

AMPA antagonistá 2,3-benzodiazepinek: Metabolitok és heterociklusos származékok szintézise

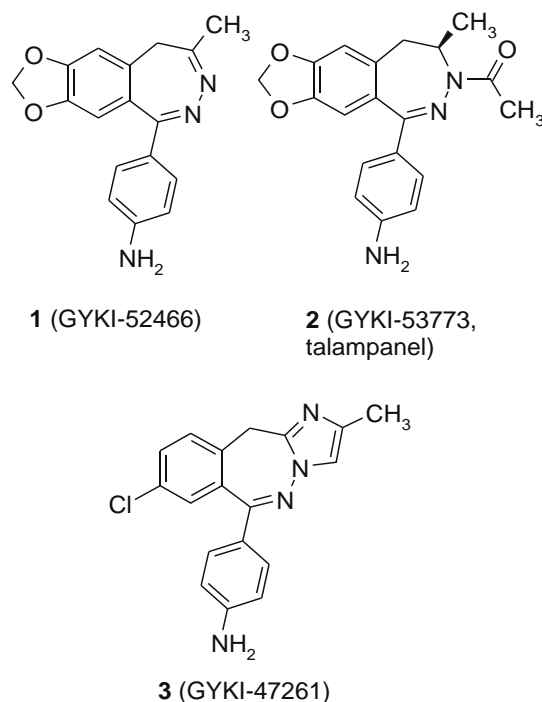
SÓLYOM Sándor*, ÁBRAHÁM Gizella, CSUZDI Emese, KERTÉSZ Máriusz és HÁMORI Tamás
 IVAX Gyógyszerkutató Intézet Kft, Berliu u. 47-49, 1045 Budapest

1. Bevezetés

A glutaminsav a legfontosabb izgató hatású idegi átvivő anyag a központi idegrendszerben. Hatását több ioncsatornához és G-fehérjéhez kapcsolódó receptor közvetíti, melyek közül az AMPA receptor által szabályozott ioncsatorna felelős a gyors szinaptikus válaszokért. (AMPA = 2-amino-3-metil-(3-hidroxi-5-metil-izoxazol-4-il)-propionsav; a receptorhoz kötött ioncsatornát e természetes, agonista hatású ligandjáról nevezték el.) Ma már közismert, hogy ez az ioncsatorna - többek között - jelentős szerepet játszik az idegsejtek fejlődésénél, változásánál (idegen szóval: plaszticitás) valamint a tanulás és memória folyamataiban. Az AMPA receptor egyes fajtáinak kóros túlműködése a sejtekbe nagy mennyiségű kalcium beáramlását okozhatja, mely sejtizgatást és neurodegenerációs folyamatokat indíthat el. Az AMPA receptor antagonisták legfontosabb terápiás felhasználási lehetőségei: görcsgátlás, epilepszia ellenes hatás, akut és krónikus neurodegenerációs betegségekben (pl. agyvérzés, Parkinson kór, Alzheimer kór, stb.) az idegsejt védelme.¹ A hatásmechanizmus azonban további alkalmazásokat is lehetővé tehet, különösen ha figyelembe vesszük, hogy e receptorok centrális és perifériás szerepe még távolról sem eléggé ismert.²

Intézetünkben a 80-as évek végén Körösi és munkatársai nyugtató hatású 2,3-benzodiazepinek vizsgálata során figyeltek fel 1 származékra, mely centrális görcsgátló hatást mutatott és a részletes vizsgálatok elsőként igazolták a nem-kompetitív AMPA antagonistá hatásmechanizmust (1. ábra). E vegyület GYKI-52466 kódszámmal azóta a terület farmakológiai standardjává vált. A nem-kompetitív hatásmechanizmus azért jelentős, mert hatását függetlenül fejtí ki az egyébként endogén körülmények között általában jelenlévő agonistától, a glutaminsavtól. Ez különféle terápiás előnyöket eredményezhet.

