

# Čudesna molekula benzotriazol

KUI – 3/2007

Prispjelo 15. prosinca 2006.

Prihvaćeno 10. siječnja 2007.

I. Butula i B. Zorc

Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu,  
A. Kovačića 1, HR-10000 Zagreb

U ovom radu dan je pregled sintetskih organskih reakcija u kojima je upotrijebljen benzotriazol. Za razliku od većine azola, benzotriazol reagira s fosgenom u molnom omjeru 1:1 i tvori klorid 1-benzotriazolkarboksilne kiseline (BtcCl, **1**), koji spremno reagira s nukleofilima dajući reaktivne spojeve iz kojih je pripremljen cijeli niz organskih spojeva: karbamati, uree, semikarbazidi, karbazidi, sulfoniluree, sulfonilkarbazidi, esteri nitroalkanskih kiselina. Nadalje, sintetizirani su različiti heterociklički spojevi: derivati benzoksazina, kinazolina, triazintriona, hidantoina i oksadiazina. Reakcijom klorida **1** s aminokiselinama otvoren je put za primjenu benzotriazola u peptidnoj kemiji, u kojoj benzotriazolkarbonilna skupina može biti *N*-zaštitna, *N*-aktivirajuća, te istodobno *N*-zaštitna i *C*-aktivirajuća skupina. *N*-(1-benzotriazolkarbonil)-aminokiseline **25** ishodišni su spojevi za sintezu različitih derivata aminokiselina, di- i tripeptida, hidantoinskih kiselina ili hidroksiurea.

Značajna je i primjena benzotriazola u sintezi konjugata polimer-lijek i tiomer-lijek, polimernih prolijekova u kojima je ljekovita tvar povezana kovalentnom vezom na polimerni nosač. U makromolekularskom obliku ljekovita tvar je neaktivna, a postaje aktivna tek nakon oslobađanja *in vivo*. Pomoću konjugata polimer-lijek može se poboljšati isporuka lijekova i postići produljeni učinak, poboljšati topljivost, smanjiti doziranje i toksičnost ili postići ciljano djelovanje. U radu je opisano vezanje ljekovitih tvari iz različitih terapijskih skupina (većinom nesteroidni protuupalni lijekovi) na polimere poliaspartamidnog tipa benzotriazolidskom metodom.

Ključne riječi: *Benzotriazol, sinteza, klorid 1-benzotriazolkarboksilne kiseline, N-(1-benzotriazolkarbonil)-aminokiselina, konjugat polimer-lijek*

## Uvod

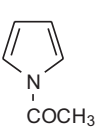
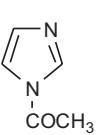
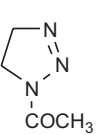
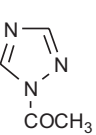
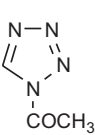
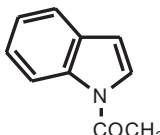
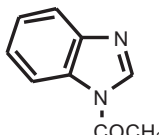
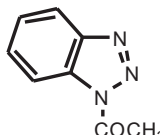
Benzotriazol spada u skupinu azola, tj. aromatskih petočlanih heterocikličkih ili benzenom kondenziranih heterocikličkih spojeva s dva i više dušikova atoma, zajedno s pirazolom, imidazolom, 1,2,3- i 1,2,4-triazolom, tetrazolom, indazolom i benzimidazolom. H. A. Staab i suradnici<sup>1</sup> su sredinom prošlog stoljeća sustavno istraživali azole te otkrili vrlo veliku reaktivnost *N*-supstituiranih azola. Ilustracije radi, navodimo poluvremena hidrolize nekih *N*-acetilazola u neutralnom vodenom mediju u usporedbi sa srodnim heterocikličkim amidima *N*-acetilpirolom, odnosno *N*-acetilindolom<sup>2</sup> (tablica 1). Dok *N*-acetilpirol i *N*-acetilindol praktički nemjerljivo polagano hidroliziraju, acetilazoli se hidroliziraju brzinom acilhalida ili anhidrida. Utvrđeno je

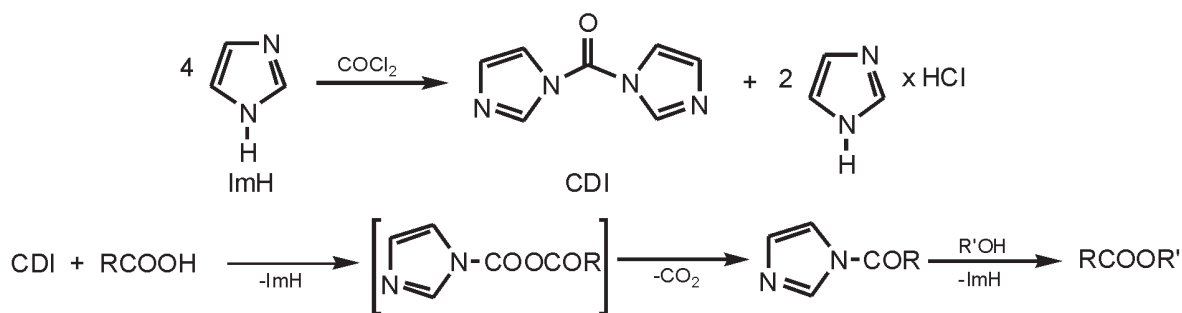
da brzina hidrolize raste s brojem dušikovitih atoma u prstenu, a u kondenziranim benzohomolozima ona je i do 20 puta manja nego u monocikličkim analogima.

Reaktivnost azolida octene kiseline ovisi o broju i rasporedu atoma dušika u azolu. Uvlačenjem elektronskog para s amidnog dušika u  $\pi$ -elektronski sustav prstena smanjuje se negativni naboj na atomu dušika, što ima kao posljedicu privlačenje elektrona iz egzocikličke veze u smjeru prstena. To se očituje u poznatoj kiselosti NH-veze kod *N*-nesupstituiranih azola i povećanju brzine nukleofilnih reakcija na karbonilnoj skupini azolida. Tu povećanu reaktivnost prati pomak karbonilne apsorpcijske vrpce u IR području prema većim valnim brojevima (tablica 1).

Tablica 1 – Brzina hidrolize *N*-acetil-azola, pirola i indola u vodi kod 25 °C i pH 7

Table 1 – Hydrolysis rate of *N*-acetyl-azoles, pyrole and indole in aqueous solution at 25 °C and pH 7

<i>N</i> -acetilni derivat <i>N</i> -acethyl derivative								
IR: $\tilde{\nu}(\text{CO})/\text{cm}^{-1}$	1732	1747	–	1765	1779	1711	1729	1735
$t_{1/2}/\text{min}$	$\rightarrow\infty$	41	26,6	6,4	<0,5	$\rightarrow\infty$	780	115



S h e m a 1 – Sinteza CDI i njegova primjena u pripravi estera RCOOR'

S c h e m e 1 – Synthesis of CDI and its use in preparation of esters RCOOR'

Staab je smatrao imidazol (ImH) najpogodnijim azolom, a njegov derivat 1,1'-karbonildiimidazol (CDI) je kao "čvrsti fosgen" našao primjenu u mnogobrojnim sintezama.<sup>1</sup> Sinteza CDI i njegova primjena u pripravi estera prikazana je na shemi 1.

Istražujući nove putove sinteza farmakološki interesantnih karbamata pronašli smo da benzotriazol, za razliku od većine azola, reagira s fosgenom u molnom omjeru 1:1 dajući klorid 1-benzotriazolkarboksilne kiseline (BtcCl, **1**).<sup>3</sup> On poput običnih kiselinskih klorida daje derivate koji pokazuju osobito reaktivna svojstva. U usporedbi s analognim derivatima imidazola racionalnije se pripremaju, stabilniji su pri rukovanju, ali su još uvijek dovoljno reaktivni za primjenu u većini sinteza. Na shemi 2 prikazana je priprava klorida **1** i njegova primjena u sintezi estera karboksilnih kiselina.

