

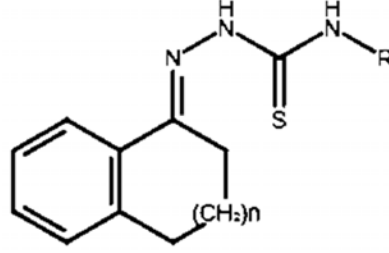
ÖZET

TİYOSEMİKARBAZİT TÜREVİ BİLEŞİKLER VE BU BİLEŞİKLERİN SENTEZ YÖNTEMİ

Buluş, kanser tedavisinde, özellikle meme kanseri tedavisinde etkin, siklooksijenaz-2
5 (COX-2) enzimleri üzerinde seçici inhibisyon özelliği gösteren, antitümör özellikli
tiyosemikarbazit türevi bileşikler, bu bileşiklerin sentez yöntemi ve biyolojik aktivitesi ile
ilgilidir.

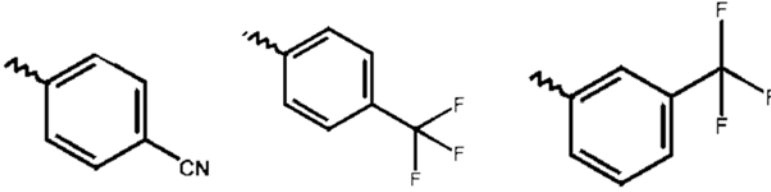
İSTEMLER

1. Formül A ile gösterilen, siklooksijenaz-2 (COX-2) enzimleri üzerinde seçici inhibisyon özelliği gösteren, antitümör özellikli tiyosemikarbazit türevi bir bileşik olup,

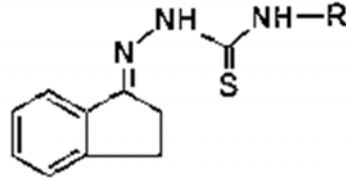


Formül A

burada n=0 veya n=1'dir ve R aşağıdaki formüllerin içerisinde seçilmektedir:

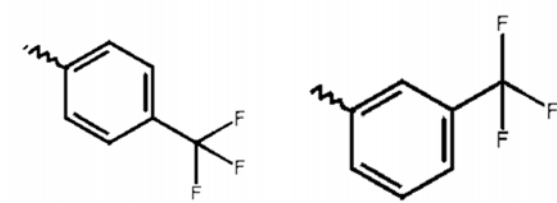


2. İstem 1'e göre bir bileşik olup özelliği, burada n=0 olduğunda söz konusu bileşiğin Formül I ile gösterilmesi

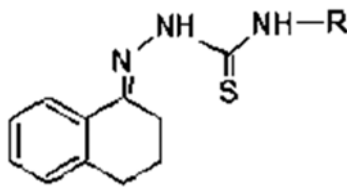


Formül I

ve R grubunun aşağıdaki formüllerden seçilmesidir:



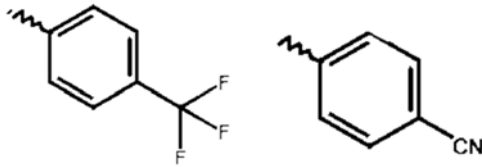
3. İstem 1'e göre bir bileşik olup, burada n=1 olduğunda söz konusu bileşiğin Formül II ile gösterilmesi



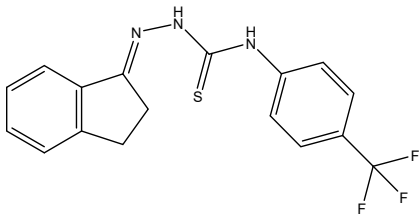
5

Formül II

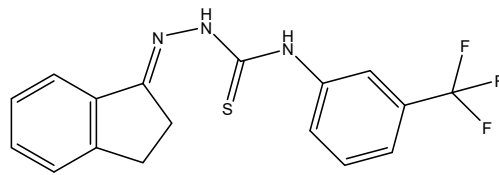
ve R grubunun aşağıdaki formüllerden seçilmesidir:



4. Aşağıdaki formüllerden herhangi birine sahip İstem 2'ye göre bir bileşik:



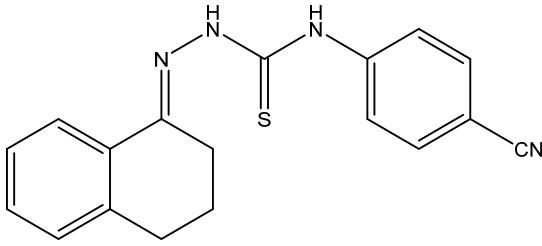
Bileşik I



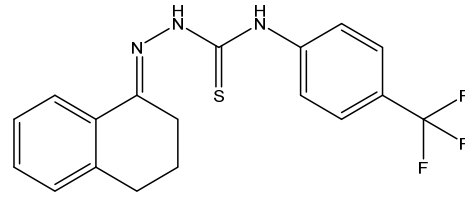
Bileşik II

10

5. Aşağıdaki formüllerden herhangi birine sahip İstem 3'e göre bir bileşik:



Bileşik III



Bileşik IV

6. İstem 1-5'ten herhangi birine göre bir bileşik olup özelliği; bu bileşiğin

- 5
- 2-(2,3-Dihidro-1H-inden-1-iliden)-N-(4-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamid (Bileşik I),
 - 2-(2,3-Dihidro-1H-inden-1-iliden)-N-(3-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamid (Bileşik II),
 - 2-(3,4-Dihidronaftalen-1(2H)-iliden)-N-(4-siyanofenil)hidrazin-1-karbotiyoamid (Bileşik III) veya
 - 2-(3,4-Dihidronaftalen-1(2H)-iliden)-N-(4-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamid (Bileşik IV)
- 10

olmasıdır.

15 7. İstem 6'ya göre bir bileşik olup özelliği; 2-(2,3-Dihidro-1H-inden-1-iliden)-N-(4-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamidin (Bileşik I) kütlesinin 349,38 g/mol olmasıdır.

8. İstem 6'ya göre bir bileşik olup özelliği; 2-(2,3-Dihidro-1H-inden-1-iliden)-N-(4-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamidin (Bileşik I) erime noktasının 205-208°C olmasıdır.

20 9. İstem 6'ya göre bir bileşik olup özelliği; 2-(2,3-Dihidro-1H-inden-1-iliden)-N-(4-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamidin (Bileşik I) %57,97 C, %3,961 H, %12,16 N içermesidir.

10. İstem 6'ya göre bir bileşik olup özelliği; 2-(2,3-Dihidro-1*H*-inden-1-iliden)-*N*-(4-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamitin (Bileşik I) infrared (IR) spektrumunun, IR $\nu_{\max}$ (KBr, cm^{-1}): 3270, 3167 (N-H g.b.), 3062 (ar. C-H g.b.), 2928, 2858 (asimetrik ve simetrik alifatik C-H g.b.), 1614, 1516, 1483, 1470 (C=N g.b. ve ar. C=C g.b.), 1406, 1325 (asimetrik ve simetrik alifatik C-H e.b.), 1276 (C-N g.b.), 1182 (C=S g.b.), 1156 (C-F g.b.), 806 (ar. 1,4 disüstitüsyon) piklerini içermesidir.

11. İstem 6'ya göre bir bileşik olup özelliği; 2-(2,3-Dihidro-1*H*-inden-1-iliden)-*N*-(4-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamitin (Bileşik I) ^1H -NMR spektrumunun, ^1H NMR (500 MHz) (DMSO- d_6 /TMS) δ (ppm): 2,95-3,02 (m, 2H, CH_2), 3,07-3,15 (m, 2H, CH_2), 7,29-7,36 (m, 1H, Ar-H), 7,38-7,46 (m, 2H, Ar-H), 7,73 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, Ar-H), 7,96 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, Ar-H), 8,07 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, Ar-H), 10,31 (s, 1H, NH), 10,89 (s, 1H, NH-4CF₃Ph) piklerini içermesidir.

12. İstem 6'ya göre bir bileşik olup özelliği; 2-(2,3-Dihidro-1*H*-inden-1-iliden)-*N*-(4-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamitin (Bileşik I) ^{13}C -NMR spektrumunun, ^{13}C -NMR (APT) (125 MHz) (DMSO- d_6 /TMS) δ (ppm): 28,09, 28,77 (CH_2), 121,59, 123,75, 128,07, 129,91 (CF₃), 123,01, 125,57, 125,60, 125,63, 126,07, 127,28, 131,37 (Ar C-H), 125,03, 125,79, 125,91, 128,10 (4-CF₃PhC₄), 137,99 (Ar-C), 143,36 (4-CF₃PhC₁), 149,56 (Ar-C), 159,14 (C=N), 176,60 (C=S) piklerini içermesidir.

13. İstem 6'ya göre bir bileşik olup özelliği; 2-(2,3-Dihidro-1*H*-inden-1-iliden)-*N*-(4-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamitin (Bileşik I) kapalı formülünün C₁₇H₁₄F₃N₃S olmasıdır.

14. İstem 6'ya göre bir bileşik olup özelliği; 2-(2,3-Dihidro-1*H*-inden-1-iliden)-*N*-(3-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamitin (Bileşik II) kütleinin 349,38 g/mol olmasıdır.

15. İstem 6'ya göre bir bileşik olup özelliği; 2-(2,3-Dihidro-1*H*-inden-1-iliden)-*N*-(3-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamitin (Bileşik II) erime noktasının 195-197°C olmasıdır.

16. İstem 6'ya göre bir bileşik olup özelliği; 2-(2,3-Dihidro-1H-inden-1-iliden)-N-(3-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamitin (Bileşik II) %58,10 C, %3,945 H, %12,20 N içermesidir.

17. İstem 6'ya göre bir bileşik olup özelliği; 2-(2,3-Dihidro-1H-inden-1-iliden)-N-(3-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamitin (Bileşik II) infrared (IR) spektrumunun, IR $\nu_{\max}$ (KBr, cm^{-1}): 3247, 3190 (N-H g.b.), 3083 (ar. C-H g.b.), 2935, 2866 (asimetrik ve simetrik alifatik C-H g.b.), 1614, 1554, 1491, 1471 (C=N g.b. ve ar. C=C g.b.), 1405, 1366 (asimetrik ve simetrik alifatik C-H e.b.), 1277 (C-N g.b.), 1189 (C=S g.b.), 1163 (C-F g.b.), 875, 763 (ar. 1,3 disübstütüsyon) piklerini içermesidir.

18. İstem 6'ya göre bir bileşik olup özelliği; 2-(2,3-Dihidro-1H-inden-1-iliden)-N-(3-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamitin (Bileşik II) ^1H -NMR spektrumunun, ^1H NMR (500 MHz) ($\text{DMSO}-d_6/\text{TMS}$) δ (ppm): 2,93-3,03 (m, 2H, CH_2), 3,06-3,18 (m, 2H, CH_2), 7,27-7,47 (m, 4H, Ar-H), 7,50-7,67 (m, 2H, Ar-H), 7,96-8,04 (m, 1H, Ar-H), 8,06-8,18 (m, 1H, Ar-H), 10,32 (s, 1H, NH), 10,89 (s, 1H, $\text{NH}-3\text{CF}_3\text{Ph}$) piklerini içermesidir.

19. İstem 6'ya göre bir bileşik olup özelliği; 2-(2,3-Dihidro-1H-inden-1-iliden)-N-(3-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamitin (Bileşik II) ^{13}C -NMR spektrumunun, ^{13}C -NMR (APT) (125 MHz) ($\text{DMSO}-d_6/\text{TMS}$) δ (ppm): 28,06, 28,77 (CH_2), 121,84, 122,07, 123,02, 126,3, 127,24, 129,52, 129,70, 131,30 (Ar C-H), 121,84, 123,52, 125,69 (CF_3), 129,37 ($3\text{CF}_3\text{PhC}_3$), 138,04 (Ar-C), 140,46 ($3\text{-CF}_3\text{PhC}_1$), 149,50 (Ar-C), 158,97 (C=N), 176,81 (C=S) piklerini içermesidir.

20. İstem 6'ya göre bir bileşik olup özelliği; 2-(2,3-Dihidro-1H-inden-1-iliden)-N-(3-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamitin (Bileşik II) kapalı formülünün $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_3\text{S}$ olmasıdır.

21. İstem 6'ya göre bir bileşik olup özelliği; 2-(3,4-Dihidronaftalen-1(2H)-iliden)-N-(4-siyanofenil)hidrazin-1-karbotiyoamitin (Bileşik III) kütlesinin 320,41 g/mol olmasıdır.

