

Araştırma Makalesi - Research Article

Hipertansiyon Tedavisi İçin Yeni Ace İnhibitörlerinin Tasarımı, Sentezi, Moleküler Doking-Dinamik Çalışmaları Design, Synthesis, Molecular Doking-Dynamic Studies of New Ace Inhibitors For Hypertension Treatment

Derya Osmaniye^{1,2*}, Bedriye Çelik³

Geliş / Received: 04/06/2024

Revize / Revised: 10/09/2024

Kabul / Accepted: 10/09/2024

ÖZ

Hipertansiyon günümüzde yaş fark etmeksizin sıklıkla karşılaşılan bir hastalık haline gelmiştir. Tedavi edilmediği durumlarda ciddi sonuçlar doğurmaktadır. Hipertansiyon tedavisinde etkili olabilecek yeni ACE inhibitörlerinin tasarımı ve sentezi, hipertansiyonun kontrol altına alınması ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi için önemli bir araştırma alanıdır. Bu çalışma kapsamında 3 yeni piperidin türevi sentezlenmiş ve antihipertansif etkileri *in silico* yöntemler ile araştırılmıştır. Sentezlenen bileşiklerin yapıları, ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve HRMS spektrumları ile doğrulanmıştır. Sentezlenen bileşenlerin moleküler doking çalışmaları yapılarak yapı-etki ilişkileri hakkında fikir elde edilmiştir. Bileşiklerin ADME parametreleri hesaplanmıştır. Moleküler doking çalışmaları sonucunda bileşik 2a'nın kaptopril ve enalapril arasında bir doking skoruna (-8.042) sahip olduğu saptanmıştır. Bileşik 2a için gerçekleştirilen moleküler dinamik çalışmaları bileşiğin hem stabilize hem de etkileşim potansiyelini göstermektedir. Bileşik 2a+IUZE kompleks yapısı 1.8 Å RMSD değerine sahiptir. Bileşik 2a üzerindeki karboksilat anyonu çinko ile %100 etkileşim kurmuştur.

Anahtar Kelimeler- Hipertansiyon, Piperidin, Moleküler Doking

ABSTRACT

Hypertension has become a frequently encountered disease today, regardless of age. If left untreated, it causes serious consequences. The design and synthesis of new ACE inhibitors that may be effective in the treatment of hypertension is an important research area for controlling hypertension and preventing cardiovascular diseases. Within the scope of this study, 3 new piperidine derivatives were synthesized and their antihypertensive effects were investigated by *in silico* methods. The structures of the synthesized compounds were confirmed by ¹H-NMR, ¹³C-NMR and HRMS spectra. Molecular docking studies of the synthesized components were carried out to obtain an idea about the structure-activity relationships. ADME parameters of the compounds were calculated. As a result of molecular docking studies, it was determined that compound 2a has a docking score (-8.042) between captopril and enalapril. Molecular dynamics studies performed for compound 2a show both stability and interaction potential of the compound. Compound 2a+IUZE complex structure has 1.8 Å RMSD value. Carboxylate anion on compound 2a has 100% interaction with zinc.

Keywords- Hypertension, Piperidine, Molecular Docking

*Sorumlu yazar iletişim: dosmaniye@anadolu.edu.tr (<https://orcid.org/0000-0002-0499-436X>)

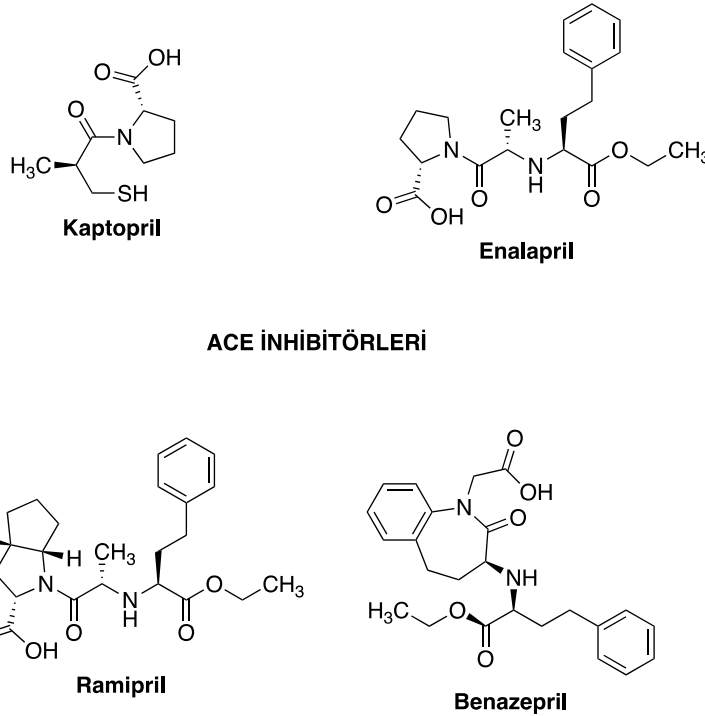
Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Anadolu University, 26470 Eskişehir, Turkey
Central Research Laboratory (MERLAB), Faculty of Pharmacy, Anadolu University, 26470 Eskişehir, Turkey

³İletişim: bedriyecelik@anadolu.edu.tr (<https://orcid.org/0009-0002-1321-5994>)

Faculty of Pharmacy, Anadolu University, 26470 Eskişehir, Turkey

I. GİRİŞ

Kronik bir hastalık olan hipertansiyon, dünya çapında ölümlerin önde gelen nedenlerinden biri olarak gösterilmektedir. Ayrıca birçok faktörün rol oynadığı bir hastalıktır. Bu kronik hastalığın her yıl dokuz milyondan fazla insanı öldürdüğü ve yaklaşık 1,13 milyar insanı etkilediği bilinmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün hipertansiyonun küresel yüküne ilişkin raporuna göre, 2025 yılına kadar 1,6 milyardan fazla insan hipertansiyona sahip olacaktır ¹. Hipertansiyon hastalığının toplumda sık görülmesi, sıklığının yaşla birlikte artması, ek hastalıklar ile birlikte olması; kronik bir hastalık olduğu için sürekli ilaç kullanımı ve takibi gerektirmesi nedeniyle önemli bir sağlık sorunudur. Gerek hastalığın ilk tanısının konması aşamasında, gerekse kontrollerde hipertansiyonun kontrol altında olup olmadığının tespitinde kan basıncına etki eden sekonder nedenlerin değerlendirilmesi önem arz etmektedir ². ACE (Anjiotensin dönüştürücü enzim), kan basıncının kontrol edilmesinde ve sıvı dengesinin korunmasında karmaşık bir şekilde yer alan düzenleyici bir mekanizma olan renin-anjiyotensin sisteminin (RAS) yapısında çok önemli ve önemli bir rol oynar ³. ACE çinko içeren bir enzimdir ⁴. Damar, kalp, akciğer ve beyin dokularında bulunur. Anjiotensin-I ACE katalizli bir reaksiyon ile anjiotensin-II'ye dönüşmektedir. ACE inhibe edilerek anjiotensin-II oluşumu engellenmekte ve böylece kan basıncının kontrol edilmesi ve antihipertansif etkinin ortaya çıkması, tansiyon tedavisi için bir strateji olarak kabul edilmektedir. Kaptopril, enalapril, ramipril ve benazepril (Şekil 1) dahil olmak üzere sentetik ACE inhibitörleri, insanlarda esansiyel hipertansiyonun tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır ⁵.



Şekil 1. Klinikte kullanılan ACE inhibitörlerinin kimyasal yapısı

ACE inhibitörlerinin yapı etkileri net bir şekilde aydınlatılmıştır, bu yapı-etki ilişkileri şu şekilde özetlenebilir. Azot taşıyan halka karboksilik asit içermelidir. Burada amaç bileşiğin ACE substratlarındaki C-terminal gruba benzemesidir. Sülfidril grubu içeren bileşikler çinko iyonlarına bağlanmada üstünlük gösterir fakat sülfidril grubu içeren bileşiklerin dimer ve disülfidler oluşturma potansiyeli vardır. Bu ise etki süresinin azalması demektir. Çinko iyonlarını bağlayan karboksilat ve fosfinik asit türevleri peptid hidrolizini ve bağlanmayı değiştirir. Bunların ester formları oral biyoyararlanımı artırır. Bileşikler amid yapısının alfa karbonunda metil içerirler. Bu bileşiklerin molekül şekillerini alanine benzetmektedir ⁶.

Yukarıda anlatılan bilgiler ışığında bu çalışma kapsamında piperidin halkası üzerinde karboksilik asit fonksiyonel grubu taşıyan yeni bileşikler sentezlenmiştir. 3 adet yeni bileşik elde edilmiştir. Elde edilen bileşiklerin yapıları ¹H-NMR (hidrojen nükleer magnetik rezonans), ¹³C-NMR (karbon nükleer magnetik rezonans) ve HRMS (yüksek çözünürlüklü kütle spektroskopisi) yöntemleri kullanılarak karakterize edilmiştir. Bileşiklerin hepsi yapı-etki ilişkilerinde bahsedilen azotlu halka üzerinde karboksilik asit taşımaktadır. Azotlu halka olarak piperidin halkası seçilmiştir. Bileşiklerden bir tanesi (2a) alfa karbonu üzerinde metil taşımaktadır. Elde edilen bileşikler ve referans ilaç olan kaptopril ve enalapril moleküler doking çalışmalarına tabi tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar çalışmanın sonuç kısmında sunulmuştur.

II. MATERYAL VE YÖNTEM

A. Sentez Çalışmaları

Sodyum 3-karboksi piperidin-1-karboditiyoat sentezi (1)

Piperidin 3-karboksilik asit (5 gr, 0.038 mol), karbon disülfür (3.46 gr, 0.045 mol) ve sodyum hidroksit (NaOH) (1.8 gr, 0.045 mol) etanol (99%, 30 mL) içinde çözölmüştür. Reaksiyon karışımı, 24 saat boyunca buz banyosunda karıştırılmıştır. İTK (ince tabaka kromatografisi) analizi yapılarak reaksiyon içeriği sonlandırılmıştır. Ham ürün, dietileter ile yıkanarak alınmış, kurutulmuş ve etanolden yeniden kristallendirilmiştir

Hedef bileşiklerin sentezi (2a-2c)

1-(((3-Oksobütan-2-il) tiyo) karbonotiyoil) piperidin-3-karboksilik asit sentezi (2a)

Sodyum 3-karboksi piperidin-1-karboditiyoat (1) (0.5 gr, 0.002 mol) ve 3-klorobutan-2-on (0.233 gr, 0.002 mol) aseton (20 mL) içinde çözölmüştür. Reaksiyon karışımı, 24 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. İTK analizi yapılarak reaksiyon içeriği sonlandırılmıştır. Ham ürün, suyla yıkanarak alınmış, kurutulmuş ve etanolden yeniden kristallendirilmiştir.