Hatékonyabb molekulák keresése során több jelentős hatású vegyületet találtunk, ezeket valamint a területen 2002-ig közzétett egyéb eredményeket egy összefoglaló közleményünk tartalmazza.³ A 2 képletű vegyülettel (GYKI-53773, talampanel) jelenleg előrehaladott fázis II klinikai vizsgálatok folynak, elsősorban epilepsziás betegeken. A különféle AMPA antagonistá hatású vegyületcsalád közül talán az egyik legfontosabb felismerés az volt, hogy a 2,3-benzodiazepin váz 3,4-helyzetébe kondenzált 5-tagú heterociklusos származékok körében igen jelentős hatású vegyületek fordulnak elő.³ Ezek közül pl. 3 (GYKI-47261) kevésbé a görcsgátló hatásával, mint inkább a neuroprotektív sajátosságával tűnt ki.⁴



1. Ábra. AMPA antagonistá 2,3-benzodiazepinek

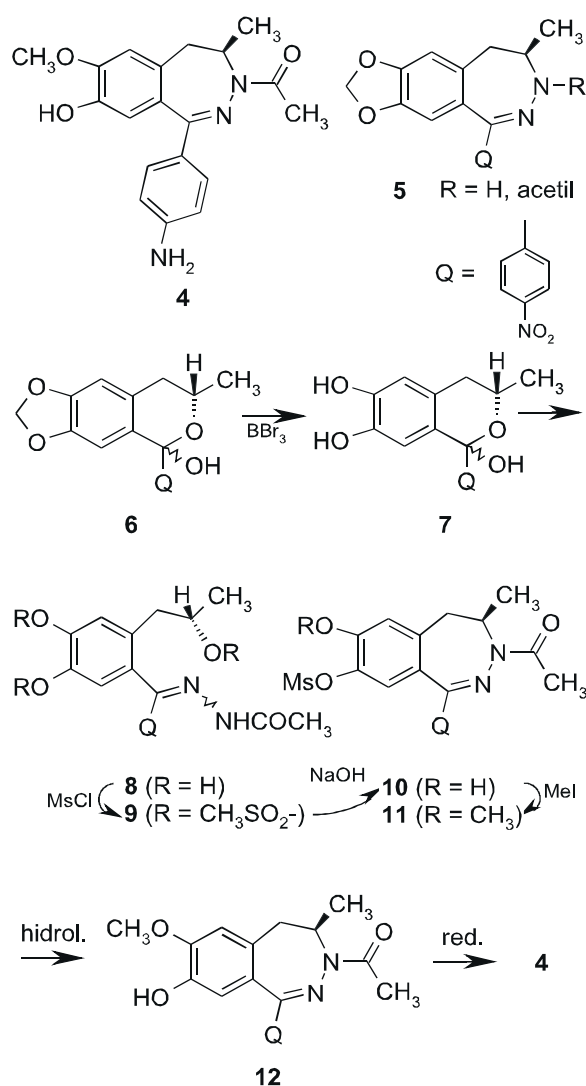
Jelen közleményben néhány kiemelt vegyület metabolitjainak előállítását, a 2,3-benzodiazepinek szintézisének néhány újabb megoldását, valamint egy új vegyületcsaláddal kapcsolatos eredményeinket mutatjuk be.

2. Néhány metabolit előállítás

4-Aminofenil-csoporttal helyettesített aktív 2,3-benzodiazepinek elsődleges metabolikus dezaktiválódási folyamatoként az aminocsoport acetileződését állapították meg.⁵ Ilyen vegyületek előállítása a kiválasztott vegyület egyszerű acetilezésével megoldható és többnyire a kutatási fázisban már erre sor kerül. A másodlagos metabolikus folyamatokban keletkező vegyületek szintézise esetenként több-kevesebb nehézségbe ütközhet. A klinikai fázisban lévő 2 vegyület humán metabolitjai között folyadék-kromatográfia-tömegspektroszkópia (HPLC-MS) vizsgálatokkal többek között 4 származékot és acetilezett analógjait mutatták ki.⁶ Ezért 4 előállítását tűztük ki célul (2. ábra).

A dioxolángyűrű felnyitására savas és bázikus módszerek jöhetnek számításba. Protikus és Lewis savas

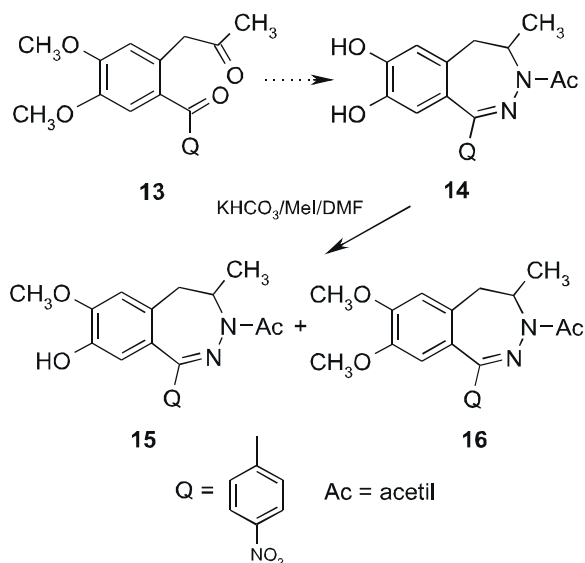
* Főszerző. Tel.: 36-1-399-3471; fax: 36-1-399-3356; e-mail: sandor.solyom@idri.hu



