

**COVID-19 TEDAVİSİ İÇİN RNA-BAĞIMLI RNA POLİMERAZ(RDRP)
İNHİBİTÖRLERİNİN SANAL LİGAND TARAMASI YÖNTEMİYLE
TASARLANMASI**

**DESIGN OF RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE (RDRP) INHIBITORS
BY VIRTUAL LIGAND SCREENING METHOD FOR THE TREATMENT OF
COVID-19**

BEKİR CAN UĞUR

PROF. DR VİLDAN ADAR GÜRSOY

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

COVID-19 TEDAVİSİ İÇİN RNA-BAĞIMLI RNA POLİMERAZ(RDRP) İNİHİTÖRLERİNİN SANAL LİGAND TARAMASI YÖNTEMİYLE TASARLANMASI

Bekir Can UĞUR

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Vildan ADAR GÜRSOY

Haziran 2024, 123 sayfa

Çin'in Wuhan kentinde Aralık 2019 tarihinde başlayan ve COVID-19 (Koronavirüs Hastalığı 2019) küresel çapta pandemik bir salgına dönüşmüştür. Bundan dolayı COVID-19 hastalığına yol açan virüse SARS-CoV-2 adı verilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre dünya genelinde hastalığa yakalanmış kişi sayısı 775 milyonu geçerken hastalıktan kaynaklı can kaybı ise 7,7 milyonu aşmıştır. Bu durum ülkemizde ise 17 milyona aşkın vaka görülürken can kaybı ise 100 binin üzerindedir. Günümüzde COVID-19 tedavisi için Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından onay alan 8 tane ilaç vardır ve Birleşik Devletler İlaç ve Gıda Yönetimi (USFDA) tarafından onay alan 3 tane ilaç vardır. Bunun yanı sıra ilaç tedavisine ek olarak güncel onay almış kullanımda 5 tane aşı vardır.

Tüm koronavirüsler yapısında membran üzerinde bulunan S protein, Membran proteini ve zarf proteini olmak üzere toplam üç yapısal protein bulundurlar. Bu proteinlere ek olarak virüs kalıtsal malzemesi olan RNA yapısında papain benzeri proteaz (PLpro), 3-kimotripsin benzeri proteaz (3CLpro), RNA bağımlı RNA Polimeraz (RdRp) ve helikaz olmak üzere dört tane fonksiyonel olan protein bulundurlar. COVID-19 tedavisi için yeni inhibitör araştırmaları için önemli ilaç hedefleri; PLpro, 3CLpro, RdRp ve S proteini. Tez kapsamında seçilen ilaç hedefi RdRp enzimidir. RdRp enzimi ile etkileşen Remdesivir ve Molnupiravir olmak üzere iki tane inhibitör bulunmaktadır.

RdRp enzimi SARS-CoV-2 virüsünün kalıtsal materyali olan RNA zincirinin transkripsiyonu ve replikasyonundan sorumludur. RdRp enzimi bu görevinden kaynaklı oldukça önem arz eden bir hedeftir. RdRp enzimi avuç içi, parmak ve başparmak bölgesinden oluşmaktadır. Aktif bölge avuç içi bölgesinde konumlanmıştır. Aktif bölge 7 bölümden oluşmaktadır. RdRp enziminin aktif bölgesine bağlanmak isteyen inhibitörler genellikle enzimin substrat yapısına kovalent bağlanırlar. Enzimin aktif bölgesi içerisinde yer alan motif B bölümü substrat yapısının stabilizasyonunu sağlamaktadır. Bu bölgeye yapılacak olan ikincil etkileşimler içeren enzim inhibisyonu bu şekilde sağlanabilir.

Bu tez çalışması, validasyon, moleküler doking (kenetlenme), sanal ligand tarama ve ADMET olmak üzere dört hesaplama içermektedir. Birinci aşamada, nükleotit olmayan moleküller için SARS-CoV-2 RdRp enziminin motif B bölgesi ile etkileşebilecek düşük 7D4F PDB kodlu protein-ligand kompleksi ile bu komplekse ait Suramin ligandı için Autodock Vina programı kullanılarak validasyon çalışması yapıldı. Nükleotit olan moleküller için SARS-CoV-2 RdRp enziminin motif F bölgesi ile etkileşebilecek 7BV2 PDB kodlu protein-ligand kompleksi ile bu komplekse ait Remdesivir Trifosfat ligandı için Autodock Vina programı kullanılarak validasyon çalışması yapıldı. Yeniden kenetlenme (redocking) hesaplamaları sonucu, deneysel (x-ray) ve hesapsal sonuçlarının karşılaştırılması sonucu 7D4F PDB kodlu protein için RMSD değeri 1.878 Å bulundu ve değer 2Å değerinden düşük olması seçilen yöntemin uygunluğunu göstermektedir. Ligandın hesaplanan Ki değeri 1.12 nM olarak bulunmuştur. 7BV2 PDB kodlu protein için RMSD değeri 1.914 Å bulundu ve değer 2Å değerinden düşük olması seçilen yöntemin uygunluğunu göstermektedir. Ligandın hesaplanan Ki değeri 1.45 nM olarak bulunmuştur.

İkinci aşama farklı hastalıklarda kullanılan 10 tane nükleotit yapıda olan antiviral ilaç, 24 tane flavonoid ve 1 tane de Zaire Ebolavirüs ve Zika virüsü tedavisinde kullanılan **Suramin** molekülü dahil olmak üzere nükleotit yapıda olmayan 35 molekül RdRp aktif bölgesinde bulunan ve RNA stabilizasyonu sağlayan motif B bölgesine bağlanması hedeflendi. Bunun için yapı tabanlı ilaç tasarımı yöntemlerinden olan moleküler kenetlenme Autodock Vina programı kullanılarak yapıldı.

Üçüncü Aşamada, PubChem veri tabanında sanal ligand taraması yapılmıştır. Yapılan sanal ligand taraması sonucunda 413 molekül bulunan bir veri tabanı oluşturulup çoklu moleküler kenetlenmeye tabi tutulmuştur. Çoklu yapılan moleküler kenetlenme

sonucunda en yüksek afinite değerine sahip 20 moleköl tespit edilmiştir. Son aşama 20 moleköl için ADME ve toksisite (emilim-dağılım-metabolizma-atılım-toksisite) hesaplamaları yapıldı. Belirlenen ADMET testlerinden uygun sonuç alan 20 moleköl belirlenerek çalışma tamamlandı. Elde edilen bu moleküller, COVID-19 pandemisi için RdRp enzim inhibitörü olarak antiviral ilaç tasarımı açısından etkili olabilir, öncü moleköl bulma konusunda önemli katkıda bulunabilir.

Anahtar Kelimeler: COVID-19, RNA-bağımlı RNA Polimeraz,RdRp, *in silico*, Molecular Doking, Sanal Ligand Tarama, ADMET

ABSTRACT

DESIGN OF RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE (RDRP) INHIBITORS BY VIRTUAL LIGAND SCREENING METHOD FOR THE TREATMENT OF COVID-19

Bekir Can UĞUR

Master of Science, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Vildan ADAR GÜRSOY

June 2024, 123 pages

The COVID-19 pandemic, which started in December 2019 in Wuhan, China, has since become a global outbreak. Consequently, the virus that causes COVID-19 has been named SARS-CoV-2. According to data from the World Health Organization (WHO), the number of people infected worldwide has exceeded 775 million, with over 7.7 million deaths. In our country, over 17 million cases have been reported, with more than 100,000 deaths. Currently, there are 8 drugs approved by the European Medicines Agency (EMA) and 3 drugs approved by the United States Food and Drug Administration (USFDA) for the treatment of COVID-19. In addition to drug treatments, there are 5 vaccines that have received approval and are in use.

All coronaviruses contain three structural proteins on their membranes: the spike (S) protein, the membrane (M) protein, and the envelope (E) protein. In addition to these proteins, the viral genetic material RNA comprises four functional proteins: papain-like

protease (PLpro), 3-chymotrypsin-like protease (3CLpro), RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), and helicase. Important drug targets for new inhibitor research in COVID-19 treatment include PLpro, 3CLpro, RdRp, and the S protein. The selected drug target for this thesis is the RdRp enzyme. There are two inhibitors interacting with the RdRp enzyme: Remdesivir and Molnupiravir.

The RdRp enzyme is responsible for the transcription and replication of the RNA strand, the genetic material of the SARS-CoV-2 virus. Due to this role, the RdRp enzyme is a highly significant target. The RdRp enzyme consists of the palm, fingers, and thumb regions, with the active site located in the palm region. The active site comprises seven segments. Inhibitors that aim to bind to the active site of the RdRp enzyme typically covalently attach to the enzyme's substrate structure. The motif B region within the enzyme's active site stabilizes the substrate structure. Enzyme inhibition can be achieved by secondary interactions within this region.

This thesis study includes four computational processes: validation, molecular docking, virtual ligand screening, and ADME/Tox (absorption-distribution-metabolism-excretion/toxicity). In the first phase, validation studies were performed using the Autodock Vina program for the interaction of nucleotide-free molecules with the motif B region of the SARS-CoV-2 RdRp enzyme with the 7D4F PDB coded protein-ligand complex and its Suramin ligand. For nucleotide molecules, validation was conducted for the interaction with the motif F region of the SARS-CoV-2 RdRp enzyme using the 7BV2 PDB coded protein-ligand complex and its Remdesivir Triphosphate ligand. Re-docking calculations yielded an RMSD value of 1.878 Å for the 7D4F PDB coded protein, indicating the method's suitability with a value below 2 Å. The calculated K_i value for the ligand was found to be 1.12 nM. For the 7BV2 PDB coded protein, an RMSD value of 1.914 Å was obtained, also indicating method suitability with a value below 2 Å. The calculated K_i value for the ligand was found to be 1.45 nM.

In the second phase, molecular docking using the Autodock Vina program was performed for 10 nucleotide antiviral drugs, 24 flavonoids, and 1 non-nucleotide molecule (Suramin) used in the treatment of Zaire Ebolavirus and Zika virus. These molecules were targeted to bind to the motif B region in the active site of RdRp, responsible for RNA stabilization.

In the third phase, a virtual ligand screening was conducted in the PubChem database, resulting in a dataset of 413 molecules subjected to multiple molecular dockings. The 20 molecules with the highest affinity values were identified.

In the final phase, ADME and toxicity (absorption-distribution-metabolism-excretion/toxicity) calculations were performed for the top 20 molecules. The molecules that passed the ADME/Tox tests were determined, completing the study. These identified molecules could be effective as RdRp enzyme inhibitors in antiviral drug design for the COVID-19 pandemic and contribute significantly to the discovery of lead compounds.

Keywords: COVID-19, RNA-dependent RNA Polymerase, RdRp, *in silico*, Molecular Docking, Virtual Ligand Screening, ADME/Tox

TEŞEKKÜR

Lisans hayatımdan başlayarak yüksek lisans eğitimimin sonuna kadar tez çalışmama ve hayatımın içerisinde vermiş olduğu tavsiyelerle sadece akademik anlamda değil hayatımın akışının çoğu noktasında vermiş olduğu bilgi birikimi ve tavsiyeler ile yoluma ışık tutmuş olan değerli görüşlerini her zaman dinlediğim öğrencileri için elinden gelen her türlü çabayı yerine getiren saygıdeğer hocam, danışmanım ve mentorum Sayın Prof. Dr. Vildan Adar Gürsoy'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tez çalışmam esnasında her türlü desteğini sürekli hissettiğim problemlerini kendi problemleri olarak düşünüp çözmek için elinden gelen ve beni hiç yalnız bırakmayan başta canım aile üyelerim Gülhan UĞUR, Burak UĞUR ve Hızır UĞUR olmak üzere ailemden ayırt etmediğim arkadaşlarım Mert KORKMAZ, Sadrettin Burak ÜNGÖR ve Ozan Çobanoğlu'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Hacettepe Üniversitesi Bilgisayar Destekli İlaç Tasarım Araştırma Grubu (CADD) içerisinde yer alan Doktora öğrencisi Saadettin BAŞTÜRK'e sağladığı tüm destekleri için ve Bilgisayar Destekli İlaç Tasarım Laboratuvarına teşekkürlerimi sunarım.

BEKİR CAN UĞUR

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Koronavirüsler	4
2.2 SARS-CoV-2	5
2.3 SARS-CoV-2 İçin İlaç Hedefleri	6
2.3.1 RNA Bağımlı RNA Polimeraz (RdRp).....	7
2.3.2 Çıkıntı(Spike , S) Protein	7
2.3.3 Proteaz Enzimleri	7
2.3.4 Helikaz Enzimleri	7
2.4 SARS-CoV-2 RNA Bağımlı RNA Polimeraz (RdRp) Enzimi.....	8
2.4.1 RdRp'nin Yapısal ve Fonksiyonel Özellikleri.....	8
2.4.2 RdRp'nin Antiviral Hedef Olarak Önemi	8
2.4.3 İlaç Geliştirme Çalışmalarında RdRp.....	9
2.4.4 RdRp'nin (nsp 12) Genel Yapısı	9
2.5 SARS-CoV-2 RNA Bağımlı RNA Polimeraz Enziminin Substrat Yapısı ..	14
2.5.1 RdRp'nin Substrat Tanıma ve Bağlanma Mekanizması	14
2.5.2 Katalitik Süreç ve NTP Polimerizasyonu	14
2.5.3 Nükleotit Olmayan Substratlar ve RdRp ile Etkileşimleri	15
2.6 SARS-CoV-2 RNA Bağımlı RNA Polimeraz İnhibitörleri	15
2.6.1 Nükleotit Analogu Olan İnhibitörler	15
2.6.2 Nükleotit Analogu Olmayan İnhibitörler	23

Flavonoidler	25
2.7 Protein Veri Tabanları ve Özellikleri	31
2.7.1 RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB)	31
2.7.2 PDBSum	31
2.7.3 PDBe (Protein Data Bank in Europe)	31
2.7.4 PDBj (Protein Data Bank Japan).....	32
2.7.5 wwPDB (World Wide Protein Data Bank).....	32
2.8 Moleküler Kenetlenme	33
2.8.1 Moleküler Kenetlenme Yöntemleri	33
2.8.2 Moleküler Kenetlenmenin Temel Adımları	33
2.8.3 Kenetlenme Skorumlama Fonksiyonları.....	34
2.8.4 Moleküler Kenetlenmede Kullanılan Yazılımlar	35
2.8.5 Moleküler Kenetlenmenin Uygulama Alanları	36
2.8.6 Moleküler Kenetlenme ve Bağlanma Enerjisi Hesaplamaları.....	36
2.8.7 Bağlanma Enerjisi ve Doking Süreci	36
2.8.8 AutoDock Vina ve Bağlanma Enerjisi Hesaplamaları.....	36
2.8.9 Bağlanma ve Ayrışma Süreçlerinin Matematiksel Modellemesi	37
2.9 Sanal Ligand Taraması: Tanımı, Yöntemleri ve Uygulamaları.....	37
2.9.1 Sanal Ligand Taramasının Temel Prensipleri	37
2.9.2 Sanal Ligand Taraması Yöntemleri.....	38
2.9.3 Sanal Ligand Taramasının Uygulamaları	38
2.9.4 Sanal Taramanın Avantajları ve Zorlukları	38
3. MATERYAL VE METOT.....	39
3.1. Tezde Kullanılan Program ve Veri Tabanları.....	39
3.1.1 RCSB Veri Tabanı.....	39
3.1.2 Autodock Vina.....	40
3.1.3 ZINC 15 Veri Tabanı	42
3.1.4 PubChem Veri Tabanı.....	44
3.1.5 BIOVIA Discovery Studio Visualizer	46
3.1.6 pkCSM Online Programı.....	47
3.1.6.1 Temel Özellikler ve Açıklamaları	47
3.2 Yapılan Çalışmanın Adımları	50

3.2.1 Moleküler Kenetleme Hesaplamaları için Hedef Proteinlerin Seçimi	52
3.2.2 Moleküler Kenetlenme Hesaplamaları için Nükleotit Yapıda Olan ve Nükleotit Yapıda Olmayan Moleküllerin Seçimi	55
3.2.3 Moleküler Kenetlenme Hesaplamaları için Metot Validasyonu	55
3.2.4 Moleküler Kenetlenme Hesaplamaları	68
3.2.5 Sanal Ligand Taraması	68
3.2.6 ADME ve Toksikite Hesaplamaları	69
4. SONUÇLAR	69
4.1 Moleküler Kenetlenme Hesaplamaları	69
4.1.1 Nükleotit Olmayan Moleküller için Moleküler Kenetlenme Hesaplamaları	69
4.1.2 Nükleotit Olan Moleküller için Moleküler Kenetlenme Hesaplamaları	72
4.1.3 Sanal Ligand Taraması	74
4.1.4 ADME ve Toksikite Sonuçları	77
4.1.4.1 24 Flavonoidlerin ADME ve Toksikoloji Sonuçları	78
5. YORUMLAR	92
6. KAYNAKLAR	98
EKLER	106
EK.1 Sanal Ligand Taramasında kullanılan parametreler	106
EK.2 7BV2 PDB Kodlu Protein Motif F için Moleküler Kenetlenme Çalışmasında kullanılan parametreler	106
EK.3 Çoklu moleküler kenetlenme için kullanılan DwimPerl Scripti	107
EK.4 Nükleotit Olmayan Moleküller için Moleküler Kenetlenme Etkileşimleri	107
EK.5 Nükleotit Olan Moleküller için En İyi, Orta ve En kötü Moleküler Kenetlenme Etkileşimleri	119
ÖZGEÇMİŞ	124

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 SARS-CoV-2 Virüsü (şekil https://www.biorender.com 'dan alınmıştır).....	6
Şekil 2.2 SARS-CoV-2 SARS-CoV-2'nin yaşam döngüsü ve ilaç hedefleri (şekil referans 25'ten alınmıştır).....	6
Şekil 2.4 SARS-CoV-2 RdRp enziminin aktif bölgesi (PDB Kod:7BV2).....	12
Şekil 2.5 Remdesivir molekülünün 2 boyutlu gösterimi.....	17
Şekil 2.6 Molnupiravir molekülünün 2 boyutlu gösterimi.....	18
18	
Şekil 2.7 Molnupiravir'in aktif ilaca dönüşümü.....	18
Şekil 2.7 Galidesivir molekülünün 2 boyutlu gösterim.....	19
Şekil 2.8 Ribavirin molekülünün 2 boyutlu gösterim.....	20
Şekil 2.9 Sofosbuvir molekülünün 2 boyutlu gösterimi.....	20
Şekil 2.10 Daclatasivir molekülünün 2 boyutlu gösterimi.....	21
Şekil 2.11 Tenofovir molekülünün 2 boyutlu gösterimi.....	21
Şekil 2.12 VV116 molekülünün 2 boyutlu gösterimi.....	22
Şekil 2.13 GS-621763 molekülünün 2 boyutlu gösterimi.....	22
Şekil 2.14 GS-441524 molekülünün 2 boyutlu gösterimi.....	22
Şekil 2.15 Suramin molekülünün 2 boyutlu gösterimi.....	25
Şekil 2.16 Korilagin molekülü 2 boyutlu gösterimi ve <i>Phyllanthus Niruri</i> bitkisi.....	25
Şekil 2.17 Hesperidin molekülünün 2 boyutlu gösterimi ve Portakal bitkisi.....	26
Şekil 2.18 Hiperisin molekülünün 2 boyutlu gösterimi ve St John's Wort bitkisi.....	26
Şekil 2.19 Baikalin ve Baikalein molekülünün 2 boyutlu gösterimi.....	27
Şekil 2.20 <i>Scutellaria baicalensis</i> bitkisi.....	27
Şekil 2.21 Kuersetin molekülünün 2 boyutlu gösterimi ve Kırmızı Soğan bitkisi.....	28
Şekil 2.22 Luteolin molekülünün 2 boyutlu gösterimi ve Biber bitkisi.....	28
Şekil 2.23 Kampferol ve Mirisetin molekülünün 2 boyutlu gösterimi.....	29
Şekil 2.25 Fisetin ve molekülünün 2 boyutlu gösterimi ve Çilek bitkisi.....	29
Şekil 2.26 Morin molekülünün 2 boyutlu gösterimi ve Şalgam bitkisi.....	30
Şekil 2.27 Apigenin molekülünün 2 boyutlu gösterimi ve Rezene bitkisi.....	30
Şekil 2.28 RCSB Protein Veri Tabanı Arayüzü.....	32
Şekil 3.1 RCSB protein veri tabanı arayüzü ve örnek protein-ligand kompleks yapısı.....	40
Şekil 3.2 Autodock Vina ile görüntülenen 7D4F proteini.....	42
Şekil 3.3 ZINC15 Veri Tabanı Arayüzü.....	44
Şekil 3.4 PubChem Veri Tabanı Arayüzü.....	45
Şekil 3.5 BIOVIA Discovery Studio Visualizer ile görüntülenen protein-ligand etkileşim örneği.....	47
Şekil 3.9 pkCSM Online Programı Arayüzü.....	49
Şekil 3.10 pkCSM Online Programı Suramin molekülü için sonuç ekranı.....	50

Şekil 3.11 Yapılan Çalışma Adımlarını İçeren Diyagram.....	51
Şekil 3.12 RdRp kompleksi alt birimi nsp12'nin şematik diyagramı; A'dan G'ye motifler	53
Şekil 3.13 A) RdRp kompleksi alt birimi nsp12'nin şematik diyagramı; A'dan G'ye kadar olan motifler vurgulanmıştır. B) 7D4F PDB kodlu proteinin yapısı. İki suramin molekülünün RdRp'nin A – G motifleriyle etkileşimleri. Renk kodu şu şekildedir: motif A (mavi), motif B (altın), motif C (turuncu kırmızı), motif D (orta mor kırmızı), motif E (macenta), motif F (mavi) ve motif G (yeşil).....	54
Şekil 3.14 7BV2 PDB kodlu proteinin x-ray yapısı.....	56
Şekil 3.15 7BV2 PDB kodlu proteinin aktif bölgesi*	56
Şekil 3.16 Remdesivir Trifosfat ligandının 2 boyutlu yapısı.....	57
Şekil 3.17 14 7BV2 PDB kodlu Protein-Ligand Kompleksi Motif B için Validasyon Çalışması Sonuçları	58
Şekil 3.18 Validasyon Çalışması Sonucu 7BV2 Motif F ile Remdesivir Trifosfat 2 boyutlu etkileşimleri	58
Şekil 3.19 Validasyon Çalışması Sonucu 7BV2 Motif F ile Remdesivir Trifosfat 3 boyutlu etkileşimleri	59
Şekil 3.20 7BV2 İçin Yeniden kenetlenme ligandı ile referans ligand karşılaştırması	59
Şekil 3.21 7BV2 kodlu RdRp Enzimi ve Remdesivir Trifosfat Kompleksi için Validasyon sonucu elde edilen ligand ile referans ligandın karşılaştırılması (Kırmızı molekül: Ligand Sarı molekül: Yeniden kenetlenme)	60
Şekil 3.22 7D4F PDB kodlu proteinin x-ray yapısı*	61
*Kırmızı alan aktif bölgeyi temsil etmektedir.	61
Şekil 3.23 Suramin ligandının 2 boyutlu yapısı.....	62
Şekil 3.24 7D4F yapısının Motif B için Validasyon Çalışması Sonuçları.....	62
Şekil 3.25 7D4F yapısının Motif G için Validasyon Çalışması Sonuçları.....	63
Şekil 3.26 7D4F yapısının Motif B için Validasyon Çalışması Sonucu 7D4F Aktif Bölgedeki Motif B ile Suramin molekülü 2 boyutlu etkileşimleri	64
Şekil 3.27 7D4F yapısının Motif B için Validasyon Çalışması Sonucu 7D4F Aktif Bölgedeki Motif B ile Suramin molekülü 3 boyutlu etkileşimleri	64
Şekil 3.28 7D4F yapısının Motif G için Validasyon Çalışması Sonucu 7D4F Aktif Bölgedeki Motif G ile Suramin molekülü 2 boyutlu etkileşimleri	65
Şekil 3.29 7D4F yapısının Motif G için Validasyon Çalışması Sonucu 7D4F Aktif Bölgedeki Motif G ile Suramin molekülü 3 boyutlu etkileşimleri	65
Şekil 3.30 7D4F yapısının Motif B için yeniden kenetlenme ligandı ile referans ligand karşılaştırması	66
Şekil 3.31 7D4F yapısının Motif B için validasyon sonucu elde edilen ligand ile referans ligandın karşılaştırılması (Turuncu molekül: Ligand Yeşil molekül: Yeniden kenetlenme)	67
Şekil 3.32 Motif G için Validasyon sonucu elde edilen ligand ile referans ligandın karşılaştırılması (Kırmızı molekül: Ligand Sarı molekül: Yeniden kenetlenme)	67

Şekil 4.1. RdRp enzim inhibitörü Sanal ligand taraması sonucu bağlanma afinitesine göre en yüksek 5 molekül ve Suramin Molekülü (Kırmızı Renkli Gruplar: Çıkarılan Gruplar, Mavi Renkli Gruplar: Eklenen Gruplar)	77
Şekil 4.2 Tez Çalışması Sonucunu İçeren Diyagram.....	84
Şekil 4.3 ADME ve toksisite çalışması sonucunda ilaç adayı olma potansiyeli yüksek olan moleküller	85
Şekil 5.1 Korilagin(soldaki) ve Genistenin yapıları(sağdaki).....	93
Şekil 5.2 Suramin molekülünün protein-aminoasit etkileşimlerinin 2 boyutlu gösterimi	94
Şekil 5.3 Suramin molekülü 2 boyutlu gösterimi.....	95
Şekil 5.4 Suramin yapısındaki yapısal değişikliklerin şematik gösterimi	96

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 SARS-CoV-2 RdRp enziminin X-ray kristal yapılarının pdb kodları ve yapısal özellikleri	13
Çizelge 2.3 İlaç Hedefi Olan Flavonoidler.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Çizelge 4.1 Nükleotit Olmayan Moleküllerin Kenetlenme Sonuçları	70
Çizelge 4.2 En iyi, orta ve en kötü bağlanma afinitesi veren nükleotit olmayan moleküllerin moleküler kenetlenme sonucu ve ligand-protein etkileşimleri.....	71
Çizelge 4.3 Nükleotit Olan Moleküllerin Kenetlenme Sonuçları.....	73
Çizelge 4.4 Sanal ligand taraması sonucu bağlanma afinitesine göre en yüksek 20 molekül.....	77
Çizelge 4.5 Sanal Ligand Tarama Sonucu En İyi Bağlanma Enerjisine Sahip Moleküller.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Çizelge 4.6 Fitokimyasalların ADMet hesaplamalarında elde ettiği Emilim Sonuçları.....	79
Çizelge 4.7 Fitokimyasalların ADMet hesaplamalarında elde ettiği Dağılım Sonuçları.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Çizelge 4.8 Fitokimyasalların ADMet hesaplamalarında elde ettiği Metabolizma Sonuçları.....	81
Çizelge 4.9 Fitokimyasalların ADMet hesaplamalarında elde ettiği Atılım Sonuçları	82
Çizelge 4.10 Fitokimyasalların ADMet hesaplamalarında elde ettiği Toksikite Sonuçları.....	83
Çizelge 4.11 Potansiyel İlaç Hedeflerinin ADMet hesaplamalarında elde ettiği Emilim Sonuçlar	86
Çizelge 4.12 Potansiyel İlaç Hedeflerinin ADMet hesaplamalarında elde ettiği Dağılım Sonuçları ...	87
Çizelge 4.13 Potansiyel İlaç Hedeflerinin ADMet hesaplamalarında elde ettiği Metabolizma Sonuçları	88
Çizelge 4.14 Potansiyel İlaç Hedeflerinin ADMet hesaplamalarında elde ettiği Atılım Sonuçları.....	89
Çizelge 4.15 Potansiyel İlaç Hedeflerinin ADMet hesaplamalarında elde ettiği Toksikite Sonuçları.	90
Çizelge 4.16 Potansiyel İlaç Hedeflerinin ADMet hesaplamalarında elde ettiği Fizikokimyasal Sonuçlar.....	91
Çizelge 5.1 AMES Toksikiteye sahip olmayan ve en iyi afinite değeri veren moleküller.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Å	Angström
$\Delta G_{Bağlanma}$	Bağlanma Enerjisi
$\Delta G_{İnhibisyon}$	İnhibisyon Enerjisi
μM	Mikromolar
nM	Nanomolar
Ki	İnhibisyon Sabiti
Kcal	Kilokalori

Kısaltmalar

COVID-19	Yeni koronavirüs hastalığı
SARS-CoV	Şiddetli Akut Solunum Yolu Sendromu Virüsü
MERS-CoV	Orta Doğu Solunum Sendromu Virüsü CoV Koronavirüsler
SARS-CoV-2	Yeni Şiddetli Akut Solunum Yolu Sendromu Virüsü
PLpro	Papain-benzeri proteaz
RdRp	RNA Bağımlı RNA polimeraz
NSP	Yapısal olmayan protein
3CLpro	3-kimotripsin proteaz
X-Ray	X-Işını
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
PDB	Protein Veri Bankası
USFDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
K(bağlanma)	Bağlanma Sabiti
K(ayrışma)	Ayrışma Sabiti

ASN	Asparajin
ARG	Arjinin
ASP	Aspartik Asit
CYS	Sistein
GLU	Glutamat
GLN	Glutamin
GLY	Glisin
HIS	Histidin
LYS	Lizin
LEU	Lösin
PRO	Prolin
THR	Treonin
TYR	Tirozin

1. GİRİŞ

Çin'in Wuhan kentinde Aralık 2019 tarihinde başlayan ve COVID-19 (Koronavirüs Hastalığı 2019) küresel çapta pandemik bir salgına dönüşmüştür. Bu salgın son derece bulaşıcılık özelliği fazla olan solunum yolu hastalığıdır. Bu hastalığa koronavirüsler ailesinden SARS-CoV-2 neden olmaktadır. 22 Mayıs 2024 tarihi itibarı ile Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre dünya genelinde hastalığa yakalanmış kişi sayısı 775 milyonu geçerken hastalıktan kaynaklı can kaybı ise 7,7 milyonu aşmıştır. Bu durum ülkemizde ise 17 milyona aşkın vaka görülürken can kaybı ise 100 binin üzerindedir[1].

Günümüzde COVID-19 tedavisinde kullanılan onaylı 7 ilaç virüsün 3 ana hedefi; **Mpro**(Ana Proteaz), **RDRP**(RNA-bağımlı RNA Polimeraz) ve **S**(Çıkıntı, Spike) Proteinleri için inhibitör olarak etkilidir [2,3].

Bunlardan;

3CLPro inhibitörleri: Nirmatrelvir, Ensitrelvir, Somnitrelvir

RdRp İnhibitörleri: Remdesivir, Molnupiravir, Azvudin küçük-moleküllü inhibitör yapısında iken,

S inhibitörü: Sotrovimab ise antikor yapısında büyük bir makromoleküldür.

Klinik araştırması devam eden ve henüz onaylanmamış ilaç adayları ise;

- Tixagevimab/Cigavimab
- Anakira
- Regdanvimab
- Tocilizumab
- Casirivimab/Imdevimab

Bunun yanı sıra ilaç tedavisine ek olarak güncel onay almış kullanımda 5 tane aşı vardır.

Bunlar:

- Bimervax (Önceki adı COVID-19 Aşısı HIPRA)
- Comirnaty
- Jcovden (Önceki adı COVID-19 Aşısı Janssen)
- Nuvaxovid
- Spikevax (Önceki Adı COVID-19 Aşısı Moderna)

Bu onay alan ilaçlar SARS-CoV-2 virüsünün 3CLpro (3-kimotripsin benzeri proteaz), RdRp (RNA'ya bağımlı RNA polimeraz) ve S proteinleri ile etkileşmektedir. SARS-CoV-2 virüsü hedeflerinden RdRp enzimi inhibitörü olarak Veklury ve Lagevrio onay alan iki ilaçtır.

Koronavirüsler (CoV) genel olarak hayvanlarda ve insanlarda ciddi seviyede zarar veren hastalıklara ve bundan kaynaklı çeşitli problemlere yol açan *Coronaviridae* ailesinde yer alan virüslerdir. Koronavirüslerin genomu büyük ve tek iplikçikli RNA'dan oluşur.

Kasım 2002'de ortaya çıkan SARS-CoV (Şiddetli Akut Solunum Yolu Sendromu) Foshan, Guangdong, Çin'de tespit edildi. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) salgından Şubat 2003'te haberdar edildi. Mart 2003'te küresel bir uyarı yayınladı. Salgının büyük kısmı yaklaşık 8 ay sürdü. MERS-CoV (Orta Doğu Solunum Sendromu) ilk defa 2012 yılında Suudi Arabistan'da tanımlanan ve yeni bir koronavirüsün neden olduğu bulaşıcı solunum yolu hastalığıdır. Yapılan genom analizleri sonucunda SARS-CoV-2 ismiyle bilinen virüsün genomu % 80-90 oranında SARS-CoV ile benzerlik gösterdiği bilinmektedir. Bundan dolayı COVID-19 hastalığına yol açan virüse SARS-CoV-2 adı verilmiştir.

Tüm koronavirüsler yapısında membran üzerinde bulunan S protein, Membran proteini ve zarf proteini olmak üzere toplam üç yapısal protein bulundurlar. Bu proteinlere ek olarak virüs kalıtsal malzemesi olan RNA yapısında papain benzeri proteaz (PLpro), 3-kimotripsin benzeri proteaz (3CLpro), **RNA bağımlı RNA Polimeraz (RdRp)** ve helikaz olmak üzere dört tane fonksiyonel olan (yapısal olmayan protein) bulundurlar.

SARS-CoV-2 RdRp enzimi için geliştirilen inhibitörler genel amacı molekülün enzim substratı olan RNA kovalent bağlanarak etkinliğinin yitirmesini planlamaktır. Bu şekilde viral proteinin kalıtsal materyal RNA'nın replikasyon ve transkripsiyonunu engeller.

Aktif bölge içerisinde 7 tane bölüm bulunur. Bu bölümlerden motif B bölgesi enzimin yapısına bağlanacak olan RNA substratının stabilizasyonu için görevlidir. Bu bölge enzim yapısında kovalent bağlanmanın gerçekleşmeyeceği inhibe edebilecek potansiyel hedefler için uygun olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmanın temel amacı, farklı hastalıklarda kullanılan 10 tane nükleotit yapıda olan antiviral ilaç, 24 tane flavonoid ve 1 tane de Zaire Ebolavirüs ve Zika virüsü tedavisinde kullanılan **Suramin** molekülü dahil olmak üzere nükleotit yapıda olmayan 35 molekül RdRp aktif bölgesinde bulunan ve RNA stabilizasyonu sağlayan motif B bölgesine bağlanması hedeflendi. Bunun için yapı tabanlı ilaç tasarımı yöntemlerinden olan moleküler kenetlenme Autodock Vina programı kullanılarak yapıldı. Suramin molekülü için PubChem veri tabanı kullanılarak benzer molekül taraması yapıldı. Bunun sonucunda veri seti oluşturuldu. Veri seti sanal ligand taramasının çoklu moleküler kenetlenmesi işleminin yapılabilmesi için DwimPerl scripti kullanıldı. Bunun akabinde ADMET hesaplamaları için pkCSM çevirim içi aracı kullanılmıştır. Sonuç olarak tüm hesaplama sonuçları değerlendirilerek 20 tane potansiyel ilaç hedefi elde edilmiştir. Bu tezde yapılan çalışmalar sonucu elde edilen veriler SARS-CoV-2 tedavisine yönelik yeni RdRp inhibitörlerinin geliştirilmesi konusunda katkı sağlayabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Koronavirüsler

Koronavirüsler, çeşitli hayvan türlerini ve insanları etkileyebilen geniş bir virüs ailesini temsil eder. Bu virüsler, genellikle solunum yolu hastalıklarına neden olur ve bunlar hafif soğuk algınlığından ciddi akut solunum yolu sendromlarına kadar değişebilir [4]. Yapısal olarak, koronavirüsler, üzerinde çıkıntı yapan dikenli (spike) proteinler bulunan yuvarlak ve zarflı virüslerdir [5]. Bu spike proteinler, virüsün hücreye bağlanmasını ve hücre içine girmesini sağlayarak enfeksiyonun başlamasında kritik bir rol oynar.

İnsanları etkileyen yedi koronavirüs tespit edilmiştir. Bunlar arasında dört tanesi genellikle hafif üst solunum yolu hastalıklarına neden olan HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 ve HCoV-HKU1'dir. Diğer üçü, ciddi hastalıklara ve salgınlara yol açabilen SARS-CoV (Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü), MERS-CoV (Orta Doğu Solunum Sendromu Koronavirüsü) ve SARS-CoV-2 (COVID-19 hastalığına neden olan) virüsleridir [6]. Bu virüsler, zoonotik patojenlerdir, yani hayvanlar arasında yayılırken insanlara da bulaşabilir. Özellikle SARS-CoV ve MERS-CoV'un yarasalarla ilişkili olduğu ve SARS-CoV-2'nin de muhtemelen yarasalardan insanlara geçtiği düşünülmektedir [7].

Koronavirüslerin genomu büyük ve tek iplikçikli RNA'dan oluşur. Bu RNA, virüsün yapısını oluşturan proteinleri ve virüsün çoğalmasını sağlayan enzimleri kodlar [6]. Koronavirüslerin çoğalma süreci, virüsün hücre içine girmesiyle başlar. Hücre içine girdikten sonra, RNA genomu kullanılarak virüs proteinleri ve yeni virüs partikülleri üretilir.

Koronavirüs pandemileri, küresel sağlık sistemleri üzerinde ciddi etkiler yaratır ve bu durum, etkili antiviral tedaviler ve aşular geliştirme ihtiyacını artırır. Ayrıca, koronavirüslerin ekoloji ve insan sağlığı üzerine etkileri, virüslerin nasıl yayıldığına dair daha derinlemesine bilgi edinmek için ek araştırmaları gerektirir [6]. Bu tür bilgiler, gelecekteki salgınları önlemek ve kontrol etmek için hayati öneme sahiptir.

2.2 SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2), 2019 yılının sonlarında Çin'in Wuhan şehrinde ortaya çıkmış ve kısa sürede dünya geneline yayılmış yeni bir koronavirüs türüdür [8]. COVID-19 (Coronavirus Disease 2019) hastalığının etken maddesi olan bu virüs, hem yüksek bulaşıcılığı hem de ciddi klinik tabloları ile öne çıkmaktadır [9]. SARS-CoV-2, yapısal olarak tek iplikçikli RNA genomuna sahip olan ve zarflı bir virüstür [10]. Virüsün genetik yapısı, diğer beta-koronavirüslerle %50 ile %79 oranında benzerlik göstermektedir [11]. Özellikle, SARS-CoV ile yüksek oranda genetik benzerlik taşımaktadır [12].

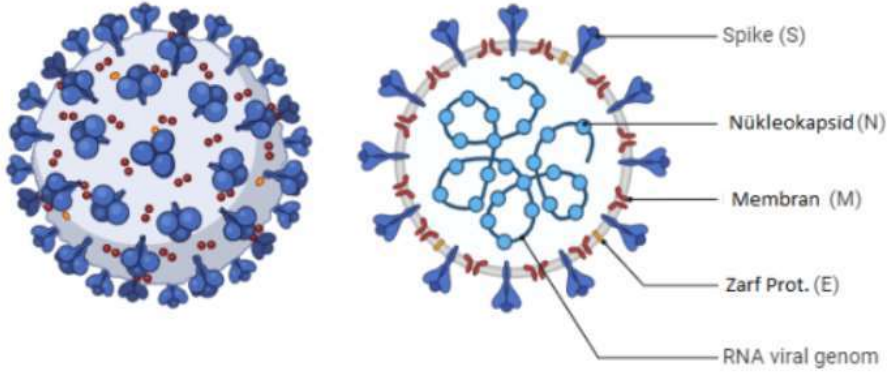
SARS-CoV-2'nin bulaşma mekanizması, viral spike (S) proteinlerinin insan hücrelerindeki ACE2 reseptörüne bağlanması ile gerçekleşir [13]. Bu bağlanma, virüsün hücre içine girişini ve sonrasında hücrenin enfekte olmasını sağlar [14]. Virüsün spike proteininde bulunan furin benzeri bir bölünme yeri, bu virüsün diğer koronavirüslerden daha verimli bir şekilde hücrelere giriş yapmasına olanak tanır [15].

Klinik olarak SARS-CoV-2, enfekte kişilerde ateş, öksürük ve nefes darlığı gibi solunum yolu semptomlarına neden olur [16]. Ağır vakalar, akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS) ve çoklu organ yetmezliğine ilerleyebilir [17]. Bu durum, özellikle yaşlılar ve kronik hastalığı olan bireylerde daha sık görülmektedir [18]. Virüsün bulaşıcılığı ve hızlı yayılımı, küresel çapta önemli bir halk sağlığı sorunu oluşturmuştur [19].

Epidemiyolojik olarak, SARS-CoV-2'nin orijini muhtemelen yarasalarla ilişkilidir fakat kesin zoonotik kökeni henüz belirlenmemiştir [20]. Virüsün insan popülasyonuna nasıl ve ne zaman geçtiği konusunda bilimsel çalışmalar devam etmektedir [21]. Pandeminin kontrol altına alınması için yaygın test uygulamaları, etkili izolasyon stratejileri, sosyal mesafe ve kapsamlı aşılama programları önem taşımaktadır [22].

Bu genel bilgiler, SARS-CoV-2 ve neden olduğu hastalık hakkında temel bir anlayış sunmakta ve virüsün biyolojisinden klinik yönetimine kadar geniş bir perspektif sağlamaktadır [23]. Bu bilgiler, pandemiyle mücadelede bilimsel yaklaşımların ve sağlık politikalarının geliştirilmesine katkıda bulunabilir [24].

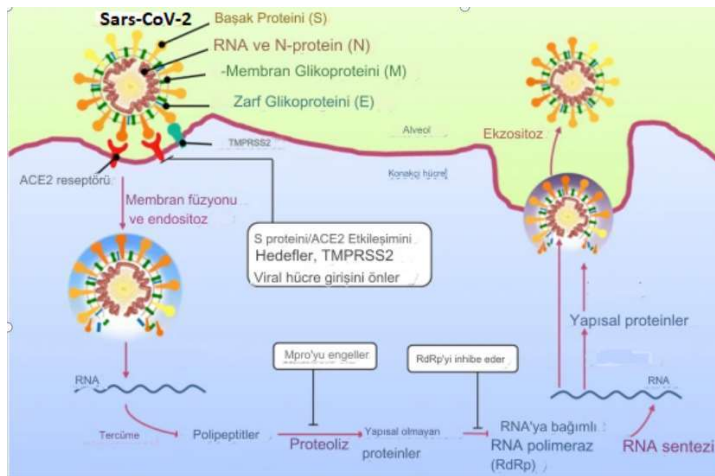
İnsan Koronavirüs Yapısı



Şekil 2.1 SARS-CoV-2 Virüsü (şekil <https://www.biorender.com>'dan alınmıştır).

2.3 SARS-CoV-2 İçin İlaç Hedefleri

SARS-CoV-2 (Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü 2), 2019 yılı sonlarında ortaya çıkan ve dünya genelinde COVID-19 pandemisine neden olan yeni bir koronavirüsdür. Virüsün hızlı yayılımı ve yüksek ölüm oranları, etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için acil bir ihtiyaç doğurmuştur. Bu bağlamda, SARS-CoV-2'ye karşı ilaç geliştirme çabaları, virüsün biyolojik yapısını ve insan hücreleri ile etkileşimini anlamak üzerine yoğunlaşmıştır. İlaç hedefleri genellikle virüsün kritik proteinlerini veya virüsün insan hücrelerine girişini sağlayan mekanizmaları içermektedir [25].



Şekil 2.2 SARS-CoV-2 SARS-CoV-2'nin yaşam döngüsü ve ilaç hedefleri(şekil referans 25'ten alınmıştır).

2.3.1 RNA Bağımlı RNA Polimeraz (RdRp)

SARS-CoV-2'nin RNA bağımlı RNA polimerazı (RdRp), viral RNA'nın replikasyonu ve transkripsiyonu için kritik öneme sahiptir. RdRp, virüsün genetik materyalini kopyalamakta ve yeni viryonların oluşumunu sağlamaktadır. Bu enzim, spesifik inhibitörlerle hedef alındığında, virüsün çoğalma yeteneği önemli ölçüde azaltılabilir. RdRp'ye yönelik geliştirilen antiviral ilaç hedefleri, virüsün genetik kopyalanma sürecini bozarak etkili bir tedavi yöntemi sunmaktadır. Bu bağlamda, remdesivir ve favipiravir gibi nükleotid analogları, COVID-19 tedavisinde umut vaat eden ilaçlar arasında yer almaktadır[26].

