

**COVID-19 TEDAVİSİ İÇİN PAPAİN-BENZERİ PROTEAZ
(PL_{pro}) İNHİBİTÖRLERİNİN *in silico* YÖNTEMLER
KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF PAPAİN-LIKE PROTEASE (PL_{pro})
INHIBITORS FOR THE TREATMENT OF COVID-19 USING
in silico METHODS**

OZAN ÇOBANOĞLU

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.

2023

ÖZET

COVID-19 TEDAVİSİ İÇİN PAPAİN- BENZERİ PROTEAZ (PLpro) İNHİBİTÖRLERİNİN *in silico* YÖNTEMLER KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI

Ozan ÇOBANOĞLU

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Vildan ADAR GÜRSOY

Ocak 2023, 121 sayfa

Çin'in Wuhan kentinde Aralık 2019 tarihinde başlayan yeni koronavirus pandemisi dünyayı etkilemektedir. SARS-CoV-2 virüsünün neden olduğu bu hastalığa COVID-19 ismi verildi. Dünya çapında 647 milyon kişi yakalanırken; 6,6 milyon kişi hayatını kaybetti. Ülkemizde ise 17 milyonu aşkın vaka yaşanırken, can kaybı sayısı ise 100 binin üzerindedir. Tedavi için onaylanan 6 aşı ile virüsün farklı hedefleriyle etkileşen 3 ilaç ve farklı hastalıklar için onay alıp ikinci onayını COVID-19 için alan 4 ilaç olmak üzere toplam 7 ilaç vardır.

Koronavirüslerin membranının üzerinde S, membran ve zarf proteinleri olmak üzere üç yapısal protein bulunur. Virüs RNA'sında 3-kimotripsin-benzeri proteaz (3CLpro), papain-benzeri proteaz (PLpro), RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp) ve helikaz olmak üzere dört fonksiyonel protein bulunur. COVID-19 tedavisi için yeni inhibitör araştırmaları için önemli ilaç hedefleri; PLpro, 3CLpro, RdRp ve S proteindir. Tez kapsamında seçilen ilaç hedefi olan PLpro enzimi ile etkileşen inhibitör henüz yoktur.

PLpro enzimi, virüsün kopyalanmasını sağlayan ve ev sahibi bağışıklığını bozabilen bir enzimdir. PLpro enzimi bu görevleriyle oldukça önemli bir ilaç hedefidir. PLpro enzimi ubikuitin-benzeri (Ubl) kısım ile parmaklar, başparmak ve avuç içi alanlarını içeren aktif kısım olmak üzere iki ana kısımdan oluşur. PLpro enziminin aktif bölgesine bağlanan inhibitörler kovalent bağlanırlar. Enzimin avuç içi alanında yeni keşfedilen

BL2 bölgesi vardır. PLpro enzim substratları bu bölgeye bağlanmamaktadır. BL2 bölgesine kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanan inhibitörler aktif bölgeyi dolaylı yoldan bozarak aktif bölgeye substrat bağlanmasını engelleyerek enzim inhibisyonunu sağlayabilir.

Bu tez çalışması, validasyon, moleküler doking (kenetlenme), sanal ligand tarama ve ADMET olmak üzere dört hesaplama içermektedir.

Birinci aşamada, SARS-CoV-2 PLpro enziminin yeni keşfedilen BL2 bölgesi ile etkileşebilecek düşük IC₅₀ değerine sahip (0.56 µM) 7LBS PDB kodlu protein-ligand kompleksi ile bu komplekse ait XR8-24 ligandı için Autodock Vina programı kullanılarak validasyon çalışması yapıldı. Yeniden doking (redoking) hesaplamaları sonucu, deneysel (x-ray) ve hesapsal sonuçlarının karşılaştırılması sonucu RMSD değeri 1.723Å bulundu ve değer 2Å değerinden düşük olması seçilen yöntemin uygunluğunu göstermektedir. Ligandın hesaplanan K_i değeri 108 nM olarak bulunmuştur.

İkinci aşamada, literatürde PLpro enzimi ile etkileşebileceği düşünülen tıbbi etkiye sahip olduğu yapılan deneysel çalışmalarla belirlenen kırmızı adaçayı, huş bitkisi gibi 10 farklı bitkiye ait 35 bitki fitokimyasalı ile farklı hastalıklar için onaylanan 8 adet ilaç olmak üzere toplam 43 ligand için moleküler doking hesaplamaları Autodock Vina programı ile 7LBS protein-ligand kompleksi ile doking hesaplamaları sonucu bağlanma enerjisi ile hesapsal K_i değerleri bulundu. En yüksek dolayısıyla en iyi bağlanma enerjisi ve hesaplanan K_i değerine sahip olan molekülün Tanşınon IIA olduğu belirlendi.

Üçüncü aşamada, Tanşınon IIA molekülüne, sanal ligand taraması yapılarak bu moleküle benzer özellik gösteren 98 molekül ZINC15 veri tabanı ile veri seti olarak indirildi. Bu moleküllere, moleküler doking hesaplamaları ile aynı parametrelerle ikinci doking hesaplamaları yapılarak en yüksek bağlanma enerjisi gösteren 21 molekül tespit edilerek; son aşama olan ADME ve toksikoloji (emilim-dağılım-metabolizma-atılım-toksisite) hesaplamaları yapıldı. Belirlenen ADMET testlerinden uygun sonuç alan 14 molekül belirlenerek çalışma tamamlandı.

Elde edilen bu moleküller, COVID-19 pandemisi için PLpro enzim inhibitörü olarak antiviral ilaç tasarımı açısından etkili olabilir, öncü molekül bulma konusunda önemli katkıda bulunabilir.

Anahtar Kelimeler: COVID-19, Papain-benzeri proteaz, *in silico*, Moleküler Doking, Sanal Ligand Tarama, ADMET

ABSTRACT

INVESTIGATION OF PAPAİN-LIKE PROTEASE (PLpro) INHIBITORS FOR THE TREATMENT OF COVID-19 USING *in silico* METHODS

Ozan ÇOBANOĞLU

Masters of Degree, Department of Chemistry

Supervisor: Vildan ADAR GÜRSOY

January 2023, 121 pages

The new coronavirus pandemic, which started in December 2019 in Wuhan, China, affects the world. This disease, caused by the SARS-CoV-2 virus, was named COVID-19. While 647 million people were caught worldwide; 6.6 million people lost their lives. While there are more than 17 million cases in Turkey, the number of deaths is over 100 thousand. There are a total of 7 drugs, including 6 vaccines approved for treatment, 3 drugs that interact with different targets of the virus, and 4 drugs that have been approved for different diseases and received their second approval for COVID-19.

There are three structural proteins on the membrane of coronaviruses: S, membrane and envelope proteins. Virus RNA contains four functional proteins: 3-chymotrypsin-like protease (3CLpro), papain-like protease (PLpro), RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), and helicase. Important drug targets for new inhibitor research for the treatment of COVID-19; PLpro is 3CLpro, RdRp and S protein. There is no inhibitor that interacts with the PLpro enzyme, which is the drug target selected within the scope of the thesis.

The PLpro enzyme is an enzyme that enables the replication of the virus and can impair host immunity. The PLpro enzyme is a very important drug target with these functions. The PLpro enzyme consists of two main parts, the ubiquitin-like (Ubl) part and the active part, which includes the areas of the fingers, thumb and palm. Inhibitors that bind to the active site of the PLpro enzyme are covalently bound. The enzyme has a newly discovered BL2 region in the palm area. PLpro enzyme substrates do not bind to this site. Inhibitors that bind to the BL2 region by non-covalent interactions can indirectly

disrupt the active site and prevent substrate binding to the active site, thereby providing enzyme inhibition.

This thesis includes four calculations: validation, molecular docking, virtual ligand scanning and ADMET.

In the first step, validation study was performed using Autodock Vina program for 7LBS PDB encoded protein-ligand complex with low IC₅₀ (0.56 μM) that can interact with the newly discovered BL2 region of SARS-CoV-2 PLpro enzyme and XR8-24 ligand belonging to this complex. As a result of redocking calculations, the experimental (x-ray) and computational results were matched, the RMSD value was found to be 1.723Å, and the value being less than 2Å indicates the suitability of the chosen method. The calculated K_i value of the ligand was found to be 108 nM.

In the second stage, molecular docking calculations for a total of 43 ligands, 8 drugs approved for different diseases, and 35 plant phytochemicals belonging to 10 different plants such as red sage and birch, determined by experimental studies that are thought to interact with the PLpro enzyme in the literature, were determined by experimental studies Autodock Vina program. As a result of docking calculations with 7LBS protein-ligand complex, binding energy and computational K_i values were found. It was determined that the molecule with the highest binding energy and calculated K_i value was Tanshinone IIA.

In the third step, 98 molecules with similar properties to Tanshinone IIA were downloaded as a data set with the ZINC15 database by scanning virtual ligands. Second docking calculations were made to these molecules with the same parameters as the molecular docking calculations, and 21 molecules with the highest binding energy were determined; ADME and toxicology (absorption-distribution-metabolism-excretion-toxicity) calculations were made. The study was completed by identifying 14 molecules that obtained appropriate results from the determined ADMET tests.

These obtained molecules may be effective in terms of antiviral drug design as PLpro enzyme inhibitor for the COVID-19 pandemic, and may contribute significantly to finding a precursor molecule.

Keywords: COVID-19, Papain-like protease, *in silico*, Molecular Docking, Virtual Ligand Screening, ADMET

TEŞEKKÜR

Gerek lisans eğitimim gerekse yüksek lisans eğitimim boyunca, tez çalıŐmama ve akademik kariyerime her türlü katkıda bulunan, sadece akademik değil kiŐisel olarak iyi bir insan olabilmek için her türlü bilgi birikim ve tecrübeleri bizlere ıŐık tutan, değerli görüŐlerini her zaman dinlediğim, öğrencileri için daima en iyiyi, en doğruyu ve en güzelini gösterebilmek için çaba sarf eden saygıdeğer hocam, danıŐmanım, mentorum Sayın Prof. Dr. Vildan Adar Gürsoy'a teŐekkürlerimi sunarım.

Tez çalıŐmam sırasında her zaman yanımda olan, her türlü desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, her problemimde beni hiç yalnız bırakmayan baŐta ailem olmak üzere, her birini birer ailem olarak gördüğüm; arkadaŐlarım, dostlarım kısacası yanımda olan herkese çok teşekkür ederim. Ayrıca Hacettepe Üniversitesi Bilgisayar Destekli İlaç Tasarım Araştırma Grubuna (CADD) sağladığı tüm destekleri için ve Bilgisayar Destekli İlaç Tasarım Laboratuvarının kurulmasında 106T088 DOI numaralı proje için sağladıkları katkıdan ötürü TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

OZAN OBANOđLU

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER.....	viii
ÇİZELGELER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. SARS-CoV-2 Virüsü ve COVID-19 Salgını.....	3
2.1.1 Koronavirüsler.....	6
2.1.2. SARS-CoV-2 Virüsünün Yapısı	8
2.1.3. SARS-CoV-2 Virüsünün Hücre ile Etkileşim Mekanizması	10
2.1.4. SARS-CoV-2 PLpro Enzimi: Yapı ve İşlev.....	11
2.1.4.1 SARS-CoV-2 PLpro Enzimi Yapısı.....	11
2.1.4.2 SARS-CoV-2 PLpro Enzimi İşlevi	13
2.1.5. SARS-CoV-2 Plpro enziminin X-ray kristal yapıları	17
2.1.6. Viral hedef yapı PLpro enziminin BL2 bölgesi	19
2.2. PLpro ile <i>in silico</i> Çalışması Yapılan Farklı Hastalıklar için Onaylanan İlaçlar	21
2.3. PLpro ile Aktivite Gösteren Tıbbi bitkiler ve Bitki Fitokimyasalları	24
2.3.1. Hint Ekinezyası (<i>Andrographis paniculata</i>): Andrografolid	27
2.3.2. Çin Takkesi (<i>Scutellaria baicalensis</i> G.i): Baikalin.....	27
2.3.3. Kapari (<i>Capparis spinosa</i>): Kuersetin	28
2.3.4. Kırmızı Gromwell (<i>Lithospermum erythrorhizon</i>): Şikonin.....	29
2.3.5. Çay: Kaemferol	29
2.3.6. Batawali (<i>Tinospora tuberculata</i>): n-cis-Feruloiltiramin.....	30
2.3.7. Cehri çiçeği (<i>Reseda luteola</i>): Luteolin.....	30
2.3.8. Acem Dutu (<i>Broussonetia papyrifera</i>): Abisinon II	31
2.3.9. Huş (<i>Betula</i>): Betülinik Asit.....	31
2.3.10. Kırmızı Adaçayı (<i>Salvia miltiorrhiza</i>): Tanşinon Molekülleri.....	32
2.4. Protein Veri Tabanları.....	33
2.5. İlaç Tasarımında Bilgisayarlar	34
2.6 Moleküler Doking Yöntemi (Moleküler Kenetlenme).....	35
2.6.1 Bağlanma Enerjisi	37
2.7 Sanal Ligand Taraması.....	37
3. MATERYAL VE METOT	38
3.1. Tezde Kullanılan Program ve Veri Tabanları	38

3.1.1. Gaussian 09W	38
3.1.2 RCSB Protein Veri Bankası	39
3.1.3. AutoDock Vina	39
3.1.4 ZINC 15 Veri Tabanı	40
3.1.5. SwissADME ve pkCSM Online Programları.....	41
3.1.6. BIOVIA Discovery Studio Visualizer.....	46
3.2. Çalışma Adımları	47
3.2.1 Moleküler Doking Hesaplamaları için Hedef Protein Seçimi.....	48
3.2.2. Moleküler Doking Hesaplamaları için Ligandların Hazırlanması	50
3.2.3. Moleküler Doking Hesaplamaları için Validasyon Çalışması	50
3.2.4. Moleküler Doking Hesaplamaları	51
3.2.5. Sanal Ligand Tarama Hesaplamaları	51
3.2.6. ADME ve Toksikoloji Hesaplamaları.....	51
4. SONUÇLAR	52
4.1. Validasyon Hesaplamaları	52
4.1.1. Validasyon Değerlendirme.....	55
4.2. Moleküler Doking Hesaplamaları	56
4.2.1. Moleküler Doking Sonuçları	57
4.2.1.1. Fitokimyasal Doking Sonuçları.....	57
4.2.1.2. İlaç Doking Sonuçları	62
4.3 Sanal Ligand Tarama	64
4.3.1. Sanal Ligand Tarama Sonuçları	65
4.3.1.1 Sanal Ligand Tarama Sonucu En İyi Afiniteye Sahip Moleküller.....	66
4.4 ADME ve Toksikoloji Hesaplamaları.....	69
4.4.1. ADME ve Toksikoloji Sonuçları.....	69
4.4.2 ADMET Değerlendirme	76
5. YORUMLAR.....	78
6. REFERANSLAR	82
EK	89
EK.1 Sanal Ligand Taramada kullanılan config dosyası	89
EK.2 Sanal Ligand Taramada kullanılan dosya	89
EK3. Fitokimyasal Doking Sonucu Etkileşimleri.....	90
EK4. İlaç Doking Sonucu Etkileşimleri.....	107
EK5. Sanal Ligand Taramada En İyi Sonucu Veren Ligandların Etkileşimleri	111
ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ŞEKİLLER

Şekil 2-1 RdRp inhibitörü Lagevriro ilacının yapısı	4
Şekil 2-2 3CLpro inhibitörü Paxlovid (Nirmatrelvir ve Ritonavir karışımı) ilacının yapısı	4
Şekil 2-3 Remdesivir ilacının yapısı	5
Şekil 2-4 Baricitinib ilacının yapısı.....	5
Şekil 2-5. SARS-CoV-2 virüsünün şematik yapısı	7
Şekil 2-6. SARS-CoV-2 genom dizilimi.....	8
Şekil 2-7 Bir ev sahibi hücreye giren ve içeride çoğalan bir koronavirüsün yaşam döngüsü.....	10
Şekil 2-8 SARS-CoV-2 PLpro enzim yapısı.....	11
Şekil 2-9 SARS-CoV-2 PLpro enziminin substratları	12
Şekil 2-10 Virüsün Pp1a/Pp1ab proteinlerinin viral PLpro ve 3CLpro tarafından parçalanarak Nsp1-16 üretimi .	13
Şekil 2-11 PLpro enziminin çift fonksiyonunun şematik gösterimi.....	14
Şekil 2-12 Ubikuitin ve ISG15 proteininin yapısı.....	15
Şekil 2-13 PLpro enzimi aktivitelerinin şematik görüntüsü.....	15
Şekil 2-14 Ubikuitin proteininin yapısı.....	16
Şekil 2-15 SARS-CoV-2 PLpro enzimi BL2 bölgesi.....	19
Şekil 2-16 BL2 bölgesi ile etkileşen moleküller	20
Şekil 2-17 7LBS protein-ligand kompleksinin protein ve ligandı arasındaki su köprüsü.....	21
Şekil 2-18 Farklı hastalıklar için onaylanan ilaçlardan doküman çalışması yapılan ilaçlar	22
Şekil 2-19 PLpro enzimi ile aktivite gösteren 9 tıbbi bitkiye ait bitki fitokimyasalları	25
Şekil 2-20 PLpro enzimi ile aktivite gösteren kırmızı adaçayına ait bitki fitokimyasalları	26
Şekil 2-21 Hint Ekinezyası bitkisi.....	27
Şekil 2-22 Çin Takkesi bitkisi.....	27
Şekil 2-23 Kapari bitkisi	28
Şekil 2-24 Kırmızı Gromwell bitkisi.....	29
Şekil 2-25 Çay bitkisi.....	29
Şekil 2-26 Batawali bitkisi.....	30
Şekil 2-27 Cehri Çiçeği bitkisi.....	30
Şekil 2-28 Acem Dutu bitkisi.....	31
Şekil 2-29 Huş bitkisi.....	31
Şekil 2-30 Kırmızı Adaçayı bitkisi	32
Şekil 2-31 RCSB Protein Veri Tabanı Arayüzü	33
Şekil 3-1 GaussView arayüzü	38
Şekil 3-2 GaussView arayüzünde görüntülenen Tanşinon IIA molekülü.....	38
Şekil 3-3 RCSB protein veri tabanı arayüzü ve örnek protein-ligand kompleks yapısı.....	39
Şekil 3-4 Autodock Vina ile görüntülenen 7LBS proteini	40
Şekil 3-5 ZINC15 Veri Tabanı Arayüzü.....	41
Şekil 3-6 Biyoyararlanım radarı örneği.....	45
Şekil 3-7 BIOVIA Discovery Studio Visualizer ile görüntülenen protein-ligand etkileşim örneği..	46
Şekil 3-8 7LBS proteininin amino asit dizilimi	48
Şekil 3-9 7LBS proteinin özellikleri	49
Şekil 4-1 BIOVIA Discovery Studio Visualizer ile görüntülenen 7LBS Proteini ve Su köprüsü etkileşimleri	53
Şekil 4-2 Validasyon Çalışması Sonuçları	53
Şekil 4-3 Validasyon sonucu elde edilen ligand ile referans ligandın karşılaştırılması	54
Şekil 4-4 Validasyon hesaplaması sonucu elde edilen 2D ve 3D Etkileşimler.....	54
Şekil 4-5 Redoking ligandı ile referans ligand karşılaştırması	55
Şekil 4-6 Tanşinon IIA en iyi sonuç 3D hidrojen bağları	61
Şekil 5-1 Tanşinon IIA molekülünün 2D etkileşimleri.....	79
Şekil 5-2 Tanşinon IIA molekülü ve Referans ligand (XR8-24)	79

ÇİZELGELER

Çizelge 2-1 Büyük viral salgına sebep olan koronavirüsler.....	3
Çizelge 2-2 Protein veri bankasında bulunan SARS-CoV-2 PLpro kompleks yapıları*.....	18
Çizelge 2-3 COVID-19 Tedavisi için denenen farklı hastalıklar için onaylanan ilaçlar.....	22
Çizelge 2-4 PLpro enzimi ile aktivite gösteren bitki fitokimyasalları	25
Çizelge 2-5 Son yıllarda <i>in silico</i> yöntemler kullanılarak geliştirilen onaylanmış ve raporlanmış ilaçlar.....	35
Çizelge 2-6 Moleküler Doking Hesaplaması Yapan Programlar.....	36
Çizelge 3-1 pkCSM veri tabanı ile yapılan ADME metotları	43
Çizelge 3-2 pkCSM veri tabanı ile yapılan Toksikoloji metotları	44
Çizelge 4-1 SARS-CoV-2 PLpro inhibitör özellikleri incelenen bitki fitokimyasalları	56
Çizelge 4-2 SARS-CoV-2 PLpro inhibitör özellikleri incelenen farklı hastalıklar için onaylanan ilaçlar ..	57
Çizelge 4-3 Fitokimyasal Doking Hesaplama Sonuçları	58
Çizelge 4-4 En iyi, orta ve en kötü bağlanma afinitesi veren fitokimyasalların moleküler doking sonucu etkileşimleri	59
Çizelge 4-5 Var olan ilaçların Doking Sonuçları	62
Çizelge 4-6 En iyi, orta ve zayıf bağlanma afinitesi veren farklı hedefler için onaylanan ilaçların moleküler doking sonucu etkileşimleri	63
Çizelge 4-7 ZINC15 Veri Tabanı ile indirilen Tanşinon IIA molekülüne benzer 98 ligand için sanal ligand tarama sonuçları	65
Çizelge 4-8 Sanal Ligand Tarama Sonucu En İyi Bağlanma Enerjisine Sahip Moleküller.....	66
Çizelge 4-9 En iyi, orta ve zayıf bağlanma afinitesi veren moleküllerin sanal ligand tarama sonucu elde edilen etkileşimler	67
Çizelge 4-10 ADME ve toksikoloji çalışması yapılan moleküller.....	70
Çizelge 4-11 21 ligand için pkCSM ile hesaplanan Emilim, Dağılım, Metabolizma, Atılım, Toksikite değerleri.....	71
Çizelge 4-12 21 ligand için SwissADME ile hesaplanan Fizikokimyasal ve Farmakokinetik Özellikler.....	72
Çizelge 4-13 SwissADME ile hesaplanan ilaç benzerliği ve biyoyararlanım radarı	73
Çizelge 4-14 AMES Toksikitesine sahip olmayan moleküllerin ADMET değerlendirmesi.....	77
Çizelge 5-1 AMES Toksikiteye sahip olmayan ve en iyi afinite değeri veren moleküller.....	80

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Å	Angström
$\Delta G_{Bağlanma}$	Bağlanma Enerjisi
$\Delta G_{İnhibisyon}$	İnhibisyon Enerjisi
μM	Mikromolar
nM	Nanomolar
K _i	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
FDA	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 COVID-19 (Koronavirüs Hastalığı 2019) küresel bir salgına neden olan oldukça bulaşıcı bir solunum yolu hastalığıdır. Bu hastalığa SARS-CoV-2 virüsü sebep olmaktadır. 16 Aralık 2022 tarihi itibarıyla Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) verilerine göre küresel çapta salgına yakalanan kişi sayısı 647 milyonu aşarken, can kaybı ise 6,6 milyonu aşmıştır [1]. Ülkemizde ise 17 milyonu aşkın vaka yaşanırken, can kaybı sayısı ise 100 binin üzerindedir [2].

Günümüzde sadece COVID-19 tedavisi için onaylanan Lagevrio, Paxlovid ve Xevudy olmak üzere 3 antiviral ilaç vardır. Bu üç ilaç, virüsün 3CLpro (3-kimotripsin benzeri proteaz), RdRp (RNA'ya bağımlı RNA polimeraz) ve S proteinleri ile etkileşir. SARS-CoV-2 virüsünün çoğalmasını sağlayan ve insan bağışıklık sistemini baskılayan PLpro enzimi için onaylanan ilaç henüz yoktur.

Koronavirüsler (CoV), hayvanlarda veya insanlarda ciddi hastalıklara, çeşitli problemlere neden olan oldukça büyük Coronaviridae isimli virüs ailesinde yer alır. Bu virüsler, zarflı ve tek iplikçikli RNA virüsleridir.

2003 yılında SARS (Şiddetli Akut Solunum Yolu Sendromu) salgını ve 2012 yılında ise MERS (Orta Doğu Solunum Sendromu) salgını ortaya çıkmıştır. Bu salgınlara sebep olan virüsler SARS-CoV ve MERS-CoV'dur. Yapılan genom analizleri, SARS-CoV-2 (ilk adıyla 2019-nCoV) isimli virüsün genomunun %80-90 oranında SARS-CoV ile aynı olduğunu göstermektedir. Bu sebeple COVID-19 pandemisine neden olan virüse SARS-CoV-2 ismi verilmiştir.

SARS-CoV-2 dahil tüm koronavirüsler için membran üzerinde S protein, membran proteini (M) ve zarf proteini olmak üzere üç yapısal protein bulunmaktadır. Bu proteinlere ek olarak virüs RNA'sında *papain-benzeri proteaz (PLpro)*, 3-kimotripsin benzeri proteaz (3CLpro), RNA'ya bağlı RNA polimeraz (RdRp) ve helikaz olmak üzere dört fonksiyonel protein (yapısal olmayan protein) bulunur [1].

COVID-19 tedavisinde sadece COVID-19 için onaylanan ilaçlara ek olarak, Ebola virüsü için onaylanan **Remdesivir**, anti iltihap ilacı olarak onaylanan **Barisitinib** ve **Anakinra** ile iltihaplı romatizma hastalığı için onaylanan **Tocilizumab** ilacı da kullanılır [2]. Farklı hastalıklar için onay alan ve ikinci onayı COVID-19 olan ilaçlardan

Remdesivir (RdRp inhibitörü) haricindeki ilaçların SARS-CoV-2 virüsünün hangi hedefi ile etkileştiği bilinmemektedir.

İlaç tedavisine ek olarak güncel kullanılan **AstraZeneca, Janssen, Moderna, Nuvaxovid, Pfizer-BioNTech, bitki bazlı virüs benzeri parçacıklar, rekombinant COVID-19 aşısı** olmak üzere 6 aşı bulunmaktadır.

SARS-CoV-2 virüsünün PLpro enziminin aktif bölgesine bağlanan inhibitörler kovalent bağlanırlar. Enzimin yeni bulunan BL2 bölgesine bağlanan inhibitörler enzime kovalent bağlanmayarak, enzimin aktif bölgesini dolaylı yoldan bozarlar. Bu sayede viral proteinlerin parçalanmasına dolayısıyla da virüsün kendini kopyalamasına engel olur.

Bu çalışmadaki amaç, SARS-CoV-2 virüsü için etkili olabileceği deneysel olarak belirlenen kırmızı adaçayı ve acem dutu gibi 10 farklı bitki içerisindeki **35 bitki fitokimyasalının**, virüsün PLpro enzimine ligandların kovalent bağlanmadığı BL2 bölgesi için inhibitör özelliklerinin yapı-temelli ilaç tasarım yöntemlerinden; Autodock Vina programı ile moleküler doking (kenetlenme) hesaplamaları, en aktif fitokimyasal için ZINC15 veri tabanı kullanılarak hazırlanan ligandların Autodock Vina ile sanal ligand taraması ve pkCSM ile SwissADME kullanılarak ADME ve toksikoloji hesaplamaları ile *in silico* aktivitesi en iyi moleküllerin farmakokinetik ve toksikolojik özelliklerinin belirlenerek, COVID-19 tedavisi için PLpro inhibitörü için öncü molekül bulmaktır. Ayrıca farklı hastalıklar için onay alan **8 ilacın** PLpro inhibitör özellikleri yapı-temelli ilaç tasarımı yöntemleri kullanılarak belirlendi. Bitkilerden izole edilen 35 bitki fitokimyasalı ile 8 adet ilacın ile birlikte toplam **43 molekülün in silico** hesaplamaları **ilk kez** bu tez kapsamında yapıldı.

Bu tezde yapılan araştırmalar sonucu elde edilen veriler, COVID-19 tedavisinde PLpro inhibitörü olarak etkili olabilecek yeni inhibitörlerin tasarlanmasına katkıda bulunabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. SARS-CoV-2 Virüsü ve COVID-19 Salgını

Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüsü-2 (SARS-CoV-2) virüsü Çin'in Wuhan kentinde Aralık 2019 tarihinde başlayarak tüm dünyayı etkilemektedir. 16 Aralık 2022 tarihi itibarıyla Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) verilerine göre küresel çapta salgına yakalanan kişi sayısı 647 milyondan fazlayken, can kaybı ise 6,6 milyonu geçti [1]. Ülkemizde ise 17 milyonu aşkın kişi hastalığa yakalanırken, can kaybı sayısı ise 100 binden fazladır [2].

Son 20 yılda, koronavirüslerin sebep olduğu 3 büyük salgın yaşanmıştır. 2002 yılında yaşanan Şiddetli Akut Solunum Sendromu koronavirüsünün (SARS-CoV-1) neden olduğu SARS ve 2012 yılında Orta Doğu Solunum Sendromu koronavirüsünün (MERS-CoV) neden olduğu MERS ile 2019 yılında başlayan SARS-CoV-2 virüsünün neden olduğu COVID-19 salgını yaşanmaktadır. (Çizelge 2-1)

COVID-19 için bugüne kadar var olan ilaçlardan onaylanan ve yalnızca COVID-19 için tasarlanarak onay alan 3 ilaç bulunmaktadır. SARS-CoV-2 virüsünün proteinlerini hedefleyen ilaçlar; Paxlovid, Lagevrio ve Xevudy ilaçlarıdır. Paxlovid 3CLpro enzimi ile, Lagevrio RdRp enzimi ile ve Xevudy S protein ile etkileşmektedir. SARS-CoV-2 virüsünün kendisini kopyalamasını sağlayan ve insan bağışıklık sistemini bozabilen PLpro enzimi için onaylanan ilaç henüz yoktur.

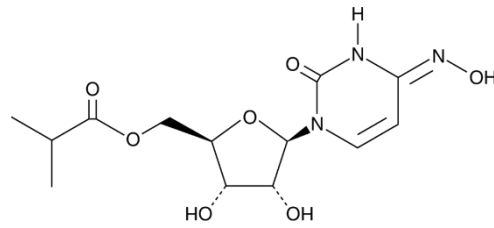
Çizelge 2-1 Büyük viral salgına sebep olan koronavirüsler

Hastalık	Virüs Cinsi	Taşıyıcı hayvanlar	Salgın Yılı
COVID-19	SARS CoV-2	Yarasa/Misk Kedisi	2019
Orta Doğu Solunum Sendromu	MERS-CoV	Deve	2012
Şiddetli Akut Solunum Yolu Sendromu	SARS-CoV	Yarasa/Misk Kedisi	2002

COVID-19 tedavisi için ilk yaklaşım farklı hastalıklar için onaylanan ilaçların kullanılmasıydı. Hastalığın tedavisi için antiviral etki gösteren ilaçlar ile SARS-CoV-2 virüsünün genom haritasının belirlenmesi sonucu tasarlanan yeni antiviral ilaçlar,

COVID-19 tedavisi için kullanılmaktadır. Tez kapsamında ele alınan antiviral hedeflerden PLpro yapısı ile etkileşen henüz bir ilaç yoktur. Yalnızca COVID-19 tedavisi için tasarlanıp onay alan 3 ilaç bulunmaktadır [3].

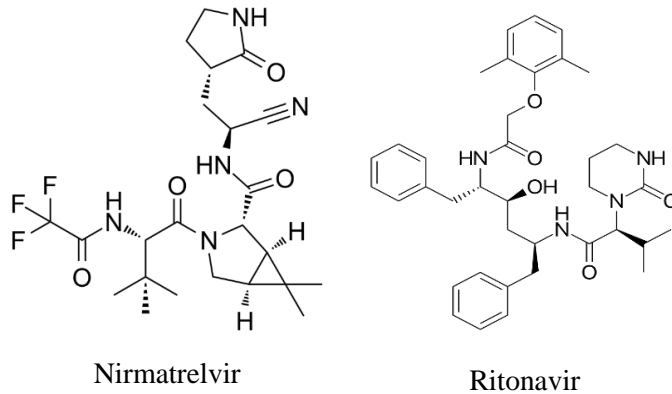
- **Lagevrio (Molnupiravir):** Lagevrio, SARS-CoV-2 virüsünün RdRp enzimi ile etkileşen bir ilaçtır. Lagevrio ilacı bir ön ilaç olarak alınıp insan vücudunda hidrolize olarak aktif ilaç halini alır. İlaç, RNA virüsünün genomu ile etkileşerek virüste mutasyona yol açar ve virüste viral hata felaketine neden olarak virüsün etkinliğini bitirmektedir. Lagevrio ilacı ABD’de Aralık 2021 yılında acil kullanım onayı almıştır. (Şekil 2-1)



Şekil

Şekil 2-1 RdRp inhibitörü Lagevrio ilacının yapısı

- **Paxlovid:** Paxlovid nirmatrelvir ile ritonavir ilaçlarının karışımı şeklinde verilen ve 3-kimotripsin-benzeri proteaz (3CLpro) ile etkileşen kokteyl bir ilaçtır. Nirmatrelvir ile ritonavir SARS-CoV-2 3CLpro inhibitörleridir. Aralık 2021 tarihinde FDA nirmatrelvir ile ritonavir karışımı halinde kullanılması için acil kullanım onayı verdi. (Şekil 2-2)



Nirmatrelvir

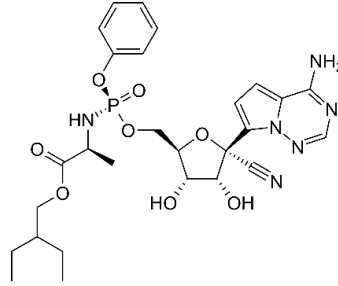
Ritonavir

Şekil 2-2 3CLpro inhibitörü Paxlovid (Nirmatrelvir ve Ritonavir karışımı) ilacının yapısı

- **Xevudy (Sotrovimab)**, COVID-19 tedavisinde kullanılan bir monoklonal antikordur. Xevudy ilacı, SARS-CoV-2 virüsünün S proteini ile etkileşmektedir. Xevudy, SARS-CoV-2'nin S proteinine bağlanmak üzere tasarlanmıştır. İlaç bir makromolekül olan protein yapısındadır. Avrupa Birliği tarafından Aralık 2021 tarihinde onaylandı.

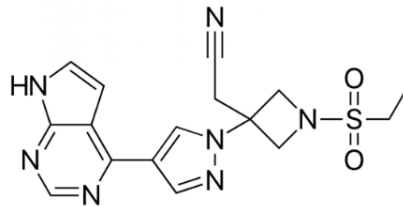
SARS-CoV-2 virüsünün neden olduğu COVID-19 tedavisi için yalnızca bu hastalık için onay alan yeni antiviral ilaç tasarımına ek olarak hali hazırda mevcut olan ilaçlar da bu hastalığın tedavisi için kullanılmaktadır. Farklı hastalıklar için onay alan ve COVID-19 tedavisinde de kullanılan 4 ilaç bulunmaktadır [3].

- **Veklury (Remdesivir)**: Remdesivir, 2016 yılında **ebola virüsü** için bir tedavi olarak tanımlanan ve yüksek antiviral aktivitesi nedeniyle COVID-19 tedavisinde de kullanılarak SARS-CoV-2 virüsünün RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp) hedefiyle de etkileştiği görülen bir adenosin trifosfat analogudur (Şekil 2-3) [4]. SARS-CoV-2 virüsünün zincir sonlandırıcı olarak RdRp hedefiyle etkileştiği görülerek, Kasım 2020 tarihinde COVID-19 tedavisi için de onay almıştır.



Şekil 2-3 Remdesivir ilacının yapısı

- **Baricitinib**, ilacı JAK1 ve JAK2 inhibitörü olan kullanılan **anti iltihap** ilacı olarak onay alan bir ilaçtır. (Şekil 2-4) JAK'lar, pro-iltihap sinyal yollarında önemli bir rol oynayan tirozin protein kinazlardır. Baricitinib, JAK1 ve JAK2'nin etkilerini inhibe ederek JAK aracılı bağışıklık etkilerini azaltır. Baricitinib ilacı, Mayıs 2022 yılında FDA tarafından acil kullanım onayı olarak COVID-19 tedavisinde de kullanılmaya başlanmıştır.



Şekil 2-4 Baricitinib ilacının yapısı

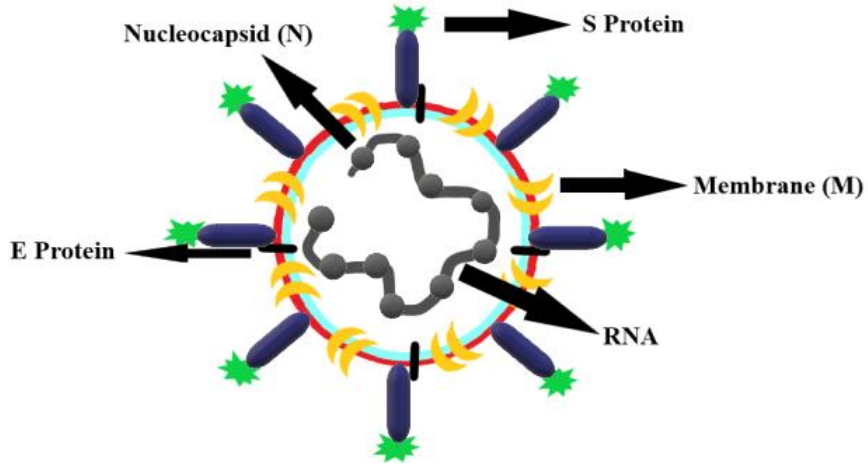
- **Anakinra**, Anakinra, iltihaplı romatizma tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. 153 amino asitten oluşan bir rekombinant insan interlökin-1 (IL-1) reseptörü antagonistidir. Bu ilaç, IL-1 reseptörüne bağlanarak IL-1 alfa ve beta ile rekabet ederek bu reseptörlerin aktivitesini inhibe eder. 8 Kasım 2022'de FDA tarafından, ciddi solunum yetmezliğine ilerleme riski taşıyan ve hastanede yatan hastalarda COVID-19 tedavisi için acil kullanım iznini (EUA) yayınladı. Anakinra protein yapısında olan bir ilaçtır.
- **Tocilizumab**: Tocilizumab, iltihaplı romatizmaya neden olup otoimmün bozukluğa yol açan problemleri tedavi etmek için kullanılan insan interlökin-6 (IL-6) reseptörüyle etkileşen bir ilaçtır. Aralık 2021'de Avrupa Komisyonu tarafından ve Ekim 2022'de Health Canada tarafından ek oksijen veya mekanik ventilasyon (solunum desteği) alan erişkinlerde COVID-19'u tedavi etmek için onaylanmıştır. Tocilizumab, protein yapısında olan bir ilaçtır.

SARS-CoV-2 virüsünün neden olduğu COVID-19 tedavisi için, SARS-CoV-2 virüsü hedef yapılarından, virüsün çoğalmasını sağlayan ve insan bağışıklık sistemini bozabilen papain-benzeri proteaz (PLpro) enzimini inhibe edebilecek bir ilaç henüz yoktur.

2.1.1 Koronavirüsler

Koronavirüs ilk kez 1930'lu yıllarda keşfedilen, memelileri ve çeşitli türleri enfekte edebilen en büyük virüs grubudur. "Koronavirüs" adı, anlamı "taç" veya "çelenk" olan Latince'den türetilmiştir. Bu isim, güneşe benzeyen bir görüntü oluşturan, çıkıntılarla süslenmiş lipit bir zarfa sahip viryonları ifade eder. Bu virüsler, Coronaviridae virüs ailesinin Orthocoronavirinae alt ailesinde yer alan Nidovirales takımına aittir.

COVID-19 isimli bu hastalık oldukça bulaşıcı solunum yolu hastalığıdır. COVID-19 hastalığına sebep olan SARS-CoV-2 virüsünün, Çin'in Wuhan kentindeki bir deniz ürünleri toptan satış pazarında ortaya çıktığı bilinmektedir [5]. Virüs, ciddi akut solunum sendromu koronavirüsü-2 (SARS-CoV-2) (Şekil 2-5) olarak adlandırılır ve insan-insan bulaşmasıyla oldukça bulaşıcıdır. 6 kıtaya yayılarak kısa süre içinde endişe verici düzeyde yayılma göstererek küresel bir pandemi olarak ortaya çıkmıştır.



Şekil 2-5. SARS-CoV-2 virüsünün şematik yapısı

Koronavirüsler genellikle, yüzeylerinden çıkıntı yapan ve benzersiz kopyalanma sürecini izleyen sivri uçlarıyla karakterize edilirler. Koronavirüslerdeki RNA genomu, replikaz proteinlerini (tekrarlama) kodlayan altı ila on açık okuma çerçevesinden (ORF'ler) ve uç, zar proteini, zarf proteini ve nükleokapsit proteinlerini içeren dört ana yapısal proteinden oluşur. S proteinlerin viral girişte ve ev sahibi belirlenmesinde yer aldığı durumlarda hem zar hem de zarf proteinleri virüs yapısı için çok önemlidir.

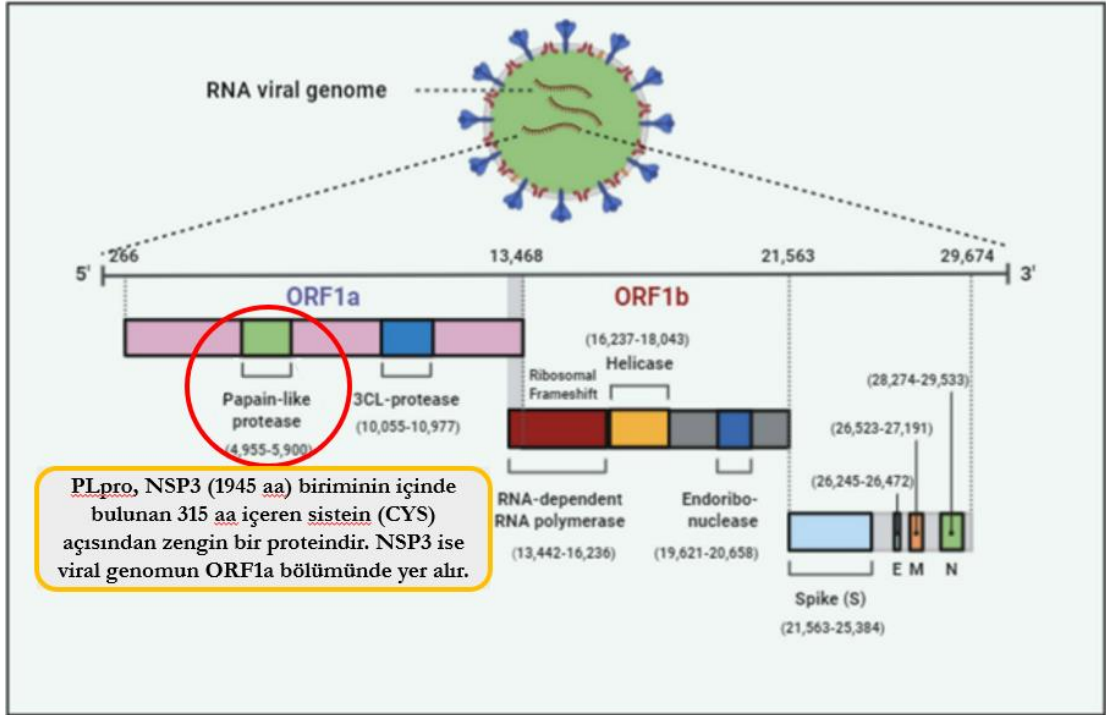
Oldukça büyük bir virüs ailesi olan koronavirüslerden son 20 yılda salgınlara neden olan üç koronavirüs (CoV) türü bulunmaktadır [5]. Aralık 2019'da ortaya çıkan COVID-19 salgınına yol açan SARS-CoV-2 virüsü küresel salgına yol açtı. Diğer pandemik koronavirüsler, **SARS-CoV** ve **MERS-CoV**, genomik ve protein seviyelerinde önemli düzeyde benzerlik gösterir ancak aralarındaki farklılıklar birbirinden farklı davranışlara yol açar. Bu farklılıklar, koronavirüs enfeksiyonu, patojenitesi, bulaşması ve evriminde önemli bir rol oynayan spike (S) glikoproteininin dizi ve yapısındaki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır.

İnsanlarda SARS enfeksiyonları ilk olarak Aralık 2019'da Çin'in Hubei eyaletinin Wuhan şehrinde gizemli etiyojisi olan bir zatürre vakası olarak ortaya çıktı. Solunum yolu örneklerinden elde edilen yüksek verimli bir genom dizileme, Coronaviridae, beta koronavirüs cinsi olarak yeni bir virüsü ortaya çıkardı ve Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (ICTV) ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından SARS-CoV-2 olarak resmi bir isim verildi. DSÖ, 11 Şubat 2020'de bu hastalığı COVID-19 olarak ilan etti ve 30 Ocak 2020'de resmi olarak uluslararası endişe yaratan bir halk sağlığı acil durumu ilan etti.

2.1.2. SARS-CoV-2 Virüsünün Yapısı

SARS-CoV-2 dahil tüm koronavirüsler için membran üzerinde en az **üç yapısal protein** bulunmaktadır: spike (S) protein, membran proteini (M) ve zarf proteini (E). Bu proteinlere ek olarak, 3-kimotripsin benzeri proteaz (**3Clpro**), papain-benzeri proteaz (**PLpro**), RNA'ya bağlı RNA polimeraz (**RdRp**) ve **helikaz** olmak üzere **dört yapısal olmayan protein** (fonksiyonel protein) daha bulunur. (Şekil 2-6)

PLpro, koronavirüsün **replikasyonunu sağlayan ve insan bağışıklık sistemini bozabilen** bir enzimdir. Tez kapsamında, önemli bir ilaç hedefi olan enzim PLpro yapısı seçilmiştir. **PLpro enzimi**, SARS-CoV-2'nin Nsp3 (1945 amino asit) biriminin içinde bulunan 315 amino asit içeren bir proteindir [6].



Şekil 2-6. SARS-CoV-2 genom dizilimi

COVID-19 pandemisini sona erdirmek için aşılama çalışmaları destekleyici antiviral ilaçlara ihtiyaç vardır. **SARS-CoV-2 PLpro enzimi**, hem **viral replikasyon (tekrarlanma)** için hem de ev sahibi (insan) proteinlerinden insanda iltihap reaksiyonlarından sorumlu **ubikuitin** ile antiviral reaksiyonlardan sorumlu **uyarılmış gen15 proteini (ISG15)** parçalamada önemli bir role sahiptir. Bu nedenle, **PLpro enzimi çift fonksiyonlu** olması yönüyle oldukça önemli bir ilaç hedefidir [7].

Yeni koronavirüs SARS-CoV-2 virüsü tercihen ubiquitini parçalarken, SARS-CoV virüsü ISG15'i parçalamaktadır [8]. SARS-CoV-2 PLpro enzimi bu proteinleri ev sahibinden ayırarak insan bağışıklığını bozar. Bu nedenle PLpro enziminin inhibe edilmesi çok önemlidir.

PLpro enziminin *avuç içi bölgesinde*, BL2 bölgesi isimli yeni keşfedilen bir bölge mevcuttur. Bu bölgenin merkezindeki Tyr268-Gln269 amino asitleri aktif bölgede gözlenen enzim-substrat arasındaki uyarılmış-uyum (aktif bölge ve substrat şekillerini değiştirerek ortak bir yapı meydana getirerek birbirine tutunması) etkilerine dahil olarak aktif bölgenin daha geniş çapta etkileşime girme konusunda önemli bir görevi olmasını sağlar. BL2 döngüsünün inhibe edilmesiyle, inhibitörlerin aktif bölgeyi **dolaylı yoldan bozabileceğini** ortaya çıkardı.

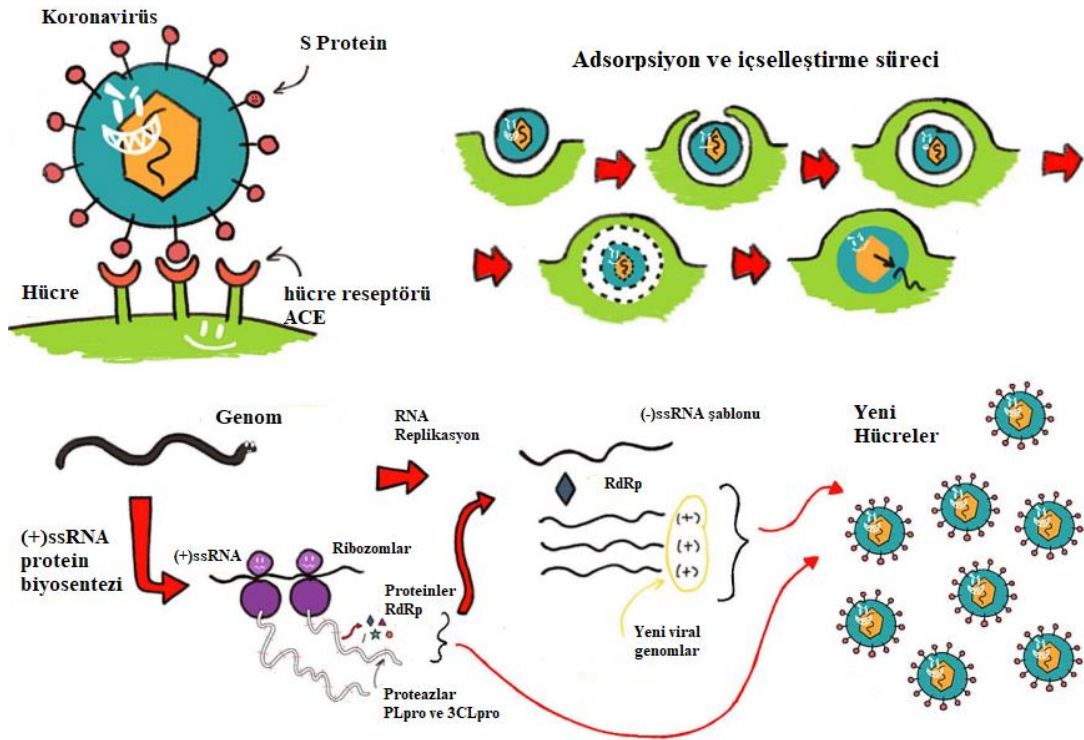
BL2 döngüsünün keşfinin ardından, BL2 bölgesinin hareketlerini devre dışı bırakabilecek küçük moleküller tasarlanmasının mümkün olabileceğini gösterilmektedir. BL2 döngüsü etkileşimlere kapatılırsa substratın enzime erişimi de kısıtlanarak proteaz aktivitesini inhibe edebileceği yapılan çalışmalarla ortaya konmaktadır. Bu inhibisyon durumunda BL2 döngüsü bozulur ve inhibitör, bu döngüyü engellemenin yanında dar konformasyondaki substrat bağlama yarığını da kapatır, böylelikle substratın LXGG motifine girmesini önler.

Yapılan çalışmalar, SARS-CoV-2 PLpro enziminin BL2 döngüsünün kapatılmasıyla birlikte yeni bir "BL2 oluşu" oluşturularak PLpro ile yeni kovalent olmayan etkileşimler yapabileceğini doğrular. SARS-CoV-2 ile yüksek bağlanma enerjileri ve düşük mikromolar aktivite (IC_{50}) ile bugüne kadar bulunan *en güçlü* PLpro inhibitörleri anlamına gelmektedir [9].

Enzimin aktif bölgesine inhibitörlerin kovalent bağlandığı düşünüldüğünde, SARS-CoV-2 virüsü PLpro enzime kovalent bağlanılmayan BL2 bölgesi için inhibitörlerin tasarımı, COVID-19 tedavisi için önemli bir adımdır. BL2 bölgesi, enzimin aktif bölgesini dolaylı yoldan bozarak enzim inhibisyonunu sağlayabilir ve SARS-CoV-2 virüsünün kendini kopyalamasının önüne geçilerek COVID-19 hastalığının tedavisi için PLpro inhibitörleri tasarlanabilir.

2.1.3. SARS-CoV-2 Virüsünün Hücre ile Etkileşim Mekanizması

SARS-CoV-2 virüsü ev sahibi hücelere girmek için anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) reseptörünü kullanır. (Şekil 2-7) SARS-CoV-2 virüsüne ait S proteinini, insan ACE2 reseptörünü tanıyarak ve reseptöre bağlanır. Bağlanmasının ardından viral girişi desteklemek için hücre yüzeyi serin proteaz TMPRSS2'yi kullanır. Girişin ardından viral RNA, iki büyük polipeptid, pp1a ve pp1ab'yi parçalayarak yeni yapısal olmayan proteinler oluşturacak şekilde ev sahibi ribozomu tarafından çevrilir.



Şekil 2-7 Bir ev sahibi hücreye giren ve içeride çoğalan bir koronavirüsün yaşam döngüsü.

