan kanserin, gelişmekte olan ülkelerde olduğu gibi, gelişmiş ülkelerde de görülme sıklığı artmaktadır.

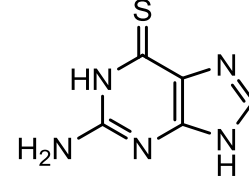
Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2020 Dünya Kanser Raporu'na göre kanser, dünya çapında 183 ülkenin 134'ünde 30-69 yaş aralığındaki ölümlerin birinci veya ikinci nedenidir. 2018 yılında dünya genelinde 18,1 milyon yeni kanser vakası ve 9,6 milyon kansere bağlı ölüm vakası meydana gelmiştir. 2040 yılına kadar tahmini olarak %50 artışla her yıl 27 milyon yeni kanser vakasının meydana gelmesi öngörülmektedir (Wild CP ve ark., 2020). Kanser olgularındaki bu hızlı büyümenin bireyi, toplumu, sağlık sistemlerini; fiziksel, duygusal ve finansal açıdan zorlayarak büyük ölçüde krize neden olabileceği öngörülmektedir (World Health Organization, 2020).

Pürin yapısı tümör hücresinin biyokimyasal bileşenlerinden olup, tümör hücre büyümesini doğrudan etkileyen kimyasal yapılardır. Kanser kemoterapisinde kullanılan pürin türevi ilaçlar kanser hücresinin DNA sentezini engelleme veya hücresel fonksiyonlarını bozma yoluyla etkisini gösterir ve hücreyi öldürür (Vardanyan ve Hruby, 2016). Kanser tedavisinde kullanılan en eski pürin türevleri FDA tarafından 1953 yılında onaylanan 6-merkaptopürin (Şekil 1.1) ve 1966 yılında onaylanan 6-tiyoguanin (Şekil 1.1)'dir (Abraham ve Denny, 2010). Her iki bileşik de hücreye kolayca girer, de novo pürin sentezini inhibe eder ve DNA'ya yanlış

bağlanan aktif formlara hücre içinde metabolize edilir. Bu bileşikler bağırsaktan oldukça iyi emilir ve genellikle oral yoldan kullanılırlar (Lind, 2020).



6-Merkaptopürin

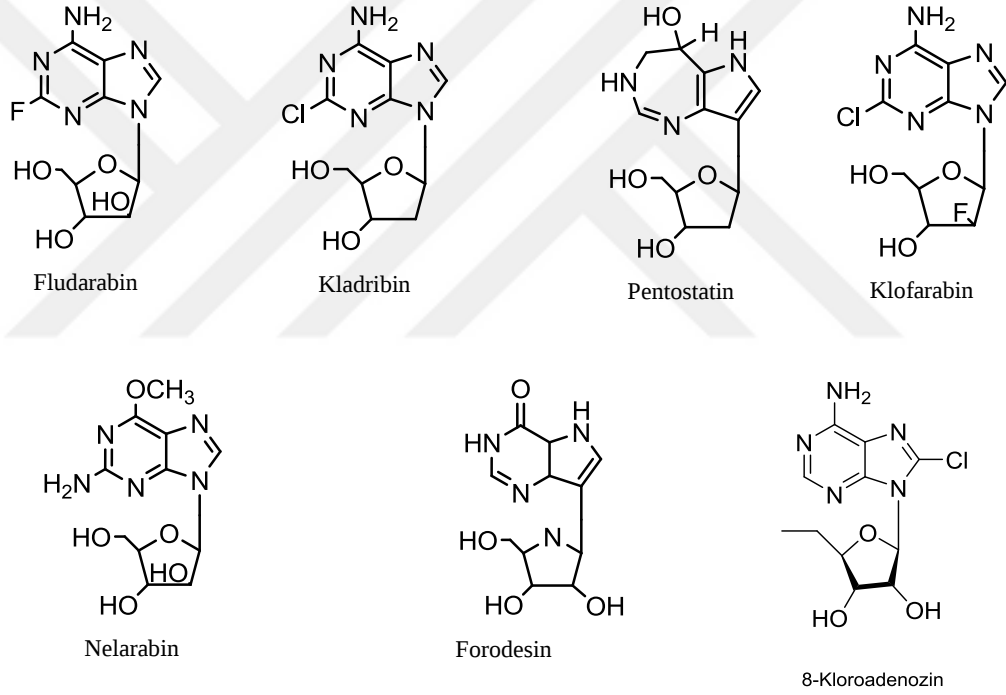


6-Tiyoguanin

Şekil 1.1. Antikanser pürin türevleri

Pürin nükleozit analogları (PNA), güçlü immün baskılayıcı özellikleri ile kanser kemoterapisinde yer alan önemli ilaç gruplarından biridir. Bu grup bileşiklerden Fludarabin ve Kladribin (Şekil 1.2), özellikle alkilleyici bileşiklere yanıt vermeyen kronik B-hücreli lenfositik lösemili hastaların tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmıştır. Diğer pürin nükleozitlerinden klofarabin, pediatrik hastalarda tekrarlayan ya da diğer tedavilere yanıt vermeyen akut lenfoblastik lösemi (ALL) tedavisi amacıyla 2004 yılında, nelarabin ise 2005 yılında T-hücreli ALL ve tekrarlayan ya da tedavi takibiyle yanıt alınamayan T-hücreli lenfoblastik lenfoma hastalıklarının tedavisi için onaylanmıştır. Pentostatin de diğer bileşikler gibi kronik/akut lösemi için endikasyona sahiptir (Chabner ve Longo, 2019). Forodesin (Immucillin H, BCX-1777) ise B ve T hücreli lösemi hastalarının tedavisi için faz II klinik çalışmalara tabi tutulan bir diğer ilaçtır (Avendaño ve Menéndez, 2015). Forodesin ve 8-Kloroadenozin halen geliştirme aşamasında olan ilaçlardır. Bu sınıftaki bileşikler yapısal olarak adenozin veya guanozin'e benzerlik gösterip, antitümör aktiviteleri üzerinde farklılık yaratan farklı metabolik özelliklere sahiptirler (Vardanyan ve Hruby, 2016). Forodesin, insan, fare, sıçan, maymun ve köpek dahil çeşitli türlerde $IC_{50} = 0.48 - 1.57$ nM arasında değişen değerlerle etkili olan güçlü bir pürin nükleozit fosforilaz (PNP) inhibitörüdür. Pürin nükleozit fosforilaz eksikliği olan hastalar, özellikle çocuklar, selektif T-hücreli immün yetersizliği gösterirler. PNP inhibitörleri potansiyel T-hücreli seçici immunosupresif bileşikler olarak tedavide ilgi çekici bir ilaç grubudur. Oral yoldan aktif olan Forodesin bileşiği model alınarak çeşitli T-hücreli bozukluklarda kullanılabilecek

yeni bir sınıf seçici immunosupresif bileşikler sentezlenmesi hedeflenmektedir (Bantia ve ark., 2001). 8-Kloroadenozin ile yapılan çalışmalar, bileşiğin çeşitli solid tümörlere ve hematolojik malignitelere karşı in vitro, kronik lenfositik lösemi hastalarında Faz I klinik çalışmalarında uygun farmakokinetik ve farmakodinamik profil ile in vivo etkinliği olduğunu göstermiştir. 8-Kloroadenozin, AML hücrelerinde doza bağımlı olarak RNA sentezini %20-80 arasında inhibe eder ve AML tedavisinde kullanılan diğer nükleozit analoglarına göre adenozin kinaz ve onların trifosfat türevleri ile metabolize edilir. Yapılan klinik çalışmalarda 8-Kloroadenozin'in AML hücrelerini 72 saatlik tedavinin ardından $IC_{50} = 0.2 - 1.4$ μM değeri ile inhibe ettiği bulunmuştur (Buettner ve ark., 2015).



Şekil 1.2. Antikanser aktivite gösteren bazı pürin nükleozit analogları

Heat Shock Proteinleri (Hsp), stres ve hücre hasarına karşı hücreyi koruyan, hücre antioksidan sistemlerinin ayrılmaz bir parçası olan protein grubudur (Venojärvi, Oksala, Kinnunen ve Atalay, 2013). Hsp'ler, hücrelerin normal ısılarından daha yüksek ısıya maruz kalmaları sonucunda üretilen spesifik proteinlerdir. Hücresel stres ya da zararlı kimyasallara maruziyet sonucunda da üretilen Hsp'lere stres proteinleri de denir. Isı artışını takiben bu proteinleri

kodlayan genlerin indüklenmesi ile sentezlenirler (Miller, 2001). Hsp ailesi; Hsp27, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 ve büyük molekül ağırlıklı Hsp'ler olmak üzere moleküler ağırlıklarına göre gruplandırılırlar (Wu ve ark., 2017).

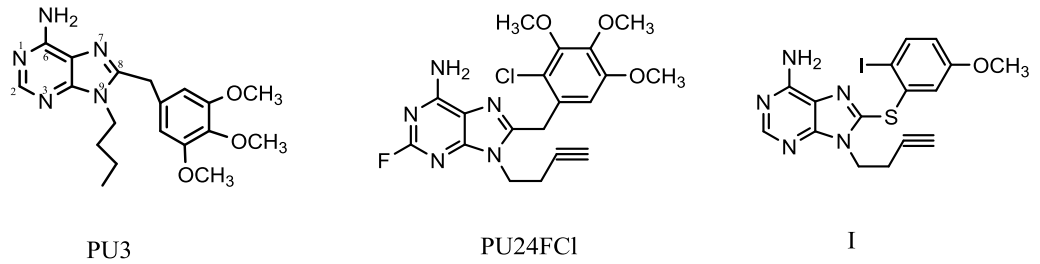
Proteinlerin doğru zamanda doğru şekilde katlanmaları hücresel faaliyetler açısından önemlidir. Proteinlerin katlanıp üç boyutlu hale gelmesini sağlayan proteinlere şaperonlar denir. Şaperonlar, proteinlerin hedeflerine ulaşmadan yanlış zamanda katlanmasını engelleyerek hedefe ulaştığında katlanmalarını sağlarlar, yanlış katlanan (misfolding) proteinleri düzeltirler ve düzeltilmesi mümkün olmayan proteinlerin ise parçalanıp uzaklaştırılmasını sağlarlar. Şaperonlar aynı zamanda stres uyaranlarına cevap olarak da üretilirler. Hsp'ler, yüksek ısıya karşı üretilen şaperonlardır (Fink, 1999).

Hsp70 proteinleri normal koşullar altında, yeni sentezlenen polipeptitlerin katlanmasına, çoklu protein komplekslerinin birleştirilmesine ve proteinlerin hücresel zarlar boyunca taşınmasına yardımcı olan ATP-bağımlı moleküler şaperonlar olarak işlev görür. Peptid bağlanma bölgesi (PBD) ve ATPaz bölgesi (ABD) olmak üzere iki fonksiyonel bölgesi vardır. PBD, substratların bağlanma ve yeniden katlanmasından sorumlu bir karboksil terminali; ABD ise ATP hidrolizinden sonra alıcı proteinin salınmasını kolaylaştıran bir amino terminalidir. Hsp70'in yüksek ekspresyonu, birçok kanser hücrelerinin yaşaması için gereklidir. Yapılan klinik çalışmalar Hsp70'in kanserde kötü bir prognoz faktörü olduğunu göstermektedir (Jego, Hazoumé, Seigneuric ve Garrido, 2013). Hsp70, protein substratlarına bağlanarak stres koşulları düzelinceye kadar bu proteinleri denatürasyon veya agregasyona karşı stabilize eder (Christopher G. Evans, Lyra Chang ve Gestwicki, 2010).

Hsp70, 7 ile 8 amino asidin uzunluğunu tanır, katlanmamış protein zincirlerinin açıkta kalan hidrofobik bölgelerine bağlanabilir. Substrat proteinlerinin bağlanması ve salınması ile ilişkili şekil değişikliklerine enerji sağlamak amacıyla ATP'yi bir enerji kaynağı olarak bağlar ve kullanır (Miller, 2001).

Steroid hormon reseptörleri (progesteron ve androjen reseptörü), protein kinazlar (ERB-B2, BCR-ABL, c-RAF-1, AKT/PKB ve CDK4), mutant p53 ve telomeraz ters transkriptazlar kanser için önemli substrat proteinlerdendir. Bu substrat proteinlerin Hsp90 ile stabilizasyonu ve düzenlenmesi, ATP'nin Hsp90 N terminaline bağlanmasına ve hidrolizine bağlıdır. Bu aktivitenin inhibisyonu, substrat proteinlerinin ubiquitin proteazom yolağı tarafından bozulmasına yol açar (Banerji ve ark., 2005). Hsp70 proteinlerine benzer şekilde Hsp90 proteinleri de; p53, Akt, Raf-1, JNK gibi çeşitli apoptozis faktörlerini düzenleyerek apoptozis üzerinde önemli bir rol oynar (Saini ve Sharma, 2017).

Hsp90 proteinleri hedeflenerek sentezlenen pürin yapıdaki PU3 (Şekil 1.3.) bileşiğinin, meme kanser hücrelerinde G1'in büyümesini ve Her2, Raf1 ve östrojen reseptörünün parçalanmasını durdurarak etki ettiği gözlemlenmiştir. Hsp90'a düşük affiniteyle bağlanan bileşiğin IC₅₀ değeri yüksek olmasından dolayı klinikte kullanım yeri bulamamıştır. Daha aktif bileşikler elde etmek için PU3 bileşiğinden hareketle sentezlenen bileşiklerden PU24FCI bileşiğinin Her2'yi parçalamada PU3'e göre 30 kat daha güçlü olduğu yapılan in vivo deneyler ile ispatlanmıştır (IC₅₀ = 1-2 µM) (Chiosis ve ark., 2003; Vilechik ve ark., 2004).

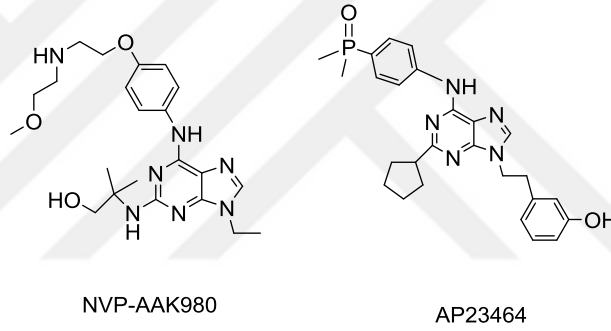


Şekil 1.3. Pürin yapıdaki bazı Hsp90 inhibitörleri

Tirozin protein kinazlar, kanser kemoterapisinde hedef alınabilecek bir diğer protein grubudur. Yapılan çalışmalarda tümörlü hücrelerde bu proteinlerin sentezinin arttığı görülmüştür (Paul ve ark., 2004). Bu amaçla sentezlenen Src kinaz (non-reseptör protein tirozin kinaz) inhibitörü bileşiklerin iskelet metastazlı kanserlerde ve

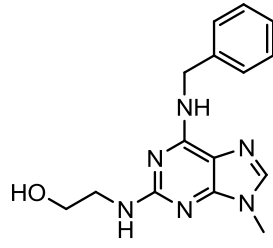
kemik kaybına sebep olan osteoporoz gibi hastalıklarda kullanılabileceği öngörülmüştür (Wang ve ark., 2003).

Src inhibitörü pürin yapıdaki NVP-AAK980 (Şekil 1.4) ile yapılan in vitro çalışmalarla kolon kanser hücrelerine karşı 5-Fluorourasil'e benzer antikanser aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Rucci ve ark., 2008). Yine pürin yapıdaki AP23464 (Şekil 1.4) 'ün hem Src hem de Abl tirozin kinaz enzim inhibitörü olduğu ve KML (kronik myeloid lösemi) hücrelerinin çoğalmasını engellediği görülmüştür. Klinik öncesi yapılan çalışmalarda insan myeloid hücrelerinde güçlü bir Src kinaz inhibitörü olan PP1 ile kıyaslandığında tümör hücrelerinin yayılmasını önlemede daha etkili olduğu görülmüştür (Legraverend ve ark., 2006).

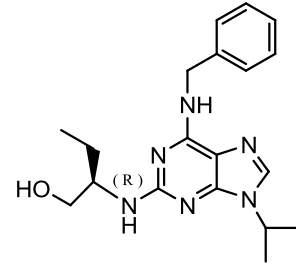


Şekil 1.4. Pürin yapıdaki bazı Src inhibitörleri

Siklin bağımlı kinazlar (Cdk) hayati hücre fonksiyonları düzenleyen proteinlerdir. Apoptozisi de düzenleyen bu proteinlerin, kanserli hücrelerde işlevlerini yitirdiğinin görülmesi üzerine Cdk inhibitörlerinin kanser kemoterapisinde kullanılabileceği fikri ortaya çıkmıştır. Bu inhibitörler, kanserli hücrelerin bölünmesini G1 ya da G2/M aşamalarında durdurarak hücre çoğalmasını engellerken, normal hücrelerin apoptozisten korunmasını sağladıkları görülmüştür. Tümör hücrelerinin selektif inhibisyonunu sağlayan bu ilaç grubunun, aynı zamanda sağlıklı hücreleri kemoterapinin yarattığı olumsuz etkilerden de korumak üzere kullanılabileceği düşünülmüştür (Knockaert ve ark., 2002). Bu amaçla sentezlenen 2,6,9-trisüstitüe pürin türevlerinden Roskovitin'in Olomusin (Şekil 1.5) 'e göre on kat daha etkili olduğu görülmüştür (De Azevedo ve ark., 1997).



Olomustin

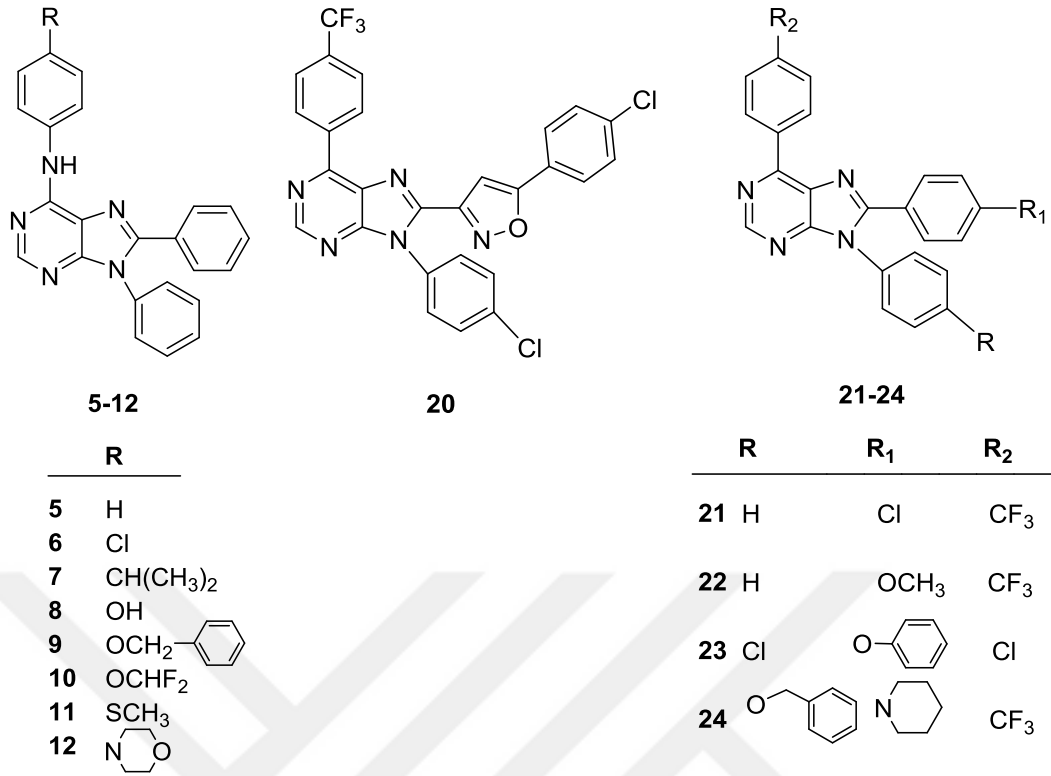


Roskovitin

Şekil 1.5. Pürin yapıdaki bazı Cdk inhibitörleri

Tüm dünyada görülen kanser olgularındaki hızlı büyümenin bireyi, toplumu ve sağlık sistemlerini; fiziksel, duygusal ve finansal açıdan zorlayarak büyük ölçüde krize neden olabileceği öngörülmektedir. Bu alanda yapılan çalışmaların fazlalığının yanı sıra halen kesin olarak başarılı bir tedavi bulunamamıştır. Etkili bulunan birçok bileşiğin toksik etkilerinin fazla olması antikanser tedavideki en büyük zorluklardandır. Tüm bu bilgiler ışığında, selektif sitotoksik etkili ve genel toksisitesi bulunmayan antikanser etkili bileşiklerin sentezlenmesi amaçlanmaktadır.

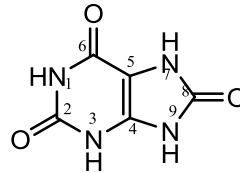
Bu yüksek lisans tez çalışmasında 6-(4-sübstitüe fenil amino)-8,9-difenil-pürin ve 6,9-(4-sübstitüe difenil)-8-[5-(4-klorofenil)-1,2-oksazol/4-sübstitüe fenil] pürin türevlerinin (Şekil 1.6) sentezi, sitotoksik aktivitelerinin in vitro olarak MCF7 meme, HepG2 karaciğer, PC3 prostat ve K562 kronik myeloid lösemi hücre hatlarında test edilmesi, etki mekanizmalarının belirlenmesi, kanser hücresi ve apoptoziste önemli olan Hsp70 ve Hsp90 proteinleri üzerinde inhibitör aktivitelerinin ve bu proteinler ile docking çalışmalarının yapılması hedeflenmiştir. Hsp apoptozu engellediği için kanser hücrelerinin en önemli silahı haline gelmiştir. Bu nedenle Hsp inhibitörleri antikanser aktivite çalışmalarında çok çalışılan moleküller olarak görülmektedir. Daha sonraki aşamada ise en aktif türev üzerinden gidilerek etki mekanizmasının belirlenmesi için çalışmaların yürütülmesi amaçlanmıştır.



Şekil 1.6. Sentezlenen pürin türevleri

1.1. Pürinlerin Tarihçesi

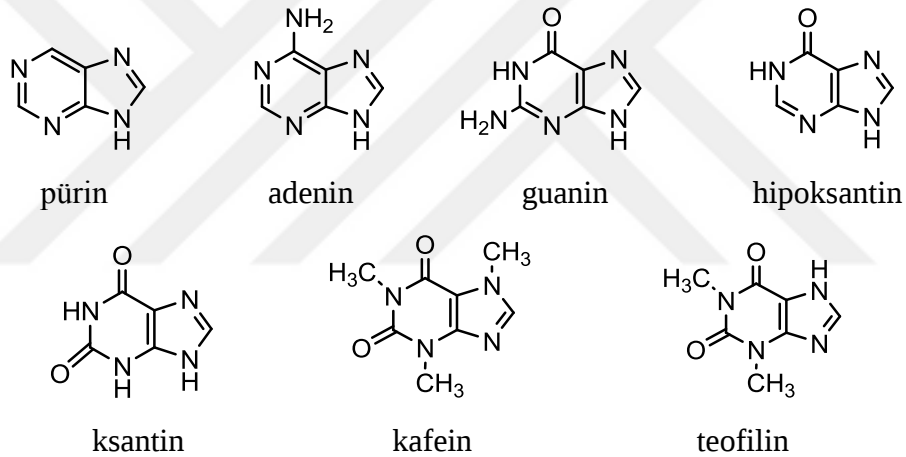
Pürinler, yapısında pirimidin ve imidazol halkalarını içeren doğada en çok bulunan N-heterosiklik yapıdaki bileşiklerdendir. Pürin yapısında keşfedilen ilk bileşik safra taşlarından izole edilen ürik asit (Şekil 1.7)'dir. 1844 yılında Alman Kimyager Emil Fischer, Latince *purum uricum* sözcüğünden türeterek bu yapıya pürin ismini vermiştir (Rosemeyer, 2004).



Şekil 1.7. Ürik asit

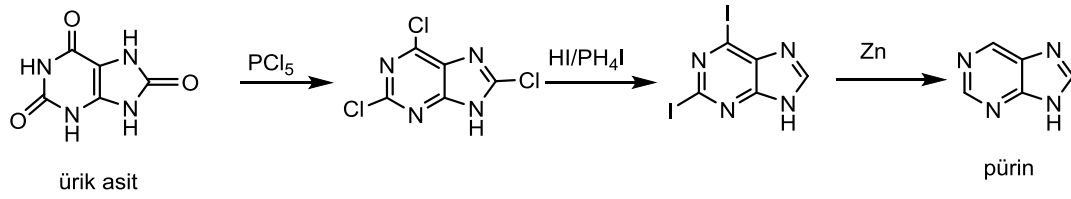
Pürin yapısı 1830’lu yıllarda sentetik olarak sentezlenmeye çalışılsa da başarılı olunamamıştır. Pürin halkasının ilk sentezi, halkaya ismini veren Emil Fischer tarafından 1898 yılında gerçekleştirilmiştir (Olsson, 2003; Rosemeyer, 2004).

Pürin yapısının sentezi için ilk olarak ürik asidi sentezleyen Fischer, ürik asitten hareketle öncelikle pürin halkasını daha sonra teofilin, kafein ve guanin halkalarını (Şekil 1.8) sentezlemiş; adenin, ksantin, kafein, ürik asit ve guanin doğal maddelerinin pürin ana yapısının farklı hidroksil ve amino türevlerine karşılık geldiğini göstermiştir. Yaptığı bu çalışma ile pürinin insan metabolizmasındaki son parçalanma ürününün ürik asit olduğunu ispatlayarak, 1902 yılında kimya dalında Nobel ödülü kazanmıştır (Legraverend ve Grierson, 2006; Olsson, 2003).



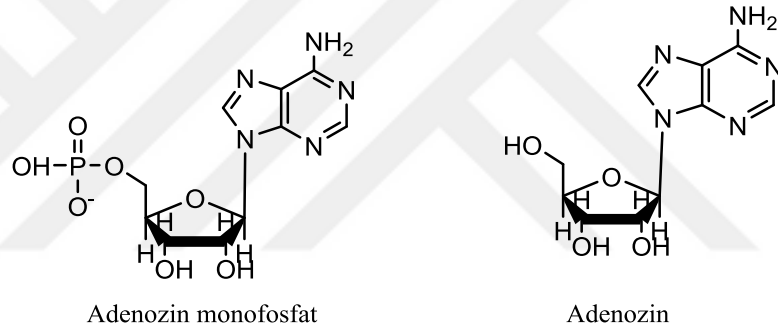
Şekil 1.8. Pürin halkası taşıyan bazı yapılar

Pürin sentez şemasında başlangıç maddesi olan ürik asit önce PCl₅ ile reaksiyona sokularak 2,6,8-trikloro-pürin elde edilmiş ve ardından HI/PH₄I’ün reaksiyona ilave edilmesiyle 2,6-diiyodopürin sentezlenmiştir. 2,6-Diiyodopürin’in çinko tuzu ile muamelesi sonucunda pürin (Şekil 1.9) yapısı elde edilmiştir. Pürin halkasının IUPAC adlandırılması imidazo[4,5-d]pirimidin olarak yapılmıştır (Rosemeyer, 2004).



Şekil 1.9. Pürin sentezi

1928 Yılında, Levene ve London tarafından guanin, hipoksantin, timin ve sitozin nükleozitleri izole ederek DNA yapısında deoksiriboz şekerinin olduğu bulunmuştur. Levene'nin nükleik asitlerin yapısı ile ilgili devam ettiği çalışmalar sonucunda AMP (adenozin monofosfat) nükleozit yapısının (Şekil 1.10) adenin, şeker ve fosfat gruplarından oluştuğunu kanıtlanmıştır (Levene ve London, 1929; Olsson, 2003).



Şekil 1.10. Adenozin monofosfat ve Adenozin Kimyasal Yapıları

Pürin ve pirimidin yapılarının nükleik asitlerin biyosentez yolağındaki rollerini araştırmak üzere çalışmalar yapan Hitchings ve ark., pürin yapısının nükleik asitlerin temel yapı taşı olması ve hücre çoğalmasında nükleik asitlerin önemini göz önünde bulundurarak, pürin antagonistlerinin hücre çoğalmasını engelleyeceği ve kanser hücrelerinin de çoğalmasını engelleyeceği düşüncesiyle ilk sitotoksik pürin bileşiklerini sentezlemişlerdir (Burchenall ve ark., 1953).

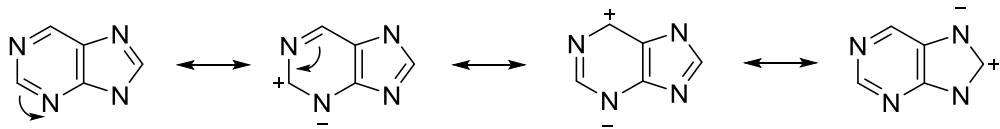
1960'lı Yıllarda, adenozin'in hipoksi koroner vazodilatasyona sebep olduğu keşfedilmiştir. 1985 Yılında ise, adenozin'in doku korunmasında büyük bir rolü olduğu ve enflamatuar hücrelerin aktivasyonunu değiştirdiği bulunmuştur (Berne, 1963; Cronstein ve ark., 1985).

ATP, kimyasal enerjinin %95'nin depolandığı pürin yapıdaki önemli moleküllerden biridir. Sayısız reaksiyonu tetikleyen ATP molekülü, ikincil ulak olan cAMP'nin oluşum reaksiyonlarında da yer alır. cAMP transkripsiyon, hücre potasyum miktarının ayarlanması, protein kinazların aktivasyonu gibi birçok metabolik olayda görev alan sinyal iletim moleküllerinden biridir.

Hücre yaşamsal faaliyetlerini düzenleyen nükleik asitler DNA ve RNA da yapılarında pürin halkasını taşırlar. Hücreler arası elektron transferi yapan koenzim bileşiklerinden NAD^+ (nikotinamid adenin dinükleotit) ve FAD (flavin adenin dinükleotit) de yapısında pürin sistemini taşır (Abd-Elfattah ve ark. 1996; Rosemeyer, 2004).

1.2. Pürin'lerin Yapısı

Pürin, pirimidin ve imidazol halkalarının kaynaşmasıyla oluşan bisiklik yapıdaki halka sistemidir. Pürin halkasının elektronları büyük ölçüde delokalize haldedir. Halka protonu molekülün durumu ve bulunduğu ortama göre halkadaki dört azot atomundan herhangi birine bağlanıp farklı pozisyonlarda bulunabilir. Pürin ve türevleri çoğunlukla $9H$ formunda gösteriliyor olsa da bu protonun halkadaki farklı pozisyonları, farklı tautomerik formlara yol açar. Pürin halkasının rezonans limit formüllerine bakılarak (Şekil 1.11) 2, 6 ve 8. konumlardan nükleofilik grupların; 3. ve 7. konumları üzerinden de elektrofillerin atağına açık olduğu söylenebilir (Shaw, 1984; Ouellette ve Rawn, 2018).



Şekil 1.11. Pürin halkası rezonans limit formülleri

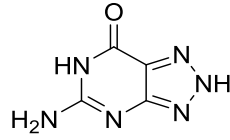
1.3. Pürin Türevlerinin Biyolojik Aktiviteleri

Pürin yapıdaki bileşiklerin HspP70, Hsp90, Src kinaz, p38 α MAP kinaz, sülfotransferazlar, fosfodiesterazlar ve CDK'ların inhibitörleri olduğu gibi; interferon inhibitörleri, adenosin reseptör agonist ve antagonistleri, kortikotropin salgılatıcı hormon reseptör ligandları olarak da tedavide kullanım alanları vardır ve biyolojideki bu uygulamaların henüz keşfedilmemiş birçok yönü bulunmaktadır (Legraverend ve Grierson, 2006). Pürin analoglarının sitotoksik, antiprotozoal, antimikobakteriyel, antifungal, antibakteriyel ve antiviral biyolojik aktivite gösterdikleri bilinmektedir (Dinesh ve ark., 2012).

1.3.1. Antikanser Etkili Pürin Türevleri

Tüm dünya üzerinde yıllardır etkisini gösteren kanser, genetikle gelen ve çeşitli karsinojen maddelerin tetiklemesiyle birlikte hücrelerin kontrolsüz veya anormal bir şekilde çoğalıp büyümesi olarak ifade edilen en önemli sağlık problemlerinin başında gelmektedir. Karsinojen bileşiklerin DNA'ya tutulması sonrasında DNA replikasyonunda hatalı eşleşme ve dolayısıyla hücrenin farklılaşması durumu gerçekleşmiş olur (Abraham, 2003).

İlk sitotoksik etki gösteren pürin analogu 8-azaguanin (Şekil 1.12), Roblin tarafından 1945 yılında sentezlenmiştir. Yapılan in vivo deneyler sonucu ilacın kötü farmakodinamik özellik gösterdiği görülmüştür ve bu yüzden klinikte kullanım alanı bulamamıştır. 1962 yılında Hall ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda, 8-azaguanin'in baş ve boyun bölgesindeki küçük infüzyonlarla ilerleyen tümörlerde etkili olduğu bulunmuştur (Roblin ve ark, 1945; Sartorelli ve Johns, 1975).

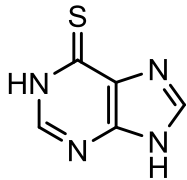


8-Azaguanin

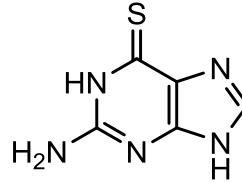
Şekil 1.12. 8-Azaguanin Yapısı

Kanser tedavisinde kullanılan ilk pürin türevi bileşikler 1953 yılında sentezlenen 6-merkaptopürin (Şekil 1.13) ve 1966 yılında sentezlenen 6-tiyoguanin (Şekil 1.13) 'dir (Abraham, 2003). 6-merkaptopürin, FDA tarafından çocukluk çağı lösemisinin erken tedavisinde kullanılmak üzere onay almıştır. Yetişkinler ve çocuklarda akut lenfoblastik lösemi (ALL) tedavisinde birincil tedavi olarak kullanılmaya devam edilmektedir.

6-Tiyoguanin; akut lenfolastik lösemi (ALL), akut myeloid lösemi (AML) ve kronik myeloid lösemi (CML) tedavilerinde yıllardır kullanılan pürin analogu antikanser bir bileşiktir.



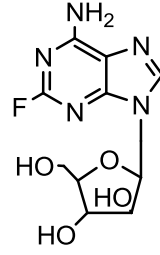
6-Merkaptopürin



6-Tiyoguanin

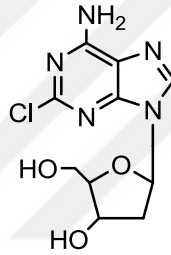
Şekil 1.13. 6-Merkaptopürin ve 6-Tiyoguanin Kimyasal Yapıları

Antikanser etkili pürin analoglarının keşfi ve tedavide kullanımı 1991 yılında Fludarabin (Şekil 1.14) ve 1992 yılında Kladribin (Şekil 1.15) ile devam etmiştir (Abraham, 2003). Adenozin monofosfat analogu olan Fludarabin, kronik lenfositik lösemi'nin (CLL) birinci basamak tedavisinde, kemik iliği transplantasyonunda ve nadiren de tekrarlayan B hücreli lenfomalar için kullanılır.



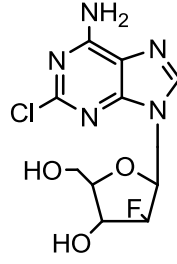
Şekil 1.14. Fludarabin

Kladribin (Şekil 1.15); lenfoproliferatif hastalıklarda, özellikle tüylü hücreli lösemisi tedavisinde, çocukluk çağı lösemisi ve multipl skleroz tedavilerinde kullanılan antineoplastik aktivitede olan pürin nükleozit analogudur. Kronik lenfositik lösemi, non-Hodgkin lenfomalar, kutanöz T hücreli lenfomalı hastalar da Kladribin tedavisine yanıt vermiştir.



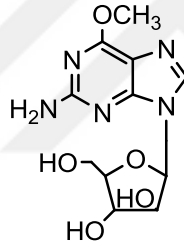
Şekil 1.15. Kladribin

Klofarabin (Şekil 1.16); Fludarabin veya Kladribin'den potansiyel olarak daha iyi aktiviteye sahip bir pürin nükleozit analogudur. Kladribin kimyasal yapısında bulunan 2-kloro adenozin iskeleti, Klofarabin yapısında da bulunur; bu sayede molekülün Adenozin Deaminaz tarafından inaktive edilmekten korunduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda, 2' konumunda, aktiviteyi artırdığı düşünülen bir flor atomu taşır. Klofarabin, önce en az iki başka kemoterapi tedavisinin uygulanması koşuluyla, tekrarlayan veya tedavisi güç ALL'li pediyatrik hastaların tedavisi için 2004 yılında FDA tarafından onaylanmıştır. AML'ye karşı, sitarabin ile kombine halde kullanımı önerilmektedir.



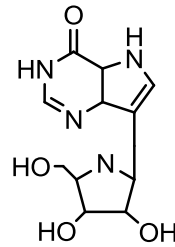
Şekil 1.16. Klorarabin

Nelarabin (Şekil 1.17), 2005 yılında FDA tarafından onaylanmış pürin analogudur. En az iki kemoterapi tedavisinden sonra yanıt vermeyen veya tekrarlayan T-hücreli akut lösemi (T-ALL) ve T-hücreli lenfoblastik lenfoma (T-LBL) hastalarının tedavisinde kullanılır. FDA tarafından sadece T-ALL ve T-LBL tedavilerinde onaylanmıştır, tedavide yanıt oranları düşüktür (%23 pediatrik ve %31 yetişkin hastalar) (Chabner ve Longo, 2019).



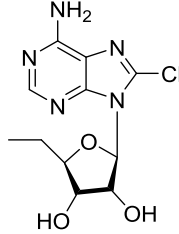
Şekil 1.17. Nelarabin

Forodesin (Immucilin H) (Şekil 1.18), T-hücreli akut lenfoblastik lösemi (T-ALL) ve kütanoz T-hücre lenfomada kullanılan pürin nükleozit fosforilaz (PNP) inhibitörüdür (Robak, 2013).



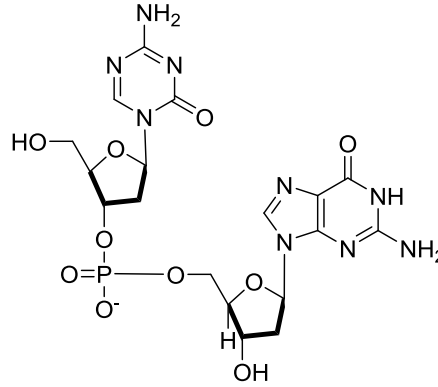
Şekil 1.18. Forodesin

8-Kloroadenozin (Şekil 1.19), çeşitli solid tümörlere ve hematolojik malignitelere karşı ve kronik lenfositik lösemi hastaların tedavisinde kullanılır. 8-Kloroadenozin, AML hücrelerinde doza bağımlı olarak RNA sentezini %20-80 arasında inhibe ederek etkisini gösterir (Buettner ve ark., 2015).



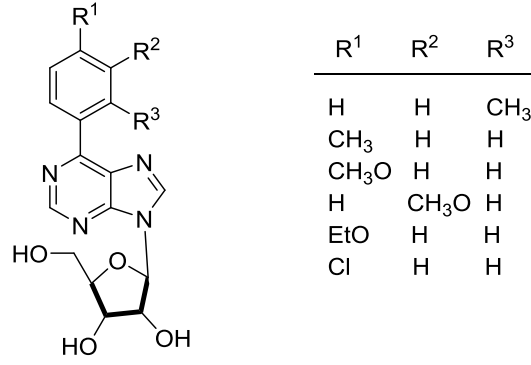
Şekil 1.19. 8-Kloroadenozin

Guadesitabin (SGI-110) (Şekil 1.20), desitabin'in ön ilacı olan dinükleotit yapıdaki antikanser bileşiktir. Deaminasyona karşı dirençsiz olan desitabin'in aksine guadesitabin, CDA tarafından inhibasyona oldukça dayanıklıdır. MDS/AML hastalığında Faz I/II ve III çalışmaları, çeşitli solid tümörlerde ise Faz I/II çalışmaları devam etmektedir (Yoo ve ark., 2007)



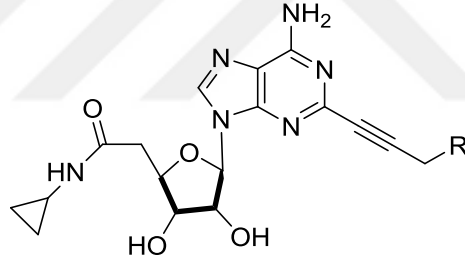
Şekil 1.20. SGI-110

Hocek ve ark., 6,9-disüstitüe pürin türevleri (Şekil 1.21) sentezlemişler ve IC₅₀ değeri 0,25 – 8,3 µM arasında değişen bileşikler elde etmişlerdir. 6. konumdaki fenil halkasının 4. konumundaki R₁ süstitüsyonu ile aktivitede artmaya, 3. konumda yapılan R₂ süstitüsyonların ise aktivitede azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Hocek ve ark., 2000).



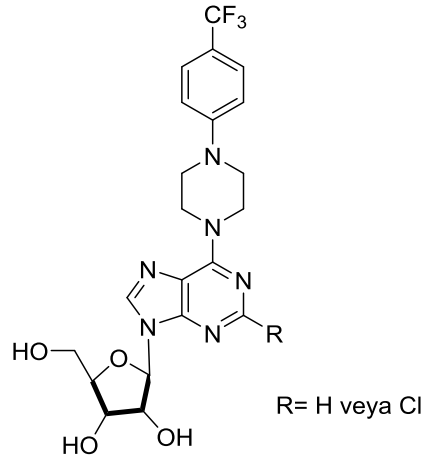
Şekil 1.21. 6-(2,3,4-Süstitüe fenil)pürin ribonükleozit türevleri

Mohan ve ark., C5'-N-siklopropilkarboksamido-C6-amino-C2-alkillenmiş pürin nükleozit analogları (Şekil 1.22) üzerine çalışmışlar ve meme kanser hücre hattı MDA-MB-231 ve kolon kanser hücre hattı Caco-2'ye karşı sırasıyla 6,8 μ M – 23,4 μ M ve 7,5 μ M – 20,9 μ M IC₅₀ değerlerini elde etmişlerdir (Mohan ve ark., 2017).



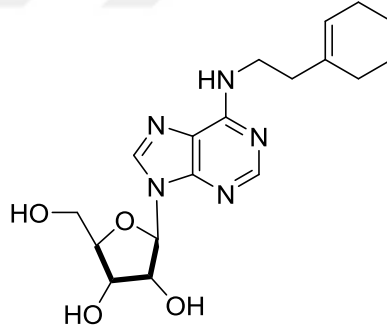
Şekil 1.22. C5'-N-Siklopropilkarboksamido-C6-amino-C2-alkillenmiş pürin nükleozit türevleri

Tunçbilek ve ark., çeşitli 6-(4-süstitüe fenil piperazin)pürin nükleozit türevlerinin (Şekil 1.23) sentezi üzerinde çalışmışlar, fenil halkasının 4. konumunda -CF₃ süstitüenti taşıyan bileşik için Huh7 (karaciğer), HCT116 (kolon) ve MCF7 (meme) kanser hücre hatlarına karşı sırasıyla 6,7 μ M, 7,5 μ M ve 7,8 μ M IC₅₀ değerlerini elde etmiştir. Ayrıca, pürin halkasının 2. konumunda klor atomu taşıyan bileşik kanser hücre hatlarında sırasıyla 2 μ M, 1 μ M ve 4 μ M IC₅₀ değerleri ile sitotoksik aktivite göstermiştir (Tuncbilek ve ark. 2018).



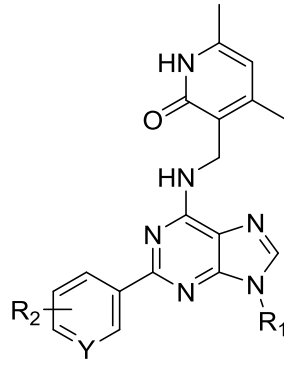
Şekil 1.23. 2-Süstitüe-6-[(4-(4-triflorometil)fenil)piperazin-1-il] -9-(β-D-ribofuranozil)pürin

Tunçbilek ve ark., 6-süstitüe amino-9-(β-D-ribofuranozil)pürin analogları (Şekil 1.24) üzerinde çalışmışlar ve sentezlenen türevler arasında pürin halkasının 6. konumunda (2-siklohekzeniletil)amino taşıyan bileşik için insan kolon kanser hücre hattı HCT116 ve insan meme kanser hücre hattı MCF7'ye karşı sırasıyla 6 µM ve 3 µM IC₅₀ değerlerini elde etmiştir (Tuncbilek ve ark. 2018).



Şekil 1.24. 6-(2-Siklohekzeniletil)amino-9-(β-D-ribofuranozil)pürin

Zhang ve ark., yeni bazı 2,6,9-trisüstitüe pürin türevleri (Şekil 1.25) sentezlemiş ve türevlerin tübülün polimerizasyon inhibitörleri olduklarını kanıtlamışlardır. Bu yeni türevler, kolorektal karsinom hücre hatlarında yapılan aktivite testlerinde, 44.5 ile 135.5 nM arasında değişen IC₅₀ değerleriyle antitümör aktivite göstermişlerdir (Zhang ve ark., 2019).



5a-5k

- 5a:** Y=N, R₁=2-Pr, R₂=6-(piperazin-1-il)
5b: Y=N, R₁=3-pentil, R₂=6-(piperazin-1-il)
5c: Y=N, R₁=siklopentil, R₂=6-(piperazin-1-il)
5d: Y=C, R₁=H, R₂=4-OCF₃
5e: Y=C, R₁=H, R₂=2-F
5f: Y=C, R₁=H, R₂=4-morfolino
5g: Y=C, R₁=H, R₂=3-morfolino
5h: Y=C, R₁=H, R₂=4-morfolinometil
5i: Y=C, R₁=H, R₂=4-(4-metilpiperazin-1-il)
5j: Y=N, R₁=H, R₂=6-(4-metilpiperazin-1-il)
5k: Y=N, R₁=H, R₂=6-(piperazin-1-il)

Şekil 1.25. 2,6,9-Trisüstitüe pürin türevleri

1.3.1.1. Hsp İnhibitörü Pürin Türevleri

Hsp'ler, etkilerini ısı şoku veya diğer stres faktörleri tarafından indüklenerek gösteren, polipeptid zincirlerinin katlanmasında görev alan geniş bir protein ailesidir (Wu ve diğerleri, 2017). Stres faktörlerine maruz kalındığında protein yapısını ve fonksiyonunu korurlar (Wu ve diğerleri, 2017). Kısmen katlanmamış proteinlerin çözünmeyen kompleksler oluşturmak üzere birikmesini de önleyen Hsp'ler, bu özellikleri ile moleküler şaperon olarak da anılırlar (Miller, 2001). Hsp'ler molekül ağırlıklarına göre Hsp27, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 ve büyük Hsp'ler şeklinde gruplandırılır.

Hsp'ler hücrel çoğalma, farklılaşma ve karsinogeneze önemli roller oynar. Anjiyogenez, hücre proliferasyonu, migrasyon, invazyon ve metastazın düzenlenmesi yoluyla karsinogeneze de önemli rolleri bulunur. Hsp'ler ayrıca bazı antikanser ilaçlara karşı direnci ve apoptozu da düzenler. Bunlara ek olarak Hsp'ler, terapötik hedefler olduğu gibi kanser teşhis ve prognozu için biyobelirteç olarak da potansiyel klinik kullanıma sahiptir.

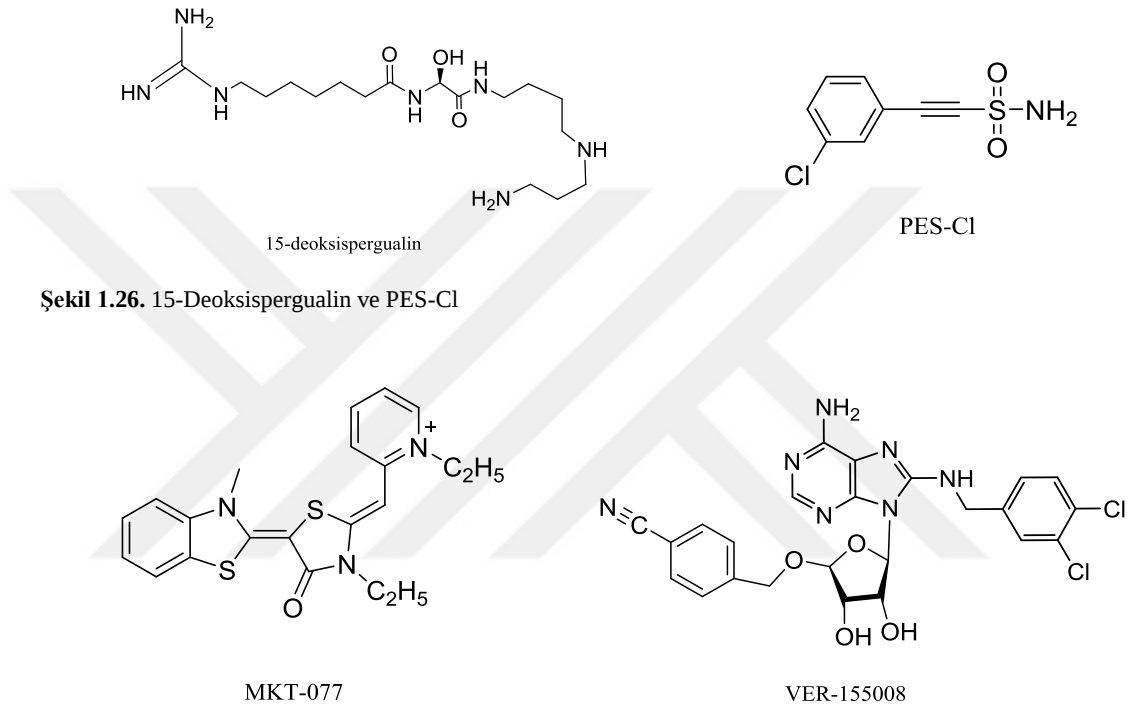
Hsp70 ve Hsp90 proteinleri, kanserdeki önemli rolleri göz önüne alınarak diğer Hsp'lere göre daha yaygın incelenmiştir. Hsp70'in artan ekspresyonu, meme, akciğer, yumurtalık, kolorektal ve pankreatik kanserler ve glioblastom dahil olmak üzere çeşitli kanserler için zayıf bir prognostik belirteç olarak gösterilmiştir. Hsp90'ın artan ekspresyonu, JAK2/STAT3, PI3K/AKT ve MAPK onkojenik protein kinazların aktivasyonunu teşvik eder ve böylece kanser hücre büyümesini destekler (Yun, Kim, Lim ve Lee, 2019). Hsp90 inhibitörleri preklinik ve klinik çalışmalarda yeni antikanser ajanlar olarak araştırılmıştır. Büyük molekül ağırlığına sahip Hsp'ler aşılarda kanser immünoterapisi için kullanılmaktadırlar. Hsp üyelerinin bir sinyal ağında hücresel fonksiyonları düzenleme amacıyla birbirleriyle işbirliği yaptıkları görülmüştür, bu durumun gözlenmesi farklı Hsp inhibitörlerinin kombine kullanımıyla antikanser aktivitenin artabileceği yönünde çalışmalara yön vermiştir (Wu ve diğerleri, 2017).

1.3.1.1.1. Hsp70 ve Kanser

Hsp70; protein katlanması, protein homeostazının düzenlenmesi ve yüksek stres etmenlerine maruziyetin ardından hücre sağkalımının arttırılmasında önemli fonksiyonları olan, HspA (Hsp70) genleri tarafından kodlanan 13 üyeli bir protein ailesidir. Hsp70'ler, genellikle kanser hücrelerinde anormal derecede yüksek seviyelerde bulunurlar. Tümörle ilişkili ekspresyonları ve anti-apoptotik etkileri nedeniyle hayatta kalma faktörleri olarak hareket ederek karsinogenezi teşvik ederler. Yapılan bazı çalışmalar Hsp70'in kanser hücrelerini TNF kaynaklı sitotoksiteden koruduğu ve bazı kanser hücrelerinin onkojenik potansiyelini immünolojik savunmadan kaçış mekanizması yoluyla arttırabileceğini göstermektedir (Jaattelal, Wissing, Bauer ve Li, 1992).

Tüm bu özellikleri göz önüne alındığında Hsp70'in antikanser tedavide ideal bir hedef olduğu düşünülmektedir. Birkaç Hsp70 inhibitörü bileşik sitotoksik etkili olarak bildirilmiş olsa da in vivo çalışmalarda çok azı değerlendirilmiştir. Etki mekanizması kesin olarak bilinmeyen 15-deoksispergualin (Şekil 1.26), aynı

zamanda zayıf oral biyoyararlanım göstermesi sebebiyle de klinikte yaygın kullanımı yoktur, parenteral olarak kullanılmaktadır (Sprangers, Pirenne, Mathieu ve Waer, 2019). Daha sonra yapılan çalışmalarla PES-Cl (Şekil 1.26), MKT-077 (Şekil 1.27) ve Ver-155008 (Şekil 1.27) 'in Hsp70 inhibitörü olarak önemli antikanser aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Bu bileşiklerden sadece PES-Cl'nin diğerlerinin aksine G2/M fazını indükleyebildiği bulunmuştur (Lianos ve ark., 2015).