2.3.2 Çıkıntı(Spike , S) Protein

SARS-CoV-2'nin hücreye girişinde kritik bir rol oynayan spike protein, ACE2 reseptörüne bağlanarak virüsün hücre içine girmesini sağlar. Spike proteininin bu reseptörle etkileşimi, enfeksiyonun başlaması için zorunludur. Bu proteinin hücre bağlanma bölgesini hedef alan antikolar veya küçük molekül inhibitörler, virüsün hücreye girişini bloke edebilir ve enfeksiyonun önlenmesine yardımcı olabilir [27].

2.3.3 Proteaz Enzimleri

SARS-CoV-2, viral poliproteinlerin işlevsel proteinlere bölünmesini sağlayan proteaz enzimlerine sahiptir. Bu proteazlardan 3CLpro (ana proteaz), virüsün replikasyon sürecinde hayati rol oynar. 3CLpro'yu hedef alan moleküler inhibitörler, virüsün yaşam döngüsünü durdurabilir ve virüs yükünü azaltabilir. Bu bağlamda, lopinavir ve ritonavir gibi HIV proteaz inhibitörleri, SARS-CoV-2 üzerinde potansiyel etkileri nedeniyle incelenmiştir [28].

2.3.4 Helikaz Enzimleri

SARS-CoV-2'nin helikaz enzimleri, viral RNA'nın düzenlenmesi ve işlenmesi süreçlerinde önemli görevler üstlenir. Bu enzimler, antiviral ilaç geliştirme çalışmalarında yeni hedefler olarak değerlendirilmektedir. Helikazların inhibisyonu, viral RNA replikasyonunun ve transkripsiyonunun engellenmesi yoluyla virüsün çoğalmasını kısıtlayabilir [29].

Bu çalışma, SARS-CoV-2'nin çeşitli ilaç hedeflerini kapsamlı bir şekilde incelemekte ve bu hedeflere yönelik terapötik stratejilerin geliştirilmesi için bir temel oluşturmaktadır. RdRp, spike protein, proteaz ve helikaz enzimleri gibi hedefler, COVID-19'a karşı

mücadelede merkezi öneme sahip olup, bu proteinler üzerine yoğunlaşan araştırmalar, pandemiye yanıt verme kapasitemizi artıracaktır.

2.4 SARS-CoV-2 RNA Bağımlı RNA Polimeraz (RdRp) Enzimi

SARS-CoV-2, dünya genelinde büyük bir sağılık krizine yol açan yeni bir koronavirüs türüdür. Bu virüsün RNA Bağımlı RNA Polimeraz (RdRp) enzimi, viral replikasyon sürecinde hayati bir role sahiptir. RdRp, SARS-CoV-2'nin genomik RNA'sının kopyalanmasını sağlayarak, virüsün hücre içinde çoğalmasını mümkün kılar. Bu nedenle, RdRp, COVID-19'a karşı geliştirilen tedavi stratejilerinde kritik bir hedef olarak öne çıkmaktadır [30].

2.4.1 RdRp'nin Yapısal ve Fonksiyonel Özellikleri

SARS-CoV-2 RdRp, virüsün çok büyük bir replikasyon-transkripsiyon kompleksinin parçasıdır. Bu kompleks, viral RNA'nın hem replikasyonunu hem de transkripsiyonunu gerçekleştirir. RdRp, birincil transkripsiyon ürünlerini başlatmak ve zincir uzamasını sağlamak üzere diğer Yapısal olmayan proteinlerle etkileşime girer. Enzim, yapısal olarak üç ana bölgeye ayrılır: avuç içi ve parmak ve başparmak bölgesidir. Bu bölgeler, RNA'yı tanıma ve RNA sentezini katalize etme kabiliyeti açısından önemlidir. Avuç içi bölgesi, enzimin katalitik merkezini içerirken, parmak ve avuç içi bölgeleri, RNA ve nükleotid substratlarının bağlanması için gerekli yapısal konformasyonları sağlar[31].

2.4.2 RdRp'nin Antiviral Hedef Olarak Önemi

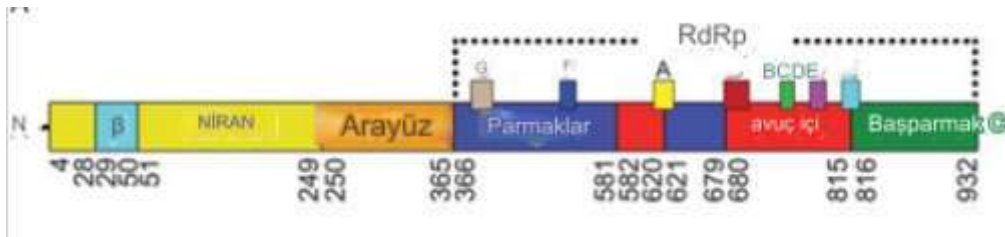
RdRp'nin virüs replikasyonundaki merkezi rolü, bu enzimi COVID-19 tedavisinde ideal bir hedef haline getirir. Spesifik RdRp inhibitörleri, viral RNA sentezini bloke ederek virüsün çoğalmasını durdurabilir. Bu bağlamda, remdesivir gibi nükleotid analogları, RdRp tarafından yanlışlıkla kullanılarak viral RNA zincirine entegre olur ve zincirin uzamasını engeller. Bu inhibitörlerin etkinliği, SARS-CoV-2'nin genetik yapısının derinlemesine anlaşılmasıyla optimize edilebilir. Ayrıca, bu tür inhibitörler, viral mutasyonlara karşı da dirençli olabilir, çünkü mutasyonlar genellikle enzimin katalitik aktivitesini azaltan değişiklikler yapar [31].

2.4.3 İlaç Geliştirme Çalışmalarında RdRp

COVID-19 pandemisine yanıt olarak RdRp'ye yönelik ilaç geliştirme çalışmaları hız kazanmıştır. Bu çalışmalar hem yapısal biyoloji tekniklerini hem de bilgisayar destekli ilaç tasarımı yöntemlerini kullanmaktadır.[30] RdRp'nin kristal yapısının çözülmesi, bu enzime bağlanabilecek potansiyel inhibitörlerin daha etkin bir şekilde tasarlanmasına olanak tanır. Ayrıca, RdRp'nin dinamik yapısının anlaşılması, enzime özgü inhibitörlerin geliştirilmesinde kritik öneme sahiptir. Yapısal bilgiler, bu moleküllerin bağlanma yerlerini ve potansiyel etkileşim noktalarını belirlemede kullanılır, böylece daha hedef odaklı ve etkili antiviral ilaç hedefleri geliştirilebilir [31].

2.4.4 RdRp'nin (nsp 12) Genel Yapısı

SARS-CoV-2 RNA Bağımlı RNA Polimeraz (RdRp), viral RNA'nın kopyalanmasında ve virüsün çoğalmasında esas rolü oynayan bir enzimdir. Bu enzim, RNA virüslerindeki en kritik katalitik ünitelerden biri olarak kabul edilir. RdRp'nin genel yapısı, enzimin fonksiyonel ve yapısal özelliklerini belirleyen birkaç ana bölgeden oluşur: avuç içi , parmak ve başparmak bölgeleridir. Bu yapısal özellikler, RdRp'nin RNA şablonunu tanıması, nükleotid substratlarını seçmesi ve yeni RNA zincirini sentezlemesi açısından kritik öneme sahiptir [32].



Şekil 2.3 COVID-19 virüsü nsp12-nsp7-nsp8 kompleksinin yapısı.

COVID-19 virüsü nsp12'nin etki alanı organizasyonu. Alanlar arası sınırlar kalıntı numaralarıyla etiketlenmiştir. Kriyo-EM harita yoğunluğu olmayan N-terminal kısmı ve haritada gözlemlenemeyen C-terminal kalıntıları atamaya dahil edilmemiştir. Polimeraz motifleri şu şekilde renklendirilir: motif A, sarı; motif B, kırmızı; motif C, yeşil; motif D, menekşe; motif E, camgöbeği; motif F, mavi; ve G motifi, açık kahverengi [32].

2.4.4.1 Avuç İçi Bölgesi

Avuç İçi bölgesi, enzimin katalitik merkezidir ve RNA polimerizasyon reaksiyonlarını gerçekleştiren ana yapıdır. Bu bölge, tipik olarak beta-levha yapısına sahip olup, iki metal iyonunu (genellikle magnezyum veya mangan) koordine eder. Bu metal iyonları, fosfodiester bağlarının oluşumu için gerekli olan fosforil transfer reaksiyonunu katalize eder. Avuç İçi bölgesi ayrıca, polimerazın substrat spesifitesini ve doğruluk oranını belirleyen amino asit kalıntılarını içerir. SARS-CoV-2 RdRp'de, bu bölge, viral replikasyon sürecinde hata oranını düşürmek için gereken redaksiyon mekanizmasına katkıda bulunur [32].

2.4.4.2 Parmak Bölgesi

Parmak bölgesi, RNA şablonunu ve nükleotid trifosfatları (NTP'ler) tanıyan ve onların doğru pozisyonda tutulmasını sağlayan yapısal bir birimdir. Bu bölge, enzimin hızlı ve etkili bir şekilde RNA sentezlemesini mümkün kılan esnek bir yapıya sahiptir. Parmak bölgesi, RNA şablonu ve NTP'ler arasında özgül etkileşimler kurarak, enzimin katalitik aktivitesini doğrudan etkiler. Bu bölge, nükleotidlerin eklenme sırasını ve hızını kontrol eden ve RdRp'nin yüksek verimlilikte çalışmasını sağlayan alanlardan biridir [32].

2.4.4.3 Başparmak Bölgesi

Başparmak Bölgesi, RdRp'nin genel üç boyutlu yapısını stabil hale getiren ve RNA polimerizasyon kompleksinin bütünlüğünü koruyan bölgedir. Bu bölge, enzimin RNA şablonu boyunca ilerlemesini ve uzun RNA zincirlerinin sentezlenmesini sağlar. Avuç içi RdRp, nsp7 ve nsp8 kofaktörleri ile kompleks halinde çalışır. Bu kofaktörler, RdRp'nin yapısal stabilitesini artırır ve replikasyon verimliliğini yükseltir. Yapılan cryo-elektron mikroskopi çalışmaları, bu kompleksin atomik çözünürlükteki yapısını ortaya koymuştur. Nsp7 ve nsp8, RdRp'nin aktivitesini artıran ve RNA sentezini destekleyen yapısal bir destek sağlar [32].

2.4.4.4 Nsp7 ve Nsp8'in Yapısal Katkıları

Nsp7: Bu küçük protein, RdRp kompleksinin stabilitesine katkıda bulunur ve özellikle virüsün RNA zincirinin başlangıç fazında önemli bir rol oynar.

Nsp8: Daha uzun bir protein olan nsp8, hem RdRp'ye yapısal destek sağlar hem de primer bağımsız RNA sentez yeteneği ile RdRp'nin replikatif fonksiyonunu destekler. Nsp8,

özellikle uzun RNA substratlarının sentezinde kritik bir role sahiptir ve bu özelliği ile geniş bir RNA virüsü ailesinde benzersizdir [32].

2.4.4.5 RdRp'nin Aktif Bölgesinin Yapısal Özellikleri

RdRp'nin aktif bölgesi, Avuç içi bölgesi içinde yer alır ve burada RNA sentezleme işlemi gerçekleşir. Avuç İçi bölgesi, polimerazın katalitik işlevini yerine getiren ve enzimatik reaksiyon için gerekli olan iki metal iyonunu (genellikle magnezyum veya mangan) içeren bir yapıdır. Bu bölge, aynı zamanda bir dizi korunmuş motif içerir: motif A'dan G'ye kadar uzanır. Bu motifler, RNA şablonundan yeni RNA zincirinin sentezlenmesini sağlayacak şekilde düzenlenmiştir [32].

Motif A (612, 626 arası aminoasitler): Bu motif, divalent katyonları (genellikle magnezyum veya mangan) bağlar. Katyonlar, RNA zincirinin büyümesi sırasında yeni nükleotidlerin eklenmesi için gerekli olan fosfodiester bağlarının oluşumunu katalize eder. Motif A, polimeraz aktivitesinin temelini oluşturur ve RNA sentezinin doğruluğu için kritik bir rol oynar [32].

Motif B (678,710 arası aminoasitler): Bu motif, genellikle polimerazın stabilitesine ve nükleotid substratların doğru şekilde tanınmasına yardımcı olan yapısal bir role sahiptir. Motif B, RdRp'nin parmak bölgesi içinde bulunur ve RNA şablonu ile etkileşimde önemlidir [32].

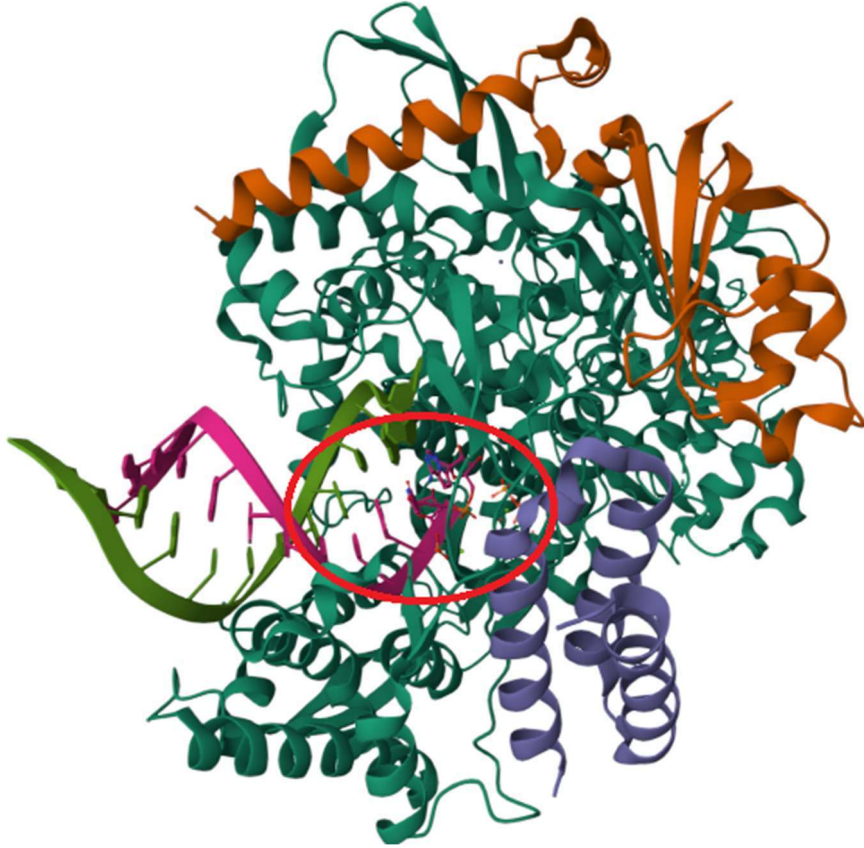
Motif C (753, 767 arası aminoasitler): Katalitik işlem sırasında fosfodiester bağlarının oluşumunu sağlayan kritik asidik amino asitleri (SDD) içerir. Bu amino asitler, RNA zincirinin uzaması sırasında katalitik merkezdeki kimyasal reaksiyonları kolaylaştırır [32].

Motif D (772, 796 arası aminoasitler): Bu motif, genellikle RNA'nın transkripsiyon sırasında stabilizasyonuna katkıda bulunur. Motif D, RdRp'nin avuç içi bölgesi içinde yer alır ve RNA şablonunun doğru şekilde konumlanmasına yardımcı olur [32].

Motif E (810,820 arası aminoasitler): RNA'nın primerine bağlanarak, yeni nükleotidlerin eklenmesi sürecini destekler. Motif E, RdRp'nin Avuç İçi bölgesi içinde kritik bir konumda yer alır ve enzimin hızını ve doğruluğunu artırır [32].

Motif F (544,560 arası aminoasitler): Bu motif, nükleotid trifosfatların (NTP'lerin) RdRp'ye girişini düzenler. Motif F, nükleotid kanalının formasyonunda yer alır ve substrat seçiminde önemli bir rol oynar [32].

Motif G (499,511 arası aminoasitler): Motif G, RdRp'nin avuç içi bölgesi içinde yer alır ve RNA'nın çıkışını ve yeni sentezlenen RNA'nın serbest bırakılmasını yönetir. Bu motif, enzimin yapısal bütünlüğünü ve RNA ile olan etkileşimlerini destekler [32].



Şekil 2.4 SARS-CoV-2 RdRp enziminin aktif bölgesi (PDB Kod:7BV2)

PDB Kodu	Ligand	Etkileşim Türü	Çözünürlük (Å)
6M71	-	-	2.9
7BTF	Zn 2+ katyonu	Kovalent olmayan	3.0
7BW4	Zn 2+ katyonu	Kovalent olmayan	3.7
7BV1	Zn 2+ katyonu	Kovalent olmayan	2.8
7BV2	Remdesivir Trifosfat	Kovalent	2.5
6YYT	Zn 2+ katyonu	Kovalent olmayan	2.9
7C2K	Zn 2+ katyonu	Kovalent olmayan	2.9
7BZF	Zn 2+ katyonu	Kovalent olmayan	2.9
6XEZ	CHAPSO, Adenozin Difosfat	Kovalent	3.5
7CXN	Zn 2+ katyonu	Kovalent olmayan	2.9
7CXM	Zn 2+ katyonu	Kovalent olmayan	3.8
7CTT	GE6	Kovalent	3.2
7AAP	GE6	Kovalent	2.5
7B3B	Zn 2+ katyonu	Kovalent olmayan	3.1
7B3C	Zn 2+ katyonu	Kovalent olmayan	3.4
7B3D	Zn 2+ katyonu	Kovalent olmayan	2.8
7L1F	Remdesivir Monofosfat	Kovalent	3.9
7YCQ	Guanozin Difosfat	Kovalent	2.8
7D4F	Suramin	Kovalent Olmayan	2.6
7OZV	Molnupiravir	Kovalent	3.2
7OZU	Molnupiravir	Kovalent	3.3

Çizelge 2.1 SARS-CoV-2 RdRp enziminin X-ray kristal yapılarının pdb kodları ve yapısal özellikleri

2.5 SARS-CoV-2 RNA Bağımlı RNA Polimeraz Enziminin Substrat Yapısı

SARS-CoV-2, RNA Bağımlı RNA Polimeraz (RdRp) enzimini kullanarak RNA replikasyonu gerçekleştirir. RdRp, viral RNA'nın çoğaltılmasında ve virüsün genetik bilgisinin yeni virionlara aktarılmasında kritik bir role sahiptir. Bu süreçte, RdRp'nin etkileştiği substrat yapıları, yani **nükleotid trifosfatlar (NTP'ler)**, enzimin işlevselliği ve etkinliği için merkezi önem taşır [33].

2.5.1 RdRp'nin Substrat Tanıma ve Bağlanma Mekanizması

RdRp, RNA şablonunu okuyarak uygun NTP'leri seçer ve RNA zincirine ekler. Bu süreç, enzimin avuç içi bölgesi içinde yer alan ve katalitik aktiviteyi sağlayan aktif bölge tarafından gerçekleştirilir. RdRp'nin substrat tanıma kabiliyeti, bir dizi korunmuş motif tarafından düzenlenir. Bu motifler arasında özellikle Motif F, substrat giriş kanalının formasyonunda yer alır ve NTP'lerin enzime doğru yönlendirilmesini sağlar [33].

NTP Giriş Kanalı: RdRp'nin baş parmak bölgesi, NTP'lerin enzime girişini düzenleyen yapısal bir alandır. Bu bölge, NTP'lerin RdRp'nin aktif sitesine erişimini sağlayan bir kanal görevi görür. Kanal, hidrofilik amino asit kalıntılarından oluşur ve bu, NTP'lerin aktif siteye etkin bir şekilde taşınmasını kolaylaştırır [33].

Substrat Seçiciliği: RdRp, RNA şablonundaki her nükleotid için tamamlayıcı NTP'yi seçer. Bu seçicilik, enzimin parmak ve avuç içi bölgeleri arasında yer alan ve RNA şablonunu sıkıca kavrayan yapısal bölgeler tarafından sağlanır. Substrat seçiciliği, viral RNA'nın doğru bir şekilde kopyalanmasında ve virüsün genetik doğruluğunun korunmasında esastır [33].

2.5.2 Katalitik Süreç ve NTP Polimerizasyonu

RdRp'nin avuç içi bölgesi, NTP'lerin RNA zincirine katılmasını katalize eden bölgedir. Bu bölgede bulunan Motif A ve Motif C, katalitik süreçte merkezi roller oynar:

Motif A ve C: Bu motifler, RdRp'nin NTP'leri RNA zincirine eklemesi için gerekli olan katalitik merkezi oluşturur. Motif A ve C arasındaki etkileşim, yeni nükleotidin eklenmesi ve sonraki fosfodiester bağının oluşumu için gerekli olan enerjiyi sağlar [33].

Katalitik Metal İyonları: RdRp'nin aktivitesi, genellikle iki magnezyum iyonu tarafından desteklenir. Bu iyonlar, nükleotidin fosfat grubuna bağlanarak, nükleofilik saldırının gerçekleşmesine ve böylece RNA zincirinin uzamasına olanak tanır [33].

2.5.3 Nükleotit Olmayan Substratlar ve RdRp ile Etkileşimleri

Nükleotit olmayan substratlar genellikle RdRp'nin polimerizasyon sürecini durdurmak için tasarlanmış moleküllerdir. Bu substratlar, genellikle viral RNA polimeraz inhibitörleri olarak bilinir ve RdRp'nin aktif sitesine yarışmalı veya yarışmasız şekilde bağlanabilirler [33].

2.6 SARS-CoV-2 RNA Bağımlı RNA Polimeraz İnhibitörleri

SARS-CoV-2'nin RNA Bağımlı RNA Polimeraz enzimi, COVID-19'un tedavisinde hedeflenen başlıca moleküler yapıdır. Bu enzimi hedef alan antiviral ilaçlar, virüsün replikasyonunu inhibe ederek hastalığın şiddetini azaltmayı amaçlar [33].

2.6.1 Nükleotit Analogu Olan İnhibitörler

Nükleotit analoğu olan inhibitörlerin genel özellikleri SARS-CoV-2 tedavisi için yeniden amaçlandırılmış daha önce USFDA, EMA gibi kuruluşlardan onay almış genellikle antiviral yapıda olan ilaçlardır. Bu inhibitörlerden Remdesivir ve Molnupiravir USFDA ve EMA tarafından onay almıştır. Nükleotit yapıda olan inhibitörlerin genel özelliklerinden birisi ise RdRp enzimi substratı olan RNA ile kovalent etkileşim kurmalarıdır. Tez çalışması kapsamında 10 tane inhibitör kullanılmıştır. Bu kullanılan inhibitörler Çizelge 2.2'de belirtilmiştir.

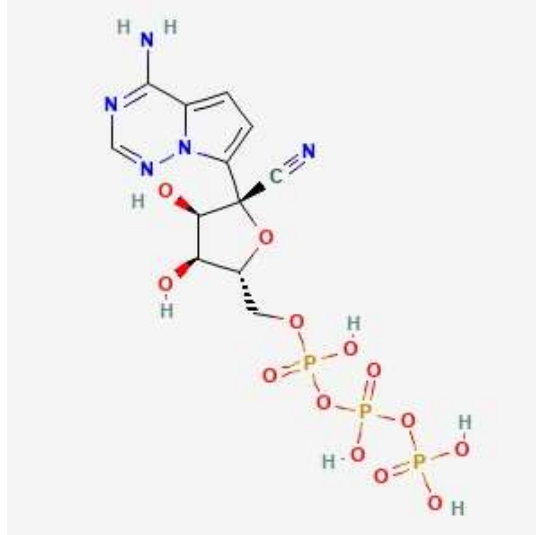
Generik adı (Ticari adı)	Yapısı	DeneySEL K_i (µM)	Etki Mekanizması
Remdesivir* (Veklury)	Adenozin Nükelotit Analogu	1.12	Kovalent Etkileşim
Molnupiravir* (Lagevrio)	N4-Hidroksisitidin Türevi	0.28	Kovalent Etkileşim
Favipiravir (Avigan)	Guanozin Nükleotit Analogu	1.28	Kovalent Etkileşim
Ribavirin (Copegus, Rebetol)	Guanozin Nükleotit Analogu	1.09	Kovalent Etkileşim
Sofosbuvir (Sovaldi)	Adenozin Nükelotit Analogu	0.50	Kovalent Etkileşim
Galidesivir (BCX4430)	Adenozin Nükelotit Analogu	0.75	Kovalent Etkileşim
Tenofovir (Viread)	Adenozin Nükelotit Analogu	0.43	Kovalent Etkileşim
Deuremidevir (VV116)	Adenozin Nükelotit Analogu	0.29	Kovalent Etkileşim
GS-621763	Adenozin Nükelotit Analogu	0.35	Kovalent Etkileşim
GS-441524	Adenozin Nükelotit Analogu	0.17	Kovalent Etkileşim
Azvudine	Adenozin Nükelotit Analogu	8.694	Kovalent Etkileşim

Çizelge 2.2 Nükleotit Yapıda olan İlaçlar ve İlaç adayları

*COVID-19 Tedavisinde kullanılan onaylı ilaçlar

2.6.1.1 Remdesivir

Remdesivir, Gilead Sciences tarafından ön ilaç olarak geliştirilmiştir Remdesivir'in aktif ilaç formu Remdesivir trifosfatdır. İlk olarak Ebola virüsü tedavisinde denemelerde kullanılmış, ancak en büyük etkinliği COVID-19 pandemisi sırasında göstermiştir. Remdesivir, COVID-19 tedavisinde kullanılmak üzere ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından Mayıs 2020'de acil kullanım onayı almıştır. Remdesivir, adenosin nükleotid analogu olarak işlev görür. Viral RdRp tarafından bir nükleotid olarak kabul edilir ve RNA zincirine entegre edilir. Bu entegrasyon, viral RNA zincirinin prematüre terminasyonuna yol açar ve böylece viral replikasyonu engeller. Remdesivir, özellikle SARS-CoV-2'de etkili olduğu gösterilmiş olup, ciddi COVID-19 vakalarında kullanımı için onaylanmıştır [33].

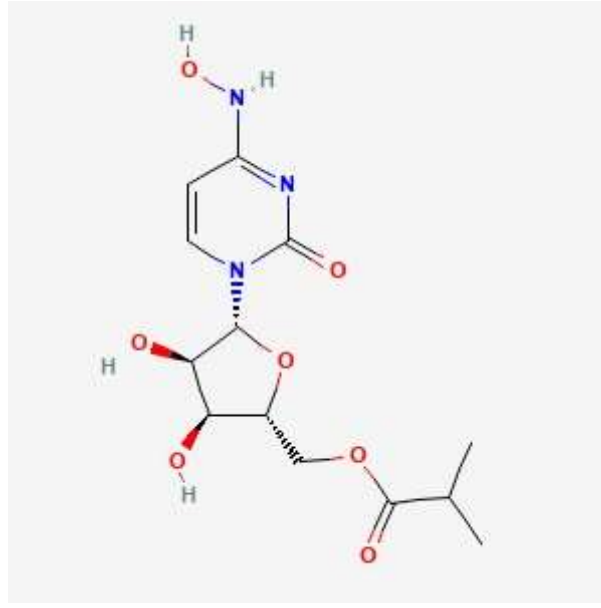


Şekil 2.5 Remdesivir molekülünün 2 boyutlu gösterimi

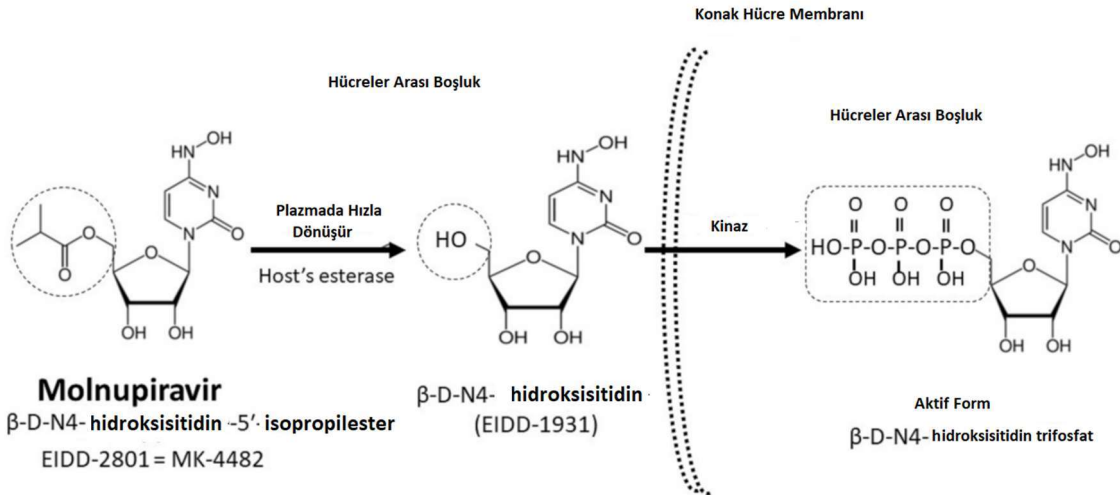
2.6.1.2 Molnupiravir

Emory Üniversitesi İlaç Geliştirme Enstitüsü tarafından keşfedilen Beta-D-N4-hidroksisitin (Şekil 2.7) oral ribonükleosid analogdur ve hayvan modellerindeki çeşitli RNA virüslerine karşı geniş- spektrumlu aktiviteye sahiptir". Molnupiravir ise beta-D-N4-hidroksisitin molekülünün ön ilacıdır. İnsan vücudunda molnupiravir esteraz enzimi ile beta-D-N4-hidroksisitin' dönüşür. Molnupiravir, Merck & Co. ve Ridgeback Biotherapeutics tarafından geliştirilen oral bir antiviral ajanıdır. İlk olarak influenza tedavisine yönelik çalışmalar için geliştirilmiş olup, COVID-19 için etkili olduğu belirlenmiştir. Molnupiravir, COVID-19 tedavisinde kullanılmak üzere Aralık 2021'de

FDA tarafından acil kullanım onayı almıştır. Molnupiravir, bir ribonükleosid prekürsörüdür ve RdRp tarafından RNA zincirine dahil edildiğinde, yüksek oranda mutasyon üreterek virüsün genetik yapısını bozar. Bu "hata felaketi" olarak bilinen süreç, virüsün bulaşıcılığını ve viyabilitesini azaltır. Molnupiravir, özellikle hafif ila orta şiddetteki COVID-19 vakalarında kullanılmak üzere geliştirilmektedir [34].



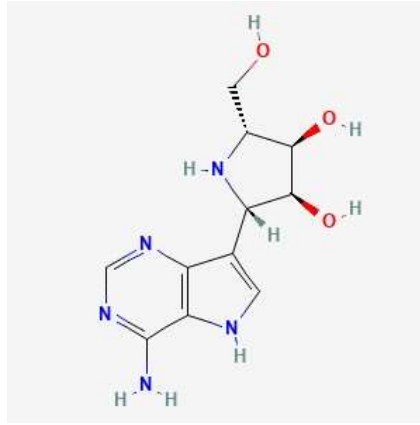
Şekil 2.6 Molnupiravir molekülünün 2 boyutlu gösterimi



Şekil 2.7 Molnupiravir'in aktif ilaca dönüşümü

2.6.1.3 Galidesivir

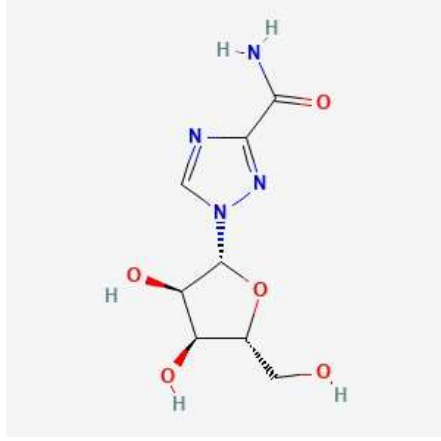
Galidesivir, BioCryst Pharmaceuticals tarafından geliştirilmiş bir ön ilaçtır. Bu geniş spektrumlu antiviral, başlangıçta hepatit C ve daha sonra Ebola gibi çeşitli RNA virüsleri için potansiyel bir tedavi olarak araştırılmıştır. COVID-19 pandemisi sırasında SARS-CoV-2'ye karşı potansiyeli değerlendirilmektedir. Galidesivir, geniş spektrumlu bir antiviral ajan olup, birçok RNA virüsüne karşı etkilidir. Bu molekül, RdRp'ye bağlanarak, viral RNA sentezini doğrudan inhibe eder. Galidesivir'in, Ebola ve Marburg gibi diğer tehlikeli patojenlere karşı da potansiyeli araştırılmaktadır [35].



Şekil 2.7 Galidesivir molekülünün 2 boyutlu gösterim

2.6.1.4 Ribavirin

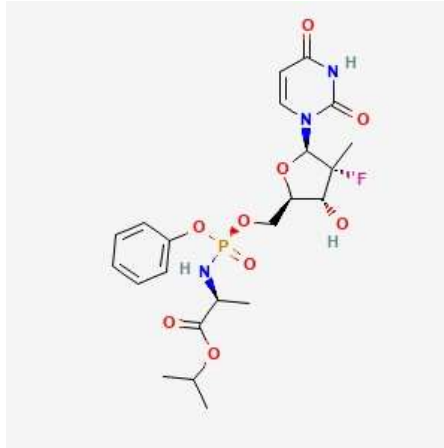
Ribavirin, çeşitli firmalar tarafından üretilmiş bir antiviral ilaçtır ve ilk olarak kronik hepatit C enfeksiyonu tedavisinde kullanılmıştır. Ribavirin, geniş spektrumlu bir antiviral olarak solunum sincityal virüs (RSV) enfeksiyonu ve diğer viral hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır. Ribavirin, uzun yıllardır kullanılan bir antiviral ilaçtır ve viral RNA sentezini inhibe etme yeteneğine sahiptir. Ribavirin'in mekanizması, RNA replikasyonunu engelleyerek ve mutasyon oranını artırarak çalışır. Ancak, Ribavirin'in SARS-CoV-2 üzerindeki etkinliği sınırlı ve genellikle diğer tedavilerle kombinasyon halinde kullanılmaktadır [36].



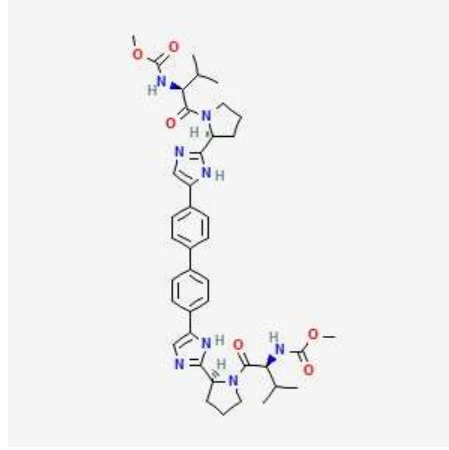
Şekil 2.8 Ribavirin molekülünün 2 boyutlu gösterim

2.6.1.5 Sofosbuvir ve Daclatasivir

Sofosbuvir, Gilead Sciences tarafından; Daclatasivir ise Bristol-Myers Squibb tarafından geliştirilmiştir. Her iki ilaç da başlangıçta Hepatit C virüsü (HCV) enfeksiyonunun tedavisi için onaylanmıştır. Bu ilaçların SARS-CoV-2 üzerindeki potansiyeli, COVID-19 pandemisi sırasında araştırma konusu olmuştur. Bu iki molekül, özellikle Hepatit C virüsü için geliştirilmiştir. Sofosbuvir, bir nükleotid analogu olup, viral RNA zincirinin sonlandırılmasına neden olur. Daclatasivir ise NS5A inhibitörü olarak işlev görür ve bu proteinin viral replikasyon ve montaj süreçlerindeki rolünü engeller. Her iki molekülün de SARS-CoV-2 üzerindeki potansiyeli laboratuvar çalışmalarında değerlendirilmektedir [40].



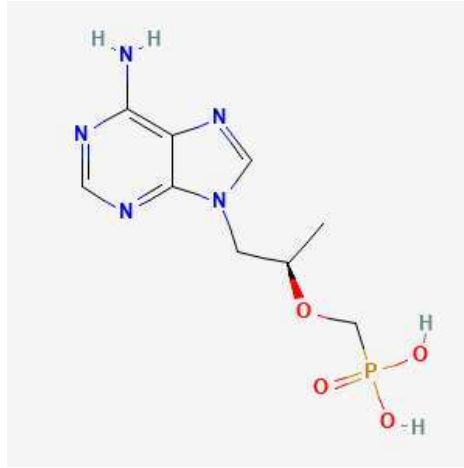
Şekil 2.9 Sofosbuvir molekülünün 2 boyutlu gösterimi



Şekil 2.10 Daclatasvir molekülünün 2 boyutlu gösterimi

2.6.1.6 Tenofovir

Tenofovir, başta HIV enfeksiyonu olmak üzere, Hepatit B tedavisinde de kullanılan bir antiviral ilaçtır. Gilead Sciences tarafından geliştirilen Tenofovir, SARS-CoV-2 üzerindeki potansiyel inhibitör etkisi nedeniyle COVID-19 tedavisinde araştırılmaktadır. Tenofovir, başta HIV olmak üzere birçok retrovirusun tedavisinde kullanılan başka bir nükleotid analogudur. SARS-CoV-2'nin RdRp enzimi üzerindeki potansiyel inhibitör etkisi, bu molekülün COVID-19'a karşı kullanımını araştırma konusu yapmıştır [39].

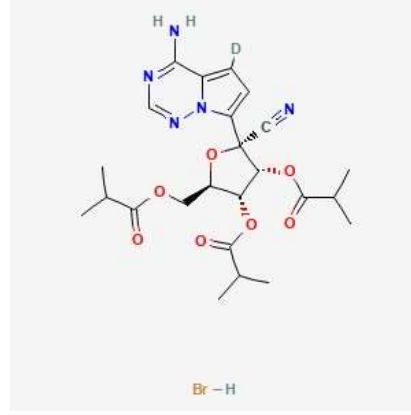


Şekil 2.11 Tenofovir molekülünün 2 boyutlu gösterimi

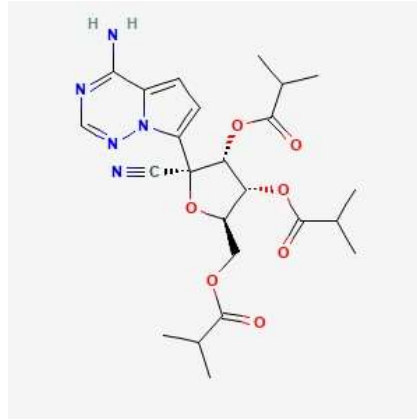
2.6.1.7 VV116, GS-621763 ve GS-441524

Bu moleküllerin geliştirilmesine katkıda bulunan firmalar hakkında spesifik bilgiler henüz genel kullanıma açık değildir. Ancak, GS-441524 özellikle Gilead Sciences tarafından geliştirilen Remdesivir'in aktif metaboliti olarak bilinir ve benzer bir inhibitör mekanizmaya sahiptir. Bu yeni geliştirilen moleküller, RdRp'yi hedefleyerek viral replikasyonu durdurmayı amaçlar. GS-441524, remdesivir'in aktif metaboliti olarak

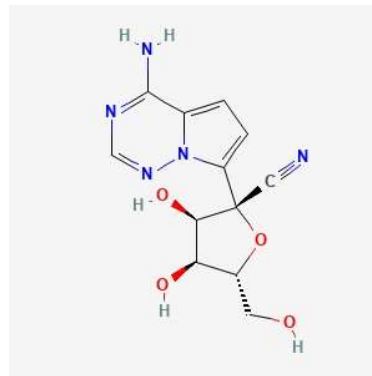
bilinir ve benzer bir inhibisyon mekanizmasına sahiptir. VV116 ve GS-621763, COVID-19 tedavisinde potansiyel yeni ajanlar olarak değerlendirilmektedir [37].



Şekil 2.12 VV116 molekülünün 2 boyutlu gösterimi



Şekil 2.13 GS-621763 molekülünün 2 boyutlu gösterimi



Şekil 2.14 GS-441524 molekülünün 2 boyutlu gösterimi

2.6.2 Nükleotit Analogu Olmayan İnhibitörler

Nükleotit analogu olmayan inhibitörlerin genel özelliği, moleküllerin RdRp enzimi ile ikincil etkileşimler yoluyla inhibisyon olayını gerçekleştirme potansiyeline sahip olmalarıdır. Bu çalışma için biri Zika Virüsü için kullanılan Suramin molekülü, 24 fitokimyasal olmak üzere 25 nükleotit analogu olmayan inhibitör kullanılmıştır.

Flavonoid	Bitkisel Kaynak	Deneysel K _i (µM)
Korilagin	<i>Phyllanthus</i> cinsi bitkiler	0.45
Hesperidin	Narenciye meyveleri (portakal, greyfurt)	0.68
Hiperisin	Kuzukulağı (St. John's wort)	0.80
Baikalin	<i>Scutellaria baicalensis</i>	1.25
Mikelyanin	Yaban mersini, kırmızı soğan	5
Astilbin	<i>Engelhardia roxburghiana</i> ve diğer bitkiler	4.55
Isokuersetin	Elma, arpa	0.34
Kuersitrin	<i>Nymphaea odorata</i>	0.66
Emetin	<i>Cephaelis ipecacuanha</i>	0.18
Genistein	Soya fasulyesi	1.5
Hiperosit	Yabani gül ve diğer bitkiler	9
Kuersetin	Soğan, elma, çay	6.9
Baikalein	<i>Scutellaria baicalensis</i>	20
Naringenin	Greyfurt ve diğer narenciye meyveleri	4.25
Siyanidanol	Yeşil çay ve diğer bitkiler	6.8
Luteolin	Biber, maydanoz ve diğer sebzeler	4.6
Neferin	<i>Nelumbo nucifera</i> (lotus)	0.925
Fisetin	Çilek, elma	1.4
Hernandezin	Geleneksel Çin bitkileri	0.485
Mirisetin	Üzüm, çay ve diğer bitkiler	0.755
Morin	Soğan, şalgam	7.5
Apigenin	Maydanoz, kereviz, rezene	0.85
Kampferol	Üzüm, çay, lahana	0.825
Likorin	<i>Lycoris radiata</i>	0.56

Çizelge 2.3 İlaç Adayı Olan Flavonoidler

2.6.2.1. Suramin'in SARS-CoV-2 RNA Bağımlı RNA Polimeraz Üzerindeki İnhibitör Etkisi

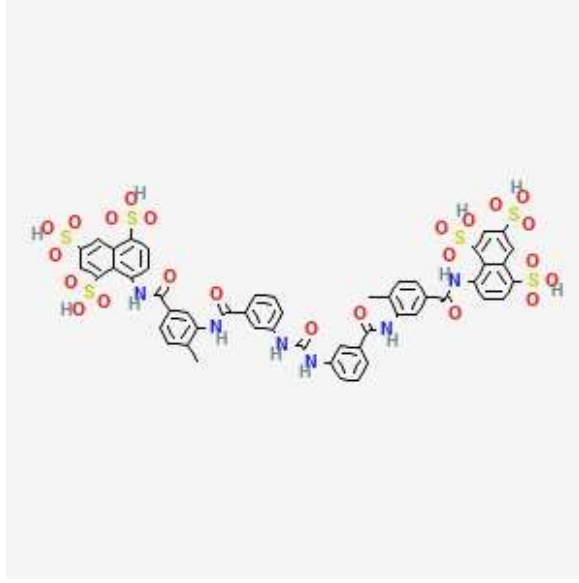
Suramin, çeşitli viral enfeksiyonlara karşı potansiyel bir tedavi olarak araştırılan, uzun süredir bilinen bir moleküldür. Bu polianiyonik bileşik, özellikle parazitik hastalıklar ve bazı virüsler üzerinde inhibisyon etkileri göstermiştir. COVID-19 pandemisi sırasında, Suramin'in SARS-CoV-2'nin kritik enzimi olan RNA Bağımlı RNA Polimeraz (RdRp) üzerindeki potansiyel inhibitör etkileri öne çıkmıştır [37].

Suramin'in Yapısal Özellikleri ve İnhibitör Mekanizması

Suramin, üre yapısında büyük bir moleküldür. Bu özellikler, onun viral enzimler ve reseptörler ile güçlü ve çok noktalı etkileşimler kurmasını sağlar. Suramin'in RdRp üzerindeki inhibitör etkisi, enzimin substrat veya nükleotid bağlama bölgeleri ile doğrudan etkileşime girerek, bu bölgelerin fonksiyonlarını bloke etmesiyle gerçekleşir [37].

RdRp Aktif Bölgesi ile Etkileşim: Suramin, RdRp'nin aktif bölgesine bağlanarak, nükleotid trifosfatların (NTP'ler) enzime erişimini ve dolayısıyla RNA polimerizasyonunu engeller. Bu bağlanma, RdRp'nin katalitik aktivitesini inhibe eder ve viral RNA sentezinin durmasına neden olur [37].

