

Sinteze i biološka svojstva 3-amino-1,4-benzodiazepina

Kolman, Robert Junior

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:174672>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Robert Junior Kolman

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

SINTEZE I BIOLOŠKA SVOJSTVA 3-AMINO-1,4-BENZODIAZEPINA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. Srđanka Tomić-Pisarović

Zagreb, 2017.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

9. srpnja 2017.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

Mentor rada: prof. dr. sc. Srđanka Tomić-Pisarović

Potpis:

Sadržaj

| | |
|--|-------|
| § SAŽETAK..... | VII |
| § 1. UVOD..... | 1 |
| § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME | 2 |
| 2.1. Djelovanje derivata 3-amino-1,4-benzodiazepin-2-ona kao inhibitora γ -sekretaze..... | 2 |
| 2.2. Konfiguracijska stabilnost | 3 |
| 2.3. Kristalizacijom inducirana asimetrična transformacija i sinteza (<i>S</i>)-N(1)-metilbenzodiazepinske jezgre..... | 3 |
| 2.4. Asimetrična Ireland-Claisen pregradnja..... | 7 |
| 2.5. Hidroboriranje terminalne C=C veze: Anti-Markovnikovljevo hidratiranje..... | 10 |
| 2.6. Kristalizacijom inducirana asimetrična transformacija u sintezi (<i>3R</i>)-N(1)-H-benzodiazepinske jezgre | 14 |
| 2.7. Zaključak | 16 |
| § 3. LITERATURNI IZVORI..... | XVIII |

§ Sažetak

1,4-Benzodiazepin-2-on supstituiran na položaju 3 daje spojeve kod kojih se malim promjenama u strukturi postiže široki spektar bioloških utjecaja. Na osnovu toga sintetizirani su lijekovi koji djeluju na različite biološke ciljeve. Obrađena su četiri takva spoja, od kojih tri inhibiraju γ -sekretazu, enzim koji stvara β -amiloidne peptide povezane s pojavom Alzheimerove bolesti, a četvrti inhibira kalijeve kanale srčanih miocita, čime se produljuje trajanje srčanog akcijskog potencijala. Time se potencijalno mogu koristiti u tretmanu Alzheimerove bolesti, kao i aritmije.

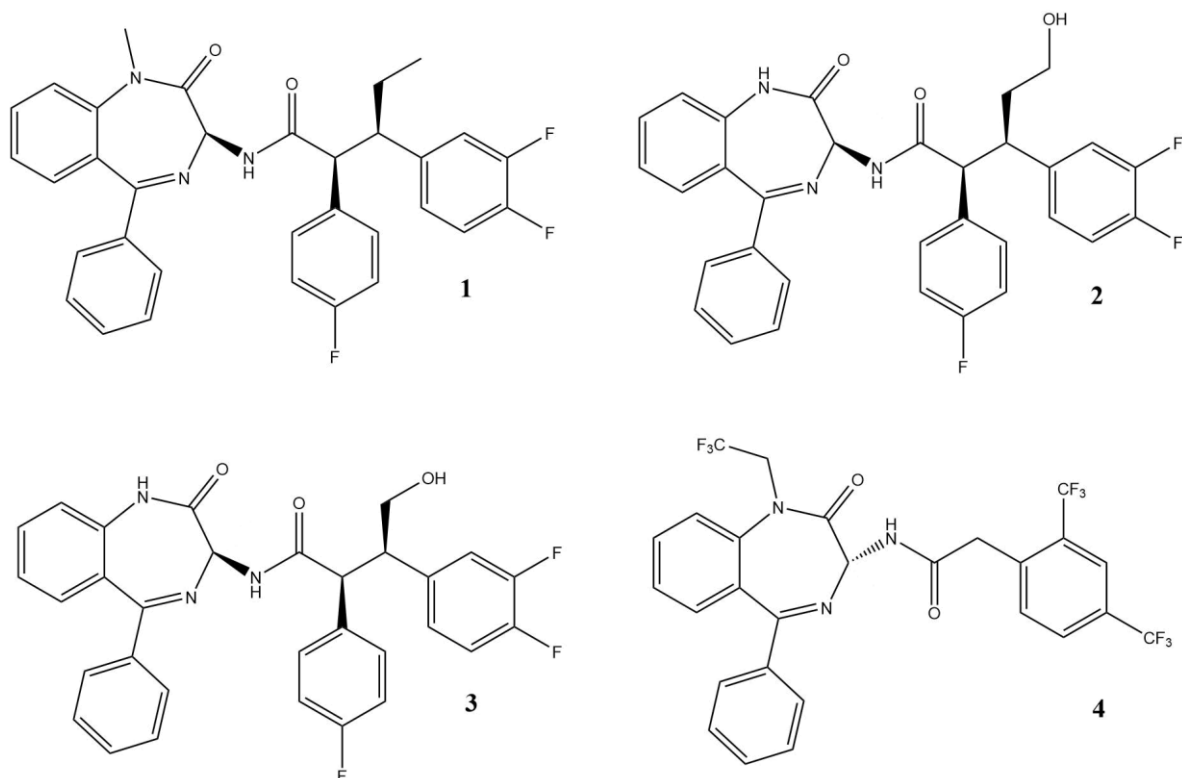
Budući da su ti spojevi kiralni i konfiguracijski nestabilni, u pripravi se moraju uzeti u obzir efekti racemizacije i enantiomerizacije. Racemizacija se također koristi pri pretvorbi neželjenih enantiomera, u procesu kristalizacijom inducirane asimetrične transformacije, a asimetrična Ireland-Claisenova pregradnja, enantioselektivna pregradnja prokiralnih alilnih estera u karboksilne kiseline, u svrhu dobivanja čistih enantiomera. Uvedene su modifikacije, gdje je hidroboriranjem terminalne C=C veze postignuto anti-Markovnikovljevo hidratiranje u prvom slučaju, odnosno ozonolizom iste dobiven za jedan ugljik kraći alkohol u drugom.

§ 1. UVOD

Derivati 1,4-benzodiazepin-2-ona supstituiranog na položaju 3 intenzivno se ispituju kao strukturna osnovica za razvoj lijekova, zbog svojstva da male promjene u strukturi uzrokuju mnogo različitih utjecaja na organizam.¹

U ovom radu obraditi će se derivati 3-amino-1,4-benzodiazepin-2-ona, njihov razvoj, biološka aktivnost, te načini sinteze. Istaknuti će se najvažniji postupci pri sintezi, kristalizacijom inducirana asimetrična transformacija, asimetrična Ireland-Claisen pregradnja i hidroboriranje, te sporedne reakcije, kao što je Polonovski reakcija. Opisati će se njihov razvoj od otkrića do spojeva veće biološke aktivnosti, izražene kao koncentracija pri kojoj je inhibirano 50% proteina (IC_{50}).

Na slici 1 prikazane su strukture četiri spoja, odabrana kao primjeri s najvećom biološkom aktivnošću. Prva tri spoja su inhibitori γ -sekretaze, potencijalni lijekovi za tretman Alzheimerove bolesti, dok je četvrti inhibitor kalijevog kanala srčanog miokarda, potencijalni antiaritmik.



Slika 1. Strukture odabranih derivata 3-amino-1,4-benzodiazepin-2-ona

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Djelovanje derivata 3-amino-1,4-benzodiazepin-2-ona kao inhibitora γ -sekretaze

γ -Sekretaza je membranski enzimski kompleks koji sudjeluje u razgradnji niza proteina, između ostalog i prekursora proteina amiloid- β (APP). APP se prvo cijepa blizu C-kraja pomoću drugog enzima, β -sekretaze. Nastali fragment C-kraja dalje cijepa γ -sekretaza; veže N-kraj na jednu od svojih podjedinica i prenosi ga u aktivno mjesto, koje omogućava hidrolitičko cijepanje unutar hidrofobnog okruženja membrane. Zbog prilagodljivosti aktivnog mjesta, fragment C-kraja se može pocijepati na više načina pri čemu nastaju β -amiloidne strukture, kratki peptidi dužine 38-42 aminokiseline.

Nakupljanje i oligomerizacija ovih peptida dovode do nastanka amiloidnih plakova u mozgu, koji su neurotoksični i dovode do smrti živčanih stanica, te konačno Alzheimerove bolesti. To je progresivni neurodegenerativni poremećaj koji dovodi do demencije, odnosno slabljenja kognitivnih funkcija kao što su pamćenje i razmišljanje. Ozbiljnost Alzheimerove bolesti se može predočiti činjenicom da ona uzrokuje 60-70% slučajeva demencije, što govori o potrebi da se ona efektivnije tretira ili čak i izliječi.

U svrhu postizanja tog cilja razvijaju se novi lijekovi, kojima je mjesto djelovanja upravo γ -sekretaza. Postoje dvije vrste spojeva prema načinu djelovanja, a to su inhibitori i modulatori γ -sekretaze. Inhibitori se vežu na katalitičku podjedinicu te time potpuno sprječavaju njenu aktivnost, pa tako i proizvodnju β -amiloida. No, budući da enzim cijepa i druge, funkcionalne proteine, to nije poželjno. Za razliku od toga, modulatori aktivnosti selektivno inhibiraju nastanak peptida od 42 aminokiseline i potiču nastanak manje toksičnih peptida od 38 aminokiselina. Način vezanja nije sa sigurnošću određen, kako je pokazalo više studija koji pokazuju različite rezultate, ali je moguće da se veže na sami supstrat ili na kompleks enzim-supstrat, ovisno o prisutnim supstituentima.

