

## 4. MOLEKÜLER MODELLEME TEKNİKLERİ

Organizmanın yapısı ve ilaç molekülünün organizmadaki yolculuğunun karmaşıklığı düşünüldüğünde, ilaç tasarımının zorlukları kolaylıkla görülebilir. Ayrıca günümüzde pekçok hastalığın (romatoid artrit, kanser, mental hastalıklar gibi) nedenleri tam olarak açıklanamamıştır ve bu hastalıklar için ilaç geliştirmek daha da güçtür. Bu zorlukların yanında, sentezi yapılan on bine yakın bileşikten ancak birkaçı ilaç olarak kullanıma girebilmektedir ve bunları geliştirebilmek için çok yüksek miktarlarda maliyet gerekmektedir. Tüm bu nedenlerden dolayı günümüzde rasyonel (akılcı) biçimde ilaç tasarlama zorunluluğu doğmuştur. Birçok fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmanın ve bunların hastalıklarla ilişkilerinin moleküler düzeyde anlaşılması, bazı reseptör ve yapılarının aydınlatılması bilgisayar destekli ilaç tasarım yöntemlerinin gelişmesine katkıda bulunmuştur.

Bilgisayar yardımıyla ilaç tasarlama yöntemleri genellikle mekanizmaya dayalı olarak yapılmaktadır. Mekanizmaya dayalı tasarım için;

- 1- Biyolojik temel (fizyolojik yolak) bilinmeli
- 2- Tüm çalışmalar moleküler düzeyde gerçekleştirilebilmelidir.

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

Moleküler modelleme *moleküler grafik* veya *konformasyon analizi* olarak da adlandırılır. Bu yöntemle öncü molekül veya analog tasarımı için bilgisayar programları veya X-ışınları kristallografisi gibi yöntemlerle ilacın moleküler şekli veya konformasyonu araştırılır.

Moleküler modelleme teknikleri kullanılarak;

- 1- Molekülün üç boyutlu yapısı
- 2- Fizikokimyasal özellikleri
- 3- Molekülün başka moleküller ile kıyaslanması
- 4- İlaç-reseptör etkileşimleri incelenebilir ve daha etkili bileşikler tasarlanması için bilgi sağlanır.

### ***Bilgisayar Ortamında Üç Boyutlu Yapının Oluşturulması :***

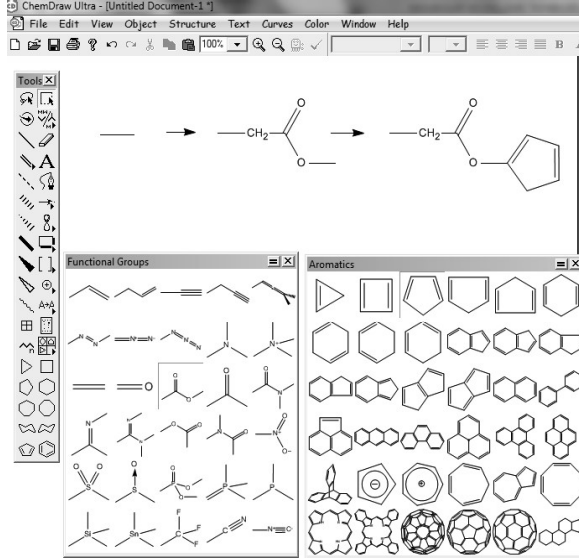
- 1- X-ışınları kristallografisi aracılığı ile oluşturulan veri bankalarından direk olarak molekülün üç boyutlu yapısı alınabilir.

The screenshot displays the RCSB Protein Data Bank interface for the entry 3RR3. The main content area shows the title "Structure of (R)-flurbiprofen bound to mCOX-2" and the PDB ID "3RR3". Below this, there is a section for "Primary Citation" with the following text: "(R)-Profens are substrate-selective inhibitors of endocannabinoid oxygenation by COX-2. Duggan, K.C., Hermanson, D.J., Musee, J.P., Prusakiewicz, J.J., Scheib, J.L., Carter, B.D., Banerjee, S., Oates, J.A., Marnett, L.J. Journal: (2011) Nat.Chem.Biol. 7: 803-809". The "PubMed Abstract" section provides a summary of the study: "Cyclooxygenase-2 (COX-2) catalyzes the oxygenation of arachidonic acid and the endocannabinoids 2-arachidonoylglycerol and arachidonyl ethanolamide. Evaluation of a series of COX-2 inhibitors revealed that many weak competitive inhibitors of arachidonic acid oxygenation are potent inhibitors of endocannabinoid oxygenation. (R) enantiomers of... [ Read More & Search PubMed Abstracts ]". The "Molecular Description" section lists the protein as "Prostaglandin G/H synthase 2" with a length of 560 amino acids. A 3D visualization of the protein structure is shown on the right side of the page, with a "View in 3D" button and a "More Images..." link. The page also includes a navigation menu on the left and a "Deposition Summary" section at the bottom right.

**Şekil 4.1.** Protein veri bankasında yer alan COX-2 enzimi ve (R)-Flurbiprofen yapısı (pdb kodu: 3RR3)

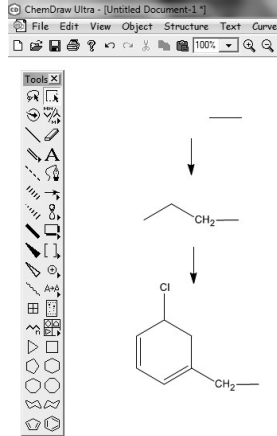
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3rr3>

2- Programda yer alan fragman verilerinden yararlanılarak 3 boyutlu yapı oluşturulabilir.



Şekil 4.2. ChemDraw programında yer alan fragmanlar kullanılarak moleküllerin oluşturulması

3- Programda yer alan taslak çizme özellikleri yardımıyla molekül üç boyutlu olarak çizilebilir.



Şekil 4.3. ChemDraw programında yer alan taslak çizme özellikleri kullanılarak moleküllerin oluşturulması

Moleküldeki atomlar değişik renklerle gösterilir. Genellikle kullanılan renkler aşağıdaki gibidir:

Karbon	→	gri
Hidrojen	→	beyaz
Azot	→	mavi
Oksijen	→	kırmızı ile gösterilir.

Fizikokimyasal özelliklerden :

Hidrofilik bölge	→	mavi
Hidrofobik bölge	→	kırmızı

Elektrostatik potansiyel enerji :

Pozitif enerji	→	mavi
Negatif enerji	→	kırmızı
Nötral enerji	→	yeşil

### ***Moleküler Modelleme Teknikleri Kullanılarak Gerçekleştirilen Tasarım Uygulamaları***

X-ışınları kristallografisi ile kristal yapı çözümlenerek üç boyutlu yapı aydınlatılabilir.

Molekülün atomik koordinatlarını da içeren kristalografik analiz sonucu elde edilen veriler çeşitli veri dosyaları (database) şeklinde temin edilebilir.

Örneğin :Cambridge Crystallographic Database  
Protein Data Bank (NLI, Brookhaven)

Protein-ligand ve enzim-inhibitör komplekslerinin kristalografik analizleri ile yapıları aydınlatılarak kompleksin oluşumundaki bağ tipleri saptanabilir.

Üç boyutlu tasarımda moleküllerin grafiksel gösterimleri, özel çalışma istasyonları (Workstation) ile çalışan bilgisayar programları kullanılarak gerçekleştirilmektedir.

Unix işletim sistemi ile çalışan bu bilgisayarlar SGI (Silicon Graphics International) adı verilmektedir. En yaygın olarak kullanılan bilgisayar programları arasında Tripos® firması tarafından geliştirilen Sybyl™, Amber™, Schrodinger® tarafından geliştirilen MacroModel™, Maestro™, Accelrys® firması tarafından geliştirilen Catalyst™, Cerius™, Discovery Studio sayılabilir.

Ayrıca PC ve Macintoshlarda kullanılan programlar da bulunmaktadır. Örneğin; Hyperchem 6.0, Alchemy 2000, Spartan, Gaussian 03, MOPAC, CS ChemDraw Pro da yer alan CS Chem3D Pro'dur.

### **Moleküler Modelleme Teknikleri Uygulama**

Aşağıda verilen bileşikler, 3D Moleküler modellemede kullanılan programlardan ChemDraw ile çizilerek uzantısı .cdx olarak kaydedilir. Chem3D Pro programında aynı dosya açılıp ortaya çıkan molekülün geometrisi MM2 metodu kullanılarak optimize edilir.

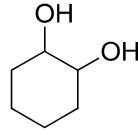
Optimize olan bileşiğin enerjisi, torsiyon açıları, bağ açıları, bağ uzunlukları, moleküllerin sterik (MW, MR), hidrofobik (Log P) ve yapısal özellikleri incelenir.



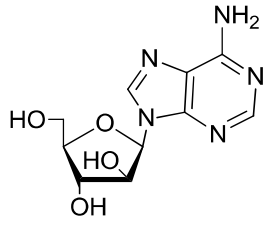
Benzen



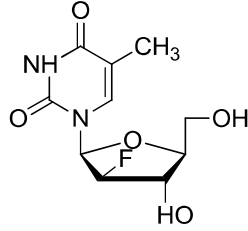
Sikloheksan



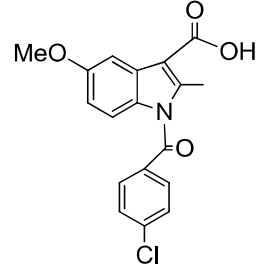
Sikloheksan-1,2-diol



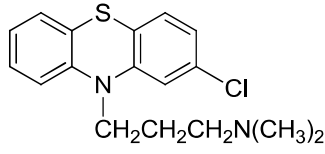
Vidarabin



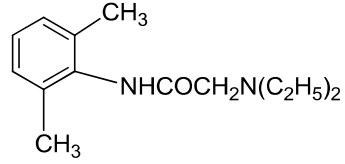
L-FMAU



Indometazin



Klorpromazin



Lidokain

### Sorular

1. Sikloheksan yapısının en kararlı olduğu konformasyonu hangisidir? Nedeni ile açıklayınız.
2. Enzim-ilaç etkileşmelerinde rol oynayan faktörler nelerdir?
3. Efektörün tanımını yapınız.
4. Biyolojik etkinin tanımını yapınız.