Substrat Bağlama Bölgesi ile Etkileşim: Ayrıca, Suramin'in RdRp'nin substrat bağlama bölgeleri ile etkileşime girerek, enzimin RNA şablonunu tanıma ve işleme kabiliyetini azaltabileceği düşünülmektedir [37].



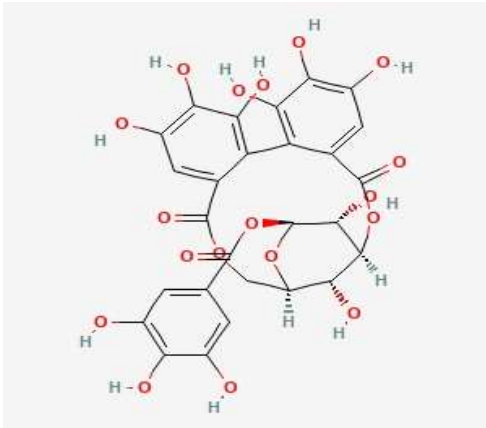
Şekil 2.15 Suramin molekülünün 2 boyutlu gösterimi

Flavonoidler

Flavonoidler, geniş bir yelpazede biyolojik ve farmakolojik aktivitelere sahip doğal bileşiklerdir. Bu fitokimyasallar, antioksidan, antikanser, anti-inflamatuar ve antiviral özellikleri nedeniyle birçok hastalığın tedavisinde potansiyel olarak kullanılmaktadır [40].

2.6.2.2 Korilagin

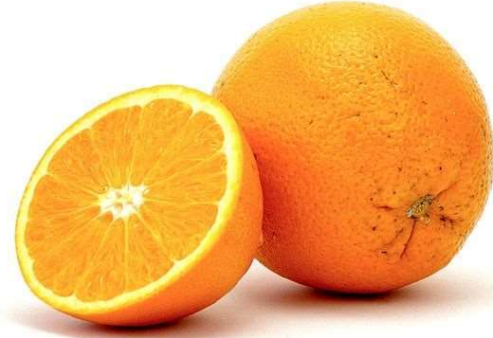
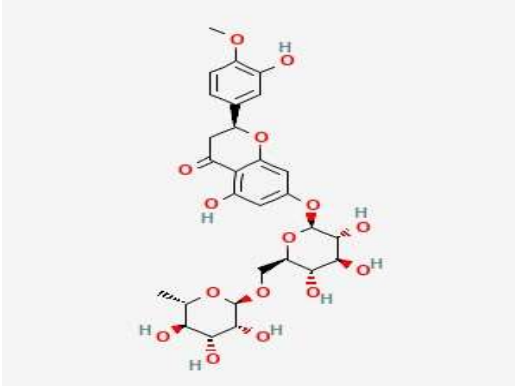
Anti-iltihap ve antitümör aktiviteleri nedeniyle kanser ve iltihabik hastalıklar üzerinde çalışılmıştır. RdRp inhibitörü olarak, viral enzimlerle etkileşimde bulunarak viral replikasyonu bloke etme potansiyeline sahiptir [41].



Şekil 2.16 Korilagin molekülü 2 boyutlu gösterimi ve *Phyllanthus Niruri* bitkisi

2.6.2.3 Hesperidin

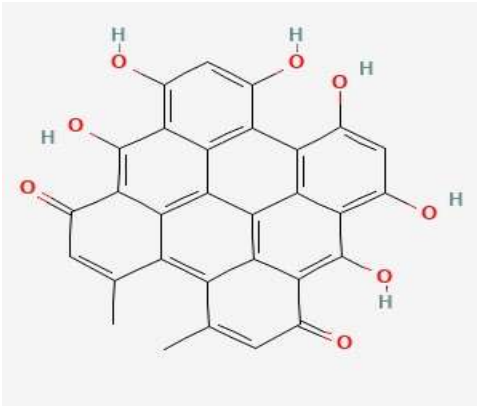
Kardiyovasküler hastalıklar ve diyabet üzerine olumlu etkileri bilinmektedir. Antiviral özellikleri, hesperidin'in RdRp ve diğer viral proteinlerle etkileşime girerek SARS-CoV-2'nin çoğalmasını engelleyebileceğini düşündürmektedir [41].



Şekil 2.17 Hesperidin molekülünün 2 boyutlu gösterimi ve Portakal bitkisi

2.6.2.4 Hiperisin

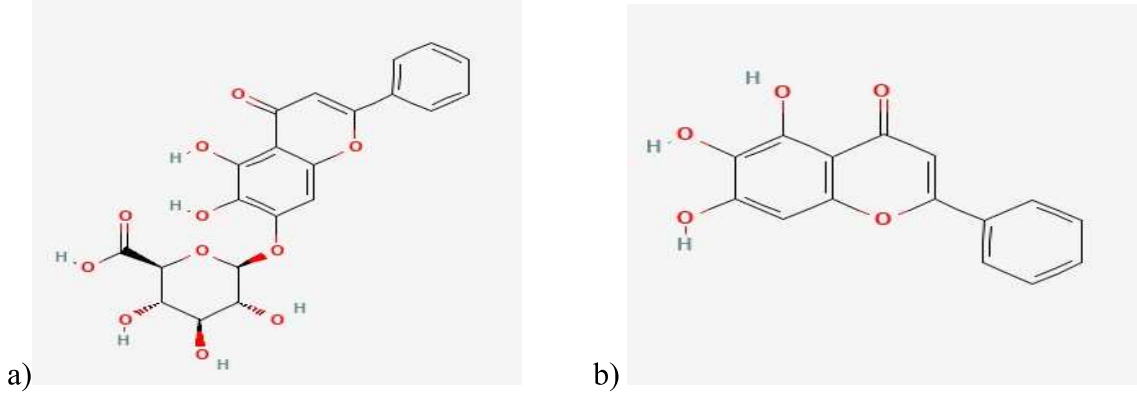
Depresyon tedavisinde kullanılmıştır ve güçlü antiviral özellikleri, viral enfeksiyonların tedavisinde araştırma konusu olmuştur. RdRp üzerindeki etki mekanizması, viral RNA sentezini doğrudan inhibe ederek çalışabilir [41].



Şekil 2.18 Hiperisin molekülünün 2 boyutlu gösterimi ve St John's Wort bitkisi

2.6.2.5 Baikalin ve Baikalein

Hepatit ve diğ er viral enfeksiyonlar üzerine etkili oldu ğ u gösterilmiştir. Bu flavonoidlerin RdRp inhibitörü olarak çalışması, viral RNA polimeraz aktivitesini bloke ederek viral çoğalmayı durdurma potansiyeli ile ilişkilendirilmiştir [42].



şekil 2.19 Baikalin ve Baikalein molekülünün 2 boyutlu gösterimi

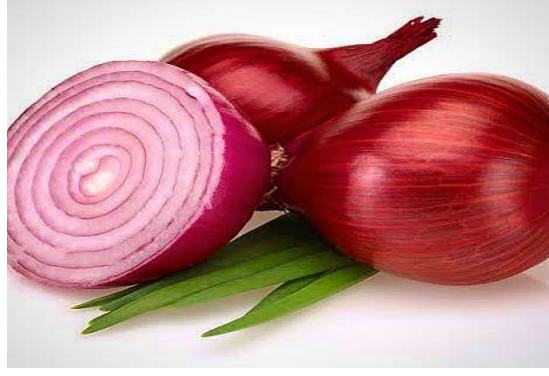
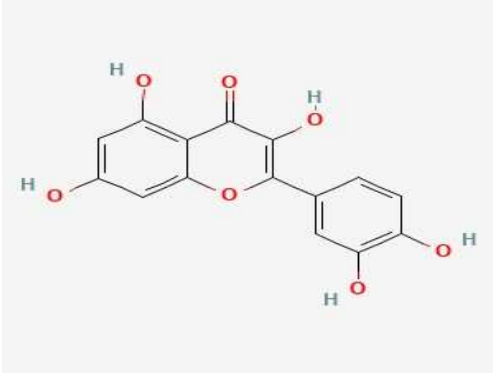
a) Baikalin molekülü b)Baikalein molekülü



şekil 2.20 *Scutellaria baicalensis* bitkisi

2.6.2.6 Kuersetin

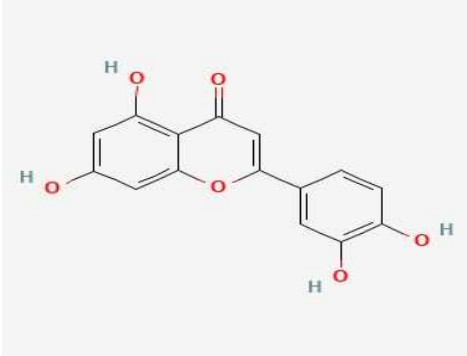
Anti-inflamatuar ve antiviral etkileri nedeniyle solunum yolu enfeksiyonları ve alerjik durumlar üzerine çalışılmıştır.Kuersetin, RdRp ve diğ er viral hedeflere bağlanarak SARS-CoV-2'nin replikasyonunu engelleyebilir [43].



Şekil 2.21 Kuersetin molekülünün 2 boyutlu gösterimi ve Kırmızı Soğan bitkisi

2.6.2.7 Luteolin

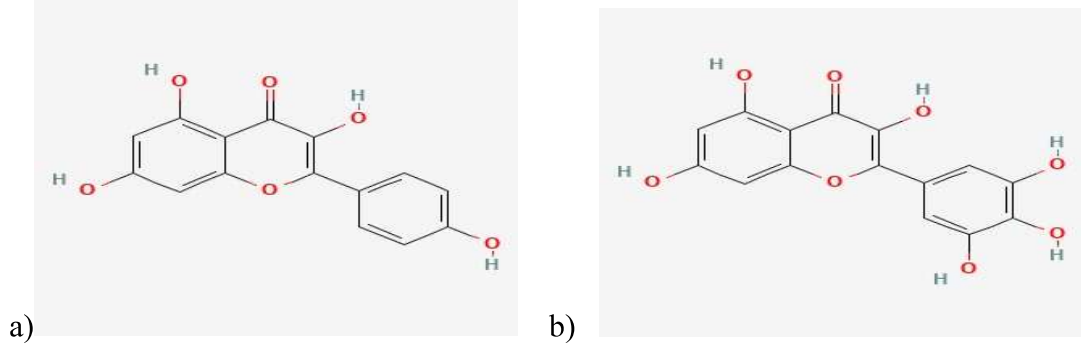
Kanser, kalp hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıklar üzerinde olumlu etkileri araştırılmıştır. Viral enfeksiyonlar üzerindeki antiviral etkisi, RdRp aktivitesinin inhibisyonu yoluyla SARS-CoV-2'ye karşı potansiyel bir tedavi sağlayabilir [43].



Şekil 2.22 Luteolin molekülünün 2 boyutlu gösterimi ve Biber bitkisi

2.6.2.8 Kampferol ve Mirisetin

Her ikisi de kanser ve inflamasyon üzerine çalışılmıştır ve güçlü antioksidan özellikleri vardır. Bu flavonoidler, viral RNA polimerazları inhibe ederek ve viral montaj süreçlerini bozarak SARS-CoV-2'nin çoğalmasını engelleyebilir [42].



Şekil 2.23 Kampferol ve Mirisetin molekülünün 2 boyutlu gösterimi

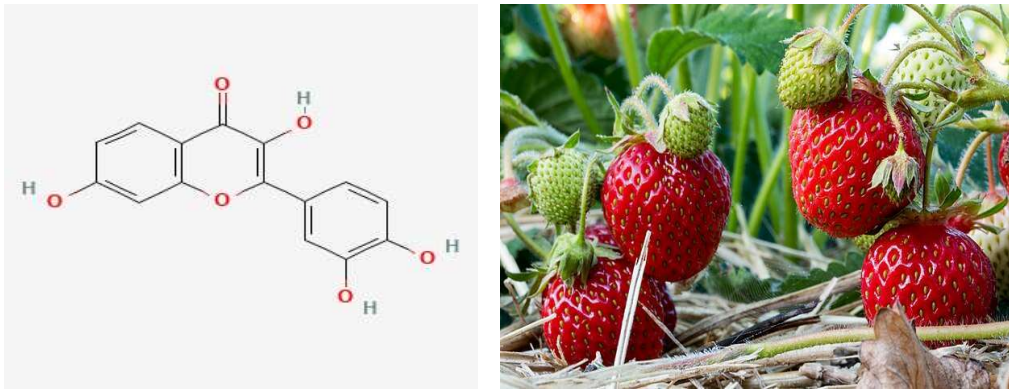
a) Kampferol molekülü b) Mirisetin molekülü



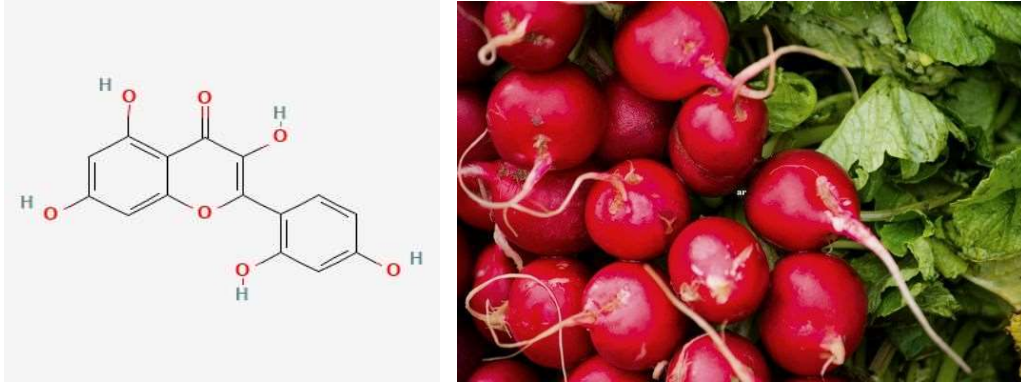
Şekil 2.24 Üzüm bitkisi

2.6.2.9 Fisetin ve Morin

Nöroprotektif ve antiinflamatuvar özellikleri ile Alzheimer ve kalp hastalıkları üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir. Fisetin ve morin, RdRp'yi inhibe ederek viral yükü azaltma potansiyeline sahiptir [44].



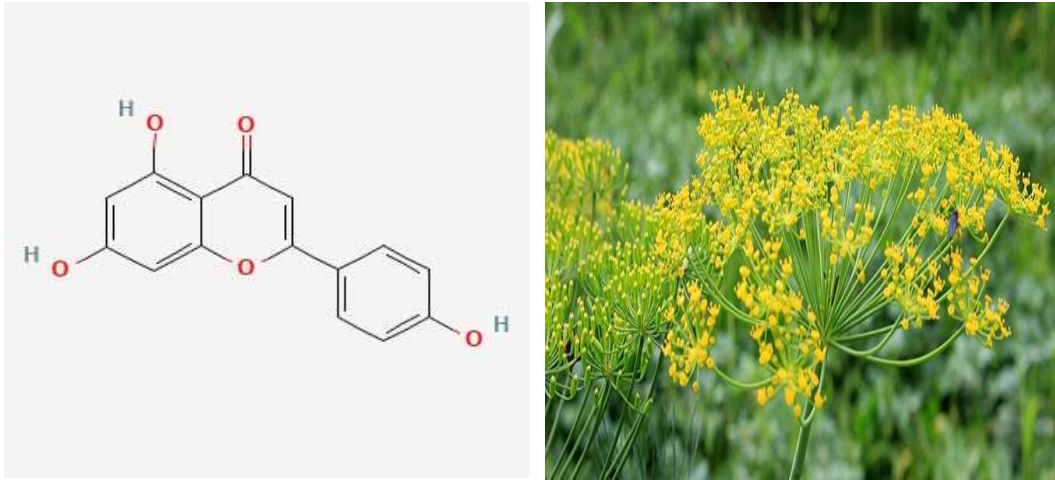
Şekil 2.25 Fisetin ve molekülünün 2 boyutlu gösterimi ve Çilek bitkisi



Şekil 2.26 Morin molekülünün 2 boyutlu gösterimi ve Şalgam bitkisi

2.6.2.10 Apigenin

Kanser üzerine yapılan çalışmalarda proapoptotik ve anti-metastatik etkileri belirlenmiştir. Ayrıca, viral proteazları inhibe ederek RdRp üzerinde dolaylı bir inhibisyon sağlayabilir [45].



Şekil 2.27 Apigenin molekülünün 2 boyutlu gösterimi ve Rezene bitkisi

Bu flavonoidler, geniş spektrumlu farmakolojik etkileri nedeniyle, özellikle viral enfeksiyonların tedavisinde umut verici adaylardır. SARS-CoV-2'nin RNA Bağımlı RNA Polimerazını hedef alarak, bu fitokimyasalların COVID-19 tedavisinde etkili olabileceği düşünülmektedir. Antiviral etkilerinin yanı sıra, bu bileşiklerin inflamasyonu azaltma ve immün yanıtı modüle etme kapasiteleri, COVID-19'un semptomlarını hafifletmede ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatmada potansiyel olarak faydalı olabilir.

2.7 Protein Veri Tabanları ve Özellikleri

Protein veri tabanları, biyolojik araştırmalar için hayati öneme sahip kaynaklardır. Bu tabanlar, proteinlerin yapısal, fonksiyonel ve evrimsel bilgilerini geniş bir kitleye sunar. Bu protein veri tabanları, biyolojik bilimlerin çeşitli dallarında temel araçlar olarak hizmet eder. Yapısal bilgiler, fonksiyonel anlayışlar ve genetik bağlantılar sağlayarak, bilim insanlarına ve araştırmacılara hastalıkların daha iyi anlaşılması, yeni ilaçların keşfi ve biyolojik sistemlerin detaylı analizi konularında yardımcı olurlar. Bu metin, protein veri tabanlarının kapsamlı anlatımını sağlamakta ve akademik çalışmalar için derinlemesine bir kaynak oluşturmayı amaçlamaktadır.

2.7.1 RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB)

RCSB PDB, küresel ölçekte protein ve nükleik asit yapılarının en büyük arşivlerinden biridir. 1971 yılında kurulmuş olup, yapısal biyoloji verilerinin depolanması, paylaşılması ve analiz edilmesi için temel bir kaynaktır. RCSB PDB, yapısal biyologlar, ilaç geliştiriciler ve eğitimciler tarafından sıklıkla kullanılır. Bu veri tabanı, moleküler modelleme, ilaç tasarımı ve biyolojik eğitim materyalleri geliştirme gibi çeşitli alanlarda temel bir referans noktasıdır [47].

2.7.2 PDBSum

PDBSum, protein yapıları ve onların komplekslerine dair grafiksel özetler sunan bir veri tabanıdır. Bu platform, protein yapılarındaki amino asitlerin etkileşimlerini ve protein-ligand bağlanmalarını görsel olarak sergiler. PDBSum, yapısal biyologların yanı sıra, eğitim amaçlı kullanımlar için de idealdir; çünkü karmaşık protein yapılarını ve etkileşimlerini anlaşılır bir biçimde sunar [48].

2.7.3 PDBe (Protein Data Bank in Europe)

PDBe, Avrupa Biyoformatik Enstitüsü tarafından yönetilen ve protein yapılarına dair kapsamlı bilgiler sunan bir veri tabanıdır. PDBe, küresel Protein Data Bank'ın bir parçası olarak Avrupa'daki araştırmacılara hizmet verir. PDBe, yapısal biyoloji verilerini analiz etmek, yorumlamak ve entegre etmek için gelişmiş araçlar sunar. Ayrıca, eğitim ve araştırma için interaktif kaynaklar sağlar [49].

2.7.4 PDBj (Protein Data Bank Japan)

PDBj, Japonya'da bulunan ve Asya'daki araştırmacılara hizmet veren yapısal biyoloji veri tabanıdır. PDBj, RCSB PDB ile paralel olarak çalışır ve küresel Protein Data Bank'ın bir parçasıdır. PDBj, özellikle Asya'daki bilim insanlarına yönelik olarak yapısal verileri derler ve sunar. Bu veri tabanı aynı zamanda yapısal biyoloji ve moleküler biyoloji eğitimi için çeşitli araçlar ve kaynaklar sağlar [50].

2.7.5 wwPDB (World Wide Protein Data Bank)

wwPDB, küresel olarak yapısal biyoloji verilerinin koordinasyonunu sağlayan bir organizasyondur. RCSB PDB, PDBe ve PDBj gibi kuruluşları bir araya getirerek, yapısal biyoloji verilerinin standartlaştırılmasını ve herkes tarafından erişilebilir olmasını sağlar. wwPDB, yapısal biyoloji verilerinin tutarlılık ve kalitesini garanti altına alır. Bu organizasyon, yapısal verilerin doğru bir şekilde toplanmasını, depolanmasını ve dağıtılmasını koordine eder [51].

The screenshot displays the RCSB Protein Data Bank (PDB) website interface. At the top, there is a navigation bar with various options: Deposit, Search, Visualize, Analyze, Download, Learn, About, Documentation, Careers, and COVID-19. Below this, the PDB logo is prominently displayed, along with statistics: 219,515 Structures from the PDB and 1,068,577 Computed Structure Models (CSM). A search bar is available for entering search terms, entry IDs, or sequences. The main content area is divided into several sections. On the left, a sidebar provides navigation options: Welcome, Deposit, Search, Visualize, Analyze, Download, and Learn. The central part of the page features a 'Welcome' message, a 'May Molecule of the Month' section highlighting 'CFTR and Cystic Fibrosis', and a 'Latest Entries' section featuring 'SARS-CoV-2 spike RBD with A8 and H3 nanobodies bound'. Below these, there are sections for 'Features & Highlights' and 'News'. The 'Features & Highlights' section includes an announcement about the DSN6 shutdown and a webinar registration for 'Understanding PDB Validation: Which experimental structures should I rely on?'. The 'News' section features a poster prize award and the election of Celia Schiffer to the National Academy of Sciences.

Şekil 2.28 RCSB Protein Veri Tabanı Arayüzü

2.8 Moleküler Kenetlenme

Moleküler kenetlenme, bilgisayar destekli ilaç tasarımı ve biyokimya alanlarında yaygın olarak kullanılan bir simülasyon tekniğidir. Bu yöntem, iki veya daha fazla molekülün birbirleriyle nasıl etkileşime girebileceğini modellemek için kullanılır; özellikle enzimler, reseptörler ve diğer biyomoleküller ile küçük molekül ligandlar arasındaki etkileşimleri anlamada kritik bir rol oynar. Moleküler kenetlenme, bir ligandın hedef bir proteinin aktif bölgesine uyum sağlama şeklini ve bu etkileşimin stabilitesini tahmin eden bir yöntemdir. Bu süreç, potansiyel ilaç adaylarının keşfi ve protein fonksiyonlarının anlaşılmasına yardımcı olur. Kenetlenme, ligandın hedef molekül üzerindeki en uygun bağlanma konfigürasyonunu ve oryantasyonunu belirlemeyi amaçlar. Bu işlem genellikle üç boyutlu protein ve ligandlar üzerinde gerçekleşir.

2.8.1 Moleküler Kenetlenme Yöntemleri

Moleküler kenetlenme çalışmaları, genellikle rijit (katı) kenetlenme ve esnek kenetlenme olarak iki ana kategoriye ayrılır:

Rijit Kenetlenme: Bu yöntemde, protein ve ligand molekülleri arasındaki etkileşimler sabit bir yapı üzerinden modellenir. Protein ve ligand moleküllerinin konformasyonları değişmeden, sadece translasyonel ve rotasyonel hareketler dikkate alınır [52].

Esnek Kenetlenme: Esnek kenetlenme, proteinin veya ligandın farklı konformasyonlarını hesaba katarak daha gerçekçi sonuçlar elde etmeyi hedefler. Bu yöntem, moleküllerin birbirleriyle etkileşime girerken alabileceği çeşitli şekilleri ve pozisyonları simüle eder [52].

2.8.2 Moleküler Kenetlenmenin Temel Adımları

Moleküler kenetlenme süreci, genellikle şu adımları içerir:

Hedef Proteinin ve Ligandın Hazırlanması: Proteinin kristal yapısı temin edilir ve ligand molekülü için uygun yapılar seçilir [53].

- **Bağlanma Bölgesinin Belirlenmesi:** Protein üzerinde ligandın bağlanacağı potansiyel aktif bölgeler tespit edilir [53].
- **Kenetlenme Simülasyonunun Yapılması:** Seçilen ligand, proteinin aktif bölgesine bilgisayar algoritmaları kullanılarak yerleştirilir. Bu süreç, çeşitli enerji minimizasyonu ve optimizasyon teknikleri ile desteklenir [53].

- **Sonuçların Analizi ve Değerlendirilmesi:** Elde edilen kompleksin stabilitesi ve enerji profili değerlendirilir. En düşük enerjiye sahip konformasyonlar, en olası bağlanma modları olarak kabul edilir [53].

2.8.3 Kenetlenme Skorlama Fonksiyonları

Moleküler kenetlenme, ligand-protein etkileşimlerinin stabilitesini ölçmek ve en uygun bağlanma modunu tahmin etmek için skorlama fonksiyonları kullanır. Bu fonksiyonlar, ligandın bağlanma konumunun uygunluğunu değerlendiren matematiksel modellerdir [54].

Empirik Skorlama Fonksiyonları: Deneysel verilere dayanarak, ligand-protein etkileşimlerini tahmin etmek için kullanılır [54].

Kraftik Mekanik Tabanlı Fonksiyonlar: Protein-ligand kompleksinin toplam enerjisini hesaplamak için moleküler mekanik modelleri kullanır [54].

Bilgisayar Destekli Öğrenme Tabanlı Fonksiyonlar: Makine öğrenmesi algoritmaları ile eğitilmiş modeller kullanılarak bağlanma serbest enerjisi tahmin edilir [54].

Kullanılan moleküler kenetlenme uygulamaları için hesaplanan skorlama fonksiyonları çeşitlilik göstermektedir. Bu bilgilerin ışığında moleküler kenetlenme işlemi *in silico* ilaç tasarım teknikleri içerisinde önem arz etmektedir. Bu teknik temel olarak biyomoleküler yapıda bulunan protein-ligand kompleksinin bazı protein saflaştırma tekniklerinin kullanılması ve bunun bilgisayar modellemesi yoluyla aktarılması sonucunda ilaç adayı olarak düşünülen ligand ile protein yapısında bulunan aktif bölge aminoasitleri için etkileşimini matematiksel algoritmalar kullanarak gerçekleştirip skorlama fonksiyonları kullanarak bir değer vermesi ve sonucun değerlendirilmesi çalışmasını içermektedir. Moleküler kenetlenme seçilen aktif bölge aminoasitleri ve ilaç adayı ligand ile etkileşimleri sonucu bir dizi konformasyonu içerir. Bu konformasyonun sonucun değerlendirilmesinde büyük katkıları olmuştur. Ligand ve aminoasit arasında yapılan etkileşimlerin türü, bağ uzaklıkları gibi kritik bilgilerin elde edilmesini sağlamıştır.

2.8.4 Moleküler Kenetlenmede Kullanılan Yazılımlar

Kenetlenme programları, moleküler biyoloji ve ilaç keşfi alanlarında kritik öneme sahiptir. Bu programlar, ligandların hedef makromoleküllerle olan etkileşimlerini modellemek için kullanılır. Çizelge 2.4'te, çeşitli doking programlarının adları, tasarım yılı ve lisans durumları hakkında bilgiler verilmiştir.

Program Adı	Tasarım Yılı	Lisans
AutoDock / Autodock Vina	1990	Ücretsiz
CABS-dock	2015	Ücretsiz
DOCK	1988	Ücretsiz
EADock	2007	Ücretsiz
FlexAID	2015	Ücretsiz
GalaxyPepDock	2018	Ücretsiz
Glide	2004	Ticari
HADDOCK	2003	Ücretsiz
LeDock	2016	Ücretsiz
LightDock	2018	Ücretsiz
Molecular Operating Environment (MOE)	2008	Ticari
MOLS 2.0	2016	Ücretsiz
PSI-DOCK	2006	Ücretsiz
rDock	2012	Ücretsiz
SEED	1999	Ücretsiz
SwissDock	2011	Ücretsiz
VirtualFlow	2020	Ücretsiz

Çizelge 2.4 Moleküler Kenetlenme Hesaplaması Yapan Uygulamalar işlevleri, tasarım yılları ve lisans durumları yer almaktadır [55].

2.8.5 Moleküler Kenetlenmenin Uygulama Alanları

Moleküler kenetlenme, biyoteknoloji, ilaç keşfi ve temel bilim araştırmalarında yaygın olarak kullanılır.

İlaç Keşfi: Potansiyel ilaç adaylarının protein hedefleri ile etkileşimlerini tahmin ederek ilaç geliştirme sürecini hızlandırır.

Protein Mühendisliği: Protein-protein etkileşimlerini ve enzim-substrat ilişkilerini inceleyerek yeni biyolojik fonksiyonlar oluşturulabilir.

Moleküler Biyoloji Araştırmaları: Proteinlerin fonksiyonlarının ve biyolojik süreçlerdeki rollerinin anlaşılmasına yardımcı olur.

Moleküler kenetlenme, ilaç keşfi ve protein mühendisliği gibi alanlarda temel bir yöntem olarak öne çıkar. Bu teknik sayesinde, yeni moleküllerin biyolojik hedefler üzerindeki etkileri hızla ve ekonomik olarak tahmin edilebilir. Moleküler kenetlenme, potansiyel terapötik ajanların geliştirilmesinde ve hastalık mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasında önemli bir araçtır [56].

2.8.6 Moleküler Kenetlenme ve Bağlanma Enerjisi Hesaplamaları

Moleküler kenetlenme, ligand ve hedef proteinler arasındaki etkileşimleri ve kompleks oluşumlarını simüle eden bir yöntemdir. Bu süreç, ilaç keşfi ve yapısal biyoloji çalışmalarında merkezi bir öneme sahiptir. Doking programları, bu etkileşimlerin sonuçlarını analiz etmek için çeşitli hesaplamalar yapar ve bağlanma enerjisini (ΔG) içeren kritik bilgiler sunar [57].

2.8.7 Bağlanma Enerjisi ve Doking Süreci

Bağlanma enerjisi, bir ligandın proteinle etkileşime girip stabil bir kompleks oluşturduğu zaman serbest bırakılan veya gereken enerji miktarını ifade eder. Bu enerji, genellikle kilokalori/mol (kcal/mol) cinsinden ölçülür ve ΔG ile simgelenir. Doking programları, ligand ve proteinin bir araya gelmesi (bağlanma) ve ayrılması (ayrışma) süreçlerini değerlendirerek bu enerjiyi hesaplar [58].

2.8.8 AutoDock Vina ve Bağlanma Enerjisi Hesaplamaları

AutoDock Vina, hem ligandın hem de proteinin esnek olduğu durumlarda kullanılan Lamarck algoritmasını temel alır. Bu yaklaşım, protein-ligand etkileşimlerinin her iki yapıda da esnek olması gerektiğini ve sabit yapıların gerçekçi sonuçlar vermediğini

öngörür. Esnek yapılar, daha doğru ve biyolojik olarak relevant sonuçlar elde edilmesini sağlar çünkü gerçek hücresel ortamlarda protein ve ligand yapıları dinamiktir ve birçok farklı konformasyona sahip olabilir [59].

2.8.9 Bağlanma ve Ayrışma Süreçlerinin Matematiksel Modellemesi

Bağlanma enerjisi, aşağıdaki denklemler kullanılarak matematiksel olarak modellenir:

Bağlanma Süreci: Protein (P) + Ligand (L) → Kompleks (PL), Bağlanma Sabiti K_b

Ayrışma Süreci: Kompleks (PL) → Protein (P) + Ligand (L), Ayrışma Sabiti K_d

Bağlanma sabiti ayrışma sabitinin tam tersidir ($K_b = 1/K_d$) ve bu ilişki aşağıdaki gibi logaritmik formda ifade edilir:

$$\ln K_b = -\ln K_d$$

Burada K_i (inhibisyon sabiti) protein-ligand kompleksinin ayrışma sabiti olarak tanımlanır ve aşağıdaki formülle ifade edilir:

$$\Delta G_{\text{bağlanma}} = -RT \ln K_b$$

$$\Delta G_{\text{inhibisyon}} = -RT \ln K_i$$

Buradan K_i değeri şu şekilde çıkarılır:

$$K_i = e^{(\Delta G_b / RT)}$$

Bu formüller, ligandın proteinle ne kadar güçlü bağlandığını ve bu bağlanmanın termodinamik olarak ne kadar uygun olduğunu gösterir. Doking simülasyonları bu hesaplamaları kullanarak, potansiyel ilaç adaylarının etkinliğini değerlendirir.

2.9 Sanal Ligand Taraması: Tanımı, Yöntemleri ve Uygulamaları

Sanal ligand taraması, bilgisayar destekli ilaç tasarımının temel yöntemlerinden biridir ve büyük kimyasal kütüphanelerden potansiyel ilaç adaylarının hızlı ve etkin bir şekilde tespit edilmesini sağlar. Bu yöntem, biyolojik hedeflerle etkileşebilecek moleküllerin belirlenmesinde kullanılır ve maliyeti düşük, hızlı alternatifler sunarak geleneksel yüksek hacimli tarama yöntemlerine bir çözüm getirir.

2.9.1 Sanal Ligand Taramasının Temel Prensipleri

Sanal tarama, yapısal biyoloji ve kimya bilimlerindeki ilerlemelerden faydalanarak, kimyasal bileşiklerin bilinen biyolojik hedeflerle olan potansiyel etkileşimlerini

incelemek için bilgisayar algoritmaları kullanır. Temel prensip, veritabanlarında bulunan yüzbinlerce hatta milyonlarca küçük molekülün biyolojik hedeflerle olan etkileşimlerinin tahmin edilmesidir [60].

2.9.2 Sanal Ligand Taraması Yöntemleri

Sanal ligand taraması iki ana yaklaşım altında toplanabilir:

Yapıya Dayalı Tarama (Structure-based Screening): Bu yöntem, hedef proteinin üç boyutlu yapısını kullanarak ligandların bağlanma bölgelerine ne kadar iyi oturduğunu hesaplar. Moleküler kenetlenme ve bağlanma enerjisi hesaplamaları bu sürecin temel bileşenleridir [61].

Liganda Dayalı Tarama (Ligand-based Screening): Hedef proteinin yapısı bilinmiyorsa, bu yöntem kullanılır. Ligand bazlı tarama, bilinen aktif bileşiklerin kimyasal ve fiziksel özelliklerine dayanarak benzer yapıları olan diğer bileşikler tespit etmeye çalışır [61].

2.9.3 Sanal Ligand Taramasının Uygulamaları

İlaç Keşfi: Sanal ligand tarama, yeni ilaç adaylarının keşfi için başlangıç noktası olarak kullanılır. Özellikle hedeflenen hastalık için potansiyel tedavi edici moleküllerin hızlı bir şekilde belirlenmesinde büyük bir rol oynar [62].

Hedef Doğrulama: Yeni keşfedilen hedeflerin potansiyel ilaçlarla etkileşim kapasitesini test etmek için sanal taramalar yapılır [62].

Yan Etki Profillemesi: Potansiyel ilaç adaylarının insan vücudundaki farklı proteinlerle etkileşim potansiyeli sanal tarama ile değerlendirilir, bu da yan etki profillerinin belirlenmesine yardımcı olur [62].

2.9.4 Sanal Taramanın Avantajları ve Zorlukları

Sanal ligand taramasının en büyük avantajlarından biri, düşük maliyet ve yüksek hızdır. Fiziksel deneylere kıyasla çok daha fazla sayıda bileşiği kısa sürede tarayabilir. Ancak,

bu yöntemin başarısı, kullanılan bilgisayar modellemelerinin doğruluğuna ve gerçek dünya verileriyle olan uyumuna bağlıdır. Yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlar, özellikle algoritmaların optimizasyonu ve veritabanlarının kalitesi konusunda sürekli geliştirmeler gerektirir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Tezde Kullanılan Program ve Veri Tabanları

3.1.1 RCSB Veri Tabanı

RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB), biyolojik makromoleküllerin üç boyutlu yapılarının depolandığı, yönetildiği ve dünya çapında bilim insanlarına sunulduğu merkezi bir veri tabanıdır. Bu veri tabanı, biyokimya, moleküler biyoloji, ilaç tasarımı ve diğer birçok bilim alanında kritik öneme sahiptir. RCSB PDB, araştırmacılara, öğretim üyelerine ve öğrencilere protein yapıları hakkında kapsamlı bilgiler sunarak biyolojik süreçlerin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunur. Veri tabanı, San Diego Süper Bilgisayar Merkezi (SDSC) ve Rutgers Üniversitesi tarafından yönetilmektedir. RCSB PDB, küresel Protein Data Bank (wwPDB) konsorsiyumunun bir parçası olarak, uluslararası standartlara uygun veri yönetimi ve paylaşımı sağlamaktadır [47].

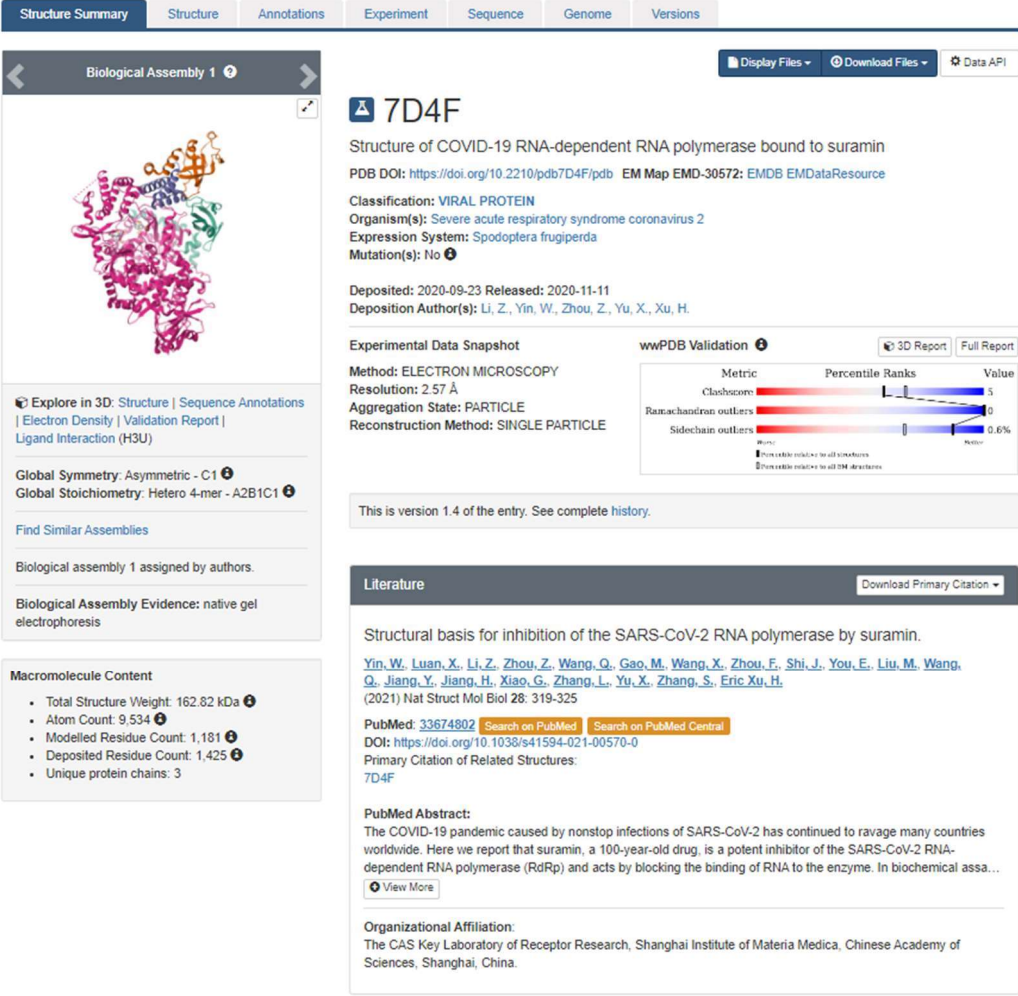
3.1.1.1 RCSB PDB'nin İşlevleri ve Özellikleri

Veri Toplama ve Depolama: RCSB PDB, X-ışını kristalografisi, nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi ve kriyo-elektron mikroskopisi gibi tekniklerle elde edilen protein yapılarının üç boyutlu verilerini toplar ve depolar. Bu veriler, bilimsel literatürden ve doğrudan araştırmacılardan elde edilir [47].

Veri Erişimi ve Paylaşımı: RCSB PDB, kullanıcı dostu bir arayüz sunarak araştırmacıların ve eğitimcilerin protein yapıları hakkında bilgiye kolayca erişmelerini sağlar. Veri tabanı, proteinlerin amino asit dizilimleri, üç boyutlu yapıları, biyolojik işlevleri ve ilişkili literatür bilgilerini içerir [47].

Veri Entegrasyonu: RCSB PDB, genomik, proteomik ve hastalık ilişkili verileri entegre ederek kullanıcılara kapsamlı analiz imkanları sunar. Bu entegrasyon, biyolojik yapıların fonksiyonel ve patolojik durumlarının daha iyi anlaşılmasına olanak tanır [47].

Eğitim ve Araştırma Desteği: RCSB PDB, eğitimciler ve öğrenciler için çeşitli öğretim materyalleri ve araçları sağlar. Bu kaynaklar, protein yapıları hakkında temel bilgilerden ileri düzey analizlere kadar geniş bir yelpazeyi kapsar. Ayrıca, araştırmacılar için gelişmiş analiz araçları ve veri görselleştirme imkanları sunar [47].



The screenshot displays the RCSB PDB entry for 7D4F. The main title is "Structure of COVID-19 RNA-dependent RNA polymerase bound to suramin". The PDB DOI is <https://doi.org/10.2210/pdb7D4F/pdb>. The classification is "VIRAL PROTEIN". The organism is "Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2". The expression system is "Spodoptera frugiperda". The deposition date is 2020-09-23, and the release date is 2020-11-11. The authors are Li, Z., Yin, W., Zhou, Z., Yu, X., Xu, H.

The experimental data snapshot shows: Method: ELECTRON MICROSCOPY, Resolution: 2.57 Å, Aggregation State: PARTICLE, and Reconstruction Method: SINGLE PARTICLE. The wwPDB Validation metrics are: Clashscore: 5, Ramachandran outliers: 0, and Sidechain outliers: 0.6%.

The literature section includes a PubMed abstract: "Structural basis for inhibition of the SARS-CoV-2 RNA polymerase by suramin." by Yin, W., Luan, X., Li, Z., Zhou, Z., Wang, Q., Gao, M., Wang, X., Zhou, F., Shi, J., You, E., Liu, M., Wang, Q., Jiang, Y., Jiang, H., Xiao, G., Zhang, L., Yu, X., Zhang, S., Eric Xu, H. (2021) Nat Struct Mol Biol 28: 319-325. The PubMed ID is 33674802. The DOI is <https://doi.org/10.1038/s41594-021-00570-0>. The primary citation of related structures is 7D4F.

The PubMed abstract states: "The COVID-19 pandemic caused by nonstop infections of SARS-CoV-2 has continued to ravage many countries worldwide. Here we report that suramin, a 100-year-old drug, is a potent inhibitor of the SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and acts by blocking the binding of RNA to the enzyme. In biochemical assa..."

Şekil 3.1 RCSB protein veri tabanı arayüzü ve örnek protein-ligand kompleks yapısı

3.1.2 Autodock Vina

AutoDock Vina, Scripps Research Institute tarafından geliştirilen biyomoleküler kenetlenme simülasyonları için yaygın olarak kullanılan açık kaynaklı bir moleküler kenetlenme yazılımıdır. 2009 yılında piyasaya sürülen bu yazılım, öncülü olan AutoDock 4'ten daha hızlı ve daha doğru sonuçlar vermek üzere tasarlanmıştır. Moleküler biyoloji ve ilaç tasarımı alanlarında önemli bir araç olan AutoDock Vina, ligandların proteinlerin

aktif bölgelerine nasıl bağlandığını tahmin etmek için geliştirilmiştir. Bu yazılım, yüksek doğruluk ve hızlı hesaplama yetenekleri ile dikkat çeker [63],[64].

3.1.2.1 AutoDock Vina'nın İşlevleri

AutoDock Vina, ligandların proteinlerin aktif bölgelerine nasıl bağlandığını tahmin etmek için gelişmiş algoritmalar kullanır. Programın temel işlevleri şunlardır:

Moleküler Kenetlenme: Ligand ve hedef protein arasındaki en uygun bağlanma konumlarını ve oryantasyonlarını tahmin eder.

Bağlanma Enerjisi Hesaplama: Ligandın proteine bağlanma enerjisini (ΔG) hesaplayarak, bağlanma afinitesini belirler.

