

5-Süstitüentli α,β -Doymamış Laktonların Sentezlenmesi ve
Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi

Proje No: 105T429

Yar. Doç. Dr. Ali Çağır
Pınar Kasaplar
İsmail Akçok

Mayıs 2009
İZMİR

ÖNSÖZ

TUBİTAK “Kariyer programı” çerçevesinde desteklenmesine 2006 yılında TUBİTAK-TBAG grubunca onay verilen 105T429 no’lu bu projenin amacı kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği bilinen (R)-goniothalamın stiril laktonunu baz alarak oluşturulacak daha yüksek sitotoksositeye sahip yeni α,β -doymamış laktonların sentezlenmeleri ve yapı-aktivite ilişkileri araştırmaktır. Proje çerçevesinde 11 adet yeni molekülün sentezi tamamlanmıştır. Projede geçen biyolojik aktivite testlerinin ilk bölümü Ege Üniversitesi biyomühendislik bölümünden sayın Doç. Dr. Kemal Korkmaz tarafından gerçekleştirilmiştir. Sitotoksosite testlerinin çoğunluğu ise İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Biyomühendislik ve Biyoteknoloji Merkezi Laboratuvarlarında mevcut olanaklar kullanılarak yapılmıştır. Raporun yazıldığı zamana kadar bir adet uluslararası makele yayınlanmış olup, ikincisi üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Projede çalışan yüksek lisans öğrencilerinden Pınar Kasaplar 2008 yılında eğitimini başarıyla tamamlamış ve yurtdışında doktora eğitimi için projeden ayrılmıştır, İsmail Akçok ise tez çalışmasını 2009 yılı yaz döneminde bitirecektir.

İçindekiler

Tablo Listeleri.....	iv
Grafik Listeleri.....	v
Şekil Listeleri.....	vi
Özet.....	viii
Abstract.....	ix
Kısaltmalar.....	x
1. Giriş.....	1
1.1. Genel Bilgiler.....	2
1.1.1. Doğa Kaynaklı 5,6-dihidro-2 <i>H</i> -pyran-2-on Türevleri.....	2
1.1.2. Antikanser Ajanı Olarak Goniotalamin ve Türevleri.....	4
1.1.3. Hedefler.....	7
2. Gereç ve Yöntem.....	9
2.1. Organik Sentez.....	9
2.1.1. Genel Metodlar.....	9
2.1.2. Kiral Alkollerin Sentezlenmesi İçin Genel Prosedür.....	9
2.1.3. Akriloyl Esterlerin Sentezi İçin Genel Prosedür.....	12
2.1.4. 5-Süstitüeli α,β -Doymamış δ -Laktonların Sentezi İçin Genel Prosedür.....	15
2.2. Biyolojik Test.....	18
2.2.1. Hücre Kültürü.....	18
2.2.2. MTT Testi.....	18
3. Bulgular.....	19
3.1. Konformasyonel Dönmeleri Sınırlandırılmış Goniotalamin Türevleri.....	19
3.2. Eter Fonksiyonalitesine Sahip Goniotalamin Türevlerinin Sentezine Yönelik Çalışmalar.....	32
3.3. Konformasyonel Dönmeleri Sınırlandırılmış Goniotalamin Türevlerinin QSAR Çalışmaları ve Michael Katılma Tepkimeleri.....	37
4. Tartışma-Sonuç.....	45
5. Yararlanılan Kaynaklar Listesi.....	47

Tablo Listeleri

Tablo 1. Konformasyonel dönüşümleri sınırlandırılmış goniotalamin türevlerinin (47 ve 48) sentezinde elde edilen verim ve enansiyomerik fazlalıklar.....	21
Tablo 2. 12 , 47 , ve 48 nolu maddeler için IC ₅₀ değerleri.....	22
Tablo 3. 6-Bisikloaril sübstitüentli 5,6-dihidro-2 <i>H</i> -pyran-2-on yapılarının (60-65) sentezlerindeki verim ve enansiyomerik fazlalıklar.....	24
Tablo 4. MCF-7 ve PC-3 kanser hücrelerinde 78-83 no'lu moleküllerin IC ₅₀ konsantrasyonları.....	28
Tablo 5. MCF-7 ve PC-3 kanser hücrelerinde 60-65 no'lu moleküllerin IC ₅₀ konsantrasyonları.....	28
Tablo 6. 1-Naftil sübstitüentleri içeren (S)-5,6-dihidro-2 <i>H</i> -pyran-2-on türevlerinin sentezi.....	32
Tablo 7. Benziloksiasetaldehit'in asimetric allillenmesi tepkimeleri için yapılan denemeler.....	34
Tablo 8. Fenollerin (S)-6-klorometil-5,6-dihidro-2 <i>H</i> -pyran-2-on ile denenen nükleofilik yerdeğiştirme tepkimeleri.....	35
Tablo 9. Gümüş tuzları eşliğinde fenollerin (S)-6-klorometil-5,6-dihidro-2 <i>H</i> -pyran-2-on ile denenen nükleofilik yerdeğiştirme tepkimeleri.....	36
Tablo 10. 12 , 47 ve 60-64 no'lu moleküller için kuantum hesaplamaları.....	37

Grafik Listeleri

Grafik 1. DU-145, LNCAP, MCF-7, ve PC-3 kanser hücreleri üzerinde 12, 47, ve 48 nolu bileşiklerin sitotoksik etkileri.....	22
Grafik 2. 78-83 no'lu maddelerinin PC-3 kanser hücreleri üzerinde, düşük mikromolar konsantrasyonlardaki sitotoksik etkileri.....	26
Grafik 3. 78-83 no'lu maddelerinin PC-3 kanser hücreleri üzerinde, nanomolar konsantrasyonlardaki sitotoksik etkileri.....	26
Grafik 4. 78-83 no'lu maddelerinin MCF-7 kanser hücreleri üzerinde, düşük mikromolar konsantrasyonlardaki sitotoksik etkileri.....	27
Grafik 5. 78-83 no'lu maddelerinin MCF-7 kanser hücreleri üzerinde, nanomolar konsantrasyonlardaki sitotoksik etkileri.....	27
Grafik 6. 60-65 no'lu maddelerinin PC-3 kanser hücreleri üzerinde, düşük mikromolar konsantrasyonlardaki sitotoksik etkileri.....	29
Grafik 7. 60-65 no'lu maddelerinin PC-3 kanser hücreleri üzerinde, nanomolar konsantrasyonlardaki sitotoksik etkileri.....	29
Grafik 8. 60-65 no'lu maddelerinin MCF-7 kanser hücreleri üzerinde, düşük mikromolar konsantrasyonlardaki sitotoksik etkileri.....	30
Grafik 9. 60-65 no'lu maddelerinin MCF-7 kanser hücreleri üzerinde, nanomolar konsantrasyonlardaki sitotoksik etkileri.....	30
Grafik 10. 12, 47 ve 60-64 no'lu moleküller için LogP ile sitotoksosite bağlantısı.....	38

Şekil Listeleri

Şekil 1. 5,6-Dihidro-2 <i>H</i> -pyran-2-on (1) farmakoforunun genel yapısı ve proteinlerdeki nükleofillerle reaksiyonu.....	2
Şekil 2. 5,6-Dihidro-2 <i>H</i> -pyran-2-on (1) farmakoforunu bünyesinde bulunduran değişik doğal ürünler (R)-(-)-massoilacton (2), (R)-(-)-argetilacton (3), (+)-fostriecin (4), aspyron (5), obolacton (6) ve obochalcolacton (7).....	3
Şekil 3. Stiril lakton ailesinden goniotalamin (8), goniodiol (9), altholacton (10), ve goniopyrpyron (11) yapıları.....	3
Şekil 4. Literatürde bilinen (R)-goniotalamin (12) yapısı ve bağlaç kısmı değiştirilmiş türevleri (13,14).....	4
Şekil 5. Literatürde bilinen (S)-goniotalamin (15) ve türevlerinin yapısı (16-23).....	5
Şekil 6. Literatürde bilinen goniotalaminin benzen halkası üzerinde yarı-sentetik türevleri: <i>o</i> -nitro (24), <i>p</i> -nitro (25), <i>o</i> -amino (26), <i>o</i> -amit (27-28) ve <i>o</i> -amino asit (29-36).....	6
Şekil 7. Literatürde (R)-goniotalamin için bilinen anahtar başlangıç molekülleri.	7
Şekil 8. Yapımı planlanan bağlaç kısımları değiştirilmiş goniotalamin türevleri (42, 43, 44).....	8
Şekil 9. Yapımı planlanan konformasyonel olarak sınırlandırılmış goniotalamin türevleri (47, 48).....	8
Şekil 10. (R)-Goniotalaminin <i>trans</i> -sinnamaldehyden başlayarak gerçekleştirilen sentezi.....	19
Şekil 11. İkinci jenerasyon dizayn edilen 6-bisikloaril sübstitüentli 5,6-dihidro-2 <i>H</i> -pyran-2-on yapıları.....	23
Şekil 12. Metoksi ve dimetilamin türevlendirilmiş 1-naftilaldehitler ve <i>m</i> -bromobenzaldehitin allillenme tepkimeleri.....	31
Şekil 13. Tasarlanan bağlaç olarak eter fonksiyonel grubuna sahip (R)- ve (S)-goniotalamin türevlerinin geri-sentez analizleri.	33
Şekil 14. (S)-6-Klorometil-5,6-dihidro-2 <i>H</i> -pyran-2-on (98) yapısındaki elektrofilik karbonlar.....	34
Şekil 15. (S)-6-Klorometil-5,6-dihidro-2 <i>H</i> -pyran-2-on'un sodyumfenoksit ve anilinle olan tepkime denemeleri.....	37
Şekil 16. DFT/ B3LYP6-31G* baz setiyle 12, 47 ve 60-64 no'lu moleküller için hesaplanan elektron yoğunluğu yüzeyindeki LUMO mutlak değerleri.....	39
Şekil 17. Moleküler modellemesi yapılan 12, 47, ve 60-64 no'lu moleküllerin etantiyol ile olan Michael katılma tepkimeleri.....	40
Şekil 18. DMSO- <i>d</i> ₆ içinde etantiyol'ün (R)-goniotalamin ile reaksiyonu. (1) sadece (R)-goniotalamin, (2) (R)-goniotalamin+EtSH (1:0.75, 10 dak.), (3) (R)-goniotalamin+EtSH (1:0,75, 20 dak.), (4) (R)-goniotalamin+EtSH (1:2, 10 dak.).....	41

Şekil 19. DMSO-d ₆ içinde etantiyol'ün 47 no'lu molekülle reaksiyonu. (1) sadece 47 no'lu molekül , (2) 47 no'lu molekül+EtSH (1:7, 10 dak.)...	41
Şekil 20. DMSO-d ₆ içinde etantiyol'ün 64 no'lu molekülle reaksiyonu. (1) sadece 64 no'lu molekül , (2) 64 no'lu molekül+EtSH (1:16, 10 dak.).	42
Şekil 21. DMSO-d ₆ içinde etantiyol'ün 60 no'lu molekülle reaksiyonu. (1) sadece 60 no'lu molekül , (2) 60 no'lu molekül+EtSH (1: 1.25, 10 dak.).....	42
Şekil 22. DMSO-d ₆ içinde etantiyol'ün 63 no'lu molekülle reaksiyonu. (1) sadece 63 no'lu molekül , (2) 63 no'lu molekül+EtSH (1: 20, 10 dak.).....	43
Şekil 23. DMSO-d ₆ içinde etantiyol'ün 61 no'lu molekülle reaksiyonu. (1) sadece 61 no'lu molekül , (2) 61 no'lu molekül+EtSH (1: 0.75, 10 dak.), (3) 61 no'lu molekül+EtSH (1:0.75, 2 hafta).....	43
Şekil 24. DMSO-d ₆ içinde etantiyol'ün 62 no'lu molekülle reaksiyonu. (1) sadece 62 no'lu molekül , (2) 62 no'lu molekül+EtSH (1:0.75, 10 dak.), (3) 62 no'lu molekül+EtSH (1:2, 10 dak.), (4) 62 no'lu molekül+EtSH (1:2, 2 hafta).....	44
Şekil 25. DMSO-d ₆ içinde etantiyol'ün 62 no'lu molekülle (1:2 oranında) değişik sıcaklıklardaki katılma reaksiyonu. (1) 25 °C , (2) 35 °C , (3) 45 °C , (4) 55 °C , (5) 65 °C , (6) 75 °C.	44

Özet

5,6-dihidro-2*H*-pyran-2-on yapısını içeren birçok doğal ürünün çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bilinmektedir. Bunların en ilginçlerinden olan goniothalamın sağlıklı hücreler üzerinde minimal etkiye sahipken kanserli hücrelerde sitotoksik etkisi olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada goniothalamının stiril sübstitüentinin 2-naftil grubuyla yer değiştirilmesiyle oluşacak konformasyonel olarak sınırlandırılmış molekülün (R)- ve (S)- enansiyomerleri 2-naftil aldehitten başlanarak literatürde bilinen yöntemlerle asimetric olarak sentezlenmiş, PC-3, MCF-7, DU-145 ve LNCAP kanser hücreleri üzerinde test edilmiştir. Bulgular konformasyonel olarak sınırlandırılmış R enansiyomerinin aktivite üzerinde küçük bir artış gösterdiği yönündedir. 2-Naftil grubu stiril grubuna göre daha büyük bir grup olduğundan stirik faktörlerin aktivite üzerindeki etkilerinin incelenmesinde gerekli görülmüştür.

Sterik olarak naftil grubuna yakın büyüklükteki sübstitüentleri içeren aldehitler seçilerek 1-naftil, 2-metil-1-naftil, 4-metil-1-naftil, 3-kinol, 4-kinol ve 3-fenoksifenil türevlendirilmiş 5,6-dihidro-2*H*-pyran-2-on'ların R enansiyomerleri sentezlenmiş ve PC-3, MCF-7 kanser hücreleri üzerinde test edilmiştir. α,β -doymamış- δ -laktona 6 konumuna yapılan 1-naftil türevlendirmelerinin sitotoksik etkiyi arttırdığı gözlemlenmiştir. Test edilenler arasında en çok sitotoksik etkiye sahip olan molekülün PC-3 kanser hücrelerindeki $IC_{50}=50$ nM değeriyle R-(+)-6-(4-metilnaft-1-il)-5,6-dihidro-2*H*-pyran-2-on olgusu gözlemlenmiştir.

Moleküllerin sentezinde, birinci basamakta benzaldehit, naftaldehit ve kinolaldehit türevlerinin katalitik asimetric alillenmesi yapılmış, daha sonra oluşan alkol türevleri akrilklorür yardımı ile esterleştirilmiştir ve son basamakta Grubbs' katalizörü eşliğinde halka kapanması tepkimesiyle hedef moleküllerin sentezleri gerçekleştirilmiştir. Bütün basamaklarda enansiyomerlerin miktarları kiral HPLC yardımıyla gözlemlenmiştir.

Anahtar kelimeler: 5,6-dihidro-2*H*-pyran-2-on, lakton, asimetric sentez, anti-kanser, sitotoksikite.

Abstract

5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-one containing natural products may possess many different biological activities. Goniotalamin, showing promising cytotoxicity against cancer cell and minimal or no damage over the uninfected cells, is a member of such styryl lactones family. In this work, enantiomers of conformationally restricted analogues of (R)- and (S)-goniotalamin were prepared by changing the styryl substituent with 2-naphthyl group, and their cytotoxic effects were studied over PC-3, MCF-7, DU-145 and LNCAP cancer cells. It was found that, conformationally constricted (R) enantiomer improved the cytotoxicity slightly.

To understand the effect of steric difference between 2-naphthyl and styryl groups over the cytotoxicity, different 1-naphthyl, quinoyl, and phenyl substituted 5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones were prepared and tested against PC-3, and MCF-7 cancer cells. Among these compounds 1-naphthyl substituents enhance the cytotoxic effect of the unsaturated lactone, and R-(+)-6-(4-methylnaphthalen-1-yl)-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-one was the most cytotoxic compound with $IC_{50}=50$ nM value over PC-3 cell lines.

Syntheses of the target molecules were started with the catalytic asymmetric allylation of benzaldehyde, naphthaldehyde and quinaldehyde derivatives in the first step. Then formed alcohols were acrylated with acryloylchloride to yield the corresponding esters. In the last step ring closing metathesis with Grubb's catalyst yielded the target molecules. Enantiomers were checked by HPLC assembled with chiral column.

Keywords: 5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones, lactone, asymmetric synthesis, anticancer, cytotoxicity.

Kısaltmalar

mg	miligram
mL	mililitre
IC ₅₀	Hücre çoğalmasını %50 durdurması için gerekli olan konsantrasyon değeri
μM	mikromolar
OS	oda sıcaklığı
DMF	N,N-dimetilformamit
g	gram
nM	nanomolar
ED ₅₀	test edilen ilacın istenen etkisini populasyonun yarısında görülmesi için gereken dozaj.
Boc	t-butyl carbamate
δ	kimyasal kayma
BINOL	1,1'-bi-2-naftol
m	multiplet
t	triplet
s	singlet
dak.	dakika
d	duplet
(M)Hz	(Mega)Hertz
mmol	milimol
mm	milimetre
bd	geniş duplet
dd	dupletin dupleti
ddd	dupletin dupletinin dupleti
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid
%ee	yüzde enansiyomerik fazlalık

rpm	dakikadaki tur sayısı
DIPEA	diizopropiletilamin
CPK	boşluk doldurma metodu
PSA	polar yüzey alanı

1. Giriş

Kanser vücudun bir bölümünde değişime uğramış hücrelerin kontrol dışı büyümesiyle oluşan yüzden farklı çeşitteki hastalığın genel adıdır. Normal bir vücutta hücreler düzenli bir şekilde büyür, bölünür ve ölürlür. İnsan hayatında bebeklikten olgunluk dönemine geçişe kadarki süreçte hücre bölünmesi daha hızlıdır. Olgunluk döneminde ise sadece yaraları tamir etmek veya ölen hücrelerin yerlerine yenilerini koymak için hücre bölünmesi gerçekleşir ve vücutta hücre bölünmesi çok kontrollü bir süreçtir.

Hücre ölümlüde, hücre bölünmesi kadar programlıdır. Bir hücrenin DNA'sı zarar gördüğünde iki seçenek vardır: ya gerçekleşen zarar vücudun savunma mekanizmaları tarafından tamir edilir yada hücre kendisini programlanmış bir şekilde ölüme yönlendirir. Eğerki DNA'daki hasar bir şekilde bu iki seçeneğin gerçekleşmesini engelleyecek türdense hücre tamir edilemediği gibi programlanmış ölümlüde gidemez. Bu durumda yaşamaya devam eder. DNA'mızın belli bölümleri hücrenin çoğalma hızını ve ömrünü kontrol eden bilgilere sahiptir ve eğer bahsedilen hasar DNA'nın bu kısmında gerçekleşirse vücutta hızla çoğalmakta olan bir tür ölümsüz hücre meydana gelir. Öyle inanılıyor ki bu değişim günümüzde kanser dediğimiz hastalığın başlangıç noktasıdır.

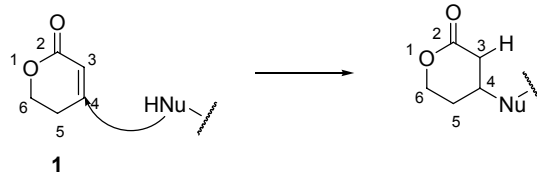
Kanser oluşumunda genetik faktörlerin yanında DNA'nın kimyasallar, virüsler, sigara ve aşırı güneş ışığı gibi çevresel koşullarında rol oynadığı düşünülmektedir. Kanser vücudun herhangi bir bölgesinde meydana gelebilir ve ilerleyen safhalarda vücuda yayılabilir, bu durum metastaz olarak adlandırılır. Kanser hastalarının çoğunlukla ölümüne nedenide aslında kanserin yayılması dediğimiz bu faktördür. Her kanser çeşidi büyüdüğü yere, çoğalma ve yayılma hızına göre tedavilere değişik şekilde cevap verebilirler. Kanser tedavi şekli kanserin türüne, evresine ve diğer kişisel faktörlere bağlı olarak değişmektedir.

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2000 yılı raporunda dünya çapındaki ölümlerin %12'si yani yaklaşık 56 milyon ölüm malignan tümör kaynaklıdır. Doğa kanserle savaşta çok önemli bir kaynaktır ve günümüzde aktif olarak kanser tedavisinde kullanılan Doxorubicin, Dactomycin, Bleomycin, Taxol (Paclitaxel), Taxotere (Docetaxel), Vincristine, Navelbine, Etoposide, Teniposide, Topotecan and Irinotecan (Mukherjee, 2001) gibi antibiyotikler ya doğa kaynaklıdır yada yarı-sentetik maddelerdir. 1981 ile 2006 yılları arasında kanserle savaşta kullanılan ilaçların yaklaşık olarak %74'ü doğal ürün yada onların semisentetik türevleridir (Newman ve Cragg, 2007). Bu nedenle kanserle savaşta yeni sitotoksik etki gösteren moleküllerin dizaynı ve sentezlenmesi önem taşımaktadır. Moleküllerin dizaynlarında çoğunlukla doğadaki kaynaklardan izole edilen moleküllerin temel alınmaktadır. Bu tür doğal bileşiklerin türevlendirilmesi ve yapı-aktivite ilişkilerinin tayin edilmesi büyük önem taşımaktadır.

1.1. Genel Bilgiler

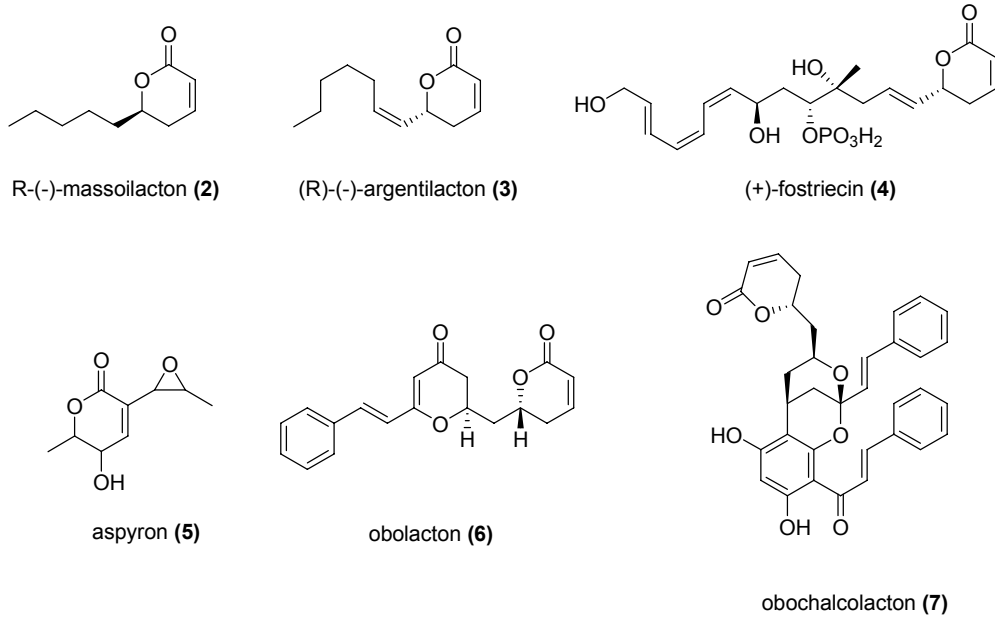
1.1.1. Doğa Kaynaklı 5,6-dihidro-2*H*-pyran-2-on Türevleri

Genel yapısı şekil 1’de gösterilen 5,6-dihidro-2*H*-pyran-2-on literatürde en çok bilinen farmakoforlar arasındadır. Bu fonksiyonel grubu yapılarında bulunduran bileşiklerin biyolojik aktivite gösterme potansiyelleri vardır. Literatürde kabul gören şekliyle biyolojik aktivitenin kaynağı halkadaki 4 numaralı karbonun dışarıdan gelebilecek herhangi bir nükleofilik atağa açık olmasıdır. Bu karbon rahatlıkla bir Michael tepkimesi verebilir, özellikle proteinlerdeki nükleofillerin Michael katılma tepkimesi vermesiyle molekül kovalent olarak kendisini proteine bağlayıp inhibe eder ve biyolojik aktivite gösterir (Fatima, 2006).



Şekil 1. 5,6-dihidro-2*H*-pyran-2-on (1) farmakoforunun genel yapısı ve proteinlerdeki nükleofillerle reaksiyonu.