2. Ábra. Talampanel metabolit szintézis-vázlata

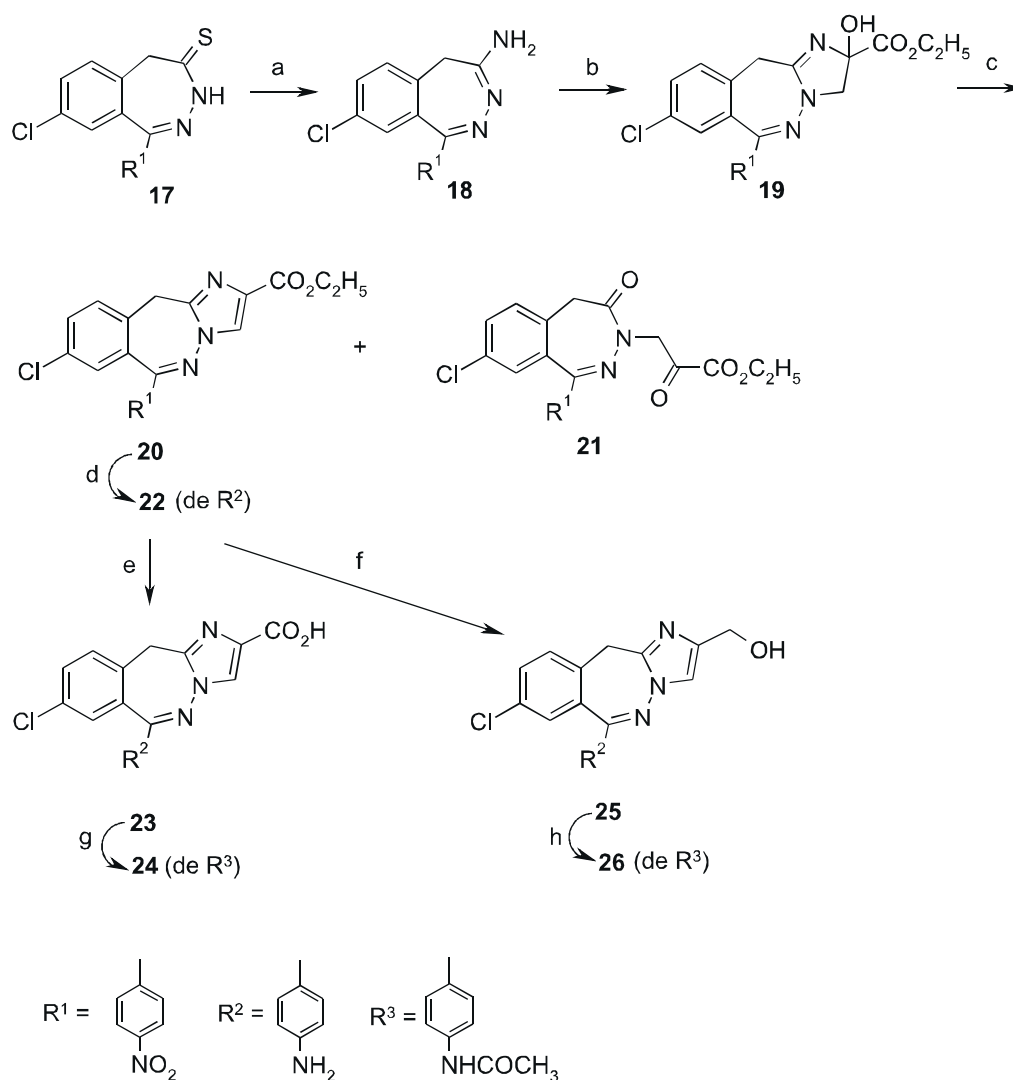
megoldások az 5H-2,3-benzodiazepin gyűrű esetén (lásd 1 gyűrűrendszerét) a vegyület elbomlásához vezetnek. Ugyanezen módszerek 1 szintézise során alkalmazott benzopiridium só típusú intermediereknél alkalmasak ugyan a benzolgyűrű fenoléter szubsztituenseinek hasítására, de mindezen eljárások elvileg sem alkalmazhatók tiszta enantiomer 4 vagy rokon szerkezet létrehozására. Ezért mindenképpen 2 szintézisének enantiomer egységes intermedierei között kellett kiindulási anyagot keresni. Ismeretes, hogy elektronszívó csoporttal helyettesített metiléndioxi-benzol származékok esetén alkáli-alkoxid anionnal dipoláros aprotikus oldószerben a dioxolángyűrű felnyitható és a megfelelő alkoxi- és hidroxicsoporthoz orto helyzetben tartalmazó benzolszármazékok keletkeznek.⁷ Sajnos a reakciókörülmények számos változtatásával sem sikerült 5 típusú vegyületekből fenolos hidroxilt tartalmazó vegyület keletkezését kimutatni. Végül a dioxolángyűrű Lewis savas hasításához tértünk vissza és a talampain (2) ismert szintézisének⁸ egy olyan intermediert használtuk kiindulási vegyületként, ahol a kiralitás centrum már optikailag aktív vegyület formájában adott, de a vegyület még nem tartalmazza a benzodiazepin gyűrűt (2. ábra). Ennek megfelelően 6 hemiketált nagy feleslegben bórtribromiddal reagáltattuk és a fenolos frakcióként izolált