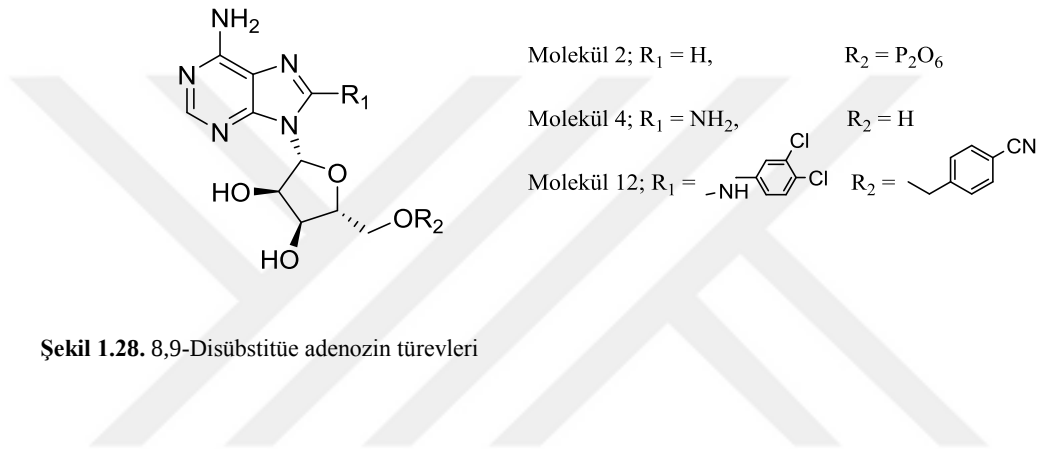


Şekil 1.26. 15-Deoksispergualin ve PES-Cl

Şekil 1.27. MKT-077 ve Ver-155008

VER-155008, Hsp70 ailesinin güçlü bir inhibitörüdür. VER-155008'in, BT474 insan meme tümör hücre hattında apoptozu indüklediği yapılan çalışmalar sonucunda bulunmuştur. Bileşiğin adenosin kısmının, Hsp70/Bag-1 ATPaz bölgesine bağlanarak ATP'nin adenosin kısmına karşılık gelen protein etkileşimlerini benimsediği yapılan X ışını kristallografisi çalışmaları ile görülmüştür. İnsan meme ve kolon kanseri hücre hatlarında yapılan çalışmalarda, VER-155008'in $GI_{50} = 5,3-14,4 \mu M$ aralığında bu hücrelerin çoğalmasını inhibe ettiği görülmüştür. Aynı zamanda HCT116 ve BT474 hücrelerinde Hsp90 substrat protein yıkımını indüklediği anlaşılmıştır (Massey ve ark., 2010).

Williamson ve ark. sentezledikleri 9-süstütle adenozin türevlerinin (Şekil 1.28) Hsp70 inhibisyon yoluyla antikanser aktivitelerini ve *in silico* moleküllerin proteine bağlanma deneylerini gerçekleştirmişlerdir. Sentezlenen türevlerden molekül 2, 4 ve 12'nin Hsp70 proteinine düşük K_d değerleri ile bağlandığı görülmüştür. İnsan kolon kanser hücre hattında (HCT116) yapılan aktivite çalışmalarında bileşik 4 ve 12'nin sırasıyla 9.4 ve 0.5 μM IC_{50} değerleri ile etki ettiği görülmüştür (Williamson ve ark., 2009)



Şekil 1.28. 8,9-Disüstitüe adenozin türevleri

1.3.1.1.2. Hsp90 ve kanser

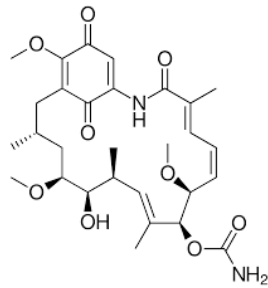
Hsp90, çeşitli sayıdaki proteinlerin katlanmasına ve stabilizasyonuna yardımcı olarak hücre koruma ve bakımında yer alan şaperon molekülleridir. Kinazlar gibi kanser ve enflamasyonda önemli rol oynayan transkripsiyonel faktörler de dahil olmak üzere yaklaşık 400 proteinin aktivitesinin Hsp90 şaperon aktivitesine bağlı olması, kanser ve enflamasyon ile ilişkili hastalıkların tedavisi için bu protein ailesinin hedef alınmasına yol açmıştır (Zhang ve ark., 2004).

Hsp90 homodimer yapıda bir proteindir ve her monomer bir amino (N-) terminali, bir orta bölge ve bir karboksi (C-) terminali içerir. N-terminali bir ATP bağlanma bölgesi; orta bölge, substrat proteinler ve ko-şaperonlar için bağlanma bölgesi; C-terminali de dimerizasyon alanı ve ko-şaperonlar için bağlanma bölgesidir. N-terminalinin Hsp90 inhibitörleri ile etkileşmesi, Hsp90'ın katladığı

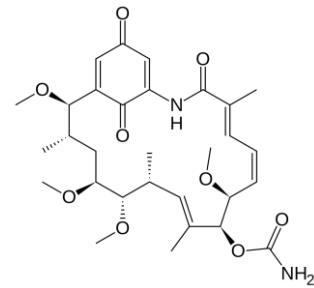
proteinlerin parçalanmasına sebep olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Mcalpine, 2016).

Klinik çalışmalarda Hsp90 inhibitörlerinin melanom, akut miyeloid lösemi, kastrasyona dirençli prostat kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve multipl miyelomda etkili sonuçları bulunmuştur. Çok sayıda ikinci kuşak Hsp90 inhibitörü bileşiğin bahsi geçen klinik çalışmaları yapılmış olsa da, bugüne kadar FDA onaylı hiçbir inhibitör veya Hsp90 inhibisyonunu belirlemek için standart bir test onaylanmamıştır (Jhaveri ve ark., 2012).

Bilinen ilk Hsp90 inhibitörü *Streptomyces hygroscopicus*'dan izole edilen Geldanamisin (Şekil 1.29)'dir. Bu doğal inhibitör madde Hsp90 aktivitesini, şaperonun ve ko-şaperonun farklı fonksiyonel bölgelerine bağlanarak inhibe eder. Geldanamisin'in istenmeyen yan etkilerini azaltarak ve etkinliğini artırarak yeni sentetik/yarı sentetik Hsp90 inhibitörleri sentezlenmeye çalışılmıştır. Herbimisin (Şekil 1.29), Geldanamisin'den türetilerek sentezlenen Hsp90 inhibitörlerindendir. Bu doğal bileşikler güçlü sitotoksik aktivite göstermelerine rağmen hepatotoksik oldukları için klinikte kullanılamamışlardır (Zhang ve ark., 2004; Neckers ve Workman, 2012) Geldanamisin'den türetilen ve 1999 yılında klinik çalışmaya katılan ilk Hsp90 inhibitörü olan 17-AAG (Şekil 1.30), Hsp90'ın N-terminaline bağlanmak için ATP ile rekabet ederek etkisini gösterir (Banerji ve diğerleri, 2005).

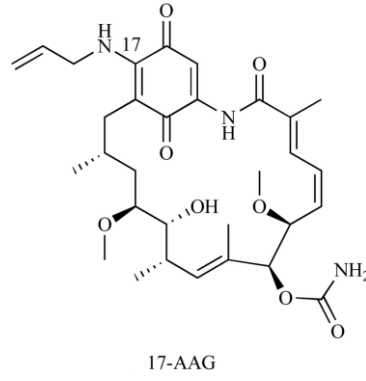


Geldanamisin



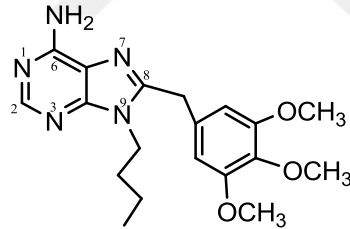
Herbimisin

1.29. Geldanamisin ve Herbimisin



Şekil 1.30. 17-AAG

Sentezlenen pürin yapıdaki ilk aktif Hsp90 inhibitörü bileşik PU3'tür (Şekil 1.31). Hsp90'a düşük afinite ile bağlanan PU3, meme kanser hücrelerinde Her2, Raf-1 ve östrojen reseptörünün parçalanmasını sağladığı ve G1'in büyümesini durdurduğu görülmüştür. Kanser hücrelerini $IC_{50} = 50-75 \mu M$ ile inhibe eden PU3, farmakokinetik özellikleri nedeni ile klinikte kullanım alanı bulamamıştır. Ancak PU3 bileşiğinden türevlendirilerek çok sayıda bileşik sentezlenmiştir.

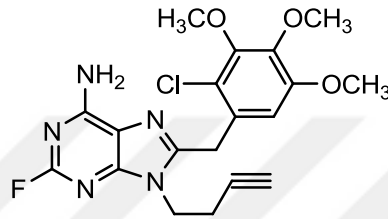


Şekil 1.31. PU3

PU3 bileşiğinde pürin halkasının 9. konumundaki alkil süstitüsyonunun sitotoksik özelliği arttırdığının belirlenmesi üzerine, aynı konuma getirilen çeşitli süstitüsyonlarla etkinin değişimi incelenmek istenmiştir. Bütil zinciri yerine, pent-4-inil veya 2-izopropoksi-etil zincirleri getirildiğinde etkinin en yüksek olduğu belirlenmiştir ($EC_{50} = 1.5-1.7 \mu M$). Aynı konuma getirilen aromatik halka yapısının antikanser aktiviteyi azalttığı görülmüştür. Pürin halkasının 2. konumuna -F atomu getirildiğinde sitotoksik etkinin PU3'ün etkisine göre 2 kat fazla olduğu; alkoksi

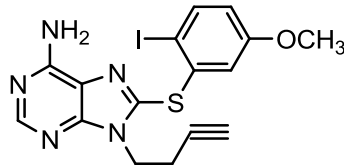
grubu veya -I atomu getirildiğinde ise etkinin azaldığı görülmüştür (Chiosis ve ark., 2003).

Yapılan çalışmalar sonucu edinilen tüm bu bilgilere dayanarak sentezlenen PU24FCl (Şekil 1.32) bileşiği ile yapılan in vivo deneylerde, bileşiğin Her2'yi parçalamada PU3'ten 30 kat daha güçlü olduğu ($IC_{50} = 1-2 \mu M$) ve meme kanser hücrelerini %72 oranında azalttığı gözlenmiştir (Vilenchik ve ark., 2004).



Şekil 1.32. PU24FCl

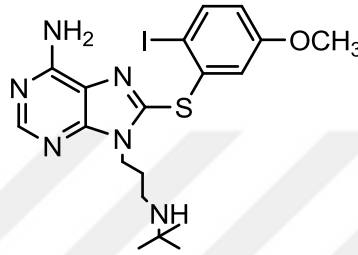
PU24FCl bileşiğinde, pürin ve fenil halkaları arasındaki $-CH_2$ köprüsü yerine $-S$ atomu getirilmesi ile oluşan 8-sülfonil adenin türevi bileşik (Şekil 1.33) daha güçlü sitotoksik etki göstermiştir.



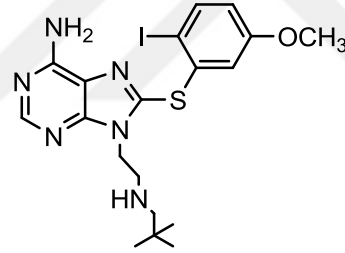
Şekil 1.33. 8-Sülfonil adenin türevi bileşik

Bahsedilen bu üç bileşiğin de oral biyoyararlanımları çok düşük olduğundan klinikte oral kullanım şekli yoktur. Farmakokinetik özelliklerini iyileştirmek amacıyla pürin halkasının 9. konumundaki alkil zincirine primer/sekonder amin grubu getirilmesiyle suda çözünürlüğün ve aynı zamanda sitotoksik aktivitenin de arttığı görülmüştür.

Pürin halkasının 9. konumunda tersiyer bütıl bulunan (Şekil 1.34) ($IC_{50} = 0,14 \mu M$) ve neopentilamin bulunan (Şekil 1.35) ($IC_{50} = 0,14 \mu M$) bileşiklerin meme kanser hücrelerinde Her2 proteinini parçaladıkları görülmüştür. Her iki bileşiğin de fosforik asit tuzlarının suda çözünme özellikleri iyidir. Yapılan in vivo deneylerde 9. konumda neopentilamin grubu içeren bileşiğin (Şekil 1.23) hasta farelere günde 200 mg/kg dozlaması ile 30 günlük uygulaması sonucunda, tümör hücre çoğalmasının %70 oranında inhibe olduğu görülmüştür (Biamonte ve ark., 2006).



Şekil 1.34. 6-Amino- 8-(2-iyodo-5-metoksifeniltiyo)-9-[3-(tert-butilamino)propil]-9H-pürin

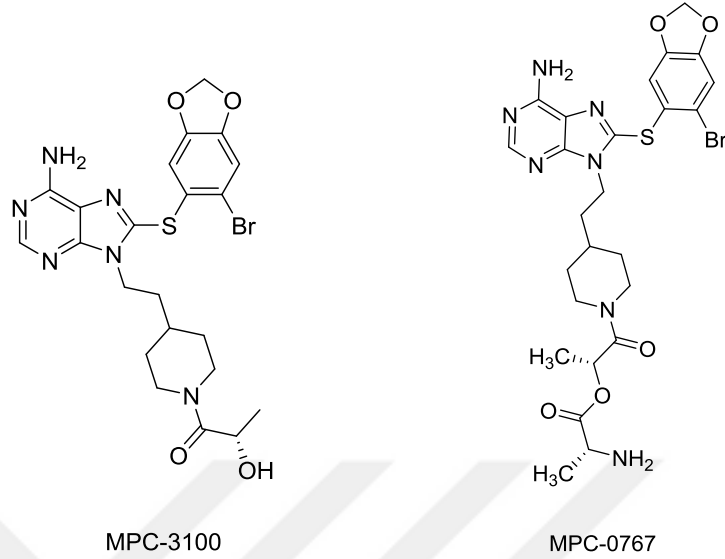


Şekil 1.35. 6-Amino- 8-(2-iyodo-5-metoksifeniltiyo)-9-[2-(neopentilamino)etil]-9H-pürin

MPC-3100 (Şekil 1.36), Faz I klinik çalışmalarını başarıyla tamamlayan pürin yapıdaki sentetik Hsp90 inhibitörüdür. Yapılan klinik çalışmalar ile bileşiğin yetersiz çözünürlük özellikleri ve formülasyon sorunları olduğu görülmüş ve klinikte kullanım alanı olabilmesi için bileşiğin suda çözünür bir ön ilacının geliştirilmesi tasarlanmıştır (Kim ve ark., 2015).

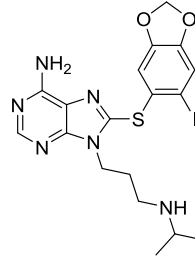
MPC-3100 bileşiği ile yapılan Faz I çalışmalarında tedavisi güç ve tekrarlayan kanserli hastalarda 28 günlük bir döngüde 21 gün boyunca 50, 100, 165 mg/m² oral MPC-3100 dozu değerlendirilmiştir. Zayıf biyoyararlanım özelliklerine rağmen etkili

inhibisyon aktivitesi olan MPC-3100'un ($IC_{50} = 0,14 \mu M$) ön ilacı olarak MPC-0767 (Şekil 1.36) geliştirilmiştir (Jhaveri ve ark., 2012)



Şekil 1.36. MPC-3100 ve MPC-0767

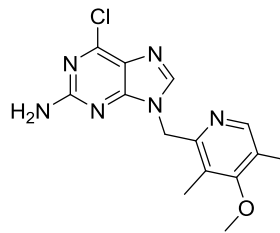
PU-H71 (Şekil 1.37); solid tümörleri, lenfoma ve miyeloproliferatif bozuklukları olan hastalarda Faz I klinik çalışmaları ile değerlendirilen Hsp90 inhibitörüdür. Usmani ve ark. (2010), insan miyelom hücre hatlarında yaptığı çalışmalara göre PU-H71'in G2/M fazındaki hücre oranlarında ve protein sentez aşamasında siklin D1 ekspresyonunda azalmaya yol açtığını bulmuşlardır. Bu sonuçlara dayanarak PU-H71'in hücre döngüsü ilerlemesini inhibe ettiği görülmüştür (Jhaveri ve diğerleri, 2012; Usmani, Bona, Chiosis ve Li, 2010) Ambati ve ark. (2013), Ewing sarkoma hücrelerinde yaptıkları çalışmalara göre, PU-H71 Ewing sarkom hücre hatlarında ve hasta örneğinden türetilen hücre kültürlerinde proliferasyonu inhibe ederek ve hücre ölümünü indüklediği bulunmuştur. Test edilen Ewing sarkom hücre hatları için ortalama IC_{50} değeri $0,23 \mu M$ bulunmuş ve maksimum hücre ölümü 48. saatte kaydedilmiştir (Ambati ve ark., 2013).



PU-H71

Şekil 1.37. PU-H71

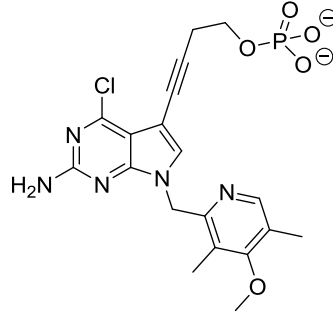
BIIB021 (CNF2024) (Şekil 1.38), Faz I ve Faz II klinik çalışmaları bulunan, in vitro ve in vivo olarak çeşitli tümör hücrelerinin apoptozunu indüklediği kanıtlanan oral yoldan kullanılabilen yeni bir Hsp90 inhibitörüdür. Wang ve ark. (2014), BIIB021'in, tek bir ajan olarak veya radyasyon ile kombine kullanımı ile özofagus yassı epitel hücreli karsinom (ESCC) hücre hatlarında güçlü sitotoksik aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. BIIB021 (IC_{50} = 0,053–0,66 μ M)'in, ESCC hücre hatlarının radyosensitif EGFR, Akt ve Raf-1 proteinlerini, artan apoptotik hücrelerini ve G2 fazındaki hücreleri azaltarak düzenlediği yapılan çalışmalarla bulunmuştur (Wang ve ark., 2014). BIIB021, pürin halkasının 9. konumunda bulunan heteroaril süstitüenti ile diğer Hsp90 inhibitörlerinden farklı kimyasal yapıdadır. Kronik lenfositik lösemili hastalarda 3 haftalık süre boyunca BIIB021'in oral yoldan haftada 2 kez maksimum 800 mg dozu ile tedavi şeması izlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, senkop, baş dönmesi, yorgunluk, hiponatremi ve hipoglisemi gibi yan etkiler görülmüştür (Jhaveri ve ark., 2012).



Şekil 1.38. BIIB021

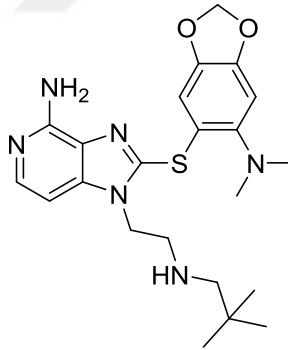
BIIB028 (Şekil 1.39), ikinci kuşak Hsp90 inhibitörlerindendir. Faz 1 klinik çalışmaları yapılmıştır. Klinik çalışma sonuçlarına göre, tekrarlayan metastatik veya

lokal ileri evre solid tümörleri olan hastalarda pozitif sonuç verdiği görülmüştür (Wu ve ark., 2017).



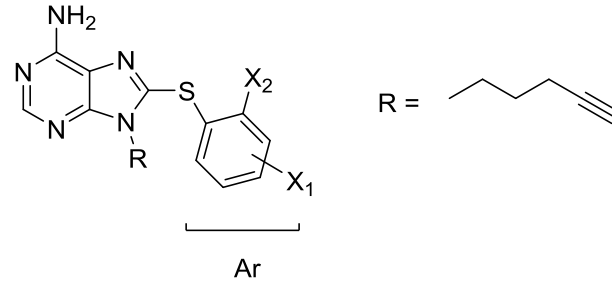
Şekil 1.39. BIIB028

Debio 0932 (CUDC-305) (Şekil 1.40), ikinci kuşak Hsp90 inhibitörlerindendir. İleri evre solid tümörler ve lenfoma tedavisinde sitotoksik olarak etkili olacağı düşünülen bileşiğin Faz I klinik çalışmaları 2010 yılında tamamlanmıştır ($IC_{50} = 0,1 \mu M$). Oral kullanılabilen molekülün küçük hücreli akciğer kanserli hastalarda Faz II çalışması başlamış ancak doz sınırlayıcı toksisitelerin ortaya çıkması nedeniyle sonlandırılmıştır (Chatterjee ve Burns, 2017).



Şekil 1.40. Debio 0932 (CUDC-305)

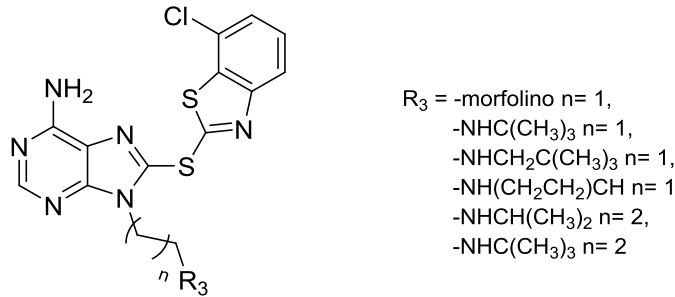
Llauger ve ark., antikanser aktivitede olabilecek bir dizi 8-aril sülfonil adenin türevi (Şekil 1.41) bileşik sentezlemişlerdir. Sentezlenen bileşiklerden 11v (Ar = 4,5-(OCH_2O -Ph), $X_2 = Br$)'nin, insan meme kanser hücre hattı HER2'yi $IC_{50} = 300 \text{ nM}$ değeri ile; Hsp90 α proteinini $EC_{50} = 30 \text{ nM}$ değeri ile inhibe ettiği aktivite tayin çalışmaları ile gösterilmiştir (Llauger ve ark., 2005).



11v: Ar = 4,5-(OCH₂O)-Ph, X₂ = Br

Şekil 1.41. 9-(Pent-4-inil)-8-arilsülfanil adenin türevleri

Zhang ve ark., Hsp90 inhibitörü olabilecek 7'-süstitüe-benzotiyazolo / piridinotiyazolo pürin yapıda (Şekil 1.42) bir dizi bileşik sentezlemişlerdir. Bileşiklerden bazıları 28-150 nM IC₅₀ değerleri ile insan meme kanser hücre hattı Her-2'yi inhhibe etmiş, iyi çözünürlük özellikleri göstererek farelerde gerçekleştirilen in vivo deneylerde ral biyoyararlanım göstermiştir. Sentezlenen türevlerden (8-(7-klorobenzotiyazol-2-ilsülfanil)-9-(2-siklopropilamino-etil)-9H-purin-6-ilamin) yapısındaki bileşik, insan kolon kanser hücre hattı N87'de kanserli hücre hatlarının büyümesini engellemiştir (L. Zhang ve ark., 2006)

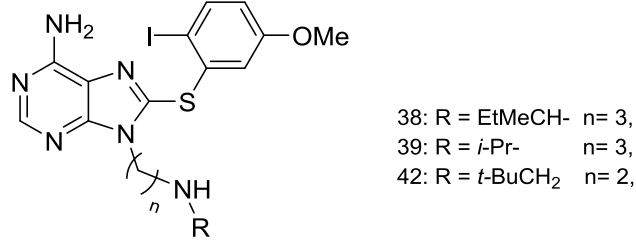


- R₃ = -morfolino n= 1,
 -NHC(CH₃)₃ n= 1,
 -NHCH₂C(CH₃)₃ n= 1,
 -NH(CH₂CH₂)CH n= 1
 -NHCH(CH₃)₂ n= 2,
 -NHC(CH₃)₃ n= 2

Şekil 1.42. 8-(7'-Kloro-benzotiyazolo)sülfanil-9-(süstitüe alkil)adenin türevleri

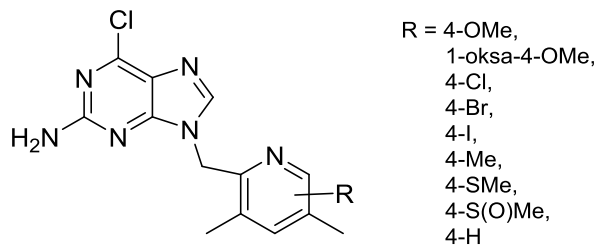
Biamonte ve ark., yeni bazı oral olarak aktif Hsp90 inhibitörlerinin sentezi üzerine çalışmışlardır. Daha önce sentezi gerçekleştirilen bazı aktif ancak oral biyoyararlanımı düşük olan 8-benziladenin ve 8-sülfaniladenin türevlerinden yola çıkarak, pürin halkasının N-9 konumunda alkil zincir süstitüsyonu ile bu düşük oral biyoyararlanımı iyileştirmeye çalışmışlardır. Sentezlenen türevlerden bileşik 42 (Şekil 1.43), insan meme kanser hücre hattı Her-2'ye karşı IC₅₀ = 90 nM değeri ile

aktivite göstermiştir. Bileşik 38 ve 39 (Şekil 1.43)'un 200 mg/kg/gün dozu ile insan gastrik epitel N87 hücre hatlarında tümör hücre büyümesini inhibe ettiği bulunmuştur. Bileşik 38, 39 ve 42 oral kullanım ile hücre büyümesini inhibe eden ilk Hsp90 türevleridir (Biamonte ve ark., 2006)



Şekil 1.43. 8-((2-İyodo-5-metoksifenil)sülfanil)-9-(süstitüe-alkil)adenin

Kasibhatla ve ark., Hsp90 inhibitörü olabilecek, 2-Amino-6-kloro-9-(süstitüe-piridin-2-il-metil)pürin türevleri (Şekil 1.44) sentezlemişlerdir. Bileşiklerden 2-Amino-6-kloro-9-(4-iyodo-3,5-dimetilpiridin-2-ilmetil)pürin yapısında olan 30 numaralı molekül, insan meme kanser hücre hattı HER2'ye karşı IC₅₀ = 0,009 µM değeri ile; MCF7'ye karşı IC₅₀ = 0,03 µM değeri ile aktivite göstermiştir. Aynı zamanda bileşiklerin Hsp90 proteinine yüksek afinite değerleri ile bağlandığı belirtilmiştir (Kasibhatla ve ark., 2007)



Şekil 1.44. 2-Amino-6-kloro-9-(süstitüe-piridin-2-il-metil)pürin türevleri

1.3.1.2. Protein Kinaz İnhibitörü Pürin Türevleri

Protein kinazlar, sinyal iletiminde anahtar moleküller olarak işlev görürler ve kinazları inhibe eden ilaç molekülleri çeşitli kanserlerin tedavisinde rutin olarak kullanılmaktadır. Kinaz inhibitörlerinin diğer sitotoksik kemoterapötiklere göre daha az toksik ve daha çok aktif oldukları yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Kinazlar fosforilasyon olarak da bilinen, yüksek enerjili fosfat grubunun efektör bir proteine ya da lipid yapıdaki bir liganda transferini katalizleyen enzimlerdir. Fosforilasyon; hedef substratın aktivitesini; proteinin enzimatik aktivitesinin doğrudan modülasyonu, protein-protein etkileşimlerini destekleyen doking bölgelerinin oluşturulması veya hücre içi lokalizasyonu değiştirmek dahil çeşitli mekanizmalarla değiştirebilir. Sinyal iletimindeki maddelerin fosforilasyonu veya defosforilasyonu, sinyallerin hücre yüzeyinden çekirdeğe iletiminde rol oynar. Sinyal iletim mekanizmasında meydana gelen düzensizlikler, kontrolsüz hücre çoğalmasına, hücrelerin hayatta kalmasında ve kanser fenotipinin diğer özelliklerine yol açabilir.

Kinazlar proteinler veya lipitleri fosforile edip etmediklerine göre; protein kinazlar da fosforile ettikleri spesifik proteinlere (ökaryotik hücrelerde, serin/treonin veya tirozin kinazlar) göre sınıflandırılırlar. Kinazlar ayrıca hücrede bulundukları yere göre de sınıflandırılabilirler. Reseptör tirozin kinazlar (RTK), membranda lokalize halde bulunan, büyüme faktörleri (PDGF, NGF, EGF, VEGF, FGF), sitokinler veya hormonlar için hücre yüzeyi reseptörleri olarak sinyalleri hücre içine ileterek hücre çoğalması ve farklılaşmasında görev alan proteinlerdir (DeVita ve ark., 2018; Bennisroune ve ark., 2004). Non-reseptör tirozin kinazlar (NRTK) hücre içinde sitoplazma ve çekirdekte lokalize halde olup, RTK tarafından iletilen sinyallerin hücre içinde dağılmasını sağlar (Krause ve Van Etten, 2005). Abl, Jak, Fak ve Src proteinleri non-reseptör tirozin kinazlar grubu içerisinde yer alır. Src gibi non-reseptör tirozin kinazlar sitoplazmada bulunurken, diğer NRTK'lar hücre çekirdeğinde bulunur (DeVita ve ark., 2018; Bennisroune ve ark., 2004).

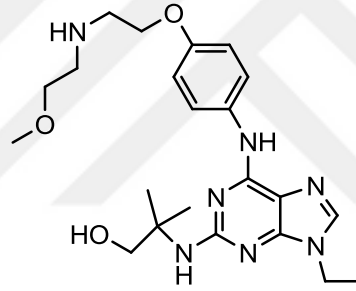
Tüm protein kinazlar, yüksek enerjili fosfat grubunun bir adenosin trifosfat (ATP) molekülünden kinaz substratına transferinden sorumlu yapısal olarak korunan katalitik bir kinaz alanına sahiptir (DeVita ve ark., 2018). Çoğu protein kinazın aşırı ekspresyonu veya çok aktif olması hücrenin proliferasyon, hayatta kalma ve metastazını teşvik ettiğinden kanser ile ilişkilidir. Kinaz mutasyonlarının genom boyu yapılan çalışmaları, belirli kinazların genetik olarak kalıtsal varyantlarının; kanser başlangıcı, büyümesi, ilerlemesi ve tekrarı ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Bhullar ve diğerleri, 2018).

Sarkoma tirozin kinazlar (Src), insan genomundaki diğer NRTK'lara göre en büyük ve üyelerinin birbiriyle en çok bağlantılı olduğu protein ailesidir. Yapısında bir katalitik tirozin kinaz bölge (SH1), non-katalitik bir fosfotirozin aracılı protein-protein etkileşimlerinde yer alan bölge (SH2) ve yine non-katalitik prolin açısından zengin protein-protein etkileşimlerinde yer alan bölge (SH3) içerir. Mutasyona uğramış ve/veya sürekli aktif halde bulunan Src, in vitro olarak hücreleri malign bir fenotipe dönüştürme ve in vivo olarak da tümörlere neden olma yeteneğine sahiptir. Bu tür mutasyonlar insan kanserlerinde kesin belgelenememiş olsa da, normal Src'nin bazı tümörlerde aşırı eksprese edildiği ve bazı EGFR ailesi gibi reseptör tirozin kinazlarla işbirliği yaptığı görülmüştür. Src, sitotoksik ilaç geliştirme çalışmalarında önemli bir hedef molekül olarak düşünülmüştür. İnsan kolon, meme ve akciğer kanseri, Src aktivitesindeki ve ekspresyonundaki değişikliklerle en güçlü şekilde ilişkilidir. Src substratı cortactin, insan meme kanseri hücrelerinden kaynaklanan kemik metastazlarını güçlendirir ve insan kolorektal karsinomda Src'nin aktivasyonu zayıf bir klinik prognoza işaret eder (Fabbro ve McCormick, 2006). Src olgun osteoklastların işlevini düzenlemede rol oynadıkları için, kemik hedefli Src-kinaz inhibitörlerini bulmaya odaklanılmıştır (Legraverend ve Grierson, 2006).

Src inhibitörleri tirozin kinaz aktivitesinin inhibitörleri (ATP bağlanma alanı aracılı) ve protein-protein (SH2-, SH3- veya substrat bağlanma alanı aracılı) etkileşimlerinin inhibitörleri olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Hücresel aktivitesi olan heterosiklik ATP analogları (pirazolo-, pirido- ve pirolopirimidinler) en güçlü ve seçici bileşiklerdendir. Pürin türevleri de yine etkili bileşiklerdendir. Bu inhibitörlerle

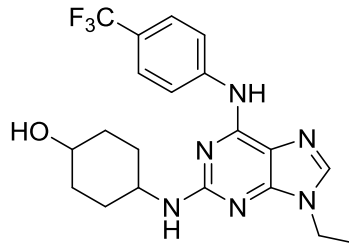
ilgili kritik olan konu, oral uygulamadan sonra yüklü fosfonat kısmı nedeniyle düşük olabilen hücre penetrasyonu ve biyoyararlanım sorunudur. Yapılan kristalografik çalışmalar, inhibitör bileşik ile kinazın omurgası arasında hidrojen bağı çiftleri oluştuğunu ve ATP tarafından işgal edilmeyen hidrofobik bölge ile bir etkileşim olduğunu göstermiştir.

Pürin yapıdaki NVP-AAK980'in (Şekil 1.45) Src'yi enzimatik ve hücrel deneylerde sırasıyla $IC_{50}=0,003$ ve $0,2 \mu M$ değerlerinde ve ayrıca kemik rezorpsiyon deneylerinde submikromolar konsantrasyonlarda inhibe ettiği görülmüştür. NVP-AAK980'in ovariektomi işlemi uygulanan ve retinoid ile tedavi edilen sıçanlarda oral yoldan 10/30-100 mg/kg dozlaması ile kemik kaybını önlemede aktif olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Fabbro ve McCormick, 2006).



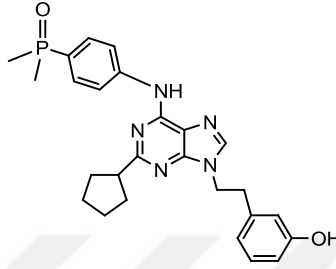
Şekil 1.45. NVP-AAK980

CGP79883 (Şekil 1.46), kemik kaybı ile ilgili yapılan in vivo deneylerinde 4 gün boyunca günde 30-75 mg/kg dozlaması ile yapılan tedavi sonucunda yan etki olarak doza bağımlı anemi ve karaciğer üzerinde istenmeyen etkiler göstermiştir (Fabbro ve McCormick, 2006).



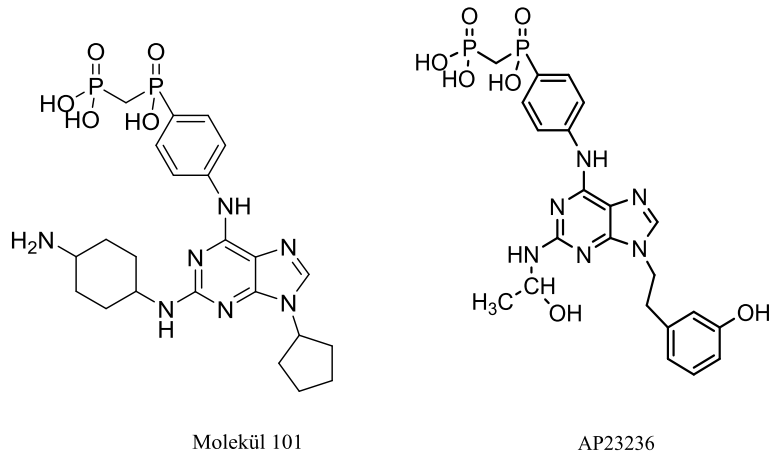
Şekil 1.46. CGP79883

Yapısında fosfin oksit içeren AP-23464 (Şekil 1.47) hem Src hem de Abl kinazların seçici ve güçlü ($IC_{50} < 1$ nM) bir inhibitörüdür. KML (kronik miyeloid lösemi) tedavisi için terapötik potansiyeli vardır. Ayrıca sistemik mastositoz (SM) ve akut miyeloid lösemi (AML) tedavisinde klinik gelişim için umut verici bir aday olarak kabul edilir (Legraverend ve Grierson, 2006).



Şekil 1.47. AP-23464

ARIAD Pharmaceuticals tarafından sentezlenen bisfosfonat grubu içeren Src inhibitörleri (Şekil 1.48) kemik hücrelerini hedefleyen güçlü (sırasıyla $IC_{50} = 0,041$ ve $0,01$ μ M) bileşikler olduğu görülmüştür. Pürin halkasının 6. konumunda bulunan anilino sübstitüentinin para pozisyonunda bulunan bisfosfonat grubu sayesinde proteinin ATP-bağlama bölgesine kolayca yerleştiği yapılan kristalografik çalışmalarda bulunmuştur. Bu 2 bileşiğin osteosarkom ve osteoporoz gibi kemikle ilişkili hastalıklara karşı uygulama alanı bulabileceği düşünülmektedir (Legraverend ve Grierson, 2006)

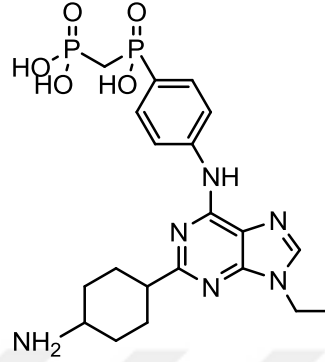


Molekül 101

AP23236

Şekil 1.48. Molekül 101 ve AP23236

Pürin yapılı bisfosfonat grubu içeren bir diğer bileşik olan AP23451 (Şekil 1.49), ile yapılan in vitro çalışmalara göre bileşiğin osteoklast oluşumunu inhibe ettiği, in vivo çalışmalarda ise hiperkalsemiyi önlediği bulunmuştur (Rucci ve ark., 2008).



Şekil 1.49. AP23451

Siklin bağımlı kinazların (Cdks) kontrolsüz hale gelen aktivitesi, hücre çoğalması ve kanser ile ilişkilendirilir. Cdk'sın inhibisyonu, potansiyel yeni sitotoksik bileşiklerin sentezi için önemli bir hedeftir. Pürin yapıdaki güçlü bir Cdk inhibitörü olan Olomoucine'in keşfinden sonra, çok sayıda tri-süstitüe pürin türevi bileşik sentezlenmiştir. Bu pürin türevi bileşikler ATP ile yarışarak, proteinin ATP cebine bağlanır ve etkisini gösterirler. Yapılan çalışmalar pürin halkasının C-2, C-6 ve N-9 konumlarında tri-süstitüsyonu olan bileşiklerin aktif Cdk inhibitörleri olduğunu göstermiştir (Haesslein ve Jullian, 2005).

Cdk inhibitörleri, tümör hücrelerinin bölünmesini hücre döngüsünde G1 veya G2/M aşamalarında engelleyerek hücre çoğalmasını durdururlar ve apoptozise yol açarlar. Normal hücrelerin ise apoptozisten korunmasını sağlarlar. Tümör hücrelerinin selektif inhibisyonunu sağlayan bu durum aynı zamanda normal hücreleri kemoterapi tedavisinin yan etkilerinden korumak için de kullanılabileceğini göstermiştir (Knockaert ve ark., 2002).

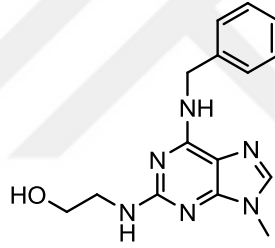
Cdk inhibitörü olarak tasarlanan bileşikler ATP ile yarışarak, ATP bağlanma bölgesine bağlanırlar. ATP molekülünün kimyasal yapısı göz önünde bulundurularak sentezlenen 6-dimetilaminopürin (Şekil 1.50) (IC_{50} = 120 μ m) ve izopenteniladenin

(Şekil 1.50) ($IC_{50}= 55 \mu m$) ilk Cdk inhibitörleridir. Zayıf etki gösteren bileşikler klinikte kullanım alanı bulamamışlardır (Haesslein ve Jullian, 2002).



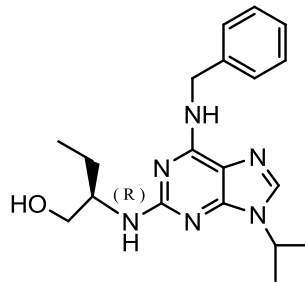
Şekil 1.50. 6-Dimetilaminopürin ve İzopenteniladenin

Pürin halkasının 2, 6, ve 9. konumlarından mono/di-/tri-süstitüe pürinlerin en etkili türevler olduğu yapılan aktivite çalışmalarıyla bulunmuştur. Orta derecede aktif olan Olomoucine'in (Şekil 1.51), selektif olarak Cdk1/B, Cdk2/A, Cdk5/p35 proteinlerini inhibe ettiği ($IC_{50}=7\mu m$) bulunmuştur (Haesslein ve Jullian, 2002).



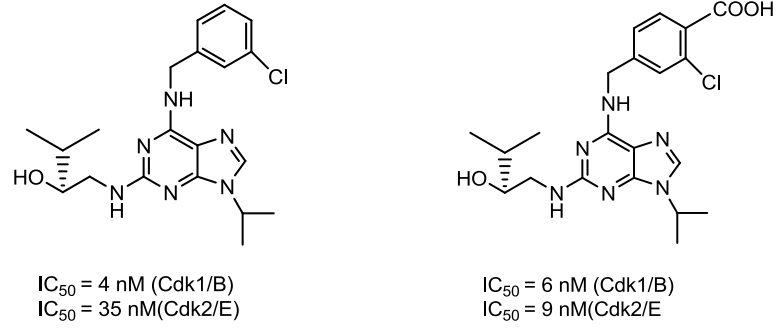
Şekil 1.51. Olomousin

Olomousin'den hareketle sentezlenen Roskovitin bileşiği (Şekil 1.52) Olomoucine ile kıyaslandığında Cdk1/B proteinine karşı on kat daha etkili ($IC_{50}= 0,65\mu m$) ve taşıdığı kiral merkezi sayesinde bulunan R izomerinin, S izomerine göre Cdk1/B inhibisyonunda 2 kat daha güçlüdür (De Azevedo ve ark., 1997).

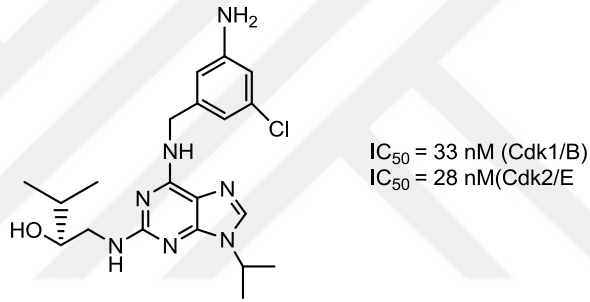


Şekil 1.52. Roskovitin

Pürin yapısındaki Cdk inhibitörlerinden Purvalanol A (Şekil 1.53), Purvalanol B (Şekil 1.53) ve Amino-purvalanol (Şekil 1.54) aktif sitotoksik bileşikler olarak bulunmuşlardır (Chang ve ark., 1999).

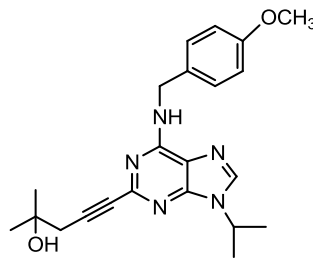


Şekil 1.53. Purvalanol A ve Purvalanol B



Şekil 1.54. Amino-purvalanol

Yapılan sentez ve aktivite çalışmalarında, pürin halkasının 2. konumundaki azot grubunun aktiviteye katkı sağlamadığı, üç bağ yapan alkil zincirlerinin, tek/iki bağlı zincirlere göre on kat daha aktif oldukları görülmüştür. Bu bileşiklerden OL567'nin (Şekil 1.55) $IC_{50}=0,23 \text{ }\mu\text{M}$ değeri ile Cdk1/B proteinini inhibe ettiği bulunmuştur (Legraverend ve ark., 2000).



Şekil 1.55. OL567

1.4. Pürinlerin Genel Sentez Yöntemleri

Pürin halkası, çeşitli ve hayati biyoaktif bileşiklerin yapısında bulunan önemli bir heterosiklik çekirdek, nükleik asitler ve enzimlerin sentez ve işlevleri ile etkileşen önemli bir farmakofordur. Sentetik olarak modifiye edilmiş pürinler; protein kinaz, fruktoz bifosfat, adenilasyon enzimi ve adenosin reseptör modülatörlerinin inhibitörleridir.

Süstitüe edilmiş pürin türevleri fizikokimyasal özellikleri bakımından, tirozin kinazlar, sülfatazlar ve fosforilazlar gibi bir hastalığın ilerlemesini etkileyen bu proteinlerin hidrofobik kıvrımlarına seçici olarak bağlanma potansiyeli kazanır.

Pürin halkasının 2, 6 ve 9. pozisyonlarında bulunan süstitüsyonların tümör hücrelerinin çoğalmasında, tümör dokusunun yaşamında ve metastazında kritik rol üstlenen kinaz protein ailesinin, hem bağlanma afinitesini hem de seçiciliğini arttırdığı görülmüştür. 2-asetilenil-6,9-disüstitüe pürin analoglarının CDK1-siklin B üzerine seçici bir inhibisyon etkisi gözlenmiştir. Bu enzim inhibitörlerinin özellikle kanserde, hücre döngüsü düzenlemesinde önemli bir rolü olduğu ve tümör baskılayıcı olarak etkili olduğu bilinmektedir. Pürin halkasının 2 ve 6. pozisyonlarındaki bazı süstitüentlerin, adenosin agonistlerinin farklı reseptör alt tipleri için hem afinitesini hem de seçiciliğini düzenlediği bilinmektedir (Kowalska, Pluta ve Latocha, 2018).

Pürinlerin di-, tri- veya tetra- süstitüe edilmeleriyle biyolojik aktiviteye sahip olduğu ve etkili sitotoksik aktivitede moleküller olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmış ve ilaç olarak piyasada yer almıştır. Günümüzde çok sayıda pürin türevi ilaç olarak kullanılmaktadır.

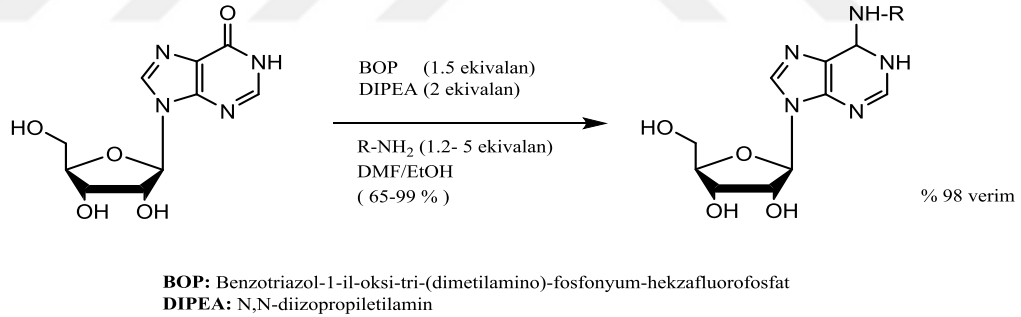
Pürin analoglarının sentezi için genellikle iki yol izlenir; bunlar reaktif pürin halkasının doğrudan süstitüsyonu, bu sayede 2, 6, 8 ve 9. pozisyonlarda rejiokontrol

sağlanarak, ya da sübtitüe pirimidin/imidazol halkalarının kaynaştırılarak 1, 3, 7 ve 9. konumlarda daha iyi rejiokontrol ile sentezidir (Legraverend, 2008).

Pürin sentezi için Traube tarafından sunulan yolda, 4,5-diaminopirimidin ve formik asit veya dietoksimetil asetat ile siklizasyon sağlanır. Diaminopirimidin'den hareketle gerçekleştirilen sentezlerde 8.konumda sübtitiüsyonlar, kaynaştırılan imidazol kısmından gelebildiği gibi 7 ve 9. konumlardan da gelebilir. Ancak çoğunlukla 7 ve 9. konumlardaki sübtitiüsyonların pirimidin halkasından geldiği görülmüştür (Shaw, 1984).

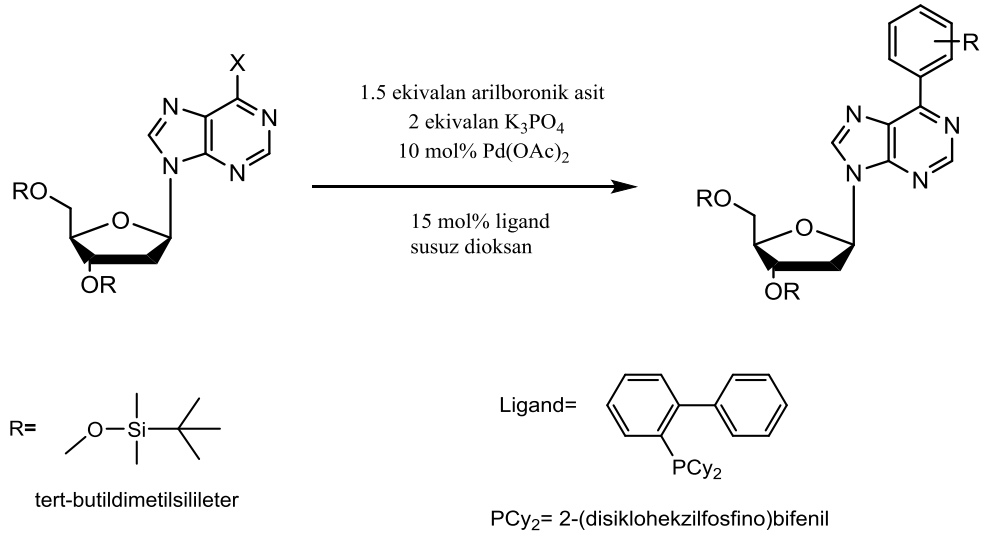
1.4.1. 6. Konumdan Sübtitüe Pürinlerin Sentezi:

6-Aminopürinler inosinden hareketle tek basamakta (Şekil 1.56) sentezlenirler (Wang ve ark., 2005).



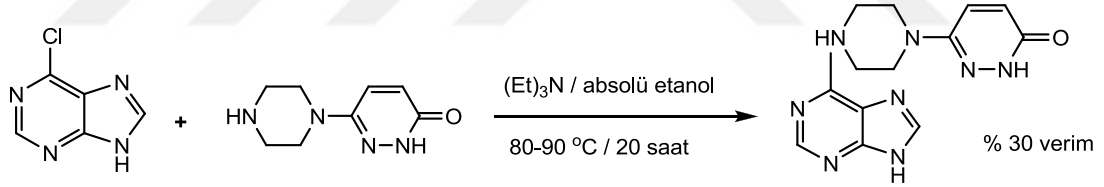
Şekil 1.56. İnosinden hareketle 6-aminopürin sentezi

C-6 halonükleozit yapıları, Suzuki-Miyaura çapraz bağlama yöntemi ile (Şekil 57) arilboronik asitlerden hareketle paladyum katalizörlüğünde sentezlenmiştir. Halojen olarak Cl ve Br kullanılmış, kloronükleozitlerin daha yüksek verimlerle elde edildiği görülmüştür (Lakshman ve ark., 2001). Arilboronik asit olarak fenilboronik asit kullanıldığında verimin maksimum (% 91) olduğu görülmüştür (Legraverend, 2008).

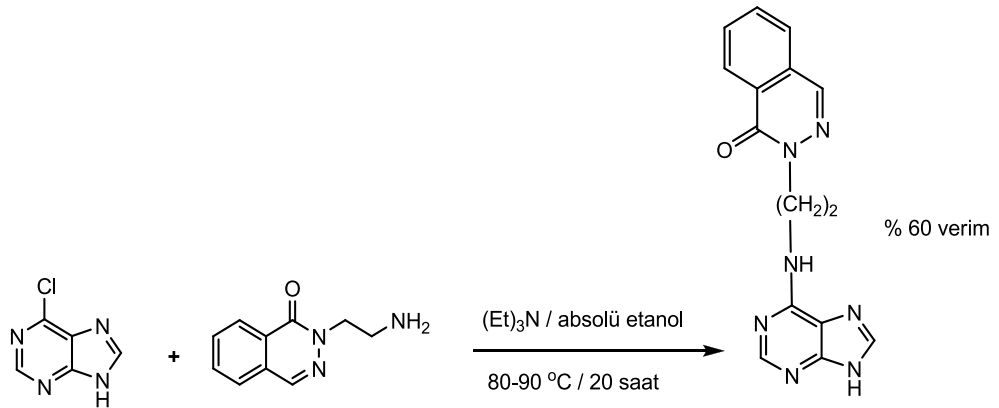


Şekil 1.57. C-6-Arılürin-2'-deoksiriboz türevlerinin sentezi

6-Kloropürinden harekele 6-aminopürin türevleri, reaksiyon ortamında başlangıç bileşiğine amin grubu, trietilamin ve absolü etanol ilavesiyle sentezlenmiştir (Şekil 1.58, Şekil 1.59) (Strappaghetti ve ark., 1998).

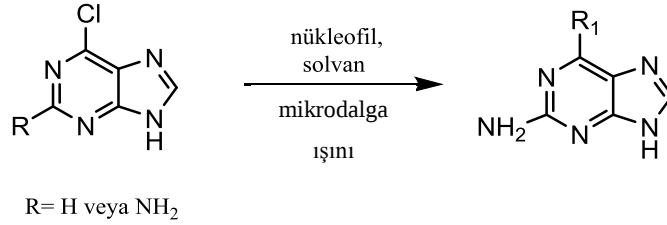


Şekil 1.58. 6-[4-(Piridazin-3(2H)-on-6-il)pipezin-1-il]-9H-pürin sentezi



Şekil 1.59. 6-[2-(Ftalazin-1(2H)-on-2-il)-aminoetil]-9H-pürin sentezi

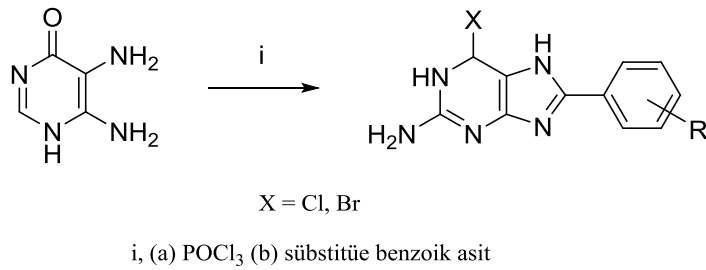
6-Kloropürin ve 2-amino-6-kloropürin yapıları ile yapılan nükleofilik yer değiştirme reaksiyonları (Şekil 1.60) mikrodalga ışını altında gerçekleştirilmiştir (Huang ve ark., 2007).



