

Atıf İçin: Akıncioğlu, A. (2023). Yeni Benzensülfonamidler ve Benzamidlerin Sentezi, Karbonik Anhidraz ve Kolinerjik Etkilerinin İncelenmesi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(3), 1814-1825.

To Cite: Akıncioğlu, A. (2023). Synthesis of New Benzenesulfonamides and Benzamides, Investigation of Their Carbonic Anhydrase and Cholinergic Effects. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(3), 1814-1825.

Yeni Benzensülfonamidler ve Benzamidlerin Sentezi, Karbonik Anhidraz ve Kolinerjik Etkilerinin İncelenmesi

Akın AKINCIOĞLU*

Öne Çıkanlar:

- Yeni benzen sülfonamid ve benzamid türevleri sentezlendi
- Karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri üzerine inhibisyon etkileri belirlendi
- AChE ve BChE enzimleri üzerine inhibisyon özellikleri araştırıldı

ÖZET:

Bu çalışmada, 1-brom-2,4-dimetoksibenzen (**8**) ve 1-brom-3,5-dimetoksibenzen (**10**)'dan çıkılarak yeni benzensülfonamid ve benzamid türevleri sentezlendi. Sentezlenen bileşiklerin hCA-I, hCA-II, AChE ve BChE enzimleri üzerine inhibisyon aktiviteleri araştırıldı. Yeni amit türevleri **9** ve **11**'in sentezi çıkış bileşikleri **8** ve **10**'un CSI ile olan reaksiyonundan gerçekleştirildi. Metoksi substitue benzenlerin aşırı HSO₃Cl ile muamelesi, akabinde elde edilen benzen sülfonil klorürlerin amonyakla reaksiyonu sülfonamidler **16** ve **17**'yi verdi. Sentezi gerçekleştirilen sülfonamid ve benzamid türevlerinin hCA-I, hCA-II, AChE ve BChE enzimleri üzerine mikromolar seviyede inhibisyon etkisi gösterdikleri belirlenmiş oldu.

Anahtar Kelimeler:

- Benzen sülfonamid
- Benzamid
- Karbonik Anhidraz
- Anti-Alzheimer

Synthesis of New Benzenesulfonamides and Benzamides, Investigation of Carbonic Anhydrase and Cholinergic Effects

Highlights:

- New benzene sulfonamide and benzamide derivatives were synthesized
- Inhibition effects on carbonic anhydrase I and II isoenzymes were determined
- Inhibition properties on AChE and BChE enzymes were investigated

ABSTRACT:

In this study, new benzene sulfonamide and benzamide derivatives were synthesized from 1-bromo-2,4-dimethoxybenzene (**8**) and 1-bromo-3,5-dimethoxybenzene (**10**). Inhibitory effects of synthesized compounds on hCA-I, hCA-II, AChE and BChE enzymes were investigated. The synthesis of the new amide derivatives **9** and **11** was carried out from the reaction of the starting compounds **8** and **10** with CSI. Treatment of methoxy-substituted benzenes with excess HSO₃Cl followed by reaction of the resulting benzene sulfonyl chlorides with ammonia gave sulfonamides **16** and **17**. It was determined that the synthesized sulfonamide and benzamide derivatives showed inhibition effect on hCA-I, hCA-II, AChE and BChE enzymes at micromolar level.

Keywords:

- Benzene sulfonamide
- Benzamide
- Carbonic Anhydrase
- Anti-Alzheimer
-

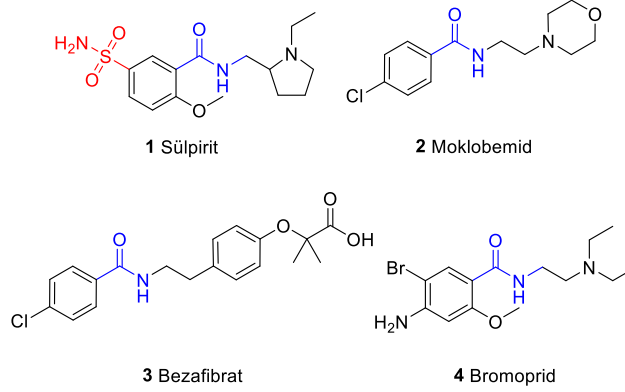
Akın AKINCIOĞLU (Orcid ID: 0000-0002-6473-6338), Merkezi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı, Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Ağrı, TÜRKİYE

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Akın AKINCIOĞLU, e-mail: aakincioglu@agri.edu.tr

GİRİŞ

Amitler biyoloji ve kimyada iyi bilinen önemli fonksiyonel gruplardır ve amit bağlarının oluşumu, özellikle karmaşık homojen glikoproteinlerin sentezinde büyük öneme sahiptir (Pandya ve ark., 2003). Amitler organik sentezlerde son derece yararlı fonksiyonel gruplardır. Ayrıca, farmasötikler, tarım kimyasalları, polimerler ve organik malzemeler dahil olmak üzere birçok değerli bileşik için öncü görevi görürler (Gómez-Carpintero ve ark., 2021)

Amit fonksiyonel grubuna sahip birçok ilaç etken maddesi mevcuttur. Bunlardan Sülpirit (1) ikinci nesil antipiskotik ilaçların ilkinin temsil eden bir ilaç etken maddesidir (Jenner ve Maraden, 1979).

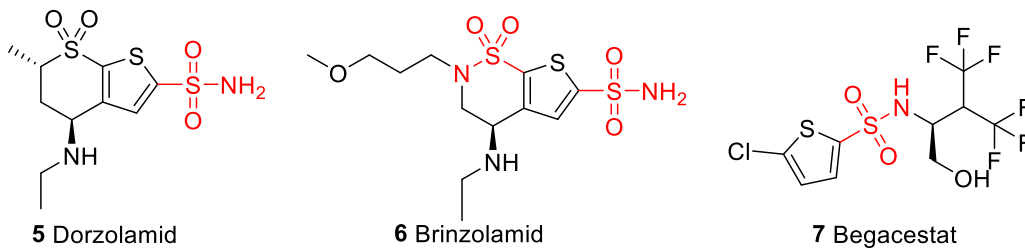


Şekil 1. Amit grubu içeren ilaç etken maddeleri

Bunun dışında, Moklobemid (2) major depresyonda MAO-A enzimini seçici olarak inhibe etmek suretiyle kullanılan ilaç etken maddesidir (Härtter ve ark., 1996). Bezafibrat (3) antiepileptik bir ilaç etken maddesi olarak LDL ve trigliseritlerin düşürülmesi ve HDL'nin yükseltilmesi amacıyla kullanılır (Goa ve ark., 1996). Bromoprid (4) yapısında hem brom hem de amin gruplarını içeren benzamid türevi, antiemetik ilaç etken maddesi olarak kullanılan dopamin antagonistidir (Felicio ve Nasello, 1989).

Sülfonamidler genel olarak $\text{NH}_2\text{SO}_2\text{R}$ formülüyle ifade edilirler ve sülfamid grubu bileşiklerin biyoizosterik türevlerindedir. Bünyesinde sülfonamid grubu ihtiva eden bileşikler farmasötik kimyada çok geniş bir çalışma alanına sahiptirler (Pandya ve ark., 2013). Yapılan çalışmalar sülfonamidlerin antibakteriyel (Gök ve ark., 2021), antifungal (Rahavi Ezabadi ve ark., 2008), karbonik anhidraz inhibisyonu (Akbaba ve ark., 2014), antikanser (Ghorab ve ark., 2011), anti-inflamatuar (Chandna ve ark., 2013), antimigren (Humphrey ve ark., 1991), diüretik olarak (Temperini ve ark., 2008), antitümör (Akurathi ve ark., 2014), antiviral ve HIV proteaz inhibisyonu (Kołaczek ve ark., 2014), antiepileptik (Thiry ve ark., 2008), hipoglisemide (Boyd, 1988), erektil disfonksiyon tedavisinde (Kim ve ark., 2001), Alzheimer hastalığı tedavisinde sistein proteaz inhibisyonu (Roush ve ark., 1998), antiglokom ajanı olarak (Abbate ve ark., 2004) aktivite gösterdikleri bildirilmiştir.