### Ödev

İkincil yapı (Secondary structure), ve onun içeriğinde yer alan  $\alpha$  sarmal ( $\alpha$  helix) ve  $\beta$  yaprak ( $\beta$  sheet) ne demektir araştırınız. Şekil 4.8'de görülen Topoizomeraz I enziminin yapısını irdeleyiniz.

#### 4.1. BİLGİSAYAR DESTEKLİ İLAÇ ETKEN MADDE TASARIM VE GELİŞTİRME YÖNTEMLERİ

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

Bilgisayar destekli ilaç etken maddesi tasarımı için iki kaynak hareket noktası kullanılmaktadır.

**1- Hedef** = Reseptörler, enzimler, nükleik asitler

**2- Efektör** = Hedefin etkili yüzeyini işgal eden, hedefi olumlu ya da olumsuz etkileyen doğal endojen maddeler veya ilaçlar olabilir.

Bilgisayar destekli ilaç molekülü tasarım ve geliştirme çalışmaları iki grupta incelenir.

- 1- Efektör (Ligand) Yapısına Dayalı Yöntemler
  - Kantitatif yapı-Etki İlişkileri Analizleri (QSAR)
  - Farmakofor analizi
- 2- Hedef Yapısına Dayalı Yöntemler
  - Moleküler Doking

Ligand yapısına dayalı tasarımda etki gösteren moleküllerin yapısından faydalanılarak reseptör yapısının yorumlanması amaçlanmaktadır. Hedef yapısına dayalı tasarımda ise, bilinen reseptör yapısından hareketle etki gösterebilecek moleküllerin tasarlanması amaçlanmaktadır.

#### 4.1.1. Efektör Yapısına Dayalı Yöntemler

##### 4.1.1.1. Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri (QSAR)

Kantitatif yapı-etki ilişkileri (QSAR), kimyasal bileşiklerin moleküler nitelikleri (yapısal/fizikokimyasal özellikleri) ile biyolojik aktiviteleri arasındaki ilişkileri matematiksel yöntemlerle tanımlama işlemleridir.

QSAR analizlerinin amacı, ilaç etken maddesi olarak tasarlanan bileşiklerin moleküler nitelikleri ile biyolojik etkileri arasındaki ilişkileri değerlendirerek, ideal ilaç etken maddesi olabilecek yeni molekülleri tasarlamaktır.

Bir seri bileşik üzerinden geliştirilen yapı-etki ilişkileri analiz denklemleri kullanılarak henüz sentezi yapılmamış ve etkisi saptanmamış bir bileşiğin etki değerini tahmin etmek ve böylece daha iyi etki gösterebilecek yeni bir bileşiği tasarlamak amacı ile kullanılabilir. Ancak, QSAR analizleri daha çok var olan bir bileşiğin toksisitesini azaltmak, seçilen bir bariyeri (örneğin kan-beyin bariyeri veya diğerleri) geçmek için optimum lipofilik özelliğe sahip lider yapıyı optimize etmek gibi amaçlar için yararlı olmuştur. QSAR çalışmalarında her çeşit biyolojik yanıt veri olarak kullanılabilir. Bunlar;

- 1- Afinite verileri: substrat veya reseptöre bağlanma
- 2- Hız sabiteleri: assosiyasyon, disosiyasyon
- 3- İnhibisyon sabiteleri: IC<sub>50</sub>, enzim inhibisyon değerleri
- 4- Farmakokinetik parametreler: absorpsiyon, dağılım, metabolizma, atılım
- 5- *In vitro* biyolojik aktivite verileri
- 6- *In vivo* biyolojik aktivite verileri
- 7- İlaçların farmakodinamik verileri (ilaç-reseptör etkileşimi)
- 8- Toksik etki parametreleridir.

Kantitatif yapı-etki ilişkileri analiz çalışmalarında kullanılan parametreler, ilaç reseptör etkileşimini sağlayan intramoleküler güçleri ve ilacın taşınma, dağılım gibi faaliyetlerini nicel olarak tanımlamak için kullanılan sabitelerdir.



Yapı-etki çalışmalarında kullanılan parametreler Tablo 4.1.'de yer almaktadır.

**Tablo 4.1.** Yapı-etki çalışmalarında kullanılan fizikokimyasal parametreler

<b>FİZİKOKİMYASAL PARAMETRELER</b>	<b>SEMBOLÜ</b>
<b>HİDROFOBİK PARAMETRELER</b>	
Partisyon Katsayısı	Log P, (log P) <sup>2</sup>
Pi Süstitüent Sabitesi	$\pi$ , ( $\pi$ ) <sup>2</sup>
Sıvı-sıvı Kromatografi Dağılım Katsayısı	R <sub>M</sub>
Hidroforik Fragman Sabitesi	f
<b>ELEKTRONİK PARAMETRELER</b>	
İyonizasyon sabitesi	pK <sub>a</sub>
Sigma Aromatik Süstitüent Sabitesi	$\sigma_m$ , $\sigma_m$
Modifiye $\sigma$ Aromatik Süstitüent Sabiteleri	$\sigma^+$ , $\sigma^-$ , $\sigma_1$ , $\sigma_R$ , $\sigma^o$
Sigma Alifatik Süstitüent Sabitesi	$\sigma^*$
Süstitüent Rezonans Etkisi	R
Süstitüent Alan Etkisi	F
<b>KUANTUM MEKANİK PARAMETRELER</b>	
Atomik $\sigma$ Elektron Ağı Yüğü	$q^\sigma$ , $Q^\sigma$
Atomik $\pi$ Elektron Ağı Yüğü	$q^\pi$ , $Q^\pi$
Nükleofilik Süperdelokalize Durum	S <sub>r</sub> <sup>N</sup>
Elektrofilik Süperdelokalize Durum	S <sub>r</sub> <sup>E</sup>
Endüşük Boş Moleküler Orbital Enerjisi	E <sub>LUMO</sub>
Enyüksek Dolu Moleküler Orbital Enerjisi	E <sub>HOMO</sub>
<b>STERİK PARAMETRELER</b>	
Sterik Süstitüent Sabitesi	E <sub>S</sub>
Molar Volüm	MV
Molar Refraktivite Süstitüent Sabitesi	MR
Moleküler Ağırlık	MW
Van der Waals Yarıçapı	R
Sterimol Genişlik ve Uzunluk Parametreleri	L, B <sub>1</sub> -B <sub>4</sub>

Kantitatif yapı-etki ilişkileri çalışmalarında fizikokimyasal parametrelerin dışında kullanılan yapısal (indikatör) değişkenlerde söz konusudur. Yapısal parametre kantitatif yapı-etki ilişkileri analizinin uygulandığı kimyasal bileşiklerin moleküler yapılarında yer alan herhangi bir konum eğer yeterli sayıda süstitüent değişimini içermiyorsa kullanılmaktadır. İndikatör değişkenler (yapısal parametreler) analizlenen moleküldeki süstitüent (niteliğin) var veya yok olmasına göre sırasıyla "1" veya "0" olarak belirlenir.

QSAR çalışmalarında en fazla kullanılan ve ilgi gösterilen fizikokimyasal nitelik lipofilik özellik olmuştur. Lipofilite su ve yağ fazı arasındaki dağılıma olarak tanımlanabilir. Bu dağılımı gösteren parametreler Log P ve  $R_M$ 'dir.

### **Log P = Partisyon katsayısı**

Kimyasal bileşiğin lipit-su tabakaları arasına dağılan konsantrasyonunu ifade eden bir parametredir. Bu amaçla en uygun solvan sisteminin 1-oktanol / su olduğu bulunmuştur.

Su olarak, fizyolojik pH'yı (pH=7.4) taklit etmek üzere hazırlanan tampon çözelti ifade edilir.

1-Oktanol'ün organizmadaki lipit katmanının bir modeli olarak seçilmesinin ve uygun oluşunun nedeni, uzun alkil zinciri ve polar hidroksil (OH) grubu nedeniyle hidrofobik kuyruk ve polar bir başlık taşıyan hücre membranı lipitlerine güzel bir örnek oluşudur. 1-oktanolün taşıdığı OH grubu hidrojen bağı oluşumunda alıcı ve verici özelliğe sahiptir ve çok çeşitli polar gruplar ile etkileşebilir. 1-oktanol düşük buhar basıncına sahiptir. Böylece ölçümlerin tekrarlanabilmesine imkan verir. 1-oktanol geniş bir UV geçirgenlik aralığına sahiptir ve içinde çözünen pek çok bileşiğin kantitatif olarak miktarının saptanmasını kolaylaştırır.

### **Partisyon Katsayısı (Log P) Hesabı**

#### **1- Fragmantasyon yöntemi ile teorik Log P hesabı**

Hanch ve arkadaşları tarafından hesaplanan çeşitli atom ve atom gruplarına (çeşitli fragmanlara) ait hidrofobik etki değerlerinin toplamından yararlanılarak molekülün hidrofobik sabite (Log P) değerinin teorik olarak hesaplanma yöntemini içerir.

Matematiksel ifade şekilleri olarak aşağıdaki semboller ve ifadeler kullanılmıştır.

$f_b$  = zincirdeki fragmanlarla tek bağ arasındaki etkileşme

$f'_b$  = halkadaki fragmanlarla tek bağ arasındaki etkileşme

(düz zincirde ilk C-C bağından sonra gelen her tek bağ molekülün esnekliğini kısıtlar ve bileşiğin lipofilitesi  $f_b$  değeri kadar azalır.)

$f_{cbr}$  = zincirdeki dallanma

$f_{gbr}$  = gruptaki dallanma (Yapıda H atomu yerine polar fragmanların yer alması durumunda kullanılır.)