Koronavirüsler ev sahibi hücelere girişini hücre yüzeyi reseptörüne bağlanmak için S proteinleri kullanarak yapar [10]. SARS-CoV-2 virüsü anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) ile etkileşerek insan hücreye girer. Virüsün ev sahibi hücreye girmesinden sonra RNA'sı, yeni viryonları oluşturmak için proteoliz yoluyla bileşenlere ayrılan iki büyük koterminal polipeptid protein sentezi için doğrudan ev sahibi ribozomuna bağlanır. Bu proteoliz sürecine katılan iki proteaz enzimi, koronavirüs ana proteinazı (3CLpro) ve papain benzeri proteazıdır (PLpro). RNA genomunu kopyalamak için koronavirüs, RNA'ya bağımlı bir RNA polimerazı (RdRp) olan bir kopyayı kodlar. Bu proteinler patojen (hastalığa neden olan organizma) için gereklidir.

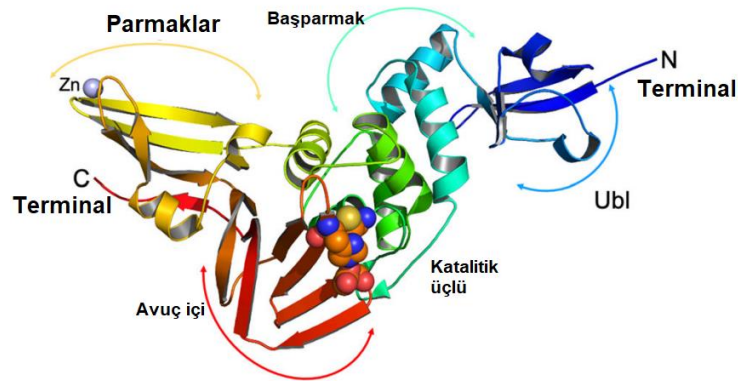
SARS-CoV-2 virüsü ana proteaz (3CLpro; nsp5) ve papain benzeri proteazı (Plpro; nsp3) yapısal olmayan proteinleri oluşturur. PLpro enzimi, yapısal olmayan protein 1-3'ü parçalamak için poliprotein içindeki üç bölgede bölünür. 3CLpro ve PLpro'nun katalitik aktiviteleri, viral replikasyon için önemlidir ve bu enzimlerin inhibisyonu antiviral tedavi için oldukça önemlidir.

2.1.4. SARS-CoV-2 PLpro Enzimi: Yapı ve İşlev

SARS-CoV-2 virüsüne ait PLpro enzimi virüsün çoğalmasını sağlayan ve insan bağışıklık sistemini bozabilen önemli bir enzimdir. PLpro enzimi **ubikuitin benzeri kısım (Ubl)** ve **aktif bölge** olmak üzere iki ana kısımdan oluşmaktadır. PLpro enziminin aktif bölgesine bağlanan inhibitörler kovalent bağlanırlar. Enzimin yeni keşfedilen BL2 bölgesine bağlanan inhibitörler kovalent bağlanmayarak dolaylı yoldan aktif bölgeyi bozarak enzim aktif bölgesine viral proteinlerin bağlanmasına engel olarak enzimi inhibe ederler. PLpro enziminin, virüsün çoğalmasını sağlamanın yanında işlevsel olarak insanda bulunan vücudun iltihap reaksiyonlarını düzenleyen ubikuitin zincirlerini hidroliz edebilme ve interferon ile uyarılan gen15 (ISG15) modifikasyonlarını proteinlerden çıkarıp antiviral tepkiyi tersine çevirerek insan bağışıklığını bozabilme görevleri vardır. Bu görevler, PLpro enziminin *çift fonksiyonlu* olmasını sağlar ve enzimi önemli bir ilaç hedefi haline getirir.

2.1.4.1 SARS-CoV-2 PLpro Enzimi Yapısı

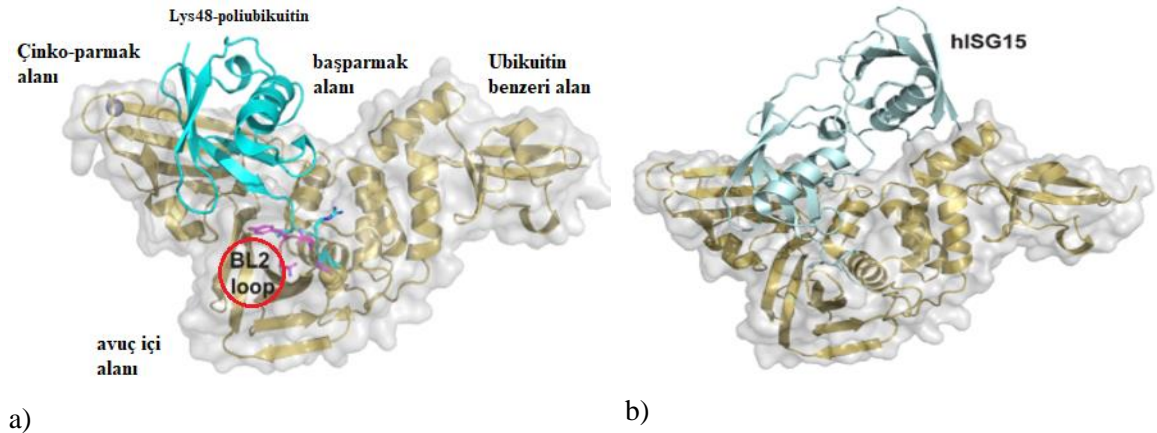
PLpro enzimi, SARS-CoV-2 virüsünün yapısal olmayan protein-3 (nsp3) alt birimlerinden biri olan, 315 aminoaside sahip bir enzimdir. PLpro enzimi **N terminalinde** yer alan ubikuitin-benzeri (**Ubl**) kısım ile parmaklar, başparmak ve avuç içi alanlarını içeren **aktif** kısım olmak üzere iki ana kısımdan oluşur. (Şekil 2-8)



Şekil 2-8 SARS-CoV-2 PLpro enzim yapısı

Enzimin aktif bölgesinde bulunan katalitik üçlü, avuç içi ve başparmak alanlarının arasında bulunan Cys111 (sistein111), His272 (histidin272) ve Asp286'dan (aspartik asit286) oluşur. Çinko-parmak kısmı, bir çinko iyonu ile dört sistein içerir ve PLpro'nun yapısal bütünlüğü ve proteaz aktivitesi için önem taşır [11]. Enzimin yeni keşfedilen BL2 bölgesi, substrat bağlanması sonucu açık konumdan kapalı konuma geçecek şekilde konformasyonel değişikliklere uğrar (Şekil 2-9). **Bu bölge aynı zamanda GRL0617 ve analogları için ilaç bağlama bölgesidir.** (GRL0617 analogu olan 7LBS protein-ligand kompleksi ligandı **XR8-24** gibi)

Apo yapıdaki (ligand içermeyen yapı) SARS-CoV-2 PLpro enzimi için X-ışını kristal yapıları, ubikuitin (Şekil 2-9a) ve ISG15 (Şekil 2-9b) içeren karmaşık formlar ile çözümlenerek yapı-temelli ilaç tasarımının ve PLpro'nun virolojisinin anlaşılmasının yolunu açmıştır. Bu çalışmalarla SARS-CoV-2 PLpro enzim substratlarının kovalent bağlandığı belirlenerek enzimin aktif bölgesinin işlevsiz olduğu görüldü ve yeni bir bağlanma bölgesi aranarak BL2 bölgesi keşfedildi.



Şekil 2-9 SARS-CoV-2 PLpro enziminin substratları

a) LYS48 poliubikuitin bağlı SARS-CoV-2 PLpro C111S mutantının X-ışını kristal yapısı. BL2 bölgesi mor renktedir. **b)** İnsan ISG15'li SARS-CoV-2 PLpro X-ışını kristal yapısı

Önemli bir ilaç hedefi olan SARS-CoV-2 PLpro enziminin temelde *iki görevi* vardır;

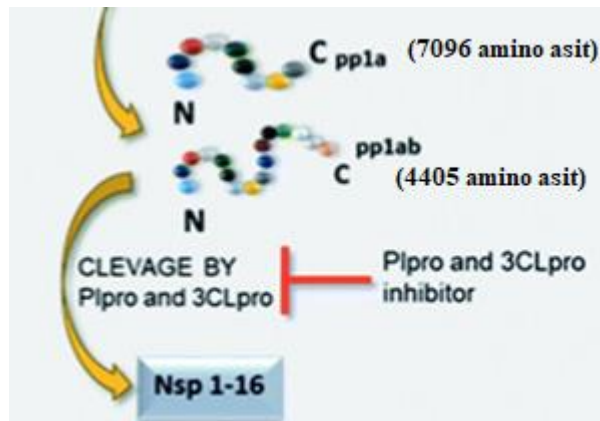
i. SARS CoV-2 virüsünün tekrarlanması için ana proteaz (3CLpro) ile viral proteinleri (pp1a ve pp1ab) parçalar. SARS-CoV-2 PLpro enzimi “LXGG↓XX” motifini tanıyarak üç kısma parçalar. Viral proteinler **nsp1** ve **nsp2** arasındaki, **nsp2** ve **nsp3** arasındaki,

nsp3 ve **nsp4** arasındaki **tetrapeptit LXCG** motifini tanır. Viral çoğalma için önemli nsp1, nsp2 ve nsp3 proteinlerini salar. Böylece virüsün çoğalması sağlanır.

ii. PLpro enzimi ev sahibinin *bağışıklık sistemini bozar*. **Ubikuitasyon** ve **ISGLEme** olayları ile canlının bağışıklık sistemini baskılar. **Viral PLpro** enzimi, viral enfeksiyona karşı insan bağışıklık tepkisinin aktivasyonundan sorumlu sitokinlerin ve kemokinlerin üretimini durdurur. Ev sahibinin iltihap reaksiyonu için önemli olan **ubikuitin** zincirlerini hidroliz eder ve ev sahibinin antiviral reaksiyonunu durdurmak için **interferon-uyarımlı gen 15 (ISG15)** modifikasyonlarını da uzaklaştırır. Bu şekilde insan bağışıklığını bozar.

2.1.4.2 SARS-CoV-2 PLpro Enzimi İşlevi

PLpro ve 3CLpro enzimleri SARS-CoV-2 virüsünün çoğalması için gerekli iki proteaz enzimdir. Çoğalma işleminde, SARS-CoV-2 virüsünün genomik ssRNA'sı, iki büyük protein olan **Pp1a** ve **Pp1ab**'yi 15 adet yapısal olmayan protein üretmek için mRNA olarak kullanır (Şekil 2-10) [12]. Virüsün Pp1a/Pp1ab zincir LXGG motifi, enzimi tarafından tanınır ve parçalanır böylece yapısal olmayan proteinler oluşur [13]. SARS-CoV-2 virüsü PLpro enzimi Nsp1 ve Nsp2 arasındaki (LNGG↓AYTR motifi), Nsp2 ve Nsp3 arasındaki (LKGG↓APTK motifi) ve Nsp3 ve Nsp4 (LKGG↓KIVN motifi) peptit bağlarını kırarak, yapısal olmayan üç protein **Nsp1**, **Nsp2** ve **Nsp3**'ü oluşturur.



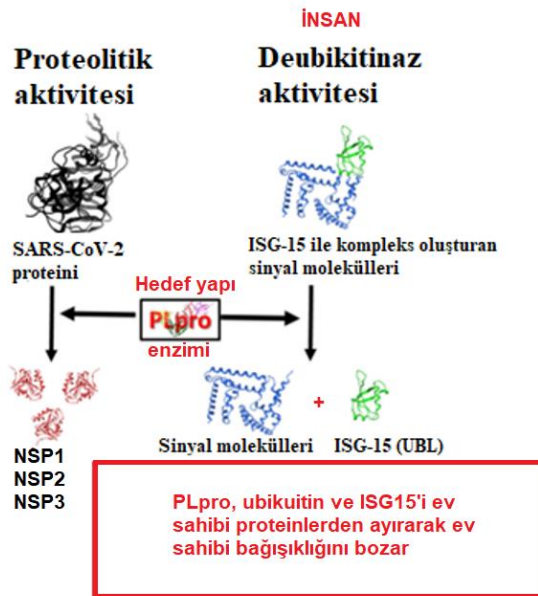
Şekil 2-10 Virüsün Pp1a/Pp1ab proteinlerinin viral PLpro ve 3CLpro tarafından parçalanarak Nsp1-16 üretimi

PLpro enziminin substratları; **viral poliproteinler**, **parçalayıcı Lys48-poliubikuitin**, **antiviral ISG15 sinyalleridir**. PLpro enzimi bu substratlar ile aktif bölgede kovalent bağ etkileşimine sahiptir. Enzim aktif bölgesine bağlanan inhibitörler kovalent

bağlandığı için antiviral ilaç tasarımında enzimin yeni bulunan ve kovalent etkileşime sahip olmayan BL2 bölgesi ile etkileşen inhibitörler temel alınır. Bu inhibitörler aktif bölgeyi dolaylı yoldan bozarak aktif bölgeye substrat bağlanmasını engeller.

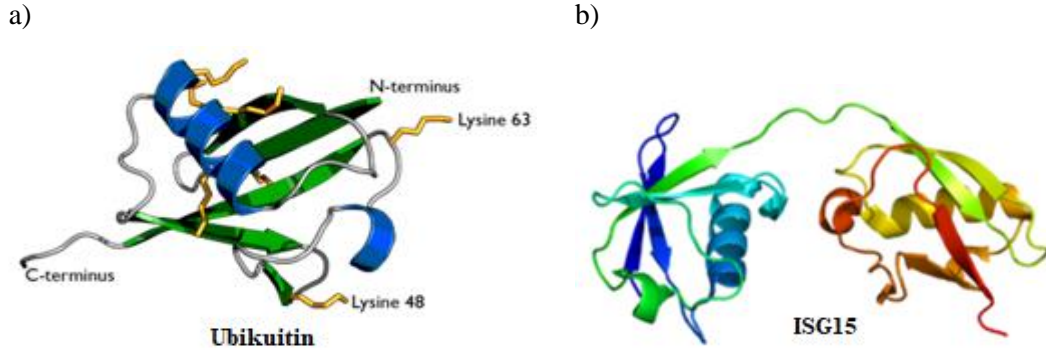
Yapılan çalışmalar SARS-CoV-2 virüsünün PLpro enziminin DUB (ubikuitin uzaklaştırma) aktivitesine sahip olduğunu ve ISGilyasyon yoluyla viral proteinlerin parçalanması ve ayrılmasının da ev sahibi bağışıklığında rol oynadığını açıkça göstermiştir [6].

SARS-CoV-2 virüsünün viral çoğalmasını sağlayan PLpro enzimi, bu görevinin yanında ev sahibinin bağışıklık sistemini bozabilmesi nedeniyle önemli bir ilaç hedefidir. PLpro insanda bulunan vücudun iltihap reaksiyonlarını düzenleyen ubikuitin zincirlerini hidroliz edebilen ve interferon ile uyarılan gen15 (ISG15) modifikasyonlarını proteinlerden çıkararak antiviral tepkiyi tersine çevirip insan bağışıklığını bozabilme yeteneğine sahip olması enzimin önemli bir ilaç hedefi haline gelmesini sağlayan nedenlerdir. (Şekil 2-11) [7].



Şekil 2-11 PLpro enziminin çift fonksiyonunun şematik gösterimi

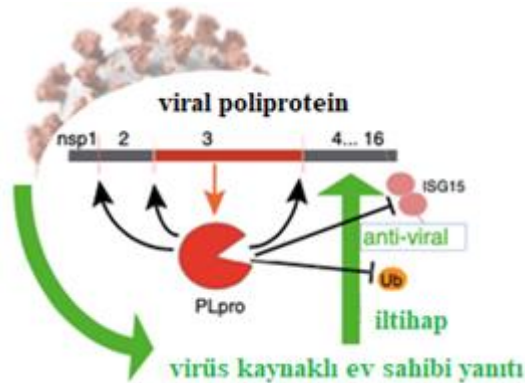
PLpro enzimi viral poliproteinleri parçalayarak NSP1, NSP2 ve NSP3 oluşturarak enzimin kopyalanma sürecine dahil olur. Buna ek olarak insan ubikuitin ve ISG15'i parçalayarak insan bağışıklığını bozar. (Şekil 2-12)



Şekil 2-12 Ubikuitin ve ISG15 proteininin yapısı

(a) Ubikuitin proteininin yapısı. (b) ISG15 proteininin yapısı.

PLpro, proteolitik (protein parçalama) olarak üç yerden viral proteinleri parçalar. **PLpro**, sinyal moleküllerine **ubikuitin** ve **ISG15** proteinlerinin bağlanmasını inhibe ederek antiviral bağışıklık tepkisini engeller ve virüsün ev sahibi hücrede hayatta kalmasını sağlar. PLpro enzimi viral kopyalamayı tamamlamak için **Pp1a/Pp1ab**'yi parçalamasının yanı sıra ubikuitin ve ISG15 uzaklaştırma aktivitesine sahiptir. Viral enfeksiyon için ev sahibi ubikuitin ve ISG15 proteini ile etkileşen PLpro enzimi, C-terminalinde PLpro tanıma motifi içerdiği için, proteinler virüs tarafından uzaklaştırılır ve viral enfeksiyona karşı vücudun tepkisi engellenir ve bağışıklık bozulur [14] (Şekil 2-13).

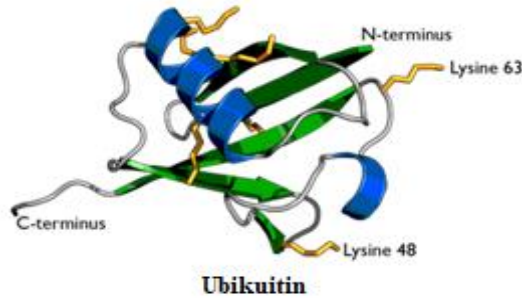


Şekil 2-13 PLpro enzimi aktivitelerinin şematik görüntüsü.

Koronavirüsler genellikle proteazlarını verimli deISGilazlar (ISG uzaklaştırıcı) ve deubikuitinazlar (ubikuitin uzaklaştırıcı) olacak şekilde kullanırlar. Koronaviral PLpro enzimleri, ISG15 ve ubikuitin modifikasyonlarını kaldırarak iltihaplanmayı ve antiviral sinyali azaltır. Yapılan çalışmalarla birlikte, **SARS-CoV-2** virüsü PLpro enziminin *tercihen* **ubikuitin** zincirlerini hidroliz ettiği, SARS-CoV virüsü PLpro enziminin ise ISG15 modifikasyonlarını proteinden çıkarma görevini tercih ettiği belirlendi [6].

Ubikuitin (Ub), yok-edilecek proteinlerin bozunmasını düzenlemek için proteinlere bağlanır. Ubikuitinaz-uzaklaştırıcı (DUB) enzimler protein ile ubikuitin arasındaki peptit veya izopeptit bağlarını kırarak bu olayı tersine çevirir. Ubikuitinasyon, yıkıma gidecek substrat proteinine insan-ubikuitin proteininin bağlanmasını içeren enzimatik bir prosestir. Enzim substratlarından **ubikuitin** 76 aminoasit uzunluğundaki bir polipeptittir ve 7 lizin aminoasidi içerir. Ubikuitin, hücrede yıkıma uğraması gereken proteinlere veya **yabancı proteinlere** yapışan bir proteindir. (Şekil 2-14)

Ubikuitinasyon, ubikuitinin 7 lizini ile substratın proteinlere kovalent bağlanmasını içeren modifikasyonlarına verilen isimdir. **Ubikuitin**, hücre içindeki yabancı proteinlere kovalent olarak bağlanır ve bu proteinler hızlı bir şekilde yıkıma uğrar. Bir protein için bu “**ölüm öpücüğü**” molekülü olarak adlandırılır.



Şekil 2-14 Ubikuitin proteininin yapısı

Katalitik üçlüden biraz uzaktaki BL2 bölgesine bağlanan PLpro inhibitörleri LXGG peptit motiflerinin bağlanmasını engeller. Yeni bulunan **BL2** bölgesi **avuç içindedir**. PLpro enzim substratları bu bölgeye bağlanmamaktadır. BL2 bölgesi ile etkileşen ligand, aktif bölgeyi dolaylı yoldan bozarak aktif bölgeye substrat bağlanmasını engelleyerek enzim inhibisyonunun yolunu açar.

2.1.5. SARS-CoV-2 Plpro enziminin X-ray kristal yapıları

SARS-CoV-2 virüsüne ait PLpro, yapısal olmayan protein-3 (nsp3) alt biriminde yer alan ve 315 aminoasit içeren bir enzimdir. RCSB Protein veri bankasında yer alan 53 adet PLpro x-ray kristali ile çözülmüş üç-boyutlu yapı vardır. Bunların 28 tanesi liganda sahiptir [15]. (Çizelge 2-2) Bu üç-boyutlu yapılar incelendiğinde;

(a) **25 adet ligandsız,**

(b) **AKTİF BÖLGEYE** bağlanan;

- i. 1 adet **substrat ubikuitin** ile çözülmüş yapı (6xaa),
- ii. 2 adet **substrat ISG15** ile çözülmüş yapı (6yva, 6xa9),
- iii. 2 adet **kovalent**-bağlı VIR250 ve VIR251 ligandı içeren yapı (6wu, 6wx4),
- iv. 6 adet S1-S2 bölgesi ile **kovalent**-bağlı yapı (7qcg v.s.) vardır.

PLpro enziminin aktif bölgesine bağlanan inhibitörler, aktif bölgeye **kovalent** bağlandığı için PLpro enziminin aktif bölgesi *in silico* çalışmaları için uygun değildir.

(c) **BL2 bölgesine** bağlı kovalent-bağlanmayan;

11 adet yeni bulunan GRL0617 ve analogunu(benzeri) içeren kompleks yapı (7cmd, 7cjm, v.s.)

(d) **BL2 bölgesi-avuç içi arasındaki kısma bağlı** kovalent-bağlanmayan;

5 adet yeni bulunan GRL0617 analogu XR8-89 (7lbr), **XR8-24(7lbs)** gibi yapılar

(e) **Ayrı bir bölgeye bağlanan**;

Ebselen ligandı içeren yapı 7m1y, *in silico* için uygun değildir.

SARS-CoV-2 virüsünün kendini kopyalamasını sağlayan ve insan bağışıklık sistemini bozabilen PLpro enziminin aktif bölgesine bağlanan inhibitörler hedef yapı ile kovalent etkileşir. Bu çalışmadaki amaç PLpro enziminin BL2 bölgesine kovalent bağlanmayan PLpro inhibitörlerini araştırmaktır. Bu bölgeye bağlanan inhibitörler, kovalent olmayan etkileşim göstererek aktif bölgeyi dolaylı yoldan bozarlar ve aktif bölgeye substrat bağlanmasını engellerler.

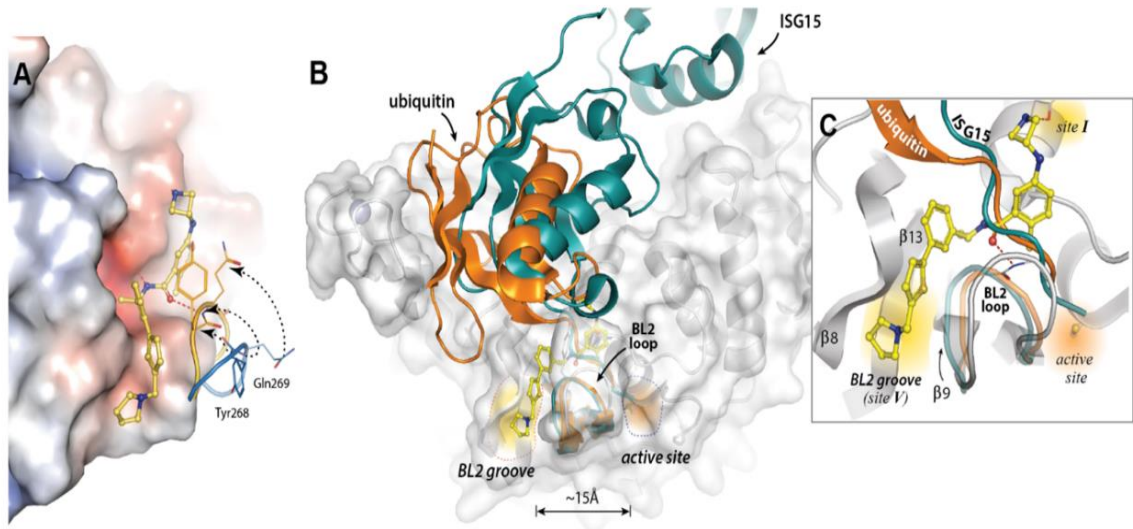
Çizelge 2-2 Protein veri bankasında bulunan SARS-CoV-2 PLpro kompleks yapıları*

No	PDB Kodu	Etkileşim Türü	Bağlanma Bölgesi/Bölgeleri	Çözünürlük Å	IC ₅₀ [µM]	Referans
1	7LBR	Kovalent olmayan	BL2 bölgesi-avuç içi arası	2.20	0.11	[9]
2	7LLF	Kovalent olmayan	BL2 bölgesi-avuç içi arası	2.30	0.21	[9]
3	7LOS	Kovalent olmayan	BL2 bölgesi-avuç içi arası	2.90	0.33	[9]
4	7LLZ	Kovalent olmayan	BL2 bölgesi-avuç içi arası	2.90	0.37	[9]
5	7LBS*	Kovalent olmayan	BL2 bölgesi-avuç içi arası	2.80	0.56	[9]
6	7TZJ	Kovalent olmayan	BL2 Bölgesi	2.66	1.02	[16]
7	7JRN	Kovalent olmayan	BL2 Bölgesi	2.48	1.60	[17]
8	7NT4	Kovalent olmayan	BL2 Bölgesi	2.68	1.66	[18]
9	7CJM	Kovalent olmayan	BL2 bölgesi	3.20	2.10	[19]
10	7CMD	Kovalent olmayan	BL2 bölgesi	2.59	2.20	[20]
11	7JIR	Kovalent olmayan	BL2 Bölgesi	2.09	2.30	[21]
12	7D7L	Kovalent olmayan	BL2 Bölgesi	2.11	2.47	[22]
13	7E35	Kovalent olmayan	BL2 Bölgesi	2.40	2.69	[23]
14	7JIT	Kovalent olmayan	BL2 Bölgesi	1.95	5.10	[21]
15	7JIV	Kovalent olmayan	BL2 Bölgesi	2.05	6.40	[21]
16	7JIW	Kovalent olmayan	BL2 Bölgesi	2.30	6.40	[21]
17	6WX4	Kovalent	Aktif Bölge	1.66	-	[24]
18	7QCG	Kovalent	Aktif Bölge	1.75	-	[25]
19	7QCI	Kovalent	Aktif Bölge	1.76	-	[25]
20	7QCM	Kovalent	Aktif Bölge	1.77	-	[25]
21	7QCJ	Kovalent	Aktif Bölge	1.84	-	[25]
22	7QCH	Kovalent	Aktif Bölge	1.88	-	[25]
23	7QCK	Kovalent	Aktif Bölge	1.92	-	[25]
24	6XAA	Kovalent	Aktif Bölge	2.70	-	[14]
25	6WUU	Kovalent	Aktif Bölge	2.79	-	[24]
26	6XA9	Kovalent	Aktif Bölge	2.90	-	[14]
27	6YVA	Kovalent	Aktif Bölge	3.18	-	[8]
28	7M1Y	?	-	2.02	-	-

*Tez kapsamında kullanılan PLpro enzimi için seçilen veri bankası kodu

2.1.6. Viral hedef yapı PLpro enziminin BL2 bölgesi

SARS-CoV-2 PLpro enzimi, hem *viral replikasyon (tekrarlanma)* için hem de ev sahibi (insan) proteinlerinden insanda iltihap reaksiyonlarından sorumlu **ubikuitin** ile antiviral reaksiyonlardan sorumlu **uyarılmış gen15 proteini (ISG15)** parçalamada önemli bir role sahiptir. Bu nedenle, **PLpro** enzimi *çift fonksiyonlu* olması yönüyle oldukça önemli bir ilaç hedefidir [7]. SARS-CoV-2 PLpro enzimini inhibe edebilecek bir antiviral ilaç henüz yoktur. PLpro'nun aktif bölgesindeki birkaç aminoasit, farklı substratlarla etkileşmek için dinamik yan/ana zincirleri içerir [26]. PLpro enziminin yeni keşfedilen BL2 bölgesine bağlanan inhibitörler enzimin aktif bölgesinin aksine kovalent etkileşim göstermezler [9]. (Şekil 2-15)



Şekil 2-15 SARS-CoV-2 PLpro enzimi BL2 bölgesi

(A) **XR8-24**: SARS-CoV-2 PLpro yapısının apoenzim yapısı (PDB: 7CJD) ile üst üste bindirilmesi. XR8-24 BL2 döngüsündeki Gln269 aminoasidi ile hidrojen bağı etkileşimi yaparak BL2 döngüsünün yeniden düzenlenmesini sağlar. (B) Ubikuitin-bağlı PLpro (PDB: 6XAA, turuncu) ve ISG15-bağlı PLpro yapıları (PDB: 6YVA, deniz mavisi) ile **üst üste binen XR8-24-bağlı PLpro yapısının yapısı**. (C) XR8-24, BL2 döngüsüne bitişik $\beta 8$ ve $\beta 9$ şeritleri arasında konumlanan yeni bir bağlanma bölgesi olan BL2 oluğuna uzanır. BL2 oluğu aktif bölgeden yaklaşık 15 Å uzaklıktadır.

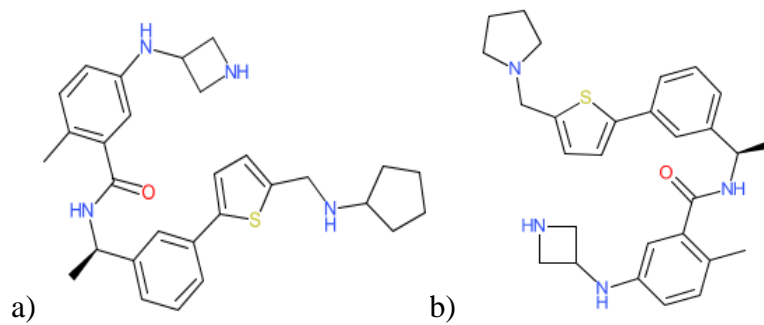
7LBS protein-ligand kompleksinin ligandı XR8-24'ün BL2 bölgesine bağlanması, ubikuitin (turuncu) veya ISG15'in (deniz mavisi) kuyruklarının aktif bölge kanalına erişmesini engeller. Böylece enzim görevini yapamayarak insan bağışıklığını bozamaz.

SARS-CoV-2 virüsü PLpro enziminin aktif bölgeden biraz uzakta avuç içi alanında BL2 bölgesi isimli yeni keşfedilen bir bölge mevcuttur. Bu bölgedeki Tyr268-Gln269 aminoasitleri aktif bölgede gözlenen enzim-substrat arasındaki uyarılmış-uyum etkilerine (aktif bölge ve substrat şekillerini değiştirerek ortak bir yapı meydana getirerek birbirine tutunması) dahil olarak aktif bölgenin daha geniş çapta etkileşime girme konusunda önemli bir görevi olmasını sağlar.

Yapılan çalışmalar, BL2 bölgesine bağlanan inhibitörlerin aktif bölgeye ubiquitin ile ISG15 bağlanmasını engelleyebileceğini ortaya çıkararak BL2 döngüsünün hareketlerini devre dışı bırakabilecek küçük moleküller tasarlanmasının mümkün olabileceğini gösterdi. BL2 döngüsü kapatılırsa substratın erişimini kısıtlayarak proteaz aktivitesini inhibe edebilir [18].

PLpro enziminin yeni keşfedilen BL2 bölgesi için saflaştırılan yeni protein-ligand kompleksler, PLpro'nun BL2 döngüsünün kapatılmasıyla birlikte yeni bir "BL2 oluşu" oluşturarak PLpro ile yeni etkileşimleri sağladığını doğrulamaktadır [7]. Bu inhibitörler kovalent olmayan etkileşimlere sahip olup, yüksek bağlanma afiniteleri ve düşük aktivite ile bugüne kadar bildirilen en güçlü PLpro inhibitörleri anlamına gelmektedir. Bu inhibitörlerden ikisi ayrıca [XR8-23 (Şekil 2-16A) ve XR8-24 (7LBS) (Şekil 2-16B)] düşük mikromolar aktivite sahip olmaları ve aktivitesini GRL0617'ye göre büyük ölçüde arttırmaları sebebiyle önemli inhibitörlerdir.

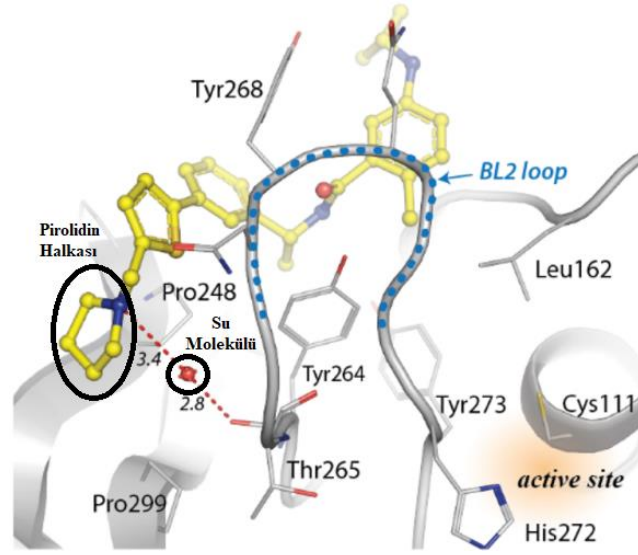
Kovalent olmayan, katalitik olmayan bir bölge PLpro inhibitörünün tasarlanabilmesi önemlidir, çünkü böyle bir inhibitör, diğer viral hedefleri (remdesivir gibi) bloke eden antivirallerle kombinasyon halinde COVID-19 tedavisi ve gelecekteki koronavirüs salgınları üzerinde büyük bir etkiye sahip olabilir.



Şekil 2-16 BL2 bölgesi ile etkileşen moleküller

a) XR8-23 b) XR8-24 (7LBS)

Yapılan çalışmalarla, SARS-CoV-2 PLpro enziminin 7LBS PDB koduna sahip protein-ligand kompleksinin ligandı olan XR8-24'ün protein ile su aracılığıyla bir hidrojen bağı oluşturarak su köprüsü yaptığı görüldü [9]. (Şekil 2-17) Bu su köprüsü bu protein-ligand kompleksinin üstün aktivitesini açıklayan nedenlerden biri olabilir. Bu su molekülü de tez çalışması kapsamına alınarak bağlanma enerjisine ve bağlanma anındaki etkileşimlere katkısı da incelendi.



Şekil 2-17 7LBS protein-ligand kompleksinin protein ve ligandı arasındaki su köprüsü SARS-CoV-2 virüsüne ait virüsün kopyalanmasını sağlayan ve insan bağışıklığını bozabilen PLpro enziminin inhibisyonu için enzimin yeni keşfedilen BL2 bölgesi etkileşimlerinin incelenmesi önemlidir. Bu bölgeye aktif bölgeye bağlanan inhibitörlerin aksine kovalent bağlanmayan mikromolar düzeyde aktiviteye sahip inhibitörlerin olması COVID-19 tedavisi için henüz antiviral ilaç bulunmayan PLpro enzimini inhibe edebilecek antiviral tasarımı için önemli bir aşama olabilir. Bu bağlamda bu bölge etkileşimleri incelenerek nanomolar düzeyinde inhibitör tasarlanması bu tez kapsamındaki amaçtır.

2.2. PLpro ile *in silico* Çalışması Yapılan Farklı Hastalıklar için Onaylanan İlaçlar

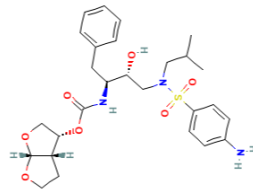
COVID-19 tedavisi için ilaç tasarımında ilk yaklaşım farklı hastalıkların için onay alan ve farklı ilaç hedefleriyle etkileşen ilaçların denenerek tedavi için antiviral etkilerine bakılmasıydı. Bu kapsamda farklı hastalıklar için onay alan ilaçlardan 8 tanesinin (Şekil 2-18) SARS-CoV-2 PLpro yapısının BL2 bölgesi ile etkileşimleri Autodock Vina yazılımı ile moleküler doking çalışması yapılarak teorik olarak hesaplandı. (Çizelge 2-3)

Çizelge 2-3 COVID-19 Tedavisi için denenen farklı hastalıklar için onaylanan ilaçlar

İlaç Adı	İlaç Hedefi	Kullanıldığı Hastalık	<i>in silico</i> * kcal/mol
Darunavir	İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü tip 1 proteaz	HIV İlacı	-25.7**
Famotidin	Histamin H2 reseptörü	Mide İlacı	-7.4
Favipiravir	RNA'ya yönelik RNA polimeraz katalitik alt birim	Influenza İlacı	-5.4
Sinakalset	Hücre dışı kalsiyum algılayan reseptör	Primer hiperparatiroid	26 nM-3 µM***
Penformin	5'-AMP ile aktive olan protein kinaz katalitik alt birim alfa-1	Antidiyabet	-7.4
Isotretinoin	-	Akne ve Cilt Kanseri İlacı	-
Kloroksazon	Kalsiyumla aktive olan potasyum kanalı alt birimi alfa-1	Kas Gevşetici	-
Asiklovir	DNA polimeraz katalitik alt birim	Antiviral İlaç	-

* Bağlanma enerjisi değeri (kcal/mol) PLpro enziminin **aktif bölgesi** ile hesaplanmaktadır.

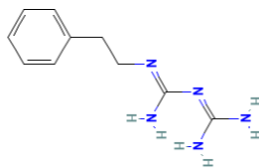
** MM-GBSA moleküler mekanik hesaplamaları sonucu. *** SEESAR doking programı ile hesaplandı.



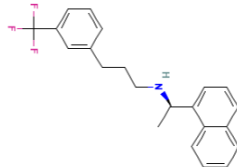
Darunavir



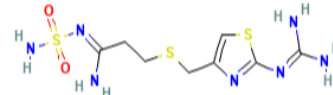
Favipiravir



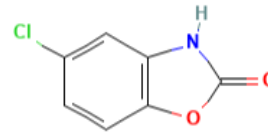
Penformin



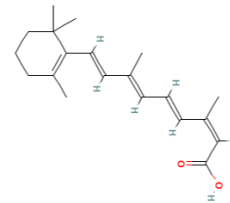
Sinakalset



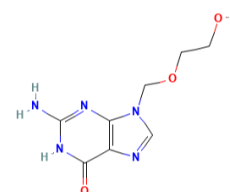
Famotidin



Kloroksazon



Isotretinoin



Asiklovir

Şekil 2-18 Farklı hastalıklar için onaylanan ilaçlardan doking çalışması yapılan ilaçlar

- Darunavir ilacı HIV tedavisi için onaylanan ilaçtır. COVID-19 tedavisi için faz 3 çalışmaları da yapılmıştır [3]. Bu ilacın PLpro enzimi aktif bölgesi için 3E9S protein-ligand kompleksi ile Autodock Vina yazılımıyla bağlanma modları belirlenip, MM-GBSA (moleküler mekanik) kullanılarak bağlanma serbest enerjisi **-25.7 kcal/mol** olarak Vaibhav Srivastava ve arkadaşları tarafından hesaplandı [27,28]. SARS-CoV-2 PLpro enzimi aktif bölgesine bağlanan inhibitörler, kovalent bağlanırlar. Bu sebeple Darunavir ilacı yeni bulunan ve bağlanan inhibitörlerin kovalent etkileşime sahip olmadığı BL2 bölgesi ile doking hesaplamaları için tez çalışmasına dahil edildi.
- Famotidin ilacı mide ilacı olarak kullanılan ilaçtır. PLpro enzimi aktif bölgesi için 6W9C protein-ligand kompleksi ile bağlanma enerjisi değeri Malay Kumar Rana ve arkadaşları tarafından **-7.41 kal/mol** olarak Maestro doking programı ile tarafından hesaplandı [29,30]. Famotidin ilacı yeni bulunan BL2 bölgesi ile doking hesaplamaları için tez çalışmasına dahil edildi.
- Favipiravir, influenza tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. PLpro enzimi aktif bölgesi için 6W9C protein-ligand kompleksi ile Autodock Vina ile doking çalışması yapılarak bağlanma afinite değeri Vaibhav Srivastava ve arkadaşları tarafından **-5.4 kcal/mol** olarak bulundu [28,31]. Favipiravir ilacı yeni bulunan BL2 bölgesi ile doking hesaplamaları için tez çalışmasına dahil edildi.
- Sinakalset ilacı primer hiperparatiroid tedavisi için kullanılan ilaçtır. PLpro enzimi aktif bölgesi için 3E9S protein-ligand kompleksi SEESAR doking programı ile hesaplanarak bağlanma afinitesi Mukesh Kumar ve arkadaşları tarafından **26 nM-3 µM** olarak bulundu [32]. SARS-CoV-2 Sinakalset ilacı yeni bulunan BL2 bölgesi ile doking hesaplamaları için tez çalışmasına dahil edildi.
- Penformin ilacı antidiyabet amaçlı kullanılan ilaçtır. PLpro enzimi aktif bölgesi için 6W9C protein-ligand kompleksi ile moleküler dinamik çalışması yapılarak bağlanma afinite değeri Mahmoud A A Ibrahim ve arkadaşları tarafından **-7.41 kal/mol** olarak Maestro doking programı ile tarafından hesaplandı [29,33]. Penformin ilacı yeni bulunan BL2 bölgesi ile doking hesaplamaları için tez çalışmasına dahil edildi.
- Isotretinoin akne ve cilt kanseri ilacı olarak kullanılır. COVID-19 tedavisi için klinik çalışmalarda denenilen bir ilaçtır [27,34,35]. Isotretinoin ilacı yeni bulunan BL2 bölgesi ile doking hesaplamaları için tez çalışmasına dahil edildi.

- Kloroksazon (kas gevşetici) ve Asiklovir (antiviral ilaç) bu tez kapsamında SARS-CoV-2 PLpro enziminin BL2 bölgesi ile doking çalışması Autodock Vina yazılımı ile yapılarak iki molekülün bağlanma enerjisi teorik olarak hesaplandı.

2.3. PLpro ile Aktivite Gösteren Tıbbi bitkiler ve Bitki Fitokimyasalları

SARS-CoV-2 virüsünün neden olduğu COVID-19 tedavisi için antiviral ilaç tasarımı farklı hastalıklar için onay alan ilaçların denenmesine ek olarak tıbbi etkisinin olduğu bilinen bitkilerin içeriğinde yer alan bitki fitokimyasalları da ilaç adayları olarak *in vitro* ve *in silico* hesaplamalarına dahil edildi.

SARS ve MERS salgınlarında antiviral etkisinin olduğu belirlenen ve SARS-CoV-2 virüsü için de etkili olacağı yapılan testlerle ortaya konan, COVID-19 tedavisi inhibitör adayları bitki fitokimyasallarının belirlenmesinin ardından, SARS-CoV-2 virüsünün çoğalmasını sağlayan ve insan bağışıklık sistemini bozabilen etkileri nedeniyle önemli bir ilaç hedefi olan PLpro enzimini inhibe edebilecek bir ilaç tasarımı konusunda bu bitki fitokimyasalları da ilaç tasarımı çalışmalarına dahil edilmiştir.

Bu tez kapsamında belirlenen 35 bitki fitokimyasalı Çizelge 2-4'tedir. Bu bitki fitokimyasallarından 16 tanesiyle SARS-CoV-2 PLpro enzimi deneysel çalışmalar mevcuttur. Tanşinon moleküllerinin SARS-CoV-2 PLpro için seçici inhibitörler olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulduğu için kırmızı adaçayı bitkisinden saflaştırılan toplam 26 tanşinon molekülü tez kapsamına dahil edildi. Bu moleküllerden 19 tanşinon molekülünün SARS-CoV-2 PLpro enzimi ile *in silico* çalışmaları ilk kez bu tez kapsamında yapıldı.

SARS-CoV-2 PLpro enzimi aktif bölgesine bağlanan inhibitörler, kovalent bağlandıkları için söz konusu bitki fitokimyasallarına SARS-CoV-2 PLpro enziminin yeni keşfedilen ve bu bölgeye bağlanan inhibitörlerin kovalent bağlanmadıkları belirlendiği için enzimin BL2 bölgesi ilaç hedefi olarak seçildi. SARS-CoV-2 PLpro enziminin BL2 döngüsünü kapatabilecek inhibitör tasarımı için yapılan *in silico* çalışmalar ile bağlanma afiniteleri ile hesaplanan Ki değerleri belirlenerek öncü molekül adaylarının belirlenmesi hedeflenmektedir.

Bu tez kapsamında tıbbi etkileri olduğu belirlenen 10 farklı bitki içerisinde bulunan toplam 35 bitki fitokimyasalı, COVID-19 tedavisi için papain-benzeri proteaz enzim inhibitörü tasarımı konusunda öncü molekül bulma çalışması doğrultusunda *in silico* metotlar kullanılarak yapılacak hesaplamalara dahil edildi. (Şekil 2-19 ve 2-20)

Çizelge 2-4 PLpro enzimi ile aktivite gösteren bitki fitokimyasalları

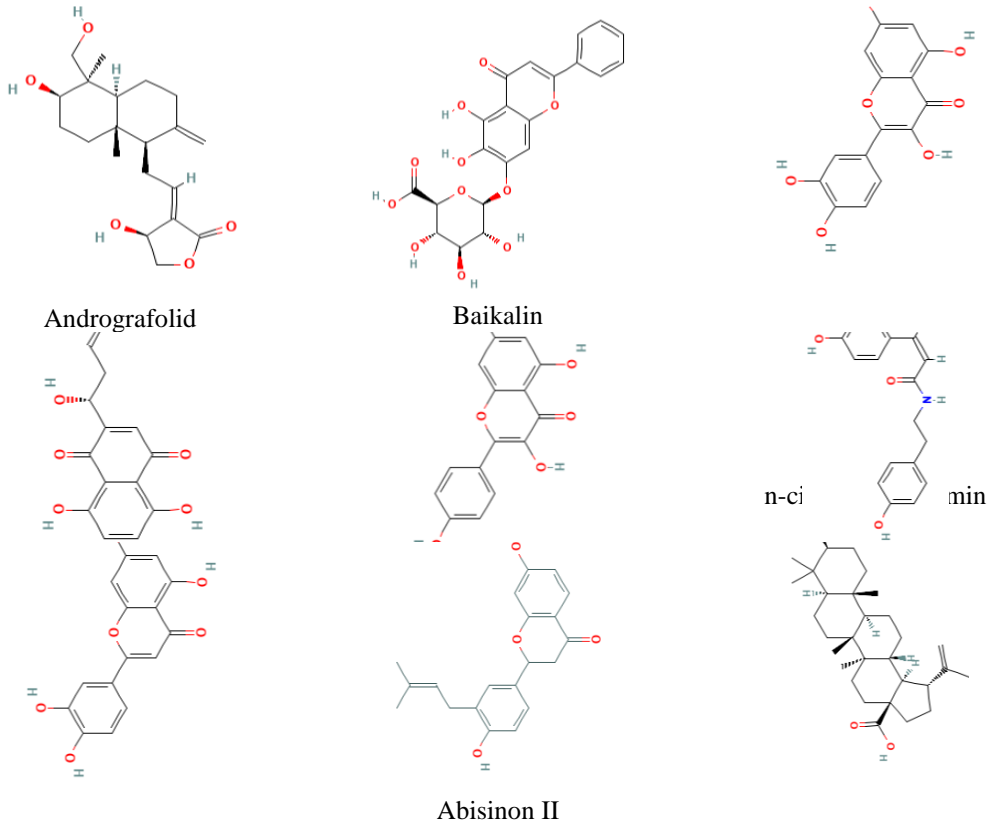
No	Bitki Adı	İçeriği Fitokimyasal	in vitro çalışmalar		in silico* kcal/mol (Aktif bölge ile)
			IC ₅₀ ** μM	EC ₅₀ *** μg/mL	
1	Hint Ekinezyası	Andrografolid	-	-	-6.5
2	Çin Takkesi	Baikalin	-	12.5	-
3	Kapari	Kuersetin	8.6	-	-7.3
4	Kırmızı Gromwell	Şikonin	-	-	-8.1
5	Çay	Kaemferol	16.3	-	-7.1
6	Batawali	n-cis-Feruloiltiramin	-	-	-3.1
7	Cehri çiçeği	Luteolin	-	-	-7.5
8	Acem Dutu	Abisinon II	-	-	-7.3
9	Huş	Betülinik asit	-	-	-8.3
10	Kırmızı Adaçayı	Kriptotaşininon	10.1	-	-9.0
		Taşininon	11.5	-	-8.6
		Taşininon IIA	17.1	-	-8.6
		Dihidrotaşininon I	10.7	-	-6.6
		Metil Taşininon	9.2	-	-
		Taşininon IIB	10.7	-	-
		Miltiron	30.0	-	-

Referans ligand: 7LBS protein-ligand kompleksi ligandı XR8-24 ligandı. (IC₅₀ : 0.56 μM)

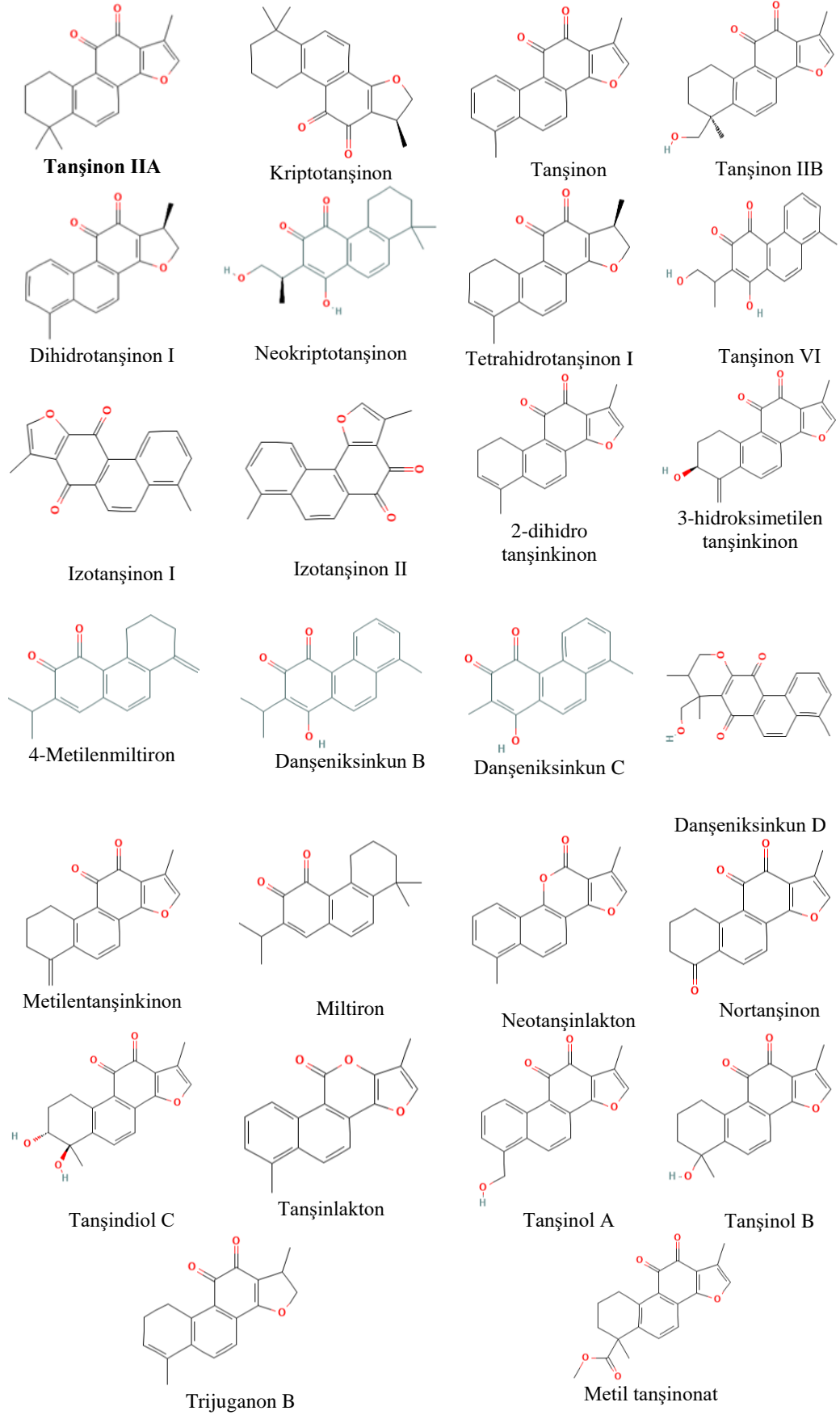
* Bağlanma enerjisi değeri (kcal/mol) PLpro enziminin aktif bölgesi ile hesaplanmaktadır.