22. İstem 6'ya göre bir bileşik olup özelliği; 2-(3,4-Dihidronaftalen-1(2H)-iliden)-N-(4-siyanofenil)hidrazin-1-karbotiyoamitin (Bileşik III) erime noktasının 195-197°C olmasıdır.
- 5 23. İstem 6'ya göre bir bileşik olup özelliği; 2-(3,4-Dihidronaftalen-1(2H)-iliden)-N-(4-siyanofenil)hidrazin-1-karbotiyoamitin (Bileşik III) %67,24 C, %5,061 H, %17,75 N, %9.949 S içermesidir.
- 10 24. İstem 6'ya göre bir bileşik olup özelliği; 2-(3,4-Dihidronaftalen-1(2H)-iliden)-N-(4-siyanofenil)hidrazin-1-karbotiyoamitin (Bileşik III) infrared (IR) spektrumunun, IR ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3237 (N-H g.b.), 3021 (ar. C-H g.b.), 2951, 2855 (asimetrik ve simetrik alifatik C-H g.b.), 2217 (CN g.b.), 1607, 1581, 1532, 1468 (C=N g.b. ve ar. C=C g.b.), 1406, 1359 (asimetrik ve simetrik alifatik C-H e.b.), 1284 (C-N g.b.), 1172 (C=S g.b.), 812 (ar. 1,4-disübstitüsyon) piklerini içermesidir.
- 15 25. İstem 6'ya göre bir bileşik olup özelliği; 2-(3,4-Dihidronaftalen-1(2H)-iliden)-N-(4-siyanofenil)hidrazin-1-karbotiyoamitin (Bileşik III) $^1\text{H-NMR}$ spektrumunun, $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) ($\text{DMSO-}d_6/\text{TMS}$) δ (ppm): 1,85 (p, $J = 6,3$ Hz, 2H, CH_2), 2,73-2,83 (m, 4H, CH_2), 7,16-7,28 (m, 2H, Ar-H), 7,29-7,36 (m, 1H, Ar-H), 7,80-7,86 (m, 2H, Ar-H), 7,94-8,00 (m, 2H, Ar-H), 8,35-8,41 (m, 1H, Ar-H), 10,29 (s, 1H, NH), 10,84 (s, 1H, NH-4CNPh) piklerini içermesidir.
- 20 26. İstem 6'ya göre bir bileşik olup özelliği; 2-(3,4-Dihidronaftalen-1(2H)-iliden)-N-(4-siyanofenil)hidrazin-1-karbotiyoamitin (Bileşik III) $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunun, $^{13}\text{C-NMR}$ (APT) (125 MHz) ($\text{DMSO-}d_6/\text{TMS}$) δ (ppm): 21,88, 26,82, 29,37 (CH_2), 107,17 (4-CNPhC₄), 119,46 (PhCN), 132,02 (Ar-C), 125,48, 126,19, 126,68, 128,99, 130,10, 132,73 (Ar-CH), 141,00 (Ar-C), 144,05 (4-CNPhC₁), 150,68 (C=N), 176,18 (C=S) piklerini içermesidir.
- 25 27. İstem 6'ya göre bir bileşik olup özelliği; 2-(3,4-Dihidronaftalen-1(2H)-iliden)-N-(4-siyanofenil)hidrazin-1-karbotiyoamitin (Bileşik III) kapalı formülünün $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{S}$ olmasıdır.

28. İstem 6'ya göre bir bileşik olup özelliği; 2-(3,4-Dihidronaftalen-1(2H)-iliden)-N-(4-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamitin (Bileşik IV) kütlesinin 372,41 g/mol olmasıdır.

29. İstem 6'ya göre bir bileşik olup özelliği; 2-(3,4-Dihidronaftalen-1(2H)-iliden)-N-(4-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamitin (Bileşik IV) erime noktasının 173-175°C olmasıdır.

30. İstem 6'ya göre bir bileşik olup özelliği; 2-(3,4-Dihidronaftalen-1(2H)-iliden)-N-(4-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamitin (Bileşik IV) %58,34 C, %4,87 H, %11,41 N içermesidir.

31. İstem 6'ya göre bir bileşik olup özelliği; 2-(3,4-Dihidronaftalen-1(2H)-iliden)-N-(4-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamitin (Bileşik IV) infrared (IR) spektrumunun, IR $\nu_{\max}$ (KBr, cm^{-1}): 3205, 3116 (N-H g.b.), 3014 (ar. C-H g.b.), 2939, 2872 (asimetrik ve simetrik alifatik C-H g.b.), 1593, 1544, 1519, 1479 (C=N g.b. ve ar. C=C g.b.), 1409, 1325 (asimetrik ve simetrik alifatik C-H e.b.), 1294 (C-N g.b.), 1184 (C=S g.b.), 1163 (C-F g.b.), 790 (ar. 1,4-disübstitüsyon) piklerini içermesidir.

32. İstem 6'ya göre bir bileşik olup özelliği; 2-(3,4-Dihidronaftalen-1(2H)-iliden)-N-(4-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamitin (Bileşik IV) ^1H -NMR spektrumunun, ^1H NMR (500 MHz) (DMSO- d_6 /TMS) δ (ppm): 1,86 (p, J = 6,2 Hz, 2H, CH_2), 2,67-2,82 (m, 4H, CH_2), 7,19-7,35 (m, 3H, Ar-H), 7,73 (d, J = 7,4 Hz, 2H, Ar-H), 7,91 (d, J = 7,3 Hz, 2H, Ar-H), 8,41 (d, J = 7,6 Hz, 1H, Ar-H), 10,26 (NH), 10,75 (NH-4CF₃Ph) piklerini içermesidir.

33. İstem 6'ya göre bir bileşik olup özelliği; 2-(3,4-Dihidronaftalen-1(2H)-iliden)-N-(4-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamitin (Bileşik IV) ^{13}C -NMR spektrumunun, ^{13}C -NMR (APT) (125 MHz) (DMSO- d_6 /TMS) δ (ppm): 21,88, 26,76, 29,37 (CH_2), 121,58, 123,74, 125,44, 128,06 (CF_3), 125,19, 125,70, 125,89 (4CF₃PhC₄), 125,58, 125,61, 126,00, 126,19, 126,66, 128,98, 130,03 (Ar-CH), 132,08, 140,94 (Ar-C), 143,40 (4CF₃PhC₁), 150,37 (C=N), 177,14 (C=S) piklerini içermesidir.

34. İstem 6'ya göre bir bileşik olup özelliği; 2-(3,4-Dihidronaftalen-1(2*H*)-iliden)-*N*-(4-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamitin (Bileşik IV) kapalı formülünün $C_{18}H_{16}F_3N_3S.O,5H_2O$ olmasıdır.

35. Kanser tedavisinde kullanılmak üzere İstem 1-6'dan herhangi birine göre antitümoral özellikli bir bileşik.

36. Meme kanserinde kullanılmak üzere İstem 35'e göre bir bileşik.

37. İstem 1-6'dan herhangi birine göre bir bileşiği içeren farmasötik bir kompozisyon.

38. İstem 37'ye göre bir farmasötik kompozisyonun meme kanseri tedavisi için bir ilacın üretiminde kullanımı.

39. İstem 37'ye göre bir farmasötik kompozisyonun meme kanseri tedavisi için bir ilacın üretiminde kullanımı.

40. İstem 37'ye göre bir farmasötik kompozisyonu ihtiva eden anti-kanser etkili bir ilaç.

41. Formül A ile gösterilen, siklooksijenaz-2 (COX-2) enzimleri üzerinde seçici inhibisyon özelliği gösteren, antitümör özellikli tiyosemikarbazit türevi bir bileşiğin sentez yöntemi olup özelliği;

i. 0,01 mol hidrazin monohidrat'ın (Bileşik A) etanoldeki çözeltisi üzerine yine etanolde çözdürülmüş 0,01 mol sübstitüe fenil izotiyosiyanat (Bileşik B) bileşiğinin damla damla ilave edilerek çözeltiler buz banyosunda manyetik karıştırıcıda 3 saat boyunca karıştırılması,

ii. çöken ürünün süzülerek etanol ve dietil eter ile yıkanması,

iii. yıkanan ürünün kurutulması ile *N*-(sübstitüe fenil)hidrazin-1-karbotiyoamidler (4-(sübstitüe fenil)tiyosemikarbazitler) (Bileşik C) bileşiğinin elde edilmesi,

iv. 0.005 mol 1-indanon/ α -tetralon'un (Bileşik D) etanoldeki çözeltisi üzerine 0.005 mol 4-sübstitüe fenil tiyosemikarbazit (Bileşik C) bileşiğinin etanoldeki çözeltisinin ilave edilmesi,

v. elde edilen karışımın birkaç damla d.HCl katalizörlüğünde 6 saat geri çeviren soğutucu altında ısıtılması,

- vi. elde edilen çözeltinin bir gece bekletilip çöken ürün süzülmesi,
 - vii. süzülen ürünün uygun çözücünden billurlandırılarak saflaştırılması
- işlem adımlarını içermesidir.

42. İstem 41'e göre bir yöntem ile sentezlenen antitümör özellikli bileşik.

- 5 **43.** Kanser tedavisinde kullanılmak üzere İstem 42'ye göre antitümoral özellikli bir bileşik.
- 44.** İstem 43'e göre bir bileşik olup özelliği, bahsi geçen kanserin meme kanseri olmasıdır.

TARİFNAME

TİYOSEMIKARBAZİT TÜREVİ BİLEŞİKLER VE BU BİLEŞİKLERİN SENTEZ YÖNTEMİ

5 Buluşun İlgili Olduğu Teknik Alan

Buluş, kanser tedavisinde, özellikle meme kanseri tedavisinde etkin, siklooksijenaz-2 (COX-2) enzimleri üzerinde seçici inhibisyon özelliği gösteren, antitümör özellikli tiyosemikarbazit türevi bileşikler ve bu bileşiklerin sentez yöntemi ile ilgilidir.

10 Tekniğin Bilinen Durumu

Kanser, vücudun herhangi organ ya da dokusundaki hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve büyümesi sonucu ortaya çıkan bir hastalık tablosudur. Kanser olduğu dokuya göre adlandırılır. 200'den fazla tipi tespit edilmiştir. En sık görülen ve ölüme yol açan kanser türleri akciğer, mide, karaciğer, kolon ve meme kanseridir. Meme kanseri, meme epitelinden kaynaklanan malign tümördür ve kadın kanserleri arasında en yaygın olan ve akciğer kanserinden sonra en sık ölüm nedeni olan kanserdir. Tüm kadın kanserlerinin %24'ünü ve kanserden ölümleri %14'ünü oluşturmaktadır. Her 8 kadından birinin hayatının belirli bir zamanında meme kanserine yakalanacağı bildirilmektedir. Nadir olarak erkeklerde de meme kanseri görülmektedir. Her 100 kadına karşılık 1 erkek meme kanseri tanısı almaktadır. Meme kanseri görülme sıklığının her yıl arttığı saptanmıştır [1].

Bir meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 hücreleri ilk kez Dr. Soule tarafından, metastatik meme kanseri olan 69 yaşında bir kadının plevral efüzyonundan çoğaltılmıştır. Adını Michigan Kanser Vakfı'dan almaktadır. Hücre hattı, östrojen reseptörü alfa'ya (ER- α) sahip olan nadir meme kanseri tiplerindendir. Yapılan araştırmalar, östrojenin MCF-7 hücre hattı üzerinde anti-apoptotik etkisi olduğunu ve diğer taraftan ise tamoxifen gibi anti-östrojenik maddelerin ise hücre proliferasyonunu inhibe ederek apoptotik etki yarattığını göstermiştir. Bugüne kadar yayınlanan 25.000 kadar makale ile MCF-7 hücreleri dünyada en çok çalışılmış meme kanseri hücre hattıdır [2].

Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) 2004 yılında yaklaşık 215.990 yeni meme kanseri hastası ve bundan dolayı 40.100 ölüm bildirilmiştir. Akciğer kanserinden sonra kadınlarda en öldürücü kanserdir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar sonucunda Non-steroidal anti-inflamatuvar ilaç (NSAİ) kullanan kişilerde meme kanseri insidansında azalma olduğu gözlenmiş ve bunun potansiyel olarak kullanılan NSAİ ilaçlara bağlı olabileceği düşünülmüştür. NSAİ ilaçlarının kanserin gelişmesini ve ilerlemesini azalttığı ilk olarak kolorektal kanserlerde kanıtlanmakla birlikte birçok kanser türünde, özellikle solid tümörlerde bu etkisi araştırılmaktadır. NSAİ ilaçlar hedef dokuda siklooksijenaz (COX) enzimini inhibe ederek etkili olmaktadır [3].