Spojevi koji pokazuju ovakvu aktivnost imaju strukturnu karakteristiku karboksilne kiseline sa nepolarnim aromatskim supstituentima, a ovdje obrađeni derivati 3-amino-1,4-benzodiazepina posjeduju upravo takvu, aromatski supstituiranu karboksilnu kiselinu, amidno vezanu na također aromatsku benzodiazepinsku jezgru.^{1,2}

2.2. Konfiguracijska stabilnost

Zbog kiralne prirode komponenata bioloških sustava, odnosno kiralnosti molekula otopljenih u staničnim tekućinama, ili sadržanim u staničnim strukturama, spojevi koji se koriste kao lijekovi također moraju biti kiralni kako bi sa njima mogli stupiti u interakciju. No, kiralna sredina također može u interakciji s drugim kiralnim spojevima utjecati na njihovu konfiguraciju, u slučaju da je njihova konfiguracijska stabilnost slaba. Tada dolazi do lagane pretvorbe enantiomera, a posljedica su procesi racemizacije odnosno enantiomerizacije.

Racemizacija je proces nastanka racemične smjese, odnosno smjese jednakih udjela enantiomera, iz čistog enantiomera. Pri razvoju lijekova se zbog potencijalno štetnog utjecaja drugih enantiomera mora ispitati mogućnost njihovog nastanka u interakciji s organizmom. U tu svrhu koriste se polarimetrija te plinska i tekućinska kromatografija sa kiralnim stacionarnim fazama.

Enantiomerizacija je proces međupretvorbe enantiomera u racemičnoj smjesi, koji također treba uzeti u obzir. Budući da u kiralnoj sredini enantiomeri imaju drugačija kemijska svojstva, brzine pretvorbe za pojedini enantiomer su također drugačije, zbog čega smjesa s vremenom više nije racemična. Kod lijekova se može pokazati da: 1) oba enantiomera imaju poželjno djelovanje, 2) samo jedan enantiomer je poželjan, a drugi ili neaktivan ili štetan, ili 3) samostalni enantiomer je štetniji od racemata. Zbog toga se provode kinetička ispitivanja, također pomoću kromatografije sa kiralnim stacionarnim fazama.

Derivati 3-amino-1,4-benzodiazepina, kao što su ovdje razmatrani spojevi posjeduju kiralni centar slabe konfiguracijske stabilnosti zbog čega podliježu i enantiomerizaciji i racemizaciji, no upravo se racemizacija koristi pri njihovoj sintezi, kao i kod drugih kiralnih lijekova, za pretvorbu neželjenih enantiomera međuprodukata u one poželjne.^{1,3}

2.3. Kristalizacijom inducirana asimetrična transformacija i sinteza (S)-N(1)-metilbenzodiazepinske jezgre

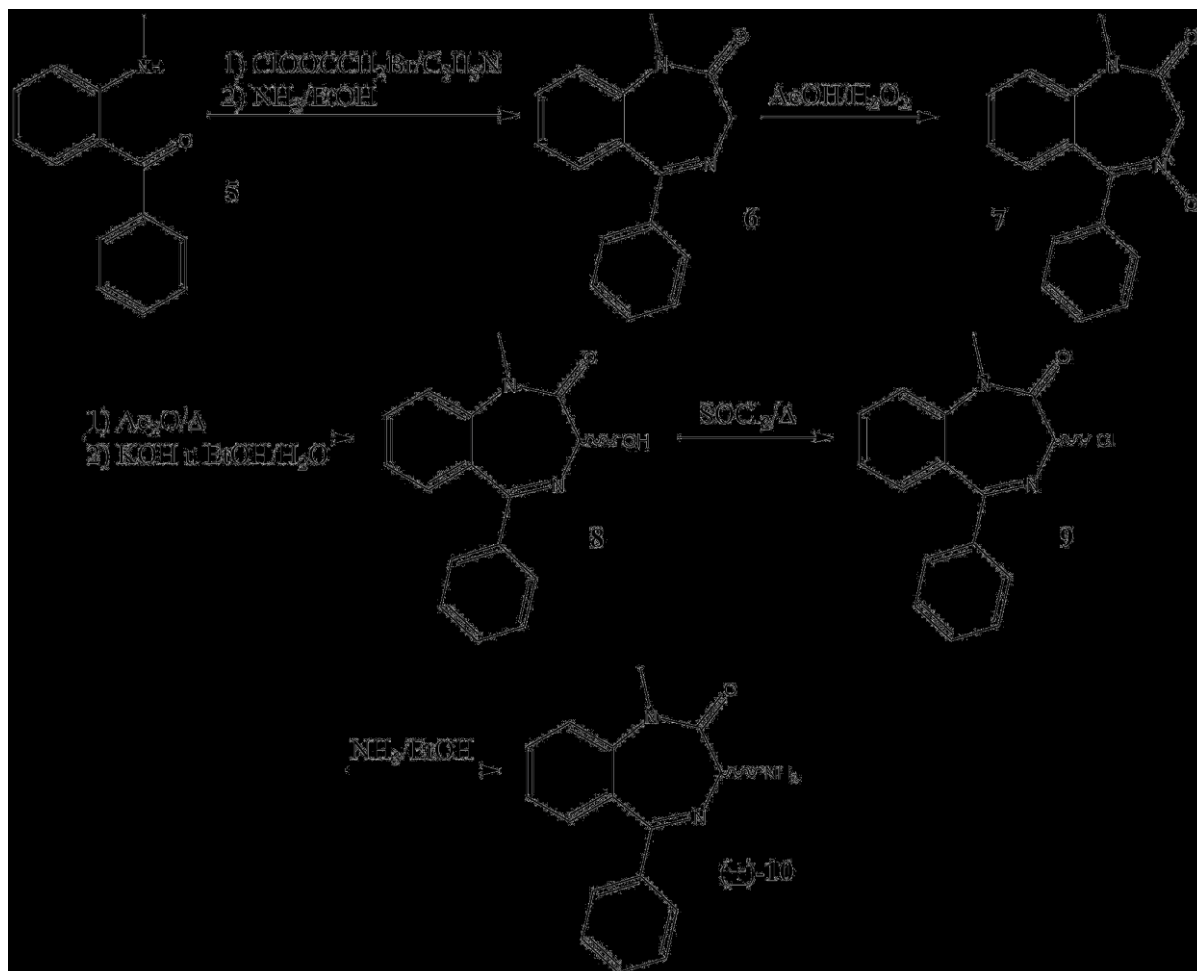
Navedena slaba konfiguracijska stabilnost promatranih spojeva pojavljuje se upravo na supstituiranom C(3) atomu, a omogućava sintezu optički čistog (3S)-10 iz racemične smjese. Racemični spoj 10 je prvi sintetizirao S. C. Bell et al., kao član Hoffman-La Roche tima pod vodstvom Sternbacha, koji je 1960-ih godina započeo istraživanja sinteze i bioloških utjecaja 1,4-benzodiazepina.¹ Otkriveni su 1950-ih, dok je tim radio na sintezi novih sredstava za

smirenje. Kako procesi koji se događaju u mozgu nisu bili poznati, nije bilo moguće razviti valjanu hipotezu strukture, pa se problemu pristupilo empirijski, sintezom potpuno nove klase spojeva. Kriteriji koje su spojevi nove klase trebali ispunjavati bili su slijedeći: 1) biti relativno neistraženi, 2) prekursori trebaju biti komercijalno dostupni, 3) treba postojati mogućnost mnogobrojnih modifikacija, 4) strukturno moraju upućivati na moguću biološku aktivnost.

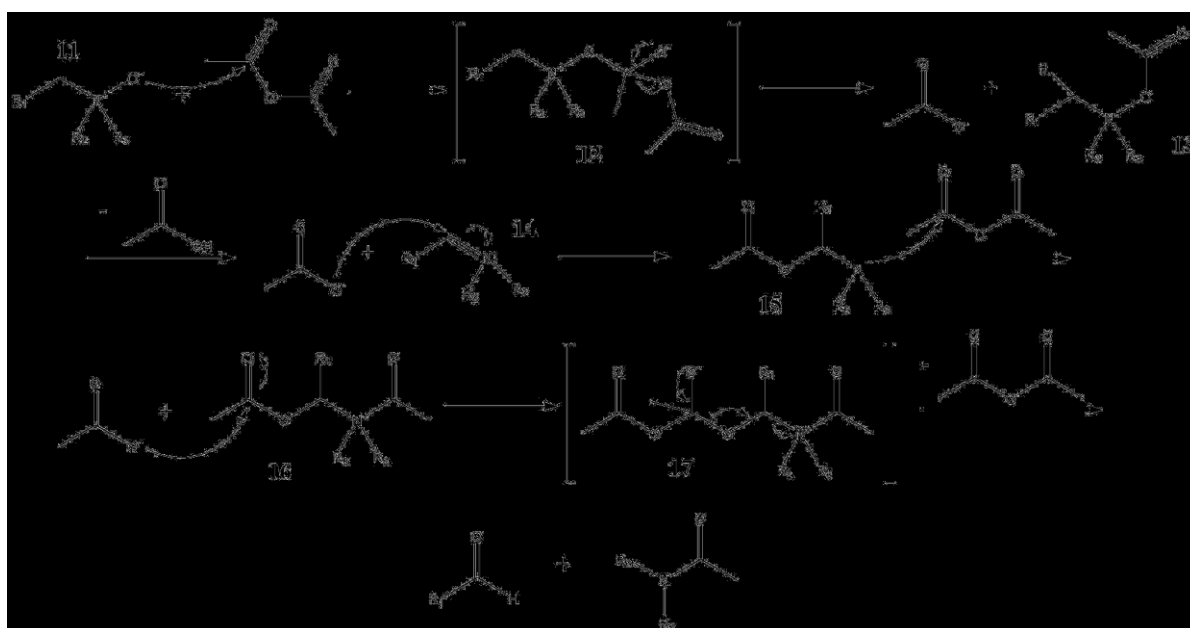
Vrsta spojeva koja je ispunjavala sve kriterije su bili benzheptoksdiazini, koje se trebalo moći lako sintetizirati iz 2-(metilamino)fenil-fenilmetanona. Međutim, pokazalo se da umjesto očekivanih benzheptoksdiazina, u reakciji nastaju kvinazolin-3-oksidi, koji su zbog zanimljive strukture, te lakoće nastanka i modifikacije postali nova ciljna klasa. Tijekom modifikacija ovih spojeva uočena su biološka svojstva produkta reakcije sa metilaminom, za koji se pokazalo da je 2-amino-1,4-benzodiazepin-4-oksid. Razvojem farmaceutski prihvatljivog oblika, koji nije gorak, higroskopan i nestabilan, uočeno je da na položaju 2 dolazi do kisele hidrolize, pri čemu nastaje keto skupina, a nastali spoj ima jednaku biološku aktivnost. Dalje je uklonjen N-oksidni ion, čime je biološka aktivnost lagano povećana. Time je dobiven prvi 1,4-benzodiazepin-2-on. Postupci dobivanja su dalje optimizirani, a daljnjim modifikacijama je dobiven 3-amino-1,4-benzodiazepin-2-on,⁴ jezgra ovdje obrađivanih spojeva.