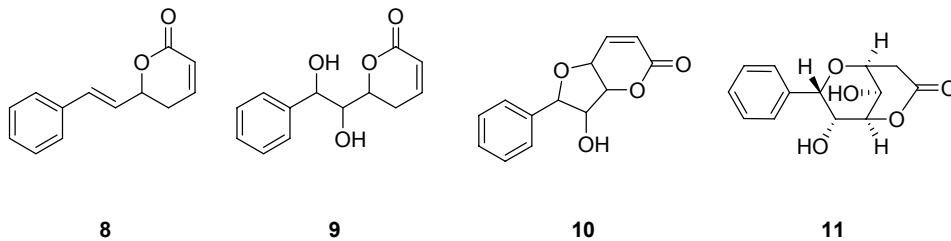
Bahsi geçen α,β -doymamış- δ -laktonların biyolojik aktiviteleri halkada bulunan sübstitüentlerin türüne ve pozisyonlarına bağlı olarak geniş bir spektrumda değişmektedir. Örnek olarak şekil 2’de gösterilen (R)-(-)-massoilacton’un (2) bitki büyümesini düzenlediği ve in-vitroda antimantar etkisi gösterdiği bilinmektedir (Parker, 1997). (R)-(-)-Argentilacton (3) ise antiparazit ve kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif etki göstermektedir (Fatima, 2004). Bir başka örnek (+)-fostriecin (4) protein fosfatase 2A (PP2A) inhibitörüdür (Biobotanic Corp., 2008). 5,6-Dihidro-2*H*-pyran-2-on yapısında 3-no’lu karbona bir epoksit, 5-no’lu karbona hidroksit ve 3-no’lu karbona metil substitüsyonu aspyronu (5) verir ve bu molekülün antibakteriyel özellikleri olduğu bilinmektedir (Holker, 1981). Obolacton (6) ve obochalcolacton (7) ise yeni izole edilmiş iki doğal bileşik olup kanser hücrelerine karşı antiproliferatif etkileri olduğu gösterilmiştir (Dumontet, 2004).



Şekil 2. 5,6-Dihidro-2*H*-pyran-2-on (1) farmakoforunu bünyesinde bulunduran değişik doğal ürünler (R)-(-)-massoilacton (2), (R)-(-)-argentilacton (3), (+)-fostriecin (4), aspyron (5), obolacton (6) ve obochalcolacton (7).

Yapılarında stiren ve α,β -doymamış- δ -lactone yapı taşlarını barındıran moleküller stiril laktonlar olarak adlandırılırlar ve birçok değişik biyolojik aktivite gösterdikleri bilinmektedir. *Goniothalamus*'lardan sitotoksosite gösteren birdizi stiril lakton izole edilmiş ve sentezlenmiştir (Bermejo, 1999).

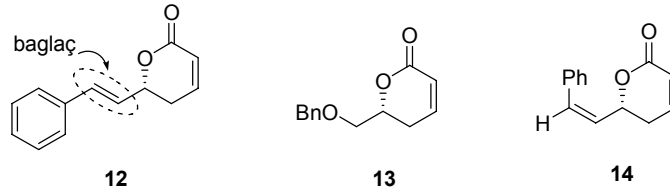
Goniothalamın (1), goniodiol (2), and altholacton (3) *Goniothalamus griffithii*'den izole edilmiş stiril laktonlardır ve ümit verici bir sitotoksositeye sahiptirler. Stiril lakton ailesinden yüksek sitotoksitiye sahip olanlar altholacton (3) (HL-60 hücreleri için $IC_{50}=86.2 \mu M$) ve goniopyrondur (4) (değişik insan kanser hücreleri üzerinde seçici olmayan sitotoksosite $ED_{50}=0.67 \mu g/mL$). (Inayat-Hussain, 2002; Surivet ve Vatele, 1997; Tian, 2006).



Şekil 3. Stiril lakton ailesinden goniothalamine (8), goniodiol (9), altholacton (10), ve goniopyrondur (11) yapıları.

1.1.2. Antikanser Ajanı Olarak Goniotalamin ve Türevleri

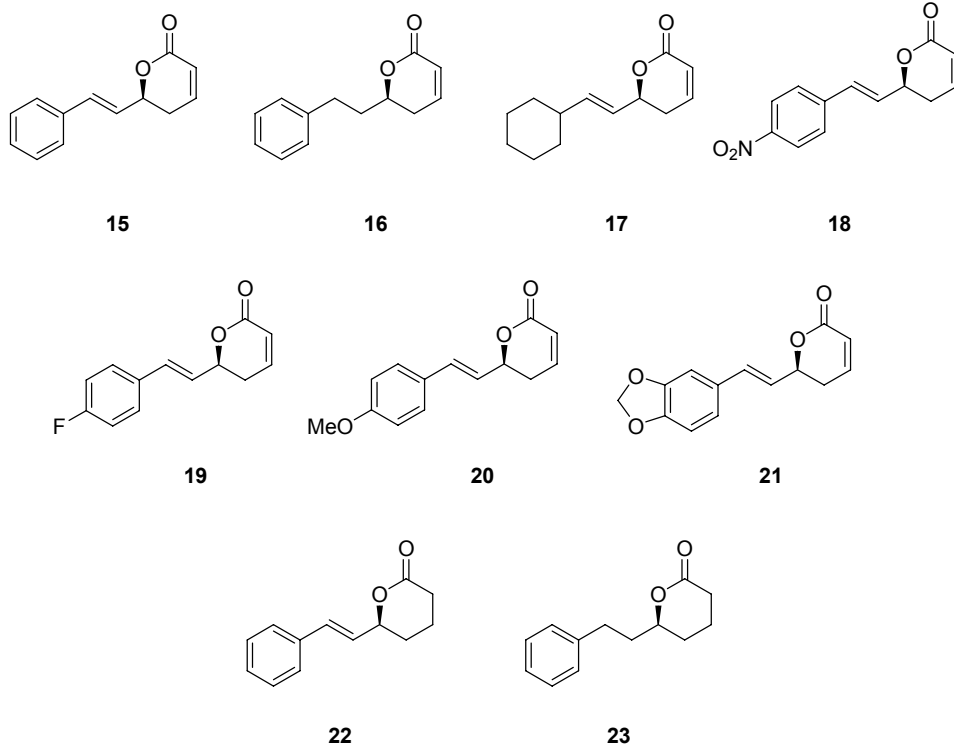
Stiril lakton ailesi içerisinde biyolojik aktivite bakımından en ilginç olanı göğüs kanser hücrelerine karşı gösterdiği seçici sitotoksikite nedeniyle goniotalamindir (**8**) (Fatima, 2006). Goniotalamin ilk olarak 1967 yılında *Cryptocarya caloneura*'dan izole edilmiştir (Pospisil ve Marco 2006). Daha sonra *Cryptocarya moschata* ve değişik spesilerdende izole edilmiştir (Fatima ve Pilli, 2003). Sitotoksik etkilerinin yanında, goniotalaminin güçlü bir antimantar, geniş bir spektrumdaki gram-pozitif ve gram-negatif bakterlere karşı zayıf bir antibiyotik, ve sivrisinek larvalarını öldürme özellikleri vardır (Mosaddik ve Haque, 2003). Çalışmalar göstermiştir ki (R)-goniotalamin (**12**, şekil 4) değişik kanser hücre hatlarına (HeLa, HGC-27, MCF-7, T47D, MDA-MB-231, HL-60 ve Caov-3) karşı sitotoksik etkiye sahipken sağlıklı göğüs hücreleri üzerinde minimal etkiye sahiptir (Fatima, 2005). Fareler üzerinde yapılan ilk testlerde goniotalamin verilen ve verilmeyen fareler arasında yapılan haematolojik karşılaştırmalarda herhangi bir toksik etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir (Mossadik, 1999).



Şekil 4. Literatürde bilinen (R)-goniotalamin (**12**) yapısı ve bağlaç kısmı değiştirilmiş türevleri (**13,14**).

Fatima ve çalışma arkadaşları goniotalaminin yapısındaki bağlaç kısmının modifiye edilmesiyle elde edilen **13** ve **14** no'lu molekülleri (şekil 4) değişik kanser hücresi hatlarında denemiş ve cis çifte bağın bulunduğu bağlacın sitotoksik etkiyi yok ettiğini ve eter bağlacının ise goniotalaminle karşılaştırılabilir bir sitotoksikite sağladığını rapor etmişlerdir (Fatima, 2005).

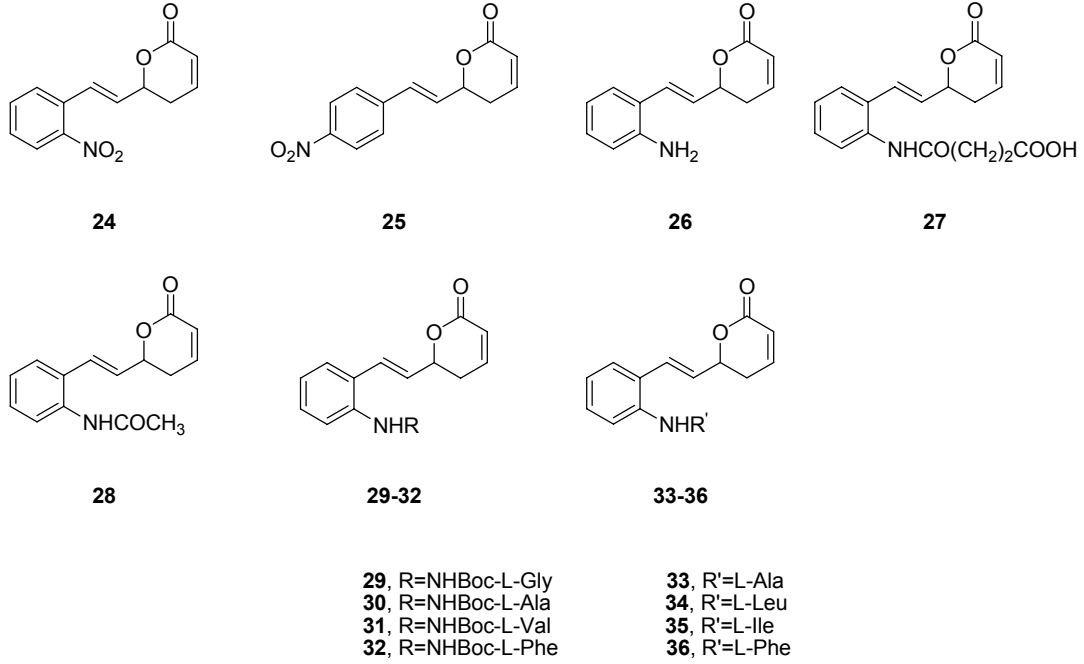
2006 yılında, projemizin yürürlüğe girmesinden hemen sonra, (S)-goniotalamin (**15**, şekil 5) asimetrik olarak sentezlenmiş ve enansiyomeri gibi sitotoksik olduğu belirlenmiştir. (S)- enansiyomerinin sitotoksik özelliği (R)- enansiyomerine yakın bir perspektif izlerken özellikle böbrek kanseri (786-0) hücrelerinde S enansiyomeri 1600 defa daha etkilidir (**15** için $IC_{50}=4$ nM, **12** için $IC_{50}=6.4$ μ M). Biyolojik aktivitedeki bu yükseliş nedeniyle yeni (S)-goniotalamin türevleri (**16-23**) sentezlenmiş ve kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri araştırılmıştır.



Şekil 5. Literatürde bilinen (S)-goniothalamin (**15**) ve türevlerinin yapısı (**16-23**).

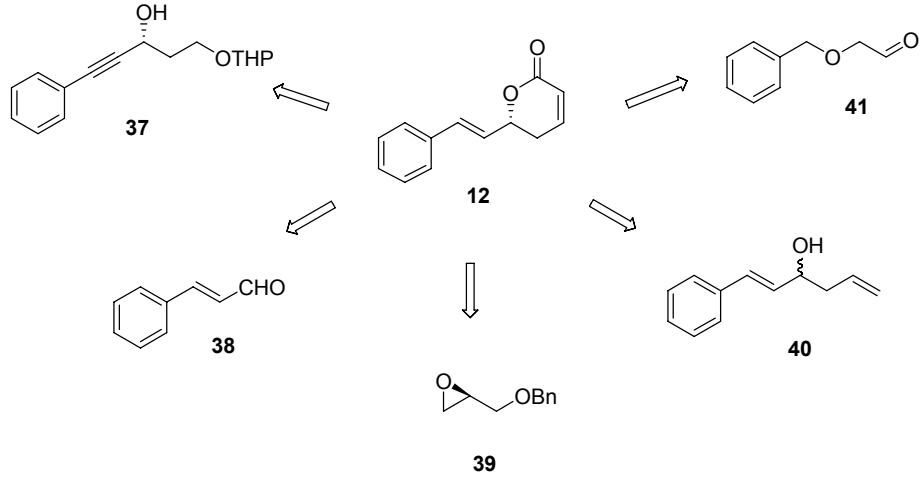
Yapı-aktivite ilişkisine bakıldığında bağlaç ve lakton halkasındaki C=C çift bağlarından herhangi birisinin olmaması durumunda (**16**, **22**, **23**) sitotoksitenin kaybolduğu ve benzen halkasında elektron veren veya elektron çeken grupların bulunmasının (**18-21**) antiproliferatif etkiyi azalttığı rapor edilmiştir (şekil 5). Buna karşın **17** ve **20** no'lu bileşikler prostat kanser hücrelerinde (PCO.3) (R)- ve (S)-goniothalaminden daha kuvvetli sitotoksositeye sahiptirler (Fatima, 2006).

Bunlara ek olarak Zhou ve ekibi semisentetik olarak **24-36** no'lu goniothalamin türevini (şekil 6) sentezlemiş ve dört değişik kanser hücresinde (HL-60, BEL-7402, A549, ve SGC-7901) sitotoksitesilerine bakmıştır. Test edilen moleküller içinde sadece **24-26** no'lu bileşikler SGC-7901 kanser hücresinde daha güçlü biyolojik aktivite göstermiştir, özellikle benzen halkasındaki o-amit veya o-amino asit sübstitüentinin bulunması antiproliferatif etkiyi olumsuz etkilemektedir (Zhou, 2005).



Şekil 6. Literatürde bilinen goniotalaminin benzen halkası üzerinde yarı-sentetik türevleri: *o*-nitro (**24**), *p*-nitro (**25**), *o*-amino (**26**), *o*-amit (**27-28**) ve *o*-amino asit (**29-36**).

Sahip oldukları özellikler nedeniyle 5,6-dihidro-2*H*-pyran-2-on fonksiyonel grubu için değişik sentez metodları çalışılmış ve literatürde rapor edilmiştir. Şekil 7’de (R)- ve (S)-goniotalaminin asimetrik sentezleri için gerekli anahtar başlangıç molekülleri gösterilmiştir. Bu yöntemlerde ya enansiyomerik olarak saf bir başlangıç maddesi (**39**, Pospisil ve Marko, 2006), veya rasemik bir homoallilik alkolün enzimatik kinetik transesterifikasyonu (**40**, Sundby, 2004; Gruttadauria, 2004), yada aldehitlerin enansiyomerik merkezlere çevrilmesi için katalitik asimetrik sentez yöntemleri kullanılmıştır (**37**, **38**, **41**, Sabitha, 2006; Ramachandran, 2006; Fatima, 2005 ve 2006).



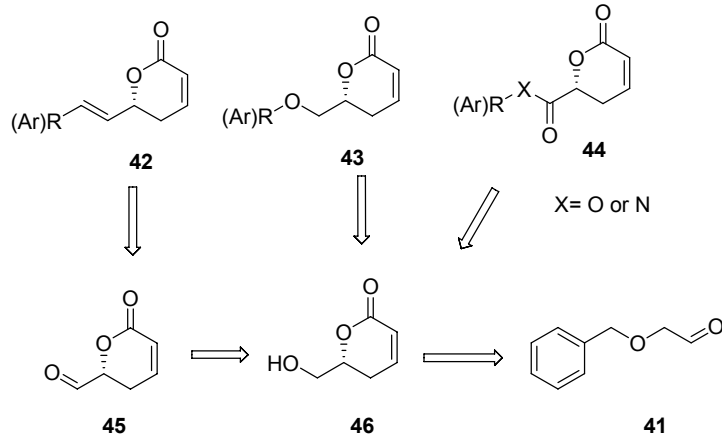
Şekil 7. Literatürde (R)-goniothalamin için bilinen anahtar başlangıç molekülleri.

1.1.3. Hedefler

Goniothalamin türevleri için yapılan yapı-aktivite ilişkisi özetinden anlaşıldığı üzere goniothalamin yapısında:

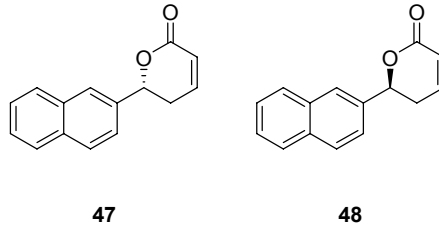
1. Lakton halkasındaki C=C çifte bağı aktivite için gereklidir.
2. Bağlaç değiştirildiğinde sitotoksosite iyi veya kötü yönde etkilenebiliyor.
3. Asimetrik karbondaki (R)- konfigürasyonu önemlidir.
4. Benzen halkasında sübstitüent olması genelde aktiviteyi olumsuz etkiliyor

Bu nedenlerden dolayı goniothalamin yapısı üzerinde yapılabilecek en uygun değişikliğin bağlaç kısmı olabileceği düşüncesi öne çıkmıştır. Proje kapsamında ilk düşünülen yeni stiren türevlerinin sübstitüsüyonu (**42**), bağlaç bölümünde yeni eter fonksiyonallitesi oluşturulması (**43**), veya bağlaç kısmında ester veya amitler (**44**) oluşturmaktı (şekil 8). Sentez yöntemi olarak Fatima ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntemi kullanarak beziloksiasetaldehitten (**41**) önce **46** no'lu alkolü sentezlemek, arkasından alkolü aldehite (**45**) yükseltgemek amaçlanıyordu (Fatima, 2005 ve 2006).



Şekil 8. Yapımı planlanan bağlaç kısımları değiştirilmiş goniotalamin türevleri (**42**, **43**, **44**).

Projenin başladığı 2006 yılında yapılması düşünülen **42** no'lu bileşiklerin (S)-enansiyomerleri sentezlenmiş ve benzen halkasındaki sübstitüsyonun genelde antikanser özelliklerini azalttığı rapor edilmiştir (Fatima, 2006). Bu nedenle ilk etapda benzen halkasını modifiye etmek yerine stirendeki konformasyonel serbestliği sınırlandırmak için 2-naftil grubunun, pyran-2-on'daki 6 no'lu karbonuna bağlanmasıyla yeni konformasyonel olarak sınırlandırılmış (R)- ve (S)-goniotalamin türevlerinin (**47**, **48**) sentezi planlanmıştır (şekil 9).



Şekil 9. Yapımı planlanan konformasyonel olarak sınırlandırılmış goniotalamin türevleri (**47**, **48**).

2. Gereç ve Yöntem

2.1. Organik Sentez

2.1.1. Genel Metodlar: Kimyasallar ticari kalitede olup firmalardan alındığı şekliyle kullanılmıştır. Diklorometan kalsiyumhidrürle distille edilerek kullanılmıştır. Bütün reaksiyonlar azot atmosferinde yapılmıştır. Reaksiyonlar Merc TLC plakaları (Silicagel 60 F₂₅₄) kullanılarak TLC kromatografisi kullanılarak izlenmiştir. Kromatografik saflaştırma işlemi 70-230 mesh boyutlarında silikajel kullanılarak yapılmıştır. SiO₂ kolonu için gerekli çözümler ticari kalitede olup firmalardan alındığı şekliyle kullanılmıştır. HPLC çalışmalarında kullanılan çözümler kromatografik kullanımına uygun kalitede olup firmalardan alındığı şekliyle kullanılmıştır. ¹H NMR ve ¹³C NMR spektrumları Varian 400-MR (400 MHz) spektrometresiyle alınmıştır. ¹H-NMR and ¹³C-NMR'daki kimyasal kaymalar δ (ppm) olarak rapor edilmiştir. CDCl₃ pikleri ¹H-NMR (7.26 ppm), ve ¹³C-NMR (77.36 ppm) spektrumları için referans olarak kullanılmıştır. Maddelerin optik döndürmeleri "Optical Digital Polarimeter (SOLF) model WZZ-1S instrument" ile ölçülmüştür. HPLC çalışmaları Agilent 1100 Serisi HPLC'de, "Chiracel AD-H" kolonu (0,46x150 mm) kullanılarak yapılmıştır. GC-MS spektrumları "Quadrupole Mass Spectrometer (EI)" ile desteklenmiş "Agilent 6890N Network GC" sistemiyle alınmıştır.

2.1.2. Kiral Alkollerin (56-57, 72-77) Sentezlenmesi İçin Genel Prosedür: Kondenser bağlanmış 10 mL'lik balon içerisinde 0.05 birim (mmol) TiCl₄, 2.6 mL diklorometan kullanılarak çözüldü. Bu çözeltinin içerisine, 0.15 birim (mmol) Ti(Oi-Pr)₄ azot atmosfer altında eklendi. Elde edilen çözelti oda sıcaklığında 1 saat karıştırılıp, üzerine 0.10 birim (mmol) gümüş (I) oksit eklendi. Daha sonra, karışım gün ışığından korunarak 5 saat karıştırıldı. Süre dolusunda, karışım 4.5 mL diklorometanla seyreltilip üzerine 0.20 birim (mmol) (R)-BINOL eklenerek 2 saat daha karıştırıldı. Kullanıma hazır hale gelen katalizör çözeltisi -75 °C'ye soğutuldu ve üzerine sırayla 1.00 birim (mmol) arilaldehit ve 1.10 birim (mmol) alliltributikalay konulduktan sonra oda sıcaklığına bırakılıp 16 saat karıştırıldı. Sürenin bitiminde (TLC'de hala reaksiyona girmemiş başlangıç maddeleri görülmekte), karışım celit üzerinden süzüldü ve 40 mL doymuş NaHCO₃ çözeltisiyle muamele edildi. Son karışım 3x30 mL etil asetatla ekstrakt edilip, birleştirilen organik faz MgSO₄ ile kurutulup süzüldü. Vakum altında çözümlerin uzaklaştırılmasıyla elde edilen ürün, SiO₂ kolon kromatografisiyle saflaştırıldı.

(R)-(+)-1-(naft-2-il)-but-3-en-1-ol (56). Vakum altında çözümlerin uzaklaştırılmasından sonra elde edilen ham ürünün SiO₂ kolon kromatografisiyle saflaştırıldı (etil asetat:hekzan, 1:8) ve 309 mg (R)-1-(naft-2-il)-but-3-en-1-ol (**56**) maddesi renksiz köpük olarak %59 verimle

elde edildi. $R_f = 0.65$ (etil asetat:hekzan, 1:2); $[\alpha]_D^{30} = + 52.7$ ($c = 3,00$, CH_2Cl_2); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.88-7.78 (m, 4H), 7.53-7.44 (m, 3H), 5.91-5.77 (m, 1H), 5.23-5.12 (m, 2H), 4.90 (t, 1H, $J = 6.3$ Hz), 2.68-2.54 (m, 2H), 2.25 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 141.58, 134.68, 133.59, 133.28, 128.52, 128.28, 128.00, 126.44, 126.13, 124.83, 124.33, 118.81, 73.72, 44.04;; MS (EI) m/z hesaplanan M^+ ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}$) = 198,1; bulunan: 198 (%2), 179 (%100), 166, 157, 129; HPLC - Chiracel AD-H kolon (*i*-propanol:hekzan 10:90, 1 mL/dak $t_1 = 5.51$ dak. "büyük enansiyomer", $t_2 = 5.97$ dak. "küçük enansiyomer").

(S)-(-)-1-(naft-2-il)-but-3-en-1-ol (57). Katalizör R-BINOL yerine S-BINOL kullanılarak hazırlandı. Vakum altında çözgenin uzaklaştırılmasından sonra elde edilen ham ürünün SiO_2 kolon kromatografisiyle saflaştırıldı (etil asetat:hekzan, 1:8) ve 133 mg S-(-)-1-(naft-2-il)-but-3-en-1-ol (57) sarı katı bir madde olarak %26 verimle elde edildi. $R_f = 0.42$ (etil asetat:hekzan, 1:4); $[\alpha]_D^{26} = -47.87$ ($c = 1.32$, CH_2Cl_2); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.88-7.78 (m, 4H), 7.53-7.44 (m, 3H), 5.91-5.77 (m, 1H), 5.23-5.12 (m, 2H), 4.90 (t, 1H, $J = 6.3$ Hz), 2.68-2,54 (m, 2H), 2.25 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 141.58, 134.68, 133.59, 133.28, 128.52, 128.28, 128.00, 126.44, 126.13, 124.83, 124.33, 118.81, 73.72, 44.04; MS (EI) m/z hesaplanan M^+ ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}$) = 198,1; bulunan: 198 (%2), 179 (%100), 166, 157, 129; Enansiyomerik fazlalık = %81 (HPLC - Chiracel AD-H kolon, *i*-propanol:hekzan 10:90, 1 mL/dak $t_1 = 5.51$ dak. "küçük enansiyomer", $t_2 = 5.95$ dak. "büyük enansiyomer").

