

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PD-L1 PROTEİNİNE YÖNELİK GÖRÜNTÜLEME AJANI
GELİŞTİRİLMESİ ve SENTEZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ceyda KÖSE

Kimya Ana Bilim Dalı

Kimya Programı

TEMMUZ 2020

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PD-L1 PROTEİNİNE YÖNELİK GÖRÜNTÜLEME AJANI
GELİŞTİRİLMESİ ve SENTEZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Ceyda KÖSE
509181277**

Kimya Ana Bilim Dalı

Kimya Programı

**Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Onur ALPTÜRK
Eş Danışman: Dr. Özgür YILMAZ**

TEMMUZ 2020

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 509181277 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Ceyda KÖSE, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “PD-L1 Proteinine Yönelik Görüntüleme Ajanı Geliştirilmesi ve Sentezi” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Dr. Öğr. Üyesi Onur ALPTÜRK**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Eş Danışman : **Dr. Özgür YILMAZ**
TUBITAK - MAM

Jüri Üyeleri : **Doç. Dr. Atilla AKDEMİR**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Doç. Dr. Behice Şebnem SESALAN
İstanbul Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Caner ÜNLÜ
İstanbul Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi : 08 Temmuz 2020
Savunma Tarihi : 24 Temmuz 2020



ÖNSÖZ

Öncelikle, bana bu projeye katılma fırsatı tanıyan Tez Danışman Hocam Dr. Öğr. Üyesi Onur Alptürk'e ve sağladığı laboratuvar imkânları ile tezimin bilimsel araştırma kısmında büyük katkıları olan Eş Danışman Hocam Dr. Özgür Yılmaz'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Proje ilerleyişinde ve tez çalışmamın teorik kısmında desteklerini bizden esirgemeyen ve aynı zamanda değerli bilgi birikimini bizimle paylaşan Dr. Atilla Akdemir'e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım. Ayrıca tecrübe ve bilgi birikimiyle her zaman kendisinden çok şey öğrendiğim Dr. Müfide D. Karahasanoğlu'na teşekkür ederim.

Olumlu ve yapıcı eleştirileriyle yüksek lisans eğitimim boyunca benim yanımda olan arkadaşım Esra Uysal'a ve başta Çiğdem Çakıcı olmak üzere beni destekleyen tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Sonuncu fakat bir o kadar da önemli teşekkürlerimi ise bugünlere gelmemde büyük katkı sahibi olan aileme ve her zaman yanımda olan Önder Horoz'a iletiyorum.

Bu tez çalışması, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından, “PET Görüntülenme Sistemlerinde Kullanılmak Üzere Tümör Mikro-Çevresi Yüksek Seçicilik ile Hedefleyen Radyonüklid İşaretli Moleküllerin Rasyonel Tasarımı ve Geliştirilmesi” (Proje Numarası: 116E661) projesi kapsamında desteklenmiştir.

Temmuz 2020

Ceyda KÖSE
(Kimyager)



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xiii
SUMMARY.....	xv
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Biyobelirteçler.....	1
1.1.1. Biyobelirteç türleri.....	1
1.1.1.1. Risk değerlendirme biyobelirteçleri.....	1
1.1.1.2. Tanısal biyobelirteçler.....	2
1.1.1.3. Tedavi öngören biyobelirteçler.....	2
1.1.1.4. Farmakodinamik biyobelirteçler.....	2
1.1.1.5. Tedavi sürecini izleyen biyobelirteçler.....	2
1.1.1.6. Tekrar olasılığını öngören biyobelirteçler.....	3
1.2. Moleküler Görüntüleme.....	3
1.2.1. Moleküler görüntüleme yöntemleri.....	3
1.2.1.1. Bilgisayarlı tomografi-BT ile görüntüleme.....	3
1.2.1.2. Manyetik rezonans - MR ile görüntüleme.....	4
1.2.1.3. PET ve SPECT cihazları ile görüntüleme.....	4
1.2.2. Moleküler görüntüleme ajanları.....	5
1.2.2.1. Kuantum noktaları	6
1.2.2.2. Floresan boyalar.....	6
1.2.2.3. Radyonüklid atomlar.....	7
1.3. Kanser Hücresinin Görüntülenmesi.....	8
1.3.1. Tümör dokusunun çoğalması ve bağışıklık sistemi etkileri.....	8
1.3.2. Kanser hücresi immün kontrol noktası: PD-L1.....	9
1.3.3. Kanser dokusunda moleküler görüntülenme ve önemi.....	10
1.3.4. Kanserli dokunun hedeflenmesi.....	11
1.4. Yapılan Çalışmanın ve Projenin Genel Özeti.....	13
1.4.1. Peptidomimetik ve farmakor yapısı.....	13
1.4.2. Farmakor yapıya göre moleküler modelleme.....	14
1.4.3. Taşıyıcı ajanların moleküler yapısı.....	16
2. MATERYALLER VE METOTLAR.....	21
2.1 Materyaller.....	21
2.1 Metotlar.....	21
3. DENEYSEL KISIM.....	23
4. SONUÇ VE ÇIKARIMLAR.....	39
4.1 Sentezlenen Maddelerin Tasarımı ve Sentez Yöntemi.....	39
4.2 Sentezlenen Maddelerin Karakterizasyonu.....	40
4.3 Proje Kapsamında Yapılacak Gelecek Çalışmalar.....	44

KAYNAKLAR.....	45
EKLER.....	49
ÖZGEÇMİŞ.....	103



KISALTMALAR

PD-L1	: Programlanmış Hücre Ölüm Ligangı-1
PD-1	: Programlanmış Hücre Ölüm Proteini
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
MR	: Manyetik Rezonans
PET	: Pozitron Emisyon Tomografisi
SPECT	: Tek Pozitronlu Emisyon Tomografisi
DOTA	: 1,4,7,10-Tetrazasiklododekan-1,4,7,10-tetraasetik Asit
P53	: Tümör Protein 53
APCs	: Antijen Sunucu Hücreler
CTLA-1	: Siklotoksik T-lenfosit Antijeni-1
IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
ITC	: İzotermal Titrasyon Kalorimetresi
DAST	: Dietilaminosülfür Triflorür
DIEA	: <i>N,N</i> -Diisopropiletilamin
¹H-NMR	: Hidrojen Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi
¹³C-NMR	: Karbon Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi
IR	: İnfrared Spektrometresi
DCM	: Dikloro metan
DMF	: <i>N,N</i> -dimetil formamid
Lys	: Lizin
Tyr	: Tirozin
Arg	: Arjinin



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1:	Göğüs hastalıkları bölündeki bir hastanın BT göğüs tomografisi.....	4
Şekil 1.2:	MR: İlaç enjeksiyonu öncesi (1) ve sonrası (2) beyin.....	4
Şekil 1.3:	Kolorektal kanser hastasının BT, BT-PET, PET görüntüleri.....	5
Şekil 1.4:	In vivo ortamda kuantum boyalar ile hedefleme görüntülemeleri.....	6
Şekil 1.5:	Florasın boya enjekte edilmiş kobay fare görüntülemeleri.....	7
Şekil 1.6:	⁶⁸ Ga radyonüklid atomu ve PET görüntülemesi.....	7
Şekil 1.7:	T ve kanser hücresi arasındaki antijen bağlanma noktaları.....	9
Şekil 1.8:	PD-1/PD-L1 kompleksi.....	10
Şekil 1.9:	Moleküler görüntüleme çalışma mekanizması.....	11
Şekil 1.10:	Görüntüleme ajanının ana parçaları.....	12
Şekil 1.11:	Görüntüleme ajanının ana parça örneklendirmesi.....	12
Şekil 1.12:	Farmakofor oluşturacak atomlar arası açısı ve uzaklık şeması.....	14
Şekil 1.13:	Farmakofor çıkarım şeması.....	15
Şekil 1.14:	GVIA peptidinin 3D modeli ve uyum sağlayan molekül.....	16
Şekil 1.15:	Sırasıyla, protein içine yerleştirilmiş molekül ve açık hali.....	17
Şekil 1.16:	Tez çalışması kapsamında tasarlanan molekül örnekleri.....	19
Şekil 1.17:	Peptidomimetiklerin DOTA ile bağlanması.....	20
Şekil 3.1:	Madde 35'in tiyonil klorür ile sentezi.....	35
Şekil 3.2:	Tez kapsamında sentezlenen maddelerin sentez şeması.....	36
Şekil 3.3:	Tez kapsamında sentezlenen maddelerin sentez şeması.....	37
Şekil 3.4:	Tez kapsamında sentezlenen maddelerin sentez şeması.....	38
Şekil 4.1:	Amin ve ftalamid uçlu maddelerin retro-sentez şeması.....	39
Şekil 4.2:	Madde 18'in, sırasıyla madde 9 ve madde 35 ile sentezi.....	40
Şekil 4.3:	Madde 1,2 ve 3'ün sentez yöntemi.....	41
Şekil 4.4:	Madde 4,5 ve 6'nın sentez yöntemi.....	42
Şekil 4.5:	Madde 18'in sentez yöntemi.....	42
Şekil 4.6:	Madde 19'un sentez yöntemi.....	43
Şekil 4.7:	Madde 26'nın sentez yöntemi.....	43
Şekil 4.8:	Madde 27'nin sentez yöntemi.....	43
Şekil 4.9:	Madde 29 ve 30'un sentez yöntemi.....	44
Şekil 4.10:	Molekül 17 ve 30'un DOTA ve ⁶⁸ Ga bağlanmış hedef yapıları.....	44
Şekil A.1:	1, 2 ve 3 bileşiklerine ait FT-IR spektrumu.....	50
Şekil A.2:	4, 5 ve 6 bileşiklerine ait FT-IR spektrumu.....	51
Şekil A.3:	7, 8 ve 9 bileşiklerine ait FT-IR spektrumu.....	52
Şekil A.4:	10, 11 ve 12 bileşiklerine ait FT-IR spektrumu.....	53
Şekil A.5:	13, 14 ve 15 bileşiklerine ait FT-IR spektrumu.....	54
Şekil A.6:	3, 16, 17 ve 26 bileşiklerine ait FT-IR spektrumu.....	55
Şekil A.7:	3, 18, 19 ve 27 bileşiklerine ait FT-IR spektrumu.....	56
Şekil A.8:	20 ve 21 bileşiklerine ait FT-IR spektrumu.....	57
Şekil A.9:	22 ve 23 bileşiklerine ait FT-IR spektrumu.....	58
Şekil A.10:	24 ve 25 bileşiklerine ait FT-IR spektrumu.....	59

Şekil A.11:	2-(3-(4-(hidroksimetil)fenoksi)propil)isoindolin-1,3-dion ve 28 bileşiklerine ait FT-IR spektrumu.....	60
Şekil A.12:	29 ve 30 bileşiklerine ait FT-IR spektrumu.	61
Şekil A.13:	6-(4-etilfenoksi)benzo[d]tiyazol-2-amin, 31, 32 ve 33 bileşiklerine ait FT-IR spektrumu.....	62
Şekil A.14:	1 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	63
Şekil A.15:	2 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	64
Şekil A.16:	3 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	65
Şekil A.17:	4 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	66
Şekil A.18:	5 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	67
Şekil A.19:	6 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	68
Şekil A.20:	7 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	69
Şekil A.21:	8 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	70
Şekil A.22:	9 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	71
Şekil A.23:	10 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	72
Şekil A.24:	11 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	73
Şekil A.25:	12 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	74
Şekil A.26:	13 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	75
Şekil A.27:	15 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	76
Şekil A.28:	16 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	77
Şekil A.29:	17 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	78
Şekil A.30:	18 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	79
Şekil A.31:	19 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	80
Şekil A.32:	20 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	81
Şekil A.33:	21 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	82
Şekil A.34:	22 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	83
Şekil A.35:	23 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	84
Şekil A.36:	24 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	85
Şekil A.37:	25 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	86
Şekil A.38:	27 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	87
Şekil A.39:	26 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	88
Şekil A.40:	29 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	89
Şekil A.41:	30 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	90
Şekil A.42:	33 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	91
Şekil A.43:	1 bileşiğine ait ¹³ C-NMR spektrumu.....	92
Şekil A.44:	2 bileşiğine ait ¹³ C-NMR spektrumu.....	93
Şekil A.45:	3 bileşiğine ait ¹³ C-NMR spektrumu.....	94
Şekil A.46:	11 bileşiğine ait ¹³ C-NMR spektrumu.....	95
Şekil A.47:	16 bileşiğine ait ¹³ C-NMR spektrumu.....	96
Şekil A.48:	26 bileşiğine ait ¹³ C-NMR spektrumu.....	97
Şekil A.49:	27 bileşiğine ait ¹³ C-NMR spektrumu.....	98
Şekil A.50:	21 bileşiğine ait ¹³ C-NMR spektrumu.....	99
Şekil A.51:	25 bileşiğine ait ¹³ C-NMR spektrumu.....	100
Şekil A.52:	29 bileşiğine ait ¹³ C-NMR spektrumu.....	101
Şekil A.53:	30 bileşiğine ait ¹³ C-NMR spektrumu.....	102

PD-L1 PROTEİNİNE YÖNELİK GÖRÜNTÜLEME AJANI GELİŞTİRİLMESİ ve SENTEZİ

ÖZET

Günümüzde pek çok hastalık gibi olan kanseri saptamak için en basit yaklaşım modülü moleküler görüntülemedir. Bu kapsamda, bir sinyal noktası hedeflenir ve bu nokta hastalığa özgü biyobelirteçlerden biri olmalıdır. Klinik testlerin tanı ve nicel sonuçları, görüntüleme ajanları tarafından sağlanan moleküler görüntü ile ele alınabilir. “Kimyasal Problar” olarak da bilinen bu ajanların biyolojik süreçleri in vivo sistemlerde görselleştirmeyi, karakterize etmeyi ve ölçmeyi sağladığı günümüz koşullarında belirlenmiştir. Bu nedenle ajanlar, seçici bağlanma substratları ile moleküler çekicilik sağlayan moleküller olan reseptör moleküllerine bağlanır.

Bu tez çalışması kansere karşı görüntüleme problemlerinde kullanılabilecek yeni taşıyıcı bileşikler geliştirmeyi hedefler. Buradaki çalışma görüntüleme problemlerinin sinyal kısımlarını, karşılık gelen dokuya taşıyan hedefleme moleküllerinin tasarımı ve hazırlanmasıdır.

Bu problemler ile kanser mikro-çevresindeki proteinlerin görüntülenmesi hedeflenmektedir. Kanser dokularının PD-L1 proteininin, hastalık ile birlikte varlığı yoğun olarak artan bileşik, özellikle seçilip buna uygun moleküller geliştirilmesi bu çalışmanın özgün değeridir. Bunu yaparken GVIA peptidinin farmakokoru baz alınarak peptidomimetikler geliştirilmiştir. GVIA proteinin seçilmesinin nedeni, bu proteine uygun peptidomimetiklerin seçilen kanser hücrelerine özgü biyobelirtece uyum sağladığının tarama çalışmalarında gözlenmesidir. PD-L1 proteini bağışıklık sistemi tarafından hedeflenerek yok edilmeye yarayan bir proteindir. İmmün sistem bunu T hücreleri ile gerçekleştirir. T hücresi (T lenfosit), immün sistemdeki bir beyaz kan hücresi türüdür ve immünolojik süreçlerde önemli rol oynayan yardımcı, katil, düzenleyici hücre tiplerini içerir ve PD-1 bu hücrelerin üzerindedir. Kanser hücreleri PD-1/PD-L1 kompleksi üreterek T-hücrelerinde programlanmış hücre ölümünü mekanizmasını işlevsiz bırakır. PD-1 ve PD-L1 proteinlerinin birleşmesi T hücresinin anti-tümör aktivitesini inhibe eder. Bu kompleks yapının bu tez çalışmasındaki görevi ise artan PD-L1 konsantrasyonundan faydalanarak hastalık tayinine yardımcı moleküller geliştirmektir. Bu proteinine uygun peptidomimetik seçimi ise farmakofor tespiti ile mümkündür.

PD-L1 proteini ile uyumlu peptidomimetik yapılarının sentezlenmesinin ardından gelecek çalışmalar için istenilen yapı oluşturulmuş olur. Peptidomimetiklerin tasarımında DOTA ligandı ile birleştirilebilir olması her aşamada önceliklerden biri olarak göz önünde bulundurulmuştur. DOTA ligandı ile ⁶⁸Ga radyonüklid atomunun oluşturduğu kompleks yapı, hedef proteinin görüntüleme ajanı ile birleşiminin ardından PET-BT cihazı tarafından kanser hücrelerinin tanımlanmasını sağlar. Böylece hedeflenen amaç olan kanser görüntülenmesi başarılmış olur. Bu tez kapsamında ise ilk adım olarak peptidomimetik sentezi tamamlanmıştır.



DEVELOPMENT AND SYNTHESIS OF MOLECULAR IMAGING AGENT FOR PROTEIN PD-L1

SUMMARY

Like many diseases, the most straight forward approach to detect cancer is molecular imaging wherein a signal stems from biomarkers unique to this disease. Of course, diagnosis and quantitative outcome of clinical tests can also be handled with molecular images which are provided by imaging agents. It is worth noting that these agents, also known as “chemical probes”, ensure to visualize, characterize, and measure biological process in vivo systems. Hence, agents are bind to receptor molecules that provide molecular attraction with the selective binding substrates.

The mainstream idea of researches that is applied on cancer, have different aims, such as diagnosis or treatment. Most of researches from them are about to target a receptor molecule or a protein unique to tumour cells. Herein, the overall purpose of this project is to design and synthesize new molecules exhibiting the potential of binding to such receptor molecules. Thus, organic compounds that hold the potential of imaging cancerous cells in a selective manner, are intended to be developed. By achieving this goal, we also believe that the development of novel imaging agents would ultimately eliminate the need for biopsy. To baseline of this thesis, molecules target cancer cells have been developed to be used in the design of imaging agents.

The main role of targeting process belongs to biomarkers, that is used as a chemical probe. These probes have an important role in development progress in drug systems and biomedical researches for many diseases like cancer. Hence, these agents become a bridge between biological processes and clinical outcomes. The vital finding ways for the treatment of targeting disease depend on these outcomes. In recent days, the results and images of biomarkers are accepted as a confidential outcome on the basis of clinical researches and practices.

Biomarkers provide objective and quantifiable results of biological systems in health care processes. The significant benefit of a biomarkers is that all types of biomarkers ensure the measurable image of the physical state of the body with the time is that undetectable effects are found on the health of patients. As an imaging technique, biomarkers provide the unique ability to interrogate the exact disease and focus such as inflammation or tumour. The word of biomarker is come from the biological marker and it refers to medical sign to analyse synthons of diseases.

The importance of cancer cell imaging lies within the fact that it eliminates the need for biopsy. A biopsy is the eradication of a certain tissue for analysis. Since it is an invasive procedure, a biopsy could lead to side-effects such as infection or blood collection under the skin and can create further contamination of the diseased area by spreading of the malignant cells. Biopsy also is a procedure that can lead to human error since it is not yet perfected. This could create inaccurate results.

For the enhancement of the detection of diseases in early stages, in vivo molecular imaging is an important tool. The benefits of molecular imaging are that it aids the physicians to; identify the degree of the disease, select the patient-specific therapeutic treatment, apply a targeted therapy and calculate the molecular-specific effect of treatment. The researches usually aim diagnosis or treatment but the focal point is to target a receptor molecule or a protein that is exclusive to the tumor cells. Imaging Programmed Death Ligand-1 Protein (PD-L1) as a biomarker can be give as an example of this.

Molecular imaging is a medical imaging model that provides pictures of the inside of the body at a molecular and cellular level. Molecular imaging focuses on locating and monitoring the progression of the disease. With the help of molecular imaging, the chemical and biological processes can be observed. Molecular imaging identifies the disease, locates its exact position at the body, even before the symptoms occur. With the help of biomarkers or organic molecules that have biomarkers, molecular imaging is specific to the destination.

The diagnosis of many other diseases, including cancer, is determined by imaging. To do so, some peptidomimetic with the consideration of pharmacore of GVIA peptide are developed for targeting for specific biomarker. To define briefly, a peptidomimetic is a small molecule that has a chain designed to substitute a certain portion of peptide. They comprise of modification of an existing peptide, or by designing similar systems that have pharmacore of peptides. This choice stems from the observation that peptide bonds are prone to hydrolysis in the human body.

In order to find the suitable peptidomimetic for the protein specific to the target tissue, the effect map of the protein according to the chemical and physical interaction is first assigned. Relevant ligands are identified, then a three-dimensional protein scheme is made. Radius is for complementarity between ligands and appropriate value, and the angle between atoms is redesigned and placed in the diagram. A few high-impact needs, molecules are sampled in multiple rotameters. All these rearrangements are the main facts of docking systems. The method requires the receptor on the targeted tissue and thus shows tissue selectivity.

The selectivity is necessary information to be provided for molecular targeting is obtained by proper targeting of the targeting molecule and biomarker. The formation of the image is provided by chemical probes on PD-L1 Protein.

With this paradigm, we aimed to monitor cancer cells through PD-1. Programmed cell death protein 1, also known as PD-1 is a cell surface receptor that has a significant role in the downregulation of the immune system. The PD-1 provides health-promoting to facilitate self-tolerance of cancer cells by suppressing T cell inflammatory activity. A T cell (T lymphocyte) is a type of white blood cell in the immune system and includes helper, killer, regulatory type of cells that have an important role in immunologic processes. PD-1 is responsible for immune system protection of own cells against autoimmunity through a mechanism of promoting programmed cell death in T-cells by producing PD-1/PD-L1 complex.

Researches of PD-L1 on tumour cells inhibits the anti-tumour activity of T cells through the engagement of PD-1 and T cells. Through complex protein mechanisms, PD-1 is an inhibitor of the immune system. This prevents autoimmune diseases, but it can also prevent the immune system from killing cancer cells. As a basic definition of mechanism, the interaction between PD-L1 on the tumour cells and PD-1 on a T-cell reduces signals which stem from T-cell function, to provide the immune system

for killing the tumour cells. The result of this mechanism the disease which is cancer in this project is avoided. Hence, several PD-1 and PD-L1 inhibitors are being trailed within the clinic for use in advanced diseases like cancer.

PD-L1 protein is present in very high rates in the tumor microenvironment and immune-derived cell structures (APCs), including different cancer cells. The mechanism between PD-L1 / T-cells briefly begins when the cancer cell is perceived as a foreign cell and is under attack to be killed by the T-cells. As a result of the interaction of PD-L1 protein on tumor cells with PD-1 on T-cells, regulatory T-cells perceive the cancerous cell as a normal cell and protect some tumor cells from immune attack and decrease anti-cancer function. The PD-L1 / PD-1 protein complex is a structure that is developed by the cancer cell to protect itself and is used to rule out attacks of T-cells.

In this project, we aim to develop some compounds which could be ultimately utilized as imaging biomarker which is PD-L1, against cancer. Therein, our contribution is the design and preparation of the targeting molecules, which carry the signalling moieties to the corresponding tissues. In doing so, we have developed some peptidomimetic with the consideration of pharmacore of GVIA peptide. With this work, we have reasoned that the development of these molecules will pave the way to imaging cancer in a non-invasive way, unlike biopsy.

The targeting molecules are designed as imaging agent with the DOTA complex molecule and ^{68}Ga radionuclide atom. Via this design, the molecules aim to become imaging agents for PET technique. With this work, we have reasoned that the development of these molecules will pave the way to imaging cancer in a non-invasive way, unlike biopsy. In this way, the targeted cancer cells are aimed imaging complete successfully. As a fundamental aim in this thesis, peptidomimetic synthesis has been completed as a first step of all imaging technique.



1. GİRİŞ

1.1. Biyobelirteçler

Günümüzde biyobelirteçler ilaç sistemlerindeki gelişim ve ilerleme sayesinde kanser gibi pek çok hastalığın teşhisinde ve biyomedikal araştırmalarında önemli rol oynamaktadırlar. Biyolojik süreç ve klinik sonuçlar arasında hedefe yönelerek köprü oluşturmaktırlar. Hedefleme süreci ise özellikle erken teşhis olanağı sağladığından hastalığının tedavisi için hayati önem taşır. Son günlerde biyobelirteçlerin hastalığın tanısı için yapılan test sonuçları ve görüntülemeleri, klinik araştırmalardaki uygulamalar için temel oluşturmaktadır. Bunun sebebi sağlık hizmetlerinde biyolojik sistemlerin nesnel ve ölçülebilir sonuçlarının temin edilmesini sağlamalarıdır. Kelime yapısı olarak da biyobelirteç kelimesi biyolojik işaretleyiciden gelmektedir ve tıbbi tanı sağlayan işaret anlamına gelir [1].

1.1.1. Biyobelirteç türleri

Tedavi aracı olan biyobelirteçler farklı amaçlar için kullanılmaktadır. Bu nedenle farklı biyobelirteç türleri vardır. Biyobelirteçler kullanım amaçlarına göre gruplandırılabilirler.

1.1.1.1. Risk değerlendirme biyobelirteçleri

DNA yapıları ve nükleotid gibi kolayca erişilebilir biyolojik bileşenler, genetik ve epigenetik biyobelirteçler olarak değerlendirilirler. Özellikle kanser hastalığında risk değerlendirme amacıyla tedavi etkinliği belirleyip klinik sonuçların tahmin edilmesinde kullanılırlar. Bu belirteçlerin bazıları, tümör hücrelerinin çoğalmasının ilk aşamasında ve tedavi yöntemini geliştirmek adına bilgi sağlayabilir. Ek olarak hedef tümör doku belirleme aşamasında kullanılan risk değerlendirme yöntemlerinin diğer dokulara zarar vermeden yapılması klinik ortamlarda kullanılabilirliğini arttırmıştır. Klinik uygulamalarda, genetik ve epigenetik biyobelirteçlerin mevcut safhasını ve kanser risk değerlendirmesinin bir örneği de beyin kanserinde

mevcuttur. Kromozom 22 bu kanser türünde yirmiden fazla allil dengesizliği tespit eden işaretleyici kullanılarak anormal değişikliklerin derecelerini belirler [2].

1.1.1.2. Tanısal biyobelirteçler

Tanısal biyobelirteçler, klinik ortamda herhangi bir uygulama gerekliliğini belirlemek ve teşhis edilecek hastalığa özgü tıbbi duruma göre görüntüleme yapma görevindedirler. Hedef hastalığa özgü seçilen biyobelirteç, uygun kullanım koşullarına göre uygulanır. Uygulamada kullanılacak cihazın verdiği sonucun ve performansın, karakterizasyon yöntemi de önem taşır. Veri elde edilecek cihazın yaygınca kullanılabilir olması öncelikler arasındadır. Bu uygulamanın bir örneği ise hastaların gen tasarım modellemesini çıkartmak ve farklı tümör grupları için tanısal biyobelirteç görevini görmektir [3].

1.1.1.3. Tedavi öngören biyobelirteçler

Tedavi öngören biyobelirteçlerin görevi ise onkoloji alanında kanserli doku tespiti yapıldıktan sonra hastalığın türü ve uygulanacak tedavi açısından bilgi vermektir. Bunlara ek olarak tanımlanmış bir hastalığın saldırganlığını belirleme açısından da bilgi verir. Hastalığın agresiflik seviyesi tedavinin gidiş yönünün belirlenmesinde önemli rol oynar [4].

1.1.1.4. Farmakodinamik biyobelirteçler

Farmakodinamik biyobelirteçler yakın zamanda uygulanmış tedavinin seyrini ölçer ve ilacın tümör üzerindeki etkilerini göstermede fayda sağlar. Bu biyobelirteç türü yeni bir anti-kanser ilacının klinik uygulamalarında doz seçimini yönetmek için kullanılabilir. Bu belirteçlerin gerekliliği belirli tümör dokularına özgü biyobelirteçlerin etkililik durumunu gözleme kısmında ortaya çıkar. Amaç ise tümör dokularının tedavilere duyarlılığını kontrol etmektir [5].

1.1.1.5. Tedavi sürecini izleyen biyobelirteçler

Tedavi sürecini izleyen biyobelirteçler, tedavi yolunun zaman içinde aldığı ilerleme ve çalışma verimini takip etmede fayda sağlarlar. Bu türe dâhil olan biyobelirteçler hastalığın belirli bir tedavi sonrasında kat ettiği iyileşme yolunu belirlemek için kullanılır.

Örnek olarak ERBB2 geninin çoğaldığı tür olan meme kanserine sahip hastalar Trastuzumab (Herceptin) etken maddesi ile yapılan tedaviden fayda sağlarken tümör tarafından östrojen reseptörünü kodlayan genin çoğalmasına neden olan başka bir kanser türünde ise Tamoksifen kullanımı tedaviye yanıt verir. Böylece hangi kanser tipinde hangi tedavi yönteminin kullanılabileceği değerlendirilebilmektedir [5].

1.1.1.6. Tekrar olasılığını öngören biyobelirteçler

Bu başlık altında anlatılan biyobelirteçler ise hastalığın tekrar nüksetme olasılığını öngörmek ve teşhis etmek amaçlı kullanılmaktadır. Bunun bir örneği olan patentli çalışma Oncotype DX®, meme kanserinin tekrarlama olasılığını araştıran bir testtir. Bu testin kullanıldığı hastalar erken seviye evresindedirler. Bu sevide hastalık hormon tedavisi ile tedavi edilebilir. Bu yöntemde tümör biyopsisi esnasında araştırılan hücrelerdeki 21 gen sıralamasına bakılır. Analiz sonuçlarının ardından hastalığın 10 yıl içerisindeki tekrarlama olasılığına bakılır [6].

1.2. Moleküler Görüntüleme

Son yıllarda klinik tedavi veya hastalık izlemede kullanılmak üzere; vücut kısımlarının, dokularının veya organlarının görselleştirilmesi için tıbbi görüntüleme yöntemleri uygulanmaya başlanmıştır. Görüntüleme tekniklerinde biyobelirteçlerin vücut içerisinde tespit edilmelerine yarayan özelliklerinden yararlanılır. Kanser gibi pek çok hastalık görüntüleme yöntemi ile tespit edilebilmektedir [7].

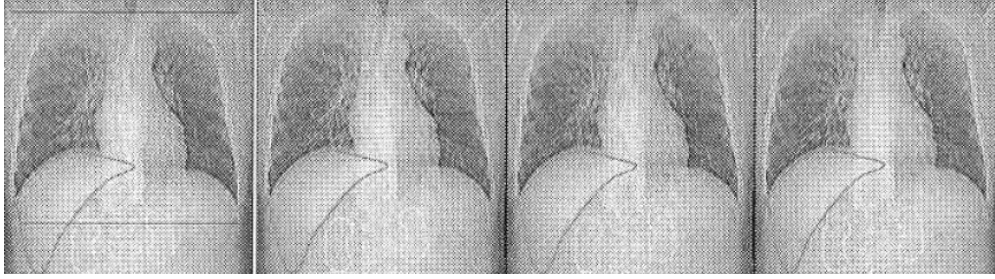
1.2.1. Moleküler görüntüleme yöntemleri

Görüntüleme tarama teknikleri; duyarlılık, lokalizasyon, boyut ve çözünürlüklerine göre birbirlerinden ayrılırlar. Moleküler görüntüleme, radyonüklid ajanlar gibi farklılık sağlayan bileşiklerin görüntülenebilir olma özelliğinden yararlanır. Bu nükleer tıp materyalleri biyopsinin zararlı etkilerinden kaçınmak için zararsız tanı konusunu ele almaktadır [8]. Günümüzde tümör tanısı ve tespiti, BT, MRI ve PET, SPECT gibi cihazlarla mümkün hale gelmiştir.

1.2.1.1. Bilgisayarlı tomografi-BT (Computed Tomography-CT) ile görüntüleme

Bilgisayarlı tomografi, yüksek dozlu x-ışını yayılımı ile doku ya da organ görüntüsü elde eden cihaz olarak tanımlanabilir. BT görüntüleri, taranacak bölgenin dilimler

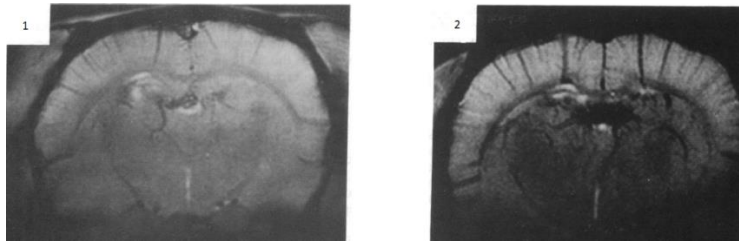
halinde ve seri radyolojik ışınlarla taranması ile elde edilir. Tarama işlemi farklı doğrultularda yapılabildiğinden organ veya dokuların üç boyutlu görüntüsü elde edilebilir. Bu tarama görüntüleri hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanılır [9]. Şekil 1.1'de gösterilen iki boyutlu akciğer görüntüsü gibi tüm görüntü dizileri, düz x-ışını taraması ile tespit edilir.



Şekil 1.1: Göğüs hastalıkları bölündeki bir hastanın BT göğüs tomografisi.

1.2.1.2. Manyetik rezonans - MR ile görüntüleme

Manyetik rezonans (Magnetic resonance imaging - MRI) ile görüntüleme, vücudun biyolojik fonksiyonları hakkında bilgi vererek hastalıkların tanı ve tedavisine katkıda bulunur. MR mıknatıs tarafından yaratılan güçlü bir manyetik alan ve radyo-frekanslarını kullanarak vücut morfolojisinin görüntüsünü tarar. Bu taramayı manyetik alan doğrultusundaki protonların sıralanmasıyla gerçekleştirir. Şekil 1.2'de ilaç enjekte edilen ve enjekte edilmeyen beyin hücrelerinin farklı tomografi görüntüsü verilmiştir [10]. MRI ile görüntülenebilen bir organ olan beyin, üzerindeki tümörlü doku ilaç enjeksiyonu ile daha belirgin hale getirilmiştir.



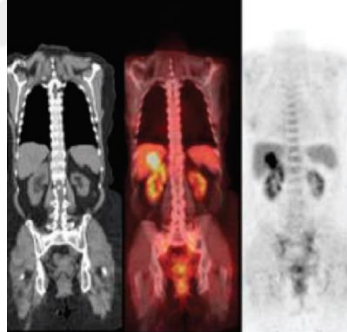
Şekil 1.2: MR: İlaç enjeksiyonu öncesi (1) ve sonrası (2) beyin.

1.2.1.3. PET ve SPECT cihazları ile görüntüleme

Pozitron emisyon tomografisi (Positron Emission Tomography-PET); in vivo ortamda hücreleri, proteinleri ve gen ekspresyonunu tespit eden cihaz olarak tanımlanabilir. PET cihazı vücudun statik ve dinamik görüntülerin elde edilmesini

sağlar. Bu cihazın önceki yıllardaki kullanım amacı doğal öldürücü hücrelerin ve metastatik tümör hücrelerinin durumunu gözlemlemektir. Yeni çalışma alanı ise pozitron yayan radyoizotop etiketli biyolojik bileşikler görüntülemektir. Bu çalışma alanındaki amaç, hedeflenen dokudaki radyo-nüklid atomun ve elektronun, kompleks oluşumundan kaynaklı, bir çift foton salınımını tespit etmektir. PET tarayıcıda, bu yöntem radyo-etiketli bileşiklerin miktarını tayin etmek ve yerini tespit etmek için kullanılır. PET cihazının mekanizması ilacın vücut içinde dağılması ile başlar. Hedefleyici olan ilaç, tümörü ve tümör mikro-çevresindeki proteinleri bulmakla yükümlüdür. Etkileşim sonucu oluşan radyo-aktivite sayesinde görüntü sağlanır [11].

Müdahalesiz görüntüleme tekniklerinden olan PET ve SPECT (Single Positron Emission Tomography-SPECT), in vivo fonksiyonlarda tanıyı en hassas şekilde yapan yöntemler arasındadır. Ancak bu iki yöntem, anatomik detayların tarama görüntüsünde düşük çözünürlük verir. Bu nedenle PET ve SPECT, yüksek çözünürlük sağlamak için BT veya MRI ile birlikte hibrit cihaz olarak kullanılır [12]. Şekil 1.3'de gösterildiği gibi en iyi sonuç veren görüntü PET-BT'nin hibrit cihazı tarafından sağlanan tarama şemasıdır.



Şekil 1.3: Kolorektal kanser hastasının BT, PET-BT, PET görüntüleri.

PET ve SPECT teknikleri arasındaki fark radyonüklid görüntüleme şeklidir. SPECT cihazında gama kamerası hedeflenen dokuyu 360 ° açı ile görüntüler. Gama ışınlarının emisyonundan toplanan bilgiler, tomografik taramaların ve görüntülenen maddelerinin pozisyonunu verir.

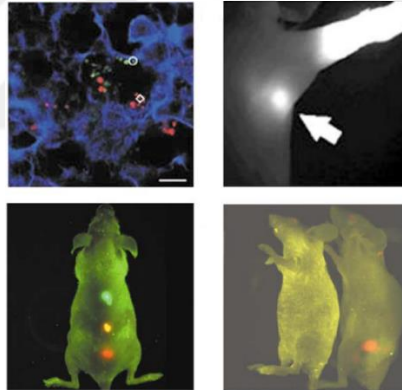
1.2.2. Moleküler görüntüleme ajanları

Görüntüleme tekniklerinde kullanılan cihazlara yetersiz kaldıkları noktalarda takviye gerekebilir. Her ne kadar moleküler görüntüleme cihazları hastalıkların teşhisi, tanısı

ve tedavisi konusunda büyük öneme sahip olsa da düşük dozlarla kullanılan görüntüleme ajanları sayesinde görüntüler gerçeğe en yakın sonucu sağlarlar. Bu nedenle doğru görüntüleme için kullanılan tekniğe özgü kimyasal ayıraç kullanımı tercih edilir. Bu ayıraçlara örnek olarak kuantum noktaları, floresans boyalar ve radyonüklid atomlar öne çıkartılabilir. Bunlar maddeler dokuyu hedef almak için görüntüleme ajanı olarak kullanılırlar [13].

1.2.2.1. Kuantum noktaları

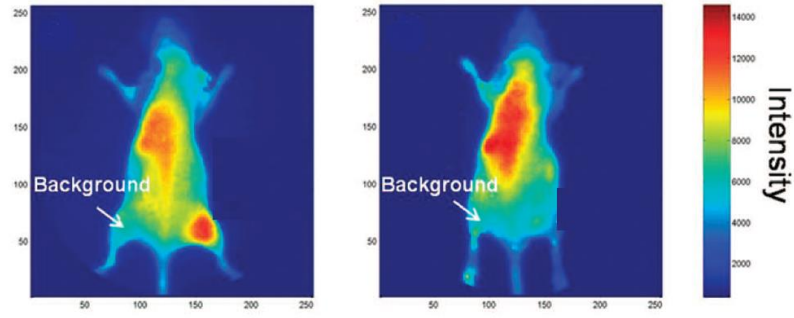
Kuantum noktaları görüntüleme gibi biyomedikal uygulamalar için kullanılan kuantum enerjili nano-parçacıklardır. Nano-parçacıkların boyutu kullanım alanına göre değişiklik gösterebilir. Kuantum noktaları geniş spektral aralıkta, yüksek emisyon katsayına sahiptirler. Bu emisyon sonucu oluşan fosforik görüntüler tanıyı mümkün kılar. Kuantum noktalarının avantajı, Şekil 1.4'de gösterildiği gibi, yüzey kimyası ve konjugasyondur. Görüntüleme tekniği hassas ve çok renkli hücresel görüntüleme sağlar [14].



Şekil 1.4: In vivo ortamda kuantum boyalar ile hedefleme ve görüntülemeleri.

1.2.2.2. Floresan boyalar

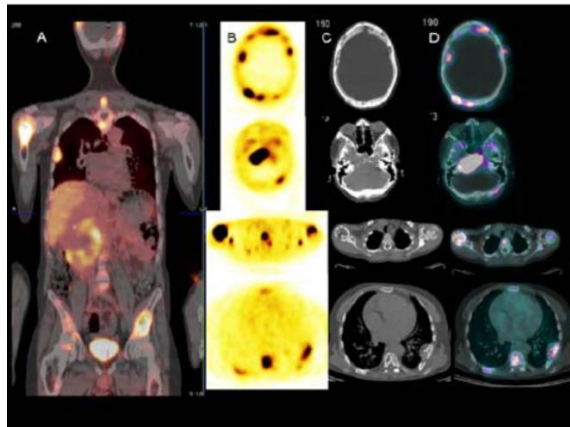
Floresan boyalar görünür bölgede emisyon göstermeleri nedeniyle görüntüleme maddesi olarak kullanılırlar. Özellikle zararsız bir yöntem olan görüntüleme alanında floresan boya ile görüntüleme ümit verici bir yöntemdir. Floresan boyalar biyolojik veya organik moleküller ile kovalent ve kovalent olmayan konjugasyon oluştururlar ve böylece biyo-moleküler olaylar hakkında eş zamanlı bilgi sağlarlar. Floresan boyaların bu özellikleri sayesinde tanı sonucu Şekil 1.5'de gösterildiği gibi kolayca gözlenir.



Şekil 1.5: Florasan boya enjekte edilmiş kobay fare görüntülemeleri [15].

1.2.2.3. Radyonüklid atomlar

Metal merkezli görüntüleme ajanları geliştirilirken metalin liganda tutunması ve koordinasyon kimyası göz önünde bulundurulması gerekir. Tutunma ve bağlanma açısından uygun olan atomlar, PET ve SPECT gibi cihazlarda görüntüleme yapmaya olanak sağlar. Örnek olarak PET cihazında görüntülenmek üzere enjekte edilmiş ilacın, pozitron yayan radyonüklid atomlarla etiketlenmesi gerekir. Radyonüklid atom gama ışınlarıyla etkileşime girdiğinde 180° dönüş yapabilen ve 511 keV ışınlık gamma kamerası pozitronu algılar ve bu bilgileri işleyerek bir tarama sonucu sağlar. Bu özelliği gösteren atomlar arasında Ga(III), In(III) ve Zr(IV) atomları da bulunur. Bunların vücut içerisinde sabit bir lokasyonda belirlenmesi için gerekli olanlar ise öncelikle taşınması ve taşıyıcı moleküle uygun koşullarda bağlanması gerekmektedir [16, 17]. Örneğin Ga elementini peptit benzeri taşıyıcı yapıya bağlayacağımız zaman, bunu DOTA kompleks yapısıyla sağlayabiliriz. Şekil 1.6'da bunun bir örneği olarak paraneoplasma hastasının PET/BT cihazı ile yapılan görüntülemesi gösterilmiştir [18].



Şekil 1.6: ^{68}Ga radyonüklid atomu ve PET cihazı ile yapılan görüntülemesi.

1.3. Kanser Hücresinin Görüntülenmesi

Son yıllarda hasta hücre görüntülenmesinde veya klinik tedavisinde kullanılmak üzere vücut kısımlarının, dokuların ve organların biyobelirteçler yardımıyla görselleştirilmesi, çeşitli tıbbi görüntüleme yöntemleri ile yaygınlaşmıştır. Kanser gibi pek çok hastalığın teşhisi, moleküler görüntüleme yöntemleri gibi gelişerek ilerleyen tekniklerle yapılabilmektedir [7].

1.3.1. Tümör dokusunun çoğalması ve bağışıklık sistemi etkileri

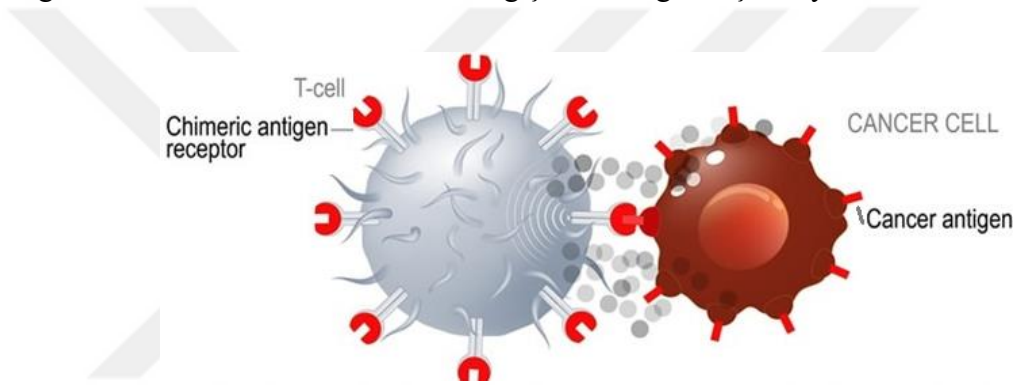
Kanser hastalığının temel sebebi kanser hücrelerinin vücut içerisinde önlenemez bir biçimde bölünmesidir. Bu kontrolsüz bölünmenin sebebi ise insan kanser hücrelerinin %50'sinin P53 geninin mutasyona uğrayıp fonksiyon kaybı yaşamasıdır. Bu fonksiyon, P53 geninin nükleer transkripsiyon ile pro-opoptotik işlev görmesi yani vücut içerisinde programlı hücre ölümleri gerçekleştirmesidir. Bu gen kanser hücresi içerisinde mutasyona uğraması sonucu, kanser hücresi çoğalması gözlenir. Çoğalan hücrelerin çoğu bağışıklık sistemi tarafından yok edilir. Ancak kalan hücrelerin birleşip, çoğalmaya devam ettikleri durumlarda ise tümör dokusu oluşur [19]. Mutant P53 genlerinin vücut içerisindeki aşırı birikmesinin oluşturduğu negatif etki ise tümör hücrelerine karşı anti-kanser etki gösteren T-hücreleri gibi yararlı hücrelerin ölümüne yol açmasıdır [20].