Siklooksijenaz (COX, PGHS), hem COX hem de peroksidaz aktiviteleri sergileyen iki işlevli bir enzimdir. COX bileşeni araşidonik asidi hidroperoksi endoperoksite (PGG₂) dönüştürür. Ağrı giderilmesi ve iltihap tedavisinde kullanılan bir enzimdir. COX enzimi, 3 izoformdan oluşmaktadır. COX izoformlarından biri olan COX-2, çoklu prokarsinojenik etkilerin modülasyonuna katkıda bulunan prostanooidlerin oluşumundan sorumlu bir prostaglandin endoperoksit sentaz 2 enzimidir. Birçok kanser tipinde bu enzimin aşırı eksprese edildiği ve markör olarak kullanıldığı gösterilmiştir. COX-2'nin aşırı ekspresyonunun karsinogenezi teşvik ettiği, kanserin nüksetme oranını ve invazyonu arttırdığı, hayatta kalmayı azalttığı, kanser hücrelerini radyoterapi ve kemoterapiye karşı dirençli hale getirdiği gösterilmiştir. Buna karşılık, COX-1, bazı insan kanser türlerinde ekspresyonun artmasına ve deneysel modellerden patogenetik bir durum ortaya çıkmasına rağmen daha az ilgi görmektedir. COX-1 ve COX-2 izoformları, kanser patofizyolojisinde, özellikle tümörijeniz sürecinde koordineli bir şekilde çalışmaktadır. COX inhibitörlerine selekoksib, indometazin, metamizol, aspirin, aminopirin örnek gösterilebilir [4].

COX inhibitörlerinin birçok yan etkisi bulunmaktadır. COX-2 inhibitörlerinin yaygın yan etkileri uykusuzluk, karın ağrısı, gaz, baş ağrısı, mide bulantısı, ishal, farenjit, rinit, sinüzit, periferik ödem, baş dönmesi, üst solunum yolu enfeksiyonu, döküntü, hazımsızlık, mide bulantısı ve ishaldir. Bu inhibitörler, mide ülseri, kanama ve mide delinmesi gibi ciddi, hatta ölümcül mide ve bağırsak yan etkileri riskini artırabilir. Bu olaylar, tedavi sırasında herhangi bir zamanda ve uyarıcı semptomlar olmaksızın ortaya çıkabilir. Sülfonamidlere,

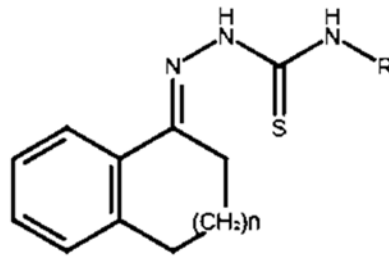
örneğin trimetoprim (Trimplex, Proloprim, Primsol) ve sülfametoksazol (Bactrim), aspirin veya diğer NSAID'lere alerjisi olan kişiler, COX inhibitörlerine karşı alerjik reaksiyonlar yaşayabilir. COX inhibitörleri kalp krizi, felç ve ilgili durum riskini artırabilir. Bu risk, kalp hastalığı ve ilişkili durumlar için risk faktörleri olan ve daha uzun kullanım süresi olan hastalarda artabilir; bu nedenle kalp krizi, felç ve benzeri olayların riskini azaltmak için en düşük etkili doz ve en kısa süre kullanılmalıdır. Ayrıca, COX inhibitörleri sıvı tutulmasına neden olabilir [5]. Ek olarak, mevcut teknikte yer alan COX inhibitörleri yeterli etkinliğe sahip değildir. Organizmada inflamatuvar yanıtlar, malign dönüşüm, invazyon ve metastaz gibi kanser gelişiminin farklı aşamalarında belirleyici rol oynamaktadır. Mevcut antiinflamatuvar ve antikanser ilaçların yüksek toksisite, düşük etkinlik ve ilaç direnci nedeniyle kullanımı oldukça kısıtlı kalmaktadır. Bu nedenle günümüzde toksisitesi daha düşük, seçiciliği ve etkisi yüksek mevcut ya da yeni mekanizmalara sahip antiinflamatuvar ve antikanser ilaç tasarımı ve geliştirme çalışmaları daha da önem kazanmıştır. Yukarıda da bahsedildiği gibi günümüzde, mevcut ilaçlar ve kombinasyonları ile kanser kemoterapisi yetersiz kalmakta ve birçok kanser türünde tam tedavi sağlanamamaktadır. Mevcut antikanser ajanlara karşı rezistans gelişimi, yeni antikanser ajanlar için bir araştırma alanı yaratmaktadır. Bununla birlikte, normal hücreler üzerine etki göstermeden ya da en az etkiyle anormal hücrelerin çoğalmasını seçici olarak inhibe edebilecek yeni ajanların geliştirilmesi çok büyük önem taşımaktadır. Bu sebeple, mevcut teknikte yer alan inhibitörlere alternatif olacak bir ilaç arayışı devam etmektedir.

Tekniğin bilinen durumunda yer alan CN112341370A patent başvurusu, bir o-vanilin Schiff baz platin kompleksinin bir sentez yöntemi ve uygulaması ile ilgilidir. Sentez yöntemi "o-vanilin ve 4-fenil-3-tiyosemikarbazid hammadde olarak alınarak bir Schiff bazı ligandının sentezlenmesi ve platin kompleksini hazırlamak için ligandın K₂PtCl₄ ile reaksiyona sokulması" işlem adımını içermektedir. Bir in vitro testte, sentezlenen platin kompleksi, bir insan meme kanseri hücre suşu MCF7 üzerinde iyi bir inhibitör aktiviteye sahiptir, hücre göçünü etkili bir şekilde inhibe edebilir ve hücre proliferasyonunu bloke etmek için hücreleri bir S fazında durgun hale getirir. Bu kompleks etkili antitümör ilaçları hazırlamak için uygundur. Ancak, CN112341370A patent başvurusu konu kompleks siklooksijenaz-1 (COX-1) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) enzimleri üzerinde inhibisyon özelliği göstermemekte; bu sebeple meme kanseri için etkin bir tedavi sağlamamaktadır.

Mevcut teknikte yer alan COX inhibitörlerinin veya NSAİ ilaçlarının, kanser hücrelerinin çoğalmasını engellemede yeterli etkinlik gösterememesinden dolayı ilgili alanda bir geliştirme yapılması gerekli kılınmıştır.

5 Buluşun Kısa Açıklaması ve Amaçları

Buluştta, siklooksijenaz-2 (COX-2) enzimleri üzerinde seçici inhibisyon özelliği gösteren, antitümör özellikli α -Tetralon/1-indanon'un 4-sübstitüe fenil tiyosemikarbazit bileşikler ile reaksiyonu sonucu 2-(3,4-dihidronaftalen-1(2H)-iliden-N-(sübstitüe fenil)hidrazin-1-karbotiyoamid ve 2-(2,3-dihidro-1H-inden-1-iliden)-N-(sübstitüe fenil)hidrazin-1-karbotiyoamid türevi bileşikler, bu bileşiklerin sentez yöntemi ve biyolojik aktivitesi açıklanmaktadır. Buluşa konu bileşikler en genel haliyle Formül A ile gösterilmektedir:



Formül A

- 15 Buluşun amacı, özellikle meme kanseri tedavisinde etkin, toksisitesi düşük, seçiciliği ve etkisi yüksek bileşikler sağlamaktır. Buluşta, antitümoral etkinliğe sahip 2-(3,4-dihidronaftalen-1(2H)-iliden-N-(sübstitüe fenil)hidrazin-1-karbotiyoamid ve 2-(2,3-dihidro-1H-inden-1-iliden)-N-(sübstitüe fenil)hidrazin-1-karbotiyoamid türevi bileşikler sayesinde etkin bir meme kanseri tedavisi sağlanmaktadır.
- 20 Buluş ile, kanser tedavisinde, özellikle meme kanseri tedavisinde etkin, toksisitesi düşük, seçiciliği ve etkisi yüksek bileşikler sağlanmaktadır.

Şekillerin Açıklaması

Şekil 1. 2-(2,3-Dihidro-1H-inden-1-iliden)-N-(4-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamid (Bileşik I) bileşiğinin IR spektrumu.

Şekil 2. 2-(2,3-Dihidro-1H-inden-1-iliden)-N-(4-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamid (Bileşik I) bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu.

Şekil 3. 2-(2,3-Dihidro-1H-inden-1-iliden)-N-(4-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamid (Bileşik I) bileşiğinin ¹³C-NMR (APT) spektrumu.

Şekil 4. 2-(2,3-Dihidro-1H-inden-1-iliden)-N-(3-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamid (Bileşik II) bileşiğinin IR spektrumu.

Şekil 5. 2-(2,3-Dihidro-1H-inden-1-iliden)-N-(3-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamid (Bileşik II) bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu.

Şekil 6. 2-(2,3-Dihidro-1H-inden-1-iliden)-N-(3-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamid (Bileşik II) bileşiğinin ¹³C-NMR (APT) spektrumu.

Şekil 7. 2-(3,4-Dihidronaftalen-1(2H)-iliden)-N-(4-siyanofenil)hidrazin-1-karbotiyoamid (Bileşik III) bileşiğinin IR spektrumu.

Şekil 8. 2-(3,4-Dihidronaftalen-1(2H)-iliden)-N-(4-siyanofenil)hidrazin-1-karbotiyoamid (Bileşik III) bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu.

Şekil 9. 2-(3,4-Dihidronaftalen-1(2H)-iliden)-N-(4-siyanofenil)hidrazin-1-karbotiyoamid (Bileşik III) bileşiğinin ¹³C-NMR (APT) spektrumu.

Şekil 10. 2-(3,4-Dihidronaftalen-1(2H)-iliden)-N-(4-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamid (Bileşik IV) bileşiğinin IR spektrumu.

Şekil 11. 2-(3,4-Dihidronaftalen-1(2H)-iliden)-N-(4-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamid (Bileşik IV) bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu.

Şekil 12. 2-(3,4-Dihidronaftalen-1(2H)-iliden)-N-(4-(trifluorometil)fenil)hidrazin-

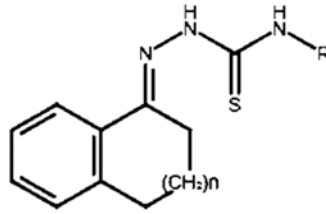
1-karbotiyoamid (Bileşik IV) bileşiğinin ^{13}C -NMR (APT) spektrumu.

Şekil 13. Standart olarak kullanılan sisplatin ve osimertinibin 24 saatlik uygulamasının MCF-7 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisini gösteren grafik.

Şekil 14. Standart olarak kullanılan sisplatin ve osimertinibin 24 saatlik uygulamasının HEK293 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisini gösteren grafik.

Buluşun Ayrıntılı Açıklaması

Buluş, kanser tedavisinde, kanser tedavisinde, özellikle meme kanseri tedavisinde etkin, siklooksijenaz-2 (COX-2) enzimleri üzerinde seçici inhibisyon özelliği gösteren, antitümör özellikli, α -Tetralon veya 1-indanon ve 4-süstitüe fenil tiyosemikarbazit bileşiklerinin reaksiyonu sonucu 2-(3,4-dihidronaftalen-1(2H)-iliden-N-(süstitüe fenil)hidrazin-1-karbotiyoamid ve 2-(2,3-dihidro-1H-inden-1-iliden)-N-(süstitüe fenil)hidrazin-1-karbotiyoamid türevi bileşikler ve bu bileşiklerin sentez yöntemi ile ilgilidir. Buluşa konu bileşikler genel formülü Formül A ile gösterilmektedir:



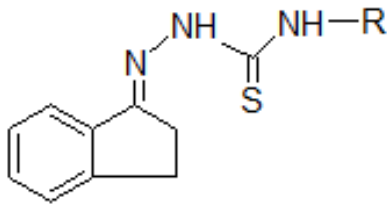
Formül A

Buluşta, siklooksijenaz-2 (COX-2) enzimleri üzerinde seçici inhibisyon özelliği gösteren, antitümör özellikli 4 bileşik sentezlenmiştir. Bu bileşikler;

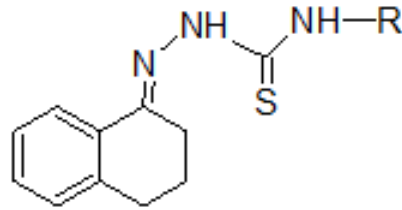
- 2-(2,3-Dihidro-1H-inden-1-iliden)-N-(4-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamid (Bileşik I),
- 2-(2,3-Dihidro-1H-inden-1-iliden)-N-(3-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamid (Bileşik II),

- 2-(3,4-Dihidronaftalen-1(2H)-iliden)-N-(4-siyanofenil)hidrazin-1-karbotiyoamid (Bileşik III),
- 2-(3,4-Dihidronaftalen-1(2H)-iliden)-N-(4-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamiddir (Bileşik IV).

5 Bileşik I ve Bileşik II, Formül I ile gösterilen kimyasal yapıya; Bileşik III ve Bileşik IV ise Formül II ile gösterilen kimyasal yapıya sahiptir.