termékelegyet, mely 7 sztereoizomerek elegyét valamint a megfelelő hidroxiketon nyílt láncú tautomert (az ábra nem mutatja) tartalmazza, ecetsav-hidraziddal sav katalízis mellett reagáltattuk. A kapott 8 hidrazon sztereoizomer keveréket metánszulfonil-klorid (MsCl) feleslegével mezileztük, majd a kapott háromszoros szulfonilezett terméket (9) számított mennyiségű nátrium-hidroxiddal kezeltük. A főtermékként kromatográfiásan izolált 10 esetén a mezilcsoport helyzetét ¹H-NMR-NOE mérésekkel igazoltuk. 10 Intermediert fenolos hidroxilcsoportját metiljodiddal kálium-hidrogén-karbonát jelenlétében alkileztük, majd a 8 meziloxi-csoportot hidrolizáltuk.



3. Ábra. Racém referens előállítása

Végül a nitrocsoporthoz redukciója vezetett a kívánt metabolithoz (4), melynek igen gyenge AMPA antagonist hatását csak *in vitro* vizsgálatokkal tudtuk igazolni. A kapott 4 metabolit optikai tisztaságát királis folyadékkromatográfiás úton bizonyítottuk, oly módon, hogy 13 ismert diketonból a kezdeti benzodiazepin szintézisek analógiájára,³ racém 14 dihidroxibenzodiazepin-származékot állítottuk elő, majd ezt részlegesen metileztük és így 15 monometoxi- valamint 16 dimetoxi-származékok 1:0,3 elegye keletkezett (3. ábra). A kapott keverék valamint 4 királis folyadékkromatográfiás összehasonlítása azt igazolta, hogy 4 tiszta enantiomer és a dioxolángyűrű bórtribromidos felnyitása az izokromán gyűrűben található királis centrumot nem érinti. A kondenzált gyűrűs AMPA antagonisták közül intézetünkben 3 került farmakokinetikai vizsgálatra. A már említett aminocsoport acetileződése itt is a metabolikus átalakulás egyik fő iránya,⁹ de további átalakulások is valószínűsíthetőek voltak. Ezúttal oly módon jártunk el, hogy előbb néhány potenciális metabolitot állítottunk elő kémiai szintézissel, majd ezeket hasonlítottuk össze egy *ex vivo* technikával 3 kiindulási vegyületből kapott termékeleggyel.¹⁰ A 4. ábra néhány 3 vegyületből várható potenciális metabolit szintézisét tartalmazza. A kiindulási vegyület 17 tiooxo származék,⁴ mely nyomás alatt tetrahydrofuranban ammóniával higany-klorid jelenlétében 18 képlettel jellemezhető tautomer amidrazon vegyületté alakult. Utóbbit bróm-piroszólósva etil-észterrel alkilezve egyetlen termék 19 gyűrűs vegyület keletkezett, melynek savas kezelése mintegy 2:1 arányban 20 és 21 termékekhez



4. Ábra. Reagensek és körülmények: (a) $\text{NH}_3/\text{THF}/\text{HgCl}_2$, autokláv, 70°C , 81 %; (b) bróm-piroszőlősav-etilészter, DMF, K_2CO_3 , sz.h., 65 %; (c) kat. pTsOH, EtOH/ CHCl_3 , 58 % (**20**), 28 % (**21**); (d) RaNi , $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 87 %; (e) NaOH, EtOH, reflux, 63 %; (f) LiAlH_4 , THF, 59 %; (g) Ac_2O , CH_2Cl_2 , sz.h., 79 %; (h) AcCl , piridin, sz.h., 41 %.

