

**Atf İçin:** Şenol, H. (2023). Nipagin Türevi Yeni Hidrazonların Sentezi ve *in Siliko* Biyolojik Etkinliklerinin Belirlenmesi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(3), 1838-1850.

**To Cite:** Şenol, H. (2023). Synthesis of New Hydrazone Derivatives of Nipagin and Determination of their *in Silico* Biological Activities. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(3), 1838-1850.

### Nipagin Türevi Yeni Hidrazonların Sentezi ve *in Siliko* Biyolojik Etkinliklerinin Belirlenmesi

Halil ŞENOL \*

#### **Öne Çıkanlar:**

- Kanser
- Sentez
- *in Siliko*

#### **Anahtar Kelimeler:**

- Nipagin
- Hidrazon
- Moleküler Doking
- Moleküler Dinamik
- ADME

#### **ÖZET:**

Bu çalışmada nipagin'den (metil paraben, metil-4-hidroksibenzoat) hareketle yeni seçici ve düşük toksisiteye sahip potansiyel anti kanser ajanlar geliştirilmesi amacıyla arilidenhidrazid yapısında sekiz adet bileşik (**4-11**) sentezlendi ve bu bileşiklerin meme kanseri büyüme faktörü reseptörü olan HER2'ye karşı etkinlikleri *in siliko* yöntemlerle ilk defa araştırıldı. Öncelikle moleküler docking çalışmaları ile hedef bileşiklerin ilgili protein üzerindeki bağlanma skorları ve serbest bağlanma enerjileri belirlendi, daha sonra moleküler dinamik çalışmaları ile protein-ligand komplekslerinin kararlılıkları incelendi ve son olarak bileşiklerin tahmini ADME parametreleri hesaplandı. Sentezlenen bütün bileşikler <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, FT-IR ve HRMS analizleri ile karakterize edildi. Moleküler doking çalışmalarının sonuçlarına göre en aktif molekülün, -10.098 kcal/mol docking skoru ve -64.97 kcal/mol serbest bağlanma enerjisine sahip bileşik Bold olduğu belirlendi. Bileşik **6-HER2** ligand-protein kompleksinin moleküler dinamik simülasyonunda simülasyon zamanının %70'i boyunca hidrojen bağı ve pi-pi staking etkileşimlerinin devam ettiği ve ligand atomlarının RMSD değerlerinin ortalamasının 2Å olduğu tespit edildi. Hedef bileşiklerin *in siliko* ADME parametrelerinin referans aralıklarda olduğu ve tahmini ADME sonuçlarına göre ilaç benzerliği taşıdığı görüldü. Ayrıca sonuçlar referans antikanser ilaç doxorubisinin ile karşılaştırıldı ve bazı parametrelerin doxorubisine göre daha anlamlı ve uygun olduğu tespit edildi. Sonuç olarak ilk defa bu çalışmada sentezlenen bileşik Bold, meme kanserinin büyüme faktörü reseptörü olan HER2'ye karşı yapılan *in siliko* çalışmalara göre en iyi inhibitör adayı olabileceği belirlendi.

### Synthesis of New Hydrazone Derivatives of Nipagin and Determination of their *in Silico* Biological Activities

#### **Highlights:**

- Cancer
- Synthesis
- *in Silico*

#### **Keywords:**

- Nipagin
- Hydrazone
- Molecular Docking
- Molecular Dynamics
- ADME

#### **ABSTRACT:**

In this study, eight compounds (**4-11**) with the arylidenehydrazide structure were synthesized in order to develop new selective and low-toxicity potential anti-cancer agents based on nipagin (methyl paraben, methyl-4-hydroxybenzoate) and these compounds were synthesized and the anti-cancer potential of these compounds against HER2, the breast cancer growth factor receptor, were investigated for the first time by *in silico* methods. For the first time, their efficacy against the disease was investigated by *in silico* methods. First of all, the binding scores and free binding energies of the target compounds on the related protein were determined by molecular docking studies, then the stability of protein-ligand complexes were determined by molecular dynamics studies and finally the predicted ADME parameters were calculated. Target compounds were characterized by <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, FT-IR and HRMS analyses. Based on the molecular docking studies, the target molecule with the highest inhibition potential was determined as compound Bold with a docking score of -10.098 kcal/mol and a free binding energy of -64.97 kcal/mol. In the molecular dynamics simulation of the compound **6-HER2** ligand-protein complex, it was determined that hydrogen bonding and pi-pi stacking interactions continued for 70% of the simulation time and the average RMSD values of the ligand atoms were 2Å. It was observed that *in silico* ADME parameters of the target compounds were within reference ranges and had drug similarity according to the estimated ADME results. In addition, the results were compared with anticancer drug doxorubicin and some parameters were found to be more significant and appropriate than doxorubicin. As a result, compound Bold, which was synthesized for the first time in this study, was determined as the best inhibitor candidate according to *in silico* studies against HER2, the growth factor receptor of breast cancer.

## GİRİŞ

Kanser, vücudun herhangi bir bölümündeki hücrelerin gereğinden fazla bir şekilde çoğalmasıyla ve başkalaşım geçirmesiyle meydana gelen bir hastalıktır. Kanser, kontrolsüz bir şekilde büyüyeabilen ve daha sonra vücutta bitişik diğer organlara yayılabilen bir hastalıktır. Kanserli hücreler dolaşım sistemi ile vücudun diğer kısımlarına yayılabilirler ve kanser türlerinin çeşitlerine bağlı olarak, hücrelerin büyüme oranları veya tedavilere yanıtları çok farklı olabilir (Hausman, 2019; Cansouline ve ark., 2022; Şenol ve ark., 2023). Kanser dünya genelinde önemli bir halk sağlığı problemi olup ölümlerin başlıca nedenlerinden biridir. Kanser, 2020 yılında yaklaşık 10 milyon ölüme neden olmuştur. Dünya çapında, her altı ölümden biri kanserden kaynaklanmaktadır. 2022 yılında Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) verilerine göre, kanser, dünya genelinde 91 ülkede 70 yaşından önce ilk veya ikinci sıradaki ölüm nedenidir. (Siegel ve ark., 2022). 2022 yılındaki dünya kanser verilerine bakıldığında kadınlarda görülen ve ölüme neden olan en yaygın kanserler meme kanseri, akciğer kanseri ve serviks kanserleridir "Meme kanseri, kadın bireylerde karşılaşılan kanser türlerinin %30'unu teşkil etmekte ve %15 oranında ölüme sebep olmaktadır ve ayrıca meme kanseri 2022 yılında dünya çapında en çok tanı konulan kanser türü olarak tespit edilmiştir (Giaquinto ve ark., 2022). Meme kanseri, "progesteron veya östrojen reseptör ekspresyonuna ve ERBB2 gen amplifikasyonuna göre sınıflandırılan 3 tür ana tümörden oluşmaktadır. Bu alt türlerin farklı risk profilleri ve tedavi yaklaşımları bulunmaktadır. Meme kanseri tedavisi için iki moleküler hedef belirlenmiştir. Bunlardan birincisi olan östrojen reseptörü alfa (ERa), meme kanseri vakalarının %70'inde görülen bir reseptördür. İkinci moleküler hedef ise epidermal büyüme faktörü-2 (ERBB2, HER2) olup meme kanserlerinin %20'sinde yüksek ekspresyon gösteren bir tirozin kinaz reseptörüdür." ERa, steroid yapısında bir hormon reseptörü olup meme kanseri hücrelerinde, östrojen tarafından aktive edildiğinde aynı anda onkogenik büyüme yollarının da aktive olduğu bir transkripsiyon faktörüdür (Waks ve Winer, 2019).

Bilgisayarlı moleküler modelleme çalışmaları (*in siliko* çalışmalar) son zamanlarda ilaç keşfi ve tasarımın en büyük yardımcısıdır. Günden güne reseptörlerin, enzimlerin ve DNA zincirlerinin yüksek çözünürlüklü kristal yapılarının çözümlenmesi ve aday ilaç bileşiklerinin hedef proteinler ile etkileşiminin belirlenmesi sonucu ilaç adaylarının potansiyelleri çalışmanın başında öngörülebilmektedir. Son elli yıldır bilim insanları, yeni biyolojik aktif bileşikler geliştirebilmek için ilaçların kimyasal yapıları ile biyolojik etkinlikleri arasındaki ilişkileri incelemektedirler. Böylece yeni ilaç aktif maddesi olabilecek bileşiklerin bulunması, daha etkili bileşiklere erişilmesi ve etki mekanizmalarının incelenmesi önemli hale gelmiştir (Crampon ve ark., 2022; Fatriansyah ve ark., 2022; Şenol ve ark., 2023a).

