



**Antikanser Etkili Yeni Kinaz İnhibitörlerinin  
Tasarımı, Sentezi ve Biyolojik Aktivitelerinin  
Araştırılması  
Yüksek Lisans Tezi**

**Arzu HIDİR**

**Eskişehir 2024**

**ANTİKANSER ETKİLİ YENİ KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNİN TASARIMI,  
SENTEZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Arzu HIDİR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Farmasötik Kimya Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Yusuf ÖZKAY  
(İkinci Danışman: Doç. Dr. Derya OSMANİYE)**

**Eskişehir  
Anadolu Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü  
Haziran 2024**

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Arzu HİDİR'in "ANTİKANSER ETKİLİ YENİ KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNİN TASARIMI, SENTEZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI" başlıklı tezi 13/06/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

|                     | <u>Unvanı-Adı Soyadı</u>             | <u>İmza</u> |
|---------------------|--------------------------------------|-------------|
| Üye (Tez Danışmanı) | Prof. Dr. Yusuf ÖZKAY                | .....       |
| Üye                 | Doç. Dr. Begüm Nurpelin SAĞLIK ÖZKAN | .....       |
| Üye                 | Dr. Öğr. Üyesi Betül KAYA            | .....       |

Prof. Dr. Saime ÖNCE  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

### ANTİKANSER ETKİLİ YENİ KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNİN TASARIMI, SENTEZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Arzu HIDIR

Farmasötik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Haziran 2024

Danışman: Prof. Dr. Yusuf ÖZKAY

(İkinci Danışman: Doç. Dr. Derya OSMANİYE)

Kanser özellikle değişen yeni yaşam şartlarıyla birlikte her yıl insidansı artan ve maalesef yakalanan kişilerin ise %20'sinin hayatını kaybettiği bir hastalıktır. Konvansiyonel kemoterapötiklerle kanser terapisinde radikal tedavi henüz mümkündür değildir ve günümüzde küçük inhibitör moleküller ve monoklonal antikorlar radikal tedavi yapabilmek için öne çıkan önemli gruplardır. Küçük inhibitör moleküller arasında ise sinyal iletiminin her noktasında görev alan ve kolaylıkla inhibe edilebilen protein kinazları inhibe eden kinaz inhibitörleridir. Bu tez kapsamında alpelisib molekülünden yola çıkılarak 20 adet tiyadiazol yapısı taşıyan yeni bileşik sentezlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerde öncü bileşikteki piridin halkasının biyoizosteri benzen halkası kullanılmış ve aktiviteyi etkileyebilecek modifikasyonları gözlemlemek amacıyla farklı süstitüent içeren türevleri kullanılmıştır. Ayrıca kanser terapisinde kombine tedavilerin daha efektif olduğu bilindiği için bazı bileşiklere sülfonamid süstitüsyonu eklenerek EGFR-COX-2 dual inhibisyon yapabilecek bileşikler tasarlanmaya çalışılmıştır. Bileşiklerin sentezi literatürle uyumlu olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve bileşiklerin yapıları IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR ve HRMS spektral analizleri ile doğrulanmıştır. Antikanser aktiviteyi ölçebilmek için A549 ve MCF-7 hücre hatları kullanılmış ve testler *in-vitro* olarak gerçekleştirilmiştir. **3j** ve **3o** bileşikleri için ise ileri aktivite çalışmaları ve moleküler yerleştirme ve moleküler dinamik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin EGFR ve COX-2 inhibisyon potansiyelleri araştırılmıştır

**Anahtar Sözcükler:** Kinaz, Alpelisib, Antikanser, COX-2, EGFR

## ABSTRACT

### DESIGN, SYNTHESIS AND INVESTIGATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF NEW KINASE INHIBITORS WITH ANTI-CANCER EFFECT

Arzu HIDIR

Department of Pharmaceutical Chemistry

Anadolu University, Institute of Graduate Schools, June 2024

Supervisor: Prof. Dr. Yusuf ÖZKAY

(Co- Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Derya OSMANİYE)

Cancer is a disease whose incidence increases every year, especially with changing new living conditions, and unfortunately, 20% of people who are diagnosed lose their lives. Radical treatment is not yet possible in cancer therapy with conventional chemotherapeutics, and today small inhibitor molecules and monoclonal antibodies are important groups that stand out for radical treatment. Among the small inhibitor molecules are kinase inhibitors, which are involved in every point of signal transmission and inhibit protein kinases that can be easily inhibited. Across the field of this thesis, 20 new compounds with thiadiazole structure were synthesized based on the alpelisib molecule. In the synthesized compounds, the bioisostere benzene ring was used as an equivalent to the pyridine ring found in the modeled compound, and derivatives containing different substituents were used to observe modifications that may affect the activity. In addition, since it is known that combined treatments are more effective in cancer therapy, it has been tried to design compounds that can dual inhibit EGFR-COX-2 by adding sulfonamide substitution to some compounds. The synthesis of the compounds was done in coincidence with the literature and the structures of the compounds have been confirmed using IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR and HRMS spectral analysis methods. To measure anticancer activity, A549 and MCF-7 cell lines were used and tests were performed in-vitro. For 3j and 3o compounds, advanced activity studies and molecular placement and molecular dynamics studies were performed then the inhibition potentials of EGFR and COX-2 were investigated.

**Keywords:** Kinase, Alpelisib, Anticancer, COX-2, EGFR

## TEŞEKKÜR

Akademik hayatım boyunca her zaman bana destek olan, endişe ettiğim zamanlarda beni sakinleştirip bana benden çok inanan, yoğun olduğu zamanlarda bile her zaman bana zaman ayırıp dinleyip yol gösteren, kendisinden bir sürü şey öğrendiğim tez danışmanım Sayın Hocam Yusuf ÖZKAY'a

Kendisinden gerek mesleğim gerekse hayat hakkında çok şey öğrendiğim, her zaman desteğini hissettiğim, umutsuz olduğum zamanlarda bile beni başarabileceğime inandıran, yoğun çalışma temposuna rağmen her zaman bize zaman ayıran Sayın Hocam Zafer Asım KAPLANCIKLİ'ya

Kendisiyle mezuniyet projesi ile yollarımız kesiştiğinden beri her zaman beni destekleyen ve motive eden, hem akademik hem hayatla ilgili problemlerimde her zaman beni dinleyip yol gösteren, bazen onu hayal kırıklığına uğrattığımı düşünüp üzüldüğüm onunla çalışmaktan çok keyif aldığım, çalışma disiplini ve azmini örnek aldığım ikinci danışmanım Sayın Hocam Doç. Dr. Derya OSMANİYE'ye

Her zaman yanımda ve destek olduklarını hissettiğim, bütün problemlerimde bana yol gösteren, onlarla çalışabildiğim için çok mutlu olduğum, kendimi ümitsiz hissettiğim anlarda beni motive eden, tezim için her aşamada desteklerini gördüğüm ve onlardan çok şey öğrendiğim kıymetli hocalarım Sayın Doç. Dr. Begüm Nurpelin SAĞLIK ÖZKAN ile Sayın Öğr. Görevlisi Dr. Serkan LEVENT'e

Bütün emeklerini yanında destekleri için sonsuz teşekkür eder, onlarla çalışma şansı bulduğum için çok mutlu olduğumu ve onların öğrencisi olduğum için gurur duyduğumu belirtmek isterim.

Tezimi hazırlarken her an söylenmelerimi dinleyen, elinden gelen bütün desteği veren, her zaman yardımına koşan, sevgili oda arkadaşım Araş. Gör. Şevval KARACA ARPA 'ya,

Her zaman desteklerini ve sevgilerini hissettiğim, bir isteğim olduğunda beni hiç kırmayan Farmasötik Kimya Anabilim Dalındaki saygıdeğer hocalarıma,

Apoptotik etkilerin belirlenmesi aşamasında destek olan Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'ndaki kıymetli hocalarıma,

Ellerinden gelen bütün desteği veren, beraber çalışmaktan çok mutlu olduğum laboratuvar çalışma arkadaşlarıma,

Yüksek lisans eğitimime maddi olarak destek olan Tübitak 2210-Yurt İçi Lisansüstü Burs Programına,

Bugün gelebildiğim noktada üzerimde en çok emeği bulunan, tek başına beni büyütüp her zaman hem maddi hem manevi destekçim olan, düştüğüm her zaman beni düştüğüm yerden kaldırıp devam etmemi sağlayan sevgili annem Fadime TOMUŐ'a,

Bugün kurduğu cumhuriyet sayesinde eğitimimi tamamlayıp, mesleğimi yapabildiğim, her zaman sevgi, saygı ve minnetle andığım Ulu Önder Mustafa Kemal ATATÜRK'e

Saygılarımla birlikte teőekkürlerimi sunarım.

## **ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ**

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Arzu HIDİR

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

|                                                                                            |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| BAŞLIK SAYFASI .....                                                                       | i    |
| JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI .....                                                                | ii   |
| ÖZET .....                                                                                 | iii  |
| ABSTRACT .....                                                                             | iv   |
| TEŞEKKÜR .....                                                                             | v    |
| İÇİNDEKİLER .....                                                                          | viii |
| TABLolar DİZİNİ .....                                                                      | xiv  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                                      | xv   |
| KISALTMALAR DİZİNİ .....                                                                   | xxiv |
| 1. GİRİŞ .....                                                                             | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                                                    | 11   |
| 2.1. Kinazlarla İlgili Temel Bilgiler .....                                                | 11   |
| 2.2. EGFR İnhibitörleri .....                                                              | 14   |
| 2.3. PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolu .....                                                       | 15   |
| 2.4. Alpelisib .....                                                                       | 18   |
| 2.5. Yapısında Tiyadiazol İçeren Antikanser Etkili Bileşiklerin Aktivite Çalışmaları ..... | 20   |
| 3. GEREÇLER .....                                                                          | 32   |
| 3.1. Kullanılan Maddeler .....                                                             | 32   |

|                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2. Kullanılan Cihazlar.....                                                               | 33 |
| 4. YÖNTEMLER .....                                                                          | 34 |
| 4.1. Sentez Çalışmaları.....                                                                | 34 |
| 4.1.1. 2-Kloro- <i>N</i> -fenilasetamid türevleri genel sentezi (A-1)<br>(Yöntem A-1) ..... | 34 |
| 4.1.1.1. 2-Kloro- <i>N</i> -(4-sülfamoilfenil)asetamid sentezi (A-2)<br>(Yöntem A-2) .....  | 34 |
| 4.1.2. <i>N</i> -(5-merkapt-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid türevleri (B)<br>(Yöntem B)..... | 35 |
| 4.1.3. Hedef Bileşiklerin Sentezi (3a-3u) (Yöntem C) .....                                  | 35 |
| 4.2. İTK Çalışmaları ve Rf değerlerinin elde edilmesi.....                                  | 36 |
| 4.3. Erime Noktalarının Bulunması.....                                                      | 36 |
| 4.4. IR Analizlerinin Eldesi .....                                                          | 37 |
| 4.5. <sup>1</sup> H-NMR Analizlerinin Eldesi.....                                           | 37 |
| 4.6. <sup>13</sup> C-NMR Analizlerinin Eldesi.....                                          | 37 |
| 4.7. Kütle Analizlerinin Eldesi .....                                                       | 37 |
| 4.8. Antikanser Aktivite Çalışmaları.....                                                   | 37 |
| 4.8.1. MTT yöntemi yardımıyla bileşiklerin sitotoksik etkilerinin<br>araştırılması .....    | 38 |
| 4.8.1.1. Hücrelerin çoğaltılması.....                                                       | 38 |
| 4.8.1.2. Hücrelerin Plakalara Ekilmesi.....                                                 | 38 |
| 4.8.1.3. MTT Sitotoksikite Testinin Gerçekleştirilmesi.....                                 | 39 |
| 4.9. Siklooksijenaz-2 (COX-2) İnhibisyon Çalışmaları.....                                   | 39 |

|                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.9.1. Test bileşik çözeltilerinin elde edilmesi .....                                                                         | 40 |
| 4.9.2. Reaksiyon Karışımı Çözeltisi .....                                                                                      | 40 |
| 4.9.3. Araşidonik asit/NaOH çözeltisinin elde edilmesi .....                                                                   | 40 |
| 4.10. Anneksin V/PI yöntemi ile bileşiklerin apoptotik etkilerinin belirlenmesi.....                                           | 41 |
| 4.10.1. Hücrelerin plakalara ekilmesi.....                                                                                     | 41 |
| 4.10.2. Anneksin/EI yönteminin gerçekleştirilmesi .....                                                                        | 41 |
| 4.11. Kinaz İnhibisyon Testleri .....                                                                                          | 43 |
| 4.12. Moleküler Modelleme Çalışmaları .....                                                                                    | 43 |
| 4.13. Moleküler Dinamik Çalışmaları .....                                                                                      | 43 |
| 5. BULGULAR VE YORUM .....                                                                                                     | 45 |
| 5.1. Sentez Çalışmaları.....                                                                                                   | 45 |
| 5.1.1. 3,4-Dikloro- <i>N</i> -(5-((2-okso-2-(fenilamino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3a).....                    | 45 |
| 5.1.2. 3,4-Dikloro- <i>N</i> -(5-((2-okso-2-((4-(triflorometil)fenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3b)..... | 50 |
| 5.1.3. 3,4-Dikloro- <i>N</i> -(5-((2-((4-florofenil)amino)-2-oksoetil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3c) .....          | 55 |
| 5.1.5. 3,4-Dikloro- <i>N</i> -(5-((2-okso-2-((4-sülfamoilfenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3e) .....      | 65 |
| 4-Kloro- <i>N</i> -(5-((2-okso-2-(fenilamino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3f).....                               | 70 |

|                                                                                                                                |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.1.6. 4-Kloro- <i>N</i> -(5-((2-okso-2-((4-(triflorometil)fenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3g) .....    | 75  |
| 5.1.7. 4-Kloro- <i>N</i> -(5-((2-((4-florofenil)amino)-2-oksoetil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3h) .....              | 80  |
| 5.1.8. 4-Kloro- <i>N</i> -(5-((2-((4-klorofenil)amino)-2-oksoetil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3i) .....              | 85  |
| 5.1.9. 4-Kloro- <i>N</i> -(5-((2-okso-2-((4-sülfamoilfenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3j) .....          | 90  |
| 5.1.10. 4-Floro- <i>N</i> -(5-((2-okso-2-(fenilamino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3k) .....                      | 95  |
| 5.1.11. 4-Floro- <i>N</i> -(5-((2-okso-2-((4-(triflorometil)fenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3l) .....   | 100 |
| 5.1.12. 4-Floro- <i>N</i> -(5-((2-((4-florofenil)amino)-2-oksoetil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3m) .....             | 105 |
| 5.1.13. 4-Floro- <i>N</i> -(5-((2-((4-klorofenil)amino)-2-oksoetil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3n) .....             | 110 |
| 5.1.14. 4-Floro- <i>N</i> -(5-((2-okso-2-((4-sülfamoilfenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3o) .....         | 115 |
| 5.1.15. 4-Metoksi- <i>N</i> -(5-((2-okso-2-(fenilamino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3p) .....                    | 120 |
| 5.1.16. 4-Metoksi- <i>N</i> -(5-((2-okso-2-((4-(triflorometil)fenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3r) ..... | 125 |
| 5.1.17. 4-Metoksi- <i>N</i> -(5-((2-okso-2-((4-florofenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3s) .....           | 130 |

|                                                                                                                |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.1.18. 4-Metoksi-N-(5-((2-okso-2-((4-klorofenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3t) .....    | 135 |
| 5.1.19. 4-Metoksi-N-(5-((2-okso-2-((4-sülfamoilfenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3u)..... | 140 |
| 5.2. Sentez Çalışmalarının Tartışılması .....                                                                  | 145 |
| 5.3. Spektral Veri Sonuçlarının Tartışılması.....                                                              | 145 |
| 5.3.1. IR verilerinin tartışılması .....                                                                       | 145 |
| 5.3.2. NMR verilerinin tartışılması .....                                                                      | 146 |
| 5.3.2.1. <sup>1</sup> H-NMR verilerinin tartışılması .....                                                     | 146 |
| 5.3.2.2. <sup>13</sup> C-NMR verilerinin tartışılması .....                                                    | 146 |
| 5.3.3. HRMS verilerinin tartışılması .....                                                                     | 147 |
| 5.4. Antikanser Aktivite Çalışmalarının Tartışılması.....                                                      | 147 |
| 5.4.1. MTT yöntemi kullanılarak elde edilen bileşiklerin sitotoksik etki sonuçları .....                       | 147 |
| 5.4.2. Anneksin V/EI yöntemi kullanılarak elde edilen bileşiklerin apoptotik etki sonuçları .....              | 148 |
| 5.5. Kinaz Enzim İnhibisyon Testleri .....                                                                     | 150 |
| 5.6. COX-2 Enzim İnhibisyon Testleri .....                                                                     | 151 |
| 5.7. Moleküler Docking Çalışmalarının Tartışılması .....                                                       | 153 |
| 5.7.1. COX-2 Enzimi Üzerinde Moleküler Docking Çalışmalarının Değerlendirilmesi.....                           | 153 |
| 5.7.2. EGFR Enzimi Üzerinde Moleküler Docking Çalışmalarının Değerlendirilmesi .....                           | 154 |

|                                                                |            |
|----------------------------------------------------------------|------------|
| <b>5.8. Moleküler Dinamik Çalışmalarının Tartışılması.....</b> | <b>155</b> |
| <b>6. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER .....</b>                    | <b>163</b> |



## **TABLÖLAR DİZİNİ**

|                                                                                                                |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Tablo 1.1. Hedeflenen Bileşikler .....</b>                                                                  | <b>10</b>  |
| <b>Tablo 3.1. Tez çalışmasında kullanılan maddeler .....</b>                                                   | <b>32</b>  |
| <b>Tablo 3.2. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar .....</b>                                                   | <b>33</b>  |
| <b>Tablo 5.1. Bileşiklerin A549, MCF-7 ve NIH3T3 hücre dizilerine ait IC<sub>50</sub> değerleri (μM). ....</b> | <b>148</b> |
| <b>Tablo 5.2 Bileşikler 3j ve 3o'nun MCF-7 hücre hattı üzerindeki apoptoz yüzdeleri .....</b>                  | <b>149</b> |
| <b>Tablo 5.3 Seçilen bileşiklerin EGFR enzimine karşı IC<sub>50</sub> değerleri (μM) ...</b>                   | <b>151</b> |
| <b>Tablo 5.4. Bileşiklerin COX-2 enzimine karşı göstermiş olduğu IC<sub>50</sub> değerleri (μM). ....</b>      | <b>151</b> |
| <b>Tablo 1. 3j -COX-2 ve 3o - COX-2 komplekslerinin moleküler dinamik simülasyon analizi. ....</b>             | <b>156</b> |
| <b>Tablo 2. 3j - EGFR ve 3o- EGFR komplekslerinin moleküler dinamik simülasyon analizi. ....</b>               | <b>160</b> |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1. Alpelisib molekül şekli .....                                                                           | 7  |
| Şekil 1.2. Selekoksisib molekül şekli .....                                                                        | 9  |
| Şekil 1.3. Valdekoksib molekül şekli .....                                                                         | 9  |
| Şekil 2.1. Kinaz İnhibitörlerinin Sınıflandırılması .....                                                          | 11 |
| Şekil 2.2. DFG-in ve DFG-out konformasyonunda kinaz alanının genel yapısı<br>.....                                 | 12 |
| Şekil 2.3. Kinazların bağlanma bölgesi ve inhibitör tiplerine göre gösterimi                                       | 13 |
| Şekil 2.4. PI3K/Akt sinyal yolunun rol aldığı biyolojik süreçler .....                                             | 16 |
| Şekil 2.5. EGFR/ PI3K/Akt/mTOR Yolağı.....                                                                         | 18 |
| Şekil 2.5. (E,E)-2,5-bis[4-(3-dimetilaminopropoksi)stiril]-1,3,4-tiyadiazol 9                                      | 20 |
| Şekil 2.6. 6-(Perflorofenil)-3-fenil-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]tiyadiazol .....                                 | 21 |
| Şekil 2.7. 3-[6-(Tiyofen-3-il)imidazo[2,1-b][1,3,4]tiyadiazol-2-il]-1H-indol<br>hidrobromür .....                  | 21 |
| Şekil 2.8. 5-Floro-1-metil-3-[6-(tiyofen-3-il)imidazo[2,1-b][1,3,4]tiyadiazol-2-<br>il]-1H-indol hidrobromür ..... | 21 |
| Şekil 2.9. 2-(4-Florofenilamino)-5-(2,4-dihidroksifenil)-1,3,4-tiyadiazol .....                                    | 22 |
| Şekil 2.10. 2-(3-(3,4,5-Trimetoksifenil)-1,2,4-tiyadiazol-5-il)-3-(tiyofen-2-<br>il)imidazo[1,2-b]piridazin.....   | 22 |
| Şekil 2.12. N-(5-(Siyanometil)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)furan-2-karboksamid ...                                       | 22 |
| Şekil 2.13. 5-(2-(2,6-Dimetoksifenil)-1H-benz[d]imidazol-5(6)-il)-N-<br>sikloheksil-1,3,4-tiyadiazol-2-amin.....   | 23 |
| Şekil 2.14. 4-(2-(piridin-2-il)imidazo[2,1-b][1,3,4]tiyadiazol-6-il)anilin.....                                    | 23 |

|                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.16. Difenil (E)-(1,3,4-tiyadiazol-2(3H)-iliden)fosforamidat .....                                                                               | 23 |
| Şekil 2.17. 2-(n-Propildisülfonil)-5-( fenaçil-metiltiyo) -1,3,4 – tiyadiazol.....                                                                      | 24 |
| Şekil 2.18. N-(5-(2,6-Diflorofenil)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)asetamid .....                                                                                | 24 |
| Şekil 2.19. 1-(2-((5-(2-Klorofenil)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)amino)asetil)indolin-<br>2,3-dion.....                                                        | 25 |
| Şekil 2.20. (3S,4S)-8-(5-((2,3-diklorofenil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)-3-metil-2-<br>oksa-8-azaspiro[4.5]dekan-4-amin.....                            | 25 |
| Şekil 2.21. 2-(2-(4,6-Dimetoksi-1,3,5-triazin-2-il)tiyazol-4-il)-5-(3,4,5-<br>trimetoksifenil)-1,3,4-tiyadiazol.....                                    | 26 |
| Şekil 2.22. N-(4-(6,7-dimetoksi-2-(3-(piridin-4-il)-1,2,4-tiyadiazol-5-<br>il)kinazolin-4-il)fenil)-3,4, 5-trimetoksibenzamid .....                     | 26 |
| Şekil 2.23. 3-((5-(4-Klorobenziliden)-4-okso-1,2,4-tiyadiazol-2-iliden)amino)-5-<br>(metiltiyo)-N-(1,3,4-tiyadiazol-2-il)-1H-pirazol-4-karboksamid...27 | 27 |
| Şekil 2.24. N-((2-(2-(1,3,4-tiyadiazol-2-il) pirimidin-5-il) oksazol-4-il)metil)-<br>3,5-dimetoksibenzamid .....                                        | 27 |
| Şekil 2.26. (E)-3-(4-(5-(4-(oksazolo[4,5-b]piridin-2-il)fenil)-1,2,4-tiyadiazol-3-<br>il)fenil)-1- (3,4,5-trimetoksifenil)prop-2-en-1-on.....           | 28 |
| Şekil 2.28. (E)-4-(5-(1-hidrazinilidenetil)-2-imino-1,3,4-tiyadiazol-3(2H)-il)<br>benzensülfonamid .....                                                | 28 |
| Şekil 2.29. 6-Kloro-2-[2-(4-triflorometilbenziltiyo) -1,3,4- tiyadiazol-5-il]-<br>kinazolin-4(3H)-on .....                                              | 28 |
| Şekil 2.30. 2-((5-(((5-Metil-1,3,4-tiyadiazol-2-il)tiyo)metil)-1,3,4-oksadiazol-2-<br>il)tiyo)-N-(4- metiltiyazol-2-il)asetamid .....                   | 29 |
| Şekil 2.33. 4-(4-Klorofenil)-5-((5-(4-klorofenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il)imino)-N-<br>fenil-4,5-dihidro-1,3,4-tiyadiazol-2-karboksamid .....             | 29 |

|                                                                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.34. 4-(5-(2-(piridin-4-il)tiyazol-4-il)-1,2,4-tiyadazol-3-il)-N-(3,4,5-trimetoksifenil)benzamid .....                                      | 30 |
| Şekil 2.35. 1-(5-((6-Nitrokinazolin-4-il)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)-3-(p-tolil)üre .....                                                         | 30 |
| Şekil 2.36. 5-(6-Kloropiridin-3-il)-N-(4-florofenil)-1,3,4-tiyadiazol-2-amin ...                                                                   | 31 |
| Şekil 4.1. 2-Kloro-N-fenilasetamid türevleri (A) sentezi için reaksiyon denklemi .....                                                             | 34 |
| Şekil 4.1. 2-Kloro-N-(4-sülfamoilfenil)asetamid (A-2) sentezi için reaksiyon denklemi .....                                                        | 35 |
| Şekil 4.2. N-(5-merkapto-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid türevleri (B) için reaksiyon denklemi .....                                                | 35 |
| Şekil 4.3. Hedef Bileşiklerin Sentezi (3a-3u) (C) için reaksiyon denklemi.....                                                                     | 36 |
| Şekil 5.1. 3,4-Dikloro-N-(5-((2-okso-2-(fenilamino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3a) molekülünün kimyasal yapısı .....                | 45 |
| Şekil 5.2. IR Analizi (3a).....                                                                                                                    | 46 |
| Şekil 5.3. <sup>1</sup> H NMR Analizi (3a) .....                                                                                                   | 47 |
| Şekil 5.4. <sup>13</sup> C NMR Analizi (3a).....                                                                                                   | 48 |
| Şekil 5.5. HRMS Analizi (3a) .....                                                                                                                 | 49 |
| Şekil 5.6. 3,4-Dikloro-N-(5-((2-okso-2-((4-(triflorometil)fenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3b) molekülünün kimyasal yapısı . | 50 |
| Şekil 5.7. IR Analizi (3b) .....                                                                                                                   | 51 |
| Şekil 5.8. <sup>1</sup> H NMR Analizi (3b) .....                                                                                                   | 52 |
| Şekil 5.9. <sup>13</sup> C NMR Analizi (3b) .....                                                                                                  | 53 |
| Şekil 5.10. HRMS Analizi (3b).....                                                                                                                 | 54 |

|                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 5.11. 3,4-Dikloro-N-(5-((2-((4-florofenil)amino)-2-oksoetil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3c) molekülünün kimyasal yapısı.....     | 55 |
| Şekil 5.12. IR Analizi (3c).....                                                                                                                 | 56 |
| Şekil 5.13. <sup>1</sup> H NMR Analizi (3c) .....                                                                                                | 57 |
| Şekil 5.14. <sup>13</sup> C NMR Analizi (3c) .....                                                                                               | 58 |
| Şekil 5.15. HRMS Analizi (3c) .....                                                                                                              | 59 |
| Şekil 5.16. 3,4-Dikloro-N-(5-((2-((4-klorofenil)amino)-2-oksoetil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3d) molekülünün kimyasal yapısı .....    | 60 |
| Şekil 5.17. IR Analizi (3d) .....                                                                                                                | 61 |
| Şekil 5.18. <sup>1</sup> H NMR Analizi (3d).....                                                                                                 | 62 |
| Şekil 5.19. <sup>13</sup> C NMR Analizi (3d).....                                                                                                | 63 |
| Şekil 5.20. HRMS Analizi (3d).....                                                                                                               | 64 |
| Şekil 5.21. 3,4-Dikloro-N-(5-((2-okso-2-((4-sülfamoilfenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3e) molekülünün kimyasal yapısı..... | 65 |
| 5.22. IR Analizi (3e) .....                                                                                                                      | 66 |
| Şekil 5.23. <sup>1</sup> H NMR Analizi (3e) .....                                                                                                | 67 |
| Şekil 5.24. <sup>13</sup> C NMR Analizi (3e) .....                                                                                               | 68 |
| Şekil 5.25. HRMS Analizi (3e) .....                                                                                                              | 69 |
| Şekil 5.26. 4-Kloro-N-(5-((2-okso-2-(fenilamino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3f) molekülünün kimyasal yapısı .....                 | 70 |
| Şekil 5.27. IR Analizi (3f) .....                                                                                                                | 71 |
| Şekil 5.28. <sup>1</sup> H NMR Analizi (3f).....                                                                                                 | 72 |

|                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 5.29. <sup>13</sup> C NMR Analizi (3f).....                                                                                             | 73 |
| Şekil 5.30. HRMS Analizi (3f).....                                                                                                            | 74 |
| Şekil 5.31. 4-Kloro-N-(5-((2-okso-2-(fenilamino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3g) molekülünün kimyasal yapısı.....               | 75 |
| Şekil 5.32. IR Analizi (3g).....                                                                                                              | 76 |
| Şekil 5.33. <sup>1</sup> H NMR Analizi (3g) .....                                                                                             | 77 |
| Şekil 5.34. <sup>13</sup> C NMR Analizi (3g).....                                                                                             | 78 |
| Şekil 5.35. HRMS Analizi (3g) .....                                                                                                           | 79 |
| Şekil 5.36. 4-Kloro-N-(5-((2-((4-florofenil)amino)-2-oksoetil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3h) molekülünün kimyasal yapısı .....     | 80 |
| Şekil 5.37. IR Analizi (3h) .....                                                                                                             | 81 |
| Şekil 5.38. <sup>1</sup> H-NMR Analizi (3h).....                                                                                              | 82 |
| Şekil 5.39. <sup>13</sup> C-NMR Analizi (3h) .....                                                                                            | 83 |
| Şekil 5.40. HRMS Analizi (3h).....                                                                                                            | 84 |
| Şekil 5.41. 4-Kloro-N-(5-((2-((4-klorofenil)amino)-2-oksoetil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3i) molekülünün kimyasal yapısı .....     | 85 |
| Şekil 5.42. IR Analizi (3i) .....                                                                                                             | 86 |
| Şekil 5.43. <sup>1</sup> H-NMR Analizi (3i).....                                                                                              | 87 |
| Şekil 5.44. <sup>13</sup> C-NMR Analizi (3i) .....                                                                                            | 88 |
| Şekil 5.45. HRMS Analizi (3i) .....                                                                                                           | 89 |
| Şekil 5.46. 4-Kloro-N-(5-((2-okso-2-((4-sülfamoilfenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3j) molekülünün kimyasal yapısı ..... | 90 |

|                                                                                                                                                     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Şekil 5.47. IR Analizi (3j) .....                                                                                                                   | 91  |
| Şekil 5.48. <sup>1</sup> H-NMR Analizi (3j) .....                                                                                                   | 92  |
| Şekil 5.49. <sup>13</sup> C-NMR Analizi (3j) .....                                                                                                  | 93  |
| Şekil 5.50. HRMS Analizi (3j) .....                                                                                                                 | 94  |
| Şekil 5.51. 4-Floro-N-(5-((2-okso-2-(fenilamino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3k) molekülünün kimyasal yapısı .....                    | 95  |
| Şekil 5.52. IR Analizi (3k) .....                                                                                                                   | 96  |
| Şekil 5.53. <sup>1</sup> H-NMR Analizi (3k).....                                                                                                    | 97  |
| Şekil 5.54. <sup>13</sup> C-NMR Analizi (3k) .....                                                                                                  | 98  |
| Şekil 5.55. HRMS Analizi (3k) .....                                                                                                                 | 99  |
| Şekil 5.56. 4-Floro-N-(5-((2-okso-2-((4-(triflorometil)fenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3l) molekülünün kimyasal yapısı ..... | 100 |
| Şekil 5.57. IR Analizi (3l).....                                                                                                                    | 101 |
| Şekil 5.58. <sup>1</sup> H-NMR Analizi (3l).....                                                                                                    | 102 |
| Şekil 5.59. <sup>13</sup> C-NMR Analizi (3l).....                                                                                                   | 103 |
| Şekil 5.60. HRMS Analizi (3l) .....                                                                                                                 | 104 |
| Şekil 5.61. 4-Floro-N-(5-((2-((4-florofenil)amino)-2-oksoetil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3m) molekülünün kimyasal yapısı .....           | 105 |
| Şekil 5.62. IR Analizi (3m) .....                                                                                                                   | 106 |
| Şekil 5.63. <sup>1</sup> H-NMR Analizi (3m) .....                                                                                                   | 107 |
| Şekil 5.64. <sup>13</sup> C-NMR Analizi (3m) .....                                                                                                  | 108 |

|                                                                                                                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Şekil 5.65. HRMS Analizi (3m).....                                                                                                                           | 109 |
| Şekil 5.66. 4-Floro-N-(5-((2-((4-klorofenil)amino)-2-oksoetil)tiyo)-1,3,4-<br>tiyadiazol-2-il)benzamid (3n) molekülünün kimyasal yapısı .....                | 110 |
| Şekil 5.67. IR Analizi (3n) .....                                                                                                                            | 111 |
| Şekil 5.68. <sup>1</sup> H-NMR Analizi (3n).....                                                                                                             | 112 |
| Şekil 5.69. <sup>13</sup> C-NMR Analizi (3n) .....                                                                                                           | 113 |
| Şekil 5.70. HRMS Analizi (3n).....                                                                                                                           | 114 |
| Şekil 5.71. 4-Floro-N-(5-((2-okso-2-((4-sülfamoilfenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-<br>tiyadiazol-2-il)benzamid (3o) molekülünün kimyasal yapısı .....            | 115 |
| Şekil 5.72. IR Analizi (3o).....                                                                                                                             | 116 |
| Şekil 5.73. <sup>1</sup> H-NMR Analizi (3o).....                                                                                                             | 117 |
| Şekil 5.74. <sup>13</sup> C-NMR Analizi (3o).....                                                                                                            | 118 |
| Şekil 5.75. HRMS Analizi (3o) .....                                                                                                                          | 119 |
| Şekil 5.76. 4-Metoksi-N-(5-((2-okso-2-(fenilamino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-<br>il)benzamid (3p) molekülünün kimyasal yapısı .....                       | 120 |
| Şekil 5.77. IR Analizi (3p) .....                                                                                                                            | 121 |
| Şekil 5.78. <sup>1</sup> H-NMR Analizi (3p).....                                                                                                             | 122 |
| Şekil 5.79. <sup>13</sup> C-NMR Analizi (3p) .....                                                                                                           | 123 |
| Şekil 5.80. HRMS Analizi (3p).....                                                                                                                           | 124 |
| Şekil 5.81. 4-Metoksi-N-(5-((2-okso-2-((4-(triflorometil)fenil)amino)etil)tiyo)-<br>1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3r) molekülünün kimyasal yapısı<br>..... | 125 |
| Şekil 5.82. IR Analizi (3r).....                                                                                                                             | 126 |

|                                                                                                                                                     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Şekil 5.83. <sup>1</sup> H-NMR Analizi (3r) .....                                                                                                   | 127 |
| Şekil 5.84. <sup>13</sup> C-NMR Analizi (3r) .....                                                                                                  | 128 |
| Şekil 5.85. HRMS Analizi (3r) .....                                                                                                                 | 129 |
| Şekil 5.86. 4-Metoksi-N-(5-((2-okso-2-((4-florofenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-<br>tiyadiazol-2-il)benzamid (3s) molekülünün kimyasal yapısı.....      | 130 |
| Şekil 5.87. IR Analizi (3s) .....                                                                                                                   | 131 |
| Şekil 5.88. <sup>1</sup> H-NMR Analizi (3s) .....                                                                                                   | 132 |
| Şekil 5.89. <sup>13</sup> C-NMR Analizi (3s) .....                                                                                                  | 133 |
| Şekil 5.90. HRMS Analizi (3s).....                                                                                                                  | 134 |
| Şekil 5.91. 4-Metoksi-N-(5-((2-okso-2-((4-klorofenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-<br>tiyadiazol-2-il)benzamid (3t) molekülünün kimyasal yapısı .....     | 135 |
| Şekil 5. 92. IR Analizi (3t) .....                                                                                                                  | 136 |
| Şekil 5.93. <sup>1</sup> H-NMR Analizi (3t) .....                                                                                                   | 137 |
| Şekil 5.94. <sup>13</sup> C-NMR Analizi (3t) .....                                                                                                  | 138 |
| Şekil 5.95. HRMS Analizi (3t).....                                                                                                                  | 139 |
| Şekil 5.96. 4-Metoksi-N-(5-((2-okso-2-((4-sülfamoilfenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-<br>tiyadiazol-2-il)benzamid (3u) molekülünün kimyasal yapısı ..... | 140 |
| Şekil 5.97. IR Analizi (3u) .....                                                                                                                   | 141 |
| Şekil 5.98. <sup>1</sup> H-NMR Analizi (3u).....                                                                                                    | 142 |
| Şekil 5.99. <sup>13</sup> C-NMR Analizi (3u) .....                                                                                                  | 143 |
| Şekil 5.100. HRMS Analizi (3u).....                                                                                                                 | 144 |
| Şekil 5.101. Hedef Bileşiklerin Sentezi .....                                                                                                       | 145 |

|                                                                                                                                                                                                                                     |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Şekil 5.102. MCF7 hücre hattında bileşik 3j ve 3o'nun akış sitometrik analiz diyagramı.....</b>                                                                                                                                  | <b>150</b> |
| <b>Şekil 5.103. Bileşik 3j'nin COX-2 enzim aktif bölgesiyle etkileşiminin iki boyutlu (A) ve üç boyutlu (B) görünümü. Bileşik 3o'nun COX-2 enzim aktif bölgesiyle etkileşiminin iki boyutlu (C) ve üç boyutlu (D) görünümü.....</b> | <b>154</b> |
| <b>Şekil 5.104. Bileşik 3j'nin EGFR enzim aktif bölgesiyle etkileşiminin iki boyutlu (A) ve üç boyutlu (B) görünümü. Bileşik 3o'nun EGFR enzim aktif bölgesiyle etkileşiminin iki boyutlu (C) ve üç boyutlu (D) görünümü.....</b>   | <b>155</b> |
| <b>Şekil 5.105. Bileşik 3j – COX-2 kompleksi ile gerçekleştirilen MD simülasyon sonuçları. ....</b>                                                                                                                                 | <b>158</b> |
| <b>Şekil 5.106. Bileşik 3o – COX-2 kompleksi ile gerçekleştirilen MD simülasyon sonuçları. ....</b>                                                                                                                                 | <b>159</b> |
| <b>Şekil 5.107. Bileşik 3j – EGFR kompleksi ile gerçekleştirilen MD simülasyon sonuçları. ....</b>                                                                                                                                  | <b>161</b> |
| <b>Şekil 5.108. Bileşik 3o – EGFR kompleksi ile gerçekleştirilen MD simülasyon sonuçları. ....</b>                                                                                                                                  | <b>162</b> |

## KISALTMALAR DİZİNİ

|                  |                                            |
|------------------|--------------------------------------------|
| ATP              | : Adenozin trifosfat                       |
| A2780            | : Ovaryum kanseri hücre hattı              |
| A549             | : İnsan akciğer kanseri hücre hattı        |
| CaCO             | : Kolon adenokarsinomu hücre hattı         |
| Colo-205         | : Kolon kanseri hücre hattı                |
| COX-2            | : Siklooksijenaz-2                         |
| DMSO             | : Dimetilsülfoksit                         |
| DU-145           | : Prostat kanseri hücre hattı              |
| E.N.             | : Erime noktası                            |
| EGFR             | : Epidermal Büyüme Faktörü                 |
| FDA              | : Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi            |
| HA22T            | : Hepatosellüler karsinom hücre hattı      |
| HCT-116          | : İnsan kolon adenokarsinomu hücre hattı   |
| Hela             | : İnsan serviks kanseri hücre hattı        |
| HEPG-2           | : Hepatosellüler karsinom hücre hattı      |
| HRMS             | : Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometrisi |
| HT29             | : İnsan kolon kanseri hücre hattı          |
| IC <sub>50</sub> | : %50 İnhibisyon Konsantrasyonu            |
| IR               | : Infrared (Kızılötesi)                    |
| İTK              | : İnce tabaka kromatografisi               |

|                     |   |                                                               |
|---------------------|---|---------------------------------------------------------------|
| K562                | : | İnsan miyeloid lösemi hücre hattı                             |
| MCF-7               | : | Meme kanseri hücre hattı                                      |
| MDA-MB231           | : | Meme kanseri hücre hattı                                      |
| MTT                 | : | (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-dibenzenltetrazolyum bromür) |
| PC3                 | : | Prostat kanseri hücre hattı                                   |
| PCL                 | : | İnsan karaciğer kanseri hücre hattı                           |
| PI3K                | : | Fosfoinositid-3 kinaz                                         |
| SMMC-7721           | : | İnsan hepatokarsinomu hücre hattı                             |
| T24                 | : | Mesane kanseri hücre hattı                                    |
| TEA                 | : | Trietilamin                                                   |
| THF                 | : | Tetrahidrofuran                                               |
| U-251               | : | İnsan gliablastomu hücre hattı                                |
| <sup>13</sup> C-NMR | : | Karbon nükleer magnetik rezonans                              |
| <sup>1</sup> H-NMR  | : | Proton nükleer magnetik rezonans                              |

## 1. GİRİŞ

Kanser en genel tanımıyla; düzensiz hücre bölünmesi, lokal doku invazyonu ve metastazlar ile karakterize edilen ve birçok hastalıktan oluşan kompleks bir hastalıktır[1–3]. Kanser geçmişten günümüze insanlar ve hayvanlarda sık görülen bir problem olmakla birlikte özellikle son yıllarda değişen hayat şartlarımız, beslenme düzenimiz, artan yaşam beklentimiz ve kanserojen maddelere olan maruziyetlerimiz nedeniyle kanser insidansı her geçen yıl artmaktadır[4,5]. Öyle ki her dört kişiden biri hayatında kansere yakalanma olasılığı taşımakta ve batı toplumlarında her 3 kişiden biri kansere yakalanmakta ve maalesef yakalanan kişilerin ise yüzde 20'si hayatını kaybetmektedir[5,6].

Globocan 2022 verilerine göre dünyada görülme sıklığı en yüksek 5 kanser türü akciğer, göğüs, kolorektum prostat ve mide kanserleri iken, ölüm oranlarında en başta yer alan 5 kanser türü ise akciğer, kolorektum, karaciğer, göğüs ve mide kanserleridir[7]. Türkiye verilerine bakacak olursak erkeklerde en çok akciğer, prostat, kolorektum, mesane ve mide kanserleri ile karşılaşmakta; kadınlarda ise göğüs, tiroid, kolorektum, akciğer ve korpus uteri kanserleri başı çekmektedir[8].

Bütün kanser türleri, DNA'da meydana gelen bazı anormallikler sonucu meydana gelmektedir. %10 ila %15 oranındaki kanserlerin nesilden nesile kalıtsal aktırımı olduğu, diğer kısmının ise DNA'nın maruz kaldığı karsinojen maddeler sonucu yapısında meydana gelen değişimlerle ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bu nedenle kanser aslında kalıtsal olarak yayılmalrından ziyade çevresel faktörler nedeniyle ortaya çıkmaktadırlar. Çevresel faktörler de güneş ışınlarından, bazı virüs türlerine kadar çok geniş bir yelpazde bulunmaktadır [6].

Kanser hücreleri vücuttaki diğer hücreler ile kıyaslandıklarında bazı farklı durumlarla karşılaşılır. Bunlar arasında hücre döngüsünün artık kontrolden çıktığı sınırsız bir büyüme halini de barındırır. Genetik değişiklikler sonucu bir çok onkogenin aktive olması ve tümör baskılanmasında görevli genlerin baskılanmasıyla, sağlıklı hücrelerin sahip olduğu katı düzenlenme yapısı bozulur. Kanser hücreleri ardından geçirdiği bir çok hücre bölünmesi sonucunda katlanarak artan boyuta sahip olur. Kanserli hücrelerin sahip olduğu bir diğer özellik ise apoptoz ve yaşlanmayı engelleyerek proglamlanmış hücre ölümüne direnmesidir. En son olarak ise bu kanserli hücreler kendileri için yeni kan damarları oluşturarak, farklı dokuları istila ederler ve vücudun uzak bölgelerine

yayılırlar[3].

Kanser kelimesi kontrolsüz hücre bölünmesi, lokal doku invazyonu ve metastazlar ile karakterize olan birçok bozukluğu ifade eder ve tıbbi ve biyolojik terim olarak bir neoplazmadır. Neoplazmalar immortal özellikleri de olabilen dönüştürülmüş hücrelerdir. Neoplazmalar malign veya benign huylu olabilmektedirler. Kanser hastalığına baktığımızda burada malign neoplazmalardan söz edilmektedir ve malignite *in vivo* olarak nakledildiğinde invaziv tümörler oluşturma yeteneğidir[1,3].

İnvaziv tümörler oluşturma yeteneğinin değerlendirilebilmesi için geçmesi gereken süre nedeniyle ne yazık ki tıbbi olarak bu tanımlama kullanışlı olmamaktadır. Benign neoplazmlar genellikle kapsüllenmiş, lokalizedirler ve yavaş ilerlerler. Adlandırılırken köken aldıkları hücre veya dokuya göre sonuna -oma eki alarak isimlendirilmektedirler. Geliştikleri hücelere benzer özellikler gösterirler, nadiren metastaz yaparlar ve rezeksiyondan sonra genellikle tekrarlamazlar. Malign neoplazmlar ise aksine çevrelerindeki dokuyu işgal ederek yok ederler. Genetik olarak kararsızdırlar ve hücrelerin kayıparı köken aldıkları hücelere göre atipik olarak gerçekleşir ve bu hücreler yapı ve fonksiyon kaybı yani “anaplazi” yaşarlar. Bu neoplazmlar sahip oldukları metastaz eğilimi ile ne yazık ki rezeksiyon sonrası genellikle nüks edebilmektedir. Bu özellikler tüm kanser türlerinin tanımlasa da, farklı konumlardan köken alan kanser türleri geniş bir yelpazede farklı özellikler barındırırlar [1,2].

Metastaz, bir neoplazmin olduğu yerden ayrılarak, vücutta başka bir yere yayılmasıdır ve ne yazık ki kansere bağlı ölümlere neden olan önemli bir faktördür. Metastaz için öncelikle malignitenin olduğu yerden kan dolaşımına geçmesi yani “intravazyon” gerekmektedir. Daha sonra genellikle bu hareketin küçük bir kılcal damarla engellendiği yeni bir yere göç gerçekleşebilir. Bu durumda, yeni göç alanında yerel hücre dışı matrise göç yani “ekstravazyon gerçekleşir, bunu hücrenin büyümesi ve gelişmesi takip eder [1].

Kanserlerin oluşum mekanizmaları henüz tamamen aydınlatılamamıştır ancak bir hücrenin yaşam döngüsündeki büyüme ve çoğalma mekanizmalarındaki bozulma sonucu ortaya çıktığı ve gelişip, yayıldığı düşünülmektedir. Bugüne kadar elde edilen bulgular karsinogenez kavramını desteklemektedir. Ölümcül olmayan genetik hasar yani başlatma evresi ile karsinogenez başlar, bunun nedeninin de karsinojen maddeler olduğu

düşünülmektedir. Karsinojen maddeler arasında birçok farklı fiziksel, biyolojik ve kimyasal ajan bulunur. Bunlar arasında asbest, benzen, ultraviyole ışık ve virüsler sayılabilir. İkinci adım olan promosyon evresinde kanserojen maddeler ve diğer faktörler ortamı genetik hasarı olan hücrelerin yaşamı ve çoğalmaları için optimum hale getirirler. Bir noktada genetik hasarı olan hücreler dönüşüm sonucu kanserleşirler. Bir kanserin başlaması ve gelişmesi yani hücrenin dönüşümü arasında 5 ila 20 yıl geçebilmektedir. Karsinogenezin son evresi ise yerel dokulara invazyonu ve metastazı içermektedir[1–3].

Kanser hücreleri kitle cerrahi olarak çıkarılmadıkça, radyoterapi, kemoterapi ya da hormonal terapi gibi kansere özgü farmakoterapi uygulanmadıkça ve çok nadir de olsa bazı melanom veya böbrek kanserlerinde görülebildiği gibi kendi kendine küçülme veya yok olmaya gitmediği sürece büyümeye devam etmektedir[5].

Kanser yeteri kadar erken teşhis edilebilirse tedavi edilebilir bir hastalıktır bunun nedeni genellikle erken teşhis edildiğinde kanserin küçük boyutlu olması ve bunun da cerrahi olarak tümörün çıkarılabilmesine olanak sağlaması veya kemoterapi ya da radyoterapi sonucu küçülebilmesidir. Kanser terapisinde amaç öncelikle vücuttan kanserli doku veya hücrelerin yok edilmesidir ancak bunun mümkün olmadığı durumlarda amaç hastanın yaşam süresini uzatmaya çalışırken yaşam kalitesinin iyileştirilmesidir[5,9].

Kanser tedavisinde kullanılan yöntemleri öncelikle sistemik ve lokal tedaviler olarak ayırmak mümkündür. Lokal tedaviler radyoterapi ve çeşitli ablatif işlemleri içerirken sistemik tedaviler ise hormonal terapiler ve hedeflendirilmiş küçük molekülleri de içeren kemoterapi ve immünoterapinin de içinde bulunduğu biyolojik tedaviden oluşmaktadır[9].

Kanser terapisindeki ana yöntemlere ise bakmamız gerekirse; cerrahi, radyasyon terapisi ve antikanser ajanların kullanımını yani kemoterapi öne çıkmaktadır. Bu yöntemler tek başına kullanılabildiği gibi belirli bir tür kanserin terapisi için sıralı ya da eş zamanlı olarak kullanılabilmektedir [3].

Cerrahi bu tedavi yöntemlerinden en eskisi olup tanı ve tedavide büyük rol oynamaktadır. Ne yazık ki kanser hücresi ilk meydana geldiği alanda kalmış ve metastaz yapmamış ise tedavi edici olabilmektedir. Meme ve kolon kanseri gibi türlerinde içinde bulunduğu erken evre kanser terapilerinde yararlanılmaktadır. İşlem sırasında yalnızca

kanserli doku değil komşu lenf düğümleride çıkarılmaktadır [3].

İlk kez 1800'lü yılların sonlarında kullanılmaya başlayan ve bazı kanser türlerinin tedavi edilmesinde temel dayanak olmaya devam eden radyasyon terapisi, lokalize olmuş bir kanser için tek başına veya tek bir kanser alanını kapsayabilen kanserler için kullanılmaktadır [3].

Kemoterapi ilk olarak 1941'de Goodman ve Gilman'ın lenfoma hastalarına nitrojen hardalı vermesiyle uygulanmıştır ve günümüze kadar birçok farklı kemoterapi ajanı geliştirilmiştir hatta kemoterapötikleri konvansiyonel ve yeni jenerasyon olarak sınıflamak mümkündür[3,10].

Konvansiyonel kemoterapötikler genellikle hızla bölünen hücreleri hedeflemektedir ancak hastalıklı ya da sağlıklı hücreler arasında bir ayırım yapamamakta kemik iliği ve gastrointestinal sistem hücreleri gibi hücrelere de zarar vermekte bulantı ve saç dökülmesi gibi problemlere yol açmaktadır. Kemoterapötik ajanlar genellikle bir siklus adı verilen tekrarlayan kürler halinde uygulanmakta ve döngünün uzunluğu genellikle kemoterapötüğün toksisitesine bağlı olmaktadır. Nötropeni gibi ciddi advers reaksiyonlarda hastanın iyileşmesine süre tanıyacak şekilde sikluslar oluşturulmaktadır[3,10,11].

Konvansiyonel terapötiklerin sağ kalım oranını arttırıp, progresyonu yavaşlatmalarına ve tümör boyutunu küçültmelerine dair kanıtlar bulunmasına rağmen kullanımları neticesinde yarattığı problemler geniş terapötik aralığa sahip, düşük toksisite gösteren ve daha spesifik kemoterapötiklere olan ihtiyacı arttırmaktadır. Bu nedenle yeni ilaç geliştirme çalışmalarında hücre sinyal iletimleri ve çeşitli biyolojik yolları etkileyerek hücrelerin kontrolsüz büyümesine engel olan ve hedeflendirilmiş ve spesifik küçük moleküller önem kazanmıştır[10,11].

Yeni jenerasyon olarak önem kazanan grupları küçük inhibitör moleküller ve monoklonal antikorlar olarak ikiye ayırmak mümkün olmakta ve konvansiyonel ilaçlardan onları ayıran özellikleri arasında sitotoksik değil sitostatik olmaları sayılabilmektedir. Etkilerini hücre içi ya da dışındaki reseptörlerle etkileşerek veya bu reseptörlerin ilerleyen sinyal iletim yollarındaki efektörleriyle etkileşimleri sonucu ortaya çıkarırlar. Neticede kanser hücrelerindeki kontrolsüz büyüme ve gelişmeyi sinyal iletimlerini bozarak inhibe ederler[10].

Yaygın olarak kullanılan kemoterapötikleri mekanizmalarına göre gruplandırmak gerekirse;

- 6-Merkaptopürin ve 6-Tiyoguanin pürin halkası biyosentezi ve DNA sentezini inhibe ederek,
- Metotreksat dihidrofolat redüksiyonu ve timidilat sentezini inhibe ederek,
- Hidroksiüre ribonükleotid redüktazı inhibe ederek,
- Kamptotesinler, etoposid, tenoposid, daunorubisin ve doksorubisin topoizomerez fonksiyonlarını inhibe ederek,
- Hidroksiüre ribonükleotid redüktazı inhibe ederek,
- 5-Florourasil timidilat sentezini inhibe ederek
- Gemisitabin, sitarabin, fludarabin DNA sentezini inhibe ederek,
- Platin analogları, alkilleyici ajanlar, mitomisin DNA'ya eklentiler ekleyerek,
- L-Asparajinaz asparajini deaminasyonu ve protein sentezini inhibe ederek,
- Taksanlar, vinka alkaloitleri mikrotübül fonksiyonlarını inhibe ederek,
- Arsenik trioksit, histon deasetilaz inhibitörleri farklılaşmayı indükleyerek,
- Protein tirozin kinaz inhibitörleri ve antikorlar ise sinyal yollarını inhibe ederek aktivite gösterirler [2].

İnsan genomunun yaklaşık %20'si sinyal iletim mekanizmalarında rol almakta bu da insan hayatı için bu mekanizmaların ne kadar önemli olduğunu gözler önüne sermektedir. Sinyal iletim mekanizmaları yoluyla hücreler büyüme, çoğalma ve farklılaşma gibi değişimler yaşamakta ve kanser nedeniyle bu hayati olayların bozulmasıyla birlikte sinyal iletim mekanizmaları ilk etkilenen sistemler arasında yer almaktadır[12].

Sinyal iletim mekanizmaları arasında önemli olan gruplardan biri fosfat gruplarının transferinde rol alan ve yapılarındaki bozulmaların kanser oluşumunda rol aldığı 1980'lerin başında ortaya çıkan protein kinazlardır. Protein kinazlar hücre farklılaşmasında rol almakta, hücreyi hayatta kalmaya teşvik etmekte ve hücre döngüsünün düzenlemektedir, kanser nedeniyle aktivitelerindeki bozukluklar çeşitli sinyal iletim yolları ile de ilişkilidir. Bu sinyal iletim yollarına örnek vermek gerekirse büyük önem araz eden Ras/Raf/MEK/ERK ve PI3K/Akt/mTOR sinyal yolları

verilebilir[10,13].

Protein kinazlar insanlardaki en büyük protein aileleri arasında yer alırlar ve protein, lipit ve diğer biyomakromoleküllerde bulunan serin, treonin veya tirozin kalıntılarına ATP molekülünden fosfat grubu transferini katalizlerler. Bu enzimlerin hücre büyümesi ve proliferasyonu, hücrenin canlılığı ve hareketi ve apoptoz ve sinyal iletimi gibi hayati olaylarda görev almaları önemlerini arttırmaktadır[13–15].

Protein kinazlar son yıllarda önemli ilaç hedeflerinden biridir ve neredeyse her büyük ilaç şirketinin klinik öncesi hedef portföyünde protein kinazların önemli bir fraksiyonu yer almaktadır. Bu kadar popüler ve önemli bir hedef olmalarının nedeni ise hücresel sinyal iletiminin her yerinde rol almaları ve küçük organik moleküllerle kolaylıkla inhibe edilebilmeleridir[16].

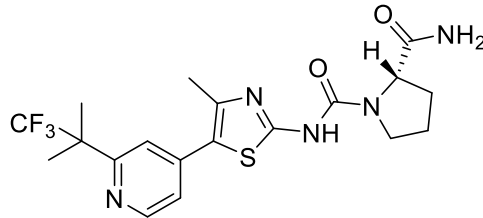
Protein kinazların deregülasyonu sonucu kanser, fibrozis, restenoz, sedef hastalığı, andaroskleroz, osteoporoz ve diyabetinde içinde bulunduğu immünolojik, inflamatuvar, dejeneratif, metabolik, kardiyovasküler ve bulaşıcı bir çok hastalığa yol açmaktadır. İlişkili bulunduğu kanserler arasında kronik miyeloid lösemi, gastrointestinal stromal tümörler, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, meme kanseri ve renal hücreli karsinom bulunmaktadır[17–20].

Hücrelerde önemli sinyal iletim yollarından olan PI3K/Akt/mTOR'un özellikle kanser hücrelerinin hayatta kalmasında, büyümesinde ve kemoterapötiklere ilaç direnci gelişiminde rol alması yeni ilaç moleküllerinin gelişmesinde ilgi çekici hale getirmektedir. Bu yolun aktivasyonu genellikle Sınıf I PI3K'nın katalitik alt birimini (p110 $\alpha$ ) kodlayan gen olan PIK3CA'nın mutasyonu veya amplifikasyonu ile olmaktadır[21,22].

Kinaz inhibitörlerinin hedeflerinden biri olan Epidermal büyüme faktörü (EGFR); EGFR ya da HER1 olarak da adlandırılan ErbB1, HER2 olarak bilinen ErbB2, HER3 olarak bilinen ErbB3 ve HER4 olarak bilinen ErbB4'ten oluşan dört reseptörün yer aldığı bir aileden oluşur. Bu reseptörlerin otofosforile olmaları sonucunda PI3K/Akt ve MAPK/ERK yolları aktive olurlar. EGFR aktive olduğu zaman, PIP2'yi PIP3'e dönüştüren PI3K'a uyarılır. PIP3 Akt serin/treonin kinaza bağlanarak onu plazma zarına taşır, burada Akt'nin T308 ve S473'te fosforilasyonu sonucu hücrenin büyümesi ve canlılığına katkıda bulunan transkripsiyon faktörleri aktive olur[10,23].

PI3K sinyal yolunun hücresel hayati fonksiyonları olan hücre çoğalması, büyümesi, hayatta kalması ve hareketliliğinin düzenlenmesinde rol aldığı ve büyüme hormonlarına yanıt olarak aktive olduğu bilinmektedir. Hücre döngüsünde anahtar rol alan bir serin-treonin kinaz proteini olan AKT olarakta bilinen protein kinaz-B'nin aktivasyonunu gerçekleştirir. Protein kinaz-B ise çekirdeğe yer değiştirir ve proapoptik sinyallerin inhibe olmasını sağlarken, antiapoptik substratların ise aktive olmasını sağlar. Aynı zamanda rapamisininin memeli hedefi olan mTOR'un fosforilasyonunu gerçekleştirebilir. Aktive olan mTOR ise, translasyon düzenleyicilerin fosforilasyonu sonucu protein sentezini uyarır ve protein bozulması ve anjiyogeneze de katkı sağlar. Fosfataz ve tezsiz analogu yani PTEN, bu yolak aracılığıyla hücre içi sinyal iletiminin blokajını sağlayan ve bir çok katı tümörde genellikle etkisiz hale getirilen bir tümör baskılayıcı gendir [2].

Alpelisib (Şekil1.1.) PI3K'nın alfa izoformunu seçici olarak hedefleyen bir inhibitördür. 24 Mayıs 2019'da FDA tarafından fulvestrant ile kombinasyon halinde PIK3CA mutasyonu olan, HER-2-negatif, hormon reseptörü pozitif, ileri veya metastatik meme kanseri olan postmenopozal kadın ve erkeklerin tedavisine kullanılmak üzere onaylanan ilk PI3K inhibitörüdür[24,25].



Şekil 1.1. Alpelisib molekül şekli

Kanser tedavilerinde farklı mekanizmaları hedef alan kombine tedavilerin sinerjistik ve/veya katkı mekanizmaları ile daha efektif olduğu kanıtlanmıştır. İki farklı ilacın eş zamanlı olarak kullanılması ise ilaç-ilaç etkileşimleri ve farmakokinetik profillerin sonucu çeşitli doz kısıtlayıcı toksisiteler nedeniyle çok zor olmaktadır. Bu nedenlerle daha çok tek molekülde birden fazla mekanizmayı hedef alan bileşiklerin geliştirilmesi önem arz etmektedir[26].

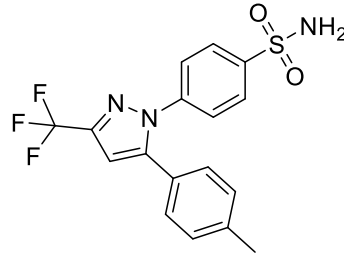
İnsanlar ve hayvanlar üzerinde yapılan çeşitli çalışmalar prostaglandinlerin kanserlerin oluşmasında rol aldığını göstermektedir. Araşidonik asidin oksidatif metabolizmasından üretilen prostaglandinler immün tepkilerin lipid formdaki

aracılarıdır. Hem akut hem de kronik inflamasyon durumlarında inflamatuvar hücreler tarafından aşırı miktarda üretimi gerçekleşmektedir. Prostaglandinlerin sentezinde 2 siklooksijenaz enzimi COX-1 ve COX-2 hız kısıtlayıcı basamaklara görev almaktadırlar[27]

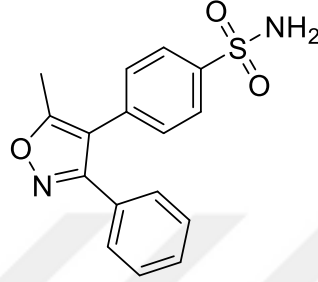
Mide mukozasının sitoproteksiyonu ve trombosit agregasyonu gibi genel vücut süreçlerinde rol alarak vücut içinde dengenin korunmasından sorumlu olan COX-1 enzimi çoğu organ ve dokuda temizlik enzimi olarak adlandırılmaktadır. COX-2 ise tam tersine genellikle sağlıklı doku ve organlarda bulunmamaktadır ve iltihaplanma, ağrı, tümör ve alzheimer hastalığı gibi durumlarda hızla artabilmektedir [28]

Son yıllarda mide, meme, akciğer ve yemek borusunda bulunanlarında aralarında bulunduğu çeşitli kanser türlerinde COX-2'nin aşırı ekspresyonu ve karsinogenezin çeşitli yönlerinde COX-2'nin rol aldığı gözlemlenmiştir. Özellikle artan COX-2 aktivitesi, tümör hücrelerinde artmış olan EGFR aktivitesi ile ilişkilidir. EGFR ekspresyonu, COX-2'nin transkripsiyonunu arttırabilmekte bunun sonucu prostaglandin E<sub>2</sub> upstream yolağını düzenleyebilir bunun sonucunda da EGFR aktivitesi aşırı şekilde artabilir [29,30].

EGFR ile dual inhibe edilebilecek hedef moleküllere daha önceki çalışmalar göz önüne alınarak bakıldığında siklooksijenaz-2 (COX-2) önemli bir hedeftir. COX-2'nin aşırı ekspresyonunun birçok farklı kanser türünde kanser sağkalımı, bağışıklıktan kaçma, tedavi sırasında kanser kök hücrelerinin yeniden popülasyonu ve nihayetinde tedaviye direnç gelişimiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Ulusal Kanser Enstitüsü yapılan bir inceleme sonucunda non-steroidal anti inflamatuvar ilaçların ve özellikle COX-2 seçici inhibisyon yapabilenlerin antikanser etkinlik gösterebileceğini ortaya koymuştur. Bu bileşiklerle hücre kültürü ve kemirgen modelleri kullanılarak yapılan araştırmalarda anjiyogenezi engelleme ve normal apoptozu yeniden sağlama potansiyeli ortaya konmuştur. COX-2 inhibitörü moleküllere bakacak olursak selekoksib (Şekil 1.2.) ve valdeoksib (Şekil 1.3.) örnek verilebilir[31].



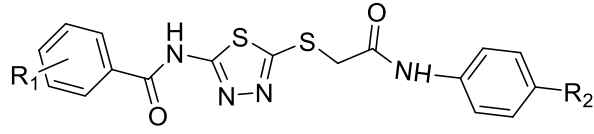
**Şekil 1.2.** Selekoksib molekül şekli



**Şekil 1.3.** Valdekoksib molekül şekli

Uzun yıllardır savaşılan ancak halen radikal bir tedavisi bulunamayan kanser hastalığı için bir umut ışığı olabilmesi amacı güdülerek yeni jenerasyon küçük inhibitör moleküller sentezlenmek istenmiş ve bu tez kapsamında verilen bilgilerin ışığında dual etkili yeni antikanser bileşiklerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Alpelisib bileşiğinin etki mekanizmasının EGFR'ye uzandığından yola çıkılarak EGFR ve COX-2 dual inhibisyon gösterebilecek moleküller tasarlanmıştır. Alpelisib molekülünde yer alan tiyazol halkası yerine tiyadiazol halkası kullanılmış, piridin halkası yerine biyoizosteri olan benzen halkası tercih edilmiş ve CF<sub>3</sub> süstitüentinin etkisini test etmek amacıyla farklı süstitüe benzen halkaları içeren bileşikler sentezlenmiştir. Bileşiklerin üç halka sistemi içermesine dikkat edilmiş ve amid yapısının da yer almasına özen gösterilmiştir. COX-2 inhibisyonu için ise genel olarak moleküllerde göze çarpan sülfonamid yapısından yararlanılmak istenmiş ve bu yapı bazı bileşiklerin süstitüenti olarak seçilmiştir. Bileşik tasarımlarının ardından bu tez kapsamında 20 yeni bileşik (Tablo 1.1.) sentezlenmiş ve antikanser etkileri araştırılmıştır.

**Tablo 1.1.** *Hedeflenen Bileşikler*



| Bileşik   | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub>                   | Bileşik   | R <sub>1</sub>     | R <sub>2</sub>                   |
|-----------|----------------|----------------------------------|-----------|--------------------|----------------------------------|
| <b>3a</b> | 3,4-Cl         | -H                               | <b>3k</b> | 4-F                | -H                               |
| <b>3b</b> | 3,4-Cl         | -CF <sub>3</sub>                 | <b>3l</b> | 4-F                | -CF <sub>3</sub>                 |
| <b>3c</b> | 3,4-Cl         | -F                               | <b>3m</b> | 4-F                | -F                               |
| <b>3d</b> | 3,4-Cl         | -Cl                              | <b>3n</b> | 4-F                | -Cl                              |
| <b>3e</b> | 3,4-Cl         | -SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> | <b>3o</b> | 4-F                | -SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> |
| <b>3f</b> | 4-Cl           | -H                               | <b>3p</b> | 4-OCH <sub>3</sub> | -H                               |
| <b>3g</b> | 4-Cl           | -CF <sub>3</sub>                 | <b>3r</b> | 4-OCH <sub>3</sub> | -CF <sub>3</sub>                 |
| <b>3h</b> | 4-Cl           | -F                               | <b>3s</b> | 4-OCH <sub>3</sub> | -F                               |
| <b>3i</b> | 4-Cl           | -Cl                              | <b>3t</b> | 4-OCH <sub>3</sub> | -Cl                              |
| <b>3j</b> | 4-Cl           | -SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> | <b>3u</b> | 4-OCH <sub>3</sub> | -SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> |

## 2. GENEL BİLGİLER

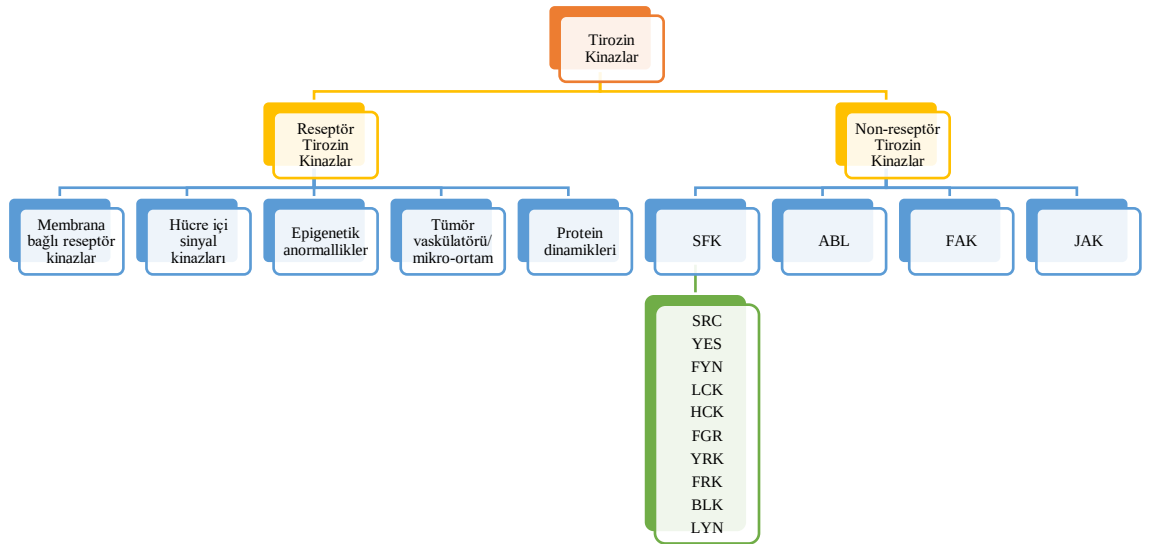
### 2.1. Kinazlarla İlgili Temel Bilgiler

Protein kinazların yapısında mutasyonlar ve translokasyon gibi meydana gelen genetik değişimler ve aşırı ekspresyon sonucu aktivitelerindeki düzensizlik otoimmün, kardiyovasküler ve inflamatuvar hastalılarında içinde bulunduğu bir dizi hastalığa neden olmakta özellikle birçok kanser türünde rol oynadığı rapor edilmiştir[32].

Protein kinazlar Faz I klinik araştırma düzeyinde geliştirilmekte olan yaklaşık 30 farklı kinaz hedefi ile 21. Yüzyılın en önemli ilaç hedefleri arasındadır, dünya genelindeki ilaç geliştirme çalışmalarının belki üçte ila dörtte biri bu enzimleri hedeflemektedir. Bu çalışmaların önünün açılması 2001 yılında Philadelphia kromozomu pozitif kronik miyeloid lösemi tedavisinde klinik etkinliğinin kanıtlanması ile olmuştur[18,32].

Protein kinazları öncelikle fosforilasyonunu gerçekleştirdikleri protein kalıntısına göre gruplara ayırmak mümkündür. Kanser patolojisiyle ilişkili olanlar arasında tirozin kinazlar, serin/treonin kinazlar ve karma tipte olanlar önde gelmektedir[10].

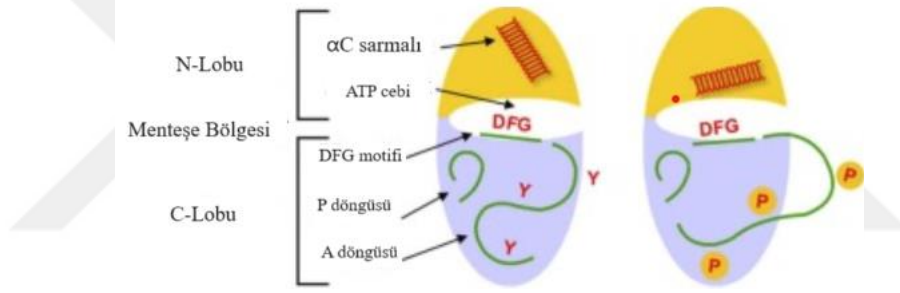
Tirozin kinazlar ise kendi içerisinde reseptör ve non-reseptör tirozin kinazlar olarak 2'ye ayrılmakta ardından ise her grup kendi içerisinde farklı gruplara ayrılmaktadır[11]. (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Kinaz İnhibitörlerinin Sınıflandırılması [11]

Kinaz alanlarının kinaz proteinleri arasında farklılık göstermeleri hedefe özgüllük verirken, kinaz alanlarındaki yapısal benzerlikler ise aynı anda birden fazla inhibisyona olanak sağlayabilmektedir. Çoklu inhibisyonlar ilaç toksisitetlerine yol açabilme ihtimali yaratsa bile ilaca karşı oluşabilen direnç gelişimini önlemede etkili olabilmektedir[33].

Kinaz alanı üç bölgeden oluşmaktadır: N-lob, menteşe bölgesi ve C-lobu (Şekil 2.2.). N-lobu  $\alpha$ C sarmalını barındırırken C-lobu ise fosfat bağlanma bölgesi olan P döngüsünü, aktivasyon döngüsü olan A-döngüsünü ve glutamat, fenilalanin ve glisinden oluşan DFG motifini içerir. Kinaz aktivitesinin düzenlenmesinde DFG motifi önemli bir rol oynamaktadır. DFG-in ve DFG-out olarak iki ana konformasyona sahip olan DFG'nin DFG-out konformasyonunda ATP'nin sterik engel yoluyla bağlanması engellenerek tirozin kinazın inaktif formuna dönmesi sağlanırken, fenilalaninin çevrilmesi ile oluşan DFG-in konformasyonu ile ise tirozin kinaz aktif formuna geçer[33].

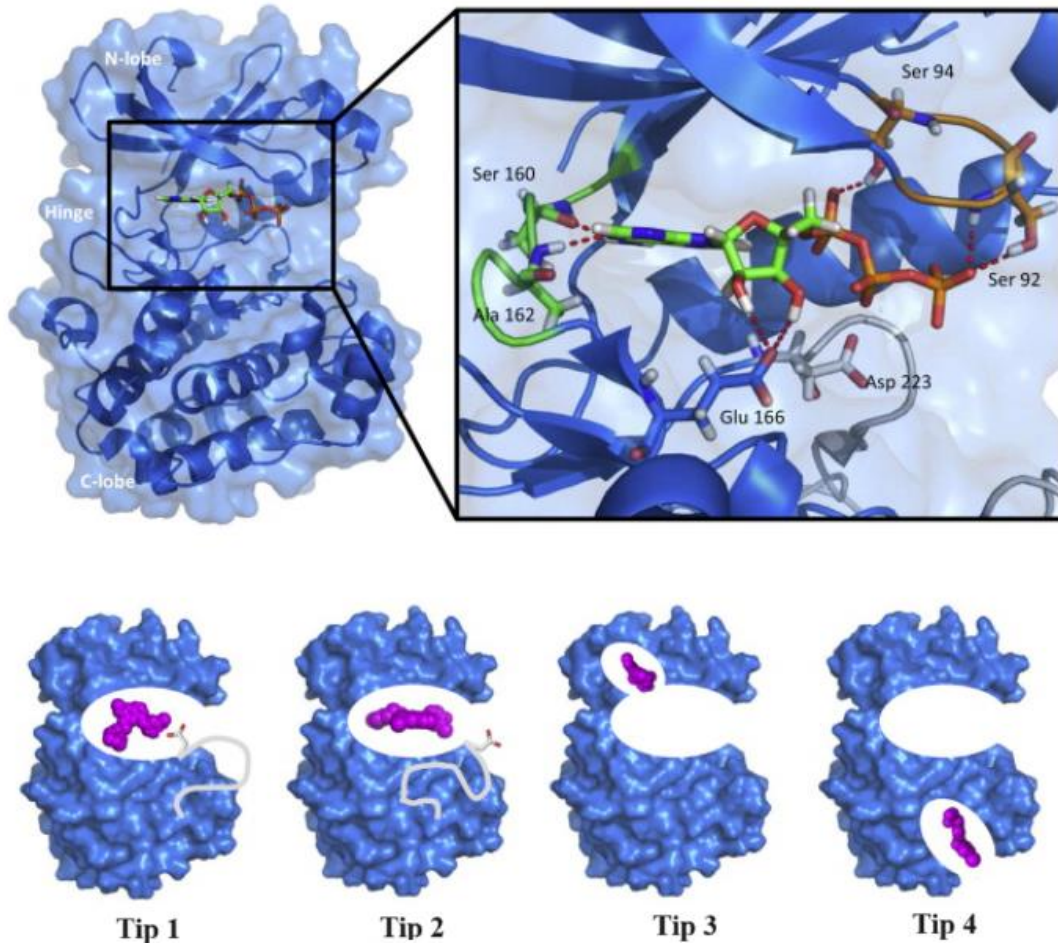


**Şekil 2.2.** DFG-in ve DFG-out konformasyonunda kinaz alanının genel yapısı[33]

Bilinen kinaz inhibitörlerinin büyük bölümü kinaz alanının ATP bölümüne bağlanır. Bu yeni ilaçların geliştirilmesi için birkaç etki ortaya çıkarır. Öncelikle 500'den fazla protein kinaz arasında seçiciliğin sağlanması hedef dışı etkilerden meydana gelebilecek yan etkilerden kaçınmanın bir yolu olabilir. İkinci olarak ise protein kinazlar için inhibitör kemotiplerinin proteinle çok benzer bölgeleri hedeflemelerinden kaynaklı olarak oldukça karmaşık bir fikri mülkiyet ortamına yol açmıştır[16].

Kinaz inhibitörlerinin özellikle onkolojik ilaçlar açısından bu kadar gelişmiş bir formatta olmasının nedeni diğer hastalık endikasyonlarına göre küçük moleküllerle kinazların nasıl inhibe edilebileceğinin anlaşılmış olmasıdır. Bunun nedeni birçok kinazın farklı tümör hücrelerinin hayati fonksiyonlarını sürdürmesine yardımcı süreçlerde yol almasıdır[18].

Kinaz inhibitörlerinin genellikle yapılarında birden çok hidrojen bağı yapmasına olanak sağlayan alifatik veya aromatik fonksiyonel gruplar barındırırlar. Kinaz inhibitörlerini kinazlara bağlanmalarına göre 4 farklı grupta sınıflandırmakta mümkündür. Tip 1 inhibitörler kinazın DFG-in durumunu hedefleyip aktif konformasyona bağlanırken, tip 2 inhibitörler DFG-out durumunu hedeflemektedir. Tip 3 inhibitörler ise ATP ile rekabet etmemekte, allosterik inhibitörler olarak bilinmekte ve aktif bölgeden farklı bölgelere bağlanmaktadır. Tip 3 inhibitörler ATP bağlanma cebine bitişik küçük ve büyük loblar arasındaki yarık içine bağlanmakta, Tip 4 inhibitörleri ise bu yarığın dışına bağlanmaktadır[11,13].



**Şekil 2.3.** Kinazların bağlanma bölgesi ve inhibitör tiplerine göre gösterimi [34]

Tirozin kinaz inhibitörlerinin çoğu tip 1 ve 2 inhibitörlerden oluşmaktadır ve her iki tipte kompetitif inhibitörlerdir. Genellikle adenosine benzeyebilmek için bir pürin ya da pirimidin parçası taşırlar. Tip 3 inhibitör grubundan yalnızca mitojenle aktive olan

protein kinaz inhibitörleri FDA onayı almışken tip 4 inhibitörlerden ise yalnızca Asciminib FDA onaylıdır [33].