Bu biyolojik aktivitelerinin yanında yapısında sülfonamid grubu içeren ve ilaç olarak kullanılan otuzun üzerinde ilacın reçete edildiği görülmektedir (Kołaczek ve ark., 2014). Örneğin; Dorzolamid (5) ve Brinzolamid (6) glokom hastalığının tedavisinde kullanılan karbonik anhidraz enzimi inhibitörü ilaç etken maddeleridir (Inoue, 2014).



Şekil 2. Sülfonamid grubu içeren ilaç etken maddeleri

Begacestat (7) tiyofen sülfonamit yapısında gama sekretaz inhibitörüdür ve Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılabileceği öngörülen ön çalışmaları bitmiş bir ilaç etken maddesi adaydır (Mayer ve ark., 2008). Enzimler, biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen önemli makromoleküllerdir ve ribozimler hariç neredeyse tamamı protein yapıdadır. Enzimler *in vivo* aktivitelerinin yanında ayrıca optimal ve fizyolojik şartlar sağlandığında *in vitro* aktivite de gösterebilirler. Bu özellikleri sayesinde çalışma alanları geniştir ve birçok iş sahasında enzimlerden yararlanır (Kara, 2009). Metabolik hastalıklarla ilişkili olan enzimler, özellikle ilaç dizaynı konusunda yapılan bilimsel çalışmalarda yol gösterici rol oynar. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki beyinde var olan nörotransmitter dengesinin bozulması ile Alzheimer hastalığı gibi bazı nörodejaneratif hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Alzheimer hastalığında en çok azalan nörotransmitter asetilkolin (ACh)'dir (David ve ark., 2004). ACh, biyolojik açıdan oldukça önemli bir nörotransmitterdir. Bu durum Alzheimer hastalığı ile biyokimyasal anlamda ortaya çıkan en büyük değişikliklerden biridir. Alzheimer hastalığını iyileştiren, semptomları ortadan kaldıran tedavi henüz bulunamamıştır. Asetilkolin (ACh) azalmasını önlemek için en önemli yaklaşım AChE (E.C.3.1.1.7) enziminin inhibe edilmesi ya da aktivitesinin azaltılmasıdır. AChE enzimi metabolizmada ACh'yi hidrolizleyen ve kolinesterazlar grubuna dahil olan bir enzimdir (Göçer ve ark., 2013).

Asetilkolinesterazın yanı sıra ve bütirilkolinesteraz (BChE; E.C.3.1.1.8) enzimi de kolinesterazlar grubuna giren bir enzimdir. Pseudokolinesteraz adı verilen BChE enzimi metabolizmada karaciğer, pankreas, kan serumu ve merkezi sinir sisteminde lokalize olmuştur (Göçer ve ark., 2013; Akincioğlu ve ark 2013).

Metabolik hastalıklarla ilgisi olan diğer bir enzimde Karbonik anhidraz (CA) enzimidir. Bu enzim bugüne kadar birçok dokudan saflaştırılmıştır (Beydemir ve Gülçin 2004). CA metabolizmanın yolağı olan oksidatif fosforilasyon sırasında oluşan CO₂'in suda çözünmesini, taşınmasını ve vücuttan uzaklaştırılmasını sağlar. Ayrıca, iyon değişimini, asit baz dengesi, kardiyovasküler sistemin düzenlenmesi gibi birçok fizyolojik açıdan önemli olayda görev alır. Beyin ödemi, glokoma, ödem, epilepsi, mide bulantısı, oksidatif stres, retinitis pigmentosa, felç, obezite, karsinogenez, epilepsi, kanser gibi birçok metabolik hastalıkla ilişkisi olduğu literatürde bildirilmektedir (Alterio ve ark., 2012).

Görüldüğü gibi hem sülfonamit türevlerinin hem de benzamit türevlerinin birçok faydalı biyolojik aktivitesinin olduğu yapılan yapı etkinlik çalışmaları ve ilgili ilaç etken maddelerinin varlığından anlaşılmaktadır. Bu çalışmada yeni benzamit ve benzensülfonamit türevlerinin sentezlerinin gerçekleştirilmesi, bu bileşiklerin önemli metabolik hastalıklarla ilişkili enzimler olan hCA I, hCA II, AChE ve BChE üzerine inhibisyon etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

MATERYAL VE METOT

Deneysel Kısım

Genel Deneysel Yöntem

Aksi belirtilmedikçe, bütün çözücüler ve reaktifler ticari olarak satın alınmıştır ve herhangi bir ileri saflaştırma yapılmadan kullanılmıştır. Kolon kromatografisinde Tekkim marka silika jel 60 (70-230 mesh) kullanıldı. Bileşiklere ait ¹H (400 MHz) ve ¹³C (100 MHz) NMR spektrumları Bruker Avance II cihazı kullanılarak alındı. Erime noktası tayini Fisherbrand™ dijital erime noktası tayin cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. LC-MS/MS analizleri ESI iyonizasyonu, Q1 pozitif iyon tarama modunda AB Sciex API 4000 Qtrap cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. FTIR spektrumları 650-4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında Thermo Scientific marka Nicolet™ iS™ 10 model FTIR cihazı ile ATR aparatıyla alındı. Enzim inhibisyon çalışmalarında Thermo Scientific™ Evolution™ 201/220 UV-Visible Spektrofotometre ve Thermo Scientific™ Multiskan™ GO UV-Vis 96 mikro plaka okuyucu kullanıldı.

Benzamid Türevlerinin Sentezi İçin Genel Yöntem (5-brom-2,4-dimetoksibenzamid (9)'un sentezi)

1-brom-2,4-dimetoksibenzen (**8**) (1.0 g, 4.61 mmol) 50 mL'lik balonda CH₃CN içerisinde çözüldü ve balonun ağzı kauçuk septa ile kapatıldı. Reaksiyon karışımı sıcaklığı 0°C'ye buz banyosu yardımıyla soğutuldu. Daha sonra reaksiyon karışımı üzerine CSI (0.78 g, 0.48 mL, 5.54 mmol) azot atmosferi altında ilave edildi. Reaksiyon karışımının sıcaklığı oda sıcaklığına getirildi ve bu sıcaklıkta 12 saat süre ile manyetik olarak karıştırıldı. Reaksiyon karışımı üzerine H₂O (5 mL) ilave edildi. Karışım EtOAc (3x25 mL) ile ekstrakte edildi. Toplanan EtOAc fazları susuz Na₂SO₄ ile kurutuldu ve çözücü evaporatör yardımıyla uçurularak uzaklaştırıldı. Kalıntı 25 g silika jel yüklü kolondan %30 EtOAc\Hekzan çözücü sistemi kullanılarak saflaştırıldı ve 5-brom-2,4-dimetoksibenzamid (**9**) (3.71 mmol, 0,79 g) beyaz katı halde %80 verimle elde edildi.

Erime Noktası: 197-199 °C

¹H-NMR (400 MHz, MeOD, ppm): δ = 8.14 (s, 1H, Ar-H), 6.79 (s, 1H, Ar-H), 4.95 (bs, MeOH ve NH₂), 4.05 (s, 3H, OMe), 4.00 (s, 3H, OMe). ¹³C-NMR (100 MHz, MeOD, ppm): δ = 169.0 (CO), 161.9 (C), 161.1 (C), 136.6 (CH), 114.1 (C), 103.4 (C), 97.8 (CH), 57.3 (OCH₃), 57.2 (OCH₃). IR (CH₂Cl₂, cm⁻¹): 3452 (N-H), 3247(N-H), 3119 (C-H (aromatik)), 3054 (C-H (aromatik)), 2987(C-H), 2951(C-H), 2913 (C-H), 2841(C-H), 1683 (C=O), 1654 (NH₂ Makaslama), 1597 (C-C), 1563 (C-C), 1495 (C-C), 1455 (C-C), 1434 (C-C), 1365 (C-N), 1254 (C-O), 1052 (C-O). LC-MS/MS (TIS) hesaplanan C₉H₁₀BrNO₃: 258.98: bulunan 243.0 (M-NH₂)⁺, 244.9 (M-NH₂)⁺, 260.1 (M)⁺ ve 262.05 (M)⁺, 282.0 (M+Na)⁺ ve 284.1 (M+Na)⁺.