** Bir enzimin %50'sini inhibe etmek için gerekli olan bir inhibitörün konsantrasyonu.

*** Maksimum olası etkinin %50'sini üretmek için gereken ilacın konsantrasyonu.



Şekil 2-19 PLpro enzimi ile aktivite gösteren 9 tıbbi bitkiye ait bitki fitokimyasalları



Şekil 2-20 PLpro enzimi ile aktivite gösteren kırmızı adaçayına ait bitki fitokimyasalları

2.3.1. Hint Ekinezyası (*Andrographis paniculata*): Andrografolid



Şekil 2-21 Hint Ekinezyası bitkisi

Hint Ekinezyası (Acanthaceae familyası) kanser, diyabet, yüksek tansiyon, ülser, bronşit, cilt hastalıkları, grip gibi bir dizi hastalığın tedavisinde geleneksel olarak kullanılan en popüler şifalı bitkilerden biridir [36]. (Şekil 2-21) Hint Ekinezyası bitkisi, Asya'da yüzyıllardır çeşitli rahatsızlıkların tedavisi için geleneksel tıp olarak kullanılmaktadır. Andrografolid fitokimyasalı da dahil olmak üzere çok sayıda fitokimyasal içermektedir. Bu fitokimyasalın PLpro enzimi aktif bölgesi için 3E9S protein-ligand kompleksi ile bağlanma modları belirlenip bağlanma enerjisi Lianxiang Luo ve arkadaşları tarafından **-6.5 kcal/mol** olarak hesaplandı [27,37]. SARS-CoV-2 PLpro enzimi aktif bölgesine bağlanan inhibitörler, kovalent bağlanırlar. Bu sebeple andrografolid ilgandı yeni bulunan ve bağlanan inhibitörlerin kovalent etkileşime sahip olmadığı BL2 bölgesi ile doking hesaplamaları için tez çalışmasına dahil edildi.

2.3.2. Çin Takkesi (*Scutellaria baicalensis* G.) Baikalin



Şekil 2-22 Çin Takkesi bitkisi

Scutellaria baicalensis Georgi. (SB), geleneksel Çin tıbbında yaygın olarak kullanılan tıbbi bitkidir [38]. (Şekil 2-22) Klinik olarak daha çok soğuk algınlığı ve öksürük gibi hastalıkların tedavisinde kullanılır. Modern fitokimyasal analizler, SB'nin ana

fitokimyasalları favonoidler olan yüzlerce fitokimyasal içerdiğini bulmuştur. Farmakolojik çalışmalar, SB'nin antibakteriyel, antiviral, antikanser gibi geniş bir farmakolojik aktivite aralığına sahip olduğunu göstermiştir. Bu bitki içeriğindeki baikalin fitokimyasalının SARS-CoV koronavirüsüne karşı EC₅₀ değeri Lianxiang Luo ve arkadaşları tarafından 12.5 µg/ml olarak belirlendiği için, SARS-CoV-2 virüsü inhibitör tasarımı çalışmalarına dahil edilerek PLpro enzimi aktif bölgesi için doking çalışması ile bağlanma modları belirlenip bağlanma enerjisi olarak hesaplandı [27,33,37]. SARS-CoV-2 PLpro enzimi aktif bölgesine bağlanan inhibitörler, kovalent bağlanırlar. Bu sebeple baikalin ligandı yeni bulunan BL2 bölgesi ile doking çalışması için tez çalışmasına dahil edildi.

2.3.3. Kapari (*Capparis spinosa*): Kuersetin



Şekil 2-23 Kapari bitkisi

Kapari (*Capparis spinosa* L.), zorlu ortamlara olağanüstü bir uyum yeteneği olan kurakçıl bir çalıdır [39]. (Şekil 2-23) Bu bitki türü, farmakolojik özellikleri nedeniyle büyük ilgi görmektedir. Kuersetin dahil birçok fitokimyasal içermektedir. Bu fitokimyasalın PLpro enzimi aktif bölgesi için 6W9C protein-ligand kompleksi ile MM-GBSA (moleküler mekanik) kullanılarak bağlanma serbest enerjisi Mahmoud A. A. Ibrahim ve arkadaşları tarafından **-40.9 kcal/mol** değeri ve IC₅₀ değeri Tewin Tencomnao ve arkadaşları tarafından **8.6 µM** olarak hesaplandı ayrıca aktif bölgesi için doking çalışması ile bağlanma modları belirlenip bağlanma enerjisi Lianxiang Luo ve arkadaşları tarafından **-7.3 kcal/mol** olarak hesaplandı [29,31,33,34,37,40,41]. SARS-CoV-2 PLpro enzimi aktif bölgesine bağlanan inhibitörler, kovalent bağlanırlar. Bu sebeple kuersetin ligandı yeni bulunan BL2 bölgesi ile doking çalışması için tez çalışmasına dahil edildi.

2.3.4. Kırmızı Gromwell (*Lithospermum erythrorhizon*): Şikonin



Şekil 2-24 Kırmızı Gromwell bitkisi

Kırmızı Gromwell olarak bilinen *L. erythrorhizon*'un kurutulmuş kökü, Çin ve Tayvan'da yaygın olarak kullanılan geleneksel bir Çin bitkisel ilacıdır [42]. (Şekil 2-24) Binlerce yıldır kızamık, çiçek hastalığı, egzema ve yanıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Şikonin ve türevleri, geleneksel Çin şifalı bitkisi *L. erythrorhizon*'un kök dokularından izole edilen aktif fitokimyasallardır ve geniş anti-iltihap aktiviteleri ile anti-tümör aktivitelerine sahiptir. Bu fitokimyasalın PLpro enzimi aktif bölgesi için doking çalışması ile bağlanma modları belirlenip bağlanma enerjisi Lianxiang Luo ve arkadaşları tarafından **-8.1 kcal/mol** olarak hesaplandı [37]. SARS-CoV-2 PLpro enzimi aktif bölgesine bağlanan inhibitörler, kovalent bağlanırlar. Bu sebeple şikonin ligandı yeni bulunan BL2 bölgesi ile doking çalışması için tez çalışmasına dahil edildi.

2.3.5. Çay: Kaemferol



Şekil 2-25 Çay bitkisi

Kaemferol, meyve ve sebzelerde bulunan bir flavonoid antioksidandır. Birçok çalışma, diyetle alınan kaemferolün kronik hastalık, özellikle kanser riskini azaltmadaki faydalı etkilerini tanımlamıştır [43]. (Şekil 2-25) Bu fitokimyasalın PLpro enzimi için IC₅₀ değeri Tewin Tencomnao ve arkadaşları tarafından **16.3 µM** olarak hesaplandı ayrıca PLpro enzimi aktif bölgesi için 5E6J protein-ligand kompleksi ile bağlanma enerjisi

Lianxiang Luo ve arkadaşları tarafından **-7.1 kcal/mol** olarak hesaplandı [34,37,40,41]. SARS-CoV-2 PLpro enzimi aktif bölgesine bağlanan inhibitörler, kovalent bağlanırlar. Bu sebeple kaemferol ligandı yeni bulunan BL2 bölgesi ile doking çalışması için tez çalışmasına dahil edildi.

2.3.6. Batawali (*Tinospora tuberculata*): n-cis-Feruloiltiramin



Şekil 2-26 Batawali bitkisi

Tinospora tuberculata, Malayca adı Batawali, Menispermaceae ailesine aittir ve geleneksel bir tıbbi bitkidir [44]. (Şekil 2-26) Malezya, Tayland ve Endonezya'nın her yerinde birincil yağmur ormanlarında yetişen bir bitkidir. n-cis-Feruloiltiramin dahil birçok fitokimyasal içermektedir [45]. Bu fitokimyasalın PLpro enzimi aktif bölgesi için 5E6J protein-ligand kompleksiyle doking çalışması ile bağlanma modları belirlenip bağlanma enerjisi AutoDock 4 programı ile Bin Peng ve arkadaşları tarafından **-3.11 kcal/mol** olarak hesaplandı [40]. SARS-CoV-2 PLpro enzimi aktif bölgesine bağlanan inhibitörler, kovalent bağlanırlar. Bu sebeple n-cis-feruloiltiramin ligandı yeni bulunan BL2 bölgesi ile doking çalışması için tez çalışmasına dahil edildi.

2.3.7. Cehri çiçeği (*Reseda luteola*): Luteolin



Şekil 2-27 Cehri Çiçeği bitkisi

Reseda luteola L., yüksek luteolin içerdiğinden dolayı tıbbi olarak kullanılan bir bitkidir ve bitkinin taze çiçeklerinden ve dış kısımlarından izole edilmiştir [46]. (Şekil 2-27) Luteolin, Düşük toksisiteye ve kılcal direnç üzerinde etkiye sahiptir ve idrar söktürücü özelliklere sahiptir [47]. Bitkinin tahrişi hafiflettiği ve ağrıları hafiflettiği

bildirilmektedir. Luteolin fitokimyasalının PLpro enzimi aktif bölgesi için 6WX4 protein-ligand kompleksi için doking çalışması ile bağlanma modları belirlenip bağlanma enerjisi Autodock Vina programı ile Lianxiang Luo ve arkadaşları tarafından **-7.5 kcal/mol** olarak hesaplandı [37,48]. SARS-CoV-2 PLpro enzimi aktif bölgesine bağlanan inhibitörler, kovalent bağlanırlar. Bu sebeple luteolin ligandı yeni bulunan BL2 bölgesi ile doking çalışması için tez çalışmasına dahil edildi.

2.3.8. Acem Dutu (*Broussonetia papyrifera*): Abisinon II



Şekil 2-28 Acem Dutu bitkisi

Broussonetia papyrifera'nın yaprakları, meyvesi ve kabuğunun çeşitli geleneksel tıbbi kullanımları vardır [49]. (Şekil 2-28) Abisinon II dahil birçok fitokimyasal içermektedir. Abisinon II fitokimyasalının PLpro enzimi aktif bölgesi için 6WX4 protein-ligand kompleksi için doking çalışması ile bağlanma modları belirlenip bağlanma enerjisi Autodock Vina programı Md. Ashraful Hasan ve arkadaşları tarafından **-7.3 kcal/mol** olarak hesaplandı [48]. SARS-CoV-2 PLpro enzimi aktif bölgesine bağlanan inhibitörler, kovalent bağlanırlar. Bu sebeple abisinon II ligandı yeni bulunan BL2 bölgesi ile doking çalışması için tez çalışmasına dahil edildi.

2.3.9. Huş (*Betula*): Betülinik Asit



Şekil 2-29 Huş bitkisi

Betula (Betulaceae) cinsinin ağaç ve çalıları, kuzey yarımkürenin ılıman ve kuzey iklim bölgelerinde çeşitli ekosistemlerde yaşar [50]. (Şekil 2-29) *Betula* kabuğu özlerinin

iyileştirici özellikleri, dünyanın farklı yerlerinde geleneksel tıpta uzun zamandır bilinmektedir. Betulanın çeşitli türleri geleneksel olarak iltihaplı romatizma dahil olmak üzere çeşitli iltihap hastalıklarının tedavisi için kullanılmıştır. Betülinik asit dahil birçok fitokimyasal içermektedir. Bu fitokimyasalın PLpro enzimi aktif bölgesi için doking çalışması ile bağlanma modları belirlenip bağlanma enerjisi Lianxiang Luo ve arkadaşları tarafından **-8.3 kcal/mol** olarak hesaplandı [37]. SARS-CoV-2 PLpro enzimi aktif bölgesine bağlanan inhibitörler, kovalent bağlanırlar. Bu sebeple betülinik asit ligandı yeni bulunan BL2 bölgesi ile doking çalışması için tez çalışmasına dahil edildi.

2.3.10. Kırmızı Adaçayı (*Salvia miltiorrhiza*): Tanşinon Molekülleri



Şekil 2-30 Kırmızı Adaçayı bitkisi

SARS-CoV virüsü için inhibitör arayışında, *Salvia miltiorrhiza*'dan türetilen tanşinonların, viral sistein proteazları olan SARS-CoV 3CLpro ve PLpro için spesifik ve seçici inhibitörler olduğu bulundu [51,52]. (Şekil 2-30) Tanşinon moleküllerinin her iki sistein proteazının da (3CLpro ve PLpro) inhibitörleri olduğunu belirlendi. Tüm izole edilmiş moleküller PLpro inhibitörleri olarak işlev görürler. Ayrıntılı bir kinetik mekanizma çalışmasında tüm tanşinon molekülleri enzim inhibitörleri olarak tanımlandı.

Bu noktada; tanşinon moleküllerinden; kriptotanşinon 10.1 μM IC_{50} ile -9.0 kcal/mol bağlanma enerjisi, tanşinon 11.5 μM IC_{50} ile -8.6 kcal/mol bağlanma enerjisi, **tanşinon IIA** 17.1 μM IC_{50} ile -8.6 kcal/mol bağlanma enerjisi, dihidrotanşinon I 10.7 μM IC_{50} ile -6.6 kcal/mol bağlanma enerjisi, metil tanşinonat 9.2 μM IC_{50} ve Tanşinon IIB 10.7 μM IC_{50} ve miltiron ise 30.0 μM IC_{50} değeri bulundu [33,34,37,40,41,52]. IC_{50} değerleri Young Bae Ryu ve arkadaşları tarafından, bağlanma enerjileri ise Lianxiang Luo ve arkadaşları tarafından hesaplandı. Tanşinon moleküllerinin PLpro için seçici inhibitörler olması sebebiyle IC_{50} değeri hesaplanan bu moleküllere ek olarak kırmızı adaçayı

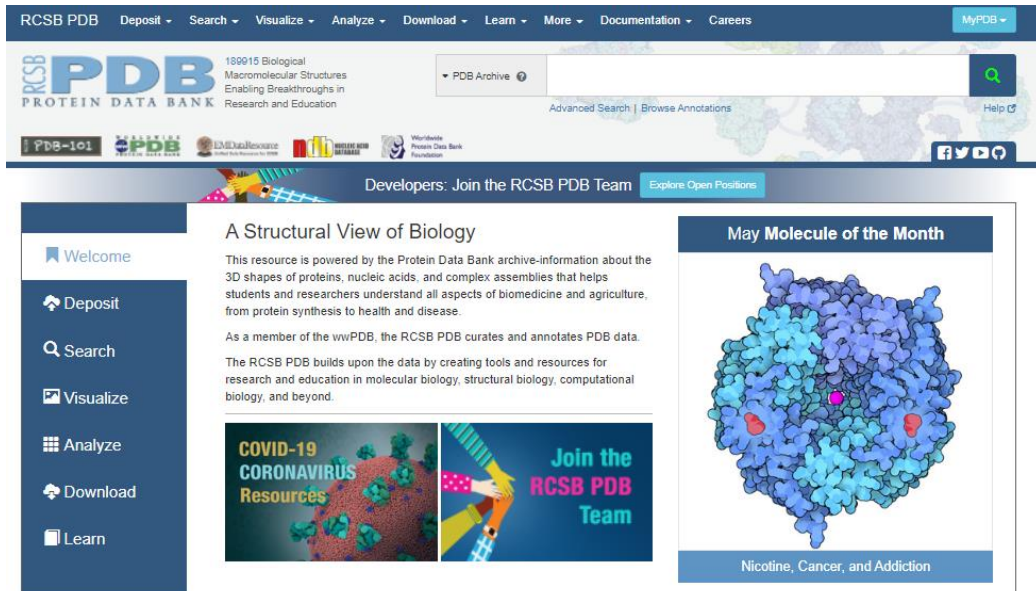
bitkisinden izole edilen moleküller de dahil olmak üzere toplam 26 tanşınon molekülü (Şekil 2-20) SARS-CoV-2 PLpro enziminin yeni bulunan BL2 bölgesi ile doking çalışması için tez çalışmasına dahil edildi.

2.4. Protein Veri Tabanları

Protein Veri Tabanı, biyolojik moleküllere, proteinlere ve nükleik asitlere ait 3 Boyutlu (3D) yapıları içeren bir veri tabanıdır [53]. RCSB, PDBSum, PDBe (PDB in europe), PDBj (PDB Japan), wwPDB (world wide PDB) olmak üzere farklı protein veri tabanları bulunmaktadır. Tez kapsamında **RCSB Protein Veri Tabanı** kullanıldı. (Şekil 2-31)

Bir molekülün formülü ve yapısı, ilaç gelişim sürecinde çok önemlidir. Protein veri tabanında yer alan yapılar küçük proteinlerden DNA parçalarına, ribozom gibi karmaşık moleküllere kadar çeşitlenen birçok farklı biçimde bulunmaktadır. Protein veri tabanlarında bulunan protein-ligand kompleksleri 3 boyutlu formda indirilerek, *in silico* çalışmalar için protein hazırlamak için kullanılır. Üç boyutlu yapıları içeren bu moleküller bakteri, bitki veya hayvanlar ile insanları içeren organizmalarda bulunan moleküller olabilir.

Genel olarak protein veri tabanındaki proteinler, X-ray veya NMR ile kristal yapıları çözülen protein-ligand komplekslerini, varsa farklı protein zincirlerini, içeriğinde yer alan kristal su moleküllerini ve inorganik elementleri içerir.



Şekil 2-31 RCSB Protein Veri Tabanı Arayüzü

2.5. İlaç Tasarımında Bilgisayarlar

İlaç tasarım süreci genel olarak karmaşık bir süreçtir ve dolayısıyla çok fazla zaman ve kaynak gerektirir [54]. Bu sebeple bilgisayar destekli ilaç tasarımı metotları kullanılarak zaman ve maliyetten kazanç yoluna gidilmesi hedeflenir. Bilgisayar destekli ilaç tasarımında yer alan metotlar ihtiyaca ve gerekli zamana göre değerlendirilir. Bu metotlar; yapı tabanlı ve ligand tabanlı ilaç tasarımıdır. Hem moleküler doking yöntemlerine hem de sanal tarama yöntemlerine öncü bileşiğin tanımlanması ve optimizasyon edilmesi için bu metotlar uygulanabilir.

Yapı tabanlı sanal tarama yönteminin ilk olarak hedef molekül üzerindeki ligand-bağlanma bölgesini tanımlamaktır [55]. Bu noktada bağlanma bölgesi bir enzim üzerindeki aktif bölge ya da başka bir molekül ile etkileşim kurmak için oluşan bir etkileşim bölgesi olabilir [56].

Yapı tabanlı sanal ligand taraması hedef molekülün 3 boyutlu yapısının taranmasıyla başlar. Hedef yapı deneysel verilerden elde edilebilir. Hedef yapının 3 boyutlu yapısını taramaya başlamadan önce taraması yapılacak molekülün, molekül kütüphanelerinden uygun şekilde seçilmesi gerekir. Sanal kütüphanelerin taranmasının ve reseptörün hazırlanmasının ardından her bir molekül doking programları ile sanal olarak hedef proteine (bağlanma bölgesine) yerleştirilir. Ardından protein-ligand arasındaki doğru konformasyonu bulmak için serbest bağlanma enerjilerini içeren skorlama fonksiyonu kullanılır.

Doking ve skorlama fonksiyonu en uygun-iyi molekülleri sıraladıktan sonra hesaplanan bağlanma enerjilerinin sıralanması ve doğru pozun uygun olup olmamasının belirlenmesiyle birlikte istenilmeyen kimyasal gruplar atılır ve istenen fizikokimyasal özellikler ile öncü moleküllere deneysel çalışmalar yapılır [57].

Ligand tabanlı sanal tarama yöntemleri ise hem öncü molekülün tanımlanması hem de molekülün optimizasyonu için bir hedef proteinin yapısı yerine bilinen aktif ligandlarda bulunan bilgileri kullanır. Ligand tabanlı yöntemler, yalnızca hedef proteinin 3D yapısı bulunmadığında kullanılır. Temelde hedef yapıyı bilmeden, genelde ilgilenilen hedefe karşı bir dizi ligandın aktif olduğu bilinir. Ligand tabanlı bir hesaplama yöntemi iki temel unsur içermektedir. Bunlar: iyi bir benzerlik ölçümü ve güvenilir bir skorlama yöntemidir. Ek olarak hesaplama yöntemi yüksek hız ve doğruluk ile sayıca fazla potansiyel ligandı tarayabilmelidir [58].

Bilgisayar destekli ilaç tasarım metotları sık kullanılmaktadır. Birçok ilacın tasarım sürecinde bilgisayar kullanılır. Günümüzde *in silico* yöntemler kullanılarak geliştirilen ve onay alarak raporlanan birçok ilaç bulunur [59]. (Çizelge 2-5)

Çizelge 2-5 Son yıllarda *in silico* yöntemler kullanılarak geliştirilen onaylanmış ve raporlanmış ilaçlar

No	İlaç Adı	Onay Aldığı Hastalık	Onay Yılı
1	Fosamprenavir	HIV	2003
2	Atazanavir	HIV	2004
3	Tipranavir	HIV	2005
4	Sorafenib	Karaciğer Kanseri	2005
5	Darunavir	HIV	2006
6	Lapatinib	Meme kanseri	2007
7	Abiraterone	Prostat kanseri	2011
8	Crizotinib	Kanser	2011
9	Ribociclib	Meme kanseri	2017
10	Apalutamide	Prostat kanseri	2018
11	Larotrectinib Sulfate	Kanser	2018
12	Cladribine	MS hastalığı	2019
13	Erdafitinib	Mesane Kanseri	2019
14	Zanubrutinib	Lenf kanseri	2019
15	Selinexor	Kanser	2019

2.6 Moleküler Doking Yöntemi (Moleküler Kenetlenme)

Moleküler doking, ilaç keşif ve tasarımı sürecinde çok önemli bir aşamadır. Moleküler doking yöntemi temel olarak bilgisayar kullanımını içeren metotlar kullanarak ligand ile reseptörün kompleks yapısı hakkında tahminler yapmasına dayanır [60].

Moleküler doking yöntemi genel olarak iki adımda gerçekleşir. İlki, proteinin aktif bölgesindeki ligandın konformasyonlarını bulmaktır. Diğer adım ise bu konformasyonları skorlama fonksiyonlarını kullanarak sıralamaktır. Bu işlemin temel prensibi oluşan konformasyonlar arasında en yüksek skora sahip olanın bağlanma modlarının deneysel olarak oluşturulabileceğidir. Moleküler doking çalışmaları ücretli ve ücretsiz birçok program tarafından çeşitli metotlarla yapılır [61]. (Çizelge 2-6) Bu programlardan en çok kullanılanı Autodock Vina programıdır. Tez kapsamında moleküler doking hesaplamaları için Autodock Vina kullanıldı.

Çizelge 2-6 Moleküler Doking Hesaplaması Yapan Programlar

Doking Program Adı	Tanımı ve İşlevi	Program Tasarım Yılı	Lisans*
AutoDock / Autodock Vina	Lamarck Genetik Algoritması ve Ampirik Serbest Enerji Puanlama Fonksiyonu ile ligandın makromoleküle otomatik dokingi için kullanılır.	1990	+
CABS-dock	Bağlanma yeri hakkında ön bilgi olmadan esnek protein-peptit dokingi için kullanılır.	2015	+
DOCK	Geometrik Eşleştirme Algoritmasına dayalıdır.	1988	+
EADock	Evrimsel algoritmalara dayalı olarak çalışır.	2007	+
FlexAID	Hedef yapı ile zincir esnekliğine göre çalışır.	2015	+
GalaxyPepDock	Etkileşim benzerliğine dayalı protein-peptit dokingi için kullanılır.	2018	+
Glide	Kapsamlı arama tabanlı yerleştirme programıdır.	2004	-
HADDOCK	Temelde protein-protein dokingi için geliştirildi, ancak protein-ligand dokinginde de kullanılabilir.	2003	+
LeDock	Küçük moleküllerin bir proteine hızlı, doğru ve esnek bir şekilde yerleştirilmesi için tasarlanan programdır.	2016	+
LightDock	Protein-protein, protein-DNA, farklı skorlama fonksiyonları kullanan protein-peptit dokingi programıdır	2018	+
Molecular Operating Environment (MOE)	'MOE' içinde doking yapılabilen ücretli bir yazılımdır.	2008	-
MOLS 2.0	Karşılıklı ortogonal Latin kareler algoritmasını kullanan protein-ligand doking programıdır.	2016	+
PSI-DOCK	Poz Duyarlı Eğimli (PSI)-DOCK programıdır.	2006	-
rDock	Proteinlere ve nükleik asitlere karşı küçük moleküllerin sanal taraması ile bağlanma modu tahmini yapar.	2012	+
SEED	Serbest bağlanma enerjisinin değerlendirilmesi ile fragmentlerin otomatik dokingi ile çalışır.	1999	+
SwissDock	Bir protein ile küçük molekül ligandı arasındaki etkileşimi tahmin etmek için online hizmettir.	2011	+
VirtualFlow	VFLP (VirtualFlow for Ligand Preparation), çok sayıda küçük molekül içeren kütüphanelerin iyileştirilmesine yöneliktir.VFVS, sanal tarama prosedürlerini gerçekleştirmeyi hedefler.	2020	+

*(+) olanlar ücretsiz, (-) olanlar ücretli yazılımlardır.

2.6.1 Bağlanma Enerjisi

Docking programları yapılan hesaplamalar sonucunda kullanıcıya skorlama fonksiyonlarının yanında bir de bağlanma enerjisi yani ΔGB değerini verir. Buna göre ilk önce protein ve ligand etkileşime girerek protein ligand kompleksini oluşturur. Ligandın sabit proteinin esnek olduğu yöntemlerin yanı sıra her ikisinin de esnek olduğu fonksiyonlar daha doğru sonuç verir. Bunun nedeni protein-ligand etkileşimlerinin her iki yapıda da olduğu ve bu yapıların sabit halde olmamasıdır. Tez çalışmasında kullanılan Autodock Vina programı hem ligandın hem proteinin esnek olduğu Lamarck algoritmasını kullanır. Bağlanma enerjisinin hesabı için elde edilen formül:

i. Denklem: Protein (P) + Ligand(L) \rightleftharpoons Kompleks (PL)

ii. Bağlanma: Protein (P) + Ligand (L) \rightarrow Kompleks (PL), $K(\text{bağlanma})=K_b$

iii. Ayırışma: Kompleks (PL) \rightarrow Protein (P) + Ligand (L), $K(\text{ayırışma})=K_d$

$K(\text{bağlanma})=1/K(\text{ayırışma})$

$\ln K(\text{bağlanma})= -\ln K(\text{ayırışma})$

K_i = Protein-Ligand kompleksinin ayırışma sabiti

Bu durumda;

$\ln K_b = -\ln K_i$ olacaktır.

i. $\Delta G_{\text{Bağlanma}}= -RT \ln K_b$

ii. $\Delta G_{\text{inhibisyon}} =RT \ln K_i$ buradan K_i değeri çekilirse;

$K_i=e(\Delta G_b/RT)$ formülü ile K_i değerine ulaşılır [62].

2.7 Sanal Ligand Taraması

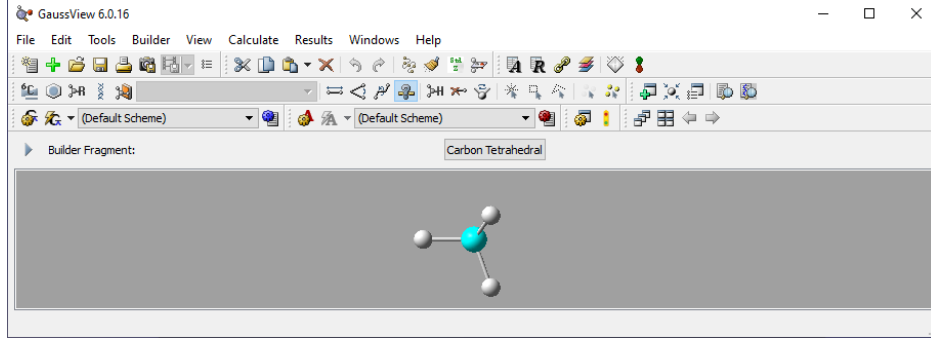
Sanal ligand taraması yeni öncü molekül tasarımı için ortaya çıkan oldukça kullanışlı bir araçtır. Yüz milyonlarca molekülün biyolojik olarak taranması oldukça zor bir işlemdir. Sanal ligand taraması bu işlemi kolaylaştıran yöntemler sunar. X-Ray ya da NMR yapısından türetilmiş biyoaktif bir konformer elde edildiğinde, bu konformerler ligand bazlı sanal tarama yeni ligandları 3D benzerlik araması yapılarak sıralanabilir. Bu hesaplamalar ve/veya teorik yöntemler, küçük moleküller ve farmasötik olarak önemli biyolojik reseptörlerin bağlanma afinitelerinin tahmini için kullanılır [63]. Tarama çok büyük veri tabanları yardımıyla yapılır. ZINC15 Veri tabanı bunlar içerisindeki en kullanışlı olanlardan birisidir ve ligand veri tabanı olarak isimlendirilebilir. Büyük molekül kütüphanesinden çok hızlı olarak molekül taraması yapar.

3. MATERYAL VE METOT

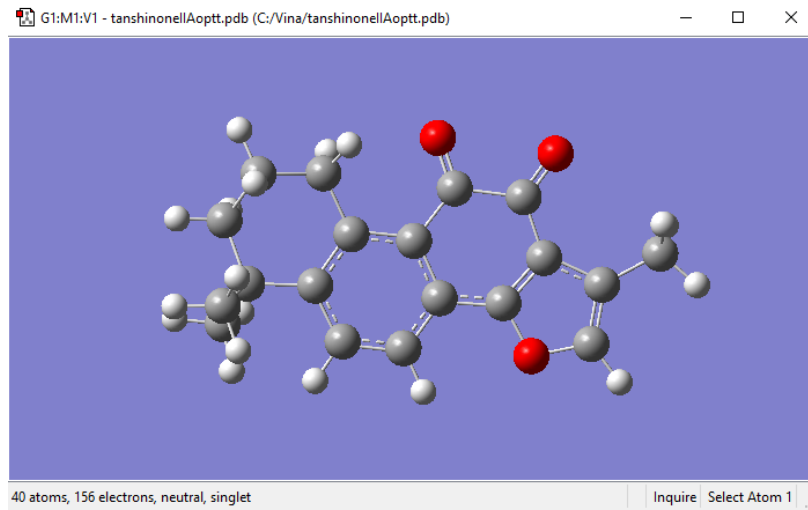
3.1. Tezde Kullanılan Program ve Veri Tabanları

3.1.1. Gaussian 09W

Gaussian 09W ligandların optimizasyonunu yapabilen programdır. Molekülleri en kararlı haline getirilmesini sağlayan Gaussian 09 programı, teorik hesaplamalarla molekülleri en kararlı hale getirir. (Şekil 3-1, 3-2) Program GaussView isimli arayüz görüntüleyici aracılığıyla ligandları görüntüler. Yarı deneysel ve DFT (Yoğunluk fonksiyonel teorisi) metotları kullanarak çalışabilir. DFT daha kapsamlı ve net sonuçlar verir. Optimize edilecek moleküllere *DFT/B3LYP/6-31G(d,p)* seti gibi birçok farklı optimize setleri kullanılarak çalışılacak moleküllerin en kararlı hale getirilmesi sağlanır [64].



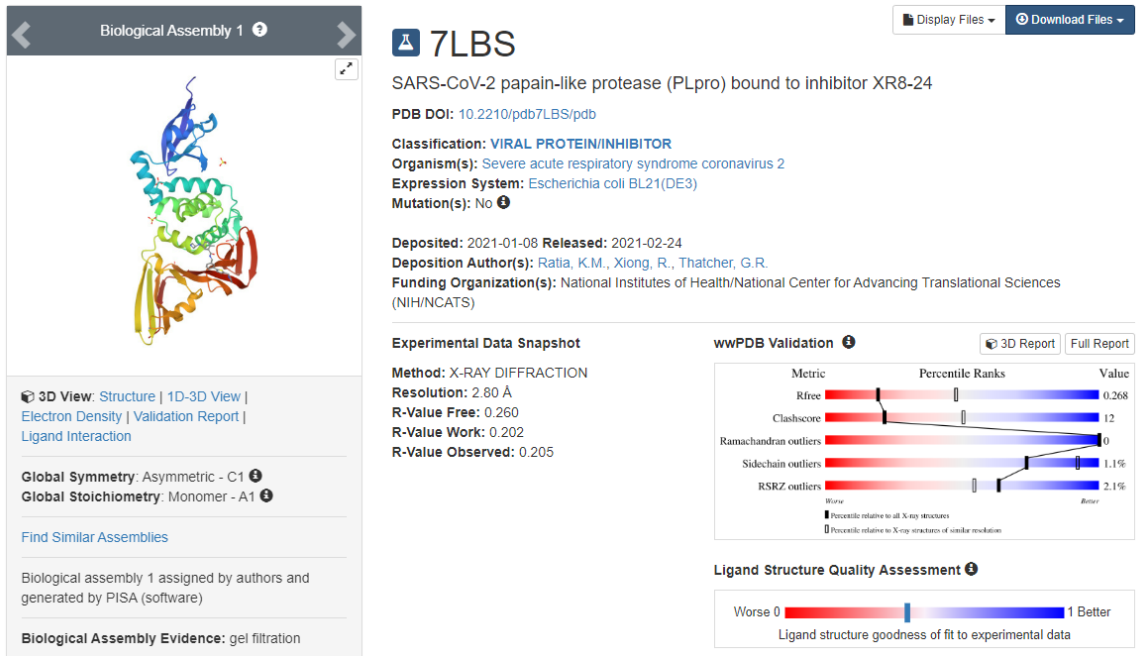
Şekil 3-1 GaussView arayüzü



Şekil 3-2 GaussView arayüzünde görüntülenen Tanşınon IIA molekülü

3.1.2 RCSB Protein Veri Bankası

Tez kapsamında protein veri tabanlarından RCSB protein veri tabanı kullanıldı. RCSB veri tabanının arayüz kullanımının oldukça kolaydır. RCSB veri tabanında çalışılan proteine ait mevcut x-ray makalesi varsa o makalenin linkinin yer alması literatür taraması açısından önemlidir. <https://www.rcsb.org/> linki ile veri tabanına ulaşılabilir. RCSB’de proteinlerin 3 boyutlu yapıları Autodock Vina programında kullanılmak üzere hazırlanabilen farklı yazılım kodları ile indirilebilir. Proteinlerin içeriğinde bulunan kristal sular ve/veya inorganik moleküllere ek olarak yapıda varsa farklı protein zincirleri yer alabilir. Bu sebeple doking çalışması öncesinde bir protein hazırlığı gereklidir. X-ray difraksiyonu, elektron mikroskopisi veya NMR yöntemleriyle kristal yapıları aydınlatılan proteinler, dört haneli kodlarla isimlendirilirler. (Şekil 3-3)



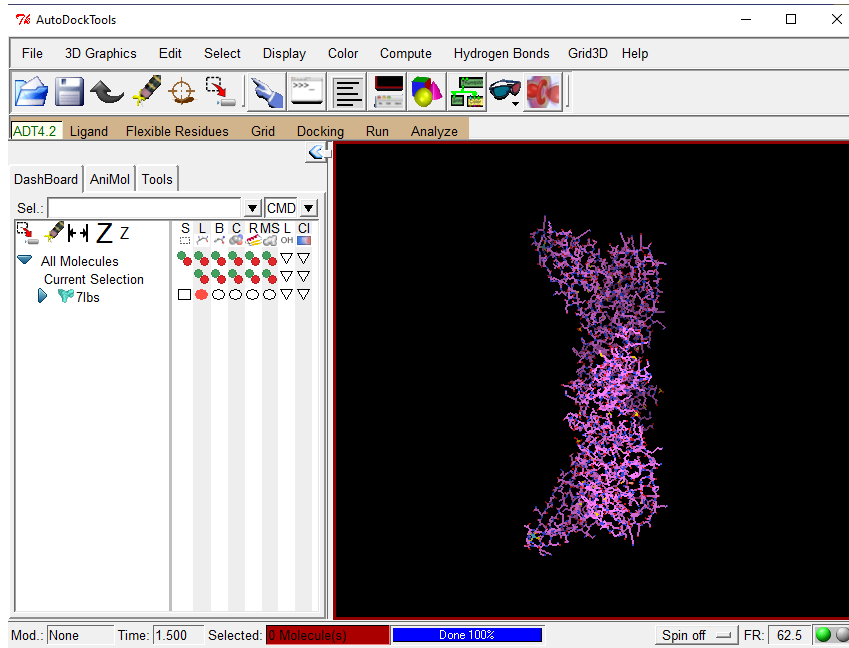
Şekil 3-3 RCSB protein veri tabanı arayüzü ve örnek protein-ligand kompleks yapısı

3.1.3. AutoDock Vina

Autodock Vina ilk olarak 1990 yılında Scripps Araştırma Enstitüsü tarafından tasarlanan ve temelde moleküler doking hesaplamaları ile protein hazırlama işlemlerinin yapılabildiği bir yazılımdır. Autodock Vina hem ücretsiz olması hem de moleküler doking işlemini çok hızlı bir biçimde yapabilmesi ve yüksek kesinlik verebildiği için güvenilir hızlı ulaşılabilir olması nedeniyle en çok tercih edilen yazılımdır. Moleküler doking yöntemi, X-ray kristalografisiyle X-ray yapılarının çözüldüğü makromolekülün (enzim, reseptör gibi) ve küçük bir molekülün (ligand) kovalent olmayan

bağlanmalarını, moleküler dinamik (MD) simülasyonlarından elde edilen yapılarından veya homoloji modellemelerinden başlayarak etkili bir şekilde tahmin etmeye çalışan bir hesaplama yöntemidir. (Şekil 3-4) Amaç, bağlanma anındaki etkileşimleri belirlemek ve bağlanma afinitesini tahmin etmektir. Küçük moleküllerin bir proteine bağlanmasının özelliklerini tahmin etmek önemlidir bunun nedeni ilaç tasarım sürecinde ilaç benzeri moleküllerin sanal kütüphanelerini taramak için bu prosedürlerin kullanılmasıdır [74].

AutoDock Vina ile AutoDock girdi/çıkış formatında aynı PDBQT isimli formatı kullanır. PDBQT formatı interaktif olarak oluşturularak MGLTools yazılımı ile okunabilen bir formattır. AutoDock Vina tasarım nedeni araştırmacının uygulama detaylarını anlamasını, arama parametrelerini değiştirmesini, kümeleme sonuçlarını ya da gelişmiş matematiksel bilgileri bilmesini gerektirmemesidir ve bu yönleriyle oldukça kullanışlıdır. [75] RMSD değerinin 2 Å değeri limit değer olarak kabul edilir ve bu değerin altındaki değerler olumludur [65].

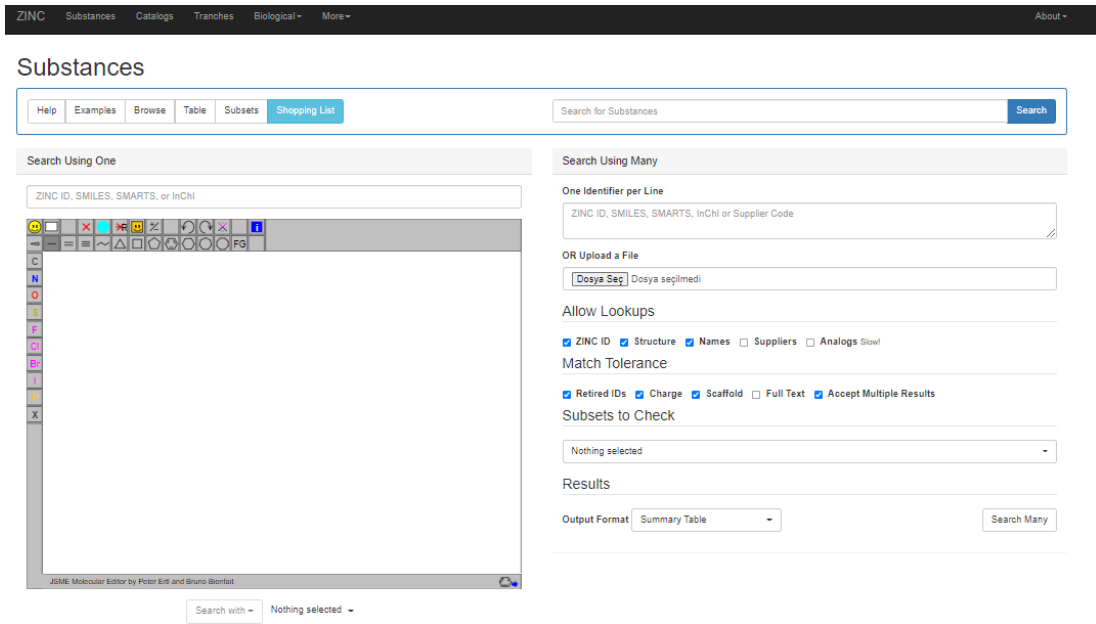


Şekil 3-4 Autodock Vina ile görüntülenen 7LBS proteini

3.1.4 ZINC 15 Veri Tabanı

ZINC15 veri tabanı tamamen ücretsiz ve içeriğinde molekül bulunduran bir veri tabanıdır. 'https://zinc15.docking.org/' linki ile ZINC15 veri tabanına erişilebilir [66]. ZINC ticari değildir sloganıyla hareket eden veri tabanının asıl amacı molekül kütüphanesi olmasıdır. Öncelikli olarak sanal tarama için geliştirilen ZINC15 zamanla

yeni ligandların keşfedilmesinin de etkisiyle bilinen hedef yapı için birbirine en çok benzeyen ligandlar aranmasına imkan vermiştir [67]. ZINC15 veri tabanında 230 milyondan fazla molekülün 3 boyutlu yapısı bulunmaktadır. Bu moleküller, moleküler doking çalışması için .pdb ve .pdbqt kodlarıyla hazır formatta indirilebilen halde bulunur. (Şekil 3-5) ZINC15 analogları bir dakikadan kısa sürede aranabilen 750 milyondan fazla satın alınabilir molekül içerir. Yapı tabanlı sanal tarama için, 3D yapıların mevcut her molekül için tek tek hesaplanması gerekmektedir. İlaç adayı olabilecek moleküllerin birçoğunun 3D yapıları çeşitli doking programlarında yer almaktadır.



Şekil 3-5 ZINC15 Veri Tabanı Arayüzü

3.1.5. SwissADME ve pkCSM Online Programları

Farmakokinetik ve toksikolojik hesaplamalar yapılması bir ilaç adayı için oldukça önemli bir süreçtir. ADME ve toksikoloji, ilaç tasarımı için öncü molekül adayı olabilecek moleküllere uygulanan; emilim, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisite kavramlarını içeren terimdir [68].

Bu çalışmada Swiss ADME ve pkCSM farmakokinetik olmak üzere iki veri tabanı kullanıldı. Bunlardan **pkCSM** (Grafik Tabanlı İmzaları Kullanarak Küçük Molekül Farmakokinetik ve Toksikite Özelliklerini Tahmin Etme) ADME ve toksikoloji için kullanıldı. Farmakokinetik özelliklerden karaciğerdeki P450 enzim inhibitörleri incelendi. **SwissADME** ise moleküllerin fizikokimyasal özellikler, CYP inhibisyonları, ilaç benzerlikleri ile biyoyararlanım radarı tespiti için kullanıldı.

pkCSM ile yapılan testler; [69] (Çizelge 3-1)

Emilim: İlaç hangi miktarda ve ne kadar hızda emilir? Sorularını cevaplamaktadır. Tez kapsamında emilim için uygulanan testler: Caco-2 geçirgenliği, Bağırsak emilimi/İnsan testleridir.

i. Caco-2 geçirgenliği: Caco-2 tek tabakalı hücre ağızdan alınan ilaçların emilimini tahmin etmek için insan bağırsak mukozasının bir modeli olarak yaygın olarak kullanılır. Bu model, görünür geçirgenlik katsayısının ($\log P_{app}$; $\log cm / s$) logaritmasını tahmin eder.

ii. Bağırsak emilimi: Bağırsak normal şartlarda bir ilacın ağızdan alınan bir solüsyondan emilmesi için birinci bölgedir. Bu yöntem, insan ince bağırsağı tarafından emilen moleküllerin oranını tahmin etmek için tasarlanmıştır.

Dağılım: İlaç vücutta hangi bölgeye dağılır? Bu dağılımın oranı ve kapsamı nedir? Sorularını cevaplamaktadır. Dağılım için uygulanan test, VDss (insan) testidir.

VDss (kararlı durum dağılım hacmi): Kararlı durum dağılım hacmi (VDss), bir ilacın toplam dozunun kan plazmasındaki ile aynı derişimi vermek için eşit olarak dağıtılması gereken teorik hacimdir. VD ne kadar yüksek değerli ise ilaç plazma yerine dokuda o kadar çok dağılacaktır. Belirli bir bileşimin VDss'sinin tahmin edilen logaritması, $\log L / kg$ olarak verilir.

Metabolizma: İlaç ne kadar hızlı metabolize olur, etki mekanizması nedir? Hangi metabolitler oluşur? Aktif veya toksik midir? Sorularını cevaplamaktadır. Metabolizma için uygulanan testler: CYP2D6 ve CYP3A4 substratı testidir.

CYP2D6 ve CYP3A4 substratı: Çoğunlukla karaciğerde bulunan sitokrom P450'ler birçok ilacın metabolizmasından sorumludur. Ayrıca P450'nin inhibitörleri, bu ilaçların farmakokinetiğini önemli ölçüde değiştirebilme özelliğine sahiptir. Bu sebeple, belirli bir bileşimin bir sitokrom P450 substratı olup olmadığının belirlenmesi oldukça önemlidir.

İlaç metabolizması için görevli iki ana izoform 2D6 ve 3A4'tür.

Atılım: İlaç hangi hızda ve ne kadar atılır? Sorularını cevaplamaktadır. Atılım için uygulanan test, Toplam Klirens (maddenin böbrekler tarafından uzaklaştırılması) testidir.

Toplam Atılım (Klirens): İlaç klirensi orantılılık sabiti CL_{tot} ile ölçülür ve temel olarak hepatik klirens (karaciğerde metabolizma ve safra klirensi) ve renal klirensin (böbrekler yoluyla atılım) bir kombinasyonu olarak ortaya çıkmıştır.

Çizelge 3-1 pkCSM veri tabanı ile yapılan ADME metotları

Metot	Uygulanan Testler	Testin değerlendirilmesi
Emilim	Caco-2 geçirgenliği	pkCSM tahmin modeli için 0,90'm üzerinde tahmin edilen Caco-2 değeri yüksek kabul edilir.
Emilim	Bağırsak emilimi/İnsan	Bir molekül %30'dan daha az soğurmaya sahip ise zayıf emilir.
Dağılım	VD _{ss} (insan)	VD _{ss} değeri 0,71 L / kg altındaysa düşük ve 2,81 L / kg üzerindeyse yüksek olarak kabul edilir.
Metabolizma	CYP2D6 ve CYP3A4 substratı	Bu belirli bir molekülün P450 tarafından metabolize edilip edilmeyeceğini değerlendirir.
Atılım	Toplam Atılım	Belirli bir bileşiğin tahmin edilen toplam atılım (klirens) log'unu (CL _{tot}), log (ml/dak/kg) sonucu olarak verir.

pkCSM için yapılan Toksikoloji testleri; [69] (Çizelge 3-2)

Toksisite: İlacın vücut sistemleri veya organlarında toksik etkisi var mıdır? Sorularını cevaplamaktadır. Toksisite için uygulanan testler: AMES Toksisitesi, Maksimum Tolere Doz (insan), Oral Fare Akut Toksisite (LD50), hERG I-II inhibitör, Oral Fare Kronik Toksisite (LOAEL) testleridir.

i. AMES Toksisitesi: AMES testi, bakteriler kullanılarak moleküllerin mutajenik potansiyelini değerlendirmek için çok kullanılan bir metottur. AMES toksisitesi *pozitif* çıkan bir test sonucu bileşiğin mutajenik olduğunu ve bu nedenle bir kanserojen gibi davranabileceğini göstermektedir.

ii. *Maksimum Tolere Doz (insan)*: Önerilen maksimum tolere edilen doz (MRTD), insandaki kimyasalların toksik doz eşliğinin bir tahminini sağlamaktadır. MRTD'nin logaritması (log mg/kg/gün) tahmin edilir. Faz I klinik çalışmalarda, farmasötikler için önerilen maksimum başlangıç dozunun belirlenmesine yardımcı olan metottur.

iii. *Oral Fare Akut Toksikite (LD₅₀)*: İlaç adayı bir molekülün toksisitesini belirlemek önemlidir. Ölümcül doz değerleri (LD₅₀), farklı moleküllerin toksisitesini değerlendirmede kullanılan standart bir akut toksisite ölçümüdür. LD₅₀, tek seferde verilen ve bir grup test hayvanının %50'sinin ölümüne neden olan bir molekülün miktarıdır.

iv. *hERG I-II inhibitör*: HERG (insan eter-a-go-go geni) tarafından kodlanan potasyum kanallarının inhibisyonu, ölümcül ritim bozukluğuna yol açan uzun QT sendromunun gelişmesinin temel nedenleridir. Birçok ilaç adayı HERG kanallarını *engellediği* için piyasadan çekilmiştir.

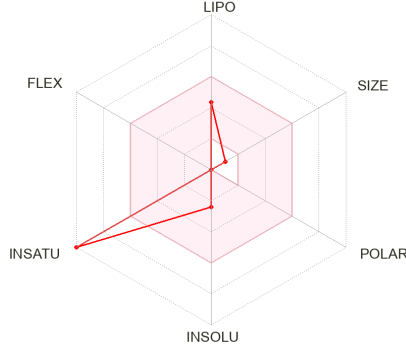
v. *Oral Fare Kronik Toksikite (LOAEL)*: Uzun süreli olarak düşük veya orta dozda kimyasallara maruz kalma insan için önemli bir problemdir. Yapılan çalışmalar, gözlemlenen bir yan etkiye (LOAEL) sebep olan bir molekülün en düşük dozunu belirlemeyi amaçlamaktadır. LOAEL değeri düşükçe olumsuz etki azalmaktadır.

Çizelge 3-2 pkCSM veri tabanı ile yapılan Toksikoloji metotları

Uygulanan Testler	Testin Değerlendirmesi
AMES Toksikitesi	Belirli bir molekülün Ames pozitif ve dolayısıyla mutajenik olup olmadığını test eder.
Maksimum Tolere Doz (insan)	Belirli bir molekül için, 0,477 log (mg / kg / gün) veya daha düşük bir MRTD ise düşük, 0,477 log'dan (mg / kg / gün) büyükse yüksek kabul edilir.
Oral Fare Akut Toksikite (LD ₅₀)	LD ₅₀ , tek seferde verilen ve bir grup test hayvanının %50'sinin ölümüne neden olan bir molekülün miktarıdır.
hERG I-II inhibitör	Test, belirli bir molekülün bir hERG I / II inhibitörü olma olasılığının olup olmadığını belirler.
Oral Fare Kronik Toksikite (LOAEL)	Belirli bir molekül için, günlük tahmini log En Düşük Gözlemlenen Olumsuz Etki (LOAEL) üretilir.

SwissADME ile yapılan testler; [70]

Fizikokimyasal Özellikler ve Biyoyararlanım Radarı: Her eksendeki fizikokimyasal aralık molekülün radar grafiğinin ilaç benzeri olarak kabul edilmesi için pembe bir alan olarak tasvir edilir. (Şekil 3-6) Biyoyararlanım Radarı, bir molekülün ilaç benzerliğine ilk bakışı sağlar. Pembe alan, her özellik için optimal aralığı temsil eder. İlaç adayını bu pembe alanın ne kadar içindeyse biyoyararlanım radarı o kadar iyi olacaktır.



Şekil 3-6 Biyoyararlanım radarı örneği

Su Çözünürlüğü: Çözünebilir bir moleküle sahip olmak, molekülün kullanımı ve formülasyon kolaylığı gibi birçok ilaç geliştirme çalışmaları için olumlu bir durumdur.

Farmakokinetik Özellikler (CYP inhibitörleri): Moleküllerin sitokromlar P450 (CYP) ile etkileşimi hakkında bilgi sahibi olmak önemlidir. Terapötik moleküllerin büyük kısmının beş ana izoformun (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4) substratı olduğu tahmin edilebilir. Bu izoenzimlerin inhibisyona uğraması, ilaç veya metabolitlerinin daha düşük atılımı ve birikimi nedeniyle toksik ve/veya diğer istenmeyen yan etkilere yol açabilen farmakokinetik ile ilişkili ilaç-ilaç etkileşimlerinin önemli bir nedenlerinden birisidir. Bu sebeple, ilaç tasarımı için molekülün CYP'lerin inhibisyonu yoluyla önemli ilaç etkileşimlerine neden olma eğilimini tahmin etmek gerekir ve hangi izoformların etkilendiğinin de belirlenmesi bu süreçte önemlidir.

İlaç benzerliği: İlaç benzerliği, bir molekülün biyoyararlanıma göre oral bir ilaç olma olasılığını değerlendirir. İlaç benzerliği, oral ilaç adayları olarak kabul edebilecek kadar gelişmiş moleküllerin yapısal veya fizikokimyasal incelemelerinden elde edilmiştir.