Literatüre bakıldığında 4-hidroksibenzoik asit ve nipagin türevlerinin anti-kanser (Şenol ve ark., 2023a; Şenol ve ark., 2023b) anti-inflamatuvar (Winter ve ark., 2017), anti-oksidan (Muangsri ve ark., 2022) ve anti-mikrobiyal (Cho ve ark., 1998) aktivite gibi geniş yelpazede biyolojik aktivite göstermektedir (Sannino ve ark., 2018). Bu amaçla nipagin'den (metil paraben, metil-4-hidroksibenzoat) hareketle potansiyel anti kanser ajanlar geliştirilmesi amacıyla arilidenhidrazid yapısında sekiz adet yeni bileşik (**4-11**) sentezlendi ve bu bileşiklerin meme kanseri büyüme faktörü reseptörü olan HER2'ye karşı etkinlikleri *in siliko* yöntemlerle araştırıldı.

## MATERYAL VE METOT

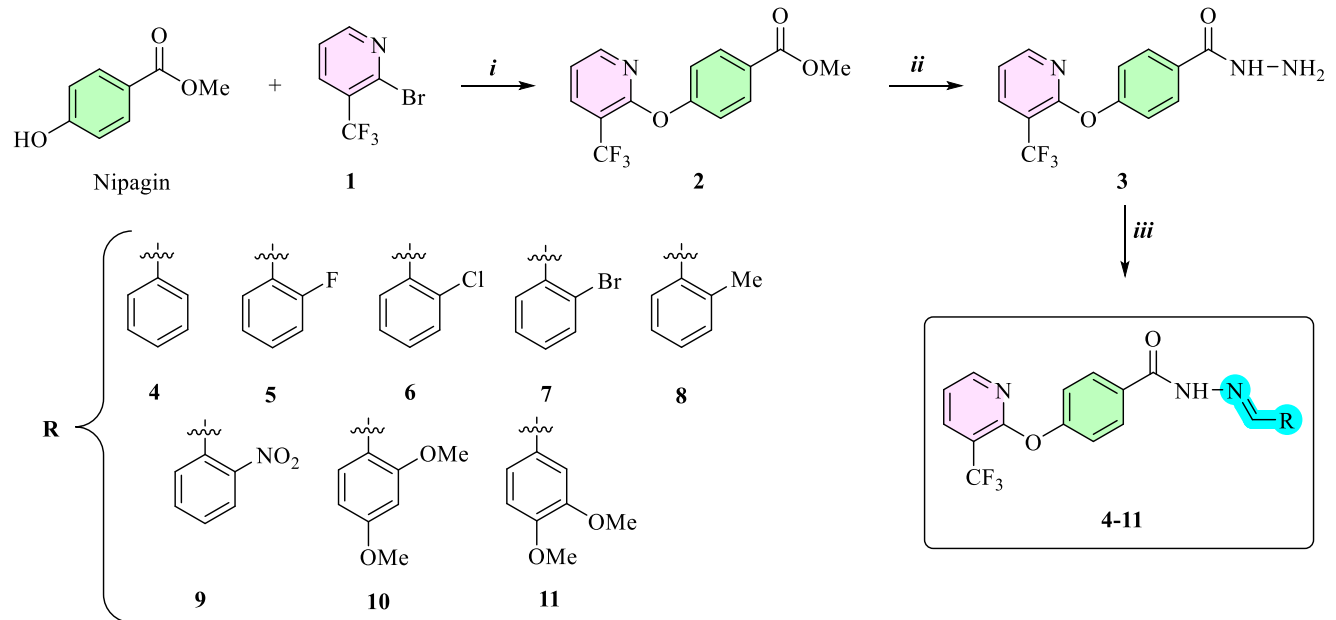
### Kimyasal Materyal

Deneylerde kullanılan tüm çözücüler ve kimyasal maddeler Sigma-Aldrich, Merck, Tekkim ve Ipluschem'den yüksek saflık değerlerinde satın alındı ve herhangi bir saflaştırma işlemine tabi

tutulmadan doğrudan kullanıldı. Kromatografik ayırmalarda silika jel kolon kromatografisi uygulandı ve bazı durumlarda madde uygun çözücüler kullanılarak kristallendirildi. Yapı tayini için nükleer manyetik rezonans (NMR) analizleri kullanıldı.

### Sentez ve Yapı Tayini Çalışmaları

Sentez çalışmalarına Şekil 1'de görüldüğü şekilde nipaginden hareketle başlandı. Nipagin (metil-4-hidroksi-benzoat) DMF içerisinde  $K_2CO_3$  varlığında 3-triflorometil-2-bromopiridin ile nükleofilik aromatik yer değiştirme tepkimesi üzerinden piridin eter türevi bileşik **2** sentezlendi. Bileşik **2**'nin hidrazin hidrat ile etanol içerisindeki reaksiyonundan bileşik **3** elde edildi. Son olarak bileşik **3**'ün, sekiz farklı benzaldehit türevi ile verdiği kondenzasyon reaksiyonundan hedef bileşikler (**4-11**) sentezlendi. Sentezlenen bütün bileşiklerin yapıları NMR analizleriyle belirlendi. Arilidenhidrazid bileşiklerinin sentezinde benzaldehit, 2-florobenzaldehit, 2-kloro-benzaldehit, 2-bromo-benzaldehit, 3-bromo-benzaldehit, 2-metil-benzaldehit, 2-nitro-benzaldehit, 2,4-dimetoksi-benzaldehit ve 3,4-dimetoksibenzaldehit bileşikleri kullanıldı.



**Reaksiyon Koşulları ve Reaktifler:** *i*)  $K_2CO_3$ , DMF, 100 °C, 12 saat; *ii*)  $NH_2NH_2 \cdot H_2O$ , EtOH, HOAc, reflüks, 12 saat

*iii*) İlgili aldehit bileşiği, EtOH, HOAc, reflüks, 6 saat.

Şekil 1. Hedef bileşiklerin sentezleri

Hedef bileşiklerde piridin halkasına bağlı  $CF_3$  grubu  $^{13}C$  NMR spektrumlarında flor atomlarının karbon sinyallerini kendinden bir fazla sayıya yarmasından dolayı florların doğrudan bağlı olduğu  $CF_3$  karbonu 272 Hz etkileşim sabiti ile 125 ppm civarında kuartet olarak rezonans olmuştur. Flor atomları üç-dört bağ uzaklığa kadar karbonları değişik etkileşim sabitleri ile etkilediğinden dolayı (Gombler, 1981; Afonin ve ark., 2013)  $CF_3$  grubunun bağlı olduğu ipso karbon  $^{13}C$  NMR spektrumlarında 113 ppm civarında 33 Hz etkileşim sabiti ile yine kuartet olarak rezonans olmuştur. Ayrıca  $^{13}C$  NMR spektrumlarında 138 ppm civarında 4-5 Hz büyüklüğünde bir etkileşim sabitine sahip olan bir kuartet sinyal daha gözlenmektedir. Bileşiklerin  $^{19}F$  NMR spektrumlarında -62 ppm civarında gözlenen bir singlet sinyal  $CF_3$  grubunu temsil etmektedir.

Bileşik **2**'den bileşik **3**'ün sentezi yapıldığında bileşik **2**'nin  $^1H$  NMR spektrumunda 3.92 ppm de rezonans olan ester-metoksi grubuna ait singlet sinyal bileşik **3**'ün  $^1H$  NMR spektrumunda kaybolmuş ve yerine 4.38 ppm'de  $NH_2$  protonlarına ait yayvan bir sinyal gözlenmiştir. Ayrıca bileşik **3**'ün CONH protonu  $^1H$  NMR spektrumunda 9.86 ppm'de yayvan singlet olarak rezonans olmuştur.

Arilidenhidrazid bileşiklerinde (**4-11**) ise CONH protonları  $^1\text{H}$  NMR spektrumlarında 12 ppm civarında rezonans olmuştur. Arilidenhidrazid bileşiklerinin imin protonu  $^1\text{H}$  NMR spektrumlarında 8.5 ppm civarında orta boylu yayvan singlet sinyal şeklinde gözlenmiştir ve bu bulgular literatür verileriyle uyumludur (Tokalı ve ark., 2022; Aslanhan ve ark., 2023; Tokalı ve ark., 2023).