2-brom-4,6-dimetoksibenzamid (11)'in Sentezi

Benzamid 11'in sentezi için 3.1'deki genel yöntem kullanıldı. Bu yöntem brom benzen türevi **10**'a (1.0 g, 4.61 mmol) uygulanarak benzamid **11** (3.77 mmol, 0.98 g) %82 verimle silika jel kolon kromatografisinden (%30 EtOAc-Hekzan çözücü sistemiyle) saflaştırılması sonucu beyaz katı halde elde edildi.

Erime Noktası : 131-133 °C

¹H-NMR (400 MHz, Aseton-d₆, ppm): δ = 6.91 (bs, 2H, NH₂), 6.71 (d, 1H, Ar-H, J = 2.2 Hz), 6.57 (d, 1H, Ar-H, J = 2.2 Hz), 3.83 (s, 3H, OMe), 3.81 (s, 3H, OMe). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ = 166.8 (CO), 160.4 (C), 157.6 (C), 122.8 (C), 119.6 (C), 108.5 (CH), 98.3 (CH), 55.98 (OCH₃), 55.75 (OCH₃). IR (CH₂Cl₂, cm⁻¹): 3466 (N-H), 3348 (N-H), 3099 (C-H (aromatik)), 3016 (C-H (aromatik)), 2945 (C-H), 2884 (C-H), 2842 (C-H), 2814 (C-H), 1690 (C=O), 1654 (NH₂ Makaslama), 1599(C-C), 1562 (C-C), 1453 (C-C), 1435 (C-C), 1384 (C-N), 1251 (C-O), 1029 (C-O). LC-MS/MS (TIS) hesaplanan C₉H₁₀BrNO₃: 258.98: bulunan 243.2 (M-NH₂)⁺, 245.0 (M-NH₂)⁺, 260.0 (M)⁺ ve 262.0 (M)⁺, 282.2 (M+Na)⁺ ve 284.0 (M+Na)⁺.

Sülfonil Klorür Türevlerinin Sentezi için Genel Yöntem [1-brom-5-klor-2,4-dimetoksibenzen (12)'nin Sentezi]

1-brom-2,4-dimetoksibenzen (**8**) (1.0 g, 4.61 mmol) 50 mL'lik balona transfer edildi, balonun ağzı sıkı bir şekilde kauçuk septa ile kapatıldı ve balondan azot gazı geçirildi. Reaksiyon karışımının sıcaklığı sıvı azot ile -80°C'ye ayarlandı. Bu sıcaklıkta reaksiyon balonuna aşırı ClSO₃H (9.66 g, 5.52 mL, 82.93 mmol) ilave edildi. Daha sonra oda sıcaklığına kadar ısıtılan reaksiyon karışımı 2 saat süre ile manyetik olarak karıştırıldı. İki saatin sonunda reaksiyon karışımı, buz (100 g) ile doldurulmuş ayırma hunisinin içerisine yavaş yavaş aktarıldı ve böylece ClSO₃H'ün aşırısı suyla tepkimeye tabi tutuldu. Karışım CH₂Cl₂ (3x25 mL) ile ekstrakte edildi. Çözelti susuz Na₂SO₄ ile kurutuldu ve çözücü evaporatör yardımıyla uçurularak uzaklaştırıldı. Bu reaksiyondan hedeflenen sülfonil klorür **13** sentezlenemediği, onun yerine 1-brom-5-klor-2,4-dimetoksibenzen (**12**)'nin %20 verimle beyaz katı halde elde edildiği

silikajel (20 g) kolon kromatografisiyle (% 30 EtOAc-hekzan) yapılan saflaştırılma neticesinde anlaşıldı. (Ek 1.1).

¹H-NMR (400 MHz, MeOD, ppm): δ = 7.34 (s, 1H, Ar-H), 6.71 (s, 1H, Ar-H), 3.93 (s, 3H, OMe), 3.77 (s, 3H, OMe). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ = 157.8 (C), 156.1 (C), 134.5 (CH), 119.8 (C), 100.6 (C), 98.2 (CH), 56.84 (OCH₃), 56.45 (OCH₃). IR (CH₂Cl₂, cm⁻¹): 3009 (C-H (Aromatik)), 2937 (C-H), 2881 (C-H), 2843 (C-H), 1594 (C-C), 1564 (C-C), 1487 (C-C), 1462 (C-C), 1451 (C-C), 1434 (C-C). LC-MS/MS (TIS) hesaplanan C₈H₈BrClO₂: 249.94: bulunan 227.2 (M-OMe-CH₃+Na)⁺⁺, 244.2 (M-2CH₃+Na)⁺, 288.5 (M+K)⁺.

2-brom-4,6-dimetoksibenzensülfonil klorür (14) ve 4-brom-2,6-dimetoksibenzensülfonil klorür (15)'in Sentezleri

Sülfonil klorür sentezi için verilen genel yöntem 1-brom-3,5-dimetoksibenzen (**10**)'a (1.0 g, 4.61 mmol) uygulandı. Reaksiyon sonucunda 2-brom-4,6-dimetoksibenzensülfonil klorür (**14**) ve 4-brom-2,6-dimetoksibenzensülfonil klorür (**15**) elde edildi. Sülfonil klorür **14** ve **15**'e herhangi ileri saflaştırma işlemi uygulanmadan bir sonraki basamak olan sülfonamid türevlerinin sentezinde kullanıldı.

2-brom-4,6-dimetoksibenzensülfonamid (16) ve 4-brom-2,6-dimetoksibenzensülfonamid (17)'nin Sentezleri

Elde edilen 2-brom-4,6-dimetoksibenzensülfonil klorür (**14**) ve 4-brom-2,6-dimetoksibenzensülfonil klorür (**15**) karışımı (1.45 g, 4.61 mmol) az miktarda THF (7 mL) ile çözüldü ve üzerine aşırı NH₃(suda) (%25'lik, 20 mL) çözeltisi oda sıcaklığında ilave edildi. Reaksiyon karışımı 12 saat süre ile oda sıcaklığında karıştırıldı. Karışımının pH'sı 7'ye 1 M HCl kullanılarak ayarlandı ve EtOAc (3x25 ml) ile ekstraksiyon yapıldı. Ekstraksiyon işlemleri sonunda organik fazlar birleştirildi ve susuz Na₂SO₄ ile kurutuldu. Çözücü düşük basınçta evaporatör yardımıyla uzaklaştırıldı. Kalıntı silika jel (30 g) kolonda %40 EtOAc-Hekzan çözücü sistemiyle saflaştırıldı. Yapılan saflaştırma işlemi neticesinde 2-brom-4,6-dimetoksibenzensülfonamid (**16**) (0.29 g, 0.98 mmol) %31 verimle beyaz katı halde ve 4-bromo-2,6-dimetoksibenzensülfonamid (**17**) (0.14 g, 0.47 mmol) beyaz katı halde %15 verimle elde edildi.

