

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

DOKTORA TEZİ

YENİ HETEROSİKLİK BİLEŞİKLERİN *IN SILICO* TASARLANMASI,
SENTEZLENMESİ, YAPILARININ AYDINLATILMASI VE MİKROBİYOLOJİK
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Sanaz Ataei

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. İlkay YILDIZ

Eylül

2018

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

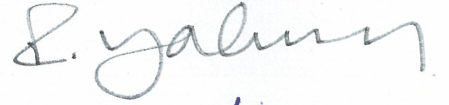
Sanaz Ataei



ONAY

Prof. Dr. İlkay Yıldız danışmanlığında Sanaz Ataei tarafından hazırlanan bu çalışma 13/09/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. İsmail YALÇIN

İmza: 

Üye: Prof. Dr. İlkay YILDIZ

İmza: 

Üye: Prof. Dr. Tijen ÖNKOL

İmza: 

Üye: Prof. Dr. Hakan GÜRDAL

İmza: 

Üye: Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU

İmza: 

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Yeni Heterosiklik Bileşiklerin *In Silico* Tasarlanması, Sentezlenmesi, Yapılarının Aydınlatılması ve Mikrobiyolojik Etkilerinin İncelenmesi

Sanaz Ataei

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman öğretim üyesi: Prof. Dr. İlkay Yıldız

Antibiyotiklere karşı gelişen direncin giderek artması çeşitli enfeksiyonların tedavilerinde kullanılan yeni antibiyotiklerin keşfini zorunlu hale gelmiştir. Bakteri hücresinin replikasyon, transkripsiyon ve translasyon işlemlerinde oldukça önemli rol oynayan bakteriyel DNA topoizomera II enzimi, yeni antibakteriyel ajanların keşfinde oldukça önemli bir hedef oluşturmaktadır. Bu tez çalışma kapsamında bakteriyel topoizomera II enziminin bir alt birimi olan DNA giraz üzerinden moleküler doking çalışmaları gerçekleştirilerek bu enzimi inhibe edebileceğini düşündüğümüz yeni 3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoksazin türevi bileşikler tasarlanmıştır. Moleküler doking işlemleri sonucunda etkili olabileceği düşünülen bileşikler üzerinden, 13 tanesi orijinal olmak üzere toplam 19 adet bileşik sentezlenerek *in vitro* ortamda mikrobiyolojik etkileri saptanmıştır.

Moleküler modelleme çalışmasında, tasarlanan 3,4-dihidro-2*H*-1,4 benzoksazin türevi bileşiklerin DNA giraz (PDB kodu: 4Z2D) enzimiyle olan etkileşimleri moleküler doking çalışmalarıyla incelenmiştir. Etkili olabileceği saptanan 3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoksazin türevlerinin sentezi, süstitüe aminofenol türevlerinin mono etil fumarik asit veya dikloroasetil klorür ile reaksiyonu sonucunda gerçekleştirilmiştir.

Sentezlenen bileşiklerin İTK yöntemiyle saflıkları kontrol edildikten sonra, erime noktaları belirlenmiş ve yapıları ¹H-NMR, ¹³C-NMR, Kütle, IR ve elementel analiz yöntemleri kullanılarak aydınlanmıştır.

Sentezlenen bileşiklerin *in vitro* antibakteriyel aktiviteleri *E.coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213 ve *E. faecalis* ATCC 29212; antifungal aktiviteleri *C. albicans* ATCC 10231 mikroorganizmalarına karşı test edilmiş ve aktiviteleri >32 µg/mL MİK değerleri arasında oldukça zayıf bulunmuştur. Ayrıca bileşiklerin dirençli *Acinetobacter baumannii* suşlarına karşı meropenem ile kombine kullanılması sonucunda dirençli MİK değerini direnç sınırının altına düşüren bir etki görülmemiştir.

2018, 186 sayfa

Anahtar Kelimeler: Benzoksazin, DNA Giraz, Moleküler Doking, Antimikrobiyal etki

ABSTRACT

PhD Thesis

In Silico Design, Synthesis, Structure Elucidation and Investigation of Microbiological Effects of New Heterocyclic Compounds

Sanaz Ataei

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Prof. Dr. İlkey Yıldız

Increasing resistance toward antibiotics has led to discovering new antibiotics used in the treatment of various infections. The bacterial DNA topoisomerase II enzyme, which plays an important role in the processes of replication, transcription and translation of bacterial cells, is a very important target in the discovery of new antibacterial agents. In this thesis, by performing molecular docking studies on DNA gyrase, a subunit of bacterial topoisomerase II enzyme, novel 3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazin derivatives which we thought they would be able to inhibit this enzyme were designed. A total of 19 compounds, originally 13, were synthesized on compounds thought to be effective as a result of molecular docking, and *in vitro* microbiological effects were determined.

In the molecular modeling study, the interactions of the designed 3,4-dihydro-2H-1,4 benzoxazin derivative compounds with the DNA gyrase (PDB code: 4Z2D) enzyme were investigated by molecular docking studies. Afterwards 3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazin derivatives which would be effective, were synthesized by reaction of substituted aminophenol derivatives with mono ethyl fumaric acid or dichloroacetyl chloride.

The synthesized compounds purities were controlled by the ITC method, melting points were determined and the structures were elucidated by ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MASS, IR and elemental analysis methods.

In vitro antibacterial activities of the synthesized compounds were determined in *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213 and *E. faecalis* ATCC 29212; antifungal activities were tested against *C. albicans* ATCC 10231 microorganisms and their activities were found to be very weak between >32 µg / mL MIC values. In addition, the use of compounds in combination with meropenem against resistant *Acinetobacter baumannii* strains did not show an effect that lowered the resistant MIC value below the resistance limit.

2018, 186 pages

Keywords: Benzoxazin, DNA Gyrase, Molecular Docking, Antimicrobial activity

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans yaptığımda artık bu aşamada bilimsel hayatımı noktalarım diye düşündüğümde bilimi bana sevdiren ve doktora yapmama sebep olan, bir araştırmacı olmak üzere bilimsel hayatımda bana ışık tutan yol gösteren, yardımlarını fikirlerini esirgemeyen, Türkiye’ de bana aile eksikliğini hissettirmeyen, güvendiğim, saygı duyduğum değerli tez danışmanım sevgili hocam sayın Prof. Dr. İlkey YILDIZ’ a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Sevgi dolu, iyilik dolu, yardım sever o güzel yüreğiniz hep böyle kalsın hocam.

Kanatsız bir melek olan, hayatı boyunca herkese yardımcı olan bendeki olan haklarını hiçbir zaman unutmayacağım ve nasıl öderim diye düşündüğüm, iyi ki bu hayatta yollarım kesişti dediğim, o kadar çok şey yazmak istemek ama kelimelerin naçiz kaldığı insan, sevgili Dr. Öğr. Üyesi Serap YILMAZ’ a sonsuz teşekkürlerimi ve minnettarlığımı sunarım.

Kardeş dediğim ve pozitif enerjisiyle çalışmalarım sırasında her zaman yardımcı olan yanımda olan sevgili Dr. Ecz.Tuğba ERTAN BOLELLİ’ye ve çalışmalarım sırasında destek ve yardımlarını gördüğüm Dr. Ecz. Zuhale KILIÇ KURT ve Dr. Ecz. Kayhan BOLELLİ’ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında bana rahat bir çalışma ortamı sağlayan Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Dekanı Sayın Prof. Dr. Gülbin ÖZÇELİKAY’a; Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hakan GÖKER’e ve başta Prof. Dr. İsmail YALÇIN ve Prof. Dr. Esin AKI-YALÇIN olmak üzere anabilim dalındaki diğer hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Aletsel analiz çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Hakan GÖKER’e ve elementel analiz çalışmaları sırasında yardımlarını aldığım Doç. Dr. Mehmet ALP’e teşekkürlerimi sunarım.

Mikrobiyolojik çalışmaların yapılmasında yardımcı olan Trakya Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalından Prof. Dr. Fatma KAYNAK-ONURDAĞ’a ve Doç. Dr. Suzan ÖKTEN’e teşekkürlerimi sunarım.

Benim için bu hayatta en değerli olan kavram aileme, çınar gibi arkamda olan Babam Manochehr Ataei, disiplin ve fedakarlığıyla beni bugünlere yönlendiren Annem Poorandokht Ataei, insanın hayatta sizin gibi kardeşleri olması gerektiğini dediğim kardeşlerim; Sadena, Afshin ve Amir’e teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez Bilim Sanayi ve Teknoloji Bakanlığının SAN-TEZ projesi (proje no: 00918.STZ.2011-1) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	ii
ONAY	iii
TEŞEKKÜR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. Antibiyotiklere Ait Genel Bilgiler	3
2.1.1. Bakteri Hücre DuvarSentezini Bozan ve Litik Enzimleri Aktive Edenler	3
2.1.2. Hücre Membranının Permeabiletisini Bozanlar.....	3
2.1.3. Ribozomlardaki Protein Sentezini Bozanlar	4
2.1.4. Genetik Materyal Üzerinde Etki Yapanlar	5
2.1.5. Bakteriyel Antimetabolitler.....	5
2.2. Mikroorganizmalarda Direnç Mekanizmaları.....	6
2.2.1. Doğal Direnç	6
2.2.2. Genetiğe Bağlı Olmayan Direnç	7
2.2.3. Kazanılmış Direnç	7
2.2.3.1. Kromozomal Direnç.....	7
2.2.3.2. Ekstrakromozomal Direnç.....	8
2.3. Direnç Biyokimyası	8
2.3.1. Hedef Modifikasyonu	8
2.3.2. Enzimatik İnaktivasyon	9
2.3.3. Hücre Zar Geçirgenliğinde Azalma	9
2.3.4. Dışa Atım Pompaları ile İlaç Atımı	10
2.3.4.1. Primer Taşıyıcılar	11
2.3.4.2. Sekonder Taşıyıcılar.....	11
2.4. DNA Topoizomeraz Enzimleri	14

2.4.1.	Bakteriyel Topoizomeraz Enzimleri	14
2.4.2.	Bakteriyel Topoizomeraz Enzim II İnhibitörleri	18
2.4.2.1.	Gyr A İnhibitörleri.....	18
2.4.2.2.	GyrB İnhibitörleri.....	22
2.5.	Antibakteriyel Etki Gösteren Benzoksazin Türevleri	22
2.6.	1,4-Benzoksazin Türevlerinin Genel Sentez Yöntemleri	28
2.7.	Moleküler Modelleme Çalışmaları	35
2.7.1.	Reseptör Tabanlı İlaç Tasarımı	36
2.7.1.1.	Doking Yöntemi	36
2.7.2.	Tahmini Farmakokinetik Özelliklerin Hesaplanması	38
2.7.2.1.	İlaçların Absorbsiyonu.....	38
2.7.2.2.	İlaçların Dağılımı.....	39
2.7.2.3.	İlaçların Metabolizması	39
2.7.2.4.	İlk Geçiş Eliminasyonu.....	40
3.	GEREKÇE VE AMAÇ	41
4.	MATERYAL VE YÖNTEM.....	44
4.1.	Materyal	44
4.1.1.	Yapı-Etki İlişki Analizleri.....	44
4.1.1.1.	Yapı-Etki İlişki Analizlerinde Kullanılan Programlar.....	44
4.1.2.	Tasarlanan Bileşiklerin Sentezi.....	44
4.1.2.1.	Kullanılan Araç ve Gereçler.....	44
4.1.2.2.	Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	45
4.1.3.	Sentezlenen Bileşiklerin Biyolojik Etki Çalışmaları	45
4.1.3.1.	Sentezlenen Bileşiklerin Biyolojik Etki Çalışmalarında Kullanılan Gereçler ve Maddeler	45
4.1.3.2.	Kullanılan Mikroorganizmalar	46
4.2.	Yöntem.....	46
4.2.1.	Yapı-Etki İlişki Analizleri.....	46
4.2.1.1.	Doking Çalışmaları (CDOCKER Yöntemi)	46
4.2.1.1.1.	Ligandların Hazırlanması	47

4.2.1.1.2. Proteinin Hazırlanması	48
4.2.1.2. Tahmini Farmakokinetik Özelliklerin Hesaplanması	49
4.2.2. Tasarlanan Bileşiklerin Sentezi.....	50
4.2.2.1. Elde Edilen Bileşiklerin Sentezleri, Reaksiyon Denklemleri ve Saflaştırma Yöntemleri	50
4.2.2.2. Elde Edilen 4/5/6/7-Süstitüe-3,4-dihidro-2-hidroksi-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-3-on Türevi Bileşiklerin Sentezi, Reaksiyon Denklemleri ve Saflaştırma Yöntemleri (Yöntem 1).....	51
4.2.2.3. Etil 3,4-Dihidro-5/7-süstitüe-3-okso-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-2-asetat ve Etil 4/5/7-Süstitüe-3-okso-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-2-asetat Türevi Bileşiklerin Sentezi, Reaksiyon Denklemleri ve Saflaştırma Yöntemleri (Yöntem 2)	52
4.2.3.1. Elde Edilen Bileşiklerin Kütle Spektrel Analizleri	55
4.2.3.2. Elde Edilen Bileşiklerin ¹ <i>H</i> -NMR Spektrel Analizleri.....	55
4.2.3.3. Elde Edilen Bileşiklerin Elementel Analizleri.....	56
4.2.4. Sentezlenen Bileşiklerin Mikrobiyolojik Etki Tayini Yöntemleri.....	56
4.2.4.1. Mikrodilüsyon Yöntemi.....	56
4.2.4.2. Mikrodilüsyon Yöntemi 2	58
4.2.4.3. Kullanılan Mikroorganizmaların Özellikleri	59
5. ARAŞTIRMA BULGULARI	60
5.1. Tasarlanan Bileşiklerin DNA Giraz Enzimi Üzerinde Moleküler Dokimg Çalışmaları	60
5.1.1. 3,4-Dihidro-2 <i>H</i> -1,4-benoksazin Bileşiklerin 4Z2D Enzimi ile Etkileşimleri.....	61
5.1.1.1. Sis01 Bileşiğinin 4Z2D Enzimi ile Etkileşimleri:.....	61
5.1.1.2. Sis04 Bileşiğinin 4Z2D Enzimi ile Etkileşimleri.....	62
5.1.1.3. Sis07 Bileşiğinin 4Z2D Enzimi ile Etkileşimleri.....	62
5.1.1.4. Sis12 Bileşiğinin 4Z2D Enzimi ile Etkileşimleri.....	63
5.1.1.5. Sis18 Bileşiğinin 4Z2D Enzimi ile Etkileşimleri.....	64
5.1.1.6. Levofloksazin Ligandın 4Z2D Enzimi ile Etkileşimleri	64
5.2. Tasarlanan Bileşiklerin Farmakokinetik Özelliklerin Hesaplanması.....	66
5.3. Elde Edilen Bileşiklerin Sentez ve Analiz Bulguları	68
5.3.1. 3,4-Dihidro-2-hidroksi-6-nitro-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-3-on (Sis01).....	68

5.3.2.	3,4-Dihidro-2-hidroksi-7-kloro-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-3-on (Sis02)	71
5.3.3.	3,4-Dihidro-2-hidroksi-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-3-on (Sis03)	74
5.3.4.	4-Etil-3,4-dihidro-2-hidroksi-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-3-on (Sis04).....	76
5.3.5.	3,4-Dihidro-2-hidroksi-7-metil-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-3-on	80
5.3.6.	3,4-Dihidro-2-hidroksi-6-kloro-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-3-on (Sis06)	82
5.3.7.	3,4-Dihidro-2-hidroksi-5-metil-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-3-on (Sis07)	84
5.3.8.	3,4-Dihidro-2-hidroksi-4-metil-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-3-on (Sis08)	87
5.3.9.	3,4-Dihidro-2-hidroksi-6-kloro-4-propil-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-3-on (Sis09).....	90
5.3.10.	4-Etil-3,4-dihidro-2-hidroksi-6-kloro-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-3-on (Sis10).....	93
5.3.11.	Etil 3,4-Dihidro-7-kloro-3-okso-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-2-asetat (Sis11).....	96
5.3.12.	Etil 4-Etil-7-kloro-3-okso-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-2-asetat (Sis12)	98
5.3.13.	Etil 7-Kloro-4-metil-3-okso-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-2-asetat (Sis13)	102
5.3.14.	Etil 3,4-Dihidro-7-metil -3-okso-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-2-asetat (Sis14).....	105
5.3.15.	Etil 4-Etil-7-metil-3-okso-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-2-asetat (Sis15).....	107
5.3.16.	Etil 4-Metil-7-metil-3-okso-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-2-asetat(Sis16).....	111
5.3.17.	Etil 3,4-Dihidro-7-metil-3-okso-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-2-asetat (Sis17)	114
5.3.18.	Etil 4-Etil-5-metil-3-okso-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-2-asetat (Sis18).....	116
5.3.19.	Etil 4-Metil-5-metil-3-okso-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-2-asetat(Sis19).....	120
5.4.	Elde Edilen Bileşiklerin Gözlenen Mikrobiyolojik Etkileri	124
6.	TARTIŞMA VE SONUÇ	126
	KAYNAKLAR.....	133
	ÖZGEÇMİŞ.....	141
	TEZDEN ÇIKARILAN YAYINLAR	146

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Sülfametoksazol (a) ve Trimetoprim (b)	6
Şekil 2.2. Primer taşıyıcılar	11
Şekil 2.3. Direnç-düğümleme hücre bölünmesi ailesinin genel yapısı	12
Şekil 2.4. DNA topoizomeraaz çeşitleri	14
Şekil 2.5. Topo IV ve DNA giraz enzimin işlem şeması	15
Şekil 2.6. DNA giraz yapısı.....	16
Şekil 2.7. DNA girazın DNA ile etkileşim mekanizması.....	17
Şekil 2.8. İkili metal-iyon mekanizması.....	18
Şekil 2.9. (a) Novobiosin, (b) Klorobiosin	22
Şekil 2.10. 3-(2-(4-Bromofenil)-2-oksoetiliden-6-(etilsülfonil)-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-2-on bileşiği	25
Şekil 2.11. 1,4-Benzoksazin-3(4H)-on bileşiğin enzimatik olarak sentezi	28
Şekil 2.12. 2-Süstitüe-2H-1,4-benzoksazin-3(4H)-on bileşiklerin sentez yöntemi.....	29
Şekil 2.13. 4-Hidroksi-2H-1,4-benzoksazin-3(4H)-on türevlerin sentezi	29
Şekil 2.14. Süstitüe-2H-1,4-benzoksazin-3(4H)-on türevlerinin reaksiyon şeması	29
Şekil 2.15. 3,4-Dihidro-2H-1,4-benzoksazin türevlerinin eldesi.....	30
Şekil 2.16. Katı-faz kombinatoriyal yöntemiyle 1,4-benzoksazin-3-on türevlerinin sentezi.....	30
Şekil 2.17. 4-(3,4-Diklorofenil)-2-(2-hidroksietil)-2H-1,4-benzoksazin-3-on bileşiğinin reaksiyon şeması.....	31
Şekil 2.18. 2-(2-Hidroksietil)-2H-1,4-benzoksazin-3(4H)-on bileşiğinin sentezi.....	31
Şekil 2.19. 2-Hidroksi-2H-1,4-benzoksazin-3(4H)-on ve etil 2-(3-okso-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-2-il) asetat türevlerinin sentezi	32
Şekil 2.20. Etil 2-(3-okso-4-alkil-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-2-il) asetat türevlerinin sentezi	32
Şekil 2.21. 4-(Fenilsülfonil)-8-(piperazin-1-il)-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin bileşiklerin sentezi	33
Şekil 2.22. 1,4-Benzoksazin-2,3-dikarboksimid türevlerinin sentezi.....	33
Şekil 2.23. Diels-Alder reaksiyonuyla çeşitli 1,4-benzoksazin türevlerinin sentezi	34
Şekil 2.24. 6. konumunda sülfonamid grubu taşıyan 1,4-benzoksazin-3-on bileşiklerinin eldesi.....	34
Şekil 2.25. Rasyonel ilaç tasarım yöntemleri	36
Şekil 3.1. (a)DIBOA, (b)DIMBOA, (c)DIM ₂ BOA	41

Şekil 3.2. (a) Ofloksazin, (b) Levofloksazin	42
Şekil 3.3. Bakteriyel topo II inhibitörü olan 4-amino piperidin türevleri	42
Şekil 4.1. Referans ligand levofloksazin (PDB'den alınan kristal yapısı, pembe renk) ve doking sonucu bulunan en uygun konformasyon (yeşil renk).....	47
Şekil 4.2. Levofloksazinin bağlanma yöresi (73)	47
Şekil 4.3. 4Z2D enziminde belirlenen küre şeklindeki alanların koordinatları ve çapı	48
Şekil 4.4. 2,2-Dikloro- <i>N</i> -(2-hidroksi-4/5/6-sübstitüefenil)asetamid türevlerinin sentezi ...	51
Şekil 4.5. 5/6/7-Sübstitüe-3,4-dihidro-2-hidroksi-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-3-on türevlerin sentezi	52
Şekil 4.6. 4/5/6/7-Sübstitüe-3,4-dihidro-2-hidroksi-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-3-on türevlerin sentezi	52
Şekil 4.7. Monoetil fumaril klorür sentezi.....	53
Şekil 4.8.3-[(2-hidroksi-4/6-sübstitüe-fenil)karbamoil]akrilat türevlerinin sentezi.....	53
Şekil 4.9. 3,4-Dihidro-5/7-sübstitüe-3-okso-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-2-asetat türevlerinin sentezi	54
Şekil 4.10. Etil 4/5/7-sübstitüe-3-okso-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-2-asetat türevlerinin sentezi .	54
Şekil 5.1. Sis01 bileşiğinin 4Z2D enzimi ile etkileşimleri: a. 3D gösterimi., b. 2D gösterimi	61
Şekil 5.2. Sis04 bileşiğinin 4Z2D enzimi ile etkileşimleri: a. 3D gösterimi., b. 2D gösterimi	62
Şekil 5.3. Sis07 bileşiğinin 4Z2D enzimi ile etkileşimleri: a. 3D gösterimi., b. 2D gösterimi	63
Şekil 5.4. Sis12 bileşiğinin 4Z2D enzimi ile etkileşimleri: a. 3D gösterimi., b. 2D gösterimi	63
Şekil 5.5. Sis12 bileşiğinin 4Z2D enzimi ile etkileşimleri: a. 3D gösterimi., b. 2D gösterimi	64
Şekil 5.6. Levofloksazin ligandının 4Z2D enzimi ile etkileşimleri: a. 3D gösterimi., b. 2D gösterimi	65
Şekil 5.7. AlogP98 ve PSA_2D grafiği şeklinde sonuçlar	66
Şekil 5.8. Sis01 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu.....	69
Şekil 5.9. Sis01 Kodlu bileşiğe ait ¹ H-NMR spektrumu	70
Şekil 5.10. Sis01 Kodlu bileşiğe ait ¹³ C-NMR spektrumu	70
Şekil 5.11. Sis01 Kodlu bileşiğe ait IR spektrumu.....	71
Şekil 5.12. Sis02 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu.....	72

Şekil 5.13. Sis02 Kodlu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu	73
Şekil 5.14. Sis02 Kodlu bileşiğe ait ^{13}C -NMR spektrumu	73
Şekil 5.15. Sis02 Kodlu bileşiğe ait IR spektrumu	74
Şekil 5.16. Sis03 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu	75
Şekil 5.17. Sis03 Kodlu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu	76
Şekil 5.18. Sis04 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu	78
Şekil 5.19. Sis04 Kodlu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu	78
Şekil 5.20. Sis04 Kodlu bileşiğe ait ^{13}C -NMR spektrumu	79
Şekil 5.21. Sis04 Kodlu bileşiğe ait IR spektrumu	79
Şekil 5.22. Sis05 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu	81
Şekil 5.23. Sis05 Kodlu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu	81
Şekil 5.24. Sis06 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu	83
Şekil 5.25. Sis06 Kodlu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu	83
Şekil 5.26. Sis07 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu	85
Şekil 5.27. Sis07 Kodlu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu	86
Şekil 5.28. Sis07 Kodlu bileşiğe ait ^{13}C -NMR spektrumu	86
Şekil 5.29. Sis07 Kodlu bileşiğe ait IR spektrumu	87
Şekil 5.30. Sis08 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu	88
Şekil 5.31. Sis08 Kodlu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu	89
Şekil 5.32. Sis08 Kodlu bileşiğe ait ^{13}C -NMR spektrumu	89
Şekil 5.33. Sis08 Kodlu bileşiğe ait IR spektrumu	90
Şekil 5.34. Sis09 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu	91
Şekil 5.35. Sis09 Kodlu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu	92
Şekil 5.36. Sis09 Kodlu bileşiğe ait ^{13}C -NMR spektrumu	92
Şekil 5.37. Sis09 Kodlu bileşiğe ait IR spektrumu	93
Şekil 5.38. Sis10 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu	94
Şekil 5.39. Sis10 Kodlu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu	95
Şekil 5.40. Sis10 Kodlu bileşiğe ait ^{13}C -NMR spektrumu	95
Şekil 5.41. Sis10 Kodlu bileşiğe ait IR spektrumu	96
Şekil 5.42. Sis11 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu	97
Şekil 5.43. Sis11 Kodlu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu	98
Şekil 5.44. Sis12 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu	100
Şekil 5.45. Sis12 Kodlu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu	100
Şekil 5.46. Sis12 Kodlu bileşiğe ait ^{13}C -NMR spektrumu	101

Şekil 5.47. Sis12 Kodlu bileşiğe ait IR spektrumu.....	101
Şekil 5.48. Sis13 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu ($M^+ + Na$)	103
Şekil 5.49. Sis13 Kodlu bileşiğe ait 1H -NMR spektrumu	104
Şekil 5.50. Sis13 Kodlu bileşiğe ait ^{13}C -NMR spektrumu	104
Şekil 5.51. Sis13 Kodlu bileşiğe ait IR spektrumu.....	105
Şekil 5.52. Sis14 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu ($M^+ + Na$)	106
Şekil 5.53. Sis14 Kodlu bileşiğe ait 1H -NMR spektrumu	107
Şekil 5.54. Sis15 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu.....	109
Şekil 5.55. Sis15 Kodlu bileşiğe ait 1H -NMR spektrumu	109
Şekil 5.56. Sis15 Kodlu bileşiğe ait ^{13}C -NMR spektrumu	110
Şekil 5.57. Sis15 Kodlu bileşiğe ait IR spektrumu.....	110
Şekil 5.58. Sis16 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu.....	112
Şekil 5.59. Sis16 Kodlu bileşiğe ait 1H -NMR spektrumu	113
Şekil 5.60. Sis16 Kodlu bileşiğe ait ^{13}C -NMR spektrumu	113
Şekil 5.61. Sis16 Kodlu bileşiğe ait IR spektrumu.....	114
Şekil 5.62. Sis17 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu.....	115
Şekil 5.63. Sis17 Kodlu bileşiğe ait 1H -NMR spektrumu	116
Şekil 5.64. Sis18 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu.....	118
Şekil 5.65. Sis18 Kodlu bileşiğe ait 1H -NMR spektrumu	118
Şekil 5.66. Sis18 Kodlu bileşiğe ait ^{13}C -NMR spektrumu	119
Şekil 5.67. Sis18 Kolu bileşiğe ait IR spektrumu.....	119
Şekil 5.68. Sis19 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu.....	121
Şekil 5.69. Sis19 Kodlu bileşiğe ait 1H -NMR spektrumu	122
Şekil 5.70. Sis19 Kodlu bileşiğe ait ^{13}C -NMR spektrumu	122
Şekil 5.71. Sis19 Kodlu bileşiğe ait IR spektrumu.....	123
Şekil 6.1. 4/5/6/7-Süstitüe-3,4-dihidro-2-hidroksi-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-3-on türevlerinin (Sis01-Sis10) sentezi	128
Şekil 6.2. Etil 3,4-dihidro-5/7-süstitüe-3-okso-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-2-asetat ve etil 4/5/7-süstitüe-3-okso-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-2-asetat türevlerinin (Sis11-Sis19) sentezi.....	128

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Antibiyotiklerin inaktivasyonunda rol alan enzimatik yollar.....	9
Çizelge 2.2. DAP inhibitörü özellikleri tespit edilen antibiyotikler	13
Çizelge 2.3. Kinolon ve florokinolon türevleri antibakteriyel ilaçlar ve kullanımları	20
Çizelge 2.4. Son yıllarda geliştirilen florokinolon türevleri	21
Çizelge 2.5. Antibakteriyel etkileri incelenmiş 1,4-benzoksazin halkası taşıyan türevler ..	23
Çizelge 2.6. 2. konumda ester yapısı olan 1,4-benzoksazin türevleri ve MİK değerleri.....	24
Çizelge 2.7. Alper-Hayta tarafından sentezlenen bileşikler ve MİK değerleri	24
Çizelge 2.8. 3. konumunda asetat ve 2-klorofenil-2-oksoetiliden taşıyan 1,4-benzoksazin türevleri ve MİK değerleri.....	25
Çizelge 2.9. Pirido[3,2-b]1,4-oksazin halkası taşıyan olan 4-amino piperidin türevleri ve MİK değerleri	26
Çizelge 2.10. Pamerla ve arkadaşları tarafından sentezlenen türevler ve MİK değerleri ...	27
Çizelge 2.11. 1,4-Benzoksazin-6-sülfonamid türevleri ve MİK değerleri	28
Çizelge 3.1. Doktora tez kapsamında sentezlenen bileşikler.....	43
Çizelge 4.1. Doktora tez kapsamında sentezlenen bileşikler.....	50
Çizelge 5.1. DNA giraz enzimi üzerinde yapılan CDOCKER çalışmasının sonuçları ve etkileşimleri	60
Çizelge 5.2. Tasarlanan Bileşiklerin Hesaplanan ADMET sonuçları	67
Çizelge 5.3. Sentezlenen bileşiklerin ve standart antibiyotiklerin MİK değerleri.....	124

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABC	ATP-Binding Cassette transporters (ATP-bağlayıcı kaset taşıyıcıları)
ABNR	Adopted Basis Newton Raphson
ADP	Adenousine difosphate (adenozin difosfat)
ATP	Adenousine Trifosphate (adenozin trifosfat)
CCCP	Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazine
CFU	Colony-Forming Unit
CHARMn	Chemistry at Harvard Macromolecular mechanics
CTD	C terminal domain
DAIB	Diasetoksiyodobenzen
DAP	Dış Atım Pompası
DIBOA	2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one
DIM ₂ BOA	2,4-dihydroxy-7,8-dimethoxy-1,4-benzoxazin-3-one
DIMBOA	2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one
DMF	Dimethylformamide (Dimetilformamid)
DMSO	DiMethyl SulphOxide
E.N	Erime Noktası
ESI	Electrospray Ionization(Elektrosprey İyonizasyonu)
FT-NMR	Fourier-Transform Nuclear Magnetic Resonance
GHKL	Giraz, Hsp90, Histidin Kinaz, MutL
INH	Isonikotinilhidrazid (Isonikotinilhidrazid)
IR	Infrared Spectroscopy
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
MATE	Multi-drug and toxic compound excretion family (Çoklu-ilaç ve toksik bileşik atılımı familyası)
MDR	Multi Drug Resistance (Çoklu İlaç Direnci)
MFS	Major Facilitator Superfamily (Başlıca kolaylaştırıcı üstfamilyası)
MHA	Mueller Hinton Agar
MHB	Mueller Hinton Broth
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MOPS	3-morpholinopropane-1-sulfonic acid
MRSA	Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (Metisilin Dirençli)

NMP	N-Methyl-2-Pyrrolidone (N-Metil-2-Pirrolidon)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi)
PAS	<i>p</i> - amino salicylic acid (<i>p</i> - amino salisilik asit)
PAβN	phenylalanine-arginine beta-naphthylamide
PBP	Penicillin Binding Protein (Penisilin Bağlayan protein)
PDB	Protein Data Bank
R _f	Resolution factor (rezolüsyon faktörü)
RMSD	Root-mean-square deviation
RND	Resistance-knotting cell division family (Direnç-düğümleme hücre bölünmesi familyası)
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
SLM	Sabouraud Liquid Medium
SMR	Small-Multiple resistance family (Küçük-Çoklu direnç familyası)
TMS	TetraMethylSilane (tetrametilsilan)
TOPRIM	Topoizomeraz/PRIMaz
VRE	Vancomycin-resistant Enterococcus (Vankomisin Dirençli Enterokok)

1. GİRİŞ

Antibiyotikler 1940'lı yıllarından itibaren enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan ilaçlar arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Antibiyotikler çocuk ölümlerinin azalması, ameliyat sonrası enfeksiyon oluşumunun engellenmesi ve kemoterapi ilaçların kullanma esnasında tıbbi destek olarak oldukça önem taşımaktadırlar. Araştırmalara göre Asya ve Afrika'da hastaneye yatırılan her iki hastadan birine, Avrupa'da her üç hastadan birine antibiyotik tedavisi uygulanır. Gelişmekte olan birçok ülkenin sağlık bütçelerinin %35'i de antibiyotiklere ayrılmış durumdadır. Ancak sık kullanılan ve maliyeti yüksek olan bu ilaçların gereksinim duyulmadan bilinçsiz kullanımı, tedavide başarısızlığı, yüksek maliyeti ve bakterilere direnç kazanımına sebep olmaktadır. Bu durum mevcut antibiyotiklerin kullanılamaması ve yeni antimikrobiyal ilaçların gereksinimi sonucu ortaya çıkmaktadır. Yeni bir antibiyotiğin bulunması uzun zaman isteyen çalışmalarla birlikte yüksek maliyet gerektirmektedir. Bundan dolayıda keşif şansı giderek azalmaktadır (1).

Bazı antibiyotikler sadece kısıtlı sayıda farklı bakteri türü ile savaşabilecek şekilde geliştirilmiştir, bu çeşit antibiyotiklere “dar spektrumlu antibiyotikler” denilir diğer antibiyotikler ise daha çeşitli bakterilere etki edebilmektedir ve “geniş spektrumlu” olarak adlandırılmaktadırlar.

Antibiyotik direnci özel olarak bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç göstermesidir. Antibiyotiklere rağmen bakterilerin ölmemeleri veya üremeye devam etmeleri olarak tanımlanmaktadır.

Günümüzde antibiyotik direnç mekanizmaları bakterilerin evrimsel sürecinin bir parçası olarak kabul edilmektedir. Bu nedenden dolayı direnç mekanizması hep var olmuş ve her zaman da var olacaktır. Klinik açıdan önem taşıyan direnç mekanizmaları ve dirençli bakteri türlerinin zaman içerisinde gösterdikleri değişikliklerden dolayı yeni antibiyotiklerin sentezlenmesinin gerektiği düşünülmektedir (2).

Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve vankomisin dirençli *Enterococcus faecium* (VRE) gibi hastane kökenli enfeksiyonların yanı sıra *E. faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter* türleri de ölümcül hastalıklara neden olmaktadır (3).

Yeni direnç mekanizmaları ile daha çok tehlikeli hale gelen çoklu ilaç direnci (MDR) *Mycobacterium tuberculosis*, MRSA gibi suşlarda etkili metilisin, rifamisin, vankomisin ve çeşitli antibiyotiklere karşı eşzamanlı direnç göstermektedirler (4, 5).

MDR gösteren mikroorganizmalar insan sağlığını tehdit eden en önemli faktörlerden biri olarak görünmektedir (6). Avrupada her yıl 25,000 ve Amerikada 23,000 insan MDR gösteren mikroorganizmalardan dolayı hayatlarını kaybetmektedirler (7-9). Türkiye’de yapılan bir çalışmaya göre 2000-2010 yılları arasında MDR gösteren *Acinetobacter* türlerinin sebep olduğu hastalıklar %60-70 oranında artış göstermektedir (10). Bu nedenler araştırmacıları yeni, etkili ve yan etkisi az olan antimikrobiyal ilaçların sentezlenmesine yöneltmektedir.



2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Antibiyotiklere Ait Genel Bilgiler

2.1.1. Bakteri Hücre Duvar Sentezini Bozan ve Litik Enzimleri Aktive Edenler

Bakteri hücre duvarının bütünlüğünü bozan antibiyotikler daha çok bakterisid etki göstermektedirler. Hücre duvarı bakterilerin yaşam döngüsünde önemli yapılardan birisidir. Bakteriler, konak hücrelerinden farklı olarak vücut sıvıları ile izotonik değildir. Hücre duvarı bakterileri ozmotik lizisten koruyarak bakterilere şeklini verir. Bakteri hücre duvarı peptidoglikan yapısındadır. Antibiyotikler peptidoglikan yapısını bozarak, bakteri şeklini ve çoğalma özelliğinin kaybetmesine ve ozmotik lizis etkisinden dolayı ölmesine neden olmaktadır (11).

β -Laktamlar (penisilinler, monobaktamlar, sefalosporinler), karbapenemler (meropenem, imipenem), teikoplanin, vankomisin ve basitrasin hücre duvar sentezinde etki göstermektedirler (12).

β -Laktam antibiyotikler, peptidoglikan sentezinde önemli görevi olan penisilin bağlayan proteine (PBP) bağlanarak veya doğrudan engelleyerek hücre duvar sentezinin durdurulmasını sağlarlar (13, 14).

Vankomisin bölünme aşamasında olan bakterilere PBP'ye bağlanarak değil doğrudan inhibe ederek etki göstermektedir. Teikoplanin de vankomisin gibi hücre duvar sentezini inhibe eder (14).

2.1.2. Hücre Membranının Permeabilitesini Bozanlar

Sitoplazma membranı bozulduğu zaman elektrolitlerin dışarı çıkmasıyla hücre dengesi bozulur. Bu tür antibiyotikler hızlı şekilde bakterisid etki gösterirler. Polien ve polimiksinler yapısına sahip olan antifungaller (nistatin) ve azol yapısındaki (ketokonazol, flukonazol, v.s.) antifungaller bu şekilde etki göstermektedirler (12, 15).

Sitoplazma zarı gerekli maddelerin dışarıdan difüzyon veya aktif taşıma ile mikroorganizma içerisine alınmasında osmotik bir engeldir. Bu tip etkili antimikrobiyal bileşikler membran geçirgenliğini artırır ve sitoplazma içerisindeki küçük maddelerin

(amino asit, potasyum, nükleotit) dışarı çıkmasına neden olup ve böylelikle hücre ölümüne sebep olmaktadır. Bu çeşit antibakteriyel bileşikler üremesi tamamlanmış olan mikroorganizmalara da etki göstermektedirler (16).

Polien yapısında olan antifungaller, hücre membranındaki ergosterole bağlanarak hücre membranını bozar (14). Azol yapısındaki antifungaller, lanosterolün ergosterole dönüştürülmesinde görev yaparlar ve sitokrom -P₄₅₀ 14- α -demetilaz enzimini engelleyerek etki göstermektedirler (15, 16).

2.1.3. Ribozomlarda Protein Sentezini Bozanlar

Ribozomlarda protein sentezini bozan antimikrobiyaller, bakteri ribozomlarıyla birleşip ve mRNA tarafından sentezlenen proteinlerin sentezini engellemektedirler. Memeli hücrelerin ribozomları bakteri ribozomlarından farklı olduğu için memeli hücreler üzerinde etki göstermezler (16).

Tetrasiklinler, aminoglikozitler, makrolidler, fusidikasit, amfenikoller bu tip etki gösteren antibakteriyel ajanlardır (12).

Tetrasiklinler 30S ribozomlara geri dönüşümlü olarak bağlanırlar ve tRNA'nın RNA-ribozoma bağlanmasını engelleyerek protein sentezini inhibe ederler. Bu grup ilaçlar bakteriyostatik etkilidirler (17).

Makrolidler ve linkozamitler, ribozomların 50S alt birimine bağlanarak bu bölgeye tRNA'nın bağlanma sonucunda peptid uzanmasını engellemektedirler ve tetrasiklinler gibi bakteriyostatik etki gösterirler (14).

Aminoglikozitler, ribozomların 16S alt birimindeki rRNA'nın aminoasit grubuna bağlanarak protein sentezini inhibe ederek bakterisit etki gösterirler (18).

Amfenikoller, 50S ribozom üzerinde etki göstermektedirler. Peptidil transferaz enziminin etkisini azaltarak peptid sentezini ve mRNA'nın ribozomlarına bağlanmasını engellemektedirler (16).

2.1.4. Genetik Materyal Üzerinde Etki Yapanlar

Genetik materyal üzerine etki yapan antimikrobiyaller DNA sentezini veya DNA sentezine bağlı olarak mRNA sentezini engelleyerek etki gösterirler. Rifampisin, asiklovir, vidarabin, griseofulvin ve nitroimidazol türevleri, doksorubisin, daunorubisin ile nalidiksik asit ve diğer kinolonlar, bu şekilde etki gösterirler. Bu ilaçların bir kısmı memeli hücrelerinde sitotoksik olup tümör tedavisinde kullanılırlar. Memeli hücrelerine sitotoksik etkisi olmayan rifamisinler ve kinolonlar ise antimikrobiyal ilaç olarak kullanılırlar (12, 16).

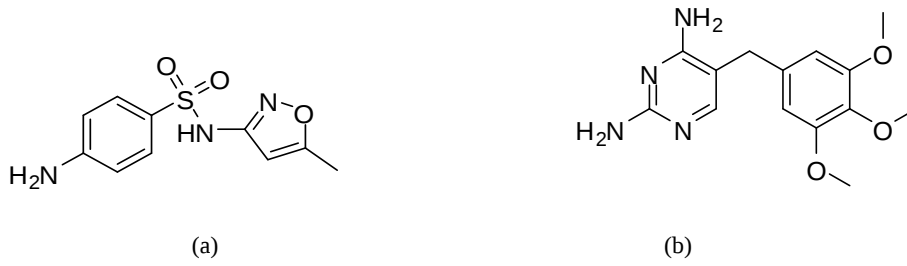
Rifampisinler, RNA polimeraza bağlanarak mRNA sentezini bozarlar ve bakterisiid etki gösterirler. Florokinolonlar ve nalidiksik asit, DNA giraz ve topoizomerez IV enzim sentezini inhibe ederek süpersarmal DNA yapısını bozarlar ve böylelikle bakterinin ölümüne sebep olurlar (14, 16).

Antiviral etkili asiklovir, viral DNA polimeraz enzimini engelleyerek DNA sentezini bozar (19). 5-Nitroimidazole türevleri, vücuda alındıktan sonra yapılarında bulunan nitro grubu indirgenir ve oluşan aktif metabolitler protein ve DNA sentezini inhibe ederler (20).

2.1.5. Bakteriyel Antimetabolitler

Antimetabolitler yapısal olarak normal substratlara benzerler, enzimler üzerindeki etkin yerler için onlar ile yarışa girerler ve bakteri metabolizması için gerekli maddelerin sentezini bozarlar. Sülfonamidler, etambutol, *p*-amino salisilik asit (PAS), izoniazid (INH), dihidrofolat redüktaz inhibitörleri bu grupta bulunmaktadır.

Sülfonamidler folik asit sentezini, trimetoprim, dihidrofolat redüktaz enzimini engelleyerek bakterisit etkiye sahiptirler. Trimetoprim + Sülfonamid kombinasyonu (Şekil 2.1.) folik asit sentez yolağında peş peşe inhibisyonla bakterisit etki göstermektedir (14, 16, 21).



Şekil 2.1. Sülfametoksazol (a) ve Trimetoprim (b)

PAS bir antimetabolit olarak sülfonamidler gibi aynı şekilde etki gösterir (22). Etambutol antitüberküloz etki gösteren bir ilaçtır. Vemiko bakterilerin hücre duvarının en önemli polisakkariti olan arabinogalaktanın hücre duvarına taşınmasında rol oynayan enzimleri inhibe ederek bakteriyostatik etki gösterir (23).

2.2. Mikroorganizmalarda Direnç Mekanizmaları

Direnç, bir mikroorganizma antimikrobiyal ajanın öldürücü veya üreme durdurucu yeteneğine karşılık verme özelliğine denir. Antimikrobiyal maddeye dirençli hale gelen bir mikroorganizma yapısal veya işlevsel olarak benzer başka bir maddeye de direnç gösterebilir ki, bu olaya çapraz direnç denir. Bu durum çoğunlukla yapıları benzer ilaçlar arasında görülmektedir. Örneğin; eritromisin-oleandomisin veya neomisin-kanamisin. Ayrıca benzer olamayan ilaçlar arasında da çapraz direnç olabilmektedir. Örneğin; eritromisin-linkomisin arasındaki direnç (24). Mikroorganizmaların yapısal ve etkili olarak farklı birkaç antimikrobiyal maddeye gösterilen dirence, çoklu ilaç direnci (MDR) denir (25).

2.2.1. Doğal Direnç

Kalıtsal olmayan direnç tipidir. Genellikle antimikrobiyal ajanın etkili olabileceği hedef molekülün olmaması doğal direnç olarak tanımlanır. Mikroorganizmanın bir maddeye karşı doğal dirençli olan hiçbir türü o antimikrobiyal ilaçtan etkilenmez. Birçok gram-negatif bakteriler, duvar yapılarında peptidoglikanın az sayıda olması nedeniyle vankomisin ve metisiline doğal direnç göstermektedirler. Genellikle ilaçlar mikroorganizmaların aktif üreme döneminde etki göstermektedir. Dormant haldeki bakteriler veya bakteri sporları gibi inaktif mikroorganizmalar ilaçlara karşı dirençli görünebilirler, ancak bu mikroorganizmalardan üretilen yeni kökenler duyarlı olabilirler.

Bunun gibi hücre duvarına sahip olmayan bakteriler de hücre duvarı sentezini bozan antimikrobiyal ilaçlara karşı doğal direnç gösterirler (14).

2.2.2. Genetiğe Bağlı Olmayan Direnç

Antimikrobiyal ilacın *in vivo* ve *in vitro* ortamda gösterdiği değişik etkiler direnç olarak değerlendirilir. Laboratuvarında etkili bir mikroorganizma *in vivo* ortamda oksijen basıncı, enfeksiyon noktasına ulaşma süresi veya pH değişiklikleri gibi nedenlerle etki göstermeyebilir. Örneğin 1. kuşak sefalosporinler kan-beyin bariyerini geçemedikleri için etken mikroorganizmada aktivite göstermelerine rağmen menenjit tedavisinde etki göstermezler (14).

2.2.3. Kazanılmış Direnç

Sonradan kazanılmış direnç tipidir. Bu direnç tipinde antimikrobiyal madde mikroorganizmayla ilk temasda etki gösterir ancak zaman süresi içerisinde veya tekrar temasında etki göstermez yani direnç kazanır. Mikroorganizmalarda gelişen direnç esas olarak bu tip dirençtir. Genetik (kazanılmış) direnç kromozom, plazmid ve transpozon kontrolü altındadır. Mikroorganizmalar, antimikrobiyal bir ilaca karşı bir veya birden fazla direnç mekanizması kullanarak direnç göstermektedirler. Mikroorganizmalar bazı antimikrobiyallere karşı tolerans gösterebilirler. Tolerans, bir antimikrobiyal maddeye *in vitro* testlerde minimal bakterisidal konsantrasyonun artması sonucu MBK/MİK değerinin 32'nin üstüne çıkmasını göstermektedir; bu değerin normalde 2-4 olması gerekmektedir (16).

2.2.3.1. Kromozomal Direnç

Kromozomda kendiliğinden bir mutasyon sonucu ortaya çıkmaktadır. Hücrede bölünme sırasında mutasyon sıklığı 10^{-5} ile 10^{-10} arasındadır ve bu oran bazı antimikrobiyaller için daha yüksektir. Bu tip kazanılan direnç bir veya çok aşamada gerçekleşebilir. Örneğin; *Enterobacter sp.*, *Serratia sp.*, indol pozitif *Proteus*, *P. aeruginosa* gibi bakterilerde sefalosporinlere karşı tek basamaklı, mutasyonla birdenbire direnç gelişebilir. Mutasyon, bu mikroorganizmalarda sefalosporinleri yıkan β -laktamaz salgılanmasında artışa yol

açar. Çok aşamalı mutasyonda ise direnç derecesi yavaş bir şekilde gelişir ve giderek artar. Penisilin ve tetrasikline direnç gelişimi bu şekilde olur (25).

2.2.3.2. Ekstrakromozomal Direnç

Bu tip direnç yabancı bir DNA parçasının bağlanmasıyla kazanılır, bu olay çeşitli yollarla ilave edilen plazmid, transpozon ve integron aracılığıyla gerçekleştirilir (14, 26). Bakteriyofajlar, protein ve DNA içeren viral partiküller olup antibiyotiklere karşı direnç genlerine sahiptirler. Bu genler, transpozonlara veya daha önce enfekte olan bakterilerin kromozomuna veya kendilerine ait olabilir (27, 28).

2.3. Direnç Biyokimyası

Direnç biyokimyasal olarak 5 farklı mekanizma olarak sıralanabilir:

1. İlaç bağlanma hedef bölgesinde değişiklik
2. Enzimatik inaktivasyon
3. Hücre duvarının geçirgenliğinde azalma
4. Antibiyotiğin aktif pompa sistemi (Dışa atım pompaları) ile dışarı atılması
5. Hedefin fazladan üretimi (14).

2.3.1. Hedef Modifikasyonu

Bakteri genlerinde antibiyotiğin olduğu ortamda kendiliğinden oluşan mutasyonlar sonucunda hedef yapısının değişmesi ile ortaya çıkan direnç mekanizmasıdır. Hedef bölgesinde değişiklik direnç genlerin başka bir mikroorganizmadan transdüksiyon, konjugasyon veya transformasyon gibi yollarla aktarılmasıyla da olabilir. Hedef bölgesindeki değişiklikler, peptidoglikan tabakasında değişim, ribozomların yapısında değişiklik (protein sentezinden sorumlu) ve DNA sentezinde görev yapan enzimlerin yapısında değişiklikler şeklinde özetlenebilir (14, 24, 29).

2.3.2. Enzimatik İnaktivasyon

Bakterilerin çoğu bakterileri parçalayan enzimler sentezlemektedirler. Bu enzimler antibiyotikleri inaktive ederek direnç gelişimine neden olmaktadır. Bazı antibiyotikler ve inaktivasyon yolları Çizelge 2.1.'de verilmiştir (30).

Çizelge 2.1. Antibiyotiklerin inaktivasyonunda rol alan enzimatik yollar

Hidroliz	Amid hidrolizi	β -Laktam antibiyotikleri
	Ester hidrolizi	Makrolidler
Grup transferi	Açıl	Aminoglikozitler Kloramfenikol Streptogramin A
	Fosforil	Aminoglikozitler Makrolidler Rifamisin
	Tiyol	Fosfomisin
	Nükleotidil	Aminoglikozitler Linkozamidler
	ADP-ribozil	Rifamisin
	Glikozil	Makrolidiller Rifamisin
Diğer	Redoks	Tetrasiklin Rifamisin Streptogramin A
	Liyaz	Streptogramin B

2.3.3. Hücre Zar Geçirgenliğinde Azalma

Gram-negatif bakterilerin hücre zarlarının dış kısmında lipopolisakkarit, iç kısmında ise fosfolipit bulunur. Antibiyotiklerin içeriye girmesi dış zardaki porinler vasıtasıyla veya difüzyon yoluyla gerçekleşmektedir. Bu porinlerin sayısı ve seçiciliği antibiyotik difüzyonunda önemlidir, porinlerin mutasyona uğraması ve yapılarının bozulması β -laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişiminden sorumludur. Dış zarda bulunan lipopolisakkaritler antibiyotiğe karşı bariyer gibi görev yaparlar bu yapılar mutasyona uğradıkları zaman bakteriler antibiyotiklere karşı duyarlılık göstermektedirler (31).

2.3.4. Dışa Atım Pompaları ile İlaç Atımı

1980'lerde *Enterobakter*'lerin tetrasikline karşı direncinin incelenmesiyle ortaya çıkmıştır (24). Dış atım pompaları (DAP) hücrede, toksik maddelerin ve antibiyotiklerin dışarıya atma görevini yapmaktadırlar (32). Glikopeptidler dışında çoğu antibiyotiklere DAP'lar ile direnç kazanması söz konusudur (33).

DAP sisteminde görev yapan proteinler, yapısal olarak transfer proteinlerine benzerlik gösterirler ve ATP'ye bağlanarak etki göstermektedirler. Antibiyotikler dışarı pompalanınca bakteri hücre içinde konsantrasyonu düşer, ribozom üzerinde antibiyotik etkisi azalır ve korunur, böylelikle bakteri üremesi devam eder. Bir substratla karşılaştığı zaman DAP sistemi indüklenirse pompa proteinlerinin fazladan üretimi başlar ve sonuçta bir veya birden fazla ajana karşı direnç gözlemlenebilir (34).

Dap sistemleri; kinolonlar, azalid, makrolidler, kloramfenikol, streptograminler ve β -laktamlara dirençte etki göstermektedirler ve bakterilerin çoğunda bulunur örneğin; *A. baumannii*, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* (24).

Dışa atım pompaları yapısal özellikleri ve kullandıkları enerji kaynağına göre iki gruba ayrılmaktadırlar (32).

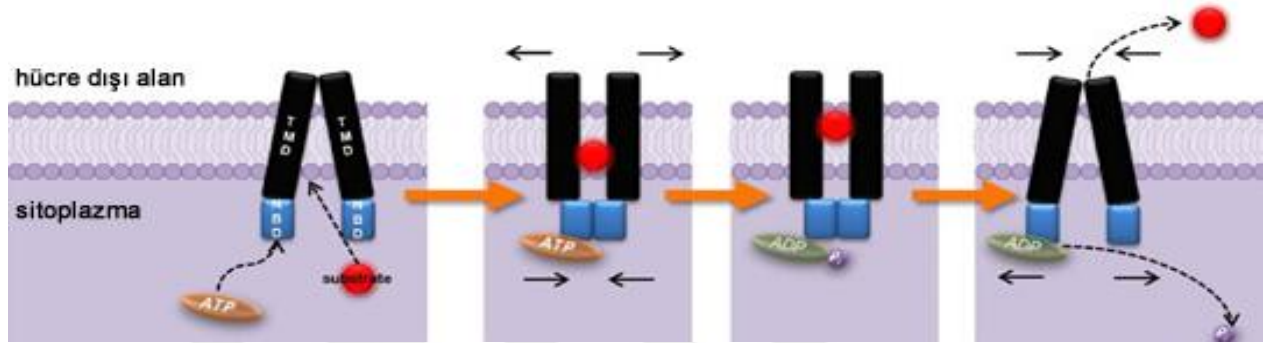
1. Primer taşıyıcılar: ATP'ye bağımlı taşıyıcılardır. (ATP-Binding cassette transporters, ABC).

2. Sekonder taşıyıcılar: Na^+ ve H^+ iyonlarının hücre içine alınması veya hücreden atılma işlemini elektrokimyasal potansiyel farkını kullanarak yapmaktadırlar.

- a. Başlıca kolaylaştırıcı süper ailesi (Major Facilitator) (MFS)
- b. Direnç-düğümleme-bölünme ailesi (Resistance-Nodulation-Division) (RND)
- c. Küçük-çoklu direnç ailesi (Small Multidrug Resistance) (SMR)
- d. Çoklu-ilaç ve toksik bileşik atılma ailesi (Multidrug and Toxic compounds Extrusion) (MATE)

2.3.4.1. Primer Taşıyıcılar

Metabolitlerin, ilaçların ve toksinlerin hücre dışına atılmasında en çok rastlanan membran transport sistemleridir. En önemli örneklerinden biri P-glikoproteindir. Bir taraftan ATP'ye bağlanırken diğer taraftan iki ayrı transmembran bölgeye bağlanmaktadır. Bu tip taşıyıcılar ilaca spesifiklerdir ve bazıları antibiyotik üreten bakterilerde bulunurlar ve böylelikle kendi ürettikleri antibiyotikten kendilerini korurlar (Şekil 2.2.)



Şekil 2.2. Primer taşıyıcılar

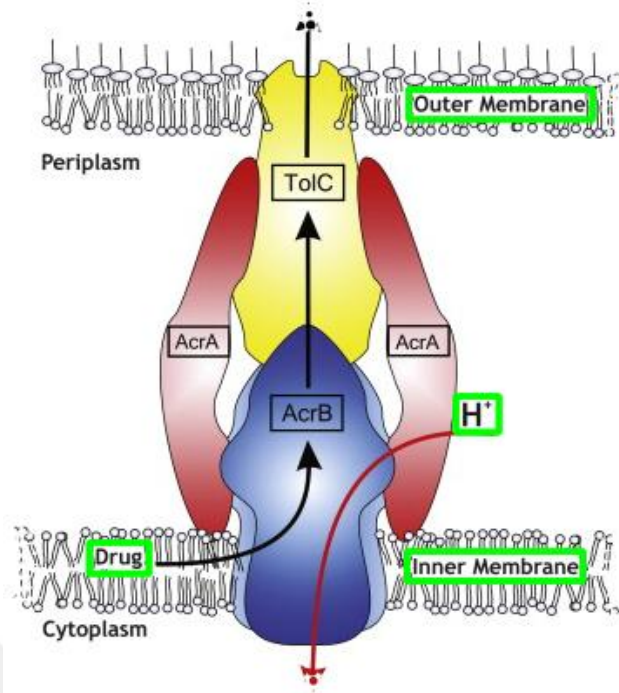
2.3.4.2. Sekonder Taşıyıcılar

a. Başlıca Kolaylaştırıcı Süper Aile (MFS)

Ökaryotik hücrelerde ve tüm bakterilerde bulunur. Tek yönlü, zıt yönlü ve aynı yönlü olarak taşıma işlemlerini yapmaktadırlar (35). Şeker taşınmasının yanı sıra metabolitler ve ilaçların dışarı atılmasında görev yapan proteinlerdir. Gram-pozitif bakterilerde bulunmaktadırlar.

b. Direnç-Düğümleme- Bölünme Ailesi (RND)

Toksik katyonların, amfifilik ve lipofilik moleküllerin transferinde görev yapmaktadırlar. Gram-negatif bakterilerde yaygın olarak bulunur ve çoklu ilaç direncini sağlarlar. Yapıları üç bölümden oluşmaktadır: iç membran pompası; dış membran kanalı; ve bu iki bölümü birbirine bağlayan füzyon protein (Şekil 2.3.) (36).



Şekil 2.3. Direnç-düğümleme hücre bölünmesi ailesinin genel yapısı

c. Küçük-Çoklu Direnç Ailesi (SMR)

Lipofilik katyonik ilaçların taşınmasına katılırlar (37). En küçük dışarı atım pompa proteinleridir. Hücre dışına atımı yapılırken hücre içine protein alma işlemi yapılmaktadır.

d. Çoklu-İlaç ve Toksik Bileşik Atılım Ailesi (MATE)

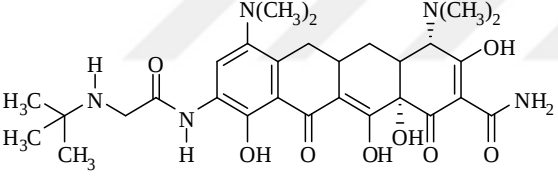
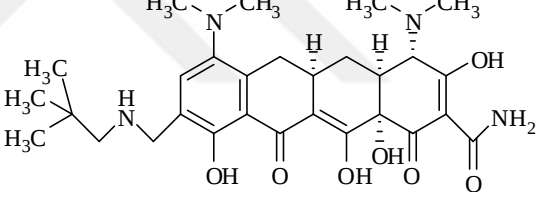
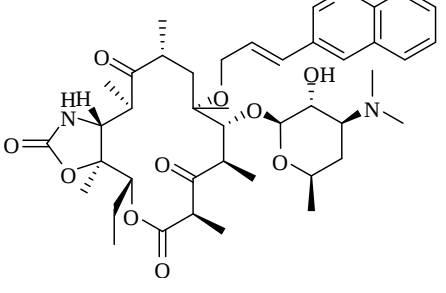
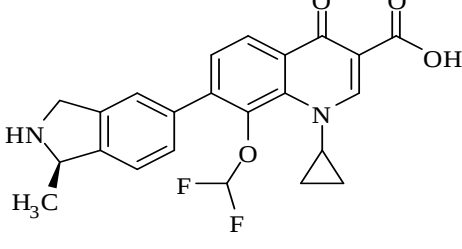
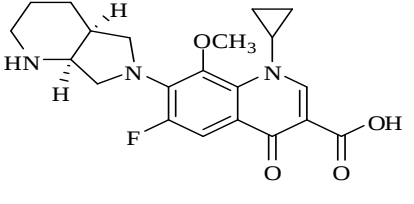
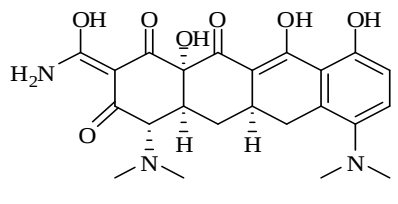
Diğer taşıyıcı sistemlerin tersine çoğunlukla ilaç/ Na^+ zıt yönlü olarak görev yapmaktadırlar (38).

Dışa Atım Pompa Vasıtasıyla dirence Karşı Mücadele Mekanizmaları (39, 40)

1. Substrat bağlayan bölgeye inhibitörün bağlanması
2. Dış membran kanalın bloke edilmesi
3. Pompa mekanizmasının inhibisyonu
4. İlacın dışarı atım pompasını baypas etmesi
5. Pompanın inhibisyonu.

Tedavi amaçlı veya klinik çalışmalarında kullanılan bazı antibiyotikler gösterdikleri etki mekanizmalarının yanında aynı zamanda DAP inhibitör özelliğine sahip oldukları saptanmıştır (Çizelge 2.2.). Örneğin, tigesiklin (Tygacil®) 2005 yılında piyasaya sürülen tetrasiklinden türetilmiş bir antibiyotiktir. Tetrasikline karşı olan iki direnç mekanizmasında (ribozomal koruma ve DAP inhibitörü) etki göstermektedirler. Deri ve karın içi enfeksiyonların tedavisinde kullanılır (41, 42). Minosiklin aynı şekilde ribozomal koruma mekanizmasıyla ve DAP inhibitörü olarak bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde özellikle akne tedavisinde kullanılan antibiyotiktir (41, 43). Ketolid yapısında olan Telitromisin diğer etki mekanizmalarının yanı sıra DAP özelliğine sahip bir antibiyotiktir. Kronik bronşitin akut alevlenmesinde kullanılmaktadır (44, 45).Yapılan araştırmalar sonucu setromisin, klaritromisin ile kıyasladığında daha fazla sayıda hastada etki gösterdiği, toplum kökenli pnömonive şarbon hastalıklarının tedavisinde etkili olduğu saptanmıştır (46). Florokinolon grubundan olan Moksifloksasin bakterisit etkili ve geniş spektrumlu antibiyotiktir (47).

Çizelge 2.2. DAP inhibitörü özellikleri tespit edilen antibiyotikler

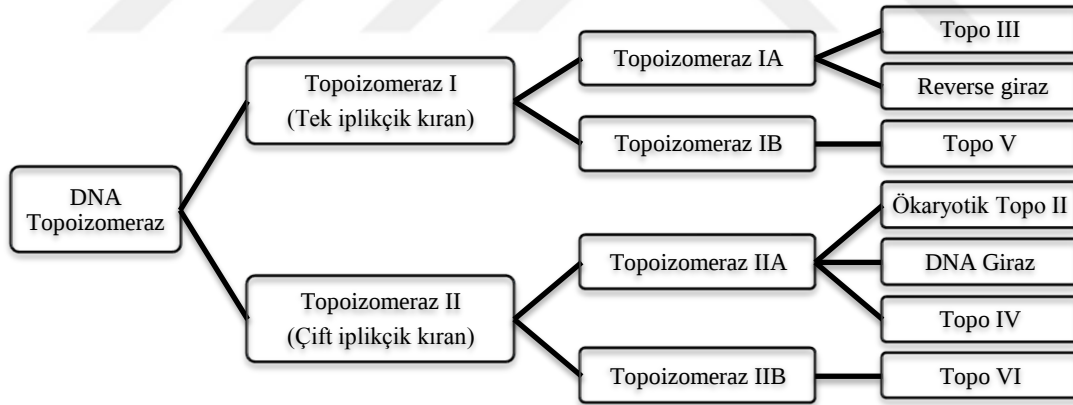
 Tigesiklin (Tygacil)	 Amadasiklin
 Setromisin (ABT-773)	 Garenoksazin
 Moksifloksazin (Avelox)	 Minosiklin (Minomycin)

2.4. DNA Topoizomeraz Enzimleri

DNA topoizomeraz enzimleri DNA sentezinden ve kromozomal rekombinasyondan sorumlu olan bir enzim olarak ökaryotlar, prokaryotlar ve mayalarda bulunmaktadır. Hücre yaşamında büyük bir görev yaptıkları için kemoterapötikler ve antibiyotikler için önemli bir hedef halindedirler (48).

Wang 1971 yılında *E.coli* üzerinden ilk olarak DNA topoizomerazı keşfetmiştir. DNA topoizomeraz yaptığı işlemlerden dolayı iki ana gruba ayrılmaktadır: Topo I ve Topo II (Şekil 2.4.) (49). Topo I, Wang tarafından, Topo II, 1976 yılında Gellert tarafından keşfedilmiştir (50, 51).

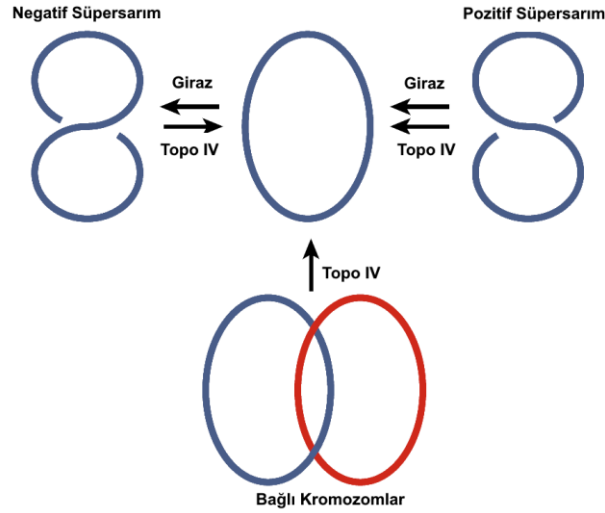
Topoizomeraz I enzimi ATP enerjisi kullanmadan DNA zincirinin tek ipliğini kırar ve topolojiyi değiştirir. Topoizomeraz II, DNA zincirinin çift ipliğini kırıp ve kırık bölgeden diğer kesilmiş DNA ipliğini geçirir ve bu işlemi yapmak için ATP enerjisi kullanmaktadır (52). Topoizomeraz II enzimi DNA'yı hem pozitif ve hem negatif süper sarmalarını gevşetebilir (53).



Şekil 2.4. DNA topoizomeraz çeşitleri

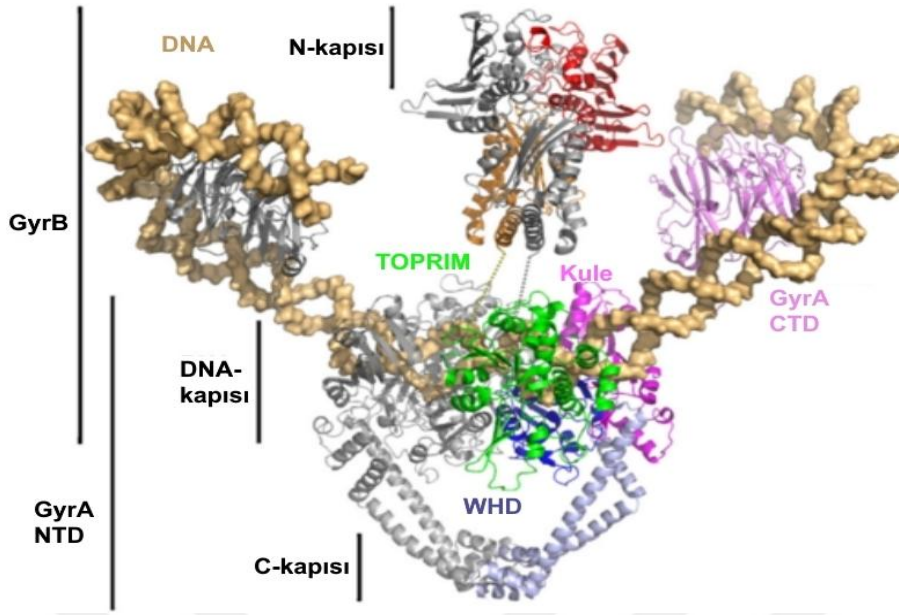
2.4.1. Bakteriyel Topoizomeraz Enzimleri

Bakteriyel DNA topoizomeraz II enzimi Topo IV ve DNA giraz olarak tanınmaktadır. Topo IV replikasyon sonrasında süpersarmaların açılmasında ve DNA giraz ise süper sarmalın düzeltilmesinde, replikasyon esnasında ve transkripsiyonun başlatılmasından sorumludur (Şekil 2.5.) (54).