Ligand hücre dışı bir reseptöre bağlandığı zaman, kinazlar hücre içi yolların aktivasyonunu uyaran sinyalleri hücrenin iç kısmına iletmektedir. Kinaz inhibitörleri ise kinazların ATP bağlanma alanını inhibe etmekte bunun neticesinde ise sinyal yolları inhibe olmakta ve işlevlerini yerine getirememektedir [3].

Tirozin kinaz inhibitörleri ile tedavide tipik olarak birincil veya ikincil direnç oluşumu gözlenmekte bu nedenle bu ajanların zaman sınırlayıcı etkinliğe sahip oldukları görülmektedir. Direncin ana mekanizmalarına bakmak gerekirse kinazların bağlanma bölgesindeki hedefine olan afinitesini azaltan mutasyonlar, gen amplifikasyonu ve diğer sinyal yollarının aktive olması yer almaktadır. Bu direncin tedavide yarattığı engeli aşabilmek, kinaz inhibitörlerinin farmakokinetik ve farmakodinamiklerini optimize edebilmek ve toksisitelerini azaltmak amacıyla çeşitli nesil inhibitörler geliştirilmiştir [33].

FDA 1 Ocak 2024'e kadar 80 adet küçük moleküllü protein kinaz inhibitörünü tedavide kullanılmak üzere onaylamıştır. Bu ilaçlardan neredeyse tamamı oral yoldan kullanılmaktadır. 80 ilaçtan 43 tanesi reseptör tirozin kinazı hedef alırken, 20'si non-reseptör tirozin kinazı 13'ü antagonize serin/treonin kinazı hedeflemektedir, 4 tanesi ise dual olarak MEK1/2 protein kinaz ailesini inhibe etmektedir.

Meme, kolorektal, epitelyal baş ve boyun ve skuamöz hücreli akciğer kanserlerinde aşırı ifade edilen EGFR inhibitörlerinin otofosforile olmasıyla PI3K/Akt ve MAPK/ERK yolları aktive olmaktadır. Piyasada lapatinib, gefitinib gibi FDA onaylı EGFR inhibitörleri bulunmasına rağmen ilaç direnci, genomik instabilite ve kanser hücresindeki mutasyonlar nedeniyle istenilen sonuçlar alınamamaktadır. Bu nedenle yeni inhibitörlere ihtiyaç bulunmaktadır[10,23].

## **2.2. EGFR İnhibitörleri**

EGFR reseptör tirozin kinaz ailesine ait bir hücre yüzeyi reseptörüdür. EGFR ailesi belirgin yapısal özellikleri olan dört üye ve reseptörlere karşılık gelen on bir ligandı içerir. Ligand reseptörle bağlandığı anda dimerizasyonun indüklenmesiyle tirozin kinaz alanı aktive olur ve neticede C-terminal kuyruğundaki tirozin kalıntıları fosforile olurlar.

Bunun neticesinde ise hücre büyümesi ve gelişmesi için downstream yolların aktivasyonu gerçekleşir [23].

EGFR'nin rahme implantasyon öncesinde embriyo gelişimine, doğuma kadar organların oluşumu ve doğum sonrası gelişiminde rol aldığı bilinmektedir. Vücuttaki hangi fizyolojik olaylarda rol aldığına bakacak olursak;

- Karaciğer formasyonu ve rejenarasyonu,
- Cilt gelişimi, integrasyonu ve homeostazının ve yenilenmesinin sağlanması,
- Nöronal hücrelerin gelişimi, migrasyonu ve aktivitesi,
- Meme kanalı gelişimi ve süt üretimi sayılabilir [23].

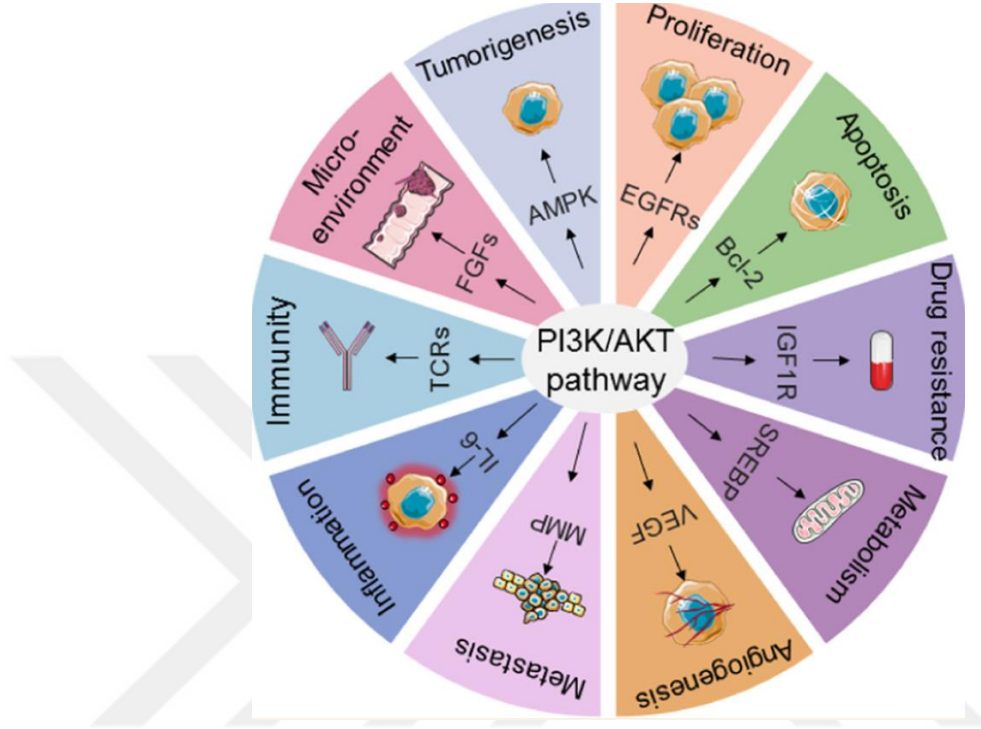
EGFR ailesinin üyeleri tirozin kinaz alanı ile benzer özelliklere sahiptirler ancak ek olarak farklı hücre dışı alana ve C-terminal kalıntısına sahiptirler. HER2'nin ligand bağlanma bölgesi bulunmamaktadır ve kendisi için bir ligand tanımlanmamıştır. Bu nedenle hiçbir zaman homodimer oluşturamamaktadır ancak heterodimerleşmeye yatkındır. Heterodimerizasyon geçirdiği zaman downstream yollar bakımından EGFR'ye benzer davranışlar göstermektedir. HER3 Asp yerine Asn kalıntısına sahip olduğu için ne yazık ki aktif olmayan kinaz alanına sahiptir ve dolayısıyla HER3 homodimerleri fosforilasyon bakımından zayıf kalmaktadır. HER3 heterodimerleri ise ortağının kinaz aktivitesi sonucu fosforile olmakta ve fosforile olmuş tirozin kalıntıları sinyal iletim yollarındaki diğer protein yapılar için bağlanma bölgesi olarak görev almaktadır. EGFR ve HER4 ise tamamen işlevsel olarak görev alan reseptörlerdir yani ligandı bağlarlar ve hem homodimer hem de heterodimer olarak işlev gösterebilirler [23].

EGFR, yukarıda belirtilen sinyal iletim yollarına; hücrenin büyümesi, farklılaşması, hayatta kalması ve işleyişi gibi çeşitli süreçlerine yardımcı olmaktadır. Bu kadar hayati olaylarda rol almasına rağmen ne yazık ki yapısındaki anormallikler, aşırı eksprese olması, gen amplifikasyonunu genetik değişiklikleri ve tümör oluşumunu indükleyebilir. Meme kanserinin de içinde bulunduğu çeşitli kanser türlerinin oluşumunda payı bulunmaktadır [23].

### **2.3. PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolu**

Bu sinyal yolu EGFR'nin tipik downstream yolları arasındadır ve hücre gelişimine, büyümesine, transkripsiyon, translasyon ve apoptoz gibi (Şekil 2.4.) süreçlerde yer

almaktadır. Ne yazık ki bu sinyal yolundaki anormal aktivasyon durumları neoplazmaların oluşumuna ve ilerlemesine neden olmaktadır. Ayrıca neoplazma ortamında anjiyogeneze ve inflamatuvar faktör alımı gibi durumlarda kritik roller almaktadır, ayrıca kanser metastazında da rol aldığı gösterilmiştir [10,35,36].



Şekil 2.4. PI3K/Akt sinyal yolunun rol aldığı biyolojik süreçler [36]

PI3K birbirinden farklı işlev ve yapıya sahip enzimlerin 4 ayrı sınıfa ayrıldığı bir enzim ailesidir. Bu enzimlerin aktivasyonu için Ras onkogeni, integrinler veya tirozin kinazların büyüme faktörü reseptörleri gibi farklı yollara ihtiyaç duyulmakta ve PI3K aktive olmasını takiben Akt'nin fosforilasyonunu gerçekleştirmektedir. Akt 3 izoforma sahip ve kanserde aktivasyonuna en çok rastlanılan kinazlar arasında yer almaktadır [10].

PI3K ailesinin bir alt sınıfı olan Sınıf 1 PI3K'lar PIK3CA, PIK3CB, PIK3CG ve PIK3CD tarafından kodlanması gerçekleştirilen dört katalitik izoformdan oluşurlar. Burada PIK3CA sık mutasyona maruz kalması nedeniyle kanser hastalıklarında adında en çok söz edilen türdür [36].

Bilim insanları bu sinyal yolunun anormal aktivasyonunun engellemek için bazı inhibitör moleküllerin kullanımı hakkında çalışmalar yapmışlardır. Ne yazık ki onkogenik olan PI3K yolunun aktivasyonu çeşitli mekanizmalar ile olduğundan geliştirilen ajanların klinik kullanımları sınırlı olmaktadır, ayrıca eşlik eden direnç gelişimi durumu daha da sıkıntılı bir hale sokmaktadır. Bu durumu düzeltmek için ise

PI3K inhibitörleri ve başka mekanizmaları kullanarak kanser terapisi için etkili ajanların bir arada içeren stratejilerden yararlanılabilir [36].

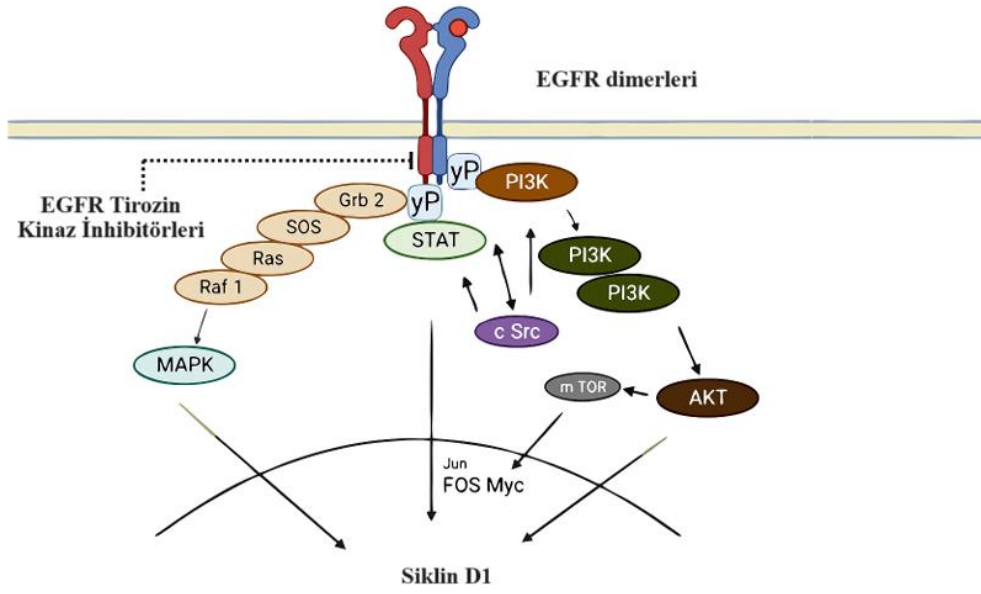
EGFR'ler sınıf 1 ve Sınıf 2 PI3K sinyal iletiminin aktivasyonunu gerçekleştirirler. EGFR ailesinden HER2 EGFR ile HER2/EGFR heterodimerlerini oluşturur ve EGFR homodimerlerinden daha yüksek sinyal iletim potansiyeli vardır. Buna göre tasarlanan bileşiklerin belirgin klinik etkileri görülmektedir ve ilaç direncini geciktirmesi söz konusu olabilir. ErbB-3 İSE PI3K'ye etkili şekilde bağlanır ve TGF-a ligandı ayrıca EGFR'ye bağlanarak sinyal yolunun aktive olmasını sağlar. Bunun sonucunda kolorektal kanser hücrelerinde tümör büyümesi ve metastazı desteklenir[36].

mTOR ise azalmış aktivitesinin uzun yaşam süreci ile ilişkilendirildiği bir serin/tirozin kinaz ve PI3K/Akt sinyal yolağının aşağı akışını sağlayan bir enzimdir [10].

Bu yolağın aktivasyonun aşırı artması bazı karsinogenik olaylara neden olabilmektedir. Bunlar arasında meme, hepatosellüler kanserleri ve akut myeloid lösemi sayılabilmektedir. Yapılan çalışmalara bakıldığında yolağın aktifleşmesinin EGFR aktivitesinin de artmasına neden olduğu öne sürülmüştür. Örneğin bir kanser türünde EGFR aktivasyonu bulunmakta ise EGFR kinaz inhibitörleri ile tedavi yarar sağlamaktadır[10,12].

Bu yolak üzerinde inhibisyon yoluyla etki gösteren kemoterapötiklere örnek olarak PI3K inhibitörlerinden duvelisib ve alpelisib mTOR inhibitörlerinden ise takrolimus örnek verilebilir[10].

Kanser hastalığında tedavinin başarısız olmasının önemli nedenlerinden biri terapi sırasında meydana gelen ilaç direncidir. PI3K sinyal yolunun sinyallerinin düzensizliği de ilaç direncinin gelişiminde önemli bir rol almaktadır. Yapılan çalışmalar IGF1R/p110 $\beta$ /Akt/mTOR ekseninin BYL-719'un PI3KCA mutasyonu bulunan meme kanseri terapisinde direnç gelişimine maruz kaldığını göstermiştir. Ayrıca direnç gelişimine ket vurabilmek için sinyal yolunda görevli bileşenleri hedeflemenin bir yol olabileceği gösterilmiştir [36].



Şekil 2.5. EGFR/ PI3K/Akt/mTOR Yolağı[13]

#### 2.4. Alpelisib

Meme kanseri kadınlarda kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenleri arasındadır. Hormon reseptörü pozitif, HER2 negatif meme kanseri, görülen bütün meme kanseri vakalarının %70'ten fazlasını oluşturmaktadır. Hormon reseptörü pozitif, HER2 negatif metastatik meme kanseri tedavisinde hedefe yönelik yeni ajanların gelişmesi ile bir paradigma kayması yaşanmıştır. Palbosiklib, ribosiklib ve abemasiklib de aralarında bulunduğu siklin bağımlı kinaz 4/6 inhibitörleri, aromataz inhibitörü veya fulvestrant ile kombinasyon halinde bu tedavide standart birinci basamak tedavi haline gelmiştir. Ek tedavi seçeneklerine bakacak olunursa etkili bir tedavi olduğu kanıtlanmış olan östrojen reseptör antagonisti fulvestrant ve mTOR inhibitörü everolimus yer almaktadır ancak ne yazık ki endokrin ve hedefe yönelik tedavilere direnç gelişimi gözlemlenir. Bu direnç gelişimi nedeniyle tedavi tamamlanamamakta ve yeni ajanlara olan ihtiyaç devam etmektedir [25].

24 Mayıs 2019'da FDA tarafından ilk küresel onayını hormon reseptörü pozitif, HER2 negatif, PIK3CA mutasyona uğramış, ileri veya meta statik meme kanseri olan postmenopozal kadınları ve erkekleri tedavi etmek için fulvestrant ile kombine halde kullanılmak üzere almış olan Alpelisib PI3K'nın  $\alpha$  alt türüne spesifik bir kinaz inhibitörüdür[37].

Meme kanserlerinin yaklaşık olarak %40'ını oluşturan solid tümörlerde sıklıkla gözlemlenen PI3K'nın katalitik (p110 $\alpha$ ) alt birimini kodlayan PIK3CA geninin mutasyonu veya amplifikasyonu nedeniyle terapide kullanmak için etkili bir hedeftir ayrıca üçlü negatif meme kanseri ve HER2 pozitif meme kanseri terapisinde kullanılabilmesi için dünya çapında çalışmalar devam etmektedir[37].

Alpelisib oral olarak kullanılır ve 400mg/gün kullanımda maksimum plazma konsantrasyonuna 2 saatte ulaşılır. Tekrarlanan dozlama sonunda minimum birikim görülür. Metabolizasyonunda öncelikle inaktif bir metabolit eldesi için bir amid hidrolizine uğrar ardından çok daha az miktarda iki hidroksillenmiş metabolit ve bir glukronidlenmiş metabolit meydana gelir[24].

Alpelisib kullanımı ile gözlenen en sık yan etkiler arasında hiperglisemi, iştah azalması, bulantı ve kusma sayılabilmektedir. Gözlenen ileri seviye yan etkiler ise hiperglisemi, şiddetli kutanöz reaksiyon ve ishaldir. Kullanım ile ilişkili hipergliseminin nedeni doza bağımlı olarak PI3K inhibisyonu ile sinyal iletimindeki blokajın nedeni olabileceği düşünülmektedir[24,25,38].

İzoform seçici olması alpelisibi diğer inhibitörlerle kıyaslandığında çekici hale getirmesine rağmen özellikle hiperglisemi, döküntü ve ishal gibi önemli toksisiteleri nedeniyle daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır [38].

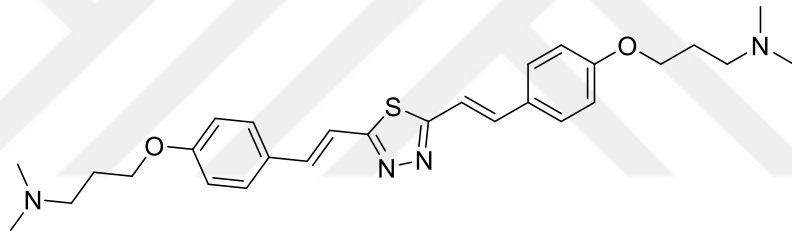
Alpelisib üzerinde halen bazı hastalılara karşı yapılan faz III denemelerine devam edilmektedir. Bunlar lokal olarak tekrarlayan veya metastatik HER2 negatif meme kanseri, HER2 pozitif metastatik meme kanseri, ileri veya metastatik östrojen reseptörü pozitif meme kanseri, tekrarlayan üçlü negatif meme kanseri ya da yüksek dereceli seröz yumurtalık kanseri ve metastatik androjen reseptörü pozitif ve PTEN pozitif meme kanseridir [37].

İlaç geliştirme çalışmalarında Faz 1 aşamasında klinik etkinliğin erken belirtileri gözlenmiş olmasına rağmen PI3K inhibitörleri gösterdikleri marjinal etkinlikleri nedeniyle alpelisib dahil diğer terapilerle kombinasyon denemeleri ya da yeni türevlerinin geliştirilmesine devam edilmektedir[22].

## 2.5. Yapısında Tiyadiazol İçeren Antikanser Etkili Bileşiklerin Aktivite Çalışmaları

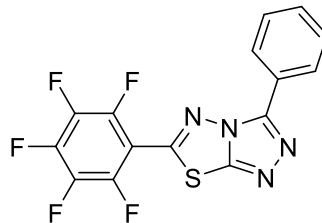
Heterosiklik bileşiklerin kimyasal ve farmakolojik özellikleri, organik kimya alanındaki gelişmelerle ve yeni ilaç geliştirme çalışmalarındaki ilerlemelerle birlikte onları son derece ilgi çekici hale getirmiştir. Bu bileşiklerin aktivite gösteren kısımları genellikle heteroatomlar içeren siklik yapılardır. Bu halka sistemlerinden biri olan tiyadiazol antimikrobiyal, antibiyotik, antifungal, antikanser, diüretik ve antidepresan gibi geniş kapsamlı aktivite çalışmalarında yer almıştır[39,40].

Chou ve ekibi tarafından 2003 yılında bir çalışmada antikanser etki gösterebileceği düşünülen bir seri yeni bileşik sentezlenmiş ve A549, PC-3 ve HA22T hücre hatlarına üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu bileşiklerden Şekil 2.5.'te gösterilen türev  $6.80 \pm 1.00 \mu\text{M}$ ,  $6.30 \pm 0.60 \mu\text{M}$ ,  $9.70 \pm 0.90 \mu\text{M}$ 'lık değerleriyle sırasıyla A549, PC-3 ve HA22T hücre hatlarına karşı aktivite göstermiştir [41].



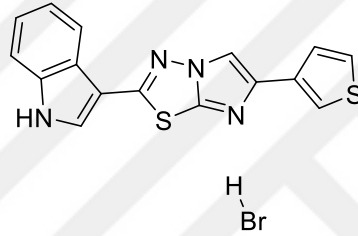
Şekil 2.5. (E,E)-2,5-bis[4-(3-dimetilaminopropoksi)stiril]-1,3,4-tiyadiazol

Chowrasia ve ekibi tarafından 2017 yılında yapılan bir çalışmada florlanmış 3,6-diaril-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]tiyadiazol türevleri sentezlenmiş ardından MCF7, SaOS-2 ve K562'ye hücre hatlarına karşı antikanser etkileri ölçülmüştür ve bileşiklerin orta ila iyi düzeylerde aktivite gösterdiği bulunmuştur. Bu Şekil 2.6.'da gösterilen türev MCF7, SaOS-2 ve K562 hücre hatlarına karşı sırasıyla  $22.10 \mu\text{M}$ ,  $19.00 \mu\text{M}$  ve  $15.00 \mu\text{M}$   $\text{IC}_{50}$  değerleriyle aktivite göstermiştir [42].

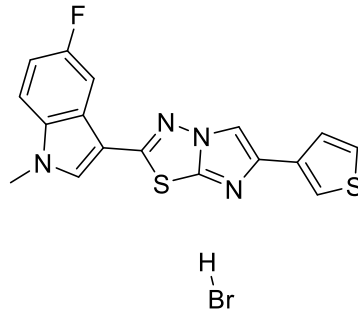


**Şekil 2.6.** 6-(Perflorofenil)-3-fenil-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]tiyadiazol

Cascioferro ve ekibinin 2020 yılındaki bir çalışmasında imidazo [2,1-b] [1,3,4]tiyadiazol yapısı taşıyan çeşitli moleküller elde edilmiş ardından antiproliferatif etkilerini ölçmek için Ulusal Kanseri Enstitüsü hücre hatları paneli kullanılmıştır. Bu bileşiklerden Şekil 2.7.'de gösterilen türev ve Şekil 2.8.'de gösterilen türev sırasıyla 0.23 ila 11.40  $\mu\text{M}$  ve 0.29 ila 12.20  $\mu\text{M}$  arasında değişen  $\text{IC}_{50}$  değeriyle aktivite göstermişlerdir. Ayrıca biri Şekil 2.7.'deki bileşik olan iki bileşiğin tüm pankreas duktal adenokarsinomu klinik öncesi modellerinde tedavide kullanıldığında hücre göçünde dikkate değer bir azalma olduğu bulunmuştur. Bileşiklerin etki mekanizmasının PT2/FAK fosforilasyonunun inhibe edilmesi olduğu sonucuna varılmıştır [43].

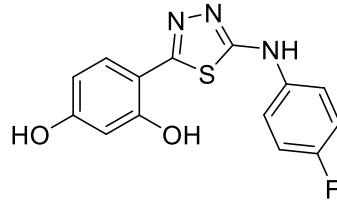


**Şekil 2.7.** 3-[6-(Tiyofen-3-il)imidazo[2,1-b][1,3,4]tiyadiazol-2-il]-1H-indol hidrobromür



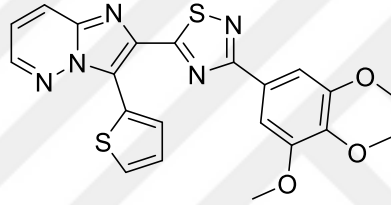
**Şekil 2.8.** 5-Floro-1-metil-3-[6-(tiyofen-3-il)imidazo[2,1-b][1,3,4]tiyadiazol-2-il]-1H-indol hidrobromür

Szeliga ve ekibi tarafından 2020 yılında yapılan bir çalışmada anti-glioblastoma ajanları olabilecek 1,3,4-tiyadiazol yapısı taşıyan bileşikler sentezlenmiştir. Bu bileşiklerden Şekil 2.9.'da gösterilen türev  $44.98 \pm 9.71 \mu\text{M}$  ile  $55.20 \pm 9.01 \mu\text{M}$  arasında değişen  $\text{IC}_{50}$  değerleri ile insan glioblastoma hücre hatlarına karşı etki göstermiştir [44].



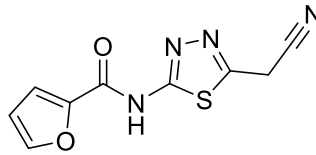
**Şekil 2.9.** 2-(4-Florofenilamino)-5-(2,4-dihidroksifenil)-1,3,4-tiyadiazol

Chidella ve ekibi tarafından 2020 yılında yapılan bir çalışmada antikanser etkili olabileceği düşünülen 1,2,4-tiyadiazol türevi imidazo[1,2-b]piridazin yapısı bulunduran bileşikler elde edilmiş ve antikanser aktiviteleri araştırılmıştır. Bu bileşiklerden Şekil 2.10.'da gösterilen türev sırasıyla MCF-7, A549, DU-145 ve MDA MB-23'ye karşı 0.090  $\mu$ M, 0.0120  $\mu$ M 0.0170  $\mu$ M, 0.0340  $\mu$ M IC<sub>50</sub> değerleriyle aktivite göstermiştir [45].



**Şekil 2.10.** 2-(3-(3,4,5-Trimetoksifenil)-1,2,4-tiyadiazol-5-il)-3-(tiyofen-2-il)imidazo[1,2-b]piridazin

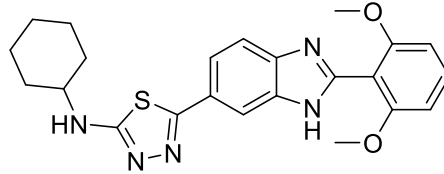
Hekal ve ekibi tarafından 2021'de gerçekleştirilen bir çalışmada VEGFR-2 inhibitörü olabileceği düşünülen *N*-(1,3,4-tiyadiazol-2-il)furan-2-karboksamid yapısı içeren bileşikler sentezlenmiş ve aktiviteleri incelenmiştir. Bu bileşiklerden Şekil 2.12.'de gösterilen türev 5.51  $\pm$  0.40  $\mu$ M, 3.97  $\pm$  0.20  $\mu$ M ve 9.10  $\pm$  0.80  $\mu$ M IC<sub>50</sub> değerleriyle sırasıyla MCF-7, HCT-116 ve PC3 hücre hatlarına karşı aktivite göstermiştir [46].



**Şekil 2.12.** *N*-(5-(Siyanometil)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)furan-2-karboksamid

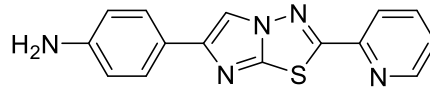
Bostancı ve Çevik A.'nın 2022'deki bir çalışmasında benzimidazol-tiyadiazol yapısını bulunduran bileşikler tasarlanıp elde edilmiş ve antikanser etki çalışmaları

yapılmıştır. Sentezlenen bileşiklerden Şekil 2.13.'de gösterilen türev  $34.13 \pm 2.48 \mu\text{M}$   $\text{IC}_{50}$  değeri ile florourasil ile kıyaslanabilir bir etki göstermiştir. Bileşiklerin toplam antioksidan statüsü ve toplam oksidan statüsü de belirlenmiş ve Şekil 2.13.'de gösterilen türevin kontrol için kullanılan ilaçla karşılaştırılabilir seviyede bir etki göstermiştir [47].



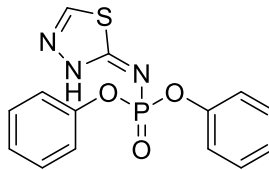
**Şekil 2.13.** 5-(2-(2,6-Dimetoksifenil)-1H-benz[d]imidazol-5(6)-il)-N-sikloheksil-1,3,4-tiyadiazol-2-amin

Ibrahim ve ekibi tarafından 2022 yılında yapılan bir çalışmada potansiyel antikanser ajan olarak imidazo[2,1-b]-tiyadiazol ve tiyadiazolo[3,2-a]pirimidin yapısı içeren bileşikler sentezlenmiş ve biyolojik aktivite çalışmaları yapılmıştır. Bu bileşiklerden Şekil 2.14.'te gösterilen türev Caco-2, PCL, MCF-7 ve MDA-231 hücre hatlarına karşı sırasıyla  $7.14 \pm 0.14$ ,  $15.98 \pm 0.22$ ,  $4.19 \pm 0.14$  ve  $3.92 \pm 0.29 \mu\text{M}$   $\text{IC}_{50}$  değerleriyle aktivite göstermiştir [48].



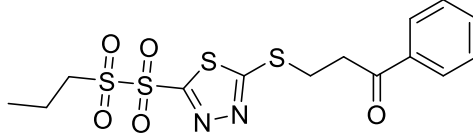
**Şekil 2.14.** 4-(2-(piridin-2-il)imidazo[2,1-b][1,3,4]tiyadiazol-6-il)anilin

Gholivand ve ekibi tarafından 2022 yılında yapılan bir çalışmada anti-glioblastoma etki gösterebileceği düşünülen 3 yeni fosfo-tiyadiazol türevi bileşik sentezlenmiş ve etkileri araştırılmıştır. Bu bileşiklerden Şekil 2.16.'da gösterilen türev U-251 hücre hattına karşı  $48.10 \pm 0.3 \mu\text{M}$   $\text{IC}_{50}$  değeriyle aktivite göstermiştir [49].



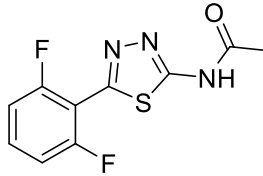
**Şekil 2.16.** Difenil (E)-(1,3,4-tiyadiazol-2(3H)-iliden)fosforamidat

Liu ve ekibi tarafından 2022 yılında yapılan bir çalışmada potansiyel antikanser ajan olabileceği düşünülen süstitüe fenaçil türevleri ve disülfidlere bağı olan 1,3,4-tiyadiazol yapısı içeren bileşikler sentezlenmiş ve biyolojik aktivite çalışmaları yapılmıştır. Bu bileşiklerden Şekil 2.17.'de gösterilen türev SMMC-7721 hücre hattına karşı 1.62  $\mu\text{M}$   $\text{IC}_{50}$  değeriyle aktivite göstermiştir [50].



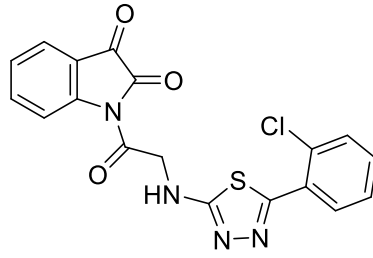
Şekil 2.17. 2-(*n*-Propyldisülfonil)-5-(fenaçil-metiltiyo)-1,3,4 – tiyadiazol

Ekrek ve ekibi tarafından 2022 yılında yapılan bir çalışmada antikanser etki gösterebileceği düşünülen yeni bileşikler tasarlanmış, elde edilmiş ve antikanser etkileri araştırılmıştır. Bu bileşiklerden Şekil 2.18.'te gösterilen türev Hela, HT-29 ve MCF-7 hücre hatlarına karşı sırasıyla 42.50  $\mu\text{M}$ , 23.71  $\mu\text{M}$ , 7.50  $\mu\text{M}$   $\text{IC}_{50}$  değerleriyle aktivite göstermiştir [51].



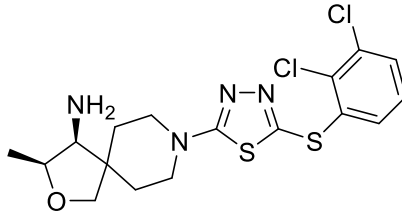
Şekil 2.18. *N*-(5-(2,6-Diflorofenil)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)asetamid

Rasgania ve ekibi tarafından 2023'de gerçekleştirilen bir çalışmada 1-(2-((aril-1,3,4-tiyadiazol-2-il)amino)asetil)indolin-2,3-dion türevi bileşikler tasarlanıp sentezlenmiş ve meme kanserine karşı antikanser etkileri MTT testi yardımıyla araştırılmıştır. Bu bileşiklerden Şekil 2.19.'da gösterilen türev 57.79  $\mu\text{g/ml}$ 'lik  $\text{IC}_{50}$  değeri ile aktivite göstermiştir [52].



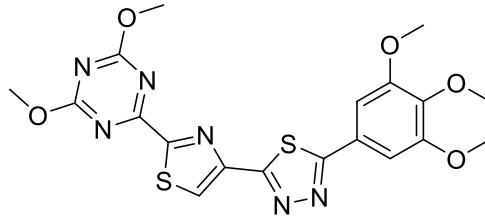
**Şekil 2.19.** 1-(2-((5-(2-Klorofenil)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)amino)asetil)indolin-2,3-dion .

Protein tirozin fosfatazlardan SHP2'nin aşırı eksprese edilmesi veya gen mutasyonu olması çeşitli kanserler ile ilişkili bulunmuştur ve önemli bir kanser hedefi olarak yeni antikanser ajanların geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Liu ve ekibi tarafından 2023 yılında yapılan çalışmada SHP2 allosterik inhibitörü SHP099'u öncü bileşik olarak alınmış ve 1,3,4-tiyadiazol yapısı bulunduran bileşikler sentezlenmiştir. CCK8 çoğalma testi gerçekleştirilmiş ve birden çok bileşiğin etkili bir şekilde kanserli hücrelerin çoğalmasını önleme potansiyeli olduğu bulunmuştur. Bu bileşiklerden Şekil 2.20.'de gösterilen türev 0.25  $\mu\text{M}$   $\text{IC}_{50}$  değeriyle aktivite göstermiştir ve bileşiğin uygulanan moleküler yerleştime çalışmaları sonucunda SHP2 ile güçlü bir etkileşim göstereceği bulunmuştur [53].



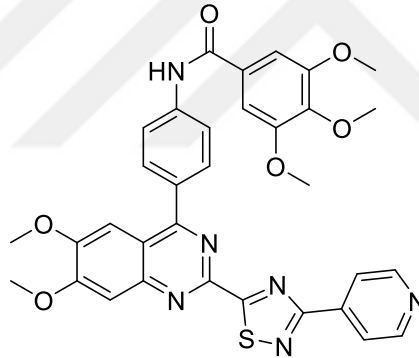
**Şekil 2.20.** (3S,4S)-8-(5-((2,3-diklorofenil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)-3-metil-2-oksa-8-azaspiro[4.5]dekan-4-amin

Nalla ve ekibi tarafından 2023 yılında yapılan bir çalışmada yeni antikanser ajanlar geliştirmek amacıyla 1,3,4-tiyadiazol yapısı taşıyan 1,3,5-triazin-tiyazol yapısı içeren bileşikler sentezlenmiş ve PC3, DU-145, MCF-7 ve A549 hücre hatlarına karşı antikanser aktiviteleri incelenmiştir. Bu bileşiklerden Şekil 2.21.'de gösterilen türev PC3, A549, MCF-7 ve DU-145 hücre hatlarına sırasıyla 0.17  $\mu\text{M}$ , 0.11  $\mu\text{M}$ , 0.13  $\mu\text{M}$ , 0.15  $\mu\text{M}$   $\text{IC}_{50}$  değerleriyle aktivite göstermiştir [54].



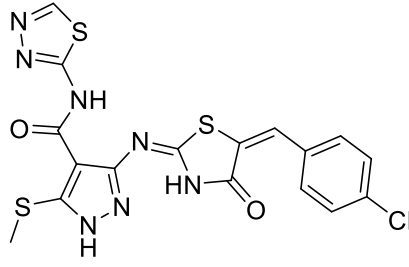
**Şekil 2.21.** 2-(2-(4,6-Dimetoksi-1,3,5-triazin-2-il)tiyazol-4-il)-5-(3,4,5-trimetoksifenil)-1,3,4-tiyadiazol

Gankidi ve ekibi tarafından 2023 yılında yapılan bir çalışmada yeni antikanser ajanlar geliştirmek amacıyla kinazoline bağlı (piridil)-1,2,4-tiyadiazollerin amid türevleri sentezlenmiş ve MCF-7, A549, Colo-205 ve A2780 hücre hatlarına karşı antikanser etkileri ölçülmüştür ve bileşiklerin çoğunun etoposid ile karşılaştırıldığında orta düzeyde aktivite gösterdiği görülmüştür. Bu bileşiklerden Şekil 2.22.'de gösterilen türev 0.08  $\mu\text{M}$ ; 0.02  $\mu\text{M}$ ; 0.33  $\mu\text{M}$  ve 0.25  $\mu\text{M}$   $\text{IC}_{50}$  değeriyle sırasıyla MCF-7, A549, Colo-205 ve A2780 hücre hatlarına karşı etoposidten daha üstün aktivite göstermiştir [55].



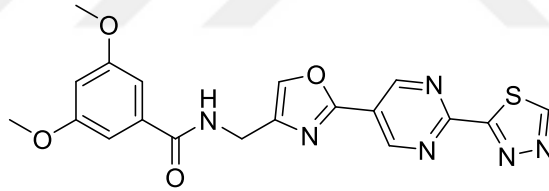
**Şekil 2.22.** N-(4-(6,7-dimetoksi-2-(3-(piridin-4-il)-1,2,4-tiyadiazol-5-il)kinazolin-4-il)fenil)-3,4, 5-trimetoksibenzamid

Abu-Melha tarafından 2023'te gerçekleştirilen bir çalışmada antikanser aktivitelerini ölçmek amacıyla tiyadiazol-pirazol ve tiyadiazol-pirazol-tiyazol yapılarını bulunduran bileşikler elde edilmiş ve HepG2, A549, MCF-7 ve HCT-116 hücre hatları yardımıyla antikanser etkileri araştırılmıştır. Bu bileşiklerden Şekil 2.23.'te gösterilen türev HepG2, HCT-116, A549, MCF-7 hücre hatlarına karşı sırasıyla  $29.30 \pm 0.16 \mu\text{M}$ ,  $9.71 \pm 0.34 \mu\text{M}$ ,  $37.16 \pm 0.52 \mu\text{M}$ ,  $30.43 \pm 0.09 \mu\text{M}$   $\text{IC}_{50}$  değerleriyle aktivite göstermiştir [56].



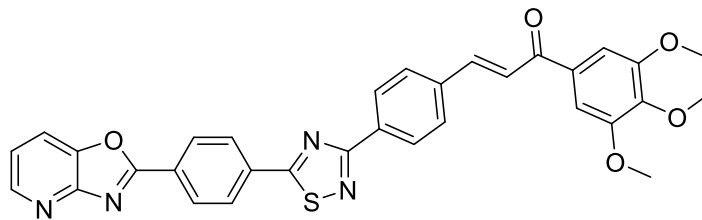
**Şekil 2.23.** 3-((5-(4-Klorobenziliden)-4-oksotiyazolidin-2-iliden)amino)-5-(metiltiy)-N-(1,3,4-tiyadiazol-2-il)-1H-pirazol-4-karboksamid

Veeraboina ve ekibi tarafından 2023 yılında yapılan bir çalışmada bir dizi oksazol-pirimidin-1,3,4-tiyadiazol yapısı bulunduran bileşik elde edilmiş ve antikanser etkilerini ölçmek amacıyla PC3, DU-145, A549 ve MCF-7 hücre hatları kullanılmıştır. Çoğu türevlerin etoposid ile kıyaslandığında orta ila iyi düzeyde değişen aktivite gösterdiği bulunmuştur. Bu bileşiklerden Şekil 2.24.'te gösterilen türev sırasıyla PC3, A549, MCF-7 ve DU-145 hücre hatlarına 0.05  $\mu$ M, 0.06  $\mu$ M, 0.01  $\mu$ M ve 0.62  $\mu$ M  $IC_{50}$  değerleriyle aktivite gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca bileşiklere EGFR ve HER2 için moleküler yerleştirme çalışmaları yapılmış ve güçlü etkileşimleri olduğu görülmüştür [57].



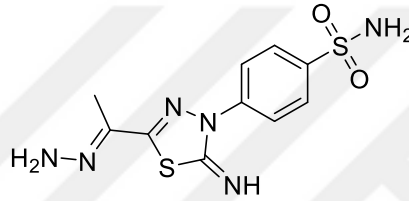
**Şekil 2.24.** N-((2-(2-(1,3,4-tiyadiazol-2-il) pirimidin-5-il) oksazol-4-il)metil)-3,5-dimetoksibenzamid

Chidella ve ekibi tarafından 2023'te gerçekleştirilen bir çalışmada 1,2,4-tiyadiazol-oksazolo[4,5-b]piridin yapısı bulunduran şalkon türevi bileşikler tasarlanmış ve antikanser aktiviteleri araştırılmıştır. Bu bileşiklerden Şekil 2.26.'da gösterilen türev 0.10 $\pm$ 0.08  $\mu$ M, 0.41 $\pm$ 0.01  $\mu$ M, 0.60 $\pm$ 0.02  $\mu$ M ve 1.43 $\pm$ 0.41  $\mu$ M  $IC_{50}$  değerleriyle sırasıyla MCF-7, A549, Colo-205 ve A2780 hücre hatlarına karşı aktivite göstermiştir [58].



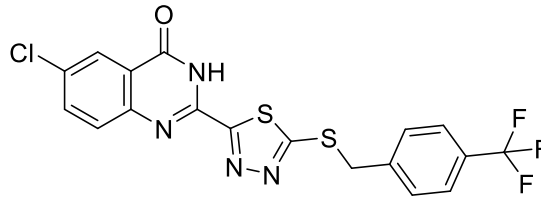
**Şekil 2.26.** (E)-3-(4-(5-(4-(oksazolo[4,5-b]piridin-2-il)fenil)-1,2,4-tiyadiazol-3-il)fenil)-1- (3,4,5-trimetoksifenil)prop-2-en-1-on

Yeni antikanser ajanların geliştirilmesinde en çok ilgi gören ilaç gruplarından biri de karbonik anhidraz enzimidir. Bondock ve ekibi tarafından 2023 yılında yapılan bir çalışmada karbonik anhidraz enzim inhibitörü etki gösterebileceği düşünülen bir seri azen ve kumarin kısımlarına sahip yeni 1, 3, 4-tiyadiazol sülfonamid bileşiği sentezlenmiş ve aktiviteleri araştırılmıştır. Bu bileşiklerden Şekil 2.28.'de gösterilen türev 1.18 µM, 5.28 µM ve 7.15 µM'lik IC<sub>50</sub> değerleriyle sırasıyla MCF-7, Caco2 ve HepG-2 hücre hatlarına karşı aktivite göstermiştir [59].



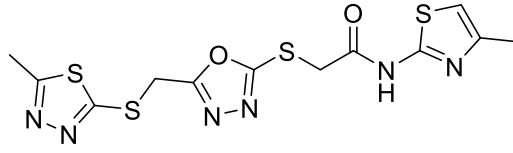
**Şekil 2.28.** (E)-4-(5-(1-hidrazinilidenetil)-2-imino-1,3,4-tiyadiazol-3(2H)-il) benzensülfonamid

Men ve ekibi tarafından 2023 yılında yapılan bir çalışmada antiproliferatif etkilerini değerlendirmek amacıyla kinazolinona bazlı 1,3,4-tiyadiazol-S-alkil yapısı bulunduran bileşikler sentezlenmiştir. Bu bileşiklerden Şekil 2.29.'da gösterilen türev MCF-7 hücre hattına karşı 3.01 µM IC<sub>50</sub> değeriyle aktivite göstermiştir [60].



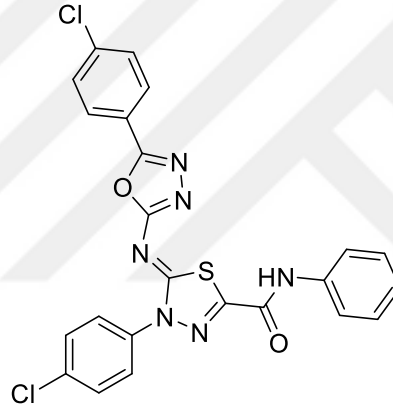
**Şekil 2.29.** 6-Kloro-2-[2-(4-triflorometilbenziltiyo) -1,3,4- tiyadiazol-5-il]-kinazolin-4(3H)-on

Evren ve ekibi tarafından 2023 yılında yapılan bir çalışmada antikanser etki gösterebileceği düşünülen tiyadiazol-oksadiazol hibriti taşıyan tiyazol türevi bir seri bileşik sentezlenmiştir. Bu bileşiklerden Şekil 2.30.'da gösterilen türev MCF-7'de 1.03 uM ve A549'da 3.91 uM'lik IC<sub>50</sub> değeriyle aktivite göstermiştir [61].



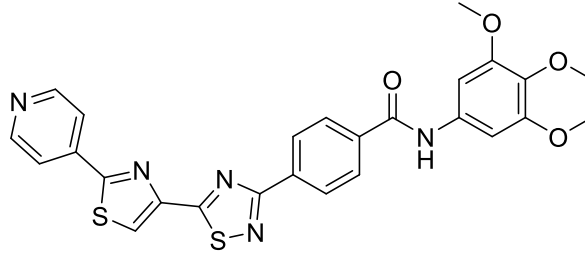
**Şekil 2.30.** 2-((5-((5-Metil-1,3,4-tiyadiazol-2-il)tiyo)metil)-1,3,4-oksadiazol-2-il)tiyo)-N-(4-metiltiyazol-2-il)asetamid

Dawood ve Gomha tarafından 2024 yılında yapılan bir çalışmada 1,3,4-oksadiazol yapısı bulunduran 1,3,4-tiyadiazol ve 1,3-tiyazol bileşikleri sentezlenmiş ve HCT-116 hücre hattına karşı antikanser etkileri araştırılmıştır. Bileşiklerin çoğunun orta derecede aktivite gösterdiği sonucuna varılmış ve bu bileşiklerden Şekil 2.33.'de gösterilen türevin  $0.86 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$   $\text{IC}_{50}$  değeriyle aktivite gösterdiği bulunmuştur [62].



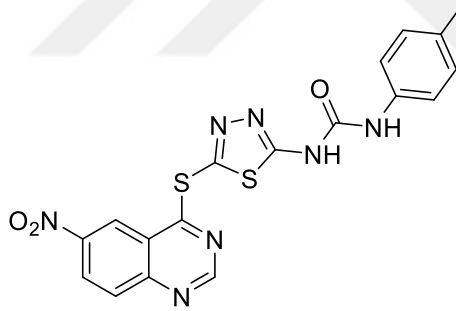
**Şekil 2.33.** 4-(4-Klorofenil)-5-((5-(4-klorofenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il)imino)-N-fenil-4,5-dihidro-1,3,4-tiyadiazol-2-karboksamid

Nalla ve ekibi tarafından 2024 yılında yapılan bir çalışmada antikanser etkinlik gösterebileceği düşünülen bir seri 1,2,4-tiyadiazol-tiyazol-piridin amid yapısı barındıran bileşik tasarlanmış, sentezlenmiş ve MTT yardımıyla aktiviteleri ölçülmüştür. Bu bileşiklerden Şekil 2.34.'de gösterilen türev  $0.34 \pm 0.09 \mu\text{M}$ ,  $0.11 \pm 0.05 \mu\text{M}$ ,  $0.12 \pm 0.06 \mu\text{M}$  ve  $0.14 \pm 0.06 \mu\text{M}$   $\text{IC}_{50}$  değerleriyle sırasıyla MCF-7, A549, Colo-205 ve A2780 hatlarına karşı etoposidden daha güçlü aktivite göstermiştir [63].



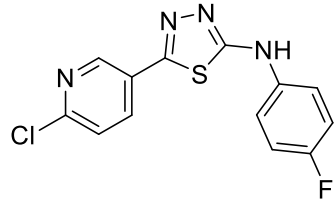
**Şekil 2.34.** 4-(5-(2-(piridin-4-il)tiyazol-4-il)-1,2,4-tiyadiazol-3-il)-N-(3,4,5-trimetoksifenil)benzamid

Masoudinia ve ekibi tarafından 2024 yılında yapılan bir çalışmada antikanser etkilerini araştırmak amacıyla bir seri 1-(5-((6-nitrokinazolin-4-il) tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)-3-fenilüre türevi bileşik sentezlenmiştir. Bu bileşiklerden Şekil 2.35.'de gösterilen türev MCF-7 hücre hattına  $25 \pm 0.001 \mu\text{M}$   $\text{IC}_{50}$  değeriyle aktivite gösterdiği bulunmuştur. Bileşiğin potansiyel VEGFR-2 inhibitörü olabileceği düşünüldüğünden, ilgili enzim kristaliyle moleküler doking ve dinamik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin iyi derecede antiproliferatif etkilerine rağmen ne yazık ki nitro grubunun olumsuz rolüyle ilişkili olabileceği düşünülen hedefe ulaşamamıştır [64].



**Şekil 2.35.** 1-(5-((6-Nitrokinazolin-4-il)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)-3-(p-tolil)üre

Demiraran ve ekibi tarafından 2024 yılında yapılan bir çalışmada aromataz enzim inhibitörü olabileceği düşünülen bir seri 1,3,4-tiyadiazol yapısı barındıran bileşik tasarlanıp sentezlenmiştir. Bileşiklerin MCF-7 hücre hattına karşı antikanser etkileri ölçüldüğünde Şekil 2.36.'da gösterilen türevin  $3.102 \pm 0.10 \mu\text{M}$   $\text{IC}_{50}$  değeriyle letrazol ile kıyasla umut verici etki gösterdiği bulunmuştur. Bu bileşik için moleküler doking ve dinamik çalışmaları gerçekleştirilip inhibisyon mekanizması daha iyi aydınlatılmaya çalışılmıştır. [65].



**Şekil 2.36.** 5-(6-Kloropiridin-3-il)-N-(4-florofenil)-1,3,4-tiyadiazol-2-amin

### 3. GEREÇLER

#### 3.1. Kullanılan Maddeler

**Tablo 3.1. Tez çalışmasında kullanılan maddeler**

| Bileşik                                       | Firma, Ülke              |
|-----------------------------------------------|--------------------------|
| 3,4-Diklorobenzoil klorür                     | Sigma-Aldrich, Almanya   |
| 4-(triflorometil)-anilin                      | Alfa Aesar, ABD          |
| 4-floroanilin                                 | Alfa Aesar, ABD          |
| 4-Florobenzoil klorür                         | Sigma-Aldrich, Almanya   |
| 4-kloroanilin                                 | Alfa Aesar, ABD          |
| 4-Klorobenzoil klorür                         | Sigma-Aldrich, Almanya   |
| 4-Metoksibenzoil klorür                       | Sigma-Aldrich, Almanya   |
| 5-amino-1,3,4-tiyadiazol-2-tiyol              | Sigma-Aldrich, Almanya   |
| A549 Hücre Hattı                              | ATCC, ABD                |
| Anilin                                        | Merck, Almanya           |
| Apoptozis ve Nekrozis Kantitatif Kit          | Biotium, ABD             |
| Asetonitril                                   | Carlo Erba, Almanya      |
| COX-2 inhibitor screening kit                 | Milpitas, CA, ABD        |
| Dimetilsülfoksit                              | Sigma, Almanya           |
| DMEM                                          | Fluka, Almanya           |
| DMSO- $d_6$                                   | Merck, Almanya           |
| Doksorubisin                                  | Sigma, Almanya           |
| EGFR ELISA Kiti                               | Bpsbioscience, ABD       |
| Erlotinib                                     | Sigma, Almanya           |
| Etanol                                        | Tekim, Türkiye           |
| Etil asetat                                   | Sigma-Aldrich, Almanya   |
| Fetal Bovine serum                            | Capricorn, Güney Amerika |
| İTK plağı (Silikajel 60 F254 kaplı alüminyum) | Merck, Almanya           |
| Kloroasetil klorür                            | Merck, Almanya           |
| MCF-7 Hücre Hattı                             | ATCC, ABD                |
| MTT Boyası                                    | Sigma, Almanya           |
| NIH3T3 Hücre Hattı                            | ATCC, ABD                |
| PBS                                           | Gibco, İngiltere         |

|                   |                   |
|-------------------|-------------------|
| Petrol eteri      | Merck, Almanya    |
| Potasyum karbonat | Merck, Almanya    |
| RPMI              | Sigma, Almanya    |
| Sülfanilamid      | Carl Roth Almanya |
| Tetrahidrofuran   | Merck, Almanya    |
| Trietilamin       | Merck, Almanya    |
| Tripsin           | Sigma, Almanya    |

### 3.2. Kullanılan Cihazlar

**Tablo 3.2.** Tez çalışmasında kullanılan cihazlar

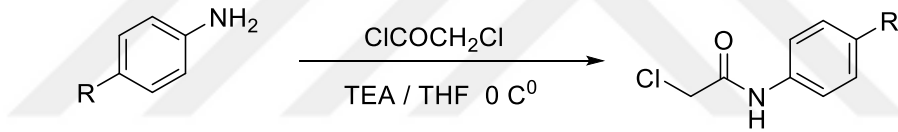
| Cihaz                                    | Firma/Model, Ülke                        |
|------------------------------------------|------------------------------------------|
| Elektronik terazi                        | Shimadzu, Libror EB-330 HU, Japonya      |
| Manyetik tabanlı ısıtıcı karıştırıcı     | Heidolph, MR 3003, Almanya               |
| Ultraviyole lambası                      | Camag, Cabinet, İsviçre                  |
| Erime derecesi tayin cihazı              | Mettler Toledo-MP90 Melting Point System |
| Infrared spektrofotometresi              | Shimadzu-IR Affinity-1S, Japonya         |
| Nükleer manyetik rezonans spektrometresi | Bruker, UltraShield 300 MHz, ABD         |
| Kütle spektrometresi                     | Shimadzu, LCMS-IT-TOF, Japonya           |
| Vortex                                   | Wisemix, Kore                            |
| Steril Kabin                             | Class II TypeA2 (CHC-222A2-60), Kore     |
| İnkübatör                                | Heraeus, Almanya                         |
| Robotik pipetleme tablası                | BioTek-Preccision XS ABD                 |
| Mikroplate okuyucu                       | BioTek-Synergy H1 ABD                    |
| Flow sitometri                           | BD Biosciences, ABD                      |

## 4. YÖNTEMLER

### 4.1. Sentez Çalışmaları

#### 4.1.1. 2-Kloro-*N*-fenilasetamid türevleri genel sentezi (A-1) (Yöntem A-1)

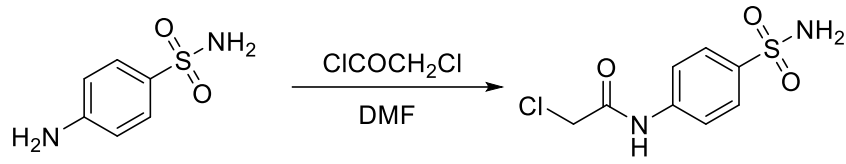
Bir deney balonu içerisine uygun anilin türevinden (1 mol) yeterli miktarda alınarak THF içerisinde çözündürülmüştür. Üzerine TEA (1.2 mol) eklenmiş ve buz banyosuna alınmıştır. Bir damlatma hunisi içerisine 30 mL THF koyulmuş ve içerisine kloroasetiklorür (1.1 mol) ilave edilmiştir. Damlatma hunisi içerisindeki karışım damla damla buz banyosu içerisinde karışmakta olan balona ilave edilmiş ve damlatma işleminin devamında 1 saat daha balon karışmaya bırakılmıştır. Daha sonra İTK işlemi ile reaksiyonun bittiği kontrol edilmiş ve öncelikle ortamdan rotavapor yardımıyla THF uzaklaştırılmış ardından kalan bakiye su ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra çöken bakiye süzülerek alınmış ve kurutulmuştur. Kurutulan bakiye etanolden kristallendirilerek kirliliklerden arındırılmış ve 2-Kloro-*N*-fenilasetamid türevleri elde edilmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. 2-Kloro-*N*-fenilasetamid türevleri (A) sentezi için reaksiyon denklemi

#### 4.1.1.1. 2-Kloro-*N*-(4-sülfamoilfenil)asetamid sentezi (A-2) (Yöntem A-2)

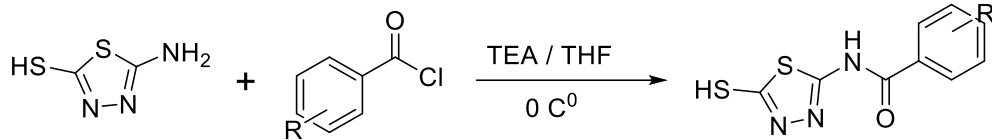
Bir deney balonu içerisine sülfanilamid 'den (1 mol) yeterli miktarda alınarak DMF içerisinde çözündürülmüş ve buz banyosuna alınmıştır. Bir damlatma hunisi içerisine 30 mL DMF koyulmuş ve içerisine kloroasetiklorür (1.1 mol) ilave edilmiştir. Damlatma hunisi içerisindeki karışım damla damla buz banyosu içerisinde karışmakta olan balona ilave edilmiş ve damlatma işleminin devamında 1 saat daha balon karışmaya bırakılmıştır. Daha sonra İTK işlemi ile reaksiyonun bittiği kontrol edilmiş ve öncelikle çöken bakiye süzülerek ortamdan alınmış ve su ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra çöken bakiye kurutulmuştur. Kurutulan bakiye etanolden kristallendirilerek kirliliklerden arındırılmış ve 2-Kloro-*N*-(4-sülfamoilfenil)asetamid elde edilmiştir (Şekil 4.2.).



Şekil 4.1. 2-Kloro-*N*-(4-sülfamoilfenil)asetamid (A-2) sentezi için reaksiyon denklemi

#### 4.1.2. *N*-(5-merkaptο-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid türevleri (B) (Yöntem B)

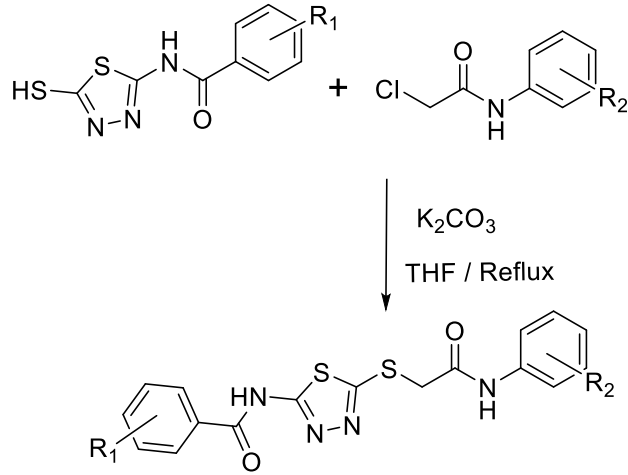
Bir deney balonuna 5-amino-1,3,4-tiyadiazol-2-tiyol'den 5g (0.0375 mol) alınmış ve THF içerisinde çözündürülmüştür. Üzerine 5.25 mL TEA (0.045 mol) eklenmiş ve buz banyosuna alınıp karıştırılmaya başlanmıştır. Bir damlatma hunisine 50 mL THF eklenmiş ve üzerine uygun benzoil klorür türevinden (0.0375 mol) yeterli miktarda ilave edilip, çözündürülmüştür. Damlatma hunisindeki karışım damla damla balon içerisine ilave edilmiş ve damlatma işleminin devamında 1 saat karışmaya bırakılmıştır. Daha sonra İTK işlemi ile reaksiyonun bittiği kontrol edilmiş ve öncelikle ortamdan rotavapor yardımıyla THF uzaklaştırılmış ardından kalan bakiye su ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra çöken bakiye süzülerek alınmış ve kurutulmuştur. Kurutulan bakiye etanolden kristallendirilerek *N*-(5-merkaptο-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid yapısı içeren bileşiklerin eldesi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. *N*-(5-merkaptο-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid türevleri (B) için reaksiyon denklemi

#### 4.1.3. Hedef Bileşiklerin Sentezi (3a-3u) (Yöntem C)

Bir deney balonuna uygun *N*-(5-merkaptο-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid türevi (1Eq) alınmış ve THF içerisinde çözündürülmüştür. Üzerine K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ilave edilmiş ve uygun 2-Kloro-*N*-fenilasetamid türevi eklenerek bir gün boyunca karışmaya bırakılmıştır. Daha sonra İTK işlemi ile reaksiyonun bittiği kontrol edilmiş ve rotavapor yardımıyla önce ortamdan THF uçurulmuştur. Ardından kalan bakiye su ile yıkanmış ve etanolden kristallendirilerek hedef bileşikler elde edilmiştir.



Şekil 4.3. Hedef Bileşiklerin Sentezi (3a-3u) (C) için reaksiyon denklemi

#### 4.2. İTK Çalışmaları ve R<sub>f</sub> değerlerinin elde edilmesi

Bütün sentez reaksiyonlarında reaksiyonların sonlandırılabilmesi için gerekli kontrolleri İTK yardımıyla yapılmıştır. Reaksiyon başladıktan sonra belirli aralıklarla örnekler alınmış, etanolde çözülmüş ilgili reaksiyonun başlangıç maddelerine de aynı işlem uygulanmış ve sabit faz olan silikajel 60 F254 kaplı alüminyum plaklara çözelti kapiller borular yardımıyla küçük noktalar şeklinde uygulanarak hareketli faz doldurulmuş tanklara alınmıştır. Hareketli faz olarak çeşitli oranlarda petrol eteri-etil asetat sistemleri kullanılmıştır. Bu sistemlerin seçilme işlemleri 3:1 sisteminden başlanarak daha polar ya da apolar sisteme geçilerek çeşitli denemelerle bulunmuştur. Uygun türeve göre değişmekle beraber yöntem A’da 1:1, 3:1 ve 4:1 sistemi içeren hareketli fazları, yöntem B için 1:1 ve 3:1 sistemi içeren hareketli fazları, yöntem C için ise 3:1 sistemi içeren hareketli fazının en uygun hareketli faz olduğu bulunmuştur. Hareketli fazın plakların 3/2’sine kadar yürümesi sağlanmış ve ardından UV kabin içerisinde 254 nm ve 366 nm dalga boylarında UV ışınlar kullanılarak plakların incelenmesi sağlanmıştır. İncelemeler sonucu bittiği tespit edilen reaksiyonların uygun şekilde sonlandırılması işlemine geçilmiştir.

#### 4.3. Erime Noktalarının Bulunması

Sentez çalışmaları kapsamında eldesi gerçekleştirilen tüm bileşiklerin erime noktalarının eldesi için “Mettler Toledo MP90 Melting Point System” adlı cihazdan yararlanılmıştır. Öncelikle kapiller boruların renksiz uçları kapatılarak tek ucu açık hale

getirilmesi işlemi yapılmıştır. Ardından kılcal borular yaklaşık yarıları dolu olacak şekilde elde edilen bileşiklerle doldurulmuştur. Doldurulan kılcal borular cihaz üzerinde ilgili haznelere konulmuş ve video kayıt alınacak şekilde cihaz çalıştırılmıştır. Bütün bileşikler için aynı işlemler uygulandıktan sonra video kayıtları incelenerek bileşiklerin erime noktaları elde edilmiştir.

#### **4.4. IR Analizlerinin Eldesi**

Sentez çalışmaları kapsamında elde edilen tüm bileşiklerin IR spektrumlarının eldesi için “Shimadzu-IR Affinity-1S” cihazı kullanılmıştır. Maddeler spektrofotometrenin ATR bölümüne uygulanarak IR spektrumları elde edilmiştir.

#### **4.5. <sup>1</sup>H-NMR Analizlerinin Eldesi**

Sentez çalışmaları kapsamında elde edilen tüm bileşiklerin <sup>1</sup>H-NMR spektrumlarının eldesi için Bruker 300 MHz’lik NMR cihazı kullanılmıştır. NMR tüplerine alınan yaklaşık 10 mg maddenin üzerine 600 µL DMSO-*d*<sub>6</sub> eklenmiş ve çözünmesi sağlanmıştır. İlgili cihaza uygulanarak <sup>1</sup>H-NMR spektrumları elde edilmiştir.

#### **4.6. <sup>13</sup>C-NMR Analizlerinin Eldesi**

Sentez çalışmaları kapsamında elde edilen tüm bileşiklerin <sup>13</sup>C-NMR spektrumlarının eldesi için Bruker 300 MHz’lik NMR cihazı kullanılmıştır. NMR tüplerine alınan yaklaşık 10 mg maddenin üzerine 600 µL DMSO-*d*<sub>6</sub> eklenmiş ve çözünmesi sağlanmıştır. İlgili cihaza uygulanarak <sup>13</sup>C-NMR spektrumları elde edilmiştir.

#### **4.7. Kütle Analizlerinin Eldesi**

Sentez çalışmaları kapsamında eldesi gerçekleştirilen tüm bileşiklerin kütle spektrumlarının eldesi için “LCMS-IT-TOF (Shimadzu, Kyoto, Japonya)” cihazı kullanılmıştır. Öncelikle maddelerden yaklaşık 1mg bir vial içine alınmış ve üzerlerine 1,5 mL asetonitril eklenerek çözünmeleri sağlanmıştır. Daha sonra çözeltiler enjeksiyon yoluyla cihaza uygulanmış ve elektron sprey iyonizasyon yoluyla pozitif ve negatif iyonlaştırma modları kullanılarak kütle spektrumları elde edilmiştir.

#### **4.8. Antikanser Aktivite Çalışmaları**

Sentez çalışmaları kapsamında elde edilen tüm bileşiklerin antikanser aktivitelerinin araştırılmasında A549 ve MCF-7 hücre hatları kullanılmıştır. Bileşiklerin

kanserli hücrelere olan seçiciliklerini değerlendirebilmek için NIH3T3 (fare embriyo fibroblast hücre hattı) tercih edilmiştir. A549 ve MCF-7 hücre hatları için besiyeri olarak fetal calf serumu 100 IU/mL penisilin ile beraber 100 mg/mL streptomisin ihtiva eden RPMI 1640 tercih edilirken, NIH3T3 hücre hattına için ise DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) tercih edilmiştir. Sentez çalışmaları kapsamında elde edilen tüm bileşiklerin antikanser etkilerinin değerlendirilebilmesi için doksorubisin ve kinaz inhibitörlerinin öncüsü olan erlotinib diğer tüm bileşikler ile kıyaslama seçilmiştir.

#### **4.8.1. MTT yöntemi yardımıyla bileşiklerin sitotoksik etkilerinin araştırılması**

##### **4.8.1.1. Hücrelerin çoğaltılması**

Aktivite çalışmalarında tercih edilen hücre hatlarının çoğaltılması ve deneye hazır hale getirilmesi için 2-3 günde pasajlama işlemi sürekli olarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle inkübatör içinden alınan hücre kültürü şişesi ölü hücrelerin besiyerine geçip canlı hücrelerden ayrılması için hafifçe çalkalanmış ardından steril bir pipet yardımıyla besi yeri hücre kültürü şişesinden uzaklaştırılmıştır. Hücreleri yıkamak için hücre kültürü şişesine fosfat tamponundan 5 mL eklenerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiş daha sonra yıkama çözeltisi ortamdan atılmıştır. 75 cm<sup>2</sup>' lik hücre kültürü şişelerinde 3-5 ml olacak şekilde, 25 cm<sup>2</sup>' lik kültürü şişelerinde ise 1-3 ml olacak şekilde tripsin EDTA çözeltisi (1X) ilave edilip hafifçe çalkalanmış ve % 5 CO<sub>2</sub>, % 95 nem oranına sahip inkübatörde 37 °C'de 5 dakika kadar bekletilmiştir. Ardından kültür şişelerine besiyerinden 20-25 mL eklenerek hücrelerin süspanse olması sağlanmış, 1:2,1:3 oranlarında bölünerek yeni hücre kültürü şişelerine aktarılmıştır. En son işlem olarak % 5 CO<sub>2</sub>, % 95 nem oranına sahip inkübatörde 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

##### **4.8.1.2. Hücrelerin Plakalara Ekilmesi**

İnkübatörün içinden çıkartılan hücre kültürü şişesi içerisinde bulunan canlı hücreleri ölü hücrelerden ayırabilmek için hafifçe çalkalanmış ardından steril bir pipet yardımıyla besi yeri hücre kültürü şişesinden uzaklaştırılmıştır. Devamında 75 cm<sup>2</sup> hacme sahip olan hücre kültürü şişelerinde 3-5 ml, hacimleri 25 cm<sup>2</sup> olanlarda ise 1-3 ml olacak şekilde tripsin EDTA çözeltisi (1X) ilave edilip hafifçe çalkalanmış ve % 5 CO<sub>2</sub>, % 95 nem oranına sahip inkübatörde 37 °C'de 5 dakika kadar bekletilmiştir. İnkübatör içinden alınan hücre kültürü şişelerine minimum eklenen tripsin-EDTA çözeltisinin iki katı olacak şekilde besiyeri ilavesi yapılmış ve bir pipet kullanılarak santrifüj tüpüne

aktarılmıştır. Aktarılan içerik çalkalanmasının ardından 10 mL alınıp otomatik hücre sayma cihazı yardımıyla sayılmasını takiben hücre süspansiyonu küvetlere alınıp her kuyucukta 2 mL ve  $25 \cdot 10^4$  hücre/100  $\mu$ L olacak formatta 6 kuyucuk ihtiva eden hücre kültür plakasına bölünerek % 5 CO<sub>2</sub>, % 95 nem oranına sahip inkübatörde 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

#### **4.8.1.3. MTT Sitotoksikite Testinin Gerçekleştirilmesi**

24 saat inkübe edilen plakalar sürenin tamamlanmasının ardından plakaların ters çevrilmesi yoluyla içlerinde bulunan besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Bileşiklerin DMSO içerisinde hazırlanan stok çözeltilerinin 0.0000316 mM-1 mM 10 seri konsantrasyonu hazırlanmış ve pozitif kontroller ile beraber plakalara uygulanarak %5 CO<sub>2</sub>, %95 nem oranına sahip inkübatörde 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatin tamamlanmasının ardından hücre kültürlerinin üst kısmı ters çevrilmek suretiyle ortamdan uzaklaştırılmıştır ve hücreleri yıkamak için fosfat tamponu uygulanmış ve yıkama çözeltisi ortamdan atılmıştır. 5 mg/mL MTT çözeltisi besiyeri ile 1:10 karıştırılmış ve hücre kültür plakasına her kuyucuğuna 100  $\mu$ L olacak şekilde uygulanarak %5 CO<sub>2</sub>, %95 nem oranına sahip inkübatörde 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra besiyerleri plakaların ters çevrilmesi yoluyla uzaklaştırılmıştır. Hücre kültür plakasının her kuyucuğuna 100  $\mu$ L DMSO eklenmiş devamında ELISA yardımıyla 540 nm’de kuyucukların OD değerleri okunmuştur. Analizi gerçekleştirilen bileşiklerin test edilen her bir konsantrasyonu için % inhibisyon değerleri hesaplanmış ve non-lineer regresyon analizi kullanılarak Sentez çalışmaları kapsamında elde edilen tüm bileşiklerin inhibitör konsantrasyon 50 (IC<sub>50</sub>) değerleri hesaplanarak sitotoksik özellikleri hakkında yorumlar yapılmıştır [66–69]

#### **4.9. Siklooksijenaz-2 (COX-2) İnhibisyon Çalışmaları**

Sentez çalışmaları kapsamında elde edilen tüm bileşiklerin siklooksijenaz-2 inhibisyon aktiviteleri araştırılmıştır. Bu aktivite çalışmasında gerçekleştirilen tüm aşamalarda Milipor, Milli-Q Synthesis A10 saflaştırma cihazı yardımıyla eldesi gerçekleştirilen distile su kullanılmıştır. Kullanılan çözeltilerinin tümünün yeni olarak hazırlanmasına ardından 1 hafta içerisinde tüketiminin tamamlanmasına dikkat edilmiştir. Enzim inhibisyon çalışmalarında hazırlanan çözeltilerin porsiyonlara bölünmesi, test edilecek bileşiklerin 96 kuyucuklu plakalara tatbiki, enzim substrat çözeltilerinin

eklenmesi işlem basamaklarında BioTek-Precision Power (Amerika Birleşik Devletleri) robotik pipetleme sistemi kullanılmıştır. BioTek-Synergy H1 Microplate Reader (Amerika Birleşik Devletleri) cihazı kullanılarak enzim protokolünün oluşturulması ve takibi devamında ise spektrofotometrik ölçümlerin alınmasıyla işlem tamamlanmıştır.

Sentez çalışmaları kapsamında elde edilen tüm bileşiklerin siklooksijenaz-2 inhibisyon aktivitelerini araştırılması PGG<sub>2</sub>'nin florometrik yöntemle ölçülmesine dayanmaktadır. Bu amaçla BioVision COX-2 Inhibitor Screening Kiti (Milpitas, CA, USA) kullanılmıştır. Kitin içeriği COX tampon çözeltisi, DMSO içerisinde çözülmüş COX probu ve COX kofaktörü, araşidonik asit, NaOH ve COX-2 enziminden oluşmaktadır. Enzim inhibisyon çalışmalarını gerçekleştirmek için Sentez çalışmaları kapsamında elde edilen tüm bileşiklerin çözeltileri, reaksiyon karışımı çözeltisi ve araşidonik asit/NaOH çözeltisi olmak üzere 3 tip çözelti hazırlanmıştır.

#### **4.9.1. Test bileşik çözeltilerinin elde edilmesi**

Biyolojik aktivite çalışmalarına ilk olarak ön tarama denilebilecek 10<sup>-3</sup> ve 10<sup>-4</sup> M konsantrasyonlarında ve %2'lik DMSO içerisinde çözündürülmüş test edilecek bileşiklerin çözeltileri ile başlanmıştır. Aktivite değerleri yüzde formatında değerlendirilmiş ve 10<sup>-4</sup> konsantrasyonda %50'den büyük bir inhibisyon oranı var ise 10<sup>-9</sup> M konsantrasyona kadar düşülerek daha düşük konsantrasyonlardaki enzimi inhibe etme aktiviteleri araştırılmıştır.

#### **4.9.2. Reaksiyon Karışımı Çözeltisi**

Bu çözeltinin eldesi için öncelikle COX-2 enzim ve seyreltik COX kofaktör çözeltisinin hazırlanması gerçekleştirilmiştir. Enzim çözeltisini elde etmek için kit içeriğinden çıkan liyofilize toz üzerine 110 µL ddH<sub>2</sub>O eklenmiştir. Seyreltik COX kofaktör çözeltisi elde etmek içinse kit içeriğinde COX kofaktörünün DMSO içindeki çözeltisinin 2 µL'sinin 398 µL COX tampon çözeltisine ilavesi gerçekleştirilmiştir.

Inhibisyon işlemi prosedürüne göre her bir kuyucukta 80 µL reaksiyon karışım çözeltisi bulunması gerekmektedir. Bu çözelti 76 µL COX tampon çözeltisi, 1 µL COX probu, 2 µL seyreltik COX kofaktör çözeltisi ve 1 µL COX-2 enzim çözeltisinin bir araya getirilmesiyle elde edilmiştir.

#### **4.9.3. Araşidonik asit/NaOH çözeltisinin elde edilmesi**

Enzim protokolüne göre her bir kuyucukta 10 µL bu çözeltiden bulunmalıdır, bu nedenle kit içeriğinden elde edilen araşidonik asit ve NaOH çözeltilerinden 5 µL bir araya getirilip karıştırılarak elde edilmiştir.

Enzim inhibisyon çalışmalarını gerçekleştirmek için 96 kuyucuklu beyaz renkli, düz tabanlı ve opak plakalar tercih edilmiştir. Öncelikle inhibitör bileşiklerinin hazırlanan her konsantrasyonu plakalara 4 tekrarlı olarak 10 µL uygulanmıştır. Ardından elde edilen reaksiyon karışımı çözeltisinden 80 µL eklenmiştir. Plakalar 25 °C’de 15 dakika BioTek-Synergy H1 (Amerika Birleşik Devletleri) mikroparka okuyucusunda inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin tamamlanmasının ardından reaksiyonun durması için araşidonik asit/NaOH çözeltisinden 10 µL ilave edilmiş ve 5’er dakika aralıklarla 535/587 nm’de florometrik yöntemlerle okuma gerçekleştirilmiştir. Yüzde inhibisyon değerleri aşağıdaki denklem yardımıyla elde edilmiştir:

$$\% \text{ Inhibisyon} = \frac{(FCt_2 - FCt_1) - (FI t_2 - FI t_1)}{FCt_2 - FCt_1} \times 100$$

FCt<sub>2</sub>: Kontrolün t<sub>2</sub> zamanında ölçülen floresansı

FCt<sub>1</sub>: Kontrolün t<sub>1</sub> zamanında ölçülen floresansı

FI t<sub>2</sub>: İnhibitörün t<sub>2</sub> zamanında ölçülen floresansı

FI t<sub>1</sub>: İnhibitörün t<sub>1</sub> zamanında ölçülen floresansı

Microsoft Office Excel programında non-lineer regresyon analizinin sigmoid doz-yanıt modeli yardımıyla çizilen inhibisyon eğrileri yardımıyla bileşiklerin IC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır.

#### **4.10. Anneksin V/PI yöntemi ile bileşiklerin apoptotik etkilerinin belirlenmesi**

Sitotoksiteleri MTT testi ile belirlenen aktif bileşiklerin ve pozitif kontrol amacıyla Erlotinib’in apoptotik etkileri A549 ve MCF-7 hücre hatlarında belirlemek için Anneksin V/PI yöntemi kullanılmıştır.