1-(((2-Metoksi-2-oksoetil) tiyo) karbonotiyoil) piperidin-3-karboksilik asit sentezi (2b)

Sodyum 3-karboksi piperidin-1-karboditiyoat (1) (0.5 gr, 0.002 mol) ve metil 2-kloroasetat (0.216 gr, 0.002 mol) aseton (20 mL) içinde çözölmüştür. Reaksiyon karışımı, 24 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. İTK analizi yapılarak reaksiyon içeriği sonlandırılmıştır. Ham ürün, suyla yıkanarak alınmış, kurutulmuş ve etanolden yeniden kristallendirilmiştir.

1-(((2-Etoksi-2-oksoetil) tiyo) karbonotiyoil) piperidin-3-karboksilik asit sentezi (2c)

Sodyum 3-karboksi piperidin-1-karboditiyoat (1) (0.5 gr, 0.002 mol) ve etil 2-kloroasetat (0.244 gr, 0.002 mol) aseton (20 mL) içinde çözölmüştür. Reaksiyon karışımı, 24 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. İTK analizi yapılarak reaksiyon içeriği sonlandırılmıştır. Ham ürün, suyla yıkanarak alınmış, kurutulmuş ve etanolden yeniden kristallendirilmiştir.

B. Moleküler Doking Çalışmaları

Moleküler docking çalışmaları Schrödinger 2020 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin molekül şekilleri çizildikten sonra Ligprep modülü ile pH:7.4±1 değeri ile ligandlar hazırlanmıştır. Protein veri bankası (PDB) aracılığı ile ACE enziminin kristal yapısı elde edilmiştir. PDB ID:1UZE kristali ⁷kullanılarak protein hazırlanmıştır. Optimizasyon ve minimizasyonu yapılan protein üzerinden Glide modülü kullanılarak glide dosyası hazırlanmıştır. Elde edilen veriler ile standart docking prosedürü gerçekleştirilmiş ve elde edilen pozların iki boyutlu, üç boyutlu görselleri ve docking skorları elde edilmiştir ⁸⁻¹⁰. Doking prosedürleri hem elde edilen bileşikler (2a-2c) hem de kaptopril ve enalapril için gerçekleştirilmiştir.

C. Moleküler Dinamik Çalışmaları

Moleküler dinamik (MD) simülasyonları bir ilaç-reseptör kompleksi için aktif bir bölgedeki bir ligandin zamana bağlı stabilitesini değerlendirmek için önemli bir hesaplama aracı olarak kabul edilmektedir, bu çalışma kapsamında ise bileşik 2a için yapılmıştır ¹¹. Yerleştirme sonucundan belirlenen komplekslerin kararlılığını sağlamak için 100 ns boyunca MD simülasyonları gerçekleştirilmiştir. Dinamik çalışmaları, desmond uygulamasını ¹²³ noktalı (TIP3P) bir su modeli ve ardından kompleksin enerji minimizasyonu ¹³ ile transfer edilebilir bir moleküller arası potansiyele sahip *Schrödinger Suite*'in standart kuvvet alanı (OPLS3e) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tek değerli iyonların fizyolojik konsantrasyonunu simüle ederken bir yandan da sistemin nötralizasyonunu sağlamak amacıyla Na⁺ ve Cl⁻ iyonları kullanılarak 0.15 M'lik bir nihai tuz konsantrasyonu sağlanmıştır. Sabit sıcaklık (310.55 K) ve basınç (1.01325 bar), topluluk sınıfı olarak NPT (sabit sayıda parçacık, basınç ve sıcaklık) ile kullanılmıştır. Hareket denklemlerini bütünleştirmek için RESPA entegratörü ¹⁴ kullanılmıştır. Simülasyon sıcaklığını sabit tutmak için NH termostatları ¹⁵ kullanılmış ve basıncı kontrol etmek için MTK yöntemi ¹⁶ uygulanmıştır. Uzun menzilli elektrostatik etkileşimler, pmE yöntemi ¹⁷ ile hesaplanmıştır. Van der Waals ve kısa menzilli elektrostatik etkileşimler için sınır 9,0 Å olarak ayarlanmıştır. Sistemin dengelenmesi, sistemi yavaşça gevşetmek için kullanılan bir dizi sınırlandırılmış minimizasyon ve moleküler dinamik simülasyonlarından oluşan Desmond'da sağlanan varsayılan protokolle gerçekleştirilmiştir. MD simülasyonu, yukarıdaki ayarlar kullanılarak ve sistem kurulumunun tamamlanmasının ardından gerçekleştirilmiştir. Rg (dönme yarıçapı), kök ortalama kare dalgalanma (RMSF) ve kök ortalama kare sapma (RMSD) değerleri Desmond uygulaması tarafından hesaplanmıştır.

D. Tahmini ADME Parametreleri

Bileşikler **2a-2c** için ADME (Absorbsiyon, Dağılım, Metabolizasyon, Atılım) ile ilgili parametreler online SwissADME programı kullanılarak hesaplanmıştır ¹⁸.

III. BULGULAR VE TARTIŞMA**1-(((3-oksobütan-2-il) tiyo) karbonotiyoil) piperidin-3-karboksilik asit (2a)**

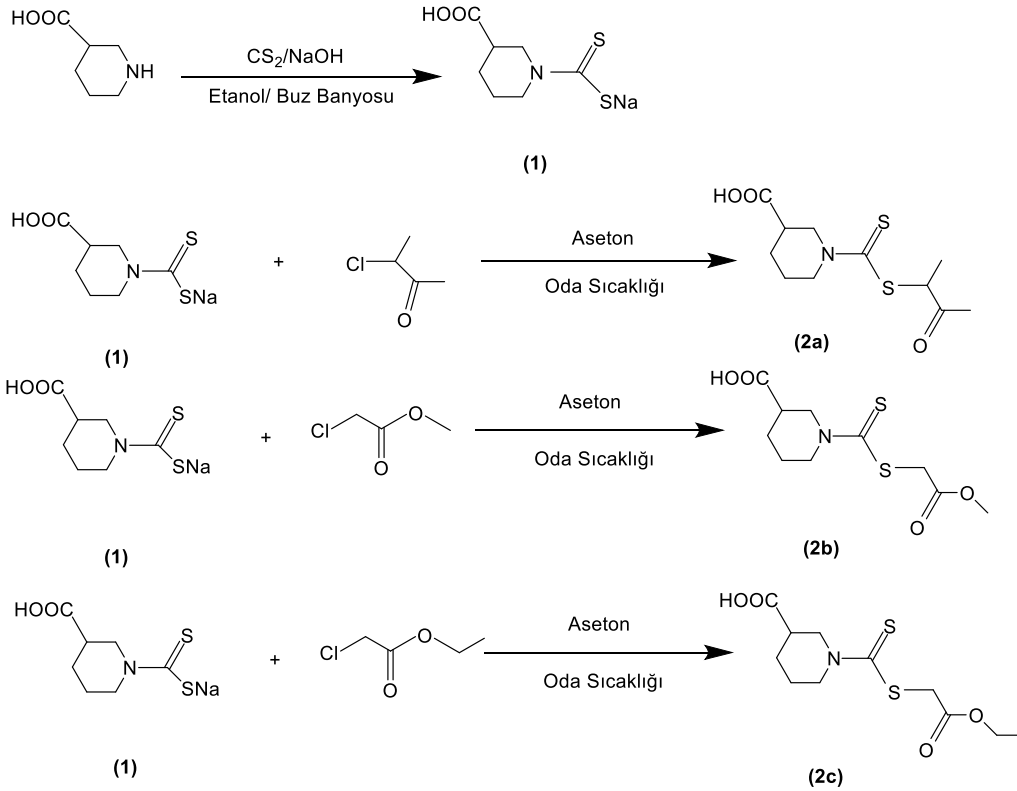
Verim:%62, yarı katı, ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): 1.38 (3H, d, *J*=7.3 Hz, -CH₃), 1.72-1.77 (3H, m, piperidin), 1.99-2.03 (1H, m, piperidin), 2.25 (3H, s, -CH₃), 3.41-3.62 (5H, m, Al-H), 4.33-4.39 (1H, m), 4.73 (1H, q, *J*=7.2 Hz, -CH-). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): 15.8, 24.1, 24.9, 26.8, 28.3, 51.1, 52.1, 53.4, 55.1, 174.2, 193.5, 205.5. HRMS: Kapalı formül; C₁₁H₁₇NO₃S₂ hesaplanan kütle: 276.0723 ölçülen kütle: 276.0711

1-(((2-metoksi-2-oksoetil) tiyo) karbonotiyoil) piperidin-3-karboksilik asit (2b)

Verim:%60, yarı katı, ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): 1.23-1.29 (2H, m), 1.45-1.50 (2H, m), 1.99-2.02 (1H, m), 2.49-2.50 (1H, m), 3.37-3.45 (2H, m), 3.63 (3H, s), 3.63-3.67 (1H, m), 4.18 (2H, s), 4.39-4.42 (1H, m). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): 24.2, 24.9, 26.9, 43.9, 52.7, 52.8, 65.0, 169.1, 174.2, 174.3, 194.1 HRMS: Kapalı formül; C₁₀H₁₅NO₄S₂ hesaplanan kütle: 300.0335 ölçülen kütle: 300.0325.

1-(((2-etoksi-2-oksoetil) tiyo) karbonotiyoil) piperidin-3-karboksilik asit (2c)

Verim:%70, yarı katı, ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): 1.18-1.21 (3H, m), 1.46-1.55 (1H, m), 1.67-1.71 (2H, m), 1.99-2.03 (1H, m), 2.44 (1H, y), 3.35-3.62 (4H, m), 4.08-4.16 (2H, m), 4.16-4.17 (2H, m), 4.36-4.41 (1H, m). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): 14.5, 24.1, 24.9, 26.9, 50.9, 53.4, 58.4, 61.5, 168.5, 173.9, 174.1, 194.3 HRMS: Kapalı formül; C₁₁H₁₇NO₄S₂ hesaplanan kütle: 292.0672 ölçülen kütle: 292.0657.



Şekil 2. Bileşikler 2a-2c için sentez şeması

Hedef bileşiklerin sentezlenmesi iki basamaklı bir reaksiyon ile gerçekleştirilmiştir. İlk basamakta piperidin-3-karboksilik asitten hareketle ditiyokarbamat tuzu oluşturulmuştur. Reaksiyon buz banyosunda gerçekleştirilmiş ve ham ürün çöktükten sonra karbon disülfin fazlasının uzaklaştırılması için diyetil eter (20 mL) ile üç tur yıkama yapılmıştır. İkinci basamakta halojenli bileşikler ile ditiyokarbamat tuzu (bileşik 1) reaksiyona sokulmuş aseton uçulurup su ile yıkama yapıldıktan sonra ürün katılaşmamıştır. Su fazı sodyum bikarbonat ile doyurulup etil asetat ile ekstraksiyon yapılmış, etil asetatlı faz uçurulup ham ürün kazınarak alınmıştır.