Bu bölüm, içinde molekülün ilaç benzeri olarak tanımlandığı çeşitli özelliklere sahip farklı kural tabanlı metotları içerir. Bu metotlar genelde büyük ilaç şirketlerinin kendi özel kimyasal molekül setlerinin analizlerini kapsar. İlaç benzerliği kapsamında Lipinski (Pfizer) beşler ve Veber kuralı gibi yöntemler bulunur.

Lipinski Beşler Kuralı temelinde,

- Molekül ağırlığı 500 g/mol'den küçük veya eşit olmalı
- Log Po/w (MlogP) değeri 4.15'ten küçük veya eşit olmalı
- N ya da O atomları 10'dan az olmalı
- NH ya da OH sayısı 5'ten az olmalı kurallarını içermektedir.

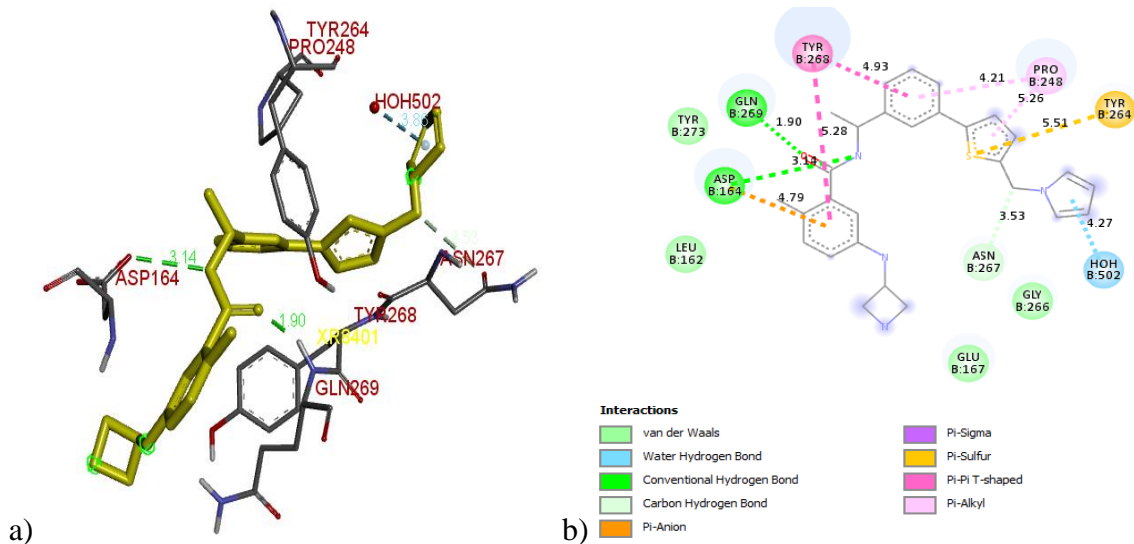
Veber Kuralı ise

- Dönebilen bağ sayısı 10'dan küçük veya eşit olmalı
- TPSA(topolojik polar yüzey alanı değeri) 140'tan küçük olmalı kurallarını içerir.

3.1.6. BIOVIA Discovery Studio Visualizer

BIOVIA Discovery Studio bünyesinde doking sonucu etkileşimlerin görüntüleyicisi de dahil birçok *in silico* metot için kullanabilen yazılımlar içeren bir programdır. 2D ve 3D etkileşimlerin de görüntülendiği BIOVIA Discovery Studio Visualizer ücretsiz olup içerdiği diğer metotlar belli bir ücret dahilinde kullanıcıya sunulur [71].

Temelde BIOVIA Discovery Studio Visualizer programı doking sonuçlarının analiz programıdır. Bir protein-ligand doking hesaplamasının ardından elde edilen ikincil etkileşimleri 2 boyutlu ve 3 boyutlu olarak görüntüleyebilir. (Şekil 3-7) Protein yapısının spesifik bir kısmına odaklanarak moleküler doking çalışması yapılan bölgenin spesifik etkileşimleri gözlenerek bağlanma anındaki etkileşimler görüntülenir.



Şekil 3-7 BIOVIA Discovery Studio Visualizer ile görüntülenen protein-ligand etkileşim örneği

a) 3D etkileşimler b) 2D etkileşimler

3.2. Çalışma Adımları

Bu tez çalışması **altı** kısımdan oluşmaktadır.

- i. **Hedef protein seçimi:** SARS-CoV-2 virüsünün PLpro enzimi hedef yapı olarak belirlendi. PLpro enziminin yeni bulunan BL2 döngüsü ile etkileşebilecek bir liganda sahip **7LBS proteini** *RCSB Protein Veri Bankasında* taranarak seçildi.
- ii. **Ligandların seçimi:** Tez çalışması için 10 farklı tıbbi bitkiden izole edilen **35 bitki fitokimyasalı** ile farklı hastalıklar için onaylanan **8 ilaç** olmak üzere toplam **43 ligand** *Pubchem* veri tabanından indirildi.
- iii. **Validasyon hesaplamaları:** Bu aşamada hem çalışılacak proteinin hem de bu proteine ait ligandın, moleküler doking (kenetlenme) hesaplamaları için uygunluğu *Autodock Vina* programı ile değerlendirilir. Deneysel (x-ray) ve hesaplanan sonuçların karşılaştırılması sonucu, RMSD (Kök Ortalama Kare Sapması) değeri 2Å'nın altında ise yapılan validasyon doğru kabul edilir. 7LBS protein-ligand kompleksi ile bu proteinin ligandı olan XR8-24 ile validasyon çalışması yapılarak RMSD değeri **1.723Å** bulundu.
- iv. **Moleküler doking hesaplamaları:** Bu aşamada, PLpro enziminin yeni keşfedilen BL2 bölgesi ile etkileşen **7LBS** PDB koduna sahip protein-ligand kompleksinin, **35 fitokimyasal** ve farklı hastalıklar için onay alan **8 ilacın**, *Autodock Vina* programı kullanılarak moleküller arası etkileşim modları ve bağlanma enerjileri incelendi. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek bağlanmayı gösteren **Tanşinon IIA** sanal ligand tarama yapılması için seçildi.
- v. **Sanal ligand tarama hesaplamaları:** Doking çalışması sonucunda en iyi sonuç veren fitokimyasal **Tanşinon IIA** molekülü alınıp *ZINC15 Veri tabanı* ile benzerlik taraması yapılarak bu moleküle benzer 98 molekülün veri seti hazırlanır. Hazırlanan veri seti için sanal ligand tarama (VLS) hesaplamaları *Autodock Vina* ile yapılmıştır. Bir ilaç adayını için hesapsal K_i değerinin nM düzeyinde olması gerekir ve sanal ligand tarama hesaplamalarının amacı da budur. Bu moleküllerden en düşük bağlanma enerjisine sahip 21 molekül belirlendi.
- vi. **ADME ve toksikoloji hesaplamaları:** İlaç tasarımının için, ADME ve toksikoloji hesaplamaları moleküllerin; absorpsiyon emilim, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisitesi incelenerek hesaplamalarda başarılı olan moleküller öncü molekül adayları olarak belirlenir. VLS çalışması sonucu edilen 21 molekül için; ADME ve

toksikoloji hesaplamaları *pkCSM* ile moleküllerin fizikokimyasal özellikleri ile ilaç benzerliği parametreleri de *SwissADME* online programları ile hesaplandı.

3.2.1 Moleküler Doking Hesaplamaları için Hedef Protein Seçimi

SARS-CoV-2 PLpro enziminin BL2 bölgesi ile etkileşecek inhibitör tasarımı için x-ray yapısı çözülen, *SARS-CoV* PLpro enzimi inhibitörlerinden GRL0617'den daha iyi bir aktiviteye sahip türevini içeren ligand XR8-24 7LBS proteini, bu tez kapsamında hedef protein-ligand kompleksi olarak belirlenmiştir.

SARS-CoV-2 PLpro enzimi aktif bölgesine bağlanan inhibitörler, kovalent bağlanırlar. Tez kapsamında kovalent olmayan etkileşimler gereklidir. PLpro enzimi inhibitörleri aktif bölgeye kovalent bağlandıkları için bağlanmamalıdır. Enzimin yeni keşfedilen BL2 bölgesine bağlanan inhibitörler kovalent bağlanmayarak dolaylı yoldan aktif bölgeyi bozarak enzim aktif bölgesine viral proteinlerin bağlanmasına engel olarak enzimi inhibe ederler. Bu nedenle SARS-CoV-2 PLpro enziminin BL2 bölgesi ile etkileşecek inhibitör tasarımı için yapılan *in silico* çalışmalar ile bağlanma afiniteleri ve hesaplanan K_i değerleri belirlenerek öncü molekül adaylarının belirlenmesi hedeflenmektedir. Belirtilen sebepler ile x-ray makalesinde yüksek aktivite verdiği belirtilen 7LBS PDB koduna sahip proteinin moleküler doking çalışması için seçilmiştir. (Şekil 3-8)

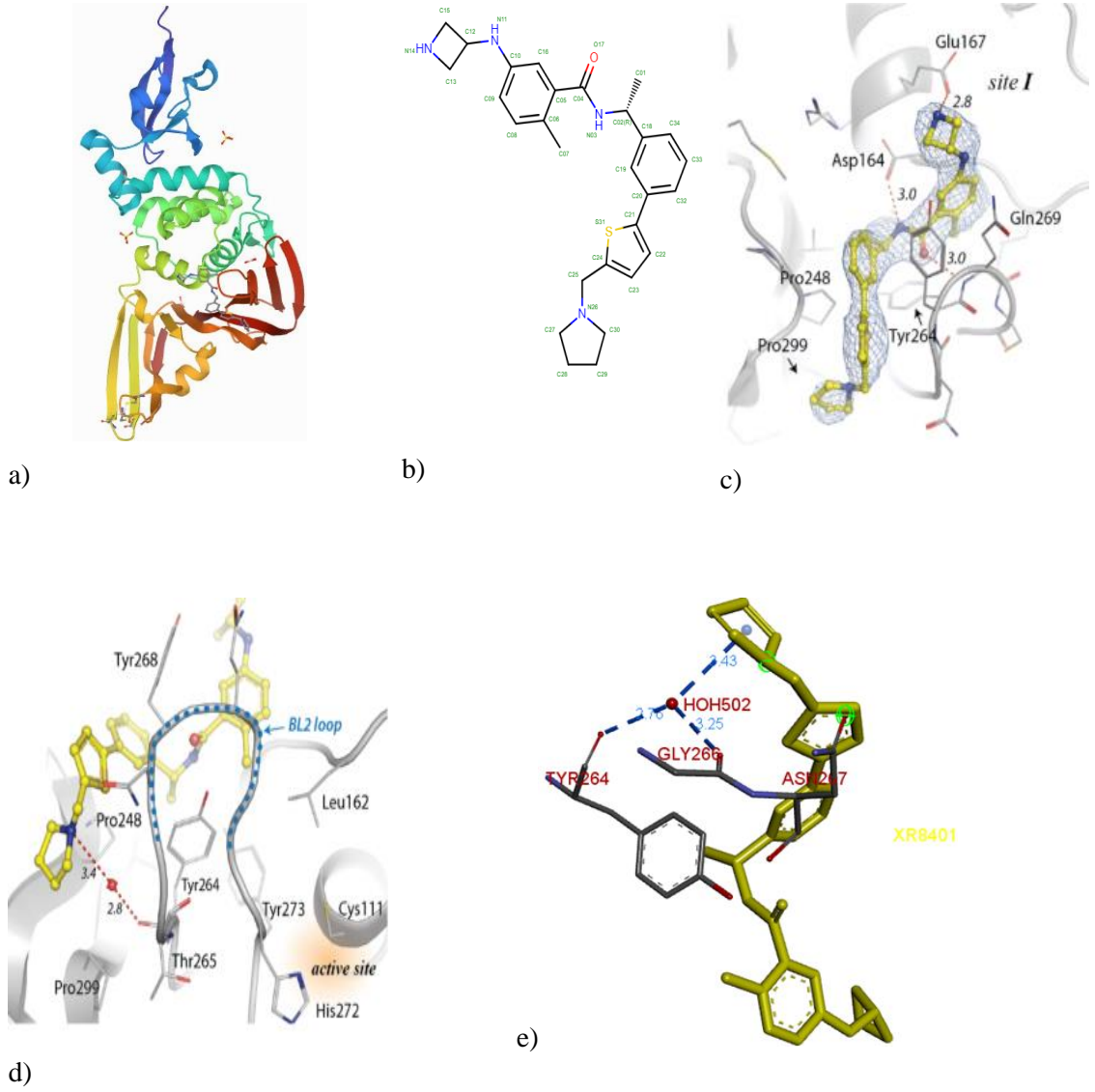
```
0      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110
SEVRTIKVFTTVDNINLHTQVVDMSMTYGGPTIYLDGADVTKIKPHNSHEGKTFYVLPNDLTLRVEAFEYHYHTDPSFLGRYMSALNHTKKWKYPQVNGLTSIKWADNNCY
120     130     140     150     160     170     180     190     200     210     220
LATALTLQQIQLKFNPPALQDAYRARAGEAANFCALILAYCNKTVGELGDVRETMSTVLFQHANLDSCKRVLNWVCKTCGQQQTTLKGVAVMYMGTLSYEQFKKGVQIPCT
230     240     250     260     270     280     290     300     310
CGKQATKYLQQESPFVWMSAPPAQVELKHGFTFCASEYTGNYQCGHYKHITSKETLYCIDGALLTKSSEYKGPITDVFYKENSYYTTTIK
```

Şekil 3-8 7LBS proteininin amino asit dizilimi

Tez çalışması kapsamında **7LBS** koduna sahip **XR8-24** ligandı içeren protein seçilmiştir. Bu protein IC_{50} değeri baz alındığında ve X-ray yapısı aydınlatılan proteinlere göre yüksek aktivite verdiği için seçildi. Ayrıca 7LBS protein-ligand kompleksi ligandı olan XR8-24, ubikuitin ile ISG15 kuyruğunun aktif bölgeye girmesini engellemektedir. Böylece PLpro enzimini içeren SARS-CoV-2 virüsü ev sahibi hücreye giremeyeceği ve insan bağışıklığını bozamayacağı görüldü.

7LBS protein veri bankasına koduna sahip protein-ligand kompleksinin XR8-24 isimli ligandının adı, 5-[(azetididin-3-il)amino]-2-metil-N-[(1R)-1-(3-{5-[(pirolidin-1-il)metil]tiyofen-2-il}fenil)etil]benzamittir. Bu protein-ligand kompleksi iki monomer

zincirinden oluşur ve bu zincirler birbirinin aynısıdır. 2.80 Å çözünürlüğe sahip protein-ligand kompleksinin yapısı X-ray kristalografisi ile 2021 yılında aydınlatıldı. [9] (Şekil 3-9)



Şekil 3-9 7LBS proteinin özellikleri

a) PLpro enziminin 7LBS koduna sahip protein-ligand kompleksi. b) 7LBS protein-ligand kompleksinin ligandının (XR8-24) yapısı c) Protein ve ligand etkileşimleri. d) Protein-ligand BL2 bölgesi ve su köprüsü etkileşimleri. e) Protein-ligand su köprüsü etkileşiminin BIOVIA Discovery Studio Visualizer ile görüntülenmesi

3.2.2. Moleküler Doking Hesaplamaları için Ligandların Hazırlanması

SARS-CoV-2 virüsünün neden olduğu COVID-19 tedavisi için antiviral ilaç tasarımında tıbbi etkisinin olduğu bilinen bitkilerden saflaştırılan bitki fitokimyasalları da *in silico* çalışmalara dahil edilmektedir. SARS-CoV virüsünün sebep olduğu salgında yapılan ilaç araştırmalarında antiviral etkisinin olduğu belirlenen ve/veya SARS-CoV-2 virüsü için de etkili olabileceği yapılan testlerle bulunan, literatürde COVID-19 tedavisi için inhibitör olabilecek tıbbi bitkilere ait bitki fitokimyasallarının belirlenmesiyle SARS-CoV-2'nin önemli bir ilaç hedefi olan PLpro enzimini inhibe edebilecek bir ilaç tasarımı konusunda bu bitki fitokimyasalları da *in silico* ilaç tasarımı çalışmalarına dahil edilmiştir.

Kırmızı adaçayı, hint ekinezyası gibi 10 farklı tıbbi etkisi bilinen bitkiden izole edilen 35 bitki fitokimyasalı tez çalışmasında yer almaktadır. Bu fitokimyasallara ek olarak farklı hastalıklar için onay alan ve çeşitli aşamalarda COVID-19 tedavisi için denenmiş 8 ilaç da tez çalışmasına dahil edildi. Toplam 43 ligandın 3 boyutlu yapıları .sdf formatında PubChem molekül veri tabanından indirilerek Gaussian09w yazılımıyla ligandlar en kararlı hale getirilmesi için optimize edilerek moleküler doking çalışması için hazırlandı.

3.2.3. Moleküler Doking Hesaplamaları için Validasyon Çalışması

SARS-CoV-2 virüsüne ait PLpro enzimi protein-ligand komplekslerinden 7LBS protein veri bankasına koduna sahip **XR8-24** isimli ligandının 3 boyutlu yapısını içeren dosya RCSB Protein Veri Bankasından indirilerek validasyon çalışması için hazır hale getirildi. 7LBS proteini içerisindeki moleküler doking hesaplamaları için ihtiyaç duyulmayan su molekülleri, inorganik maddeler ile iki monomerik zincir içeren 7LBS'nin bir zinciri yapıdan atılır. XR8-24 ligandının protein ile su aracılığıyla bir hidrojen bağı oluşturarak yaptığı su köprüsü sağlayan su molekülü haricindeki tüm sular yapıdan atıldı.

7LBS protein-ligand kompleksindeki ligand yapıdan atılarak, tekrar aynı bağlanma bölgesine kenetlenmesi sağlanır. Hesaplamaların ardından elde edilen RMSD değeri **1.723Å** olarak bulunması ve bu değer **2Å**'dan küçük olması sebebiyle parametrelerin doğru olduğu kabul edildi.

Elde edilen konformasyonlardan en iyi sonuç, validasyon öncesi ligand konumu ile validasyon sonrası ligand konumunun karşılaştırılması ile en iyi sonucu elde eden

konformasyon seçilerek bulundu. Bu çakışma sonucu elde edilen en iyi konformasyon olan 1. konformasyonu sağlayan doking parametreleri Autodock Vina programı ile moleküler doking hesaplamaları yapılması için kullanıldı. Hesaplanan K_i değeri ile deneysel IC_{50} değeri kıyaslamasının ardından moleküler doking hesaplamaları yapıldı.

3.2.4. Moleküler Doking Hesaplamaları

SARS-CoV-2 virüsüne ait PLpro enzimi 7LBS protein veri bankası koduna sahip protein-ligand kompleksinin validasyonu sonucunda elde edilen parametrelerle moleküler doking hesaplamaları, tıbbi etkiye sahip 10 bitkinin içeriğinde bulunan 35 bitki fitokimyasalı ile farklı hastalıklar için onay alan 8 ilacın dahil olduğu toplam **43 ligand** için yapıldı. Hesaplamalar sonucu elde edilen sonuçlara göre virüsün PLpro enziminin kovalent bağlanmayan bölgesi olan BL2 bölgesine en iyi bağlanma enerjisi gösteren ligand **Tanşinon IIA** sanal ligand tarama için seçildi.

3.2.5. Sanal Ligand Tarama Hesaplamaları

Moleküler doking hesaplamaları sonucu en iyi bağlanma enerjisi sonucu veren **tanşinon IIA** ligandına ZINC15 veri tabanında benzerlik taraması yapılarak bu moleküle benzer moleküllerin veri seti bulundu. Veri setinin içerdiği 98 molekül ZINC15 veri tabanından indirilerek çoklu moleküler doking hesaplaması yapılması için ligandlar Autodock Vina ile hazırlandı. Validasyon ve moleküler doking hesaplamalarında kullanılan parametreler sanal ligand taramada da kullanıldı. En yüksek bağlanma enerjisi veren **21 ligand** seçildi. En yüksek bağlanma göstermesi ilaç adayı olması için yeterli olmadığı için bu ilaçların farmakokinetik özelliklerinin incelenmesi için hesapsal ADME ve toksikoloji hesaplamaları yapıldı.

3.2.6. ADME ve Toksikoloji Hesaplamaları

Bir ilaç adayı için en önemli aşamalardan biri olan emilim, dağılım, metabolizma, atılım ve toksikoloji hesaplamalarıdır. Sanal ligand tarama sonucu en iyi bağlanma enerjisi gösteren **21 ligand** için ADME ve toksikoloji hesaplamaları, pkCSM ve SwissADME online programları kullanılarak yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre toksik olmayan **14 molekül** belirlenerek bu moleküllerin öncü molekül adayı olup olmadıkları değerlendirilerek en iyi sonucu veren ligandlar belirlenerek öncü molekül tasarımı konusunda moleküller incelendi.

4. SONUÇLAR

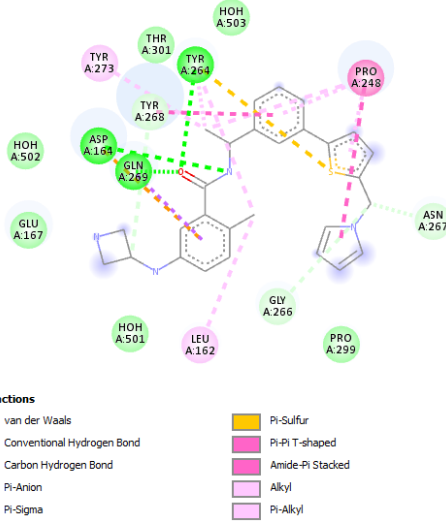
SARS-CoV-2 virüsünün PLpro enziminin aktif bölgesine bağlanan inhibitörler kovalent bağlanırlar. PLpro enziminin yeni bulunan BL2 bölgesine bağlanan inhibitörlerin kovalent bağlanmaması nedeniyle tez kapsamında seçilen ligandların bu bölge ile etkileşimleri incelendi. Seçilen **43 ligandin**, virüsün PLpro enzimine ait 7LBS protein veri bankasına koduna sahip protein-ligand kompleksi ile Autodock Vina programıyla yapılan moleküler doking hesaplamaları sonucunda en iyi bağlanma enerjisinin **tanşinon IIA** molekülü olduğu belirlendi. Bu moleküle ZINC15 veri tabanında benzerlik taraması yapılarak tanşinon IIA ligandına benzer **98 molekül** bulundu. Bu moleküllere moleküler doking hesaplamaları ile aynı parametrelerle tekrar doking çalışması yapılarak en yüksek bağlanma enerjisi gösteren **21 molekül** belirlendi. 21 molekül için yapılan ADME ve toksikoloji hesaplamaları ile toksikolojiye sahip olmayan **14 molekül** belirlendi. Bu moleküller öncü molekül tasarımında etkili olabilir ve SARS-CoV-2 virüsünün neden olduğu COVID-19 tedavisi için, SARS-CoV-2 virüsü hedef yapılarından, virüsün çoğalmasını sağlayan ve insan bağışıklık sistemini bozabilen papain-benzeri proteaz (PLpro) enzimini inhibe edebilir.

4.1. Validasyon Hesaplamaları

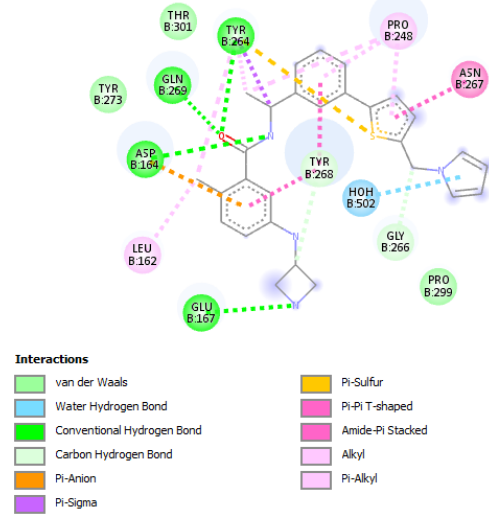
SARS-CoV-2 PLpro enzimine ait 7LBS protein kodunun **XR8-24** isimli ligandının 3 boyutlu yapısını içeren dosyası indirilerek, protein içerisindeki ligand dışında kalan tüm molekül ve iyonlar silinerek elde edilerek PDBQT formatında kaydedildi. Sonraki aşamada 7LBS kodlu PLpro yapısının 3D yapısı RCSB Protein Veri Tabanı kullanılarak .pdb dosya formatında indirildi. İndirilen 3D dosya AutodockTools ile açılarak bağlanma enerjisi için önemli olabilecek su molekülü dışındaki kristal sular ve içerisinde protein dışında olan moleküller ile monomerik yapıda olduğu için zincirlerden belirlenen zincir silindi. (Şekil 4-1) Ardından proteine polar hidrojenler eklenmiştir.

Validasyon çalışması yapılmasının amacı, doking programı aracılığıyla proteine bağlanan ligandın RMSD değerlerine bakılarak orijinal bağlanmadan sapma derecesinin belirlenmesiyle çalışmada seçilen yöntemin doğruluğunun kanıtlanmasıdır. Temel olarak RMSD değerinin 2Å altında olması uygun sonuç olarak kabul edilir ve başarılı bir validasyon yapıldığını kanıtlamaktadır.

7LBS A Zinciri Ligandı ile 2D Etkileşimleri*



7LBS B Zinciri Ligandı ile 2D Etkileşimleri*



* İki zincir de monomer yapısındadır ve aralarında aminoasit sırası, ligand yapısı ve konumu açısından fark bulunmamaktadır.

Şekil 4-1 BIOVIA Discovery Studio Visualizer ile görüntülenen 7LBS Proteini ve Su köprüsü etkileşimleri

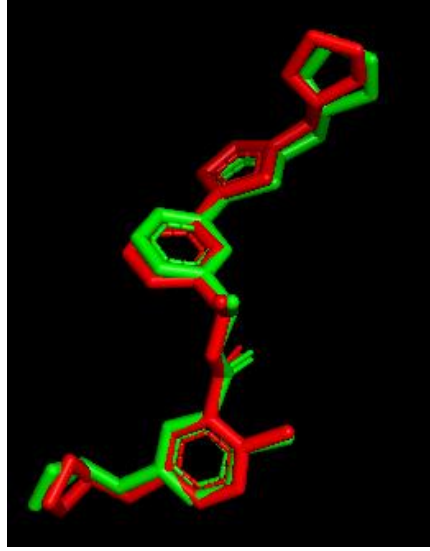
7LBS proteininin ligandı **XR8-24** 5-[(azetidin-3-il)amino]-2-metil-N-[(1R)-1-(3-{5-[(pirolidin-1-il)metil]tiyofen-2-yl}fenil)etil]benzamittir. SARS-CoV-2 PLpro enziminin BL2 bölgesi ile etkileşebilecek inhibitör tasarımı için SARS-CoV virüsü PLpro enzimi inhibitörlerinden GRL0617'den daha iyi bir aktiviteye (IC₅₀) sahip türevini içeren ligand XR8-24 7LBS proteini referans molekül olarak kabul edilmiştir. Validasyon hesaplamaları B zinciri ile belirlenen parametreler ile yapıldı. (Şekil 4-2)

receptor = 7lbsb.pdbqt	mode affinity dist from best mode
ligand = ligand.pdbqt	(kcal/mol) rmsd l.b. rmsd u.b.
	-----+-----+-----
center_x = 19.665	1 -9.5 0.000 0.000
center_y = 67.056	2 -8.8 1.324 1.723
center_z = -4.11	3 -8.2 4.476 8.000
	4 -7.8 2.861 10.845
size_x = 20	5 -7.8 2.937 11.542
size_y = 20	6 -7.8 3.040 11.205
size_z = 16	7 -7.6 1.489 2.640
	8 -7.4 2.993 11.646
a) exhaustiveness = 16	b) 9 -7.2 3.106 11.126

Şekil 4-2 Validasyon Çalışması Sonuçları

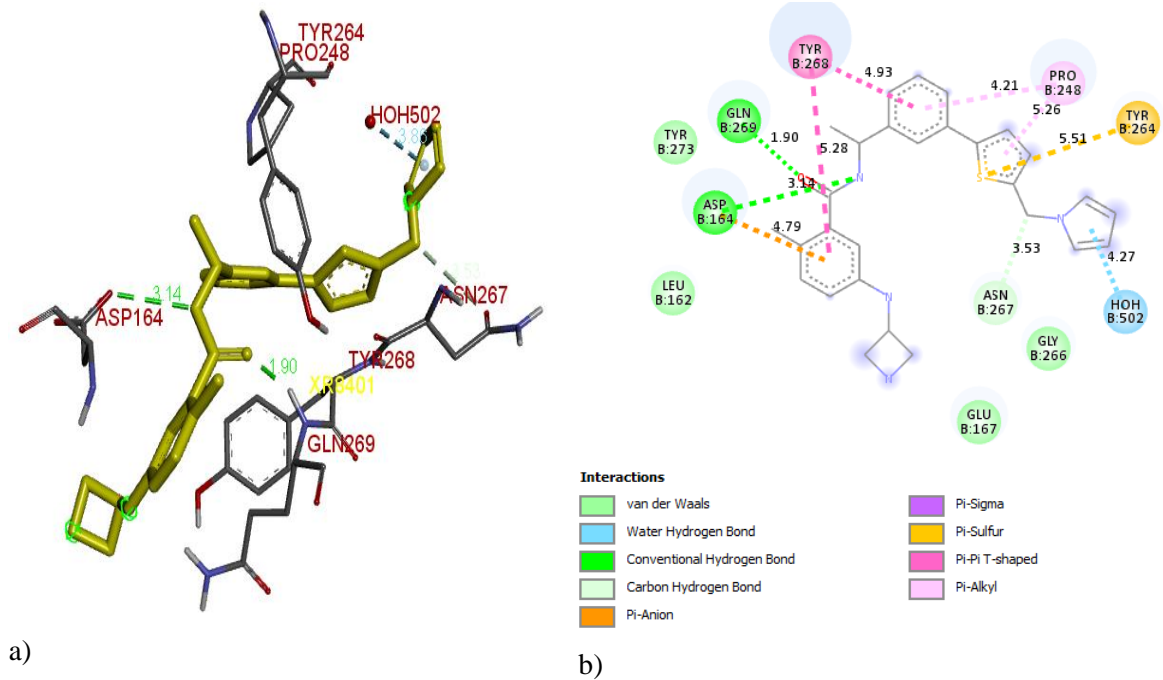
a) Autodock Vina ile validasyonu yapılan config dosyası b) Log sonuç dosyası

Validasyon hesaplamaları sonucu RMSD değeri 1.723 Å olan ligandın proteindeki konumu ile karşılaştırılması Şekil 4-3'de gösterildi. Validasyon sonucu elde edilen ligand ile referans ligandın karşılaştırılması sonucu tam çakışma görüldü. Bu sonuç yapılan validasyonun başarılı olduğu göstermektedir. (Şekil 4-4a ve b)



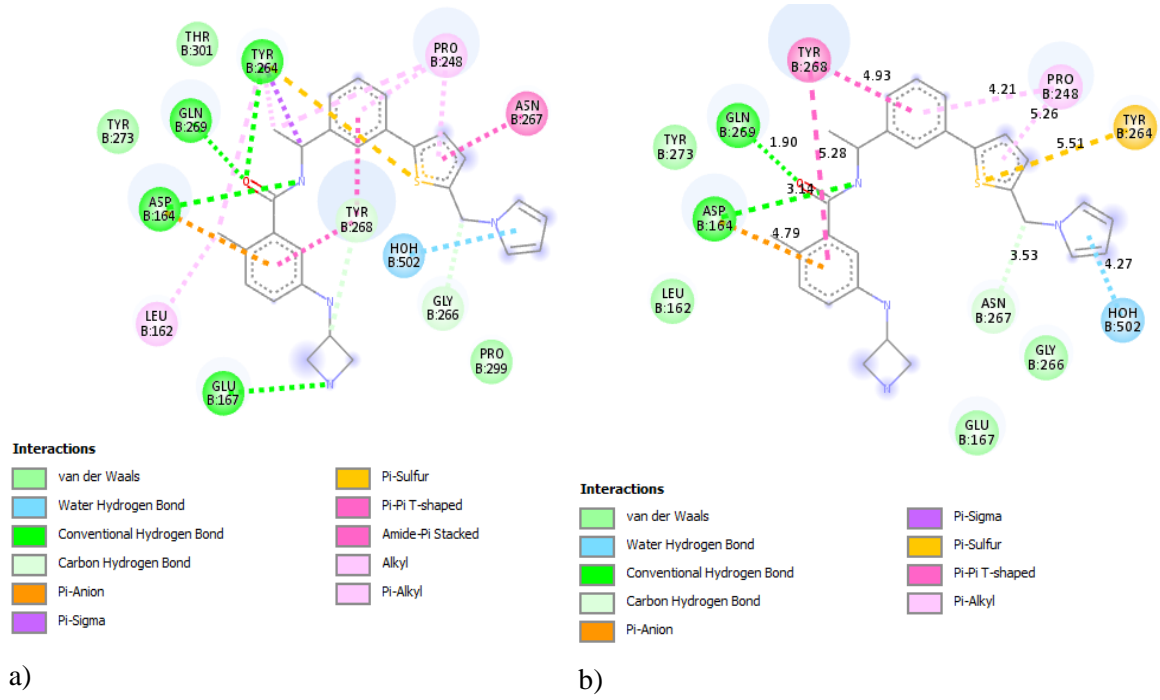
Şekil 4-3 Validasyon sonucu elde edilen ligand ile referans ligandın karşılaştırılması

Kırmızı molekül: Ligand
Yeşil molekül: Redoking



Şekil 4-4 Validasyon hesaplaması sonucu elde edilen 2D ve 3D Etkileşimler

a) 3D etkileşimler b) 2D etkileşimler



Şekil 4-5 Redoking ligandı ile referans ligand karşılaştırması

a) Referans ligand XR8-24 b) Redoking hesaplaması yapılan XR8-24 ligandı

- Referans ligand ile redoking hesaplaması sonucu elde edilen ligandın sahip olduğu moleküller arası etkileşimlerin benzer olduğu görüldü. (Şekil 4-5a ve b)
- Validasyon hesaplamaları sonucunda belirlenen 1.723 Å RMSD değerinin 2Å'den düşük olması hesaplamaların anlamlı bir sonuç verdiğini gösterir. (Şekil 4-2b) Autodock Vina aracılığıyla hesaplanan bu validasyon çalışmasının deneysel olarak hesaplanan K_i değeri şu formül ile hesaplanır; $\Delta GB = R.T.\ln K_i$ (ΔGB = bağlanma enerjisi; $R= 1.986 \text{ cal/mol.K}$; $T= 298,15 \text{ K}$) Validasyonu yapılan 7LBS ligandının hesaplanan K_i değeri yukarıdaki formülden yararlanarak: $K_i = 108 \text{ nM}$ olarak bulunmuştur. Referans makaleye göre deneysel $IC_{50}=0.56 \mu\text{M}$ 'dır.

4.1.1. Validasyon Değerlendirme

Validasyonu yapılan 7LBS proteini için elde edilen sonuçlara göre;

- Referans Ligand ile validasyonu yapılan ligandın tam çakışma gözlenmesi,
- Validasyon çalışması sonucu hesaplanan hesapsal K_i değerinin nanomolar düzeyinde olması,
- 1.723Å RMSD değerinin 2Å değerinden düşük olması, parametreleri sonucunda belirlenen metotlarla moleküler doking çalışmasının yapılması uygundur.

4.2. Moleküler Doking Hesaplamaları

Moleküler doking hesaplamaları için seçilen 7LBS protein ligand kompleksinin, RMSD değerinin 2Å'den düşük olması sebebiyle moleküler doking çalışmasına uygundur. PLpro hedefiyle etkileşen henüz bir ilaç bulunmadığından ve SARS-CoV PLpro yapısıyla etkileşim gösteren GRL0617 inhibitörünün bir türevi olan ve X-ray yapısı çözülen 7LBS PDB koduna ait XR8-24 ligandı referans ligand olarak alındı. Bir protein ile birden fazla ligandın belirlenen metotlarla moleküler doking yapılabilmesine imkan sağlayan DwimPerl ile çoklu doking yapılarak en iyi bağlanma afinitesi gösteren ligandlar belirlenerek referans ligand olan XR8-24 ile kıyaslandı. Moleküler doking hesaplamaları, 10 farklı tıbbi bitkiden izole edilen 35 bitki fitokimyasalı ile farklı hastalıklar için onaylanan 8 ilaç olmak üzere toplam 43 ligand ile yapıldı. (Çizelge 4-1 ve Çizelge 4-2)

Çizelge 4-1 SARS-CoV-2 PLpro inhibitör özellikleri incelenen bitki fitokimyasalları

No	Bitki Adı	İçeriği Fitokimyasal
1	Hint Ekinezyası	Andrografolid
2	Çin Takkesi	Baikalin
3	Kapari	Kuersetin
4	Kırmızı Gromwell	Şikonin
5	Çay	Kaemferol
6	Batawali	n-cis-Feruloiltiramin
7	Cehri çiçeği	Luteolin
8	Acem Dutu	Abisinon II
9	Huş	Betülinik asit
10	Kırmızı Adaçayı	<ul style="list-style-type: none">• Kriptotaşininon• Taşininon• Taşininon IIA• Dihidrotaşininon I• Neokriptotaşininon• Tetrahidrotaşininon I• Taşininon VI• Izotaşininon I• Izotaşininon II• 1,2-dihidro taşinoninon• 3-hidroksimetilen taşinoninon• 4-Metilenmiltiron• Danşeniksinkun B• Danşeniksinkun C• Danşeniksinkun D• Metilentaşinoninon• Miltiron• Neotaşinlakton• Nortaşininon• Taşinindiol C• Taşinlakton• Taşinol A• Taşinol B• Trijuganon B• Metil taşininonat• Taşininon IIB

Referans ligand: SARS-CoV PLpro inhibitör tasarımında yüksek aktiviteye sahip GRL0617 ligandının türevi olan 7LBS protein ligandı XR8-24 alındı.

Çizelge 4-2 SARS-CoV-2 PLpro inhibitör özellikleri incelen farklı hastalıklar için onaylanan ilaçlar

No	İlaç Adı	Kullanıldığı Hastalık
1	Darunavir	HIV İlacı
2	Famotidin	Mide İlacı
3	Favipiravir	Influenza İlacı
4	Sinakalset	Primer hiperparatiroid
5	Penformin	Antidiyabet
6	Isotretinoin	Akne ve Cilt Kanseri İlacı
7	Kloroksazon	Kas Gevşetici
8	Asiklovir	Antiviral İlaç

Referans ligand: SARS-CoV PLpro inhibitör tasarımında yüksek aktiviteye sahip GRL0617 ligandının türevi olan 7LBS protein ligandı XR8-24 alındı.

4.2.1. Moleküler Doking Sonuçları

Doking çalışması, validasyonu sağlanan grid ve config dosyalarındaki koordinatlar ile yapılmıştır. PLpro enziminin yeni keşfedilen BL2 döngüsünün kapatılması için seçilen 7LBS PDB koduna sahip proteinin, **35 fitokimyasal** ve farklı hastalıklar için onay alan **8 ilaç** için Gaussian programı ile gaz fazında *DFT/B3LYP/6-31G(d,p)* seti ile optimizasyon edilerek en kararlı hale getirilen ligandlara, her ligand için üç tekrar yapılarak doking çalışması tamamlanmıştır.

4.2.1.1. Fitokimyasal Doking Sonuçları

Yapılan moleküler doking çalışmasının ardından elde edilen sonuçlara göre, **tanşinon** moleküllerinin genel olarak bağlanma afinitesinin (yüksek) iyi olduğu görüldü. Her bir fitokimyasal için 3 tekrar ile yapılan moleküler doking çalışması için belirlenen fitokimyasalların doking sonuçları Çizelge 4-3'te ve bu sonuçların ardından elde edilen en iyi, orta ve en kötü bağlanma enerjisine sahip ligandların protein ile yaptığı etkileşimler Çizelge 4-4'te yer almaktadır. Tüm ligandların protein ile yaptığı etkileşimler ise ekte yer almaktadır.

Çizelge 4-3 Fitokimyasal Doking Hesaplama Sonuçları

Fitokimyasal Adı	Bağlanma Afinitesi (kcal/mol)	Hesaplanan Ki Değeri (nM)	<i>in vitro</i> IC ₅₀ µM	<i>in silico</i> ** kcal/mol
Tanşinon IIA	-9.5	108	17.1	-8.6
Tanşinon IIB	-9.3	151	10.7	-
Metil tanşinonat	-9.3	151	9.2	-
Dihidrotanşinon I	-9.3	151	10.7	-6.6
Kriptotanşinon	-9.2	179	10.1	-9.0
3-Hidroksimetilen tanşinkinon	-9.2	179	-	-
Tetrahidro tanşinon I	-9.1	212	-	-
Miltiron	-9.1	212	30.0	-
Tanşinol B	-9.0	250	-	-
Trijuganon B	-9.0	250	-	-
Neocriptotanşinon	-8.8	351	-	-
Izotanşinon I	-8.8	351	-	-
Nortanşinon	-8.8	351	-	-
Methilentanşinkinon	-8.8	351	-	-
Tanşinone	-8.8	351	11.5	-8.6
Izotanşinon II	-8.7	416	-	-
Tanşinlakton	-8.7	416	-	-
1,2-Dihidro tanşinkinon	-8.7	416	-	-
Neo-tanşinlakton	-8.7	416	-	-
Tanşinol A	-8.7	416	-	-
Tanşinon VI (Danşenksinkun A)	-8.5	583	-	-
Danşenksinkun C	-8.5	583	-	-
Danşenksinkun B	-8.5	583	-	-
Danşenksinkun D	-8.4	690	-	-
4-Metilenmiltiron	-8.4	690	-	-
Şikonin	-8.2	967	-	-8.1
Tanşindiol C	-8.1	1.145*	-	-
Abisinon II	-8.1	1.145*	-	-7.3
Baikalin***	-7.9	1.606*	-	-
n-cis-Feruloiltiramin	-7.6	2.666*	-	-3.11
Luteolin	-7.6	2.666*	-	-7.5
Kuersetin	-7.4	3.727*	8.6	-7.3
Kaemferol	-7.4	3.727*	16.3	-7.1
Andrografolit	-6.7	12.190*	-	-6.5
Betülinik asit	-4.9	254.800*	-	-8.3
Referans Ligand: XR8-24	-9.5****	108	0.56	

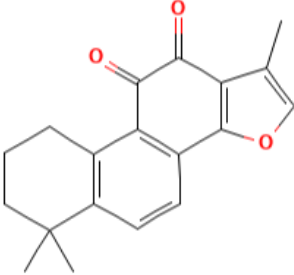
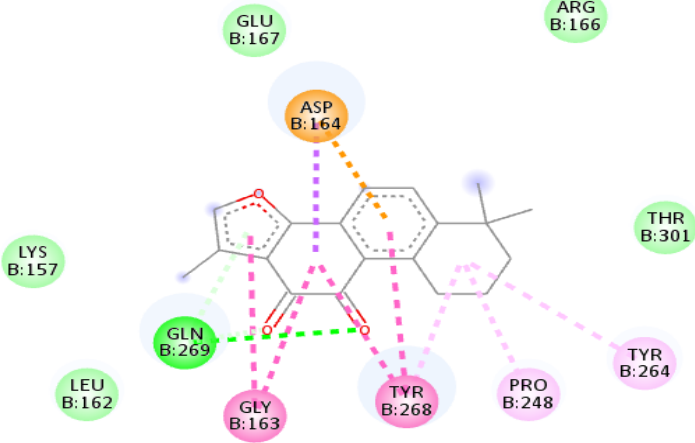






























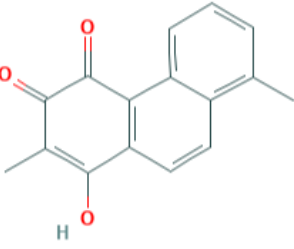
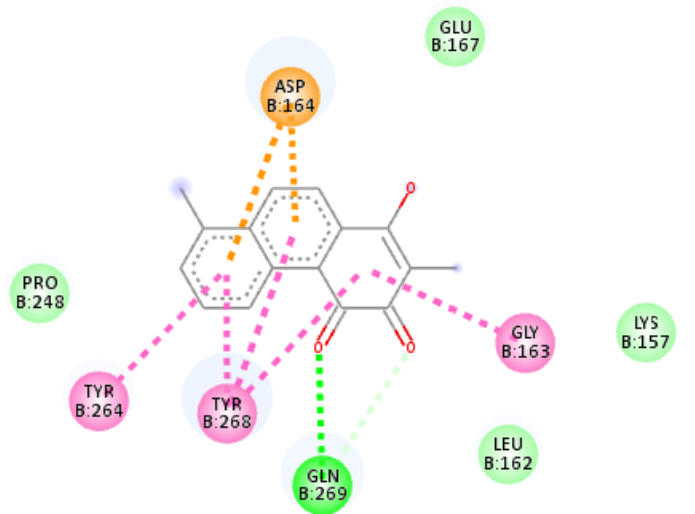


















* Hesaplanan Ki değerleri µM düzeydedir.

Bağlanma enerjisi değeri (kcal/mol) PLpro enziminin **aktif bölgesi ile hesaplanmaktadır.

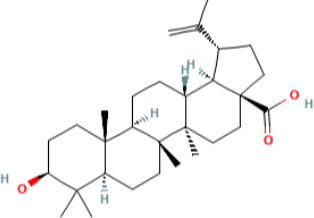
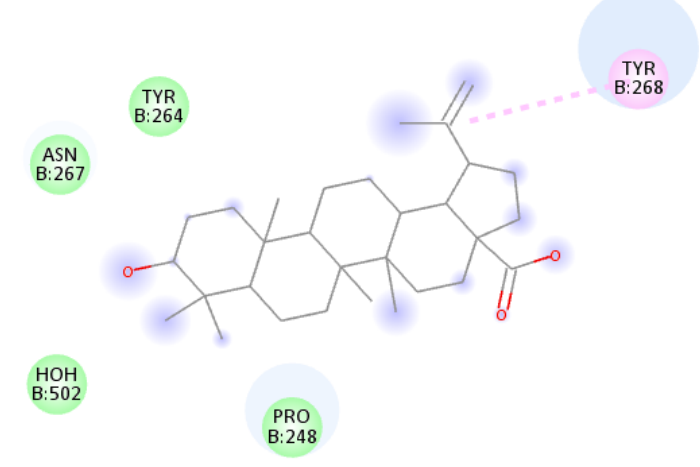
*** Antiviral EC₅₀ değeri 12.5 µg/mL'dir.

**** Validasyon sonucu elde edilen bağlanma enerjisi değeridir.

Çizelge 4-4 En iyi, orta ve en kötü bağlanma afinitesi veren fitokimyasalların moleküler doking sonucu etkileşimleri

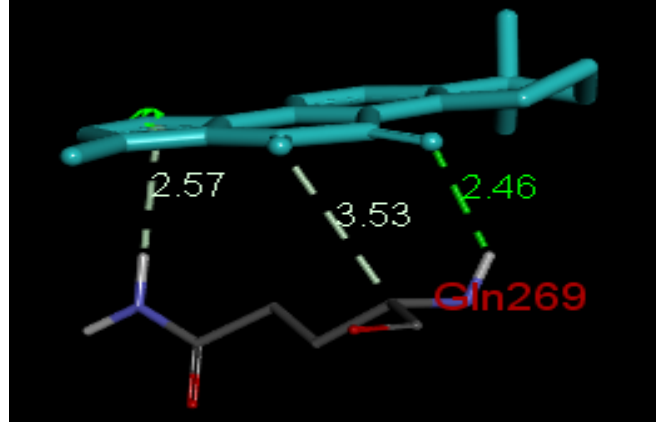
Ligand Adı ve Hidrojen Bağları	2D Etkileşimler ve Bağlanma Enerjisi Değeri										
<p data-bbox="331 539 507 568">Tanşınon IIA</p>  <p data-bbox="331 987 507 1111">GLN269 2.46 Å GLN269 2.57 Å GLN269 3.59 Å</p>	 <p data-bbox="663 965 775 987">Interactions</p> <table border="0" data-bbox="663 992 1278 1137"> <tr> <td> van der Waals</td> <td> Pi-Sigma</td> </tr> <tr> <td> Conventional Hydrogen Bond</td> <td> Pi-Pi T-shaped</td> </tr> <tr> <td> Carbon Hydrogen Bond</td> <td> Amide-Pi Stacked</td> </tr> <tr> <td> Pi-Anion</td> <td> Alkyl</td> </tr> <tr> <td> Pi-Donor Hydrogen Bond</td> <td> Pi-Alkyl</td> </tr> </table> <p data-bbox="767 1167 1174 1196">Bağlanma enerjisi: -9.5 kcal/mol</p>	 van der Waals	 Pi-Sigma	 Conventional Hydrogen Bond	 Pi-Pi T-shaped	 Carbon Hydrogen Bond	 Amide-Pi Stacked	 Pi-Anion	 Alkyl	 Pi-Donor Hydrogen Bond	 Pi-Alkyl
 van der Waals	 Pi-Sigma										
 Conventional Hydrogen Bond	 Pi-Pi T-shaped										
 Carbon Hydrogen Bond	 Amide-Pi Stacked										
 Pi-Anion	 Alkyl										
 Pi-Donor Hydrogen Bond	 Pi-Alkyl										
<p data-bbox="316 1317 523 1346">Danşensinkun C</p>  <p data-bbox="331 1720 507 1794">GLN269 2.66 Å GLN269 3.45 Å</p>	 <p data-bbox="663 1765 775 1787">Interactions</p> <table border="0" data-bbox="663 1792 1278 1899"> <tr> <td> van der Waals</td> <td> Pi-Anion</td> </tr> <tr> <td> Conventional Hydrogen Bond</td> <td> Pi-Pi T-shaped</td> </tr> <tr> <td> Carbon Hydrogen Bond</td> <td> Amide-Pi Stacked</td> </tr> </table> <p data-bbox="767 1921 1174 1951">Bağlanma enerjisi: -8.5 kcal/mol</p>	 van der Waals	 Pi-Anion	 Conventional Hydrogen Bond	 Pi-Pi T-shaped	 Carbon Hydrogen Bond	 Amide-Pi Stacked				
 van der Waals	 Pi-Anion										
 Conventional Hydrogen Bond	 Pi-Pi T-shaped										
 Carbon Hydrogen Bond	 Amide-Pi Stacked										

Devam ediyor...

Ligand Adı ve Hidrojen Bağları	2D Etkileşimler ve Bağlanma Enerjisi Değeri
<p>Betülinik asit</p>  <p>-</p>	 <p>Interactions</p> <p>van der Waals Pi-Alkyl</p> <p>Bağlanma enerjisi: -4.9 kcal/mol</p>

SARS-CoV-2 PLpro enzimi aktif bölgesine bağlanan inhibitörler kovalent bağlanırlar. Daha önce yapılan çalışmalardaki *in silico* hesaplamaları enzimin aktif bölgesi ile yapıldığı için bu hesaplamaların enzimin yeni keşfedilen kovalent etkileşim içermeden BL2 bölgesine bağlanan inhibitörlerin *in silico* hesaplamalarının yapılması önemlidir. BL2 bölgesi dolaylı yoldan aktif bölgeyi bozarak kovalent aktif bölgeye substrat bağlanmasını engeller ve enzim inhibe olur. BL2 bölgesi ile etkileşen ligandlar, enzimin daha önce hesaplamaları yapılan aktif bölgesine bağlanan ligandlara göre daha yüksek bağlanma enerjisi verdi. En yüksek bağlanma enerjisi veren ligand **tanşınon IIA** molekülüdür.

Referans ligand (XR8-24) ile en iyi doking sonucu elde edilen Tanşınon IIA ligandının bağlanma afinitesi ile hesaplanan K_i değeri eşittir. Doking hesaplamaları sonucu elde edilen bu sonuca göre SARS-CoV-2 PLpro enziminin BL2 bölgesini inhibe edebilecek öncü molekül tasarımında bu ligand temel alınabilir. (Şekil 4-6) Validasyon çalışmasında tam çakışma gözlenen konformasyon 1 numaralı konformasyon olduğu için 1 numaralı konformasyon enerjisi doking hesaplamalarında temel olarak alındı.