(R)-(+)-1-(naft-1-il)-but-3-en-1-ol (72): Vakum altında çözgenin uzaklaştırılmasından sonra elde edilen ham ürünün SiO_2 kolon kromatografisiyle saflaştırıldı (etil asetat:hekzan, 1:8) ve 214 mg R-(+)-1-(naft-1-il)-but-3-en-1-ol (72) sarı katı bir madde olarak %41 verimle elde edildi. $R_f = 0.42$ (etil asetat:hekzan, 1:4); $[\alpha]_D^{26} = + 84.35$ ($c = 2.14$, CH_2Cl_2); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.07 (d, 1H, $J = 7.18$ Hz), 7.92-7.87 (m, 1H), 7.79 (d, 1H, $J = 8.08$ Hz), 7.67 (d, 1H, $J = 7.18$ Hz), 7.57-7.46 (m, 3H), 5.99-5.88 (m, 1H), 5.55-5.48 (m, 1H), 5.26-5.16 (m, 2H), 2.81-2.73 (m, 1H), 2.66-2.56 (m, 1H), 2.37 (brs, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 139.34, 134.71, 133.68, 130.15, 128.87, 127.87, 125.94, 125.41, 125.36, 122.90, 122.76, 118.22, 69.88, 42.76. MS (EI) m/z hesaplanan M^+ ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}$) = 198,1; bulunan: 198 (%2), 179 (%100), 166, 157, 129; Enansiyomerik fazlalık = %77, (HPLC - Chiracel AD-H kolon, *i*-propanol:hekzan 5:95, 1 mL/dak, $t_1 = 7.57$ dak. "küçük enansiyomer", $t_2 = 8.62$ dak. "büyük enansiyomer").

(R)-1-(2-metilnaft-1-il)-but-3-en-1-ol (73): Vakum altında çözgenin uzaklaştırılmasından sonra elde edilen ham ürünün SiO_2 kolon kromatografisiyle saflaştırıldı (etil asetat:hekzan, 1:8) ve 104 mg R-(+)-1-(2-metilnaft-1-il)-but-3-en-1-ol (73) maddesi renksiz bir yağ olarak %19 verimle elde edildi. $R_f = 0.34$ (etil asetat:hekzan, 1:6); $[\alpha]_D^{21} =$ (Ölçülemedi) ($c = 1.04$, değişik solventler denendi); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.67 (d, 1H, $J = 8.61$ Hz), 7.81 (d, 1H, $J = 7.82$ Hz), 7.51-7.39 (m, 2H), 7.29-7.24 (m, 1H), 5.96-5.84 (m,

1H), 5.64-5.57 (m, 1H), 5.21 (ddd, 1H, J = 17.21, 3.13 ve 1.56 Hz), 5.17-5.12 (m, 1H), 3.60-2.96 (m, 1H), 2.76-2.67 (m, 1H), 2.56 (s, 3H), 2.20 (brs, 1H); ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 135.30, 135.08, 133.38, 132.99, 131.26, 129.49, 128.70, 128.03, 125.63, 125.50, 124.64, 117.90, 71.54, 41.21, 21.00; Enansiyomerik fazlalık = %96, (HPLC - Chiracel AD-H kolon, *i*-propanol:hekzan 5:95, 1 mL/dak, t₁ = 3.70 min “küçük enansiyomer”, t₂ = 4.50 min “büyük enansiyomer”).

(R)-(+)-1-(4-metilnaft-1-il)-but-3-en-1-ol (74): Vakum altında çözgenin uzaklaştırılmasından sonra elde edilen ham ürünün SiO₂ kolon kromatografisiyle saflaştırıldı (etil asetat:hekzan, 1:10) ve 71 mg R-(+)-1-(4-metilnaft-1-il)-but-3-en-1-ol (**74**) maddesi sarımsı bir yağ olarak %14 verimle elde edildi. R_f = 0.24 (etil asetat:hekzan, 1:6); [α]_D²⁰ = +57.72 (c = 0.71, CH₂Cl₂); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.14-8.03 (m, 2H), 7.58-7.51 (m, 3H), 7.34 (d, 1H, J = 7.43 Hz), 6.00-5.89 (m, 1H), 5.55-5.49 (m, 1H), 5.26-5.15 (m, 2H), 2.81-2.73 (m, 1H), 2.70 (s, 3H), 2.66-2.57 (m, 1H), 2.11 (brs, 1H); ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 137.51, 134.89, 134.04, 132.85, 130.37, 126.21, 125.67, 125.36, 124.98, 123.48, 122.55, 118.22, 69.96, 42.85, 19.58; Enansiyomerik fazlalık = %72 (HPLC - Chiracel AD-H kolon, *i*-propanol:hekzan 5:95, 1 mL/dak, t₁ = 6.80 dak. “büyük enansiyomer”, t₂ = 7.10 dak. “küçük enansiyomer”).

(R)-(+)-1-(kinolin-4-il)-but-3-en-1-ol (75): Vakum altında çözgenin uzaklaştırılmasından sonra elde edilen ham ürünün SiO₂ kolon kromatografisiyle saflaştırıldı (etil asetat:hekzan, 1:6) ve 73 mg R-(+)-1-(kinolin-4-il)-but-3-en-1-ol (**75**) maddesi renksiz yağ olarak %21 verimle elde edildi. R_f = 0.22 (etil asetat:hekzan, 1:1); [α]_D²¹ = +67.08 (c = 0.73, EtOH); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.71-8.65 (m, 1H), 8.06-8.00 (m, 1H), 7.97-7.91 (m, 1H), 7.65-7.58 (m, 1H), 7.55-7.45 (m, 2H), 5.94-5.83 (m, 1H), 5.52-5.46 (m, 1H), 5.18-5.10 (m, 2H), 4.30 (br s, 1H), 2.74-2.65 (m, 1H), 2.57-2.47 (m, 1H); ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 150.04, 149.94, 147.68, 133.94, 129.80, 128.98, 126.43, 125.31, 122.82, 118.50, 117.52, 68.78, 42.71; Enansiyomerik fazlalık = %65 (HPLC - Chiracel AD-H kolon, *i*-propanol:hekzan 5:95, 1 mL/dak, t₁ = 14.70 dak. “büyük enansiyomer”, t₂ = 17.09 dak. “küçük enansiyomer”).

(R)-(+)-1-(kinolin-3-il)-but-3-en-1-ol (76): Vakum altında çözgenin uzaklaştırılmasından sonra elde edilen ham ürünün SiO₂ kolon kromatografisiyle saflaştırıldı (etil asetat:hekzan, 1:6) ve 253 mg R-(+)-1-(kinolin-3-il)-but-3-en-1-ol (**76**) sarı katı bir madde olarak %48 verimle elde edildi. R_f = 0.22 (etil asetat:hekzan, 1:1); [α]_D²⁰ = +28.21 (c = 2.53, EtOH); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.72 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 8.00 (d, 1H, J = 8.22 Hz), 7.71 (d, 1H, J = 8.22 Hz), 7.65-7.58 (m, 1H), 7.51-7.44 (m, 1H), 5.85-5.72 (m, 1H), 5.14-5.06 (m, 2H), 4.93-4.87 (m, 1H), 4.15 (br s, 1H), 2.59-2.52 (m, 2H); ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 149.19, 147.15, 136.83, 133.66, 132.78, 129.20, 128.66, 127.71, 127.69, 126.70, 118.71,

71.06, 43.56; Enansiyomerik fazlalık = %93 (HPLC - Chiracel AD-H kolon, *i*-propanol:hekzan 5:95, 1 mL/dak t_1 = 23.90 dak. "küçük enansiyomer", t_2 = 26.40 dak. "büyük enansiyomer").

(R)-(+)-1-(3-fenoksifenil)-but-3-en-1-ol (77): Vakum altında çözünenin uzaklaştırılmasından sonra elde edilen ham ürünün SiO₂ kolon kromatografisiyle saflaştırıldı (etil asetat:hekzan, 1:14) ve 72 mg R-(+)-1-(3-fenoksifenil)-but-3-en-1-ol (77) maddesi renksiz yağ olarak %11 verimle elde edildi. R_f = 0.12 (etil asetat:hekzan, 1:10); $[\alpha]_D^{22}$ = +31.66 (c = 0.72, CH₂Cl₂); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.38-7.28 (m, 3H), 7.17-7.08 (m, 2H), 7.06-7.00 (m, 3H), 6.92 (ddd, 1H, J = 8.22, 2.74 ve 1.17 Hz), 5.86-5.74 (m, 1H), 5.19-5.15 (m, 1H), 5.15-5.13 (m, 1H), 4.74-4.68 (m, 1H), 3.43-2.57 (m, 2H), 2.23 (brd, 1H, J = 2.74 Hz); ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 157.33, 157.12, 146.00, 134.15, 129.72, 129.70, 123.23, 120.58, 118.84, 118.64, 117.83, 116.30, 72.87, 43.79; Enansiyomerik fazlalık = %76 (HPLC - Chiracel AD-H kolon, *i*-propanol:hekzan 5:95, 1 mL/dak, t_1 = 6.90 dak. "büyük enansiyomer", t_2 = 7.80 dak. "küçük enansiyomer").

2.1.3. Akriloyl Esterlerin (58-59, 78-83) Sentezi İçin Genel Prosedür: 3 mL diklorometan içerisindeki 1.00 birim (mmol) alkol (56-57, 72-77) çözeltisi 0 °C'ye kadar soğutulup, üzerine sırasıyla 1.80 birim (mmol) akriloyl klorür ve 3.60 birim (mmol) trietilamin eklendi. Daha sonra karışım oda sıcaklığına getirilip 22 saat azot atmosferinde karıştırıldı. Elde edilen çözelti celit üzerinden süzülüp su içerisine döküldükten sonra 3x25 mL diklorometan ile ekstraksiyon yapıldı. Toplanan organik faz MgSO₄ ile kurutulduktan sonra süzüldü, ve vakum altında çözünenin uzaklaştırılmasından sonra SiO₂ kolon kromatografisiyle saflaştırıldı.

(R)-(+)-1-(naft-2-il)-but-3-enil akrilat (58). Vakum altında çözünenin uzaklaştırılmasından sonra elde edilen ham ürünün SiO₂ kolon kromatografisiyle saflaştırıldı (ethyl acetate:hekzan, 1:8) ve 204.8 mg (R)-1-(naft-2-il)-but-3-enil akrilat (58) maddesi %53 verimle elde edildi. R_f = 0.63 (etil asetat:hekzan, 1:4); $[\alpha]_D^{25}$ = + 67.46 (c = 2.05, CH₂Cl₂); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.88-7.70 (m, 4H), 7.53-7.41 (s, 3H), 6.44 (d, 1H, J = 17.3 Hz), 6.24-6.12 (m, 1H), 6.09-6.00 (m, 1H), 5.84 (d, 1H, J = 10.4 Hz), 5.80-5.67 (m, 1H), 5.16-5.00 (m, 2H), 2.85-2.63 (m, 2H); ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 165.74, 137.64, 133.49, 133.45, 133.44, 131.28, 128.92, 128.65, 128.41, 128.01, 126.56, 126.45, 126.10, 124.62, 118.56, 75.86, 41.00; MS (EI) m/z hesaplanan M⁺ (C₁₇H₁₆O₂) = 252,1; bulunan: 252 (%2), 224, 178, 156(%100), 128, 68; Enansiyomerik fazlalık = %79 (HPLC - Chiracel AD-H kolon, *i*-propanol:hekzan 10:90, 1 mL/dak t_1 = 2,80 dak. "büyük enansiyomer", t_2 = 3,50 dak. "küçük enansiyomer").

(S)-(-)-1-(naft-2-il)-but-3-enil akrilat (59): Vakum altında çözünenin uzaklaştırılmasından sonra elde edilen ham ürünün SiO₂ kolon kromatografisiyle saflaştırıldı

(ethyl acetate:hekzan, 1:8) ve 124 mg S(-)-1-(naft-2-il)-but-3-enyl akrilat (**59**) maddesi %73 verimle elde edildi. $R_f = 0.63$ (etil asetat:hekzan, 1:4); $[\alpha]_D^{27} = -54.79$ ($c = 1.23$, CH_2Cl_2); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.88-7.70 (m, 4H), 7.53-7.41 (m, 3H), 6.44 (d, 1H, $J = 17.3$ Hz), 6.24-6.12 (m, 1H), 6.09-6.00 (m, 1H), 5.84 (d, 1H, $J = 10.4$ Hz), 5.80-5.67 (m, 1H), 5.16-5.00 (m, 2H), 2.85-2.63 (m, 2H); $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 165.74, 137.64, 133.49, 133.45, 133.44, 131.28, 128.92, 128.65, 128.41, 128.01, 126.56, 126.45, 126.10, 124.62, 118.56, 75.86, 41.00; MS (EI) m/z hesaplanan M^+ ($\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_2$) = 252,1; bulunan: 252 (2%), 224, 178, 156(100%), 128, 68; Enantiomerik fazlalık = %81 (HPLC - Chiracel AD-H kolon, *i*-propanol:hekzan 5:95, 1 mL/dak $t_1 = 3.21$ dak. "büyük enansiyomer", $t_2 = 4.22$ dak. "küçük enansiyomer").

(R)-(+)-1-(naft-1-il)-but-3-enil akrilat (78): Vakum altında çözünenin uzaklaştırılmasından sonra elde edilen ham ürünün SiO_2 kolon kromatografisiyle saflaştırıldı (ethyl acetate:hekzan, 1:8) ve 186 mg R-(+)-1-(naft-1-il)-but-3-enyl akrilat (**78**) maddesi %69 verimle elde edildi. $R_f = 0.63$ (etil asetat:hekzan, 1:4); (ikinci sentezde %73 ee için $[\alpha]_D^{26} = +7.92$ ($c = 2.12$, EtOAc) olarak hesaplandı); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.16 (d, 1H, $J = 8.27$ Hz), 7.88 (d, 1H, $J = 8.27$ Hz), 7.81 (d, 1H, $J = 8.27$ Hz), 7.61-7.44 (m, 4H), 6.71-6.66 (m, 1H), 6.47 (dd, 1H, $J = 17.46$ ve 1.84 Hz), 6.21 (dd, 1H, $J = 17.46$ ve 10.11 Hz), 5.89-5.74 (m, 2H), 5.15-5.04 (m, 2H), 2.87-2.81 (m, 2H); $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 165.59, 136.08, 134.04, 133.69, 131.21, 130.55, 129.15, 128.77, 128.73, 126.54, 125.89, 125.45, 124.11, 123.39, 118.23, 72.73, 40.60; Enansiyomerik fazlalık = %44 (HPLC - Chiracel AD-H kolon, *i*-propanol:hekzan 5:95, 1 mL/dak $t_1 = 3.21$ dak. "büyük enansiyomer", $t_2 = 4.22$ dak. "küçük enansiyomer").

(R)-(+)-1-(2-metilnaft-1-il)-but-3-enil akrilat (79): Vakum altında çözünenin uzaklaştırılmasından sonra elde edilen ham ürünün SiO_2 kolon kromatografisiyle saflaştırıldı (ethyl acetate:hekzan, 1:10) ve 81 mg R-(+)-1-(2-metilnaft-1-il)-but-3-enil akrilat (**79**) maddesi sarı yağ olarak %62 verimle elde edildi. $R_f = 0.47$ (etil asetat:hekzan, 1:4); $[\alpha]_D^{18} = +15.15$ ($c = 0.80$, CH_2Cl_2); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.51 (d, 1H, $J = 8.61$ Hz), 7.82 (d, 1H, $J = 7.82$ Hz), 7.71 (d, 1H, $J = 8.61$ Hz), 7.54-7.48 (m, 1H), 7.46-7.41 (m, 1H), 7.29 (d, 1H, $J = 8.22$ Hz), 6.42 (dd, 1H, $J = 17.22$ ve 1.56 Hz), 6.18 (dd, 1H, $J = 17.22$ ve 10.56 Hz), 5.84-5.72 (m, 2H), 5.14 (ddd, 1H, $J = 17.22$, 3.13, ve 1.56 Hz), 5.10-5.05 (m, 1H), 3.19-3.09 (m, 1H), 2.92-2.83 (m, 1H), 2.68 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 165.42, 134.28, 133.54, 133.27, 132.01, 131.08, 130.72, 129.34, 128.84, 128.53, 128.46, 125.73, 124.54, 117.92, 117.90, 72.83, 39.11, 20.92; Enansiyomerik fazlalık = %100 (HPLC - Chiracel AD-H kolon, *i*-propanol:hekzan 1:99, 0.7 mL/dak $t_1 = 4.00$ dak. tek sinyal).

(R)-(+)-1-(4-metilnaft-1-il)-but-3-enil akrilat (80): Vakum altında çözünenin uzaklaştırılmasından sonra elde edilen ham ürünün SiO_2 kolon kromatografisiyle saflaştırıldı

(acetate:hekzan, 1:12) ve 50 mg R-(+)-1-(4-metilnaft-1-il)-but-3-enil akrilat (**80**) maddesi sarımsı bir yağ olarak %56 verimle elde edildi. $R_f = 0.45$ (etil asetat:hekzan, 1:8); $[\alpha]_D^{31} = +13.33$ ($c = 2.73$, CH_2Cl_2) ikinci sentezde %77 ee için hesaplandı; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.21-8.16 (m, 1H), 8.07-8.03 (m, 1H), 7.60-7.52 (m, 2H), 7.48 (d, 1H, $J = 7.04$ Hz), 7.32 (dd, 1H, $J = 7.43$ ve 0.78 Hz), 6.70-6.65 (m, 1H), 6.46 (dd, 1H, $J = 17.22$ ve 1.56 Hz), 6.20 (dd, 1H, $J = 17.22$ ve 10.56 Hz), 5.88-5.76 (m, 2H), 5.13 (dd, 1H, $J = 3.13$ ve 1.56 Hz), 5.09-5.04 (m, 1H), 2.87-2.81 (m, 2H), 2.69 (d, 3H, $J = 0.78$ Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 165.36, 134.64, 133.96, 133.56, 132.84, 130.85, 130.39, 128.56, 126.02, 125.92, 125.49, 124.92, 123.63, 117.87, 72.51, 40.32, 19.58; Enansiyomerik fazlalık = %66 (HPLC - Chiracel AD-H kolon, *i*-propanol:hekzan 1:99, 1 mL/dak $t_1 = 2.80$ dak. "büyük enansiyomer", $t_2 = 3.16$ dak. "küçük enansiyomer").

(R)-(-)-1-(kinolin-4-il)-but-3-enil akrilat (81): Vakum altında çözünenin uzaklaştırılmasından sonra elde edilen ham ürünün SiO_2 kolon kromatografisiyle saflaştırıldı (ethyl acetate:hekzan, 1:8) ve 43 mg R-(+)-1-(kinolin-4-il)-but-3-enil akrilat (**81**) maddesi renksiz köpük olarak %56 verimle elde edildi. $R_f = 0.15$ (etil asetat:hekzan, 1:4); $[\alpha]_D^{28} = -5.50$ ($c = 2.30$, CH_2Cl_2); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.90 (d, 1H, $J = 4.30$ Hz) 8.18-8.07 (m, 2H), 7.73 (ddd, 1H, $J = 8.22$, 6.65, ve 1.17 Hz), 7.60 (ddd, 1H, $J = 8.22$, 7.04, ve 1.17 Hz), 7.43 (d, 1H, $J = 3.91$ Hz), 6.62 (dd, 1H, $J = 7.43$ ve 5.48 Hz), 6.49 (dd, 1H, $J = 17.22$ ve 1.56 Hz), 6.22 (dd, 1H, $J = 17.22$ ve 10.56 Hz), 5.90 (dd, 1H, $J = 10.56$ ve 1.17 Hz), 5.83-5.71 (m, 1H), 5.13-5.05 (m, 2H), 2.85-2.71 (m, 2H); $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 165.08, 150.07, 148.39, 145.45, 132.41, 131.67, 130.46, 129.28, 128.01, 126.88, 125.19, 122.91, 118.74, 117.83, 71.21, 40.01; Enansiyomerik fazlalık = %100 with HPLC - Chiracel AD-H kolon (*i*-propanol:hekzan 1:99, 1 mL/dak $t_1 = 11.50$ dak. tek sinyal).

(R)-(+)-1-(kinolin-3-il)-but-3-enil akrilat (82): Vakum altında çözünenin uzaklaştırılmasından sonra elde edilen ham ürünün SiO_2 kolon kromatografisiyle saflaştırıldı (ethyl acetate:hekzan, 1:8) ve 171 mg (R)-(+)-1-(kinolin-3-il)-but-3-enil akrilat (**82**) sarı katı bir madde olarak %54 verimle elde edildi. $R_f = 0.26$ (etil asetat:hekzan, 1:4); $[\alpha]_D^{18} = +74.37$ ($c = 1.71$, EtOH); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.92 (d, 1H, $J = 2.35$ Hz) 8.11-8.06 (m, 2H), 7.79 (d, 1H, $J = 8.22$ Hz), 7.67 (ddd, 1H, $J = 8.22$, 6.65, ve 1.56 Hz), 7.55-7.48 (m, 1H), 6.43 (dd, 1H, $J = 17.61$ ve 1.56 Hz), 6.20-6.11 (m, 1H), 6.09-6.04 (m, 1H), 5.83 (dd, 1H, $J = 10.56$ ve 1.56 Hz), 5.78-5.66 (m, 1H), 5.12-5.04 (m, 2H), 2.86-2.77 (m, 1H), 2.75-2.66 (m, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 165.08, 149.21, 147.74, 133.69, 132.48, 132.18, 131.35, 129.53, 129.13, 128.04, 127.77, 127.42, 126.82, 118.89, 73.34, 40.26; Enansiyomerik fazlalık = %92 (HPLC - Chiracel AD-H kolon, *i*-propanol:hekzan 1:99, 1 mL/dak $t_1 = 19.50$ dak. "büyük enansiyomer", $t_2 = 21.50$ dak. "küçük enansiyomer").

(R)-(+)-1-(3-fenoksifenil)-but-3-enil akrilat (83): Vakum altında çözünenin uzaklaştırılmasından sonra elde edilen ham ürünün SiO₂ kolon kromatografisiyle saflaştırıldı (etil asetat:hekzan, 1:12) ve 61 mg R-(+)-1-(3-fenoksifenil)-but-3-enil akrilat (**83**) maddesi sarımsı bir yağ olarak %76 verimle elde edildi. $R_f = 0.50$ (etil asetat:hekzan, 1:8); $[\alpha]_D^{21} = +28.67$ ($c = 0.43$, CH₂Cl₂); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.38-7.28 (m, 3H), 7.15-7.08 (m, 2H), 7.06-7.00 (m, 3H), 6.92 (ddd, 1H, $J = 8.22, 2.35, \text{ ve } 0.78$ Hz), 6.43 (dd, 1H, $J = 17.22$ ve 1.56 Hz), 6.16 (dd, 1H, $J = 17.22$ ve 10.17 Hz), 5.90-5.82 (m, 2H), 5.79-5.67 (m, 1H), 5.13-5.05 (m, 2H), 2.73-2.55 (m, 2H); ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 165.21, 157.27, 156.94, 142.04, 132.92, 130.94, 129.71, 129.70, 128.41, 123.29, 121.22, 118.86, 118.23, 118.06, 116.80, 74.83, 40.72; Enansiyomerik fazlalık = %75 (HPLC - Chiracel AD-H kolon, *i*-propanol:hekzan 1:99, 1 mL/dak $t_1 = 4.50$ dak. "küçük enansiyomer", $t_2 = 4.80$ dak. "büyük enansiyomer").

2.1.4. 5-Sübstitüeli α,β -Doymamış δ -Laktonların (47-48, 60-65) Sentezi İçin Genel Prosedür: 8 mL diklorometan içerisindeki %10mol Grubbs' katalizörüne, 90 mL dichlorometan içerisindeki 1.00 birim (mmol) akriloyl ester çözeltisi 60 °C'de karıştırılarak eklendi. Elde edilen karışım 14 saat reflüks edildikten sonra, oda sıcaklığına getirilip vakum altında diklorometan uçuruldu. Geride kalan siyah balçık SiO₂ kolon kromatografisiyle saflaştırıldı.

(R)-(+)-5,6-dihidro-6-(naft-2-il)-pyran-2-on (47). Vakum altında çözünenin uzaklaştırılmasından sonra elde edilen ham ürünün SiO₂ kolon kromatografisiyle saflaştırıldı (etil asetat:hekzan, 1:8) ve 159 mg (R)-5,6-dihidro-6-(naft-2-il)-pyran-2-on (**47**) maddesi %92 verimle elde edildi. $[\alpha]_D^{20} = +190.19$ ($c = 1.59$, CH₂Cl₂). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.91-7.82 (m, 4H), 7.54-7.47 (m, 3H), 7.03-6.96 (m, 1H), 6.18 (d, 1H, $J = 10.9$ Hz), 5.63 (dd, 1H, $J = 10.7$ ve 5.2 Hz), 2.80-2.64 (m, 2H); ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 164.41, 145.19, 136.13, 133.59, 133.42, 128.46, 128.08, 126.87, 126.83, 125.53, 123.86, 122.13, 105.11, 79.65, 32.08; MS (EI) m/z hesaplanan M^+ (C₁₅H₁₂O₂) = 224,1; bulunan: 224 (%50), 178, 156 (%100), 128, 68; Enansiyomerik fazlalık = %76 (HPLC - Chiracel AD-H kolon, *i*-propanol:hekzan 5:95, 1 mL/dak $t_1 = 17,66$ dak. "büyük enansiyomer", $t_2 = 18.27$ dak. "küçük enansiyomer").