T-hücreleri, bağışıklık sisteminde ve kanser hücresi ölümlerinde büyük bir yeri olan beyaz kan hücrelerinin bir alt tipidir. Bu hücreler vasıtasıyla; vücuttaki bakteri, virüs ve kanser hücreleri doğrudan öldürülebilir ya da antikor üretimi gerçekleştirerek vücudu yabancı bileşenlerden korur. T-hücresi kemik iliğinde üretildikten sonra timüs bezinde gelişimini tamamlarlar. T-hücresi ismi buradan kaynaklanmaktadır [21].

Fonksiyon farklılıklarının hala araştırılmasından dolayı, T-hücreleri net olmasa da işlevlerine göre gruplara ayrılabilirler. Bunlardan sitotoksik T-hücreleri ve doğal öldürücü T-hücreleri; bakteri, virüs ve kanser hücresi gibi kendinden olmayan yapıları yok ederler. Çalışma mekanizmaları aynıdır ancak doğal öldürücü T-hücreleri önceden aktifleşmiş ve farklılaşmış sitotoksik T-hücreleridir [22, 23]. Yardımcı T-hücreleri ise diğer T-hücrelerinden bilgi toplayıp verilecek cevabı düzenler [24]. Hafızadan sorumlu T-hücreleri daha önce gördükleri yapıların mikro-çevresindeki protein kaydının tutulmasından sorumludur [25]. Son olarak düzenleyici

T-hücreleri ise T-hücresi mikro-çevresinde bulunan reseptörü yabancı olarak algılamaz böylece bağışıklık sistemi baskılanır. Ancak bu hücre özellikle immüno-terapi için büyük önem taşır ve yapısı hala incelenmektedir [26].

Bütün T-hücrelerinin ortak görevi kanser hücresi gibi yabancı bir hücreyi tanımlayarak (Şekil 1.7’de antijen ve reseptörler yoluyla tanınma şeması gösterilmiştir) bu hücreye atak edip ölümünü sağlamaktır. Kanser hücresi bağışıklık döngüsü, kanser hücresinin ölüp antijen salgılamasıyla başlar. Bu antijenler Şekil 1.7’deki gibi bağışıklık sistemi tarafından tanınır hücrelerin mikro-çevrelerine yerleştirilirler böylece APCs (antigen presenting cells) hücreleri oluşur. Bu oluşan özel hücreler antijenlerinden oluştuklarından dolayı kanser hücrelerini görüp tanıma görevindedirler ve kanser hücresi bağışıklık döngüsü içinde yer alabilirler [21].



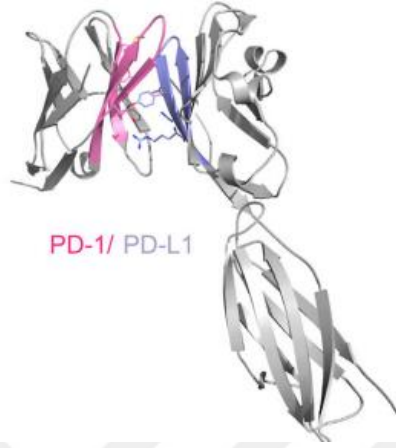
Şekil 1.7: T ve kanser hücresi arasındaki antijen bağlanma noktaları [27].

T-hücrelerinin kanser hücrelerine yaptığı immüno atağa rağmen kanser hücreleri mikro-çevrelerinde yüksek seviyede bulunan immün kontrol noktaları vasıtasıyla bağışıklık sistemini ekarte edebilmektedir. Vücut sisteminde immün kontrol noktalarının temel görevi, bağışıklık sisteminin, dışardan sayılan hücreye karşı verdiği tepkinin kontrol altında tutulması ve içerden bir hücrenin bağışıklık sisteminin gösterdiği ataklardan etkilenmemesini sağlamaktır. Bir başka tanımla immün kontrol noktaları taşıyan vücut hücrelerini tanıyıp tanımadıkları hücrelere ise immün sistem saldırıları göstermektir [28].

1.3.2. Kanser hücresi immün kontrol noktası: PD-L1

Kanser mikro-çevresindeki immün noktalarının keşfi James P. Allison (CTLA-1) ve Tasuku Honjo (PD-L1) tarafından yapılmıştır ve ilerleyen yıllarda da çalışma mekanizmaları ve protein çalışma şekilleri tanımlanmıştır. CTLA-1 ve PD-L1 tümör doku çevresinde bulunur ve T hücreleri tarafından tanınmayı sağlar [29]. Görev

tanımlarının aynı olmasına rağmen çalışma mekanizmaları birbirinden farklıdır. Bilim insanlarının bu çalışma doğrultusunda yapılan kanserli hücre hedefleyerek tedavi etme çalışmaları başarıyla sonuçlanmıştır. Allison ve Honjo kanser alanında yaptıkları keşif ile 2018 yılında Nobel ödülüne layık görülmüştür [30].



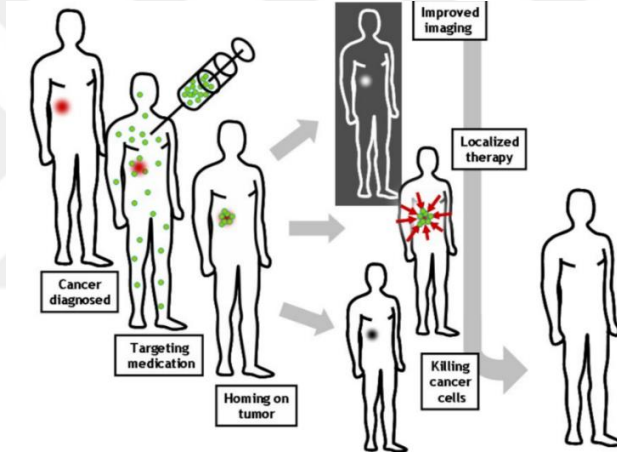
Şekil 1.8: PD-1/PD-L1 kompleksi [31].

PD-L1 proteini farklı kanser hücreleri olmak üzere, tümör mikro-çevresinde ve immün kaynaklı hücre yapılarında (APCs) çok yüksek oranlarda bulunmaktadır [32]. PD-L1 ve T-hücreleri arasındaki mekanizma kısaca; kanser hücrelerinin yabancı hücre olarak algılanıp T-hücreleri tarafından öldürülmek üzere saldırı altında kalmaları ile başlar. Tümörlü doku üzerinde bulunan PD-L1 proteininin T-hücreleri üzerinde bulunan PD-1 ile etkileşimi sonucunda düzenleyici T-hücreleri kanserli hücreyi normal hücreymiş gibi algılar ve bir kısım tümör hücresi immün ataktan koruyarak anti-kanser fonksiyonunu düşürür. Şekil 1.8’deki gibi PD-L1/PD-1 protein kompleks yapısı, kanser hücresi tarafından kendini korumak adına geliştiren bir yapıdır ve T-hücrelerinin ataklarını ekarte etmek için kullanılır [33].

1.3.3. Kanser dokusunda moleküler görüntülenme ve önemi

Günümüzde PD-L1 yalnızca tedavi için değil aynı zamanda görüntüleme için de araştırılıp geliştirilmeye başlanmıştır. İmmün kontrol noktası olan PD-L1 proteininden yola çıkarak hücresel ve moleküler düzeyde özgüllüğe sahip görüntüleme ajanlarının geliştirilmesi biyopsi gibi yan etkileri bulunan yöntemlere alternatif olmuştur [34]. Görüntüleme amaçlı kullanılan bu tıbbi malzemelerin temelde çalışma amacı biyopsinin zararlı etkilerinden kaçınmak ve zararsız tanı sağlamaktır [8].

Son yıllarda klinik tedavi veya hastalık izleme amacıyla kullanılmak üzere vücut kısımlarının, dokularının ve organlarının görselleştirilmesi için tıbbi görüntüleme teknikleri uygulanmaya başlanmıştır. Görüntüleme tekniklerinde biyobelirteçlerin çeşitli özelliklerinden faydalanılarak uygun görüntüleme tekniği ile birlikte doku görselleştirilir. Kanser de içlerinde olmak üzere daha birçok hastalığın teşhisi görüntüleme yöntemi ile belirlenir [7]. Görüntüleme tanım olarak sistemdeki canlı hücrelerin içindeki veya mikro-çevresindeki biyo-moleküllerin ayırt edilmesi için kullanılan yöntemdir. Yöntem, Şekil 1.9'da gösterildiği gibi hedeflenen doku üzerindeki reseptöre ihtiyaç duyar ve böylece doku seçiciliği gösterir. Moleküler görüntüleme için sağlanacak gerekli bilgi, hedefleyici molekül ve biyobelirtecın uygun bir şekilde reseptör görevi görmesi ile elde edilir. Görüntünün oluşması ise kimyasal problemler aracılığı ile sağlanır [35].



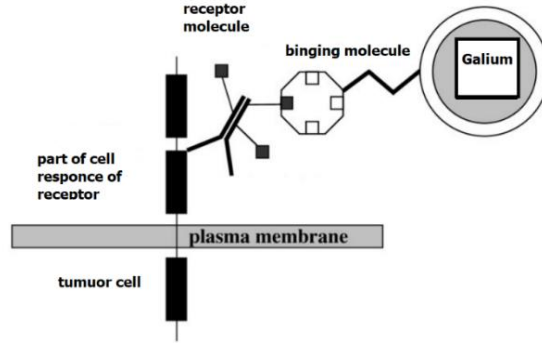
Şekil 1.9: Moleküler görüntüleme çalışma mekanizması [36].

1.3.4. Kanserli dokunun hedeflenmesi

Reseptörler, seçici bağlayıcı substratlar ile moleküler çekim sağlayan moleküllerdir. Uygun yerlere ve boşluklara sahip olan hedef dokular, kimyasal ve fiziksel etkiler ile reseptör molekülleri tarafından seçilir. Reseptörler; boyut, şekil ve spektrum oluşumuna dayanarak hedefleme molekülü için özel olarak tasarlanmıştır [37].

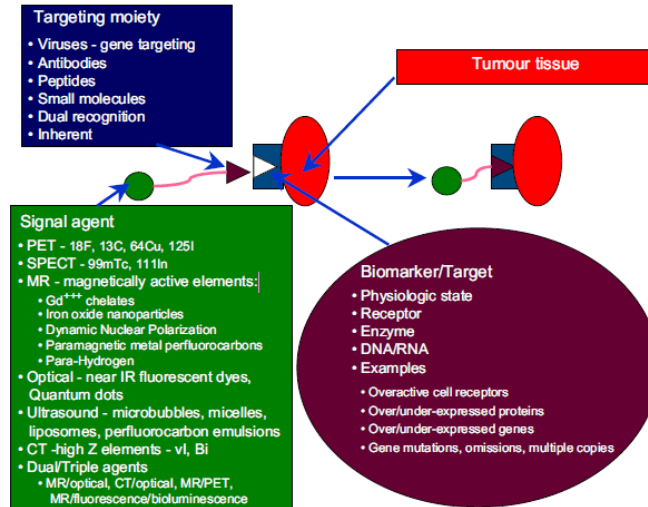
Bütün ligand ve reseptör çiftlerinin etkileşim koşulları fiziksel ve kimyasal olarak birbirinden farklıdır. Ancak Şekil 1.10'da resmedildiği gibi temelde işlerin yürüme yöntemi aynıdır. Reseptör spesifik ligandları tanır ve etkileşimler sonucu ligand ve reseptörler birbirlerine bağlanır. Hücre üzerinde şekil, aktivite veya renk gibi kimyasal ve fiziksel koşullar değiştirilir [38]. Doku hedefleme için belirlenmiş uygun

moleküller, moleküllerin seçicilik kabiliyeti ile birlikte kanser gibi hastalıkların görüntülenmesi amacıyla kullanılabilir.



Şekil 1.10: Görüntüleme ajanının ana parçaları.

Kimyasal problemler in vivo sistemlerde biyolojik işlemin görselleştirilmesini, karakterizasyonunu ve ölçülmesini sağlayan ajanlardır. Radyo-etiketli elementler de içinde olduğu doku üzerine taşınarak rutin klinik uygulamalar için uygun koşulları sağlarlar [39]. Moleküler görüntüleme ajanlarının 3D modelinde kimyasal problemlerin konumu istenen bileşiğin genel görüntüsüne göre belirlenir. ^{68}Ga gibi radyonüklid atomlar, PET görüntüleme yönteminde kullanılan atomlardır ancak vücut sıvısında dağılımları yüzünden atomik formda kullanılamazlar. Bu sorunun üstesinden gelmek için istenen vücut kısmını veya dokusunu hedef alma amacı ile tasarlanan taşıyıcı bileşiğe bağlanmaları gerekir. Bu nedenle Şekil 1.11'deki gibi üç kısımdan oluşan tasarım moleküle ihtiyaç vardır [12].



Şekil 1.11: Görüntüleme ajanının ana parça örneklendirmesi [8].

Kimyasal görüntüleme ajanları Şekil 1.11'de özetlenen üç ana faktör içerir. İlk olarak uygun kimyasal prob, moleküler görüntüleme yönteminin tekniğine göre seçilir. Ayrıca kimyasal prob, sonuç ürünün bağlanma noktası ile etkileşime girmelidir. İkinci kısım ise hedef molekülün immün kontrol noktalarının aktif parçaları için reseptör görevi yapıp hücre tanınması sağlar. Her immün kontrol noktası alıcısı için tasarlanan reseptör özgün olmalıdır. Kimyasal ve fiziksel özellikler göz önünde bulundurularak hedef moleküle uygun reseptör seçilir. Son kısım ise hem kimyasal probun hem de reseptör molekülün birleştirilmesinden oluşur. Kombinasyonu gerçekleştirmek için uygun bağlayıcı molekül atanır. Atanan molekül hem kimyasal probu hem de reseptör molekülü bağlayacak kimyasal özellikleri taşımalıdır.

1.4. Yapılan Çalışmanın ve Projenin Genel Özeti

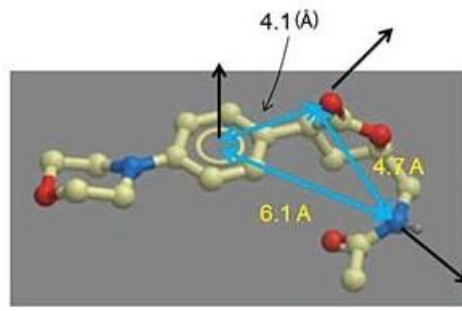
Projede yapılan çalışmanın amacı ise tümör mikro-çevresinde bulunan immün kontrol noktalarına özgü yüksek oranda seçicilik gösteren radyonüklid işaretli moleküllerin tasarlanması amacıyla taşıyıcı molekül sentezlenmesidir. Radyonüklid işaretli moleküllerin hedefi olarak da kanser mikro-çevresinde bulunan ve artışı ile kanserli hücrelerin tayinini sağlayan PD-L1 biyobelirteci, proje kapsamında seçilmiştir. Seçilen biyobelirtece uygun modelleme sonuçları değerlendirilerek yapılan sentez aşamasından sonra geliştirilen ajanların işlevselliğinin test edilmesi ve eğer olumlu veri alınabilirse örnek üretim yapılması planlanmaktadır. Bu fikirden yola çıkarak donanımlı hastanelerde sıklıkla kullanılan PET-BT cihazlarıyla görüntülenebilecek radyosyonel yapıyı taşıyacak peptidomimetik sentezi gerçekleştirilmiştir.

1.4.1. Peptidomimetik ve farmakor yapısı

Peptidomimetikler, yapısal olarak bir peptidin üç boyutlu yapısını taklit ederek proteinlerin anahtar-kilit modeli için sağladığı etkileşimlerin tümünü sağlamaktadırlar. Temelde hedef peptidlerle aynı biyolojik etkiyi göstermektedirler. Bu etkiyi sağlamak amacı ile biyobelirtece uygun formakofor belirleme çalışması modelleme aşamasında yapılmıştır. Ayrıca peptid yerine peptidomimetik kullanımındaki amaç ise peptidlerin, insan vücudunda hidrolize eğilimli yapıda olmalarıdır. Peptidomimetiklerin stabilitesi in vivo çalışmalar için peptidlere kıyasla daha yüksektir. Bunun sebebi yapılarındaki peptid bağlarının su ile kolayca kırılmasıdır. Peptidomimetiklerin çalışmak için daha kararlı yapıda olması onların

daha çok tercih edilmesini sağlamıştır. Bu organik moleküller hedef dokuya özgü proteinin modifiye edilmesi veya peptid farmakoruna benzer yapı tasarımı ile oluşturulurlar [40].

IUPAC tarafından yapılan tanıma göre, farmakofor yapısı belirli biyolojik aktivite için kimyasal ve fiziksel etkileşimleri sağlamak adına gerekli olan elektronik ve yapısal özelliklerin bir araya gelmesidir. Bu toplam etkileri içeren molekül, biyolojik yanıt veren sistemleri hedeflemek veya tetiklemek için en uygun yapıyı sağlar. Farmakofor taklit edilecek molekül üzerindeki bütün yapıları içermez ancak hedef moleküle yönelik aynı moleküler etkileri Şekil 1.12'deki gibi belirleyerek tamamen sağlar. Başka bir deyişle, en büyük ortak paydaki tüm aktif grupları içeren bileşik olarak da bilinir [41].



Şekil 1.12: Farmokofor oluşturacak atomlar arası açı ve uzaklık şeması [45].

Hedef dokuya özgü proteinin farmakoforunu bulmak için öncelikle proteinin kimyasal ve fiziksel etkileşimlerine göre etki haritası atanmalıdır. İlgili ligandlar tanımlandıktan sonra üç boyutlu protein şeması çıkarılır. Yarıçap, ligandlar arası uzaklık ve uygun değerlerde tamamlayıcılık belirlenip atomlar arasındaki açı yeniden tasarlanıp şemaya yerleştirilir, Şekil 1.12 gibi. Yüksek etki gösteren pozisyonlar belirlenip moleküller çoklu rotametrelerde örneklenir [42].

1.4.2. Farmakor yapıya göre moleküler modelleme

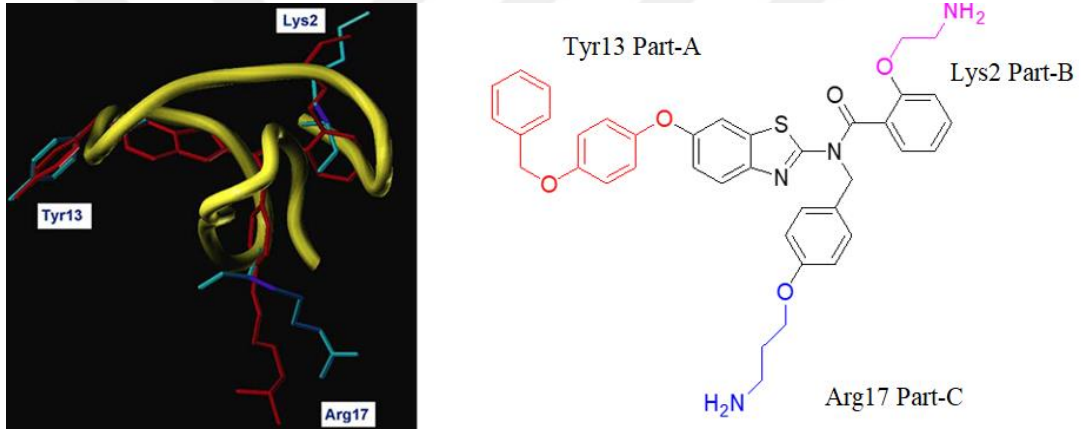
Moleküler modelleme, biyolojik sistemlerdeki anahtar-kilit modelinde meydana gelen hem kimyasal denge hem de fiziksel dinamik olayların atomik düzeyde anlaşılmasını sağlar. Moleküler modellemenin doğruluğu, büyük ölçüde akışkan fazındaki moleküler etkileşimleri tanımlamak için kullanılan kuvvet alanlarının ve model elektrotunun geometrisinin geçerliliğine bağlıdır [43].

Kimyasal reseptörler kan yolunda veya vücut sıvısında kontrolsüz bir şekilde dağılırlar. Bu nedenle hedef dokuya direkt iletimi sağlayan taşıyıcı moleküllere ihtiyaç duyulur. Molekül modelleme kısmında dikkat edilmesi gereken kısımlardan biri de eklenen taşıyıcı parçaların molekül aktifliğini bozmamaları gerektiğidir [44, 45].

Bu incelemede, ligand ve protein arasında kurulan etkileşimler incelenerek Şekil 1.13’de olduğu gibi oluşturulacak yeni moleküller için kaynak yaratılır. Araştırma sonucunda tasarlanan moleküller ideal sentez yöntemi ile tarama çalışmalarına uygun bir şekilde sentezlenir.



Yapılan geniş tarama çalışmaların ardından en iyi eşleşme sağlayacak molekül yapılarının, 2004 yılında yayınlanan makaleden elde edilen benzotiyazol türevi bileşiğinin sentez yöntemi ile sentezlenebileceği anlaşıldı. Bu molekül sentez yöntemi, PD-L1 proteininin aktif bölgesi ile eşleşmeye yatkın peptidomimetiklerin sentezi için uygun bulunmuştur. Bu nedenle projedeki peptidomimetik tasarımları için 2004 yılında Bael ve ekip arkadaşları tarafından yayımlanan makale referans alınmıştır. Tasarımlarının temeli, biyokimyasal prob olarak kullanılan N-tipi voltaj kapılı kalsiyum kanallarında yaygın olarak kullanılan ω -Conotoksin GVIA peptidinin peptidomimetik yapısıdır. Şekil 1.14'deki GVIA peptidini kullanmak yerine, yine aynı şekildeki üç boyutlu yapısı da belirtilen peptidomimetik kullanılmıştır. Yapısında da gösterilen Lys2, Tyr13 ve Arg17, GVIA için farmakofor olarak belirlenmiştir ve uygun peptidomimetik buna göre sentezlenmiştir [40, 46].



Şekil 1.14: GVIA peptidinin 3D modeli ve uyum sağlayan molekül [40].

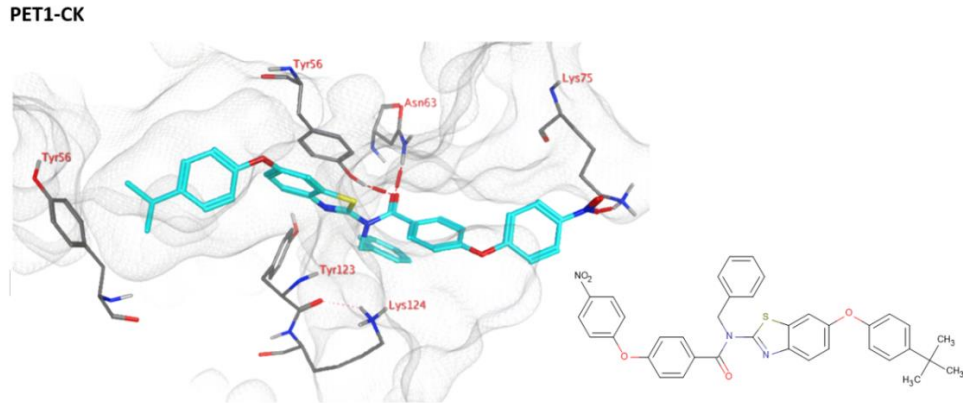
1.4.3. Taşıyıcı ajanların moleküler yapısı

Hastalıkların teşhisini sağlamak için hücre reseptörünü kullanma fikri, özellikle yan etkileri bulunan biyopsi yöntemi ile kıyaslandığında görüntülemenin, yan etkisiz ve uygulamada zararsız olması özelliği sayesinde umut verici ve önemli bir tekniktir. Ayrıca bu teknik erken teşhisi de sağlar. PET (positron emission tomography) ve SPECT (single photon emission tomography) tomografi türleri en sık kullanılan görüntüleme yöntemleri arasındadır [47]. Proje kapsamında bu tekniğe yardımcı olacak görüntüleme ajanı sentezine ilham verecek taşıyıcı moleküllerin sentezi yapılmıştır.

Taşıyıcı molekül tasarlanması ve sentezi öncesinde, molekül modelleme çalışmalarında Dr. Akdemir tarafından taraması yapılan moleküllerin hidrofobik kuvvetler, hidrojen bağları ve elektrostatik itmeler gibi çeşitli etkileşimler ve yüksek afinite ile PD-L1 proteinine bağlandığını ortaya konulmuştur. Bununla birlikte aminobenzotiyazol yapılu bu peptidomimetiklerin PD-L1 proteinine karşı reseptör tasarlama aşamasında iyi bir taşıyıcı olabileceğine karar verilmiştir.

Yapılan farklı araştırmalar sonucunda PD-L1 proteini ve buna bağlı olan inhibitörlerin molekül yapıları aydınlatılmıştır. Bu yapılan moleküler yapı belirleme sonuçları, inhibitör ve proteininin aktif bölgesi arasında bağlanma ilişkileri ve uyumlulukları hakkında detaylı bilgi vermektedir. Ligandların proteine bağlanabilmesi için hangi özelliklere sahip olması gerektiği bu çalışmalarla anlaşılmaktadır [43].

Dr. Akdemir tarafından yapılan tarama sonucu Şekil 1.15’de gösterilmiştir. Yapılan çalışma doğrultusunda aktif bölge etkileşimleri göz önünde bulundurularak sentezlenen yine aynı şekildeki molekülün protein yapısına uygun olduğu gözlenmiştir. Ligand üzerinde bulunan tersiyer bütıl grubu ile Tyr56B aminoasidi arasında hidrofobik etkileşim vardır. Benzotiyazol yapısı üzerinde bulunan halka yapısının ise hidrofobik etkileşimlerle, Tyr56A aminoasidi ile uyum sağladığı gözlenmiştir. Aynı yapının devamında bulunan amid grubu ile Asn63A ve Tyr56A aminoasitlerinin yan zinciri arasında hidrojen bağı kurulmuştur. Lys75A aminoasidi ve ligandın nitro uçlu grubu arasında da hidrojen bağı kurulmuştur. Aynı zamanda Lys124B aminoasidi induced-fit etkisiyle benzil grubu ile katyon-pi bağı etkileşimi yapabilir.



Şekil 1.15: Sırasıyla, protein içine yerleştirilmiş molekül ve açık hali.

Çalışma kapsamında protein sabit tutularak farklı ligand duruş varyasyonları, ligandın hareketli parça olduğu varsayılarak denenmiştir. Birçok farklı molekül ve varyasyonlarının bilgisayar destekli taranmasının tamamlanmasının ardından birkaç molekülün hedefe yüksek seçicilik ile uyum sağladığı ve bunun yanında entalpi ve entropi değerlerinin teoride uygun olduğu gözlenmiştir.

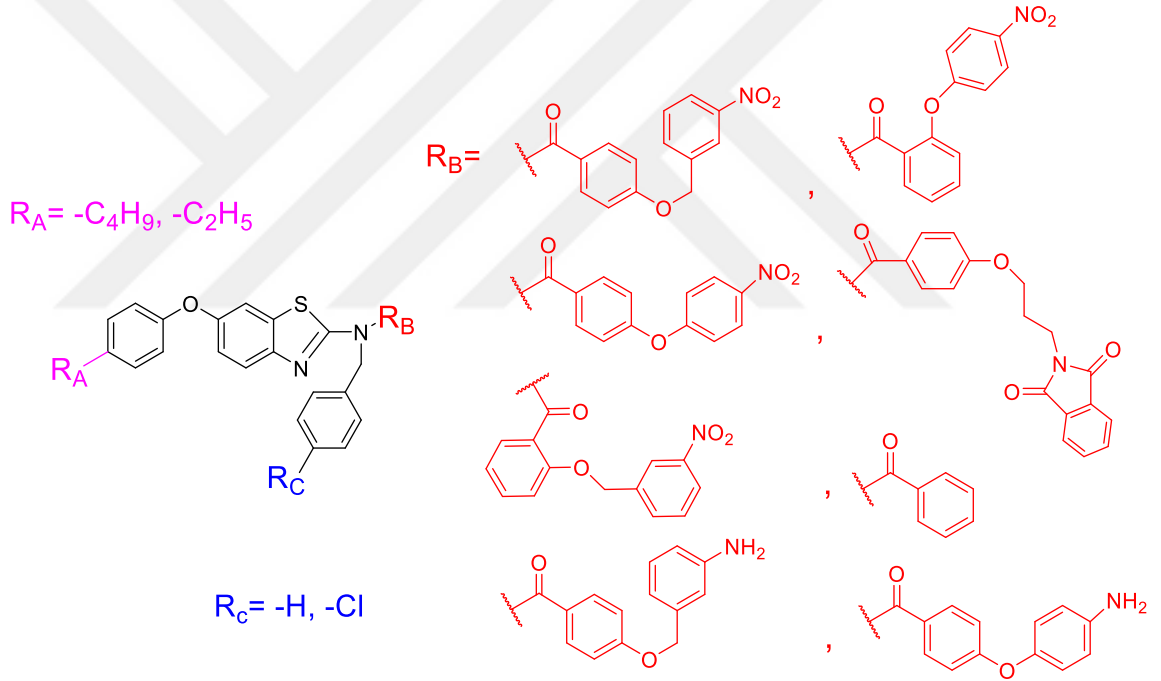
Bu tarama çalışmasının teorik alt yapısı ise anahtar-kilit teorisinin, kendisi ile kendisine göre daha doğru varyasyonu olarak kabul edilen induced-fit etkisinin birlikte düşünülerek bir veri bankası oluşturulmasıdır. Teori, aktif hareketli parça (molekül varyasyonları) ve bu parçaya uyumlu sabit yapının (Şekil 1.15'teki protein) şekil olarak birbirine uyumlu bir eş olduğunu savunur. Gerçekte ise iki yapı hareketli halde düşünülüp bağlanma hakkında yorum yapılabilir. Bunun nedeni induced-fit etkisinin, proteinin tam karşılığını bulduktan sonra etkileşime girmesi ancak morfoloji olarak iki parça birbirine uyumlu olmadığından proteine uyumlu parça eşleşme sağladıktan sonra proteinde şekil değişiklikleri gözlenmesidir [48].

Kanserle ilgili in vivo hedefleme çalışmalarının asıl amacı, tümör üzerindeki spesifik yüzey ile hedefleme ajanı arasında kimyasal veya fiziksel bağ oluşturmak ve bu karmaşık molekülü görüntülemektir. Bu kimyasal etkiyi yarattığı düşünülen peptidomimetiklerin sentezi için araştırmalar sonucu Jonathan B. Baell ve ekip arkadaşları tarafından yazılan makale bulunmuştur. Peptidomimetik sentezini temel alan 2004 projesinde, Jonathan B. Baell ve ark. (2004), aminobenzotiyazol orta yapısına sahip peptidomimetik moleküllerini, w-conotoksin GVIA peptidinden ilham alarak üretmiştir [41]. Bu makaleden de alınan fikir ile Baell ve arkadaşları tarafından geliştirilen aminobenzotiyazol yapısı sabit tutularak tasarımı yapılacak görüntüleme ajanları için taşıyıcı moleküller geliştirilmiştir. Bu modifikasyon işleminde, farklı molekül varyasyonları geliştirilmiş ve en uygun peptidomimetikler moleküler modelleme çalışmaları doğrultusunda, görüntüleme ajanlarını oluşturulacak molekül yapısına ilham vermiştir.

Şekil 1.16'te gösterilen olası türevlerin çeşitliliği üç bölümden oluşur. Burada, Kısım A, B ve C, Şekil 1.14'de gösterildiği gibi sırasıyla GVIA peptidi üzerindeki tirozin, arginin ve lizin amino asitlerini temsil eder. Peptidomimetiklerin türevleri olarak kabul edilen moleküllerin C kısmı, söz konusu bileşiğin sentezlenmesindeki kolaylık nedeniyle değişmeden kalır. İstenen üç ayrı kısmın sentezi tamamlandıktan sonra,

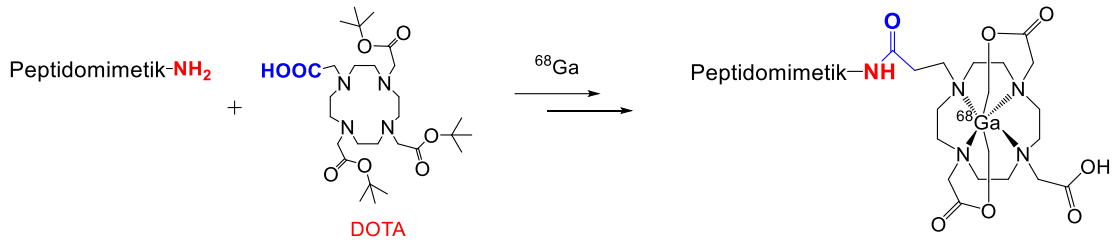
taşıyıcı parça yaratmak için Şekil 1.16'da gösterildiği gibi birleştirilecektir [49]. Bu ana parça sentezine ilham verecek molekül sentezleri bu çalışmada tamamlanmıştır.

Taşıyıcı moleküllerin, PD-L1 proteinine karşı afiniteleri ITC (Isothermal Titration Calorimetry) cihazı ile test edilecektir. ITC cihazı, istenilen işlem doğrultusunda sabit sıcaklıktaki biyo-kimyasal reaksiyonların veya moleküler etkileşimlerin; enzim-substrat etkileşimleri, multi-moleküler komplekslerin bileşenleri arasındaki etkileşimler gibi biyolojik olayların enerjisini ölçer [50]. Bu işlemin ardından taşıyıcı molekül tasarımına göre sentezlenecek peptidomimetikler üzerine DOTA takılacaktır. Bu işlem yapılırken DOTA grubu üzerindeki üç amin ligandı Boc grupları ile korunur. DOTA takımından sonra moleküller ^{68}Ga ile kompleks yapı oluşturmaya hazır hale gelecektir. ^{68}Ga ile birleşimin ardından Boc grupları kaldırılır.



Şekil 1.16: Tez çalışması kapsamında tasarlanan molekül örnekleri.

Yukarıdaki maddelerin tasarımında kullanılan taslak, Şekil 1.17’de gösterilmiştir. Ticari olarak satılan DOTA’nın bir molekül üzerine takılması, DOTA üzerindeki serbest karboksilik asit grubu ile taşıyıcı molekül üzerindeki amin grubu arasında amid bağı oluşumu ile olur. Dolayısıyla görüntüleme ajanı, sentezlenen birleşiklerdeki biyolojik aktiviteyi sağlayacak serbest bir amin grubu ile elde edilir ve ana iskeletin aktivitesini kaybetmemesi amaçlanır.



Şekil 1.17: Peptidomimetiklerin DOTA ile bağlanması.

DOTA ligandı ile ^{68}Ga radyonüklidinin kompleks oluşturması, hedef dokunun görüntüleme ajanı ile etkileşimini PET-BT cihazı ile tanımlanmasını sağlar. Sentezlenen ve in vitro/in vivo analizlerden başarı ile geçen radyonüklid işaretli görüntüleme ajanları uygun fizyolojik tampon içerisinde farelere uygulanacaktır. İlgili ajanın vücuda dağılımının gerçekleşmesi beklenecek ve daha sonra anestezi altına alınan farelerin testleri PET-BT cihazı ile değerlendirilecektir.

2. MATERYALLER VE METOTLAR

2.1. Materyaller

Metil 4-hidroksi benzoat, 3-tertiyer-bütil fenol, floro-4-nitrobenzen, etil 2-hidroksi benzoat, 3-nitrobenzil klorür, potasyum karbonat, DMSO, DMF, etil asetat, hekzan, DCM, asetik asit, benzoil klorür, asetik asit ve benzil klorür Merck firmasından temin edildi. Amonyum tiyosiyonat, bromin, sodyum hidroksit ve DIEA Sigma Aldrich firmasından temin edildi. DAST Alfa Aesar firmasından temin edildi.

2.2 Metotlar

^1H -NMR ve ^{13}C -NMR, sırasıyla 500 MHz ve 125 MHz'de bir Agilent VNMRS Spektrometresi üzerinde elde edildi. Verilerin değeri hertz cinsinden kaydedildi. Spektrum ayırım cinsleri ise s (singlet), d (dublet), t (triplet) ve m (multiplet) olarak tanımlanmıştır.

İnfrared spektroskopisi Perkin Elmer Spektrum One FT-IR spektrometresi ile kaydedildi. Verilerin değeri cm^{-1} cinsinden rapor edildi.



3. DENEYSEL KISIM

Deneysel kısımda yapılan sentezlerin tümü kısımda özetlenmiştir. Yapılan reaksiyonların detaylı gösterimleri Şekil 3.2, Şekil 3.3 ve Şekil 3.4’de mevcuttur.

1-t-bütil-4-(4-nitrofenoksi)-benzen 1 sentezi [50]: 4-t-bütil fenol (1.07 g, 7.09 mmol) ve 1-floro-4-nitrobenzen (1 g, 7.09 mmol), DMF (8 mL) içerisinde çözülür. Daha sonra karışımın içerisine K_2CO_3 (2.94 g, 21.27 mmol) eklenir, 70 °C’de 14 saat karıştırılır. Reaksiyon bitiminde etil asetat (15 mL) eklenir ve sırasıyla su (15 mL x 3) ve tuzlu su (15 mL x 1) ile yıkanır. Daha sonra organik kısım, Na_2SO_4 ile kurutulur, süzülür ve çözücü indirgenmiş basınç altında buharlaştırılır. Verim= %79. 1H -NMR (d - $CDCl_3$) δ ppm: 8.39 (2H, d, J=7.3); 7.42 (2H, d, J=7.5); 7.12 (4H, d, J=8.3); 1.33 (9H, s). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ ppm: 163.5; 152.5; 148.2; 142.7; 127.5; 126.4; 120.3; 117.4; 30.5; 31.5. FT-IR (KBr tablet) ν_{max}/cm^{-1} : 2963-2867 (alifatik C-H); 1586 (N-O gerilmesi).

4-(4-(t-bütil)fenoksi)anilin 2 sentezi [50]: 1-tertiyerbütil-4-(4-nitrofenoksi)-benzen 1 (2 g, 7.37 mmol), metanol (30 mL) içerisinde çözülür ve oda sıcaklığında karıştırılır. Daha sonra $SnCl_2$ (5.5 g, 29.5 mmol), HCl (%37, 5 mL) içerisinde çözülerek reaksiyon ortamına damla damla eklenir. $SnCl_2$ çözeltisi eklendikten sonra karışım 4-5 saat süresince 70 °C’de karıştırılır. Reaksiyon bitiminde metanol indirgenmiş basınç ortamında uçurulur. Kalan çökelti saf su ile çözülüp, pH değeri %1 NaOH çözeltisi ile 11’e getirilir. Oluşan süspansiyon karışım santrifüj ile çöktürülüp, DCM (30 mL x 3) ve saf su (30 mL x 3) ile ekstraksiyon yapılır. DCM ile toplanılan madde Na_2SO_4 ile kurutulur, süzülür ve çözücü indirgenmiş basınç altında buharlaştırılır. Verim= %47. 1H -NMR (DMSO- d_6) δ ppm: 7.32 (4H, d, J=7.3); 6.82 (4H, d, J=7.3); 4.82 (2H, s); 1.33 (9H, s). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ ppm: 156.2; 149.2; 144.6; 140.4; 126.4; 120.7; 118.3; 116.4; 122.0; 34.0; 31.7. FT-IR (KBr tablet) ν_{max}/cm^{-1} : 3443-3369 (N-H gerilmesi); 2960-2904 (alifatik C-H); 1620 (N-H eğilmesi).

6-(4-(t-bütil)fenoksi)benzo[d]tiyazol-2-amin 3 sentezi [40]: 4-(4-(t-bütil)fenoksi)anilin 2 (0.605 g, 2.51 mmol) ve NH_4SCN (0.69 g, 9.1 mmol), yaklaşık %20 formik

asit-asetik asit karışımı (75 mL) içerisinde çözülür. Reaksiyon ışık almadan N₂ atmosferinde, -3 °C'nin altında karıştırılır. Ardından bir saat süresince ortama 3 dakikada bir 1 mL brom çözeltisi (20 ml asetik asit içerisinde 0.182 mL bromin) eklenir. Çözelti ekleme işlemi ardından reaksiyon oda sıcaklığında 14 saat karıştırılır. Reaksiyon bitiminde ortam sıcaklığı -8 °C'nin altında tutularak NaOH çözeltisi ile pH derecesi 11'e çıkartılır. Ardından tüm karışım etil asetat (4 x 60 mL) ile ekstraksiyon yapılır. Organik faz selit ile süzülür ve sırasıyla doymuş NaHCO₃ (2 x 50 mL) ve saf su (2 x 50 mL) ile yıkanır. Organik faz toplanıp Na₂SO₄ ile kurutulur, süzülür ve çözücü indirgenmiş basınç altında buharlaştırılır. Verim= %80. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.39 (2H, s); 7.37 (1H, d, J=8.7 Hz); 7.35 (2H, d, J=8.7 Hz); 6.90 (2H, d, J=7.7 Hz); 6.87 (2H, d, J=8.7 Hz); 1.25 (9H, s). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm: 166.6; 156.0; 151.1; 149.4; 145.3; 132.3; 126.9; 118.6; 117.8; 117.4; 112.4; 34.2; 31.5. FT-IR (KBr tablet) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3440-3126 (N-H gerilmesi); 2960-2904 (alifatik C-H); 1680 (C=N gerilmesi); 1627-1586 (N-H eğilmesi).

Metil 4-((3-nitrobenzil)oksi)benzoat sentezi 4 [50]: Metil 4-hidroksi benzoate (0.57 g, 3.73 mmol) ve 3-nitrobenzil klorür (0.69 g, 3.73 mmol), DMF (10 mL) içerisinde çözülür. Daha sonra karışımın içerisine K₂CO₃ (1.55 g, 11.19 mmol) eklenir ve süspansiyon reaksiyon ortamı elde edilir. Reaksiyon 70 °C'de 14 saat karıştırılır. Reaksiyon bitiminde etil asetat (15 mL) eklenir ve reaksiyon sırasıyla su (15 mL x 3) ve tuzlu su (15 mL x 1) ile yıkanır. Daha sonra organik kısım Na₂SO₄ ile kurutulur, süzülür ve çözücü indirgenmiş basınç altında buharlaştırılır. Verim= %82. ¹H-NMR (*d*-CDCl₃) δ ppm: 3.91 (3H, s); 5.23 (2H, s); 7.02 (2H, d, J=8.7 Hz); 7.04 (1H, t, J=8.7 Hz); 7.21 (1H, d, J=8.8 Hz); 7.60 (1H, t, J=7.9 Hz); 7.79 (1H, d, J=7.6 Hz); 8.04 (2H, d, J=8.8 Hz); 8.23 (1H, d, J=8.1 Hz); 8.34 (1H, s). FT-IR (KBr tablet) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 2963-2950 (alifatik C-H); 1586 (ester C=O); 1504 (N-O gerilmesi).

4-((3-nitrobenzil)oksi)benzoik asit 5 sentezi [50]: Metil 4-((3-nitrobenzil)oksi)benzoat 4 (0.75 g, 2.63 mmol) dioksan (30 mL) içerisinde çözülür. Üzerine NaOH çözeltisi (2.75 mL 1.4 M) damla damla eklenir ve 2 saat boyunca 70 °C'de karıştırılır. Reaksiyon bitimde dioksan düşük basınç altında uzaklaştırılır ve geri kalan çökelti HCl çözeltisi (1 M) ile pH 2 olacak şekilde asitlendirilir. Çökelti vakum filtrasyon ile ayrılır. Su ile yıkandıktan sonra vakum altında kurutulur. Verim= %95. ¹H-NMR (*d*-CDCl₃) δ ppm: 5.35 (2H, s); 7.13 (2H, t, J=7.9 Hz); 7.71 (1H, t, J=7.9 Hz); 7.95 (2H, d, J=8.2 Hz); 7.88 (2H, d, J=8.8 Hz); 8.21 (1H, d, J=8.1

Hz); 8.33 (1H, s); 12.66 (1H, s). FT-IR (KBr tablet) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3038 (O-H); 2960-2867 (alifatik C-H); 1620 (karboksilik asit C=O).

4-((3-nitrobenzil)oksi)benzoil florür 6 sentezi [40]: 4-((3-nitrobenzil)oksi)benzoik asit 5 (0.5 g, 1.82 mmol) azot koşulları altında DCM (25 mL) içerisinde çözülür. 0 °C buz banyosunda DAST (1.17g, 0.96 mL, 7.28 mmol) ilave edilir. Oda sıcaklığında azot altında 2 saat karıştırılır. Reaksiyon bitiminde buzlu su (25 mL x 3) ve DCM (25 mL x 3) ile ekstraksiyon yapılır. NaHCO₃ ile yıkandıktan sonra MgSO₄ ile kurutulur. DCM düşük basınç altında uzaklaştırılır. Ürün vakum altında kurutulur. Verim= %91 ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm: 8.32 (1H, s); 8.18 (1H, d, J=8.2 Hz); 7.99 (2H, d, J=7.9 Hz); 7.90 (1H, d, J=7.9 Hz); 7.69 (1H, t, J=7.7 Hz); 7.25 (2H, d, J=7.2 Hz); 5.39 (2H, s). FT-IR (KBr tablet) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 2960-2866 (alifatik C-H); 1627 (asit halojenür C=O); 1586 (N-O gerilmesi).