Formül I



Formül II

10

Buluşa konu bileşiklerin sentez yöntemi;

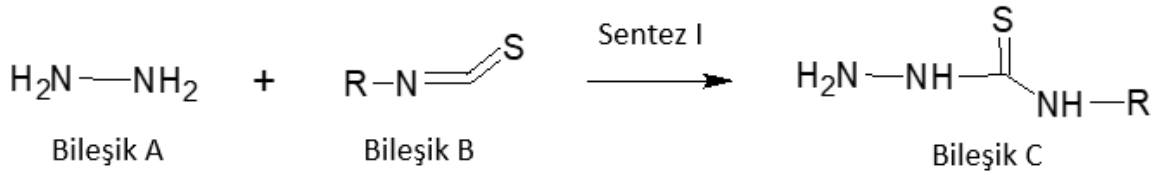
- 0,01 mol hidrazin monohidratın (Bileşik A) etanoldeki çözeltisi üzerine yine etanolde çözdürülmüş 0,01 mol sübstitüe fenil izotiyosiyanat (Bileşik B) bileşiğinin damla damla ilave edilerek çözeltilerin buz banyosunda manyetik karıştırıcıda 3 saat boyunca karıştırılması,
- çöken ürünün süzülerek etanol ve dietil eter ile yıkanması,
- yıkanan ürünün oda sıcaklığında kurutulması ve N-(sübstitüe fenil)hidrazin-1-karbotiyoamidler (4-(sübstitüe fenil)tiyosemikarbazitler) (Bileşik C) bileşiğinin elde edilmesi,
- 0.005 mol 1-indanon veya α -tetralonun (Bileşik D) etanoldeki çözeltisi üzerine 0.005 mol 4-sübstitüe fenil tiyosemikarbazit (Bileşik C) bileşiğinin etanoldeki çözeltisinin ilave edilmesi,
- elde edilen karışımın birkaç damla derişik hidklorik asit (d.HCl) katalizörlüğünde 6 saat geri çeviren soğutucu altında ısıtılması,

20

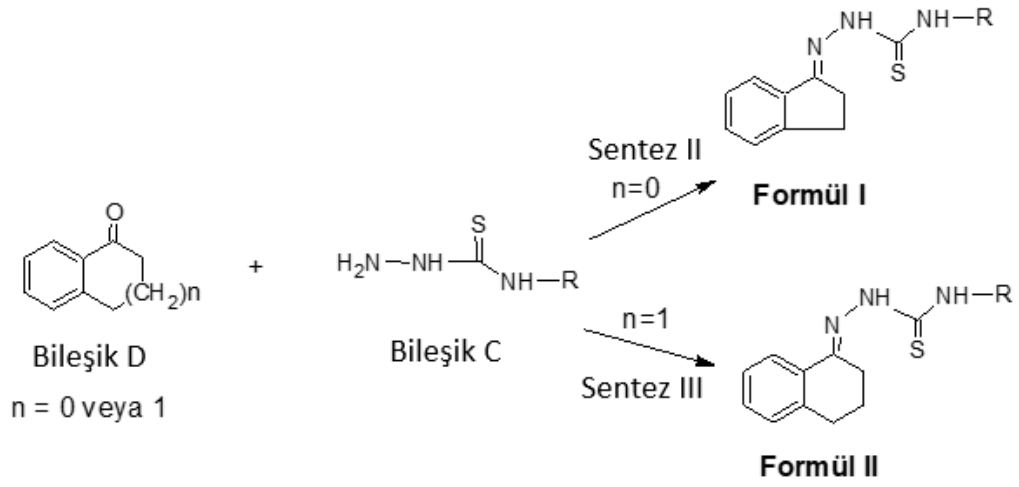
- vi. elde edilen çözeltinin bir gece bekletilip çöken ürün süzülmesi,
- vii. süzülen ürünün uygun çözücünden billurlandırılarak saflaştırılması

işlem adımlarını içermektedir.

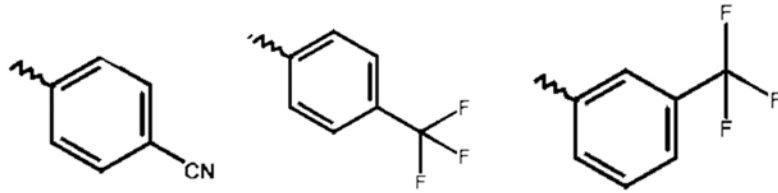
- 5 Buluşa konu bileşiklerin sentezi için öncelikle 0,01 mol hidrazin monohidratın (Bileşik A) etanoldeki çözeltisi üzerine yine etanolde çözdürülmüş 0,01 mol sübstitüe fenil izotiyosiyanat (Bileşik B) bileşiği damla damla ilave edilerek çözeltiler buz banyosunda manyetik karıştırıcıda 3 saat karıştırılmıştır. Ardından, çöken ürün süzülerek etanol ve dietil eter ile yıkanarak kurutulmuştur. Bu reaksiyon sonucu, N-(sübstitüe fenil)hidrazin-1-
- 10 karbotiyoamidler (4-(sübstitüe fenil)tiyosemikarbazitler) (Bileşik C) sentezlenmiştir (Sentez I).



- Daha sonra, 0.005 mol 1-indanon veya α -tetralonun (Bileşik D) etanoldeki çözeltisi üzerine 0.005 mol 4-sübstitüe fenil tiyosemikarbazit (Bileşik C) bileşiğinin etanoldeki
- 15 çözeltisi ilave edilerek birkaç damla d.HCl katalizörlüğünde 6 saat geri çeviren soğutucu altında ısıtılmış, elde edilen çözelti bir gece bekletilip çöken ürün süzümüştür. Ardından, süzülen ürün uygun çözücünden billurlandırılarak saflaştırılmıştır (Sentez II ve Sentez III).



Bahsi geçen R grubu n parametresine göre değişiklik göstermektedir ve aşağıdaki fonksiyonel gruplardan herhangi biri olabilir:

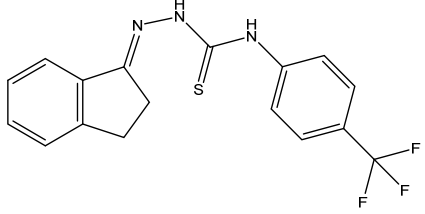
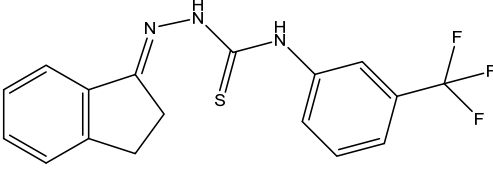
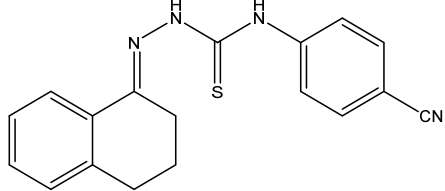
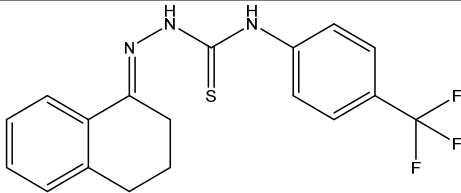


5 $n=0$ olduğunda; R grubu veya olmaktadır.

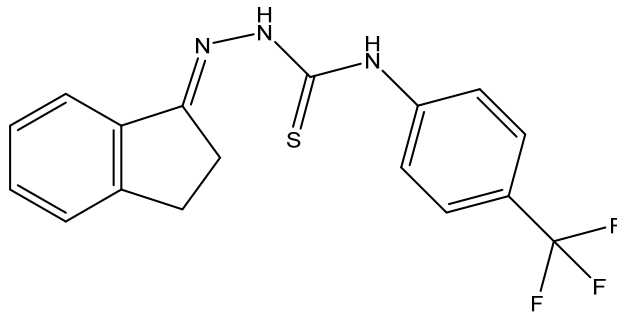
$n=1$ olduğunda ise; R grubu veya olmaktadır.

Buluştta sentezlenen bileşikler Tablo 1'de gösterilmektedir.

Tablo 1. Sentezlenen bileşiklerin kimyasal yapıları

Bileşik	Kimyasal Yapı
Bileşik I	
Bileşik II	
Bileşik III	
Bileşik IV	

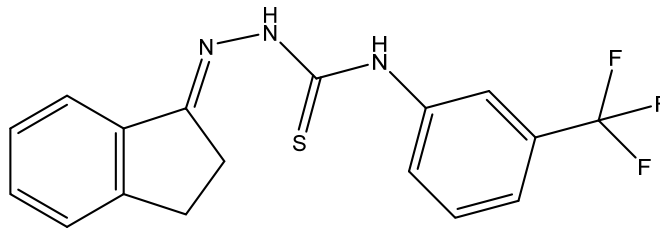
2-(2,3-Dihidro-1*H*-inden-1-iliden)-*N*-(4-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamid
(Bileşik I)



Erime noktası 205-208°C ve verim %86,78'dir. C₁₇H₁₄F₃N₃S kapalı formülüne sahip bileşiğin (Bileşik I) kütlesi 349,38 g/mol'dür. Bu bileşikte yer alan elementlerin oranları için hesaplanan değerler kütlece, %58,44 C, %4,04 H ve %12,03 N'dir. Bulunan değerler ise kütlece, %57,97 C, %3,961 H ve %12,16 N'dir. Bileşik I'e ilişkin IR, ¹HNMR ve ¹³CNMR sonuçları aşağıda verilmektedir.

- **IR** ν_{max} (KBr, cm⁻¹): 3270, 3167 (N-H g.b.), 3062 (ar. C-H g.b.), 2928, 2858 (asimetrik ve simetrik alifatik C-H g.b.), 1614, 1516, 1483, 1470 (C=N g.b. ve ar. C=C g.b.), 1406, 1325 (asimetrik ve simetrik alifatik C-H e.b.), 1276 (C-N g.b.), 1182 (C=S g.b.), 1156 (C-F g.b.), 806 (ar. 1,4 disüstitüsyon).
- **¹HNMR (500 MHz) (DMSO-d₆/TMS) δ (ppm)**: 2,95-3,02 (m, 2H, CH₂), 3,07-3,15 (m, 2H, CH₂), 7,29-7,36 (m, 1H, Ar-H), 7,38-7,46 (m, 2H, Ar-H), 7,73 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H, Ar-H), 7,96 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, Ar-H), 8,07 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H, Ar-H), 10,31 (s, 1H, NH), 10,89 (s, 1H, NH-4CF₃Ph).
- **¹³C-NMR (APT) (125 MHz) (DMSO-d₆/TMS) δ (ppm)**: 28,09, 28,77 (CH₂), 121,59, 123,75, 128,07, 129,91 (CF₃), 123,01, 125,57, 125,60, 125,63, 126,07, 127,28, 131,37 (Ar C-H), 125,03, 125,79, 125,91, 128,10 (4-CF₃PhC₄), 137,99 (Ar-C), 143,36 (4-CF₃PhC₁), 149,56 (Ar-C), 159,14 (C=N), 176,60 (C=S).

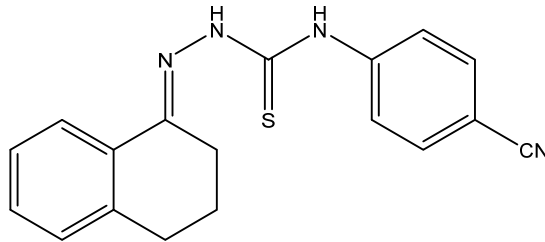
2-(2,3-Dihidro-1*H*-inden-1-iliden)-*N*-(3-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamid (Bileşik II)



Erieme noktası 195-197°C ve verim %66,60'dır. C₁₇H₁₄F₃N₃S kapalı formülüne sahip bileşğin (Bileşik II) kütlesi 349,38 g/mol'dür. Bu bileşikte yer alan elementlerin oranları için hesaplanan değerler kütlece, %58,44 C, %4,04 H ve %12,03 N'dir. Bulunan değerler ise kütlece, %58,10 C, %3,945 H ve %12,20 N'dir. Bileşik II'ye ilişkin IR, ¹HNMR ve ¹³CNMR sonuçları aşağıda verilmektedir.

- **IR** ν_{max} (KBr, cm⁻¹): 3247, 3190 (N-H g.b.), 3083 (ar. C-H g.b.), 2935, 2866 (asimetrik ve simetrik alifatik C-H g.b.), 1614, 1554, 1491, 1471 (C=N g.b. ve ar. C=C g.b.). 1405, 1366 (asimetrik ve simetrik alifatik C-H e.b.), 1277 (C-N g.b.), 1189 (C=S g.b.), 1163 (C-F g.b.), 875, 763 (ar. 1,3 disüstitüsyon).
- **¹HNMR (500 MHz) (DMSO-*d*₆/TMS) δ (ppm)**: 2,93-3,03 (m, 2H, CH₂), 3,06-3,18 (m, 2H, CH₂), 7,27-7,47 (m, 4H, Ar-H), 7,50-7,67 (m, 2H, Ar-H), 7,96-8,04 (m, 1H, Ar-H), 8,06-8,18 (m, 1H, Ar-H), 10,32 (s, 1H, NH), 10,89 (s, 1H, NH-3CF₃Ph).
- **¹³C-NMR (APT) (125 MHz) (DMSO-*d*₆/TMS) δ (ppm)**: 28,06, 28,77 (CH₂), 121,84, 122,07, 123,02, 126,3, 127,24, 129,52, 129,70, 131,30 (Ar C-H), 121,84, 123,52, 125,69 (CF₃), 129,37 (3CF₃PhC₃), 138,04 (Ar-C), 140,46 (3-CF₃PhC₁), 149,50 (Ar-C), 158,97 (C=N), 176,81 (C=S).