2-brom-4,6-dimetoksibenzensülfonamid (16):

Erime Noktası : 182-184 °C

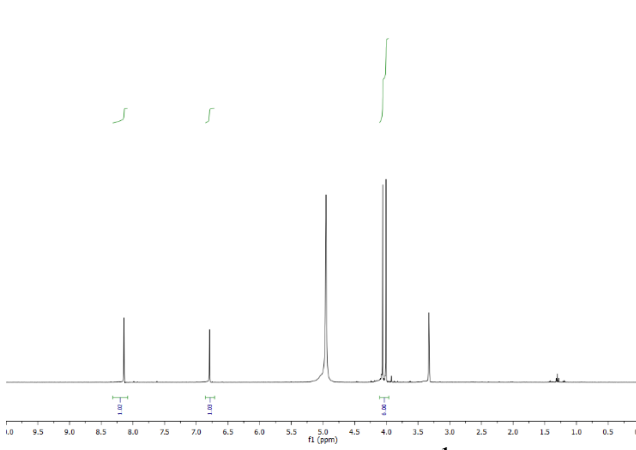
¹H-NMR (400 MHz, Aseton-d₆, ppm): δ = 6.76 (d, 1H, Ar-H, *J* = 2.3 Hz), 6.64 (d, 1H, Ar-H, *J* = 2.3 Hz), 6.36 (bs, 2H, NH₂), 3.88 (s, 3H, OMe), 3.76 (s, 3H, OMe). ¹³C-NMR (100 MHz, Aseton-d₆, ppm): δ = 163.3 (C), 160.4 (C), 125.1 (C), 121.4 (C), 113.3 (CH), 99.9 (CH) 57.4 (OCH₃), 56.4 (OCH₃).

IR (CH₂Cl₂, cm⁻¹): 3384 (N-H), 3283 (N-H), 3088 (C-H (Aromatik)), 2923 (C-H), 2849 (C-H), 1591 (C-C), 1558 (C-C), 1540 (C-C), 1507 (C-C), 1472 (C-C), 1456 (C-C), 1430 (C-N), 1328 (S=O), 1219 (C-O), 1025 (C-O). LC-MS/MS (TIS) hesaplanan C₈H₁₀BrNO₄S: 296.14: bulunan 318.0 (M+Na)⁺, 320.0 (M+Na)⁺.

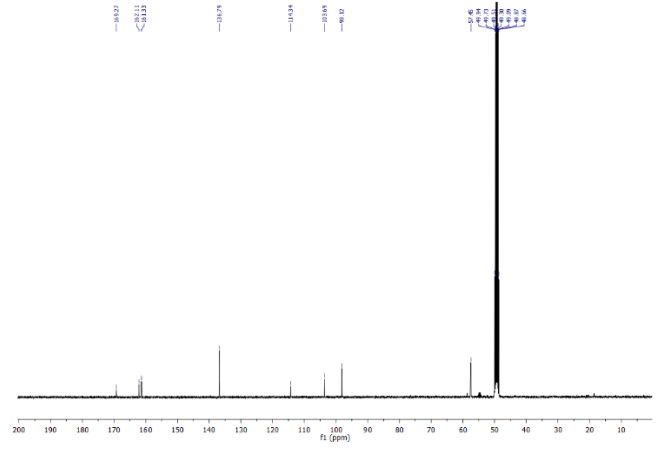
4-brom-2,6-dimetoksibenzensülfonamid (17):

Erime Noktası : 218-220 °C

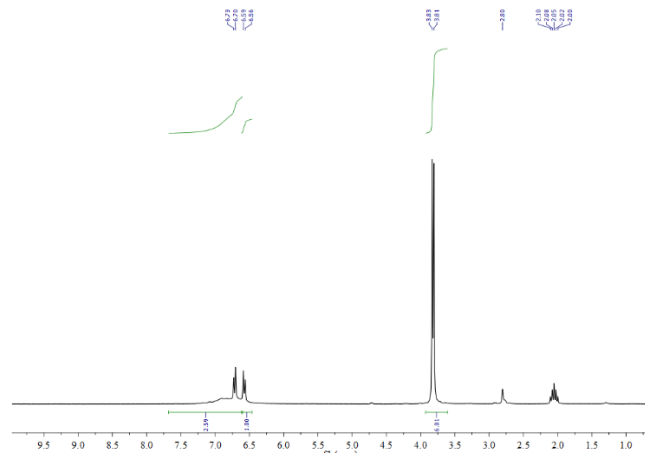
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ = 7.09 (bs, 2H, NH₂), 6.99 (s, 2H, 2Ar-H), 3.84 (s, 6H, 2OMe). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ = 158.0 (2C), 126.5(C), 119.9 (C), 108.8 (2CH), 57.0 (2OCH₃). IR (CH₂Cl₂, cm⁻¹): 3283 (N-H), 3230 (N-H), 3089 (C-H (Aromatik)), 2916 (C-H), 2848 (C-H), 1570 (C-C), 1507 (C-C), 1489 (C-C), 1457 (C-C), 1435 (C-N), 1328 (S=O), 1222 (C-O), 1013 (C-O). LC-MS/MS (TIS) hesaplanan C₈H₁₀BrNO₄S: 296.14: bulunan 274.04 (M-2CH₃-NH₂+Na)⁺⁺, 381.3 (M+2Na+K)⁺³.



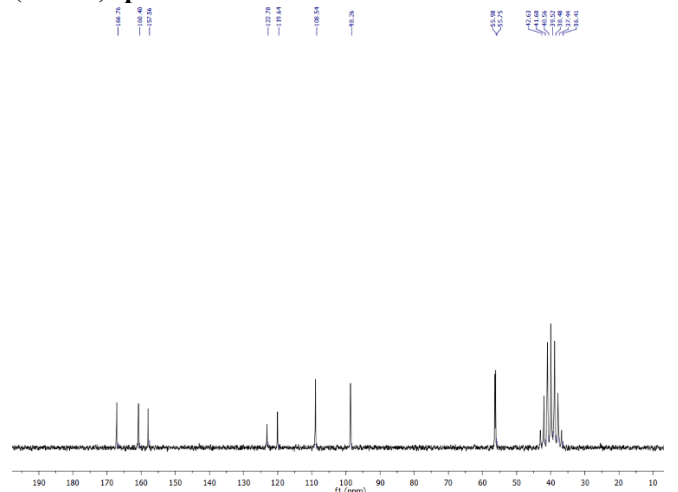
5-brom-2,4-dimetoksibenzamit (9)'un $^1\text{H-NMR}$ (MeOD) spektrumu



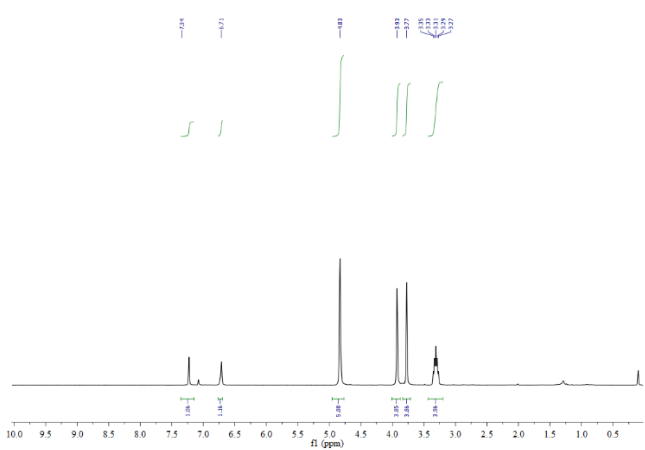
5-brom-2,4-dimetoksibenzamit (9)'un $^{13}\text{C-NMR}$ (MeOD) spektrumu



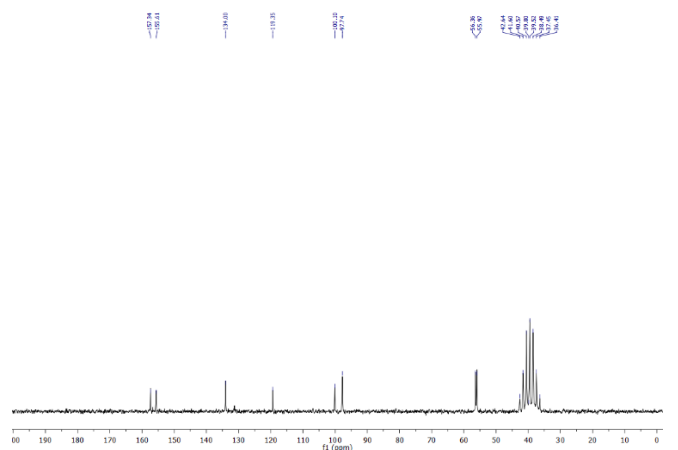
2-brom-4,6-dimetoksibenzamit (11)'in $^1\text{H-NMR}$ (Aseton- d_6) spektrumu