Bileşik **5**'te  $\text{CF}_3$  grubuna ek olarak arilidenhidrazid yapısındaki aromatik halkada taşınan flor atomu bağlı olduğu karbonu ve kendine dört bağ uzaklıktaki bütün karbonları  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumunda dublet olacak şekilde yarmıştır. Bileşik **5**'te florun bağlı olduğu ipso karbon  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumunda 163 ppm'de 252 Hz etkileşim sabiti ile dublet şeklinde rezonans olmuştur. Bileşik **5**'in  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarında florun orto pozisyonundaki CH karbonu 20 Hz, meta pozisyonundaki CH, 10 Hz ve para pozisyonundaki CH ise 8.5 Hz etkileşim sabiti ile dublet olarak rezonans olmuşlardır. Bileşik **5**'te aromatik halkaya bağlı flor atomu  $^{19}\text{F}$  NMR spektrumunda -118 ppm'de singlet olarak rezonans olmuştur. Florlu bileşiklerin NMR analizleri literatür verileri ile desteklenmiştir (Afonin ve ark., 2013). Bileşik **5**'in  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumları sırasıyla Şekil 2 ve 3'te verilmiştir.

## Deneysel Yöntem

### Sentez Çalışmaları

#### *Bileşik 2'nin sentezi (metil 4-((3-(triflorometil)piridin-2-il)oksi)benzoat)*

Yuvarlak dipli bir balona metil-4-hidroksi-benzoat (nipagin) (10 g, 65 mmol, 1 eşd.) konuldu ve DMF (250 mL) ile çözüldü. Üzerine  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (27 g, 195 mmol, 3 eşd.) ve 2-bromo-3-triflorometil-piridin (16 g, 72 mmol, 1.1 eşd.) ilave edilerek 100 °C sıcaklıkta 12 saat ısıtılarak karıştırıldı. Reaksiyon TLC ile kontrol edildikten sonra sonlandırıldı, çözücü döner buharlaştırıcıda düşük basınç altında uzaklaştırıldı ve ham ürün silikajel üzerine adsorbe edildi. Bileşik **2** kolon kromatografisi ile (silika jel, 1:9 etilasetat:hekzan) saflaştırıldı. Beyaz renkli katı (%82 verim, 16 gram). **E.N.:** 58-59 °C;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.30 (dd,  $J = 5.1, 1.9$  Hz, 1H), 8.12 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 8.02 (dd,  $J = 7.7, 1.9$  Hz, 1H), 7.25 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.14 (dd,  $J = 7.6, 4.9$  Hz, 1H), 3.92 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.33, 159.65 (q,  $J = 1.7$  Hz, 159.67, 159.66, 159.64, 159.63), 157.01, 150.89, 137.23 (q,  $J = 4.6$  Hz, 137.29, 137.25, 137.22, 137.18), 131.38, 127.05, 122.66 (q,  $J = 272.0$  Hz, 125.91, 123.74, 121.58, 119.42), 121.31, 118.51, 114.67 (q,  $J = 33.6$  Hz, 115.07, 114.80, 114.54, 114.27), 52.09.

#### *Bileşik 3'ün sentezi (4-((3-(triflorometil)piridin-2-il)oksi)benzohidrazid)*

Yuvarlak dipli bir balonda bileşik **2** (15 g, 50 mmol, 1 eşd.) etanol ile çözüldü. 10 dakika karıştırıldıktan sonra  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (8 mL, %80, 150 mmol, 3 eşd.) ve katalitik miktarda asetik asit eklendi. Nihai karışım, reflüks sıcaklığında gece boyunca karıştırıldı. Reaksiyonun sonunda metanol, düşük basınç altında buharlaştırıldı, balonda kalan tortu suyla yıkandı ve etil asetat ile ekstrakte edildi. Organik faz,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ile kurutuldu ve süzülde. Çözücü, düşük basınç altında uzaklaştırıldı ve bileşik **3**, beyaz katı olarak elde edildi (13 g, %86 verim). **E.N.:** 155-157 °C;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  9.86 (bs, 1H), 8.39 (dd,  $J = 4.9, 1.9$  Hz, 1H), 8.25 (dd,  $J = 7.7, 1.9$  Hz, 1H), 7.93 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.34 (dd,  $J = 7.7, 5.0$  Hz, 1H), 7.25 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 4.38 (s, 2H).

#### *Ariliden Hidrazid Bileşiklerinin Genel Sentezi (4-11)*

Yuvarlak dipli bir balona etanol (100 mL), bileşik **3** (0.5 g, 1.7 mmol, 1 eşd.), ilgili aldehit bileşiği (2.5 mmol, 1.5 eşd.) ve katalitik miktarda asetik asit konuldu. Nihai karışım, gece boyunca geri çeviren soğutucu altında kaynatıldı. Reaksiyonun sonunda karşılık gelen ariliden hidrazid hibrit bileşikleri (**4-11**) elde edildi. Elde edilen bileşikler çöktürme, kloroform-metanol kullanılarak yeniden kristalleştirme veya kolon kromatografisi yoluyla saflaştırıldı.

**Bileşik 4:** (*E*)-*N'*-benziliden-4-((3-(triflorometil)piridin-2-il)oksi)benzohidrazid, Benzaldehit kullanılarak ariliden hidrazid bileşiklerinin genel sentez yöntemine göre sentezlendi. Açık sarı renkli katı (0.62 gram, %96 verim). **E.N.:** 175-176 °C; **<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ 11.93 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 8.43 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 8.30 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.04 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.89 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.56-7.44 (m, 5H); **<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ 162.88, 161.97, 159.52, 156.14, 152.10, 148.27, 138.51 (q, *J* = 4.6 Hz, 138.56, 138.52, 138.49, 138.45), 134.81, 134.27, 131.82, 130.76, 130.55, 129.99, 129.37, 129.31, 128.84, 127.57, 123.34 (CF<sub>3</sub>, q, *J* = 272.0 Hz, 126.58, 124.42, 122.26, 120.10), 121.84, 119.88, 113.41 (CF<sub>3</sub>-C q, *J* = 32.9 Hz, 113.80, 113.54, 113.28, 113.02); **<sup>19</sup>F NMR (471 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ -61.87; **FT-IR cm<sup>-1</sup> vmax:** 3221, 3061, 3038, 2947, 1645, 1620, 1585, 1545, 1503, 1492, 1439, 1365, 1322, 1303, 1285, 1266, 1206, 1162, 1128, 1114, 1066, 1056 968, 862, 692; **ESI-HRMS, m/z:** Molekül formülü: C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, Hesaplanan monoizotopik kütle, [M-H]<sup>+</sup> = 384.09599, Bulunan monoizotopik kütle, [M-H]<sup>+</sup> = 384.09417.

**Bileşik 5:** (*E*)-*N'*-(2-florobenziliden)-4-((3-(triflorometil)piridin-2-il)oksi)benzohidrazid, 2-Florobenzaldehit kullanılarak ariliden hidrazid bileşiklerinin genel sentez yöntemine göre sentezlendi. Açık sarı renkli katı (0.59 gram, %87 verim). **E.N.:** 168-170 °C; **<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ 12.05 (s, 1H), 8.82 (s, 1H), 8.73 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.29 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.12 – 7.95 (m, 2H), 7.73-7.44 (m, 1H), 7.40-7.15 (m, 5H); **<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ 162.02 (F-*C*<sub>ipso</sub>, d, *J* = 252.91 Hz, 163.02, 161.01), 162.84 (C=O), 160.29, 156.24, 155.54 (CH=N, d, *J* = 3.5 Hz, 155.55, 155.53), 152.08, 138.49 (CF<sub>3</sub>-*C*<sub>meta</sub>, q, *J* = 4.6 Hz, 138.53, 138.50, 138.47, 138.44), 134.18 (F-*C*<sub>para</sub>, d, *J* = 8.5 Hz, 134.22, 134.15), 132.45 (F-*C*<sub>meta</sub>, d, *J* = 8.5 Hz, 132.48, 132.41), 130.51, 130.02, 128.28 123.32 (CF<sub>3</sub>, q, *J* = 272.2, Hz, 126.57, 124.40, 122.24, 120.08), 121.87, 121.52 (F-*C*<sub>meta</sub>, d, *J* = 10.0 Hz, 121.56, 121.48), 119.88, 116.45 (F-*C*<sub>orto</sub>, d, *J* = 20.7 Hz, 116.53, 116.36), 113.42 (CF<sub>3</sub>-*C*<sub>ipso</sub>, q, *J* = 33.3 Hz, 113.81, 113.55, 113.28, 113.02); **<sup>19</sup>F NMR (471 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ -61.91, -118.46; **FT-IR cm<sup>-1</sup> vmax:** 3172, 3061, 2945, 1656, 1620, 1580, 1501, 1482, 1432, 1371, 1324, 1232, 1198, 1115, 1031, 982, 935, 893, 752; **ESI-HRMS, m/z:** Molekül formülü: C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>F<sub>4</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, Hesaplanan monoizotopik kütle, [M-H]<sup>+</sup> = 402.08656, Bulunan monoizotopik kütle, [M-H]<sup>+</sup> = 402.08472.