Bellova sinteza spoja **10**, prikazana na slici 2, sastoji se od ciklizacije 2-(metilamino)fenil-fenilmetanona **5** sa bromacetil-kloridom, i uvođenja amino skupine. Ciklizacija se odvija u 2 koraka: u prvom se klor iz bromacetil-klorida supstituira sa amino skupinom polaznog spoja, pri čemu nastaje amid, a u drugom se brom dodatkom amonijaka zamjenjuje sa amino skupinom, kako bi njenom reakcijom sa keto skupinom nastao ciklički imin **6**.⁵

U postupku uvođenja amino skupine treba istaknuti Polonovski reakciju, kojom se uvodi hidroksilna skupina. Polonovski reakcijom se djelovanjem derivata karboksilne kiseline terciarni amin-oksid cijepa na aldehid i acetamid. Reakcija započinje napadom oksidnog iona terciarnog amin-oksida **11** na derivat karboksilne kiseline (u ovom slučaju je to acetanhidrid) pri čemu nastaje ester **13**, uz odlazak acetatnog iona preko prijelaznog stanja **12**. Acetat odcjepljuje susjedni proton, kako bi eliminacijom drugog acetatnog iona nastao iminijev ion **14**. Acetatni ion se adira na dvostruku vezu, što omogućava napad dušika nastalog amino-estera **15** na novu molekulu acetanhidrida, pri čemu nastaje acetilamino-ester **16**, ponovno uz odlazak acetatnog iona. Njegov napad na karbonilni ugljik estera dovodi do prijelaznog stanja



Slika 2. Sinteza racemičnog derivata 3-amino-1,4-benzodiazepina 10

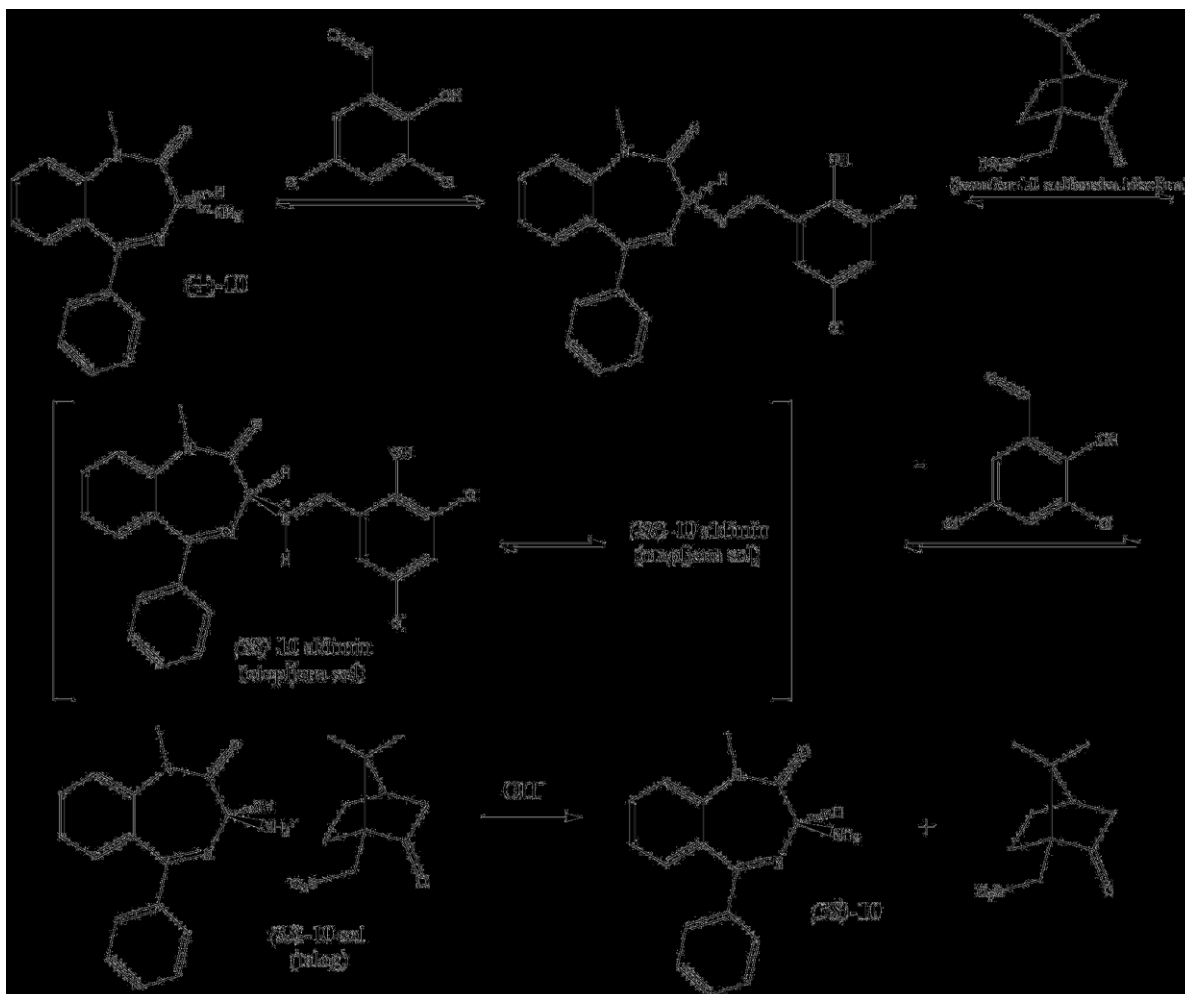


Slika 3. Mehanizam Polonovski reakcije

17, čija pregradnja uzrokuje cijepanje. Mehanizam je prikazan na slici 3.^{6a)}

Pri uvođenju hidroksilne skupine na benzodiazepinsku jezgru pokazalo se da reakcija ide samo do amino-estera **15**, odnosno 3-acetiloksi-1,4-benzodiazepin-2-ona, koji hidrolizom u bazičnoj sredini (ovdje otopinom KOH u etanolu) daje spoj **8**. Hidroksilna skupina se dalje tionil kloridom prevodi u klor, koji se supstituira sa amino skupinom djelovanjem amonijaka.⁷

Iz ovako dobivene racemične smjese dobiva se, pomoću procesa kristalizacijom inducirane asimetrične transformacije, razvijenog od strane kemičara iz Merck-a, a prikazanog na slici 4, u 100%-tnom iskorištenju željeni (3*S*)-**10**. Uočeno je da (3*R*)-enantiomer u prisutnosti kamfor-10-sulfonske kiseline spontano racemizira pri temperaturi od 90°C, ali je proces popraćen raspadom. Kako bi se omogućilo odvijanje spontane racemizacije pri blažim uvjetima, odnosno sobnoj temperaturi, dodana je katalitička količina 3,5-diklorsalicaldehida, koji sa spojem **10** daje aldimin. Njegov α-proton time postaje znatno



Slika 4. Kristalizacijom inducirana asimetrična transformacija racemičnog spoja **10** u (3*S*)-enantiomer

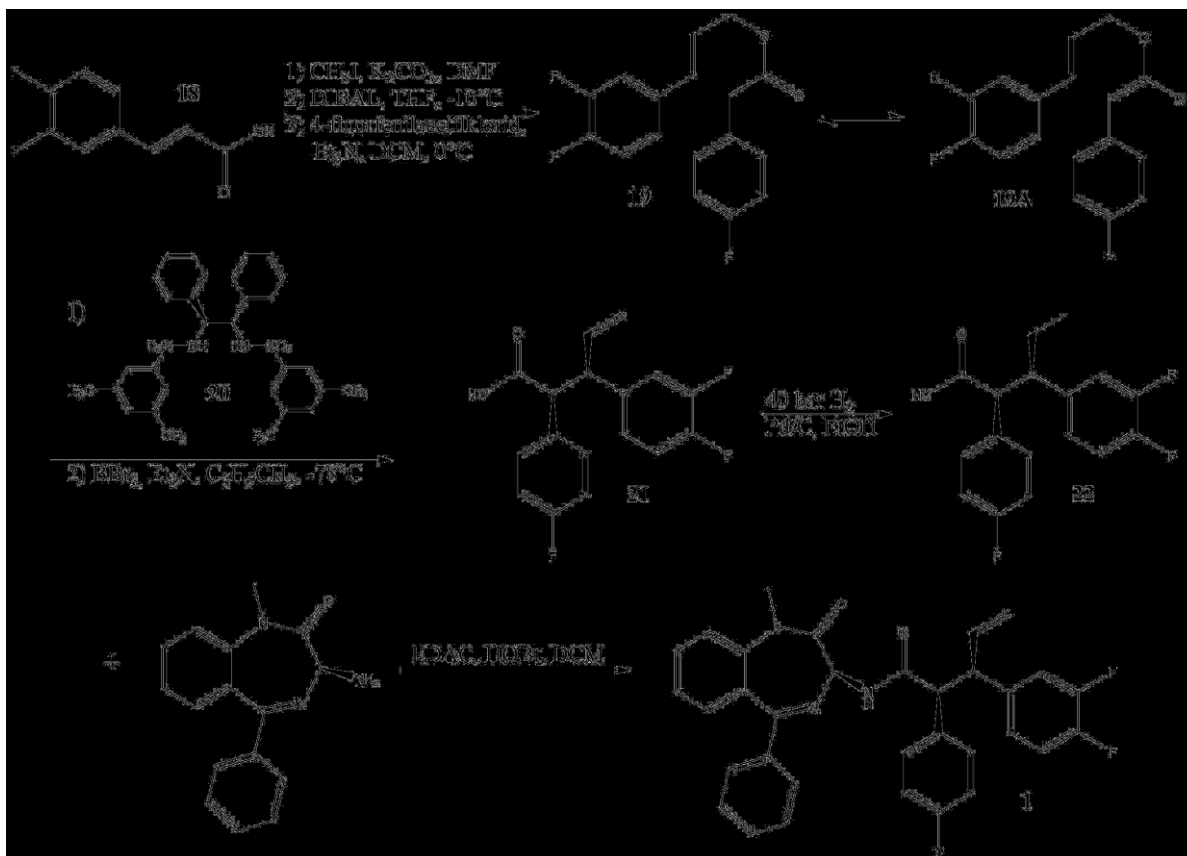
kiseliji, što omogućava lakšu racemizaciju preko karbaniona. Sol kamfor-10-sulfonske kiseline spoja **10**, pa tako i njegovog aldimina, je znatno slabije topljiva za (3*S*)-enantiomer od one (3*R*)-enantiomera, čega kristalizira i pomiče ravnotežu, što dodatno potiče racemizaciju neželjenog (3*R*)-enantiomera i potpuno taloženje u obliku željenog (3*S*)-enantiomera.⁸