2-(3,4-Dihidronaftalen-1(2H)-iliden)-N-(4-siyanofenil)hidrazin-1-karbotiyoamid
(Bileşik III)



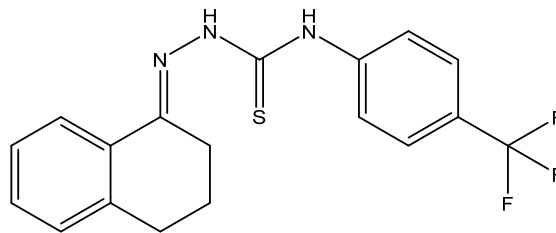
Erieme noktası 195-197°C ve verim %35'tir. C₁₈H₁₆N₄S kapalı formülüne sahip bileşğin (Bileşik III) kütlesi 320,41 g/mol'dür. Bu bileşikte yer alan elementlerin oranları için

hesaplanan değerler kütlece, %67,47 C, %5,03 H, %17,49 N, %10,01 S'dir. Bulunan değerler ise kütlece, %67,24 C, %5,061 H, %17,75 N, %9.949 S'dir. Bileşik III'e ilişkin IR, ¹HNMR ve ¹³CNMR sonuçları aşağıda verilmektedir.

- 5 - **IR** ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3237 (N-H g.b.), 3021 (ar. C-H g.b.), 2951, 2855 (asimetrik ve simetrik alifatik C-H g.b.), 2217 (CN g.b.), 1607, 1581, 1532, 1468 (C=N g.b. ve ar. C=C g.b.), 1406, 1359 (asimetrik ve simetrik alifatik C-H e.b.), 1284 (C-N g.b.), 1172 (C=S g.b.), 812 (ar. 1,4-disüstitüsyon).
- 10 - **¹HNMR (500 MHz) (DMSO-*d*₆/TMS) δ (ppm)**: 1,85 (p, $J = 6,3$ Hz, 2H, CH₂), 2,73-2,83 (m, 4H, CH₂), 7,16-7,28 (m, 2H, Ar-H), 7,29-7,36 (m, 1H, Ar-H), 7,80-7,86 (m, 2H, Ar-H), 7,94-8,00 (m, 2H, Ar-H), 8,35-8,41 (m, 1H, Ar-H), 10,29 (s, 1H, NH), 10,84 (s, 1H, NH-4CNPh).
- 15 - **¹³C-NMR (APT) (125 MHz) (DMSO-*d*₆/TMS) δ (ppm)**: 21,88, 26,82, 29,37 (CH₂), 107,17 (4-CNPhC₄), 119,46 (PhCN), 132,02 (Ar-C), 125,48, 126,19, 126,68, 128,99, 130,10, 132,73 (Ar-CH), 141,00 (Ar-C), 144,05 (4-CNPhC₁), 150,68 (C=N), 176,18 (C=S).

2-(3,4-Dihidronaftalen-1(2H)-iliden)-N-(4-(trifluorometil)fenil)hidrazin-1-karbotiyoamid (Bileşik IV)

20



Erime noktası 173-175°C ve verim %57,45'tir. C₁₈H₁₆F₃N₃S.0,5H₂O kapalı formülüne sahip bileşiğin (Bileşik IV) kütlesi 372,41 g/mol'dür. Bu bileşikte yer alan elementlerin oranları için hesaplanan değerler kütlece, %58,05 C, %4,60 H ve %11,28 N'dir. Bulunan

25

değerler ise kütlece, %58,34 C, %4,87 H ve %11,41 N'dir. Bileşik IV'e ilişkin IR, ¹HNMR ve ¹³CNMR sonuçları aşağıda verilmektedir.

- **IR ν_{max} (KBr, cm^{-1}):** 3205, 3116 (N-H g.b.), 3014 (ar. C-H g.b.), 2939, 2872 (asimetrik ve simetrik alifatik C-H g.b.), 1593, 1544, 1519, 1479 (C=N g.b. ve ar. C=C g.b.), 1409, 1325 (asimetrik ve simetrik alifatik C-H e.b.), 1294 (C-N g.b.), 1184 (C=S g.b.), 1163 (C-F g.b.), 790 (ar. 1,4-disüstitüsyon).
- **¹HNMR (500 MHz) (DMSO-*d*₆/TMS) δ (ppm):** 1,86 (p, J = 6,2 Hz, 2H, CH₂), 2,67-2,82 (m, 4H, CH₂), 7,19-7,35 (m, 3H, Ar-H), 7,73 (d, J = 7,4 Hz, 2H, Ar-H), 7,91 (d, J = 7,3 Hz, 2H, Ar-H), 8,41 (d, J = 7,6 Hz, 1H, Ar-H), 10,26 (NH), 10,75 (NH-4CF₃Ph).
- **¹³C-NMR (APT) (125 MHz) (DMSO-*d*₆/TMS) δ (ppm):** 21,88, 26,76, 29,37 (CH₂), 121,58, 123,74, 125,44, 128,06 (CF₃), 125,19, 125,70, 125,89 (4CF₃PhC₄), 125,58, 125,61, 126,00, 126,19, 126,66, 128,98, 130,03 (Ar-CH), 132,08, 140,94 (Ar-C), 143,40 (4CF₃PhC₁), 150,37 (C=N), 177,14 (C=S)

Başvuruya konu sentezlenen bileşiklerin insan meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 ve insan sağlıklı embriyonik böbrek hücre hattı olan HEK293 üzerinde biyoaktivite analizleri yapılmıştır. Deneylerde kullanılan HEK293 ve MCF-7 hücre hattı çoğaltımı için Dulbecco'nun modifiye Eagle ortamı (DMEM)/yüksek glukoz (DMEM/High, Gibco 41966) kullanılmıştır. DMEM/yüksek glukoz içeriğinde pirüvat, L-Glutamin ve 4.5 g/L D-glukoz bulunmaktadır. Deneylerde kullanılan besiyeri; steril ortam solüsyonuna %10 (v/v) fetal sıgır serumu (FBS, Gibco), ve %1 (v/v) antibiyotik-antimikotik solüsyonu (Gibco) eklenerek hazırlanmıştır. Hücreler Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC) temin edilmiştir. Hücre açma işleminden sonra hücre kültürü flaskı 37°C'lik inkübatöre kaldırılmıştır. Hücre çözüldükten 24 saat sonra hücre kültürü flaskındaki hücrelerin canlılıkları, ters mikroskop ile tutunma durumlarına göre kontrol edilmiştir. Hücreler %80 oranında yüzeyi kaplayacak kadar çoğaldıklarında pasaj işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle HEK293 ve MCF-7 hücrelerinin alt kültürleri hazırlanmıştır. Öncelikle 25 cm²'lik hücre kültür kabı içerisindeki besiyeri uzaklaştırılmıştır. 5 ml "Dulbecco Fosfat Tamponlu Tuzlu Su" (D-PBS) ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra D-PBS ortamdan

uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin kültür kabı yüzeyinden kalkmalarını sağlamak için 1 ml Tripsin/Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ilave edilerek kültür kabı inkübatöre koyulmuştur. Hücrelerin yüzeyden ve birbirlerinden ayrımını sağlamak için fiziksel olarak, yavaşça, kültür kabı kenarına el ile vurma işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin tamamen
5 kültür kabı yüzeyinden kalkması ters mikroskop ile kontrol edilmiştir. Ayrılma işlemi tamamlandıktan sonra tripsin aktivitesini sonlandırmak için 5 ml besiyeri kültür kabı içine konulmuş ve pipetaj yapılmıştır. Hücre sayımı hemositometre (Neubauer lamı) ile yapılmıştır. Yeni kültür kabına hücreler koyulmuştur. Üzeri taze besiyeri ile 7 ml'ye tamamlanmıştır. Hücreler %90'dan fazla bağıl nem ve %5 CO₂ sağlayan 37°C'lik
10 inkübatöre (Thermo Scientific, Heracell™ 150i) kaldırılmıştır. Hücre devamlılığı için bu işlem haftada 2 ya da 3 kez tekrarlanmıştır. Hücrelerinin alt kültürlenmesi işlemleri laminar hava akımlı steril kabinde (Heal Force HFsafe-1200 versiyon 2.01) gerçekleştirilmiştir.

HEK293 ve MCF-7 hücrelerinin alt kültürleri hazırlandıktan sonra bu hücrelerin sitotoksite analizleri yapılmıştır. Bu yöntemde canlı hücrelerdeki mitokondriyal
15 dehidrogenaz enzimi aktivitesi sayesinde 3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolyum) (MTT) molekülünün tetrazolium halkası koparılmakta ve MTT molekülün suda çözünemeyen formazan kristallerine dönüşümü sağlanmaktadır. Oluşan formazan kristalleri dimetil sülfoksit (DMSO) yardımıyla çözündürüldükten sonra spektrofotometrede absorbans ölçümü yapılmaktadır.

20 Sitotoksite analizi için öncelikle 96 kuyucuklu kültür kaplarının her bir kuyucuğuna, $5 \cdot 10^4$ hücre/kuyucuk hücre süspansiyonlarından 200 µl konulmuştur. Kültür kabı %5 CO₂ sağlayan 37°C'lik etüvde inkübe edilmiştir. Kuyucukların yüzeyine tutunmuş olan hücrelerin üzerindeki besiyeri 24. saatin sonunda uzaklaştırılmıştır. Öncelikle 50 µM madde içeren besiyerlerinin canlılıkları analiz edilmiştir. Daha sonra bu besiyerlerinin farklı
25 konsantrasyonlardaki etkileri de test edilmiştir. Deney grubu hücrelerin üzerine farklı derişimlerde ajan içeren besiyerlerinden, kontrol grubuna ise sadece besiyerinden 200'er µl uygulanarak inkübatörde (37°C, %5 CO₂) tutulmuştur. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin üzerine 30 µl PBS içinde hazırlanan MTT stok çözeltisinden (5mg/ml) eklenmiş ve daha sonra bu hücreler 4
30 saat inkübatörde bekletilmiştir. Formazan kristallerinin çözünmesi için 150µl izopropanol

eklenmiştir. Çözelti homojenitesi için kültür kabı oda sıcaklığında çalkalayıcıda (Heidolph Unimax 1010) çalkalanmıştır. Oluşan renkli ürünün 570 nm dalga boyundaki absorbansı mikroparka okuyucuda (Spektramax i3) ölçülmüştür. Sonuçlar aşağıdaki denkleme göre değerlendirilmiştir. Deneyler her seferinde 3 tekrarlı ve 3 ayrı periyotta gerçekleştirilmiştir ve sonuçlar Tablo 2’de gösterilmektedir.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{Deney grubuna ait absorbans}}{\text{Kontrole ait absorbans}} \times 100$$

Sentezlenen bileşiklerin COX-1 ve COX-2 enzim aktivitelerini test edebilmek amacıyla maddeler DMSO içerisinde çözündürülmüştür. DMSO’nun etkisi ortadan kaldırılmış ve solüsyonlardaki DMSO oranı kit içerisinde çıkan tampon solüsyonu ile %1’in altına indirilmiştir. Sentezlenen bileşiklerin, COX-1 (koyun) ve COX-2’yi (insan rekombinant) inhibe edip etmediği test edilmiştir. Bu deneyde, PGG₂ ve 10-asetil-3,7-dihidroksifenoksazin (ADHP) arasındaki reaksiyon, yüksek oranda floresan bileşiği olan resorufini üretmektedir. Deney sonucunda oluşan floresan ölçülerek yüzde inhibisyon oranı hesaplanmıştır ve sonuçlar Tablo 3’te gösterilmektedir.

Enzim inhibisyon deneyi, kit (COX Fluorescent Inhibitor Screening Assay Kit (Cayman, 700100)) üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiş ve maddelerin enzim inhibisyonları multimod mikroparka okuyucu’da (Spektramax i3) 530-540 nm’lik bir eksitasyon dalga boyu ve 585-595 nm’lik bir emisyon dalga boyu ile ölçülmüştür. Maddelerin 10 µM’lık konsantrasyondaki enzim inhibisyonları standartlara göre kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

Tüm deneyler üç farklı zamanda ve en az üç tekrarlı şekilde gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel veriler GraphPad Prism yazılımın 7.02 versiyonu (La Jolla, California, USA) kullanılarak değerlendirilmiştir. Gruplar arasındaki fark tek yönlü varyans analizi (ANOVA), Dunnet çoklu karşılaştırma testi kullanılarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel açıdan Tablo 2 ve Tablo 3’te belirtilen tüm veriler anlamlılık göstermektedir (en az $P < 0.05$).