**Bileşik 6:** (*E*)-*N'*-(2-klorobenziliden)-4-((3-(triflorometil)piridin-2-il)oksi)benzohidrazit, 2-Klorobenzaldehit kullanılarak ariliden hidrazid bileşiklerinin genel sentez yöntemine göre sentezlendi. Açık sarı renkli katı (0.65 gram, %92 verim). **E.N.:** 176-177 °C; **<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ 12.07 (s, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.54 – 8.31 (m, 1H), 8.25 (dd, *J* = 7.8, 1.8 Hz, 1H), 8.10 (dd, *J* = 7.8, 1.7 Hz, 1H), 8.04 – 7.92 (m, 2H), 7.58 – 7.36 (m, 3H), 7.35 – 7.31 (m, 1H), 7.29 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H); **<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ 162.86, 159.50, 156.27, 152.14, 144.11, 138.57 (q, *J* = 4.4 Hz, 138.62, 138.59, 138.55, 138.51), 135.16, 133.67, 131.99, 130.67, 130.42, 130.06, 128.68, 127.36, 123.35 (q, *J* = 271.7 Hz, 126.59, 124.43, 122.26, 120.10), 121.88, 119.94, 113.41 (q, *J* = 32.9 Hz, 113.80, 113.54, 113.28, 113.02); **<sup>19</sup>F NMR (471 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ -61.83; **FT-IR cm<sup>-1</sup> vmax:** 3079, 3067, 3037, 1651, 1639, 1585, 1469, 1360, 1323, 1281, 1203, 1160, 1117, 1033, 976, 892, 825, 715; **ESI-HRMS, m/z:** Molekül formülü: C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>35</sup>Cl, Hesaplanan monoizotopik kütle, [M-H]<sup>+</sup> = 418.05701, Bulunan monoizotopik kütle, [M-H]<sup>+</sup> = 418.05509.

**Bileşik 7:** (*E*)-*N'*-(2-bromobenziliden)-4-((3-(triflorometil)piridin-2-il)oksi)benzohidrazit, 2-Bromobenzaldehit kullanılarak ariliden hidrazid bileşiklerinin genel sentez yöntemine göre sentezlendi. Parlak sarı renkli katı (0.62 gram, %79 verim). **E.N.:** 183-184 °C; **<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ 12.10 (s, 1H), 8.77 (s, 1H), 8.37 (dd, *J* = 5.1, 1.8 Hz, 1H), 8.25 (dd, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.97 (dd, *J* = 7.4, 5.2 Hz, 3H), 7.78-7.59 (m, 2H), 7.33 (dd, *J* = 7.8, 4.9 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H); **<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO)** δ 162.88, 161.21, 152.14, 146.46, 138.57 (q, *J* = 4.7 Hz, 138.62, 138.59, 138.55, 138.52), 133.91, 133.66, 133.55, 132.24, 130.46, 130.07, 128.61, 127.74, 124.06,

123.35 (q,  $J = 271.82$  Hz, 126.59, 124.43, 122.27, 120.10), 121.87, 119.95, 113.41 (q,  $J = 32.9$  Hz, 113.80, 113.54, 113.28, 113.02);  $^{19}\text{F}$  NMR (471 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  -61.82; FT-IR  $\text{cm}^{-1}$  vmax: 3305, 2997, 1644, 1608, 1587, 1504, 1462, 1430, 1369, 1313, 1279, 1205, 1076, 1062, 953, 938, 894, 748; ESI-HRMS, m/z: Molekül formülü:  $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2^{81}\text{Br}$ , Hesaplanan monoizotopik kütle,  $[\text{M}-\text{H}]^+ = 464.00650$ , Bulunan monoizotopik kütle,  $[\text{M}-\text{H}]^+ = 464.00865$ .

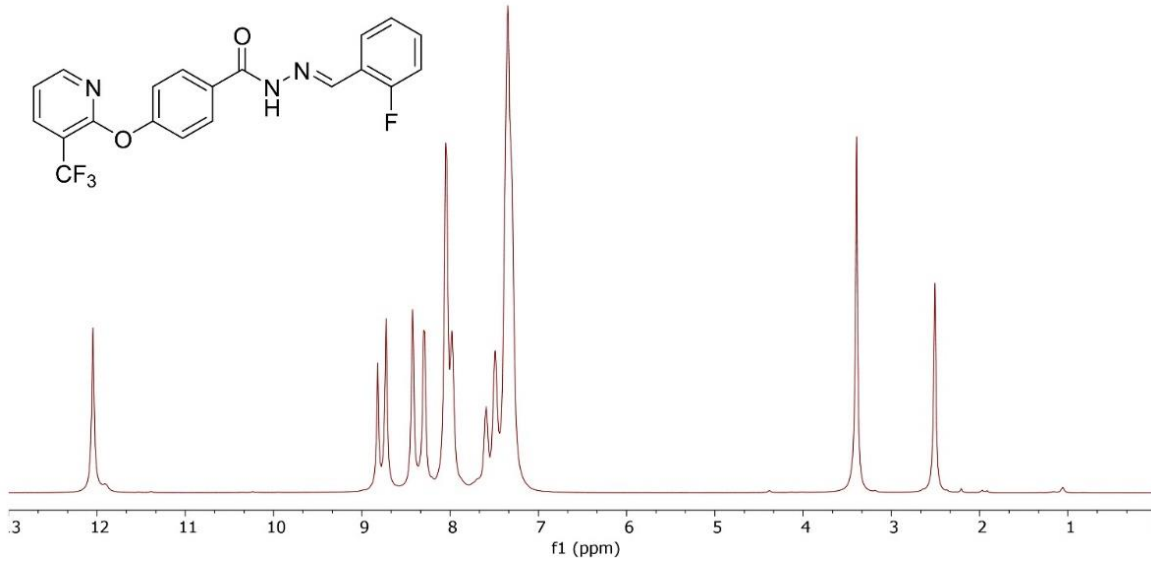
**Bileşik 8:** (E)-N'-(2-metilbenziliden)-4-((3-(triflorometil)piridin-2-il)oksi)benzohidrazit, 2-Metilbenzaldehit kullanılarak ariliden hidrazid bileşiklerinin genel sentez yöntemine göre sentezlendi. Krem renkli katı (0.65 gram, %96 verim). E.N.: 163-164 °C;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.89 (s, 1H), 8.77 (s, 1H), 8.04 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.88 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 7.43 – 7.19 (m, 5H), 2.54 (s, 1H), 2.46 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$  162.69, 160.42, 156.12, 152.11, 146.86, 138.52 (q,  $J = 4.6$  Hz, 138.57, 138.54, 138.50, 138.47), 137.34, 132.78, 132.21, 131.43, 131.34, 130.23, 129.93, 126.30, 123.40 (q,  $J = 272$  Hz, 126.66, 124.43, 122.27, 120.10), 121.85, 119.89, 113.40 (q,  $J = 32.8$  Hz, 113.79, 113.53, 113.27, 113.01), 19.49;  $^{19}\text{F}$  NMR (471 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -63.39; FT-IR  $\text{cm}^{-1}$  vmax: 3209, 3066, 1648, 1608, 1585, 1500, 1384, 1366, 1282, 1201, 1063, 1011, 959, 914, 824, 767, 683; ESI-HRMS, m/z: Molekül formülü:  $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2$ , Hesaplanan monoizotopik kütle,  $[\text{M}-\text{H}]^+ = 398.11164$ , Bulunan monoizotopik kütle,  $[\text{M}-\text{H}]^+ = 398.11365$ .