Iz klorida **1** načinjeni su različiti produkti koji su zbog prisutnosti benzotriazola u molekuli vrlo reaktivni, pa su upotrebljeni kao reaktanti u cijelom nizu reakcija. Benzotriazol ima u tim reakcijama ulogu "pomoćnika". A. R. Katritzky, koji je posebno zaslužan za razvitak kemije benzotriazola (samo u razdoblju između 1985. i 1995. godine objavio je preko 250 radova o benzotriazolu i njegovim derivatima) definirao je benzotriazol kao spoj koji ispunjava sve uvjete "sintetskog pomoćnika" (*synthetic auxiliary*): nije skup, lako se ugrađuje u početni spoj, lako se izdvaja iz reakcijske smjese kako bi se mogao ponovno upotrijebiti, stabilan je pri kemijskim operacijama i, što je najvažnije, aktivira ishodni reaktant za njegovu kemijsku pretvorbu.<sup>4</sup>

BtcCl je pripravljen zagrijavanjem benzotriazola u 20 % otopini fosgena<sup>3</sup> ili zagrijavanjem benzotriazola s trifosgenom.<sup>5</sup> Osim benzotriazola, odgovarajuće kloride 1-azolkarboksilnih kiselina (AzcCl) daju indazol, 5-nitroindazol i 5-metilbenzotriazol. Slabo kiseli azoli imidazol, 1,2,3-

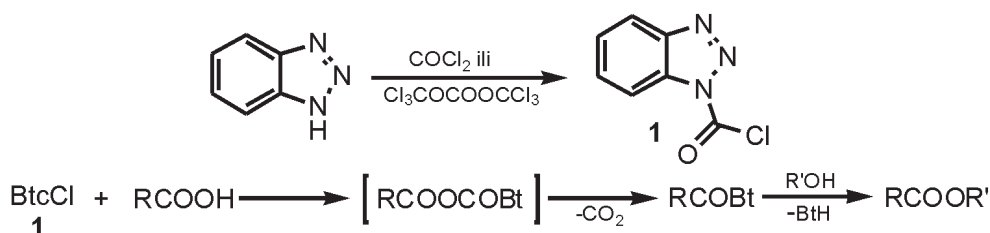
i 1,2,4-triazol i benzimidazol pod istim reakcijskim uvjetima daju smjese produkata, dok tetrazol i tetraklorbenzotriazol s  $pK_a$  vrijednošću reda octene kiseline uopće ne reagiraju (tablica 2).

T a b l i c a 2 – Priprava klorida 1-azolkarboksilnih kiselina (AzcCl) zagrijavanjem azola u 20 % otopini fosgena u toluenu

T a b l e 2 – Preparation of 1-azolecarboxylic acid chlorides (AzcCl) by heating in 20 % phosgene solution in toluene

Azol (AzH) Azole (AzH)	Kisela $pK_a$ Acidic $pK_a$	Bazična $pK_a$ Basic $pK_a$	AzcCl	$t_f/^\circ\text{C}$ m.p./ $^\circ\text{C}$	IR: $\tilde{\nu}(\text{CO})/$ $\text{cm}^{-1}$
imidazol	14,5	7,16	smjesa produkata	–	–
1,2,3-triazol	8,3	–	smjesa produkata	–	–
1,2,4-triazol	10,1	2,30	smjesa produkata	–	–
tetrazol	4,79	–	nema reakcije	–	–
benzimidazol	12,75	5,68	smjesa produkata	–	–
benzotriazol	8,57	1,6	BtcCl	54–56	17–65
indazol	13,86	1,25	IncCl	72–74	17–35
5-nitroindazol	–	–	NIncCl	144–145	17–45
5-metilbenzotriazol	8,4	–	MBtcCl	55–62	17–50
tetraklorbenzotriazol	5,48	–	nema reakcije	–	–

Azc = 1-azolkarbonil; Btc = 1-benzotriazolkarbonil; Inc = 1-indazolkarbonil; NInc = 5-nitroindazolkarbonil; MBtc = 5-metil-1-benzotriazolkarbonil



S h e m a 2 – Sinteza klorida 1-benzotriazolkarboksilne kiseline (BtcCl) i njegova primjena u pripravi estera RCOOR'

S c h e m e 2 – Synthesis of 1-benzotriazolecarboxylic acid chloride (BtcCl) and its use in preparation of esters RCOOR'

Reaktivnost derivata azola pripremljenih iz ovih klorida ispitana je brojnim reakcijama.<sup>6</sup> Ovdje prikazujemo samo vremena pretvorbe metilnih estera azolkarboksilnih kiselina (AzCO<sub>2</sub>Me) u *N*-cikloheksil-*O*-metil-karbamat kao ilustraciju utjecaja pojedinih azola na brzinu reakcija.

Tablica 3 – Vrijeme pretvorbe metil-1-azolkarboksilata (AzCO<sub>2</sub>Me) u *N*-cikloheksil-*O*-metil-karbamat u benzenu pri 80 °C

Table 3 – Conversion time of methyl 1-azolecarboxylate (AzCO<sub>2</sub>Me) to *N*-cyclohexyl-*O*-methyl carbamate in benzene at 80 °C

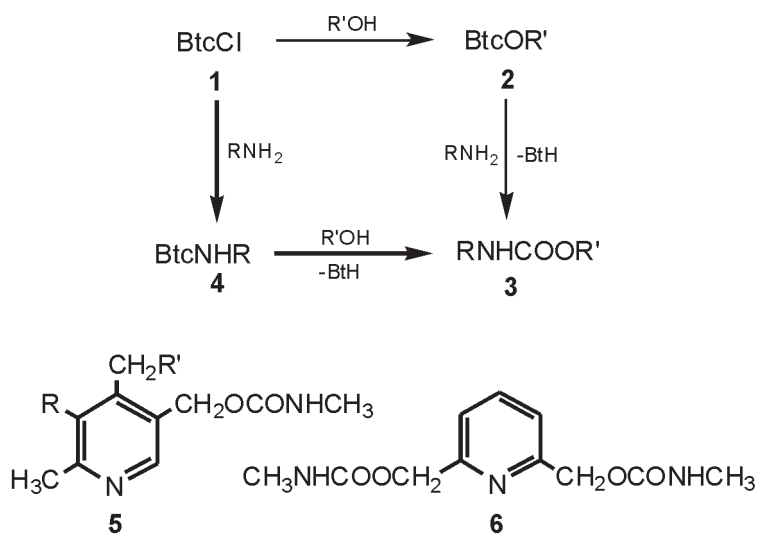
AzCO <sub>2</sub> Me + C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NH <sub>2</sub> → AzH + C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NHCOOMe		
AzCO <sub>2</sub> Me	$\tilde{\nu}(\text{CO})/\text{cm}^{-1}$	Vrijeme/h Time/h
BtcOMe	1767	<0,1
IncOMe	1734	20
NIncOMe	1440	7
MBtcOMe	1753	<0,1

Azc = 1-azolkarbonil; Btc = 1-benzotriazolkarbonil; Inc = 1-indazolkarbonil; NInc = 5-nitroindazolkarbonil; MBtc = 5-metil-1-benzotriazolkarbonil

U ovom radu dan je pregled reakcija s kloridom **1** koje su razvijene i provedene u okviru naših istraživanja.

## Sinteza karbamata

BtcCl (**1**) u reakciji s alkoholima daje različite reaktivne 1-alkoksikarbonilbenzotriazole (BtcOR, **2**), a s aminima reaktivne 1-karbamoilbenzotriazole (BtcNHR, **4**).<sup>3</sup> Karbamati **2** pokazuju veliku otpornost prema alkoholizi i hidrolizi, za razliku od alkoksikarbonilimidazola ili 1,2,3-triazola, koji s alkoholima reagiraju u estere ugljične kiseline i azol.<sup>1</sup> S aminima i srodnim nukleofilima (hidrazinom, semikarbazinom) lako reagiraju u odgovarajuće karbamate RNHCOOR' (**3**). Osim ostalog, na ovaj način sintetizirani su derivati vitamina B<sub>6</sub> (**5**) i tada aktualan antiaterosklerotik piribamat (**6**)<sup>3</sup> (shema 3).



Shema 3 – Sinteza karbamata

Scheme 3 – Synthesis of carbamates

Spojevi **5** i **6** pripremljeni su i zagrijavanjem taline odgovarajućeg hidroksipiridinskog derivata s karbamoilazolima, među kojima i s BtcNHCH<sub>3</sub> (**4a**) iznad 100 °C. Poznato je da monosupstituirani karbamoilazoli **4** podliježu aminolizi i hidrolizi mehanizmom intermolekulskog eliminacijsko/adicijskog premještanja acila uključujući u prvom stupnju nastajanje izocijanata RNCO, dok disupstituirani karbamoilazoli AzcNRR' reagiraju izravnim nukleofilnim napadom na karbonil.<sup>8</sup>

## Sinteza urea, semikarbazida, karbazida i sulfonilurea

1-Karbamoilbenzotriazoli **4** su dalje podvrgnuti reakciji s aminima i srodnim spojevima. Staab i suradnici<sup>1</sup> ispitali su karbamoilazole i utvrdili da derivati imidazola i benzimidazola, koji već kod sobne temperature disociraju u azol i izocijanat, daju *N,N'*-disupstituirane uree. Reakcijom anilida 1,2,4-triazolkarboksilne kiseline, koji ne pokazuje tendenciju disocijacije u izocijanat, nastaje 1,2,4-triazol i difenilurea. Kako anilid 1-benzotriazolkarboksilne kiseline pod istim uvjetima nije reagirao, autori su zaključili da je uzrok tome nedovoljna reaktivnost benzotriazola. Nasuprot tome, mi smo utvrdili da amidi **4** reagiraju lako s amino-spojevima ako su odabrani prikladni reakcijski uvjeti: bazičniji spojevi reagiraju već kod sobne temperature, a slabiji nukleofili kao što je anilin kod povišene temperature i produljenog vremena provođenja reakcije. Na taj su način pripravljene brojne simetrične i asimetrične uree **7**, semikarbazidi **8** i karbazidi **11**<sup>9</sup> (shema 4).