Esnek Kenetlenme: Hem ligandın hem de proteinin esnekliğini dikkate alarak daha gerçekçi bağlanma modelleri oluşturur.

Yüksek Hız ve Doğruluk: Hızlı hesaplama yetenekleri sayesinde büyük veritabanları üzerinde tarama yapabilir ve yüksek doğrulukla sonuçlar sunar.

AutoDock Vina'nın Kullanım Alanları

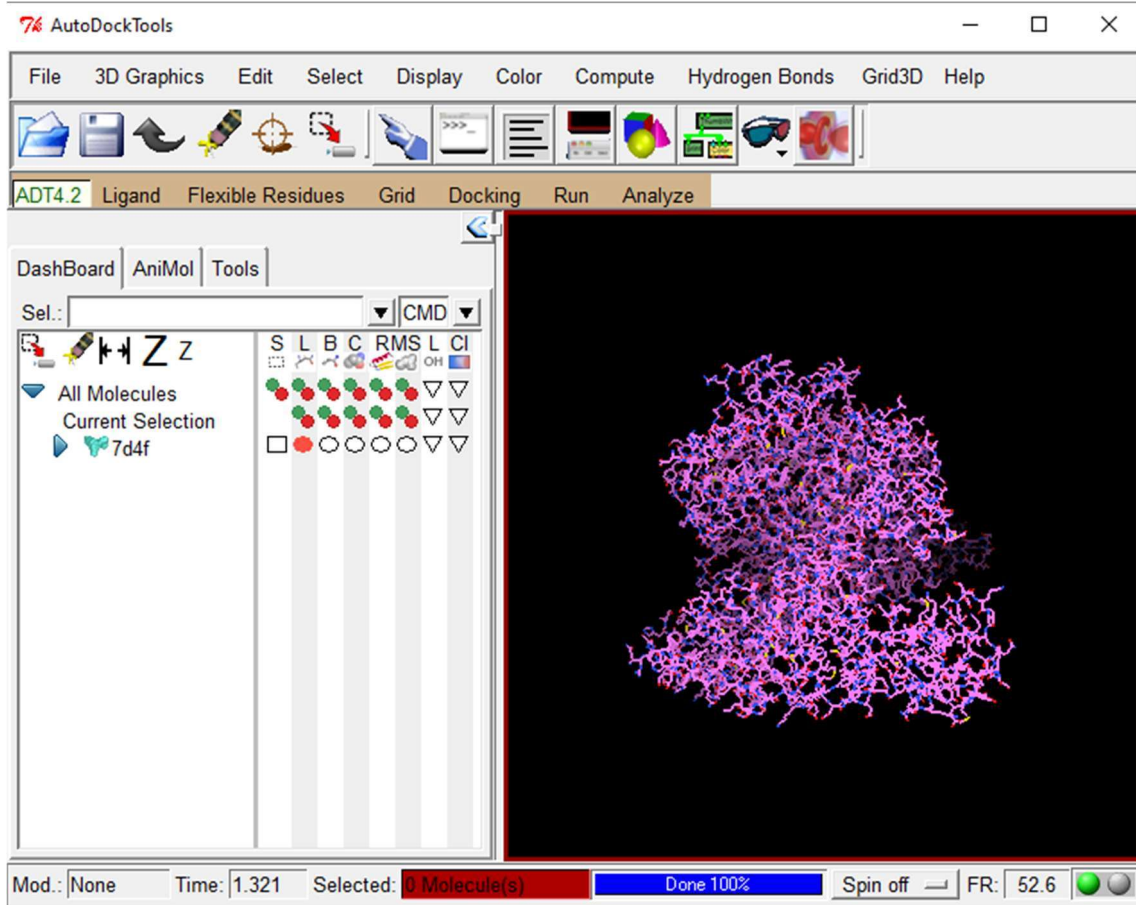
AutoDock Vina, biyomoleküler araştırmaların birçok alanında kullanılmaktadır. Başlıca kullanım alanları şunlardır:

İlaç Keşfi: Potansiyel ilaç adaylarının belirlenmesi ve bu adayların biyolojik hedeflerle etkileşimlerinin tahmin edilmesi için kullanılır.

Protein Fonksiyonlarının İncelenmesi: Proteinlerin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin anlaşılmasına yardımcı olur.

Enzim Mekanizmalarının Araştırılması: Enzimlerin substratlarıyla olan etkileşimlerini modelleyerek, enzim mekanizmalarının detaylı incelenmesini sağlar.

Protein-Protein Etkileşimleri: Proteinler arası etkileşimlerin yapısal temellerini araştırmak için kullanılır.



Şekil 3.2 Autodock Vina ile görüntülenen 7D4F proteini

3.1.3 ZINC 15 Veri Tabanı

ZINC15, araştırmacıların küçük moleküllerin biyolojik aktivitesi ve ulaşılabilirliği hakkında bilgi edinmelerini kolaylaştırmak amacıyla geliştirilmiş bir halk erişimli veritabanı ve araç setidir. ZINC (ZINC Is Not Commercial) başlangıçta sanal tarama için bileşiklere kolay erişim sağlamak amacıyla geliştirilmiş, zamanla sanal tarama, ligand keşfi, farmakofor taramaları, karşılaştırma ve kuvvet alanı geliştirme gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. ZINC15, biyolojik ve kimyasal verileri bir araya getirerek kullanıcı dostu bir arayüz sunar ve uzman olmayan kullanıcıların da rahatça kullanabileceği şekilde tasarlanmıştır [71].

3.1.3.1 ZINC15'in Temel Özellikleri

Geniş Bileşik Kütüphanesi: ZINC15, 120 milyondan fazla satın alınabilir "ilaç benzeri" bileşiği içermektedir. Bu bileşikler arasında metabolitler, ilaçlar, doğal ürünler ve literatürde tanımlanmış bileşikler bulunmaktadır [71].

Biyolojik ve Kimyasal Verilerin Entegrasyonu: ZINC15, küçük moleküllerin biyolojik aktiviteleri, kimyasal özellikleri ve ticari ulaşılabilirlik verilerini bir araya getirir. Bu sayede araştırmacılar, hedef proteinlere bağlanabilen ligandları ve bu ligandların biyolojik etkilerini kolayca sorgulayabilir [71].

Kullanıcı Dostu Arayüz: ZINC15, programlama bilgisi gerektirmeden kullanılacak şekilde tasarlanmış bir grafik kullanıcı arayüzü sunar. Aynı zamanda uzman kullanıcılar için tamamen programlanabilir bir yapı da sağlar [71].

Hazır Dokunabilir Formatlar: Tüm moleküller biyolojik olarak anlamlı, dokunmaya hazır formatlarda mevcuttur [71].

3.1.3.2 ZINC15'in Kullanım Alanları

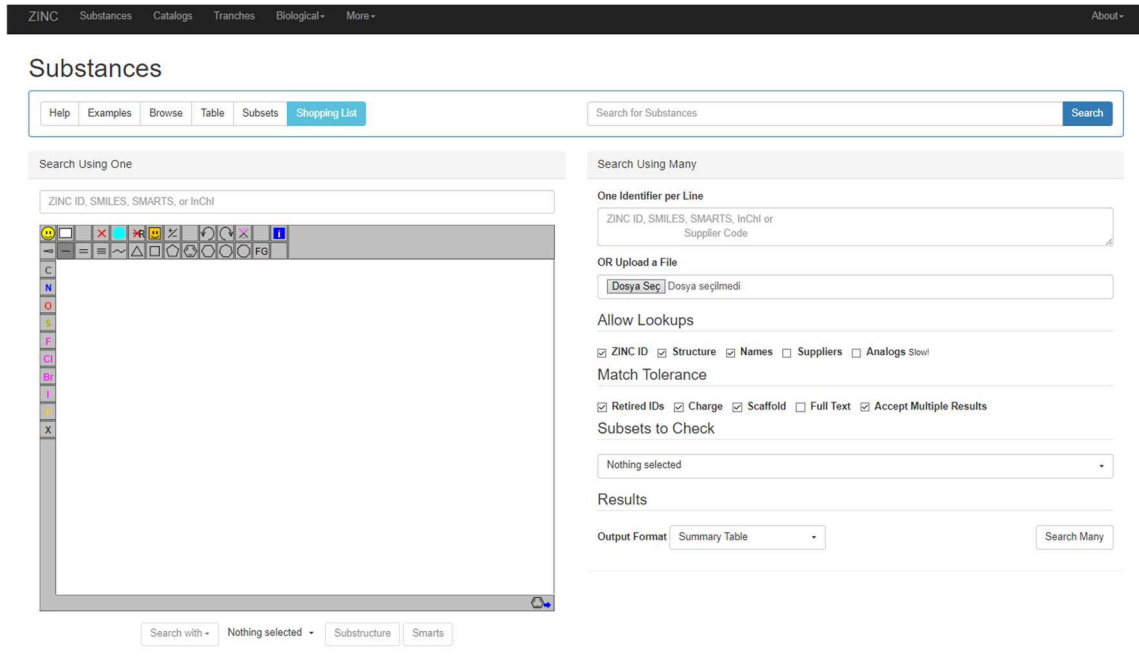
ZINC15, çeşitli araştırma alanlarında kullanılabilir:

İlaç Keşfi: Araştırmacılar, potansiyel ilaç adaylarını belirlemek ve bu adayların biyolojik hedeflerle etkileşimlerini incelemek için ZINC15'i kullanabilir [72].

Sanal Tarama: Biyolojik hedeflere yönelik büyük bileşik kütüphanelerinin sanal taramaları yapılabilir [72].

Biyolojik Anotasyonlar: ZINC15, bileşikleri biyolojik aktiviteleri ve ticari ulaşılabilirlikleri ile ilişkilendirir. Bu sayede araştırmacılar, belirli bir proteine bağlanan ligandları veya belirli bir molekülün bağlandığı proteinleri sorgulayabilir [72].

Benzetim ve Modelleme: ZINC15, yeni bileşiklerin keşfi ve bu bileşiklerin bilinen ligandlarla karşılaştırılması için kullanılabilir [72].



Şekil 3.3 ZINC15 Veri Tabanı Arayüzü

3.1.4 PubChem Veri Tabanı

PubChem, ABD Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH) bünyesinde, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) tarafından barındırılan, küçük moleküllerin biyolojik aktiviteleri ve kimyasal yapıları hakkında kapsamlı veriler sunan halka açık bir veri deposudur. PubChem, kimya biyolojisi, tıbbi kimya ve bilgi bilimi araştırmalarında yaygın olarak kullanılan ve ilaç keşfinde önemli bir kaynak olarak hizmet vermektedir [75].

3.1.4.1 PubChem'in Yapısı ve İşlevleri

PubChem, birbirine bağlı üç ana veri tabanından oluşur:

Madde Veritabanı: Bu veritabanı, çeşitli kaynaklardan sağlanan kimyasal örneklerin açıklamalarını içerir [76].

Bileşik Veritabanı: Burada, eşsiz kimyasal yapılar yer alır. Madde veritabanındaki kayıtlar, burada benzersiz kimyasal bileşikler olarak derlenir [76].

Biyolojik Test (BioAssay) Veritabanı: Kimyasal maddelerin biyolojik aktivite sonuçlarını içerir ve biyolojik test sonuçlarının halka açık deposu olarak hizmet verir [76].

3.1.4.2 PubChem'in Kullanım Alanları

PubChem, araştırmacılar ve endüstriyel kullanıcılar tarafından çeşitli alanlarda kullanılmaktadır:

İlaç Keşfi: Potansiyel ilaç adaylarının belirlenmesi ve bu adayların biyolojik hedeflerle etkileşimlerinin incelenmesi için kullanılır [77].

Sanal Tarama: Biyolojik hedeflere yönelik büyük kimyasal kütüphanelerin sanal taramaları yapılabilir [77].

Biyolojik Anotasyonlar: PubChem, bileşikleri biyolojik aktiviteleri ve ticari ulaşılabilirlikleri ile ilişkilendirir, böylece belirli bir proteine bağlanan ligandları veya belirli bir molekülün bağlandığı proteinleri sorgulamak mümkün hale gelir.

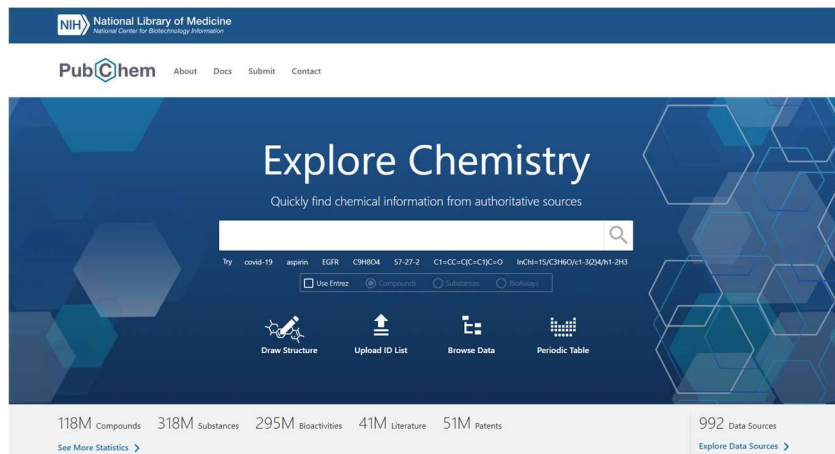
Benzetim ve Modelleme: Yeni bileşiklerin keşfi ve bu bileşiklerin bilinen ligandlarla karşılaştırılması için kullanılabilir [77].

3.1.4.3 PubChem'in Teknik Özellikleri ve Geliştirme Süreci

PubChem, geniş kapsamlı bir bilgi ve araç seti sunar:

Veri Alımı ve Entegrasyonu: PubChem, kimyasal yapıların ve biyolojik aktivitelerin entegre edildiği çeşitli veri alım araçlarına sahiptir [78].

Veri Analiz Araçları: Yapısal ve biyolojik aktiviteleri analiz etmek için çeşitli web tabanlı hizmetler ve araçlar sunar. Bu araçlar, kimyasal yapıların aranması, biyolojik test sonuçlarının karşılaştırılması ve yapı-aktivite ilişkilerinin analiz edilmesi gibi işlevleri içerir [79],[80].



Şekil 3.4 PubChem Veri Tabanı Arayüzü

3.1.5 BIOVIA Discovery Studio Visualizer

BIOVIA Discovery Studio Visualizer, moleküler modelleme, simülasyon ve veri analizi için kullanılan güçlü bir yazılım paketidir. Bu program, özellikle biyoteknoloji ve ilaç keşfi alanlarında araştırma yapan bilim insanları ve mühendisler için tasarlanmıştır. Discovery Studio Visualizer, kullanıcıların biyomoleküler yapıların görselleştirilmesini, analiz edilmesini ve yorumlanmasını sağlar [82].

BIOVIA Discovery Studio Visualizer, çeşitli özellikleri ile araştırmacılara geniş bir yelpazede işlevsellik sunar. Bu özellikler arasında şunlar bulunur:

Moleküler Görselleştirme: Moleküler yapıların yüksek çözünürlüklü görselleştirilmesini sağlar. Kullanıcılar, proteinler, nükleik asitler ve diğer biyomoleküller üzerinde detaylı incelemeler yapabilirler [83].

Veri Analizi: Kimyasal ve biyolojik verilerin analiz edilmesine olanak tanır. Bu analizler, moleküler dinamik simülasyonları ve protein-ligand etkileşimleri gibi çeşitli konuları kapsar [84].

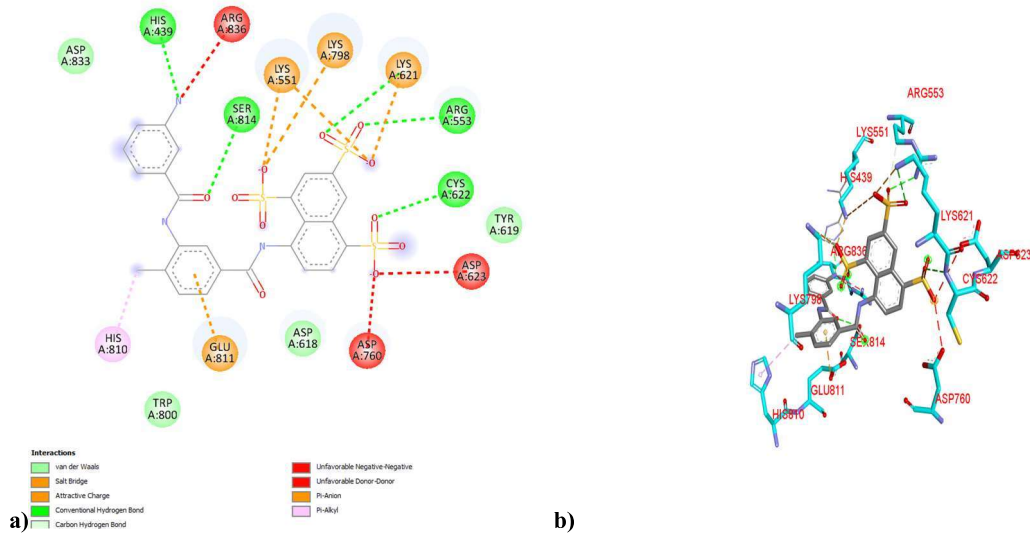
Modelleme ve Simülasyon: Moleküler dinamikler, homoloji modelleme ve ligand doking gibi işlemler için güçlü araçlar sunar [84].

BIOVIA Discovery Studio Visualizer, çeşitli bilimsel araştırma ve geliştirme alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Öne çıkan kullanım alanları şunlardır:

İlaç Keşfi: Yeni ilaç adaylarının belirlenmesi ve optimizasyonu için kullanılır. Protein-ligand etkileşimlerinin analizi, ilaç hedeflerinin doğrulanması ve aday bileşiklerin doking çalışmaları için idealdir [85].

Yapısal Biyoloji: Proteinlerin ve diğer biyomoleküllerin yapısal analizleri için kullanılır. Kristalografi ve NMR verilerinin analizi, yapı-tabanlı ilaç tasarımı çalışmalarında önemli bir rol oynar [86].

Biyoinformatik: Genomik ve proteomik verilerin analizi ve yorumlanması için biyoinformatik araçlar sunar. Bu, biyolojik süreçlerin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olur [86].



Şekil 3.5 BIOVIA Discovery Studio Visualizer ile görüntülenen protein-ligand etkileşim örneği

a) 2D etkileşimler b) 3D etkileşimler

3.1.6 pkCSM Online Programı

pkCSM (Pharmacokinetics Comparative Structural Modeling), küçük moleküllerin farmakokinetik ve toksisite özelliklerini tahmin etmek için grafik tabanlı imza kullanarak geliştirilen bir araçtır. İlaç keşfi ve geliştirme süreçlerinde kritik rol oynayan ADMET (Absorpsiyon, Dağılım, Metabolizma, Atılım ve Toksikite) profillerinin hızlı ve güvenilir bir şekilde değerlendirilmesini sağlar [87].

3.1.6.1 Temel Özellikler ve Açıklamaları

pkCSM, çeşitli farmakokinetik ve toksisite parametrelerini tahmin eder. Bu parametrelerin her biri, ilaç adaylarının değerlendirilmesinde kritik bir rol oynar:

3.1.6.1.1 Absorpsiyon (Emilim)

Suda Çözünürlük: Molekülün suda ne kadar çözünebildiğini gösterir. Düşük bir çözünürlük, düşük biyoyararlanım anlamına gelebilir [88].

Caco-2 Geçirgenliği: Caco-2 hücreleri, insan bağırsak epitelini taklit eder ve bu değer, molekülün bağırsak bariyerinden geçiş yeteneğini gösterir.

İnsan İnce Bağırsak Emilimi (HIA): Molekülün gastrointestinal sistemden emilimini ifade eder. Yüksek HIA değeri, iyi oral biyoyararlanım anlamına gelir.

Deri Geçirgenliği: Molekülün deri yoluyla emilim yeteneğini gösterir. Düşük deri geçirgenliği, topikal uygulamalarda sınırlı emilim anlamına gelir.

P-glikoprotein Substratlığı ve İnhibitörlüğü: P-gp, hücre zarlarından ilaçların dışarı pompalanmasını sağlayan bir proteindir. Molekülün P-gp substratı veya inhibitörü olup olmadığı, ilacın hücre içi konsantrasyonunu etkiler.

3.1.6.1.2 Dağılım

Dağılım Hacmi (V_{dss}): Molekülün vücutta nasıl dağıldığını gösterir. Yüksek dağılım hacmi, molekülün geniş doku dağılımına sahip olduğunu gösterir [89].

Protein Bağlanma Oranı: Molekülün plazma proteinlerine bağlanma oranını ifade eder. Yüksek protein bağlanma oranı, molekülün serbest formda dolaşımında az bulunmasını sağlar.

Kan-Beyin Bariyeri Geçirgenliği (BBB): Molekülün kan-beyin bariyerini geçme yeteneğini gösterir. Bu parametre, beyin hedefli tedaviler için kritiktir.

Merkezi Sinir Sistemi (CNS) Geçirgenliği: Molekülün merkezi sinir sistemine erişimini gösterir. Yüksek CNS geçirgenliği, merkezi sinir sistemi üzerinde etkili olabilecek ilaçlar için önemlidir.

3.1.6.1.3 Metabolizma

CYP450 Enzim Substratlığı ve İnhibitörlüğü: CYP450 enzimleri, ilaç metabolizmasında önemli rol oynar. Bir molekülün CYP450 enzimlerinin substratı veya inhibitörü olup olmadığı, ilacın metabolik stabilitesini ve ilaç-ilaç etkileşimlerini etkiler [89].

3.1.6.1.4 Atılım

Total Klirens: Molekülün vücuttan atılım hızını gösterir. Yüksek klirens, molekülün hızlı bir şekilde atıldığını gösterir [89].

Renal OCT2 Substratlığı: Molekülün renal OCT2 taşıyıcısı tarafından taşınma yeteneğini gösterir. Bu, böbrekler yoluyla atılım için önemlidir [89].

3.1.6.1.5 Toksisite

AMES Testi: Molekülün mutajenik olup olmadığını belirler. Mutajenik bileşikler, DNA'ya zarar vererek kanserojen olabilir [90].

Maksimum Tolere Edilebilir Doz (İnsan): İnsanlarda tolere edilebilecek maksimum dozu gösterir. Bu, ilaç güvenliği için önemlidir [90].

hERG İnhibitörlüğü: Molekülün hERG kanalını inhibe edip etmediğini belirler. hERG inhibitörleri, kardiyotoksisite riskini artırabilir [90].

Oral Sıçan Akut Toksisitesi (LD50): Sıçanlarda oral yolla verilen dozun 50%'sini öldüren dozu gösterir. Bu, akut toksisite seviyesini belirler [90].

Hepatotoksisite: Molekülün karaciğer toksisitesine neden olup olmadığını belirler. Karaciğer toksisitesi, ilaç geliştirme sürecinde yaygın bir sorun olabilir [90].

Deri Hassasiyeti: Molekülün deri hassasiyetine neden olup olmadığını belirler [90].

Diğer Toksisite Parametreleri: T.pyrifomis toksisitesi ve minnow toksisitesi gibi çevresel ve ekotoksikolojik etkileri belirleyen parametrelerdir.

pkCSM, küçük moleküllerin farmakokinetik ve toksisite özelliklerini tahmin etmek için kullanılan güçlü bir araçtır. Sağladığı parametreler sayesinde, ilaç adaylarının etkinliğini ve güvenliğini optimize etmeye yardımcı olur [91].

The screenshot displays the pkCSM Online Program interface. At the top, it says "Pharmacokinetic properties". Below this, there is a diagram showing the flow from "Input Molecules" to "Calculate PK Parameters" and "Calculate Properties", which then leads to "ADMET Properties". A "Run example" button is visible. A disclaimer box states: "No molecule information will be retained on the system after being uploaded by the user." The main interface is divided into two steps:

Step 1: Please provide a set of molecules (SMILES format)

There are two options for providing molecules: "Upload your SMILES file:" with a "Dosya Seç" button, and "Provide a SMILES string:" with a text input field containing the example string CC1=C(C)C=C(C)C=C1 and a "Example:" field with the string CC(O)CC1=CC=CC=C1C(O)O.

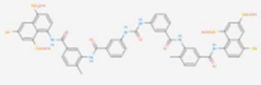
Step 2: Please choose the prediction mode

There are several prediction modes: "Absorption", "Distribution", "Metabolism", "Excellence", "Toxicity", and "ADMET". The "ADMET" mode is currently selected.

At the bottom, there are logos for Instituto René Rachou FIOCRUZ MINAS, THE UNIVERSITY OF MELBOURNE, and UNIVERSITY OF CAMBRIDGE. A small note at the bottom right says "Best viewed using Chrome on 1280x1024 resolution and above".

Şekil 3.9 pkCSM Online Programı Arayüzü

Molecule Depiction



SMILES

Molecule properties:

Descriptor	Value
Molecular Weight	1297.302
LogP	6.74324
#Rotatable Bonds	16
#Acceptors	17
#Donors	12
Surface Area	488.513

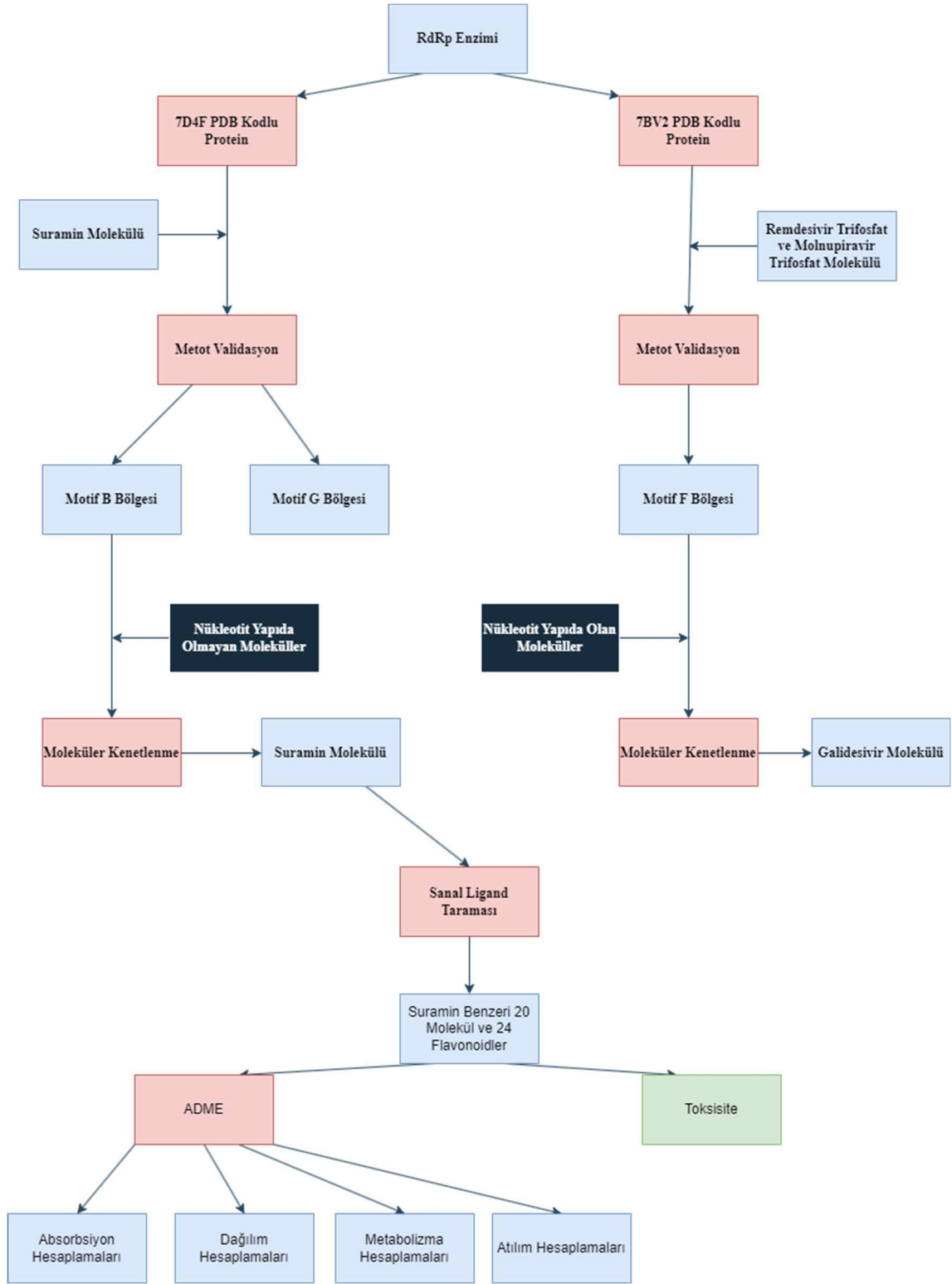
Property	Model Name	Predicted Value	Unit
Absorption	Water solubility	-2.892	Numeric (log mol/L)
Absorption	Caco2 permeability	-3.531	Numeric (log Papp in 10 ⁻⁶ cm/s)
Absorption	Intestinal absorption (human)	0	Numeric (% Absorbed)
Absorption	Skin Permeability	-2.735	Numeric (log Kp)
Absorption	P-glycoprotein substrate	No	Categorical (Yes/No)
Absorption	P-glycoprotein I inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Absorption	P-glycoprotein II inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Distribution	VDss (human)	-0.017	Numeric (log L/kg)
Distribution	Fraction unbound (human)	0.378	Numeric (Fu)
Distribution	BBB permeability	-3.905	Numeric (log BB)
Distribution	CNS permeability	-5.037	Numeric (log PS)
Metabolism	CYP2D6 substrate	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP3A4 substrate	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP1A2 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP2C19 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP2C9 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP2D6 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP3A4 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Excretion	Total Clearance	-4.274	Numeric (log ml/min/kg)
Excretion	Renal OCT2 substrate	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	AMES toxicity	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	Max. tolerated dose (human)	0.438	Numeric (log mg/kg/day)
Toxicity	hERG I inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	hERG II inhibitor	Yes	Categorical (Yes/No)
Toxicity	Oral Rat Acute Toxicity (LD50)	2.482	Numeric (mol/kg)
Toxicity	Oral Rat Chronic Toxicity (LOAEL)	7.327	Numeric (log mg/kg_bw/day)
Toxicity	Hepatotoxicity	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	Skin Sensitisation	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	T.Pyiformis toxicity	0.285	Numeric (log ug/L)
Toxicity	Minnow toxicity	5.545	Numeric (log mM)

Şekil 3.10 pkCSM Online Programı Suramin molekülü için sonuç ekranı

3.2 Yapılan Çalışmanın Adımları

Bu tez çalışması toplam **altı** adımdan oluşmaktadır. Bu adımlar aşağıdaki gibi belirlenmiştir:

- Hedef protein (ler)in seçilmesi
- Nükleotit yapıda olan moleküllerin ve nükleotit yapıda olmayan fitokimyasalların seçilmesi
- Metot validasyon hesaplamaları
- Moleküler kenetlenme çalışması
- Sanal ligand tarama hesaplamaları
- ADMET hesaplamaları



Şekil 3.11 Yapılan Çalışma Adımlarını İçeren Diyagram

3.2.1 Moleküler Kenetleme Hesaplamaları için Hedef Proteinlerin Seçimi

SARS-CoV-2 RdRp enziminin aktif bölgesinde toplam yedi tane her birinin görevi birbirinden farklı olan 7 tane motif bulunmaktadır. Bunlar:

Motif A

Görev: Katalitik aktiviteyi sağlar ve metal iyonlarının (Mg^{2+} veya Mn^{2+}) bağlanmasında kritik rol oynar.

Konservatif Amino Asitler: Asp (D) ve Asn (N)

Detaylar: Bu motif, metal iyonlarını koordine ederek RNA sentezini katalize eder.

Motif B

Görev: RNA'nın uygun şekilde bağlanmasını ve stabilizasyonunu sağlar.

Konservatif Amino Asitler: Ser (S) ve Thr (T)

Detaylar: RNA'nın fosfat omurgası ile etkileşime girerek, RNA'nın doğru pozisyonda tutulmasına yardımcı olur.

Motif C

Görev: Katalitik merkezde yer alır ve fosfodiester bağlarının oluşumunu sağlar.

Konservatif Amino Asitler: Asp (D)

Detaylar: RNA sentezi sırasında yeni nükleotidlerin eklenmesi için gereklidir.

Motif D

Görev: RNA'nın pozisyonunu ve doğruluğunu kontrol eder.

Konservatif Amino Asitler: Lys (K) ve Arg (R)

Detaylar: RNA şablonunun doğru şekilde hizalanmasını sağlar.

Motif E

Görev: RdRp'nin yapısal stabilitesini sağlar ve RNA'nın hareketini düzenler.

Konservatif Amino Asitler: Pro (P) ve Ala (A)

Detaylar: Protein yapısını destekleyerek RNA'nın doğru yönlendirilmesini sağlar.

Motif F

Görev: NTP'lerin (nükleozid trifosfatlar) bağlanmasını sağlar ve yeni nükleotidlerin RNA'ya eklenmesi için gerekli enerjiyi sağlar.

Konservatif Amino Asitler: Tyr (Y) ve Phe (F)

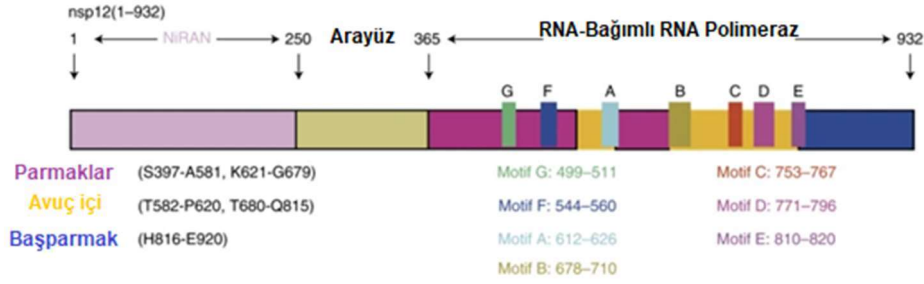
Detaylar: NTP'lerin bağlanmasını ve uygun konumda tutulmasını sağlar.

Motif G

Görev: RNA sentezinin başlamasında ve devamında rol oynar.

Konservatif Amino Asitler: His (H) ve Arg (R)

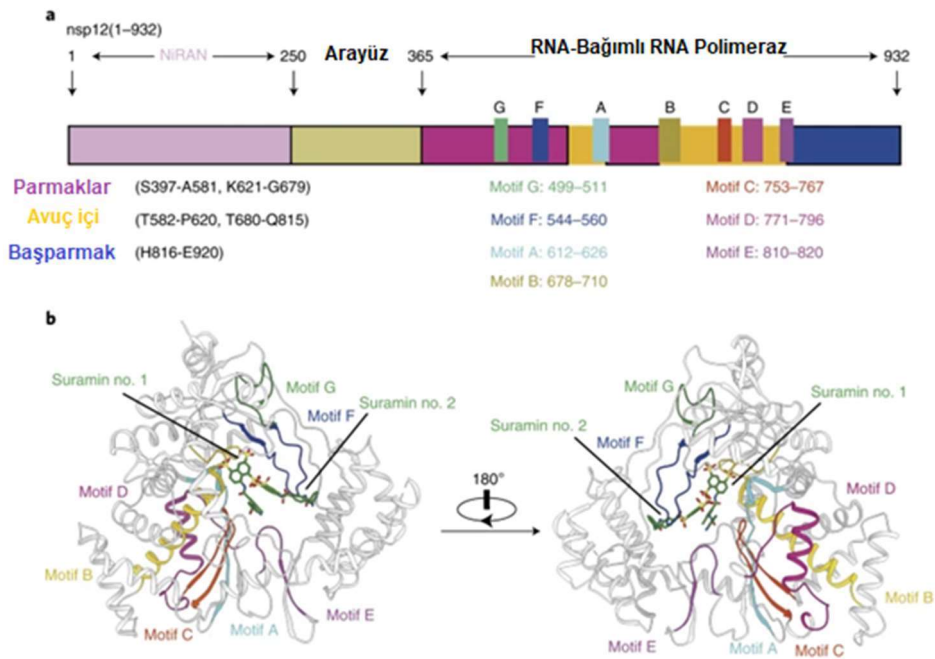
Detaylar: RNA ile etkileşim kurarak sentez sürecini destekler.



Şekil 3.12 RdRp kompleksi alt birimi nsp12'nin şematik diyagramı; A'dan G'ye motifler

Nükleotit yapıda olan moleküller için aktif bölgede bulunan moleküller RdRp enziminin katalitik aktivitesini motif F bölgesinde olduğu görülmüştür. Bu motif, nükleotid trifosfatların (NTP'lerin) RdRp'ye girişini düzenler. Motif F, nükleotid kanalının formasyonunda yer alır ve substrat seçiminde önemli bir rol oynar. Bu da nükleotid trifosfatların motif F üzerinden yarışmalı inhibisyon yaparak nükleotid trifosfatların yerine RNA yapısına kovalent bağlanırlar. Bu bilgiye dayanarak yapılan literatür sonucunda nükleotit yapıda olan onay almış ilaç molekülleri olan **Remdesivir** ve **Molnupiravir** moleküllerinin trifosfatları ile x-ray yapısı saflaştırılan **7BV2**, **7OZU** ve **7OZV** PDB kodlu proteinler seçilmiştir. **Nükleotit yapıda olmayan moleküllerin** etkileşiminin katalitik aktivitesinin ise motif B ve motif G bölgelerinin inhibisyonu için kimyasal olan ikincil etkileşimler ile bu bölgeleri inhibe ettiği gözlenmiştir. Bu etkinin

gözenmesi ile **Suramin (H3U)** molekülü ile x-ray yapısı saflaştırılan **7D4F** PDB kodlu protein seçilmiştir. Bu nedenle RdRp enziminin aktif bölgesinde bulunan motifler (A-G) ile tasarımı yapılan *in silico* çalışmalar ile bağlantı afiniteleri ve hesaplanan Ki değerleri belirlenerek nükleotit olan ilaç molekülleri ve nükleotit yapıda olmayan flavonoidler içerisinde moleküler kenetlenme yöntemi ile öncü bir bileşik belirlenmesi hedeflenmektedir.



Şekil 3.13 A) RdRp kompleksi alt birimi nsp12'nin şematik diyagramı; A'dan G'ye kadar olan motifler vurgulanmıştır. B) 7D4F PDB kodlu proteinin yapısı. İki suramin molekülünün RdRp'nin A – G motifleriyle etkileşimleri. Renk kodu şu şekildedir: motif A (mavi), motif B (altın), motif C (turuncu kırmızı), motif D (orta mor kırmızı), motif E (macenta), motif F (mavi) ve motif G (yeşil).

3.2.2 Moleküler Kenetlenme Hesaplamaları için Nükleotit Yapıda Olan ve Nükleotit Yapıda Olmayan Moleküllerin Seçimi

RdRp'nin virüs replikasyonundaki merkezi rolü, bu enzimi COVID-19 tedavisinde ideal bir hedef haline getirir. Spesifik RdRp inhibitörleri, viral RNA sentezini bloke ederek virüsün çoğalmasını durdurabilir. Bu bilginin ışığında tez çalışmasında SARS-CoV-2 virüsü için antiviral ilaç tasarlanması için RdRp enzimi hedef olarak seçilmiştir.

RdRp inhibitörü olarak nükleotit yapıda olan **on tane molekülün** yanı sıra nükleotit olmayan moleküller olan biri Ebola virüsünde kullanılan **bir ilaç** ve **yirmi dört fitokimyasalın** etkileşimlerinin olduğu varsayılan **otuz beş molekülün** teorik olarak denenmesi gerektiği düşünüldü. Nükleotit yapıda olan antiviral yeniden amaçlandırılmış ilaçların birincil RNA yapısına kovalent bağlandığı bilinmektedir. Bu kovalent bağlanmanın virüs bağlanmış hücrelerin dışında sağlıklı olan hücreleri de etkilediği ve vücuttaki RNA üretiminin genel olarak azaldığı gözlemlendi. Bunun için fitokimyasalların yapmış olduğu kimyasal olan tersinir ikincil etkileşimlerin tersinmez olan kovalent bağlanmadan daha etkili olması varsayılarak çalışmalarda fitokimyasalların önceliği artırıldı.

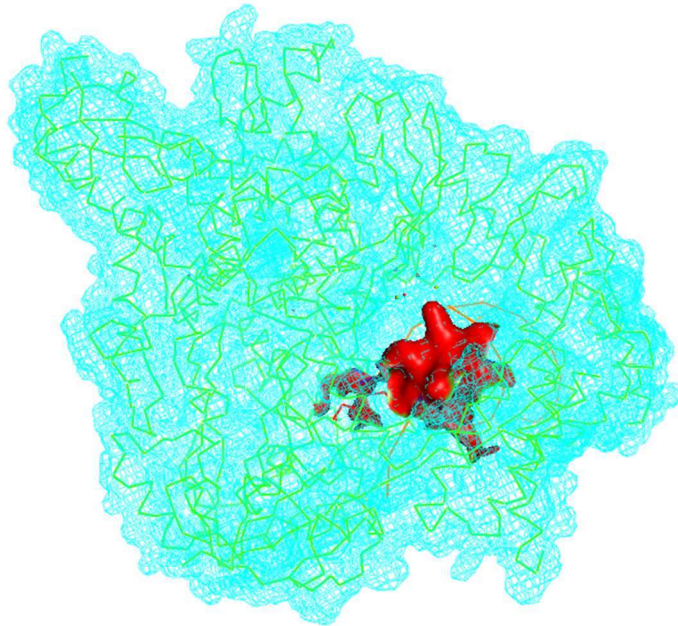
3.2.3 Moleküler Kenetlenme Hesaplamaları için Metot Validasyonu

3.2.3.1 Nükleotit Olan Molekülleri Kapsayan Moleküler Kenetlenme Hesaplamaları için Metot Validasyonu

SARS-CoV-2 RNA-bağımlı RNA Polimeraz enzimine ait **7BV2** PDB kodlu protein ile saflaştırılmış **Remdesivir Trifosfat** isimli ligand ile saflaştırılan 3 boyutlu yapısını içeren dosya RCSB:PDB veritabanından .pdb uzantısı ile indirilmiştir. UCSF Chimera programı ile yapıda saflaştırılmış halde bulunan ligand çıkarılmıştır. Bunun yanısıra enzimin heteromer yapıda olduğu bilindiğinden nsp7 ve nsp 8 zincirleri validasyon sırasında yapıda bırakılmıştır. Yapılan literatür taraması sonucunda yapıda Mg²⁺ iyonları aktif bölgede katalitik aktivite merkezi olduğu saptandığından sabit bırakılmıştır. Ardından proteinin yapısına polar hidrojenler eklenmiştir.

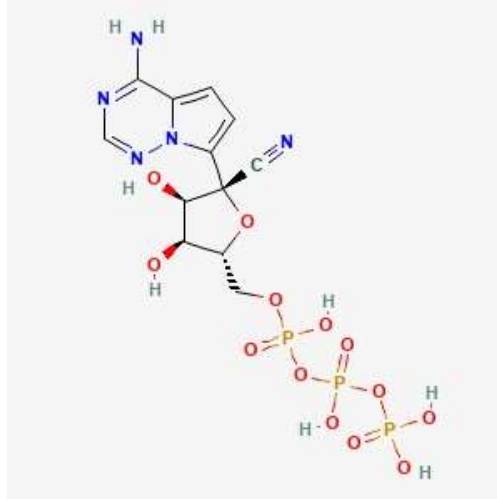


Şekil 3.14 7BV2 PDB kodlu proteinin x-ray yapısı



Şekil 3.15 7BV2 PDB kodlu proteinin aktif bölgesi*

*Aktif bölge kırmızı alan ile gösterilmiştir.



Şekil 3.16 Remdesivir Trifosfat ligandının 2 boyutlu yapısı

RdRp enzimi, viral RNA'nın replikasyonunu ve transkripsiyonunu gerçekleştirir. Remdesivir trifosfat (GS-443902), doğal ATP (adenozin trifosfat) molekülüne yapısal olarak benzediği için, RNA zincirine entegre edilir. Bu entegrasyon, birkaç temel mekanizma ile gerçekleşir:

Mimetik Etki: Remdesivir trifosfat, ATP'nin doğal bir analogu olarak hareket eder ve RdRp'nin aktif bölgesine bağlanır. Bu bağlanma, RNA sentezi sırasında doğal nükleotidlerin yerine geçmesini sağlar.

RNA Zincirine Entegrasyon: RdRp, Remdesivir trifosfatı, RNA zincirine entegre eder. Bu süreç, RNA sentezi sırasında yeni nükleotidlerin eklenmesi sırasında gerçekleşir.