$f_\phi$  = bir aromatik halkaya tutunan bir fragman




$f_{\phi\phi}$  = iki aromatik halkaya tutunan bir fragman

Bazı atom ve atom grupları için saptanan Log P katkı değerleri aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

**Tablo 4.2.** Düzenlenmiş Fragman (parça) sabiteleri

<b>A</b>			
$f_H = 0.225$	$f_b = -0.12$	tek bağ (zincir ile fragman arasındaki)	
$f_{CH_3} = 0.89$	$f_b = -0.09$	tek bağ (halka ile fragman arasındaki)	
$f_{CH_2} = f_{CH_3} - f_H = 0.66$	$f_{cbr} = -0.13$	(zincirdeki dallanma)	
$f_{CH} = f_{CH_2} - f_H = 0.43$	$f_{gbr} = -0.22$	(gruptaki dallanma)	
$f_C = f_{CH} - f_H = 0.20$			
<b>B</b>			
<b>Fragman sabiteleri</b>			
Polar grup	f	$f_\phi$	$f_{\phi\phi}$
- Br	0.20	1.09	
- Cl	0.06	0.94	
- F	-0.38	0.37	
- I	0.60	1.35	
-N<	-2.16	-1.17	-1.29
-NO <sub>2</sub>	-1.26	-0.02	
- O -	-1.81	-0.57	0.53
- S -	-0.79	0.03	0.77
- NH -	-2.11	-1.03	-0.18
- NH <sub>2</sub> -	-1.54	-1.00	
- OH	-1.64	-0.40	
-CN	-1.28	-0.34	
$\begin{array}{c} O \\    \\ -C-N< \end{array}$	-3.20	-2.82	-2.09
$\begin{array}{c} O \\    \\ -C-NH- \end{array}$	-2.71	-1.81	-1.06
-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	1.90		

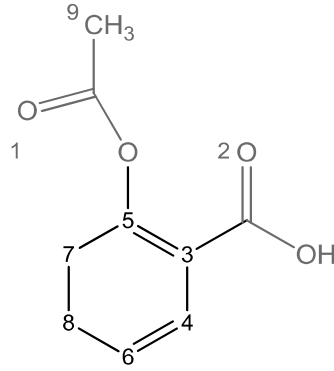
### Bazı moleküller için örnek hesaplamalar

- 1) İzobutan:  $\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
- $$3 f_{\text{CH}_3} + 1 f_{\text{CH}} + 2 f_{\text{b}} + 1 f_{\text{cbr}} = 3(0.89) + (0.43) + 2(-0.12) + (-0.13)$$
- $$= 2.73 \text{ (bulunan log P : 2.76)}$$
- 2)   $3 f_{\text{CH}_2} + 2 f_{\text{b}} = 3(0.66) + 2(-0.09)$
- $$= 1.80 \text{ (bulunan log P : 1.72)}$$
- 3)   $5 f_{\text{CH}_2} + 4 f_{\text{b}} = 5(0.66) + 4(-0.09)$
- $$= 2.94 \text{ (bulunan log P : 3.00)}$$
- 4)   $6 f_{\text{CH}_2} + 5 f_{\text{b}} = 6(0.66) + 5(-0.09)$
- $$= 3.44 \text{ (bulunan log P : 3.44)}$$
- 5)  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$   $f_{\text{C}_6\text{H}_5} + 2 f_{\text{CH}_2} + f_{\text{OH}} + 2 f_{\text{b}}$
- $$= (1.90) + 2(0.66) + (-1.64) + 2(-0.12)$$
- $$= 1.34 \text{ (bulunan log P : 1.36)}$$
- 6)  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$   $f_{\text{C}_6\text{H}_5} + 2 f_{\text{CH}_2} + f_{\text{NH}_2} + 2 f_{\text{b}}$
- $$= (1.90) + 2(0.66) + (-1.54) + 2(-0.12)$$
- $$= 1.44 \text{ (bulunan log P : 1.41)}$$
- 7)  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$   $f_{\text{C}_6\text{H}_5} + 2 f_{\text{CH}_2} + f_{\text{Cl}} + 2 f_{\text{b}}$
- $$= (1.90) + 2(0.66) + (0.06) + 2(-0.12)$$
- $$= 3.04 \text{ (bulunan log P : 2.95)}$$
- 8)  $\text{HOCH}(\text{CH}_3)_2$   $2 f_{\text{CH}_3} + 1 f_{\text{CH}} + f_{\text{OH}} + 2 f_{\text{b}} + f_{\text{gbr}}$
- $$= 2(0.89) + (0.43) + (-1.64) + 2(-0.12) + (-0.22) = 0.11 \text{ (bulunan log P : 0.05)}$$
- 9)  $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_3)_3$   $3 f_{\text{CH}_3} + 1 f_{\text{C}} + f_{\text{NH}_2} + 3 f_{\text{b}} + 2 f_{\text{gbr}}$

$$= 3 (0.89) + (0.20) + (- 1.54) + 3 (-0.12) + 2 (-0.22) = 0.53 \text{ (bulunan log P : 0.40)}$$

## 2- ACD Log P programı kullanılarak bilgisayarla dağılma katsayısı hesabı

Aspirin molekülü ACD(Advanced Chemistry Development)/Labs firmasının ChemSketch çizim programı ile çizilerek Log P modulu kullanılmak suretiyle hidrofobik parametrelerden Log P değeri hesaplanmıştır.



*Increments of the functional groups:*

1.	-1.1231	<i>(experimental value)</i>
2.	+0.1253	<i>(experimental value)</i>

*Increments of the carbon atoms:*

3.	-0.0793	<i>(experimental value)</i>
4.	+0.3697	<i>(experimental value)</i>
5.	-0.0793	<i>(experimental value)</i>
6.	+0.3697	<i>(experimental value)</i>
7.	+0.3697	<i>(experimental value)</i>
8.	+0.3697	<i>(experimental value)</i>
9.	+0.9091	<i>(experimental value)</i>

*Interactions through aromatic system:*

1-2	-0.0416	<i>(experimental value)</i>
-----	---------	-----------------------------

*Calculated logP: 1.19 ± 0.23*

**Şekil 4.4.** Aspirin'in ACD Log P hesabıyla dağılma katsayısı hesabı

### 3- Deneysel yöntemle Log P değerinin hesaplanması

Log P Çalışmalarında kullanılacak olan 1-oktanol ve tampon çözeltilerin hazırlanışı:

20.4 g Potasyum dihidrojen fosfat, 53.72 g disodyum hidrojen fosfat.12 H<sub>2</sub>O tartılarak ayrı ayrı su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Böylece her birinden 0.15 M çözelti hazırlanmış olur. 250 ml tampon çözelti hazırlamak için 0.15 M potasyum dihidrojen fosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)çözeltisinden 49 ml, disodyum hidrojen fosfat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) çözeltisinden 201 ml alınarak karıştırılır ve çözeltinin pH'ı pH metrede ölçülerek fizyolojik pH ile uyumlu olduğu görülür. Hazırlanan bu tampon çözeltilerden 250 ml alınarak 1 L'lik ayırma hunisine aktarılır. Üzerine 250 ml 1-oktanol ilave edilir. Uygun şekilde karıştırılarak solvanların birbiri içerisinde doyması sağlanır. Daha sonra yağlı (tampon çözelti ile doyurulmuş 1-oktanol) ve sulu (1-oktanol ile doyurulmuş tampon çözelti) fazlar birbirinden ayrılır.

Bu şekilde;

1-oktanol (tampon çözelti ile doyurulmuş) tampon çözelti (1-oktanol ile doyurulmuş) hazırlanmış olur.

### Deneyin Yapılışı

10 mg civarında tam tartılmış dağılma katsayısı tayin edilecek olan bileşik 50 ml'lik bir balon jöjeye aktarılır. 1-oktanol ile 50 ml'ye tamamlanır (A çözeltisi). Bu çözeltilerden 10 ml alınıp kapaklı bir erlen içine aktarılır. Daha sonra üzerine 10 ml tampon çözelti ilave edilir. Erlen içine uygun büyüklükte bir magnet atılarak 37°C'lik (vücut ısısı) su banyosunda magnetik karıştırıcı üzerinde 1 saat karıştırılır. Bu süre sonunda erlen içeriği ayırma hunisine alınarak 1-oktanol ve su (sulu tampon çözelti) tabakaları ayrılır. Oktanol tabakasından 1 ml alınarak 1-oktanol ile 20 ml'ye tamamlanır. Bu çözeltinin 190-400 nm arasında alınan UV spectrumunda maksimum verdiği dalga boyundaki absorbans değeri (y<sub>1</sub>) belirlenir.

### Standart çözeltilerin ve kalibrasyon eğrisinin hazırlanması

Deneye başlarken hazırlanan (A) çözeltisinden 3 ayrı balonjöjeye 1'er ml aktarılır. Daha sonra balonjöljeler 1-oktanol ile ayrı ayrı 25, 50 ve 100 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan standart çözeltilerin UV spektrumları 190-400

nm arasında alınır ve maksimum verdikleri dalga boyundaki absorbands değerleri okunur.

Elde edilen absorbands değerleri kullanılarak iki ayrı çalışma yapılabilir.

### **1- Regresyon analizi yöntemi**

Matematiksel olarak 0 noktasından geçen  $y = ax + b$  doğru denklemi kullanılarak uygulanan bu yöntemde  $y$  (standart çözeltinin absorbandsı) yerine, çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanmış olan standart çözeltilerin absorbands değerleri,  $x$  yerine bu çözeltilerin konsantrasyon değerleri konularak  $a$  ve  $b$  değerleri bulunur.

Daha sonra  $\log P$  değeri tayin edilecek olan bileşiğin UV spektrumunda maksimum verdiği dalga boyundaki absorbands değeri ( $y_1$ )

$y_1 = ax_1 + b$  denkleminde  $y_1$  (örneğin absorbandsı) yerine konularak ve daha önce bulunmuş olan  $a$  ve  $b$  değerleri de yerine konularak  $x_1$  yani; oktanol tabakasına geçen bileşik konsantrasyonu (miktarı) bulunmuş olur.