Reakcija se može provesti i bez izolacije spoja **4**, tako da se klorid **1** najprije s jednim molom amina (hidrazina) prevede u **4** (**9**), a zatim dodatkom drugog mola istog amina (hidrazina) u simetrične ili različitog amina (hidrazina) u asimetrične uree **7** (karbazide **11**).

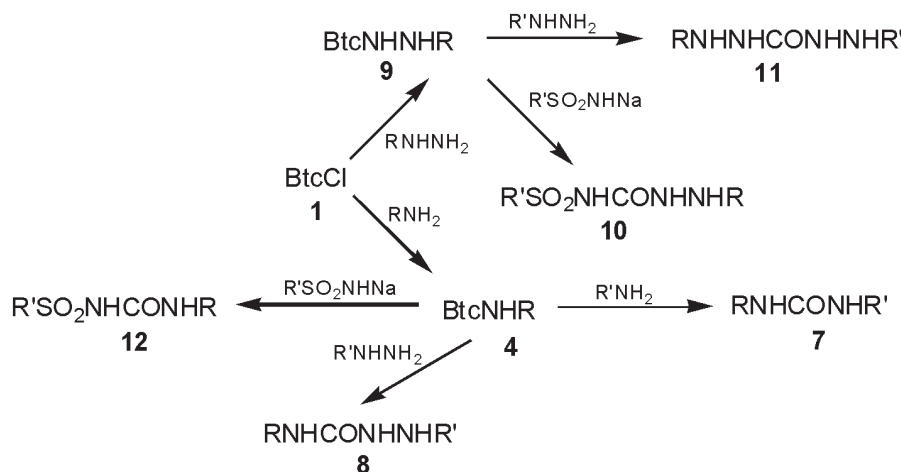
Na sličan način su s natrijevim solima sulfonamida sintetizirani sulfonilkarbazidi **10**, odnosno sulfoniluree **12**, među kojima i poznati hipoglikemici.<sup>10</sup>

## Sinteza 3,1-benzoksazin-4-ona i kinazolin-2,4-(1*H*,3*H*)-diona

Djelovanjem jednog mola BtcCl (**1**) na antranilnu kiselinu nastaje anhidrid **13** koji s drugim molom klorida **1**, vjerojatno preko nestabilnog međuprodukta **14**, prelazi u 2-(1-benzotriazolil)-3,1-benzoksazin-4-on (**15**).<sup>11</sup> Taj spoj aminolizom s dietilaminom daje 2-dietilamino-3,1-benzoksazinon-4-on (**16**), koji sa suviškom amina reagira u ureido amid **17**. Spoj **15** reagira s metilaminom preko nestabilnog benzoksazinona **18** u 3-metilkinazolin-2,4-(1*H*,3*H*)-dion (**19**).

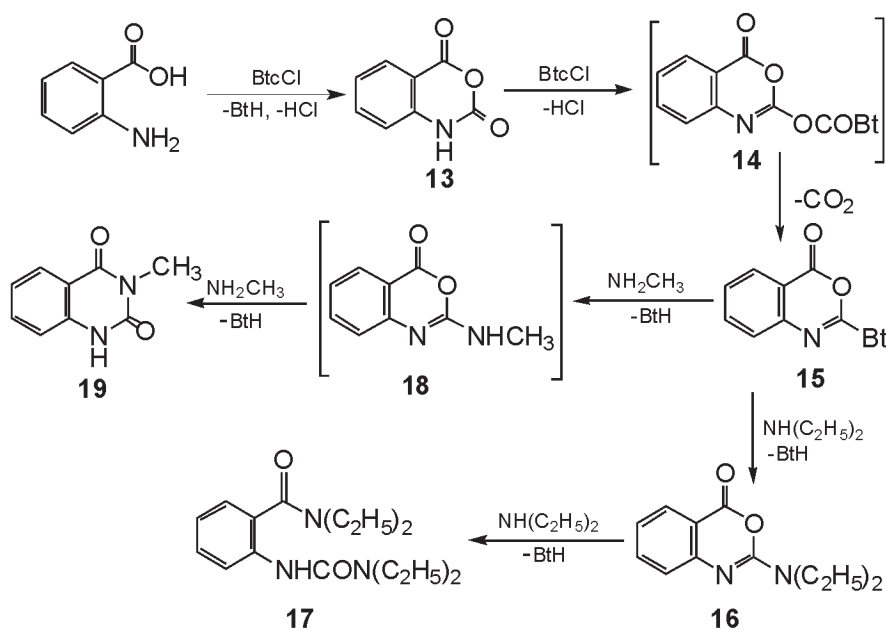
## Sinteza derivata *N*-hidroksiizocijanata

U nastavku radova na sintezi jednostavnih *N*-supstituiranih derivata ugljične kiseline namjeravalo se preko 1-benzilokskarboilbenzotriazola **4b** sintetizirati hidroksiuree kao potencijalne citostatike. BtcCl (**1**) reagirao je s *O*-benzilhidroksilaminom i dao *N*-1-benzilokskarboilbenzotriazol (**4b**). U skladu s poznatim svojstvima karbamoilbenzo-



S h e m a 4 – Sinteza urea, semikarbazida, karbazida, sulfonylurea i sulfonylsemikarbazida

S c h e m e 4 – Synthesis of ureas, semicarbazides, carbazides, sulfonylureas and sulfonylsemicarbazides



S h e m a 5 – Sinteza 3,1-benzoksazin-4-ona i kinazolin-2,4-(1H,3H)-diona

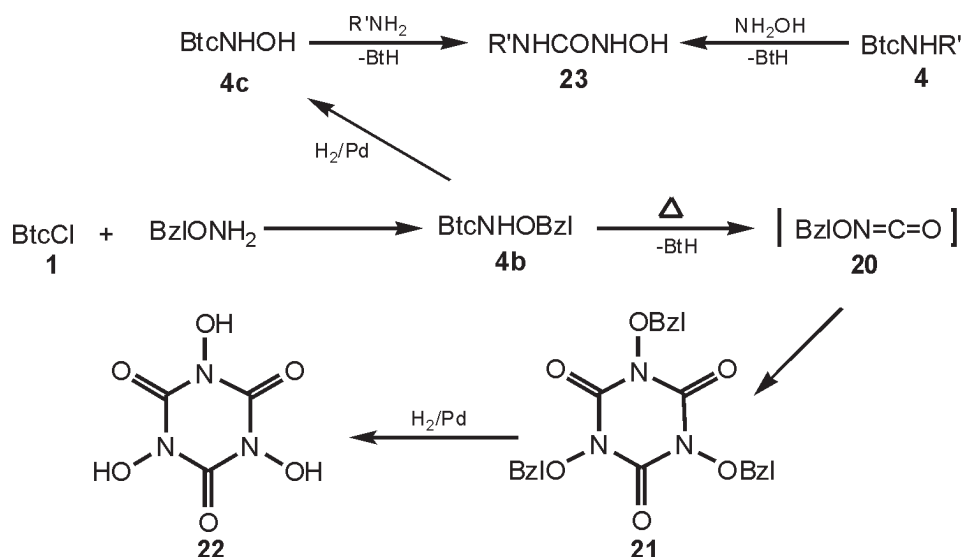
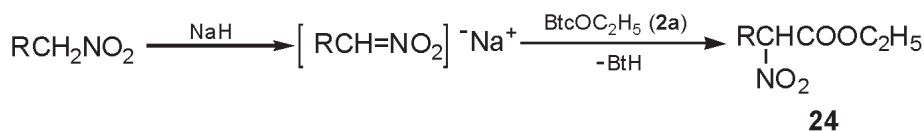
S c h e m e 5 – Synthesis of 3,1-benzoxazine-4-one derivatives and quinazolin-2,4-(1H,3H)-dione

triazola i drugih azola kao i sličnom ponašanju 1-benziloksi-karbamoilimidazola<sup>12</sup> spoj **4b** je zagrijavanjem i disocijacijom preveden u benzotriazol i *N*-benziloksiizocijanat **20** koji trimerizira u 1,3,5-tribenziloksi-1,3,5-triazin-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)trion (**21**).<sup>5</sup> Za razliku od prije opisane redukcije s natrijem u etanolu,<sup>12</sup> pri čemu nastaje cijanurna kiselina, **21** je katalitičkom hidrogenolizom na paladiju preveden u trimer dosad nepoznatog izocijanata 1,3,5-trihidroksi-1,3,5-triazin-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)trion (**22**). Hidrogenolizom spoja **4b** pod istim uvjetima dobiven je *N*-hidroksikarbamoilbenzotriazol (**4c**, R = OH), koji s aminima daje, na prije opisani način, hidroksiuree **23**. Spojevi **23** pripremljeni su i iz **4** u reakciji s hidroksilaminom, analogno postupku za pripremu urea **7**. Preliminarna analiza MS i TGA trimera **22** ukazuje na hidroksiizocijanat HONCO kao produkt razgradnje.