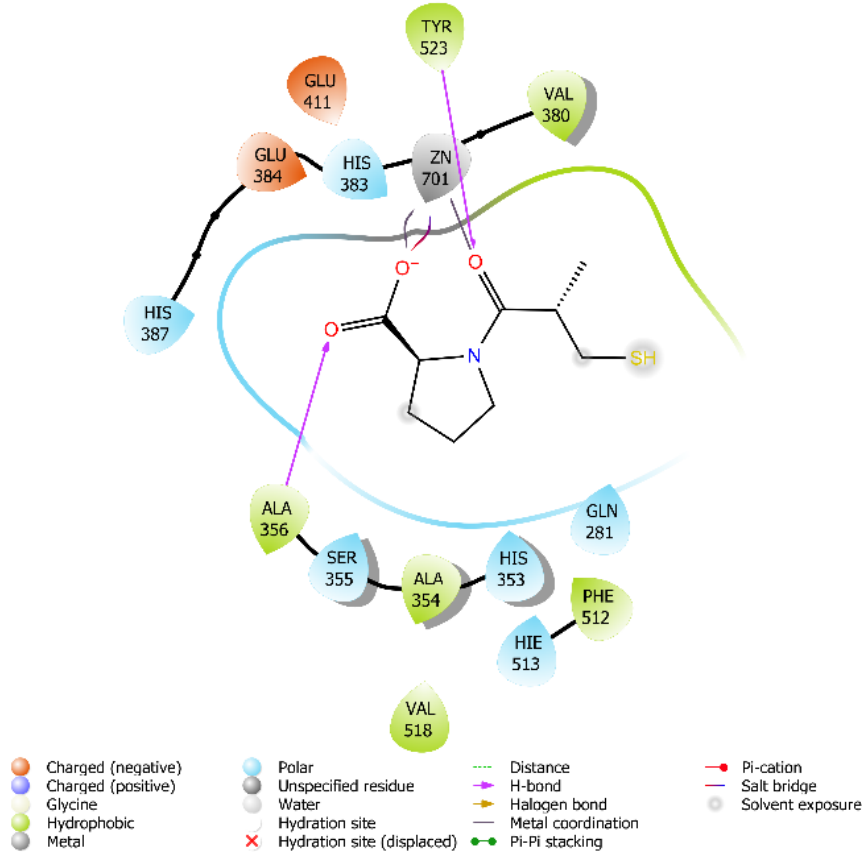
Bileşiklerin analizleri ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve HRMS spektroskopik metotları kullanılarak incelenmiştir. İlgili raporlar EK dosyasında spektra 1-9 arasında sunulmuştur. Elde edilen bileşiklerin doking çalışmaları Schrödinger 2020 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ACE enziminin kristal yapısına protein veri bankası

aracılığı ile ulaşılmıştır. PDB ID:1UZE olan kristal kullanılmıştır. Bileşikler 2a-2c, kaptopril ve enalapril için doking çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen doking skorları Tablo 1’de sunulmuştur.

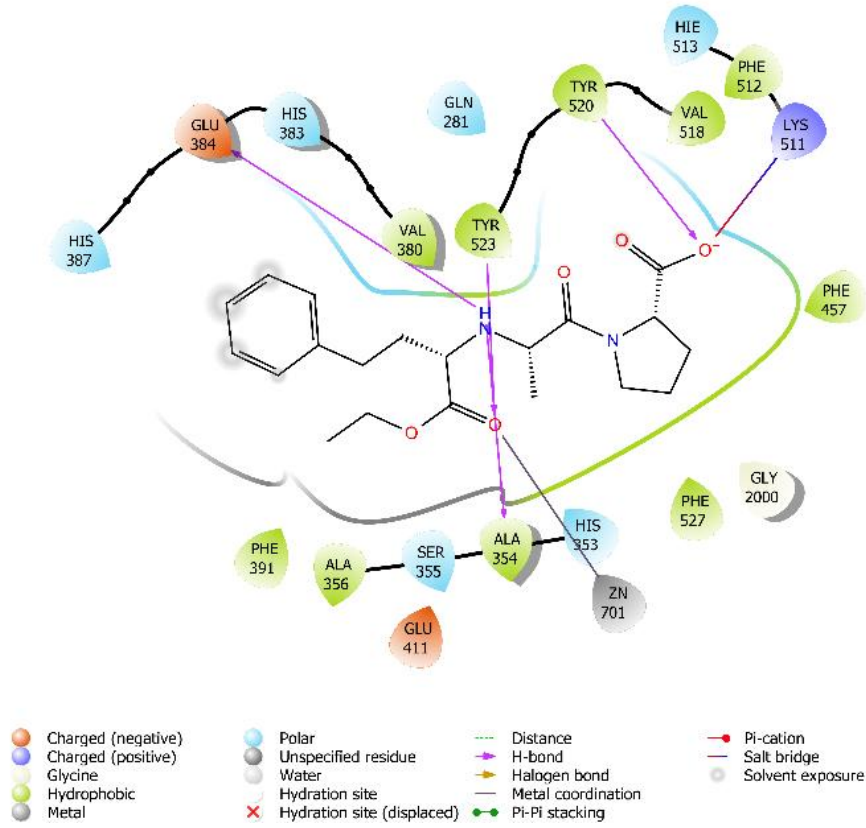
Tablo 1. Bileşikler 2a-2c, kaptopril ve enalapril için doking skorları

Bileşik	Doking Score	Glide Score	Glide e model
2a	-8.042	-8.042	-66.758
2b	-6.342	-6.342	-63.450
2c	-6.804	-6.804	-74.050
Kaptopril	-7.754	-7.758	-60.222
Enalapril	-8.537	-8.618	-87.763

Doking skorları incelendiğinde kaptopril -7.754 kcal/mol, enalapril ise -8.537 kcal/mol doking skoruna sahip oldukları görülmektedir. Bileşikler 2a, 2b ve 2c için doking skorları incelendiğinde sırası ile -8.042, -6.342 ve -6.804 kcal/mol doking skoruna sahip oldukları görülmektedir. Bileşik 2a kaptopril ile enalapril arasında bir doking skoruna sahiptir. Bu bileşiğin affinitesini göstermektedir. Şekil 3-7 arasında bileşiklerin ACE-2 enzim aktif bölgesinde bileşikler 2a-2c, kaptopril ve enalapril etkileşimlerini sunmaktadır. Şekil 3 incelendiğinde kaptopril molekülünün etkileşimleri görülmektedir. Bu etkileşimler şu şekilde sıralanabilir; karboksilat anyonu ile Zn atomu arasında ikili tuz köprüsü oluşturmaktadır, pirolidin halkasının ikinci konumuna bağlı karbonil grubu ile Ala356 arasında bir hidrojen bağı oluşturmaktadır, pirolidin halkasının birinci konumuna bağlı karbonil Zn ile metal koordinasyonu yaparken Tyr523 ile hidrojen bağı oluşturmıştır.



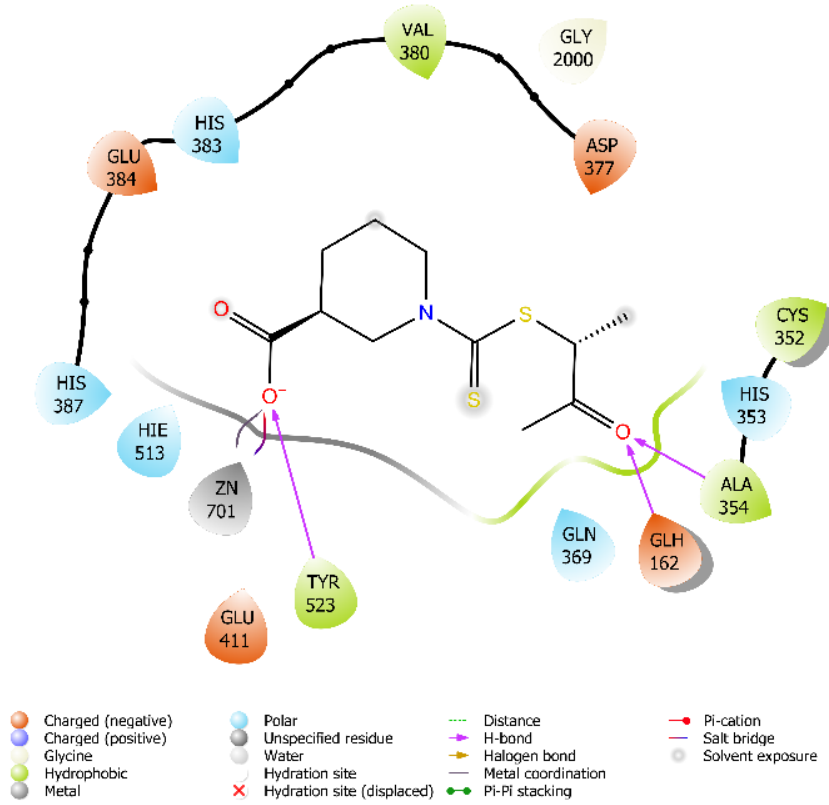
Şekil 3. Kaptopril'e ait iki boyutlu doking pozu (PDB ID:1UZE)



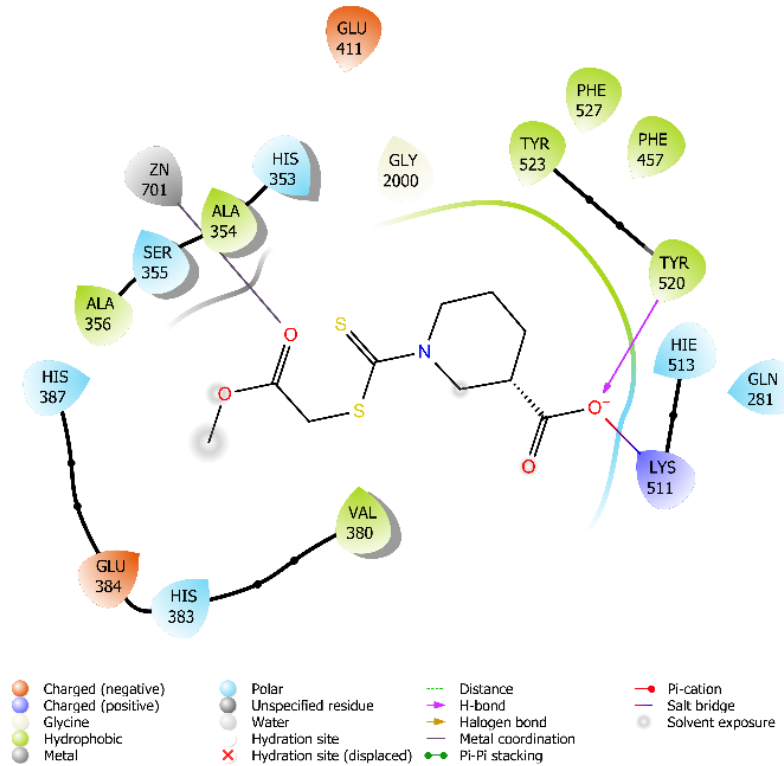
Şekil 4. Enalapril'e ait iki boyutlu doking pozu (PDB ID:1UZE)

Şekil 4 incelendiğinde enalapril molekülünün etkileşimleri görülmektedir. Bu etkileşimler şu şekilde sıralanabilir; karbonil grubu ile Zn atomu arasında metal koordinasyon bağı, Tyr523 ile hidrojen bağı oluşmaktadır, amin grubu ile Ala354 ve Glu384 arasında iki adet hidrojen bağı oluşmaktadır, karboksilat anyonu ile Tyr520 arasında hidrojen bağı oluşken Lys511 ile tuz köprüsü oluşturmaktadır. Şekil 5 incelendiğinde bileşik 2a'nın ACE enzim aktif bölgesindeki etkileşimleri görülmektedir. Bu etkileşimler şu şekilde sıralanabilir; karboksilat anyonu ile Zn atomu arasında ikili tuz köprüsü, Tyr523 ile hidrojen bağı oluşmaktadır, bileşik 2a'nın karbonil grubu ile Glu162 ve Ala354 ile hidrojen bağı oluşturmaktadır. Şekil 6 incelendiğinde bileşik 2b'nin ACE enzim aktif bölgesindeki etkileşimleri görülmektedir. Bu etkileşimler şu şekilde sıralanabilir; karbonil grubu ile Zn atomu arasında metal koordinasyon bağı oluşmaktadır, bileşik 2b'nin karboksilat anyonu ile Lys511 ve Tyr520 arasında iki adet hidrojen bağı oluşturmaktadır. Şekil 7 incelendiğinde bileşik 2c'nin ACE enzim aktif bölgesindeki etkileşimleri görülmektedir. Bu etkileşimler şu şekilde sıralanabilir; karbonil grubu ile Zn atomu arasında metal koordinasyon bağı yaparken Tyr523 ile hidrojen bağı oluşturmaktadır, bileşik 2c'nin karboksilat anyonu ile Lys511 ve Tyr520 arasında iki adet hidrojen bağı oluşturmaktadır.