**Bileşik 9:** (E)-N'-(2-nitrobenziliden)-4-((3-(triflorometil)piridin-2-il)oksi)benzohidrazit, 2-Nitrobenzaldehit kullanılarak ariliden hidrazid bileşiklerinin genel sentez yöntemine göre sentezlendi. Sarı renkli katı (0.71 gram, %98 verim). E.N.: 189-190 °C;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.27 (s, 1H), 8.90 (s, 1H), 8.43 (d,  $J = 5.0$  Hz, 1H), 8.30 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 8.15 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H), 8.07 (dd,  $J = 15.8, 8.2$  Hz, 3H), 7.69 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.47-7.28 (m, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  163.02, 159.48, 159.15, 156.34, 152.10, 148.69, 143.39, 138.52 (d,  $J = 4.6$  Hz, 138.57, 138.54, 138.50, 138.47), 134.19, 131.12, 130.14, 129.21, 128.40, 123.33 (q,  $J = 271.8$  Hz, 126.57, 124.41, 122.25, 120.08), 125.14, 121.85, 119.92, 113.43 (q,  $J = 32.9$  Hz, 113.82, 113.56, 113.30, 113.04);  $^{19}\text{F}$  NMR (471 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  -61.88; FT-IR  $\text{cm}^{-1}$  vmax: 3195, 3079, 2895, 1664, 1595, 1585, 1554, 1477, 1435, 1369, 1326, 1205, 1162, 1063, 920, 892, 742, 680; ESI-HRMS, m/z: Molekül formülü:  $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_6$ , Hesaplanan monoizotopik kütle,  $[\text{M}-\text{H}]^+ = 461.07089$ , Bulunan monoizotopik kütle,  $[\text{M}-\text{H}]^+ = 461.07336$ .

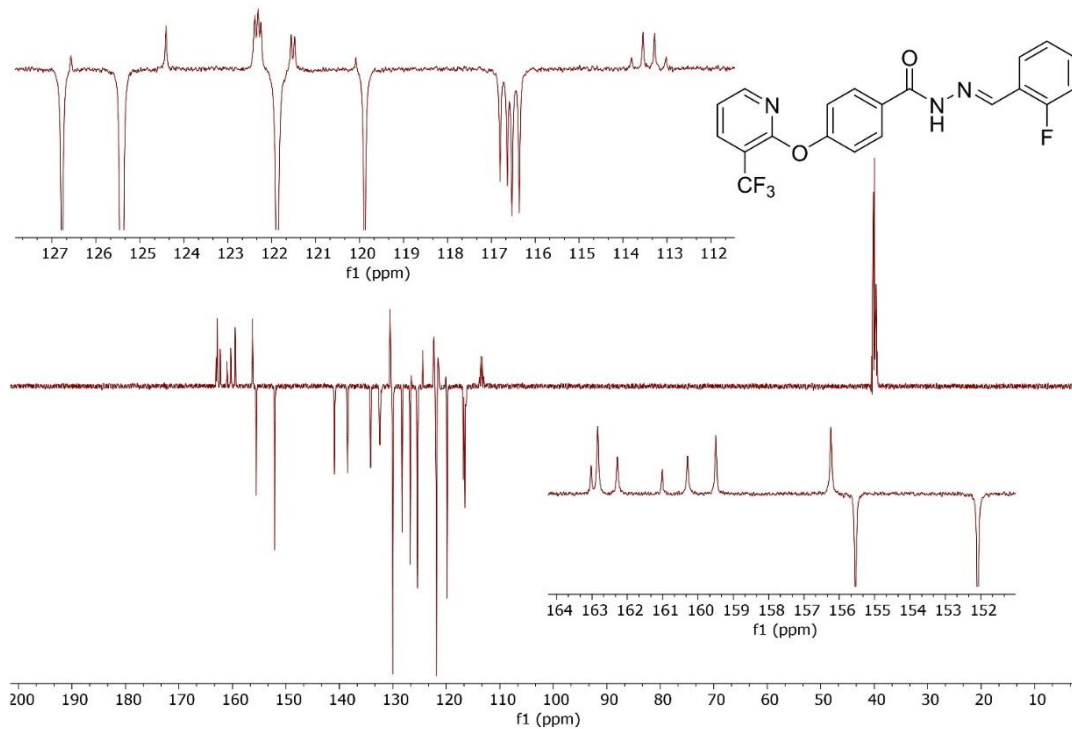
**Bileşik 10:** (E)-N'-(2,4-dimetoksibenziliden)-4-((3-(triflorometil)piridin-2-il)oksi)benzohidrazit, 2,4-Dimetoksibenzaldehit kullanılarak ariliden hidrazid bileşiklerinin genel sentez yöntemine göre sentezlendi. Açık sarı renkli katı (0.61 gram, %87 verim). E.N.: 196-197 °C;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.68 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.36 (dd,  $J = 4.9, 1.8$  Hz, 1H), 8.24 (dd,  $J = 7.8, 1.8$  Hz, 1H), 7.94 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 7.76 (d,  $J = 9.3$  Hz, 1H), 7.38 – 7.29 (m, 1H), 7.25 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 6.58 (dt,  $J = 4.3, 1.8$  Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.76 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  163.84, 162.93, 162.39, 159.63, 155.98, 152.13, 143.78, 138.54 (q,  $J = 4.4$  Hz, 138.59, 138.56, 138.52, 138.49), 130.89, 129.88, 127.15, 123.36 (q,  $J = 271.9$  Hz, 126.60, 124.44, 122.27, 120.11), 121.77, 119.88, 115.60, 113.38 (q,  $J = 32.9$  Hz, 113.77, 113.51, 113.24, 112.98), 106.87, 98.76, 56.23, 55.91;  $^{19}\text{F}$  NMR (471 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  -61.83; FT-IR  $\text{cm}^{-1}$  vmax: 3183, 3077, 2978, 1634, 1584, 1564, 1433, 1414, 1356, 1141, 1119, 1032, 969, 904, 805, 750, 637; ESI-HRMS, m/z: Molekül formülü:  $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4$ , Hesaplanan monoizotopik kütle,  $[\text{M}-\text{H}]^+ = 444.11712$ , Bulunan monoizotopik kütle,  $[\text{M}-\text{H}]^+ = 444.11480$ .

**Bileşik 11:** (E)-N'-(3,4-dimetoksibenziliden)-4-((3-(triflorometil)piridin-2-il)oksi)benzohidrazit, 3,4-Dimetoksibenzaldehit kullanılarak ariliden hidrazid bileşiklerinin genel sentez yöntemine göre sentezlendi. Açık sarı renkli katı (0.63 gram, %89 verim). E.N.: 191-192 °C;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.72 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.36 (dd,  $J = 4.9, 1.8$  Hz, 1H), 8.24 (dd,  $J = 7.8, 1.8$  Hz, 1H),

8.03-7.87 (m, 2H), 7.32 (dd,  $J = 7.7, 5.0$  Hz, 1H), 7.30 – 7.25 (m, 3H), 7.15 (dd,  $J = 8.3, 1.9$  Hz, 1H), 6.97 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.75 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$  162.69, 159.55, 156.03, 152.12, 151.24, 149.54, 148.49, 138.55 (q,  $J = 4.5$  Hz, 138.60, 138.57, 138.53, 138.50), 130.94, 129.91, 127.49, , 123.35 (q,  $J = 271.8$  Hz, 126.60 124.43, 122.27, , 120.11), 122.38, 121.84, 119.89, 113.38 (q,  $J = 32.9$  Hz, 113.77, 113.51, 113.25, 112.98), 111.94, 108.66, 56.03, 55.91;  $^{19}\text{F}$  NMR (471 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  -61.83; FT-IR  $\text{cm}^{-1}$  vmax: 3217, 3072, 3001, 2928, 1643, 1584, 1547, 1436, 1327, 1308, 1259, 1202, 1134, 1056, 957, 900, 768, 687; FT-IR  $\text{cm}^{-1}$  vmax: 3183, 3077, 2978, 1634, 1584, 1564, 1433, 1414, 1356, 1141, 1119, 1032, 969, 904, 805, 750, 637; ESI-HRMS,  $m/z$ : Molekül formülü:  $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4$ , Hesaplanan monoizotopik kütle,  $[\text{M}-\text{H}]^+ = 444.11712$ , Bulunan monoizotopik kütle,  $[\text{M}-\text{H}]^+ = 444.11964$ .