Çalışma kapsamında kullanılan ajanların MCF-7 ve HEK293 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için yapılan canlılık testleri 3x3 tekrarlı şekilde

gerçekleştirilmiştir. Deneylerdeki kontrol grubu, herhangi bir ajan uygulanmayan grup olarak belirlenmiş ve %100 canlı olarak kabul edilmiştir. Deney grupları içindeki tekrarlar arasındaki tutarlılığın analizi için elde edilen verilere tek yönlü ANOVA testi uygulanmıştır. Grupların kontrol grubuna göre anlamlılıkları ise Dunnett testi ve Tukey testi ile değerlendirilmiştir. Literatür taramaları sonucu ajanların uygulama konsantrasyonlarına ve zamanlarına karar verilmiştir. Hücrelere uygulanan ajanların hücre canlılığını yarıya indiren konsantrasyon değerleri (IC_{50}) hesaplanmıştır. Ajanların IC_{50} değeri hesaplaması için sigmoidal doz yanıtı eğrisi (sigmoidal dose response variable slope) GraphPad Prism® 7.0 programı kullanılarak hesaplanmıştır.

- 10 MCF-7 ve HEK293 hücreleri üzerine maddelerin sitotoksik etkilerini belirlemek amacı ile, 24 saatlik kültürlere farklı konsantrasyonlarda (50-0.1 μ M) maddelerden içeren besiyerleri ilave edilmiştir. Hiç madde uygulanmayan kontrol grubunun da besiyeri tazelenmiştir. 24 saatlik inkübasyon periyodundan sonra MTT testi yapılarak veriler elde edilmiştir. 50 μ M madde uygulanmış deneylerin % canlılık sonuçları Şekil 13 ve Şekil 14'te yer almaktadır.
- 15 Buluşa konu bileşiklerin ve mevcut teknikteki karşılaştırılan bileşiklerin IC_{50} sonuçları ise Tablo 2'de gösterilmektedir. Sonuçlara göre, her bir bileşik için MCF-7 hücre hattında anlamlı değerler elde edilmiş ve sağlıklı hücre olan HEK293 hücre hattına göre daha etkili bulgulara ulaşılmıştır. Özellikle Bileşik IV, MCF-7 hücresinde neredeyse standartlar kadar etkili çıkmıştır. Standart bileşiklerin normal hücrelere karşı da sitotoksiste göstermesi
- 20 dezavantaj oluştururken sentezlenen bileşiklerin sağlıklı hücreler olan HEK293 hücreleri üzerine toksik etkileri oldukça sınırlıdır (maksimum 43.18 μ M).

Tablo 2. Sentezlenen bileşiklerin, standart olarak kullanılan sisplatin ve osimertinib maddelerinin MCF-7 ve HEK293 hücreleri üzerindeki IC_{50} değerleri

Cpd No.	IC_{50} (μ M)	
	HEK293	MCF-7
Bileşik I	43.18 $\pm$ 0.78	21.17 $\pm$ 1.57
Bileşik II	>50	25.30 $\pm$ 0.93
Bileşik III	49.54 $\pm$ 1.04	23.98 $\pm$ 1.12

Bileşik IV	48.16 ± 1.04	17.19 ± 1.08
sisplatin	10.17 ± 1.39	8.13 ± 0.45
osimertinib	2.98 ± 0.05	10.11 ± 0.22

Maddelerin COX-1 ve COX-2 enzim inhibisyon etkilerini test edebilmek için üretici firmanın önerdiği şekilde işlemler yapılmıştır. Bu amaçla, öncelikle enzimler ile maddeler inkübasyona bırakılmış sonrasında içerisinde 20 µM madde bulunan 200 µl'lik madde-
5 enzim koktaili plate kuyucuklarına koyulmuştur. Her madde için ölçülen enzim aktivitesi 3 tekrarlı şekilde 3 farklı zamanda yapılarak gerçekleştirilmiştir. Deney gruplarının tekrarları arasındaki tutarlılığın analizi için tek yönlü ANOVA testi uygulanmıştır. Grupların standart inhibitörler (COX-1 için SC-560, COX-2 için DuP-697, selekoksib, indometazin) grubuna göre anlamlılıkları ise Dunnett testi ile değerlendirilmiştir. Buluşa konu bileşiklerin ve
10 mevcut teknikteki karşılaştırılan bileşiklerin 20 µM'lık konsantrasyondaki COX-1 ve COX-2 enzim inhibisyonları Tablo 3'te verilmiştir. Tüm değerler istatistiksel açıdan anlamlılık göstermektedir (en az P<0.05). Siklooksijenaz-2 (COX-2), karsinogenezin oluşumunda veya teşvikinde, ayrıca kanser hücrelerinin kemo- ve radyoterapiye direncinde pleiotropik ve çok yönlü rol uygulayan birçok kanser türünde sıklıkla eksprese edilmektedir. COX-
15 2'nin inhibisyonu, kanserde terapötik sonuçlar alınabilmesi açısından önemli oranda olasılık sağlamaktadır. COX-2 inhibitörlerinin preoperatif ortamda uygulanması kanser hastalarında metastaz riskini azaltabilir. COX-2 inhibisyonu ayrıca kanser hücrelerini radyo ve kemoterapi gibi tedavilere karşı duyarlı hale getirir. Tüm özgün moleküllerin COX-2 enzimini seçici inhibisyonu bu bağlamda oldukça etkili sonuçlardır. COX-1'e göre
20 COX-2 enzim inhibisyonu seçiciliği nedeniyle mide mukozasına zararın da önemli ölçüde azaltılmış olması öngörülmektedir.

Tablo 3. Siklooksijenaz (COX) inhibitör aktiviteleri.

Bileşik	% Inhibisyon (20 µM)		IC ₅₀		SI
	COX-1	COX-2	COX-1	COX-2	
Bileşik I	45.02 ± 0.42	90.13 ± 1.03	26.27 ± 1.14	8.86 ± 1.16	0.33
Bileşik II	42.26 ± 1.22	87.95 ± 1.28	37.94 ± 1.36	9.98 ± 1.27	0.26

Bileşik III	42.94 ± 0.93	89.36 ± 0.81	39.36 ± 1.25	9.15 ± 0.83	0.23
Bileşik IV	47.37 ± 0.68	85.16 ± 0.98	25.94 ± 0.72	11.08 ± 0.74	0.42
Diklofenak	99.97 ± 0.77	99.98 ± 0.25	56.16 ± 0.07 (nM)	35.05 ± 0.18 (nM)	0.62
Ibuprofen	99.79 ± 0.35	99.09 ± 0.46	12.37 ± 1.05 (µM)	85.20 ± 5.20 (µM)	6.88
Selekoksib	99.85 ± 0.85	99.91 ± 1.03	9.15 ± 1.05 (µM)	1.03 ± 0.02 (µM)	0.11
SC-560	99.98 ± 1.07	99.86 ± 0.92	10.17 ± 1.15 (nM)	5.98 ± 0.46 (µM)	>50
Dup-697	99.78 ± 0.94	99.95 ± 0.36	9.5 ± 0.12 (µM)	70.44 ± 0.12 (nM)	0.007

Seçicilik İndeksi SI= $IC_{50} \text{ COX-2} / IC_{50} \text{ COX-1}$.

Buluşa konu bileşiklerin sentez ve ardından yapı tayini amaçlı olarak yapılan elementel analiz ve spektral veri analiz bulguları tasarımı gerçekleştirilen ve öngörülen özgün bileşiklerin oluştuğuna dair bilimsel verilerdir ve yapıyı kanıtlamaktadır. Buluşa konu bileşikler ile antikanser ilaç etkin maddesi geliştirme hedefine yönelik olarak özgün moleküllerin, sentez, yapı tayini ile MCF-7 meme kanseri hücre hattı ve HEK293 insan embriyonik böbrek hücre hattında ve ayrıca COX-1 ve COX-2 enzimleri üzerinde inhibitor etkinlikleri değerlendirilmiştir. Buluş ile in vitro ilk deneylerde bileşiklerin MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerine toksik etki göstermekle birlikte sağlıklı hücre hattı HEK293 üzerine toksisite göstermemeleri, diğer bir deyişle sağlıklı hücrelere düşük dozlarda zarar vermeyecekleri gözlemlenmiştir. Bu bağlamda buluş konusu özgün moleküller yapılan in vitro deneylerde seçici COX-2 inhibitör etki gösterme potansiyeline sahip bulunmuş, bu sonuçlar moleküllerimizin koruma kapsamına alınarak daha ileri testler ve araştırmalar için potansiyel bileşikler olduğu gerçeğini ortaya koymuştur. Buluşa konu bileşikler dihidroinden/dihidronaftalen çekirdek yapısı taşıyan, R grubu olarak özellikle trifluorometilfenil grubu taşıyan ve özellikle bu grup nedeniyle etkinliği artmış bileşiklerdir. Bu grup meta ya da para konumunda bulunmakta, para konumunda bulunması özellikle MCF-7 meme kanseri hücre hattına karşı etkinliği artırmaktadır (Bileşik IV). Ayrıca R grubu olarak fenil halkasının para konumunda siyano grubu taşıyan (Bileşik III) molekülde COX-2 seçiciliği en yüksek oranda saptanmıştır.

Buluşu konu tiyosemikarbazit türevi bileşikler (Bileşik I, Bileşik II, Bileşik III ve Bileşik IV) kanser tedavisinde, özellikle meme kanseri tedavisinde, antitümör olarak kullanıma uygundur. Dolayısıyla, buluş konusu bileşiklerden (Bileşik I, Bileşik II, Bileşik III ve Bileşik IV) en az birini içeren bir ilaç; kanser tedavilerinde endikedir.

REFERANSLAR

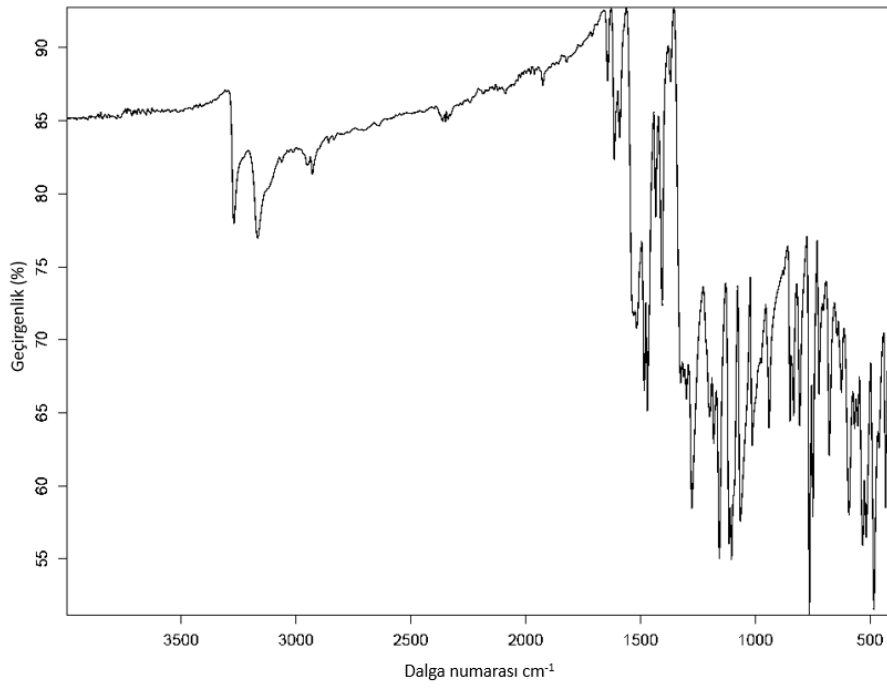
[1] Çakmakçı, M. (2018, March 30). *Meme Kanseri Belirtileri, Teşhisi ve Tedavi Yöntemleri*. Anadolu Sağlık. <https://www.anadolusaglik.org/blog/meme-kanseri>

5 [2] Lee, A. V., Oesterreich, S., & Davidson, N. E. (2015). MCF-7 Cells--Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 107(7), djv073. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv073>

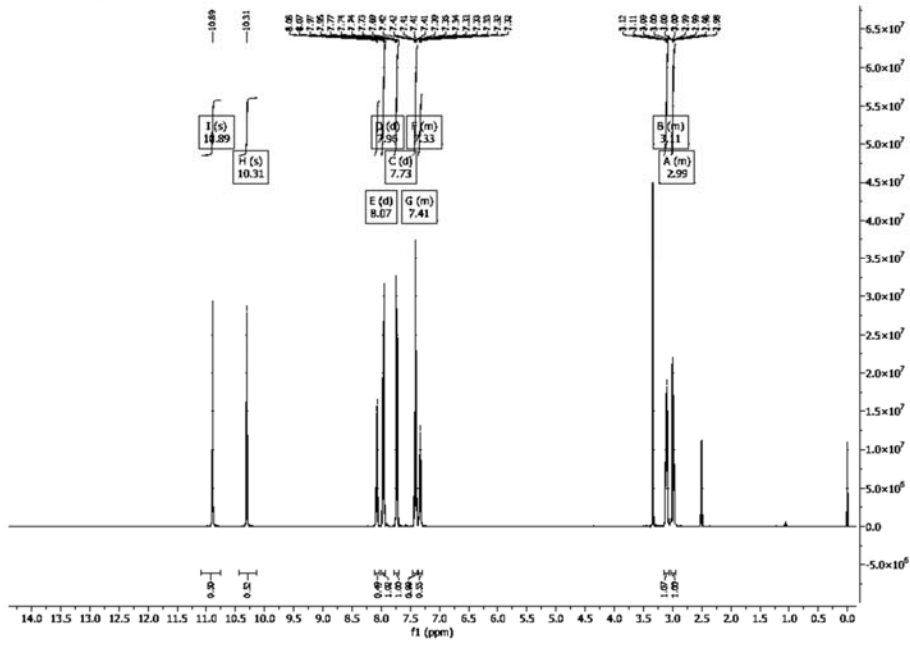
[3] NHS website. (2022, May 17). *NSAIDs*. Nhs.Uk. <https://www.nhs.uk/conditions/nsaids/>