## Sinteza estera 2-nitroalkanskih kiselina

Esteri nitroalkanskih kiselina poznati su međuprodukti u sintezi aminokiselina, nitroalkohola, nitroamina i halonitro-spojeva.<sup>13</sup> Sintetska sposobnost C-karboksilacije jednostavnih *aci*-nitro-soli nitroalkana (nitronata)  $[\text{RCH}=\text{NO}_2]^- \text{Na}^+$  u pripravi estera 2-nitroalkanskih kiselina (**24**) mala je zbog slabe nukleofilnosti anionske specije s jakom preferencijom za *O*-karboksilaciju. Izuzetak je postignut upotrebom dilitijevog natronata  $[\text{RC}=\text{NO}_2]^{2-} 2\text{Li}^+$ , koji se lagano karboksilira različitim sredstvima za karboksilaciju.<sup>14</sup>

Uvođenjem benzotriazolnog ostatka u karboksilatnu komponentu **2a** (R = etil) povećana je reaktivnost C-karboksilne skupine toliko da je omogućena sinteza **24** s natrijevom soli *aci*-nitro-alkana.

S h e m a 6 – Sinteza derivata *N*-hidroksiizocijanataS c h e m e 6 – Synthesis of *N*-hydroxyisocyanate derivatives

S h e m a 7 – Sinteza estera nitroalkanskih kiselina

S c h e m e 7 – Synthesis of esters of nitroalkanoic acids

### Sinteza *N*-(1-benzotriazolkarbonil)-amino-kiselina, alkilamida *N*-(1-benzotriazolkarbonil)-, *N*-alkil- i *N*-hidroksikarbamoilaminokiselina, hidantoina te 1,2,5-oksadiazina

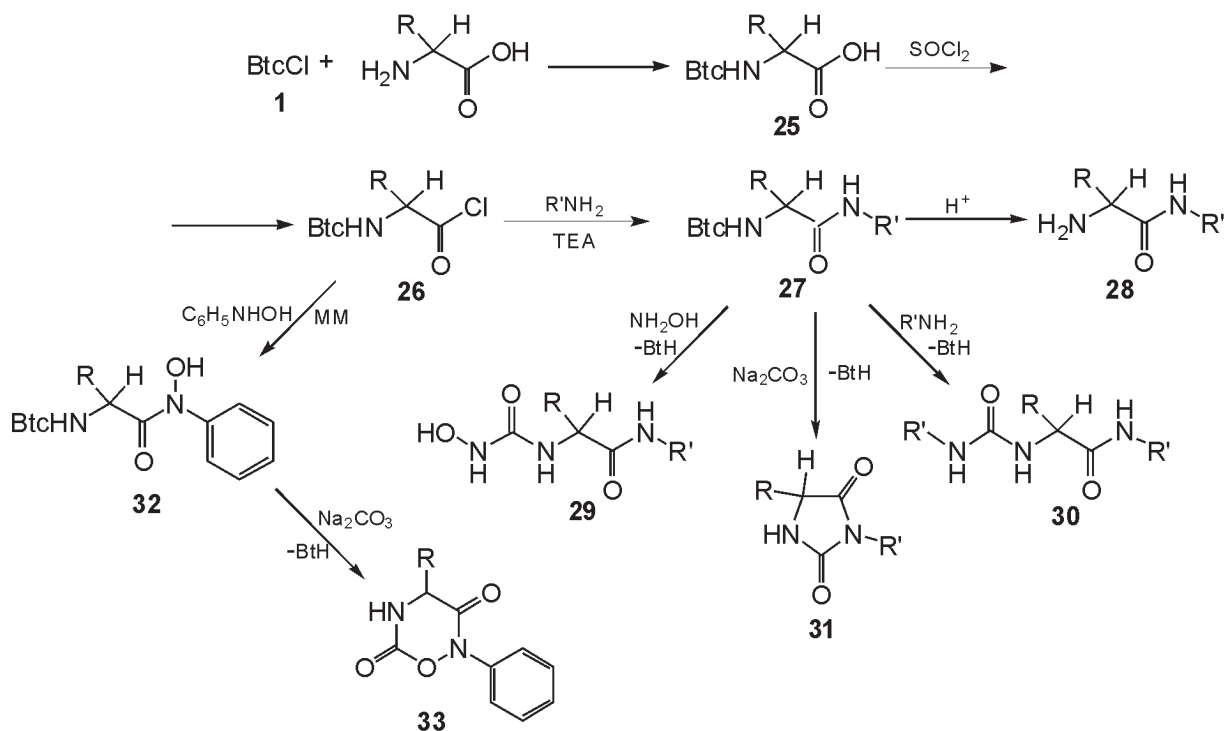
Klorid **1** reagira s dva mola aminokiseline dajući *N*-(1-benzotriazolkarbonil)aminokiseline (**25**) i hidroklorid aminokiseline.<sup>15</sup> Reakcija je provedena u dioksanu u kojem je nastali produkt topljiv, a hidroklorid praktički netopljiv, pa se filtracijom u potpunosti odjeljuju. Pokušaji da se kao akceptori klorovodika upotrijebe organske baze kao što su piridin, trietilamin (TEA) i *N*-metilmorfolin (MM), nisu uspjeli zbog raspada produkta u njihovoj prisutnosti. *N*-Btc-aminokiseline su u čvrstom stanju veoma stabilni spojevi, pogodni za rukovanje i skladištenje, tališta iznad 100 °C. U IR spektru pokazuju apsorpcijsku vrpce reaktivnog karbonila Btc skupine kod 1750–1730 cm<sup>-1</sup> i karbonila iz karboksilne skupine oko 1700 cm<sup>-1</sup>.

Uspješna sinteza *N*-Btc-aminokiselina navela nas je da ispitamo mogućnost upotrebe tih spojeva u sintezi derivata aminokiselina i peptida, pri čemu se vjerovalo da će Btc skupina poslužiti kao *N*-zaštitna skupina. Ona bi se trebala lakše hidrolizirati od amidne, odnosno peptidne veze, ali bi trebala izdržati npr. operaciju kloriranja, amidiranja i slično. Na shemi 8. prikazane su provedene reakcije.

Djelovanjem tionil-klorida na *N*-Btc-aminokiseline dobiveni su kiselinski kloridi **26** koji su podvrgnuti aminolizi s jednim,

odnosno dva mola amina, uz dodatak TEA kao akceptora reakcijom oslobođenog klorovodika, pri čemu su selektivno amidirane prvo kiselinskokloridna pa onda Btc skupina. Na taj način dobiveni su amidi *N*-(1-benzotriazolkarbonil)-aminokiselina **27**, odnosno *N*-alkilkarbamoilni alkilamidi aminokiselina (amidi hidantoinskih kiselina, **30**).<sup>16</sup> Sinteza amida **27** morala se provoditi dokapavanjem amina u kiselinski klorid **26** jer je kod obrnutog redoslijeda dolazilo do stvaranja amida **30**. Iskorištenja tijekom reakcije bila su visoka, što ukazuje na izuzetnu selektivnost reakcije. Upotrebom različitih amina u drugoj fazi reakcije dobivaju se raznovrsno supstituirani amidi hidantoinskih kiselina **30**, a djelovanjem hidroksilamina na amide **27** dobiveni su amidi hidroksiureidoalkanskih kiselina, tj. alkilamidi *N*-hidroksikarbamoil-aminokiselina **29**.<sup>17</sup> Amidi **27** su u kiselom mediju kod sobne temperature relativno stabilni: hidroliza skupine Btc u smjesi 5 %-tne HCl/dioksan 1:1 zbiva se polagano ( $t_{1/2} > 12$  h). U razrijeđenoj otopini NaOH ili Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> cikliziraju u hidantoina **31**, uz otcjepljenje benzotriazola.<sup>16,18–20</sup> To se događa djelomično i u neutralnom mediju pri povišenoj temperaturi ili u kiseloj otopini pri 60 °C u smjesi aceton/5 % HCl 1:1. Btc skupina se najbolje hidrolizira u trifluorocetnoj kiselini, 24-satnim stajanjem derivata *N*-Btc-aminokiselina na sobnoj temperaturi.<sup>21</sup> U trifluorocetnoj kiselini karboksiamidi ne hidroliziraju pa tako benzilamid Btc-L-fenilalanina (**27a**) hidrolizira u benzilamid L-fenilalanina (**28a**) u 75 % iskorištenju, uz očuvanje optičke čistoće. Amid **27a** dao je nakon 4-satnog zagrijavanja u otopini aceton/HCl uz amid **28a** (33 %) i 3,5-dibenzilhidantoin (**31a**, 40 %).