##### **4.10.1. Hücrelerin plakalara ekilmesi**

İnkübatörün içinden çıkartılan hücre kültürü şişesi içerisinde bulunan canlı hücreleri ölü hücrelerden ayırmak için hafifçe çalkalanmış ardından steril bir pipet yardımıyla

besi yeri hücre kültürü şişesinden uzaklaştırılmıştır. Devamında 75 cm<sup>2</sup> hacme sahip olan hücre kültürü şişelerinde 3-5 ml, hacimleri 25 cm<sup>2</sup> olanlarda ise 1-3 ml olacak şekilde tripsin EDTA çözeltisi (1X) ilave edilip hafifçe çalkalanmış ve % 5 CO<sub>2</sub>, % 95 nem oranına sahip inkübatörde 37 °C’de 5 dakika kadar bekletilmiştir. İnkübatör içinden alınan hücre kültürü şişelerine minimum eklenen tripsin-EDTA çözeltisinin iki katı olacak şekilde besiyeri ilavesi yapılmış ve bir pipet kullanılarak santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Aktarılan içerik çalkalanmasının ardından 10 mL alınıp otomatik hücre sayma cihazı yardımıyla sayılmasını takiben hücre süspansiyonu küvetlere alınıp her kuyucukta 2 mL ve 25.104 hücre/100 µL olacak formatta 6 kuyucuk ihtiva eden hücre kültür plakasına bölünerek % 5 CO<sub>2</sub>, % 95 nem oranına sahip inkübatörde 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

#### **4.10.2. Anneksin/EI yönteminin gerçekleştirilmesi**

24 saat inkübasyon süresinin tamamlanmasının ardından besiyerleri plakaların ters çevrilmesi yoluyla uzaklaştırılmış devamında test edilecek bileşiklerin ve pozitif kontrol IC<sub>50</sub> konsantrasyonlarında 2 tekrar şeklinde flasklara uygulanmış ve %5 CO<sub>2</sub>, % 95 nem oranına sahip inkübatörde 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin tamamlandığında hücre kültürleri üst kısımlarıyla beraber santrifüj tüplerine alınmıştır. Flasklara 1500 µl tripsin-EDTA çözeltisi eklenip 3 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübatörden çıkarılan plakalara 4,5 mL besiyeri ilavesi yapılmış ardından bir pipet kullanılarak santrifüj tüplerine aktarılmış ve santrifüje edilmiştir (+4 °C, 1200 g, 5dk). Santrifüjün devamında tüplerin içindeki besiyeri ortamdan alınmış ve hücre pelleti 1 ml fosfat tamponu ilavesi ile süspanse edilerek ve tekrar santrifüje edilmiştir (+4 °C, 1200 g, 5dk). Ardından fosfat tamponu uzaklaştırılarak hücre pellet’i 1x Annexin V Binding Buffer yardımıyla süspanse edilmiştir (1 x 10<sup>6</sup> hücre/ml). Farklı tüplerin birbirine karışmaması sağlanarak 5 µl Anexin V ve 5 µl EI ilavesi yapılmış ardından her tüpe 100 µl hücre süspansiyonu eklenmiştir. Tüpler ışık almayacak şekilde 15 dakika boyunca oda ısısında bekletilmiş devamında 400 µl 1x Annexin V Binding Buffer ilavesi yapılmış ve akış sitometri cihazında (Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında) analiz gerçekleştirilmiştir [70]

#### 4.11. Kinaz İnhibisyon Testleri

Kinaz enzimi inhibisyonu belirlenirken ilgili kitin kılavuzundaki protokole uygun hareket edilmiştir [78]. *In vitro* kinaz enzimi inhibisyon çalışmalarında inhibisyon değerlerinin belirlemek için EGFR elisa kitinden yardım alınmıştır. Protokole göre yapılan çalışmaların sonunda Elisa metodu yardımıyla ortalama değer belirlenmiştir. Kitin ihtiva ettiği standart madde kullanılmış ve pozitif kontrol olması için erlotinibden yararlanılmıştır.

#### 4.12. Moleküler Modelleme Çalışmaları

Sentez çalışmaları kapsamında elde edilen tüm bileşikler içinden EGFR ve COX-2 enzimlerine karşı inhibisyon aktivitesi en yüksek olan **3j** ve **3o** bileşiklerinin enzimlerle yapabilecekleri olası etkileşimleri ve kimyasal bağları belirleyebilmek amacıyla EGFR enzimi için PDB:1M17 [71] ve COX-2 için ise PDB:3LN1[72] enzim kristalleri kullanılarak yapı temelli *in-silico* docking metodu uygulanmıştır. İlgili enzim kristalleri üzerinde *Schrödinger Suite 2020 Update 2 Maestro* [73] programı yardımıyla protein-ligand etkileşim analizi gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle ilgili programın ara yüzünde yer alan *Protein Preparation Wizard* protokolü yardımıyla kristal yapısı docking çalışmalarında kullanılabilir hale getirilmiş, OPLS 2005 kuvvet alanı yardımıyla bağ uzunluklarını optimize edilmiş, yüklü aminoasitlerin üzerinde yer alan atomların belirtilen ortam koşullarında sahip olabilecekleri olası yükleri otomatik olarak belirlenmiştir. Docking için bileşikler hazırlamak amacıyla *LigPrep 3.8* [74] modülü kullanılarak dock edilecek bileşikler hazır hale getirilmiştir. *Glide 7.1* [75] modülü yardımıyla grid oluşturulmuş ve ardından single precision ile docking gerçekleştirilerek moleküler modelleme çalışmaları tamamlanmıştır.

#### 4.13. Moleküler Dinamik Çalışmaları

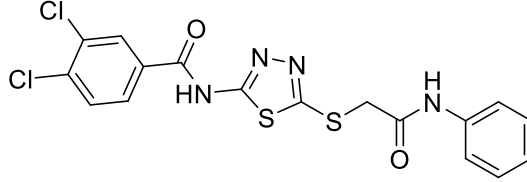
Moleküler Dinamik (MD) çalışmaları bir reseptör ile etkileşim gösteren ilacın aktif bölgedeki zamana bağlı stabilitesi değerlendirmek için kullanılmaktadır [76]. Sentez çalışmaları kapsamında elde edilen bileşiklerden **3j** ve **3o**'nun da EGFR ve COX-2 enzimleri ile olan etkileşimlerinin stabilitesi incelemek amacıyla 100 ns boyunca MD çalışmaları yapılmıştır. Dinamik çalışmaları, desmond uygulamasını [77] 3 noktalı (TIP3P) bir su modeli ve ardından kompleksin enerji minimizasyonu [78] ile transfer

edilebilir bir moleküller arası potansiyele sahip *Schrödinger Suite*'in standart kuvvet alanı (OPLS3e) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sistemin nötralizasyonu 0.15 M'lik nihai bir tuz derişimi ile  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Cl}^-$  iyonları kullanılarak sağlanırken aynı zamanda tek değerli iyonların fizyolojik derişimleri taklit edilmiş olmaktadır [79]. 310.55 K sabit sıcaklık ve 1.01325 bar basınç ve topluluk sınıfı olarak sabit sayıda parçacığın sabit sıcaklık ve basınçla kullanıldığı NPT tercih edilmiştir. Hareket denklemlerini bütünleştirmek için RESPA entegratörü [80], simülasyon sıcaklığının sabit kalması için NH termostatları ve basıncı kontrol etmek amacıyla MTK yöntemi uygulanmıştır [81]. pmE yöntemi yardımıyla uzun menzilli elektrostatik etkileşimler hesaplanmıştır[82]. Van der Waals ve kısa menzilli elektrostatik etkileşimlerde sınır olarak 9,0 Å kullanılmıştır. Desmond moleküler dinamik simülasyonları, sitemim dengelenmesi ve sistemi yavaşça gevşetebilmek için bir dizi minimizasyondan oluşur ve varsayılan protokolü kullanılarak işlem gerçekleştirilmiştir. MD simülasyonu yukarıda belirtilen ayarların etkinleştirilmesinin ardından sistem kurulumunun tamamlanmasıyla gerçekleştirilmiştir ve Rg (dönme yarıçapı), kök ortalama kare dalgalanma (RMSF) ve kök ortalama kare sapma (RMSD) değerleri desmond uygulaması tarafından hesaplanmıştır [83].

## 5. BULGULAR VE YORUM

### 5.1. Sentez Çalışmaları

#### 5.1.1. 3,4-Dikloro-N-(5-((2-okso-2-(fenilamino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3a)



**Şekil 5.1.** 3,4-Dikloro-N-(5-((2-okso-2-(fenilamino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3a)  
molekülünün kimyasal yapısı

**Deneyisel E.N.:** 250.3-253.2 °C **Verim:** %75

**IR (ATR)  $\nu_{\text{maks}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3255 (N-H bağına ait band), 3068 (C-H bağına ait band), 1658 (C=O bağına ait band)

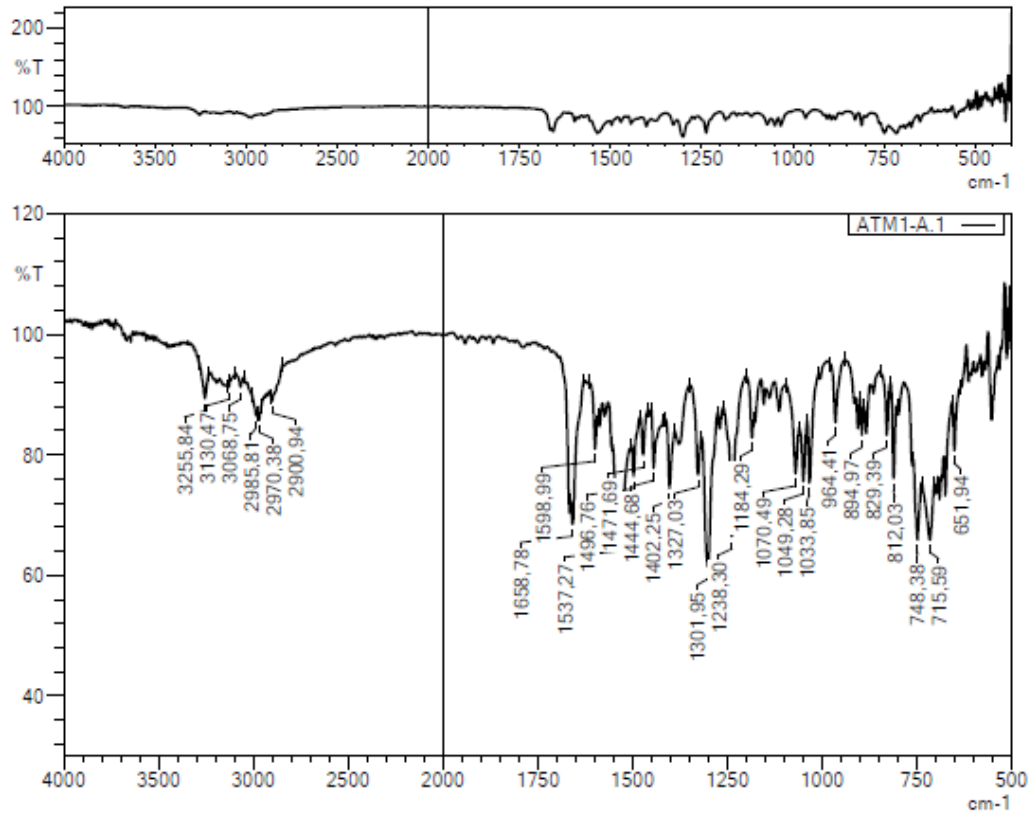
**$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 4.24 (2H, s,  $-\text{CH}_2$ ), 7.07 (1H, t, Ar-H), 7.32 (2H, t, Ar-H), 7.57 (2H, d,  $J=7.62$  Hz, Ar-H), 7.85 (2H, d,  $J=8.47$  Hz, Ar-H), 8.04 (1H, dd,  $J_1=2.07$  Hz,  $J_2=8.47$  Hz, Ar-H), 10.37 (1H, s, NH), 13.30 (1H, s, NH)

**$^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 38.46, 119.59, 124.08, 128.12, 129.12, 129.15, 129.33, 130.35, 130.84, 131.48, 139.26, 150.32, 160.09, 165.90, 171.70

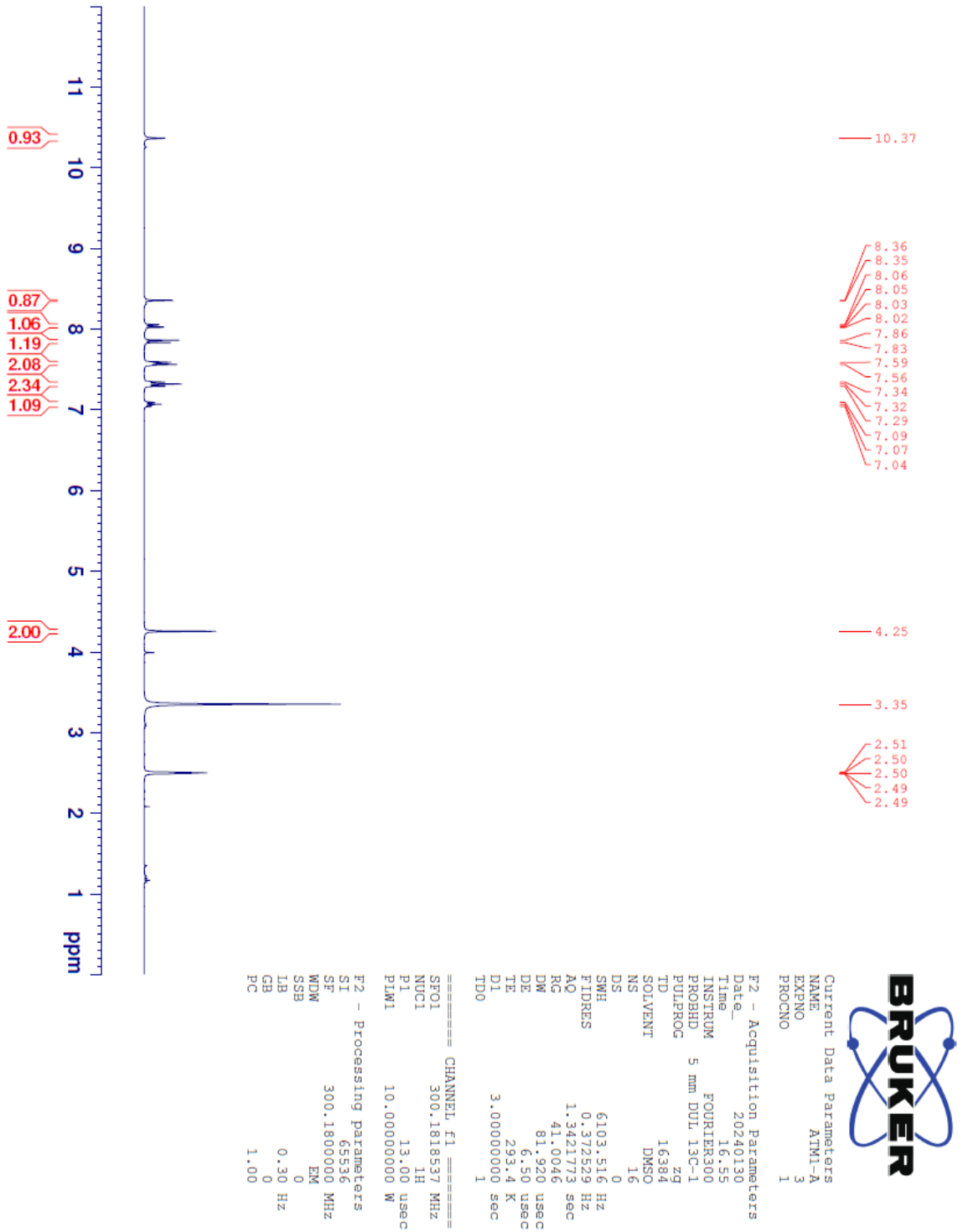
**HRMS (ESI) (m/z)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ :**  $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_2\text{Cl}_2$  için hesaplanan: 438.9851, bulunan: 438.9853

## DOPNALAB

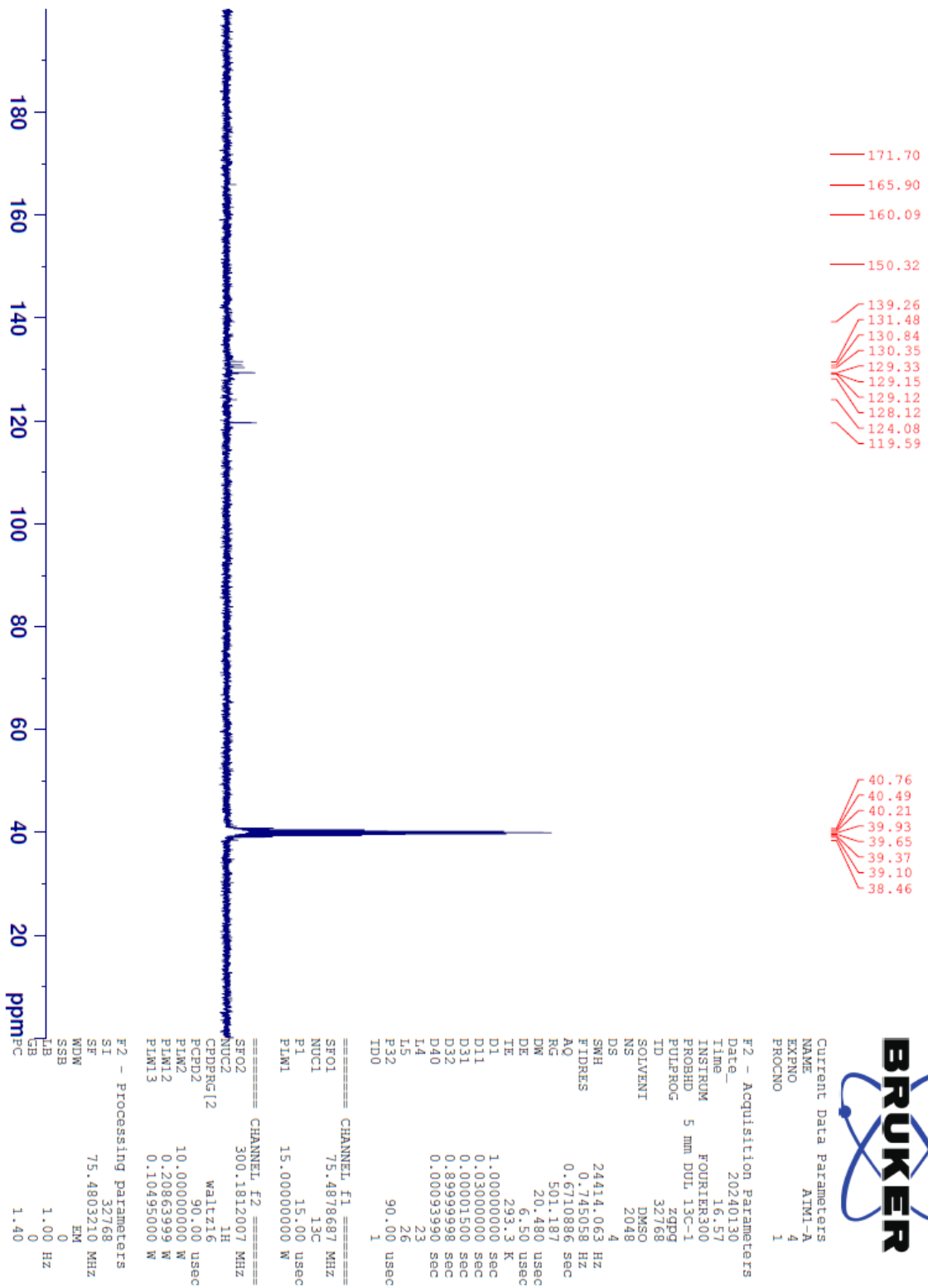
| Item               | Value                                                      |
|--------------------|------------------------------------------------------------|
| Acquired Date&Time | 16.05.2024 10:18:19                                        |
| Acquired by        | System Administrator                                       |
| Filename           | C:\Users\dopnalab\Desktop\MASAUSTUARZU HIDIR\ATM1-A.1.ispd |
| Spectrum name      | ATM1-A.1                                                   |
| Sample name        | ATM1-A                                                     |
| Sample ID          |                                                            |
| Option             |                                                            |
| Comment            |                                                            |
| No. of Scans       | 30                                                         |
| Resolution         | 4 [cm-1]                                                   |
| Apodization        | Happ-Genzel                                                |



Şekil 5.2. IR Analizi (3a)



Şekil 5.3.  $^1\text{H}$  NMR Analizi (3a)



Şekil 5.4.  $^{13}\text{C}$  NMR Analizi (3a)

| Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Use Adduct |
|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------------|
| H    | 1    | 0   | 35  | O    | 2    | 0   | 2   | S    | 2    | 0   | 2   | Ru   | 2    | 0   | 0   | H          |
| C    | 4    | 0   | 35  | F    | 1    | 0   | 0   | Cl   | 1    | 0   | 2   | Pd   | 2    | 0   | 0   |            |
| N    | 3    | 0   | 7   | P    | 3    | 0   | 0   | Br   | 1    | 0   | 0   | I    | 3    | 0   | 0   |            |

Error Margin (ppm): 5

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

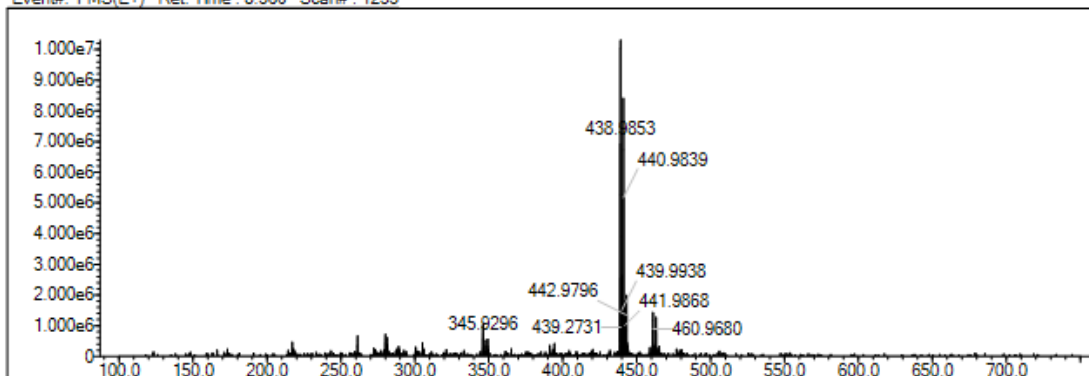
Electron Ions: both

Use MSn Info: yes

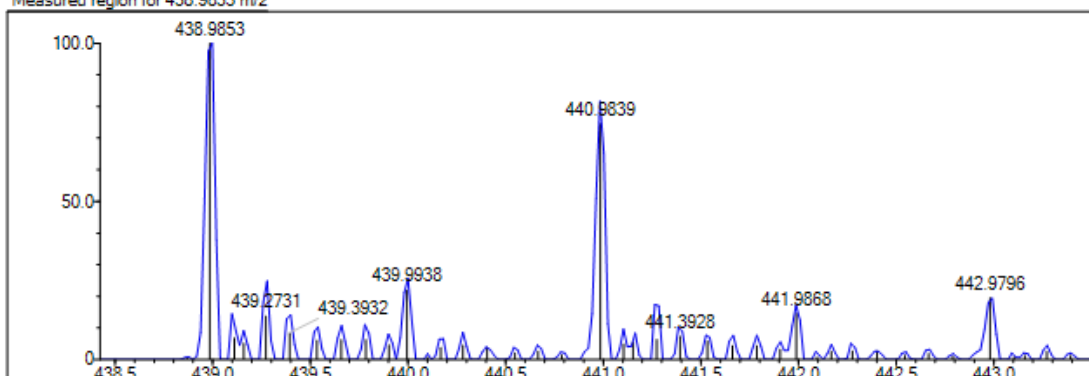
Isotope Res: 9000

Max Results: 50

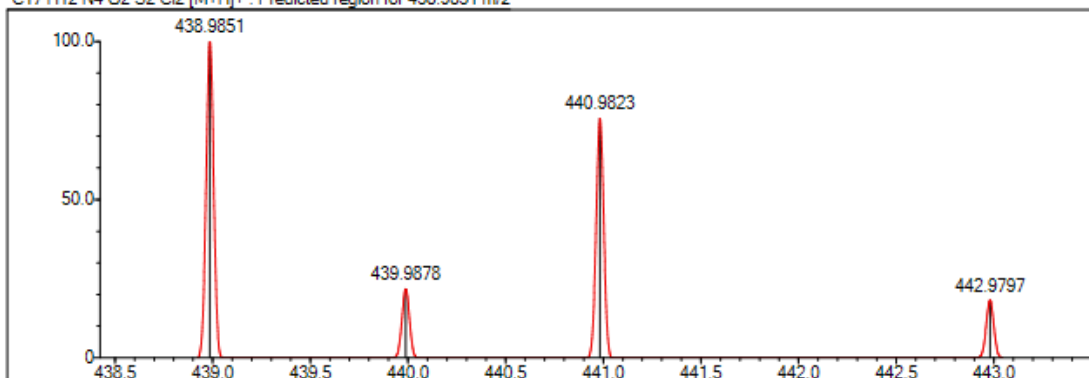
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 8.360 Scan#: 1255



Measured region for 438.9853 m/z



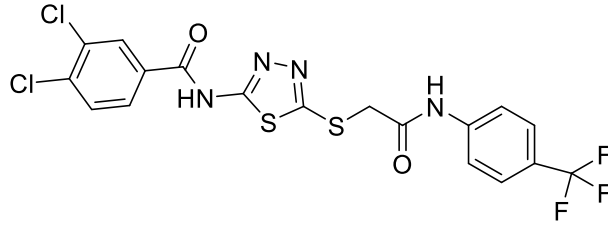
C17 H12 N4 O2 S2 Cl2 [M+H]<sup>+</sup> : Predicted region for 438.9851 m/z



| Rank | Score | Formula (M)          | Ion                | Meas. m/z | Pred. m/z | Df. (mDa) | Df. (ppm) | Iso   | DBE  |
|------|-------|----------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|------|
| 1    | 79.74 | C17 H12 N4 O2 S2 Cl2 | [M+H] <sup>+</sup> | 438.9853  | 438.9851  | 0.2       | 0.46      | 79.74 | 13.0 |

Şekil 5.5. HRMS Analizi (3a)

**5.1.2. 3,4-Dikloro-N-(5-((2-okso-2-((4-(triflorometil)fenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3b)**



**Şekil 5.6.** 3,4-Dikloro-N-(5-((2-okso-2-((4-(triflorometil)fenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3b) molekülünün kimyasal yapısı

**Deneyisel E.N.:** 245.1-247.3 °C **Verim:** %82

**IR (ATR)  $\nu_{\text{maks}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3300 (N-H bağına ait band), 3169 (C-H bağına ait band), 1656 (C=O bağına ait band)

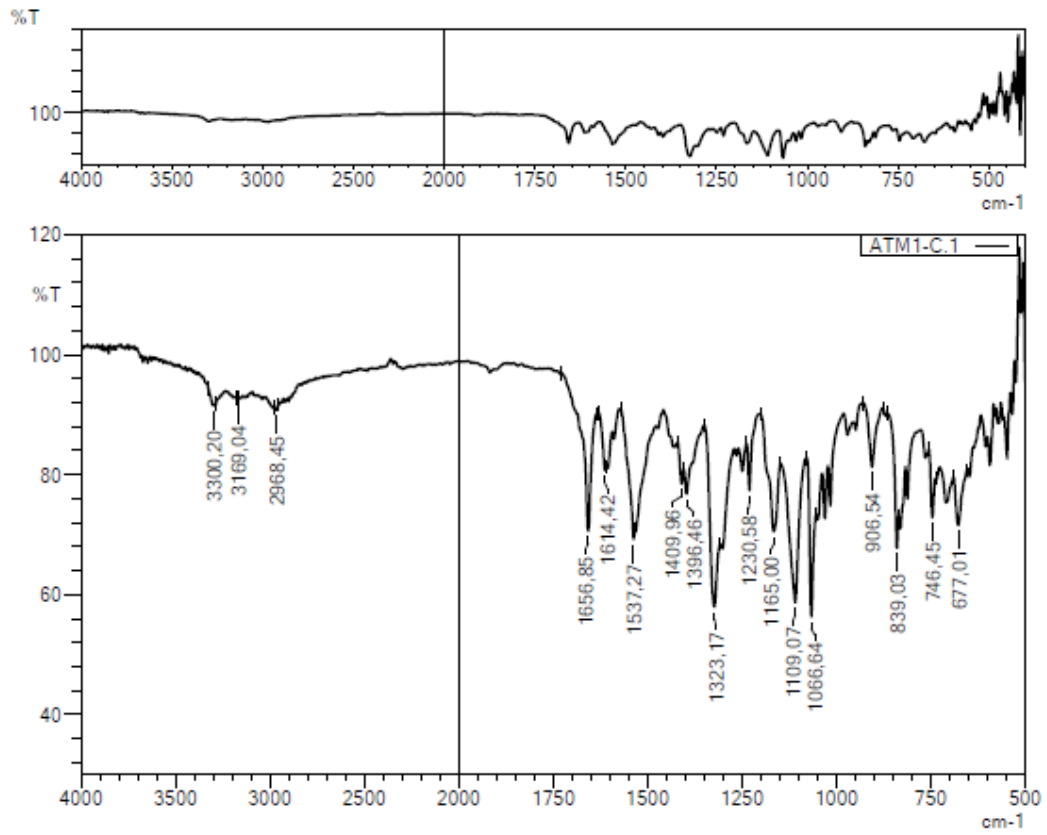
**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 4.26 (2H, s,  $-\text{CH}_2$ ), 7.69 (2H, d,  $J= 8.65$  Hz, Ar-H), 7.77-7.81 (3H, m, Ar-H), 8.04 (1H, dd,  $J_1= 2.05$  Hz,  $J_2= 8.43$  Hz, Ar-H), 8.33 (1H, d,  $J=2.01$  Hz, Ar-H), 10.73 (1H, s, NH)

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 38.42, 119.51, 120.60, 122.64, 125.52, 126.64, 129.01, 130.12, 130.71, 131.27, 131.79, 142.76, 154.12, 157.75, 162.73, 166.82

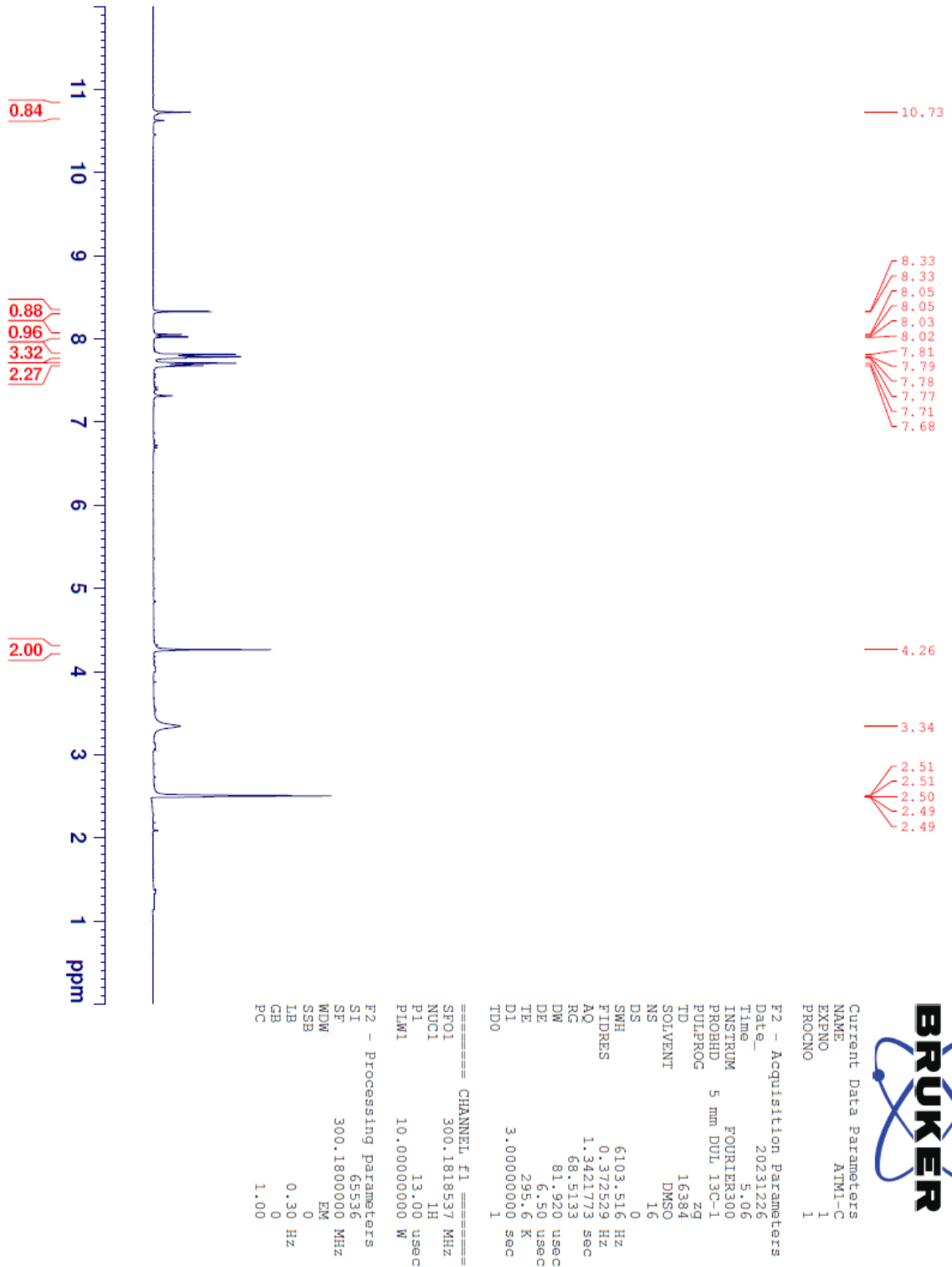
**HRMS (ESI) (m/z)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ :**  $\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}_2\text{F}_3\text{S}_2\text{Cl}_2$  için hesaplanan: 506.9725, bulunan: 506.9723

## DOPNALAB

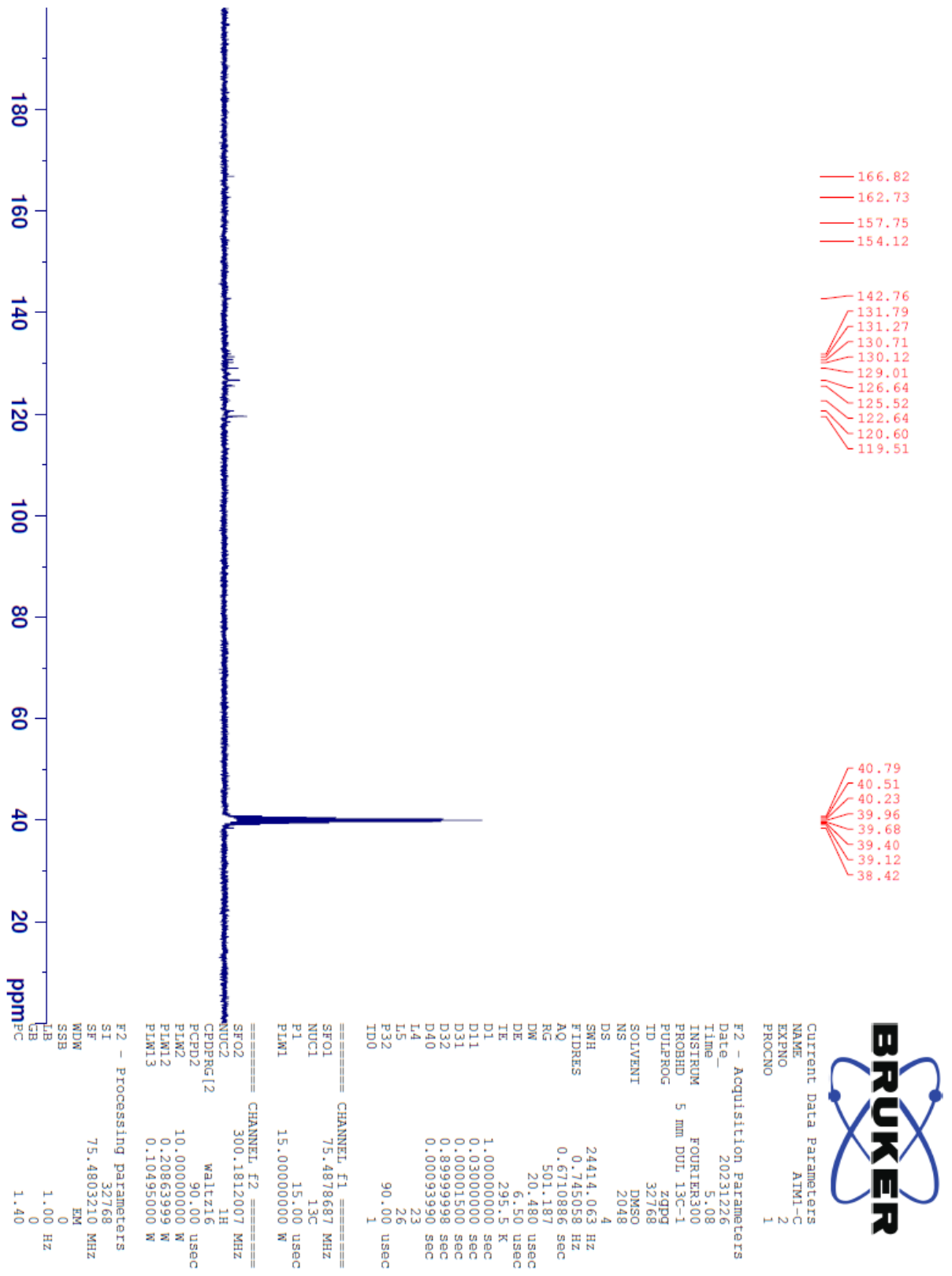
| Item               | Value                                                          |
|--------------------|----------------------------------------------------------------|
| Acquired Date&Time | 16.05.2024 10:42:49                                            |
| Acquired by        | System Administrator                                           |
| Filename           | C:\Users\dopnalab\Desktop\MASAUSTUARZU HIDIR\ATM\ATM1-C.1.ispd |
| Spectrum name      | ATM1-C.1                                                       |
| Sample name        | ATM1-C                                                         |
| Sample ID          |                                                                |
| Option             |                                                                |
| Comment            |                                                                |
| No. of Scans       | 30                                                             |
| Resolution         | 4 (cm-1)                                                       |
| Apodization        | Happ-Genzel                                                    |



Şekil 5.7. IR Analizi (3b)



Şekil 5.8.  $^1\text{H}$  NMR Analizi (3b)



Şekil 5.9. <sup>13</sup>C NMR Analizi (3b)

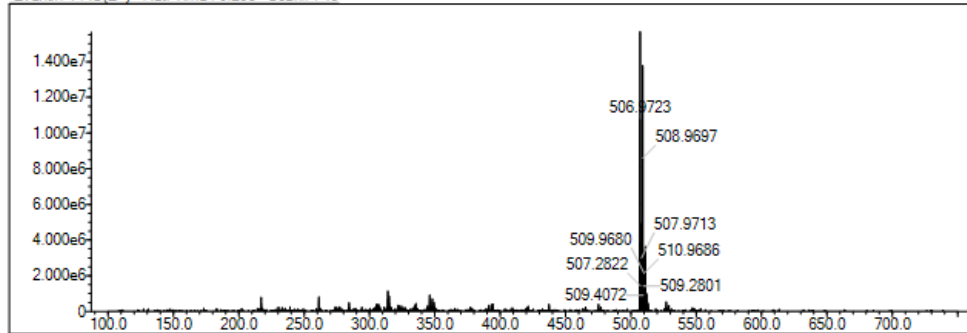
| Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Use Adduct |
|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------------|
| H    | 1    | 0   | 35  | O    | 2    | 0   | 2   | S    | 2    | 0   | 2   | Ru   | 2    | 0   | 0   | H          |
| C    | 4    | 0   | 35  | F    | 1    | 0   | 3   | Cl   | 1    | 0   | 2   | Pd   | 2    | 0   | 0   |            |
| N    | 3    | 0   | 7   | P    | 3    | 0   | 0   | Br   | 1    | 0   | 0   | I    | 3    | 0   | 0   |            |

Error Margin (ppm): 5  
 HC Ratio: unlimited  
 Max Isotopes: 3  
 MSn Iso RI (%): 10.00

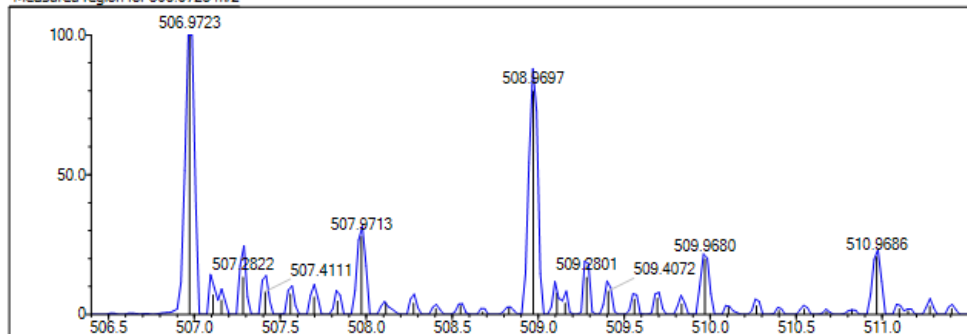
DBE Range: 0.0 - 30.0  
 Apply N Rule: no  
 Isotope RI (%): 1.00  
 MSn Logic Mode: AND

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

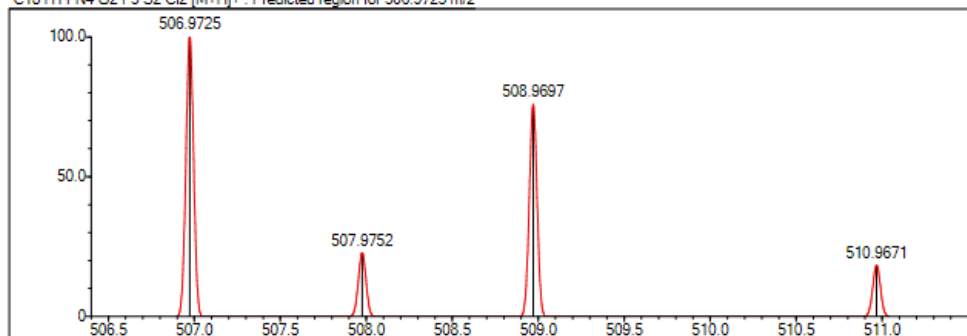
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 0.293 Scan#: 45



Measured region for 506.9723 m/z



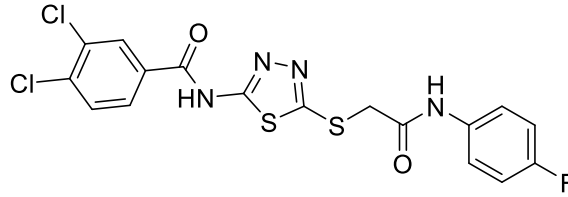
C18 H11 N4 O2 F3 S2 Cl2 [M+H]<sup>+</sup> : Predicted region for 506.9725 m/z



| Rank | Score | Formula (M)             | Ion                | Meas. m/z | Pred. m/z | Df. (mDa) | Df. (ppm) | Iso   | DBE  |
|------|-------|-------------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|------|
| 6    | 68.91 | C18 H11 N4 O2 F3 S2 Cl2 | [M+H] <sup>+</sup> | 506.9723  | 506.9725  | -0.2      | -0.39     | 68.91 | 13.0 |

Şekil 5.10. HRMS Analizi (3b)

**5.1.3. 3,4-Dikloro-N-(5-((2-((4-florofenil)amino)-2-oksoetil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3c)**



**Şekil 5.11.** 3,4-Dikloro-N-(5-((2-((4-florofenil)amino)-2-oksoetil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3c) molekülünün kimyasal yapısı

**Deneyisel E.N.:** 255.8-258.5 °C **Verim:** %85

**IR (ATR)  $\nu_{\text{maks}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3300 (N-H bağına ait band), 3169 (C-H bağına ait band), 1650 (C=O bağına ait band)

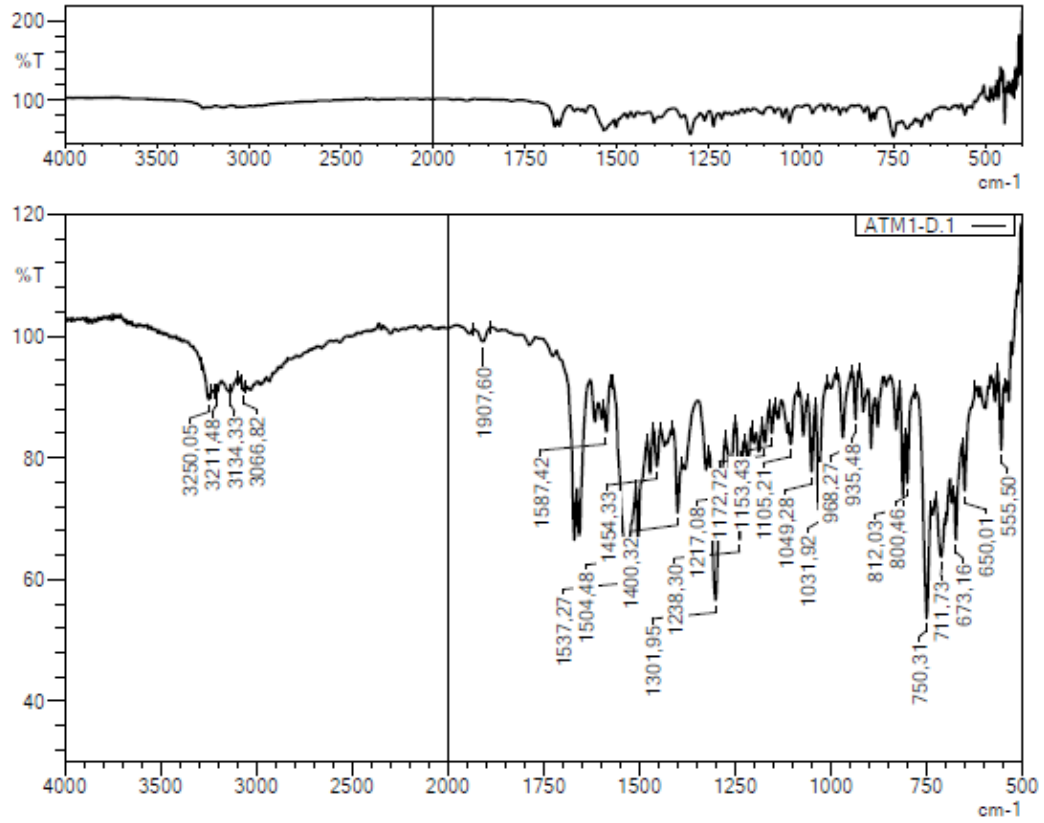
**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 4.31 (2H, s,  $-\text{CH}_2$ ), 7.15-7.19 (3H, m, Ar-H), 7.24-7.31 (1H, m, Ar-H), 7.85 (1H, d,  $J = 8.45$  Hz, Ar-H), 7.91-7.93 (1H, m, Ar-H), 8.05 (1H, dd,  $J_1 = 2.13$  Hz,  $J_2 = 8.44$  Hz, Ar-H), 8.36 (1H, d,  $J = 2.07$  Hz, Ar-H), 10.16 (1H, s, NH), 13.31 (1H, s, NH)

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 38.04, 115.89, 116.15, 124.18, 124.95, 126.03, 129.13, 130.83, 131.49, 132.05, 136.34, 152.54, 159.26, 161.22, 166.60

**HRMS (ESI) ( $m/z$ ) [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ :**  $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}_2\text{FS}_2\text{Cl}_2$  için hesaplanan: 456.9757, bulunan: 456.9770

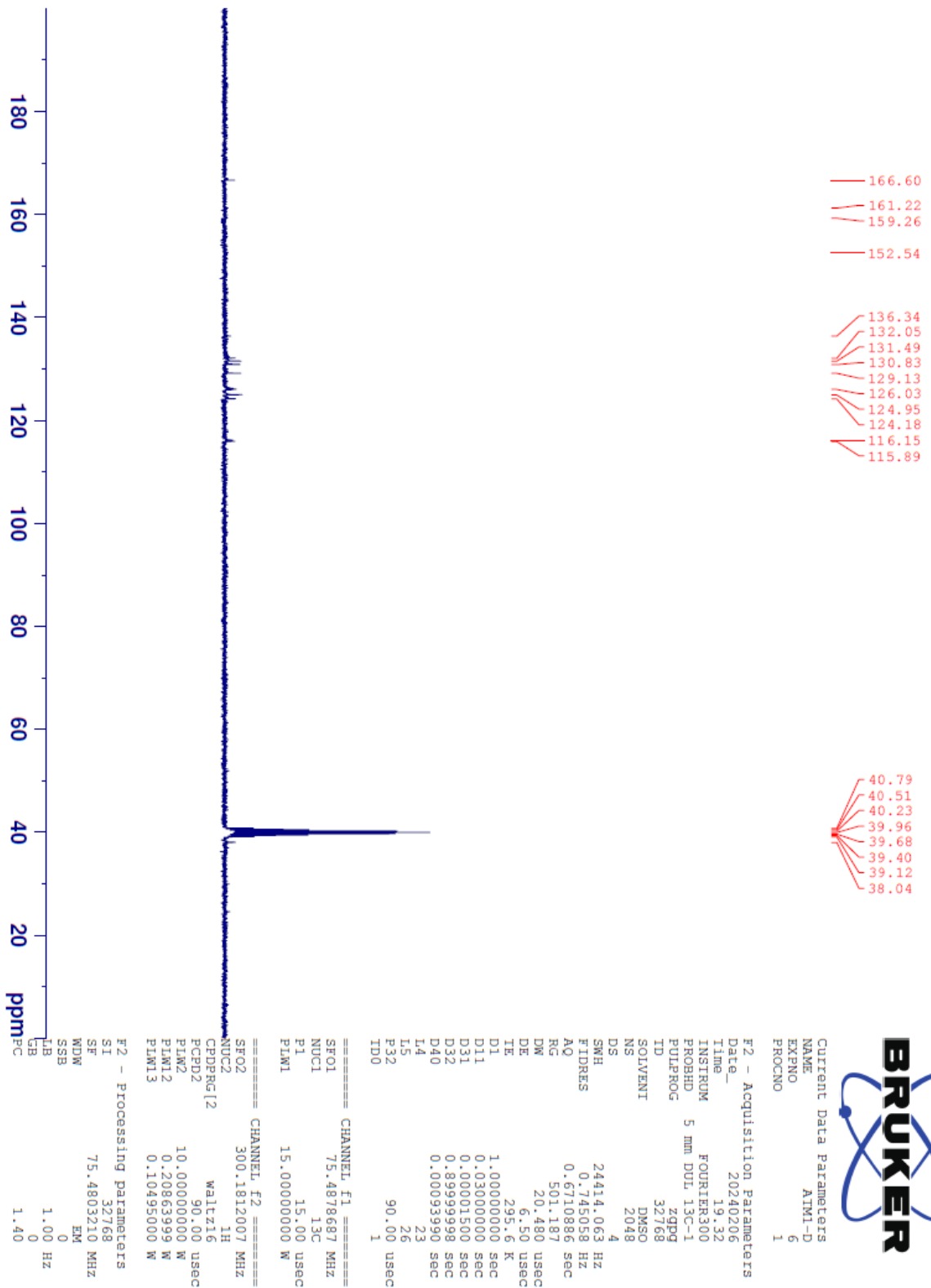
## DOPNALAB

| Item               | Value                                                          |
|--------------------|----------------------------------------------------------------|
| Acquired Date&Time | 16.05.2024 10:37:28                                            |
| Acquired by        | System Administrator                                           |
| Filename           | C:\Users\dopnalab\Desktop\MASAUSTUARZU HIDIR\ATM\ATM1-D.1.ispd |
| Spectrum name      | ATM1-D.1                                                       |
| Sample name        | ATM1-D                                                         |
| Sample ID          |                                                                |
| Option             |                                                                |
| Comment            |                                                                |
| No. of Scans       | 30                                                             |
| Resolution         | 4 (cm <sup>-1</sup> )                                          |
| Apodization        | Happ-Genzel                                                    |



Şekil 5.12. IR Analizi (3c)





Şekil 5.14.  $^{13}\text{C}$  NMR Analizi (3c)

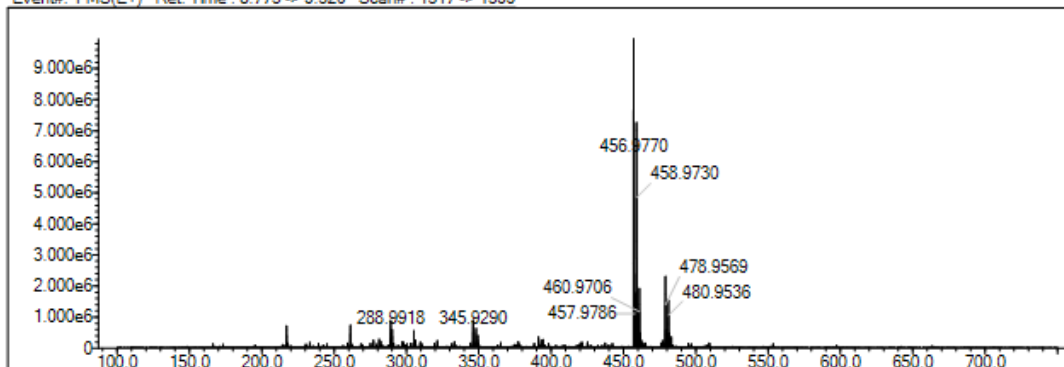
| Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Use Adduct |
|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------------|
| H    | 1    | 0   | 35  | O    | 2    | 0   | 2   | S    | 2    | 0   | 2   | Ru   | 2    | 0   | 0   | H          |
| C    | 4    | 0   | 35  | F    | 1    | 0   | 3   | Cl   | 1    | 0   | 2   | Pd   | 2    | 0   | 0   |            |
| N    | 3    | 0   | 7   | P    | 3    | 0   | 0   | Br   | 1    | 0   | 0   | I    | 3    | 0   | 0   |            |

Error Margin (ppm): 5  
 HC Ratio: unlimited  
 Max Isotopes: 3  
 MSn Iso RI (%): 10.00

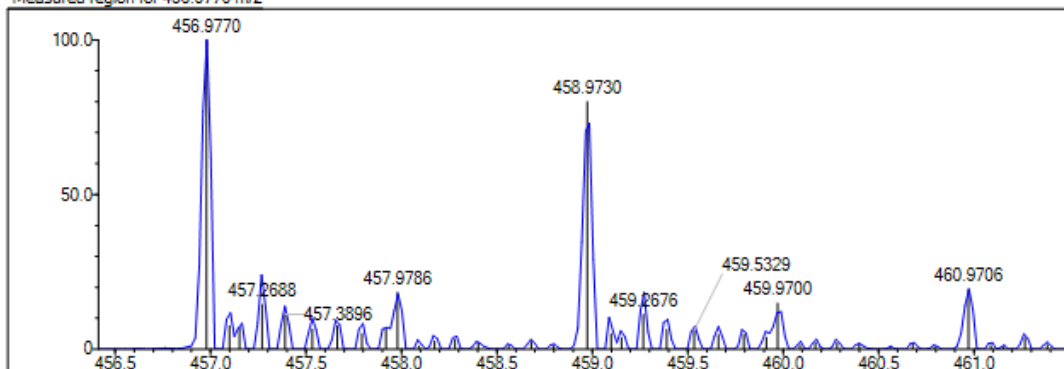
DBE Range: 0.0 - 30.0  
 Apply N Rule: no  
 Isotope RI (%): 1.00  
 MSn Logic Mode: AND

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

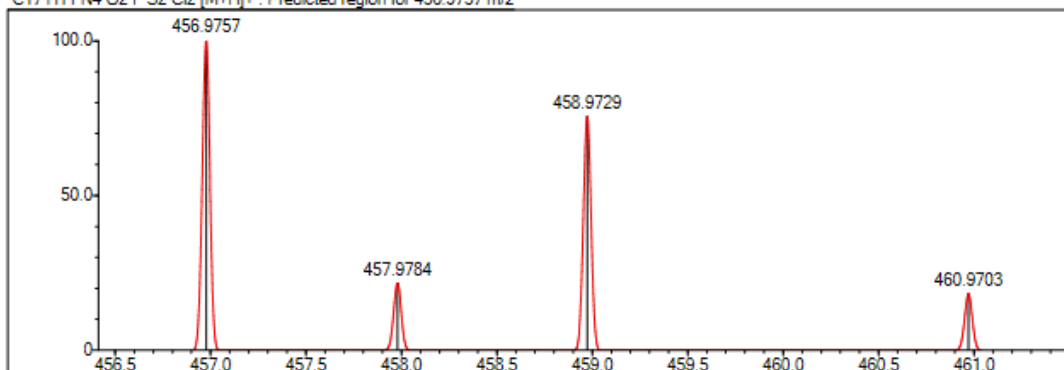
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 8.773 -> 9.320 Scan#: 1317 -> 1399



Measured region for 456.9770 m/z



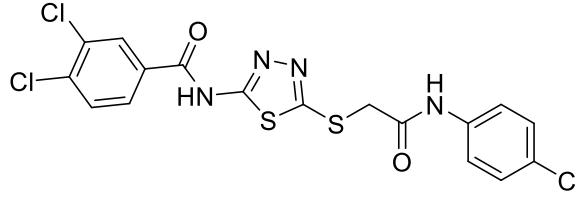
C17 H11 N4 O2 F S2 Cl2 [M+H]<sup>+</sup> : Predicted region for 456.9757 m/z



| Rank | Score | Formula (M)            | Ion                | Meas. m/z | Pred. m/z | Df. (mDa) | Df. (ppm) | Isc   | DBE  |
|------|-------|------------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|------|
| 2    | 79.23 | C17 H11 N4 O2 F S2 Cl2 | [M+H] <sup>+</sup> | 456.9770  | 456.9757  | 1.3       | 2.84      | 83.05 | 13.0 |

Şekil 5.15. HRMS Analizi (3c)

**3,4-Dikloro-N-(5-((2-((4-klorofenil)amino)-2-oksoetil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3d)**



**Şekil 5.16.** 3,4-Dikloro-N-(5-((2-((4-klorofenil)amino)-2-oksoetil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid  
(3d) molekülünün kimyasal yapısı

**DeneySEL E.N.:** 242.5-245.4 °C **Verim:** %87

**IR (ATR)  $\nu_{\text{maks}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3288 (N-H bağına ait band), 3068 (C-H bağına ait band), 1651 (C=O bağına ait band)

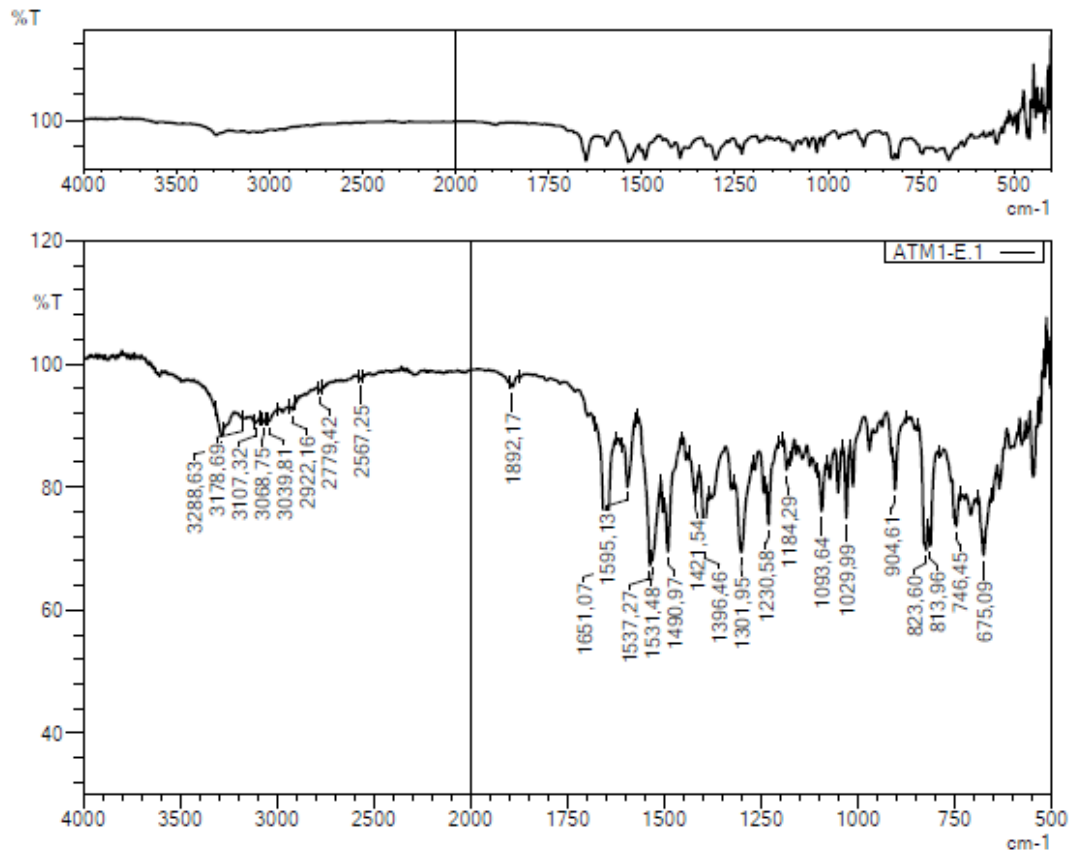
**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 4.21 (2H, s, -CH<sub>2</sub>), 7.38 (3H, d,  $J$ = 8.86 Hz, Ar-H), 7.61 (3H, d,  $J$ = 8.91 Hz, Ar-H), 7.80 (1H, d,  $J$ = 7.42 Hz, Ar-H), 8.04 (1H, dd,  $J_1$ =2.07 Hz,  $J_2$ = 8.42 Hz, Ar-H), 8.33 (1H, d,  $J$ = 2.04 Hz, Ar-H), 10.50 (1H, s, NH)

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 38.39, 121.15, 127.59, 129.01, 129.23, 130.74, 131.27, 131.80, 134.04, 135.53, 138.18, 157.79, 158.73, 166.28, 166.46

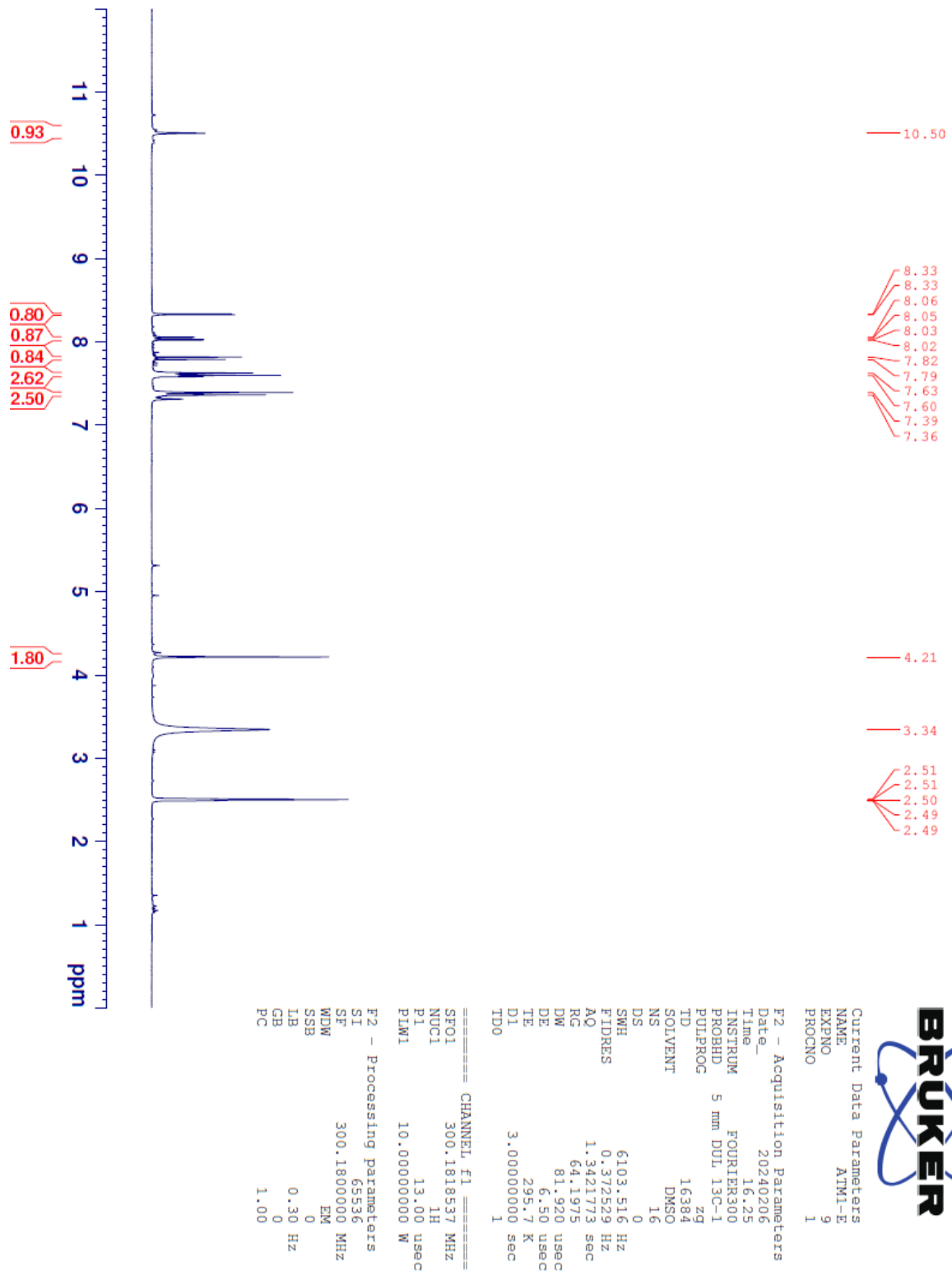
**HRMS (ESI) ( $m/z$ ) [ $M+H$ ]<sup>+</sup>:** C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub> için hesaplanan: 472.9462, bulunan: 472.9464

## DOPNALAB

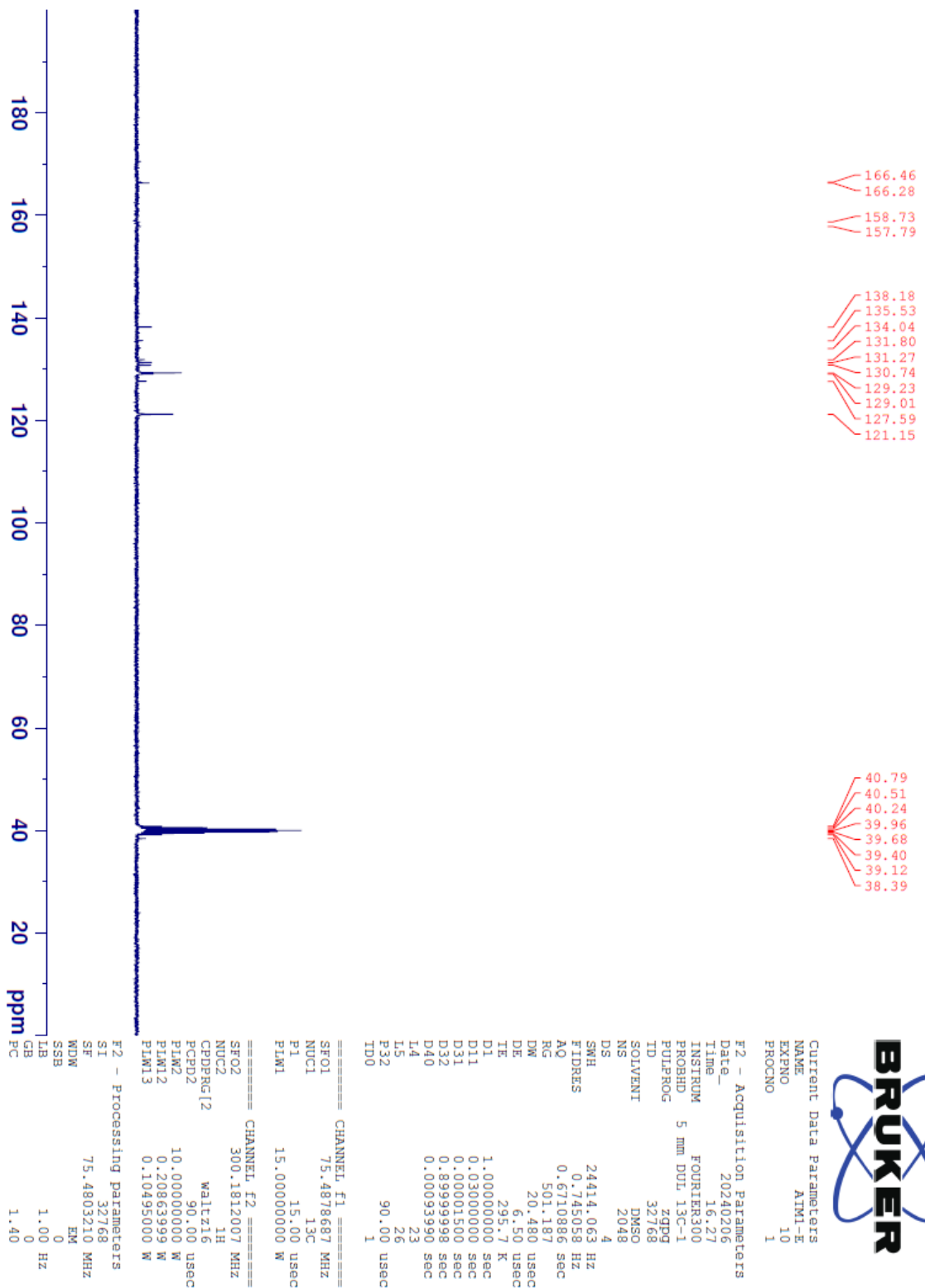
| Item               | Value                                                          |
|--------------------|----------------------------------------------------------------|
| Acquired Date&Time | 16.05.2024 10:28:05                                            |
| Acquired by        | System Administrator                                           |
| Filename           | C:\Users\dopnalab\Desktop\MASAUSTUARZU HIDIR\ATM\ATM1-E.1.ispd |
| Spectrum name      | ATM1-E.1                                                       |
| Sample name        | ATM1-E                                                         |
| Sample ID          |                                                                |
| Option             |                                                                |
| Comment            |                                                                |
| No. of Scans       | 30                                                             |
| Resolution         | 4 [cm-1]                                                       |
| Apodization        | Happ-Genzel                                                    |



Şekil 5.17. IR Analizi (3d)



Şekil 5.18.  $^1\text{H}$  NMR Analizi (3d)



Şekil 5.19.  $^{13}\text{C}$  NMR Analizi (3d)

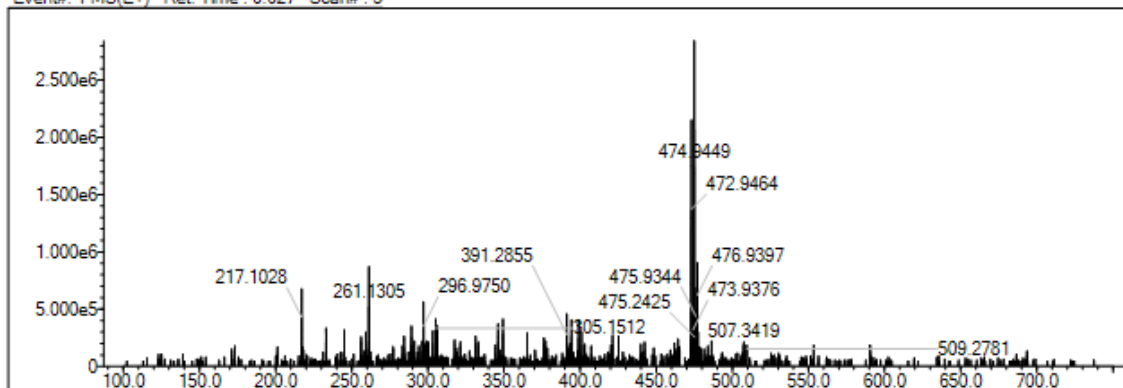
| Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Use Adduct |
|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------------|
| H    | 1    | 0   | 35  | O    | 2    | 0   | 2   | S    | 2    | 0   | 2   | Ru   | 2    | 0   | 0   | H          |
| C    | 4    | 0   | 35  | F    | 1    | 0   | 0   | Cl   | 1    | 0   | 3   | Pd   | 2    | 0   | 0   |            |
| N    | 3    | 0   | 7   | P    | 3    | 0   | 0   | Br   | 1    | 0   | 0   | I    | 3    | 0   | 0   |            |

Error Margin (ppm): 5  
 HC Ratio: unlimited  
 Max Isotopes: 3  
 MSn Iso RI (%): 10.00

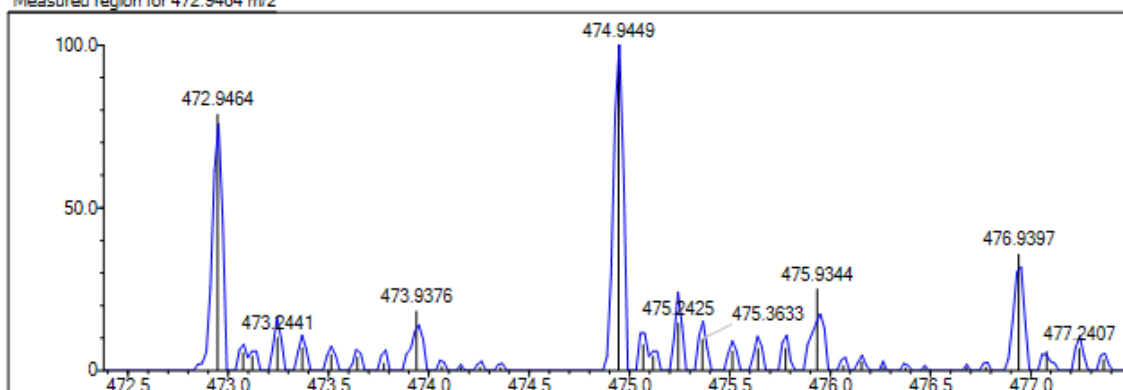
DBE Range: 0.0 - 30.0  
 Apply N Rule: no  
 Isotope RI (%): 1.00  
 MSn Logic Mode: AND

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

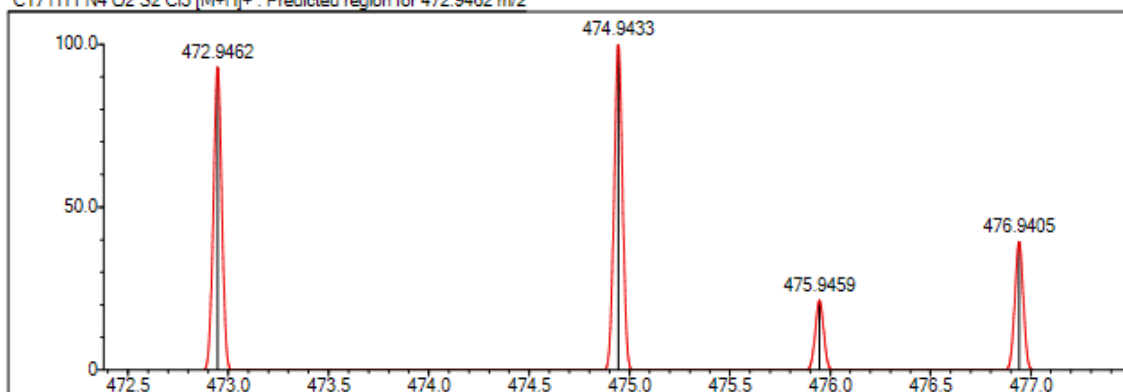
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 0.027 Scan#: 5



Measured region for 472.9464 m/z



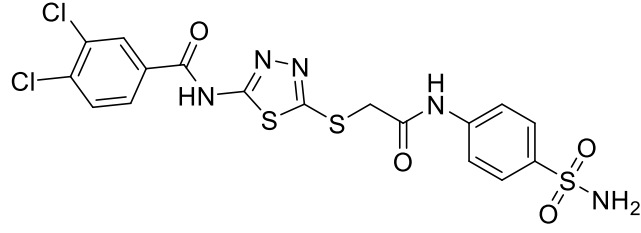
C17 H11 N4 O2 S2 Cl3 [M+H]<sup>+</sup> : Predicted region for 472.9462 m/z



| Rank | Score | Formula (M)          | Ion                | Meas. m/z | Pred. m/z | Df. (mDa) | Df. (ppm) | Iso   | DBE  |
|------|-------|----------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|------|
| 1    | 42.69 | C17 H11 N4 O2 S2 Cl3 | [M+H] <sup>+</sup> | 472.9464  | 472.9462  | 0.2       | 0.42      | 42.69 | 13.0 |

Şekil 5.20. HRMS Analizi (3d)

**5.1.5. 3,4-Dikloro-N-(5-((2-okso-2-((4-sülfamoilfenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3e)**



**Şekil 5.21.** 3,4-Dikloro-N-(5-((2-okso-2-((4-sülfamoilfenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3e) molekülünün kimyasal yapısı

**DeneySEL E.N.:** 245.6-248.1 °C **Verim:** %83

**IR (ATR)  $\nu_{\text{maks}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3338 (N-H bağına ait band), 3244.2 (C-H bağına ait band), 1655 (C=O bağına ait band)

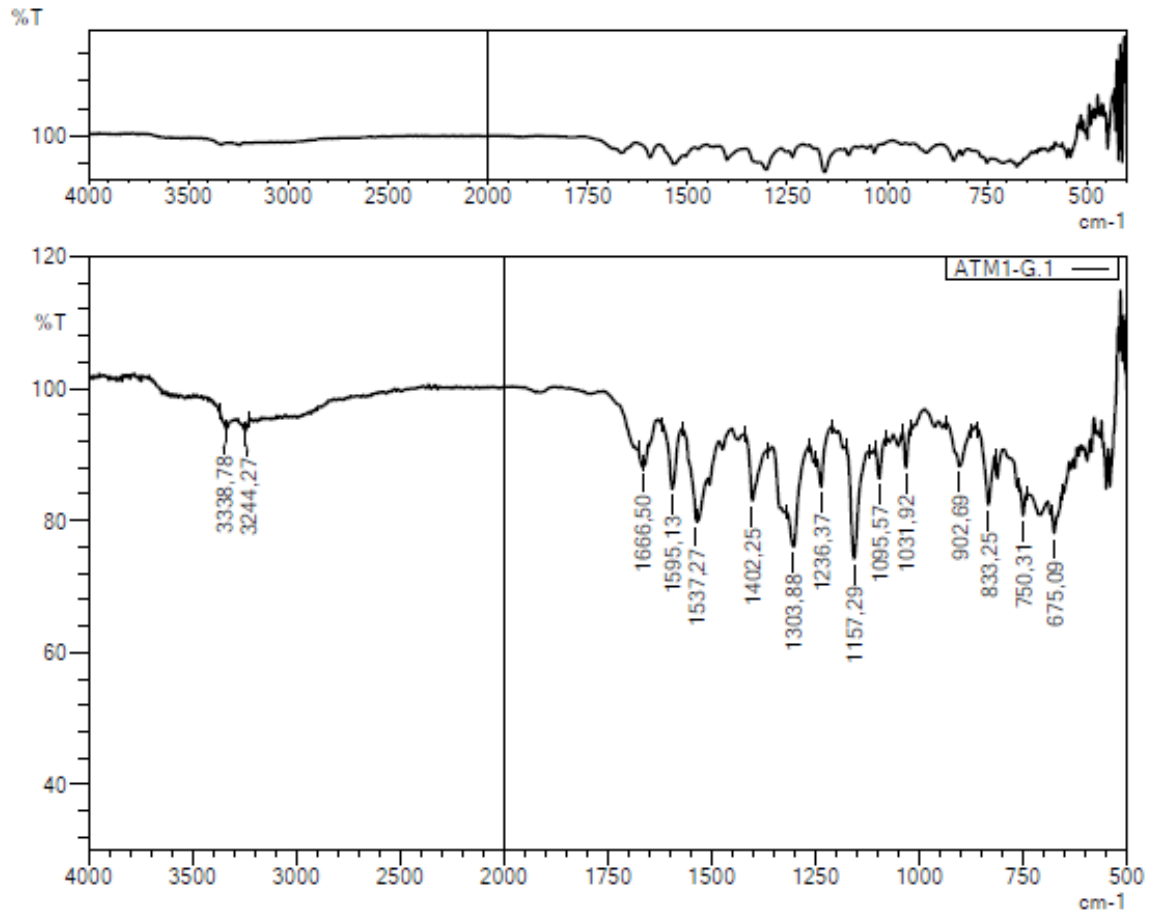
**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 4.25 (2H, s,  $-\text{CH}_2$ ), 7.28-7.32 (3H, m, Ar-H), 7.72-7.80 (5H, m, Ar-H), 8.06 (1H, dd,  $J_1=2.06$  Hz,  $J_2=8.43$  Hz, Ar-H), 10.71 (1H, s, NH)