Şekil 2. Bileşik 5'e ait  $^1\text{H}$  NMR Spektrumu (500 MHz, DMSO- $d_6$ )



Şekil 3. Bileşik 5'e ait  $^{13}\text{C}$  APT NMR Spektrumu (125 MHz, DMSO- $d_6$ )

## Moleküler Doking Çalışmaları

Bileşiklerin HER2 proteinine karşı inhibisyon profilleri, her bir bileşiğin ilgili reseptöre ayrı ayrı doklanmasıyla *in silico* olarak araştırıldı. Bu çalışmada, Schrödinger Molecular Modeling Suite (Schrödinger Release 2023-1: Maestro, LLC, New York, NY2023) Maestro 13.5 programı kullanılarak moleküler doking çalışmaları yapıldı. İlk olarak, hedef enzimin (HER2, PDB ID: 3PP0) X-ışını kristal yapısı RCSB Protein Data Bank'tan temin edildi. Reseptör proteini hazırlamak için Schrödinger'in Protein Hazırlama Sihirbazı modülü kullanıldı. Bileşikler Chem Draw kullanılarak çizildi ve Schrödinger'e aktarıldı. Bileşiklerin optimizasyon çalışmaları Maestro'nun LigPrep yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm bileşikler, Glide/XP kullanılarak HER2 proteinine karşı doklandı. Son olarak, doklanmış pozların ligand-protein bağlanma ilgisini ve serbest bağlanma enerjisini hesaplamak için MM/GBSA (Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area) modülü kullanıldı. Maestro 13.5 programı kullanılarak bağlanma pozları ve etkileşim diyagramları oluşturuldu (Saikia ve Bordoloi, 2019; Şenol ve ark., 2023; Tokalı ve ark., 2023).

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### Moleküler Doking ve Moleküler Dinamik Çalışmaları

Hedef bileşiklerin HER2 (PDB: 3PP0) reseptör proteini ile etkileşimlerini incelemek ve potansiyel inhibitör etkinliklerini belirlemek amacıyla moleküler doking çalışmaları yapıldı. Moleküler doking çalışmalarına ek olarak hedef bileşiklerin reseptör protein ile bağlanma ilgileri ve serbest bağlanma enerjileri de belirlendi. Moleküler doking çalışmalarından elde edilen doking bağlanma skorları ve serbest bağlanma enerjileri (MM-GBSA  $\Delta G_{bind}$ ) Tablo 1'de verilmiştir. Moleküler doking sonuçlarına göre bileşik **6**, meme kanseri büyüme faktörü reseptörü HER2'ye en iyi bağlanan molekül olarak belirlendi. Bileşik **6**'nın HER2 proteinine bağlanma skoru -10.098 kcal/mol'dur. Hedef bileşiklerin bağlanma skorları aynı çalışmada kullanılan referans antikanser ilaç doksorubisinin bağlanma skoruyla karşılaştırıldı. Doksorubisinin HER2 proteinine bağlanma skoru -7.854 kcal/mol iken sadece bileşik **9** doksorubisinden daha az ilgi ile proteine bağlanmış olup diğer bütün bileşikler doksorubisine göre daha yüksek ilgiyle ve daha iyi bağlanma skorlarıyla hedef proteine bağlanmışlardır.

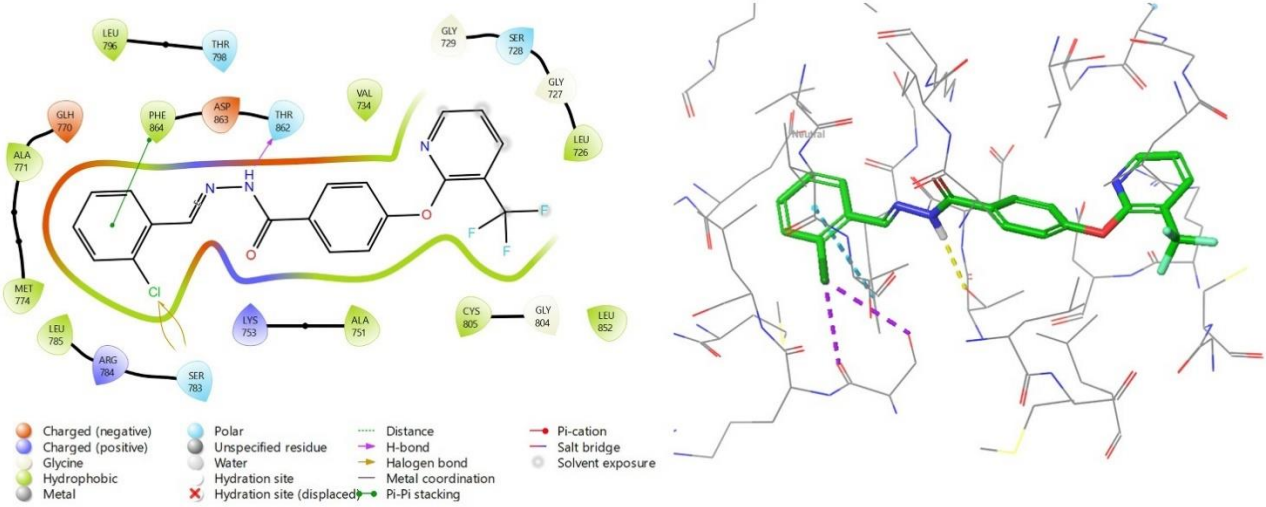
**Tablo 1.** Sentezlenen bileşiklerin doking skorları ve serbest bağlanma enerjileri

Bileşikler	XP Doking Skoru (kcal/mol)	MM-GBSA $\Delta G_{bind}$ (kcal/mol)
<b>4</b>	-8.035	-59.02
<b>5</b>	-8.329	-63.04
<b>6</b>	-10.098	-64.97
<b>7</b>	-8.687	-62.61
<b>8</b>	-8.825	-63.54
<b>9</b>	-7.276	-63.35
<b>10</b>	-7.923	-55.53
<b>11</b>	-8.264	-53.78
<b>Doksorubisin</b>	-7.854	-44.63

Bileşikler **4**, **5**, **7**, **8** ve **11**'in doking skorları 8-9 kcal/mol arasında değişmekte olup referans ilaca göre daha güçlü bir sonuç ortaya koymuşlardır. Moleküllerin reseptör proteine karşı ilgilerinin ölçüldüğü MM-GBSA analizinden elde edilen sonuçlara göre yine bileşik **6**'nın -64.97 kcal/mol enerji ile çok düşük bir bağlanma enerjisine sahip olduğu ve meydana gelen kompleksin yüksek kararlılığa sahip olabileceği anlaşılmaktadır. Doksorubisinin MM-GBSA serbest bağlanma enerjisi ise aynı çalışmada -44.63 kcal/mol olarak bulundu.



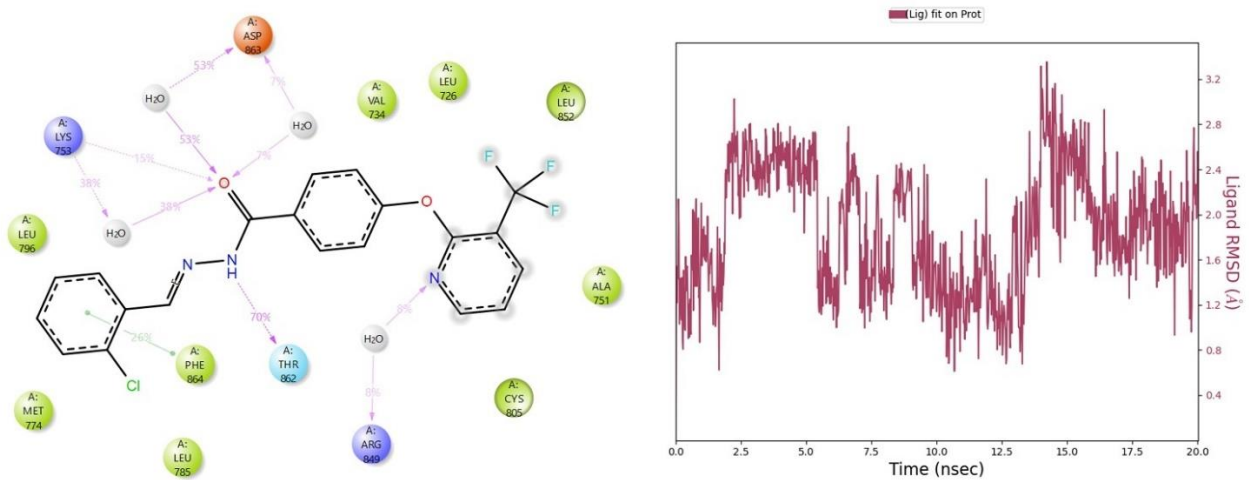
Moleküler doking çalışmalarında bileşik 6'nın HER2 proteininin aktif bölgesindeki aminoasit kalıntılarıyla yapmış olduğu etkileşimler iki boyutlu ve üç boyutlu olarak Şekil 4'te gösterilmektedir.