(S)-(-)-6-(naft-2-il)-5,6-dihidro-2H-pyran-2-on (48): Vakum altında çözünenin uzaklaştırılmasından sonra elde edilen ham ürünün SiO₂ kolon kromatografisiyle saflaştırıldı (etil asetat:hekzan, 1:8) ve 78 mg S-(-)-6-(naft-1-il)-5,6-dihidro-2H-pyran-2-on (**48**) renksiz katı bir madde olarak %73 verimle elde edildi. $R_f=0.13$ (etil asetat:hekzan, 1:4). $[\alpha]_D^{20} = -175.38$ ($c = 0.78$, CH₂Cl₂). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.91-7.82 (m, 4H), 7.54-7.47 (m, 3H), 7.03-6.96 (m, 1H), 6.18 (d, 1H, $J = 10.9$ Hz), 5.63 (dd, 1H, $J = 10.7$ ve 5.2 Hz), 2.80-2.64 (m, 2H); ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 164.41, 145.19, 136.13, 133.59, 133.42, 128.46,

128.08, 126.87, 126.83, 125.53, 123.86, 122.13, 105.11, 79.65, 32.08; MS (EI) m/z hesaplanan M^+ ($C_{15}H_{12}O_2$) = 224,1; bulunan: 224 (%50), 178, 156 (%100), 128, 68; Enansiyomerik fazlalık = 43% (HPLC - Chiracel AD-H kolon, *i*-propanol:hekzan 5:95, 1 mL/dak t_1 = 17.52 dak. "küçük enansiyomer", t_2 = 18.25 dak. "büyük enansiyomer")

(R)-(+)-6-(naft-1-il)-5,6-dihidro-2H-pyran-2-on (60): Vakum altında çözgenin uzaklaştırılmasından sonra elde edilen ham ürünün SiO_2 kolon kromatografisiyle saflaştırıldı (etil asetat:hekzan, 1:8) ve 125 mg R-(+)-6-(naft-1-il)-5,6-dihidro-2H-pyran-2-on (**60**) sarı katı bir madde olarak %75 verimle elde edildi. $R_f=0.14$ (etil asetat:hekzan, 1:4). $[\alpha]_D^{23} = +172.88$ ($c = 1.25, CH_2Cl_2$). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.00-7.82 (m, 3H), 7.71 (d, 1H, $J = 7.14$ Hz), 7.58-7.45 (m, 3H), 7.09-6.99 (m, 1H), 6.25-6.17 (m, 2H), 2.84-2.78 (m, 2H); ^{13}C -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 164.54, 145.49, 134.07, 133.99, 130.16, 129.41, 128.38, 126.85, 126.07, 125.61, 124.39, 122.72, 121.89, 76.71, 31.38; Enansiyomerik fazlalık = %11 (HPLC - Chiracel AD-H kolon, *i*-propanol:hekzan 5:95, 1 mL/dak t_1 = 15.50 dak. "büyük enansiyomer", t_2 = 19.50 dak. "küçük enansiyomer").

(R)-(+)-6-(2-metilnaft-1-il)-5,6-dihidro-2H-pyran-2-on (61): Vakum altında çözgenin uzaklaştırılmasından sonra elde edilen ham ürünün SiO_2 kolon kromatografisiyle saflaştırıldı (etil asetat:hekzan, 1:8) ve 38 mg R-(+)-6-(2-metilnaft-1-il)-5,6-dihidro-2H-pyran-2-on (**61**) maddesi sarımsı bir yağ olarak %60 verimle elde edildi. $R_f=0.24$ (etil asetat:hekzan, 1:2). $[\alpha]_D^{27} = + 136.79$ ($c = 0.31, CH_2Cl_2$). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.22 (d, 1H, $J = 8.61$ Hz), 7.82 (dd, 1H, $J = 7.82$ ve 1.57 Hz), 7.75 (d, 1H, $J = 8.22$ Hz), 7.50-7.40 (m, 2 H), 7.29 (d, 1H, $J = 8.22$ Hz), 7.06 (ddd, 1H, $J = 9.78, 6.26,$ ve 1.96 Hz), 6.30 (dd, 1H, $J = 13.30$ ve 4.30 Hz), 6.23 (ddd, 1H, $J = 9.78, 2.74,$ ve 1.17 Hz), 3.27-3.15 (m, 1H), 2.56 (s, 3 H), 2.55-2.44 (m, 1H); ^{13}C -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 164.28, 145.70, 133.91, 133.11, 131.03, 129.74, 129.35, 129.32, 128.94, 126.20, 124.89, 124.46, 121.48, 76.58, 29.48, 20.84; Enansiyomerik fazlalık = %100 (HPLC - Chiracel AD-H kolon, *i*-propanol:hekzan 5:95, 1 mL/dak t_1 = 21.14 dak. tek sinyal).

(R)-(+)-6-(4-metilnaft-1-il)-5,6-dihidro-2H-pyran-2-on (62): Vakum altında çözgenin uzaklaştırılmasından sonra elde edilen ham ürünün SiO_2 kolon kromatografisiyle saflaştırıldı (etil asetat:hekzan, 1:8) ve 27 mg R-(+)-6-(4-metilnaft-1-il)-5,6-dihidro-2H-pyran-2-on (**62**) açık sarı katı bir madde olarak %87 verimle elde edildi. $R_f=0.15$ (etil asetat:hekzan, 1:4). $[\alpha]_D^{28} = + 114.64$ ($c = 0.21, CH_2Cl_2$). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.10-8.03 (m, 1H), 8.01-7.95 (m, 1H), 7.61-7.52 (m, 3H), 7.35 (d, 1H, $J = 7.04$ Hz), 7.06-6.99 (m, 1H), 6.24-6.15 (m, 2H), 2.83-2.76 (m, 2H), 2.71 (s, 1H); ^{13}C -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 164.38, 145.27, 135.44, 132.83, 131.96, 130.03, 126.18, 126.10, 125.64, 125.14, 123.88, 123.01, 121.59, 76.79, 31.08, 19.61; Enansiyomerik fazlalık = %93 (HPLC - Chiracel AD-H kolon, *i*-propanol:hekzan 5:95, 1 mL/dak t_1 = 14.96 dak. "büyük enansiyomer", t_2 = 17.64 dak. "küçük enansiyomer").

(R)-(+)-6-(kinolin-4-il)-5,6-dihidro-2H-pyran-2-on (63): Vakum altında çözgenin uzaklaştırılmasından sonra elde edilen ham ürünün SiO₂ kolon kromatografisiyle saflaştırıldı (etil asetat:hekzan, 1:8) ve 9 mg R-(+)-6-(kinolin-4-il)-5,6-dihidro-2H-pyran-2-on (**63**) açık sarı katı bir madde olarak %34 verimle elde edildi. R_f=0.14 (etil asetat:hekzan, 1:1). (ikinci sentezde %86 ee için $[\alpha]_D^{26} = +313.91$ (c = 0.63, CH₂Cl₂) olarak hesaplandı). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.91 (d, 1H, J = 4.70 Hz), 8.15 (dd, 1H, J = 8.61 ve 0.78 Hz), 8.01 (dd, 1H, J = 8.61 ve 0.78 Hz), 7.72 (ddd, 1H, J = 8.22, 6.65 ve 1.17 Hz), 7.61-7.55 (m, 2H), 5.96-5.85 (m, 1H), 5.57-5.52 (m, 1H), 5.27-5.21 (m, 2H), 2.82-2.74 (m, 1H), 2.58-2.49 (m, 1H); ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 150.33, 149.20, 148.26, 133.73, 130.37, 129.06, 126.57, 125.35, 122.76, 119.21, 117.44, 68.85, 42.80, 29.67; Enansiyomerik fazlalık = %95 (HPLC -Chiracel AD-H kolon, *i*-propanol:hekzan 5:95, 1 mL/dak t₁ = 6.42 dak. “büyük enansiyomer”, t₂ = 7,15 dak. “küçük enansiyomer”).

(R)-(+)-6-(kinolin-3-il)-5,6-dihidro-2H-pyran-2-on (64): Vakum altında çözgenin uzaklaştırılmasından sonra elde edilen ham ürünün SiO₂ kolon kromatografisiyle saflaştırıldı (etil asetat:hekzan, 1:6) ve 80 mg R-(+)-6-(kinolin-3-il)-5,6-dihidro-2H-pyran-2-on (**64**) açık sarı katı bir madde olarak %62 verimle elde edildi. R_f=0.11 (etil asetat:hekzan, 1:2). $[\alpha]_D^{22} = +205.76$ (c = 0.78, EtOH). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.92 (d, 1H, J = 1.96 Hz), 8.26 (s, 1H), 8.12 (d, 1H, J = 8.22 Hz), 7.85 (d, 1H, J = 8.22 Hz), 7.78-7.72 (m, 1H), 7.62-7.55 (m, 1H), 7.06-6.99 (m, 1H), 6.20 (dd, 1H, J = 9.78 ve 1.56 Hz), 5.73-5.66 (m, 1H), 2.79-2.73 (m, 2H); ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 163.48, 148.26, 148.06, 144.56, 133.30, 131.18, 130.04, 129.28, 127.98, 127.45, 127.26, 121.83, 77.11, 31.52; Enansiyomerik fazlalık = 97% (HPLC - Chiracel AD-H kolon, *i*-propanol:hekzan 5:95, 1 mL/dak t₁ = 27.46 dak. “küçük enansiyomer”, t₂ = 33.19 dak. “büyük enansiyomer”).

(R)-(+)-6-(3-phenoxyphenyl)-5,6-dihidro-2H-pyran-2-on (65): Vakum altında çözgenin uzaklaştırılmasından sonra elde edilen ham ürünün SiO₂ kolon kromatografisiyle saflaştırıldı (etil asetat:hekzan, 1:8) ve 35 mg R-(+)-6-(3-phenoxyphenyl)-5,6-dihidro-2H-pyran-2-on (**65**) sarı katı bir madde olarak 91% verimle elde edildi. R_f=0.30 (etil asetat:hekzan, 1:2). $[\alpha]_D^{29} = + 115.0$ (c = 0.34, CH₂Cl₂). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.39-7.30 (m, 3H), 7.17-6.92 (m, 7H), 6.12 (ddd, 1H, J = 9.78, 2.35, ve 1.56 Hz), 5.45-5.37 (m, 1H), 2.70-2.55 (m, 2H); ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 163.80, 157.57, 156.75, 144.74, 140.39, 130.03, 129.80, 123.53, 121.61, 120.69, 118.99, 118.74, 116.40, 78.77, 31.52; Enansiyomerik fazlalık = 77% (HPLC - Chiracel AD-H kolon, *i*-propanol:hekzan 5:95, 1 mL/dak t₁ =14.99 dak. “küçük enansiyomer”, t₂ = 16.82 dak. “büyük enansiyomer”).

2.2. Biyolojik Test

2.2.1. Hücre Kültürü: Prostat kanseri hücre hattı (PC3) Doç.Dr. Kemal Korkmaz'dan (Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü), insan meme kanser (MCF7) hücre hattı Şap Enstitüsü'nden sağlandı. PC3 hücre hattı; %5 Fetal Bovine Serum (FBS), 100µg/mL streptomisin/100IU/mL penisilin eklenmiş Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), MCF7 hücre hattı; %10 FBS, 100µg/mL streptomisin/100IU/mL penisilin eklenmiş Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640) (BIO.IND) besiyerinde nemli atmosferde, %5 CO₂, %95 hava içeren inkübatörde 37 °C'de kültüre edildi ve 3-4 günde %80-85 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlandı. Denemede kullanılan bütün hücreler 10-20. pasajlardan elde edildi.

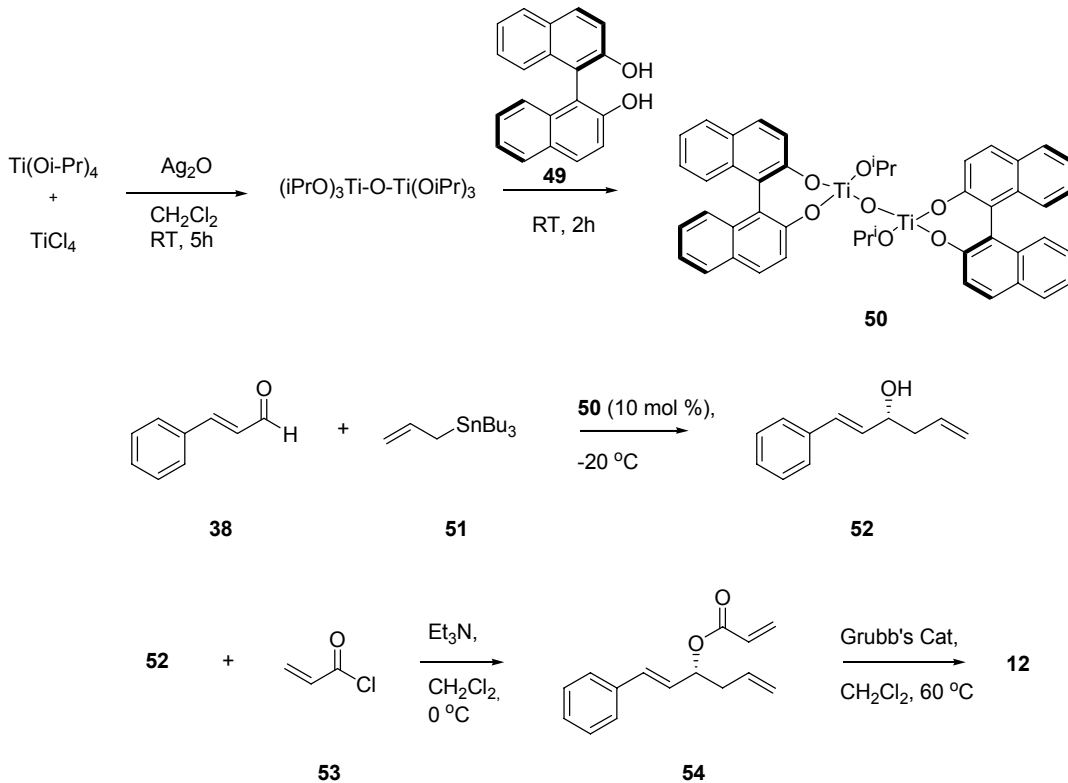
2.2.2. MTT Testi: Hücre canlılığının ve bölünmesinin inhibisyonu MTT (Sigma Chemical Co.) (Ciapetti G, Cenni E, Paratelli L, Pizzoferrato A. *Biomaterials*, **1993**, *14*, 359) metodu ile belirlendi. Kısaca; her kuyucuğa 1.10⁴ hücre 95µL besiyeri içinde, 96 kuyucuklu plağa inoküle edildi. Tüm bileşikler dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözüldü ve her deneme öncesinde taze hazırlandı. Bileşiklerin son seyreltmesi test kuyucukları %1 DMSO içerecek şekilde DMEM içinde hazırlandı. 24 saat sonra 50, 30, 10, 1 µM ve 800, 600, 400 nM konsantrasyonlarında üç tekrarlı olarak eklendi. Tüm negatif kontrollerin %1 DMSO içermesi sağlandı. Hücre canlılığı 48 saatlik zaman dilimi için belirlendi. Zaman diliminin bitiminden 4 saat önce kuyucuklar, önceden 37 °C'ye ısıtılmış PBS ile, bileşiklerin ölçümde renk girişimi vermemesi amacıyla bir kere yıkandı. MTT stok solüsyonu (5mg/ml) tam besi yeri içinde 1:10 oranında seyreltilerek test kuyucuklarına eklendi. İnkübasyon periyodunun bitiminden 30 dakika önce plaklar, formazan kristallerinin kazara kaybını önlemek amacıyla 1800 rpm'de, oda sıcaklığında, 10 dakika santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Plaklar, kuyucuklara 100µL DMSO eklenmesinin ardından 5 dakika süreyle 150 rpm'de çalkalandı. Optik yoğunluk 540 nm'de okutuldu. Sonuçlar yüzde canlılık olarak değerlendirildi.

3. Bulgular

3.1. Konformasyonel Dönmeleri Sınırlanmış Goniothalamın Türevleri

Literatürde sentez yöntemleri incelendiğinde, 6 no'lu karbonunda 2-naftil sübstituentini bulunduracak 5,6-dihidro-2*H*-pyran-2-on yapısını (**47**, **48**, şekil 9) hazırlayabilmek için en uygun yöntem Fatima ve ortakları tarafından geliştirilen Ti-O-Ti iskeleti üzerine sabitlenmiş iki mol (R)-BINOL'ün aldehitlerin allillenmesi reaksiyonunda asimetric katölizör görevi gördüğü çalışmadır (Fatima, 2005 ve 2006). Bu yöntemle hem (R)- hemde (S)-goniothalamın türevlerini elde etmek mümkündür.

Çalışmada konformasyonel olarak sabitlenmiş goniothalamın türevlerini sentezlemeden önce hem tekniği laboratuvarımızda tam olarak oturtmak hemde ilerideki sitotoksisite testlerinde pozitif referans olarak kullanılmak üzere (R)-goniothalamın sentezi gerçekleştirildi (Fatima, 2005).



Şekil 10. (R)-Goniothalaminin *trans*-sinnamaldehyitten başlayarak gerçekleştirilen sentezi.

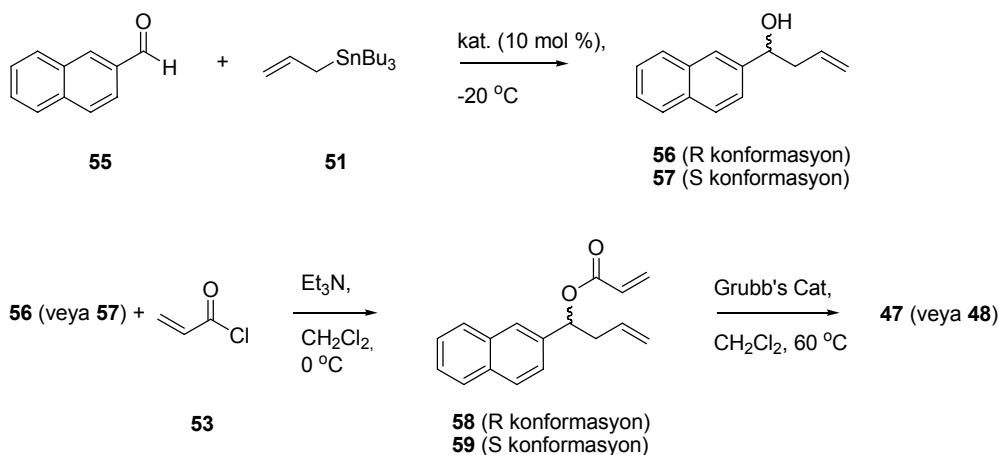
(R)-BINOL'den (**49**) titanyum tetra-isopropoksit, titanyum tetraklorür ve gümüş (I) oksit eşliğinde elde edilen katalizör (**50**) daha sonra *trans*-sinnamaldehite (**38**) asimetrik allillenme reaksiyonunda kullanılmış ve %14-27 aralığında verimlerle beklenen ürün (**52**) elde edilmiştir. Ürünün enantiyomerik fazlası elde edilen ürünün optikal rotasyonunun literatürdeki değerlerle karşılaştırıldığında %73 olarak bulunmuştur. Benzer enansiyomerik fazla ayrıca HPLC çalışmasında da (Chiralcel AD-H kolon) görülmüştür, sentezin devamı bu asimetrik sentez yöntemiyle elde edilen alkol üzerinden yapılmıştır. Allil alkol (**52**) trietilamin bazı eşliğinde akriloyl klorür (**53**) ile reaksiyona sokulmuş ve %48-65 aralığındaki verimlerle ester (**54**) elde edilmiştir. Son basamakta elde edilen lakton Grubbs' katalizörü ile (R)-goniothalamine (**12**) %38 verimlerle çevrilmiştir (Şekil 10).

Yöntemin sağlıklı çalıştığı görüldükten sonra benzaldehitten başlanarak konformasyonel olarak sınırlandırılmış (R)- ve (S)-goniothalamine türevlerinin sentezlerine başlanmıştır. Sentez sırasında (R)-goniothalamine için (R)-BINOL, (S)-goniothalamine içinse (S)-BINOL'ün Ti-O-Ti iskeletine tutunmasıyla oluşturulan kompleksler asimetrik katalizör olarak kullanılmıştır. Sentez işlemleri süresince sentezlenen moleküllerdeki enansiyomerik fazlalığın daha ilk basamakta dengeye ulaştığı, dolayısıyla ikinci ve üçüncü basamaklarda %ee değerinde herhangi bir değişimin olması beklenmiyordu. Bu nedenle başlangıçta sadece elde edilen alkollerin enansiyomerik fazlalıkları optikal rotasyonlarına (literatürde referans değeri varsa) yada analitik bir kiral kolon (Chiralcel AD-H, 0,46x150 mm) monte edilmiş HPLC'de bakarak karar veriliyordu. Buna tezat olarak literatürde işleyiş mekanizmaları tam anlaşılamamakla beraber kiral olmayan dolgu malzemelerinin kullanıldığı kromatografik kolonların enansiyomerik olarak yarı saf olan moleküller üzerinde enansiyomerik zenginleştirmeye neden olduğu rapor edilmiştir (Cundy 1983, Gawley 1996). İlginçtir ki bu fenomenanın işlendiği birçok çalışmada herhangi bir fonksiyonel grup için genelleme yapılmamışken Stephani ve çalışma arkadaşları özellikle kiral karbonlarında benzil hidrojene sahip olan moleküllerde enansiyomerik zenginleştirmenin daha rahat olduğunu rapor etmişlerdir (Stephani 1998).

Bu nedenle hedef olarak aldığımız konformasyonel olarak sınırlandırılmış goniothalamine türevlerinin sentezi sırasındaki bütün ürünler kiral karbonlarında benzilik protona sahip oldukları için her basamak sonrasında HPLC bakma zorunluluğu doğmuştur. **47** ve **48** no'lu moleküllerin sentezleri sırasında gerçekleştirilen reaksiyonlar, bunların verimleri ve kiral kolon monte edilmiş HPLC kullanılarak hesaplanmış enansiyomerik fazlalıkları tablo 1'de özetlenmiştir. Tablodanda görüleceği üzere (R)-BINOL'le yapılan reaksiyon serisinin enansiyomerik fazlalıklarında çok büyük bir değişim olmazken, (S)-BINOL ile gerçekleştirilen reaksiyon serisinin son basamagında literatürde bahsedilenin tersine enansiyomerik fazlalıkta azalma gerçekleştiği görülmüştür. Bu çalışma daha çok hedeflenen

moleküllerin sentezlenmesi ve antikanser özelliklerinin belirlenmesinin amacını hedeflediğinden test edilecek moleküllerin enansiyomerik fazlalığının doğru olarak belirlenmesi çok önem taşımaktadır. Elde edilen ürünlerin biyolojik aktiviteleri burda belirtilen enansiyomerik fazlalıklarla test edilmiştir.

Tablo 1. Konformasyonel dönüşümleri sınırlandırılmış goniotalamin türevlerinin (**47** ve **48**) sentezinde elde edilen verim ve enansiyomerik fazlalıklar.

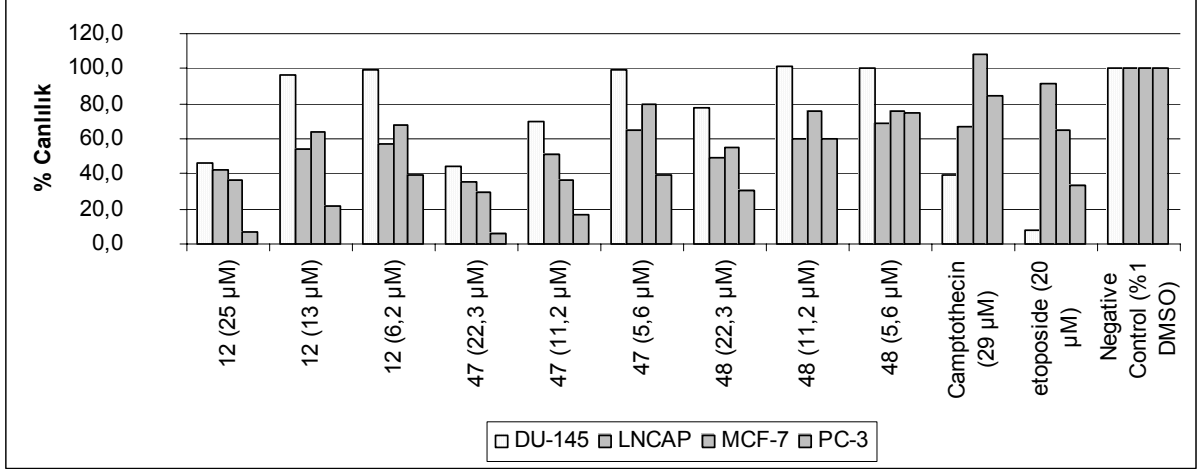


Katalizör	Alkol (verim %ee)	Ester (verim %ee)	Lakton (verim %ee)
(R)-BINOL	56 (59, 80)	58 (53, 79)	47 (88, 76)
(S)-BINOL	57 (26, 82)	59 (73, 81)	48 (73, 43)

Sentez işlemleri bittiği sırada enstitümüzde henüz bir hücre kültür laboratuvarı bulunmadığından Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümünden Prof. Dr. Kemal Korkmaz bizim için bu molekülleri dört değişik kanser hücresi (PC-3, MCF-7, DU-145 ve LNCAP) üzerinde 4 değişik konsantrasyonda test etti. Elde edilen ilk sonuçlarda test edilen bütün moleküller 50 µM konsantrasyonda hücre çoğalmasını ortalama %97 oranında durdurmaktadır. Bu maddelerin değişik dozlarda (22,3 µM, 11,2 µM, ve 5,6 µM) kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileride çalışılmış ve sonuçlar grafik 1'de gösterilmiştir.