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 38.43, 119.19, 127.27, 129.00, 130.72, 131.26, 131.80, 134.07, 135.52, 139.13, 142.10, 164.73, 166.75, 166.92, 170.48

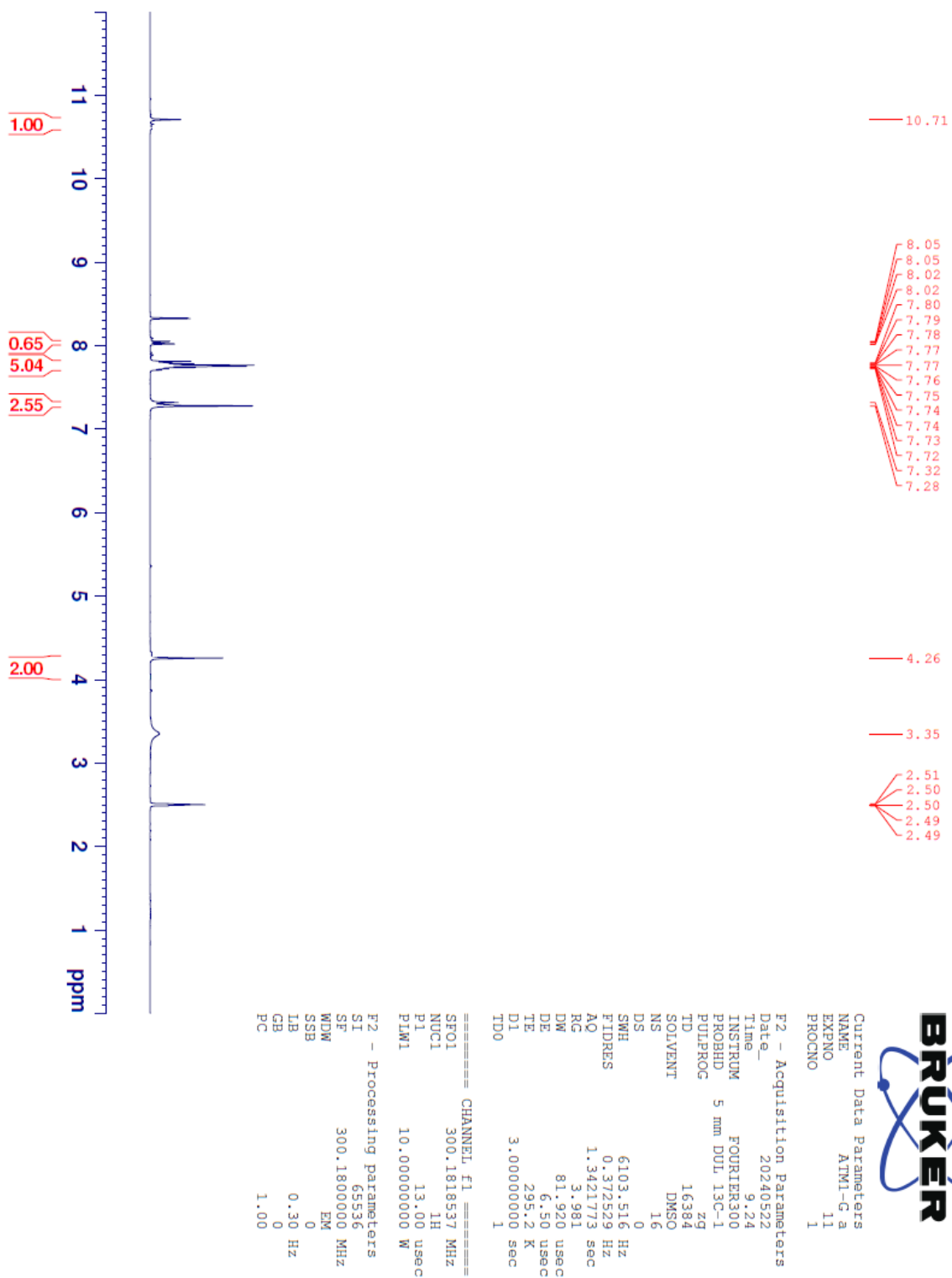
**HRMS (ESI) ( $m/z$ )  $[\text{M}+\text{H}]^+$ :**  $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_3\text{Cl}_2$  için hesaplanan: 517.9576, bulunan: 517.9579

## DOPNALAB

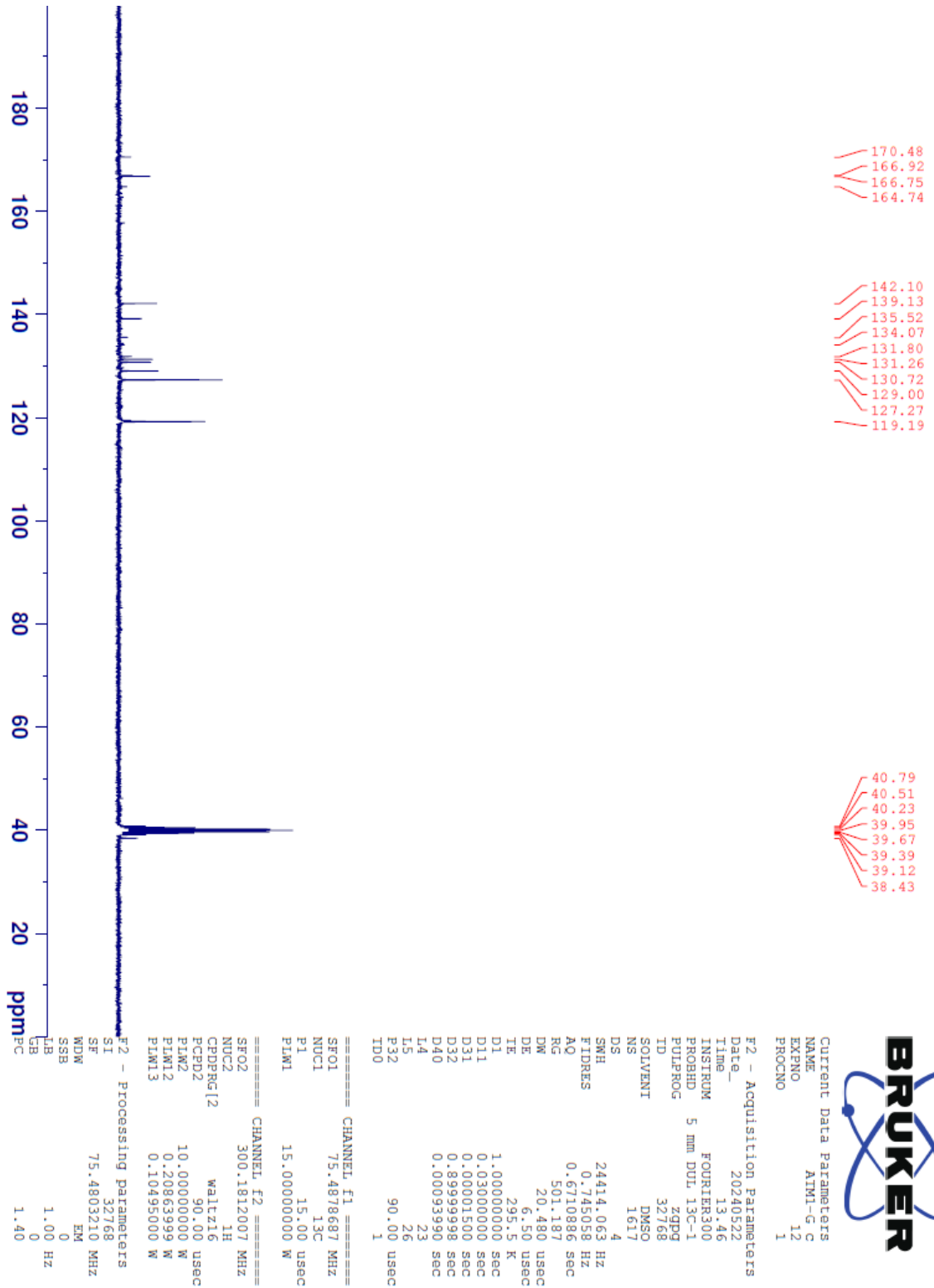
| Item               | Value                                                         |
|--------------------|---------------------------------------------------------------|
| Acquired Date&Time | 16.05.2024 10:03:11                                           |
| Acquired by        | System Administrator                                          |
| Filename           | C:\Users\dopnalab\Desktop\MASAUSTUARZU HIDIR\ATMATM1-G.1.ispd |
| Spectrum name      | ATM1-G.1                                                      |
| Sample name        | ATM1-G                                                        |
| Sample ID          |                                                               |
| Option             |                                                               |
| Comment            |                                                               |
| No. of Scans       | 30                                                            |
| Resolution         | 4 (cm-1)                                                      |
| Apodization        | Happ-Genzel                                                   |



### 5.22. IR Analizi (3e)



Şekil 5.23.  $^1\text{H}$  NMR Analizi (3e)



Şekil 5.24.  $^{13}\text{C}$  NMR Analizi (3e)

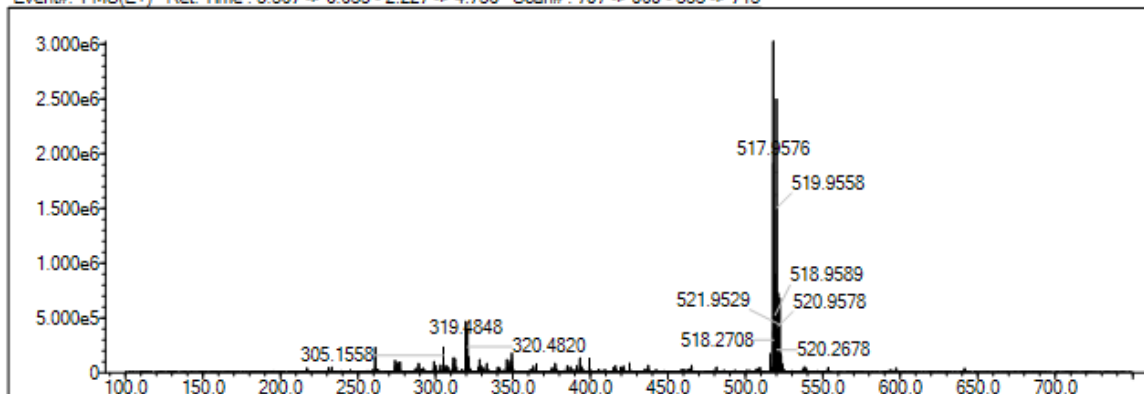
| Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Use Adduct |
|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------------|
| H    | 1    | 0   | 35  | O    | 2    | 0   | 4   | S    | 2    | 0   | 3   | Ru   | 2    | 0   | 0   | H          |
| C    | 4    | 0   | 35  | F    | 1    | 0   | 0   | Cl   | 1    | 0   | 2   | Pd   | 2    | 0   | 0   |            |
| N    | 3    | 0   | 7   | P    | 3    | 0   | 0   | Br   | 1    | 0   | 0   | I    | 3    | 0   | 0   |            |

Error Margin (ppm): 5  
 HC Ratio: unlimited  
 Max Isotopes: 3  
 MSn Iso RI (%): 10.00

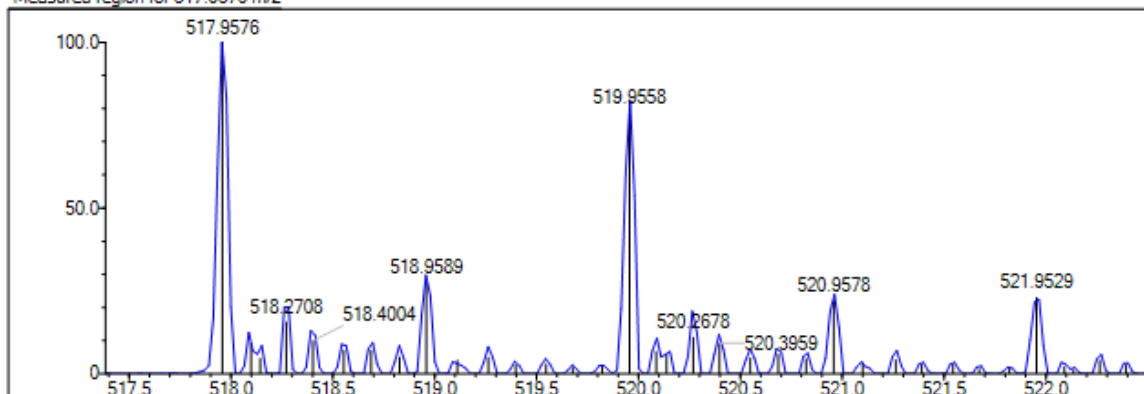
DBE Range: 0.0 - 30.0  
 Apply N Rule: no  
 Isotope RI (%): 1.00  
 MSn Logic Mode: AND

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

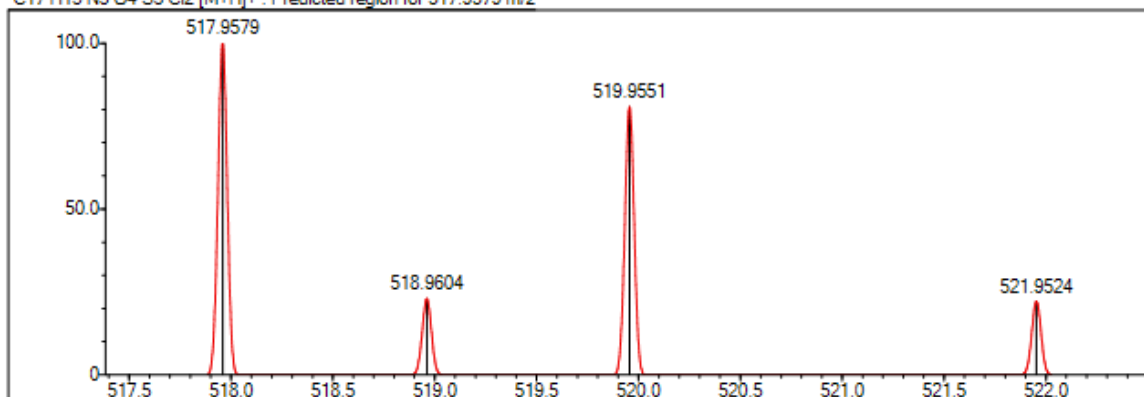
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 5.307 -> 6.053 - 2.227 -> 4.756 Scan#: 797 -> 909 - 335 -> 715



Measured region for 517.9576 m/z



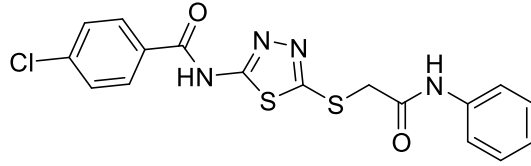
C17 H13 N5 O4 S3 Cl2 [M+H]<sup>+</sup> : Predicted region for 517.9579 m/z



| Rank | Score | Formula (M)          | Ion                | Meas. m/z | Pred. m/z | Df. (mDa) | Df. (ppm) | Iso   | DBE  |
|------|-------|----------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|------|
| 3    | 91.46 | C17 H13 N5 O4 S3 Cl2 | [M+H] <sup>+</sup> | 517.9576  | 517.9579  | -0.3      | -0.58     | 91.46 | 13.0 |

Şekil 5.25. HRMS Analizi (3e)

**4-Kloro-N-(5-((2-okso-2-(fenilamino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3f)**



**Şekil 5.26.** 4-Kloro-N-(5-((2-okso-2-(fenilamino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3f)  
molekülünün kimyasal yapısı

**Deneyisel E.N.:** 253.2-255.3 °C **Verim:** %77

**IR (ATR)  $\nu_{\text{maks}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3296 (N-H bağına ait band), 3095 (C-H bağına ait band), 1660 (C=O bağına ait band)

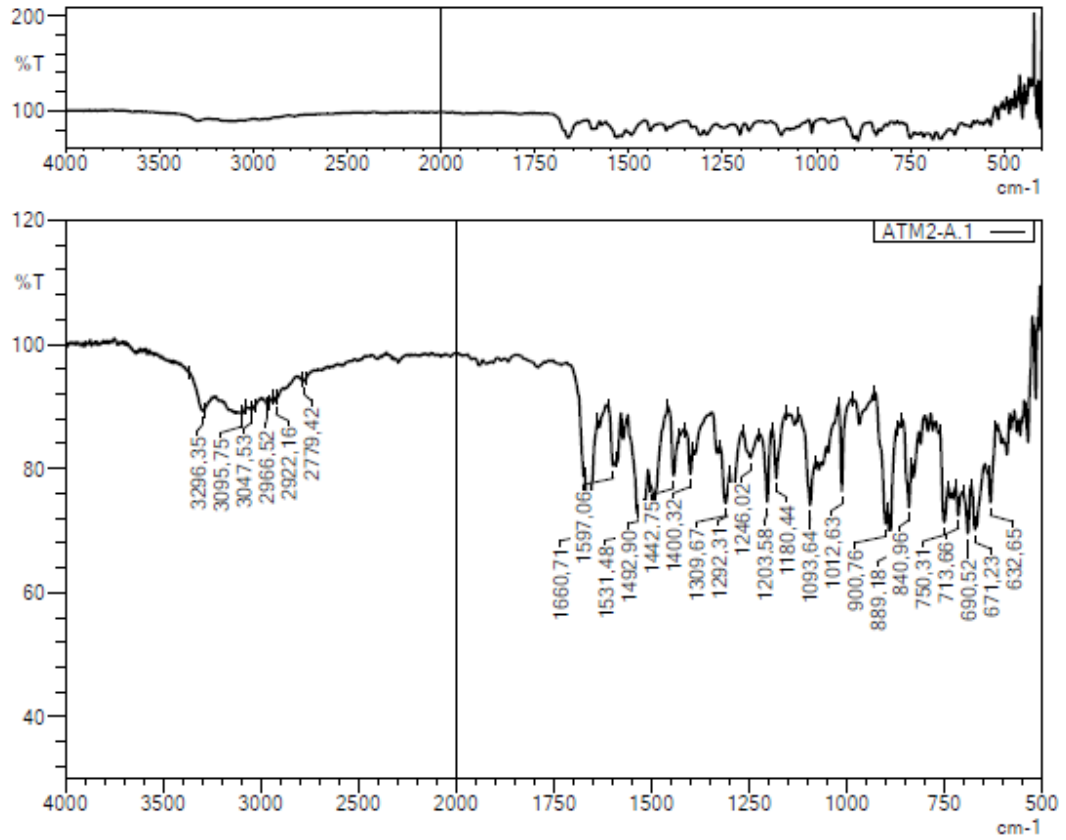
**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 4.25 (2H, s,  $-\text{CH}_2$ ), 7.04-7.09 (1H, m, Ar-H), 7.32 (2H, t,  $J= 7.94$  Hz, Ar-H), 7.57 (2H, d,  $J= 8.57$  Hz, Ar-H), 7.64 (2H, d,  $J=8.64$  Hz, Ar-H), 7.92-8.12 (2H, m, Ar-H), 10.36 (1H, s, NH), 13.27 (1H, s, NH)

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 38.51, 119.61, 124.07, 129.25, 130.13, 130.82, 131.61, 138.42, 139.20, 159.15, 160.48, 165.93, 166.91

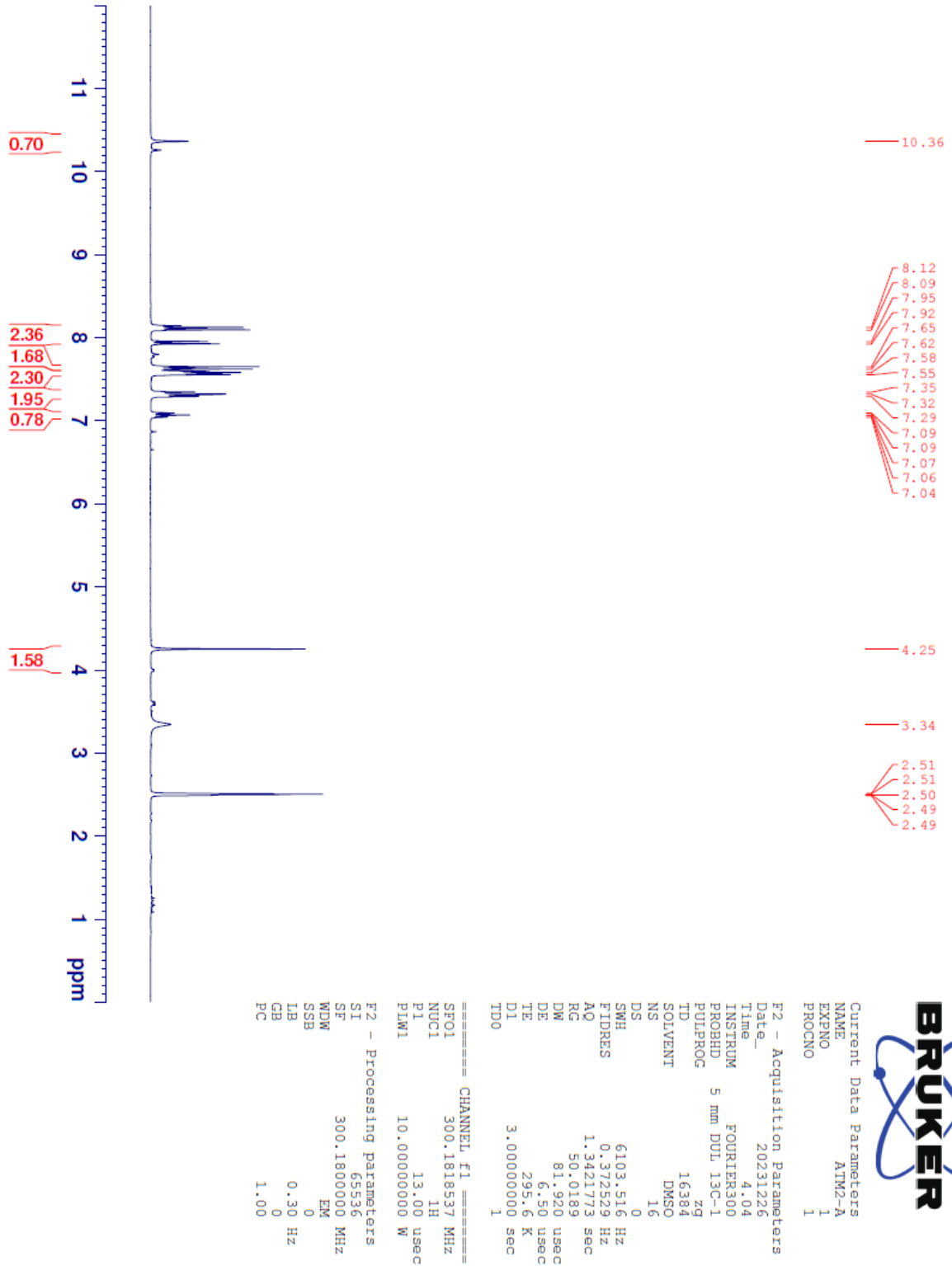
**HRMS (ESI) ( $m/z$ )  $[\text{M}+\text{H}]^+$ :**  $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_2\text{Cl}$  için hesaplanan: 405.0241, bulunan: 405.0240

## DOPNALAB

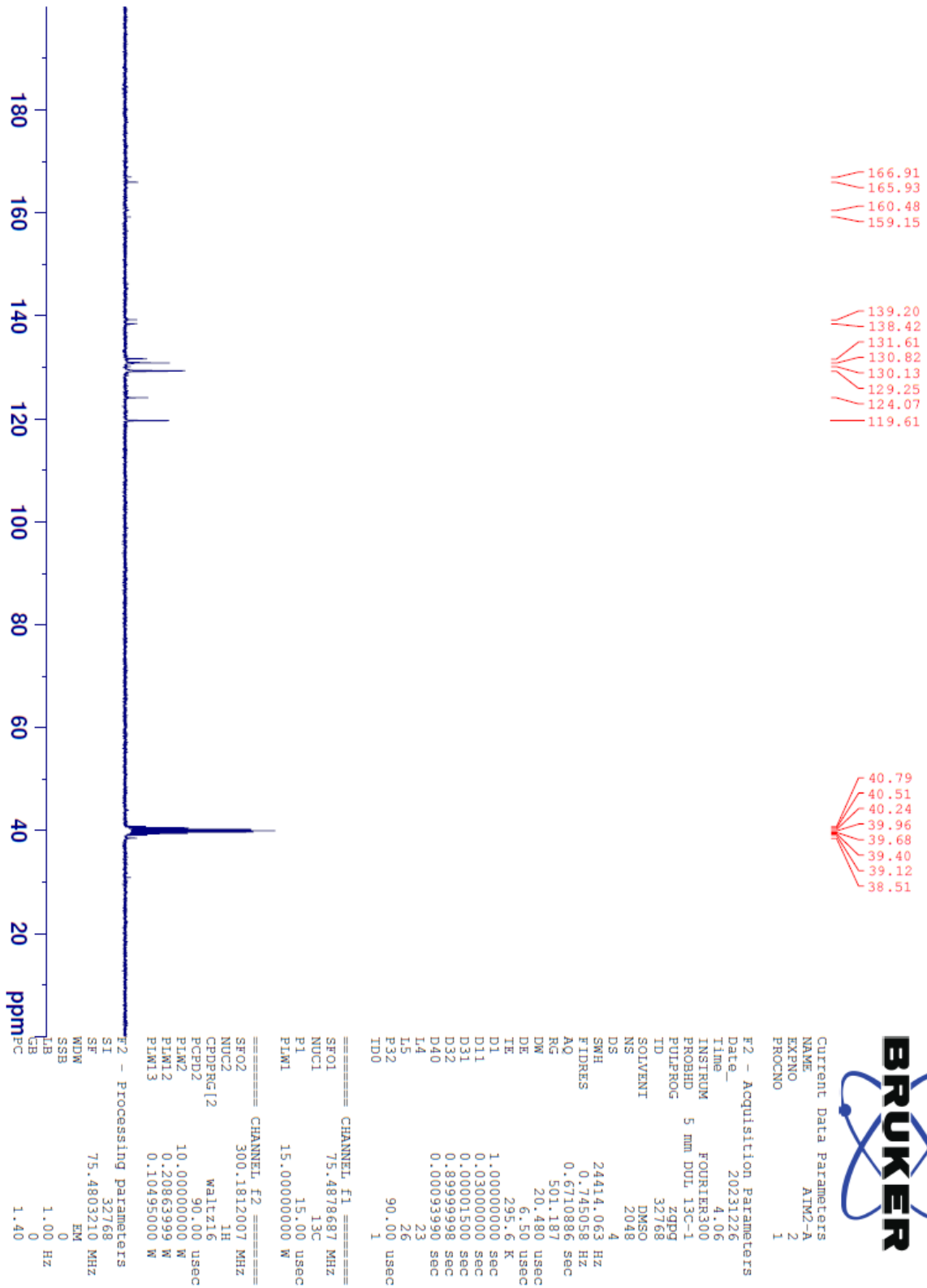
| Item               | Value                                                          |
|--------------------|----------------------------------------------------------------|
| Acquired Date&Time | 16.05.2024 10:21:38                                            |
| Acquired by        | System Administrator                                           |
| Filename           | C:\Users\dopnalab\Desktop\MASAUSTUARZU HIDIR\ATM\ATM2-A.1.ispd |
| Spectrum name      | ATM2-A.1                                                       |
| Sample name        | ATM2-A                                                         |
| Sample ID          |                                                                |
| Option             |                                                                |
| Comment            |                                                                |
| No. of Scans       | 30                                                             |
| Resolution         | 4 [cm-1]                                                       |
| Apodization        | Happ-Genzel                                                    |



Şekil 5.27. IR Analizi (3f)



Şekil 5.28.  $^1\text{H}$  NMR Analizi (3f)



Şekil 5.29.  $^{13}\text{C}$  NMR Analizi (3f)

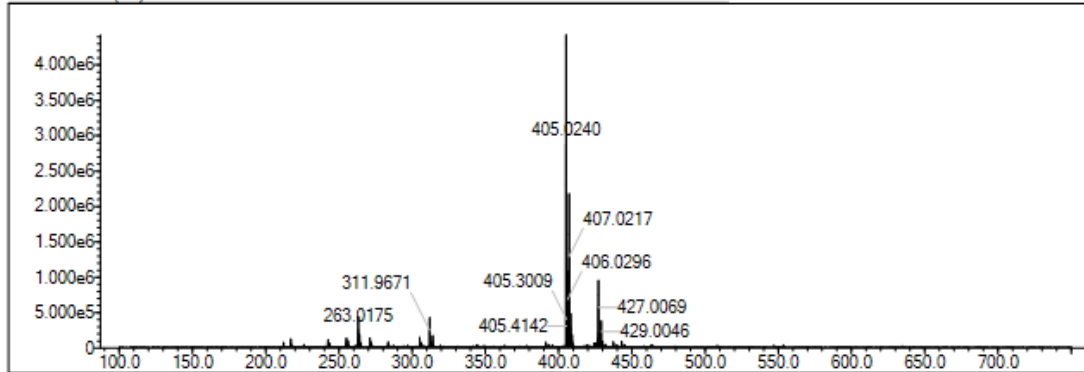
| Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Use Adduct |
|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------------|
| H    | 1    | 0   | 35  | O    | 2    | 0   | 4   | S    | 2    | 0   | 3   | Ru   | 2    | 0   | 0   | H          |
| C    | 4    | 0   | 35  | F    | 1    | 0   | 0   | Cl   | 1    | 0   | 2   | Pd   | 2    | 0   | 0   |            |
| N    | 3    | 0   | 7   | P    | 3    | 0   | 0   | Br   | 1    | 0   | 0   | I    | 3    | 0   | 0   |            |

Error Margin (ppm): 5  
 HC Ratio: unlimited  
 Max Isotopes: 3  
 MSn Iso RI (%): 10.00

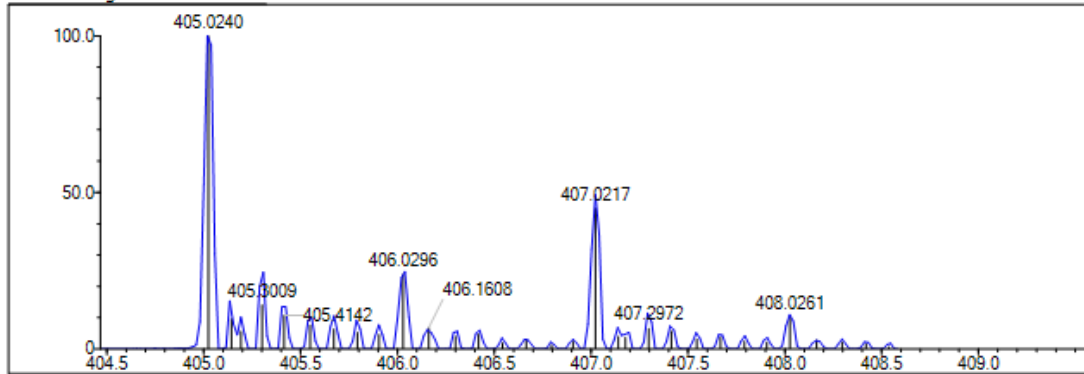
DBE Range: 0.0 - 30.0  
 Apply N Rule: no  
 Isotope RI (%): 1.00  
 MSn Logic Mode: AND

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

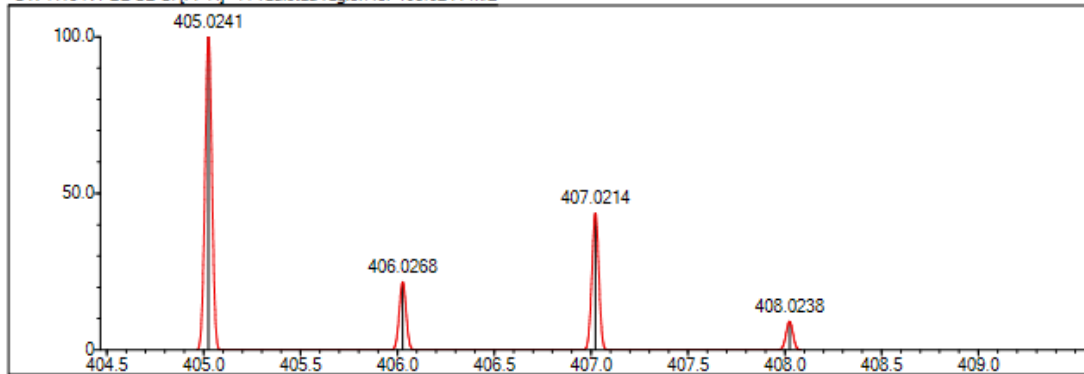
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 6.627 -> 7.067 - 4.160 -> 4.604 Scan#: 995 -> 1061 - 625 -> 691



Measured region for 405.0240 m/z



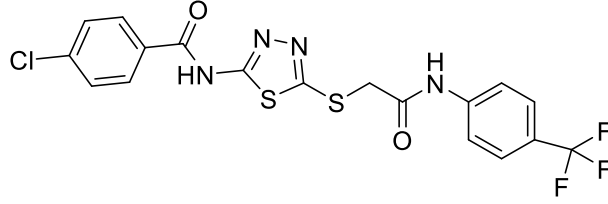
C17 H13 N4 O2 S2 Cl [M+H]<sup>+</sup> : Predicted region for 405.0241 m/z



| Rank | Score | Formula (M)         | Ion                | Meas. m/z | Pred. m/z | Df. (mDa) | Df. (ppm) | Iso   | DBE  |
|------|-------|---------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|------|
| 2    | 89.34 | C17 H13 N4 O2 S2 Cl | [M+H] <sup>+</sup> | 405.0240  | 405.0241  | -0.1      | -0.25     | 89.34 | 13.0 |

Şekil 5.30. HRMS Analizi (3f)

**5.1.6. 4-Kloro-N-(5-((2-okso-2-((4-(triflorometil)fenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3g)**



**Şekil 5.31.** 4-Kloro-N-(5-((2-okso-2-(fenilamino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3g)

*molekölünün kimyasal yapısı*

**Deneyisel E.N.:** 257.7-259.9 °C **Verim:** %90

**IR (ATR)  $\nu_{\text{maks}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3307 (N-H bağına ait band), 3053 (C-H bağına ait band), 1656 (C=O bağına ait band)

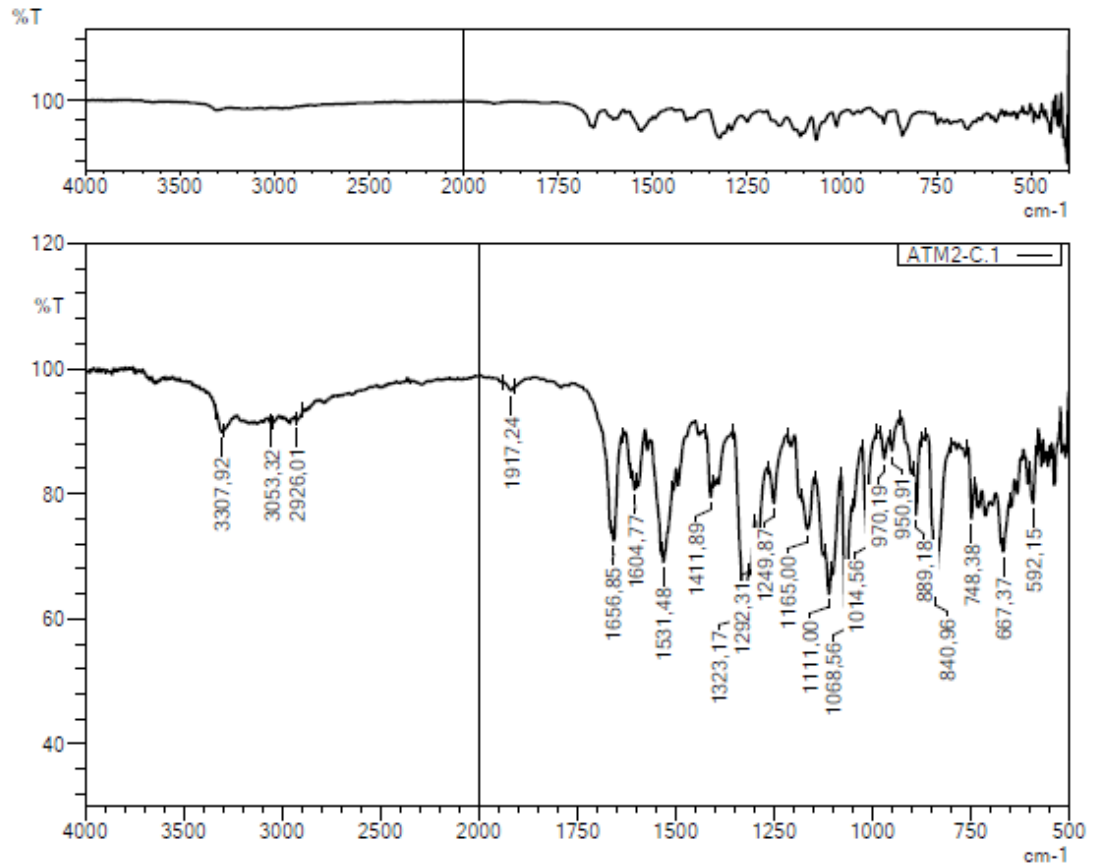
**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 4.30 (2H, s, -CH<sub>2</sub>), 7.55-7.65 (2H, m, Ar-H), 7.69 (2H, d,  $J$ = 8.71 Hz, Ar-H), 7.80 (2H, d,  $J$ = 8.50 Hz, Ar-H), 7.92-8.12 (2H, m, Ar-H), 7.92-8.12 (2H, m, Ar-H), 10.76 (1H, s, NH), 13.23 (1H, s, NH)

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 38.48, 112.15, 119.53, 124.40, 126.64, 129.25, 130.82, 131.60, 138.44, 142.74, 158.97, 164.87, 166.69, 166.92

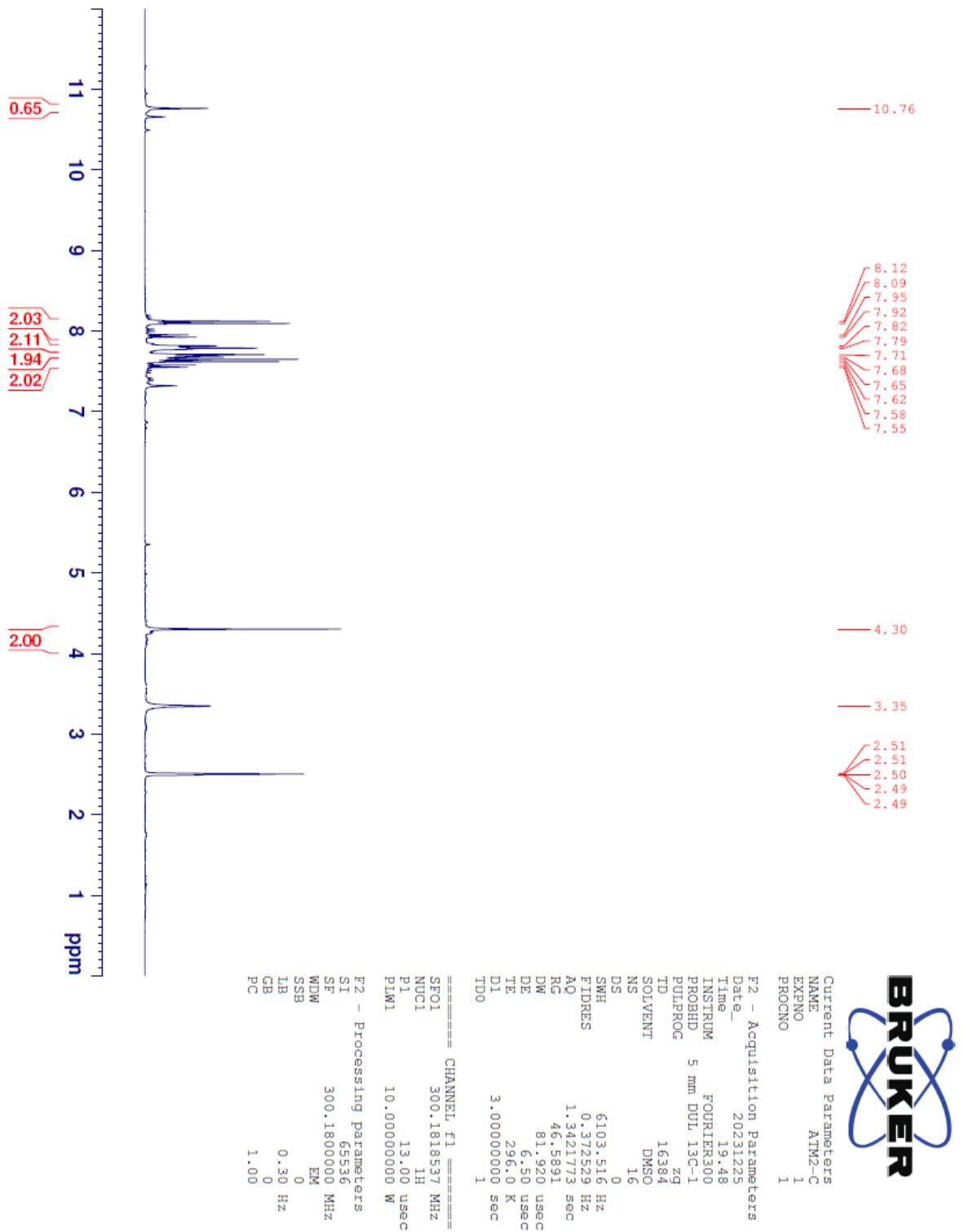
**HRMS (ESI) ( $m/z$ ) [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ :** C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>F<sub>3</sub>S<sub>2</sub>Cl için hesaplanan: 473.0115, bulunan: 473.0124

## DOPNALAB

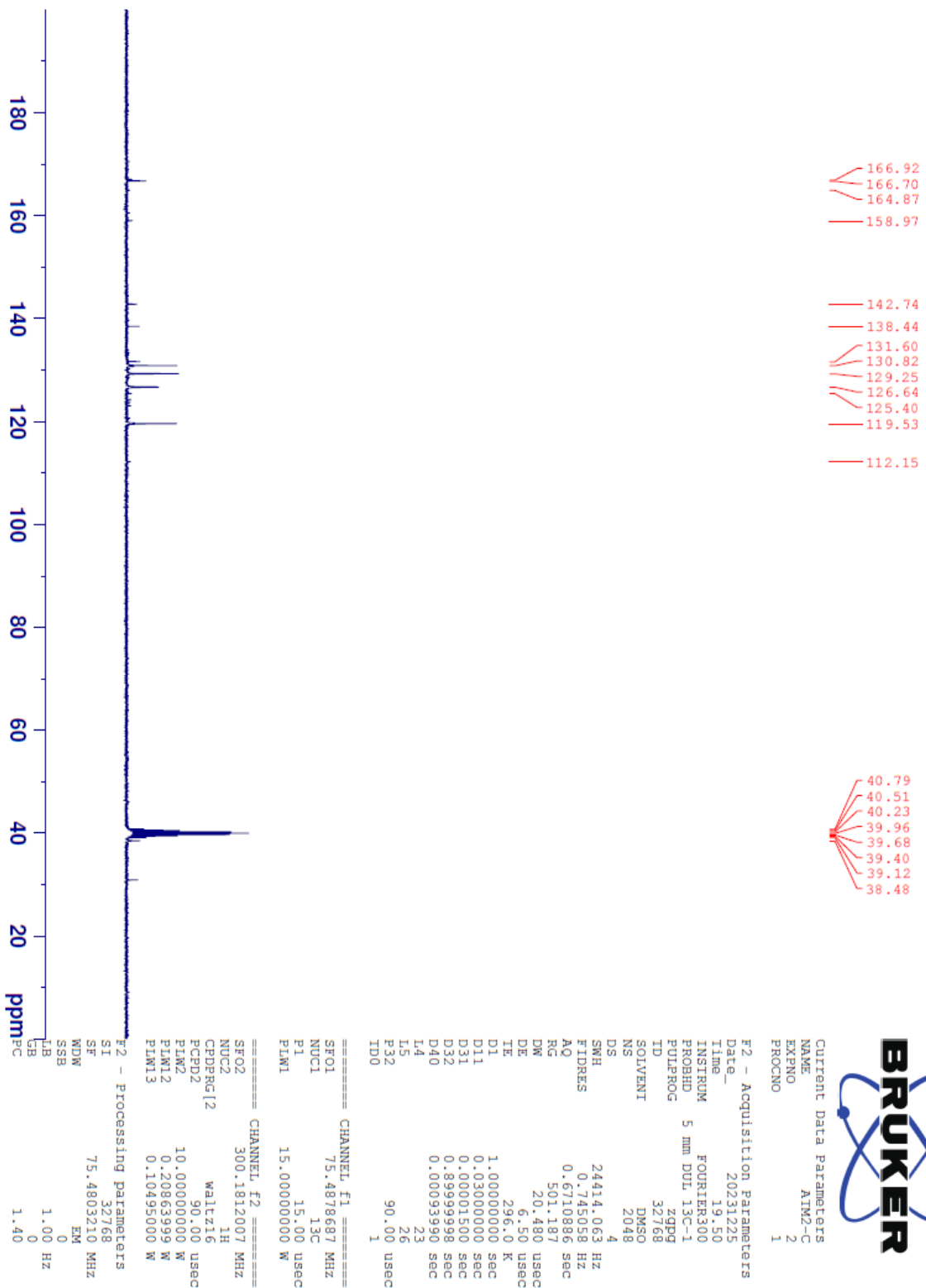
| Item               | Value                                                          |
|--------------------|----------------------------------------------------------------|
| Acquired Date&Time | 16.05.2024 10:48:49                                            |
| Acquired by        | System Administrator                                           |
| Filename           | C:\Users\dopnalab\Desktop\MASAUSTUARZU HIDIRIATM\ATM2-C.1.ispd |
| Spectrum name      | ATM2-C.1                                                       |
| Sample name        | ATM2-C                                                         |
| Sample ID          |                                                                |
| Option             |                                                                |
| Comment            |                                                                |
| No. of Scans       | 30                                                             |
| Resolution         | 4 [cm-1]                                                       |
| Apodization        | Happ-Genzel                                                    |



Şekil 5.32. IR Analizi (3g)



Şekil 5.33.  $^1\text{H}$  NMR Analizi (3g)



Şekil 5.34.  $^{13}\text{C}$  NMR Analizi (3g)

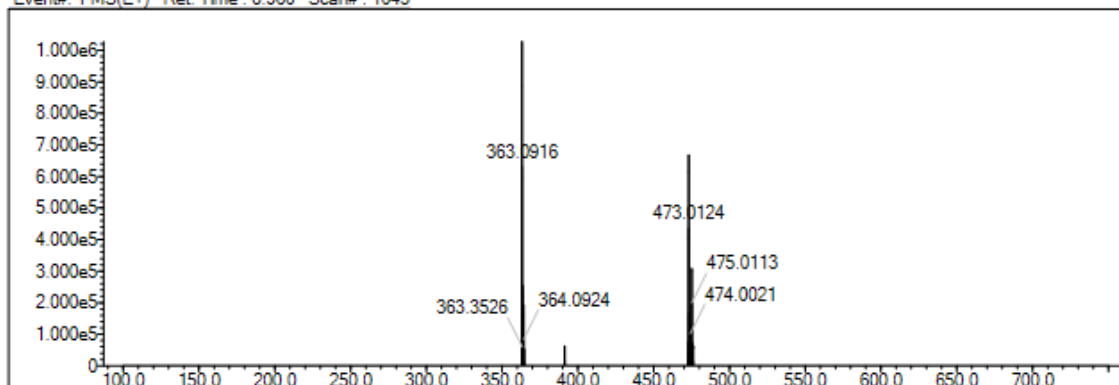
| Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Use Adduct |
|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------------|
| H    | 1    | 8   | 33  | O    | 2    | 0   | 2   | S    | 2    | 0   | 3   | Ru   | 2    | 0   | 0   | H          |
| C    | 4    | 4   | 32  | F    | 1    | 3   | 3   | Cl   | 1    | 1   | 1   | Pd   | 2    | 0   | 0   |            |
| N    | 3    | 0   | 6   | P    | 3    | 0   | 0   | Br   | 1    | 0   | 0   | I    | 3    | 0   | 0   |            |
|      |      |     |     |      |      |     |     |      |      |     |     |      |      |     |     |            |

Error Margin (ppm): 5  
 HC Ratio: unlimited  
 Max Isotopes: 3  
 MSn Iso RI (%): 10.00

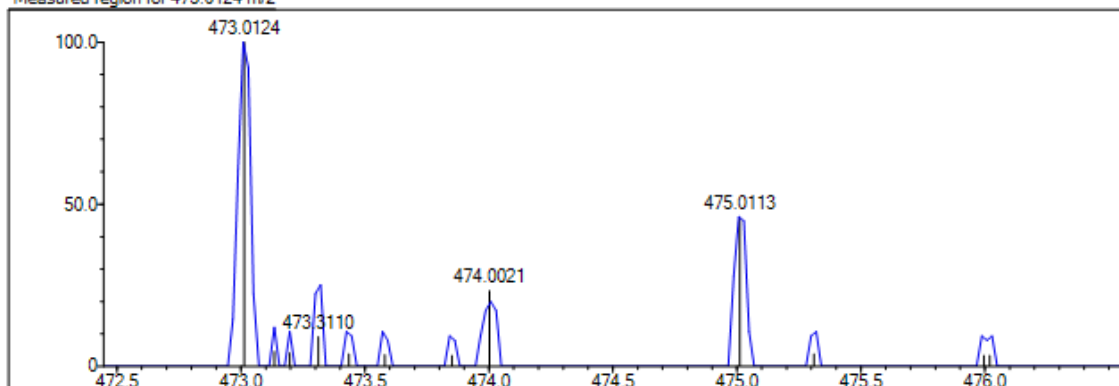
DBE Range: 0.0 - 20.0  
 Apply N Rule: no  
 Isotope RI (%): 1.00  
 MSn Logic Mode: AND

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

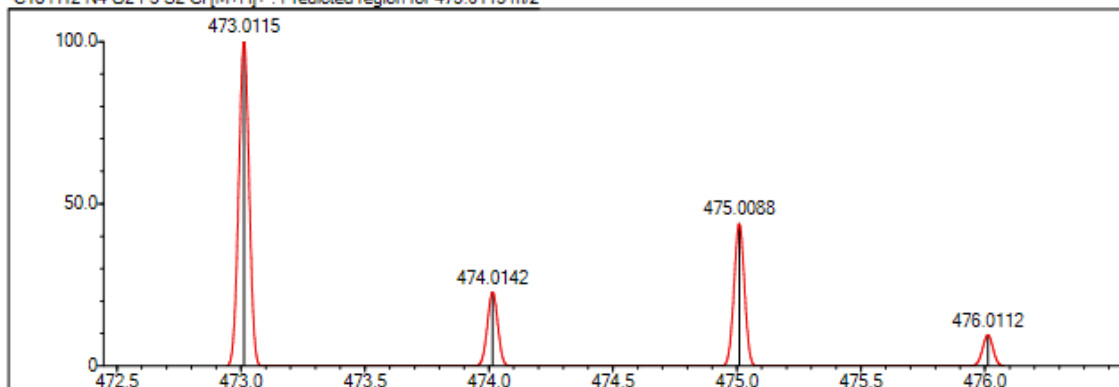
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time: 6.960 Scan#: 1045



Measured region for 473.0124 m/z



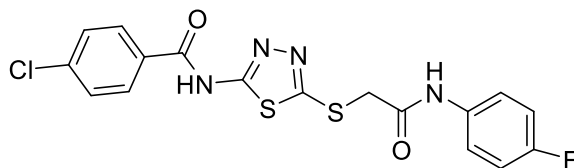
C18 H12 N4 O2 F3 S2 Cl [M+H]<sup>+</sup>: Predicted region for 473.0115 m/z



| Rank | Score | Formula (M)            | Ion                | Meas. m/z | Pred. m/z | Df. (mDa) | Df. (ppm) | Iso   | DBE  |
|------|-------|------------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|------|
| 1    | 70.22 | C18 H12 N4 O2 F3 S2 Cl | [M+H] <sup>+</sup> | 473.0124  | 473.0115  | 0.9       | 1.90      | 71.83 | 13.0 |

Şekil 5.35. HRMS Analizi (3g)

**5.1.7. 4-Kloro-N-(5-((2-((4-florofenil)amino)-2-oksoetil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3h)**



**Şekil 5.36.** 4-Kloro-N-(5-((2-((4-florofenil)amino)-2-oksoetil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3h)  
molekülünün kimyasal yapısı

**Deneyisel E.N.:** 245.1-247.5 °C **Verim:** %83

**IR (ATR)  $\nu_{\text{maks}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3294 (N-H bağına ait band), 3045 (C-H bağına ait band), 1658 (C=O bağına ait band)

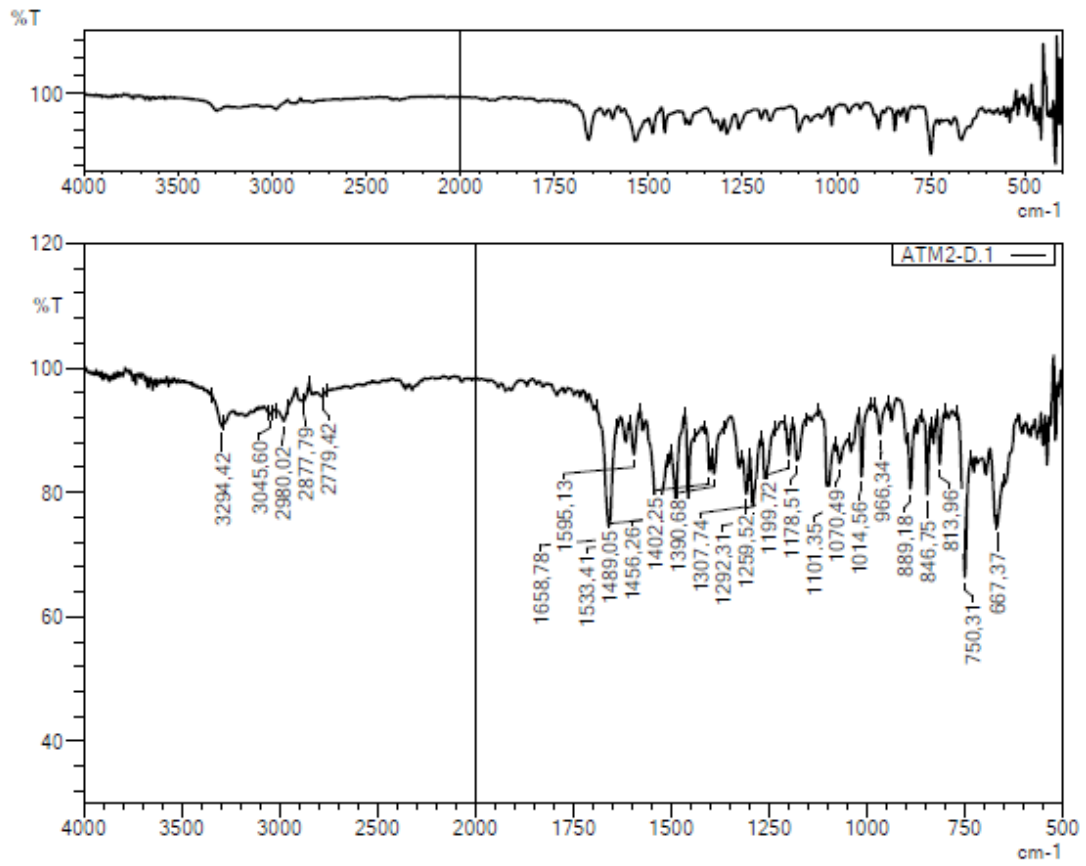
**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 4.31 (2H, s,  $-\text{CH}_2$ ), 7.15-7.18 (2H, m, Ar-H), 7.24-7.33 (1H, m, Ar-H), 7.64 (2H, d,  $J = 8.66$  Hz, Ar-H), 8.10-8.13 (2H, d,  $J = 8.67$  Hz, Ar-H), 10.16 (1H, s, NH), 13.23 (1H, s, NH)

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 38.06, 116.14, 120.56, 124.17, 124.94, 126.01, 129.25, 130.82, 138.40, 155.46, 159.02, 164.91, 166.64

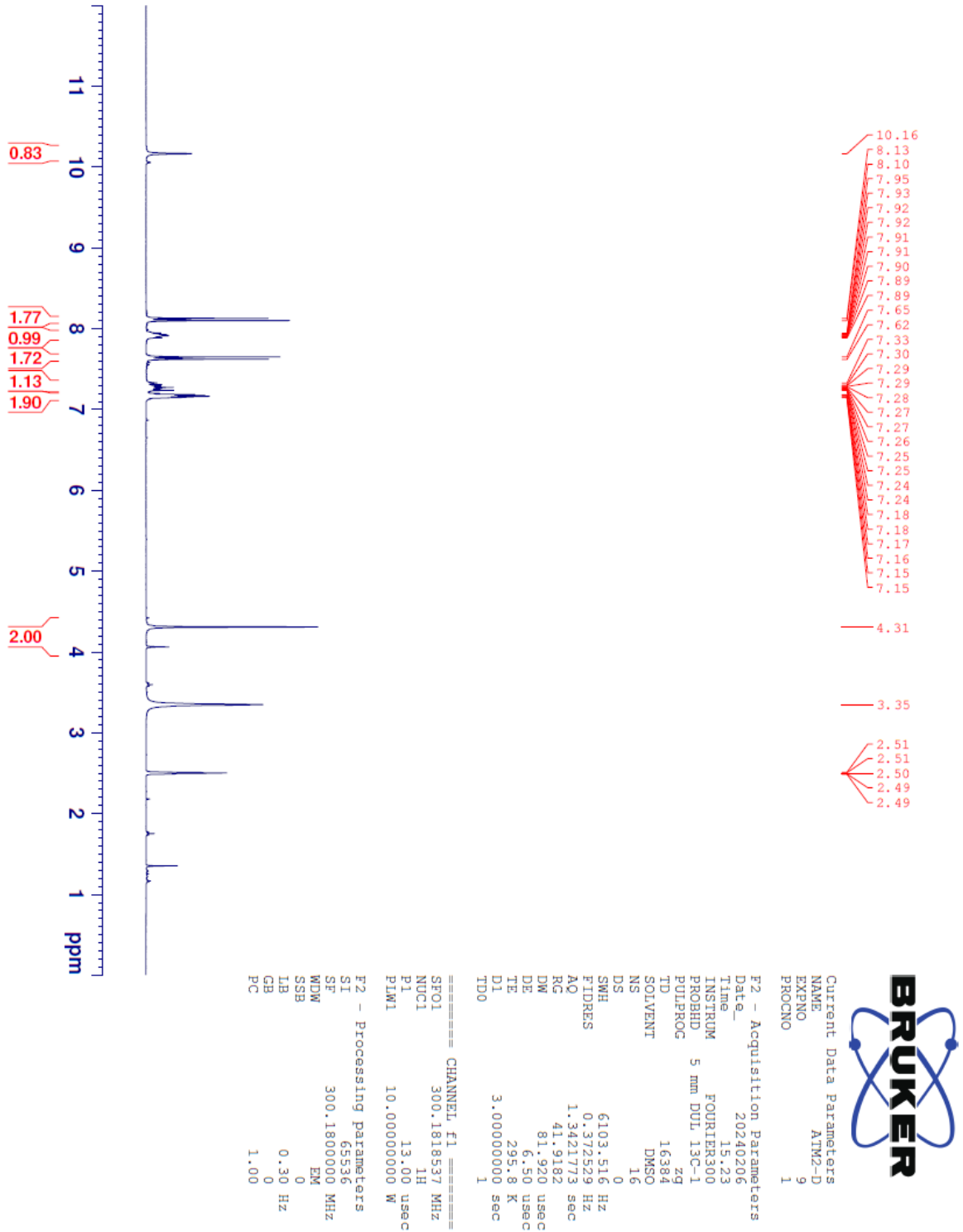
**HRMS (ESI) ( $m/z$ )  $[\text{M}+\text{H}]^+$ :**  $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2\text{FS}_2\text{Cl}$  için hesaplanan: 423.0147, bulunan: 423.0150

## DOPNALAB

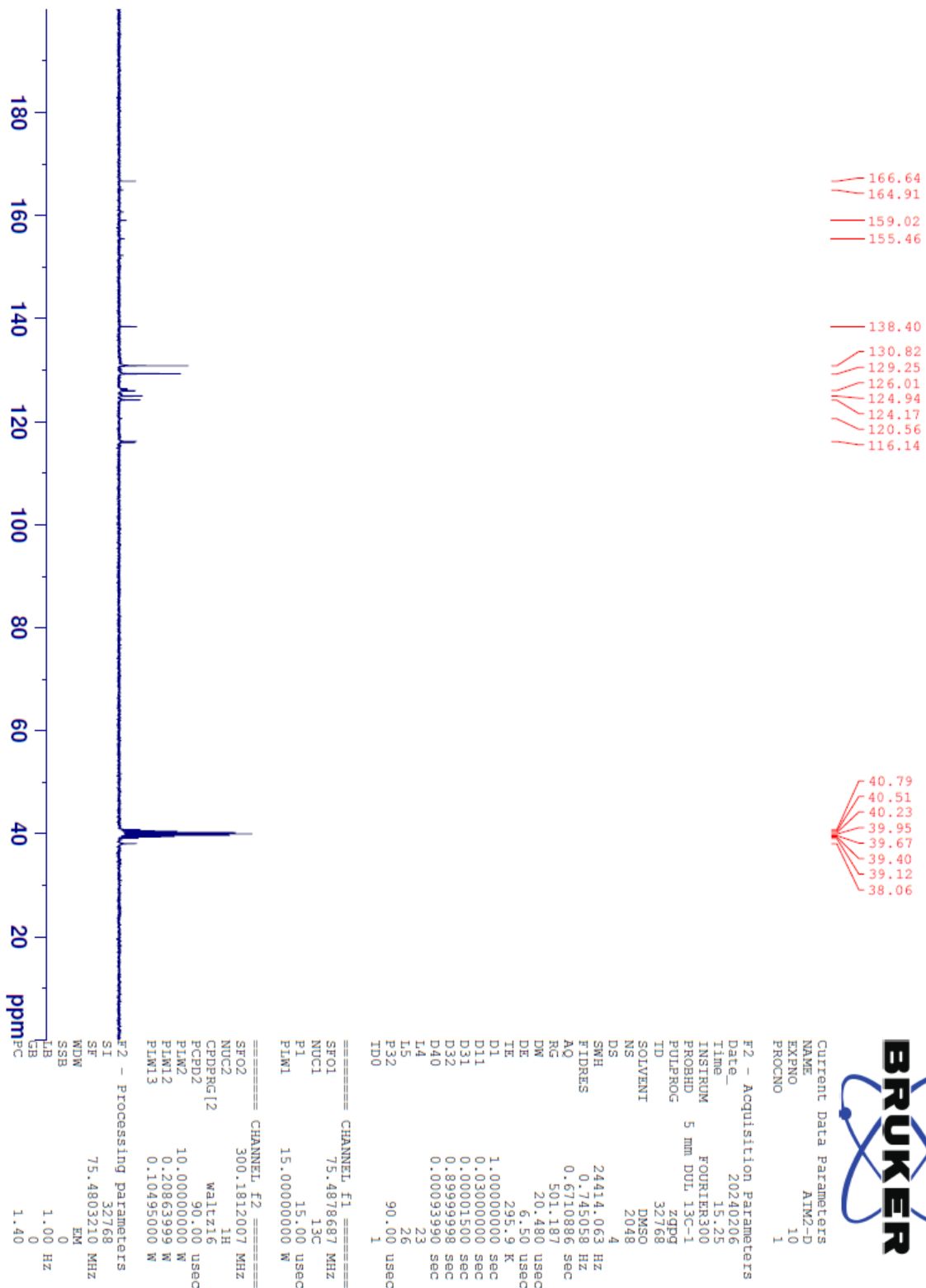
| Item               | Value                                                          |
|--------------------|----------------------------------------------------------------|
| Acquired Date&Time | 16.05.2024 09:59:18                                            |
| Acquired by        | System Administrator                                           |
| Filename           | C:\Users\dopnalab\Desktop\MASAUSTUARZU HIDIR\ATM\ATM2-D.1.ispd |
| Spectrum name      | ATM2-D.1                                                       |
| Sample name        | ATM2-D                                                         |
| Sample ID          |                                                                |
| Option             |                                                                |
| Comment            |                                                                |
| No. of Scans       | 30                                                             |
| Resolution         | 4 [cm-1]                                                       |
| Apodization        | Happ-Genzel                                                    |



Şekil 5.37. IR Analizi (3h)



Şekil 5.38.  $^1\text{H}$ -NMR Analizi (3h)



Şekil 5.39.  $^{13}\text{C}$ -NMR Analizi (3h)

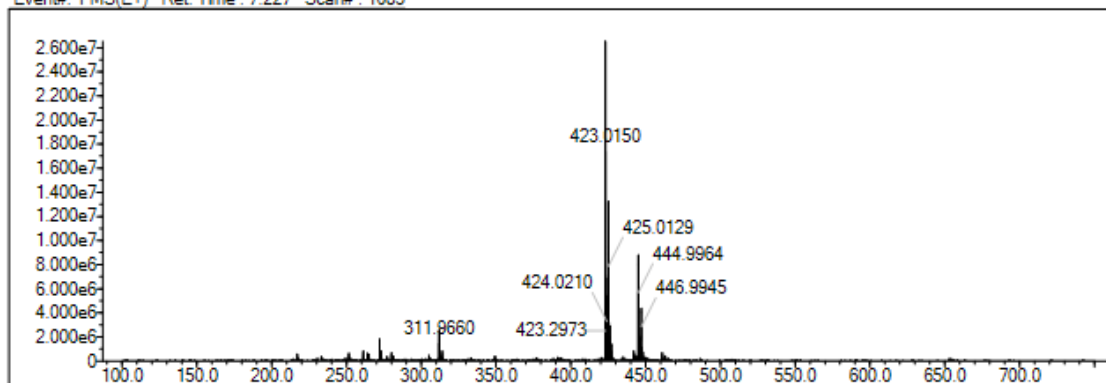
| Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Use Adduct |
|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------------|
| H    | 1    | 0   | 35  | O    | 2    | 0   | 4   | S    | 2    | 0   | 3   | Ru   | 2    | 0   | 0   | H          |
| C    | 4    | 0   | 35  | F    | 1    | 1   | 1   | Cl   | 1    | 0   | 2   | Pd   | 2    | 0   | 0   |            |
| N    | 3    | 0   | 7   | P    | 3    | 0   | 0   | Br   | 1    | 0   | 0   | I    | 3    | 0   | 0   |            |

Error Margin (ppm): 5  
 HC Ratio: unlimited  
 Max Isotopes: 3  
 MSn Iso RI (%): 10.00

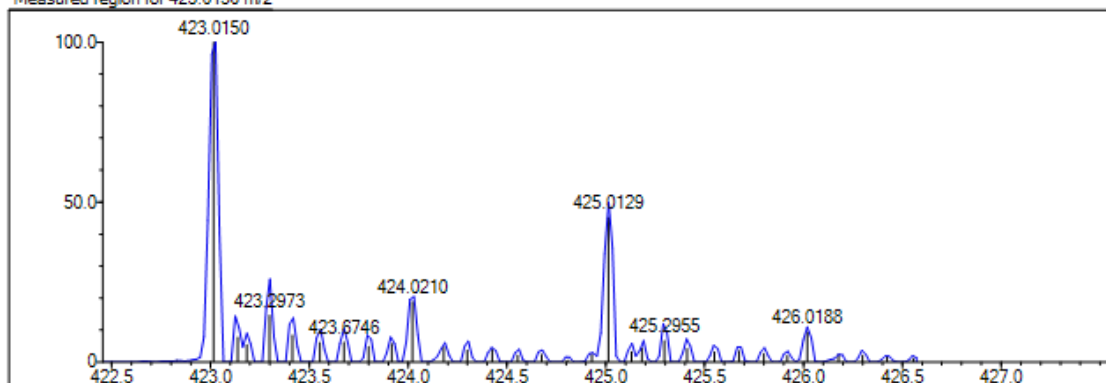
DBE Range: 0.0 - 30.0  
 Apply N Rule: no  
 Isotope RI (%): 1.00  
 MSn Logic Mode: AND

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

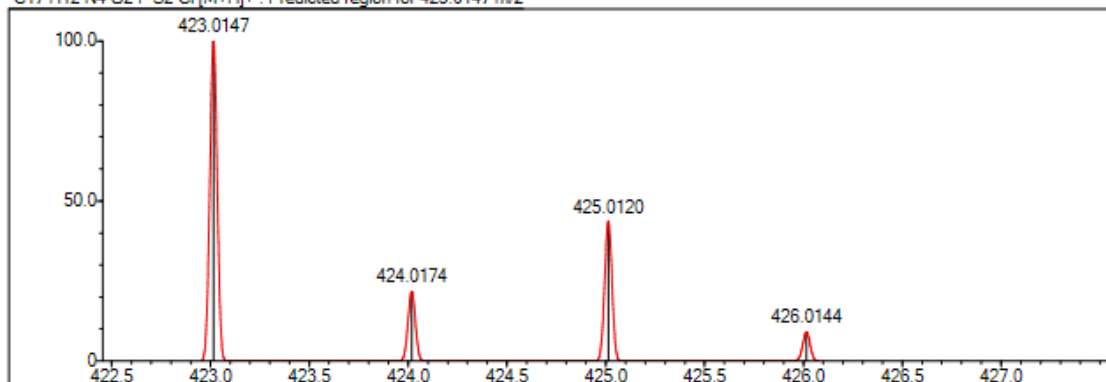
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 7.227 Scan#: 1085



Measured region for 423.0150 m/z



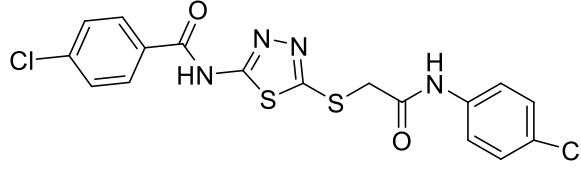
C17 H12 N4 O2 F S2 Cl [M+H]<sup>+</sup> : Predicted region for 423.0147 m/z



| Rank | Score | Formula (M)           | Ion                | Meas. m/z | Pred. m/z | Df. (mDa) | Df. (ppm) | Iso   | DBE  |
|------|-------|-----------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|------|
| 1    | 87.64 | C17 H12 N4 O2 F S2 Cl | [M+H] <sup>+</sup> | 423.0150  | 423.0147  | 0.3       | 0.71      | 87.64 | 13.0 |

Şekil 5.40. HRMS Analizi (3h)

**5.1.8. 4-Kloro-N-(5-((2-((4-klorofenil)amino)-2-oksoetil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3i)**



**Şekil 5.41.** 4-Kloro-N-(5-((2-((4-klorofenil)amino)-2-oksoetil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3i)  
molekülünün kimyasal yapısı

**Deneyisel E.N.:** 260.4-263.0 °C **Verim:** %84

**IR (ATR)  $\nu_{\text{maks}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3282 (N-H bağına ait band), 3124 (C-H bağına ait band), 1651 (C=O bağına ait band)

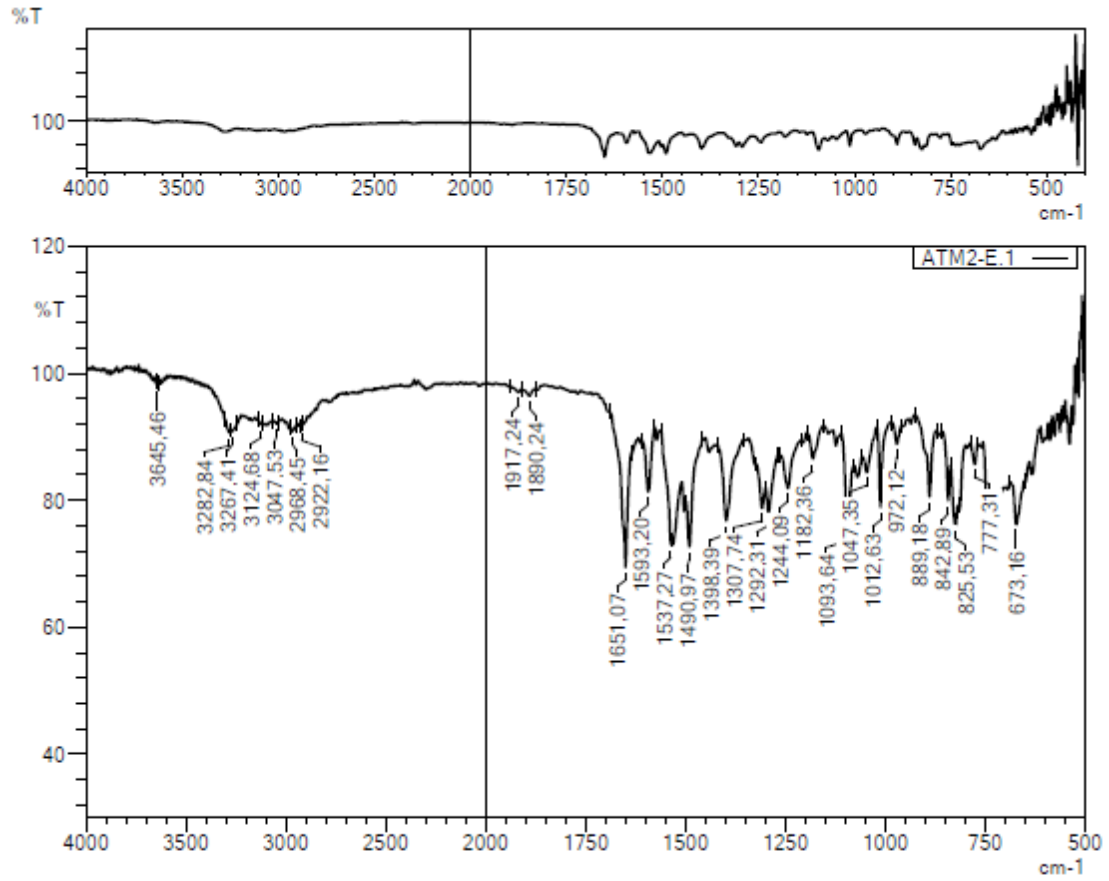
**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 4.26 (2H, s, -CH<sub>2</sub>), 7.38 (2H, dd,  $J_1 = 2.04$  Hz,  $J_2 = 8.55$  Hz, Ar-H), 7.55-7.66 (3H, m, Ar-H), 7.92-8.12 (1H, m, Ar-H), 10.56 (1H, s, NH), 13.22 (1H, s, NH)

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 38.44, 121.16, 125.40, 127.62, 129.23, 130.82, 131.61, 138.16, 138.45, 159.09, 166.15, 166.46, 170.46

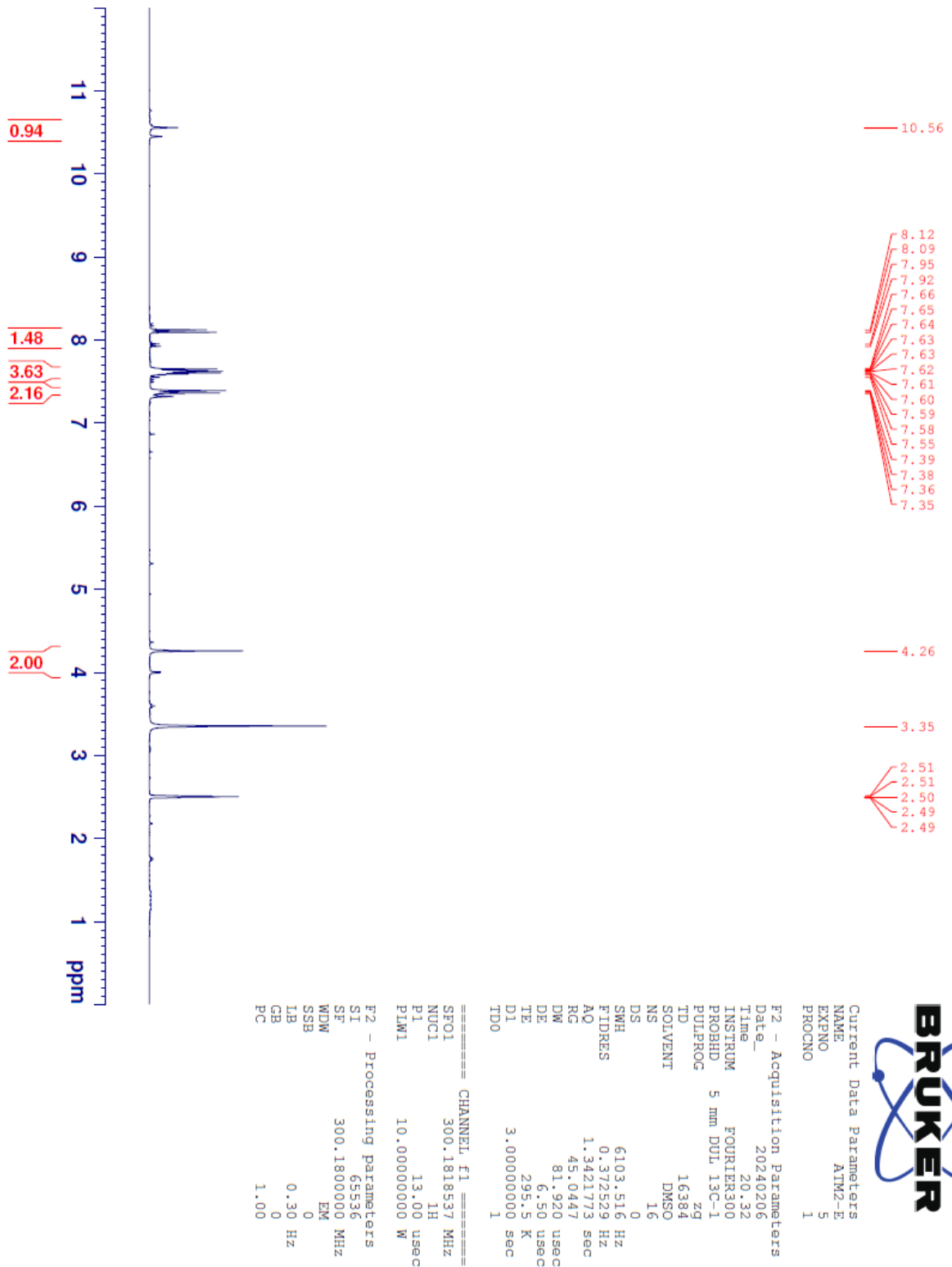
**HRMS (ESI) (m/z)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ :** C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> için hesaplanan: 438.9851, bulunan: 438.9849