Shema 8 – Sinteza *N*-(1-benzotriazolkarbonil)-aminokiselina, amida *N*-(1-benzotriazolkarbonil)-, *N*-alkil- i *N*-hidroksikarbamoil-aminokiselina, hidantoina te 1,2,5-oksadiazina

Scheme 8 – Synthesis of *N*-(1-benzotriazolecarbonyl)-amino acids, amides of *N*-(1-benzotriazolecarbonyl)-, *N*-alkyl- and *N*-hydroxycarbamoyl-amino acids, hydantoin and 1,2,5-oxadiazines

Reakcijom klorida **26** s *N*-fenilhidroksilaminom pripravljene su hidroksamske kiseline **32** (*N*-fenil-*N*-hidroksiamidi *N*-Btc-aminokiselina), dok analogna reakcija s hidroksilaminom nije uspjela.<sup>22</sup> Poput amida **27** i produkti **32** u bazičnoj mediju cikliziraju dajući derivate 1,2,5-oksadiazina **33**.<sup>22</sup> Supstituent na C-4 ovisi o početnoj aminokiselini, a supstituent na C-2 o upotrebljenom hidroksilaminu.

### Sinteza estera i amida aminokiselina, di- i tripeptida

U nastavku rada s derivatima 1-benzotriazolkarboksilne kiseline ispitana je mogućnost primjene Btc-skupine kao zaštitne, odnosno aktivirajuće skupine u sintezi peptida. Istraživanja su pokazala da su principijelno moguća tri načina stvaranja peptidne veze pri čemu Btc-skupina služi kao:

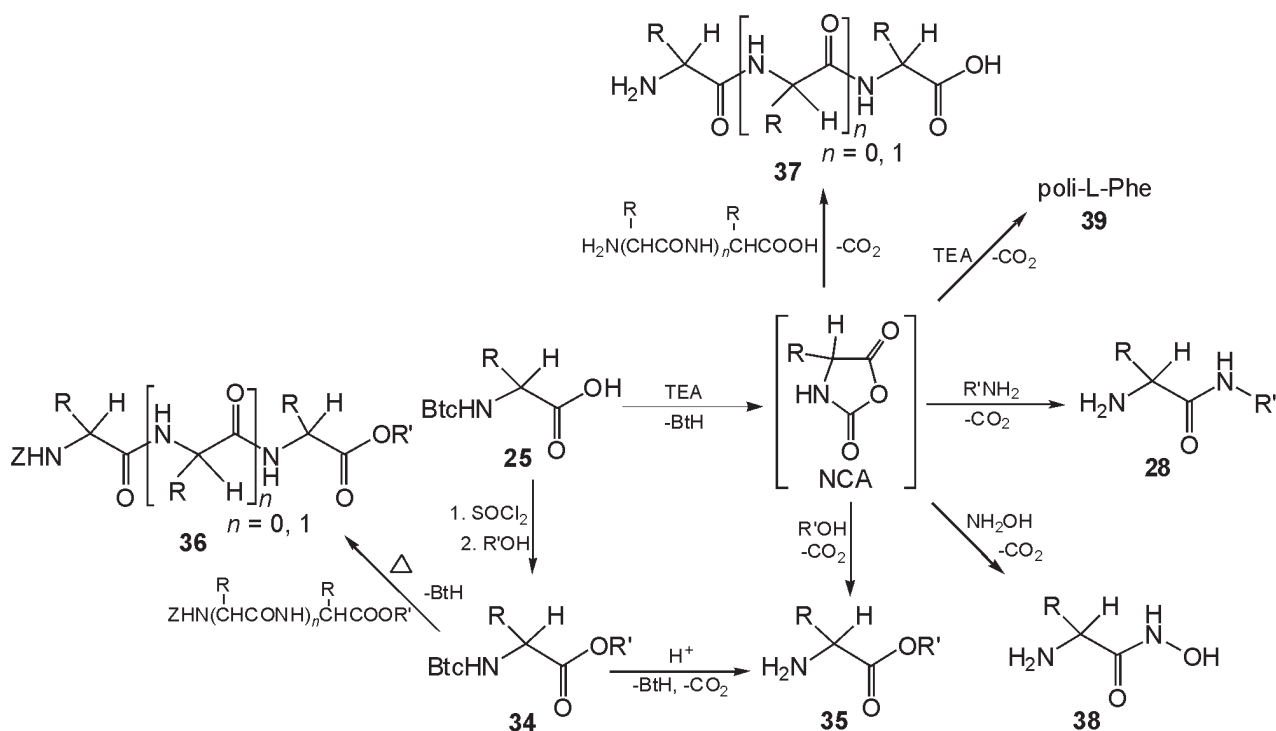
- *N*-zaštitna,
- *N*-aktivirajuća i
- istodobno *N*-zaštitna i *C*-aktivirajuća skupina.

Kao što je u prethodnom poglavlju opisano, uklanjanje Btc-skupine na modelu amida *N*-Btc-aminokiseline bilo je uspješno samo acidolizom u trifluoroctenoj kiselini ili u razrijeđenoj klorovodičnoj kiselini kod sobne temperature u trajanju od 20 do 30 sati. Povišenje temperature skratilo bi reakciju acidolize, ali se ne može općenito primijeniti zbog moguće ciklizacije u hidantoinu.

Analognim reakcijama pripreme amida **27**, sintetizirani su i esteri *N*-Btc-aminokiselina (**34**). Uklanjanjem Btc-skupine kod istih uvjeta kao i kod amida **27** dobivena je smjesa ami-

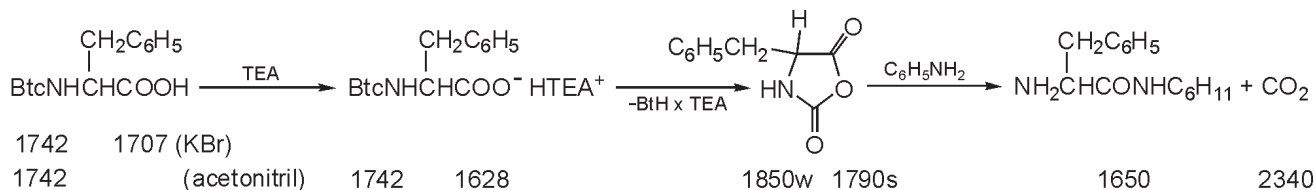
nokiselina i estera aminokiselina (**35**), pa je priprava estera **35** djelotvornije provedena izravnom reakcijom *N*-Btc-aminokiselina **25** s alkoholom, u prisutnosti trietilamina. *N*-Btc-aminokiseline **25** reagiraju s alkoholima,<sup>23</sup> aminima,<sup>24</sup> hidroksilaminom,<sup>17</sup> aminokiselinama i dipeptidima<sup>21</sup> dajući estere **35**, amide **28**, hidroksamske kiseline **38**, di- i tripeptide **37** (shema 9).

Btc-skupina, uvedena u aminokiseline kao *N*-zaštitna, postala je, kako se pokazalo, stvaranjem međuproducta anhidrida *N*-karboksiaminokiselina (NCA)<sup>25</sup> i *C*-aktivirajuća skupina. Umjesto očekivanih derivata hidantoinskih kiselina nastali su, uz benzotriazol i CO<sub>2</sub>, derivati aminokiselina sa slobodnom amino-skupinom **28**, **35**, **37** i **38**. Reakcije su provedene u acetonitrilu uz dodatak TEA na sobnoj temperaturi, bez TEA zagrijavanjem u smjesi aceton/voda ili je *N*-Btc-aminokiselina dovedena u reakciju sa nezaštićenom aminokiselinom ili dipeptidom u boratnom puferu kod sobne temperature. Iako se pretpostavljalo da se reakcije zbivaju preko NCA, tek se snimanjem IR-spektara *N*-Btc-L-fenilalanina (**25a**) u acetonitrilu u prisutnosti TEA uspjelo to i dokazati.<sup>25</sup> Dodatkom TEA u otopinu spoja **25a** smanjuje se početna apsorpcijska vrpca  $\tilde{\nu}(\text{CO})$  kod 1742 cm<sup>-1</sup> i pojavljuje se nova vrpca nastalog karboksilatnog aniona kod 1628 cm<sup>-1</sup>. Nakon nekoliko minuta jasno se uočavaju apsorpcijske vrpce kod 1850 i 1790 cm<sup>-1</sup>, identične vrpceama poredbenog L-Phe-NCA. S vremenom se vrpce NCA pojačavaju da bi se nakon približno 3 h počele smanjivati, uz pojavu polifenilalanina.<sup>22</sup> Ako se u nastali anhidrid doda cikloheksilamin, trenutno nestaju apsorpcijske vrpce anhidrida, a pojavljuju se karbonilne vrpce cikloheksilamida fenilalanina **28b** kod 1650 cm<sup>-1</sup>, uz nagli porast apsorpcijske vrpce CO<sub>2</sub> na 2340 cm<sup>-1</sup> (shema 10).