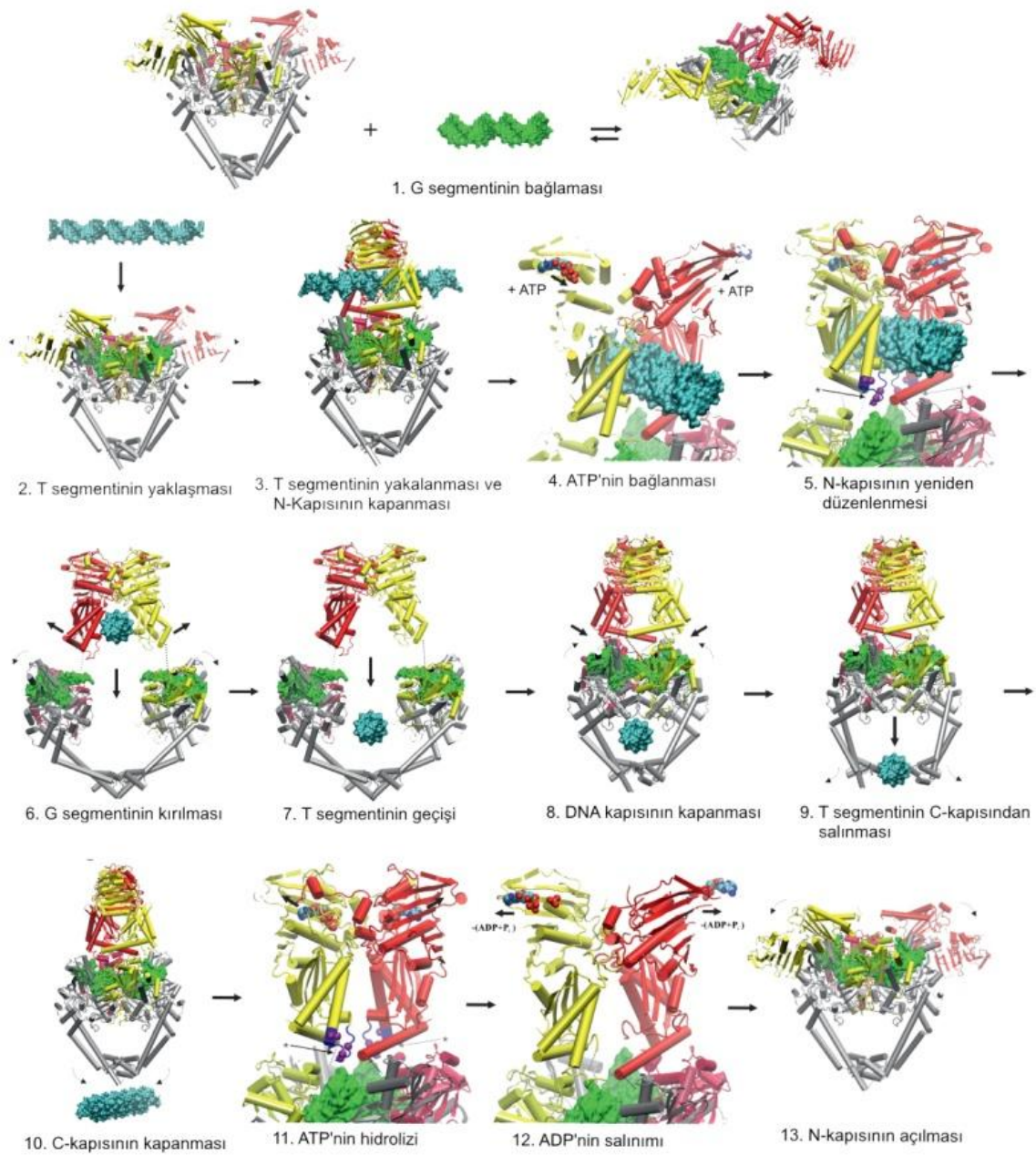
Şekil 2.5. Topo IV ve DNA giraz enzimin işlem şeması

DNA giraz enzimi pozitif ve negatif DNA süper sarmalını gevşetir ancak negatif süper sarmal için ATP enerjisine ihtiyaç duyar. DNA giraz iki alt birimden oluşmaktadır: GyrA (97 kDa) ve GyrB (97 kDa). GyrB 3 kısımdan oluşmaktadır; GHKL proteini (**G**iraz, **H**sp90, **H**istidin **K**inaz, **M**ut**L**) ATP ye bağlanan kısım, ATP enerjisinin aktarımında görev yapan kısım ve DNA-enzim arasında oluşan bağdan sorumlu olan TOPRIM (Topoizomerz/PRIMaz) kısmıdır (55, 56). GyrA ise dört kısımdan oluşmaktadır; nükleik asitlerin bağlanma proteinlerinin kanatlı sarmal kısım (WHD) (57), kule kısmı, katlanmış sarmal olarak uzun kısım ve değiştirilebilen C terminal uç (CTD) kısmıdır. GyrA ve GyrB dimer şeklinde A_2B_2 olarak bulunmaktadır. Enzim görevini yerine getirebilmesi için bu altbirimler arasında üç tane geçit mevcuttur bunlardan ikisi GyrB bölgesinde; GHKL kısmında olan N-kapısı, ikincisi TOPRIM kısmında olan DNA kapısı ve üçüncüsü GyrA bölgesinde katlanmış sarmal kısmında olan C kapısıdır (Şekil 2.6.) (54).



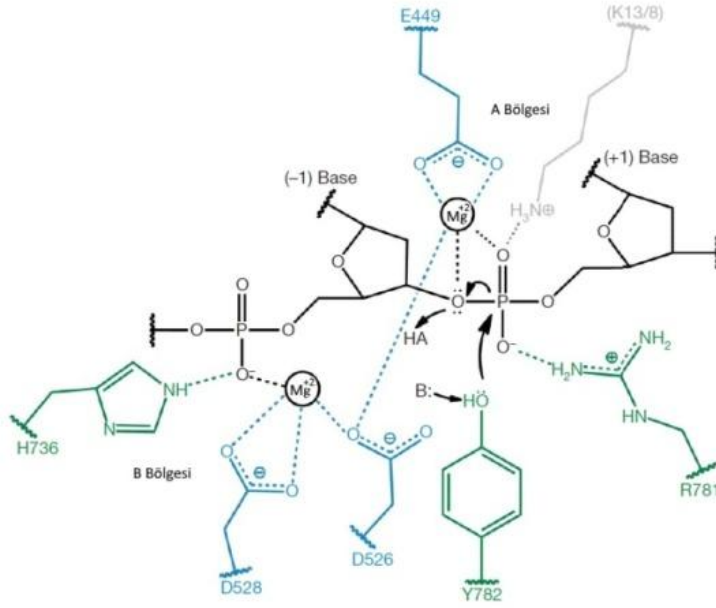
Şekil 2.6. DNA giraz yapısı

Günümüzde DNA girazın DNA ile olan etkileşim mekanizmasının araştırmaları halen devam ederken, “iki kapı mekanizma” modeli yapılan bu araştırmalara yapısal ve biyokimyasal olarak en güçlü desteği vermektedir (Şekil 2.7.) (58). Bu mekanizmada, DNA’nın geçit segmenti enzimin *N*-ucuyla etkileşip ve enzimin TOPRIM ucuna hareket ederken enzimin etrafında yaklaşık 130 baz çiftlik pozitif sarmal oluşmaktadır (59). Gerçekleşen bu süpersarmal sayesinde aynı DNA molekülünün T segmentinin N kapıya ulaşmasını kolaylaştırır ve DNA iplikçiklerin bir biri içerisinde geçirmesi için G segment uygun pozisyon sağlamaktadır (60). N kapısı ATP bağlandıktan sonra kapanır ve bu kısımda T segmenti yakalanır. DNA’nın G segmentine DNA-fosfotirozil bağlanır ve enzim dört baz çiftini ayırarak keser, böylelikle çift kırık oluşur ve DNA ile GyrA arasında kovalent bağ oluşur bunu sonucunda T segmenti açık olan DNA kapısından ve yarılan G segmentin içinden C kapısına doğru geçmektedir. ATP hidrolizi ile T segmenti G segmentin arasından geçişi gerçekleşmektedir. ATP hidroliz sonucunda ortaya çıkan ADP N kapısını açarak yeni bir döngü için enzimi hazır hale getirmektedir (61). Bir döngüde iki ATP hidroliz olarak iki negatif süpersarım meydana gelmektedir (62).



Şekil 2.7. DNA girazın DNA ile etkileşim mekanizması

Topoizomeraz IIA enzimler aktivitelerini göstermek için iki değerli katyon çeşitlerine ihtiyaç duymaktadırlar. Mg^{++} bu tip enzimler için fizyolojik olarak uygun metal iyonlardır ancak diğer iki değerli iyonları da enzim için kofaktör olarak görev yapmaktadırlar (63). DNA üzerinde kırma reaksiyonu gösteren DNA giraz enzimin işlevini “ikili metal- iyon” mekanizması ile katalizlenmektedir. A bölgede bulunan Mg^{++} iyonu DNA iplikçiklerin birbirinin içerisine geçmesini, B bölgesinde bulunan Mg^{++} iyonu -1 yüklü fosfat iyonun sabitlenmesini sağlamaktadır (Şekil 2.8.) (64, 65).



Şekil 2.8. İkili metal-iyon mekanizması

Bakteriyel topoizomeraz II enzimlerin işlevleri çeşitli topoizomeraz enzim inhibitörü tarafından engellenebilmektedir. DNA iplikçiklerin kırılması, DNA'nın bağlanması, DNA iplikçiklerin birbirinin içerisinden geçirilmesi ve ATP hidrolizinin engellenmesi gibi etki göstermektedirler. Bundan dolayı bakteriyel Topo II enzimleri yeni antibakteriyel ilaçların keşfi için büyük bir hedef olmaktadır (61, 66).

2.4.2. Bakteriyel Topoizomeraz Enzim II İnhibitörleri

Bakteriyel topoizomeraz II inhibitörleri, bakteri suşları ve kimyasal yapılarındaki farklılıklara göre genellikle her iki enzimi de (DNA giraz ve Topo IV) hedef olarak alabilmektedir (67).

2.4.2.1. Gyr A İnhibitörleri

- Kinolon ve Florokinolon Türevleri
- İzotiyazolokinolon Türevleri
- 3-Aminokinazolindion Türevleri
- Aminopiperidin Türevleri
- Oksabisiklooktan

2.4.2.1.1. Kinolon ve Florokinolon Türevleri

1967 den bu tarafa tedavide kinik olarak aktif şekilde kullanılan kinolonlar özellikle bakteriyel DNA giraz ve Topo IV enzimlerin inhibitörleridir (68). Nalidiksik asit ve oksolinik asit kinolonların birinci kuşaklarında yer almaktadırlar ve zayıf antimikrobiyal etkiye sahiptirler ancak ilerleyen kuşakların gelişiminde önemli rol oynamaktadırlar (69).

Florokinolonlar, genellikle kinolon halkasının 3. konumunda karboksil grubu taşıyan 6-florokinolin-4-on yapısındadırlar ve halkanın 7.konumunda ve azota bağlı olan farklı süstitüentler taşımaktadırlar ve bu türevler klinikte sıklıkla kullanılan ama sadece DNA giraz ve Topo IV enzim inhibitörleri olarak etki göstermektedirler (70).

Nalidiksik asit ve oksolinik asit, dar etki spektrumuna sahip oldukları için sadece basit üriner sistem enfeksiyonlarında kullanılmaktadırlar. İkinci kuşak kinolonlarda yer alan norfloksazin, ofloksazin ve siprofloksazin bileşikleri ise geniş etki spektrumuna sahip oldukları için üriner sistem enfeksiyonları dışında sistemik enfeksiyonların tedavisinde de kullanılmaktadırlar. Üçüncü kuşak kinolonlardan olan levofloksazin ve moksifloksazin, Gram-pozitif bakterilerden özellikle *S. pneumoniae*'ye karşı etkili olduğu için solunum yolu enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadırlar. Gemifloksazin ve Trovafloksazin dördüncü kuşak da yer almaktadırlar ve anaerob bakteri olan *Bacteroides fragilis* üzerinde etki göstermektedirler. Bu türevlerin *S. pneumoniae*'ye karşı aktiviteleri üçüncü kuşaklara göre daha fazladır (Çizelge 2.3.) (71).

Çizelge 2.3. Antibakteriyel etkili kinolon ve florokinolon türevi ilaçlar ve kullanımları

	Jenerik adı	Kimyasal yapı	Antibakteriyel spektrum	Klinik Kullanımı
1. Kuşak	Nalidiksik asit		Gram (-) bakteriler (<i>Pseudomonas</i> hariç)	Üriner sistem enfeksiyonları
	Oksolinik asit			
2. Kuşak	Norfloksazin		Gram (-) bakteriler, bazı Gram (+) bakteriler (<i>S. Pneumonia</i> hariç)	Üriner sistem enfeksiyonları Cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar Cilt enfeksiyonları
	Ofloksazin			
	Siprofloksazin			
3. Kuşak	Levofloksazin		Gram (-) bakteriler, Gram (+) bakteriler	Akut ve kronik bronşit Toplum kökenli pnömoni
	Moksifloksazin			
4. Kuşak	Gemifloksazin		Gram (-) bakteriler, Gram (+) bakteriler, Anaerob bakteriler	Üriner sistem enfeksiyonları Cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar Cilt enfeksiyonları Akut ve kronik bronşit Toplum kökenli ve nosokomiyal pnömoni
	Trovafloksazin			

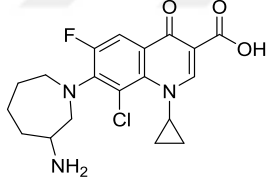
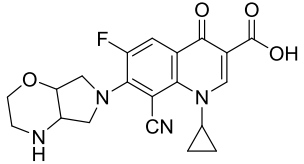
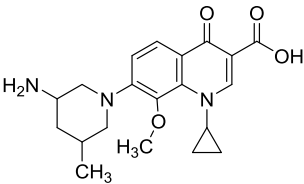
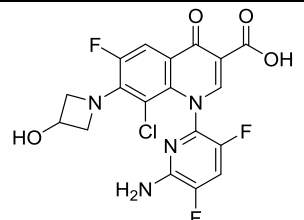
Florokinolonlar etkilerini DNA replikasyonunu inhibe ederek bunun yanı sıra eksik protein sentezi, DNA hasarı, oksidatif hasarın indüklenmesi gibi işlemlerle gösterir (72). GyrA enziminin aktif bölgesinde bulunan tirozin ile kovalent bağ yapmak suretiyle yarılmış DNA stabilize hale gelir. Böylelikle GyrA-DNA kompleksine bağlanmış florokinolon yapısındaki bileşikler, DNA iplikçiklerinin ayrılmasında, RNA polimerazın ve DNA

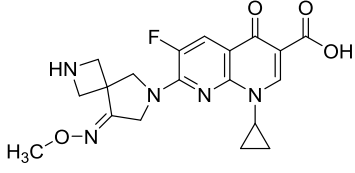
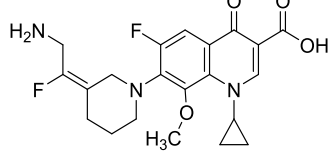
helikazın önüne engel oluşturarak hücre ölümüne götürecek bir seri olayı tetiklemektedirler (68). Kristalografi yöntemleri ile, florokinolonların DNA ve bakteriyel Topo II enzimleriyle etkileşimleri aydınlatılmıştır (59, 73, 74). 2010 yılında *A. baumannii* bakterisi üzerinden DNA ve Topo IV enzimi ile kompleks oluşturan moksifloksazinin etkileşimleri ortaya konmuştur (75).

Florokinolon türevi bileşikler antibakteriyel aktivitelerini zaman içerisinde gelişen dirençten dolayı kaybetmektedirler. Bu bileşiklere karşı oluşan direnç; hedefte oluşan değişikliklerden dolayı, membran geçirgenliğinde olan değişimden, dış atım pompa sayılarının artmasından veya plazmid aracılığıyla bakteriler arasında yapılan aktarımdan oluşmaktadır (76).

Son 50 yıldır florokinolonlar en çok kullanılan ve geniş spektrumlu bir antibiyotik grubudur. Bundan dolayı farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri daha iyi olabilecek yeni türevlerin geliştirilme çalışmaları devam etmektedir (Çizelge 2.4.) (77).

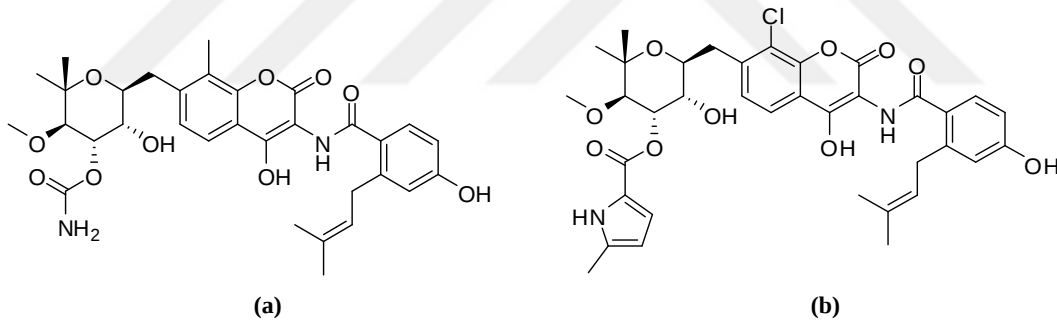
Çizelge 2.4. Son yıllarda geliştirilen florokinolon yapısı taşıyan bileşikler

Jenerik adı	Bileşikler	Klinik Kullanımı	Kaynaklar
Besifloksazin		Oftalmik ilaç olarak kullanılmaktadır	(78)
Finafloksazin		Akut dış kulak iltihabı tedavisinde kullanılmaktadır	(79)
Nemonoksazin		Toplum kökenli pnömoni tedavisinde kullanılmaktadır	(80)
Delafloksazin		Faz 4 aşamasında	(81)

Zabofloksazin		Faz 3 aşamasında	(82)
JNJ-Q2		Akut Cilt iltihabı tedavisinde kullanılmaktadır	(83)

2.4.2.2. GyrB İnhibitörleri

Bu grup inhibitörler ATP'nin, enzimin GyrB altbirimine bağlanmasını engellemektedirler. *Streptomyces* türleri tarafından üretilen novobiosin, aminokumarin ve klorobiosin ilk enzim inhibitörleridir. Klorobiosin ve novobiosin bileşiklerinin GyrB alt birimi ile kompleksinin kristal yapısında, bu bileşiklerin ATP bölgesine bağlandıkları ve böylece ATP'nin bağlanmasını engelledikleri ortaya konmuştur (Şekil 2.9.) (84, 85).



Şekil 2.9. (a) Novobiosin, (b) Klorobiosin

2.5. Antibakteriyel Etki Gösteren Benzoksazin Türevleri

Benzoksazin halka sisteminin önemi ilk olarak DIBOA ve DIMBOA bileşiklerin insektisit etkilerinin keşfi ile başlamıştır (86-88). Hayakawa ve ark.'nın 1,4-benzoksazin halkası taşıyan ofloksazin türevini ortaya çıkarmasıyla bu halka sistemini taşıyan bileşiklerin antibakteriyel etkilerinin yüksek olabileceği ortaya konmuştur (89).

Daha sonraki yıllarda 1,4-benzoksazin ve türevlerini içeren bileşikler sentezlenmiş ve antimikrobiyal etkileri incelenmiştir (Çizelge 2.5.). 1,4-benzoksazin halkanın 2.konumunda

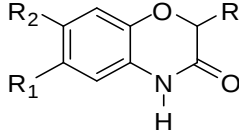
furan süstitüsünu getirilerek Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı yüksek antibakteriyel etkili bileşikler elde edimiştir (90). 1988 yılında Hogale ve Nikam, 1,4-benzoksazin halkasının 6. ve 8. konumunda klor ve brom gibi halojen taşıyan hidrazino bileşiklerinde antibakteriyel etki saptamışlardır (91). Yapılan diğer çalışmalarda 1,4-benzoksazin halkasının N konumunda hidrazino veya hidroksil taşıyan türevlerin antibakteriyel aktivite açısından olumlu sonuçlar verdiği gösterilmiştir (92, 93). Özden ve ark., 2000 yılında 1,4-benzoksazin yapısının 2. konumuna alkil zincirleri eklemiş ve antibakteriyel etkinliğin azaldığını bildirmişlerdir (94).

Çizelge 2.5. Antibakteriyel etkileri incelenmiş 1,4-benzoksazin halkası taşıyan türevler

Bileşikler	Süstitüentler			Kaynaklar
	R	R ₁	R ₂	
	-H, -NO ₂ , -Cl	-	-	(90)
	-H, -Br, -Cl	-H, -Br, -Cl, -CH ₃	-	(91)
	-H, -CH ₃ , -C ₂ H ₅ , -CH ₂ C ₆ H ₅	-	-	(95)
	-Br, -Cl	- H, -CH ₃	-Br, -Cl	(96)
	-Br, -Cl	- H, -CH ₃	-Br, -Cl	(96)
	-H, -OH, -OCH ₃	- H, -CH ₃ , -OCH ₃ , -NO ₂ , -F, -CN	-	(93)
	-H, 8-Cl, 6-OCH ₃	-H, -CH ₃ , -C ₂ H ₅ , n-C ₃ H ₇ , n-C ₄ H ₉ , n-C ₅ H ₁₁	-	(97)

2003 yılında, 1,4-benzoksazin halkasının 2. konumunda etil asetat yapısı taşıyan türevleri sentezlenerek *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* bakterilerine karşı antibakteriyel etkilerini incelenmiştir (Çizelge 2.6.) (98).

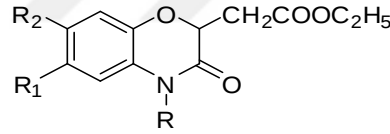
Çizelge 2.6. 2. konumda etil asetat taşıyan 1,4-benzoksazin türevleri ve MİK değerleri



Bileşikler				MİK (µg/mL)				
	R	R ₁	R ₂	S.a	B.s	E.c	K.p.	P.a
1	-OH	-H	-H	50	50	25	25	25
2	-CH ₂ COOC ₂ H ₅	-H	-H	25	50	50	50	50
3	-CH ₂ COOC ₂ H ₅	-Cl	-H	50	50	25	25	25
4	-CH ₂ COOC ₂ H ₅	-CH ₃	-H	50	50	25	25	25
5	-CH ₂ COOC ₂ H ₅	-H	-NO ₂	25	25	25	25	50
6	-CH ₂ COOC ₂ H ₅	-H	-CH ₃	50	50	50	50	50
7	-CH ₂ COOC ₂ H ₅	-Cl	-NO ₂	50	25	25	25	50
8	-CH ₂ COOH	-H	-H	25	50	50	25	25
Ampisilin				1,56	1,56	12,5	25	>200
Amoksisilin				1,56	1,56	3,12	12,5	>200
Streptomisin				3,12	50	1,56	1,56	100
Tetrasiklin				1,56	1,56	3,12	3,12	50

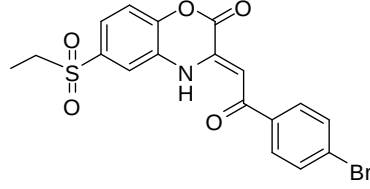
Alper-Hayta ve ark ise etil 3,4-dihidro-3-okso-4,6,7-trisüstitüe-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat türevlerini sentezlemişler ve *St. faecalis*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakterilerine karşı aktivitelerini incelenmişlerdir (Çizelge 2.7.) (99).

Çizelge 2.7. Etil 3,4-dihidro-3-okso-4/6/7-trisüstitüe-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat türevleri ve MİK değerleri



Bileşikler				MİK (µg/mL)				
	R	R ₁	R ₂	S.a	S.f	B.s	E.c	P.a
1	-H	-H	-H	50	50	25	50	12,5
2	-H	-CH ₃	-H	50	50	25	25	25
3	-H	-Cl	-H	50	50	25	50	50
4	-H	-COOC ₂ H ₅	-H	50	50	25	50	25
5	-H	-H	-NO ₂	25	25	12,5	25	50
6	-H	-H	-NH ₂	25	50	25	50	25
7	-H	-Cl	-NO ₂	25	25	12,5	25	25
8	-CH ₃	-H	-H	50	50	25	50	25
9	-CH ₃	-CH ₃	-H	50	50	25	25	25
10	-CH ₃	-Cl	-H	50	50	50	50	25
11	-CH ₃	-COOC ₂ H ₅	-H	50	50	25	50	25
12	-CH ₃	-Cl	-NO ₂	50	50	50	25	25
13	-CH ₃	-H	-NO ₂	50	50	50	50	25
14	-C ₂ H ₅	-H	-H	25	-	25	100	-
15	-C ₂ H ₅	-Cl	-H	25	-	50	50	-
16	-C ₂ H ₅	-H	-NO ₂	50	-	50	50	-
17	-C ₂ H ₅	-Cl	-NO ₂	25	-	100	100	-
Siprofloksazin				3,125	-	1,56	3,125	0,78
Gentamisin				3,125	12,5	1,56	12,5	12,5

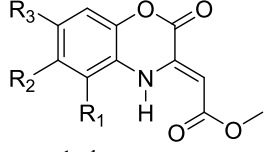
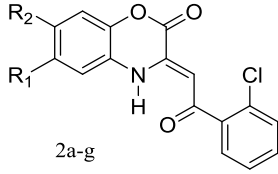
2006 yılında, 3. konumunda 4-bromofenil-2-oksoetiliden ve 6. konumunda etilsülfonil grubu içeren 1,4-benzoksazin bileşiğinin *S. aureus*, *E. Coli* bakterilerine karşı oldukça iyi antibakteriyel etki gösterdiği bildirilmiştir (Şekil 2.10.) (100).



Şekil 2.10. 3-(2-(4-bromofenil)-2-oksoetiliden-6-(etilsülfonil)-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-2-on bileşiği

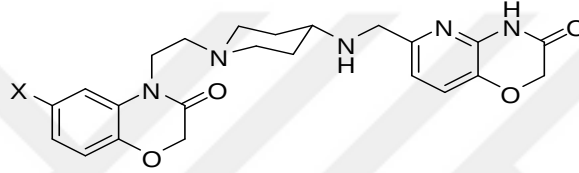
2010 yılında ise 3.konumunda metil asetat ve 2-klorofenil-2-oksoetiliden süstitüsüonu taşıyan 1,4-benzoksazin türevleri sentezlenmiş ve *M. tuberculosis* bakterisine karşı etkileri incelenmiştir. 1,4-Benzoksazin halkasındaki benzen üzerinde flor taşıyan türevlerde daha yüksek antibakteriyel aktivite saptanmıştır (Çizelge 2.8.) (101).

Çizelge 2.8. 3. konumunda metil asetat ve 2-klorofenil-2-oksoetiliden taşıyan 1,4-benzoksazin türevleri ve MİK değerleri

 1a-k					 2a-g				
Bileşikler				M. tuberculosis	Bileşikler			M. tuberculosis	
	R	R ₁	R ₂	MİK (µg/mL)		R ₁	R ₂	MİK (µg/mL)	
1a	-H	-H	-H	0,64	2a	-H	-H	3,13	
1b	-CH ₃	-H	-H	25	2b	-CH ₃	-H	100	
1c	-H	-CH ₃	-H	>100	2c	-F	-H	3,13	
1d	-H	-F	-H	0,63	2d	-Cl	-H	12,5	
1e	-H	-Cl	-H	5	2e	-H	-CH ₃	>100	
1f	-H	-NO ₂	-H	50	2f	-H	-F	1,56	
1g	-H	-EtSO ₂	-H	>100	2g	-H	-Cl	3,13	
1h	-H	-H	-CH ₃	100					
1i	-H	-H	-F	0,63					
1j	-H	-H	-Cl	0,63					
1k	-H	-H	-NO ₂	>100					

2011 yılında, 1,4-benzoksazin halkasının biyoizosteri olan pirido[3,2-b][1,4]oksazin halkası taşıyan 4-amino piperidin türevlerinin *S. pyogenes*, *M. catarrhalis*, *H. influenza*, *S. aureus*, *S. pneumonia*, *P. aeruginosa* ve *E. coli*, *K. Pneumoniae* bakterilerine karşı antibakteriyel etkileri incelenmiştir (Çizelge 2.9.) (102). Bu çalışmada, test edilen bileşiklerin *E.coli*'ye karşı aktivitesini bakteriyel Topo IIa enzimini inhibe ederek gösterdiği bildirilmiştir.

Çizelge 2.9. Pirido[3-2,b][1,4]oksazin halkası taşıyan olan 4-amino piperidin türevleri ve MİK değerleri



Bileşik	X	MİK (µg/mL)								IC ₅₀ (nM) Topo IIa
		<i>S.a</i>	<i>S.p</i>	<i>S.py</i>	<i>H.i</i>	<i>M.c</i>	<i>P.a</i>	<i>E.c</i>	<i>K.p</i>	
1	-OH	117,7	8,8	1,1	0,3	0,1	17,7	4,4	>17,7	36
2	-Br	0,1	0,3	-	0,1	<0,015	7,7	0,5	3,9	18
3		1	8,1	2	0,5	0,1	>16,1	4	16,1	78
4	-CN	0,3	0,8	0,3	0,1	0	3,8	0,5	4,3	36
5	-Cl	0,3	0,5	0,5	0,1	0,1	4,2	0,5	-	23
6		0,5	0,5	2	0,3	0,06	15,9	2,0	15,9	18

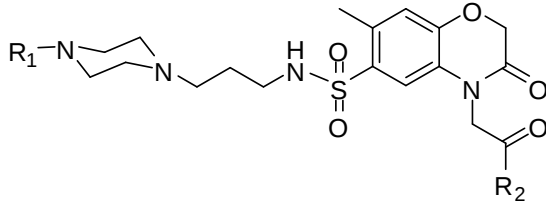
2015 yılında yapılan bir çalışmada bir seri 1,4-benzoksazin halkası taşıyan türevler sentezlenmiş ve *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı aktiviteleri saptanmıştır. Bu bileşikler içerisinde triflorometil ve nitro grubu taşıyan türevlerin daha iyi antibakteriyel etki gösterdiği bildirilmiştir (Çizelge 2.10.) (103).

Çizelge 2.10. *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı antibakteriyel aktivitesi incelenen 1,4-benzoksazin türevleri ve biyolojik aktivite sonuçları

Bileşikler				Zon İnhibisyonu (mm)	
	R ₁	R ₂	R ₃	E.c.	S.a
1a	-CN	-H	-H	17	14
1b	-CN	-H	-OCH ₃	15	10
1c	-COOCH ₃	-H	-H	15	>8
1d	-CF ₃	-H	-H	21	19
1e	-NO ₂	-H	-H	20	21
1f	-H	-NO ₂	-H	22	18
2a	-CN	-H	-H	14	14
2b	-CN	-H	-OCH ₃	13	16
2c	-COOCH ₃	-H	-H	10	-
2d	-CF ₃	-H	-H	18	19
2e	-NO ₂	-H	-H	20	15
2f	-H	-NO ₂	-H	19	14
3a	-CN	-H	-H	19	23
3b	-CN	-H	-OCH ₃	13	15
3c	-COOCH ₃	-H	-H	10	12
3d	-CF ₃	-H	-H	20	20
3e	-NO ₂	-H	-H	24	16
3f	-H	-NO ₂	-H	23	19
4a	-NO ₂	-H	-H	19	19
4b	-H	-NO ₂	-H	15	17
Ofloksazin				21	18
Tetrasiklin				18	23

Konda ve ark., 6. konumunda sübstitüe sülfonamdi grubu taşıyan bir seri 1,4-benzoksazin türevini sentezlemiş ve *B. megaterium*, *X. campestris*, *P. aeruginosa* ve *E. coli* karşı etkilerini incelemişlerdir (Çizelge 2.11.) (104). Bu çalışmada, denenen moleküllerden bazılarının standard olarak kullanılan rifampisin bileşiği ile benzer sonuçlar verdiği gözlenmiştir.

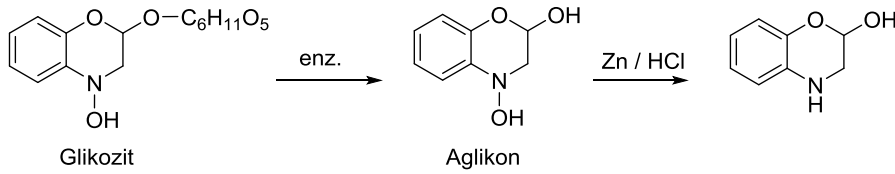
Çizelge 2.11. 6. konumunda sübstitüe sülfonamid yapısı taşıyan 1,4-benzoksazin türevleri ve MİK değerleri



Bileşikler			MİK (µg/mL)			
	R ₁	R ₂	<i>B. megaterium</i>	<i>X. campestris</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
2c			125	125	31,25	62,5
2d			31,25	125	31,25	62,5
2e			62,5	250	125	250
2g			31,25	125	31,25	125
2h			62,5	125	250	500
2i			62,5	62,5	125	125
2j			125	125	62,5	62,5
2k			62,5	125	250	250
2l			31,25	62,5	31,25	62,5
Rifampisin			64	32	32	64

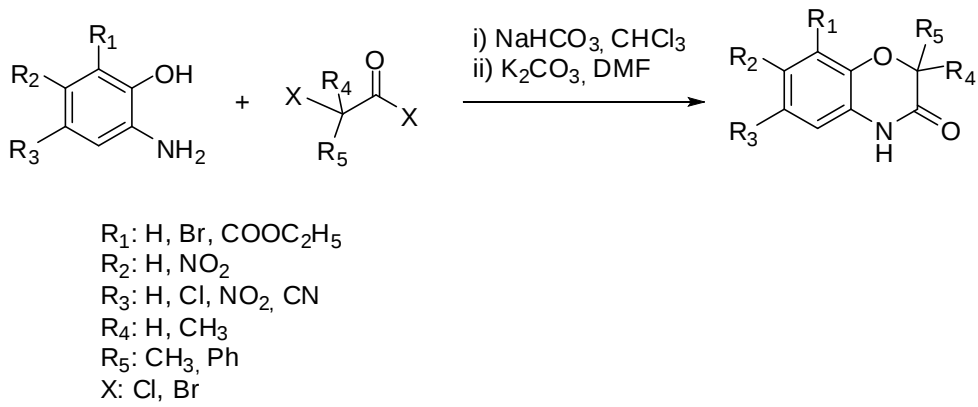
2.6. 1,4-Benzoksazin Türevlerinin Genel Sentez Yöntemleri

İlk olarak 1960'lı yıllarda çavdar bitkisinden enzimatik parçalanma ile benzoksazin yapısı aglikon şeklinde izole edilmiş daha sonra redüksiyon sonucunda 1,4-benzoksazin-3(4*H*)-on yapısına ulaşılmıştır (Şekil 2.11.) (105).



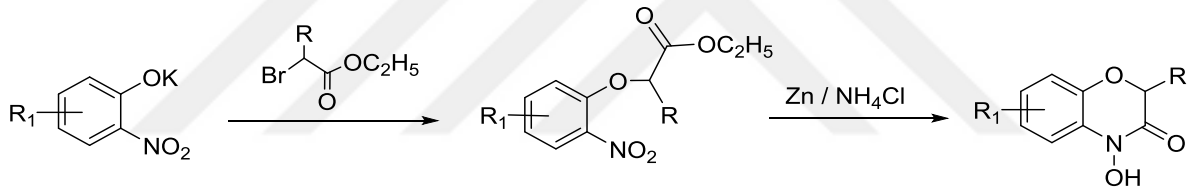
Şekil 2.11. 1,4-benzoksazin-3(4*H*)-on bileşiğin enzimatik olarak sentezi

Birçok çalışmada araştırmacılar 2-aminofenol türevlerinin α -sübstitüe açıl halojenürler ile reaksiyonu sonucunda 2-sübstitüe-2*H*-1,4-benzoksazin-3(4*H*)-on bileşiklerini elde etmişlerdir (Şekil 2.12.) (106-108).



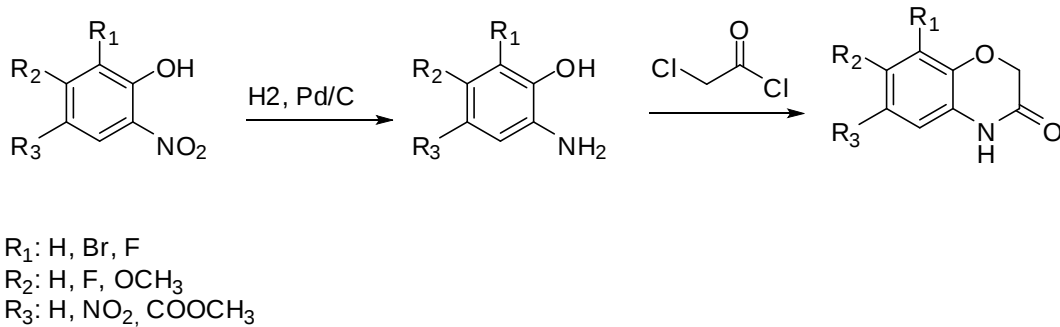
Şekil 2.12. 2-sübstitüe-2*H*-1,4-benzoksazin-3(4*H*)-on bileşiklerin sentez yöntemi

2000 yılında, 2-nitrofenol türevlerinin potasyum fenolatları ile α -bromoalkanoatlarla reaksiyonu sonrası $\text{Zn}/\text{NH}_4\text{Cl}$ varlığındaki reaksiyonu sonucunda 4-hidroksi-2*H*-1,4-benzoksazin-3(4*H*)-on türevi bileşikler elde edilmiştir (Şekil 2.13.) (94).



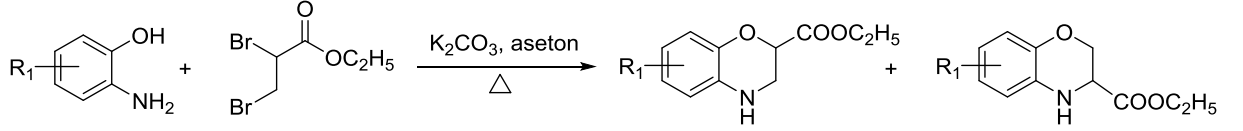
Şekil 2.13. 4-hidroksi-2*H*-1,4-benzoksazin-3(4*H*)-on türevlerin sentezi

Birçok çalışmada, 2-nitrofenol türevlerini ilk olarak redüksiyon reaksiyonuyla 2-aminofenol türevlerine dönüştürüp daha sonra kloroasetil klorür ile reaksiyonu sonunda 2-*H*-1,4-benzoksazin-3(4*H*)-on türevleri elde edilmiştir (Şekil 2.14.) (109-111).



Şekil 2.14. Sübstitüe-2-*H*-1,4-benzoksazin-3(4*H*)-on türevlerinin reaksiyon şeması

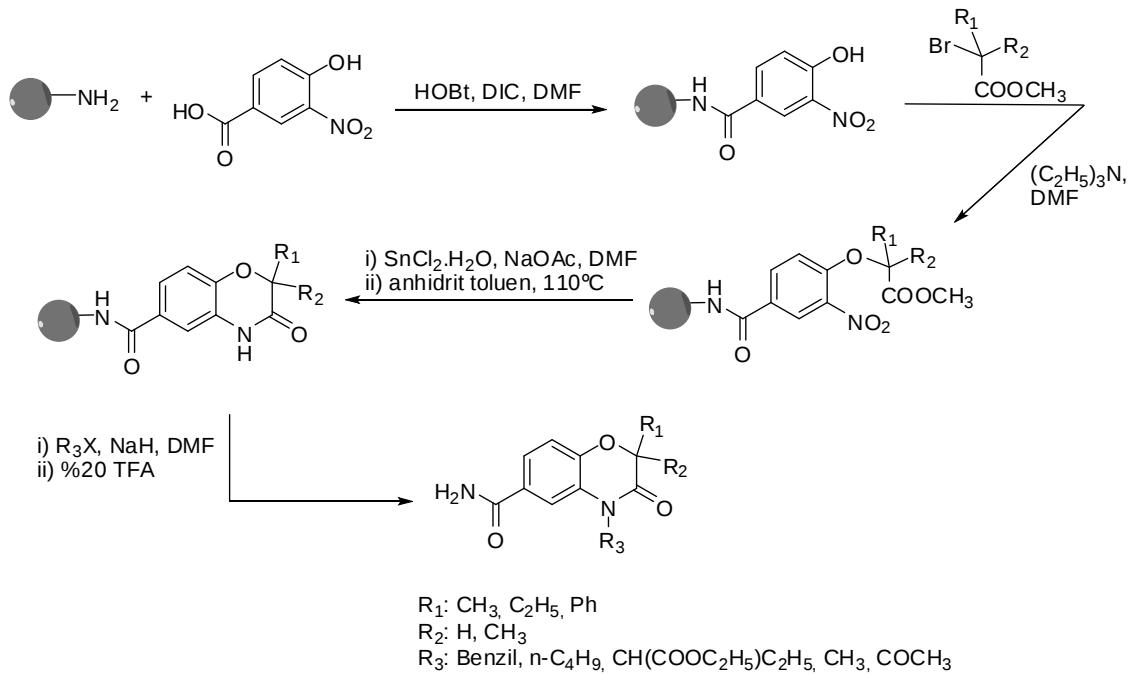
Mayer ve ark., 2-aminofenol türevlerini 2,3-dibromopropionatın potasyum karbonat ile muamelesi sonucunda 2. ve 3. konumunda etil ester yapısı taşıyan 3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoksazin türevlerini elde etmişlerdir (Şekil 2.15.) (112).



R₁: 5-CH₃, 6-CH₃, 7-CH₃, 8-CH₃, 6-OCH₃, 8-OCH₃, 6-8-(CH₃)₂, 7-Cl

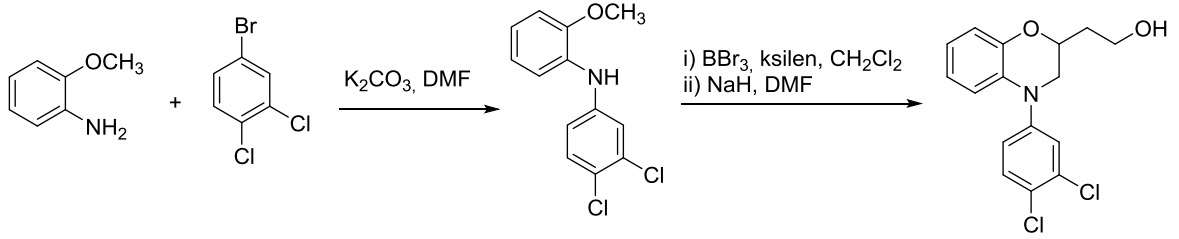
Şekil 2.15. 3,4-Dihidro-2*H*-1,4-benzoksazin türevlerinin eldesi

Lee ve ark., katı-faz kombinatoriyal metodunu kullanarak 1,4-benzoksazin-3-on türevlerinin sentezlemişlerdir. Bu yöntemde 4-hidroksi-3-nitrobenzoik asiti rink amin reçinesiniyle birleştirip (*N,N* diizopropilkarbodiimid/*N*-hidroksibenzotriazol sistemi kullanmışlar) ve birleşme sonunda 2-alkil/aril-2-bromoalkanoat ile reaksiyona sokmuşlardır. Reaksiyon sonunda elde edilen ürünü sodyum asetat, kalay klorür ve DMF ortamında siklizasyon reaksiyonu yapılmış ve 1,4-benzoksazin-3-on türevler elde edilmiştir. Ayrıca alkil halojenleri kullanarak 4. konumunda azot atomunu süstitüe ettikten sonra trifloroasetik asit kullanarak reçeneyi elede edilen bileşiklerden uzaklaştırmışlar (Şekil 2.16.) (113).



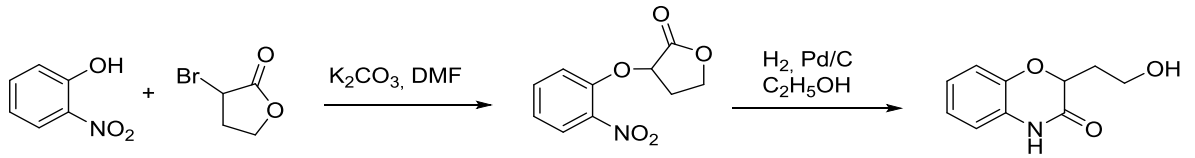
Şekil 2.16. Katı-faz kombinatoriyal yöntemiyle 1,4-benzoksazin-3-on türevlerinin sentezi

2003 yılında Rybczynski ve ark., 2-metoksianilin ve 4-bromo-1,2-diklorobenzen DMF içinde potasyum karbonat ile reaksiyonu sonucunda difenilamin türevi bileşiğini elde etmişlerdir. Daha sonra bu bileşiğin bor tribromür ile reaksiyonu sonucunda 4-(3,4-diklorofenil)-2-(2-hidroksietil)-2*H*-1,4-benzoksazin-3-on bileşiğini sentezlemişlerdir (Şekil 2.17.) (114).



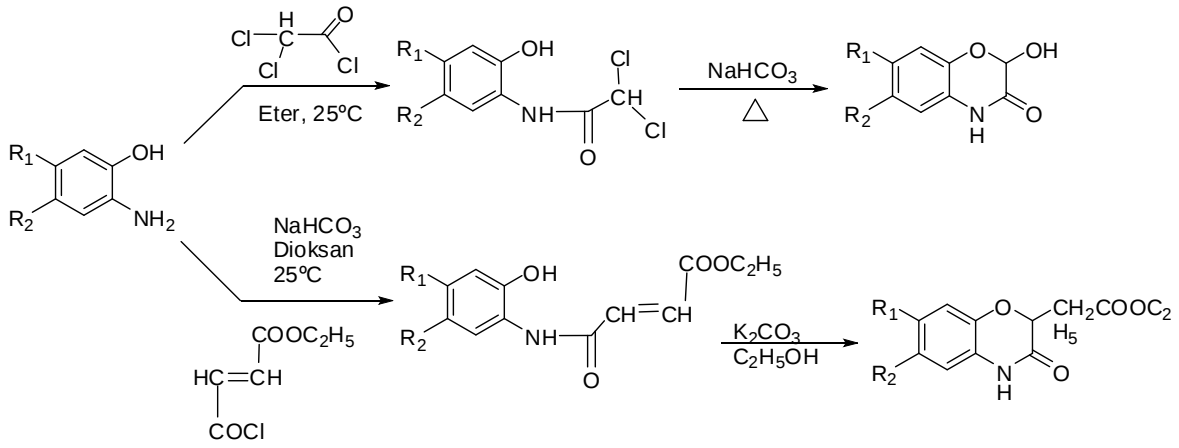
Şekil 2.17. 4-(3,4-diklorofenil)-2-(2-hidroksietil)-2*H*-1,4-benzoksazin-3-on bileşiğinin reaksiyon şeması

Aynı araştırmacılar 2004 yılında, 2-aminofenol bileşiği ile α -bromo- γ -butirolaktan lakton halkasını DMF içinde potasyum karbonat ile reaksiyona sokmuşlar ve daha sonra elde edilen bileşikteki nitro grubunun katalitik hidrojenasyonu ile birlikte gerçekleşen siklizasyonu sonucunda rasemik 2-(2-hidroksietil)-2*H*-1,4-benzoksazin-3(4*H*)-on bileşiğini sentezlemişlerdir (Şekil 2.18.) (115).



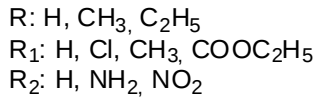
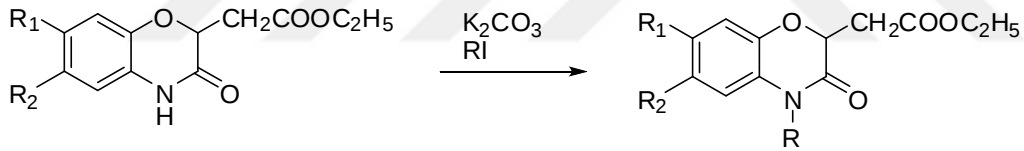
Şekil 2.18. 2-(2-hidroksietil)-2*H*-1,4-benzoksazin-3(4*H*)-on bileşiğinin sentezi

Yalçın ve ark., 2003 yılında uygun 2-aminofenolden hareketle dikloroasetil klorür ile 2-hidroksi-2*H*-1,4-benzoksazin-3(4*H*)-on türevlerini, monoetilmumaril klorür kullanarak etil 2-(3-okso-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoksazin-2-il) asetat türevlerini elde etmişlerdir (Şekil 2.19.) (98).



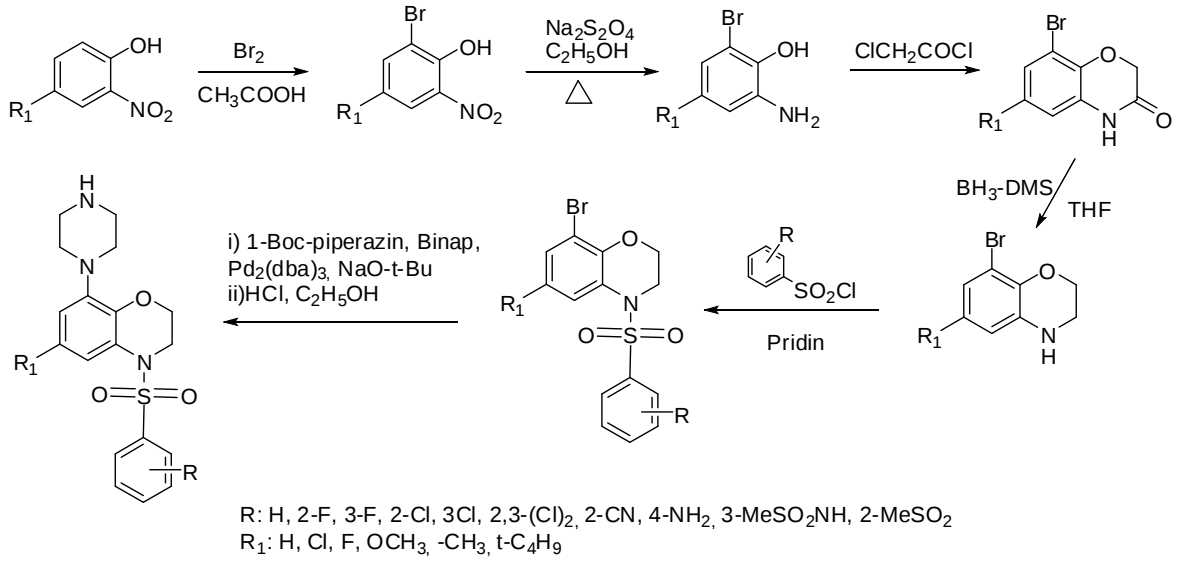
Şekil 2.19. 2-hidroksi-2H-1,4-benzoksazin-3(4H)-on ve etil 2-(3-okso-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-2-il) asetat türevlerinin sentezi

Alper-Hayta ve ark., 2006 yılında etil 2-(3-okso-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-2-il) asetat türevlerini yeniden sentezlemişler ve alkil iyodür kullanarak azot atomunu alkil grupları ile süstitüe etmişlerdir (Şekil 2.20.) (99).



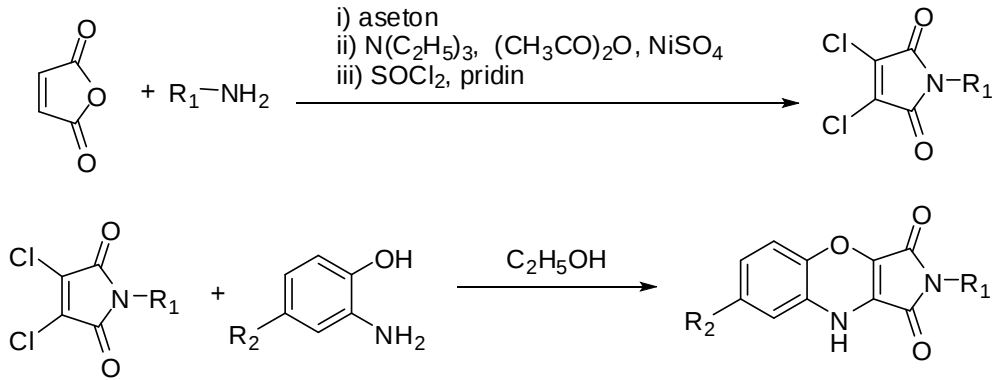
Şekil 2.20. Etıl 2-(3-okso-4-alkıl-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-2-il) asetat türevlerinin sentezi

Zhao ve ark., uygun 2-nitrofenol türevlerini asetik asitli ortamda brom ile muamele ettikten sonra nitro grubunu indirgemişlerdir. Daha sonra kloroasetil klorür kullanılarak siklizasyon reaksiyonu gerçekleştirilerek oksazin halkası elde edilmiştir. Boran kullanılarak karbonil grubu redüklenmiş ve 8-bromo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin türevleri sentezlenmiştir. Daha sonra fenilsülfonil klorür kullanılarak azot atomuna sülfonil yapısı getirilmiş ve son basamakta 8. konumuna piperazin eklenerek 4-(fenilsülfonil)-8-(piperazin-1-il)-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin türevlerielde edilmiştir (Şekil 2.21.) (116).



Şekil 2.21. 4-(fenilsülfonil)-8-(piperazin-1-il)-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin bileşiklerin sentezi

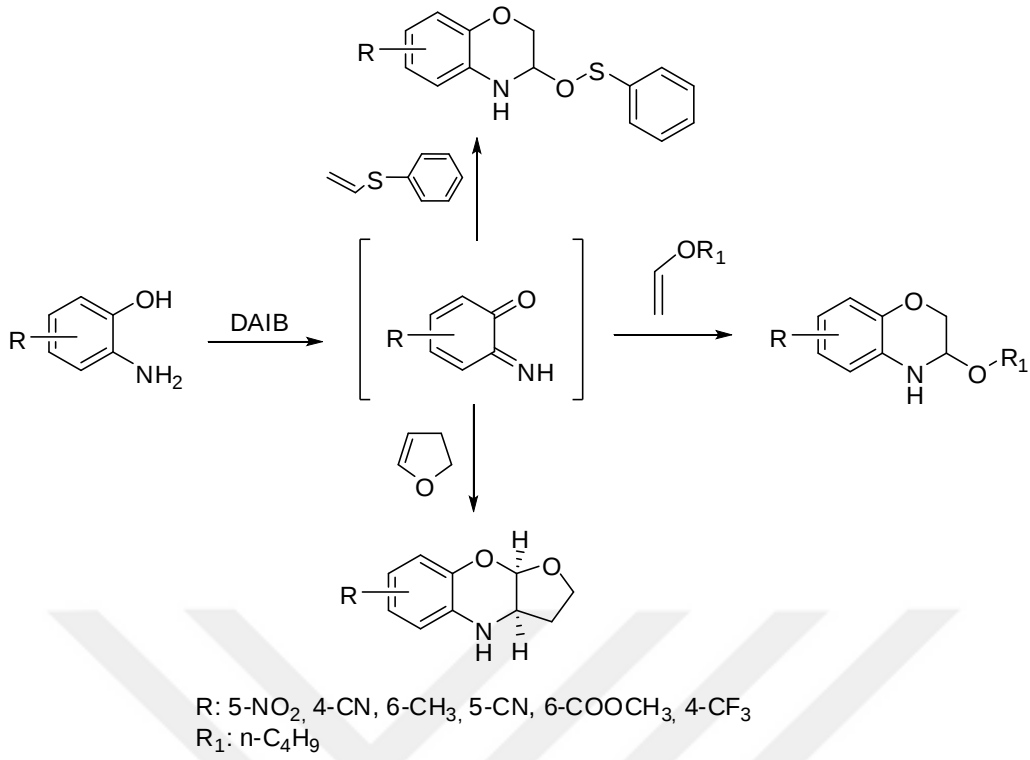
Wu ve Hu, sübtitüe aromatik aminleri maleik anhidrit ile reaksiyona sokarak *N*-fenildikloromaleimidleri sentezlemişlerdir. Bir sonraki reaksiyonda sübtitüe 2-aminofenol kullanarak 1,4-benzoksazin-2,3-dikarboksimid türevlerini elde etmişlerdir (Şekil 2.22.) (117).



R₁: H, p-F-Ph, p-Cl-Ph, p-CH₃-Ph, m-CH₃-Ph, p-NO₂-Ph, m-NO₂-Ph, 3,4-(CH₃)₃Ph, benzil, naftil
R₂: H, Cl, t-C₄H₉

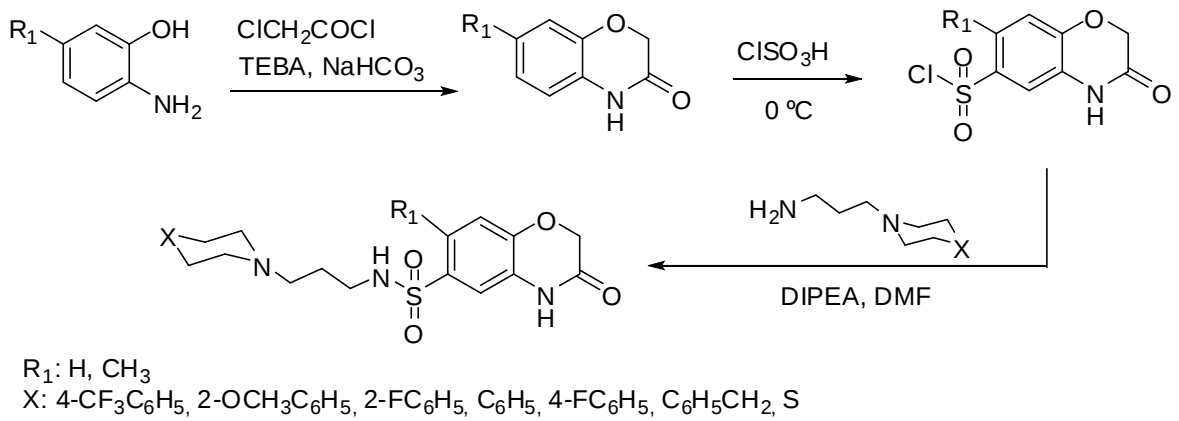
Şekil 2.22. 1,4-benzoksazin-2,3-dikarboksimid türevlerinin sentezi

Bodipati ve Peddinti 2012 yılında, uygun 2-aminofenolleri diasetoksiyodobenzen (DAIB) ile reaksiyona sokarak *o*-kinon monoimin türevlerini sentezlemişlerdir. Daha sonra Diels-Alder reaksiyonu ile çeşitli vinil eterler ve fenil vinil sülfat ile muamele ederek 1,4-benzoksazin türevlerini elde etmişlerdir (Şekil 2.23.) (118).



Şekil 2.23. Diels-Alder reaksiyonuyla çeşitli 1,4-benzoksazin türevlerinin sentezi

2015 yılında, sübstitüe 2-aminofenolün dikloroasetil klorür ile reaksiyonu sonucunda 1,4-benzoksazin-3-on türevleri sentezlenmiştir. Bu türevler klorosülfürik asitle muamele edilerek 6. konuma sülfonil klorür ilave edilmiş daha sonra bu grubun uygun aminlerle amidifikasyonu sağlanmıştır (Şekil 2.24.) (104).



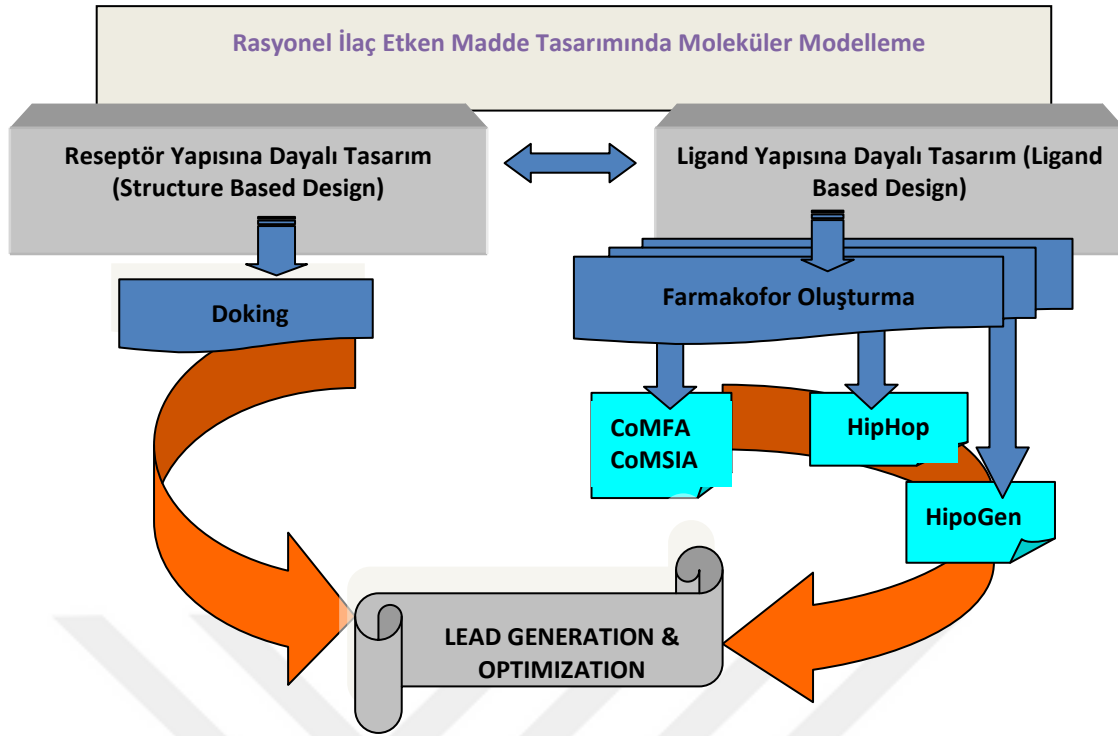
Şekil 2.24. 6. Konumunda sülfonamid grubu taşıyan 1,4-benzoksazin-3-on bileşiklerinin eldesi

2.7. Moleküler Modelleme Çalışmaları

İlaç etken maddesi olabilecek yeni kimyasal bileşiklerin rasyonel tasarlanması farmasötik ve medisinal kimyacıların en önemli hedeflerindedir. Bundan dolayı bilgisayar destekli ilaç tasarımı gün gittikçe önem kazanmaktadır. Moleküler modelleme çalışmalarının hedefi, bileşiklerin kimyasal ve fiziksel özellikleri arasındaki ilişkiyi açıklamak, üç boyutlu ve kimyasal yapılarını anlamaktır. İlişkilerin ve yapıların aydınlanması birçok bilim alanında hayatı önem taşımaktadır (119).

Son yıllarda bilgisayar teknolojisi ve yazılımlardaki ilerlemeler moleküler modelleme çalışmalarını daha uygun ve kolay bir duruma getirmektedir. Moleküler modelleme çalışmaları hedef yapısına dayalı ve ligand yapısına dayalı olarak ikiye ayrılmaktadır (Şekil 2.25.). Ligand yapısına dayalı tasarımlarda aktif olan bileşikten yola çıkılarak reseptör (hedef) yapısının yorumlanması yapılır. Hedef yapısına dayalı tasarımda ise bilinen hedef yapısından hareketle etki gösterebilecek yeni bileşiklerin tasarımı gerçekleştirilebilmektedir (120).

Hedef yapısına dayalı tasarımlarda tasarlanan bileşiklerin reseptördeki kaviteye uyumu ve amino asitler ile etkileşimleri önem taşımaktadır. Ligand-reseptör etkileşmesi bilgisayar ortamında 3D olarak ele alınır ve bu yüzden reseptör tabanlı ilaç tasarımı olarak bilinen doking de bu kısımda yer almaktadır (121).



Şekil 2.25. Rasyonel ilaç tasarım yöntemleri

Son yıllarda araştırmacılar yeni ilaç etken maddesine ulaşabilmek için, bileşiklerin moleküler yapıları ve biyolojik etkileri arasındaki ilişkileri tanımlama işlemlerine yoğunlaşmışlardır. Yeni teknikler, yeni ilaç etken madde olarak kimyasal bileşiklerin geliştirilmesinde, etki mekanizmalarının tanımlanmasında büyük rol oynamaktadırlar (121).

2.7.1. Reseptör Tabanlı İlaç Tasarımı

2.7.1.1. Moleküler Doking Yöntemi

Medisinal kimya alanında bilgisayar kullanımı gün gittikçe artmakta ve standart hale gelmektedir. Yapısal tabanlı ilaç etken madde tasarımında protein-ligand etkileşiminin önemi tartışmasızdır (122-124).

Doking, ilaç adaylarının proteine afinitesi, bağlanması ve bu nedenden dolayı biyolojik aktivitesini önceden tahmin edilmesi için kullanılmaktadır ve dolayısıyla ilaç etken tasarımında önemli bir rol oynamaktadır (125, 126).

Doking çalışmalarında reseptör olarak ifade edilen yapı protein yapısındadır. Hedef yapısının aydınlatılmasında X-ray kristallografisi ve nükleer manyetik rezonans (NMR) yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak, NMR metodu çok karışık kompleks çözümlemelere

ihtiyaç duyduğu için X ışınlar kristallografisi tercih edilmektedir. Bu yöntemde bazen her proteinin kristal halde elde edilmesinin mümkün olmaması bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır.

Rasyonel ilaç tasarımı ilaç veya ilaç adayı bileşikler ile enzim, hedef protein ve nükleik asitlerin birbirlerine olan afiniteleri moleküler doking teknikleri ile araştırılabilmektedir (127, 128). Doking çalışmalarında reseptör bağlanma enerjisi ve ligandın bağlanma bölgesindeki pozisyonu belirlenebilmektedir. Böylelikle bağlanma tipinin anlaşılması daha uyumlu yeni ligandların tasarlanması için faydalı olabilmektedir (129).

Doking, ligand ve reseptör arasındaki ilişkisi kilit-anahtar ilişkisine benzer bir uyum durumudur. Ligandlar hareketlidir ve bu nedenden dolayı çözücü içerisinde farklı konformasyonlar gösterebilmektedirler. En çok kullanılan doking yönteminde, reseptörün aktif bölgesi sabit tutulmakta ve ligandların farklı konformasyonları arasında doking işlemleri denenmektedir.

Moleküllerin afinite gösterdikleri bölge yerleşmesi “doking” olarak isimlendirirken aralarındaki ilişkinin tahmin edilmesi “skoring” olarak adlandırılır. Bu iki işlem arasındaki ayrım doking programları ile ilgili iki önemli konuyu aydınlatmaktadır: Ligandların doğru şekilde aktif bölgeye bağlanması (pose prediction) ve bu moleküllerin afinitelerinin doğru tahminidir (130, 131).

CDOCKER, moleküler dinamik tabanlı bir algoritmadır ki doking çalışmalarında en çok kullanılan yöntemdir. Bu yöntemde liganlar hareketliken protein sabit tutulmaktadır.

Güç alanı kuantum mekanik hesaplamalar ve deneysel olarak belirlenmektedir. Güç alanı bir molekülün potansiyel enerjisini ifade etmektedir. CDOCKER yönteminde güç alanı olarak CHARMm (Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics) kullanılmaktadır (132). CHARMm, organik moleküler, kofaktörler, nükleik asit ve proteinlerin optimize işlemlerini yapmaktadır ve atomların eksik parametrelerin tahmininde kullanılır (133).

Wu ve ark., 2003 yılında CDOCKER yönteminin başarı yüzdesini 41 adet ligand kullanarak belirlemiştir. Bu doking çalışmasına göre %66-76 oranında başarı elde edilmiştir (134).

2.7.2. Tahmini Farmakokinetik Özelliklerin Hesaplanması

İlaç, insanlarda hastalıklardan korunma, tanı, tedavi veya bir fonksiyonun düzeltilmesi ya da insan yararına değiştirilmesi için kullanılan bir veya birden fazla yardımcı madde ile formüle edilmiş etken madde ve maddeleri içeren bitmiş dozaj şeklidir.

Dünya sağlık örgütü (WHO) ilacı “Fizyolojik sistemlerin veya patolojik durumların, alıcının yararı için modifiye edilmesi veya incelenmesi amacıyla kullanılan, farmasötik ürün içindeki herhangi bir madde” olarak belirtmektedir. İlaç yerine ‘ilaç etken maddesi’, ‘aktif bileşen’ veya ‘farmakon’ sıklıkla kullanılan terimlerdir (135).

İlaçların fiziksel ve kimyasal özellikleri ilaç keşfi sonrasındaki formülasyon geliştirme çalışmaları esnasında yapılan detaylı stabilite, farmakokinetik, metabolizma ve toksisite çalışmalarının önemli bir parçası olmakla birlikte, bu özelliklerin önceden belirlenmesi günümüzde ilaç keşfi için zorunlu hale gelmiştir (136).

Medisinal Kimya ise güncel tanımıyla, ilaç endüstrisinde kullanılabilecek etkin ve yardımcı maddeleri araştıran ve bu araştırmayı takiben sentezinin gerektirdiği çalışmaları yürüten ana bilim dalıdır. Araştırmacılar, bu bağlamda bilgi birikiminin rasyonel şekilde kullanıldığı çalışmalara ihtiyaç duymaktadırlar. Nitekim, molekül sentezinde ilacın farmakokinetiği büyük rol oynamaktadır (137).

İlaç benzeri özellikler moleküllerin özgül (intrinsik) özellikleridir. Bu sebeple bu özelliklerin optimizasyonu, sadece farmakolojik özellikleri belirlemesi ile sınırlı olmadığından aynı zamanda medisinal kimyacıların da sorumluluğunda olan ve ilacın geliştirilmesi aşamasında göz önüne alınması gereken bir faktördür.

2.7.2.1. İlaçların Absorbsiyonu

Absorbsiyon, bir ilacın uygulandığı yerden merkezi kompartmana hareketi ve bunun oluşma derecesidir (138).