Su tabakasına geçen bileşik miktarı, 1/20 oranında hazırlanmış olan standart çözelti içindeki bileşik miktarından  $x_1$  miktarı çıkarılarak bulunur.

Elde edilecek sonuçların güvenilir olabilmesi için regresyon analizi çalışmalarında elde edilen (korelasyon katsayısı)<sup>2</sup> ( $r^2$ ) değerinin 1'e yakın olması gerekmektedir. Bu da çalışmaların uygun konsantrasyonlarda dikkat ve özenle yapılması ile sağlanabilir.

### **2- Grafik Yöntemi**

Çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanmış olan standart çözeltilerin konsantrasyon değerleri  $x$  eksenine (absise), ölçülen absorbands değerleri  $y$  eksenine (ordinata) yerleştirilir. Daha sonra standart kalibrasyon eğrisi çizilir. Bu eğrinin Lambert- Beer kanununa uygun, yani absorbands ile konsantrasyon arasında düzgün doğrusal bir ilişki olduğunu gösteren '0' noktasından geçen bir doğru olması gerekmektedir.

Daha sonra numunenin absorbans değeri ( $y_1$ ) grafikte işaretlenerek oktanol tabakasına geçen bileşik konsantrasyonu (miktarı)  $x_1$  bulunur. Su tabakasına geçen bileşik miktarı regresyon analizi yönteminde belirtildiği gibi hesaplanır.

Her bileşik için bulunmuş olan 1-oktanol ve su tabakasına geçen bileşik miktarları aşağıda verilen formülde yerine konularak log P değerleri bulunur.

$$\text{Log P} = \log \frac{\text{Oktanol tabakasına geçen bileşik miktarı}}{\text{Su tabakasına geçen bileşik miktarı}}$$

### **R<sub>M</sub> Tayini**

Kromatografik R<sub>M</sub> değerleri, kimyasal yapı ile biyolojik etki arasındaki ilişkilerin araştırıldığı çalışmalarda kullanılan bir diğer parametredir. R<sub>M</sub> değerleri bileşiklerin lipofilik özelliklerini kabaca tahmin etmek konusunda yararlıdırlar.

İnce tabaka kromatografisi (İTK) yöntemi kullanılan R<sub>M</sub> tayini çalışmalarında

1-Oktanol (veya uygun olan başka bir lipofilik solvan) ile doyurulmuş plakların organizmadaki lipit fazı temsil ettiği düşünülür.

İTK plaklar üzerine R<sub>M</sub> değeri tayin edilecek olan bileşikler tatbik edilir. Bu plaklar üzerindeki bileşikler organizmadaki sulu fazı temsil ettiği düşünülen hareketli bir faz ile sürüklenir. Elde edilecek olan R<sub>f</sub> değerleri bileşiklerin lipofilik özelliklerine yani kimyasal yapılarına göre birbirinden farklı olacaktır. Bulunan R<sub>f</sub> değerleri aşağıdaki formülde yerine konularak R<sub>M</sub> değerleri elde edilir.

$$R_m = \log \frac{1 - R_f}{R_f} = \log \frac{1}{R_f} - 1$$



Log P çalışmalarına göre daha kolay ve daha az zaman alan  $R_M$  çalışmalarının ayrıca aşağıda belirtilen üstünlükleri vardır.

- Geniş aralıkta hidrofilik ve hidrofobik özelliğe sahip bileşikler ile çalışılabilir.
- Eser miktarda madde ile çalışabilmeye imkan verir.
- Pratik olarak çözünürlüğü olmayan bileşiklerin  $R_M$  değerlerinin saptanması problem yaratmaz.
- $R_M$  değeri saptanacak olan bileşiğin mutlaka çok saf olması gerekmez.
- Birçok bileşiğin  $R_M$  değeri bir arada (aynı plak üzerinde) saptanabilir.
- $R_M$  değerlerinin, log P değerleri ile uyumlu bir ilişkisi vardır.
- Önemli bir dezavantajı tekrarlanabilme özelliğinin %100 olmayışıdır.

#### ***Bileşiklerin $R_M$ Değerlerinin Saptanması***

Tampon çözelti log P'nin deneysel yöntemle bulunuşunda anlatıldığı gibi hazırlanır. Hazırlanan bu tampon çözülden 250 ml alınarak 1 L'lik ayırma hunisine aktarılır. Üzerine 250 ml 1-oktanol ilave edilir. Uygun şekilde karıştırılarak solvanların birbiri içerisinde doyması sağlanır. Daha sonra yağlı (tampon çözelti ile doyurulmuş 1-oktanol) ve sulu (1-oktanol ile doyurulmuş tampon çözelti) fazlar birbirinden ayrılır.

$R_M$  çalışmalarında kullanılacak olan 1-oktanol (tampon çözelti ile doyurulmuş) ve tampon çözelti (1-oktanol ile doyurulmuş) hazırlanmış olur.

$R_M$  Çalışmasında:

Sabit faz: 1-oktanol ile doyurulmuş plaklar

Hareketli faz: Tampon çözeltinin, su ile karışabilen ve  $R_M$  tayini yapılacak olan bileşikler için uygun olan bir solvan ile uygun orandaki karışımıdır.

Örnek: Etanol : Tampon çözelti (50 : 20) veya (85 : 15)

Aseton : Tampon çözelti (75 : 25) veya (90 : 10)

### **Deneyin yapılışı**

İçinde uygun miktarda 1-oktanol : eter (5 : 95) (v/v) solvan sistemi bulunan kromatografi tankına silikajel ile hazır kaplanmış kromatografi plağı yerleştirilerek, yaklaşık 3 saat solvan sistemi içinde doyurulur. Bu sürenin sonunda plak tanktan çıkarılır. Normal oda ısısında eteri uçurulur. Bu şekilde organizmadaki lipit fazı temsil edebileceği düşünülen 1-oktanol ile doyurulmuş plaklar elde edilir.

Bileşiklerin  $10^{-3}$  M konsantrasyonda uygun bir çözücü içinde hazırlanmış çözeltilerinden, 1-oktanol ile doyurulmuş kromatografi plakları üzerinde ayrı ayrı noktalara üçer damla tatbik edilir. Daha sonra plak, içinde hareketli faz olarak kullanılan solvan sistemi bulunan kromatografi tankına yerleştirilir. Hareketli faz plak üzerinde yeterli seviyeye yükselince plak çıkarılır ve 105 °C'lik etüvde kurutulur. Lekelerin belirlenmesi için; UV ışığından, Dragendorf belirtecinden, iyot buharından ya da uygun olan başka belirteçlerden yararlanılır. Her bileşiğin R<sub>f</sub> değerleri ayrı ayrı hesaplanır. Bulunan bu değerler formülde yerine konularak bileşiklerin R<sub>M</sub> değerleri hesaplanır.

### **Hansch Analiz Metodu**

1960'lı yıllarda iki ayrı kantitatif yapı aktivite ilişkileri analiz yöntemi geliştirilmiştir. Birisi Hansch ve Fujita, diğeri Free ve Wilson tarafından olmak üzere geliştirilen bu metodlar, biyolojik aktivite ile fizikokimyasal parametreler ve yapısal parametreler arasında ilişkileri analizlerler.

QSAR metodları araştırmacının kendisi tarafından uygun olduğu veya olabileceği düşünülerek seçilen ve istatistiksel kurallar ile de uygunluğu saptanan moleküler nitelik (yapısal ve/veya fizikokimyasal özellik) değerleri ile biyolojik etki arasındaki ilişkiye dayanan hipotezleri ispatlamak için geliştirilen metodlardır.

Kimyasal bileşiğe ait moleküler nitelikler olarak fizikokimyasal parametrelerin kullanıldığı QSAR analizlerinde Hansch tarafından geliştirilen korelasyon denklemi biyolojik etki ile yapı arasındaki ilişkileri en iyi açıklayan denklem olmuştur.

Hansch, geliştirdiği analiz metodunda homolog bir seri içerisindeki bileşiklerin gözlenen biyolojik etkilerinin, bu bileşiklerin fizikokimyasal özelliklerinin bir fonksiyonu olduğunu ifade ederek aşağıda verilen formülü geliştirmiştir.

$$\text{biyolojik etki} = f(\text{hidrofobik}) + f(\text{elektronik}) + f(\text{sterik}) + c(\text{sabite})$$

Böylece homolog bir dizin içerisindeki moleküllerdeki sübstitüentlerin elektronik, sterik, hidrofobik ve diğer değişik özelliklerinin biyolojik etki üzerine gösterdikleri olası katkıların kantitatif değerleri bulunabilmektedir. Böylece, güçlü aktivite için gerekli olan fizikokimyasal özelliklerin belirlenmesi ve buna uygun olarak gerekli yapısal modifikasyonların gerçekleştirilerek lider bileşiğe ulaşmak mümkün olabilir.