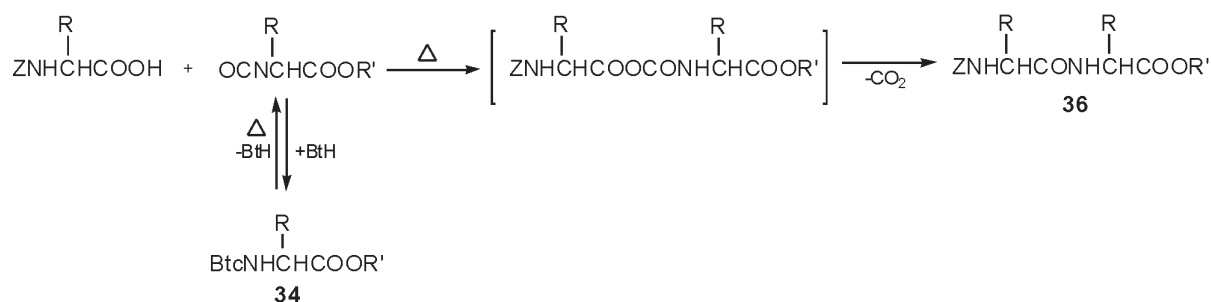
S h e m a 9 – Sinteza derivata aminokiselina, di- i tripeptida

S c h e m e 9 – Synthesis of amino acid, di- and tripeptide derivatives

S h e m a 10 – Promjena apsorpcijskih vrpca karbonilnih skupina  $\tilde{\nu}(\text{CO})/\text{cm}^{-1}$  u IR-spekturu *N*-Btc-*L*-fenilalanina (**25a**) u acetonitrilu u prisutnosti TEAS c h e m e 10 – Change of absorption bands of carbonyl groups  $\tilde{\nu}(\text{CO})/\text{cm}^{-1}$  in IR-spectrum of *N*-Btc-*L*-phenylalanine (**25a**) in acetonitrile in the presence of TEA

*N*-Btc-skupina može služiti i kao *N*-aktivirajuća skupina u sintezi peptida. Reakcija je slična Goldschmidtovoj<sup>26</sup> i Ganteovoj<sup>27,28</sup> reakciji *N*-zaštićene aminokiseline i estera  $\alpha$ -izocijanoalkan kiselina. Umjesto nestabilnih i toksičnih estera  $\alpha$ -izocijanoalkanskih kiselina upotrijebili smo estere *N*-Btc-

-aminokiselina **34**, koji tijekom višesatnog zagrijavanja u ksilenu disociraju u izocijanate, koji reagiraju sa *N*-Z-zaštićenim aminokiselinama (Z = benziloksikarbonil). Nastali su esteri *N*-zaštićenih di- ili tripeptida **36** u prosječno 60 %-tnom iskorištenju (shema 11).

S h e m a 11 – Btc-skupina kao *N*-aktivirajuća skupina u sintezi estera *N*-Z-dipeptidaS c h e m e 11 – Btc-group as *N*-activating group in synthesis of *N*-Z-dipeptide esters

## Sinteza konjugata polimer-lijek

Konjugati polimer-lijek relativno su nova, interesantna klasa lijekova. To su polimerni prolijekovi u kojima je ljekovita tvar povezana kovalentnom vezom za polimerni nosač (*drug carrier*). U makromolekulskom obliku ljekovita tvar je neaktivna, a postaje aktivna tek nakon oslobađanja, tj. kidanja kemijske veze u lizosomima. Pomoću konjugata polimer-lijek može se poboljšati isporuka lijekova i postići produljeni učinak, povećati topljivost, smanjiti doziranje i toksičnost ili postići ciljano djelovanje, što je osobito važno u terapiji citostaticima.<sup>29–32</sup> U ovom radu dan je pregled naših istraživanja o upotrebi benzotriazola u pripravi konjugata polimer-lijek, ali i jednostavnih prolijekova esterskog ili amidnog tipa.

Kao polimerna komponenta konjugata polimer-lijek izabrani su polimeri poliaspartamidnog tipa koji su pripremljeni aminolizom poli-D,L-(2,5-dioksa-1,3-pirolidindiila) (polisukcinimida, PSI, **40**) s različitim aminima (2-aminoetanolom, 3-aminopropanolom, etilendiaminom ili cisteaminom). PSI je dobiven termičkom polikondenzacijom L-asparaginske kiseline u prisutnosti *o*-fosforne kiseline, uz povišenu temperaturu i sniženi tlak (shema 12).<sup>33,34</sup> Na taj način pripremljeni su različiti poliaspartamidni polimeri: poli[ $\alpha,\beta$ -(N-2-hidroksietil-D,L-aspartamid)] (PHEA, **41**)<sup>33,34</sup> poli[ $\alpha,\beta$ -(N-3-hidroksipropil-D,L-aspartamid)] (PHPA, **42**)<sup>35</sup> poli[ $\alpha,\beta$ -(N-2-aminoetil-D,L-aspartamid)]-poli[ $\alpha,\beta$ -(N-2-hidroksietil-D,L-aspartamid)]-kopolimer (PAHA, **43**)<sup>35</sup> i poli[ $\alpha,\beta$ -(N-2-hidroksietil-D,L-aspartamid)]-poli[ $\alpha,\beta$ -(N-2-tioetil-D,L-aspartamid)]-kopolimer (PHTA, **44**).<sup>36</sup>

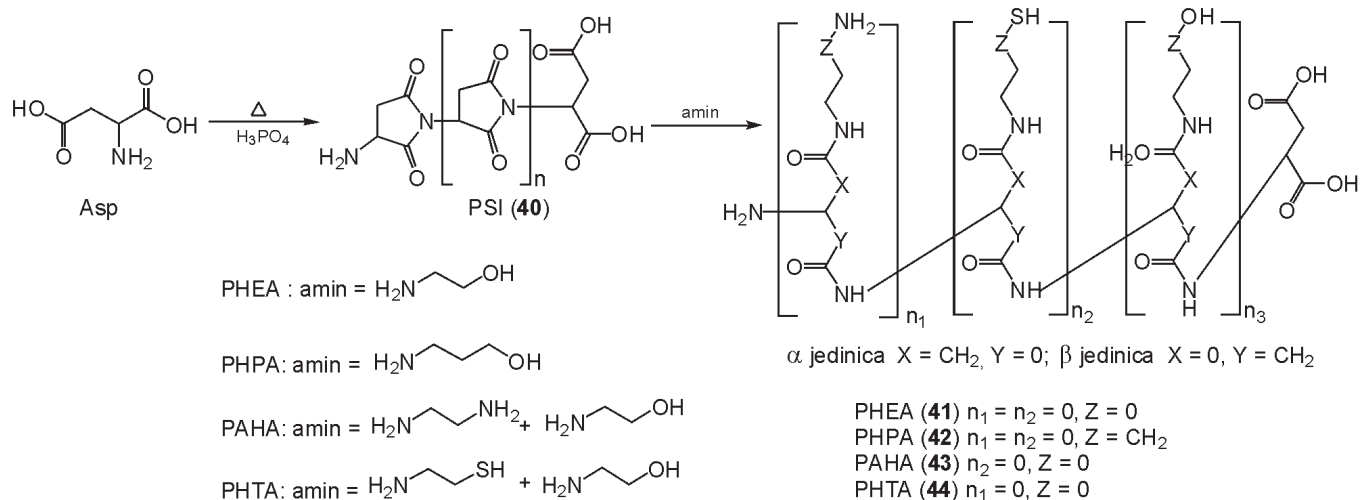
Na slici 1 prikazane su strukturne formule ljekovitih tvari od kojih su priređeni konjugati polimer-lijek. To su prije svega nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAID) ketoprofen, fenoprofen, ibuprofen, diklofenak i indometacin, urikozurik probenecid, antihiperlipemik gemfibrozil i estrogenski steroid estradiol-benzoat.