N-(6-(4-(*t*-bütil)fenoksi)benzo[*d*]tiyazol-2-il)-4-((3-nitrobenzil)oksi)benzamid 16 sentezi [51]: 4-((3-nitrobenzil)oksi)benzoil florür 6 (0.0425g, 0.17 mmol) ve 6-(4-(*t*-bütil)fenoksi)benzo[*d*]tiyazol-2-amin 3 (0.05g, 0.17 mmol) DCM (10 mL) içerisinde çözülür. Azot koşulları altında DIEA (0.08g, 0.12 mL, 0.67 mmol) eklenir. Reaksiyon 45 °C'de 14 saat karıştırılır. Reaksiyon bitiminde sırasıyla %10 sitrik asit çözeltisi (2 x 20 mL), buzlu su (2 x 20 mL) ve doymuş NaHCO₃ (10 mL) ile ekstraksiyon yapılır. Organik faz MgSO₄ ile kurutulur ve çözücü düşük basınç altında buharlaştırılır. Ürün soğuk metanolde çöktürülür. Verim= %70. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm: 8.33 (1H, s); 8.20 (1H, d, J=8.7 Hz); 8.13 (2H, d, J=7.6 Hz); 7.93 (1H, d, J=8.7 Hz); 7.72 (2H, d, J=8.7 Hz); 7.70 (1H, s); 7.38 (2H, d, J=7.8 Hz); 7.19 (2H, d, J=8.7 Hz); 7.11 (2H, s); 6.93 (2H, d J=8.7 Hz); 5.72 (1H, s); 5.37 (2H, s); 1.26 (9H, s). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm: 167.3; 165.6; 162.2; 155.7; 153.3; 148.2; 146.5; 145.7; 139.3; 134.5; 131.7; 131.2; 131.0; 130.5; 129.9; 127.2; 123.4; 122.5; 118.8; 118.1; 125.2; 112.0; 68.8; 34.5; 34.4; 31.9. FT-IR (KBr tablet) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3072 (N-H gerilmesi); 2925-2867 (alifatik C-H); 1730 (amid C=O); 1668 (N-H eğilmesi).

N-benzil-*N*-(6-(4-(*t*-bütil)fenoksi)benzo[*d*]tiyazol-2-il)-4-((3-nitrobenzil)oksi)benzamid 17 sentezi [51]: *N*-(6-(4-(*t*-bütil)fenoksi)benzo[*d*]tiyazol-2-il)-4-((3-nitrobenzil)oksi)benzamid 16 (0.089g, 0.16 mmol), benzil klorür (0.041 g, 0.37 mL, 0.32 mmol) ve K₂CO₃ (0.07g, 0.48 mmol) DMF (10 mL) içerisinde çözülür. Reaksiyon karışımı 100 °C'de azot ortamı altında 14 saat boyunca karıştırılır. Reaksiyon bitiminde DCM (3 x 20 mL) ve buzlu su (3 x 20 mL) ile ekstraksiyon

yapılır. Organik faz Na_2SO_4 ile kurutulur ve çözücü düşük basınç altında buharlaştırılır. Ürün soğuk metanolde çöktürülür. Verim= %70. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.31 (1H, s); 8.21 (3H, m); 7.92 (1H, d, $J=8.7$ Hz); 7.69 (1H, t, $J=7.9$ Hz); 7.63 (2H, d, $J=7.6$ Hz); 7.41 (2H, d, $J=8.7$ Hz); 7.37 (2H, d, $J=8.6$ Hz); 7.32 (2H, t, $J=7.7$ Hz); 7.25 (1H, t, $J=7.8$ Hz); 7.13 (3H, m); 6.92 (2H, d, $J=7.8$ Hz); 5.79 (2H, s); 5.34 (2H, s); 1.25 (9H, s). FT-IR (KBr tablet) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3031-2919 (alifatik C-H); 1598 (C=N gerilmesi); 1566 (N-O gerilmesi); 1530 (Amid C=O).

4-((3-aminobenzil)oksi)-*N*-benzil-*N*-(6-(4-(*t*-bütil)fenoksi)benzo[*d*]tiyazol-2-il)benzamid 26 sentezi [52]: *N*-benzil-*N*-(6-(4-(*t*-bütil)fenoksi)benzo[*d*]tiyazol-2-il)-4-((3-nitrobenzil)oksi) benzamid 17 (0.1 g, 0.15 mmol), metanol (20 mL) içerisinde çözülür. SnCl_2 (0.11 g, 0.6 mmol), HCl (%37, 5 mL) içerisinde çözülerek reaksiyon ortamına damla damla eklenir ve 5 saat süresince 70 °C'de karıştırılır. Reaksiyon bitiminde metanol indirgenmiş basınç altında uçurulur. Kalan çökelti saf su çözülüp, çözeltinin pH değeri %1 NaOH çözeltisi ile 11'e getirilir. Oluşan süspansiyon karışım santrifüj ile çöktürülüp, DCM (30 mL x 3) ve saf su (30 mL x 3) ile ekstraksiyon yapılır. DCM ile toplanılan madde Na_2SO_4 ile kurutulur, süzülür ve çözücü indirgenmiş basınç altında buharlaştırılır. Safsızlık metanolde çöktürülüp, uzaklaştırılır. Verim= %50. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.25 (2H, d, $J=8.7$ Hz); 7.99 (1H, d, $J=7.5$ Hz); 7.93 (2H, d, $J=6.5$ Hz); 7.67 (2H, d, $J=8.9$ Hz); 7.55 (7H, m); 7.43 (1H, d, $J=7.3$ Hz); 7.38 (1H, d, $J=8.6$ Hz); 7.33 (2H, d, $J=7.4$ Hz); 6.69 (1H, d, $J=7.9$ Hz); 5.82 (2H, s); 4.01 (2H, s); 1.25 (9H, s). $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ 173.7; 168.5; 166.9; 156.1; 155.1; 150.3; 136.5; 134.8; 134; 133.6; 132.4; 132.3; 132.0; 129.2; 129.0; 128.6; 127.9; 123.6; 123.5; 123.3; 120.8; 118.1; 115.6; 114.0; 112.5; 112.2; 62.4; 55.0; 34.8; 26.9. FT-IR (KBr tablet) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3345 (N-H gerilmesi); 3031-2955 (alifatik C-H); 1728 (amid C=O).

Metil 4-(4-nitrofenoksi)benzoat 7 sentezi [50]: Metil 4-hidroksi benzoat (2 g, 13.14 mmol) ve 1-floro-4-nitro benzen (1.85 g, 13.14 mmol) DMF (10 mL) içerisinde çözülür. Daha sonra karışımın içerisine K_2CO_3 (5.4 g, 39.42 mmol) eklenir ve 70 °C'de 14 saat karıştırılır. Reaksiyon bitiminde etil asetat (15 mL) eklenir ve reaksiyon sırasıyla su (15 mL x 3) ve tuzlu su (15 mL x 1) ile yıkanır. Daha sonra organik kısım Na_2SO_4 ile kurutulur, süzülür ve çözücü indirgenmiş basınç altında buharlaştırılır. Verim= %85. $^1\text{H-NMR}$ ($d\text{-CDCl}_3$) δ ppm: 3.95 (3H, s); 7.12 (4H, t,

J=8.7 Hz); 8.12 (2H, d, J=8.6 Hz); 8.26 (2H, d, J=9.1 Hz). FT-IR (KBr tablet) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3084-2957 (alifatik C-H); 1712 (ester C=O); 1583 (N-O gerilmesi).

4-(4-nitrofenoksi)benzoik asit 8 sentezi [50]: Metil 4-(4-nitrofenoksi)benzoat 7 (3 g, 10.98 mmol) dioksan (40 mL) içerisinde çözülür. Üzerine NaOH çözeltisi (11.5 mL 1.4 M) damla damla eklenir ve 2 saat 70 °C'de karıştırılır. Reaksiyon bitiminde dioksan düşük basınç altında uzaklaştırılır ve geri kalan çökelti HCl çözeltisi (1 M) ile pH=2 olacak şekilde asitlendirilir. Çökelti vakum filtrasyon ile ayrılır. Kalan beyaz çökelti su ile yıkandıktan sonra düşük basınçta vakum altında kurutulur. Verim= %97. $^1\text{H-NMR}$ ($d\text{-CDCl}_3$) δ ppm: 8.26 (2H, d, J=7.6 Hz); 8.01 (2H, d, J=8.6 Hz); 7.22 (4H, d, J=9.1 Hz); 5.72 (1H, s). FT-IR (KBr tablet) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3538 (O-H gerilmesi); 3084-2957 (alifatik C-H); 1676 (karboksilik asit C=O).

4-(4-nitrofenoksi)benzoil florür 9 sentezi [40]: 4-(4-nitrofenoksi)benzoik asit 8 (0.5 g, 1.91 mmol) azot koşulları altında DCM (25 mL) içerisinde çözülür. 0 °C buz banyosunda DAST (1.23g, 1 mL, 7.64 mmol) ilave edilir. Oda sıcaklığında azot altında 2 saat karıştırılır. Reaksiyon bitiminde buzlu su (25 mL x 3) ve DCM (25 mL x 3) ile ekstraksiyon yapılır. NaHCO_3 ile yıkandıktan sonra MgSO_4 ile kurutulur. DCM düşük basınç altında uzaklaştırılır. Ürün vakum altında kurutulur. Verim= %80. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.30 (2H, d, J=8.2 Hz); 8.10 (2H, d, J=8.0 Hz); 7.33 (2H, d, J=7.3 Hz); 7.30 (2H, d, J=7.3 Hz). FT-IR (KBr tablet) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3068-2873 (alifatik C-H); 1736 (N-O gerilmesi); 1676 (asit halojenür C=O).

N-(6-(4-(t-bütil)fenoksi)benzo[d]tiyazol-2-il)-4-(4-nitrofenoksi)benzamid 18 sentezi [51]: 4-(4-nitrofenoksi)benzoil florür 9 (0.158 g, 0.67 mmol) ve 6-(4-(t-bütil)fenoksi)benzo[d]tiyazol-2-amin 3 (0.2 g, 0.67 mmol) DCM (20 mL) içerisinde çözülür. Azot koşulları altında DIEA (0.34g, 0.46 mL, 2.68 mmol) eklenir. Reaksiyon 45 °C sıcaklıkta 14 saat döndürülür. Reaksiyon bitiminde sırasıyla %10 sitrik asit çözeltisi (2 x 20 mL), buzlu su (2 x 20 mL) ve doymuş NaHCO_3 (10 mL) ile ekstraksiyon yapılır. Organik faz MgSO_4 ile kurutulur ve çözücü düşük basınç altında buharlaştırılır. Ürün soğuk metanolde çöktürülür. Verim= %70. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 12.87 (1H, s); 8.12 (2H, d, J=9.4 Hz); 7.76 (1H, d, J=8.6 Hz); 7.68 (1H, s); 7.63 (2H, t, J=9.6 Hz); 7.56 (2H, t, J=8.6 Hz); 7.38 (4H, m); 7.14 (1H, d, J=9.6 Hz, J=8.9 Hz); 6.94 (2H, d, J=7.6 Hz); 1.25 (9H, s). FT-IR (KBr tablet) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3455 (N-H gerilmesi); 3074-2866 (alifatik C-H); 1739 (amid C=O); 1676 (N-O gerilmesi); 1606 (N-H eğilmesi).

N-benzil-*N*-(6-(4-(*t*-bütil)fenoksi)benzo[*d*]tiyazol-2-il)-4-(4-nitrofenoksi)benzamid
19 sentezi [51]: *N*-(6-(4-(*t*-butil)fenoksi)benzo[*d*]tiyazol-2-il)-4-(4-nitrofenoksi)benzamid 18 (0.05 g, 0.1 mmol), benzil klorür (0.025 g, 0.23 mL, 0.2 mmol) ve K₂CO₃ (0.04 g, 0.3 mmol) DMF (10 mL) içerisinde çözülür. Reaksiyon karışımı 100 °C’de azot ortamı altında 14 saat ile karıştırılır. Reaksiyon bitiminde DCM (3 x 20 mL) ve buzlu su (3 x 20 mL) ile ekstraksiyon yapılır. Organik faz Na₂SO₄ ile kurutulur ve çözücü düşük basınç altında buharlaştırılır. Ürün soğuk metanolde çöktürülür. Verim= %70. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm: 8.34 (2H, d, J=9.1 Hz); 8.26 (2H, d, J=7.0 Hz); 7.66 (1H, d, J=9.6 Hz, J=8.8 Hz); 7.64 (1H, t, J=7.7 Hz); 7.40 (2H, s); 7.38 (2H, d, J=8.7 Hz); 7.31 (3H, t, J=7.3 Hz); 7.26 (2H, d, J=7.3 Hz); 7.22 (2H, d, J=8.7 Hz); 6.93 (2H, d, J=8.8 Hz, J=8.6 Hz); 5.81 (2H, s); 1.25 (9H, s). FT-IR (KBr tablet) ν_{max}/cm⁻¹: 3028-2866 (alifatik C-H); 1738 (amid C=O).

4-(4-aminofenoksi)-*N*-benzil-*N*-(6-(4-(*t*-bütil)fenoksi)benzo[*d*]tiyazol-2-il)benzamid
27 sentezi [50]: *N*-benzil-*N*-(6-(4-(*t*-bütil)fenoksi)benzo[*d*]tiyazol-2-il)-4-(4-nitrofenoksi)benzamid (0.1 g, 0.15 mmol) 19, etanol (10 mL) ve asetik asit (10 mL) çözeltisi içerisine koyulur. Karışımın içine HCl (1 mL) ve Fe tozu (0.5 g, 9 mmol) eklenir. Ardından karışım oda sıcaklığında ultrasonik banyoya koyulur. Reaksiyon bitiminde etanol indirgenmiş basınç altında uçurulur. Kalan karışımın pH değeri %1 NaOH ile 11’e getirilir. DCM (30 mL x 3) ve saf su (30 mL x 3) ile ekstraksiyon yapılır. DCM ile toplanılan madde Na₂SO₄ ile kurutulur, süzülür ve çözücü indirgenmiş basınç altında buharlaştırılır. Safsızlık metanol ile çöktürülüp, uzaklaştırılır. Verim= %70. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm: 8.24 (2H, d, J=7.1 Hz); 7.92 (2H, d, J=6.7 Hz); 7.66 (1H, s); 7.59 (1H, t, J=5.8 Hz); 7.49 (4H, d, J=5.5 Hz); 7.41 (2H, d, J=7.4 Hz); 7.36 (2H, d, J=6.9 Hz); 7.32 (2H, d, J=6.1 Hz); 7.26 (1H, d, J=6.9 Hz); 7.14 (1H, d, J=8.5 Hz); 6.93 (2H, d, J=7.9 Hz); 5.82 (2H, s); 4.01 (2H, s); 1.25 (2H, s). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm: 174.2; 173.4; 167.7; 162.7; 155.1; 153.9; 146.0; 136.5; 135.3; 133.45; 133.4; 129.6; 129.5; 129.45; 129.4; 129.3; 128.9; 128.3; 127.9; 127.2; 119.1; 118.3; 113.7; 34.4; 30.5; 28.5. FT-IR (KBr tablet) ν_{max}/cm⁻¹: 3356 (N-H gerilmesi); 2952-2851 (alifatik C-H); 1755 (amid C=O).

Etil 2-((3-nitrobenzil)oksi)benzoat 10 sentezi [50]: Etil salisilat (0.387 g, 2.33 mmol) ve 3-nitrobenzil klorür (0.4 g, 2.33 mmol) DMF (10 mL) içerisinde çözülür. Daha sonra karışımın içerisine K₂CO₃ (1.29 g, 9.33 mmol) eklenir ve süspansiyon reaksiyon ortamı elde edilir. Reaksiyon 70 °C’de gece boyunca karıştırılır. Reaksiyon

bitiminde etil asetat (15 mL) eklenir ve reaksiyon sırasıyla su (15 mL x 3) ve tuzlu su (15 mL x 1) ile yıkanır. Daha sonra organik kısım, Na₂SO₄ ile kurutulur, süzülür ve çözücü indirgenmiş basınç altında buharlaştırılır. Verim= %84. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm: 1.38 (3H, t, J = 7.1 Hz); 4.42 (2H, q, J = 7.1 Hz); 5.26 (2H, s); 7.05 (2H, t, J = 8.2 Hz); 7.48 (1H, t, J = 2.2 Hz); 7.59 (1H, t, J = 8.2 Hz); 7.88 (1H, d, J = 1.7 Hz); 7.91 (1H, d, J = 7.6 Hz); 8.19 (1H, d, J = 8.2 Hz); 8.48 (1H, s). FT-IR (KBr tablet) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3090-2857 (alifatik C-H); 1694 (ester C=O); 1660 (N-O gerilmesi).

2-((3-nitrobenzil)oksi)benzoik asit 11 sentezi [50]: Etil 2-((3-nitrobenzil)oksi)benzoat 10 (1 g, 3.3 mmol) dioksan (20 mL) içerisinde çözülür. Üzerine NaOH çözeltisi (3.4 mL 1.4 M) damla damla eklenir ve 2 saat 70 °C'de karıştırılır. Reaksiyon bitiminde dioksan düşük basınç altında uzaklaştırılır ve geri kalan çökelti HC1 çözeltisi (1M) ile pH 2 olacak şekilde asitlendirilir. Çökelti vakum filtrasyon ile ayrılır. Su ile yıkandıktan sonra vakum altında kurutulur. Verim= %97. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm: 5.35 (2H, s); 7.04 (1H, t, J = 7.6 Hz); 7.21 (1H, d, J = 8.2 Hz); 7.52 (1H, t, J = 7.1); 7.70 (2H, m); 7.95 (1H, d, J = 7.1 Hz); 8.18 (1H, d, J = 7.1 Hz); 8.46 (1H, s); 12.79 (1H, s). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm: 68.8; 114.4; 121.2; 121.9; 122.2; 122.9; 130.3; 131.3; 133.5; 133.8; 140.0; 148.3; 157.2; 167.6. FT-IR (KBr tablet) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3091 (O-H); 2922-2859 (alifatik C-H); 1662 (karboksilik asit C=O); 1580 (N-O gerilmesi).

2-((3-nitrobenzil)oksi)benzoil florür 12 sentezi [40]: 2-((3-nitrobenzil)oksi)benzoik asit 11 (0.2183 g, 0.70 mmol) azot koşulları altında DCM (25 mL) içerisinde çözülür. 0 °C buz banyosunda DAST (420 μ L, 3.19 mmol) ilave edilir. Oda sıcaklığında azot altında 2 saat karıştırılır. Reaksiyon bitiminde buzlu su (25 mL x 3) ve DCM (25 mL x 3) ile ekstrakte edilir. NaHCO₃ ile yıkandıktan sonra MgSO₄ ile kurutulur. DCM düşük basınç altında uzaklaştırılır. Ürün vakum altında kurutulur. Verim= %80. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm: 8.41 (1H, s); 8.18 (1H, d, J=8.1 Hz); 7.94 (2H, t, J=7.9 Hz); 7.78 (1H, t, J=7.8 Hz); 7.70 (1H, t, J=7.7 Hz); 7.37 (1H, d, J=7.4 Hz); 7.15 (1H, t, J=7.2); 5.43 (2H, s). FT-IR (KBr tablet) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3091-2853 (alifatik C-H); 1803 (asit halojenür C=O).

N-(6-(4-(t-bütil)fenoksi)benzo[d]tiyazol-2-il)-2-((3-nitrobenzil)oksi)benzamid 20 sentezi [51]: 2-((3-nitrobenzil)oksi)benzoil florür 12 (0.92 g, 0.34 mmol) ve 6-(4-(t-bütil)fenoksi)benzo[d]tiyazol-2-amin 3 (0.1 g, 0.34 mmol) DCM (10 mL) içerisinde çözülür. Azot koşulları altında DIEA (0.173g, 0.234 mL, 1.36 mmol) eklenir.

Reaksiyon karışımı 45 °C'de 14 saat karıştırılır. Reaksiyon bitiminde sırasıyla %10 sitrik asit çözeltisi (2 x 20 mL), buzlu su (2 x 20 mL) ve doymuş NaHCO₃ (10 mL) ile ekstraksiyon yapılır. Organik faz MgSO₄ ile kurutulur ve çözücü düşük basınç altında buharlaştırılır. Ürün soğuk metanolde çöktürülür. Verim= %70. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm: 12.19 (1H, s); 8.42 (1H, s); 8.16 (1H, d, J=7.3 Hz); 8.00 (1H, d, J=6.3 Hz); 7.73 (1H, d, J=7.5 Hz); 7.67 (2H, m); 7.57 (1H, t, J=7.9 Hz); 7.38 (1H, t, J=7.5 Hz); 7.29 (2H, d, J=8.6 Hz); 7.11 (2H, m); 6.93 (2H, d, J=8.0 Hz); 5.41 (2H, s); 1.26 (9H, s). FT-IR (KBr tablet) ν_{max}/cm⁻¹: 3313 (N-H eğilmesi); 2956-2849 (alifatik C-H); 1735 (amid C=O); 1665 (N-O gerilmesi).

N-benzil-*N*-(6-(4-(*t*-bütil)fenoksi)benzo[*d*]tiyazol-2-il)-2-((3-nitrobenzil)oksi)benzamid 21 sentezi [51]: *N*-(6-(4-(*t*-bütil)fenoksi)benzo[*d*]tiyazol-2-il)-2-((3-nitrobenzil)oksi)benzamid 20 (0.1571 g, 0.29 mmol), benzil klorür (0.072 g, 0.58 mmol) ve K₂CO₃ (0.12 g, 0.87 mmol) DMF (20 mL) içerisinde çözülür. Reaksiyon karışımı 100 °C'de azot ortamı altında 14 saat karıştırılır. Reaksiyon bitiminde DCM (3 x 20 mL) ve buzlu su (3 x 20 mL) ile ekstraksiyon yapılır. Organik faz Na₂SO₄ ile kurutulur ve çözücü düşük basınç altında buharlaştırılır. Ürün soğuk metanolde çöktürülür. Verim= %70. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm: 8.17 (1H, d, J=7.8); 7.72 (2H, m); 7.63 (1H, t, J=7.2 Hz); 7.57 (1H, d, J=8.0 Hz); 7.36 (9H, m); 7.17 (1H, m); 7.09 (2H, m); 6.92 (2H, m); 5.72 (2H, s); 5.34 (2H, s); 1.23 (9H, s). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm: 174.9; 166.9; 157.4; 155.2; 153.8; 148.2; 146.3; 140.3; 136.3; 133.7; 132.6; 131.7; 130.0; 129.2; 128.3; 127.7; 127.6; 127.5; 127.2; 122.9; 121.95; 121.2; 199.2; 118.2; 114.6; 114.3; 113.7; 68.9; 48.8; 34.4; 31.7. FT-IR (KBr tablet) ν_{max}/cm⁻¹: 3039-2866 (alifatik C-H); 1619 (amid C=O); 1527 (N-O gerilmesi).

Etil 2-(4-nitrofenoksi)benzoat 13 sentezi [50]: Etil salisilat (0.5 g, 3 mmol) ve 1-floro-4-nitro benzen (0.42 g, 3 mmol) DMF (10 mL) içerisinde çözülür ve K₂CO₃ (1.24 g, 9 mmol) eklenir, süspansiyon reaksiyon ortamı elde edilir. Reaksiyon 70 °C'de 14 saat karıştırılır. Reaksiyon bitiminde etil asetat (15 mL) eklenir ve reaksiyon sırasıyla su (15 mL x 3) ve tuzlu su (15 mL x 1) ile yıkanır. Daha sonra organik katman Na₂SO₄ ile kurutulur, süzülür ve çözücü indirgenmiş basınç altında buharlaştırılır. Verim= %84. ¹H-NMR (*d*-CDCl₃) δ ppm: 8.21 (2H, d, J=8.0 Hz); 8.12 (2H, d, J=8.7 Hz); 7.63 (1H, t, J=7.2 Hz); 7.39 (1H, t, J=7.5 Hz); 7.16 (1H, dd, J=8.7 Hz, J=7.9 Hz); 6.94 (2H, d, J=8.7 Hz); 1.23 (9H, s). FT-IR (KBr tablet) ν_{max}/cm⁻¹: 3107-2984 (alifatik C-H); 1715 (ester C=O); 1698 (N-O gerilmesi).

2-(4-nitrofenoksi)benzoik asit 14 sentezi [50]: Etil 2-(4-nitrofenoksi)benzoat 13 (1 g, 3.8 mmol) dioksan (20 mL) içerisinde çözülür. Üzerine NaOH çözeltisi (4 mL 1.4 M) damla damla eklenir ve 2 saat 70 °C’de karıştırılır. Reaksiyon bitiminde dioksan düşük basınç altında uzaklaştırılır ve geri kalan çözelti HCl çözeltisi (1 M) ile pH 2 olacak şekilde asitlendirilir. Çökelti vakum filtrasyon ile ayrılır. Su ile yıkandıktan sonra vakum altında kurutulur. Verim= %97. ¹H-NMR (*d*-CDCl₃) δ ppm: 8.21 (2H, d, J=8.1 Hz); 8.12 (2H, d, J=8.5 Hz); 7.63 (1H, t, J=7.2 Hz); 7.39 (1H, t, J=7.5 Hz); 7.16 (1H, d, J=8.5 Hz); 6.94 (2H, d, J=8.3 Hz). FT-IR (KBr tablet) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3107-3075 (O-H gerilmesi); 2955-2869 (alifatik C-H); 1728 (karboksilik asit C=O); 1669 (N-O gerilmesi).

2-(4-nitrofenoksi)benzoil florür 15 sentezi [40]: 2-(4-nitrofenoksi)benzoik asit 14 (0.5 g, 1.9 mmol) azot koşulları altında DCM (25 mL) içerisinde çözülür. 0 °C buz banyosunda DAST (1.23g, 1 mL, 7.6 mmol) ilave edilir. Oda sıcaklığında azot altında 2 saat karıştırılır. Reaksiyon bitiminde buzlu su (25 mL x 3) ve DCM (25 mL x 3) ile ekstraksiyon yapılır. NaHCO₃ ile yıkandıktan sonra MgSO₄ ile kurutulur. DCM düşük basınç altında uzaklaştırılır. Ürün vakum altında kurutulur. Verim= %80. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm: 8.24 (2H, d, J=8.2 Hz); 8.10 (1H, d, J=8.1 Hz); 7.89 (1H, t, J=7.8 Hz); 7.53 (1H, t, J=7.5 Hz); 7.36 (1H, d, J=7.3 Hz); 7.14 (2H, d, J=7.1). FT-IR (KBr tablet) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3080-2965 (alifatik C-H); 1800 (asit halojenür C=O); 1590 (N-O gerilmesi).

N-(6-(4-(*t*-bütil)fenoksi)benzo[*d*]tiyazol-2-il)-2-(4-nitrofenoksi)benzamid 22 sentezi [51]: 2-(4-nitrofenoksi)benzoil florür 15 (0.117g, 0.44 mmol) ve 6-(4-(*t*-bütil)fenoksi)benzo[*d*]tiyazol-2-amin 3 (0.1327 g, 0.44 mmol) DCM (10 mL) içerisinde çözülür. Azot koşulları altında DIEA (0.277g, 0.307 mL, 1.76 mmol) eklenir. Reaksiyon karışımı 45 °C’de 14 saat karıştırılır. Reaksiyon bitiminde sırasıyla %10 sitrik asit çözeltisi (2 x 20 mL), buzlu su (2 x 20 mL) ve doygun NaHCO₃ (10 mL) ile ekstraksiyon yapılır. Organik faz MgSO₄ ile kurutulur ve çözücü düşük basınç altında buharlaştırılır. Ürün soğuk metanolde çöktürülür. Verim= %70. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm: 10.10 (1H, s); 7.72 (1H, d, J=8.9 Hz); 7.61 (1H, s); 7.39 (1H, d, J=8.7 Hz); 7.37 (2H, d, J=8.7 Hz); 7.31 (2H, d, J=8.7 Hz); 7.08 (1H, d, J=7.6 Hz); 7.03 (1H, t, J=2.5 Hz); 6.93 (1H, dd, J=8.7 Hz, J=7.9 Hz); 6.69 (2H, d, J=8.7 Hz); 6.61 (1H, t, J=7.4 Hz); 1.25 (9H, s). FT-IR (KBr tablet)

$\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3068 (N-H gerilmesi); 2959-2866 (alifatik C-H); 1747 (amid C=O); 1700 (N-O gerilmesi); 1674 (N-H eğilmesi).

N-benzil-*N*-(6-(4-(*t*-bütil)fenoksi)benzo[*d*]tiyazol-2-il)-2-(4-nitrofenoksi)benzamid 23 sentezi [51]: *N*-(6-(4-(*t*-bütil)fenoksi)benzo[*d*]tiyazol-2-il)-2-(4-nitrofenoksi)benzamid 22 (0.1144 g, 0.212 mmol), benzil klorür (0.054 g, 0.49 ml, 0.424 mmol) ve K_2CO_3 (0.089 g, 0.636 mmol), DMF (20 mL) içerisinde çözülür. Reaksiyon karışımı 100 °C'de azot ortamı altında 14 saat karıştırılır. Reaksiyon bitiminde DCM (3 x 20 mL) ve buzlu su (3 x 20 mL) ile ekstraksiyon yapılır. Organik faz Na_2SO_4 ile kurutulur ve çözücü düşük basınç altında buharlaştırılır. Ürün soğuk metanolde çöktürülür. Verim= %70. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.22 (2H, d, $J=9.0$ Hz); 8.12 (1H, d, $J=7.8$ Hz); 8.00 (1H, d, $J=9.2$ Hz); 7.81 (1H, d, $J=9.2$ Hz); 7.60 (1H, d, $J=5.4$ Hz); 7.53 (1H, s); 7.35 (6H, m); 7.07 (1H, t, $J=2.6$ Hz); 7.03 (1H, d, $J=8.0$ Hz); 6.97 (1H, d, $J=7.6$ Hz); 6.92 (4H, m); 5.72 (2H, s); 1.24 (9H, s). FT-IR (KBr tablet) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3064-2850 (alifatik C-H); 1729 (amid C=O); 1674 (N-O gerilmesi).

N-(6-(4-(*t*-bütil)fenoksi)benzo[*d*]tiyazol-2-il)benzamid 24 sentezi [51]: 6-(4-(*t*-bütil)fenoksi)benzo[*d*]tiyazol-2-amin 3 (0.8 g, 2.68 mmol) ve benzoil klorür (0.75g, 5.36 mmol) DCM (20 mL) içerisinde çözülür. Azot koşulları altında DIEA (1.38 g, 1.85 mL, 10.72 mmol) eklenir. Reaksiyon karışımı 45 °C'de 14 saat karıştırılır. Reaksiyon bitiminde sırasıyla %10 sitrik asit çözeltisi (2 x 20 mL), buzlu su (2 x 20 mL) ve doygun NaHCO_3 (10 mL) ile ekstraksiyon yapılır. Organik faz MgSO_4 ile kurutulur ve çözücü düşük basınç altında buharlaştırılır. Ürün soğuk metanolde çöktürülür. Verim= %70. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.12 (1H, d, $J=7.3$ Hz); 7.92 (2H, d, $J=7.1$ Hz); 7.67 (1H, s); 7.61 (1H, t, $J=7.8$ Hz); 7.54 (1H, d, $J=8.7$ Hz); 7.47 (1H, dd, $J=8.6$ Hz, $J=8.0$ Hz); 7.38 (2H, d, $J=8.7$ Hz); 7.12 (1H, d, $J=8.7$ Hz); 6.93 (2H, d, $J=8.7$ Hz); 5.72 (2H, s); 1.25 (9H, s). FT-IR (KBr tablet) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3205 (N-H gerilmesi); 2956-2866 (alifatik C-H); 1738 (amid C=O); 1673 (N-O gerilmesi); 1602 (N-H eğilmesi).

N-benzil-*N*-(6-(4-(*t*-bütil)fenoksi)benzo[*d*]tiyazol-2-il)benzamid 25 sentezi [51]: *N*-(6-(4-(*t*-bütil)fenoksi)benzo[*d*]tiyazol-2-il)benzamid 24 (0.312g, 0.78 mmol), benzil klorür (0.19 g, 0.17 ml, 1.5 mmol) ve K_2CO_3 (0.32 g, 2.34 mmol) DMF (20 mL) içerisinde çözülür. Reaksiyon karışımı 100 °C sıcaklıkta azot ortamı altında 14 saat boyunca karıştırılır. Reaksiyon bitiminde DCM (3 x 20 mL) ve buzlu su (3 x 20 mL)

ile ekstraksiyon yapılır. Organik faz Na_2SO_4 ile kurutulur ve çözücü düşük basınç altında buharlaştırılır. Ürün soğuk metanolde çöktürülür. Verim= %70. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 7.64 (3H, m); 7.56 (1H, t, $J=8.7$ Hz); 7.35 (9H, m); 7.13 (1H, d, $J=8.8$ Hz); 6.92 (2H, d, $J=8.6$ Hz); 5.81 (2H, s); 1.24 (9H, s). $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 174.8; 167.8; 155.2; 154.1; 146.2; 137.9; 132.7; 129.5; 129.2; 128.8; 127.8; 127.2; 119.1; 118.3; 114.3; 113.8; 34.5; 30.8. FT-IR (KBr tablet) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3089-2866 (alifatik C-H); 1600 (amid C=O).

2-(3-(4-(florometil)fenoksi)propil)isoindolin-1,3-dion 28 sentezi [40]: 2-(3-(4-(hidroksimetil)fenoksi)propil)isoindolin-1,3-dion (0.5 g, 1.82 mmol) azot koşulları altında DCM (25 mL) içerisinde çözülür. 0 °C buz banyosu içerisinde DAST (1.17 g, 0.96 mL, 7.28 mmol) ilave edilir. Oda sıcaklığında azot altında 2 saat karıştırılır. Reaksiyon bitiminde buzlu su (25 mL x 3) ve DCM (25 mL x 3) ile ekstraksiyon yapılır. NaHCO_3 ile yıkandıktan sonra MgSO_4 ile kurutulur. DCM düşük basınç altında uzaklaştırılır. Ürün vakum altında kurutulur. Verim= %89. FT-IR (KBr tablet) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3277 (O-H gerilmesi); 2972-2547 (alifatik C-H); 1741 (amid C=O).

2-(3-(4-(((6-(4-(t-bütil)fenoksi)benzo[d]tiyazol-2-il)amino)metil)fenoksi)propil)isoindolin-1,3-dion 29 sentezi [51]: 2-(3-(4-(florometil)fenoksi)propil)isoindolin-1,3-dion 31 (0.12 g, 0.37 mmol) ve 6-(4-(t-bütil)fenoksi)benzo[d]tiyazol-2-amin 3 (0.89 g, 0.37 mmol) DCM (10 mL) içerisinde çözülür. Azot koşulları altında DIEA (0.19 g, 0.14 mL, 1.48 mmol) eklenir. Reaksiyon karışımı 45 °C'de 14 saat döndürülür. Reaksiyon bitiminde sırasıyla %10 sitrik asit çözeltisi (2 x 20 mL), buzlu su (2 x 20 mL) ve doymuş NaHCO_3 (10 mL) ile ekstraksiyon yapılır. Organik faz MgSO_4 ile kurutulur ve çözücü düşük basınç altında buharlaştırılır. Ürün soğuk metanolde çöktürülür. Verim= %68. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.05 (2H, d, $J=8.8$ Hz); 7.99 (2H, d, $J=8.8$ Hz); 7.80 (5H, m); 7.65 (1H, s); 7.38 (1H, d, $J=6.2$ Hz); 7.13 (1H, d, $J=6.2$ Hz); 6.97 (1H, d, $J=6.2$ Hz); 6.93 (2H, d, $J=8.9$ Hz); 5.73 (1H, s); 4.38 (2H, t, $J=5.3$ Hz); 4.08 (2H, m); 3.77 (2H, t, $J=2.3$ Hz); 1.26 (9H, s). $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 171.2; 168.4; 164.3; 156.1; 155.5; 154.3; 153.4; 134.7; 132.0; 130.8; 127.5; 127.0; 126.9; 123.4; 117.9; 114.5; 113.9; 112.1; 66.4; 49.6; 35.3; 34.4; 31.6; 27.9. FT-IR (KBr tablet) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3302 (N-H gerilmesi); 2954-2849 (alifatik C-H); 1770 amid C=O); 1712 (N-O gerilmesi); 1602 (N-H eğilmesi).

2-(3-(4-(((6-(4-(t-bütil)fenoksi)benzo[d]tiyazol-2-il)(4-klorobenzil)amino)metil)fenoksi)propil)isoindolin-1,3-dion 30 sentezi [51]: 2-(3-(4-(((6-(4-(t-bütil)fenoksi)

benzo [*d*]tiyazol-2-il)amino)metil)fenoksi)propil) isoindolin-1,3-dion 32 (0.6 g, 1 mmol), 4-kloro-benzil klorür (0.32 g, 2 mmol) ve K₂CO₃ (0.41 g, 3 mmol) DMF (10 mL) içerisinde çözülür. Reaksiyon 100 °C sıcaklıkta azot ortamı altında 14 saat karıştırılır. Reaksiyon bitiminde DCM (3 x 20 mL) ve buzlu su (3 x 20 mL) ile ekstraksiyon yapılır. Organik faz Na₂SO₄ ile kurutulur ve çözücü düşük basınç altında buharlaştırılır. Ürün metanolde çöktürülür. Verim= %65. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.89 (2H, d, J=8.8 Hz); 7.85 (2H, d, J=7.8 Hz); 7.45 (3H, m); 7.37 (5H, m); 5.28 (2H, s); 4.08 (2H, t, J=5.3 Hz); 3.72 (2H, t, J=6.4 Hz); 2.09 (2H, m); 1.26 (9H, s). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm: 168.4; 165.6; 162.9; 136.3; 135.7; 135.4; 134.7; 133.1; 132.4; 131.7; 131.3; 130.1; 129.8; 129.0; 128.9; 126.7; 123.4; 121.5; 117.9; 114.8; 66.5; 65.4; 62.5; 35.3; 31.6; 27.8. FT-IR (KBr tablet) ν_{max}/cm⁻¹: 2955-2849 (alifatik C-H); 1771 (amid C=O).

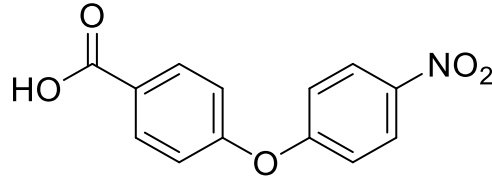
N-(6-(4-etilfenoksi)benzo[*d*]tiyazol-2-il)-2-(4-nitrofenoksi)benzamid 31 sentezi [51]: 6-(4-etilfenoksi)benzo[*d*]tiyazol-2-amin (0.1 g, 0.37 mmol) ve 15 (0.09 g, 0.37 mmol), DCM (10 mL) içerisinde çözülür. Azot koşulları altında DIEA (0.19 g, 0.14 mL, 1.48 mmol) eklenir. Reaksiyon karışımı 45 °C sıcaklıkta, 14 saat karıştırılır. Reaksiyon bitiminde sırasıyla %10 sitrik asit çözeltisi (2 x 20 mL), buzlu su (2 x 20 mL) ve doymuş NaHCO₃ (10 mL) ile ekstraksiyon yapılır. Organik faz MgSO₄ ile kurutulur ve çözücü düşük basınç altında buharlaştırılır. Ürün metanolde çöktürülür. Verim= %70. FT-IR (KBr tablet) ν_{max}/cm⁻¹: 2955-2848 (alifatik C-H); 1824,1730 (amid C=O).

N-benzil-*N*-(6-(4-etilfenoksi)benzo[*d*]tiyazol-2-il)-2-(4-nitrofenoksi)benzamid 32 sentezi [51]: *N*-(6-(4-etilfenoksi)benzo[*d*]tiyazol-2-il)-2-(4-nitrofenoksi)benzamid 28 (0.19 g, 0.1 mmol), benzil klorür (0.26 g, 0.23 mL, 0.1 mmol) ve K₂CO₃ (0.04 g, 0.3 mmol), DMF (10 mL) içerisinde çözülür. Reaksiyon karışımı 100 °C'de azot ortamı altında 14 saat boyunca karıştırılır. Reaksiyon bitiminde DCM (3 x 20 mL) ve buzlu su (3 x 20 mL) ile ekstraksiyon yapılır. Organik faz Na₂SO₄ ile kurutulur ve çözücü düşük basınç altında buharlaştırılır. Ürün metanolde çöktürülür. Verim= %75. FT-IR (KBr tablet) ν_{max}/cm⁻¹: 2955-2848 (alifatik C-H); 1730 (amid C=O).

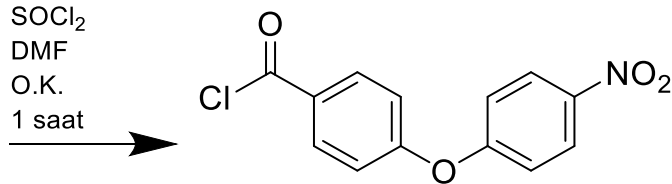
2-(4-aminofenoksi)-*N*-benzil-*N*-(6-(4-etilfenoksi)benzo[*d*]tiyazol-2-il)benzamid 33 sentezi [50]: *N*-benzil-*N*-(6-(4-etilfenoksi)benzo[*d*]tiyazol-2-il)-2-(4-nitrofenoksi)benzamid 29 (0.09 g, 0.15 mmol) metanol (20 mL) içerisinde çözülür ve oda sıcaklığında karıştırılır. Daha sonra SnCl₂ (0.11 g, 0.68 mmol) HCl (%37, 5 mL)

içerisinde çözülerek reaksiyon ortamına damla damla eklenir. SnCl_2 çözeltisi eklendikten sonra karışım 4-5 saat süresince $70\text{ }^\circ\text{C}$ 'de karıştırılır. Reaksiyon bitiminde metanol indirgenmiş basınç altında uçurulur. Kalan çökelti saf su çözülüp, çözeltinin pH değeri, %1 NaOH çözeltisi ile 11'e getirilir. Oluşan süspansiyon karışım santrifüj ile çöktürülüp DCM (30 mL x 3) ve saf su (30 mL x 3) ile ekstraksiyon yapılır. DCM ile toplanılan madde Na_2SO_4 ile kurutulur, süzülür ve çözücü indirgenmiş basınç altında buharlaştırılır. Safsızlık metanolde çöktürülüp, uzaklaştırılır. Verim= %56. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: 8.13 (2H, d, $J=8.7$ Hz); 7.50 (1H, d, $J=7.6$ Hz); 7.34 (12H, m); 7.37 (2H, t, $J=7.9$); 6.94 (1H, d, 4.34 (2H, s);); 6.85 (2H, d, $J=7.8$); 4.65 (2H, s); 4.34 (2H, s); 2.17 (2H, m); 1.15 (3H, t, $J=8.7$ Hz). FT-IR (KBr tablet) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3304, 3229 (N-H gerilmesi); 3030-2850 (alifatik C-H); 1730 (amid C=O).

4-(4-nitrofenoksi)benzoil klorür 35 sentezi [53]: 4-(4-nitrofenoksi)benzoik asit 8 (0.5 g, 1.91 mmol) SOCl_2 içerisinde çözülerek üzerine katalitik miktarda (1 damla) DMF eklenir ve 1 saat boyunca karıştırılır. Reaksiyon bitiminde reaksiyon karışımı toluen ile karıştırılıp çözücüler düşük basınç altında uzaklaştırılır. Ürün vakum altında kurutulur. Verim= %95. FT-IR (KBr tablet) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3345 (N-H gerilmesi); 3031-2955 (alifatik C-H); 1728 (amid C=O).