## DOPNALAB

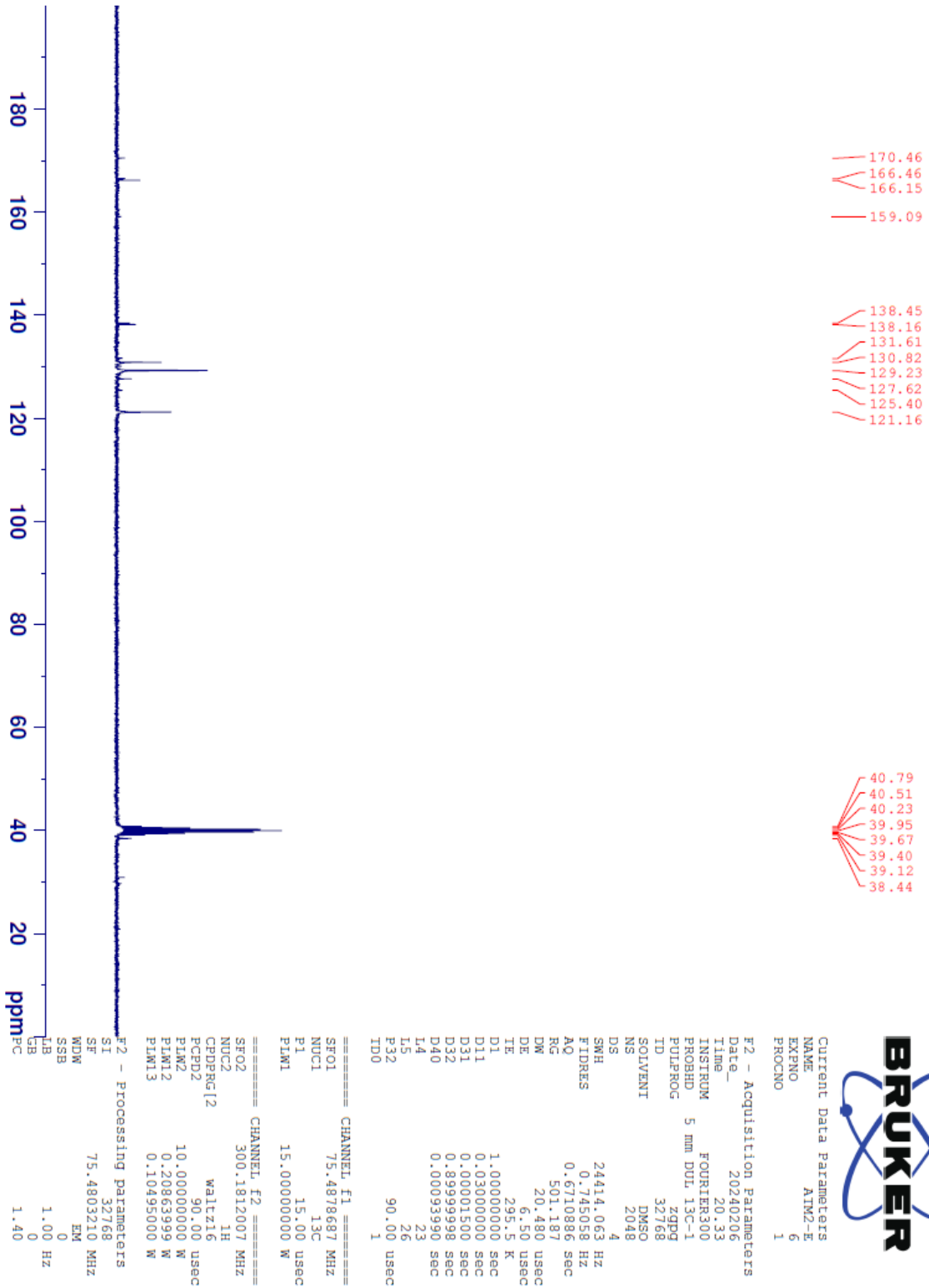
| Item               | Value                                                        |
|--------------------|--------------------------------------------------------------|
| Acquired Date&Time | 16.05.2024 10:30:56                                          |
| Acquired by        | System Administrator                                         |
| Filename           | C:\Users\dopnlab\Desktop\MASAUSTUARZU HIDIR\ATMATM2-E.1.ispd |
| Spectrum name      | ATM2-E.1                                                     |
| Sample name        | ATM2-E                                                       |
| Sample ID          |                                                              |
| Option             |                                                              |
| Comment            |                                                              |
| No. of Scans       | 30                                                           |
| Resolution         | 4 [cm-1]                                                     |
| Apodization        | Happ-Genzel                                                  |



Şekil 5.42. IR Analizi (3i)



Şekil 5.43.  $^1\text{H}$ -NMR Analizi (3i)

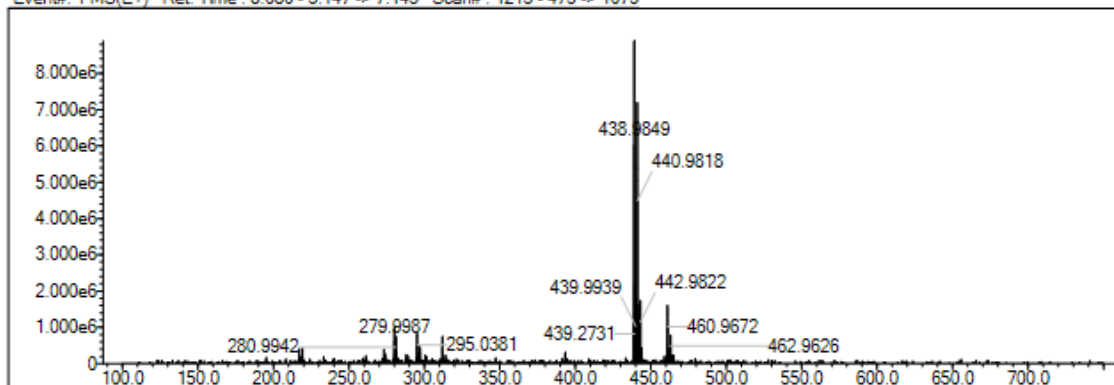


Şekil 5.44.  $^{13}\text{C}$ -NMR Analizi (3i)

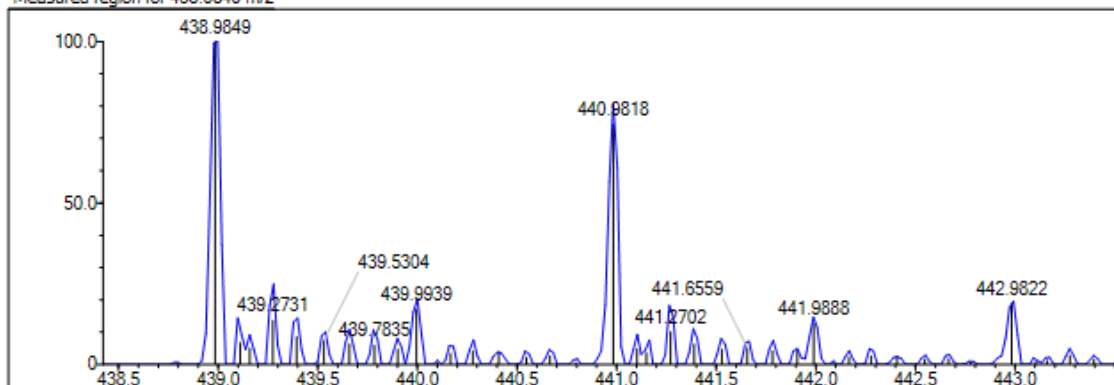
| Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Use Adduct |
|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------------|
| H    | 1    | 0   | 35  | O    | 2    | 0   | 4   | S    | 2    | 0   | 3   | Ru   | 2    | 0   | 0   | H          |
| C    | 4    | 0   | 35  | F    | 1    | 0   | 0   | Cl   | 1    | 0   | 2   | Pd   | 2    | 0   | 0   |            |
| N    | 3    | 0   | 7   | P    | 3    | 0   | 0   | Br   | 1    | 0   | 0   | I    | 3    | 0   | 0   |            |

Error Margin (ppm): 5  
 DBE Range: 0.0 - 30.0  
 Electron Ions: both  
 HC Ratio: unlimited  
 Apply N Rule: no  
 Use MSn Info: yes  
 Max Isotopes: 3  
 Isotope RI (%): 1.00  
 Isotope Res: 9000  
 MSn Iso RI (%): 10.00  
 MSn Logic Mode: AND  
 Max Results: 50

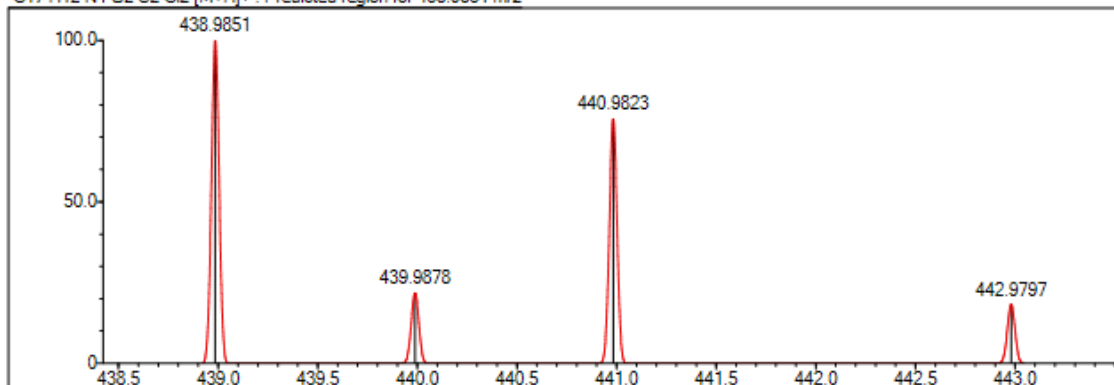
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 8.080 - 3.147 -> 7.143 Scan#: 1213 - 473 -> 1073



Measured region for 438.9849 m/z



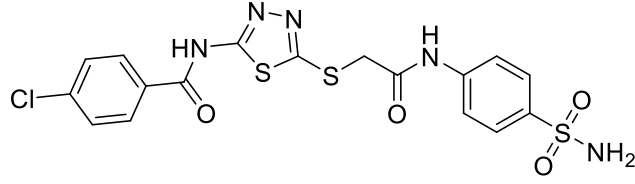
C17 H12 N4 O2 S2 Cl2 [M+H]<sup>+</sup> : Predicted region for 438.9851 m/z



| Rank | Score | Formula (M)          | Ion                | Meas. m/z | Pred. m/z | Df. (mDa) | Df. (ppm) | Iso   | DBE  |
|------|-------|----------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|------|
| 1    | 79.62 | C17 H12 N4 O2 S2 Cl2 | [M+H] <sup>+</sup> | 438.9849  | 438.9851  | -0.2      | -0.46     | 79.62 | 13.0 |

Şekil 5.45. HRMS Analizi (3i)

**5.1.9. 4-Kloro-N-(5-((2-okso-2-((4-sülfamoilfenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3j)**



**Şekil 5.46.** 4-Kloro-N-(5-((2-okso-2-((4-sülfamoilfenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3j) molekülünün kimyasal yapısı

**Deneysel E.N.:** 241.0-242.7 °C **Verim:** %84

**IR (ATR)  $\nu_{\text{maks}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3282 (N-H bağına ait band), 3124 (C-H bağına ait band), 1651 (C=O bağına ait band)

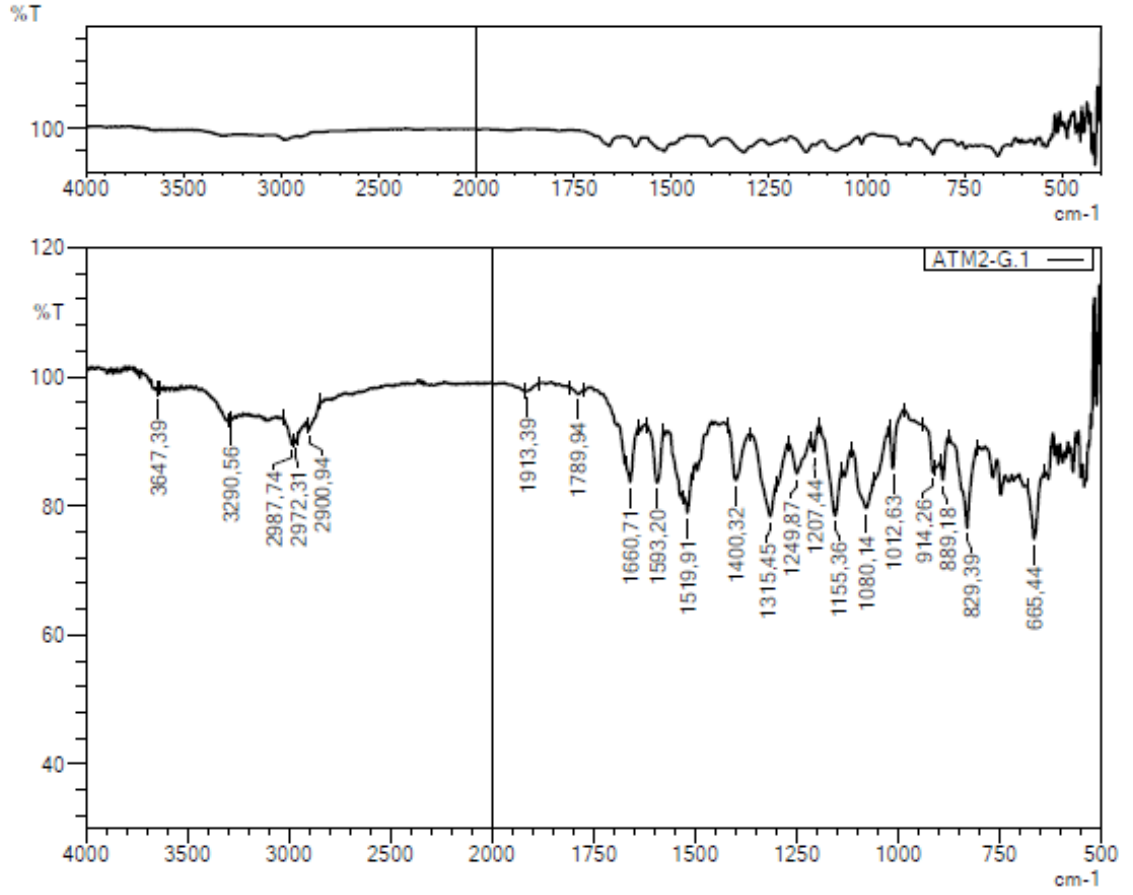
**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 4.03 (2H, s, -CH<sub>2</sub>), 7.30 (4H, d,  $J$ = 11.75 Hz, Ar-H), 7.56-7.79 (6H, m, Ar-H), 10.60 (1H, s, NH)

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 38.45, 119.19, 126.47, 127.27, 128.95, 130.72, 137.51, 139.11, 142.10, 149.59, 166.82, 166.93, 170.49

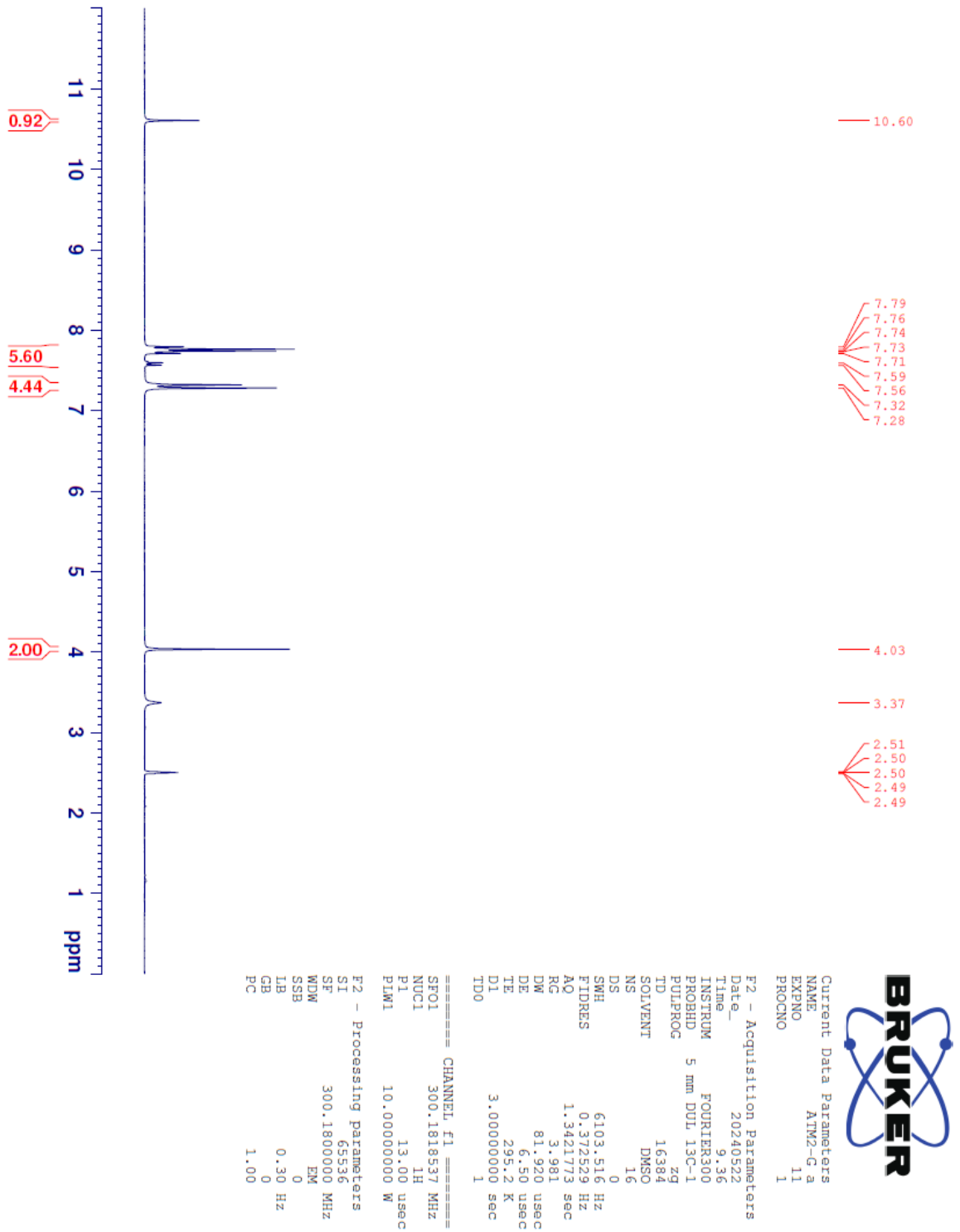
**HRMS (ESI) (m/z)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ :** C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S<sub>3</sub>Cl için hesaplanan: 483.9964, bulunan: 483.9969

## DOPNALAB

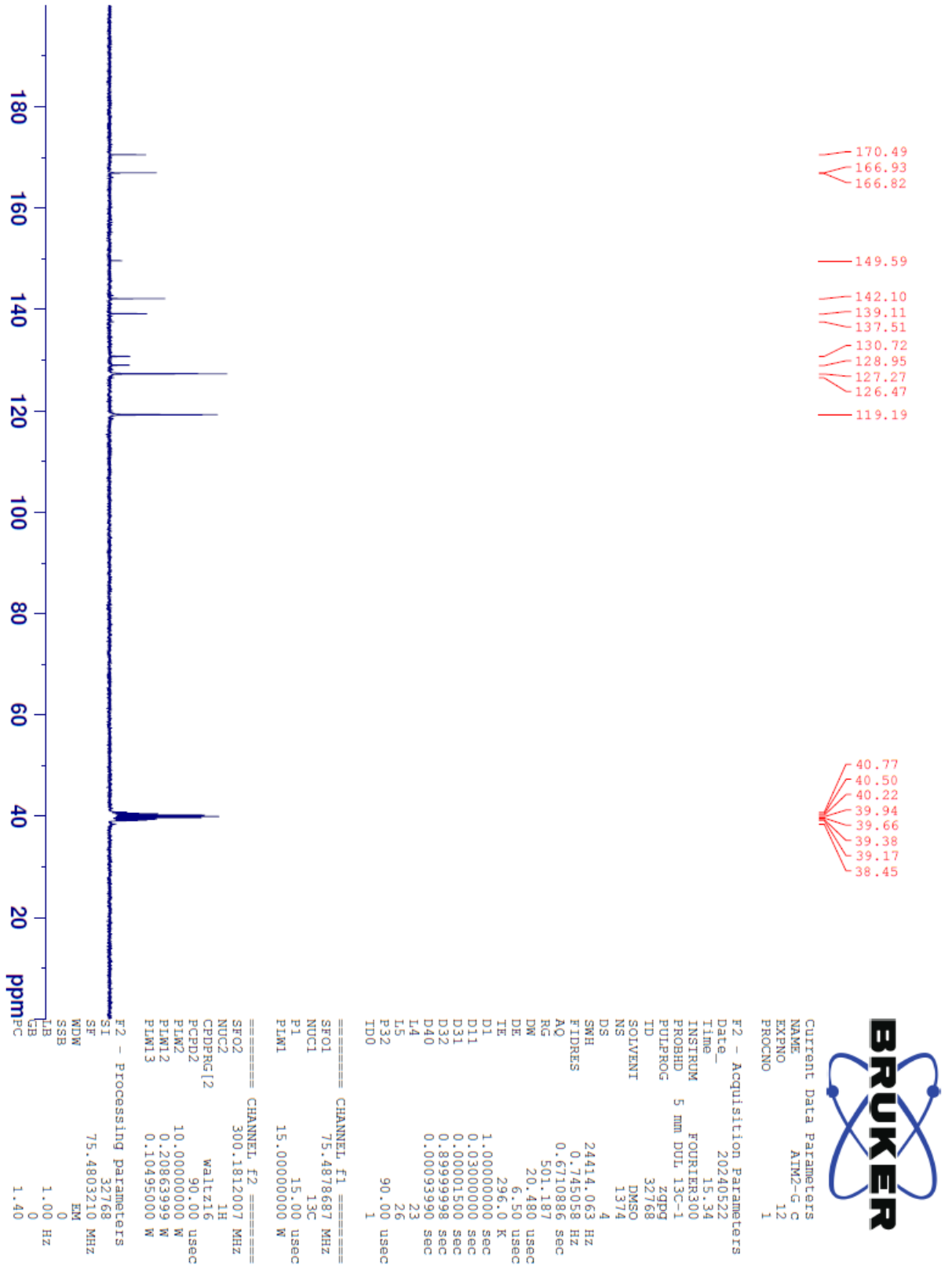
| Item               | Value                                                           |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Acquired Date&Time | 16.05.2024 10:15:47                                             |
| Acquired by        | System Administrator                                            |
| Filename           | C:\Users\dopnalab\Desktop\MASAUSTU\ARZU HIDIR\ATM\ATM2-G.1.ispd |
| Spectrum name      | ATM2-G.1                                                        |
| Sample name        | ATM2-G                                                          |
| Sample ID          |                                                                 |
| Option             |                                                                 |
| Comment            |                                                                 |
| No. of Scans       | 30                                                              |
| Resolution         | 4 [cm-1]                                                        |
| Apodization        | Happ-Genzel                                                     |



Şekil 5.47. IR Analizi (3j)



Şekil 5.48.  $^1\text{H}$ -NMR Analizi (3j)



Şekil 5.49.  $^{13}\text{C}$ -NMR Analizi (3j)

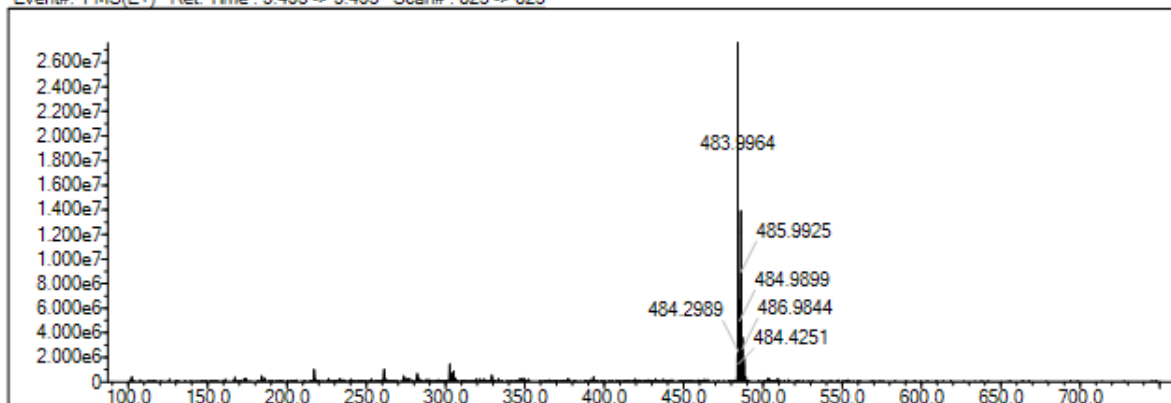
| Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Use Adduct |
|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------------|
| H    | 1    | 0   | 35  | O    | 2    | 0   | 4   | S    | 2    | 0   | 3   | Ru   | 2    | 0   | 0   | H          |
| C    | 4    | 0   | 35  | F    | 1    | 0   | 0   | Cl   | 1    | 0   | 2   | Pd   | 2    | 0   | 0   |            |
| N    | 3    | 0   | 7   | P    | 3    | 0   | 0   | Br   | 1    | 0   | 0   | I    | 3    | 0   | 0   |            |

Error Margin (ppm): 5  
 HC Ratio: unlimited  
 Max Isotopes: 3  
 MSn Iso RI (%): 10.00

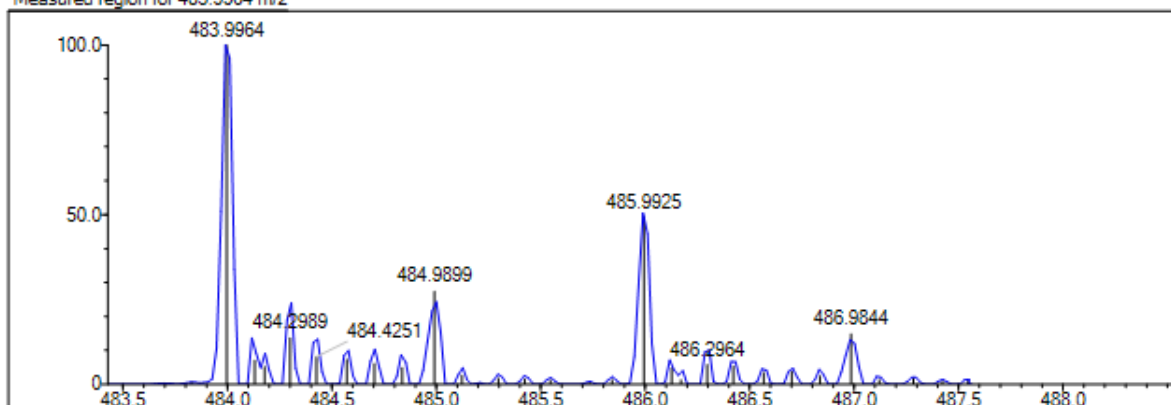
DBE Range: 0.0 - 30.0  
 Apply N Rule: no  
 Isotope RI (%): 1.00  
 MSn Logic Mode: AND

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

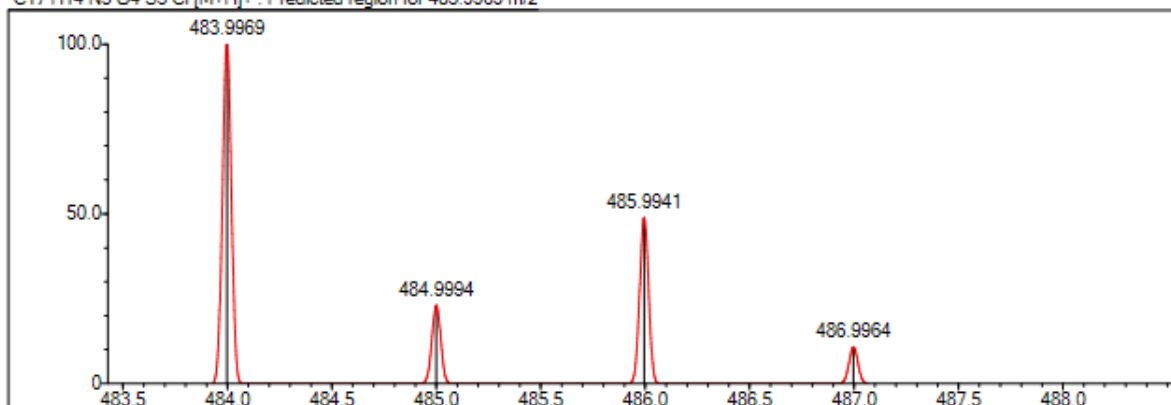
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 5.493 -> 5.493 Scan#: 825 -> 825



Measured region for 483.9964 m/z



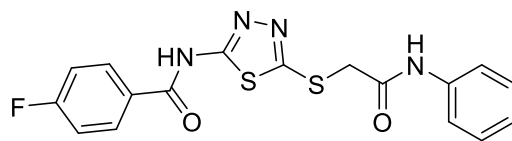
C17 H14 N5 O4 S3 Cl [M+H]<sup>+</sup> : Predicted region for 483.9969 m/z



| Rank | Score | Formula (M)         | Ion                | Meas. m/z | Pred. m/z | Df. (mDa) | Df. (ppm) | Iso   | DBE  |
|------|-------|---------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|------|
| 1    | 78.63 | C17 H14 N5 O4 S3 Cl | [M+H] <sup>+</sup> | 483.9964  | 483.9969  | -0.5      | -1.03     | 78.69 | 13.0 |

Şekil 5.50. HRMS Analizi (3j)

**5.1.10. 4-Floro-N-(5-((2-okso-2-(fenilamino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3k)**



**Şekil 5.51.** 4-Floro-N-(5-((2-okso-2-(fenilamino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3k)  
molekülünün kimyasal yapısı

**Deneyisel E.N.:** 241.4-244.8 °C **Verim:** %87

**IR (ATR)  $\nu_{\text{maks}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3253 (N-H bağına ait band), 3061 (C-H bağına ait band), 1681 (C=O bağına ait band)

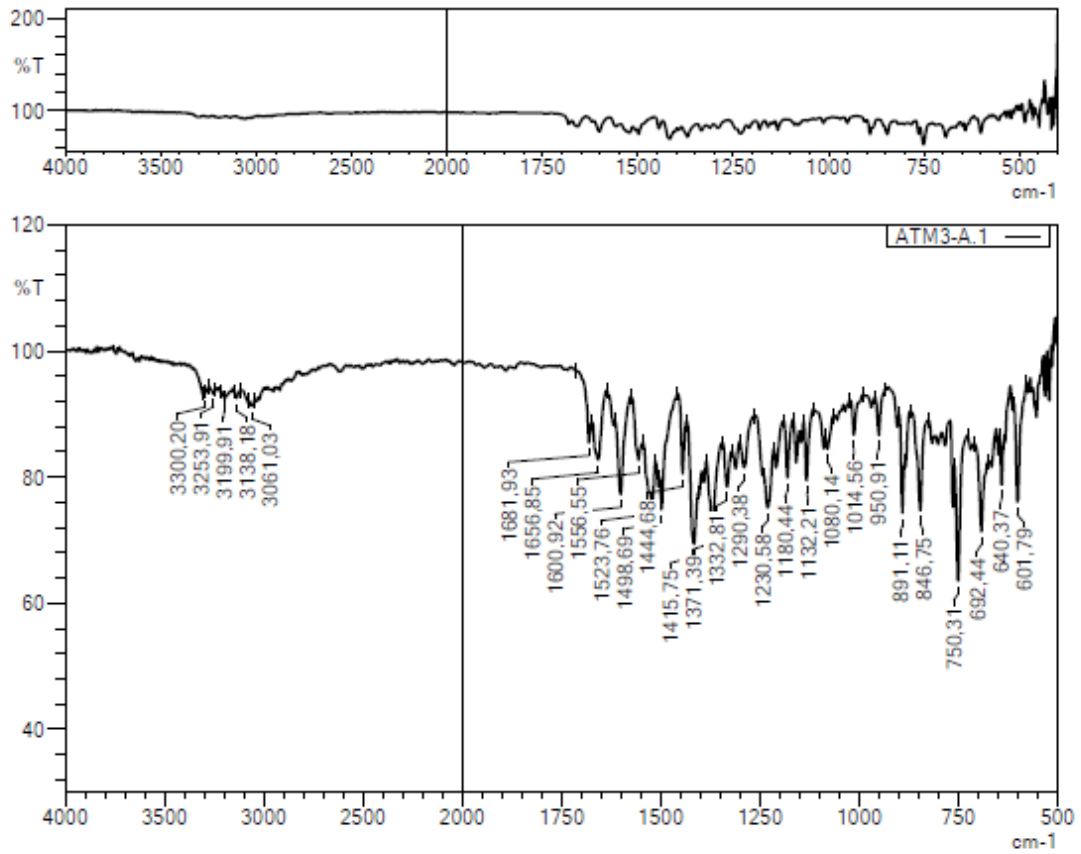
**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 4.07 (2H, s,  $-\text{CH}_2$ ), 7.05 (1H, t,  $J= 7.38$  Hz, Ar-H), 7.18 (2H, t,  $J= 8.94$  Hz, Ar-H), 7.31 (2H, t,  $J= 7.93$  Hz, Ar-H), 7.59 (2H, d,  $J= 7.62$  Hz, Ar-H), 8.13-8.17 (2H, m, Ar-H), 10.39 (1H, s, NH)

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 38.40, 114.67, 119.56, 123.89, 129.25, 130.98, 132.20, 135.75, 139.40, 162.19, 165.45, 166.73, 168.95

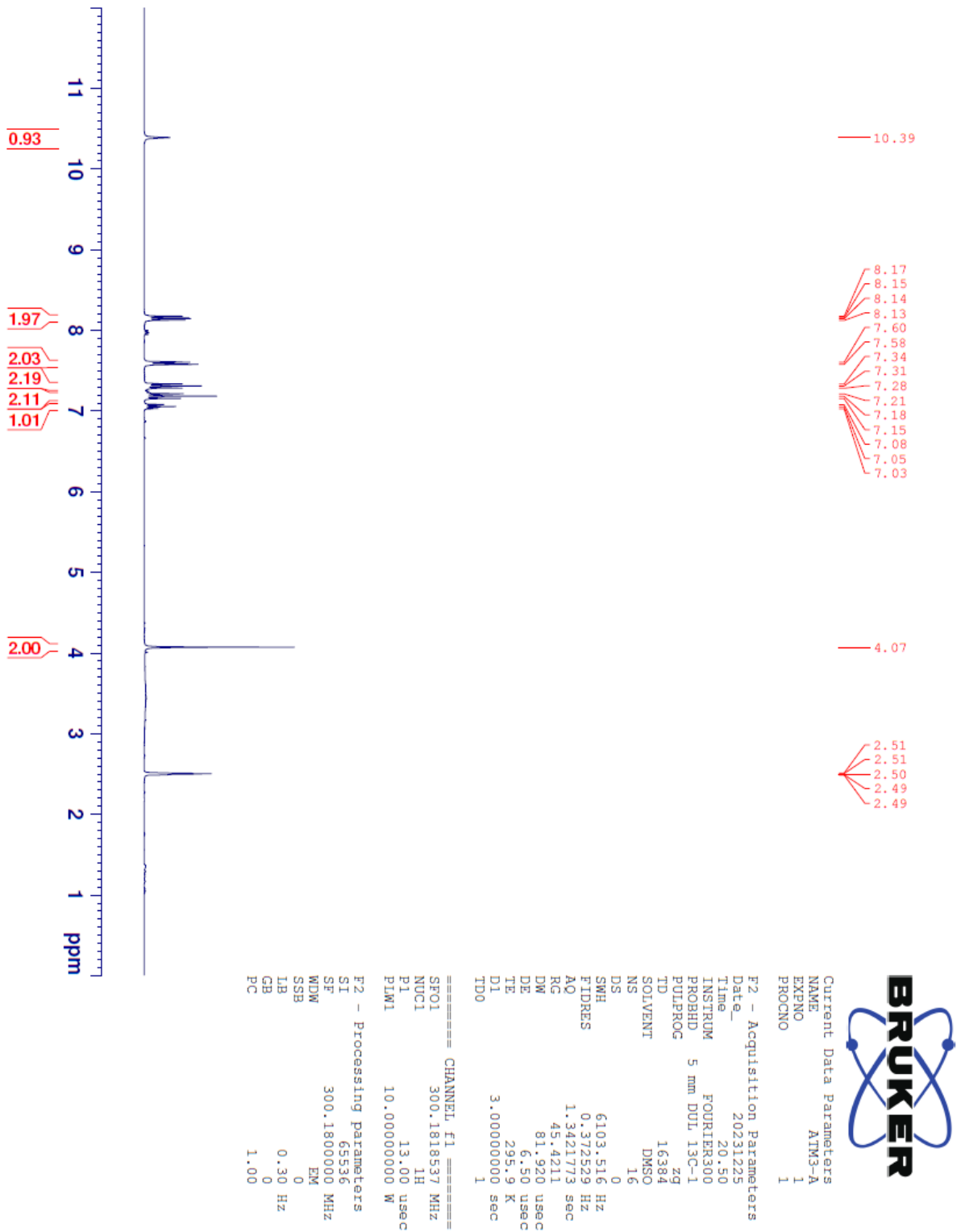
**HRMS (ESI) ( $m/z$ )  $[\text{M}+\text{H}]^+$ :**  $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_2\text{FS}_2$  için hesaplanan: 389.0556, bulunan: 389.0557

## DOPNALAB

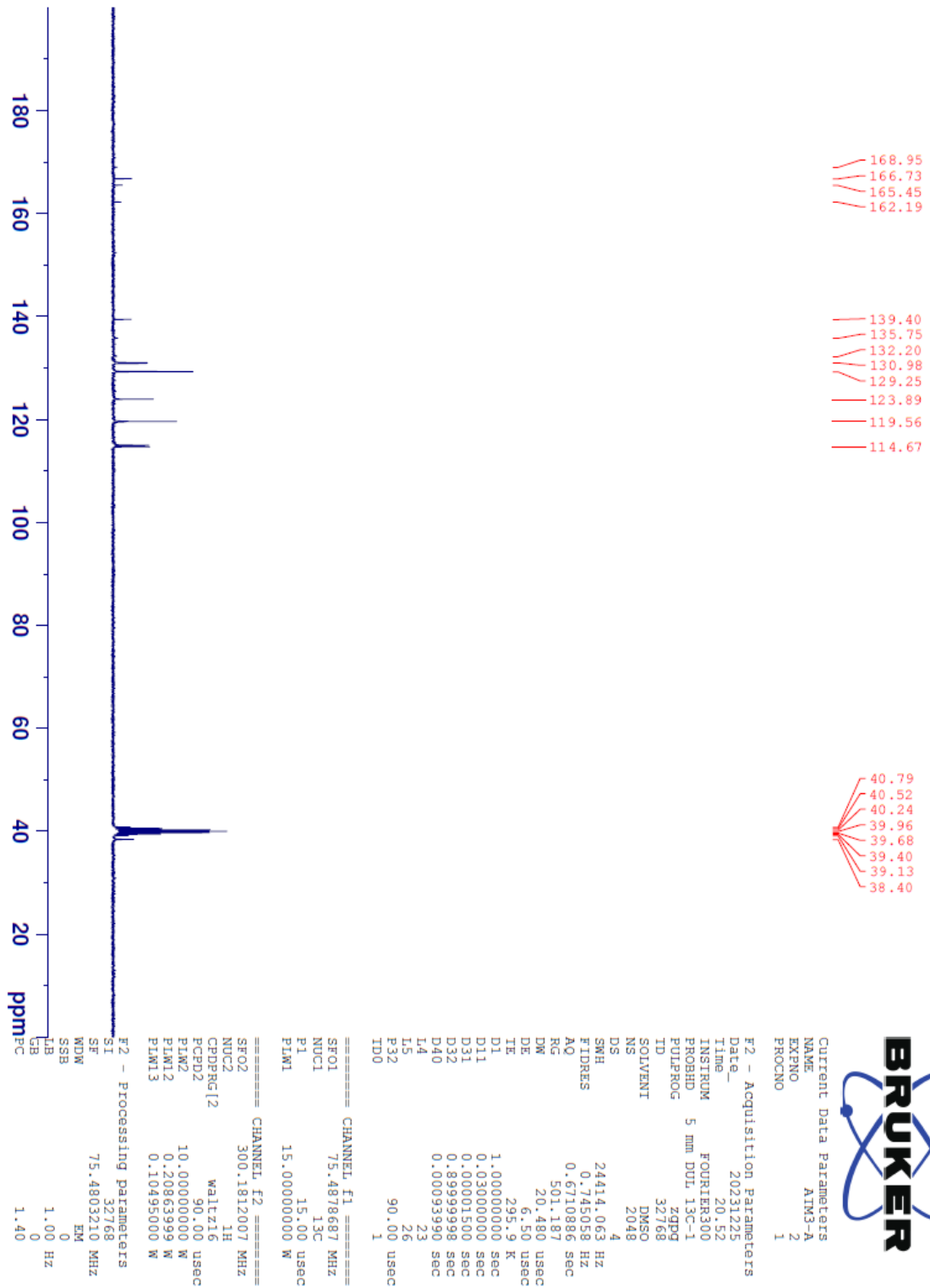
| Item               | Value                                                       |
|--------------------|-------------------------------------------------------------|
| Acquired Date&Time | 16.05.2024 10:46:20                                         |
| Acquired by        | System Administrator                                        |
| Filename           | C:\Users\dopnalab\Desktop\MASAUSTU\ARZU HIDIR\ATM3-A.1.ispd |
| Spectrum name      | ATM3-A.1                                                    |
| Sample name        | ATM3-A                                                      |
| Sample ID          |                                                             |
| Option             |                                                             |
| Comment            |                                                             |
| No. of Scans       | 30                                                          |
| Resolution         | 4 [cm-1]                                                    |
| Apodization        | Happ-Genzel                                                 |



Şekil 5.52. IR Analizi (3k)



Şekil 5.53.  $^1\text{H}$ -NMR Analizi (3k)



Şekil 5.54.  $^{13}\text{C}$ -NMR Analizi (3k)

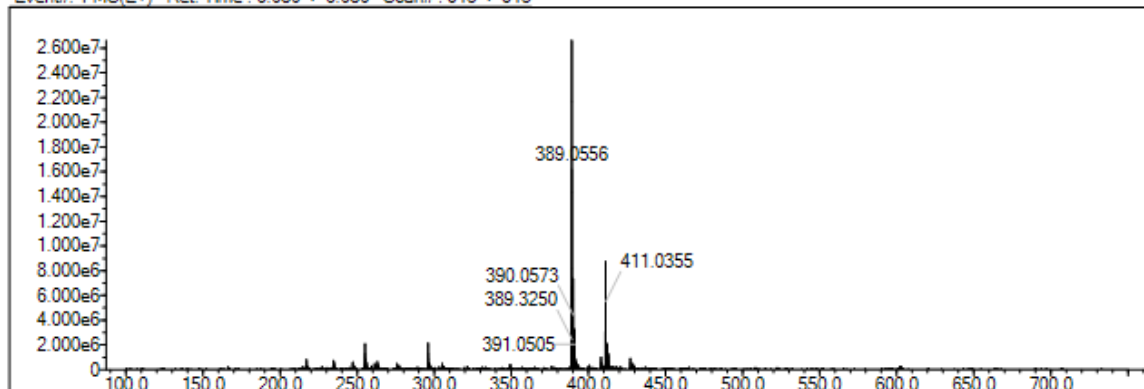
| Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Use Adduct |
|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------------|
| H    | 1    | 0   | 35  | O    | 2    | 0   | 4   | S    | 2    | 0   | 2   | Ru   | 2    | 0   | 0   | H          |
| C    | 4    | 0   | 35  | F    | 1    | 1   | 1   | Cl   | 1    | 0   | 2   | Pd   | 2    | 0   | 0   |            |
| N    | 3    | 0   | 7   | P    | 3    | 0   | 0   | Br   | 1    | 0   | 0   | I    | 3    | 0   | 0   |            |

Error Margin (ppm): 5  
 HC Ratio: unlimited  
 Max Isotopes: 3  
 MSn Iso RI (%): 10.00

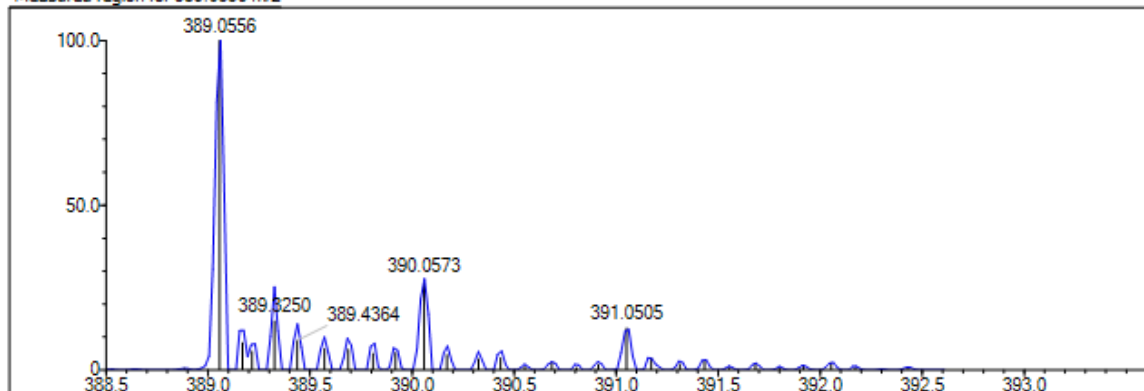
DBE Range: 0.0 - 30.0  
 Apply N Rule: no  
 Isotope RI (%): 1.00  
 MSn Logic Mode: AND

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

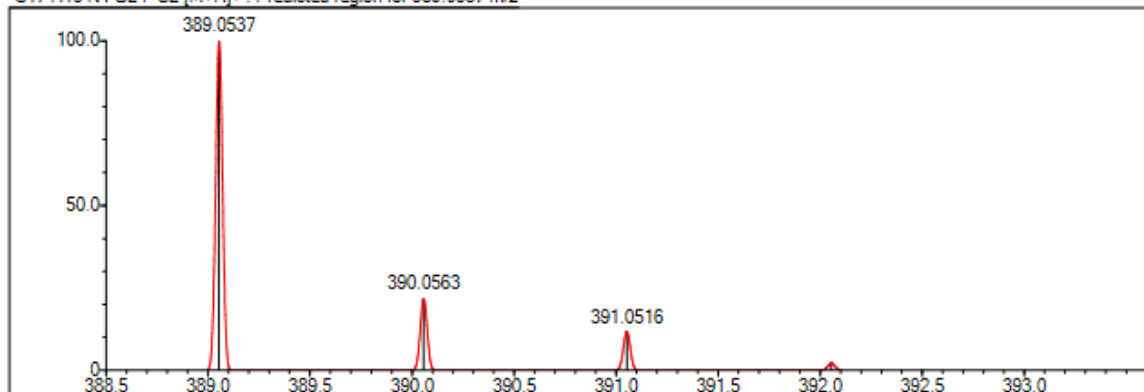
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 6.080 -> 6.080 Scan#: 913 -> 913



Measured region for 389.0556 m/z



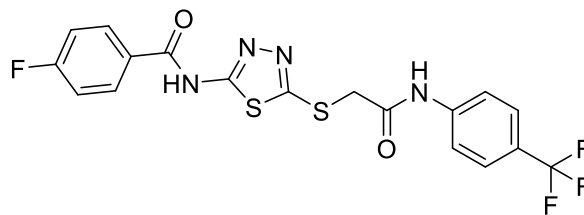
C17 H13 N4 O2 F S2 [M+H]<sup>+</sup> : Predicted region for 389.0537 m/z



| Rank | Score | Formula (M)        | Ion                | Meas. m/z | Pred. m/z | Df. (mDa) | Df. (ppm) | Iso   | DBE  |
|------|-------|--------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|------|
| 3    | 77.48 | C17 H13 N4 O2 F S2 | [M+H] <sup>+</sup> | 389.0556  | 389.0537  | 1.9       | 4.88      | 85.81 | 13.0 |

Şekil 5.55. HRMS Analizi (3k)

**5.1.11. 4-Floro-N-(5-((2-okso-2-((4-(triflorometil)fenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3l)**



**Şekil 5.56.** 4-Floro-N-(5-((2-okso-2-((4-(triflorometil)fenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3l) molekülünün kimyasal yapısı

**Deneyisel E.N.:** 220.7-223.8 °C **Verim:** %87

**IR (ATR)  $\nu_{\text{maks}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3294 (N-H bağına ait band), 1658 (C=O bağına ait band)

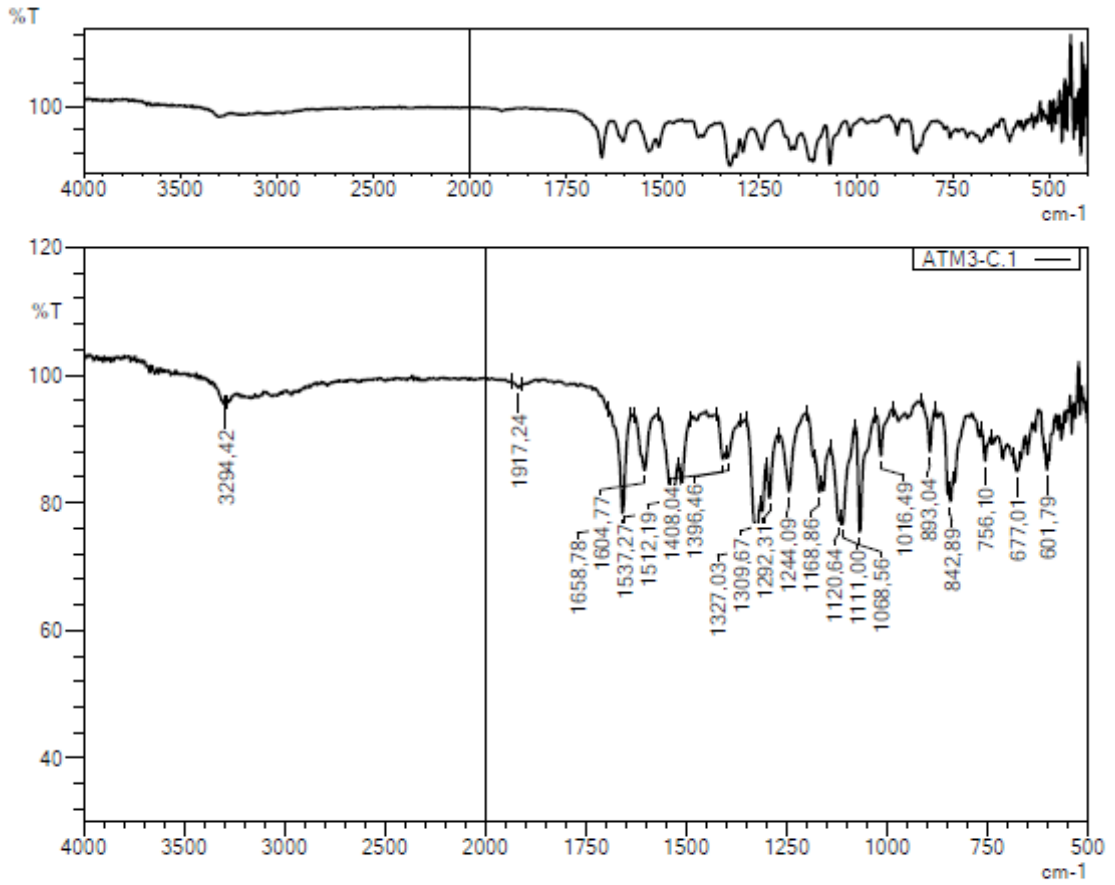
**$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 4.02 (2H, s,  $-\text{CH}_2$ ), 7.68 (4H, d,  $J= 8.76$  Hz, Ar-H), 7.77-7.81 (4H, m, Ar-H), 10.75 (1H, s, NH), 10.66 (1H, s, NH)

**$^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 38.44, 112.16, 115.51, 115.79, 119.50, 126.39, 126.62, 131.40, 131.52, 142.80, 163.09, 166.39, 167.01, 170.47

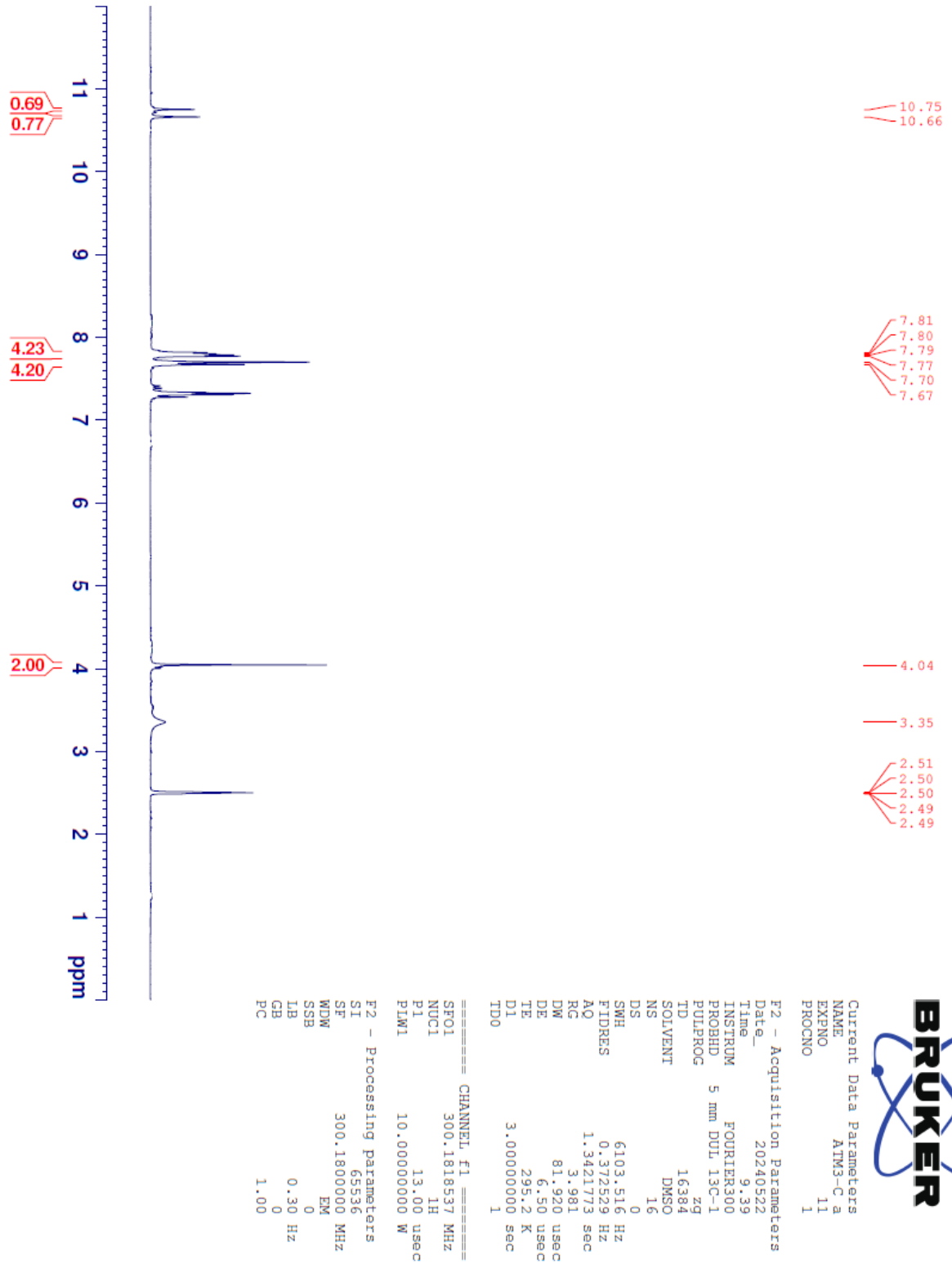
**HRMS (ESI) ( $m/z$ )  $[\text{M}+\text{H}]^+$ :**  $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2\text{F}_4\text{S}_2$  için hesaplanan: 457.0411, bulunan: 457.0413

## DOPNALAB

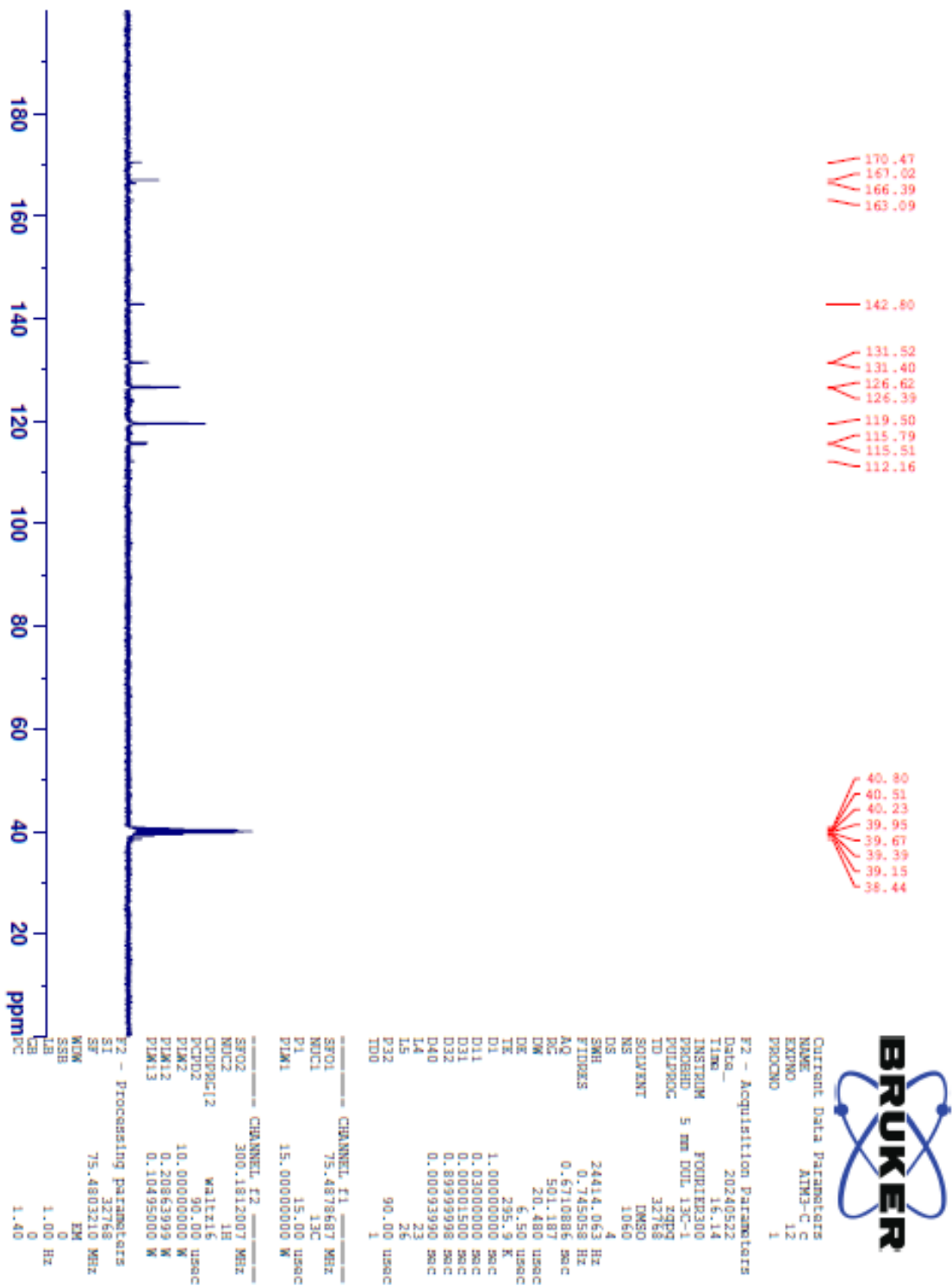
| Item               | Value                                                         |
|--------------------|---------------------------------------------------------------|
| Acquired Date&Time | 16.05.2024 09:53:17                                           |
| Acquired by        | System Administrator                                          |
| Filename           | C:\Users\dopnalab\Desktop\MASAUSTUARZU HIDIR\ATMATM3-C.1.ispd |
| Spectrum name      | ATM3-C.1                                                      |
| Sample name        | ATM3-C                                                        |
| Sample ID          |                                                               |
| Option             |                                                               |
| Comment            |                                                               |
| No. of Scans       | 30                                                            |
| Resolution         | 4 [cm-1]                                                      |
| Apodization        | Happ-Genzel                                                   |



Şekil 5.57. IR Analizi (3I)



Şekil 5.58.  $^1\text{H}$ -NMR Analizi (3l)



Şekil 5.59.  $^{13}\text{C}$ -NMR Analizi (3l)

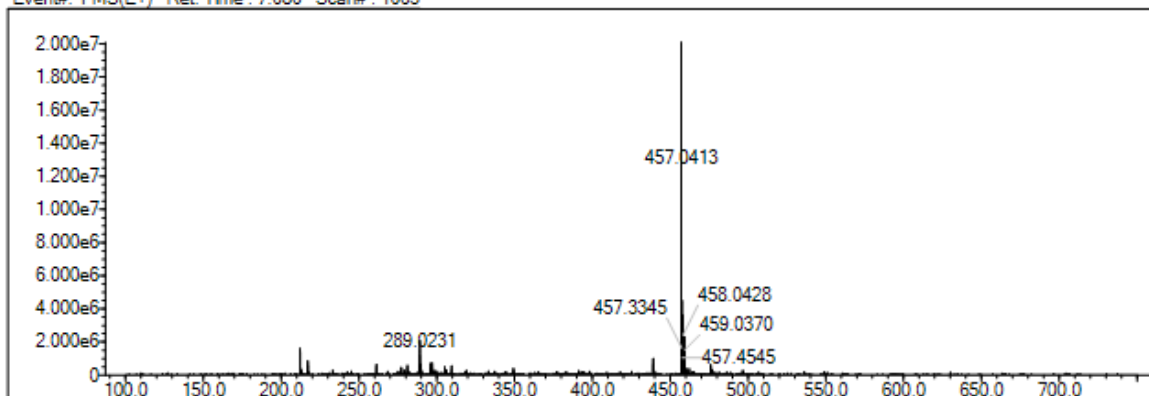
| Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Use Adduct |
|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------------|
| H    | 1    | 0   | 35  | O    | 2    | 0   | 4   | S    | 2    | 0   | 2   | Ru   | 2    | 0   | 0   | H          |
| C    | 4    | 0   | 35  | F    | 1    | 1   | 4   | Cl   | 1    | 0   | 0   | Pd   | 2    | 0   | 0   |            |
| N    | 3    | 0   | 7   | P    | 3    | 0   | 0   | Br   | 1    | 0   | 0   | I    | 3    | 0   | 0   |            |

Error Margin (ppm): 5  
 HC Ratio: unlimited  
 Max Isotopes: 3  
 MSn Iso RI (%): 10.00

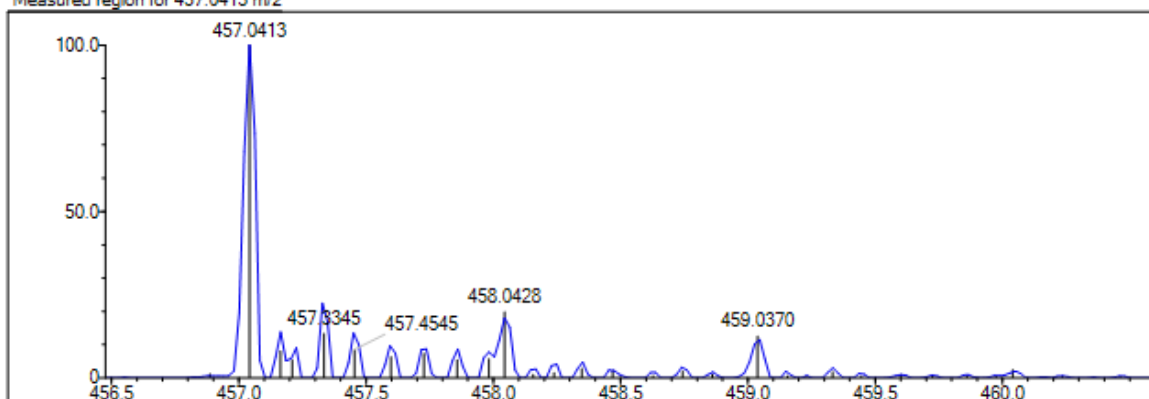
DBE Range: 0.0 - 30.0  
 Apply N Rule: no  
 Isotope RI (%): 1.00  
 MSn Logic Mode: AND

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

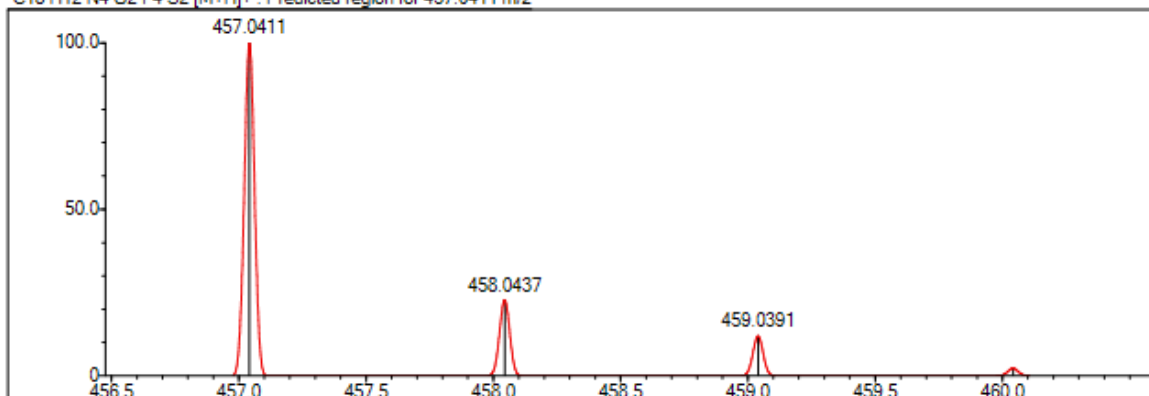
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 7.080 Scan#: 1063



Measured region for 457.0413 m/z



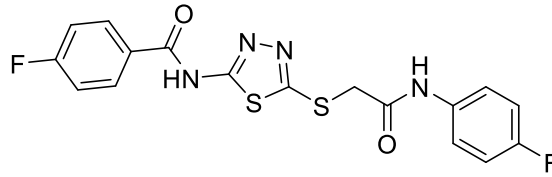
C18 H12 N4 O2 F4 S2 [M+H]<sup>+</sup> : Predicted region for 457.0411 m/z



| Rank | Score | Formula (M)         | Ion                | Meas. m/z | Pred. m/z | Df. (mDa) | Df. (ppm) | Iso   | DBE  |
|------|-------|---------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|------|
| 1    | 81.27 | C18 H12 N4 O2 F4 S2 | [M+H] <sup>+</sup> | 457.0413  | 457.0411  | 0.2       | 0.44      | 81.27 | 13.0 |

Şekil 5.60. HRMS Analizi (3I)

**5.1.12. 4-Floro-N-(5-((2-((4-florofenil)amino)-2-oksoetil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3m)**



**Şekil 5.61.** 4-Floro-N-(5-((2-((4-florofenil)amino)-2-oksoetil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3m)  
molekülünün kimyasal yapısı

**Deneyisel E.N.:** 221.7-224.6 °C **Verim:** %85

**IR (ATR)  $\nu_{\text{maks}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3269 (N-H bağına ait band), 3051 (C-H bağına ait band), 1664 (C=O bağına ait band)

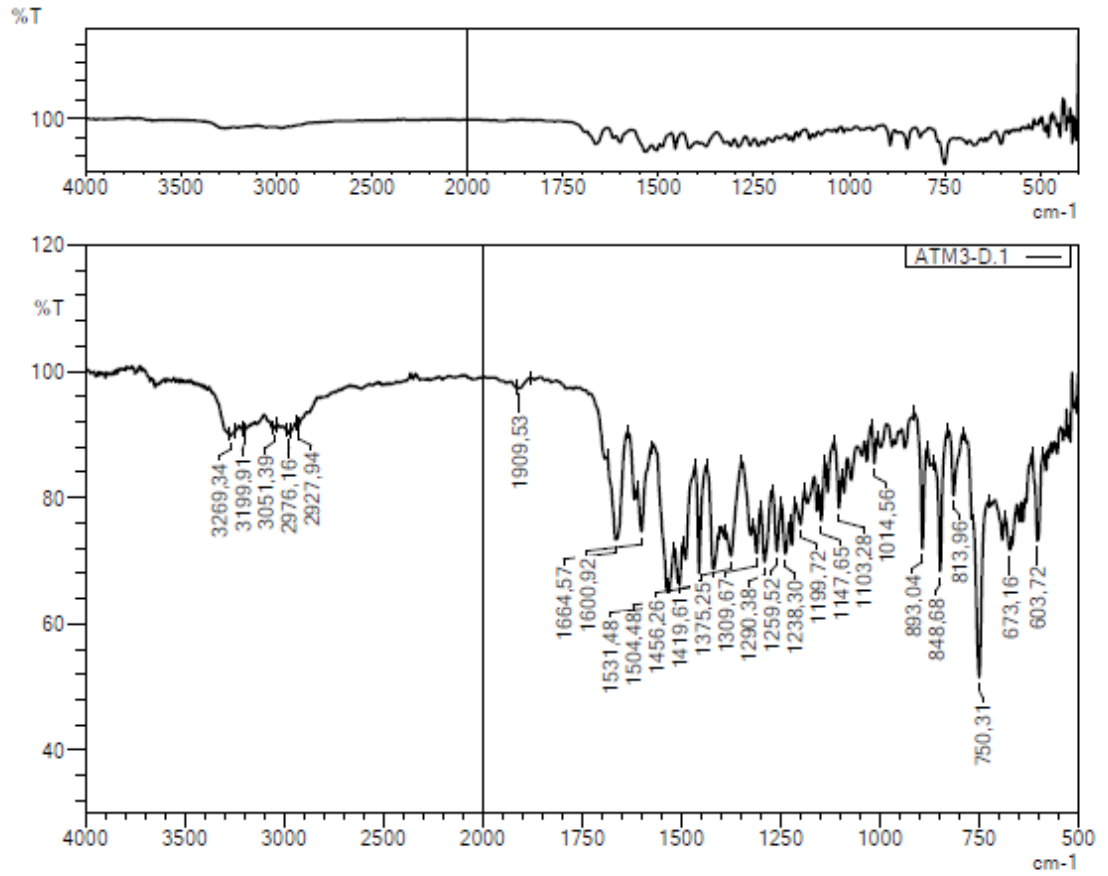
**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 4.14 (2H, s,  $-\text{CH}_2$ ), 7.27 (2H, t,  $J= 8.90$  Hz, Ar-H), 7.35-7.39 (2H, m, Ar-H), 7.60-7.64 (2H, m, Ar-H), 8.14-8.18 (1H, m, Ar-H ), 8.22-8.27 (1H, m, Ar-H), 10.56 (1H, s, NH), 10.65-10.85 (1H, m, NH)

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 37.97, 115.31, 124.05, 124.47, 124.91, 125.86, 126.20, 131.39, 132.40, 155.39, 164.95, 166.22, 167.06

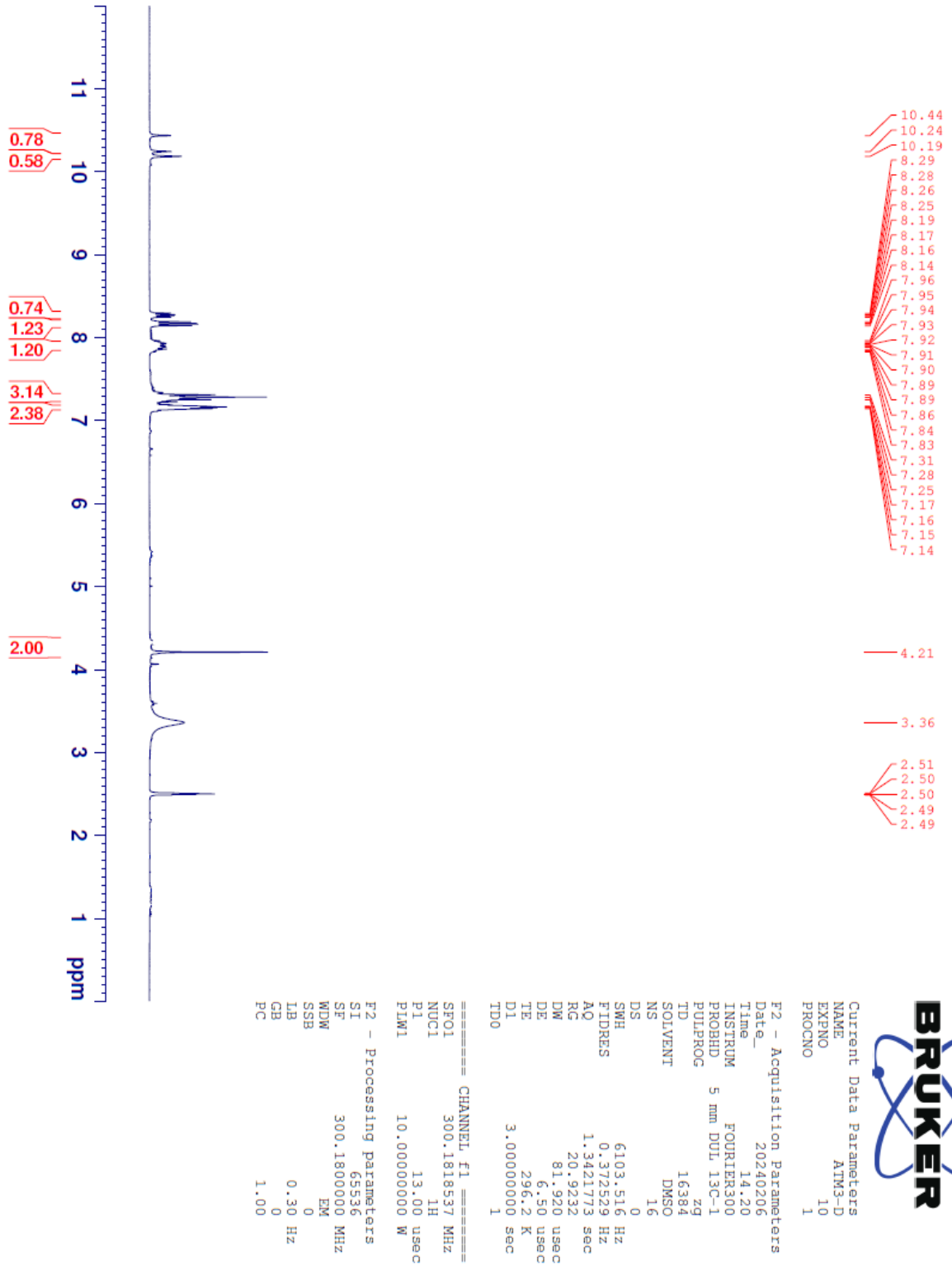
**HRMS (ESI) ( $m/z$ )  $[\text{M}+\text{H}]^+$ :**  $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2\text{F}_2$  için hesaplanan: 407.0443, bulunan: 407.0437

## DOPNALAB

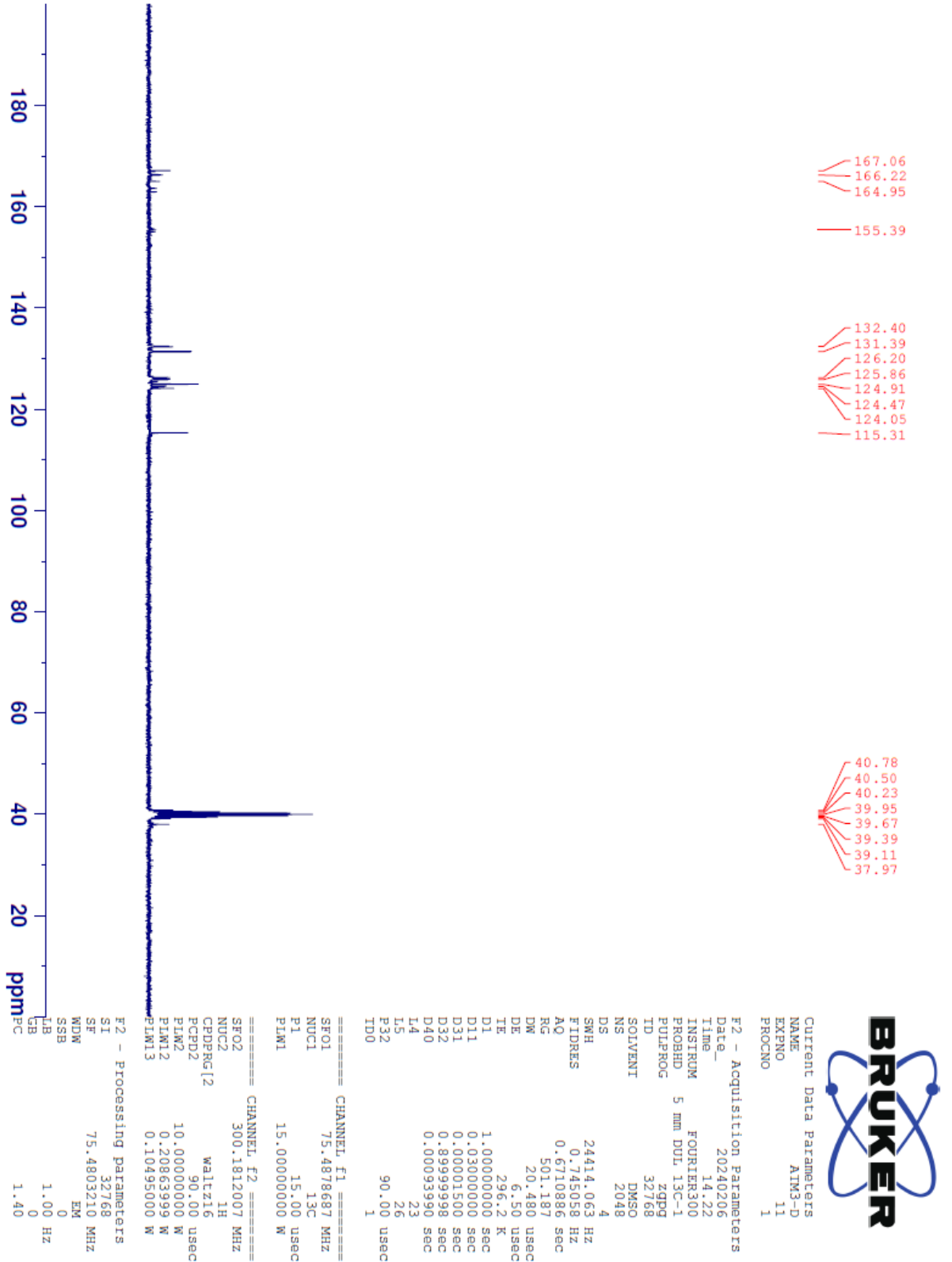
| Item               | Value                                                      |
|--------------------|------------------------------------------------------------|
| Acquired Date&Time | 16.05.2024 10:51:13                                        |
| Acquired by        | System Administrator                                       |
| Filename           | C:\Users\dopnalab\Desktop\MASAUSTUARZU HIDIR\ATM3-D.1.ispd |
| Spectrum name      | ATM3-D.1                                                   |
| Sample name        | ATM3-D                                                     |
| Sample ID          |                                                            |
| Option             |                                                            |
| Comment            |                                                            |
| No. of Scans       | 30                                                         |
| Resolution         | 4 [cm-1]                                                   |
| Apodization        | Happ-Genzel                                                |