Hansch analizleri, sentezleri gerçekleştirilen bir seri kimyasal bileşiğin gözlenen biyolojik etkileri ile nicel olarak belirlenen fizikokimyasal özelliklerini gösteren parametrik değerler arasındaki ilişkilerinin bilgisayar aracılığı ile gerçekleştirilen istatistiksel metodlarla zmne dayanmaktadır. Daha çok homolog bir dizin içerisinde yürütülen Hansch analiz metodu, matematiksel olarak aşağıda verildiği şekilde tanımlanabilir.

$$Y(\text{biyolojik aktivite}) = k_0 + k_1X_1 + k_2X_2 + \dots + k_nX_n$$

$X_{1-n}$  = Parametrik değerler şeklindeki fizikokimyasal sabiteler

$k_{1-n}$  = Fizikokimyasal özelliğin biyolojik aktiviteye olan + veya - katkısını tanımlayan sabiteler (regresyon katsayıları)

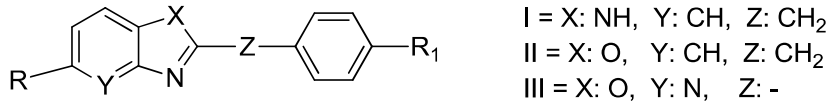
$k_0$  = Açıklanamayan artık kısmın biyolojik aktiviteye olan katkısını gösteren sabit (korelasyon sabiti)

$$Y = \text{Log } 1/C = \text{Logaritmik olarak bulunan biyolojik etki}$$

### **Sentezlenen Bir Seri Bileşiğin Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri Analizi**

Bir seri 2,5-disübstitüe benzimidazole, benzoksazol ve 2-sübstitüe oksazolo (4,5-b) piridin türevleri (şekil) sentezlemiş ve *K. pneumoniae*'ye

karşı *in vitro* olarak test edilmişlerdir. Elde edilen aktivite sonuçlarından yararlanarak çoklu regresyon analiz yöntemi kullanılarak bilgisayar yardımı ile bileşiklerin kantitatif yapı-etki ilişkileri **Hansch analiz yöntemi** uygulanarak açıklanmıştır (Farmasötik Kimya Anabilim Dalımızda yapılmış bir çalışmadır).



Bileşiklere ait fizikokimyasal parametreler, daha önceden hesaplanan ve kaynaklarda yer alan verilerden alınmıştır. Bileşiklerin kimyasal yapıları, bileşiklere ait bazı fizikokimyasal parametreler ve aktivite sonuçları Tablo 4.3.'de yer almaktadır. **Stat Graphics** istatistik programı kullanılarak bileşiklere ait tüm fizikokimyasal parametreler ve aktivite sonuçları bilgisayara yüklenmiş ve ileri basamaklı çoklu regresyon analizi kullanılarak sonuçların istatistiksel anlamı kontrol edilmiştir.

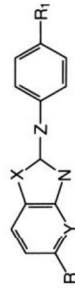
Hesaplamalara **Hansch denklemi** kullanılarak adım adım geliştirilen eşitlikler şeklinde optimum sonuç alınıncaya kadar devam edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.3.'de açıklanmıştır. Tablo 4.3.'de yer alan *eşitlik 1*,  $R^2 = \%97$  ve  $p < 0.001$  değerleri ile en uygun korelasyon (doğrusal ilişki) elde edilmiştir. *Eşitlik 1* incelendiğinde, bitişik halka sistemindeki R grubunun K. pneumoniae'ye karşı biyolojik etkinlik için önemli olduğu anlaşılmaktadır. Bu pozisyonda hidrojen yakalayıcı özellikteki (H<sub>ACCEPTÖR</sub>) süstituentlerin aktivite üzerinde artırıcı (pozitif) etki sağladığı anlaşılmaktadır. Ayrıca bu eşitlik, R gruplarının negatif alandaki elektronik etkileşimleri de R ( $F_R$ ) etkinliği artırmaktadır.

Bu bulgulara ilave olarak yapısal parametreler  $I_X$ ,  $I_Y$ ,  $I_Z$ 'in de aktivite için belirleyici olduğu görülmektedir. *p*-Süstitüe fenil yapısı ile bitişik halka sistemi arasındaki metilen grubunun ( $I_Z$ ) önemli olduğu ve aktivitede artış sağladığı tespit edilmiştir. Diğer yapısal parametreler olan  $I_X$  ve  $I_Y$ , oksazolo(4,5-*b*)piridin halka sisteminin diğer heterosiklik çekirdeklere göre tercih edilmesi gereğini belirtmektedir.

Diğer yandan aktivite ile R<sub>1</sub> grubu ve fenil halkasının *p*-konumunun veya benzil yöresindeki sübtitüsyonun arasında herhangi belirgin bir istatistiksel ilişki bulunmamıştır.

Özet olarak analiz sonucunda *K. pneumoniae*'ye karşı etkili öncü bileşik 2 no'lu konumunda benzil grubu içeren oksazolo (4,5-b) piridin yapısı olduğu belirlenmiştir. Bitişik halka sisteminde 5. konumda yer alan R yerinde negatif alan etkisi oluşturan ve hidrojen akseptör özelliği olan bir sübtitüentin bulunmasının, aktiviteyi arttıracığı bulunmuştur.

Tablo 4.3. 2,5-Disüstitüe benzimidazol, benzoksazol ve 2-süstitüe oksazol (4,5-b) piridin türevleri ve eşitlik 1'de kullanılan parametreler



Bileşik R	R <sub>1</sub>	X	Y	Z	H <sub>ACCEPTOR</sub>	F <sub>R</sub>	I <sub>X</sub>	I <sub>Y</sub>	I <sub>Z</sub>	MIC (µg/ml)	Gözlenen <sup>a</sup>	Hesaplanan <sup>b</sup>	Artan
1	H	O	CH	-	0	0.00	0	0	0	12.5	4.1936	4.2445	-0.0509
2	H	OCH <sub>3</sub>	CH	-	0	0.00	0	0	0	12.5	4.2557	4.2445	0.0112
3	H	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	CH	-	0	0.00	0	0	0	12.5	4.3033	4.2445	0.0588
4	H	NH <sub>2</sub>	CH	-	0	0.00	0	0	0	12.5	4.2538	4.2445	-0.0187
5	H	NHCH <sub>3</sub>	CH	-	0	0.00	0	0	0	12.5	4.2538	4.2445	0.0093
6	Cl	CH <sub>3</sub>	CH	-	0	0.41	0	0	0	25	3.9889	4.0491	-0.0602
7	Cl	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH	-	0	0.41	0	0	0	25	4.0132	4.0491	-0.0359
8	Cl	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	CH	-	0	0.41	0	0	0	25	4.0580	4.0491	0.0089
9	Cl	NHCOCH <sub>3</sub>	CH	-	0	0.41	0	0	0	25	4.0595	4.0491	0.0104
10	Cl	NHCH <sub>3</sub>	CH	-	0	0.41	0	0	0	25	4.0148	4.0191	-0.0343
11	Cl	Cl	CH	-	0	0.41	0	0	0	25	4.0238	4.0191	-0.0253
12	Cl	NO <sub>2</sub>	CH	-	0	0.41	0	0	0	25	4.0624	4.0191	0.0133
13	NO <sub>2</sub>	H	CH	-	1	0.67	0	0	0	12.5	4.2837	4.3253	-0.0416
14	NO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	CH	-	1	0.67	0	0	0	12.5	4.3083	4.3253	-0.0170
15	NO <sub>2</sub>	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	CH	-	1	0.67	0	0	0	12.5	4.3718	4.3253	0.0495
16	NO <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	CH	-	1	0.67	0	0	0	12.5	4.3100	4.3253	-0.0153
17	NO <sub>2</sub>	Cl	CH	-	1	0.67	0	0	0	12.5	4.3418	4.3253	0.0165
18	NO <sub>2</sub>	Br	CH	-	1	0.67	0	0	0	12.5	4.4070	4.3253	0.0817
19	NH <sub>2</sub>	H	CH	-	1	0.02	0	0	0	6.25	4.5269	4.6351	-0.1082
20	NH <sub>2</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH	-	1	0.02	0	0	0	6.25	4.6060	4.6351	-0.0291
21	NH <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub>	CH	-	1	0.02	0	0	0	6.25	4.6142	4.6351	-0.0209
22	NH <sub>2</sub>	Br	CH	-	1	0.02	0	0	0	6.25	4.7197	4.6351	0.0846

23	NH <sub>2</sub>	F		CH	-	1	0.02	0	0	0	6.25	4.6296	4.6351	-0.0055
24	NH <sub>2</sub>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		CH	-	1	0.02	0	0	0	6.25	4.6313	4.6351	-0.0038
25	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>		CH	-	0	-0.04	0	0	0	12.5	4.2519	4.2636	-0.0117
26	CH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>		CH	-	0	-0.04	0	0	0	12.5	4.2783	4.2636	0.0147
27	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>		CH	-	0	-0.04	0	0	0	12.5	4.2819	4.2636	0.0183
28	CH <sub>3</sub>	F		CH	-	0	-0.04	0	0	0	12.5	4.2595	4.2636	-0.0041
29	CH <sub>3</sub>	NHCOCH <sub>3</sub>		CH	-	0	-0.04	0	0	0	12.5	4.2874	4.2636	0.0238
30	CH <sub>3</sub>	NHCH <sub>3</sub>		CH	-	0	-0.04	0	0	0	12.5	4.2801	4.2636	0.0165
31	CH <sub>3</sub>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		CH	-	0	-0.04	0	0	0	12.5	4.3050	4.2636	0.0414
32	H	CH <sub>3</sub>		N	-	0	0.00	0	1	0	6.25	4.5298	4.5763	-0.0465
33	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>		N	-	0	0.00	0	1	0	6.25	4.5584	4.5763	-0.0179
34	H	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>		N	-	0	0.00	0	1	0	6.25	4.6090	4.5763	0.0327
35	H	OCH <sub>3</sub>		N	-	0	0.00	0	1	0	6.25	4.5622	4.5763	-0.0141
36	H	OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>		N	-	0	0.00	0	1	0	6.25	4.5883	4.5763	0.0120
37	H	NH <sub>2</sub>		N	-	0	0.00	0	1	0	6.25	4.5319	4.5763	-0.0444
38	H	NO <sub>2</sub>		N	-	0	0.00	0	1	0	6.25	4.5763	4.5763	0.0137
39	H	Cl		N	-	0	0.00	0	1	0	6.25	4.5703	4.5763	-0.0060
40	H	Br		N	-	0	0.00	0	1	0	6.25	4.6471	4.5763	0.0708
41	H	H		CH	CH <sub>2</sub>	0	0.00	0	0	1	6.25	4.5282	4.5918	-0.0636
42	H	OCH <sub>3</sub>		CH	CH <sub>2</sub>	0	0.00	0	0	1	6.25	4.5865	4.5918	-0.0053
43	H	Br		CH	CH <sub>2</sub>	0	0.00	0	0	1	6.25	4.6672	4.5918	0.0754
44	H	Cl		CH	CH <sub>2</sub>	0	0.00	0	0	1	6.25	4.5945	4.5918	0.0027
45	H	NO <sub>2</sub>		CH	CH <sub>2</sub>	0	0.00	0	0	1	6.25	4.6129	4.5918	0.0211
46	NO <sub>2</sub>	H		CH	CH <sub>2</sub>	1	0.67	0	0	1	6.25	4.6130	4.6725	-0.0595
47	NO <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>		CH	CH <sub>2</sub>	1	0.67	0	0	1	6.25	4.6610	4.6725	-0.0115
48	NO <sub>2</sub>	Br		CH	CH <sub>2</sub>	1	0.67	0	0	1	6.25	4.7300	4.6725	0.0055
49	NO <sub>2</sub>	Cl		CH	CH <sub>2</sub>	1	0.67	0	0	1	6.25	4.6680	4.6725	-0.0045
50	NO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub>		CH	CH <sub>2</sub>	1	0.67	0	0	1	6.25	4.6840	4.6725	0.0115
51	NO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub>	NH	CH	CH <sub>2</sub>	1	0.67	1	0	1	12.5	4.373	4.3641	0.0132
52	NO <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>	NH	CH	CH <sub>2</sub>	1	0.67	1	0	1	12.5	4.3549	4.3641	-0.0092
53	NO <sub>2</sub>	OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	NH	CH	CH <sub>2</sub>	1	0.67	1	0	1	12.5	4.3159	4.3641	0.0118
54	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	NH	CH	CH <sub>2</sub>	0	-0.04	1	0	1	12.5	4.2760	4.3023	-0.0263