Yapılan literatür çalışması sonucunda Remdesivir trifosfat ligandının 7BV2 PDB kodlu proteinin aktif bölgesinde motif F bölgesi ile etkileştiği bilinmektedir. Bu bölge 7BV2 kodlu proteinin Ala-554 ve Val-560 aminoasitleri arasında kalan bölge olduğu tespit edildi. Ayrıca Tyr-619, Asp-623 ve Asp-760 aminoasitleri ile kalan bölgede bulunan Mg^{2+} iyonlarının katalitik aktiviteyi sağladığı bilinmektedir. Bu bulgular neticesinde validasyon için gerekli olan Şekil 3.15 teki parametreler belirlendi.

```

receptor = 7bv2.pdbqt
ligand = remdesivir.pdbqt

center_x = 91.312
center_y = 93.155
center_z = 102.826

size_x = 20
size_y = 34
size_z = 20

exhaustiveness = 16

log = log3.txt
out= output3.pdbqt

```

mode	affinity	dist from best mode	
	(kcal/mol)	rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-8.9	0.000	0.000
2	-8.8	1.252	1.914
3	-8.7	2.154	3.058
4	-8.5	1.323	2.414
5	-8.2	1.703	3.587
6	-8.2	5.505	9.193
7	-8.1	1.043	2.086
8	-7.8	3.762	5.075
9	-7.8	4.031	5.599

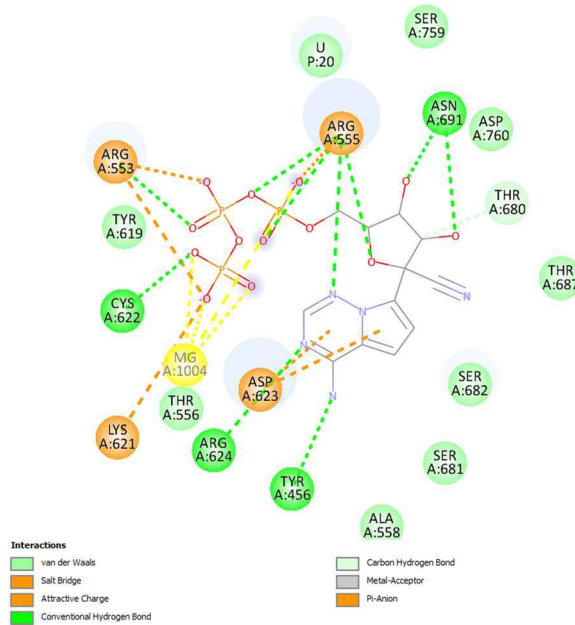
a)

b) Writing output ... done.

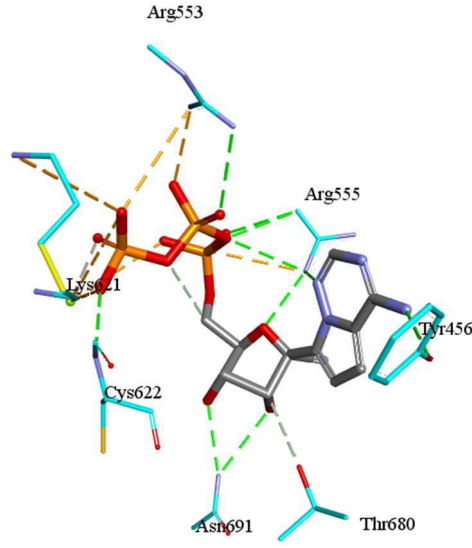
Şekil 3.17 14 7BV2 PDB kodlu Protein-Ligand Kompleksi Motif B için Validasyon Çalışması Sonuçları

a) Autodock Vina ile validasyonu yapılan config dosyası b) Log sonuç dosyası

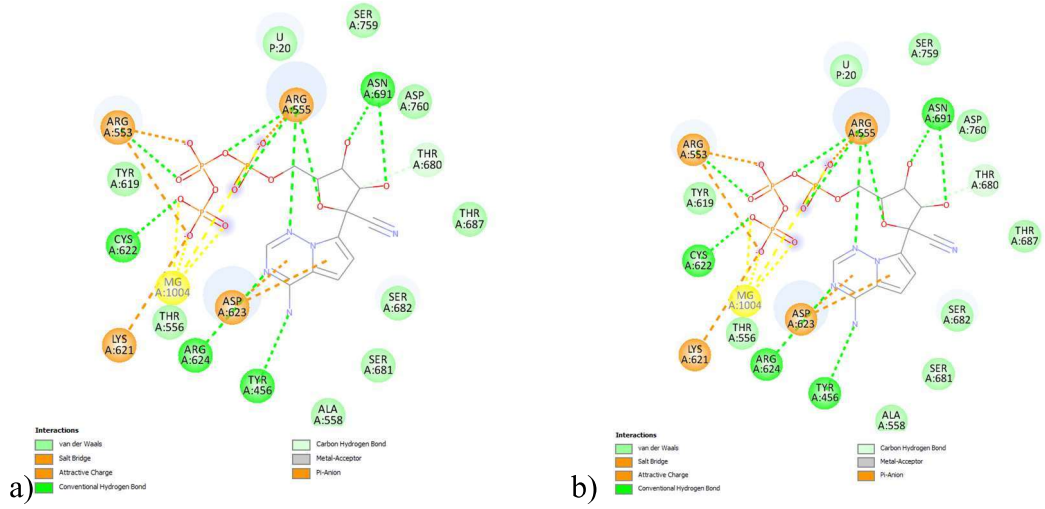
Bu çalışma 7BV2 protein-ligand yapısındaki saflaştırılmış olan ligand yapıdan atılarak tekrar aynı bölgeye kenetlenmesini içermektedir. Hesaplamalar sonucunda elde edilen RMSD (Kök Ortalama Kare Sapması) değeri 1.914 Å bulundu. Bu değer 2 Å değerinin altında olması parametrelerin doğru olduğu kabul edildi.



Şekil 3.18 Validasyon Çalışması Sonucu 7BV2 Motif F ile Remdesivir Trifosfat 2 boyutlu etkileşimleri



Şekil 3.19 Validasyon Çalışması Sonucu 7BV2 Motif F ile Remdesivir Trifosfat 3 boyutlu etkileşimleri



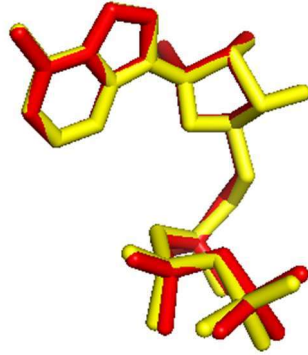
Şekil 3.20 7BV2 İçin Yeniden kenetlenme ligandı ile referans ligand karşılaştırması

a) Referans ligand Remdesivir Trifosfat

b) Yeniden kenetlenme hesaplaması yapılan Remdesivir Trifosfat ligandı

Referans ligand ile yeniden kenetlenme hesaplaması sonucu elde edilen ligandın sahip olduğu moleküller arası etkileşimlerin benzer olduğu görüldü. (Şekil 3.17 a ve b)

Validasyon hesaplamaları sonucu RMSD değeri 1.914Å olan ligandın proteindeki konumu ile karşılaştırılması şekilde gösterildi. Validasyon sonucu elde edilen ligand ile referans ligandın karşılaştırılması sonucu tam çakışma görüldü. Bu sonuç yapılan validasyonun başarılı olduğu göstermektedir.

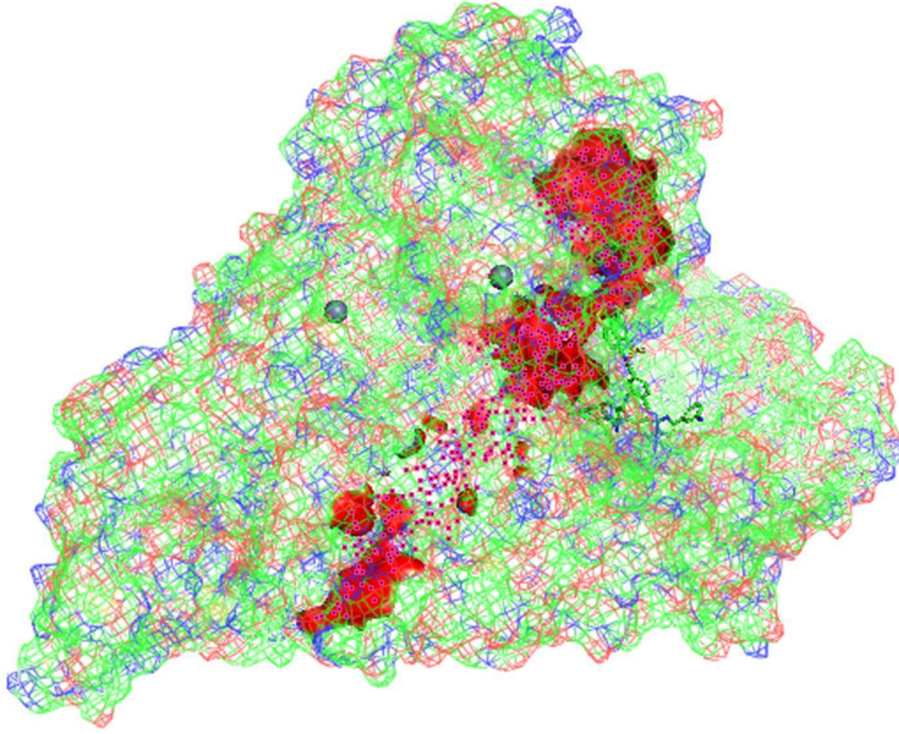


Şekil 3.21 7BV2 kodlu RdRp Enzimi ve Remdesivir Trifosfat Kompleksi için Validasyon sonucu elde edilen ligand ile referans ligandın karşılaştırılması (**Kırmızı molekül: Ligand Sarı molekül: Yeniden kenetlenme**)

Autodock Vina ile yapılan yeniden kenetlenme çalışmasında bağlanma afinitesi $\Delta GB = -8.8$ kcal/mol değeri elde edilmiştir. Bu değer üzerinden deneysel K_i değeri hesaplanabilmektedir. $\Delta GB = R.T.\ln K_i$ (ΔGB = bağlanma enerjisi; $R= 1.986$ cal/mol.K; $T= 298,15$ K) Validasyonu yapılan 7BV2 ligandının hesaplanan K_i değeri yukarıdaki formülden yararlanarak deneysel $K_i = 1.45$ nM olarak bulunmuştur. Referans makaleye göre deneysel K_i değeri ise 1.12 μM 'dir.

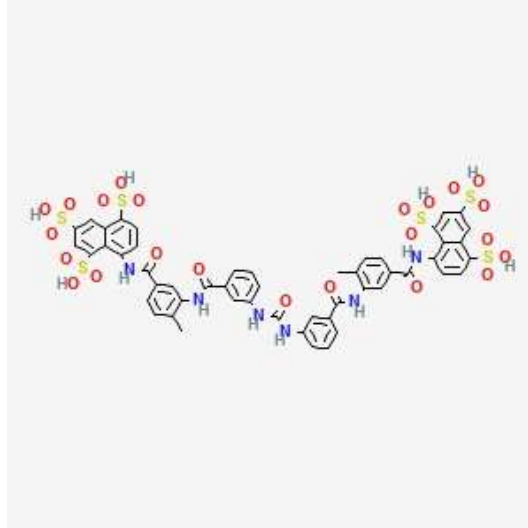
3.2.3.2 Nükleotit Olmayan Molekülleri Kapsayan Moleküler Kenetlenme Hesaplamaları için Metot Validasyonu

SARS-CoV-2 RNA-bağımlı RNA Polimeraz enzimine ait 7D4F PDB kodlu protein ile saflaştırılmış **Suramin** isimli ligand ile saflaştırılan 3 boyutlu yapısını içeren dosya RCSB:PDB veritabanından .pdb uzantısı ile indirilmiştir. UCSF Chimera programı ile yapıda saflaştırılmış halde bulunan ligand çıkarılmıştır. Bunun yanı sıra enzimin heteromer yapıda olduğu bilindiğinden nsp7 ve nsp 8 zincirleri validasyon sırasında yapıda bırakılmıştır. Ardından proteinin yapısına polar hidrojenler eklenmiştir.



Şekil 3.22 7D4F PDB kodlu proteinin x-ray yapısı*

***Kırmızı alan aktif bölgeyi temsil etmektedir.**



Şekil 3.23 Suramin ligandının 2 boyutlu yapısı

Yapılan literatür çalışması sonucunda Suramin ligandının x-ray yapısı içerisinde iki mol bulunduğu tespit edildi. 7D4F PDB kodlu proteinin aktif bölgesinde motif B ile motif G bölgesi ile etkileştiği bilinmektedir. Bu bölge 7D4F kodlu proteinin motif G bölgesi Ala-499 ve Lys-511 aminoasitleri arasında kalan bölge olduğu tespit edildi. Ayrıca motif B bölgesi ise Gly-678 ve Thr-710 aminoasitleri ile kalan bölgede bulunarak katalitik aktiviteyi sağladığı bilinmektedir. Motif B ve motif G için ayrı validasyon çalışması uygulanmasına karar verildi. Bu bulgular neticesinde motif B bölgesinde validasyon için gerekli olan Şekil 3.20'deki parametreler belirlendi.

		mode	affinity	dist from best mode	
			(kcal/mol)	rmsd l.b.	rmsd u.b.
receptor = 7d4f.pdbqt					
ligand = suramin.pdbqt					
center_x = 115.488		1	-8.4	0.000	0.000
center_y = 133.725		2	-8.2	1.408	1.878
center_z = 142.532		3	-8.2	2.236	3.825
size_x = 20		4	-7.7	2.691	5.096
size_y = 20		5	-7.6	2.261	4.183
size_z = 20		6	-7.6	3.593	10.655
exhaustiveness = 16		7	-7.6	5.125	10.548
log = log7.txt		8	-7.6	4.254	9.688
out= output6.pdbqt		9	-7.4	3.051	5.497

A)

B)

Şekil 3.24 7D4F yapısının Motif B için Validasyon Çalışması Sonuçları

A) Motif B için Autodock Vina ile validasyonu yapılan config dosyası

B) Motif B için Log sonuç dosyası

Bu çalışma 7D4F protein-ligand yapısındaki saflaştırılmış olan ligand yapıdan atılarak tekrar aynı bölgeye kenetlenmesini içermektedir. Hesaplamalar sonucunda elde edilen RMSD (Kök Ortalama Kare Sapması) değeri 1.878 Å bulundu. Bu değerin 2 Å değerinin altında olması parametrelerin doğru olduğu kabul edildi.

```
receptor = 7d4f.pdbqt
ligand = suramin.pdbqt

center_x = 141.178
center_y = 125.863
center_z = 132.852

size_x = 30
size_y = 30
size_z = 30

exhaustiveness = 16

log = log2.txt
out= output2.pdbqt
```

A)

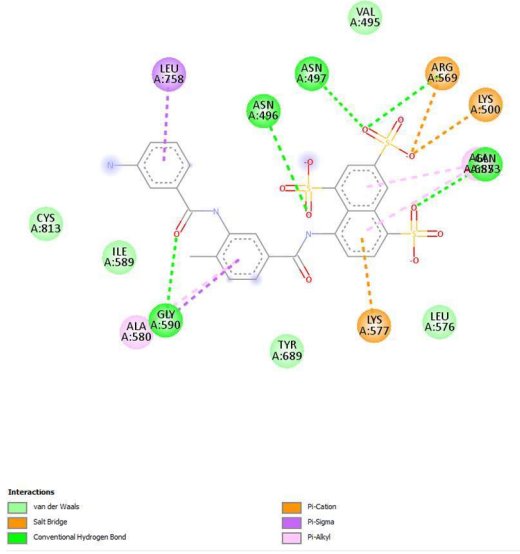
mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode	
		rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-8.7	0.000	0.000
2	-8.7	0.212	1.252
3	-8.5	0.960	1.471
4	-8.4	1.880	4.066
5	-8.4	3.486	9.978
6	-8.2	2.080	4.401
7	-8.1	4.258	7.864
8	-8.1	5.838	10.272
9	-8.0	3.610	5.176

B)

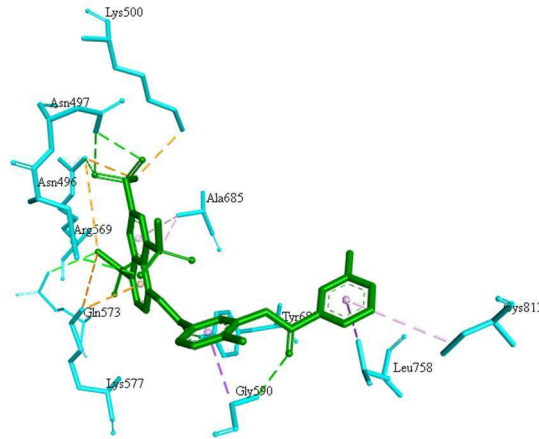
Şekil 3.25 7D4F yapısının Motif G için Validasyon Çalışması Sonuçları

A) Motif B için Autodock Vina ile validasyonu yapılan config dosyası

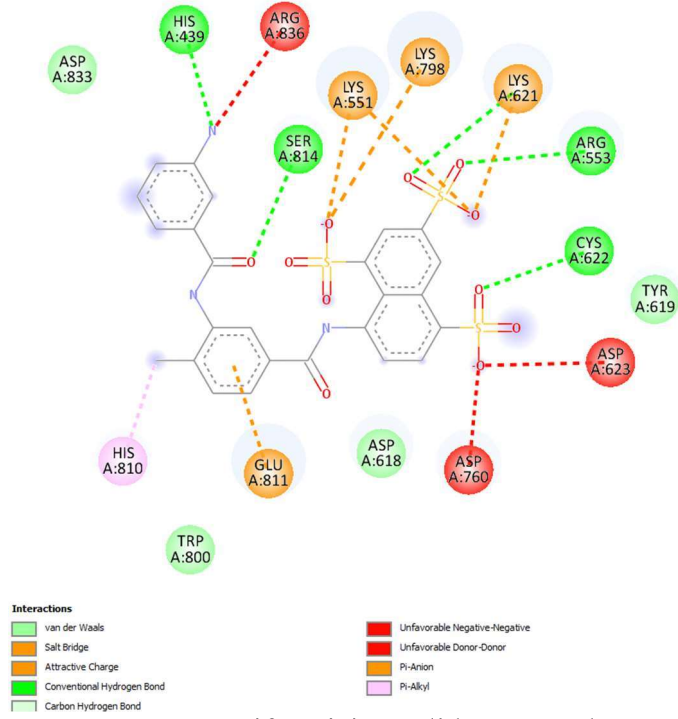
B) Motif B için Log sonuç dosyası



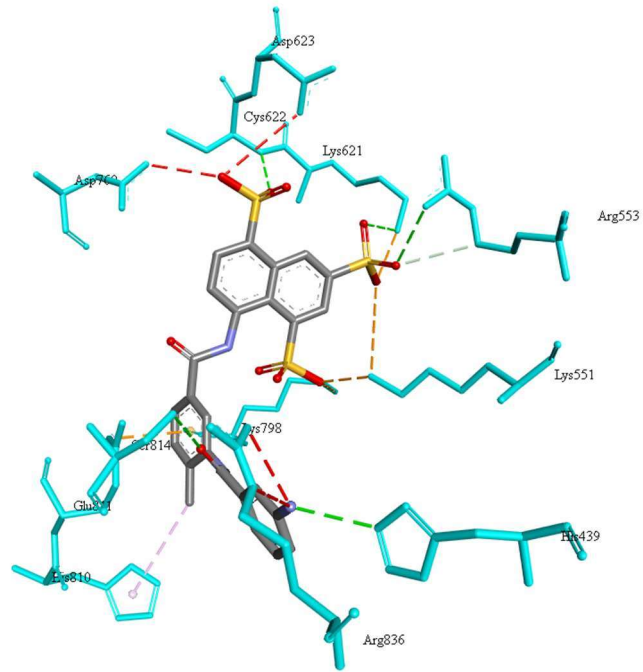
Şekil 3.26 7D4F yapısının Motif B için Validasyon Çalışması Sonucu 7D4F Aktif Bölgedeki Motif B ile Suramin molekülü 2 boyutlu etkileşimleri



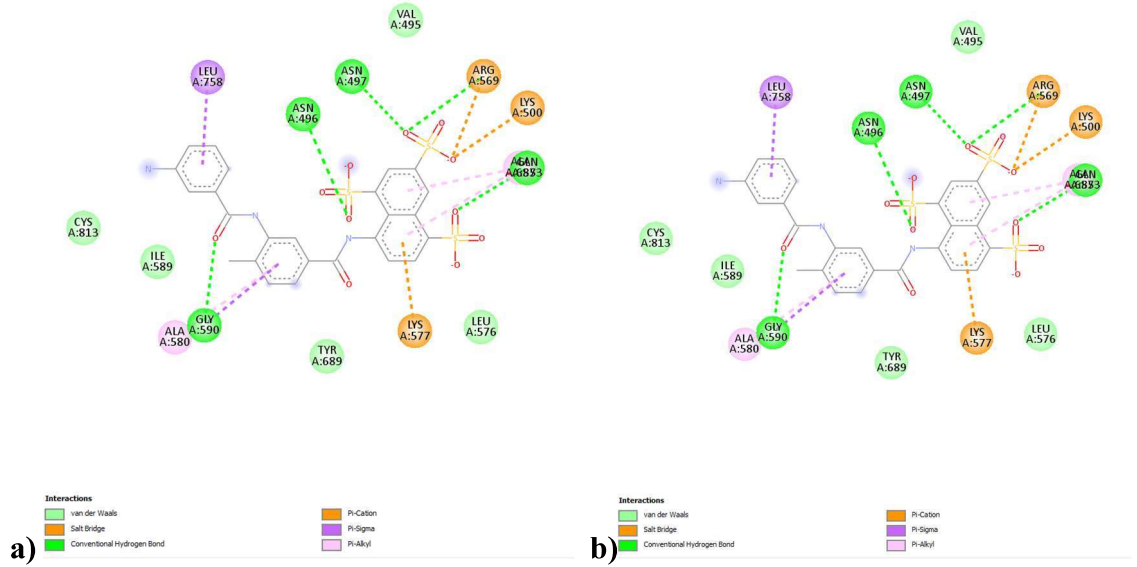
Şekil 3.27 7D4F yapısının Motif B için Validasyon Çalışması Sonucu 7D4F Aktif Bölgedeki Motif B ile Suramin molekülü 3 boyutlu etkileşimleri



Şekil 3.28 7D4F yapısının Motif G için Validasyon Çalışması Sonucu 7D4F Aktif Bölgedeki Motif G ile Suramin molekülü 2 boyutlu etkileşimleri



Şekil 3.29 7D4F yapısının Motif G için Validasyon Çalışması Sonucu 7D4F Aktif Bölgedeki Motif G ile Suramin molekülü 3 boyutlu etkileşimleri



Şekil 3.30 7D4F yapısının Motif B için yeniden kenetlenme ligandı ile referans ligand karşılaştırması

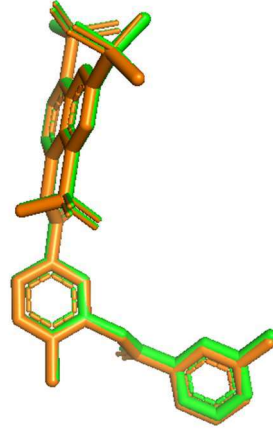
a) Referans ligand Suramin

b) Yeniden kenetlenme hesaplaması yapılan Suramin ligandı

Referans ligand ile yeniden kenetlenme hesaplaması sonucu elde edilen ligandın sahip olduğu moleküller arası etkileşimlerin benzer olduğu görüldü. (Şekil 3.26 a ve b)

Motif B için validasyon hesaplamaları sonucu RMSD değeri 1.878 Å olan ligandın proteindeki konumu ile karşılaştırılması şekilde gösterildi. Validasyon sonucu elde edilen ligand ile referans ligandın karşılaştırılması sonucu tam çakışma görüldü. Bu sonuç yapılan validasyonun başarılı olduğu göstermektedir.

Motif G için için validasyon hesaplamaları sonucu RMSD değeri 1.252 Å olan ligandın proteindeki konumu ile karşılaştırılması şekilde gösterildi. Validasyon sonucu elde edilen ligand ile referans ligandın karşılaştırılması sonucu tam çakışma görüldü. Bu sonuç yapılan validasyonun başarılı olduğu göstermektedir.



Şekil 3.31 7D4F yapısının Motif B için validasyon sonucu elde edilen ligand ile referans ligandın çakıştırılması (**Turuncu molekül: Ligand Yeşil molekül: Yeniden kenetlenme**)



Şekil 3.32 Motif G için Validasyon sonucu elde edilen ligand ile referans ligandın çakıştırılması (**Kırmızı molekül: Ligand Sarı molekül: Yeniden kenetlenme**)

Autodock Vina ile yapılan yeniden kenetlenme çalışmasında bağlanma afinitesi **motif B** için $\Delta GB = -8.4 \text{ kcal/mol}$ değeri elde edilmiştir. Bu değer üzerinden deneysel K_i değeri hesaplanabilmektedir. $\Delta GB = R.T.\ln K_i$ (ΔGB = bağlanma enerjisi; $R= 1.986 \text{ cal/mol.K}$; $T= 298,15 \text{ K}$) Validasyonu yapılan 7D4F ligandının hesaplanan K_i değeri yukarıdaki formülden yararlanarak deneysel $K_i = 1.12 \text{ nM}$ olarak bulunmuştur. Referans makaleye göre deneysel K_i değeri ise **0.26 μM** dir.

Autodock Vina ile yapılan yeniden kenetlenme çalışmasında bağlanma afinitesi **motif G** için $\Delta GB = -8.7 \text{ kcal/mol}$ değeri elde edilmiştir. Bu değer üzerinden deneysel K_i değeri hesaplanabilmektedir. $\Delta GB = R.T.\ln K_i$ (ΔGB = bağlanma enerjisi; $R= 1.986 \text{ cal/mol.K}$; $T= 298,15 \text{ K}$) Validasyonu yapılan 7D4F ligandının hesaplanan K_i değeri yukarıdaki formülden yararlanarak: $K_i = 1.45 \text{ nM}$ olarak bulunmuştur. Referans makaleye göre deneysel K_i değeri ise **0.26 μM** dir.

3.2.4 Moleküler Kenetlenme Hesaplamaları

SARS-CoV-2 virüsü hedeflerinden RdRp enzimi için nükleotit yapısında olan 10 tane hedef için 7BV2 PDB koduna ait olan validasyon parametreleri ile moleküler kenetlenme işlemi yapılmıştır. Bunun yanı sıra nükleotit olmayan hedefler için 7D4F PDB kodlu protein ile aktif bölgede bulunan motif B bölgesindeki validasyon parametreleri dikkate alınarak Çizelge 3.2 de belirtilen yirmi dört adet flavonoid ve Suramin molekülü ile moleküler kenetlenme yapılmıştır. Nükleotit olmayan moleküller arasında yapılan hesaplamalar neticesinde elde edilen sonuçlara göre virüsün ikincil etkileşimler ile enzim arasında en iyi inhibisyon değerini gösteren ligand olan **Suramin** ligandı sanal ligand taraması için seçilmiştir.

3.2.5 Sanal Ligand Taraması

Moleküler kenetlenme hesaplaması sonucunda en iyi bağlanma enerjisi veren molekülün Suramin olduğu tespit edildi. Suramin molekülü PubChem veri tabanında benzerlik taraması yapıldı ve bu moleküllerden bir veri seti oluşturuldu. Veri setinin oluşturulduğu toplam 413 molekül çoklu moleküler kenetlenme işleminin yapılabilmesi için ligandlar hazırlandı. Aktif bölge içerisinde bulunan motif B bölgesinde validasyon sonucunda elde edilen parametreler moleküler kenetlenme işleminde kullanıldığı gibi

sanal ligand taramasında da kullanıldı. En yüksek bağlanma afinitesi elde edilen 20 ligand seçildi. En yüksek bağlanma afinitesinin ilaç adayı olarak görülmesi tek bir kriter olmadığından farmakokinetik çalışmaların yapılması için hesaplamalı ADME ve toksikoloji deneylerine tabi tutuldu.

3.2.6 ADME ve Toksikite Hesaplamaları

Sanal ligand taraması sonucunda elde edilen 20 potansiyel ilaç hedefi sadece bağlanma afinitesinin değerlendirme için yeterli olmaması üzerine farmakokinetik hesaplamaların yapılmasına karar verildi. Farmakokinetik çalışmalar emilim, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisite hesaplamalarını içerir. Bu hesaplamaların yapılabilmesi için pkCSM online programı kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre toksik olmayan molekül belirlenerek bu moleküllerin potansiyel ilaç hedefi olup olmadıkları değerlendirildi.

4. SONUÇLAR

4.1 Moleküler Kenetlenme Hesaplamaları

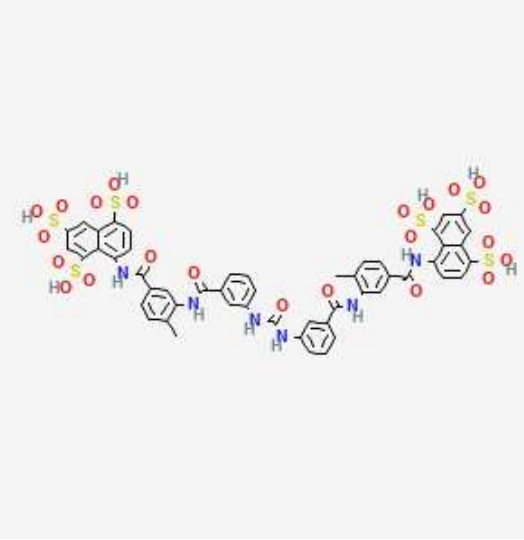
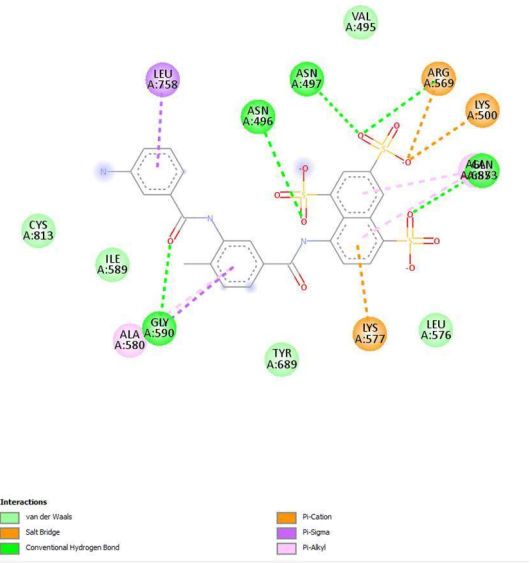
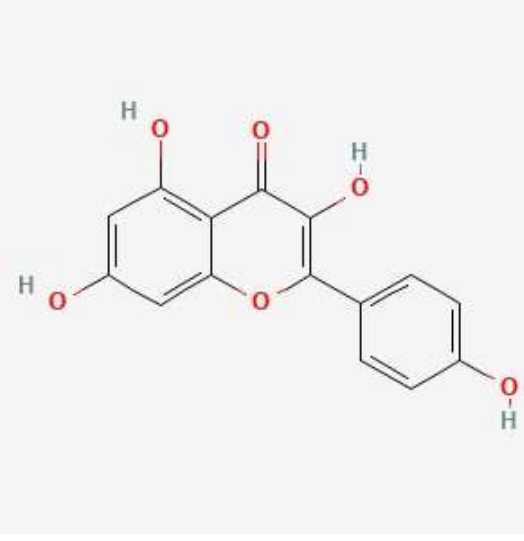
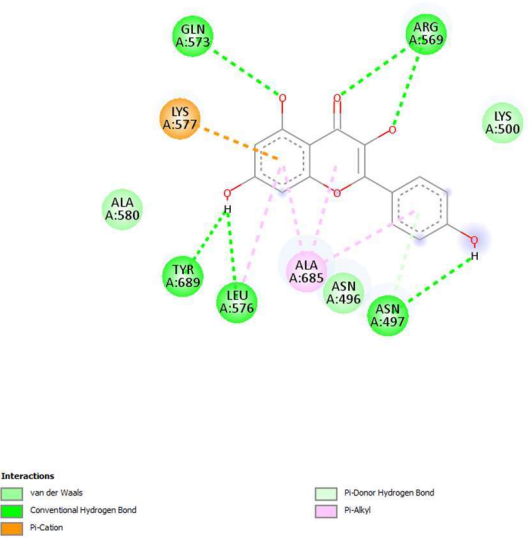
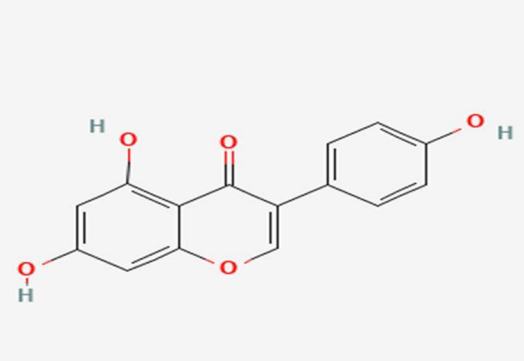
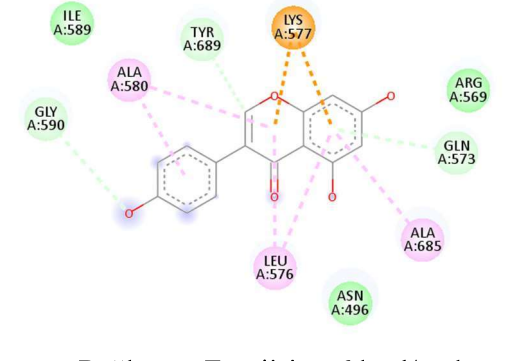
4.1.1 Nükleotit Olmayan Moleküller için Moleküler Kenetlenme Hesaplamaları

Moleküler kenetlenme için seçilen 7D4F PDB kodlu protein-ligand kompleksinin validasyon işlemi sonucunda RMSD değerinin 2Å'den düşük olduğu gözlemlendi. Bu gözlem sonucunda 7D4F PDB kodlu proteinin motif B bölümünün moleküler kenetlenme için uygundur. RdRp enzimi ile etkileşim gösteren Remdesivir ve Molnupiravir ilacı onay aldığından referans moleküller olarak tayin edildi. Bir protein yapısı ile birden fazla ligandın çoklu moleküler kenetlenme hesaplamasına olanak sağlayan Perl diliyle yazılmış olan DwimPerl scripti bu kenetlenme işinin gerçekleştirilmesinde kullanıldı. Elde edilen bağlanma afiniteleri referans moleküllerin bağlanma afiniteleri ile karşılaştırıldı. Moleküler kenetlenme işlemi biri Ebola virüs tedavisinde kullanılan suramin molekülü olmak üzere 24 tane belirlenen fitokimyasal ile toplam 25 molekül için yapıldı. Moleküler kenetlenme validasyonu sağlanan 7D4F PDB kodlu proteinin grid ve config dosyası ile yapıldı. Her ligand için üçer defa moleküler kenetlenme çalışması yapılarak tamamlandı.

Flavonoidler	Bağlanma Afinitesi (kcal/mol)	Hesapsal K _i (μM)	Deneysel K _i (μM)
Korilagin	-7.9	1.606	0.45
Hesperidin	-7.8	1.901	0.68
Baikalin	-7.7	2.251	1.25
Hiperisin	-7.7	2.251	0.8
Emetin	-7.4	3.737	0.18
Mikelyanin	-7.4	3.737	5.0
Isokuersetin	-7.3	4.424	0.34
Morin	-7.0	7.343	7.5
Kampferol	-7.0	7.343	0.825
Fisetin	-6.9	8.694	1.4
Hiperosit	-6.9	8.694	9.0
Likorin	-6.9	8.694	0.56
Kuersetin	-6.9	8.694	6.9
Mirisetin	-6.8	10.293	0.755
Kuersitrin	-6.8	10.293	0.66
Hernandezin	-6.7	12.187	0.485
Neferin	-6.7	12.187	0.925
Apigenin	-6.7	12.187	0.85
Luteolin	-6.6	14.429	4.6
Astilbin	-6.5	17.084	4.55
Siyanidanol	-6.5	17.084	6.8
Naringenin	-6.4	20.227	0.004
Baikalein	-6.4	20.227	20.0
Genistein	-6.0	39.747	1.5
Referans Moleküller			
Molnupiravir	-8,1	1.146	0.280
Remdesivir	-8,8	0.351	1.120
Suramin	-8.5	0.583	0.26

Çizelge 4.1 Nükleotit Olmayan Moleküllerin Kenetlenme Sonuçları

Yapılan moleküler kenetlenme sonucunda **Suramin** molekülünün bağlanma afinitesini (-8.5 kcal/mol) diğer fitokimyasallara göre yüksek çıktığı tespit edildi.

Ligand Adı	2 Boyutlu Etkileşimler ve Bağlanma Enerjisi Değeri
<p style="text-align: center;">Suramin</p> 	 <p style="text-align: center;">Bağlanma Enerjisi= -8.5 kcal/mol</p>
<p style="text-align: center;">Kaempferol</p> 	 <p style="text-align: center;">Bağlanma Enerjisi= -7 kcal/mol</p>
<p style="text-align: center;">Genistein</p> 	 <p style="text-align: center;">Bağlanma Enerjisi= -6 kcal/mol</p>

Çizelge 4.2 En iyi, orta ve en kötü bağlanma afinitesi veren nükleotit olmayan moleküllerin moleküler kenetlenme sonucu ve ligand-protein etkileşimleri

SARS-CoV-2 RdRp enzimi için geliştirilen ilaçlar ve moleküllerin genel amacı molekülün substrata kovalent bağlanarak etkinliğinin yitirmesini planlamaktır. Bu tezde asıl amaç nükleotit olmayan ve enzim yapısında aktif bölgede önemli görülen noktalardan biri olan motif B bölgesine ikincil etkileşimler ile bağlanan moleküller tasarlamaktır. Bu hedefe yönelik *in silico* çalışma yapmak önemlidir. SARS-CoV-2 için onay almış olan ilaçların Remdesivir enzim substratına kovalent bağlanmasının yaratmış olması veya Molnupiravir gibi ilaçların substrat yapısında mutasyon yaratmasının yanı sıra bu moleküllerin yapmış olduğu yan etki vermiş olduğu dezavantajların önlenmesi amacıyla RdRp enzim yüzeyi ile ikincil etkileşimler gerçekleştiren çalışmaların yapılması önem kazanmıştır. Suramin bu konuda motif B ile yapmış olduğu Asn-496 ve Asn-497 hidrojen bağları nedeniyle enzim yapısına bağlanma ihtimali olan Primer RNA'nın stabilizasyonu bozarak transkripsiyonu ve replikasyonu engellemektedir. Suramin molekülü Remdesivir'den daha az bağlanma enerjisine sahip olsa da RNA yapısına kovalent bağlanmamasından dolayı hedef sanal tarama için hedef molekül olarak seçilmiştir. Fitokimyasalların bağlanma afinitesi veren nükleotit yapısında olmayan moleküllerin moleküler kenetlenme sonuçları ve ligand-protein etkileşimleri EK.3'te verilmiştir.

4.1.2 Nükleotit Olan Moleküller için Moleküler Kenetlenme Hesaplamaları

SARS-CoV-2 tedavisinde ilk yapılan çalışmalar benzer yapıda olan virüslere etkiyen ilaçların yeniden amaçlandırılması üzerine oldu. Bu bağlamda RdRp inhibitörü olarak Remdesivir (Veklury) ve Molnupiravir (Lagevrio) ilaçları başta USFDA (Gıda ve İlaç İdaresi) başta olmak üzere ilaç konusunda söz sahibi olan onay kuruluşları tarafından bu ilaçlar SARS-CoV-2 tedavisi için onay almışlardır. Bunun dışında Çizelge 2.2'de belirtilen diğer ilaçlar da potansiyel olarak yüksek görülüp belirli aşamalarda klinik çalışmalar görmüşlerdir. Bu çalışmaların ışığında ilaç olarak potansiyeli en yüksek görülen 10 molekül moleküler kenetlenme çalışması için seçilmiştir. Moleküler kenetlenme çalışması için 7BV2 PDB kodlu proteinin motif F bölgesi seçilmiştir.

Yapılan moleküler kenetlenme çalışmalarında elde edilen sonuçlara göre Galidesivir molekülünün bağlanma afinitesi diğer moleküllerden daha yüksektir. Fakat Zaire Ebolavirüs ve Zika Virüsü tedavisinde kullanılan antiviral bir ilaç ve temel olarak etki mekanizması Remdesivir ile benzerlik göstermektedir. Bu mekanizmanın temel amacı adenozin analogu olan bu ilaçlar substrat olan RNA yapısına kovalent bağlanarak

transkripsiyonu ve replikasyonu önlemektir. Her bir ilaç 3 tekrar ile yapılan moleküler kenetlenme sonuçları Çizelge 4.5'te ve bu sonuçlar verilmiştir.

No	Nükleotit Yapıda Olan İlaçlar	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)	Teorik K _i (nM)	DeneySEL K _i (nM)
1	Galidesivir	-9.5	0.108	0.75
2	Favipiravir	-8.9	0.297	1.28
3	Ribavirin	-8.6	0.492	1.09
4	Tenofovir	-8.2	0.968	0.43
5	Sofosbuvir	-8.1	1.146	0.5
6	GS-621763	-7.8	1.901	0.35
7	Deuremidevir	-7.7	2.251	0.29
8	Azvudine	-7.3	4.424	8.694
9	GS-441524	-6.9	8.694	0.17
10 11	Referans Ligandlar			
	Molnupiravir Remdesivir	-8,1 -8,8	1145,67 351,2731	280 1120

Çizelge 4.3 Nükleotit Olan Moleküllerin 7BV2 kodlu RDRP hedefi ile Kenetlenme Sonuçları

Referans moleküllerin aksine en iyi bağlanma afinitesi değerini Galidesivir molekülü vermiştir. Validasyon çalışması esnasında yeniden kenetlenme ligandı ile saflaştırılan ligand arasındaki kenetlenme en iyi 1. Konformasyonda verildiği için bu konformasyonda bulunan bağlanma afinite değerleri alınmıştır. SARS-CoV-2 virüsünde kalıtsal materyalin transkripsiyonu ve replikasyonunda görev alan RdRp enziminin inhibisyonu için geliştirilen ilaç adayları Suramin molekülü olarak belirlenmiştir. Bu molekül ile yapılacak sanal ligand taraması tasarımının gerçekleşmesinde büyük rol oynamaktadır.

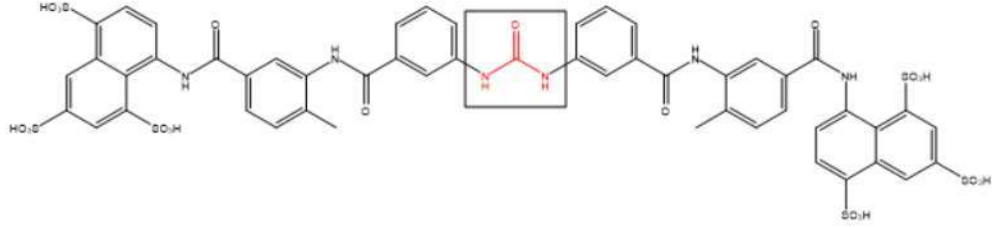
4.1.3 Sanal Ligand Taraması

PubChem veri tabanı ile yapılan sanal ligand taraması sonucunda Suramin molekülüne benzer 413 molekül bulunmaktadır. SARS-CoV-2 RdRp enzimine ait olan 7D4F protein-ligand kompleksi ile en iyi sonucu elde ettiğimiz Suramin molekülü benzeri moleküller içerisinde en iyi bağlanma afinitesine sahip 20 molekül Çizelge 4.6’da yer almaktadır.