Şekil 5.62. IR Analizi (3m)



Şekil 5.63.  $^1\text{H}$ -NMR Analizi (3m)



Şekil 5.64.  $^{13}\text{C}$ -NMR Analizi (3m)

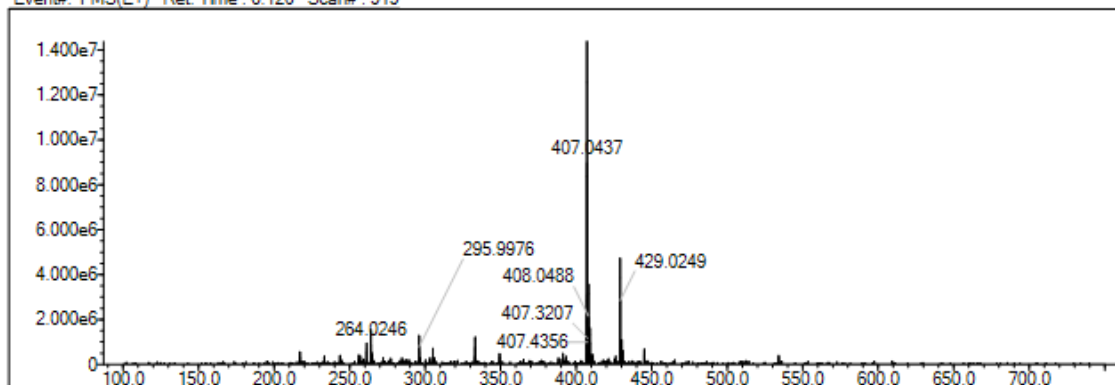
| Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Use Adduct |
|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------------|
| H    | 1    | 0   | 35  | O    | 2    | 0   | 4   | S    | 2    | 0   | 2   | Ru   | 2    | 0   | 0   | H          |
| C    | 4    | 0   | 35  | F    | 1    | 1   | 4   | Cl   | 1    | 0   | 0   | Pd   | 2    | 0   | 0   |            |
| N    | 3    | 0   | 7   | P    | 3    | 0   | 0   | Br   | 1    | 0   | 0   | I    | 3    | 0   | 0   |            |

Error Margin (ppm): 5  
 HC Ratio: unlimited  
 Max Isotopes: 3  
 MSn Iso RI (%): 10.00

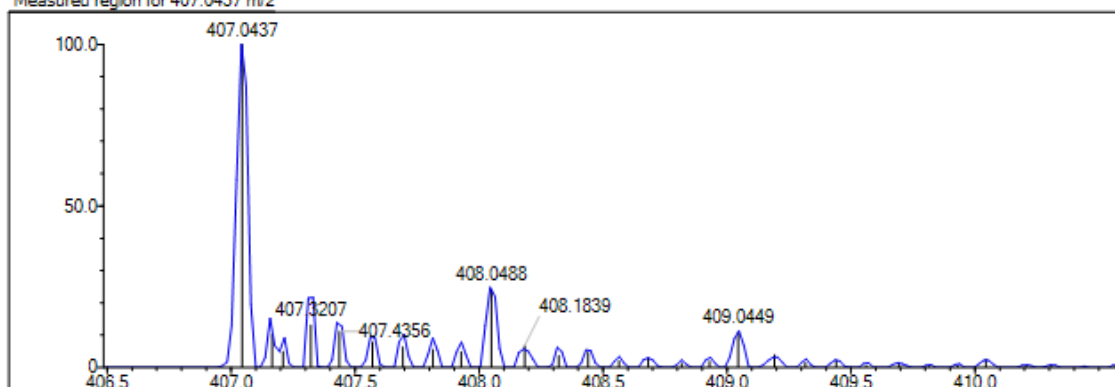
DBE Range: 0.0 - 30.0  
 Apply N Rule: no  
 Isotope RI (%): 1.00  
 MSn Logic Mode: AND

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

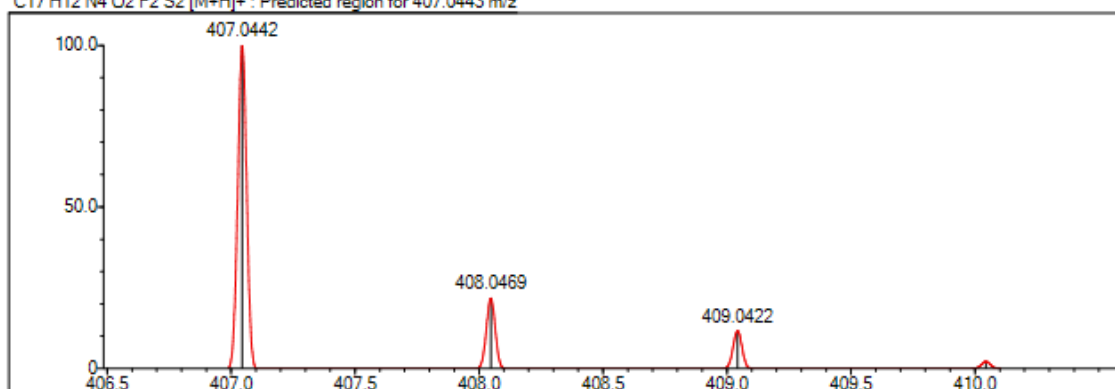
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 6.120 Scan#: 919



Measured region for 407.0437 m/z



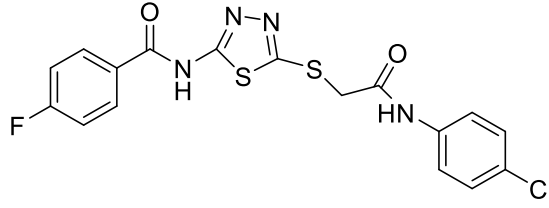
C17 H12 N4 O2 F2 S2 [M+H]<sup>+</sup> : Predicted region for 407.0443 m/z



| Rank | Score | Formula (M)         | Ion                | Meas. m/z | Pred. m/z | Df. (mDa) | Df. (ppm) | Iso    | DBE  |
|------|-------|---------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------|------|
| 1    | 98.83 | C17 H12 N4 O2 F2 S2 | [M+H] <sup>+</sup> | 407.0437  | 407.0443  | -0.6      | -1.47     | 100.00 | 13.0 |

Şekil 5.65. HRMS Analizi (3m)

**5.1.13. 4-Floro-N-(5-((2-((4-klorofenil)amino)-2-oksoetil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3n)**



**Şekil 5.66.** 4-Floro-N-(5-((2-((4-klorofenil)amino)-2-oksoetil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3n)

*molekülünün kimyasal yapısı*

**Deneyisel E.N.:** 238.1-241.1 °C **Verim:** %82

**IR (ATR)  $\nu_{\text{maks}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3280 (N-H bağına ait band), 3057 (C-H bağına ait band), 1656 (C=O bağına ait band)

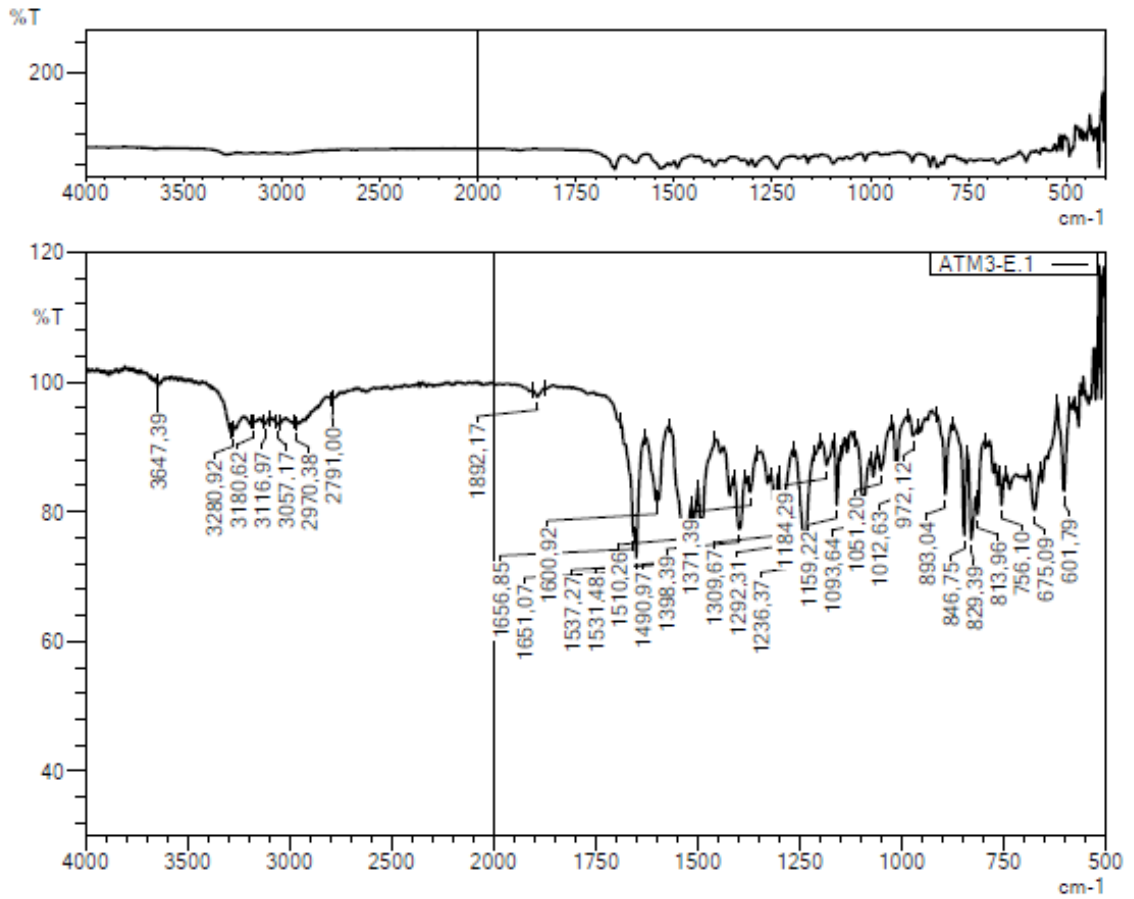
**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 4.21 (2H, s,  $-\text{CH}_2$ ), 7.14-7.17 (2H, m, Ar-H), 7.25-7.31 (3H, m, Ar-H), 7.83-7.96 (2H, m, Ar-H), 8.14-8.19 (1H, m, Ar-H), 8.25-8.29 (1H, m, Ar-H), 10.18 (1H, s, NH), 10.24-10.44 (1H, m, NH)

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 38.38, 115.51, 121.28, 127.49, 129.19, 131.34, 132.29, 138.04, 138.29, 162.79, 164.51, 165.76, 166.63

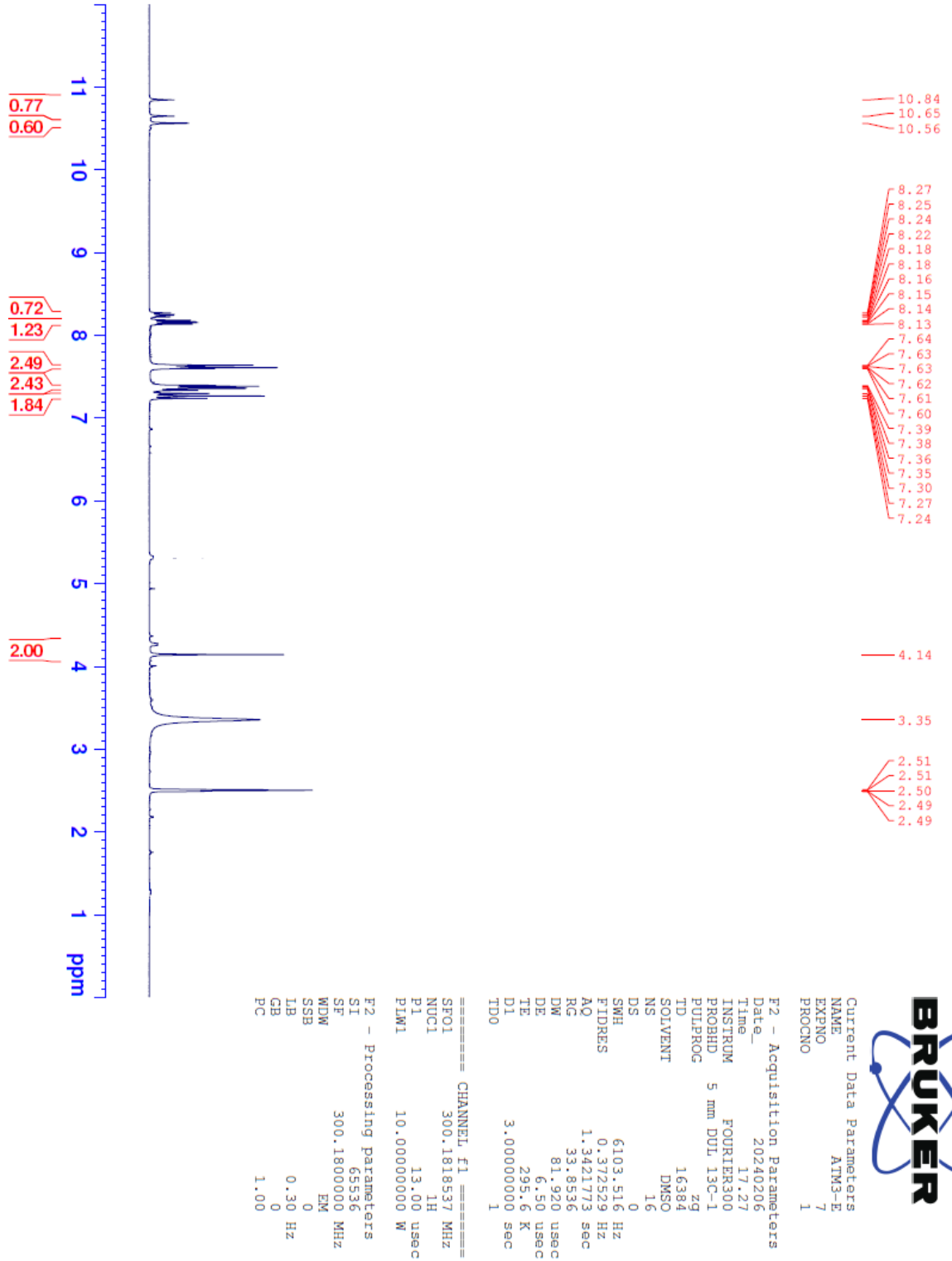
**HRMS (ESI) ( $m/z$ )  $[\text{M}+\text{H}]^+$ :**  $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2\text{FS}_2\text{Cl}$  için hesaplanan: 423.0147, bulunan: 423.0156

## DOPNALAB

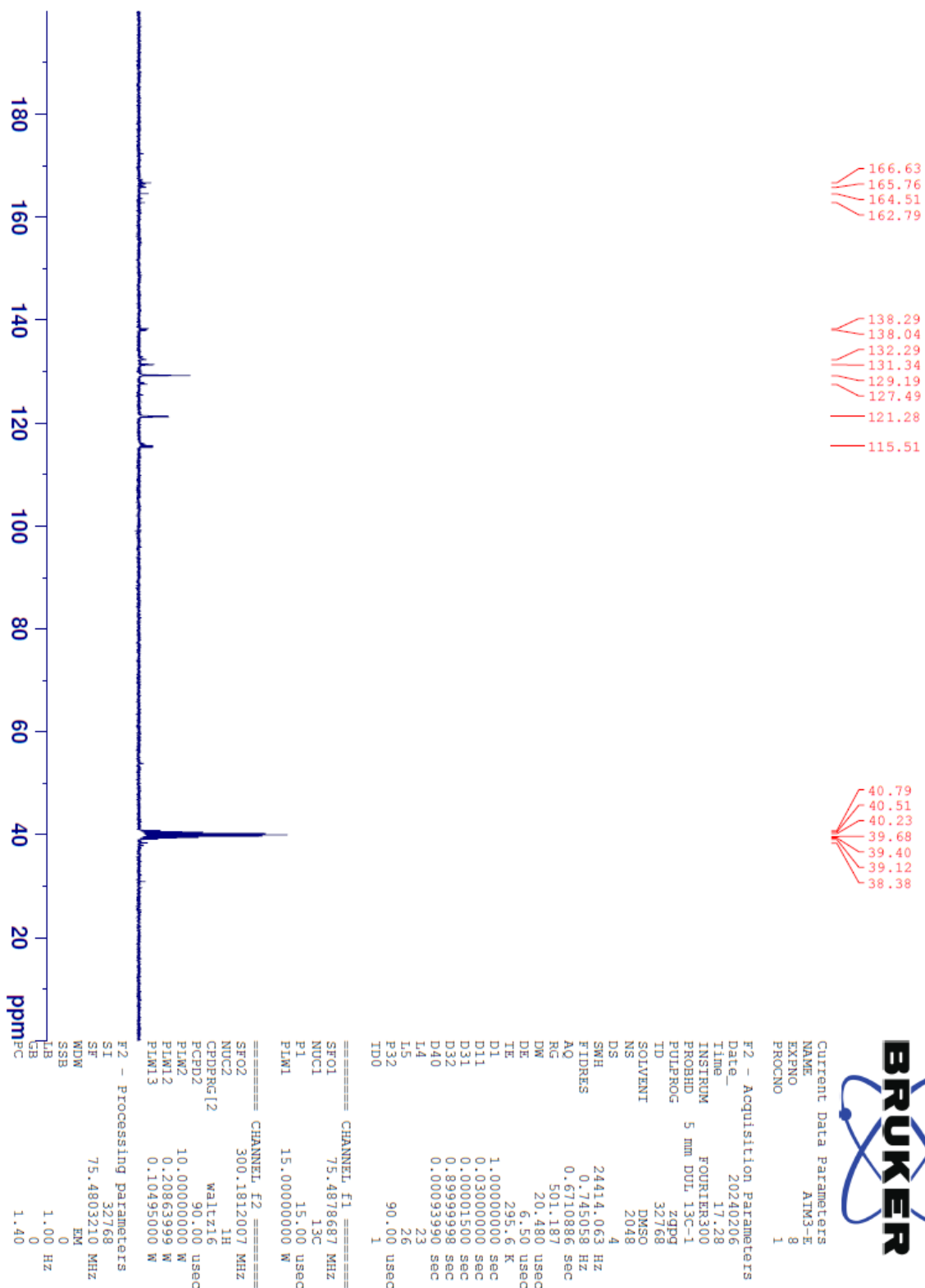
| Item               | Value                                                          |
|--------------------|----------------------------------------------------------------|
| Acquired Date&Time | 16.05.2024 10:12:55                                            |
| Acquired by        | System Administrator                                           |
| Filename           | C:\Users\dopnalab\Desktop\MASAUSTU\ARZU HIDIR\ATMATM3-E.1.ispd |
| Spectrum name      | ATM3-E.1                                                       |
| Sample name        | ATM3-E                                                         |
| Sample ID          |                                                                |
| Option             |                                                                |
| Comment            |                                                                |
| No. of Scans       | 30                                                             |
| Resolution         | 4 [cm-1]                                                       |
| Apodization        | Happ-Genzel                                                    |



Şekil 5.67. IR Analizi (3n)



Şekil 5.68.  $^1\text{H}$ -NMR Analizi (3n)



Şekil 5.69.  $^{13}\text{C}$ -NMR Analizi (3n)

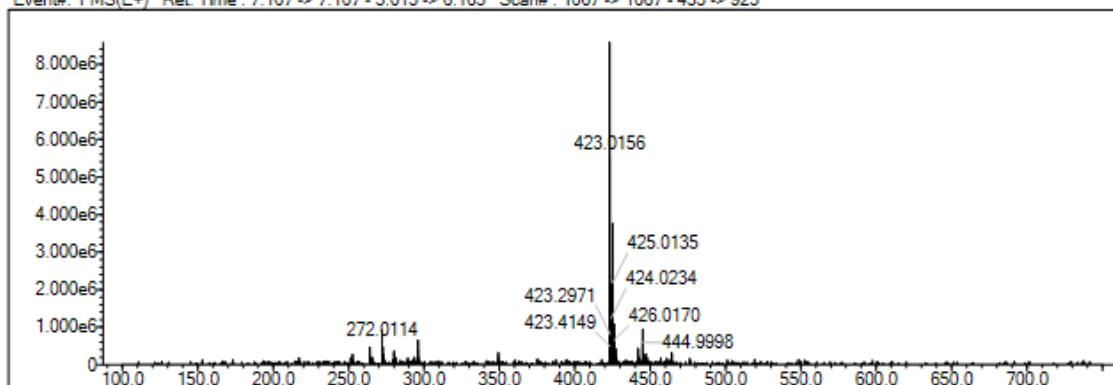
| Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Use Adduct |
|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------------|
| H    | 1    | 0   | 35  | O    | 2    | 0   | 4   | S    | 2    | 0   | 2   | Ru   | 2    | 0   | 0   | H          |
| C    | 4    | 0   | 35  | F    | 1    | 1   | 4   | Cl   | 1    | 1   | 1   | Pd   | 2    | 0   | 0   |            |
| N    | 3    | 4   | 7   | P    | 3    | 0   | 0   | Br   | 1    | 0   | 0   | I    | 3    | 0   | 0   |            |

Error Margin (ppm): 5  
 HC Ratio: unlimited  
 Max Isotopes: 3  
 MSn Iso RI (%): 10.00

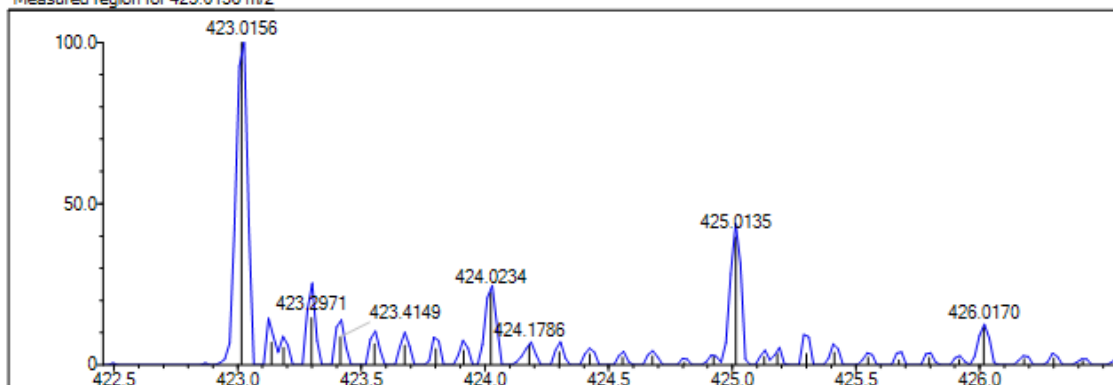
DBE Range: 0.0 - 30.0  
 Apply N Rule: no  
 Isotope RI (%): 1.00  
 MSn Logic Mode: AND

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

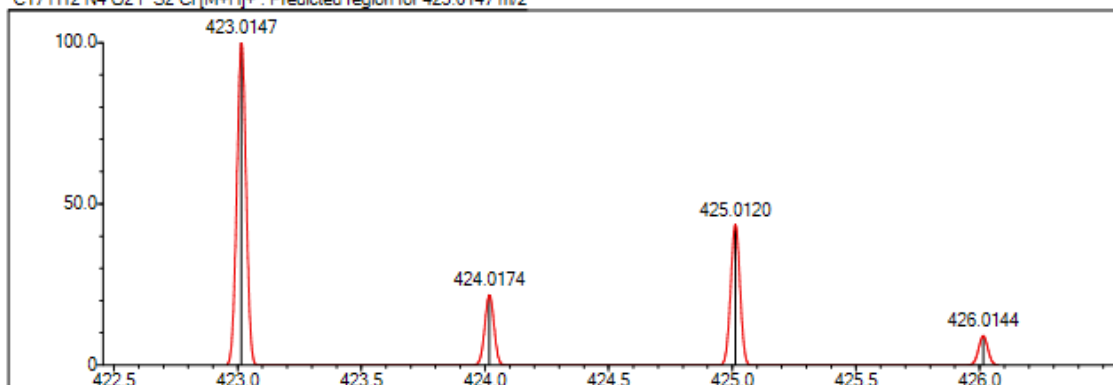
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 7.107 -> 7.107 - 3.013 -> 6.165 Scan#: 1067 -> 1067 - 453 -> 925



Measured region for 423.0156 m/z



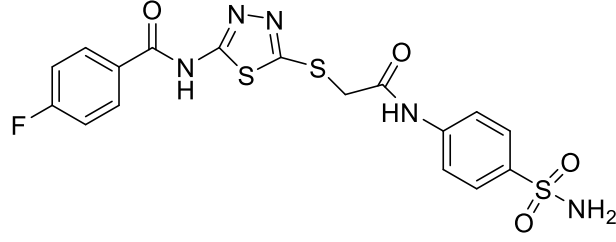
C17 H12 N4 O2 F S2 Cl [M+H]<sup>+</sup> : Predicted region for 423.0147 m/z



| Rank | Score | Formula (M)           | Ion                | Meas. m/z | Pred. m/z | Df. (mDa) | Df. (ppm) | Iso   | DBE  |
|------|-------|-----------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|------|
| 2    | 79.80 | C17 H12 N4 O2 F S2 Cl | [M+H] <sup>+</sup> | 423.0156  | 423.0147  | 0.9       | 2.13      | 82.12 | 13.0 |

Şekil 5.70. HRMS Analizi (3n)

**5.1.14. 4-Floro-N-(5-((2-okso-2-((4-sülfamoilfenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3o)**



**Şekil 5.71.** 4-Floro-N-(5-((2-okso-2-((4-sülfamoilfenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3o) molekülünün kimyasal yapısı

**Deneyisel E.N.:** 224.9-227.2 °C **Verim:** %86

**IR (ATR)  $\nu_{\text{maks}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3277 (N-H bağına ait band), 2958 (C-H bağına ait band), 1681 (C=O bağına ait band)

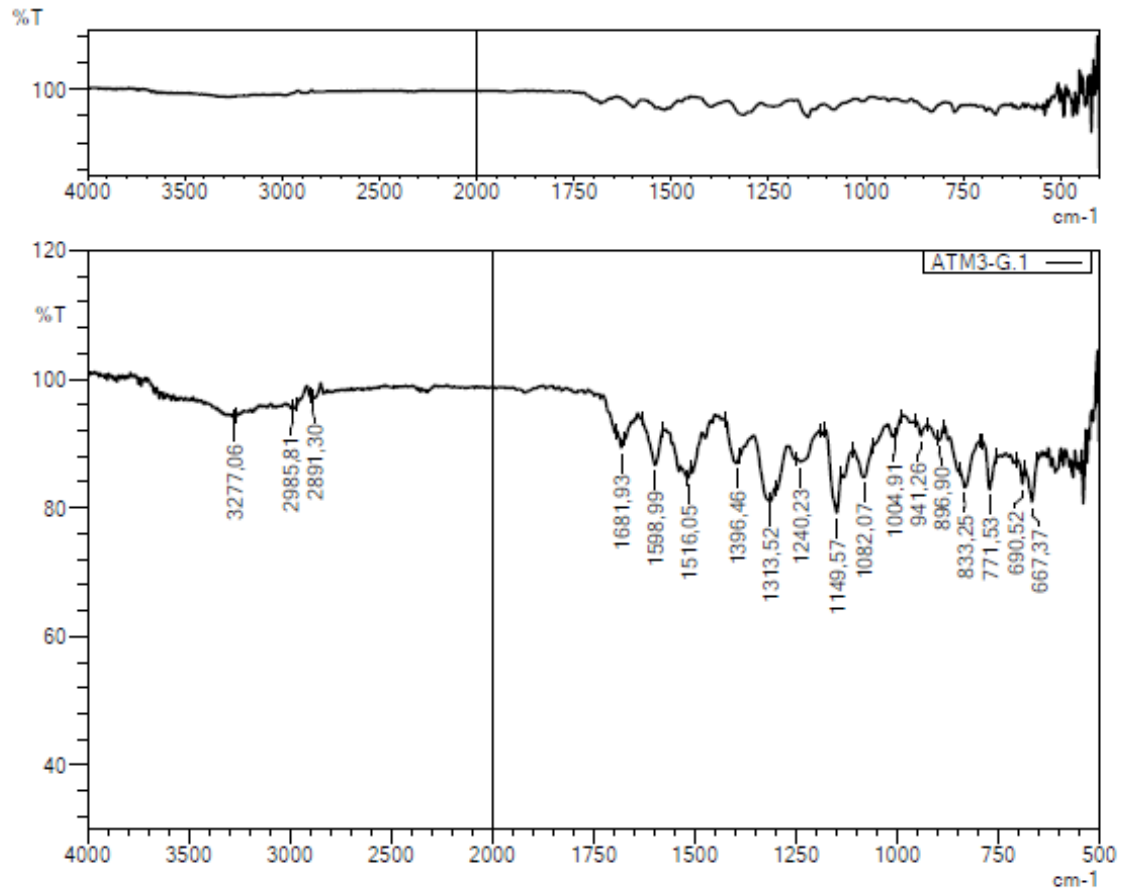
**$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 4.05-4.09 (2H, m,  $-\text{CH}_2$ ), 7.16 (1H, t,  $J= 8.93$  Hz, Ar-H), 7.26-7.38 (4H, m, Ar-H), 7.76 (3H, s, Ar-H), 7.99-8.04 (1H, m, Ar-H ), 8.11-8.16 (1H, m, Ar-H)

**$^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 38.39, 114.54, 114.82, 116.21, 116.50, 119.16, 127.23, 130.90, 132.56, 142.31, 166.97, 167.48, 170.50

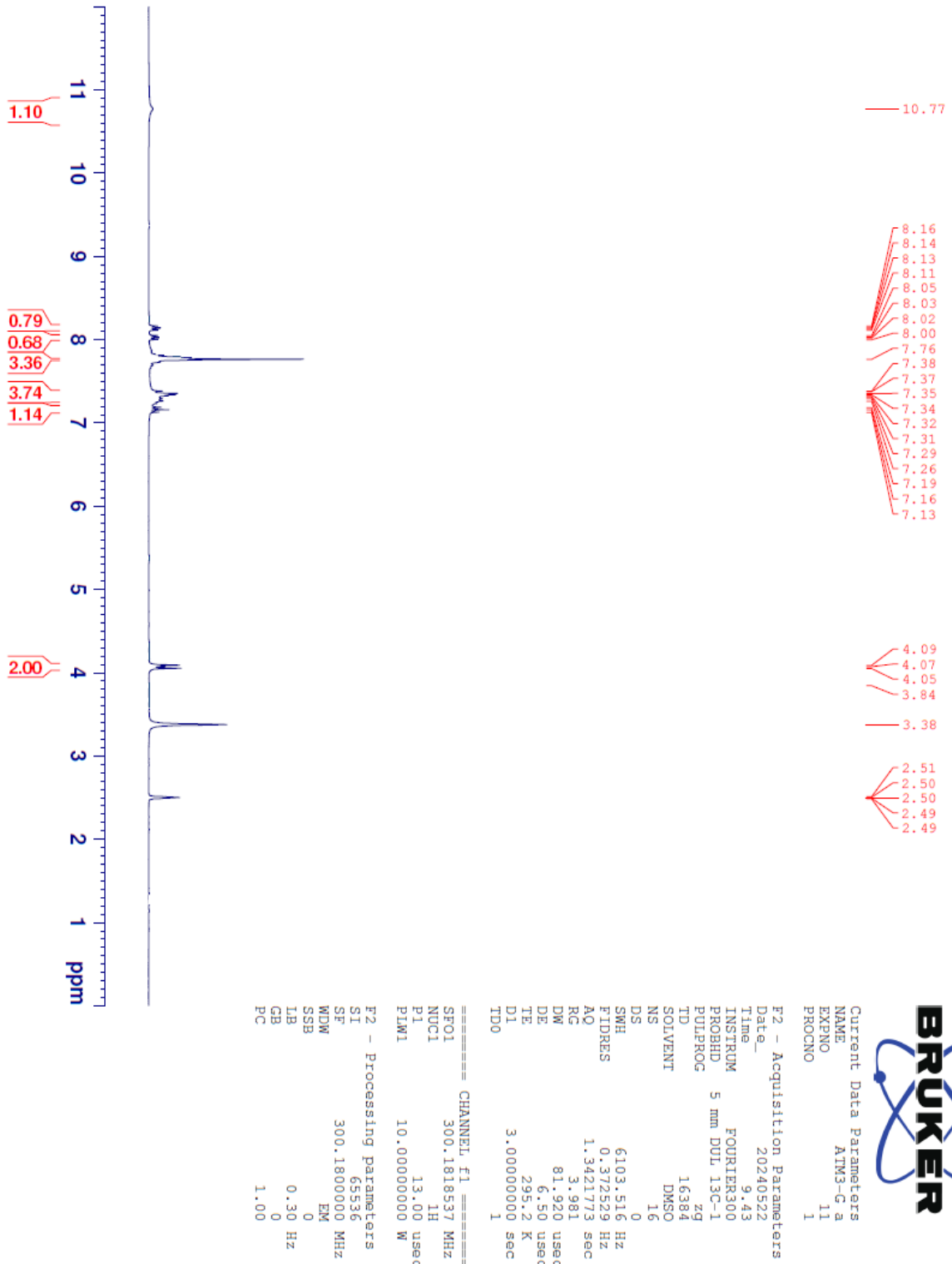
**HRMS (ESI) ( $m/z$ )  $[\text{M}+\text{H}]^+$ :**  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_4\text{FS}_3$  için hesaplanan: 468.0267, bulunan: 468.0265

## DOPNALAB

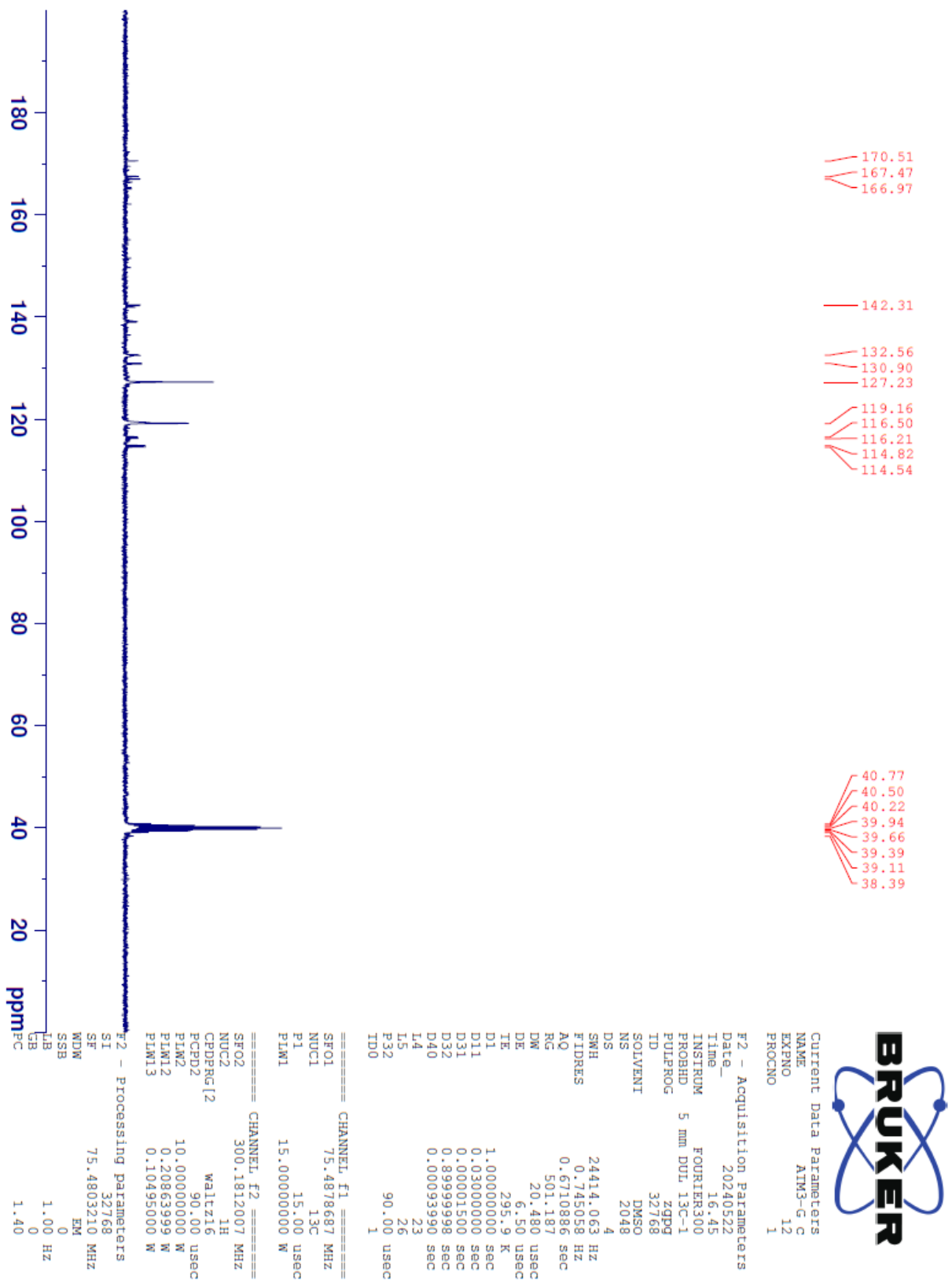
| Item               | Value                                                           |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Acquired Date&Time | 16.05.2024 09:55:57                                             |
| Acquired by        | System Administrator                                            |
| Filename           | C:\Users\dopnalab\Desktop\MASAUSTU\ARZU HIDIR\ATM\ATM3-G.1.ispd |
| Spectrum name      | ATM3-G.1                                                        |
| Sample name        | ATM3-G                                                          |
| Sample ID          |                                                                 |
| Option             |                                                                 |
| Comment            |                                                                 |
| No. of Scans       | 30                                                              |
| Resolution         | 4 [cm-1]                                                        |
| Apodization        | Happ-Genzel                                                     |



Şekil 5.72. IR Analizi (3o)



Şekil 5.73.  $^1\text{H}$ -NMR Analizi (3o)



Şekil 5.74.  $^{13}\text{C}$ -NMR Analizi (3o)

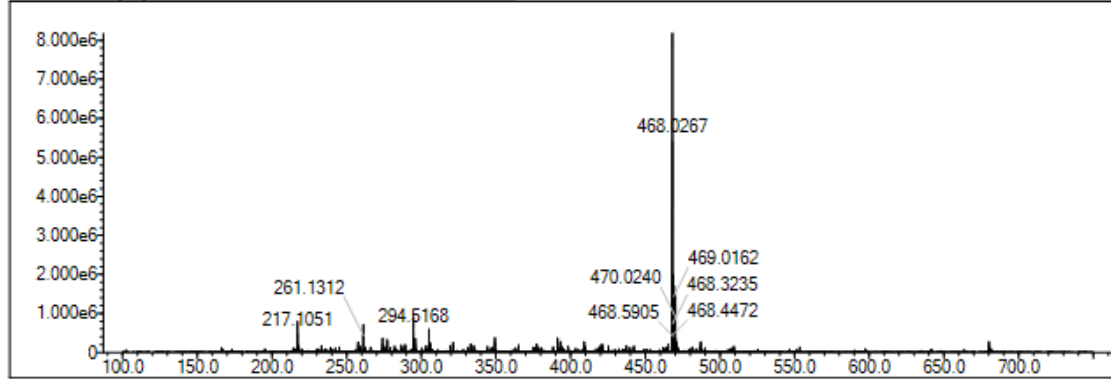
| Elmt | Val | Min | Max | Elmt | Val | Min | Max | Elmt | Val | Min | Max | Elmt | Val | Min | Max | Use Adduct |
|------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|------------|
| H    | 1   | 0   | 35  | O    | 2   | 0   | 4   | S    | 2   | 0   | 3   | Ru   | 2   | 0   | 0   | H          |
| C    | 4   | 0   | 35  | F    | 1   | 1   | 1   | Cl   | 1   | 0   | 1   | Pd   | 2   | 0   | 0   |            |
| N    | 3   | 4   | 7   | P    | 3   | 0   | 0   | Br   | 1   | 0   | 0   | I    | 3   | 0   | 0   |            |

Error Margin (ppm): 5  
 HC Ratio: unlimited  
 Max Isotopes: 3  
 MSn Iso RI (%): 10.00

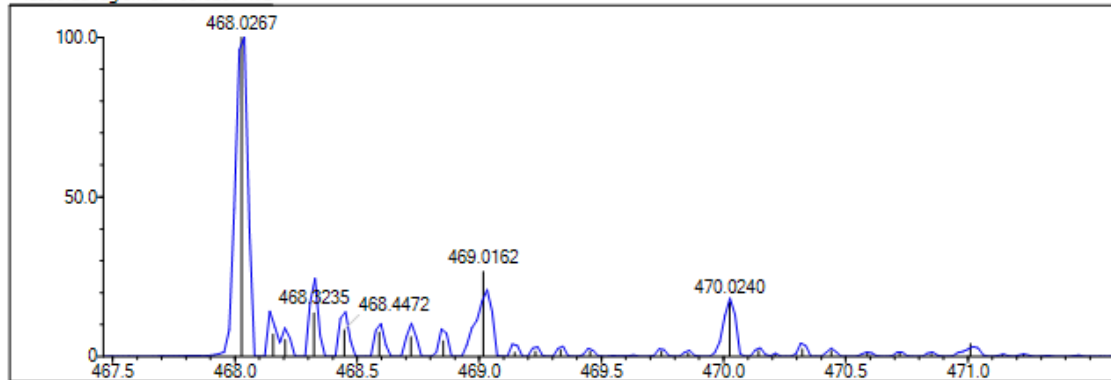
DBE Range: 0.0 - 30.0  
 Apply N Rule: no  
 Isotope RI (%): 1.00  
 MSn Logic Mode: AND

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

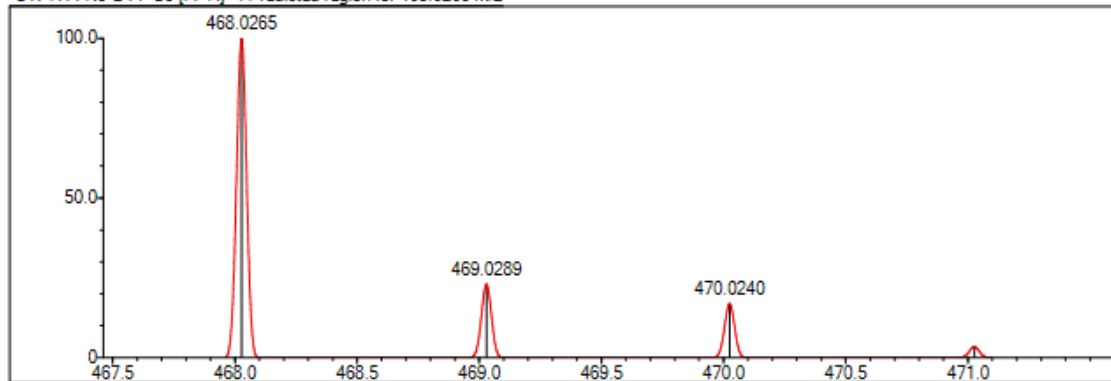
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 4.347 -> 4.680 Scan#: 653 -> 703



Measured region for 468.0267 m/z



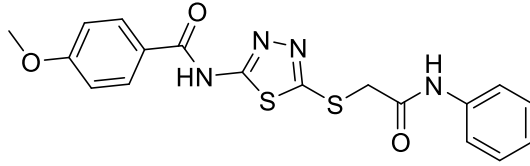
C17 H14 N5 O4 F S3 [M+H]<sup>+</sup> : Predicted region for 468.0265 m/z



| Rank | Score | Formula (M)        | Ion                | Meas. m/z | Pred. m/z | Df. (mDa) | Df. (ppm) | Iso   | DBE  |
|------|-------|--------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|------|
| 1    | 78.29 | C17 H14 N5 O4 F S3 | [M+H] <sup>+</sup> | 468.0267  | 468.0265  | 0.2       | 0.43      | 78.29 | 13.0 |

Şekil 5.75. HRMS Analizi (3o)

**5.1.15. 4-Metoksi-N-(5-((2-okso-2-(fenilamino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3p)**



**Şekil 5.76.** 4-Metoksi-N-(5-((2-okso-2-(fenilamino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3p)  
molekülünün kimyasal yapısı

**DeneySEL E.N.:** 207.0-208.6 °C **Verim:** %83

**IR (ATR)  $\nu_{\text{maks}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3197 (N-H bağına ait band), 3055 (C-H bağına ait band), 1672 (C=O bağına ait band)

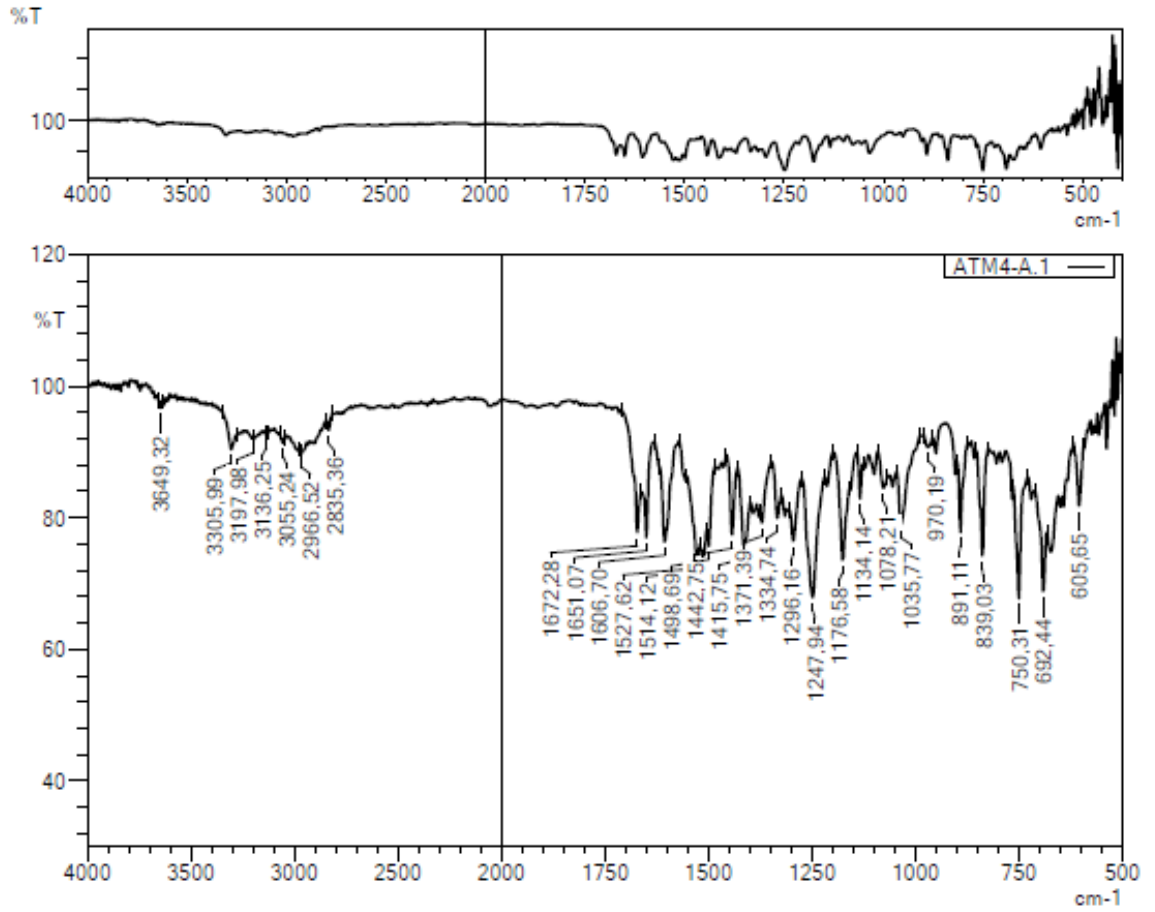
**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 3.80 (3H,s,-CH<sub>3</sub>), 4.11 (2H, s, -CH<sub>2</sub>), 6.97 (1H, d,  $J$ = 8.85 Hz, Ar-H), 7.03-7.13 (2H, m, Ar-H), 7.92 (3H, t,  $J$ = 7.91 Hz, Ar-H), 7.57-7.59-8.19 (2H, m, Ar-H ), 8.07 (1H, d,  $J$ = 8.86 Hz, Ar-H)

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 38.46, 55.74, 113.66, 115.33, 119.58, 123.94, 125.38, 129.28, 130.51, 139.33, 149.37, 166.26, 166.52, 170.47

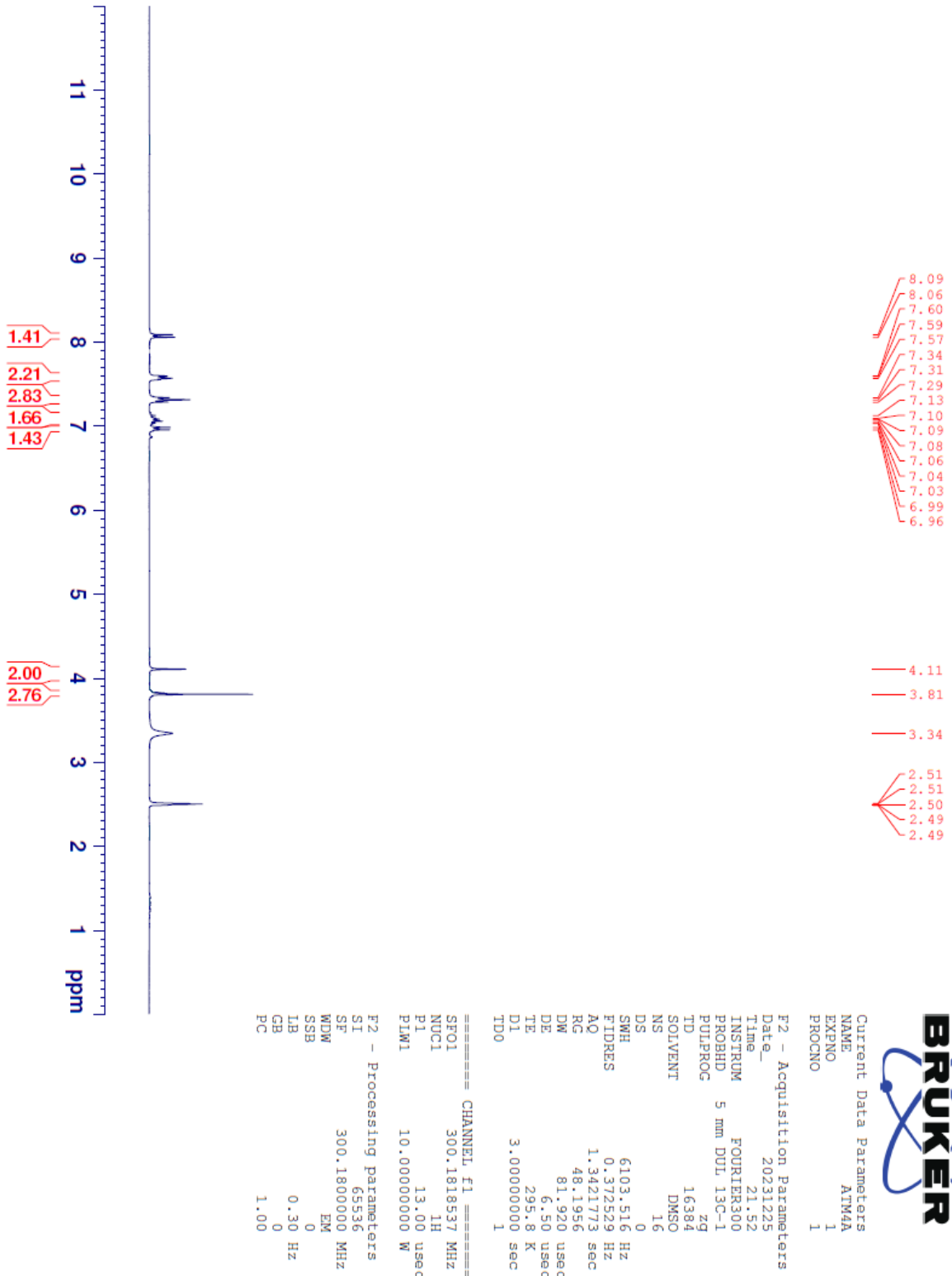
**HRMS (ESI) ( $m/z$ ) [ $M+H$ ]<sup>+</sup>:** C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub> için hesaplanan: 401.0737, bulunan: 401.0737

## DOPNALAB

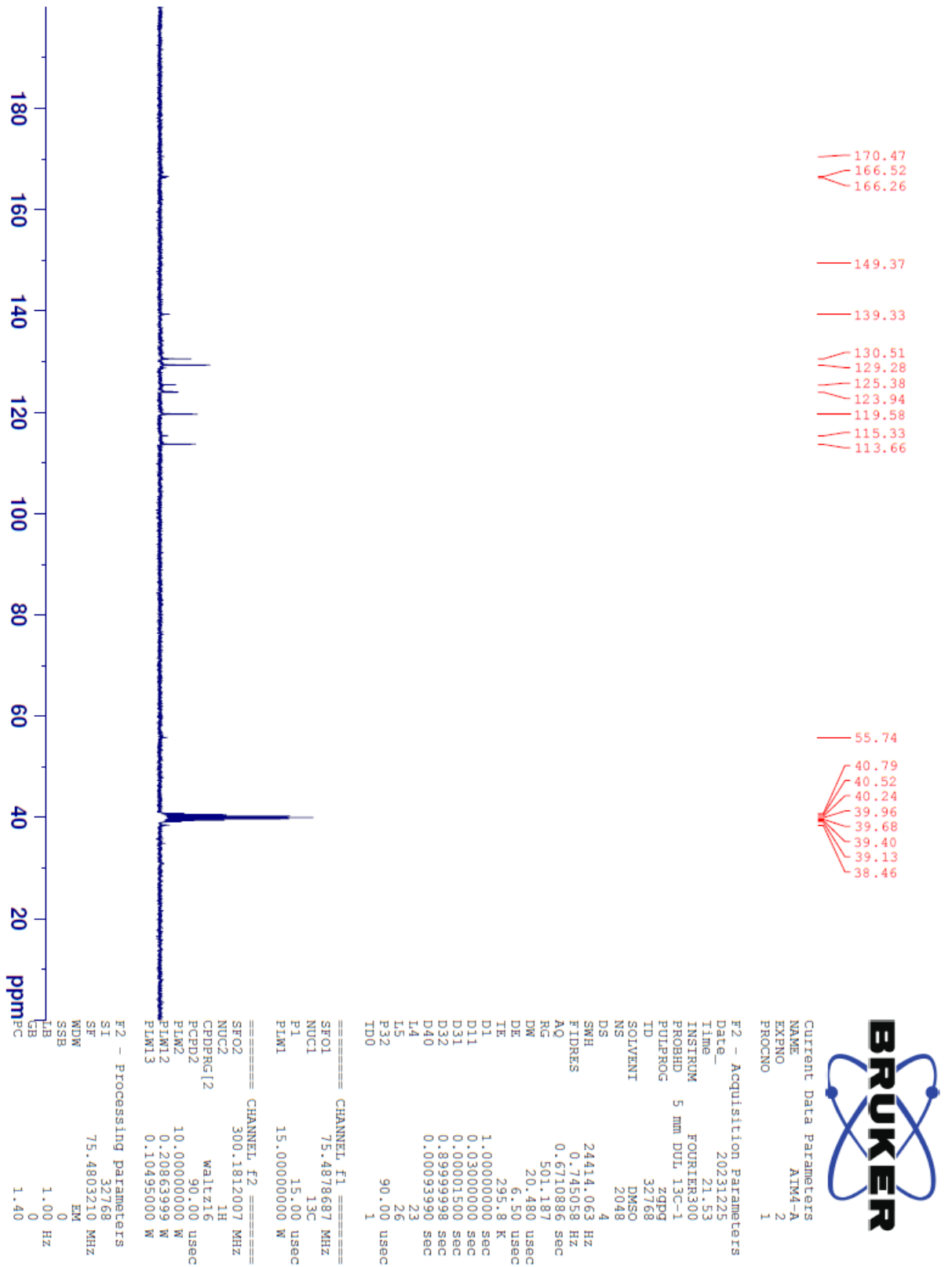
| Item               | Value                                                         |
|--------------------|---------------------------------------------------------------|
| Acquired Date&Time | 16.05.2024 10:05:57                                           |
| Acquired by        | System Administrator                                          |
| Filename           | C:\Users\dopnalab\Desktop\MASAUSTUARZU HIDIR\ATM\ATM4-A.1.spd |
| Spectrum name      | ATM4-A.1                                                      |
| Sample name        | ATM4-A                                                        |
| Sample ID          |                                                               |
| Option             |                                                               |
| Comment            |                                                               |
| No. of Scans       | 30                                                            |
| Resolution         | 4 [cm-1]                                                      |
| Apodization        | Happ-Genzel                                                   |



Şekil 5.77. IR Analizi (3p)



Şekil 5.78.  $^1\text{H}$ -NMR Analizi (3p)



Şekil 5.79.  $^{13}\text{C}$ -NMR Analizi (3p)

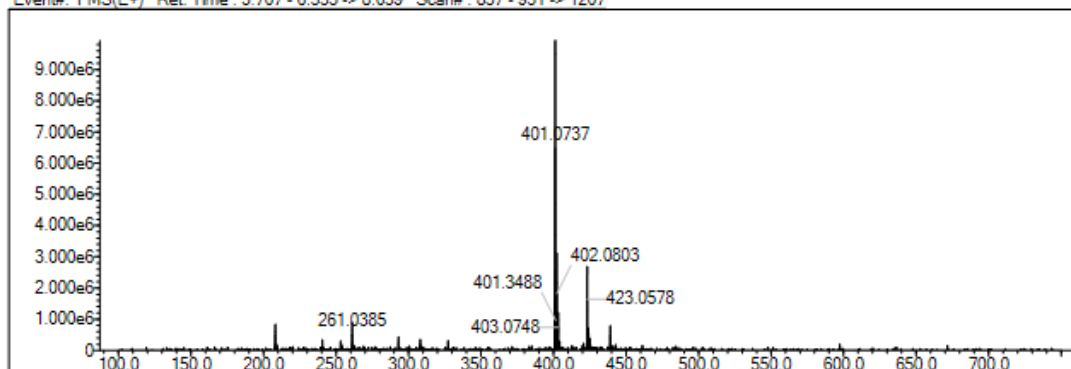
| Elmt | Val. | Mini | Max | Elmt | Val. | Mini | Max | Elmt | Val. | Mini | Max | Elmt | Val. | Mini | Max | Use Adduct |
|------|------|------|-----|------|------|------|-----|------|------|------|-----|------|------|------|-----|------------|
| H    | 1    | 0    | 35  | O    | 2    | 0    | 4   | S    | 2    | 0    | 3   | Ru   | 2    | 0    | 0   | H          |
| C    | 4    | 0    | 35  | F    | 1    | 0    | 0   | Cl   | 1    | 0    | 0   | Pd   | 2    | 0    | 0   |            |
| N    | 3    | 4    | 7   | P    | 3    | 0    | 0   | Br   | 1    | 0    | 0   | I    | 3    | 0    | 0   |            |

Error Margin (ppm): 5  
 HC Ratio: unlimited  
 Max Isotopes: 3  
 MSn Iso RI (%): 10.00

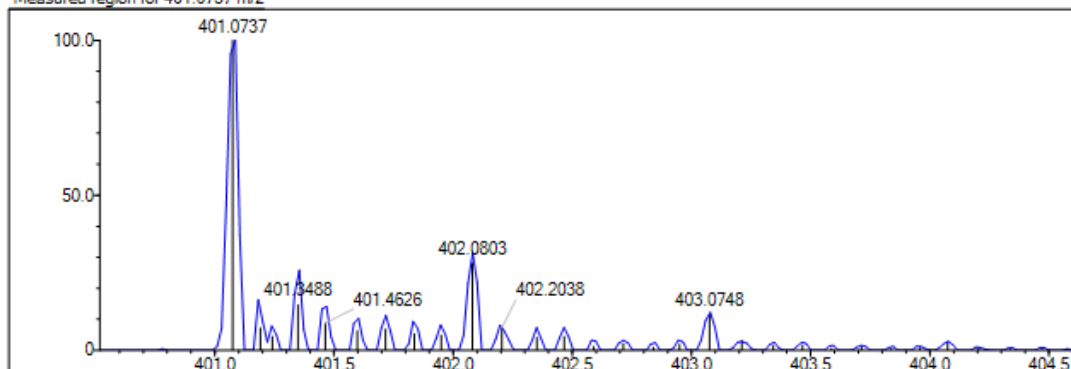
DBE Range: 0.0 - 30.0  
 Apply N Rule: no  
 Isotope RI (%): 1.00  
 MSn Logic Mode: AND

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

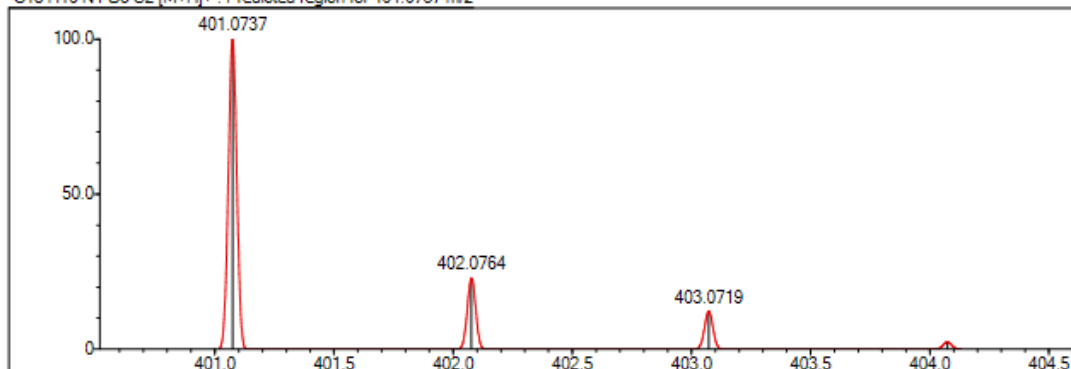
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 5.707 - 6.333 -> 8.039 Scan#: 857 - 951 -> 1207



Measured region for 401.0737 m/z



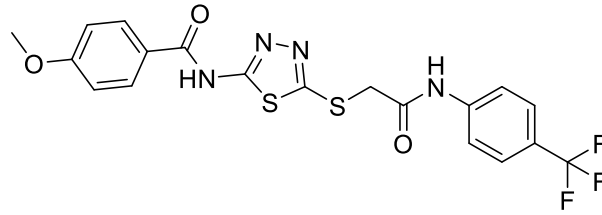
C18 H16 N4 O3 S2 [M+H]<sup>+</sup> : Predicted region for 401.0737 m/z



| Rank | Score | Formula (M)      | Ion                | Meas. m/z | Pred. m/z | Df. (mDa) | Df. (ppm) | Iso   | DBE  |
|------|-------|------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|------|
| 2    | 86.39 | C18 H16 N4 O3 S2 | [M+H] <sup>+</sup> | 401.0737  | 401.0737  | 0.0       | 0.00      | 86.39 | 13.0 |

Şekil 5.80. HRMS Analizi (3p)

**5.1.16. 4-Metoksi-N-(5-((2-okso-2-((4-(triflorometil)fenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3r)**



**Şekil 5.81.** 4-Metoksi-N-(5-((2-okso-2-((4-(triflorometil)fenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3r) molekülünün kimyasal yapısı

**DeneySEL E.N.:** 250.5-253.3 °C **Verim:** %88

**IR (ATR)  $\nu_{\text{maks}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3304 (N-H bağına ait band), 2987 (C-H bağına ait band), 1674 (C=O bağına ait band)

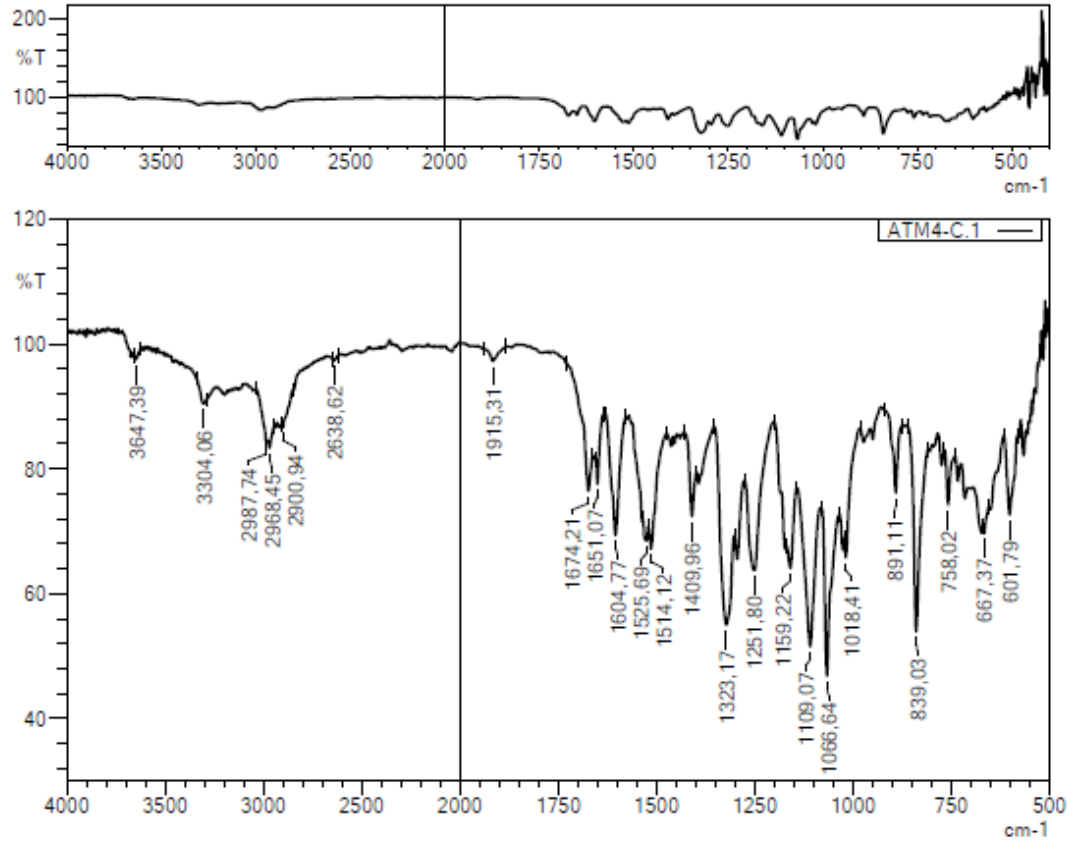
**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 4.21 (2H, s, -CH<sub>2</sub>), 7.14-7.17 (2H, m, Ar-H), 7.25-7.31 (3H, m, Ar-H), 7.83-7.96 (2H, m, Ar-H), 8.14-8.19 (1H, m, Ar-H), 8.25-8.29 (1H, m, Ar-H), 10.18 (1H, s, NH), 10.24-10.44 (1H, m, NH)

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 30.87, 56.40, 112.16, 114.30, 119.51, 122.98, 125.85, 126.68, 130.92, 133.38, 142.78, 163.21, 166.85, 167.01, 170.46

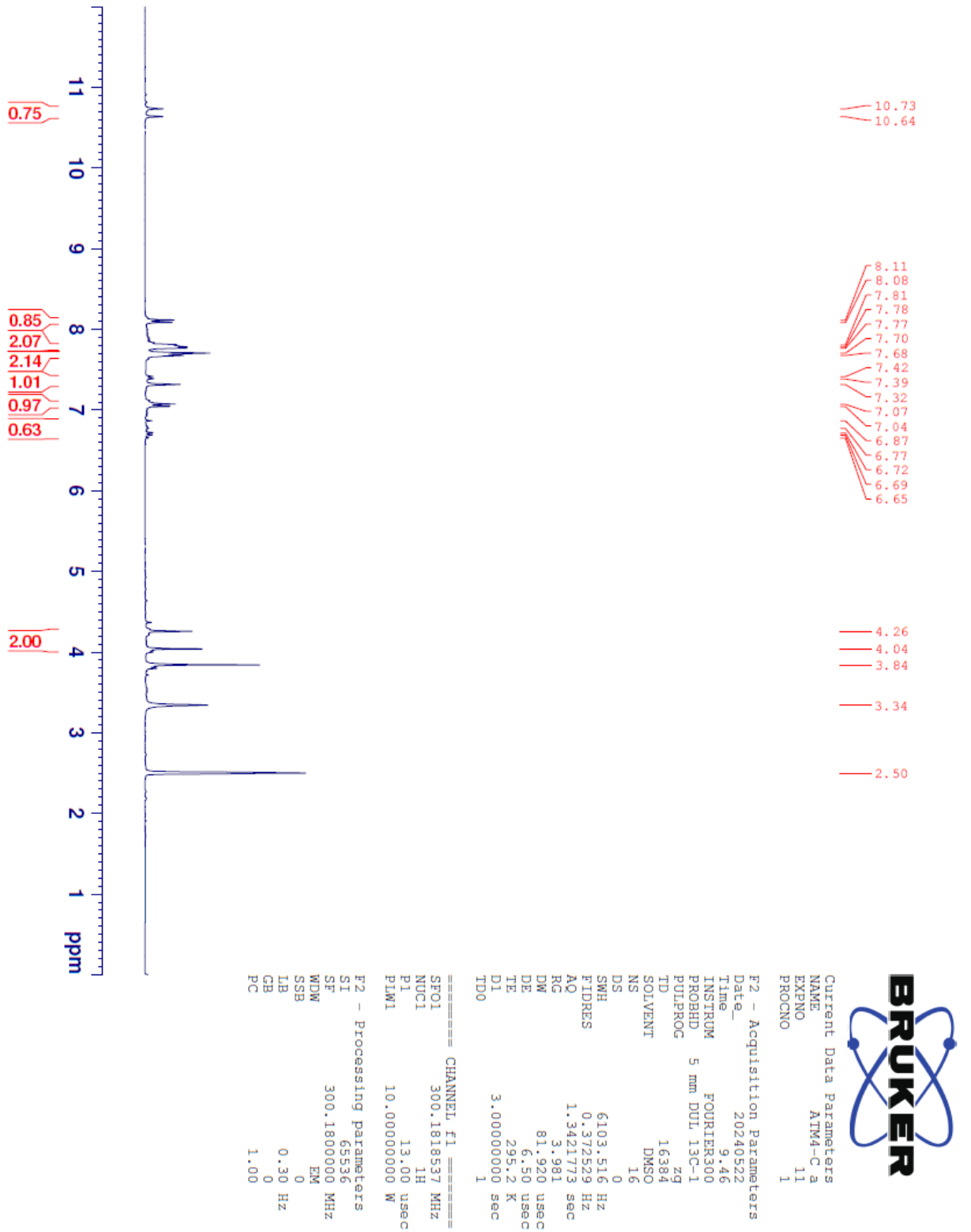
**HRMS (ESI) (m/z)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ :** C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>N<sub>4</sub>F<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub> için hesaplanan: 469.0616, bulunan: 469.0610

## DOPNALAB

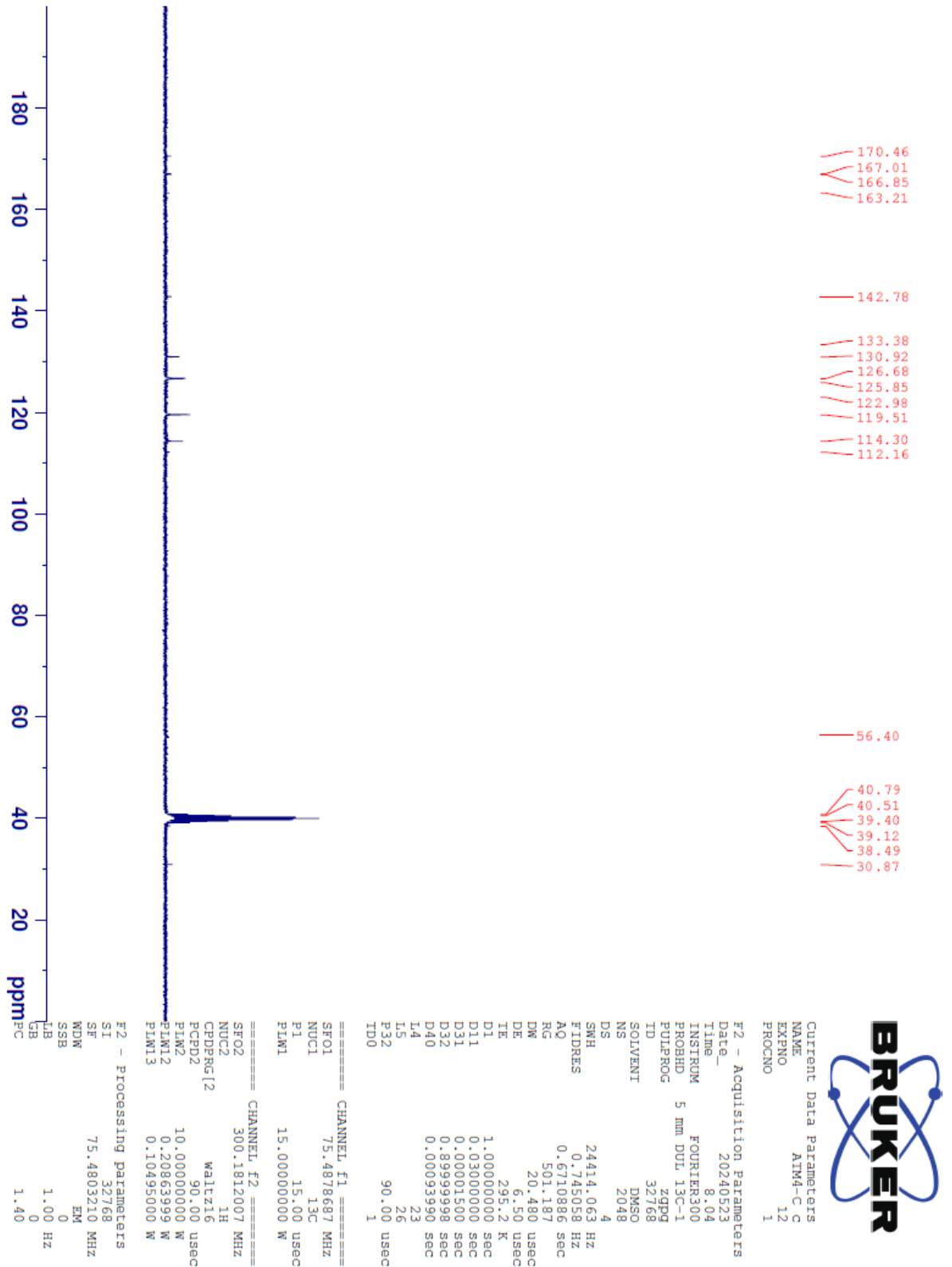
| Item               | Value                                                           |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Acquired Date&Time | 16.05.2024 10:24:08                                             |
| Acquired by        | System Administrator                                            |
| Filename           | C:\Users\dopnalab\Desktop\MASAUSTU\ARZU HIDIR\ATM\ATM4-C.1.ispd |
| Spectrum name      | ATM4-C.1                                                        |
| Sample name        | ATM4-C                                                          |
| Sample ID          |                                                                 |
| Option             |                                                                 |
| Comment            |                                                                 |
| No. of Scans       | 30                                                              |
| Resolution         | 4 [cm-1]                                                        |
| Apodization        | Happ-Genzel                                                     |



Şekil 5.82. IR Analizi (3r)



Şekil 5.83. <sup>1</sup>H-NMR Analizi (3r)



Şekil 5.84. <sup>13</sup>C-NMR Analizi (3r)

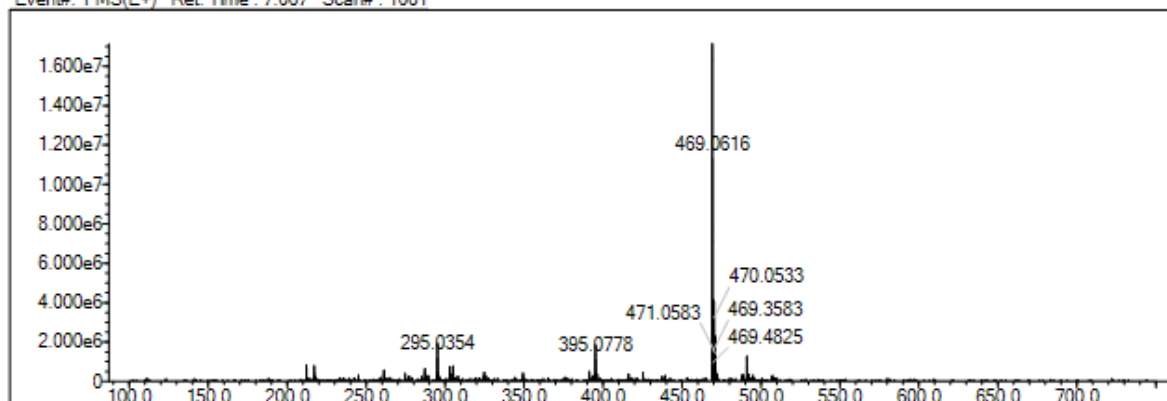
| Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Use Adduct |
|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------------|
| H    | 1    | 0   | 35  | O    | 2    | 0   | 4   | S    | 2    | 0   | 3   | Ru   | 2    | 0   | 0   | H          |
| C    | 4    | 0   | 35  | F    | 1    | 3   | 3   | Cl   | 1    | 0   | 0   | Pd   | 2    | 0   | 0   |            |
| N    | 3    | 4   | 7   | P    | 3    | 0   | 0   | Br   | 1    | 0   | 0   | I    | 3    | 0   | 0   |            |

Error Margin (ppm): 5  
 HC Ratio: unlimited  
 Max Isotopes: 3  
 MSn Iso RI (%): 10.00