Şekil 4-6 Taşınon IIA en iyi sonuç 3D hidrojen bağları

- Elde edilen sonuçlara göre gerek bağlanma afinitesi gerekse hesaplanan K_i değeri olarak **Taşınon IIA** ligandı en iyi sonucu verdi. Buna göre bu ligand, PLpro proteinine en iyi bağlanmıştır ayrıca taşınon IIA en düşük K_i değerine de sahiptir. (Çizelge 4-3)
- Elde edilen sonuçlara göre, taşınon IIA bileşiği 7LBS proteinin ligand kompleksine en iyi bağlanmıştır ve öncü molekül tasarımı konusunda sanal ligand taramasının yapılması oldukça önemlidir.
- 7LBS koduna ait XR8-24 ligandı IC_{50} değeri baz alındığında ve X-ray yapısı aydınlatılan proteinlere göre yüksek aktivite verdiği seçildi. 7LBS proteinine bağlanan XR8-24 ligandı, ubikuitin ile ISG15 kuyruğunun aktif bölgeye girmesini engellemektedir. Böylece PLpro enzimini içeren SARS-CoV-2 virüsü ev sahibi hücreye giremez ve bağışıklığı bozamaz.
- Referans ligandın protein ile yapmış olduğu bağlanma afinitesi ve hesaplanan K_i değerinin taşınon IIA ligandında da aynı değerde olması, **taşınon IIA** ligandının sanal ligand tarama hesaplamaları için seçilmesini sağladı.

4.2.1.2. İlaç Doking Sonuçları

COVID-19 tedavisi için ilaç tasarımında farklı hastalıkların için onay alan ve farklı ilaç hedefleriyle etkileşen ilaçların denenerek tedavi için antiviral etkilerine bakılmasıydı. Bu kapsamda SARS-CoV-2 PLpro enzimi ile hesapsal bağlanma enerjileri hesaplanan var olan ilaçlardan 8 tanesi seçilerek SARS-CoV-2 PLpro yapısının BL2 bölgesi ile etkileşimleri Autodock Vina yazılımı ile moleküler doking çalışması yapılarak teorik olarak hesaplandı.

Yapılan moleküler doking çalışmasının ardından elde edilen sonuçlara göre, sinakalset ilacının genel olarak diğer ilaçlara göre bağlanma afinitesinin (yüksek) iyi olduğu görüldü. Bu ilaçların moleküler doking hesaplaması yapılan fitokimyasallardan daha kötü bir afinite değeri verdiği belirlendi. Bunun nedeni doking hesaplaması yapılan ilaçların, başka bir hedefle etkileşmesi için tasarlanmış olması dolayısıyla o reseptöre özgü bir molekül olması olabilir.

Her bir ilaç için 3 tekrar ile yapılan moleküler doking çalışması için belirlenen ilaçların doking sonuçları Çizelge 4-5'te ve bu sonuçların ardından elde edilen en iyi, orta ve en kötü bağlanma enerjisine sahip ligandların protein ile yaptığı etkileşimler Çizelge 4-6'da yer almaktadır. Tüm ligandların protein ile yaptığı etkileşimler ise ekte yer almaktadır. Elde edilen sonuçların referans ligand bağlanma afinite değerinden daha yüksek olduğu görüldü. Bağlanma afinite değeri ne kadar küçükse yani ne kadar eksi değeri yüksekse molekül o liganda o kadar iyi bağlanacağı için elde edilen sonuçlar bitki fitokimyasallarına göre iyi netice elde edilemedi.

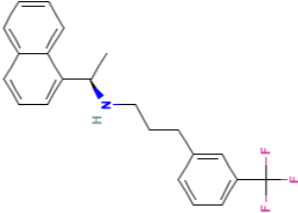
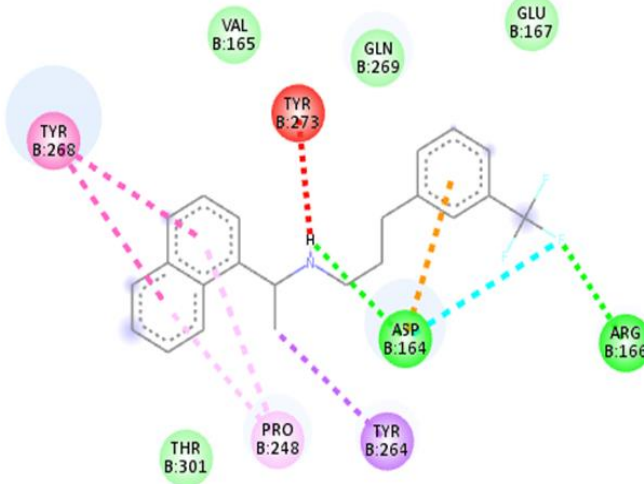
























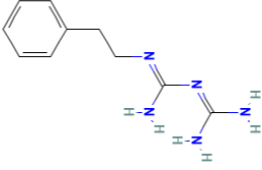
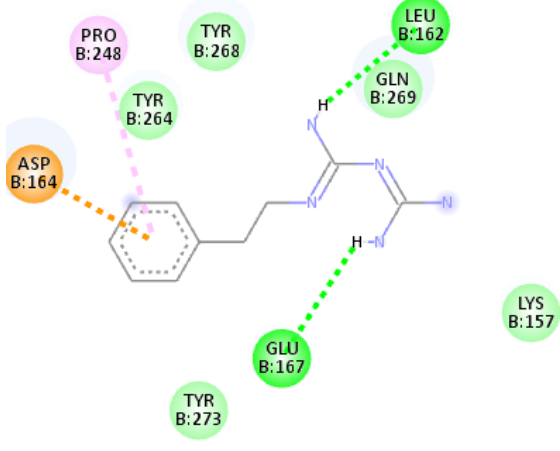












Çizelge 4-5 Var olan ilaçların Doking Sonuçları

İlaç Adı	Bağlanma Afinitesi (kcal/mol)	Hesaplanan Ki Değeri (µM)	<i>in silico</i> * kcal/mol
Sinakalset	-8.3	0.817	26 nM-3 µM**
Isotretinoin	-7.9	1.606	-
Darunavir	-7.3	4.417	-25.7***
Penformin	-7.1	6.144	-7.4
Famotidin	-7.1	6.144	-7.4
Kloroksazon	-6.1	33.56	-
Asiklovir	-6.1	33.56	-
Favipiravir	-5.7	65.92	-5.4
Referans Ligand: XR8-24	-9.5	108 nm	


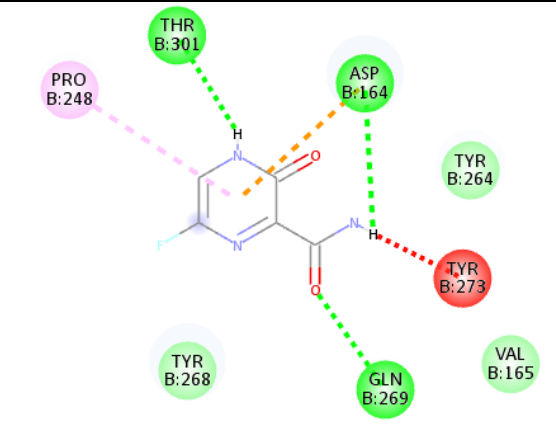
* Bağlanma enerjisi değeri (kcal/mol) PLpro enziminin **aktif bölgesi** ile hesaplanmaktadır.

** SEESAR doking programı ile hesaplandı. *** MM-GBSA moleküler mekanik hesaplamaları sonucu.

Çizelge 4-6 En iyi, orta ve zayıf bağlanma afinitesi veren farklı hedefler için onaylanan ilaçların moleküler doking sonucu etkileşimleri

Ligand Adı ve Hidrojen Bağları	2D Etkileşimler ve Bağlanma Enerjisi Değeri								
<p data-bbox="427 479 555 510">Sinakalset</p>  <p data-bbox="403 969 582 1093">ASP164 1.87 Å TYR273 2.33 Å ARG166 2.43 Å</p>	 <p data-bbox="722 969 826 990">Interactions</p> <table border="0" data-bbox="722 996 1292 1131"> <tr> <td> van der Waals</td> <td> Pi-Anion</td> </tr> <tr> <td> Conventional Hydrogen Bond</td> <td> Pi-Sigma</td> </tr> <tr> <td> Halogen (Fluorine)</td> <td> Pi-Pi T-shaped</td> </tr> <tr> <td> Unfavorable Donor-Donor</td> <td> Pi-Alkyl</td> </tr> </table> <p data-bbox="802 1155 1209 1187">Bağlanma enerjisi: -8.3 kcal/mol</p>	 van der Waals	 Pi-Anion	 Conventional Hydrogen Bond	 Pi-Sigma	 Halogen (Fluorine)	 Pi-Pi T-shaped	 Unfavorable Donor-Donor	 Pi-Alkyl
 van der Waals	 Pi-Anion								
 Conventional Hydrogen Bond	 Pi-Sigma								
 Halogen (Fluorine)	 Pi-Pi T-shaped								
 Unfavorable Donor-Donor	 Pi-Alkyl								
<p data-bbox="427 1305 555 1337">Penformin</p>  <p data-bbox="403 1742 582 1821">LEU162 2.42 Å GLU167 2.63 Å</p>	 <p data-bbox="722 1720 826 1740">Interactions</p> <table border="0" data-bbox="722 1747 1292 1825"> <tr> <td> van der Waals</td> <td> Pi-Anion</td> </tr> <tr> <td> Conventional Hydrogen Bond</td> <td> Pi-Alkyl</td> </tr> </table> <p data-bbox="802 1848 1209 1879">Bağlanma enerjisi: -7.1 kcal/mol</p>	 van der Waals	 Pi-Anion	 Conventional Hydrogen Bond	 Pi-Alkyl				
 van der Waals	 Pi-Anion								
 Conventional Hydrogen Bond	 Pi-Alkyl								

Devam ediyor...

Ligand Adı ve Hidrojen Bağları	2D Etkileşimler ve Bağlanma Enerjisi Değeri
<p>Favipiravir</p>  <p>THR301 2.10 Å ASP164 2.56 Å TYR273 1.63 Å GLN269 2.34 Å</p>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Unfavorable Donor-Donor Pi-Anion Pi-Alkyl <p>Bağlanma enerjisi: -5.7 kcal/mol</p>

Referans ligandın (**XR8-24**) bağlanma afinitesi ile hesaplanan Ki değeri, en iyi doking sonucu elde edilen **Sinakalset** ligandı değerinden iyi olduğu belirlendi. Validasyon çalışmasında tam çakışma gözlenen konformasyon 1 numaralı konformasyon olduğu için 1 numaralı konformasyon enerjisi doking hesaplamalarında temel olarak alındı. Bu ligandın bitki fitokimyasallarına göre kötü afiniteye sahip olduğu görüldüğü için temel alınmayacağı teorik olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre tıbbi etkisi olduğu bilinen bitkilere ait bitki fitokimyasallarının, SARS-CoV-2 virüsünün çoğalmasını sağlayan ve insan bağışıklık sistemini bozabilen PLpro enzimini inhibe edebilecek ilaç adayı olabilecek ligandın kırmızı adaçayı bitkisine ait **tanşınon IIA** molekülü olduğu belirlendi. Bu moleküle sanal ligand tarama yapılması nanomolar düzeyinde inhibitör tasarımı konusunda oldukça önemlidir.

4.3 Sanal Ligand Tarama

ZINC Database aracılığıyla Tanşınon IIA molekülüne sanal ligand tarama yapılarak bu moleküle benzer moleküller belirlenerek öncü molekül tasarımı konusunda sanal ligand tarama hesaplamaları yapıldı. 'Tanşınon IIA' molekülü için Similarity-30 (Tanimoto katsayısı 0.30) seçeneği kullanılarak tanimoto yöntemi ile bu moleküle benzer moleküller bulundu. Tanimoto yöntemi, molekül iskeletini sabit tutarak bu iskelet dışındaki yapıların benzerlik oranına göre taranması yoluyla çalışır.

4.3.1. Sanal Ligand Tarama Sonuçları

ZINC15 veri tabanı ile yapılan sanal ligand tarama sonucunda tañşınon IIA bileşigine benzer; **98 molekül** bulunmuştur. (Çizelge 4-7)

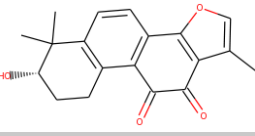
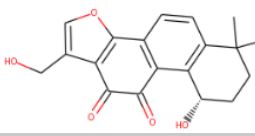
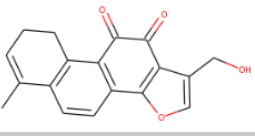
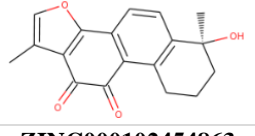
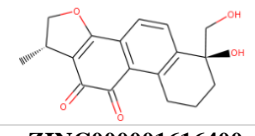
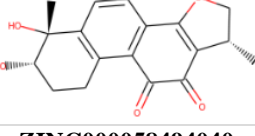
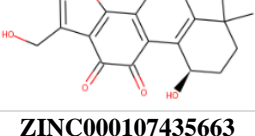
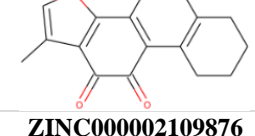
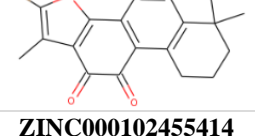
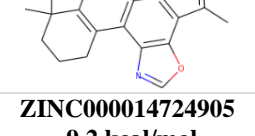
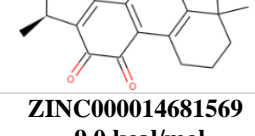
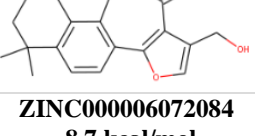
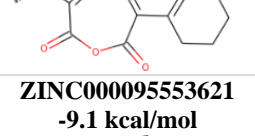
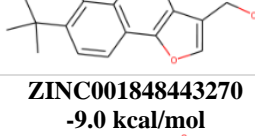
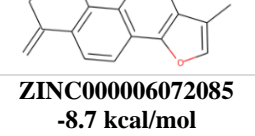
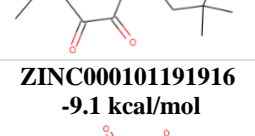

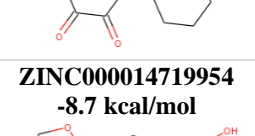
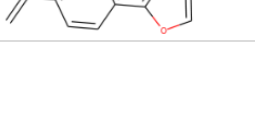
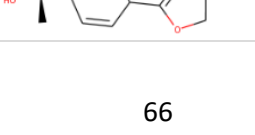
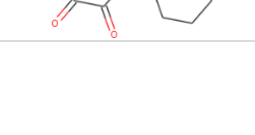
Çizelge 4-7 ZINC15 Veri Tabanı ile indirilen Tañşınon IIA molekülüne benzer 98 ligand için sanal ligand tarama sonuçları

Molekülün ZINC Kodu	Bağlanma enerjisi (kcal/mol)	Molekülün ZINC Kodu	Bağlanma enerjisi (kcal/mol)
ZINC000014719982	-9.6	ZINC000299817544	-8.0
ZINC000006072087	-9.4	ZINC000002558132	-8.0
ZINC000102454863	-9.3	ZINC000006037872	-8.0
ZINC000107435663	-9.3	ZINC000006037874	-8.0
ZINC000014724905	-9.2	ZINC000015165365	-8.0
ZINC000095553621	-9.1	ZINC000095553927	-8.0
ZINC000101191916	-9.1	ZINC000504707895	-7.9
ZINC000102454861	-9.1	ZINC000001557770	-7.9
ZINC000102728363	-9.1	ZINC000006072091	-7.9
ZINC000001616400	-9.0	ZINC000014719976	-7.9
ZINC000002109876	-9.0	ZINC000014724907	-7.9
ZINC000014681569	-9.0	ZINC000014615557	-7.8
ZINC001848443270	-9.0	ZINC000026893897	-7.8
ZINC000070451201	-8.9	ZINC000070454138	-7.8
ZINC000102554548	-8.9	ZINC000095553200	-7.8
ZINC000299817542	-8.9	ZINC000102728373	-7.8
ZINC000058494040	-8.8	ZINC000107435639	-7.8
ZINC000102455414	-8.8	ZINC000140676301	-7.8
ZINC000014719954	-8.7	ZINC000001537184	-7.8
ZINC000006072085	-8.7	ZINC000006072082	-7.7
ZINC000006072084	-8.7	ZINC000026893894	-7.7
ZINC000095553996	-8.6	ZINC000102474699	-7.7
ZINC000100091468	-8.6	ZINC000102728356	-7.7
ZINC000102157895	-8.5	ZINC000102728378	-7.7
ZINC000033833089	-8.5	ZINC000196512953	-7.7
ZINC000045288054	-8.4	ZINC000213168485	-7.7
ZINC000032273167	-8.4	ZINC000299817545	-7.7
ZINC000102474715	-8.4	ZINC000605706739	-7.7
ZINC000102728360	-8.4	ZINC000014719956	-7.6
ZINC000110135655	-8.4	ZINC000026893891	-7.6
ZINC000006072083	-8.4	ZINC000102728368	-7.6
ZINC000102157897	-8.3	ZINC000110135652	-7.6
ZINC000107435656	-8.2	ZINC000014724903	-7.5
ZINC000006072094	-8.2	ZINC000070454950	-7.5
ZINC000014719958	-8.2	ZINC000070454951	-7.5
ZINC000026893888	-8.2	ZINC000238768654	-7.3
ZINC000045298609	-8.2	ZINC000002031811	-7.3
ZINC000095552037	-8.1	ZINC000006031260	-7.3
ZINC000102474709	-8.1	ZINC000014719978	-7.3
ZINC000006072088	-8.1	ZINC000070454137	-7.3
ZINC000014719960	-8.1	ZINC000102474703	-7.2
ZINC000014719970	-8.1	ZINC000001650575	-7.2
ZINC000014719980	-8.1	ZINC000100091474	-7.0
ZINC000014719989	-8.1	ZINC000213168424	-6.9
ZINC000015169808	-8.1	ZINC000015169804	-6.8
ZINC000006031262	-8.1	ZINC000070451203	-6.7
ZINC000095553928	-8.0	ZINC001079929364	-6.5
ZINC000107435643	-8.0	ZINC000014719962	-6.4

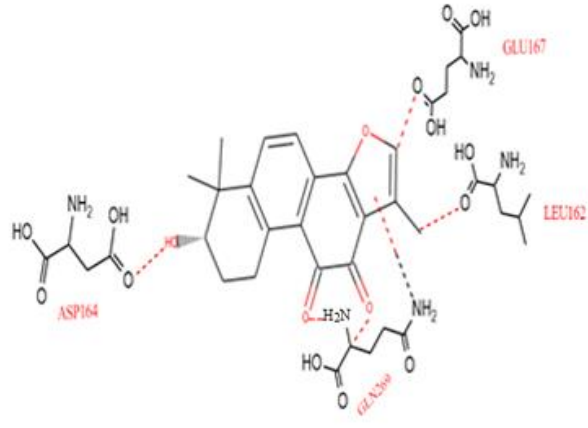
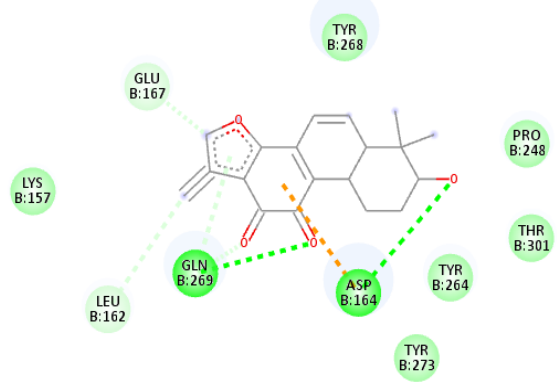
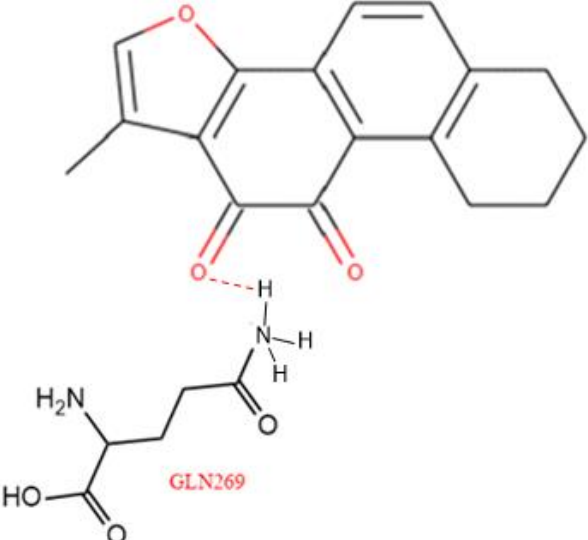
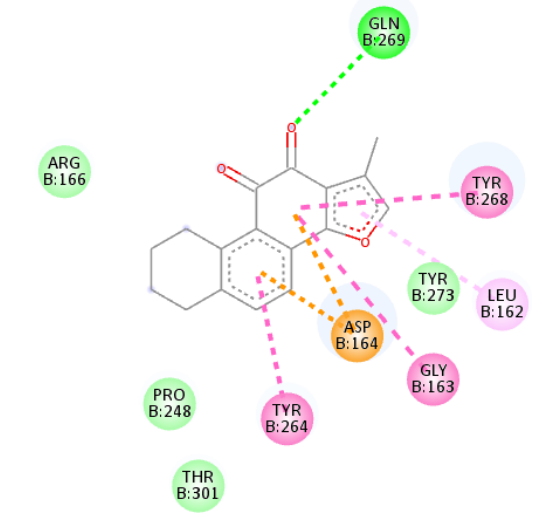
4.3.1.1 Sanal Ligand Tarama Sonucu En İyi Afiniteye Sahip Moleküller

SARS-CoV-2 PLpro enzimine ait 7LBS protein-ligand kompleksi ile moleküler doking hesaplamaları sonucunda en iyi sonucu veren tanşinon IIA molekülüne yapılan benzerlik taraması sonucu elde edilen 98 moleküle yapılan sanal ligand tarama hesaplamalar sonucunda en iyi afiniteye sahip **21 molekül** Çizelge 4-8'de yer almaktadır. En iyi, orta ve en kötü bağlanma enerjisine sahip ligandların protein ile yaptığı etkileşimler Çizelge 4-9'da yer almaktadır. Tüm ligandların etkileşimleri ekte yer almaktadır.

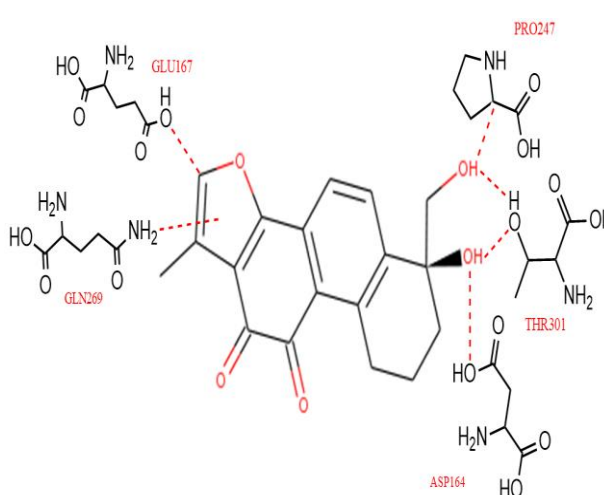
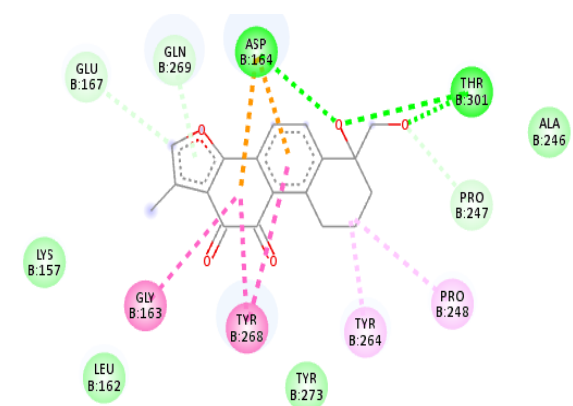
Çizelge 4-8 Sanal Ligand Tarama Sonucu En İyi Bağlanma Enerjisine Sahip Moleküller

ZINC000014719982 -9.6 kcal/mol 	ZINC000102454861 -9.1 kcal/mol 	ZINC000102554548 -8.9 kcal/mol 
ZINC000006072087 -9.4 kcal/mol 	ZINC000102728363 -9.1 kcal/mol 	ZINC000299817542 -8.9 kcal/mol 
ZINC000102454863 -9.3 kcal/mol 	ZINC000001616400 -9.0 kcal/mol 	ZINC000058494040 -8.8 kcal/mol 
ZINC000107435663 -9.3 kcal/mol 	ZINC000002109876 -9.0 kcal/mol 	ZINC000102455414 -8.8 kcal/mol 
ZINC000014724905 -9.2 kcal/mol 	ZINC000014681569 -9.0 kcal/mol 	ZINC000006072084 -8.7 kcal/mol 
ZINC000095553621 -9.1 kcal/mol 	ZINC001848443270 -9.0 kcal/mol 	ZINC000006072085 -8.7 kcal/mol 
ZINC000101191916 -9.1 kcal/mol 	ZINC000070451201 -8.9 kcal/mol 	ZINC000014719954 -8.7 kcal/mol 

Çizelge 4-9 En iyi, orta ve zayıf bağlanma afinitesi veren moleküllerin sanal ligand tarama sonucu elde edilen etkileşimler

Ligandın ZINC15 veri tabanı kodu Hidrojen Bağı etkileşimleri	2D Etkileşimler ve Bağlanma Enerjisi Değeri (kcal/mol)
<p style="text-align: center;">14719982</p> 	<p style="text-align: center;">Bağlanma enerjisi: -9.6</p>  <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond Pi-Anion Pi-Donor Hydrogen Bond
<p style="text-align: center;">1616400</p> 	<p style="text-align: center;">Bağlanma enerjisi: -9.0</p>  <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Pi-Anion Pi-Pi T-shaped Amide-Pi Stacked Pi-Alkyl

Devam ediyor...

Ligandın ZINC15 veri tabanı kodu Hidrojen Bağı etkileşimleri	2D Etkileşimler ve Bağlanma Enerjisi Değeri (kcal/mol)										
<p style="text-align: center;">14719954</p> 	<p style="text-align: center;">Bağlanma enerjisi: -8.7</p>  <p>Interactions</p> <table border="0"> <tr> <td>■ van der Waals</td> <td>■ Pi-Pi T-shaped</td> </tr> <tr> <td>■ Conventional Hydrogen Bond</td> <td>■ Amide-Pi Stacked</td> </tr> <tr> <td>■ Carbon Hydrogen Bond</td> <td>■ Alkyl</td> </tr> <tr> <td>■ Pi-Anion</td> <td>■ Pi-Alkyl</td> </tr> <tr> <td>■ Pi-Donor Hydrogen Bond</td> <td></td> </tr> </table>	■ van der Waals	■ Pi-Pi T-shaped	■ Conventional Hydrogen Bond	■ Amide-Pi Stacked	■ Carbon Hydrogen Bond	■ Alkyl	■ Pi-Anion	■ Pi-Alkyl	■ Pi-Donor Hydrogen Bond	
■ van der Waals	■ Pi-Pi T-shaped										
■ Conventional Hydrogen Bond	■ Amide-Pi Stacked										
■ Carbon Hydrogen Bond	■ Alkyl										
■ Pi-Anion	■ Pi-Alkyl										
■ Pi-Donor Hydrogen Bond											

SARS-CoV-2 virüsünün PLpro enziminin aktif bölgesine bağlanan inhibitörler kovalent bağlanırlar. PLpro enziminin yeni bulunan BL2 bölgesine bağlanan inhibitörler enzime kovalent bağlanmayarak, enzimin aktif bölgesini dolaylı yoldan bozarlar. Bu sayede viral proteinlerin parçalanmasına dolayısıyla da virüsün kendini kopyalamasına engel olarak enzimi inhibe ederler.

BL2 bölgesini temel alan moleküler doking hesaplaması yapılarak elde edilen taşınım IIA molekülüne sanal ligand taraması ZINC15 veri tabanından yapılarak 98 molekül bulundu. Sanal Ligand Taraması sonucu elde edilen sonuçlara göre, en yüksek afinite değerini veren 21 molekül tespit edilmiştir. Buna göre bu moleküllerin, küresel salgına yol açan COVID-19 tedavisi için öncü moleküller olabileceği *in silico* metotlar kullanılarak belirlenmiştir.

Öncü molekül tasarımı konusunda umut verici olan bu moleküllere; ADME ve toksikoloji hesaplamaları "emilim, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisite" çalışmalarının yapılması ilaç tasarımı çalışmaları için çok önemlidir.

4.4 ADME ve Toksikoloji Hesaplamaları

ADME ve toksikoloji hesaplamaları bir molekülün ilaç adayı olma potansiyeline doğrudan katkı sunan bir metotlardır. İlaç adayı moleküllerinin büyük bir kısmı toksisite nedeniyle elenmektedir, bu bağlamda ADME ve toksikoloji çalışmasının yapılabilmesi oldukça önemlidir.

ADME ve toksikoloji hesaplamaları teorik olarak da belirli internet web sayfalarındaki veri tabanlarından yapılabilir. pkCSM ile SwissADME bu hesaplamalar kapsamında kullanıldı. Bu veri tabanları ücretsiz olup, ADME ve toksikoloji hesaplaması yapılacak molekülün site üzerinden çizilmesi veya molekül kodlarının siteye girilmesiyle yapılır.

4.4.1. ADME ve Toksikoloji Sonuçları

ADMEt, ilaç tasarımı için öncü molekül adaylarına uygulanan emilim, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisite kelimelerinin baş harfleriyle tanımlanan terimdir.

Bir molekülün bir proteine bağlanması onun ilaç adayı olması için yeterli bir sonuç değildir. Birçok ilaç adayının elendiği nokta ADME ve toksikoloji hesaplamalarıdır. İlaç tasarımının önemli aşamalarından birisi olan ADME ve toksikoloji hesaplamaları yapılarak moleküllerin; absorpsiyon emilim, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisitesi incelenerek belirli metotları başarıyla geçen moleküller öncü molekül adayı olarak belirlenir.

Hesapsal *in vitro* hesaplamaları, en iyi moleküler doking sonucu veren tanşınon IIA molekülünün ZINC15 veri tabanında benzerlik taraması yapılarak ZINC15 veri tabanından indirilen veri setinden (98 molekül) hesaplanan sanal ligand taraması sonucunda en iyi bağlanma afinitesi gösteren 21 molekül seçilerek yapıldı. Bu moleküller Çizelge 4-10'da yer almaktadır.

Çizelge 4-10 ADME ve toksikoloji çalışması yapılan moleküller

No	ZINC Kodu	Bağlanma Afinitesi (kcal/mol)
1	ZINC000014719982	-9.6
2	ZINC000006072087	-9.4
3	ZINC000102454863	-9.3
4	ZINC000107435663	-9.3
5	ZINC000014724905	-9.2
6	ZINC000095553621	-9.1
7	ZINC000101191916	-9.1
8	ZINC000102454861	-9.1
9	ZINC000102728363	-9.1
10	ZINC000001616400	-9.0
11	ZINC000002109876	-9.0
12	ZINC000014681569	-9.0
13	ZINC001848443270	-9.0
14	ZINC000070451201	-8.9
15	ZINC000102554548	-8.9
16	ZINC000299817542	-8.9
17	ZINC000058494040	-8.8
18	ZINC000102455414	-8.8
19	ZINC000006072084	-8.7
20	ZINC000006072085	-8.7
21	ZINC000014719954	-8.7

ADME ve toksikoloji hesaplamaları pkCSM veri tabanı ile moleküllerin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ve ilaç benzerliği parametreleri de SwissADME ile hesaplandı. Bu moleküllerin hesaplama sonuçları ise Çizelge 4-11, Çizelge 4-12 ve Çizelge 4-13'te yer almaktadır.

Çizelge 4-11 21 ligand için pkCSM ile hesaplanan Emilim, Dağılım, Metabolizma, Atılım, Toksikite değerleri

No	Bileşiğin ZINC Kodu	Emilim		Dağılım	Metabolizma		Atılım	Toksikite				
		Caco-2 geçirgenliği (log Papp in 10 ⁻⁶ cm/s)	Bağırsak emilimi/ İnsan (% Absorbed)	VDss* (insan) (logL/kg)	CYP2D6 substratı	CYP3A4 substratı	Toplam Atılım (log ml/min/kg)	AMES Toksitesisi	Maks.Tolere Doz (insan) (log mg/kg/day)	Oral Fare Akut Toksikite (LD50) (mol/kg)	hERG I-II inhibitör	Oral Fare Kronik Toksikite (LOAEL) (log mg/kg_bw/day)
1	14719982	1.163	96.128	0.316	Hayır	Evet	0.67	Hayır	-0.038	2.508	Hayır- Evet	1.193
2	6072087	1.245	95.317	0.299	Hayır	Evet	0.105	Hayır	-0.085	2.536	Hayır- Hayır	1.214
3	102454863	1.005	93.781	0.28	Hayır	Hayır	0.646	Evet	-0.054	3.002	Hayır- Hayır	1.721
4	107435663	1.245	95.385	0.361	Hayır	Evet	0.446	Evet	0.4	2.468	Hayır- Evet	0.458
5	14724905	1.317	98.744	0.169	Hayır	Evet	0.8	Evet	-0.09	2.417	Hayır- Hayır	1.670
6	95553621	1.402	96.605	0.329	Hayır	Evet	0.092	Hayır	0.022	2.614	Hayır- Hayır	1.870
7	101191916	1.089	96.159	0.466	Hayır	Evet	0.221	Hayır	0.072	2.797	Hayır- Hayır	1.869
8	102454861	1.005	93.781	0.28	Hayır	Hayır	0.646	Evet	-0.054	3.002	Hayır- Hayır	1.721
9	102728363	1.37	97.317	0.057	Hayır	Hayır	0.072	Hayır	-0.107	2.096	Hayır- Hayır	2.351
10	1616400	1.375	96.928	0.23	Hayır	Evet	0.168	Evet	-0.114	2.524	Hayır- Hayır	1.910
11	2109876	1.42	98.144	0.109	Hayır	Evet	0.845	Hayır	0.125	2.113	Hayır- Hayır	1.835
12	14681569	1.122	97.217	0.524	Hayır	Evet	0.702	Hayır	0.208	2.849	Hayır- Hayır	1.850
13	1848443270	1.17	78.609	0.25	Evet	Evet	1.244	Evet	0.277	2.455	Hayır- Evet	1.709
14	70451201	0.143	95.076	0.218	Hayır	Evet	0.056	Evet	-0.237	2.656	Hayır- Hayır	1.867
15	102554548	1.092	96.235	0.491	Hayır	Evet	0.233	Hayır	0.002	2.702	Hayır- Hayır	1.762
16	299817542	1.419	97.602	-0.076	Hayır	Evet	0.055	Hayır	0.14	2.188	Hayır- Hayır	2.090
17	58494040	1.449	94.608	0.367	Hayır	Evet	-0.231	Hayır	-0.164	2.914	Hayır- Hayır	1.767
18	102455414	1.169	99.149	0.519	Hayır	Evet	0.597	Hayır	-0.348	2.657	Hayır- Evet	1.277
19	6072084	1.322	97.922	0.508	Hayır	Evet	0.146	Hayır	-0.008	2.676	Hayır- Hayır	2.070
20	6072085	1.245	95.317	0.299	Hayır	Evet	0.105	Hayır	-0.085	2.536	Hayır- Hayır	1.214
21	14719954	1.174	95.852	0.236	Hayır	Hayır	0.111	Hayır	-0.034	2.3	Hayır- Hayır	2.276

Not: * Kararlı durum dağılım hacmi

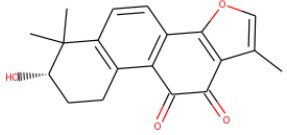
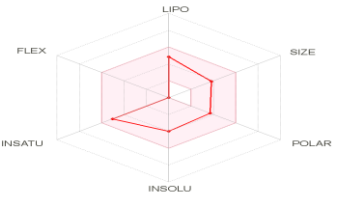
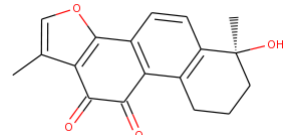

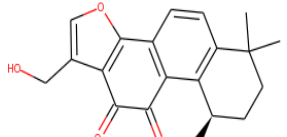
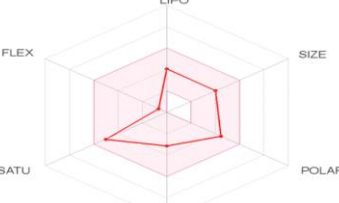

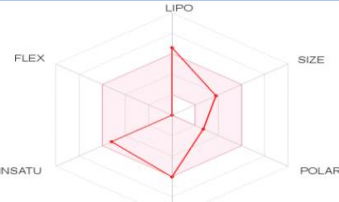
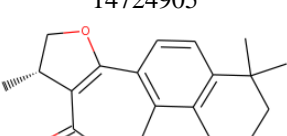
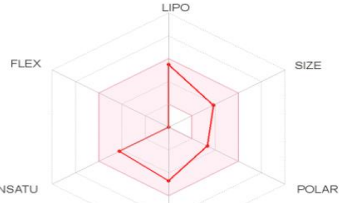
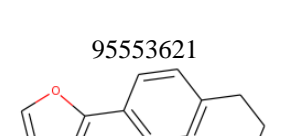

Çizelge 4-12 21 ligand için SwissADME ile hesaplanan Fizikokimyasal ve Farmakokinetik Özellikler

No	Molekülün ZINC Kodu	Fizikokimyasal Özellikler			Su çözünürlüğü Log S (ESOL)*	Sitokrom P450 enzim (CYP) inhibisyonları**					Cilt geçirgenliği Log Kp (cm/s)
		Dönebilen Bağlar	H-bağı akseptörleri	H-bağı donörleri		CYP1A2 inhibitör	CYP2C19 inhibitör	CYP2C9 inhibitör	CYP2D6 inhibitör	CYP3A4 inhibitör	
1	14719982	0	4	1	-4.00 (Orta)	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet	-6.07
2	6072087	0	4	1	-3.41 (Çözünür)	Evet	Evet	Hayır	Evet	Evet	-6.57
3	102454863	1	5	2	-3.14 (Çözünür)	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	-7.15
4	107435663	0	3	0	-6.05 (Zayıf)	Evet	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	-3.88
5	14724905	0	4	0	-4.72 (Orta)	Hayır	Evet	Evet	Hayır	Evet	-5.29
6	95553621	0	3	0	-4.62 (Orta)	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet	-5.18
7	101191916	1	4	1	-3.27 (Çözünür)	Evet	Evet	Hayır	Evet	Evet	-6.63
8	102454861	1	5	2	-3.14 (Çözünür)	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	-7.15
9	102728363	1	5	2	-2.29 (Çözünür)	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	-7.80
10	1616400	0	3	0	-4.08 (Orta)	Evet	Evet	Hayır	Evet	Evet	-5.47
11	2109876	0	3	0	-4.27 (Orta)	Evet	Evet	Hayır	Hayır	Evet	-5.41
12	14681569	1	4	1	-3.99 (Çözünür)	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet	-6.01
13	1848443270	0	2	1	-5.87 (Orta)	Evet	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	-4.07
14	70451201	1	5	2	-2.18 (Çözünür)	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	-7.92
15	102554548	1	4	1	-3.12 (Çözünür)	Evet	Evet	Hayır	Evet	Evet	-6.80
16	299817542	0	5	2	-2.40 (Çözünür)	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	-7.75
17	58494040	0	3	0	-5.88 (Orta)	Evet	Evet	Evet	Hayır	Hayır	-4.77
18	102455414	1	5	1	-4.36 (Orta)	Evet	Evet	Evet	Hayır	Hayır	-5.88
19	6072084	0	3	0	-4.04 (Orta)	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet	-5.64
20	6072085	0	4	1	-3.41 (Çözünür)	Evet	Evet	Hayır	Evet	Evet	-6.57
21	14719954	1	5	2	-2.77 (Çözünür)	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	-7.41

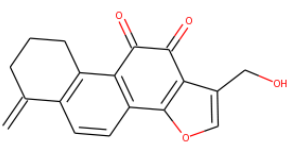
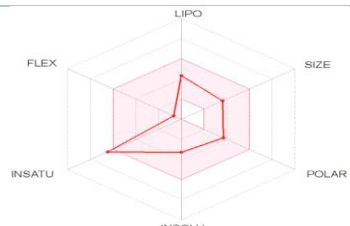
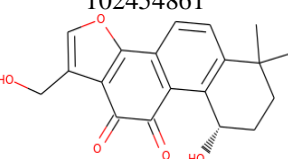
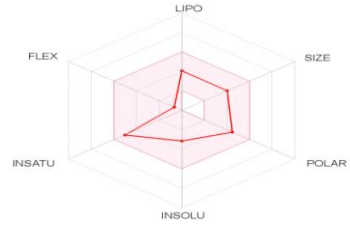
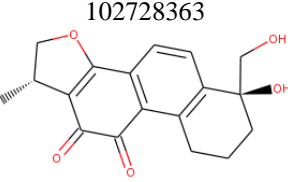
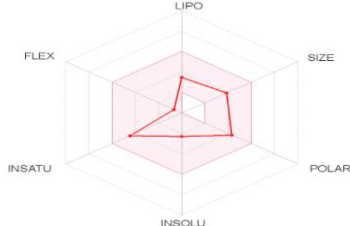
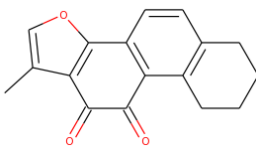
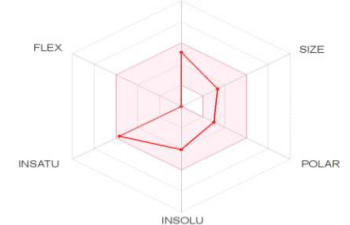
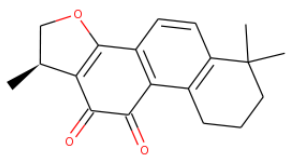
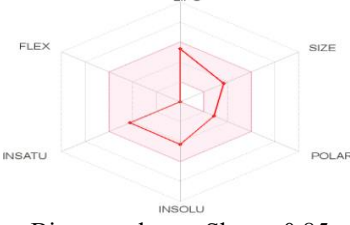
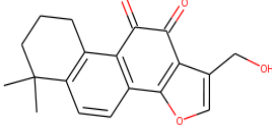
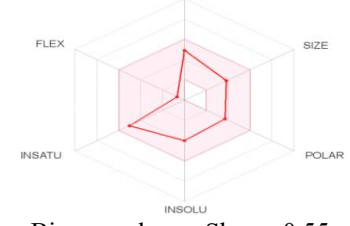
*Su Çözünürlüğü Tahmini

** Molekülün sonucu **evet** ise toksik yan etkilere açabilen sonuçlara neden olabilir.

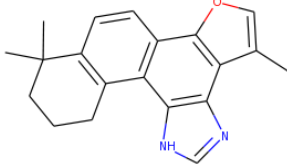
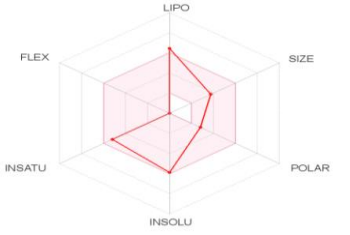
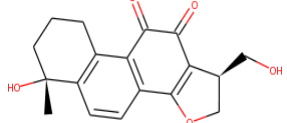
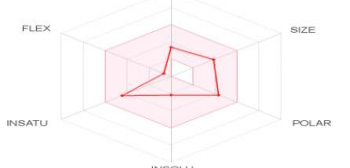
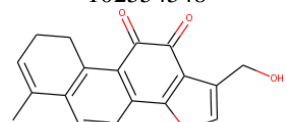
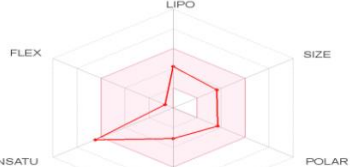
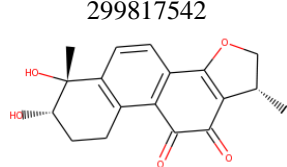
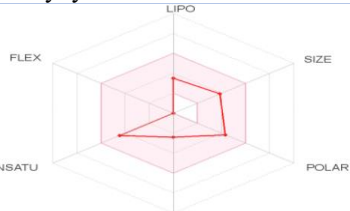
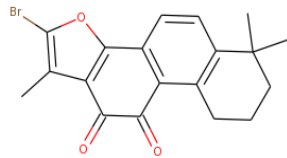
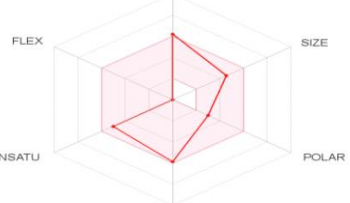
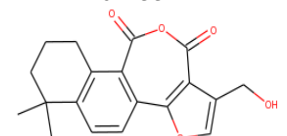
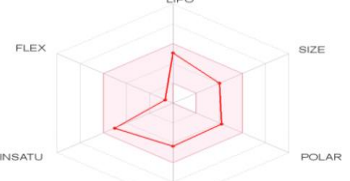
Çizelge 4-13 SwissADME ile hesaplanan ilaç benzerliği ve biyoyararlanım radarı

No	Molekülün ZINC Kodu ve İskelet Formülü	İlaç benzerliği		Biyoyararlanım Radarı
		Lipinski Beşler Kuralı	Veber	
1	14719982 	Evet; 0 ihlal	Evet	 Biyoyararlanım Skoru: 0.55
2	6072087 	Evet; 0 ihlal	Evet	 Biyoyararlanım Skoru: 0.55
3	102454863 	Evet; 0 ihlal	Evet	 Biyoyararlanım Skoru: 0.55
4	107435663 	Evet; 0 ihlal	Evet	 Biyoyararlanım Skoru: 0.55
5	14724905 	Evet; 0 ihlal	Evet	 Biyoyararlanım Skoru: 0.55
6	95553621 	Evet; 0 ihlal	Evet	 Biyoyararlanım Skoru: 0.55

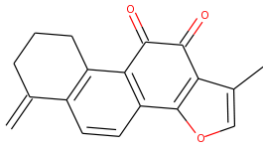
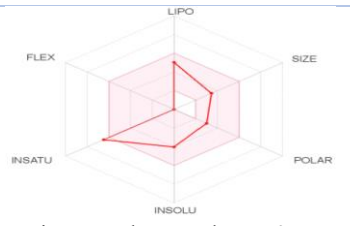
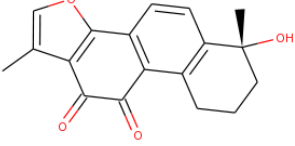
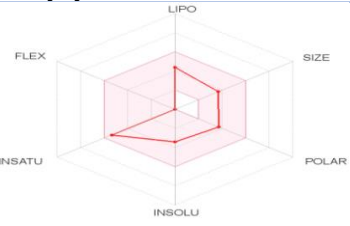
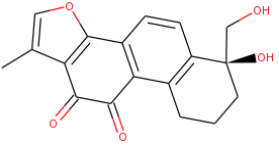
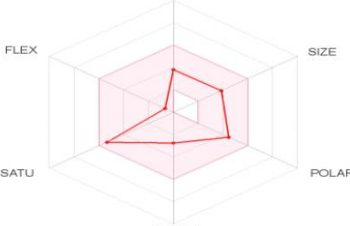
Devam ediyor...

No	Molekülün ZINC Kodu ve İskelet Formülü	İlaç benzerliği		Biyoyararlanım Radarı
		Lipinski Beşler Kuralı	Veber	
7	<p>101191916</p> 	Evet; 0 ihlal	Evet	 <p>Biyoyararlanım Skoru: 0.55</p>
8	<p>102454861</p> 	Evet; 0 ihlal	Evet	 <p>Biyoyararlanım Skoru: 0.55</p>
9	<p>102728363</p> 	Evet; 0 ihlal	Evet	 <p>Biyoyararlanım Skoru: 0.56</p>
10	<p>1616400</p> 	Evet; 0 ihlal	Evet	 <p>Biyoyararlanım Skoru: 0.55</p>
11	<p>2109876</p> 	Evet; 0 ihlal	Evet	 <p>Biyoyararlanım Skoru: 0.85</p>
12	<p>14681569</p> 	Evet; 0 ihlal	Evet	 <p>Biyoyararlanım Skoru: 0.55</p>

Devam ediyor...

No	Molekülün ZINC Kodu ve İskelet Formülü	İlaç benzerliği		Biyoyararlanım Radarı
		Lipinski Beşler Kuralı	Veber	
13	1848443270 	Evet; 0 ihlal	Evet	 Biyoyararlanım Skoru: 0.55
14	70451201 	Evet; 0 ihlal	Evet	 Biyoyararlanım Skoru: 0.56
15	102554548 	Evet; 0 ihlal	Evet	 Biyoyararlanım Skoru: 0.55
16	299817542 	Evet; 0 ihlal	Evet	 Biyoyararlanım Skoru: 0.56
17	58494040 	Evet; 0 ihlal	Evet	 Biyoyararlanım Skoru: 0.55
18	102455414 	Evet; 0 ihlal	Evet	 Biyoyararlanım Skoru: 0.55

Devam ediyor...

No	Molekülün ZINC Kodu ve İskelet Formülü	İlaç benzerliği		Biyoyararlanım Radarı
		Lipinski Beşler Kuralı	Veber	
19	6072084 	Evet; 0 ihlal	Evet	 Biyoyararlanım Skoru: 0.55
20	6072085 	Evet; 0 ihlal	Evet	 Biyoyararlanım Skoru: 0.55
21	14719954 	Evet; 0 ihlal	Evet	 Biyoyararlanım Skoru: 0.55

4.4.2 ADMET Değerlendirme

Sanal Ligand Taraması yapılan ve en iyi sonucu verdiği belirlenen 21 molekül için ADMET çalışması yapıldı ve ADMET çalışmasındaki en önemli aşamalardan birisi olan toksisteyi (AMES) geçen **14 molekül** belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre;

70451201 ZINC koduna sahip molekül haricindeki tüm moleküller yüksek Caco-2 geçirgenliğine sahiptir. Tüm moleküller **yüksek** bağırsak emilimine sahiptir. VDss değeri düşük olan bir molekül bulunmazken, 101191916, 14681569, 102554548, 102455414, 6072084 ZINC koduna sahip moleküllerde **yüksek** olduğu belirlendi. VD ne kadar yüksekse, ilaç plazma yerine dokuda o kadar çok dağılır. Tüm moleküllerin maksimum tolere edilen doz (MRTD) değeri **küçük** olduğu gözlemlendi. 21 molekülün **tamamı** lipinski beşler kuralı ve Veber kuralını sağladı. Biyoyararlanım değerleri birbirine yakın ve 0.55 civarında olduğu belirlendi. ADMET çalışması için en önemli test olan AMES toksisiteye sahip **olmayan** 14 molekül belirlendi, diğer moleküllerin toksik olması molekülün ilaç adaylığını olumsuz etkilemektedir. AMES toksisiteye sahip olmayan moleküllerin ADMET değerlendirilmesi Çizelge 4-14'tedir.

Çizelge 4-14 AMES Toksisitesine sahip olmayan moleküllerin ADMET değerlendirilmesi

No	ZINC Kodu	Afinitesi (kcal/mol)	Hidrojen Bağı Sayısı	ADME ve Toksikoloji Değerlendirilmesi			
				Su Çözünürlüğü	CYP inhibitörleri	HERG I ve II inhibitörü	Değerlendirme
1	14719982	-9.6	6	Orta	-	+/-	CYP inhibisyonu
2	6072087	-9.4	2	Çözünür	CYP2C9 haricinde -	+/+	CYP inhibisyonu
3	95553621	-9.1	2	Orta	-	+/+	CYP inhibisyonu
4	101191916	-9.1	2	Çözünür	CYP2C9 haricinde -	+/+	CYP inhibisyonu
5	102728363	-9.1	4	Çözünür	CYP1A2 haricinde +	+/+	CYP1A2 inhibisyonu
6	2109876	-9.0	1	Orta	CYP2C9 haricinde -	+/+	CYP inhibisyonu
7	14681569	-9.0	5	Çözünür	-	+/+	CYP inhibisyonu
8	102554548	-8.9	4	Çözünür	CYP2C9 haricinde -	+/+	CYP inhibisyonu
9	299817542	-8.9	3	Çözünür	+	+/+	Genel olarak ADMET testlerini başarıyla geçti.
10	58494040	-8.8	2	Orta	CYP2D6 ve CYP3A4 haricinde -	+/+	CYP inhibisyonu
11	102455414	-8.8	4	Orta	CYP2D6 ve CYP3A4 haricinde -	+/-	CYP inhibisyonu
12	6072084	-8.7	3	Orta	-	+/+	CYP inhibisyonu
13	6072085	-8.7	3	Çözünür	CYP2C9 haricinde -	+/+	CYP inhibisyonu
14	14719954	-8.7	6	Çözünür	CYP1A2 haricinde +	+/+	CYP1A2 inhibisyonu

5. YORUMLAR

SARS-CoV-2 PLpro enzimi aktif bölgesine bağlanan inhibitörlerin kovalent bağlanması nedeniyle enzimin yeni keşfedilen BL2 bölgesiyle etkileşen ilaç tasarımı bu tez kapsamında temel alındı. BL2 bölgesine bağlanan inhibitörler dolaylı yoldan aktif bölge yapısını bozarak enzimin tekrarlanması engellemektedir. Bu nedenle seçilen 35 bitki fitokimyasalı ile farklı hastalıklar için onay alan 8 ilacın BL2 bölgesine bağlanması hedeflendi.