**Şekil 4.** Bileşik 6 ve HER2 proteininin aktif bölgesi arasındaki etkileşimlerin iki (sol) ve üç (sağ) boyutlu moleküler doking görüntüleri

Şekil 4'ün sol kısmındaki iki boyutlu etkileşimlere bakıldığında, hidrazid azotuna bağlı hidrojen atomunun Thr-862 ile hidrojen bağı etkileşimi yaptığı görülmektedir. Yine aynı şekilde benzen halkasının Phe-864 ile pi-pi staking etkileşimi ve klor atomunun Ser-783 ile halojen bağı etkileşimi yaptığı görülmektedir. Şekil 4'ün üç boyutlu parçasında ise molekülün uzaysal şekli ve bağlanma bölgesinin üç boyutlu yapısı görülmektedir. Üç boyutlu gösterimde kesikli mor çizgiler halojen bağı etkileşimlerini, kesikli sarı çizgiler hidrojen bağı etkileşimlerini ve kesikli turkuaz çizgiler ise pi-pi staking etkileşimlerini göstermektedir.

Doking skorlarına ve MM-GBSA serbest bağlanma enerjilerine göre bileşik 6'nın HER2 proteini ile meydana getirdiği kompleks seçilerek bu kompleksin kararlılığını belirlemek amacıyla moleküler dinamik simülasyonu yapıldı. Moleküler dinamik simülasyonunda elde edilen ligand-protein etkileşimlerine ait iki boyutlu görüntü ve simülasyon zamanı boyunca ligand atomlarının kök ortalama kare sapmasına (RMSD) ait grafik Şekil 5'te verilmiştir.



**Şekil 5.** Bileşik 6-HER2 ligand-protein kompleksinin moleküler dinamik simülasyonuna ait iki boyutlu etkileşimler (sol) ve ligand atomlarının simülasyon boyunca gösterdiği RMSD değerlerine ait grafik (sağ).

Şekil 5'ten görüleceği üzere bileşik 6'nın hidrazid hidrojeni simülasyon süresinin %70'inde Thr-862 ile hidrojen bağı etkileşimi yapmaktadır. Ayrıca hidrazid karbonili de Lys-753 ile simülasyonun %15'lik bir diliminde doğrudan hidrojen bağı etkileşimi göstermektedir. Bileşik 6'nın simülasyonda su molekülleri üzerinden aminoasitlerle yapmış olduğu su köprülü hidrojen bağlarına bakılacak olursa karbonil oksijeninin Asp-863 (%53 ve %7) ve Lys-753 (%38) ile, piridin azotunun ise Arg-849 (%8) ile etkileşim yaptığı görülmektedir. Ayrıca ariliden grubundaki aromatik halka simülasyon zamanının %26'lık bir bölümünde Phe-864 ile pi-pi staking etkileşimler yapmıştır. Bileşik 6-HER2 ligand protein kompleksinin moleküler dinamik simülasyonunda ligand atomlarının RMSD değerleri ortalama 2Å olarak hesaplanmıştır. Bu RMSD değeri ilgili kompleksin kararlı olduğunu bileşiğin uygun bir inhibitör olabileceğini göstermektedir.

### in siliko ADME Sonuçları

Sentezlenen hedef bileşiklerin fizikokimyasal tanımlayıcılarını, farmakokinetik özelliklerini ve ilaca benzerliğini tahmin etmek için ADME (absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve boşaltım) çalışmaları yapıldı. ADME çalışmalarında, tahmin edilen oktanol/su dağılım katsayısı, tahmin edilen sulu çözünürlük, nm/saniye cinsinden tahmin edilen görünür Caco-2 hücre geçirgenliği, tahmin edilen beyin/kan dağılım katsayısı, nm/saniye cinsinden öngörülen görünür MDCK hücre geçirgenliği, tahmin edilen insan %0-100 ölçeğinde oral absorpsiyon, Lipinski'nin beş kuralının ihlal sayısı ve Jorgensen'in üç kuralının ihlal sayısı belirlenerek değerlendirildi (Kılınç ve ark., 2022). Bileşiklerin yanı sıra referans ilaç doksorubisinin (dox.) de tahmini ADME sonuçları Tablo 2'de verilmiştir. Moleküllerin ilaç olarak kabul edilmesi için genellikle iki önemli tanımlayıcı vardır (Shafique ve ark., 2022). Bunlar, Lipinski'nin beş kuralının ihlal sayısı (Ro5) (Lipinski, 2004) ve Jorgensen'in üç kuralının ihlal sayısıdır (Ro3) (Jorgensen ve Duffy, 2002). Bir molekülün ilaç olarak kabul edilebilmesi için bu iki tanımlayıcının değerinin sıfır olması beklenir ancak Lipinski'nin kurallarından üçü ve Jorgensen'in kurallarından ikisi ihlal edilebilir (Lipinski ve ark., 1997; Shafique ve ark., 2022).

**Tablo 2.** Hedef bileşiklerin tahmini ADME parametreleri

Parametreler*	4	5	6	7	8	9	10	11	Dox.
Mol MW	385.34	403.33	419.79	464.24	399.37	430.34	445.39	445.39	543.52
donorHB	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	5.000
accptHB	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	5.000	5.500	5.500	14.800
QplogPo/w	5.408	5.607	5.846	5.922	5.689	4.755	5.656	5.613	-0.525
QplogS	-6.813	-7.119	-7.461	-7.575	-7.254	-6.911	-7.357	-7.294	-2.284
QPPCaco	1891	1861	1836	1834	1899	276	1898	1892	3
QplogBB	-0.354	-0.271	-0.227	-0.217	-0.363	-1.417	-0.516	-0.514	-2.827
QPPMDCK	3931	6305	8392	9023	3950	492	3946	3932	1
% HOA	100	100	100	100	100	100	100	100	0
Ro5	1	1	1	1	1	0	1	1	3
Ro3	1	1	1	1	1	1	1	1	2

Tablo 2'de verilen sonuçlara göre hedef bileşiklerin oktanol/su partiyon katsayıları dışındaki bütün parametreleri ilaç benzerliği açısından referans değerler ile uyumludur. Bu bakımdan Lipinski'nin ve Jorgensen'in ilaç adaylarında aradığı kurallardan sadece birer tanesi ihlal edilmiştir. Doksorubisinde ise Lipinski'nin üç kuralı ve Jorgensen'in iki kuralı ihlal edilmiştir. Bu sonuçlar tahmini parametreler olduğundan ve çoğunlukla ağızdan alınan ilaçların ilaç benzerliklerini yansıttığından *in vitro* ADME parametrelerinin de belirlenmesi ile daha anlamlı hale gelebilecektir.

## SONUÇ

Kanser tedavisinde kullanılan mevcut ilaçların çoğunun düşük biyoyararlanıma sahip olması ve toksisite gibi yan etkileri nedeniyle tedavide yeni ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır. Tedavide kullanılan anti-kanser ilaçların genellikle düşük seçicilik göstermesi, etkin bir tedavi sürecini zorlaştırmaktadır. Bu sebeple, tümör hücrelerini etkili bir şekilde hedef alacak, güçlü ve seçici ajanların keşfi büyük bir önem taşımaktadır. Literatürde yapılan araştırmalar, 4-hidroksibenzohidrazid türevlerinin geniş bir biyolojik aktivite yelpazesine sahip olduğunu göstermektedir. (Sannino ve ark., 2018; Şenol ve ark., 2023).

Bu çalışmada metil-4-hidroksibenzoat bileşiğinden hareketle arilidenhidrazid yapısında sekiz adet yeni bileşik (**4-11**) sentezlendi ve bu bileşiklerin meme kanseri büyüme faktörü reseptörü olan HER2'ye karşı potansiyel anti kanser etkinlikleri bilgisayarlı moleküler modelleme yöntemleriyle araştırıldı. Sentezlenen hedef bileşiklerin moleküler docking çalışmaları HER2 proteini üzerindeki bağlanma skorları ve serbest bağlanma enerjileri (MM-GMSA  $\Delta G_{bind}$ ) hesaplandı, daha sonra moleküler dinamik çalışmaları ile ligand-protein komplekslerinin kararlılıkları incelendi. Ligand protein komplekslerinin kararlılığı bir ligandın proteini inhibe etme kapasitesini göstermektedir. Bir ligandın protein ile meydana getirdiği kompleks ne kadar kararlı olursa inhibisyon o derecede kuvvetli olacaktır. Bu sebeple moleküler dinamik çalışmaları ile bu kararlılığın belirlenmesi oldukça önemlidir. Son olarak bileşiklerin tahmini ADME (emilim, dağılım, metabolizma ve atılım) özellikleri bilgisayar yardımıyla hesaplandı bilinen ilaçların parametreleri ile kıyaslanarak ilaç benzerlikleri tartışıldı. Sentezlenen bütün bileşikler  $^1H$  NMR,  $^{13}C$  NMR, FT-IR ve HRMS analizleri ile karakterize edildi.