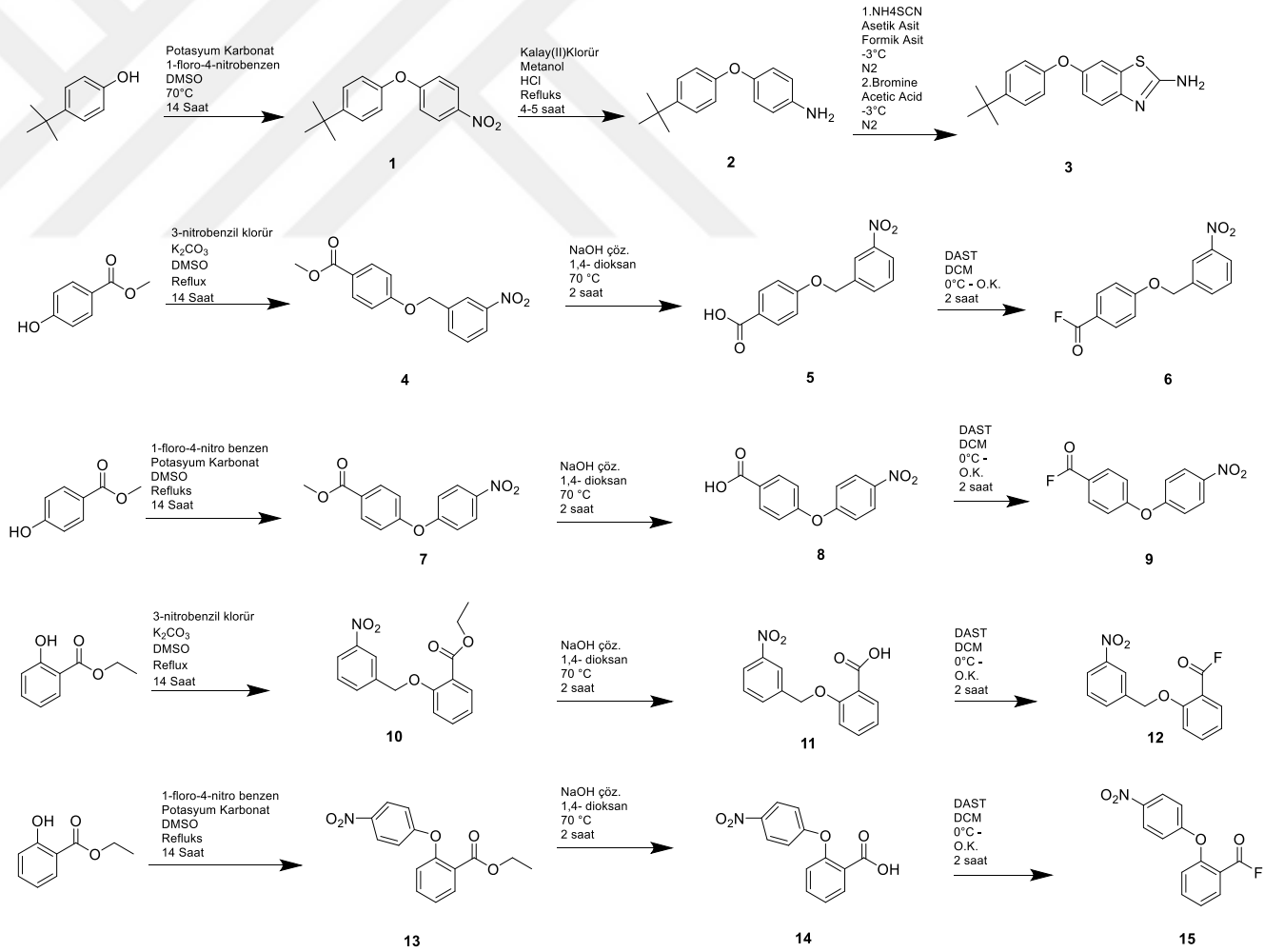


8

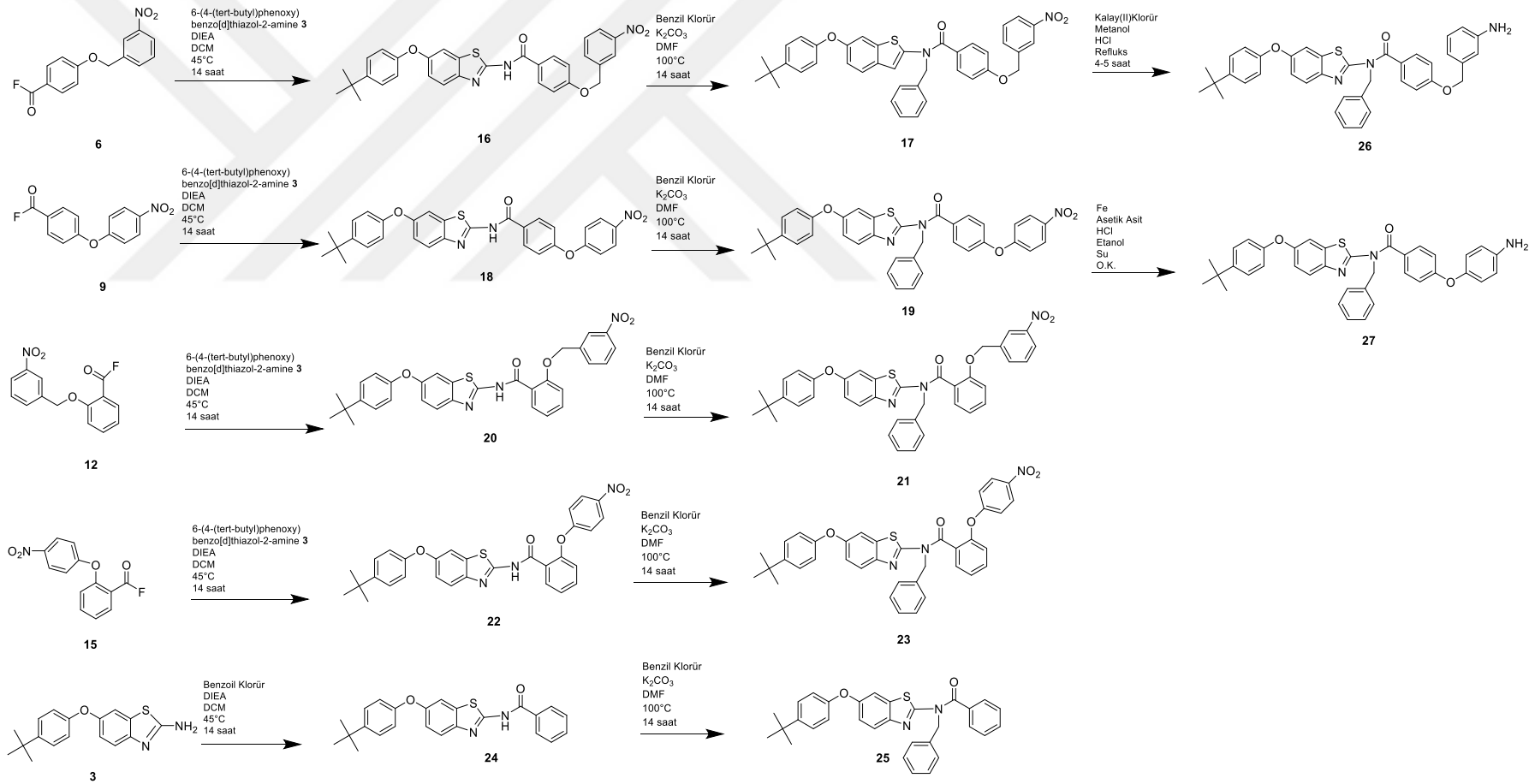


35

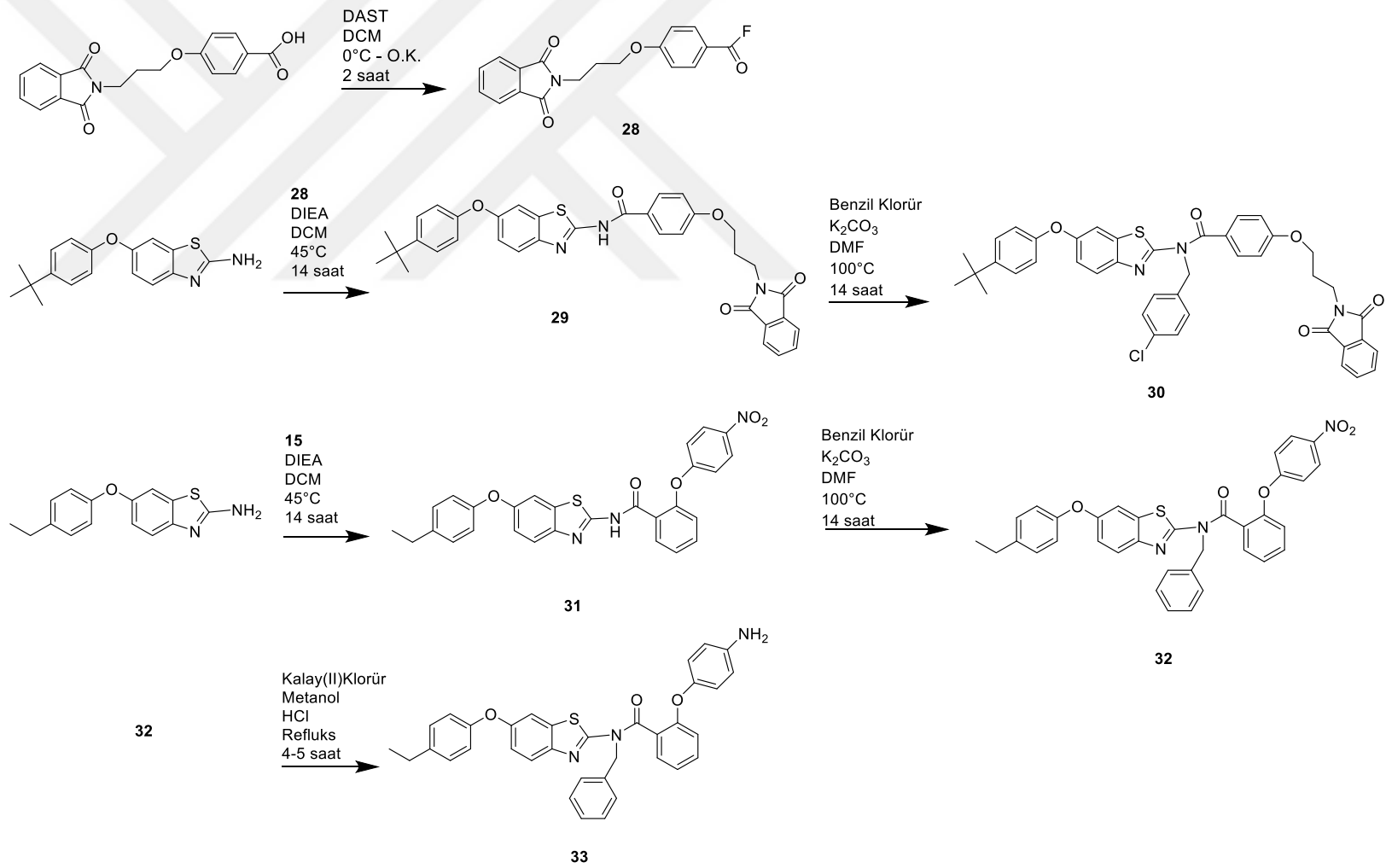
Şekil 3.1: Madde 35'in tiyonil klorür ile sentezi.



Şekil 3.2: Tez kapsamında sentezlenen maddelerin sentez şeması.



Şekil 3.3: Tez kapsamında sentezlenen maddelerin sentez şeması.

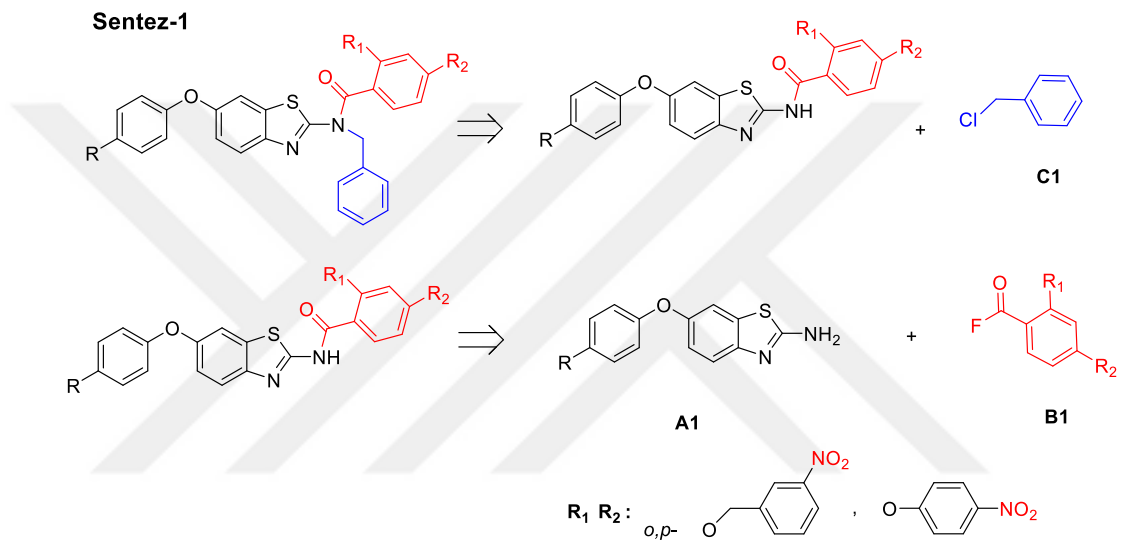


Şekil 3.4: Tez kapsamında sentezlenen maddelerin sentez şeması.

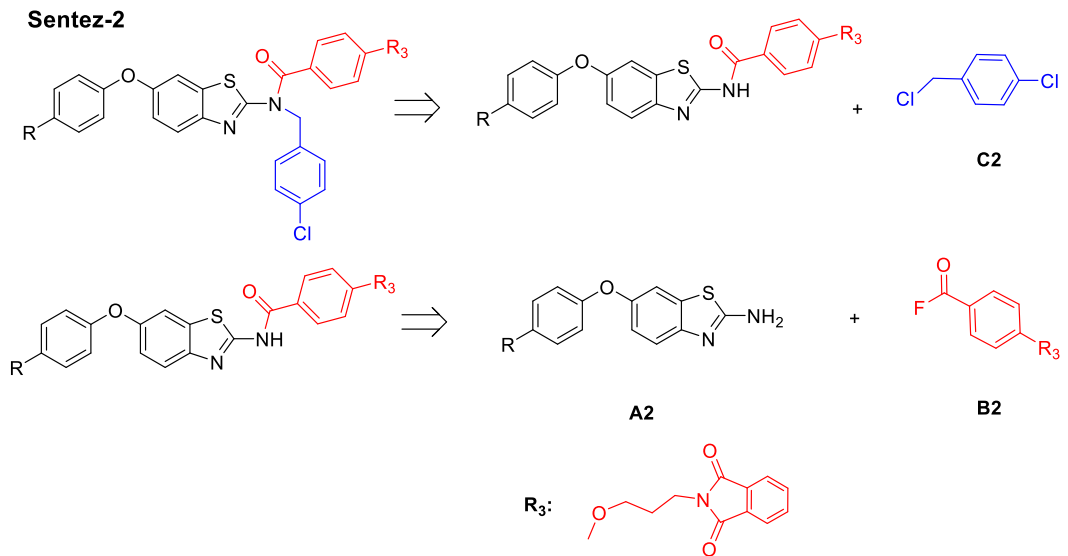
4. SONUÇ VE ÇIKARIMLAR

4.1 Sentezlenen Maddelerin Tasarımı ve Sentez Yöntemi

DOTA molekülünün sentezlenen bileşiklere NH₂ fonksiyonel grubu yardımıyla takılması için 2 sentez yöntemi geliştirilmiştir. Şekil 4.1'deki retrosentez şeması ile Sentez-1 ve Sentez-2 yöntemleri detaylı bir şekilde aydınlatılmıştır.



Sekil 3.2'de tüm örnekleri bulunur.



Sekil 3.4'de tam molekül gösterilir.

Şekil 4.1: Amin ve ftalamid uçlu maddelerin retro-sentez şeması.

İki retrosentez yönteminin de ara yapıları temel olarak A, B, C harfleri ile gösterilmiş üç parça olarak tanımlanabilir. Şekil 4.1'deki üst kısımda yer alan Sentez-1'in, Sentez-2 ile arasındaki fark amin fonksiyonu içeren parçanın, Sentez-1'de nitro fonksiyonel grubundan amine indirgenmesi, Sentez-2'de ise ftalamid koruması ile eklenmesidir.

Şekil 4.1'de A1 ve A2 olarak gösterilen aminobenzotiyazol yapısı, sekonder amid verecek şekilde benzoil klorür türevleri ve benzoil florür türevleri (Şekil 4.1'deki B1 ve B2) ile reaksiyon verir. Bu sekonder amid yapıları, hedeflenen bileşikler elde etmek için benzil klorür türevleri (Şekil 4.1'deki C1 ve C2) ile reaksiyon verir. Madde 26 ve 27 olduğu gibi amin yapısının elde edilmesi için nitro grupları amine indirgenir. Ftalamid yapısı içeren Sentez-2'deki maddenin koruma grubu ise DOTA takım aşamasından önce kaldırılacaktır.

4.2 Sentezlenen Maddelerin Karakterizasyonu

Şekil 4.1 üzerinden bu retrosentez adımlarını anlatacak olursak; öncelikle hedef ürünün planı sekonder amid ve benzil klorür türevleri ile reaksiyona girmesi ve sonuç ürün yani tersiyer amid oluşmasıdır. Bütün bu yapılan planlamaların ışığında sentezlenen maddelerin karakterizasyon verilerinin açıklamaları aşağıda yapılmıştır.

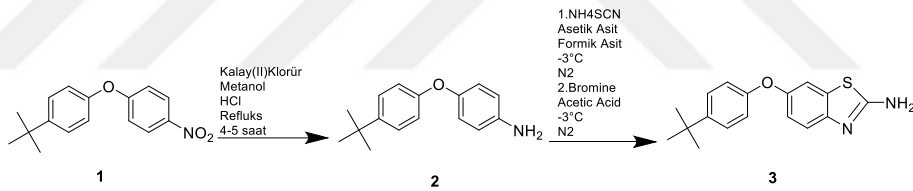


Şekil 4.2: Madde 18'in, sırasıyla madde 9 ve madde 35 ile sentezi.

Sekonder amid yapısını oluşturmak adına benzotiazol türevi bileşikler asit halojenürler ile reaksiyona girmiştir. Asit halojenürlerin karboksilik asitlerden elde edilmesi ise DAST kimyasalı ile yapılmıştır. DAST kullanılarak yapılan karboksilik

asitlerin, florlama reaksiyonun başka bir sentez yöntemi ise tıyonil klorür ile denenmiş ve başarılı olduğu görölmüştür. Şekil 3.1'deki yöntem kullanılarak yapılan iki reaksiyonun ürünü madde 3 ile reaksiyona sokulmuş ve FT-IR spektrumu aşağıda gösterilmiştir. Şekil 4.2'de oluşan iki ürünün birebir aynı olduğu gözlenmiştir.

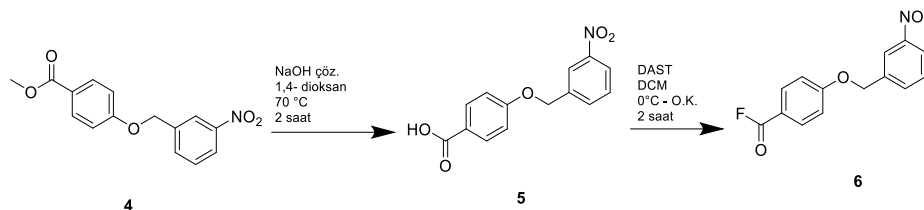
Molekül 1, 2 ve 3 için karakterizasyon aşaması: Şekil 4.3'deki metot ile sentezlen molekül 1, 2 ve 3 için 1586 cm^{-1} güçlü N-O sinyali molekül 1'de bulunan nitro fonksiyonel grubunun varlığını gösterir. Yine bu güçlü sinyalin bir sonraki reaksiyonda kaybolması molekül 2'de nitro fonksiyonel grubunun olmadığını kanıtlar. Ayrıca $3400\text{-}3350\text{ cm}^{-1}$ civarında gözlenen sinyaller madde 2'deki N-H bağlarını gösterir. Molekül 3 için; 3379 cm^{-1} 'de N-H gerilme bandının gözlemlenmesi yapıda amin grubunun varlığını kanıtlamaktadır ve 1680 cm^{-1} 'de bulunan sinyal N=C bandına aittir, Şekil A.1'de gösterilmiştir. $^1\text{H-NMR}$ ve $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumlarında ise tüm bağlı gruplardaki hidrojenlerin tam sayıda ve öngörülen kimyasal kayma değerlerinde gözükmesi, moleküllerin başarıyla sentezlendiğini göstermiştir, Şekil A.14, Şekil A.15, Şekil A.16 ve Şekil A.43, Şekil A.44, Şekil A.45'deki gibi.



Şekil 4.3: Madde 1,2 ve 3'ün sentez yöntemi.

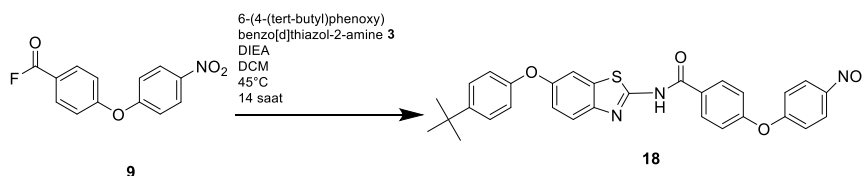
Asit halojenür olan molekül 6, 9, 12 ve 15 için karakterizasyon aşaması: Şekil 4.4'deki metot ile sentezlen molekül için 1580 cm^{-1} civarındaki güçlü ester sinyali molekülde bulunan ester grubunun varlığını gösterir. Yine bu güçlü sinyalin bir sonraki reaksiyonda kaybolması molekülün artık ester olmadığını kanıtlar. $3025\text{-}3030\text{ cm}^{-1}$ civarında gözlenen sinyaller O-H bağlarını gösterir. Bir sonraki florlama adımı için asit halojenür varlığı 3030 cm^{-1} 'de O-H gerilme bandının gözlemlenmemesi ve $1625\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ arasında bulunan asit halojenürüne ait karbonil yapısından gelen güçlü sinyal kanıtlar. $^1\text{H-NMR}$ spektrumlarında ise tüm bağlı gruplardaki hidrojenlerin tam sayıda ve öngörülen kimyasal kayma değerlerinde gözükmesi, moleküllerin başarıyla sentezlendiğini göstermiştir. Karakterizasyon spektrumları Şekil A.2, Şekil A.3, Şekil A.4, Şekil A.5, Şekil A.17, Şekil A.18, Şekil

A.19, Şekil A.20, Şekil A.21, Şekil A.22, Şekil A.23, Şekil A.24, Şekil A.25, Şekil A.26, Şekil A.27, Şekil A.46’da detaylı bir şekilde verilmiştir.



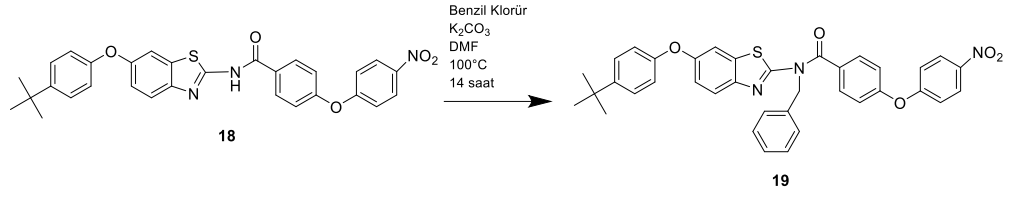
Şekil 4.4: Madde 4, 5 ve 6’nın sentez yöntemi.

Molekül 16, 18, 20, 22, 24, 29 ve 31 (sekonder amid) için karakterizasyon aşaması: Şekil 4.5’de de sentez örneği bulunan sekonder amidler için FT-IR spektrumunda moleküllerin sentezlendiğinin kanıtı $3500-3300\text{ cm}^{-1}$ arasında bulunan güçlü ve sivri N-H sinyalinin geniş ve daha güçsüz bir sonuç olarak gözlenmesi ve 1730 cm^{-1} civarında bulunan karbonil sinyali. Ayrıca $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda 10 ppm civarındaki azota bağlı hidrojen sinyalinin integralinin yarıya düşmesi ve karbonil fonksiyonel grubunun bağlı olduğu karbon atomunun $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda gözlenmesi moleküllerin başarıyla sentezlendiği gösterir. Karakterizasyon spektrumları Şekil A.6, Şekil A.7, Şekil A.8, Şekil A.9, Şekil A.10, Şekil A.11, Şekil A.12, Şekil A.13, Şekil A.28, Şekil A.30, Şekil A.32, Şekil A.34, Şekil A.36, Şekil A.40, Şekil A.47, Şekil A.52’de detaylı bir şekilde verilmiştir.



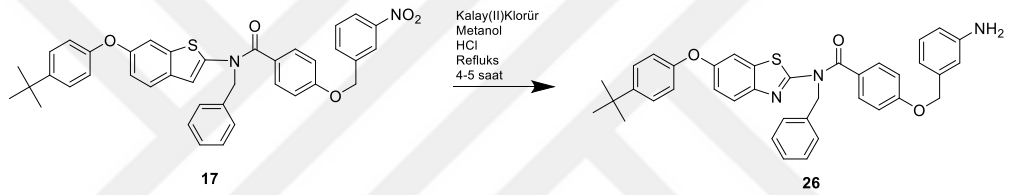
Şekil 4.5: Madde 18’in sentez yöntemi.

Molekül 17, 19, 21, 23, 25, 30 ve 32 (tersiyer amid) için karakterizasyon aşaması: Şekil 4.6’de de bir sentez örneği bulunan tersiyer amidler için FT-IR spektrumunda bu moleküllerin sentezlendiğinin kanıtı $3500-3300\text{ cm}^{-1}$ arasında bulunan N-H sinyalinin gözlenmemesi ve $1740-1680\text{ cm}^{-1}$ bulunan sekonder amide ait çift boyunlu sinyalin, tek boyunluya dönüşmesidir. Ayrıca $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda 10 ppm civarında sekonder amid için gözlenen azota atomuna bağlı hidrojen sinyali, tersiyer amid için gözlenmemiştir. Karakterizasyon spektrumları Şekil A.29, Şekil A.31, Şekil A.33, Şekil A.35, Şekil A.37, Şekil A.41, Şekil A.50, Şekil A.51, Şekil A.53’de detaylı bir şekilde verilmiştir.



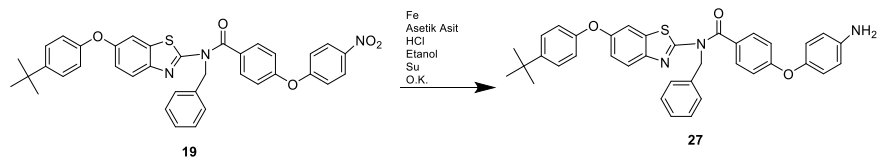
Şekil 4.6: Madde 19'un sentez yöntemi.

Amin fonksiyonu içerecek molekül 26, 27 ve 33 için karakterizasyon aşaması: Şekil 4.7'da bir sentez örneği bulunan madde 26 için DOTA molekülünün bağlanması için gerekli olan NH₂ fonksiyonel grubunun elde edildiğinin kanıtı; FT-IR spektrumuna bakılarak 3500-3300 cm⁻¹ arasında belirgin bir şekilde gözlenen geniş sinyaldir. Ayrıca ¹H-NMR spektrumunda 6.9 ppm civarında gözlenen iki hidrojen integralini sağlayan singlet sinyali ile kanıtlanır. Karakterizasyon spektrumları Şekil A.38, Şekil A.39, Şekil A.42, Şekil A.48, Şekil A.49'da detaylı bir şekilde verilmiştir.



Şekil 4.7: Madde 26'nın sentez yöntemi.

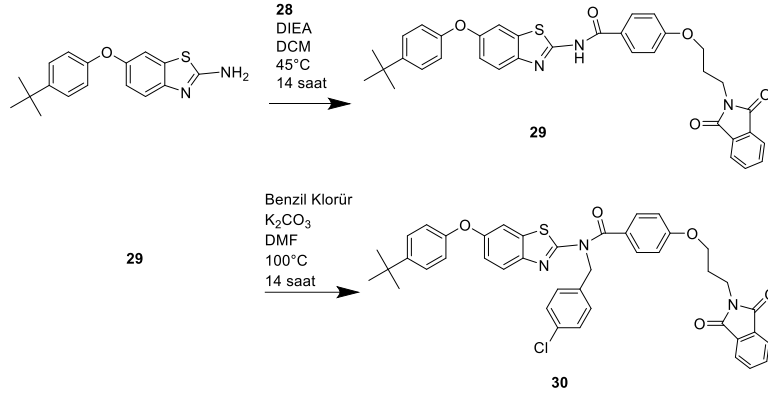
DOTA molekülünün bağlanması için gerekli olan NH₂ fonksiyonu için yapılan nitro grubunun indirgenmesi ise madde 2'nin sentezinden ilham alınarak madde 26 ve 33 için Şekil 4.7'deki metot ile yapılmıştır. Ancak verim %50 civarında olmuştur. Bu nedenle kalay (II) klorüre göre daha sert koşullara sahip bir yöntem araştırılıp ileri reaksiyona Şekil 4.8'daki madde 27'nin sentezi olan demir elementi içeren reaksiyon ile devam edilmiş ve reaksiyon verimi %70 civarındadır. Bu sebeple kalay (II) klorür ile yapılan reaksiyondan vazgeçilip ileri reaksiyonlara demir içeren yöntem ile devam ettirilmiştir.



Şekil 4.8: Madde 27'nin sentez yöntemi.

DOTA molekülünün bağlanması için gerekli olan NH₂ fonksiyonu için yapılan ve Şekil 4.9'da sentez metodu gösterilen bir diğer yöntem ise fatalamid koruma

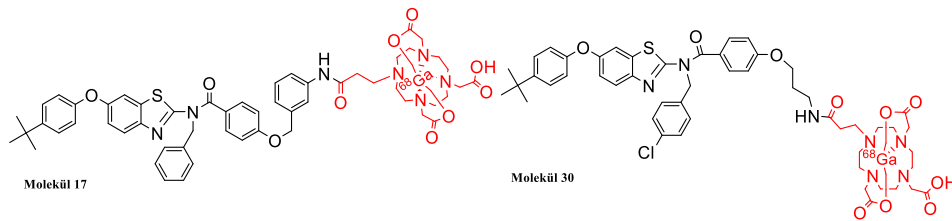
grubunun hidrazin hidrat ile kaldırılmasıdır. Bu işlemden sonra koruma grubu kalkan NH_2 fonksiyonel ucu DOTA molekülü ile birleşmeye hazır bir aşamaya getirilir.



Şekil 4.9: Madde 29 ve 30'un sentez yöntemi.

4.3 Proje Kapsamında Yapılacak Gelecek Çalışmalar

Bu projenin gelecekteki amacı ise bu peptidomimetiklerin PD-L1'e karşı izotermal titrasyon kalorimetrisi ile afinitesini ve termodinamik parametrelerini belirlemek ve daha sonra termodinamik parametreleri ve afinitesi açısından ilgili proteine karşı en uygun sonuçların alındığı moleküller ile yapılacak olan *in vitro* testlerde de başarılı bulunanlar ile pozitron emisyon tomografisi kullanılarak yeni PET/BT görüntüleme ajanları elde etmek için DOTA ve ^{68}Ga ile birleştirmek ve *in-vivo* şartlarda görüntüleme çalışmalarını tamamlamaktır. ^{68}Ga radyonüklid atomu kanser hücresi için geliştirilecek görüntüleme ajanlarının son haline ulaşmaları için tez kapsamında sentezlenen peptidomimetiklere sinyal ajanı olarak eklenecektir. Görüntüleme ajanlarının hedeflenen son hali ise Şekil 4.10'de detaylı bir şekilde gösterilmiştir.



Şekil 4.10: Molekül 17 ve 30'un DOTA ve ^{68}Ga bağlanmış hedef yapıları.

KAYNAKLAR

- [1] **Strimbu, K., & Tavel, J. A.** (2010). What are biomarkers?, *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(6), 436-466.
- [2] **Verma, M., & Manne, U.** (2006). Genetic and epigenetic biomarkers in cancer diagnosis and identifying high risk populations, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 60(1), 9-18.
- [3] **FDA-NIH Biomarker Working Group.** (2016). BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource, *The U.S. Food and Drug Administration and The National Institutes of Health*.
- [4] **Biomarker.** Erişim: 04 Ocak 2020, <https://en.wikipedia.org/wiki/Biomarker>
- [5] **Sawyers, C. L.** (2008). The cancer biomarker problem, *Nature*, 452, 548–552.
- [6] **Gao, X., Cui, Y., Levenson, R. M., Chung, L. W. K., & Nie, S.** (2004). In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots, *Nature Biotechnology*, 22, 969–976.
- [7] **Shrimpton, P. C., Hillier, M. C., Lewis, M. A.** (2014). Doses from Computed Tomography (CT) Examinations in the UK – 2011 Review. <https://assets.publishing.service.gov.uk>. Retrieved September, 2014, from https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/349188/PHE_CRCE_013.pdf
- [8] **Ogawa, S., Lee, T. M., Kay, A. R., & Tank, D. W.** (1990). Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(24), 9868–9872.
- [9] **Imperial College Department of Bioengineering.** (2008). Imaging and cancer: A review, *Molecular Oncology*, 2, 115–152.
- [10] **Matsui, K., Wang, Z., McCarthy, T. J., Allen, P. M., & Reichert, D. E.** (2004). Quantitation and visualization of tumor-specific T cells in the secondary lymphoid organs during and after tumor elimination by PET, *Nuclear Medicine and Biology*, 31(8), 1021-1031.
- [11] **Pimlott, S. L., & Sutherland, A.** (2011). Molecular tracers for the PET and SPECT imaging of disease, *Chemical Society Reviews*, 40, 149-162.
- [12] **Gao, X., Yang, L., Petros, J. A., Marshall, F. F., Simons, J. W., & Nie, S.** (2005). In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots, *Current Opinion in Biotechnology*, 16(1), 63-72.
- [13] **Adams, K. E., Ke, S., Kwon, S., Liang, F., Fan, Z., Lu, Y., ... Sevcik-Muraca, E. M.** (2007). Comparison of visible and near-infrared

wavelength-excitable fluorescent dyes for molecular imaging of cancer, *Journal of Biomedical Optics*, 12(2), 17-24.

- [14] **Wadas, T. J., Wong, E. H., Weisman, G. R., & Anderson, C. J.** (2010). Coordinating radiometals of copper, gallium, indium, yttrium, and zirconium for PET and SPECT imaging of disease, *Chemical Reviews*, 110(5), 2858-2902.
- [15] **Breeman, W. A. P., De Jong, M., De Blois, E., Bernard, B. F., Konijnenberg, M., & Krenning, E. P.** (2005). Radiolabelling DOTA-peptides with ⁶⁸Ga, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 32, 478-485.
- [16] **Prasad, V., Fetscher, S., & Baum, R. P.** (2007). Changing role of somatostatin receptor targeted drugs in NET: Nuclear Medicine's view, *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 10(2), 321-337.
- [17] **Ozaki, T., & Nakagawara, A.** (2011). Role of p53 in cell death and human cancers. *Cancers*, 3(1), 994-1013.
- [18] **Shamalov, K., Levy, S. N., Horovitz-Fried, M., & Cohen, C. J.** (2017). The mutational status of p53 can influence its recognition by human T-cells, *OncoImmunology*, 6(4), e1285990.
- [19] **Bertucci, F., & Gonçalves, A.** (2017). Immunotherapy in Breast Cancer: the Emerging Role of PD-1 and PD-L1, *Current Oncology Reports*, 19(64), 1912-1917.
- [20] **Chen, D. S., & Mellman, I.** (2013). Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity*, 30(1), 1-10.
- [21] **Jerud, E. S., Bricard, G., & Porcelli, S. A.** (2006). CD1d-restricted natural killer T cells: Roles in tumor immunosurveillance and tolerance, *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 33, 18-36.
- [22] **Gutcher, I., & Becher, B.** (2007). APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation, *Journal of Clinical Investigation*, 117(5), 1119-1127.
- [23] **Pagès, F., Berger, A., Camus, M., Sanchez-Cabo, F., Costes, A., Molitor, R., ... Galon, J.** (2005). Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer, *New England Journal of Medicine*, 353(25), 2654-66.
- [24] **Cao, X.** (2010). Regulatory T cells and immune tolerance to tumors, *Immunologic Research*, 46(1-3), 79-93.
- [25] **CAR-T Cell Toxicity and Safety Profiles.** Erişim: 14 Mayıs 2019, <https://www.news-medical.net/health/CAR-T-Cell-Toxicity-and-Safety-Profiles.aspx>
- [26] **Pardoll, D. M.** (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy, *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 252-64.
- [27] **Zak, K. M., Grudnik, P., Magiera, K., Dömling, A., Dubin, G., & Holak, T. A.** (2017). Structural Biology of the Immune Checkpoint Receptor PD-1 and Its Ligands PD-L1/PD-L2, *Structure*, 25(8), 1163-1174.

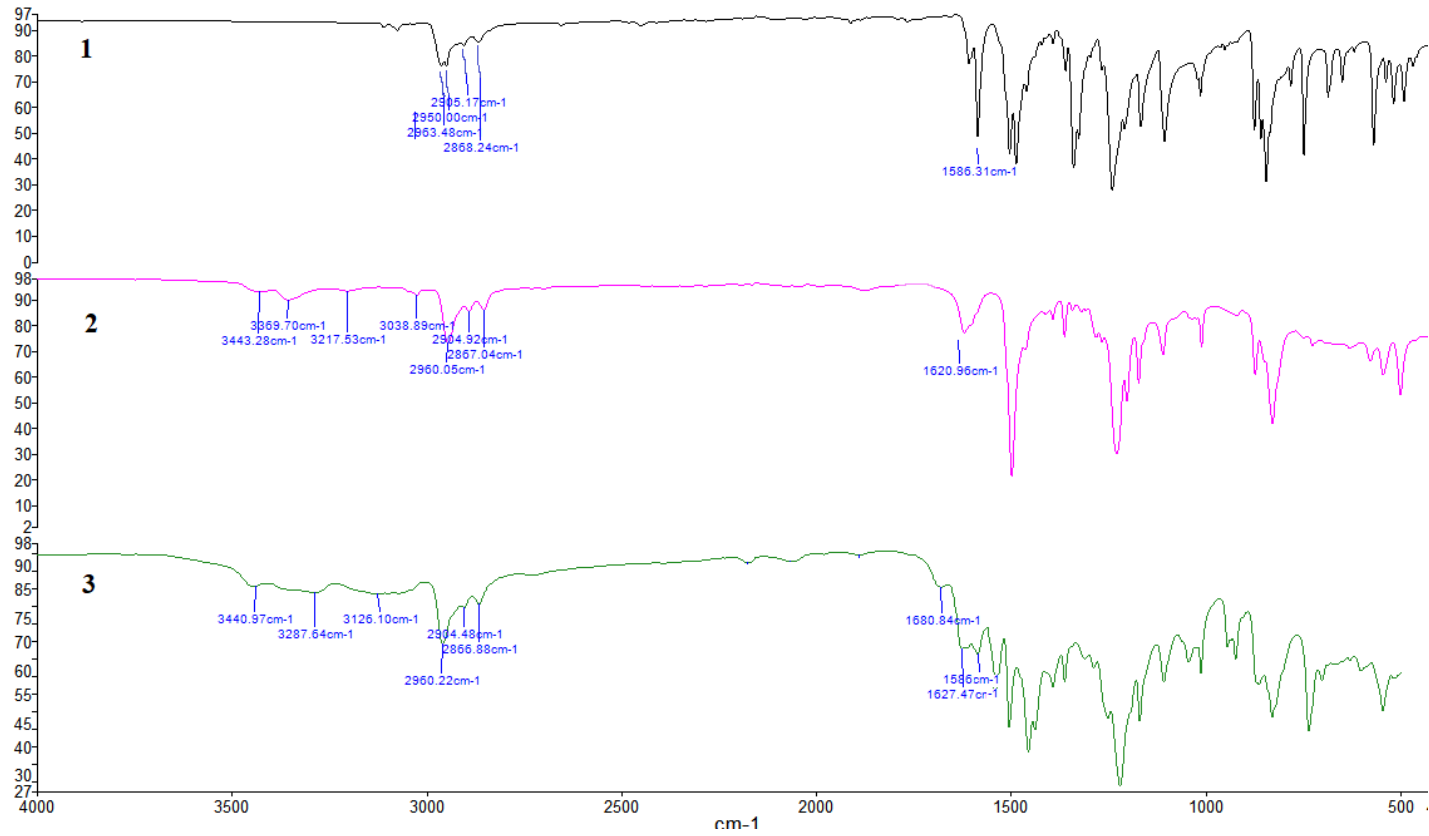
- [28] **Blank, C., Brown, I., Peterson, A. C., Spiotto, M., Iwai, Y., Honjo, T., & Gajewski, T. F.** (2004). PD-L1/B7H-1 Inhibits the Effector Phase of Tumor Rejection by T Cell Receptor (TCR) Transgenic CD8⁺ T Cells, *Cancer Research*, 64(3), 1140-1145.
- [29] **Loke, P., & Allison, J. P.** (2003). PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9), 5336-5341.
- [30] **Pysz, M. A., Gambhir, S. S., & Willmann, J. K.** (2010). Molecular imaging: current status and emerging strategies, *Clinical Radiology*, 65(7), 500-516.
- [31] **Molecular Imaging.** Erişim: 13 Aralık 2019, https://en.wikipedia.org/wiki/Molecular_imaging
- [32] **Lehn, J. M.** (1978). Cryptates: Inclusion complexes of macropolycyclic receptor molecules, *Pure and Applied Chemistry*, 50(9-10), 871-892.
- [33] **Ligands & receptors.** (t.y.). <https://www.khanacademy.org/science/biology/cell-signaling/mechanisms-of-cell-signaling/a/signal-perception>
- [34] **Vagner, J., Qu, H., & Hruby, V. J.** (2008). Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discovery, *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(3), 292-296.
- [35] **Baskin, M., J., Prescher, J., A., Laughlin S., T., Agard, N., J., and Chang P., V., et. al.** (2007). Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging, *PNAS*, 104(43), 16793–16797.
- [36] **Qing, X., Lee, X. Y., De Raeymaeker, J., Tame, J. R., Zhang, K. Y., De Maeyer, M., & Voet, A. R.** (2014). Pharmacophore modeling: Advances, Limitations, And current utility in drug discovery, *Journal of Receptor, Ligand and Channel Research*, 2014(7), 81-92.
- [37] **Burt, R., Birkett, G., & Zhao, X. S.** (2014). A review of molecular modelling of electric double layer capacitors, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2014(16), 6519.
- [38] **Qing, X., Yin L., X., De Raeymaecker, J., Tame, J., Zhang, K., De Maeyer, M., Voet, A.** (2014). Pharmacophore modeling: Advances, Limitations, And current utility in drug discovery, *Journal of Receptor*, 7, 81-92.
- [39] **Geppert, T. D., & Lipsky, P. E.** (1989). Antigen presentation at the inflammatory site, *Critical Reviews in Immunology*, 9(4), 313-362.
- [40] **Baell, J. B., Duggan, P. J., Forsyth, S. A., Lewis, R. J., Lok, Y. P., & Schroeder, C. I.** (2004). Synthesis and biological evaluation of nonpeptide mimetics of ω -conotoxin GVIA, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 12(15), 4025-4037.
- [41] **Sherman, W., Day, T., Jacobson, M. P., Friesner, R. A., & Farid, R.** (2006). Novel procedure for modeling ligand/receptor induced fit effects, *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(2), 534-553.

- [42] **Lenzo, N., Meyrick, D., & Turner, J.** (2018). Review of Gallium-68 PSMA PET/CT Imaging in the Management of Prostate Cancer, *Diagnostics*, 8(1), pii: E16.
- [43] **Biroschak, J. R., Schwartz, G. F., Palazzo, J. P., Toll, A. D., Brill, K. L., Jaslow, R. J., & Lee, S. Y.** (2013). Impact of oncotype DX on treatment decisions in ER-positive, node-negative breast cancer with histologic correlation, *Breast Journal*, 19(3), 269-275.
- [44] **Kerkvliet, N., & Lawrence, B. P.** (2010). Cytotoxic T Cells. In Mcqueen, C., A., Yost, G., S., (Eds.), *In Comprehensive Toxicology*, (2nd ed. Vol.12, pp. 921-938). Elsevier Science.
- [45] **Artemov, D., Mori, N., Okollie, B., & Bhujwala, Z. M.** (2003). MR molecular imaging of the Her-2/neu receptor in breast cancer cells using targeted iron oxide nanoparticles, *Magnetic Resonance in Medicine*, 49(3), 403-408.
- [46] **Wang, Z. J., Chang, T. T. A., & Slauter, R.** (2017). Use of Imaging for Preclinical Evaluation. In Faqi, A., S., (Ed.), *In A Comprehensive Guide to Toxicology in Preclinical Drug Development*, (2nd ed. Vol.1, pp. 1-4). Academic Press.
- [47] **Van Drie, J. H.** (2013). Generation of three-dimensional pharmacophore models. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 2013(3), 449–464.
- [48] **Allison, J. P.** (2018). Discovery of cancer therapy by inhibition of negative immune regulation-The 2018 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *The Nobel Assembly at Karolinska Institutet*.
- [49] **Kim, D., Kim, J., Park, Y. Il, Lee, N., & Hyeon, T.** (2018). Recent Development of Inorganic Nanoparticles for Biomedical Imaging, *ACS Central Science*, 5(7), 1211-1222.
- [50] **Yang, L., Liu, W., Mei, H., Zhang, Y., Yu, X., Xu, Y., ... Zhao, Z.** (2015). Synthesis and biological evaluation of pentanedioic acid derivatives as farnesyltransferase inhibitors, *Medicinal Chemistry Communications*, 6(4), 671–676.
- [51] **Huang, S., T., et al.** (2006). Synthesis and anticancer evaluation of bis (benzimidazoles), bis(benzoxazoles), and benzothiazoles, *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 14, 6106–6119.
- [52] **Korich, A., L., Hughes, T., S.** (2007). A Facile, One-Pot Procedure for Forming Diarylimines from Nitroarenes and Benzaldehydes, *Synlett*, 16, 2602-2604.
- [53] **Cason, J., Reist, E., J.** (1958). Structure of Succinyl Dichloride and of Certain Other Potentially Cyclic Difunctional Compounds, *Journal Organic Chemistry*, 23(10), 2602-2604.