Oral alınan ilaçlarda absorbsiyon gastrointestinal mukozadan, lokal uygulanan ilaçlarda ise vücudun içinde veya dışında belli bir bölgeden oluşur. İlaç, daha sonra sistemik lenf veya kan dolaşimleri aracılığı ile organizmanın diğer kısımlarına dağılır. İlacın etkili olabilmesi için vücuttaki etki bölgesine yeterince yüksek konsantrasyonda ulaşması gerekir.

İlaç absorbsiyonuna etki eden faktörler:

İlaçların büyük bir çoğunluğu pasif difüzyonla absorbe edilir. Absorbsiyon hızı ve derecesi çeşitli faktörlere bağlıdır (135):

- İlacın fizikokimyasal ve stereokimyasal özellikleri, çözünürlüğü
- Partikül büyüklüğü ve yüzey alanı
- Dozaj şekli, içerdiği dolgu maddeleri
- Tatbik edilen doz
- Tatbik yolu ve bölgesi
- Absorbsiyon yüzeyi ile temas süresi
- Absorbsiyon yüzeyinin alanı
- Absorbsiyon bölgesindeki pH
- Membranın bütünlüğü
- Absorbsiyon bölgesindeki damarlanma

2.7.2.2. İlaçların Dağılımı

İlaç moleküllerinin kana geçtikten sonra kapiller damarlardan interstisyel sıvıya, daha sonra da dokuların ve organların içine yayılmasına dağılım denilmektedir. Vücut birçok dokudan oluşmuştur ve ilacın her birine afinitesi farklıdır. Organ ve dokulardaki kan akım hızı, membran geçirgenliği ve plazma ile dokular arası pH farkı vücutta ilaç dağılımını etkileyen önemli faktörlerdir. İlacın vücutta dağıldığı ortam genellikle fizyolojik sıvı kompartmanlarıdır.

Fizyolojik sıvı kompartmanları ekstrasellüler sıvı ve intraselüler sıvı kompartmanları olarak ikiye ayrılır. Ekstrasellüler sıvı vücut ağırlığının yaklaşık %17'sini oluşturur. Bunun da %4'ü (3- 3,5 litre) intravasküler sıvı (plazma), %13'ü (9 litre) interstisyel sıvı (hücreler arası sıvı + BOS + vücut boşluk sıvıları) dan oluşmaktadır. İntraselüler sıvı ise vücut ağırlığının yaklaşık %41'ini (29 litre) oluşturmaktadır. Normal erişkin vücudunun %58'ini su oluştururken bu oran yenidoğan ve bebeklerde %78'e kadar çıkabilmektedir (135, 139).

2.7.2.3. İlaçların Metabolizması

İlaçların genellikle enzim etkisiyle *in vivo* olarak kimyasal değişikliklere uğramasına metabolizma (biyotransformasyon) denir. Metabolizmanın amacı molekülü absorbsiyon ve

dağılıma uygun hale getirmek ve idrarla kolayca atılımını sağlamaktır. Metabolizmaya uğrayan ilaçlar daha polar hale gelir, suda çözünürlükleri artar, partisyon katsayıları ise azalır. Bu şekilde vücuttan daha kolay atılmaktadır (140).

İlaçların metabolik dönüşümleri genellikle enzimler aracılığı ile gerçekleştiğinden, majör eliminasyon yolağının hepatik metabolizma olduğu saptanmıştır. Bütün dokularda bir ölçüde metabolik aktivite olmakla birlikte, ilaç metabolizmasında rol oynayan enzim sistemlerinin bulunduğu, metabolizmada başlıca rolü olan temel organ karaciğerdir. Bununla birlikte akciğerler, böbrekler, mide-bağırsak kanalı ve deri de önemli metabolik aktiviteye sahip organlardır.

2.7.2.4. İlk Geçiş Eliminasyonu

Bir ilaç parenteral yol dışında bir yolla uygulandığında, dozunun önemli bir kısmı sistemik dolaşıma katılmadan önce gastrointestinal kanaldan ve hepatik hücre membranlarından absorbe olduktan sonra (ilk geçişte) metabolik olarak inaktif edilir. Bu olay presistemik metabolizma (ilk geçiş eliminasyonu) olarak tanımlanır ve metabolizması yüksek olan ilaçların (aspirin, lidokain, morfin, propranolol vs.) biyo yararlanımını büyük oranda kısıtlar.

İlk geçiş etkisine uğrayan ilaçlar genellikle fazla lipofiliktirler. Lipofilik bileşikler, yapılarında bir değişiklik olmazsa organizmada uzun süre kalır ve yağ dokularında veya çeşitli dokularda birikirler. Bu nedenle organizma, lipofilik bileşikleri vücuttan atılabilecek hidrofilik ürünlere çevirerek enzim sistemlerine sahiptir. Bu enzimler, sadece ilaçların ve diğer yabancı maddelerin metabolizmaları açısından değil, aynı zamanda organizmanın hormonlar, safra asitleri ve transmitterler gibi endojen maddeleri için de önem taşımaktadır (135).

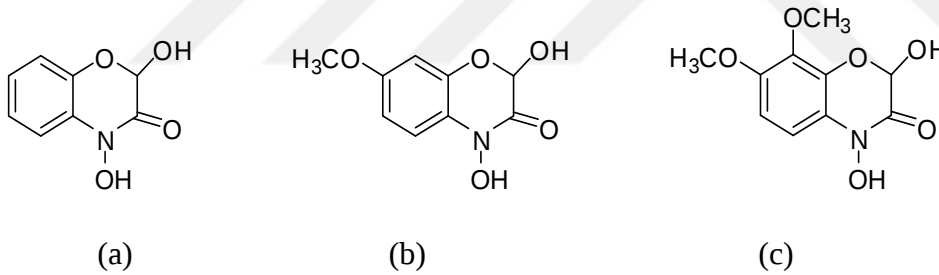
İlaçların inaktivasyonuna neden olan ilk geçiş etkisinden kurtulmak için oral doz artırılır veya ilacın verilmiş yolu değiştirilir. Bazı durumlarda ise verilmiş yolu yerine ilaç molekülünün yapısında değişikliklerle, ilk-geçiş etkisi minimuma indirilebilir (135).

Bir ilacın geliştirilmesinde erken dönemde ADME/Tox tanımlayıcılarının hesaplanması, tercihen sentezden önce, gelişim sürecinde daha sonra istenmeyen ADME/Tox özelliklerine sahip olan bileşiklerin ortadan kaldırılmasının önlenmesi için önemlidir (133).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Araştırmalar, heterosiklik halka taşıyan bileşiklerin oldukça güçlü antimikrobiyal etkilere sahip olduklarını göstermektedir (141-143). Benzoksazin ve türevleri doğal veya sentetik yeni antimikrobiyal aktif bileşiklerin sentezinde sıklıkla kullanılan bir heterosiklik yapıdır (144).

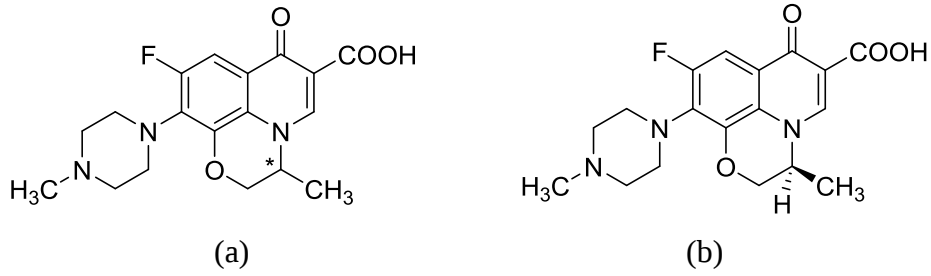
Benzoksazin halkası, bu yapıyı taşıyan doğal ve sentetik türevlerin antimikrobiyel, antimikobakteriyel, antidiyabetik, antihipolipidemik, antidepresan gibi çok çeşitli biyolojik aktivite göstermelerinden dolayı oldukça önemli bir halka sistemidir (144). İlk olarak Çavdar bitkisinden izole edilen ve bir benzoksazin türevi 2,4-dihidroksi-1,4-benzoksazin-3-on (DIBOA) (Şekil 3.1a.), buğdaydan elde edilen 2,4-dihidroksi-7-metoksi-1,4-benzoksazin-3-on (DIMBOA) (Şekil 3.1b.) ve mısırdan elde edilen 2,4-dihidroksi-7,8-dimetoksi-1,4-benzoksazin-3-on (DIM₂BOA) (Şekil 3.1c.) bileşiklerinin insektisit etki göstermeleri fitokimya alanında dikkat çekmiştir (87, 88). Ayrıca bu bileşiklerin tahıllara karşı yumuşak çürütücü olarak etki gösteren bazı mikroorganizmalara karşı antifungal veya antibakteriyel etki gösterdikleri de saptanmıştır (145).



Şekil 3.1. (a)DIBOA, (b)DIMBOA, (c)DIM₂BOA

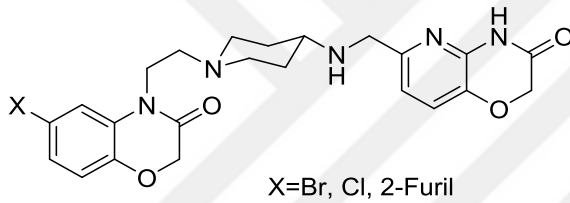
Bu çalışmalardan yola çıkarak yapılan çalışmalarda benzoksazin halkasını taşıyan ve biyolojik aktivite gösteren bileşiklerin herbisid (146), fungusid (147), antibakteriyel (89, 102, 148, 149) ve antimikobakteriyel (101) etkiler gösterdiği tespit edilmiştir.

1,4-benzoksazin halka çekirdeğini taşıyan ofloksazin'in (Şekil 3.2.) keşfi ve antibakteriyel aktivitesinin ortaya çıkmasıyla benzoksazin yapısı taşıyan bileşiklere ilgi oldukça artmıştır (89). Ofloksazin, 3. konumunda bulunan kiral karbon nedeniyle optik izomeri göstermektedir ve yapılan çalışmalar sonucunda bu izomerinin levojir formunun daha yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiği kanıtlanmış ve böylece levofloksazin molekülü (Şekil 3.2.) ilaç olarak kullanılmaya başlanmıştır (150).



Şekil 3.2. (a) Ofloksazin, (b) Levofloksazin

Daha sonra yapılan çalışmalarda, 1,4-benzoksazin ve bu halkanın biyoizosteri olan pirido[3,2-*b*][1,4]oksazin halkasını taşıyan 4-amino piperidin türevlerinin (Şekil 3.3.), bakteriyel tip IIa topoizomeras enzimini inhibe ederek antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edilmiş (102) ve bu durum araştırmacıların bu halka sistemlerine karşı olan ilgisini arttırmıştır.



Şekil 3.3. Bakteriyel topo II inhibitörü olan 4-amino piperidin türevleri

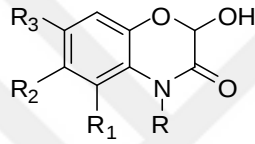
Yapılan çalışmalar ışığında benzoksazin halka sistemini içeren bileşiklerin bakteriyel tip IIa topoizomeras enzimini inhibe ederek kuvvetli antibakteriyel aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir (67).

Bu doktora tezi kapsamında tasarlanan 3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoksazin-3-on yapısı içeren çeşitli bileşiklerin bakteriyel topoizomeras II enziminin alt birimi olan DNA giraz enzimi ile etkileşimlerinin moleküler modelleme çalışmalarıyla incelenmesi ve yapılan doking çalışmaları sonucunda etkili olabileceği düşünülen 19 adet bileşiğin sentezlenmesi amaçlanmıştır (Çizelge 3.1.). Ayrıca sentezlenen bileşiklerin tahmini farmakokinetik özellikleri hesaplanarak ilaç olarak kullanılabilmesi için gerekli özelliklere sahip olup olmadıkları belirlenecektir.

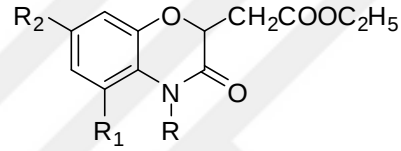
Sentezlenen bileşiklerin yapıları IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, kütle ve elementel analiz yöntemleri kullanılarak aydınlatılması ve bileşiklerin *in vitro* ortamda antibakteriyel

etkilerinin gram negatif bakterilerden; *E.coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve gram pozitif bakterilerden; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ve fungallerden *Candida albicans* ATCC 10231 suşları üzerinde test edilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca sentezleri gerçekleştirilecek bileşiklerin, dirençli *A.baumannii* bakterisi üzerinde menopenenemle kombine halde kullanımlarıyla direnç üzerindeki etkileri test edilecektir.

Çizelge 3.1. Doktora tez kapsamında incelenmesi tasarlanan 3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoksazin türevleri



Sis01-10



Sis11-19

	R	R ₁	R ₂	R ₃		R	R ₁	R ₂
Sis01	-H	-H	-NO ₂	-H	Sis11	-H	-H	-Cl
Sis02	-H	-H	-H	-Cl	Sis12	-C ₂ H ₅	-H	-Cl
Sis03	-H	-H	-H	-H	Sis13	-CH ₃	-H	-Cl
Sis04	-C ₂ H ₅	-H	-H	-H	Sis14	-H	-H	-CH ₃
Sis05	-H	-H	-H	-CH ₃	Sis15	-C ₂ H ₅	-H	-CH ₃
Sis06	-H	-H	-Cl	-H	Sis16	-CH ₃	-H	-CH ₃
Sis07	-H	-CH ₃	-H	-H	Sis17	-H	-CH ₃	-H
Sis08	-CH ₃	-H	-H	-H	Sis18	-C ₂ H ₅	-CH ₃	-H
Sis09	-C ₃ H ₇	-H	-Cl	-H	Sis19	-CH ₃	-CH ₃	-H
Sis10	-C ₂ H ₅	-H	-Cl	-H				

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. Materyal

4.1.1. *In Silico* Çalışmalar

4.1.1.1. *In Silico* Çalışmalarında Kullanılan Programlar

Doktora tezi kapsamında gerçekleştirilen moleküler modelleme çalışmaları ve tahmini farmakokinetik özelliklerin hesaplanması için aşağıda verilen programlar kullanılmıştır.

- ChemBioDraw Ultra 12.0
- Gauss View 3.0
- Accelrys Discovery Studio 3.5
- Biovia Discovery Studio Visualizer V17.2.0.16349

4.1.2. 3,4-Dihidro- 2*H*-1,4-benzoksazin Bileşiklerin Sentezi

4.1.2.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

Doktora kapsamında sentezlenen bileşiklerin NMR analizleri, ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları, Varian Mercury 400 High Performance Digital FT-NMR Spektrometre cihazı ile sırasıyla 400 MHz ve 100 MHz'de yapılmıştır. İç standart madde olarak tetrametilsilan (TMS), çözücü olarak dimetilsülfoksit- d_6 (DMSO- d_6) ve kloroform- d (CDCl_3 - d) kullanılmıştır. Kütle analizleri, Waters 2695 Alliance Mikromass ZQ marka LC/MS spektrometre cihazında, Elektrosprey İyonizasyonu (ESI) yöntemi uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen bileşiklerin erime noktası tayini, Büchi Melting Point B-540 cihazı kullanılarak, kapiller yöntem ile tayin edilmiştir. Değerler düzeltme olmadan verilmiştir. Elementel analizler, CHNS-932 (LECO) Elementel cihazı kullanılarak yapılmıştır. Sentez çalışmaları esnasında, reaksiyonları takip etme amacıyla, elde edilen maddelerin saflık durumunu anlamak ve R_f değerlerini saptamak için ince tabaka kromatografisi (İTK) kullanılmıştır. Bunun için Silica Gel 60 GF₂₅₄ alüminyum plaklardan yararlanılmıştır. Sentezlenen maddeler için uygun çözücü sistemi belirlenmiş ve sürüklenme işlemi tamamlandıktan sonra plaklar açık havada kurutulup daha sonra lekelerin

belirlenmesi için 254 ve 366 nm dalga boyundaki UV ışığı veren Camag UV Lambası kullanılmıştır.

4.1.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Sentez ve saflaştırma işlemlerinde, 2-amino-4-nitrofenol (Acros), 2-amino-5-klorofenol (Aldrich), 2-aminofenol (Fluka), 2-amino-5-metilfenol (Aldrich), 2-amino-4-klorofenol (Aldrich), 2-amino-3-metilfenol (Aldrich), monoetilfumarat (Acros), tiyonilklorür (Aldrich), dikloroasetilklorür (Aldrich), trietilamin (Fluka), sodyum bikarbonat (Fluka), dioksan (Merk), etiliyodür (Aldrich), metiliyodür (Aldrich), aseton (Fluka), susuz sodyum sülfat (Riedel-de Haen), kloroform (Riedel-de Haen), etilasetat (Carlo Erba), etanol (Aldrich), petrol eteri (Riedel-de Haen), hekzan (Riedel-de Haen), dietileter (Carlo Erba), metanol (Aldrich), diklorometan (Riedel-de Haen), potasyum karbonat (J.T. Baker), sodyum bikarbonat (Fluka), benzen (Riedel-de Haen), diklorometan (Aldrich), kullanılmıştır.

4.1.3. Sentezlenen Bileşiklerin Biyolojik Etki Çalışmaları

4.1.3.1. Sentezlenen bileşiklerin biyolojik etki çalışmalarında kullanılan gereçler ve maddeler

Mikrobiyoloji çalışmalarında, 96 kuyucuklu düz tabanlı mikrolept (Bioster), steril pipet ucu ve tek kanallı otomatik pipet (Socorex) kullanılmıştır.

Çalışmada MuellerHintonAgar (MHA) (Merck), MuellerHinton Broth (MHB) (Merck), SabouraudDextroseAgar (SDA) (Merck), Sabouraud Liquid Medium (SLM) (Merck) ve MOPS ile pH:7'ye tamponlanmış L-glutamin içeren RPMI 1640 besiyeri (Sigma) kullanılmıştır. MHA, MHB, SDA ve SLM 121°C'de 15-20 dakika otoklavlanarak, RPMI besiyeri, milipor (0.22µm) filtreden süzülerek steril edilmiştir. Antibakteriyel aktiviteleri belirlenecek olan maddelerin ve standart antimikrobiyal maddelerin homojen bir süspansiyon oluşturacak şekilde çözünmesini sağlamak için DMSO (Merck) kullanılmıştır.

Mikrobiyolojik etki çalışmalarında standart madde olarak, ampisilin (Biomatik), gentamisin sülfat (Sigma), seftazidim (Sigma), meropenem (Sigma), siprofloksasin

(Sigma), flusitozin (Sigma), azitromisin (World Medicine İlaç Sanayi ve Tic. A.Ş.) ve klaritromisin (World Medicine İlaç Sanayi ve Tic. A.Ş.) standartları kullanılmıştır.

4.1.3.2. Kullanılan Mikroorganizmalar

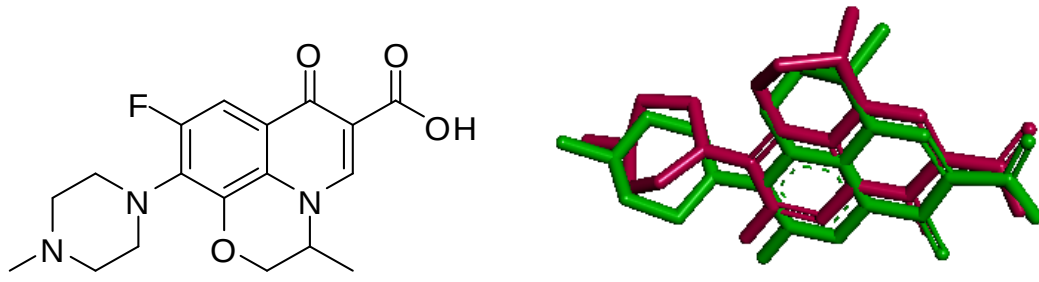
Sentezlenen bileşiklerin mikrobiyolojik etki çalışmaları Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesi mikrobiyoloji laboratuvarında yapılmıştır. Gram negatif bakterilerden; *E.coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve gram pozitif bakterilerden; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ve funguslardan *Candida albicans* ATCC 10231 suşları ve klinik izolatları kullanılmıştır.

4.2. Yöntem

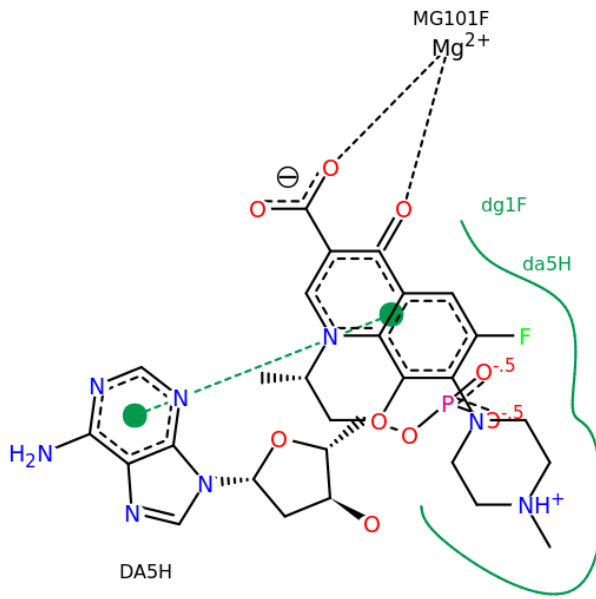
4.2.1. In Silico Çalışmaları

4.2.1.1. Tasarlanan 3,4-dihidro- 2H-1,4-benzoksazin Bileşiklerinde Moleküler Doking Çalışmaları (CDOCKER Yöntemi)

Doktora tez kapsamında bazı yeni 3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin yapısı taşıyan bileşikler (Çizelge 3.1.) tasarlanarak moleküler docking çalışmaları yapılmıştır. DNA giraz enzimi üzerinde etkili olabileceği düşünülen bileşiklerin enzim ile etkileşimlerini incelemek için yapılan docking çalışmalarında *S. pneumoniae* ait DNA giraz enzimi ile referans ligand levofloksazin (Şekil 4.1.) kullanılmıştır. Protein veri bankasından (PDB) 4Z2D kodlu kristal yapı alınmıştır (73). Levofloksazinin CDOCKER yöntemi kullanılarak yapılan docking çalışması sonucunda bulunan en uygun konformasyon ve X-ışınları kristalografisiyle karşılaştırılmıştır (Şekil 4.1). Gerçekleştirilen docking işleminin sonuçları, X-ışınları kristalografisi sonuçlarına uygun şekilde levofloksazin ile DA5H ve DG1H (nükleotid) ve enzim aktivitesinde önemli rol oynayan Mg^{++} iyonu arasında H bağları ve $\pi-\pi$ etkileşimleri yaptığı gözlenmiştir (Şekil 4.2.). En uygun konformasyon ve X-ışınları kristalografisi arasındaki farklılığı ifade eden RMSD değeri 1.22 bulunarak literatüre göre uygun bir sonuç elde edilmiştir (129). Böylelikle valide edilmiş CDOCKER yöntemi kullanılarak doktora tez kapsamında yeni benzoksazin türevleri tasarlanmıştır.



Şekil 4.1. Referans ligand levofloksazin (PDB’den alınan kristal yapısı, pembe renk) ve doking sonucu bulunan en uygun konformasyon (yeşil renk)



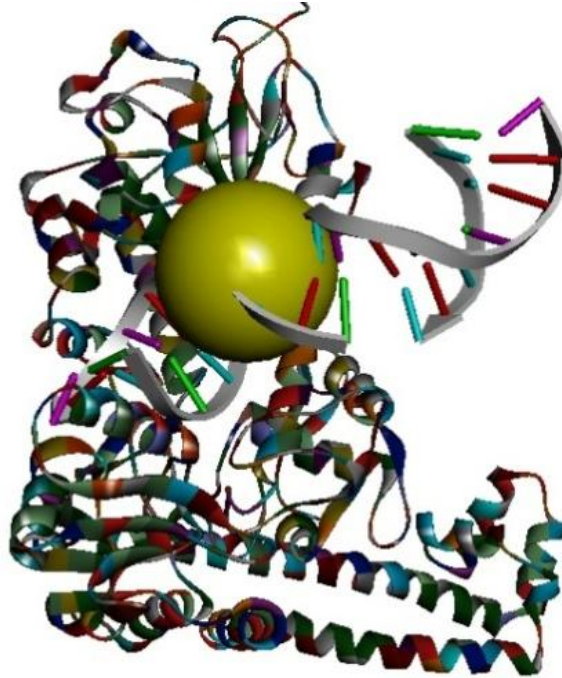
Şekil 4.2. Levofloksazinin bağlanma yöresi(73)

4.2.1.1.1. Ligandların Hazırlanması

Tüm moleküller önce ChemBioDraw Ultra 12,0 programında çizilmiş ve mol formatında kaydedildikten sonra Discovery Studio programına aktarılmıştır. Programın minimizasyon kısmında algoritma olarak ABNR (Adopted Basis Newton Raphson) metodunu kullanarak tüm moleküller minimize edilmiş ve daha sonra simulation bölümünden moleküler dinamik metodlarından heat and cool (700K-200K) protokolü kullanılarak moleküllerin en uygun konformasyonları elde edilmiştir.

4.2.1.1.2. Proteinin Hazırlanması

Protein Veri Bankasından 4Z2D kodlu protein Discovery Studio programına aktarıldıktan sonra proteinin içinden ligandı çıkartılarak ayrı bir dosya olarak kaydedilmiştir. Protein, programın otomatik hazırlanma kısmında hazırlanmış ve eksik kısımlar tamamlanmıştır. Macromolecule protokolünde protein minimization bölümünde yer alan Adopted Basis Newton Raphson (ABNR) metodu kullanılarak minimize edilmiştir. Ligandın protein içindeki konumuna bağlı olarak aktif bölgeler küre şeklinde tespit edilmiş ve doking işlemi belirlenen kürenin içinde gerçekleştirilir. Aktif bölgeyi içeren kürenin çapı ve koordinatları Şekil 4.3.'de verilmiştir.



4Z2D

Kürenin koordinatları: 91,175 10,432 42,767

Kürenin çapı: 10,7327

Şekil 4.3. 4Z2D enziminde belirlenen küre şeklindeki alanların koordinatları ve çapı

4.2.1.2. *In Silico* Farmakokinetik Özelliklerin Hesaplanması

Doktora tez kapsamında tasarlanan 3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoksazin yapısı taşıyan heterosiklik bileşiklerin tahmini farmakokinetik özelliklerini hesaplamak için Discovery Studio 3.5 programında ADMET çalışması yapılmıştır. ADMET çalışması olarak; moleküllere ait aşağıda verilen absorpsiyon, dağılım, metabolizma, eliminasyon ve toksisite özellikleri teorik olarak hesaplanmıştır:

- Sulu çözünürlük
- Kan beyin bariyeri penetrasyonu (BBB)
- Sitokrom P450 (CYP450) 2D6 inhibisyonu
- Hepatotoksisite
- İnsan bağırsak emilimi (SED)
- Plazma proteini bağlanması

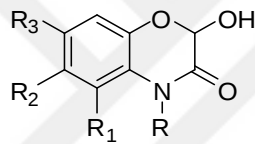
Tasarlanan ligandların ADMET hesaplamaları programın Küçük Moleküler/ Moleküler Özellikler protokolünden yararlanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma doğrultusunda sonuçlar AlogP98 ve PSA_2D grafiği şekilde elde edilir ve bu grafiğe göre iyi emilim gösteren bileşiklerin bulunmasının beklendiği bölgeler: İyi emilen bileşiklerin %95'inin, %95 elips içinde (mavi elips) düşmesi beklenirken, en iyi emilen bileşiklerin %99'u, %99'luk elipsin (pembeelips) içine düşmelidir. %95 elipsoidi için PSA_2D değerinin üst sınırı 131.62, %99 elipsoidi için PSA_2D değerinin üst sınırı ise 148.12'dir.

4.2.2. 3,4-Dihidro-2H-1,4-benzoksazin Bileşiklerin Sentezi

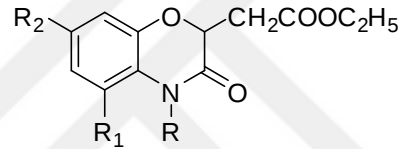
4.2.2.1. Elde Edilen Bileşiklerin Sentezleri, Reaksiyon Denklemleri ve Saflaştırma Yöntemleri

Doktora tez kapsamında iki farklı sentez metodu kullanılarak 3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin bileşikler sentezlenmiştir. Birinci metod ile 4/5/6/7-süstitüe-3,4-dihidro-2-hidroksi-2H-1,4-benzoksazin-3-on türevlerinin (Sis01-Sis10) sentezi, ikinci metod ile etil3,4-dihidro-5/7-süstitüe-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat ve etil 4/5/7-süstitüe-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat türevlerinin (sis11-sis19) sentezi gerçekleştirilmiştir. İki yöntem halinde sentezlenen bileşikler Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Doktora tez kapsamında sentezlenen bileşikler



Sis01-10

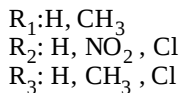
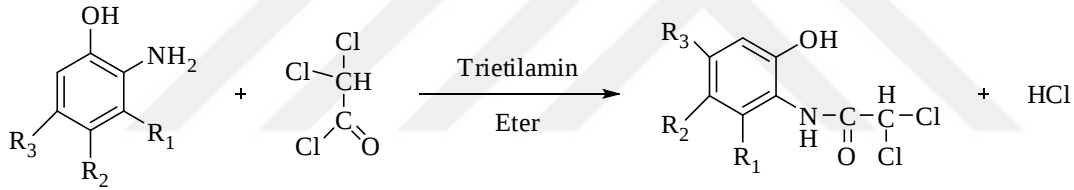


Sis11-19

	R	R ₁	R ₂	R ₃			R	R ₁	R ₂
Sis01	-H	-H	-NO ₂	-H		Sis11	-H	-H	-Cl
Sis02	-H	-H	-H	-Cl		Sis12	-C ₂ H ₅	-H	-Cl
Sis03	-H	-H	-H	-H		Sis13	-CH ₃	-H	-Cl
Sis04	-C ₂ H ₅	-H	-H	-H		Sis14	-H	-H	-CH ₃
Sis05	-H	-H	-H	-CH ₃		Sis15	-C ₂ H ₅	-H	-CH ₃
Sis06	-H	-H	-Cl	-H		Sis16	-CH ₃	-H	-CH ₃
Sis07	-H	-CH ₃	-H	-H		Sis17	-H	-CH ₃	-H
Sis08	-CH ₃	-H	-H	-H		Sis18	-C ₂ H ₅	-CH ₃	-H
Sis09	-C ₃ H ₇	-H	-Cl	-H		Sis19	-CH ₃	-CH ₃	-H
Sis10	-C ₂ H ₅	-H	-Cl	-H					

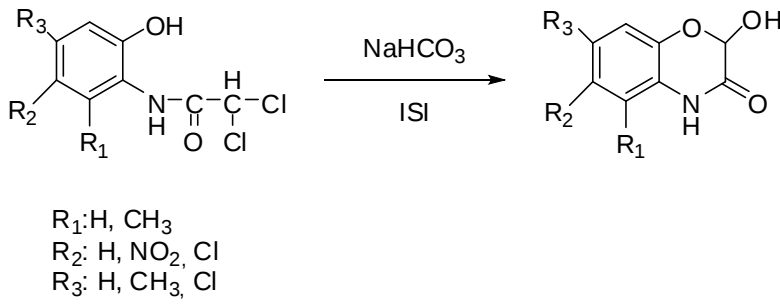
4.2.2.2. Elde Edilen 4/5/6/7-sübstitüe-3,4-dihidro-2-hidroksi-2H-1,4-benzoksazin-3-on Türevi Bileşiklerin Sentezi, Reaksiyon Denklemleri ve Saflaştırma Yöntemleri (Yöntem 1)

4/5/6/7-sübstitüe-3,4-dihidro-2-hidroksi-2H-1,4-benzoksazin-3-on türevlerin sentezi için, -10°C ortamında dietil eter içerisinde olan 50 mmol 3/4/5-sübstitüe-2-aminofenol, 50 mmol trietilaminin oluşturduğu süspansiyon üzerine, 50 mmol dikloro asetilklorür, 20 ml dietil eter karışımı damla damla ilave edildi ve 1 saat süre ile -10°C 'de magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. Bu süre sonunda reaksiyon ısı oda ısısına (25°C) yükseltildi. Reaksiyon 4 saat süre ile oda ısısında devam edildi. Süre sonunda çökelti halinde olan trietilamin pileli süzgeç kağıdından süzülerek ortamdan uzaklaştırıldı. Süzüntü sırasıyla su (100 ml), 0.5 M HCl (2 × 100) ve tuzlu su (100 ml) ile ekstre edildi, sonrasında susuz sodyum sülfat ile muamele edildi ve kuruluğa kadar rotarievaporatörde uçuruldu. Bakiye kloroformdan kristallendirildi (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. 2,2-dikloro-N-(2-hidroksi-4/5/6-sübstitüefenil)asetamid türevlerinin sentezi

Elde edilen 2,2-dikloro-N-(2-hidroksi-4/5/6-sübstitüefenil)asetamid türevleri, sulu sodyum bikarbonat içerisinde 30 dakika süre ile magnetik karıştırıcı üzerinde kaynatıldı. Bu süre sonunda reaksiyon ortamı oda ısısına kadar soğutuldu, 1 M HCl ile asitlendirildi (pH=3) ve etil asetat ile ekstre edildi daha sonra organik faz sırasıyla 1 M HCl, sulu sodyum bikarbonat ve tuzlu suyla ekstre edildi, susuz sodyum sülfat ile muamele edilerek fazla sudan arındırıldı, indirgenmiş basınç altında rotarievaporatörde uçularak kurutuldu. Elde edilen bakiye etil asetat ve hekzan solvan sistemi ile kristallendirildi (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. 5/6/7-sübstitüe-3,4-dihidro-2-hidroksi-2H-1,4-benzoksazin-3-on türevlerin sentezi

Elde edilen 5/6/7-sübstitüe-3,4-dihidro-2-hidroksi-2H-1,4-benzoksazin-3-ontürevleri vakum etüvünde kurutuldu, alkil iyodür, potasyum karbonat, aseton içerisinde 4 saat süre ile 40⁰C-50⁰C de karıştırıldı. Süre bitiminde aseton rotarievaporatörde uçuruldu bakiye etil asetat ile ekstre edildi ve susuz sodyum sülfat ile muamele edilerek sudan arındırıldı. Kuruluğa kadar etil asetat fazı rotarievaporatörde uçuruldu. Bakiye yağimsı şeklinde elde edildi. Bu yağimsı bakiye kolon kromatografisi ile saflaştırıldı ve kolon sonrası toplanan kristaller vakumlu etüvde kurutuldu (Şekik 4.6.).

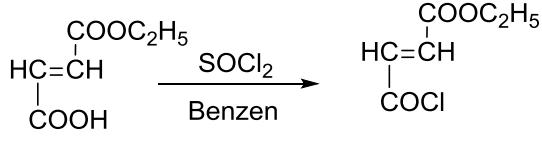


Şekil 4.6. 4/5/6/7-sübstitüe-3,4-dihidro-2-hidroksi-2H-1,4-benzoksazin-3-on türevlerin sentezi

4.2.2.3. Etil 3,4-dihidro-5/7-sübstitüe-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat ve Etil 4/5/7-sübstitüe-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat türevi Bileşiklerin Sentezi, Reaksiyon Denklemleri ve Saflaştırma Yöntemleri (Yöntem 2)

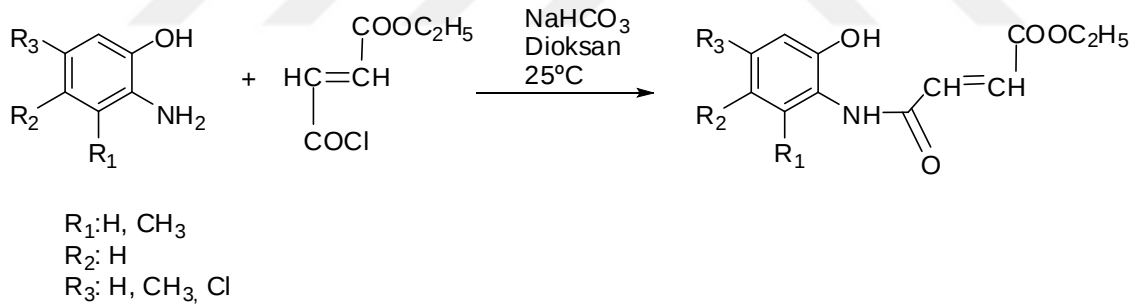
Etil 3,4-dihidro-5/7-sübstitüe-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat türev bileşiklerin sentezi için, 10 ml benzen içerisine, 10 mmol monoetil fumarat ve 2 ml tiyonil klorür ekleyerek 3 saat süre ile 80⁰C’de magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. 3 saat bitiminde

benzen ve tiyonil klorürün fazlası indirgenmiş basınç altında rotarievaporatörde uçularak monoetil fumaril klorür (Şekil 4.7.) sıvı halinde elde edildi.



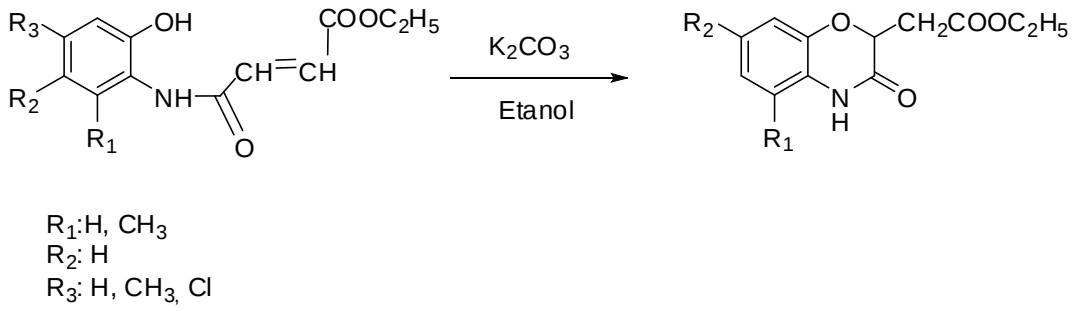
Şekil 4.7. Monoetil fumaril klorür sentezi

Kuru dioksan içerisindeki 3/5-sübstitüe-2-aminofenol ve sodyum bikarbonat karışımına elde edilen monoetilfumaril klorür damla damla ilave edildi. Reaksiyon 24 saat süre ile oda ısısında magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. Süre sonunda reaksiyon ortamı distile suya döküldü ve süzülerek oluşan çökelekler ayrıldı. Çökelek oluşmamışsa etanol ile çözülüp soğukta kristallendirildi. Böylelikle etil 3-[(2-hidroksi-4/6-sübstitüe-fenil)karbamoil]akrilat türevleri (Şekil 4.8.) elde edilmiştir.



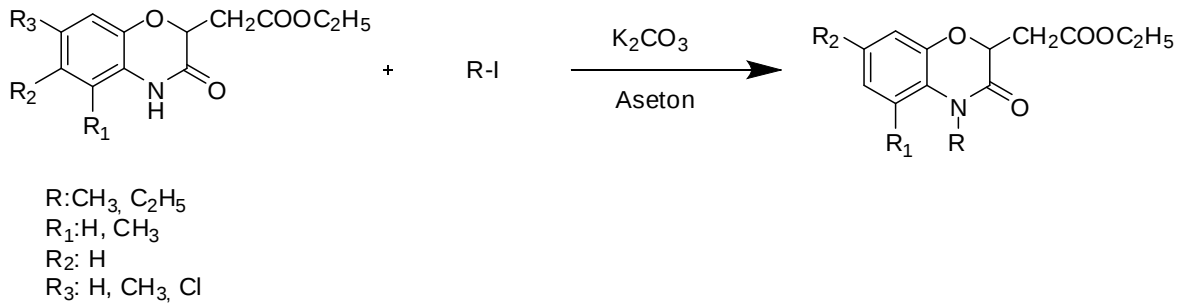
Şekil 4.8.3-[(2-hidroksi-4/6-sübstitüe-fenil)karbamoil]akrilat türevlerinin sentezi

Reaksiyon sonunda elde edilen bileşik etanol ve potasyum karbonat karışımına eklenerek 24 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Bu süreç sonunda elde edilen karışım suya dökülerek çökelek oluştu ve bu çökelek süzülerek ayrıldı. Bu şekilde etil 3,4-dihidro-5/7-sübstitüe-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat türevleri (Şekil 4.9.) elde edildi.



Şekil 4.9. 3,4-Dihidro-5/7-sübstitüe-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat türevlerinin sentezi

Elde edilen etil 3,4-dihidro-5/7-sübstitüe-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat türevleri, alkiliodür, potasyum karbonat, aseton içerisinde 4 saat boyunca 40⁰C ısıda karıştırıldı. Reaksiyon süresinin bitiminde aseton ortamdan indirgenmiş basınç altında rotarievaporatörde uçularak uzaklaştırıldı. Daha sonra elde edilen katı madde su ve etil asetat ile ekstre edildi toplanan etil asetatlı faz susuz sodyum sülfat ile muamele edilerek suyundan arındırıldı ve kuruluğa kadar rotarievaporatörde uçuruldu ve bakiye kolon kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı ve elde edilen kristaller vakum etüvünde kurutuldu (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Etil 4/5/7-sübstitüe-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat türevlerinin sentezi

Sentez çalışmaları esnasında, reaksiyon sürecini takip ve bileşiğin saflığını kontrol etmek için İTK (ince tabaka kromatografisi) ve saflaştırma işlemleri için kolon kromatografisinden yararlanılmıştır. İTK ve kolon kromatografisi için kullanılan solvan sistemleri:

İTK için solvan sistemi

n-hekzan:etilasetat (2:1)

n-hekzan:etilasetat (3:1)

Kolon kromatografisi için solvan sistemi

n-hekzan:etilasetat (7:3)

n-hekzan:etilasetat (6:4)

4.2.3. 3,4-Dihidro- 2H-1,4-benzoksazin Bileşiklerinin Yapı Analiz Yöntemleri

4.2.3.1. Elde Edilen Bileşiklerin Kütle Spektral Analizleri

Sentezlenen bileşiklerin kütle spektral analizleri elektrosprey iyonizasyon (ESI) yöntemi ile belirlenmiştir. Tüm bileşikler bu yöntem ile iyonize olmuştur. Bazı bileşiklerde moleküler iyon (M^+) piki görünürken, çoğu bileşikte (M) -H piki gözlenmiştir. ESI yönteminde, bazı bileşikler proton yerine K^+ , Na^+ , NH_4^+ gibi katyonlar ile iyonize oldukları için $M^+ + 23(Na^+)$, $M^+ + 39(K)$, $M^+ + 41(CH_3CN)$ pikleri görünmektedir.

4.2.3.2. Elde Edilen Bileşiklerin 1H -NMR Spektral Analizleri

Sentezlenen bileşiklerin çözünürlük durumlarına göre dimetilsülfoksit- d_6 (DMSO) veya kloroform- d ($CDCl_3$) içinde çözülerek 1H -NMR spektrumları alınmıştır. Bu çözücülerin 100% döterolanmış olmadıkları için çözücülerin döterolanmamış formlarının, spektrumlar pikleri görünmektedir. Spektrumlardaki 2,25-2,35 ppm'de görünen pik çözücü içindeki döterolanmamış DMSO'den 3,35-3,60 ppm'de görünen pik DMSO- d_6 içindeki sudan, 7,20-7,30 ppm'deki pik çözücü içindeki döterolanmamış $CHCl_3$ 'den kaynaklanmaktadır.

1,4-Benzoksazin türevlerinin 1H -NMR spektrumları incelendiğinde, benzoksazin halkasının 2.konumuna bağlı olan etil esterin CH_3 protonları 1,05-1,30 ppm arasında triplet olarak, $-CH_2$ protonları 4,1-4,4 ppm arasında quartet olarak görünmektedirler. Ester yapısı ve halka arasında kalan $-CH_2$ grubun $-H$ 'leri ayrı ayrı dublet vererek pikleri 2,9-3,3 ppm'de görünmektedir. 2.konumunda hidroksil ($-OH$) taşıyan türevlerde, $-OH$ protonu 7,40 ppm'de görünmektedir. 2.konumdaki $-H$ 4,9-5,1 ppm aralığında dublet dublet olarak gözlenmiştir. Aromatik halkanın protonları 6,7-8,1 ppm arasında gözlenirken, $-NH$ protonu 8-11 ppm'de $-NCH_3$ 3,40-3,45 ppm'de spektrumlarda görünmektedir.

Elde edilen her bileşiğin 1H -NMR spektrumu bulgular kısmında detaylı şekilde verilmiştir.

4.2.3.3. Elde Edilen Bileşiklerin Elementel Analizleri

Sentezlenen bileşiklerin elementel analizleri yapılmış. Bileşiklerin içerdiği C, H, N elementlerinin yüzde miktarları tayin edilmiştir. Bu sonuçlar teorik hesaplamalarla karşılaştırılarak bileşiklerin saflığı ve içerdikleri su miktarları belirlenmiştir. Bileşiklerde C, H, N elementlerin miktarı % ± 4 sınırları içinde bulunmuştur.

4.2.4. 3,4-Dihidro- 2H-1,4-benzoksazin Bileşiklerinin Mikrobiyolojik Etki Tayin Yöntemleri

Elde edilen bileşiklerin antibakteriyel ve antifungal aktivite tayini için, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı tarafından temin edilen aşağıdaki mikroorganizmalar kullanılmış ve mikrodilüsyon yöntemi kullanarak MİK değerleri belirlenmiştir.

- *E.coli* ATCC 25922
- *P. aeruginosa* ATCC 27853
- *S. aureus* ATCC 29213
- *E. faecalis* ATCC 29212
- *C. albicans* ATCC 10231
- *A. baumannii* dirençli izolatları

4.2.4.1. Mikrodilüsyon Yöntemi

Çalışmada MuellerHintonAgar (MHA) (Merck), MuellerHinton Broth (MHB) (Merck), SabouraudDextroseAgar (SDA) (Merck), Sabouraud Liquid Medium (SLM) (Merck) ve MOPS ile pH:7'ye tamponlanmış L-glutamin içeren RPMI 1640 besiyeri (Sigma) kullanılmıştır. MHA, MHB, SDA ve SLM 121°C'de 15-20 dakika otoklavlanarak, RPMI besiyeri, milipor (0.22 μ m) filtreden süzülerek steril edilmiştir.

Duyarlılık testi Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü, CLSI-M100-S28 (1) ve CLSI-M27-A3 (2) protokollerine göre yapılmıştır.

Bakteriler için MHA, mayalar için SDA kültür plaklarında üretilmiş olan kolonilerden sırasıyla MHB ve SLM besiyerlerine aktarılmıştır. Sıvı besiyerlerindeki kültürler inkübe

edilip, kültürün bulanıklığı, 0.5 McFarland standardına uygun bulanıklığa ulaşınca kadar üzerine sıvı besiyeri eklenerek yoğunluk ayarlanmıştır. Bakteri süspansiyonu densitometre kullanılarak McFarland 0.5 yoğunluğunda ayarlandıktan sonra 1:100 oranında dilüe edilerek 10^5 CFU/ml yoğunluğunda kullanılmıştır. Maya süspansiyonu ise densitometre kullanılarak McFarland 0.5 yoğunluğunda ayarlandıktan sonra, önce 1:100 sonra 1:20 oranında sulandırarak 2.5×10^3 CFU/ml yoğunluğunda kullanılmıştır. Ayarlanan bu süspansiyonlar inokulum olarak kullanılmıştır.

Bakteri inokülasyonu yapılacak olan mikrodilüsyon plaklarının her kuyucuğuna 100 µl MHB, maya inokülasyonu yapılacak olan mikrodilüsyon plaklarının her kuyucuğuna 100 µl MOPS ile pH:7'ye tamponlanmış L-glutamin içeren RPMI 1640 besiyeri eklenmiştir.

Antibiyotiklerin stok solüsyonlarının hazırlanmasında kullanılan çözücüler aşağıda verilmiştir. Yeni sentezlenen bileşikler DMSO ile çözülmüştür.

<u>Antibiyotik</u>	<u>Çözücü</u>	<u>Sulandırıcı</u>
Ampisilin	0.1 mol/l pH:8 fosfat tamponu	0.1 mol/l pH:6 fosfat tamponu
Gentamisin	Su	Su
Seftazidim	Sodyum karbonat	Su
Meropenem	Su	Su
Siprofloksasin	Su	Su
Azitromisin	Glasiyel asetik asit	Besiyeri
Klaritromisin	Glasiyel asetik asit	0.1 mol/l pH:6,5 fosfat tamponu
Flusitozin	Su	Besiyeri

Stok solüsyonları hazırlanan antibiyotikler ve yeni sentezlenen bileşikler, mikrodilüsyon plaklarının ilk kuyucuklarına 100 µl hacimde eklenmiştir. Böylece stok solüsyondaki madde konsantrasyonu çift katlı olarak sulandırılmış olur. Çok kanallı mikropipet kullanılarak çift katlı dilüsyona devam edilip mikrodilüsyon plaklarının takip eden kuyucuklarında da madde konsantrasyonu her defasında yarı yarıya azaltılmıştır. Sonuç olarak mikroplaklarda yeni sentezlenen bileşiklerin 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 µg/ml konsantrasyonları ve standart antibiyotiklerin 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 konsantrasyonları elde edilmiştir.

Dilüsyon işlemi tamamlandıktan sonra, mikrodilüsyon plağındaki her kuyucuğa, hazırlanan inokulum süspansiyonlarından 10 µl inokülasyon yapılmıştır.

Her mikrodilüsyon plağında sadece besiyeri ve mikroorganizma içeren ve sadece besiyeri içeren kontrol kuyucukları eklenmiştir. Ayrıca kullanılan tüm çözücülerin antimikrobiyal etkilerine bakılmıştır.

Bakteri inoküle edilmiş mikrodilüsyon plakları 37°C’de 16–20 saat, maya inoküle edilmiş mikrodilüsyon plakları 35°C’de 24–48 saat süre ile aerobik koşullarda inkübe edilmiştir.

MİK, mikroorganizmanın mikrodilüsyon kuyucuklarındaki üremesini inhibe eden en düşük madde konsantrasyonu olarak saptanmıştır.

4.2.4.2. Mikrodilüsyon Yöntemi 2

Çalışmada, Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilen ve daha önceki çalışmalarda meropeneme dirençli olduğu gösterilen *Acinetobacter baumannii* klinik izolatları kullanılmıştır. İzolatlarda siprofloksasin direncinin; DAP genlerinin aşırı ekspresyonunun baskılanması yolu ile inhibe edildiği ve bu inhibisyonun dışa atım pompası inhibitörleri (PAßN, CCCP, NMP) ile gerçekleştiği önceki çalışmalarımızda gösterilmiştir. Meropenem direncinde de AdeABC dışa atım pompası ile direnç gelişebileceğinden meropenem+madde kombinasyonlarının meropeneme dirençli olan bu izolatlarda direnci ortadan kaldırıp etkili olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmada, yeni sentezlenen maddelerin meropenem direncini azaltıp, *A. Baumannii* izolatları için meropenem direnç sınırı olan 2 µg/ml’ye indirebileceği öngörülmüştür. Bu amaçla mikrodilüsyon yöntemi 4 µg/ml meropenem içeren MHB besiyeri ile tekrar yapılmıştır. Tüm kuyucuklarda meropenemin 2 µg/ml konsantrasyonu ve maddelerin seri sulandırılmaları mevcuttur. Kuyucuklarda mikroorganizma üremesinin görülmemesi meropenem+madde kombinasyonlarının, meropeneme dirençli olan bu izolatlarda etkili olduğunu gösterecektir.

Olabilecek hataları önlemek için her deney iki paralel şekilde çalışılmıştır. Sentezlenen bileşiklerin ve standart olarak kullanılan bileşiklerin MİK değerleri bulgular kısmında verilmiştir.

4.2.4.3. Kullanılan Mikroorganizmaların Özellikleri

Pseudomonas türleri ampisilin ve amoksisiline doğal direnç göstermektedir. 1. ve 2. kuşak sefalosporinlere doğal direnç gösterirken *P. aeruginosa* izolatu siprofloksasine direnç göstermektedir.

E. coli ATCC 25922 standart suşu TEM-1 β -laktamaz üreten kökendir ve β -laktam antibiyotiklere dirençlidir ayrıca *E. coli* izolatu siprofloksasine direnç göstermektedir.

S. aureus izolatu MRSA'dır ve tüm β -laktam antibiyotiklere ve meropeneme karşı direnç göstermektedir.

Staphylococcus'lar *Eubacteriales* takımının *Micrococcaceae* familyasından bakterilerdir. Stafilokoklar antibiyotiklere duyarlıdırlar. Mastitislerde erken dönemde tedavi mümkündür. Antibiyotik duyarlılık testi yaparak tedaviye başlamak gerekmektedir. Zira dirençli suşlar özellikle bilinçsiz antibiyotik kullanımı nedeni ile sahada çok yaygındır.

Candida albicans, eşeyli çoğalan, diploit, maya tipi bir mantar türü ve insanlarda oral ve vajinal fırsatçı enfeksiyonların temenidir.

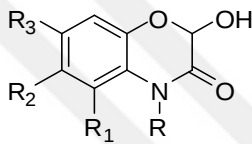
Enterococcus faecalis ATCC 29212 sefalosporinlere doğal dirençlidir. *E. faecium* izolatu vankomisine direnç gösterirken imipenem çoğunlukla *E. faecalis*'e etkili *E. faecium*'a etkisizdir. VRE izolatlarına karşı meropenem etkinliği zaten yoktur.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

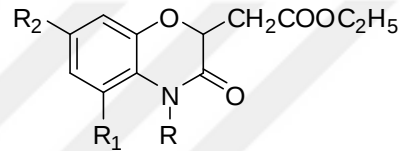
5.1. 3,4-Dihidro-2H-1,4-benzoksazin Türevlerinin DNA Giraz Enzimi Üzerinde Moleküler Doking Çalışmaları

Tasarlanan bileşiklerin Discovery Studio 3.5 programını kullanılarak DNA giraz enzimi (PDB kodu: 4Z2D) üzerinden gerçekleştirilen doking çalışmalarının sonuçları çizelge 5.1.'de verilmiştir.

Çizelge 5.1. DNA giraz enzimi üzerinde yapılan CDOCKER çalışmasının sonuçları ve etkileşimleri



Sis01-10



Sis11-19

	-CDocker Enerjisi	-CDocker Interaction Enerji	H-bağları	C-H Bağı	Pi-Pi Bağı	Pi-Alkil Bağı	Pi-Sigma
Sis01	30,3028	44,2892	DA5, GLY457	DG1	DG1, DA5, DT15	-	DG1
Sis02	30,3098	40,069	-	-	DG,DT15	-	-
Sis03	28,6652	38,9163	DT15	-	DG1	-	-
Sis04	24,8568	35,3816	DA5	DG1	DG1,DT15	DG1	-
Sis05	31,4605	40,3886	-	-	DG1, DA5, DT15	ARG456	-
Sis06	31,9443	42,9003	DA5	-	DG1, DA5, DT15	-	DG1
Sis07	32,3433	41,7937	DA5	-	DG1, DA5, DT15	DT15,DG1	DG1
Sis08	14,7852	25,7518	-	-	-	DG1, DA5, DT15,ARG456	-
Sis09	27,0375	39,6562	-	DT15	DG1,DT15	ARG456	-
Sis10	27,5126	37,749	-	DT15	DG1,DT15	DA5	-
Sis11	34,5476	39,8105	-	GLY457, DA2,DG1,DA5	DA5	ARG456	-
Sis12	37,085	41,6767	DG1	GLU475, ARG456, DG1	DG1	DT15,DG1,DA5	-
Sis13	41,6382	47,2416	-	-	-	ARG456,DT15,	-

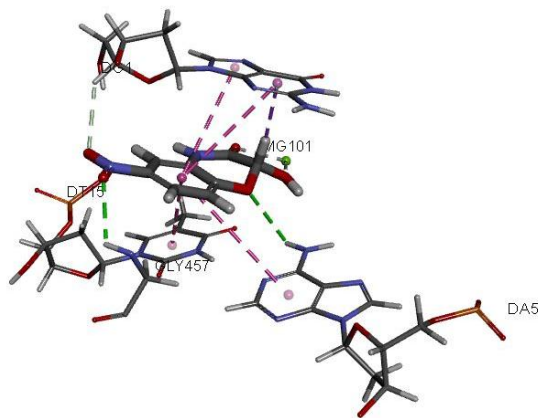
						DG1	
Sis14	43,254	47,2347	-	DG1	DA5,DG1	ARG456	DG1
Sis15	36,9079	42,0471	-	GLY457,DG1	DT15,DG1	DA5,DG1,DT15	-
Sis16	41,4567	52,431	DT15	DG1	-	ARG456,DT15, DG1	-
Sis17	35,5317	39,0091	-	GLY457,DG1,D A5	DT15,DG1	DA5	DT15
Sis18	33,5931	43,5936	DT15,DG1	GLU475, GLU474,DG1	-	ARG456,DT15, DG1	DG1
Sis19	34,4917	42,3396	DG1	GLU474,DA5,D G1	-	ARG456,DT15, DA5	DA5
levofloksazin	55,8738	77,7146	DA5,DG1	GLU433,DG1,D A2,DT15	DA5,DG1,DT1 5	DA5,DG1	-

5.1.1. 3,4-Dihidro-2H-1,4-benoksazin Bileşiklerinin 4Z2D Enzimi ile Etkileşimleri

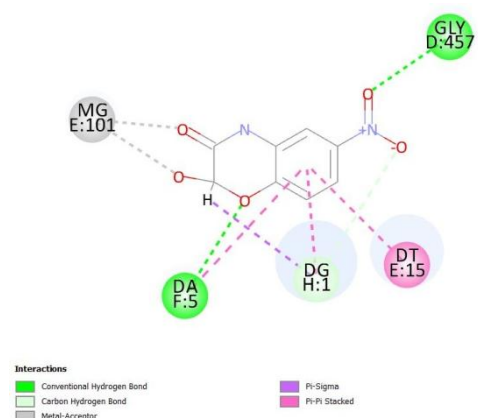
5.1.1.1. Sis01 bileşiğinin 4Z2D enzimi ile etkileşimleri:

Sis01		<u>-CDOCKER Enerjisi</u>	<u>-CDOCKER Interaction Enerjisi</u>
		30,3028	44,2892
<u>H bağları</u>	<u>C-H Bağları</u>	<u>Pi-etkileşimleri</u>	<u>Metal akseptör</u>
		<u>Pi-Pi</u>	<u>Pi-Sigma</u>
DA5, GLY457	DG1	DG1, DA5, DT15	DG1
			MG101

a.



b.

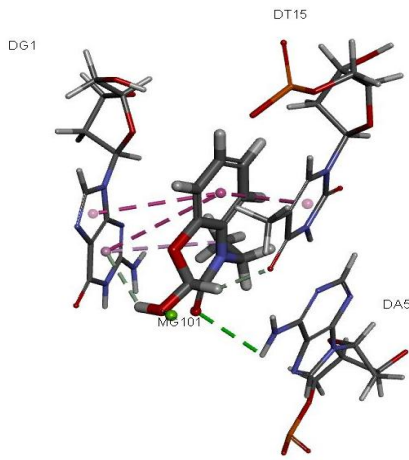


Şekil 5.1. Sis01 bileşiğinin 4Z2D enzimi ile etkileşimleri: a. 3D gösterimi., b. 2D gösterimi

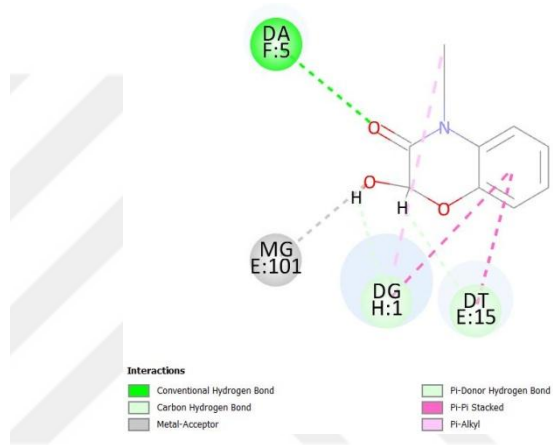
5.1.1.2. Sis04 bileşiğinin 4Z2D enzimi ile etkileşimleri

Sis04	<u>-CDOCKER Enerjisi</u>	<u>-CDOCKER Interaction Enerjisi</u>		
	24,8568	35,3816		
<u>H bağları</u>	<u>C-H Bağları</u>	<u>Pi-etkileşimleri</u>		<u>Metal akseptör</u>
		<u>Pi-Pi</u>	<u>Pi-Alkil</u>	
DA5	DG1	DG1,DT15	DG1	MG101

a.



b.

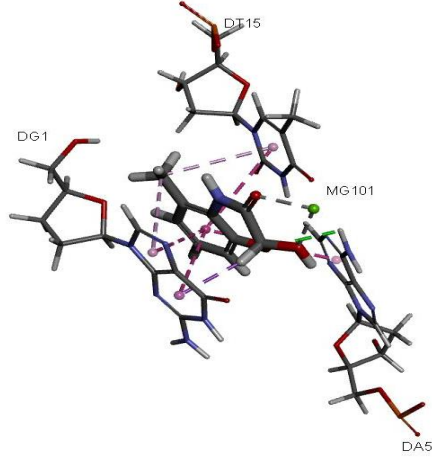


Şekil 5.2. Sis04 bileşiğinin 4Z2D enzimi ile etkileşimleri: a. 3D gösterimi., b. 2D gösterimi

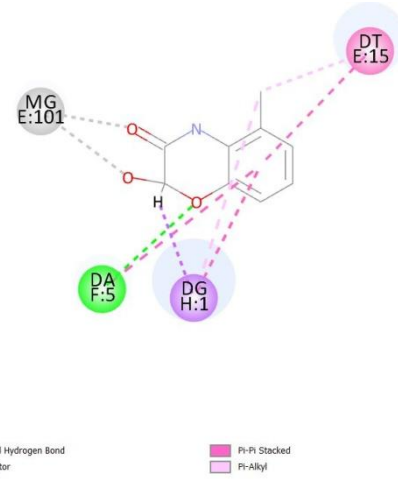
5.1.1.3. Sis07 bileşiğinin 4Z2D enzimi ile etkileşimleri

Sis07	<u>-CDOCKER Enerjisi</u>	<u>-CDOCKER Interaction Enerjisi</u>		
	32,3433	41,7937		
<u>H bağları</u>	<u>Metal akseptör</u>	<u>Pi-etkileşimleri</u>		
		<u>Pi-Pi</u>	<u>Pi-Sigma</u>	<u>Pi-Alkil bağı</u>
DA5	MG101	DG1, DA5, DT15	DG1	DT15,DG1

a.



b.

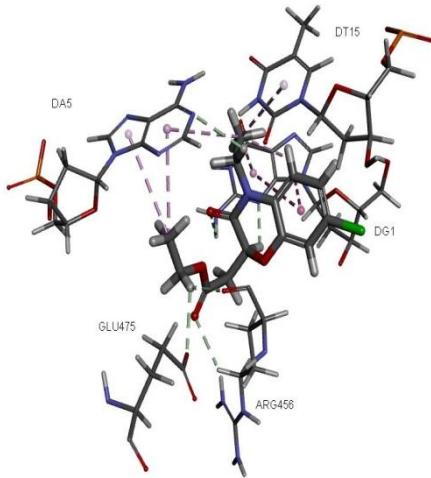


Şekil 5.3. Sis07 bileşiğinin 4Z2D enzimi ile etkileşimleri: a. 3D gösterimi., b. 2D gösterimi

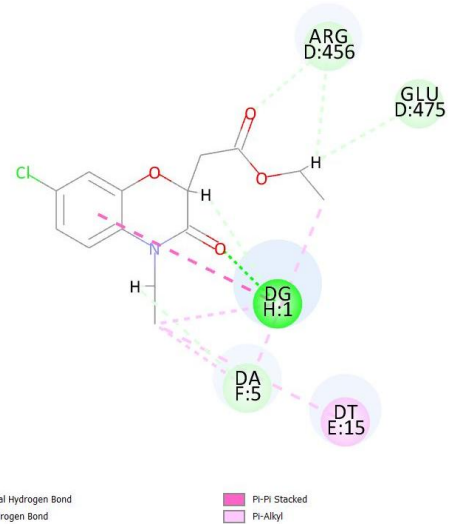
5.1.1.4. Sis12 bileşiğinin 4Z2D enzimi ile etkileşimleri

Sis12	<u>-CDOCKER Enerjisi</u>	<u>-CDOCKER Interaction Enerjisi</u>
	37,085	41,6767
<u>H bağları</u>	<u>C-H bağı</u>	<u>Pi-etkileşimleri</u>
DG1	GLU475, ARG456, DG1	<u>Pi-Pi</u>
		<u>Pi-Alkil bağı</u>
		DG1
		DT15,DG1,DA5

a.



b.

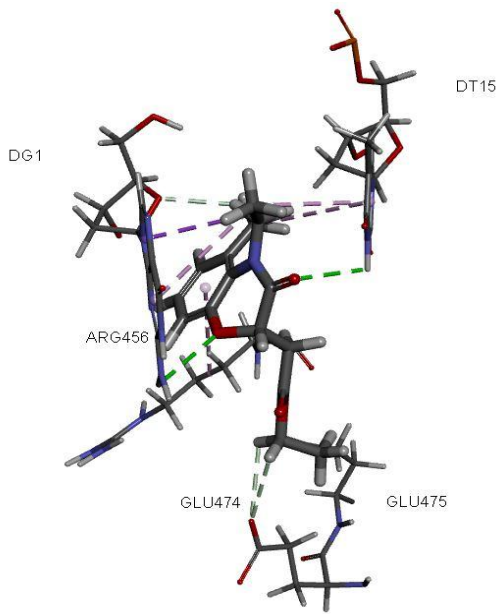


Şekil 5.4. Sis12 bileşiğinin 4Z2D enzimi ile etkileşimleri: a. 3D gösterimi., b. 2D gösterimi

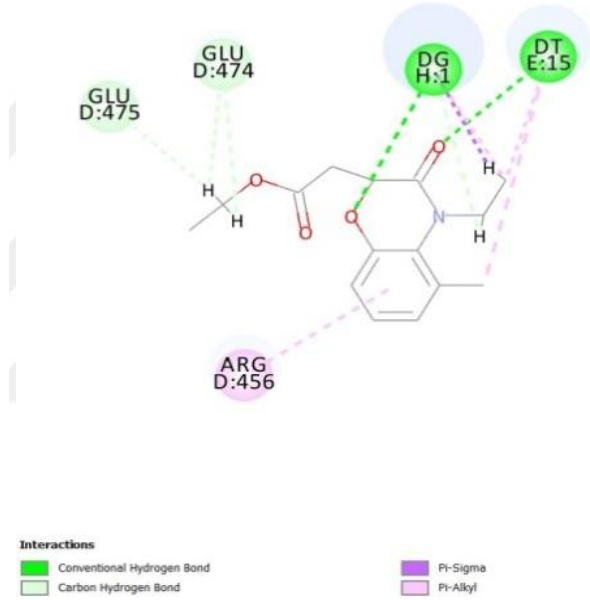
5.1.1.5. Sis18 bileşiğinin 4Z2D enzimi ile etkileşimleri

Sis18	<u>-CDOCKER Enerjisi</u>	<u>-CDOCKER Interaction Enerjisi</u>	
	33,5931	43,5936	
<u>H bağları</u>	<u>C-H bağı</u>	<u>Pi-etkileşimleri</u>	
		<u>Pi-Sigma</u>	<u>Pi-Alkil bağı</u>
DT15,DG1	GLU475, GLU474,DG1	DG1	ARG456,DT15,DG1

a.



b.

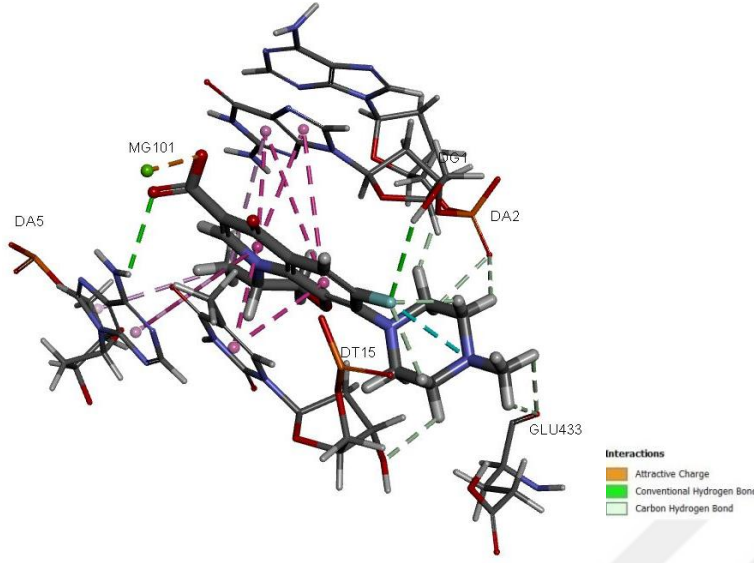


Şekil 5.5. Sis12 bileşiğinin 4Z2D enzimi ile etkileşimleri: a. 3D gösterimi., b. 2D gösterimi

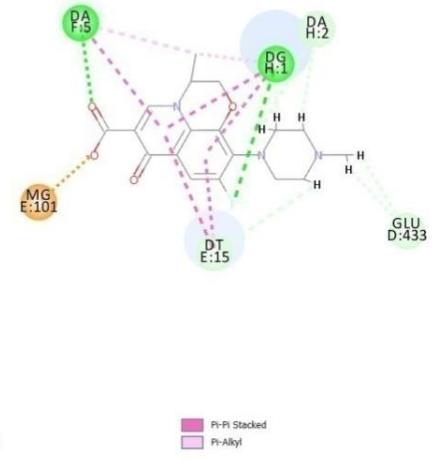
5.1.1.6. Levofloksazin ligandının 4Z2D enzimi ile etkileşimleri

Levofloksazin	<u>-CDOCKER Enerjisi</u>	<u>-CDOCKER Interaction Enerjisi</u>	
	55,8738	77,7146	
<u>H bağları</u>	<u>C-H bağı</u>	<u>Pi-etkileşimleri</u>	
		<u>Pi-Pi</u>	<u>Pi-Alkil bağı</u>
DA5,DG1	GLU433,DG1,DA2,DT15	DA5,DG1,DT15	DA5,DG1

a.