Sve ove ljekovite tvari (osim estradiol-benzoata) imaju slobodnu karboksilnu skupinu koja reagira s BtcCl dajući mješovite anhidride koji nakon dekarboksilacije stvaraju ben-

zotriazolide **45** (shema 13). U benzotriazolidima je karboksilna skupina dovoljno aktivirana da s aminima i alkoholima daje amide **46**,<sup>37–39</sup> odnosno estere **47**,<sup>38,40,41</sup> u vrlo blagim uvjetima, uz odcjepljenje benzotriazola. Benzotriazolidi **45** vrlo lako reagiraju i s hidroksilnim skupinama poliaspartamida i tako omogućuju vezanje ljekovitih tvari na polimerni nosač esterskom vezom. Na taj način su pripremljeni konjugati polimer-lijek **48–56**.<sup>40–42</sup> Konjugati **57** i **58** pripremljeni su aminolizom sukcinimidnih prstenova PSI s amidima **46a**.<sup>35,42</sup> U tim konjugatima ljekovite tvari su vezane za polimer amidnim vezama. U konjugatima polimer-lijek **61–64** fenoprofen je vezan na PHEA i PHPA preko aminokiselinske razmaknice (*spacer*).<sup>35</sup> Benzotriazolid fenoprofena je prvo s glicinom (Gly) ili  $\beta$ -alaninom ( $\beta$ -Ala) preveden u odgovarajuće *N*-acilaminokiseline **59** koje s BtcCl daju nove benzotriazolide **60**, koji kao i benzotriazolidi **45** reagiraju s PHEA, odnosno PHPA.

Estradiol-benzoat ima slobodnu hidroksilnu skupinu koja reagira s BtcCl i daje reaktivni karbamat (EB-OBtc, **2b**), koji spremno reagira s amino-skupinama PAHA i daje konjugat **65**, u kojem je estradiolski ostatak povezan karbamatnim vezama.<sup>43</sup> Dakle, sintetizirani konjugati polimer-lijek razlikuju se po polimernom nosaču, prosječnoj relativnoj molekularnoj masi, vrsti ljekovite tvari, tipu kovalentne veze kojom su lijekovi povezani, duljini razmaknice između lijeka i polimerne okosnice te udjelu ljekovite tvari.

Naša najnovija istraživanja usmjerena su na pripravu novih tiomera, njihovu primjenu u oblikovanju lijekova te pripravu konjugata tiomer-lijek.<sup>44–46</sup> Tiomeri su polimeri sa slobodnim tiolnim skupinama, koji su za farmaceutsku tehnologiju interesatni ponajprije zbog mukoadhezivnosti. Konjugati tiomer-lijek **67**, **68** i **70** pripremljeni su vezanjem diklofenaka, odnosno fenoprofena na dva tiomera PHTA i PAHMA.<sup>47</sup> PHTA je pripremljen parcijalnom aminolizom PSI sa cisteaminom, nakon čega je slijedila aminoliza preostalih sukcinimidnih prstenova sa 2-aminoetanolom, dok je u pripravi poli[ $\alpha,\beta$ -(N-2-aminoetil-D,L-aspartamid)]-poli[ $\alpha,\beta$ -(N-2-hidroksietil-D,L-aspartamid)] poli[ $\alpha,\beta$ -(N-3-merkapto-1-metoksikarbonil-propil-D,L-aspartamid)] kopolimera (PAHMA) tiolna skupina uvedena pomoću metil-(2-amino-4-merkapto)-butirata (shema 13).

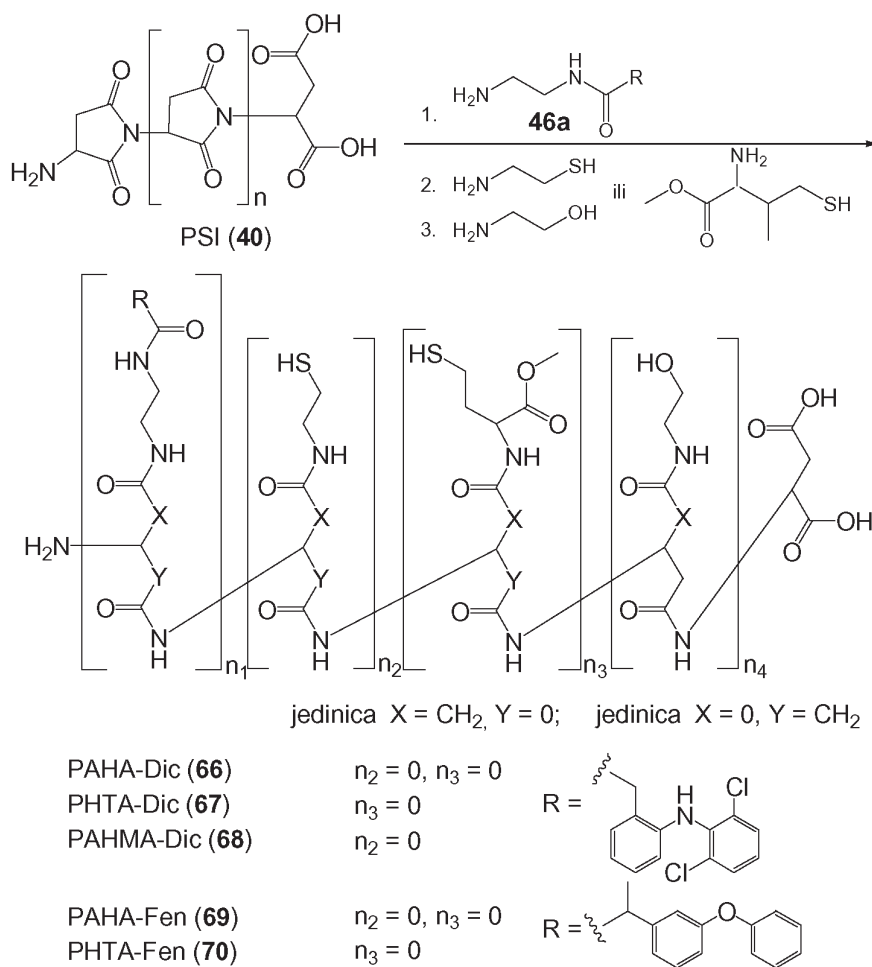


Shema 12 – Sinteza polimera poliaspartamidnog tipa

Scheme 12 – Synthesis of polymers of polyaspartamide types







S h e m a 14 – Sinteza konjugata tiomer-lijek

S c h e m e 14 – Synthesis of thiomers-drug conjugate

Na kraju da objasnimo zašto ovaj rad nosi naslov *Čudesna molekula benzotriazol*. Naravno, sve je čudesno dok se ne uspiju objasniti određene pojave. Zato bi možda bilo prikladnije reći *čudesno na prvi pogled*. Danas su gotovo sva kemijska svojstva azola objašnjena. Ostaje npr. činjenica da još nije sa sigurnošću utvrđeno zašto neki karbamoilazoli disociraju u izocijanat i azol već kod sobne temperature, dok to drugi čine tek zagrijavanjem iznad 100 °C. Još smo više začuđeni da ni na *drugi pogled* ne znamo zašto *N*-1-Btc-glicin kemijski veže vodu u hidrat kada to ostali derivati azola i aminokiselina ne čine. Pregledom literature nismo našli niti jedan primjer uree koja tvori takav hidrat osim nekih teorijskih *ab initio* razmatranja. Rezultati ovih istraživanja uskoro će biti objavljeni.<sup>48</sup>

### Akronimi

Asp – asparaginska kiselina  
 Azc – 1-azolkarbonil  
 AzH – azol  
 Bt – *N*-1-benzotriazolil  
 Btc – 1-benzotriazolkarbonil  
 BtH – benzotriazol  
 CDI – 1,1'-karbonildiimidazol

Dic – diklofenak  
 Gem – gemfibrozil  
 Gly – glicin  
 Fen – fenoprofen  
 EB – estradiol-benzoat  
 Ibu – ibuprofen  
 ImH – imidazol  
 Inc – 1-indazolkarbonil  
 Ind – indometacin  
 Ket – ketoprofen  
 MBtc – 5-metil-1-benzotriazolkarbonil  
 MM – *N*-metilmorfolin  
 NCA – *N*-karboksianhidrid  
 NInc – 5-nitroindazolkarbonil  
 NSAID – nesteroidni protuupalni lijek  
 PAHA – poli[ $\alpha,\beta$ -(*N*-2-aminoetil-D,L-aspartamid)]-poli[ $\alpha,\beta$ -(*N*-2-hidroksietil-D,L-aspartamid)]-kopolimer  
 PAHMA – poli[ $\alpha,\beta$ -(*N*-2-aminoetil-D,L-aspartamid)]-poli[ $\alpha,\beta$ -(*N*-2-hidroksietil-D,L-aspartamid)]-poli[ $\alpha,\beta$ -(*N*-3-merkpto-1-metoksikarbonil-propil-D,L-aspartamid)]  
 Phe – L-fenilalanin

PHEA	– poli[ $\alpha,\beta$ -(N-2-hidroksietil-D,L-aspartamid)]
PHPA	– poli[ $\alpha,\beta$ -(N-3-hidroksipropil-D,L-aspartamid)]
PSI	– poli-D,L-(2,5-dioksa-1,3-pirolidindiiil)
PHTA	– poli[ $\alpha,\beta$ -(N-2-hidroksietil-D,L-aspartamid)-poli [ $\alpha,\beta$ -(N-2-tioetil-D,L-aspartamid)-kopolimer
Pro	– probenecid
TEA	– trietilamin
Z	– benziloksikarbonil
$\beta$ -Ala	– $\beta$ -alanin.