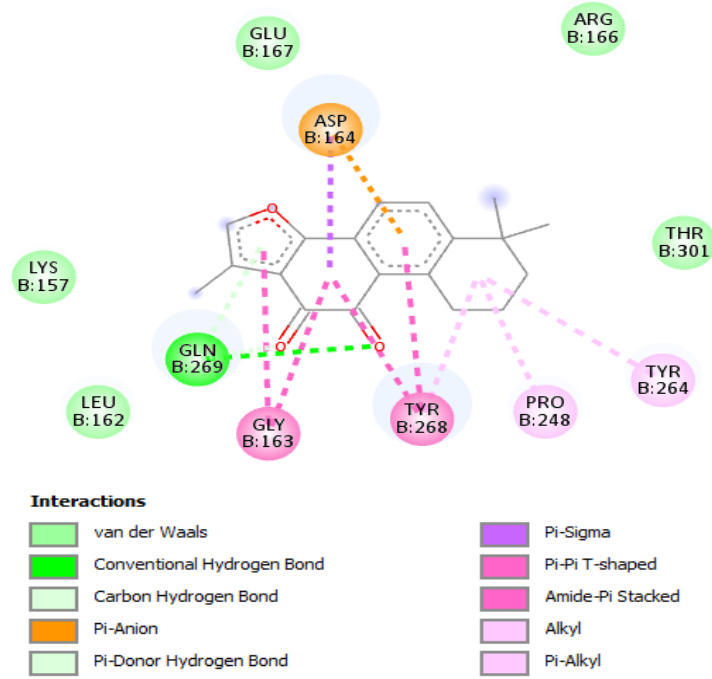
Validasyon çalışmasında oldukça iyi bir RMSD değeri olan 1.723Å ile kabul edilebilir bir doking çalışması yapılan 7LBS proteinini **8 adet ilaç ve 35 adet bitki fitokimyasalı olmak üzere 43 ligand** ile doking çalışması sonucunda tanşinon molekülleri genel olarak diğer ilaç ve fitokimyasallara yüksek bağlanma afinitesi ve dolayısıyla da iyi sonuç verdi.

Kırmızı Adaçayı (*Salvia miltiorrhiza*) bitkisinden elde edilen, molekül yapısı tanımlanan tüm tanşinon molekülleri ve tez kapsamında belirtilen diğer ligandların (ilaç ve bitki fitokimyasalları), SARS-CoV-2 PLpro'nun yeni keşfedilen BL2 bölgesi ile etkileşebilecek düşük IC₅₀ değerine sahip proteini olan **7LBS** proteini ile doking çalışması sonucu **bağlanma afiniteleri** ile **K_i** değerlerinin hesaplanması ve ADME ve toksikoloji çalışması **ilk kez** bu tez kapsamında yapıldı.

Daha önce yapılan *in vitro* çalışmalar kapsamında SARS-CoV ve SARS-CoV-2 PLpro enzimini inhibe edileceği belirtilen tıbbi bitkilere ait bitki fitokimyasallarının daha önce enzim aktif bölgesine bağlanan çalışmalar yapıldı. PLpro enziminin aktif bölgesine kovalent bağlanan inhibitörler ilaç tasarımı için uygun olmadığından bu tez kapsamında enzimin yeni keşfedilen inhibitörlerin kovalent bağlanmadığı BL2 bölgesi temel alındı.

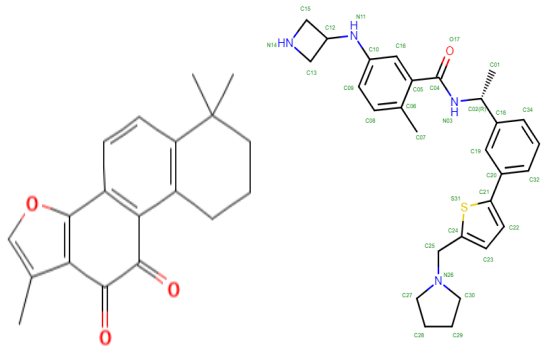
SARS-CoV-2 PLpro proteinleri ile yapılan çalışmalarda elde edilen tanşinon moleküllerinden daha iyi sonuçların elde edilmesi ilaç tasarımı için oldukça umut verici bir gelişme olacaktır. Tanşinon moleküllerinin PLpro proteini ile yüksek bağlanma afinitesi göstermesi biyolojik aktivite çalışması yapılması açısından önemlidir.

Tanşinon IIA molekülünün -9.5 gibi oldukça iyi bir bağlanma enerjisine sahip olması nedeniyle hesaplanan K_i değerinin de 108 nM olması bu tez kapsamında sanal ligand tarama çalışmasının bu molekül sanal ligand tarama için referans ligand olarak seçildi. (Şekil 5-1)



Şekil 5-1 Tanşınon IIA molekülünün 2D etkileşimleri

Tanşınon IIA molekülünün etkileşimleri de incelendiğinde gerek hidrojen bağları gerekse diğer ikincil etkileşimler göz önüne alındığında iyi bağlanma afinitesi verdiği görüldü.

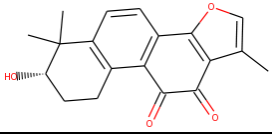
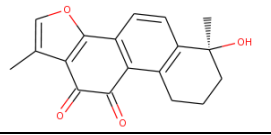
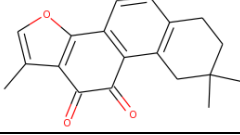
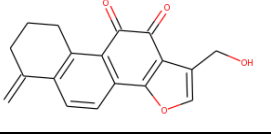
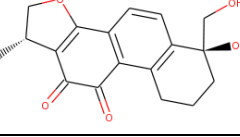
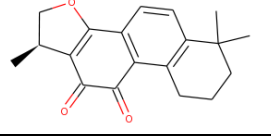
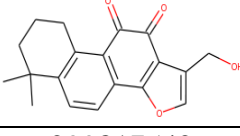
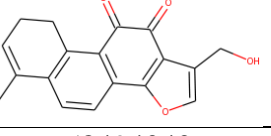
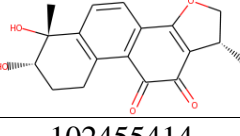
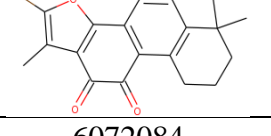
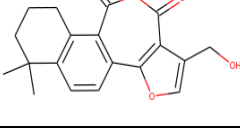
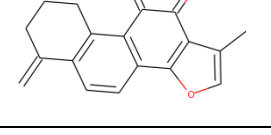
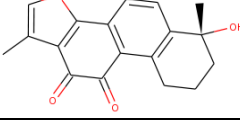
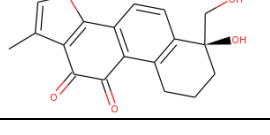


Şekil 5-2 Tanşınon IIA molekülü ve Referans ligand (XR8-24)

Hidrojen bağlarını yapabilen yüksek elektronegatifliğe sahip element olan oksijeni içermesi Tanşınon IIA molekülünün iyi bağlanmasını açıklayan bir diğer nedendir. Tanşınon IIA molekülünde su köprüsü etkileşimi ise gözlenmedi. İyi sonuç elde edilen tanşınon IIA ligandına, sanal ligand taraması yapılan 98 molekülden en iyi afinite değerini veren 21 molekül seçildi. Bu moleküllere hesapsal ADME ve toksikoloji hesaplaması yapılarak moleküllerin ilaç adayı olup olmadığı değerlendirildi.

Elde edilen tüm bu sonuçlar neticesinde, ADMET hesaplamaları için önemli adımlardan birisi olan AMES toksisiteye sahip olmayan bu 14 molekül belirlendi. (Çizelge 5-1)

Çizelge 5-1 AMES Toksikiteye sahip olmayan ve en iyi afinite değeri veren moleküller

14719982 	6072087 
95553621 	101191916 
102728363 	2109876 
14681569 	102554548 
299817542 	58494040 
102455414 	6072084 
6072085 	14719954 

SARS-CoV-2 PLpro enziminin aktif bölgesine bağlanan inhibitörler kovalent bağlanırlar. Enzimin avuç içi alanında yeni keşfedilen BL2 bölgesine PLpro enzim substratlarının bağlanmaması nedeniyle bu bölge tez kapsamında hedef bölge seçildi. BL2 bölgesine kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanan inhibitörler aktif bölgeyi dolaylı yoldan bozarak aktif bölgeye substrat bağlanmasını engelleyerek enzim inhibisyonunu sağlayabilir. BL2 bölgesine bağlanan inhibitörler dolaylı yoldan aktif

bölge yapısını bozarak enzimin kopyalanmasını engellemektedir. Bu nedenle tıbbi etkiye sahip olan SARS-CoV-2 PLpro için deneysel IC_{50} değerleri hesaplanan **35 bitki fitokimyasalı** ile farklı hastalıklar için onay alan **8 ilacın** BL2 bölgesine bağlanması hedeflendi.

Yapılan hesaplamaların ardından, SARS-CoV-2 virüsü PLpro enziminin BL2 bölgesi ile etkileşebilecek bir inhibitör içeren 7LBS PDB koduna sahip protein-ligand kompleksi proteini temel alınan tez çalışması kapsamında, en iyi sonucu veren ve sanal ligand taraması yapılan **tanşinon IIA** molekülünden yola çıkılarak elde edilen toksisiteye sahip olmayan ve yüksek bağlanma gösteren 14 molekülün BL2 bölgesi ile etkileşebileceği teorik olarak belirlendi. Elde edilen sonuçların COVID-19 tedavisi için papain-benzeri proteaz inhibitör tasarımı için öncü molekül adayı olmalarına katkı sunacağını düşünülmektedir.

Elde edilen sonuçların ileri düzeyde yapılması gereken çalışmalar;

- Biyolojik aktivite çalışmaları, toksisiteye sahip olmayan 14 molekül için yapılmalı, bu moleküllerin deneysel K_i ve/veya IC_{50} değerleri hesaplanarak moleküllerin deneysel hesaplamaları yapılmalıdır.
- Henüz antiviral ilacı bulunmayan SARS-CoV-2 virüsü PLpro enzimini inhibe edebilecek ilaç tasarımı için, moleküler dinamik (MD) gibi ileri seviye *in silico* hesaplamalar yapılmalıdır.

6. REFERANSLAR

1. Who Health Organization, <https://covid19.who.int/> (Erişim tarihi: **Aralık 2022**)
2. T.C. Sağlık Bakanlığı COVID-19 Bilgilendirme Platformu, <https://covid19.saglik.gov.tr/> (Erişim tarihi: **Aralık 2022**)
3. Drugbank Online, <https://go.drugbank.com/indications/DBCOND0128668> (Erişim tarihi: **Aralık 2022**)
4. Drugbank Online, <https://go.drugbank.com/> (Erişim tarihi: **Aralık 2022**)
5. Venkatesh Pooladanda, Sowjanya Thatikonda, Chandraiah Godugu, The current understanding and potential therapeutic options to combat COVID-19, *Life Sciences*, **2020**
6. Shahab Mahmoudvand, Somayeh Shokri, Interactions between SARS coronavirus 2 papain-like protease and immune system: A potential drug target for the treatment of COVID-19, *Scandinavian Journal of Immunology*, **2021**
7. Devin S. M. Lewis, Joanna Ho, Savannah Wills, Anasha Kawall, Avini Sharma, Krishna Chavada, Maximilian C. C. J. C. Ebert, Stefania Evoli, Ajay Singh, Srujana Rayalam, Vicky Mody, Shashidharamurthy Taval, Aloid isoforms (A and B) selectively inhibits proteolytic and deubiquitinating activity of papain like protease (PLpro) of SARS-CoV-2 in vitro, *Scientific Reports*, **2022**
8. Donghyuk Shin, Rukmini Mukherjee, Diana Grewe, Denisa Bojkova, Kheewoong Baek, Anshu Bhattacharya, Laura Schulz, Marek Widera, Ahmad Reza Mehdipour, Georg Tascher, Paul P. Geurink, Alexander Wilhelm, Gerbrand J. van der Heden van Noort, Huib Ovaas, Stefan Müller, Klaus-Peter Knobeloch, Krishnaraj Rajalingam, Brenda A. Schulman, Jindrich Cinatl, Gerhard Hummer, Sandra Ciesek, Ivan Dikic, Papain-like protease regulates SARS-CoV-2 viral spread and innate immunity, *Nature*, **2020**
9. Zhengnan Shen, Kiira Ratia, Laura Cooper, Deyu Kong, Hyun Lee, Youngjin Kwon, Yangfeng Li, Saad Alqarni, Fei Huang, Oleksii Dubrovskiy, Lijun Rong, Gregory R. J. Thatcher, and Rui Xiong, Design of SARS-CoV-2 PLpro Inhibitors for COVID-19 Antiviral Therapy Leveraging Binding Cooperativity, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2022**
10. Jared S. Morse, Tyler Lalonde, Shiqing Xu, Wenshe Ray Liu, Learning from the Past: Possible Urgent Prevention and Treatment Options for Severe Acute Respiratory Infections Caused by 2019-nCoV, *Chembiochem*, **2020**
11. Haozhou Tan, Yanmei Hu, Prakash Jadhav, Bin Tan ve Jun Wang, Progress and Challenges in Targeting the SARS-CoV-2 Papain-like Protease, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2022**
12. Giri, R. et al. Understanding COVID-19 via comparative analysis of dark proteomes of SARS-CoV-2, human SARS and bat SARS-like coronaviruses. *Cell Mol. Life Sci.* <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03603-x> **2020**
13. Harcourt, B. H. et al. Identification of severe acute respiratory syndrome coronavirus replicase products and characterization of papain-like protease activity. *J. Virol*, **2004**.

14. Theresa Klemm, Gregor Ebert, Dale J Calleja, Cody C Allison, Lachlan W Richardson, Jonathan P Bernardini, Bernadine GC Lu, Nathan W Kuchel, Christoph Grohmann, Yuri Shibata, Zhong Yan Gan, James P Cooney, Marcel Doerflinger, Amanda E Au, Timothy R Blackmore, Gerbrand J van der Heden van Noort, Paul P Geurink, Huib Ovaa, Janet Newman, Alan Riboldi-Tunnicliffe, Peter E Czabotar, Jeffrey P Mitchell, Rebecca Feltham, Bernhard C Lechtenberg, Kym N Lowes, Grant Dewson, Marc Pellegrini, Guillaume Lessene, David Komander, Mechanism and inhibition of the papain-like protease, PLpro, of SARS-CoV-2, *The EMBO Journal*, **2020**
15. RCSB Protein Data Bank, <https://www.rcsb.org/> (Erişim Tarihi: **Ağustos 2022**)
16. Dale J. Calleja, Nathan Kuchel, Bernadine G. C. Lu, Richard W. Birkinshaw, Theresa Klemm, Marcel Doerflinger, James P. Cooney, Liana Mackiewicz, Amanda E. Au, Yu Q. Yap, Timothy R Blackmore, Kasiram Katneni, Elly Crighton, Janet Newman, Kate E. Jarman, Melissa J. Call, Bernhard C. Lechtenberg, Peter E. Czabotar, Marc Pellegrini, Susan A. Charman, Kym N. Lowes, Jeffrey P. Mitchell, Ueli Nachbur, Guillaume Lessene, David Komander Insights Into Drug Repurposing, as Well as Specificity and Compound Properties of Piperidine-Based SARS-CoV-2 PLpro Inhibitors, *Frontiers in Chemistry*, **2022**
17. Chunlong Ma, Michael Dominic Sacco, Zilei Xia, George Lambrinidis, Julia Alma Townsend, Yanmei Hu, Xiangzhi Meng, Tommy Szeto, Mandy Ba, Xiujun Zhang, Maura Gongora, Fushun Zhang, Michael Thomas Marty, Yan Xiang, Antonios Kolocouris, Yu Chen, Jun Wang, Discovery of SARS-CoV-2 Papain-like Protease Inhibitors through a Combination of High-Throughput Screening and a FlipGFP-Based Reporter Assay, *ACS Central Science*, **2021**
18. Valeria Napolitano, Agnieszka Dabrowska, Kenji Schorpp, André Mourão, Emilia Barreto-Duran, Malgorzata Benedyk, Pawel Botwina, Stefanie Brandner, Mark Bostock, Yuliya Chykunova, Anna Czarna, Grzegorz Dubin, Tony Fröhlich, Michael Hölscher, Malwina Jedrysik, Alex Matsuda, Katarzyna Owczarek, Magdalena Pachota, Oliver Plettenburg, Jan Potempa, Ina Rothenaigler, Florian Schlauderer, Klaudia Slysz, Artur Szczepanski, Kristin Greve-Isdahl Mohn, Bjorn Blomberg, Michael Sattler, Kamyar Hadian, Grzegorz Maria Popowicz, Krzysztof Pyrc, Acriflavine, a clinically approved drug, inhibits SARS-CoV-2 and other betacoronaviruses, *Cell Chemical Biology*, **2022**
19. Ziyang Fu, Bin Huang, Jinle Tang, Shuyan Liu, Ming Liu, Yuxin Ye, Zhihong Liu, Yuxian Xiong, Wenning Zhu, Dan Cao, Jihui Li, Xiaogang Niu, Huan Zhou, Yong Juan Zhao, Guoliang Zhang, Hao Huang, The complex structure of GRL0617 and SARS-CoV-2 PLpro reveals a hot spot for antiviral drug discovery, *Nature Communications*, **2021**
20. Xiaopan Gao, Bo Qin, Pu Chen, Kaixiang Zhu, Pengjiao Hou, Justyna Aleksandra Wojdyla, Meitian Wang, Sheng Cui, Crystal structure of SARS-CoV-2 papain-like protease, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **2020**

21. Jerzy Osipiuk, Saara-Anne Azizi, Steve Dvorkin, Michael Endres, Robert Jedrzejczak, Krysten A. Jones, Soowon Kang, Rahul S. Kathayat, Youngchang Kim, Vladislav G. Lisnyak, Samantha L. Maki, Vlad Nicolaescu, Cooper A. Taylor, Christine Tesar, Yu-An Zhang, Zhiyao Zhou, Glenn Randall, Karolina Michalska, Scott A. Snyder, Bryan C. Dickinson, Andrzej Joachimiak, Structure of papain-like protease from SARS-CoV-2 and its complexes with non-covalent inhibitors, *Nature Communications*, **2021**
22. Yao Zhao, Xiaoyu Du, Yinkai Duan, Xiaoyan Pan, Yifang Sun, Tian You, Lin Han, Zhenming Jin, Weijuan Shang, Jing Yu, Hangtian Guo, Qianying Liu, Yan Wu, Chao Peng, Jun Wang, Chenghao Zhu, Xiuna Yang, Kailin Yang, Ying Lei, Luke W. Guddat, Wenqing Xu, Gengfu Xiao, Lei Sun, Leike Zhang, Zihe Rao, Haitao Yang, High-throughput screening identifies established drugs as SARS-CoV-2 PLpro inhibitors, *Protein & Cell*, **2021**
23. Hengyue Shan, Jianping Liu, Jiali Shen, Jialin Dai, Gang Xu, Kuankuan Lu, Chao Han, Yaru Wang, Xiaolong Xu, Yilun Tong, Huaijiang Xiang, Zhiyuan Ai, Guanglei Zhuang, Junhao Hu, Zheng Zhang, Ying Li, Lifeng Pan, Li Tan, Development of potent and selective inhibitors targeting the papain-like protease of SARS-CoV-2, *Cell Chemical Biology*, **2021**
24. Wioletta Rut, Zongyang Lv, Mikolaj Zmudzinski, Stephanie Patchett, Digant Nayak, Scott J. Snipas, Farid El Oualid, Tony T. Huang, Miklos Bekes, Marcin Drag, Shaun K. Olsen, Activity profiling and crystal structures of inhibitor bound SARS-CoV-2 papain-like protease: A framework for anti-COVID-19 drug design, *SCIENCE ADVANCES*, **2020**
25. Wiebke Ewert, Sebastian Günther, Francesca Miglioli, Sven Falke, Patrick Y. A. Reinke, Stephan Niebling, Christian Günther, Huijong Han, Vasundara Srinivasan, Hévila Brognaro, Julia Lieske, Kristina Lorenzen, Maria M. Garcia-Alai, Christian Betzel, Mauro Carcelli, Winfried Hinrichs, Dominga Rogolino, Alke Meents, Hydrazones and Thiosemicarbazones Targeting Protein-Protein-Interactions of SARS-CoV-2 Papain-like Protease, *Frontiers in Chemistry*, **2022**
26. Anh-Tien Ton, Mohit Pandey, Jason R. Smith, Fuqiang Ban, Michael Fernandez, Artem Cherkasov, Targeting SARS-CoV-2 Papain-Like Protease in the Post-Vaccine Era, *Trends in Pharmacological Sciences*, **2022**
27. Canrong Wu, Yang Liu, Yueying Yang, Peng Zhang, Wu Zhong, Yali Wang, Qiqi Wang, Yang Xu, Mingxue Li, Xingzhou Li, Mengzhu Zheng, Lixia Chen, Hua Li, Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods, *Acta Pharmaceutica Sinica B* 766-788, 2020
28. Natarajan Arul Murugan, Sanjiv Kumar, Jeyaraman Jeyakanthan, Vaibhav Srivastava, Searching for target-specific and multi-targeting organics for Covid-19 in the Drugbank database with a double scoring approach, *Scientific Reports*, 2020
29. Mahmoud Kandeel, Alaa H. M. Abdelrahman, Kentaro Oh-Hashi, Abdelazim Ibrahim, Katharigatta N. Venugopala, Mohamed A. Morsy, Mahmoud A. A. Ibrahim, Repurposing of FDA-approved antivirals, antibiotics, anthelmintics,

- antioxidants, and cell protectives against SARS-CoV-2 papain-like protease, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2020
30. Parth Sarthi Sen Gupta, Satyaranjan Biswal, Dipankar Singha ve Malay Kumar Rana, Binding insight of clinically oriented drug famotidine with the identified potential target of SARS-CoV-2, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, **2020**
 31. Nabajyoti Baildya, Abdul Ashik Khan, Narendra Nath Ghosh, Tanmoy Dutta, Asoke P.Chattopadhyay, Screening of potential drug from *Azadirachta Indica* (Neem) extracts for SARS-CoV-2: An insight from molecular docking and MD-simulation studies, *Journal of Molecular Structure*, **2020**
 32. Rimanshee Arya, Amit Das, Vishal Prashar, Mukesh Kumar, Potential inhibitors against papain-like protease of novel coronavirus (SARS-CoV-2) from FDA approved drugs, *ChemRxiv*, **2020**
 33. Ankur Gupta, Anish Pradhan, Vimal K Maurya, Swatantra Kumar, Angila Theengh, Bipin Puri, Shailendra K Saxena, Therapeutic Approaches for SARS-CoV-2 Infection, *Methods*, **2021**
 34. Amiya Das, Deepti Pandita, Gaurav Kumar Jain, Pallavi Agarwal, Ajmer Singh Grewal, Roop K. Khar, Viney Lather, Role of phytoconstituents in the management of COVID-19, *Chemico-Biological Interactions*, **2021**
 35. ClinicalTrials.gov, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04361422> (Erişim tarihi: **Mayıs 2022**).
 36. Agbonlahor Okhuarobo, Joyce Ehizogie Falodun, Osayemwenre Erharuyi, Vincent Imieje, Abiodun Falodun, Peter Langer, Harnessing the medicinal properties of *Andrographis paniculata* for diseases and beyond: a review of its phytochemistry and pharmacology, *Asian Pacific journal of tropical disease*, **2014**
 37. Fangfang Huang, Ying Li, Elaine Lai-Han Leung, Xiaohua Liu, Kaifeng Liu, Qu Wang, Yongqi Lan, Xiaoling Li, Haibing Yu, Liao Cu, Hui Luo, Lianxiang Luo, A review of therapeutic agents and Chinese herbal medicines against SARS-COV-2 (COVID-19), *Pharmacological Research*, **2020**
 38. Jia-Wen Song, Jia-Ying Long, Long Xie, Lin-Lin Zhang, Qing-Xuan Xie, Hui-Juan Chen, Mao Deng, Xiao-Fang Li, Applications, phytochemistry, pharmacological effects, pharmacokinetics, toxicity of *Scutellaria baicalensis* Georgi. and its probably potential therapeutic effects on COVID-19: a review, *Chinese Medicine*, **2020**
 39. Stephanie Chedraoui, Alain Abi-Rizk, Marc El-Beyrouthy, Lamis Chalak, Naim Ouaini, Loïc Rajjou, *Capparis spinosa* L. in A Systematic Review: A Xerophilous Species of Multi Values and Promising Potentialities for Agrosystems under the Threat of Global Warming, *Frontiers in Plant Science*, **2017**
 40. Deng-hai Zhang, Kun-lun Wu, Xue Zhang, Sheng-qiong Deng, Bin Peng, In silico screening of Chinese herbal medicines with the potential to directly inhibit 2019 novel coronavirus, *Journal of Integrative Medicine*, **2020**

41. Anchalee Prasansuklab, Atsadang Theerasri, Panthakarn Rangsinth, Chanin Sillapachaiyaporn, Siriporn Chuchawankul, Tewin Tencomnao, Anti-COVID-19 drug candidates: a review on potential biological activities of natural products in the management of new coronavirus infection, *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, **2020**
42. Chih-ChunWen, Hui-MingChen, Ning-SunYang, Chapter 6- Developing Phytocompounds from Medicinal Plants as Immunomodulators, *Advances in Botanical Research*, **2012**
43. Jéssica Silva dos Santos, João Pedro Gonçalves Cirino, Patrícia de Oliveira Carvalho, Manoela Marques Ortega, The Pharmacological Action of Kaempferol in Central Nervous System Diseases: A Review, *Frontiers in Pharmacology*, **2021**
44. Farzad Aslani, Abdul Shukor Juraimi, Muhammad Saiful Ahmad-Hamdani, Farahnaz Sadat, Golestan Hashemi, Md Amirul Alam, Md Abdul Hakim, Md Kamal Uddin, Effects of *Tinospora tuberculata* leaf methanol extract on seedling growth of rice and associated weed species in hydroponic culture, *Journal of Integrative Agriculture*, **2016**
45. BOC Sciences, <https://www.bocsci.com/product/n-cis-feruloyltyramine-cas-80510-09-4-477449.html> (Erişim tarihi: **19 Mayıs 2022**)
46. U. Woelfle, B. Simon-Haarhaus, I. Merfort, C.M. Schempp, *Reseda luteola* L. extract displays antiproliferative and pro-apoptotic activities that are related to its major flavonoids, *PHYTOTHERAPY RESEARCH*, **2010**
47. Khare C. (2007) *Reseda luteola* Linn.. In: Khare C. (eds) *Indian Medicinal Plants*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-70638-2_1328 (Erişim tarihi: **Mayıs 2022**)
48. Mohammad Mahfuz Ali Khan Shawan, Sajal Kumar Halder, Md. Ashraful Hasan, Luteolin and abyssinone II as potential inhibitors of SARS-CoV-2: an in silico molecular modeling approach in battling the COVID-19 outbreak, *Bulletin of the National Research Centre*, **2021**
49. Plants of the World Online, <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:850861-1> (Erişim tarihi: **Mayıs 2022**)
50. Subha Rastogi, Madan Mohan Pandey, Ajay Kumar Singh Rawat, Medicinal plants of the genus *Betula*—Traditional uses and a phytochemical—pharmacological review, *Journal of Ethnopharmacology*, **2015**
51. Meenakshi Negi, Pooja A. Chawla, Abdul Faruk, Viney Chawla, Role of heterocyclic compounds in SARS and SARS CoV-2 pandemic, *Bioorganic Chemistry*, **2020**
52. Ji-Young Park, Jang Hoon Kim, Young Min Kim, Hyung Jae Jeong, Dae Wook Kim, Ki Hun Park, Hyung-Jun Kwon, Su-Jin Park, Woo Song Lee, Young Bae Ryu, Tanshinones as selective and slow-binding inhibitors for SARS-CoV cysteine proteases, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2012**

53. About RCSB PDB: Enabling Breakthroughs in Scientific and Biomedical Research and Education, <https://www.rcsb.org/pages/about-us/index> (Erişim Tarihi: **Mayıs 2022**)
54. Surabhi, B. K. Singh, COMPUTER AIDED DRUG DESIGN: AN OVERVIEW, *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, **2018**
55. Irwin D. Kuntz, Jeffrey M. Blaney, Stuart J. Oatley, Robert Langridge, Thomas E. Ferrin, A geometric approach to macromolecule-ligand interactions, *Journal of Molecular Biology (JMB)*, **1982**
56. Diane Joseph-McCarthy, Computational approaches to structure-based ligand design, *Pharmacology & Therapeutics*, **1999**
57. Evanthia Liota, George Spyrou, Demetrios K. Vassilatis, Zoe Cournia, Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: Principles, Applications and Recent Advances, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2014**
58. Adel Hamza, Ning-Ning Wei, and Chang-Guo Zhan, Ligand-Based Virtual Screening Approach Using a New Scoring Function, *Journal of Chemical Information and Modeling*, **2012**
59. Bilal Shaker, Sajjad Ahmad, Jingyu Lee, Chanjin Jung ve Dokyun Na, In silico methods and tools for drug discovery, *Computers in Biology and Medicine*, **2021**
60. Xuan-Yu Meng, Hong-Xing Zhang, Mihaly Mezei, Meng Cu, Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery, *Current computer aided drug design*, **2011**
61. Handwiki,
https://handwiki.org/wiki/Software:List_of_protein-ligand_docking_software
(Erişim Tarihi: **Aralık 2022**)
62. Keşkek Y., Kantaron Flavonoidlerinin Moleküler Modelleme ve Deneysel Çalışmalar İle Depresyon Tedavisinde Kullanılacak Yeni Mao-A İnhibitörlerinin Tasarlanması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara **2016**.
63. Douglas B. Kitchen, Hélène Decornez, John R. Furr, Jürgen Bajorath, Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications, *Nature Reviews Drug Discovery*, **2004**.
64. Gaussian, <https://gaussian.com/> (Erişim Tarihi: **Mayıs 2022**).
65. Oleg Trott, 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*, **2009**
66. ZINC15 Database, <https://zinc15.docking.org/> (Erişim tarihi: **Mayıs 2022**)
67. John J Irwin, Brian K Shoichet, ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening, *Journal of Chemical Information and Modeling*, **2005**
68. Technology Networks Drug Discovery, <https://www.technologynetworks.com/drug-discovery/articles/what-is-adme-336683> (Erişim tarihi: **Mayıs 2022**)
69. pkCSM, <http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/theory> (Erişim tarihi: **Mayıs 2021**)

70. Antoine Daina, Olivier Michielin, Vincent Zoete, SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules, Scientific Reports, **2017**
71. Dassault Systemes, <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download> (Erişim Tarihi: **Mayıs 2022**)

EK

receptor = 7lbsb.pdbqt

center_x = 19.665

center_y = 67.056

center_z = -4.11

size_x = 20

size_y = 20

size_z = 16

exhaustiveness = 16

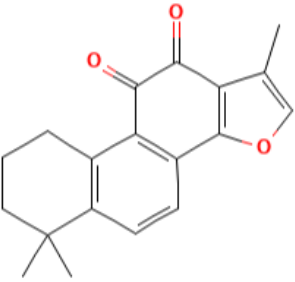
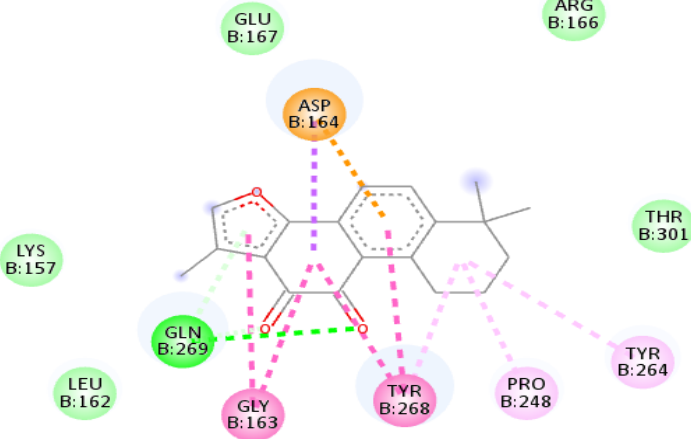
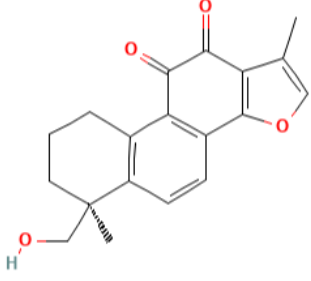
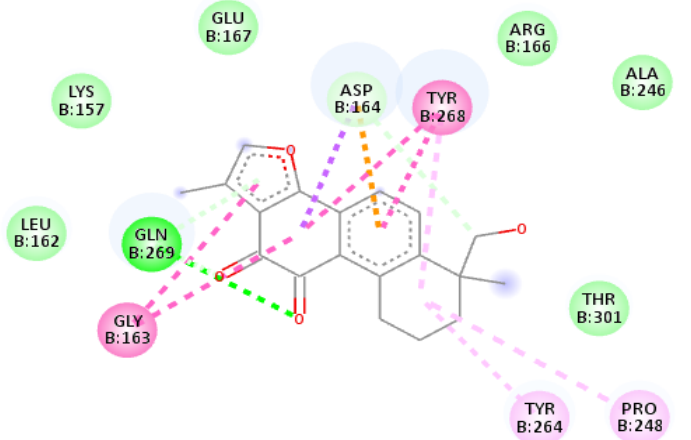
EK.1 Sanal Ligand Taramada kullanılan config dosyası