vezetett. (**21** Jelű nyíltláncú melléktermék keletkezése az alkilezés regioselektív lefutását is igazolja.) A **20** jelű benzodiazepin karbonsav-észter csoportjának redukciója, illetve hidrolízise, valamint ezek acilezése eredményezte a **23-26** potenciális metabolit származékokat. Az *ex vivo* metabolizmus kísérletet patkány májon történő perfúzióval végeztük.¹¹ A kapott mintát folyadékromatográfia-tömegspektroszkópiai módszerrel elemeztük. Ilyen módon **3** kiindulási vegyületen kívül **25** metilcsoporton hidroxilált származék, valamint mindkét vegyület N-acetil származéka volt azonosítható. (Hasonló, metilimidazo-csoporttal kondenzált benzodiazepin-származék metabolikus hidroxileződését mások is megfigyelték.¹²) A biológiai vizsgálatok szerint **25** csak jelentéktelen AMPA antagonistá hatással rendelkezik, így megállapítható, hogy **3** vegyületből nagy valószínűséggel nem keletkezik aktív metabolit.

3. Néhány, talampanellel (**2**) rokon vegyület előállítás

Szerkezet-hatás összefüggések tanulmányozásához **27** (2 meta-izomerje) valamint **28** előállítását céloztuk

meg (5. ábra). Utóbbi esetén tanulmányozni kívántuk az aminocsoport teljes szterikus árnyékolásának a biológiai hatására való befolyását, ugyanis EGIS kutatók leírták, hogy egyetlen orto-metil helyettesítő előnyösen módosította **2** és rokon vegyületek metabolikus dezaktiválódását és ezen keresztül a hatásidőtartamot.¹³ A kívánt vegyületek szintézisét **2** előállításának jól bevált útján kívántuk végrehajtani.⁸ (Metiléndioxi-fenil)acetone mikrobiológiai redukciójával kapott S-konfigurációjú **29** izopropanolból a megfelelő benzaldehiddel **30a,b** izokromán vegyületeket állítottuk elő. A következő, hemiketál képzési reakciót **2** szintézise során DMSO-DMF oldószer keverékben levegővel történő oxidációval hajtják végre erősen bázikus körülmények során. Ez az egyébként igen jó hozamú reakció **30a** esetén nem megy végbe, **30b**-ből pedig egy használhatatlan termékelegy képződött. Előbbi esetben nyilván a meta helyzetű nitrocsoport egy olyan elektronikusan előnytelen átmeneti állapotot eredményez, mely gátolja a benziles, kétszeresen aktivált proton leválását. Másik esetben (**30b**) viszont további reaktív benzil-helyzetű protonok ellenőrizhetetlen folyamatokat indíthatnak el. Emiatt más mechanizmust követő hemiketál képzési