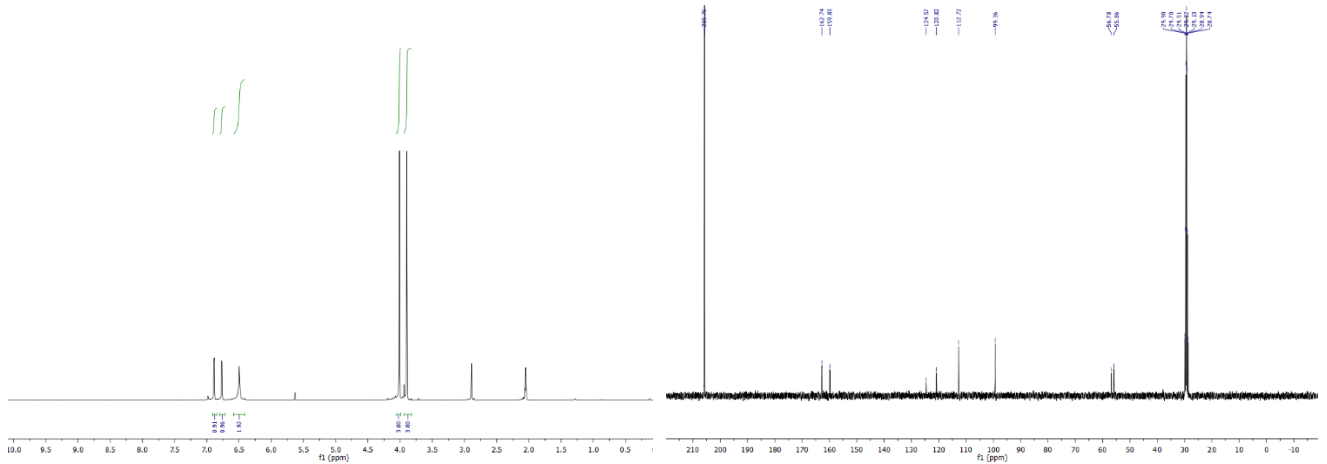
2-brom-4,6-dimetoksibenzamit (11)'in $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) spektrumu



1-brom-5-klor-2,4-dimetoksibenzen (12)'nin $^1\text{H-NMR}$ (MeOD) spektrumu

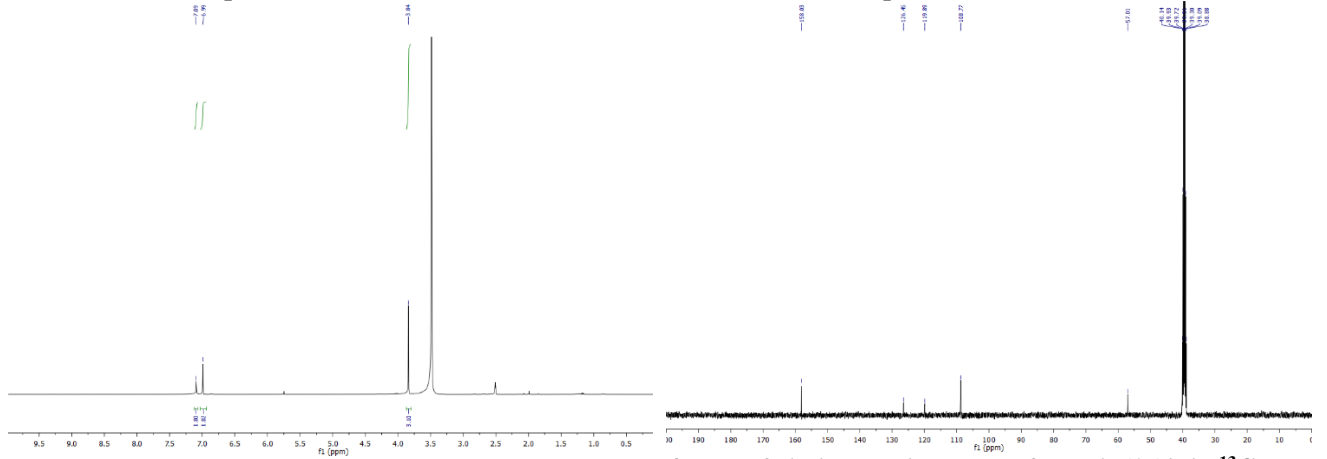


1-brom-5-klor-2,4-dimetoksibenzen (12)'nin $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) spektrumu



2-brom-4,6-dimetoksibenzensülfonamid (16)'nin ¹H-NMR (Aseton-d₆) spektrumu

2-brom-4,6-dimetoksibenzensülfonamid (16)'nin ¹³C-NMR (Aseton-d₆) spektrumu



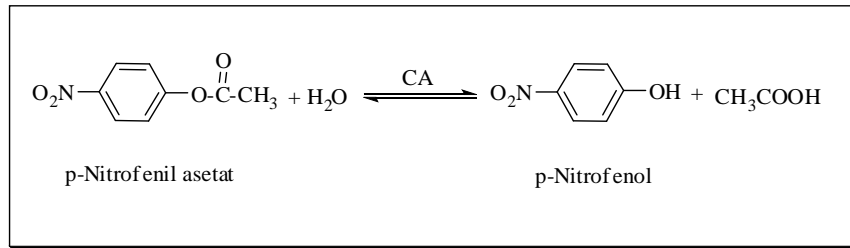
4-brom-2,6-dimetoksibenzensülfonamid (17)'nin ¹H-NMR (DMSO-d₆) spektrumu

4-brom-2,6-dimetoksibenzensülfonamid (17)'nin ¹³C-NMR (DMSO-d₆) spektrumu

Biyolojik Aktivite Çalışmaları

hCA I ve II İzoenzimlerinin Esteraz Aktivitesi

Karbonik anhidraz enzimi esteraz aktivitesine sahip bir enzimdir. Metodun prensibi karbonik anhidraz enzimi substrat olarak kullandığımız *p*-nitrofenilasetatı, *p*-nitrofenol veya *p*-nitrofenolata hidroliz eder. Oluşan ürün 348 nm'de absorbans verir. Bu esasa dayanarak inhibisyon çalışmaları yapılır (Armstrong ve ark., 1966; Verpoorte ve Mehta 1967; Göçer ve Gülçin 2013).



Şekil 3. *p*-Nitrofenilasetatın *p*-nitrofenole dönüşüm mekanizması

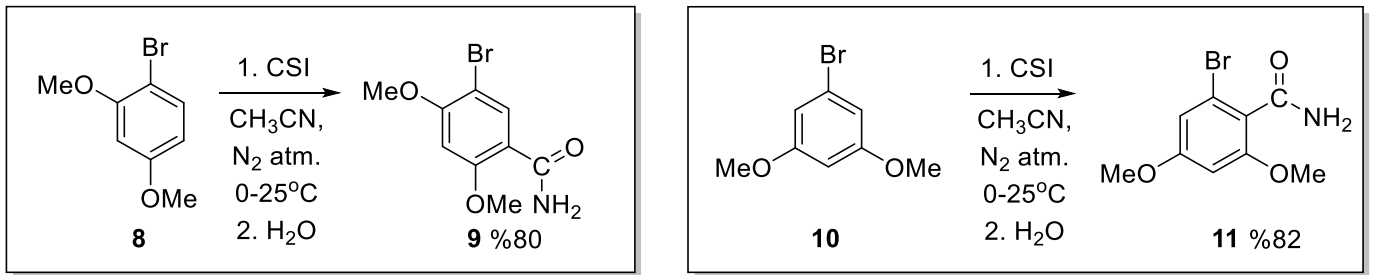
Asetilkolinesteraz ve Butirilkolinesteraz Enzimi İçin İnhibisyon Çalışmaları