10 [4] Mazhar, D., Ang, R., & Waxman, J. (2006). COX inhibitors and breast cancer. *British Journal of Cancer*, 94(3), 346–350. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602942>

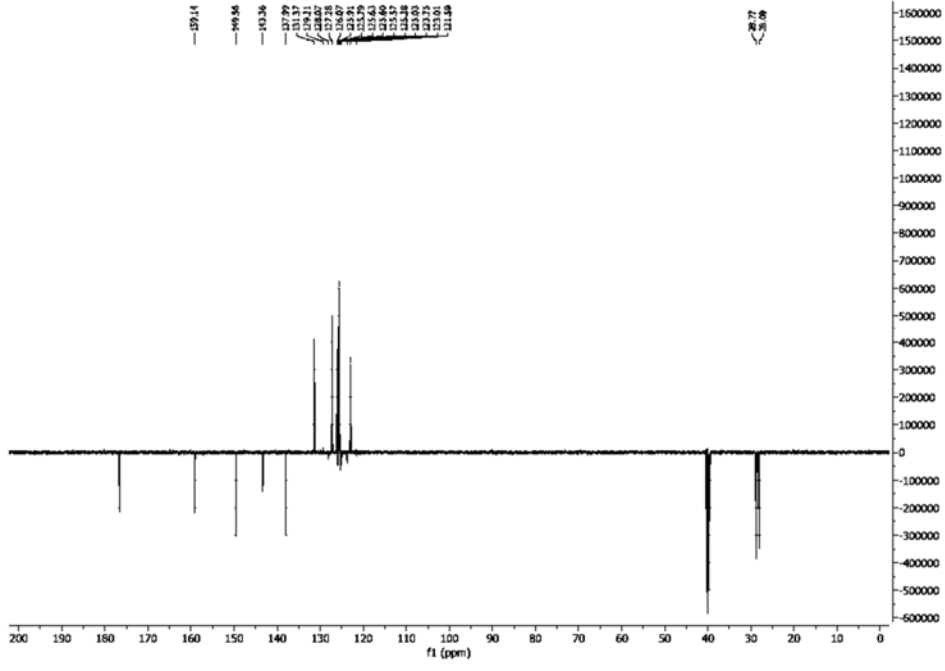
[5] *Cox-2 Inhibitors Side Effects, List, Uses & Dosage*. (2019, February 28). MedicineNet. https://www.medicinenet.com/cox-2_inhibitors/article.htm#nsaids_vs_cox-2_inhibitors__which_is_better