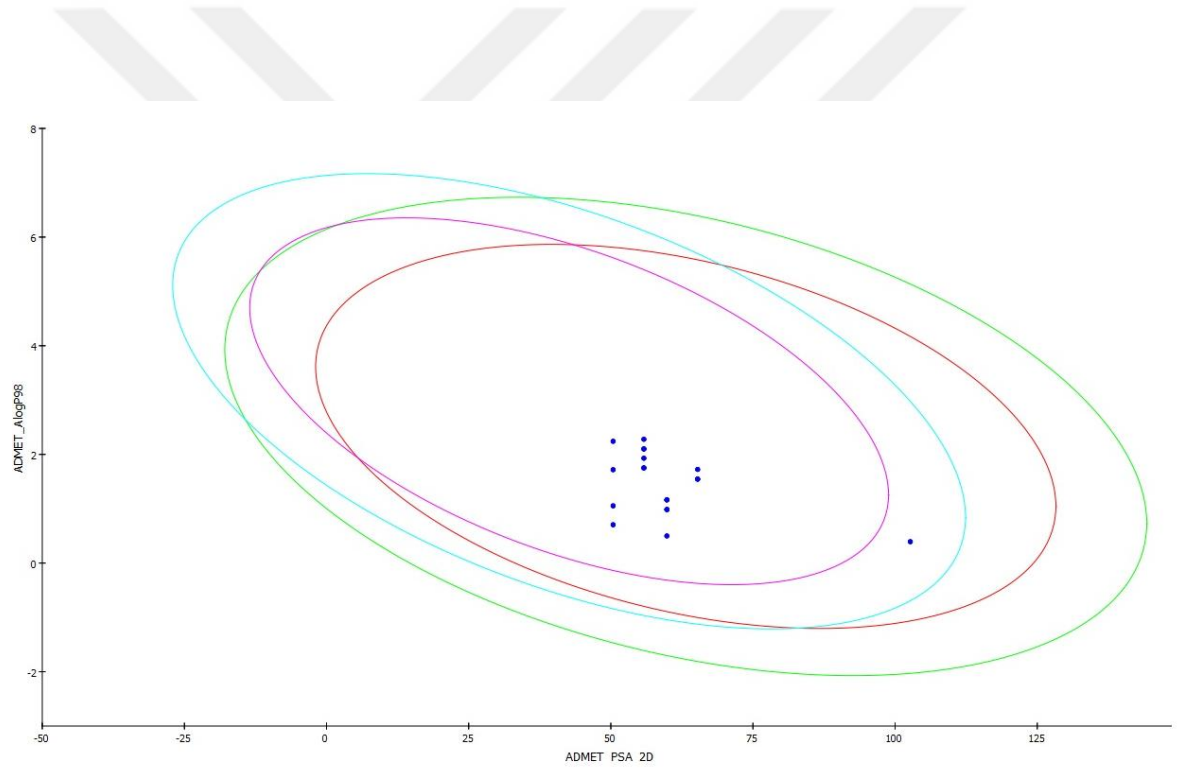
b.



Şekil 5.6. Levofloksazin ligandının 4Z2D enzimi ile etkileşimleri: a. 3D gösterimi., b. 2D gösterimi

5.2. 3,4-Dihidro-2H-1,4-benzoksazinTürevlerinin Farmakokinetik Özelliklerinin Hesaplanması

Tasarlanan bileşiklerin Discovery Studio 3.5 programı kullanılarak AlogP98 ve PSA_2D grafiği (Şekil 5.7.) ve ayrıca diğer ADME/Tox özellikleri (polar yüzey alanı, partisyon katsayısı, sitokrom p450 2D6 inhibisyonu, kan beyin bariyeri geçirgenliği, hepatotoksitesi, plazma proteinlerine bağlanması, absorpsiyon ve çözünürlük seviyeleri) hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 5.2.'de verilmiştir.



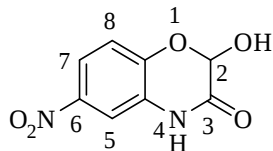
Şekil 5.7. AlogP98 ve PSA_2D grafiği şeklinde sonuçlar

Çizelge 5.2. Tasarlanan 3,4-dihidro- 2*H*-1,4-benzoksazin türevlerinin hesaplanan ADMET sonuçları

	ADMET PSA_2D	ADMET AlogP98	ADMET CYP2D6	ADMET BBB	ADMET Hepatotoxic	ADMET PPB	ADMET Absorption Level	ADMET Solubility Level
Sis01	102,679	0,393	-12,9699	-1,657	0,998095	-5,28413	0	4
Sis02	59,856	1,163	-8,43955	-0,742	-0,0951783	-0,79028	0	3
Sis03	59,856	0,499	-10,2043	-0,947	-1,33334	-4,13374	0	4
Sis04	50,398	1,053	-9,6953	-0,626	-3,33931	-2,34281	0	4
Sis05	59,856	0,985	-11,5254	-0,797	-2,33007	-3,46721	0	4
Sis06	59,856	1,163	-8,56104	-0,742	0,667034	-0,303374	0	3
Sis07	59,856	0,985	-11,1665	-0,797	-1,84578	-4,54247	0	4
Sis08	50,398	0,705	-9,2369	-0,734	-1,7653	-2,54955	0	4
Sis09	50,398	2,241	-4,49054	-0,259	-1,46482	3,46378	0	3
Sis10	50,398	1,718	-6,95343	-0,421	-1,50381	2,04278	0	3
Sis11	65,272	1,723	-8,14457	-0,654	-8,66336	2,05382	0	3
Sis12	55,814	2,278	-6,34371	-0,333	-9,61718	3,30245	0	3
Sis13	55,814	1,929	-6,62403	-0,441	-9,46969	2,95565	0	3
Sis14	65,272	1,545	-10,286	-0,709	-10,6115	0,0584315	0	3
Sis15	55,814	2,1	-8,45649	-0,388	-11,5717	0,827485	0	3
Sis16	55,814	1,751	-8,86258	-0,496	-11,1924	0,480684	0	3
Sis17	65,272	1,545	-9,92711	-0,709	-10,1272	-1,01683	0	3
Sis18	55,814	2,1	-8,09763	-0,388	-11,0874	-0,593962	0	3
Sis19	55,814	1,751	-8,50373	-0,496	-10,7081	-0,940763	0	3

5.3. Elde Edilen Bileşiklerin Sentez ve Analiz Bulguları

5.3.1. 3,4-Dihidro-2-hidroksi-6-nitro-2H-1,4-benzoksazin-3-on (Sis01)



Yöntem 1'de belirtilen sentez yöntemine göre gerçekleştirilen reaksiyonun ilk basamağında, 5 ml (50 mmol) dikloroasetil klorür, 8 g (50 mmol) 2-amino-4-nitrofenol, 7 ml (50 mmol) trietil amin ve 20 ml dietil eter kullanılarak 2,2-dikloro-*N*-(2-hidroksi-5-nitrofenil)asetamid elde edildi. Reaksiyonun ikinci basamağında 1,26 g (5 mmol) 2,2-dikloro-*N*-(2-hidroksi-5-nitrofenil)asetamid ve 1,68 g (20 mmol) sodyum bikarbonat kullanıldı. Sentezlenen bileşik hekzan ve etil asetat solvan sistemi ile kristallendirildi. %25 verimle 0,21 g saf bileşik elde edildi.

Erime Noktası: 208-210 °C

R_f Değeri: 0.33 (S₁)

Kapalı Formülü ve Molekül Ağırlığı: C₈H₆N₂O₅; 210,14

Kütle Spektrumu (ES+) m/z (%X): 209,41 (M⁺-H) (100%)

Elementel Analiz;	<u>%C</u>	<u>%H</u>	<u>%N</u>
Hesaplanan :	45.72	2.88	13.33
Bulunan :	45.09	3.34	13.06

¹H-NMR Spektrumu (Int. TMS, DMSO) δ ppm: 5,63 (d, 1H, -CH protonu, *J*=6,4); 7,22 (s, 1H, O-H- protonu); 7,77 (d, 1H, (5) aromatik proton, *J*=2,8); 7,86 (dd, 1H, (8) aromatik proton, *J*_o=8,4; *J*_m=2,2); 8,37 (d, 1H, (7) aromatik proton, *J*=6,4); 11,18 (s, 1H, N-H protonu).

¹³C-NMR Spektrumu (Int. TMS, DMSO) δ ppm: 90,529; 110,547; 117,882; 118,908; 127,282; 142,177; 146,364; 161,785

IR Spektrumu: 3180-2978 cm^{-1} O-H, N-H, aromatik C-H, alifatik C-H gerilimleri

1679 cm^{-1} Amid I bandı

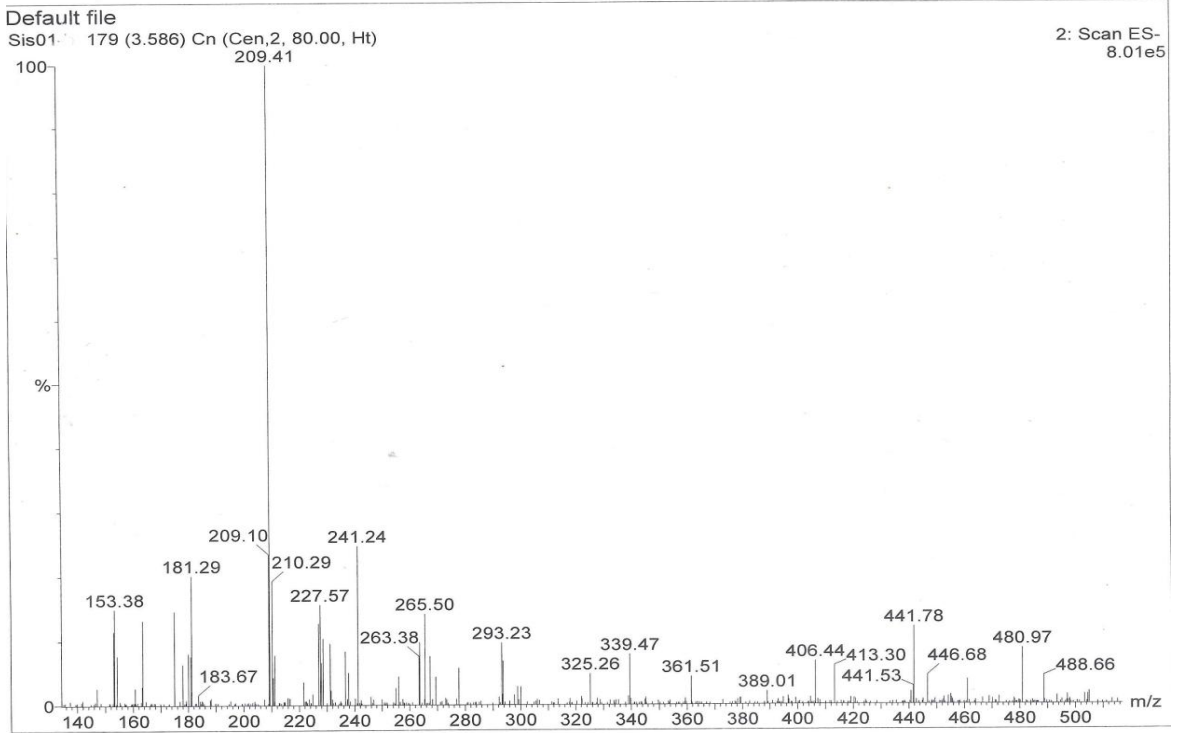
1498 cm^{-1} N-H eğilimi

1276 cm^{-1} aromatik C=C gerilimi

1399-1200 cm^{-1} C-N gerilimi ile simetrik NO_2 gerilimi

1015 cm^{-1} C-O-C gerilimleri

747 cm^{-1} benzen halkası =C-H düzlem dışı eğilimleri



Şekil 5.8. Sis01 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu

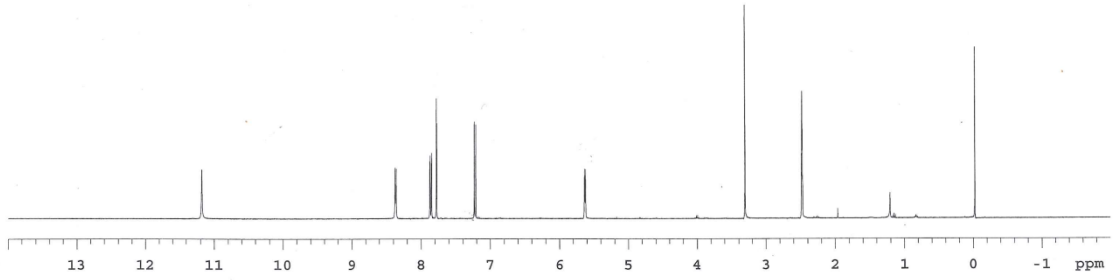
SIS01
Sample Name:
SIS01-b
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
SIS01-b 20150831_01
FidFile: PROTON_02

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Aug 31 2015

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

Agilent Technologies



Şekil 5.9. Sis01 Kodlu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu

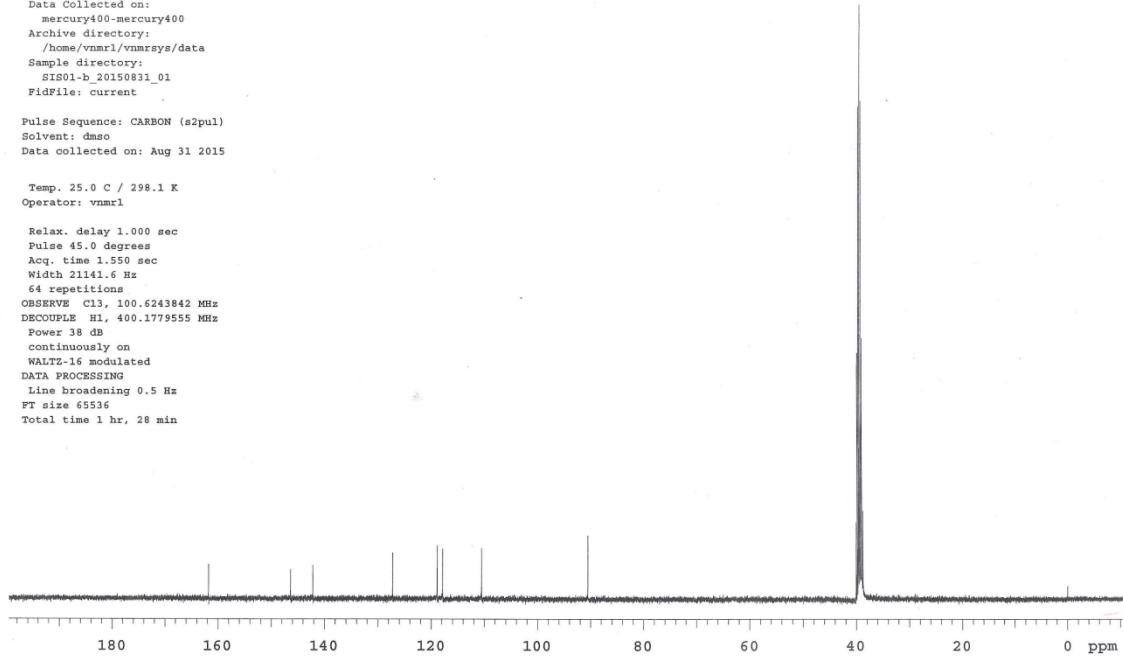
SIS01-b
Sample Name:
SIS01-b
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
SIS01-b 20150831_01
FidFile: current

Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Aug 31 2015

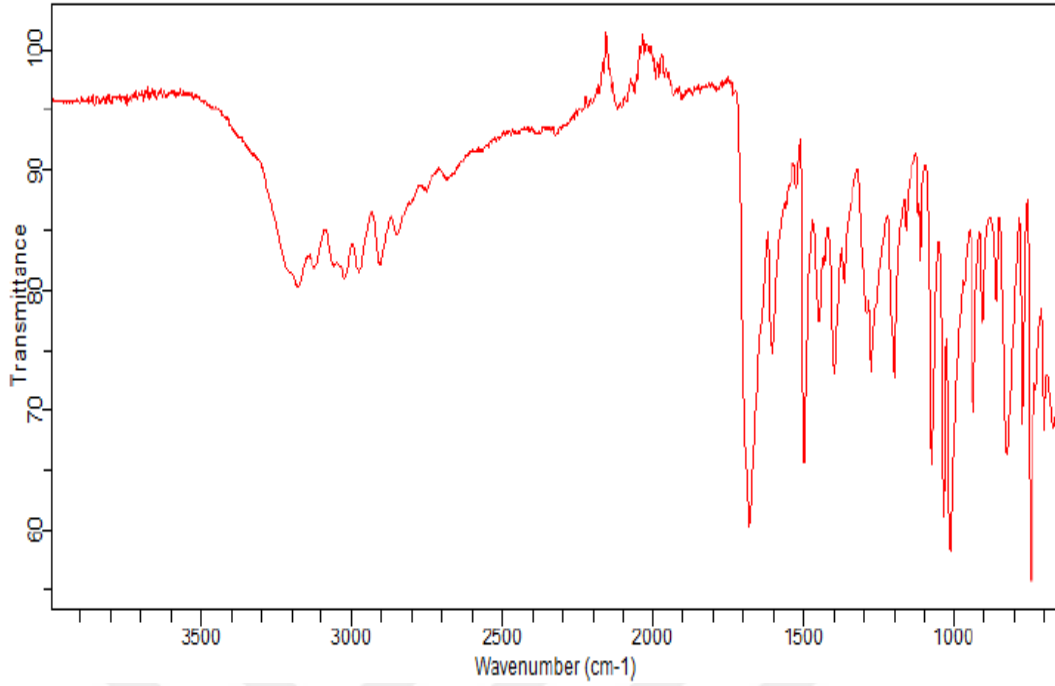
Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.550 sec
Width 21141.6 Hz
64 repetitions
OBSERVE C13, 100.6243842 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

Agilent Technologies

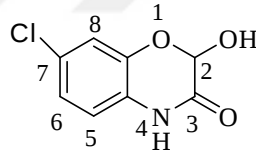


Şekil 5.10. Sis01 Kodlu bileşiğe ait ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 5.11. Sis01 Kodlu bileşiğe ait IRspektrumu

5.3.2. 3,4-Dihidro-2-hidroksi-7-kloro-2*H*-1,4-benzoksazin-3-on (Sis02)



Yöntem 1’de belirtilen sentez yöntemine göre gerçekleştirilen reaksiyonun ilk basamağında, 2,5 ml (25 mmol) dikloroasetil klorür, 5 g (25 mmol) 2-amino-5-klorofenol, 4 ml (25 mmol) trietil amin ve 20 ml dietil eter kullanılarak 2,2-dikloro-*N*-(2-hidroksi-4-klorofenil)asetamid elde edildi. Reaksiyonun ikinci basamağında 1,25 g (10 mmol) 2,2-dikloro-*N*-(2-hidroksi-4-klorofenil)asetamid ve 1,68 g (20 mmol) sodyum bikarbonat kullanıldı. Sentezlenen bileşik hekzan ve etil asetat solvan sistemi ile kristallendirildi. %68.33 verimle 1,23 g saf bileşik elde edildi.

Erime Noktası: 214-216 °C

R_f Değeri: 0.27 (S₁)

Kapalı Formülü ve Molekül Ağırlığı: C₈H₆ClNO₃, 199,59

Kütle Spektrumu (ES⁺) m/z (%X): 198,33(M⁺-H) (100%)

Elementel Analiz;	%C	%H	%N
Hesaplanan :	48.14	3.03	7.01
Bulunan :	47.79	3.14	7.17

¹H-NMR Spektrumu (Int. TMS, DMSO) δ ppm: 5,5 (s, 1H, -CH protonu); 8,10 (s, 1H, O-H- protonu); 6,93 (d, 1H, (5) aromatik proton, $J=8,8$); 7,05 (dd, 1H, (6) aromatik proton, $J_o=8,8$, $J_m=2$); 7,10 (d, 1H, (8) aromatik proton, $J=1,6$); 10,9 (s, 1H, N-H protonu).

¹³C-NMR Spektrumu (Int. TMS, DMSO) δ ppm: 90,238; 116,489; 117,343; 122,250; 125,862; 126,182; 141,430; 162,081

IR Spektrumu: 3170-3032 cm^{-1} O-H, N-H, aromatik C-H, alifatik C-H gerilimleri

1671 cm^{-1} Amid I bandı

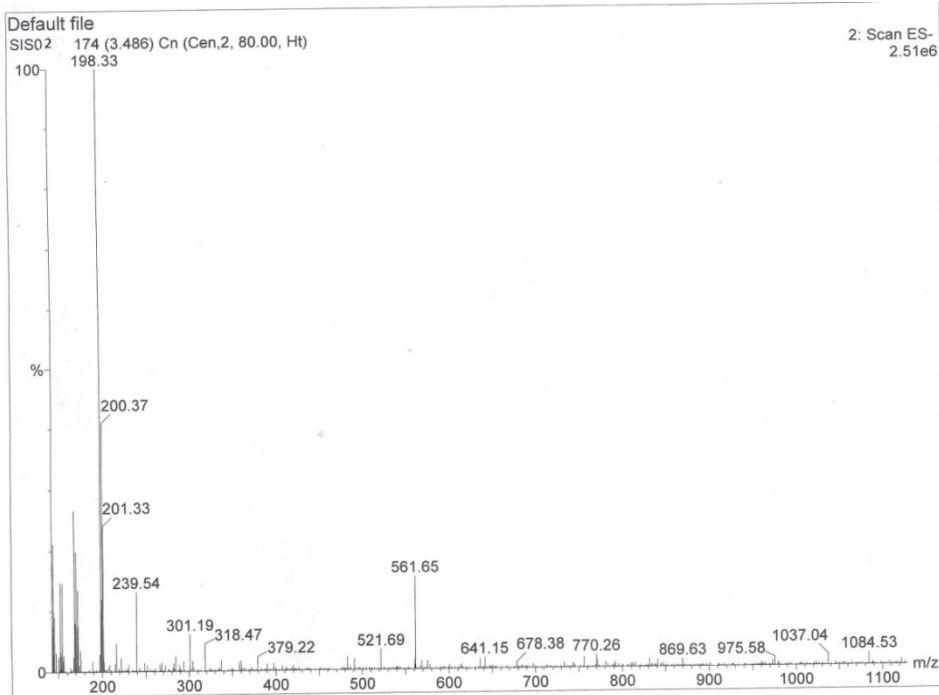
1500 cm^{-1} N-H eğilimi

1399 cm^{-1} aromatik C=C gerilimi

1200-1220 cm^{-1} C-N gerilimi

1017 cm^{-1} C-O-C gerilimleri

810-825 cm^{-1} benzen halkası =C-H düzlem dışı eğilimleri



Şekil 5.12. Sis02 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu

SIS02

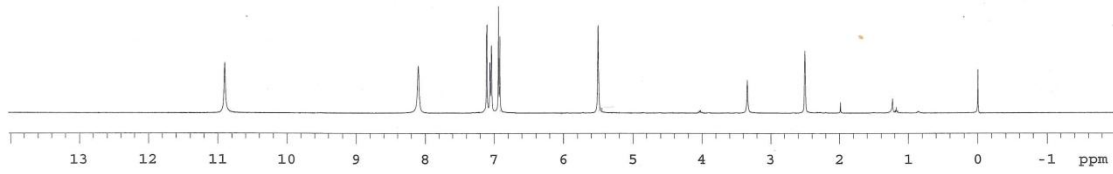
Sample Name:
SIS03-b
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
SIS03-b_20150831_01
FidFile: PROTON_02

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Aug 31 2015

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, 400.1759654 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min 31 sec

Agilent Technologies



Şekil 5.13. Sis02 Kodlu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu

SIS02

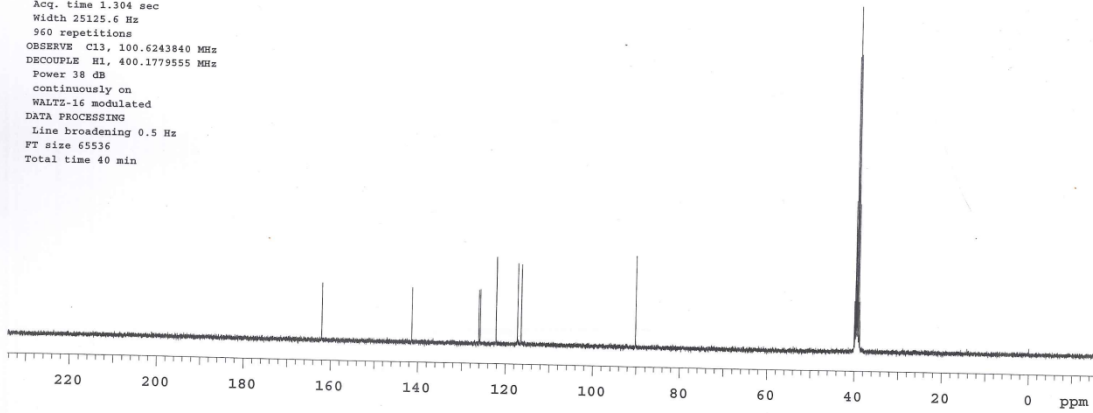
Sample Name:
SIS03-b
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
SIS03-b_20150831_01
FidFile: current

Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Aug 31 2015

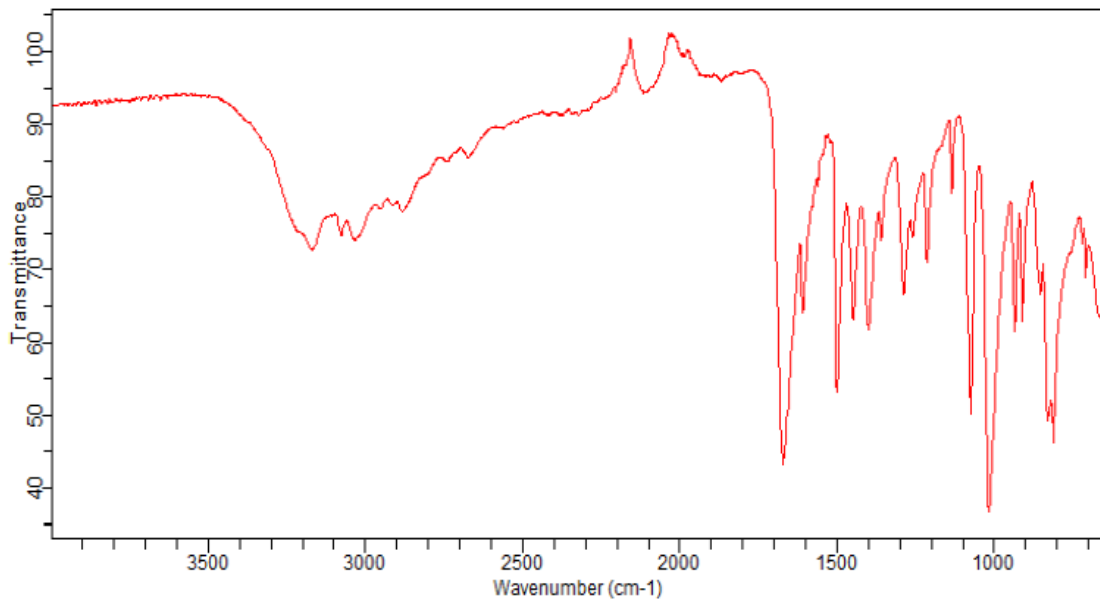
Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.304 sec
Width 25125.6 Hz
960 repetitions
OBSERVE C13, 100.6243840 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 40 min

Agilent Technologies

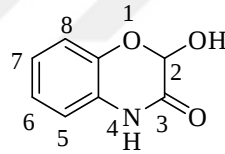


Şekil 5.14. Sis02 Kodlu bileşiğe ait ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 5.15. Sis02 Kodlu bileşiğe ait IRspektrumu

5.3.3. 3,4-Dihidro-2-hidroksi-2H-1,4-benzoksazin-3-on (Sis03)



Yöntem 1'de belirtilen sentez yöntemine göre gerçekleştirilen reaksiyonun ilk basamağında, 2,5 ml (25 mmol) dikloroasetil klorür, 5 g (25 mmol) 2-aminofenol, 4 ml (25 mmol) trietil amin ve 20 ml dietil eter kullanılarak 2,2-dikloro-*N*-(2-hidroksifenil)asetamid elde edildi. Reaksiyonun ikinci basamağında 1,25 g (10 mmol) 2,2-dikloro-*N*-(2-hidroksifenil)asetamid ve 1,68 g (20 mmol) sodyum bikarbonat kullanıldı. Sentezlenen bileşik hekzan ve etil asetat solvan sistemi ile kristallendirildi. %76.4 verimle 0,66 g saf bileşik elde edildi (151).

Erime Noktası: 201-203⁰C (151)

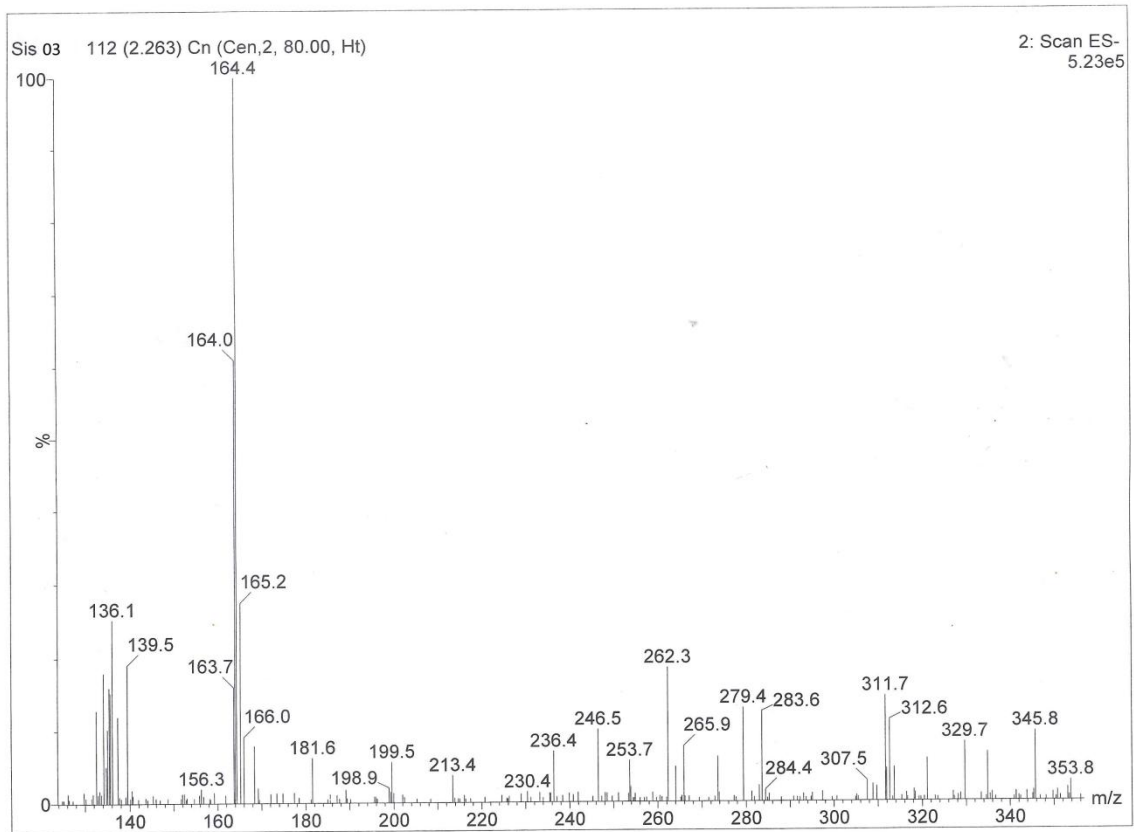
R_f Değeri: 0.3 (S₁)

Kapalı Formülü ve Molekül Ağırlığı: C₈H₇NO₃; 165,15

Kütle Spektrumu (ES⁺) m/z (%X): 164,4(M⁺-H) (100%)

Elementel Analiz;	%C	%H	%N
Hesaplanan :	58.18	4.27	8.48
Bulunan :	58.21	4.43	8.53

¹H-NMR Spektrumu (Int. TMS, DMSO) δ ppm: 5,60 (s, 1H, -CH- protonu); 6,90-7,01 (m, 4H, (5,6,7,8) aromatik protonları); 7,90 (s, 1H, O-H protonu); 10,75 (s, 1H, N-H protonu).



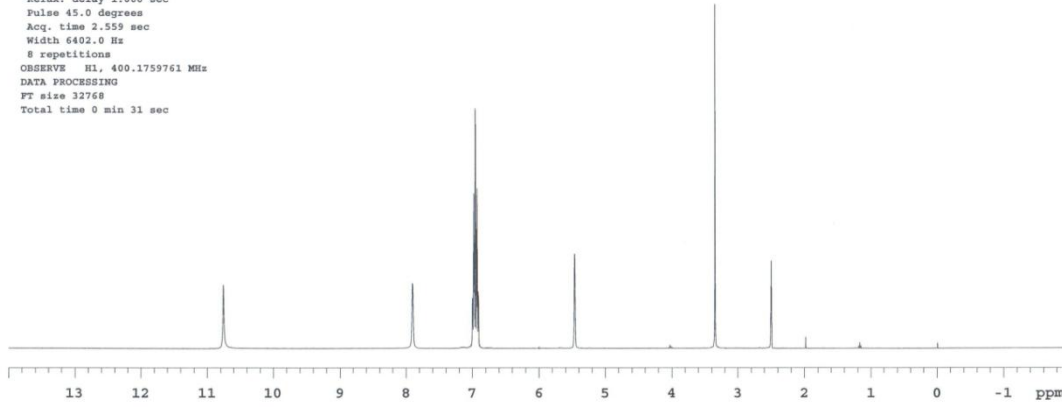
Şekil 5.16. Sis03 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu

Sample Name:
SIS03
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
SIS03_20180715_01
FidFile: PROTON_02

Pulse Sequence: PROTON (a2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Jul'15 2018

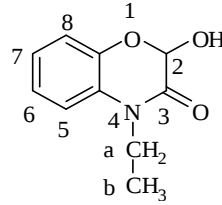
Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

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 5.17. Sis03 Kodlu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu

5.3.4. 4-Etil-3,4-dihidro-2-hidroksi-2H-1,4-benzoksazin-3-on (Sis04)



Yöntem 1’de belirtilen sentez yöntemine göre gerçekleştirilen reaksiyonun ilk basamağında, 2,5 ml (25 mmol) dikloroasetil klorür, 5 g (25 mmol) 2-aminofenol, 4 ml (25 mmol) trietil amin ve 20 ml dietil eter kullanılarak 2,2-dikloro-N-(2-hidroksifenil)asetamid elde edildi. Reaksiyonun ikinci basamağında 1,25 g (10 mmol) 2,2-dikloro-N-(2-hidroksifenil)asetamid ve 1,68 g (20 mmol) sodyum bikarbonat kullanıldı. Sentezlenen bileşik hekzan ve etil asetat solvan sistemi ile kristallendirildi. %76 verimle 0,66 g saf bileşik elde edildi. Üçüncü basamakda ise 0,82 g (5 mmol) 3,4-dihidro-2-hidroksi-2H-1,4-benzoksazin-3-on, 2,07 g (15 mmol) potasyum karbonat ve 2,145 g (15 mmol) etil iyodür kullanıldı. Reaksiyon sonunda elde edilen ürün etil asetat: n-hekzan (7:1) çözücü sisteminde kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırılarak %30,61 verimle 0,3 g saf bileşik elde edildi.

Erime Noktası: 64-67 °C

R_fDeğeri: 0,33 (S₁)

Kapalı Formülü ve Molekül Ağırlığı: C₁₀H₁₁NO₃, 193,20

Kütle Spektrumu (ES+) m/z (%X): 192,4(M⁺-H) (100%)

Elementel Analiz;	C ₁₀ H ₁₁ NO ₃ .0.09C ₂ H ₅ OH.1C ₃ H ₆ O	<u>%C</u>	<u>%H</u>	<u>%N</u>
	Hesaplanan	: 61.97	6.92	5.48
	Bulunan	: 61.68	6.99	5.61

¹H-NMR Spektrumu (Int. TMS, DMSO) δ ppm: 1,35 (t, 3H, -CH₃ protonu); 4,11 (q, 2H, (a), -CH₂ protonu); 4,45 (m, 1H, -CH protonu); 6,42 (s, 1H, -OH protonu); 6,87-7,05 (m, 3H, (5,6,7) aromatik protonlar); 8,23 (t, 1H, (8) aromatik proton).

¹³C-NMR Spektrumu (Int. TMS, DMSO) δ ppm: 14,574; 30,287; 47,623; 64,060; 111,945; 118,460; 120,533; 123,771; 147,165; 171,565

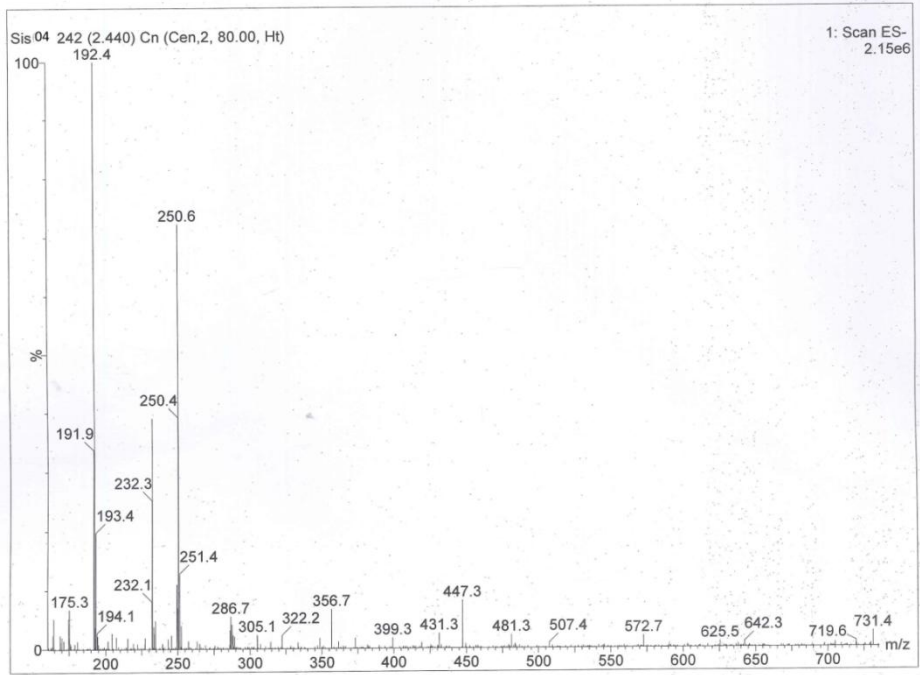
IR Spektrumu:3363-2877 cm⁻¹ O-H, aromatik C-H, alifatik C-H gerilimler

1451 cm⁻¹aromatik C=C gerilimi

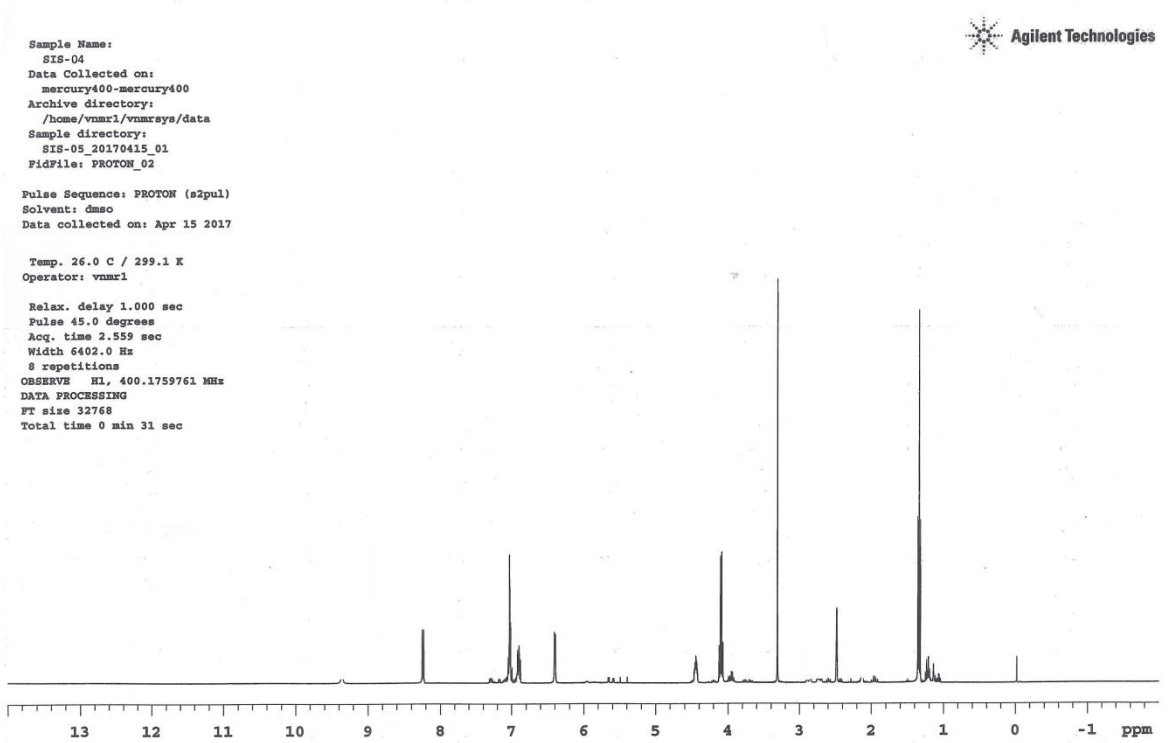
1215 cm⁻¹ C-N gerilimi

1039cm⁻¹ C-O-C gerilimleri

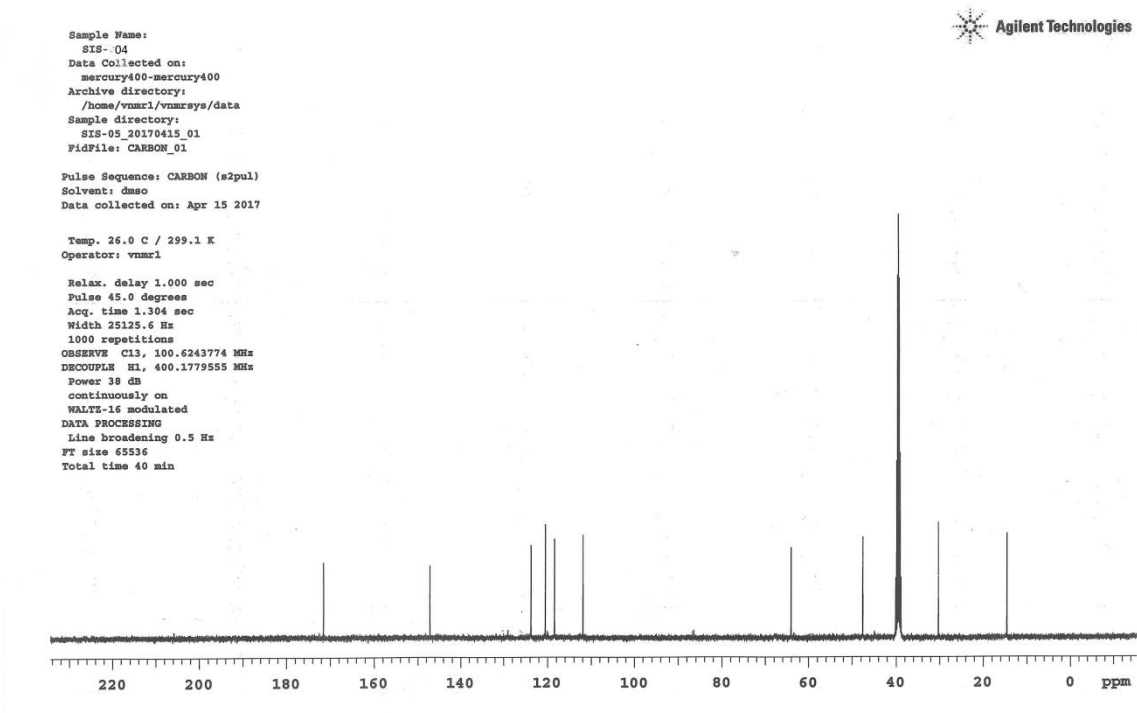
726 cm⁻¹ benzen halkası =C-H düzlem dışı eğilimleri



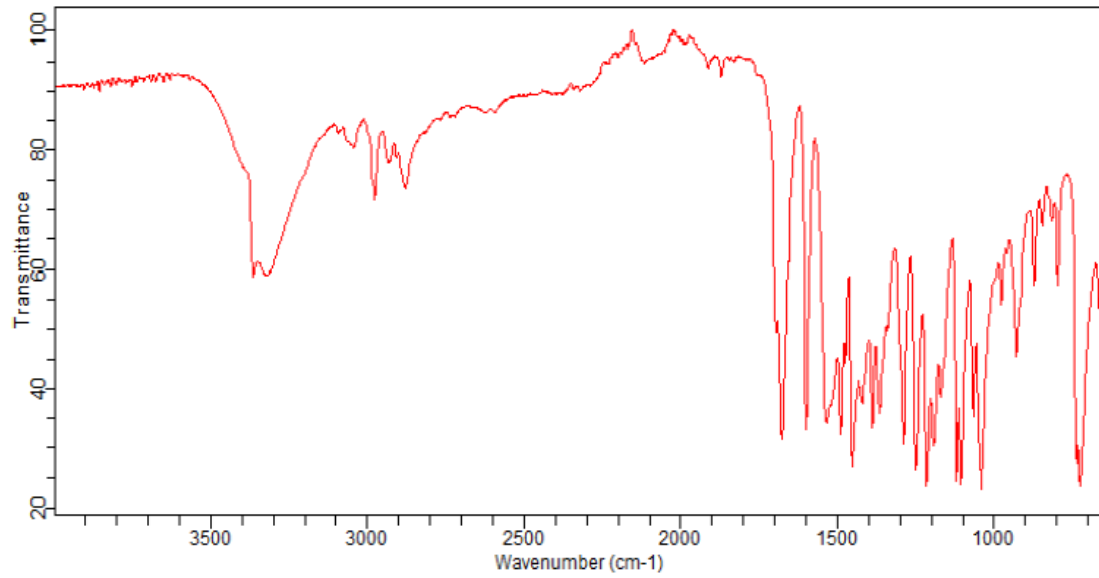
Şekil 5.18. Sis04 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu



Şekil 5.19. Sis04 Kodlu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu

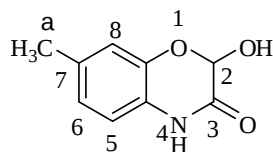


Şekil 5.20. Sis04 Kodlu bileşiğe ait ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 5.21. Sis04 Kodlu bileşiğe ait IRspektrumu

5.3.5. 3,4-Dihidro-2-hidroksi-7-metil-2H-1,4-benzoksazin-3-on(Sis05)



Yöntem 1'de belirtilen sentez yöntemine göre gerçekleştirilen reaksiyonun ilk basamağında, 5 ml (50 mmol) dikloroasetil klorür, 9 g (50 mmol) 2-amino-5-metilfenol, 7 ml (50 mmol) trietil amin ve 20 ml dietil eter kullanılarak 2,2-dikloro-*N*-(2-hidroksi-4-metilfenil)asetamid elde edildi. Reaksiyonun ikinci basamağında 1,25 g (5 mmol) 2,2-dikloro-*N*-(2-hidroksi-4-metilfenil)asetamid ve 0,84 g (10 mmol) sodyum bikarbonat kullanıldı. Sentezlenen bileşik hekzan ve etil asetat solvan sistemi ile kristallendirildi. %51.1 verimle 0,45 g saf bileşik elde edildi (152).

Erime Noktası: 208-210 °C(208-211°C) (152)

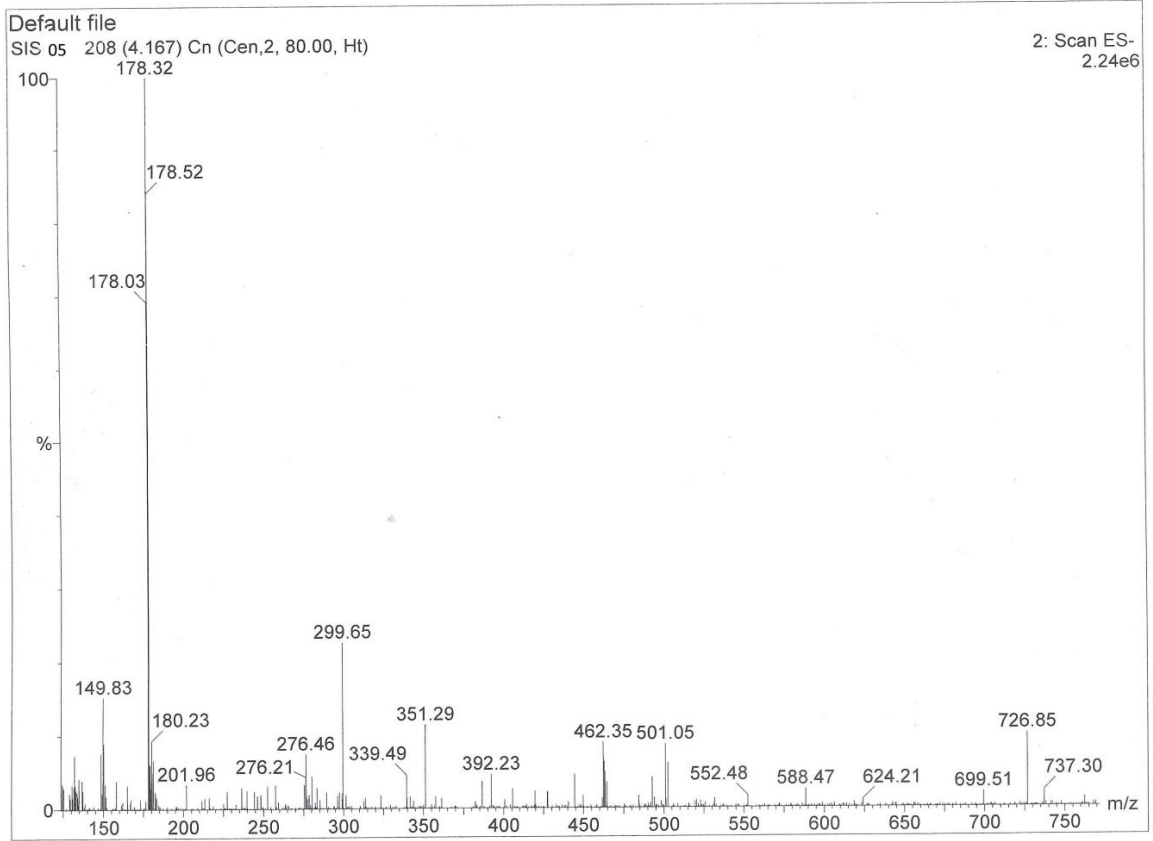
R_f Değeri: 0,23 (S₁)

Kapalı Formülü ve Molekül Ağırlığı: C₉H₉NO₃, 179,06

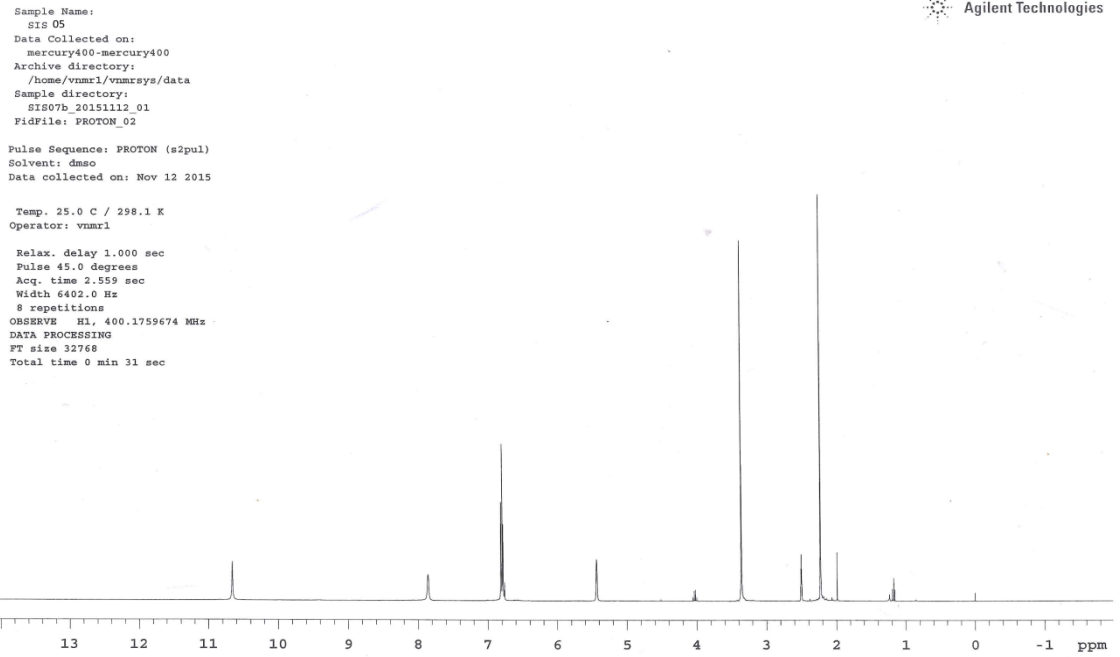
Kütle Spektrumu (ES+) m/z (%X): 178,32(M⁺-H) (100%)

Elementel Analiz;	<u>%C</u>	<u>%H</u>	<u>%N</u>
Hesaplanan :	60.33	5.06	7.81
Bulunan :	60.43	5.33	7.71

¹H-NMR Spektrumu (Int. TMS, DMSO) δ ppm:2,22 (s, 3H, -CH₃ protonları);5,43 (s, 1H, -CH protonu); 7,86 (s, 1H, O-H- protonu);6,76-6,81 (m, 3H, (5,6,8) aromatik protonları); 10,66 (s, 1H, N-H protonu).

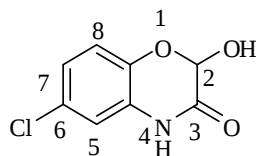


Şekil 5.22. Sis05 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu



Şekil 5.23. Sis05 Kodlu bileşiğe ait ¹H-NMR spektrumu

5.3.6. 3,4-Dihidro-2-hidroksi-6-kloro-2H-1,4-benzoksazin-3-on (Sis06)



Yöntem 1'de belirtilen sentez yöntemine göre gerçekleştirilen reaksiyonun ilk basamağında, 5 ml (50 mmol) dikloroasetil klorür, 7 g (50 mmol) 2-amino-4-klorofenol, 7 ml (50 mmol) trietil amin ve 20 ml dietil eter kullanılarak 2,2-dikloro-*N*-(2-hidroksi-5-klorofenil)asetamid elde edildi. Reaksiyonun ikinci basamağında 1,34 g (5 mmol) 2,2-dikloro-*N*-(2-hidroksi-5-klorofenil)asetamid ve 0,84 g (10 mmol) sodyum bikarbonat kullanıldı. Sentezlenen bileşik hekzan ve etil asetat solvan sistemi ile kristallendirildi. %30.3 verimle 0,33 g saf bileşik elde edildi (153).

Erime Noktası: 209-212 °C (210-215 °C) (153)

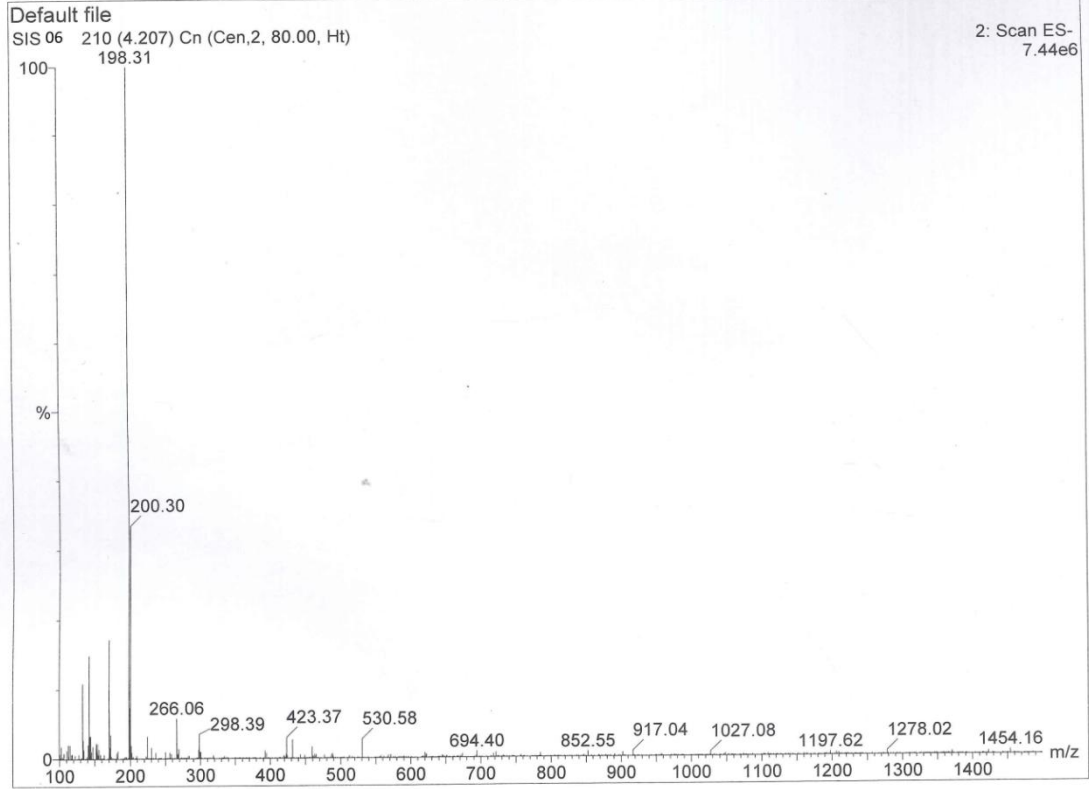
R_f Değeri: 0,4 (S₁)

Kapalı Formülü ve Molekül Ağırlığı: C₈H₆ClNO₃, 199,59

Kütle Spektrumu (ES+) m/z (%X): 198,31 (M⁺-H) (100%)

Elementel Analiz;	C ₁₀ H ₁₁ NO ₃ .0.09C ₂ H ₅ OH.0.09C ₃ H ₆ O	%C	%H	%N
	Hesaplanan :	48.56	3.41	6.7
	Bulunan :	49.11	3.55	6.86

¹H-NMR Spektrumu (Int. TMS, DMSO) δ ppm: 5,5 (s, 1H, -CH protonu); 8,07 (s, 1H, O-H- protonu); 6,94 (d, 1H, (5) aromatik protonu, *J*=2); 6,99 (dd, 1H, (7) aromatik protonu, *J*_o=12, *J*_m=2,4); 7,03 (d, 1H, (8) aromatik protonu, *J*=8); 10,9 (s, 1H, N-H protonu).



Şekil 5.24. Sis06 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu

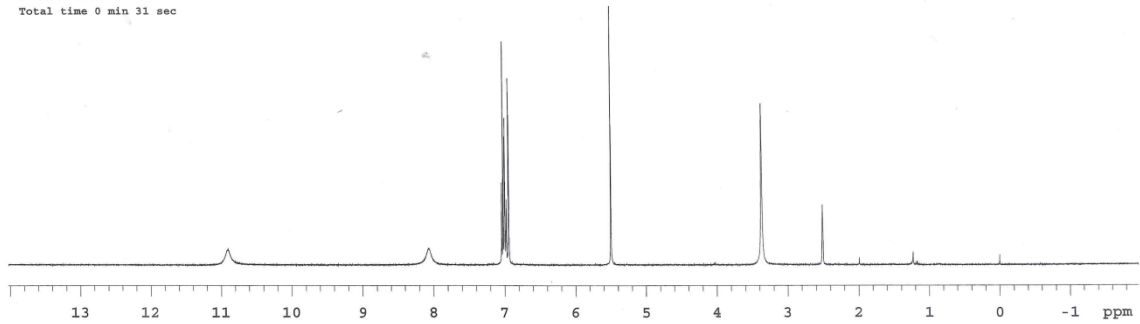
Sample Name:
SIS 06
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
SIS06b_20151112_01
FidFile: PROTON_02

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Nov 12 2015

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

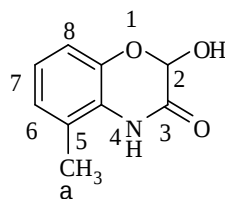
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.559 sec
Width 6402.0 Hz
8 repetitions
OBSERVE H1, 400.1759650 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min 31 sec

Agilent Technologies



Şekil 5.25. Sis06 Kodlu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu

5.3.7. 3,4-Dihidro-2-hidroksi-5-metil-2*H*-1,4-benzoksazin-3-on (Sis07)



Yöntem 1'de belirtilen sentez yöntemine göre gerçekleştirilen reaksiyonun ilk basamağında, 5 ml (50 mmol) dikloroasetil klorür, 9 g (50 mmol) 2-amino-3-metilfenol, 7 ml (50 mmol) trietil amin ve 20 ml dietil eter kullanılarak 2,2-dikloro-*N*-(2-hidroksi-6-metilfenil)asetamid elde edildi. Reaksiyonun ikinci basamağında 1,25 g (5 mmol) 2,2-dikloro-*N*-(2-hidroksi-6-metilfenil)asetamid ve 0,84 g (10 mmol) sodyum bikarbonat kullanıldı. Sentezlenen bileşik hekzan ve etil asetat solvan sistemi ile kristallendirildi. %52.4 verimle 0,65 g saf bileşik elde edildi.

Erime Noktası: 175-179 °C

R_f Değeri: 0,33 (S₁)

Kapalı Formülü ve Molekül Ağırlığı: C₉H₉NO₃, 179,06

Kütle Spektrumu (ES+) m/z (%X): 178,35(M⁺-H) (100%)

Elementel Analiz; C₁₀H₁₁NO₃·0.09C₂H₅OH·0.03H₂O %C %H %N

Hesaplanan : 59.96 5.26 7.61

Bulunan : 59.49 5.33 7.69

¹H-NMR Spektrumu (Int. TMS, DMSO) δ ppm: 2,22 (s, 3H, -CH₃ protonu); 5,42 (s, 1H, O-H protonu); 6,79-6,86 (m, 3H, (5,6,8) aromatik protonlar); 7,83 (d, 1H, -CH- protonu, *J*=6,4); 10,24 (s, 1H, N-H protonu).

¹³C-NMR Spektrumu (Int. TMS, DMSO) δ ppm: 16,726; 90,025; 115,125; 122,540; 123,995; 124,521; 125,031; 140,805; 163,102

IR Spektrumu: 3203-3071 cm^{-1} O-H, N-H, aromatik C-H, alifatik C-H gerilimleri

1673 cm^{-1} Amid I bandı

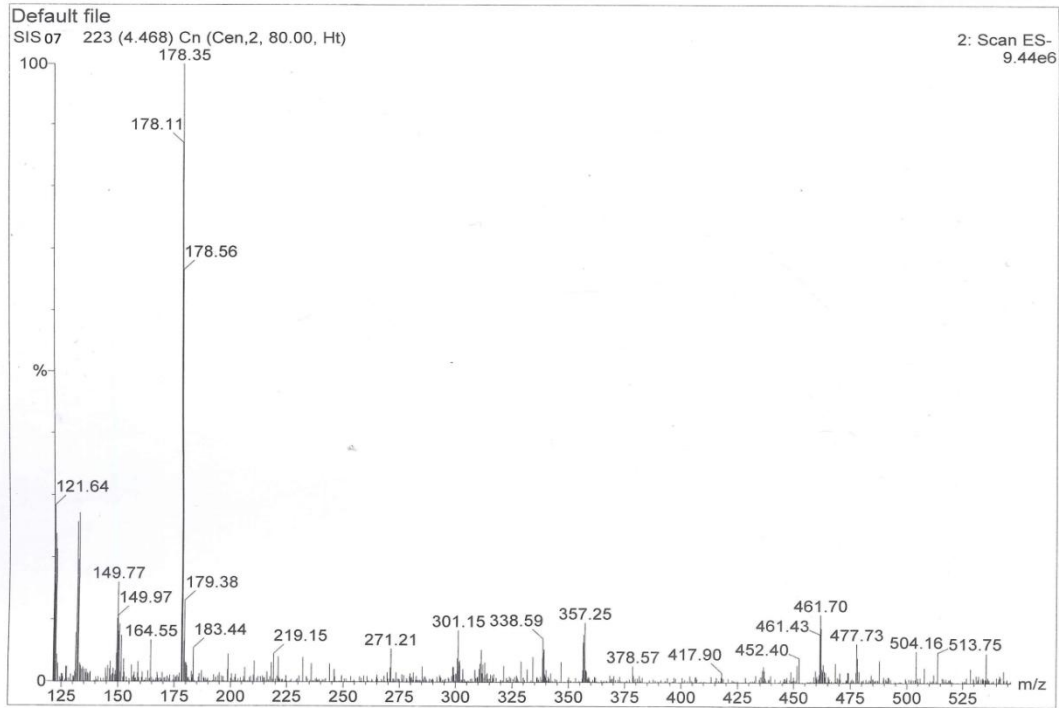
1615 cm^{-1} N-H eğilimi

1479 cm^{-1} aromatik C=C gerilimi

1265 cm^{-1} C-N gerilimi

1038 cm^{-1} C-O-C gerilimleri

771 cm^{-1} benzen halkası =C-H düzlem dışı eğilimleri



Şekil 5.26. Sis07 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu

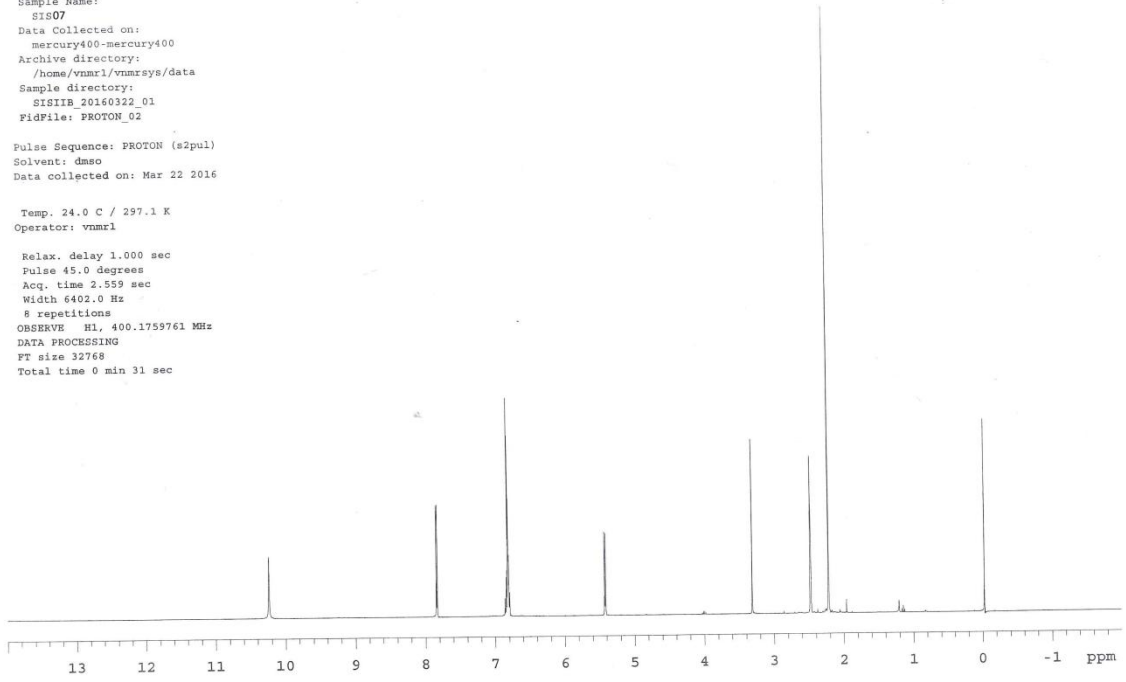
Sample Name:
SIS07
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
SISIIB_20160322_01
FidFile: PROTON_02

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Mar 22 2016

Temp. 24.0 C / 297.1 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

Agilent Technologies



Şekil 5.27. Sis07 Kodlu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu

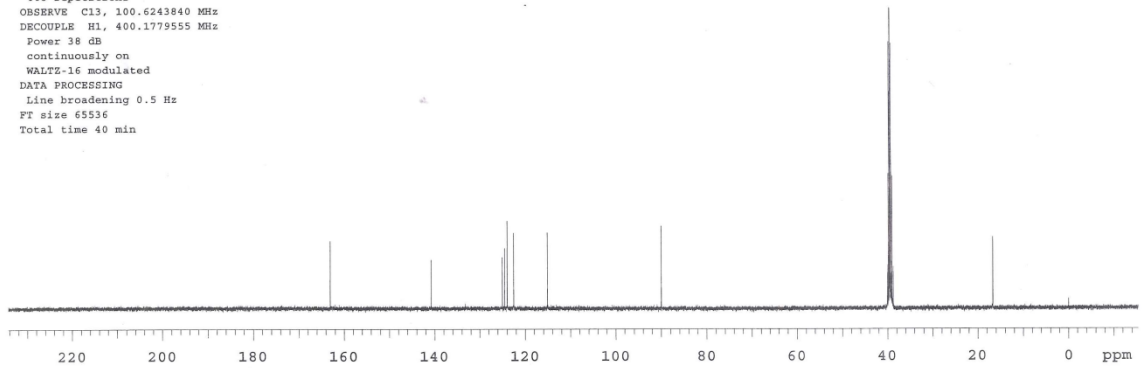
Sample Name:
SIS07
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
SISIIB_20160322_01
FidFile: current

Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Mar 22 2016

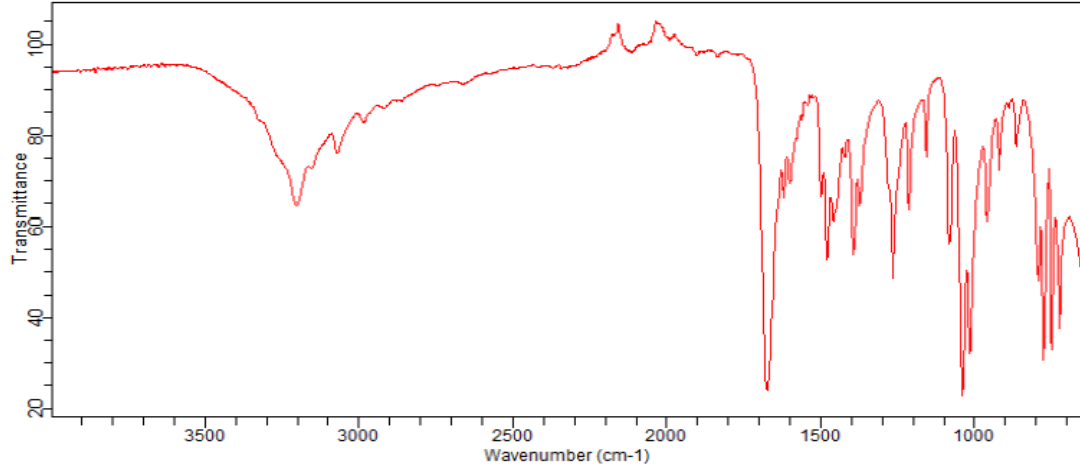
Temp. 24.0 C / 297.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.304 sec
Width 25125.6 Hz
448 repetitions
OBSERVE C13, 100.6243840 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 40 min

Agilent Technologies

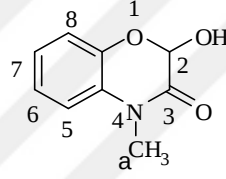


Şekil 5.28. Sis07 Kodlu bileşiğe ait ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 5.29. Sis07 Kodlu bileşiğe ait IRspektrumu

5.3.8. 3,4-Dihidro2-hidroksi-4-metil-2H-1,4-benzoksazin-3-on (Sis08)



Yöntem 1’de belirtilen sentez yöntemi uygulanarak reaksiyonun ikinci basamağın sonunda 3,4-dihidro-2-hidroksi-2H-1,4-benzoksazin-3-on elde edildi. Üçüncü basamak, elde edilen saf bileşiğe (sis03) metilasyon işlemi uygulanarak gerçekleştirildi, reaksiyonda, 0,66 g (5 mmol) 3,4-dihidro-2-hidroksi-2H-1,4-benzoksazin-3-on, 2,07 g (15 mmol) potasyum karbonat ve 2,145 g (15 mmol) metil iyodür kullanıldı. Reaksiyon sonunda elde edilen ürün etil asetat: n-hekzan (7:1) çözücü sisteminde kolon kromatografi yöntemiyle % 39,4 verimle 0,28 g saf bileşik elde edildi.