2.4. Asimetrična Ireland-Claisen pregradnja

Druga strukturna jedinica spoja **1**, uz benzodiazepinsku jezgru, je 2,3-difenilpentanamidni supstituent na položaju 3. Inhibitorsku aktivnost ovakvih hidrocinaamidnih struktura otkrili su Merck-ovi kemičari, u testu gdje je 2,4-diklorfenilpropanska kiselina inhibirala γ -sekretazu pri $IC_{50} = 33 \text{ nmol dm}^{-3}$. Daljnjim razvojem potvrđena je aktivnost nepolarnih halogenidnih supstituenata, s najvećom aktivnošću za 3,4-diklorfenil ($IC_{50} = 22 \text{ nmol dm}^{-3}$), dok su polarni supstituenti i promjena duljine ugljikovodičnog lanca značajno smanjili aktivnost ($IC_{50} > 1600 \text{ nmol dm}^{-3}$, odnosno $IC_{50} > 5000 \text{ nmol dm}^{-3}$). Uvođenjem različitih supstituenata na α -položaj lanca je dobiveno povećanje za metil, najviše za (*S*)-konfiguraciju hidrocinaamidnog α -C i benzodiazepinskog C(3), za $IC_{50} = 1,9 \text{ nmol dm}^{-3}$.

U ovim ispitivanjima korištena je 5-(4-karboksamidfenil)benzodiazepinska jezgra, te su ispitivanja također provedena sa komercijalno dostupnom 5-fenilbenzodiazepinskom jezgrom, gdje je došlo do inaktivacije ($IC_{50} > 10000 \text{ nmol dm}^{-3}$). Ponovno se pokazala veća aktivnost spojeva sa nepolarnim halogenidnim supstituentima i (*S*)-konfiguracijom benzodiazepinskog C(3). Povrat aktivnosti na razinu 5-(4-karboksamidfenil)benzodiazepina uočen je tijekom ponovnog promatranja utjecaja α supstituenata, koje je pokazalo veliku aktivnost aromatskih supstituenata, s najvećom aktivnošću za (*R*)-4-fluorfenil ($IC_{50} = 15 \text{ nmol dm}^{-3}$). Gotovo potpuni povrat aktivnosti ($IC_{50} = 3,8 \text{ nmol dm}^{-3}$) postignut je zamjenom klorovih atoma 3,4-diklorfenila sa fluorovim,⁹ čime je dobivena struktura koja se od ovdje razmatrane razlikuje za 3-etil supstituent lanca.

Njegova sinteza postignuta je asimetričnom Ireland-Claisen pregradnjom, gdje se pomoću katalizatora **20**, prokiralni alilni ester **19** pericikličkom $4\pi + 2\sigma$ reakcijom prevodi u 2,3-aril-pent-4-ensku kiselinu **21** s definiranom (2*S*,3*R*)-apsolutnom konfiguracijom, uz iskorištenje od 80%. Dalje se hidrogeniranjem dvostruke veze dobiva **22**, aktivira pomoću EDAC-a i prevodi u traženi amid sa (3*S*)-**10**. Opisana sinteza do spoja **1** je prikazana na slici 5.

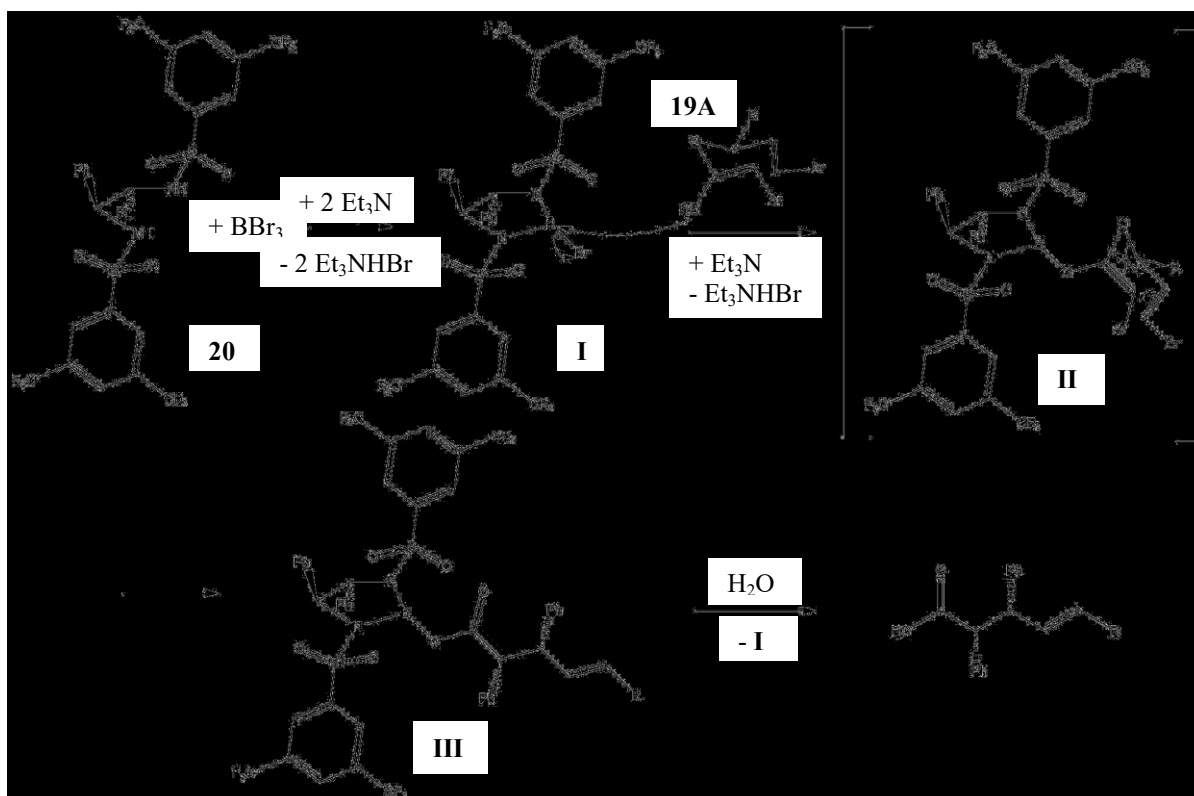


Slika 5. Sinteza spoja **1** iz benzodiazepinske jezgre i asimetričnom Ireland-Claisen pregradnjom dobivenog 3-supstituenta

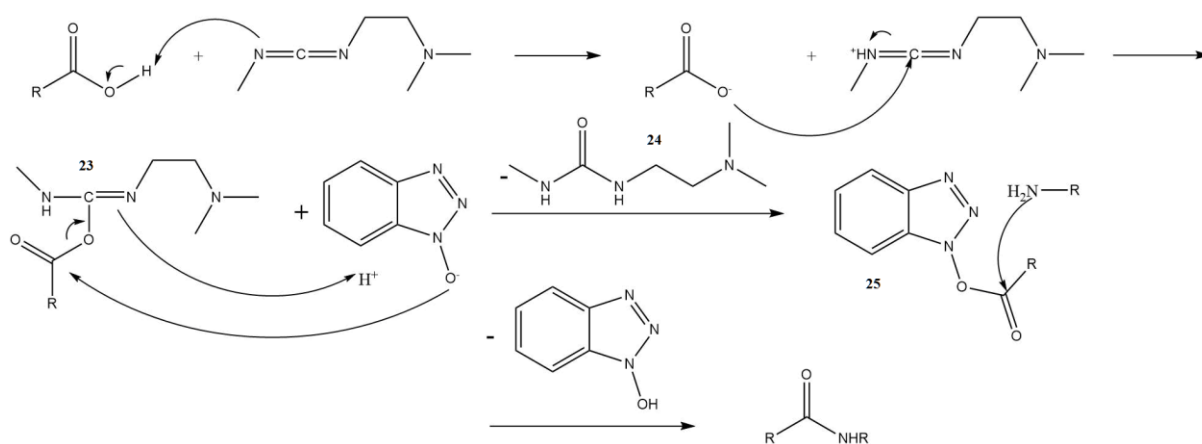
U reakciji katalizatora, kojeg je uveo Corey et al., sa BBr_3 nastaje odgovarajući supstituirani N-bromborolidin **I** (analog pirolidina), koji s enolnim oblikom estera tvori bor-enolatno prijelazno stanje **II**. Njegova preferirana geometrija, konformacija stolca, je u skladu sa dijastereoselektivnošću nastalog produkta, određenom korištenim otapalom i tercijarnim aminom. Reakcija provedena u CH_2Cl_2 uz $(i\text{-Pr})_2\text{NEt}$ daje (*E,E*)-izomer, dok u 1:2 smjesi toluen-heksan uz Et_3N daje (*E,Z*)-izomer, prema Corey-u uobičajeno u omjeru iznad 90:10 u oba slučaja, a ovdje u toluenu uz Et_3N dolazi do *E/Z* 99:1. Prijelazno stanje stabilizira enolni oblik prokiralnog estera **19A**, što omogućava pregradnju pericikličkom reakcijom, te se hidrolizom nastalog boril-estera **III** dobiva karboksilna kiselina i regenerirani katalizator. Snažna enantioselektivnost, odnosno nastanak (*2R,3R*)-**III** je u skladu s (*S,S*)-konfiguracijom *bis*-aril-sulfonamida u strukturi katalizatora. Mehanizam katalize je prikazan na slici 6.^{10,11}