Bu deneylerde pozitif kontrol olarak kamptotesin (29 µM) ve Etoposit (20 µM) kullanılmıştır. Hemen hemen test edilen bütün kanser hücrelerinde R konfigürasyonuna sahip naftalin türevinin (**47**), hem S-enansiyomerine (**48**) hemde (R)-goniotalamine (**12**) göre daha sitotoksik olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen bu sonuç literatürde daha öncede belirtilen (R)-goniotalaminin (S) enansiyomerine göre daha sitotoksik olduğu sonucuyla

uyuşmaktadır. Buna ek olarak konformasyonel olarak sabitlenmiş naftalin yapısının stilbene göre sitotoksik etkiyi arttırdığını söylemekte yanlış olmaz.



Grafik 1. DU-145, LNCAP, MCF-7, ve PC-3 kanser hücreleri üzerinde **12**, **47**, ve **48** nolu bileşiklerin sitotoksik etkileri.

Elde edilen sonuçlar üzerinden hücre çoğalmasını %50 oranında durdurulması için gerekli olan IC_{50} değerleri GraphPad Prism biyoistatistik programıyla hesaplanmıştır, sonuçlar tablo 2’de bilginize sunulmuştur. Bu sonuçlardanda **47** nolu naftil türevinin **12** ve **48**’e göre daha düşük konsantrasyonlarda hücre çoğalmasını %50 durdurduğu görülmektedir.

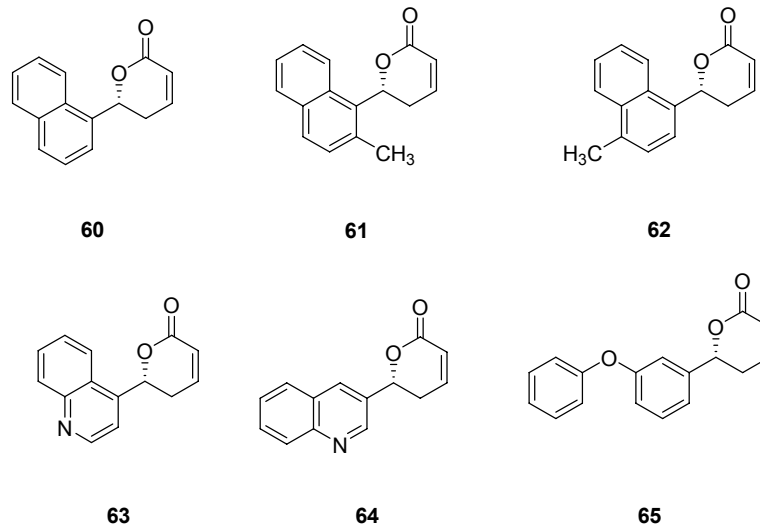
Tablo 2. **12**, **47**, ve **48** nolu maddeler için IC_{50} değerleri.^a

	DU-145	LNCAP	MCF-7	PC-3
12	28	12	19	4
47	19	11	12	3
48	37	15	28	12

^a Hücre çoğalmasını %50 durdurması için gerekli olan konsantrasyon değeri (üç deneyin ortalaması alınmıştır). GraphPad Prism programında µM olarak hesaplanmıştır. (doğrusal olmayan bağlanım, $r^2 > 0,9$).

Konformasyonel olarak sınırlandırılmış moleküllerin dizaynında mümkün olduğunca sterik faktörlerden kaçınmak gerekmektedir çünkü bu sterik faktörler potansiyel ilaç molekülünün bir hedef enzime bağlanması sırasında oluşacak etkileşimleri azaltabilir veya

çoğaltabilir. Sitiren ile 2-naftil grubu arasında C_2H_2 büyüklüğünde bir siterik farklılık bulunmaktadır, bu nedenle **47** no'lu molekülün aktivitesinin yüksekliğinin kaynağı stirendeki sigma bağının dönmesinin engellenmesi olabileceği gibi bu sterik farklılıkda olabilir. Piyasadaki mevcut aldehitle muhtemel başlangıç noktası olarak kullanıldığından goniotalamindeki sitireni 2-naftilden daha iyi mimikleyecek daha küçük bir sübstrat bulunamamıştır. Bunun yerine 2-naftille benzer veya biraz daha büyük aldehitler seçilerek şekil 11'de gösterilen 5,6-dihidro-2*H*-pyran-2-on yapıları (**60-65**) dizayn edilmiştir.

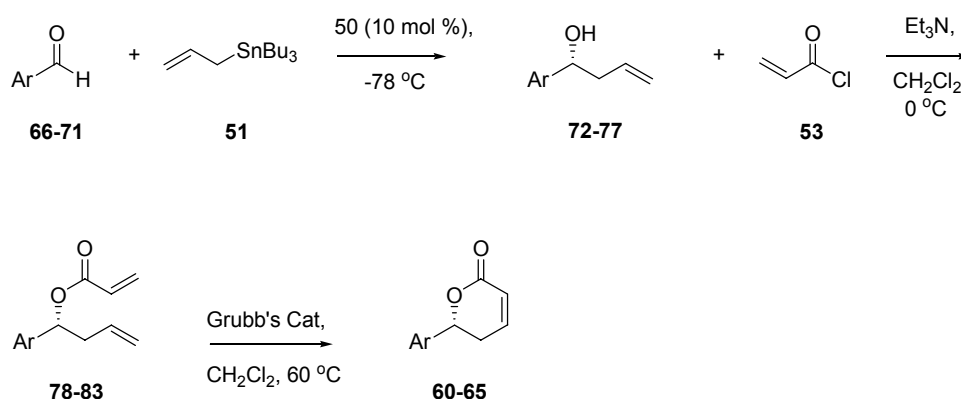


Şekil 11. İkinci jenerasyon dizayn edilen 6-bisikloaril sübstitüentli 5,6-dihidro-2*H*-pyran-2-on yapıları.

Seçilen moleküller arasında 2-naftil grubuna en yakın olan 3-kinolin substratıdır. Diğer ürünler daha çok sterik olarak 2-naftile yakın büyüklükte olması nedeniyle seçilmiştir. (S) enansiyomerinin (R)'dan daha az aktif olduğu gözlemlendiğinden ileriki sentezlerde sadece R enansiyomerlerin elde edilmesi planlanmıştır. Hedeflenen (R) enansiyomerleri literatürde tanımlanmış (R)-goniotalaminin sentezine benzer yolla sentezlenmiştir (Fatima 2005). (R)-BINOL'den (**49**) elde edilen katalizör **50**, seçilen arilaldehitlerin (**66-71**) enansiyoseçici allillenmesi reaksiyonunda kullanılmış ve kiral alkoller (**72-77**) elde edilmişlerdir. Ürünlerin enansiyomerik fazlası elde edilen ürünün varsa optikal rotasyonunun literatürdeki değerlerle karşılaştırılmasıyla ve/veya kiral HPLC kromatografisiyle (Chiralcel AD-H kolon) tayin edilmiştir. Sentezlerin devamı asimetrik sentez yöntemiyle elde edilen alkoller üzerinden yapılmıştır. Bu alkoller daha sonra akriloyl esterlerine (**78-83**) dönüştürülmüş ve son olarakta Grubbs' katalizörüyle hedeflenen ürünlere (**60-65**) çevrilmiştir. Tepkimelerin verimleri ve enansiyomerik fazlalıkları tablo 3'de özetlenmiştir. Butun basamaklardaki ürünler HPLC'de kiral kolonla kontrol edilmiştir. Bunun

yanında elde edilen bazı maddelerin (**73**, **78**, **80**, ve **63**) optiksel döndürme analizlerini ilk sentezlediğimizde okunamadığı için bu sentezler ikinci defa tekrarlanmış ve tekrarlanan tepkimelerin verimleri ve enansiyomerik fazlalıkları tablo 3'de köşeli parantez içerisinde italik olarak gösterilmiştir. Bu maddelerde birinci denemelerde herhangi bir çevirme okunmamasının muhtemel iki nedeninin olduğunu düşünüyoruz ya bu maddelerin spesifik optikal döndürmeleri çok güçlü olmadığı için düşük konsantrasyonlarda herhangi bir çevrilme görülmedi yada polarimetre cihazında sorun vardı. Bu optiksel döndürmelerini ölçebilmek için bu maddelerin daha büyük miktarlarda eldesi gerekmektedir.

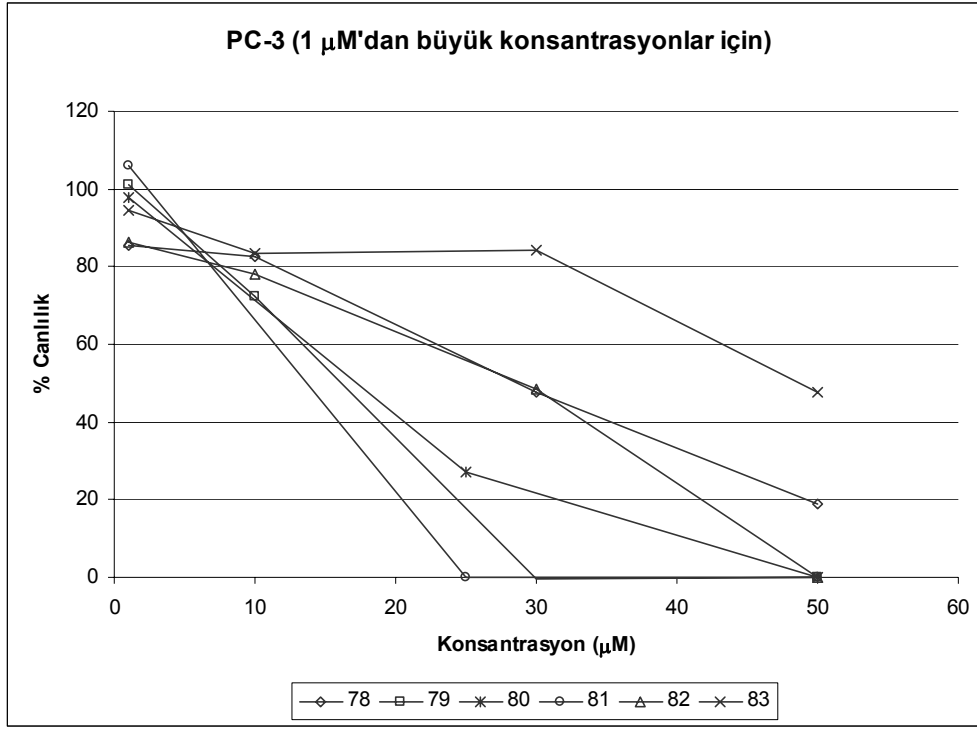
Tablo 3. 6-Bisikloaril sübstitüentli 5,6-dihidro-2H-pyran-2-on yapılarının (**60-65**) sentezlerindeki verim ve enansiyomerik fazlalıklar.



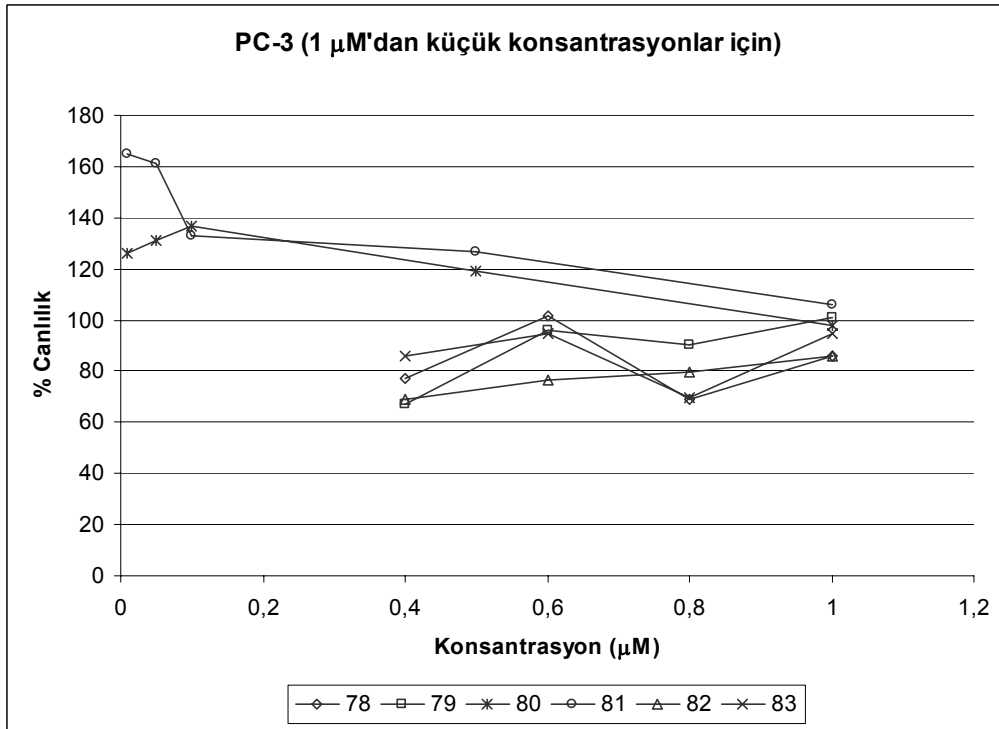
Ar	Alkol, (% verim, %ee)	Ester, (% verim, %ee)	Product, (% verim, %ee)
	72 , (41, 77) [48, 87]	78 , (69, 44) [73, 73]	60 , (75, 11)
	73 , (19, 97) [11, ?]	79 , (62, 100)	61 , (60, 100)
	74 , (14, 72) [65, 73]	80 , (56, 66) [62, 78]	62 , (87, 93)
	75 , (21, 65) [76, 85]	81 , (56, 100) [48, 84]	63 , (34, 95) [34, 86]
	76 , (48, 93)	82 , (54, 92)	64 , (62, 97)
	77 , (11, 76)	83 , (76, 75)	65 , (91, 77)

Tabloda açıkça görüleceği üzere bu sentez yönteminin birinci basamağındaki verim bütün denemelerde %50'nin altında bunun en büyük nedeni olarak iki muhtemel açıklama getirilebilir. Birincisi, literatürde bu reaksiyonlar çok uzun süreli reaksiyonlardır ve tamamlanması günlerce sürebilir. Bu basamakta yüksek enansiyomerik fazlalık için sıcaklığın mümkün olduğunca düşük tutulması gerekmektedir. Laboratuvarımızda reaksiyonu günlerce düşük sıcaklarda tutabilecek ekipman bulunmamaktadır, ve rapor edilen verimler insan gücüyle yaklaşık bir günlük denemelerde elde edilen verimlerdir. Reaksiyon süreci uzun tutulduğunda verim artacaktır. İkinci sebep olarak solvent içerisinde muhtemel nem bulunma olasılığı. Enstitümüz deniz kenarında yerleşkelendirildiğinden her ne kadar diklorometanı kalsiyum hidrür üzerinde distille edersek edelim aktarmalar sırasında yada deney kurumu sırasında azda olsa ortamdan nem kapma olasılı bulunmamaktadır. Çalışılan madde miktarları da çok büyük olmadığından nemin etkisi çok önemli olabilir. İkinci ve üçüncü basamaklar genelde daha sorunsuz çalışmaktadır.

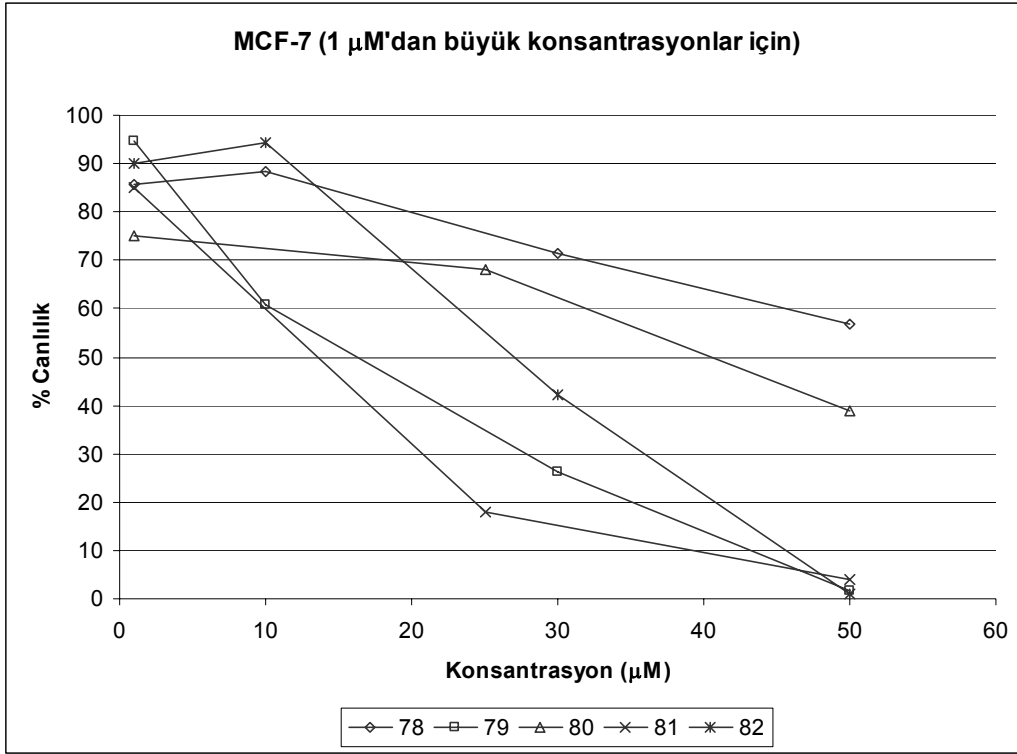
Giriş kısmında literatürde yer alan (R)-goniothalaminin türevlerinin yapı-aktivite ilişkileri incelenirken bahsedildiği gibi Michael tepkimesi için bir akseptörün varlığı molekülün aktivitesi için büyük önem taşımaktadır. Bunun yanında siklik olmayan bir Michael akseptörüne sahip akriloyl esterlerinin (**78-83**) sitotoksik etkilerinin olup olmadığı bilinmemektedir. Bu nedenle sitotoksikite testlerine öncelikle bu esterlerden başlanmıştır. Başlangıçta IC₅₀ değeri 50µM'dan yüksek olan molekülleri belirlemek için bütün maddeler bu konsantrasyonda PC-3 ve MCF-7 kanser hücreleri için standard MTT testine tabi tutulmuştur. 3-Fenoksifenilden elde edilen akriloyl esterinin (**83**) IC₅₀ değeri MCF-7 için test edilen konsantrasyonun üzerinde olduğu belirlenmiştir. Sitotoksik etki gösteren diğer moleküllerse PC-3 ve MCF-7 kanser hücrelerinde 7 değişik konsantrasyonda MTT testine tabi tutulmuşlardır. Sonuçlar grafik 2-5'te 1µM'dan yüksek ve küçük konsantrasyonlar için ayrı ayrı gösterilmiştir. Grafiklerden görüldüğü gibi her iki kanser hücresi hattındaki en aktif moleküller **79** ve **81**'dir.



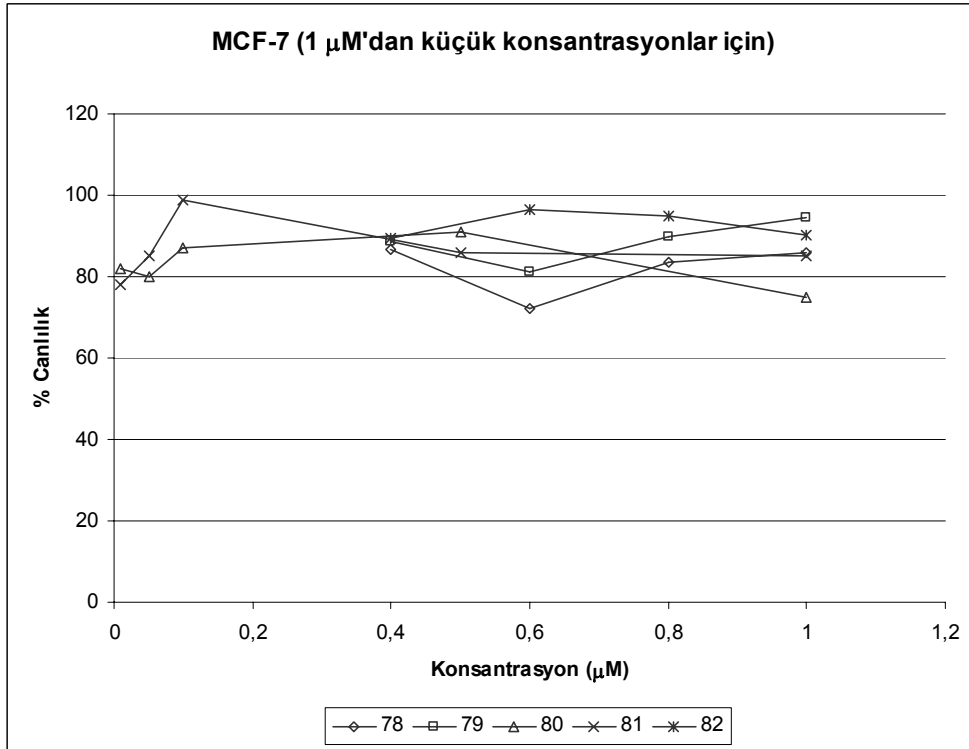
Grafik 2. 78-83 no'lu maddelerinin PC-3 kanser hücreleri üzerinde, düşük mikromolar konsantrasyonlardaki sitotoksik etkileri.



Grafik 3. 78-83 no'lu maddelerinin PC-3 kanser hücreleri üzerinde, nanomolar konsantrasyonlardaki sitotoksik etkileri.



Grafik 4. 78-83 no'lu maddelerinin MCF-7 kanser hücreleri üzerinde, düşük mikromolar konsantrasyonlardaki sitotoksik etkileri.



Grafik 5. 78-83 no'lu maddelerinin MCF-7 kanser hücreleri üzerinde, nanomolar konsantrasyonlardaki sitotoksik etkileri.

Bu değerler kullanılarak esterler için IC₅₀ değerleride hesaplanmış ve tablo 4'de gösterilmiştir. Denemelerde akrilat esterlerinin (R)-goniothalaminden daha az sitotoksik etkiye sahip oldukları, yapıları ile aktiviteleri arasında herhangi bir ilişki bulunamadığı ve **79**, **81** ve **82** no'lu moleküllerin en sitotoksik esterler olduğu gözlemlenmiştir.

Tablo 4. MCF-7 ve PC-3 kanser hücrelerinde **78-83** no'lu moleküllerin IC₅₀ konsantrasyonları.^a

	MCF-7	PC-3
78	>50.0	22,9
79	10,4	8,8
80	33,1	45,0
81	13,2	15,0
82	28,8	16,3
83	>50.0	>50.0

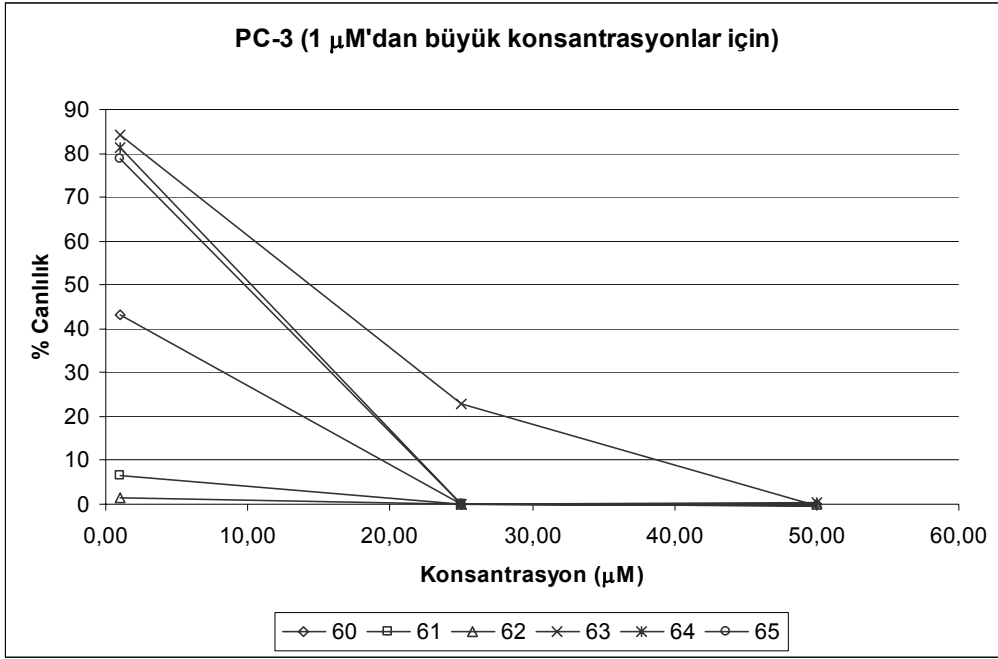
^a Hücre çoğalmasını %50 durdurması için gerekli olan konsantrasyon değeri (üç paralel deneyin ortalaması alınmıştır). GraphPad Prism programında μM olarak hesaplanmıştır. (doğrusal olmayan bağlanım, $r^2 > 0,9$).