Şekil 1.60. 2-Amino-6-süstitüe pürin türevlerinin sentezi

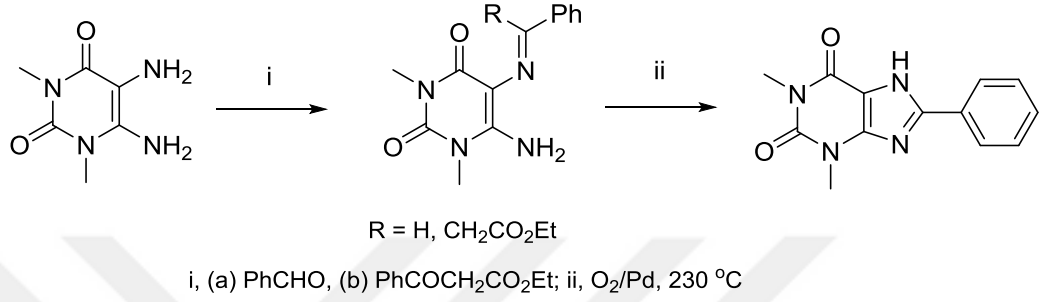
1.4.2. 8. Konumdan Süstitüe Pürinlerin Sentezi

8-Arılürin sentezi amacıyla siklizasyon ajanları olarak serbest aromatik asitlerin kullanıldığı görülmüştür. Bununla birlikte, 8-fenilguanin sentezi için 4,5-diamino-6-okso-1,6-dihidropirimidin'den hareketle olifosforik asit içinde benzoik asit ve siklizasyon ajanı olarak fosforil klorür kullanılmıştır. Oksopirimidinlerle, fosforil klorür kullanımı kloropürinlerin oluşumuna yol açtığı için, bu sentez yoluyla da 2-amino-6-kloro/bromo-8-(süstitüe fenil) pürin türevleri (Şekil 1.61) hazırlanmıştır. Bu sentez şemasından da anlaşılacağı üzere halojenasyon, siklizasyon reaksiyonundan önce gerçekleştirilmiştir.



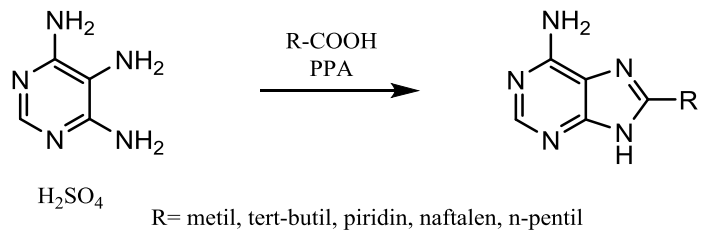
Şekil 1.61. 2-Amino-6-kloro/bromo-8-(süstitüe fenil) pürin türevleri

Arilpürin eldesi için pirimidinlerin aldehitlerle bir oksitleyici ajan varlığında reaksiyonu da kullanılabilir. Bu şekilde 8-fenilteofilin; diaminourasil, benzaldehit, oksijen ve paladyum katalizörlüğünde yüksek ısıyla reaksiyonla (Şekil 1.62) kolayca elde edilebilir. Aldehit fazlası kullanılması durumunda 8-aril-7-benzil pürin türevleri elde edilir (Shaw, 1984).



Şekil 1.62. 8-Fenilteofilin eldesi

8-Aril pürin eldesi için; 4,5,6-triaminopirimidin sülfat, karboksilik asit ve PPA (polifosforik asit) karışımına katılarak 150°C'de 2 saat ısıtılmıştır (Şekil 1.63). Reaksiyon ortamı soğuduktan sonra su ve sodyum bikarbonat karışımından nötralize edilip, solvan evaporasyonu ardından kristalizasyon ile bileşik elde edilmiştir (Young ve ark., 1990).

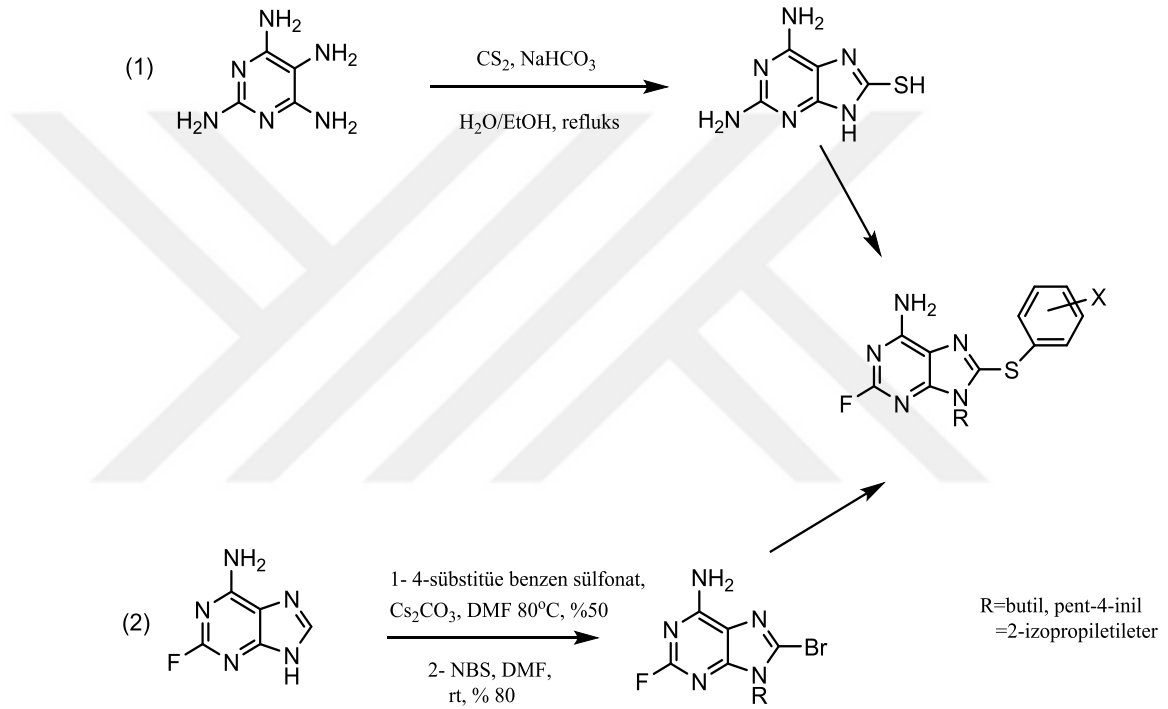


Şekil 1.63. 8-Süstitüe pürin türevlerinin sentezi

Llauger ve ark., iki farklı yöntemle (Şekil 1.64) 8-arilsülfanil türevleri elde etmişlerdir. İlk yöntemde (1) 2,4,5,6-tetraaminopirimidin başlangıç bileşiğinden hareketle 8-tiyopürin türevi bileşik sentezlenmiş, buradan hareketle de aril iyodür

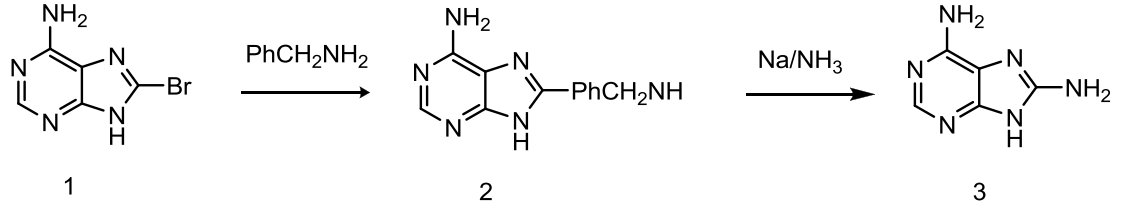
grubu ile 8-arilsülfanil türevleri elde edilmiştir. Pürin halkasının 2. konumuna F atomunu bağlamak için HF/piridin ve NaNO_2 ile -40°C 'de reaksiyona sokulmuştur.

İkinci yöntemde ise (2) 6-amino-2-floroadenin başlangıç bileşiğinden hareketle N-bromosüksinimid (NBS) ile 8. konuma Br atomu getirilmiştir. 8. Konumdaki tiyoarilasyon için ArSH , K_2CO_3 ve DMF 130°C 'de reaksiyona sokularak çok sayıda farklı 8-arilsülfanil-pürin türevleri elde edilmiştir (Llauger ve ark., 2005).



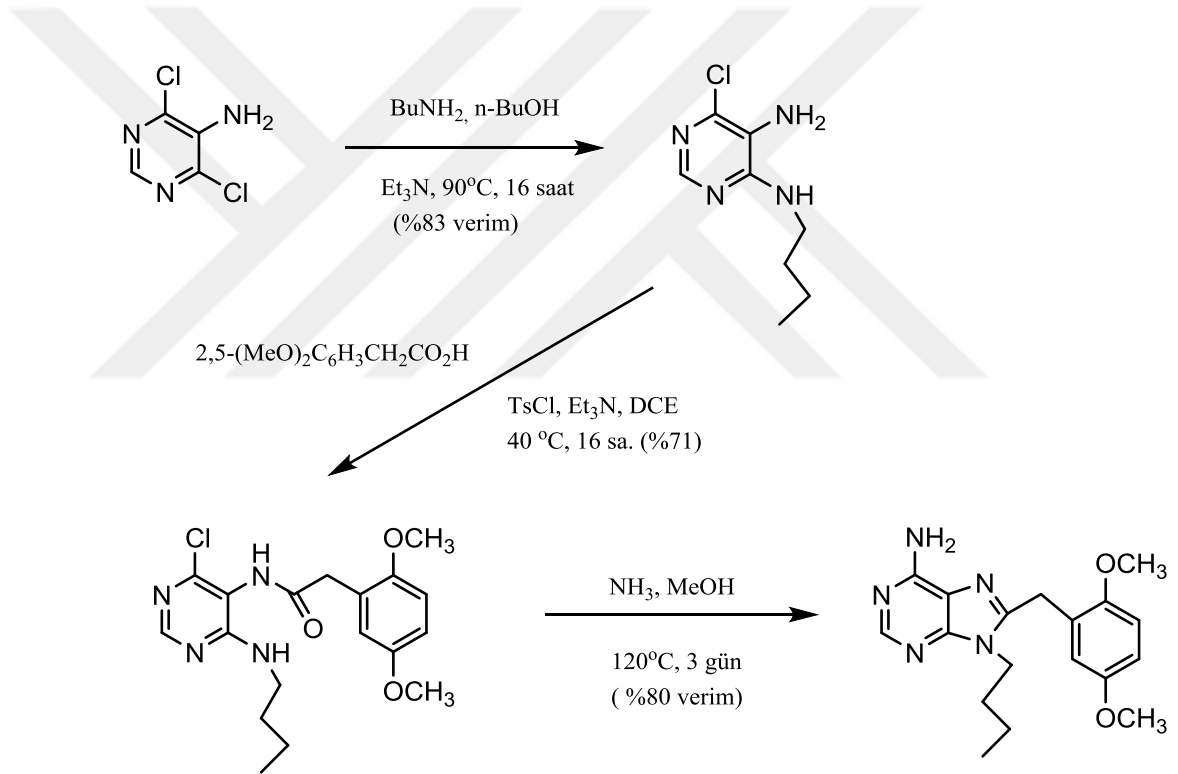
Şekil 1.64. 6-Amino-2-fluoro-9-alkil-8-arilsülfanil-pürin türevlerinin sentezi

Young ve ark., 6-8-diaminopürin sentezi için, 8-bromoadenine(1) başlangıç bileşiğinden hareket etmişlerdir. Reaksiyon ortamına benzil amin ilavesi ile 8-benzilaminadenin(2) elde edilmiştir. Buradan hareketle Na/NH_3 katalizörlüğünde sonuç ürün olan 6-8-diaminopürin (3) bileşiği elde edilmiştir (Şekil 1.65).



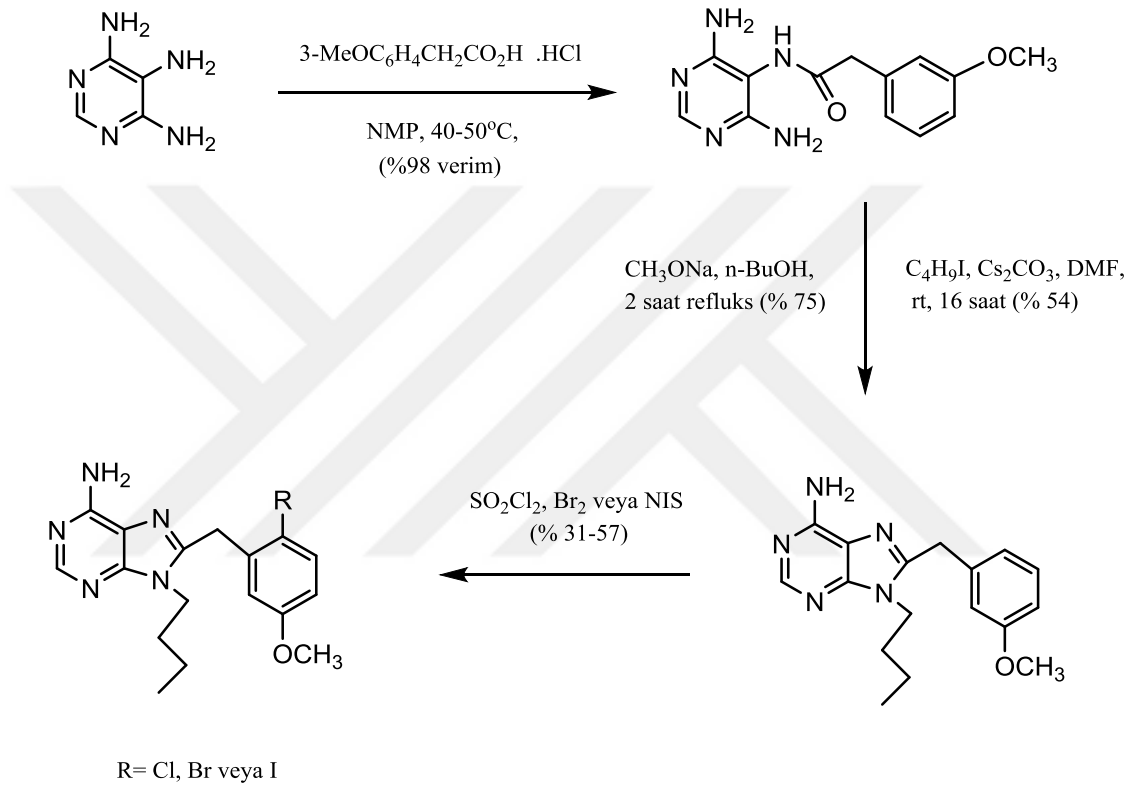
Şekil.1.65. 6,8-Diaminopürinin sentezi

Biamonte ve ark., iki farklı yöntemle 8,9-disübstitüe pürin türevleri sentezlemişlerdir. İlk yöntemde 4,6-dikloro-5-aminopirimidinden hareketle, 9-bütill-6-amino-8-(2,5-dimetoksibenzil)-9H-pürin yapısı (Şekil 1.66) elde etmişlerdir (Biamonte ve ark., 2006).



Şekil 1.66. 9-Bütill-6-amino-8-(2,5-dimetoksibenzil)-9-H-pürin sentezi

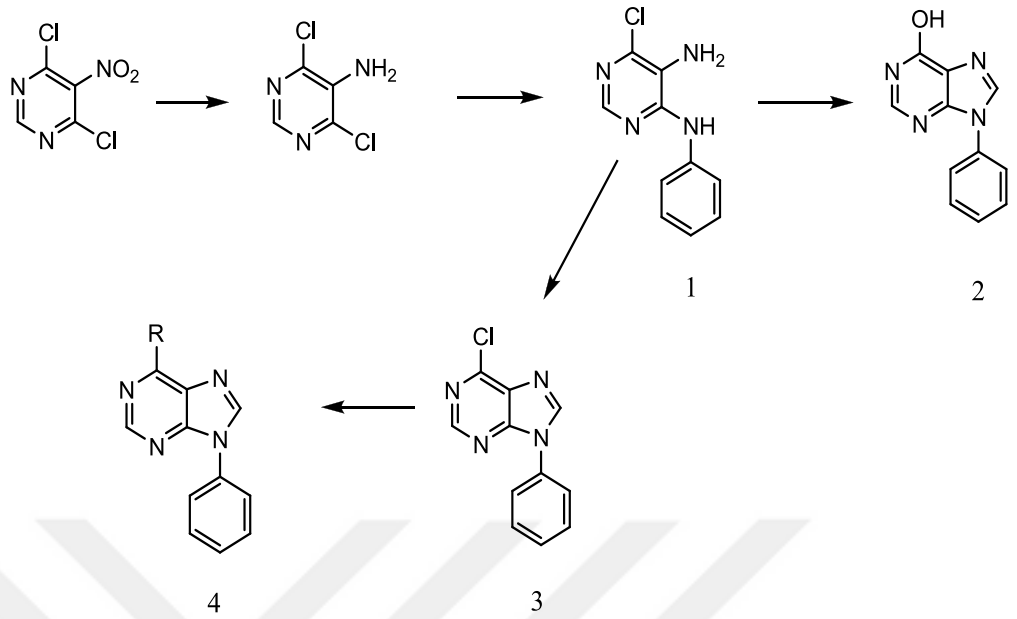
Biamonte ve ark. uyguladığı 2. yöntemde ise; 4,5,6-triaminopirimidinden hareketle 9-butil-6-amino-8-(3-metoksibenzil)-9H-pürin yapısı sentezlenmiş, ardından benzil halkasına çeşitli halojenlerin süstitasyonu ile halojenli türevler (Şekil 1.67) elde edilmiştir (9-butil-6-amino-8-(2-kloro-3-metoksibenzil)-9H-pürin veya 9-butil-6-amino-8-(2-bromo-3-metoksibenzil)- 9H -pürin veya 9-butil-6-amino-8-(2-iyodo-3-metoksibenzil)- 9H -pürin) (Biamonte ve ark., 2006).



Şekil 1.67. 9-Bütıl-6-amino-8-(2-kloro/bromo/iyodo-3-metoksibenzil)- 9H-pürin sentezi

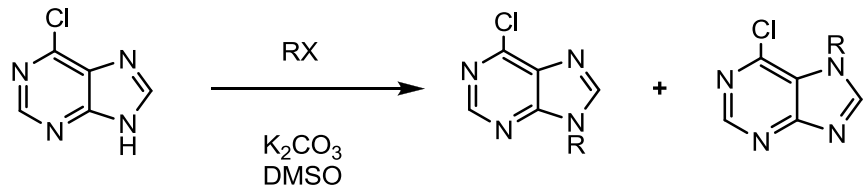
1.4.3. 9. Konumdan Süstitüe Pürinlerin Sentezi

Nükleofilik yer değıştirme reaksiyonları ile (Şekil 1.68). 5-amino-4-anilino-6-kloropirimidin'den hareketle 6-kloro/hidroksi-9-arıl/fenil türevleri sentezlenmiştir (Greenberg ve ark., 1959). 5-amino-4,6-dikloro pirimidinden hareketle, öncelikle HCl varlığında anilin süstitasyonu gerçekleştirilmiştir. 6-kloro-9-arıl/fenil türevlerinin sentezi için asetik anhidritler ve etil ortoformat katalizörlüğünde siklizasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.



Şekil 1.68. 6-Süstitüe-9-aril/fenil analoglarının sentezi

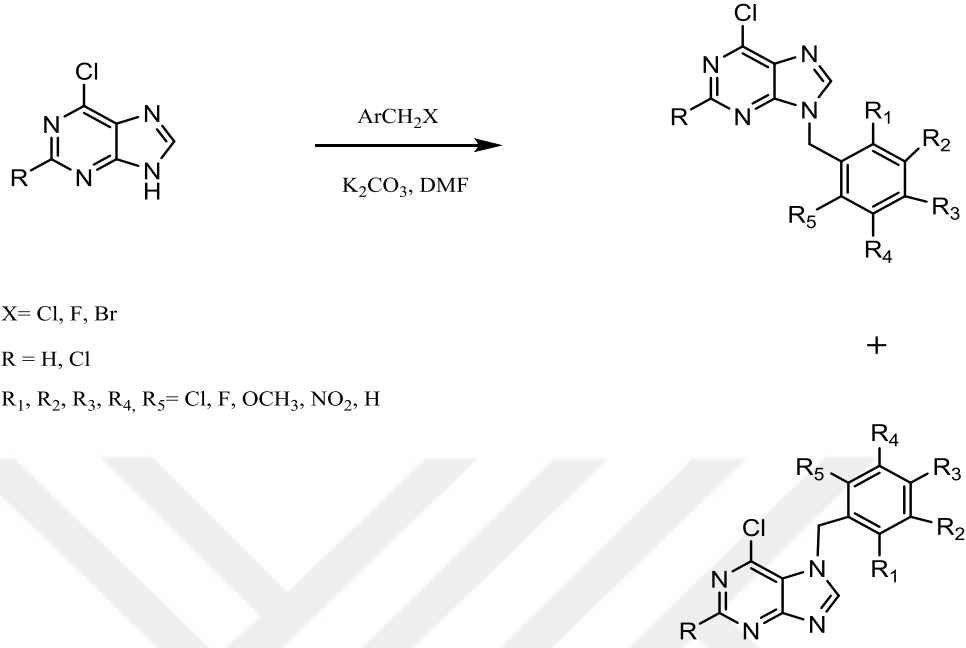
9-alkil pürin türevleri sentezlemek için genellikle 6-kloropürin başlangıç bileşiklerinden hareket edilmiştir. 6-kloropürinden hareketle, 9-alkil-6-kloropürin (Şekil 1.69) sentezlenmeye çalışılmış ancak, 7/9-alkil-6-kloropürin izomerleri birlikte elde edilmiştir. Sadece 2-(6-kloro-9H-pürin-9-il)etil asetat bileşiği sentezlenirken 9 izomer, 7 izomerden bağımsız elde edilmiştir. Sentezlenen izomer bileşikler çeşitli izolasyon yöntemleri kullanılarak birbirlerinden ayrılmıştır.



Şekil 1.69. 9-Alkil-6-kloropürin sentezi

Bakkestuen ve ark., pürin halkasının N-9 konumunda aril süstitüsyonu için; 6-kloropürin veya 2,6-dikloropürin başlangıç bileşiklerinden hareketle DMF içinde

benzil hlojenürler ile azot gazı varlığında (Şekil 1.70.) reaksiyona sokulmuştur (Bakkestuen ve ark., 2005).



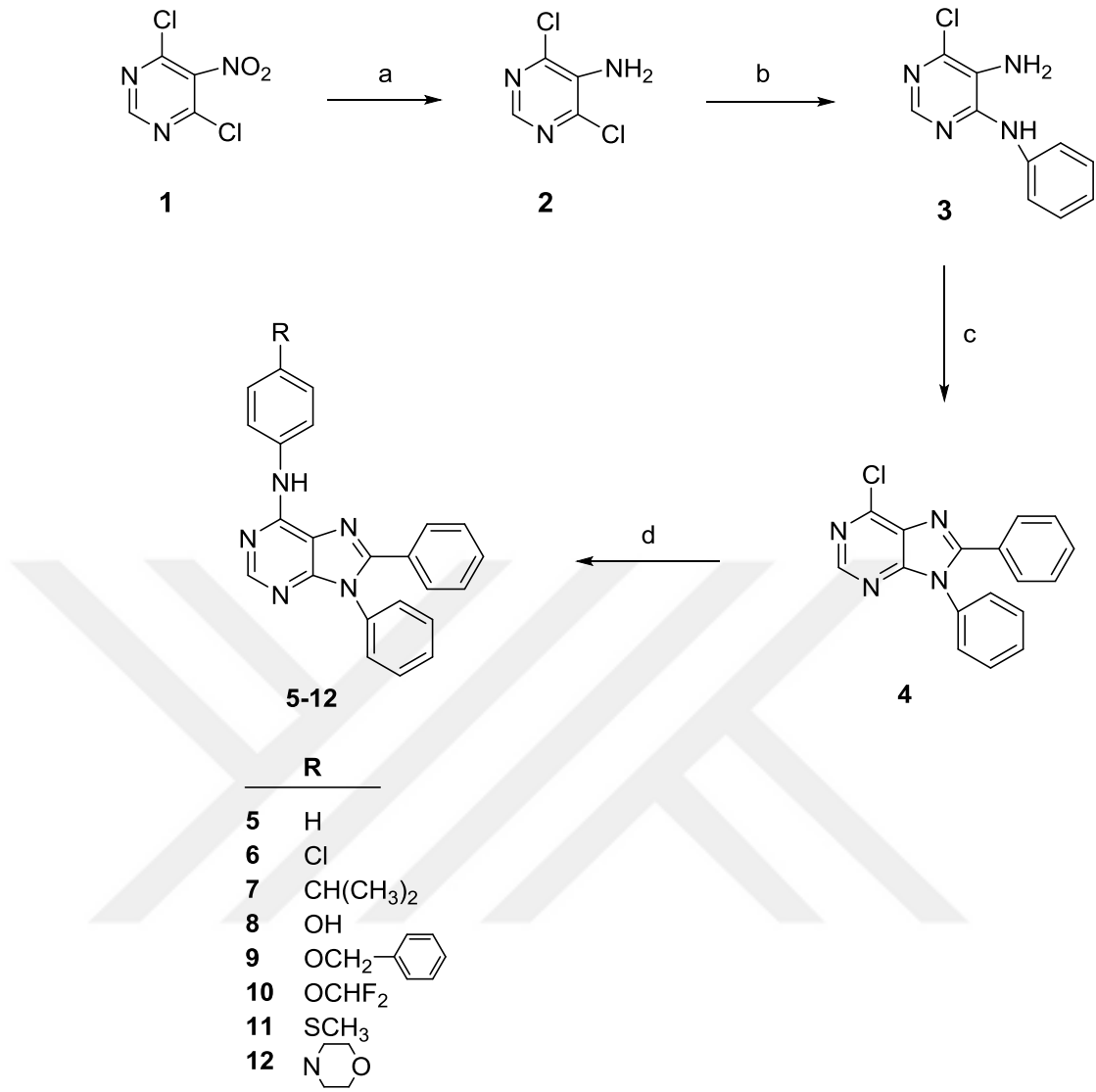
Şekil 1.70. 9-Alkil pürin türevlerinin sentezi

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Tasarlanan Türevlerin Sentezleri

2.1.1. 6-(4-Süstitüe fenil amino)-8,9-difenil-pürin Türevlerinin Sentezi

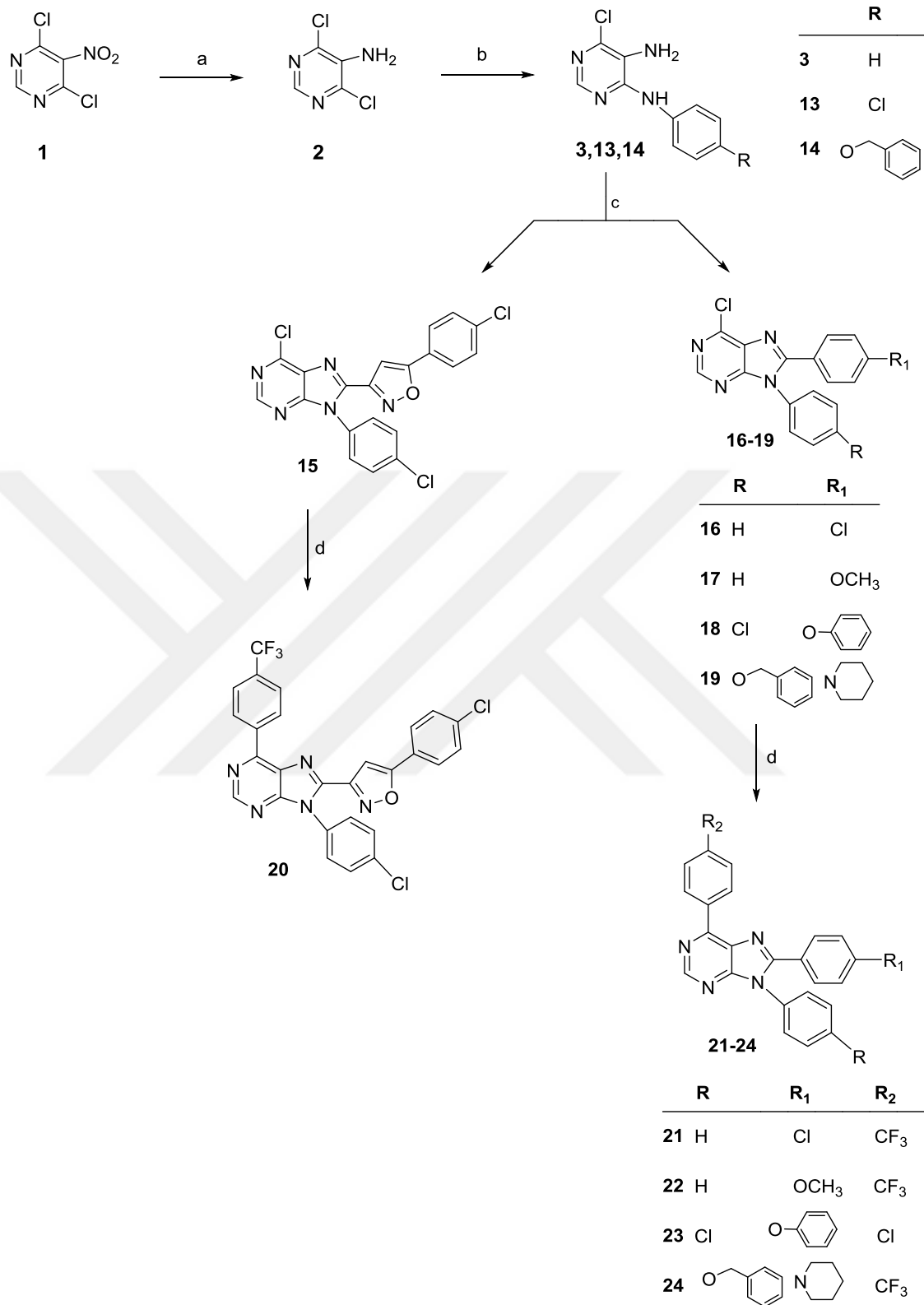
Tez kapsamında sentezi tasarlanan bileşiklerden 6-(4-Süstitüe fenil amino)-8,9-difenil-pürin türevlerini (5-12) sentezlemek üzere 4,6-dikloro-5-nitro-pirimidin'den (1) hareketle Şekil 2.1'de verilen sentez yöntemine göre öncelikle 6-kloro-8,9-difenil-pürin türevinin (4) sentezi yapılmıştır. Buna göre başlangıç maddesinin (1) SnCl_2 ile redüksiyonunu takiben elde edilen 5-amino-4,6-dikloropirimidin bileşiğinin (2) anilin ile aromatik nükleofilik süstitüsyonu ile sentezlenen ara ürünün (3) p-TsOH katalizörlüğünde süstitüe benzaldehitler ile siklizasyonu sonucu pürin halkası (4) elde edilmiştir. Bu bileşik (4), süstitüe anilin türevleri ile reaksiyona tabi tutularak sonuç pürin bileşikleri (5-12) sentezlenmiştir (Şekil 2.1). Böylece toplam 8 yeni pürin türevinin sentezi gerçekleştirilmiş ve bu bileşiklerin saflık kontrolleri İTK, Erime noktası ile yapılmış ve ^1H ve ^{13}C NMR, Mass spektral analizleri ile beklenen kimyasal yapıları kanıtlanmıştır.



Şekil 2.1. 6-(4-Süstitüe fenil amino)-8,9-difenil-pürin türevlerinin sentezi. Reajanlar: (a) SnCl₂.2H₂O, EtOH; (b) anilin, konst HCl, EtOH, H₂O (c) benzaldehit, p-TsOH, DMF; (d) 4-süstitüe anilin, Et₃N, EtOH.

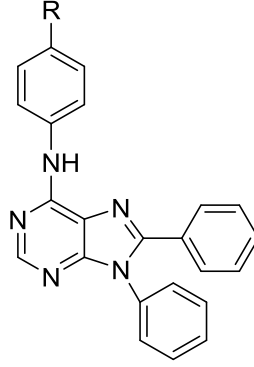
2.1.2. 6,9-(4-Süstitüe difenil)-8-[5-(4-klorofenil)-1,2-oksazol/4-süstitüe fenil] pürin Türevlerinin Sentezi

Tasarlanan 6,9-(4-Süstitüe difenil)-8-[5-(4-klorofenil)-1,2-oksazol/4-süstitüe fenil] pürin türevlerini (20-24) sentezlemek üzere bölüm 2.1.1’de verilen yöntem ile elde edilen 5-amino-4-(4-süstitüe fenil)amino-6-kloropirimidin (3,13,14) ara ürünlerinin 5-(4-klorofenil)-1,2-oksazol-3-karboksaldehit ve 4-süstitüe benzaldehitler ile p-TsOH katalizörlüğünde siklizasyonu sonucu pürin halkası (15-19) elde edilmiştir. Bu bileşiklerin, Suzuki Coupling reaksiyonu ile toluen içinde K_2CO_3 varlığında ve $Pd(PPh_3)_4$ katalizörlüğünde 4-süstitüe fenil boronik asitler ile reaksiyona tabi tutulması ile sonuç pürin türevlerinin (20-24) sentezi gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.2). Böylece toplam 5 yeni pürin türevinin elde edilmiş ve bu bileşiklerin saflık kontrolleri İTK, Erime noktası ile yapılmış ve 1H ve ^{13}C NMR, Mass spektral analizleri ile beklenen kimyasal yapıları kanıtlanmıştır.



Şekil 2.2. 6,9-(4-Süstitüe difenil)-8-[5-(4-klorofenil)-1,2-oksazol/4-süstitüe fenil] pürin türevlerinin sentezi. Re ajanlar: (a) SnCl₂.2H₂O, EtOH; (b) anilin, 4-(kloro)anilin, 4-(benziloksi)anilin, konst HCl, EtOH, H₂O (c) 5-(4-klorofenil)-1,2-oksazol-3-karboksaldehit, 4-süstitüe benzaldehit, p-TsOH, DMF; (d) 4-süstitüe fenil boronik asit, Pd(PPh₃)₄, K₂CO₃, toluen.

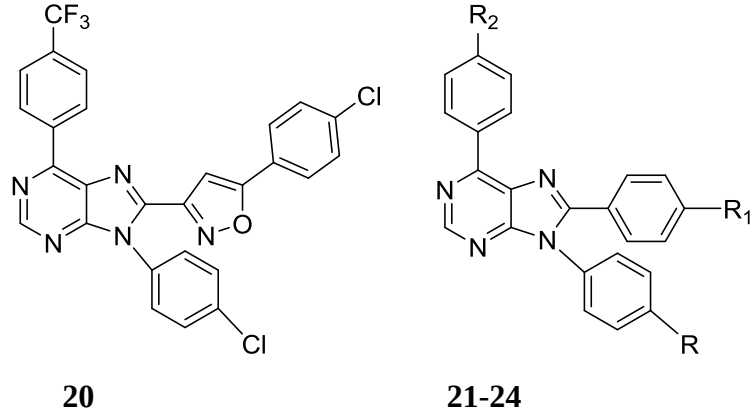
Çizelge 2.1. Sentezlenen 6-(4-süstitüe fenil amino)-8,9-difenil-pürin türevi sonuç bileşikler



5-12

Bileşik	R
5	-H
6	-Cl
7	-CH(CH ₃) ₂
8	-OH
9	-O-CH ₂ - 
10	-OCHF ₂
11	-SCH ₃
12	-N 

Çizelge 2.2. Sentezlenen 6,9-(4-Süstitüe difenil)-8-[5-(4-klorofenil)-1,2-oksazol/4-süstitüe fenil] pürin türevi sonuç bileşikler (20-24)



Bileşik	R	R ₁	R ₂
21	-H	-Cl	-CF ₃
22	-H	-OCH ₃	-CF ₃
23	-Cl	-O- 	-Cl
24	-O- 	-N- 	-CF ₃

2.2. Sentezlenen Bileşiklerin Analitik İncelemelerinde Uygulanan Yöntemler

2.2.1. Kromatografik Analizler

Sentez reaksiyonları esnasında reaksiyonların ilerleyişini takip etmek için İnce Tabaka Kromatografisi yöntemi (İTK) kullanılmıştır. Kieselgel-60 GF254 (Merck) kaplı alüminyum plaklar kullanılarak, lekelerin belirginleştirilmesinde 254 ve 366 nm dalga boylarında UV ışığı veren Camag UV Lambası kullanılmıştır. Sentezlenen bileşiklerin saflaştırılmasında kolon kromatografisi yöntemi, Silicagel 60, 0.040-0.060 mm (230-400 mesh) (Merck) kullanılarak uygulanmıştır.

Çizelge 2.3. İTK çalışmalarında kullanılan solvan sistemleri

	Solvanlar	Oran
1	Diklorometan:Metanol	30:1, 50:1, 100:1
2	Hekzan:Etil asetat	10:1, 5:1, 6:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2
3	Hekzan:Etil asetat:İzopropanol	10:10:1, 20:10:1
4	Kloroform:Hegzan:Etil asetat	5:4:1

2.2.2. Erime Noktası Tayinleri

Sentezlenen her bileşiğin erime noktası tayinleri Buchi B450 Erime Noktası Tayin Cihazı ile bakılmıştır.

2.2.3. Elementel Analiz *

Sentezlenen bileşiklerin Elementel Analizleri, Leco CHNS932 Elementel Analiz cihazı ile bakılmıştır.

2.2.4. Spektral Analizler

NMR Spektrumları (^1H , ^{13}C) *

Sentezlenen bileşiklerin NMR Spektrumları Varian Mercury-400 FT-NMR ve Bruker Avance NEO-500 NMR spektrometresine bakılmıştır. İç standart madde olarak tetrametilsilan (TMS), çözücü olarak DMSO- d_6 ve CDCl_3 kullanılmıştır.

* Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Kütle (MASS) Spektrumları *

Sentezlenen bileşiklerin Kütle Spektrumları, Waters ZQ Mikromass LC-MS spektrometresinde, Elektrospray İyonizasyon (ESI) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

2.3. Sentez İşlemlerinde Kullanılan Kimyasal Maddeler

5-amino-4,6-dikloropirimidin (Aldrich), benzaldehit (Merck), *p*-klorobenzaldehit (Aldrich), 4-metoksibenzaldehit (Merck), 4-izopropilanilin (Acros Organics), 4-metiltiyoanilin (Acros Organics), 4-Morfolinoanilin (AcrosOrganics), 4-Difluorometoksianilin (Aldrich), 4-benziloksianilin hidroklorür (Fluka), 4-kloroanilin (Merck), 4-hidroksianilin (Aldrich), 4-(piperidin-1-il)benzaldehyt (Aldrich), 4-fenoksibenzaldehit (Aldrich), 5-(4-klorofenil)izoksazol-3-karbaldehyt (Aldrich), *p*-toluensülfonil klorür (Aldrich), Trietilamin (Riedel-de Haen), diklorometan (R Aldrich), n-hekzan (Aldrich), susuz Na₂SO₄ (Riedel-de Haen), anhidr DMF (Fluka), (4-triflorometil)fenil boronik asit (Aldrich), 4-klorofenil boronik asit (Aldrich), DMF (Merck), etilasetat (Aldrich), metanol (Aldrich), absöü etanol (Aldrich), kloroform (Aldrich), toluen (Merck).

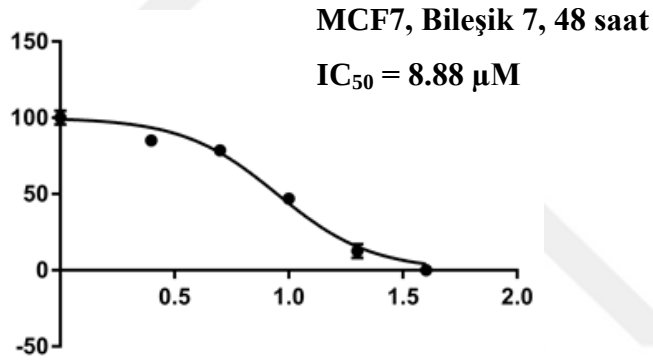
2.4. Sentezlenen Bileşiklerin Antikanser Aktivitelerinin Saptanması

Sentezi gerçekleştirilen pürin analoglarının hücre hatlarında yarattığı sitotoksik etki, nonradyoaktif, kolorimetrik bir metod olan XTT hücre canlılık testi ile incelenmiştir. Bütün pürin türevleri MCF7, HepG2, PC3, K562 hücreleri üzerine tek doz 10 µM uygulanmış ve hücreler bileşikler ile 48 saat inkübasyondan sonra elde edilen sonuçlar yüzde canlılık değerleri olarak gösterilmiştir. 48 saatlik inkübasyon sonunda bileşik 7 MCF7 hücrelerinde % 66 ölüm sağlamıştır. Bu türevin (7) MCF7

* Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

hücreleri üzerindeki IC₅₀ değeri 10 µM' ın altında gözlenmiştir. Diğer hücre hatlarında pürin türevlerinin hemen hemen hepsi de 10 µM'lık dozda etki göstermemiştir. Sentezlenen pürin analoglarına ait % canlılık değerleri Bulgular bölümünde verilen tablolarda gösterilmiştir.

Daha sonraki aşamada % hücre canlılığını 50'nin altına düşüren ve en aktif pürin türevi olan bileşik 7 için MCF7 hücre hattında IC₅₀ değeri hesaplanmıştır. MCF7 hücreleri üzerine sırasıyla 40, 20, 10, 5 ve 2.5 µM konsantrasyonlarda uygulanmış ve 48 saatin sonunda bileşik 7'nin MCF7 hücreleri üzerindeki IC₅₀ değeri 8.88 µM olarak hesaplanmıştır (Şekil 2.3).

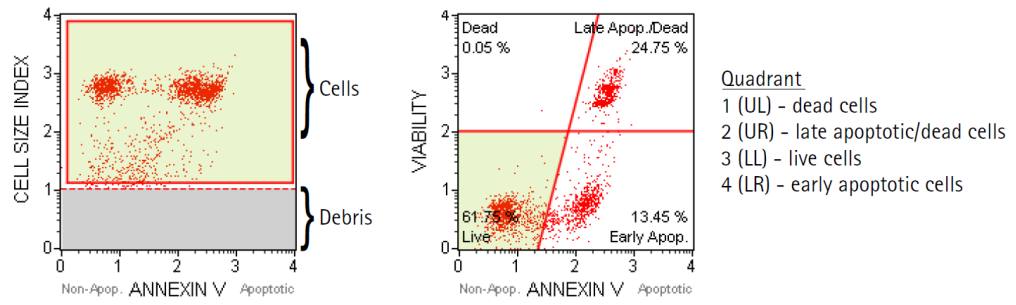


Şekil.2.3. Bileşik 7'nin IC₅₀ grafiği

2.5. Apoptozisin Flow Sitometri Yöntemi ile Değerlendirilmesi

Çalışmada apoptozun tespit edilmesi için MuseTM Hücre Analiz Sistemi ve bu sistem ile uyumlu şekilde etkinlik gösteren MuseTM Annexin V & Hücre ölüm kiti kullanılmıştır. Bu kit Annexin V boyası ile apoptotik hücrelerin fosfotidil serin rezidülerini boyadığı gibi aynı zamanda 7-ADD boyası ile hücre membranının yapısal bütünlüğünü değerlendirmektedir. Böylece bu kit sayesinde 4 farklı hücre popülasyonu tespit edilebilmektedir (Şekil 2.4).

1. Canlı hücreler: Annexin V (-) ve 7-ADD (-)
2. Erken dönem apoptotik hücreler: Annexin V (+) ve 7-ADD (-)
3. Geç dönem apoptotik hücreler: Annexin V (+) ve 7-ADD (+)
4. Nükleer debrisler: Annexin V (-) ve 7-ADD (+)



Şekil 2.4. Canlı, erken/geç dönem apoptotik hücrelerin ve ölü hücrelerin gösterilmesi

Protokol kısaca şu şekilde gerçekleştirilmiştir: MCF7 hücreleri IC_{50} konsantrasyonda ($8.88 \mu M$) bileşik 7 ile muamele edilmiş ve hücreler 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda hücreler tripsin ile kaldırılmış, DMEM besi yeri ile tripsin inaktif hale getirildikten sonra hücreler 800 x rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant atılmış ve dipteki pellet 1 ml, en az %1 fetal bovine serum içeren PBS ile resuspende edilerek hücreler thoma lamında sayılmıştır. Uygun hücre sayısı elde edildiğinde ise hücreler üzerine 100 μL Annexin V Cell Reagent eklenmiş ve hücreler oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda ise muse cihazı yardımıyla apoptoz belirlenmiştir.

İstatistiksel Analiz

Testler için istatistiksel anlamlılık GraphPad Prism 7.0 (GraphPad) kullanılarak belirlenmiştir. Deneylerden elde edilen veriler ortalama $\pm$ Standart Sapma (SD) olarak ifade edilmiş ve kontrol karşılaştırmaları için post hoc Dunnett testi ve ANOVA testi uygulanmıştır.

2.6. Moleküler Docking Çalışmaları

Moleküler docking çalışmaları, PyRx kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen türevlerin moleküler yapıları ChemSketch programı ile çizilmiş ve Pymol programı ile görselleştirilmiştir. Kristal yapısı belirlenmiş ligand içeren insan

Hsp90 α (PDB kodu:1YC4), Hsp90 β (PDB kodu: 6N8Y), Hsp70 ATPaz bölgesi (PDB kodu: 1S3X) ve Hsp70 SBD bölgesi (PDB kodu: 4WV5) yapıları pdb formatında protein data banktan (PDB) indirilmiştir. Protein data bankta kompleks halde bulunan proteine bağlı moleküller silinmiştir. PyMol programına proteinlerin pdb dosyaları yüklenerek, sentezlenen türevleri ile insan Hsp90 ve HSP70 bölgeleri arasındaki etkileşim web tabanlı çalışan Pymol programı ile belirlenmiştir. Hesaplama sonucu sentezlenen pürin türevleri ile Hsp90 α , Hsp90 β , Hsp70 ATPaz, Hsp70 SBD arasındaki bağlanma enerjileri ve etkileşime giren kritik amino asitler tespit edilmiştir. Moleküler docking sonuçları PYMOL görüntüleme programı ile görselleştirilmiştir.

2.7. Hsp70 Bağlanma Deneyleri

Bağlanma deneyleri inhibitörlerin proteinin fonksiyonuna etkisini belirlemek için yapılmaktadır. Hsp70, ATP'yi hidroliz ederek elde ettiği enerjiyi SBD'in kapağının açılıp kapanmasını sağlamak için kullanmaktadır. Sentezlenen pürin analoglarının bağlanma deneylerini gerçekleştirmek için MCF7 hücre hattında oldukça aktif bulunan bileşik 7 seçilmiş ve bilinen Hsp70 inhibitörü PES ve *Tutar Y. ve ark.*, tarafından patentlenen KBR1307 bileşikleri pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Ligand bağlanmasını ölçmek için ANS (8-anilino-1-naftalen sülfonik asit) azo boyar maddesi (ekstrinsik prob) kullanılmıştır. Bileşik 7 ve KBR1307 protein çözeltisine ardışık artışlarla ilave edilerek, Kd değerleri hesaplanmıştır. Deneyler 1 μ M Hsp70 ve 10 μ M ANS ve inhibitörler ile oda sıcaklığında titrasyon yapılarak gerçekleştirilmiştir. Proteinin ANS probu ile floresansı Shimadzu Spectrofluorometrede sırasıyla 340 nm ve 520 nm dalga boylarında ölçülmüştür.

2.8. Hsp70 Agregasyon Deneyleri

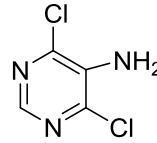
Katlanma deneyleri için lüminesans özellik gösteren lüsiferaz (ateş böceği) enzimi agregate edilmiştir. Değişen Hsp-koşaperon-inhibitör konsantrasyonlarında agregasyon, lüminometrik sinyal söndürmesi ile bileşik 7 inhibitörünün Hsp70'e karşı etkinliği tespit edilmiştir. Hsp proteinleri birbirleri ile kooordineli çalıştıkları için farklı kombinasyonlarında protein agregasyon etkisi ölçülmüştür. Deneyler Macherey-Nagel Biofix Lumi 10 ile gerçekleştirilmiştir.

Lüsiferaz peptit denatüre edilmiş ve lüsiferazın Hsp tarafından yeniden katlanması farklı koşullarda izlenmiştir. Pürin türevinin (7) inhibe edici özelliklerini anlamak için pozitif kontrol grubu olarak KBR1307 kullanılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. 6-(4-Sübstitüe fenilamino)-8,9-difenil-pürin Türevlerinin Sentezi:

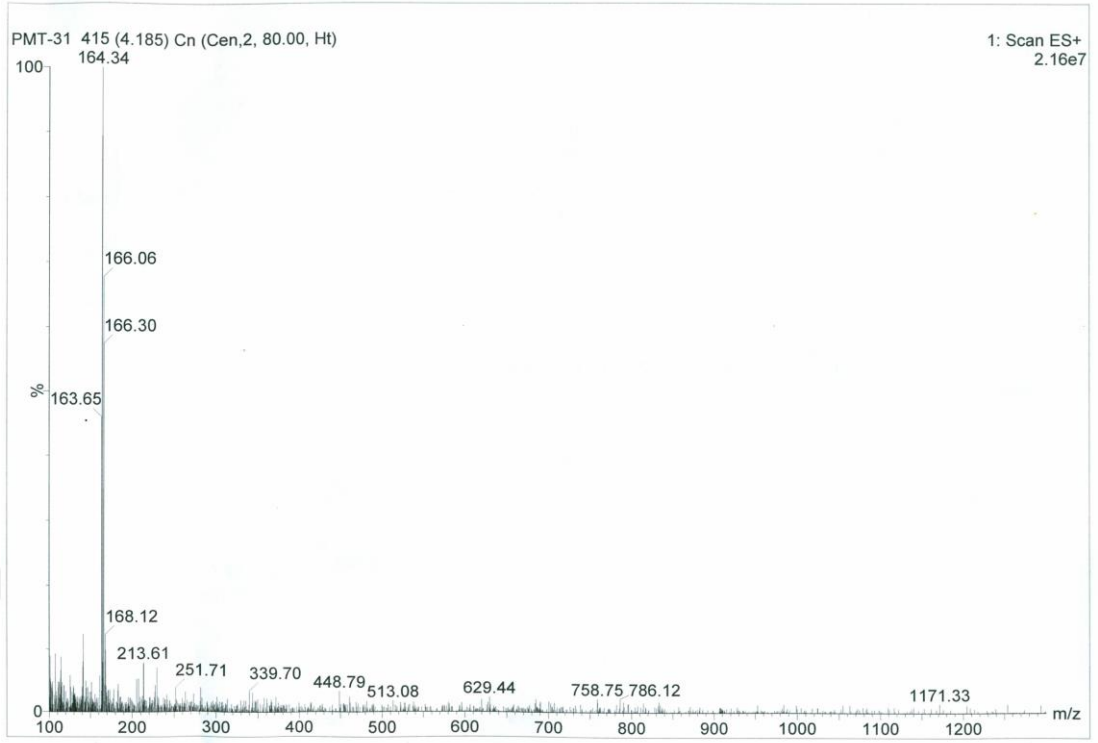
3.1.1. 5-Amino-4,6-dikloropirimidin (2)



6 g (30.93 mmol) 4,6-Dikloro-5-nitropirimidin (1) 135 ml absolü EtOH'de çözülüp 27.9 g (123.7 mmol) SnCl₂.2H₂O ilave edildi ve 6 saat geri çeviren soğutucu altında ısıtıldı, reaksiyon ortamı evaporatörde konsantre edildikten sonra doymuş NaHCO₃ çözeltisi ile pH=8'e ayarlanıp EtOAc ile 3 kez ekstraksiyon yapıldı, Na₂SO₄ ile kurutuldu. %84 Verimle 4.26 g beyaz renkli madde elde edildi.

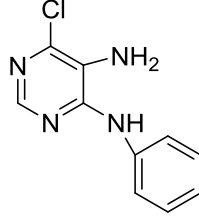
E.N: 143-145 °C (147 °C) (Brown, 1954).

Kütle Spektrumu: MS (ESI+) m/e 164.34 (%100) (M+H), 166.30 (%58) (M+H+2), 168.12 (%10) (M+H+4).