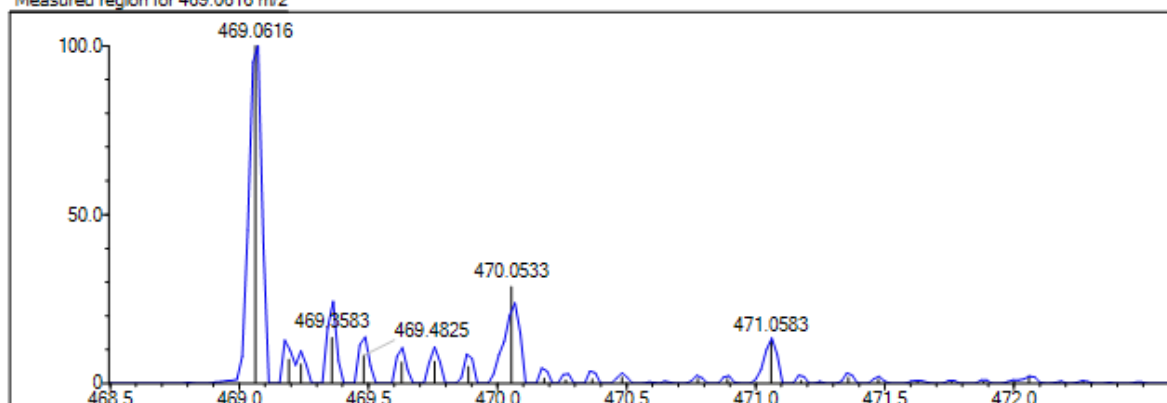
DBE Range: 0.0 - 30.0  
 Apply N Rule: no  
 Isotope RI (%): 1.00  
 MSn Logic Mode: AND

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

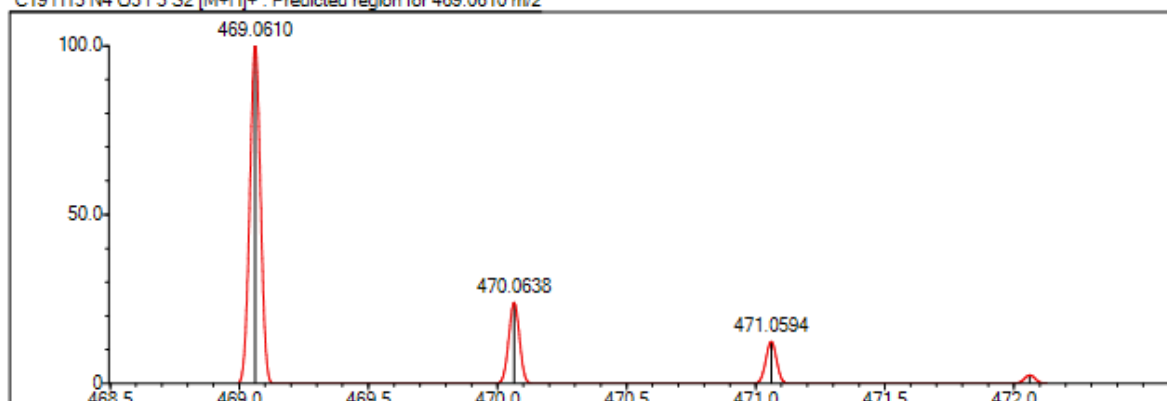
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 7.067 Scan#: 1061



Measured region for 469.0616 m/z



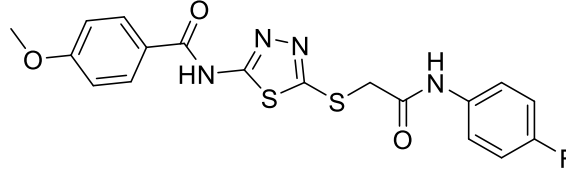
C19 H15 N4 O3 F3 S2 [M+H]<sup>+</sup> : Predicted region for 469.0610 m/z



| Rank | Score | Formula (M)         | Ion                | Meas. m/z | Pred. m/z | Df. (mDa) | Df. (ppm) | Iso   | DBE  |
|------|-------|---------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|------|
| 1    | 81.68 | C19 H15 N4 O3 F3 S2 | [M+H] <sup>+</sup> | 469.0616  | 469.0610  | 0.6       | 1.28      | 82.25 | 13.0 |

Şekil 5.85. HRMS Analizi (3r)

**5.1.17. 4-Metoksi-N-(5-((2-okso-2-((4-florofenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3s)**



**Şekil 5.86.** 4-Metoksi-N-(5-((2-okso-2-((4-florofenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3s) molekülünün kimyasal yapısı

**Deneyisel E.N.:** 187.6-191.0 °C **Verim:** %77

**IR (ATR)  $\nu_{\text{maks}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3286 (N-H bağına ait band), 2987 (C-H bağına ait band), 1668 (C=O bağına ait band)

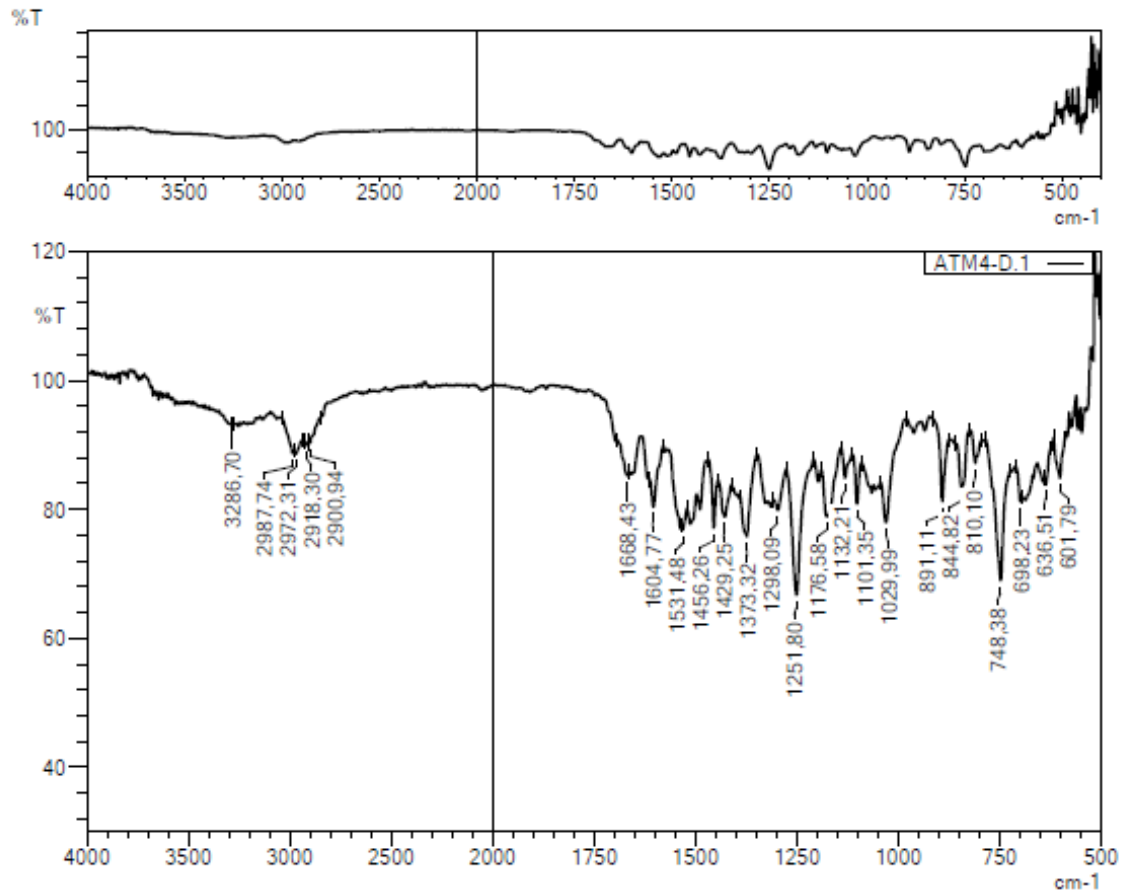
**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 3.81 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 4.19 (2H, s, -CH<sub>2</sub>), 6.98 (2H, d,  $J$ = 8.94 Hz, Ar-H), 7.14-7.18 (2H, m, Ar-H), 7.23-7.30 (1H, m, Ar-H), 7.90-7.97 (1H, m, Ar-H), 8.09 (2H, d,  $J$ = 8.90 Hz, Ar-H), 10.18 (1H, s, NH), 10.19 (1H, s, NH)

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 37.98, 55.80, 113.78, 116.08, 124.01, 124.87, 125.38, 125.84, 126.50, 130.61, 155.37, 162.18, 167.13, 170.54

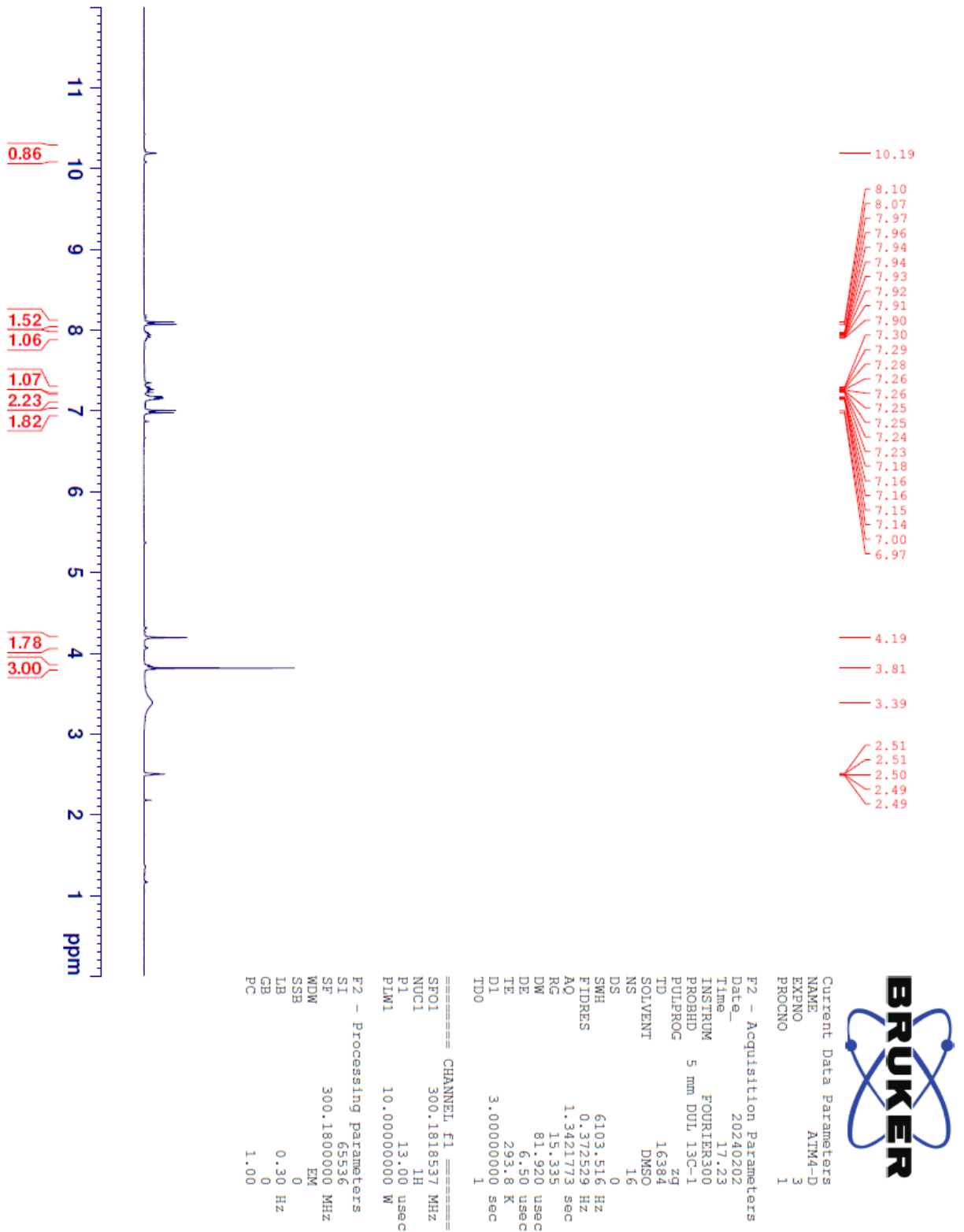
**HRMS (ESI) ( $m/z$ ) [ $M+H$ ]<sup>+</sup>:** C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>FS<sub>2</sub> için hesaplanan: 419.0642, bulunan: 419.0645

## DOPNALAB

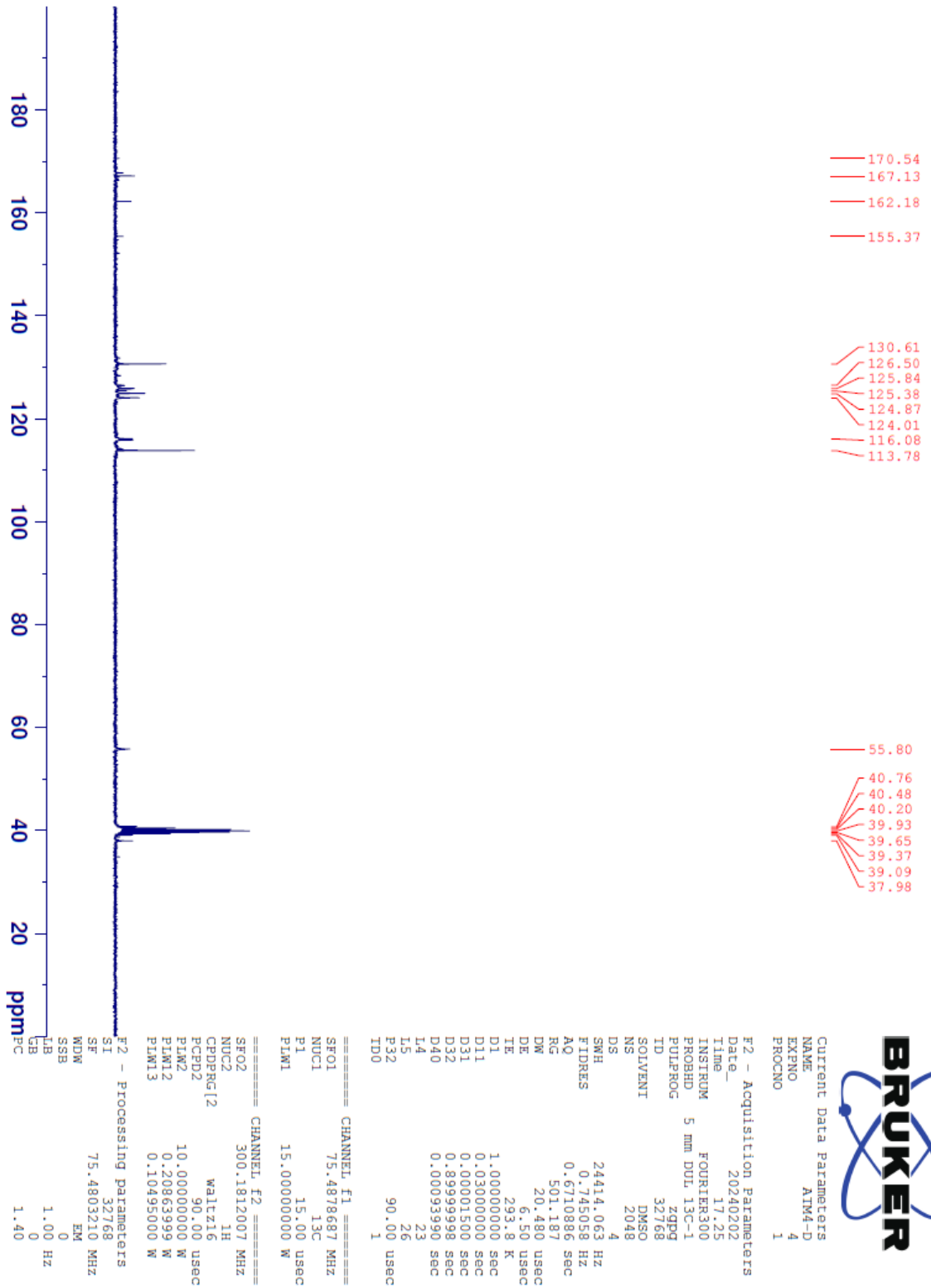
| Item               | Value                                                         |
|--------------------|---------------------------------------------------------------|
| Acquired Date&Time | 16.05.2024 10:08:33                                           |
| Acquired by        | System Administrator                                          |
| Filename           | C:\Users\dopnalab\Desktop\MASAUSTUARZU HIDIR\ATMATM4-D.1.ispd |
| Spectrum name      | ATM4-D.1                                                      |
| Sample name        | ATM4-D                                                        |
| Sample ID          |                                                               |
| Option             |                                                               |
| Comment            |                                                               |
| No. of Scans       | 30                                                            |
| Resolution         | 4 [cm-1]                                                      |
| Apodization        | Happ-Genzel                                                   |



Şekil 5.87. IR Analizi (3s)



Şekil 5.88.  $^1\text{H}$ -NMR Analizi (3s)



Şekil 5.89. <sup>13</sup>C-NMR Analizi (3s)

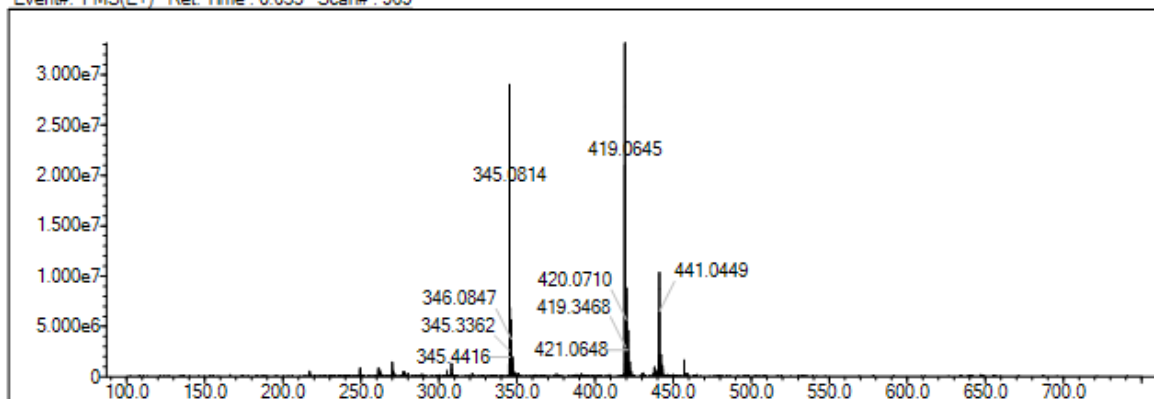
| Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Use Adduct |
|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------------|
| H    | 1    | 0   | 35  | O    | 2    | 0   | 4   | S    | 2    | 0   | 3   | Ru   | 2    | 0   | 0   | H          |
| C    | 4    | 0   | 35  | F    | 1    | 0   | 1   | Cl   | 1    | 0   | 0   | Pd   | 2    | 0   | 0   |            |
| N    | 3    | 4   | 7   | P    | 3    | 0   | 0   | Br   | 1    | 0   | 0   | I    | 3    | 0   | 0   |            |

Error Margin (ppm): 5  
 HC Ratio: unlimited  
 Max Isotopes: 3  
 MSn Iso RI (%): 10.00

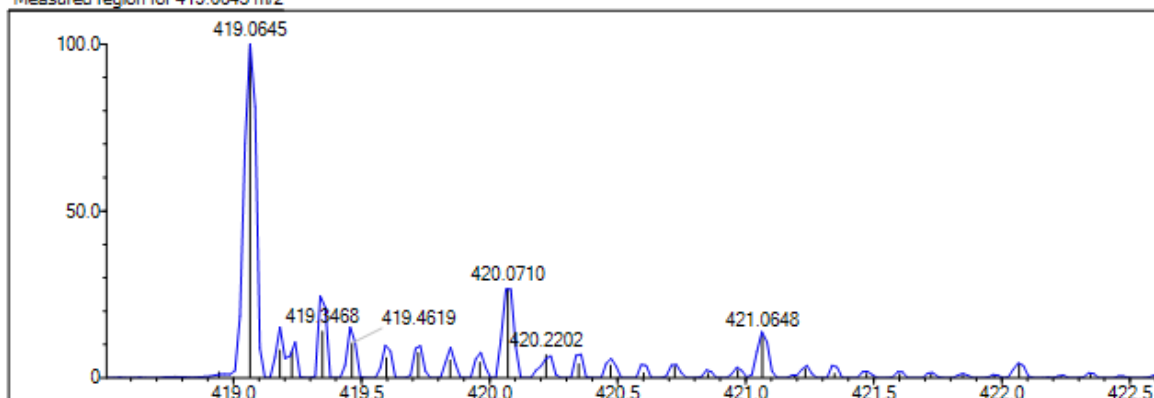
DBE Range: 0.0 - 30.0  
 Apply N Rule: no  
 Isotope RI (%): 1.00  
 MSn Logic Mode: AND

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

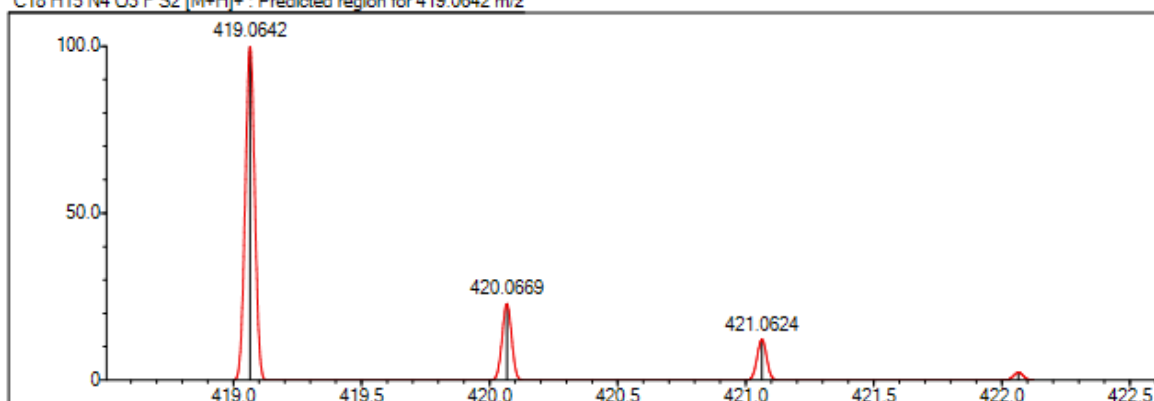
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 6.053 Scan#: 909



Measured region for 419.0645 m/z



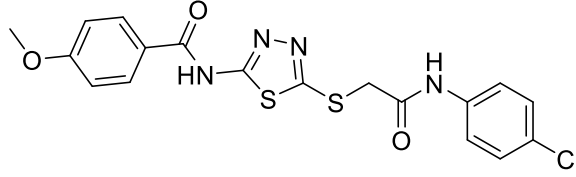
C18 H15 N4 O3 F S2 [M+H]<sup>+</sup> : Predicted region for 419.0642 m/z



| Rank | Score | Formula (M)        | Ion                | Meas. m/z | Pred. m/z | Df. (mDa) | Df. (ppm) | Iso   | DBE  |
|------|-------|--------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|------|
| 2    | 87.13 | C18 H15 N4 O3 F S2 | [M+H] <sup>+</sup> | 419.0645  | 419.0642  | 0.3       | 0.72      | 87.13 | 13.0 |

Şekil 5.90. HRMS Analizi (3s)

**5.1.18. 4-Metoksi-N-(5-((2-okso-2-((4-klorofenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3t)**



**Şekil 5.91.** 4-Metoksi-N-(5-((2-okso-2-((4-klorofenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3t)  
molekülünün kimyasal yapısı

**Deneyisel E.N.:** 233.5-235.8 °C **Verim:** %83

**IR (ATR)  $\nu_{\text{maks}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3283 (N-H bağına ait band), 3043 (C-H bağına ait band), 1655 (C=O bağına ait band)

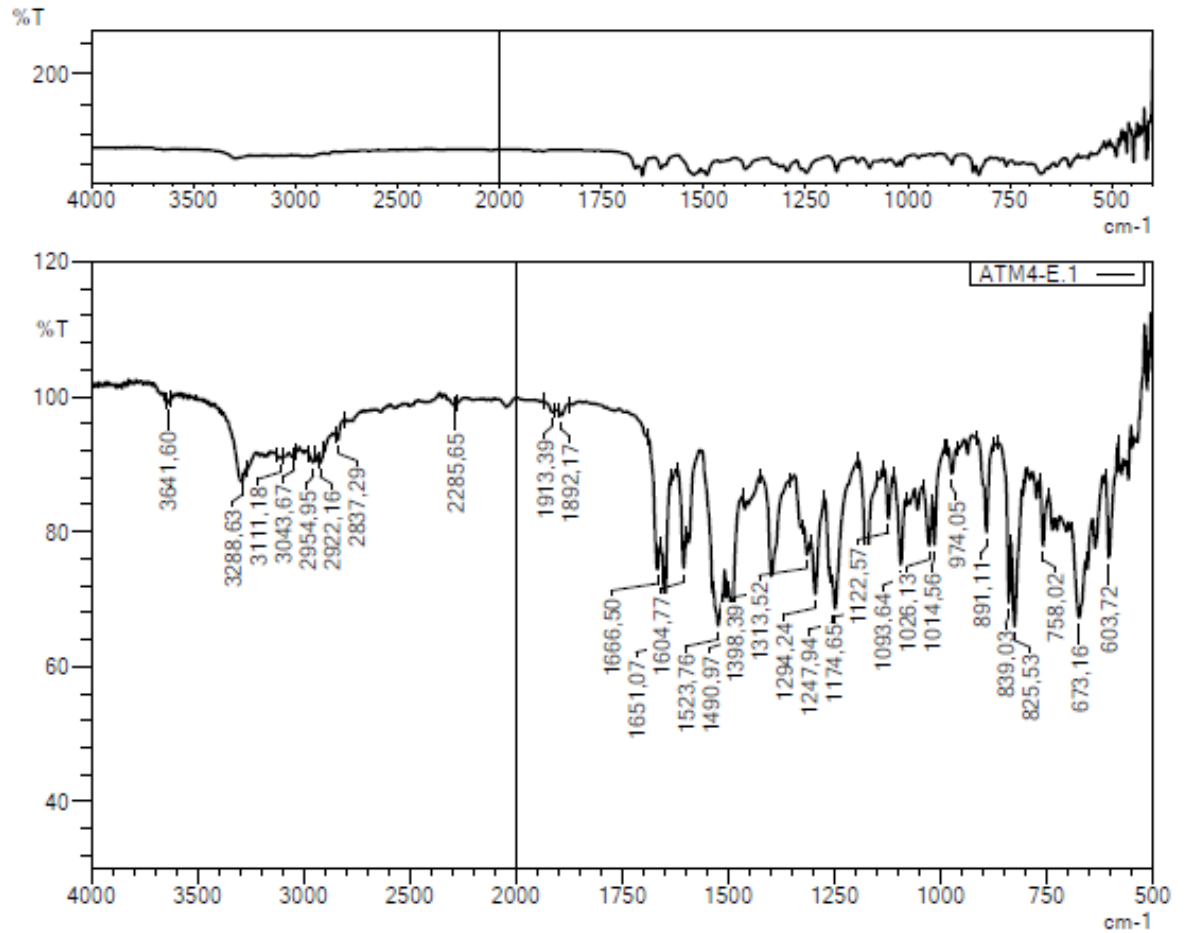
**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 3.82 (3H,s,-CH<sub>3</sub>), 4.17 (2H, s, -CH<sub>2</sub>), 7.02 (2H, d,  $J$ = 8.94 Hz, Ar-H), 7.37 (2H, d,  $J$ = 8.86 Hz, Ar-H), 7.59-7.63 (2H, m, Ar-H), 8.14-8.09 (1H, d,  $J$ = 8.89 Hz Ar-H ), 10.51 (1H, s, NH)

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 38.42, 55.90, 114.02, 121.15, 125.38, 126.71, 127.55, 129.21, 130.75, 138.23, 162.66, 166.49, 166.72, 170.46

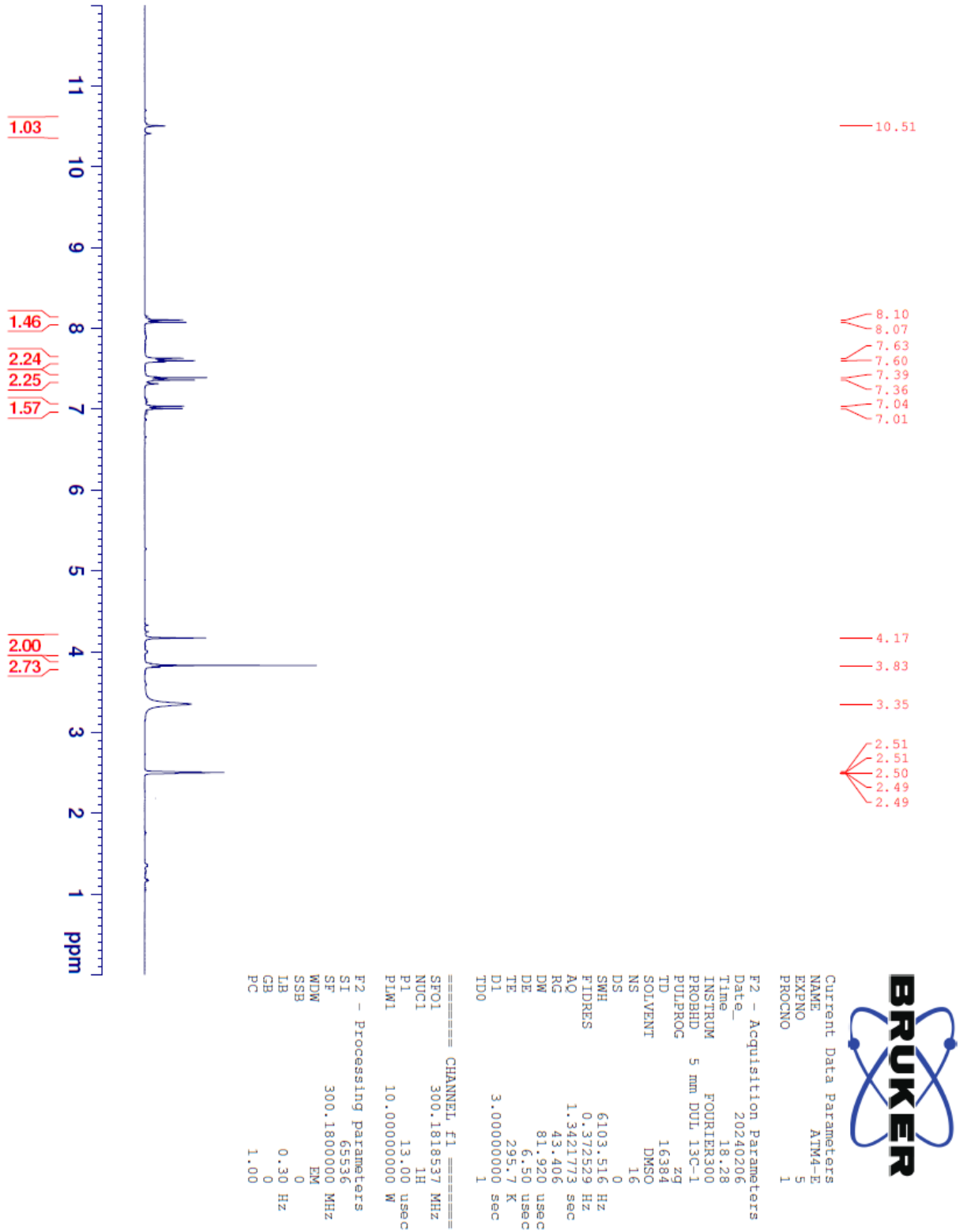
**HRMS (ESI) (m/z)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ :** C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub>Cl için hesaplanan: 435.0347, bulunan: 435.0362

## DOPNALAB

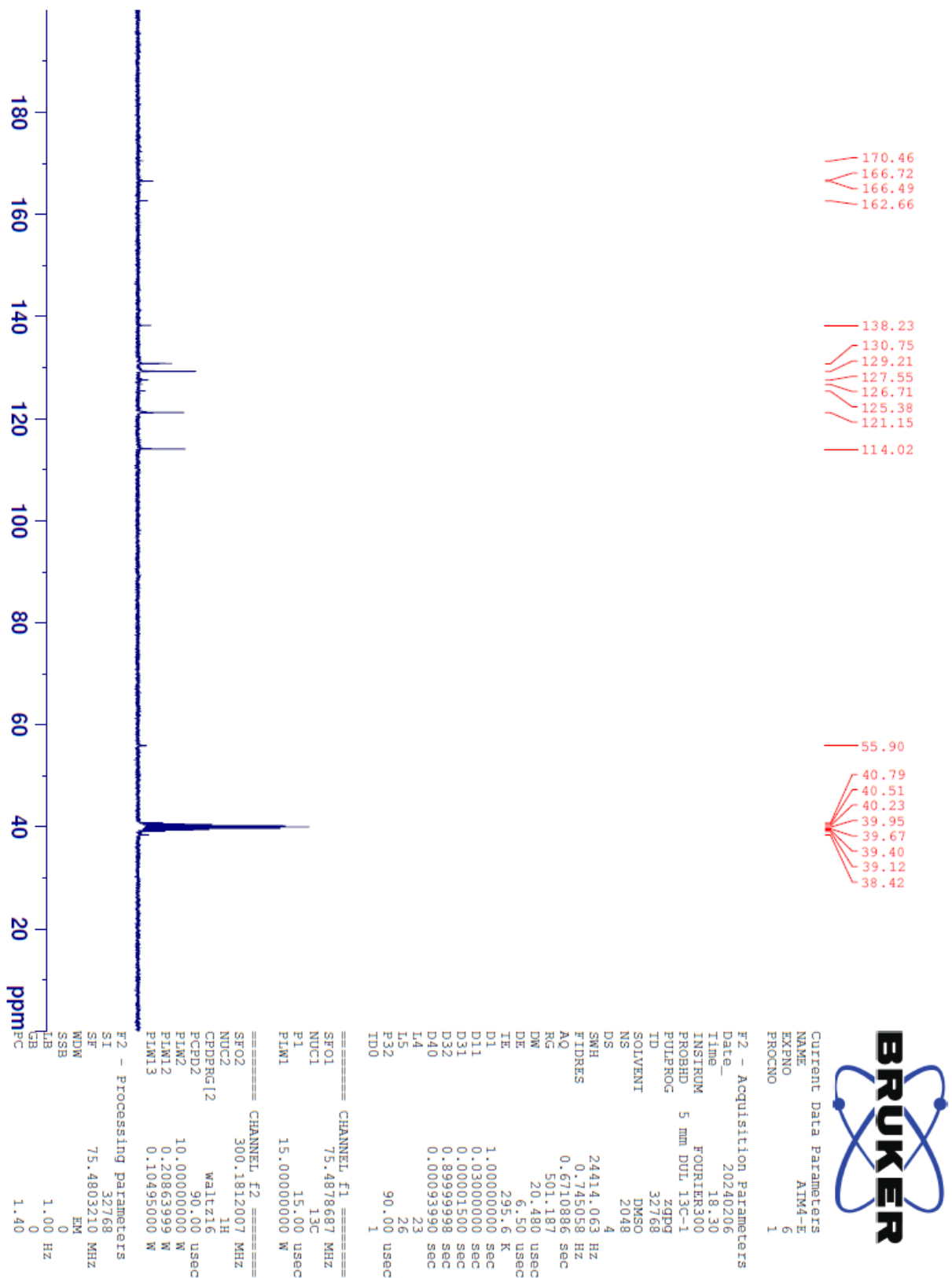
| Item               | Value                                                      |
|--------------------|------------------------------------------------------------|
| Acquired Date&Time | 16.05.2024 10:39:49                                        |
| Acquired by        | System Administrator                                       |
| Filename           | C:\Users\dopnalab\Desktop\MASAUSTUARZU HIDIR\ATM4-E.1.ispd |
| Spectrum name      | ATM4-E.1                                                   |
| Sample name        | ATM4-E                                                     |
| Sample ID          |                                                            |
| Option             |                                                            |
| Comment            |                                                            |
| No. of Scans       | 30                                                         |
| Resolution         | 4 [cm <sup>-1</sup> ]                                      |
| Apodization        | Happ-Genzel                                                |



Şekil 5. 92. IR Analizi (3t)



Şekil 5.93.  $^1\text{H}$ -NMR Analizi (3t)



Şekil 5.94. <sup>13</sup>C-NMR Analizi (3t)

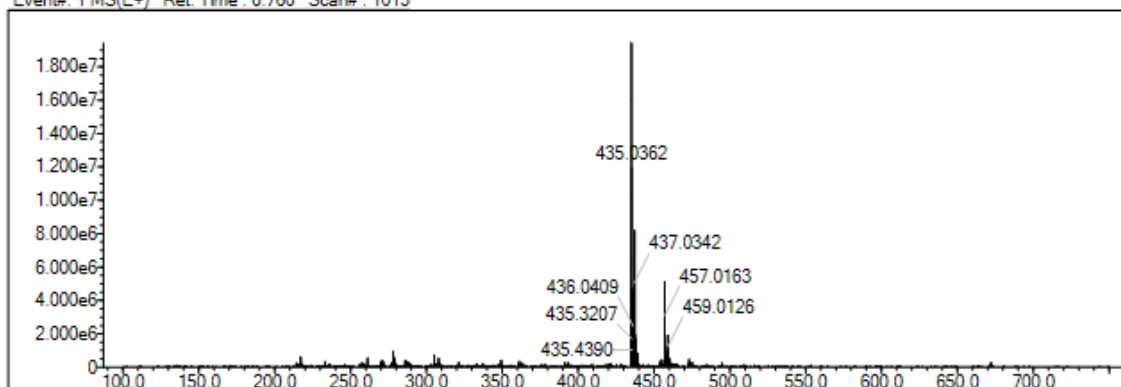
| Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Use Adduct |
|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------------|
| H    | 1    | 0   | 35  | O    | 2    | 0   | 4   | S    | 2    | 0   | 3   | Ru   | 2    | 0   | 0   | H          |
| C    | 4    | 0   | 35  | F    | 1    | 0   | 0   | Cl   | 1    | 1   | 1   | Pd   | 2    | 0   | 0   |            |
| N    | 3    | 4   | 7   | P    | 3    | 0   | 0   | Br   | 1    | 0   | 0   | I    | 3    | 0   | 0   |            |

Error Margin (ppm): 5  
 HC Ratio: unlimited  
 Max Isotopes: 3  
 MSn Iso RI (%): 10.00

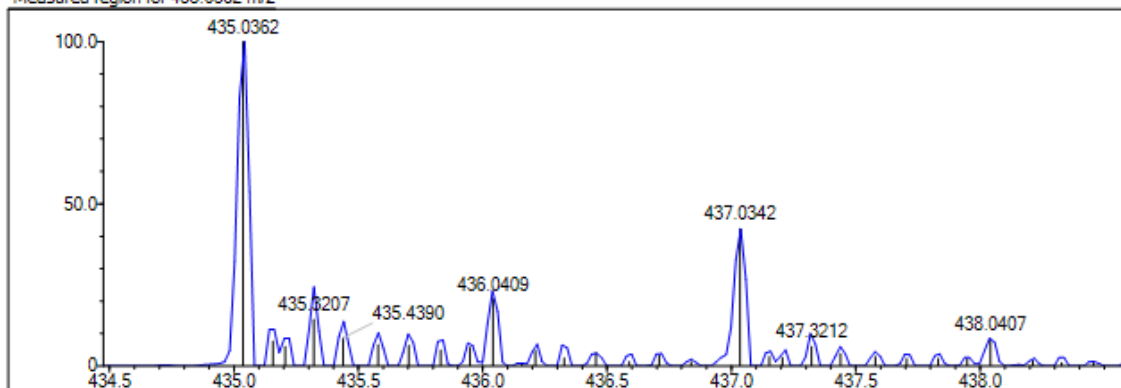
DBE Range: 0.0 - 30.0  
 Apply N Rule: no  
 Isotope RI (%): 1.00  
 MSn Logic Mode: AND

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

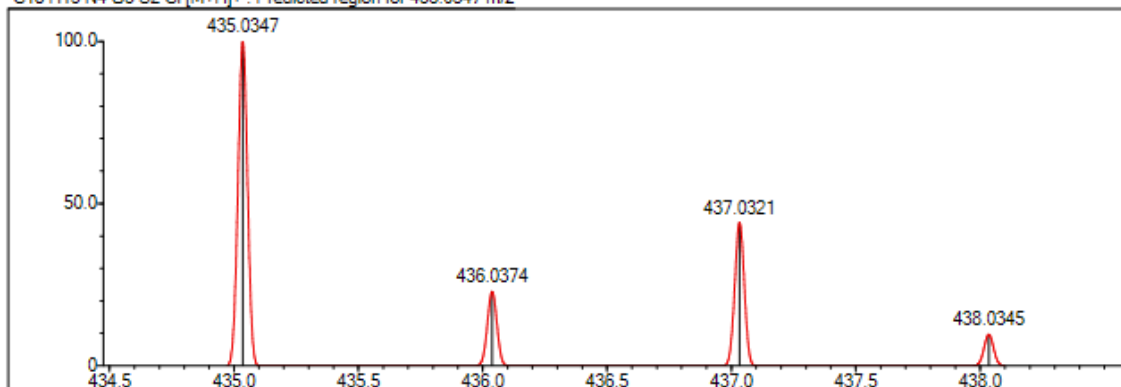
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 6.760 Scan#: 1015



Measured region for 435.0362 m/z



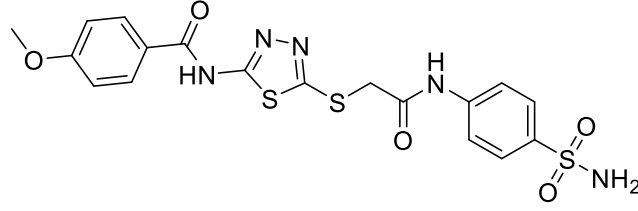
C18 H15 N4 O3 S2 Cl [M+H]<sup>+</sup> : Predicted region for 435.0347 m/z



| Rank | Score | Formula (M)         | Ion                | Meas. m/z | Pred. m/z | Df. (mDa) | Df. (ppm) | Iso   | DBE  |
|------|-------|---------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|------|
| 4    | 69.53 | C18 H15 N4 O3 S2 Cl | [M+H] <sup>+</sup> | 435.0362  | 435.0347  | 1.5       | 3.45      | 74.07 | 13.0 |

Şekil 5.95. HRMS Analizi (3t)

**5.1.19. 4-Metoksi-N-(5-((2-okso-2-((4-sülfamoilfenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3u)**



**Şekil 5.96.** 4-Metoksi-N-(5-((2-okso-2-((4-sülfamoilfenil)amino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (3u) molekülünün kimyasal yapısı

**Deneysel E.N.:** 214.5-216.7 °C **Verim:** %90

**IR (ATR)  $\nu_{\text{maks}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3296 (N-H bağına ait band), 2985 (C-H bağına ait band), 1678 (C=O bağına ait band)

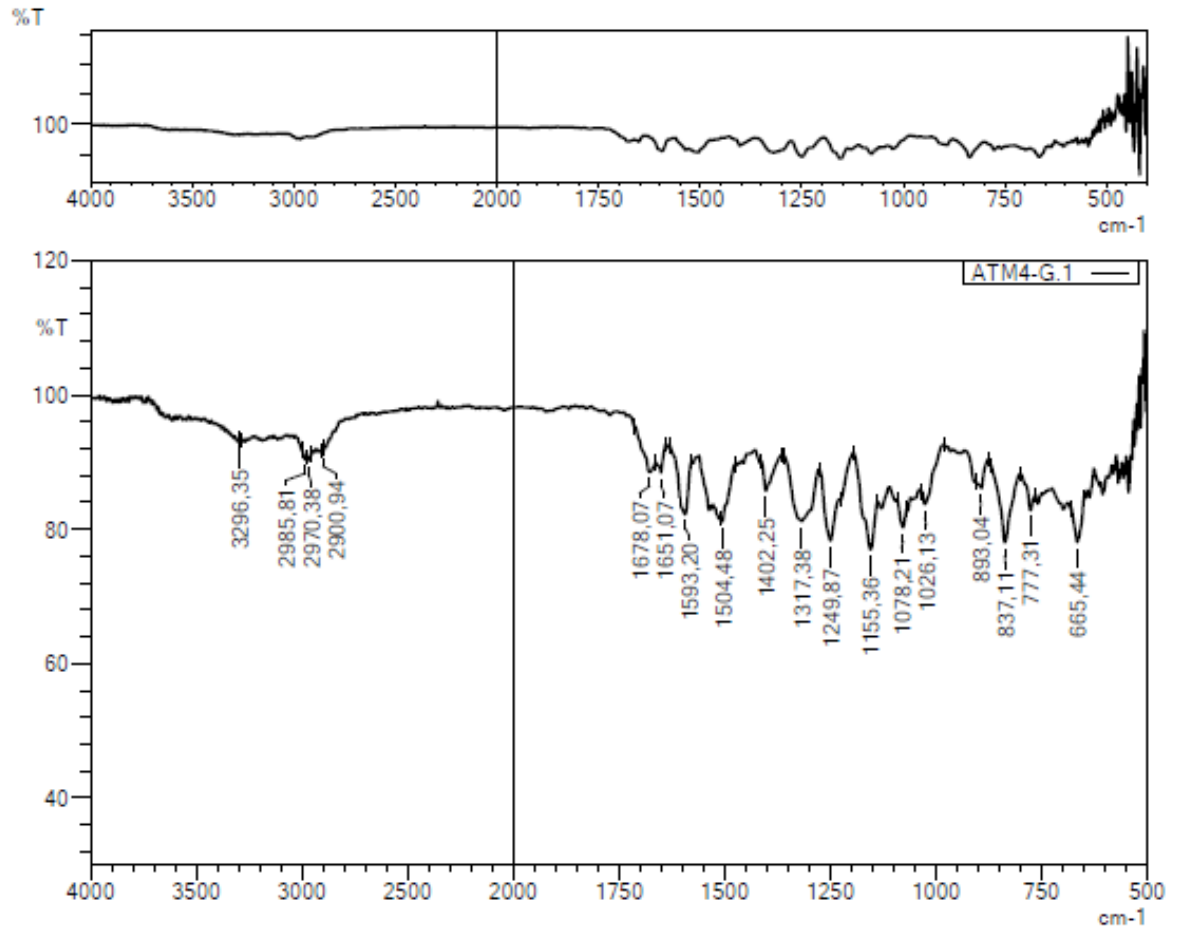
**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 3.80-3.82 (2H, m, -CH<sub>2</sub>), 4.03 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 7.28-7.32 (4H, m, Ar-H), 7.71-7.79 (6H, m, Ar-H), 10.61 (1H, s, NH)

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 39.11, 55.98, 113.26, 114.49, 119.19, 127.26, 130.26, 131.69, 139.11, 142.11, 149.59, 163.57, 166.93, 170.49

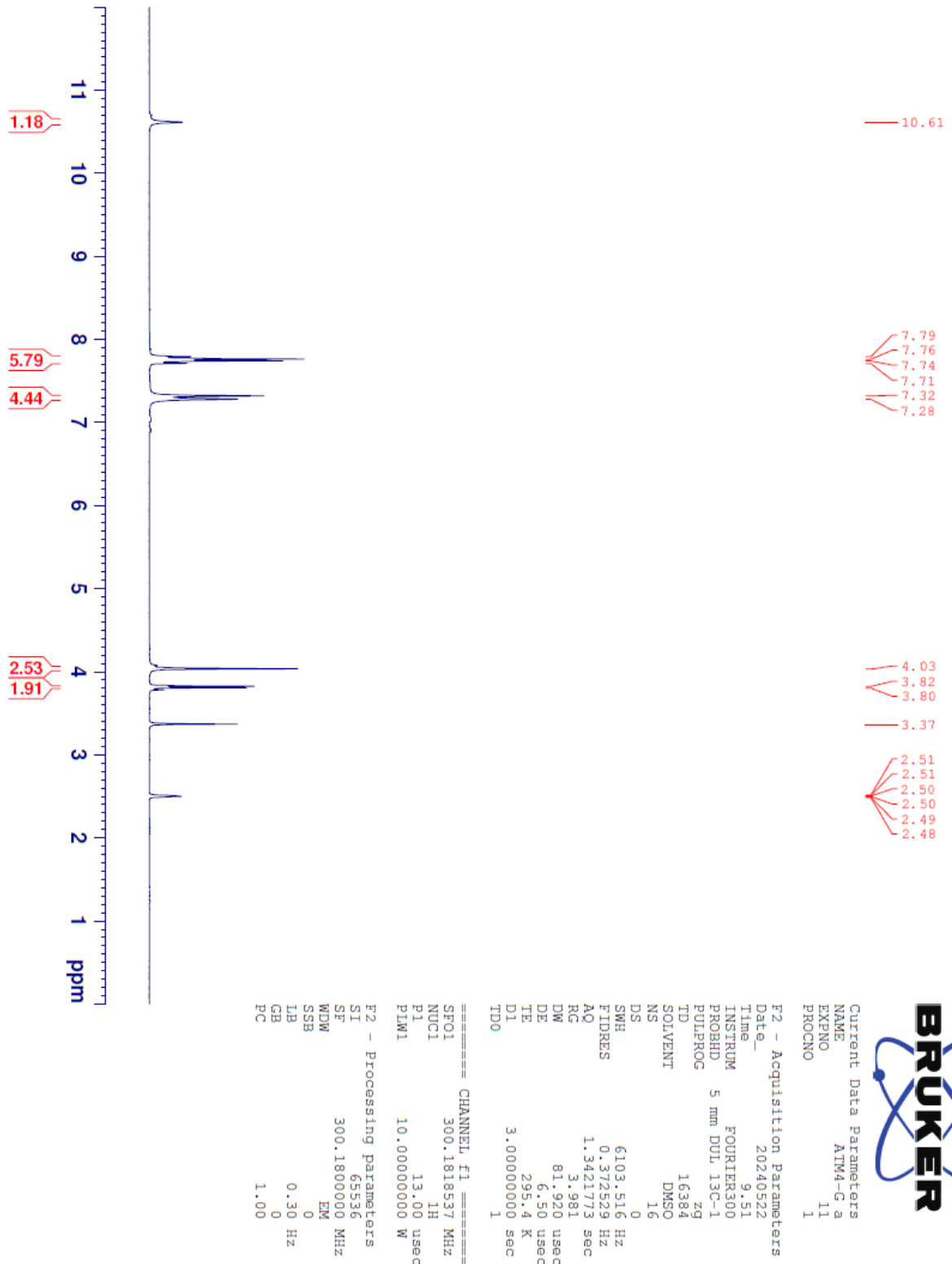
**HRMS (ESI) ( $m/z$ ) [ $M+H$ ]<sup>+</sup>:** C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>S<sub>3</sub> için hesaplanan: 480.0465, bulunan: 480.0466

## DOPNALAB

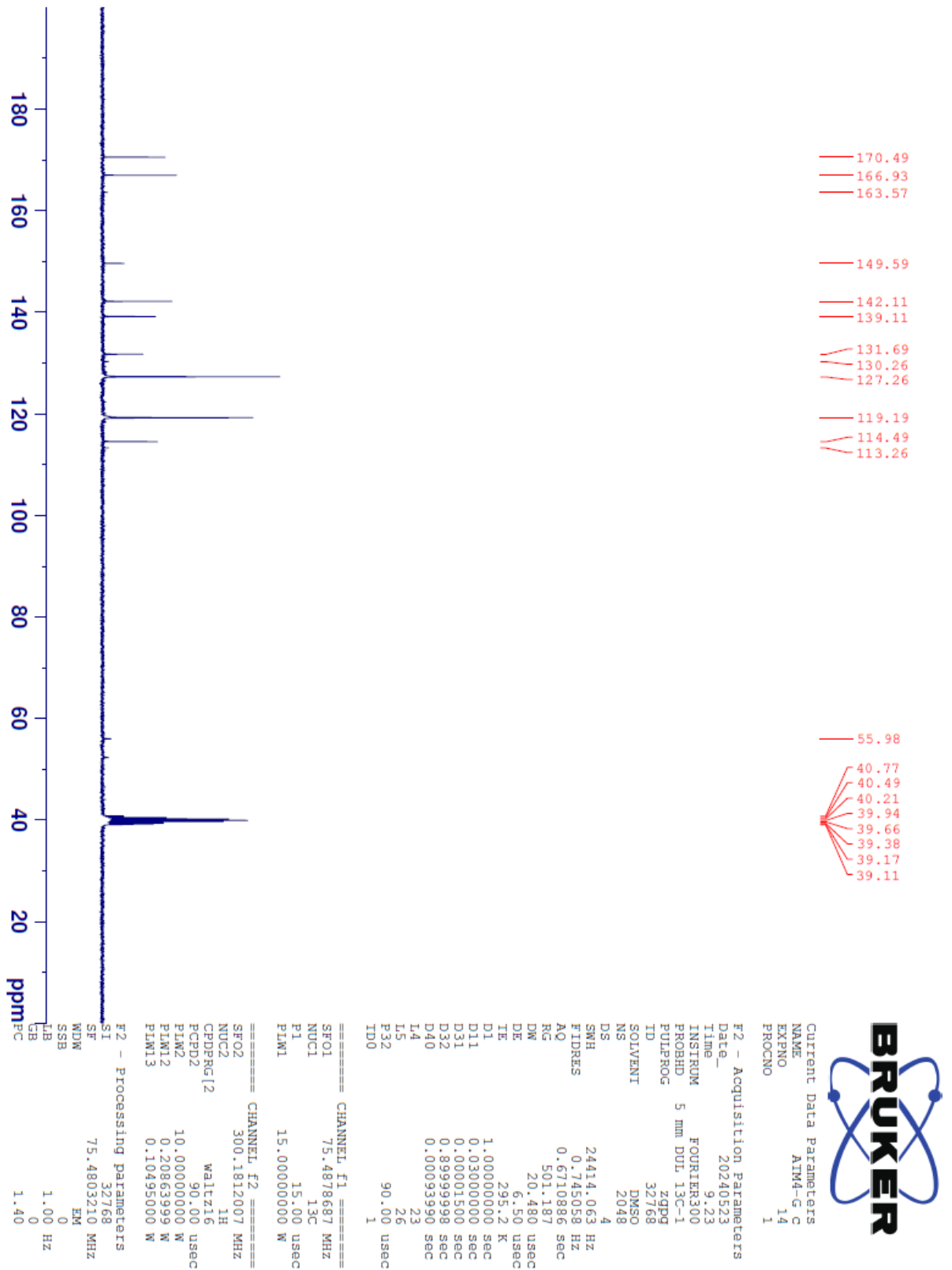
| Item               | Value                                                            |
|--------------------|------------------------------------------------------------------|
| Acquired Date&Time | 16.05.2024 10:33:42                                              |
| Acquired by        | System Administrator                                             |
| Filename           | C:\Users\dopnalab\Desktop\MASAUSTRU\ARZU HIDIR\ATM\ATM4-G.1.ispd |
| Spectrum name      | ATM4-G.1                                                         |
| Sample name        | ATM4-G                                                           |
| Sample ID          |                                                                  |
| Option             |                                                                  |
| Comment            |                                                                  |
| No. of Scans       | 30                                                               |
| Resolution         | 4 [cm-1]                                                         |
| Apodization        | Happ-Genzel                                                      |



Şekil 5.97. IR Analizi (3u)



Şekil 5.98.  $^1\text{H}$ -NMR Analizi (3u)



Şekil 5.99.  $^{13}\text{C}$ -NMR Analizi (3u)

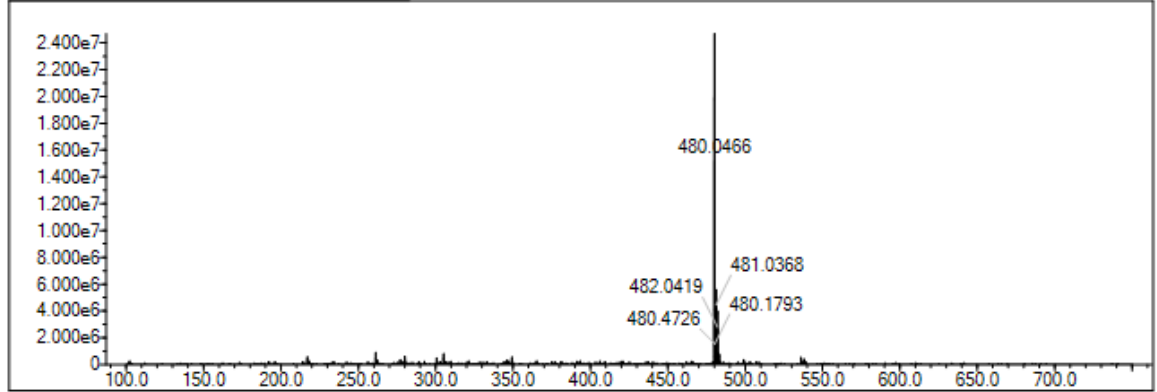
| Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Elmt | Val. | Min | Max | Use Adduct |
|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------------|
| H    | 1    | 0   | 35  | O    | 2    | 0   | 5   | S    | 2    | 0   | 3   | Ru   | 2    | 0   | 0   | H          |
| C    | 4    | 0   | 35  | F    | 1    | 0   | 0   | Cl   | 1    | 0   | 0   | Pd   | 2    | 0   | 0   |            |
| N    | 3    | 4   | 7   | P    | 3    | 0   | 0   | Br   | 1    | 0   | 0   | I    | 3    | 0   | 0   |            |

Error Margin (ppm): 5  
 HC Ratio: unlimited  
 Max Isotopes: 3  
 MSn Iso RI (%): 10.00

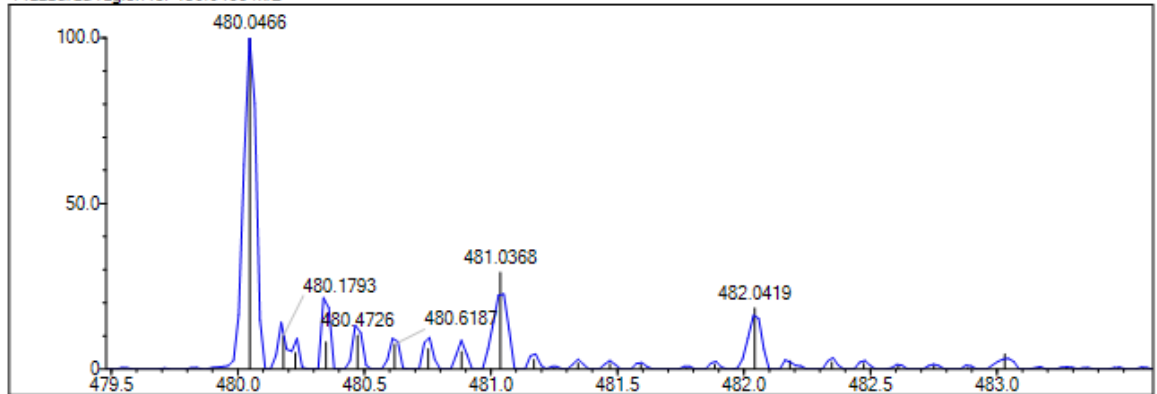
DBE Range: 0.0 - 30.0  
 Apply N Rule: no  
 Isotope RI (%): 1.00  
 MSn Logic Mode: AND

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

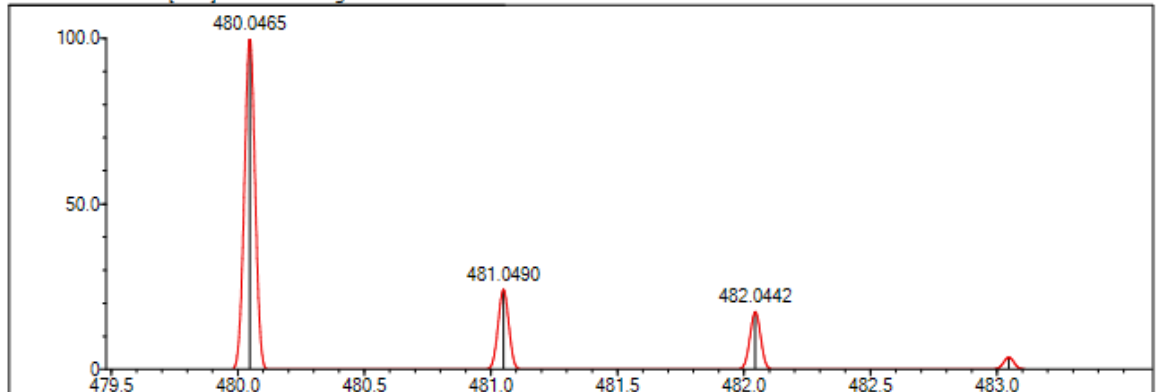
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 4.387 Scan#: 659



Measured region for 480.0466 m/z



C18 H17 N5 O5 S3 [M+H]<sup>+</sup> : Predicted region for 480.0465 m/z

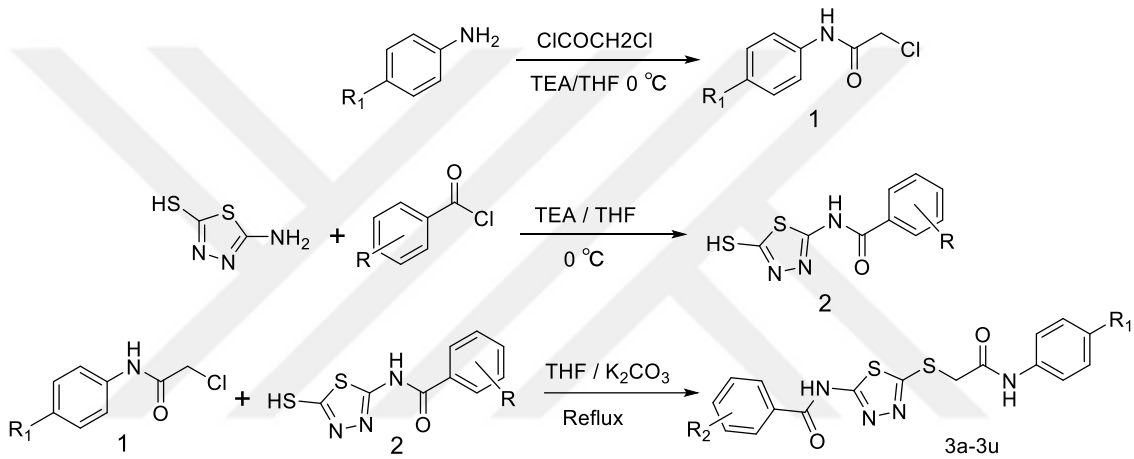


| Rank | Score | Formula (M)      | Ion                | Meas. m/z | Pred. m/z | Df. (mDa) | Df. (ppm) | Iso   | DBE  |
|------|-------|------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|------|
| 1    | 73.11 | C18 H17 N5 O5 S3 | [M+H] <sup>+</sup> | 480.0466  | 480.0465  | 0.1       | 0.21      | 73.11 | 13.0 |

Şekil 5.100. HRMS Analizi (3u)

## 5.2. Sentez Çalışmalarının Tartışılması

Bu tez kapsamında 20 adet yeni *N*-(5-((2-okso-2-(fenilamino)etil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid yapısı içeren bileşik elde edilmiştir. Çalışmalar 3 basamakta gerçekleştirilmiştir. İlk basamakta öncelikle anilin türevlerinin kloroasetiklorür kullanılarak, asetillenmesi gerçekleştirilmiştir, ardından 2. basamakta 5-amino-1,3,4-tiyadiazol-2-tiyol bileşiğine 4 farklı benzoil klorür türevinin adisyonu gerçekleştirilmiştir. Son basamakta ise ana yapıya ilk basamakta sentezi gerçekleştirilen anilin türevleri eklenmiştir. Bütün sentez basamaklarının tamamlanmasıyla birlikte yapıların aydınlatılması amacıyla spektral analizlere geçilmiştir. (Şekil 5.101).



Şekil 5.101. Hedef Bileşiklerin Sentezi

## 5.3. Spektral Veri Sonuçlarının Tartışılması

Bu tezde hedef olarak sentezlenmesi planlanan ve sentezlenmiş olan 20 adet (3a-3u) yeni bileşiğin yapılarını aydınlatmak amacıyla IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR ve HRMS spektral analiz yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemlere ait verilerin değerlendirmeleri alt başlıklarda verilmiştir.

### 5.3.1. IR verilerinin tartışılması

Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin yapıları incelendiğinde ortak yapı olarak amid (-NHCO) yapısı göze çarpmaktadır. Spektrumlar incelendiğinde ise N-H yapısına ait olan bantlar 3300-3000 cm<sup>-1</sup> aralığında gözlenmiştir. Yine amid yapısına ait bir diğer bant olan

C=O bandı ise 1650-1750 cm<sup>-1</sup> aralığında elde edilmiştir. Bu bant değerleri literatürdeki veriler ile kıyaslandığında uyumlu olarak değerlendirilmiştir [84].

### 5.3.2. NMR verilerinin tartışılması

#### 5.3.2.1. <sup>1</sup>H-NMR verilerinin tartışılması

Sentezi başarıyla gerçekleştirilen sonuç bileşiklerin yapısı incelendiğinde benzen ve tiyadiazol halka sistemleri ve -CH<sub>2</sub> köprüsü ortak olmasıyla dikkat çekmektedir. Tüm yapılarda bulunan -CH<sub>2</sub> köprüsüne ait protonlar 4.07-4.31 ppm değerleri arasında singlet olarak gözlenmiştir. Benzen halkalarına ait pikler 7.07-8.36 ppm aralığında gözlemlenmiş, özellikle yapısında F bulunduran benzen halkalarına ait piklerde F-H yarılmaları kaynaklı multipler piklere rastlanmıştır.

Tiyadiazol yapısına bağlı amidin yapısında bulunan protona ait pikler 13.22-13.30 aralığında F-H yarılmalarına bağlı olarak singlet ya da multipler olarak bazı bileşiklerde gözlemlenmiş ancak protonun hetero atoma bağlı olması nedeniyle ise bazı spektrumlarda gözlenememiştir. -CH<sub>2</sub> köprüsüne bağlı olan amid yapısındaki proton ise 10.16-10.76 aralığında ve yine aralığında F-H yarılmalarına bağlı olarak singlet ya da multipler olarak gözlenmiştir.

**3p-3u** bileşiklerinde benzen halkasına bağlı olan metoksi (-OCH<sub>3</sub>) yapısındaki protonlar 3.81-4.03 aralığında singlet olarak gözlenmiştir. **3e**, **3j**, **3o** ve **3u** bileşiklerinde -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> yapısındaki protonlar ise benzen halkasında bulunan protonların içlerinde gözlemlenmiştir. Spektral analiz sonuçları literatürde bulunan veriler ile kıyaslandığında uyumlu olduğu görülmüştür [85-86].

#### 5.3.2.2. <sup>13</sup>C-NMR verilerinin tartışılması

Sentezi başarıyla gerçekleştirilen sonuç bileşiklerin <sup>13</sup>C spektrumlarında genel olarak beklenen pikler gözlemlenmiştir. Spesifik olarak tiyadiazol halkasına ait C=N ve amid yapılarına ait C=O pikleri 150.20-171.70 ppm aralığında ve literatürle uyumlu olarak gözlenmiştir. -CH<sub>2</sub> köprüsüne ait pikler ise 38.04-38.51 ppm aralığında ve 3p-3u bileşiklerinde bulunan -OCH<sub>3</sub>'e ait pikler ise 55.74-55.90 ppm aralığında gözlenmiştir. Genel yapıda bulunan diğer aromatik karbonlar ise 112.14-157.79 ppm aralığında gözlenmiştir [65,87].

### 5.3.3. HRMS verilerinin tartışılması

Elektron sprey iyonlaştırma modunda yüksek çözünürlüklü kütle analizi gerçekleştirilerek bileşiklerin kütle spektrumları elde edilmiştir.

Kütle spektrumlarında molekül ağırlıkları baz alınmamış, oluşan yüklü atom ya da gruplar kütle/yük oranlarına karşı bağıl bolluklarına göre grafiğe geçirilmesiyle elde edilmiştir. Molekül iyonları ve oluşan molekül parçacıkları +1 yük taşımakta ve bu yüzden hesaplanan kütleden bir fazla değer saptanması beklenmektedir. Spektrumlar incelendiğinde tüm bileşiklerde M+1 pikleri gözükmemektedir.

### 5.4. Antikanser Aktivite Çalışmalarının Tartışılması

#### 5.4.1. MTT yöntemi kullanılarak elde edilen bileşiklerin sitotoksik etki sonuçları

Bileşiklerin A549 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkilerine bakıldığında maalesef hiçbir bileşik doksorubisinden daha etkili değildir. Bileşikler içinde bu hücre hattına en etkili iki türev ise  $20.682 \pm 0.984 \mu\text{M}$  ile **3j** ve  $21.128 \pm 0.996 \mu\text{M}$  ile **3g** bileşikleridir. Doksorubisin ise gösterdiği  $10.985 \pm 0.247 \mu\text{M}$   $\text{IC}_{50}$  değeriyle neredeyse bileşiklerin yarısı kadar dozda aktivite göstermektedir. Ancak **3j** ve **3g**'nin NIH3T3 hücre karşı sırasıyla gösterdikleri  $85.604 \pm 3.164 \mu\text{M}$  ve  $>100 \mu\text{M}$   $\text{IC}_{50}$  değerleriyle sitotoksik etkili değildirler ve A549 hücre hattına karşı seçici sitotoksik etki göstermektedirler.

MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkilere bakıldığında ise  $2.375 \pm 0.108 \mu\text{M}$  ile **3j** ve  $2.884 \pm 0.124 \mu\text{M}$  ile **3o** bileşikleri ön plana çıkmaktadır.  $1.940 \pm 0.084 \mu\text{M}$ 'lik  $\text{IC}_{50}$  değerine sahip olan doksorubisin ile karşılaştırılabilir aktivite göstermektedirler. Ayrıca NIH3T3 hücre karşı gösterdikleri **3j**=  $85.604 \pm 3.164 \mu\text{M}$  ve **3o**=  $81.561 \pm 2.739 \mu\text{M}$  değerleri ile sitotoksik etkili olmadıkları ve MCF-7 hücre hattına karşı selektif potansiyel ilaç adayı olabilecekleri gösterilmiştir.

Bileşiklerin A549, MCF-7 ve NIH3T3 hücre hattına karşı gösterdikleri  $\text{IC}_{50}$  değerleri (Tablo 5.1.) verilmiştir.

**Tablo 5.1.** Bileşiklerin A549, MCF-7 ve NIH3T3 hücre dizilerine ait IC<sub>50</sub> değerleri (μM).

| Bileşik      | IC <sub>50</sub> (μM) |              |              |
|--------------|-----------------------|--------------|--------------|
|              | A549                  | MCF7         | NIH3T3       |
| 3a           | >100                  | >100         | >100         |
| 3b           | 46.548±1.452          | >100         | 67.128±2.369 |
| 3c           | >100                  | 7.940±0.384  | 43.623±2.041 |
| 3d           | >100                  | >100         | >100         |
| 3e           | >100                  | 10.987±0.402 | 70.784±2.502 |
| 3f           | >100                  | >100         | >100         |
| 3g           | 21.128±0.996          | 27.068±1.255 | >100         |
| 3h           | >100                  | >100         | >100         |
| 3i           | >100                  | 12.064±0.589 | 24.896±1.178 |
| 3j           | 20.682±0.984          | 2.375±0.108  | 85.604±3.164 |
| 3k           | 69.085±2.802          | >100         | >100         |
| 3l           | 41.098±1.964          | 30.469±1.374 | 46.151±1.825 |
| 3m           | 29.410±1.210          | 35.702±1.262 | 60.274±2.140 |
| 3n           | >100                  | >100         | >100         |
| 3o           | 25.150±1.187          | 2.884±0.124  | 81.561±2.739 |
| 3p           | >100                  | >100         | >100         |
| 3r           | >100                  | 43.065±2.061 | 47.608±1.774 |
| 3s           | >100                  | >100         | 76.145±2.859 |
| 3t           | >100                  | >100         | >100         |
| 3u           | >100                  | 6.415±0.298  | 55.762±2.112 |
| Doksorubisin | 10.985±0.247          | 1.940±0.084  | >100         |

#### 5.4.2. Anneksin V/EI yöntemi kullanılarak elde edilen bileşiklerin apoptotik etki sonuçları

Organizmada zamanla meydana gelen istenmeyen veya işlevsiz hücrelerin ortadan kaldırılması için programlanmış hücre ölüm mekanizmalarından apoptoz doğal bir yoldur. Ayrıca homeostaz ve hücre gelişiminde oynadığı kritik roller ile özellikle uzun ömürlü memeliler için kritik önemi bulunmaktadır. Antikanser ilaçları çoğu hücrede

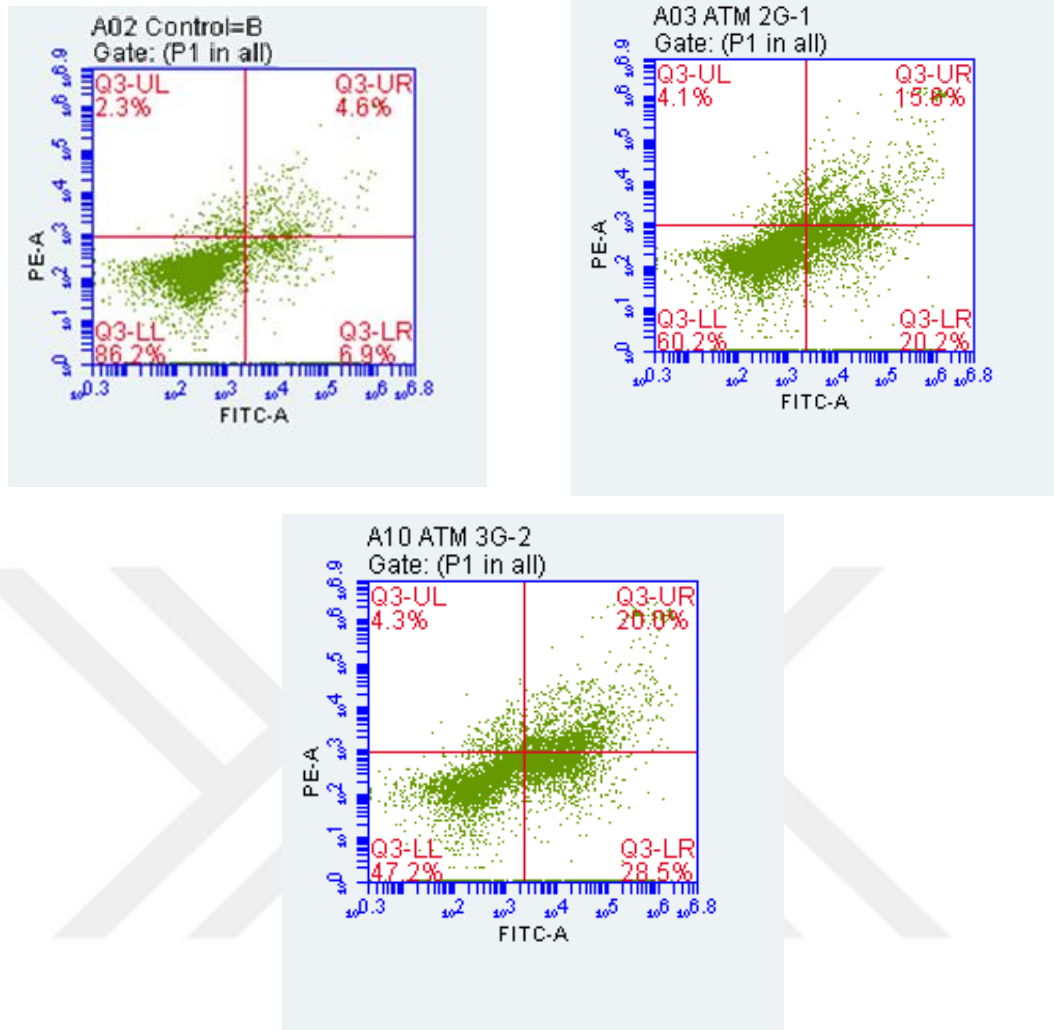
apoptozu indükleyerek etki gösterdiğinden *in-vitro* antikanser etki belirleme çalışmalarında da yararlanılmaktadır [88].

Hücre apoptoza uğrayacağı zaman hücre zarının sitoplazmik kısmının lipit sırasında yer alan fosfotidilserin hücre zarının dış kısmına geçmekte ve bu olay erken apoptoz döneminde meydana gelmektedir. Anneksin V fosfotidilserin ile bağlanma gerçekleştirebilen bir proteindir ve floresans özellikli maddeler ile etkileştirilip apoptotik hücrelerin flow sitometri ile tespiti mümkün olmaktadır. Floresans özellikli maddeler olarak Anneksin V-FITC ve EI kullanıldığı zaman hücreler apoptoz ve nekroz olma durumlarına göre ilgili boyalarla meydana getirdikleri kompleksler sayesinde flow sitometri analizleri sonucu nekroz, erken apoptoz ve geç apoptoz gibi kadrnlara ayrılmaktadır. Sağ üst kadrnda hücreler 2 maddeye de bağlanan geç apoptotik hücreler, sağ alt kadrnda yalnızca Anneksin V'ye bağlanan erken apoptotik hücreler, sol üst kadrnda yalnızca EI'ya bağlanan nekrotik hücreler ve sol en alt kadrnda ise iki madde ile de bağlanmayan sağlıklı hücreler yer alırlar [89-90].

Tez çalışması kapsamında sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin sitotoksik etkilerine bakıldığında MCF-7 hücre hattında daha iyi aktivite gösterdiği görülmüştür. Bu nedenle bu hücre hattında en etkili bulunan **3j** ve **3o** bileşiklerine ilgili yöntem uygulanmış ve aşağıda verilen sonuçlar (Tablo 5.2.) ve kadrnlr (Şekil 5.102) elde edilmiştir.

**Tablo 5.2** Bileşikler 3j ve 3o 'nun MCF-7 hücre hattı üzerindeki apoptoz yüzdeleri.

| Bileşik   | MCF7 Hücre Dizisi |               |                 |
|-----------|-------------------|---------------|-----------------|
|           | % Nekroz          | % Geç Apoptoz | % Erken Apoptoz |
| <b>3j</b> | 4.08%             | 15.56%        | 20.20%          |
| <b>3o</b> | 4.32%             | 20.05%        | 28.48%          |



Şekil 5.102. MCF7 hücre hattında bileşik 3j ve 3o'nun akış sitometrik analiz diyagramı.

Bileşiklerin MCF-7 hücre hattındaki etkilerine bakıldığında IC<sub>50</sub> konsantrasyonunda **3j**'nin 4.08% ile nekrozu, 15.56% ile geç apoptozu, 20.20% ile erken apoptozu indüklediği görülürken; **3o**'nun ise 4.32% ile nekrozu, 20.05% ile geç apoptozu ve 28.48% ile erken apoptozu indüklediği görülmüştür. Etkilerini nekrotik olarak gösteren kemoterapötik ajanların sitotoksik olduğu bilindiği için bu ajanların etkilerinin çok iyi olduğu söylenebilir.

### 5.5. Kinaz Enzim İnhibisyon Testleri

Kinazlar özellikle onkolojik ilaçların geliştirilmesi için önemli ilaç hedefleri arasında yer almaktadırlar. Hücrelerin büyüme, çoğalma gibi sinyal iletiminin her anında rollerinin olması ve karsinogenez nedeniyle kanserli hücrelerde bozulan bu iletimin blokajının

sağlanabilmesi ve küçük moleküllerle inhibe edilebilmeleri onları çekici bir hedef haline getiren unsurlar arasındadır.