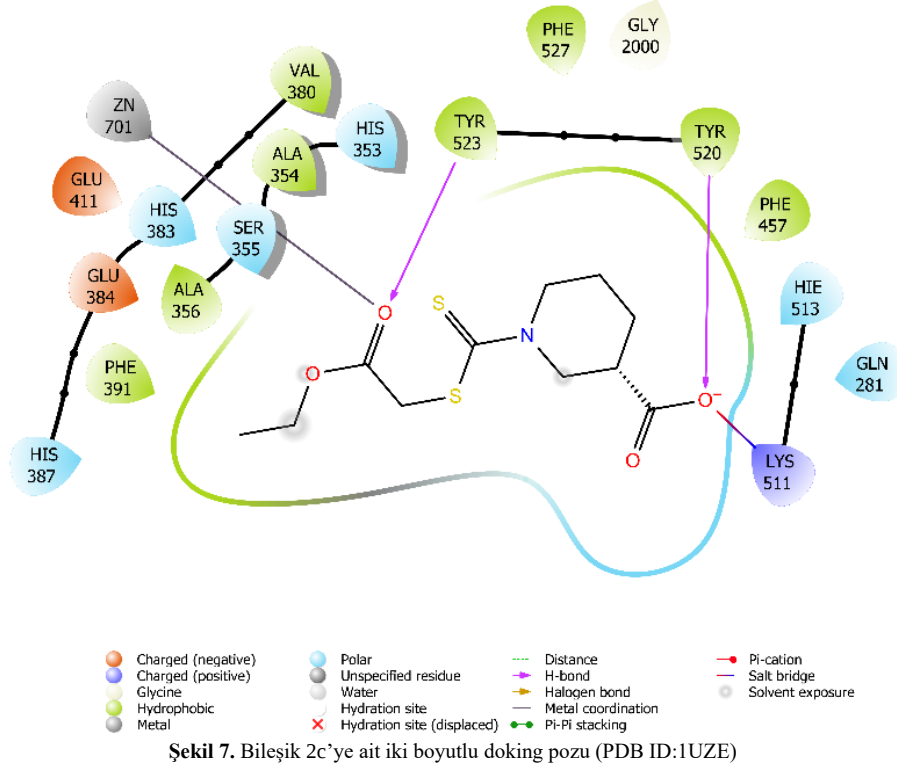
Bu bilgiler ışığında özellikle bileşik 2a'nın kaptopril ile çok benzer bir yerleşim gösterdiği belirlenmiştir. Kaptopril molekülünün gerçekleştirdiği çinko ve Tyr523 etkileşimlerini bileşik 2a'da gözlenmiştir. Ayrıca ek olarak enalapril de görülen Ala354 ile olan etkileşimi de sağlamıştır.



Şekil 5. Bileşik 2a'ya ait iki boyutlu doking pozı (PDB ID:1UZE)

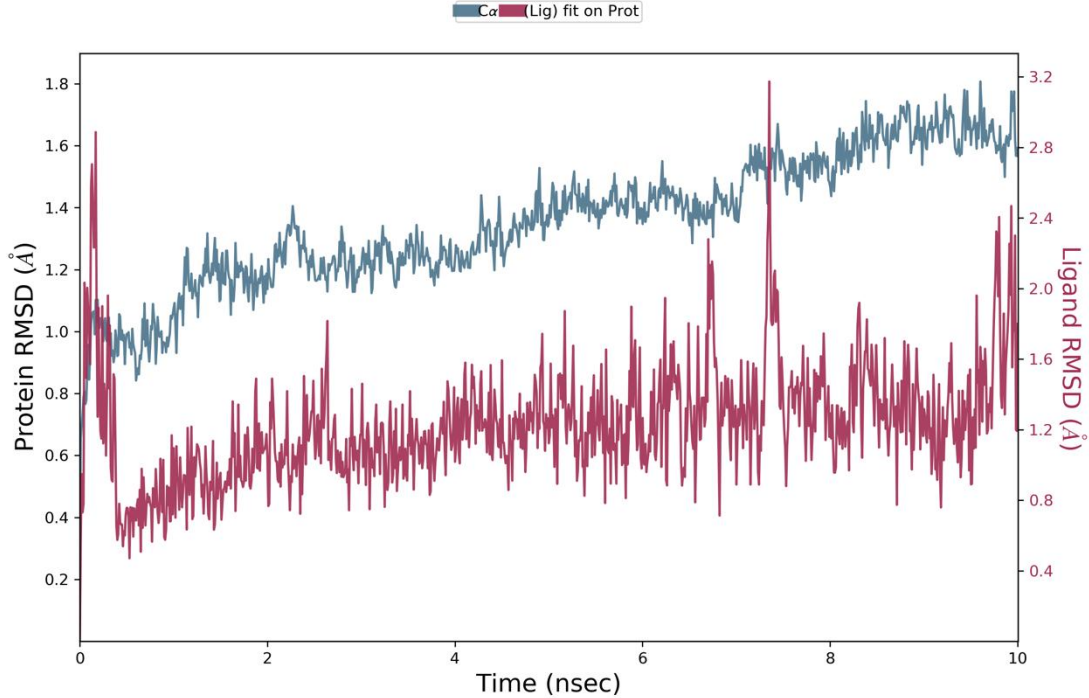


Şekil 6. Bileşik 2b'ye ait iki boyutlu doking pozı (PDB ID:1UZE)



Şekil 7. Bileşik 2c'ye ait iki boyutlu doking pozu (PDB ID:1UZE)

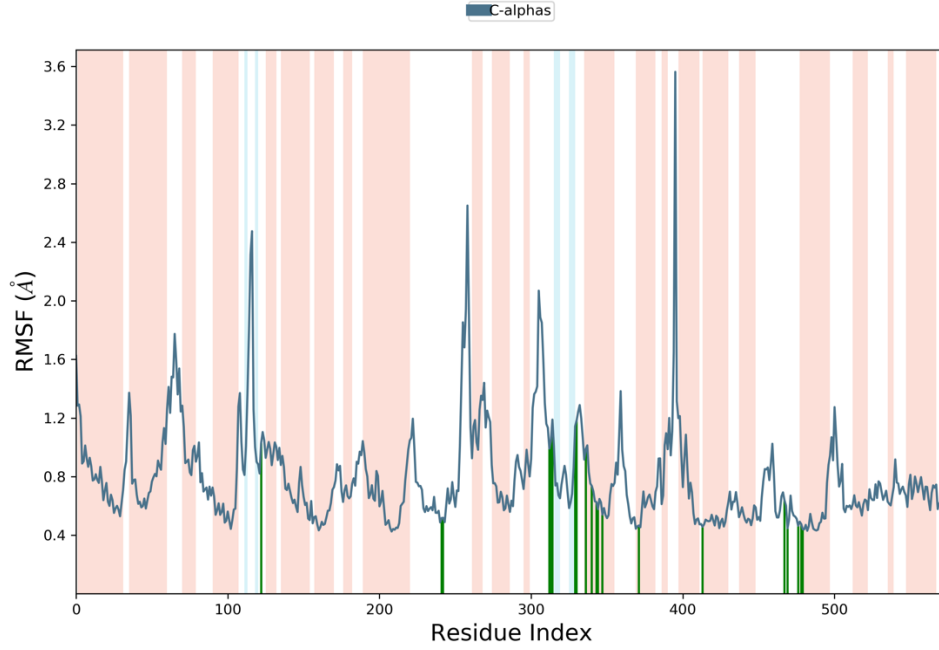
Moleküler doking çalışmaları bileşiğin anlık enzim aktif bölgesindeki etkileşimlerini göstermektedir. Dinamik çalışmaları ise bir süre boyunca bileşiğin enzim aktif bölgesinde nasıl davrandığının göstergesidir. Dolayısıyla bileşiğin stabilitesi ve aktivite potansiyeli hakkında daha net bilgi verir. RMSD (kök ortalama kare sapma) değeri bir stabilite göstergesidir. Bu değer 1-3 Å arasında olması bileşiğin enzim aktif bölgesinde stabil bir şekilde durduğunu gösterir. Şekil-8 incelendiğinde bileşik 2a'da bu değer maksimum 1.8 Å olmuştur. Bu bileşik 2a'nın 1UZE kristali ile yaptığı kompleksin enzim aktif bölgesinde stabil olduğunu göstermektedir.