Şekil 3.1. Bileşik 2'in kütle spektrumu

3.1.2. 5-Amino-4-(fenil)amino-6-kloropirimidin (3)



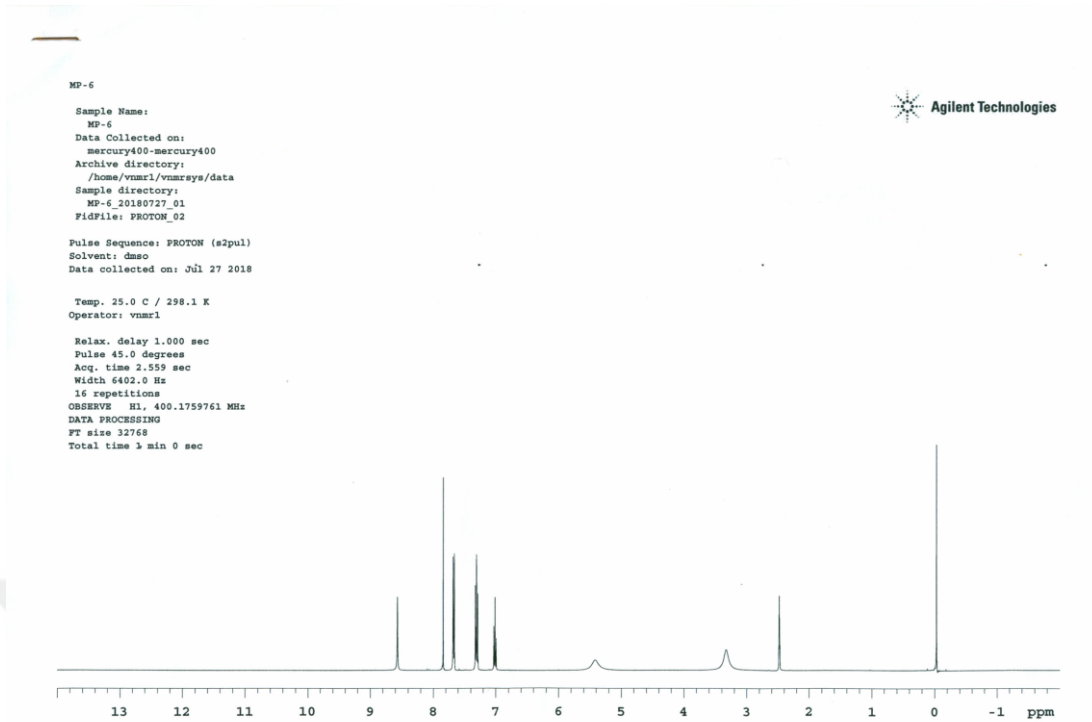
1 g (6.1 mmol) 5-Amino-4,6-dikloropirimidin (2) ve 0.35 g (7.56 mmol) anilin'in 17 ml H₂O ve 3 ml absolü EtOH içindeki çözeltisi 0.096 g (3.05 mmol) konsantre HCl varlığında 80 °C'de ısıtıldı. Çöken kristaller reaksiyon ortamından süzüldü, önce distile su ardından Hegzan ile yıkandı. % 67 Verimle 0.9 g madde elde edildi.

E.N: 173-176 °C (175-176 °C) (Greenberg ve ark., 1959)

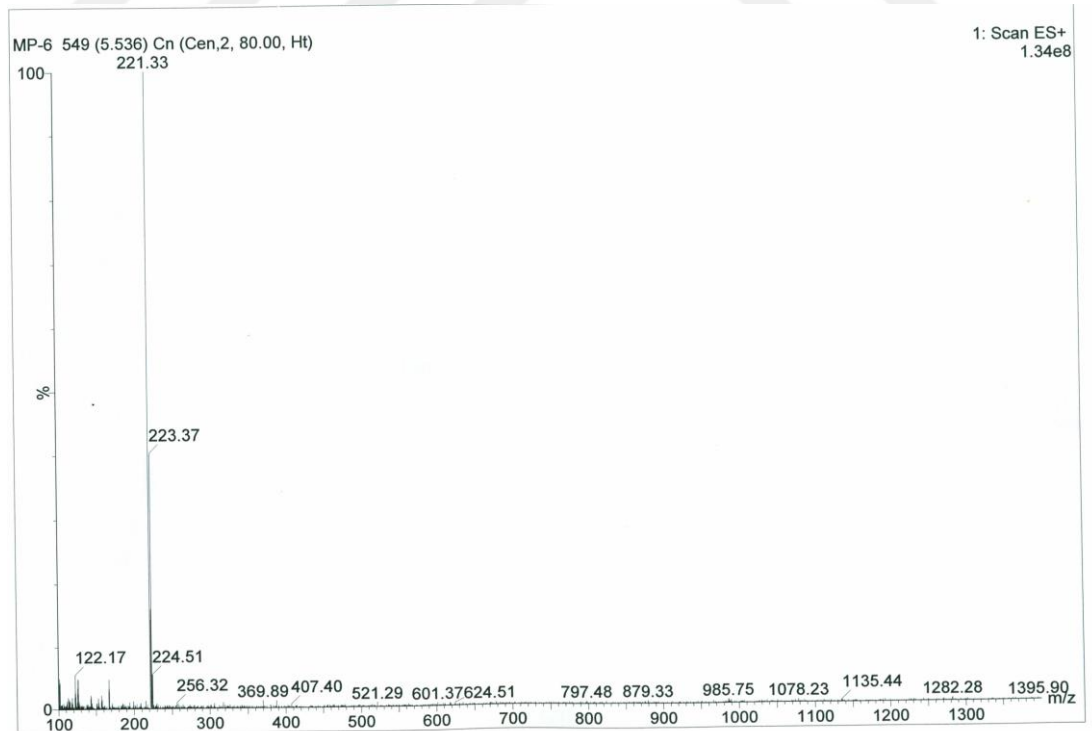
¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆) δppm:

5.41 (br s, 2H), 7.01 (t, 1H, *J*_o = 7.6 Hz), 7.31 (t, 2H, *J*_o = 8 Hz), 7.66 (d, 2H, *J*_o = 8.8 Hz), 7.84 (s, 1H), 8.56 (s, 1H).

Kütle Spektrumu: MS (ESI+) *m/e* 221.33 (%100) (M+H), 223.37 (%40) (M+H+2).

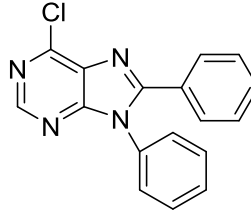


Şekil 3.2. Bileşik 3'in ^1H -NMR spektrumu



Şekil 3.3. Bileşik 3'in kütle spektrumu

3.1.3. 6-Kloro-8,9-difenil-pürin (4)



1 g (4.52 mmol) 5-Amino-4-(fenil)amino-6-kloropirimidin (**3**) ve 0.17 g (0.9 mmol) *p*-TsOH'ın 10 ml DMF içindeki çözeltisine oda sıcaklığında 0.96 g (9 mmol) benzaldehit ilave edildi. Reaksiyon karışımı 80 °C'de 1 gece ısıtıldı. Reaksiyon ortamı oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Sulu Na₂CO₃ (0.2 mmol) ve 20 ml doymuş NaCl çözeltisi ilave edildikten sonra reaksiyon ortamı 3 kez 100 ml EtOAc ile ekstre edildi. Organik faz Na₂SO₄ üzerinden kurutuldu. Kloroform:Hegzan:Etil asetat (5:4:1) solvan sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. % 60 Verimle 0.84 g madde elde edildi.

E.N: 175-178 °C

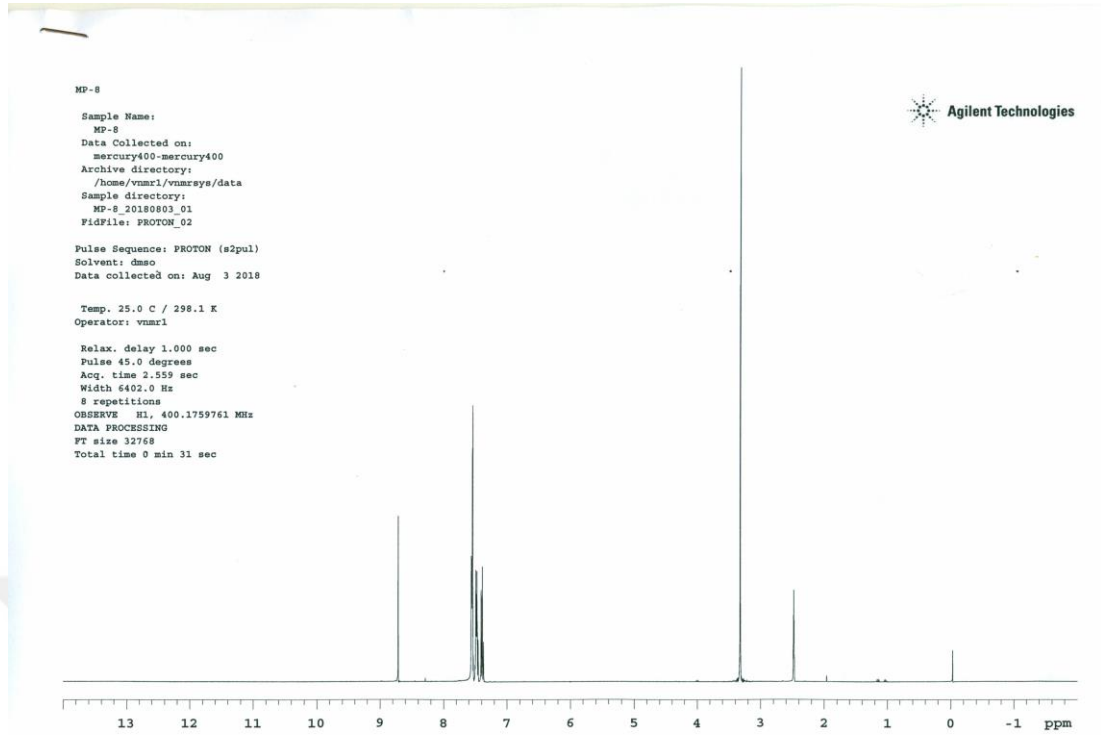
¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆) δppm:

7.38 (t, 2H, *J*_o = 8 Hz), 7.45-7.56 (m, 8H), 8.71 (s, 1H) .

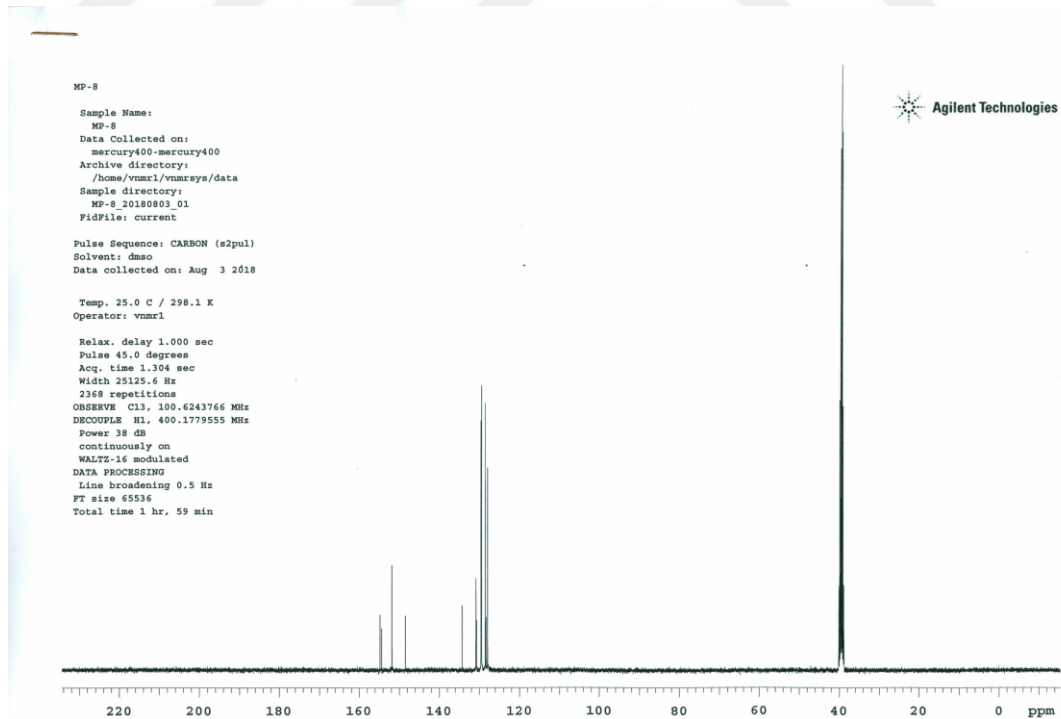
¹³C NMR Spektrumu (DMSO-d₆) δppm:

127.94, 128.30, 128.52, 129.47, 129.55, 129.61, 130.69, 130.86 (C-fenil), 134.30, 148.49, 151.85, 154.41, 154.80 (C-pürin).

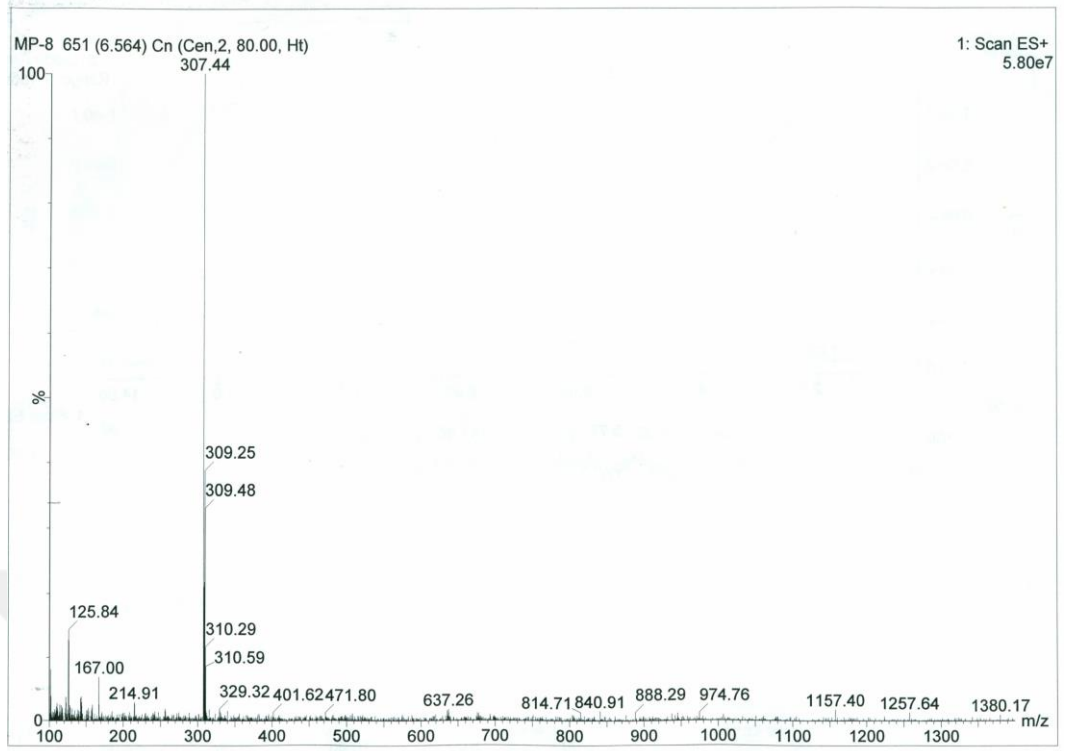
Kütle Spektrumu: MS (ESI+) *m/e* 307.44 (%100) (M+H), 309.48 (%38) (M+H+2).



Şekil 3.4. Bileşik 4'ün ^1H -NMR spektrumu



Şekil 3.5. Bileşik 4'ün ^{13}C -NMR spektrumu

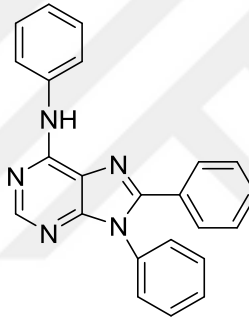


Şekil 3.6. Bileşik 4'ün kütle spektrumu

3.1.4. 6-(4-Süstitüe fenilamino)-8,9-difenil-pürin Türevlerinin (5-12) Genel Sentez Yöntemi

0.30 mmol 6-Kloro-8,9-difenil-pürin (4) üzerine 0.30 mmol 4-süstitüe anilin, 0.90 mmol Et₃N ve 10 ml absölü EtOH ilave edilerek 80-90 °C'de geri çeviren soğutucu altında 6-12 saat ısıtıldı, EtOH evaporatörde uçuruldu. Elde edilen ürün Etil asetat:hegzan (1:10)/(1:5)/(1:3) solvan sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı.

3.1.4.1. 6-(Fenilamino)-8,9-difenil-9H-pürin (5)



Genel sentez yöntemine göre 0,10 g başlangıç maddesinden hareketle % 49 Verimle 0,06 g madde elde edildi.

E.N: 193-197 °C

Elementel Analiz: C₂₃H₁₇N₅·0,2H₂O

	%C	%H	%N
Hesaplanan:	75.25	4.78	19.09
Analiz:	75.11	4.55	19.21

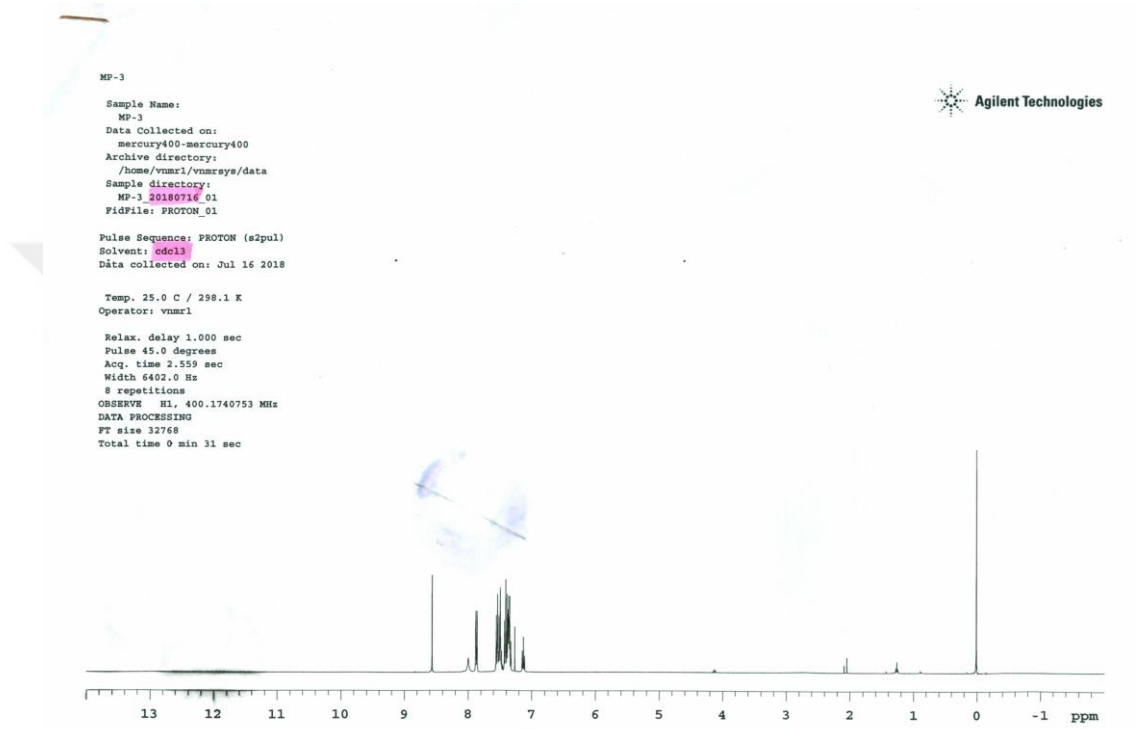
¹H-NMR Spektrumu (CDCl₃) δppm:

7.13 (t, 1H, *J*_o = 7.2 Hz), 7.32-7.56 (m, 12H), 7.87 (d, 2H, *J*_o = 8.8 Hz), 7.99 (br s, 1H), 8.56 (s, 1H).

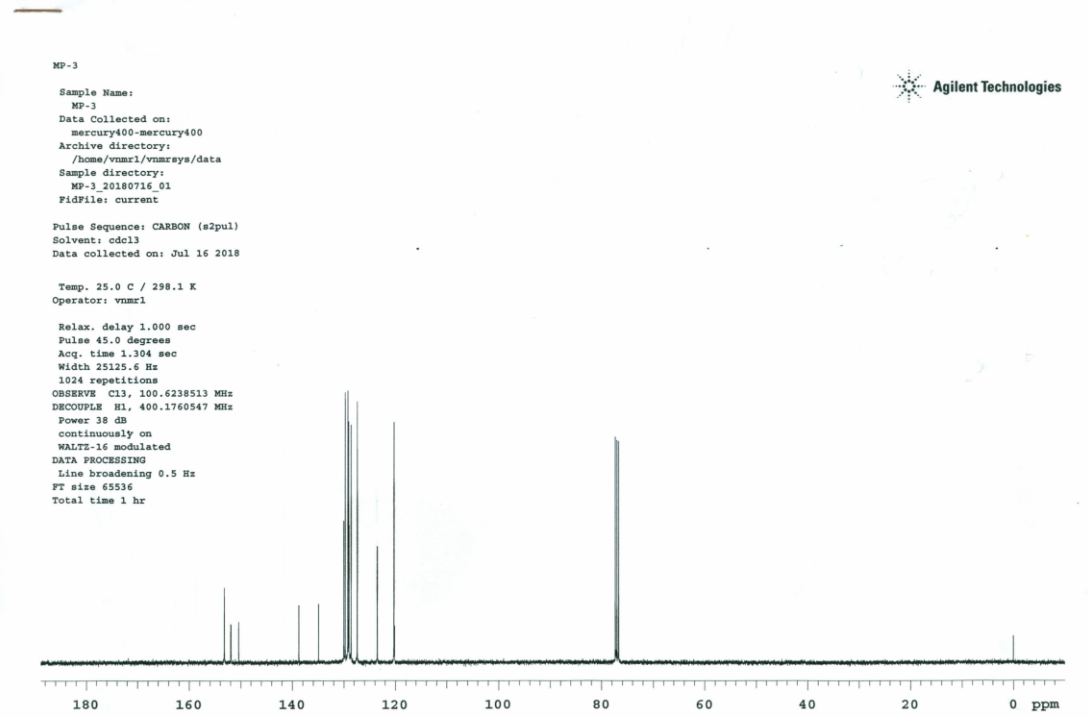
^{13}C NMR Spektrumu (CDCl_3) δppm :

120.17, 120.30, 123.53, 127.41, 128.60, 128.99, 129.07, 129.23, 129.74, 130.01 (C-fenil), 134.94, 138.76, 150.43, 151.96, 153.23 (C-pürin).

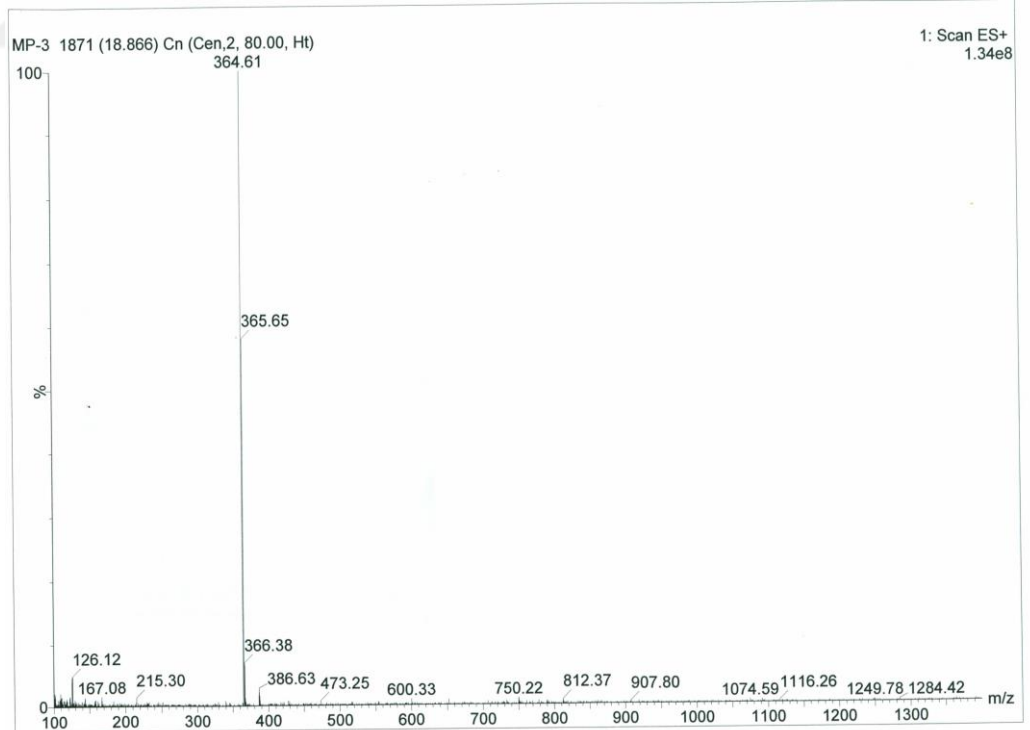
Kütle Spektrumu: MS (ESI+) m/e 364.51 (%100) (M+H).



Şekil 3.7. Bileşik 5'in ^1H -NMR spektrumu

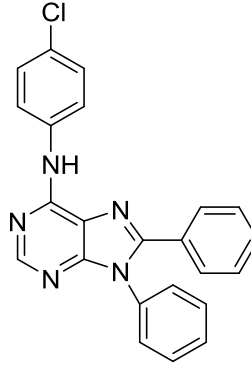


Şekil 3.8. Bileşik 5'in ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 3.9. Bileşik 5'in kütle spektrumu

3.1.4.2. 6-(4-Klorofenilamino)-8,9-difenil-9H-pürin (6)



Genel sentez yöntemine göre 0,10 g başlangıç maddesinden hareketle % 85 Verimle 0.11 g madde elde edildi.

E.N: 227-230 °C

Elementel Analiz: C₂₃H₁₆ClN₅·1,1H₂O

	%C	%H	%N
Hesaplanan:	66.19	4.39	16.79
Analiz:	66.33	4.13	16.89

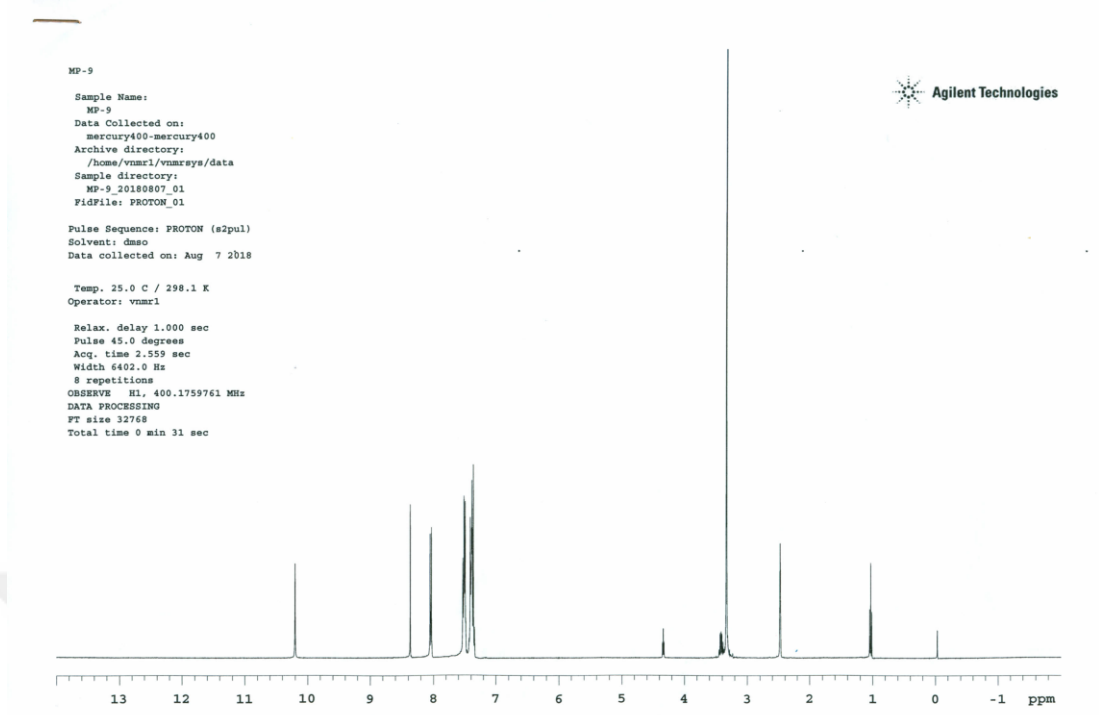
¹H-NMR Spektrumu (DMSO) δppm:

7.34-7.53 (m, 12H), 8.04 (d, 2H, $J_o = 8.8$ Hz), 8.36 (s, 1H), 10.20 (s, 1H).

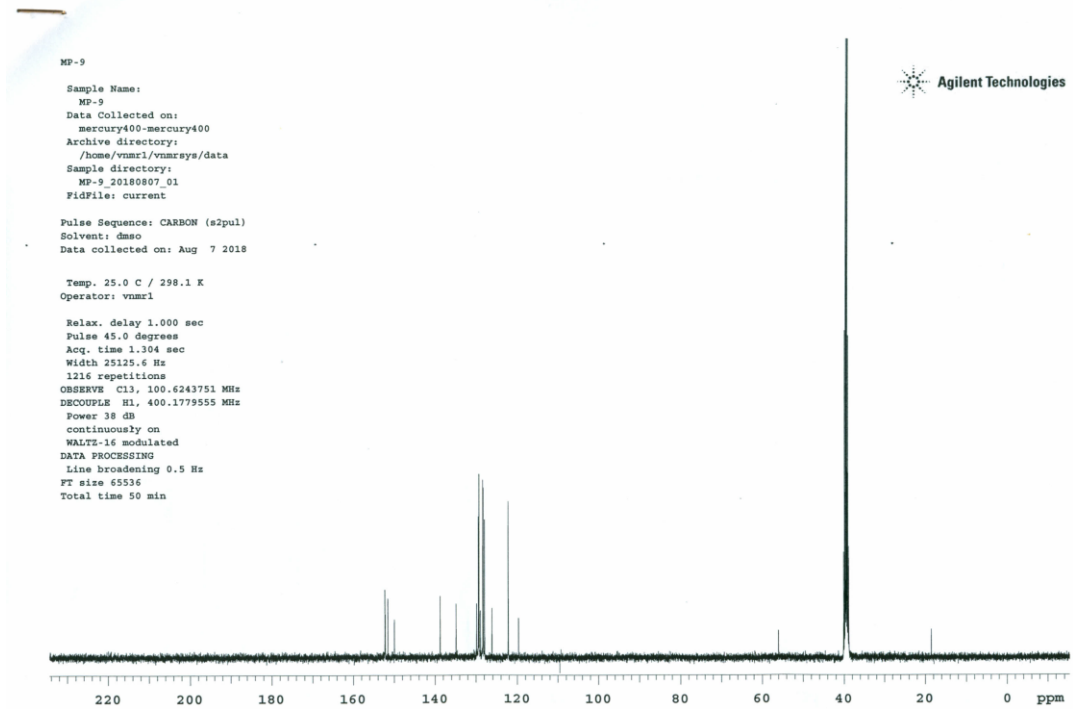
¹³C NMR Spektrumu (DMSO) δppm:

119.71, 122.20, 126.16, 127.92, 128.25, 128.34, 128.90, 129.22, 129.27, 129.41, 129.84 (C-fenil), 134.85, 138.77, 149.96, 151.57, 152.23 (C-pürin).

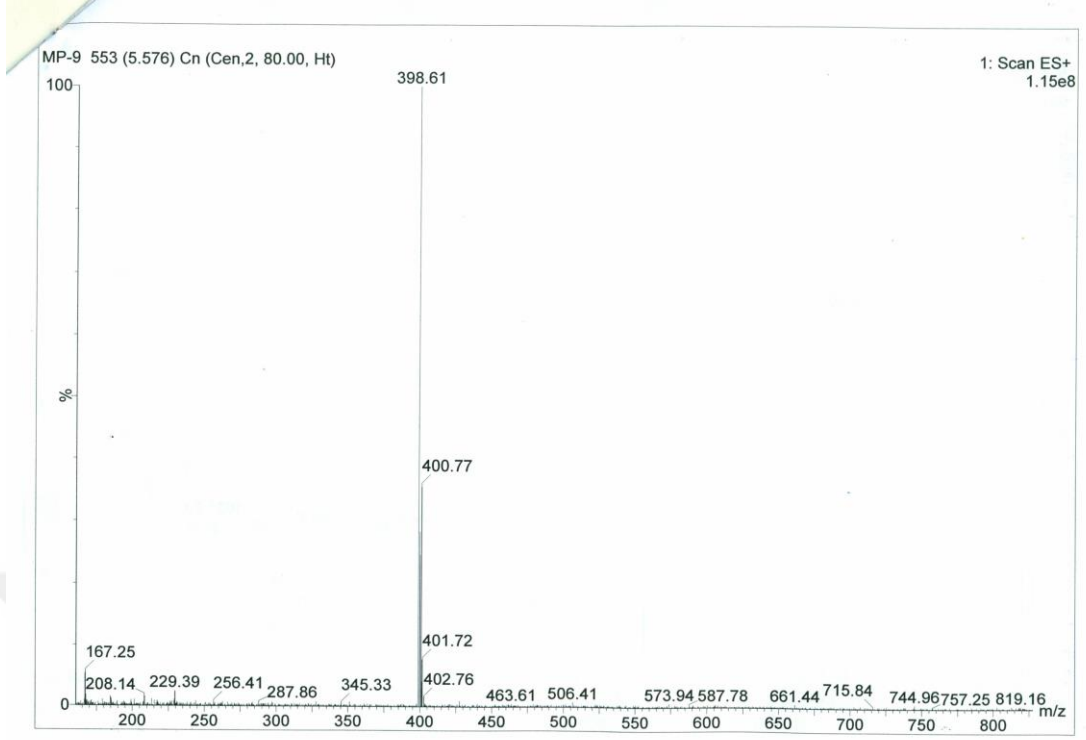
Kütle Spektrumu: MS (ESI⁺) m/e 398.61 (%100) (M+H). 400.77 (%38) (M+H+2).



Şekil 3.10. Bileşik 6'nın ^1H -NMR spektrumu

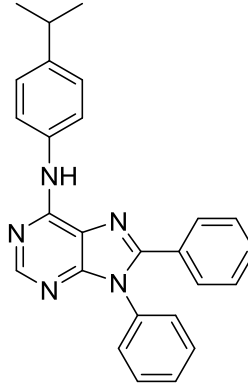


Şekil 3.11. Bileşik 6'nın ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 3.12. Bileşik 6'nın kütle spektrumu

3.1.4.3. 6-(4-İzopropilfenilamino)-8,9-difenil-9H-pürin (7)



Genel sentez yöntemine göre 0,10 g başlangıç maddesinden hareketle % 66 Verimle 0.088 g madde elde edildi.

E.N: 137-139 °C.

Elementel Analiz: C₂₆H₂₃N₅.1H₂O

	%C	%H	%N
Hesaplanan:	73.72	5.95	16.54
Analiz:	73.46	5.68	16.78

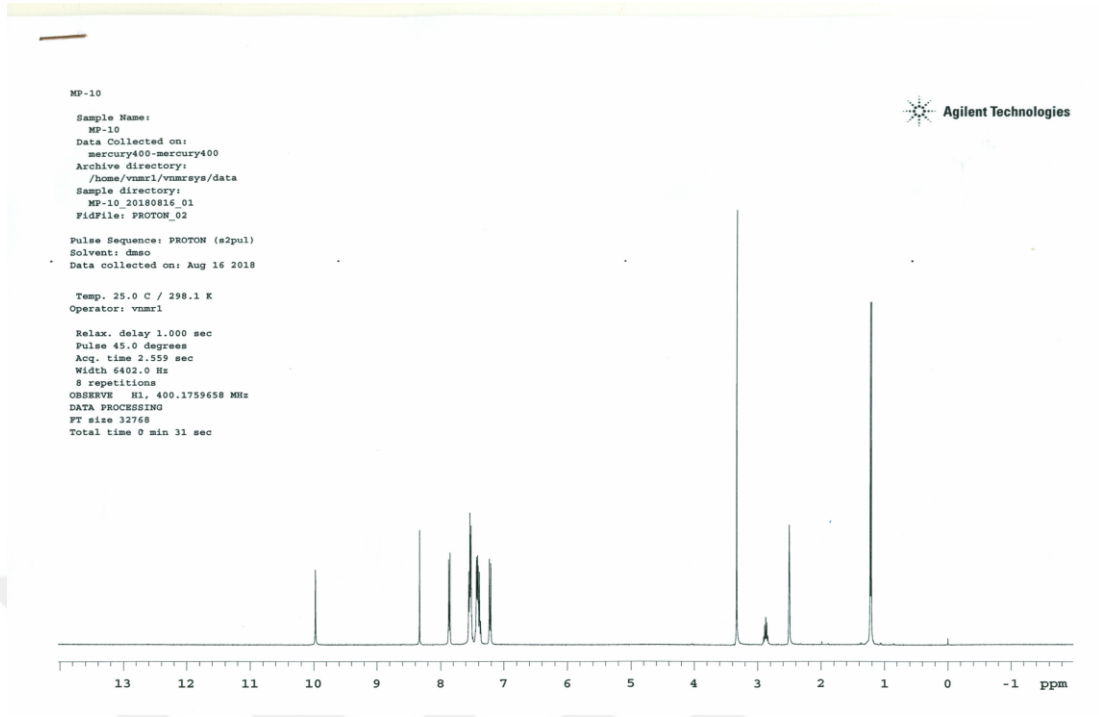
¹H-NMR Spektrumu (DMSO) δppm:

1.22 (d, 6H, $J = 6.8$ Hz), 2.87 (m, 1H), 7.21 (d, 2H, $J_o = 8.8$ Hz), 7.36-7.55 (m, 10H), 7.86 (d, 2H, $J_o = 8.4$ Hz), 8.33 (s, 1H), 9.97 (s, 1H).

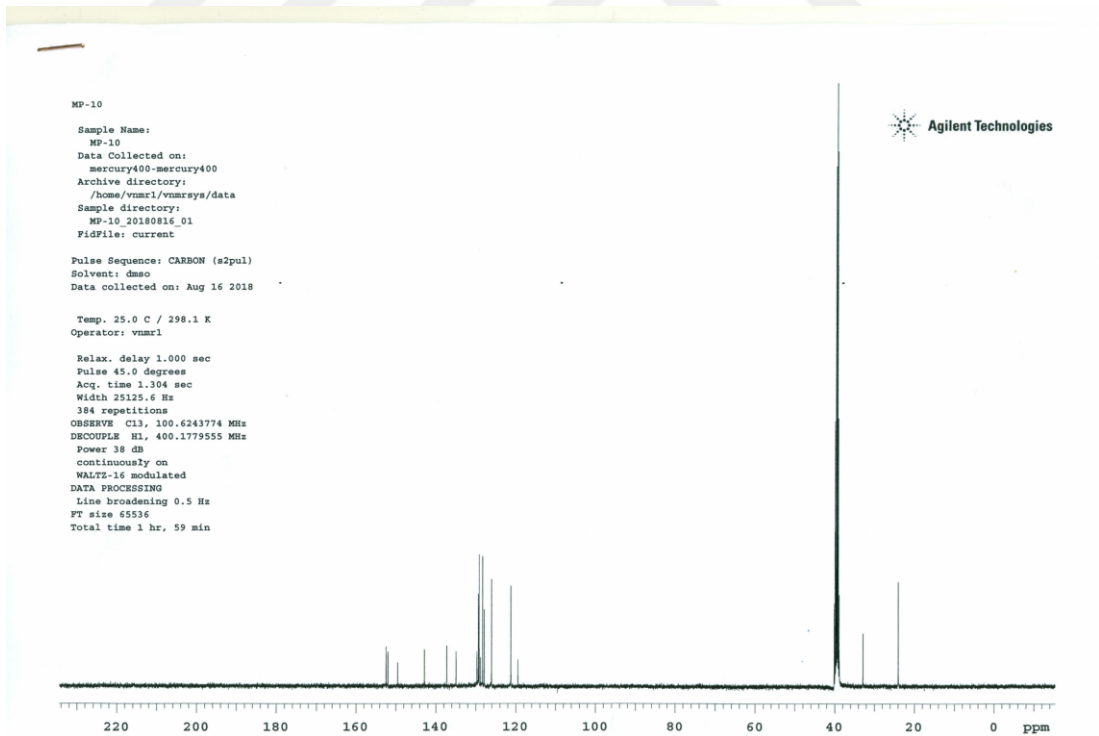
¹³C NMR Spektrumu (DMSO) δppm:

24.0 (CH₃), 32.89 (CH), 119.48, 121.23, 126.08, 127.90, 128.30, 128.82, 129.15, 129.37, 129.71, 134.94 (C-fenil), 137.27, 142.86, 149.52, 151.95, 152.43 (C-pürin).

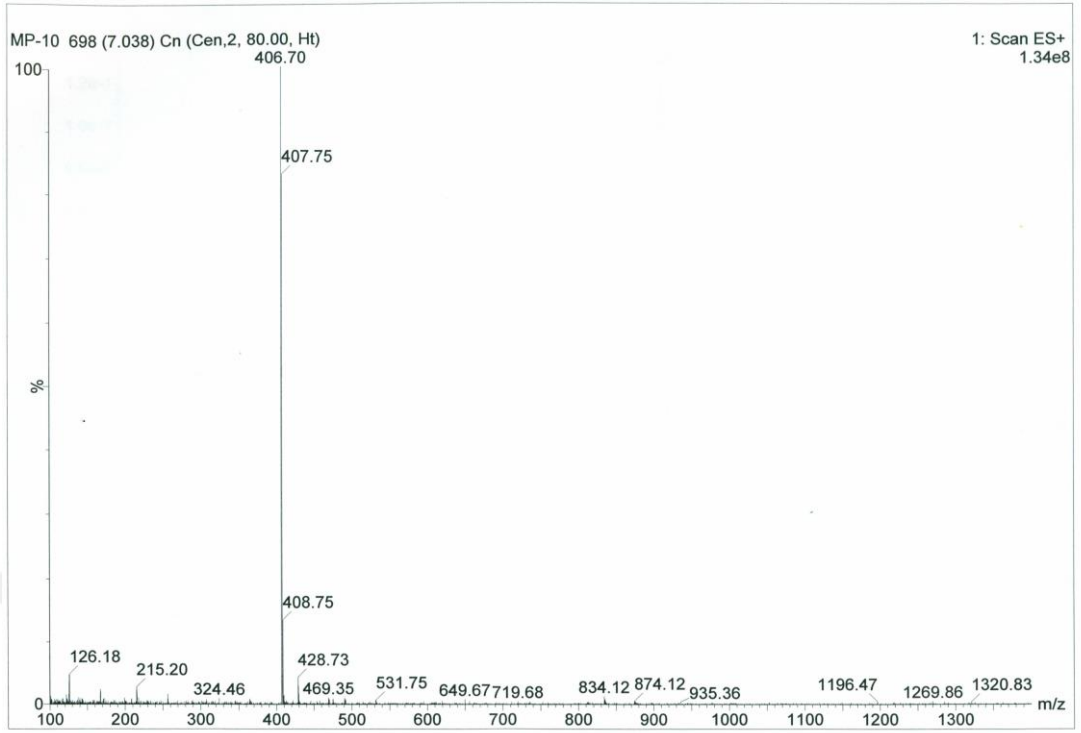
Kütle Spektrumu: MS (ESI⁺) m/e 406.70 (%100) (M+H).



Şekil 3.13. Bileşik 7'nin ^1H -NMR spektrumu

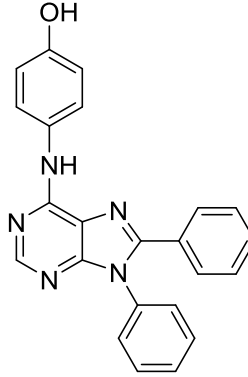


Şekil 3.14. Bileşik 7'nin ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 3.15. Bileşik 7'nin kütle spektrumu

3.1.4.4. 6-(4-Hidroksifenilamino)-8,9-difenil-9H-pürin (8)



Genel sentez yöntemine göre 0,10 g başlangıç maddesinden hareketle % 45 Verimle 0.055 g madde elde edildi.

E.N: 265-268 °C.

Elementel Analiz: C₂₃H₁₇N₅O.0,3C₆H₁₄.0,4H₂O

	%C	%H	%N
Hesaplanan:	72.20	5.37	16.98
Analiz:	72.12	5.23	16.64

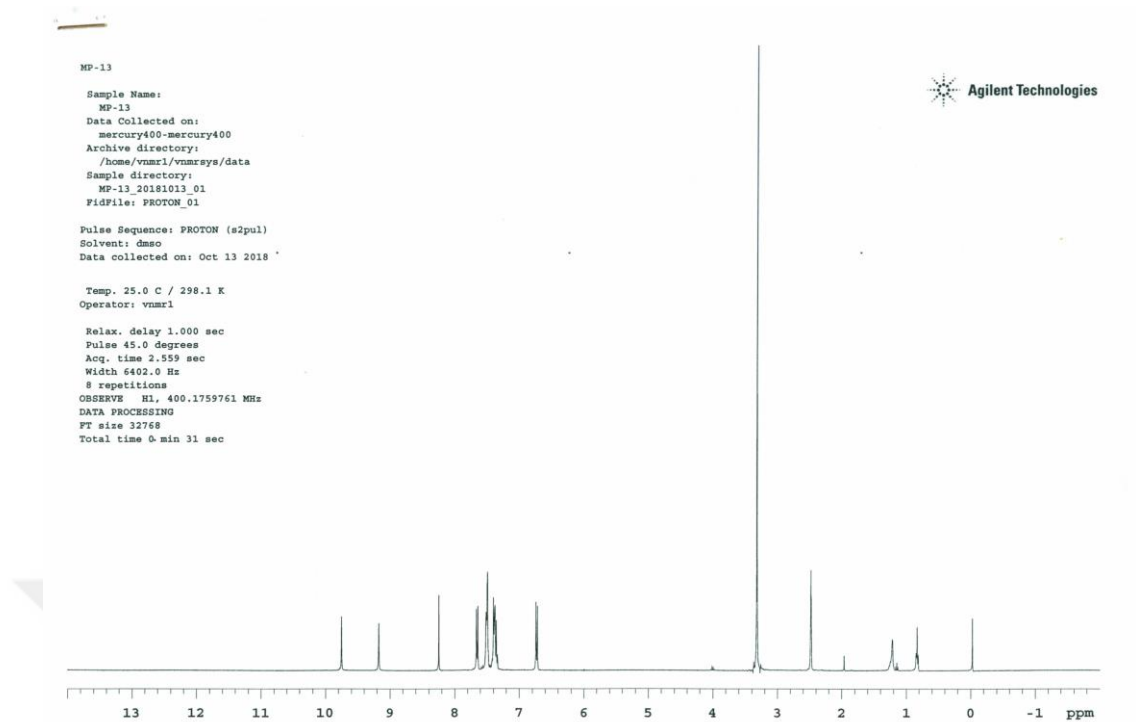
¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆+D₂O) δppm

6.73 (d, 2H, $J_o = 8.4$ Hz), 7.33-7.51 (m, 10H), 7.65 (d, 2H, $J_o = 9.2$ Hz), 8.24 (s, 1H), 9.17 (s, 1H), 9.75 (s, 1H).

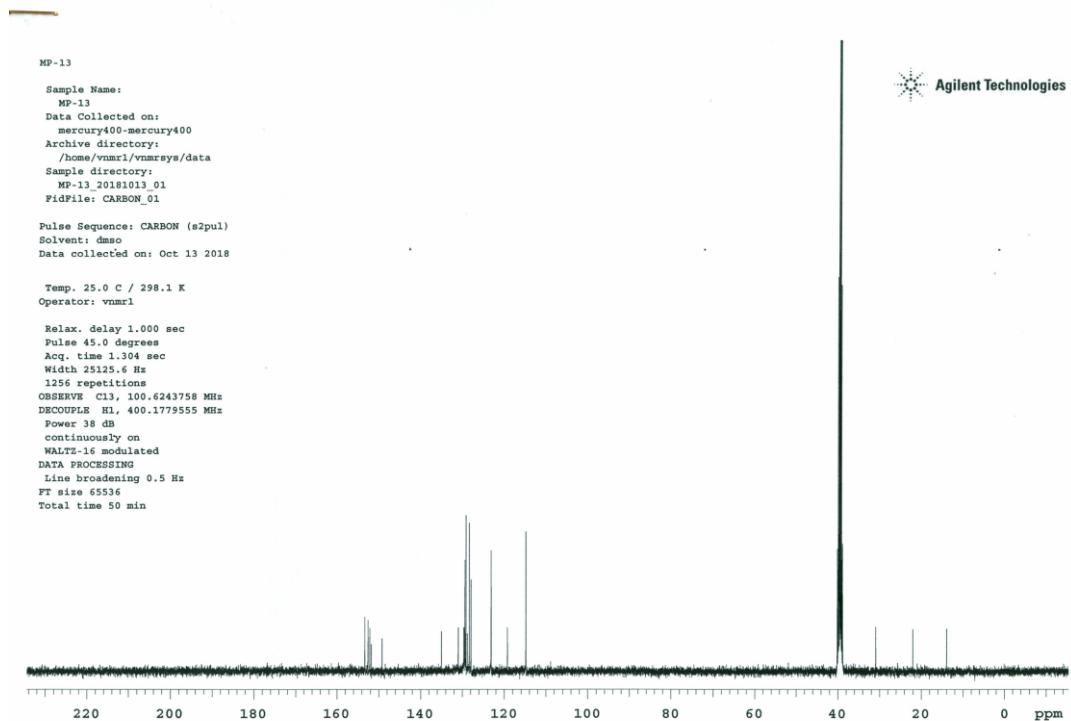
¹³C NMR Spektrumu (DMSO) δppm:

114.83, 119.25, 123.13, 127.90, 128.31, 128.79, 129.12, 129.37, 129.45, 129.66, 130.98, 135.01 (C-fenil), 149.21, 151.78, 152.13, 152.56, 153.32 (C-pürin).

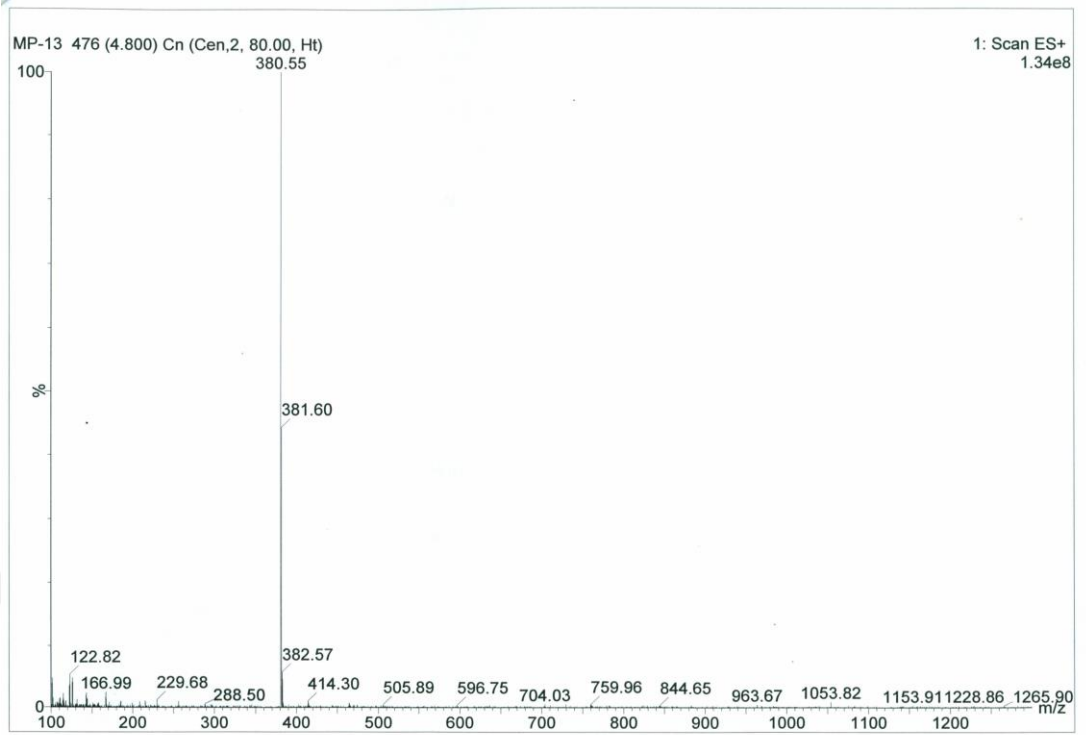
Kütle Spektrumu: MS (ESI+) m/e 380.55 (%100) (M+H).



Şekil 3.16. Bileşik 8'in ^1H -NMR spektrumu

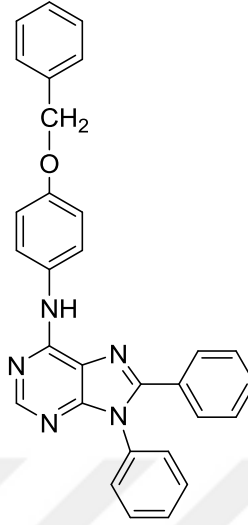


Şekil 3.17. Bileşik 8'in ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 3.18. Bileşik 8'in kütle spektrumu

3.1.4.5. 6-(4-Benziloksifenilamino)-8,9-difenil-9H-pürin (9)



Genel sentez yöntemine göre 0,10 g başlangıç maddesinden hareketle % 44 Verimle 0.067 g madde elde edildi.

E.N: 139-141 °C.