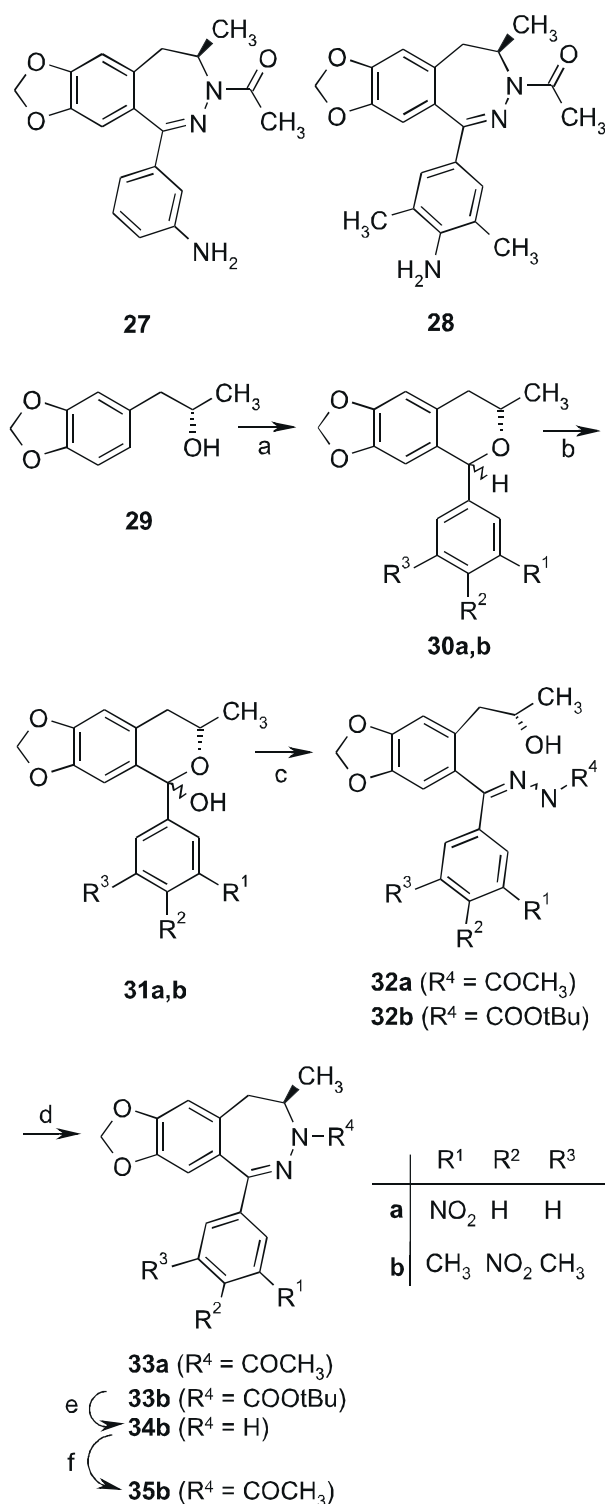
eljárást kellett kidolgozni.¹⁴ Segítségül vettük azt az ismert reakciót, mi szerint oxigén atommal szomszédos benzil helyzetű szénatomot CrO₂-dal, vagy cérium-ammónium-nitráttal illetve 2,3-diklór-5,6-diciánbenzoquinonnal (DDQ) oxidálva oxokarbénium ion keletkezhet, mely azután alkohol vagy víz jelenlétében acetállá, hemiketállá vagy laktonná alakul.¹⁵⁻¹⁷ Ennek megfelelően, amikor **30a,b** izokrománokat csekély feleslegű DDQ-val reagáltattuk diklórmetánban kevés víz jelenlétében, gyakorlatilag kvantitatív hozammal és jó tisztasággal **31a,b** hemiketál származékok keletkeztek. Utóbbiakat a megfelelő savhidraziddal savkatalízis mellett toluolban vízválasztás mellett forralva nyertük **32a,b** hidrazonokat, melyekből **2** szintézisével analóg módon⁸ állítottuk elő **33a,b** nitroszármazékokat.¹⁴ **33b** Vegyületből a könnyen hidrolizálható védőcsoport eltávolításával jutottunk a helyettesítést nem tartalmazó **34b**-hez, majd ennek acetilezésével **35b** származékhoz. Végül **33a** és **35b** nitros csoportjait redukálva állítottuk elő a szerkezet-hatás tanulmányokhoz szükséges **27,28** vegyületeket. Utóbbiak AMPA antagonistá hatást gyakorlatilag nem mutattak. A részleteket illetően a megfelelő közleményre utalunk.¹⁴