EDAC, odnosno 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid, je vrlo koristan reagens za aktivaciju karboksilne skupine prilikom sinteze amida. Aktivacija se postiže nastankom O-acil izouree **23**, što daje dobru izlaznu skupinu u obliku supstituirane uree **24** te tako olakšava

napad na karbonilnu skupinu. Uz EDAC se koristi hidroksibenzotriazol (HOBt), dobar nukleofil i izlazna skupina, kako bi se spriječila samo-acilacija - prijenos acilne skupine sa kisika na susjedni dušik, što deaktivira karbonilnu skupinu. HOBt prvo napada tako aktivirani spoj, omogućavajući izlaz supstituirane uree. Željeni amid se dobiva reakcijom odgovarajućeg amina sa benzotriazol-esterom **25**, uz eliminaciju HOBt. Mehanizam je prikazan na slici 7.^{12a)}



Slika 6. Mehanizam katalize asimetrične Claisenove pregradnje alilnih estera pomoću *(S,S)*-1,2-difenil-*N,N'*-(3,5-bis(trifluormetil)benzensulfo)etan-1,2-diamina (spoj **19**)



Slika 7. Mehanizam sinteze amida aktivacijom karboksilne skupine s EDAC i HOBt

2.5. Hidroboriranje terminalne C=C veze: Anti-Markovnikovljevo hidratiranje

Pri istraživanju utjecaja supstituenata na β položaju hidrocinaamidnog lanca, uvođenje hidroksilne skupine na α -metilom supstituirani lanac pokazalo je za različite stereoizomere veliku aktivnost za (2*R*,3*R*)-izomer ($IC_{50} = 19 \text{ nmol dm}^{-3}$). Dalje su provedene derivatizacije hidroksilne skupine, te prevođenje u keton i oksim. Derivati i keton pokazali su smanjenje aktivnosti (IC_{50} u rasponu od 59 - 4750 nmol dm^{-3}), dok je prevođenjem ketona u oksim aktivnost povraćena ($IC_{50} = 35 \text{ nmol dm}^{-3}$). No, prevođenje u metil oksim inaktivira spoj, što ukazuje na značajnu ulogu β -hidroksi supstituenta. α -(4-Fluorfenil)- β -hidroksi spojevi su ponovno pokazali veliko povećanje aktivnosti, konkretno 1,2 nmol dm^{-3} za (2*R*,3*R*)-izomer, a zamjenom klorovih atoma 3-fenila sa fluorovim dodatno raste na 0,8 nmol dm^{-3} .

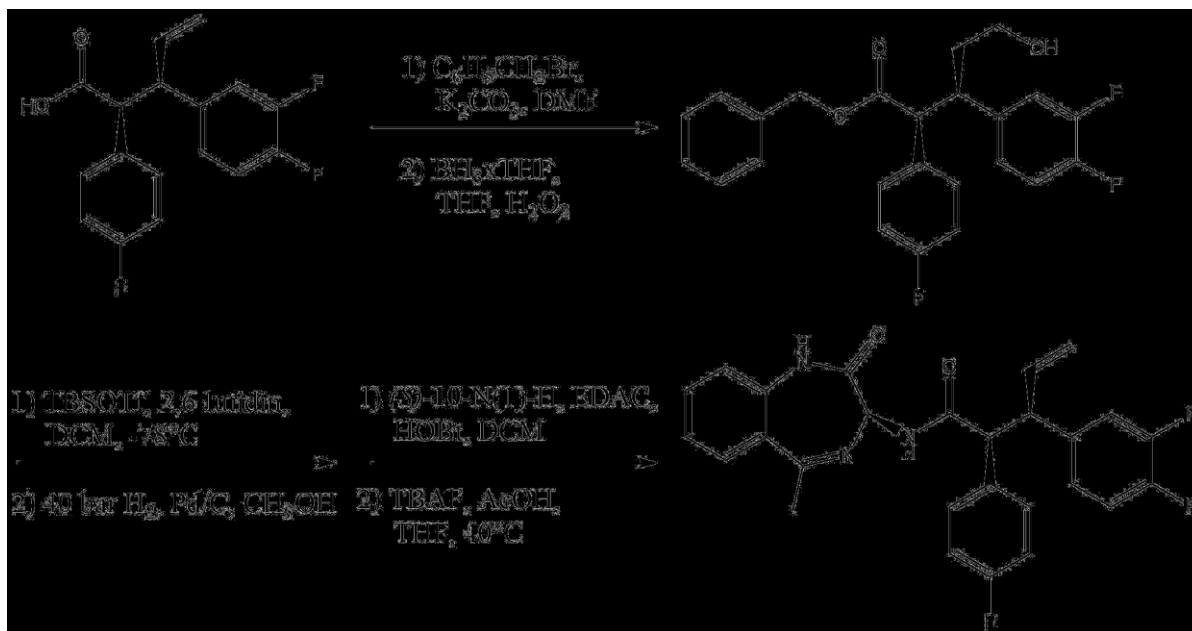
Povećanje aktivnosti prilikom prevođenja ketona u oksim ukazivalo je na pozitivan utjecaj produljenja lanca. Uvođenjem β -hidroksimetila aktivnost se očekivano povećala, na 6,9 nmol dm^{-3} uz α -metil, odnosno 0,07 nmol dm^{-3} uz α -(4-fluorfenil). Napolarni supstituenti su smanjili aktivnost (126 nmol dm^{-3} za etil, spoj **1**), kao i dodatno produljenje na 2-hidroksietil (spoj **2**, 35 nmol dm^{-3}). Sva ispitivanja provedena su sa benzodiazepinskom jezgrom **10**, no ispitivanje β -hidroksimetila sa N(1)-H-**10** jezgrom (spoj **3**) je dalo dodatno povećanje aktivnosti na 0,06 nmol dm^{-3} , odnosno približno 10^4 puta veću aktivnost u odnosu na spoj **1**.

Kako bi se dobili spojevi **2** i **3**, provedene su selektivne transformacije spoja **21**. Prvi korak u sintezi spoja **2** je anti-Markovnikovljevo hidratiranje terminalne C=C veze u spoju **21**, kao što se vidi na slici 8.¹⁰ Pri tome adicija vode teče na način da se elektronegativnija OH skupina veže na elektronegativniji terminalni ugljik, dok se proton veže na elektropozitivniji ugljik, odnosno naboji se prividno sparuju suprotno elektrostatskoj prirodi.

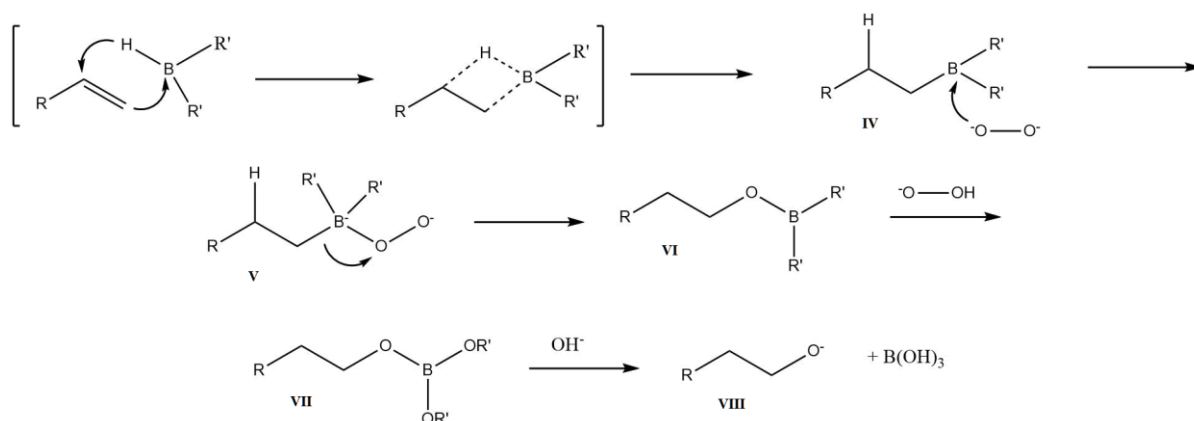
To se postiže adicijom borana iz boran-tetrahidrofurana (BH_3 -THF) na nezasićenu vezu. BH_3 -THF pokazuje svojstvo da selektivno reducira karboksilne kiseline u prisutnosti ostalih funkcionalnih skupina, pri čemu reaktivnost pada u nizu: karboksilne kiseline \geq olefini $>$ ketoni $>$ nitrili $>$ epoksidi $>$ esteri $>$ acil-kloridi. Kako bi se osigurala adicija na C=C vezu, potrebno je uvesti zaštitu karboksilne skupine u obliku manje reaktivnog benzil-estera.¹³

Proces hidroboriranja započinje *sin*-adicijom borana na terminalnu C=C vezu pri čemu nastaje alkil-boran **IV**, zatim slijedi napad peroksidnog iona i pregradnja nastalog peroksoborata do alkoksi borana **VI** i dalje do boronatnog estera **VII** analogonom Bayer-Williger reakcije, čijom se hidrolizom u bazičnom dobije primarni alkohol **VII**, prema slici 9.