Erime Noktası: 68-72 °C

R_f Değeri: 0,76 (S₁)

Kapalı Formülü ve Molekül Ağırlığı: C₉H₉NO₃, 179,06

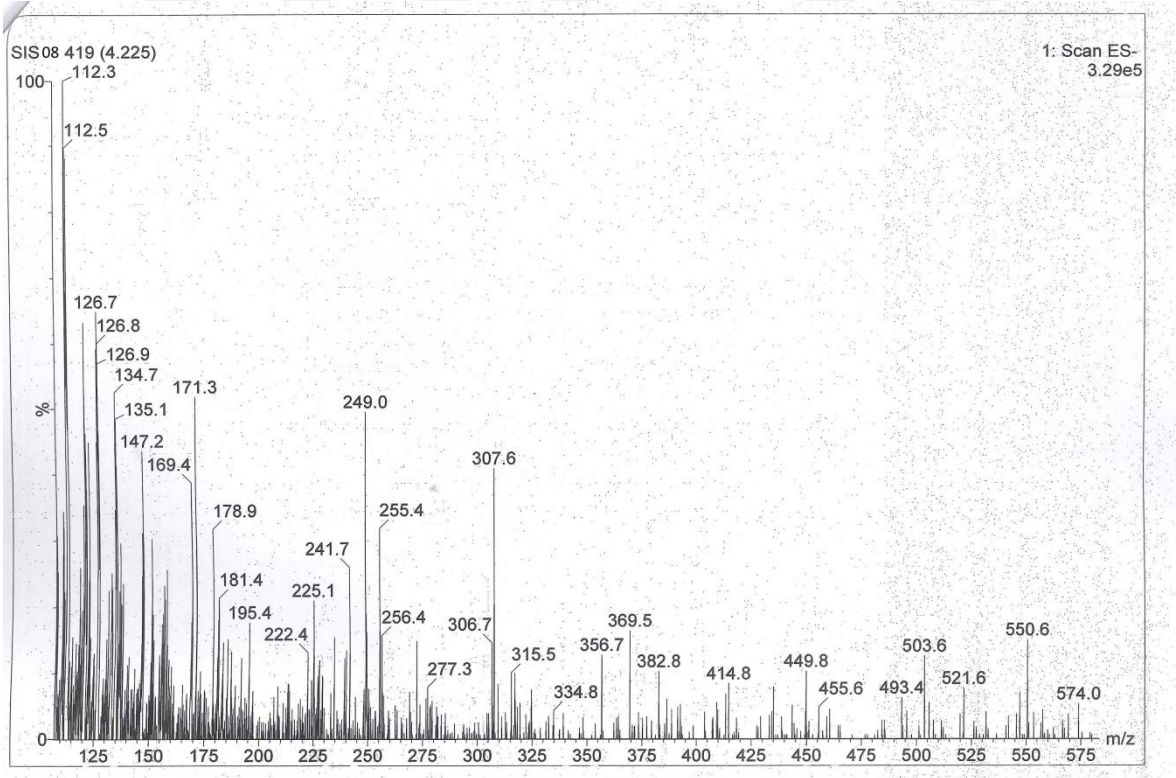
Kütle Spektrumu (ES⁺) m/z (%X): 178,9 (M⁺-H) (30%)

Elementel Analiz;	%C	%H	%N
Hesaplanan :	60.33	5.06	7.82
Bulunan :	61.45	5.66	7.17

¹H-NMR Spektrumu (Int. TMS, CDCl₃) δ ppm: 3,38 (s, 3H, –CH₃ protonu); 5,31 (s, 1H, -CH protonu); 7-7,12 (m, 4H, (5,6,7,8) aromatik protonları); 7,25 (s, H, O-H protonu).

¹³C-NMR Spektrumu (Int. TMS, DMSO) δ ppm: 27,948; 55,653; 95,996; 115,275; 117,477; 123,223; 123,794; 140,802; 159,982

IR Spektrumu: 3070-2940 cm⁻¹ O-H, N-H, aromatik C-H, alifatik C-H gerilimleri
1684 cm⁻¹ aromatik C=C gerilimi
1415-1330 cm⁻¹ C-N gerilimi
1021 cm⁻¹ C-O-C gerilimleri
941-804 cm⁻¹ benzen halkası =C-H düzlem dışı eğilimleri



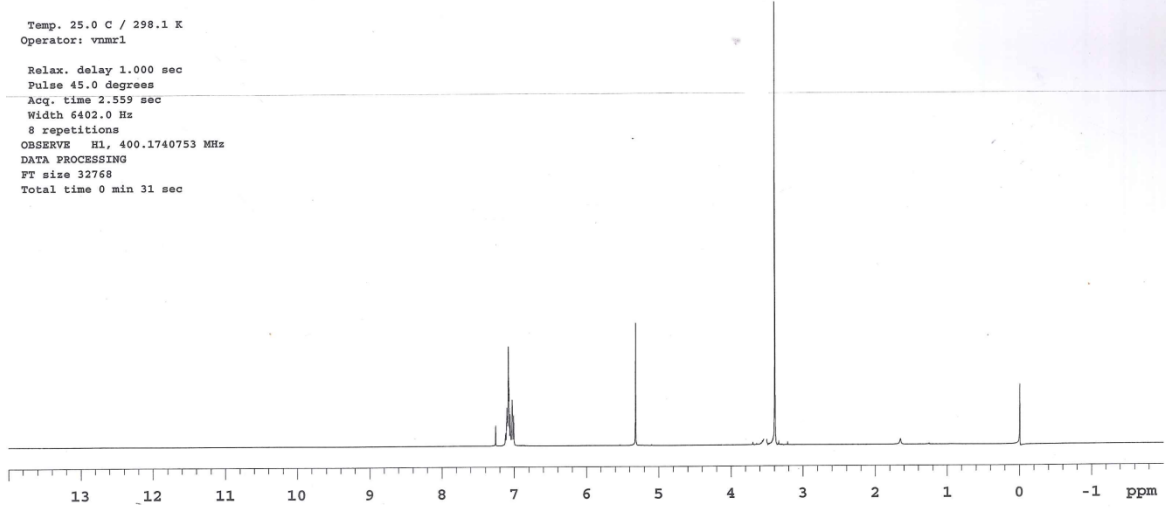
Şekil 5.30. Sis08 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu

Sample Name:
SIS08
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
SIS12_20180412_01
FidFile: PROTON_01

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: cdcl3
Data collected on: Apr 12 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, 400.1740753 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min 31 sec



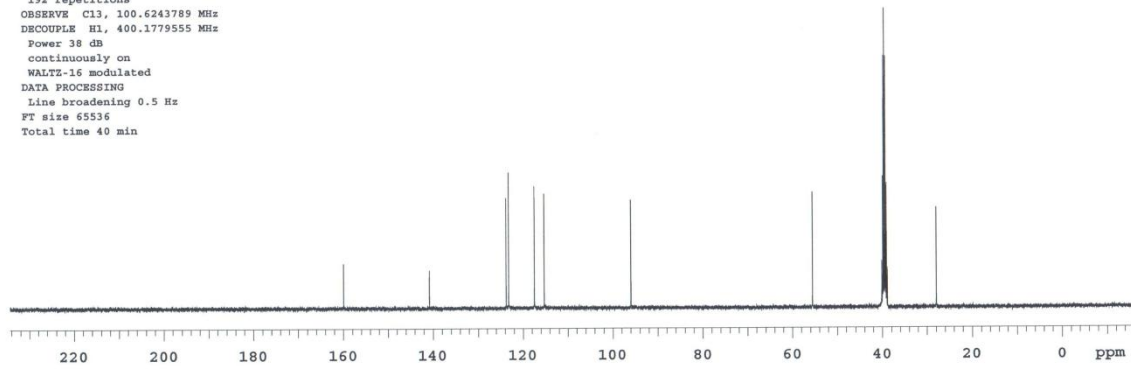
Şekil 5.31. Sis08 Kodlu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu

Sample Name:
SIS08
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
SIS08_20180715_02
FidFile: current

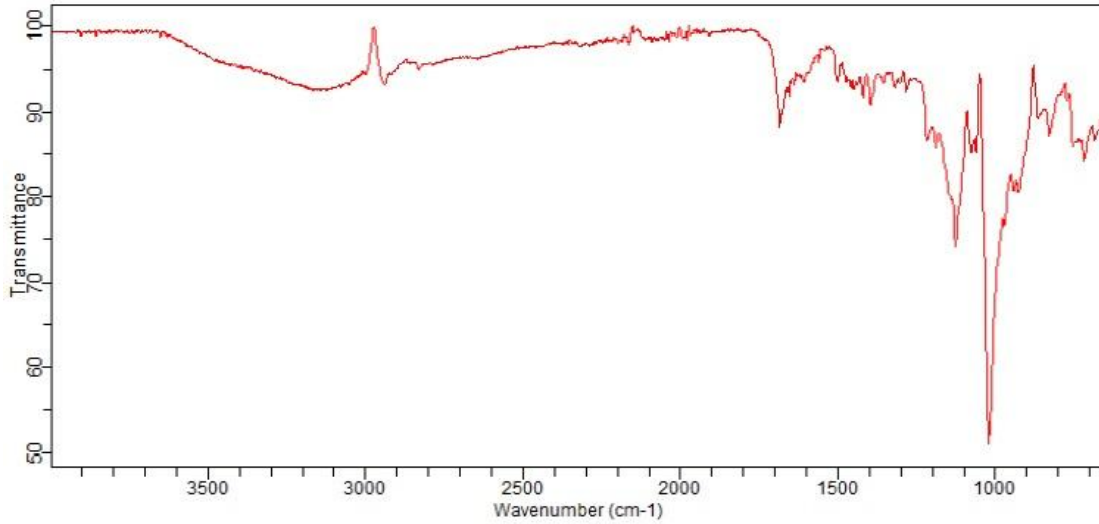
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Jul 15 2018

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.304 sec
Width 25125.6 Hz
192 repetitions
OBSERVE C13, 100.6243789 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 40 min

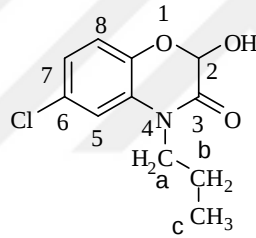


Şekil 5.32. Sis08 Kodlu bileşiğe ait ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 5.33. Sis08 Kodlu bileşiğe ait IRspektrumu

5.3.9. 3,4-Dihidro-2-hidroksi-6-kloro-4-propil-2H-1,4-benzoksazin-3-on (Sis09)



Yöntem 1’de belirtilen sentez yöntemi uygulanarak ilk basamağında, Reaksiyonun ikinci basamağın sonunda 3,4-dihidro-2-hidroksi-4-kloro-2H-1,4-benzoksazin-3-on elde edildi. Üçüncü basamak elde edilen saf bileşiğe (sis06) propilasyon işlemi uygulanarak gerçekleştirildi, reaksiyonda, 1 g (5 mmol) 3,4-dihidro-2-hidroksi-4-kloro-2H-1,4-benzoksazin-3-on, 2,07 g (15 mmol), potasyum karbonat ve (15 mmol) propil iyodür kullanıldı. Reaksiyon sonunda elde edilen ürün etil asetat: n-hekzan (7:1) çözücü sisteminde kolon kromatografi yöntemiyle % 25 verimle 0,31 g saf bileşik elde edildi.

Erime Noktası: 98-101 °C

R_f Değeri: 0,31 (S₁)

Kapalı Formülü ve Molekül Ağırlığı: C₁₁H₁₂ClNO₃, 241,67

Kütle Spektrumu (ES⁺) m/z (%X): 240,6(M⁺-H) (100%)

Elementel Analiz; $C_{10}H_{11}NO_3 \cdot 0.09C_2H_5OH \cdot C_3H_6O$ **%C** **%H** **%N**

Hesaplanan : 56.04 6.14 4.6

Bulunan : 55.63 6.35 4.73

1H -NMR Spektrumu (Int. TMS, DMSO) δ ppm: 1,00 (t, 3H, $-CH_3$ protonu); 1,75 (m, 2H, (b), $-CH_2-$ protonu); 4,00 (t, 2H, (a), $-CH_2$ protonu); 4,45 (q, 1H, $-CH$ protonu); 6,5 (s, 1H, $-OH$ protonu); 7,05-7,09 (d, 2H, (5,7) aromatik protonları, $J=8$); 8,32 (t, 1H, (8) aromatik protonu).

^{13}C -NMR Spektrumu (Int. TMS, DMSO) δ ppm: 30,229; 47,382; 67,682; 70,060; 113,129; 117,663; 122,982; 128,095; 146,010; 172,010; 205,637

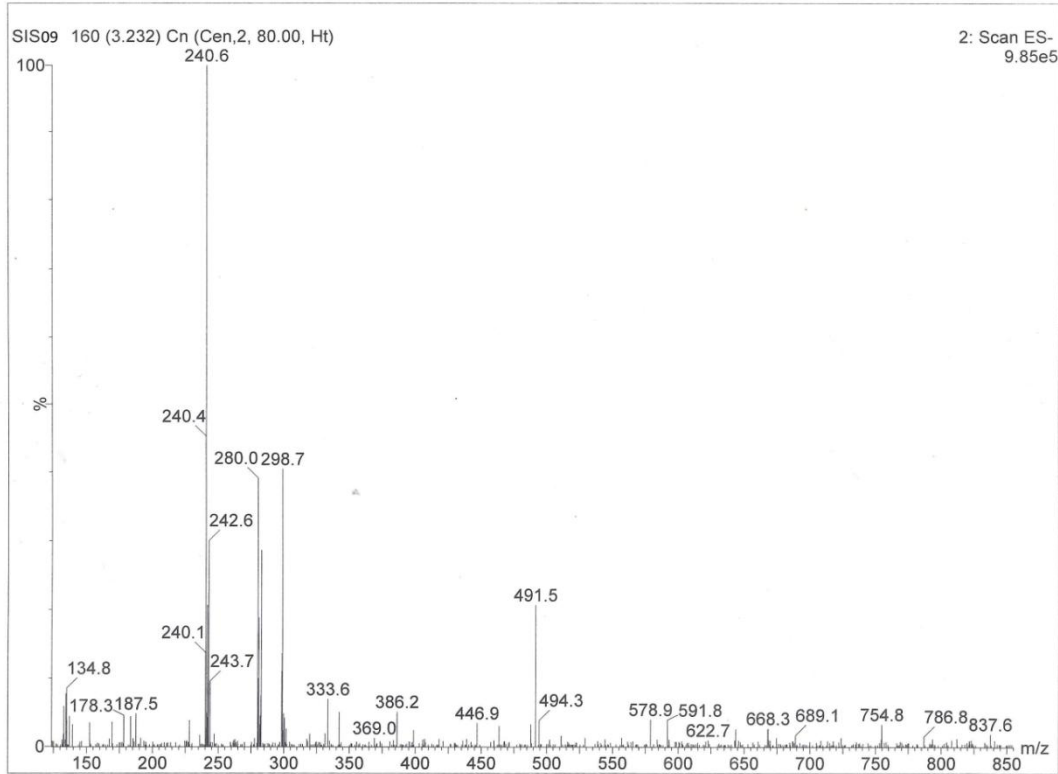
IR Spektrumu: 3378-2879 cm^{-1} O-H, aromatik C-H, alifatik C-H gerilimleri

1526 cm^{-1} aromatik C=C gerilimi

1415-1330 cm^{-1} C-N gerilimi

1207 cm^{-1} C-O-C gerilimleri

874-803 cm^{-1} benzen halkası $=C-H$ düzlem dışı eğilimleri



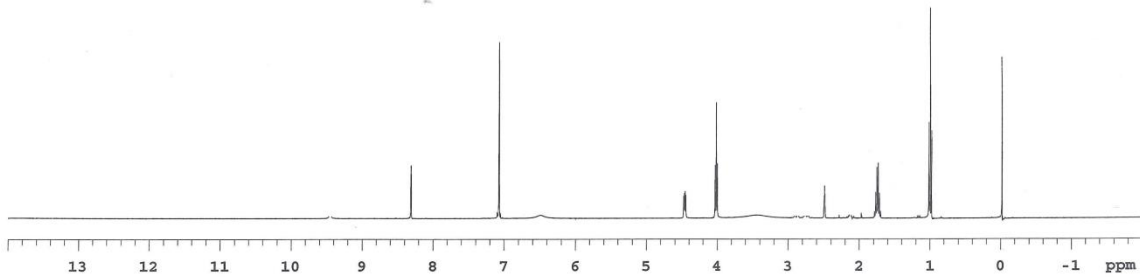
Şekil 5.34. Sis09 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu

Sample Name:
SIS09
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
SIS17_20160610_01
FidFile: PROTON_02

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Jun 10 2016

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



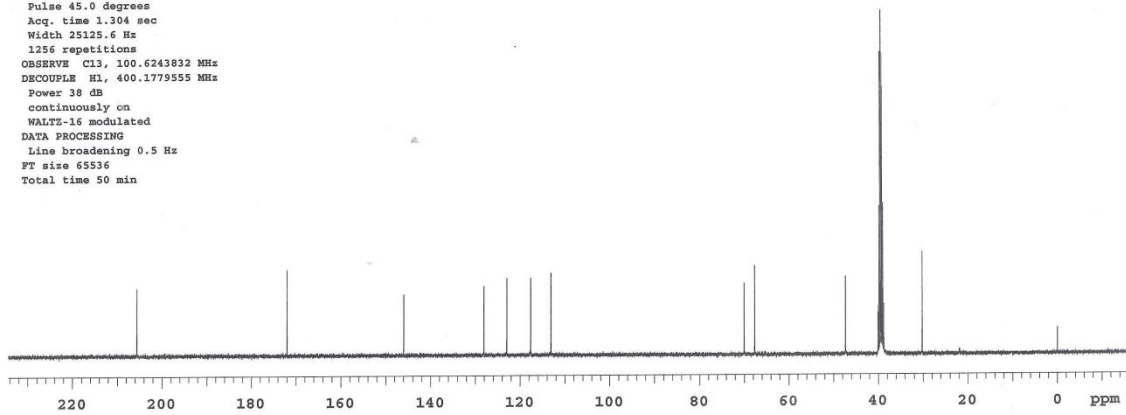
Şekil 5.35. Sis09 Kodlu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu

Sample Name:
SIS09
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
SIS17_20160610_01
FidFile: CARBON_01

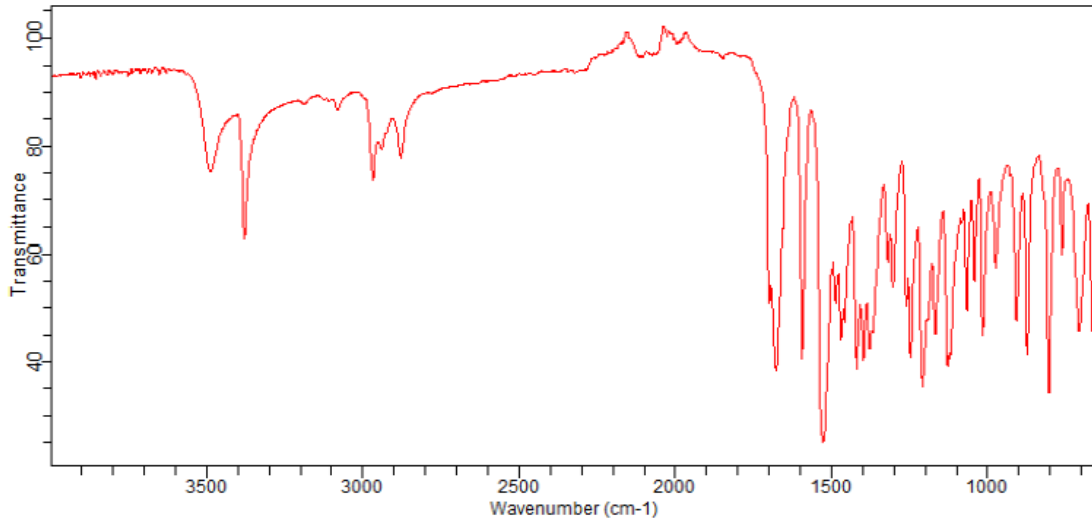
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Jun 10 2016

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.304 sec
Width 25125.6 Hz
1256 repetitions
OBSERVE C13, 100.6243832 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 50 min

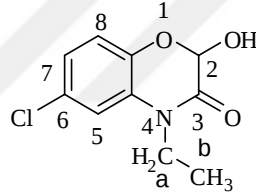


Şekil 5.36. Sis09 Kodlu bileşiğe ait ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 5.37. Sis09 Kodlu bileşiğe ait IRspektrumu

5.3.10. 3,4-Dihidro-2-hidroksi-4-etil-6-kloro -2H-1,4-benzoksazin-3-on (Sis10)



Yöntem 1’de belirtilen sentez yöntemi uygulanarak ilk basamağında, Reaksiyonun ikinci basamağın sonunda 3,4-dihidro-2-hidroksi-4-kloro-2H-1,4-benzoksazin-3-on elde edildi. Üçüncü basamak elde edilen saf bileşiğe (sis06) etilasyon işlemi uygulanarak gerçekleştirildi, reaksiyonda, 0,66 g (4 mmol) 3,4-dihidro-2-hidroksi-4-kloro-2H-1,4-benzoksazin-3-on, 2,07 g (15 mmol), potasyum karbonat ve (15 mmol) etil iyodür kullanıldı. Reaksiyon sonunda elde edilen ürün etil asetat: n-hekzan (7:1) çözücü sisteminde kolon kromatografi yöntemiyle % 20,2 verimle 0,15 g saf bileşik elde edildi.

Erime Noktası: 100-103 °C

R_f Değeri: 0,22 (S₁)

Kapalı Formülü ve Molekül Ağırlığı: C₁₀H₁₀ClNO₃, 227,64

Kütle Spektrumu (ES⁺) m/z (%X): 226,6 (M⁺-H) (100%)

Elementel Analiz;	$C_{10}H_{11}NO_3 \cdot 0.01C_2H_5OH \cdot C_3H_6O$	%C	%H	%N
	Hesaplanan:	54.64	5.65	4.89
	Bulunan :	54,24	5.84	5.09

1H -NMR Spektrumu (Int. TMS, DMSO) δ ppm: 1,35 (t, 3H, $-CH_3$ protonu); 4,12 (q, 2H, $-CH_2$ protonu); 4,45 (m, 1H, $-CH$ protonu); 6,45 (s, 1H, $-OH$ protonu); 7,07 (s, 2H, (5,7) aromatik protonlar); 8,31 (s, 1H, (8) aromatik proton).

^{13}C -NMR Spektrumu (Int. TMS, DMSO) δ ppm: 30,237; 47,367; 67,682; 113,220; 117,769; 122,997; 128,064; 145,903; 172,010; 205,668

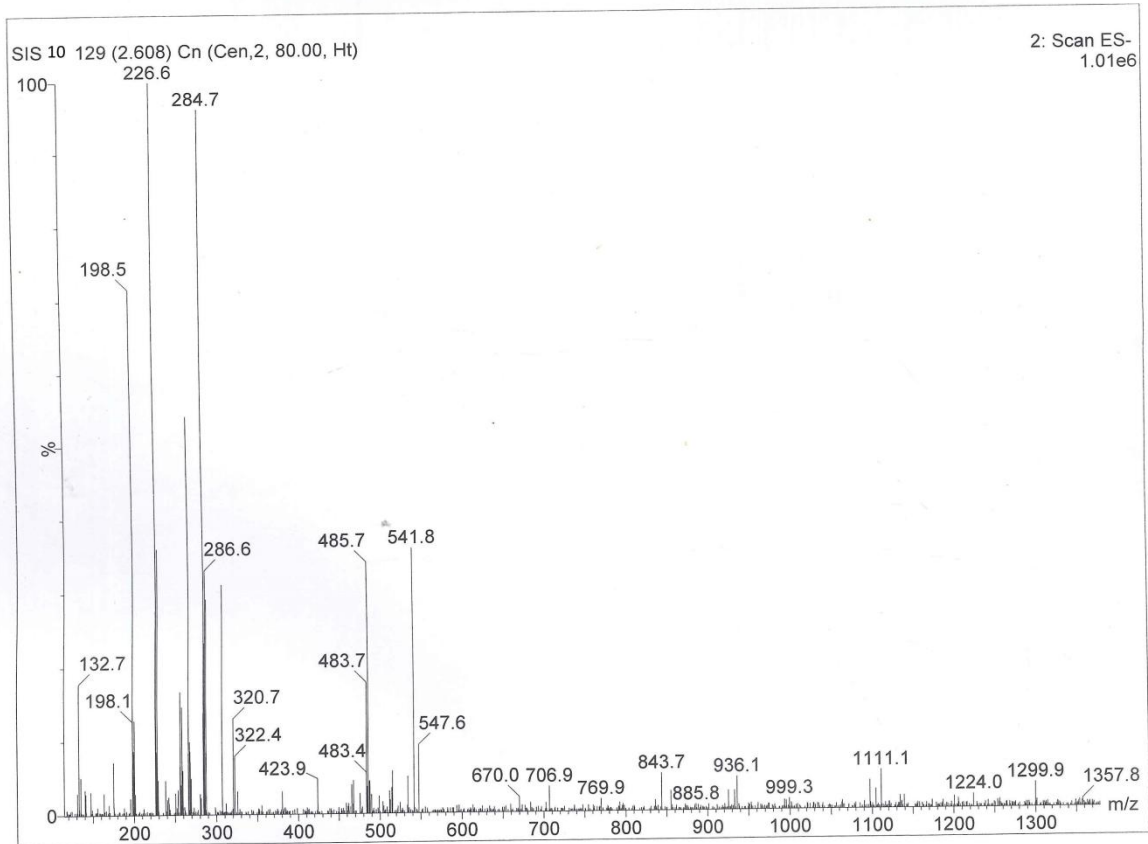
IR Spektrumu: 3360-2980 cm^{-1} O-H, aromatik C-H, alifatik C-H gerilimleri

1530 cm^{-1} aromatik C=C gerilimi

1209 cm^{-1} C-N gerilimi

1045 cm^{-1} C-O-C gerilimleri

784 cm^{-1} benzen halkası =C-H düzlem dışı eğilimleri



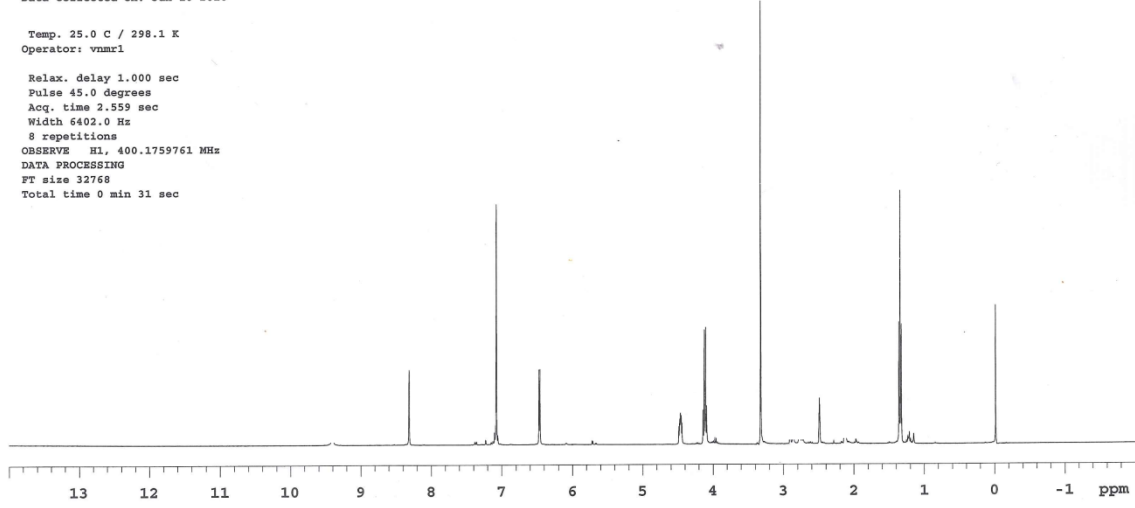
Şekil 5.38. Sis10 Nolu bileşiğin kütle spektrumu

Sample Name:
SIS10
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
SIS19_20160610_01
FidFile: PROTON_02

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Jun 10 2016

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



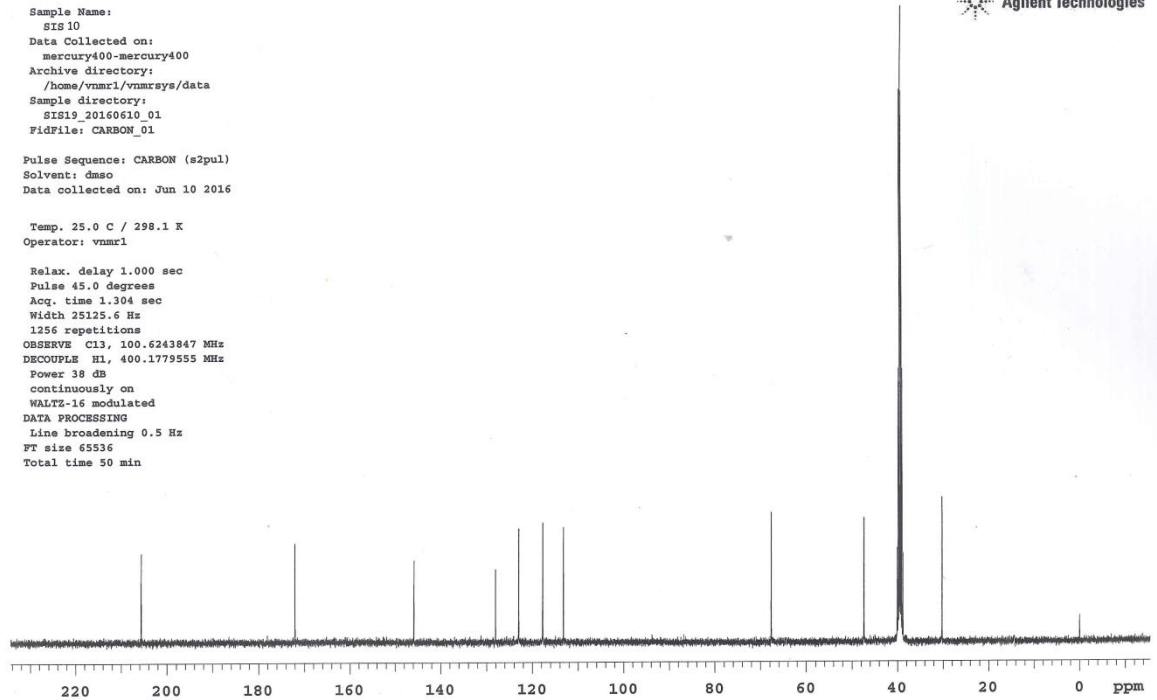
Şekil 5.39. Sis10 Kodlu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu

Sample Name:
SIS10
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
SIS19_20160610_01
FidFile: CARBON_01

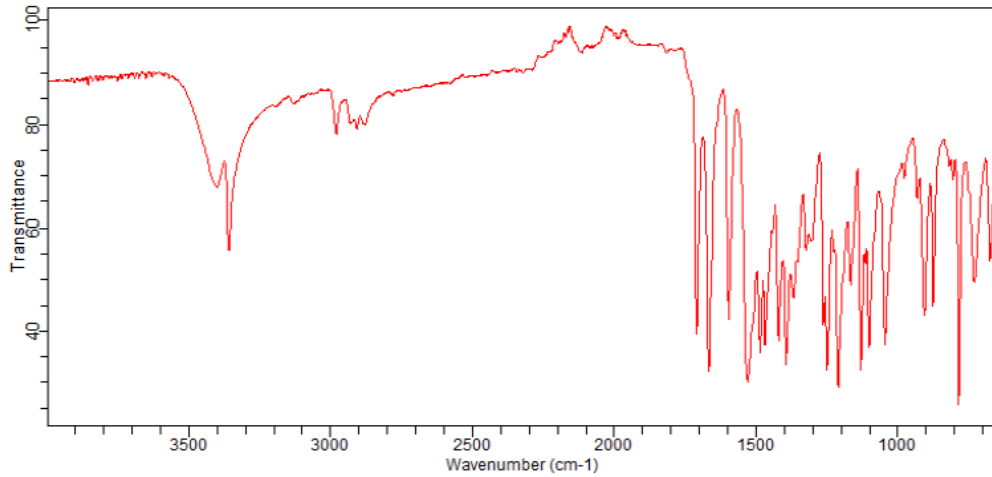
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Jun 10 2016

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.304 sec
Width 25125.6 Hz
1256 repetitions
OBSERVE C13, 100.6243847 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 50 min

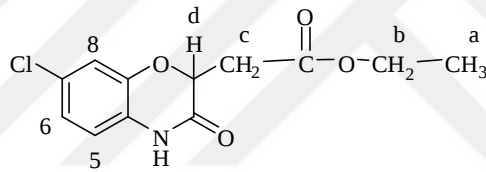


Şekil 5.40. Sis10 Kodlu bileşiğe ait ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 5.41. Sis10 Kodlu bileşiğe ait IRspektrumu

5.3.11. Etil 3,4-dihidro-7-kloro -3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat (Sis11)



Yöntem 2’de gerçekleştirilen reaksiyonların ilk basamağında 2,21 g monoetil fumarat, 2,26 g 2-amino-5-kloro-fenol, 1,97 g sodyum bikarbonat kullanıldı. Bu reaksiyon sonucunda etil-3-[(2-hidroksi-4-kloro-fenil)karbamoil]akrilat elde edildi. Sentez işleminin üçüncü basamağında 2,51 g etil 3-[(2-hidroksi-4-kloro-fenil)karbamoil]akrilat ve 1,91 g potasyum karbonat kullanıldı ve elde edilen ham ürün hekzan ve etil asetat solvan sistemi ile kristallendirildi. % 48 verimle 1,2 g saf bileşik elde edildi (154).

Erime Noktası:160 - 164 °C (161 - 163 °C)(154)

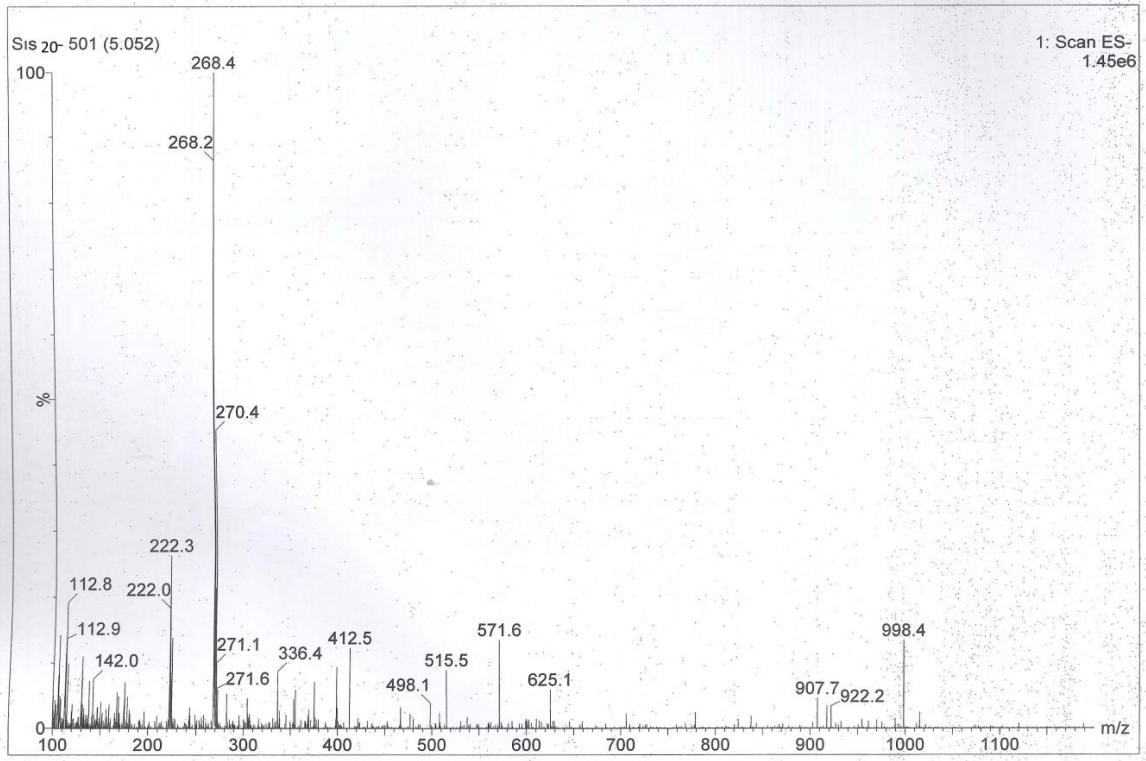
R_f Değeri: 0,33 (S₁)

Kapalı Formülü ve Molekül Ağırlığı: C₁₂H₁₂ClNO₄; 269,68

Kütle Spektrumu (ES-) m/z (%X); 268,3 (M⁺-H) (%100)

Elementel Analiz;	C₁₂H₁₂ClNO₄·0.09H₂O	%C	%H	%N
	Hesaplanan	: 53,09	4,52	5,16
	Bulunan	: 52.5	4,52	5,28

¹H-NMR Spektrumu (Int. TMS, DMSO); δ ppm; 1,17 (t, 3H, (a) –CH₃ protonu); 2,88-3,02 (dd, 2H, -CH₂(c) protonu, $J_o=8$, $J_m=4,4$); 4,07 (q, 2H, -CH₂(b) protonu); 4,97 (dd, 1H, –CH protonu, $J_o=8$, $J_m=4,8$); 6,88 (d, 1H, aromatik proton, $J_o=9,2$); 6,99-7,02 (m, 2H, aromatik protonlar); 10,86 (s, 1H, N-H protonu).



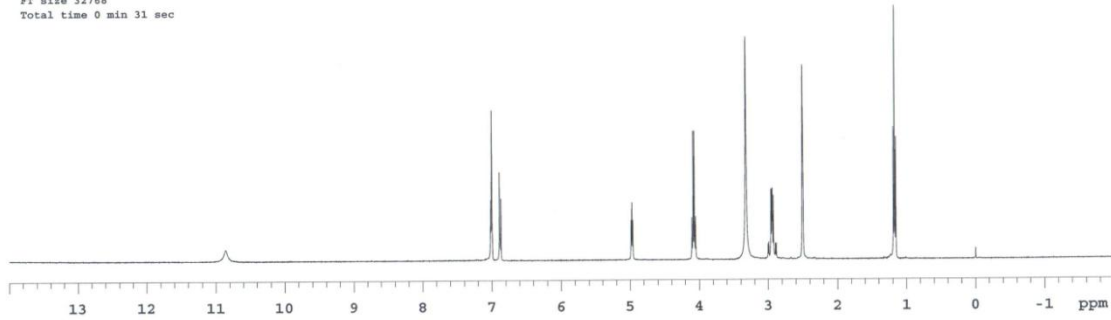
Şekil 5.42. Sis11 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu

Sample Name:
SIS11
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsw/data
Sample directory:
SIS11_20180715_01
FidFile: PROTON_01

Pulse Sequence: PROTON (zgpg30)
Solvent: dmsd
Data collected on: Jul 15 2018

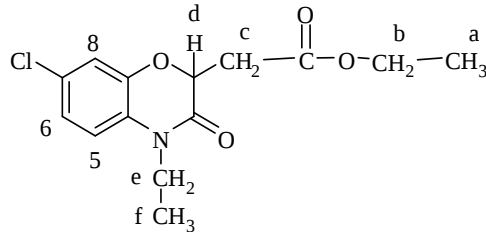
Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

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 5.43. Sis11 Kodlu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu

5.3.12. Etil 4-etil-7-kloro-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat(Sis12)



Yöntem 2’de gerçekleştirilen reaksiyonların ilk basamağında 2,21 g monoetil fumarat, 2,26 g 2-amino-5-kloro-fenol, 1,97 g sodyum bikarbonat kullanıldı. Bu reaksiyon sonucunda etil-3-[(2-hidroksi-4-kloro-fenil)karbamoil]akrilat elde edildi. Sentez işleminin üçüncü basamağında 2,51 g etil 3-[(2-hidroksi-4-kloro-fenil)karbamoil]akrilat ve 1,91 g potasyum karbonat kullanıldı ve elde edilen ham ürün hekzan ve etil asetat solvan sistemi ile kristallendirildi. % 48 verimle 1,2 g saf bileşik elde edildi. Son basamakta etilasyon işlemi uygulanarak gerçekleştirilen reaksiyonda, 1,2 g (5 mmol) etil 3,4-dihidro-7-kloro-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat, 2,07 g (15 mmol) potasyum karbonat ve (15 mmol) etil iyodür kullanıldı. Reaksiyon sonunda elde edilen ürün etil asetat: n-hekzan (7:1) çözücü sisteminde kolon kromatografi yöntemiyle % 30 verimle 0,4 g saf bileşik elde edildi.

Erime Noktası: 84-86 °C

R_f Değeri: 0,48 (S₁)

Kapalı Formülü ve Molekül Ağırlığı: C₁₄H₁₆ClNO₄; 297,73

Kütle Spektrumu (ES-) m/z (%X); 296,7 (M⁺-H) (100%)

Elementel Analiz;	<u>%C</u>	<u>%H</u>	<u>%N</u>
Hesaplanan :	56.47	5.41	4.7
Bulunan :	56.26	5.53	4.73

¹H-NMR Spektrumu (Int. TMS, DMSO); δ ppm;1,09-1,17 (m, 6H,(a ve f) -CH₃protonu); 2,95 (q, 2H, (b) -CH₂protonu); 3,90 (q, 2H, (e) -CH₂); 4,06 (q, 2H, (c) -CH₂); 4,98 (t, 1H, -CH); 7,05 (d, 1H, (8) aromatik protonu, J_m=1,6); 7,10 (dd, 1H, (6) aromatik protonu, J_o=8,4; J_m=2,4); 7,21 (d, 1H, (5) aromatik protonu, J_o=8,4).

¹³C-NMR Spektrumu (Int. TMS, DMSO) δ ppm: 12,025; 13,899; 35,563; 35,906; 60,275; 73,108; 116,352; 116,558; 122,471; 126,853; 127,104; 144,623; 163,574; 169,122

IR Spektrumu:3354-2898 cm⁻¹ alifatik C-H ve aromatik C-H

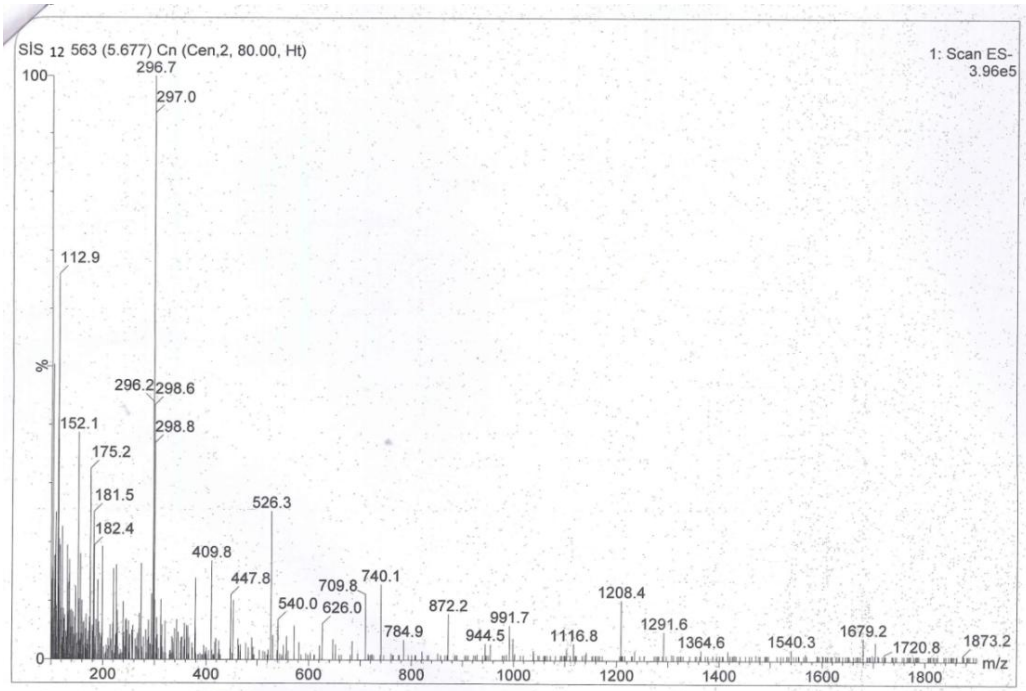
1720-1686 cm⁻¹ amid fonksiyonel grubuna ait C=O ile ester fonksiyonel grubuna ait C=O gerilimleri

1560 cm⁻¹ aromatik C=C gerilimi

1375 cm⁻¹ C-N gerilimi

1142-1043 cm⁻¹ C-O-C gerilimi

792 cm⁻¹ benzen halkası -C=H düzlem dışı eğilimi



Şekil 5.44. Sis12 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu

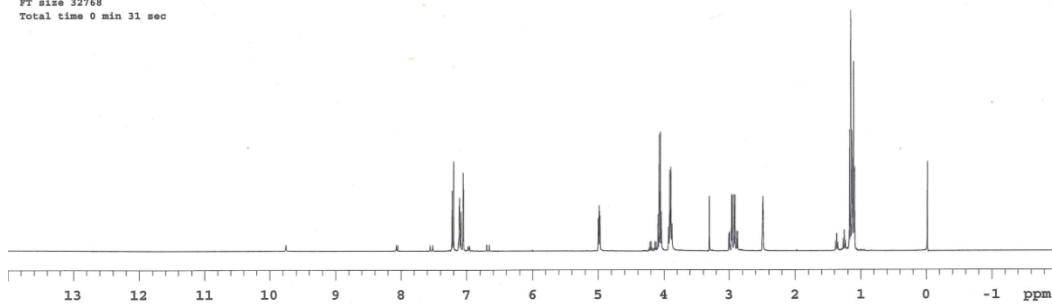
Sample Name:
SIS12
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
SIS20a_20180223_01
Fidfile: PROTON_02



Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Feb 23 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
9 repetitions
OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min 31 sec



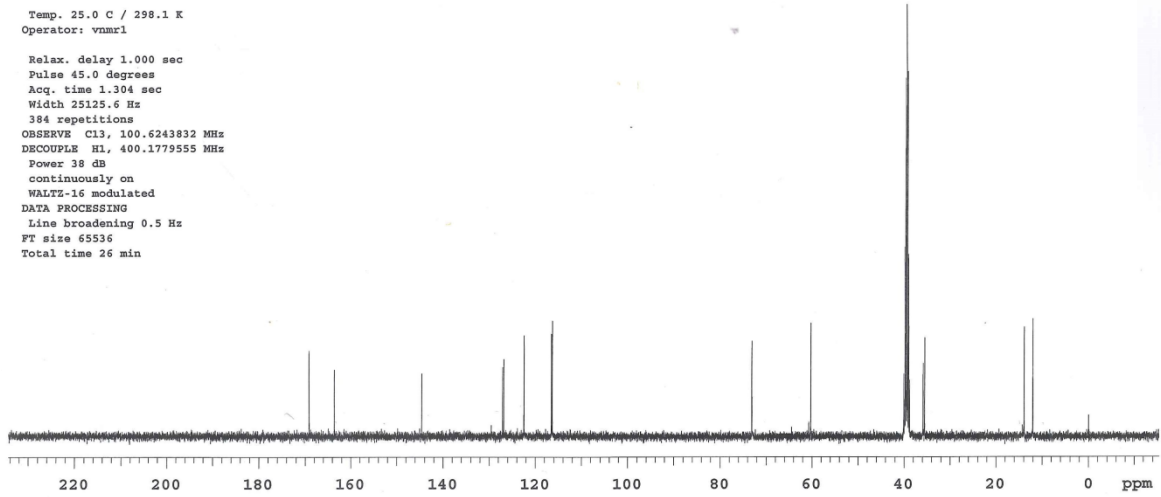
Şekil 5.45. Sis12 Kodlu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu

Sample Name:
SIS12
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmr5s/data
Sample directory:
SIS20a_20180223_01
FidFile: current

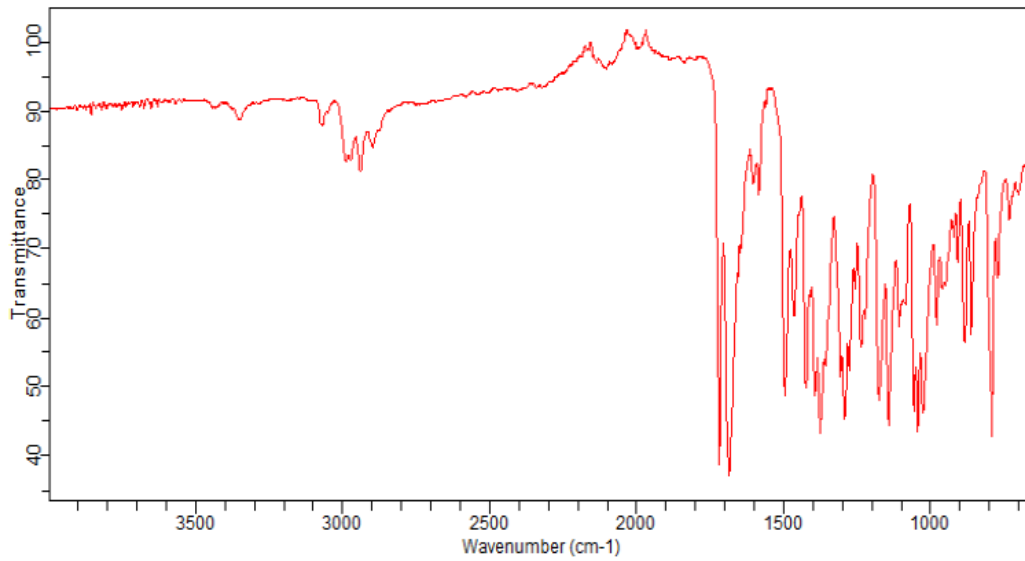
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Feb 23 2018

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.304 sec
Width 25125.6 Hz
384 repetitions
OBSERVE C13, 100.6243832 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 26 min

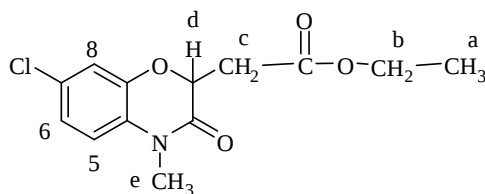


Şekil 5.46. Sis12 Kodlu bileşiğe ait ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 5.47. Sis12Kodlu bileşiğe ait IRspektrumu

5.3.13. Etil 4-metil-7-kloro-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat (Sis13)



Yöntem 2'de gerçekleştirilen reaksiyonların ilk basamağında 2,21 g monoetil fumarat, 2,26 g 2-amino-5-kloro-fenol, 1,97 g sodyum bikarbonat kullanıldı. Bu reaksiyon sonucunda etil-3-[(2-hidroksi-4-kloro-fenil)karbamoil]akrilat elde edildi. Sentez işleminin üçüncü basamağında 2,51 g etil 3-[(2-hidroksi-4-kloro-fenil)karbamoil]akrilat ve 1,91 g potasyum karbonat kullanıldı ve elde edilen ham ürün hekzan ve etil asetat solvan sistemi ile kristallendirildi. % 48 verimle 1,2 g saf bileşik elde edildi. Yöntem 2'de belirtilen sentez yöntemi uygulanarak etil 3,4-dihidro-7-kloro-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat elde (sis11) edildi. Son basamakta metilasyon işlemi uygulanarak gerçekleştirilen reaksiyonda, 1,2 g (5 mmol) etil 3,4-dihidro-7-kloro-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat, 2,07 g (15 mmol) potasyum karbonat ve (15 mmol) metil iyodür kullanıldı. Reaksiyon sonunda elde edilen ürün etil asetat: n-hekzan (7:1) çözücü sisteminde kolon kromatografi yöntemiyle % 35,7 verimle 0,45 g saf bileşik elde edildi.

Erime Noktası: 92-95 °C

R_f Değeri: 0,57 (S₁)

Kapalı Formülü ve Molekül Ağırlığı: C₁₃H₁₄ClNO₄;283,71

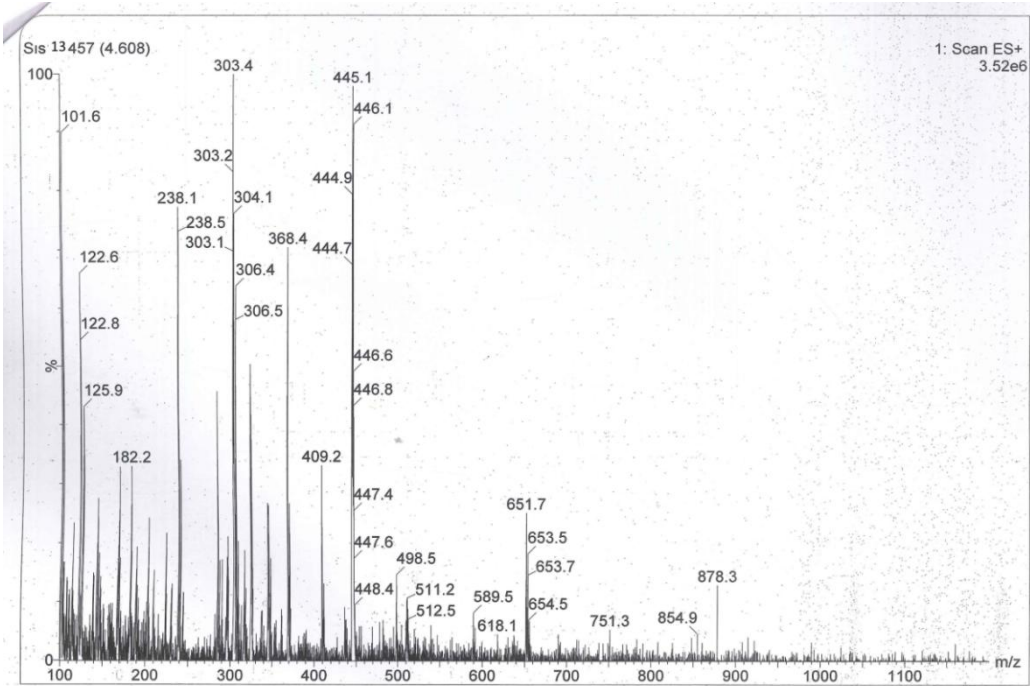
Kütle Spektrumu (ES-) m/z (%X); 282,2 (M⁺-H) (%10) ; 306,4(M⁺+Na)(%65)

Elementel Analiz;	C ₁₃ H ₁₄ ClNO ₄ .0.07H ₂ O	%C	%H	%N
	Hesaplanan :	54.79	5	4.91
	Bulunan :	54.30	5.09	4.92

¹H-NMR Spektrumu (Int. TMS, DMSO); δ ppm; 1,16 (t, 3H, (a) -CH₃protonu); 2,95 (q, 2H, (b) -CH₂protonu); 3,25 (s, 3H, (e) -CH₃protonu); 4,07 (dd, 2H, (c) -CH₂protonu); 5,00 (t, 1H, -CH protonu); 7,05 (d, 1H, (8) aromatik proton, J_m=2); 7,11 (dd, 1H, (6) aromatik proton, J_o=8,8; J_m=2); 7,16 (d, 1H, (5) aromatik proton, J_o=8,8).

^{13}C -NMR Spektrumu (Int. TMS, DMSO) δ ppm:13,942; 28,276; 35,682; 60,334; 73,242; 116,235; 116,555; 122,407; 126,995; 128,534; 144,376; 164,181; 169,195

IR Spektrumu: 3350-2835 cm^{-1} alifatik C-H ve aromatik C-H
1722-1690 cm^{-1} amid fonksiyonel grubuna ait C=O ile ester fonksiyonel grubuna ait C=O gerilimleri
1420 cm^{-1} aromatik C=C gerilimi
1375 cm^{-1} C-N gerilimi
1153-1050 cm^{-1} C-O-C gerilimi
887 cm^{-1} benzen halkası -C=H düzlem dışı eğilimi



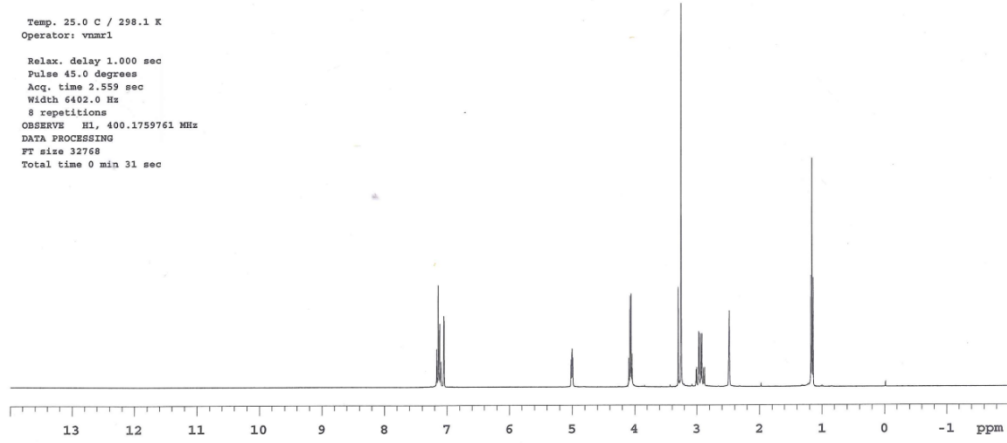
Şekil 5.48. Sis13 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu($\text{M}^+ + \text{Na}$)

Sample Name:
SIS13
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
SIS20b_20180208_01
FidFile: PROTON_02

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Feb 8 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



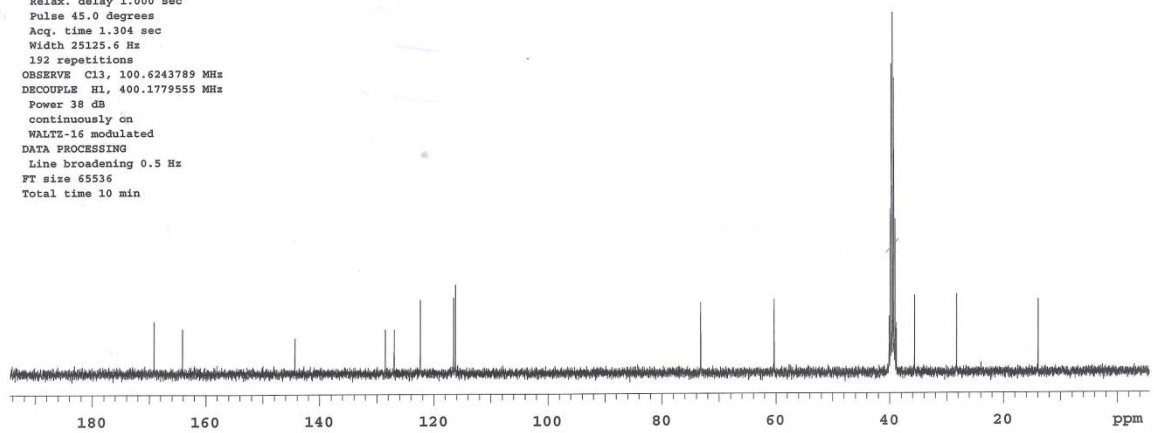
Şekil 5.49. Sis13 Kodlu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu

Sample Name:
SIS13
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
SIS20b_20180208_01
FidFile: current

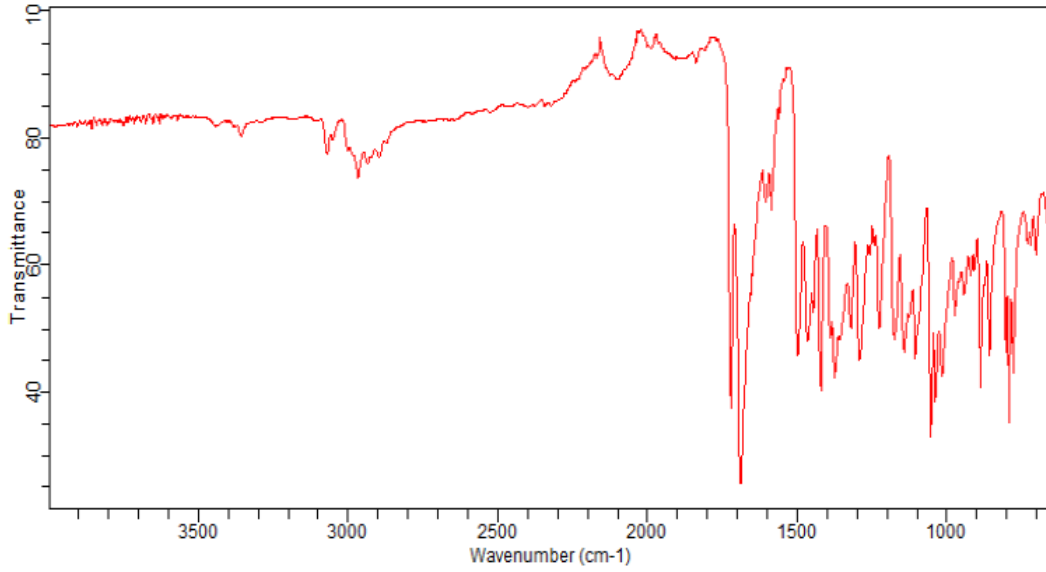
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Feb 8 2018

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.304 sec
Width 25125.6 Hz
192 repetitions
OBSERVE C13, 100.6243789 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 10 min

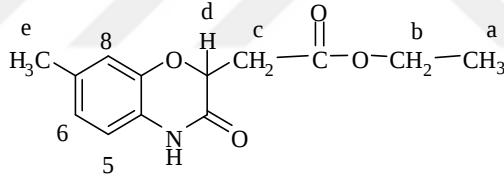


Şekil 5.50. Sis13 Kodlu bileşiğe ait ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 5.51. Sis13 Kodlu bileşiğe ait IRspektrumu

5.3.14. Etil 3,4dihidro-7-metil -3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat (Sis14)



Yöntem 2’de gerçekleştirilen reaksiyonların ilk basamağında 2,21 g monoetil fumarat, 2,26 g 2-amino-5-metil-fenol, 1,97 g sodyum bikarbonat kullanıldı. Bu reaksiyon sonucunda etil-3-[(2-hidroksi-4-metil-fenil)karbamoil]akrilat elde edildi. Sentez işleminin üçüncü basamağında 2,51 g etil 3-[(2-hidroksi-4-metil-fenil)karbamoil]akrilat ve 1,91 g potasyum karbonat kullanıldı. Sentezlenen bileşik hekzan ve etil asetat solvan sistemi ile kristallendirildi. % 68 verimle 1,7 g saf bileşik elde edildi (155).

Erime Noktası: 124 - 127 °C (124-125 °C) (155)

R_f Değeri: 0,45 (S₁)

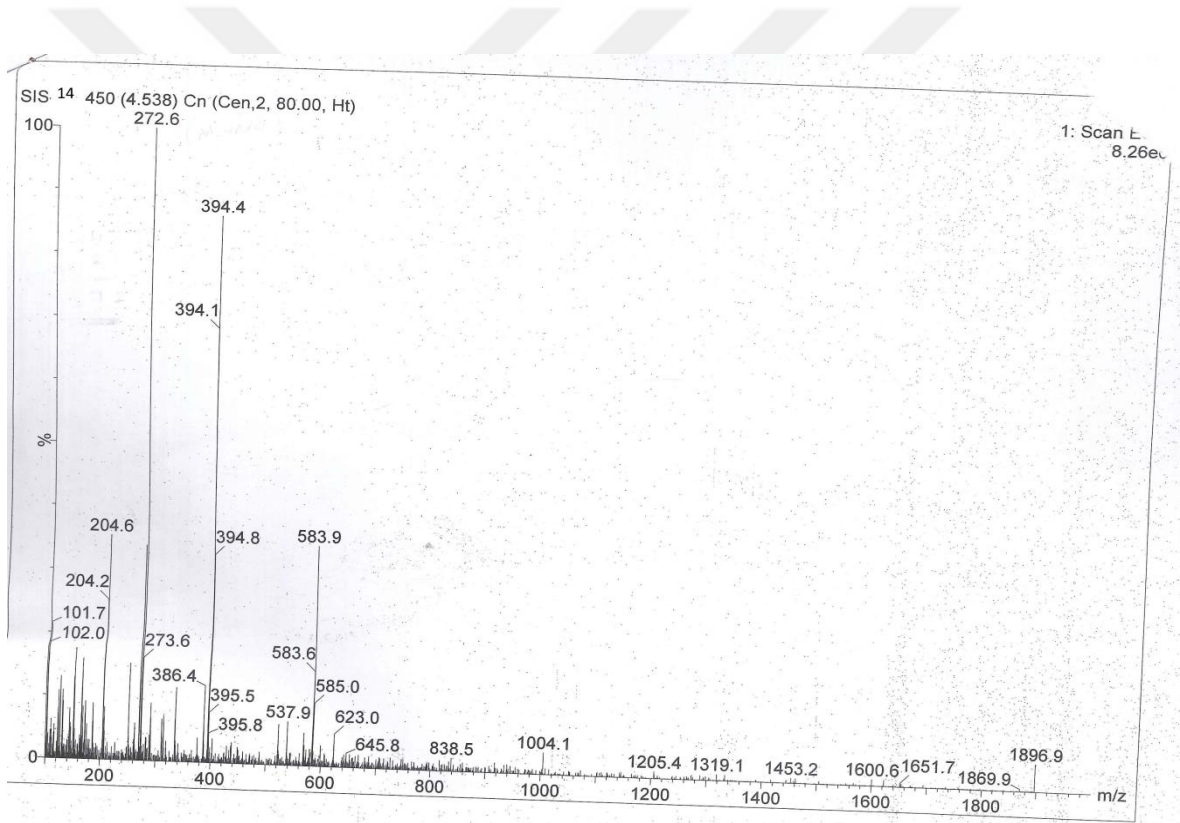
Kapalı Formülü ve Molekül Ağırlığı: C₁₃H₁₅NO₄; 249,26

Kütle Spektrumu (ES-) m/z (%X); 272,6 (M⁺+Na)(%100)

Elementel Analiz;	<u>%C</u>	<u>%H</u>	<u>%N</u>
Hesaplanan :	62,64	6,07	5,62
Bulunan :	62,82	6,22	5,48

¹H-NMR Spektrumu (Int. TMS, DMSO); δ ppm; 1,17 (t, 3H, (a) -CH₃ protonu); 2,2 (s, 3H, (e) -CH₃ protonu); 2,80-2,97 (q, 2H, (b) -CH₂- protonu); 4,08 (dd, 2H, (c) -CH₂- protonu, $J_o=16$, $J_m=7,2$); 4,83 (dd, 1H, -CH protonu, $J_o=7,2$, $J_m=4,4$); 6,72-6,78 (m, 3H, (5,6,8) aromatik protonları).