Benzer sitotoksikite çalışmaları aynı kanser hücre hatlarında laktonlar (**60-65**) içinde yapılmış ve PC-3 ve MCF-7 kanser hücrelerinde 7 değişik konsantrasyonda MTT testine tabi tutulmuşlardır. Sonuçlar grafik 6-9'da $1\mu\text{M}$ 'dan yüksek ve küçük konsantrasyonlar için ayrı ayrı gösterilmiştir. Grafiklerden 1-naftil substitüentine sahip laktonların belli bir yapı-aktivite ilişkisine sahip olduğu görülmektedir. 1-Naftil substitüenti ayrıca bir metil substitüentine sahipse aktivitenin dahada arttığı gözlemlenmektedir. Net farklılıklarını görmek için laktonların IC₅₀ değerleride hesaplanmış ve tablo 5'de gösterilmiştir. Her iki kanser hücresine en yüksek sitotoksikiteyi gösteren lakton **62** no'lu 1-(4-metilnaftil) substitüenti olandır, ve (R)-goniothalamine göreceli olarak PC-3'de 80 kat, MCF-7'de 40 kat daha aktiftir.

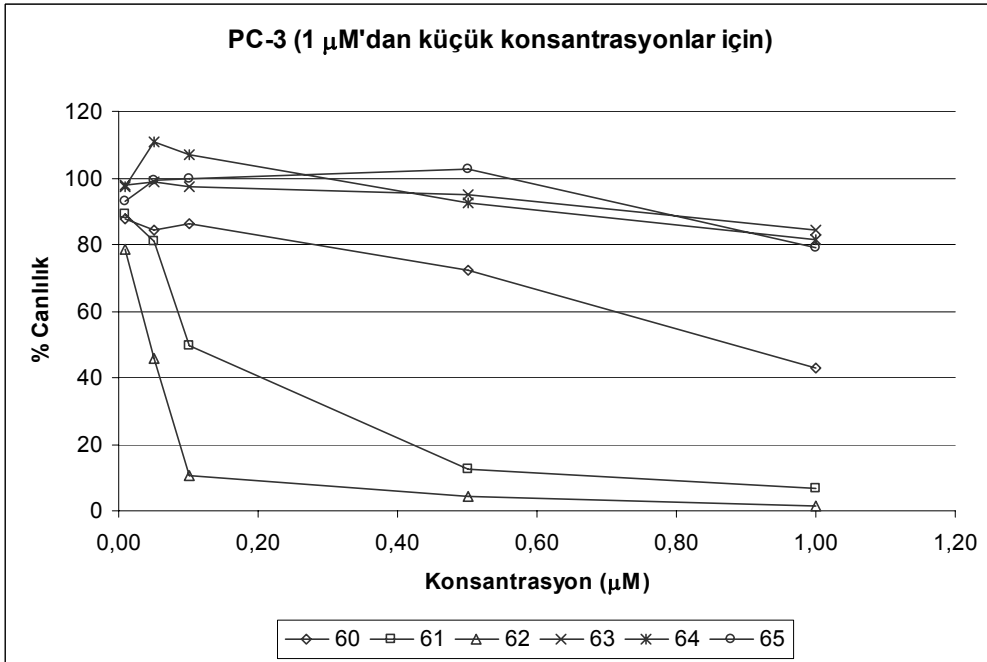
Tablo 5. MCF-7 ve PC-3 kanser hücrelerinde **60-65** no'lu moleküllerin IC₅₀ konsantrasyonları.^a

	MCF-7	PC-3
60	2,6	0,8
61	2,6	0,13
62	0,44	0,05
63	32,5	9,8
64	3,2	2,5
65	>50.0	11,0

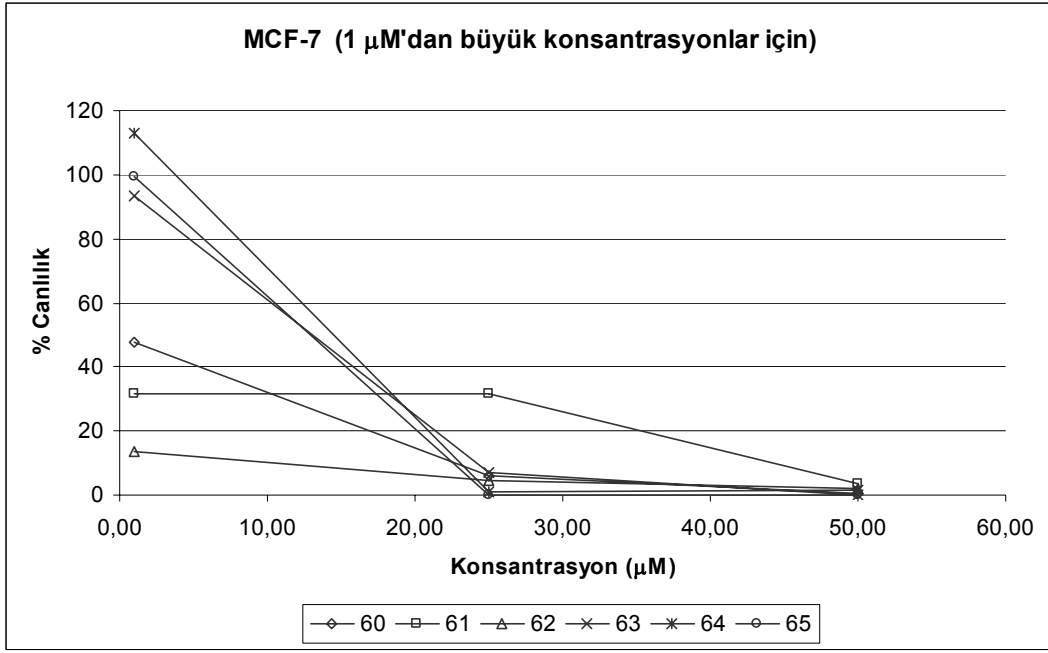
^a Hücre çoğalmasını %50 durdurması için gerekli olan konsantrasyon değeri (üç paralel deneyin ortalaması alınmıştır). GraphPad Prism programında μM olarak hesaplanmıştır. (doğrusal olmayan bağlanım, $r^2 > 0,9$).



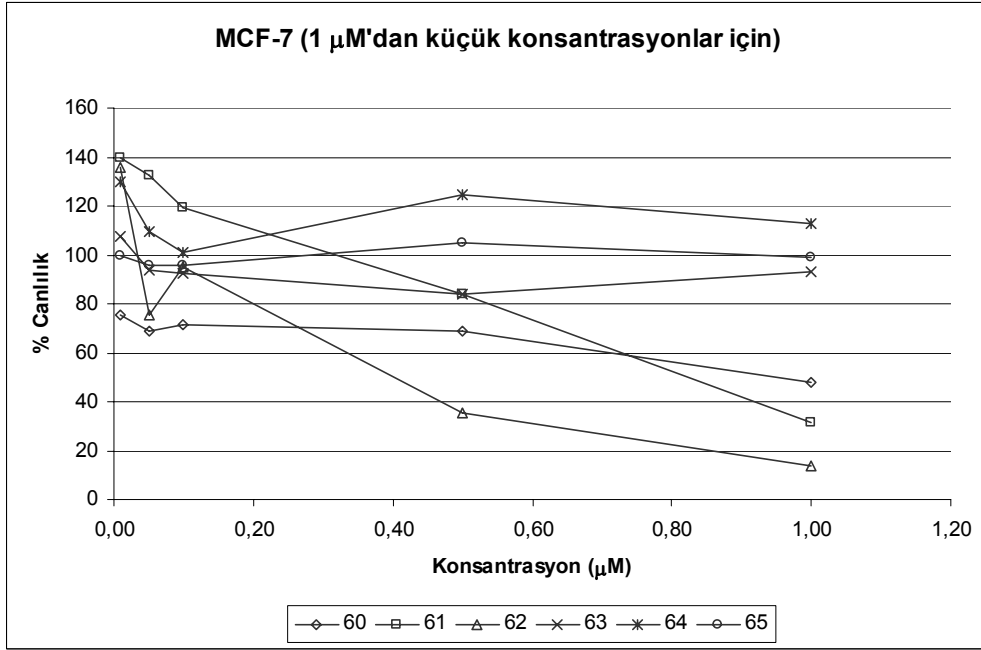
Grafik 6. 60-65 no'lu maddelerinin PC-3 kanser hücreleri üzerinde, düşük mikromolar konsantrasyonlardaki sitotoksik etkileri.



Grafik 7. 60-65 no'lu maddelerinin PC-3 kanser hücreleri üzerinde, nanomolar konsantrasyonlardaki sitotoksik etkileri.



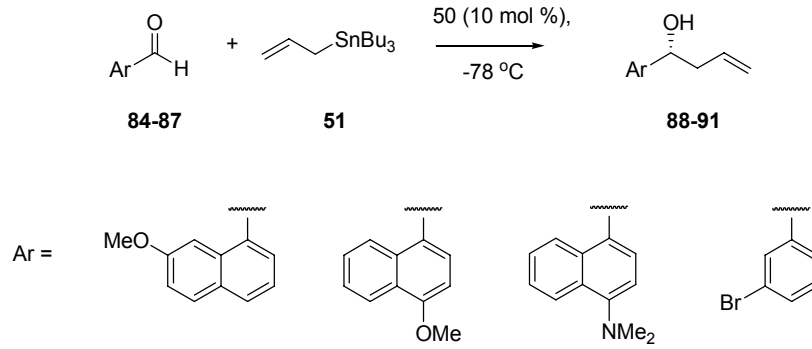
Grafik 8. 60-65 no'lu maddelerinin MCF-7 kanser hücreleri üzerinde, düşük mikromolar konsantrasyonlardaki sitotoksik etkileri.



Grafik 9. 60-65 no'lu maddelerinin MCF-7 kanser hücreleri üzerinde, nanomolar konsantrasyonlardaki sitotoksik etkileri.

Bunun yanında yapısal olarak 2-naftil ve 1-naftile benzeyen kinolin türevlerinde paralel bir aktivite artışı gözlemlenememiştir. Sonuçlar bisikloaril türevlendirilmiş pyran-2-one'ların aktivitesi için konformasyonel sınırlandırma ve sterik faktörün yanına üçüncü bir faktör olarak polariteyi eklemiştir.

Polaritenin aktiviteye olabilecek etkilerini daha iyi anlayabilmek için ticari olarak satılan 1-naftilaldehit türevlerinden üç tanesi (**84-86**) başlangıç noktası alınarak yeni 1-naftil türevlendirilmiş δ -laktonların sentez çalışmaları yapılmıştır. Laboratuvarımızda yapılan bütün denemelerde daha ilk basamakta **84-86** no'lu aldehitlerin asimetrik olarak alkollere (**88-90**) dönüştürülmeleri çabaları başarısız olmuştur. Yine literatürde bulunmayan 3-bromofenil sübstitüentli 5,6-dihidro-2*H*-pyran-2-on sentezi denenmiştir. Bu denemelerde *m*-bromobenzaldehitin allillenme reaksiyonu başarısızlıkla sonuçlanmıştır (şekil 12).

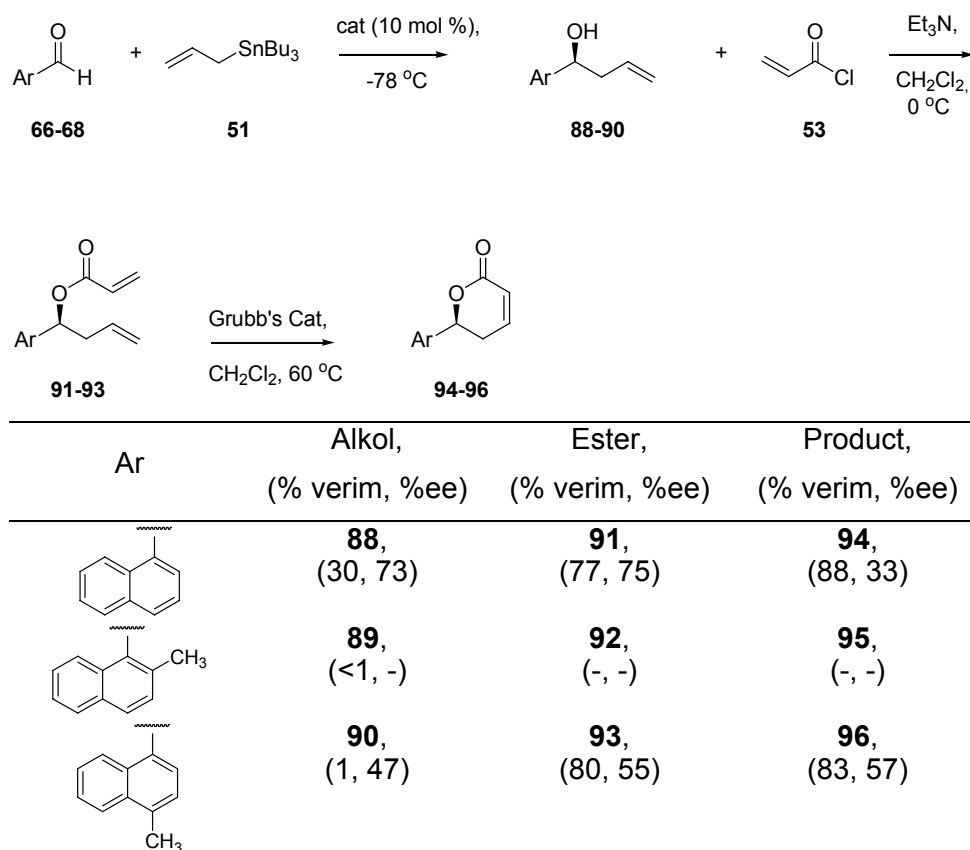


Şekil 12. Metoksi ve dimetilamin türevlendirilmiş 1-naftilaldehitler ve *m*-bromobenzaldehitin allillenme tepkimeleri.

Bu başarısız denemelerden sonra, güçlü antiproliferatif etki gösteren **60-62** no'lu bileşiklerindeki stereojenik merkezlerdeki (R)- konfigürasyonunun (S)- ile değiştirilmesinin aktiviteyi ne şekilde etkilendiğini görmek için **94-96** no'lu moleküllerin sentezlerine çalışılmıştır. Sentezlerde yine (S)-BINOL-Ti katalizörü varlığında aldehitlerin asimetrik allillenme tepkimeleri yapılmıştır. Tepkimelerin verimleri (R)-BINOL varlığında elde edilen reaksiyonlarla karşılaştırıldığında düşük kalmaktadır. Özellikle bu basamakta 2-metil-1-naftil ve 4-metil-1-naftilaldehitlerin tepkimeleri %5'ten küçük verimlerle sonuçlanmıştır. 2-Metil-1-naftilaldehit ile yapılan reaksiyondan elde edilen alkolün miktarı sonraki basamaklarda devam edebilmek için yeterli olmamıştır. Daha sonra **88** ve **90** no'lu alkoller akriloyl klorür ile esterleştirilmiş ve Grubbs' katalizörüyle α,β -doymamış laktonlara (**94, 96**) çevrilmiştir. Ürünlerin enansiyomerik fazlası yine kiral HPLC kromatografisiyle (Chiralcel AD-H kolon) tayin edilmiştir, reaksiyon verimleri ve enansiyomerik fazlalıkları tablo 6'da özetlenmiştir. Bu bileşiklerin biyolojik aktiviteleri rapor yazıldığı sürede henüz yapılmamış olduğundan şu an

bunların yapı-aktiviteleri arasında benzer bir ilişki bulunup bulunmadığını söylemek mümkün değildir. Bu moleküllerin aktivite testleri yapıldıktan sonra bulgular yeni bir yayın olarak sunulacaktır.

Tablo 6. 1-Naftil sübstitüentleri içeren (S)-5,6-dihidro-2H-pyran-2-on türevlerinin sentezi.

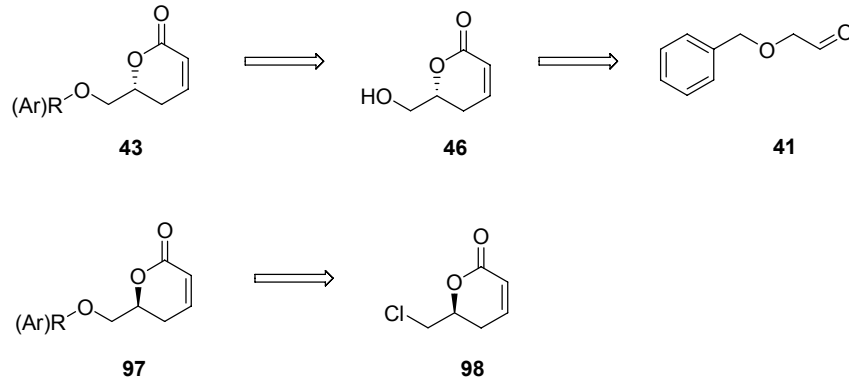


3.2. Eter Fonksiyonlitesine Sahip Goniotalamin Türevlerinin Sentezine Yönelik Çalışmalar

Projede örnek alınan goniotalamin yapısında yapılması planlanan ikinci değişiklik bağlaç kısmında C=C çifte bağının yerine bir eter fonksiyonel grubu yerleştirilmesiydi. Goniotalamin türevlerinin yapı aktivite ilişkileri incelenirken benzer bir eter fonksiyonlitesine sahip **13** no'lu molekülün antiproliferatif etkisi goniotalaminle karşılaştırılabilecek düzeydedir (Fatima, 2005). Bu nedenle (R)- veya (S)- konfigürasyona sahip benzer türvlerin sentezi daha yüksek sitotoksik potansiyele sahip molekülleri verebilir.

Bu moleküllerin sentezi için düşünölen başlangıç maddeleri şekil 13'te gösterilmiştir. (R)-Goniotalamin türevlerinin (**43**) sentezleri için Fatima ve ekibi tarafından geliştirilen

benziloksiasetaldehitten (**41**) başlayarak önce (R)-6-hidroksimetil-5,6-dihidro-pyran-2-one (**46**) yapısına (Fatima, 2005) arkasındanda nükleofilik yerdeğiştirme tepkimeleriyle hedeflenen moleküllere ulaşılması planlanmıştır. Aynı moleküllerin (S)- enansiyomerleri içinse, ticari olan satılan (S)-klorometil-5,6-dihidro-2H-pyran-2-on (**97**) başlangıç noktası olarak seçilmiştir. Her ne kadar bu molekülün yapısında üç tane elektrofilik karbon bulunsada, bir nükleofilik yerdeğiştirme reaksiyonundan elde edilecek küçük miktardaki eter fonksiyonaltisine sahip doymamış lakton biyolojik testler için yeterli olabilecektir.

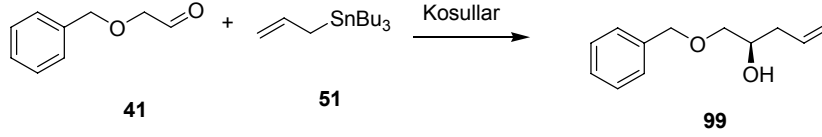


Şekil 13. Tasarlanan bağlaç olarak eter fonksiyonel grubuna sahip (R)- ve (S)-goniothalamın türevlerinin geri-sentez analizleri.

Benziloksiasetaldehit'in allillenme reaksiyonu değişik koşullar altında denenmiştir, denemelerin özeti tablo 7'de verilmiştir. İlk deneme literatürde rapor edilen R-BINOL'ün $Ti(O-^iPr)_4$ ile CH_2Cl_2 içerisinde geridönüşüm altında 1 saat muamele edilmesiyle oluşturulan katalizör eşliğinde $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de denenmiştir. Reaksiyon sonunda hedeflenen allil alkol %30 verimle rasemik olarak elde edildi. Maddenin SiO_2 kolonunda saflaştırılmasından sonra enansiyomerler kiral HPLC kromatografisiyle (Chiralcel AD-H kolon) gözlemlenmiştir. Ayrıca aynı deney sonunda reaksiyona giren katalizör saf olarak kolondan izole edilmiş ve kiral HPLC kromatografisiyle (Chiralcel AD-H kolon) enansiyomerik incelemesi yapılmıştır. İlginçtir ki reaksiyon sonunda geri kazanılan BINOL'de rasemik bir karışım halindedir. İnaniyoruz ki katalizörün hazırlanması sırasında verilen ısı sonucunda R-BINOL rotasyonel enerji bariyerini geçerek rasemizasyona gitmektedir. Bu nedenle daha sonraki bütün denemelerde katalizör hazırlama esnasında ısı kullanılmamıştır.

Daha önceki aldehytlerin asimetric allillenmesi tepkimelerinde kullanılan **50** no'lu katalizörlede denemelerde bulunulmuş fakat bu sefer herhangi bir ürün oluşumu gözlenmemiştir. İlk denemedeki başarılı deneme tekrar edilemediği için aynı reaksiyon BINOL yokluğunda denenmiş, sadece titanyum (IV) klorür veya titanyum tetraizopropoksit ile denenmiştir. Bu denemelerde de hedeflenen alkol (**99**) oluşturulamamıştır.

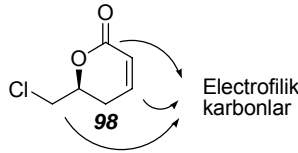
Tablo 7. Benziloksiasetaldehit'in asimetric allillenmesi tepkimeleri için yapılan denemeler.



Deneme	Koşullar	Sonuç
1	Katalizör*, CH ₂ Cl ₂ , -20 °C	%30 verim, rasemik karışım
2	50 , CH ₂ Cl ₂ , -20 °C	Reaksiyon gözlemlenmedi
3	Ti(O- ⁱ Pr) ₄ , CH ₂ Cl ₂ , -20 °C	Reaksiyon gözlemlenmedi
4	TiCl ₄ , CH ₂ Cl ₂ , -20 °C	Reaksiyon gözlemlenmedi

* R-BINOL'ün Ti(O-ⁱPr)₄ ile CH₂Cl₂ içerisinde geridönüşüm altında 1 saat muamele edilmesiyle oluşturulmuştur.

Benziloksiasetaldehitin başarısız allillenme denemelerin yanında eter grubuyla fonksiyonize edilmiş (S)-goniothalamın türevlerini sentezlemek için ticari olarak satılan (S)-6-klorometil-5,6-dihidro-2H-pyran-2-on (**98**) maddesi başlangıç noktası olarak alınmış ve değişik koşullarda oluşturulan fenoksite iyonlarıyla reaksiyona tabi tutulmuştur. Şekil 14'de de gösterildiği üzere **98** no'lu molekülde nükleofillerle reaksiyona girmesi muhtemel üç adet karbon bulunmaktadır. Buna rağmen elde edilecek küçük miktardaki hedef molekül biyolojik aktivite testlerini yapmamız için yeterli olacaktır. Bu amaçla fenoksite eklenme tepkimeleri için denenen koşullar tablo 8'de özetlenmiştir.

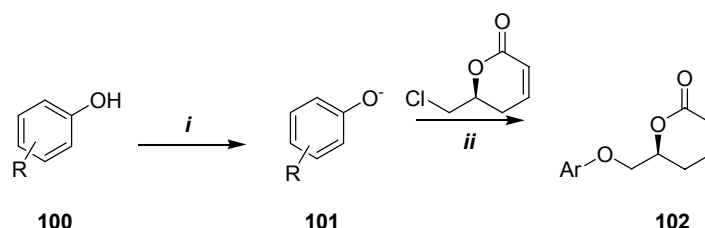


Şekil 14. (S)-6-klorometil-5,6-dihidro-2H-pyran-2-on (**98**) yapısındaki elektrofilik karbonlar.

Tablo 8'den de görüleceği üzere, genelde 1 birim **98** no'lu molekül 1 birim fenoksite reaksiyona tabii tutulmuştur. Sadece 8 no'lu denemede 6 birim fenoksite kullanılmıştır. Genelde iki basamaklı düşünülen reaksiyonlarda elde edilen fenoller bazlarla (NaOH, Na₂CO₃, Et₃N) fenoksite çevrilmiş, arkasından **98** no'lu moleküllerle tepkimeleri denenmiştir. Reaksiyonlarda OS'den (oda sıcaklığı) solventlerin geri döndürme sıcaklıklarına kadar değişen reaksiyon sıcaklıkları denenmiştir. Solvent olarak polar protik olmayan solventlerden DMF, Et₃N, Aseton, CH₂Cl₂ ile polar protik solventlerden su ve etanol kullanılmıştır. Muhtemel bir yavaş reaksiyon olasılığına karşın bütün reaksiyonlar en az 2,5

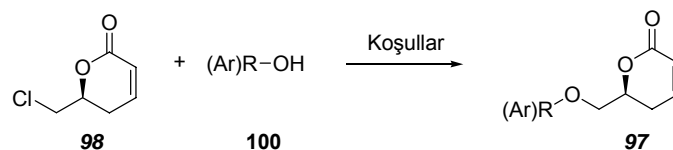
saat TLC ile izlenmiştir. Bu reaksiyon için yapılan bütün denemeler başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Bunun yanında 10 ve 11 no'lu denemelerde öncelikle iyot iyonu ile klorürün yer değiştirme tepkimeleri denenmiş arkasından oluşan ham ürün saflaştırılmadan fenol ve fenoksitle reaksiyona sokulmuştur. Bu denemelerde de başarı elde edilememiştir.