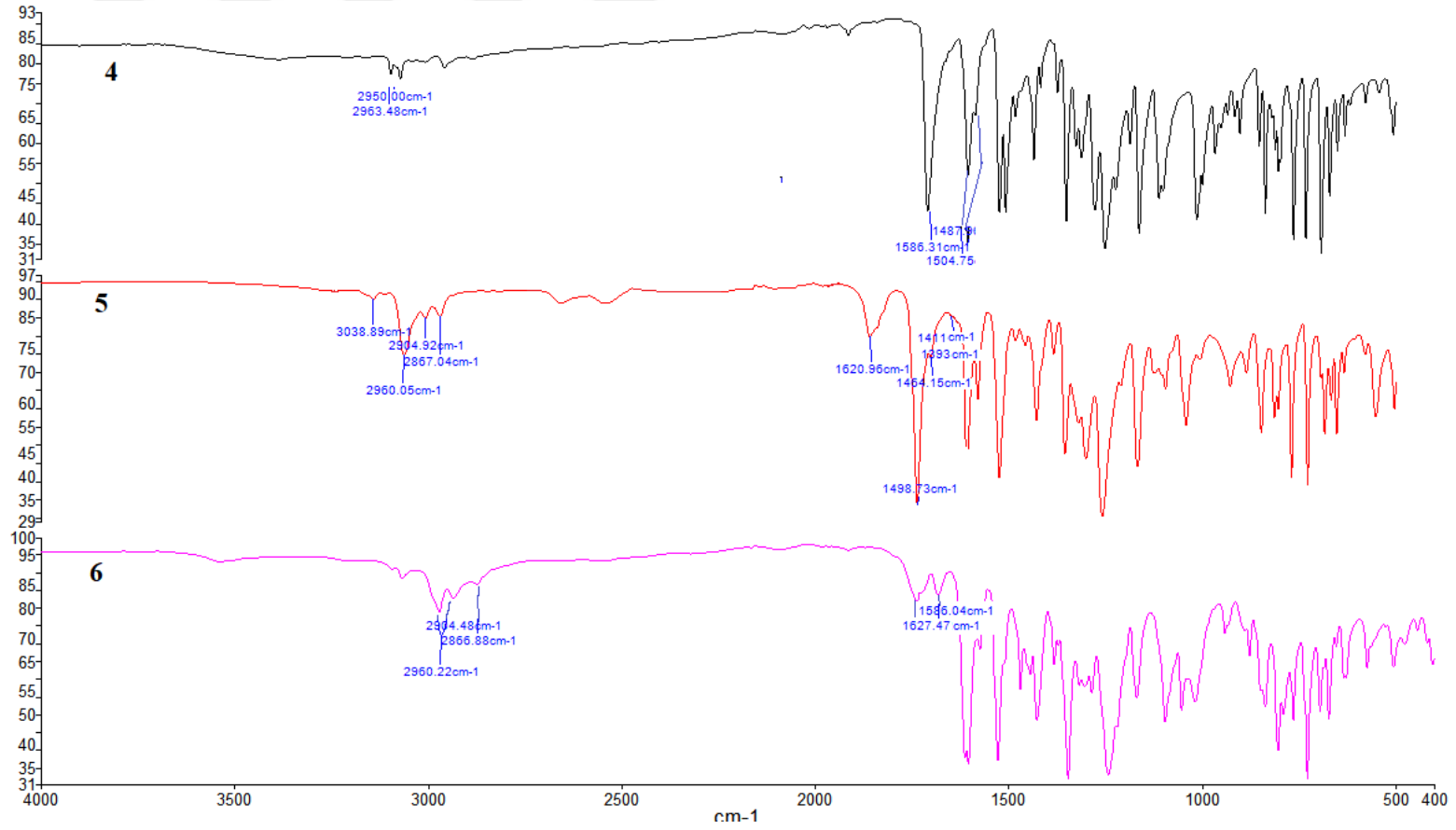
EKLER

EK A: Sentezlenen bileşiklere ait yapısal analiz spektrumları.

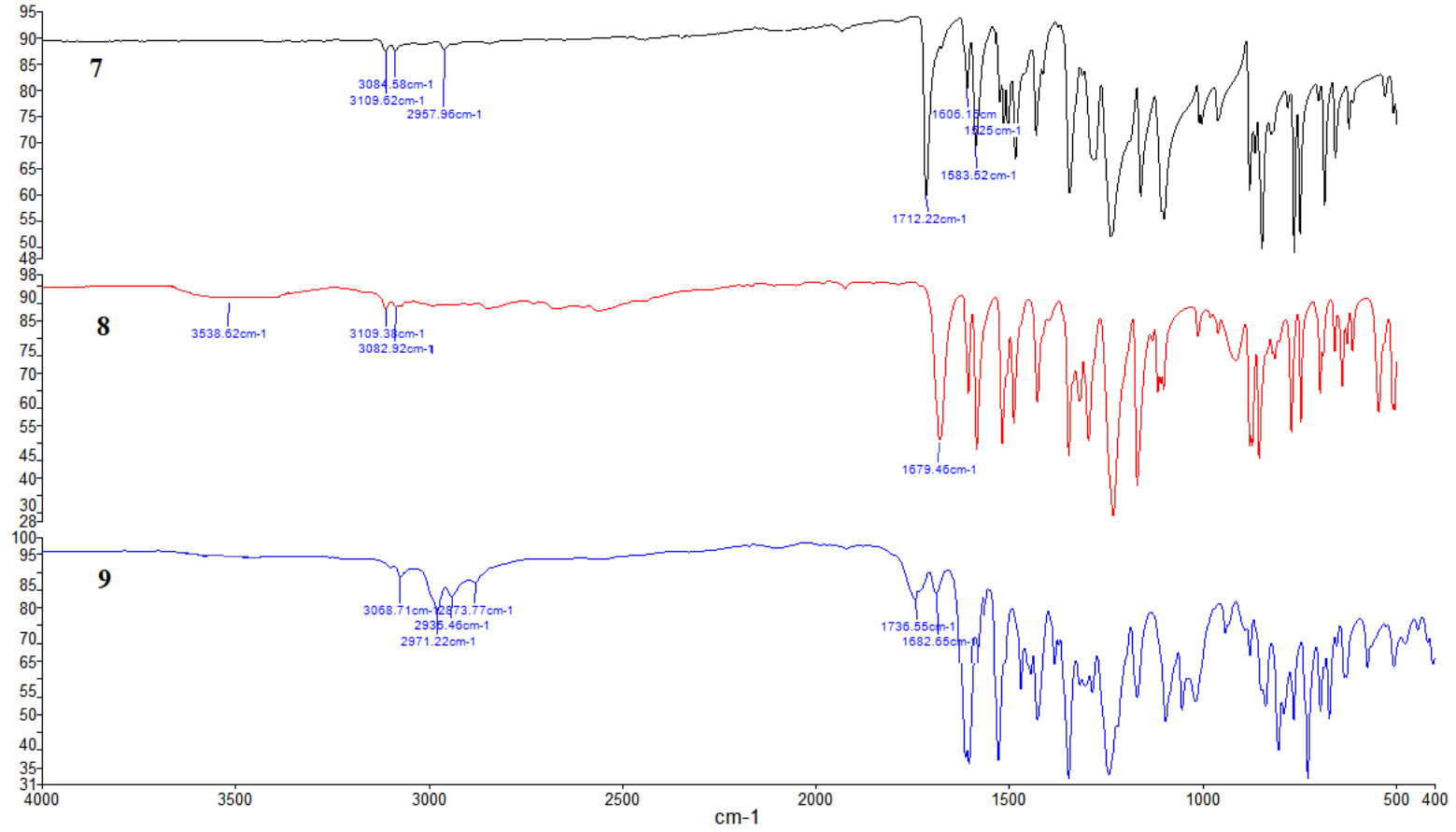




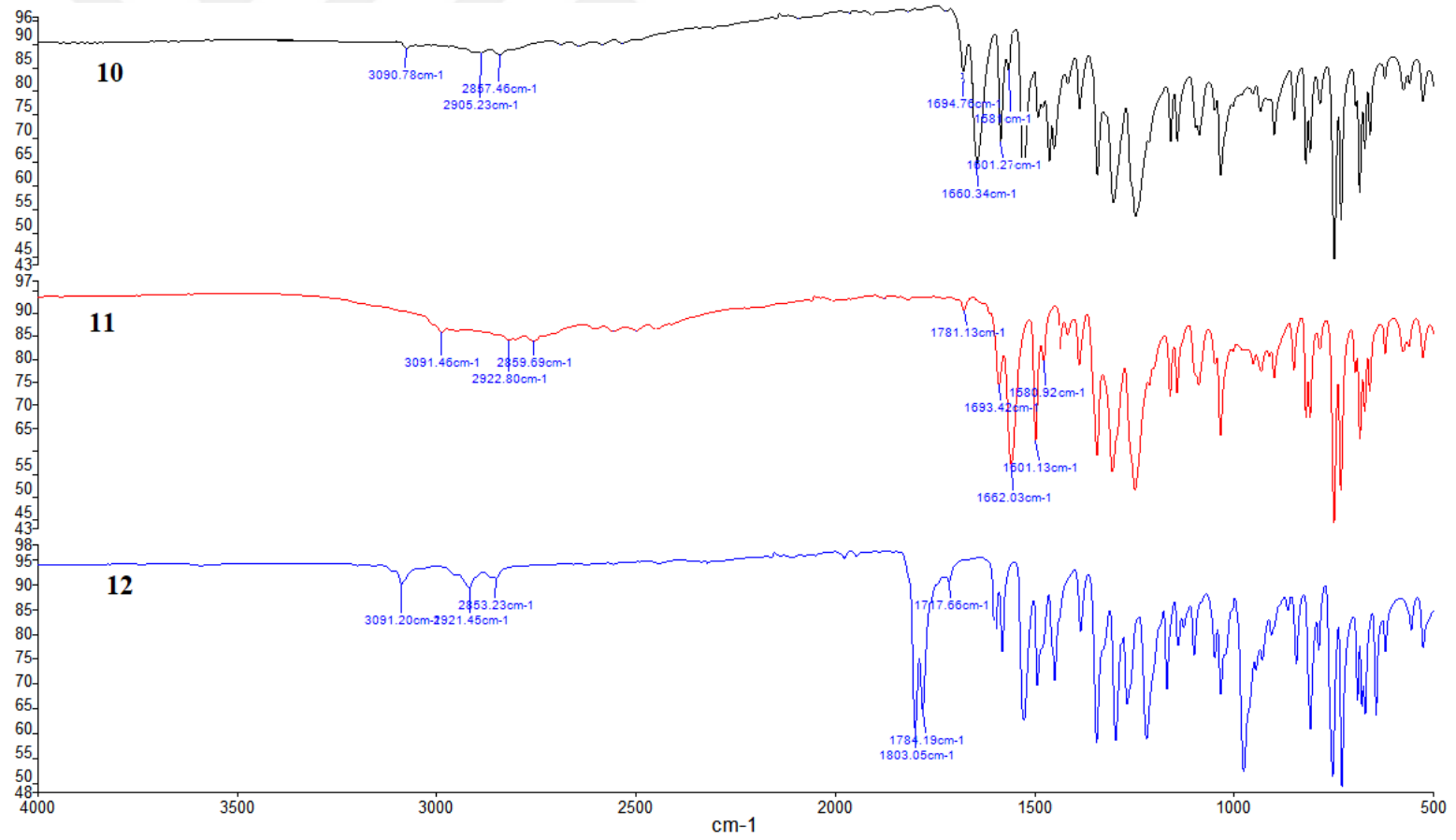
Şekil A.1: 1, 2 ve 3 bileşiklerine ait FT-IR spektrumu.



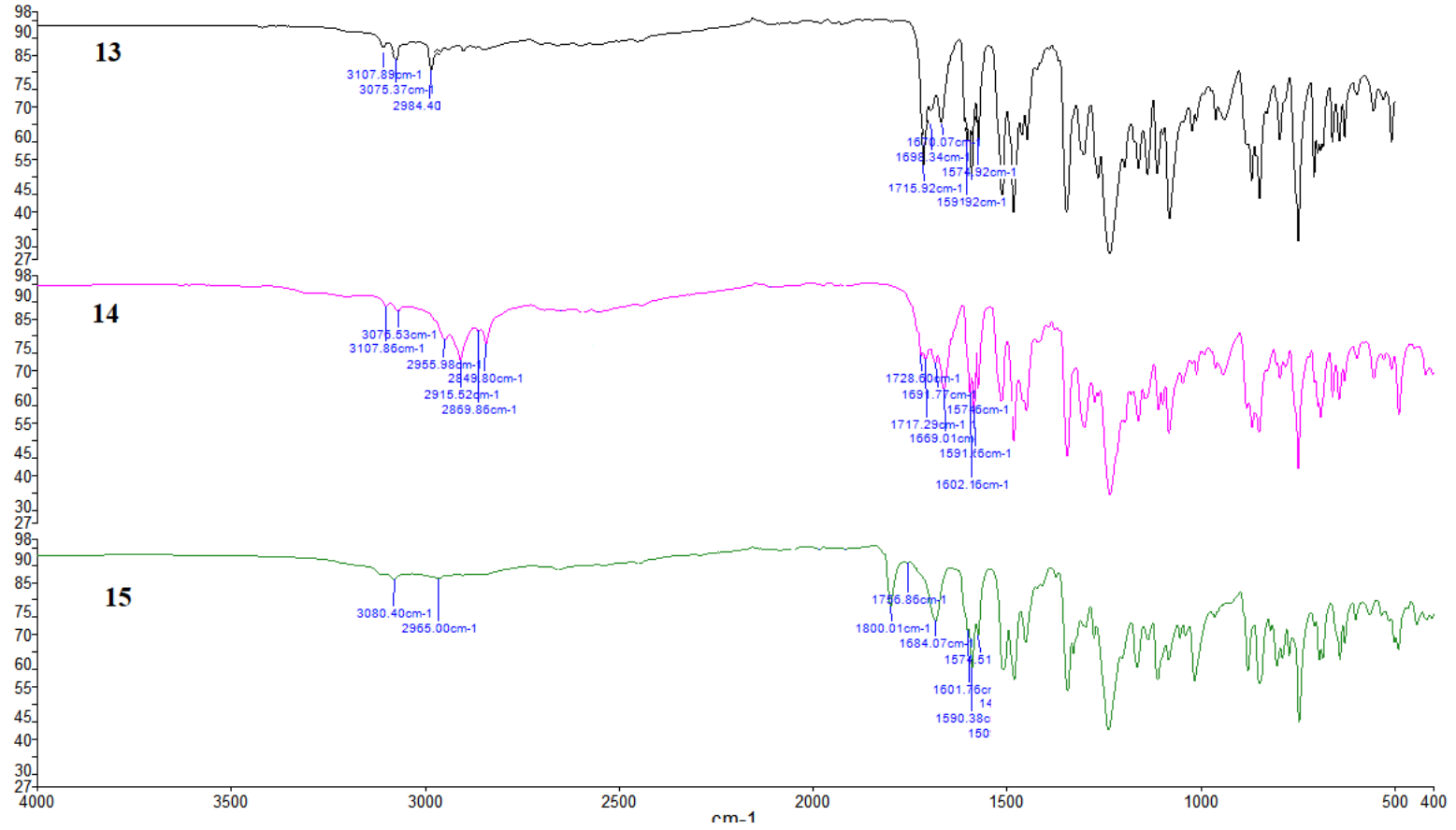
Şekil A.2: 4, 5 ve 6 bileşiklerine ait FT-IR spektrumu.



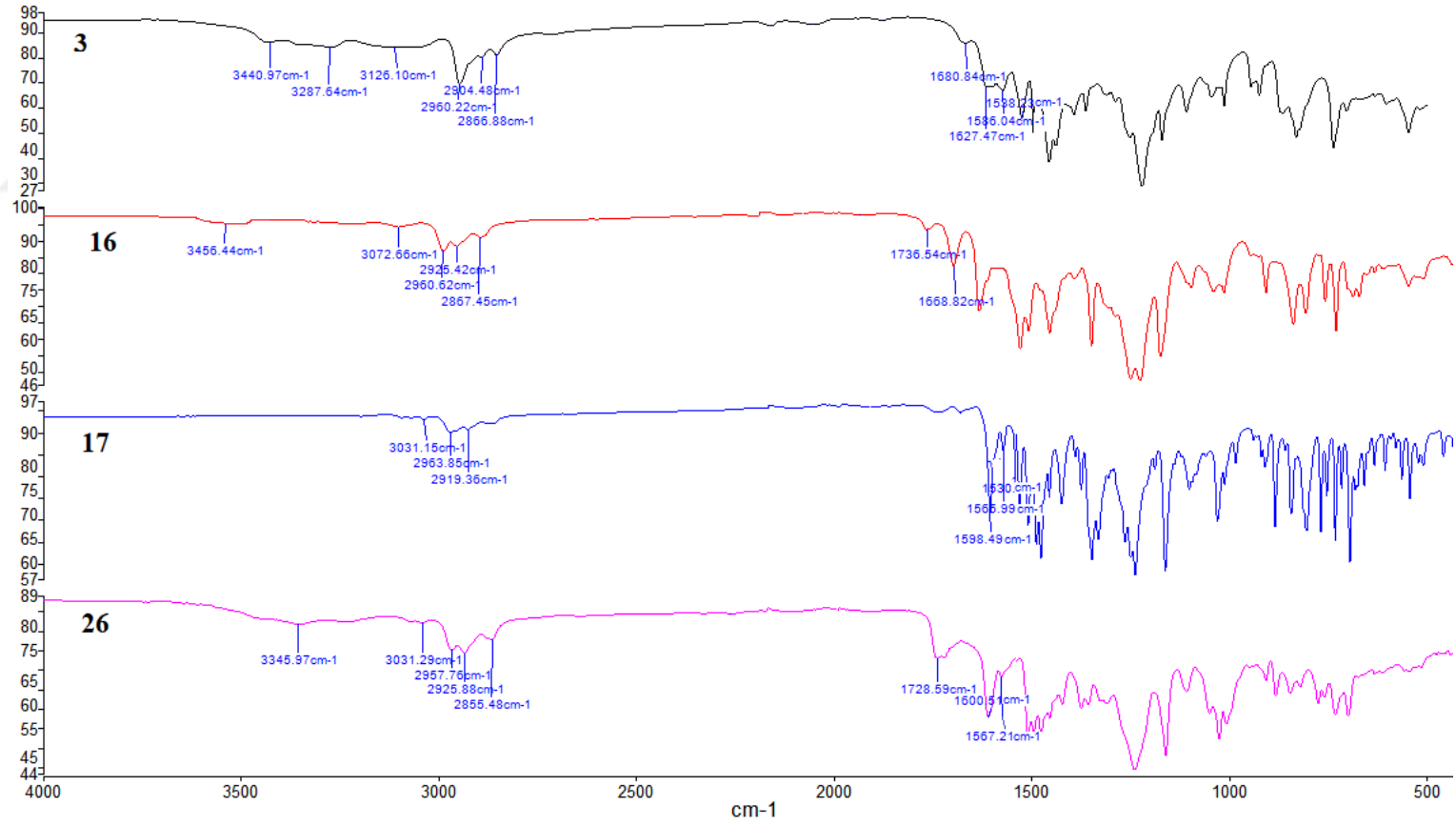
Şekil A.3: 7, 8 ve 9 bileşiklerine ait FT-IR spektrumu.



Şekil A.4: 10, 11 ve 12 bileşiklerine ait FT-IR spektrumu.



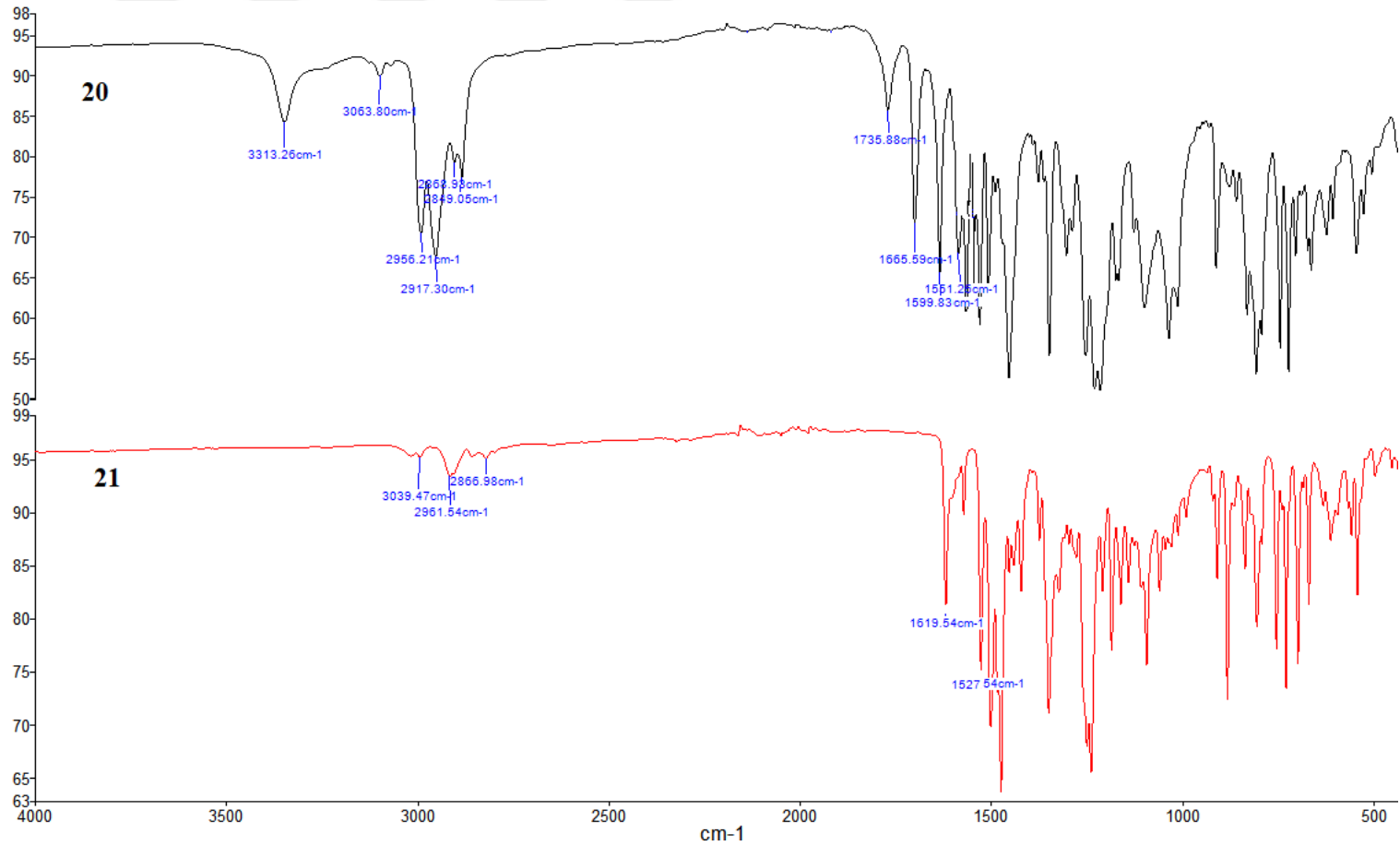
Şekil A.5: 13, 14 ve 15 bileşiklerine ait FT-IR spektrumu.



Şekil A.6: 3, 16, 17 ve 26 bileşiklerine ait FT-IR spektrumu.



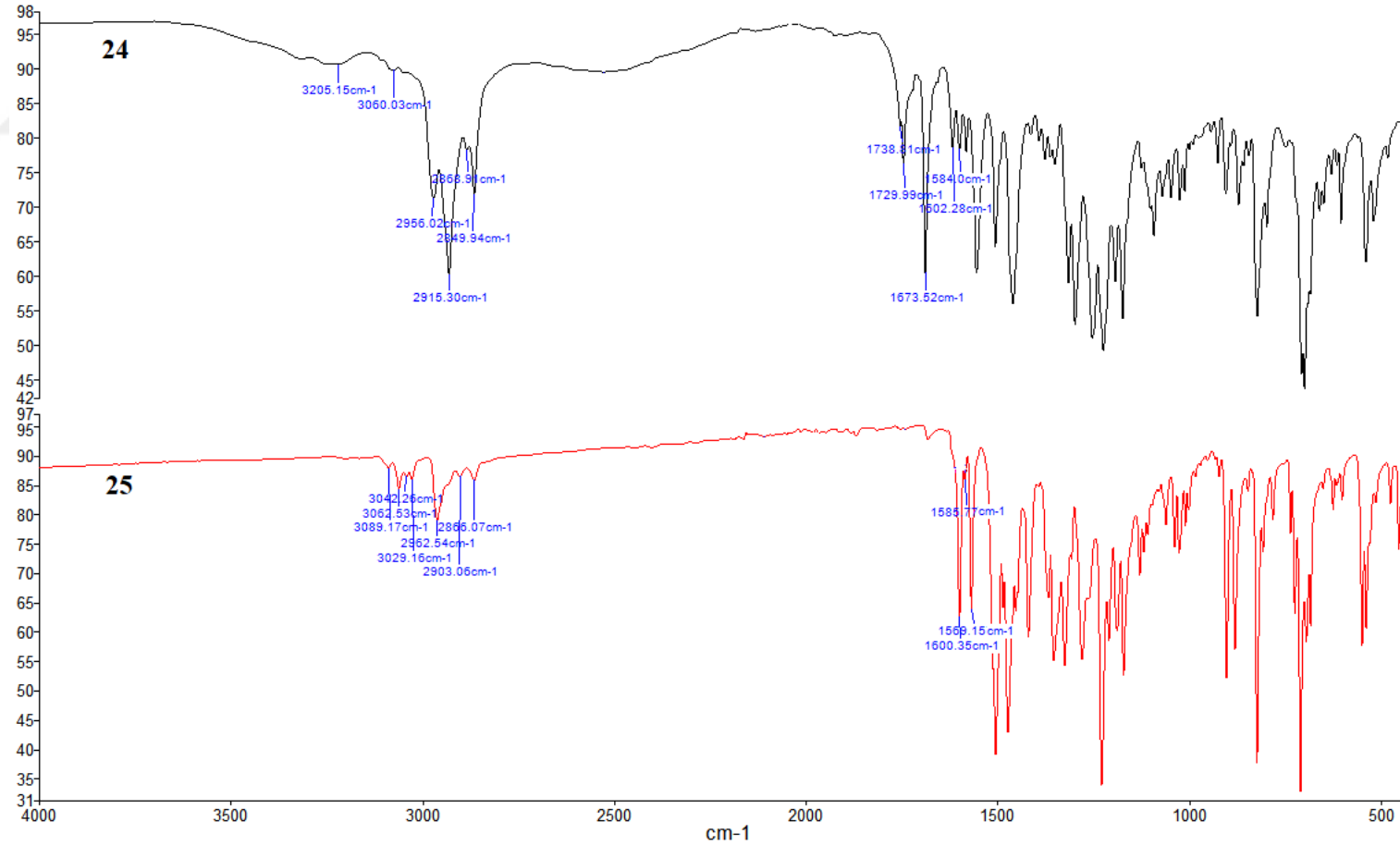
Şekil A.7: 3, 18, 19 ve 27 bileşiklerine ait FT-IR spektrumu.



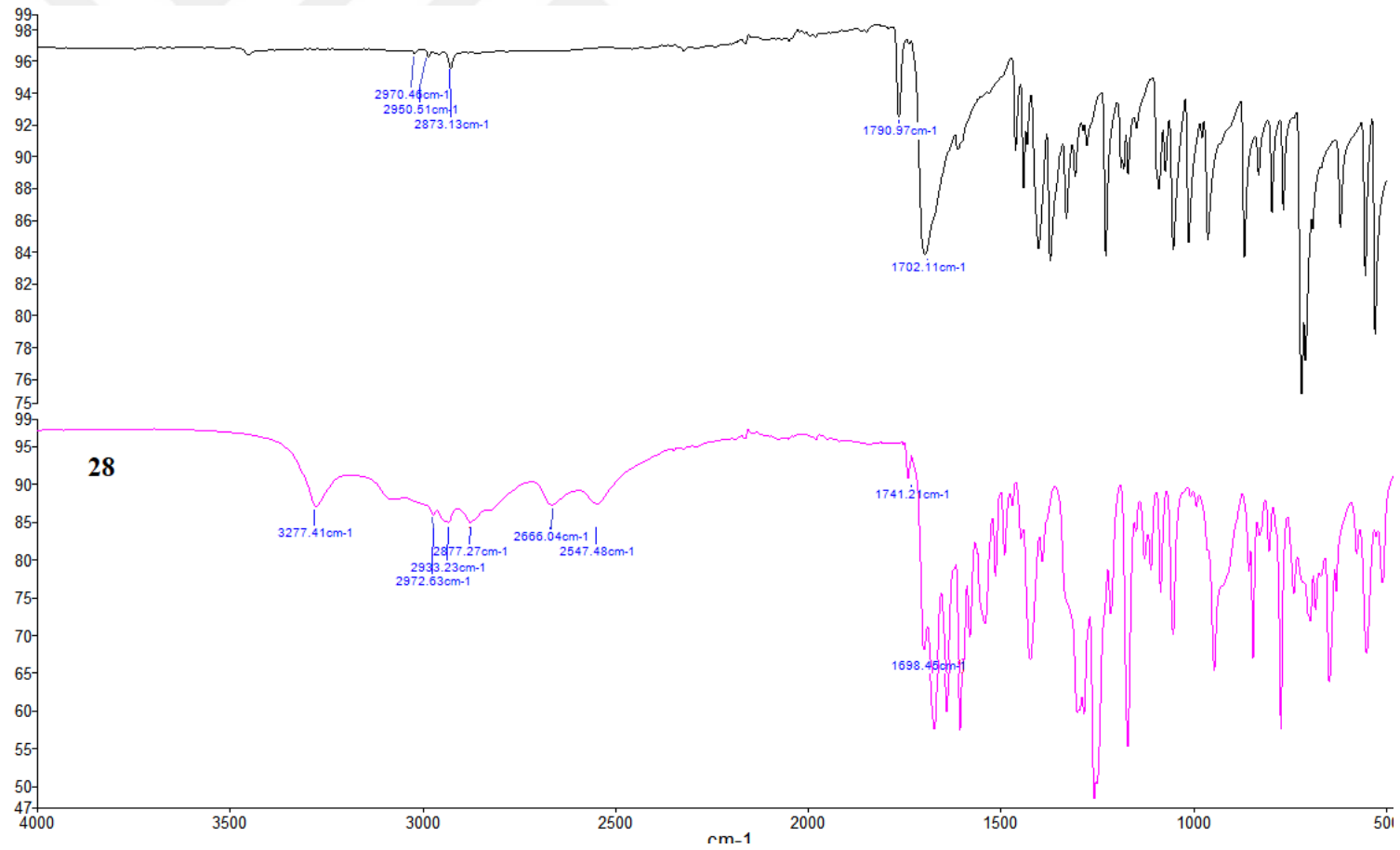
Şekil A.8: 20 ve 21 bileşiklerine ait FT-IR spektrumu.



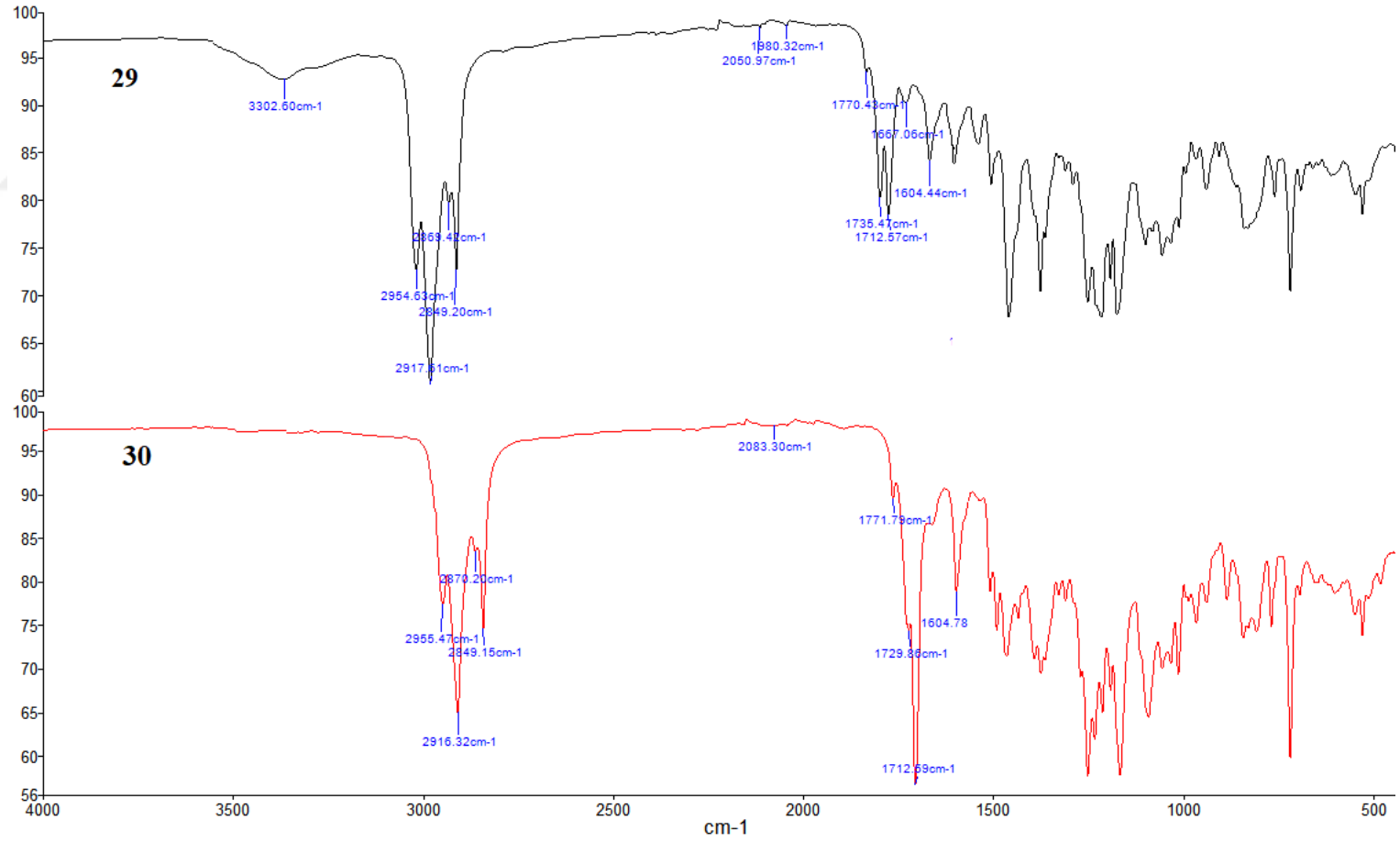
Şekil A.9: 22 ve 23 bileşiklerine ait FT-IR spektrumu.



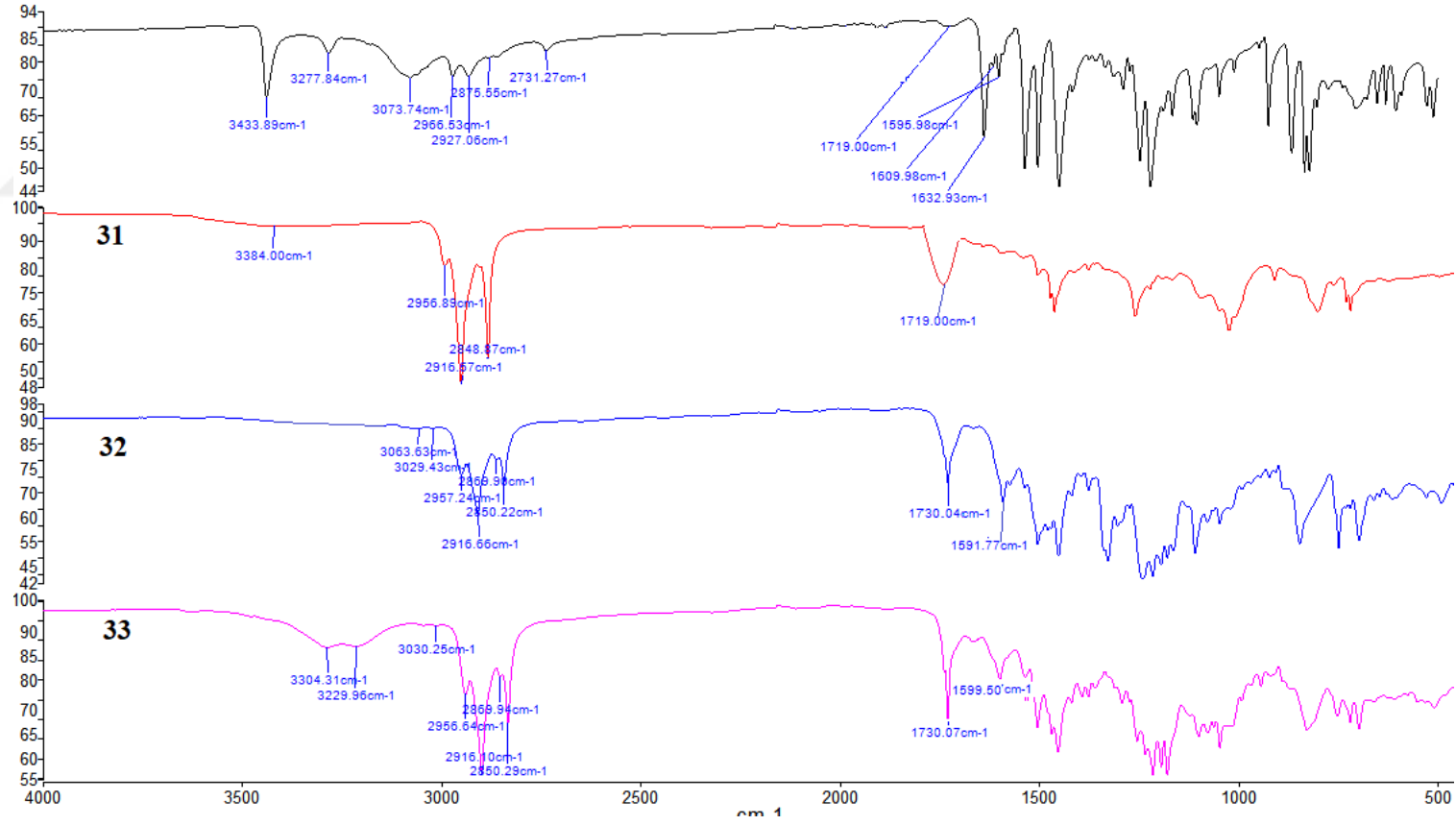
Şekil A.10: 24 ve 25 bileşiklerine ait FT-IR spektrumu.



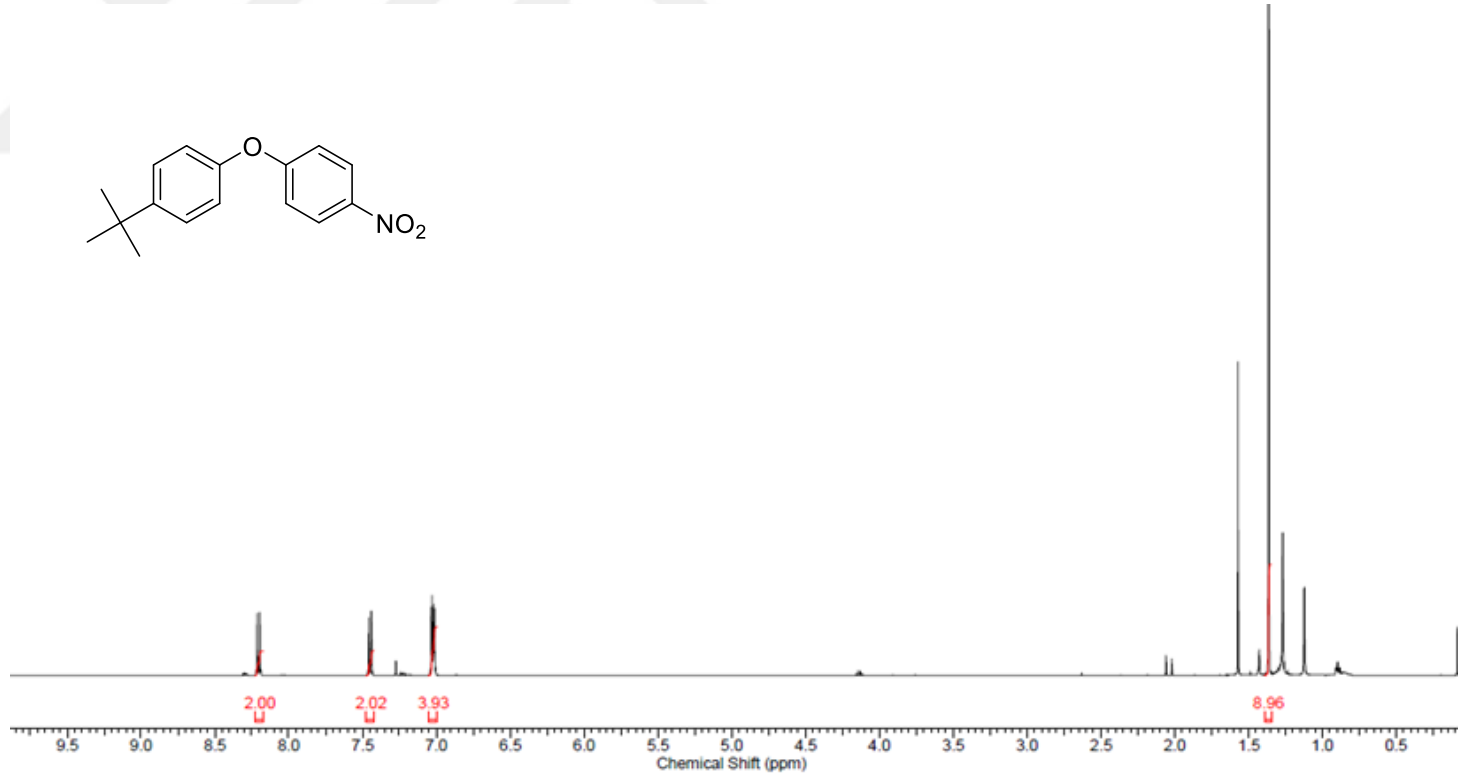
Şekil A.11: 2-(3-(4-(hidroksimetil)fenoksi)propil)isoindolin-1,3-dion ve 28 bileşiklerine ait FT-IR spektrumu.



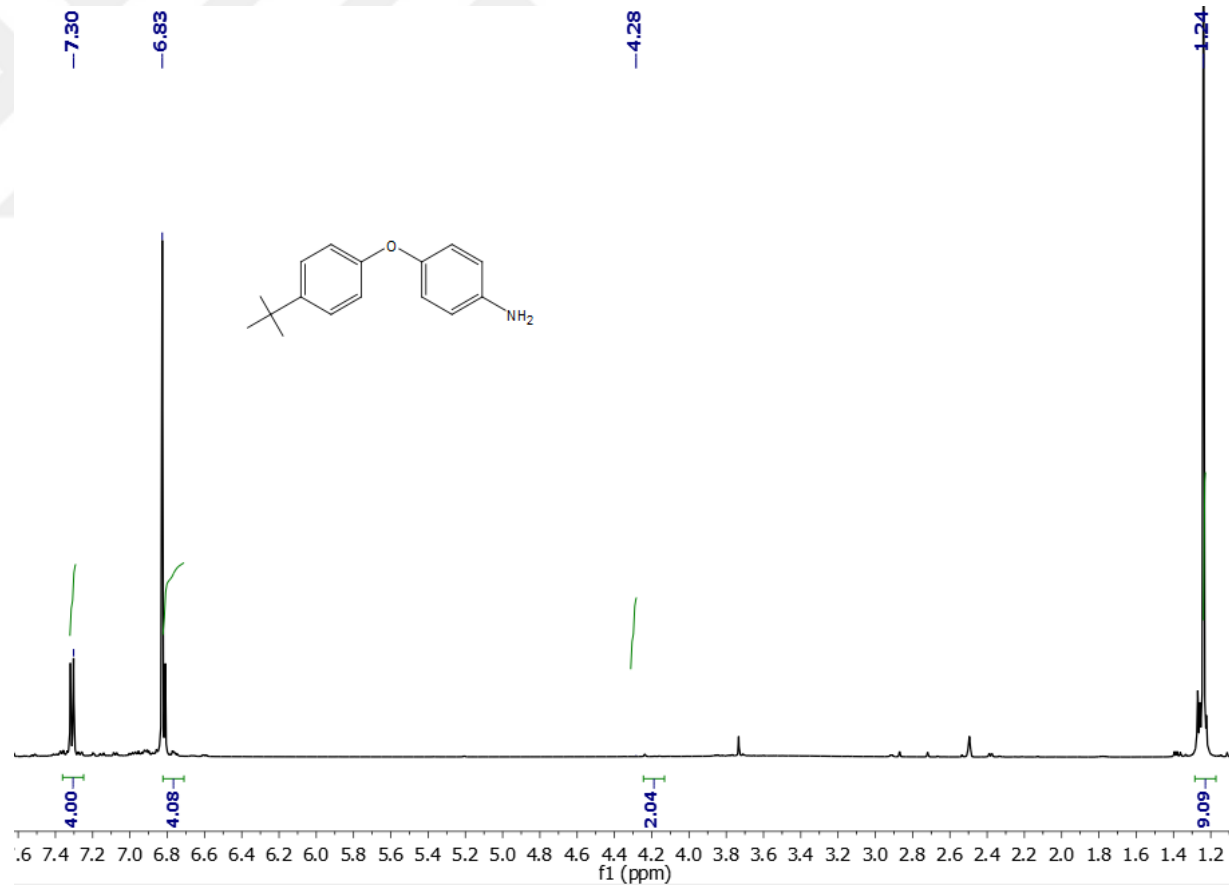
Şekil A.12: 29 ve 30 bileşiklerine ait FT-IR spektrumu.