Elementel Analiz: C₃₀H₂₃N₅O.1,1H₂O

	%C	%H	%N
Hesaplanan:	73.61	5.19	14.31
Analiz:	73.57	4.99	13.94

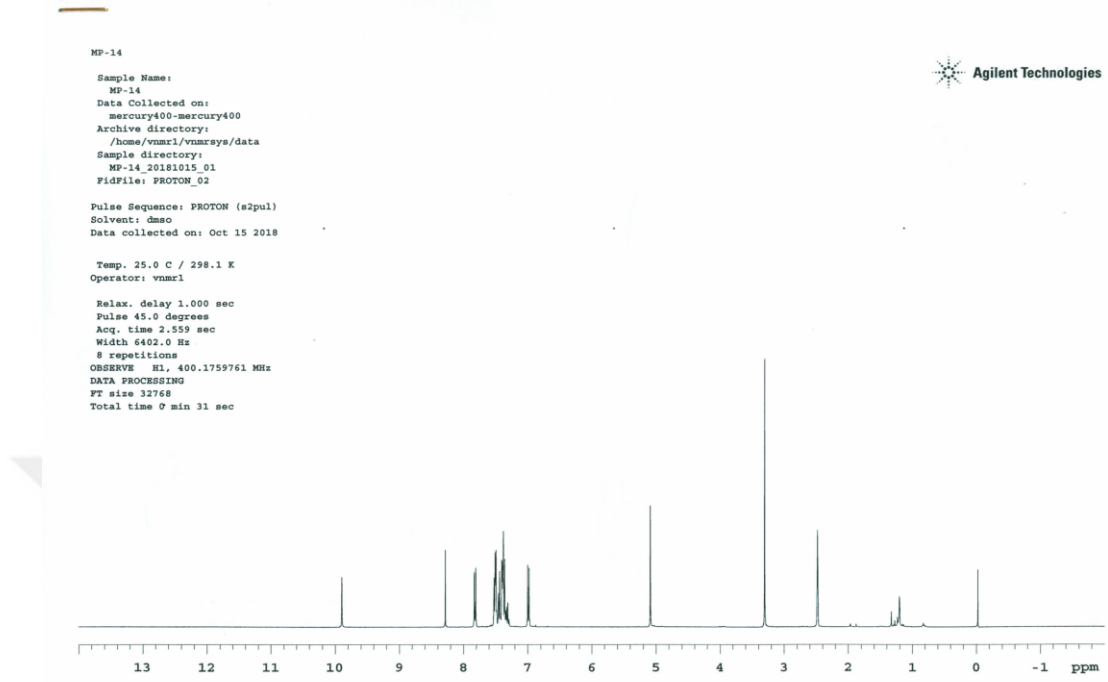
¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆+D₂O) δppm

5.08 (s, 2H), 6.99 (d, 2H, *J*_o = 9.2 Hz) 7.29-7.53 (m, 15H), 7.82 (d, 2H, *J*_o = 9.6 Hz), 8.28 (s, 1H), 9.89 (s, 1H).

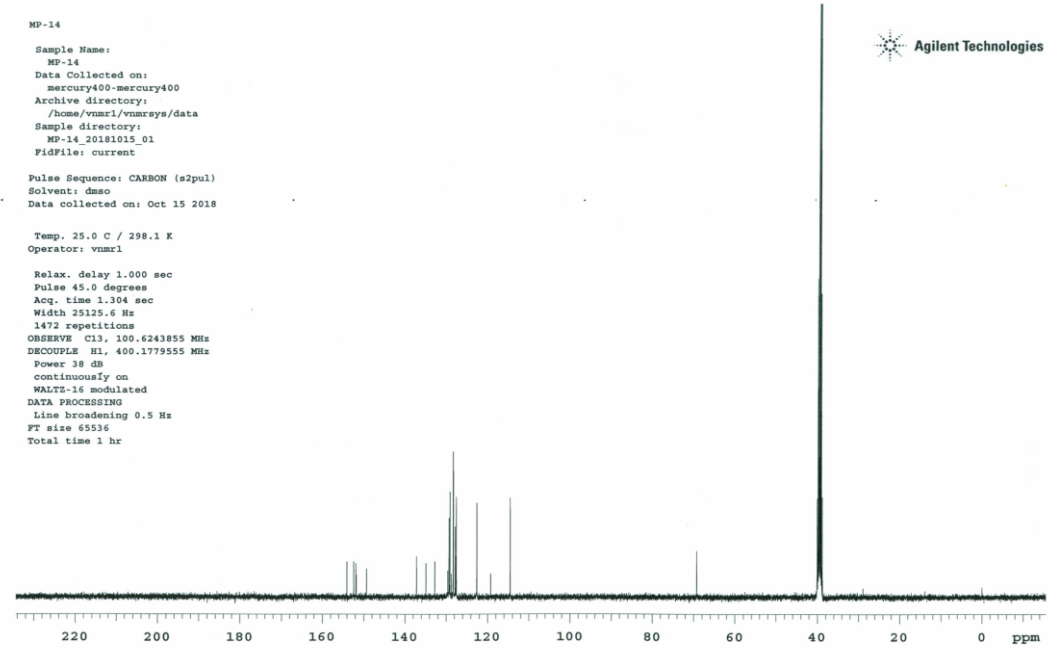
¹³C NMR Spektrumu (DMSO) δppm:

69.27 (CH₂), 114.51, 119.27, 122.60, 127.53, 127.64, 127.82, 128.22, 128.30, 128.72, 129.05, 129.28, 129.32, 129.60, 132.74, 134.87, 137.20 (C-fenil), 149.31, 151.78, 151.88, 152.40, 154.04 (C-pürin).

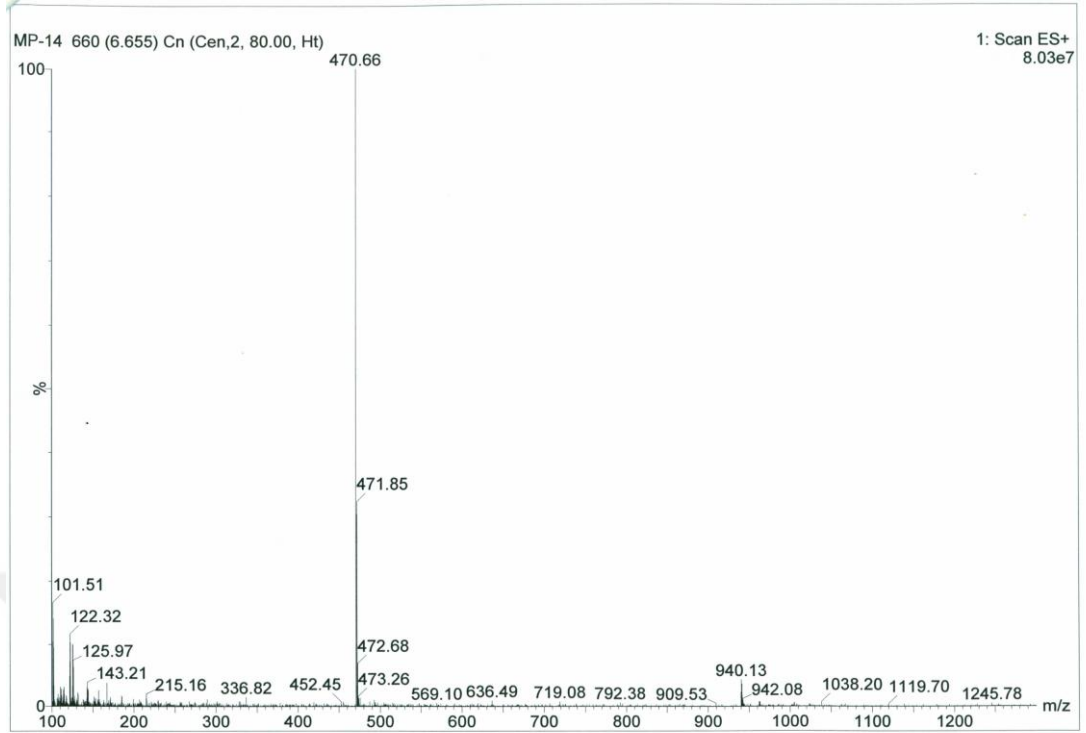
Kütle Spektrumu: MS (ESI+) m/e 470.66 (%100) (M+H).



Şekil 3.19. Bileşik 9'un ¹H-NMR spektrumu

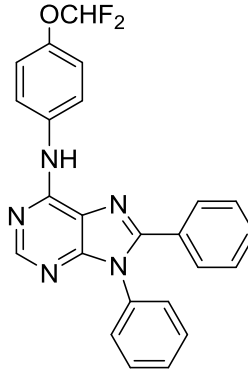


Şekil 3.20. Bileşik 9'un ¹³C-NMR spektrumu



Şekil 3.21. Bileşik 9'un kütle spektrumu

3.1.4.6. 6-(4-Difluorometoksifenilamino)-8,9-difenil-9H-pürin (10)



Genel sentez yöntemine göre 0,10 g başlangıç maddesinden hareketle % 88 Verimle 0.123 g madde elde edildi.

E.N: 127-130 °C.

Elementel Analiz: C₂₄H₁₇F₂N₅O.1H₂O

	%C	%H	%N
Hesaplanan:	64.40	4.28	15.65
Analiz:	64.26	4.21	15.57

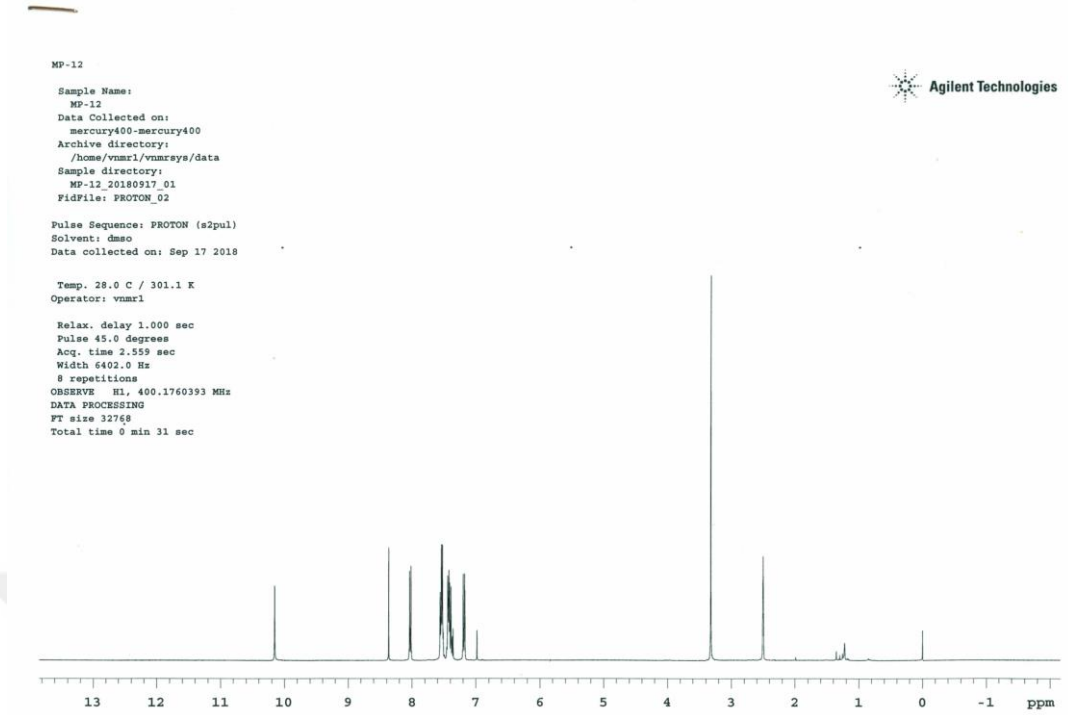
¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆+D₂O) δppm

7.17-7.19 (m, 3H), 7.35-7.55 (m, 10H), 8.03 (d, 2H, *J*_o = 8.8 Hz), 8.36 (s, 1H), 10.15 (s, 1H).

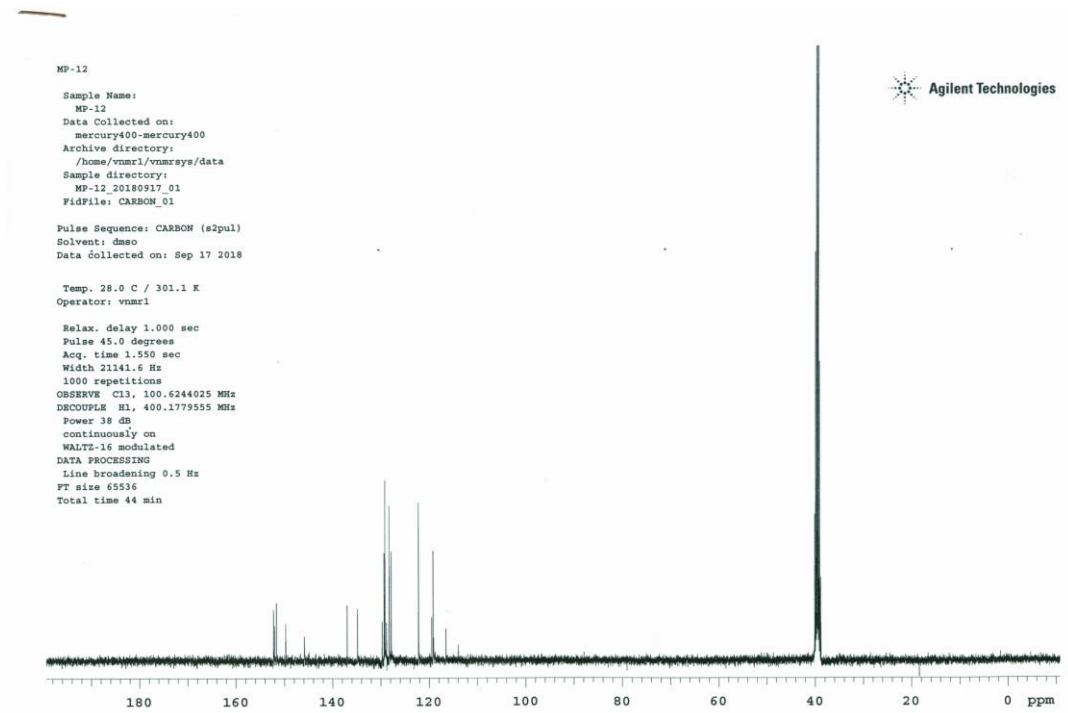
¹³C NMR Spektrumu (DMSO) δppm:

113.96, 116.52 (C-fenil), 119.19 (OCHF₂), 119.48, 122.20, 127.84, 128.24, 128.79, 129.11, 129.30, 129.71, 134.81, 136.97 (C-fenil), 145.88, 149.74, 151.66, 152.03, 152.26 (C-pürin).

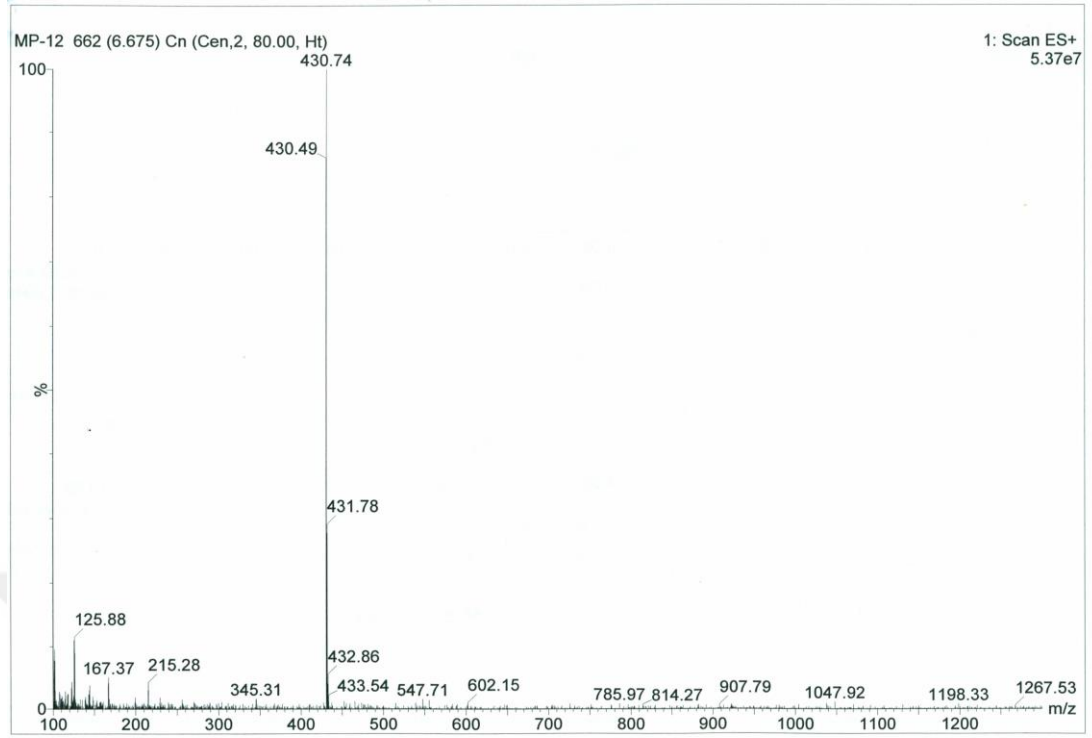
Kütle Spektrumu: MS (ESI⁺) m/e 430.74 (%100) (M+H).



Şekil 3.22. Bileşik 10'un ^1H -NMR spektrumu

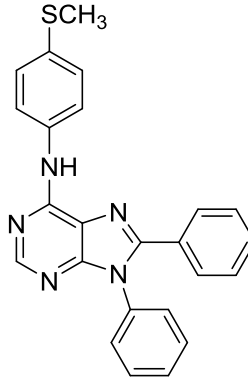


Şekil 3.23. Bileşik 10'un ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 3.24. Bileşik 10'un kütle spektrumu

3.1.4.7. 6-(4-Metiltiyofenilamino)-8,9-difenil-9H-pürin (11)



Genel sentez yöntemine göre 0,10 g başlangıç maddesinden hareketle % 59 Verimle 0.086 g madde elde edildi.

E.N: 123-126 °C.

Elementel Analiz: C₂₄H₁₉N₅S.1,2H₂O

	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan:	66.86	5.00	16.25	7.42
Analiz:	66.64	4.69	16.44	7.41

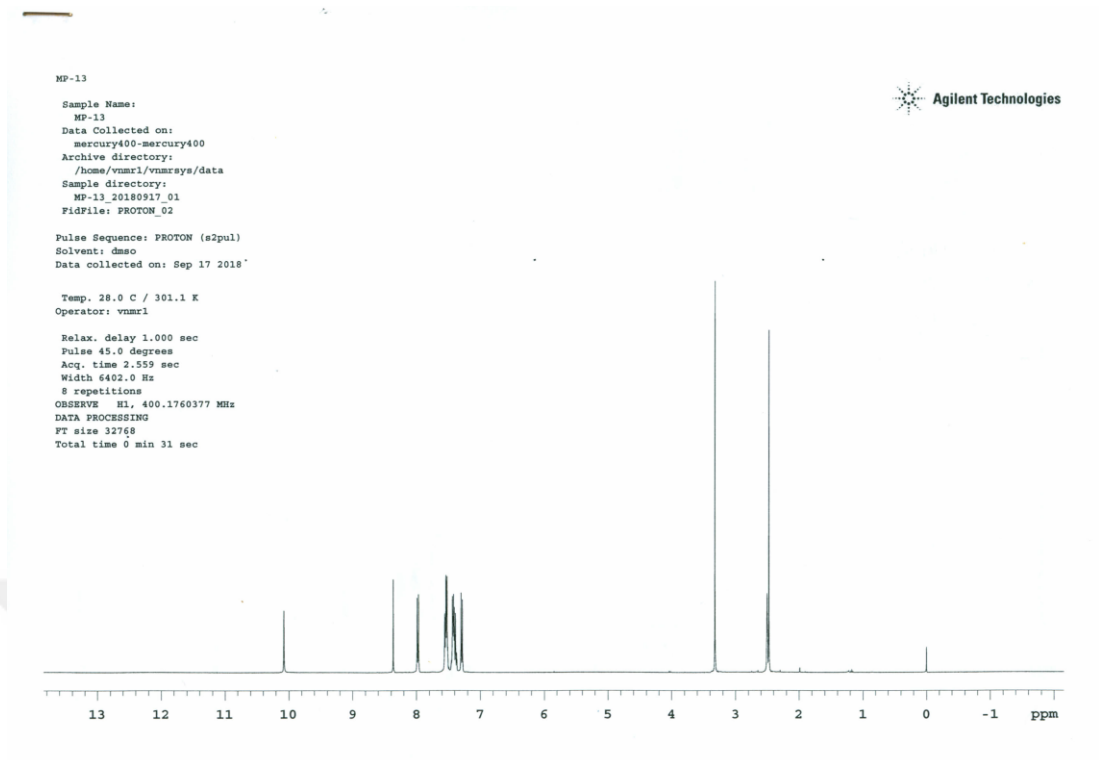
¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆+D₂O) δppm

2.47 (s, 3H), 7.29 (d, 2H, *J*_o = 8.8 Hz), 7.35-7.55 (m, 10H), 7.98 (d, 2H, *J*_o = 8.4 Hz), 8.36 (s, 1H), 10.07 (s, 1H).

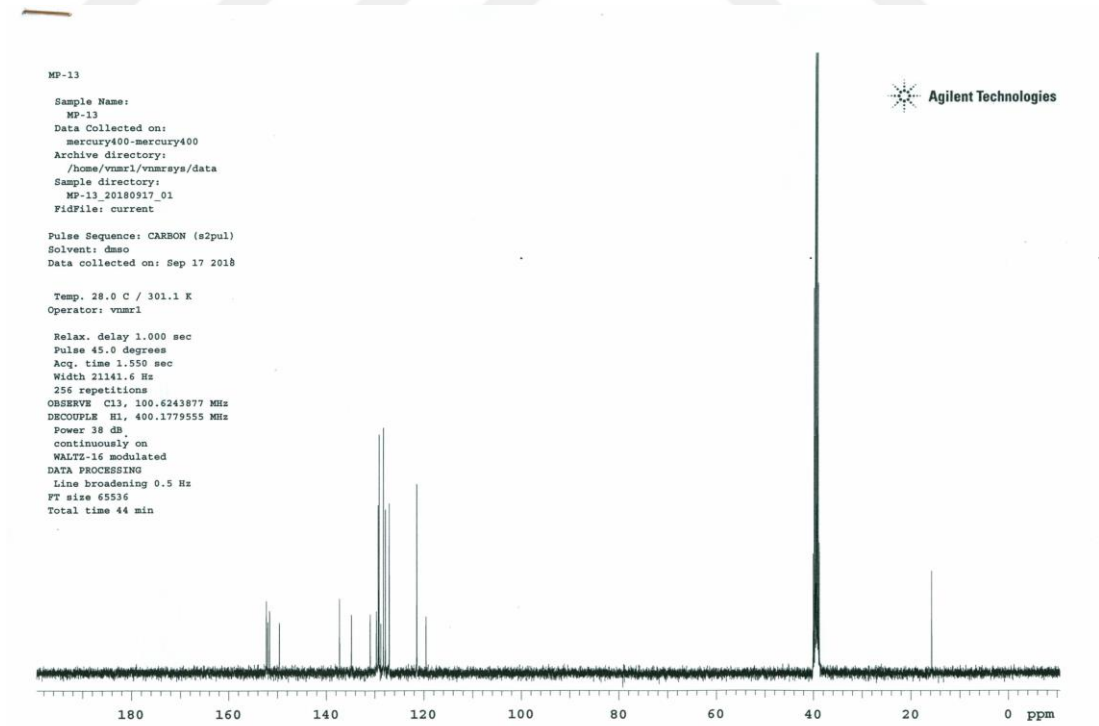
¹³C NMR Spektrumu (DMSO) δppm:

15.77 (CH₃), 119.55, 121.44, 127.06, 127.83, 128.24, 129.78, 129.10, 129.26, 129.30, 129.69, 130.93, 134.82 (C-fenil), 137.27, 149.64, 151.65, 151.99, 152.28 (C-pürin).

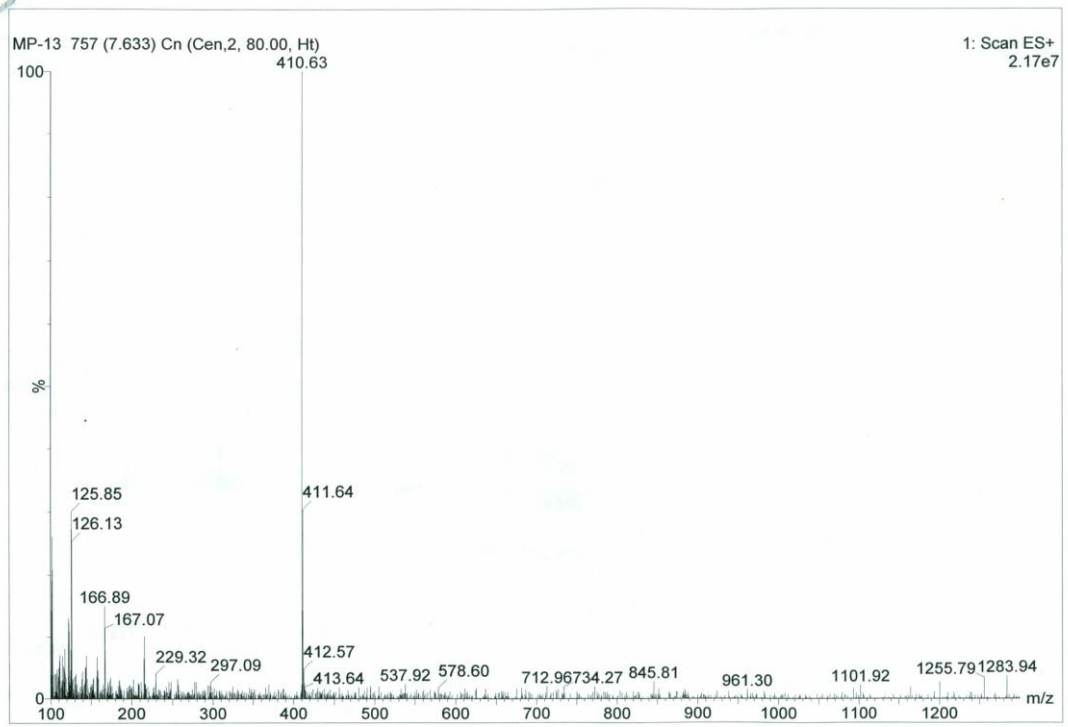
Kütle Spektrumu: MS (ESI⁺) m/e 410.63 (%100) (M+H).



Şekil 3.25. Bileşik 11'in ^1H -NMR spektrumu

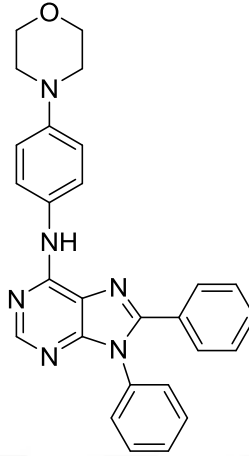


Şekil 3.26. Bileşik 11'in ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 3.27. Bileşik 11'in kütle spektrumu

3.1.4.8. 6-(4-Morfolinefenilamino)-8,9-difenil-9H-pürin (12)



Genel sentez yöntemine göre 0,10 g başlangıç maddesinden hareketle % 53 Verimle 0.078 g madde elde edildi.

E.N: 213-215 °C.

Elementel Analiz: C₂₇H₂₄N₆O.0,3H₂O

	%C	%H	%N
Hesaplanan:	71.42	5.46	18.52
Analiz:	71.37	5.16	18.55

¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆+D₂O) δppm

3.07 (t, 4H, *J* = 4.8 Hz), 3.75 (t, 4H, *J* = 4.8 Hz), 6.94 (d, 2H, *J*_o = 8.8 Hz), 7.36-7.54 (m, 10H), 7.79 (d, 2H, *J*_o = 9.2 Hz), 8.29 (s, 1H), 9.80 (s, 1H).

¹³C NMR Spektrumu (DMSO) δppm:

49.04, 66.06 (C-morfolin), 115.24, 119.30, 122.25, 127.82, 128.22, 128.70, 129.04, 129.27, 129.39, 129.58, 131.71 134.94 (C-fenil), 147.04, 149.22, 151.77, 151.95, 152.45 (C-pürin).

Kütle Spektrumu: MS (ESI+) *m/e* 449.71 (%100) (M+H).

MP-11

Sample Name:
MP-11

Data Collected on:
mercury400-mercury400

Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data

Sample directory:
MP-11_20180908_01

FidFile: PROTON_02

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)

Solvent: dmsd

Data collected on: Sep 8 2018

Temp. 35.0 C / 308.1 K

Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 2.559 sec

Width 6402.0 Hz

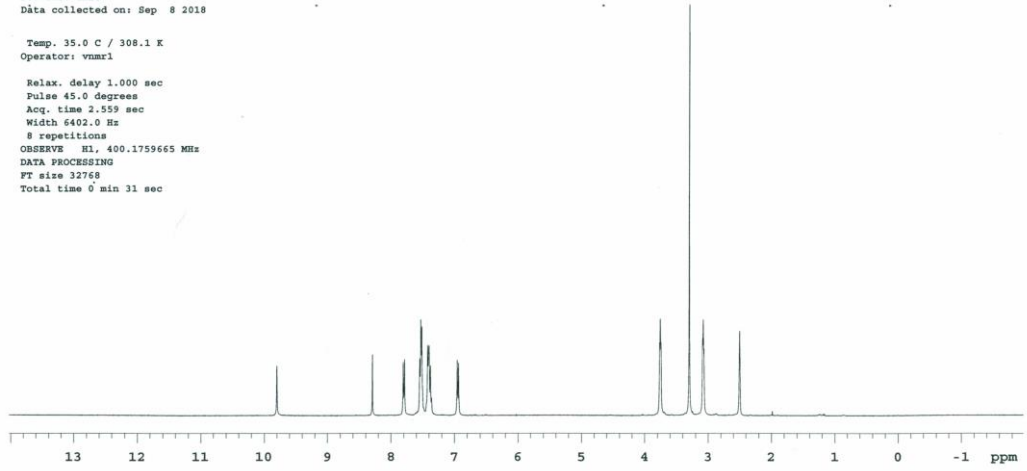
8 repetitions

OBSERVE H1, 400.1759665 MHz

DATA PROCESSING

FT size 32769

Total time 0 min 31 sec



Şekil 3.28. Bileşik 12'nin ^1H -NMR spektrumu

MP-11

Sample Name:
MP-11

Data Collected on:
mercury400-mercury400

Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data

Sample directory:
MP-11_20180908_01

FidFile: current

Pulse Sequence: CARBON (s2pul)

Solvent: dmsd

Data collected on: Sep 8 2018

Temp. 35.0 C / 308.1 K

Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 1.550 sec

Width 21141.6 Hz

1408 repetitions

OBSERVE C13, 100.6243939 MHz

DECOUPLE H1, 400.1779555 MHz

Power 38 dB

continuously on

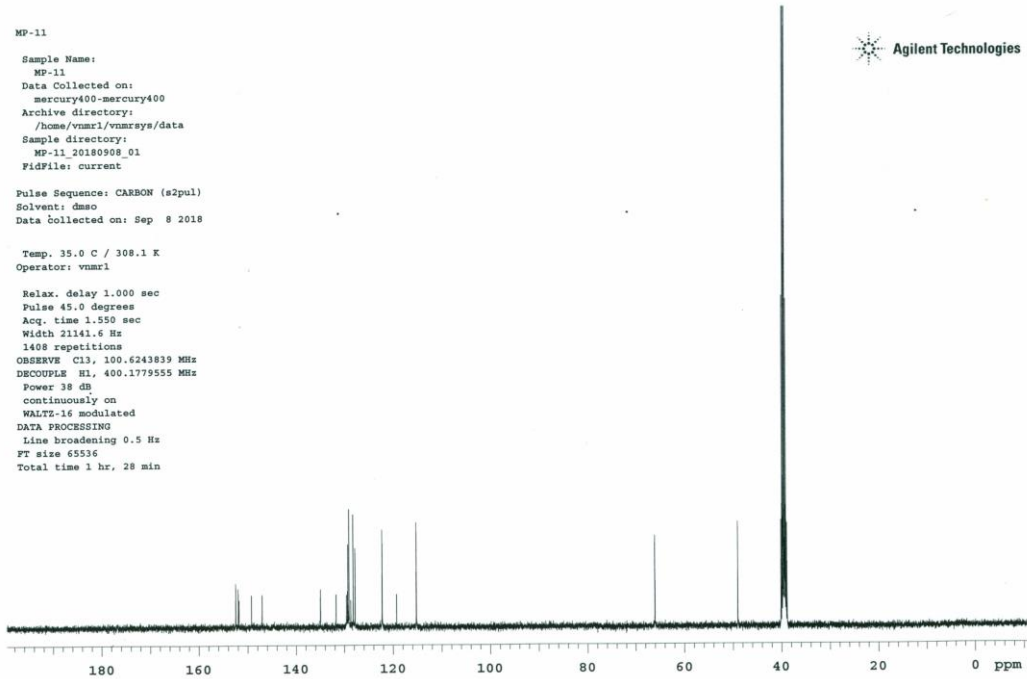
WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

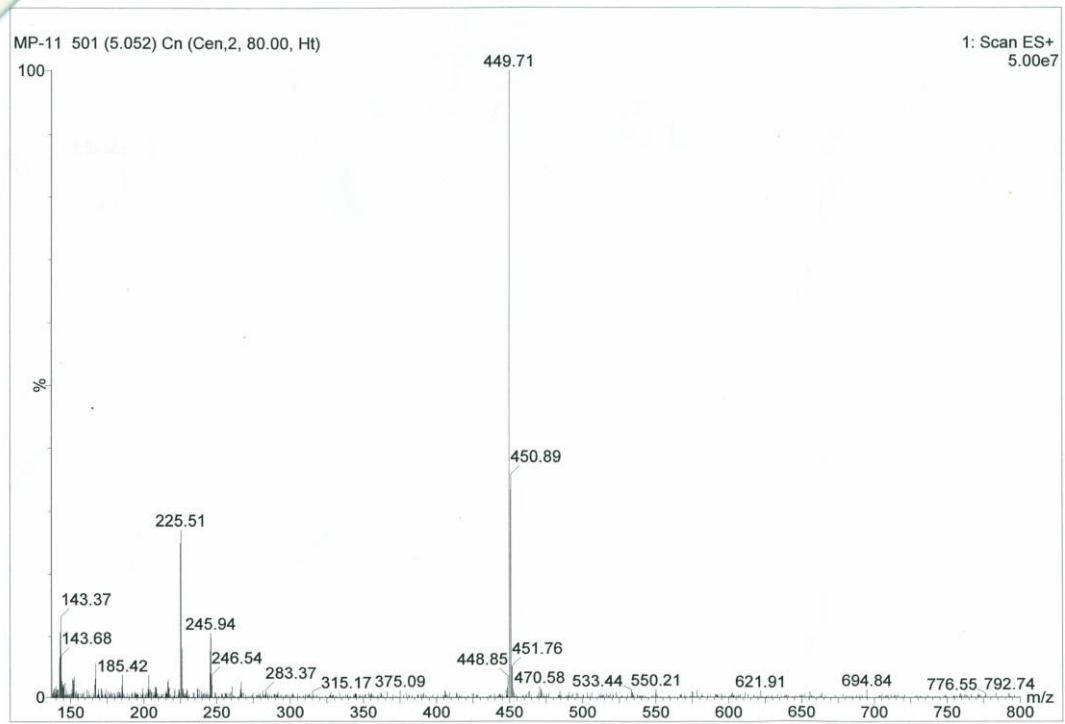
Line broadening 0.5 Hz

FT size 65536

Total time 1 hr. 28 min



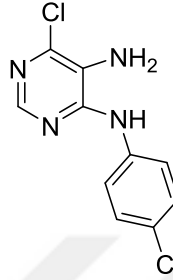
Şekil 3.29. Bileşik 12'nin ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 3.30. Bileşik 12'nin kütle spektrumu

3.2. 6,9-(4-Süstitüe difenil)-8-[5-(4-klorofenil)-1,2-oksazol/4-süstitüe fenil] pürin Türevlerinin Sentezi

3.2.1. 5-Amino-4-(4-klorofenil)amino-6-kloropirimidin (13)



0.35 g (2.14 mmol) 5-Amino-4,6-dikloropirimidin (2) ve 0.36 g (2.79 mmol) 4-kloroanilin'in 6 ml H₂O ve 1 ml absolü EtOH içindeki çözeltisi 0.0372 g (1.02 mmol) konsantre HCl varlığında 80 °C'de ısıtıldı. Çöken kristaller reaksiyon ortamından süzöldü, önce distile su ardından Hegzan ile yıkandı. % 70 Verimle 0.383 g madde elde edildi.

E.N: 218-220 °C (222 °C) (Greenberg ve ark., 1959).

¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆+D₂O) δppm

5.43 (br s, 2H), 7.34 (d, 2H), 7.72 (d, 2H), 7.85 (s, 1H), 8.67 (s, 1H)

Kütle Spektrumu: MS (ESI+) m/e 255.74 (%100) (M⁺), 257.61 (%65) (M+2), 259.77 (%12) (M+4).

MP-4

Sample Name:
MP-4

Data Collected on:
mercury400-mercury400

Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data

Sample directory:
MP-4_20180720_01

File: PROTON_02

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)

Solvent: dmsc

Data collected on: Jul 20 2018

Temp. 25.0 C / 298.1 K

Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 2.559 sec

Width 6402.0 Hz

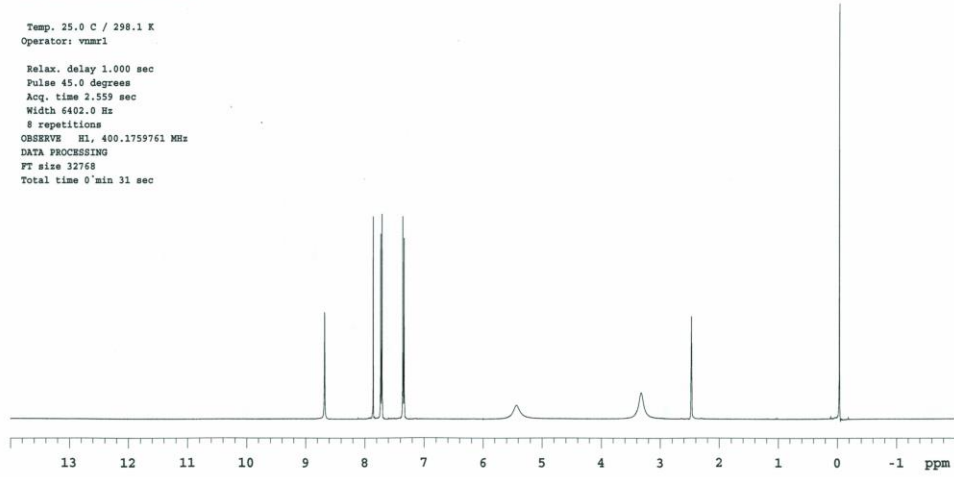
8 repetitions

OBSERVE H1, 400.1759761 MHz

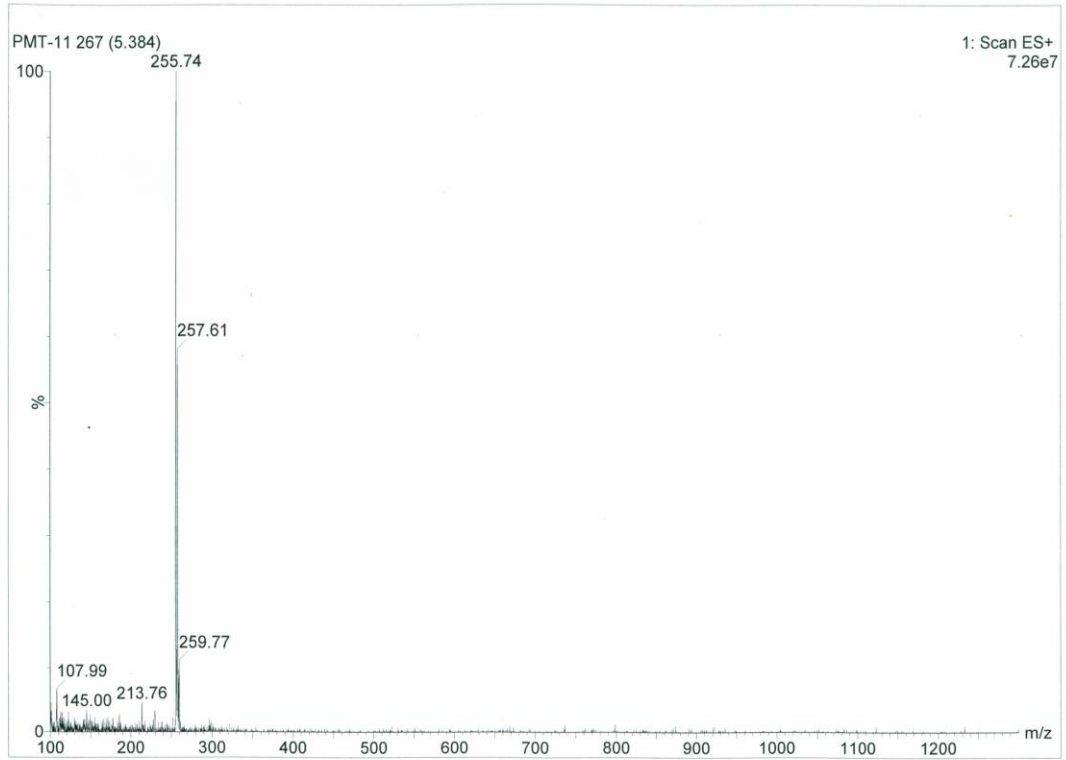
DATA PROCESSING

FT size 32768

Total time 0' min 31 sec

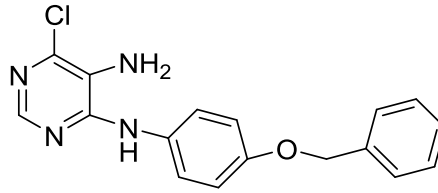


Şekil 3.31. Bileşik 13'ün ^1H -NMR spektrumu



Şekil 3.32. Bileşik 13'ün kütle spektrumu

3.2.2. 5-Amino-4-(4-benziloksifenil)amino-6-kloropirimidin (14)



0.32 g (1.96 mmol) 5-Amino-4,6-dikloropirimidin (**2**) ve 0.61 g (2.55 mmol) 4-benziloksianilin.HCl 'in 6 ml H₂O ve 1 ml absolü EtOH içindeki çözeltisi 0.036 g (0.99 mmol) konsantre HCl varlığında 80 °C'de ısıtıldı. Çöken kristaller reaksiyon ortamından süzüldü, önce distile su ardından Hegzan ile yıkandı. % 68 Verimle 0.436 g madde elde edildi.

E.N: 163-165 °C

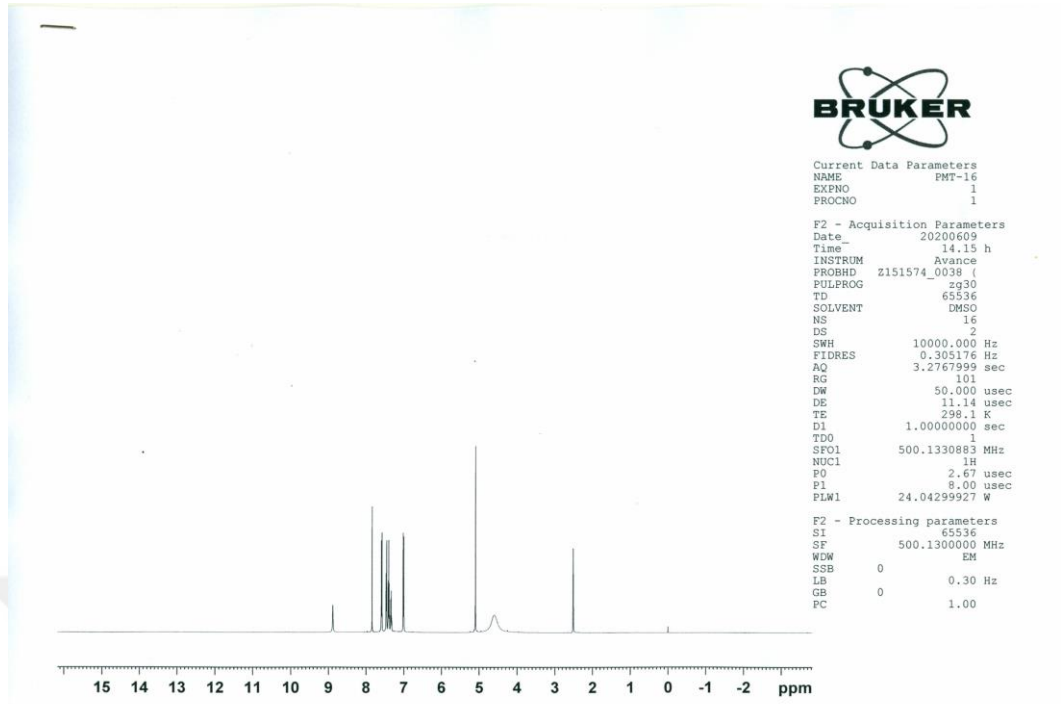
¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆+D₂O) δppm

4.59 (br s, 2H), 5.09 (s, 2H), 7.01 (d, 2H), 7.31-7.46 (m, 5H), 7.58 (d, 2H), 7.38 (s, 1H), 8.88 (s, 1H).

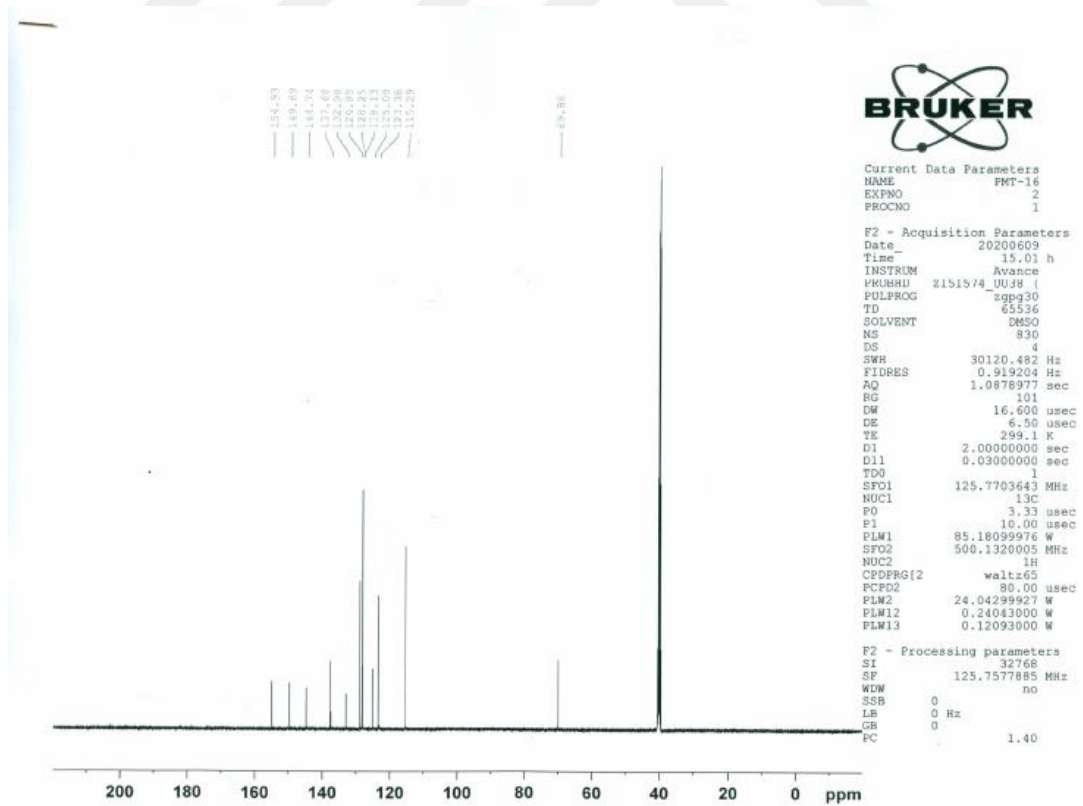
¹³C NMR Spektrumu (DMSO) δppm:

69.87 (OCH₂), 115.29, 123.37, 125.08, 128.12, 128.25, 128.88, 132.98, 137.40 (C-fenil), 137.68, 144.74, 149.68, 154.93 (C-pirimidin).

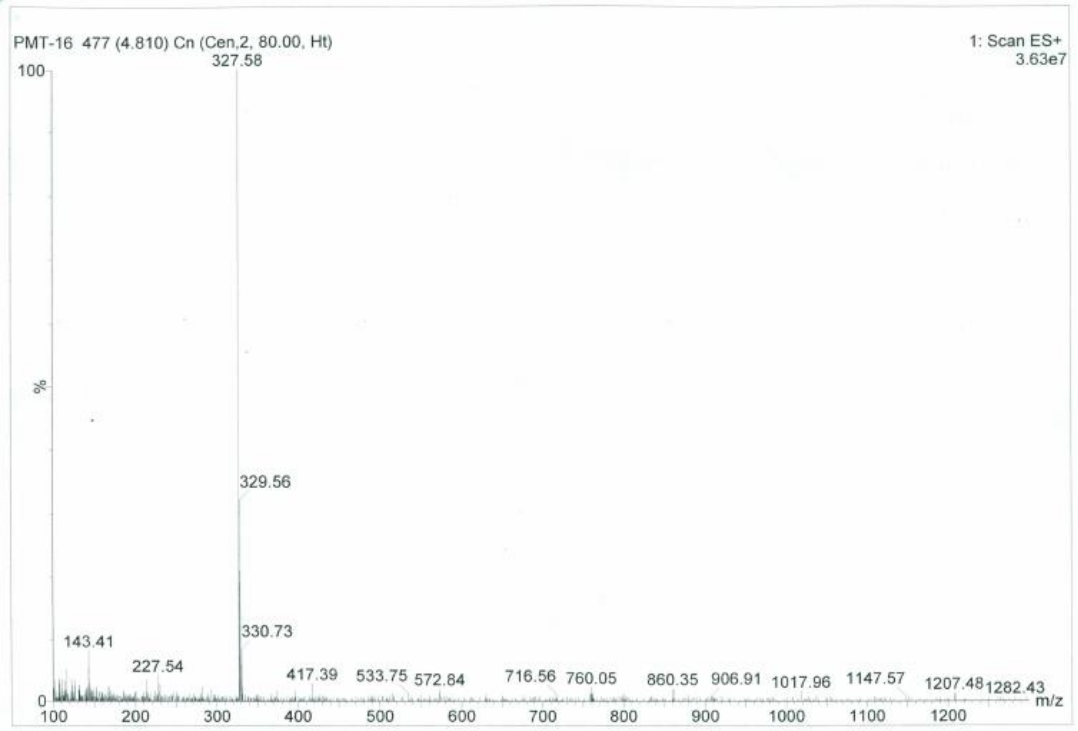
Kütle Spektrumu: MS (ESI+) m/e 327.58 (%100) (M+H), 329.56 (%33) (M+H+2).



Şekil 3.33. Bileşik 14'ün ^1H -NMR spektrumu

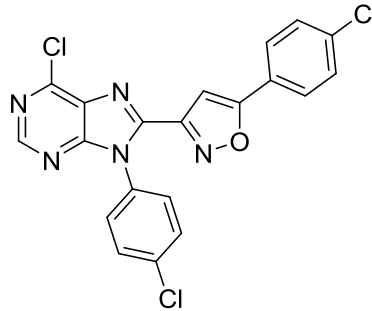


Şekil 3.34. Bileşik 14'ün ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 3.35. Bileşik 14'ün kütle spektrumu

3.2.3. 6-Kloro-8-[5-(4-klorofenil)izoksazol-3-il]-9-(4-klorofenil)-pürin (15)



0.15 g (0.59 mmol) 5-Amino-4-(4-klorofenil)amino-6-kloropirimidin (13) ve 0.02 g (0.118 mmol) *p*-TsOH'ın 10 ml DMF içindeki çözeltisine oda sıcaklığında 0.25 g (1.18 mmol) benzaldehit ilave edildi. Reaksiyon karışımı 80 °C'de 1 gece ısıtıldı. Reaksiyon ortamı oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Sulu Na₂CO₃ (0.03 mmol) ve 3 ml doymuş NaCl çözeltisi ilave edildikten sonra reaksiyon ortamı 3 kez 100 ml EtOAc ile ekstre edildi. Organik faz Na₂SO₄ üzerinden kurutuldu. Hegzan:Etil asetat (6:1) solvan sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. % 35 Verimle 0.90 g madde elde edildi.

E.N: 247-249 °C.

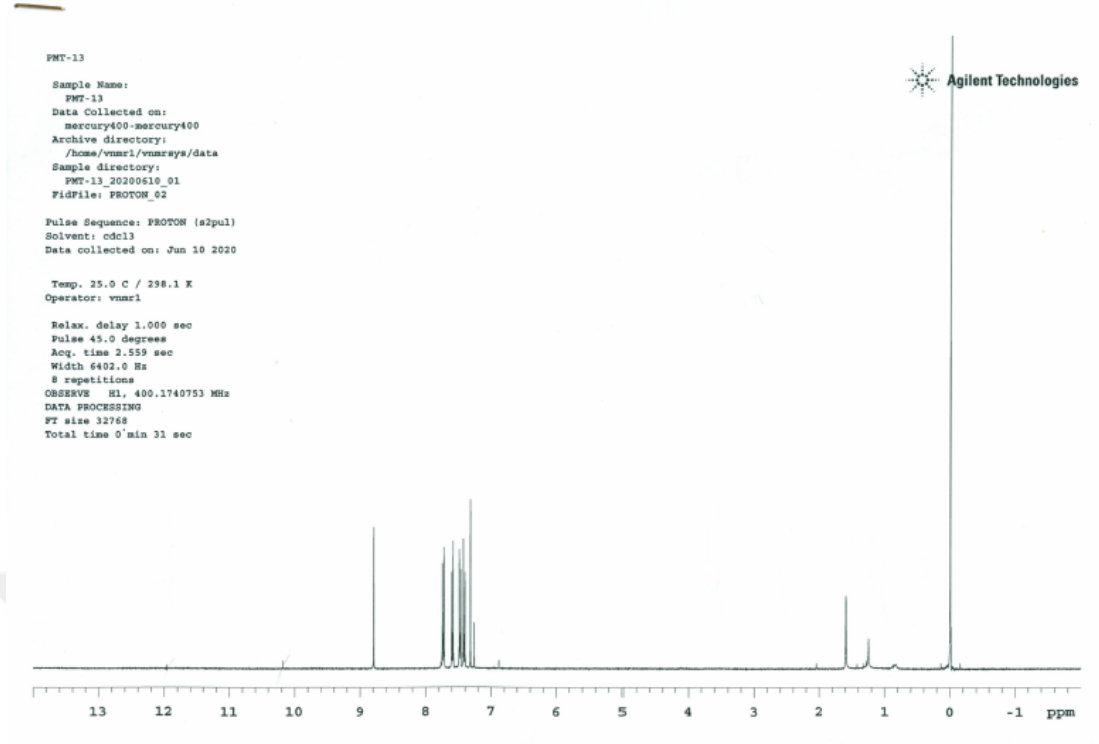
¹H-NMR Spektrumu (CDCl₃) δppm

7.31 (s, 1H), 7.41 (d, 2H, *J*_o = 8.8 Hz), 7.47 (d, 2H, *J*_o = 8.4 Hz), 7.59 (d, 2H, *J*_o = 8.4 Hz), 7.73 (d, 2H, *J*_o = 8.8 Hz), 8.79 (s, 1H).