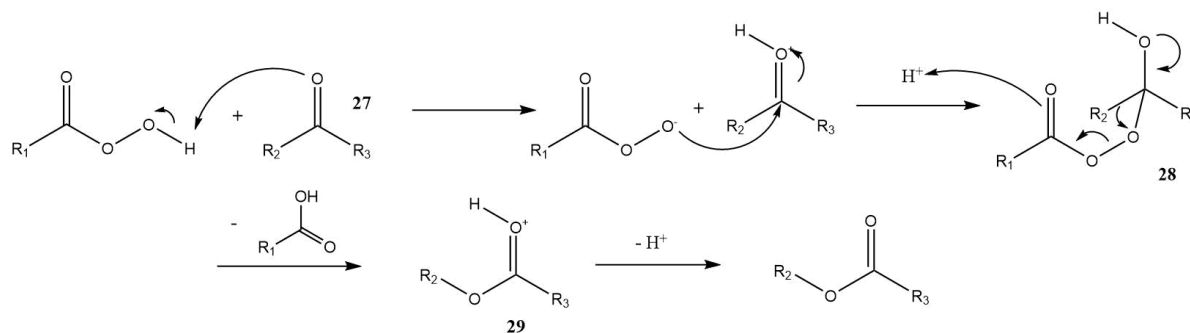
Bayer-Williger reakcijom se ketoni djelovanjem perokso-vrste, kao što su peroksidni ion ili perokso kiseline, prevode u estere. Prvi korak reakcije je aktivacija karbonilne skupine ketona **27** protoniranjem, nakon čega slijedi napad perokso vrste na karbonilni ugljik i nastanak tetraedarskog međuprodukta **28**. Međuprodukt se pregrađuje pomakom alkilne skupine na peroksidni kisik, a karbonilni kisik perokso kiseline protonira i izlazi karboksilna kiselina. Reakcija završava deprotonacijom estera **29**, a prikazana je na slici 10.^{6b)}



Slika 8. Sinteza spoja **2** iz hidroboriranjem modificirane strukturne jedinice **21** i benzodiazepinske jezgre (3S)-5-N(1)-H



Slika 9. Mehanizam hidroboriranja, anti-Markovnikovljeve adicije vode na terminalnu C=C vezu

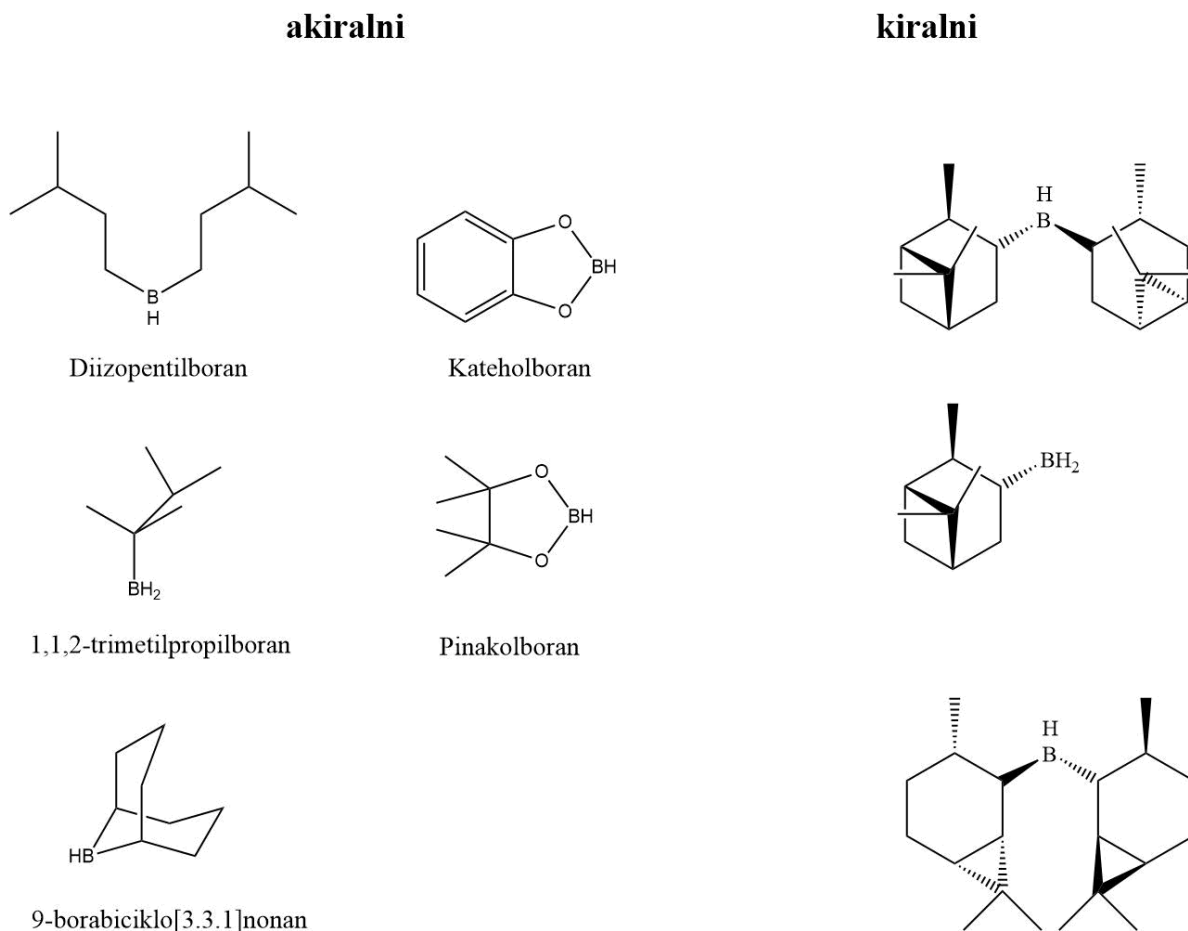


Slika 10. Mehanizam Bayer-Williger reakcije

Snaga procesa proizlazi iz nastanka primarnog alkil borana, gdje se elektropozitivni bor adira na elektronegativniji ugljikov atom, u skladu s elektrostatskom prirodom. Na prikazu energije sudionika reakcije u ovisnosti o reakcijskoj koordinati uočava se niža energija međuprodukta pri adiciji bora na primarni ugljik od onog na sekundarnom ugljiku, zbog čega je ta reakcija povoljnija, unatoč tome što je energija primarnog alkohola veća od energije sekundarnog alkohola. Drugim riječima, reakcija je kinetički kontrolirana.

Borani, kako kiralni tako i akiralni, koji se koriste pri hidroboriranju su prikazani na slici 11. Od kiralnih se mnogi mogu dobiti iz prirode, posebno iz terpena i seskviterpena, kao što su α -pinen i limonen. Upotrebljavaju se u enantioselektivnom hidroboriranju alkena gdje adicijom hidridnog iona nastaju kiralni atomi.¹

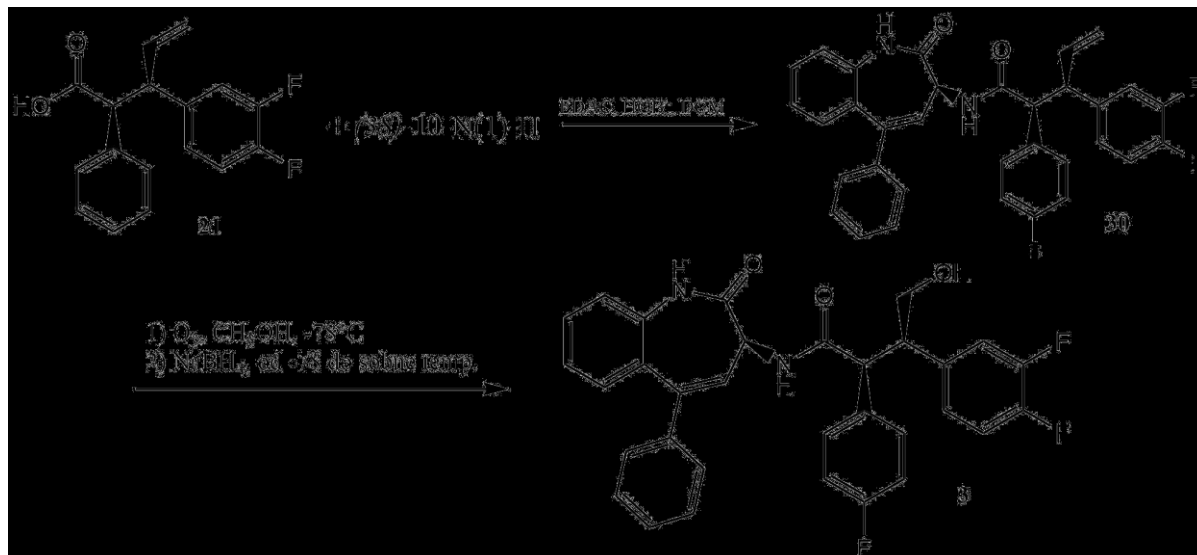
Kako bi se nastavila sinteza spoja **2**, potrebno je ukloniti estersku zaštitnu skupinu kako bi se moglo modificiranu karboksilnu kiselinu supstituirati na benzodiazepinsku jezgru, ponovno aktivacijom s EDAC/HOBt. U tu svrhu je provedena hidrogenoliza, reakcija cijepanja veze ugljik-ugljik ili ugljik-heteroatom pomoću vodika. No, uvedena hidroksilna skupina je također podložna hidrogenolizi, te ju je potrebno zaštititi. Korišten je *tert*-butildimetilsilil trifluorometansulfonat (TBSOTf) kojim je dobiven silil eter, uobičajena zaštitna skupina za alkohole. Nakon nastanka amidne veze zaštitna skupina se skida tetra-*n*-butilamonijevim fluoridom (TBAF) kao izvorom fluoridnog iona, koji napada silicij. Pri tome nastaje jaka Si-F veza, što uzrokuje cijepanje Si-O veze i nastanak alkoksidnog iona, čijim se protoniranjem sa octenom kiselinom regenerira hidroksilna skupina i dobiva spoj **2**.¹⁴