Kütle Spektrumu (ES-) m/z (%X); 272,6 (M⁺+Na)(%100)



Şekil 5.52. Sis14 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu(M⁺+Na)

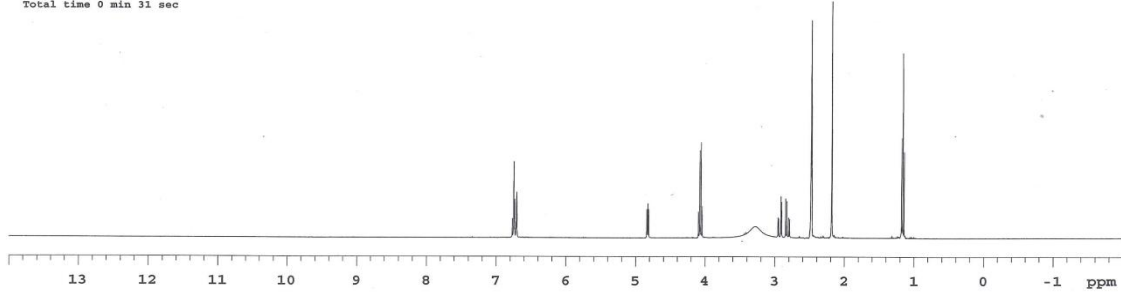
Sample Name:
SIS14
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
SIS21_20180124_01
FidFile: PROTON_02

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Jan 24 2018

Temp. 40.0 C / 313.1 K
Operator: vnmr1

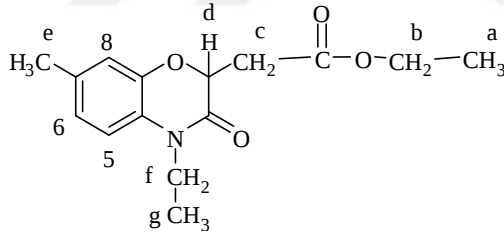
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.559 sec
Width 6402.0 Hz
8 repetitions
OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DATA PROCESSING
F1 size 32768
Total time 0 min 31 sec

Agilent Technologies



Şekil 5.53. Sis14 Kodlu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu

5.3.15. Etil-4-etil-7-metil-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat (Sis15)



Yöntem 2’de gerçekleştirilen reaksiyonların ilk basamağında 2,21 g monoetil fumarat, 2,26 g 2-amino-5-metil-fenol, 1,97 g sodyum bikarbonat kullanıldı. Bu reaksiyon sonucunda etil-3-[(2-hidroksi-4-metil-fenil)karbamoil]akrilat elde edildi. Sentez işleminin üçüncü basamağında 2,51 g etil 3-[(2-hidroksi-4-metil-fenil)karbamoil]akrilat ve 1,91 g potasyum karbonat kullanıldı. Sentezlenen bileşik hekzan ve etil asetat solvan sistemi ile kristallendirildi. % 68 verimle 1,7 g saf bileşik elde edildi. Son basamakta etilasyon işlemi uygulanarak gerçekleştirilen reaksiyonda, 1,25 g (5 mmol) etil 3,4-dihidro-7-metil-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat, 2,07 g (15 mmol) potasyum karbonat ve (15 mmol) etil iyodür kullanıldı. Reaksiyon sonunda elde edilen ürün etil asetat: n-hekzan (7:1) çözücü sisteminde kolon kromatografi yöntemiyle % 39,5 verimle 0,55 g saf bileşik elde edildi.

Erime Noktası: 125-128 °C

R_f Değeri: 0,75 (S₁)

Kapalı Formülü ve Molekül Ağırlığı: C₁₅H₁₉NO₄, 277,32

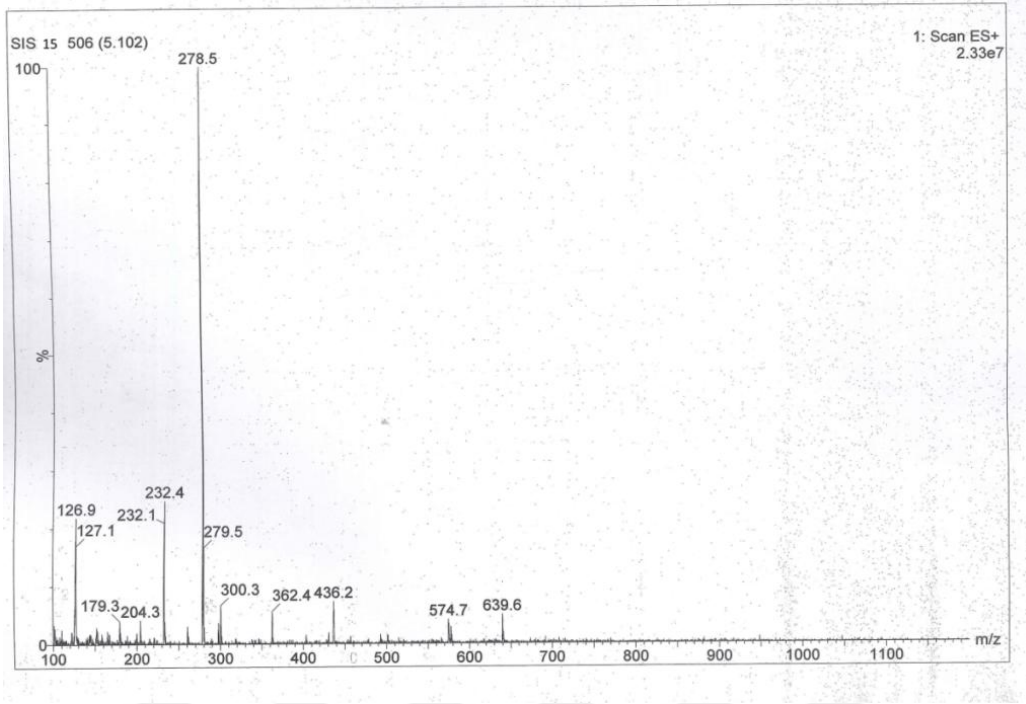
Kütle Spektrumu (ES-) m/z (%X) : 278,5 (M⁺+H) (100%)

Elementel Analiz;	C ₁₅ H ₁₉ NO ₄ .0.09H ₂ O	%C	%H	%N
	Hesaplanan :	64.58	6.93	5.02
	Bulunan :	64.09	7.1	5.06

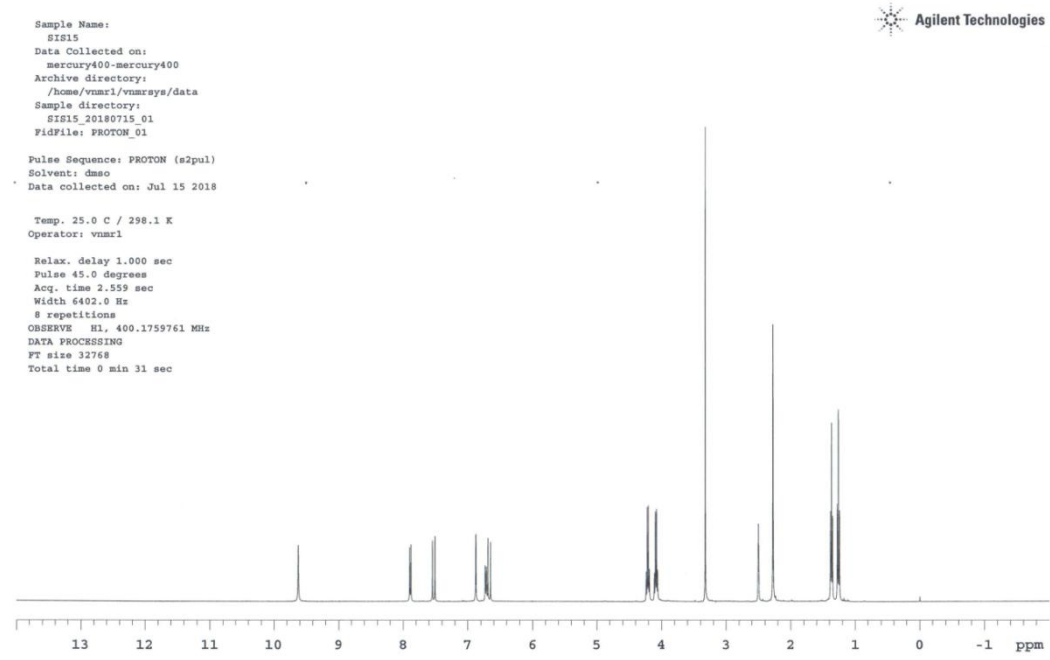
¹H-NMR Spektrumu (Int. TMS, DMSO); δ ppm; 1,26 (t, 3H, (a) -CH₃protonu); 1,36 (t, 3H, (g) -CH₃protonu); 2,27 (s, 3H, (e) -CH₃protonu); 4,08 (q, 2H, (b) -CH₂protonu); 4,20 (q, 2H, (f) -CH₂protonu); 6,69 (dd, 2H, (c) -CH₂ protonu, *J_o*=20, *J_m*=15,2); 6,87 (s, 1H, -CH); 7,52 (d, 1H, (5) aromatik proton, *J*=15,6); 7,88 (d, 1H, (6) aromatik proton, *J*=7,6); 9,62 (s, 1H, (8) aromatik proton).

¹³C-NMR Spektrumu (Int. TMS, CDCl₃) δ ppm: 14,153; 14,900; 21,438; 61,246; 64,203; 111,753; 119,853; 121,308; 124,631; 130,818; 134,583; 137,029; 147,217; 160,888; 165,643

IR Spektrumu: 3375-2899 cm⁻¹ alifatik C-H ve aromatik C-H
1690-1675 cm⁻¹ amid fonksiyonel grubuna ait C=O ile ester fonksiyonel grubuna ait C=O gerilimleri
1526 cm⁻¹ aromatik C=C gerilimi
1287 cm⁻¹ C-N gerilimi
1161-974 cm⁻¹ C-O-C gerilimi
821 cm⁻¹ benzen halkası -C=H düzlem dışı eğilimi



Şekil 5.54. Sis15 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu

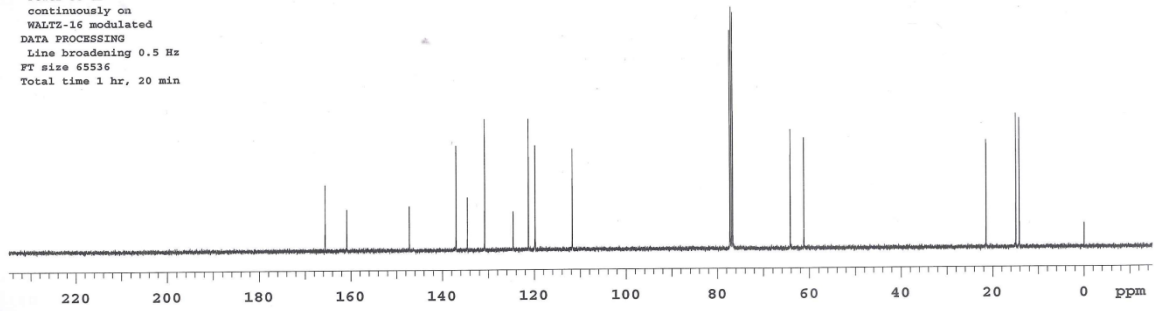


Şekil 5.55. Sis15 Kodlu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu

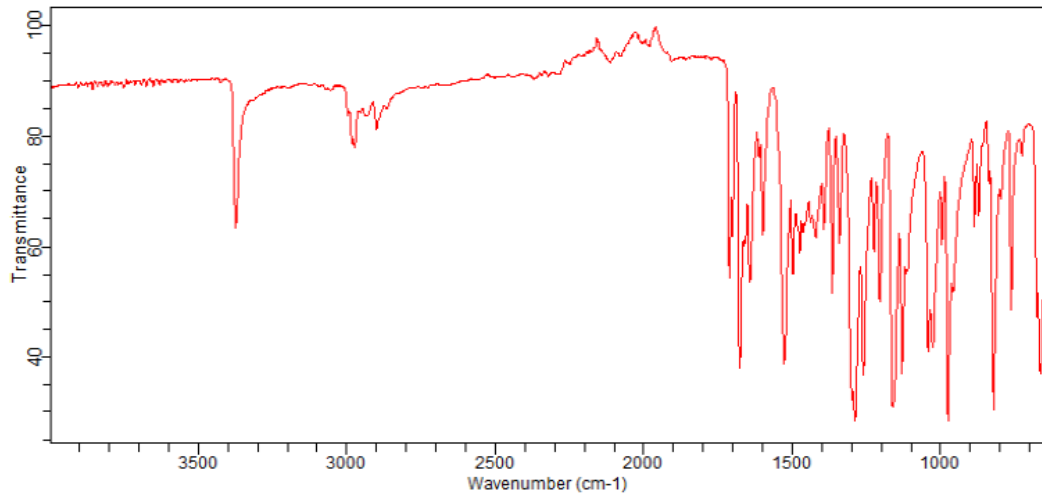
Sample Name:
Sis 15
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
Sis21a_20180309_01
FidFile: current

Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: cdcl3
Data collected on: Mar 9 2018

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.304 sec
Width 25125.6 Hz
1728 repetitions
OBSERVE C13, 100.6238513 MHz
DECOUPLE H1, 400.1740547 MHz
Power 38 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 1 hr, 20 min

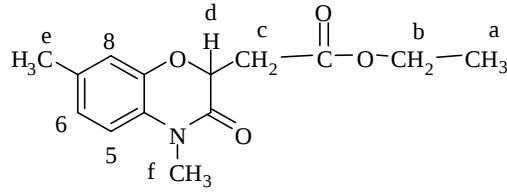


Şekil 5.56. Sis15 Kodlu bileşiğe ait ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 5.57. Sis15 Kodlu bileşiğe ait IR spektrumu

5.3.16. Etil 4-metil-7-metil-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat(Sis16)



Yöntem 2’de gerçekleştirilen reaksiyonların ilk basamağında 2,21 g monoetil fumarat, 2,26 g 2-amino-5-metil-fenol, 1,97 g sodyum bikarbonat kullanıldı. Bu reaksiyon sonucunda etil-3-[(2-hidroksi-4-metil-fenil)karbamoil]akrilat elde edildi. Sentez işleminin üçüncü basamağında 2,51 g etil 3-[(2-hidroksi-4-metil-fenil)karbamoil]akrilat ve 1,91 g potasyum karbonat kullanıldı. Sentezlenen bileşik hekzan ve etil asetat solvan sistemi ile kristallendirildi. % 68 verimle 1,7 g saf bileşik elde edildi. Son basamakta metilasyon işlemi uygulanarak gerçekleştirilen reaksiyonda, 1,24 g (5 mmol) etil 3,4-dihidro-7-metil-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat, 2,07 g (15 mmol) potasyum karbonat ve (15 mmol) metil iyodür kullanıldı. Reaksiyon sonunda elde edilen ürün etil asetat: n-hekzan (7:1) çözücü sisteminde kolon kromatografi yöntemiyle % 22,7 verimle 0,29 g saf bileşik elde edildi.

Erime Noktası: 63-66 °C

R_f Değeri: 0,67 (S₁)

Kapalı Formülü ve Molekül Ağırlığı: C₁₄H₁₇NO₄, 263,29

Kütle Spektrumu (ES-) m/z (%X); 264,3 (M⁺+H) (50%)

Elementel Analiz; C₁₄H₁₇NO₄.0.05H₂O **%C** **%H** **%N**

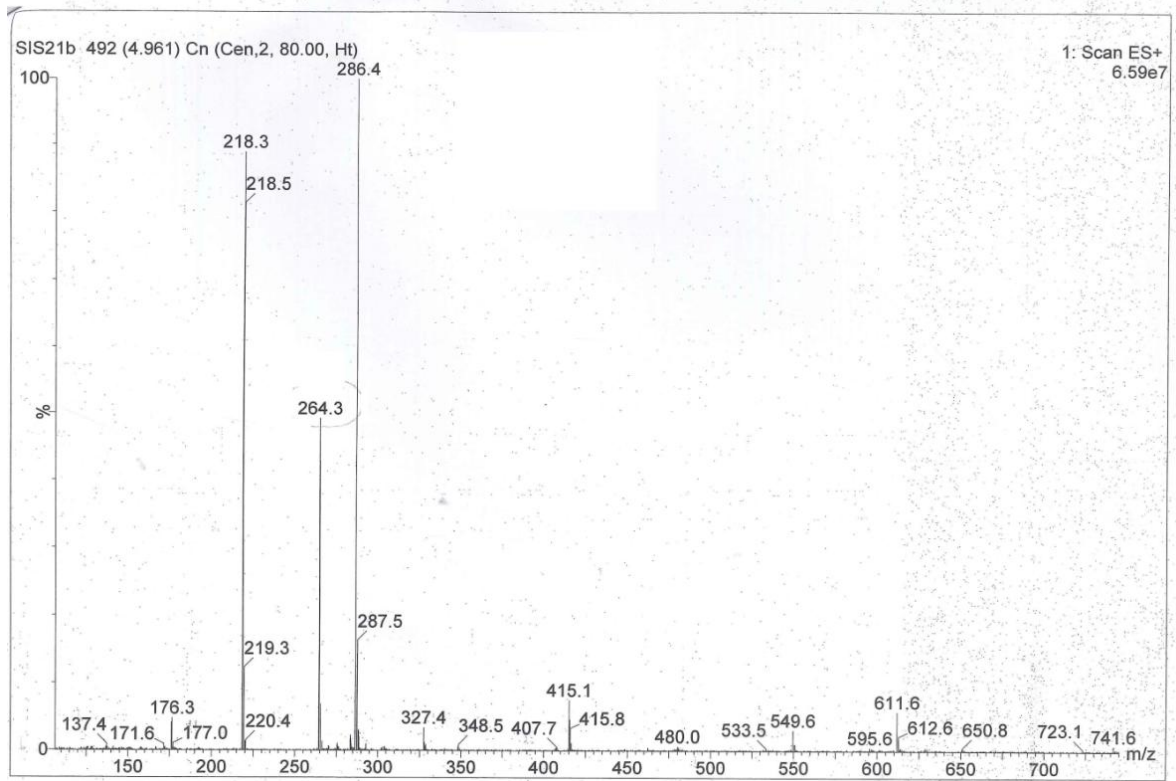
Hesaplanan: 63.64 6.52 5.3

Bulunan: 63.23 6.77 5.33

¹H-NMR Spektrumu (Int. TMS, DMSO); δ ppm; 1,16 (t, 3H, (a) -CH₃ protonu); 2,21 (s, 3H, (f) -CH₃ protonu); 2,80-2,98 (d, 2H, (c) -CH₂ protonu, J=7,6); 3,23 (s, 3H, (e) -CH₃ protonu); 4,06 (q, 2H, (b) -CH₂ protonu); 4,87 (dd, 1H, -CH protonu, J_o=5, J_m=4,4); 6,76 (s, 1H, (8) aromatik proton); 6,84-6,87 (dd, 1H, (6) aromatik proton, J_o=4,8, J_m=0,8); 7,01 (d, 1H, (5) aromatik proton, J=8).

^{13}C -NMR Spektrumu (Int. TMS, DMSO) δ ppm: 13,965; 20,198; 28,131; 35,667; 60,265; 73,181; 115,061; 116,761; 123,131; 126,941; 133,091; 143,424; 164,280; 169,332

IR Spektrumu: 3354-2885 cm^{-1} alifatik C-H ve aromatik C-H
1722-1682 cm^{-1} amid fonksiyonel grubuna ait C=O ile esterfonksiyonel grubuna ait C=O gerilimleri
1511-1500 cm^{-1} aromatik C=C gerilimi
1313 cm^{-1} C-N gerilimi
1287-1159 cm^{-1} C-O-C gerilimi
799 cm^{-1} benzen halkası -C=H düzlem dışı eğilimi



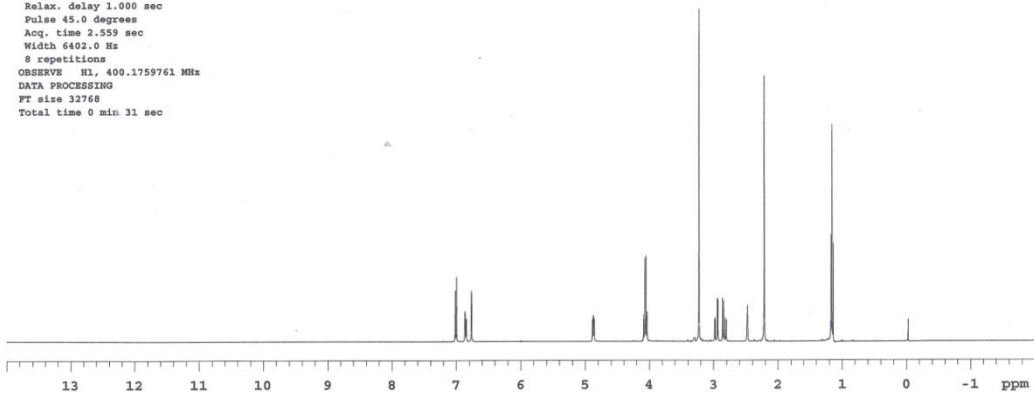
Şekil 5.58. Sis16 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu

Sample Name:
Sis 16
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
Sis21b_20180302_01
FidFile: PROTON_01



Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Mar 2 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



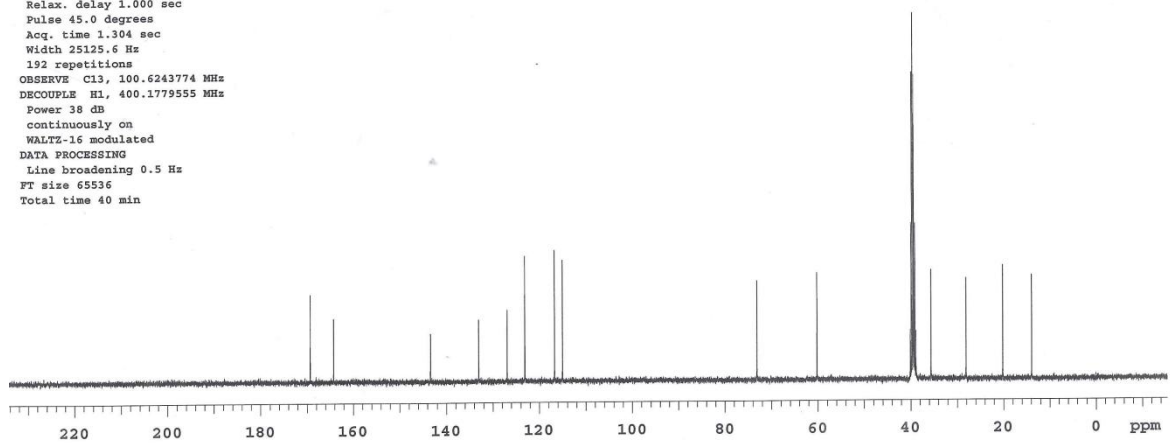
Şekil 5.59. Sis16 Kodlu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu

Sample Name:
Sis 16
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
Sis21b_20180302_01
FidFile: current

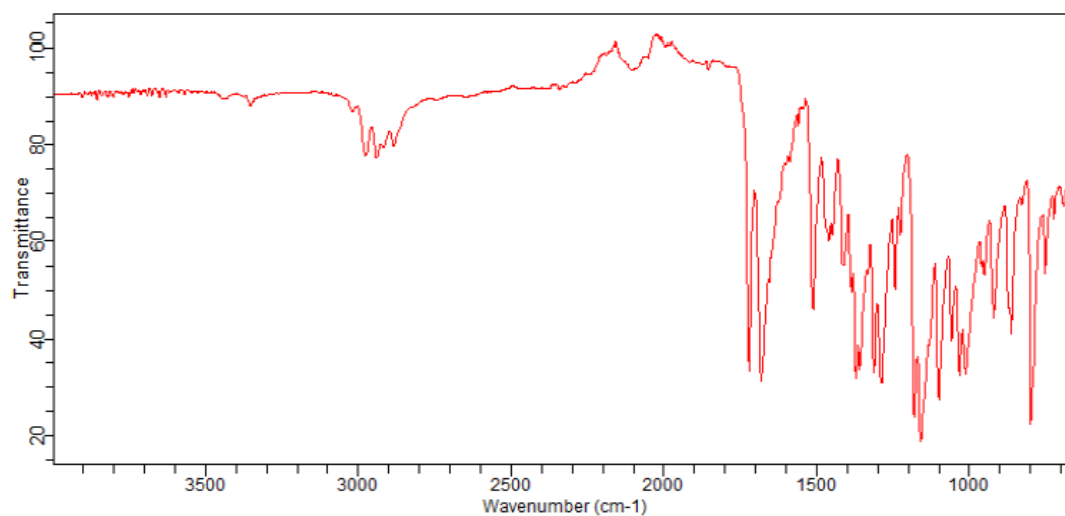


Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Mar 2 2018

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.304 sec
Width 25125.6 Hz
192 repetitions
OBSERVE C13, 100.6243774 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 40 min

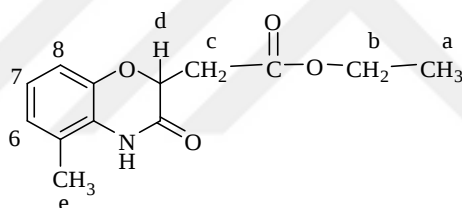


Şekil 5.60. Sis16 Kodlu bileşiğe ait ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 5.61. Sis16 Kodlu bileşiğe ait IRspektrumu

5.3.17. Etil 3,4dihidro-7-metil -3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat (Sis17)



Yöntem 2’de gerçekleştirilen reaksiyonların ilk basamağında 2,21 g monoetil fumarat, 2,26 g 2-amino-3-metil-fenol, 1,97 g sodyum bikarbonat kullanıldı. Bu reaksiyon sonucunda etil-3-[(2-hidroksi-4-metil-fenil)karbamoil]akrilat elde edildi. Sentez işleminin üçüncü basamağında 2,5 g etil 3-[(2-hidroksi-6-metil-fenil)karbamoil]akrilat ve 1,91 g potasyum karbonat kullanıldı. Sentezlenen bileşik hekzan ve etil asetat solvan sistemi ile kristallendirildi. % 56 verimle 1,4 g saf bileşik elde edildi (154).

Erime Noktası: 129 - 133 °C (131 - 134 °C) (154)

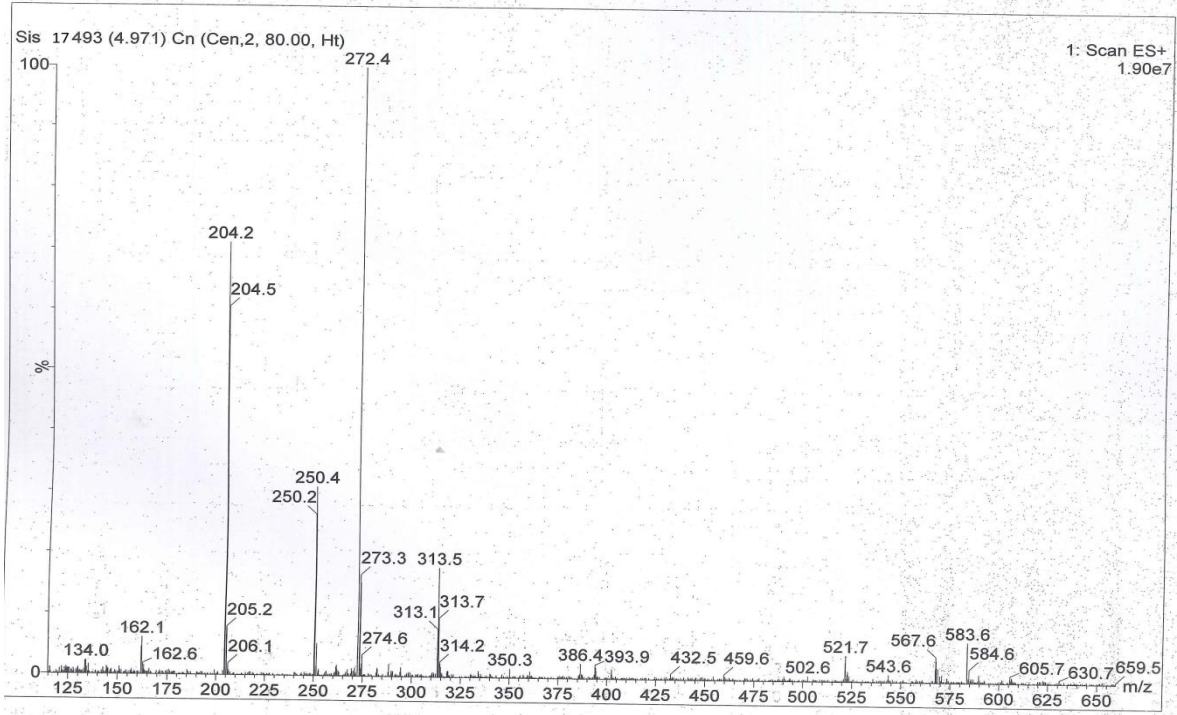
R_f Değeri: 0,65 (S₁)

Kapalı Formülü ve Molekül Ağırlığı: C₁₃H₁₅NO₄; 249,26

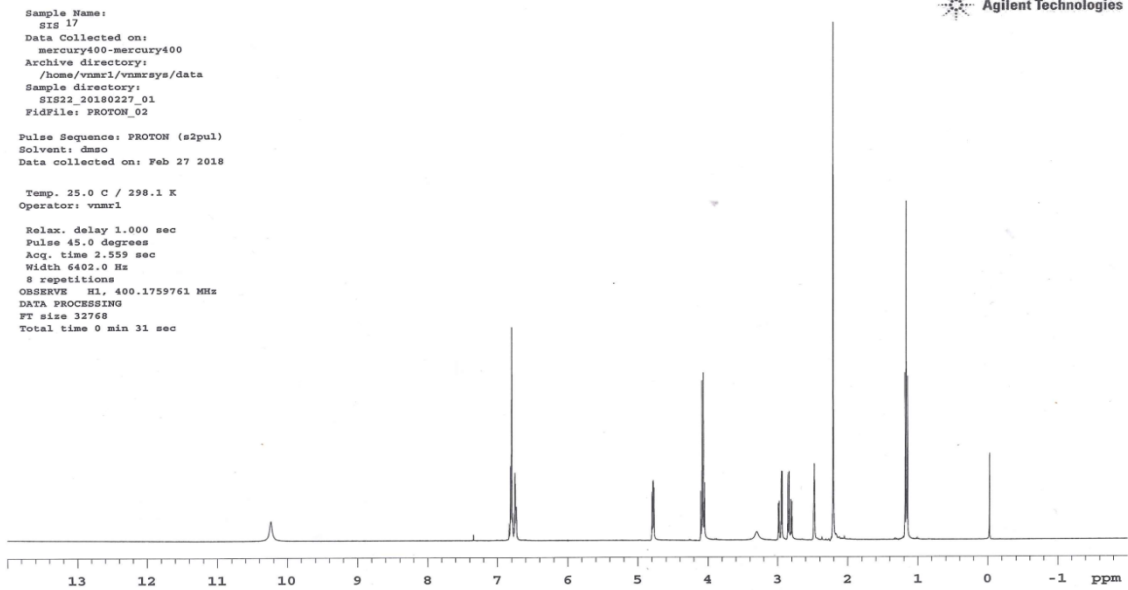
Kütle Spektrumu (ES+) m/z (%X); 272,4 (M⁺+Na) (100%)

Elementel Analiz;	%C	%H	%N
Hesaplanan :	62,64	6,06	5,61
Bulunan :	62,25	6,45	5,66

¹H-NMR Spektrumu (Int. TMS, DMSO); δ ppm; 1,16 (t, 3H, (a) -CH₃ protonu); 2,21 (s, 3H, (e) -CH₃ protonu); 2,79-2,99 (dd, 2H, (c) -CH₂- protonu, $J_o=13,2$, $J_m=7,2$); 4,06 (q, 2H, (b) -CH₂- protonu); 4,78 (dd, 1H, -CH protonu, $J_o=5,8$, $J_m=4,4$); 6,73-6,83 (m, 3H, (6,7,8) aromatik protonlar); 10,23 (s, 1H, N-H protonu)

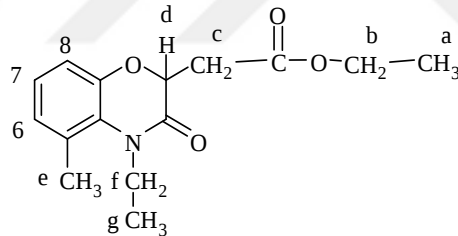


Şekil 5.62. Sis17 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu



Şekil 5.63. Sis17 Kodlu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu

5.3.18. Etil 4-etil-5-metil-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat (Sis18)



Yöntem 2’de gerçekleştirilen reaksiyonların ilk basamağında 2,21 g monoetil fumarat, 2,26 g 2-amino-3-metil-fenol, 1,97 g sodyum bikarbonat kullanıldı. Bu reaksiyon sonucunda etil-3-[(2-hidroksi-4-metil-fenil)karbamoil]akrilat elde edildi. Sentez işleminin üçüncü basamağında 2,5 g etil 3-[(2-hidroksi-6-metil-fenil)karbamoil]akrilat ve 1,91 g potasyum karbonat kullanıldı. Sentezlenen bileşik hekzan ve etil asetat solvan sistemi ile kristallendirildi. % 56 verimle 1,4 g saf bileşik elde edildi. Son basamakta etilasyon işlemi uygulanarak gerçekleştirilen reaksiyonda, 1,24 g (5 mmol) etil 3,4-dihidro-5-metil-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat, 2,07 g (15 mmol) potasyum karbonat ve 2,145 g (15 mmol) etil iyodür kullanıldı. Reaksiyon sonunda elde edilen ürün etil asetat: n-hekzan (7:1) çözücü sisteminde kolon kromatografi yöntemiyle % 23,9 verimle 0,33 g saf bileşik elde edildi.

Erime Noktası: 82-85 °C

R_f Değeri: 0,84 (S₁)

Kapalı Formülü ve Molekül Ağırlığı: C₁₅H₁₉NO₄, 277,32

Kütle Spektrumu (ES-) m/z (%X); 278,4 (M⁺+H) (90%)

Elementel Analiz;	<u>%C</u>	<u>%H</u>	<u>%N</u>
Hesaplanan :	64.96	6.9	5.05
Bulunan :	64.98	7.17	5.11

¹H-NMR Spektrumu (Int. TMS, CdCl₃); δ ppm;1,10 (t, 3H, (a) -CH₃protonu); 1,28 (t, 3H, (g) -CH₃); 2,38 (s, 3H, (e) -CH₃ protonu); 2,84 (q, 2H, (b) -CH₂ protonu); 3,76 (q, 2H, -CH₂, protonu); 4,16-4,29 (q, 2H, (f) -CH₂protonu); 4,64 (dd, 1H, -CH protonu, J_o=7,6 J_m=2); 6,87-6,97 (m, 3H, (6,7,8) aromatik protonları).

¹³C-NMR Spektrumu (Int. TMS, CdCl₃) δ ppm: 13,246; 14,161; 20,562; 35,261; 40,123; 60,888; 74,482; 114,755; 124,745; 126,719; 128,380; 128,936; 149,198; 167,891; 170,123

IR Spektrumu:3010-2922 cm⁻¹ alifatik C-H ve aromatik C-H

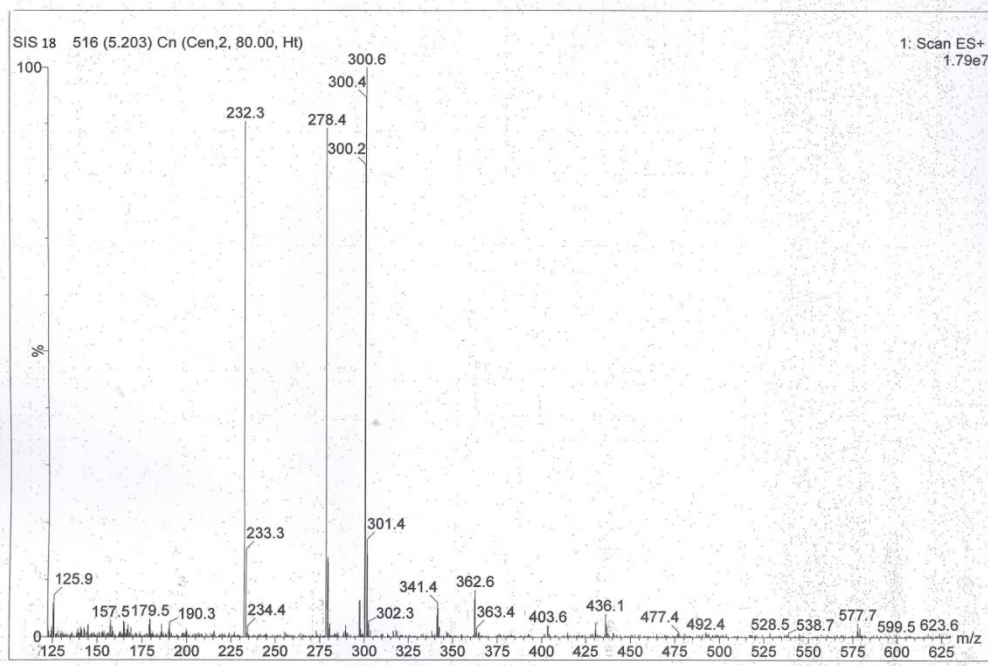
1735-1669 cm⁻¹ amid fonksiyonel grubuna ait C=O ile ester fonksiyonel grubuna ait C=O gerilimleri

1470-1420 cm⁻¹aromatik C=C gerilimi

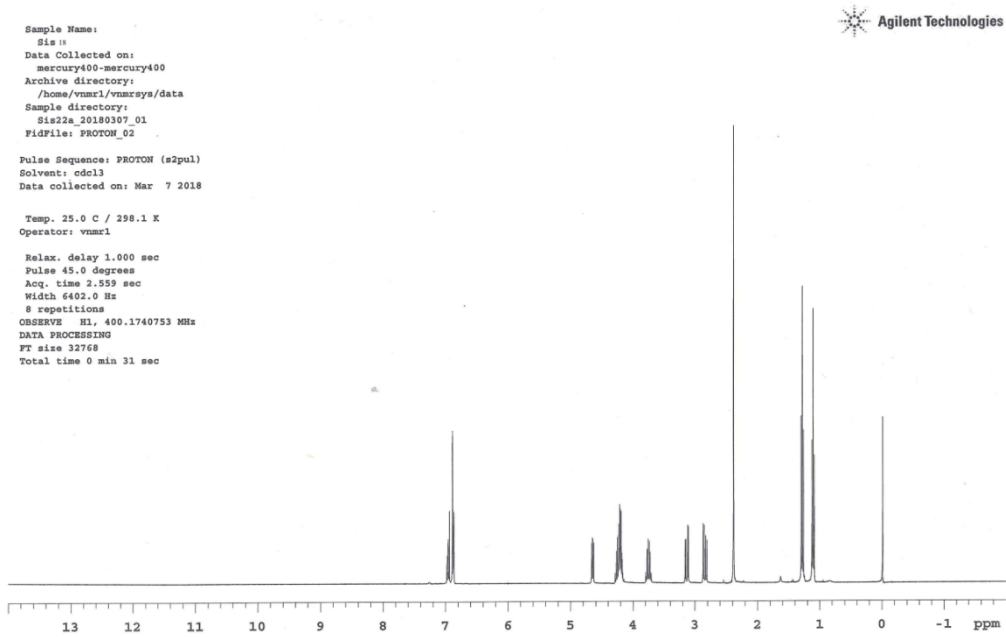
1373 cm⁻¹ C-N gerilimi

1177 cm⁻¹ C-O-C gerilimi

792 cm⁻¹ benzen halkası -C=H düzlem dışı eğilimi



Şekil 5.64. Sis18 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu



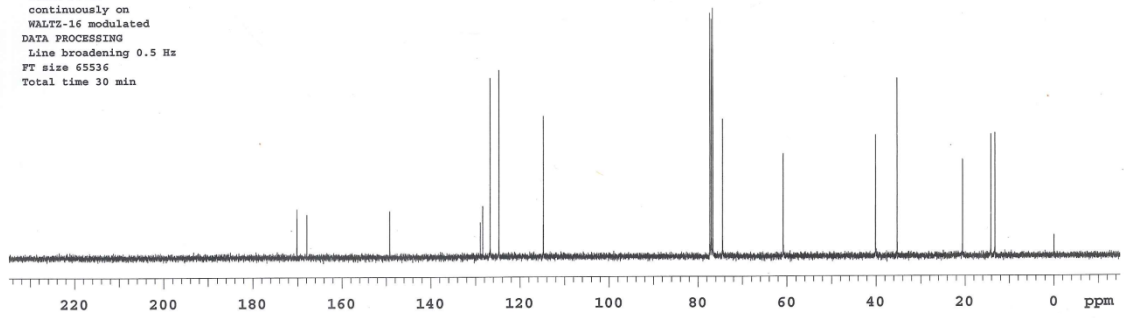
Şekil 5.65. Sis18 Kodlu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu

Sample Name:
Sis 18
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
Sis22a_20180307_01
FidFile: current

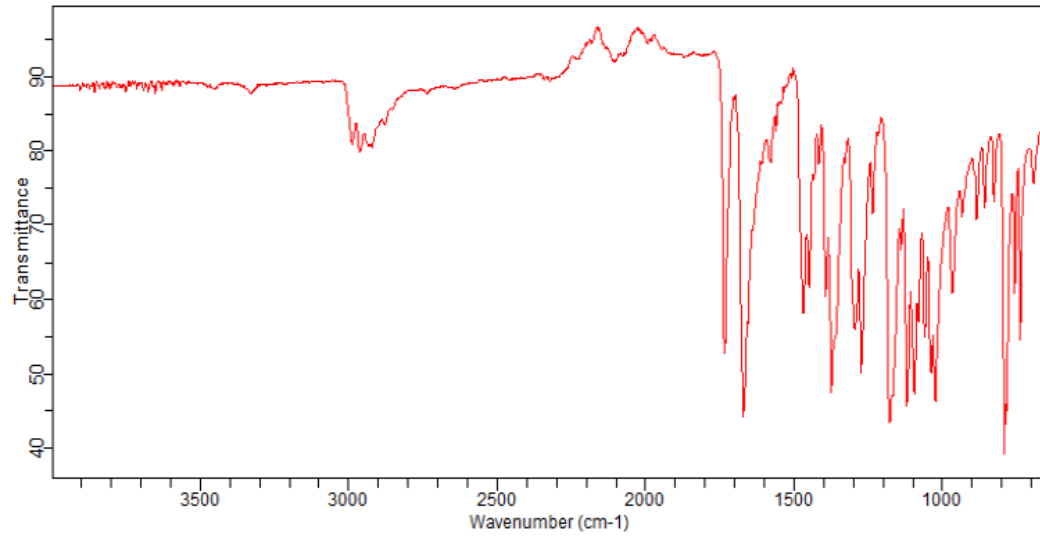
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: cdcl3
Data collected on: Mar 7 2018

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.304 sec
Width 25125.6 Hz
704 repetitions
OBSERVE C13, 100.6238513 MHz
DECOUPLE H1, 400.1760547 MHz
Power 38 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 30 min

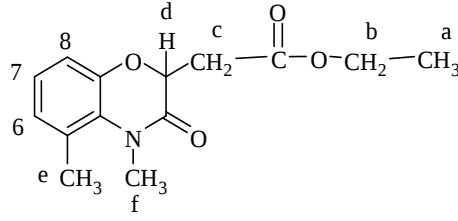


Şekil 5.66. Sis18 Kodlu bileşiğe ait ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 5.67. Sis18 Nolu bileşiğe ait IR spektrumu

5.3.19. Etil 4-metil-5-metil-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat(Sis19)



Yöntem 2’de gerçekleştirilen reaksiyonların ilk basamağında 2,21 g monoetil fumarat, 2,26 g 2-amino-3-metil-fenol, 1,97 g sodyum bikarbonat kullanıldı. Bu reaksiyon sonucunda etil-3-[(2-hidroksi-4-metil-fenil)karbamoil]akrilat elde edildi. Sentez işleminin üçüncü basamağında 2,5 g etil 3-[(2-hidroksi-6-metil-fenil)karbamoil]akrilat ve 1,91 g potasyum karbonat kullanıldı. Sentezlenen bileşik hekzan ve etil asetat solvan sistemi ile kristallendirildi. % 56 verimle 1,4 g saf bileşik elde edildi. Son basamakta metilasyon işlemi uygulanarak gerçekleştirilen reaksiyonda, 1,24 g (5 mmol) etil 3,4-dihidro-5-metil-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat, 2,07 g (15 mmol) potasyum karbonat ve 2,145 g (15 mmol) metil iyodür kullanıldı. Reaksiyon sonunda elde edilen ürün etil asetat: n-hekzan (7:1) çözücü sisteminde kolon kromatografi yöntemiyle % 28 verimle 0,35 g saf bileşik elde edildi.

Erime Noktası: 65-68 °C

R_f Değeri: 0,78 (S₁)

Kapalı Formülü ve Molekül Ağırlığı: C₁₄H₁₇NO₄; 263,29

Kütle Spektrumu (ES-) m/z (%X); 286,4 (M⁺+Na) (100%)

Elementel Analiz;	<u>%C</u>	<u>%H</u>	<u>%N</u>
Hesaplanan :	63.86	6.5	5.3
Bulunan :	63.61	6.77	5.35

¹H-NMR Spektrumu (Int. TMS, DMSO); δ ppm;1,28 (t, 3H, (a) -CH₃protonu); 2,41 (s, 3H, (f) -CH₃protonu); 2,81-2,87 (q, 2H, (b) -CH₂protonu); 3,11-3,17 (dd, 2H, (c) -CH₂, protonu $J_o=16,6$, $J_m=5,6$); 3,38 (s, 3H, (e) -CH₃protonu); 4,72 (dd, 1H, -CH, protonu $J_o=16,8$, $J_m=7,6$); 6,86-6,97 (m, 3H, (6,7,8) aromatik protonları)

^{13}C -NMR Spektrumu (Int. TMS, DMSO) δ ppm: 14,161; 20,524; 34,705; 35,322; 60,926; 74,383; 114,686; 124,699; 126,833; 127,801; 130,635; 147,979; 167,845; 170,062

IR Spektrumu: 2983-2935 cm^{-1} alifatik C-H ve aromatik C-H

1736-1673 cm^{-1} amid fonksiyonel grubuna ait C=O ile ester

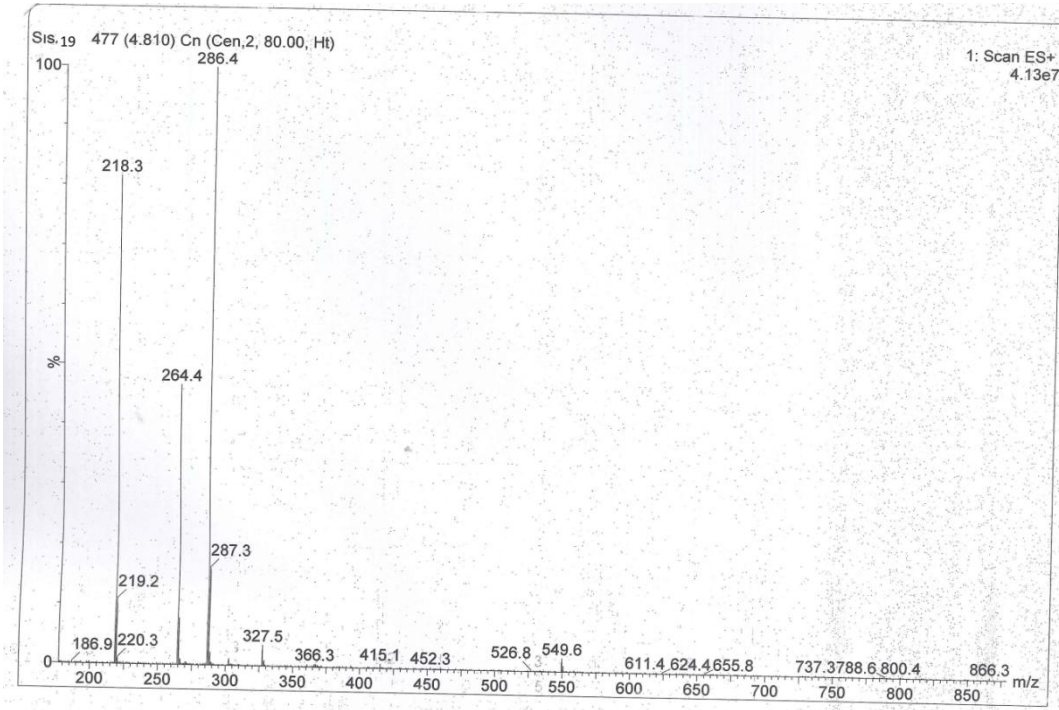
fonksiyonel grubuna ait C=O gerilimleri

1474-1366 cm^{-1} aromatik C=C gerilimi

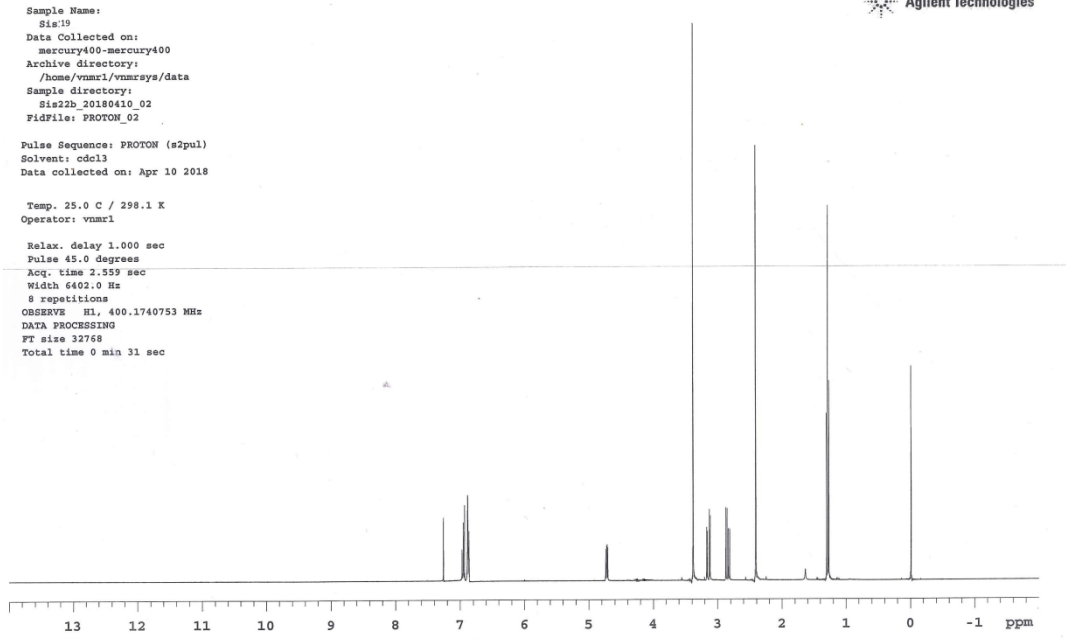
1351-1183 cm^{-1} C-N gerilimi

1114-1030 cm^{-1} C-O-C gerilimi

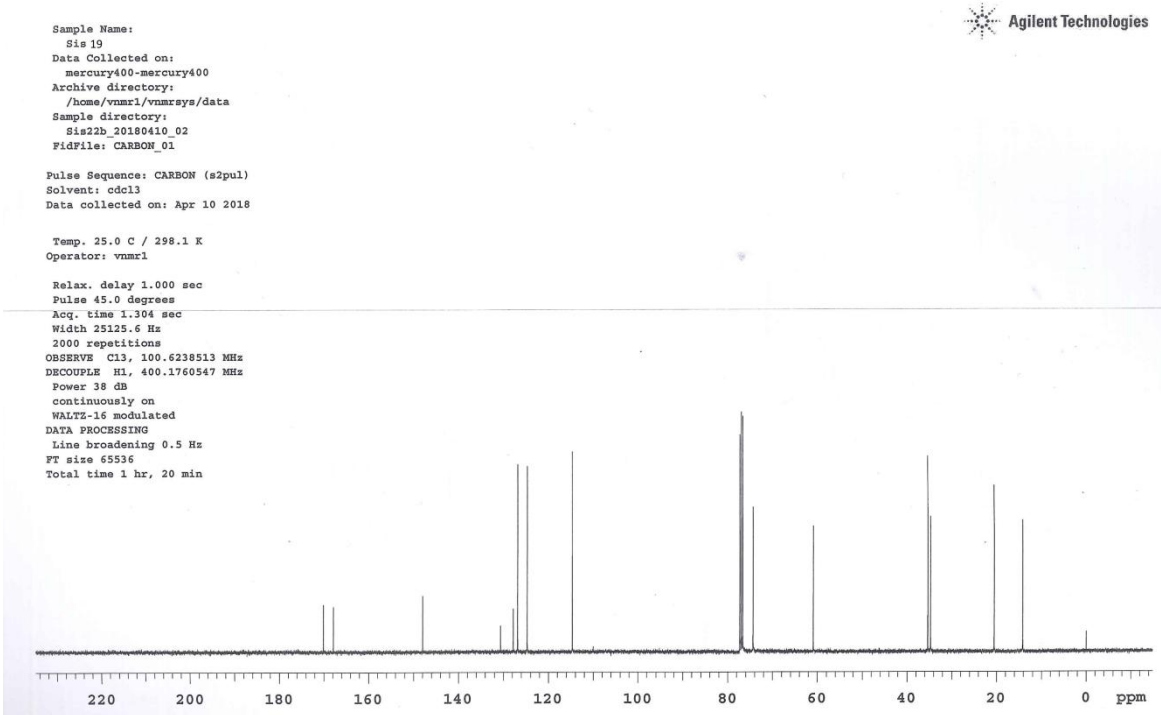
784 cm^{-1} benzen halkası -C=H düzlem dışı eğilimi



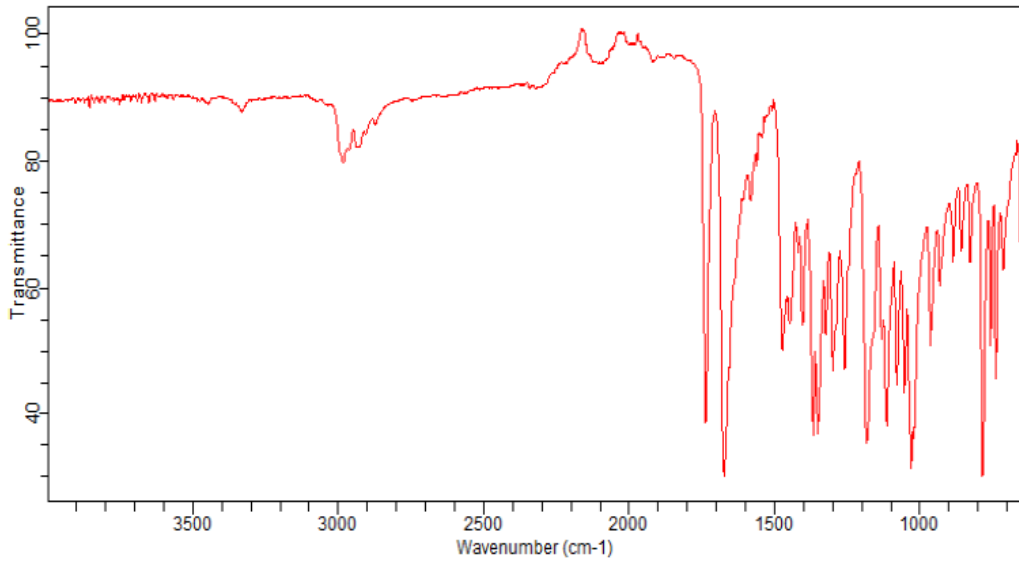
Şekil 5.68. Sis19 Kodlu bileşiğe ait kütle spektrumu



Şekil 5.69. Sis19 Kodlu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu



Şekil 5.70. Sis19 Kodlu bileşiğe ait ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 5.71. Sis19 Nolu bileşiğe ait IR spektrumu

5.4. Elde Edilen Bileşiklerin Gözlenen Mikrobiyolojik Etkileri

Sentezlenen bileşiklerin ve standart antibiyotiklerin, *E.coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ve *Candida albicans* ATCC 10231 bakterilerine karşı MİK değerleri Çizelge 5.2’ de verilmiştir.

Çizelge 5.3. Sentezlenen bileşiklerin ve standart antibiyotiklerin MİK değerleri

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Sis01	32	64	-	-	-	-	32	-	-	-
Sis02	32	-	-	-	-	-	32	-	-	-
Sis03	32	-	-	-	-	-	64	-	-	-
Sis04	64	-	-	-	-	-	64	-	-	-
Sis05	64	-	-	-	-	-	64	-	-	-
Sis06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sis07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sis08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sis09	-	-	-	-	-	-	64	-	-	-
Sis10	64	-	-	-	-	-	64	-	-	-
Sis11	-	-	-	32	-	-	64	-	-	-
Sis12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sis13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sis14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sis15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sis16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sis17	-	-	-	-	-	64	-	-	-	-
Sis18	-	-	-	-	-	64	-	-	-	-
Sis19	-	-	-	-	64	64	-	-	-	-
Gentamisin	0,25	<0,125	0,5	16	0,125	2	4	>16	-	-
Ampisilin	2	4	-	-	0,5	2	0,5	2	-	-
Seftazidim	<0,125	1	1	>16	4	>16	-	-	-	-
Meropenem	<0,03125	<0,03125	<0,03125	<0,03125	<0,03125	0,5	2	2	-	-
Siprofloksasin	<0,0156	<0,0156	0,125	<0,0156	0,125	0,125	0,25	0,25	-	-
Azitromisin	-	-	-	-	0,5	0,5	-	-	-	-
Klaritromisin	-	-	-	-	<0,0156	<0,0156	-	-	-	-
Flusitozin	-	-	-	-	-	-	-	-	<0,125	<0,125

A: *E.coli* ATCC 25922, B: *E.coli* izolat, C: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, D: *P.aeruginosa* izolat, E:

Staphylococcus aureus ATCC 29213, F: *S.aureus* izolat, G: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, H: *E.faecalis* izolat,

I: *Candida albicans* ATCC 10231, J: *Candida albicans* izolat

Acinetobacter baumannii-1 izolatu için Meropenem, Azitromisin ve Klaritromisin MİK değerleri sırasıyla; 128 µg/ml, <0,0156 µg/ml ve <0,0156 µg/ml'dir. İzolat meropeneme dirençli, azitromisin ve klaritromisine duyarlıdır.

Acinetobacter baumannii-2 izolatu için Meropenem, Azitromisin ve Klaritromisin MİK değerleri sırasıyla; 64 µg/ml, <0,0156 µg/ml ve <0,0156 µg/ml'dir. İzolat meropeneme dirençli, azitromisin ve klaritromisine duyarlıdır.

Maddelerle meropenem kombinasyonlarında her iki izolat için de, meropenem MİK değerini direnç sınırının altına düşüren bir etki görülmemiştir.



6. TARTIŞMA VE SONUÇ

İlk olarak bitkilerden izole edilen 2,4-dihidroksi-1,4-benzoksazin-3-on türevi bileşiklerde antibakteriyel etkinin saptanması ile 1,4-benzoksazin dikkati çeken bir halka sistemi olmuştur. 1985 yılında bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaya başlanan ofloksazin bileşiği yapısında 1,4-benzoksazin halka sistemini taşımaktadır. Ofloksazin bileşiği, antibakteriyel aktivitesini DNA giraz enzimini inhibe ederek göstermektedir (68).

Yeni antibakteriyel etkili bileşiklerin geliştirilmesinde bakteriyel topoizomera II enzimi oldukça önemli hedef enzimlerinden biridir. Bu enzimin alt tiplerinden biri ise DNA giraz enzimidir.

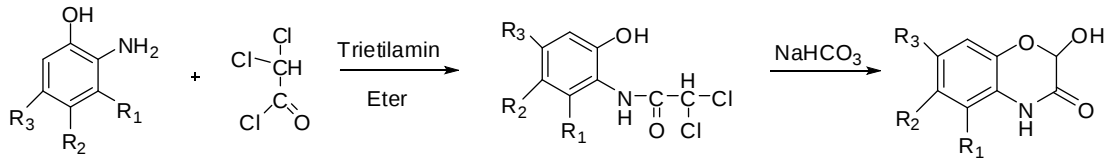
Doktora tez kapsamında DNA giraz enzimini inhibe edebileceği düşünülen bazı yeni 3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoksazin türevi bileşikler tasarlanmıştır. Tasarlanan bu bileşikler üzerinde öncelikle moleküler doking çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla protein veri bankasından içinde ligand olarak levofloksazin taşıyan 4Z2D kodlu enzim seçilmiş ve enzimin minimizasyonu yapılmıştır. Daha sonra levofloksazin molekülü ChemDraw programında çizilmiş, Accelrys Discovery Studio 3.5 programında minimize edilmiştir. Öncelikle, hazırladığımız levofloksazin molekülünün doking işlemi gerçekleştirilmiş, enzimin kristal yapısı içerisinde bulunan levofloksazin ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda RMSD değeri 1.22 olarak bulunmuştur. Bu değerin 2'nin altında olması yapılan doking çalışmasını doğrulamaktadır. Ayrıca levofloksazin molekülünün yaptığı etkileşimleri de incelenmiş ve X-ray bileşiği ile benzer etkileşimlerde edilmiştir.

Enzimin aktif yöresinde, 4Å uzaklığında DNA'nın DG1, DA2, DC4, DA5, DT15 rezidüleri ile Arg456, Gly457, Glu475, Ser81 amino asitleri yer almaktadır. Yapılan moleküler doking çalışmasına göre referans molekül olan levofloksazin X-ray bileşiğine benzer bir şekilde DNA'nın DG1, DA2, DA5, DT15 rezidüleriyle ve GLU433 amino asit ile etkileşim göstermiştir. Bunun yanı sıra enzimde bulunan Mg^{+2} iyonunun enzim aktivitesinde önemli rol oynadığı ve bileşiklerin Mg^{+2} ile olan etkileşimlerinin enzimin inhibisyonuna neden olduğu düşünülmektedir. Gerçekleştirdiğimiz doking çalışmasında levofloksazin bileşiğinde Mg^{+2} ile etkileşim göstermiştir. Daha sonra tasarladığımız 3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoksazin türevi bileşiklerin moleküler doking çalışmaları gerçekleştirilmiş ve tüm sonuçlar Çizelge 5.1'de gösterilmiştir. Bu çalışmaya göre tasarlanan tüm 3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoksazin türevi bileşiklerin CDOCKER enerjilerinin

oldukça uygun olduğu aktif bölgede DNA rezidüleri ve/veya amino asitlerle etkileşim yaptığı gözlenmiştir.

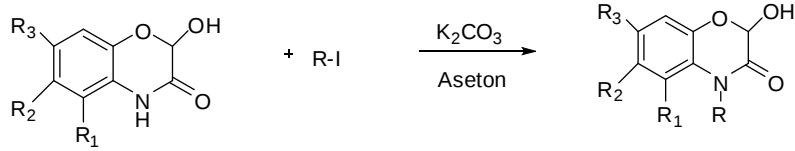
Tasarlanan bileşiklerin ilaç adayı olabilmesi için gerekli polar yüzey alanı, partiyon katsayısı, sitokrom p450 2D6 inhibisyonu, kan beyin bariyeri geçirgenliği, hepatotoksitesisi, plazma proteinlerine bağlanma, absorpsiyon ve çözünürlük seviyeleri gibi çeşitli farmakokinetik özellikleri hesaplanarak değerlendirilmiştir. Bileşiklerin hepsi 5'den düşük AlogP değeri ve 140'dan düşük polar yüzey alanına sahiptir. Bu özellikler bileşiklerin iyi bir absorpsiyona sahip olmalarını sağlamıştır.

Moleküler doking işlemine ve tahmini ADME/Tox çalışmasına göre biyolojik aktivite gösterebileceğini düşündüğümüz 19 adet 3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoksazin türevi bileşiğin sentezi gerçekleştirilmiştir. 5/6/7-süstitüe-3,4-dihidro-2-hidroksi-2*H*-1,4-benzoksazin-3-on türevlerinin (Sis01, 02, 03, 05, 06, 07) sentezi (Şekil 6.1.) için öncelikle trietil amin varlığında 3/4/5-süstitüe-2-aminofenol ile dikloroasetil klorürün reaksiyonu sonucunda 2,2-dikloro-*N*-(2-hidroksi-4/5/6-süstitüefenil)asetamid türevleri elde edilmiştir. Elde edilen 2,2-dikloro-*N*-(2-hidroksi-4/5/6-süstitüefenil)asetamid türevleri, NaHCO₃ ile reaksiyona sokularak benzoksazin halkasının kapanması sağlanmıştır. *N*-süstitüe türevlerinin (Sis04, 08, 09, 10) hazırlanması için uygun alkil iyodür ve K₂CO₃ kullanılmıştır. Etil 3,4-dihidro-5/7-süstitüe-3-okso-2*H*-1,4-benzoksazin-2-asetat türevlerinin (Sis11, Sis14, Sis17) sentezi (Şekil 6.2.) için öncelikle monoetil fumarat SOCl₂ ile etkileştirilerek açılasyonu yapılmış ardından, 3/5-süstitüe-2-aminofenol ile reaksiyonu sonucunda etil 3-[(2-hidroksi-4/6-süstitüe-fenil)karbamoil]akrilat türevleri elde edilmiştir. Bu türevlerin K₂CO₃ ile reaksiyonu sonucunda etil 3,4-dihidro-5/7-süstitüe-3-okso-2*H*-1,4-benzoksazin-2-asetat türevleri sentezlenmiştir. Bu grup bileşiklerde *N*-süstitüe türevlerinin (Sis 12, 13, 15, 16, 18, 19) hazırlanması için uygun alkil iyodür ve K₂CO₃ kullanılmıştır.



R₁: H, CH₃
R₂: H, NO₂, Cl
R₃: H, CH₃, Cl

Sis 01,02,03,05,06,07

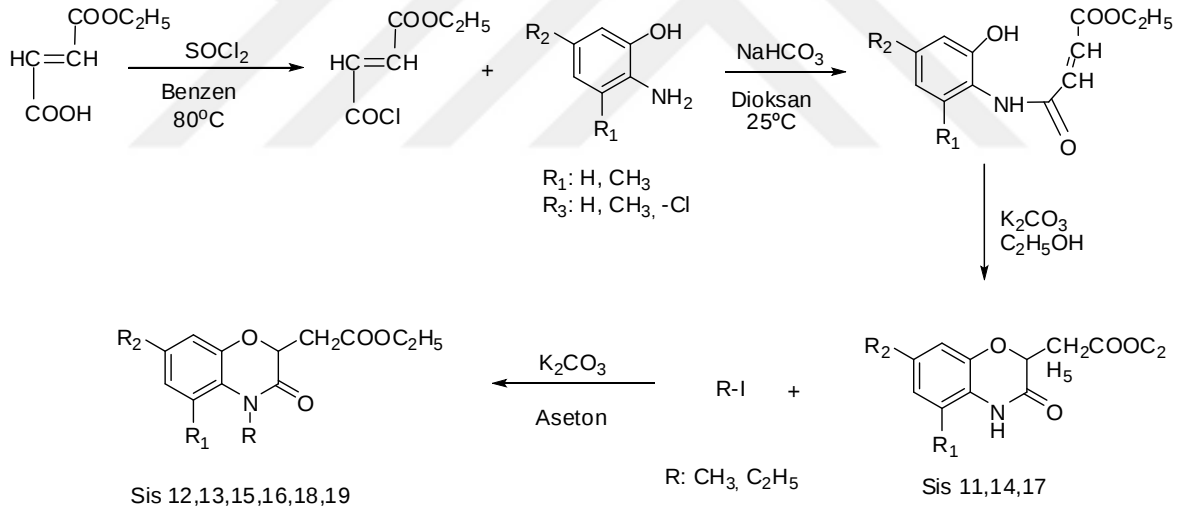


R₁: H, CH₃
R₂: H, NO₂, Cl
R₃: H, CH₃, Cl

R: CH₃, C₂H₅

Sis 04,08,09,10

Şekil 6.1. 4/5/6/7-süstitüe-3,4-dihidro-2-hidroksi-2H-1,4-benzoksazin-3-on türevlerinin (Sis01-Sis10) sentezi



Sis 12,13,15,16,18,19

R: CH₃, C₂H₅

Sis 11,14,17

Şekil 6.2. Etil 3,4-dihidro-5/7-süstitüe-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat ve etil 4/5/7-süstitüe-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat türevlerinin (Sis11-Sis19) sentezi

Elde edilen 3,4-dihidro- 2H-1,4-benzoksazin türevi bileşiklerin saflıkları ve yapı analizleri; erime noktası, ince tabaka kromatografisi (İTK) ve ¹H-NMR, ¹³C-NMR, kütle ve elementel analizleri gibi enstrümental analizlerle kanıtlanmıştır.