4. Heterociklussal helyettesített 2,3-benzodiazepinek

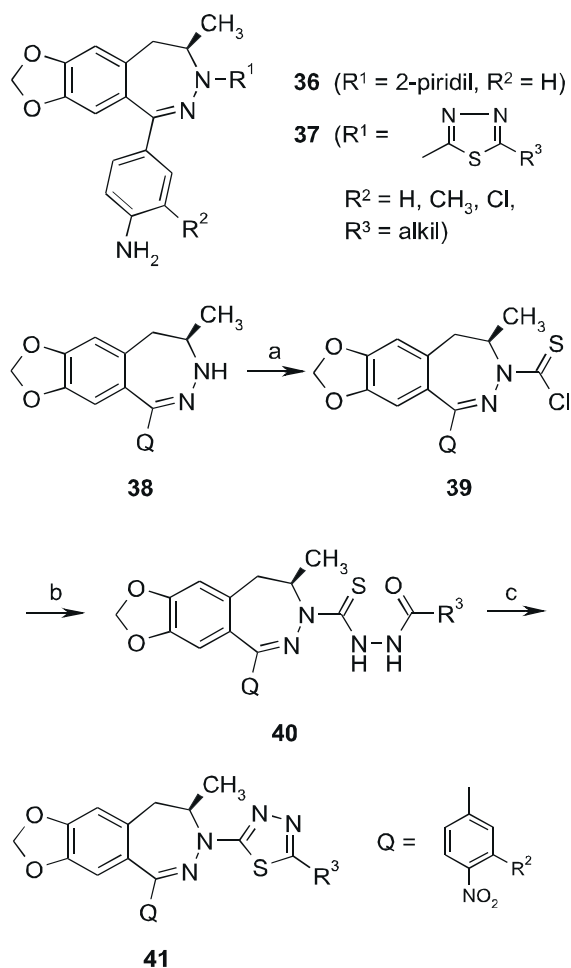
Korábbi hatásos AMPA antagonistá 2,3-benzodiazepinek jellegzetes szerkezeti elemeit figyelembe véve DISCO számítások segítségével egy 4-pontos farmakofor modellt szerkesztettünk.¹⁸ Érdekes módon két, egymástól csak egy H-híd donor kapcsolódási helynél különbséget mutató modell jött létre. Arra is felfigyeltünk, hogy az egyik modellhez tartozó vegyületek (ilyen pl. **3** és rokon származékai) körében nagyobb gyakorisággal fordulnak elő az in vitro vizsgálatokban kisebb IC₅₀ értéket mutató anyagok, mely a kötőhelyhez való nagyobb affinitásra utalhat. Ennek megfelelően flexibilis, az adott donor helyhez heteroatommal kapcsolódó, heterociklussal helyettesített 2,3-benzodiazepinek előállítását kezdtük el (6. ábra). Már az első vegyületek is igazolták, hogy hatásos vegyületek remélhetően e körben. Az időközben az Eli Lilly kutatói által publikált 36 2-piridil-származék talampanel megközelítő hatékonysága csak fokozta igyekezetünket.¹⁹ Számos, különféle 5- és 6-tagú heterociklussal helyettesített 2,3-benzodiazepint állítottunk elő.²⁰

A nagyobb biológiai aktivitás egyértelműen az 5-tagú valamint a kén- és nitrogén tartalmú heterociklusos vegyületek körében volt megfigyelhető. Kiemelkedő, a referensek (pl. **2**, **3**) hatását jelentősen meghaladó aktivitással **37** származékok (R³=1-3 szénatomszámú alkilcsoport) rendelkeztek. A jelentős szélesspektrumú görcsgátló tulajdonság mellett egyes vegyületek a humán stroke valamint a szklerózis multiplex patkány modelljeiben mutattak erős aktivitást.²⁰ A heterociklusos vegyületek előállítására számos szintézis módszert alkalmaztunk, melyek részletes ismertetésére itt nincs mód. Zömmel a szubsztituálatlan **38** típusú származékokból kiindulva építettük fel a heterociklust ismert módszerekkel. (**38** Szubsztituálatlan kiindulási vegyületeket az 5. ábrában bemutatott szintézishez hasonlóan, terc-butoxi-karbonil védőcsoport alkalmazásával készítettük el.) A 6. ábra az 1,3,4-tiadiazol-származékok egyik szintézisét mutatja be. Tiofoszfént használunk **39** tiokarbamoil-kloridok

előállítására, majd ezekkel savhidrazidot acilezünk (**40**), végül a gyűrűzárást savas közegben melegítéssel hajtjuk végre (**41**). Biológiai vizsgálatra mindenkor csak az aminofenil-származékok kerültek.



5. Ábra. Reagensok és körülmények: (a) megfelelő benzaldehydszármazékok, toluol, kat. HCl, 60°C, 63-75 %; (b) CH₂Cl₂, 5 % H₂O, DDQ, 96 %; (c) acethidrazid vagy *tert*-butil-karbazát, toluol, kat. HCl, reflux, 80-85 %; (d) 1. CH₂Cl₂, Et₃N, MsCl, 0°C; 2. EtOH, NaOH, 52-78 %; (e) HCl/etil-acetát, sz.h., 88 %; (f) CH₂Cl₂, Ac₂O, sz.h., 99 %.



6. Ábra. Reagensok és körülmények: (a) benzol, Et_3N , $CSeCl_2$, sz.h.; (b) sav-hidrazid, DMF, Et_3N , $50^\circ C$; (c) EtOH, kat. HCl, reflux.

5. Összefoglalás

Eljárást dolgoztunk ki a legfontosabb AMPA antagonisták 2,3-benzodiazepinszármazékainak fő metabolitjainak előállítására. Az optikailag aktív 2,3-benzodiazepinek szintézisét újabb szintézis módszerek bevezetésével alkalmassá tettük olyan vegyületek előállítására is, melyekre a korábbi módszer nem volt alkalmazható.