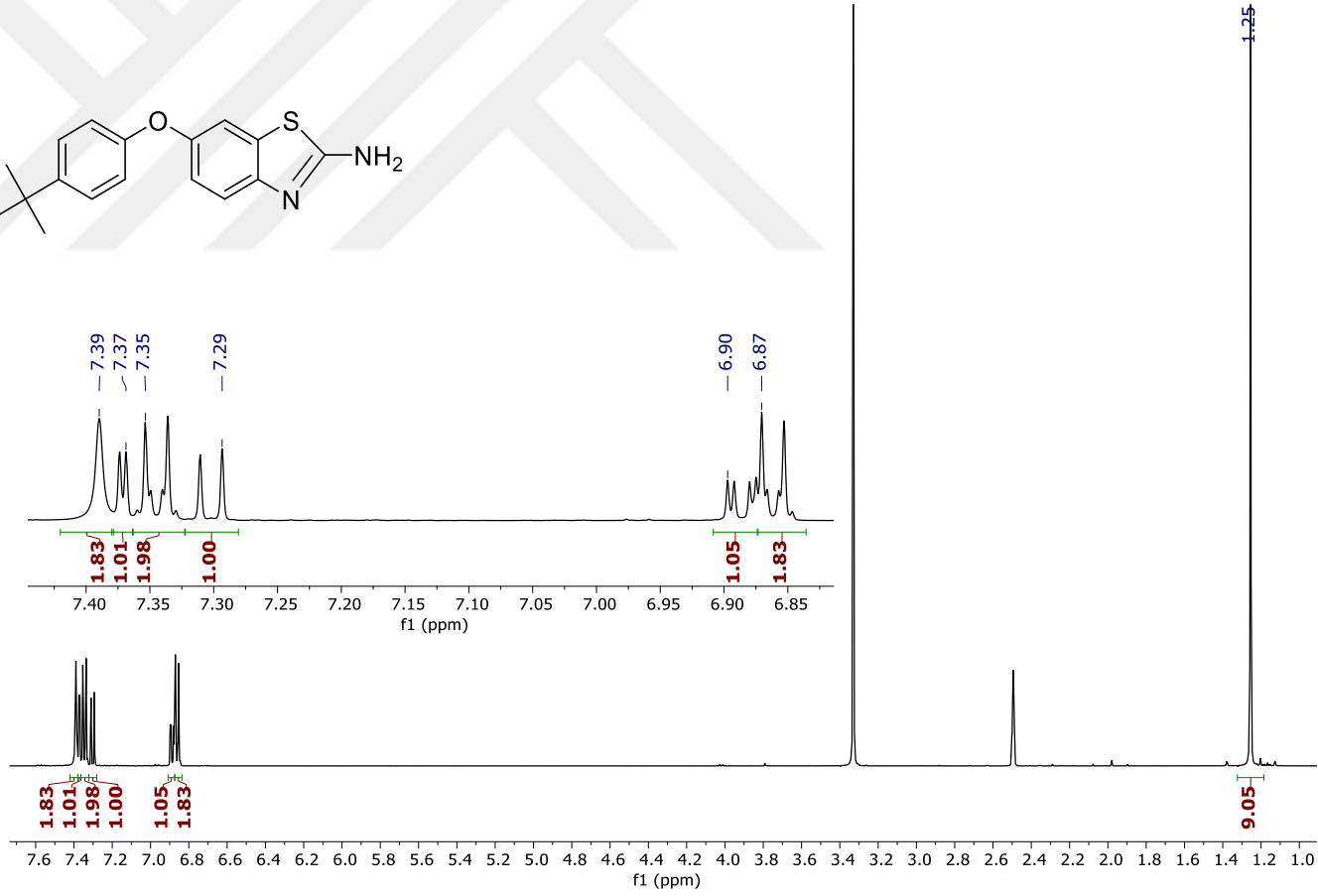
Şekil A.13: 6-(4-etilfenoksi)benzo[*d*]tiyazol-2-amin, 31, 32 ve 33 bileşiklerine ait FT-IR spektrumu.



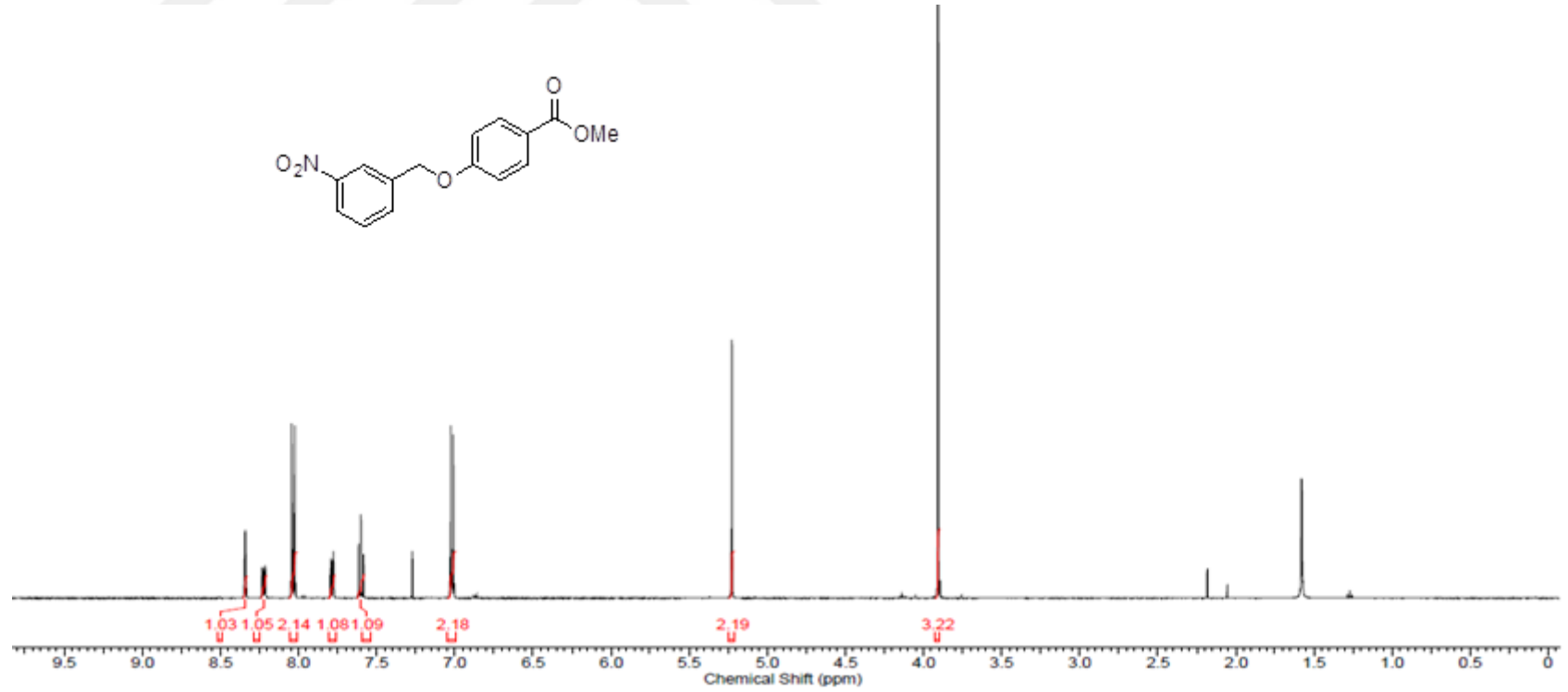
Şekil A.14: 1 bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu.



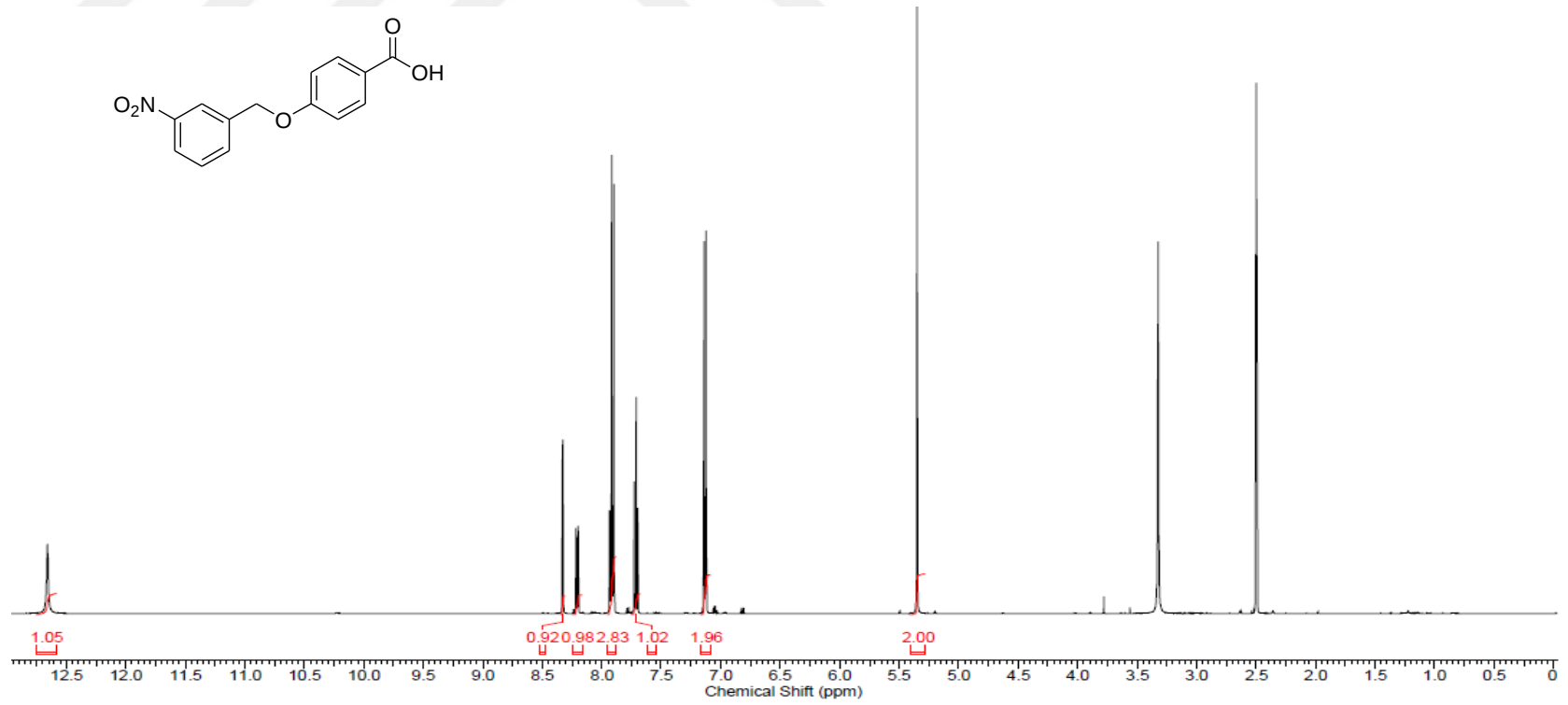
Şekil A.15: 2 bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu.



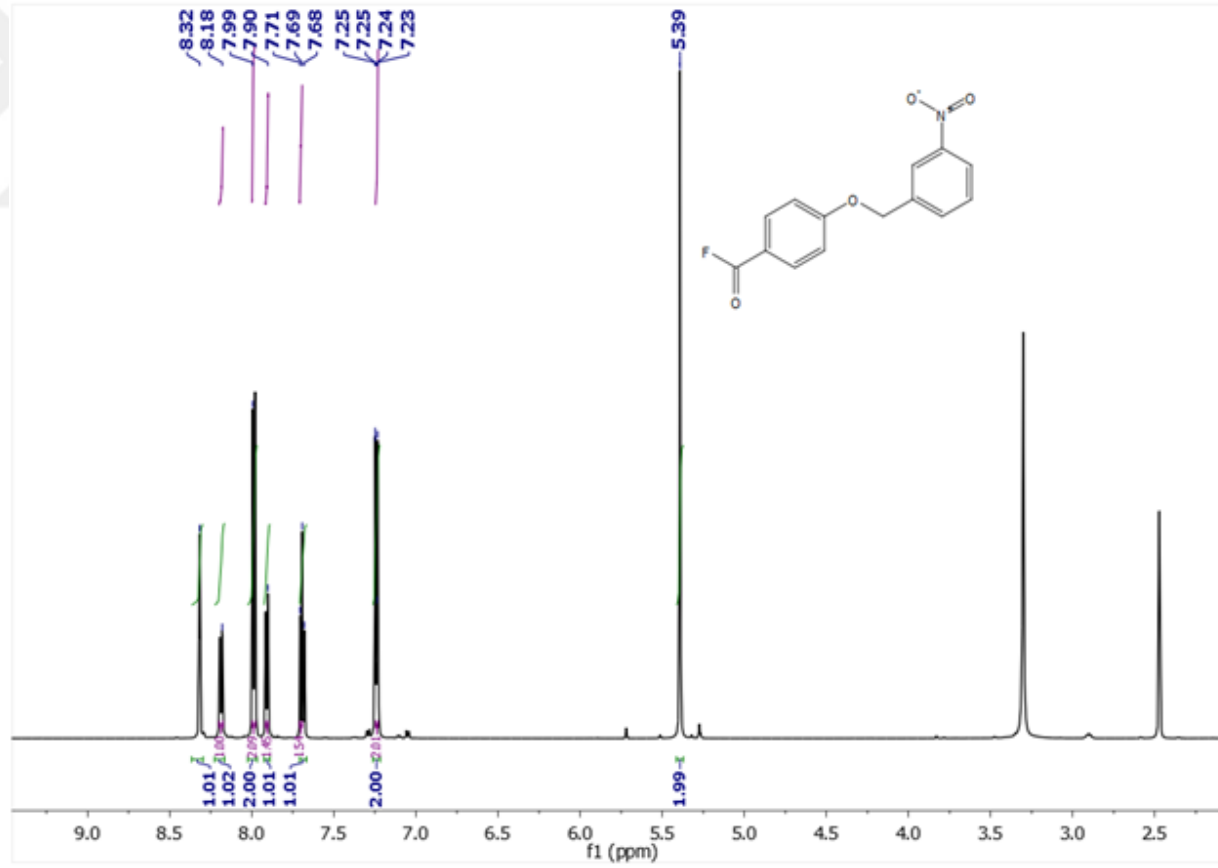
Şekil A.16: 3 Molekülüne ait ¹H-NMR spektrumu.



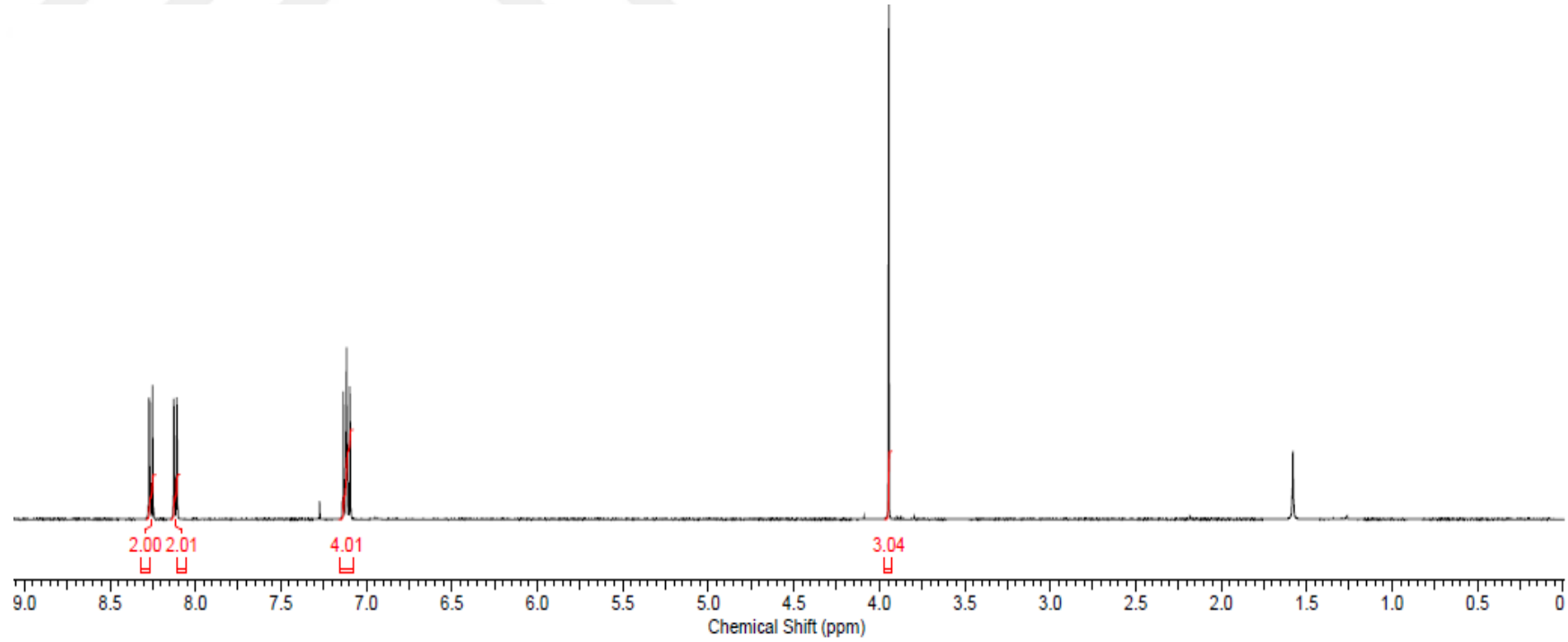
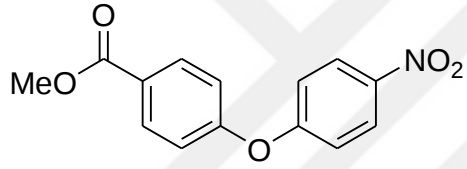
Şekil A.17: 4 bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu.



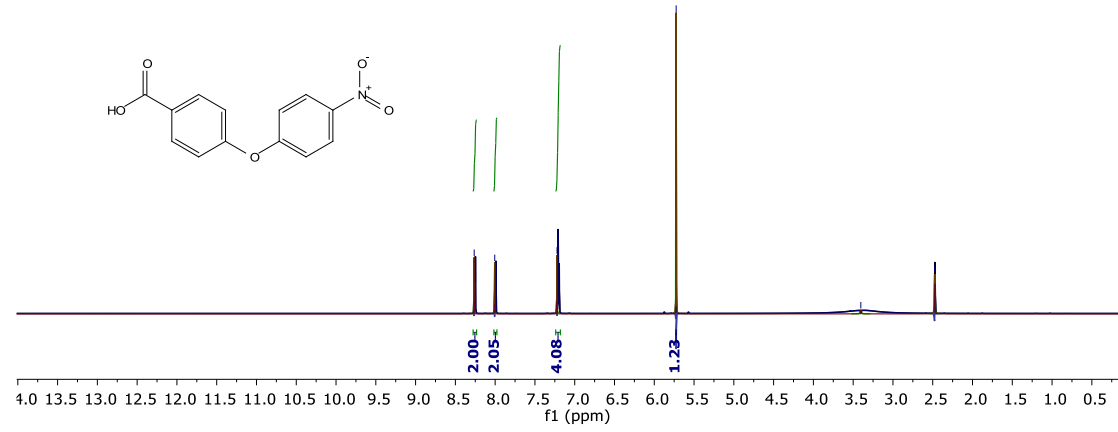
Şekil A.18: 5 bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu.



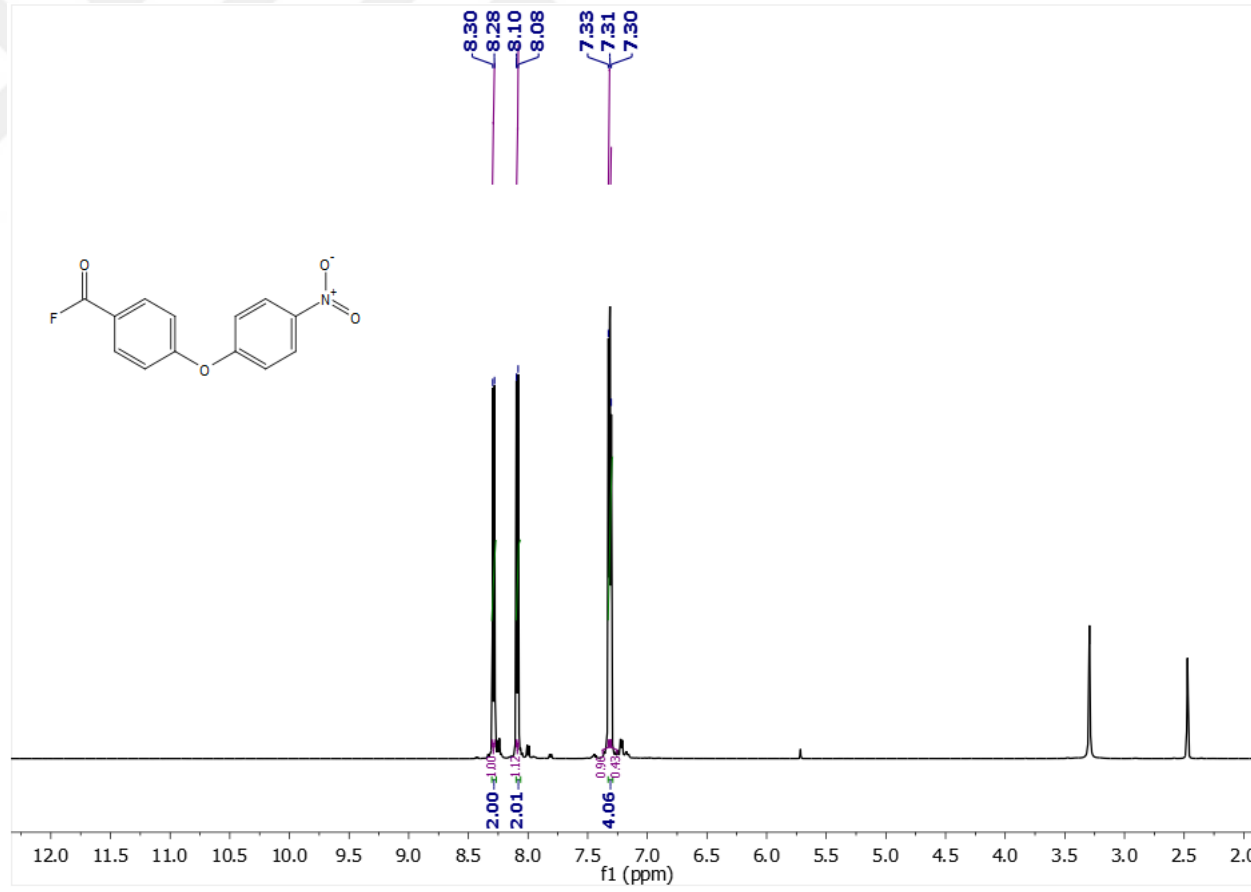
Şekil A.19: 6 bileşiğine ait ^1H -NMR spektrumu.



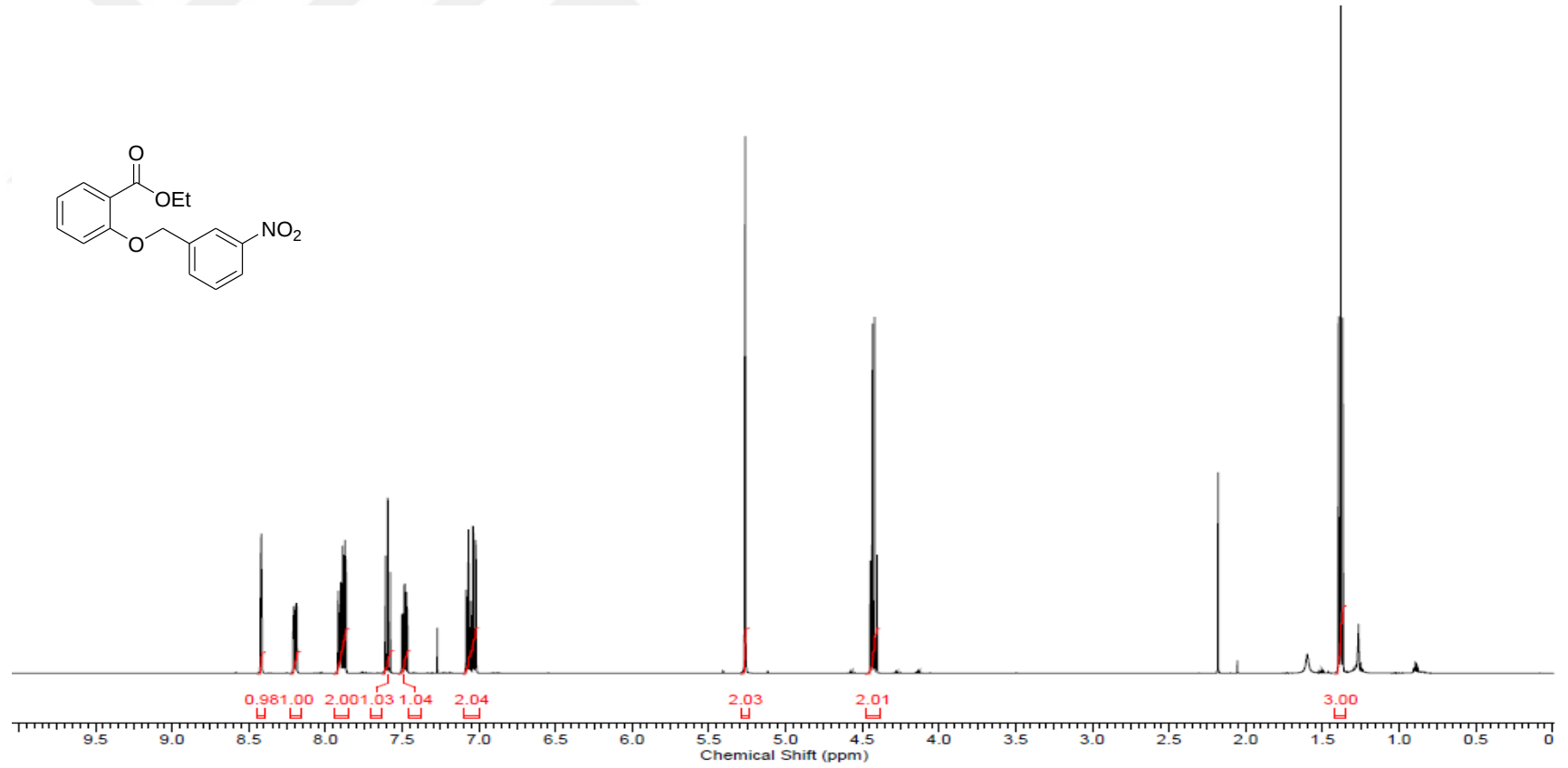
Şekil A.20: 7 bileşiğine ait ^1H -NMR spektrumu.



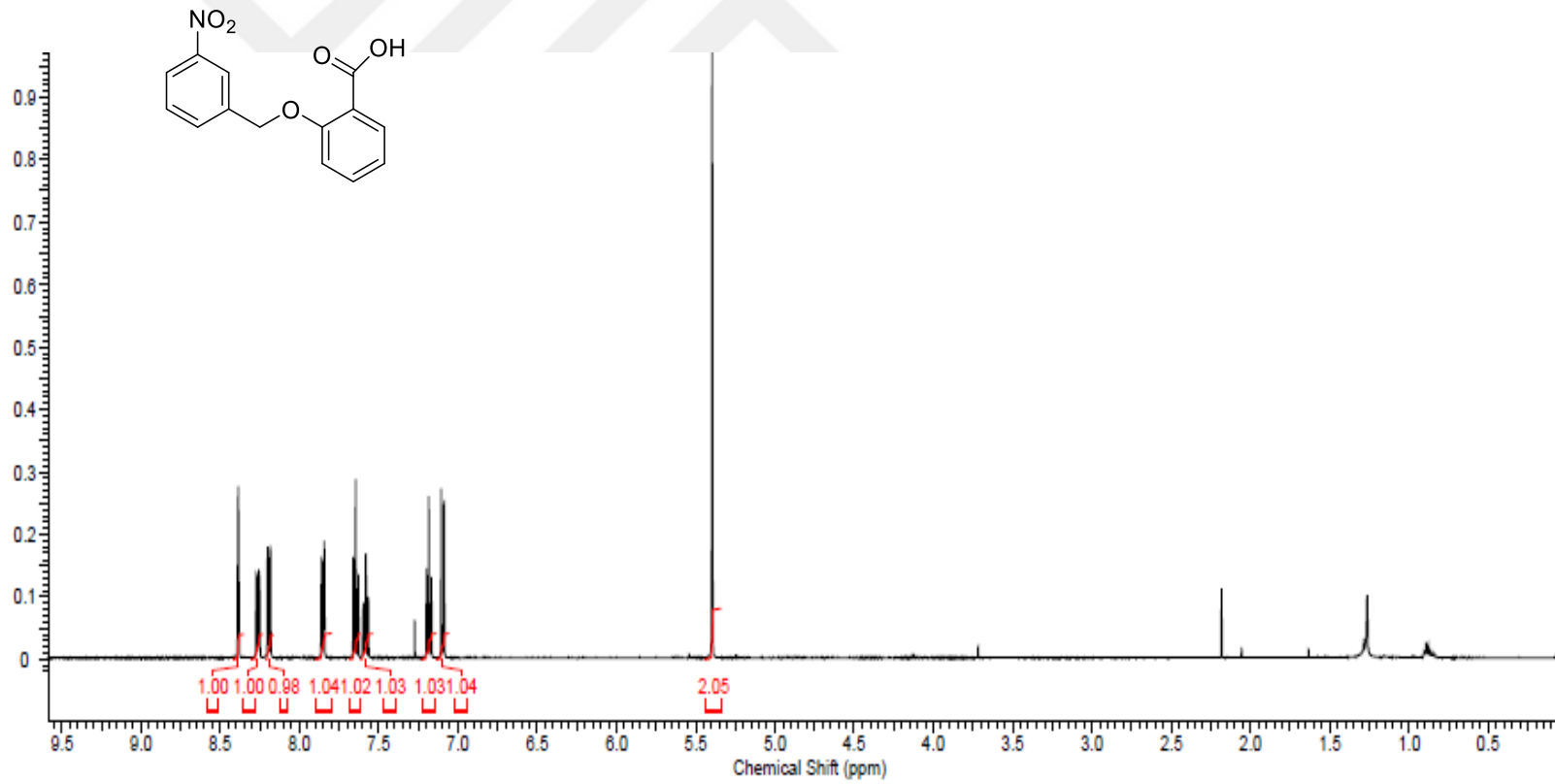
Şekil A.21: 8 bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu.



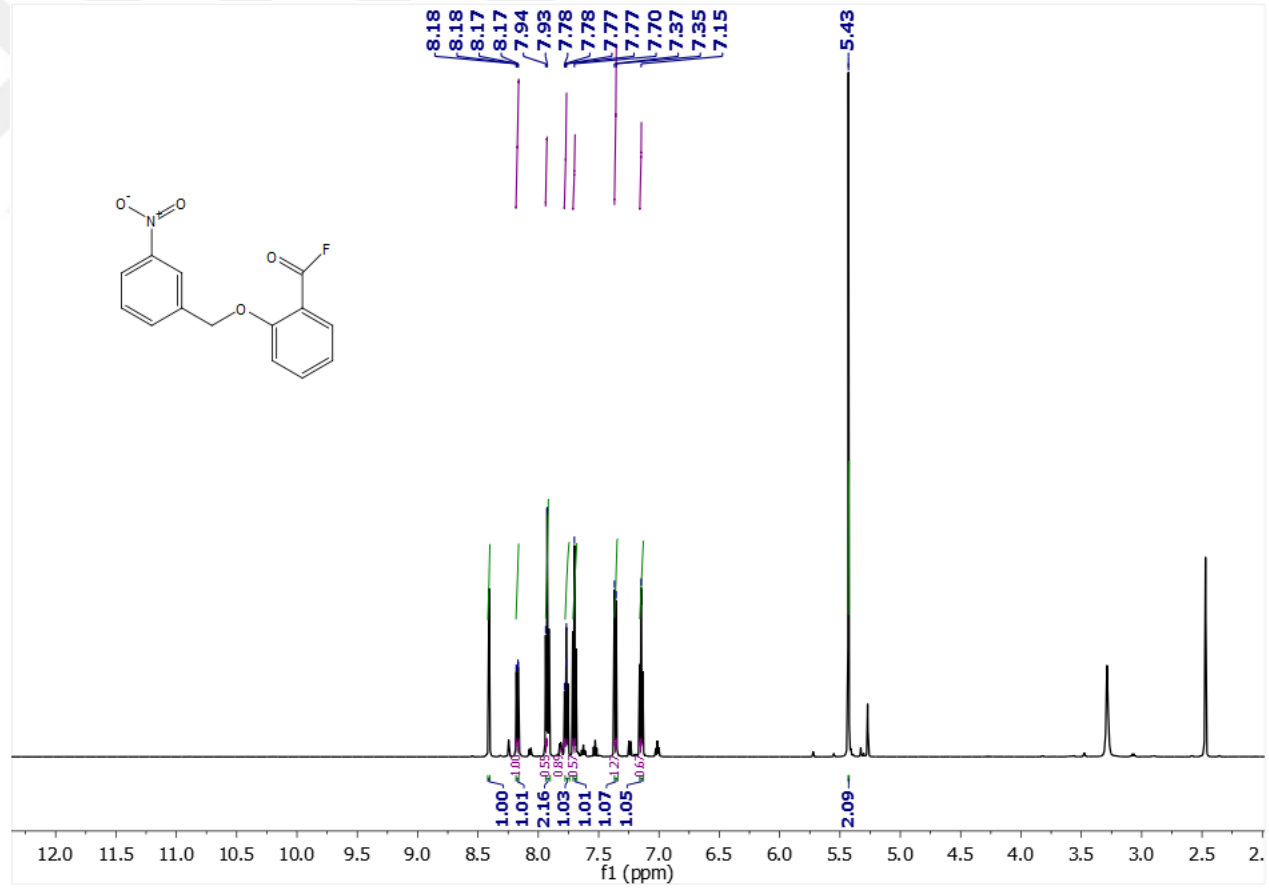
Şekil A.22: 9 bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu.



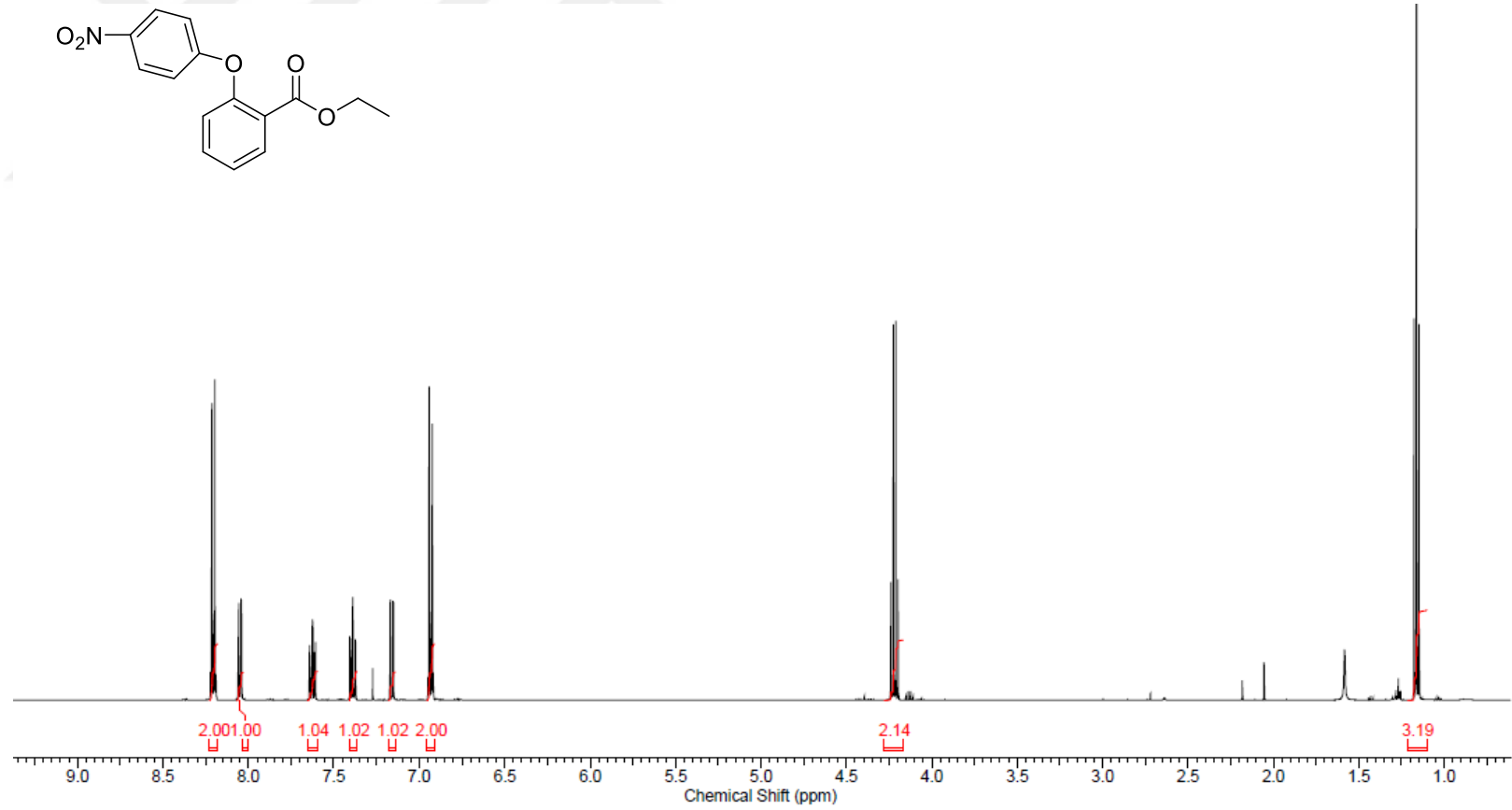
Şekil A.23: 10 bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu.



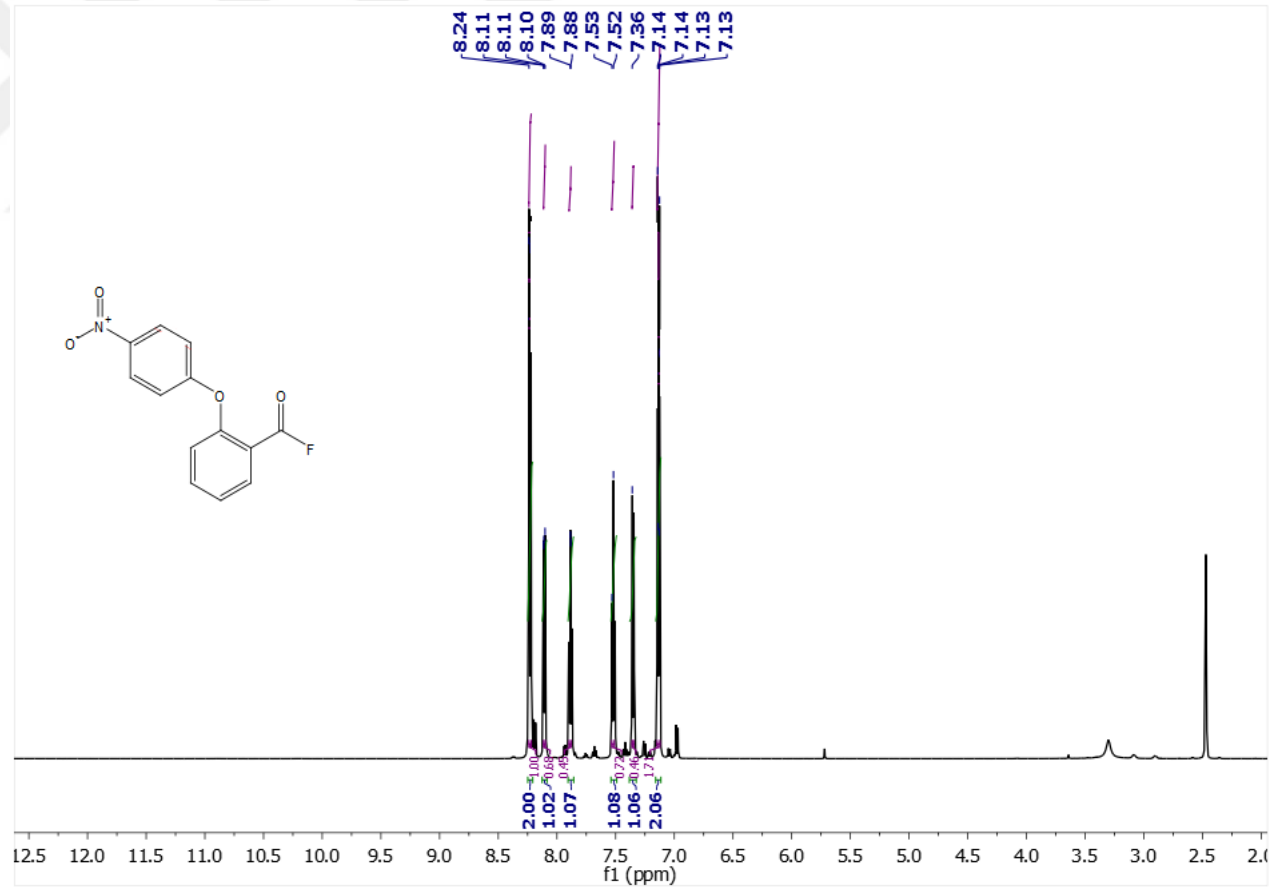
Şekil A.24: 11 bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu.



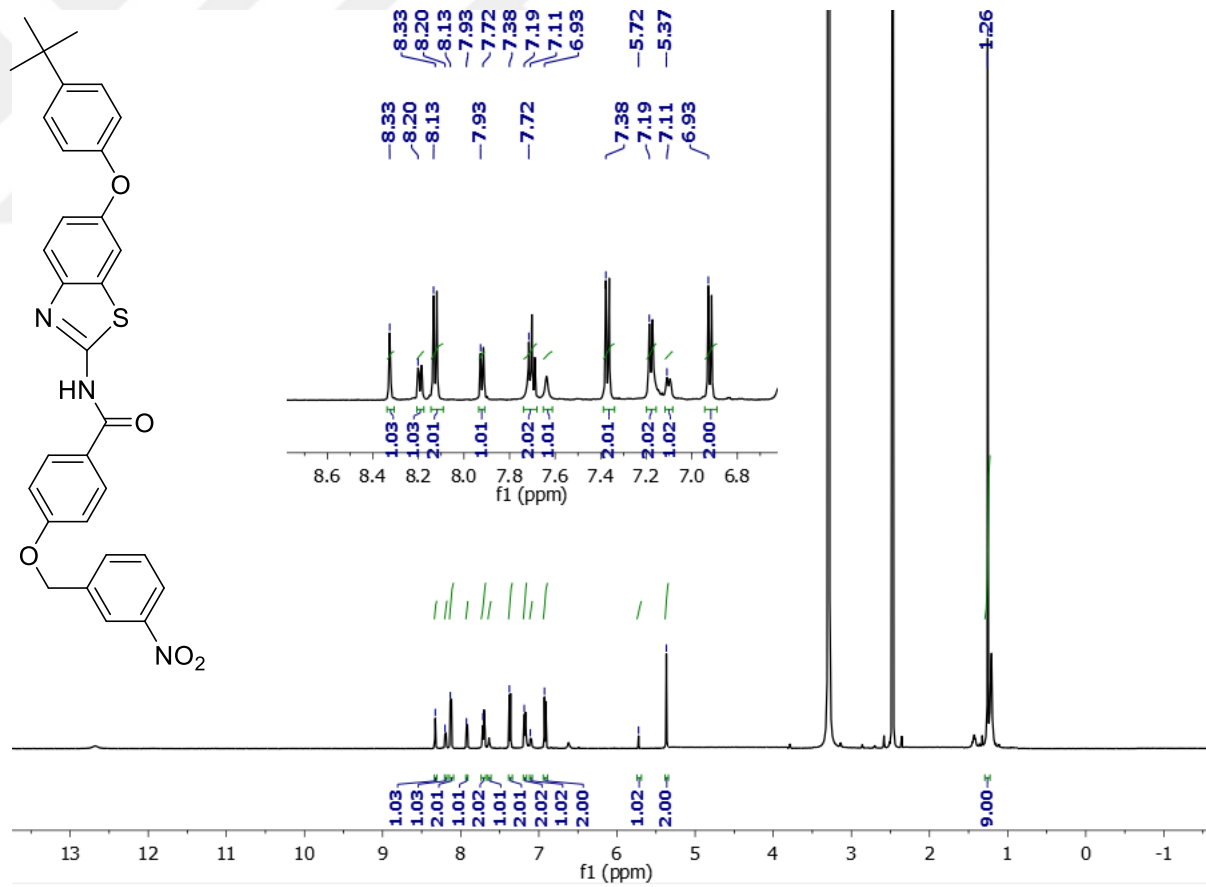
Şekil A.25: 12 bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu.



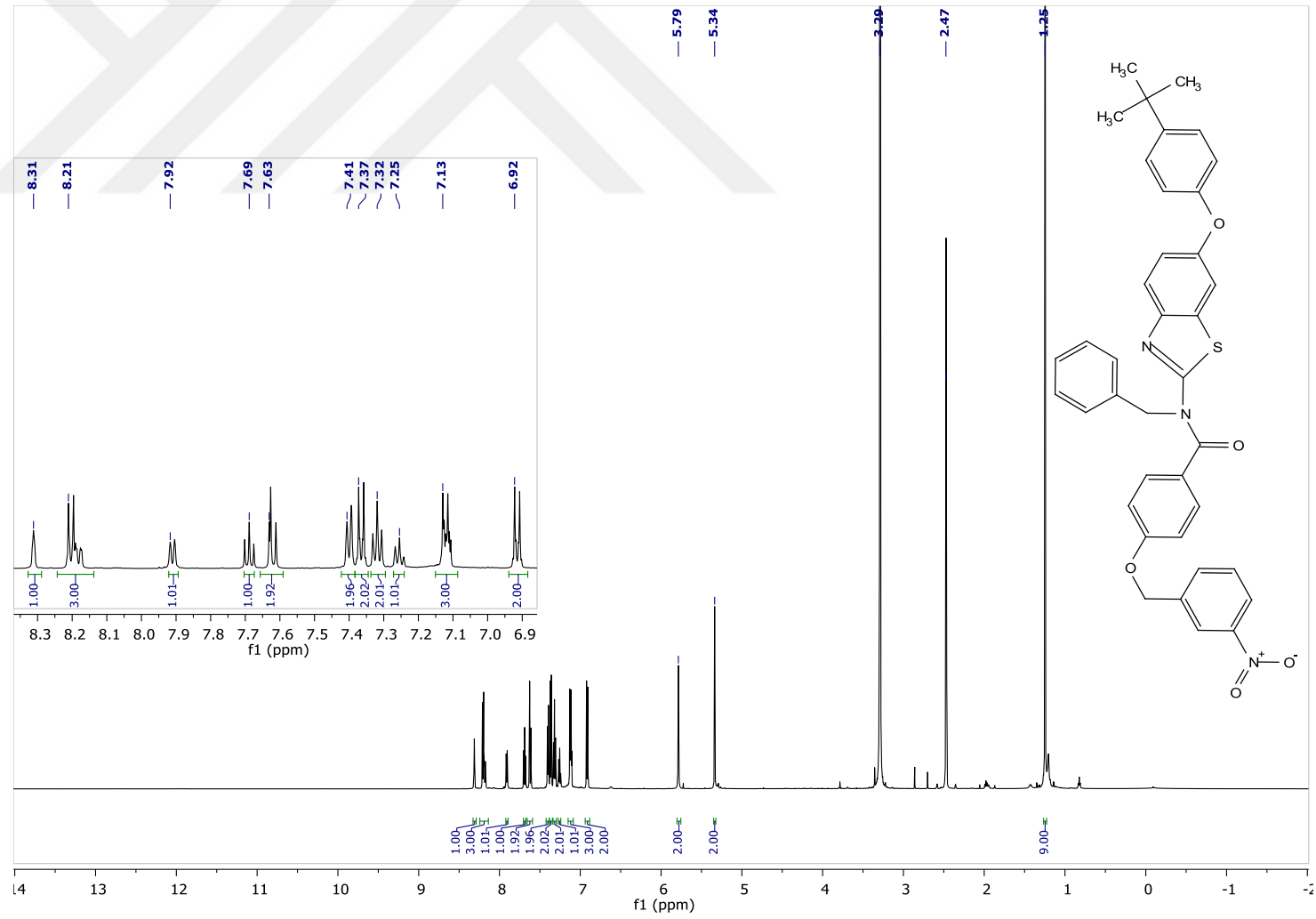
Şekil A.26: 13 bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu.