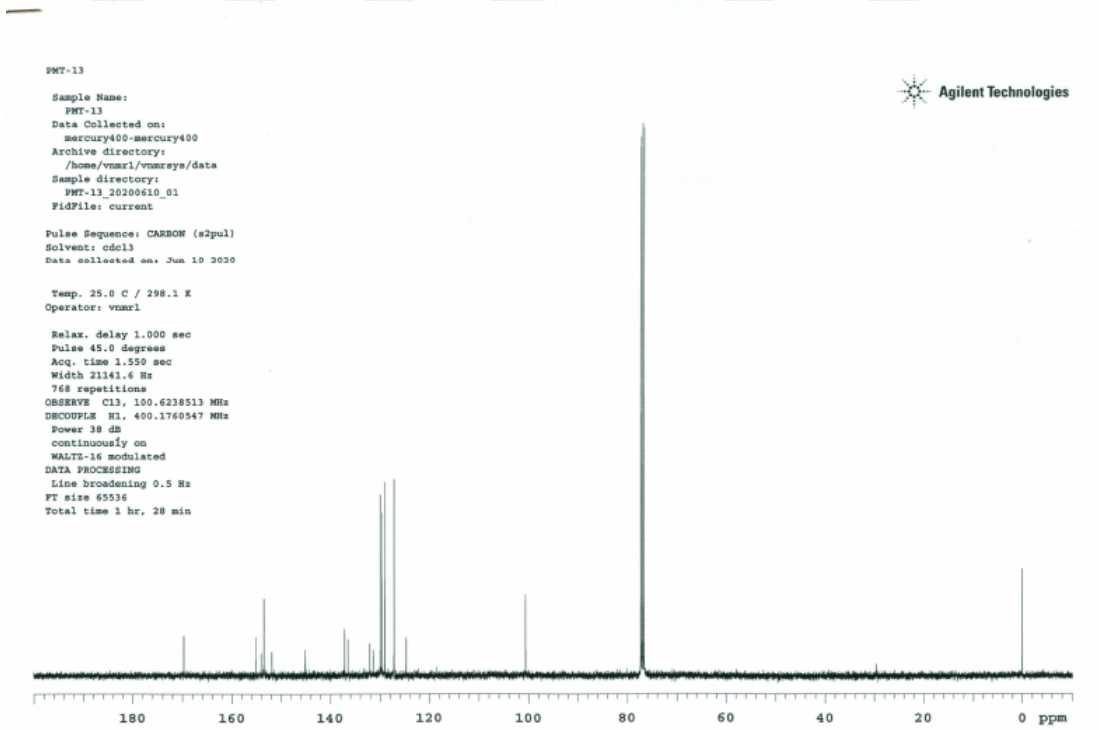
¹³C NMR Spektrumu (CDCl₃) δppm:

100.64 (C-izoksazol), 124.73, 127.22, 129.07, 129.60, 129.99, 131.38, 132.13, 136.52 (C-fenil), 137.17, 145.12, 151.91, 153.51, 154.09, 155.16 (C-pürin, C-izoksazol), 169.76 (C-izoksazol).

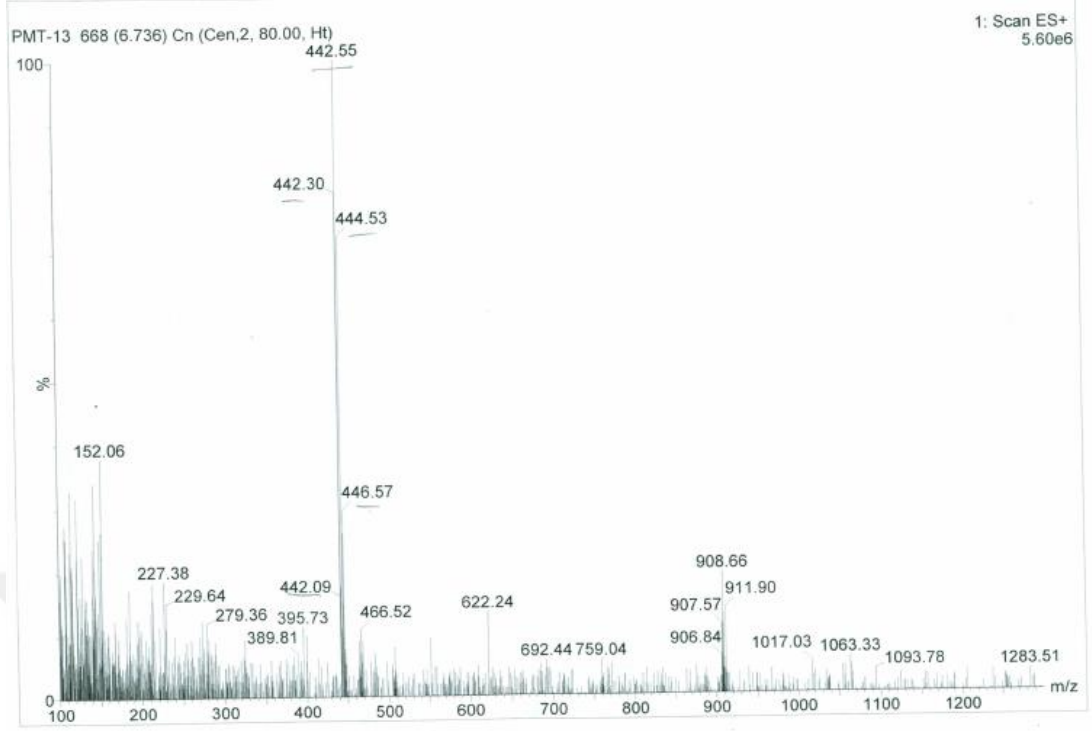
Kütle Spektrumu: MS (ESI+) *m/e* 442.55 (%100) (M⁺), 444.53 (%72) (M+2), 446.57 (%30) (M+4).



Şekil 3.36. Bileşik 15'in ^1H -NMR spektrumu

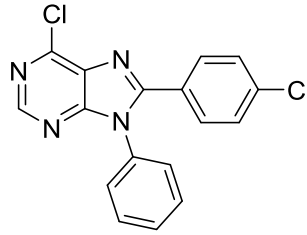


Şekil 3.37. Bileşik 15'in ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 3.38. Bileşik 15'in kütle spektrumu

3.2.4. 6-Kloro-8-(4-klorofenil)-9-fenil-pürin (16)



0.43 g (1.95 mmol) 5-Amino-4-(fenil)amino-6-kloropirimidin (**3**) ve 0.075 g (0.4 mmol) *p*-TsOH'ın 10 ml DMF içindeki çözeltisine oda sıcaklığında 0.55 g (3.9 mmol) 4-klorobenzaldehit ilave edildi. Reaksiyon karışımı 80 °C'de 1 gece ısıtıldı. Reaksiyon ortamı oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Sulu Na₂CO₃ (0.083 mmol) ve 9 ml doymuş NaCl çözeltisi ilave edildikten sonra reaksiyon ortamı 3 kez 100 ml EtOAc ile ekstre edildi. Organik faz Na₂SO₄ üzerinden kurutuldu. Hegzan:Etil asetat (5:1) solvan sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. % 27 Verimle 0.178 g madde elde edildi.

E.N: 208-210 °C.

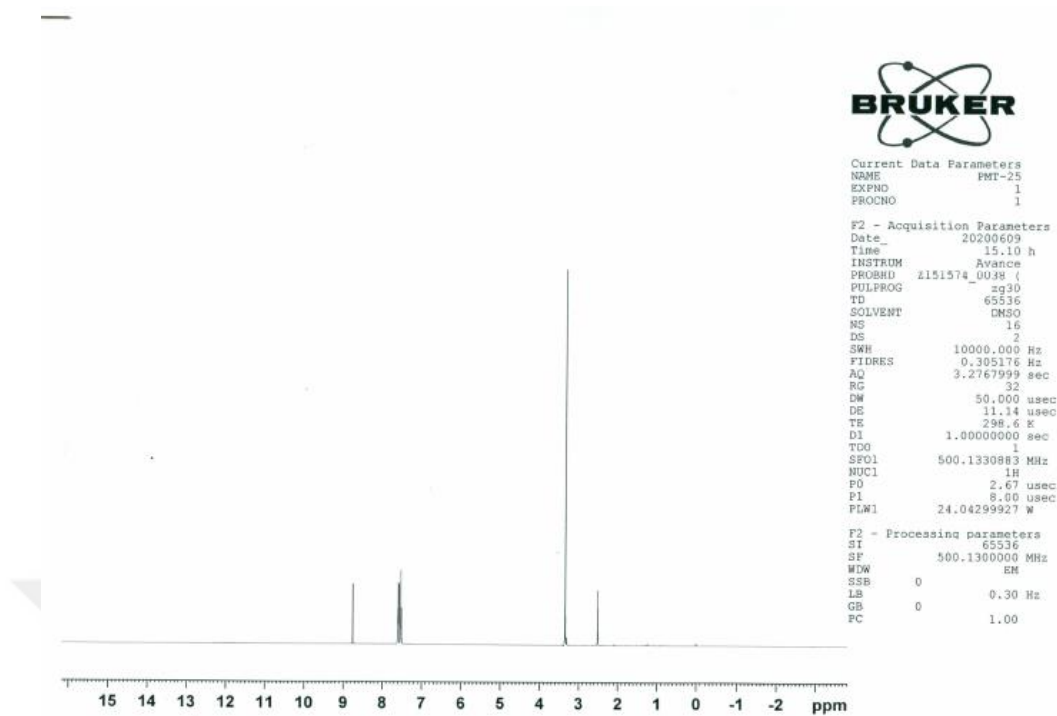
¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆+D₂O) δppm

7.50-7.59 (m, 9H), 8.75 (s, 1H).

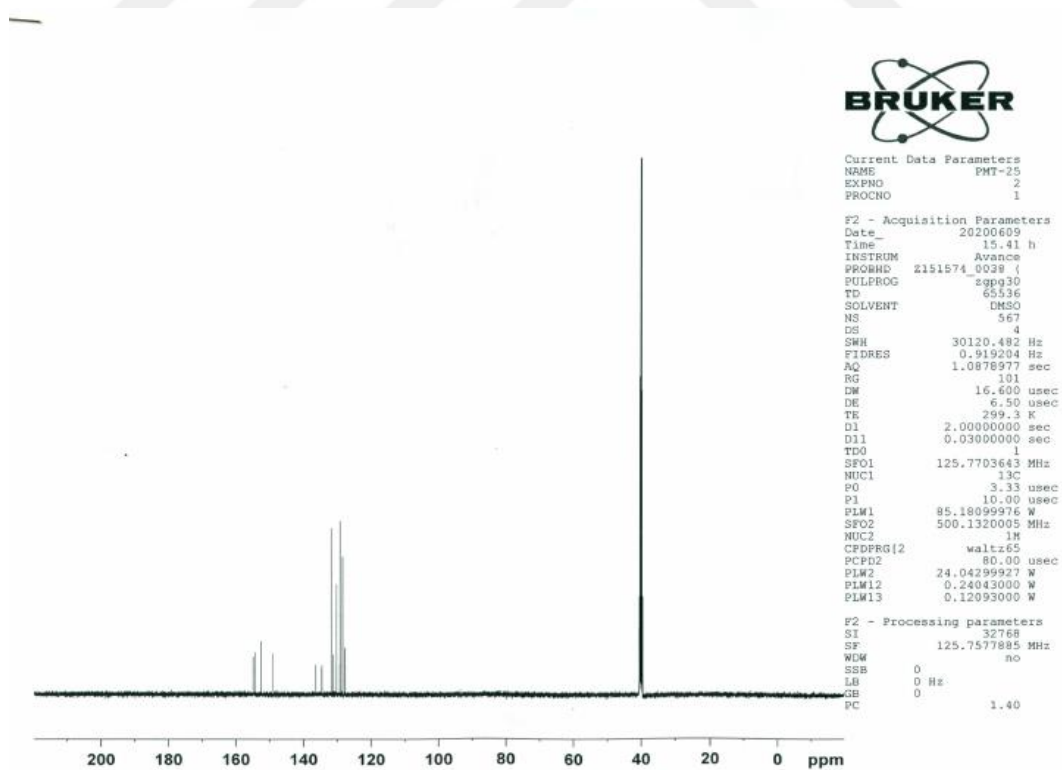
¹³C NMR Spektrumu (DMSO-d₆) δppm:

127.69, 128.41, 129.22, 130.18, 130.20, 131.16, 131.73, 134.57 (C-fenil), 136.35, 149.13, 152.51, 154.57, 154.86 (C-pürin).

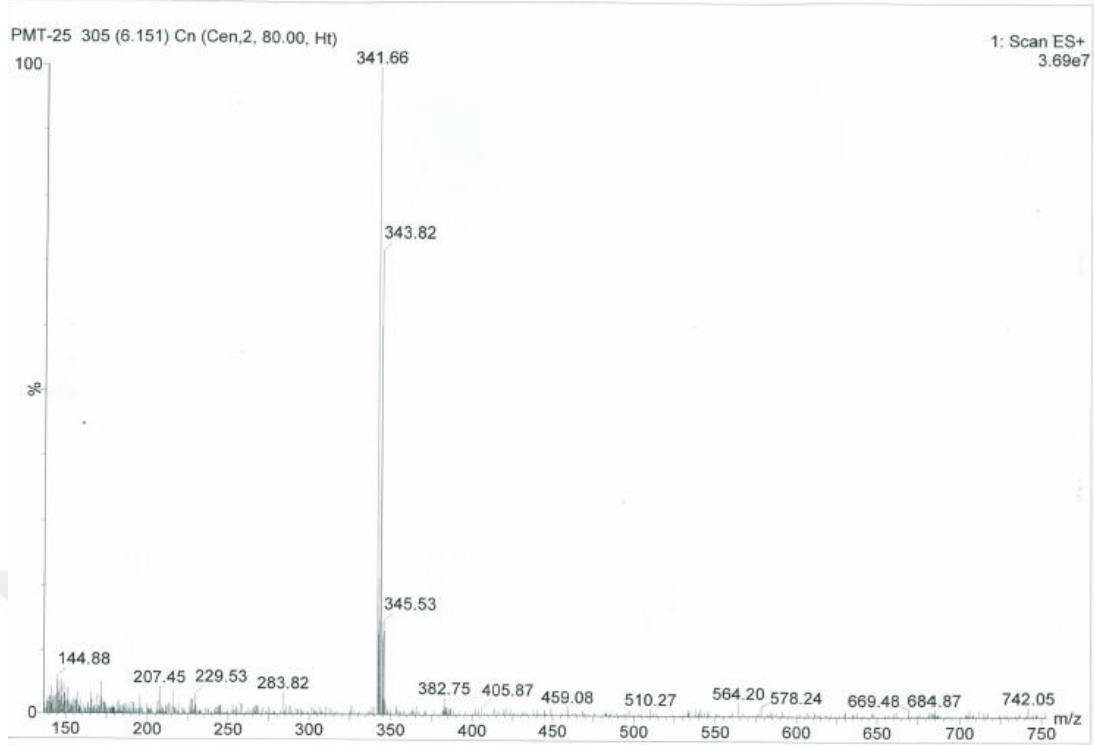
Kütle Spektrumu: MS (ESI+) m/e 341.66 (%100) (M⁺), 343.82 (%70) (M+2), 345.53 (%12) (M+4).



Şekil 3.39. Bileşik 16'nın ^1H -NMR spektrumu

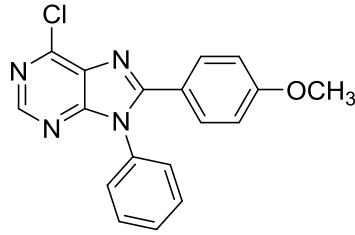


Şekil 3.40. Bileşik 16'nın ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 3.41. Bileşik 16'nın kütle spektrumu

3.2.5. 6-Kloro-8-(4-metoksifenil)-9-fenil-pürin (17)



0.43 g (1.95 mmol) 5-Amino-4-(fenil)amino-6-kloropirimidin (**3**) ve 0.075 g (0.4 mmol) *p*-TsOH'ın 10 ml DMF içindeki çözeltisine oda sıcaklığında 0.55 g (3.9 mmol) 4-klorobenzaldehit ilave edildi. Reaksiyon karışımı 80 °C'de 1 gece ısıtıldı. Reaksiyon ortamı oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Sulu Na₂CO₃ (0.083 mmol) ve 9 ml doymuş NaCl çözeltisi ilave edildikten sonra reaksiyon ortamı 3 kez 100 ml EtOAc ile ekstre edildi. Organik faz Na₂SO₄ üzerinden kurutuldu. Hegzan:Etil asetat (5:1) solvan sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. % 27 Verimle 0.178 g madde elde edildi.

E.N: 178-180 °C.

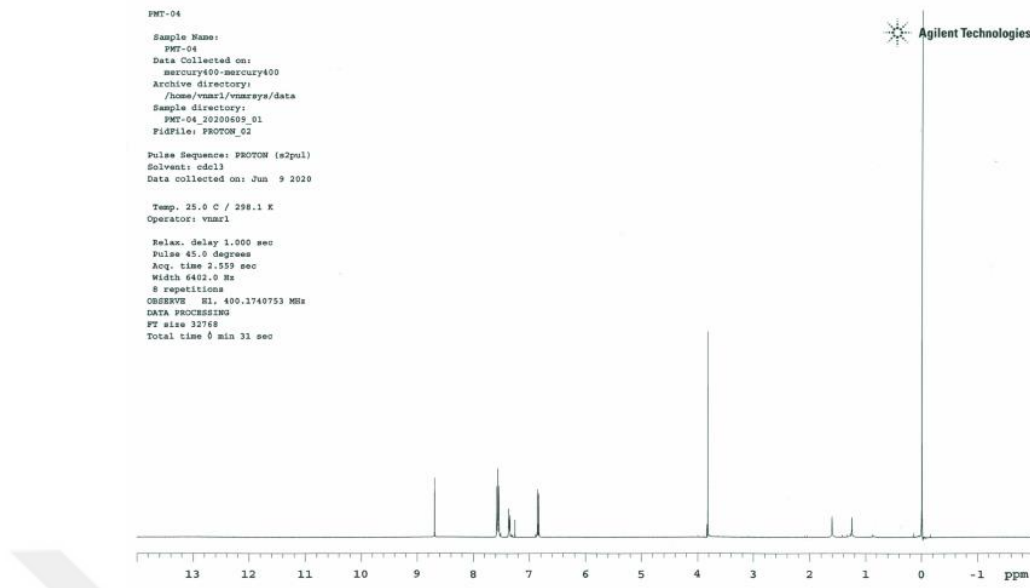
¹H-NMR Spektrumu (CDCl₃) δppm

3.81 (s, 3H), 6.84 (d, 2H, *J*_o = 8.8 Hz) 7.34-7.58 (m, 7H), 8.69 (s, 1H).

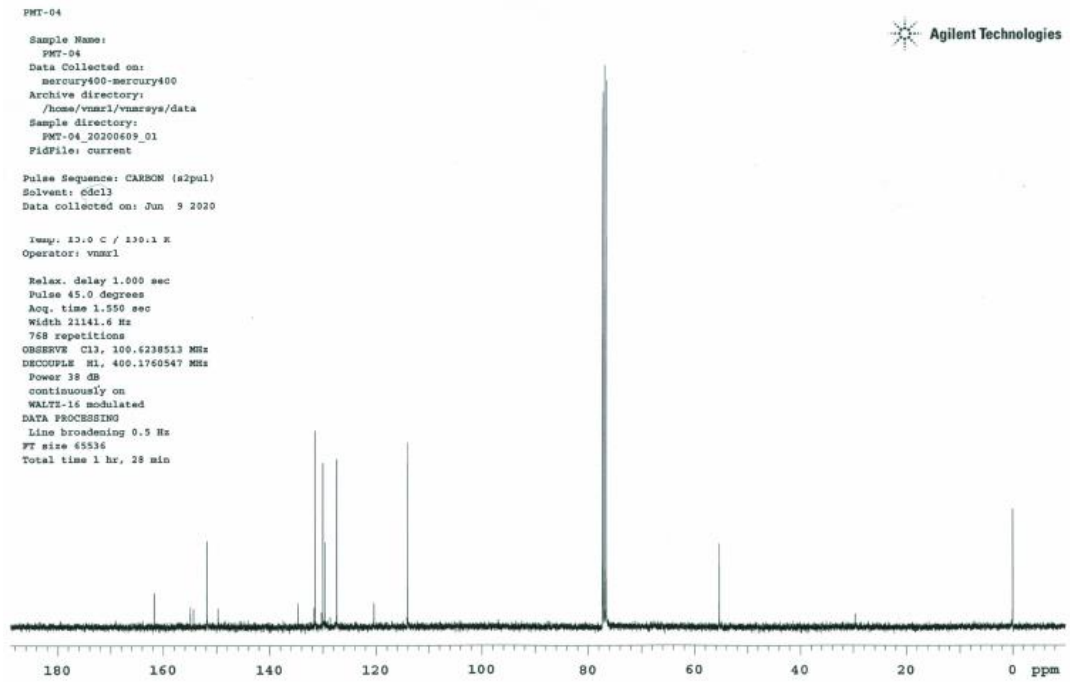
¹³C NMR Spektrumu (CDCl₃) δppm:

55.36 (OCH₃), 114.06, 120.40, 127.39, 129.56, 129.99, 130.23, 131.43, 131.65, (C-fenil), 134.64, 149.76, 151.82, 154.66, 161.73 (C-pürin).

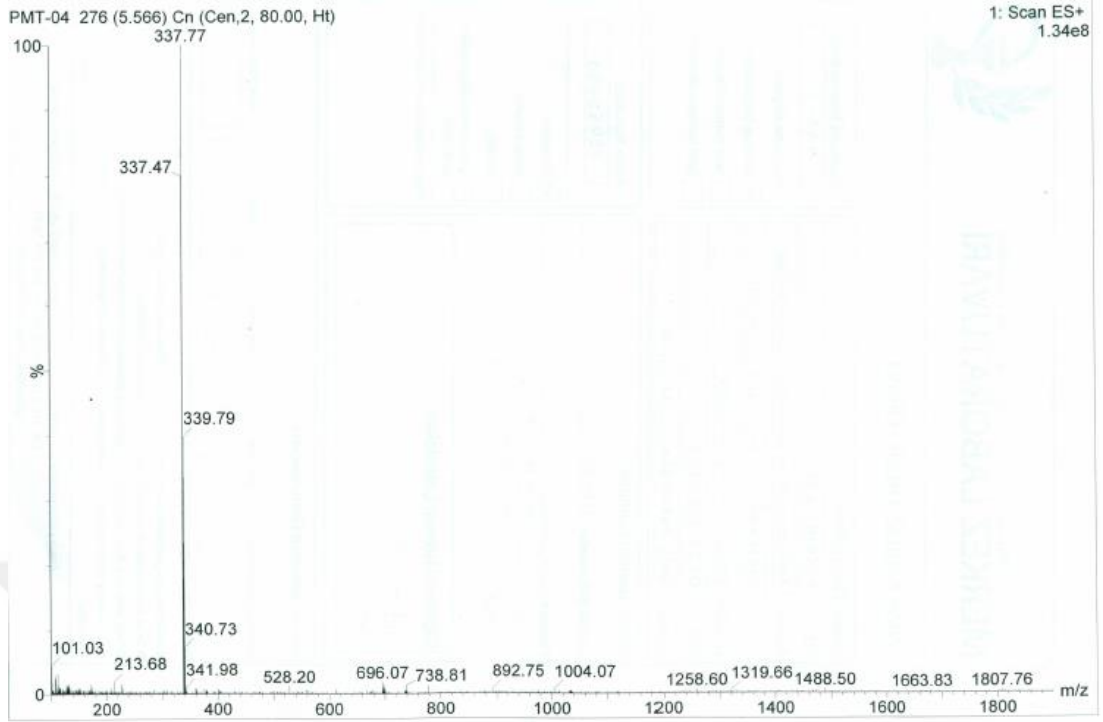
Kütle Spektrumu: MS (ESI+) m/e 337.77 (%100) (M+H), 339.79 (%38) (M+H+2).



Şekil 3.42. Bileşik 17'nin ^1H -NMR spektrumu

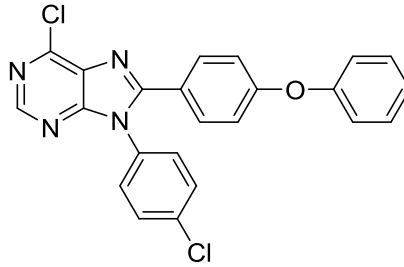


Şekil 3.43. Bileşik 17'nin ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 3.44. Bileşik 17'nin kütle spektrumu

3.2.6. 6-Kloro-8-(4-fenoksifenil)-9-(4-klorofenil)-pürin (18)



0.35 g (1.372 mmol) 5-Amino-4-(4-klorofenil)amino-6-kloropirimidin (13) ve 0.06 g (0.288 mmol) *p*-TsOH'nın 10 ml DMF içindeki çözeltisine oda sıcaklığında 0.55 g (2.75 mmol) 4-fenoksibenzaldehyt ilave edildi. Reaksiyon karışımı 80 °C'de 1 gece ısıtıldı. Reaksiyon ortamı oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Sulu Na₂CO₃ (0.06 mmol) ve 6 ml doymuş NaCl çözeltisi ilave edildikten sonra reaksiyon ortamı 3 kez 100 ml EtOAc ile ekstre edildi. Organik faz Na₂SO₄ üzerinden kurutuldu. Hegzan:Etil asetat (3:1) solvan sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. % 37 Verimle 0.21 g madde elde edildi.

E.N: 213-215 °C.

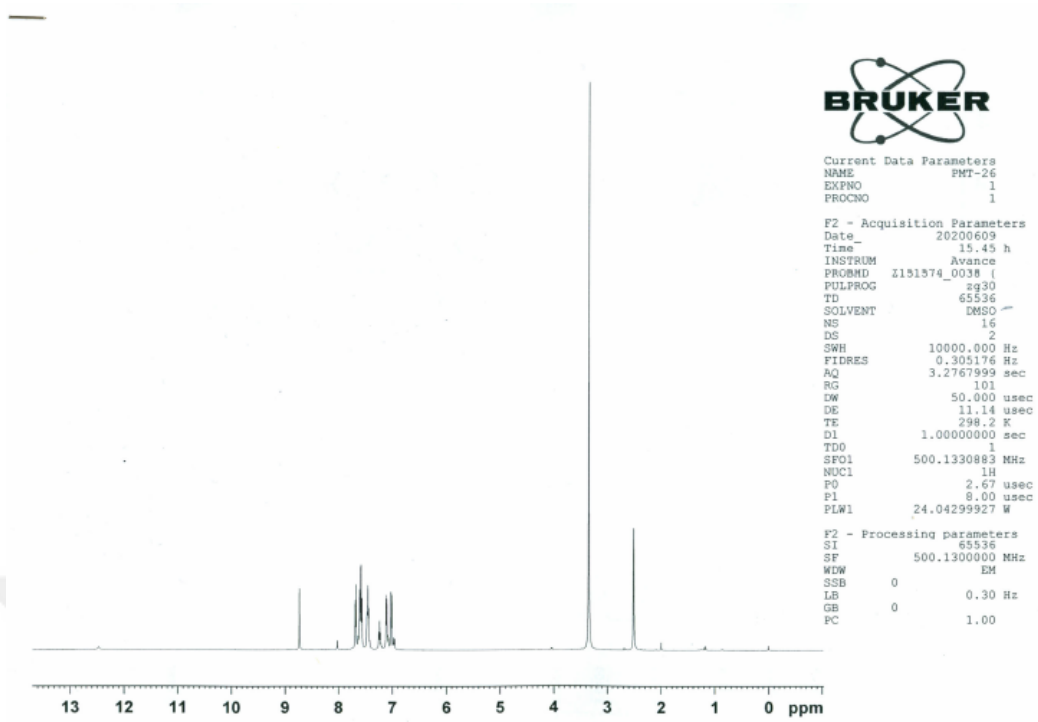
¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆+D₂O) δppm

7.01 (d, 2H, *J*_o = 8.6 Hz), 7.10 (d, 2H, *J*_o = 7.9 Hz), 7.23 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz), 7.41-7.61 (m, 6H), 7.68 (d, 2H, *J*_o = 8.5 Hz), 8.73 (s, 1H).

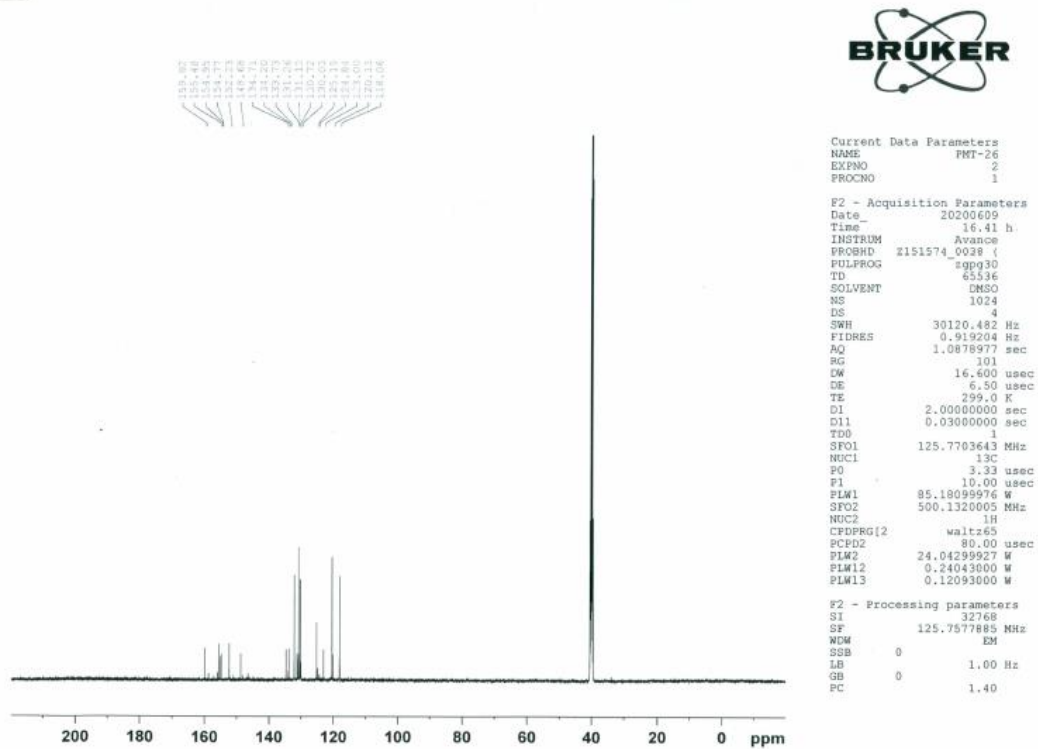
¹³C NMR Spektrumu (DMSO) δppm:

118.06, 120.12, 122.99, 124.83, 125.14, 130.03, 130.71, 131.11, 131.25, 133.73, 134.20, 134.70 (C-fenil), 148.67, 152.23, 154.86, 155.48, 159.91 (C-pürin).

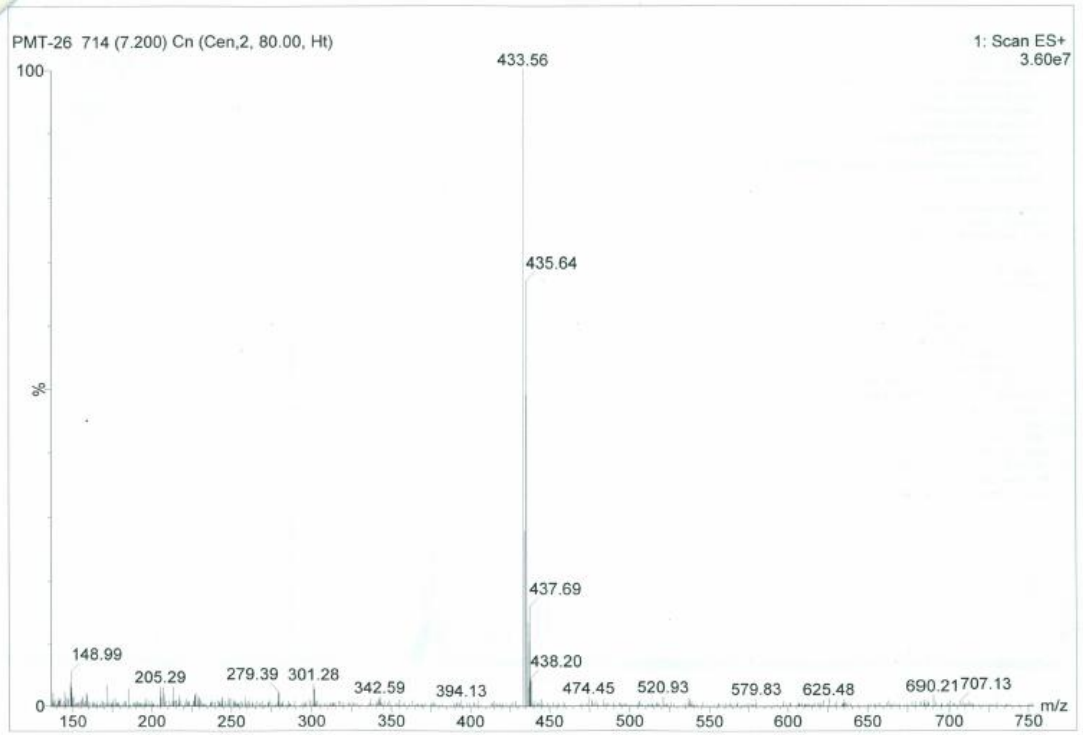
Kütle Spektrumu: MS (ESI+) *m/e* 433.56 (%100) (M⁺), 435.64 (%68) (M+2), 437.69 (%15) (M+4).



Şekil 3.45. Bileşik 18'nin ^1H -NMR spektrumu

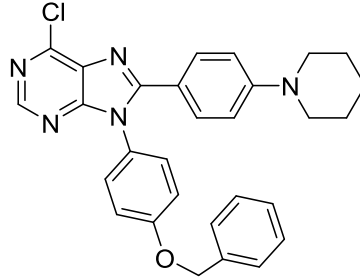


Şekil 3.46. Bileşik 18'nin ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 3.47. Bileşik 18'nin kütle spektrumu

3.2.7. 6-Kloro-8-[(4-piperidin-1-il)fenil]-9-(4-benziloksifenil)-pürin (19)



0.205 g (0.63 mmol) 5-Amino-4-(4-benziloksifenil)amino-6-kloropirimidin (**14**) ve 0.024 g (0.126 mmol) *p*-TsOH'ın 10 ml DMF içindeki çözeltisine oda sıcaklığında 0.24 g (1.26 mmol) benzaldehit ilave edildi. Reaksiyon karışımı 80 °C'de 1 gece ısıtıldı. Reaksiyon ortamı oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Sulu Na₂CO₃ (0.027 mmol) ve 3 ml doymuş NaCl çözeltisi ilave edildikten sonra reaksiyon ortamı 3 kez 100 ml EtOAc ile ekstre edildi. Organik faz Na₂SO₄ üzerinden kurutuldu. Hegzan:Etil asetat (3:1) solvan sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. % 44 Verimle 0.138 g madde elde edildi.

E.N: 156-158 °C.

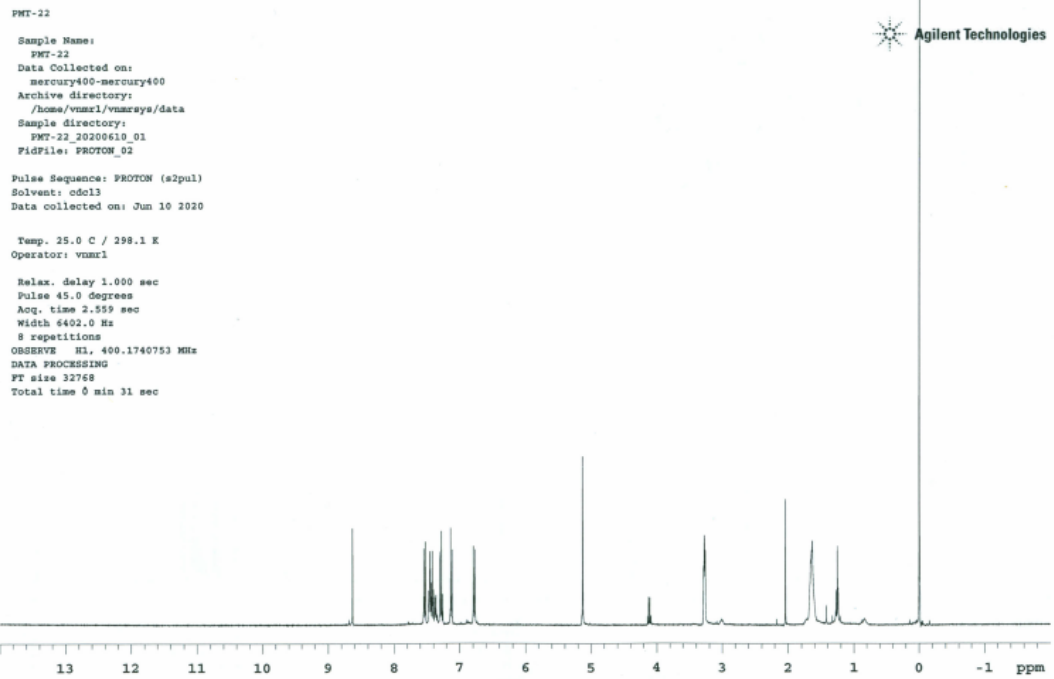
¹H-NMR Spektrumu (CDCl₃) δppm

1.58 - 1.70 (m, 6H), 3.27 (t, 4H, *J* = 5.6 Hz), 5.12 (s, 2H), 6.78 (d, 2H, *J*_o = 9.2 Hz), 7.12 (d, 2H, *J*_o = 9.2 Hz), 7.27 (t, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.34-7.47 (m, 5H), 7.53 (d, 2H, *J*_o = 9.2 Hz), 8.63 (s, 1H).

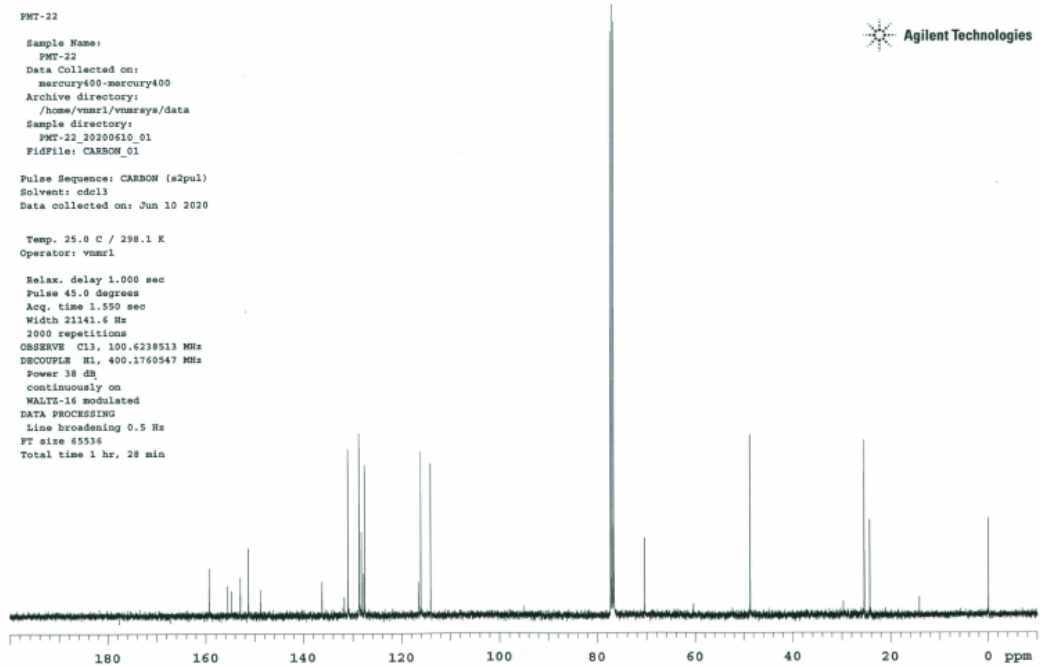
¹³C NMR Spektrumu (CDCl₃) δppm:

24.27, 25.39, 48.69 (C-piperidin), 70.42 (OCH₂), 114.07, 116.05, 116.53, 127.56, 127.82, 128.27, 128.68, 128.70, 130.97, 131.72, 136.24, 148.82 (C-fenil), 151.32, 152.93, 154.81, 155.65, 159.34 (C-pürin).

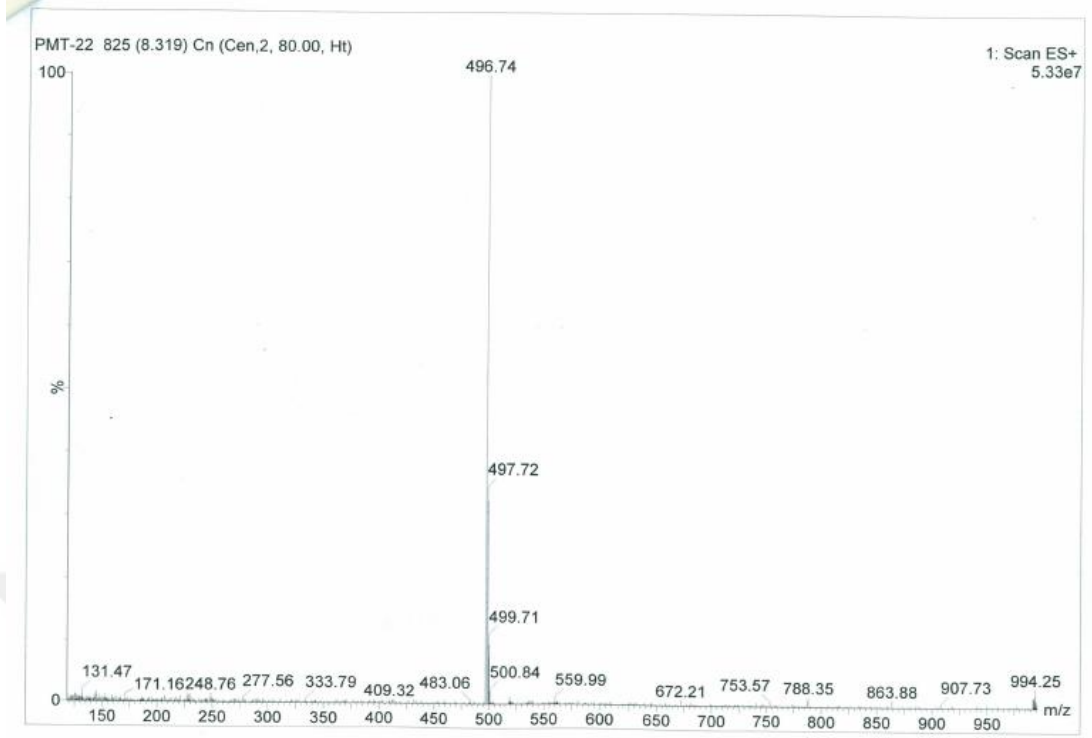
Kütle Spektrumu: MS (ESI⁺) *m/e* 496.74 (%100) (M⁺), 497.72 (%38) (M+2).



Şekil 3.48. Bileşik 19'nin ^1H -NMR spektrumu



Şekil 3.49. Bileşik 19'nin ^{13}C -NMR spektrumu

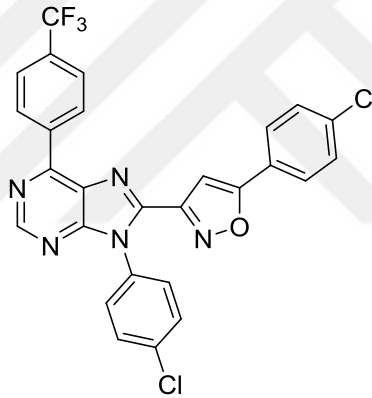


Şekil 3.50. Bileşik 19'nin kütle spektrumu

3.2.8. 6-[4-(süstitüe)fenil]-8,9-(4-süstitüe difenil)pürin (20-24) Genel Sentez Yöntemi

3 mmol 6-Kloro 8,9-(4-süstitüe difenil)pürin üzerine 6 mmol K_2CO_3 , 6 mmol 4-süstitüe fenilboronik asit ve 0.15 mmol $Pd(PPh_3)_4$ ve 20 ml tolüen ilave edilerek $100^\circ C$ 'de geri çeviren soğutucu altında 20-46 saat ısıtıldı. Solvan evaporasyonundan sonra elde edilen ürün Etil asetat:hegzan (1:10)/(1:5)/(1:3) kolon kromatografisi ile saflaştırıldı.

3.2.8.1. 6-[4-(triflorometil)fenil]-8-[5-(4-klorofenil)izoksazol-3-il]-9-(4-klorofenil)-9H-pürin (20)



Genel sentez yöntemine göre 0,08 g başlangıç maddesinden hareketle % 10 Verimle 0.01 g madde elde edildi.

E.N: 303-305 $^\circ C$.

Elementel Analiz: $C_{27}H_{14}Cl_2F_3N_5O.0,26CH_3COOC_2H_5.1,7C_6H_{14}$

	%C	%H	%N
Hesaplanan:	63.70	5.57	9.71
Analiz:	64.07	5.21	9.31

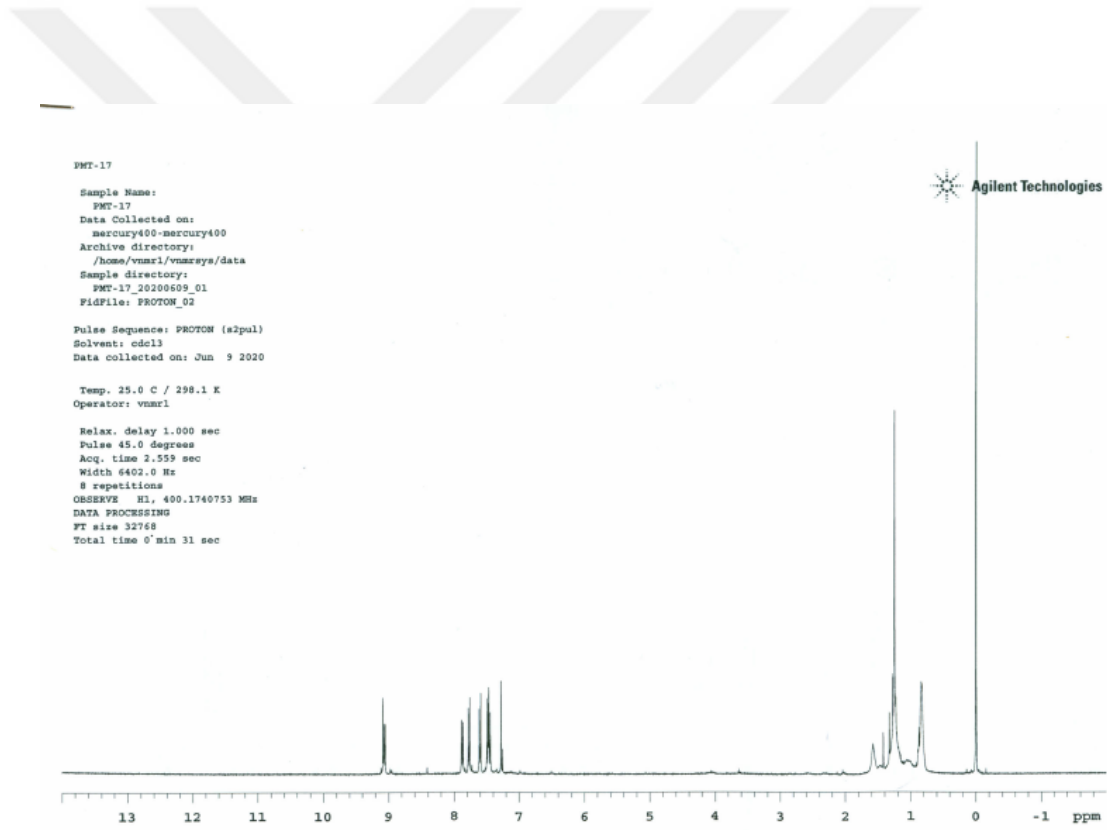
¹H-NMR Spektrumu (CDCl₃) δppm

7.28 (s, 1H), 7.44 – 7.49 (m, 4H), 7.60 (d, 2H, $J_o = 8.4$ Hz), 7.77 (d, 2H, $J_o = 8.4$ Hz), 7.87 (d, 2H, $J_o = 8.4$ Hz), 9.06 (d, 2H, $J_o = 8.4$ Hz), 9.08 (s, 1H).

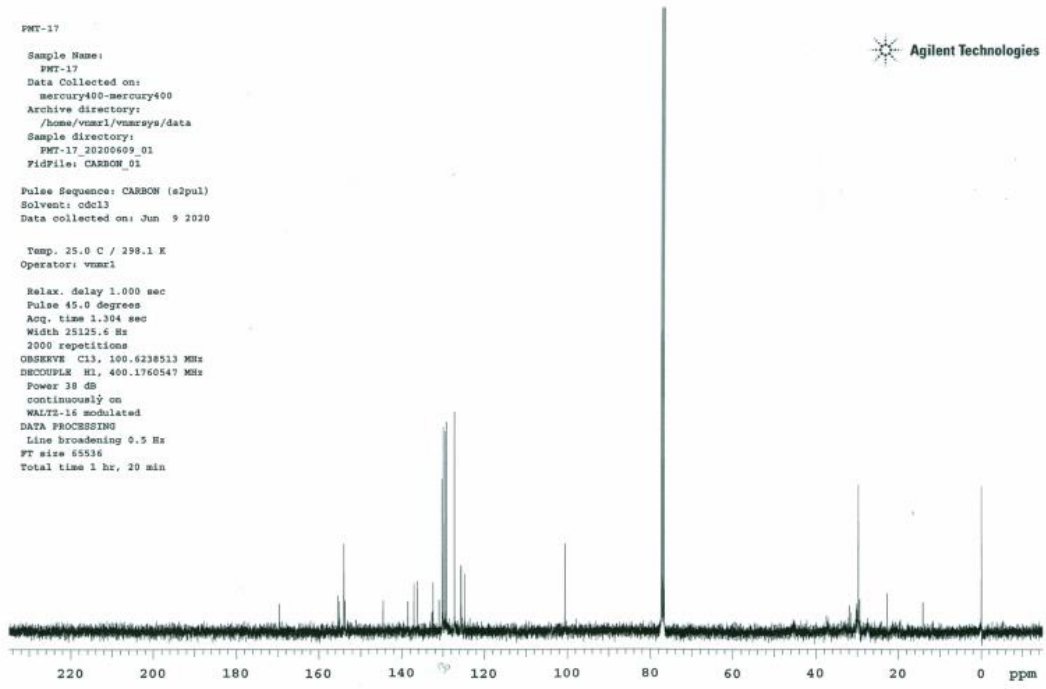
¹³C NMR Spektrumu (CDCl₃) δppm:

100.59 (C-izoksazol), 124.82, 125.62 (q, CF₃), 127.23, 129.22, 129.57, 129.95, 130.29, 130.95, 132.41, 132.60, 136.25, 137.13 (C-fenil), 138.60 144.58, 153.80, 154.02, 155.17, 155.52 (C-pürin, C-izoksazol), 169.62 (C-izoksazol).