Slika 11. Borani koji se koriste pri hidroboriranju alkena

U sintezi spoja **3**, prikazanoj na slici 12, ozonolitički se skraćuje alkenski ogranak. Ozonoliza počinje 1,3-dipolarnom cikloadicijom ozona na dvostruku vezu, čime nastaje 1,2,3-trioksolan, takozvani primarni ozonid. Zbog prisutnosti dvije O-O veze ovi su spojevi nestabilni, i raspadaju se na karbonilni spoj, koji se može promatrati kao dipolarofil, i karbonil oksid, koji je 1,3-dipol. Time se reakcija raspada može smatrati reverznom 1,3-dipolarnom cikloadicijom, i naziva se 1,3-dipolarnom cikloreverzijom. Ovisno o stupnju supstitucije polaznog alkena, nastali karbonilni spoj može biti aldehid ili keton. Nastali karbonil oksid se dalje u prisutnosti metanola prevodi u hidroperoksi poluacetal, ili u prisutnosti CH_2Cl_2 ponovno podliježe cikloadiciji, dajući sa drugom molekulom karbonil oksida eksplozivne 1,2,4,5-tetroksane ako nastaje uz keton, a s aldehidom daje različite 1,2,4-trioksolane, takozvane sekundarne ozonide, koji su mnogo stabilniji budući da sadrže samo jednu O-O vezu.

U ovom slučaju na spoju **30** ozonolizom nastaje aldehidna skupina, a terminalni ugljikov atom odlazi u obliku formil oksida i prevodi se u hidroperoksi-metoksimetan pomoću metanola. Nastali aldehid se dalje reducira pomoću borhidrida kako bi se dobio primarni alkohol za jedan ugljikov atom kraći nego u spojevima **1** i **2**.^{10,12b)}



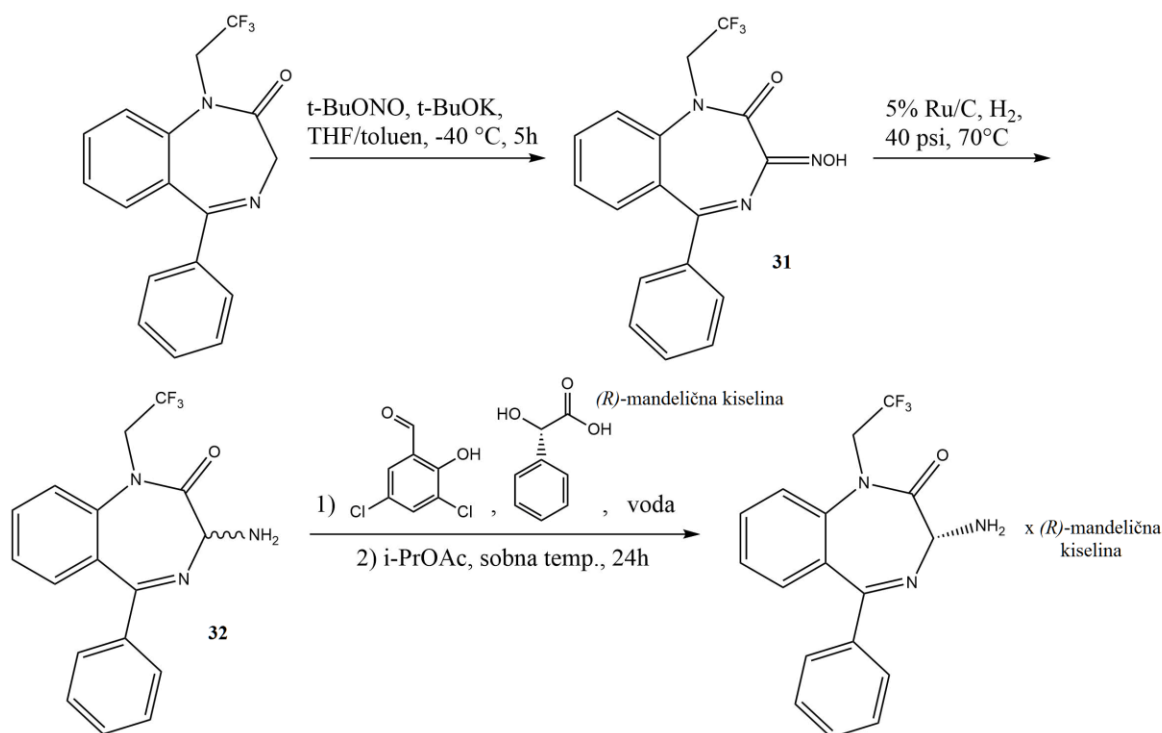
Slika 12. Sinteza spoja **3** iz karboksilne kiseline **21** i benzodiazepinske jezgre **10-N(1)-H**

2.6. Kristalizacijom inducirana asimetrična transformacija u sintezi (3*R*)-N(1)-H-benzodiazepinske jezgre

Srčani akcijski potencijal, čije su promjene odgovorne za kontrakciju srca, djeluje u 5 faza. U fazi 4 stanica miruje i membranski potencijal je najnegativniji. U fazi 0 dolazi do nagle depolarizacije, odnosno pozitivne promjene u potencijalu otvaranjem Na⁺ kanala što omogućava ulaz Na⁺. U fazi 1 zatvaraju se Na⁺ kanali, a brzim otvaranjem i zatvaranjem K⁺ kanala propušta se kratki tok K⁺ van stanice, čime membrana postaje negativnija. U fazi 2 se potencijal održava konstantnim izlazom K⁺ kroz kanal koji spoj **4** inhibira, ulazom Ca²⁺ (što dalje dovodi do kontrakcije) i Cl⁻ koji uz Ca²⁺ poništava promjenu potencijala uzrokovanu izlaskom K⁺. Ova faza je odgovorna za trajanje akcijskog potencijala, pa se inhibicijom K⁺ kanala ono produljuje. Za vrijeme trajanja akcijskog potencijala, on ne može biti ponovno iniciran, te se njegovim produljenjem, u slučaju da neka anomalija izazove nepravilne impulse, sprječava ponovna inicijacija, što onemogućava nastanak nepravilnih kontrakcija, odnosno aritmije. U fazi 3 dolazi do zatvaranja Ca²⁺ kanala, dok K⁺ kanali ostaju otvoreni, što

dovodi do toka pozitivnih iona van stanice, čime dolazi do negativne promjene u akcijskom potencijalu, odnosno nagle repolarizacije membrane, i povratka u fazu 4.¹⁵

Spoj 4 također se dobiva procesom kristalizacijom inducirane asimetrične transformacije. Za razliku od spojeva 1-3, za spoj 4 je potreban (3*R*)-5-N(1)-(2,2,2-trifluoretil), pa se sukladno tome koristi (*R*)-mandelična kiselina za taloženje traženog (*R*)-enantiomera. Daljnje razlike u procesu (slika 13) su način uvođenja amino skupine na položaj 3, te dodatak vodene otopine *iso*-propilacetata potrebne za potpuno taloženje (3*R*)-enantiomera. Amino skupina uvodi se nitrozacijom pomoću *tert*-butil nitrita, umjesto uobičajenog *iso*-pentil nitrita. Uporabom *iso*-pentil nitrita dolazi do trenutnog napada *iso*-pentiloksida na nastali oksim, što kod *tert*-butil nitrita nije moguće zbog steričkih smetnji. Nastali oksim 31 se hidrogeniranjem reducira u racemični amin 32 i provodi asimetrična transformacija.