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

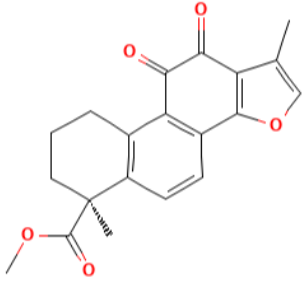
for ($i=0;$i<@arr_file;$i++)
{
print "@arr_file[$i]\n";
$name=split(/\./,@arr_file[$i]);
}
for ($i=0;$i<@arr_file;$i++)
{
chomp @arr_file[$i];
print "@arr_file[$i]\n";
system("vina.exe --config conf_vs.txt --ligand @arr_file[$i] --log @arr_file[$i]_log.log");
}
```

EK.2 Sanal Ligand Taramada kullanılan dosya

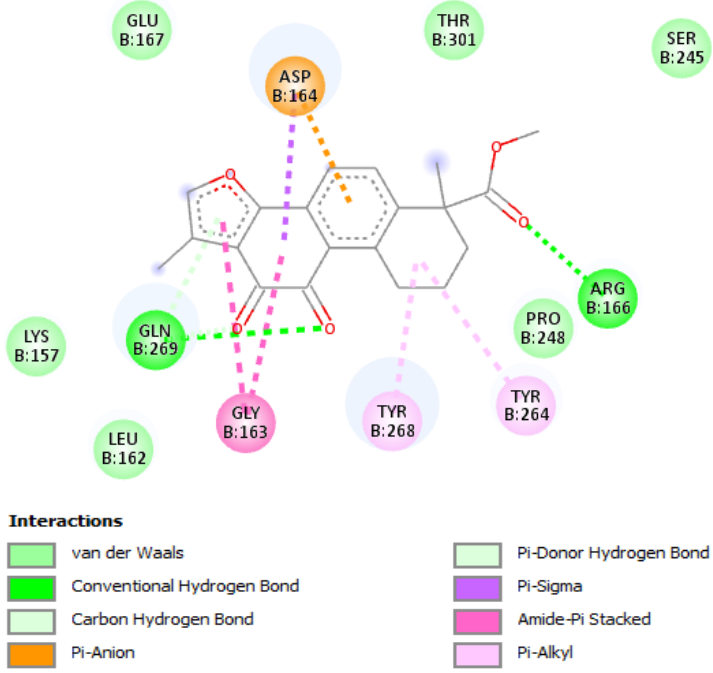
EK3. Fitokimyasal Doking Sonucu Etkileşimleri

Ligand Adı ve Hidrojen Bağları	2D Etkileşimler ve Bağlanma Enerjisi Değeri										
<p>Tanşınon IIA</p>  <p>GLN269 2.46 Å GLN269 2.57 Å GLN269 3.59 Å</p>	 <p>Interactions</p> <table border="0"> <tr> <td> van der Waals</td> <td> Pi-Sigma</td> </tr> <tr> <td> Conventional Hydrogen Bond</td> <td> Pi-Pi T-shaped</td> </tr> <tr> <td> Carbon Hydrogen Bond</td> <td> Amide-Pi Stacked</td> </tr> <tr> <td> Pi-Anion</td> <td> Alkyl</td> </tr> <tr> <td> Pi-Donor Hydrogen Bond</td> <td> Pi-Alkyl</td> </tr> </table> <p>Bağlanma enerjisi: -9.5 kcal/mol</p>	van der Waals	Pi-Sigma	Conventional Hydrogen Bond	Pi-Pi T-shaped	Carbon Hydrogen Bond	Amide-Pi Stacked	Pi-Anion	Alkyl	Pi-Donor Hydrogen Bond	Pi-Alkyl
van der Waals	Pi-Sigma										
Conventional Hydrogen Bond	Pi-Pi T-shaped										
Carbon Hydrogen Bond	Amide-Pi Stacked										
Pi-Anion	Alkyl										
Pi-Donor Hydrogen Bond	Pi-Alkyl										
<p>Tanşınon IIB</p>  <p>GLN269 2.45 Å GLN269 2.58 Å GLN269 3.53 Å ASP164 3.61 Å</p>	 <p>Interactions</p> <table border="0"> <tr> <td> van der Waals</td> <td> Pi-Sigma</td> </tr> <tr> <td> Conventional Hydrogen Bond</td> <td> Pi-Pi T-shaped</td> </tr> <tr> <td> Carbon Hydrogen Bond</td> <td> Amide-Pi Stacked</td> </tr> <tr> <td> Pi-Anion</td> <td> Alkyl</td> </tr> <tr> <td> Pi-Donor Hydrogen Bond</td> <td> Pi-Alkyl</td> </tr> </table> <p>Bağlanma enerjisi: -9.3 kcal/mol</p>	van der Waals	Pi-Sigma	Conventional Hydrogen Bond	Pi-Pi T-shaped	Carbon Hydrogen Bond	Amide-Pi Stacked	Pi-Anion	Alkyl	Pi-Donor Hydrogen Bond	Pi-Alkyl
van der Waals	Pi-Sigma										
Conventional Hydrogen Bond	Pi-Pi T-shaped										
Carbon Hydrogen Bond	Amide-Pi Stacked										
Pi-Anion	Alkyl										
Pi-Donor Hydrogen Bond	Pi-Alkyl										

Methyl tanşınonat

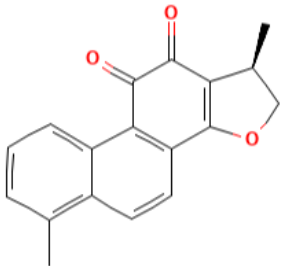


GLN269 2.48 Å
 GLN269 3.00 Å
 GLN269 3.41 Å
 ARG166 3.08 Å

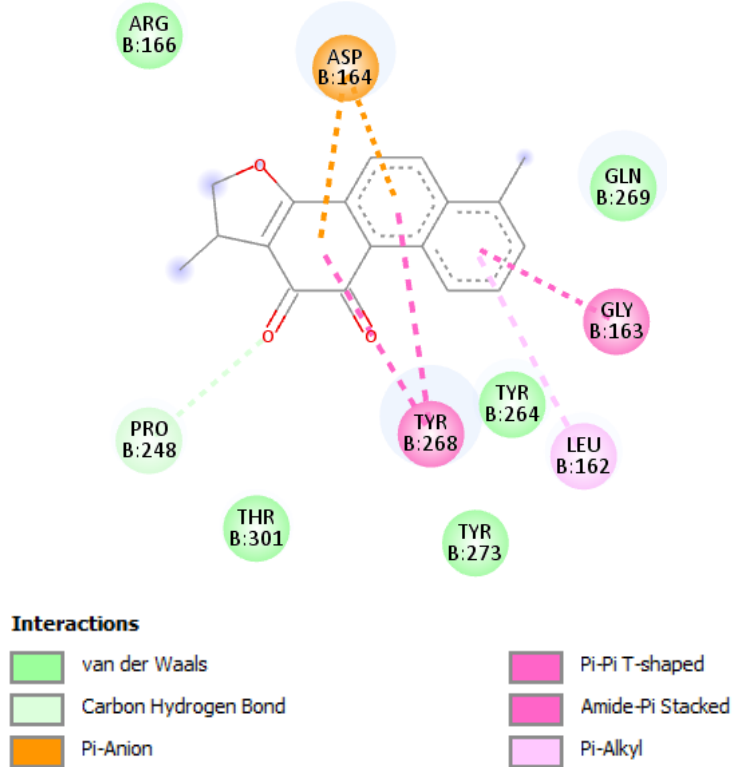


Bağlanma enerjisi: -9.3 kcal/mol

Dihidrotanşınon I

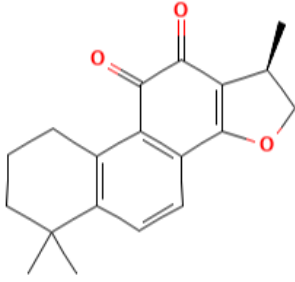


PRO248 3.31 Å

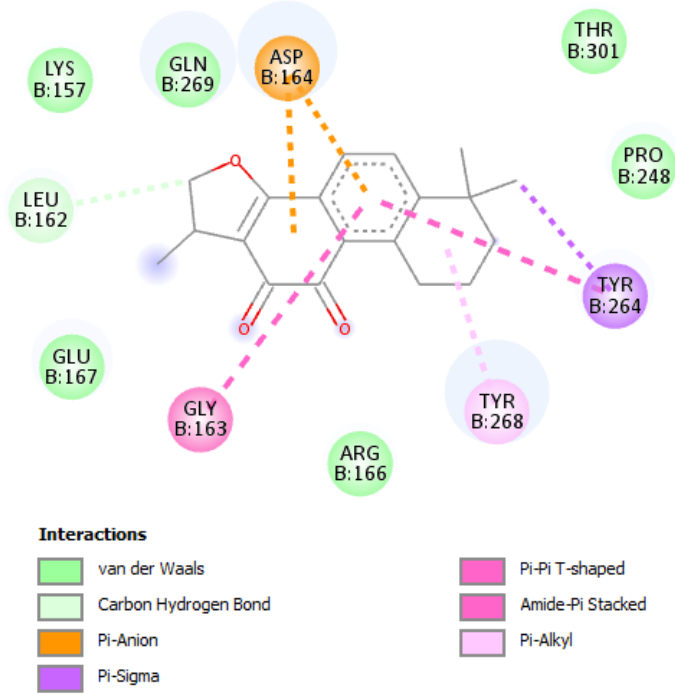


Bağlanma enerjisi: -9.3 kcal/mol

Kriptotaşınon

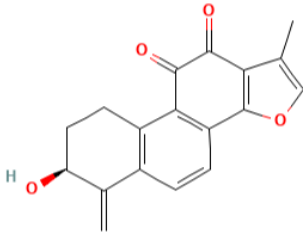


LEU162 3.44 Å



Bağlanma enerjisi: -9.2 kcal/mol

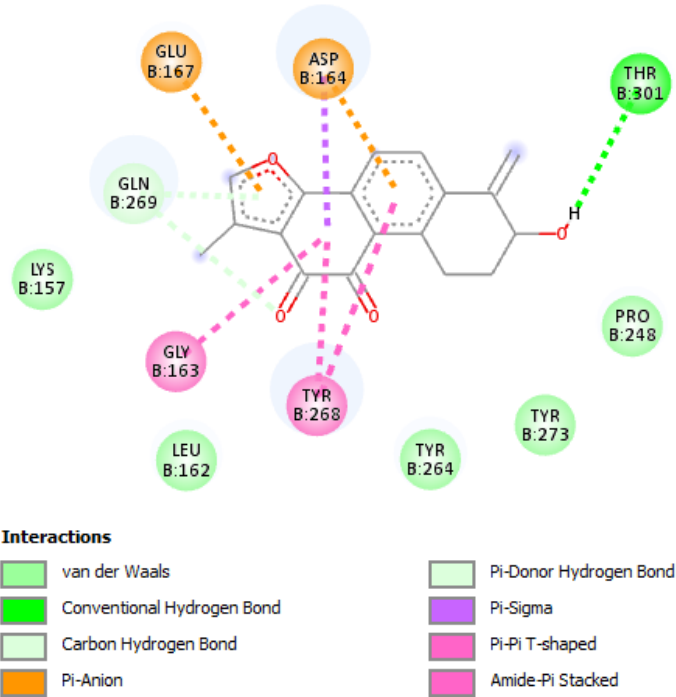
3-Hidroksimetilen taşınkinon



GLN269 2.48 Å

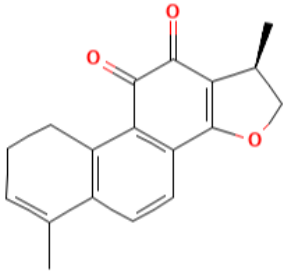
GLN269 3.54 Å

THR301 2.83 Å

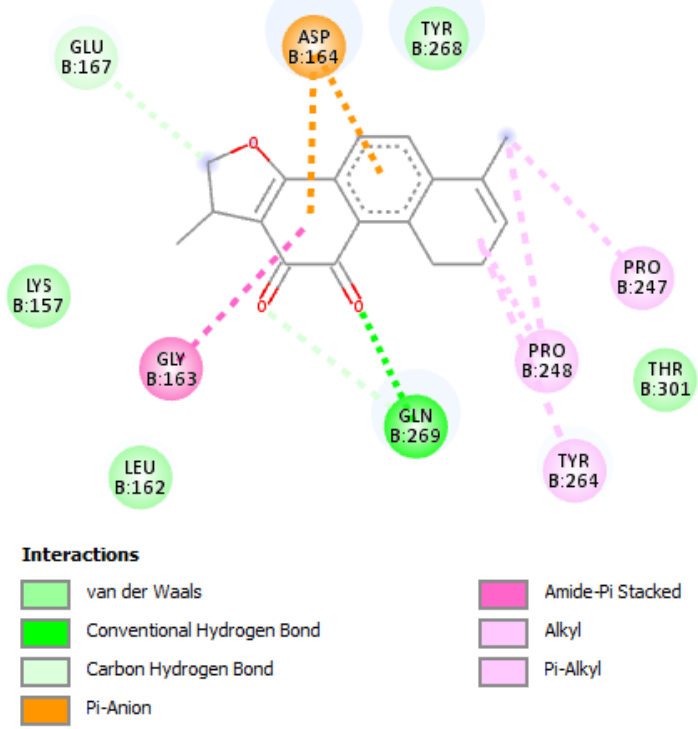


Bağlanma enerjisi: -9.2 kcal/mol

Tetrahidro tanşınon I

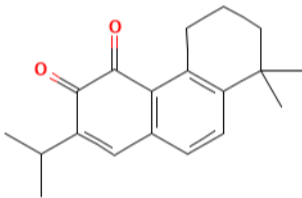


GLN269 2.41 Å
 GLN269 3.57 Å
 GLU167 3.60 Å

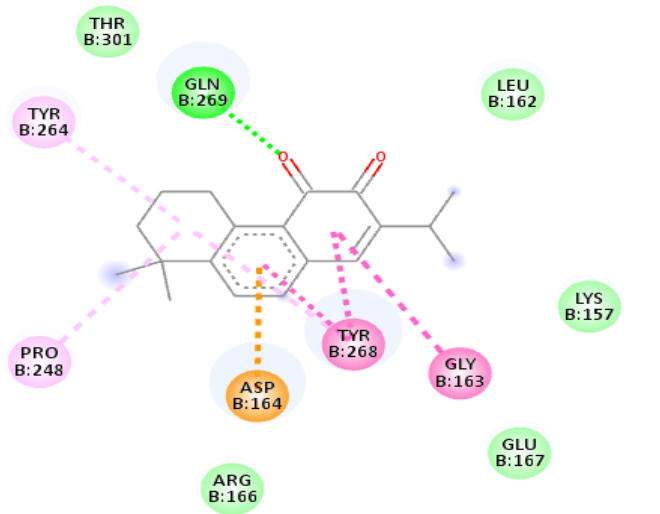


Bağlanma enerjisi: -9.1 kcal/mol

Miltiron

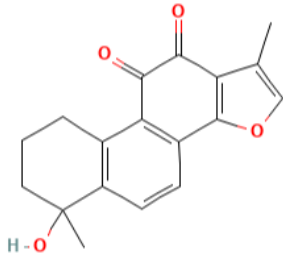


GLN269 2.51 Å

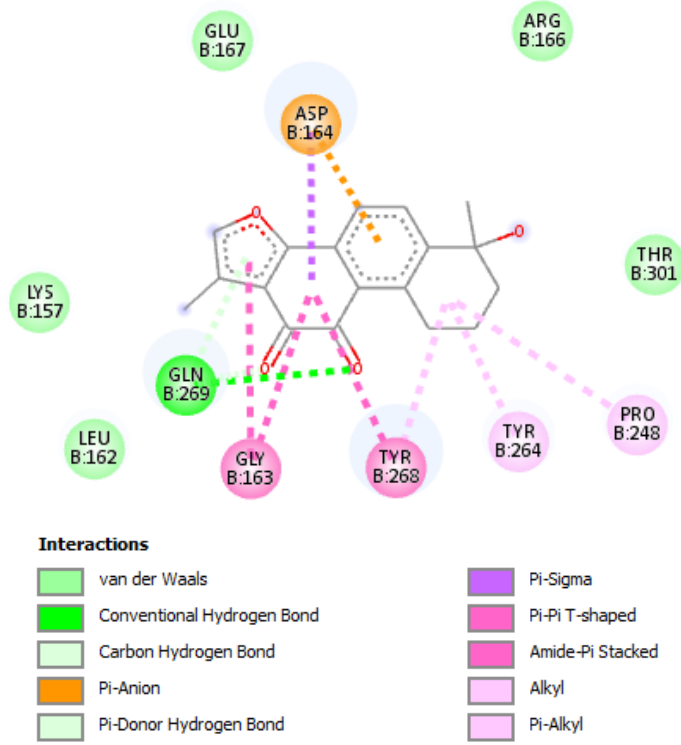


Bağlanma enerjisi: -9.1 kcal/mol

Tanşinol B

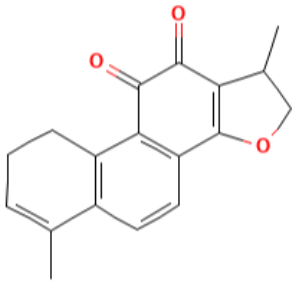


GLN269 2.46 Å
 GLN269 2.60 Å
 GLN269 3.48 Å

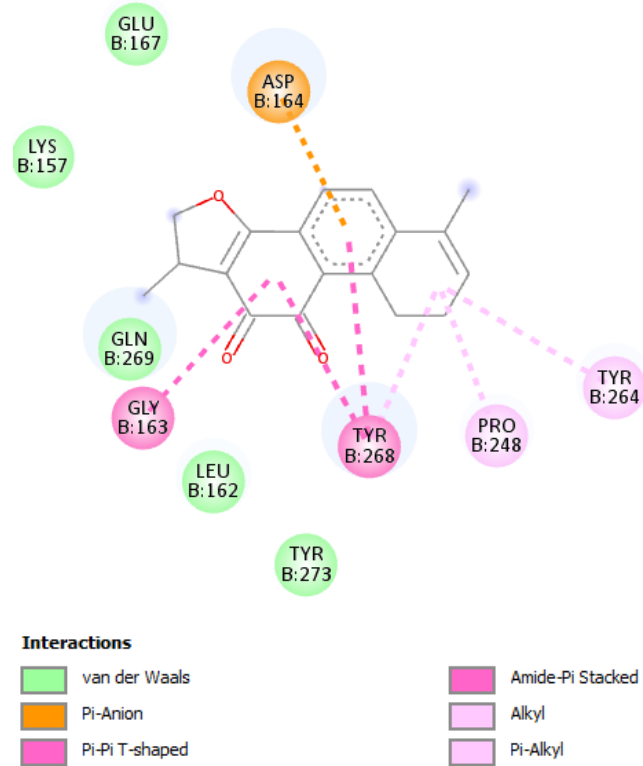


Bağlanma enerjisi: -9.0 kcal/mol

Trijuganon B

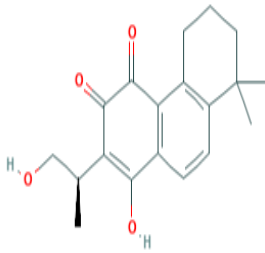


-

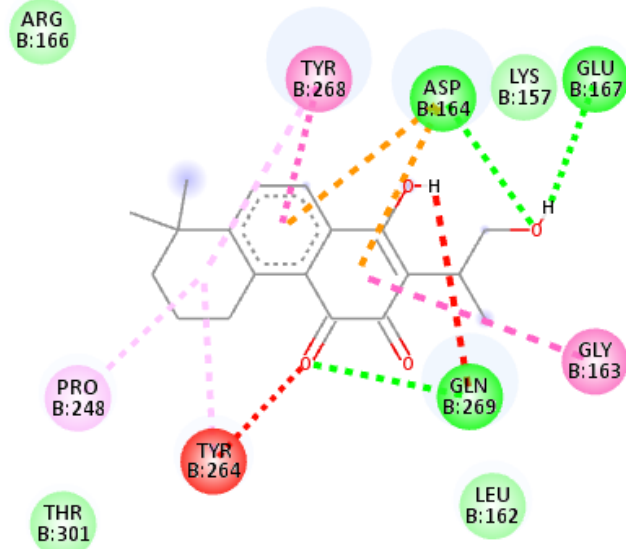


Bağlanma enerjisi: -9.0 kcal/mol

Neokriptotanşinon



ASP164 2.01 Å
 GLN269 2.28 Å
 GLN269 2.36 Å
 GLU167 2.36 Å
 TYR264 2.97 Å

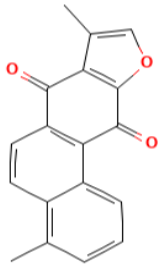


Interactions

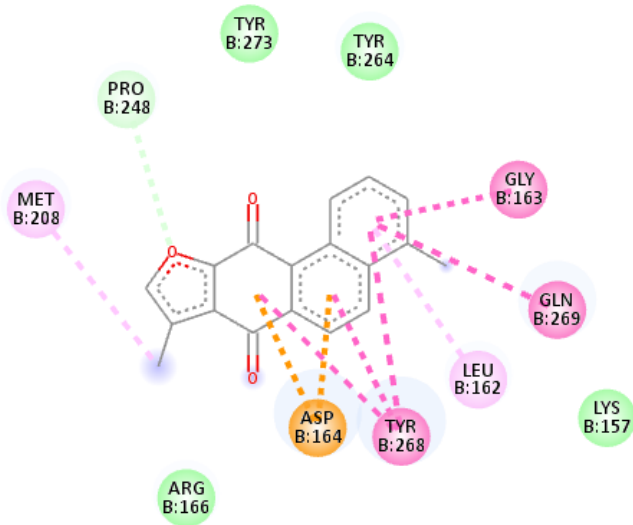
- | | |
|-------------------------------|------------------|
| van der Waals | Pi-Pi T-shaped |
| Conventional Hydrogen Bond | Amide-Pi Stacked |
| Unfavorable Donor-Donor | Alkyl |
| Unfavorable Acceptor-Acceptor | Pi-Alkyl |
| Pi-Anion | |

Bağlanma enerjisi: -8.8 kcal/mol

Izotanşinon I



PRO248 3.58 Å

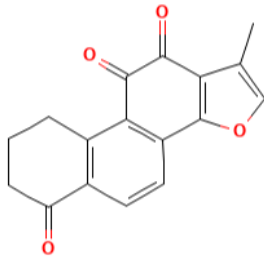


Interactions

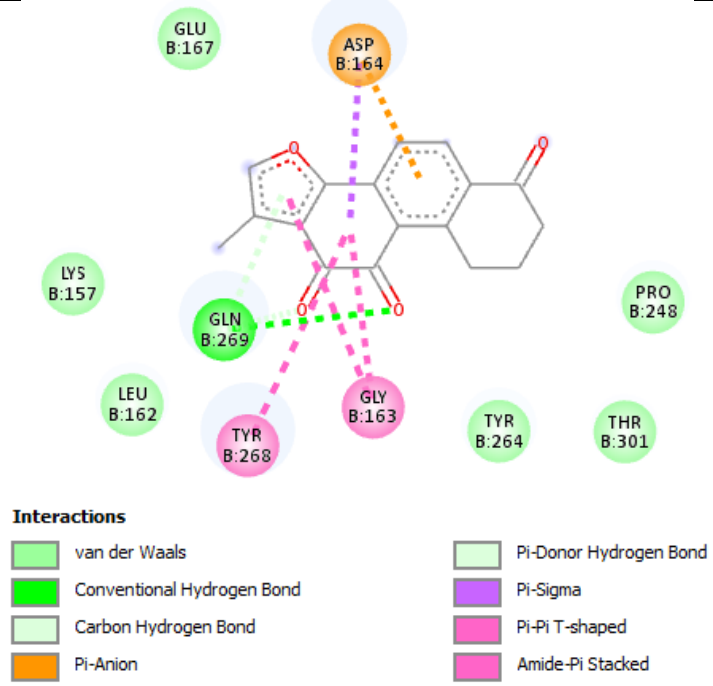
- | | |
|----------------------|------------------|
| van der Waals | Amide-Pi Stacked |
| Carbon Hydrogen Bond | Alkyl |
| Pi-Anion | Pi-Alkyl |
| Pi-Pi T-shaped | |

Bağlanma enerjisi: -8.8 kcal/mol

Nortanşinon

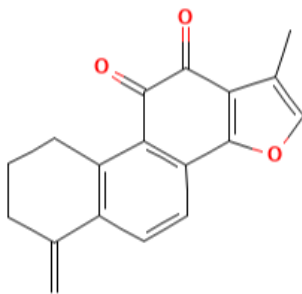


GLN269 2.45 Å
 GLN269 2.57 Å
 GLN269 3.52 Å

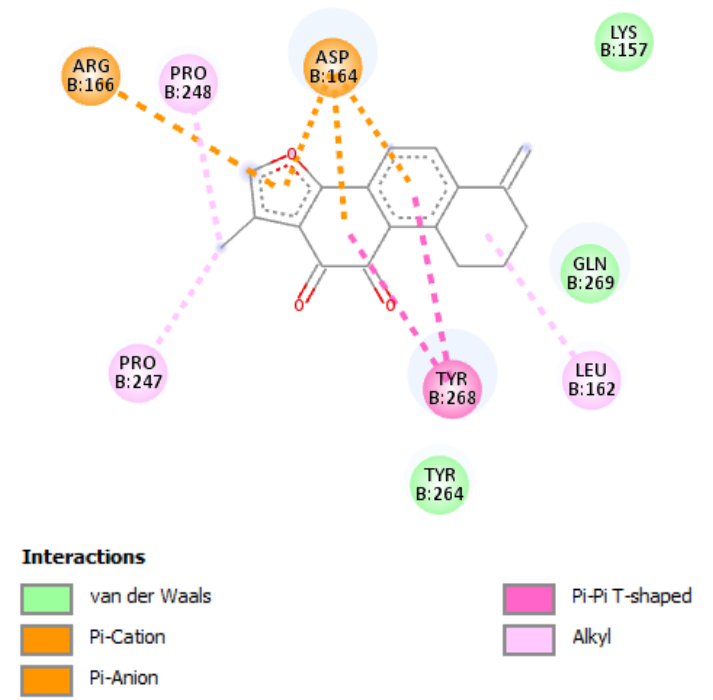


Bağlanma enerjisi: -8.8 kcal/mol

Metilentanşinkinon

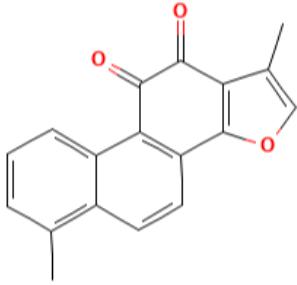


-

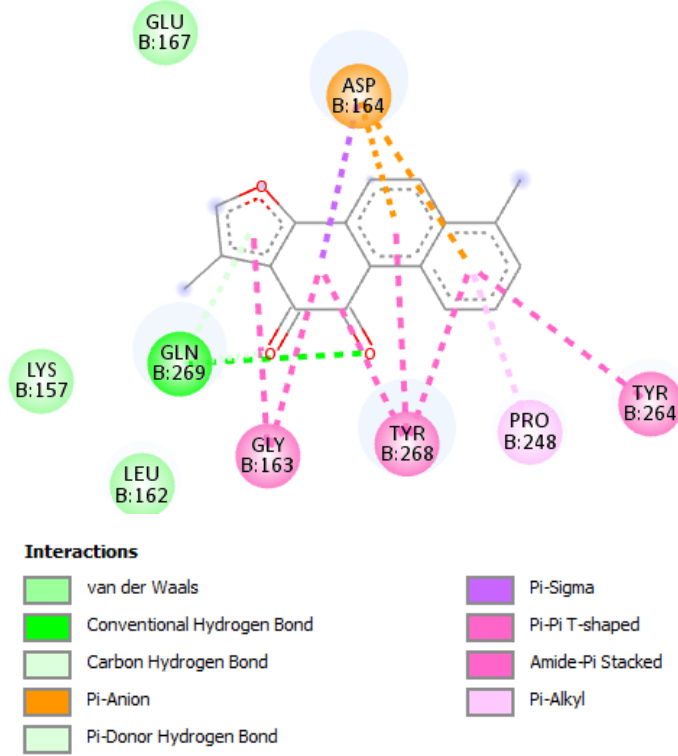


Bağlanma enerjisi: -8.8 kcal/mol

Tanşınon

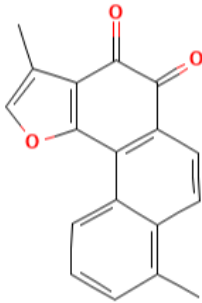


GLN269 2.48 Å
 GLN269 2.78 Å
 GLN269 3.48 Å

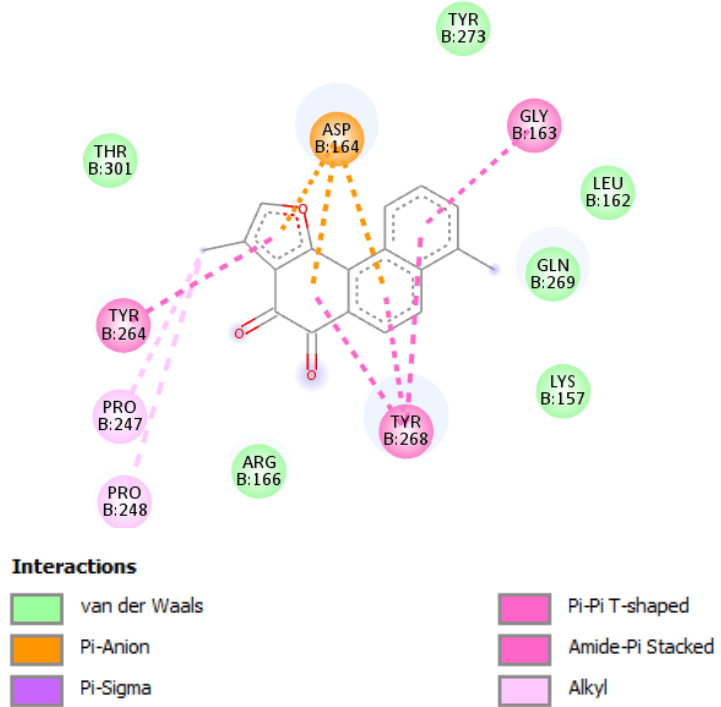


Bağlanma enerjisi: -8.8 kcal/mol

Izotanşınon II

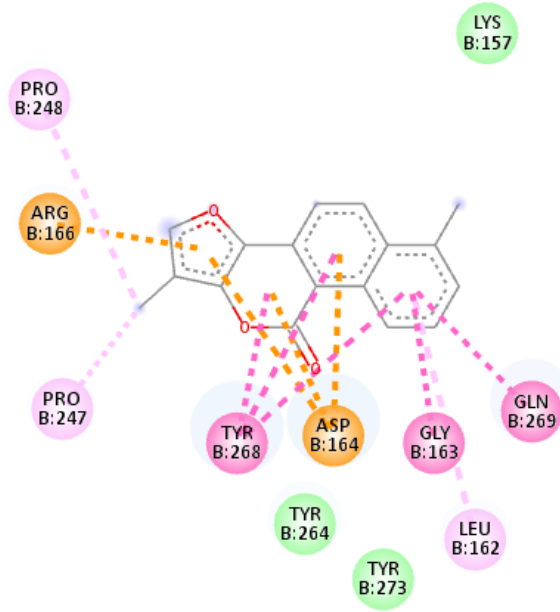
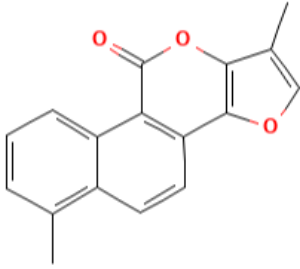


-



Bağlanma enerjisi: -8.7 kcal/mol

Tanşinlakton

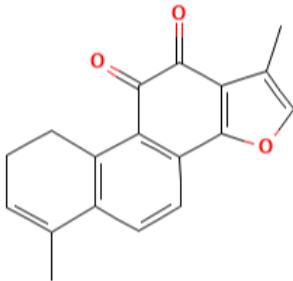


Interactions

- | | |
|----------------|------------------|
| van der Waals | Amide-Pi Stacked |
| Pi-Cation | Alkyl |
| Pi-Anion | Pi-Alkyl |
| Pi-Pi T-shaped | |

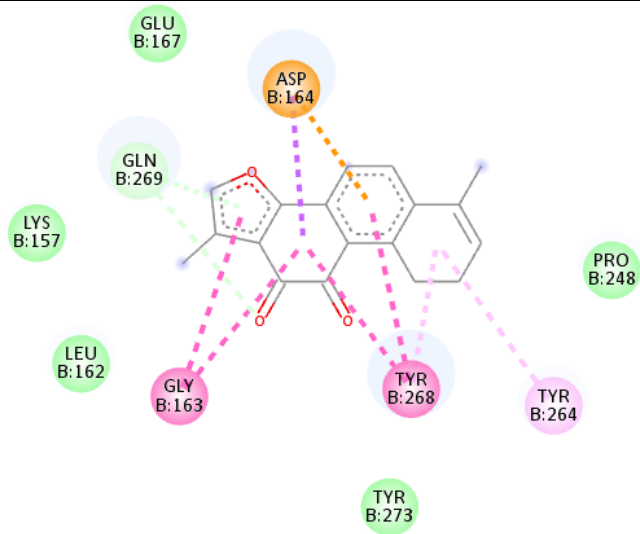
Bağlanma enerjisi: -8.7 kcal/mol

1,2-Dihidro tanşinkinon



GLN269 2.50 Å

GLN269 3.46 Å

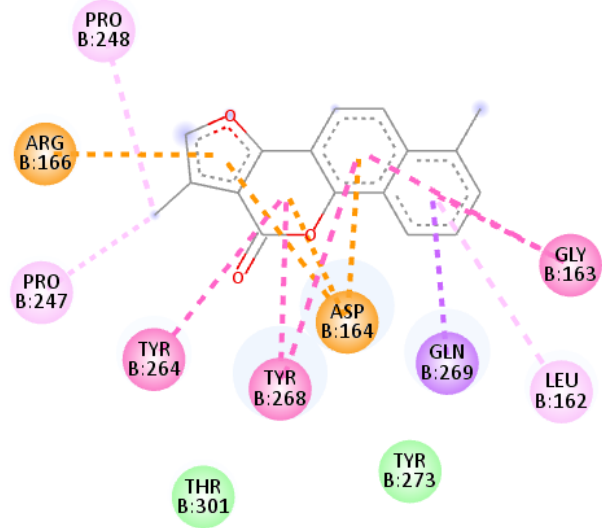
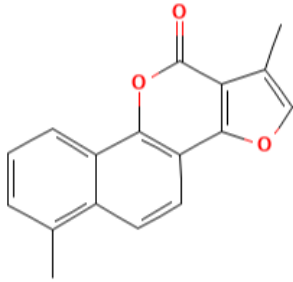


Interactions

- | | |
|------------------------|------------------|
| van der Waals | Pi-Sigma |
| Carbon Hydrogen Bond | Pi-Pi T-shaped |
| Pi-Anion | Amide-Pi Stacked |
| Pi-Donor Hydrogen Bond | Pi-Alkyl |

Bağlanma enerjisi: -8.7 kcal/mol

Neo-tanşinlakton

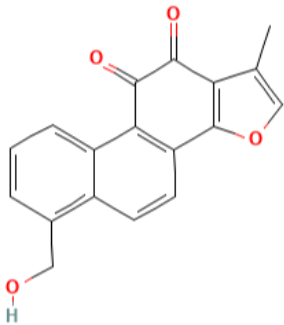


Interactions

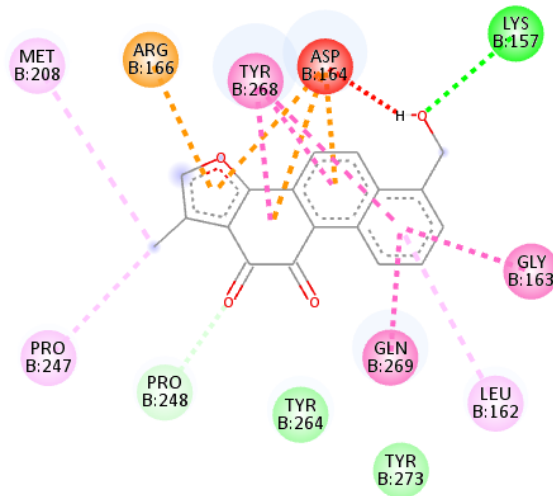


Bağlanma enerjisi: -8.7 kcal/mol

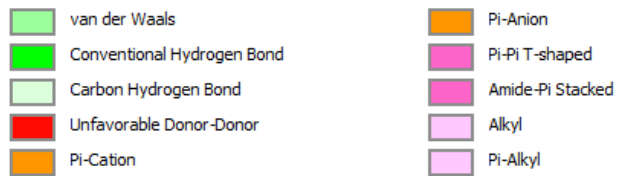
Tanşinol A



ASP164 1.82 Å
LYS157 2.82 Å
PRO248 3.22 Å

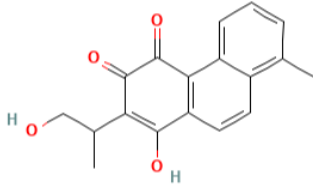


Interactions

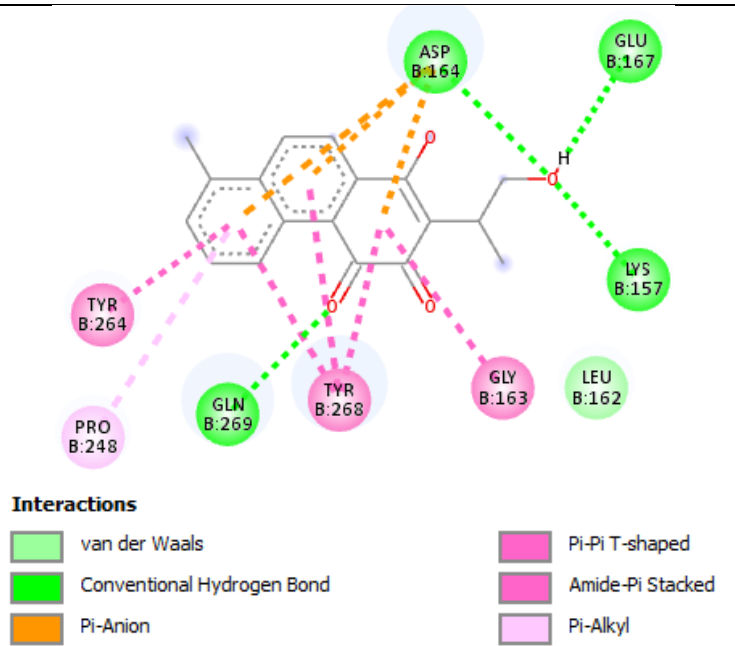


Bağlanma enerjisi: -8.7 kcal/mol

Tanşınon VI
(Danşenksinkun A)

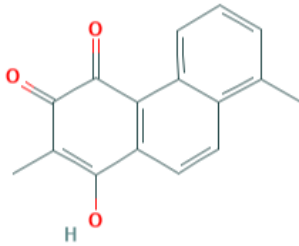


ASP164 1.96 Å
GLU167 2.18 Å
LYS157 2.20 Å
GLN269 2.49 Å

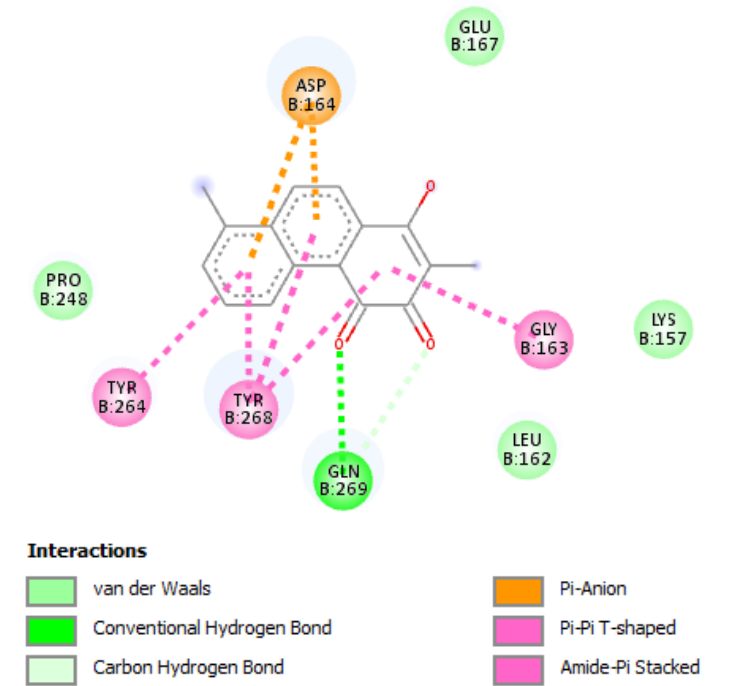


Bağlanma enerjisi: -8.5 kcal/mol

Danşenksinkun C

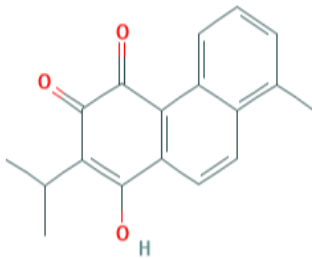


GLN269 2.66 Å
GLN269 3.45 Å

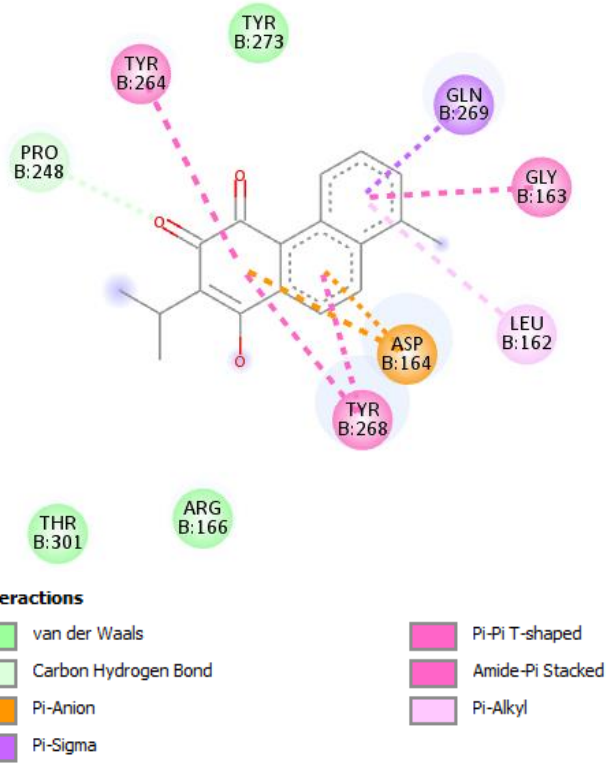


Bağlanma enerjisi: -8.5 kcal/mol

Danşenksinkun B

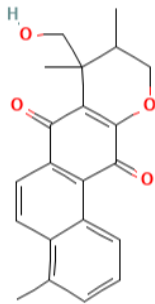


PRO248 3.28 Å



Bağlanma enerjisi: -8.5 kcal/mol

Danşenksinkun D

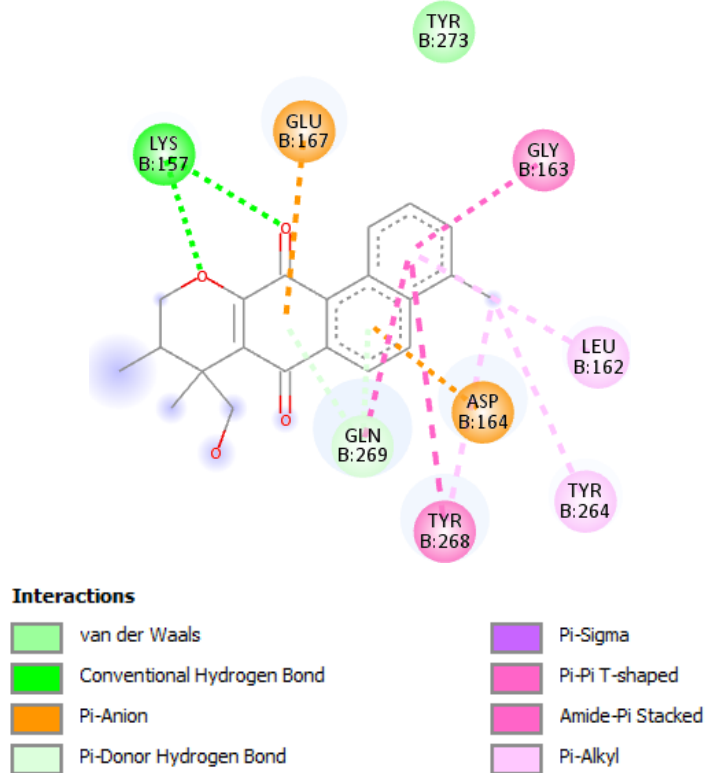


LYS157 2.20 Å

GLN269 2.46 Å

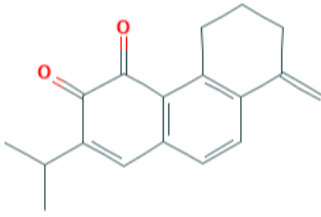
GLN269 3.17 Å

LYS157 6.18 Å

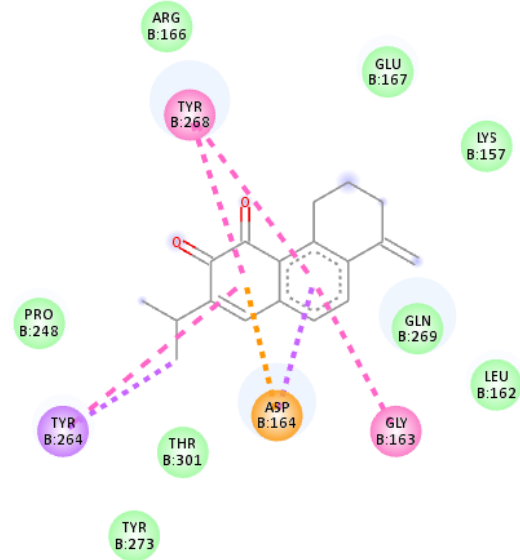


Bağlanma enerjisi: -8.4 kcal/mol

4-Metilenmiltiron



-