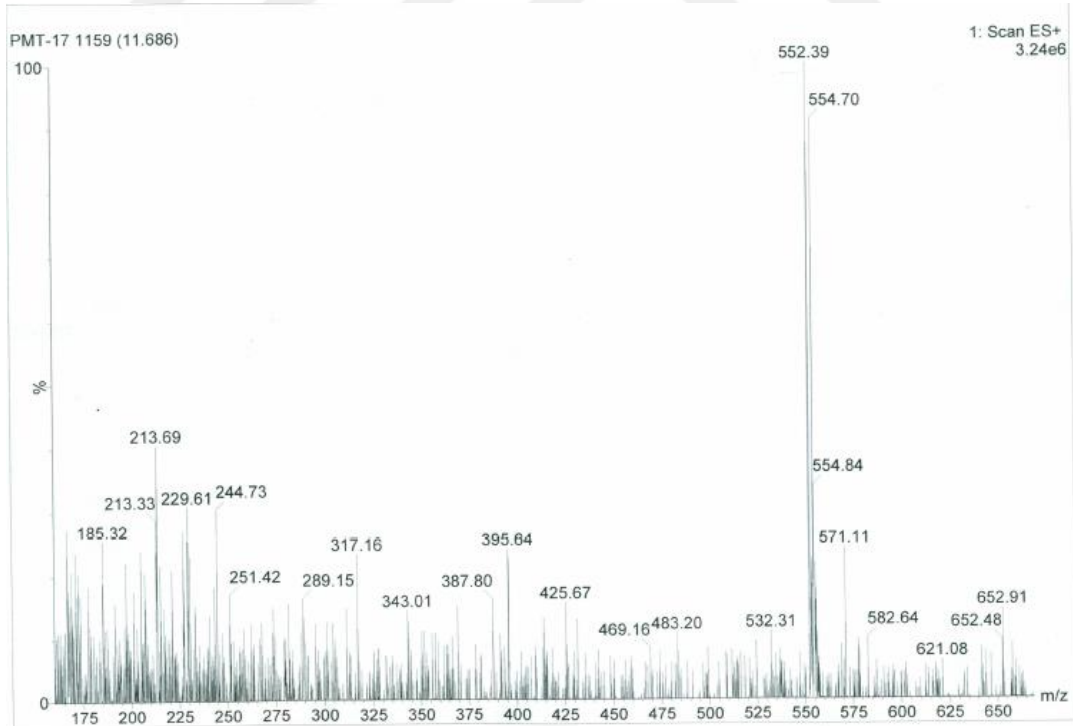
Kütle Spektrumu: MS (ESI+) m/e 552.39 (%100) (M⁺), 554.84 (%38) (M+2).



Şekil 3.51. Bileşik 20'nin ¹H-NMR spektrumu

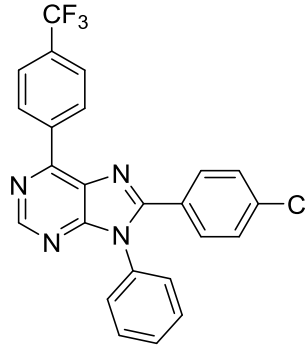


Şekil 3.52. Bileşik 20'nin ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 3.53. Bileşik 20'nin kütle spektrumu

3.2.8.2. 6-[4-(triflorometil)fenil]-8-(4-klorofenil)-9-fenil-9H-pürin (21)



Genel sentez yöntemine göre 0,15 g başlangıç maddesinden hareketle % 18 Verimle 0.036 g madde elde edildi.

E.N: 228-230 °C.

Elementel Analiz: C₂₄H₁₄ClF₃N₄

	%C	%H	%N
Hesaplanan:	63.98	3.13	12.44
Analiz:	64.38	3.40	12.34

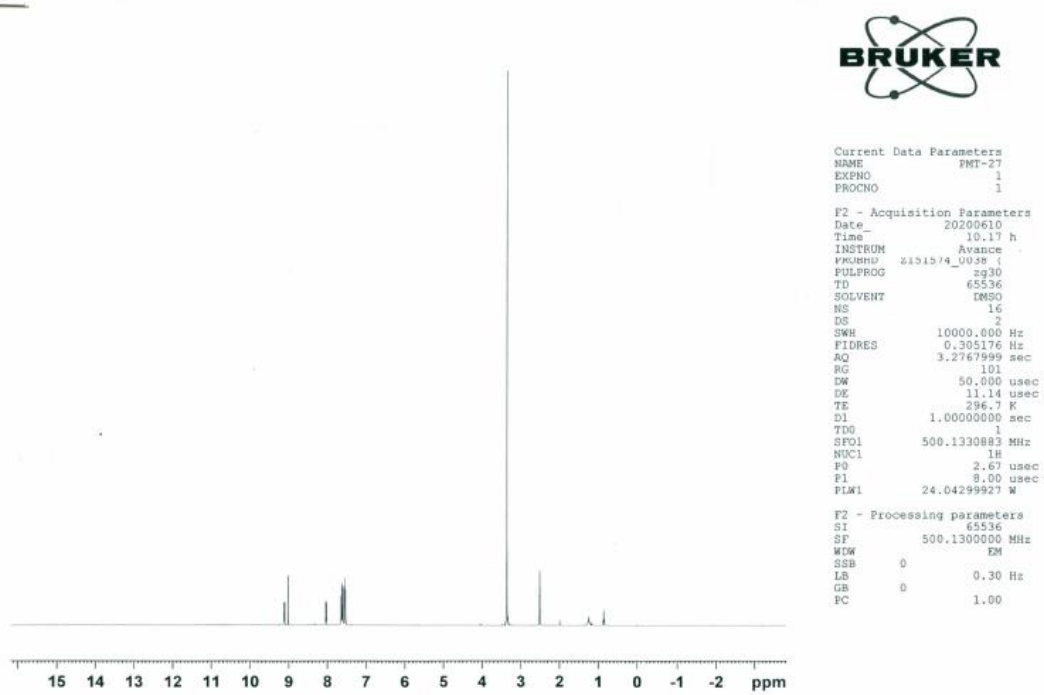
¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆+D₂O) δppm

7.52 - 7.64 (m, 9H), 8.03 (d, 2H, *J*_o = 8.3 Hz), 9.01 (s, 1H), 9.11 (d, 2H, *J*_o = 8.2 Hz)

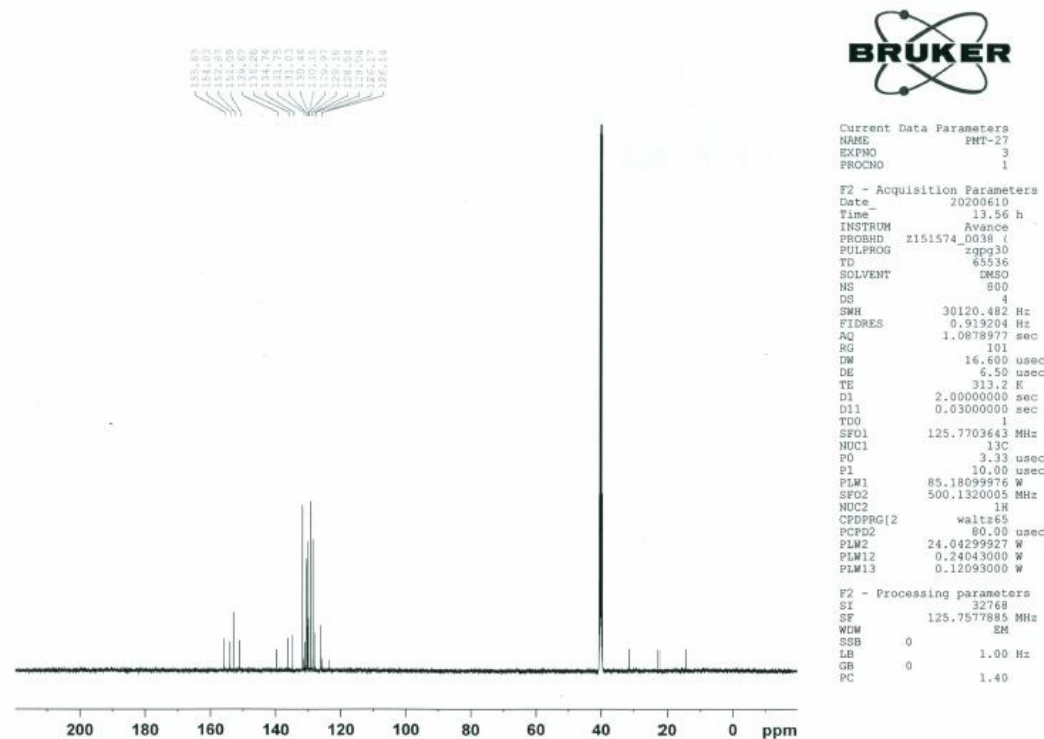
¹³C NMR Spektrumu (DMSO-d₆) δppm:

126.14 (q, CF₃), 128.04, 128.53, 129.18, 129.97, 130.14, 130.46, 131.03, 131.75, 134.76, 136.27 (C-fenil), 139.67, 151.09, 152.87, 154.03, 155.83 (C-pürin).

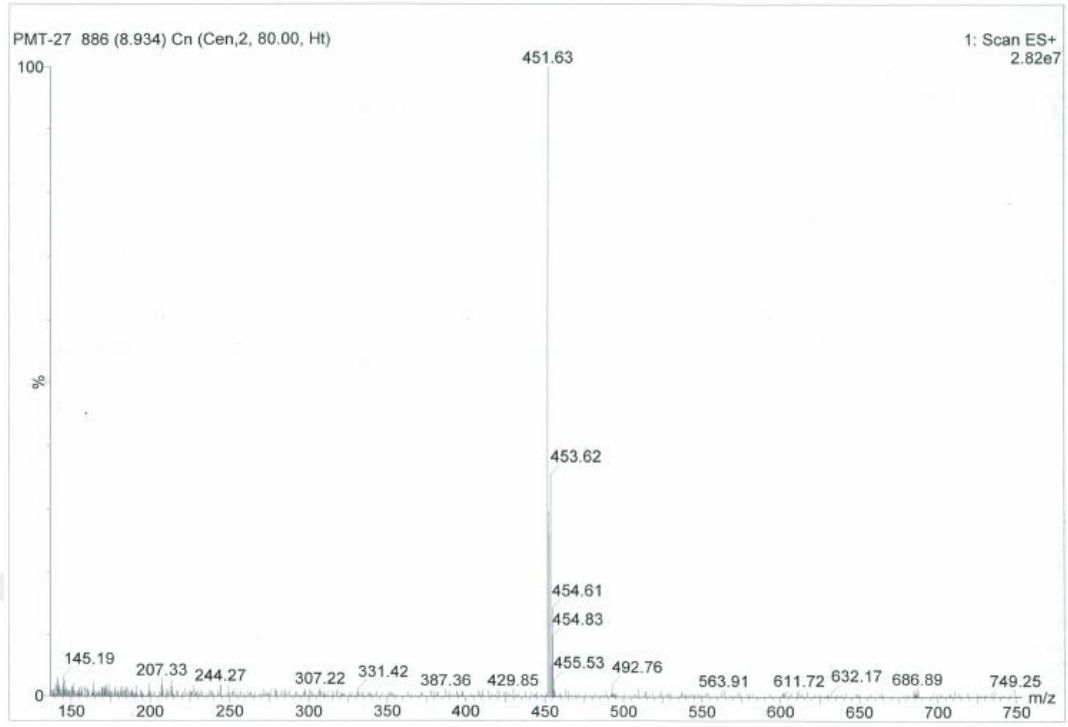
Kütle Spektrumu: MS (ESI⁺) m/e 451.63 (%100) (M+H), 453.62 (538) (M+H+2).



Şekil 3.54. Bileşik 21'in ^1H -NMR spektrumu

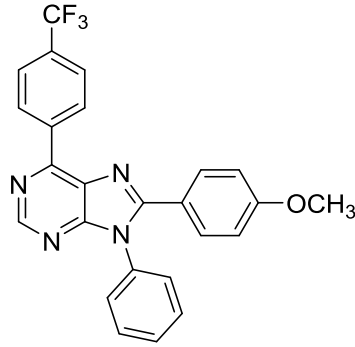


Şekil 3.55. Bileşik 21'in ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 3.56. Bileşik 21'in kütle spektrumu

3.2.8.3. 6-[4-(triflorometil)fenil]-8-(4-metoksifenil)-9-fenil-9H-pürin (22)



Genel sentez yöntemine göre 0,055 g başlangıç maddesinden hareketle % 51 Verimle 0.037 g madde elde edildi.

E.N: 223-225 °C.

Elementel Analiz: C₂₅H₁₇F₃N₄O.0,3C₆H₁₄.0,7CH₃COOC₂H₅

	%C	%H	%N
Hesaplanan:	66.56	5.06	10.49
Analiz:	66.72	5.03	10.57

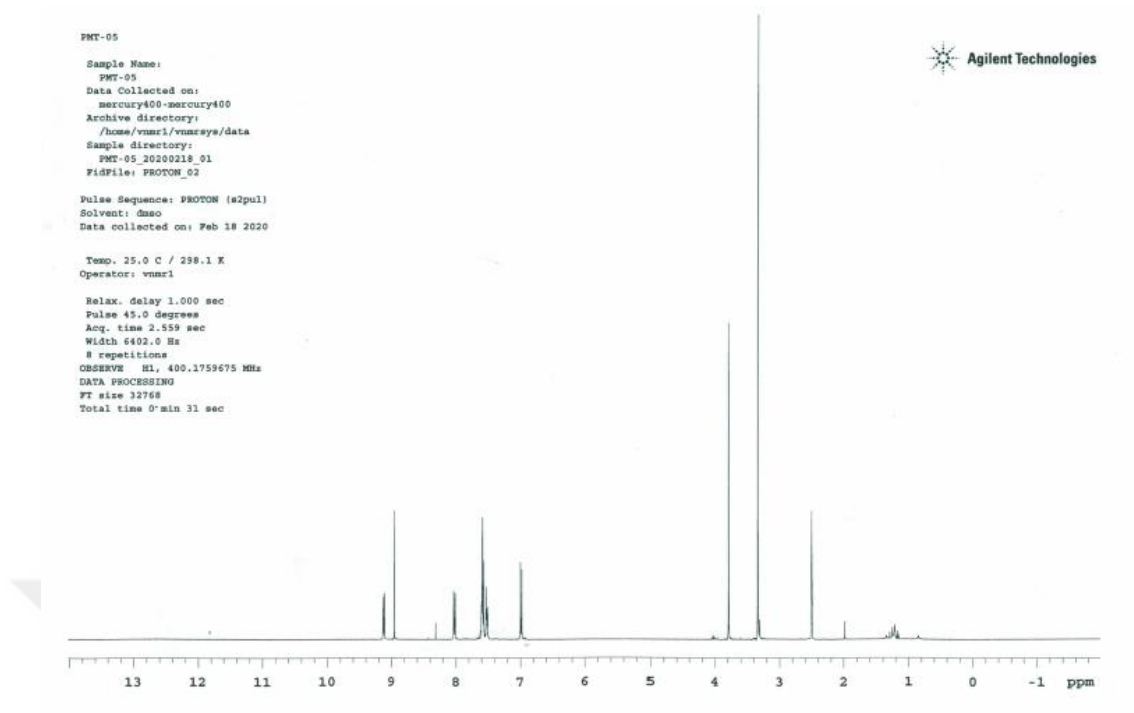
¹H-NMR Spektrumu (CDCl₃) δppm

3.78 (s, 3H), 6.98 (d, 2H, *J*_o = 9.2 Hz) 7.50-7.60 (m, 7H), 8.02 (d, 2H, *J*_o = 8.4 Hz)
8.95 (s, 1H), 9.12 (d, 2H, *J*_o = 8 Hz)

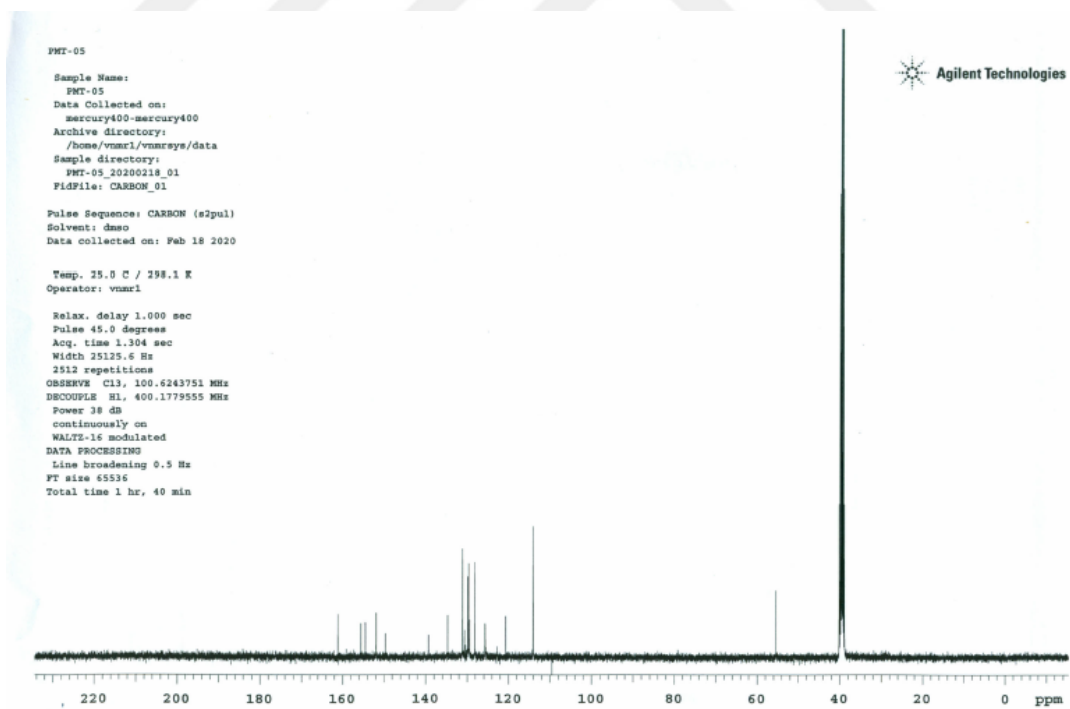
¹³C NMR Spektrumu (CDCl₃) δppm:

55.39 (OCH₃), 109.54, 114.07, 120.67 (C-fenil), 125.69 (CF₃), 128.14, 129.40, 129.66, 129.89, 130.65, 131.16, 134.71, 139.35 (C-fenil), 149.67 151.89, 154.50, 155.57, 161.18 (C-pürin).

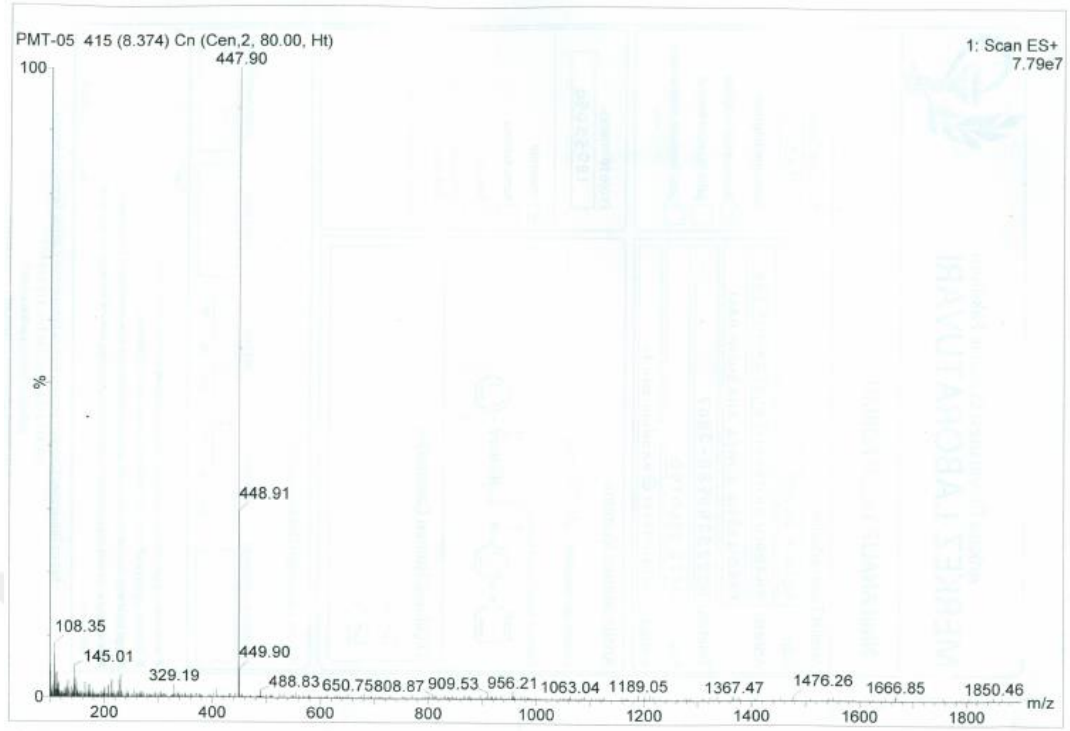
Kütle Spektrumu: MS (ESI+) m/e 447.9 (%100) (M+H).



Şekil 3.57. Bileşik 22'nin ^1H -NMR spektrumu

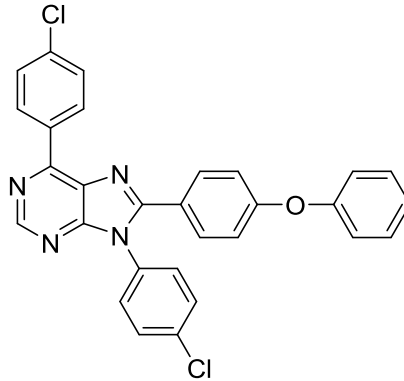


Şekil 3.58. Bileşik 22'nin ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 3.59. Bileşik 22'nin kütle spektrumu

3.2.8.4. 6,9-di(4-klorofenil)-8-(4-fenoksifenil]-9H-pürin (23)



Genel sentez yöntemine göre 0,18 g başlangıç maddesinden hareketle % 8 Verimle 0.02 g madde elde edildi.

E.N: 188-190 °C.

Elementel Analiz: C₂₉H₁₈Cl₂N₄O.0,5H₂O

	%C	%H	%N
Hesaplanan:	67.29	3.70	10,83
Analiz:	67.38	3.59	10.92

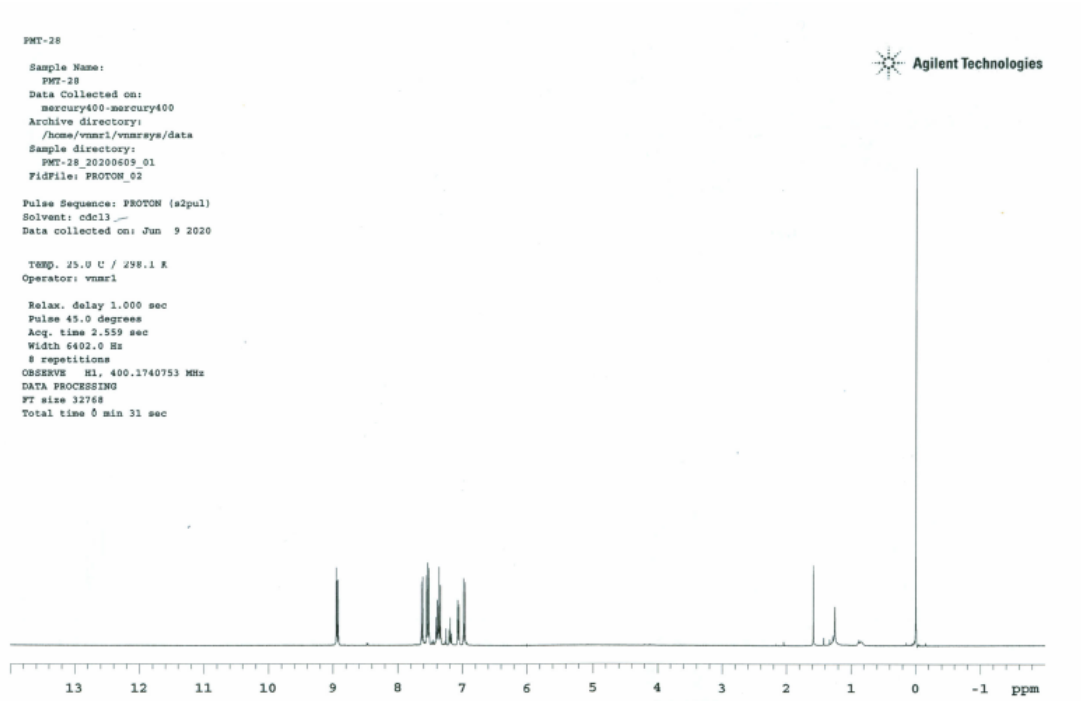
¹H-NMR Spektrumu (CDCl₃) δppm

6.97 (d, 2H, $J_o = 8.8$ Hz), 7.06 (d, 2H, $J_o = 8$ Hz), 7.21 (t, $J = 7.6$ Hz), 7.34-7.41 (m, 4H), 7.51-7.56 (m, 4H), 7.62 (d, 2H, $J_o = 8.8$ Hz), 8.92 (d, 2H, $J_o = 8.4$ Hz), 8.95 (s, 1H).

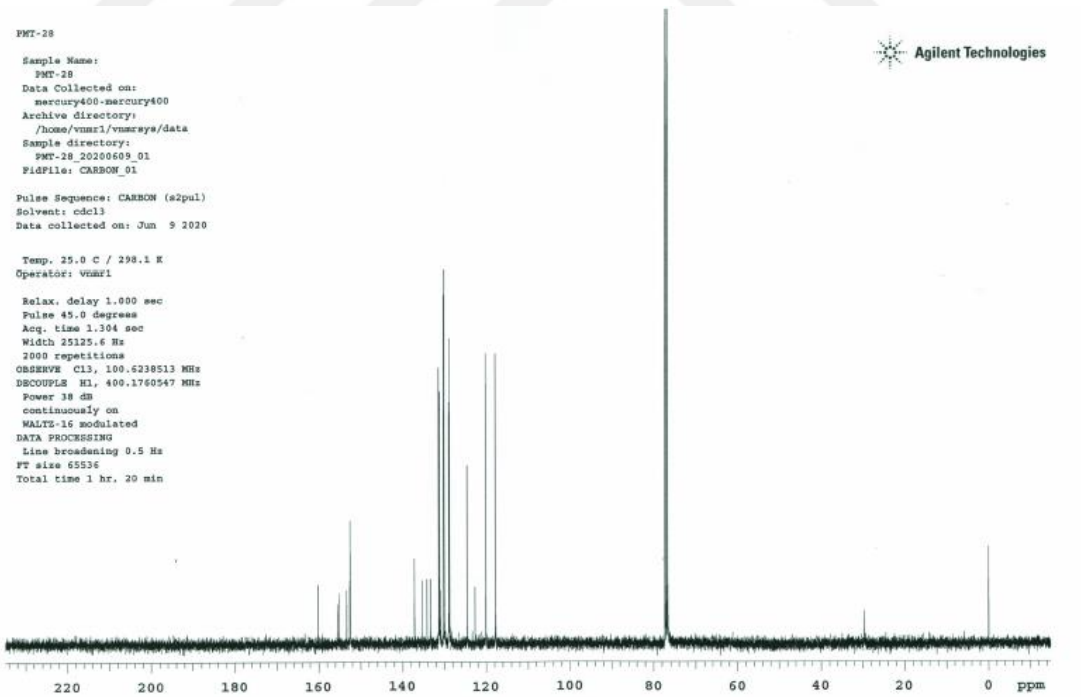
¹³C NMR Spektrumu (CDCl₃) δppm:

117.79, 120.11, 122.71, 124.57, 128.79, 128.92, 129.02, 130.04, 130.19, 130.90, 131.17, 131.39, 133.33, 134.20, 135.36, 137.21 (C-fenil), 152.51, 153.30, 155.14, 155.49, 160.16 (C-pürin).

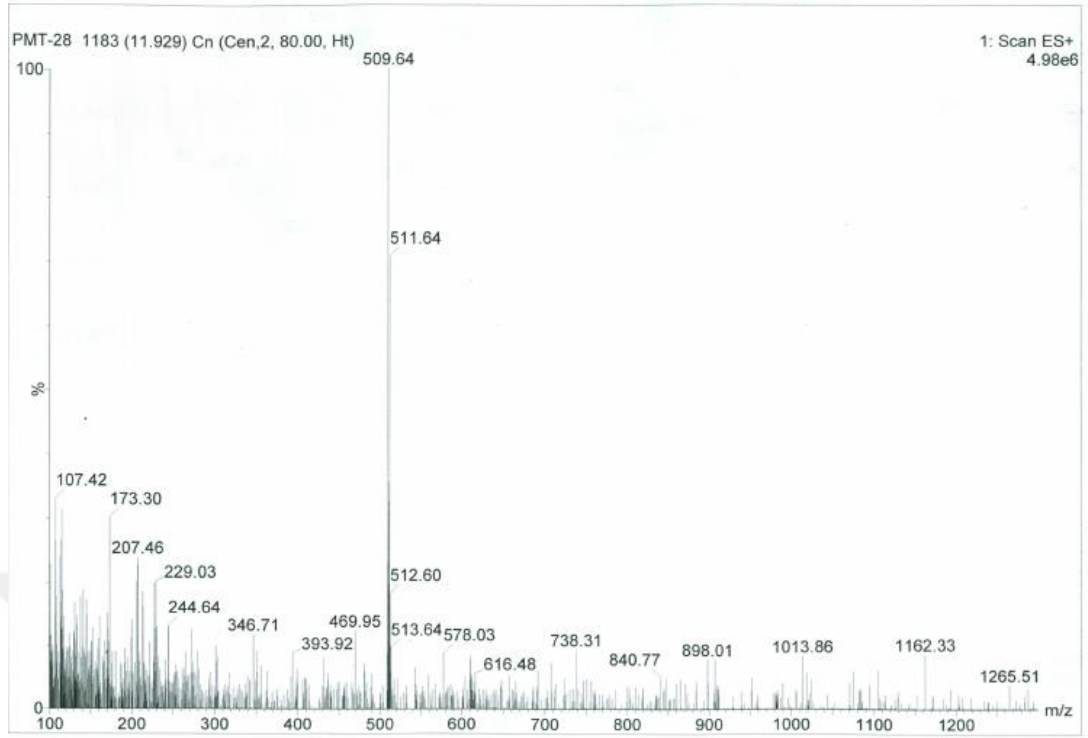
Kütle Spektrumu: MS (ESI+) m/e 509.64 (%100) (M⁺) 511.64 (%70) (M+2), 513.64 (%10) (M+4).



Şekil 3.60. Bileşik 23'ün ^1H -NMR spektrumu

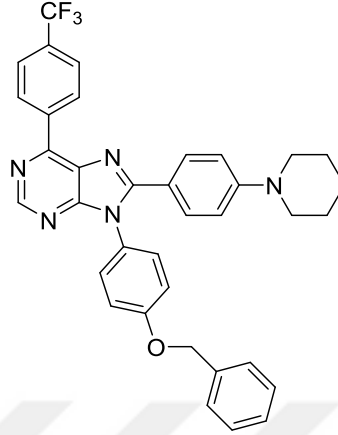


Şekil 3.61. Bileşik 23'ün ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 3.62. Bileşik 23'ün kütle spektrumu

3.2.8.5. 6-[4-(triflorometil)fenil]-8-(4-(piperidin-1-il)fenil)-9-(4(benziloksi)fenil)-9H-pürin (24)



Genel sentez yöntemine göre 0,12 g başlangıç maddesinden hareketle % 32 Verimle 0.048 g madde elde edildi.

E.N: 231-235 °C.

Elementel Analiz: C₃₆H₃₀F₃N₅O.0,7H₂O.0,1CH₃COOC₂H₅

	%C	%H	%N
Hesaplanan:	69.70	5.17	11.17
Analiz:	69.73	4.77	10.82

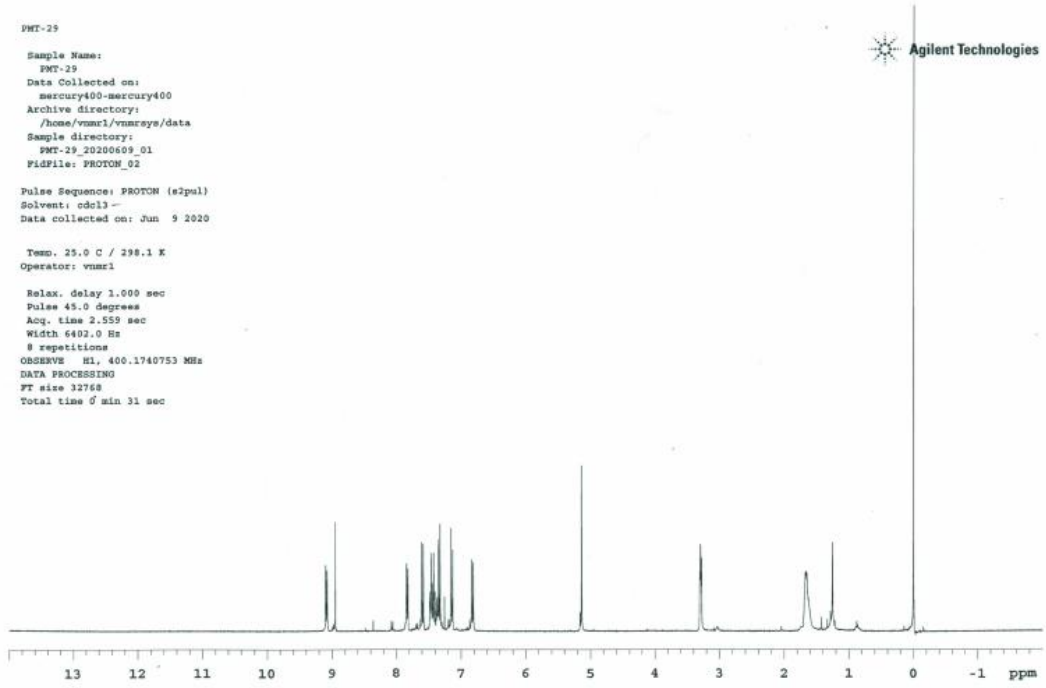
¹H-NMR Spektrumu (CDCl₃) δppm

1.58-1.70 (m, 6H), 3.29 (t, 4H, *J* = 5.2 Hz), 5.13 (s, 2H), 6.82 (d, 2H, *J*_o = 9.2 Hz), 7.14 (d, 2H, *J*_o = 8.8 Hz), 7.31-7.48 (m, 7H), 7.59 (d, 2H, *J*_o = 8.8 Hz), 7.83 (d, 2H, *J*_o = 8.8 Hz), 8.95 (s, 1H), 9.08 (d, 2H, *J*_o = 8 Hz).

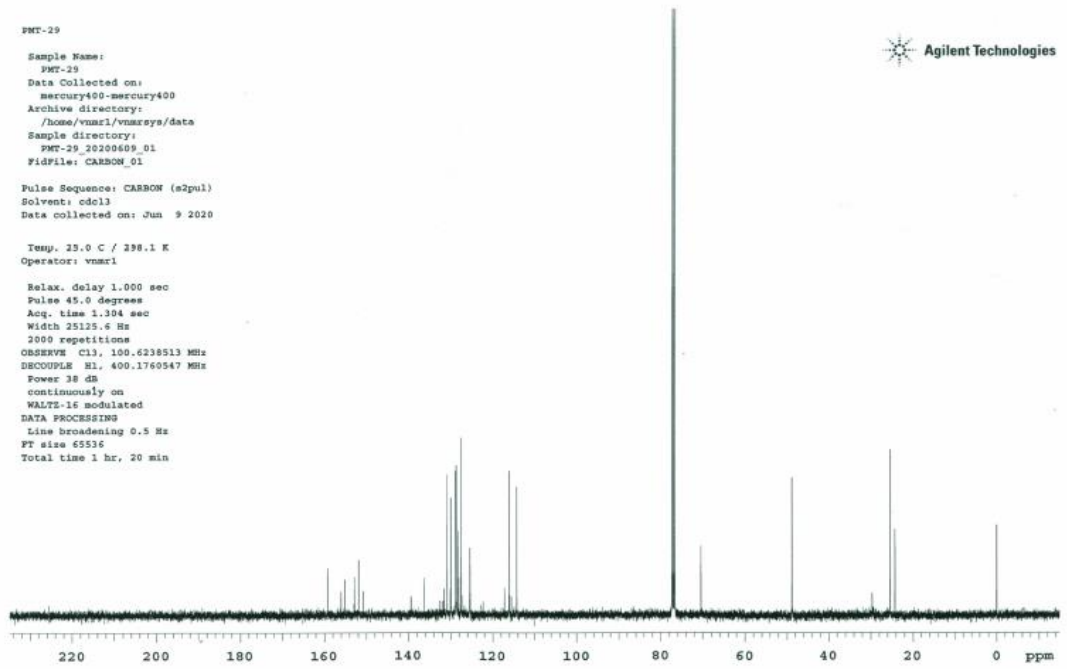
¹³C NMR Spektrumu (CDCl₃) δppm:

24.29, 25.40, 48.84 (C-piperidin), 70.42 (OCH₂), 114.26, 116.04, 117.21, 125.40 (q, CF₃), 127.42, 127.57, 128.09, 128.25, 128.70, 128.85, 130.01, 130.86, 131.58, 132.63, 136.34, 139.47, 150.75 (C-Fenil), 151.86, 152.87, 155.10, 156.04, 159.22 (C-Pürin).

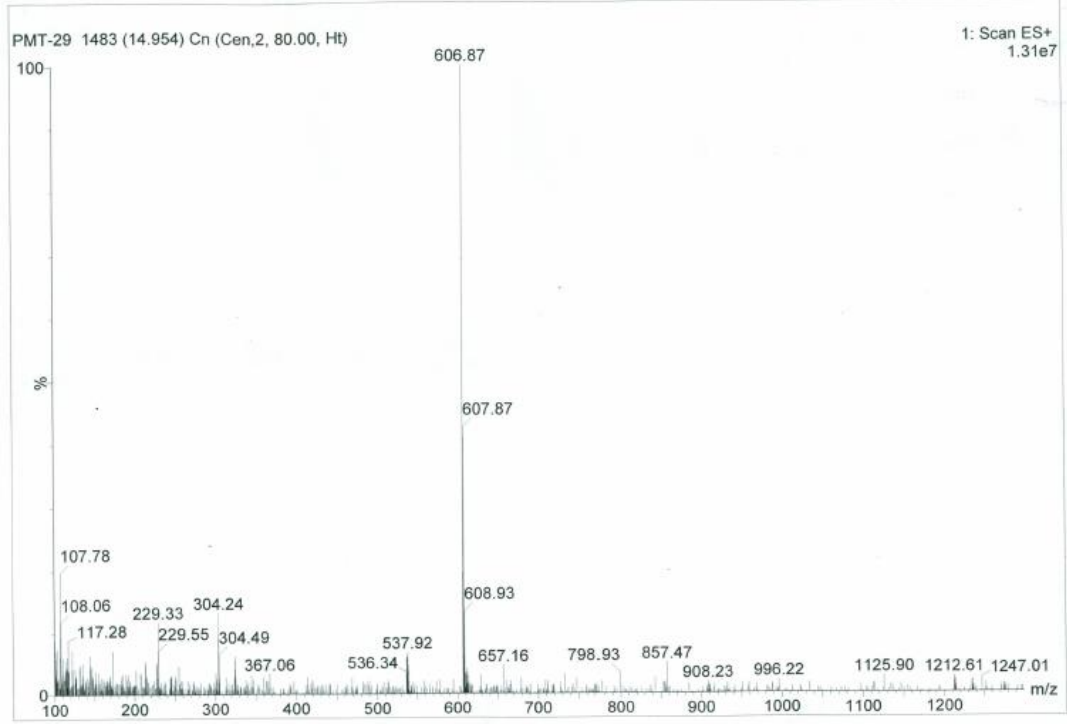
Kütle Spektrumu: MS (ESI+) m/e 606,87 (%100) (M+H).



Şekil 3.63. Bileşik 24'ün ^1H -NMR spektrumu



Şekil 3.64. Bileşik 24'ün ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 3.65. Bileşik 24'ün kütle spektrumu

3.3. Sentezlenen Türevlerin Sitotoksik Etkilerinin Saptanması

Sentezlenen pürin türevlerinin (5-12, 20-24) sitotoksik aktiviteleri, MCF7, HepG2, PC3, K562 hücreleri üzerinde XTT (2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)karbonil]-2H-tetrazolyum hidroksit) hücre canlılık testi ile araştırılmıştır.

Hücre Kültürü

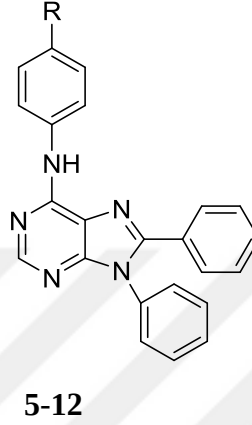
MCF7, HepG2, PC3 ve K562 hücreleri steril koşullar altında 37°C ve %5 CO₂'li ortamda, 25 cm²'lik flasklarda, %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin ve %10 fetal sıgır serumu içeren DMEM hücre kültür besiyeri de çoğaltıldı. K562 hücreleri için farklı olarak RPMI besiyeri kullanıldı. Hücreler %80 yoğunluğa ulaştıklarında pasaj yapıldı ve üçüncü pasajın ardından çalışmalara başlandı.

XTT Hücre Canlılık Testi

Öncelikle her kuyuda 10x10³ hücre olacak şekilde hücre alınıp steril 96 kuyucuklu mikro plakaya ekildi ve hücrelerin yapışması için bir gece beklendi (K562 hücreleri süspanse hücreler olduğu için aynı gün kimyasal uygulaması yapılmıştır). Ertesi gün hücreler üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı, kuyucuklar PBS ile yıkandı ve pürin türevleri (5-12, 20-24) sabit konsantrasyonda (10 µM) hücreler üzerine uygulanıp 48 saat inkübasyon gerçekleştirildi. 48 Saatin sonunda bileşikler içeren besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler üç defa PBS ile yıkandı. Daha sonra her bir kuyucuğa 100 µL şeffaf (renksiz) RPMI 1640 ve bununda üzerine 50 µL XTT solüsyonu eklenerek CO₂'li etüvde 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda optik dansite değeri mikroparka okuyucuda 450 nm'de okundu. Kontrol grubunun hücre canlılık oranı %100 olarak kabul edilip % Hücre canlılık = (Konsantrasyon O.D. / Kontrol O.D.) X 100 formülünden yararlanarak hesaplandı(Çizelge 3.1, Çizelge 3.2). Hücre canlılık değeri 50 nin altına indiren bileşik 7 için IC₅₀ değeri hesaplandı. Bu amaçla 7 bileşiği MCF7 hücreleri üzerine 40, 20, 10, 5 ve 2.5 µM konsantrasyonlarda uygulandı ve 48 saat inkübe edildi. Sonrasında yukarıdaki

protokoller takip edilerek bileşik 7'e ait IC₅₀ değeri hesaplandı(Şekil 3.66). Konsantrasyona bağımlı hücre canlılık grafikleri GraphPad Prism 7 programı yardımıyla çizildi ve kimyasallara ait IC₅₀ değerleri aynı program yardımıyla hesaplandı.

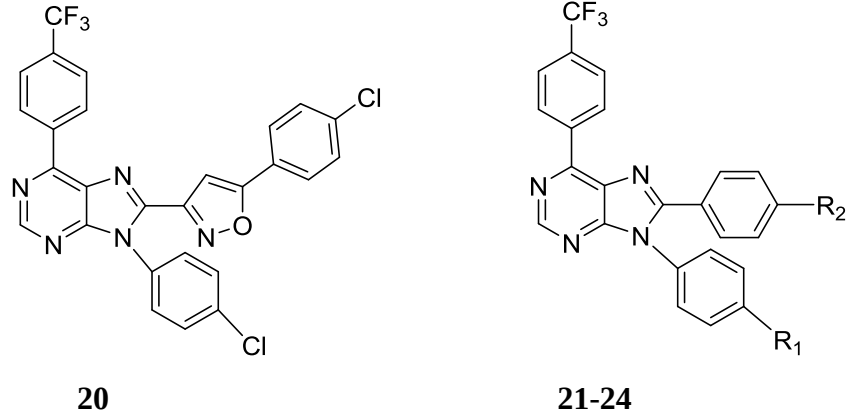
Çizelge 3.1 6-(4-Süstitüe fenil amino)-8,9-difenil pürin türevlerinin (5-12) sitotoksik aktiviteleri



Bileşikler	R	% Hücre Canlılığı (± Standart Hata)			
		MCF7	HepG2	PC3	K562
5	H	96 ± 3.12	EG	EG	EG
6	Cl	90 ± 2.17	EG	EG	EG
7	CH(CH ₃) ₂	34 ± 1.09	81 ± 2.74	97 ± 2.11	99 ± 2.87
8	OH	EG	EG	EG	EG
9	O-CH ₂ - 	60 ± 3.32	EG	99 ± 1.95	96 ± 1.11
10	OCHF ₂	71 ± 2.96	EG	EG	EG
11	SCH ₃	87 ± 1.96	EG	EG	EG
12		EG	EG	EG	98 ± 4.07
Fludarabin		59 ± 3.36	63±2.85	49 ± 3.96	45 ± 3.27

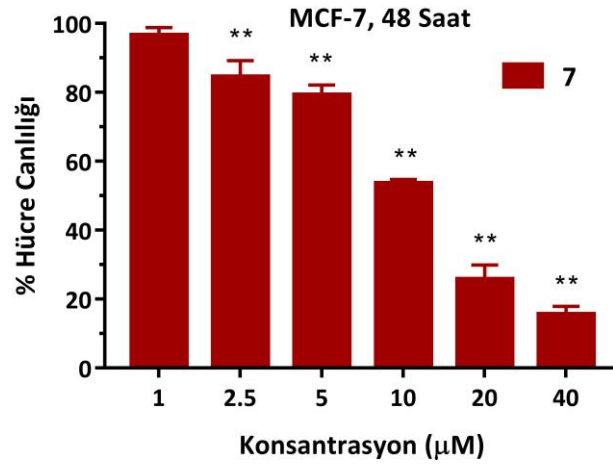
Maddeler ve Fludarabin 10 µM'lık tek doz uygulandıktan sonra 48 saatlik inkübasyon sonunda XTT analizi ile % hücre canlılık değerleri hesaplandı.
EG: Etki Görülmedi

Çizelge 3.2. 6-[4-(Triflorometil)fenil]-8,9-(4-süstitüe difenil)pürin türevlerinin (20-24) sitotoksik aktiviteleri

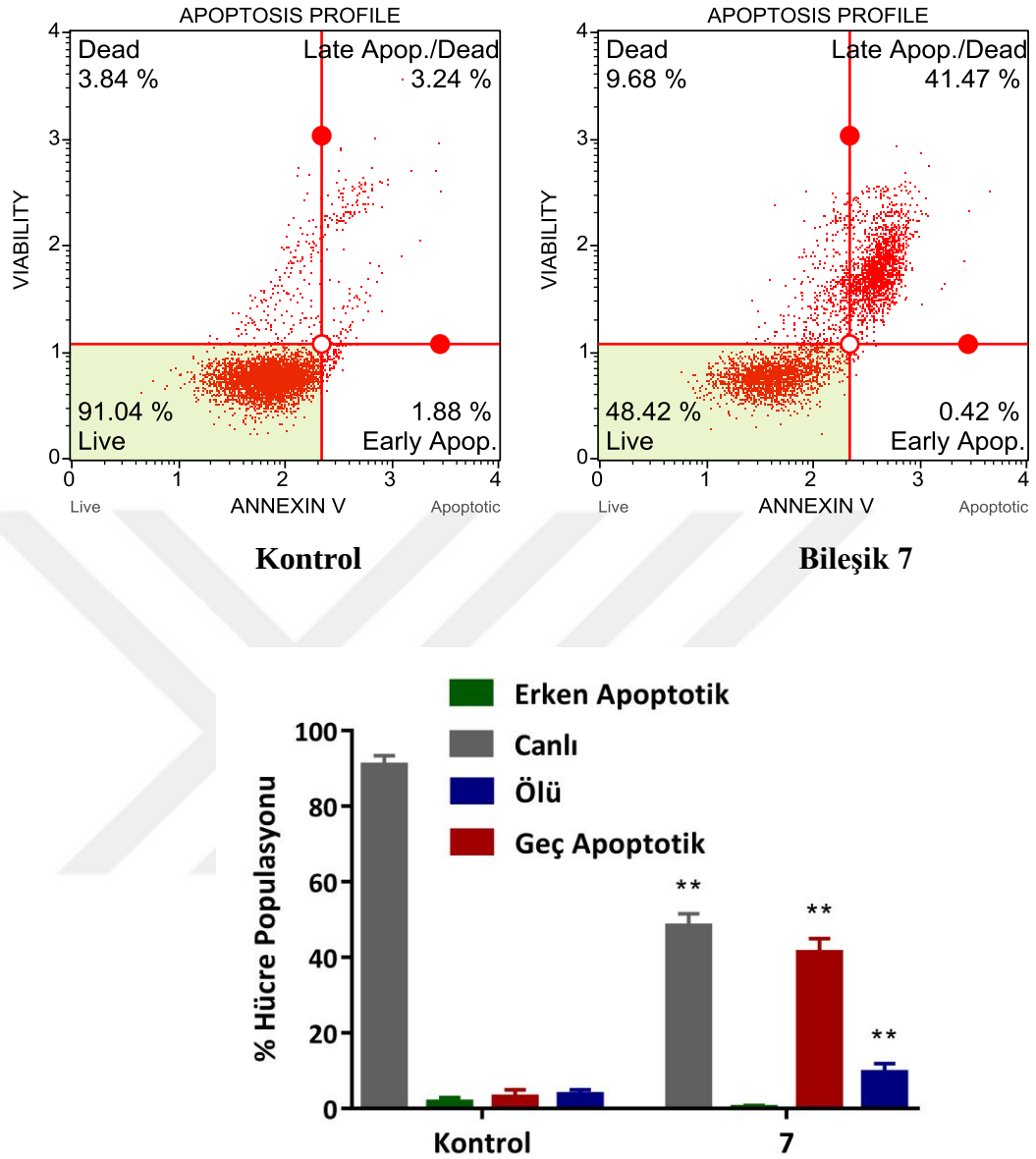


Bileşikler	R ₁	R ₂	% Hücre Canlılığı (± Standart Hata)			
			MCF7	HepG2	PC3	K562
20	-	-	91 ± 4.21	96 ± 3.45	98 ± 3.42	92 ± 2.74
21	H	Cl	89 ± 3.27	EG	97 ± 2.18	EG
22	H	OCH ₃	EG	EG	EG	EG
23	Cl	O-C ₆ H ₅	93 ± 3.85	97 ± 4.23	EG	95 ± 1.98
24	O-CH ₂ -C ₆ H ₅	N-C ₆ H ₁₁	89 ± 4.48	EG	95 ± 3.41	EG
Fludarabin			59 ± 3.36	63 ± 2.85	49 ± 3.96	45 ± 3.27

Maddeler ve Fludarabin 10 µM' lık tek doz uygulandıktan sonra 48 saatlik inkübasyon sonunda XTT analizi ile % hücre canlılık değerleri hesaplandı.
EG: Etki Görülmedi



Şekil 3.66. Bileşik 7'nin, MCF7 meme kanser hücre hattındaki % inhibisyon grafiği. **P < 0.01.



Şekil.3.67. Bileşik 7'nin 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda MCF7 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi. MCF7 hücreleri, Bileşik 7'nin IC₅₀ konsantrasyonu ile muamele edildi, ardından 48 saat süreyle inkübe edildi ve apoptoz, Muse hücre analizörü (Millipore) ile tespit edildi. Geç apoptotik ve ölü hücre yüzdesi, Bileşik 7 uygulamasını takiben önemli ölçüde artmıştır (P < 0.01). Tüm deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. ** P < 0.01'dir.

3.4. Moleküler Docking Çalışmaları

Sentezlenen pürin türevlerinin docking çalışmaları Hsp70 ATPaz (PDB: 1S3X), Hsp70 SBD (PDB: 4WV5), Hsp90α (PDB: 1YC4) ve Hsp90β (PDB: 6N8Y)

bölgelerinde gerçekleştirilmiştir. Bağlanma enerjisi, inhibisyon değeri ve moleküller arası etkileşimler, Docking Sunucusu web sitesi (<http://www.dockingserver.com/web>) kullanılarak hesaplanmıştır. Dockingler yapılırken ticari PES ve Tutar Y. ve ark. tarafından patentlenen KBR1307 molekülleri için de yapılmıştır.

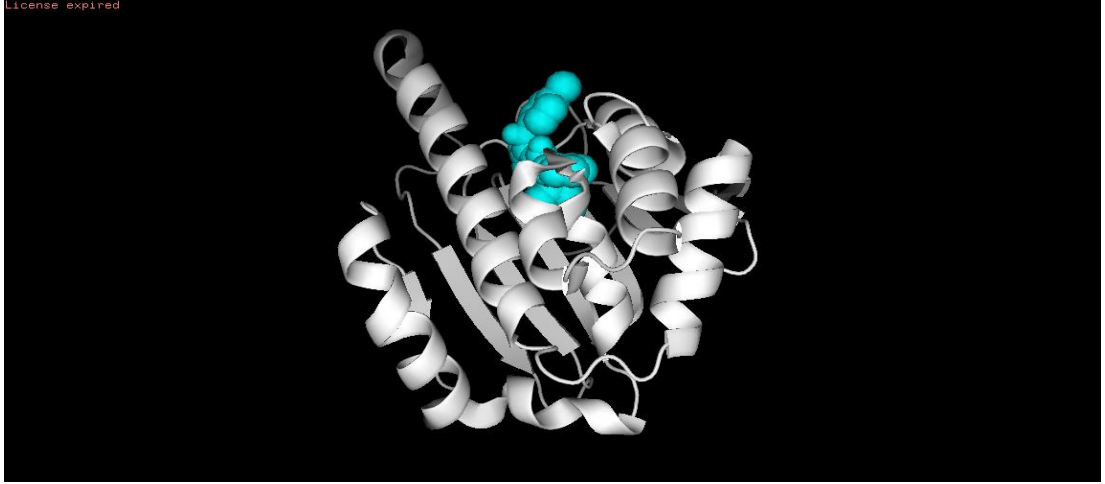
Bileşiklerin Hsp90 ve Hsp70 ATPaz ve SBD bölgelerindeki tahmini bağlanma konformasyonunu bulmak ve antikanser aktivitelerindeki farklılıkları tahmin etmek için moleküler doking çalışmaları yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre tüm bileşikler, Hsp70 proteinin ATP bağlanma cebine (PDB: 1S3X) -8.5 ile -10.8 kcal/mol; Hsp70 substrat bağlanma bölgesine (PDB: 4WV5), -6.5 ile -7.7 kcal/mol; Hsp90 α (PDB: 1YC4) bölgesine -7.3 ile -8.6; Hsp90 β bölgesine (PDB: 6N8Y) -8.5 ile -10 arasında değişen bağlama enerjileri ile bağlanmıştır.