Tablo 8. Fenollerin (S)-6-klorometil-5,6-dihidro-2H-pyran-2-on ile denenen nükleofilik yer değiştirme tepkimeleri.



Deney	Ar-OH	i	ii	Sonuç
1	3-Fenilfenol (1 birim)	-	CH ₂ Cl ₂ , OS, 2,5 s.	Olumsuz
2	3-Fenilfenol (1 birim)	-	CH ₂ Cl ₂ , Et ₃ N, OS, 2,5 s.	Olumsuz
3	3-Fenilfenol (1 birim)		DMF, Na ₂ CO ₃ , 90 °C, 3 s.	Olumsuz
4	3-Fenilfenol (1 birim)	NaOH, H ₂ O	H ₂ O/DMF, Geridöndürme, 3,5 s.	Olumsuz
5	1-Naftol (1 birim)	NaOH, H ₂ O	H ₂ O/DMF, Geridöndürme, 3,5 s.	Olumsuz
6	2-hidroksi-6-metilasetofenon (1 birim)	NaOH, H ₂ O	H ₂ O/DMF, Geridöndürme, 4 s.	Olumsuz
7	3-hidroksi benzaldehit (1 birim)	NaOH, H ₂ O	H ₂ O/DMF, Geridöndürme, 3,5 s.	Olumsuz
8	3-Fenilfenol (6 birim)	NaOH, H ₂ O	H ₂ O/DMF, Geridöndürme, 1 gün	Olumsuz
9	3-Fenilfenol (1 birim)	NaOH, H ₂ O	H ₂ O/EtOH, Geridöndürme, 2,5 s.	Olumsuz
10	3-Fenilfenol (1 birim)	-	Kuru Aseton, KI, Na ₂ CO ₃ , Geridöndürme	Olumsuz
11	3-Fenilfenol (1 birim)	NaOH, EtOH, Geridöndürme	Kuru Aseton, KI, Geridöndürme	Olumsuz
12	3-Fenilfenol (1 birim)	DMF, Na ₂ CO ₃ , OS.	DMF, Geridöndürme, 1 gün	Olumsuz
13	3-Fenilfenol (1 birim)	DMF, Et ₃ N, OS.	DMF, OS -> 70 °C, 1 gün	Olumsuz

Tablo 9. Gümüş tuzları eşliğinde fenollerin (S)-6-klorometil-5,6-dihidro-2H-pyran-2-on ile denenen nükleofilik yerdeğiştirme tepkimeleri.

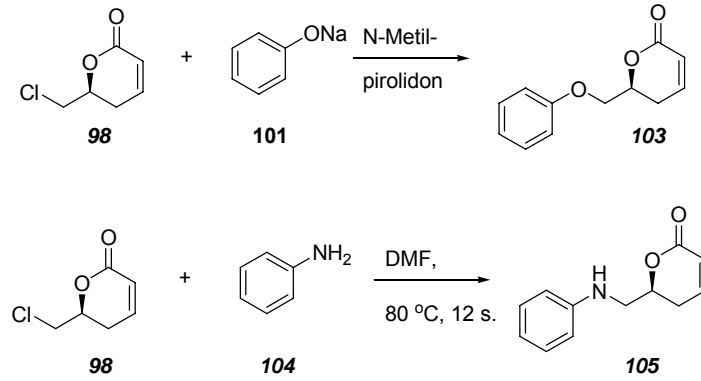


Deneme	Koşullar	Sonuç
1.	Ag ₂ O, Toluen, 25 °C.	Olumsuz
2.	Ar-OH=3-fenilfenol, DIPEA, Ag ₂ O, CH ₂ Cl ₂ , 0 -> 25 °C, 7 s.	Olumsuz
3.	Ar-OH=3-fenilfenol, DIPEA, Ag ₂ O, DMF, 0 -> 70 °C, 15 s.	Olumsuz
4.	Ar-OH=3-Metoksifenol, piridin, Ag ₂ O, CH ₂ Cl ₂ , 0 -> 25 °C, 5 s.	Olumsuz
5.	Ar-OH=3-Fenilfenol, DIPEA, AgOTf, CH ₂ Cl ₂ , 0 -> 25 °C, 5 s.	Olumsuz
6.	Ar-OH=Benzilalkol, piridin, AgOTf, CH ₂ Cl ₂ , OS, 5 s.	Olumsuz
7.	Ar-OH=3-Fenilfenol, AgOTf, Et ₃ N, Geridöndürme	Olumsuz
8.	i) 98 , AgOTf, CH ₃ CN. ii) 3-Fenilfenol, Et ₃ N	Olumsuz

Reaksiyonlardan TLCde oluştuğu gözlenen yeni moleküllerin saflaştırılmasına çalışılmıştır. Yapılan NMR analizleri sonucunda hedeflenen moleküle rastlanmamıştır. Bu tepkimelerin çalışmama nedenleri belirlenemezken α,β -doymamış laktonun Michael reaksiyonu muhtemel en hızlı reaksiyon olduğu düşünülmüştür fakat SiO₂ kolonundan izole edilen moleküllerin NMR'larında bunu destekleyen bir bulgu bulunmamıştır. Geline nokta C-Cl bağının reaktivitesinin muhtemel Michael reaksiyonundan daha hızlı çalışması için literatürde iyi bilinen gümüş tuzları eşliğinde eter oluşturma denemeleride yapılmıştır. Williamson Eter sentezine göre daha ılımlı koşullarda gerçekleştirilen bu denemelerin özeti tablo 9'da verilmiştir.

3-Metoksifenol, 3-fenilfenol gibi elektronca zengin fenollerle benzilalkolün kullanıldığı denemelerde gümüş (I) oksit ve gümüş triflate tuzları kullanılmıştır. Toluene, diklorometan, DMF, piridin, Et₃N ve CH₃CN çözügen olarak kullanılmıştır. Denemelerin bir kısmında (8 no'lu deney modeli) ilk basamakta Cl ile OTf'nin yerdeğişmesinden oluşan ara ürün süzülerek beyaz renkteki AgCl çökeltisinden uzaklaştırılmış ve sonrasında fenoksit ile reaksiyona tabii tutulmuştur. Yine bu gruptaki denemelerimizde de bütün çabalarımız boşa çıkmıştır.

Son olarak herhangi bir katalizöre ihtiyaç duymayacak fenoksit ve anilin gibi nükleofillerle **98** no'lu molekülün tepkimeleri DMF ve N-metilpirolidon içerisinde denenmiştir (şekil 15). Bu reaksiyon denemlerinde de herhangi bir başarıya ulaşılamamıştır.



Şekil 15. (S)-6-Klorometil-5,6-dihidro-2*H*-pyran-2-on'un sodyumfenoksit ve anilinle olan tepkime denemeleri.

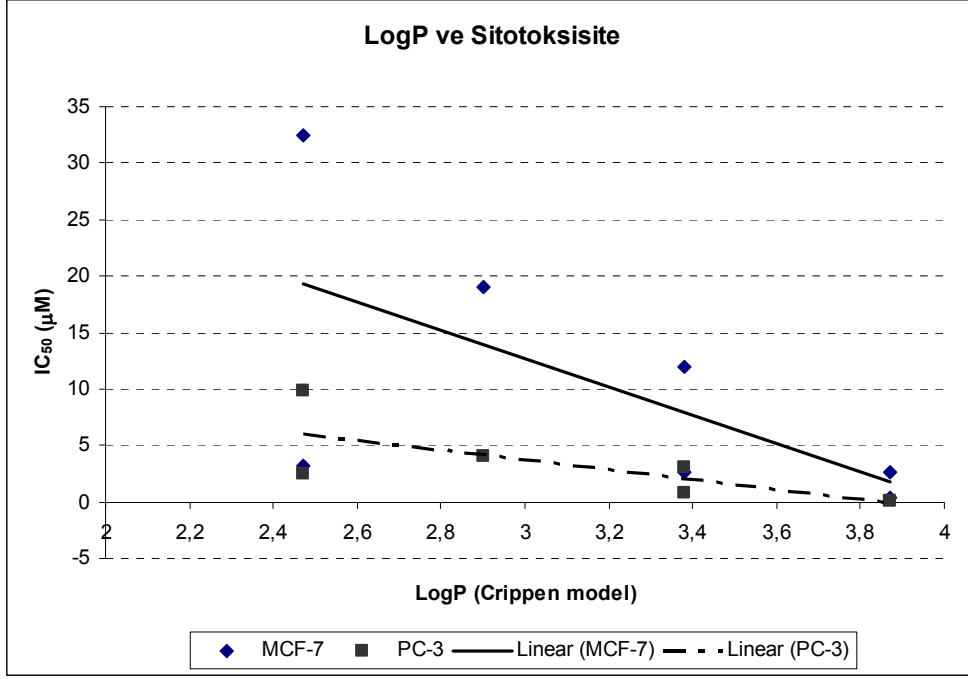
3.3. Konformasyonel Olarak Sınırlandırılmış Goniotalamin Türevlerinin QSAR Çalışmaları ve Michael Katılma tepkimeleri

Günümüzde biyolojik aktivitesi bilinen moleküllerin yapılarına göre ilişkilendirilmesi için moleküler modelleme çalışmaları gelişmiş programlarla yapılabilmektedir. Bu modeller sayesinde moleküllerin hacimleri, yüzey alanları, LogP değerleri, HOMO ve LUMO enerji seviyeleri ve muhtemel reaktif bölgeleri tayin edilebilmektedir. Bu şekilde elde edilen bilgi bir sonraki jenerasyonda yeni dizaynlar yapılırken dikkat edilecek noktaları da açığa çıkarmaktadır. Projenin son altı aylık sürecinde spartan 08 programı temin edilmiş biyolojik aktivitesini bildiğimiz moleküller (**12**, **47**, ve **60-64**) için değişik kuantum hesaplamaları, molekülün yüzey alanı, molekülün hacmi, HOMO-LUMO enerji seviyeleri DFT (Density Functional Theory) metoduyla B3LYP6-31G* baz setiyle konformasyonel enerjisi minimize edildikten sonra hesaplanmıştır (Shao 2006). Elde edilen bilgiler tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. **12**, **47** ve **60-64** no'lu moleküller için kuantum hesaplamaları.

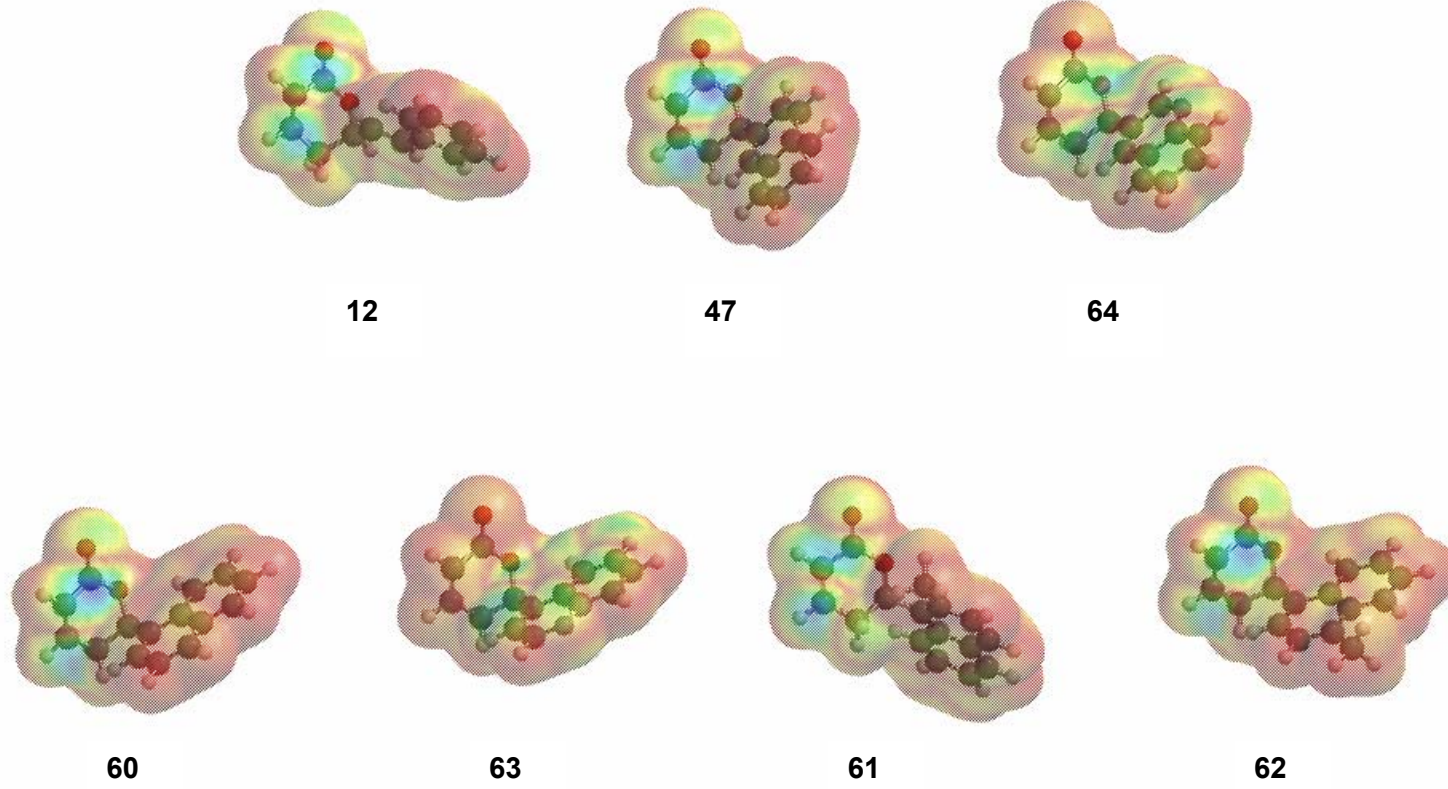
Molekül	CPK Alan (Å ²)	CPK Hacim (Å ³)	PSA (Å ²)	LogPC	E HOMO (kcal/mol)	E LUMO (kcal/mol)
12	236,06	218,33	21,82	2,9	-143,83	-30,13
47	245,15	236,7	21,32	3,38	-137,82	-30,76
64	240,62	230,47	28,56	2,47	-148,64	-36,37
60	241,96	236,11	20,68	3,38	-136,71	-29,81
63	237,42	229,96	27,82	2,47	-146,63	-37,44
61	262,23	254,4	19,65	3,87	-135,97	-30,66
62	259,85	253,97	20,87	3,87	-134,65	-29,21

Yapı-aktivite ilişkisine ek olarak sitotoksisteyi etkileyen bir diğer faktör olarak logP ön plana çıkmaktadır. LogP değeri molekülün hücre zarından geçişinde rol oynayan lifofilitenin bir göstergesidir. Moleküller için her iki kanser hücresindeki sitotoksisiye karşılık LogP değerleri grafik olarak gösterildiğinde lifofilite ile sitotoksiste arasında doğru bir ilişki olduğu gözlemlenmiştir (grafik 10).

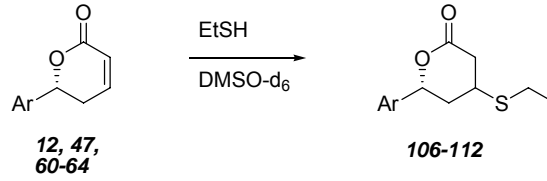


Grafik 10.12, 47 ve 60-64 no'lu moleküller için LogP ile sitotoksiste bağlantısı

Yine DFT/ B3LYP6-31G* baz setiyle hesaplanan elektron densite yüzeyindeki LUMO mutlak değerlerini gösteren yapılar şekil 16'da gösterilmiştir. Bu yüzeylerde gösterilen mavi alanlar nükleofilik atağın yapılacağı noktaları göstermektedir. Yüzeyler karşılaştırıldığında kinolin türevleri (63-64) hariç moleküllerin tamamında lakton halkalarında Michael reaksiyonuna girecek karbon üzerinde mavi yüzeyler belirmiştir. Quinolin türevlerinin sitotoksitesinin 1- ve 2-naftil türevlerinininkine oranla daha düşük olmasının bir nedenide bu olabilir. Kafamızda beliren bu sonucu doğrulamak için moleküler modellemesi yapılan laktonların tamamının etantiyol ile olan Michael katılma tepkimeleri dötöryumlu DMSO içerisinde gerçekleştirilmiş ve ¹H-NMR yardımıyla tepkimelerin oluşumu izlenmiştir (şekil 17).



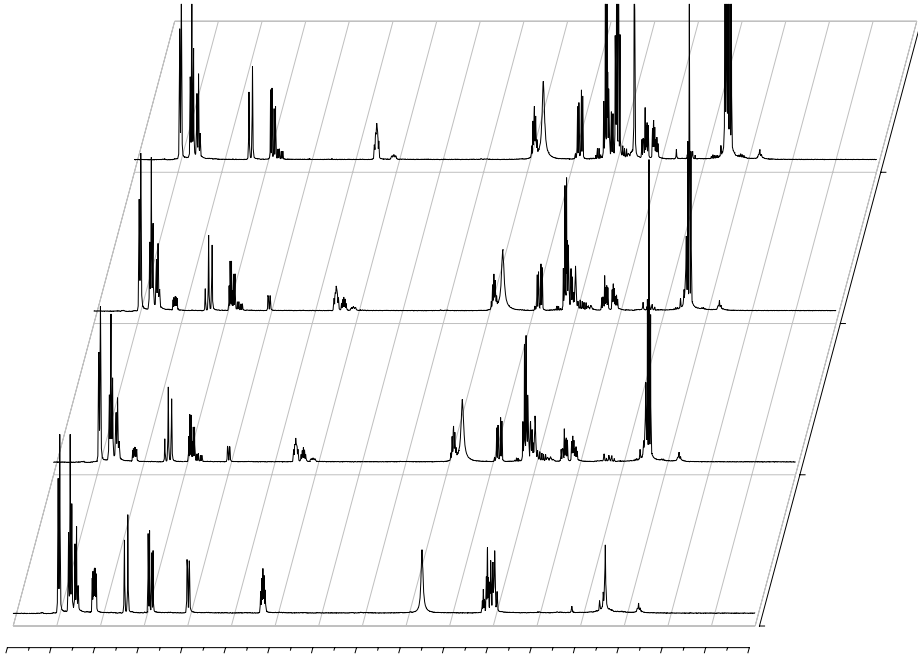
Şekil 16. DFT/ B3LYP6-31G* baz setiyle 12, 47 ve 60-64 no'lu moleküller için hesaplanan elektron yoğunluğu yüzeyindeki LUMO mutlak değerleri.



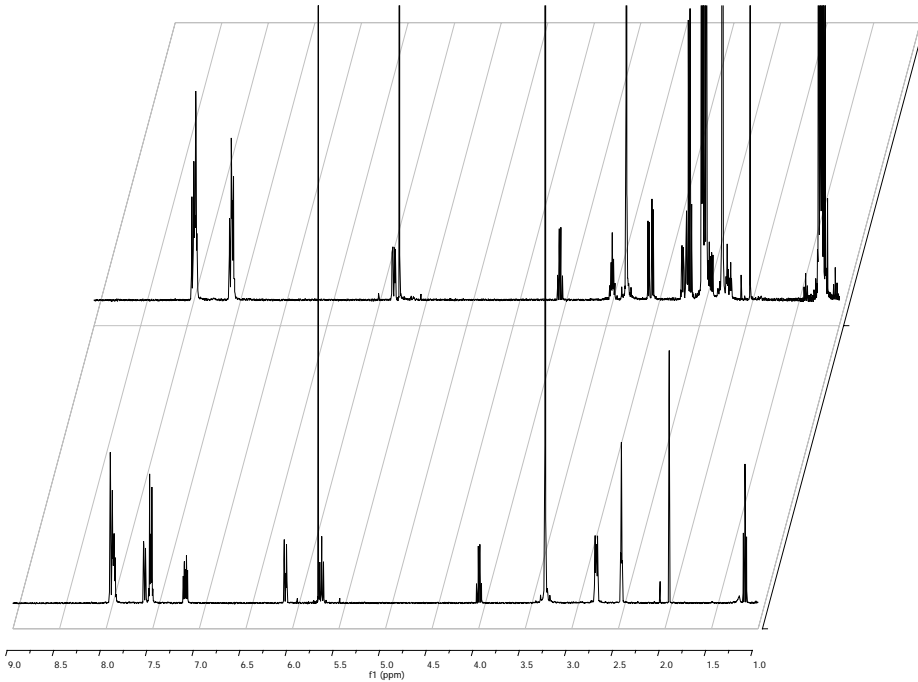
Şekil 17. Moleküler modellemesi yapılan **12, 47,** ve **60-64** no'lu moleküllerin etantiyol ile olan Michael katılma tepkimeleri.

İlk gözlemlerimiz tepkimelerin biyolojik aktiviteleri en yüksek olan **63** ve **64** no'lu moleküller hariç hemen hepsinde 10 dakikanın içerisinde bittiği yönündeydi. Öyleki **63** ve **64** no'lu moleküller iki hafta boyunca etantiyol varlığında bozulmadan kalmışlardır. Olması beklenen tepkimelerin gözlemlenmemesinin sıcaklıkla ilişkili olup olmadıklarını anlamak için **63** ve **64** no'lu moleküllerin reaksiyon karışımlarının değişik sıcaklıklardaki (25-75 °C) NMR'larına bakılmıştır (NMRlar için şekil 18-24'e bakınız). Yine ısıtıldığında bile bu moleküllerin etantiyolle reaksiyona girmedikleri gözlemlenmiştir. Bu konudaki ilk savımız **63** ve **64** no'lu moleküllerin doğal olmayan bir şekilde Michael tepkimesine girmediği için biyolojik aktivitelerinin yüksek olduğuydu. Özellikle **63** nolu molekülün etantiyol ile olan tepkimesi tekrar edildiğinde beklenen reaksiyonun gerçekleştiği görüldü. Bir madde için iki zıt sonucun çıkması denemelerin güvenilirliği hakkında şüphe uyandırdığı için gözlemlenen sonuçlar mantıklı bir açıklama bulunana kadar yayına dönüştürülmeyecektir.

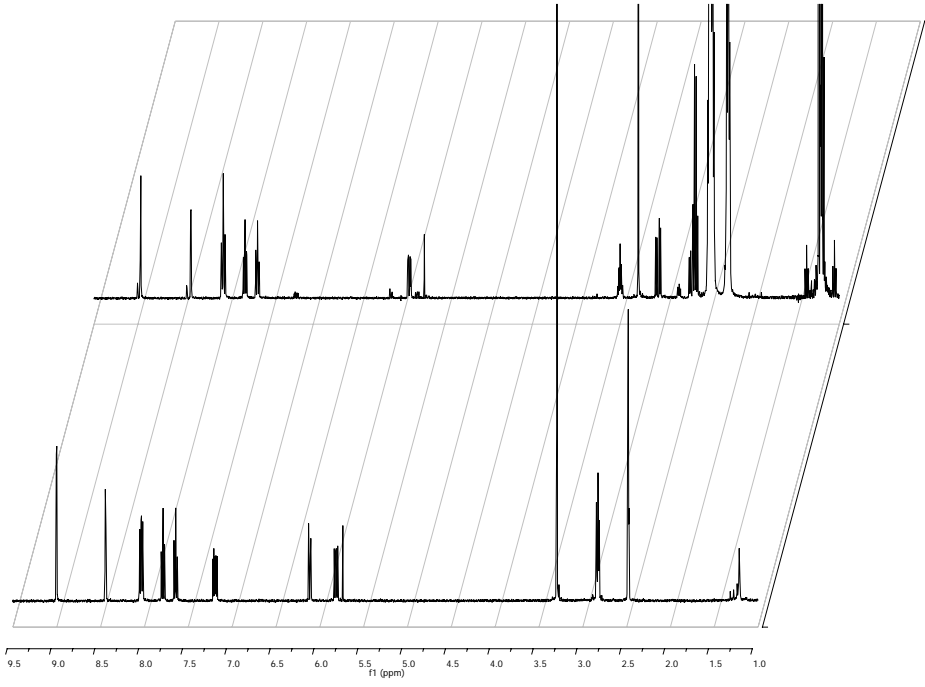
Bunun yanında moleküllerden üç tanesinin ((R)-goniothalamın (**12**), 2-naftil sübstitüentli **47**, ve 1-naftil sübstitüentli **60**) Michael eklenme ürünleri saflaştırılmış ve MCF-7 ile PC-3 kanser hücreleri üzerinde test edilmişlerdir. Moleküllerdeki Michael akseptörünün kaybolmasıyla moleküllerin aktivitelerinde ortadan kalktığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçta literatürdeki Michael akseptörünün biyolojik aktivite için gerekliliği sonuçlarını destekler niteliktedir.