Moleküler doking çalışmalarının sonuçlarına göre en aktif molekülün, -10.098 kcal/mol docking skoru ve -64.97 kcal/mol serbest bağlanma enerjisine sahip bileşik **6** olduğu belirlendi. Bileşik **6**-HER2 ligand-protein kompleksinin moleküler dinamik simülasyonunda simülasyon zamanının %70'i boyunca hidrojen bağı ve pi-pi staking etkileşimlerinin devam ettiği ve ligand atomlarının RMSD değerlerinin ortalamasının 2Å olduğu tespit edildi. Hedef bileşiklerin *in siliko* ADME parametrelerinin referans aralıklarda olduğu ve tahmini ADME sonuçlarına göre ilaç benzerliği taşıdığı görüldü. Ayrıca sonuçlar referans antikanser ilaç doksorubisinin ile karşılaştırıldı ve bazı parametrelerin doksorubisine göre daha anlamlı ve uygun olduğu tespit edildi. Sonuç olarak ilk defa bu çalışmada sentezlenen bileşik **6**, meme kanserinin büyüme faktörü reseptörü olan HER2'ye karşı yapılan *in siliko* çalışmalara göre en iyi inhibitör aday olabileceği belirlendi.

## Çıkar Çatışması

Makalenin planlanması, yürütülmesi ve yazılması sırasında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederim.

## Yazar Katkısı

Makalenin planlama, yürütme ve yazımının makalenin tek yazarı olarak tarafımdan yapıldığını beyan ederim.

## KAYNAKLAR

Afonin, A. V., Ushakov, I. A., Pavlov, D. V., Petrova, O. V., Sobenina, L. N., Mikhaleva, A. I. ve Trofimov, B. A. (2013). Structural studies of meso-CF<sub>3</sub>-3(5)-aryl(hetaryl)- and 3,5-diaryl(dihetaryl)-BODIPY dyes by H-1, C-13 and F-19 NMR spectroscopy and DFT calculations. *Journal of Fluorine Chemistry*, 145, 51-57.

- Aslanhan, Ö., Kalay, E., Tokalı, F. S., Can, Z. ve Şahin, E. (2023). Design, synthesis, antioxidant and anticholinesterase activities of novel isonicotinic hydrazide-hydrazone derivatives. *Journal of Molecular Structure*, 1279, 135037.
- Cansouline, X., Lipan, B., Sizaret, D., Tallet, A., Vandier, C., Carmier, D. ve Legras, A. (2022). EGFR-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer at Surgical Stages: What Is the Place for Tyrosine Kinase Inhibitors? *Cancers*, 14 (9), 2257.
- Cho, J. Y., Moon, J. H., Seong, K. Y. ve Park, K. H. (1998). Antimicrobial activity of 4-hydroxybenzoic acid and trans 4-hydroxycinnamic acid isolated and identified from rice hull. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 62 (11), 2273-2276.
- Crampon, K., Giorkallos, A., Deldossi, M., Baud, S. ve Steffanel, L. A. (2022). Machine-learning methods for ligand-protein molecular docking. *Drug Discovery Today*, 27 (1), 151-164.
- Fatriansyah, J. F., Rizqillah, R. K., Yandi, M. Y., Fadilah ve Sahlan, M. (2022). Molecular docking and dynamics studies on propolis sulabiroin-A as a potential inhibitor of SARS-CoV-2. *Journal of King Saud University Science*, 34 (1), 101707.
- Giaquinto, A. N., Sung, H., Miller, K. D., Kramer, J. L., Newman, L. A., Minihan, A., Jemal, A. ve Siegel, R. L. (2022). Breast Cancer Statistics, 2022. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, 72 (6), 524-541.
- Gomblér, W. (1981). NMR Spectroscopic Studies on Chalcogen Compounds .2. Te-125, Se-77, F-19 And C-13 Chemical-Shifts of CF<sub>3</sub> Substituted Selenium and Tellurium Compounds. *Zeitschrift Fur Naturforschung Section B-a Journal of Chemical Sciences*, 36 (5), 535-543.
- Hausman, D. M. (2019). What is cancer? *Perspectives in Biology and Medicine*, 62 (4), 778-784.
- Jorgensen, W. L. ve Duffy, E. M. (2002). Prediction of drug solubility from structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54 (3), 355-366.
- Kılınç, N., Açar, M., Tuncay, S. ve Karasakal, F. Ö. (2022). Potential Inhibitors Identification of Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Angiotensin-Converting Enzyme 2 and Main Protease from Anatolian Traditional Plants. *Letters in Drug Design & Discovery*, 19 (11), 996 - 1006.
- Lipinski, C. A. (2004). Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*, 1 (4), 337-341.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. ve Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23 (1), 3-25.
- Muang Sri, R., Chuysinuan, P., Thanyacharoen, T., Techasakul, S., Sukhavattanakul, P. ve Ummartyotin, S. (2022). Release Characteristic and Antioxidant Activity of 4-Hydroxybenzoic Acid (4HB) from Sodium Alginate and Polyvinyl Alcohol-based Hydrogel. *Chemistryselect*, 7 (34), e202202329.
- Saikia, S. ve Bordoloi, M. (2019). Molecular Docking: Challenges, Advances and its Use in Drug Discovery Perspective. *Curr Drug Targets*, 20 (5), 501-521.
- Sannino, F., Sansone, C., Galasso, C., Kildgaard, S., Tedesco, P., Fani, R., Marino, G., De Pascale, D., Ianora, A., Parrilli, E., Larsen, T. O., Romano, G. ve Tutino, M. L. (2018). Pseudoalteromonas haloplanktis TAC125 produces 4-hydroxybenzoic acid that induces pyroptosis in human A459 lung adenocarcinoma cells. *Scientific Reports*, 8 (1), 1190.
- Shafique, I., Saeed, A., Ahmed, A., Shabir, G., Ul-Hamid, A., Khan, A., Tüzün, B., Kirici, M., Taslimi, P. ve Latif, M. (2022). Exploring the multi-target enzyme inhibition potential of new

- sulfonamido-thiazoline derivatives; synthesis and computational studies. *Results in Chemistry*, 4, 100656.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E. ve Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, 72 (1), 7-33.
- Şenol, H., Ağgöl, A. G. ve Atasoy, S. (2023a). Synthesis, Characterization, Molecular Docking and in vitro Biological Studies of Thiazolidin-4-one Derivatives as Anti-Breast-Cancer Agents. *Chemistryselect*, 8 (20), e202300481.
- Şenol, H., Ağgöl, A. G., Atasoy, S. ve Güzeldemirci, N. U. (2023). Synthesis, characterization, molecular docking and in vitro anti-cancer activity studies of new and highly selective 1,2,3-triazole substituted 4-hydroxybenzohydrazide derivatives. *Journal of Molecular Structure*, 1283, 135247.
- Tokalı, F. S., Şenol, H., Bulut, Ş. ve Hacıosmanoğlu-Aldoğan, E. (2023). Synthesis, characterization and molecular docking studies of highly selective new hydrazone derivatives of anthranilic acid and their ring closure analogue Quinazolin-4(3H)-ones against lung cancer cells A549. *Journal of Molecular Structure*, 1282, 135176.
- Tokalı, F. S., Taslimi, P., Demircioğlu, İ. H., Şendil, K., Tuzun, B. ve Gülçin, İ. (2022). Novel phenolic Mannich base derivatives: synthesis, bioactivity, molecular docking, and ADME-Tox Studies. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 19 (2), 563-577.
- Tokalı, F. S., Taslimi, P., Sadeghian, N., Taskin-Tok, T. ve Gülçin, İ. (2023). Synthesis, Characterization, Bioactivity Impacts of New Anthranilic Acid Hydrazones Containing Aryl Sulfonate Moiety as Fenamate Isosteres. *Chemistryselect*, 8 (13), e202300241.
- Waks, A. G. ve Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment A Review. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 321 (3), 288-300.
- Winter, A. N., Brenner, M. C., Punessen, N., Snodgrass, M., Byars, C., Arora, Y. ve Linseman, D. A. (2017). Comparison of the Neuroprotective and Anti-Inflammatory Effects of the Anthocyanin Metabolites, Protocatechuic Acid and 4-Hydroxybenzoic Acid. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017:6297080