Bu çalışma kapsamında Alpelisib molekülünden yola çıkıldığından ve bu ilacın etkisini gösterdiği temel sinyal iletim mekanizmasının bir protein kinaz olan EGFR'ye bağlanması nedeniyle bileşik **3j** ve **3o**'ya diğer bileşiklere kıyasla gösterdikleri üstün sitotoksik aktiviteleri ve apoptotik etkileri nedeniyle EGFR kinaz inhibisyon testi uygulanmıştır. Çalışmada pozitif kontrol olarak erlotinib kullanılmıştır. Kit içeriğinden elde edilen saflaştırılmış standart bileşiklerin uygulandığı kısımdaki enzim inhibisyon potansiyeli 0 kabul edilerek okumalar gerçekleştirilmiş ve aşağıdaki (Tablo 5.3.) sonuçlar elde edilmiştir.

**Tablo 5.3** Seçilen bileşiklerin EGFR enzimine karşı IC<sub>50</sub> değerleri (μM).

| Bileşik          | EGFR IC <sub>50</sub> (μM) |
|------------------|----------------------------|
| <b>3j</b>        | 0.020±0.0008               |
| <b>3o</b>        | 0.028±0.0012               |
| <b>Erlotinib</b> | 0.002±0.0001               |

Bileşiklerden **3j** gösterdiği IC<sub>50</sub>= 0.020±0.0008 μM ile inhibitör etkinliği ile en aktif bileşik iken **3o** ise IC<sub>50</sub>= 0.028±0.0012 μM ile inhibitör aktive göstermiştir. Bileşikler maalesef EGFR erlotinib ile kıyaslandığında daha zayıf aktivite göstermişlerdir. Ancak

### 5.6. COX-2 Enzim İnhibisyon Testleri

Bileşiklerin dual etki göstermesi istendiğinden dolayı bazı bileşikler COX-2 inhibitörlerine benzer olarak tasarlanmıştır. Bileşikler gerçekleştirilen biyolojik aktive çalışmalarının son basamağında COX-2 enzimine karşı inhibitör aktiviteleri bakımından değerlendirilmiştir. Referans bileşikler olarak COX-1 ve COX-2'ye karşı herhangi birine karşı bir afinitesi olmadan inhibisyon gösteren ibuprofen ve selektif COX-2 inhibitörleri nimesulid ve selekoksib kullanılmıştır. Bileşiklerin COX-2'ye karşı inhibitör aktiviteleri Tablo 5.4.'te verilmiştir.

**Tablo 5.4.** Bileşiklerin COX-2 enzimine karşı göstermiş olduğu IC<sub>50</sub> değerleri (μM).

| Bileşik | COX-2 IC <sub>50</sub> (μM) |
|---------|-----------------------------|
|---------|-----------------------------|

|           |             |
|-----------|-------------|
| <b>3a</b> | 2.395±0.104 |
| <b>3b</b> | >1000       |
| <b>3c</b> | >1000       |

**Tablo 5.4.** Bileşiklerin COX-2 enzimine karşı göstermiş olduğu IC<sub>50</sub> değerleri (μM) (DEVAM)

|                   |             |
|-------------------|-------------|
| <b>3d</b>         | 6.723±0.312 |
| <b>3e</b>         | 0.320±0.014 |
| <b>3f</b>         | 0.874±0.039 |
| <b>3g</b>         | >100        |
| <b>3h</b>         | >1000       |
| <b>3i</b>         | 3.785±0.177 |
| <b>3j</b>         | 0.192±0.008 |
| <b>3k</b>         | >1000       |
| <b>3l</b>         | 0.974±0.045 |
| <b>3m</b>         | >100        |
| <b>3n</b>         | 0.721±0.030 |
| <b>3o</b>         | 0.208±0.009 |
| <b>3p</b>         | >1000       |
| <b>3r</b>         | >100        |
| <b>3s</b>         | 8.401±0.370 |
| <b>3t</b>         | >100        |
| <b>3u</b>         | 0.375±0.016 |
| <b>İbuprofen</b>  | 5.326±0.218 |
| <b>Selekoksib</b> | 0.132±0.005 |
| <b>Nimesulid</b>  | 1.684±0.079 |

Bileşiklerden **3a** 2.395±0.104 μM, **3e** 0.320±0.014 μM, **3f** 0.874±0.039 μM, **3i** 3.785±0.177 μM, **3j** 0.192±0.008 μM, **3l** 0.974±0.045 μM, **3n** 0.721±0.030 μM, **3o** 0.208±0.009 μM ve **3u** 0.375±0.016 μM IC<sub>50</sub> değerleriyle ibuprofenin 5.326±0.218 μM'lik IC<sub>50</sub> değerine kıyasla çok daha iyi aktivite göstermişlerdir. Ancak kanser terapisinde COX-2 inhibitörleri kullanıldığı için bileşiklerin COX-2 inhibisyon

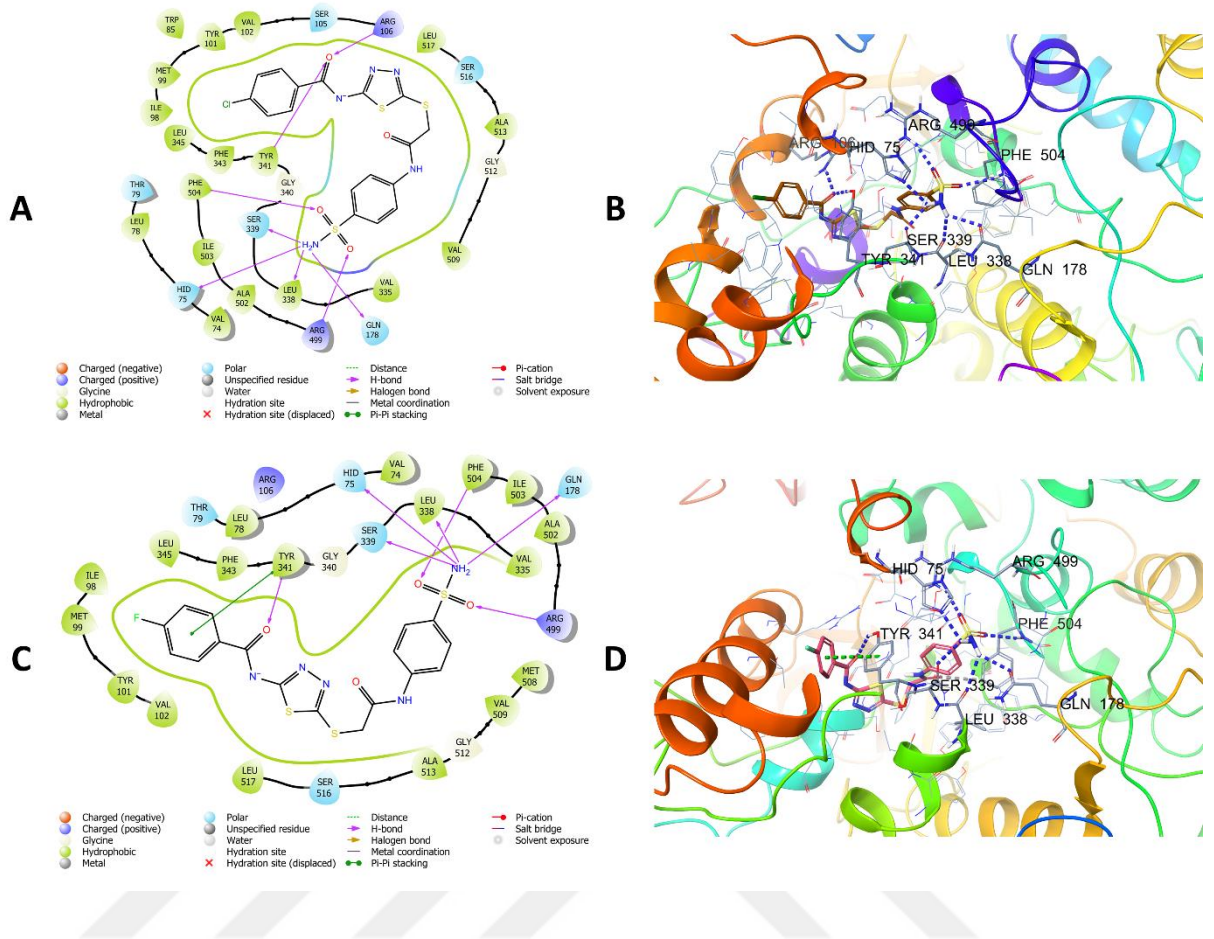
potansiyelleri daha önemlidir. Bu açıdan bakıldığında ise 3e, 3f, 3j 3l, 3n, 3o ve 3u bileşiklerinin IC<sub>50</sub> değerleri, IC<sub>50</sub> değeri 1.684±0.079 µM olan nimesulide göre çok daha düşüktür ve bu durum daha etkili olduklarını göstermektedir. Maalesef hiçbir bileşik selekoksib'in sahip olduğu 0.132±0.005 µM IC<sub>50</sub> değeri gibi düşük konsantrasyonda etki göstermemiştir ancak serini en etkili türevi 0.375±0.016 µM IC<sub>50</sub> değeri ile 3u olmuştur.

### 5.7. Moleküler Docking Çalışmalarının Tartışılması

Tez kapsamında sentezlenmesi planmış ve elde edilmiş bileşiklerden, COX-2 ve EGFR enzimlerini inhibe etme potansiyeli maksimum bulunan bileşikler **3j** ve **3o**'nun ilgili enzimlerin aktif bölgeleriyle potansiyel etkileşimlerini görebilmek amacıyla PDB Kodu: 3LN1 [72] olan COX-2 enzim kristali ve PDB: 1M17 [71] olan EGFR enzim kristali kullanılarak docking çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla Glide programı yardımıyla gerçekleştirilen docking tekniği kullanılmış ve GlideScore SP yardımıyla en muhtemel pozlar elde edilmiştir. Şekil 5.103.'de COX-2 enzimi için eldesi gerçekleştirilen en muhtemel docking pozları gösterilmişken; Şekil 5.104.'de EGFR enzimi ile ilgili docking pozları yer almaktadır.

#### 5.7.1. COX-2 Enzimi Üzerinde Moleküler Docking Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Şekil 1'de görülebildiği gibi, bileşik **3j** ve **3o**'da *p*-kloro fenil ve *p*-floro fenil halkalarına komşu olan karbonil grubu Tyr341'in hidroksili ile H- bağı oluşturmaktadır. **3j**'de bu karbonil grubu diğer bileşikten farklı olarak Arg106'nın amino grubu bir H- bağı başı kurmaktadır. Bileşik **3o**'da *p*-floro fenil halkası Tyr341'in fenili ile  $\pi$ -  $\pi$  etkileşimi oluşturmaktadır. İki bileşikte de ortak yapı olarak göze çarpan sülfonamit grubu polar etkileşimler açısından oldukça önemlidir. Söz konusu grupta yer alan amin grubunun Hid75, Gln178, Leu338 ve Ser339 amino asitleriyle 4 H- bağı kurduğu görülmektedir. Ayrıca yapıda yer alan sülfonamit grubundaki oksijen atomlarının da Arg499 ve Phe504 amino asitleriyle 2 H- bağı aracılığıyla etkileştiği tespit edilmiştir. Sülfonamit grubu üzerinde belirlenen söz konusu etkileşimler ilgili bileşiklerin COX-2 enzim aktif bölgesinde yer alan ve selektiviteden sorumlu olduğu düşünülen yan cebe çok uyumlu bir şekilde yerleştiğini göstermektedir. Elde edilen tüm veriler bileşikler **3j** ve **3o**'nun COX-2 enzimine karşı gösterdiği *in vitro* güçlü seçici inhibitör aktiviteyi desteklemektedir.

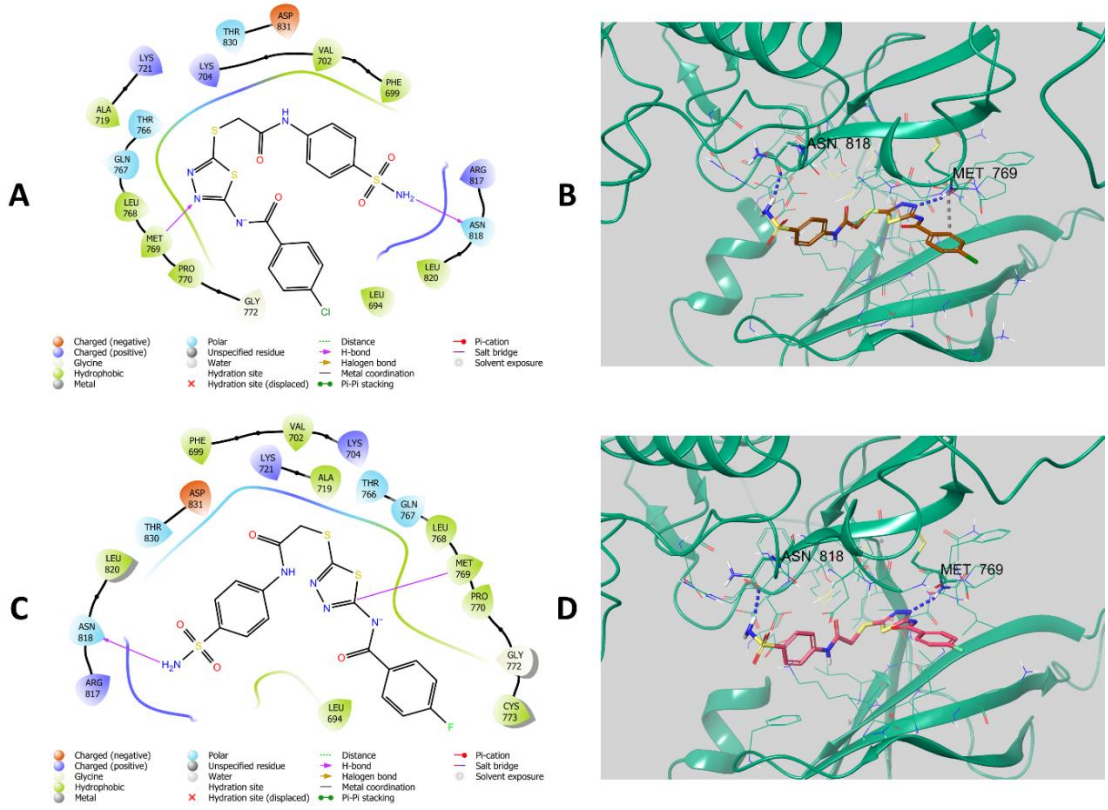


**Şekil 5.103.** Bileşik 3j'nin COX-2 enzim aktif bölgesiyle etkileşiminin iki boyutlu (A) ve üç boyutlu (B) görünümü. Bileşik 3o'nun COX-2 enzim aktif bölgesiyle etkileşiminin iki boyutlu (C) ve üç boyutlu (D) görünümü.

### 5.7.2. EGFR Enzimi Üzerinde Moleküler Docking Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Şekil 2'de bileşikler 3j ve 3o'nun EGFR enzimi kullanılarak elde edilmiş docking pozları görülmekte ve elde edilen pozlara bakıldığında söz konusu bileşiklerin COX-2 enziminde olduğu gibi EGFR enzimi içinde enzimi bloke edebilecek optimal bir pozisyonda yerleştiği görülmektedir. Elde edilen docking pozları incelendiğinde her iki bileşiğin de aynı etkileşimleri sağlayarak ilgili enzim aktif bölgesine benzer konformasyonda yerleştiği görülmektedir. Yapıda yer alan sülfonamid grubundaki amin yapısı Asn818'in karbonili ile bir H- bağı oluşturmaktadır. Ayrıca bir diğer H- bağı da yapıda yer alan tiyadiazol halkasında azot atomu ile Met769'un amin grubu arasında tespit edilmiştir. Belirlenen bu etkileşimlerin EGFR enzim aktif bölgesindeki önemli

amino asitler üzerinden olduğu bilinmektedir. Elde edilen tüm veriler bileşik **3j** ve **3o**'nun EGFR enzimini güçlü bir şekilde inhibe etme potansiyelinin olduğunu açıkça göstermektedir.



**Şekil 5.104.** Bileşik **3j**'nin EGFR enzim aktif bölgesiyle etkileşiminin iki boyutlu (A) ve üç boyutlu (B) görünümü. Bileşik **3o**'nun EGFR enzim aktif bölgesiyle etkileşiminin iki boyutlu (C) ve üç boyutlu (D) görünümü.

## 5.8. Moleküler Dinamik Çalışmalarının Tartışılması

MD simülasyon yöntemi, proteinlerin veya protein ligand komplekslerinin dinamik davranışını araştırmak için yaygın olarak kullanılır. Bu tez çalışması kapsamında, gelecek vaat eden molekül **3j** ve **3o** ile COX-2 (PDB kodu: 3LN1) [72] ve EGFR (PDB kodu: 1M17) [71] enzimleri arasında oluşan kenetlenme kompleksinin stabilitesini değerlendirmek için, açık bir hidrasyon ortamında 100 ns MD simülasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. İlgili enzimlerle gerçekleştirilen moleküler dinamik simülasyon değerlendirmeleri aşağıda verilmiştir. Tablo 5.5 ve Tablo 5.6'da **3j** ve **3o**'nun ilgili enzimlere karşı oluşturdukları komplekslerin moleküler dinamik simülasyon çalışmaları

sonucunda elde edilen verilerin analizleri sunulmuştur. Şekil 5.105. -5.108.'de söz konusu moleküler dinamik simülasyon çalışmalarında elde edilen sonuçlar verilmiştir.

Simülasyonlar sırasında modelin kararlılığını kontrol etmek için RMSD kullanılmıştır. Simülasyon süresinin bir fonksiyonu olarak RMSD çizimi, Şekil 5.105. -5.108.'de A şekilleri sunulmuştur. RMSD değeri 1-3 arasında olmalıdır. Elde ettiğimiz grafik bu belirtilen değerler arasında (Max 3 Å) kaldığı için söz konusu kompleksler için kararlılığın korunduğunu söylemek doğru olacaktır.

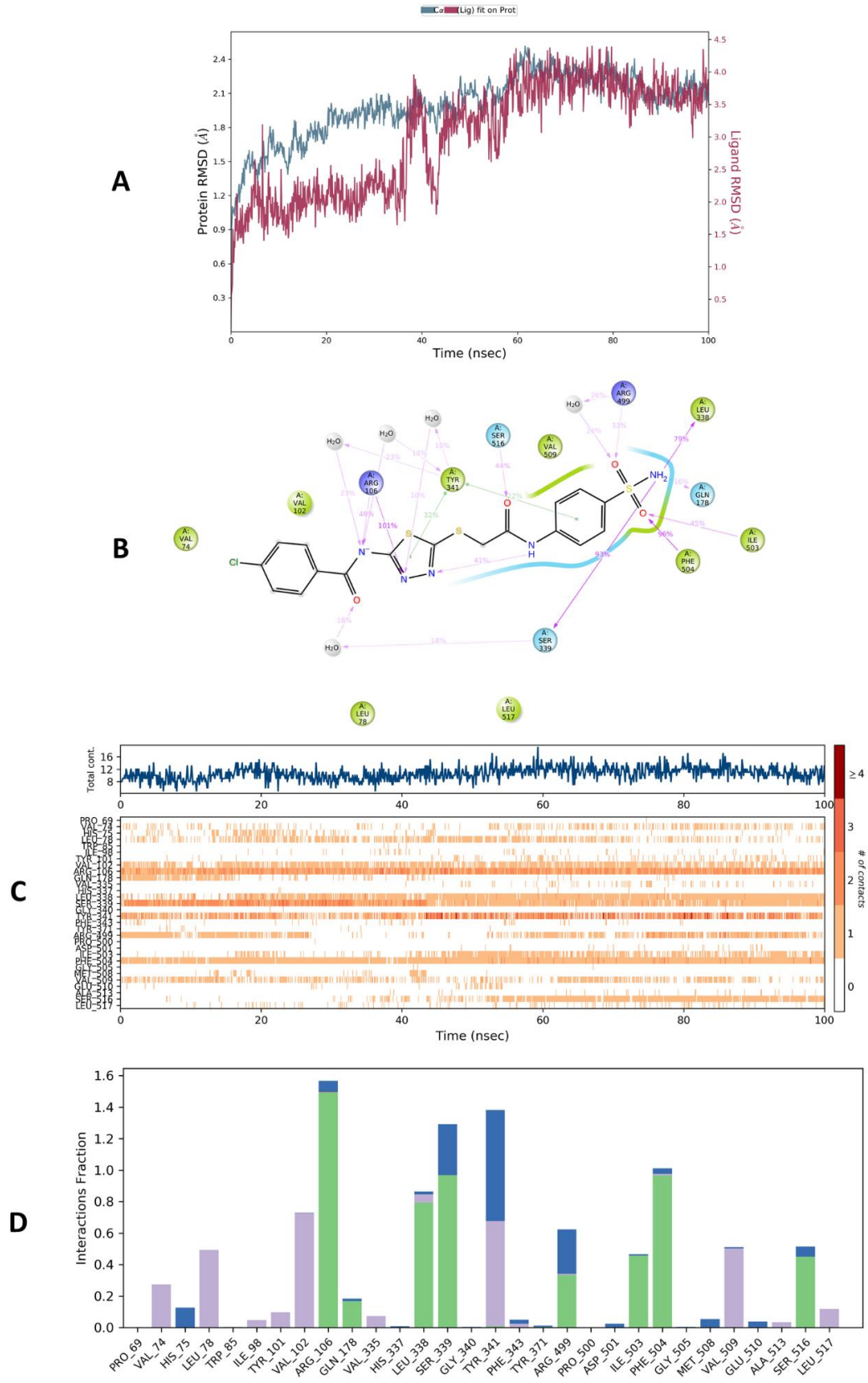
Şekil 5.105.-5.108'de B grafiği enzim aktif bölgesinde %15 üzerinde etkileşim gösteren aminoasitleri sergilemektedir. Söz konusu komplekslerin B grafiklerinden elde edilen amino asit etkileşim türü ve yüzde oranı Tablo 1 ve 2'de verilmiştir. Şekil 5.105.-5.108.'de etkileşim sayısı ve kalıntı grafikleri sunulmaktadır. Şekil 5.105. -5.108.'de D şekilleri simülasyon sırasında komplekse göre etkileşim fraksiyonlarını sunmaktadır Burada mavi: su aracılı H-bağı; yeşil: H-bağı, pembe: iyonik etkileşim, mor: hidrofobik etkileşimleri temsil etmektedir. Söz konusu grafiklerde enzim aktif bölgesi için önemli olan aminoasitler ile etkileşimler net bir şekilde görülmektedir. Bu grafiklerden elde edilen veriler Tablo 5.5 ve 5.6'da sunulmuştur.

Bu etkileşimlere bakıldığında 3j'nin Val102, Arg106, Ser339, Tyr341 ve Phe 504 ve 3o'nun Val102, Arg106, Leu338, Ser339, Tyr341 ve Phe504 ile simülasyon süresince yaptığı neredeyse kesintisiz etkileşimler dikkat çekici özelliktedir.

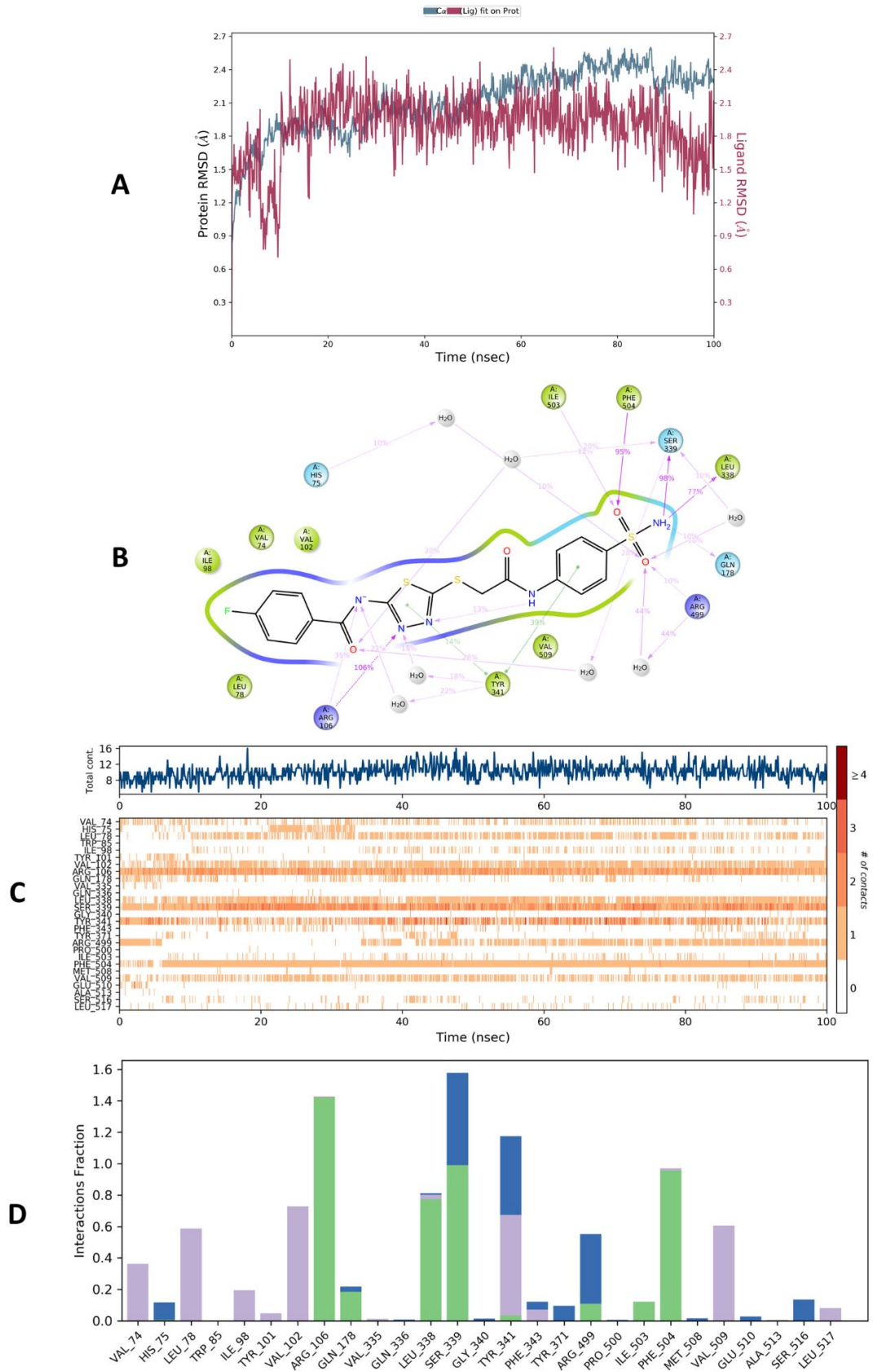
**Tablo 5.5.** 3j – COX-2 ve 3o – COX-2 komplekslerinin moleküler dinamik simülasyon analizi.

| Kompleks   | RMSD  | %15 Üzerinde Etkileşim Gösteren Aminoasitler | Etkileşim Fraksiyonları                                                                                                                                               |
|------------|-------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3j – COX-2 | 2.4 Å | Arg106 (H- bağı: %48 ve %100)                | <b>Su aracılı H-bağı (mavi)</b>                                                                                                                                       |
|            |       | Gln178 (H- bağı: %16)                        | His75, Val102, Arg106, Gln178, His337, Leu338, Ser339, Gly340, Tyr341, Phe343, Tyr371, Arg499, Pro500, Asp501, Ile503, Phe504, Gly505, Met508, Val509, Glu510, Ser516 |
|            |       | Leu338 (H- bağı: %79)                        |                                                                                                                                                                       |
|            |       | Ser339 (H- bağı: %93)                        | <b>H-bağı (yeşil)</b>                                                                                                                                                 |
|            |       | Arg499 (H- bağı: %33)                        |                                                                                                                                                                       |
|            |       | Ile503 (H- bağı: %45)                        | Arg106, Gln178, Leu338, Ser339, Tyr341, Arg499, Ile503, Phe504, Ser516                                                                                                |
|            |       | Phe504 (H- bağı: %96)                        |                                                                                                                                                                       |
|            |       | Ser516 (H- bağı: %44)                        | <b>İyonik etkileşim (pembe)</b>                                                                                                                                       |
|            |       | Tyr341 (π-π etkileşimi: %22 ve %32)          | Arg106                                                                                                                                                                |
|            |       |                                              | <b>Hidrofobik etkileşim (mor)</b>                                                                                                                                     |

|                   |       |                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                               |
|-------------------|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                   |       |                                                                                                                                                                                                                            | Val74, Leu78, Ile98, Tyr101, Val102, Val335, Leu338, Tyr341, Phe343, Arg499, Phe504, Val509, Ala513, Leu517   |
|                   |       |                                                                                                                                                                                                                            | <b><i>Su aracılı H-bağı (mavi)</i></b>                                                                        |
|                   |       |                                                                                                                                                                                                                            | His75, Gln178, Gln336, Leu338, Ser339, Gly340, Tyr341, Phe343, Tyr371, Arg499, Pro500, Met508, Glu510, Ser516 |
|                   |       |                                                                                                                                                                                                                            | <b><i>H-bağı (yeşil)</i></b>                                                                                  |
|                   |       |                                                                                                                                                                                                                            | His75, Arg106, Gln178, Leu338, Ser339, Tyr341, Arg499, Ile503, Phe504                                         |
|                   |       |                                                                                                                                                                                                                            | <b><i>İyonik etkileşim (pembe)</i></b>                                                                        |
|                   |       |                                                                                                                                                                                                                            | Arg106                                                                                                        |
|                   |       |                                                                                                                                                                                                                            | <b><i>Hidrofobik etkileşim (mor)</i></b>                                                                      |
|                   |       |                                                                                                                                                                                                                            | Val74, Leu78, Trp85, Ile98, Tyr101, Val102, Val335, Leu338, Tyr341, Phe343, Phe504, Val509, Ala513, Leu517    |
| <b>3o – COX-2</b> | 2.7 Å | Arg106 (H- bağı: %35 ve %100)<br>Gln178 (H- bağı: %16)<br>Leu338 (H- bağı: %77)<br>Ser339 (H- bağı: %98)<br>Arg499 (H- bağı: %16)<br>Ile503 (H- bağı: %12)<br>Phe504 (H- bağı: %95)<br>Tyr341 (π-π etkileşimi: %28 ve %39) |                                                                                                               |



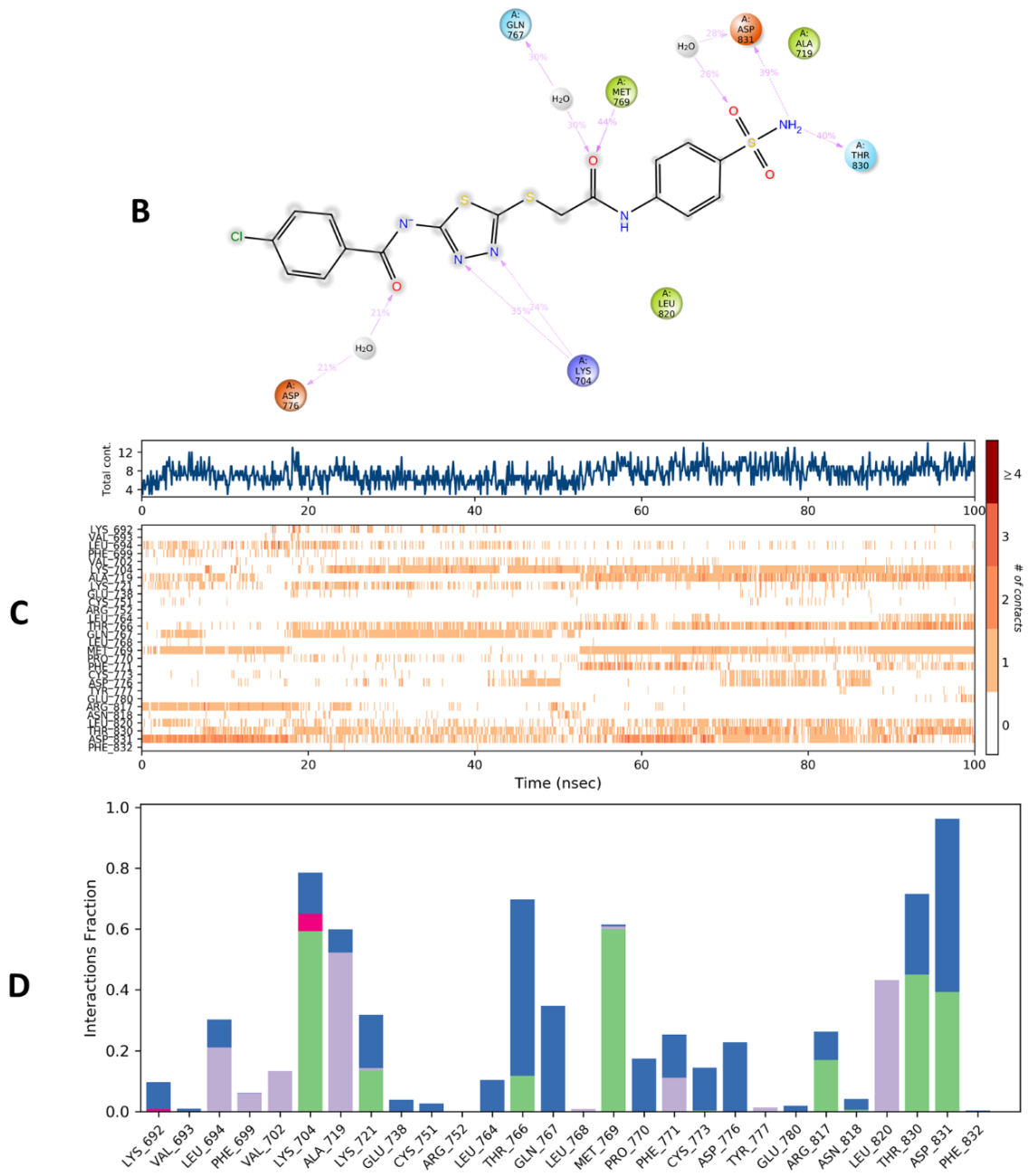
Şekil 5.105. Bileşik 3j – COX-2 kompleksi ile gerçekleştirilen MD simülasyon sonuçları.



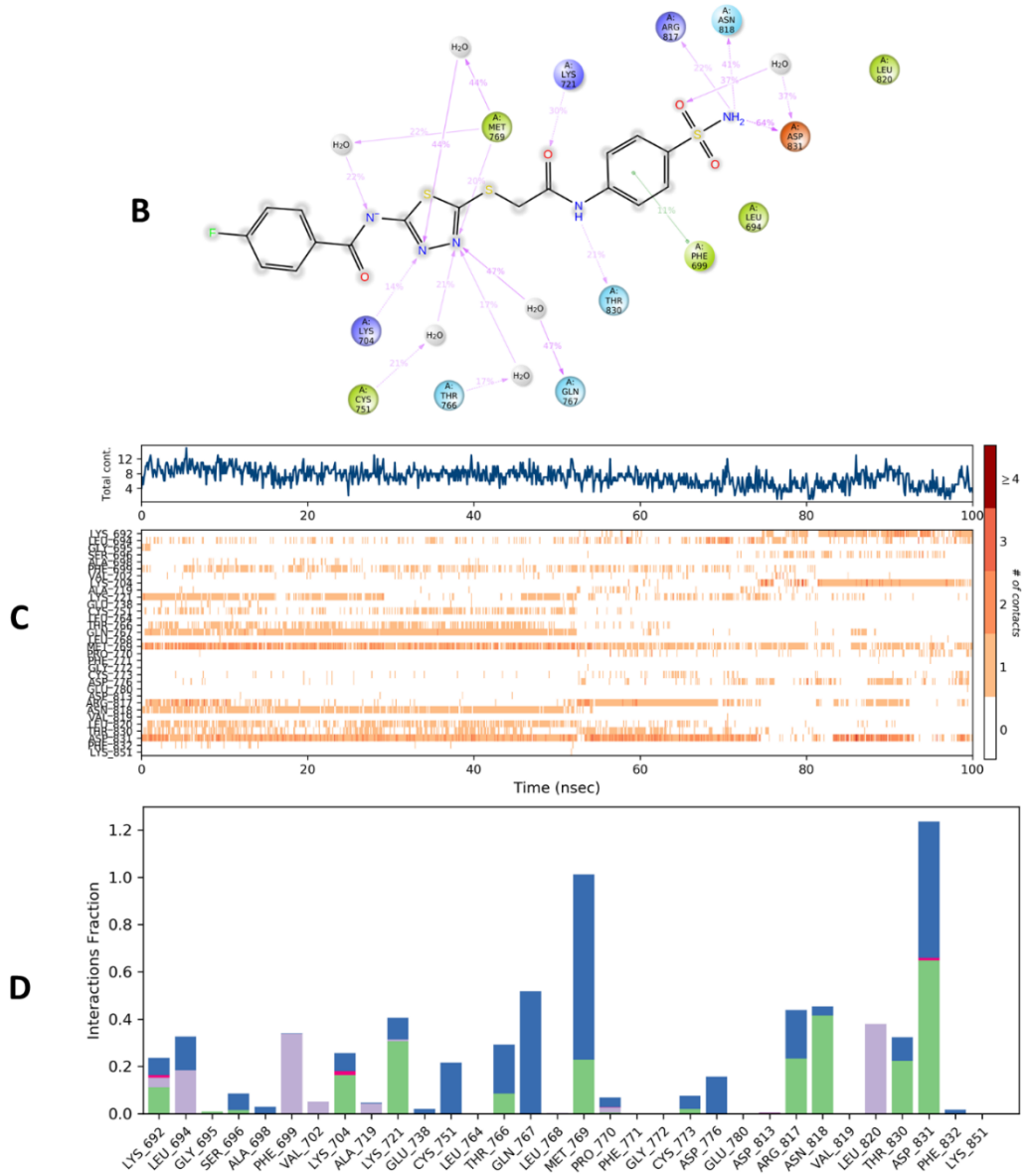
Şekil 5.106. Bileşik 3o – COX-2 kompleksi ile gerçekleştirilen MD simülasyon sonuçları.

**Tablo 2.** 3j – EGFR ve 3o – EGFR komplekslerinin moleküler dinamik simülasyon analizi.

| Kompleks  | RMSD  | %15 Üzerinde Etkileşim Gösteren Aminoasitler                                                                                                                                                                           | Etkileşim Fraksiyonları                                                                                                                                                                                                           |
|-----------|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3j – EGFR | 3 Å   | Lys704 (H- bağı: %24 ve %35)<br>Met769 (H- bağı: %44)<br>Thr830 (H- bağı: %40)<br>Asp831 (H- bağı: %39)                                                                                                                | <b>Su aracılı H-bağı (mavi)</b><br>Lys692, Val693, Leu694, Phe699, Lys704, Ala719, Lys721, Glu738, Cys751, Arg752, Leu764, Thr766, Gln767, Met769, Pro770, Phe771, Cys773, Asp776, Glu780, Arg817, Asn818, Thr830, Asp831, Phe832 |
|           |       |                                                                                                                                                                                                                        | <b>H-bağı (yeşil)</b><br>Lys704, Lys721, Thr766, Met769, Arg817, Asn818, Thr830, Asp831                                                                                                                                           |
|           |       |                                                                                                                                                                                                                        | <b>İyonik etkileşim (pembe)</b><br>Lys692, Lys704                                                                                                                                                                                 |
|           |       |                                                                                                                                                                                                                        | <b>Hidrofobik etkileşim (mor)</b><br>Leu694, Phe699, Val702, Ala719, Lys721, Leu768, Met769, Phe771, Tyr777, Leu820                                                                                                               |
| 3o – EGFR | 2.7 Å | Phe699 ( $\pi$ - $\pi$ etkileşimi: %11)<br>Lys704 (H- bağı: %14)<br>Met769 (H- bağı: %20)<br>Lys721 (H- bağı: %30)<br>Arg817 (H- bağı: %22)<br>Asn818 (H- bağı: %41)<br>Thr830 (H- bağı: %21)<br>Asp831 (H- bağı: %64) | <b>Su aracılı H-bağı (mavi)</b><br>Lys692, Leu694, Ser696, Ala698, Phe699, Lys704, Ala719, Lys721, Glu738, Cys751, Leu764, Thr766, Gln767, Met769, Pro770, Phe771, Cys773, Asp776, Glu780, Arg817, Asn818, Thr830, Asp831, Phe832 |
|           |       |                                                                                                                                                                                                                        | <b>H-bağı (yeşil)</b><br>Lys692, Gly695, Ser696, Lys704, Lys721, Thr766, Met769, Cys773, Arg817, Asn818, Thr830, Asp831                                                                                                           |
|           |       |                                                                                                                                                                                                                        | <b>İyonik etkileşim (pembe)</b><br>Lys692, Lys704, Pro770, Asp831                                                                                                                                                                 |
|           |       |                                                                                                                                                                                                                        | <b>Hidrofobik etkileşim (mor)</b><br>Lys692, Leu694, Phe699, Val702, Ala719, Lys721, Pro770, Asp813, Leu820                                                                                                                       |



**Şekil 5.107.** Bileşik 3j – EGFR kompleksi ile gerçekleştirilen MD simülasyon sonuçları.



Şekil 5.108. Bileşik 3o – EGFR kompleksi ile gerçekleştirilen MD simülasyon sonuçları.

## 6. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Kanser günümüzde özellikle değişen yaşam şartlarımız nedeniyle artan kanserojen maruziyeti nedeniyle görülme sıklığı sürekli artan ancak henüz radikal bir tedavisi olmayan kompleks bir hastalıktır. Kanser terapisinde bir an önce umut verici gelişmeler yaşanması önem arz etmektedir, öyle ki her dört kişiden biri hayatında kansere yakalanma ihtimali taşımakta ve batı toplumlarında her 3 kişiden biri kanser teşhisi almaktadır. Ne yazık ki kanser hastalarından beşte biri hayatlarını kaybetmektedirler.

Ne yazık ki milattan önceki kayıtlarda bile yer alan bu hastalığa radikal bir terapi bulunamaması ve bu kadar çok kayıp verilmesi yeni terapi ajanlarına olan ihtiyacı her geçen gün arttırmaktadır.

Kanser terapisinde konvansiyonel kemoterapötikler yerine yeni küçük inhibitör moleküllerin kullanılmasıyla daha selektif ve etkili tedavi mümkün olmaktadır. Bu küçük inhibitör moleküllerin genel olarak etki mekanizmaları bazı enzim veya sinyal yollarının inhibisyonu ile olmaktadır. Özellikle insanlardaki en büyük enzim aileleri arasında yer alan protein kinazlar önemli hedeflerden biridir. Protein kinazların hücrelerin hayati olaylarını düzenleyen sinyal iletiminin her kısmında yer almaları ve küçük moleküllerle kolayca inhibe olmaları onları öne çıkartmaktadır.

Yeni küçük inhibitör moleküller sınıfında yer alan ve Alpelisib bu tez kapsamındaki bileşiklerin tasarımında yola çıkılan molekül olmuştur. Alpelisib bir PI3K inhibitörüdür ve PI3K'nın  $\alpha$  alt birimine özgül bir inhibitördür. Bu bileşiğin seçilmesinin nedeni ilk onaylanan PI3K inhibitörü olması ve aynı zamanda bir izoforma olan özgüllüğünün onu öne çıkarıyorken, ne yazık ki tedavi sırasında görülen ve bazıları ciddi olan yan etkilere neden olmasıdır. Bu nedenle hem yeni PI3K inhibitörü bileşikler elde etmek hem de yan etkileri minimize edebilmek yeni antikanser ajan sentezi için önem arz etmektedir.

Bu tez kapsamında da bu alanda gün geçtikçe artan yeni nesil bir kemoterapötik ihtiyacından yola çıkılarak yeni antikanser ajanların elde edilmesi amaçlanmıştır. Öncelikle 20 adet antikanser etki gösterebileceği düşünülen bileşik tasarlanmıştır. Bu bileşiklerin tasarımında Alpelisib molekülünden yola çıkıldığından, moleküldeki tiyazol halkası yerine tiyadiyazol halkası tercih edilmiş, piridin yerine biyozosteri benzen halkası kullanılmıştır. Piridin halkası üzerinde bulunan  $-CF_3$  süstitüentinin aktiviteyi nasıl etkilediğini görmek amacıyla  $-CF_3$  ve farklı süstitüsyonlar taşıyan benzen halkalarına yer verilmiştir. Amid yapısının yer almasını sağlamak ve üç halka sistemini

korumak amacıyla da bileşiğe benzamid yapısı eklenmiştir. Ayrıca benzamid yapısı üzerinde yapılabilecek sübstitüsyonların aktiviteye nasıl katkısı olabileceğini görebilmek için 2 tanesi 3,4-disübstitüe, 2 tanesi 4-sübstitüe olmak üzere 4 farklı yapı tercih edilmiştir.

Kanser tedavisinde aynı anda kombine ya da bir molekülde dual etki ile daha iyi sonuçlar alınabileceği bilinmektedir. Alpelisib de Fulvestrant ile kombine kullanılmak üzere onaylanmıştır. Ayrıca PI3K inhibitörlerinin diğer kemoterapötikler ya da tedavi rejimleriyle desteklenmesinin ilaç direncinin önüne geçebileceğinin literatürde ortaya konması nedeniyle dula inhibisyon yapabilecek moleküller elde edebilmeye özen gösterilmiştir. Tek ajanların kullanılması hem ilaç-ilac etkileşimlerine yol açabileceğinden hem de hasta uyuncunu düşürebileceğinden tek bir molekül kullanarak dual inhibisyon yakalayabilmenin daha işe yarar olacağı düşünülmüştür. Bu amaçla öncelikle PI3K'nın en üstte EGFR'ye ulaştığı ve etkilediği görülmüş, EGFR ile kombine gerçekleştirilen çalışmalara bakıldığında COX-2'nin önemli bir hedef olduğu görülmüştür. COX-2 inhibitörlerinin de antikanser etkinliğiyle ilgili literatürde veriler bulunmaktadır. Aynı zamanda COX-2'nin aktivasyonu sonucu tümörlerde zaten artmış olan EGFR aktivitesinin daha da artabilmesi mümkündür. Bu çalışmada da selektif COX-2 inhibitörlerinin antikanser etkinliklerinin ortaya konulmuş olması nedeniyle bazı bileşiklere selektif COX-2 inhibitörlerinin yapılarında yer alan sülfonamid yapısı ekleyerek bu yönde aktivitelerinin ölçülmesi yoluna gidilmesine neden olmuştur. Bileşikler sentezlenmiş ve yapıları IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, HRMS spektral yöntemleri ile doğrulanmıştır.

Bileşiklerin biyolojik aktivitelerini ölçmek için Alpelisib'in meme kanserinde kullanımı için onay alması nedeniyle MCF-7 ve yine benzer anatomik bir bölgede yer alan akciğer kanserine etkisini gözlemlemek amacıyla A549 hücre hattı tercih edilmiştir.

Bileşiklerin sitotoksik aktivitelerine bakıldığında hem A549 hem de MCF-7 hücre hattı için sitotoksisite problemi bulunan bileşik bulunmaması önemli bir parametredir. Bileşiklerin A549 hücre hattı için öne çıkan bileşiği 20.682±0.984 µM ile **3j**'dir. MCF-7 için ise 2.375±0.108 µM ile **3j** ve 2.884±0.124 µM ile **3o** bileşikleri öne çıkmaktadır.

COX-2 inhibitör etkilerine bakıldığında ise 20 bileşikten dokuzunun non-selektif inhibitör olan ibuprofenden daha düşük konsantrasyonlarda etki gösterdiği, özellikle **3e**, **3f**, **3j**, **3l**, **3n**, **3o** ve **3u** bileşiklerinin nimesulide kıyasla daha iyi etkinlik göstermesi umut

vericidir. **3e**, **3j**, **3o** ve **3u** bileşiklerinin COX-2 inhibisyon potansiyellerinde yapılarında sülfonamid yapısının bulunmasının etkisinden bahsedilebilir. Özellikle en dikkat çekici aktiviteye sahip bileşiğin **3u** olması da bunu desteklemektedir.

Bileşiklerin kinaz inhibitör potansiyellerine bakıldığında ise **3j**'nin **3u**'ya kıyasla daha iyi bir inhibitör olduğu görülmüştür. **3j** bileşiğinin hem EGFR hem COX-2 inhibisyon potansiyelinde öne çıkmasının bileşik tasarımında beklenen dual inhisiyon gösterebilecek molekül olarak öne çıkmasına neden olmuştur.

Sitotoksik aktivite, COX-2 inhibitör etkinliği ve kinaz inhibitör potansiyeli birlikte değerlendirmek gerekirse **3j** bileşiğinin hem sitotoksikite problemi olmadan MCF-7 hücre hattına etkili olmasının yanında kayda değer COX-2 aktivitesinin yanında gösterdiği kinaz inhibitör potansiyeli bu bileşiği potansiyel bir antikanser ajan olabilmesi adına öne çıkarmaktadır.

Bileşiklerden **3j** ve **3o** aktivite çalışmaları sonucunda umut vadettiklerinden dolayı daha ileri testler için moleküler doking ve dinamik çalışmalarına alındığında bileşiklerin COX-2 ve EGFR enzimlerin aktif bölgelerine uyumlu bir şekilde yerleşmeleri ve güçlü etkileşimler oluşturmaları bileşiklerin kanser terapisi için kullanılabilmesi açısından umut vericidir.

Sentez çalışmalarının sonucunda elde edilen bileşiklerin yapılarına bakılacak olunursa ortak yapı olarak tiyadiazol halkasının ve biri -CH<sub>2</sub> köprüsüyle bağlı iki sübstitüe benzamid yapısının ortak olduğu görülecektir. Sübstitüsyonların hangisinin daha etkili olacağını anlamak için aktivite sonuçlarına bakarak yorum yapmak gerekirse,

- Alpelisbin yapısında bulunduğu için tercih edilen ve ne kadar etkili olduğu görülmek istenilen -CF<sub>3</sub> sübstitüsyonunun yer aldığı **3b**, **3g**, **3l** ve **3r** bileşiklerini gösterdikleri aktivite çalışması sonuçlarıyla diğer bileşiklere kıyasla öne çıkamamışlardır. Bu durumda -CF<sub>3</sub> sübstitüsyonunun aktivite için gerekli olmadığı sonucuna varılabilir.
- -CH<sub>2</sub> köprüsüyle bağlı benzamid yapısının üzerinde **3a**, **3f**, **3k** ve **3p** bileşiklerinde olduğu gibi bir sübstitüsyon bulunmaması durumunda en düşük aktivite sonuçları görülmüştür. Bu nedenle -CH<sub>2</sub> köprüsüyle bağlı benzamid yapısının üzerinde 4. Konumundan bir sübstitüsyon yapılması aktiviteyi arttırmaktadır.
- -CH<sub>2</sub> köprüsüyle bağlı benzamid yapısının üzerinde en iyi aktivite sonuçlarını

veren süstitüsyon aslında COX-2 inhibe edici etkiyi yakalayabilmek için kullanılan -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> süstitüsyonu bulunan **3e**, **3u**, **3j** ve **3o** bileşiklerinde bulunmuştur. Bu durumda -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> süstitüsyonun antikanser aktive içinde önemli olduğu söylenebilir.

**3e**, **3u**, **3j** ve **3o** bileşiklerinin yapısında ortak olarak bulunan sülfonamit grubunun gerek COX-2 enzimin selektiviteden sorumlu kısmıyla olan etkileşimi ve cebe çok güzelce yerleşmesi gerekse her iki bileşikte de EGFR enziminin aktif bölgesinde gösterdiği etkileşimler sonucu inhibisyona katkı sağlaması sülfonamit grubunun COX-2 ve EGFR dual inhibisyon çalışmalarında önemini ortaya koymaktadır. Ancak yapılarında sülfonamit grubu bulunan bileşiklerden **3e** ve **3u** ne yazık ki **3j** ve **3o** kadar öne çıkamamıştır. Bunun nedeninin ise **3j** ve **3o** bileşiklerinin sentezlerinde kullanılan benzoil klorür türevlerinin 4.konumlarından monosüstitüe olması **3e** ve **3u** bileşiklerinin sentezlerinde kullanılan benzoil klorür türevlerinin ise 3. ve 4. konumlarından disüstitüe olmaları ve bunun neticesinde daha hacimli bir yapıya sahip olduklarından enzimlerin aktif bölgesiyle etkileşmemeleri olduğu söylenebilir.

Doking çalışmalarının sonuçlarına bakıldığında **3o** bileşiğindeki 4.konumunda F süstitüenti olan benzen halkasının COX-2 enzimi için aktif bölge ile etkileşim verdiği görülürken, **3j** için böyle bir duruma rastlanmadığı görülmüştür. Buna karşılık COX-2 enzimini inhibe potansiyellerine bakıldığında ise **3j** daha iyi bir sonuç vermiştir. Bu nedenle 4. konumunda F süstitüenti olan benzen halkasının COX-2 enzimi ile yaptığı bağın aktivite için önemli olmadığı söylenebilir.

**3j** ve **3o** bileşiklerinin EGFR enziminin aktif bölgesiyle olan etkileşimine bakıldığında benzamid yapısındaki 4.konumdan süstitüe halkaların aktif bölgenin dışına doğru kaydığı ve bir bağ yapmadığı görülmüştür. Bu nedenle bu halka üzerinde daha büyük süstitüentlerin kullanılmaması gerektiği söylenebilir.

Bileşiklerden **3j** ve **3o**'nun MCF-7 hücre hattı üzerindeki etkilerini apoptotik ya da nekrotik yoldan hangisini kullanarak etki gösterdiği belirlemek için Anneksin V/EI yöntemi kullanılarak bileşiklerin etkileri incelenmiştir. **3j** bileşiğinin % 19.64 apoptoz ile hücreleri etkisiz hale görülürken, % 20.20 ile de nekroz ile etki gösterdiği görülmüştür. **3o** bileşiğinin ise %24.37 apoptoz ile hücreleri etkisiz hale görülmüş, %28.48 ile de nekroz ile etkisini gösterdiği bulunmuştur.

**3j** ve **3o** bileşikleri gerek sitotokisite ve biyolojik aktivite çalışmalarıyla gerekse

moleküler doking çalışmaları sonucu COX-2 ve EGFR enzimleriyle oluşturduğu gl etkileşimler ve moleküler dinamik çalışmaları sonucu potansiyel bir ilaç adayının vermesi gereken analiz sonuçlarını verdiğinden bu tez kapsamındaki türevler içinde ne çıkmaktadırlar.

**3j** ve **3o** bileşikleri arasında bir kıyaslama yapmak gerekirse **3j**'nin A549 ve MCF-7 hücre hatlarına karşı göstermiş olduğu IC<sub>50</sub> değerleri, COX-2 ve EGFR enzimlerini yapılan inhibisyon testleri sonucu **3o**'dan daha kuvvetli inhibe etmesi nedeniyle en etkili bileşiğin **3j** olduğu söylenebilmektedir.

Bu tez kapsamında en başta planlandığı üzere antikanser etkinlik gösteren kinaz inhibitörlerine ulaşılmış aynı zamanda bileşiklerin tasarımında istenildiği gibi COX-2 ile dual etki göstermesi de mümkün kılınmıştır. Alınan sonuçlar ile tez çalışmasının başında amaçlanan ajanlara ulaşıldığı ve sonuçta başarılı olunduğunu söylemek mümkün olabilir. Ayrıca başta başarılı olsa bile çoğu kanser terapi ajanının kullanımında problem yaratan ilaç direnci probleminin de iki farklı mekanizma ile tek bir molekül ile gerçekleştirilebiliyor oluşu bu bileşikleri ne çıkaran özellikleri arasında yer almaktadır. Bu bileşiklerle yapılabilecek ileri çalışmalar sonucunda maalesef çağımızın vebasası gibi olan ve her yıl birçok kişiye kaybettiğimiz kanser hastalığının terapisi için bir umut ışığı yakalanabilecektir.

Bu tez kapsamında sentezlenen bileşiklerden umut vadeden **3j** ve **3o** bileşiklerinin etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi amacıyla daha ileri çalışmalar yapılması gerektiği görülmekte ve bazı ileri çalışmalar önerilmektedir. Bu amaçla yapılabilecek çalışmalar arasında genel kinaz aktivitesinin llmesi, PI3K'nın  $\alpha$  alt birimine etkili olup olmayacağının daha net ortaya konabilmesi amacıyla ilgili test kiti kullanılarak aktivite çalışmalarının yapılması, sinyal yolunun devamında yer alan mTOR hedefini etkileyip etkilemediğinin belirlenebilmesi için ilgili test kitiyle aktivitesinin ölçülmesi ve farklı kanser türlerinde etkili olup olamayacağının belirlenmesi gibi çalışmalar yapılabilir. Ayrıca bileşiklerin aslında model alınan Alpelisib molekülün PI3K ile yaptığı etkileşimleri yapıp yapmadığının gözlemlemek için bileşiklerin Alpelisib referans olarak kullanılarak moleküler yerleştirme ve moleküler dinamik çalışmalarını gerçekleştirmekte model bileşiğe ne kadar yaklaşılabildiğini daha net gösterecektir. Bu nedenle ileride yapılacak çalışmalarda bunların gerçekleştirilmesi daha net sonuçların ortaya konmasını sağlayacaktır.

## KAYNAKÇA

- [1] (2023). Cancer biology. King M.W.(Ed.), *High-Yield Q & A Review for USMLE Step 1: Biochemistry and Genetics*. McGraw Hill Education.
- [2] Cordes L.M., & Cuellar S (2023). Cancer: the disease and treatment. DiPiro J.T., & Yee G.C., & Haines S.T., & Nolin T.D., & Ellingrod V.L., & Posey L(Eds.), *DiPiro's Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*, 12th Edition. McGraw Hill.
- [3] Cordes L.M., & Shord S.S. (2020). Cancer treatment and chemotherapy. DiPiro J.T., & Yee G.C., & Posey L, & Haines S.T., & Nolin T.D., & Ellingrod V(Eds.), *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*, 11e. McGraw-Hill Education.
- [4] O. Baykara, Current Modalities in Treatment of Cancer, *Balıkesir Health Sciences Journal* 5 (2016) 154–165.
- [5] P.S. Roy, B.J. Saikia, Cancer and cure: A critical analysis, *Indian J Cancer* 53 (2016) 441–442.
- [6] Yokuş, B., & Çakır, D. Ü. (2012). Kanser Biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*(1), 7-18.
- [7] Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2024).*Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.who.int/today>, accessed (Erişim tarihi: 21.02.2024)
- [8] Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2024).*Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.who.int/today>, accessed (Erişim tarihi: 21.02.2024)
- [9] Sausville E.A., & Longo D.L. (2022). Principles of cancer treatment. Loscalzo J, & Fauci A, & Kasper D, & Hauser S, & Longo D, & Jameson J(Eds.), *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 21e. McGraw-Hill Education.
- [10] S.U. Mutluay, L.D. Kozacı, Hücre İçi Sinyal Yolaklarını Hedefleyen Kemoterapötik Ajanlar, *Black Sea Journal of Health Science* 4 (2021) 175–184.
- [11] Ölgün S, Sentürk A (2021). Tirozin Kinaz İnhibitörü Bileşiklerin Tasarımı ve Antikanser Etki Mekanizmaları. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46(2), 159- 178.
- [12] Çoban Z, Güran Ş. Hücre içi sinyal iletimi mekanizmalarının kanser tanı ve tedavisindeki rolü. *CMJ*. Haziran 2013;35(2):302-310.
- [13] S. Hussain, M. Mursal, G. Verma, S.M. Hasan, M.F. Khan, Targeting oncogenic kinases: Insights on FDA approved tyrosine kinase inhibitors, *Eur J Pharmacol* 970 (2024).
- [14] G.L. Goebel, X. Qiu, P. Wu, Kinase-targeting small-molecule inhibitors and emerging bifunctional molecules, *Trends Pharmacol Sci* 43 (2022) 866–881.

- [15] Gurkan-Alp, A. S., & Bozca, F. (2019). Tirozin Kinaz Enzim İnhibitörü Yeni Bileşikler ve Yapı-Aktivite İlişkilerinin Değerlendirilmesi. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44(1), 65-78.
- [16] I. Akritopoulou-Zanze, P.J. Hajduk, Kinase-targeted libraries: The design and synthesis of novel, potent, and selective kinase inhibitors, *Drug Discov Today* 14 (2009) 291–297.
- [17] J.J. Lou Liao, Molecular recognition of protein kinase binding pockets for design of potent and selective kinase inhibitors, *J Med Chem* 50 (2007) 409–424.
- [18] J. Zhang, P.L. Yang, N.S. Gray, Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors, *Nat Rev Cancer* 9 (2009) 28–39.
- [19] Y. Yin, X. Yuan, H. Gao, Q. Yang, Nanoformulations of small molecule protein tyrosine kinases inhibitors potentiate targeted cancer therapy, *Int J Pharm* 573 (2020).
- [20] H. Weinmann, R. Metternich, Drug discovery process for kinase inhibitors, *ChemBioChem* 6 (2005) 455–459.
- [21] M. Tufail, W.-D. Wan, C. Jiang, N. Li, Targeting PI3K/AKT/mTOR Signaling to Overcome Drug Resistance in Cancer, *Chem Biol Interact* (2024) 111055.
- [22] A. James, L. Blumenstein, U. Glaenzel, Y. Jin, A. Demailly, A. Jakab, R. Hansen, K. Hazell, A. Mehta, L. Trandafir, P. Swart, Absorption, distribution, metabolism, and excretion of [<sup>14</sup>C]BYL719 (alpelisib) in healthy male volunteers, *Cancer Chemother Pharmacol* 76 (2015) 751–760.
- [23] R. Mariam Raju, J. Joy A, R. Nulgumnalli Manjunathaiah, A. Justin, B.R. Prashantha Kumar, EGFR as therapeutic target to develop new generation tyrosine kinase inhibitors against breast cancer: A critical review, *Results Chem* 7 (2024) 101490.
- [24] S.-W. Seo, J.-M. Kim, D.-G. Han, D. Geum, H. Yun, I.-S. Yoon, A sensitive HPLC-FLD method for the quantification of alpelisib, a novel phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, in rat plasma: Drug metabolism and pharmacokinetic evaluation in vitro and in vivo, *Journal of Chromatography B* 1163 (2021) 122508.
- [25] Armaghani, A. J., & Han, H. S. (2020). Alpelisib in the treatment of breast cancer: a short review on the emerging clinical data. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 251-258. 251–258.
- [26] L. Hu, M. Fan, S. Shi, X. Song, F. Wang, H. He, B. Qi, Dual target inhibitors based on EGFR: Promising anticancer agents for the treatment of cancers (2017-), *Eur J Med Chem* 227 (2022) 113963.
- [27] N. Kumar, S. Drabu, S.C. Mondal, NSAID's and selectively COX-2 inhibitors as potential chemoprotective agents against cancer. 1st Cancer Update., *Arabian Journal of Chemistry* 6 (2013) 1–23.

- [28] M. Regulski, K. Regulska, W. Prukała, H. Piotrowska, B. Stanis, M. Murias, COX-2 inhibitors: A novel strategy in the management of breast cancer, *Drug Discov Today* 21 (2016) 598–615.
- [29] Y.W. Meng, J.Y. Liu, Pathological and pharmacological functions of the metabolites of polyunsaturated fatty acids mediated by cyclooxygenases, lipoxygenases, and cytochrome P450s in cancers, *Pharmacol Ther* 256 (2024).
- [30] M. Urade, Cyclooxygenase (COX)-2 as a potent molecular target for prevention and therapy of oral cancer, *Japanese Dental Science Review* 44 (2008) 57–65.
- [31] N.A. El-Sayed, M.S. Nour, M.A. Salem, R.K. Arafa, New oxadiazoles with selective-COX-2 and EGFR dual inhibitory activity: Design, synthesis, cytotoxicity evaluation and in silico studies, *Eur J Med Chem* 183 (2019) 111693.
- [32] R. Roskoski, Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2024 update, *Pharmacol Res* 200 (2024).
- [33] D. Combarel, L. Dousset, S. Bouchet, F. Ferrer, P. Tetu, C. Lebbe, J. Ciccolini, N. Meyer, A. Paci, Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancers: treatment optimization – Part I, *Crit Rev Oncol Hematol* (2024) 104384.
- [34] P. Wu, T.E. Nielsen, M.H. Clausen, FDA-approved small-molecule kinase inhibitors, *Trends Pharmacol Sci* 36 (2015) 422–439.
- [35] M. Tang, H. Deng, K. Zheng, J. He, J. Yang, Y. Li, Ginsenoside 3 $\beta$ -O-Glc-DM (C3DM) suppressed glioma tumor growth by downregulating the EGFR/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and modulating the tumor microenvironment, *Toxicol Appl Pharmacol* 460 (2023) 116378.
- [36] Y. He, M.M. Sun, G.G. Zhang, J. Yang, K.S. Chen, W.W. Xu, B. Li, Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy, *Signal Transduct Target Ther* 6 (2021) 425.
- [37] A. Markham, Alpelisib: First Global Approval, *Drugs* 79 (2019) 1249–1253.
- [38] D.-Y. Chang, W.-L. Ma, Y.-S. Lu, Role of Alpelisib in the Treatment of PIK3CA-Mutated Breast Cancer: Patient Selection and Clinical Perspectives, *Ther Clin Risk Manag* Volume 17 (2021) 193–207.
- [39] S. Ahmad, Md.Z. Alam, U. Salma, Md. Mohasin, P.F. Rahaman, H. Parveen, S.A. Khan, A review on recent progress in synthesis and biological activities of thiadiazole and its derivatives, *J Mol Struct* 1312 (2024) 138438.
- [40] A. Oubella, A. Bimoussa, M.T. Rehman, M.F. AlAjmi, A. Auhmani, M.L. Taha, H. Morjani, M.Y. Ait. Itto, Molecular hybrids based on 1,2,3-triazole and 1,3,4-thiadiazole cores: Synthesis, characterization, anticancer activity and in silico study, *J Mol Struct* 1311 (2024) 138339.

- [41] J.Y. Chou, S.Y. Lai, S.L. Pan, G.M. Jow, J.W. Chern, J.H. Guh, Investigation of anticancer mechanism of thiadiazole-based compound in human non-small cell lung cancer A549 cells, *Biochem Pharmacol* 66 (2003) 115–124.
- [42] D. Chowrasia, C. Karthikeyan, L. Choure, Sahabjada, M. Gupta, M. Arshad, P. Trivedi, Synthesis, characterization and anti cancer activity of some fluorinated 3,6-diaryl-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazoles, *Arabian Journal of Chemistry* 10 (2017) S2424–S2428.
- [43] S. Cascioferro, G.L. Petri, B. Parrino, D. Carbone, N. Funel, C. Bergonzini, G. Mantini, H. Dekker, D. Geerke, G.J. Peters, G. Cirrincione, E. Giovannetti, P. Diana, Imidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazoles with antiproliferative activity against primary and gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells, *Eur J Med Chem* 189 (2020).
- [44] M. Szeliga, M. Karpińska, R. Rola, A. Niewiadomy, Design, synthesis and biological evaluation of novel 1,3,4-thiadiazole derivatives as anti-glioblastoma agents targeting the AKT pathway, *Bioorg Chem* 105 (2020).
- [45] K. Chidella, N. Seelam, P.K.R. Cherukumalli, J. Reddy N, G. Sridhar, Design and synthesis of novel 1,2,4-Thiadiazole linked imidazo[1,2-b]pyridazine as anticancer agents, *Chemical Data Collections* 30 (2020).
- [46] M.H. Hekal, P.S. Farag, M.M. Hemdan, W.M. El-Sayed, New N-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)furan-2-carboxamide derivatives as potential inhibitors of the VEGFR-2, *Bioorg Chem* 115 (2021).
- [47] H.E. Bostancı, U. Acar Çevik, Benzimidazol-Tiyadiazol Türevlerinin Sentezi, Karakterizasyonu, Antioksidan ve Antikanser Çalışmaları, *Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi* 9 (2022) 783–790.
- [48] S.A. Ibrahim, M.M. Salem, H.A.A. Elsalam, A.A. Noser, Design, synthesis, in-silico and biological evaluation of novel 2-Amino-1,3,4-thiadiazole based hydrides as B-cell lymphoma-2 inhibitors with potential anticancer effects, *J Mol Struct* 1268 (2022).
- [49] K. Gholivand, M. Faraghi, N. Fallah, A. Babaei, F. Pirastehfar, M. Dusek, V. Eigner, F. Salimi, Therapeutic potential of phospho-thiadiazole derivatives as anti-glioblastoma agents: synthesis, biological assessment and computational study, *Bioorg Chem* 129 (2022).
- [50] Y. Liu, J. Li, X. Liu, Z. Li, Y. Men, Y. Sun, B. Chen, Design, synthesis, and screening for the antiproliferative activity of new 1,3,4-thiadiazole scaffold linked to substituted phenacyl derivatives and disulfides, *Journal of Sulfur Chemistry* 43 (2022) 426–442.
- [51] S. Ekrek, S. Şenkardeş, Ö. Erdoğan, Ö. Çevik, Synthesis and biological evaluation of thiazole and thiadiazole derivatives as potential anticancer agents, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem* 198 (2023) 223–231.

- [52] J. Rasgania, R. Gavadia, S. Nimesh, L. Loveleen, S. Mor, D. Singh, K. Jakhar, Synthesis of isatin-tagged thiadiazoles as anti-breast cancer leads: In-vitro and in-silico investigations, *J Mol Struct* 1294 (2023).
- [53] W.S. Liu, J.F. Zhao, X.J. Guo, S.Z. Lu, W. Li, W.Z. Li, Design, synthesis, activity and molecular dynamics studies of 1,3,4-thiadiazole derivatives as selective allosteric inhibitors of SHP2 for the treatment of cancer, *Eur J Med Chem* 258 (2023).
- [54] S. Nalla, Y. Pavani, G. Ravi kumar, P. Sumalatha, T. Syed, M. Subbarao, Design, synthesis, anticancer evaluation, and molecular docking studies of 1,3,4-thiadiazole bearing 1,3,5-triazine-thiazoles, *Synth Commun* 54 (2024) 268–281.
- [55] K.R. Gankidi, S. Shivakumara, N. Govindappa, Synthesis and biological evaluation of amide derivatives of the quinazoline tethered (pyridyl)-1,2,4-thiadiazoles as anticancer agents, *Synth Commun* 54 (2024) 305–311.
- [56] S. Abu-Melha, Molecular modeling and cytotoxic activity of new thiadiazole-pyrazole hybridized with thiazole, *J Mol Struct* 1291 (2023).
- [57] M.R. Veeraboina, V. Pattabi, N. Somaiah, S. Navuluri, N. Mulakayala, Synthesis anticancer evaluation and molecular docking studies of Amide derivatives of Oxazole-Pyrimidine-1,3,4-Thiadiazole analogues, *Chemical Data Collections* 47 (2023).
- [58] K. Chidella, J.V.S. Kumar, P.K.R. Cherukumalli, N. Jagannadha Reddy, N. Somaiah, N. varma Seelam, Design, synthesis and anticancer evaluation of chalcone incorporated 1,2,4-thiadiazole-oxazolo[4,5-b]pyridine derivatives, *Chemical Data Collections* 48 (2023).
- [59] S. Bondock, T. Albarqi, T. Nasr, N.M. Mohamed, M.M. Abdou, Design, synthesis, cytotoxic evaluation and molecular docking of novel 1, 3, 4-thiadiazole sulfonamides with azene and coumarin moieties as carbonic anhydrase inhibitors, *Arabian Journal of Chemistry* 16 (2023).
- [60] Y. Men, Z. Li, H. Wang, Y. Liu, X. Liu, B. Chen, Synthesis and antiproliferative evaluation of novel 1,3,4-thiadiazole-S-alkyl derivatives based on quinazolinone, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem* 198 (2023) 591–601.
- [61] A.E. Evren, D. Nuha, S. Dawbaa, A.B. Karaduman, B.N. Sağlik, L. Yurttaş, Novel oxadiazole-thiadiazole derivatives: synthesis, biological evaluation, and in silico studies, *J Biomol Struct Dyn* (2023).
- [62] K.M. Dawood, S.M. Gomha, Synthesis and Anti-cancer Activity of 1,3,4-Thiadiazole and 1,3-Thiazole Derivatives Having 1,3,4-Oxadiazole Moiety, *J Heterocycl Chem* 52 (2015) 1400–1405.
- [63] S. Nalla, Y. Pavani, R. kumar Gollapudi, S. Poodari, S. Mannam, Synthesis and biological evaluation of amide derivatives of 1,2,4-thiadiazole-thiazole-pyridine as anticancer agents, *Chemical Data Collections* 49 (2024).

- [64] S. Masoudinia, M. Samadizadeh, M. Safavi, H.R. Bijanzadeh, A. Foroumadi, Novel quinazolines bearing 1,3,4-thiadiazole-aryl urea derivative as anticancer agents: design, synthesis, molecular docking, DFT and bioactivity evaluations, *BMC Chem* 18 (2024).
- [65] S. Demiraran, D. Osmaniye, Y. Özkay, Z.A. Kaplancıklı, B. Koçyiğit-Kaymakçıoğlu, F. Tok, Synthesis, characterization, biological evaluation and in silico studies of novel 1,3,4-thiadiazole derivatives as aromatase inhibitors, *J Mol Struct* 1296 (2024).
- [66] M. Altıntop, A. Özdemir, G. Turan-Zitouni, S. Ilgın, Ö. Atlı, F. Demirci, Z. Kaplancıklı, Synthesis and in Vitro Evaluation of New Nitro-Substituted Thiazolyl Hydrazone Derivatives as Anticandidal and Anticancer Agents, *Molecules* 19 (2014) 14809–14820.
- [67] B.N. Sağlık, S. Ilgın, Y. Özkay, Synthesis of new donepezil analogues and investigation of their effects on cholinesterase enzymes, *Eur J Med Chem* 124 (2016) 1026–1040.
- [68] M.D. Altıntop, A. Özdemir, G. Turan-Zitouni, S. Ilgın, Ö. Atlı, R. Demirel, Z.A. Kaplancıklı, A novel series of thiazolyl–pyrazoline derivatives: Synthesis and evaluation of antifungal activity, cytotoxicity and genotoxicity, *Eur J Med Chem* 92 (2015) 342–352.
- [69] Ü. Demir Özkay, Ö.D. Can, B.N. Sağlık, U. Acar Çevik, S. Levent, Y. Özkay, S. Ilgın, Ö. Atlı, Design, synthesis, and AChE inhibitory activity of new benzothiazole–piperazines, *Bioorg Med Chem Lett* 26 (2016) 5387–5394.
- [70] L. Yurttaş, Ş. Demirayak, S. Ilgın, Ö. Atlı, In vitro antitumor activity evaluation of some 1,2,4-triazine derivatives bearing piperazine amide moiety against breast cancer cells, *Bioorg Med Chem* 22 (2014) 6313–6323.
- [71] <https://bpsbioscience.com/egfr-kinase-assay-kit> (Erişim tarihi: 15.02.2024).
- [72] Stamos, J., Sliwkowski, M. X., & Eigenbrot, C. (2002). Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *Journal of biological chemistry*, 277(48), 46265-46272.
- [73] Wang, J. L., Limburg, D., Graneto, M. J., Springer, J., Hamper, J. R. B., Liao, S., ... & Carter, J. (2010). The novel benzopyran class of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. Part 2: The second clinical candidate having a shorter and favorable human half-life. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20(23), 7159-7163.
- [74] Schrödinger (2020). Maestro (10.6 ed). Schrödinger LLC.
- [75] Schrödinger (2020). LigPrep (3.8 ed). Schrödinger, LLC.
- [76] Schrödinger (2020). Glide. 7.1 ed. Schrödinger, LLC.
- [77] Liu, X., Shi, D., Zhou, S., Liu, H., Liu, H., ve Yao, X. (2018). Molecular dynamics simulations and novel drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 13 (1), 23-37.
- [78] Schrödinger Release 2018-3: Prime, (2018). M.-D.I. Tools, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020.

- [79] Sureshkumar, B., Mary, Y. S., Resmi, K. S., Suma, S., Armarković, S., Armarković, S. J., Van Alsenoy, C., Narayana, B., ve Sobhana, D. (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
- [80] S. Release, 1: Desmond molecular dynamics system, version 3.7, DE Shaw Research, New York, NY, Maestro-Desmond Interoperability Tools, version, 3 (2014).
- [81] Humphreys, D. D., Friesner, R. A., ve Berne, B. J. (1994). A Multiple-Time-Step Molecular Dynamics Algorithm for Macromolecules. *The Journal of Physical Chemistry*, 98 (27), 6885-6892.
- [82] Hoover, W. G. (1985). Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Physical Review A*, 31 (3), 1695-1697.
- [83] Martyna, G. J., Tobias, D. J., ve Klein, M. L. (1994). Constant pressure molecular dynamics algorithms. *The Journal of Chemical Physics*, 101 (5), 4177-4189.
- [84] Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M. L., Darden, T., Lee, H., ve Pedersen, L. G. (1995). A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics*, 103 (19), 8577-8593
- [85] Turan-Zitouni, G., Demirayak, Ş., Özdemir, A., Kaplancıklı, Z. A., & Yıldız, M. T. (2004). Synthesis of some 2-[(benzazole-2-yl) thioacetyl amino] thiazole derivatives and their antimicrobial activity and toxicity. *European journal of medicinal chemistry*, 39(3), 267-272.
- [86] Nongpiur, C. G. L., Saxena, H., Poluri, K. M., Kaminsky, W., & Kollipara, M. R. (2024). Investigation of half-sandwich platinum group metal complexes featuring benzamide derived ligands and their diazido derivatives: Synthesis, molecular structures and biological studies. *Inorganica Chimica Acta*, 122127.
- [87] Kannappan, J., Jain, N., & Bedekar, A. V. (2015). Synthesis and applications of exo N-((1R, 2R, 4R)-1, 7, 7-trimethylbicyclo [2.2. 1] heptan-2-yl) benzamides as NMR solvating agents for the chiral discrimination of 1, 1'-binaphthyl-2, 2'-diyl hydrogenphosphates and  $\alpha$ -substituted acids. *Tetrahedron: Asymmetry*, 26(18-19), 1102-1107.
- [88] Baran, A. U. (2013). Comparative study of microwave-assisted and conventional synthesis of ibuprofen-based acyl hydrazone derivatives. *Turkish Journal of Chemistry*, 37(6), 927-935.
- [89] Osmaniye, D. (2022). *Yeni Kinaz Inhibitörlerinin Tasarımı, Sentezi ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları* (Doctoral dissertation, Anadolu University (Turkey)).
- [90] Yurttaş, L. (2012). *Bazı 1-(2 aril-2-okzoetil)-2-[morfolin-4-il] tiyosektometil benzimidazol türevlerinin sentezi ve antikanser etkilerinin araştırılması* (Doctoral dissertation, Anadolu University (Turkey)).

- [91] Sever, B. (2016). *Yeni triazolotiyadiazin türevlerinin sentezi ve biyolojik etki çalışmaları* (Doctoral dissertation, Anadolu University (Turkey)).