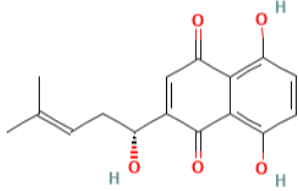


Interactions

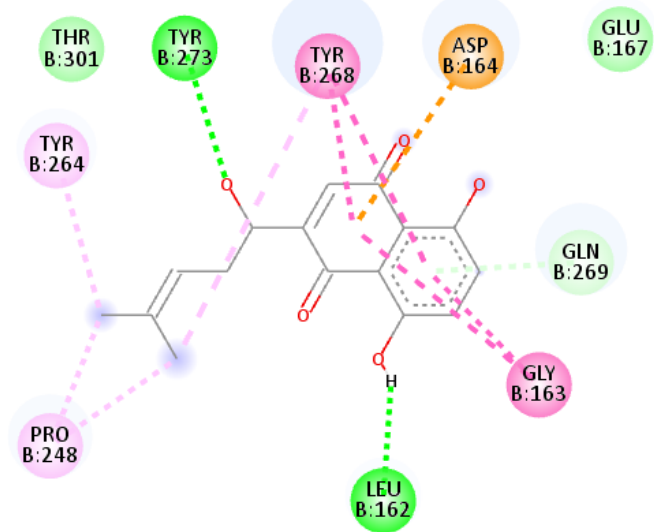
- | | |
|---------------|------------------|
| van der Waals | Pi-Pi T-shaped |
| Pi-Anion | Amide-Pi Stacked |
| Pi-Sigma | |

Bağlanma enerjisi: -8.4 kcal/mol

Şikonin



LEU162 2.01 Å
TYR273 2.79 Å
GLN269 2.97 Å

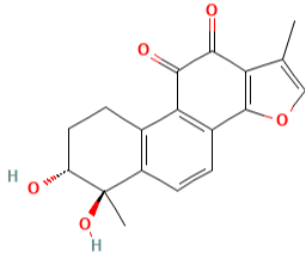


Interactions

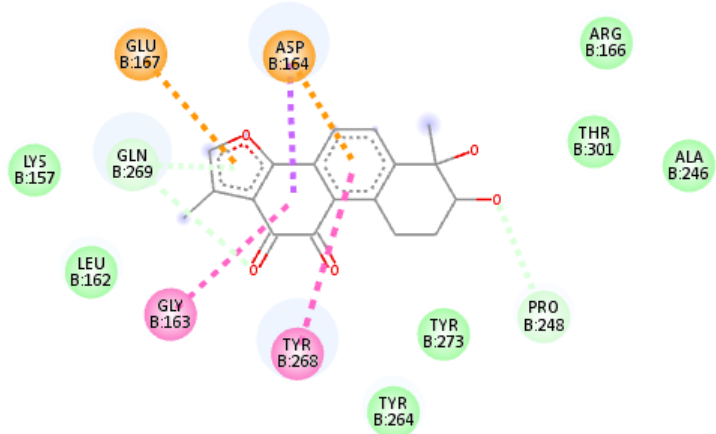
- | | |
|----------------------------|------------------|
| van der Waals | Pi-Pi T-shaped |
| Conventional Hydrogen Bond | Amide-Pi Stacked |
| Pi-Anion | Alkyl |
| Pi-Donor Hydrogen Bond | Pi-Alkyl |
| Pi-Sigma | |

Bağlanma enerjisi: -8.2 kcal/mol

Tanşindiol C



GLN269 2.29 Å
 PRO248 2.92 Å
 GLN269 3.45 Å

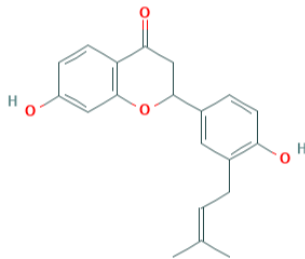


Interactions

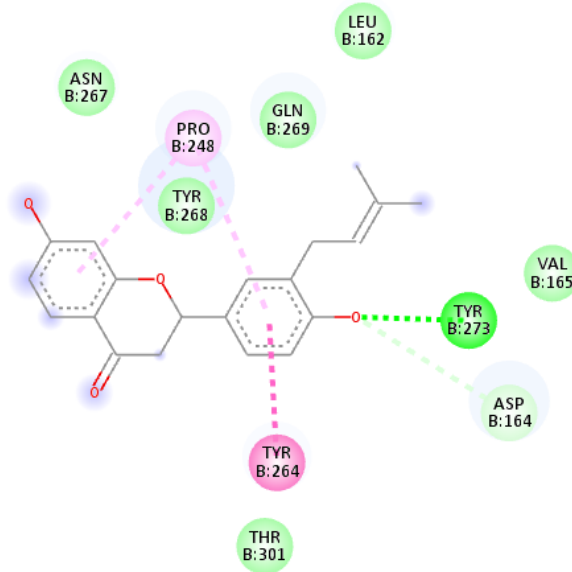
- | | |
|------------------------|------------------|
| Pi-Anion | Pi-Sigma |
| Pi-Donor Hydrogen Bond | Pi-Pi T-shaped |
| van der Waals | Amide-Pi Stacked |
| Carbon Hydrogen Bond | |

Bağlanma enerjisi: -8.1 kcal/mol

Abisinon II



TYR273 2.04 Å
 ASP164 3.29 Å

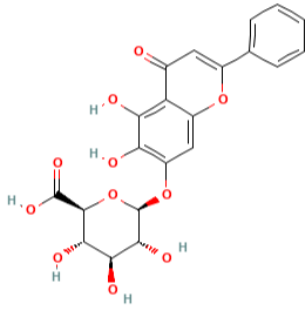


Interactions

- | | |
|----------------------------|---------------|
| van der Waals | Pi-Pi Stacked |
| Carbon Hydrogen Bond | Pi-Alkyl |
| Conventional Hydrogen Bond | |

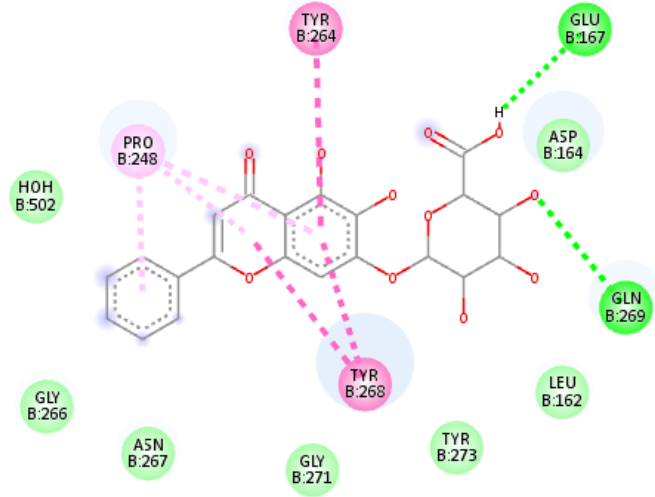
Bağlanma enerjisi: -8.1 kcal/mol

Baikalin



GLN269 2.51 Å

GLU167 2.64 Å

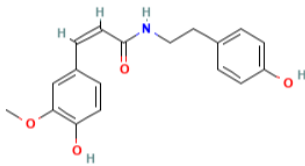


Interactions

- | | |
|----------------------------|----------------|
| van der Waals | Pi-Pi T-shaped |
| Conventional Hydrogen Bond | Pi-Alkyl |

Bağlanma enerjisi: -7.9 kcal/mol

n-cis-Feruloiltiramin



H₂O 502 2.11 Å

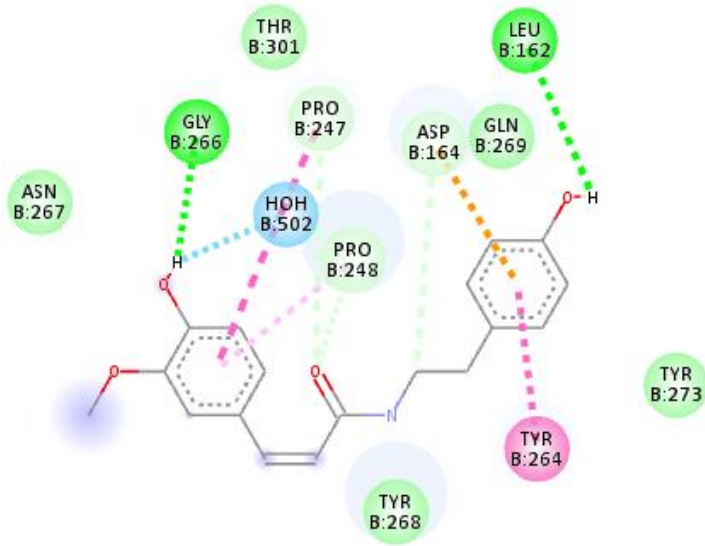
GLY266 2.40 Å

LEU162 2.96 Å

PRO247 3.41 Å

ASP164 3.41 Å

PRO248 3.57 Å

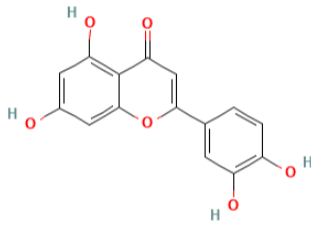


Interactions

- | | |
|----------------------------|------------------|
| van der Waals | Pi-Anion |
| Water Hydrogen Bond | Pi-Pi Stacked |
| Conventional Hydrogen Bond | Amide-Pi Stacked |
| Carbon Hydrogen Bond | Pi-Alkyl |

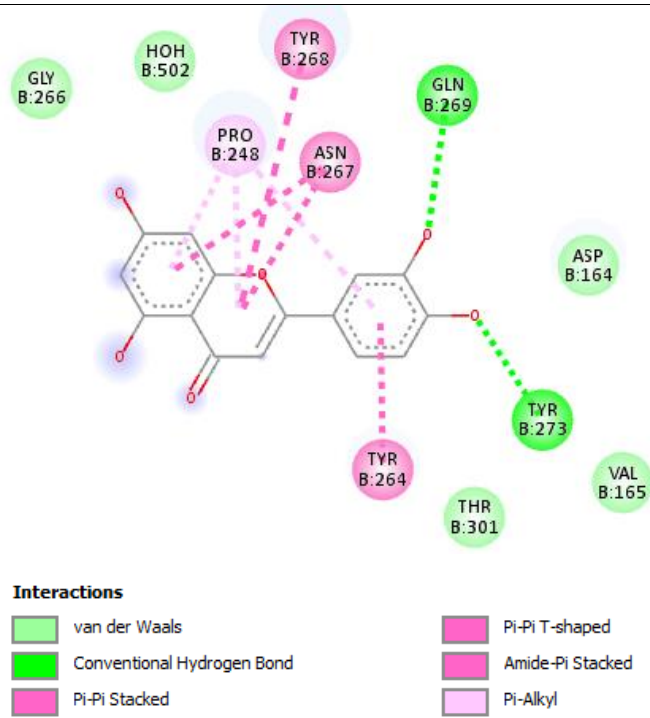
Bağlanma enerjisi: -7.6 kcal/mol

Luteolin



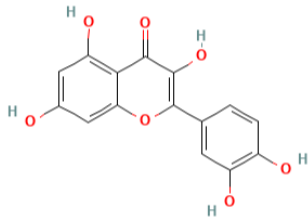
TYR273 2.16 Å

GLN269 2.52 Å



Bağlanma enerjisi: -7.6 kcal/mol

Kuersetin



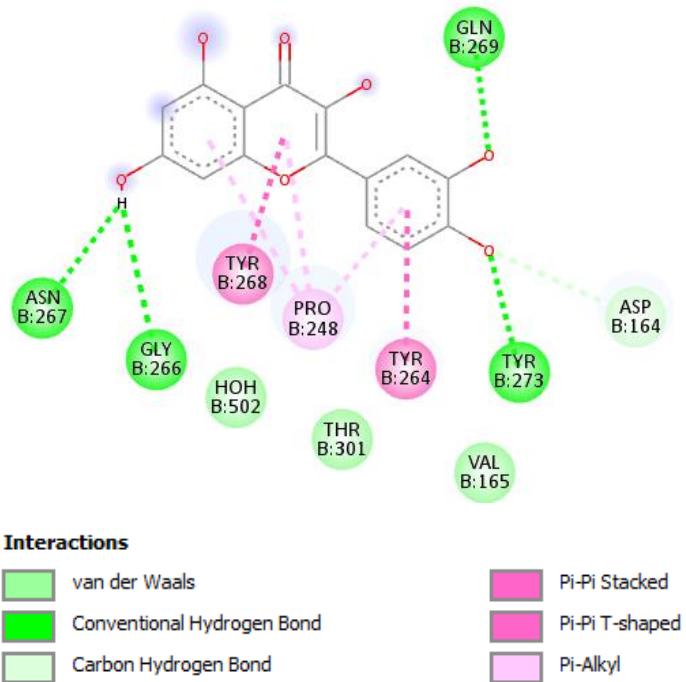
TYR273 2.12 Å

GLN269 2.54 Å

GLY266 2.82 Å

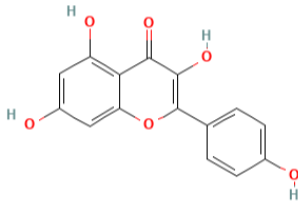
ASN267 3.08 Å

ASP164 3.24 Å

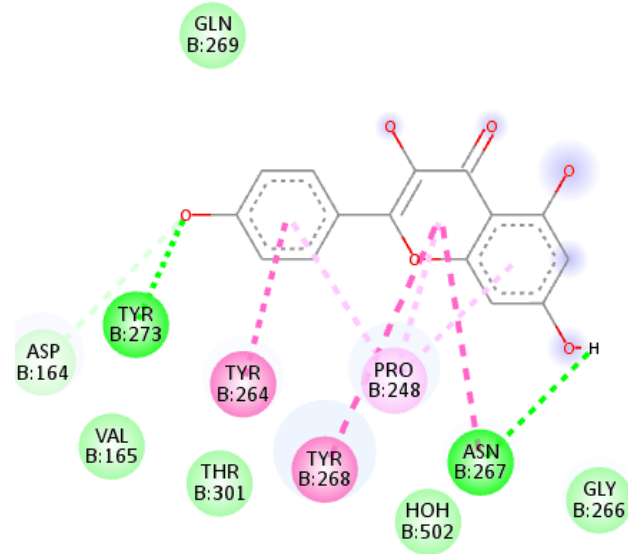


Bağlanma enerjisi: -7.4 kcal/mol

Kaemferol



TYR273 2.11 Å
 ASN267 2.84 Å
 ASP164 3.23 Å

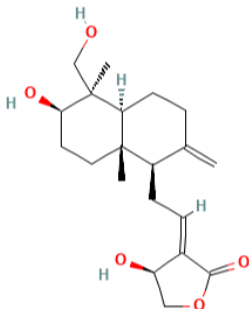


Interactions

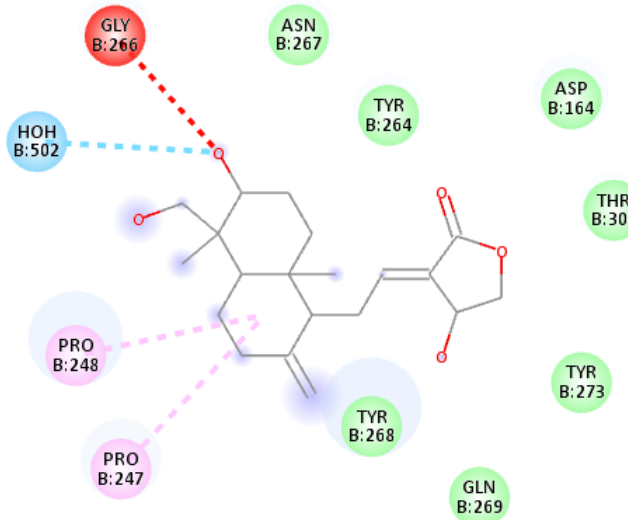
- | | |
|----------------------------|------------------|
| van der Waals | Pi-Pi T-shaped |
| Conventional Hydrogen Bond | Amide-Pi Stacked |
| Carbon Hydrogen Bond | Pi-Alkyl |
| Pi-Pi Stacked | |

Bağlanma enerjisi: -7.4 kcal/mol

Andrografolid



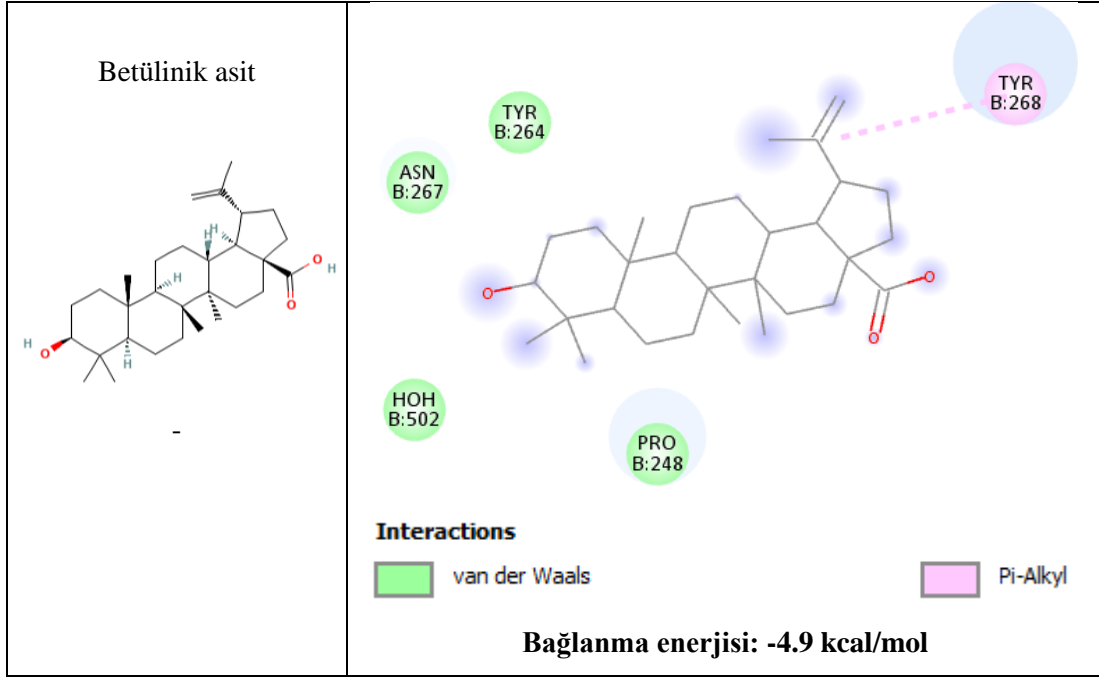
GLY266 2.95 Å
 H₂O 502 3.39 Å



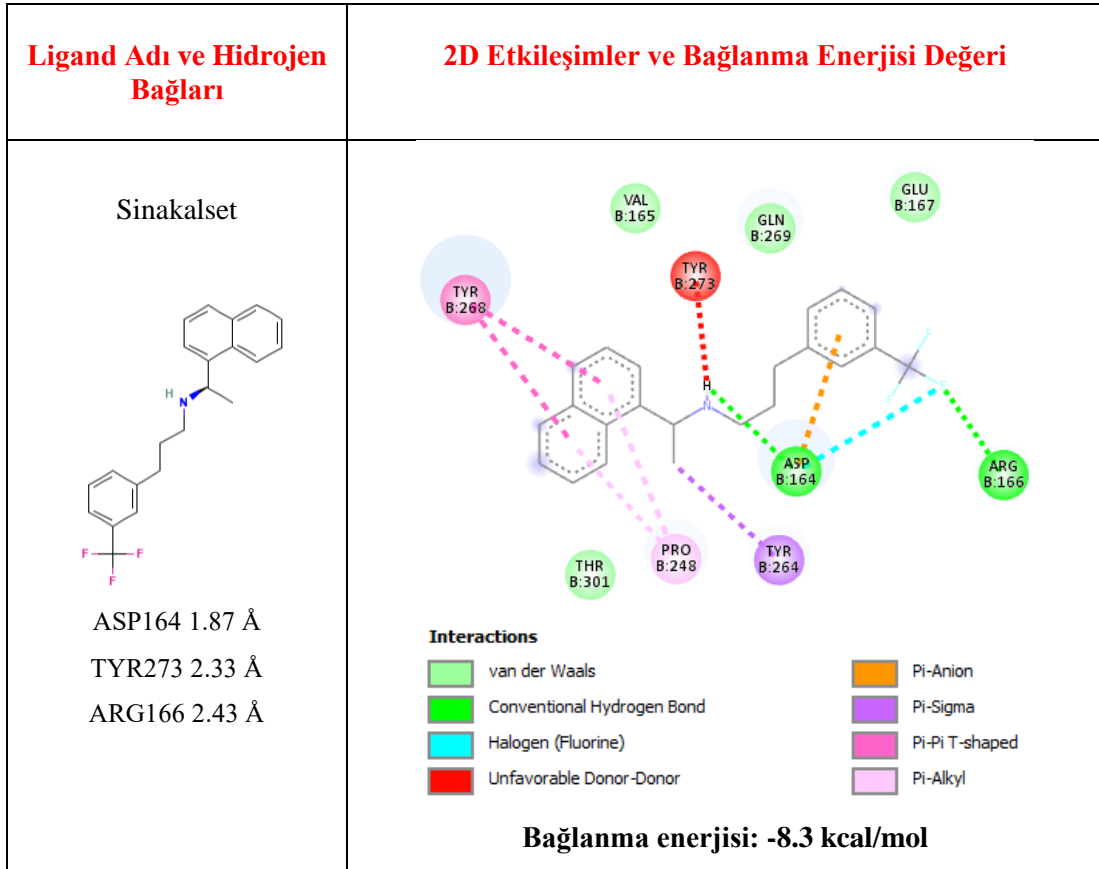
Interactions

- | | |
|---------------------|-------------------------------|
| van der Waals | Unfavorable Acceptor-Acceptor |
| Water Hydrogen Bond | Alkyl |

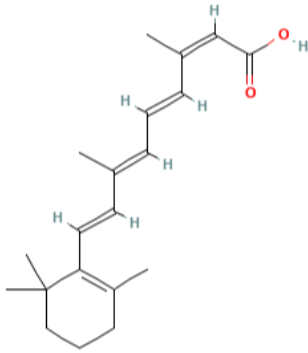
Bağlanma enerjisi: -6.7 kcal/mol



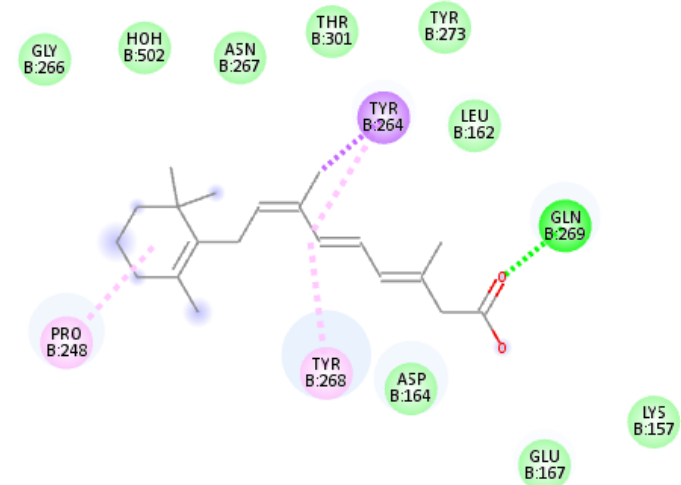
EK4. İlaç Doking Sonucu Etkileşimleri



Izotretinoin



GLN269 2.16 Å

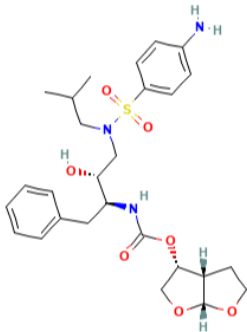


Interactions

- | | |
|----------------------------|----------|
| van der Waals | Alkyl |
| Conventional Hydrogen Bond | Pi-Sigma |
| Pi-Sigma | |

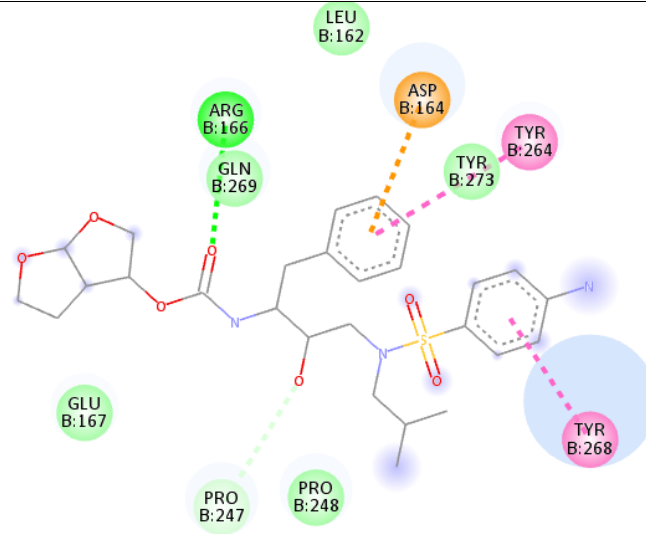
Bağlanma enerjisi: -7.9 kcal/mol

Darunavir



ARG166 2.61 Å

PRO247 3.39 Å

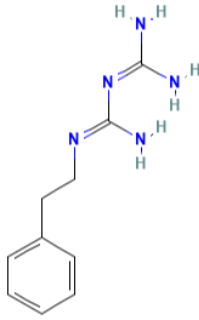


Interactions

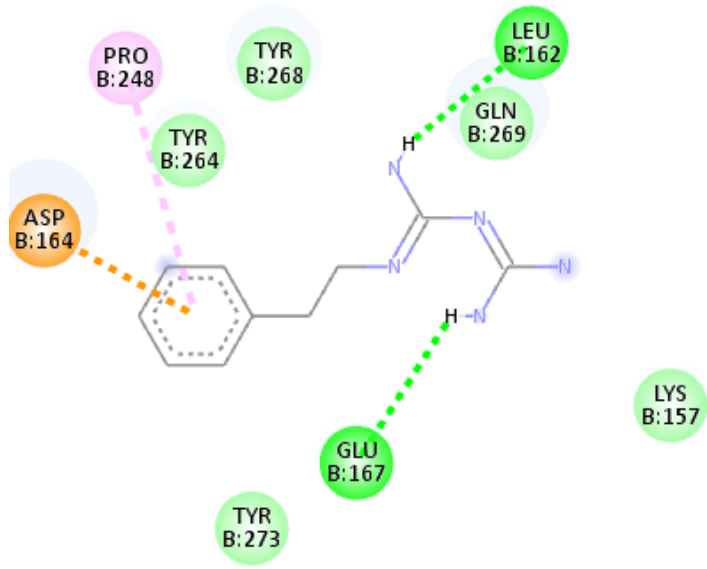
- | | |
|----------------------------|---------------|
| van der Waals | Pi-Anion |
| Conventional Hydrogen Bond | Pi-Pi Stacked |
| Carbon Hydrogen Bond | |

Bağlanma enerjisi: -7.3 kcal/mol

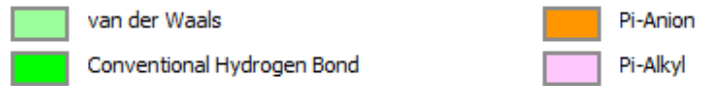
Penformin



LEU162 2.42 Å
GLU167 2.63 Å

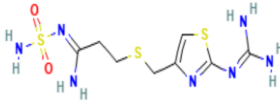


Interactions

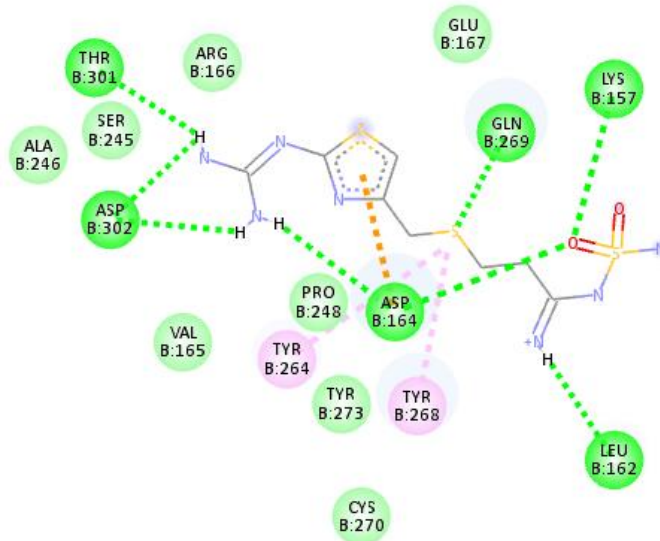


Bağlanma enerjisi: -7.1 kcal/mol

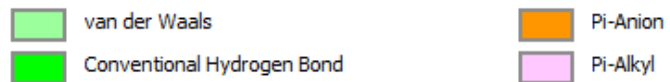
Famotidin



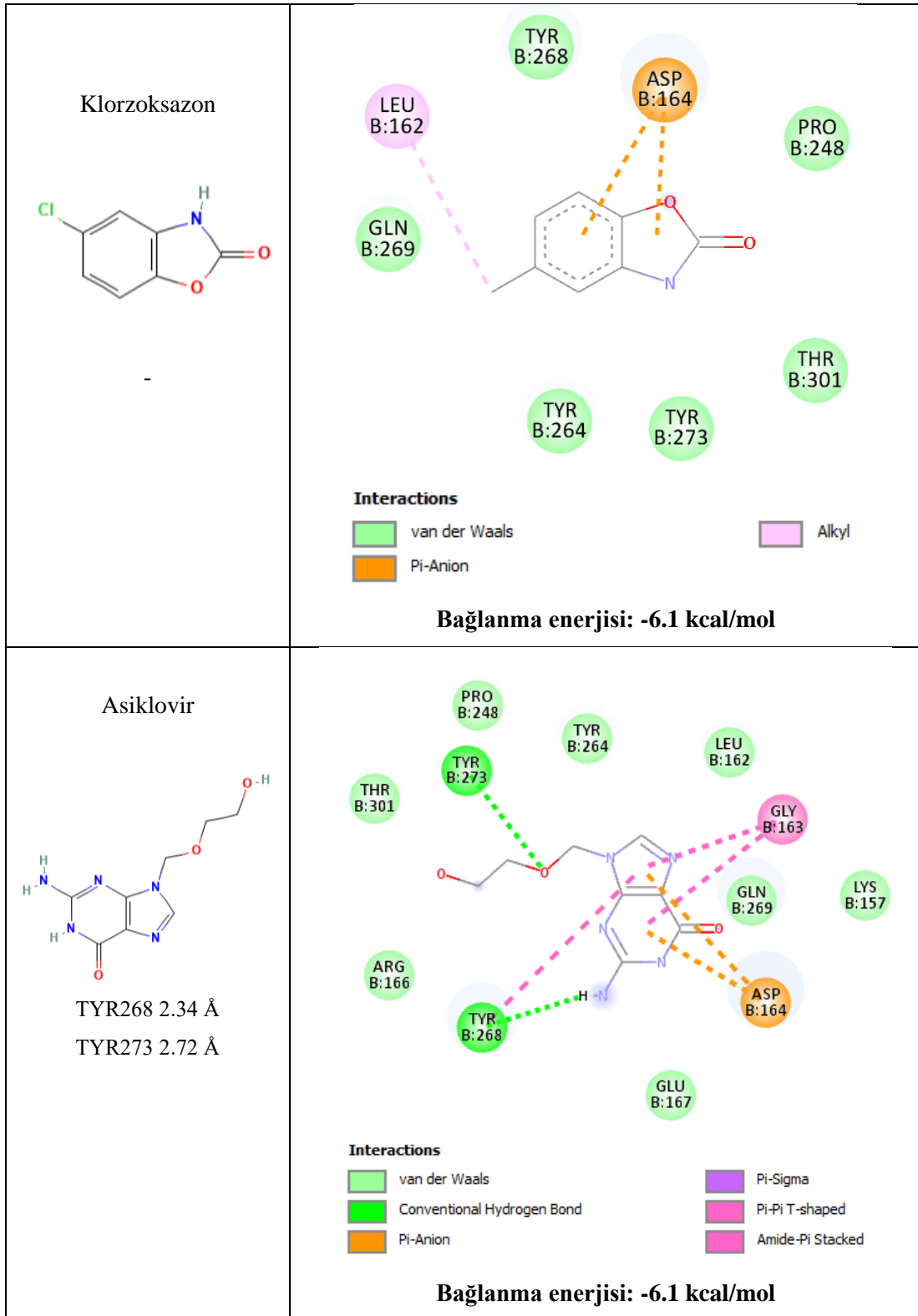
LEU162 2.38 Å
GLN269 2.85 Å
ASP302 1.82 Å
ASP302 2.32 Å
THR301 2.62 Å
LYS157 2.76 Å
ASP164 2.36 Å
ASP164 2.44 Å

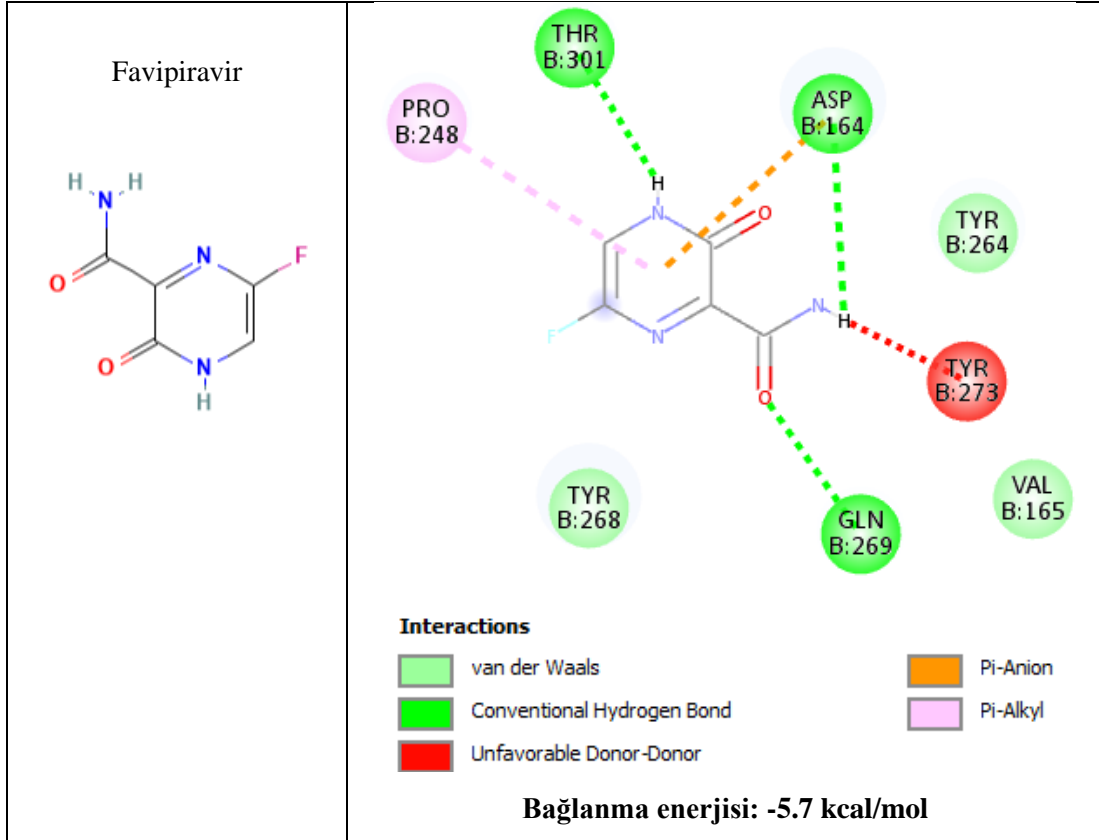


Interactions

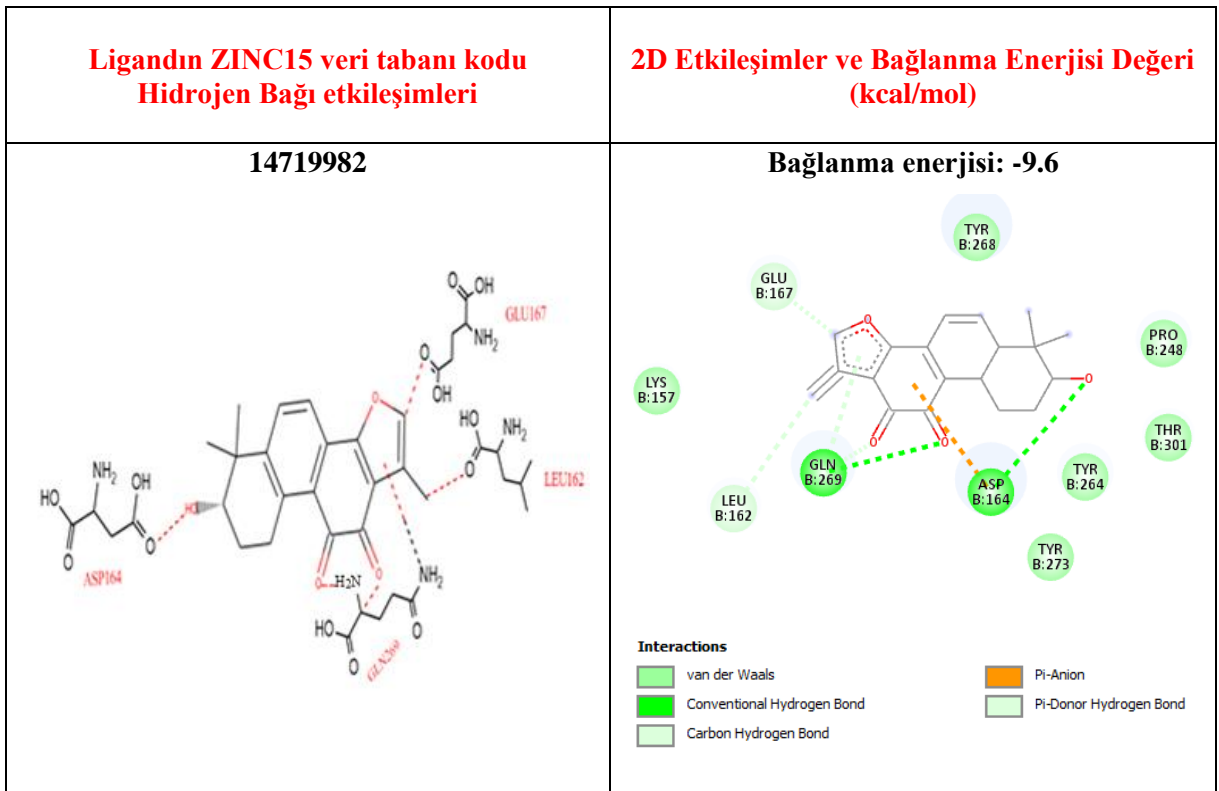


Bağlanma enerjisi: -7.1 kcal/mol

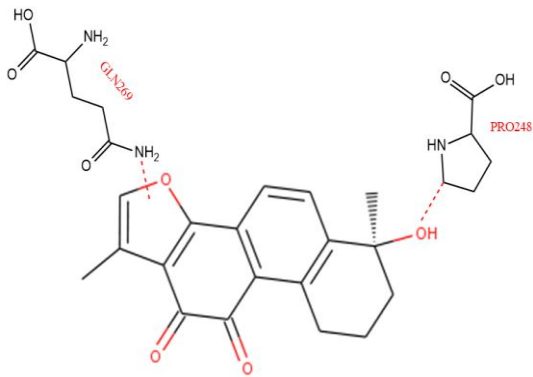




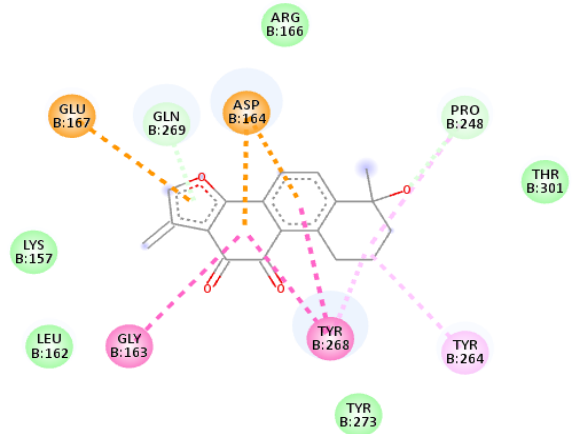
EK5. Sanal Ligand Taramada En İyi Sonucu Veren Ligandların Etkileşimleri



6072087



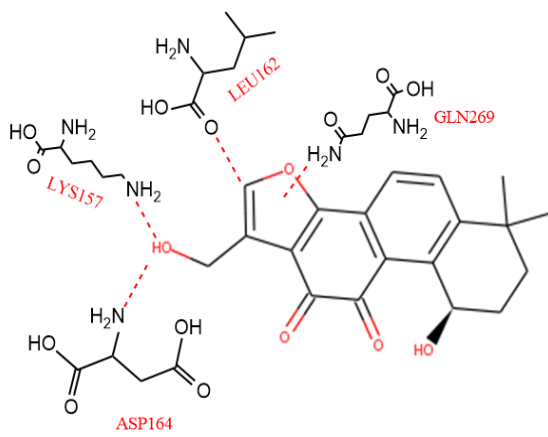
Bağlanma enerjisi: -9.4



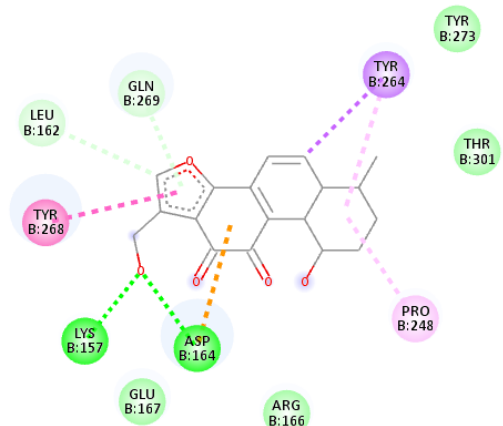
Interactions

- | | |
|------------------------|------------------|
| van der Waals | Pi-Pi T-shaped |
| Carbon Hydrogen Bond | Amide-Pi Stacked |
| Pi-Anion | Alkyl |
| Pi-Donor Hydrogen Bond | Pi-Alkyl |

102454863



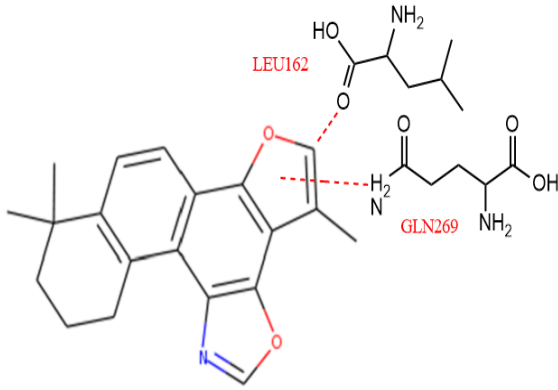
Bağlanma enerjisi: -9.3



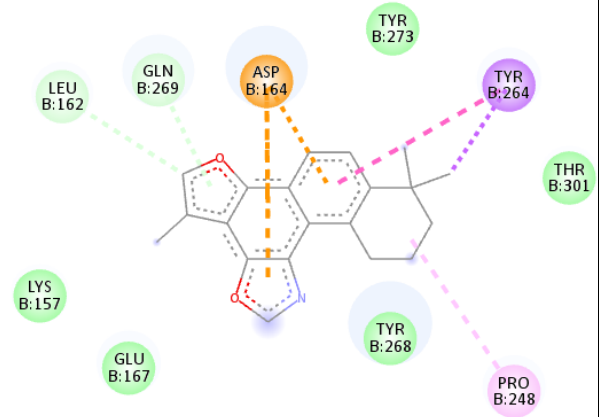
Interactions

- | | |
|----------------------------|----------------|
| van der Waals | Pi-Sigma |
| Conventional Hydrogen Bond | Pi-Pi T-shaped |
| Carbon Hydrogen Bond | Alkyl |
| Pi-Anion | Pi-Alkyl |
| Pi-Donor Hydrogen Bond | |

107435663



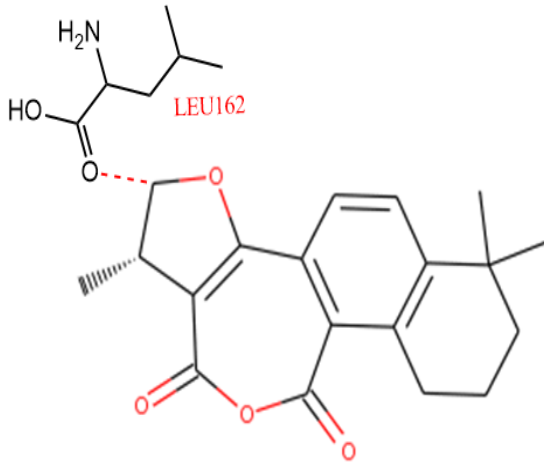
Bağlanma enerjisi: -9.3



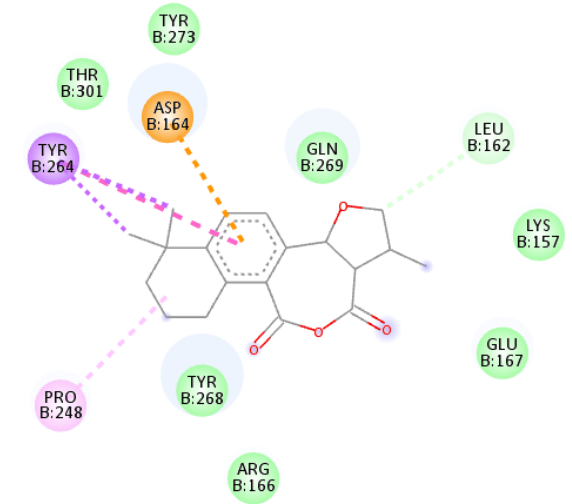
Interactions

- | | |
|------------------------|----------------|
| van der Waals | Pi-Sigma |
| Carbon Hydrogen Bond | Pi-Pi T-shaped |
| Pi-Anion | Alkyl |
| Pi-Donor Hydrogen Bond | |

14724905

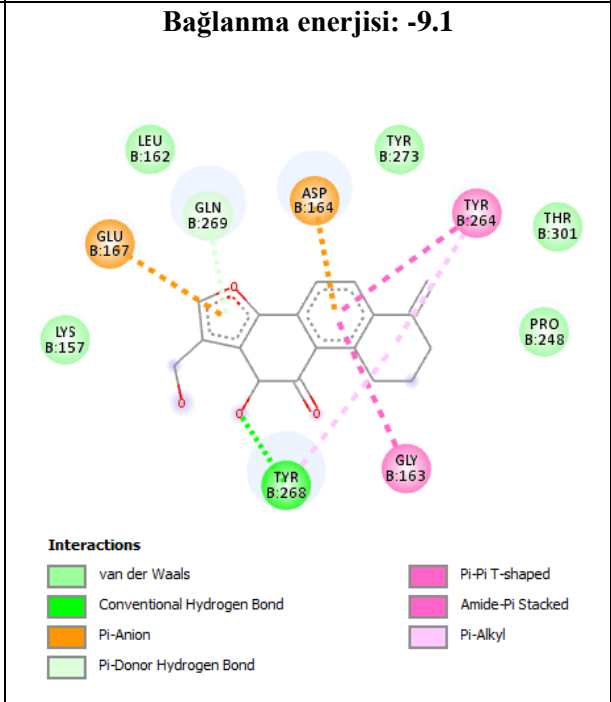
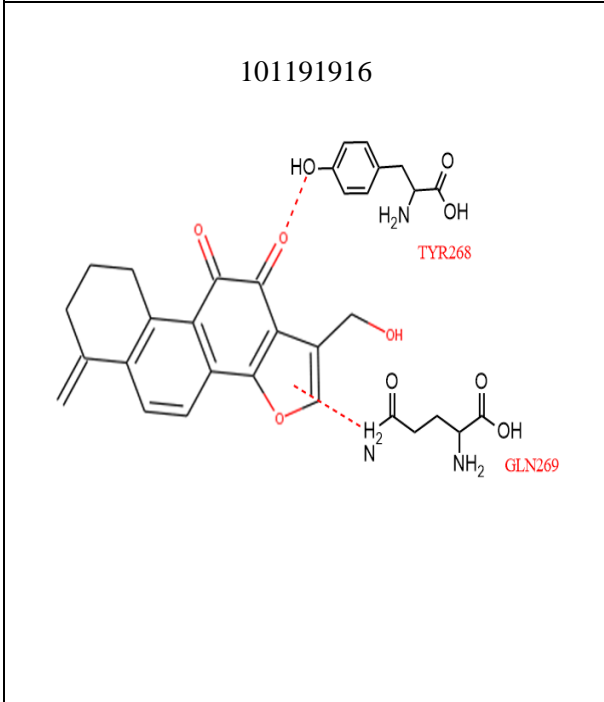
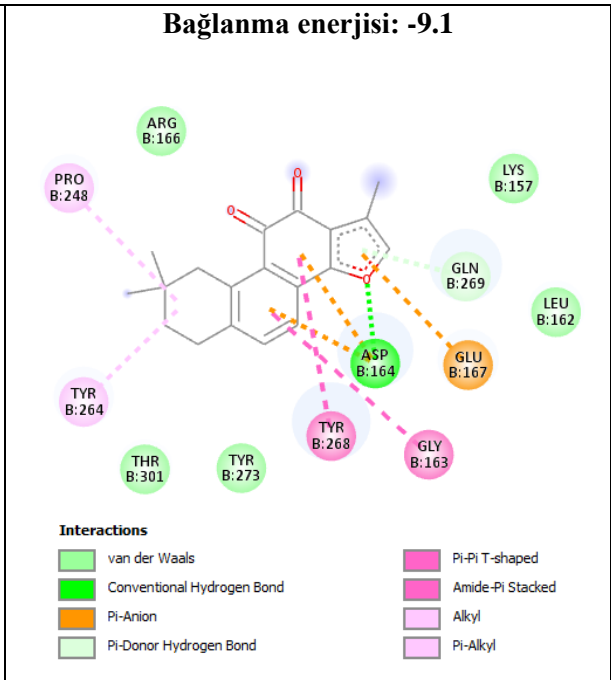
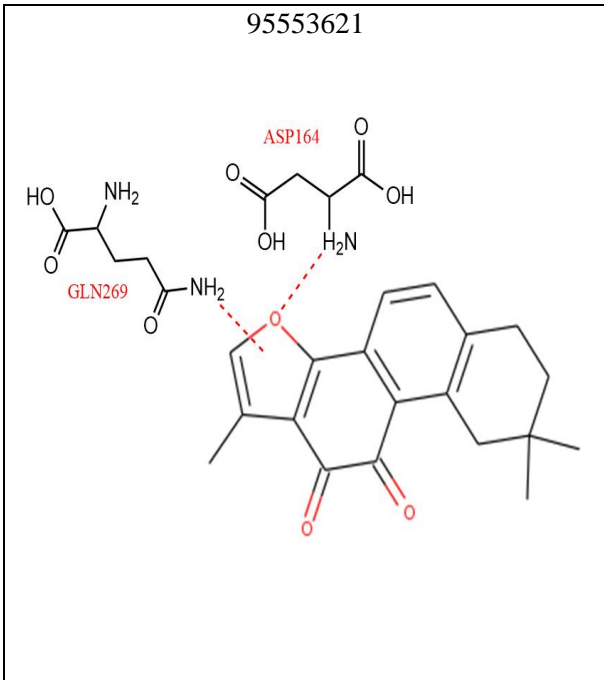


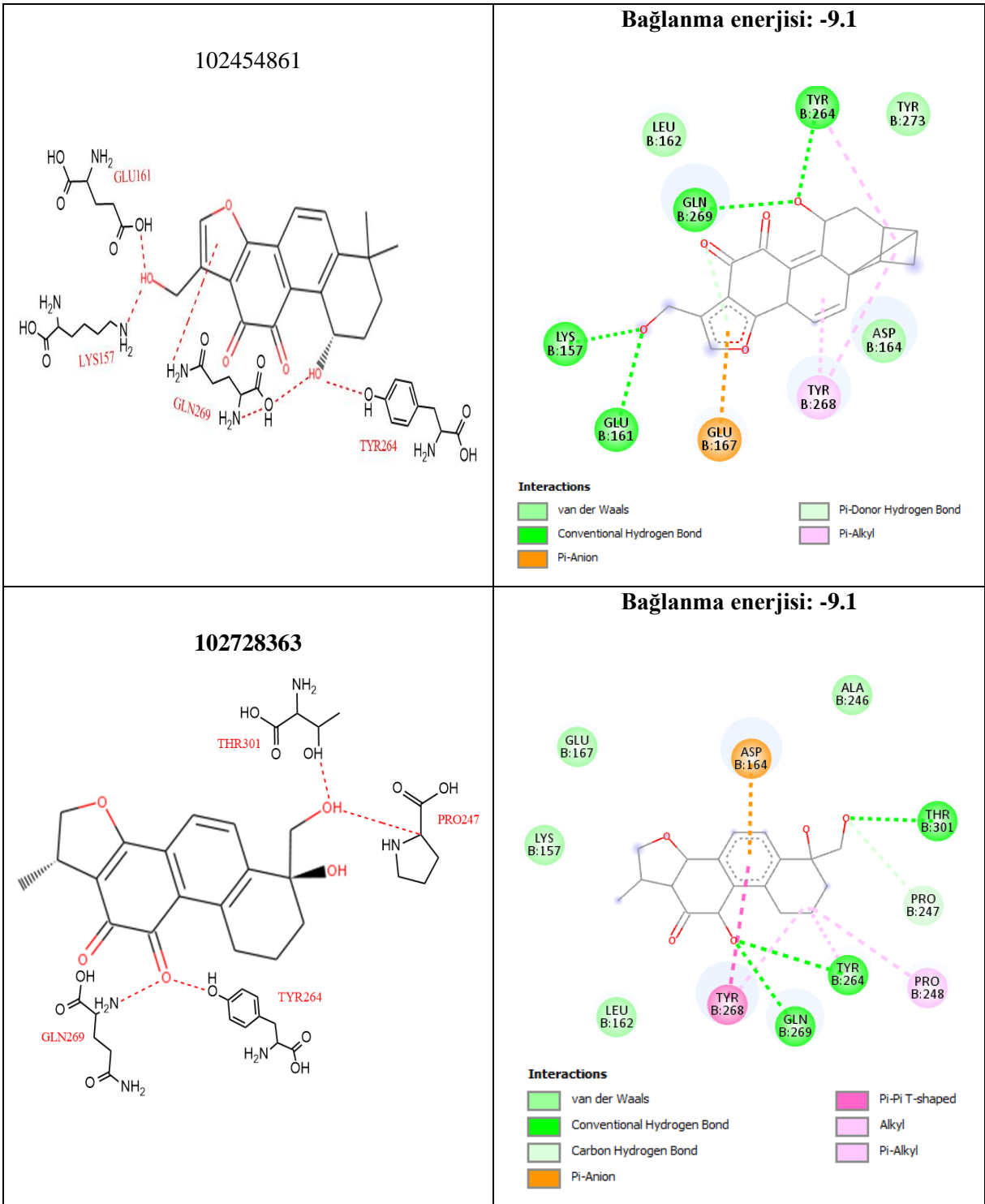
Bağlanma enerjisi: -9.2

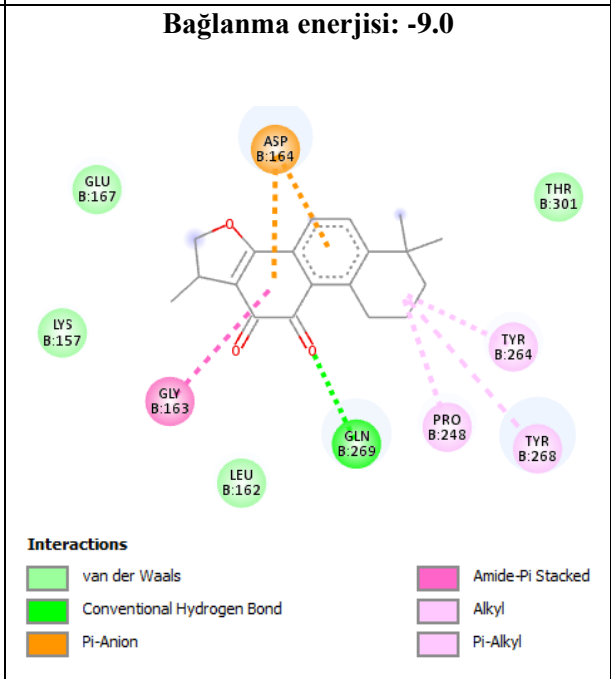
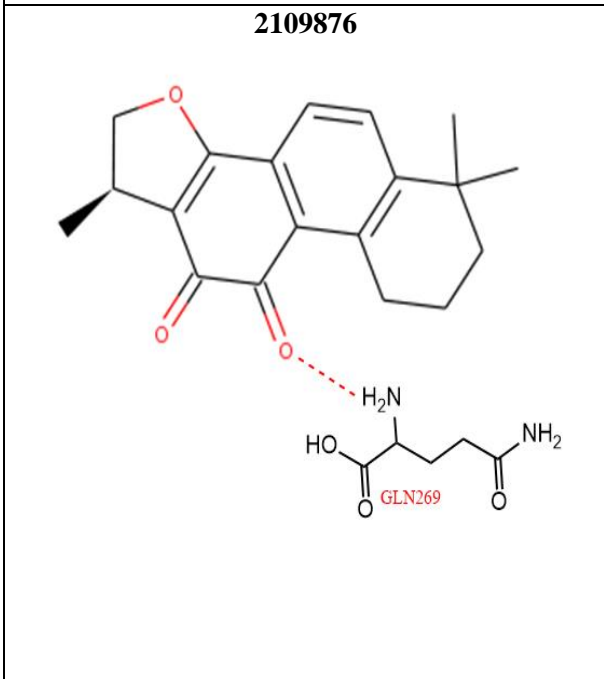
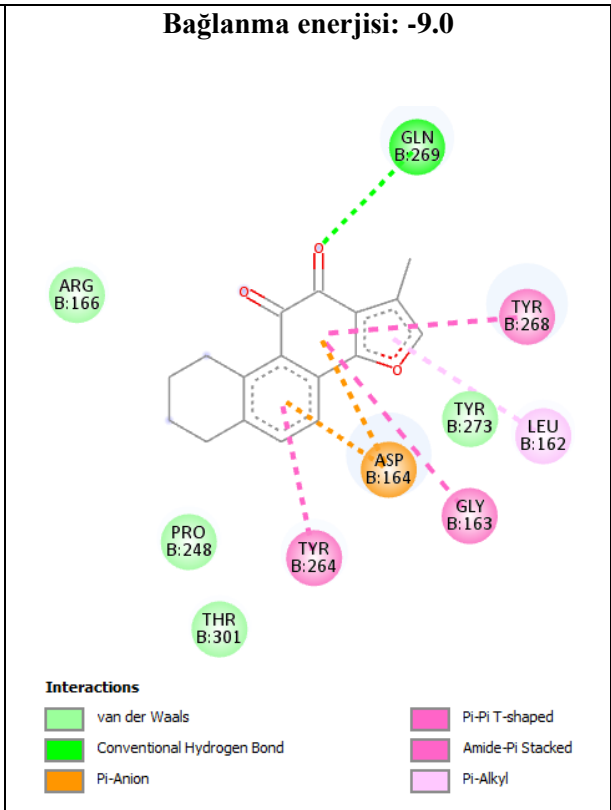
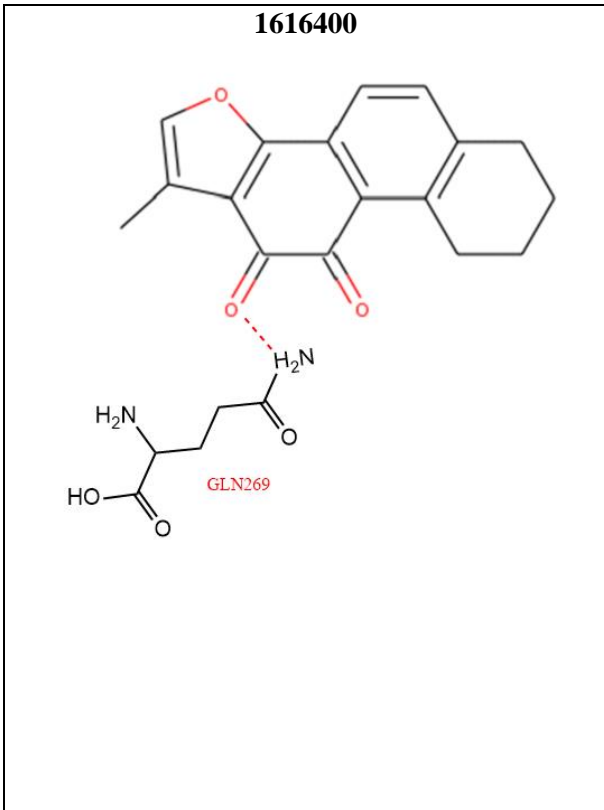


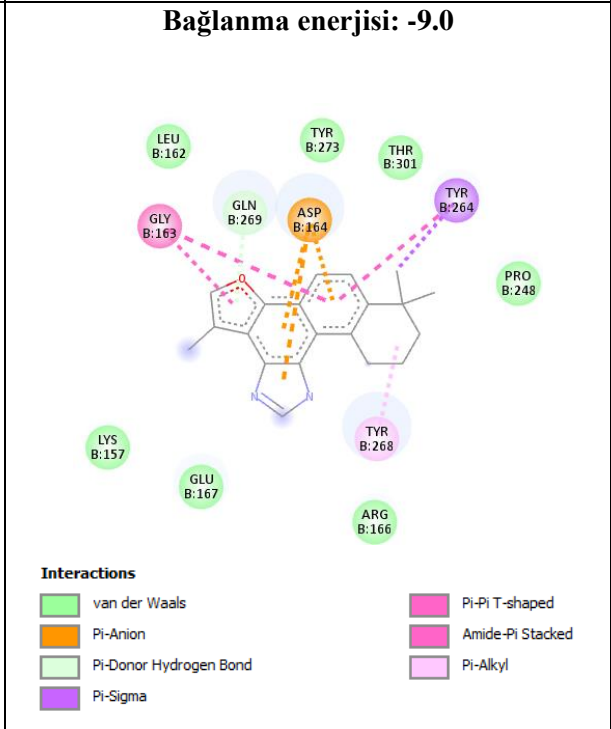
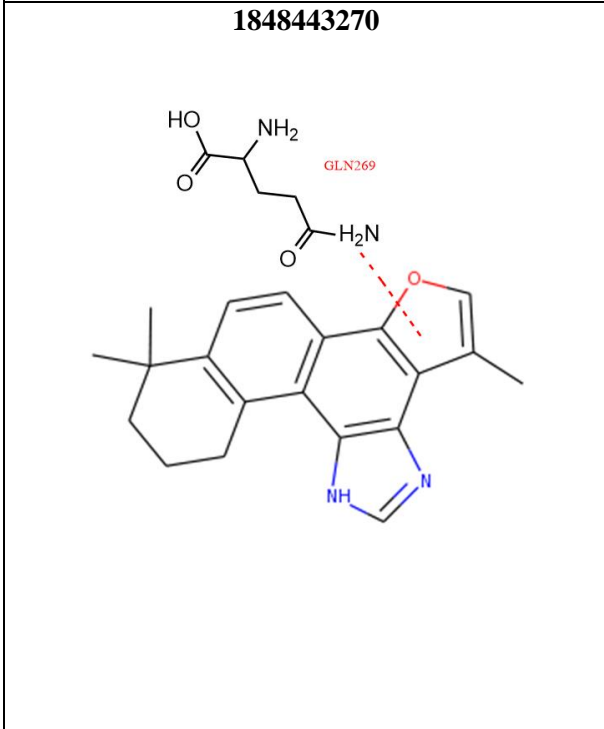
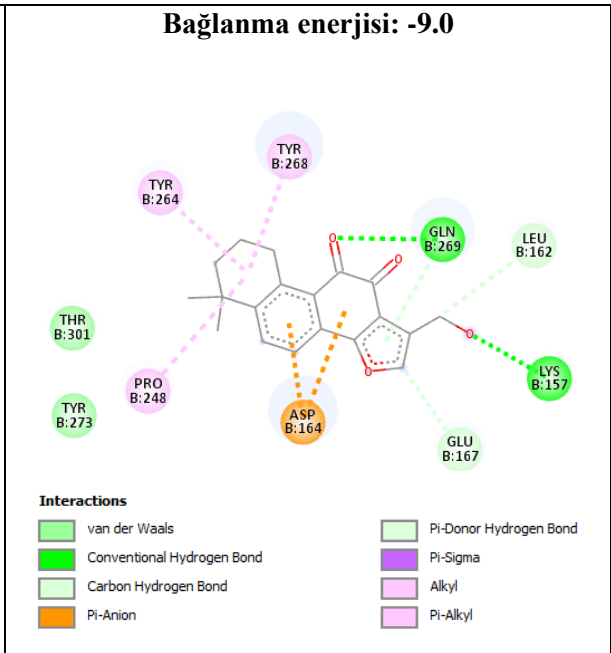
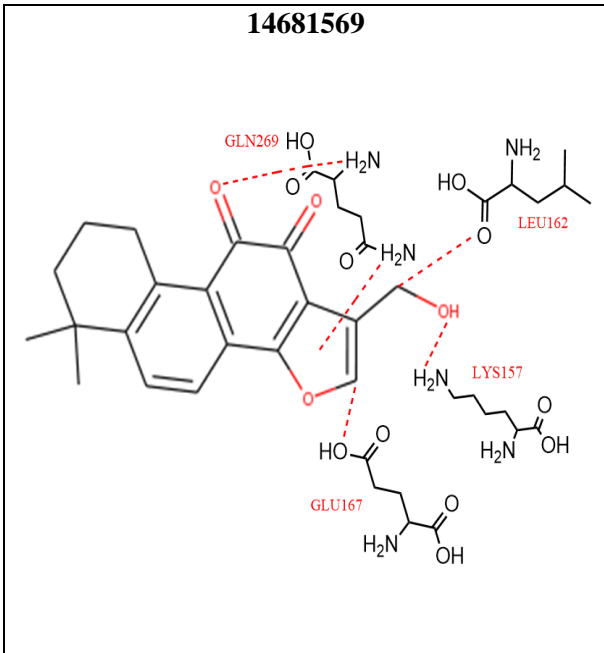
Interactions

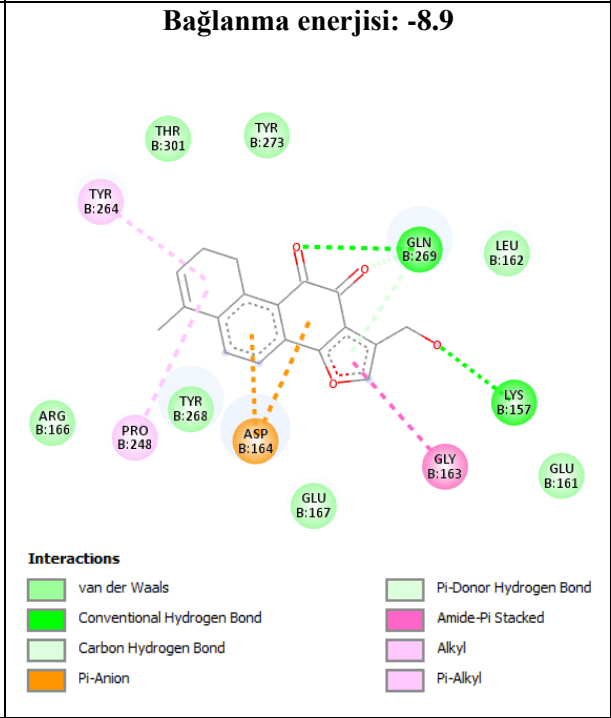
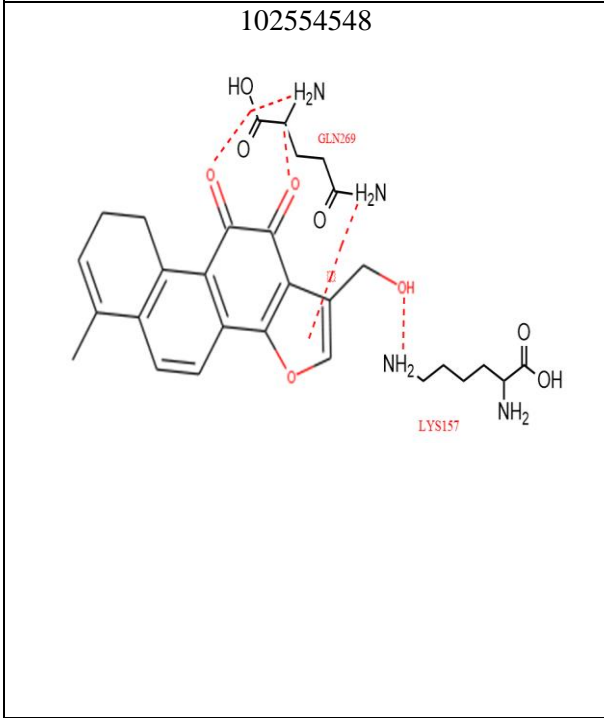
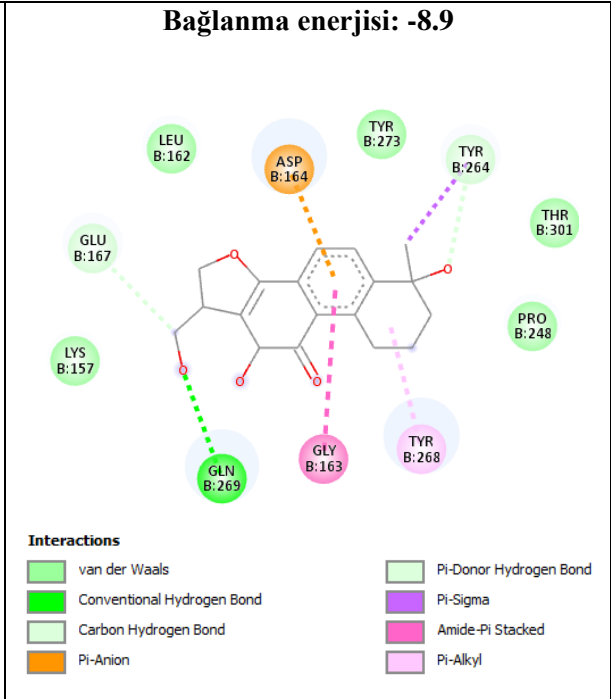
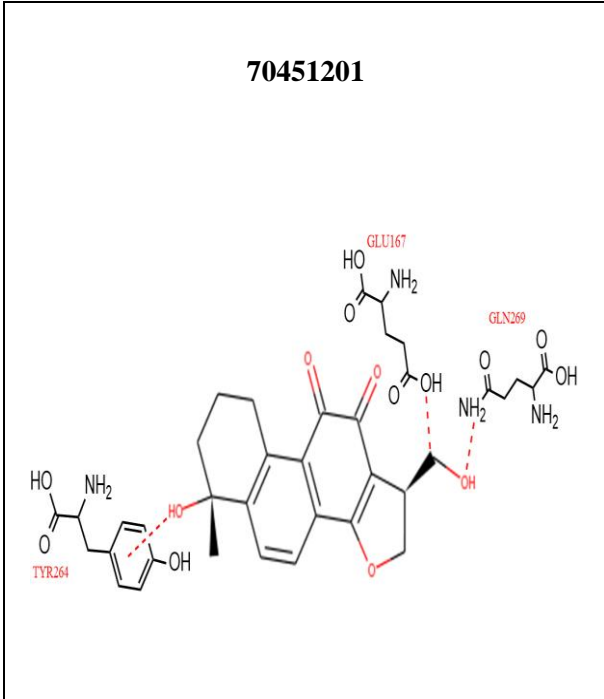
- | | |
|----------------------|----------------|
| van der Waals | Pi-Sigma |
| Carbon Hydrogen Bond | Pi-Pi T-shaped |
| Pi-Anion | Alkyl |

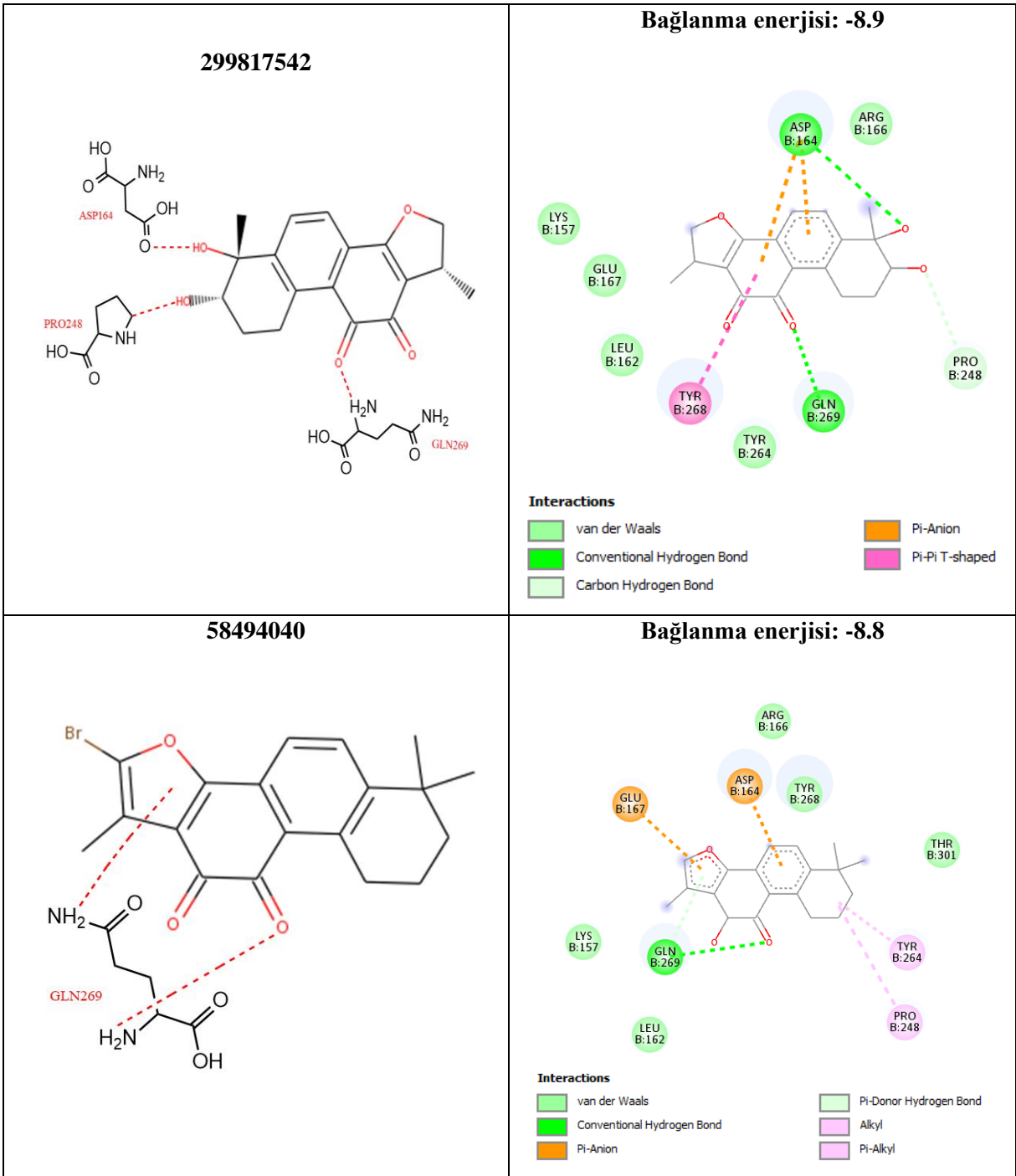




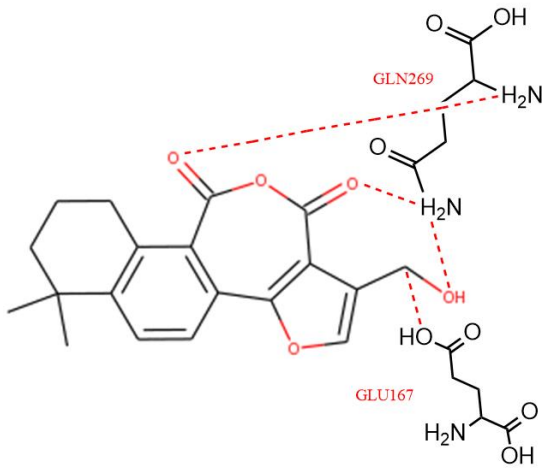




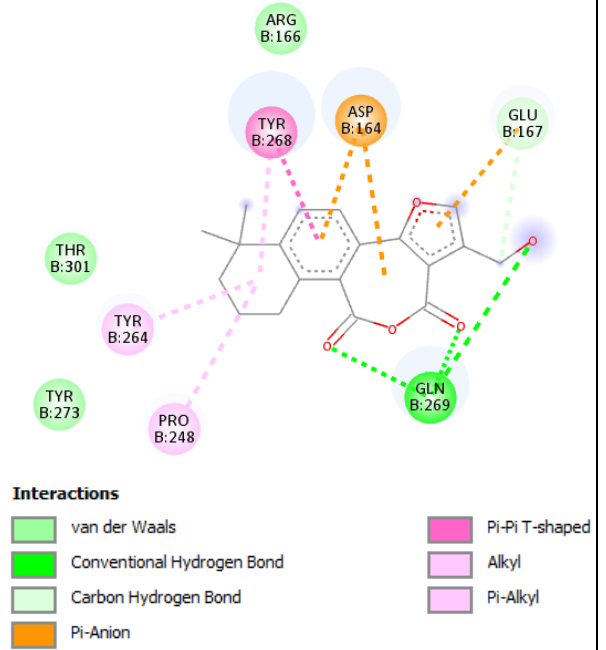




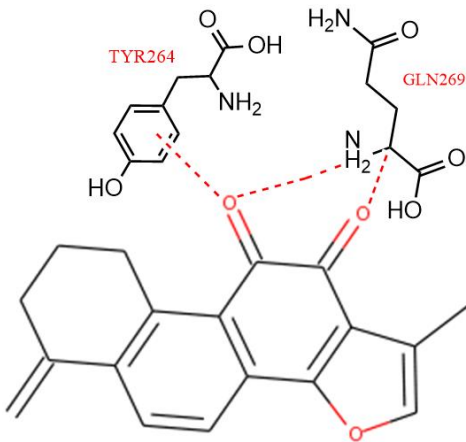
102455414



Bağlanma enerjisi: -8.8



6072084



Bağlanma enerjisi: -8.7