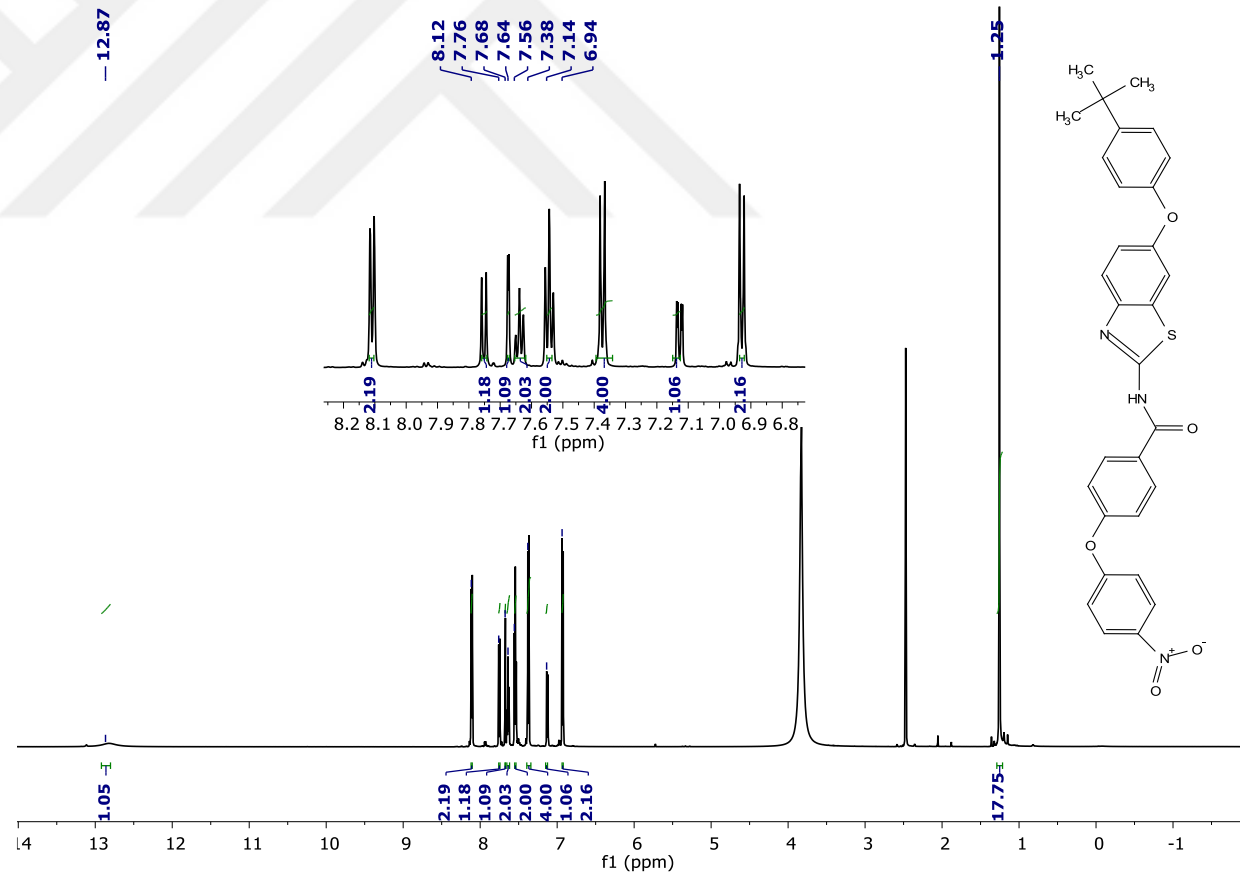
Şekil A.27: 15 bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu.



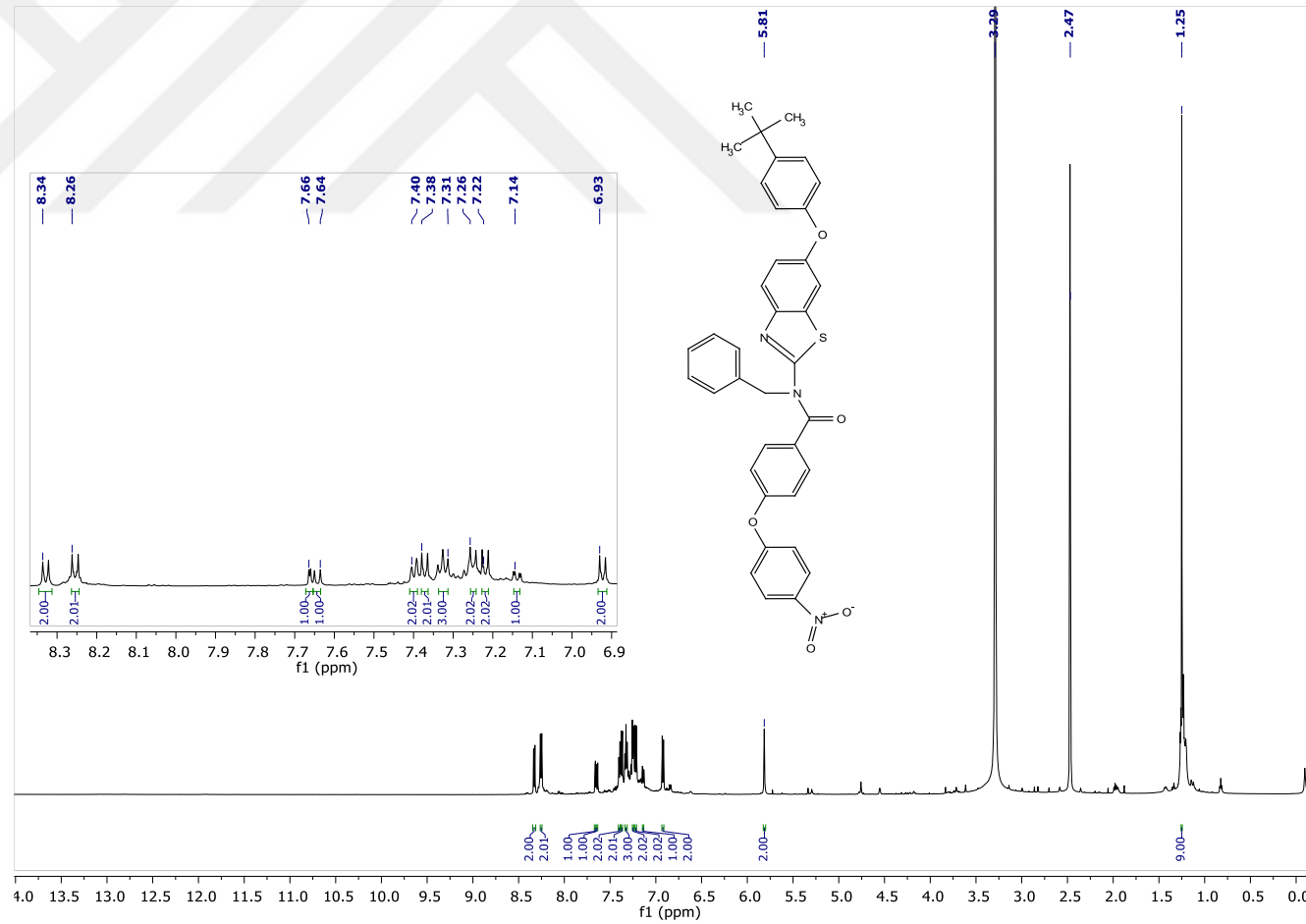
Şekil A.28: 16 bileşiğine ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu.



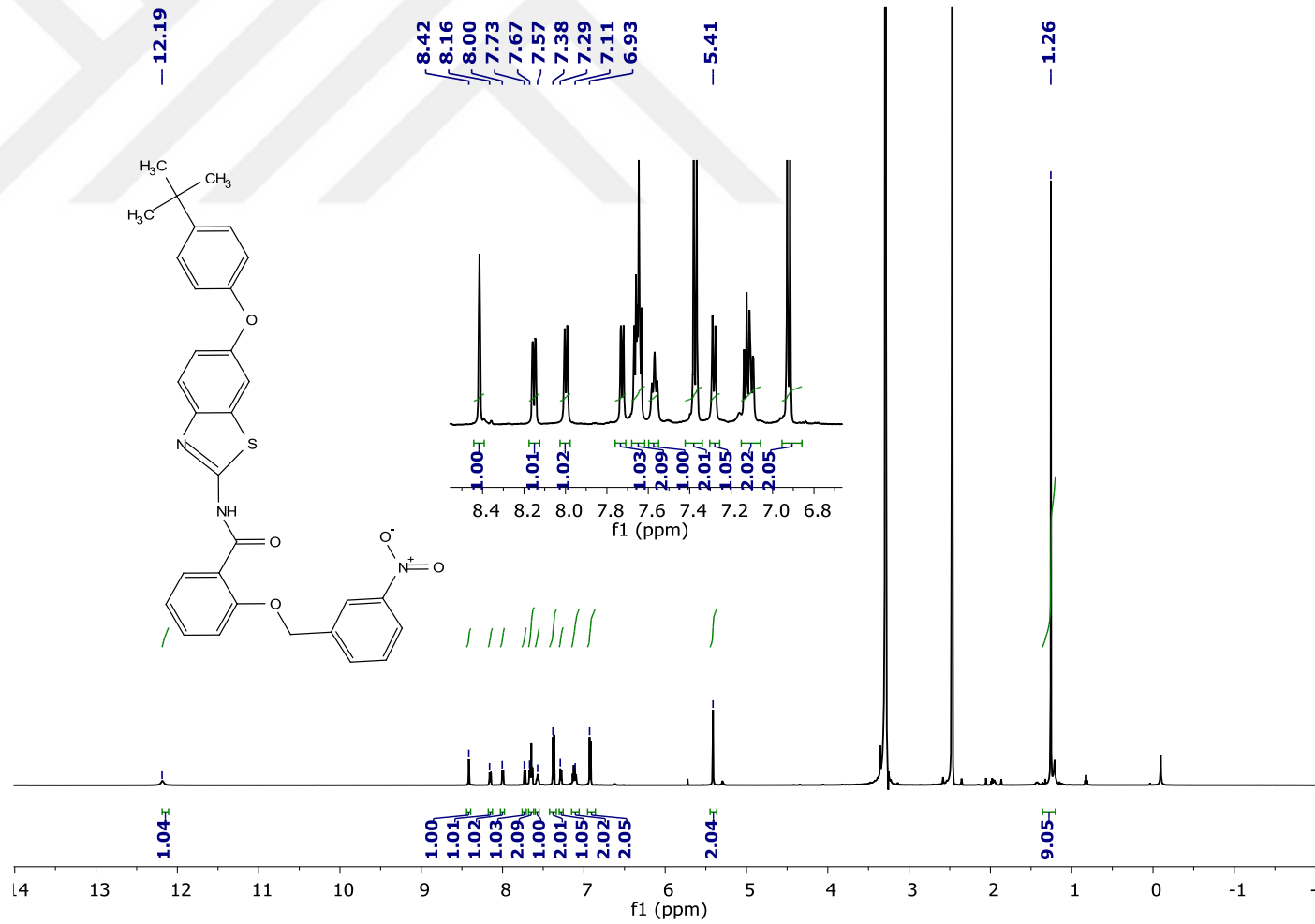
Şekil A.29: 17 bileşiğine ait ^1H -NMR spektrumu.



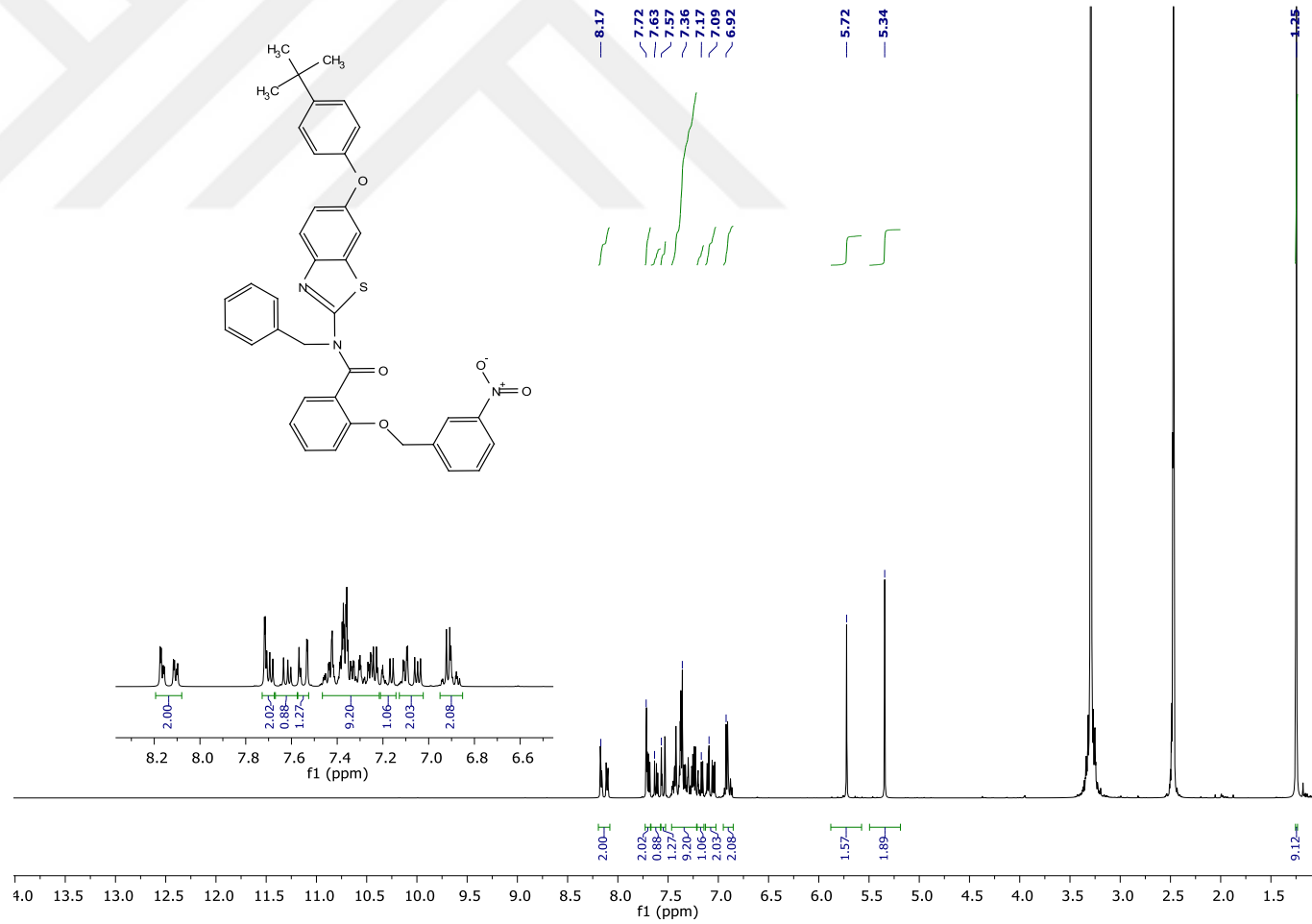
Şekil A.30: 18 bileşiğine ait ^1H -NMR spektrumu.



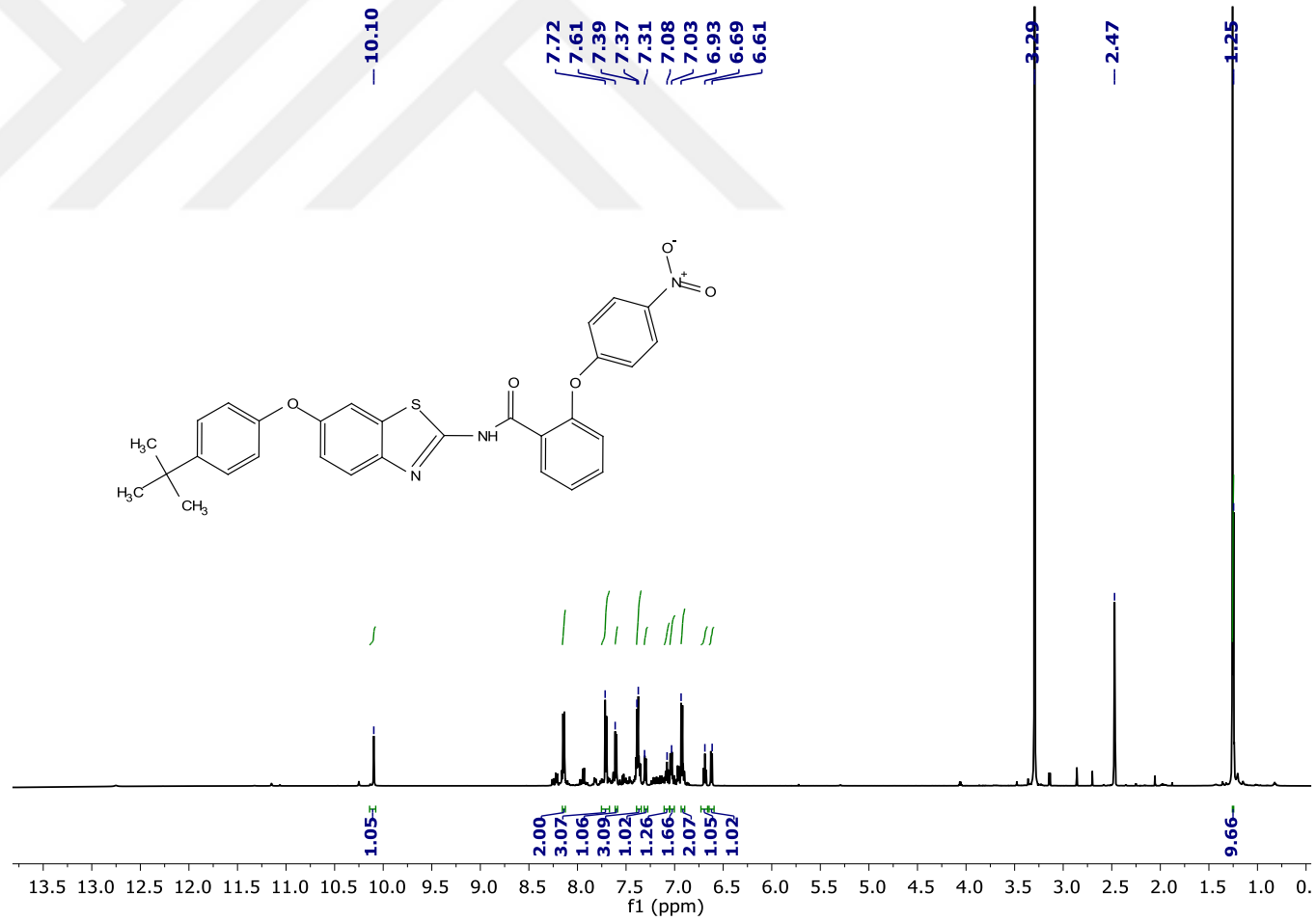
Şekil A.31: 19 bileşiğine ait ^1H -NMR spektrumu.



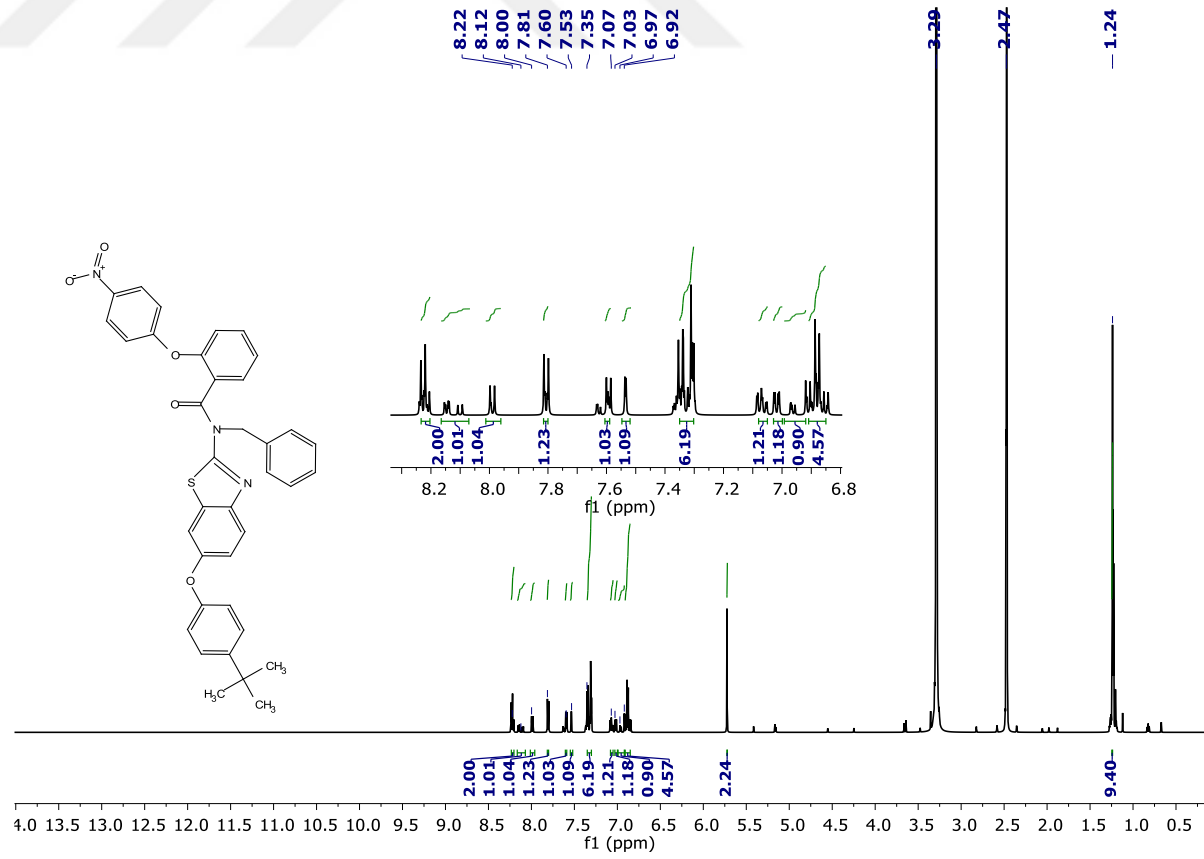
Şekil A.32: 20 bileşiğine ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu.



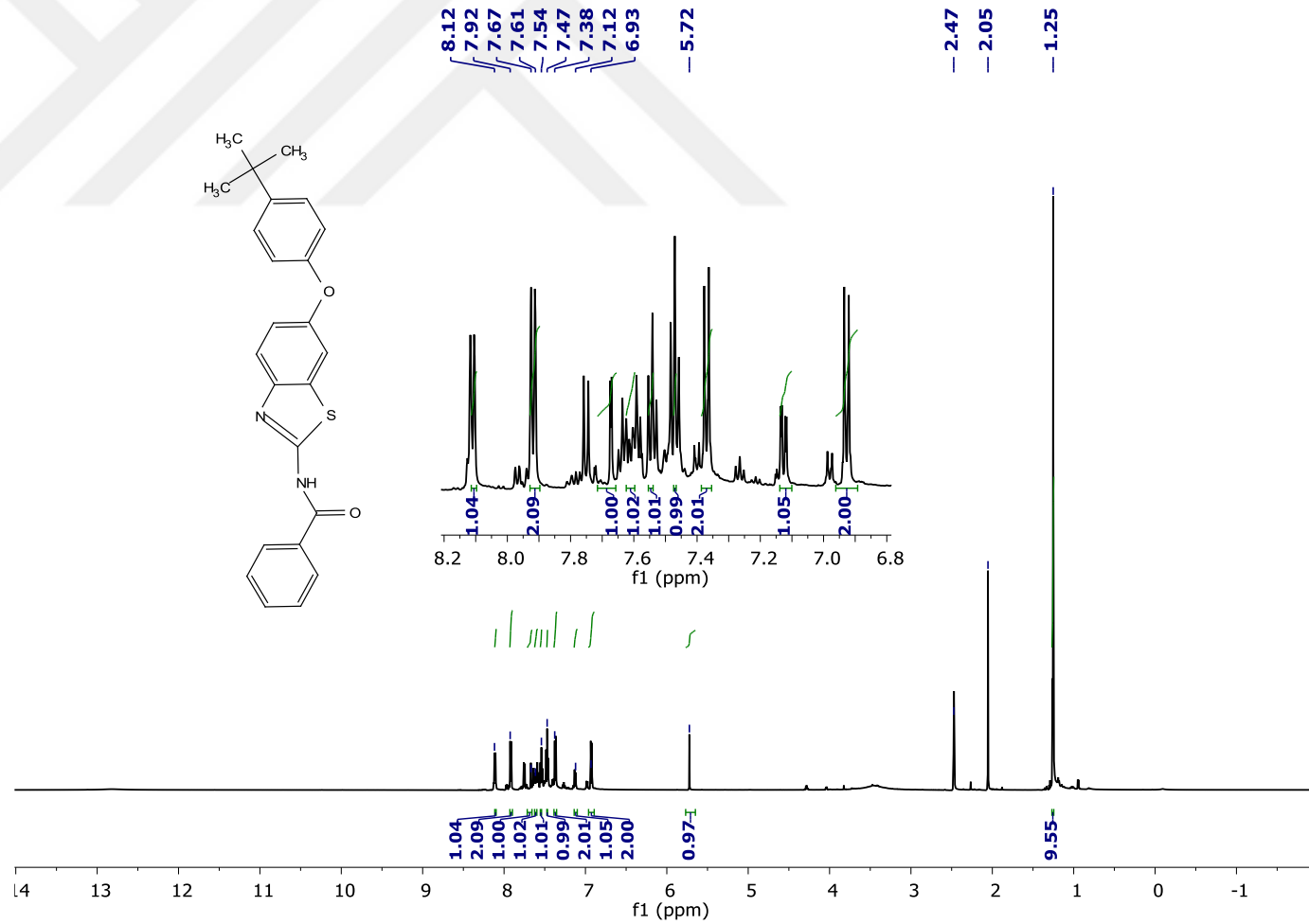
Şekil A.33: 21 bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu.



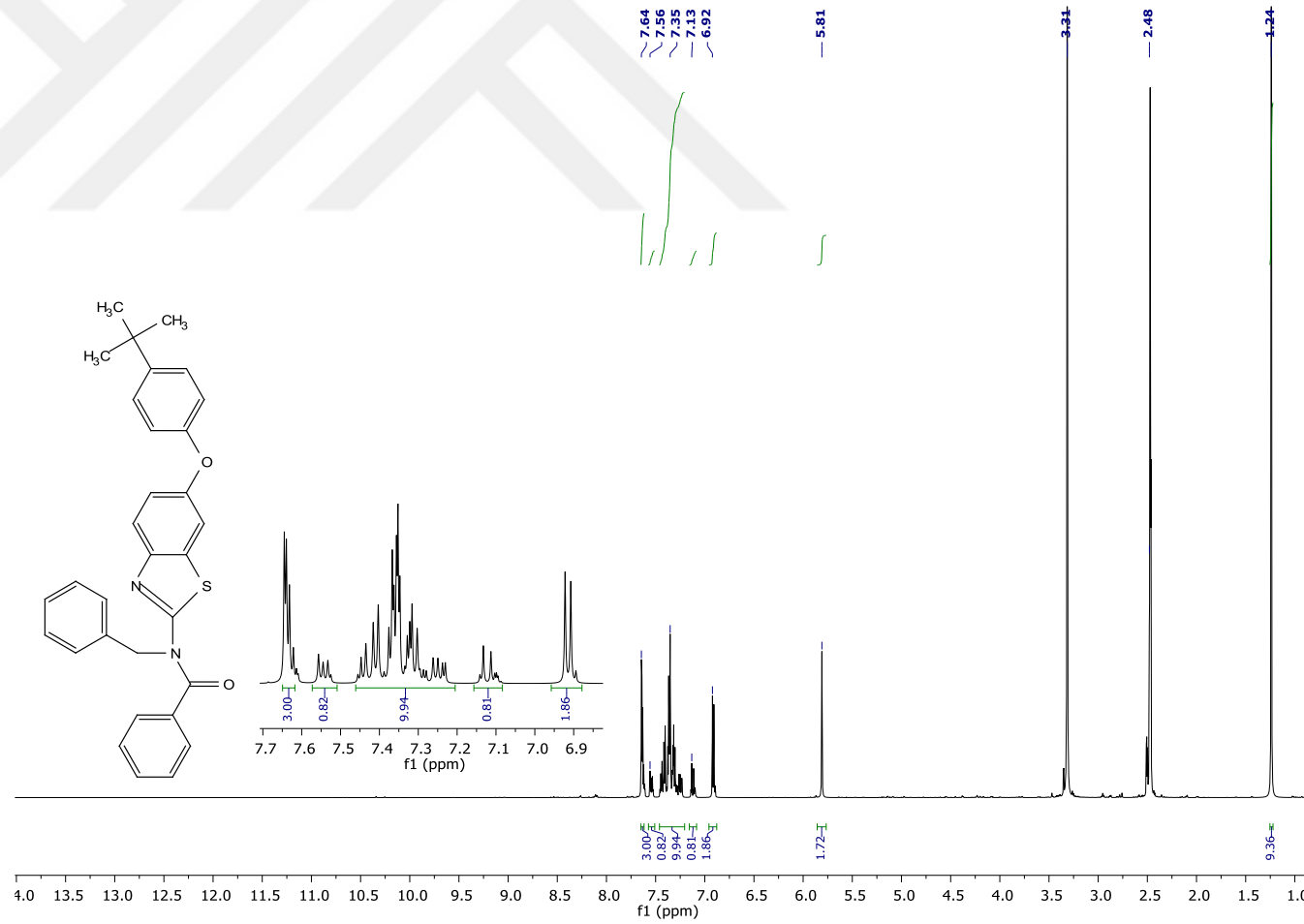
Şekil A.34: 22 bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu.



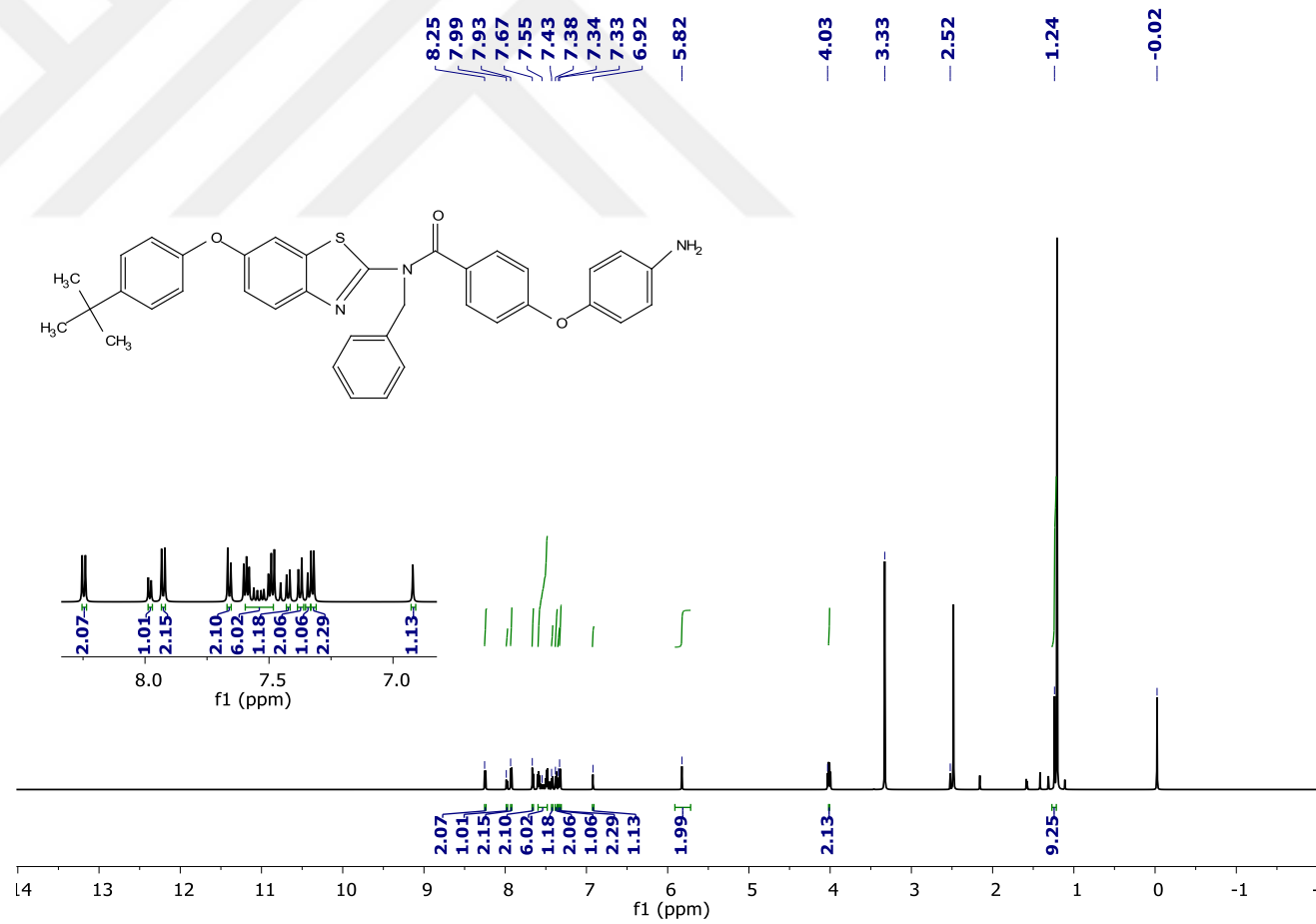
Şekil A.35: 23 bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu.



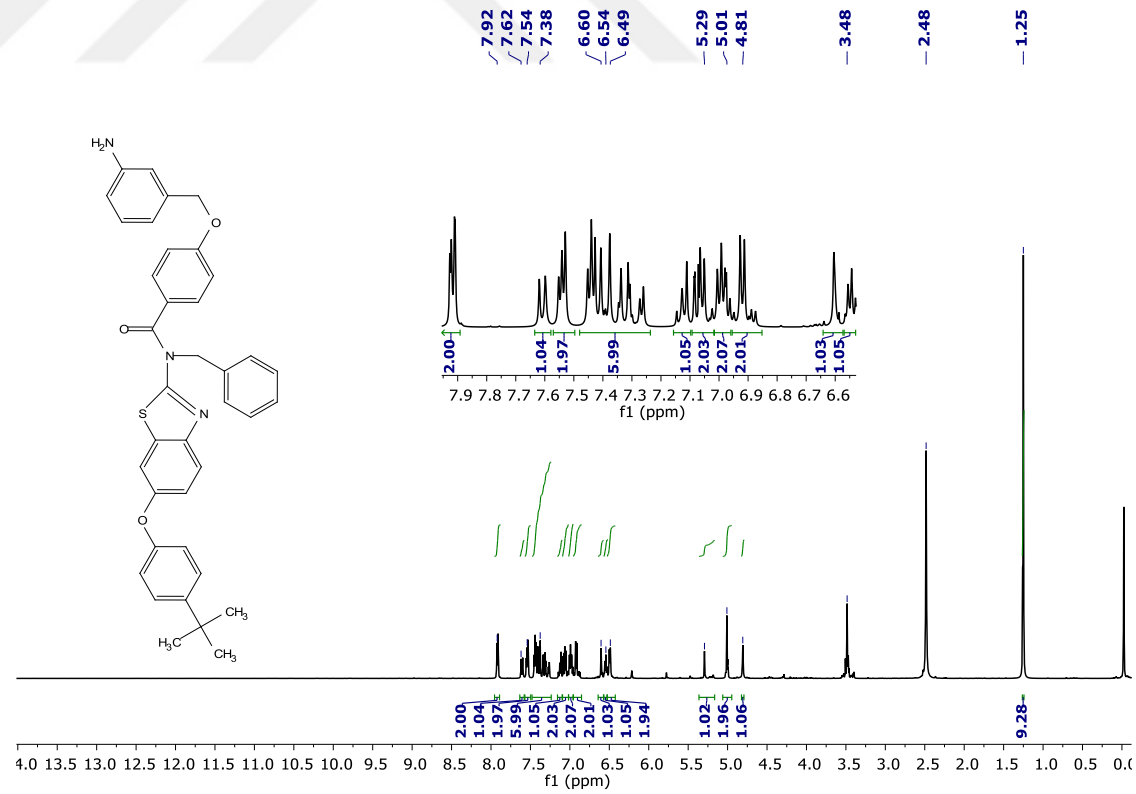
Şekil A.36: 24 bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu.



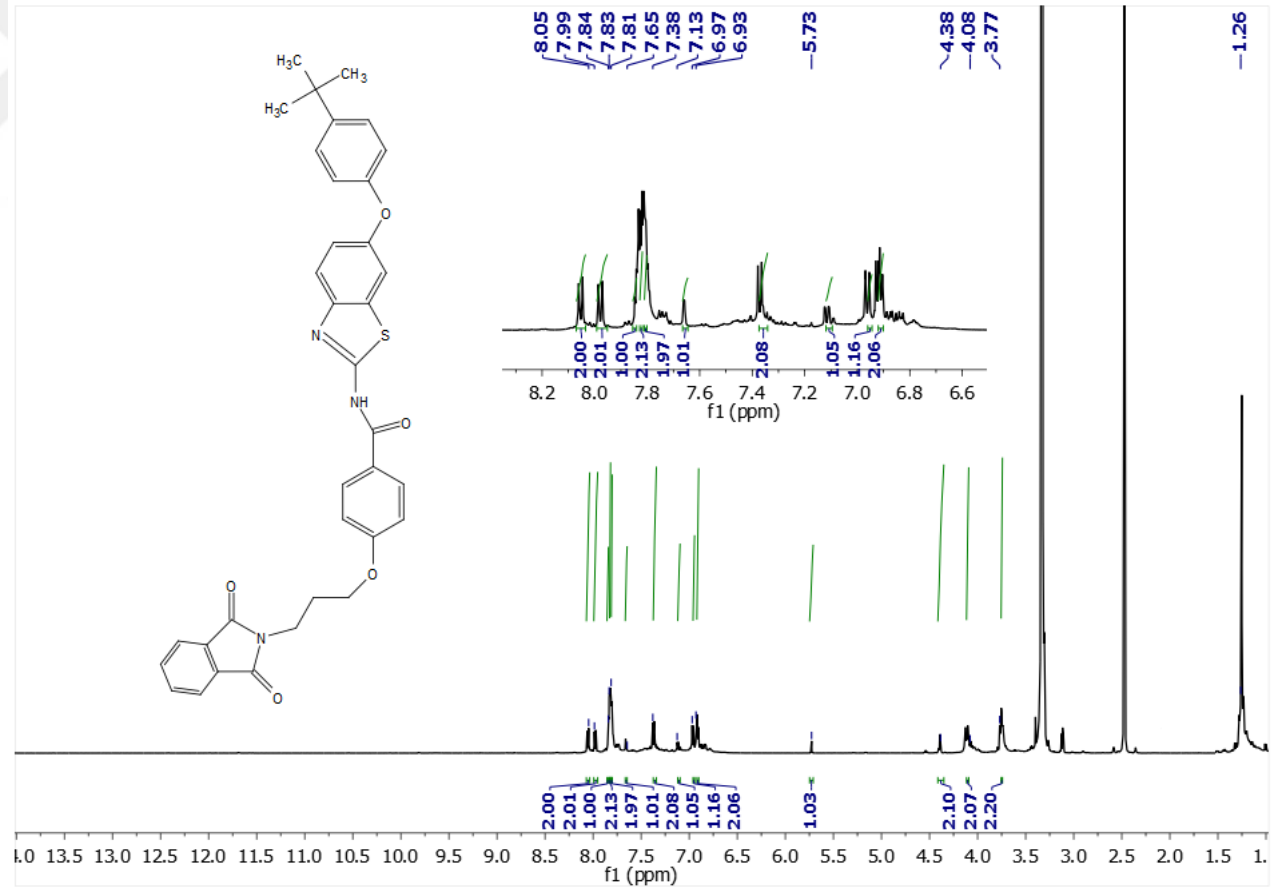
Şekil A.37: 25 bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu.



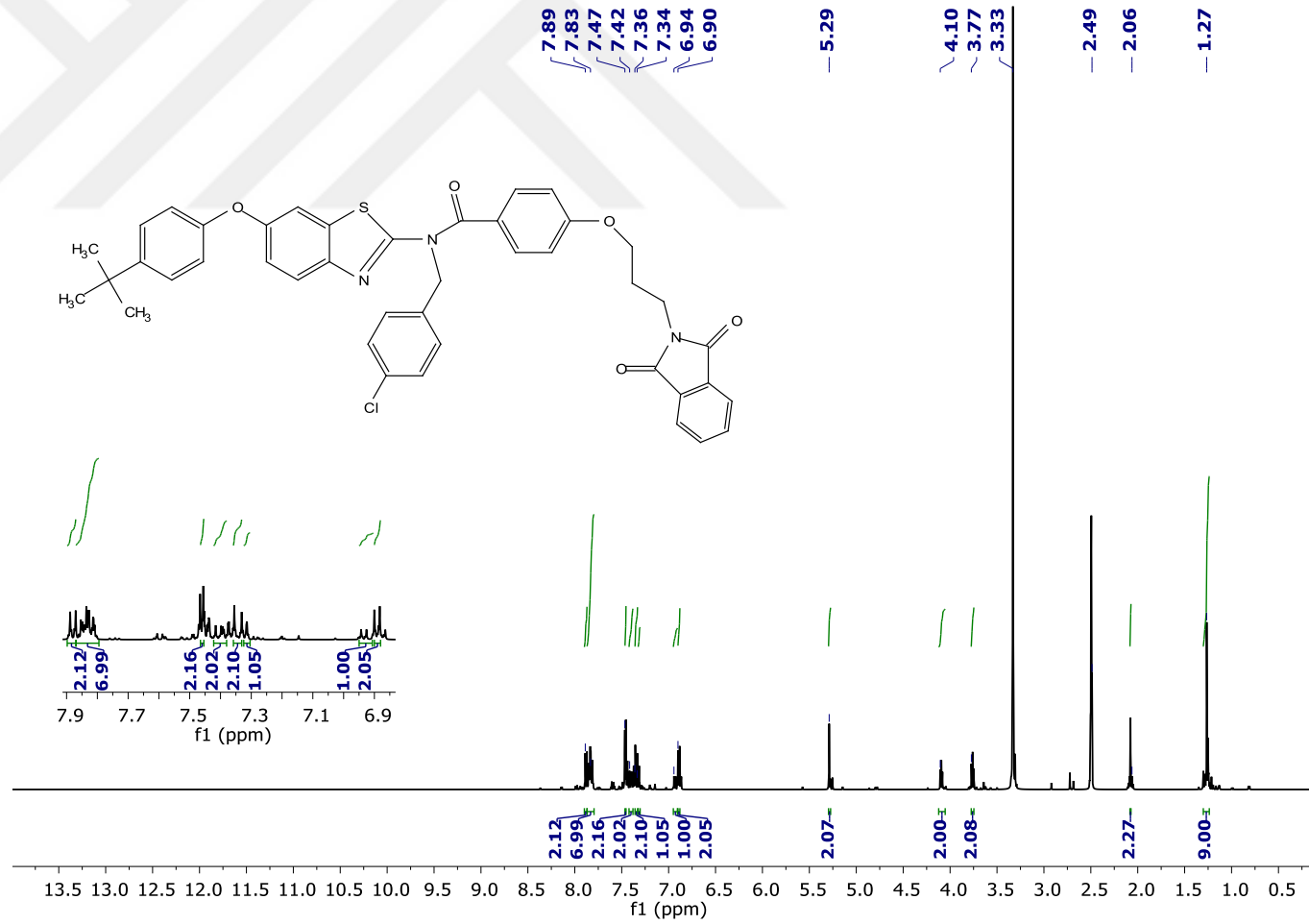
Şekil A.38: 27 bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu.