55	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	NH	CH	CH <sub>2</sub>	0	-0.04	1	0	1	12.5	4.3045	4.3023	0.0022
56	CH <sub>3</sub>	OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	NH	CH	CH <sub>2</sub>	0	-0.04	1	0	1	12.5	4.2869	4.3023	-0.0154
57	H	CH <sub>3</sub>	NH	CH	-	0	0.00	1	0	0	25	3.9201	3.9361	0.0160
58	H	OCH <sub>3</sub>	NH	CH	-	0	0.00	1	0	0	25	3.9523	3.9361	0.0162
59	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	NH	CH	-	0	-0.04	1	0	0	25	3.9786	3.9551	0.0235

<sup>a</sup> log 1 / C.

<sup>b</sup> Eşitlik 4.1. kullanılarak

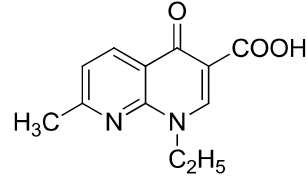
Eşitlik no.	Eşitlik 4.1.	n	R <sup>2</sup>	s	F
4	$\log 1 / C = 0.196(+0.058)H_{\text{ACCEPT},R} + 4.315$	59	0.17	0.21	11
5	$\log 1 / C = 0.274(+0.051)H_{\text{ACCEPT},R} + 0.340(+0.067)I_Y + 4.237$	59	0.43	0.18	21
6	$\log 1 / C = 0.245(+0.043)H_{\text{ACCEPT},R} + 0.398(+0.058)I_Y$	59	0.60	0.15	27
7	$+0.219(+0.046)I_Z + 4.178$				
8	$\log 1 / C = 0.415(+0.042)H_{\text{ACCEPT},R} + 0.371(+0.044)I_Y +$ $0.252(+0.035)I_Z - 0.443(+0.068)F_R + 4.205$	59	0.77	0.11	46
9	$\log 1 / C = 0.400(+0.015)H_{\text{ACCEPT},R} + 0.332(+0.015)I_Y +$ $0.347(+0.013)I_Z - 0.477(+0.024)F_R - 0.308(+0.015)I_X +$ $4.245$	59	0.97	0.04	393

**p < 0.001**



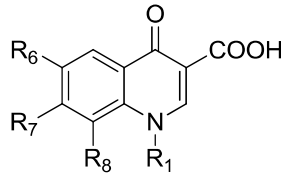
Kinolonkarboksilik asit yapısı taşıyan antibakteriyal etkili yeni bir ilaç etken maddesi olan NORFLOXACIN in tasarlanması kantitatif yapı-etki ilişkileri analizi sonucunda elde edilen Hansch denkleminde yararlanılarak yapılmıştır (Ayrıntılı bilgi için bakınız Akı-Şener, E., Yalçın, İ., *Farmasötik/Medisinal Kimya'da İlaç Etken Madde Tasarım Yöntemleri-I Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri Analizleri (QSAR)* Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No:86, sayfa 226-234) .

Bu çalışmada öncü madde antibakteriyal etkili Nalidiksik asittir.



Nalidiksik Asit

Bunun için aşağıdaki genel formül üzerinden bir seri bileşik sentezlenmiş *E. coli* NIH JC-2 ye karşı gösterdikleri minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerleri saptanmıştır.



71 Bileşik üzerinden basamak basamak yapılan kantitatif yapı-etki ilişkileri analizi sonucunda elde edilen Hansch denklemi aşağıdaki gibidir.

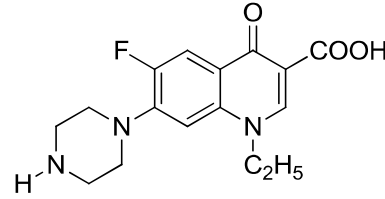
$$\begin{aligned} \text{Log}1/C = & 3.04(\pm 2.21) L_{R1} - 3.35(\pm 0.73) E_{SR6} + 0.99(\pm 0.24) I_{R7(-)} - \\ & - 0.73(\pm 0.27) I_{R7(N-CO)} + 3.72(\pm 0.92) B_{R8} - 0.49(\pm 0.10) \sum \Pi_{R6,R7,R8} - \\ & - 0.68(\pm 0.39) \sum F_{R6,R7,R8} - 4.57 \end{aligned}$$

R<sub>1</sub>= Et, Me, vinil, propil, allil, hidroksietil, benzil, dimetilaminometil,  
R<sub>6</sub> = H, F, Cl, Br, I, NO<sub>2</sub>, Me, OMe

R<sub>7</sub> = H, Cl, NO<sub>2</sub>, Ac, Me, OMe, NMe<sub>2</sub>, N-CO, piperazin, N'-metilpiperazin

R<sub>8</sub> = H, F, Cl, Me, Et, OMe, OEt

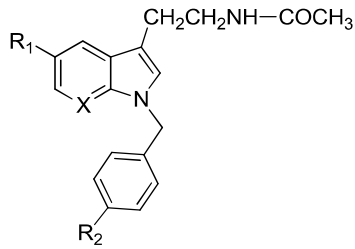
Araştırmacılar, ele geçen bu denklemden yararlanarak, Norfloksazin bileşiğini en uygun yapı olarak sentezlemişlerdir.



Norfloksazin

### Sorular

1. Norfloksazin yapısının bulunmasında yararlanılan Hansch denkleminin kısaca açıklamasını yapınız.
2. Yapılan bir QSAR çalışmasında, sentezlenen bir seri bileşikteki süstitüentlere ait çeşitli parametreler ile biyolojik aktivite (log1/C) arasındaki ilişki aşağıdaki şekilde bulunmuştur.



$\pi$  değerleri

- H = 0

- CH<sub>3</sub> = 0.56

- Cl = 0.71

- OCH<sub>3</sub> = - 0.02

- NO<sub>2</sub> = -0.28

- F = 0.14

B<sub>1</sub> değerleri

- H = 1

- CH<sub>3</sub> = 1.52

- Cl = 1.8

- OCH<sub>3</sub> = 1.35

- NO<sub>2</sub> = 1.7

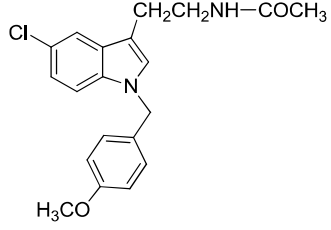
I değerleri

- N = 1

- CH = 0

$$\text{Log}1/C = 1.024 + 0.097\pi R_1 - 0.026B_1 R_2 + 0.185I_X$$

a)

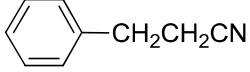


Bileşiminin log 1/C değerini, gerekli olan parametreleri ve verilen QSAR sonuçlarını kullanarak hesaplayınız.

b) En aktif olması beklenen bileşimin formülünü çiziniz. Bu moleküle nasıl ulaştığınızı açıklayınız.

c) log 1/C ifadesindeki "C" neyi ifade etmektedir açıklayınız.

3. Aşağıdaki molekülün teorik olarak logP değerini hesaplayınız.

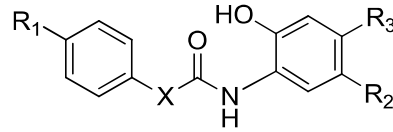


4. İndikatör parametreyi tanımlayınız.

5. LogP tayininde neden n-oktanol kullanılmaktadır açıklayınız.

## QSAR Uygulaması

*S. aureus* üzerindeki antibakteriyel etkileri saptanmış benzamid ve fenil asetamid yapısındaki bileşiklerin formülleri ve etki değerleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.