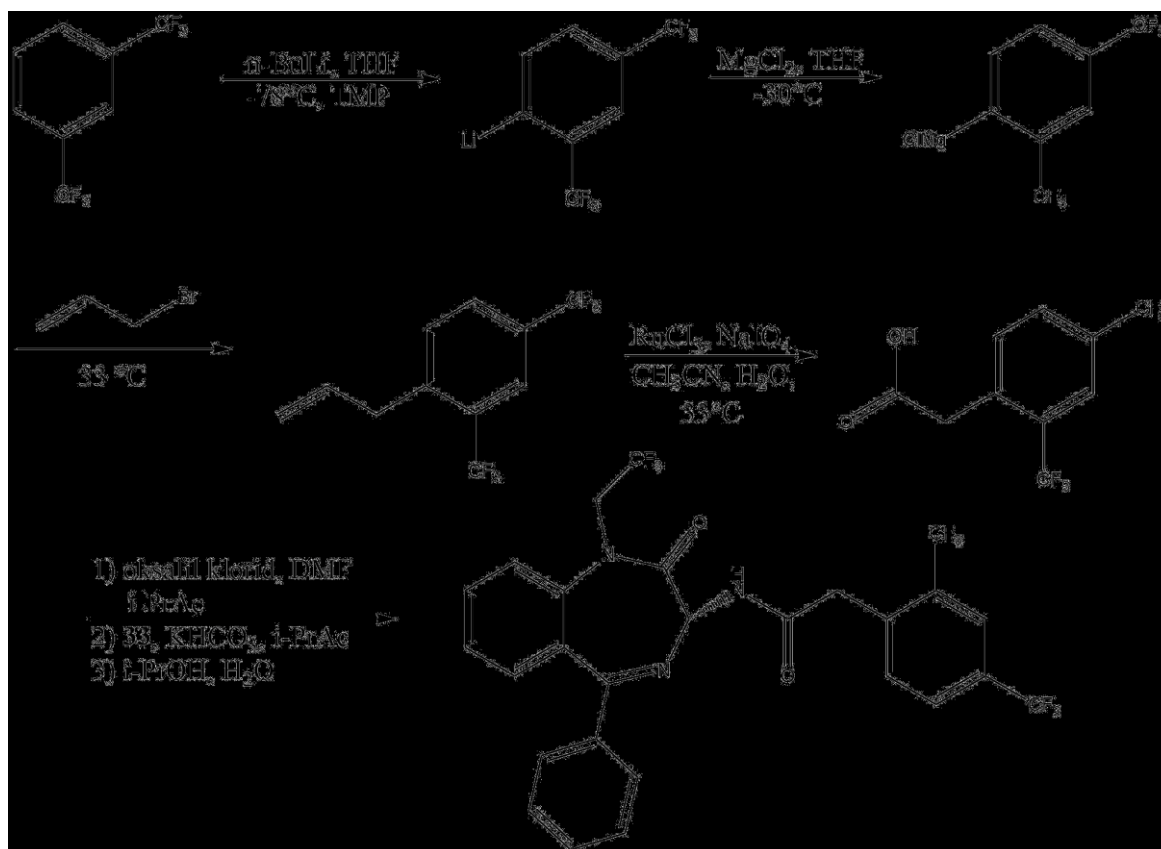


Slika 13. Sinteza benzodiazepinske jezgre (3*R*)-10-N(1)-(2,2,2-trifluoretil) spoja 4

Supstituent je 2,4-bis(trifluorometil)feniloctena kiselina, a dobiven je prema slici 14, iz 1,3-bis(trifluorometil)benzena, za razliku od izvornog načina dobivanja, u kojem se kao polazni spoj koristio 2,4-bis(trifluorometil)benzil bromid, koji je bio teško dostupan. Polazni spoj je u potpunosti preveden u aril-litij (regioselektivno, gdje je Li u *orto*-položaju) pomoću *n*-butillitija, uz prisutnost 2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TMP). Pri prvotnom dobivanju aril-litija je korišten Li-TMP, no pokazalo se da ne dolazi do potpune litiacije. Aril-litij dalje je

preveden u odgovarajući Grignardov reagens pomoću $MgCl_2$, kako bi se mogao alkilirati sa alil bromidom. Terminalna dvostruka veza oksidirana je pomoću Ru-katalizatora i $NaIO_4$ do željene karboksilne kiseline, koja je prekrystalizirana iz heksana uz iskorištenje od 35%.

Posljednji korak sinteze je povezivanje 3-amino-1,4-benzodiazepinske jezgre sa 2,4-bis(trifluormetil)fenilactenom kiselinom Schotten-Baumann reakcijom. Karboksilna skupina je aktivirana prevođenjem u odgovarajući acil-klorid pomoću oksalil-klorida, te je dodana u smjesu otopine mandelata u $KHCO_3$ i *iso*-propil-acetata. Anorganska baza omogućava napad benzodiazepinske amino skupine na aktiviranu karboksilnu kiselinu neutralizacijom korištene amonijeve soli, te nakon napada odcjepljuje preostali proton, osiguravajući ireverzibilnost reakcije. Produkt je prekrystaliziran iz *iso*-propanola uz iskorištenje od 87%.^{16,6c)}



Slika 14. Sinteza spoja 4

2.7. Zaključak

1,4-benzodiazepin-2-on i njegovi derivati, pa tako i 3-hidrocinamidni pokazuju niz bioloških aktivnosti, zbog čega se koriste kao lijekovi za razne bolesti. α,β -Supstituirana hidrocimetna kiselina sa (3*S*)-3-amino-N(1)-metil-1,4-benzodiazepin-2-onom daje spojeve koji pokazuju

inhibitorsko djelovanje prema γ -sekretazi, enzimu zaslužnom za nastanak β -amiloidnih peptida, koji oligomerizacijom u mozgu tvore plakove povezane s Alzheimerovom bolešću, zbog čega se potencijalno mogu koristiti u njenom tretmanu. Sintetizirana je asimetričnom Ireland-Claisen pregradnjom, kojom se prokiralni alilni esteri prevode u 2,3-disupstituirane nezasićene karboksilne kiseline, iz (*E*)-3-(3,4-difluorfenil)alil(4-fluorfenil)acetata. Ispitivanjem utjecaja α - i β -supstituenata je utvrđeno da najaktivniji spojevi posjeduju α -(4-fluorfenil) i β -hidroksilnu funkciju, dok polarni supstituenti na α -položaju i nepolarni supstituenti na β -položaju smanjuju aktivnost ($IC_{50} = 126 \text{ nmol dm}^{-3}$ za β -etil dobiven hidrogeniranjem dvostruke veze). Anti-Markovnikovljevim hidratiranjem dvostruke veze, postignutim hidroboriranjem, dobiven je β -(2-hidroksietil) sa $IC_{50} = 35 \text{ nmol dm}^{-3}$, a najaktivniji je β -hidroksimetil, dobiven ozonolizom dvostruke veze i hidroboriranjem nastalog aldehida, koji γ -sekretazu inhibira pri koncentraciji od $0,06 \text{ nmol dm}^{-3}$.

2-(2,4-bis(trifluormetil)fenil)octena kiselina sa (*3R*)-3-amino-N(1)-H-1,4-benzodiazepin-2-onom daje potencijalni antiaritmik, inhibitor kalijevog kanala srčanog miokarda, čime se produljuje trajanje srčanog akcijskog potencijala i sprječava njegoa ponovna inicijacija nepravilnim impulsima, odnosno nepravilna kontrakcija srca. Sintetizirana je alkilacijom 1,3-bis(trifluormetil)benzena sa alil-bromidom, preko aril-litijevog međuprodukta, te oksidacijom terminalne dvostruke veze. Dalje su karboksilne kiseline amidno vezane na pripadne benzodiazepinske jezgre, dobivene ciklizacijom 2-(metilamino)fenil-fenilmetanona u 1,4-benzodiazepin-2-on i njegovim prevođenjem u amin-oksid, kako bi se do određenog stupnja provedenom Polonovski reakcijom, kojom se tercijarni amin-oksid djelovanjem derivata karboksilne kiseline cijepa na aldehyd i acetamid, uvela hidroksilna skupina i supstituirala sa amino skupinom. Dobiveni racemični produkti se dalje prevode u željeni enantiomer procesom *kristalizacijom inducirane asimetrične transformacije*, gdje prevođenje u aldimin povećava kiselost α -protona i olakšava racemizaciju, kako bi dodatkom odgovarajuće kiseline, čija je sol slabije topljiva za željeni enantiomer, on taložio iz smjese.

Derivati 3-amino-1,4-benzodiazepin-2-ona time su vrlo korisna i zanimljiva klasa spojeva koja se zbog terapijskih svojstava široko koristi u lijekovima, i daje mnogo prostora razvoju novih lijekova za teške bolesti poput Alzheimerove, razumijevanju procesa koji ih uzrokuju, te zanimljivim sintetskim pristupima potrebnim da se postigne njihova funkcionalnost.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

- 1) V. Šunjić, M. J. Parnham, *Singposts to Chiral Drugs*, Springer Basel AG, 2011, str. 69-82.
- 2) H. Zettl, S. Weggen, P. Schneider, G. Schneider, *Trends Pharmacol. Sci.* **31** (2010) 402-410.
- 3) FDA, *Chirality* **4** (1992) 338-340.
- 4) L. H. Sternbach, *J. Med. Chem.* **22** (1979) 1-7.
- 5) L. H. Sternbach, *Angew. Chem. Int. Edit.* **10** (1971) 34-43.
- 6) Kürti L, Czako B, *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*, Elsevier Academic Press, 2005, (a) str. 356-357.; (b) str. 28-29.; (c) str. 398-399.
- 7) S. C Bell, S. J. Childress, *J. Org. Chem* **27** (1962) 1691-1695.
- 8) P. J. Reider, P. Davis, D. L. Hughes, E. J. J. Grabowski, *J. Org. Chem.* **52** (1987) 955-957.
- 9) I. Churcher, S. Williams, S. Kerrad, T. Harrison, J. L. Castro, M. S. Shearman, H. D. Lewis, E. E. Clarke, J. D. J. Wrigley, D. Beher, Y. S. Tang, W. S Liu, *J. Med. Chem* **46** (2003), 2275-2278.
- 10) I. Churcher, K. Ashton, J. W. Butcher, E. E. Clarke, T. Harrison, H. D. Lewis, A. P. Owens, M. R. Teall, S. Williams, J. D. J. Wrigley, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13** (2003) 179-183.
- 11) E. J. Corey, D.-H. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **113** (1991) 4026-4028.
- 12) R. Brückner, *Organic Mechanisms*, Springer Basel AG, 2010, (a) str. 278-282.; (b) str. 683-685.
- 13) N. M. Yoon, C. S. Pak, *J. Org. Chem.* **38** (1973), 2786-2792.
- 14) P. G. M. Wuts, T. M. Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, 2007, 189-211; 598-602.
- 15) H. G. Selnick, N. J. Liverton, J. J. Baldwin, J. W. Butcher, D. A. Claremon, J. M. Elliott, R. M. Freidinger, S. A. King, B. E. Libby, C. J. McIntyre, D. A. Pribush, D. C. Remy, G. R. Smith, A. J. Tebben, N. K. Jurkiewicz, J. J. Lynch, J. J. Salata, M. C. Sanguinetti, P. K. S. Siegl, D. E. Slaughter, K. Vyas, *J. Med. Chem.* **40** (1997), 3865-3868.
- 16) Y. J. Shi, K. M. Wells, P. J. Pye, W. B. Choi, H. R. O. Churchill, J. E. Lynch, A. Maliakal, J. W. Sager, K. Rossen, R. P. Volante, P. J. Reider, *Tetrahedron* **55** (1999) 909-918.