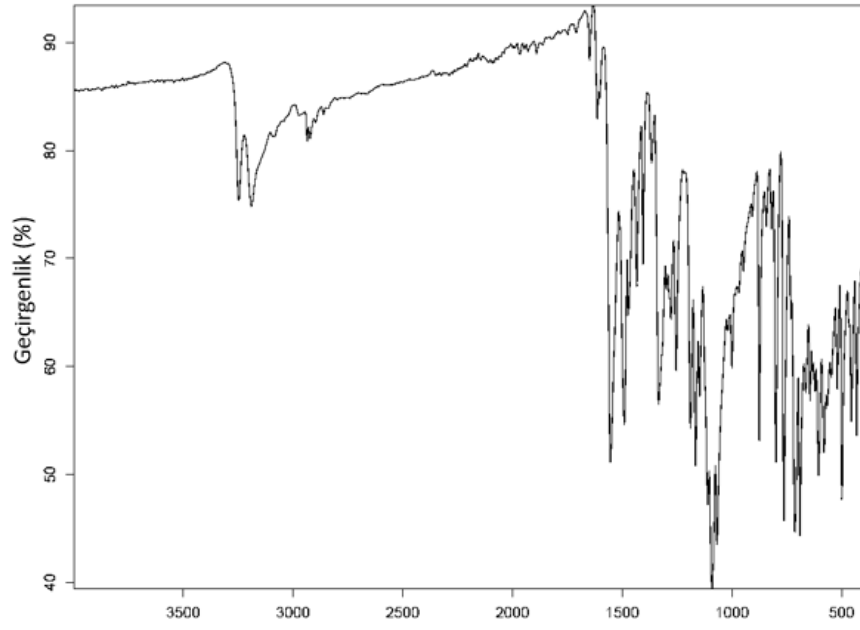
Şekil 1



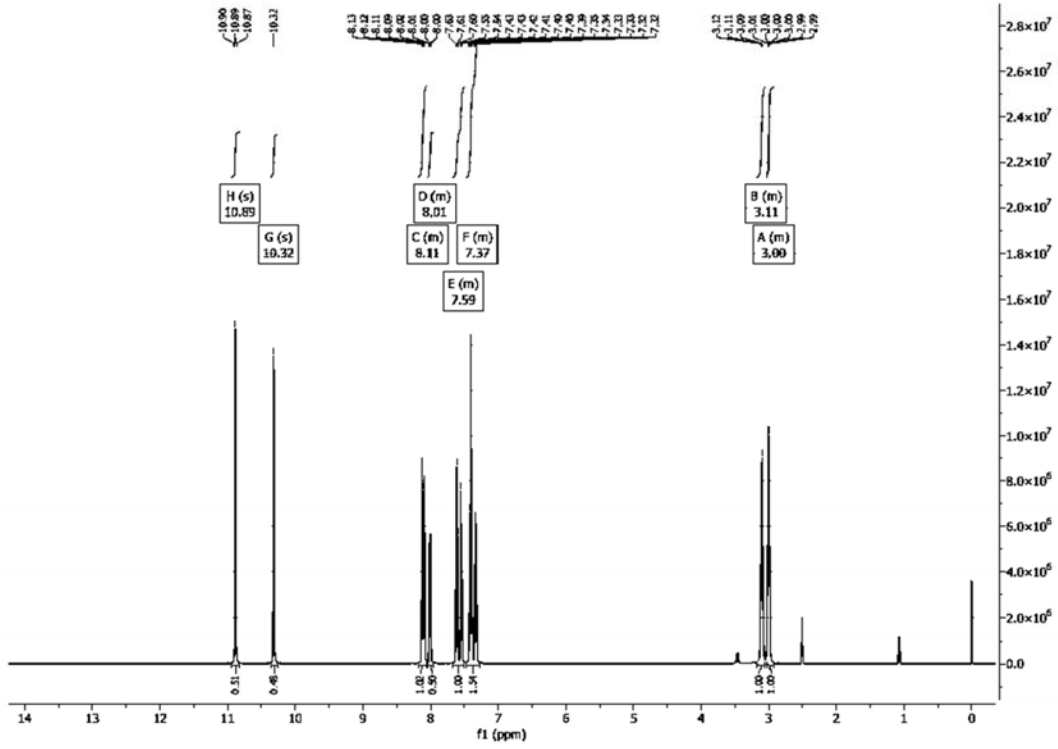
Şekil 2



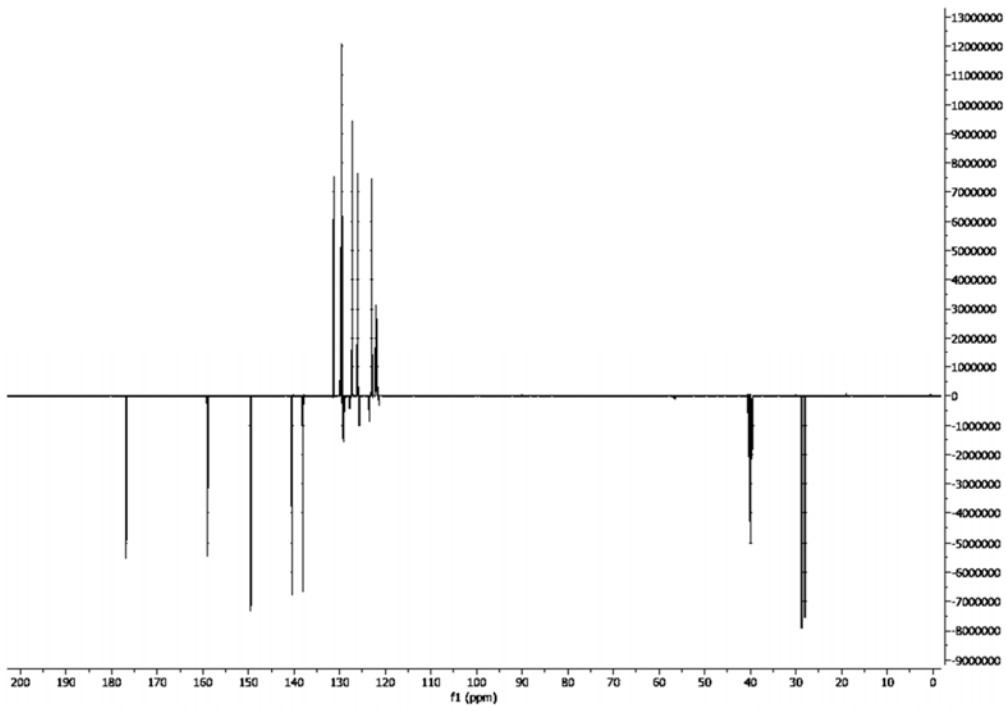
Şekil 3



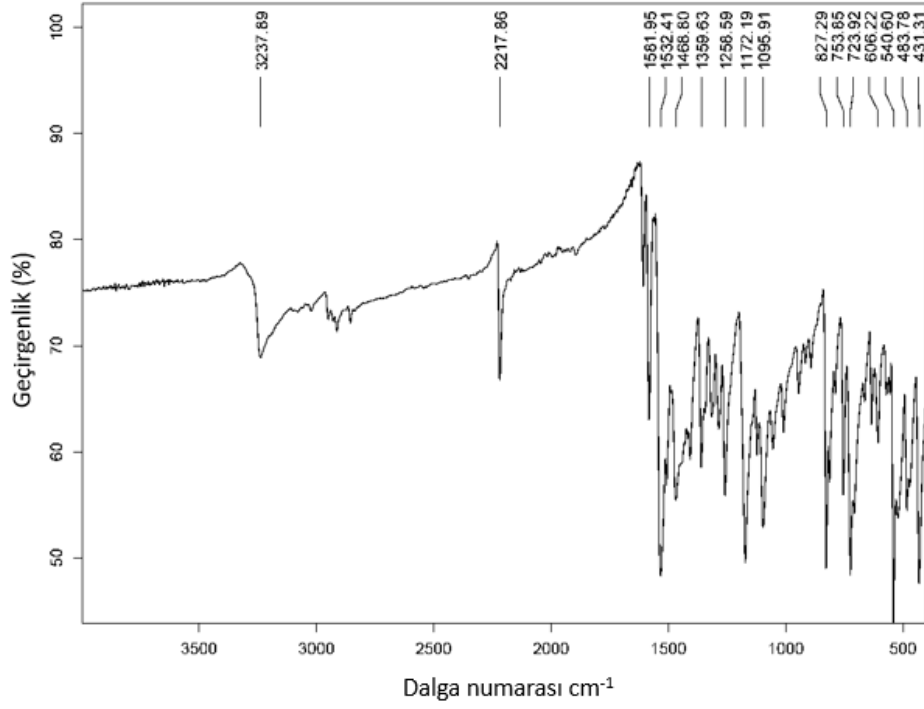
Şekil 4



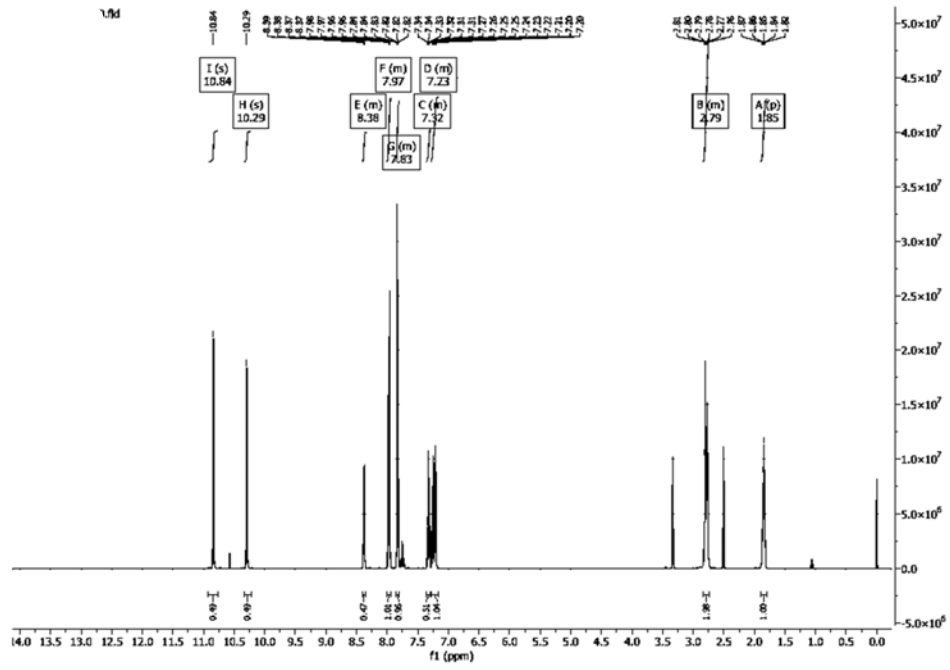
Şekil 5



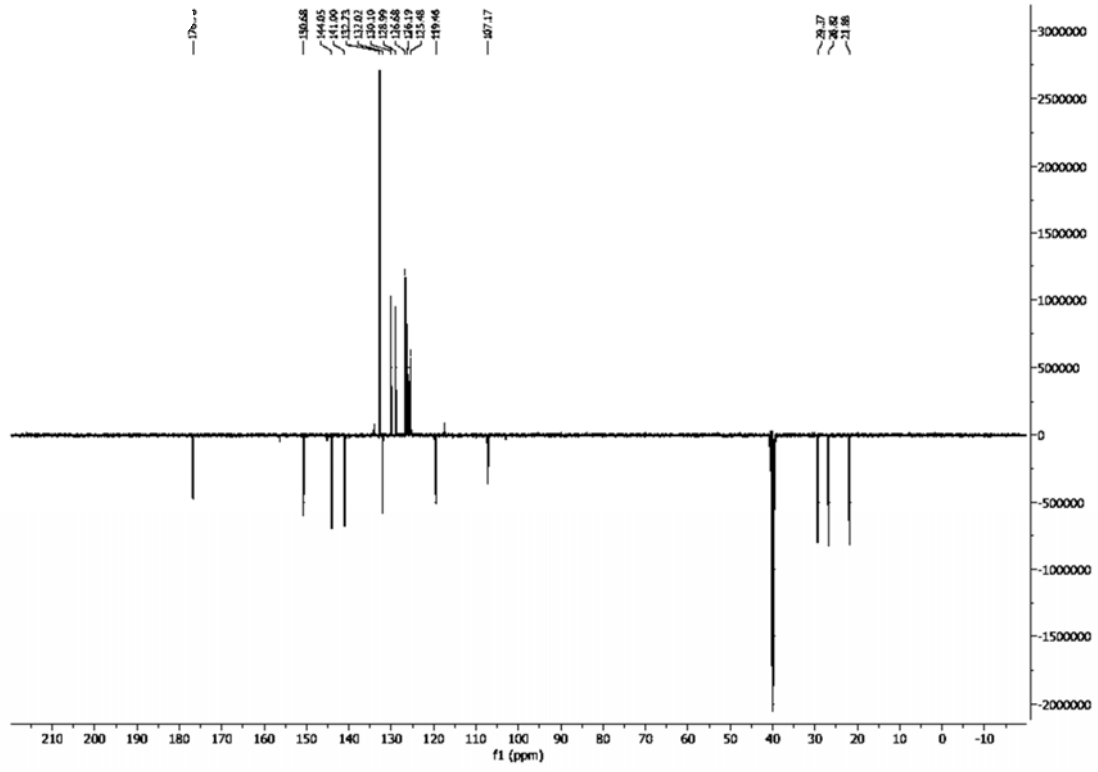
Şekil 6



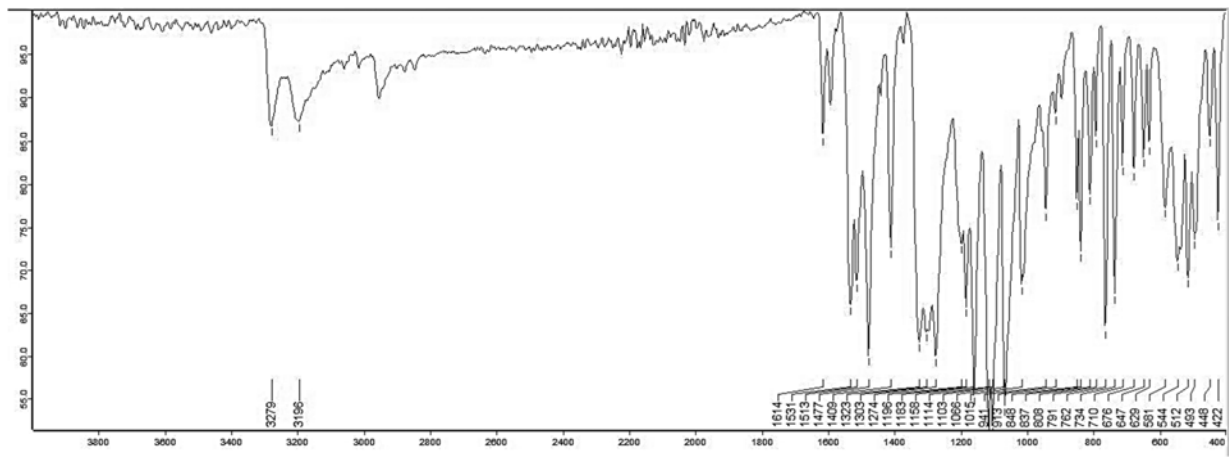
Şekil 7



Şekil 8

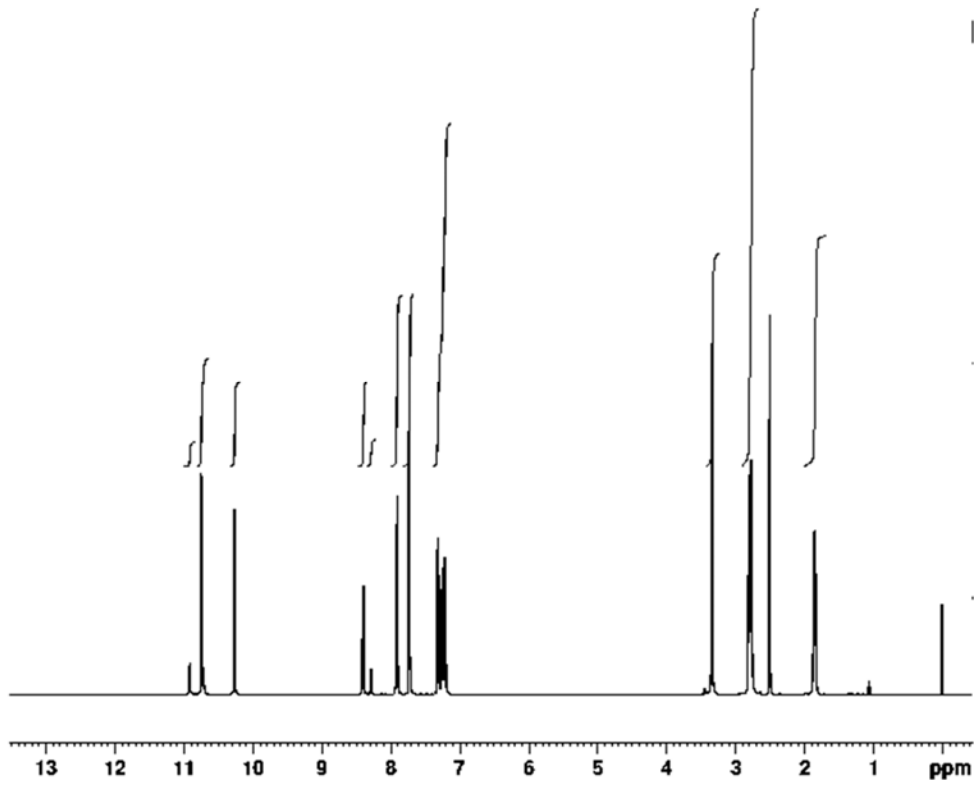


Şekil 9

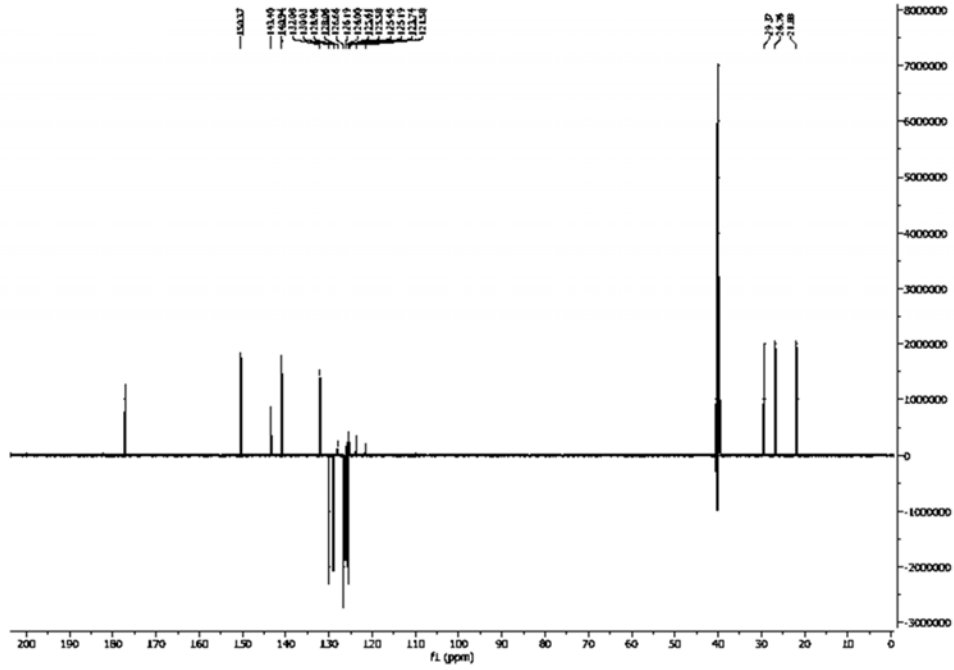


Şekil 10

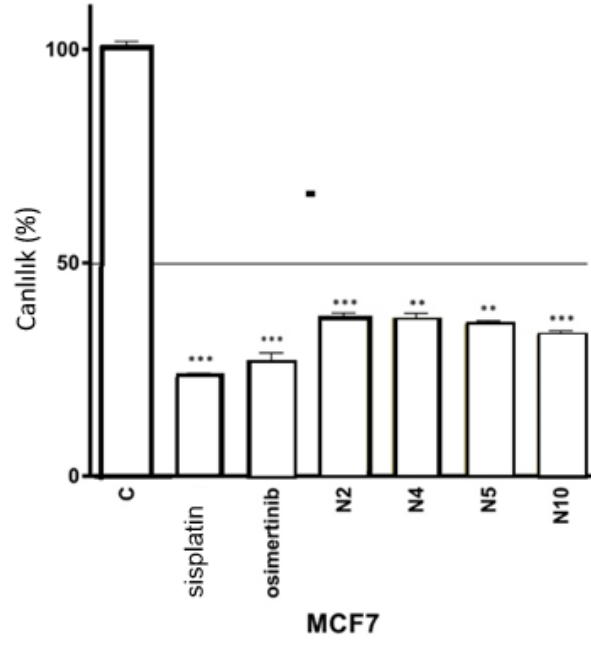
6/7



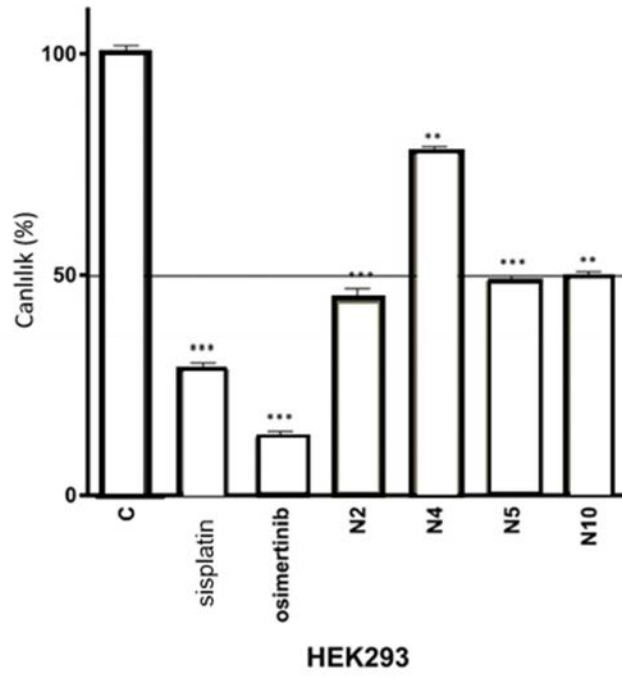
Şekil 11



Şekil 12



Şekil 13



Şekil 14