Comp.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	X	MIC µg/ml	I <sub>x</sub>	α <sub>R3</sub>	BI <sub>R1</sub>
1	-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	-H	-NO <sub>2</sub>	-	1,95	0	0,78	2,59
2	-H	-H	-NO <sub>2</sub>	-	125	0	0,78	1
5	-H	-NO <sub>2</sub>	-H	-	15,6	0	0	1
6	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-NO <sub>2</sub>	-H	-	7,8	0	0	1,52
7	-F	-NO <sub>2</sub>	-H	-	15,6	0	0	1,35
8	-Br	-H	-NO <sub>2</sub>	-CH <sub>2</sub> -	125	1	0,78	1,95
9	-Cl	-H	-NO <sub>2</sub>	-CH <sub>2</sub> -	125	1	0,78	1,80
12	-CH <sub>3</sub>	-NO <sub>2</sub>	-H	-CH <sub>2</sub> -	125	1	0	1,52
15	-H	-H	-NH <sub>2</sub>	-	15,6	0	-0,66	1
16	-F	-H	-NH <sub>2</sub>	-	15,6	0	-0,66	1,35
18	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-H	-NH <sub>2</sub>	-	7,8	0	-0,66	1,52
19	-H	-NH <sub>2</sub>	-H	-	31,25	0	0	1
20	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-NH <sub>2</sub>	-H	-	15,6	0	0	1,52
21	-F	-NH <sub>2</sub>	-H	-	15,6	0	0	1,35
22	-Br	-H	-NH <sub>2</sub>	-CH <sub>2</sub> -	31,25	1	-0,66	1,95
23	-Cl	-H	-NH <sub>2</sub>	-CH <sub>2</sub> -	31,25	1	-0,66	1,80
24	-CH <sub>3</sub>	-H	-NH <sub>2</sub>	-CH <sub>2</sub> -	62,5	1	-0,66	1,52
25	-F	-H	-NH <sub>2</sub>	-CH <sub>2</sub> -	62,5	1	-0,66	1,35
26	-CH <sub>3</sub>	-NH <sub>2</sub>	-H	-CH <sub>2</sub> -	62,5	1	0	1,52

a) Tablodaki veriler ile Minitab programını kullanarak en uygun korelasyon denklemini belirleyiniz.

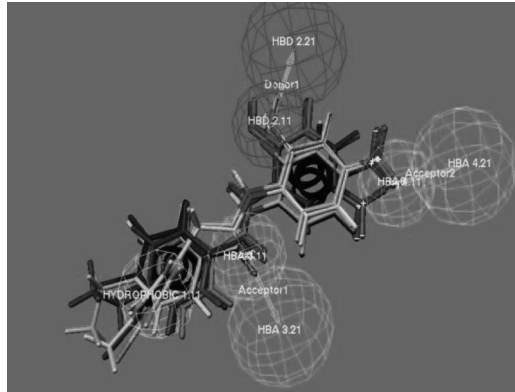
b) Uygun bulunan korelasyon denklemini kullanarak en etkili bileşik ile en düşük etkili bileşiklerden birinin Log I/C değerlerini hesaplayınız.

#### 4.1.1.2. Farmakofor Analizi

İlaç tasarımında sık karşılaşılan, terapötik olarak söz konusu reseptörün üç boyutlu yapısı bilinmediği durumlarda, moleküler modelleme çalışmalarıyla, ligandların yapıları iyice karakterize edilir. Böylece biyolojik etkide rol oynayan konformasyonları kesin bir biçimde ortaya çıkarılabilir. Reseptörün yapısı daha sonra bu tür ligandlardan ortaya çıkartılabilmekte veya ‘haritalanabilmektedir’. Böylelikle mevcut yapı-etki ilişkilerini kullanarak yeni ilaç adaylarını tasarlamak mümkün olmaktadır.

Farmakofor ligandların biyolojik aktiviteleri için gerekli olan temel fonksiyonel grupları olarak tanımlanmaktadır. Diğer bir ifadeyle farmakofor, belli bir biyolojik aktivite için gerekli olan yapısal elemanların uzaysal düzenlemesidir.

Farmakofor modeli ise molekülün üç boyutlu yapısını kapsayan; hidrofobik gruplar, yüklü veya iyonize olabilen gruplar, hidrojen bağı verici (donör) ve alıcıları (akseptör) gibi molekül özelliklerini gösterir. Farmakofor model oluşturmak için bileşikler üst üste çakıştırılarak sahip oldukları ortak özellikler tespit edilir. Bu özellikler, reseptöre bağlanmak için gerekli olan karakteristik özelliklerle benzeşen kimyasal fonksiyonları içerir. Oluşturulan farmakofor modeli ile uyumlu olan bileşikler üç boyutlu veri tabanları olarak kullanılabilir ve sonuçta etkin yeni aday moleküllerin önerilmesini sağlar.



Şekil 4.5. İki hidrojen bağı alıcısı, bir hidrojen bağı vericisi ve bir hidrofobik özellikten oluşan farmakofor model ve bu modelle haritalandırılan bileşikler

Farmakofor analiz ile etki gösteren moleküllerin yapısından yola çıkılarak reseptör yapısının yorumlanması amaçlanır. Bu yöntem kullanılırken;

- Reseptörün yapısı bilinmemekte
- Etki mekanizması bilinmemekte veya bilinmemekte
- Ligant ve ligandın biyolojik aktivitesi bilinmemektedir.

### **Farmakofor grupların özellikleri**

**Hidrojen bağı alıcısı:** Üzerinde serbest elektron çifti taşıyan atomlar  
Ör: O, N, S...

**Hidrojen bağı vericisi:** Üzerinde en az bir tane H atomu taşıyan atomlar

Ör: -OH, -NH-,  $R_3NH^+$ , -SH...

**Hidrofobik Özellik:**

- Nonpolar gruplar hidrofobik özelliği artırır.

Ör: -R, -X, -Ar

- Polar gruplar ise hidrofobik özelliği azaltır.

Ör: -COOH, -OH, -NH<sub>2</sub>

**Aromatik Halka Özelliği:** Aromatik yapıdaki halkalar

Ör: -Ar

benzen, tiyofen, piridin, naftalen...

**Elektrostatik özellik:** Anyon veya katyan halinde bulunan atomlar

Ör: -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> (pozitif iyonize olabilen grup)

-COO<sup>-</sup> (negatif iyonize olabilen grup)

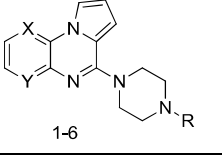
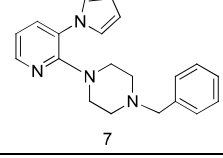
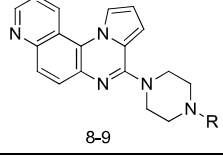
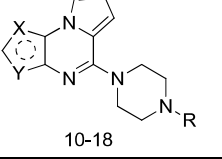
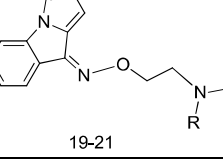
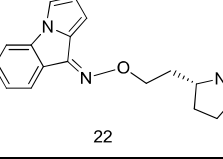
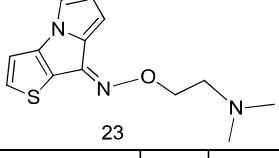
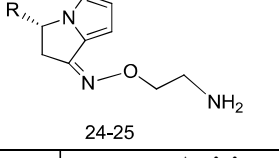
### **Serotonin 5-HT<sub>3</sub> Reseptörü Kısmi Agonistleri Üzerine Farmakofor Analiz Uygulaması**

Serotonin 5-HT<sub>3</sub> reseptörleri çok sayıda fizyolojik olayların oluşumundaki etkileri nedeniyle potansiyel terapötik hedefler olarak araştırılmıştır. Bu reseptörün agonistler tarafından aktive edilmesi durumunda;

- santral sinir sisteminde; beyin sapında mide bulantısı ve kusma merkezi uyarılması, anksiyete ve felç
- periferik sinir sisteminde; sinir hücrelerinin uyarılması (otonom ve ağrı sinirleri) kusma gibi etkiler gözlenmektedir.

Serotonin 5-HT<sub>3</sub> reseptörü kısmi agonistleri, çeşitli gastrointestinal sistem rahatsızlıklarında özellikle irritabl barsak sendromunda (spastik kolon) kullanılmaktadır.

**Tablo 4.4.** Çalışma seti olarak kullanılan etkili Serotonin 5-HT<sub>3</sub> reseptör agonistleri

					
					
					
Bileşik	X	Y	R	R <sub>1</sub>	Activite (-log IC <sub>50</sub> )
1	N	C	H	-	8,83
2	N	C	allil	-	11,40
3	N	C	benzil	-	12,09
4	N	C	4F-benzil	-	8,59
5	C	C	Benzil	-	9,45
6	C	C	4F-benzil	-	8,62
7	-	-	-	-	7,34
8	-	-	allil	-	7,71
9	-	-	benzil	-	7,51
10	S	C	H	-	7,92
11	S	C	CH <sub>3</sub>	-	6,09
12	S	C	allil	-	8,58
13	S	C	benzil	-	8,85
14	S	C	4F-benzil	-	7,67
15	C	S	CH <sub>3</sub>	-	6,62

	C	S			
<b>16</b>	C	S	allil	-	9,04
<b>17</b>	C	S	benzil	-	8,34
<b>18</b>	C	S	4F-benzil	-	8,93
<b>19</b>	-	-	H	H	6,66
<b>20</b>	-	-	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	8,24
<b>21</b>	-	-	benzil	H	6,54
<b>22</b>	-	-	-	-	7,85
<b>23</b>	-	-	-	-	8,46
<b>24</b>	-	-	tiyenil	-	6,05
<b>25</b>	-	-	fenil	-	6,00

### **1. Konformasyonel veribankası oluşturma**

- Çalışmada biyolojik aktivitesi bilinen 25 bileşik ve 19000 farklı bileşik içeren bir veribankasından bu 25 bileşiğe yapısal olarak benzerlik gösteren 250 inaktif bileşik kullanılır.
- Oluşturulan çalışma setindeki 275 bileşik için konformasyonel analiz çalışması başlatılır ve bu bileşikler farklı konformasyonları elde edilir.
- Oluşturulan konformerlerin biyolojik aktivite değerleri girilir.

### **2. Farmakoforun oluşturulması**

Biyolojik aktivitesi en yüksek olan bileşik üzerinde, iki aromatik halka, bir hidrojen bağı akseptörü, bir hidrojen bağı vericisi ve katyonik bölge özelliklerini içeren farmakofor model gösterilir.

### **3. Farmakofor analizi**

Çalışma serisindeki 275 molekül ve bunların konformerleri oluşturulan farmakofor modeli ile karşılaştırılır.