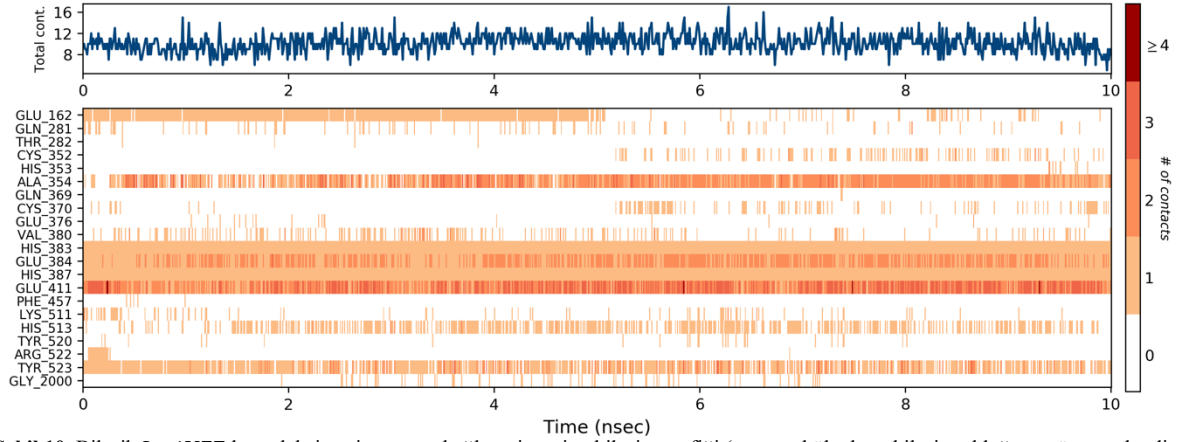
Şekil 8. Bileşik 2a+1UZE kompleksine ait RMSD grafiği

RMSF (Ortalama karekök dalgalanma) ise bileşik 2a+1UZE kompleksinin dinamik süresi içerisinde aminoasitler ile yaptığı etkileşimlerin dalgalanmalarını göstermektedir. Elde edilen RMSF verileri şu şekilde

listelenebilir; Leu161 (0.82 Å), Gln281 (0.52 Å), Thr282 (0.52 Å), Cys352 (0.99 Å), His353 (1.04 Å), Ala354 (1.19 Å), Gln369 (1.14 Å), Cys370 (1.19 Å), Glu376 (0.99 Å), Val380 (0.73 Å), His383 (0.63 Å), Glu384 (0.58 Å), His387 (0.54 Å), His410 (0.46 Å), Phe457 (0.46 Å), Lys511 (0.64 Å), Ile514 (0.51 Å), Pro519 (0.51 Å), Ile521 (0.49 Å), Tyr523 (0.44 Å). Şekil-9 bileşik 2c+1UZE kompleksinin RMSF analizini sunmaktadır. Burada pembe alanlar α -heliks bölgelerini mavi alanlar β -sarmal yapıları beyaz alanlar ise loop bölgelerini ifade etmektedir. Bileşik pembe ve mavi alanlarda stabil iken loop bölgelerinde dalgalanma göstermiştir. Bu kabul edilebilirdir.

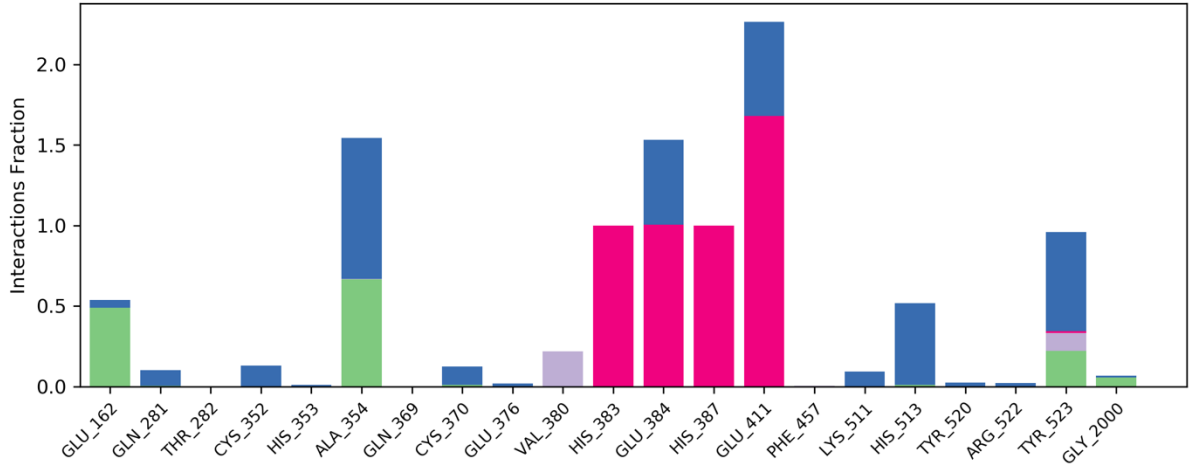


Şekil 9. Bileşik 2a+1UZE kompleksine ait RMSF grafiği



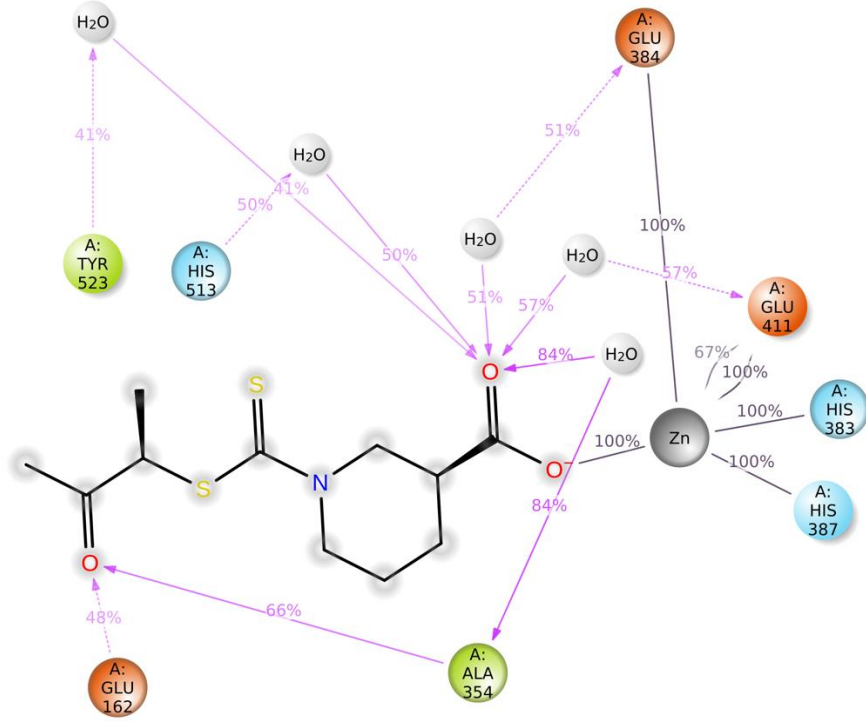
Şekil 10. Bileşik 2a+1UZE kompleksine ait zamana bağlı aminoasit etkileşim grafiği (turuncu bölgeler etkileşim olduğunu göstermektedir.)

Şekil 10 incelendiğinde bileşiğin dinamik çalışmaları boyunca etkileşim içinde olduğu aminoasitler görülmektedir. Burada özellikle Ala354, His383, Glu384, His387, Glu411 ve Tyr523 ile yapılan kesintisiz etkileşimler dikkat çekicidir. Bu etkileşimlerin bileşiğin stabilitesinde primer rol oynadıkları düşünülebilir. Şekil-11 ise etkileşim tiplerini özetlemektedir. Burada yeşil renk hidrojen bağı, mavi renk su aracılı hidrojen bağı, pembe renk iyonik etkileşimleri, mor renk ise hidrofobik etkileşimleri göstermektedir. Burada bileşik 2a'nın Glu162, Thr282, Ala354, Cys370, His513, Tyr523 ve Gly2000 ile hidrojen bağı; Glu162, Gln281, Cys352, His353, Ala354, Cys370, Glu376, Glu384, Glu411, Lys511, His513, Tyr520, arg522, Tyr523, Gly2000 ile su aracılı hidrojen bağı, His383, Glu384, His387, Glu411 ve Tyr523 ile iyonik bağı ve Val380, Tyr523 ile hidrofobik etkileşim gösterdiği görülmektedir.



Şekil 11. Bileşik 2a+1UZE kompleksine ait zamana bağlı aminoasit etkileşim türleri

Şekil 12 ise bileşik 2c'nin enzim aktif bölgesindeki etkileşiminin iki boyutlu görselini sunmaktadır. ACE inhibisyonu için en önemli etkileşiminin çinko ile yapılan etkileşim olduğu bilinmektedir. Bu etkileşimin 100% şeklinde gözlenmesi bileşiğin etki gücünü gözler önüne sermektedir. Ayrıca çinko atomunun karboksilat ile etkileşmiş hali de His383, His387 ve Glu411 ile 100% etkileşim sergilemiştir. Ala354 her iki karbonil atomu ile 84% ve 66% etkileşim oranlarına sahiptir.



Şekil 12. Bileşik 2c+1UZE kompleksine ait yüzde etkileşim oranları

Bileşiklerin fizikokimyasal özelliklerini belirlemek amacıyla ADME parametreleri incelenmiştir. İlgili sonuçlar Tablo 2'de sunulmuştur. Elde edilen bileşiklerin (2a-2c) oral biyoyararlanım radarları hesaplanmış ve görselleri Şekil 13'de sunulmuştur. Burada bileşiğin parametrelerinin pembe alan içerisinde kalması bileşiklerin oral biyoyararlanım oranlarının iyi olduğunu göstermektedir. Tablo-2 incelendiğinde bileşiklerin her biri için gastrointestinal sistem (GI) geçirgenliğinin yüksek olduğu görülmektedir. Bu Şekil-13'yi de destekler niteliktedir. Kan beyin bariyeri (KBB) geçirgenliği üç bileşik içinde saptanamamıştır. Bu merkezi sinir sistemi ile ilgili yan etkilerin görülmemesi açısından önemli bir bulgudur. SwissADME programı kullanılarak hesaplanan parametreler sonucunda üç bileşik (2a-2c) içinde ilaç benzerlik parametresi de pozitif çıkmıştır. Bu bilgi bileşiklerin ilaç adayı olma potansiyellerini göstermektedir.

Tablo 2. Bileşikler 2a-2c, için ADME parametreleri

Bileşik	Molekül Ağırlığı g/mol	TPSA Å ²	logPo/w	GI Absorbsiyon	KBB Geçirgenliği	İlaç Benzerlik
2a	275.39	115.00	2.04	Yüksek	Yok	Evet
2b	277.36	124.23	2.02	Yüksek	Yok	Evet
2c	291.39	124.23	2.35	Yüksek	Yok	Evet



Şekil 13. Bileşik 2a-2c'nin oral biyoyararlanım radarları

IV. SONUÇLAR

Bu çalışma kapsamında üç adet yeni piperidin-3-karboksilik asit (2a-2c) türevi bileşikler sentezlenmiştir. Bileşiklerin yapı analizleri için ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve HRMS spektroskopi yöntemleri kullanılmıştır. Bileşiklerin tasarımı sırasında ACE inhibitörlerinin yapıları ve yapı-etki ilişkileri baz alınmıştır. Bu sebeple elde edilen bileşiklerin yapıları doğrulandıktan sonra kaptopril ve enalapril bileşiklerini kullanarak moleküler doking ve moleküler dinamik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Kristal olarak PDB ID:1UZE kristali kullanılmıştır. Elde edilen bileşik 2a'nın potansiyel ACE inhibitörü etkilerini gösterir niteliktedir. Bileşik 2a, -8.042 kcal/mol doking skoru ile kaptopril ile enalapril arasında bir etkinlik potansiyeli sergilemiştir. İlgili doking pozları bileşik 2a'nın kaptopril ile etkileşimlerine ek olarak enalaprilin yaptığı bazı ekstra etkileşimleri de yaptığını göstermektedir. Elde edilen bulgular azotlu halka üzerindeki karboksilik asit grubunun önemini bir kez daha göstermiştir. Azotlu halkanın kaptopril ve enalapril'e göre daha büyük olması *in silico* yerleşme açısından çok büyük bir fark yaratmamıştır. Bileşik 2a'nın yapısını alanin aminoasidine benzeten metil dallanması onun kaptoprile daha çok benzemesine ve enzim aktif bölgesine daha iyi lokalize olmasına yardımcı olmuştur. Bileşik 2b ve 2c ise yine potansiyel inhibitör bileşiklerdir. Bu bileşiklerin ester grupları *in vivo* ortamda karboksilik aside parçalanırsa daha yüksek inhibitör potansiyel göstermeleri beklenmektedir. İleri çalışmalarda bu bileşiklerin *in vitro* enzim çalışmaları yanında bileşik 2b ve 2c için metabolizma çalışmaları yapılması planlanmaktadır.