Új, heterociklussal helyettesített 2,3-benzodiazepineket állítottunk elő, melyek AMPA antagonisták hatása a korábbi referensekét meghaladta. Több fejlesztésre alkalmas vegyület került kiválasztásra.

Recent Results in Synthesis of AMPA Antagonist 2,3-Benzodiazepines

A summary of a study on the preparation of a human metabolite (4) of talampanel (2), an AMPA antagonist in Phase II clinical investigations, is disclosed. Some putative metabolites of another leading, AMPA antagonist benzodiazepine (3) were also synthesized and compared to constituents prepared by an *ex vivo* experiment with 3 in rat liver. A modified hemiketal formation reaction and the

Hivatkozások

- Parsons, G. C.; Danysz, W.; Quack, G. *Drug News Perspect.* **1988**, *11*, 523-569.
- Gitto, R.; Barreca, M. L.; De Luca, L.; Chimirri, A. *Expert Opin. Ther. Patents* **2004**, *14*, 1199-1213.
- Sólyom, S.; Tarnawa, I. *Curr. Pharm. Design* **2002**, *8*, 913-939.
- Ábrahám, G.; Sólyom, S.; Csuzdi, E.; Berzsenyi, P.; Ling, I.; Tarnawa, I.; Hámori, T.; Pallagi, I.; Horváth, K.; András, F.; Kapus, G.; Hársing, L. G. J.; Király, I.; Patthy, M.; Horváth, Gy. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 2127-2147.
- Eckstein, J. A.; Swanson, S. P. J. *Chromatogr. B. Biomed. Appl.* **1995**, *668*, 153-158.
- Nem publikált információ.
- Imakura, Y.; Okimoto, K.; Konishi, T.; Hisazumi, M.; Yamazaki, J.; Kobayashi, S.; Yamashita, S. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 1691-1696.
- Anderson, B. A.; Hansen, M. M.; Harkness, A. R.; Henry, C. L.; Vicenzi, J. T.; Zmijewski, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12358-12360.
- Migléczi, K.; Hazai, I.; Jemnitz, K.; Pátfalusi, M. *J. Planar Chrom.* **2001**, *14*, 226-271.
- Csuzdi, E.; Migléczi, K.; Hazai, I.; Berzsenyi, P.; Pallagi, I.; Horváth, Gy.; Lengyel, G.; Sólyom, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4662-4665.
- Kukan, M. *The Isolated Perfused Liver as a Tool in Drug Metabolism Studies. Handbook of Drug Metabolism*; Wolf T. F., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York **1999**.
- Elger, B.; Huth, A.; Neuhaus, R.; Ottow, E.; Schneider, H.; Seilheimer, B.; Turski, L. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4618-4627.
- Greff, Z.; Szabó, G.; Barkóczy, J.; Rátkai, Z.; Blaskó, G.; Simig, Gy.; Gigler, G.; Markó, Martonné B.; Lévay, Gy.; Tihanyi, K.; Egyed, A.; Simó, A. PCT Int. Appl. WO 01 04122; *Chem. Abstr.* **2001**, *134*, 100896a.
- Sólyom, S.; Pallagi, I.; Ábrahám, G.; Kertész, M.; Horváth, Gy.; Berzsenyi, P. *Medicinal Chemistry* **2005**, *1*, 481-485.
- Isobe, K.; Takeda, N.; Mohri, K.; Tsuda, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 3390-3392.
- Oikawa, Y.; Yoshioka, T.; Yonemitsu, O. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 889-892.
- Xu, Y.-C.; Lebeau, E.; Gillard, J. W.; Attarda, G. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *24*, 3841-3844.
- Rezessy, B.; Sólyom, S. *Lett. in Drug Design & Disc.* **2004**, *1*, 217-223.
- Anderson, B. A.; Harn, N. K.; Hansen, M. M.; Harkness, A. R.; Lodge, D.; Leander, J. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1953-1956.
- Sólyom, S.; Ábrahám, G.; Hámori, T.; Berzsenyi, P.; András, F.; Kurucz, I. U. S. Patent 6 858 605, **2005**; (PCT Int. Appl. WO 2004 069197), *Chem. Abstr.* **2004**, *141*, 174197.

application of an easily removable protecting group rendered the synthesis of 2 suitable for preparation of some types of derivatives the original procedure had not been suited for. A reference is made to another biologically active group of 2,3-benzodiazepine derivatives, substituted by 5- and 6-membered heterocycles, and the synthesis of the most active compounds is presented.