Elman metodunun küçük bir modifikasyonu ile AChE ve BChE enzimlerinin inhibisyon çalışmaları yapılmaktadır. Yapılan çalışmanın esası asetilkolinesterazın asetilkolini asetat ve koline parçalamasına dayanır. Reaksiyonunun ardından tiyokolin ile 5,5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB) reaksiyona girerek sarı renk veren 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit oluşturur. Elde edilen çözelti 412 nm'de

ölçülür. (Ellman ve ark., 1961). Asetilkolintiyoyodat AChE enzimi için substrat olarak kullanılırken, bütiriltiyokolinyodat BChE enzimi için substrat olarak kullanılır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

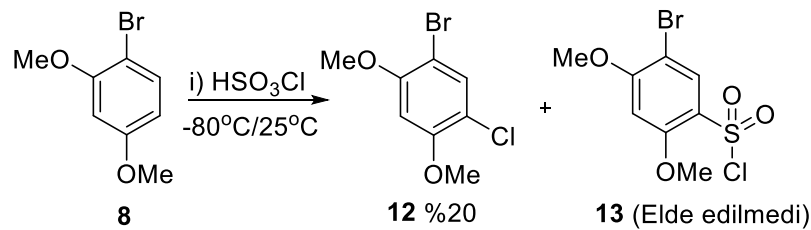
Genel olarak amitlerin sentezi, şu yolları içerir: karboksilik asitlerin, aldehitlerin ve alkollerin aminlerle olan birleşme (coupling) reaksiyonundan, (Lundberg ve ark., 2012; Arnold ve ark., 2008; Ghosh ve ark., 2012) alkinlerin hidroaminasyonu (Uenoyama ve ark., 2005) ve nitrillerin hidrasyonu (Mitsudome ve ark., 2009). Ayrıca transaminasyon reaksiyonu ile metal katalize (Becerra-Figueroa ve ark., 2014) veya homojen organo kataliz (Rao ve ark., 2014) ile amit türevlerinin sentezlerinin gerçekleştirildiği görülmektedir. Bu çalışma kapsamında metoksi substitüe brom benzen türevleri **8** ve **10**'un CSI ile asetonitril içerisinde ve azot atmosferindeki reaksiyonu sonucu tek kademede yüksek verimlerle amit türevleri **9** ve **11**'in sentezleri gerçekleştirildi (Şekil 4). Sentezi gerçekleştirilen benzamid türevi **9** ve **11**'in $^1\text{H-NMR}$ ve $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumlarının yapılar ile uyum içerisinde oldukları belirlendi.



Şekil 4. Benzamid türevleri **9** ve **11**'in sentezleri

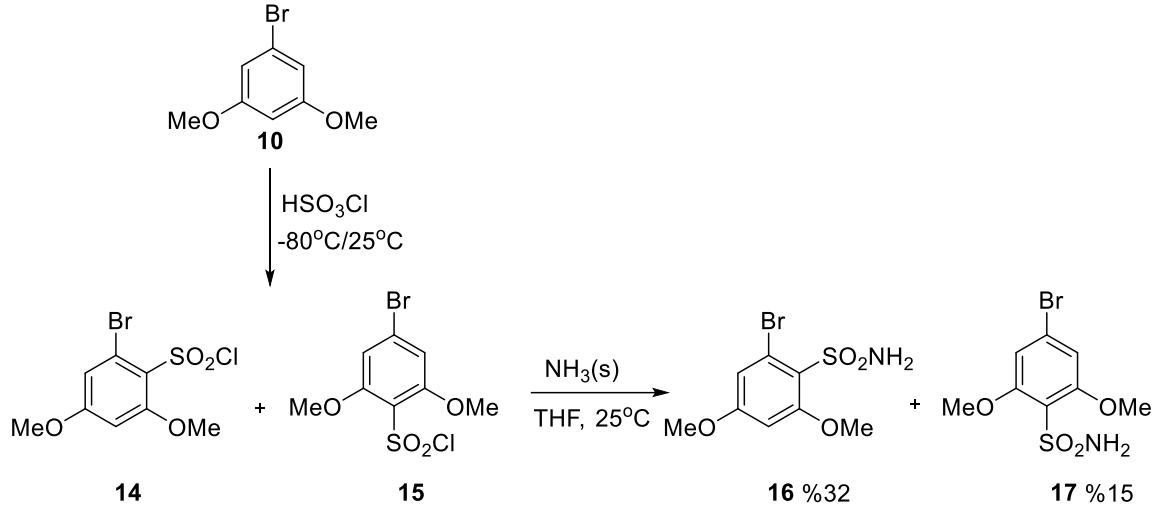
Bir diğer hedefimiz olan sülfonamidlerin sentezleri için yine metoksi substitüe brom benzen türevleri **8** ve **10** çıkış bileşikleri olarak kullanıldı. Bu amaçla **8**'in aşırı klor sülfonik asit ile $-80^\circ\text{C}/25^\circ\text{C}$ 'de gerçekleştirilen reaksiyonu ve ekstraksiyon işlemleri neticesinde elde edilmesi hedeflenen sülfonil klorür türevi **13**'ün oluşmadığı bunun yerine klor benzen türevi **12**'nin oluştuğu yapılan saflaştırma ve spektroskopik analiz işlemleri sonucunda tespit edildi (Şekil 5).

Diğer bir çıkış bileşiği olan brom benzen türevi **10** aşırı klor sülfonik asit reaksiyona tabi tutuldu. Bu reaksiyon sonucunda oluşan sülfonil klorür türevi **14** ve **15**'e ileri saflaştırma işlemi yapılmadan NH_4OH (%25) çözeltisi ile muamele edilmesini takiben kolon kromatografisiyle saflaştırma işlemleri gerçekleştirildi.



Şekil 5. 1-Brom-5-klor-2,4-dimetoksibenzen **12**'nin sentezi

Aromatik halkadaki brom göre orto ve para pozisyonlarından katılmanın gerçekleştiği yapılan spektroskopik analiz çalışmaları sonucunda anlaşıldı. Sentezlenen bileşiklere ait $^1\text{H-NMR}$ ve $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumlarının **16** ve **17** nolu sülfonamid yapıları ile uyum içerisinde olduğu görülmektedir.



Çalışmanın devamında sentezlenen benzamit ve sülfonamid türevleri biyolojik aktivite yönünden değerlendirildi.

Çizelge 1. Sentezlenen bileşikler **9**, **11**, **12**, **16** ve **17**'nin AChE ve BChE enzimleri üzerine inhibisyon etkileri

	AChE	BChE
	IC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)
9	220,96±29,93	1177,69±88,37
11	257,84±26,41	852,71±79,22
12	Belirlenemedi	Belirlenemedi
16	Belirlenemedi	Belirlenemedi
17	Belirlenemedi	Belirlenemedi
Tacrin	0,08±0,017	0,008±0,002

Yaptığımız çalışmada sentezlenen bileşiklerin Alzheimer hastalığı ile yakından ilişkili AChE ve BChE enzimleri üzerine inhibisyon etkileri incelendi. Benzamit türevi **9** ve **11**'in her iki enzim üzerine inhibisyon etkisi gösterirken, **12**, **16** ve **17** nolu bileşikler inhibisyon etkisi göstermedi. Sonuçlar Tablo 1'de verilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde çok güçlü inhibisyon etkilerinin olmadığı gözlemlenmektedir. Ancak **9** ve **11**'in AChE enzimine karşı seçici inhibitör olmaları dikkat çekici bir durumdur. Çünkü metabolik hastalıkların tedavisindeki yaklaşım seçici inhibitörlerin kullanımı yönündedir. AChE enzimi seçici bileşikler olmaları ileri araştırmalarda sentezlenebilecek bileşikler için ilaç dizaynı ve yapı aktivite açısından yol gösterici olabilir.