Bileşik 2a ile gerçekleştirilen dinamik çalışmaları bileşik 2a'nın enzim aktif bölgesinde stabilitesini koruduğunu göstermektedir. Bileşiğin 10 ns boyunca Zn ile 100% etkileşim içerisinde olması da enzim aktif bölgesinde güçlü inhibisyon potansiyelini göstermektedir. İleriki çalışmalarda bileşik 2a ve türevleri sentezlenerek *in vitro* ve *in vivo* aktivite potansiyellerinin incelenmesi hedeflenmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yazarları olarak Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkezi Araştırma Laboratuvarına ve Anadolu Üniversitesi BAP Birimine teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

- [1] Ali, M.Y., Jannat, S., & Chang, M.S. (2023). Discovery of potent angiotensin-converting enzyme inhibitors in pomegranate as a treatment for hypertension. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71, 11476-11490.
- [2] Muntner P., Carey R.M., Gidding S., Jones D.W., Taler S.J., Wright J.T., Whelton P.K. (2018). Potential US population impact of the 2017 ACC/AHA high blood pressure guideline. *Circulation*, 137, 109-118.
- [3] Gayathiri, E., Prakash, P., Selvam, K., Pratheep, T., Chaudhari, S.Y., & Priyadharshini, S.D. (2024). In silico elucidation for the identification of potential phytochemical against ACE-II inhibitors. *Journal of Molecular Modeling*, 30, 78.
- [4] Wang W., McKinnie S.M.K., Farhan M., Paul M., McDonald T., McLean B., Llorens-Cortes C., Hazra S., Murray A.G., Vederas J.C., Oudit G.Y. (2016). Angiotensin-converting enzyme 2 metabolizes and partially inactivates Pyr-Apelin-13 and Apelin-17. *Hypertension*, 68(2), 365-377.
- [5] Ko S.C., Kim J.Y., Lee J.M., Yim M.J., Kim H.S., Oh G.W., Kim C.H., Kang N., Heo S.J., Baek K., Lee D.S. (2023). Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibition and molecular docking study of meroterpenoids isolated from brown alga, *Sargassum macrocarpum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 11065.
- [6] Akgün, H., Balkan, A., Bilgin, A.A., et al. (2014). *Farmasötik Kimya*. Hacettepe Yayınları, Ankara, Türkiye
- [7] Natesh, R., Schwager, S.L.U., Evans, H.R., Sturrock, E.D., & Acharya, K.R. (2004). Structural details on the binding of antihypertensive drugs captopril and enalaprilat to human testicular angiotensin I-converting enzyme. *Biochemistry*, 43(27), 8718-8724.
- [8] Schrödinger, LLC. (2020). *Glide* (Version 7.1). New York, NY, USA.
- [9] Schrödinger, LLC. (2020). *LigPrep* (Version 3.8). New York, NY, USA.
- [10] Schrödinger, LLC. (2020). *Maestro* (Version 10.6). New York, NY, USA.
- [11] Liu, X., Shi, D., Zhou, S., Liu, H., Liu, H., & Yao, X. (2018). Molecular dynamics simulations and novel drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 13(1), 23-37.
- [12] D.E. Shaw Research. (2014). *Desmond Molecular Dynamics System* (Version 3.7). New York, NY, USA.
- [13] Sureshkumar B., Mary Y.S., Resmi K.S., Varghese H.T., Panicker C.Y., Al-Saadi A.A. (2018). Spectroscopic characterization of hydroxyquinoline derivatives with bromine and iodine atoms and theoretical investigation by DFT calculations, MD simulations and molecular docking studies. *Journal of Molecular Structure*, 1167, 95-106.
- [14] Humphreys, D.D., Friesner, R.A., & Berne, B.J. (1994). A multiple-time-step molecular dynamics algorithm for macromolecules. *Journal of Physical Chemistry*, 98(27), 6885-6892.
- [15] Hoover, W.G. (1985). Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Physical Review A*, 31(3), 1695-1697.
- [16] Martyna, G.J., Tobias, D.J., & Klein, M.L. (1994). Constant pressure molecular dynamics algorithms. *Journal of Chemical Physics*, 101(5), 4177-4189.
- [17] Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M.L., Darden, T., Lee, H., & Pedersen, L.G. (1995). A smooth particle mesh Ewald method. *Journal of Chemical Physics*, 103(19), 8577-8593.
- [18] SwissADME. (2024). *SwissADME Web Tool*. Erişim adresi: <http://www.swissadme.ch/index.php>

Formula Predictor Report - BC-B-3_595.lcd

Page 1 of 1

Data File: C:\LabSolutions\Data\Analiz\derya\BC-B-3_595.lcd

Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Use Adduct
H	1	8	33	O	2	0	4	S	2	1	2	Ru	2	0	0	H
C	4	4	11	F	1	0	0	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	
N	3	0	1	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 10

HC Ratio: unlimited

Max Isotopes: 3

MSn Iso RI (%): 10.00

DBE Range: 0.0 - 30.0

Apply N Rule: no

Isotope RI (%): 1.00

MSn Logic Mode: AND

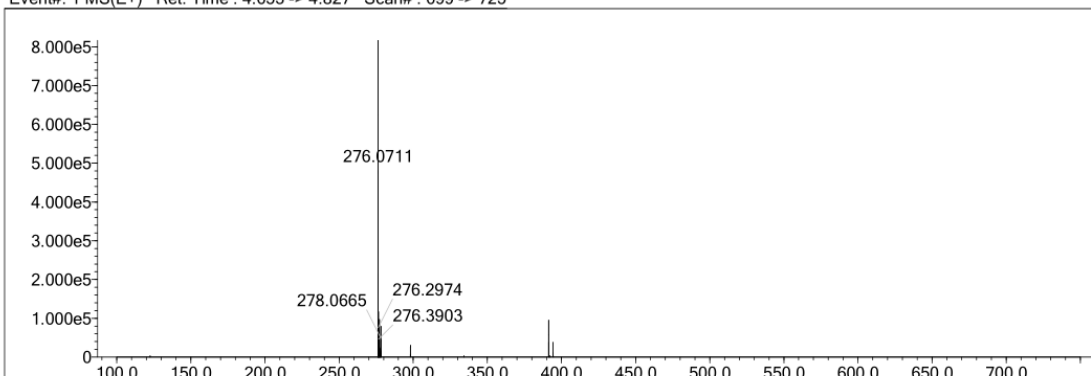
Electron Ions: both

Use MSn Info: yes

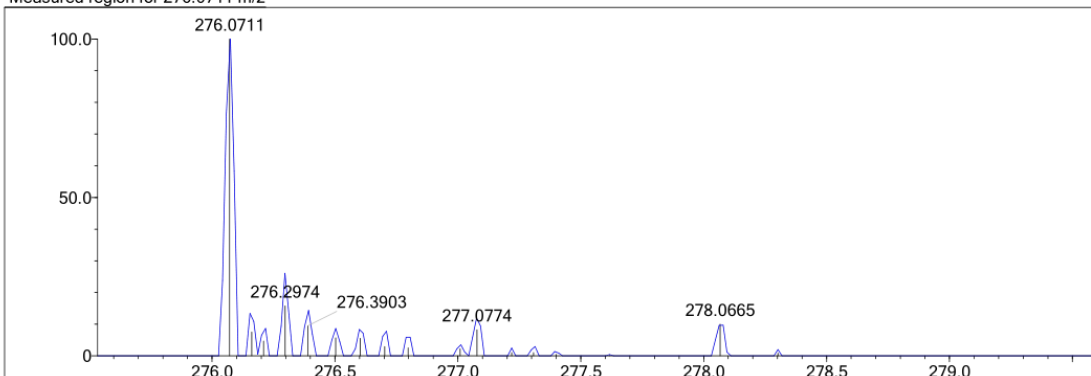
Isotope Res: 9000

Max Results: 50

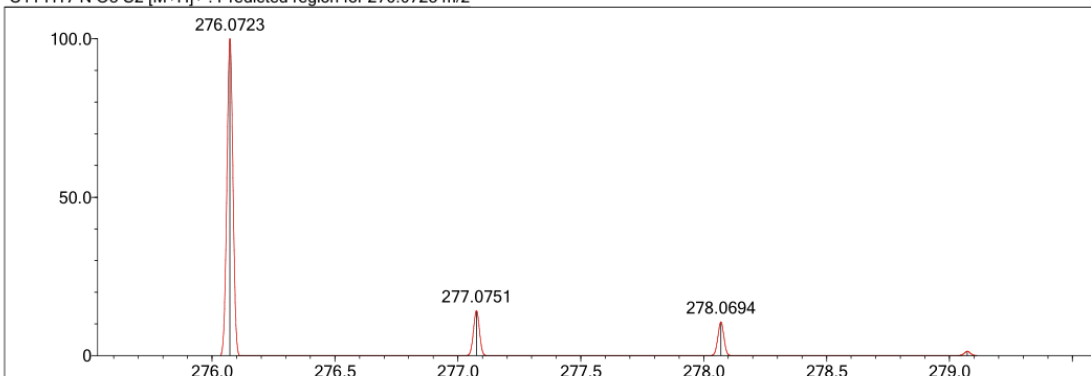
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 4.653 -> 4.827 Scan#: 699 -> 725