Sentezlenen bileşiklerin antibakteriyel aktiviteleri Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilen gram negatif bakterilerden; *E.coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve gram pozitif bakterilerden; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ve fungallerden *Candida albicans* ATCC 10231 suşları ve klinik izolatları üzerinden incelenmiştir.

E. coli ATCC 25922 suşuna karşı, Sis 01, Sis 02 ve Sis 03 bileşikler 32 µg/ml MİK değeriyle ve Sis 04, Sis 05 ve Sis 10 bileşikler ise 64 µg/ml MİK değeriyle etki göstermişlerdir. Bu sonuçlara Doking sonuçları doğrultusunda baktığımızda Sis 01, Sis 02 ve Sis 03 bileşikler düşük ve kabul edilebilir CDOCKER enerjilerine (sırasıyla 30.3028, 30.3098, 28.6652) sahiptirler. Sis 01 ve Sis 03 bileşikler DA ve DT residüleri ve GLY 457 amino asit ile H-bağı, DG, DA, DT residüleri ile Pi etkileşimi göstermişlerdir. Sis 02 bileşiği ise DT rezidüsü ile Pi bağı aracılığı ile etkileşim oluşturmuştur. Sis 04 bileşiği DA rezidüsü ile H-bağı, Sis 05 ve Sis 10 bileşikler DG, DT ve DA rezidüleriyle Pi etkileşimleri göstermişlerdir. Gerçekleştirilen moleküler doking çalışmasına göre sentezlenen diğer bileşikler DNA giraz enzimi ile uygun etkileşimler göstermesine rağmen yapılan mikrobiyolojik etki çalışmasında *E. coli* ATCC 25922 suşuna karşı etki göstermemişlerdir.

E.coli ATCC 25922 klinik izolatına karşı, sadece Sis 01 bileşiği 64 µg/ml MİK değeriyle etki göstermiştir.

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 suşuna karşı sentezlene bileşikler hiçbir etki göstermemektedirler.

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 izolatına karşı, sadece Sis 11 bileşiği 32 µg/ml MİK değeriyle etki göstermiştir. Sis 11 bileşiği düşük CDOCKER enerjiye (34.5476) sahip olup DA rezidüsü ile Pi etkileşim göstermiştir.

Gram-negatif bakterilerden *E. coli* ve *P. aeruginosa*'ya karşı DNA giraz enzim inhibitörlerinin etkili olduğu bilinmektedir (156). Tez kapsamında sentezlenen bileşiklerden *E.coli*'ye karşı Sis 01, Sis 02, Sis 03, Sis 04, Sis 05 ve Sis 10 bileşikler, *P. aeruginosa*'ya karşı ise sadece Sis 11 de düşük de olsa etki gözlenmiştir. Ancak bunların dışındaki bileşiklerde etki gözlenmemiştir. Oysaki moleküler doking çalışmalarına göre etki gözlenmesi beklenmiştir.

Staphylococcus aureus ATCC 29213 suşuna karşı, sadece Sis 19 bileşiği 64 µg/ml MİK değeriyle etki göstermiştir. Sis 19 bileşiğin Doking sonuçlarına baktığımızda, düşük CDOCKER enerjisine (34.4917) sahip olduğu ve DG rezidüsü ile H-bağı kurduğu gözlenmiştir. *S. aureus* ATCC 29213 suşuna karşı test edilen diğer bileşiklerde hiçbir etki gözlenmemiştir.

Staphylococcus aureus ATCC 29213 izolatına karşı, Sis 17, Sis 18 ve Sis 19 bileşikleri 64 µg/ml MİK değeriyle etki göstermişlerdir. Bu bileşiklerin CDOCKER enerjileri yüksek olmayıp, DG ve DT rezidüleri ile H-bağ ve Pi etkileşimleri oluşturmuşlardır. Sentezlenen diğer bileşikler *S. aureus* izolatına karşı hiçbir etki göstermemişlerdir.

Enterococcus faecalis ATCC 29212 suşuna karşı, Sis 01 ve Sis 02 bileşikleri test edilen bileşikler içinde en yüksek etkiyi 32 µg/ml MİK değeri ile etki göstermişler ancak standart ilaçlardan daha etkili bulunmamışlardır. Sis 03, Sis 04, Sis 05, Sis09, Sis 10 ve Sis 11 bileşikleri ise 64 µg/ml MİK değeriyle etki göstermişlerdir. Moleküler doking çalışmalarına göre bu bileşikler düşük CDOCKER enerjiye sahip olup Sis 11 bileşiği DA rezidüsü ile Pi etkileşimi göstermiştir. Sentezlenen diğer bileşiklerin hiçbirisi bu bakteriye karşı aktivite göstermemiştir.

Enterococcus faecalis ATCC 29212 izolatına karşı sentezlenen bileşiklerin hiçbirisi etki göstermemiştir.

Candida albicans ATCC 10231 suşuna ve izolatına karşı, sentezlenen bileşiklerde hiçbir aktivite gözlenmemiştir.

Sentezlenen bileşiklerin *Acinetobacter baumannii* bakterisinin dirençli izolatlarına karşı kombine olarak test edilerek direnç üzerine etkileri incelenmiştir. *Acinetobacter baumannii* 1 ve 2 izolatları sırasıyla 128/64 µg/ml MİK değerleriyle meropeneme dirençli, <0,0156/<0,0156 µg/ml MİK değerleriyle azitromisin ve <0,0156/<0,0156 µg/ml MİK değerleriyle klaritromisine duyarlı oldukları belirlenmiştir. Ancak maddelerin meropenem kombinasyonlarında her iki izolat için de, meropenem MİK değerini direnç sınırının altına düşüren bir etki görülmemiştir.

Doktora tez kapsamında değerlendirilen 3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoksazin türevi bileşiklerin moleküler doking çalışmalarında elde edilen sonuçlar ile *in vitro* ortamda gerçekleştirilen antibakteriyel etkileri arasında tam olarak paralel bir ilişkilendirme yapılamamıştır. Bu

ilişkilendirmenin yapılamamasının nedenleri ile ileriye dönük araştırmalarda göz önüne alınması gereken noktalar aşağıda verilmektedir:

- 3,4-Dihidro-2*H*-1,4-benzoksazin bileşiklerinin ikinci konumunda yer alan “C” atomu asimetrik özelliğe sahiptir. Sentezleri gerçekleştirilen bileşikler rasemiktir. Moleküler doking çalışmaları rasemik bileşikler için uygun değildir. Mutlaka molekülün belli bir konfigürasyonunun kullanılması gerekmektedir. 2003 yılında yapılan DFT analizine göre (157) bu grup bileşiklerde “S” konfigürasyonunun daha düşük enerjiye sahip olduğu ortaya konmuştur. Bu nedenle doktora tez kapsamında moleküler doking çalışmalarında bileşiklerin “S” konfigürasyonları değerlendirilmiştir. Bileşiklerin “R” konfigürasyonlarında DNA giraz enzimi ile etkileşmelerinin incelenmesinin gerekli olduğu görülmüştür.
- Ortaya çıkan saptamalardan bir diğeri moleküler doking çalışmalarında DNA giraz enzimi ile en iyi etkileşimi gösteren bileşiklerde daha gerçeğe yakın etkileşimleri ortaya koymak üzere moleküler dinamik çalışmalarının yapılmasının gerekli olduğu düşünülmektedir.
- Moleküler doking çalışmalarında reseptördeki aktif bölge değiştirilebilir.
- *In vitro* antimikrobiyal etki çalışmalarında bileşiklerin suda yeterince çözünmemesinden dolayı beklenen mikrobiyolojik aktivite gözlenememiş olabilir. Bu nedenle bileşiklerin tuzlarının sentezlenmesi ileri çalışmalar olarak düşünülmektedir.
- Tez kapsamında sentezlenen bileşikler rasemiktir. Bundan sonraki çalışmalarda “R” ve “S” konfigürasyonlarının ayrı ayrı sentezlenmesi ön görülmektedir.

Bu tez çalışmasında moleküler modelleme yöntemiyle tasarlanan ve bakteriyel DNA giraz enzim inhibisyonu ile antibakteriyel aktivite göstereceğini düşündüğümüz 19 adet 3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoksazin türevi bileşiğin sentezi ve antimikrobiyal aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Gerçekleştirilen moleküler doking çalışmaları sonucunda tasarlanan 3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoksazin bileşiklerinin DNA giraz enzimi üzerinde etkili olduğu görülmüş ancak *in vitro* mikrobiyolojik aktivite sonuçlarının beklenenden çok farklı olduğu gözlenmiştir. İleriye dönük olarak antimikrobiyel etkinliği daha iyi olabilecek 3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoksazin türevi bileşiklere ulaşmak için yukarıda belirtilen saptamalar doğrultusunda çalışmaların yapılması ön görülmektedir.



KAYNAKLAR

1. Saltoğlu N. Antibiyotiklere Direnç Problemi. *Klinik dergisi*. 2005;18(1):178-81.
2. Kurumu TivTC. Akılcı İlaç Kullanımı 2018.
3. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases*. 2009;48(1):1-12.
4. Alanis AJ. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Archives of medical research*. 2005;36(6):697-705.
5. Yoneyama H, Katsumata R. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2006;70(5):1060-75.
6. We F. The Global Risks Report 2016. Switzerland: 2016.
7. Walker D, Fowler T. Annual Report of the Chief Medical Officer 2011.
8. Hampton T. Report reveals scope of US antibiotic resistance threat. *Jama*. 2013;310(16):1661-3.
9. WHO. Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance France: 2014.
10. Dizbay M, Tunccan OG, Sezer BE, Hizel K. Nosocomial imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: epidemiology and risk factors. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 2010;42(10):741-6.
11. Gülay Z. Hücre duvar sentezini etkileyen antibakteriyeller. *Ankem Derg*. 2003;17(3):192-204.
12. Akkan AG. Antibiyotiklerin Sınıflandırılmaları. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. 1997:53-62.
13. Yorgancıgil B. BETA-LAKTAM ANTİBİYOTİKLERE KARŞI OLUŞAN DİRENÇ MEKANİZMALARI. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*. 1999;6(2).
14. Abbasoğlu U, Çevikbaş A. Farmasötik Mikrobiyoloji. Ankara: Efil Yayınevi. 2011.
15. Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical microbiology reviews*. 1999;12(4):501-17.
16. Öztürk R. Antibiyotiklerin etki mekanizmaları, antimikrobik ilaçlara karşı direnç gelişmesi ve günümüzde direnç durumu. Ü Cerrahpaşa tıp fakültesi sürekli tıp eğitimi etkinlikleri, pratikte antibiyotik kullanımı sempozyumu,(2-3 Mayıs 1997). 1997:27-51.
17. Connell SR, Tracz DM, Nierhaus KH, Taylor DE. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003;47(12):3675-81.
18. Durante-Mangoni E, Grammatikos A, Utili R, Falagas ME. Do we still need the aminoglycosides? *International journal of antimicrobial agents*. 2009;33(3):201-5.
19. De Clercq E. Antivirals and antiviral strategies. *Nature Reviews Microbiology*. 2004;2(9):704.
20. Mital A. Synthetic Nitroimidazoles: Biological Activities and Mutagenicity Relationships. *Scientia pharmaceutica*. 2009;77(3).
21. Yamazhan T. Sulfonamidler ve Aminoglikozidler. *Ankem Derg*. 2007;21:52-6.
22. Rengarajan J, Sasseti CM, Naroditskaya V, Sloutsky A, Bloom BR, Rubin EJ. The folate pathway is a target for resistance to the drug para-aminosalicylic acid (PAS) in mycobacteria. *Molecular microbiology*. 2004;53(1):275-82.
23. Yendapally R, Lee RE. Design, synthesis, and evaluation of novel ethambutol analogues. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2008;18(5):1607-11.
24. Yüce A. Antimikrobik İlaçlara Direnç Kazanma Mekanizmaları. *Klinik Dergisi*. 2001;14(2):41-6.
25. Öztürk R. Antibiyotik kullanımı ve erişkinde toplumda edinilmiş enfeksiyonlar. İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Sempozyum Dizisi. 2002;31:83-100.

26. Kuyucu N. Antibiyotik Direnci. Çocuk; 2007.
27. Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature medicine*. 2004;10(12s):S122.
28. Silva J. Mechanisms of antibiotic resistance. *Current therapeutic research*. 1996;57(13):30-5.
29. Lambert PA. Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Advanced drug delivery reviews*. 2005;57(10):1471-85.
30. Wright GD. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced drug delivery reviews*. 2005;57(10):1451-70.
31. Džidić S, Šušković J, Kos B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technology & Biotechnology*. 2008;46(1).
32. Marquez B. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie*. 2005;87(12):1137-47.
33. Van Bambeke F, Balzi E, Tulkens PM. Antibiotic efflux pumps. *Biochemical pharmacology*. 2000;60(4):457-70.
34. Bal Ç. Toplum Kökenli İnfeksiyonlarda Gram Negatif Çomak Direnci. *Ankem Derg*. 2006;20(ek2). Epub 281.
35. Pao SS, Paulsen IT, Saier MH. Major facilitator superfamily. *Microbiology and molecular biology reviews*. 1998;62(1):1-34.
36. Malléa M, Mahamoud A, Chevalier J, Alibert-Franco S, Brouant P, Barbe J, et al. Alkylaminoquinolines inhibit the bacterial antibiotic efflux pump in multidrug-resistant clinical isolates. *Biochemical Journal*. 2003;376(3):801-5.
37. Chung Y, Saier JM. SMR-type multidrug resistance pumps. *Current opinion in drug discovery & development*. 2001;4(2):237-45.
38. Brown MH, Paulsen IT, Skurray RA. The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Molecular microbiology*. 1999;31(1):394-5.
39. Poole K, Lomovskaya O. Can efflux inhibitors really counter resistance? *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*. 2006;3(2):145-52.
40. Mahamoud A, Chevalier J, Alibert-Franco S, Kern WV, Pagès J-M. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007;59(6):1223-9.
41. Fluit AC, Florijn A, Verhoef J, Milatovic D. Presence of tetracycline resistance determinants and susceptibility to tigecycline and minocycline. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49(4):1636-8.
42. Pfizer. Pfizer for Professionals, Tygacyl Home 2012 [08.03.2012]. Available from: <http://www.pfizerpro.com/hcp/tygacyl>.
43. INC WL. Minocycline hydrochloride 2008 [10.11.2011]. Available from: http://pi.watson.com/data_stream.asp.
44. Bryskier A. Ketolides—telithromycin, an example of a new class of antibacterial agents. *Clinical Microbiology and Infection*. 2000;6(12):661-9.
45. PHARMACEUTICALS A. KETEK™ (telithromycin), . Briefing Document for the FDA Anti-Infective Drug Products Advisory Committee Meeting; Bridgewater, NJ, USA.2001.
46. Garcia I, Pascual A, Ballesta S, del Castillo C, Perea E. Accumulation and activity of cethromycin (ABT-773) within human polymorphonuclear leucocytes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003;52(1):24-8.
47. Lomovskaya O, Bostian KA. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic—a vision for applied use. *Biochemical pharmacology*. 2006;71(7):910-8.
48. Maxwell A, Lawson DM. The ATP-binding site of type II topoisomerases as a target for antibacterial drugs. *Current topics in medicinal chemistry*. 2003;3(3):283-303.
49. Hande KR. Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*. 1998;1400(1-3):173-84.

50. Wang JC. Interaction between DNA and an Escherichia coli protein ω . *Journal of molecular biology*. 1971;55(3):523-IN16.
51. Gellert M, Mizuuchi K, O'Dea MH, Nash HA. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1976;73(11):3872-6.
52. Nitiss JL. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nature Reviews Cancer*. 2009;9(5):327.
53. Buhler C, Lebbink JH, Bocs C, Ladenstein R, Forterre P. DNA topoisomerase VI generates ATP-dependent double-strand breaks with two-nucleotide overhangs. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(40):37215-22.
54. J Perez J, S Lupala C, Gomez-Gutierrez P. Designing type II topoisomerase inhibitors: a molecular modeling approach. *Current topics in medicinal chemistry*. 2014;14(1):40-50.
55. Aravind L, Leipe DD, Koonin EV. Toprim—a conserved catalytic domain in type IA and II topoisomerases, DnaG-type primases, OLD family nucleases and RecR proteins. *Nucleic acids research*. 1998;26(18):4205-13.
56. Dutta R, Inouye M. GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends in biochemical sciences*. 2000;25(1):24-8.
57. Harami GM, Gyimesi M, Kovács M. From keys to bulldozers: expanding roles for winged helix domains in nucleic-acid-binding proteins. *Trends in biochemical sciences*. 2013;38(7):364-71.
58. Roca J, Berger JM, Harrison SC, Wang JC. DNA transport by a type II topoisomerase: direct evidence for a two-gate mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(9):4057-62.
59. Bax BD, Chan PF, Eggleston DS, Fosberry A, Gentry DR, Gorrec F, et al. Type IIA topoisomerase inhibition by a new class of antibacterial agents. *Nature*. 2010;466(7309):935.
60. Heddle JG, Mittelheiser S, Maxwell A, Thomson NH. Nucleotide binding to DNA gyrase causes loss of DNA wrap. *Journal of molecular biology*. 2004;337(3):597-610.
61. Collin F, Karkare S, Maxwell A. Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011;92(3):479-97.
62. Bates AD, Maxwell A. Energy coupling in type II topoisomerases: why do they hydrolyze ATP? *Biochemistry*. 2007;46(27):7929-41.
63. Oppegard LM, Schwanz HA, Towle TR, Kerns RJ, Hiasa H. Fluoroquinolones stimulate the DNA cleavage activity of topoisomerase IV by promoting the binding of Mg²⁺ to the second metal binding site. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2016;1860(3):569-75.
64. Schmidt BH, Burgin AB, Deweese JE, Osheroff N, Berger JM. A novel and unified two-metal mechanism for DNA cleavage by type II and IA topoisomerases. *Nature*. 2010;465(7298):641.
65. Pitts SL, Liou GF, Mitchenall LA, Burgin AB, Maxwell A, Neuman KC, et al. Use of divalent metal ions in the DNA cleavage reaction of topoisomerase IV. *Nucleic acids research*. 2011;39(11):4808-17.
66. Vos SM, Tretter EM, Schmidt BH, Berger JM. All tangled up: how cells direct, manage and exploit topoisomerase function. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2011;12(12):827.
67. East SP, Silver LL. Multitarget ligands in antibacterial research: progress and opportunities. *Expert opinion on drug discovery*. 2013;8(2):143-56.
68. Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and molecular biology reviews*. 1997;61(3):377-92.
69. Emmerson A, Jones A. The quinolones: decades of development and use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003;51(suppl_1):13-20.
70. Mitscher LA. Bacterial topoisomerase inhibitors: quinolone and pyridone antibacterial agents. *Chemical reviews*. 2005;105(2):559-92.
71. Pucci MJ, Wiles JA. Bacterial topoisomerase inhibitors: quinolones and beyond. *Antimicrobials*: Springer; 2014. p. 307-26.
72. Sanyal G, Doig P. Bacterial DNA replication enzymes as targets for antibacterial drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*. 2012;7(4):327-39.

73. Laponogov I, Sohi MK, Veselkov DA, Pan X-S, Sawhney R, Thompson AW, et al. Structural insight into the quinolone–DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2009;16(6):667.
74. Laponogov I, Pan X-S, Veselkov DA, McAuley KE, Fisher LM, Sanderson MR. Structural basis of gate-DNA breakage and resealing by type II topoisomerases. *Plos one*. 2010;5(6):e11338.
75. Wohlkonig A, Chan PF, Fosberry AP, Homes P, Huang J, Kranz M, et al. Structural basis of quinolone inhibition of type IIA topoisomerases and target-mediated resistance. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2010;17(99):1152.
76. Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJ. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in microbiology*. 2014;22(8):438-45.
77. Wiles JA, Bradbury BJ, Pucci MJ. New quinolone antibiotics: a survey of the literature from 2005 to 2010. *Expert opinion on therapeutic patents*. 2010;20(10):1295-319.
78. Haas W, Pillar CM, Zurenko GE, Lee JC, Brunner LS, Morris TW. Besifloxacin, a novel fluoroquinolone, has broad-spectrum in vitro activity against aerobic and anaerobic bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(8):3552-60. doi: 10.1128/AAC.00418-09. PubMed PMID: 19506065; PubMed Central PMCID: PMC2715578.
79. McKeage K. Finafloxacin: first global approval. *Drugs*. 2015;75(6):687-93. doi: 10.1007/s40265-015-0384-z. PubMed PMID: 25808831.
80. Poole RM. Nemonoxacin: first global approval. *Drugs*. 2014;74(12):1445-53. doi: 10.1007/s40265-014-0270-0. PubMed PMID: 25079302.
81. Bassetti M, Della Siega P, Pecori D, Scarparo C, Righi E. Delafloxacin for the treatment of respiratory and skin infections. *Expert Opin Investig Drugs*. 2015;24(3):433-42. doi: 10.1517/13543784.2015.1005205. PubMed PMID: 25604710.
82. Rhee CK, Chang JH, Choi EG, Kim HK, Kwon YS, Kyung SY, et al. Zabofloxacin versus moxifloxacin in patients with COPD exacerbation: a multicenter, double-blind, double-dummy, randomized, controlled, Phase III, non-inferiority trial. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2015;10:2265-75. doi: 10.2147/COPD.S90948. PubMed PMID: 26543359; PubMed Central PMCID: PMC4622522.
83. Covington PS, Davenport JM, Andrae DA, Stryjewski ME, Turner LL, McIntyre G, et al. A Phase 2 study of the novel fluoroquinolone JNJ-Q2 in community-acquired bacterial pneumonia. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(11):2691-3. doi: 10.1093/jac/dkt217. PubMed PMID: 23749951; PubMed Central PMCID: PMC3797640.
84. Holdgate GA, Tunnicliffe A, Ward WH, Weston SA, Rosenbrock G, Barth PT, et al. The entropic penalty of ordered water accounts for weaker binding of the antibiotic novobiocin to a resistant mutant of DNA gyrase: a thermodynamic and crystallographic study. *Biochemistry*. 1997;36(32):9663-73.
85. Tsai FT, Singh OM, Skarzynski T, Wonacott AJ, Weston S, Tucker A, et al. The high-resolution crystal structure of a 24-kDa gyrase B fragment from *E. coli* complexed with one of the most potent coumarin inhibitors, clorobiocin. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 1997;28(1):41-52.
86. Virtanen A. Some aspects of factors in the maize plant with toxic effects on insect larvae1961.
87. Niemeyer HM, Pesel E, Franke S, Francke W. Ingestion of the benzoxazinone DIMBOA from wheat plants by aphids. *Phytochemistry*. 1989;28(9):2307-10.
88. Barria BN, Copaja SV, Niemeyer HM. Occurrence of diboa in wild *Hordeum* species and its relation to aphid resistance. *Phytochemistry*. 1992;31(1):89-91.
89. Hayakawa I, Atarashi S, Yokohama S, Imamura M, Sakano K-I, Furukawa M. Synthesis and antibacterial activities of optically active ofloxacin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1986;29(1):163-4.

90. Raghava Raju K, Rao P. Chemistry of lichen products: part V—Synthesis and antimicrobial activity of some new 1, 4-benzimidazones from pulvinic acid dilactone. *Indian Journal of Chemistry*. 1986;25:94-6.
91. Hogale M, Nikam B. Synthesis Of Some 2 (H), 4 (H)-1, 2, 4-Triazino [3, 4-C]-1, 4-Benzoxazin-5-Ones.: *Indian Chemical Soc* 92 Acharya Prafulla Chandra Rd Attn: Dr Indrajit Kar/Exec Sec, Calcutta 700009, India; 1988. p. 735-7.
92. HOGALE M, MULIK A, NIKAM B. Synthesis of Some New 4-Hydrazido-1, 4-benzoxazin-3 (2H)-ones and Their Triazolo Derivatives as Possible Antibacterial Agents. *ChemInform*. 1992;23(7):no-no.
93. Bravo HR, Lazo W. Antimicrobial activity of cereal hydroxamic acids and related compounds. *Phytochemistry*. 1993;33(3):569-71.
94. Özden S, Oeztuerk AM, Göker H, Altanlar N. Synthesis and antimicrobial activity of some new 4-hydroxy-2H-1, 4-benzoxazin-3 (4H)-ones. *Il Farmaco*. 2000;55(11-12):715-8.
95. Sastry CR, Rao KS, Krishnan V, Rastogi K, Jain M, Narayan G. Synthesis And Biological-Activity Of Some Novel 2h, 7h-[1, 4] Thiazino [2, 3-G]-1, 4-Benzoxazine-3, 8 (4h, 9h)-Diones And 7, 8-Dihydro-2H-[1, 5] Thiazepino [2, 3-G]-1, 4-Benzoxazine-3, 9 (4h, 10h)-Diones. *Indian Journal Of Chemistry Section B-Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry*. 1989;28(1):48-51.
96. Hogale M, Mulik A, Nikam B. Synthesis of Some New 4-Hydrazido-1, 4-benzoxazin-3 (2H)-ones and Their Triazolo Derivatives as Possible Antibacterial Agents. *ChemInform*. 1992;23(7).
97. Özden S, Öztürk AM, Göker H, Altanlar N. Synthesis and antimicrobial activity of some new 4-hydroxy-2H-1, 4-benzoxazin-3 (4H)-ones. *Il Farmaco*. 2000;55(11):715-8.
98. Yalcin I, Tekiner BP, Oren IY, Arpacı OT, Aki-Sener E, Altanlar N. Synthesis and antimicrobial activity of some novel 2, 6, 7-trisubstituted-2H-3, 4-dihydro-1, 4-benzoxazin-3-one derivatives. 2003.
99. Alper-Hayta S, Aki-Sener E, Tekiner-Gulbas B, Yıldız I, Temiz-Arpacı O, Yalcin I, et al. Synthesis, antimicrobial activity and QSARs of new benzoxazine-3-ones. *European journal of medicinal chemistry*. 2006;41(12):1398-404.
100. Gein V, Rassudikhina N, Voronina E. Synthesis and antibacterial activity of 6-ethylsulfonyl-3-acylmethylene-1, 4-benzoxazin-2-ones. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2006;40(10):554-6.
101. Li X, Liu N, Zhang H, Knudson SE, Slayden RA, Tonge PJ. Synthesis and SAR studies of 1, 4-benzoxazine MenB inhibitors: Novel antibacterial agents against *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2010;20(21):6306-9.
102. Geng B, Comita-Prevoir J, Eyermann CJ, Reck F, Fisher S. Exploring Left-Hand-Side substitutions in the benzoxazinone series of 4-amino-piperidine bacterial type IIa topoisomerase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2011;21(18):5432-5.
103. Pamerla M, Reddy DRS, Rao BS, Bodipati N, Murthy Y. Antimicrobial evaluation of 1, 4-benzoxazine derivatives. *Medicinal Chemistry Research*. 2015;24(2):611-5.
104. Konda S, Raparathi S, Bhaskar K, Munaganti RK, Guguloth V, Nagarapu L, et al. Synthesis and antimicrobial activity of novel benzoxazine sulfonamide derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2015;25(7):1643-6.
105. Virtanen A. Precursors of benzoxazolidone in rye plants. I. Precursor II, the aglucone. *Acta chem scand*. 1960;14:499-502.
106. Kuroita T, Marubayashi N, Sano M, KANZAKI K, INABA K, KAWAKITA T. Benzoxazines. II. Synthesis, Conformational Analysis, and Structure-Activity Relationships of 3, 4-Dihydro-2H-1, 4-benzoxazine-8-carboxamide Derivatives as Potent and Long-Acting Serotonin-3 (5-HT₃) Receptor Antagonists. *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 1996;44(11):2051-60.
107. MATSUMOTO Y, TSUZUKI R, MATSUHISA A, TAKAYAMA K, YODEN T, UCHIDA W, et al. Novel potassium channel activators: Synthesis and structure-activity relationship studies of 3, 4-dihydro-2H-1, 4-benzoxazine derivatives. *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 1996;44(1):103-14.

108. Caliendo G, Perissutti E, Santagada V, Fiorino F, Severino B, Cirillo D, et al. Synthesis by microwave irradiation of a substituted benzoxazine parallel library with preferential relaxant activity for guinea pig trachealis. *European journal of medicinal chemistry*. 2004;39(10):815-26.
109. Belliotti TR, Wustrow DJ, Brink WA, Zoski KT, Shih Y-H, Whetzel SZ, et al. A series of 6-and 7-piperazinyl-and-piperidinylmethylbenzoxazinones with dopamine D4 antagonist activity: discovery of a potential atypical antipsychotic agent. *Journal of medicinal chemistry*. 1999;42(25):5181-7.
110. Huang W, Zhang P, Zuckett JF, Wang L, Woolfrey J, Song Y, et al. Design, synthesis and structure–activity relationships of benzoxazinone-based factor Xa inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2003;13(3):561-6.
111. Vianello P, Bandiera T. Substituted benzoxazines as integrin antagonists. Google Patents; 2004.
112. Mayer S, Arrault A, Guillaumet G, Mérour JY. Attempted synthesis of ethyl 3, 4-dihydro-2H-1, 4-benzoxazine-3-carboxylate and 3-acetate derivatives. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 2001;38(1):221-5.
113. Lee CL, Chan KP, Lam Y, Lee SY. Solid-phase combinatorial synthesis of 1, 4-benzoxazin-3 (4H)-one and 1, 4-benzothiazin-3 (4H)-one derivatives. *Tetrahedron Letters*. 2001;42(6):1167-9.
114. Rybczynski PJ, Zeck RE, Combs DW, Turchi I, Burris TP, Xu JZ, et al. Benzoxazinones as PPAR γ agonists. part 1: SAR of three aromatic regions. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2003;13(14):2359-62.
115. Rybczynski PJ, Zeck RE, Dudash J, Combs DW, Burris TP, Yang M, et al. Benzoxazinones as PPAR γ agonists. 2. SAR of the amide substituent and in vivo results in a type 2 diabetes model. *Journal of medicinal chemistry*. 2004;47(1):196-209.
116. Zhao S-H, Berger J, Clark RD, Sethofer SG, Krauss NE, Brothers JM, et al. 3, 4-Dihydro-2H-benzo [1, 4] oxazine derivatives as 5-HT $_6$ receptor antagonists. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2007;17(12):3504-7.
117. Wu P, Hu Y. Synthesis of novel 1, 4-benzoxazine-2, 3-dicarboximides from maleic anhydride and substituted aromatic amines. *Synthetic Communications*[®]. 2008;39(1):70-84.
118. Bodipati N, Peddinti RK. Chemical generation of o-quinone monoimines for the rapid construction of 1, 4-benzoxazine derivatives. *Organic & biomolecular chemistry*. 2012;10(10):1958-61.
119. Cohen NC. Guidebook on molecular modeling in drug design: Elsevier; 1996.
120. Young DC. Computational drug design: a guide for computational and medicinal chemists: John Wiley & Sons; 2009.
121. Aki-Şener E, Yalçın İ. Farmasötik ve Medisinal Kimya'da İlaç Etken Madde Tasarım Yöntemleri-1. Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri Analizleri (QSAR), Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları. 2003(86):40-181.
122. Schneider G, Böhm H-J. Virtual screening and fast automated docking methods. *Drug discovery today*. 2002;7(1):64-70.
123. Waszkowycz B. Structure-based approaches to drug design and virtual screening. *Current opinion in drug discovery & development*. 2002;5(3):407-13.
124. Toledo-Sherman L, Chen D. High-throughput virtual screening for drug discovery in parallel. *Current opinion in drug discovery & development*. 2002;5(3):414-21.
125. Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature reviews Drug discovery*. 2004;3(11):935.
126. Chikhi A, Bensegueni A. Comparative study of the efficiency of three protein-ligand docking programs. *Journal of Proteomics and Bioinformatics*. 2008;1:161-5.
127. Jain AN. Surflex-Dock 2.1: robust performance from ligand energetic modeling, ring flexibility, and knowledge-based search. *Journal of computer-aided molecular design*. 2007;21(5):281-306.

128. Spitzer GM, Wellenzohn B, Laggner C, Langer T, Liedl KR. DNA minor groove pharmacophores describing sequence specific properties. *Journal of chemical information and modeling*. 2007;47(4):1580-9.
129. Holt PA, Chaires JB, Trent JO. Molecular docking of intercalators and groove-binders to nucleic acids using Autodock and Surflex. *Journal of chemical information and modeling*. 2008;48(8):1602-15.
130. Verkhivker GM, Bouzida D, Gehlhaar DK, Rejto PA, Arthurs S, Colson AB, et al. Deciphering common failures in molecular docking of ligand-protein complexes. *Journal of computer-aided molecular design*. 2000;14(8):731-51.
131. Stahl M, Rarey M. Detailed analysis of scoring functions for virtual screening. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2001;44(7):1035-42.
132. Brooks BR. A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of computational chemistry*. 1983;4:187-217.
133. Accelrys. Discovery Studio 3.5. 2012.
134. Wu G, Robertson DH, Brooks III CL, Vieth M. Detailed analysis of grid-based molecular docking: A case study of CDOCKER—A CHARMM-based MD docking algorithm. *Journal of computational chemistry*. 2003;24(13):1549-62.
135. AKGÜN H, BALKAN, A., ÇALIŞ, Ü., DALKARA, S., EROL, D.D., ERDOĞAN, H., ERTAN, M., KELEKÇİ, N.G., ÖZKANLI, F., PALASKA, E., SARAÇ, S., ŞAFAK, C., . *Farmasötik Kimya/ Hacettepe üniversitesi yayınları* 2013;3:3.
136. Wang J, Urban L. The impact of early ADME profiling on drug discovery and development strategy. *DDW Drug Discovery World*. 2004;5(4):73-86.
137. AKI YALÇIN E, YALÇIN, İ. *Medisinal Kimya'da İlaç Etken Madde Tasarım Yöntemleri –I-, Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri (QSAR) ankara üniversitesi*2002.
138. Brunton L, Chabner B, Knollman B. editors. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. China: McGraw-Hill companies. 2011.
139. KAYAALP O. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. Ankara: pelikan yayıncılık. 2009;12.
140. Lin JH, Lu AY. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. *Pharmacological reviews*. 1997;49(4):403-49.
141. Beckett A, Kerridge K. 4-HYDROXYBENZAZOLES: PREPARATION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1956;8(1):661-5.
142. Cossey H, Sharpe C, Stephens F. 827. Some anti-microbial compounds in the heterocyclic series. Part III. Basic ethers of the benzothiazole and benzoxazole series. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*. 1963:4322-30.
143. Daidone G, Maggio B, Schillaci D. Salicylanilide and its heterocyclic analogues. A comparative study of their antimicrobial activity. *Pharmazie*. 1990;45(6):441-2.
144. Siddiqui N, Ali R, Alam MS, Ahsan W. Pharmacological profile of benzoxazines: a short review. *J Chem Pharm Res*. 2010;2:309-16.
145. Corcuera LJ, Woodward MD, Helgeson JP, Kelman A, Upper CD. 2, 4-Dihydroxy-7-methoxy-2H-1, 4-benzoxazin-3 (4H)-one, an inhibitor from Zea mays with differential activity against soft rotting Erwinia species. *Plant physiology*. 1978;61(5):791-5.
146. Macías FA, Marín D, Oliveros-Bastidas A, Molinillo JM. Optimization of benzoxazinones as natural herbicide models by lipophilicity enhancement. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2006;54(25):9357-65.
147. Macchiarulo A, Costantino G, Fringuelli D, Vecchiarelli A, Schiaffella F, Fringuelli R. 1, 4-Benzothiazine and 1, 4-benzoxazine imidazole derivatives with antifungal activity: a docking study. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2002;10(11):3415-23.
148. Filippou PS, Koini EN, Calogeropoulou T, Kalliakmani P, Panagiotidis CA, Kyriakidis DA. Regulation of the Escherichia coli AtoSC two component system by synthetic biologically active 5; 7; 8-trimethyl-1; 4-benzoxazine analogues. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2011;19(16):5061-70.

149. Xin Q, Fan H, Guo B, He H, Gao S, Wang H, et al. Design, synthesis, and structure–activity relationship studies of highly potent novel benzoxazinyl-oxazolidinone antibacterial agents. *Journal of medicinal chemistry*. 2011;54(21):7493-502.
150. Davis R, Bryson HM. Levofloxacin. *Drugs*. 1994;47(4):677-700.
151. Matlin SA, Sammes PG, Upton RM. The oxidation of trimethylsilylated amides to hydroxamic acids. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. 1979:2481-7.
152. Atkinson J, Morand P, Arnason JT, Niemeyer HM, Bravo HR. Analogs of the cyclic hydroxamic acid 2, 4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1, 4-benzoxazin-3-one (DIMBOA): decomposition to benzoxazolinones and reaction with. beta.-mercaptoethanol. *The Journal of Organic Chemistry*. 1991;56(5):1788-800.
153. Tachibana Y, Masuda T, inventors Preparation of Aromatic Fused Heterocyclic Compounds As Histamine H4 Receptor Modulators 2011.
154. Yilmaz S, Yalcin I, Okten S, Onurdag F, Aki-Yalcin E. Synthesis and investigation of binding interactions of 1, 4-benzoxazine derivatives on topoisomerase IV in *Acinetobacter baumannii*. SAR and QSAR in Environmental Research. 2017;28(11):941-56.
155. Yalcin I, Tekiner BP, Oren IY, Arpacı OT, AKI-SENER E, Altanlar N. Synthesis and antimicrobial activity of some novel 2, 6, 7-trisubstituted-2H-3, 4-dihydro-1, 4-benzoxazin-3-one derivatives. *Indian journal of chemistry Sect B: Organic chemistry, including medical chemistry*. 2003;42(4):905-9.
156. Durcik M, Lovison D, Skok Ž, Cruz CD, Tammela P, Tomašič T, et al. New N-phenylpyrrolamide DNA gyrase B inhibitors: Optimization of efficacy and antibacterial activity. *European journal of medicinal chemistry*. 2018;154:117-32.
157. YILDIZ-ÖREN İ, TEKİNER-GÜLBAŞ, B.P. DFT Calculations of Some Antimicrobial Active 3,4-Dihydro-1,4-benzoxazin-3-one Derivatives. *J Fac Pharm Ankara*. 2003;32(3):165-73.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Sanaz Ataei

Doğum Yeri: İRAN

Doğum Tarihi: 21.09.1980

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce, Farsça

Eğitim Durumu

Lisans: Tabriz Üniversitesi, Kimya Fakültesi, İran (1998-2002)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü (2007-2010)

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar: Farmasötik ve Medisinal Kimya Derneği

Bilimsel ilgi alanları: Moleküler Modelleme, Biyoteknoloji, Medisinal Kimya

Projeler: SAN-TEZ ., proje No. 00918.STZ.2011-1).

Doktora Öncesi Yayınlar

1. **Sanaz Ataei**, Serap Yilmaz, Tugba Ertan-Bolelli, Ilkay Yildiz. “Generated 3D-Common Feature Hypotheses Using the HipHop Method For Developing New Topoisomerase I Inhibitors” Arch. Pharm. Chem. Life Sci. 2015, 348, 1–10. DOI:10.1002/ardp.201500045
2. Esin Aki-Yalcin, Tuğba Ertan-Bolelli, Tugba Taskin-Tok, Ozum Ozturk, **Sanaz Ataei**, Cigdem Ozen, Ilkay Yildiz, Ismail Yalcin, Evaluation of Inhibitory Effects of Benzothiazole and 3-Amino-benzothiazolium Derivatives on DNA Topoisomerase II by Molecular Modeling Studies, SAR and QSAR in Environmental Research, 25(8), 637-649, 2014.10.1080/1062936X.2014.923039
3. Mary, Y. S., Jojo, P. J., Panicker, C. Y., Van Alsenoy, C., **Ataei, S.**, Yıldız, I., "Theoretical investigations on the molecular structure, vibrational spectra, HOMO–LUMO and NBO analysis of 5-chloro-2-((4-chlorophenoxy)methyl)benzimidazole", Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy, 122, 499-511, (2014).

4. Mary, Y. S., Jojo, P. J., Panicker, C. Y., Van Alsenoy, C., **Ataei, S.**, Yıldız, I., "Quantum mechanical and spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, ¹H NMR and UV) investigations of 2-(phenoxyethyl)benzimidazole", *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 125, 12-24, (2014). doi:10.1016/j.saa.2014.01.068

Bildirileri

Sözlü bildirileri

1. İlkay Yıldız, Serap Yılmaz, **sanaz Ataei**, Tugba Ertan Bolelli, Kayhan Bolelli, Fatma Zilfidar, Egemen Foto "MolecularModellingStudies on Benzoxazines asAnticancerAgents" International Chemistry Biology Conference 18, 11-14 July 2018P: Sham El Sheikh-Egypt.
2. İlkay Yıldız, **Sanaz Ataei**, Serap Yılmaz, Tugba Ertan-Bolelli, Egemen Foto Benzoxazine Derivatives as Antitumor Agents Targeting Topo I, 3RD INTERNATIONAL TURKIC WORLD CONFERENCE ON CHEMICAL SCIENCES AND TECHNOLOGIES, OR45, ITWCCST2017.September 10-132017 Baku-Azerbaijan
3. İlkay Yıldız, Esin Karataş, Egemen Foto, Fatma Zilifdar, **Sanaz Ataei**, Synthesis, MolecularModelling of ssomenewbenzoxazolederivatives as Topoisomerase II inhibitors, ICSD International Conference on Sustainable Development, 19-23 October 2016, Skopje-Macedonia. Page:77.
4. İlkayYildiz, Tuğba Ertan-Bolleli, **SanazAtaei**, Serap Yılmaz, Egemen Foto, Nuran Diril, İsmail Yalçın MolecularModelingStudiesTopoisomerase I inhibitors" 3rd International BAU 2015. Drug Design Congress,, CL 28, BahçeşehirUniversity, October 1-3, 2015, İstanbul-Turkey
5. İlkay Yıldız, **Sanaz Atei**, Serap Yılmaz, Tugba Ertan-Bolelli, Egemen Foto, Molecular Modeling Studies on BS10 as Topoisomerase I Poison, 1st International Congress: from drug discovery to drug delivery, Royal Olympic Hotel, Athens, Greece, OP-02, p14, 13-15 November 2014.
6. Serap Yılmaz, Tugba Ertan-Bolelli, Kayhan Bolelli, Ozum Ozturk, **Sanaz Ataei**, İlkay Yıldız, Esin Aki-Yalcin, Ismail Yalcin. Computational Drug Design Studies for Multidrug Resistance AcrAB-TolC Efflux Pump Inhibitors on Escherichia coli, The 3rd International Conference on Computation for Science and Technology, Aston Denpasar Hotel and Convention Center, Bali, Indonesia, O-P106: p62, 23-25 September 2014.
7. İlkay Yıldız, **Sanaz Ataei**, Serap Yılmaz, Tugba Ertan-Bolelli, Egemen Foto, Esin Aki-Yalcin, Ismail Yalcin. Molecular Modeling Studies On Some Topoisomerase I Inhibitors, 2nd International BAU-Drug Design Symposium 2014, Bahçeşehir University, Faculty of Medicine, Istanbul, Turkey, OP-1: p38-39, 17-19 April 2014.

8. Ismail Yalcin, Kayhan Bolelli, Serap Yilmaz, Tugba Ertan-Bolelli, Ozum Ozturk, **Sanaz Ataei**, Ilkay Yildiz, Esin Aki-Yalcin. CADD Studies on Chemotherapeutical Active Fused Heterocyclic Compounds, 9th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (AIMECS 13), The Grand Hotel, Taipei, Taiwan, S18-01: p55, 15-18 October 2013.
9. Esin Aki, Ismail Yalcin, Ilkay Yildiz, Betul Tekiner-Gulbas, Tugba Ertan-Bolelli, Kayhan Bolelli, Serap Yilmaz, **Sanaz Ataei**, Özüm Öztürk. Chemometrics in Drug Design, 1st International Conference on New Trends in Chemometrics and Applications (NTCA-2011), Side, Antalya, Turkey, IL-05: p7, October 08-11, 2011.

Poster Bildiriler

1. I. YILDIZ, S. ATAEL, Molecular Docking Studies Of Some Benzoxazine Derivatives As Dna Topoisomerase I Inhibitors, Poster Sunumu, 17th Hellenic Symposium On Medicinal Chemistry, 01-03 Haziran 2017.
2. S. ATAEL, I. YILDIZ, Molecular Modeling Studies On Benzoxazine Derivatives As Human Sirt3 Inhibitors, Poster Sunumu, 2nd Biology Of Aging Symposium Advances In Therapeutic Approaches To Extend Healthspan, 22 Ocak 2017, Jupiter, Florida, USA, P2.
3. S. ATAEL, E. FOTO & I. YILDIZ, Synthesis And Dna Topoisomerase I Inhibitor Activity Of Some Novel Benzoxazine Derivatives, Poster Sunumu, 15th Belgian Organic Synthesis Symposium Boss 2016, 10-15 Temmuz 2016
4. **Sanaz Ataei**, Ilkay Yildiz, Predicting ADME/Tox Properties of Some Heterocyclic Inhibitors for Topoisomerase I with Molecular Modelling, 4. İlaç Kimyası: İlaç Etkin Maddesi Tasarımı, Sentezi, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi, 17-20 MART 2016 Kuşadası / AYDIN.
5. Y. Shyma Mary, P.J. Jojo, C. Yohannan Panicker, Christian Van Alsenoy, **Sanaz Ataei** Ilkay Yildiz” Theoretical investigations on the molecular structure, vibrational spectra, HOMO–LUMO and NBO analysis of 5-chloro-2-((4-chlorophenoxy)methyl)benzimidazole, 3rd International Conference on New Trends in Chemometrics and Applications, May 25-28, 2016, Side-Antalya, Turkey.
6. **Sanaz Ataei**, Ilkay Yıldız, Ozgur Karban, Metin Karabulut, Hakan Simsek, Erdal Dınc, Raushan Tahıyeu, Mahmut Özbek, Erkan ER. Determination of some Macrolide Antibiotics by High Liquid Performance Chromatographic Method (HPLC). 4. İlaç Kimyası: İlaç Etkin Maddesi Tasarımı, Sentezi, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi, 17-20 MART 2016 Kuşadası / AYDIN
7. Gözde Yalçın, **Sanaz Ataei**, İlkey Yıldız. ” PP – 84 Pharmacophore Generation Studies For The Discovery Of Potential Acetylcholinesterase Inhibitors”. 3rd International BAU 2015. Drug Design Congress

8. İlkay Yildiz, **Sanaz Ataei**, Serap Yilmaz, Tuğba Ertan-Bolleli, Egemen Foto, İsmail Yalçın "Pharmacophore Analysis And Molecular Docking Studies On Benzoxazines As Topoisomerase I inhibitors" 3rd International BAU 2015. Drug Design Congress, October 1-3, 2015, İstanbul-Turkey
9. **Sanaz Ataei**, Esin Karataş, İlkay Yildiz. Predicting ADME/Tox Properties of Some Heterocyclic Inhibitors for Topoisomerase I with Molecular Modelling. 1st International Congress: from drug discovery to drug delivery, Royal Olympic Hotel, Athens, Greece, OP-02, p14, 13-15 November 2014.
10. Serap Yilmaz, Tugba Ertan Bolelli, Kayhan Bolelli, Ozum Ozturk, **Sanaz Ataei**, İlkay Yildiz, Esin Aki Yalcin, Ismail Yalcin. Molecular Docking Studies of AcrB Trimeric Multidrug Efflux Pumps, 20th European Symposium on Quantitative Structure-Activity Relationships (20th EuroQSAR), St-Petersburg, Russia, P096: p170, 31 August - 4 September 2014.
11. İlkay Yildiz, Tugba Ertan-Bolelli, Serap Yilmaz, **Sanaz Ataei**, Kayhan Bolelli, Ozum Ozturk, Esin Karatas, Esin Aki-Yalcin, Ismail Yalcin. Molecular Modeling Studies on Some Benzazole Derivatives as Topoisomerase I Poison, 20th European Symposium on Quantitative Structure-Activity Relationships (20th EuroQSAR), St-Petersburg, Russia, P147: p221, 31 August - 4 September 2014.
12. Serap Yilmaz, Ismail Yalcin, Tugba Ertan-Bolelli, Kayhan Bolelli, Ozum Ozturk, **Sanaz Ataei**, İlkay Yildiz, and Esin Aki-Yalcin. Molecular Docking Studies on AcrB Trimeric Multidrug Efflux Pumps of *Escherichia coli*, 9th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (AIMECS 13), The Grand Hotel, Taipei, Taiwan, P1-04: p63, 15-18 October 2013.
13. Tugba Ertan-Bolelli, İlkay Yildiz, Selda Ozgen, Kayhan Bolelli, Serap Yilmaz, **Sanaz Ataei**, Ozum Ozturk, Esin Aki-Yalcin, and Ismail Yalcin. Molecular Docking Studies on Enoyl-ACP Reductase Enzyme, 9th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (AIMECS 13), The Grand Hotel, Taipei, Taiwan, P1-05: p63, 15-18 October 2013.
14. Tugba Ertan-Bolelli, İlkay Yildiz, Kayhan Bolelli, Serap Yilmaz, **Sanaz Ataei**, Ozum Ozturk, Selda Ozgen, Esin Aki, Ismail Yalcin. Molecular Docking Studies on Dihydropteroate Synthase Enzyme, Seventh International Symposium on Computational Methods in Toxicology and Pharmacology Integrating Internet Resources (CMTPI-2013), Seoul, South Korea, PO-C-09: p72, 8-12 October 2013.
15. **Sanaz Ataei**, Serap Yilmaz, İlkay Yıldız, Tugba Ertan-Bolelli, Kayhan Bolelli, Ozum Ozturk, Esin Aki-Yalcin, Ismail Yalcin. Common Feature Pharmacophore Generation of DNA Topoisomerase II Enzyme Inhibitors, 49th International Conference on Medicinal Chemistry (RICT-49), The Conference Center Nice Acropolis, Nice, France, HT006: p182, 3-5 July 2013.

16. Ozum Ozturk, Esin Akı-Yalcın, Tugba Ertan-Bolelli, Kayhan Bolelli, Serap Yılmaz, **Sanaz Ataei**, Ilkay Yıldız, Ismail Yalcın. Common Feature Pharmacophore Generation of DNA Topoisomerase II Enzyme Inhibitors, 49th International Conference on Medicinal Chemistry (RICT-49), The Conference Center Nice Acropolis, Nice, France, HT094: p268, 3-5 July 2013.
17. İlkey Yıldız, **Sanaz Ataei**, Özgür Karban, Hakan Simşek, Raushan Tahiyev, Mahmut Özbek, Erkan Er And Erdal Dinç. High Performance Liquid Chromatographic Method For The Determination Of Azithromycin In Lyophilized Form. 3rd International Conference and Exhibition on, Analytical & Bioanalytical Techniques, 2012 Hyderabad International Convention Center, India
18. Serap Yılmaz, **Sanaz Ataei**, Ilkay Yildiz, Esin Aki, Ismail Yalcin. Pharmacophore Modelling of Some Fused Heterocyclic Compounds as HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors, EuroQSAR Knowledge Enabled Ligand Design, 19th European Symposium on Quantitative Structure-Activity Relationships (19th EuroQSAR), Vienna, Austria, P083: p146, 26-30 August 2012.
19. İlkey Yıldız, Serap Yılmaz, **Sanaz Ataei**, Esin Akı, İsmail Yalçın. Pharmacophore Analysis of Some Aromathecins as Topoisomerase I Inhibitor, 1st International Conference on New Trends in Chemometrics and Applications (NTCA-2011), Antalya, Turkey, PP-36: p63, 08-11 October 2011
20. **Sanaz Ataei**, Ilkay Yildiz, , Ozgur Karban, Metin Karabulut, Hakan Simsek, Erdal Dinc, Raushan Tahiyev, Mahmut Özbek, Erkan Er . High Performace Liquid Chromatographic Method For Determination Of Clarithromycin In Lyophilized Form. 3rd International Conference and Exhibition on, Analytical & Bioanalytical Techniques, 2012 Hyderabad International Convention Center, India.
21. İlkey Yıldız, **Sanaz Ataei**, Serap Yılmaz, Egemen Foto, Tugba Ertan-Bolelli, Kayhan Bolelli, Nuran Diril, Esin Akı-Yalcin, İsmail Yalcin. Three-Dimensional Common-Feature Hypotheses on Benzoxazine Derivatives as Topoisomerase I Inhibitors, The 18th International Conference on Organic Synthesis (ICOS-18), Bergen, Norway, 377: p54, 1-6 August 2010.

Full Paper

Generated 3D-Common Feature Hypotheses Using the HipHop Method For Developing New Topoisomerase I Inhibitors

Sanaz Ataei¹, Serap Yılmaz², Tugba Ertan-Bolelli², and Ilkay Yıldız²

¹ Biotechnology Institute, Ankara University, Tandoğan-Ankara, Turkey

² Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Ankara University, Turkey

The continued interest in designing novel topoisomerase I (Topo I) inhibitors and the lack of adequate ligand-based computer-aided drug discovery efforts combined with the drawbacks of structure-based design prompted us to explore the possibility of developing ligand-based three-dimensional (3D) pharmacophore(s). This approach avoids the pitfalls of structure-based techniques because it only focuses on common features among known ligands; furthermore, the pharmacophore model can be used as 3D search queries to discover new Topo I inhibitory scaffolds. In this article, we employed the HipHop module using Discovery Studio to construct plausible binding hypotheses for clinically used Topo I inhibitors, such as camptothecin, topotecan, belotecan, and SN-38, which is an active metabolite of irinotecan. The docked pose of topotecan was selected as a reference compound. The first hypothesis (Hypo 01) among the obtained 10 hypotheses was chosen for further analysis. Hypo 01 had six features, which were two hydrogen-bond acceptors, one hydrogen-bond donor, one hydrophobic aromatic and one hydrophobic aliphatic, and one ring aromatic. Our obtained hypothesis was checked by using some of the aromathecine derivatives which were published for their Topo I inhibitory potency. Moreover, five structures were found to be possible anti-Topo I compounds from the DruglikeDiverse database. From this research, it can be suggested that our model could be useful for further studies in order to design new potent Topo I-targeting antitumor drugs.

Keywords: Aromathecine / HipHop / Pharmacophore analysis / Topoisomerase I inhibitors / Topotecan

Received: January 31, 2015; Revised: March 15, 2015; Accepted: March 20, 2015

DOI 10.1002/ardp.201500045

Introduction

Eukaryotic DNA topoisomerases I and II are essential nuclear enzymes responsible for the organization and modulation of the topological features of DNA so that a cell may replicate, transcribe, and repair genetic information [1–4]. Topoisomerase I (Topo I) functions by creating transient single-stranded nicks in DNA supercoils relieving torsional strain that has accumulated during DNA replication and transcription [2, 4, 5]. Intracellular levels of Topo I are elevated in a number of

human solid tumors, relative to the respective normal tissues, suggesting that variations in Topo I levels are tumor-type specific [6–8]. Therefore, Topo I represents a promising target for the development of new cancer chemotherapeutic agents against a number of solid human tumors.

In 1966, Wall et al. [9] discovered that camptothecin (CPT; Fig. 1), a pentacyclic alkaloid was the component in the extract from the stem of the Chinese tree *Camptotheca acuminata* active against L1210 murine leukemia cells. Early clinical trials with the sodium salt of CPT in the early 1970s showed that this plant alkaloid had activity against a variety of solid tumors [10–12]. However, further clinical trials were discontinued because of unpredictable and severe myelosuppression, gastrointestinal toxicity, and hemorrhagic cystitis. In 1985, however, it was reported that the cytotoxic activity of CPT was attributed to a novel mechanism of action involving the nuclear enzyme Topo I [13], and this discovery of unique mechanism of action revived interest in CPT and its analogs as anticancer agents.

Correspondence: Dr. Ilkay Yıldız, Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Ankara University, 06100 Tandoğan-Ankara, Turkey
 E-mail: iyildiz@pharmacy.ankara.edu.tr
 Fax: +90 312 2131081

Enzymology studies have shown a rather intriguing mechanism in that CPT does not interact with Topo I alone, nor does it bind to DNA [14–16], and exerts its cytotoxic effect by binding and stabilizing the cleavable complex, a transient species where the hydroxyl group on tyrosine 723 of Topo I binds covalently to DNA via its phosphodiester backbone and causes a single-strand break. The formation of a stable ternary complex between CPT, Topo I, and the cleaved DNA leads to the S-phase specific arrest of replication at the single-strand level, causing irreversible DNA damage and eventually cell death [17]. Contrary to these initial reports, recent studies have suggested that CPT analogs may interact directly with double-stranded DNA prior to the action of Topo I, and the DNA-associated drugs are likely to be involved in the subsequent formation of a ternary complex [18]. Although the exact structure of the ternary complex remains to be determined [19, 20], this mechanism accounts for the good correlation found between the ability to induce stabilized cleavable complexes and the cytotoxicity of various CPT analogs [21]. Subsequently, CPT analogs, classified as DNA Topo I inhibitors, have recently emerged as a prominent class of anticancer agents with a novel mechanism of action, potent antiproliferative activity on a wide spectrum of tumor cells including multidrug-resistant lines, and impressive activity in xenograft models [22].

The later development of topotecan and irinotecan as camptothecin analogs, which are the only FDA-approved anticancer agents, were found to inhibit Topo I activity by intercalating into the cleavage complex and preventing the religation step of the catalytic cycle [23–25]. Moreover, belotecan [26, 27], which is 7-Me₂CHNHCH₂CH₂CPT, has been approved to be used in the clinic as anticancer drugs in South Korea, as well. One of these drugs, irinotecan, is a pro-drug and is converted to the active 7-ethyl-10-hydroxy-CPT (OHC2CPT; SN-38) by carboxylesterases to exert its antitumor activity [28, 29]. Although the camptothecins possess potent anticancer activity, issues regarding solubility and bioactivity, dose-limiting toxicity [24, 25, 30], the instability of the hydroxy lactone, and associated pharmacokinetic liabilities [31–33], led to the development of Topo I inhibitors as novel anticancer drugs.

One promising class of noncamptothecin Topo I poisons is the indenoisoquinolines, such as MJ-III-65 [34, 35]. These compounds possess high anti-Topo I activity, are cytotoxic, and are more stable because they lack the hydroxylactone. Through comprehensive SAR studies [34, 36–38], two clinical candidates, indotecan and indimitecan, were developed and have begun Phase 1 clinical trials at the National Cancer Institute [39, 40].

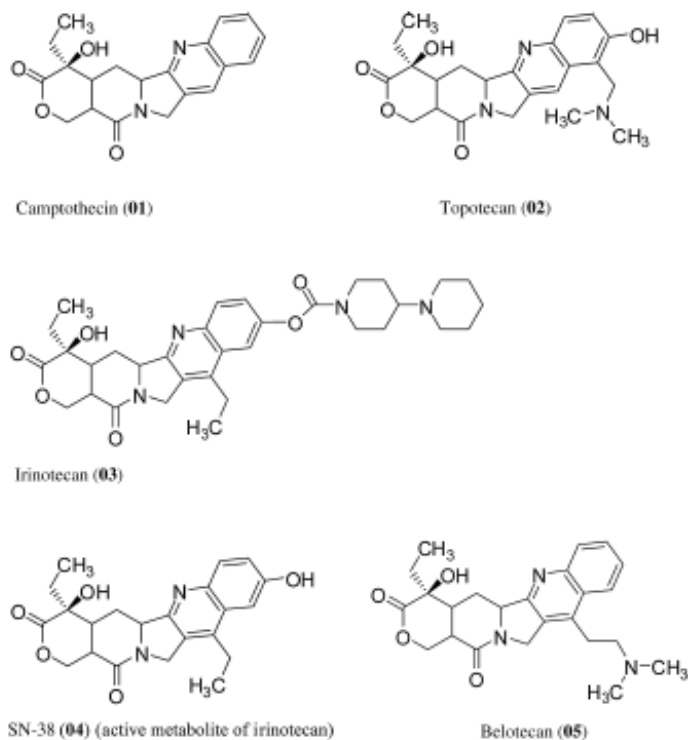


Figure 1. Representative clinically used Topo I inhibitors.

The continued interest in designing new Topo I inhibitors, a common feature 3D-pharmacophore model from clinically used Topo I inhibitors such as camptothecin (01), topotecan (02), SN-38 (03) (which is an active metabolite of irinotecan (03)), belotecan (05) (Fig. 1) have been developed to offer promising scaffolds for the development of novel cancer chemotherapeutics. In this research, HipHop pharmacophore-based virtual screening was performed by using Discovery Studio 3.5 [41]. Moreover, we applied ligand-based virtual screening approaches for some of the aromathecine derivatives from Reference [42] to validate our hypotheses. Additionally, selected hypotheses were searched in DruglikeDiverse database using the "Search 3D Database" protocol in Discovery Studio 3.5 [41].

Computational details

All of the molecular modeling studies were carried out using Discovery Studio 3.5 [41].

Training and test set selection

Clinically used Topo I inhibitors such as camptothecin (01), topotecan (02), SN-38 (which is an active metabolite of irinotecan (03)) (04), and belotecan (05) (as seen in Fig. 1) were used as a training set in order to develop a common feature 3D-pharmacophore model. Topotecan, which was the docked pose from taking molecular docking study, was selected for the reference compound. All of the test set were chosen from published studies [42]. Moreover, DruglikeDiverse database, which has 5384 compounds, was screened [41].

Molecular docking study of topotecan

Preparation of the enzyme

The crystal structure of the topoisomerase I, complexed with topotecan, was retrieved from the Protein Data Bank (PDB ID: 1k4t) [43]. Accelrys Discovery Studio 3.5 [41] software was used for preparation of protein and ligands. The target protein was taken, the ligand was extracted, hydrogens were added, and their positions were optimized using the all atom CHARMM force field and the Adopted Basis set Newton Raphson (ABNR) method available in Discovery Studio 3.5 protocol until the root mean deviation (RMS) gradient was $<0.05 \text{ kcal/mol/Å}^2$. The minimized protein was defined as the receptor using the binding site module. The binding site was defined from the cavity finding method which was modified to accommodate all the important interacting residues in the active site of the enzyme. Binding sphere for 1k4t (21.261, -3.517, 28.108, and 14.1604) was selected from the active site using the binding site tools.

Ligand preparation

Reference drug topotecan was sketched, all atom CHARMM forcefield parameterization was assigned, and then minimized using the ABNR method as described above.

Conformational searches of the ligand were carried out using a simulated annealing molecular dynamics (MD) approach. The ligand was heated to a temperature of 700 K and then annealed to 200 K.

Docking

CDocker [44] method was performed by using Discovery Studio 3.5. The protein is held rigid while the ligand is allowed to be flexible during refinement. The docking parameters were as follows: Top Hits: 10; Random Conformations: 10; Random Conformations Dynamics Step: 1000; Grid Extension: 8.0; Random Dynamics Time Step: 0.002. The docking and scoring methodology was validated by docking of known inhibitor, topotecan. The docked position of topotecan overlaps well with the crystal structure position, with an RMSD of 0.6538 Å.

Pharmacophore modeling for topoisomerase I inhibitors

Pharmacophore modeling is one of the most powerful techniques to classify and identify key features from a group of molecules such as active and inactive compounds. Chemical features in the hypothesis or pharmacophore model will furnish a new insight into design novel molecules that can enhance or inhibit the function of the target and will be useful in drug discovery strategies. HipHop module from CATALYST software in Discovery Studio 3.5 was used to develop pharmacophore models [41].

Molecules were built using ISIS draw and minimized using CATALYST software to the closest local minimum by applying the CHARMM-like force field [45]. Catalyst automatically generated conformational models for each compound using the Poling Algorithm [46–48]. The "best conformer generation" procedure was applied to provide the best conformational coverage for a maximum number of conformers generated defaulted to 255 in a 0–20 kcal/mol range from the global minimum [49]. The generated conformations were used to align common molecular features and generate pharmacophore hypothesis. HipHop was used to the conformations generated to align chemically important functional groups common to the molecules in the study set. A pharmacophoric hypothesis then was generated from these aligned structures.

HipHop provides feature-based alignment of a collection of compounds without considering the activity. It matches the chemical features of a molecule, against drug candidate molecules. HipHop takes a collection of conformational models of molecules and a selection of chemical features, and produces a series of molecular alignments in a variety of standard file formats. HipHop begins by identifying configurations of features common to a set of molecules. A configuration consists of a set of relative locations in 3D space and associated feature types. A molecule matches the configurations if it possesses conformations and structural features that can be superimposed within a certain tolerance

from the corresponding ideal locations. HipHop also maps partial features of molecules in the alignment set. This provision gives the option to use partial mapping during the alignment. Partial mapping allows to identify larger, more diverse, more significant hypotheses and alignment models without the risk of missing compounds that do not have to map to all of the pharmacophore features.

In this research, HipHop common feature hypotheses were generated in order to offer promising scaffolds for the development of novel Topo I inhibitors for contributing to the cancer chemotherapy.

This tool builds hypotheses (overlaying common features) for which the fit of individual molecules to a hypothesis can be correlated with activity of the molecule. Clinically used four potent Topo I inhibitors, camptothecin (01), topotecan (02), irinotecan's (03) metabolite (SN-38 (04)), and belotecan (05), were selected as the target training set (Fig. 1). All the compounds were built using ISIS draw and minimized using CATALYST software to the closest local minimum by applying the CHARMM-like force field [46]. Docked pose of topotecan was considered as "reference compound" specifying a "Principal" value of 2 and a "MaxOmitFeat" value of 0, meaning its structure and conformation would have the strongest influence in the model building phase. The "Principal" and "MaxOmitFeat" values for the remaining compounds were set to 1 and 2, respectively (Principal=1 means that this molecule must map onto the hypothesis generated by the search procedure. Partial mapping is allowed. Principal=2 means that this is a reference compound. The chemical feature space of the conformers of such a compound is used to define the initial set of potential hypotheses. The MaxOmitFeat column specifies how many hypothesis features must map to the chemical features in each compound. A "0" in this column forces mapping of all features, a "2" allows hypotheses to which no compound features map). Diverse conformational models for each compound were generated using the "best conformational analysis" method and an energy threshold of 20kcal/mol

above the global energy minimum for conformation searching [49]. The maximum number of conformers for each molecule was specified as 255 to ensure maximum coverage of the conformational space. Due to the basic structures of the compounds, seven kinds of features including hydrogen-bond acceptor (HBA), hydrogen-bond donor (HBD), hydrophobic group (Hyd), hydrophobic aliphatic (Hyd_Al), hydrophobic aromatic (Hyd_Ar), Poslonizable (PI), and ring aromatic (RA) features were selected to initiate the pharmacophore hypotheses generation process. The characteristics of the generated potential 10 hypotheses are listed in Table 1 and all the hypotheses contain six features.

Results and discussion

DNA topoisomerase I is an essential nuclear enzyme for cell survival. Targeting this enzyme has become one of the best solutions for cancer therapy [1–4]. DNA topoisomerase I targeted cytotoxic drugs are used in clinic for treatment of solid tumors such as lung, ovarian, colon cancers, etc. However, the number of topoisomerase I targeted drugs on market is very limited. Hence, there is still a gap to fill for finding new kind of chemical structures which specifically target topoisomerase I. In this research, HipHop common feature hypotheses were generated in order to offer promising scaffolds for the development of novel Topo I inhibitors for contributing to the cancer chemotherapy.

First of all, the docked pose of topotecan which was the reference drug was obtained by using CDocker method, before generating pharmacophoric features for Topo I inhibitors. According to molecular docking study, the binding energy of topotecan was found to be -56.2735 kcal/mol. Moreover, docking study showed that topotecan had 4 H bonds with Glu356, Lys532, Asp533, Arg364, 2 water mediated H bonds with Arg488, Asn722, and PI interactions with Lys532, DT B10, TGP C11 in Topo I residues (as seen in Fig. 2a and b).

Table 1. The results of pharmacophore hypotheses generated by using HipHop.