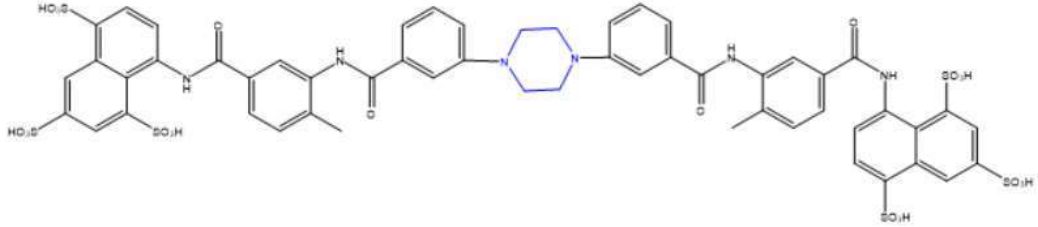
No	PubChem Bileşik Kodu	Bağlanma Afinitesi (kcal/mol)
1.	10329067	-12,1
2.	100964010	-11,7
3.	16151843	-11,6
4.	133588152	-11,6
5.	16139209	-11,4
6.	11788083	-11,3
7.	158942684	-11,2
8.	158879506	-11,1
9.	155522677	-11
10.	158589534	-11
11.	135215193	-10,9
12.	12094697	-10,9
13.	157734168	-10,8
14.	117864514	-10,8
15.	11216794	-10,8
16.	158879507	-10,8
17.	10080005	-10,7
18.	16163320	-10,6
19.	10103003	-10,6
20.	101835662	-10,6
Referans Ligand	Suramin	-8.5

Çizelge 4.4 Sanal ligand taraması ile elde edilen Suramin-benzeri en iyi sonuç gösteren 20 molekül

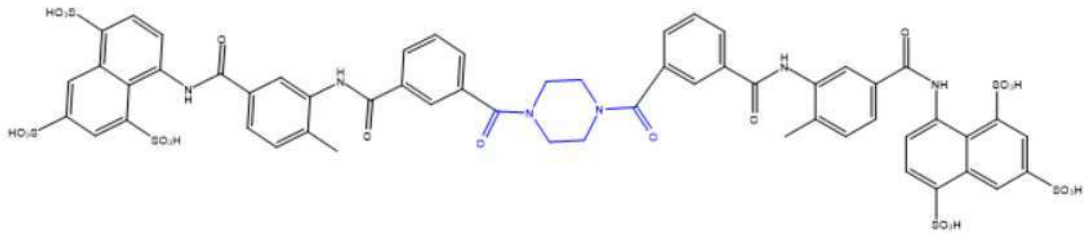
Şekil 4.1' de sanal ligand taraması yöntemi ile en etkili bulunan ilk 5 bileşik verilmiştir. En etkili molekül(PubChem ID: 10329067)'de **Süramin** molekülündeki üre yapısı yerine pirazin halkası bulunmaktadır.



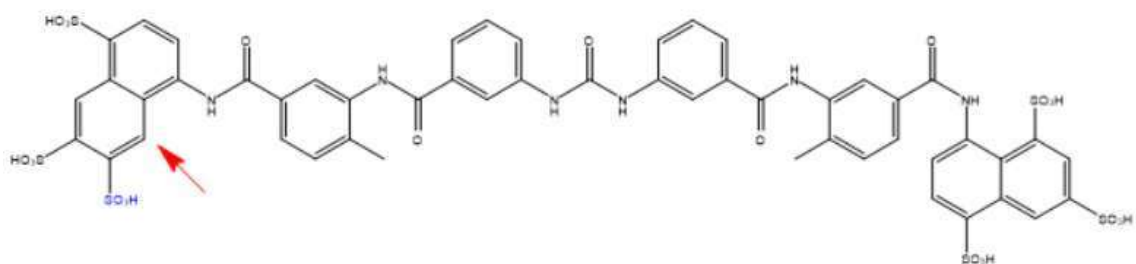
Suramin



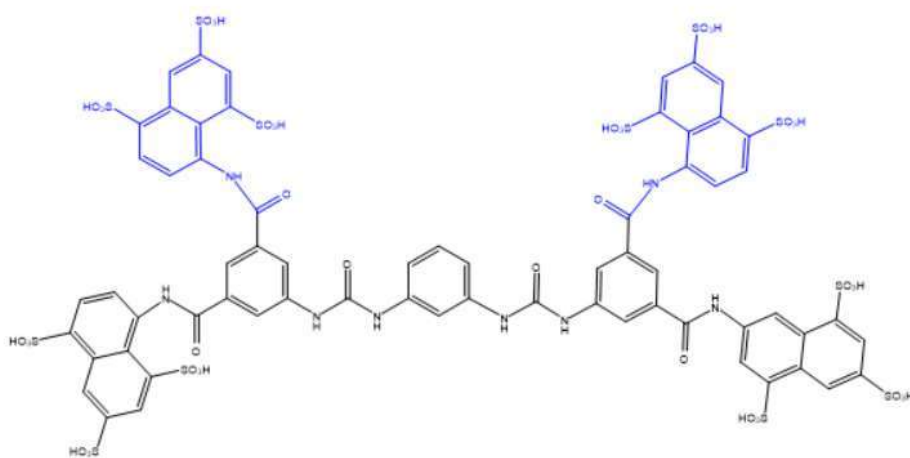
PubChem ID: 10329067



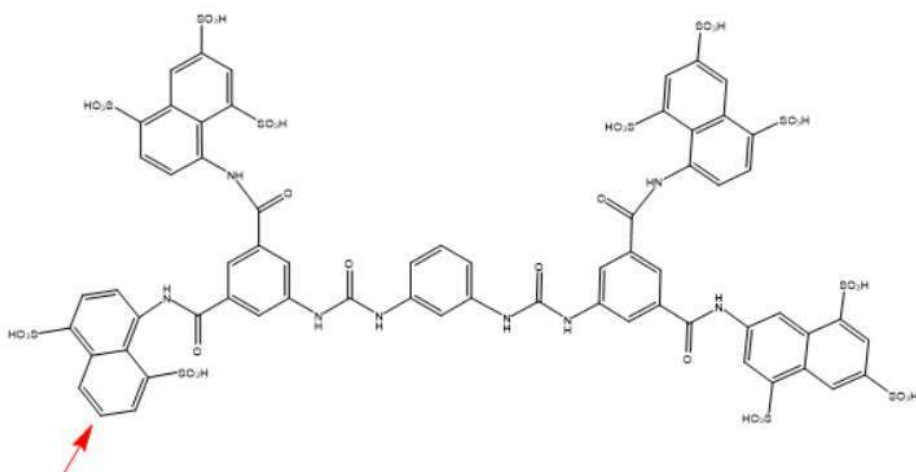
PubChem CID: 100964010



PubChem CID:133588152



PubChem CID:16851843



PubChem CID:16139209

Şekil 4.1. RdRp enzim inhibitörü Sanal ligand taraması sonucu bağlanma afinitesine göre en yüksek 5 molekül ve Suramin Molekülü (Kırmızı Renkli Gruplar: Çıkarılan Gruplar, Mavi Renkli Gruplar: Eklenen Gruplar)

SARS-CoV-2 virüsünün hedeflerinden olan RdRp enzimi aktif bölgesi içerisinde birden fazla görevi olan bölgeler bulundurulur. Bu bölgeler temel özelliklerine göre enzimi ve substratı inhibe edebilecek potansiyel hedeflerdir. Bu bölgelerden motif B bölgesi enzimin yapısına bağlanacak olan RNA substratının stabilizasyonu için görevlidir. Bu bölge enzim yapısında kovalent bağlanmanın gerçekleşmeyeceği inhibe edebilecek potansiyel hedefler için uygun olduğu düşünülmektedir. Suramin molekülü moleküler kenetlenme ile hesaplandı. Moleküler kenetlenme hesaplaması için gerekli parametreler 7D4F PDB kodlu proteinin validasyonunda elde edilen parametrelerdir. Yapılan hesaplama sonucunda PubChem veri tabanında sanal ligand taraması yapılmıştır. Yapılan sanal ligand taraması sonucunda 413 molekül bulunan bir veri tabanı oluşturulup çoklu moleküler kenetlenmeye tabi tutulmuştur. Çoklu yapılan moleküler kenetlenme sonucunda en yüksek afinite değerine sahip 20 molekül tespit edilmiştir. Bu moleküllerin SARS-CoV-2 tedavisi amacıyla potansiyel ilaç hedefleri olduğu düşünülmektedir. Ancak bağlanma afinitesi bu ilaçların potansiyel ilaç hedefleri olarak düşünülmesi için yeterli değildir. Bu moleküllere ADME ve toksisite hesaplamaları çalışmaları da yapılarak bu tasarımdaki moleküllerin potansiyel ilaç hedefi olarak doğrulanması için önemlidir.

4.1.4 ADME ve Toksisite Sonuçları

Bir molekülün potansiyel ilaç hedefi olması için protein-ligand etkileşimi yeterli değildir. ADME ve toksisite, potansiyel ilaç hedefinin insan vücudunda yapmış olduğu emilim, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisiteyi tanımlamaktadır. ADME ve toksisite hesaplamaları bir molekülün potansiyel ilaç adayı olup olmadığını doğrulamak için sunulan metotlardandır.

Potansiyel ilaç adaylarının bu hesaplamalar sonucunda büyük kısmı toksisite tarafından elenmektedir. İlaç hedefi olarak görülen moleküllerin vücuda alınmasıyla beraber vücutta toksik etkiler yaratmaması gerekmektedir. ADME ve toksisite için yapılan hesaplar için genellikle internette online olarak kullanılan araçlar mevcuttur. Bu araçlardan pkCSM büyük yapılı moleküllerde daha kullanışlı olmasından dolayı seçildi. Bu araçlar ücretsiz olup ADME ve toksisite hesaplaması için moleküle ait olan Basitleştirilmiş Moleküler Giriş Hattı Giriş Sistemi (SMILES) adı verilen her moleküle özgü olan bir kodun girilmesi veya molekülün 2 boyutlu olarak

Çizilmesi ile girdiler oluşturulur. Yapılan hesaplamalar sonucunda bir molekülün potansiyel ilaç hedefi olup olmaması belirlenir.

Hesaplamalı *in vitro* çalışması, protein-ligand etkileşimi en iyi moleküler kenetlenme sonucu elde edilen Suramin molekülünün PubChem veri tabanında benzeri bulunan 413 molekülük veri setinin sanal ligand taraması sonucunda elde edilen en iyi bağlanma afinitesi elde edilen 20 molekülü üzerine gerçekleştirildi. Bu moleküller Çizelge 4.6'da belirtilmiştir. ADME, toksikoloji ve moleküllerin bazı fizikokimyasal özellikleri pkCSM online web aracı ile yapılmıştır. Bu moleküllerin hesaplama sonuçları Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8 de verilmiştir.

4.1.4.1 24 Flavonoidlerin ADME ve Toksikoloji Sonuçları

Moleküler kenetlenme sonucunda sanal ligand taraması yapılmayan 24 tane flavonoid vardır. Bu flavonoidler sanal ligand taramasında elde edilen Suramin benzeri 20 molekül gibi potansiyel ilaç hedefi olarak görülmektedir. Flavonoidlerin genel olarak emilim değerlerinin yüksek olduğu görülmüştür. VD_{ss} değerlerinin referans moleküllere göre yüksek oldukları görülmektedir. Bı durum flavonoidlerin plazmadan ziyade dokularda dağıldığını göstermektedir. Seçilen flavonoidler genel olarak karaciğer enzimleri ile etkileştiğinde metabolize olmamaktadır. Vücuttan atılımlarının kolay olduğu görülmüştür. Toksisite sonuçları içerisinde önemli sonuçlardan biri olan AMES toksisitesi Hernandezin ve Likorin flavonoidi dışında hepsi bu testten geçmiştir.

PubChem Molekül Kodu	Sudaki Çözünürlük (log.mol/L)	Caco2 Geçirgenliği (log Papp in 10 ⁻⁶ cm/s)	Bağırsak Emilimi (% Absorbed)	Deri Geçirgenliği (log Kp)	P- Glikoprotein Substratı (Evet/Hayır)	P- Glikoprotein I İnhibitörü (Evet/Hayır)	P- Glikoprotein II İnhibitörü (Evet/Hayır)
Korilagin	-2.892	-1.337	58.509	-2.735	Evet	Evet	Evet
Hesperidin	-3.014	0.505	31.481	-2.735	Evet	Hayır	Hayır
Baikalin	-2.764	-0.67	26.224	-2.735	Evet	Hayır	Hayır
Hiperisin	-2.892	-0.594	100	-2.735	Evet	Evet	Evet
Emetin	-3.666	0.751	91.032	-2.798	Evet	Evet	Evet
Mikelyanin	-2.897	-1.061	25.112	-2.735	Evet	Hayır	Hayır
Isokuersetin	-2.925	0.242	47.999	-2.735	Evet	Hayır	Hayır
Morin	-2.978	-0.294	75.408	-2.735	Evet	Hayır	Hayır
Kampferol	-3.04	0.032	74.29	-2.735	Evet	Hayır	Hayır
Fisetin	-3.181	0.058	83.752	-2.735	Evet	Hayır	Hayır
Hipersit	-2.925	0.242	47.999	-2.735	Evet	Hayır	Hayır
Likorin	-3.193	0.551	83.639	*3.165	Evet	Hayır	Hayır
Kuersetin	-2.925	-0.229	77.207	-2.735	Evet	Hayır	Hayır
Mirisetin	-2.915	0.095	65.93	-2.735	Evet	Hayır	Hayır
Kuersitrin	-2.903	0.048	52.709	-2.735	Evet	Hayır	Hayır
Hernandezin	-4.086	0.491	94.557	-2.735	Evet	Evet	Evet
Apigenin	-3.329	1.007	93.25	-2.735	Evet	Hayır	Hayır
Luteolin	-3.094	0.096	81.13	-2.735	Evet	Hayır	Hayır
Astilbin	-3.03	0.343	49.005	-2.735	Evet	Hayır	Hayır
Siyanidanol	-3.117	-0.283	68.829	-2.735	Evet	Hayır	Hayır
Naringenin	-3.224	1.029	91.31	-2.742	Evet	Hayır	Hayır
Baikalein	-3.302	1.117	94.268	-2.735	Evet	Hayır	Hayır
Genistein	-3.595	0.9	93.387	-2.735	Evet	Hayır	Hayır
Referans Moleküller							
Suramin	-2.892	3.531	0	-2.735	Hayır	Hayır	Hayır
Remdesivir	-3.07	0.635	71.109	-2.735	Evet	Evet	Hayır
Molnupiravir	-2.162	0.531	53.464	-2.735	Hayır	Hayır	Hayır

Çizelge 4.5 Fitokimyasalların ADMet hesaplamalarında elde ettiği Emilim Sonuçlar

PubChem Kodu	Molekül	Kararlı Durum Dağılım Hacmi (VDss) (insan), (Fu)	BBB Geçirgenliği (log BB)	Çevresel Sinir Sistemi Geçirgenliği (log PS)
	Korilagin	0.462	-2.828	-5.044
	Hesperidin	0.996	-1.715	-4.807
	Baikalin	0.267	-1.331	-3.811
	Hiperisin	-0.734	-1.561	-3.443
	Emetin	1.596	-0.394	-2.067
	Mikelyanin	1.647	-1.614	-4.139
	Isokuersetin	1.846	-1.688	-4.093
	Morin	1.229	-1.18	-3.389
	Kampferol	1.274	-0.939	-2.228
	Fisetin	0.718	-1.039	-2.282
	Hiperosit	1.846	-1.688	-4.093
	Likorin	0.73	-0.131	-2.57
	Kuersetin	1.559	-1.098	-3.065
	Mirisetin	1.317	-1.493	-3.709
	Kuersitrin	1.517	-1.495	-4.156
	Hernandezin	-0.183	-0.268	-2.327
	Apigenin	0.822	-0.734	-2.061
	Luteolin	1.153	-0.907	-2.251
	Astilbin	1.592	-1.199	-4.165
	Siyanidanol	1.027	-1.054	-3.298
	Naringenin	-0.015	-0.578	-2.215
	Baikalein	-0.004	-1.061	-2.21
	Genistein	0.094	-0.71	-2.048
Referans Moleküller				
	Suramin	-0.017	-3.905	-5.037
	Remdesivir	0.307	-2.056	-4.675
	Molnupiravir	0.581	-1.057	-3.761

Çizelge 4.6 Fitokimyasalların ADMET hesaplamalarında elde ettiği Dağılım Sonuçları

PubChem Molekül Kodu	CYP2D6 Substrat (Evet/Hayır)	CYP3A4 Substrat (Evet/Hayır)	CYP1A2 Substrat (Evet/Hayır)	CYP2C19 İnhibitör (Evet/Hayır)	CYP2C9 İnhibitör (Evet/Hayır)	CYP2D6 İnhibitör (Evet/Hayır)	CYP3A4 İnhibitör (Evet/Hayır)
Korilagin	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
Hesperidin	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
Baikalin	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
Hiperisin	Hayır	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
Emetin	Evet	Evet	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Hayır
Mikelyanin	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
Isokuersetin	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
Morin	Hayır	Hayır	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
Kampferol	Hayır	Hayır	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
Fisetin	Hayır	Evet	Evet	Hayır	Evet	Hayır	Hayır
Hiperosit	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
Likorin	Hayır	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
Kuersetin	Hayır	Hayır	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
Mirisetin	Hayır	Hayır	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
Kuersitrin	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
Hernandezin	Hayır	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
Apigenin	Hayır	Hayır	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
Luteolin	Hayır	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Hayır	Hayır
Astilbin	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
Siyanidanol	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
Naringenin	Hayır	Hayır	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
Baikalein	Hayır	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Hayır	Hayır
Genistein	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Evet	Hayır	Hayır
Referans Moleküller							
Suramin	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
Remdesivir	Hayır	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
Molnupiravir	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır

Çizelge 4.7 Fitokimyasalların ADMET hesaplamalarında elde ettiği Metabolizma Sonuçları

PubChem Molekül Kodu	Toplam Boşluk (Log ml/min/kg)	Böbrek OCT2 Substratı (Evet/Hayır)
Korilagin	0.229	Evet
Hesperidin	0.211	Hayır
Baikalin	0.04	Hayır
Hiperisin	0.004	Hayır
Emetin	0.993	Hayır
Mikelyanin	0.434	Hayır
Isokuersetin	0.394	Hayır
Morin	0.486	Hayır
Kampferol	0.477	Hayır
Fisetin	0.421	Hayır
Hiperosit	0.394	Hayır
Likorin	1.044	Hayır
Kuersetin	0.407	Hayır
Mirisetin	0.422	Hayır
Kuersitrin	0.364	Hayır
Hernandezin	0.668	Hayır
Neferin	1.01	Hayır
Apigenin	0.566	Hayır
Luteolin	0.495	Hayır
Astilbin	-0.284	Hayır
Siyanidanol	-3.963	Hayır
Naringenin	0.183	Hayır
Baikalein	0.252	Hayır
Genistein	0.151	Hayır
Referans Moleküller		
Suramin	-4.274	Hayır
Remdesivir	0.198	Hayır
Molnupiravir	0.203	Hayır

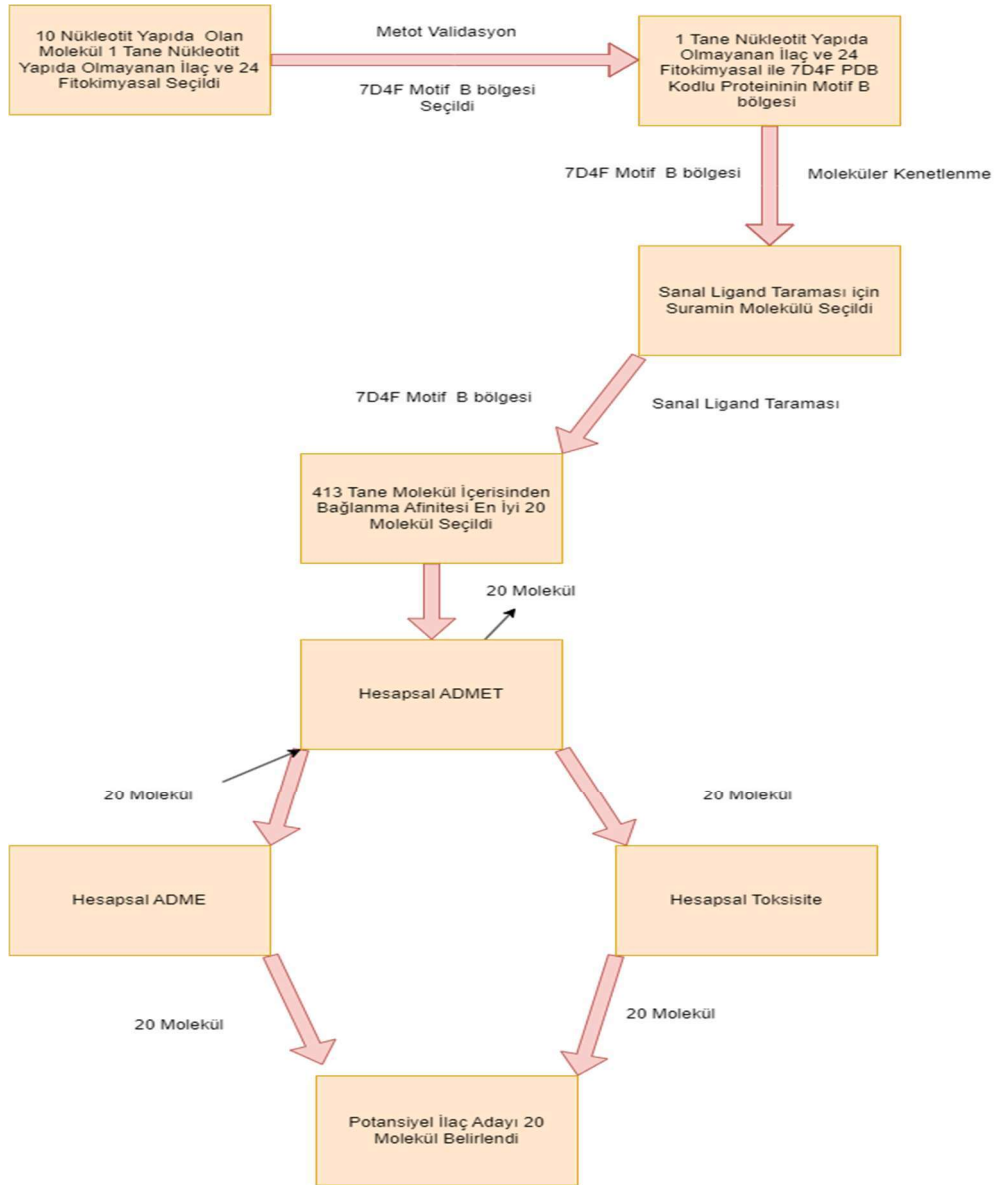
Çizelge 4.8 Fitokimyasalların ADMET hesaplamalarında elde ettiği Atılım Sonuçları

PubChem Molekül Kodu	AMES Toksikitesi (Evet/Hayır)	Maks.Tolere Doz (insan) (log mg/kg/day)	Oral Fare Akut Toksikite (LD50) (mol/kg)	hERG I-II inhibitör (Evet/Hayır)	Oral Fare Kronik Toksikite (LOAEL) (log mg/kg_bw/day)
Korilagin	Hayır	0.438	2.482	Hayır-Hayır	6.333
Hesperidin	Hayır	0.525	2.482	Hayır-Evet	3.167
Baikalin	Hayır	0.652	2.482	Hayır- Hayır	4.536
Hiperisin	Hayır	0.438	2.482	Hayır-Evet	2.421
Emetin	Hayır	-0.019	2.793	Hayır-Evet	0.674
Mikelyanin	Hayır	0.434	2.497	Hayır-Hayır	4.51
Isokuersetin	Hayır	0.569	2.541	Hayır-Evet	4.417
Morin	Hayır	0.537	2.413	Hayır-Evet	2.448
Kampferol	Hayır	0.531	2.449	Hayır- Hayır	2.505
Fisetin	Hayır	0.579	2.465	Hayır- Hayır	1.921
Hiperosit	Hayır	0.569	2.541	Hayır-Evet	4.417
Likorin	Evet	-0.012	2.545	Hayır-Hayır	0.912
Kuersetin	Hayır	0.499	2.471	Hayır-Hayır	2.612
Mirisetin	Hayır	0.51	2.497	Hayır-Hayır	2.718
Kuersitrin	Hayır	0.495	2.586	Hayır-Evet	3.022
Hernandezin	Evet	0.159	2.527	Hayır-Evet	1.437
Neferin	Hayır	0.278	2.36	Hayır-Evet	2.214
Apigenin	Hayır	0.328	2.45	Hayır-Evet	2.298
Luteolin	Hayır	0.499	2.455	Hayır-Evet	2.409
Astilbin	Hayır	0.448	2.589	Hayır-Hayır	3.354
Syanidanol	Hayır	0.438	2.428	Hayır-Hayır	2.5
Naringenin	Hayır	-0.176	1.791	Hayır-Hayır	1.944
Baikalein	Hayır	0.498	2.325	Hayır-Hayır	2.645
Genistein	Hayır	0.478	2.268	Hayır-Hayır	2.189
Referans Moleküller					
Suramin	Hayır	0.438	2.482	Hayır-Hayır	7.327
Remdesivir	Hayır	0.15	2.043	Hayır-Evet	1.639
Molnupiravir	Hayır	0.28	2.158	Hayır-Hayır	2.832

Çizelge 4.9 Fitokimyasalların ADMET hesaplamalarında elde ettiği Toksikite Sonuçları

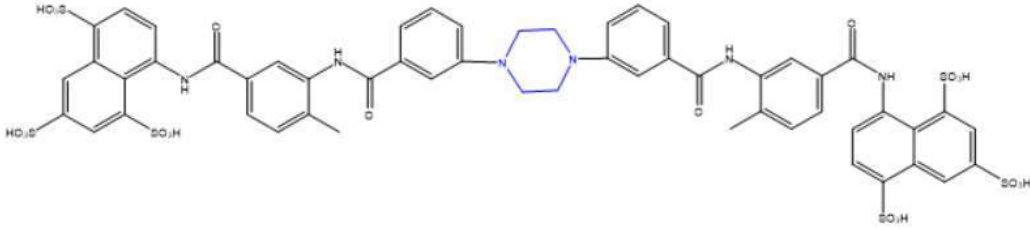
4.1.4.2 Sanal Ligand Taramasındaki En İyi Aktif 20 Bileşik için ADME ve Toksikoloji Hesaplamaları

Sanal ligand taraması sonucunda bağlanma afinitesi en yüksek olan 20 molekül için ADMET çalışması yapıldı. ADMET çalışması sonucunda en önemli parametrelerden biri olan AMES toksisitesi göstermeyen 20 molekül olduğu belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre; çalışma dahilinde seçilen 20 molekül Caco-2 geçirgenliğine sahiptir. Moleküllerin bağırsak emilimlerinin düşük olduğu gözlemlenmiştir.

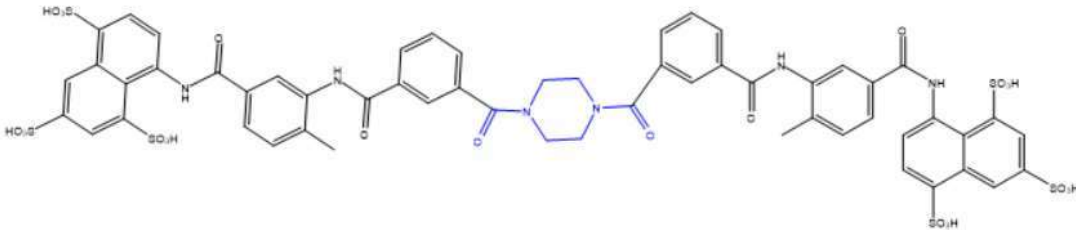


Şekil 4.2 Tez Çalışması Sonucunu İçeren Diyagram

10080005, 133588152, 100964010, 10329067, 133588152 ,100964010, 10329067, 012094697, 012094697 PubChem kodlu moleküllerin VDss değerinin düşük olduğu tespit edilmiştir. VDss değeri ne kadar artarsa ilacın plazma yerine doku içerisinde dağılma olasılığı o kadar artmaktadır. Potansiyel ilaç hedeflerinin hepsi maksimum tolere edilen doz miktarı 0.438 log mg/kg/gün olarak hesaplanmıştır. Bu değer düşük kabul edilmektedir. ADMET çalışması içerisinde en önemli testlerden biri AMES toksisite testidir. Potansiyel ilaç hedefi olan 20 molekül bu testi geçmiştir. AMES testi bir molekülün mutajenik olup olmadığını belirler. Mutajenik bileşikler, DNA'ya zarar vererek kanserojen olabilir. Bu 20 molekül içerisinde ilk 2 molekül PubChem CID'leri sırasıyla 10329067 ve 100965010 ADME ve toksisite testlerinde elde ettikleri emilim, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisite değerleri ile potansiyel olarak yüksek bir ilaç adayı olma eğilimi göstermişlerdir.



PubChem ID: 10329067



PubChem CID: 100964010

Şekil 4.3 ADME ve toksisite çalışması sonucunda ilaç adayı olma potansiyeli yüksek olan moleküller

PubChem Molekül Kodu	Sudaki Çözünürlük (log.mol/L)	Caco2 Geçirgenliği (log Papp in 10⁻⁶ cm/s)	Bağırsak Emilimi (% Absorbed)	Deri Geçirgenliği (log Kp)	P- Glikoprotein Substratı (Evet/Hayır)	P- Glikoprotein I İnhibitörü (Evet/Hayır)	P- Glikoprotein II İnhibitörü (Evet/Hayır)
1613320	-2.892	3.732	0	-2.735	Hayır	Hayır	Hayır
10103003	-2.892	3.337	0	-2.735	Hayır	Hayır	Hayır
101835662	-2.892	2.729	0	-2.735	Hayır	Hayır	Hayır
10080005	-2.892	2.789	0	-2.735	Hayır	Hayır	Hayır
158879507	-2.892	3.43	0	-2.735	Hayır	Hayır	Hayır
157734168	-2.892	3.565	0	-2.735	Hayır	Hayır	Hayır
117864514	-2.892	3.515	0	-2.735	Hayır	Hayır	Hayır
11216794	-2.892	3.051	0	-2.735	Hayır	Hayır	Hayır
135215193	-2.892	2.626	3.353	-2.735	Hayır	Hayır	Hayır
012094697	-2.892	1.372	55.692	-2.735	Hayır	Hayır	Hayır
155522677	-2.892	4.148	0	-2.735	Hayır	Hayır	Hayır
158589534	-2.892	2.171	4.745	-2.735	Hayır	Hayır	Hayır
158879506	-2.892	2574	0	-2.735	Hayır	Hayır	Hayır
158942684	-2.892	2.646	0	-2.735	Hayır	Hayır	Hayır
11788083	-2.892	2.533	0	-2.735	Hayır	Hayır	Hayır
16139209	-2.892	5.524	0	-2.735	Hayır	Hayır	Hayır
16151843	-2.892	5.916	0	-2.735	Hayır	Hayır	Hayır
133588152	-2.892	2.884	0	-2.735	Hayır	Hayır	Hayır
100964010	-2.892	3.462	0	-2.735	Hayır	Hayır	Hayır
10329067	-2.892	2.736	0	-2.735	Hayır	Hayır	Hayır
Referans Moleküller							
Suramin	-2.892	3.531	0	-2.735	Hayır	Hayır	Hayır
Remdesivir	-3.07	0.635	71.109	-2.735	Evet	Evet	Hayır
Molnupiravir	-2.162	0.531	53.464	-2.735	Hayır	Hayır	Hayır

Çizelge 4.10 Potansiyel İlaç Hedeflerinin ADMET hesaplamalarında elde ettiği Emilim Sonuçlar

PubChem Molekül Kodu	Kararlı Durum Dağılım Hacmi (VDss) (insan), (Fu)	BBB Geçirgenliği (log BB)	Çevresel Sinir Sistemi Geçirgenliği (log PS)
1613320	0.005	-3.906	-4.722
10103003	0.376	-3.997	-4.98
101835662	0.004	-3.346	-4.899
10080005	-0.002	-3.887	-4.962
158879507	-0.011	-3.866	-5.045
157734168	-0.026	-3.92	-4.736
117864514	-0.026	-3.91	-4.848
11216794	-0.008	0.379	-5.036
135215193	0.001	-3.199	-3.93
012094697	-1.692	-1.086	2.991
155522677	0.009	-4.808	-5.991
158589534	-0.209	-2.281	-3.487
158879506	0.006	-3.797	-4.784
158942684	0.003	-3.343	-4.687
11788083	0	-3.093	-4.009
16139209	0.011	-6.435	-7.234
16151843	0.011	-6.924	-7.518
133588152	-0.001	-3.941	-5.129
100964010	-0.015	-4.088	-5.254
10329067	-0.003	-3.753	-4.988
Referans Moleküller			
Suramin	-0.017	-3.905	-5.037
Remdesivir	0.307	-2.056	-4.675
Molnupiravir	0.581	-1.057	-3.761

Çizelge 4.11 Potansiyel İlaç Hedeflerinin ADMET hesaplamalarında elde ettiği Dağılım Sonuçları

PubChem Molekül Kodu	CYP2D6 Substrat (Evet/Hayır)	CYP3A4 Substrat (Evet/Hayır)	CYP1A2 Substrat (Evet/Hayır)	CYP2C19 İnhibitör (Evet/Hayır)	CYP2C9 İnhibitör (Evet/Hayır)	CYP2D6 İnhibitör (Evet/Hayır)	CYP3A4 İnhibitör (Evet/Hayır)
1613320	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
10103003	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
101835662	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
10080005	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
158879507	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
157734168	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
117864514	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
11216794	Hayır	Hayır	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
135215193	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
012094697	Hayır	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
155522677	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
158589534	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
158879506	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
158942684	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
11788083	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
16139209	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
16151843	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
133588152	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
100964010	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
10329067	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
Referans Moleküller							
Suramin	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
Remdesivir	Hayır	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
Molnupiravir	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır

Çizelge 4.12 Potansiyel İlaç Hedeflerinin ADMET hesaplamalarında elde ettiği Metabolizma Sonuçları

PubChem Molekül Kodu	Toplam Boşluk (Log ml/min/kg)	Böbrek OCT2 Substratı (Evet/Hayır)
1613320	-2.038	Hayır
10103003	-2.152	Hayır
101835662	-0.934	Hayır
10080005	-2.996	Hayır
158879507	-4.116	Hayır
157734168	-4.236	Hayır
117864514	-1.944	Hayır
11216794	-0.11	Hayır
135215193	-1.652	Hayır
012094697	-0.399	Hayır
155522677	-5.035	Hayır
158589534	-0.837	Hayır
158879506	-3.047	Hayır
158942684	-3.625	Hayır
11788083	-1.64	Hayır
16139209	-7.705	Hayır
16151843	-7.409	Hayır
133588152	-4.233	Hayır
100964010	-4.694	Hayır
10329067	-3.963	Hayır
Referans Moleküller		
Suramin	-4.274	Hayır
Remdesivir	0.198	Hayır
Molnupiravir	0.203	Hayır

Çizelge 4.13 Potansiyel İlaç Hedeflerinin ADMET hesaplamalarında elde ettiği Atılım Sonuçları

PubChem Molekül Kodu	AMES Toksikitesi (Evet/Hayır)	Maks.Tolere Doz (insan) (log mg/kg/day)	Oral Fare Akut Toksikite (LD50) (mol/kg)	hERG I-II inhibitör (Evet/Hayır)	Oral Fare Kronik Toksikite (LOAEL) (log mg/kg_bw/day)
1613320	Hayır	0.438	2.482	Hayır-Evet	8.606
10103003	Hayır	0.438	2.482	Hayır-Evet	7.216
101835662	Hayır	0.438	2.482	Hayır- Hayır	5.355
10080005	Hayır	0.438	2.482	Hayır-Evet	5.643
158879507	Hayır	0.438	2.482	Hayır-Evet	7.642
157734168	Hayır	0.438	2.482	Hayır-Evet	7.122
117864514	Hayır	0.438	2.482	Hayır-Evet	5.383
11216794	Hayır	0.438	2.482	Hayır-Evet	5.963
135215193	Hayır	0.438	2.482	Hayır- Hayır	5.283
012094697	Hayır	0.453	2.473	Hayır- Hayır	2.522
155522677	Hayır	0.438	2.482	Hayır-Evet	9.186
158589534	Hayır	0.438	2.482	Hayır-Hayır	3.944
158879506	Hayır	0.438	2.482	Hayır-Hayır	4.83
158942684	Hayır	0.438	2.482	Hayır-Hayır	6.267
11788083	Hayır	0.438	2.482	Hayır-Evet	5.189
16139209	Hayır	0.438	2.482	Hayır-Evet	13.771
16151843	Hayır	0.438	2.482	Hayır-Evet	14.758
133588152	Hayır	0.438	2.482	Hayır-Evet	9.29
100964010	Hayır	0.438	2.482	Hayır-Evet	9.249
10329067	Hayır	0.438	2.482	Hayır-Hayır	6.478
Referans Moleküller					
Suramin	Hayır	0.438	2.482	Hayır-Hayır	7.327
Remdesivir	Hayır	0.15	2.043	Hayır-Evet	1.639
Molnupiravir	Hayır	0.28	2.158	Hayır-Hayır	2.832

Çizelge 4.14 Potansiyel İlaç Hedeflerinin ADMET hesaplamalarında elde ettiği Toksikite Sonuçları

PubChem Molekül Kodu	Yağda çözünürlük LogP	Dönebilen Bağlar	H-Bağı Alıcıları	H-Bağı Donörleri
1613320	9.4604	18	17	12
10103003	6.1264	16	17	12
101835662	1.9778	10	14	8
10080005	4.2386	12	15	10
158879507	6.9163	17	17	11
157734168	7.5737	17	17	12
117864514	7.0472	17	17	12
11216794	1.56	10	15	6
135215193	8.5582	14	13	10
012094697	6.6670	8	7	6
155522677	5.2366	18	21	14
158589534	6.1901	9	9	7
158879506	5.2033	17	22	6
158942684	7.2068	17	15	9
11788083	7.633	14	13	10
16139209	4.6663	21	27	17
16151843	3.913	22	29	18
133588152	6.7432	16	17	12
100964010	6.4808	16	18	12
10329067	6.4258	16	18	10
Referans Moleküller				
Suramin	6.7433	16	17	12
Remdesivir	2.3121	13	13	4
Molnupiravir	-1.1372	5	10	4

Çizelge 4.15 Potansiyel İlaç Hedeflerinin ADMET hesaplamalarında elde ettiği Fizikokimyasal Sonuçlar

5. YORUMLAR

SARS-CoV-2 virüsünün hedeflerinden olan RdRp enzimi aktif bölgesine etki eden çeşitli ülkelerin kurullarından yeniden amaçlandırılmış antiviral ilaçlar olan Remdesivir (Veklury) ve Molnupiravir (Lagevrio) enzimin aktif bölgesine bağlanan RNA substratına kovalent bağlanırlar. Bunun yanı sıra insan vücudu üzerinde olası yan etkilere sahiptirler. Bunlar genel olarak karaciğer enzimlerinde anormal artışlar, mide bulantısı, baş ağrısı, kusma, ishal, karın ağrısı kalp ritminde bozukluklar, pankreatit, ciddi alerjik reaksiyonlar ve teratojenik potansiyel gibi önemli yan etkilere sahiptir. Bu tezde amaç substratın aktif bölgesine bağlanarak RNA'nın transkripsiyonunu ve replikasyonunu engellemek yerine enzim yapısında bulunan aktif bölgede 7 adet bulunan bölgeden biri olan motif B bölgesine ikincil etkileşimler ile bağlanan ve antiviral ilaçların yaratmış olduğu mutasyon, ilaçların yaratmış olduğu olası yan etkiler gibi dezavantajları ortadan kaldıracak potansiyel ilaç hedefleri tasarlanmasıdır. Genel olarak yeni ilaç geliştirme isteği biyoyararlanımı yüksek olan vücutta absorbe edilebilen metabolize olmayan ve görevini yerine getirdiğinde ise vücuttan atılan ilaç tasarlamaktır. Aynı zamanda düşük dozlarda etki gösterebilen ve yan etkilerin az olduğu ilaç tasarlamaya gitmektedir. Bu tezde antiviral ilaçlar kadar etkili olan, vücutta metabolize olmayan, yan etki miktarının az olduğu, toksisite bulundurmeyen, mutasyona yol açmayan ilaç tasarlamayı hedeflemektedir. Bu nedenle öncelikle farklı hastalıklarda kullanılan 10 tane nükleotit yapıda olan antiviral ilaç, 24 tane flavonoid ve 1 tane de Zaire Ebolavirüs ve Zika virüsü tedavisinde kullanılan suramin molekülü dahil olmak üzere nükleotit yapıda olmayan 25 molekül RdRp aktif bölgesinde bulunan ve RNA stabilizasyonu sağlayan motif B bölgesine bağlanması hedeflendi.

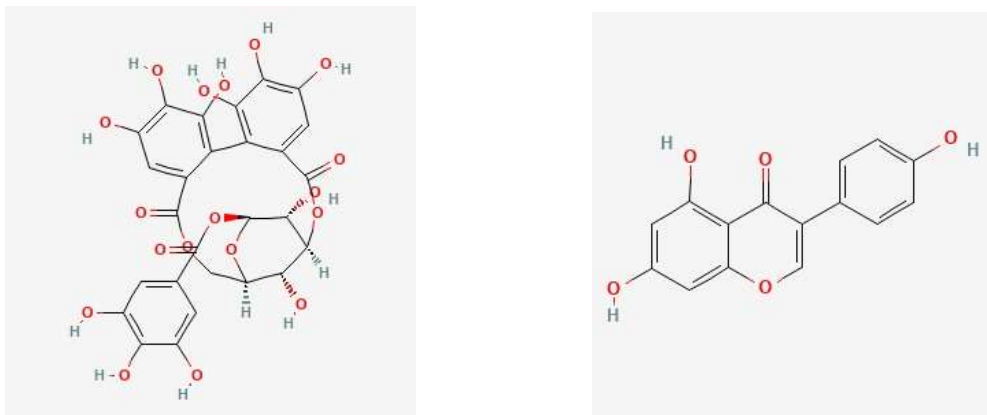
Validasyon çalışmasında nükleotit yapıda olmayan moleküller için 7D4F PDB kodlu proteinin motif B bölgesi için elde edilen RMSD değeri 1.878 Å olarak hesaplanmıştır. Nükleotit yapıda olan moleküller için 7BV2 PDB kodlu proteinin RMSD değeri 1.914 Å olarak hesaplanmıştır RMSD değerinin 2 Å değerinin altında olması validasyon sonucunda elde edilen parametrelerin moleküler kenetlenme ve sanal ligand taraması için kabul edilebilir olduğunu göstermiştir. Nükleotit yapıda olan 10 antiviral ilaç 7BV2 kodlu proteinin motif F bölgesi ile moleküler kenetlenme çalışması yapılmıştır. Genel olarak antiviral ilaçlar yüksek bağlanma afinitesi göstermiştir. Nükleotit yapıda olmayan moleküller için 7D4F PDB kodlu proteinin motif B bölgesi seçilmiştir. Bunun amacı inhibisyonun enzim yapısına ikincil etkileşimler ile gerçekleştirilmesidir. Nükleotit

yapısında olmayan 25 molekülün 11 tanesi -7 kcal/mol üstü bağlanma afinitesine sahiptir. Suramin molekülü dışında 24 flavonoid içerisinde en yüksek değer-7.9 kcal/mol ile Korilagin flavonoidi olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra 9 flavonoid -7 kcal/mol'ün üzerinde bağlanma afinitesi göstermişlerdir. Sanal ligand taraması için Suramin molekülü bağlanma afinitesi flavonoidlerden yüksek olduğu için seçilmiştir fakat bu sonuç flavonoidlerin işlevinin olmadığı anlamına gelmemektedir. **Korilagin** molekülünün RdRp enzimi ile yapmış olduğu etkileşimlerin en az **Suramin** molekülü kadar etkili olduğu elde edilen sonuçlar neticesi ile görülmüştür.

Zaire Ebolavirüs ve Zika Virüsü için geliştirilen Suramin molekülü, nükleotit yapısında olmayan moleküllerin 7D4F PDB kodlu proteinin aktif bölgesinde bulunan motif B bölgesi ile moleküler kenetlenme çalışması yapıldı. Bu çalışmanın sonucunda, bağlanma afinitesi, deneysel K_i değerinin hesaplanması, ADME ve toksisite çalışması bu tez kapsamında gerçekleştirildi.

Bu çalışmanın temeli enzim yapısına ikincil etkileşimler ile bağlanabilen ve bu antiviral ilaçların yaratmış olduğu dezavantajları ortadan kaldıracak potansiyel ilaç hedeflerinin tasarlanmasının amaçlanmasıdır. Bu nedenle RdRp enziminin aktif bölgesinde görevli olan motif B bölgesi seçilmiştir.

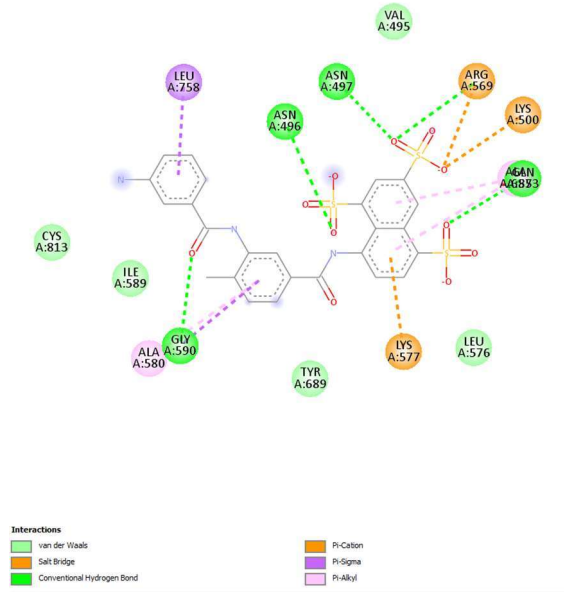
Nükleotit olmayan moleküller içerisinde Suramin molekülü dışında 24 flavonoid molekülü vardır. Bu flavonoidler içerisinde 7D4F PDB kodlu proteinin Motif B bölgesi ile Suramin dışında en iyi etkileşimi ve bağlanma afinitesini büyük bir yapıya sahip olan polar **Korilagin** molekülü sağlamaktadır(Şekil 5.1). Bunun yanı sıra **Genistein** molekülü ise düşük bağlanma afinitesi ve etkileşim sağlamaktadır.