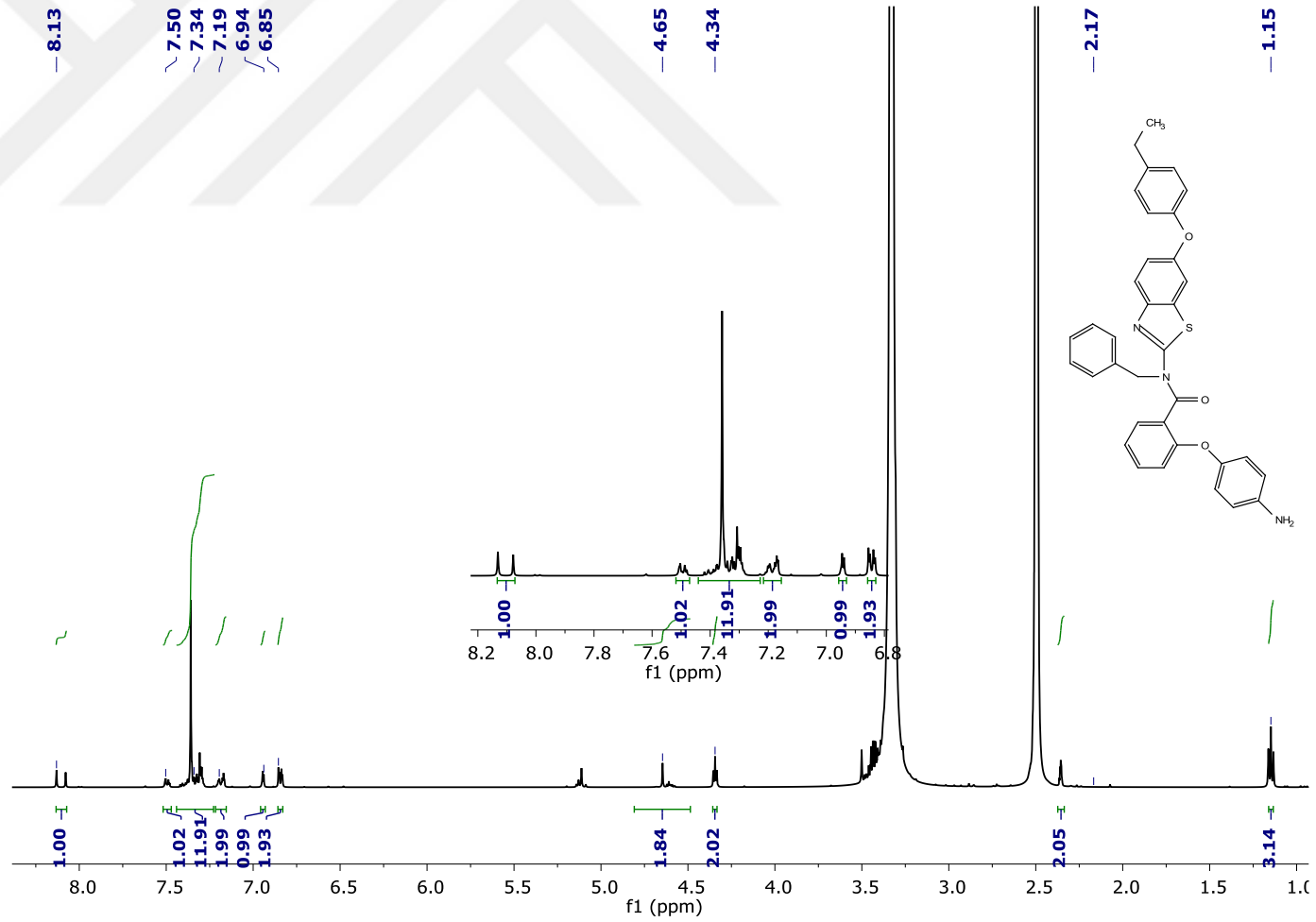
Şekil A.39: 26 bileşiğine ait ^1H -NMR spektrumu.



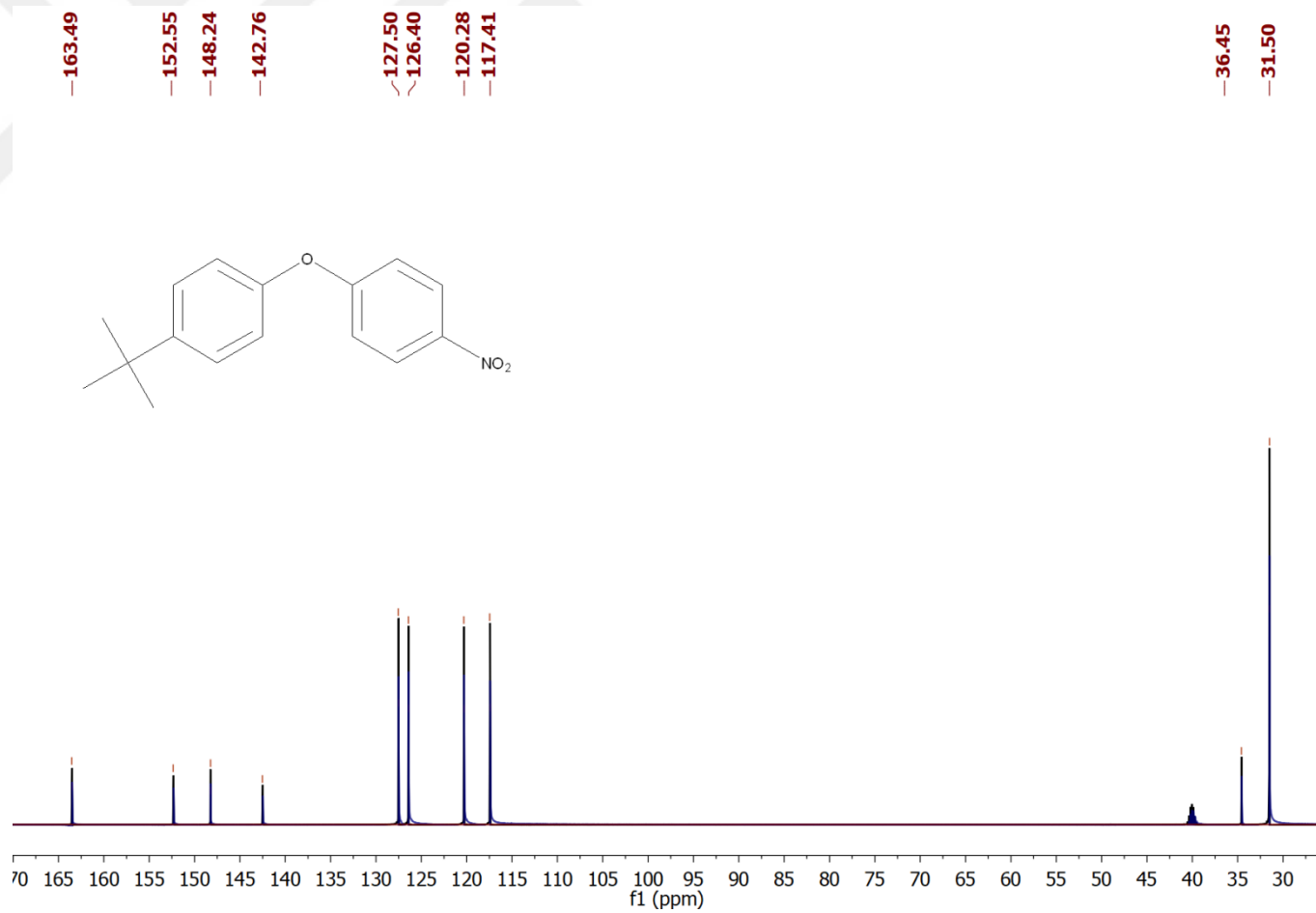
Şekil A.40: 29 bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu.



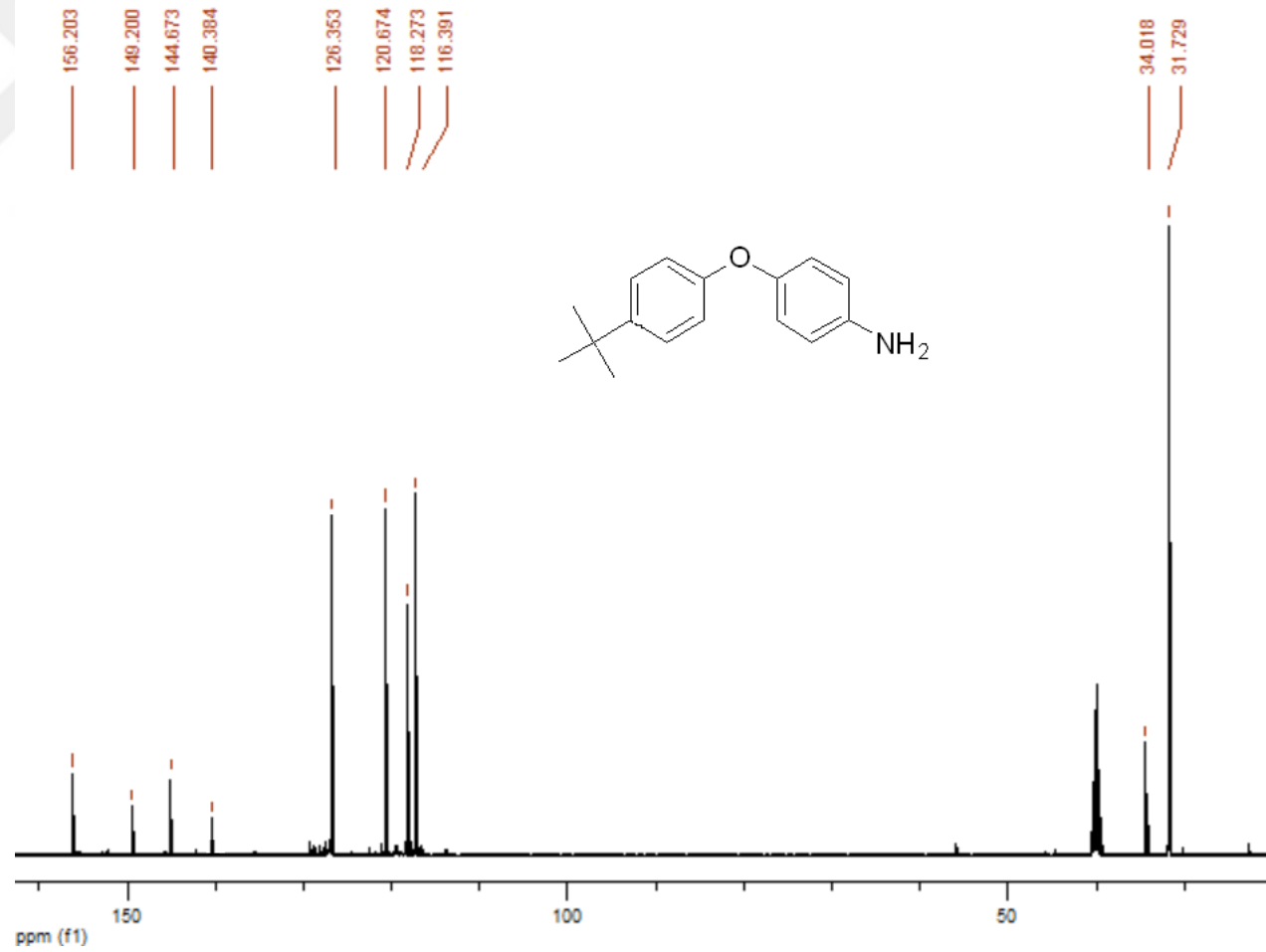
Şekil A.41: 30 bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu.



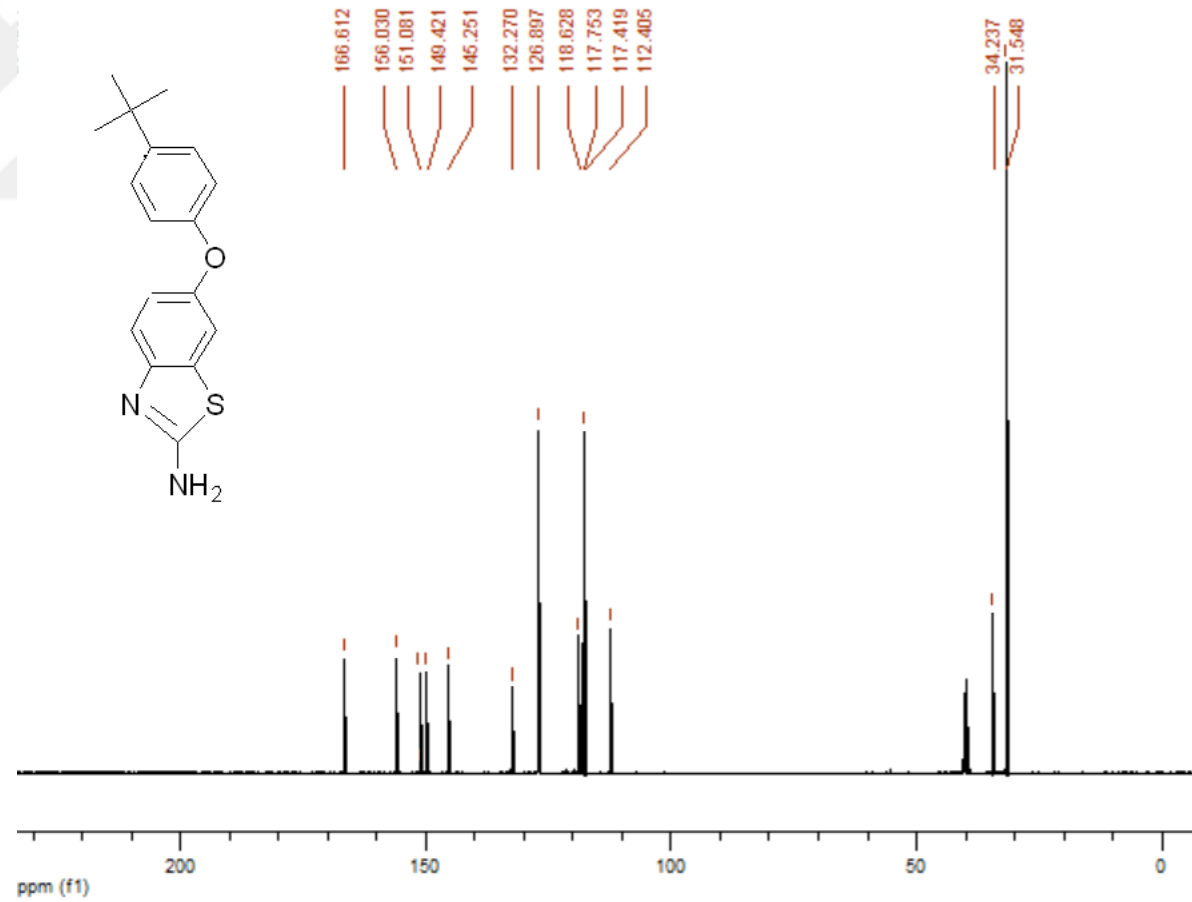
Şekil A.42: 33 bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu.



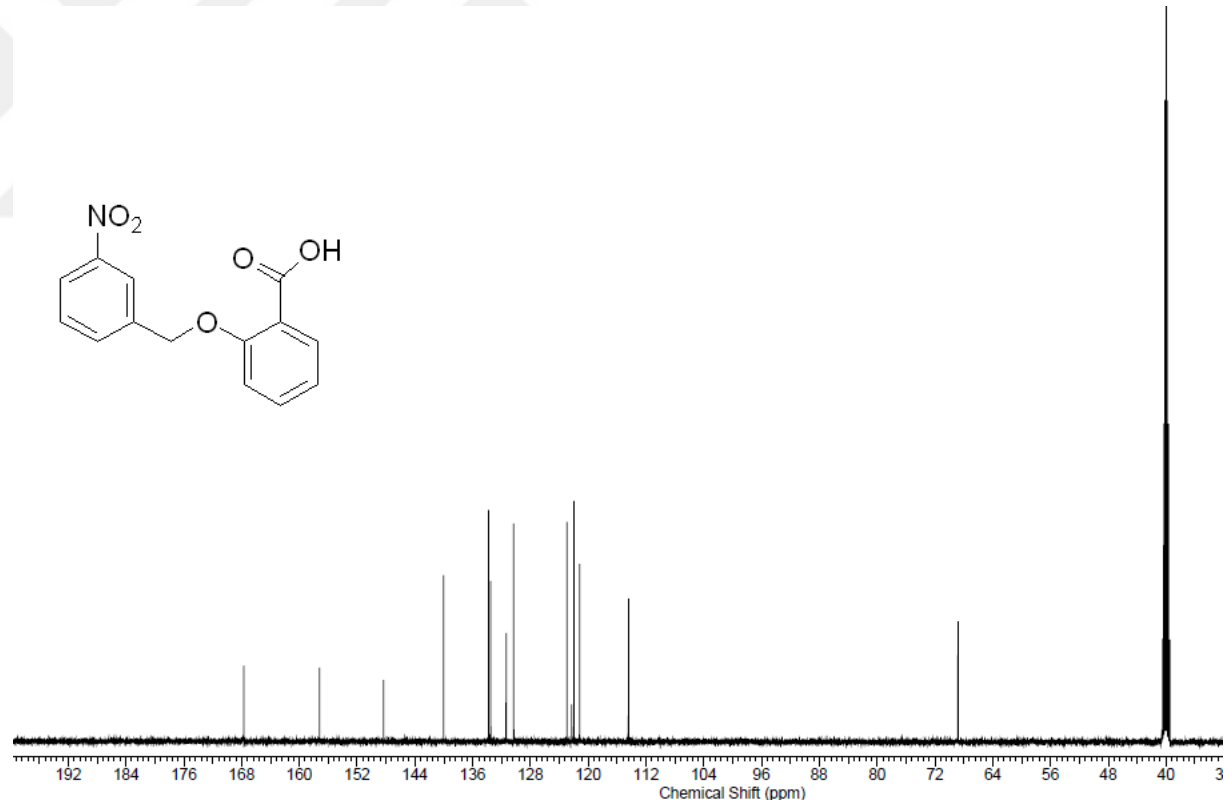
Şekil A.43: 1 bileşiğine ait ^{13}C -NMR spektrumu.



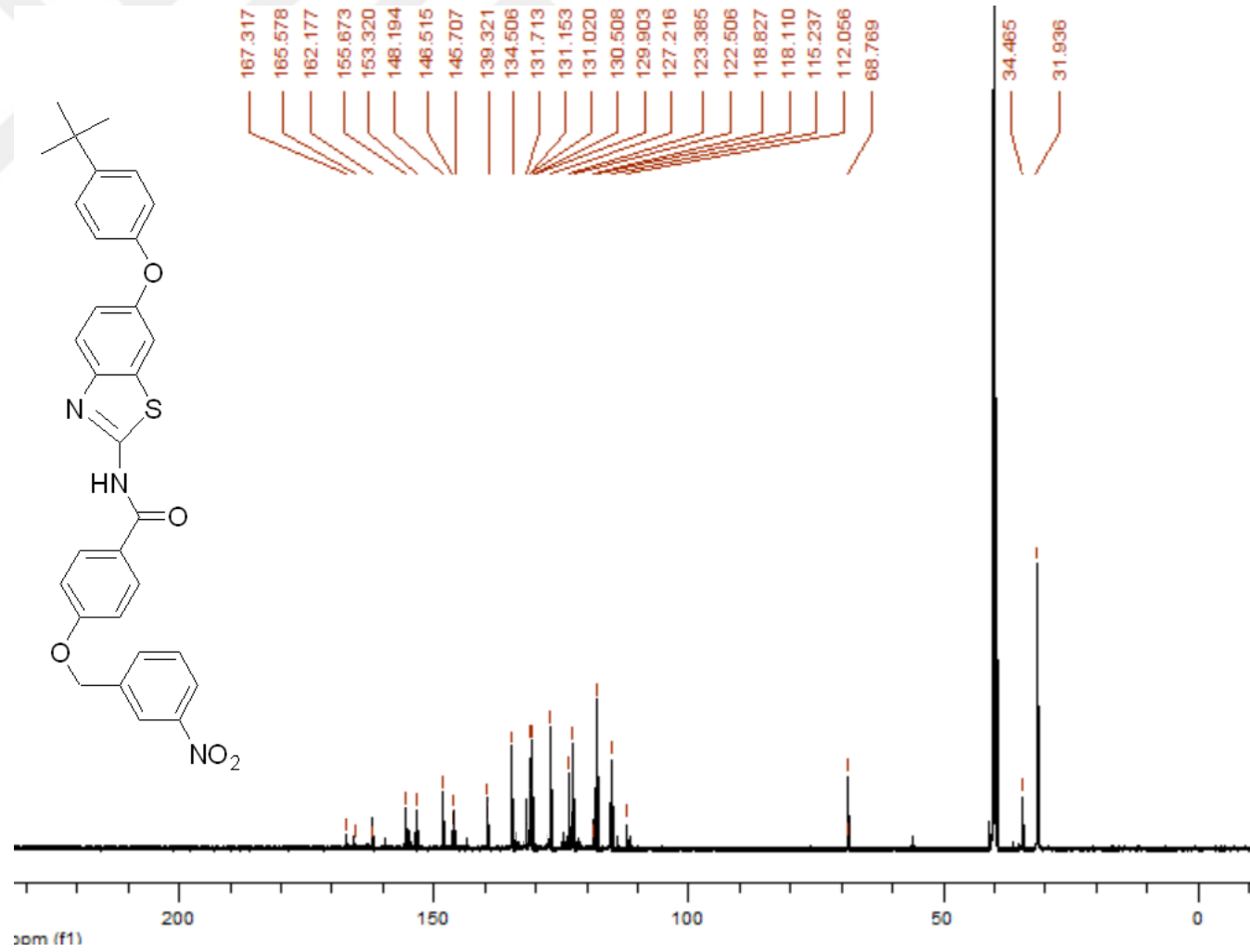
Şekil A.44: 2 bileşiğine ait ¹³C-NMR spektrumu.



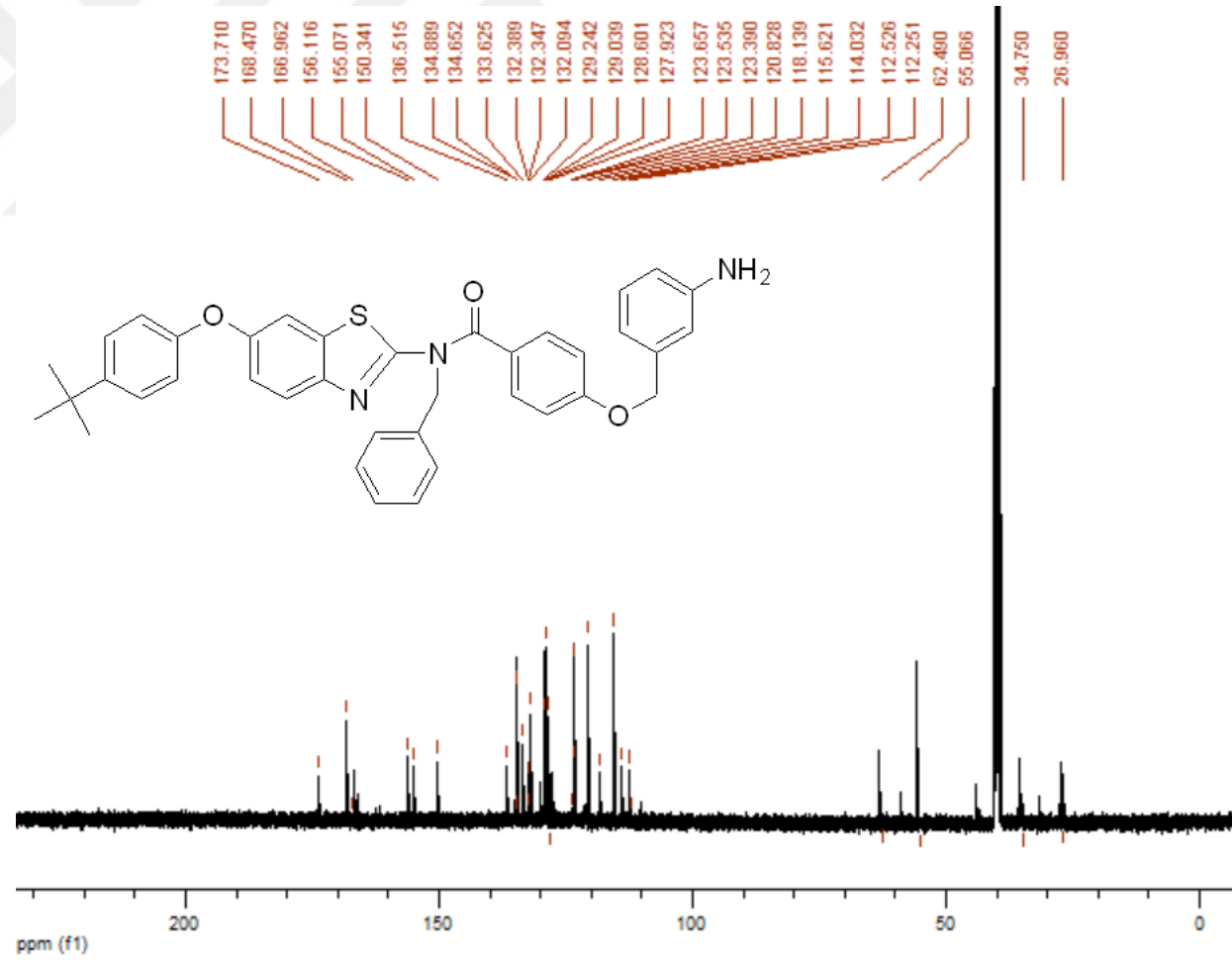
Şekil A.45: 3 bileşiğine ait ^{13}C -NMR spektrumu.



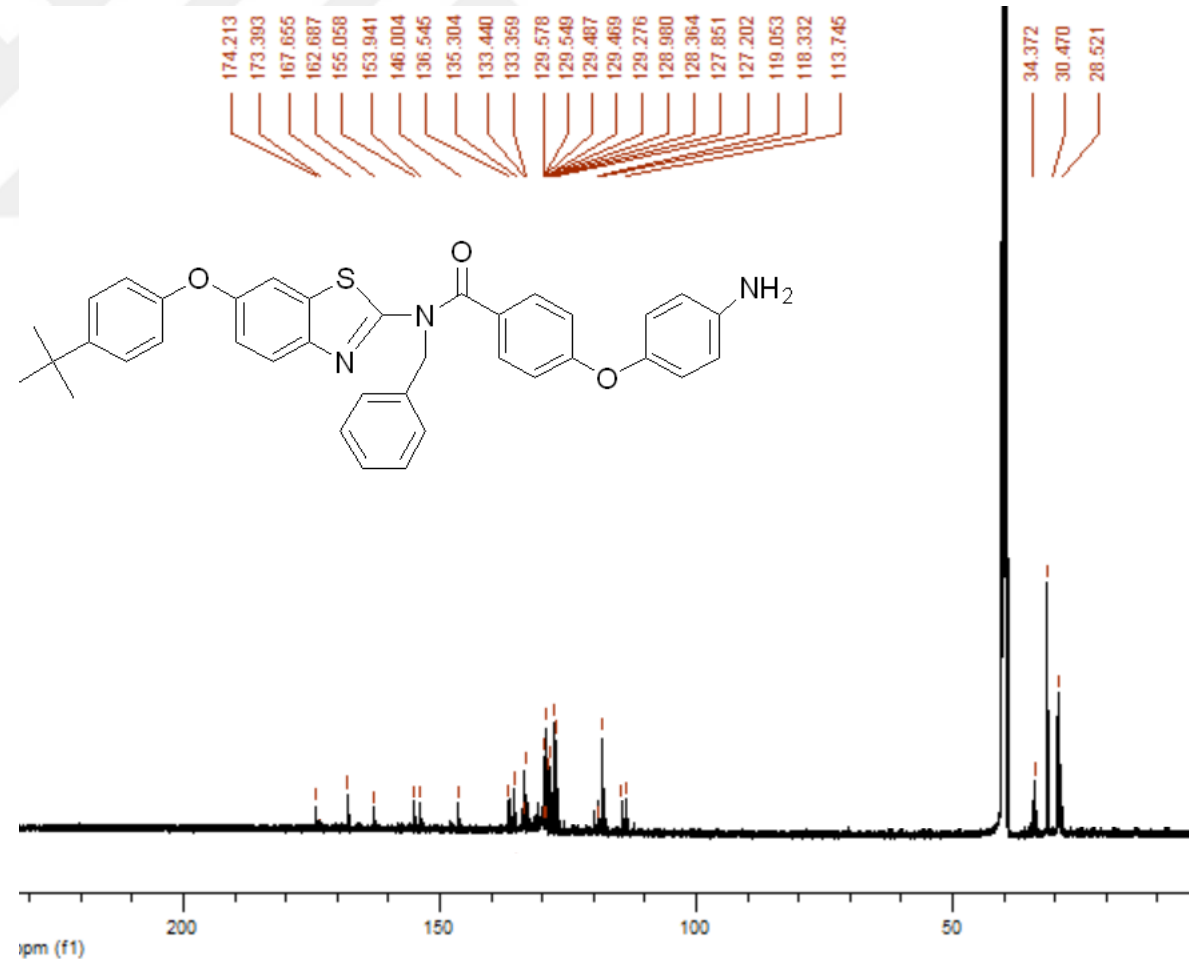
Şekil A.46: 11 bileşiğine ait ¹³C-NMR spektrumu.



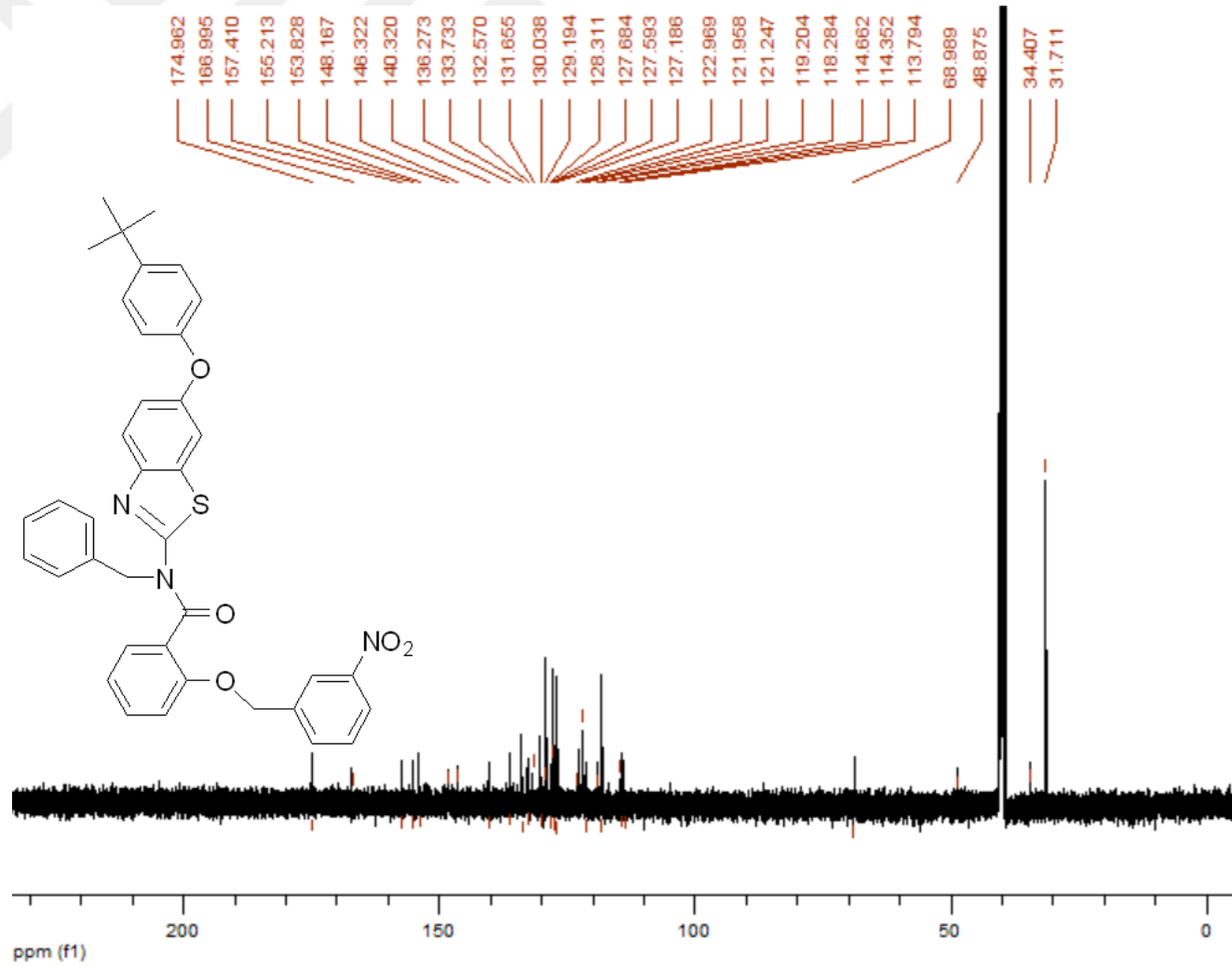
Şekil A.47: 16 bileşiğine ait ¹³C-NMR spektrumu.



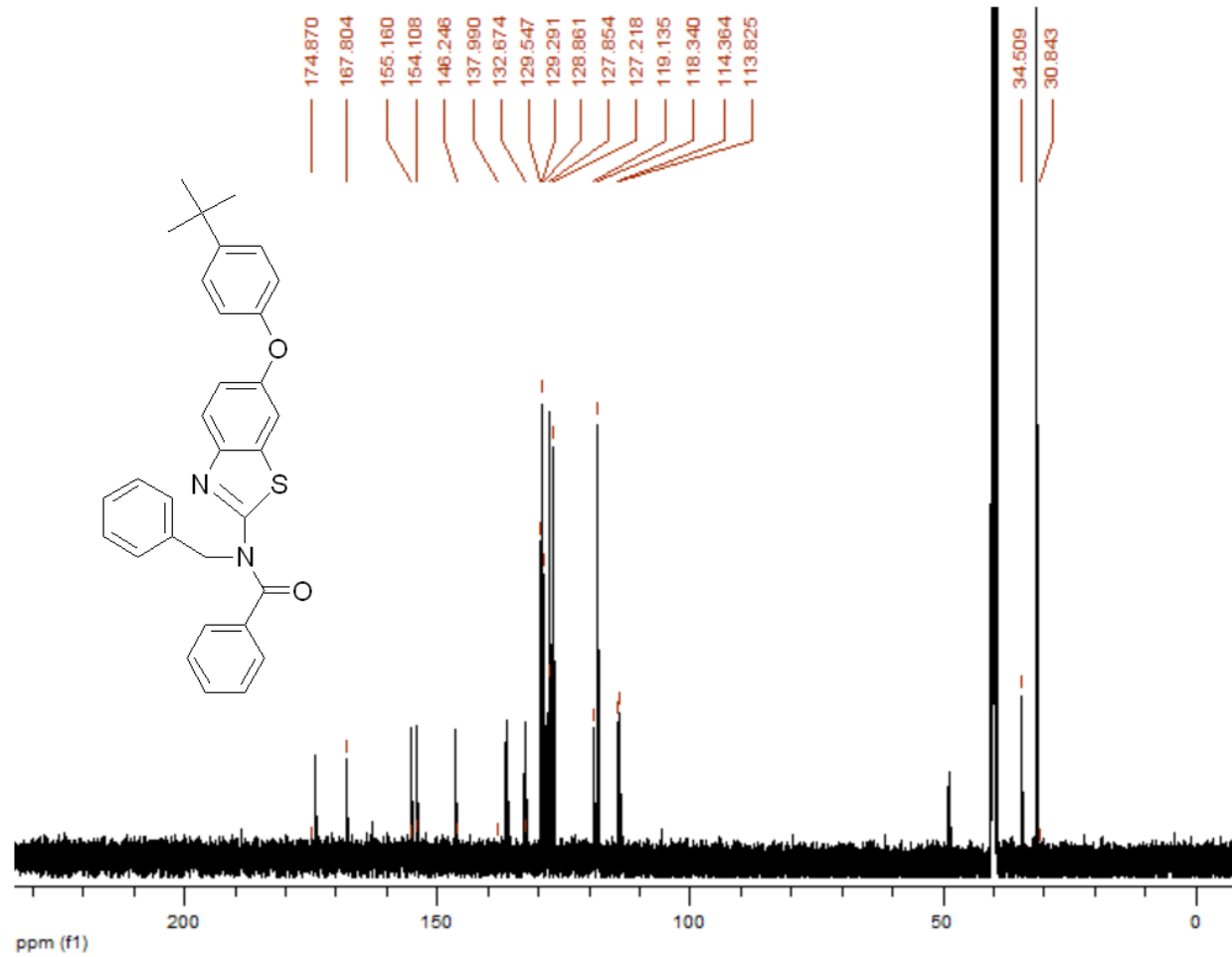
Şekil A.48: 26 bileşiğine ait ^{13}C -NMR spektrumu.



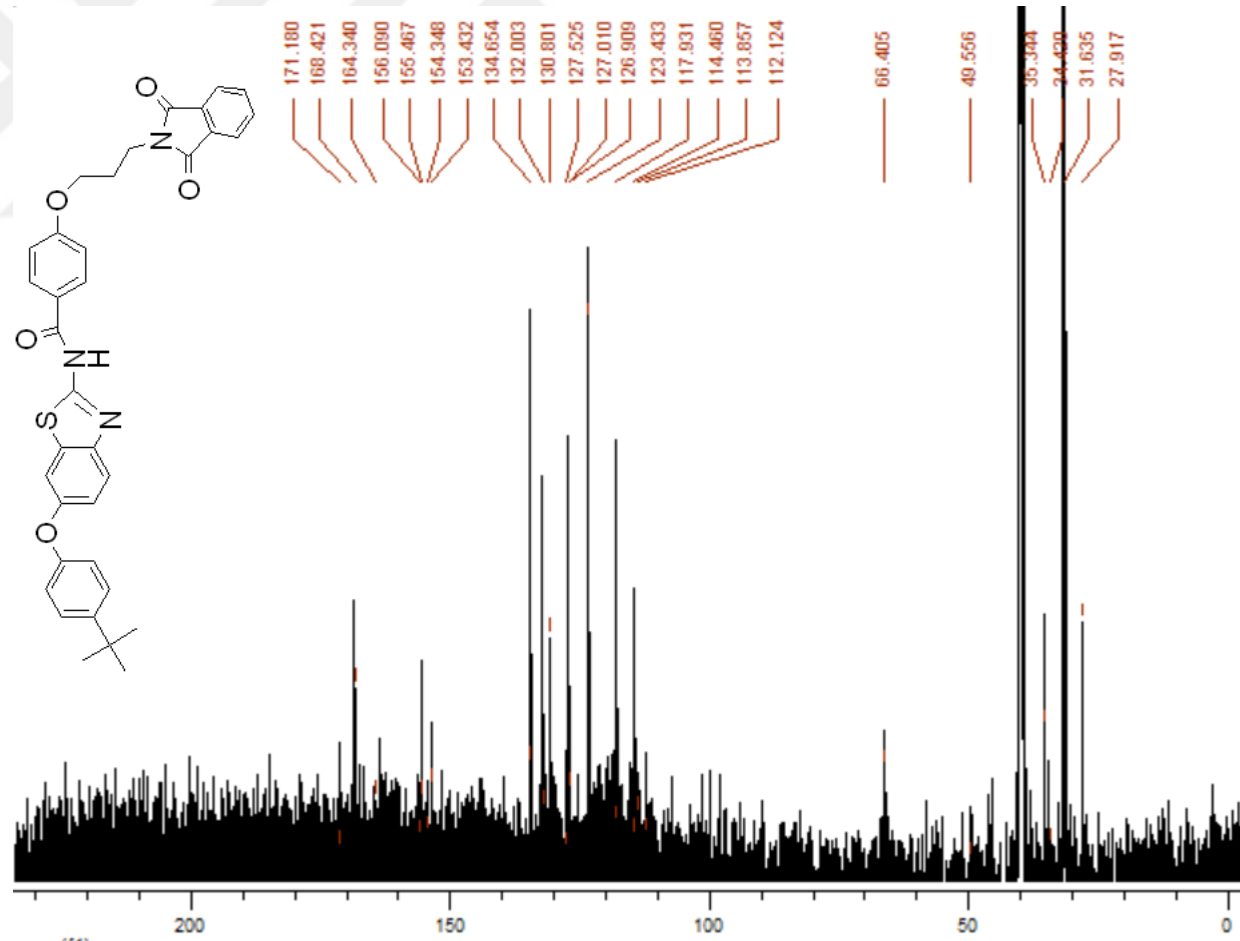
Şekil A.49: 27 bileşiğine ait ¹³C-NMR spektrumu.



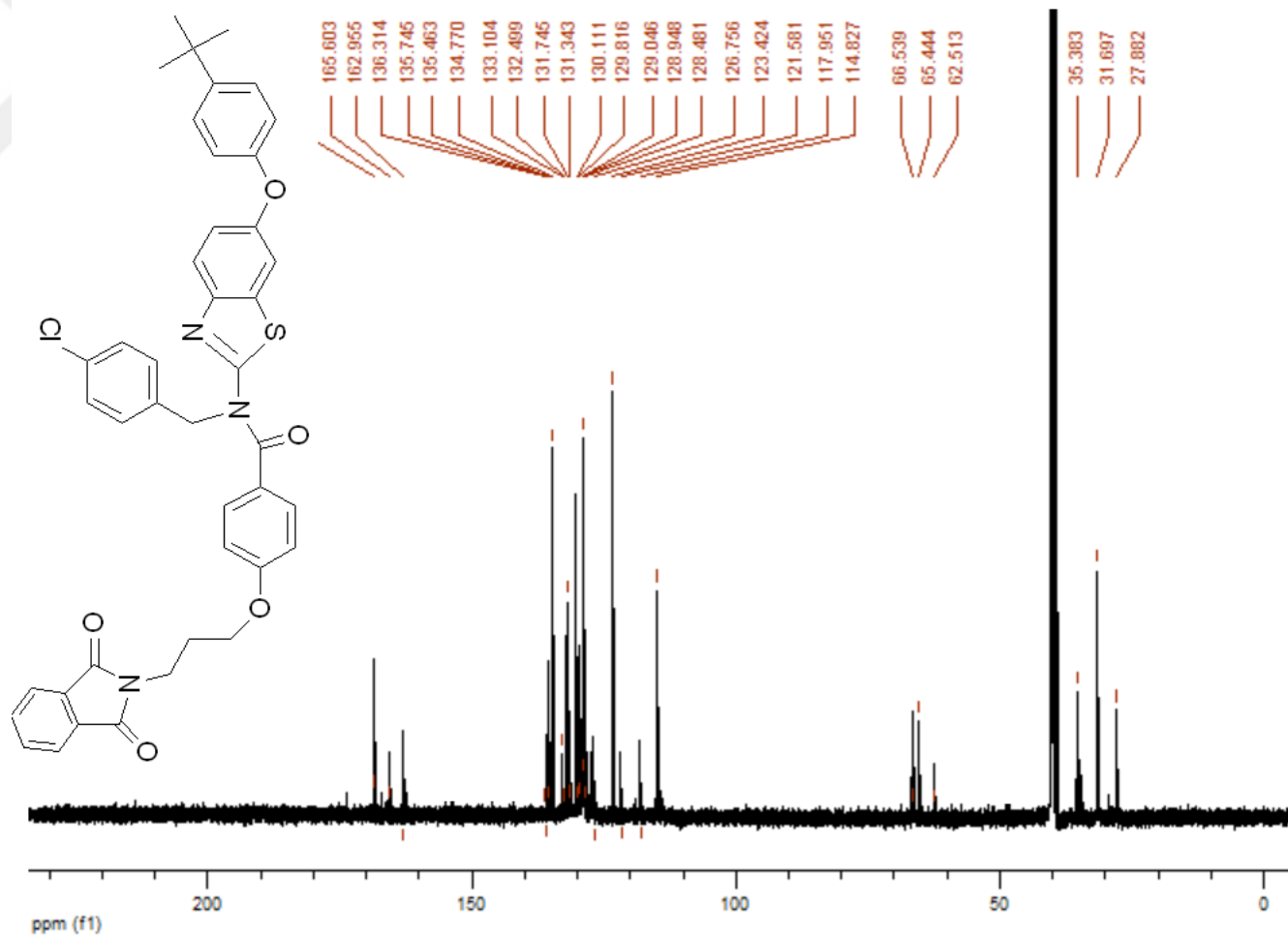
Şekil A.50: 21 bileşiğine ait ¹³C-NMR spektrumu.



Şekil A.51: 25 bileşiğine ait ^{13}C -NMR spektrumu.



Şekil A.52: 29 bileşiğine ait ¹³C-NMR spektrumu.



Şekil A.53: 30 bileşiğine ait ^{13}C -NMR spektrumu.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Ceyda Köse

Doğum Tarihi ve Yeri: 22/07/1994 İstanbul

e-posta: ceydakose.1@gmail.com / kosecey@itu.edu.tr



ÖĞRENİM DURUMU

- **Lisans:** 2018, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü

Lisans Bitirme Tezi: Syntehsis of Tyrosine Mimics from *p*-Metoksifenol

- **Lisans Erasmus Programı:** 2017, Universidade do Minho, Faculty of Science, Chemistry Department
- **Yüksek Lisans:** 2020, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü

Yüksek Lisans Tezi: PD-L1 Proteinine Yönelik Görüntüleme Ajanı Geliştirilmesi ve Sentezi

PROJELER

- PET Görüntülenme Sistemlerinde Kullanılmak Üzere Tümör Mikro-Çevresi Yüksek Seçicilik ile Hedefleyen Radyonüklid İşaretli Moleküllerin Rasyonel Tasarımı ve Geliştirilmesi (**Bursiyer**)