Bileşik 23, Hsp70 ATPaz bağlanma cebine (PDB: 1S3X) (Şekil 3.68); Bileşik 6 ve 24 Hsp90 α (PDB: 1YC4) bölgesine (Şekil 3.69, Şekil 3.70) Bileşik 5 ve 24 Hsp90 β bölgesine (PDB: 6N8Y) (Şekil 3.71, Şekil 3.72) iyi bağlanma enerjileri ile bağlandığı görülmüştür.



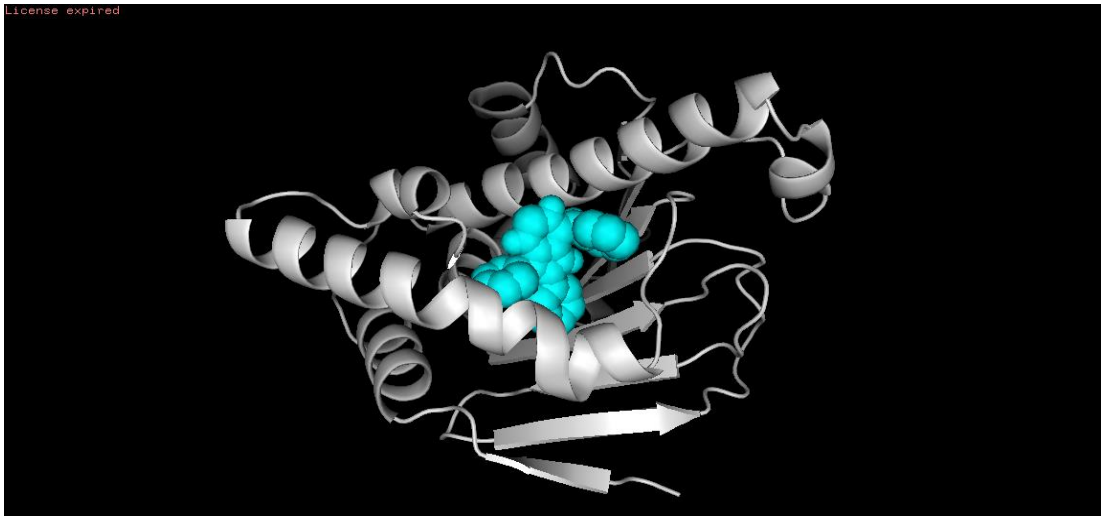
Şekil 3.68. Bileşik 23'ün Hsp70 ATPaz bağlanma cebindeki görünümü



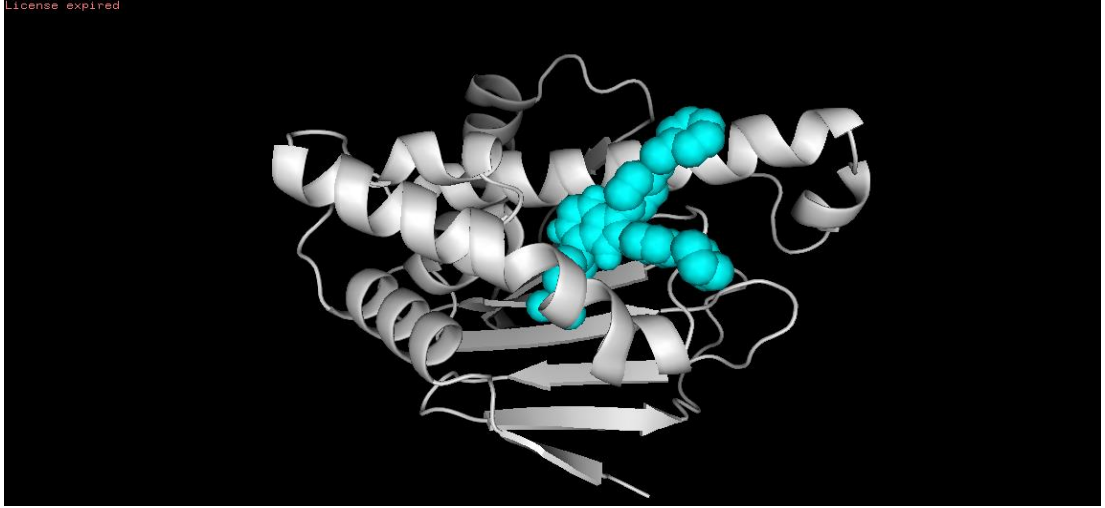
Şekil 3.69. Bileşik 6'nın Hsp90 α bağlanma cebindeki görünümü



Şekil 3.70. Bileşik 24'ün Hsp90 α bağlanma cebindeki görünümü

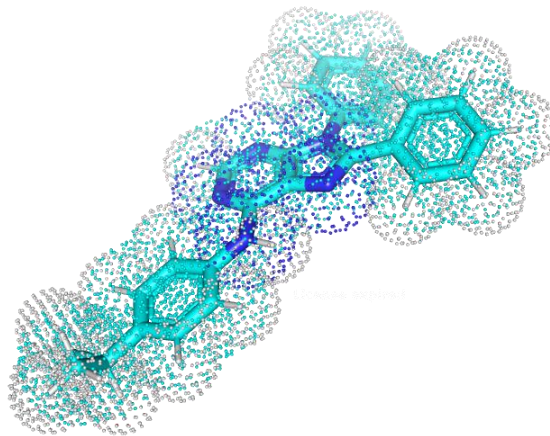


Şekil 3.71. Bileşik 5'in Hsp90 β bağlanma cebindeki görünümü

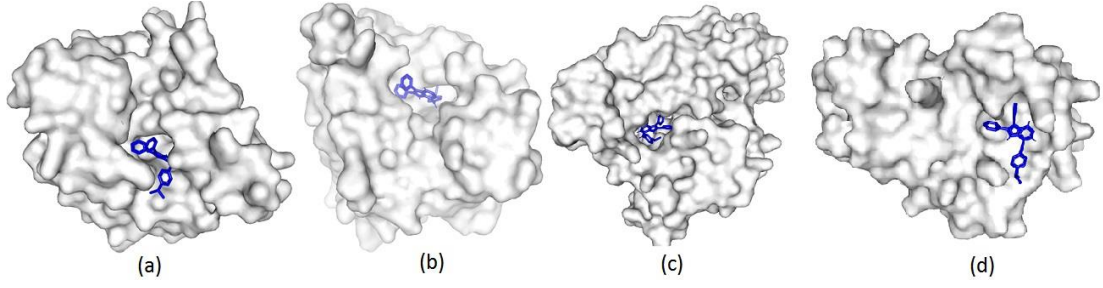


Şekil 3.72. Bileşik 24'ün Hsp90 β bağlanma cebindeki görünümü

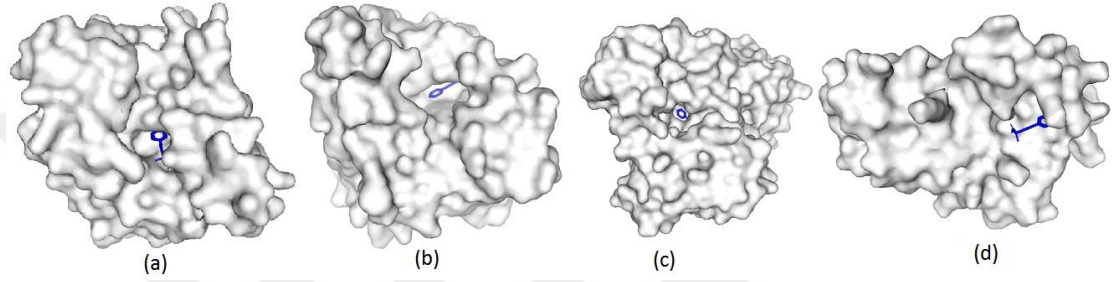
Bileşik 7'nin (Şekil 3.73) Hsp inhibisyon mekanizmasının aydınlatılması için; insan Hsp90 α domain (PDB kodu:1YC4), Hsp90 β domain (PDB kodu: 6N8Y), Hsp70 ATPaz domain (PDB kodu: 1S3X) ve Hsp70 SBD (PDB kodu: 4WV5) kristal yapıları ile Bileşik 7 inhibitörü moleküler docking metodu ile etkileştirilmiştir (Şekil 3.74) ve 7 inhibitörünün bu yapılarla bağlanma enerjisi hesaplanmıştır. Kontrol grubu olarak, aynı etkileştirmeler ve hesaplamalar insan Hsp90 α domain (PDB kodu:1YC4), Hsp90 β domain (PDB kodu: 6N8Y), Hsp70 ATPaz domain (PDB kodu: 1S3X) ve Hsp70 SBD (PDB kodu: 4WV5) ve PES ile de gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.75).



Şekil 3.73 ChemSketch programıyla çizilen bileşik 7'nin Pymol programında görüntülenmesi.



Şekil 3.74. (a) 1yc4 ile Bileşik 7'nin etkileşimi (b) 6n8y ile bileşik 7'nin etkileşimi (c) 1s3x ile bileşik 7'nin etkileşimi (d) 4wv5 ile bileşik 7'nin etkileşimi



Şekil 3.75. (a) 1yc4 ile PES etkileşimi (b) 6n8y ile PES etkileşimi (c) 1s3x ile PES etkileşimi (d) 4wv5 ile PES etkileşimi

Moleküler docking sonuçlarına göre, Bileşik 7, Hsp70 ATPaz domain bölgelerine yüksek bir afinite ile bağlanmıştır. Bileşik 7 inhibitörünün bağlanma enerjisi -8.8 kcal/mol, PES'in bağlanma enerjisi -6.4 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre Bileşik 7'nin Hsp70 ATPaz bölgesi ile olan etkileşimi, PES'e kıyasla daha yüksek bir afiniteyle gerçekleşmiştir ve bu bölgedeki Asp11 amino asiti ile etkileşmiştir. Ayrıca Bileşik 7;

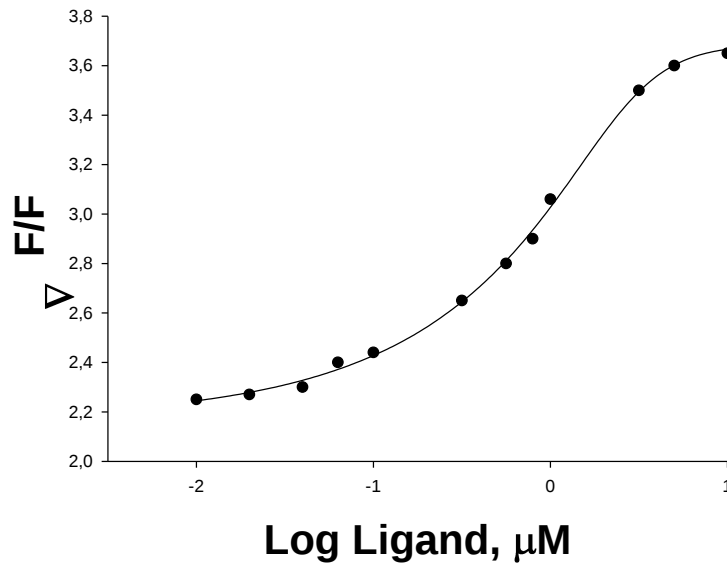
- Hsp90 α domain bölgesinde Asn 51, Asp 54, Gly 97, Gly 135, Thr 184 amino asitleri,
- Hsp90 β domain bölgesinde Leu 102, Gly 130 amino asitleri,
- Hsp70 ATPaz domain bölgesinde Asp69, Glu 231, Glu268 amino asitleri,
- Hsp70 SBD bölgesinde Ser400, Met410, Glu446 amino asitleri ile etkileşmiştir.

Bileşik 7'nin MCF7 meme kanser hücre hattında önemli antikanser aktivite gösterdiği yapılan aktivite tayin çalışmaları ile bulunmuştur. Sentezlenen türevlerin seçilen proteinlerdeki konumu ve bağlanma enerjileri göz önünde bulundurularak,

bileşiklerin ortak iskeletinin çıkarılması ve ileri çalışmalarımızda antikanser ilaçlar için potansiyel ana yapı olabileceği düşünülmektedir.

3.5. Hsp70 Bağlanma Deneyleri

Sentezlenen pürin analoglarının bağlanma deneylerini gerçekleştirmek için MCF7 hücre hattında IC_{50} değeri $8.88 \mu M$ ile kaydadeğer sitotoksik aktivite gösteren bileşik 7, bilinen Hsp70 inhibitörü PES ve *Tutar Y. ve ark.*, tarafından patentlenen KBR1307 bileşikler pozitif kontrol olarak kullanılarak Hsp70 bağlanma deneyleri yapılmış sonuçlar Şekil 3.76 ve Çizelge 3.3’de verilmiştir.



Şekil 3.76. Bileşik 7'in $1 \mu M$ ATP varlığında, Hsp70'e bağlanma grafiği

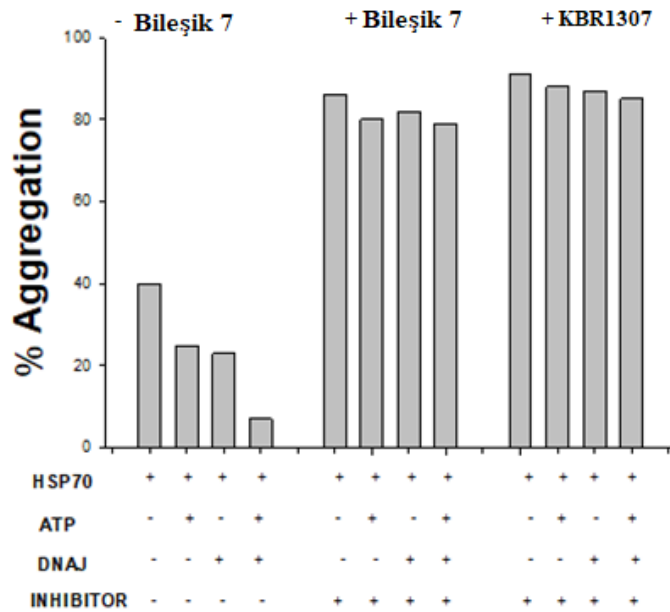
Bileşik 7 ve KBR1307 için K_d değeri sırasıyla $0.82 \mu M$ ve $3.16 \mu M$ olarak bulunmuştur. Bileşik 7 göreceli iyi bağlanmakta ve potansiyel olarak konformasyonel değişimi perturbe edici özellik göstermektedir. Dolayısı ile inhibitör olarak kullanılması oldukça potansiyeldir.

Çizelge 3.3. Bileşik 7'nin bağlanma sabitinin KBR1307 ve ticari olarak kullanılan PES ile karşılaştırılması.

	Hsp70 + ATP	Hsp70
KBR1307	3.16 μ M	0.8 μ M
PES	1.00 μ M	-
7	0.82 μ M	ND

3.6. Hsp70 Agregasyon Deneyleri

Hsp proteinlerinin en önemli özelliği substrat proteinlerin doğal haline erişmelerini sağlamaktır. Geliştirilen inhibitörlerin fonksiyonelliğini indirek olarak anlamanın yolu substrat proteinleri katlamasının derecesi olarak ölçülebilir. Lusiferaz lüminometrik sinyal verdiği için iyi bir substrattır. Lüsiferazın doğal halindeki lüminesans 100 denature olduğu haldeki sinyal sıfır alınarak Hsp yapılarının lüsiferazı katlama dereceleri hesaplanabilir. Denature edile lüsiferaz Hsp70 in farklı formları ile muamele ederek substrat katlama seviyesi belirlenirken inhibitörün bu fonksiyonu engellemesi sentezlenen yapının etkinliği için önemli bir ölçüttür. Bileşik 7 inhibitör olmadığı durum ile karşılaştırıldığında Hsp70 in katlanmasının önemli ölçüde engellediği için iyi bir inhibitör olup patentli KBR1307 yapısına benzer bir etki göstermektedir (Şekil 3.78).



Şekil 3.78. Bileşik 7'nin % agregasyon grafiği.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada 6-(4-sübstütie fenil amino)-8,9-difenil-pürin ve 6,9-(4-sübstütie difenil)-8-[5-(4-klorofenil)-1,2-oksazol/4-sübstütie fenil] pürin türevlerinin (5-12, 20-24) sentezi, yapılarının aydınlatılması ve sitotoksik aktiviteleri in vitro olarak MCF7, HepG2 PC3 ve K562 hücre hatlarında test edilmiştir. Daha sonra en aktif türev olan 6-(4-İzopropilfenilamino)-8,9-difenil-9H-pürin (7) bileşiği ile etki mekanizmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Ayrıca bu türevin MCF7 meme kanser hücresi ve apoptozisinde önemli yeri olan Hsp70 proteini ile bağlanma ve agregasyon deneyleri yapılmıştır. Bu deneylere ilave olarak Hsp70 proteini ile bileşik 7'nin docking çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Tasarlanan 6-(4-sübstütie fenil amino)-8,9-difenil-pürin türevlerini (5-12) sentezlemek üzere 4,6-dikloro-5-nitro-pirimidin'den hareketle SnCl_2 ile redüksiyon, anilin ile aromatik nükleofilik sübstütüsyon reaksiyonlarını takiben elde edilen ara ürünün *p*-TsOH katalizörlüğünde sübstütie benzaldehitler ile siklizasyonu yapılmıştır. Elde edilen pürin halkası sübstütie anilin türevleri ile reaksiyona tabi tutularak sonuç pürin bileşikleri (5-12) sentezlenmiştir.

Pürin halkasının 6.konumunda 4-sübstütie fenil amino grubu yerine direk 4-sübstütie fenil sübstütientinin yer aldığı 6,9-(4-sübstütie difenil)-8-[5-(4-klorofenil)-1,2-oksazol/4-sübstütie fenil] pürin analoglarını (20-24) sentezlemek üzere bölüm 2.1.1'de verilen yöntem ile elde edilen 5-amino-4-(4-sübstütie fenil)amino-6-kloropirimidin (3,13,14) ara ürünlerinin 5-(4-klorofenil)-1,2-oksazol-3-karboksaldehit ve 4-sübstütie benzaldehitler ile *p*-TsOH katalizörlüğünde siklizasyonu sonucu pürin halkası (15-19) elde edilmiştir. Bu bileşiklerin, Suzuki Coupling reaksiyonu ile toluen içinde K_2CO_3 varlığında ve $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ katalizörlüğünde 4-sübstütie fenil boronik asit ile reaksiyona tabi tutulması ile sonuç pürin türevlerinin (20-24) sentezi gerçekleştirilmiştir.

Bu şekilde 5 orijinal ara ürün, 13 adet orijinal sonuç ürün olmak üzere toplam 23 adet bileşiğin sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen bileşiklerin saflık kontrolleri İTK ve erime noktası tayini ile yapılmış ve ^1H , ^{13}C NMR ve Mass spektral analizleri ile beklenen kimyasal yapıları kanıtlanmıştır.

Sentezlenen bileşiklerin ^1H NMR ve ^{13}C NMR spektrumları çözünürlüklerine göre DMSO- d_6 ve CDCl_3 çözücülerinde alınmıştır. 6-(4-süstitüe fenil amino)-8,9-difenil-pürin türevlerinin (5-12) ^1H -NMR spektrumu incelendiğinde pürin halkasının 2. konumunda yer alan protonlar 8.56 – 10.20 ppm aralığında singlet olarak gözlenmiştir. Bu bileşiklerin 6. konumunda yer alan amino grubuna bağlı fenil halkası 4. konumdan süstitüe olduğundan halka protonları karakteristik A_2X_2 bölünme sistemi ile izlenmektedir. Yapıda 2 adet daha nonsüstitüe fenil halkası bulunması ve bu halkaların protonlarının yakın ppm'lerde pik vermesi nedeniyle aromatik protonların bir arada pik verdiği gözlenmiştir.

Sentezi gerçekleştirilen 2.grup bileşikler olan 6,9-(4-süstitüe difenil)-8-[5-(4-klorofenil)-1,2-oksazol/4-süstitüe fenil] pürin türevlerinin (20-24) ^1H -NMR spektrumlarında pürin halkasının 2.konumundaki protonlar 8.92 – 9.08 ppm aralığında görülmüştür. Bu pürin türevlerinde 6, 8, 9. konumlarda p-süstitüe fenil gruplarının yer alması yine halka protonlarının A_2X_2 bölünme sistemi ile görülmesine neden olmaktadır.

Sentezlenen bileşiklerin kütle spektrumları Elektrosprey İyonizasyonu (ESI) yöntemi ile alınmıştır. Pozitif iyonizasyon tekniği ile bütün bileşikler iyonize olmuş ve %100 bağıl bolluk ile moleküler iyon (M^++H) piki gözlenmiştir. Klor atomu içeren bileşiklerin izotoplarının bağıl bollukları 3:1 oranında M^++H ve $\text{M}^++\text{H}+2$ pikleri şeklinde gözlenmiştir. 2 Adet klor atomu taşıyan bileşiklerde izotopların bağıl bollukları 9:6:1 oranında gözlenmiş, M^+ , M^++2 , M^++4 pikleri şeklinde görülmüştür.

Sentezi gerçekleştirilen orijinal sonuç pürin türevlerinin (5-12, 20-24) antikanser aktiviteleri öncelikle MCF7 meme, HepG2 karaciğer, PC3 prostat ve K562 kronik myeloid lösemi kanser hücre hatlarında XTT hücre canlılık testi ile

araştırılmıştır. Aynı zamanda bu kanser hücre hatlarında yürütülen sitotoksik aktivite çalışmalarında, bilinen antikanser ilaçlardan nükleozit analogu Fludarabin de pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

6-(4-Süstitüe fenil amino)-8,9-difenil-pürin (5-12) türevlerinden 6. konumdaki amino yapısında 4-izopropilfenil grubu taşıyan pürin analogunun (7) MCF7 meme kanser hücre hattında $IC_{50} = 8.88 \mu M$ değeri ile en aktif pürin türevi olarak belirlenmiş ve bu IC_{50} değerinin ilaç olarak kullanılabilecek etkin doz aralığında olduğu ($<10 \mu M$) saptanmıştır. Ayrıca bu bileşik ile aynı hücre hattında $\% 34 \pm 1.09$ hücre canlılığı tespit edilirken bu değer Fludarabin için $\% 59 \pm 3.36$ olarak görülmüştür. Buna göre bileşik 7, MCF7 kanser hücresinde pürin nükleozit analogu Fludarabin'den daha aktif bulunmuştur. Buna ilave olarak 6. Konumda 4-benziloksifenilamino grubu taşıyan pürin türevinin (9) MCF7 meme kanser hücre hattında hücre canlılığı $\% 60 \pm 3.32$ olarak bulunmuş ve Fludarabin ile karşılaştırılabilir kaydedeğer aktivite gözlenmiştir.

MCF7 hücreleri, bileşik 7'nin IC_{50} konsantrasyonu ile muamele edilerek Şekil.3.67'de görüldüğü üzere kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 7 nolu bileşiğin özellikle geç apoptoz olmak üzere apoptozu anlamlı olarak indüklediği belirlenmiştir ($P < 0.01$). Kontrol grubunda $\% 1.88 \pm 0.12$ olan geç apoptotik hücre değeri, Bileşik 7 grubunda $\% 41.47 \pm 1.39$ olarak hesaplanmıştır. Bileşik 7 uygulaması ayrıca kontrol grubunda $\% 3.84 \pm 0.27$ olan ölü hücre popülasyonunun $\% 9.68 \pm 1.07$ 'ye yükselmesine neden olmuştur ($P < 0.01$).

Hsp70 inhibitörü bileşikler, proteinin ATP bağlanma bölgesine bağlanır. İnhibitörün bağlanmasıyla uygun üç boyutlu yapıya geçemeyen karsinogenezle ilişkili bu protein bloke olur ve tümör oluşumu engellenir. Hsp70 inhibitörü olarak sentezlenen pürin türevlerinin yapı-aktivite ilişkileri, yenilikçi ilaç tasarımı için bir ana iskelet sağlar. Hsp70, özellikle kanser hücrelerinde çok fazla eksprese edilen proteinlerden biri olduğundan, pürin türevlerinin bu proteini inhibe edici etkileri, kanser tedavisi ve ilaç tasarım araştırmalarına büyük fayda sağlamaktadır.

Hsp70 yapı fonksiyon etkisinin incelenmesi için sentezlenen moleküller ilk önce *in silico* ortamda taranarak en etkin molekül 7 olarak belirlenmiştir. Bu yapı Hsp70 ve Hsp90'ın iki ayrı alt ünitesinde bu etkileşim incelenmiştir. Substrat bağlanma bölgesi off-target etkileri minimize ettiği için özellikle hedeflenen bölgedir. Ayrıca Hsp90 inhibisyonu ile Hsp90'a komplementer yapı olan Hsp70 in ve izoformlarının indüklenmesi dual inhibitör arayışlarını hızlandırmıştır.

Bileşik 7 bu anlamda oldukça uygun bir inhibitördür. Hsp70 substrat bağlanma bölgesine etkin bir şekilde bağlanması Hsp70 in koopere ve koordine olduğu diğer Hsp yapılarının etkileşimlerini perturbe edebileceğini özellikle agregasyon deneyleri ile göstermiştir. Hsp70 antiapoptotik özelliği bu yapı ile engellenmesi antikanser ilaç adayı potansiyel olarak umut vericidir. Bu yapının farklı hücre hatlarında ve direnç gösteren hücrelerde denenmesi ayrıca klinik ilaçlar ile sinerjetik etki göstermesi kullanım alanlarını arttıracak için önemlidir. İlerleyen çalışmalarda *in vivo* etkilerinin belirlenmesi klinik ilaç olarak değerlendirilmesi için önemlidir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Dünyadaki en ciddi klinik sorunlardan biri olan kanserin tedavisine yönelik çalışmalar yıllardan beri devam etmesine rağmen günümüzde hala çok başarılı sonuçlar elde edilememiştir. Aktivitesi yüksek bileşikler sentezlense dahi; toksisite, biyoyararlanım gibi sorunlar yüzünden tedavi alanında büyük boşluklar bulunmaktadır. Son yıllarda özellikle kanser hücrelerine selektif etkili ve normal hücrelere karşı sitotoksik olmayan aktif kimyasal bileşiklerin sentezlenmesine odaklanılmıştır. Sentez aşamasını takiben yapılan bileşiklerin etkileri önce in vitro ardından ilk aşamayı geçen bileşikler için detaylandırılan in vitro çalışmalar ile moleküler mekanizmaların açığa çıkarılması hedeflenmektedir.

Bu çalışmada, sentezi yapılan orijinal pürin analogu bileşiklerin sitotoksik aktiviteleri, MCF7 meme hücre, HepG2 karaciğer hücre, PC3 prostat ve K562 kronik myeloid lösemi hücre hatlarında Fludarabin pozitif kontrolüne karşı incelenmiş, farklı konsantrasyonlarda yol açtıkları inhibisyon yüzdeleri hesaplanmış, sonuçlar yüzde canlılık değerlerini gösterecek şekilde verilmiştir.

Elde edilen sitotoksikite sonuçlarına göre pürin halkasının 8. konumunda 4-(izopropil)anilin bulunan bileşik 7, bilinen MCF7 meme hücre hattında pürin nükleozit analogu Fludarabin'den daha yüksek, ümit verici sitotoksik aktivitede olduğu görülmüştür.

Hsp inhibitörü olarak şu ana kadar kullanılan yapıların Hsp90 inhibitörü olması Hsp90' komplementer fonksiyon gösteren Hsp70 yapılarından dolayı etkinliği istenilen seviyede olmamıştır. Hsp70 ATPaz bölgesine geliştirilen inhibitörlerinde farklı ATPaz bölgelerine bağlanmaları inhibitör çalışmalarını daha spesifik bir hedef olan Hsp70 substrat bağlanma bölgesine yönlendirmiştir. Bu çalışmada sentezlenen pürin türevi bileşik 7 bu kapsamda potansiyel bir ilaç adayı moleküldür.

Bundan sonraki çalışmalarımızda ümit verici aktiviteye sahip bileşik 7'nin etki mekanizmalarına yönelik çalışmalar, ilaveten sitotoksisite çalışmaları ve yeni modifikasyonlar ile daha aktif sitotoksik etkili bileşiklerin tasarlanması ve in vivo çalışmalar hedeflenmektedir.



ÖZET

Yeni Bazı Pürin Türevi Bileşiklerin Sentez, Yapı Aydınlatılması ve Biyolojik Aktiviteleri Üzerinde Çalışmalar

Bu çalışmada yeni bazı 6,8,9-trisüstitüe pürin türevlerinin sentezi yapılmıştır (5-12, 20-24). 6-(4-Süstitüe fenil amino)-8,9-difenil-pürin türevlerinin (5-12) sentezi için, başlangıç maddesi 4,6-dikloro-5-nitro-pirimidin'den hareketle SnCl_2 ile redüksiyon, anilin ile aromatik nükleofilik süstitüsyon, $p\text{-TsOH}$ katalizörlüğünde süstitüe benzaldehitler ile siklizasyon yapılmıştır. Elde edilen pürin halkası süstitüe anilin türevleri ile reaksiyona tabi tutularak sonuç pürin bileşikleri (5-12) sentezlenmiştir.

6,9-(4-süstitüe difenil)-8-[5-(4-klorofenil)-1,2-oksazol/4-süstitüe fenil] pürin türevlerini (20-24) sentezlemek üzere başlangıç maddesi 4,6-dikloro-5-nitro-pirimidin'den hareketle SnCl_2 ile redüksiyon, 4-süstitüe anilinler ile aromatik nükleofilik süstitüsyon ile elde edilen 5-amino-4-(4-süstitüe fenil)amino-6-kloropirimidin (3,13,14) ara ürünlerinin 5-(4-klorofenil)-1,2-oksazol-3-karboksaldehit ve 4-süstitüe benzaldehitler ile $p\text{-TsOH}$ katalizörlüğünde siklizasyonu sonucu pürin halkası (15-19) elde edilmiştir. Bu bileşiklerin, Suzuki Coupling reaksiyonu ile toluen içinde K_2CO_3 varlığında ve $\text{Pd}(\text{Ph}_3)_4$ katalizörlüğünde 4-(süstitüe)fenil boronik asitler ile reaksiyona tabi tutulması ile sonuç pürin türevlerinin (20-24) sentezi gerçekleştirilmiştir.

Sentezlenen pürin türevlerinin (5-12, 20-24) MCF7 meme hücre, HepG2 karaciğer hücre, PC-3 prostat ve K562 kronik myleoid lösemi hücre hatlarında yarattığı sitotoksik etki, bilinen antikanser ilaç Fludarabin pozitif kontrolüne karşı incelenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda yol açtıkları inhibisyon yüzdeleri hesaplanmış, sonuçlar yüzde canlılık değerlerini gösterecek şekilde verilmiştir.

Elde edilen sitotoksikite sonuçlarına göre pürin halkasının 8. konumunda 4-(İzopropil)anilin bulunan bileşik 7, MCF7 meme kanser hücre hattında Fludarabin'den daha aktif olduğu görülmüştür.

Ayrıca en aktif türev olan bileşik 7 ile yapılan docking ve Hsp70 bağlanma ve agregasyon çalışmalarında, Hsp70'in antiapoptotik özelliğinin bileşik 7 ile inhibe edilmesi, bileşiğin potansiyel antikanser ilaç adayı olarak umut verici olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: 6,8,9-Tri süstitüe pürin, sitotoksik aktivite, Hsp70 inhibitör aktivite

SUMMARY

Studies on the Synthesis, Structure Elucidation and Biological Activity of Some Novel Purine Derivatives

In this study, we designed and synthesized novel 6,8,9-trisubstituted purine derivatives (**5-12**, **20-24**). The synthesis of 6-(4-Substituted phenyl amino)-8,9-diphenyl purine derivatives (**5-12**) was carried out starting from reduction with SnCl_2 of commercially available starting material 4,6-dichloro-5-nitro-pyrimidine, aromatic nucleophilic substitution with aniline, cyclization with substituted benzaldehydes under the catalyst of *p*-TSOH. The resulting purine ring was reacted with substituted aniline derivatives to produce the resulting purine compounds (**5-13**).

The synthesis of the 6,9-(4-substituted diphenyl)-8[5-(4-chlorophenyl)-1,2-oxazole/4-substituted phenyl] purine derivatives (**20-24**) was carried out starting from reduction with SnCl_2 of commercially available starting material 4,6-dichloro-5-nitro-pyrimidine, aromatic nucleophilic substitution with 4-substituted anilines, cyclization with 5-(4-chlorophenyl)-1,2-oxazole-3-carboxaldehyde and 4-substituted benzaldehydes under the catalyst of *p*-TSOH. The resulting purine ring (**15-19**) was reacted with 4-(substituted) phenyl boronic acids in the presence of K_2CO_3 in toluene with catalysis of $\text{Pd}(\text{Ph}_3)_4$, by the Suzuki Coupling reaction.

The synthesized purine derivatives (**5-12**, **20-24**) were evaluated for their cytotoxic activity over human breast carcinoma MCF7, human liver carcinoma HepG2, human prostate carcinoma PC-3 and human chronic myeloid leukemia K562 cell lines against positive control of known anticancer drug Fludarabine. The inhibition percentages of the synthesized purine derivatives at different concentrations were calculated, results were given to show the percent cell viability values.

According to the cytotoxicity results, compound **7** which has 4-(Isopropyl)aniline substitution at position 8 of the purine ring showed comparable, promising activity in the MCF7 breast cancer cell line with Fludarabine.

In addition; the docking, Hsp70 binding and aggregation studies with the most active derivative, compound **7**, showed that the antiapoptotic property of this compound for Hsp70 was evaluable and that compound **7** was promising as a potential anticancer drug candidate.

Key Words: 6,8,9-Tri substituted purine, cytotoxic activity, Hsp70 inhibitory activity

KAYNAKLAR

- ABD-ELFATTAH AS A, EL-GUESSAB EM, GUO JH, WECHSLER AS (1996). Physiologic and Pathophysiologic Significance of Purine Metabolism in the Heart. *Purines and Myocardial Protection. Developments in Cardiovascular Medicine*, **vol 181**.
- ABRAHAM DJ, DENNY WA (2010). Synthetic DNA-Targeted Chemotherapeutic Agents And Related Tumor-Activated Prodrugs. *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. doi:10.1002/0471266949.bmc075.pub2
- ABRAHAM DJ. (Ed.) (2003). Volume 5: Chemotherapeutic Agents. *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, New Jersey: A John Wiley and Sons, Inc. Publication, **6**: 2-81.
- ADAMS S, BOHACEK RS, CHESTER A, DALGARNO DC, HARALDSON C, WANG Y, KEATS J, KEENAN TP, LIOU S, MANI U, METCALF I, NARULA SS, PRADEEPAN S, RAM M, SAWYER TK, SHAKESPEARE WC, SUNDARAMOORTHY R, VAN SCHRAVENDIJK MR, VIOLETTE SM, WEIGELE M, (2003). Bone-Targeted 2,6,9- Trisubstituted Purines: Novel Inhibitors of Src Tyrosine Kinase for the Treatment of Bone Diseases. *Bioorg. Med. Chem. Lett*, **13**: 3067-3070.
- AGUIRRE J, CHIOSIS G, DAVIES P, HE H, KIM J, LLAUGER L, PETERS U, ROSEN N, (2005). Evaluation of 8-Arylsufanyl, 8-Arylsulfoxyl, and 8-Arylsulfonyl Adeine Derivatives as Inhibitors of the Heat Shock Protein 90. *J. Med. Chem*, **48**: 2892-2905.
- ALEXIOU GA, BONI L, DIONIGI G, LIANOS GD, MANGANO A, MANGANO A, RAUSEI S, ROUKOS DH. (2015). The role of heat shock proteins in cancer. *Cancer Letters*, **360**(2): 114–118. doi:10.1016/j.canlet.2015.02.026
- AMBATI SR, CHIOSIS G, KOSUGI K, LOPES EC, MEYER PA, MONY U, MOORE MA, MOREIRA AL, SHAH SK, TALDONE T, ZEHİR A (2013). Pre-clinical efficacy of PU-H71 , a novel HSP90 inhibitor, alone and in combination with bortezomib in

Ewing sarcoma. *Molecular Oncology*, **8**(2): 323–336.
doi:10.1016/j.molonc.2013.12.005

American Cancer Society. (2020). Cancer Facts & Figures 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 1–76.

ANANTH SL, BANTIA S, HORN LL, HUTCHISON TL, KILPATRICK JM, MILLER PJ, MONTGOMERY JA, MORRIS PE, PARKER CD, SANDHU JS (2001). Purine nucleoside phosphorylase inhibitor BCX-1777 (Immucillin-H) - A novel potent and orally active immunosuppressive agent. *International Immunopharmacology*, **1**(6): 1199–1210. doi:10.1016/S1567-5769(01)00056-X

ASAD Y, BANERJI U, CAMPBELL M, JUDSON I, KAYE S, LAKHANI S, MALONEY A, O'DONNELL A, PACEY S, RAYNAUD F, SCURR M, SIMMONS L, STAPLETON S, WALTON M, WORKMAN P (2005). Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin in patients with advanced malignancies. *Journal of Clinical Oncology*, **23**(18): 4152–4161. doi:10.1200/JCO.2005.00.612

ATALAY M, KINNUNEN S, OKSALA N, VENOJÄRVİ M (2013). Stress Proteins and Heat Shock Proteins: Role in Muscle Building and Sports Nutrition. *Nutrition and Enhanced Sports Performance: Muscle Building, Endurance, and Strength*, 229–235. doi:10.1016/B978-0-12-396454-0.00023-0

AUNIS D, BENNASROUNE A, CRÉMEL G, GARDIN A, HUBERT P (2004). Tyrosine Kinase Receptors as Attractive Targets of Cancer Therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **50** : 23-38.

AVENDAÑO C, MENÉNDEZ JC (2015). Antimetabolites That Interfere With Nucleic Acid Biosynthesis. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs* (Second.). Madrid. doi:10.1016/B978-0-444-52824-7.X0001-7

BAICHWAL V., PAPAC D, BAJJI A, BRADFORD C, CARLSON R, KIM IC, KIM SH, PARKER D, PATTON JS, REEVES L, TANGALLAPALLY R, TROVATO R, WETTSTEIN D, YAGER KM (2015). Discovery of an L -alanine ester prodrug of the

Hsp90 inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **25**(22), 5254–5257.
doi:10.1016/j.bmcl.2015.09.053

BAKKESTUEN AK, GUNDERSEN LL, UTENOVA BT (2005). Synthesis, Biological Activity, and SAR of Antimycobacterial 9-Aryl-,9-Arylsulfonyl-, and 9-Benzyl-6-(2-furyl)purines. *J. Med. Chem*, **48** : 2710-2723.

BAO CH, CHENG YF, JIA YB, LIU F, MA W, SONG QX, WANG C, WANG JB, WANG N, WANG XT (2014). BIIB021 , a novel Hsp90 inhibitor , sensitizes esophageal squamous cell carcinoma to radiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **452**(4): 945–950. doi:10.1016/j.bbrc.2014.09.026

BARBARO R, BETTI L, CORSANO S, GIANNACCINI G, LUCACCHINI A, STRAPPAGHETTI G (1998). Adenosine Receptors: Synthesis, Structure Activity Relationships and Biological Activity of New 6-amino Purine Derivatives. *Eur. J. Med. Chem*, **33**: 501-508.

BASSO A, CHIOSIS G, HE H, HUEZO H, LUCAS B, MODRICH P, ROSEN N, SOLIT D, SPAMPINATO C, VILECHIK M (2004). Targeting Wide-Range Oncogenic Transformation via PU24FCl, a Specific Inhibitor of Tumor Hsp90. *Chem. Biol*, **11**: 787-789.

BASSO A, CHIOSIS G, HUEZO H, LUCAS B, ROSEN N, SOLIT D (2003) Development of Purine-Scaffold Small Molecule Inhibitors of Hsp90. *Current Cancer Drug Targets*, **31**: 371-376.

BASSO A, CHIOSIS G, HUEZO H, LUCAS B, ROSEN N, SOLIT D (2003). Development of Purine-Scaffold Small Molecule Inhibitors of Hsp90. *Current Cancer Drug Targets*, **31** : 371-376.

BASSO A, CHIOSIS G, SOLIT D, HE H, HUEZO H, LUCAS B, MODRICH P, ROSEN N, SPAMPINATO C, VILENCHIK M (2004). Targeting Wide-Range Oncogenic Transformation via PU24FCl, a Specific Inhibitor of Tumor Hsp90. *Chem. Biol*, **11** : 787-789.

- BAUER PA, JAATTELAL M, LI GC, WISSING D (1992). Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from necrosis factor cytotoxicity. *The EMBO Journal*, **11**(10): 3507–3512.
- BERNE RM. (1963). Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am. J. Physiol*, **204** (2) : 317–322.
- BHAVANA G, DILEEP S, DINESH S, NIDHI S, SHIKHA G (2012). Biological Activities of Purine Analogues: a Review. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, **1**(2), 29–34. Erişim Adresi : [www.jpsonline.com] Erişim Tarihi : 5 Haziran 2020.
- BHULLAR KS, HUBBARD BP, LAGARÓN NO, MCGOWAN EM, PARMAR I, JHA A, RUPASINGHE HPV (2018). Kinase-targeted cancer therapies : progress , challenges and future directions. *Molecular Cancer*, 1–20. doi: 10.1186/s12943-018-0804-2.
- BIAMONTE MA, BOEHM MF, BURROWS FJ, BUSCH DJ, SHI J, DURST DC, FAN J, HONG K, KAMAL A, KARJIAN PA, KASIBHATLA SR, LOUGH RE, LUNDGREN K, MALDONADO AA, SENSINTAFFAR JL, TIMONY GA, YANG YC, ZHANG L (2006). Orally Active Purine-Based Inhibitors of the Heat Shock Protein 90. *J. Med. Chem*, **49**: 817-828.
- BONA RD, CHIOSIS G, LI Z, USMANI SZ (2010). The Anti-Myeloma Activity Of A Novel Purine scaffold HSP90 inhibitor PU-H71 is via inhibition of both HSP90A and HSP90B1. *Journal of Hematology & Oncology*, **3**(1): 40. doi:10.1186/1756-8722-3-40
- BRAY F, DE MARTEL C, FERLAY J, FRANCESCHI S, PLUMMER M, VIGNAT J (2016). Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *The Lancet Global Health*, **4**(9): e609–e616. doi:10.1016/S2214-109X(16)30143-7
- BROWNE H, MASSEY AJ, MURRAY JB, DOKURNO P, SHAW T, MACÍAS AT, DANIELS Z, GEOFFROY S, DOPSON M, LAVAN P, MATASSOVA N, FRANCIS GL, GRAHAM CJ, PARSONS R, WANG Y, PADFIELD A, COMER M, DRYSDALE MJ, WILLIAMSON DS, WOOD M. (2010). A novel, small molecule inhibitor of Hsc70/Hsp70 potentiates Hsp90 inhibitor induced apoptosis in HCT116 colon carcinoma cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **66**(3): 535–545.

BUETTNER R, CHEN CC, KUMAR B, CHEN LS, WENNERBERG K, THOMPSON R, PEMOVSKA T, LI L, GANDHI V, MARCUCCI G, PULLARKAT V, ROSEN ST (2015). 8-Chloro-Adenosine Inhibits Molecular Poor-Risk Acute Myeloid Leukemia (AML) and Leukemic Stem Cells (LSC) Growth Via Novel RNA- and ATP-Directed Mechanisms: A Novel Therapeutic Approach for AML. *Blood*, **126** (23): 792. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V126.23.792.792>

BURCHENAL JH, CRAVER LF, DARGEON HW, ELLISON RR, KAMOFISKY DA, LEONE LA, MURPHY ML, RHOADS CP, SYKES MP, TAN TC (1953). Clinical evaluation of a new metabolite, 6-mercaptopurine, in the treatment of leukemia and allied diseases. *Blood*. **8** : 965–999.

CAO S, LIN X, LIU T, MEI Q, RIOS Z, WU J (2017). Heat Shock Proteins and Cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*, **38**(3): 226–256. doi:10.1016/j.tips.2016.11.009

CHABNER BA, LONGO DL (2019). *Cancer chemotherapy, immunotherapy and biotherapy: Principles and practice, sixth edition. Cancer Chemotherapy, Immunotherapy and Biotherapy: Principles and Practice, Sixth Edition* (Sixth.).

CHANG L, EVANS CG, GESTWICKI JE (2010). Heat Shock Protein 70 (Hsp70) as an Emerging Drug Target Introduction to Hsp70 Structure and Function. *Journal of Medicine chemistry*, **53**(12), 4585–4602. doi:10.1021/jm100054f.Heat

CHANG YT, GRAY NS, KWON S, LEOST M, MEIJER L, NORMAN TC, ROSANIA GR, SAROHIA R, SCHULTZ PG, SUTHERLIN DP (1999). Synthesis and application of functionally diverse 2,6,9-trisubstituted purine libraries as CDK inhibitors. *Chemistry and Biology*, **6**: 361-375.

CHAO YL, CHENG YR, CHERNG YC, CHERNG YT, HUANG LK, JANG JP (2007). An efficient synthesis of substituted cytosines and purines under focused microwave irradiation. *Tetrahedron*, **63**: 5323-5327.

CHIOSIS G, LUCAS B, MUNSTER MN, ROSEN NA, SEPP-LORENZINO L, TIMAUL

- MN, ZHENG FF (2001). Small Molecule Designed to Bind to the Adenine Nucleotide Pocket of Hsp90 Causes Her2 Degradation and the Growth Arrest and Differentiation of Breast Cancer Cells. *Chem. Biol*, **8** : 289-299.
- CHIOSIS G, JHAVERI K, MODI S, TALDONE T (2012). Advances in the clinical development of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors in cancers ☆. *BBA - Molecular Cell Research*, **1823**(3): 742–755. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.10.008
- COLE QP, ENGLISH JP, LAMPEN JO, ROBLIN RO, VAUGHAN JR (1945). Studies in Chemotherapy. VIII. Methionine and Purine Antagonists and their Relation to the Sulfonamides. *J. Am. Chem. Soc*, **67** : 290-294.
- CRONSTEIN BN, HIRSCHHOM R, KRAMER SB, ROSENSTEIN ED, WEISSMANN G (1985). Adenosine Modulates the Generation of Superoxide Anion by Stimulated Human Neutrophils via Interaction with a Specific Cell Surface Receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **451** : 291-301.
- DE AZEVEDO WF, HAVLICEK L, KIM SH, LECLERC S, MEIJER L, STRNAD M (1997). Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogue Crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur. J. Biochem*, **243**: 518-526.
- DEVITA VT, LAWRENCE T, ROSENBERG SA (2018). *Cancer Principles & Practice of Oncology*. Вестник КазНМУ (11th bs., C. №3). Cancer Principles & Practice of Oncology.
- FABBRO D, MCCORMICK F (2006). *Protein Tyrosine Kinases From Inhibitors to Useful Drugs*.
- FINK AL (1999). Chaperone-Mediated Protein Folding. *Physiological Reviews*, **79** (2) : 425-449.
- GARRIDO C, HAZOUMÉ A, JEGO G, SEIGNEURIC R (2013). Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Letters*, **332**(2): 275–285. doi:10.1016/j.canlet.2010.10.014
- GREENBERG SM, ROBBINS RK, ROSS LO (1959). Potential Purine Antagonists

XXI. Preparation of Some 9-Phenyl-6-Substituted Purines. *J. Org. Chem*, **24** (9): 1314-1317.

GREENGARD P, KNOCKAERT M, MEIJER L (2002). Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends in Pharmacological Sciences*, **23**: 417-425.

GRIERSON DS, LEGRAVEREND M (2006). The Purines: Potent and Versatile Small Molecule Inhibitors and Modulators of Key Biological Targets. *Bioorg. Med. Chem*, **14**: 3987-4006.

GRIERSON DS, LEGRAVEREND M (2006). The purines: Potent and versatile small molecule inhibitors and modulators of key biological targets. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **14**(12): 3987–4006. doi:10.1016/j.bmc.2005.12.060

HAESSLEIN JL, JULLIAN N (2002). Recent Advances in Cyclin-Dependent Kinase Inhibition. Purine-Based Derivatives as Anti-Cancer Agents. Roles and Perspectives for the Future. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2**:1037-1050.

HAESSLEIN J, JULLIAN N (2005). Recent Advances in Cyclin-Dependent Kinase Inhibition. Purine-Based Derivatives as Anti-Cancer Agents. Roles and Perspectives for the Future. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2**(9): 1037–1050. doi:10.2174/1568026023393291

HRUBY V, VARDANYAN R (2016). *Synthesis of Best-Seller Drugs*. Arizona. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411492-0.00028-6

JOHNS DG, SARTORELLI AC (1975). Antineoplastic and Immunosuppressive Agents II, **51**: 458-460.

JONES M, MILLINER KJ, RANA KK, WARD JG, YOUNG RC (1990). Purine Derivatives as a Competitive Inhibitors of Human Erythrocyte Membrane Phosphatidylinositol 4-kinase. *J. Med. Chem*, **33** (8): 2073-2080.

KIM HJ, LEE SH, LIM JH, YUN CW (2019). Heat Shock Proteins: Agents of Cancer Development and Therapeutic Targets in Anti-Cancer Therapy. *Cells*, **9**(1): 60. doi:10.3390/cells9010060

- KOWALSKA A, LATOCHA M, PLUTA K (2018). Synthesis and anticancer activity of multisubstituted purines and xanthenes with one or two propynylthio and aminobutynylthio groups. *Medicinal Chemistry Research*, **27**(5): 1384–1395. doi:10.1007/s00044-018-2155-3
- LEVENE PA, LONDON ES (1929). The structure of thymonucleic acid. *J. Biol. Chem*, **83** : 793–802.
- LİND MJ (2020). Principles of systemic anticancer therapy. *Medicine (United Kingdom)*, **48**(2): 90–96. doi:10.1016/j.mpmed.2019.11.005
- MATHİEU C, PİRENNE J, SPRANGERS BEN, WAER M (2019). *Other Forms of Immunosuppression. Kidney Transplantation: Principles and Practice* (Eighth Edi.). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-323-53186-3.00020-6
- MCALPİNE SR (2016). *Heat Shock Protein Inhibitors* (C. 19). doi:10.1007/978-3-319-32607-8
- MİLLER OJ (2001). Harlequin Chromosomes. *Encyclopedia of Genetics*, 914. doi:10.1006/rwgn.2001.0586
- MUKHOPADHYAY AK, PAUL MK (2004). Tyrosine Kinase– Role and Significance in Cancer. *Int. J. Med. Sci*, **1**: 101-115.
- NECKERS L, WORKMAN P (2012). Hsp90 molecular chaperone inhibitors: Are we there yet? *Clinical Cancer Research*, **18**(1): 64–76. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1000
- OLSSON RA (2003). Robert Berne: His Place in the History of Purine Research. *Drug Development Research*, **58** : 296-301.
- Ouellette RJ, Rawn JD (2018). Nucleotides and Nucleic acids. *Organic Chemistry (Second Edition)* içinde (second., ss. 973–1000). Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-812838-1.50030-X
- ROSEMEYER H (2004). The Chemodiversity of Purine as a Constituent of Natural Products. *Chemistry and Biodiversity*, **1** (3) : 361:401.

RUCCI N, ŠUŠA M, TETI A (2008). Inhibition of Protein Kinase c-Src as a Therapeutic Approach for Cancer and Bone Metastases. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **8**: 342-349.

SAİNİ J, SHARMA PK (2017). Clinical, Prognostic and Therapeutic Significance of Heat Shock Proteins in Cancer. *Current Drug Targets*, **19**(13): 1478–1490. doi:10.2174/1389450118666170823121248

SHAW G (1984). Purines. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry* (ss. 499–605). doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-008096519-2.00077-1

TUNCBILEK M, BILGET GUVEN E, ONDER T, CETIN ATALAY R. (2012). Synthesis of novel 6-(4-substituted piperazine-1-yl)-9-(β -d-ribofuranosyl) purine derivatives, which lead to senescence-induced cell death in liver cancer cells. *J. Med Chem*, **55** (7):3058-3065.

TUNCBILEK M, KUCUKDURLU A, GUVEN EB, ALTIPARMAK D, CETIN-ATALAY R. (2018). Synthesis of novel 6-substituted amino-9-(β -d-ribofuranosyl) purine analogs and their bioactivities on human epithelial cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett*, **28** (3):235-239.

WELDERPASS ESB, WİLD CP, (2020). *World cancer report: Cancer Research for Cancer Prevention*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. (S. B. Wild CP, Welderpass E, Ed.) *World Health Organization*. Lyon. Erişim Adresi : [http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014] Erişim Tarihi : 6 Haziran 2020.

WORKMAN P (2004) Combinatorial attack on multistep oncogenesis by inhibiting the Hsp90 molecular chaperone. *Cancer Letters*, **206** : 149–157.

World Health Organization. (2020). Cancer. Erişim Adresi : [https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1] Erişim Tarihi: 6 Haziran 2020.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Pınar
Soyadı : KUL
Doğum yeri ve tarihi : Şahinbey, 23.04.1993
Uyruğu : T.C.
İletişim : Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik
Kimya Araştırma Laboratuvarı, 0312 2033073
E-posta : pkul@ankara.edu.tr

II- Eğitimi

2017-2020 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya
Anabilim Dalı (Yüksek Lisans)
2012-2017 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (Lisans)
2007-2011 Kanuni Anadolu Lisesi / Trabzon
Yabancı dili: İngilizce

III- Ünvanları

2017- Eczacı

IV- Mesleki Deneyimi

2018- Araştırma Görevlisi, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Kimya Anabilim Dalı

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

- Türk Farmasötik ve Medisinal Kimya Derneği