Biyokimya çalışmalarının ikinci basamağında sentezlenen amit ve sülfonamid türevi bileşiklerin birçok hastalıkla ilişkili hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerine inhibisyon etkileri araştırıldı.

Sentezlenen bileşiklerin hCA I ve hCA II enzimleri üzerine yapılan inhibisyon çalışmalarının sonuçları değerlendirildiğinde en iyi IC₅₀ değerine sahip sülfonamidler **16** ve **17**'nin olduğu görülmektedir. Bilindiği gibi sülfonamid türevleri hCA'nın spesifik ve güçlü inhibitörleridir. Ancak amit bileşiklerinin sülfonamidler kadar güçlü inhibisyon göstermedikleri bilinmektedir. Amit inhibitörleri nötral inhibitörler olduklarından ilgili enzimle etkileşimleri zayıftır ve görece düşük bir inhibisyon meydana getirirler (Liang ve Lipscom, 1991). Bu bilgiler ışığında sonuçlar değerlendirildiğinde **9**, **11** amit türevlerinin **16**, **17** sülfonamid türevlerine göre daha az inhibisyon gösterdikleri görülmektedir. Ayrıca aktivite çalışmaları **12** nolu bileşiğin inhibisyon göstermediğini ortaya koymaktadır. Çünkü **12** bileşiğinin hCA izoenzimleri ile kuvvetli bağlanma yapabilecek uygun fonksiyonel grubu bulunmamaktadır. En iyi inhibisyon etkiyi **16** göstermiştir. **16**'nın sülfonamid türevi olması bu inhibisyonda etkili olmuştur. Ancak sülfonamid türevi olan **17** nolu bileşik çok güçlü inhibisyon etkiye

sahip değildir. Bu durum incelendiğinde **17** nolu bileşikte etkili olduğu bilinen sülfonamit fonksiyonel grubunun iki metoksi grubuna komşu olmasından kaynaklı oluşan sterik engelden dolayı enzimle güçlü bir şekilde etkileşemediği ve bu yüzden de güçlü bir inhibisyon etki gösteremediği sonucuna varılmaktadır (Tablo 2).

Çizelge 2. Sentezlenen moleküllerin (**9**, **11**, **12**, **16** ve **17**) hCA-I ve hCA-II enzimleri üzerine inhibisyon etkileri

	hCAI	hCAII
	IC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)
9	549,12±114,90	760,91±142,31
11	345,84±52,09	702,21±87,58
12	Belirlenemedi	Belirlenemedi
16	86,89±14,14	46,78±2,44
17	541,87±48,11	585,71±112,47
AZA	0,79±0,05	0,17±0,002

SONUÇ

Bu çalışma kapsamında metoksi substitüe brom benzen türevleri **8** ve **10**'un CSI ile reaksiyonu sonucunda tek kademede amit türevleri **9** ve **11** yüksek verimlerle ilk kez sentezlendi. Yine metoksi substitüe brom benzen türevi **8**'in aşırı HSO₃Cl ile olan reaksiyonu neticesinde ilgili sülfonil klorür türevi **13** yerine klor substitüe **12** elde edildiği belirlendi. Ayrıca 1-brom-3,5-dimetoksibenzen (**10**)'un HSO₃Cl ile olan reaksiyonunu takiben elde edilen benzen sülfonil klorür türevlerinin NH₄OH ile olan reaksiyonundan iki yeni sülfonamit türevi **16** ve **17** elde edildi.

Sentezlenen bileşikler üzerine yapılan biyolojik aktivite çalışmaları neticesinde önemli verilerin elde edildiği görülmektedir. Bütün bu sonuçlar göz önüne alındığında bu verilerin farmakolojik çalışmalarda yol gösterici olabileceği söylenebilir. Ayrıca elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde benzamit türevi **9**'un AChE enzimini seçici olarak inhibe etmesi önemli bir bulgu olarak değerlendirilebilir. hCA I ve hCA II izoenzimleri için elde edilen inhibisyon sonuçlarında ise sülfonamit **16**'nın glokom başta olmak üzere hCA enzimi ile ilişkili metabolik hastalıkların tedavisinde kullanılabilir ilaçların dizaynı açısından öncü bir bileşik olarak değerlendirilebileceği çıkarımı yapılabilir.

TEŞEKKÜR

Projeyi maddi olarak destekleyen Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi BAP Koordinatörlüğüne (Proje No: MARŞL.21.01) ve çalışmanın gerçekleştirildiği Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Merkezi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarına teşekkür ederim. Biyokimya çalışmaları boyunca bilgi ve deneyiminden faydalandığım Prof. Dr. Hülya AKINCIOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

Çıkar Çatışması

Makaleye ait çalışmanın planlanması, yürütülmesi ve makalenin yazılması aşamalarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederim.

Yazar Katkısı

Makalenin planlanması, yürütülmesi ve yazılmasında makalenin tek yazarı olarak tarafıma yapıldığını beyan ederim.

KAYNAKLAR

Abbate, F., Casini, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., (2004). Carbonic anhydrase inhibitors: X-ray crystallographic structure of the adduct of human isozyme II with a topically acting antiglaucoma sulfonamide. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, 2357-2361.

- Akbaba, Y., Akıncioğlu, A., Göçer, H., Göksu, S., Gülçin, İ., Supuran, C. T. (2014). Carbonic anhydrase inhibitory properties of novel sulfonamide derivatives of aminoindanes and aminotetralins. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 29(1), 35-42.
- Akıncioğlu, A., Akbaba, Y., Göçer, H., Göksu, S., Gülçin, İ., Supuran, C.T., (2013). Novel sulfamides as potential carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 21, 1379–1385.
- Akıncioğlu, A., Akıncioğlu, H., Gülçin, İ., Durdagi, S., Supuran, C. T., Göksu, S. (2015). Discovery of potent carbonic anhydrase and acetylcholine esterase inhibitors: novel sulfamoylcarbamates and sulfamides derived from acetophenones. *Bioorg. Med. Chem.*, 23(13), 3592-3602.
- Akurathi, V. Dubois, L. Celen, S. Lieuwes, N.G. Chitneni, S. K. Cleyhens, B.J. Innocenti, A. Supuran, C.T. Verbruggen, A.M., Lambin, P., Bormans, G.M., (2014). Development and biological evaluation of ^{99m}Tc-sulfonamide derivatives for in vivo visualization of CA IX as surrogate tumor hypoxia markers. *Eur. J. Med. Chem.*, 71, 374–384.
- Alterio V., Fiore D.A., Katia D’Ambrosio, Supuran C.T., Simone G. D., (2012). Multiple Binding Modes of Inhibitors to Carbonic Anhydrases: How to Design Specific Drugs Targeting 15 Different Isoforms?. *Chem. Rev.*, 112, 4421–4468.
- Armstrong, J.M., Myers, D.V., Verpoorte, J.A., Edsall, J.T., (1966). Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.*, 214, 5137-5149.
- Arnold, K., Davies, B., Héroult, D., Whiting, A. (2008). Asymmetric direct amide synthesis by kinetic amine resolution: a chiral bifunctional aminoboronic acid catalyzed reaction between a racemic amine and an achiral carboxylic acid. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 47(14), 2673-2676.
- Becerra-Figueroa, L., Ojeda-Porras, A., & Gamba-Sanchez, D. (2014). Transamidation of carboxamides catalyzed by Fe (III) and water. *J. Org. Chem.*, 79(10), 4544-4552.
- Beydemir, Ş., Gülçin İ., (2004). Effect of melatonin on carbonic anhydrase from human erythrocyte in vitro and from rat erythrocyte in vivo. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 19, 193-197.
- Boyd, A.E., (1988). Sulfonylurea receptors, ion channels, and fruit flies. *Diabetes*, 37, 847-850.
- Chandna, N., Kumar, S., Kaushik, P., Kaushik, D., Roy, S.K., Gupta, G.K., Jachak, S. M., Kapoor, J.K., Sharma, P.K., (2013). Synthesis of novel celecoxib analogues by bioisosteric replacement of sulfonamide as potent anti-inflammatory agents and cyclooxygenase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 21, 4581–4590.
- David, G., Wilkinson, P.T., Schwam, E., Parrish, J.P., (2004). Cholinesterase inhibitors used in the treatment of alzheimer’s disease. the relationship between pharmacological effects and clinical efficacy. *Drugs Aging*, 21, 7, 453-478.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Felicio, L. F., & Nasello, A. G. (1989). Effect of acute bromopride treatment on rat prolactin levels and sexual behavior. *Braz J Med Biol Res.*, 22(8), 1011-1014.
- Ghorab, M.M., Ragab, F.A., Heiba, H.I., El-Hazek, R.M., 2011. Anticancer and radio-sensitizing evaluation of some new thiazolopyrane and thiazolopyranopyrimidine derivatives bearing a sulfonamide moiety. *Eur. J. Med. Chem.*, 46, 5120-5126.
- Ghosh, S. C., Ngiam, J. S., Seayad, A. M., Tuan, D. T., Chai, C. L., Chen, A. (2012). Copper-catalyzed oxidative amidation of aldehydes with amine salts: synthesis of primary, secondary, and tertiary amides. *J. Org. Chem.*, 77(18), 8007-8015.
- Goa, K. L., Barradell, L. B., Plosker, G. L. (1996). Bezafibrate: an update of its pharmacology and use in the management of dyslipidaemia. *Drugs*, 52, 725-753.
- Gómez-Carpintero, J., Sánchez, J. D., González, J. F., Menéndez, J. C. (2021). Mechanochemical Synthesis of Primary Amides. *J. Org. Chem.*, 86(20), 14232-14237.
- Göçer, H., Akıncioğlu, A., Öztaşkın, N., Göksu, S., Gülçin, İ. (2013). Synthesis, Antioxidant, and Antiacetylcholinesterase Activities of Sulfonamide Derivatives of Dopamine-R elated Compounds. *Arch. Pharm.*, 346(11), 783-792.
- Härter, S., Dingemans, J., Baier, D., Ziegler, G., Hiemke, C. (1996). The role of cytochrome P450 2D6 in the metabolism of moclobemide. *Eur Neuropsychopharmacol.*, 6(3), 225-230.