Şekil 5.1 Korilagin(soldaki) ve Genistenin yapıları(sağdaki)

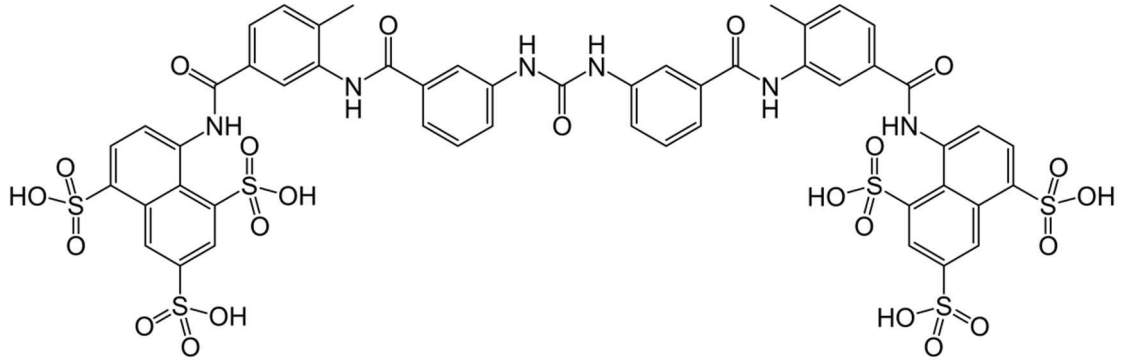
Flavonoidlerin ADMET çalışmaları göz önüne alındığında ise genel olarak vücutta emilim sağlayabilen, doku içerisinde dağılan, metabolize olmayan kolay yolla atılan; **Hernandezin** ve **Likorin** molekülü dışındaki flavanoidler AMES toksisitesi testini geçmişlerdir.

SARS-CoV-2 RdRp proteinleri ile yapılan çalışmalarda **Suramin**-benzeri moleküllerin Suramin molekülüne göre daha yüksek bağlanma afinitesine sahip olduğu bulunmuştur. Bu sonuçların ışığında SARS-CoV-2 RdRp enzimi ilaç tasarımı için oldukça umut verici neticelerin gözlemlendiği gelişmeler olanağını ortaya koyar. **Suramin** molekülü bağlanma afinitesi -8.5 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Bağlanma afinitesi olarak oldukça iyi bir sonuç elde edilmiştir. Elde edilen hesaplanan K_i değerinin de 0,583 μ M olması bu molekülün sanal ligand taraması için referans molekül olması için seçilmiştir. (Şekil 5.1)



Şekil 5.2 Suramin molekülünün protein-aminoasit etkileşimlerinin 2 boyutlu gösterimi

Suramin molekülünün aminoasitlerle yapmış olduğu etkileşimler irdelendiğinde gerek yapmış olduğu hidrojen bağları gerek diğer ikincil etkileşimler göz önüne alındığında oldukça iyi bir bağlanma afinitesi gösterdiği görülmektedir.

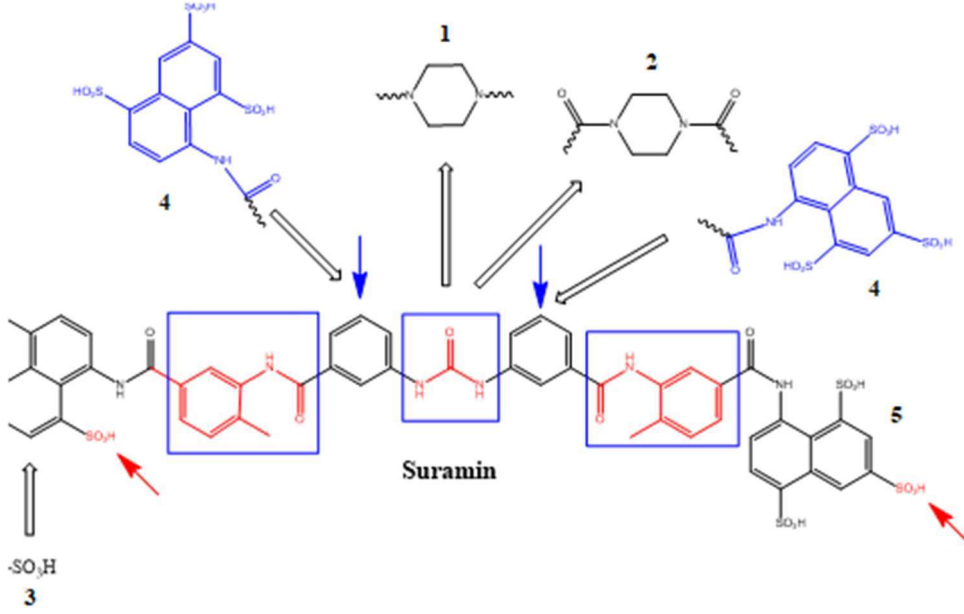


Şekil 5.3 Suramin molekülü 2 boyutlu gösterimi

Hidrojen bağları yapabilen aynı zamanda yüksek elektronegatifliğe sahip olan oksijen içeren gruplar bulundurması Suramin molekülünün bağlanma afinitesinin bu denli iyi olmasının göstergesidir. Moleküler kenetlenme sonucunda iyi sonuçlar gösteren Suramin molekülü için yapılan sanal ligand taraması sonucunda 413 molekül içerisinde en iyi bağlanma afinitesine sahip 20 molekül seçildi. Bağlanma afinitesinin potansiyel ilaç adayı seçimi için tek başına yeterli olmadığı düşünüldüğünden ADME ve toksisite çalışması yapılarak seçilen 20 molekülün potansiyel ilaç adayı olup olmadığı değerlendirildi.

Sanal ligand taraması sonucunda yapılan hesaplamalarda en iyi değere sahip beş molekülün PubChem ID'leri sırası ile, 10329067, 100964010, 133588152, 16151843 ve 16139209 olmuştur.

Şekil 5.4'de sanal ligand taraması ile bulunan en aktif 5 bileşiğin suramin iskelet yapısındaki farklılıklar verilmiştir. Mavi kare içindekiler suramin yapısından çıkarılan, mavi oklar yapıya eklenen ve kırmızı oklar yapıdan çıkarılan grupların konumun gösterirken, içi boş oklar yapıya eklenen grupları göstermektedir.



Şekil 5.4 Suramin yapısındaki yapısal değişikliklerin şematik gösterimi

Şekil 5.4'teki 1 nolu bileşik PubChem bileşik numarası 10329067 olan Suramin molekülünün yapısında bulunan, üre grubu çıkarılmış ve yerine piperazin içeren grup eklenmiş yapıdır. Bu değişikliğin sonucunda piperazin eklenmesi molekülün bağlanma affinitesini arttırmıştır.

Şekil 5.4'teki 2 nolu bileşik PubChem bileşik numarası 100964010 olan bileşikte ise Suramin yapısında bulunan üre grubunun yerine 1,4 dikarbonil piperazin grubu eklendiğinde bağlanma affinitesinin arttığı görülmüştür.

Şekil 5.4'deki 3 nolu bileşik 133588152 numaralı bileşikte ise naftalin halkasında bulunan sülfonik asit grubu Suramin yapısı ile karşılaştırıldığında altı numaralı konumdan yedi numaralı konuma geçtiği görülmüştür.

Şekil 5.4'deki 4 nolu bileşik numarası 16851843 olan yapıda ise mavi kare içerisinde bulunan kırmızı ile gösterilen grupların çıkarılması ve mavi renkli grupların eklenmesi ile bağlanma affinitesi artış göstermiştir

Şekil 5.4'teki 5 nolu bir diğer bileşik olan 16139209 numaralı yapı için, naftalin halkasındaki kırmızı okla gösterilen sülfonik asit grubu çıkarılmıştır. Bu işlem bağlanma affinitesini arttırmaktadır.

Sanal ligand taraması sonucunda seçilen 20 molekülün ADMET hesaplama sonuçları değerlendirildiğinde bir ilaç adayı mümkün oldukça AMES toksisitesi yapmaması gerekir ve ADMET testleri içerisinde önem sıralaması yüksektir. AMES testi bir molekülün

mutajenik olup olmadığını belirler. Mutajenik bileşikler, DNA'ya zarar vererek kanserojen olabilir. Seçilen 20 molekül de AMES testinde mutajenik olmadıklarını kanıtlamışlardır. (EK.6)

SARS-CoV-2 RdRp enzimi aktif bölgesinde bulunan onay almış RdRp inhibitörleri motif F bölgesi üzerine yapılmıştır. Motif F bölgesinin genel özelliği enzime bağlanan ve substratı olan RNA zincirinin replikasyonu esnasında nükleozit trifosfatları (NTP) taklit ederek şablon yarışmalı inhibisyona girerek birincil RNA zincirine kovalent bağlanması üzerinedir. Bu tez kapsamında nükleotit yapıda olan **10 molekül** ve nükleotit yapıda olmayan **25 molekül** için deneysel IC₅₀ hesaplandı ve RdRp aktif bölgesinde bulunan ve RNA stabilizasyonu sağlayan motif B bölgesine bağlanması hedeflendi.

Yapılan hesaplamaların neticesinde, SARS CoV-2 virüsünün hedeflerinden olan RdRp enziminin aktif bölgesinde bulunan motif B ile etkileşim gösterebilen bir inhibitörü içeren 7D4F PDB kodlu protein-ligand kompleksi protein yapısı temel alınan tez çalışması, nükleotit olmayan moleküller içerisinde elde edilebilen en iyi sonuçları elde eden **Suramin** molekülünden yola çıkılan düşük toksisite değerlerine sahip ve yüksek bağlanma afinitesi değerlerine sahip olan **20 molekül** teorik olarak belirlenmiştir. Elde edilmiş sonuçların SARS-CoV-2 tedavisi için öncü molekül olma potansiyeli göstermelerinin ilaç adayı olarak virüs tedavisinde katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Elde edilen sonuçlar ışığında ileri düzeyde yapılması gerekliliği düşünülen çalışmalar SARS-CoV-2 virüsü hedeflerinden olan RdRp enzimi için toksisite bulundurmeyen ve tasarımı yapılan 20 ilaç molekülü için, moleküler dinamik simülasyon (MD) gibi ileri seviye *in silico* teknikler ile hesaplamaların yapılması desteklenmelidir. Ayrıca biyolojik aktivite çalışmaları yapılarak bu moleküller için deneysel K_i ve/veya IC₅₀ değerleri yapılarak deneysel olarak uygunluğu kanıtlanmalıdır.

6. KAYNAKLAR

1. World Health Organization <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases> (Erişim Tarihi: Mayıs 2024)
2. European Medicine Agency <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory-overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/covid-19-medicines#authorised-covid-19-vaccines-14489> (Erişim Tarihi: Mayıs 2024)
3. U.S Food And Drug Administration <https://www.fda.gov/drugs/emergency-preparedness-drugs/coronavirus-covid-19-drugs> (Erişim Tarihi: Mayıs 2024)
4. Masters, P.S. (2006). The molecular biology of coronaviruses. *Advances in Virus Research*, 66, 193–292.
5. Neuman, B.W., Adair, B.D., Yoshioka, C., et al. (2006). Supramolecular architecture of severe acute respiratory syndrome coronavirus revealed by electron cryomicroscopy. *Journal of Virology*, 80(16), 7918-28.
6. Perlman, S. & Netland, J. (2009). Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 7(6), 439-450.
7. Sawicki, S.G., Sawicki, D.L., & Siddell, S.G. (2007). A contemporary view of coronavirus transcription. *Journal of Virology*, 81(1), 20–29.
8. Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., et al. (2020). A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *The New England Journal of Medicine*, 382(8), 727-733.
9. Zhou, P., Yang, X.L., Wang, X.G., et al. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270-273.
10. Zhu N., et al. (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*.
11. Wu F., et al. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*.
12. Zhou P., et al. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*.

13. Perlman S., et al. (2020). Another Decade, Another Coronavirus. *New England Journal of Medicine*.
14. Drosten C., et al. (2003). Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *New England Journal of Medicine*.
15. Hoffmann M., et al. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*.
16. Letko M., et al. (2020). Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nature Microbiology*.
17. Coutard B., et al. (2020). The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Research*.
18. Huang C., et al. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*.
19. Wang D., et al. (2020). Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*.
20. Zhou F., et al. (2020). Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *The Lancet*.
21. Li Q., et al. (2020). Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. *New England Journal of Medicine*.
22. Zhou P., et al. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*.
23. Andersen K.G., et al. (2020). The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine*.
24. Wu Z., McGoogan J.M. (2020). Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China. *JAMA*.
25. Phelan A.L., et al. (2020). COVID-19 immunity passports and vaccination certificates: scientific, equitable, and legal challenges. *The Lancet*.

26. Kupferschmidt K., Cohen J. (2020). Race to find COVID-19 treatments accelerates. *Science*.
27. Xu, H. E. (2020). Structural Basis for the Inhibition of the RNA-Dependent RNA Polymerase from SARS-CoV-2 by Remdesivir. *Science*, 368, 1499.
28. "A hypothesis on designing strategy of effective RdRp inhibitors for SARS-CoV." *Sage Journals*, 2020.
29. "RNA-Dependent RNA Polymerase as a Target for COVID-19 Drug Discovery." *Springer*, 2022.
30. "Structure of the SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase in the presence of favipiravir." *PNAS*, 2022.
31. "Identification of novel SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase (RdRp) inhibitors." *ScienceDirect*, 2022.MDPI. (2022). Favipiravir Analogues as Inhibitors of SARS-CoV-2 RNA-Dependent RNA Polymerase.
32. "Molecular Docking of FDA Approved Drugs Targeting the RNA-Dependent RNA Polymerase (RdRp) of SARS-CoV-2." *An update on inhibitors targeting RNA-dependent RNA polymerase*, 2022.
33. Yin, W., Mao, C., Luan, X., Shen, D.D., Shen, Q., Su, H., Wang, X., Zhou, F., Zhao, W., Gao, M., Chang, S., Xie, Y.C., Tian, G., Jiang, H.W., Tao, S.C., Shen, J., Jiang, Y., Jiang, H., Xu, Y., Zhang, S., Zhang, Y., Xu, H.E. Structural basis for inhibition of the RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2 by remdesivir. (2020) *Science* 368: 1499-1504
34. "An update on inhibitors targeting RNA-dependent RNA polymerase." 2022
35. "Potential RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) inhibitors as therapeutics for SARS-CoV-2." *NCBI*, 2023.
36. "The triple combination of Remdesivir (GS-441524), Molnupiravir and Ribavirin is highly efficient in inhibiting coronavirus replication in human." *BioRxiv*, 2024.
37. "RNA-dependent RNA polymerase of SARS-CoV-2 as a therapeutic target." *ResearchGate*, 2020.

38. "Favipiravir Analogues as Inhibitors of SARS-CoV-2 RNA-Dependent RNA Polymerase." *MDPI*, 2022.
39. "Identification of novel SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase (RdRp) inhibitors." *ScienceDirect*, 2022.
40. "RNA-Dependent RNA Polymerase as a Target for COVID-19 Drug Discovery." *Springer*, 2020.
41. "Sofosbuvir/daclatasvir regimens for the treatment of COVID-19." *MDPI*, 2020.
42. "The Functional Implications of Broad Spectrum Bioactive Compounds." *MDPI*, 2022.
43. "Design, synthesis, docking, and biochemical characterization of non-nucleoside SARS-CoV-2 RdRp inhibitors." *ScienceDirect*, 2023.
44. "Quercetin and luteolin are single-digit micromolar inhibitors of the SARS-CoV-2 RdRp." *Nature*, 2022.
45. "Neurological disorders of COVID-19: insights to applications of known drugs." *Springer*, 2022.
46. "Potential RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) inhibitors as therapeutics for SARS-CoV-2." *NCBI*, 2023.
47. Burley, Stephen K., Helen M. Berman, Gary J. Kleywegt, John L. Markley, Haruki Nakamura, Rolf D. Pannu, Sameer Velankar, et al. "RCSB Protein Data Bank: Sustaining a Living Digital Data Resource That Enables Breakthroughs in Scientific Research and Biomedical Education." *Nucleic Acids Research* 46, no. D1 (2018): D368–D376.
48. EBI. "PDBSum: A Web-based Database Providing Graphical Summaries of Protein Structures and Their Functional Annotations." Erişim Tarihi 21, 2024. <https://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>,
49. PDBe Team. "Protein Data Bank in Europe." European Bioinformatics Institute. Accessed May 21, 2024. <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/>.
50. Protein Databases Laboratory. "Laboratory of Protein Databases (Protein Data Bank Japan)." Osaka University. Erişim Tarihi 21, 2024. <http://www.protein.osaka-u.ac.jp/rcsfp/databases/index.html.en>.
51. wwPDB Consortium. "wwPDB: Worldwide Protein Data Bank." Worldwide Protein Data Bank. Erişim Tarihi Mayıs 21, 2024. <https://www.wwpdb.org/>.

52. Ferreira, Luciana G., Rafael N. Dos Santos, Glaucius Oliva, and Adriano D. Andricopulo. "Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies." *Molecules* 20, no. 7 (2015): 13384-13421.
53. Pagadala, N. Siva Krishna, Krishna M. Syed, and Jeffy Tuszynski. "Software for molecular docking: a review." *Biophysical Reviews* 9, no. 2 (2017): 91-102.
54. Sousa, Silvio F., Paulo A. Fernandes, and Maria J. Ramos. "Protein-ligand docking: current status and future challenges." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 65, no. 1 (2006): 15-26.
55. Meng, Xiang-Jun, Huan-Lei Wang, Yue Hu, and Shu-Hong Chen. "Computational Molecular Docking Methods in Drug Discovery." *European Chemical Bulletin* 9, no. 4 (2023): 301-310.
56. Morris, Garrett M., David S. Goodsell, David J. Halliday, Robert Huey, William E. Hart, and Arthur J. Olson. "AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility." *Journal of Computational Chemistry* 30, no. 16 (2009): 2785-2791.
57. Morris, Garrett M., David S. Goodsell, Richard S. Huey, and Arthur J. Olson. "Distributed docking using a grid-based approach." *Journal of Computational Chemistry* 19, no. 14 (1998): 1639-1662.
58. Trott, Oleg, and Arthur J. Olson. "AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading." *Journal of Computational Chemistry* 31, no. 2 (2010): 455-461.
59. Zhou, Guo-Ping, and Qiao-Lu Huang. "Exploring the Mechanisms of the Action of Drugs on Targets through Molecular Docking." *Journal of Chemical Information and Modeling* 53, no. 12 (2013): 3001-3012.
60. Ferreira, Luciana G., Rafael N. Dos Santos, Glaucius Oliva, and Adriano D. Andricopulo. "Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies." *Molecules* 20, no. 7 (2015): 13384-13421.
61. Pagadala, N. Siva Krishna, Krishna M. Syed, and Jeffy Tuszynski. "Software for molecular docking: a review." *Biophysical Reviews* 9, no. 2 (2017): 91-102.

62. Sousa, Silvio F., Paulo A. Fernandes, and Maria J. Ramos. "Protein-ligand docking: current status and future challenges." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 65, no. 1 (2006): 15-26.
63. Morris, Garrett M., David S. Goodsell, David J. Halliday, Robert Huey, William E. Hart, and Arthur J. Olson. "AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility." *Journal of Computational Chemistry* 30, no. 16 (2009): 2785-2791.
64. Trott, Oleg, and Arthur J. Olson. "AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading." *Journal of Computational Chemistry* 31, no. 2 (2010): 455-461.
65. Zhou, Guo-Ping, and Qiao-Lu Huang. "Exploring the Mechanisms of the Action of Drugs on Targets through Molecular Docking." *Journal of Chemical Information and Modeling* 53, no. 12 (2013): 3001-3012. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ci400145a>.
66. "Virtual screening strategies in drug design: methods and applications." *Biotechnologia Journal* (2022).
67. "The Light and Dark Sides of Virtual Screening: What Is There to Know?" *NCBI* (2019).
68. "Docking and Virtual Screening in Drug Discovery: Finding the Right Hit." *Deep Origin* (2024).
69. Sterling, T., and J. J. Irwin. "ZINC 15- Ligand Discovery for Everyone." *Journal of Chemical Information and Modeling* 55, no. 11 (2015): 2324-2337.
70. Walters, W. Patrick, Matthew T. Stahl, and Peter W. Ertl. "Virtual Screening - An Overview." *Drug Discovery Today* 15, no. 7-8 (2010): 267-272.
71. Irwin, John J., and Brian K. Shoichet. "ZINC- A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening." *Journal of Chemical Information and Modeling* 45, no. 1 (2005): 177-182.
72. Shoichet, Brian K., and John J. Irwin. "The ZINC Database: A Free Resource for Ligand Discovery." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, no. 16 (2000): 9371-9376.

73. Coleman, R. Guy, and John J. Irwin. "Structure-based Virtual Screening for Drug Discovery: Principles, Applications and Recent Advances." *Current Opinion in Chemical Biology* 15, no. 5 (2011): 694-701.
74. Kim, Sunghwan, Paul A. Thiessen, Evan E. Bolton, Jian Zhang, Stephen H. Bryant, and John J. Irwin. "PubChem: A Public Information System for Analyzing Bioactivities of Small Molecules." *Nucleic Acids Research* 47, no. D1 (2019): D1102-D1109.
75. Wang, Yanli, John J. Irwin, and Brian K. Shoichet. "The PubChem Database: A Chemical Structure and Bioactivity Resource." *Journal of Medicinal Chemistry* 55, no. 22 (2012): 7658-7673.
76. Hettne, Kristina M., Egon L. Willighagen, Stefan E. J. de Jong, Jean-Luc Faulon, Jan A. Kors, and Barend Mons. "Automatic vs. Manual Curation of a Multi-source Chemical Dictionary: The Impact on Text Mining." *Journal of Cheminformatics* 4, no. 1 (2012): 11
77. Bolton, Evan E., Yanli Wang, Paul A. Thiessen, and Stephen H. Bryant. "PubChem: Integrated Platform of Small Molecules and Biological Activities." *Annual Reports in Computational Chemistry* 4 (2008): 217-241.
78. Chen, Xue-wen, and Thomas Z. Jiang. "Mining Bioinformatics Data: Methods and Applications." *Methods of Biochemical Analysis* 43 (2002): 343-367.
79. Wang, Yanli, Jian Zhang, Evan E. Bolton, and Stephen H. Bryant. "PubChem BioAssay: 2017 update." *Nucleic Acids Research* 45, no. D1 (2017): D955-D963.
80. Kim, Sunghwan, Paul A. Thiessen, Evan E. Bolton, Jian Zhang, Stephen H. Bryant, and John J. Irwin. "PubChem BioAssay: A Decade's Development Toward Open High-Throughput Screening Data Sharing." *Journal of Biomolecular Screening* 21, no. 2 (2016): 222-233.
81. "Molecular interaction analysis and visualization of protein-ligand complexes using BIOVIA Discovery Studio Visualizer." *International Journal of Computational Biology* (2023): 1-10.
82. "BIOVIA Discovery Studio Visualizer." *Dassault Systèmes* (2023).
83. "Hierarchical Virtual Screening Based on Rocaglamide Derivatives to Inhibit Protein Targets." *Frontiers in Molecular Biosciences* 9 (2022): 836572..

84. "Dihydrofolate Reductase (DHFR) Inhibitors and DNA-Binding Agents: Applications in Drug Discovery." *Journal of Medicinal Chemistry* (2021): 8037161.
85. "DS Visualizer: Uses & Applications." *Bioinformatics Review* (2023).
86. "BIOVIA Discovery Studio Visualizer 4.5 – Molecular Visualization." *MyBioSoftware* (2021).
87. Pires, Douglas E. V., Tom L. Blundell, and David B. Ascher. "pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures." *Journal of Medicinal Chemistry* 58, no. 9 (2015): 4066-4072.
88. Pires, Douglas E. V., Tom L. Blundell, and David B. Ascher. "In Silico Methods for Predicting Small-Molecule ADMET Properties." *Methods in Molecular Biology* 2114 (2020): 281-296.
89. Daina, Antoine, Olivier Michielin, and Vincent Zoete. "SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules." *Scientific Reports* 7 (2017): 42717.
90. Cheng, Feixiong, et al. "Prediction of ADMET Properties." *Annual Reports in Computational Chemistry* 10 (2014): 55-75.
91. Blundell, Tom L., Douglas E. V. Pires, and David B. Ascher. "ADMET Modeling with pkCSM." *Annual Reports in Medicinal Chemistry* 49 (2016): 321-336.

EKLER

EK.1 Sanal Ligand Taramasında kullanılan parametreler

```
receptor = 7d4f.pdbqt

center_x = 115.488
center_y = 133.725
center_z = 142.532

size_x = 20
size_y = 20
size_z = 20

exhaustiveness = 16
```

EK.2 7BV2 PDB Kodlu Protein Motif F için Moleküler Kenetlenme Çalışmasında kullanılan parametreler

```
receptor = 7bv2.pdbqt
ligand = remdesivir.pdbqt

center_x = 91.312
center_y = 93.155
center_z = 102.826

size_x = 20
size_y = 34
size_z = 20

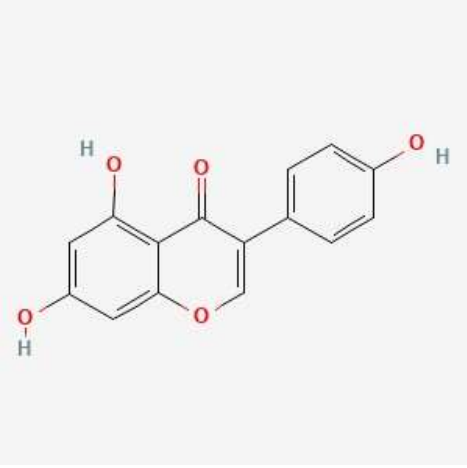
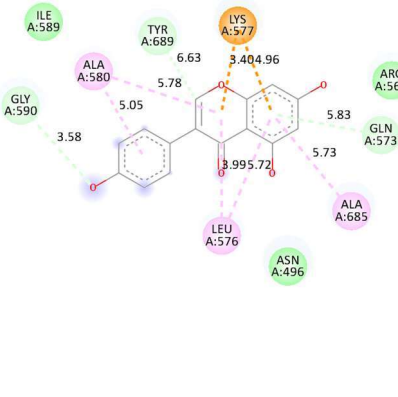

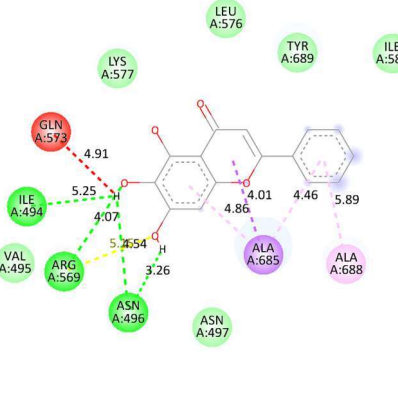
exhaustiveness = 16

log = log3.txt
out= output3.pdbqt
```


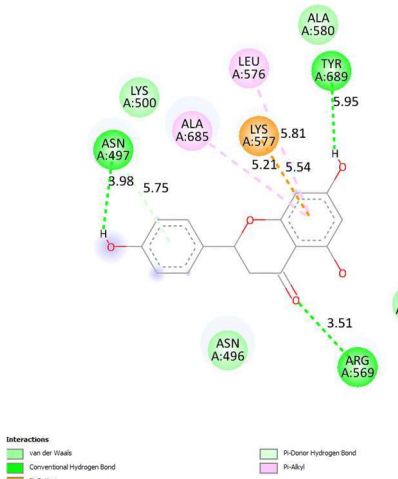

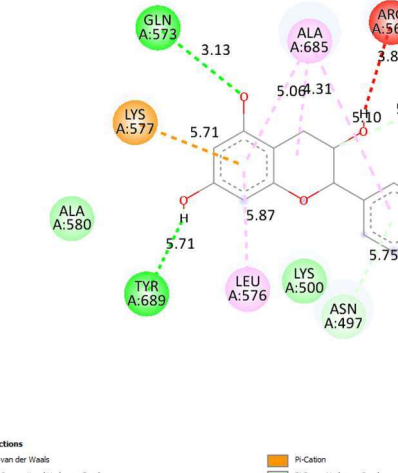
```
#!/usr/bin/perl
print"Ligand file:\t";
$ligfile=<STDIN>;
chomp $ligfile;
open (FH,$ligfile)||die "Cannot open file\n";
@arr_file=<FH>;


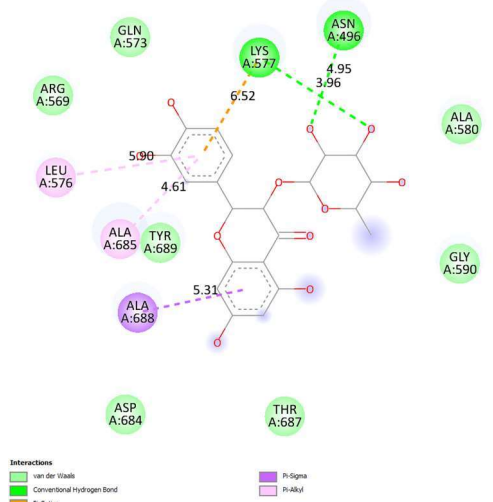
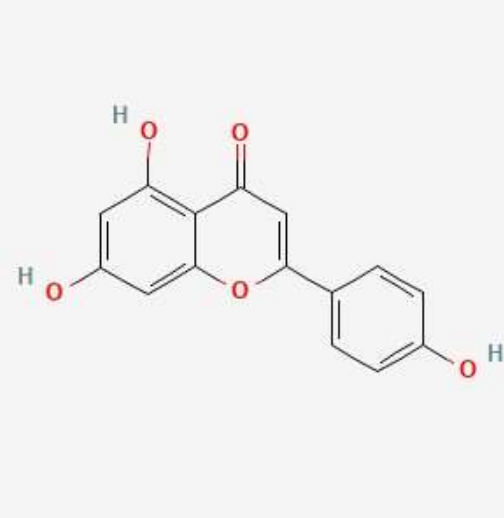
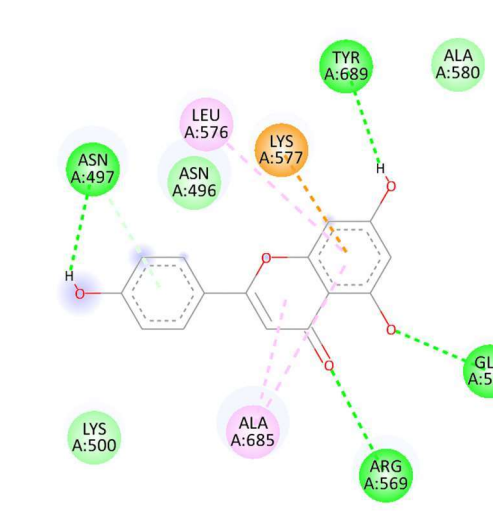
for ($i=0;$i<@arr_file;$i++)
{
print"@arr_file[$i]\n";
@name=split(/\/\./,@arr_file[$i]);
}
for ($i=0;$i<@arr_file;$i++)
{
chomp @arr_file[$i];
print"@arr_file[$i]\n";
system("vina.exe --config conf_vs.txt --ligand @arr_file[$i] --log @arr_file[$i]_log.log");
}
```

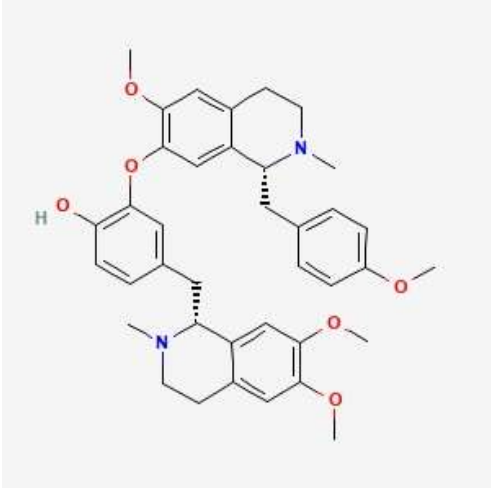
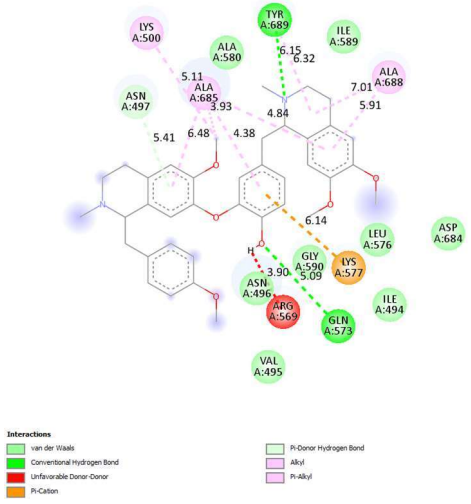
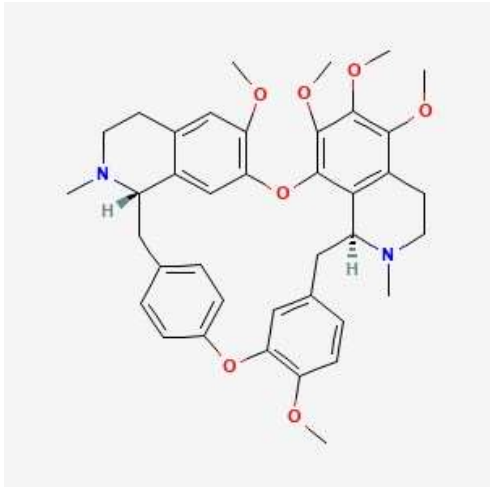
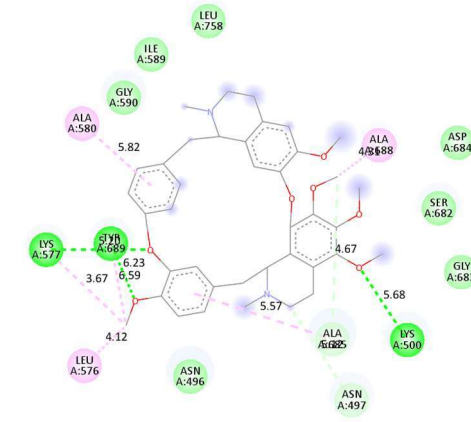
EK.3 Çoklu moleküler kenetlenme için kullanılan DwmPerl Scripti


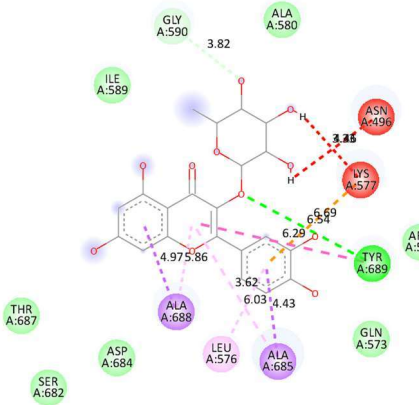
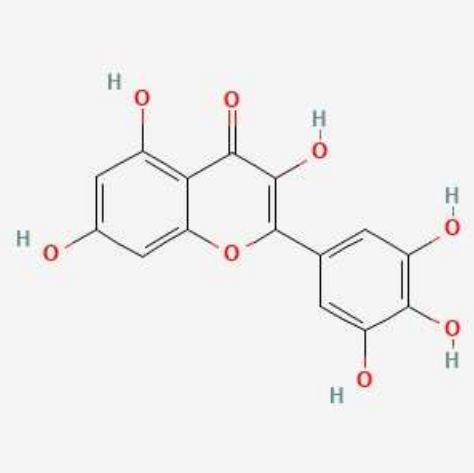
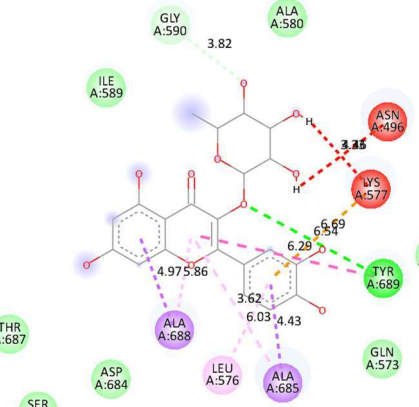
Ligand Adı ve İki Boyutlu Molekül Şekli	İki Boyutlu Etkileşimler ve Bağlanma Enerjisi Değeri
<p style="text-align: center;">Genistein</p>  <p>The image shows the chemical structure of Genistein, a flavonoid compound. It consists of a chromane core with a 4-hydroxyphenyl group at the 7-position and a 5-hydroxyphenyl group at the 8-position. The structure is shown with red and blue highlights on the hydroxyl groups and the phenyl rings.</p>	<p style="text-align: center;">Bağlanma Afinitesi -6 kcal/mol</p>  <p>The diagram illustrates the interactions of Genistein with various amino acid residues. The residues are represented by colored circles: green for van der Waals, blue for Pi-Donor Hydrogen Bond, orange for Pi-Cation, purple for Pi-Alkyl, and pink for Pi-Cation. The interactions are labeled with residue names and distances in Angstroms (Å): ILE A:589, TYR A:689, LYS A:577, ARG A:569, GLN A:573, ALA A:580, GLY A:590, LEU A:576, ASN A:496, ALA A:685, and ALA A:577. Distances include 6.63, 3.40, 4.96, 5.78, 5.05, 5.83, 5.73, 3.58, 3.99, and 5.72 Å.</p> <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Carbon Hydrogen Bond Pi-Cation Pi-Donor Hydrogen Bond Pi-Alkyl
<p style="text-align: center;">Baikalein</p>  <p>The image shows the chemical structure of Baikalein, a flavonoid compound. It consists of a chromane core with a 4-hydroxyphenyl group at the 7-position and a 5-hydroxyphenyl group at the 8-position. The structure is shown with red and blue highlights on the hydroxyl groups and the phenyl rings.</p>	<p style="text-align: center;">Bağlanma Afinitesi -6.4 kcal/mol</p>  <p>The diagram illustrates the interactions of Baikalein with various amino acid residues. The residues are represented by colored circles: green for van der Waals, blue for Pi-Donor Hydrogen Bond, red for Undetectable Donor-Donor, purple for Pi-Sigma, and pink for Pi-Alkyl. The interactions are labeled with residue names and distances in Angstroms (Å): LEU A:576, TYR A:689, ILE A:589, LYS A:577, GLN A:573, ILE A:494, VAL A:495, ARG A:569, ASN A:496, ASN A:497, ALA A:685, ALA A:688, and ALA A:577. Distances include 4.91, 5.25, 4.07, 5.75, 5.54, 3.26, 4.01, 4.86, 4.46, and 5.89 Å.</p> <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Undetectable Donor-Donor Pi-Sigma Pi-Alkyl

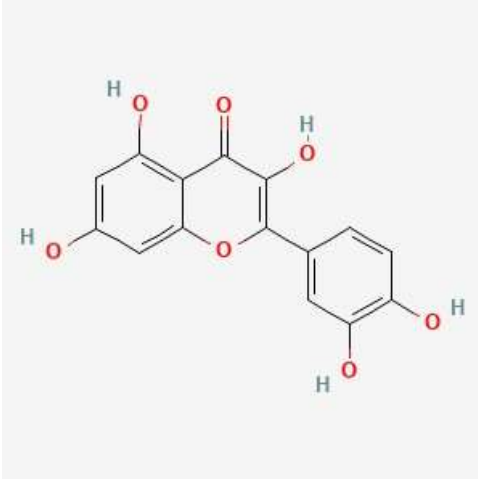
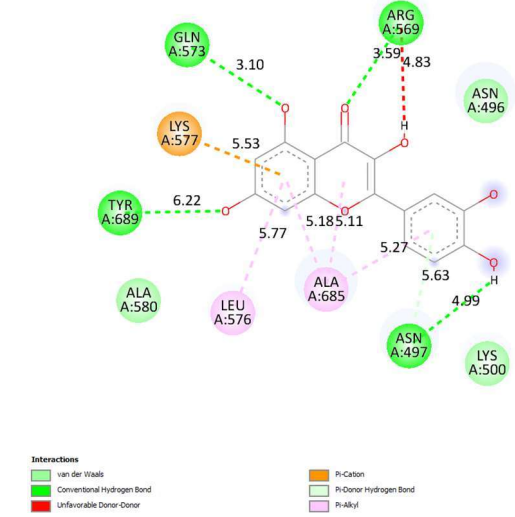
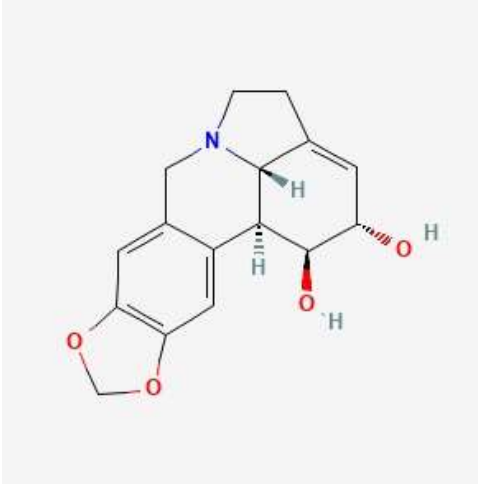
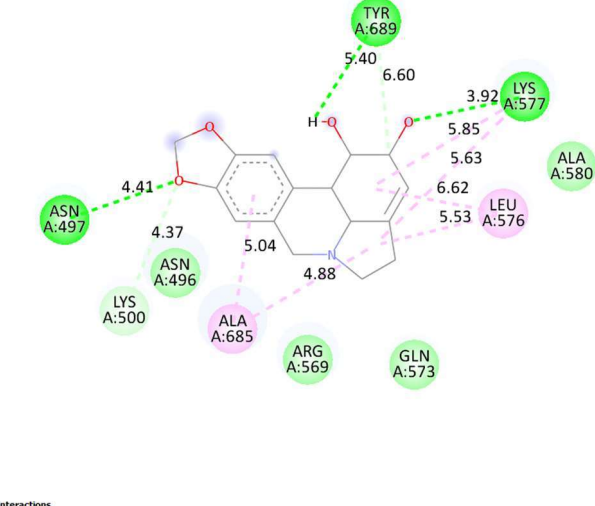
EK.4 Nükleotit Olmayan Moleküller için Moleküler Kenetlenme Etkileşimleri