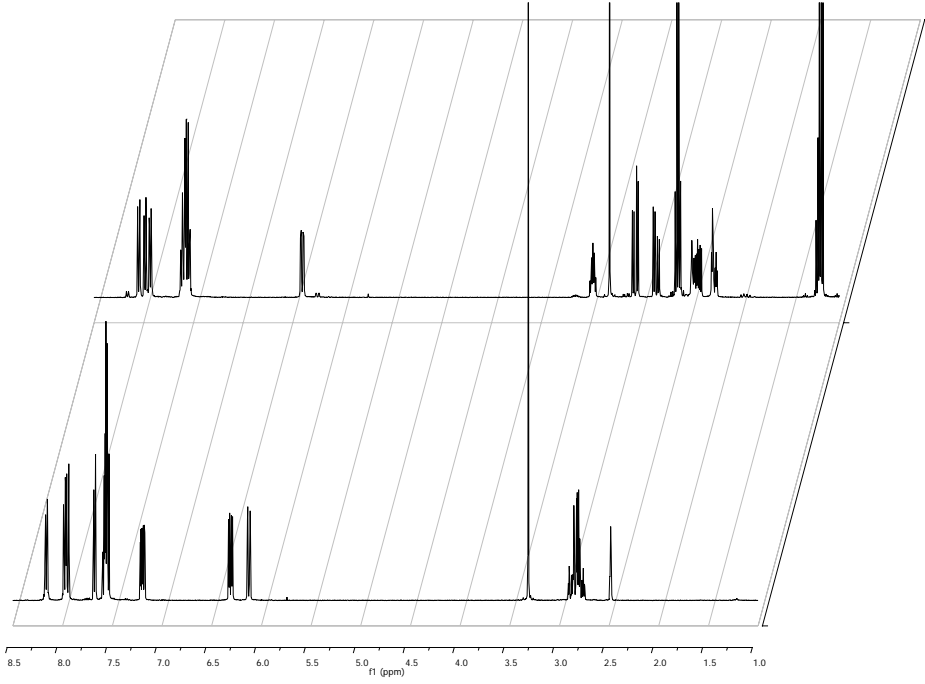
Şekil 18. DMSO-d₆ içinde etantiyol'ün (R)-goniothalamin ile reaksiyonu. (1) sadece (R)-goniothalamin, (2) (R)-goniothalamin+EtSH (1:0.75, 10 dak.), (3) (R)-goniothalamin+EtSH (1:0.75, 20 dak.), (4) (R)-goniothalamin+EtSH (1:2, 10 dak.).



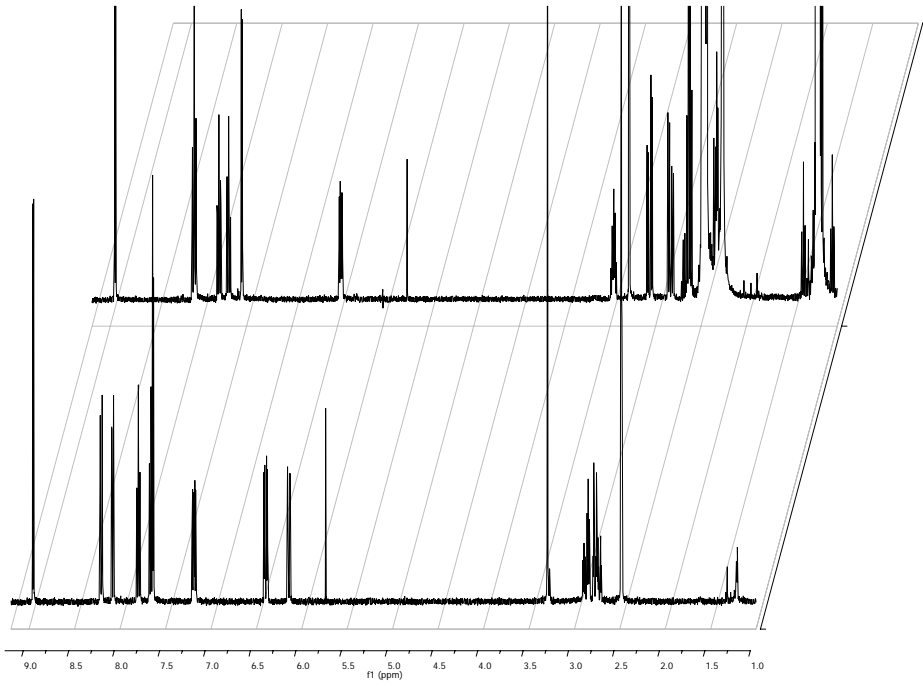
Şekil 19. DMSO-d₆ içinde etantiyol'ün 47 no'lu molekülle reaksiyonu. (1) sadece 47 no'lu molekül , (2) 47 no'lu molekül+EtSH (1:7, 10 dak.).



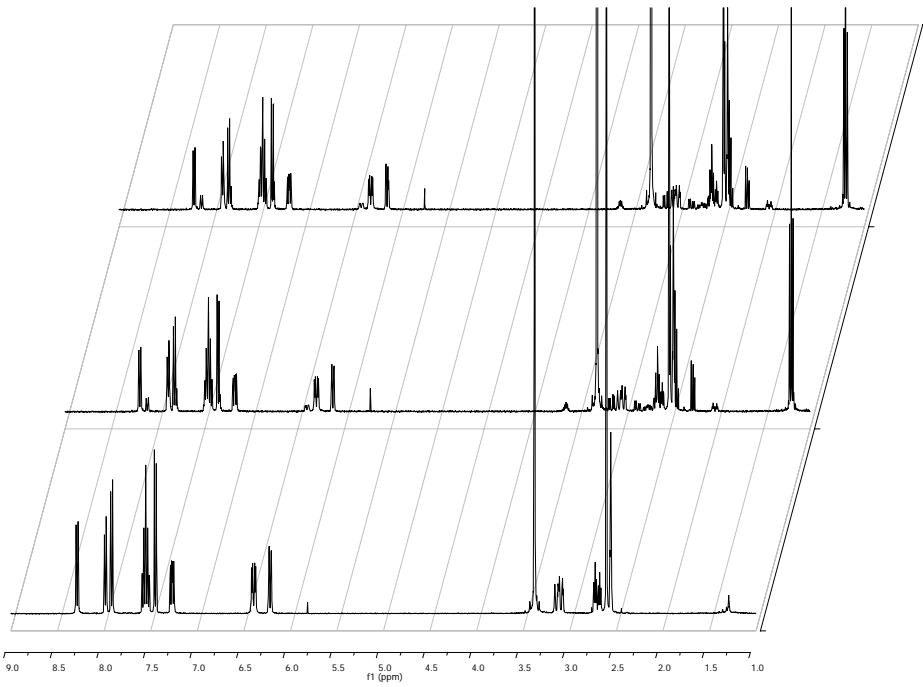
Şekil 20. DMSO-d₆ içinde etantiyol'ün **64** no'lu molekülle reaksiyonu. (1) sadece **64** no'lu molekül , (2) **64** no'lu molekül+EtSH (1:16, 10 dak.).



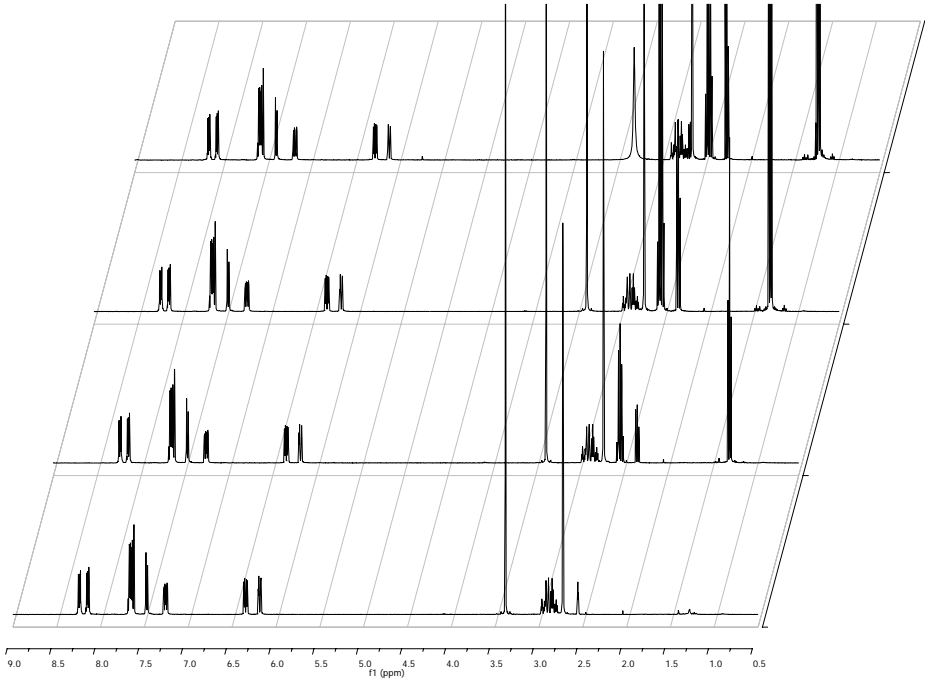
Şekil 21. DMSO-d₆ içinde etantiyol'ün **60** no'lu molekülle reaksiyonu. (1) sadece **60** no'lu molekül , (2) **60** no'lu molekül+EtSH (1:1.25, 10 dak.).



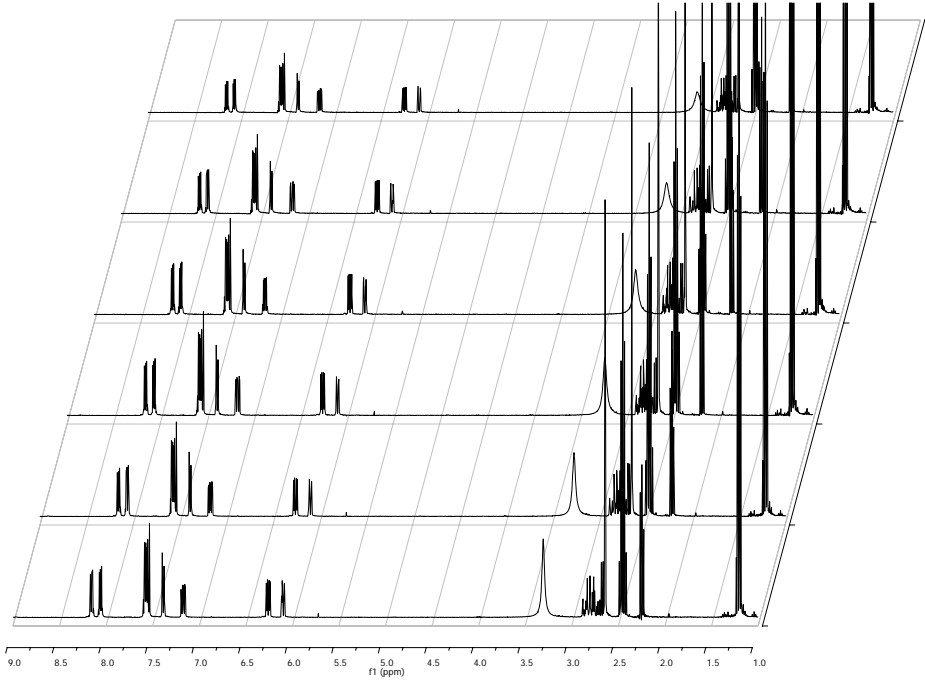
Şekil 22. DMSO-d₆ içinde etantiyol'ün **63** no'lu molekülle reaksiyonu. (1) sadece **63** no'lu molekül , (2) **63** no'lu molekül+EtSH (1:20, 10 dak.).



Şekil 23. DMSO-d₆ içinde etantiyol'ün **61** no'lu molekülle reaksiyonu. (1) sadece **61** no'lu molekül , (2) **61** no'lu molekül+EtSH (1:0.75, 10 dak.), (3) **61** no'lu molekül+EtSH (1:0.75, 2 hafta).



Şekil 24. DMSO-d₆ içinde etantiyol'ün **62** no'lu molekülle reaksiyonu. (1) sadece **62** no'lu molekül , (2) **62** no'lu molekül+EtSH (1: 0.75, 10 dak.), (3) **62** no'lu molekül+EtSH (1: 2, 10 dak.), (4) **62** no'lu molekül+EtSH (1:2, 2 hafta).



Şekil 25. DMSO-d₆ içinde etantiyol'ün **62** no'lu molekülle (1:2 oranında) değişik sıcaklıklardaki katılma reaksiyonu. (1) 25 °C , (2) 35 °C , (3) 45 °C , (4) 55 °C , (5) 65 °C , (6) 75 °C.

4. Tartışma-Sonuç

Antikanser ilaç geliştirme projesi kapsamında hazırlanan bu projede (R)-goniothalamın referans alınarak dizayn edilen 6-sübstitüentli 5,6-dihidro-2*H*-pyran-2-on moleküllerinden sadece bisikloaril sübstitüentli moleküllerin asimetric sentezleri literatüre uygun olarak gerçekleştirilebilmiştir. Bağlaç kısmında eter sübstitüenti içeren moleküllerin anahtar ara ürünlerinin sentezleri için literatürde belirtilen yöntemler denenmiş fakat başarı sağlanamamıştır.

Proje kapsamında asimetric sentezleri bitirilip saflaştırılan 13 molekülün 11 tanesinin anti-kanser özelliklerini belirlemek amacıyla değişik kanser hücreleri üzerinde denemeler yapılmıştır. 6-sübstitüentli 5,6-dihidro-2*H*-pyran-2-on türevleri ve bunların biyolojik aktiviteleri literatürde çok geniş yer almalarına karşın günümüze kadar belli bir yapı-aktivite ilişkisini ima eden substituentin varlığı bulunmaktadır. Özellikle bilinen ön koşul molekülün biyolojik aktivite gösterebilmesi için lakton halkasında bir Michael alseptörünün olması gerektiğidir. Bu çalışmada benzer bir sonuç gözlemlenmiş olmakla beraber laktonun yapısında 6 konumuna 1-naftil sübstituentinin eklenmesiyle moleküllerin antiproliferatif etkisinin arttığı gözlemlenmiştir. 1-Naftil grubunda lifofilitiyi arttırıcı başka bir substituentin varlığı ayrıca biyolojik aktiviteye pozitif yönde etki etmektedir. Kanser hücrelerinde test edilen moleküller içinde en aktif olanı 5,6-dihidro-2*H*-pyran-2-on yapısında 6 konumunda 1-(4-metilnaftil) substituentine sahip **62** no'lu moleküldür. Bahsi geçen molekül PC-3 (prostat kanseri) hücrelerindeki 50 nM'lık IC₅₀ değeriyle kayda değer bir potansiyele sahiptir. Bu molekül için fare üzerinde testler yapabileceğimiz bir kurumla ortak araştırma olanakları araştırılmaktadır.

Siklik yapıya sahip olmayan fakat yapılarında bir Michael akseptörünü barındıran moleküllerinde benzer fakat daha az sitotoksik etkiye sahip olduğu, muthemel işleyiş mekanizmalarının farklı olması nedeniyle laktonlarda görülen yapı aktivite ilişkisine sahip olmadıkları gözlemlenmiştir.

(R)-goniothalamın referans alınarak hazırlanan 2-naftil sübstitüentli 5,6-dihidro-2*H*-pyran-2-on türevinin (R)- enansiyomerinin (S)- enansiyomerine ve goniothalamine göre daha yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğu görülmüştür. Her ne kadar 2-naftil sübstitüenti goniothalamın yapısındaki sitiren sübstituentinin konformasyonel olarak sınırlandırılmış analogu gibi görünsede sitotoksitenin artışında sübstitüentler arasındaki siterik farklılıklarda rol oynamış olabilir.

Spartan programıyla yapılan hesaplamalarda biyolojik aktivitesi bilinen laktonların çoğunda Michael akseptörlerin varlığı teorik olarakda belirlenmiştir. Sadece kinolin türevlerinde herhangi bir Michael akseptörün varlığı görülemezken yaptığımız etantiyol

katılma deneylerinde bu moleküllerde de Michael katılma tepkimelerinin gerçekleştiği görülmüştür. Hesaplamalarda ayrıca moleküllerin LogP değerinin sitotoksiteleriyle yakın ilişki içinde olduğu sonucuna varılmıştır. Bu bilgiler ışığında ileriki safhalarda yapılması düşünülen moleküllerin dizaynında lifofilitiyi arttıracak sübstitüentlere sahip 1-naftil türevleri dizayn edilecektir. Hesaplamalar öncesinde sentez denemeleri yapılan ve metoksit-dimetilamin gibi değişik elektron veren sübstitüentlere sahip 1-naftil türevlerinin sentezleri başarılı olmasada teorik hesaplamalar ışığında bu moleküllerin muhtemel LogP değerlerinin düşük olacağı ve muhtemelen Kinolin türevlerine yakın bir sitotoksik etki potansiyeline sahip olacakları düşünülmektedir.

5. Yararlanılan Kaynaklar Listesi

- Bermejo A., Blazquez M.A., Rao K.S., Cortes D. Styryl-lactones from the Stem Bark of *Goniothalamus arvensis*. *Phytochem. Anal.*, 10, 127-131, (1999).
- Bermejo A., Leonce S., Cabedo N., Andreu I., Caignard D.H., Atassi G., Cortes D. Semisynthesis and Cytotoxicity of Styryl-Lactone Derivatives. *J. Nat. Prod.*, 62, 1106-1109, (1999).
- Cundy K.C., Crooks P.A. *J. Chromatogr.* 17, 281, (1983).
- Dumontet V., Hung N.V., Adeline M.T., Riche C., Chiaroni A., Sévenet T., and Gueritte F., Cytotoxic Flavonoids and α -Pyrone from *Cryptocarya obovata*. *J. Nat. Prod.* 67, 858-862, (2004).
- Fatima A., Kohn K. L., de Carvalho J. E., Pillia R. A. Cytotoxic activity of (S)-goniothalamine and analogues against human cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 622-631, (2006).
- Fatima A., Kohn L.K., Antonio M.A., Carvalho J.E., Pilli R.A. Enantioselective syntheses of (R)- and (S)-argentilactone and their cytotoxic activities against cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12, 5437-5442, 2004.
- Fatima A., Pilli R.A. Total syntheses of (R)-argentilactone and (R)-goniothalamine via catalytic enantioselective allylation of aldehydes. *Tetrahedron Letters*, 44, 8721-8724, (2003).
- Fatima A., Kohn L.K., Antonio M.A., Carvalhob J.E., Pillia R.A. (R)-Goniothalamine: total syntheses and cytotoxic activity against cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13, 2927-2933, (2005).
- Gawley R.E., Aube J. Principles of Asymmetric Synthesis. In Baldwin, J. E., Ed.; Pergamon Press: Great Britain, 46-50, (1996). (ve ordaki referanslar)
- Gruttadauria M., Meo P.L., Noto R. Short and efficient chemoenzymatic synthesis of goniothalamine. *Tetrahedron Letters*, 45, 83-85, (2004).
- Holker J.S.E., Simpson T.J. Studies on Fungal Metabolites. Part 2. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Biosynthetic Studies on Pentaketide Metabolites of *Aspergillus melleus*: 3-(1,2-Epoxypropyl)-5,6-dihydro-5-hydroxy-6-methylpyran-2-one and Mellein. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry* 1397-1400, (1981).
- Inayat-Hussain H.S., Osman A.B., Din L.B., Taniguchi N. Altholactone, a novel styryl-lactone induces apoptosis via oxidative stress in human HL-60 leukemia cells. *Toxicology Letters*, 131,153-159, (2002).
- Mosaddik M.A., Haque M.E. Cytotoxicity and antimicrobial activity of goniothalamine isolated from *Bryonopsis laciniosa*. *Phytother. Res.*, 17, 1155-1157, (2003).
- Mosaddik M.A., Haque M.E., Toxicological Evaluation of Goniothalamine Isolated from *Bryonopsis laciniosa* Linn. in Rats. *Pharmacy and Pharmacology Communications*, 5, 411-414, (1999).
- Mukherjee A.K., Basu S., Sarkar N., Ghosh A.C. Advances in Cancer Therapy with Plant Based Natural Products, *Current Medicinal Chemistry*, 8, 1467-1486, (2001).
- Newman D.J., Cragg G.M., Snader K.M. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Rep.*, 17, 215-234, (2000).

- Parker S.R., Cutler H.G., Jacyno J.M., Hill R.A. Biological Activity of 6-Pentyl-2H-pyran-2-one and Its Analogs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2774-2776, (1997).
- Pospisil J., Marko I. E. Total synthesis of (R)-(+)-goniothalamine and (R)-(+)-goniothalamine oxide: first application of the sulfoxide-modified Julia olefination in total synthesis. *Tetrahedron Lett.* 47, 5933-5937, (2006).
- Ramachandran P.V., Ram Reddy M.V., Brown H.C. Asymmetric synthesis of goniothalamine, hexadecanamide, massoia lactone, and parasorbic acid via sequential allylboration-esterification ring-closing metathesis reactions. *Tetrahedron Lett.* 41, 583-586, (2006).
- Sabitha G., Sudhakar K., Yadav J. S. Application of the Cosford cross-coupling protocol for the stereoselective synthesis of (R)-(+)-goniothalamine, (R)-(+)-kavain and (S)-(+)-7,8-dihydrokavain. *Tetrahedron Lett.* 47, 8599-8602, (2006).
- Shao Y., Molnar L.F., Jung Y., Kussmann J., Ochsenfeld C., Brown S.T., Gilbert A.T.B., Slipchenko L.V., Levchenko S.V., O'Neill D.P., DiStasio Jr. R.A., Lochan R.C., Wang T., Beran G.J.O., Besley N.A., Herbert J.M., Lin C.Y., Van Voorhis T., Chien S.H., Sodt A., Steele R.P., Rassolov V.A., Maslen P.E., Korambath P.P., Adamson R.D., Austin B., Baker J., Byrd E.F.C., Dachsel H., Doerksen R.J., Dreuw A., Dunietz B.D., Dutoi A.D., Furlani T.R., Gwaltney S.R., Heyden A., Hirata S., Hsu C-P., Kedziora G., Khalliulin R.Z., Klunzinger P., Lee A.M., Lee M.S., Liang W.Z., Lotan I., Nair N., Peters B., Proynov E.I., Pieniazek P.A., Rhee Y.M., Ritchie J., Rosta E., Sherrill C.D., Simonett A.C., Subotnik J.E., Woodcock III H.L., Zhang W., Bell A.T., Chakraborty A.K., Chipman D.M., Keil F.J., Warshel A., Hehre W.J., Schaefer H.F., Kong J., Krylov A.I., Gill P.M.W., Head-Gordon M. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 8, 3172, (2006). (*Spartan'06* has been obtained from Wavefunction, Inc. Irvine, CA.)
- Stephani R., Cesare V.J. *Chromatogr. A* 79, 813, (1998).
- Sundby E., Perk L., Anthonsen T., Aasenb A.J., Hansenb T.V. Synthesis of (R)-goniothalamine and its enantiomer by combination of lipase catalyzed resolution and alkene metathesis. *Tetrahedron*, 60, 521-524, (2004).
- Surivet J.P., Vatele J.M. Total Synthesis of Antitumor Agents, (+)-Goniopyrone and (+)-7-epi-Goniofufurone. *Tetrahedron Letters*, 38, 819-820, (1997).
- Tian Z., Chen S., Zhangb U., Huangb G., Feng Huang S., Fongb C., Yangb M., Xiaoa P. The cytotoxicity of naturally occurring styryl lactones. *Phytomedicine*, 13, 181-186, (2006).
- Zhou F.S., Tang W.D., Mu Q., Yang G.X., Wang Y., Liang G.L., Lou L.G. Semisynthesis and antitumor activities of new styryl-lactone derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* 53,1389-1391, (2005).
- Zhao L., Gao Y. Scar Treatment Using Protein Phosphatase Inhibitors. Patent, Biobotanic Corp., US2008004440, (2008).

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 105T429
Proje Başlığı: 5-Süstitüentli α,β-doymamış laktonların sentezlenmesi ve biyolojik aktivitelerinin incelenmesi
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Ali Çağır, Pınar Kasaplar, İsmail Akçok
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Fakültesi, Kimya Bölümü 35430, Gülbahçeköyü, Urla-İzmir
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Fakültesi, Kimya Bölümü 35430, Gülbahçeköyü, Urla-İzmir
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 1 Mayıs 2006 - 30 Nisan 2009
Öz <p>(R)-Goniothalamın örnek alınarak öncelikle konformasyonel olarak sınırlandırılmış (R)- ve (S)-goniothalamın analogları sentezlenmiş ve sitotoksisitelerine bakılmıştır. (R)-enansiyomerinin sitotoksisitedeki aktiviteyi artırıcı etkisinden dolayı 8 yeni 6-bisikloaril süstitüe edilmiş 5,6-dihidro-2H-pyran-2-on türevi sentezlenmiş ve MCF-7 ile PC-3 kanser hücrelerinde antiproliferatif etkilerine bakılmıştır. 1-naftil süstitüent içeren moleküllerin yapıları ile aktiviteleri arasında bir ilişki olduğu gözlemlenmiştir. Biyolojik aktivite için Michael akseptörünün varlığı gereklidir. Benzer reseptöre sahip akriloyl esterler ise α,β-doymamış laktonlardan daha düşük sitotoksisiteye sahiptirler.</p>
Anahtar Kelimeler: 5,6-dihidro-2H-pyran-2-on, lakton, asimetrik sentez, anti-kanser, sitotoksisite.
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> <small>Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.</small>
Projeden Yapılan Yayınlar: Kasaplar P., Yılmaz Ö., Çağır, A. "6-Bicycloaryl substituted (S)- and (R)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-ones: Asymmetric Synthesis, and Anti-proliferative Properties" <i>Bioorg. Med. Chem.</i> 17, 311, (2009).