- Humphrey, P.P., Feniuk, W., Marriott, A.S., Tanner, R.J., Jackson, M.R., Tuckeri M.L., (1991). Preclinical studies on the anti-migraine drug, sumatriptan. *Eur Neurol.*, 31, 282-290.
- Inoue, K., (2014). Managing adverse effects of glaucoma medications. *Clin. Ophthalmol.*, 8, 903–913.
- Jenner, P., Maraden, C. D. (1979). The substituted benzamides—a novel class of dopamine antagonists. *Life Sci.*, 25, 479–486.
- Kara, B., (2009). Aldoz redüktaz, α -Amilaz, Monoamin Oksidaz ve Ksantin Oksidaz Enzimlerinin İnhibisyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Kim, D.-K., Lee, J.Y., Lee, N., Ryu, D.H., Kim, J.-S., Lee, S., Choi, J.-Y., Ryu, J.-H., Kim, N.-H., Im, G.-J., Choi, W.-S., Kim, T.-K., (2001). Synthesis and phosphodiesterase inhibitory activity of new sildenafil analogues containing a carboxylic acid group in the 5'-sulfonamide moiety of a phenyl ring. *Bioorg. Med. Chem.*, 9, 3013-3021.
- Kołaczek, A., Fusiarz, I., Iawecka, J., Branowska, D., (2014). Biological activity and synthesis of sulfonamide derivatives: a brief review. *CHEMIK*, 68, 620–628.
- Liang, Y. J., Lipscom, W. N. (1991). Substrate and inhibitor binding to human carbonic anhydrase II: a theoretical study. Inhibitors in the carbonic anhydrase from biochemistry and physiology and clinical medicine. Weinheim: VCH Publishers, 50-64.
- Lundberg, H., Tinnis, F., Adolfsson, H. (2012). Direct Amide Coupling of Non-activated Carboxylic Acids and Amines Catalysed by Zirconium (IV) Chloride. *Chem. Eur. J.*, 18(13), 3822-3826.
- Mayer, S. C., Kreft, A. F., Harrison, B., Abou-Gharbia, M., Antane, M., Aschmies, S., Atchison, K., Chlenov, M., Cole, D.C., Comery, T., Diamantidis, G., Ellingboe, J., Fan, K., Galante, R., Gonzales, C., Ho, D.M., Hoke, M. E., Hu, Y., Huryn, D., Jain, U., Jin, M., Kremer, K., Kubrak, D., Lin, M., Lu, P., Magolda, R., Martone, R., Moore, W., Oganessian, A., Pangalos, M. N., Porte, A., Reinhart, P., Resnick, L., Riddell, D.R., Sonnenberg-Reines, J., Stock, J.R., Sun, S., Wagner, E., Wang, T., Woller, K., Xu, Z., Zaleska, M. M., Zeldis, J., Zhang, M., Zhou, H., Jacobsen, J.S., (2008). Discovery of Begacestat, a Notch-1-Sparing γ -Secretase Inhibitor for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.*, 51, 7348–7351.
- Mitsudome, T., Mikami, Y., Mori, H., Arita, S., Mizugaki, T., Jitsukawa, K., Kaneda, K. (2009). Hydration of Nitriles to Amides with Supported Silver Nanoparticles. *Synfacts*, 2009(10), 1167-1167.
- Gök, N., Akıncioğlu, A., Erümit Binici, E., Akıncioğlu, H., Kılınç, N., Göksu, S. (2021). Synthesis of novel sulfonamides with anti-Alzheimer and antioxidant capacities. *Arch. Pharm.*, 354(7), 2000496.
- Pandya, R., Takashi, M., Tedeschi, L., Barrett, A.G.M., (2003). Facile One-Pot Synthesis of Aromatic and Heteroaromatic Sulfonamides. *J. Org. Chem.*, 68, 8274-8276.
- Rahavi Ezabadi, I., Camoutsis, C., Zoumpoulakis, P., Geronikaki, A., Soković, M., Glamočilija, J., Čirič, A., (2008). Sulfonamide-1,2,4-triazole derivatives as antifungal and antibacterial agents: Synthesis, biological evaluation, lipophilicity, and conformational studies. *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 1150-1161.
- Rao, S. N., Mohan, D. C., Adimurthy, S. (2014). Chitosan: an efficient recyclable catalyst for transamidation of carboxamides with amines under neat conditions. *Green Chemistry*, 16(9), 4122-4126.
- Roush, W.R., Gwaltney, S.L., Cheng, J., Scheidt, K. A., McKerrow, J.H., Hansell, E., (1998). Vinyl Sulfonate Esters and Vinyl Sulfonamides: Potent, Irreversible Inhibitors of Cysteine Proteases. *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 10994-10995.
- Temperini, C., Cecchi, A., Scozzafava, A., Supuran, C. T. (2008). Carbonic anhydrase inhibitors. Sulfonamide diuretics revisited—old leads for new applications?. *Org. Biomol. Chem.*, 6(14), 2499-2506.
- Thiry, A., Dogné, J.M., Supuran, C.T., Masereel, B., (2008). Anticonvulsant sulfonamides/sulfamates/sulfamides with carbonic anhydrase inhibitory activity: drug design and mechanism of action. *Curr Pharm Des.*, 14, 661-671.
- Uenoyama, Y., Fukuyama, T., Nobuta, O., Matsubara, H., Ryu, I. (2005). Alkyne Carbonylation by Radicals: Tin-Radical-Catalyzed Synthesis of α -Methylene Amides from 1-Alkynes, Carbon Monoxide, and Amines. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 117(7), 1099-1102.
- Verpoorte, J.A., Mehta, S., Edsall, J.T., (1967). Esterase activities of human carbonic anhydrases. B and C. *J. Biol. Chem.*, 242, 4221-4229.