Hypo no.	Features ^{a)}	Rank	DF ^{b)}	PH ^{c)}	Max. Fit
01	RYZDAA	63.459	1111	0000	6
02	RYZDAA	63.459	1111	0000	6
03	RYZDAA	63.459	1111	0000	6
04	RYZDAA	62.964	1111	0000	6
05	RYZDAA	62.908	1111	0000	6
06	RYZDAA	62.908	1111	0000	6
07	RYZAAA	62.659	1111	0000	6
08	RYZAAA	62.659	1111	0000	6
09	YZDAAA	62.240	1111	0000	6
10	RYZAAA	62.108	1111	0000	6

^{a)} Features: A: HBA, D: HBD, Z: HYDROPHOBAliphatic (Hyd_Al), Y: HYDROPHOBAromatic (Hyd_Ar), R: RING_AROMATIC (RA).

^{b)} DF (Direct Hit Mask): Mapping of each feature onto training set molecule. 1 means yes and 0 means no.

^{c)} PH (Partial Hit Mask): A training set molecule mapped all but one feature in the hypothesis. 1 means yes and 0 means no.

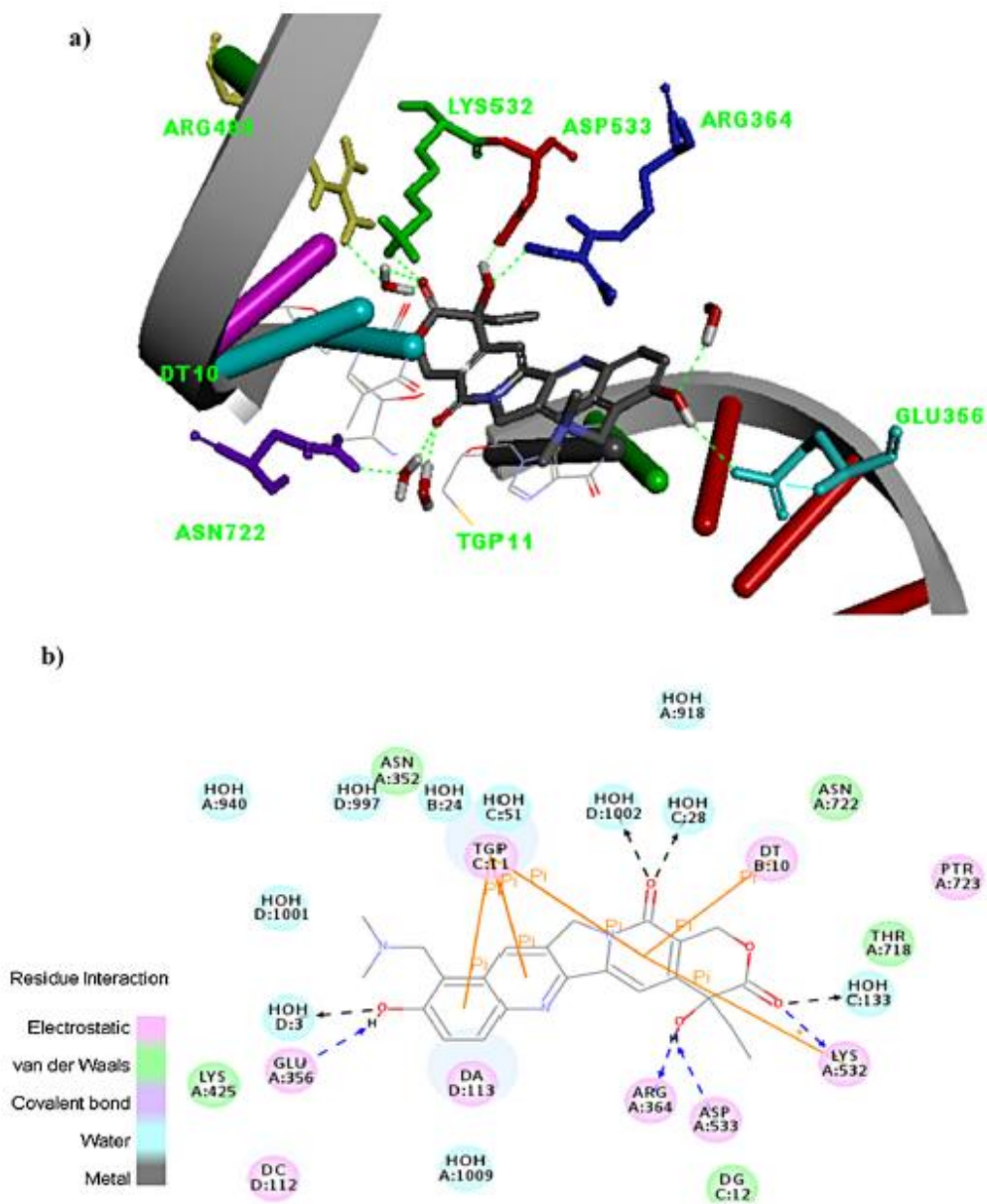


Figure 2. Docked position of topotecan: (a) 3D figure; (b) 2D figure.

Clinically used four potent Topo I inhibitors, camptothecin (01), topotecan (02), irinotecan's active metabolite SN-38 (04), and belotecan (05), were selected as the training set to generate pharmacophore models by using HipHop methodology (Fig. 1). The docked pose of topotecan, reported above, was considered as a reference compound, which was allowed to map all features, while the other three molecules were allowed to map partially on the hypotheses. Finally, the 10 six-feature hypotheses were generated. The ranking scores of hypotheses range from 63.459 to 62.108 as shown in Table 1. The first hypothesis (Hypo 01) was selected for further analysis that contained RA-1, Hyd_Ar-2, Hyd_Al-3, HBD-4, HBA-5, and HBA-6, which is presented in Fig. 3a and b. Direct hit mask and partial hit mask revealed that all the six features were mapped onto four training set compounds. Figure 4 shows the mapping of Hypo 01 onto the training set compounds. The compound 2 (topotecan) taken as reference mapped well onto all the features (Fig. 5). The HBD-4 feature mapped on OH group at the fourth position of topotecan represents interaction with Asp533 and Arg364 in the active site of Topo I (as seen in Figs 2 and 5). Moreover, HBA-5 fitted on

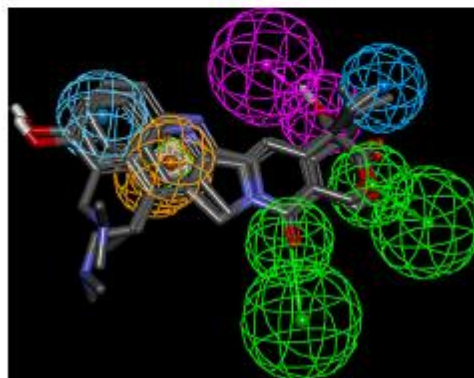


Figure 4. All training set with Hypo 01.

“O” of carbonyl on the pyran ring of topotecan shows interaction with Lys532. HBA-6 mapped on OH group at the 14th position of topotecan represents interaction to Asn722 with water mediated H bond.

The aromathecine or “rosettacin” class of Topo I inhibitors is effectively a “composite” of the natural products camptothecin and the synthetic indenoisoquinolines [50]. In here, some of the aromathecine derivatives taken from Reference [42] were used as a test set for validating our selected hypotheses as seen in Table 2. These compounds were mapped onto the Hypo 01 by using “flexible” fitting method, “best mapping only,” and “Maximum Omitted Features: –1” options to obtain the bioactive conformation of each molecule in Ligand Pharmacophore Mapping protocol in Discovery Studio 3.5. All of the statistical data were shown in

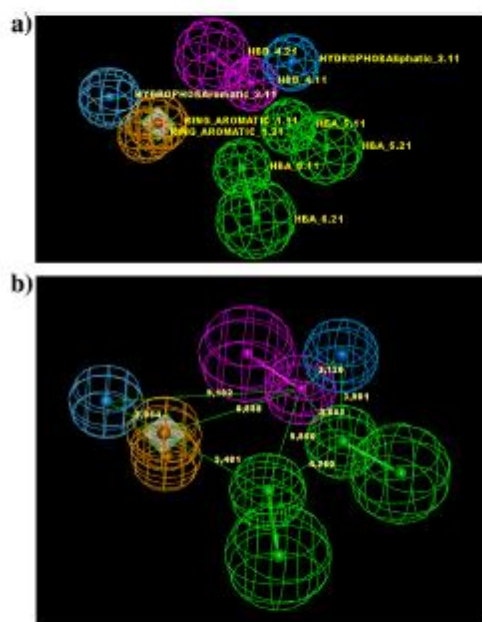


Figure 3. The best hypotheses of HipHop Pharmacophore Modeling (Hypo 01) obtained from clinically used Topo I inhibitors: (a) Mapping of Hypo 01, which contains two HBAs (green), one HBD (violet), one RA (yellow), one Hyd_Al (dark blue), and one Hyd_Ar (light blue) pharmacophore features; (b) the geometry of the features.

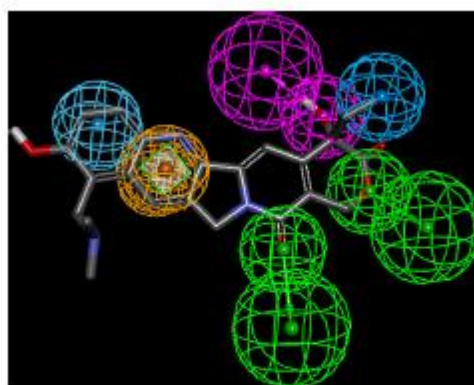


Figure 5. Docked pose of topotecan with Hypo 01.

Table 2. Aromathecine derivatives [42] as Topo I inhibitors used as test series for checking Hypo 01.

Comp. no.	n	Topo I cleavage ^{a)}
53	2	+++
54	3	++(+)
55	4	+++
56	5	+
57	6	++(+)
58	7	++
59	8	+
60	9	+
61	10	0
62	11	0
63	12	0

^{a)}Compound-induced DNA cleavage due to Top1 inhibition is graded by the following rubric relative to 1 μ M camptothecin: 0, no inhibitory activity; +, between 20 and 50% activity; ++, between 50 and 75% activity; +++, between 7 and 95% activity; ++++, equipotent. The 0/+ ranking is between 0 and + [42].

Table 3. The results of mapping of features onto test set compounds are given in Fig. 6.

According to Table 3 and Fig. 6, compounds 57–63 mapped well onto the five features with a good Fit/Values 4.7718, 4.7562, 4.7562, 4.7539, 4.6414, 4.5765, and 4.1962, respectively. These structures did not only map into HBA-5 as seen Pharmprint (111101: that means RA-1: 1; Hyd_Ar-2: 1; Hyd_Al-3: 1; HBD-4: 1; HBA-5: 0; HBA-6: 1) in Table 3. It was reported that compounds 61–63 were found to be inactive for Topo I cleavage [42]. Even if non-effect compounds matched with five features well but their Van der Waals Energy number are smaller than the other. On the other hand, we noticed that among the aromathecine derivatives, which had 111101 as Pharmprint and a good Fit/Values, none of them had indicated an equipotent activity like camptothecin. According to these results, we could consider that HBA-5 feature played a very important role for getting Topo I inhibitory activity. Furthermore, the aromathecins 53–56 fitted onto RA-1, Hyd_Ar-2, HBD-4, and HBA-6 features as seen in Table 3. Although compounds 53–55 showed best map with only four features, they had more significant Topo I inhibitory activity than derivatives 58–60. It was noticed that their Van der Waals energies were found to be higher than the other. Therefore, it can be considered that the Van der Waals energies of aromathecins 53–55 should be also important for developing

Table 3. Statistical data of aromathecine derivatives as Topo I inhibitors used as test series for checking Hypo 01.

Comp. no. (Topo I cleavage ^{a)})	Absolute energy	Angle energy	Bond energy	CHARMM energy	Conf. number	Dihedral energy	Electrostatic energy	Fit Values	RMS gradient	Pharmprint ^{b)}	Relative energy	Potential energy	Van der Waals energy
63 (0)	78.3535	28.4814	2.1349	40.0866	157	1.3048	4.3176	4.7718	0.04648	111101	16.7078	40.0866	3.81309
59 (+)	76.3511	28.1897	2.2814	39.751	98	0.8399	2.8802	4.7562	0.04575	111101	13.3094	39.751	5.73426
62 (0)	89.2469	28.9100	1.9630	40.3235	143	2.66552	3.1526	4.7562	0.03883	111101	27.2611	40.3235	3.56921
58 (++)	71.7707	28.6476	1.9455	40.8366	32	2.52215	1.6669	4.7539	0.04995	111101	8.38123	40.8366	6.00887
60 (+)	78.5427	28.7570	1.9516	40.5888	83	2.50053	2.3681	4.6414	0.03985	111101	15.8508	40.5888	4.96476
61 (0)	77.6839	28.6623	2.2007	38.0146	27	3.2858	0	4.5765	0.04737	111101	15.3427	38.0146	3.60654
57 (++)	89.2201	27.9411	2.1898	40.911	84	0.92464	2.8563	4.1962	0.04935	111101	25.4779	40.911	6.97707
54 (++)	99.3871	27.8058	2.1717	51.9463	118	2.54616	11.0881	3.8836	0.048	110101	34.6003	51.9463	8.32883
53 (++)	77.6469	28.2138	2.0452	33.9275	39	0.90812	-6.0542	3.8788	0.04015	110101	12.5153	33.9275	8.77744
56 (+)	79.0867	29.0881	2.0662	40.1191	72	2.48156	-0.5047	3.8324	0.04234	110101	14.988	40.1191	7.05361
55 (++)	88.2554	28.1998	2.3457	39.2612	134	1.25024	-0.8778	3.7542	0.04826	110101	23.8313	39.2612	8.28577

^{a)}Compound-induced DNA cleavage due to Top1 inhibition is graded by the following rubric relative to 1 μ M camptothecin: 0, no inhibitory activity; +, between 20 and 50% activity; ++, between 50 and 75% activity; +++, between 7 and 95% activity; ++++, equipotent. The 0/+ ranking is between 0 and + [42, 43].

^{b)}Pharmprint refers to mapped features such as RA-1, Hyd_Ar-2, Hyd_Al-3, HBD-4, HBA-5, and HBA-6, respectively.

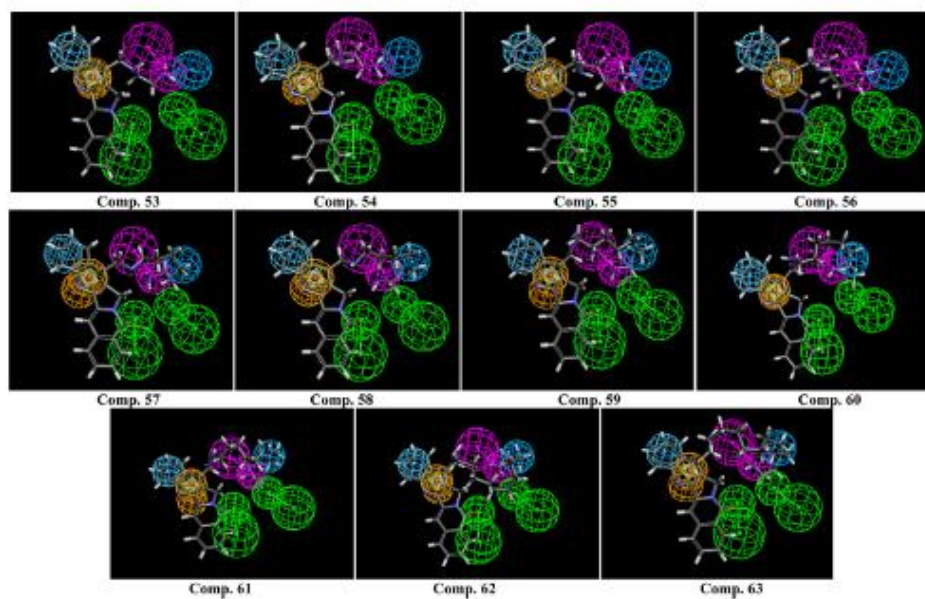


Figure 6. Compared test set series of Hypo 01.

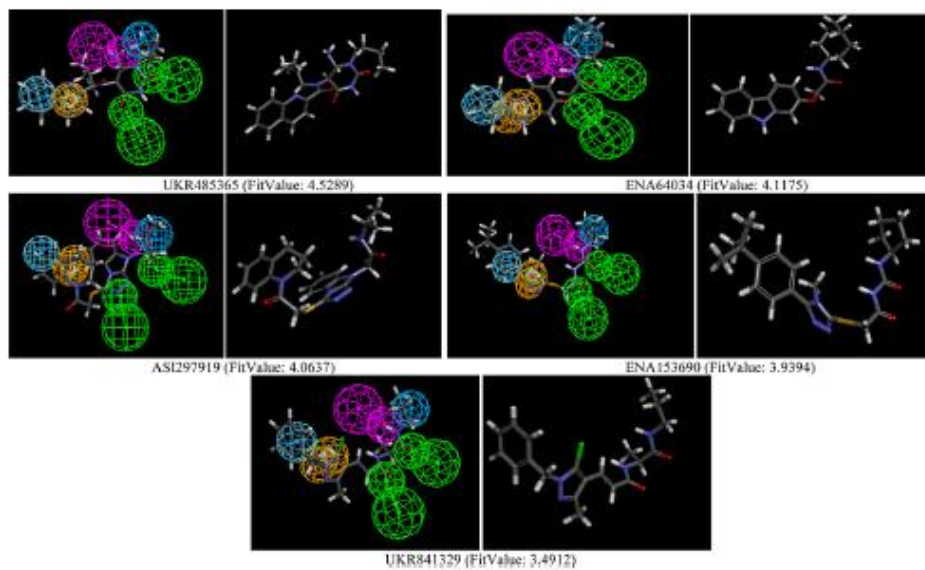


Figure 7. Possible Topo I inhibitors from DruglikeDiverse database.

new Topo I inhibitors. Unfortunately, our hypothesis was not appropriate for compound 56. We can conclude that our model would be useful for further studies.

In this study, selected Hypo 01 was searched in Druglike-Diverse database where 5384 compounds were, as well. According to this screening, it was obtained that 764 compounds fitted with Hypo 01. However, only five compounds (UKR485365, ENA64034, ASI297919, ENA153690, and UKR841329) fitted onto all the features with satisfactory FitValues (4.5289, 4.1175, 4.0637, 3.9394, and 3.4912, respectively) as seen in Fig. 7. Here, it can be considered that these five molecules could be new lead Topo I inhibitors for cancer therapy.

Conclusion

HipHop provides feature-based alignment of collection of compounds without considering biological activity. It matches pharmacophoric features of the molecules against template. HipHop takes collection of conformational models of molecules and produces series of molecular alignments in variety of standard file formats. HipHop begins by identifying configurations of features common to a set of molecules. A configuration consists of a set of relative locations in 3D space and associated feature types. A molecule matches the configuration if it possesses the conformations and pharmacophoric features that can be superimposed within a tolerance limit from the corresponding ideal locations.

The training set compounds associated with their diverse conformational models were subjected for hypotheses generation. The molecular characteristics, which are essential for tight binding between ligand and its corresponding targets like Topo I, were expressed as common features disposed in 3D space known as hypotheses. In this study, we have done a common feature 3D-pharmacophore model from clinically used four potent Topo I inhibitors, camptothecin (01), topotecan (02), irinotecan's (03) active metabolite (SN-38 (04)), and belotecan (05), as presented in Fig. 1 by using HipHop methodology to offer promising scaffolds for the development of novel cancer chemotherapeutics. Our main goal was to generate 3D-common chemical features in order to be able to develop new Topo I inhibitors for further studies.

In this research, 10 hypotheses, which had six features, were obtained. The first hypothesis (Hypo01) was selected for further analysis that contained two hydrogen-bond acceptors, one hydrogen-bond donor, one hydrophobic aromatic and one hydrophobic aliphatic, and one ring aromatic features, which is presented in Fig. 3. Selected hypotheses (Hypo 01) were checked by using some of the aromathecins taken from Reference [42].

Moreover, Hypo 01 was searched in DruglikeDiverse database, as well. It was obviously noticed that five compounds (UKR485365, ENA64034, ASI297919, ENA153690, and UKR841329) as seen in Fig. 7 could be novel Topo I-targeting antitumor compounds.

Finally, it can be considered that our model could be more useful for further studies in order to design new potent Topo I inhibitors.

We thank the Research Fund of Ankara University (Grant No: 1283336002) for the financial support of this research.

The authors have declared no conflict of interest.

References

- [1] M. Potmesil, K. K. Kohn, *DNA Topoisomerases in Cancer*. Oxford University Press, New York 1991.
- [2] M. Casati, A. Amadei, G. Camilloni, E. Di Mauro, *Biochemistry* 1990, 29, 8152–8157.
- [3] P. J. Smith, *Int. J. Radiat. Biol.* 1990, 58, 553–559.
- [4] J. C. Wang, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002, 3, 430–440.
- [5] E. Pommier, *Chem. Rev.* 2009, 109, 2849–2902.
- [6] B. P. Giovannella, J. S. Stehlin, M. E. Wall, M. Wani, A. W. Nicholas, L. F. Liu, R. Silber, M. Potmesil, *Science* 1989, 246, 1046–1048.
- [7] I. Husain, J. L. Mohler, H. F. Seigler, M. Besterman, *Cancer Res.* 1994, 54, 539–546.
- [8] C. D. Lima, J. C. Wang, A. Mondragon, *Nature* 1994, 367, 138–146.
- [9] M. E. Wall, M. C. Wani, C. E. Cook, K. H. Palmer, A. T. McPhail, G. A. Sim, *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 3888–3890.
- [10] J. A. Gottlieb, A. M. Guarino, J. B. Call, V. T. Oliverio, J. B. Block, *Cancer Chemother. Rep.* 1970, 54, 461–470.
- [11] P. J. Creaven, L. M. Allen, F. M. Muggia, *Cancer Chemother. Rep.* 1972, 56, 573–578.
- [12] F. M. Muggia, P. J. Creaven, H. Hansen, M. H. Cohen, O. S. Selawry, *Cancer Chemother. Rep.* 1972, 56, 515–521.
- [13] Y. H. Hsiang, R. Hertzberg, S. Hecht, L. F. Liu, *J. Biol. Chem.* 1985, 260, 14873–14878.
- [14] R. P. Hertzberg, M. J. Caranfa, S. M. Hecht, *Biochemistry* 1989, 28, 4629–4638.
- [15] L. H. Li, T. J. Fraser, E. J. Olin, B. K. Bhuyan, *Cancer Res.* 1972, 32, 2643–2650.
- [16] M. Fukada, *Biochem. Pharmacol.* 1985, 34, 1225–1230.
- [17] C. Holm, J. M. Covey, D. Kerrigan, Y. Pommier, *Cancer Res.* 1989, 49, 6365–6368.
- [18] D. Yang, J. T. Strode, H. P. Spielmann, A. H. J. Wang, G. Burke, *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 2979–2980.
- [19] M. R. Redinbo, L. Stewart, P. Kuhn, J. J. Champoux, W. G. Hol, *Science* 1998, 279, 1504–1513.
- [20] Y. Fan, J. N. Weinstein, K. W. Kohn, L. M. Shi, Y. Pommier, *J. Med. Chem.* 1998, 41, 2216–2226.
- [21] C. Jaxel, K. W. Kohn, M. C. Wani, M. E. Wall, Y. Pommier, *Cancer Res.* 1989, 49, 1465–1469.
- [22] Y. Kawato, H. Terasawa, *Prog. Med. Chem.* 1997, 34, 69–109.
- [23] R. Garcia-Carbonero, J. G. Supko, *Clin. Cancer Res.* 2002, 8, 641–661.

- [24] C. J. Thomas, N. J. Rahier, S. M. Hecht, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 1585–1604.
- [25] B. Teicher, *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *75*, 1262–1271.
- [26] J. C. Kim, D. H. Shin, S. H. Kim, J. K. Kim, S. C. Park, W. C. Son, H. S. Lee, J. E. Suh, C. Y. Kim, C. S. Ha, M. K. Chung, *Regul. Toxicol. Pharm.* **2004**, *40*, 356–369.
- [27] A. L. Graul, J. R. Proulx, *Drug News Perspect* **2005**, *18*, 21–36.
- [28] Y. Kawato, M. Aonuma, Y. Hirota, H. Kuga, K. Sato, *Cancer Res.* **1991**, *51*, 4187–4191.
- [29] T. Kunimoto, K. Nitta, T. Tanaka, N. Uehara, H. Baba, M. Takeuchi, T. Yokokura, S. Sowada, T. Miyasaka, M. Mutai, *Cancer Res.* **1987**, *47*, 5944–5947.
- [30] U. Schaeppi, R. W. Fleisch, D. A. Cooney, *Cancer Chemother. Rep.* **1974**, *5*(Part 3) 25–36.
- [31] T. G. Burke, Z. H. Mi, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 40–46.
- [32] M. J. Luzzio, J. M. Besterman, D. L. Emerson, M. G. Evans, K. Lackey, P. L. Leitner, G. McIntyre, B. Morton, P. L. Myers, M. Peel, J. M. Sisco, D. D. Sternbach, W. Q. Tong, A. Truesdale, D. E. Uehling, A. Vuong, J. Yates, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 395–401.
- [33] Z. H. Mi, T. G. Burke, *Biochemistry* **1994**, *33*, 10325–10336.
- [34] M. Nagarajan, A. Morrell, B. C. Fort, M. R. Meckley, S. Antony, G. Kohlhaagen, Y. Pommier, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5651–5661.
- [35] C. Marchand, S. Antony, K. W. Kohn, M. Cushman, A. Ioanoviciu, B. L. Staker, L. Stewart, Y. Pommier, *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 287–295.
- [36] A. Morrell, M. Placzek, S. Parmley, B. Grella, S. Antony, Y. Pommier, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4388–4404.
- [37] A. Morrell, S. Antony, G. Kohlhaagen, Y. Pommier, M. Cushman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3659–3663.
- [38] M. Nagarajan, A. Morrell, A. Ioanoviciu, S. Antony, G. Kohlhaagen, M. Hollingshead, Y. Pommier, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6283–6289.
- [39] Y. Pommier, M. Cushman, *Mol. Cancer Ther.* **2009**, *8*, 1008–1014.
- [40] S. Antony, K. K. Agama, Z. H. Mi, K. Takagi, M. H. Wright, A. I. Robles, L. Varticovski, M. Nagarajan, A. Morrell, M. Cushman, Y. Pommier, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 10397–10405.
- [41] Accelrys Inc. Discovery Studio 3.5, **2012**.
- [42] M. A. Cinelli, B. Cordero, T. S. Dexheimer, Y. Pommier, M. Cushman, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7145–7155.
- [43] B. Staker, K. Hjerrild, M. D. Feese, C. A. Behnke, A. B. Burgin, L. Stewart, *PNAS* **2002**, *99*(24), 15387–15392.
- [44] G. Wu, D. H. Robertson, C. L. Brooks, M. Vieth, *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*(13), 1549–1562.
- [45] B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, M. Karplus, *J. Comput. Chem.* **1983**, *4*, 187–217.
- [46] A. Smellie, S. D. Kahn, S. L. Teig, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1995**, *35*, 285–294.
- [47] A. Smellie, S. D. Kahn, S. L. Teig, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1995**, *35*, 295–304.
- [48] A. Smellie, S. L. Teig, P. Towbin, *J. Comp. Chem.* **1994**, *16*, 171–187.
- [49] H. Yu, Z. Wang, L. Zhang, Q. Huang, *Chem. Biol. Drug. Des.* **2007**, *69*, 204–211.
- [50] M. A. Cinelli, A. Morrell, T. Dexheimer, E. Scher, Y. Pommier, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4609–4619.

Evaluation of inhibitory effects of benzothiazole and 3-amino-benzothiazolium derivatives on DNA topoisomerase II by molecular modeling studies

E. Aki-Yalcin^{a*}, T. Ertan-Bolelli^a, T. Taskin-Tok^b, O. Ozturk^a, S. Ataei^c, C. Ozen^d, I. Yildiz^a and I. Yalcin^a

^aPharmaceutical Chemistry Department, Faculty of Pharmacy, Ankara University, Ankara, Turkey;

^bChemistry Department, Gaziantep University, Şehitkamil/Gaziantep, Turkey; ^cBiotechnology Institute, Ankara University, Ankara, Turkey; ^dMolecular Biology and Genetics Dept., BilGen Genetics and Biotechnology Center, Bilkent University, Ankara, Turkey

(Received 19 December 2013; in final form 9 April 2014)

There has been considerable interest in DNA topoisomerases over the last decade, as they have been shown to be one of the major cellular targets in anticancer drug development. Previously we synthesized some benzothiazole derivatives and corresponding benzothiazolium forms, and tested their DNA inhibitory activity to develop novel antitumor agents. Among the 12 prepared compounds, compound BM3 (3-aminobenzothiazole-3-ium 4-methylbenzene sulfonate) exhibited extreme topoisomerase II inhibitory activity compared with the reference drug etoposide. We also tried to determine the DNA and enzyme binding abilities of BM3 and found that BM3 acted on topoisomerase II first at low doses, while it had also showed DNA minor groove binding properties at higher doses. In this study the interactions between DNA topoisomerase II and the compounds were examined in detail by molecular modelling studies such as molecular docking and pharmacophore analysis performed using Discovery Studio 3.5. As a result, it was found that benzothiazolium compounds exhibited a totally different mechanism than benzothiazoles by binding to the different amino acids at the active site of the protein molecule. 3-Aminobenzothiazoliums are worthy of carrying onto anticancer studies; BM3 especially would be a good anticancer candidate for preclinical studies.

Keywords: anticancer; benzothiazole; benzothiazolium; molecular docking; pharmacophore analysis; topoisomerase II

1. Introduction

There are many benefits for the stable storage of genetic information in the double-helical structure of DNA. It is protected from chemical damage by sequestering information-rich nucleotides, while complementarity among the sister strands allows mistakes, lesions and discontinuities in the genome to be addressed and repaired. However, the intertwined structure of duplex DNA is not without drawbacks. Because the two strands of deoxyribonucleic acid are wound around one another, processes that require strand separation, such as replication or transcription, lead naturally to DNA overwinding and strand entanglement which can pose serious challenges to the cell [1–3]. They interfere with gene expression, DNA duplication and chromosome segregation, and cells depend on DNA supercoiling as a means of compacting

*Corresponding author. Email: esinaki@ankara.edu.tr

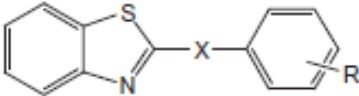
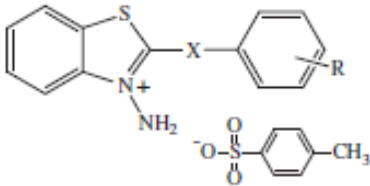
the genome and promoting DNA unwinding at replication origins and promoter regions at the same time [2,3]. Thus, the cell strives to preserve the information content of the genome and invests considerable energy in maintaining the topology of its chromosomes in an appropriate topological state.

DNA topoisomerases are the ubiquitous enzymes in key cellular processes such as replication, transcription, recombination and repair, and chromatin assembly by solving these topological problems of genomic DNA [4–10]. DNA topoisomerases are divided into two classes depending on the number of broken strands (type I cuts one strand, type II cuts both strands) of DNA by the enzymes in one reaction circle. In recent years, topoisomerases have become popular targets for cancer chemotherapy treatments. It is thought that topoisomerase inhibitors block the ligation step of the cell cycle, generating single- and double-stranded breaks that harm the integrity of the genome. Introduction of these breaks subsequently leads to apoptosis and cell death. Lack of topoisomerase in the cell is fatal. In light of this fact, DNA topoisomerases have been targeted for killing cancer cells or pathogenic bacteria in the clinic. The purpose of this study is to identify a new type of anticancer drug candidates.

Indeed, there are commercially available anticancer drugs that possess DNA topoisomerase inhibitory activity such as doxorubicin, etoposide and camptothecin [11–14]. Our group has been working for many years on the synthesis of some new heterocyclic compounds that were potentially DNA topoisomerase I and II inhibitors, and molecular modelling studies of these compounds [15–21]. So far some of the compounds exhibited significant topoisomerase II inhibitory activity with IC_{50} values differing from 11.4 and 46.8 μ M compared with the standard drug etoposide [15,18]. Recently, we also reported results obtained through a DNA topoisomerase relaxation assay indicated 2-substituted benzyl or phenyl benzothiazole derivatives and corresponding 3-aminobenzothiazole-3-ium 4-methylbenzene sulfonates were strong topoisomerase II inhibitors (Table 1).

In this research, the DNA topoisomerase II inhibitory activity of 3-amino-2-(2-bromobenzyl)-1,3-benzothiazole-3-ium 4-methylbenzene sulfonate (BM3) was the most effective DNA topoisomerase II inhibitor with the lowest IC_{50} value of 39 nM, which could be considered

Table 1. IC_{50} values of benzothiazole and 3-amino-benzothiazolium derivatives for catalytic inhibitory activity on topoisomerase II.

Compound	X	R	Topo II IC_{50}	Compound	X	R	Topo II IC_{50}
M2	CH ₂	2-F	1.06 mM	BM6	CH ₂	2-F	1.78 mM
M6	CH ₂	4-CH ₃	72.93 μ M	BM1	CH ₂	4-CH ₃	6.87 mM
M7	CH ₂	4-Cl	107.10 μ M	BM7	CH ₂	4-Cl	6.20 mM
M9	CH ₂	4-Br	8.10 μ M	BM2	CH ₂	4-Br	8.46 mM
M10	CH ₂	2-Br	788.00 μ M	BM3	CH ₂	2-Br	39.40 nM[†]
M15	–	2-Br	6.68 mM	BM4	–	2-Br	1.26 mM

[†]Most effective compound.

as an extremely strong activity compared with etoposide. According to the mechanistic studies, BM3 was neither a DNA intercalator nor a topoisomerase poison; it was only a DNA minor groove-binding agent [21]. BM3 initially bound to the DNA topoisomerase II enzyme and its mechanisms of action might be directly interaction with the enzyme. It is reported that there is a clear evidence for a covalent 5' link between DNA and the active site tyrosine (Tyr782) resident in topoisomerase II's winged helix domain (WHD). Topoisomerase II undergoes substantial conformational changes on binding substrate. Structures of apo *Saccharomyces cerevisiae* topoisomerase II have shown that the two dimer-related WHDs and their resident active site tyrosines are separated by 25–30 Å (Figure 1A). In the presence of DNA, however, these elements move towards each other, forming a nearly contiguous interaction surface across both protomers [22,23].

Hence, BM3 could be a good candidate as a new anticancer agent. We attempted to support the experimental results with theoretical findings by working with molecular modeling techniques such as docking and pharmacophore generation using Accelrys Discovery Studio (DS) 3.5 software [24]. These may direct us to find novel and more potent topoisomerase II inhibitors.

In the drug design area, quantitative structure–activity relationship (QSAR) method is an area of research pioneered by Hansch and Leo [25] and Hansch and Fujita [26]. The QSAR method assumes that differences in the measured structural or physical properties account experimentally for differences in the observed biological or chemical properties [26–28]. A QSAR study usually leads to a predictive formula and attempts to model the activity of a series of compounds using measured or computed properties of the compounds.

More recently, QSAR has been extended by including three-dimensional (3D) information. In drug discovery, it is common to have measured activity data for a set of compounds acting upon a particular protein, but not to have knowledge of the 3D structure of the active site. In the absence of such 3D information, one may attempt to build a hypothetical model of the active site that can provide insight on the nature of the latter. Three-dimensional approaches such as HypoGen and/or HipHop are useful in building 3D pharmacophore models from the activity data and conformational structure [29]. They can be used as an alternative for QSAR methods because of their easy visualization and high prediction capability. However, ranging activity values of a collection of conformational models of compounds should be at least four orders of magnitude for the algorithm, HypoGen. The other algorithm in 3D pharmacophore generation within Catalyst is called HipHop and is based on alignment of common features present in highly potent compounds. The scalar affinity values of the molecules are not regarded in this model generation mode.

HipHop pharmacophore models are derived by comparing a set of conformational models and a number of 3D configurations of chemical features shared among the training set molecules.

Molecular docking is a key tool in structural molecular biology and computer-assisted drug design. The goal of ligand-protein docking is to predict the predominant binding model (s) of a ligand with a protein of known 3D structure. In this study, we used fast flexible docking to study the binding orientations and predict binding affinities of benzothiazole and benzothiazolium derivatives. Such studies have been carried out to understand the forms of interaction of 12 compounds, examined by Kaplan-Ozen and colleagues for human DNA topoisomerases [21]. The results obtained from this study will be useful in understanding the inhibitory mode of benzothiazole and benzothiazolium derivatives, as well as in rapidly and accurately predicting the activities of newly designed inhibitors on the basis of docking scores. These models also provide some beneficial clues in structural modification for the

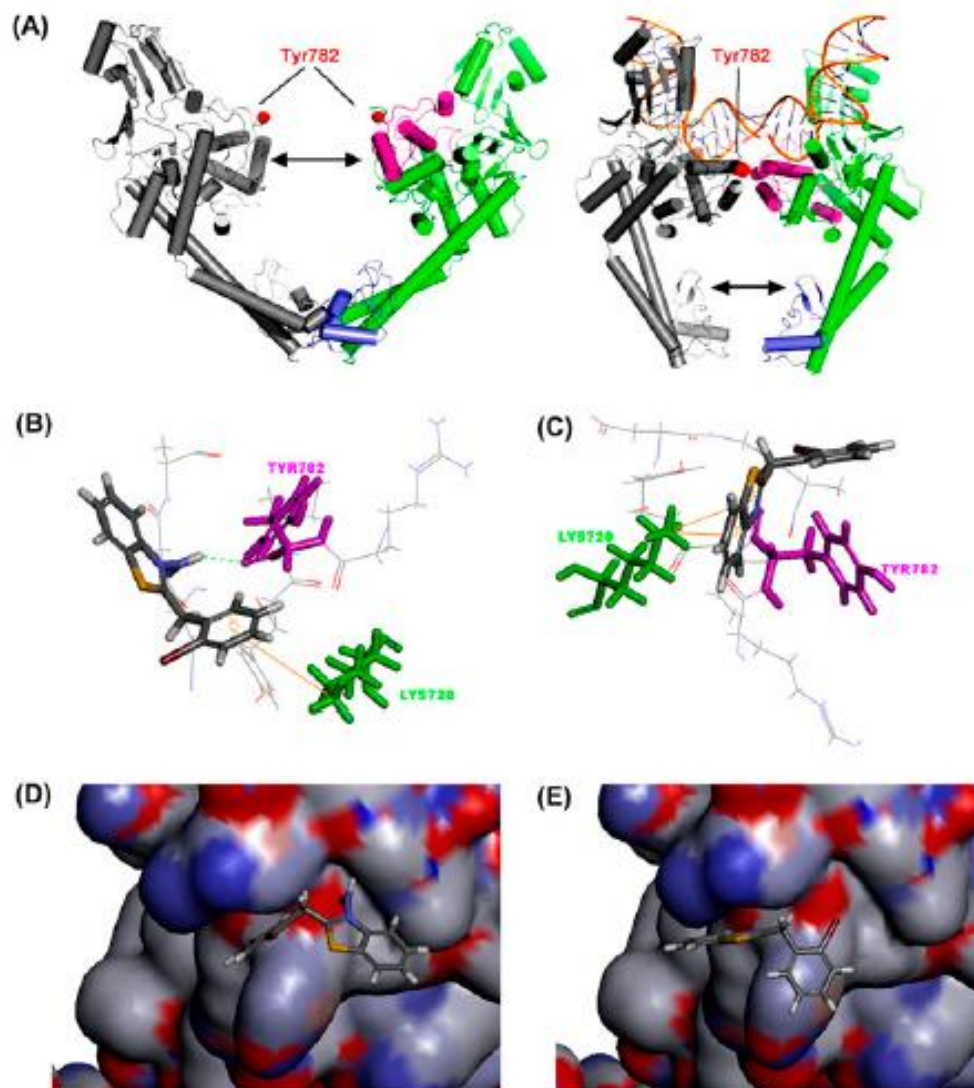


Figure 1. (A) Conformational changes of topoisomerase II, after DNA binding [22]. (B) Docked position of BM3: NH_2 group at position 3 of benzothiazolium has H bond with Tyr782 (pink) and phenyl ring on second position of benzothiazole ring has π -cation interactions with Lys720 (green). (C) Docked position of M10: benzothiazole ring has π -cation interactions with Lys720 (green). (D) Docking overlay of BM3 in atom charged surface area. (E) Docking overlay of M10 in atom charged surface area.

design of new inhibitors for the treatment of cancer with much higher inhibitory activities against DNA topoisomerase II.

2. Materials and methods

2.1 Molecular structures and optimization

A set of previously synthesized benzothiazole and 3-amino-benzothiazolium derivatives [16] tested for DNA topoisomerase II inhibitory activity were chosen from our previous study [21]

as shown in Table 1. The DNA topoisomerase II inhibitory activities of these compounds are represented as IC_{50} values in the millimolar, micromolar or nanomolar range [21]. The structures of all the compounds were constructed using the DS 3.5 Sketch Molecules module (www.accelrys.com). The geometries of these compounds were subsequently optimized using the Minimization module of DS 3.5 using the CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics) force field. CHARMM provides a vast range of functionality for molecular mechanics and can be used to diverse areas of research, including protein modeling and structural biology [30].

3. Computational methods

3.1 Molecular docking

The most straightforward computational approaches for finding new leads for therapeutic macromolecular targets are increasingly based on 3D information about proteins. Molecular docking is an effective method to predict ligands, which are low molecular weight compounds that may interact with a macromolecular target. A primary objective in molecular docking is the ability to estimate the scoring function and evaluate protein–ligand interactions as a means of hit identification (virtual screening) and lead optimization (to enhance desired drug properties). This method is also successfully used as a computational tool to assist drug discovery.

3.1.1 Preparation of the enzyme

The crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* topoisomerase II (PDB ID: 1BJT) was retrieved from the Protein Data Bank (PDB) (www.rcsb.org) [31] and further modified for docking calculations. For preparation of protein and ligands, DS 3.5 software was used. The target protein was taken, hydrogens were added and their positions were optimized using the all-atom CHARMM force field and the Adopted Basis set Newton Raphson (ABNR) method available in the D.S 3.5 protocol until the root mean square deviation (RMSD) gradient was <0.05 kcal/mol $\text{\AA}^2$. The minimized protein was defined as the receptor using the binding site module. The binding site was defined from the cavity finding method, which was modified to accommodate all the important interacting residues in the DNA binding site of topoisomerase II enzyme. The binding sphere for 1BJT (6.12, 47.51, 26.54, 14.67) was selected from the active site using the binding site tools.

3.1.2 Preparation of ligands

Previously synthesized benzothiazole and 3-amino-benzothiazolium derivatives were sketched; all-atom CHARMM force field parameterization was assigned and then minimized using the ABNR method as described above. Conformational search of the ligands was carried out using a simulated annealing molecular dynamics (MD) approach. The ligands were heated to a temperature of 700 K and then annealed to 200 K.

3.1.3 Docking

3.1.3.1 Core-constrained docking (CCD) subprotocol. The CCD subprotocol includes conformer generation, core-constrained docking and scoring. In terms of core-constrained

docking, use of the molecular docking algorithm CDOCKER is considered since it has been shown to be a viable research tool [32,33]. CDOCKER is a CHARMM-based grid-enabled docking method that uses soft core potentials and MD-generated random ligand conformations, and poses refinement in the active site using a simulated annealing process. In the original work, CDOCKER treats the entire ligand as flexible during the initial docking phase. The core-constrained docking method described here is a modification to the CDOCKER CHARMM script that allows the scaffold to be locked but the rest of the ligand molecule to be flexible during initial minimization and the MD conformer generation stage. The core is allowed to move during final refinement with simulated annealing. Current docking tools do a reasonable job at getting correct poses, but errors occur in a significant number of cases [34,35]. Constraining the core to the crystal structure coordinates helps prevent incorrect docking poses.

A grid is defined using the 'Grid Extension' parameter visible at the top level of the sub-protocol and has been set to a default 8 Å distance from the ligand's center of mass. Details of the modified CDOCKER process begin with creation of the CHARMM set-up files and generation of the CDOCKER protein grid. Ligand partial atomic charges and atom types default to those of Momany-Rone force field [36] as implemented in CHARMM. The typed ligand is first run through an ABNR minimization stage [30]. Ligand conformations are then generated, in the absence of protein, through high-temperature MD simulations and a specified number (top level parameter, default = 20) of simulations are applied. The starting ligand conformation for each MD simulation is that of its predecessor. Conformations resulting from each MD simulation are then docked into the protein and minimized using steepest-descent (SD), preparing them for final refinement. It is only during this initial docking and conformer refinement phase where an energy grid for the ligand is imposed and nonbonded interactions involving van der Waals and electrostatic potentials are softened, enabling enhanced sampling of conformational space. The core is held fixed throughout the conformer generation and docking phase. With the core now unconstrained, the docked poses are then further refined in the receptor active site using a simulated annealing protocol and a full MD minimization (SD + conjugate-gradient). During this process the protein is held rigid. A user-specified number of top poses (top level parameter), based on the largest minus CDOCKER scores, are saved for the final rescoring step. Many of the advanced CHARMM parameters have been optimized and do not require changing from their default values.

3.1.3.2 Calculated binding energy (CBE) subprotocol. The CDOCKER docked ligands are rescored using a physics-based implicit solvation model as the final step. Within the CBE subprotocol step, the docked ligand poses are rank scored in terms of their binding energies. For this study, top CDOCKER poses of neutral and/or charged ligands were rescored using Molecular Mechanics-Generalized Born with Molecular Volume (MM-GBMV) and/or Molecular Mechanics-Generalized Born with Simple Switching (MM-GBSW) methods in DS CHARMM, which approximates the binding energy [37–39]. Bound and unbound ligand receptor energy terms contained within the calculated binding energy include three simulations: free ligand; apo protein; and protein–ligand complex. Solute entropy contributions are ignored in these calculations. Standard output includes the binding energy terms for the three simulations and the net calculated binding energy as shown in Equation 1:

$$\Delta\Delta G_{\text{Bind}} = \Delta G_{\text{Complex}} - \Delta G_{\text{Ligand}} - G_{\text{Protein}} \quad (1)$$

In present study, the CDOCKER [33] method was performed using DS 3.5. All docked poses were scored by applying the Analyze Ligand Poses subprotocol to analyze

receptor–ligand interactions or a set of poses (the results of a docking run) using a variety of methods. Binding energies were also calculated by applying the Calculated Binding Energy subprotocol in DS 3.5 using the *in situ* ligand minimization step in the ABNR method. The lowest binding energy was taken as the best-docked conformation of the compound for the macromolecule. The docking results were given in Table 2 and Figure 1B–1E.

3.2 Pharmacophore modelling

According to the IUPAC definition, a pharmacophore model is ‘an ensemble of steric and electronic features that is necessary to ensure the optimal intermolecular interactions with a specific biological target and to trigger (or block) its biological response’. In DS software, a pharmacophore is described as the essential features or chemical substructures and their corresponding 3D locations that are responsible for the similar biological activities of a set of compounds. Typically, pharmacophore features include hydrophobic, aromatic, hydrogen bond acceptor, hydrogen bond donor, positive ionizable and negative ionizable.

3.2.1 Create pharmacophore automatically tools

The Create Pharmacophore Automatically tools allow you to automatically build pharmacophore models from a ligand, a receptor or a receptor–ligand complex. The Auto Pharmacophore Generation protocol is used based on a bioactive conformation. This protocol includes

Table 2. Molecular docking results of benzothiazoles and 3-amino-benzothiazolium derivatives with DNA topoisomerase II.

Compound	Calculated binding energy (kcal/mol)	Interacted residues (contact radius in 4 Å)*
M2	−37.996	Lys720 (2,37 Å) ^b , Arg781 ^a , Tyr782 ^c , Tyr784 ^f
M6	−13.110	Lys720 ^b , Gly765 ^c , Ala766 ^c , Arg781 ^c , Tyr782 ^c , Ile783 ^c , Tyr784 ^c
M7	+27.347	Lys720 ^b , Gly765 ^c , Ala766 ^c , Ala778 ^c , Arg781 ^c , Tyr782 ^c , Ile783 ^c , Tyr784 ^c
M9	−43.121	Lys720 ^b , Arg781 ^c , Tyr782 ^a , Tyr784 ^f
M10	−25.198	Lys720 ^{b(2)} , Arg781 ^f , Tyr782 ^f , Tyr784 ^f
M15	−24.174	Lys720 ^{b(4)} , Arg781 ^f , Tyr782 ^c , Ile783 ^c , Tyr784 ^f
BM6	+4.999	Lys720 (2) (1,89–2,35 Å), Arg781 ^f , Tyr782 ^f , Tyr784 ^f
BM1	−8.390	Lys720 ^b , Arg781 ^c , Tyr782 (2,06 Å), Tyr784 ^c
BM7	−11.338	Lys720 ^b , Asn764 ^c , Gly765 ^c , Ala766 ^c , Arg781 ^c , Tyr782 ^f , Ile783 ^c , Tyr784 ^f
BM2	+77.486	Lys720 ^f , Arg781 ^f , Tyr782 ^a , Ile783 ^f , Tyr784 ^d (2,31 Å)
BM3	−26.257	Lys720 ^b , Asn764 ^f , Gly765 ^f , Ala766 ^f , Arg781 ^c , Tyr782 (2,09 Å), Ile783 ^c , Tyr784 ^c
BM4	−6.631	Lys720 ^f , Arg781 ^c , Tyr782 ^c , Tyr784 (1,96 Å),

*Bold: H-bonds.

^aπ–π interactions.

^bπ–cation interactions.

^cπ–sigma interactions.

^dbumps (steric clash).

^eVan der Waals interactions.

^fElectrostatic interactions.

all pharmacophore features, scores all possible pharmacophore combinations, and returns the top pharmacophores. The score is based on a predictive model that uses simple descriptors derived from the type and relative location of the pharmacophore features to predict the number of hits from a diverse database.

The most widely used geometry- and feature-based pharmacophore elucidation method is Catalyst from Accelrys, which is currently part of the DS package. Catalyst is an integrated set of algorithms for conformation generation (ConFirm), molecular superimposition (HipHop), pharmacophore generation (HypoGen) and database searching (Info). HipHop and HypoGen provide two approaches for automatic pharmacophore generation.

HipHop provides feature-based alignment of a collection of compounds without considering the activity. It matches the chemical features of a molecule against drug candidate molecules. HipHop takes a collection of conformational models of molecules and a selection of chemical features, and produces a series of molecular alignments in a variety of standard file formats. HipHop begins by identifying configurations of features common to a set of molecules. A configuration consists of a set of relative locations in 3D space and associated feature types. A molecule matches the configurations if it possesses conformations and structural features that can be superimposed within a certain tolerance from the corresponding ideal locations. HipHop also maps partial features of molecules in the alignment set. This provision gives the option to use partial mapping during the alignment. Partial mapping allows us to identify larger, more diverse, more significant hypotheses and alignment models without the risk of missing compounds that do not have to map to all of the pharmacophore features.

In this study, pharmacophore analysis of the docking pose of BM3 was done by using Auto Pharmacophore Generation method in DS 3.5. The Auto Pharmacophore Generation protocol considers the following feature types to generate a selective pharmacophore model

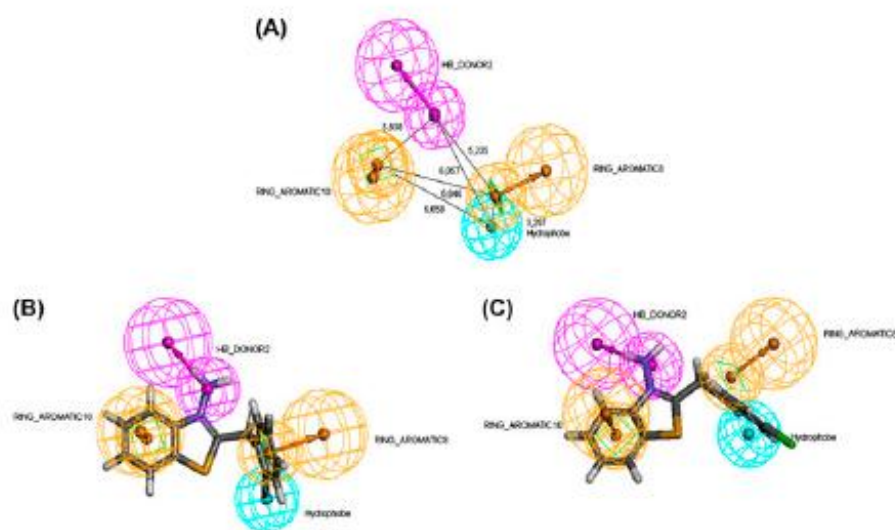


Figure 2. (A) Pharmacophore model of the docking pose of BM3. The model contains four features: one hydrophobic (cyan), two ring aromatic (orange) and one hydrogen bond donor (pink). (B) The mapping of BM3 (fit value 3.96), to hypo10. (C) The mapping of BM7 (fit value 2.51), to hypo10.

Table 3. Alignment of common-feature pharmacophore model with test set.

Compound	Fit value
BM3	3.96037
BM4	2.76215
BM6	2.57326
BM1	2.55159
BM2	2.51312
BM7	2.50526
M10	No map found
M15	No map found
M2	No map found
M6	No map found
M7	No map found
M9	No map found

from a bioactive conformation of a single ligand (BM3): hydrogen bond acceptor; hydrogen bond donor; hydrophobic feature; negative ionizable feature; positive ionizable feature; and aromatic ring feature. Ten pharmacophore hypotheses were performed by using Auto Pharmacophore Generation. Hypothesis 10 (Hypo10) was chosen as the best hypothesis and tested to the others. The distances of the best hypothesis were shown in Figure 2A. The fit values of all the compounds were indicated in Table 3.

4. Results and discussion

In this study, we used benzothiazole derivatives and their corresponding benzothiazolium forms that had been previously synthesized and shown inhibitory activities against DNA topoisomerase II to interpret the interaction of the 12 molecules with DNA topoisomerase II enzyme by theoretically comparing them with the experimental data.

In the earlier study, 3-amino-2-(2-bromobenzyl)-1,3-benzothiazole-3-ium 4-methylbenzene sulfonate (BM3) was not only the most potent inhibitor, it was also extremely active compared with the standard drug, etoposide, among the tested benzothiazoles and benzothiazoliums [21]. In the present study, we showed the different activity mechanisms of benzothiazoliums and benzothiazole derivatives by using Molecular Docking and Pharmacophore identification protocols of DS 3.5.

It could be stated that BM3 is a catalytic inhibitor of topoisomerase II, and neither a poison nor an intercalator. Moreover, that BM3 plays a preventive role in the DNA binding ability of topoisomerase II. This could be explained by BM3 directly interacts with the topoisomerase II enzyme without interacting with DNA.

It was previously reported that there was a clear evidence for a covalent 5' link between DNA and the active site tyrosine (Tyr782) resident in topoisomerase II's winged helix domain (WHD) [22,23]. The docking studies showed that BM3 bound to Tyr782 at the active site to prevent topoisomerase II enzyme binding to its substrate DNA. This was one of the reasons why we selected the DNA topoisomerase II enzyme of *S. cerevisiae*, which was not bound to DNA at its present form as its PDB code (1BJT) for the molecular docking studies. Benzothiazole and benzothiazolium derivatives were docked into the topoisomerase II enzyme (PDB ID: 1BJT) using the CDocker method of DS 3.5. All the docking results are shown in Table 2.

Additionally, pharmacophore analysis of the docking pose of BM3 was performed using the Auto Pharmacophore Generation method in DS 3.5. Hypothesis 10 was chosen as the best hypothesis (Figure 2) and the rest of the compounds were used as a test set and mapped with Hypo 10 using the rigid method in DS 3.5. All the fitted values were shown in Table 3.

As a result of the molecular modeling studies, the NH_2 group attached to the third position of the 3-amino-benzothiazolium ring in BM3, which is the most active compound, makes a hydrogen bond with Tyr782 (binding energy is -26.257 kcal/mol). It also fitted to the hydrogen bond donor feature of Hypo10. The phenyl ring on the second position of the benzothiazole ring has π -cation interactions with Lys720 and fitted to the ring aromatic feature of Hypo10 (Figure 1B, Figure 2B). In this way, BM3 binds to the active site tyrosine (Tyr782) and shows inhibitory activity by blocking the active site of the enzyme, which seems consistent with the experimental data found [21]. When we look at the compound M10, which is the base form of BM3, the benzothiazole ring of this compound has only π -cation interactions with Lys720 (Figure 1C) and it does not bind to Tyr782. Binding to Tyr782 is very important such that BM3 prevents the binding of DNA, which binds via Tyr782, to DNA topoisomerase II to continue its function to survive.

According to the pharmacophore analysis, it is observed that any of the benzothiazole derivatives (M10, M15, M2, M6, M7 and M9) that have no cation form and do not carry amino group at the third position are not mapped into Hypo 10 as seen in Table 3. Thus it can be considered that the activity mechanisms of benzothiazoliums and benzothiazole derivatives are different.

5. Conclusions

In 2013, some of the new six benzothiazole derivatives and their corresponding 3-amino-benzothiazolium forms were synthesized and their inhibitory activities on DNA topoisomerase II enzyme were determined by our group [21]. According to our earlier study, the 2-substituted-benzothiazole derivatives (M2, M6, M7, M9, M10 and M15) indicated IC_{50} values of topoisomerase II inhibitory activity between 6.678 mM and 8.1 μM . Among the benzothiazole derivatives, only 2-(4-bromophenyl)benzothiazole (M9) with an IC_{50} of 8.1 μM was found to be more effective than the standard drug, etoposide ($\text{IC}_{50} = 10 \mu\text{M}$). However, 2-substituted-3-aminobenzothiazolium derivatives (BM6, BM1, BM7, BM2, BM3 and BM4, which were the 4-methylbenzene sulfonate salts of 3-amino-benzothiazolium derivatives of M2, M6, M7, M9, M10 and M15, respectively) showed the inhibition effect on topoisomerase II with IC_{50} values of 8.457 mM to 39.4 nM. While the compound M10 had an IC_{50} value of 788 μM , its 3-amino-benzothiazolium *p*-toluenesulfonate salt (BM3) was found to be the most potent inhibitor; it was also extremely active compared with the standard drug, etoposide, among the tested compounds. The results suggested that BM3 inhibited topoisomerase II by a different mechanism. To explore the mechanisms of the topoisomerase II inhibitory activity of benzothiazole and 3-aminobenzothiazolium derivatives, molecular docking and pharmacophore analysis were performed in this study.

It was previously reported that there was a clear evidence for a covalent 5' link between DNA and the active site tyrosine (Tyr782) resident in topoisomerase II's winged helix domain [22,23]. And, according to earlier studies, BM3 played a preventive role in the DNA binding ability of topoisomerase II [21]. It could be considered that BM3 bound to this active site via Tyr782 and played preventive role in DNA binding ability of topoisomerase II. We showed the interactions of benzothiazole and 3-aminobenzothiazol-3-ium derivatives with

topoisomerase II by using molecular docking studies. The results of this process were compared with the experimental data to identify the interaction mechanisms of 12 compounds with topoisomerase II. The most potent 3-amino-2-(2-bromobenzyl)-1,3-benzothiazole-3-ium 4-methylbenzene sulfonate (BM3) was chosen for the template revealing their interactions on topoisomerase II.

From the results of molecular docking, it can be concluded that benzothiazolium compounds bind to the active site tyrosine 782 to prevent the interactions between DNA and the topoisomerase II enzyme. This property of the benzothiazoliums most probably executes the cell proliferation process in tumor cells. The methods presented in this study are able to provide valuable information about key features and interactions that are important for the biological activity of the compound, BM3. Our present study showed that the 3-amino group, as well as the CH₂ bridge and the bromine atom bound on the *ortho* position of the phenyl ring substituted at the second position of benzothiazole, play a significant role in enhancing the activity. Moreover, according to the performed docking and pharmacophore analysis results, it can be stated that 3-amino-benzothiazol-3-ium derivatives exhibit a totally different mechanism than neutral benzothiazoles, which do not bind to the active site in the same way as 3-amino-benzothiazolium compounds. In conclusion, BM3 would be a good anticancer candidate for preclinical studies and 3-amino-benzothiazoliums are worth carrying onto anticancer studies.

Acknowledgements

This paper was presented at the 7th CMTPI conference in Seoul, 8–12 October 2013. We thank the Research Fund of Ankara University (Grant No: 12B3336002 and Grant No: 11A3336001) for financial support for this study.

References

- [1] L.F. Liu and J.C. Wang, *Supercoiling of the DNA template during transcription*, Proc. Natl. Acad. Sci. 84 (1987), pp. 7024–7027.
- [2] V.F. Holmes and N.R. Cozzarelli, *Closing the ring: Links between SMC proteins and chromosome partitioning, condensation, and supercoiling*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (2000), pp. 1322–1324.
- [3] J.C. Wang, *Cellular roles of DNA topoisomerases: A molecular perspective*, Nature 3 (2002), pp. 430–440.
- [4] J.A. Holden, *DNA topoisomerases as anticancer drug targets: From the laboratory to the clinic*, Curr. Med. Chem. Anticancer Agent 1 (2001), pp. 1–25.
- [5] Z. Topcu, *DNA topoisomerases as targets for anticancer drugs*, J. Clin. Pharm. Ther. 26 (2001), pp. 405–416.
- [6] J.C. Wang, *DNA topoisomerases*, Annu. Rev. Biochem. 65 (1996), pp. 635–692.
- [7] J.M. Berger, *Structure of DNA topoisomerases*, Biochim. Biophys. Acta 1400 (1998), pp. 3–18.
- [8] S.H. Kaufmann, *Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs: More questions than answers*, Biochim. Biophys. Acta 1400 (1998), pp. 195–211.
- [9] Y. Pommier, *Diversity of DNA topoisomerases I and inhibitors*, Biochimie 80 (1998), pp. 255–270.
- [10] M.R. Redinbo, L. Stewart, P. Kuhn, J.J. Champoux, and W.G. Hol, *Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA*, Science 279 (1998), pp. 504–507.
- [11] G.L. Chen, L. Yang, T.C. Rowe, B.D. Halligan, K.M. Tewey, and L.F. Liu, *Nonintercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II*, J. Biol. Chem. 259 (1984), pp. 13560–13566.

- [12] J.L. Nitiss, *Investigating the biological function of DNA topoisomerases in eukaryotic cells*, Biochem. Biophys. Acta 14 (1998), pp. 63–81.
- [13] K.H. Cho, J.M. Pezzuto, J.L. Bolton, V.E. Steele, G.J. Kelloff, S.K. Lee, and A. Constantinou, *Selection of cancer chemopreventive agents based on inhibition of topoisomerase II activity*, Eur. J. Cancer 36 (2000), pp. 2146–2156.
- [14] Y. Pommier, A. Orr, K.W. Kohn, and J.F. Riou, *Differential effects of amsacrine and epipodophyllotoxins on topoisomerase II cleavage in the human c-myc proto-oncogene*, Cancer Res. 52 (1992), pp. 3125–3130.
- [15] A. Pinar, P. Yurdakul, I. Yildiz, Ö. Temiz-Arpaci, N.L. Açan, E. Aki-Sener, and I. Yalcin, *Some fused heterocyclic compounds as eukaryotic topoisomerase II inhibitors*, Biochem. Biophys. Res. Comm. 317 (2004), pp. 670–674.
- [16] B. Tekiner-Gulbas, L. Filak, G.A. Vasko, O. Egyed, I. Yalcin, E. Aki-Sener, Z. Riedl, and G. Hajos, *Synthesis of novel pyrazolo[5,1-b][1,3]benzothiazoles: A new pericyclic pathway*, Heterocycles 75 (2008), pp. 2005–2012.
- [17] T. Taskin, S. Yilmaz, I. Yildiz, I. Yalcin, and E. Aki, *Insight into eukaryotic topoisomerase II-inhibiting fused heterocyclic compounds in human cancer cell lines by molecular docking*, SAR QSAR Environ. Res. 23 (2012), pp. 345–355.
- [18] E. Oksuzoglu, B. Tekiner-Gulbas, S. Alper, O. Temiz-Arpaci, T. Ertan, I. Yildiz, N. Diril, E. Sener-Aki, and I. Yalcin, *Some benzoxazoles and benzimidazoles as DNA topoisomerase I and II inhibitors*, J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 23 (2007), pp. 37–42.
- [19] B. Tekiner-Gulbas, O. Temiz-Arpaci, I. Yildiz, E. Aki-Sener, and I. Yalcin, *3D-QSAR study on heterocyclic topoisomerase II inhibitors using CoMSIA*, SAR QSAR Environ. Res. 17 (2006), pp. 121–132.
- [20] H. Age, B. Tekiner-Gulbas, O. Temiz-Arpaci, E. Aki-Sener, and I. Yalcin, *High antineoplastic activity of heterocyclic DNA topoisomerase II inhibitors in cancer cells with resistance against classical DNA topoisomerase II-targeting drugs and structure-activity relationships*, Int. J. Cancer 119 (2006), pp. 213–220.
- [21] C. Kaplan-Ozen, B. Tekiner-Gulbas, E. Foto, I. Yildiz, N. Diril, E. Aki, and I. Yalcin, *Benzothiazole derivatives as human DNA topoisomerase IIa inhibitors*, Med. Chem. Res. 22 (2013), pp. 5798–5808.
- [22] K.C. Dong and J.M. Berger, *Structural basis for gate-DNA recognition and bending by type IIA topoisomerases*, Nature 450 (2007), pp. 1201–1205.
- [23] B.H. Schmidt, A.B. Burgin, J.E. Deweese, N. Osheroff, and J.M. Berger, *A novel and unified two-metal mechanism for DNA cleavage by type II and IA topoisomerases*, Nature 465 (2010), pp. 641–644.
- [24] Discovery Studio 3.5, Accelrys Software Inc., San Diego 2013; software available at <http://accelrys.com/products/discovery-studio>.
- [25] C. Hansch and A. Leo, *Exploring QSAR: Fundamentals and Applications in Chemistry and Biochemistry*, American Chemical Society, Washington DC, 1995.
- [26] C. Hansch and T. Fujita, *p-σ-π Analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure*, J. Am. Chem. Soc. 86 (1964), pp. 1616–1626.
- [27] V.E. Golender and E.R. Vorpapel, *Computer-assisted pharmacophore identification*, in *3D-QSAR in Drug Design. Volume 1: Theory, Methods and Applications*, H. Kubinyi, ed., ESCOM Science Publishers, Leiden, The Netherlands, 1993, pp. 137–199.
- [28] B. Tekiner-Gulbas, O. Temiz-Arpaci, E. Oksuzoglu, H. Eroglu, I. Yildiz, N. Diril, E. Aki-Sener, and I. Yalcin, *QSAR of genotoxic active benzazoles*, SAR QSAR Environ. Res. 18 (2007), pp. 251–263.
- [29] E.M. Krovat, K.H. Fruhwirth, and T. Langer, *Pharmacophore identification, in silico screening, and virtual library design for inhibitors of the human factor Xa*, J. Chem. Inf. Model. 45 (2005), pp. 146–159.

- [30] B.R. Brooks, R.E. Bruccoleri, B.D. Olafson, D.J. States, S. Swaminathan, and M. Karplus, *CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations*, J. Comput. Chem. 4 (1983), pp. 187–217.
- [31] D. Fass, C.E. Bogden, and J.M. Berger, *Quaternary changes in topoisomerase II may direct orthogonal movement of two DNA strands*, Nature Struct. Bio. 6 (1999), pp. 322–326.
- [32] C. Brooks, III *assessing, improving and using grid-based docking algorithms in CHARMM*, Abstracts of Papers, Proceedings of the 233rd National Meeting and Exposition of the American Chemical Society, Chicago, IL, 25–29 March 2007, Abstract COMP-250.
- [33] G. Wu, D.H. Robertson, C.L. III. Brooks, and M. Vieth, *Detailed analysis of grid-based molecular docking: A case study of CDOCKER- A CHARMM-based MD docking algorithm*, J. Comput. Chem. 24 (2003), pp. 1549–1562.
- [34] P.D. Lyne, M.L. Lamb, and J.C. Saeh, *Accurate prediction of the relative potencies of members of a series of kinase inhibitors using molecular docking and MM-GBSA scoring*, J. Med. Chem. 49 (2006), pp. 4805–4808.
- [35] N. Moitessier, P. Englebienne, D. Lee, J. Lawandi, and C.R. Corbeil, *Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: A long way to go*, Br. J. Pharmacol. 153 Suppl. 1 (2008), pp. S7–S26.
- [36] F.A. Momany and R. Rone, *Validation of the general purpose QUANTA 3.2/CHARMM force field*, J. Comput. Chem. 13 (1992), pp. 888–900.
- [37] B. Jayaram, D. Sprous, and D.L. Beveridge, *Solvation free energy of biomacromolecules: Parameters for a modified generalized born model consistent with the AMBER force field*, J. Phys. Chem. B102 (1998), pp. 9571–9576.
- [38] I. Massova and P.A. Kollman, *Combined molecular mechanical and continuum solvent approach (MM-PBSA/GBSA) to predict ligand binding*, Perspect. Drug Discov. 18 (2000), pp. 113–135.
- [39] J. Srinivasan, T.E. III. Cheatham, P. Cieplak, P.A. Kollman, and D.A. Case, *Continuum solvent studies of the stability of DNA, RNA, and phosphoramidate-DNA helices*, J. Am. Chem. Soc. 120 (1998), pp. 9401–9409.