## Literatura References

1. A. Staab, *Angew. Chem.* **74** (1962) 407.
2. H. A. Staab, *Chem. Ber.* **89** (1956) 1927.
3. I. Butula, M. V. Proštenik, V. Vela, *Croat. Chem. Acta* **49** (1977) 843.
4. A. R. Katritzky, Xiangfu Lan, Jason Z. Yang, O. V. Denisko, *Chem. Rev.* (1998) 409.
5. I. Butula, M. Jadrijević-Mladar Takač, *Croat. Chem. Acta* **73** (2000) 569.
6. I. Kalčić, M. Zovko, M. Jadrijević-Mladar Takač, B. Zorc, I. Butula, *Croat. Chem. Acta* **76** (2003) 217.
7. I. Butula, M. Ćurković, M. V. Proštenik, V. Vela, F. Zorko, *Synthesis* (1977) 704.
8. A. F. Hegarty, C. N. Hegarty, F. L. Scoot, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* (1975) 1176.
9. I. Butula, V. Vela, B. Ivezic (Zorc), *Croat. Chem. Acta* **51** (1978) 339.
10. I. Butula, V. Vela, M. V. Proštenik, *Croat. Chem. Acta* **52** (1979) 47.
11. I. Butula, V. Vela, B. Zorc, *Croat. Chem. Acta* **54** (1981) 105.
12. H. A. Staab, W. Benz, *Ang. Chem.* **73** (1961) 657.
13. M. T. Shipchandler, *Synthesis* (1979) 666.
14. D. Seebach, Flehr, *Ang. Chem.* **88** (1976) 590.
15. I. Butula, B. Zorc, V. Vela, *Croat. Chem. Acta* **54** (1981) 435.
16. B. Zorc, I. Butula, *Croat. Chem. Acta* **54** (1981) 441.
17. I. Muskolaj, J. Matijević-Sosa, B. Zorc, I. Butula, *Acta Pharm.* **47** (1997) 109.
18. N. Opačić, M. Barbarić, B. Zorc, M. Cetina, A. Nagl, D. Frković, M. Kralj, K. Pavelić, J. Balzarini, G. Andrei, E. De Clercq, S. Raić-Malić, M. Mintas, *J. Med. Chem.* **48** (2005) 475.
19. N. Opačić, B. Zorc, M. Cetina, D. Mrvoš-Sermek, S. Raić-Malić, M. Mintas, *J. Peptide Res.* **66** (2005) 85.
20. Z. Rajić, B. Zorc, S. Raić-Malić, K. Ester, M. Kralj, K. Pavelić, J. Balzarini, E. De Clercq, M. Mintas, *Molecules* **11** (2006) 837.
21. B. Zorc, G. Karlović, I. Butula, *Croat. Chem. Acta*, **63** (1990) 565.
22. M. Barbarić, S. Kraljević, M. Grce, B. Zorc, *Acta Pharm.* **53** (2003) 175.
23. J. Matijević-Sosa, B. Zorc, I. Butula, *Croat. Chem. Acta* **58** (1985) 239.
24. I. Butula, B. Zorc, M. Ljubić, G. Karlović, *Synthesis* (1983) 4327.
25. M. Zovko, I. Kalčić, B. Zorc, I. Butula, *Croat. Chem. Acta* **76** (2003) 229.
26. S. Goldschmidt, M. Wick, *Ann. Chem.* **575** (1952) 217.
27. J. Gante, *Angew. Chem.* **78** (1966) 334, 602.
28. J. Gante, *Chem. Ber.* **99** (1966) 2521.
29. A. Al-Shamkhani, R. Duncan, *Int. J. Pharm.* **122** (1995) 107.
30. R. Duncan, S. Dimitrijević, E. G. Evagorou, S. T. P. Pharma Sciences **6** (1996) 237.
31. R. Duncan, J. K. Coatsworth, S. Burtles, *Human Exper. Toxicol.* **17** (1998) 93.
32. P. A. Vasey, S. B. Kaye, R. Morrison, C. Twelves, P. Wilson, R. Duncan, A. H. Thomson, L. S. Murray, T. E. Hilditch, T. Murray, S. Burtles, D. Fraier, E. Frigerio, J. Cassidy, *Clin. Cancer Res.* **5** (1999) 83.
33. A. Neri, G. Antoni, F. Benvenuti, F. Cocola, G. Gazei, *J. Med. Chem.* **16** (1973) 893.
34. B. Zorc, M. Ljubić, S. Antolić, J. Filipović-Grčić, D. Maysinger, T. Alebić-Kolbah, I. Jalšenjak, *Int. J. Pharm.* **99** (1993) 135.
35. M. Zovko, B. Zorc, M. Lovrek, B. Boneschans, *Int. J. Pharm.* **228** (2001) 129.
36. D. Ballian, M. Zovko, J. Filipović-Grčić, A. Martinac, B. Zorc, *European Conference on Drug Delivery and Pharmaceutical Technology*, Sevilla, 2004.
37. M. Zovko, B. Zorc, M. Jadrijević-Mladar Takač, B. Metelko, P. Novak, *Croat. Chem. Acta* **76** (2003) 335.
38. M. Lovrek, M. Jadrijević-Mladar Takač, B. Zorc, B. Boneschans, *Die Pharmazie* **55** (2000) 811.
39. M. Zovko, B. Zorc, M. Jadrijević-Mladar Takač, D. Zorc, *Acta Pharm.* **51** (2001) 107.
40. B. Zorc, S. Antolić, I. Butula, *Acta Pharm.* **43** (1993) 127.
41. B. Zorc, I. Butula, *Acta Pharm.* **44** (1994) 103.
42. M. Lovrek, B. Zorc, B. Boneschans, I. Butula, *Int. J. Pharm.* **200** (2000) 59.
43. M. Zovko, B. Zorc, P. Novak, P. Tepeš, B. Cetina-Čižmek, M. Horvat, *Int. J. Pharm.* **285** (2004) 35.
44. M. Bubenik Biličić, J. Filipović-Grčić, A. Martinac, M. Barbarić, B. Zorc, B. Cetina-Čižmek, P. Tudja, *Int. J. Pharm.* **291** (2005) 211.
45. M. Bubenik Biličić, J. Filipović-Grčić, A. Hafner, B. Zorc, B. Cetina-Čižmek, *J. Drug Del. Sci. Tech.* **16** (2006) 339.
46. D. Ballian Krznar, J. Filipović-Grčić, B. Zorc, M. Zovko, *Acta Pharm.* **56** (2006) 463.
47. M. Barbarić, M. Kralj, M. Marjanović, I. Husnjak, K. Pavelić, J. Filipović-Grčić, D. Zorc, B. Zorc, *Eur. J. Med. Chem.* **42** (2007) 20.
48. M. Žegarac, M. Zovko, M. Košutić Mulica, B. Prugovečki, I. Butula, M. Dumić, Rad u pripremi za tisak.

## SUMMARY

**The Curious Molecule Benzotriazole***I. Butula and B. Zorc*

In this paper, a review of reactions with benzotriazole as synthetic auxiliary is given. In contrast to most other azoles, benzotriazole reacts with phosgene in molar ratio 1:1 yielding carboxylic acid chloride (BtcCl, **1**), which readily reacts with nucleophiles giving reactive compounds. These products can be easily transformed into carbamates, ureas, semicarbazides, carbazides, sulfonylureas, sulfonylcarbazides, nitroalkanic acid esters, etc. In addition, benzotriazole was used in the synthesis of various heterocyclic compounds: benzoxazine, kinazoline, triazinetrione, hydantoin and oxadiazine derivatives. The reaction of chloride **1** with amino acids enabled the use of benzotriazole in peptide chemistry, with triple role of benzotriazolecarbonyl group as *N*-protecting, *N*-activating, and both *N*-protecting/*C*-activating group. *N*-(1-benzotriazolecarbonyl)-amino acids **25** are starting compounds in the synthesis of various amino acid, di- and tripeptide derivatives, hydantoic acids and hydroxyureas.

Benzotriazole was also applied in the preparation of polymer-drug and thiomers-drug conjugates, polymeric prodrugs with drugs covalently bound to the polymeric carriers. Such macromolecular prodrugs may offer many advantages compared to other drug delivery systems such as increased drug solubility, prolonged drug release, increased stability. It is also possible to accumulate the drug at the site of the pathological process and to minimize its toxicity. In this paper, the binding of drugs from various therapeutic groups (mostly nonsteroidal, anti-inflammatory drugs) to polymers of polyaspartamide type by the benzotriazolide method is described.

*Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
University of Zagreb, A. Kovačića 1, Zagreb, Croatia*

*Received December 15, 2006  
Accepted January 10, 2007*