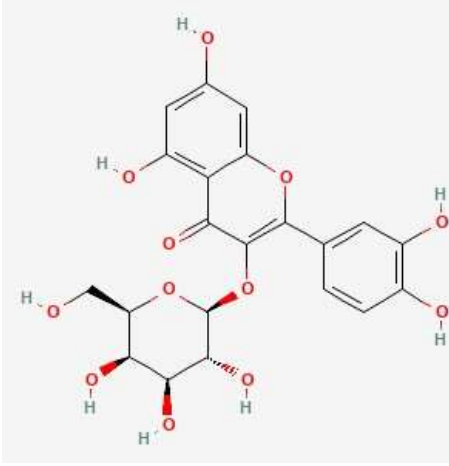
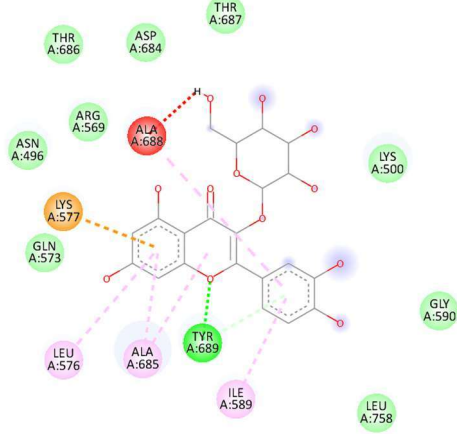
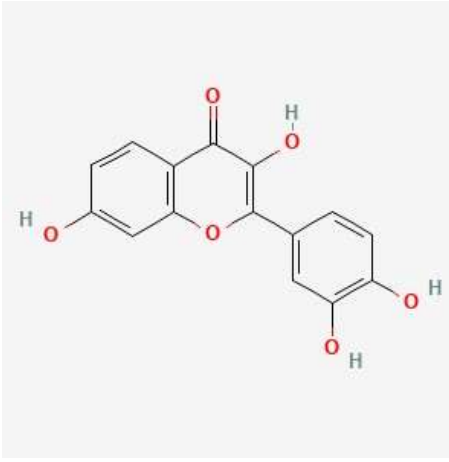
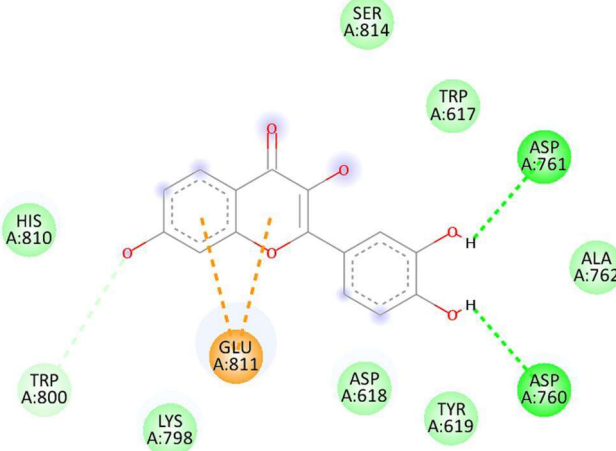
Ligand Adı ve İki Boyutlu Molekül Şekli	İki Boyutlu Etkileşimler ve Bağlanma Enerjisi Değeri
<p style="text-align: center;">Naringenin</p> 	<p style="text-align: center;">Bağlanma Afinitesi -6.4 kcal/mol</p>  <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ van der Waals ■ Conventional Hydrogen Bond ■ Pi-Cation ■ Pi-Donor Hydrogen Bond ■ Pi-Alkyl
<p style="text-align: center;">Siyanidanol</p> 	<p style="text-align: center;">Bağlanma Afinitesi -6.5 kcal/mol</p>  <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ van der Waals ■ Conventional Hydrogen Bond ■ Carbon Hydrogen Bond ■ Pi-Donor Hydrogen Bond ■ Alkyl ■ Pi-Cation ■ Pi-Alkyl ■ Unfavorable Donor-Donor

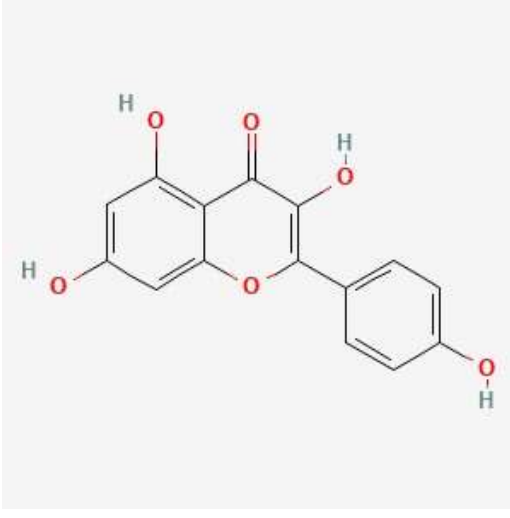
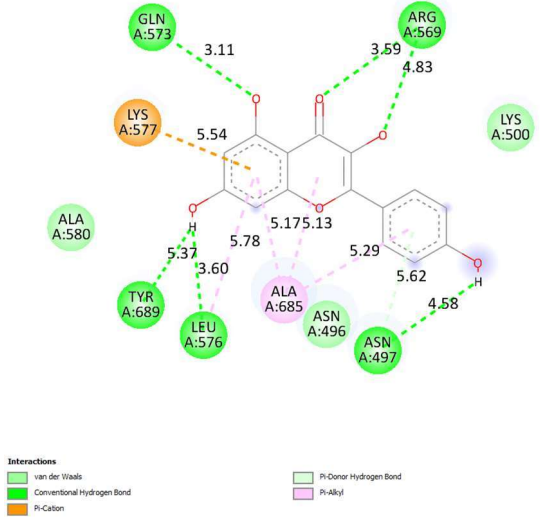
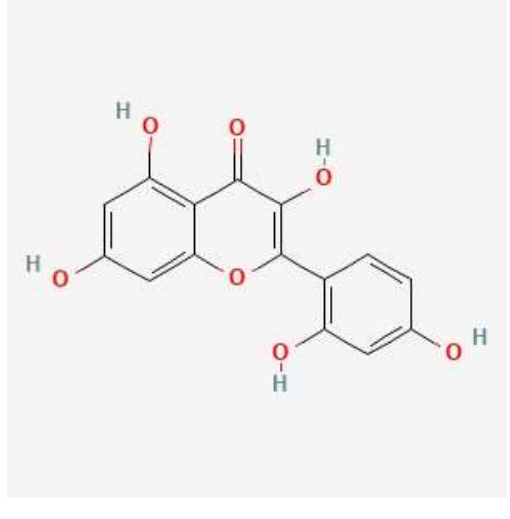
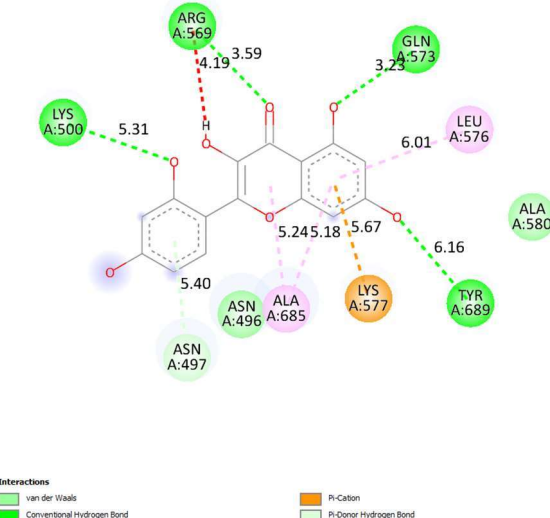
Ligand Adı ve İki Boyutlu Molekül Şekli	İki Boyutlu Etkileşimler ve Bağlanma Enerjisi Değeri
<p style="text-align: center;">Astilbin</p>  <p>The image shows the chemical structure of Astilbin, a flavonoid glycoside. It consists of a central flavone core with a glucose molecule attached to the 7-position and a p-coumaroyl group attached to the 8-position. The structure is shown in a 2D perspective with stereochemistry indicated by wedges and dashes.</p>	<p style="text-align: center;">Bağlanma Afinitesi -6.5 kcal/mol</p>  <p>The diagram illustrates the interactions of Astilbin with various amino acid residues. The residues are represented by colored circles: green for van der Waals, red for conventional hydrogen bonds, orange for pi-cation, purple for pi-sigma, and pink for pi-alkyl. Distances are provided for several interactions: 6.52 Å (van der Waals), 4.95 Å (conventional hydrogen bond), 3.96 Å (conventional hydrogen bond), 5.90 Å (pi-sigma), 4.61 Å (pi-sigma), 5.31 Å (pi-sigma), and 5.31 Å (pi-sigma). The residues involved are ARG A:569, LEU A:576, ALA A:685, TYR A:689, ALA A:688, ASP A:684, THR A:687, LYS A:577, ASN A:496, ALA A:580, and GLY A:590.</p> <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Pi-Cation Pi-Sigma Pi-Alkyl
<p style="text-align: center;">Apigenin</p>  <p>The image shows the chemical structure of Apigenin, a flavone. It features a central flavone core with hydroxyl groups at the 5 and 7 positions and a p-coumaroyl group at the 8 position. The structure is shown in a 2D perspective.</p>	<p style="text-align: center;">Bağlanma Afinitesi -6.7 kcal/mol</p>  <p>The diagram illustrates the interactions of Apigenin with various amino acid residues. The residues are represented by colored circles: green for van der Waals, red for conventional hydrogen bonds, orange for pi-cation, purple for pi-sigma, and pink for pi-alkyl. Distances are provided for several interactions: 4.95 Å (conventional hydrogen bond), 3.96 Å (conventional hydrogen bond), 5.90 Å (pi-sigma), 4.61 Å (pi-sigma), 5.31 Å (pi-sigma), and 5.31 Å (pi-sigma). The residues involved are ASN A:497, ASN A:496, LEU A:576, LYS A:577, TYR A:689, ALA A:580, LYS A:500, ALA A:685, ARG A:569, and GLN A:573.</p> <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Pi-Cation Pi-Donor Hydrogen Bond Pi-Alkyl

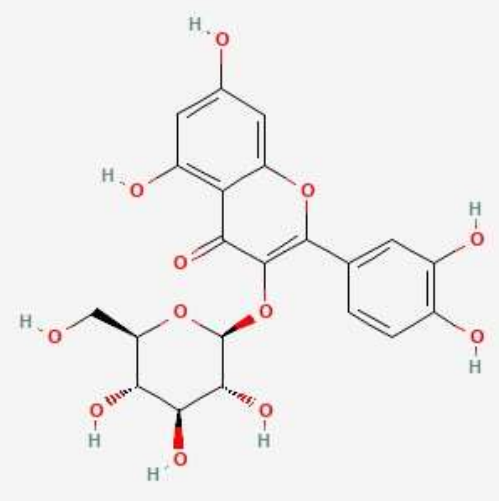
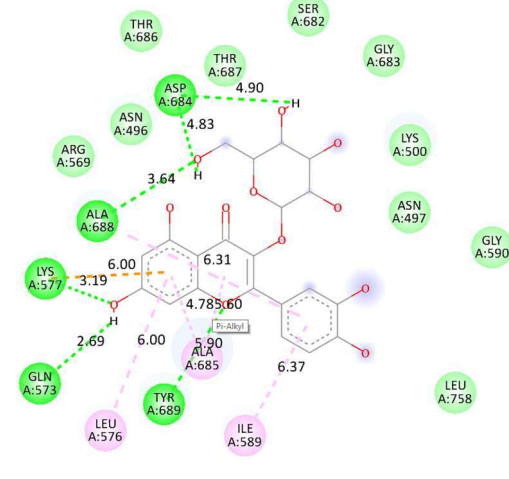

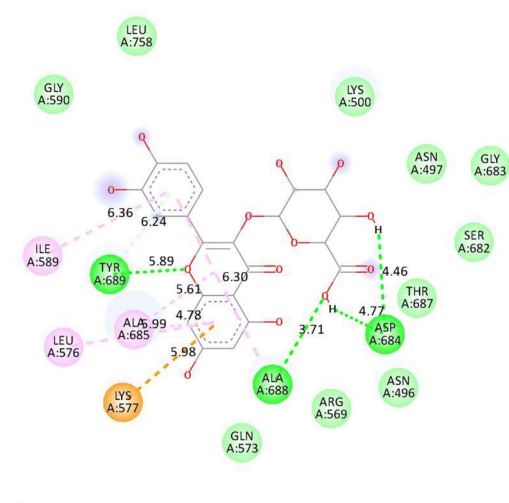
Ligand Adı ve İki Boyutlu Molekül Şekli	İki Boyutlu Etkileşimler ve Bağlanma Enerjisi Değeri
<p style="text-align: center;">Neferin</p> 	<p style="text-align: center;">Bağlanma Afinitesi -6.7 kcal/mol</p>  <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ van der Waals ■ Conventional Hydrogen Bond ■ Unfavorable Donor-Donor ■ Pi-Cation ■ Pi-Donor Hydrogen Bond ■ Alkyl ■ Pi-Alkyl
<p style="text-align: center;">Hernandezin</p> 	<p style="text-align: center;">Bağlanma Afinitesi -6.7 kcal/mol</p>  <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ van der Waals ■ Conventional Hydrogen Bond ■ Carbon Hydrogen Bond ■ Alkyl ■ Pi-Alkyl

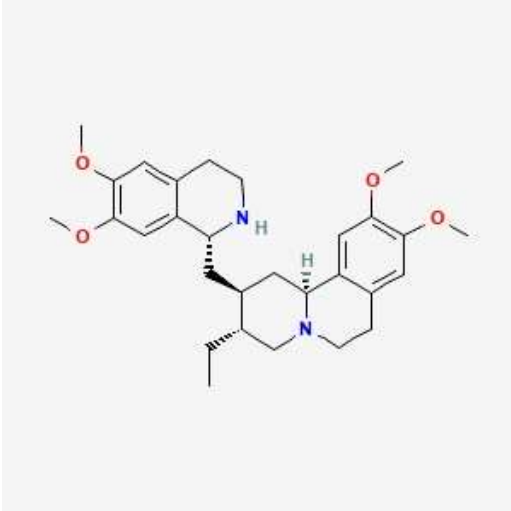
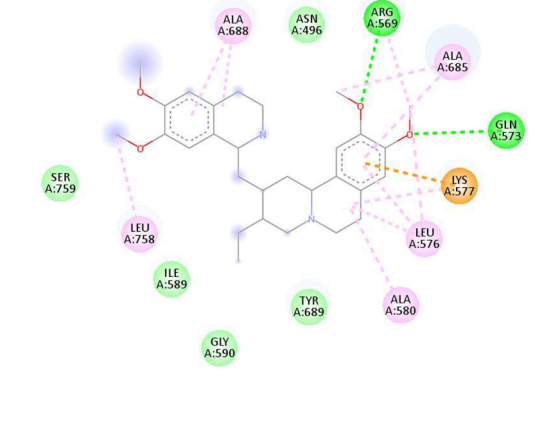
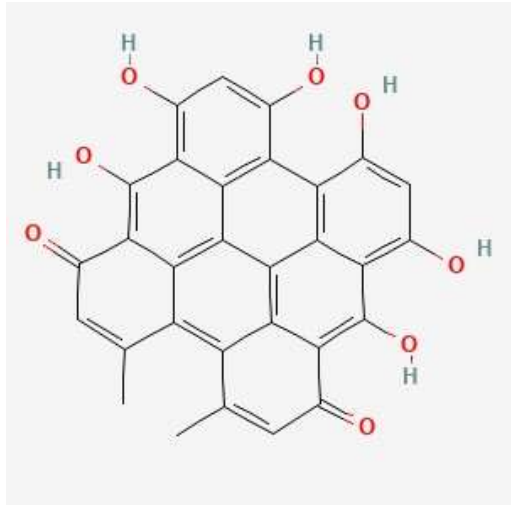
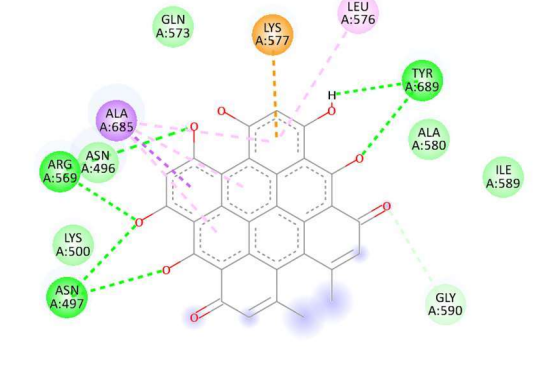
Ligand Adı ve İki Boyutlu Molekül Şekli	İki Boyutlu Etkileşimler ve Bağlanma Enerjisi Değeri
<p style="text-align: center;">Kuersitrin</p> 	<p style="text-align: center;">Bağlanma Afinitesi -6.8 kcal/mol</p>  <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ van der Waals ■ Conventional Hydrogen Bond ■ Carbon Hydrogen Bond ■ Unfavorable Donor-Donor ■ Pi-Cation ■ Pi-Sigma ■ Pi-Pi T-shaped ■ Pi-Alkyl
<p style="text-align: center;">Mirisetin</p> 	<p style="text-align: center;">Bağlanma Afinitesi -6.8 kcal/mol</p>  <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ van der Waals ■ Conventional Hydrogen Bond ■ Carbon Hydrogen Bond ■ Unfavorable Donor-Donor ■ Pi-Cation ■ Pi-Sigma ■ Pi-Pi T-shaped ■ Pi-Alkyl

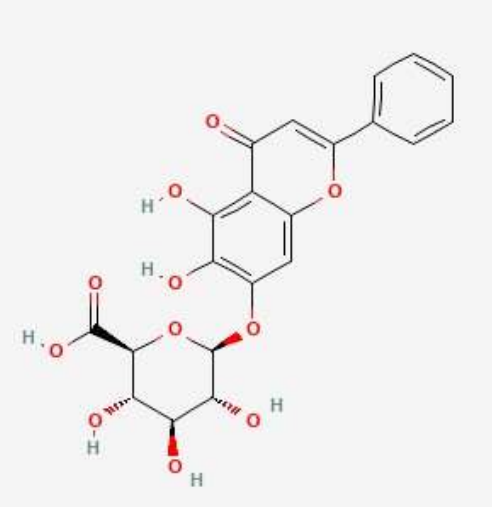
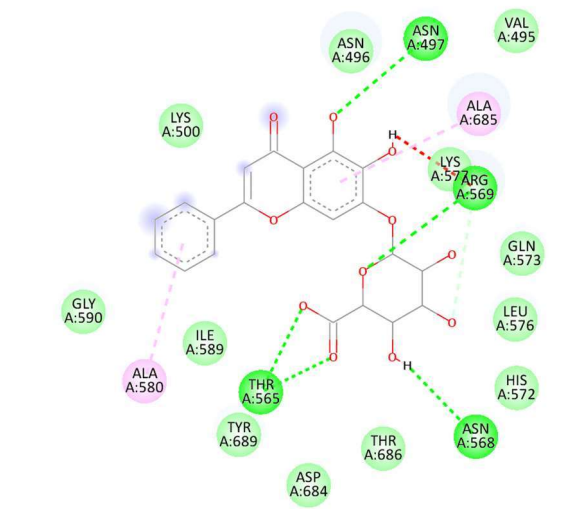
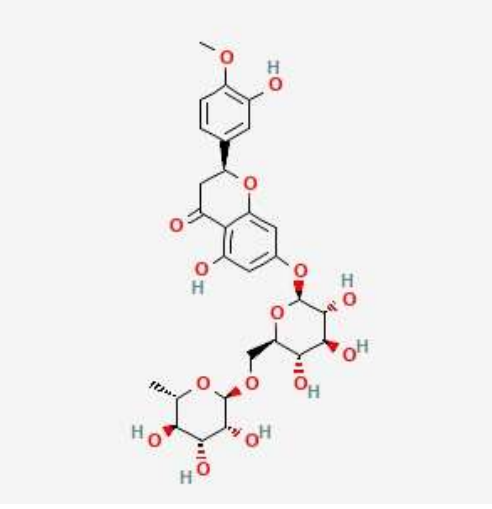
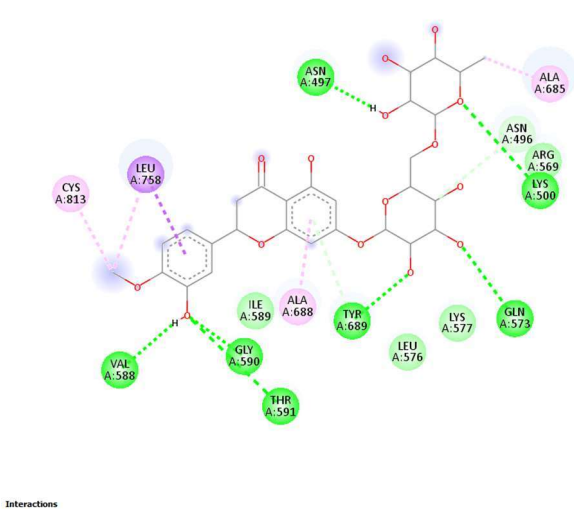
Ligand Adı ve İki Boyutlu Molekül Şekli	İki Boyutlu Etkileşimler ve Bağlanma Enerjisi Değeri
<p style="text-align: center;">Kuersetin</p> 	<p style="text-align: center;">Bağlanma Afinitesi -6.9 kcal/mol</p>  <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> — van der Waals — Conventional Hydrogen Bond — Unfavorable Donor-Donor — Pi-Cation — Pi-Donor Hydrogen Bond — Pi-Alkyl
<p style="text-align: center;">Likorin</p> 	<p style="text-align: center;">Bağlanma Afinitesi -6.9 kcal/mol</p>  <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> — van der Waals — Conventional Hydrogen Bond — Carbon Hydrogen Bond — Alkyl — Pi-Alkyl

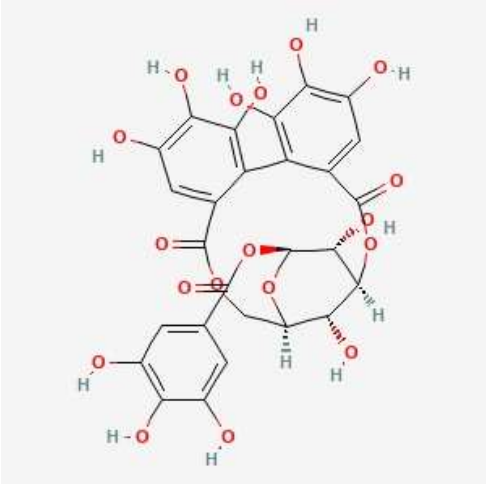
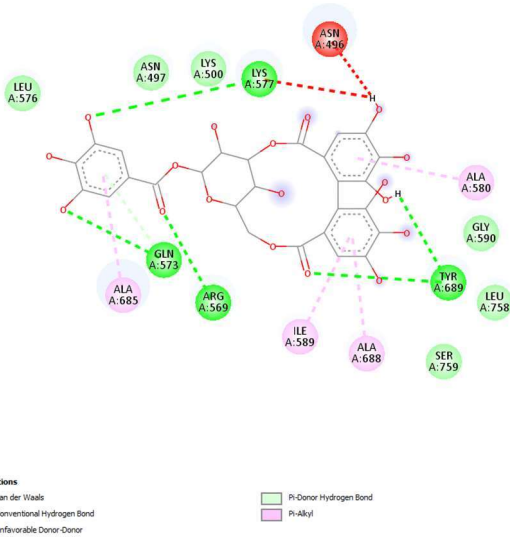
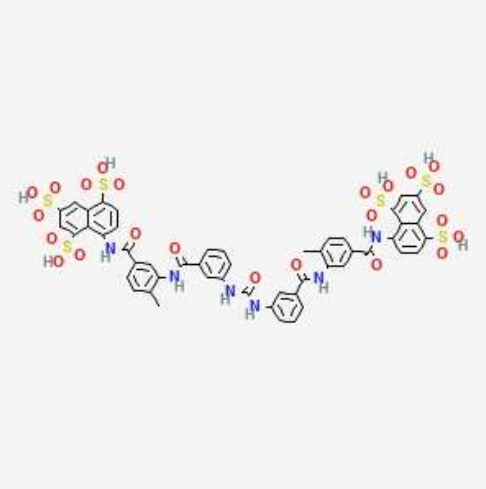
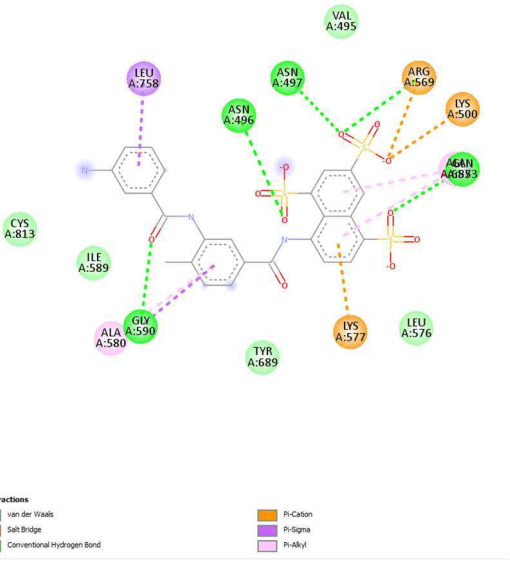
Ligand Adı ve İki Boyutlu Molekül Şekli	İki Boyutlu Etkileşimler ve Bağlanma Enerjisi Değeri
<p style="text-align: center;">Hiperosit</p> 	<p style="text-align: center;">Bağlanma Afinitesi -6.9 kcal/mol</p>  <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ van der Waals ■ Conventional Hydrogen Bond ■ Unfavorable Donor-Acceptor ■ Pi-Cation ■ Pi-Donor Hydrogen Bond ■ Pi-Alkyl
<p style="text-align: center;">Fisetin</p> 	<p style="text-align: center;">Bağlanma Afinitesi -6.9 kcal/mol</p>  <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ van der Waals ■ Conventional Hydrogen Bond ■ Carbon Hydrogen Bond ■ Pi-Anion

Ligand Adı ve İki Boyutlu Molekül Şekli	İki Boyutlu Etkileşimler ve Bağlanma Enerjisi Değeri
<p style="text-align: center;">Kampferol</p> 	<p style="text-align: center;">Bağlanma Afinitesi -6.9 kcal/mol</p>  <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Pi-Cation Pi-Donor Hydrogen Bond Pi-Alkyl
<p style="text-align: center;">Morin</p> 	<p style="text-align: center;">Bağlanma Afinitesi -7 kcal/mol</p>  <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Unfavorable Donor-Donor Pi-Cation Pi-Donor Hydrogen Bond Pi-Alkyl

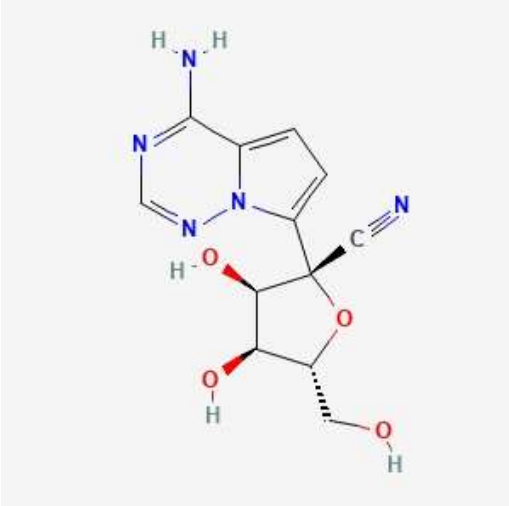
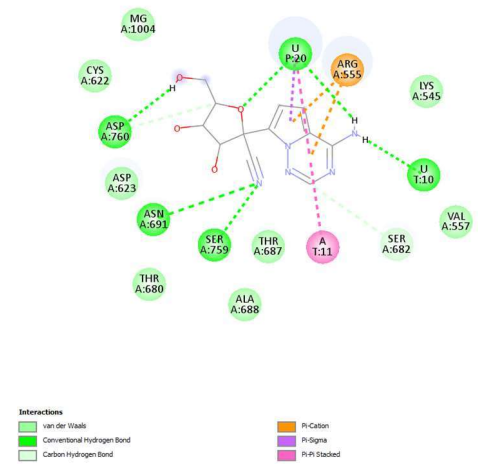
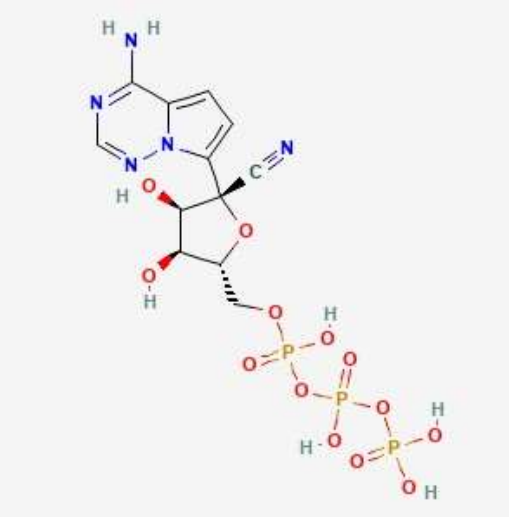
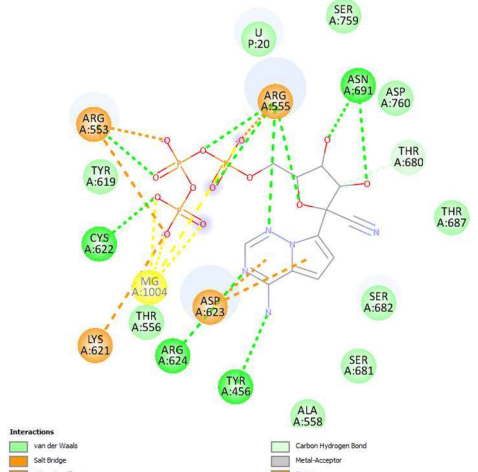
Ligand Adı ve İki Boyutlu Molekül Şekli	İki Boyutlu Etkileşimler ve Bağlanma Enerjisi Değeri
<p style="text-align: center;">Isokuersetin</p>  <p>The image shows the chemical structure of Isokueretin, a flavonoid compound. It features a central chromone ring system with a 3-phenyl group and a 7-O-glucoside moiety. The structure is shown with stereochemistry at the glycosidic linkage.</p>	<p style="text-align: center;">Bağlanma Afinitesi -7.3 kcal/mol</p>  <p>The interaction diagram for Isokueretin shows its binding to a protein. Key interactions include: <ul style="list-style-type: none"> Conventional Hydrogen Bonds (green dashed lines): THR A:686, THR A:687, ASP A:684, ASN A:496, ARG A:569, ALA A:688, LYS A:577, GLN A:573, TYR A:689, ILE A:589, LEU A:576, SER A:682, GLY A:683, LYS A:500, ASN A:497, and GLY A:590. van der Waals (light green dashed lines): THR A:686, THR A:687, ASP A:684, ASN A:496, ARG A:569, ALA A:688, LYS A:577, GLN A:573, TYR A:689, ILE A:589, LEU A:576, SER A:682, GLY A:683, LYS A:500, ASN A:497, and GLY A:590. π-π Stacking (pink dashed lines): ILE A:589 and ALA A:685. π-Cation (orange dashed lines): LYS A:577. π-Alkyl (purple dashed lines): LEU A:576. </p> <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond π-Cation π-Alkyl
<p style="text-align: center;">Mikelyanin</p>  <p>The image shows the chemical structure of Mikelyanin, a flavonoid compound. It features a central chromone ring system with a 3-phenyl group and a 7-O-glucoside moiety. The structure is shown with stereochemistry at the glycosidic linkage.</p>	<p style="text-align: center;">Bağlanma Afinitesi -7.4 kcal/mol</p>  <p>The interaction diagram for Mikelyanin shows its binding to a protein. Key interactions include: <ul style="list-style-type: none"> Conventional Hydrogen Bonds (green dashed lines): LEU A:758, GLY A:590, LYS A:500, ASN A:497, GLY A:683, SER A:682, THR A:687, ASP A:684, ASN A:496, ARG A:569, ALA A:688, LYS A:577, GLN A:573, TYR A:689, ILE A:589, LEU A:576, and ALA A:685. van der Waals (light green dashed lines): LEU A:758, GLY A:590, LYS A:500, ASN A:497, GLY A:683, SER A:682, THR A:687, ASP A:684, ASN A:496, ARG A:569, ALA A:688, LYS A:577, GLN A:573, TYR A:689, ILE A:589, LEU A:576, and ALA A:685. π-Donor Hydrogen Bond (light green dashed lines): TYR A:689 and ALA A:685. π-Cation (orange dashed lines): LYS A:577. π-Alkyl (purple dashed lines): LEU A:576. </p> <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond π-Donor Hydrogen Bond π-Cation π-Alkyl

Ligand Adı ve İki Boyutlu Molekül Şekli	İki Boyutlu Etkileşimler ve Bağlanma Enerjisi Değeri
<p style="text-align: center;">Emetin</p> 	<p style="text-align: center;">Bağlanma Afinitesi -7.4 kcal/mol</p>  <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ van der Waals ■ Conventional Hydrogen Bond ■ Pi-Cation ■ Pi-Sigma ■ Pi-Alkyl
<p style="text-align: center;">Hiperisin</p> 	<p style="text-align: center;">Bağlanma Afinitesi -7.7 kcal/mol</p>  <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ van der Waals ■ Conventional Hydrogen Bond ■ Pi-Cation ■ Pi-Sigma ■ Pi-Alkyl

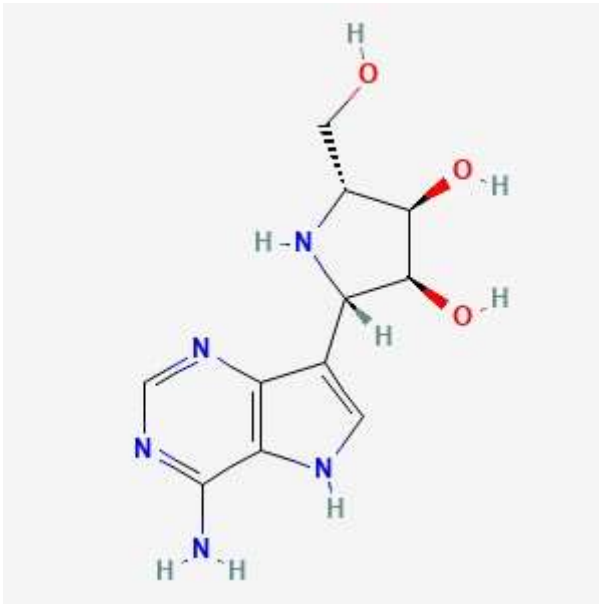
Ligand Adı ve İki Boyutlu Molekül Şekli	İki Boyutlu Etkileşimler ve Bağlanma Enerjisi Değeri
<p style="text-align: center;">Baikalin</p> 	<p style="text-align: center;">Bağlanma Afinitesi -7.7 kcal/mol</p>  <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ van der Waals ■ Conventional Hydrogen Bond ■ Carbon Hydrogen Bond ■ Pi-Alkyl ■ Unfavorable Donor-Donor
<p style="text-align: center;">Hesperidin</p> 	<p style="text-align: center;">Bağlanma Afinitesi -7.8 kcal/mol</p>  <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ van der Waals ■ Conventional Hydrogen Bond ■ Carbon Hydrogen Bond ■ Pi-Donor Hydrogen Bond ■ Pi-Sigma ■ Pi-H T-shaped ■ Alkyl ■ Pi-Alkyl

Ligand Adı ve İki Boyutlu Molekül Şekli	İki Boyutlu Etkileşimler ve Bağlanma Enerjisi Değeri
<p style="text-align: center;">Korilagin</p> 	<p style="text-align: center;">Bağlanma Afinitesi -7.9 kcal/mol</p>  <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> Van der Waals Conventional Hydrogen Bond Unfavorable Donor-Donor Pi-Donor Hydrogen Bond Pi-Alkyl
<p style="text-align: center;">Suramin</p> 	<p style="text-align: center;">Bağlanma Afinitesi -8.5 kcal/mol</p>  <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> Van der Waals Salt Bridge Conventional Hydrogen Bond Pi-Cation Pi-Sigma Pi-Alkyl

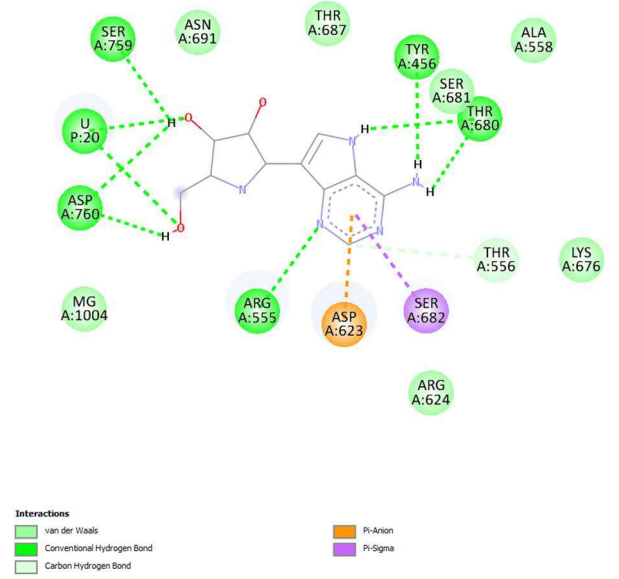
**EK.5 Nükleotit Olan Moleküller için En İyi, Orta ve En kötü Moleküller
Kenetlenme Etkileşimleri**

Ligand Adı ve İki Boyutlu Molekül Şekli	İki Boyutlu Etkileşimler ve Bağlanma Enerjisi Değeri
<p align="center">GS-441524</p> 	<p align="center">Bağlanma Afinitesi -6.9 kcal/mol</p>  <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond Pi-Cation Pi-Pi Pi-Pi Stacked
<p align="center">Remdesivir</p> 	<p align="center">Bağlanma Afinitesi -8,8 kcal/mol</p>  <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Salt Bridge Attractive Charge Conventional Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond Metal-Acceptor Pi-Anion

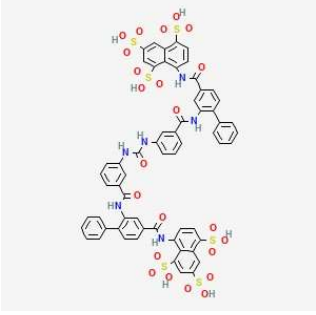
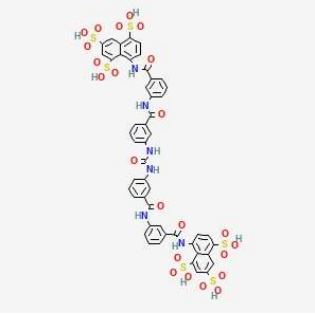
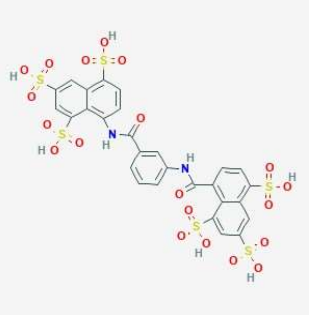
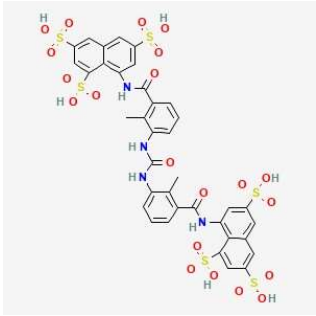
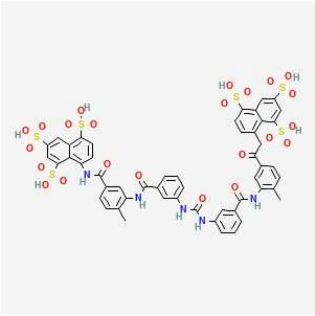
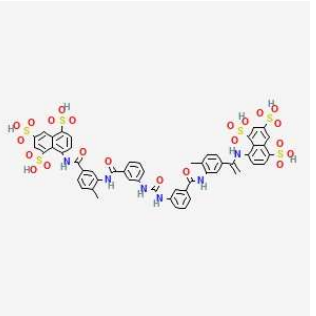
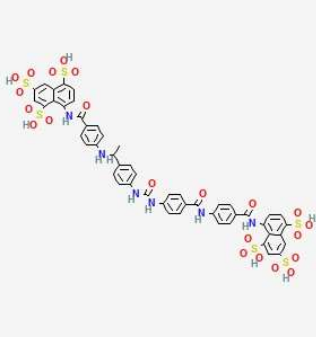
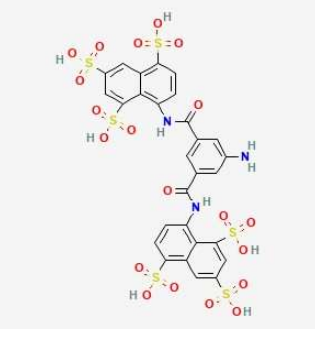
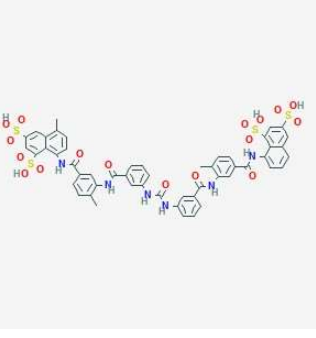
Galidesivir

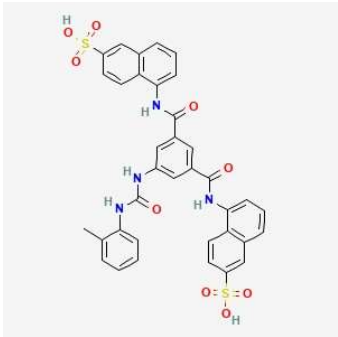
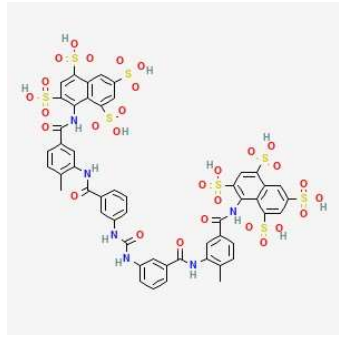
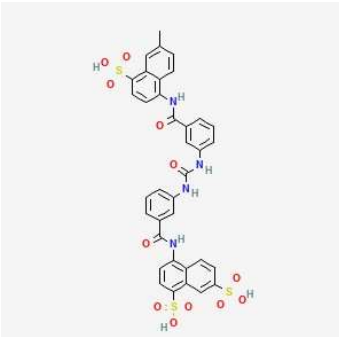
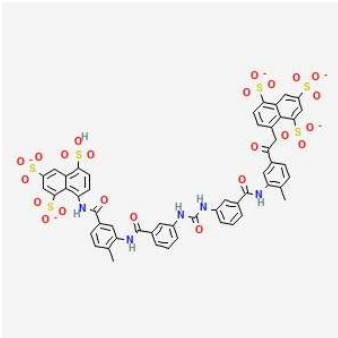
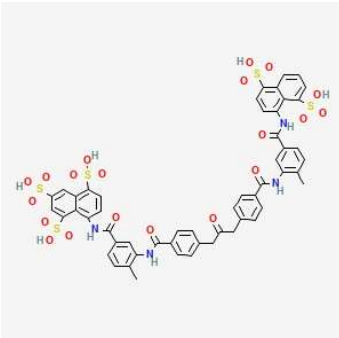
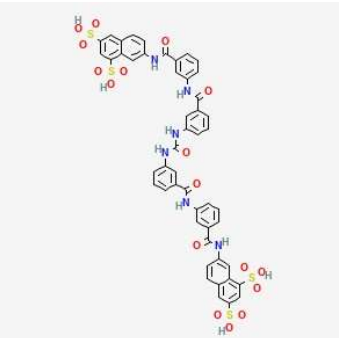
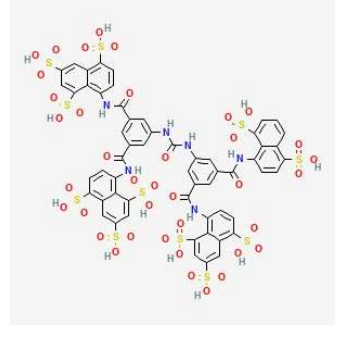
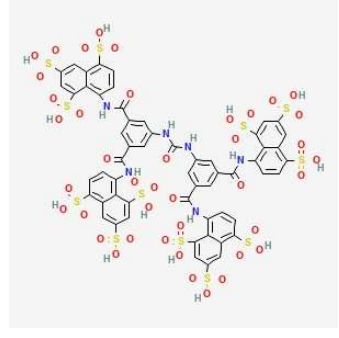
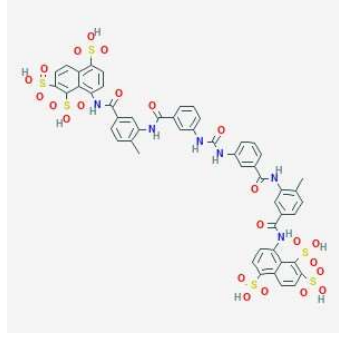


Bağlanma Afinitesi -9.6 kcal/mol



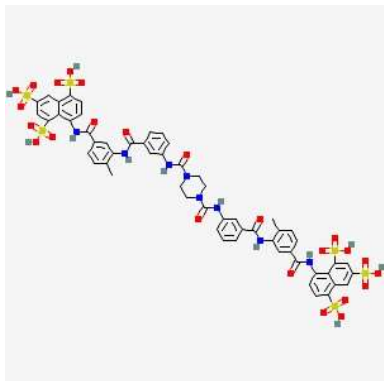
EK.6 Sanal Ligand Taraması Sonucunda Elde Edilen 20 Potansiyel İlaç Adayı

<p>16163320 -10,6 kcal/mol</p> 	<p>10103003 -10,6 kcal/mol</p> 	<p>101835662 -10,6 kcal/mol</p> 
<p>10080005 -10,7 kcal/mol</p> 	<p>158879507 -10,8 kcal/mol</p> 	<p>157734168 -10,8 kcal/mol</p> 
<p>117864514 -10,8 kcal/mol</p> 	<p>11216794 -10,8 kcal/mol</p> 	<p>135215193 -10,9 kcal/mol</p> 

<p>12094697 -10,9 kcal/mol</p> 	<p>155522677 -11 kcal/mol</p> 	<p>158589534 -11 kcal/mol</p> 
<p>158879506 -11.1 kcal/mol</p> 	<p>158942684 -11.2 kcal/mol</p> 	<p>11788083 -11.3 kcal/mol</p> 
<p>16139209 -11.4 kcal/mol</p> 	<p>16151843 -11.6 kcal/mol</p> 	<p>133588152 -11.6 kcal/mol</p> 

100964010

-11.7 kcal/mol



10329067

-12.1 kcal/mol