Measured region for 276.0711 m/z

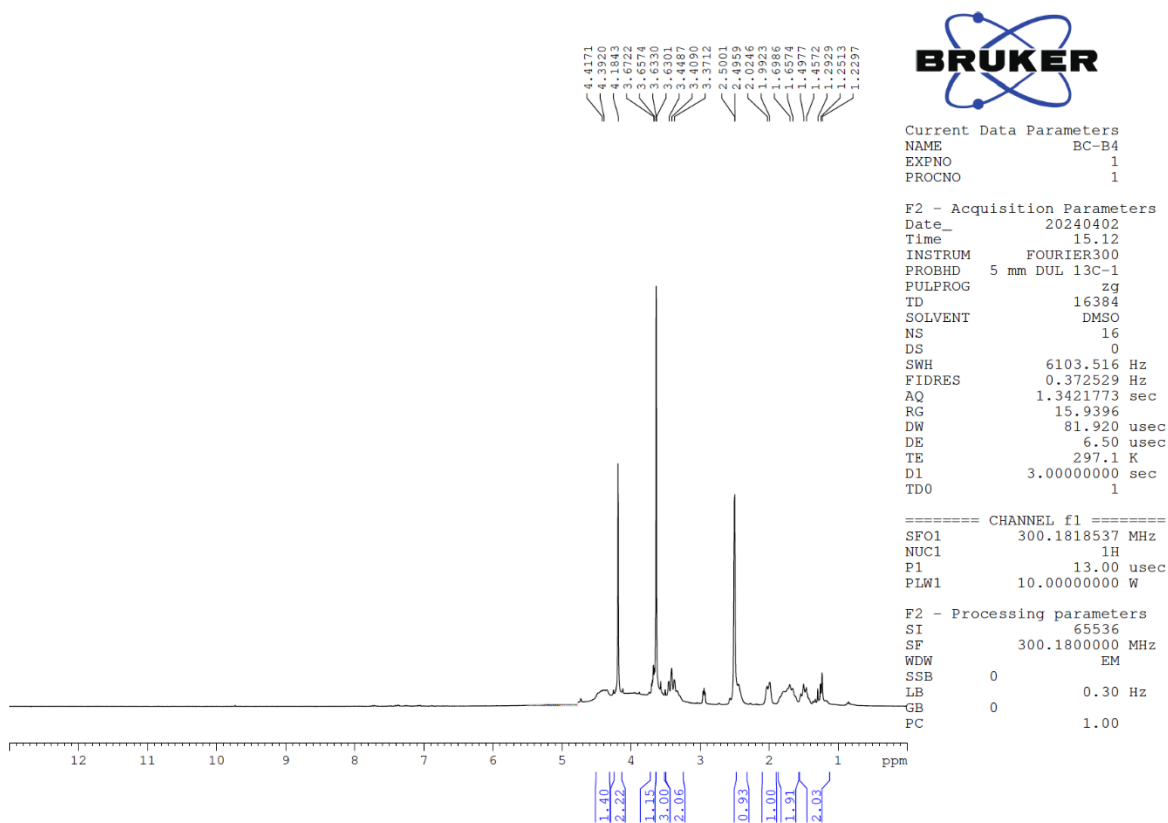
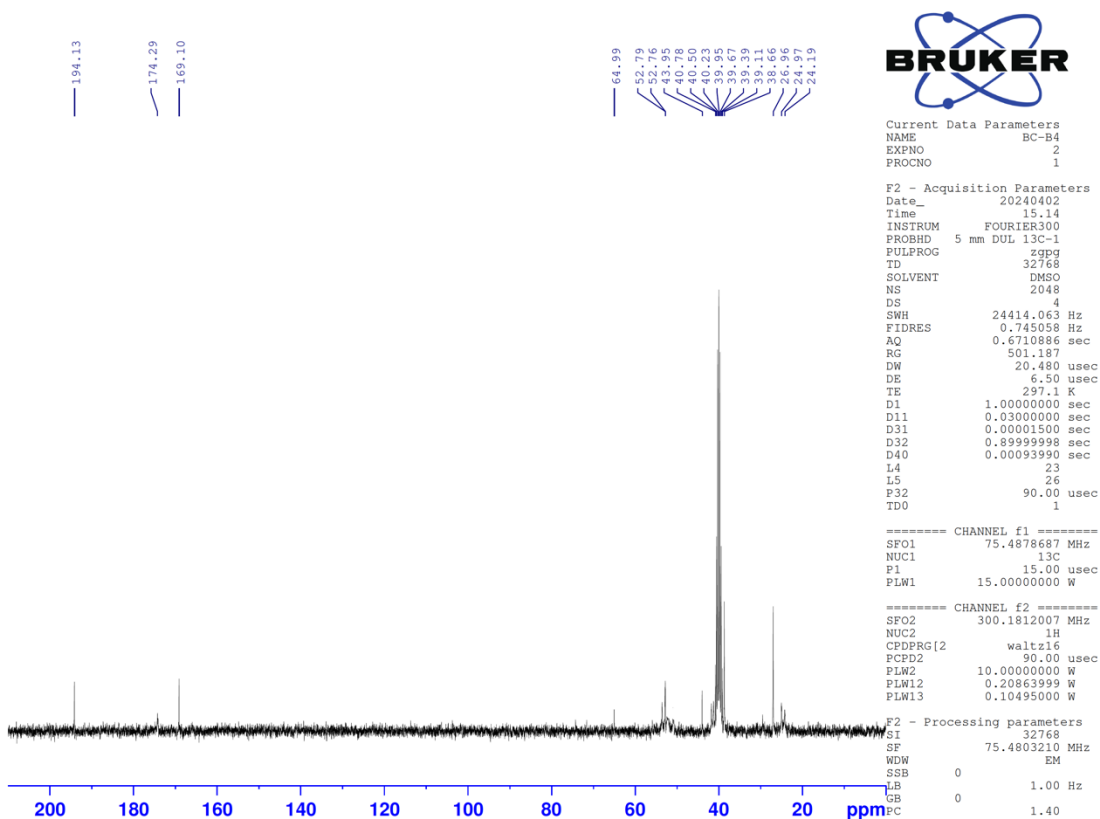


C11 H17 N O3 S2 [M+H]⁺ : Predicted region for 276.0723 m/z



Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	80.17	C11 H17 N O3 S2	[M+H] ⁺	276.0711	276.0723	-1.2	-4.35	87.50	4.0

Spektra 3. Bileşik 2a'ya ait HRMS spektrumu

Spektra 4. Bileşik 2b'ye ait ¹H-NMR spektrumuSpektra 5. Bileşik 2b'ye ait ¹³C-NMR spektrumu

Formula Predictor Report - BC-B-4_596.lcd

Page 1 of 1

Data File: C:\LabSolutions\Data\Analiz\derya\BC-B-4_596.lcd

Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Use Adduct
H	1	8	33	O	2	0	4	S	2	1	2	Ru	2	0	0	H
C	4	4	11	F	1	0	0	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	Na
N	3	0	1	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 15

HC Ratio: unlimited

Max Isotopes: 3

MSn Iso RI (%): 10.00

DBE Range: 0.0 - 50.0

Apply N Rule: no

Isotope RI (%): 1.00

MSn Logic Mode: AND

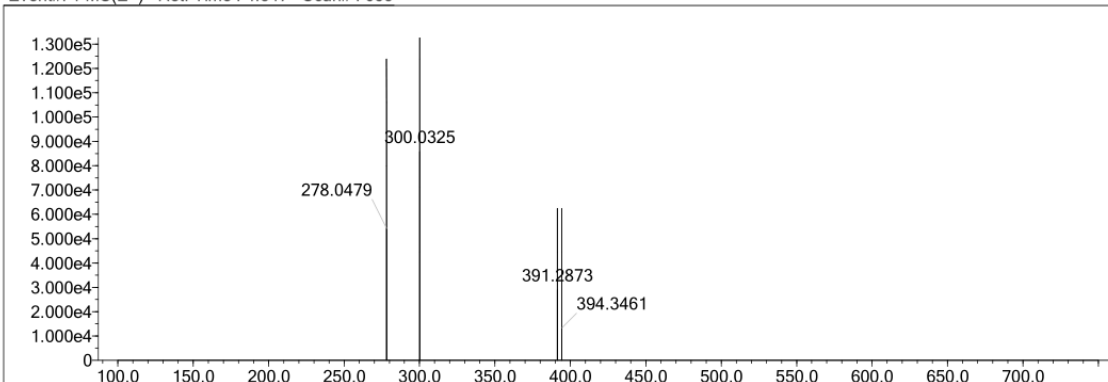
Electron Ions: both

Use MSn Info: yes

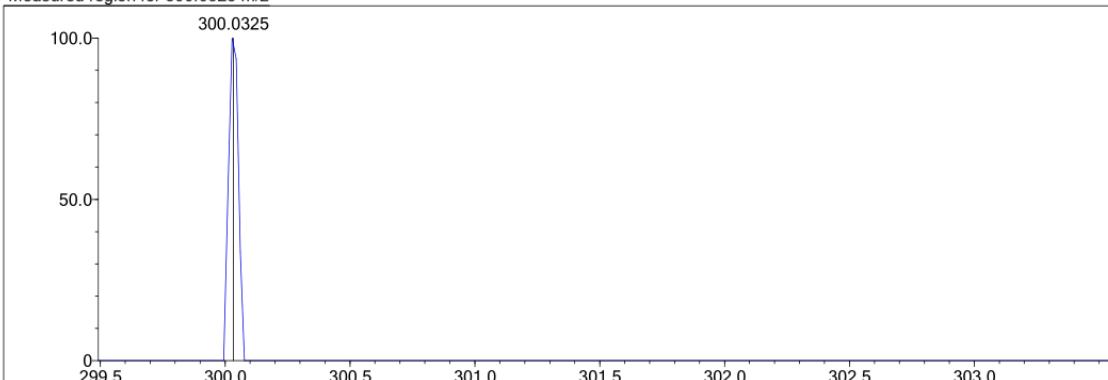
Isotope Res: 9000

Max Results: 50

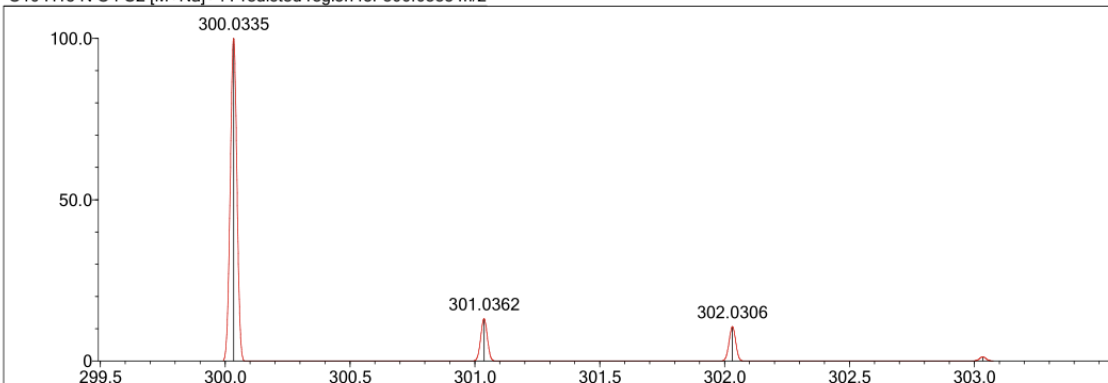
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 4.347 Scan#: 653