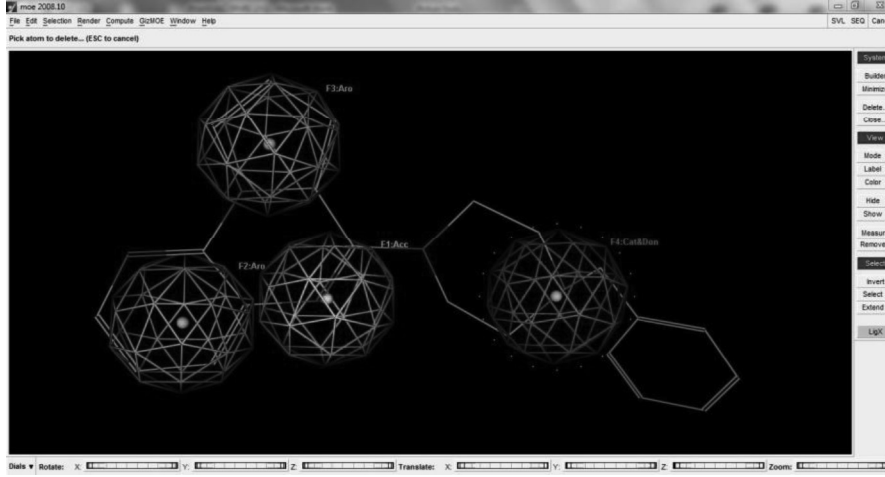
### **4. Sonuçların değerlendirilmesi**

Çalışma serisindeki bileşiklerin farmakofor model ile karşılaştırılması işlemi sonucunda elde edilen sayısal veriler incelenir. Moleküllerin farmakofor model ile uyumları RMSD değeri ile açıklanır.

RMSD (Root-mean-square deviation): Gerçekte gözlenen değer ile bir model oluşturularak tahmin edilen değer arasındaki farklılığı ölçen bir



değerdir. Bu değer sıfıra ne kadar yakınsa molekül farmakofor model ile uyumu o kadar yüksektir.



Şekil 4.6. Çalışma sonucunda oluşturulan farmakofor model  
Turuncu: aromatik halka, açık mavi: hidrojen bağı alıcısı, mor: hidrojen bağı vericisi ve katyonik merkez

	mol	rmsd	mseq	row	hitmap	-log1C50
1	03	0.3115	1	1	7 17 27 29	12.0900
25	02	0.3115	2	2	7 17 23 25	11.4000
93	05	0.2984	3	3	7 17 27 29	9.4500
117	16	0.3035	4	4	3 13 23 24	9.0400
185	18	0.3035	5	5	3 13 28 29	8.9300
209	13	0.2946	6	6	3 13 27 28	8.8500
233	01	0.3101	7	7	7 17 20 22	8.8300
237	06	0.2984	8	8	7 17 28 30	8.6200
261	04	0.3115	9	9	7 17 28 30	8.5900
285	12	0.2946	10	10	3 13 23 24	8.5800

1152 entries, 39 selected, 39 visible. 6 fields, 0 selected, all visible.

Şekil 4.7. Farmakofor analizi çalışması sonucunda elde edilen sonuçlar

## Sorular

- 1) Farmakofor model nedir? Nasıl oluşturulur?
- 2) Serotonin 5-HT<sub>3</sub> reseptörü kısmi agonistleri üzerine oluşturduğunuz farmakofor modelde ortaya çıkan en önemli özellikler nelerdir?
- 3) Serotonin 5-HT<sub>3</sub> reseptörü kısmi agonistleri üzerine oluşturduğunuz farmakofor modelini esas alarak Serotonin 5-HT<sub>3</sub> reseptörü kısmi agonisti olabilecek yeni bir molekül tasarlayınız.

### 4.1.2. Hedef Yapısına Dayalı Yöntemler

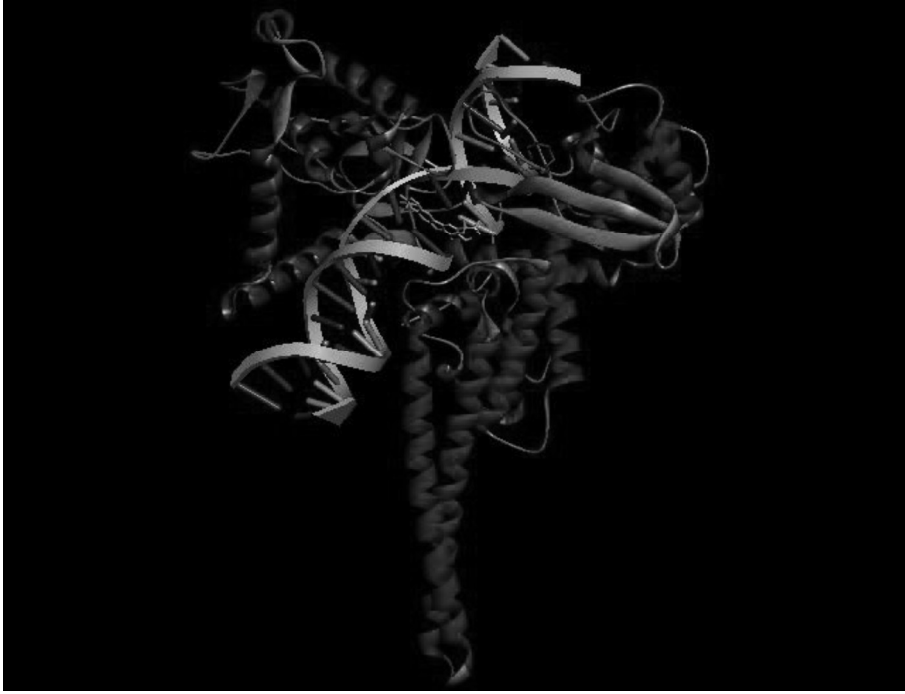
#### 4.1.2.1. Doking Yöntemi

Protein-ligand doking yöntemlerinin, ilaç tasarımı konusundaki önemi tartışmasıdır. İlaç tasarımı, küçük moleküller ile reseptörler arasında yapılan doking çalışmaları gittikçe artan bir önem kazanmaktadır.

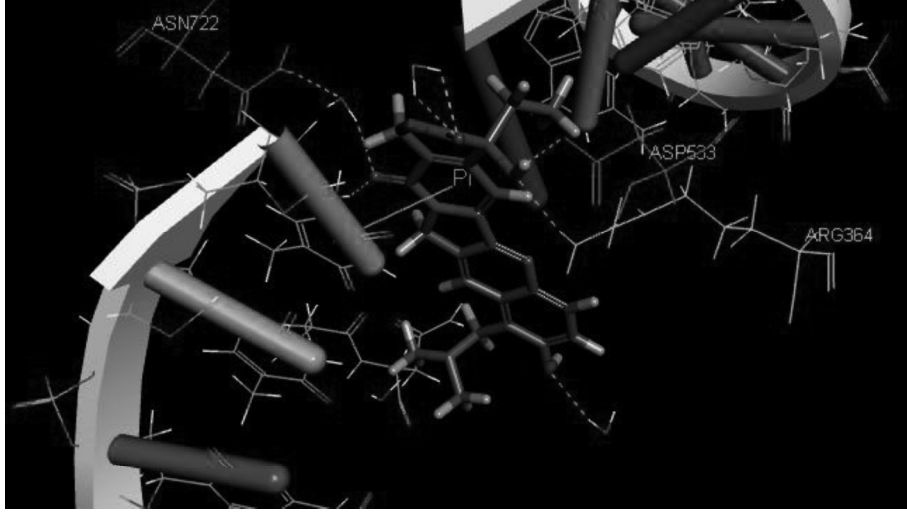
Doking çalışmalarında reseptör olarak ele alınan yapı, protein yapısındadır. Reseptörün yapısının tanımlanmasında en çok X ışınları kristallografisi ve nükleer manyetik rezonans (NMR) teknikleri kullanılmaktadır. Kristal olarak elde edilebilen bir protein üzerine X ışınları gönderilerek, bu proteinin yapısı belirlenebilmektedir. Daha kompleks olan NMR yönteminde, su ortamında çözünen proteinin konformasyonu saptanabilmektedir. Ancak, NMR yöntemi oldukça karışık ve kompleks çözümlere gereksinim duymaktadır. Dolayısıyla, tercih edilen yöntem X ışınları kristallografisidir.

Moleküler doking teknikleri, bilgisayar destekli rasyonel ilaç tasarımı, ilaç ya da ilaç adayları ile enzim, nükleik asit, reseptör proteinlerinin birbirine nasıl uyum gösterdiklerini araştırmak için sıklıkla kullanılmaktadır. Doking çalışmalarında, üç boyutlu yapısı belli olan reseptöre bağlanma enerjileri belirlenebilmekte ve reseptörün bağlanma bölgesinde ligandın pozisyonu canlandırılabilir. Bu durum, bağlanma tipinin anlaşılması ve proteinleri hedefleyen küçük moleküllü, daha uyumlu ligandların tasarlanması için faydalı olabilmektedir.

Başka bir deyişle; doking, ligandın uygun konformasyonu ile reseptör arasında anahtar-kilit ilişkisine benzer bir uyum olması durumudur. Ligandlar genellikle hareketlidir (flexible) ve çözücü içerisinde birçok farklı konformasyonda bulunmaktadır. En çok kullanılan doking yöntemi; sabit tutulan proteinin aktif yöresi ile ligandın bir seri konformasyonu arasında yapılan doking işlemidir. Şekil 4.8 ve Şekil 4.9 da protein ilaç etkileşimleri görülmektedir.



**Şekil 4.8.** Topotekan bileşiğinin (sarı renkli) Topoizomerez I enzimi ve DNA ile etkileşimi (Pdb: 1K4T)



Şekil 4.9. Topotekan bileşğinin doking pozu (Hidrojen bağları ve pi etkileşimleri)