Measured region for 300.0325 m/z

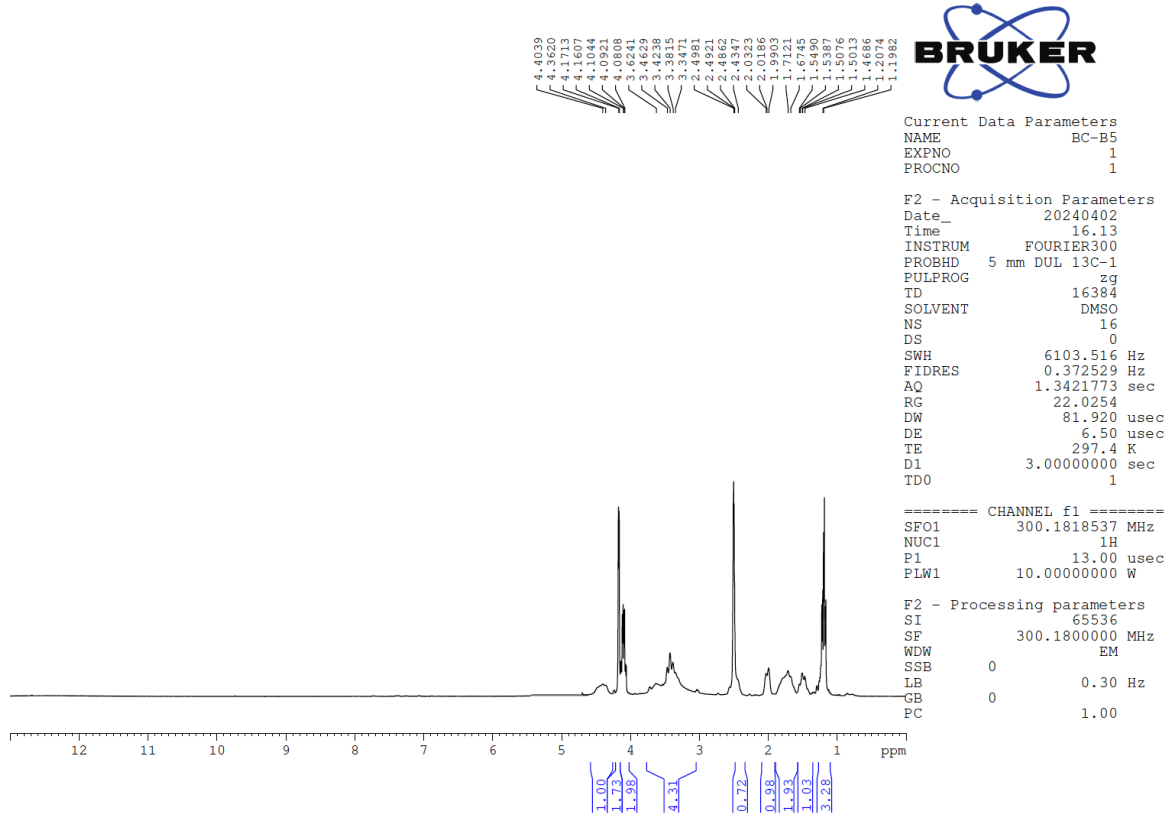


C10 H15 N O4 S2 [M+Na]+ : Predicted region for 300.0335 m/z

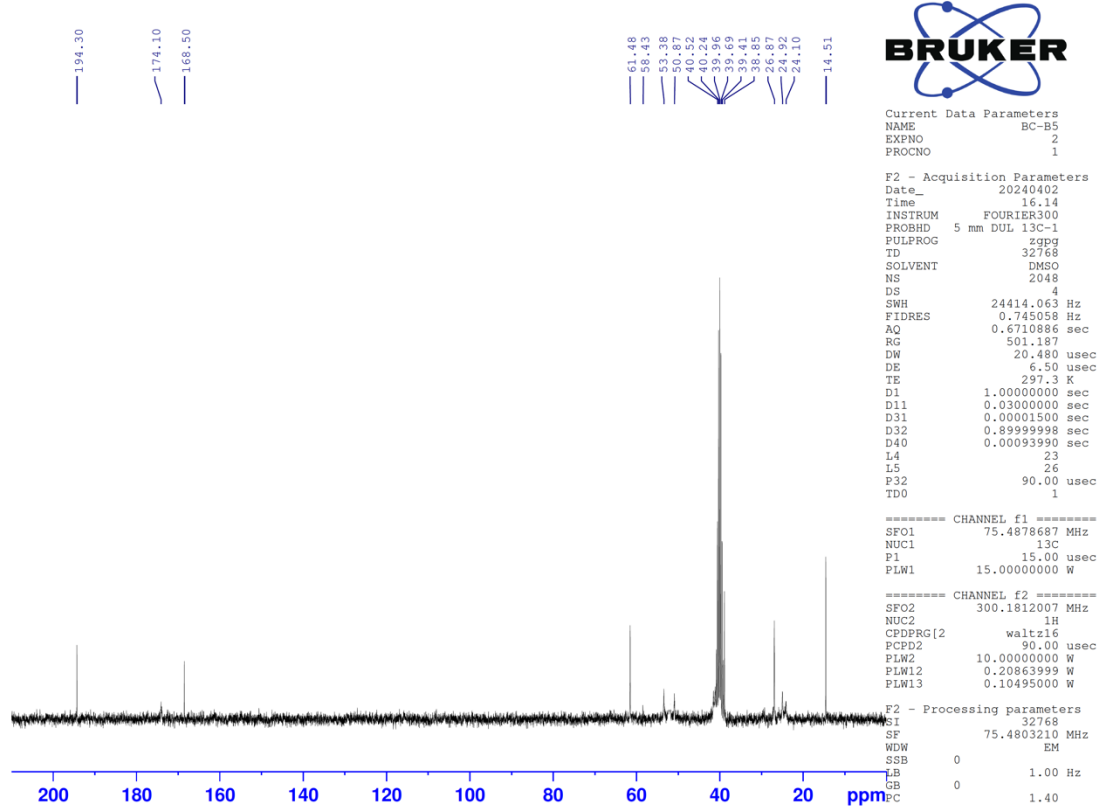


Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	0.00	C10 H15 N O4 S2	[M+Na]+	300.0325	300.0335	-1.0	-3.33	0.00	4.0

Spektra 6. Bileşik 2b'ye ait HRMS spektrumu



Spektra 7. Bileşik 2c'ye ait ¹H-NMR spektrumu



Spektra 7. Bileşik 2c'ye ait ¹³C-NMR spektrumu

Formula Predictor Report - BC-B-5_597.lcd

Page 1 of 1

Data File: C:\LabSolutions\Data\Analiz\derya\BC-B-5_597.lcd

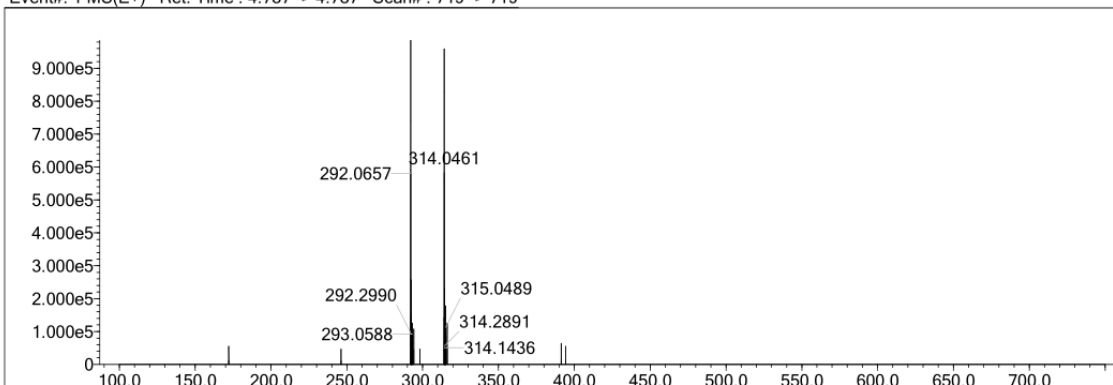
Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Use Adduct
H	1	8	33	O	2	0	4	S	2	1	2	Ru	2	0	0	H
C	4	4	11	F	1	0	0	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	
N	3	0	1	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 10
HC Ratio: unlimited
Max Isotopes: 3
MSn Iso RI (%): 10.00

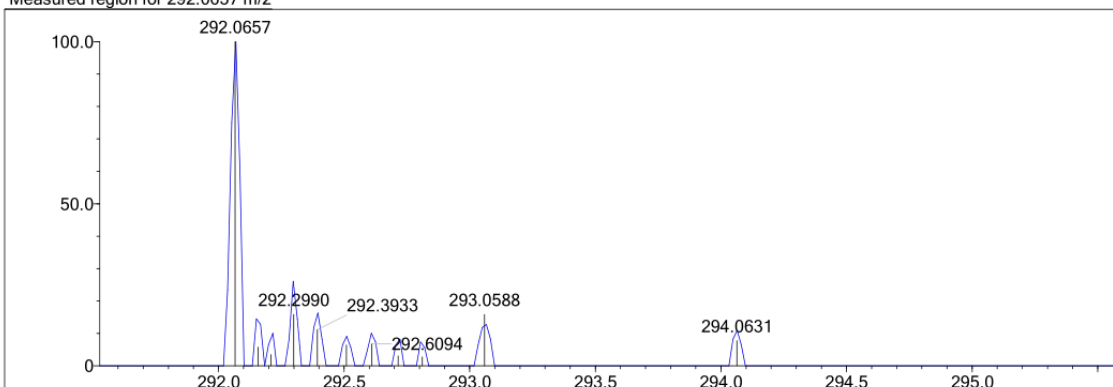
DBE Range: 0.0 - 30.0
Apply N Rule: no
Isotope RI (%): 1.00
MSn Logic Mode: AND

Electron Ions: both
Use MSn Info: yes
Isotope Res: 9000
Max Results: 50

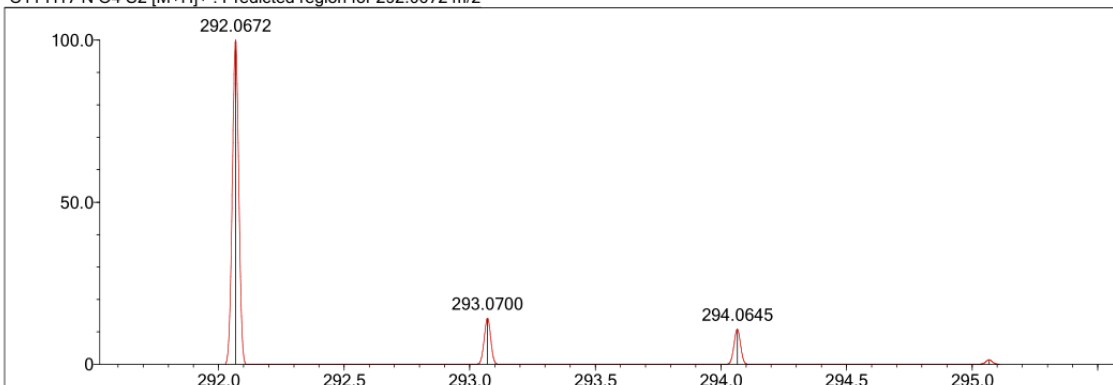
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 4.787 -> 4.787 Scan#: 719 -> 719



Measured region for 292.0657 m/z



C11 H17 N O4 S2 [M+H]⁺ : Predicted region for 292.0672 m/z



Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	62.19	C11 H17 N O4 S2	[M+H] ⁺	292.0657	292.0672	-1.5	-5.14	70.19	4.0

Spektra 9. Bileşik 2c'ye ait HRMS spektrumu