

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Barbara Pem

**Računalna studija tautomerizacije  
benzodiazepina**

ZAGREB, 2017.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za organsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Valerija Vrčeka i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2016./2017.

## Sadržaj rada

<b>1. Uvod</b>	1
1.1. Tautomerizacija	1
1.1.1. Definicija tautomerizacije	1
1.1.2. Mehanizam tautomerizacije	1
1.1.3. Ravnotežne reakcije tautomerizacije	2
1.2. Keto-enolna i keto-iminolna tautomerija	2
1.2.1. Relativna stabilnost tautomera	2
1.2.2. Kompeticija enola i iminola u amidnim molekulama	3
1.3. Značaj tautomerizacije	3
1.3.1. Važnost tautomerizacije u kemiji i biologiji	3
1.3.2. Racemizacija	4
1.3.3. Ilustracija važnosti tautomerizacije – slučaj talidomida	5
1.3.4. Tautomerizacija u farmaceutskoj kemiji	5
1.4. Benzodiazepini	6
1.4.1. Povijest benzodiazepina	6
1.4.2. Upotreba benzodiazepina u Hrvatskoj	6
1.4.3. 1,4-diazepinska struktura	7
1.4.4. Mehanizam djelovanja	7
1.4.5. Benzodiazepini u farmaceutskoj kemiji	8
1.4.6. Tautomerizacija diazepina	9
1.4.7. Racemizacija benzodiazepina	10
<b>2. Obrazloženje teme</b>	11
<b>3. Materijali i metode</b>	12
3.1. Računalna kemija	12
3.2. Konformacijska analiza	12
3.3. Geometrijska optimizacija strukture	12
3.4. Izračun Gibbsove energije	13
3.5. Solvacijski račun	13
<b>4. Rezultati i rasprava</b>	15
4.1. Klasični 1,4-benzodiazepin-2-oni	15
4.2. Heteroaromatski 1,4-diazepin-2-oni	19
4.3. 3-supstituirani 1,4-benzodiazepin-2-oni	22
4.4. Solvacijski učinci	27
<b>5. Zaključak</b>	28
<b>6. Zahvala</b>	30
<b>7. Literatura</b>	31
<b>8. Sažetak</b>	39
<b>9. Summary</b>	40

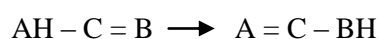
## 1. Uvod

### 1.1. Tautomerizacija

#### 1.1.1. Definicija tautomerizacije

Tautomerizacija (gr. *tauto* = isto, *meros* = dio) definira se kao postojanje više oblika iste molekule, koji mogu prelaziti jedan u drugi intramolekulskim pomakom atoma. Dva ili više tautomera razlikuju se u položaju veza, atoma ili funkcionalnih skupina. Konvertiraju jedan u drugi reverzibilno i u mediju egzistiraju u ravnoteži koja je određena čimbenicima okoliša kao što su pH, temperatura, otapalo te prisutnost katalizatora (kiselina ili baza) (Guasch i sur., 2016; Raczynska i sur., 2005).

Tautomerizacija obuhvaća širok spektar reakcija, uključujući pomak protona, kationa ili aniona te ciklizaciju ili otvaranje prstena (Sayle, 2010; Raczynska i sur., 2005). U ovom radu razmatrat će se reakcije pomaka protona, tzv. prototropička tautomerizacija. Prototropička tautomerizacija može se opisati općom jednadžbom:



koja pokazuje pomak protona (vodikovog iona) s položaja A na položaj B, uz istovremeni pomak  $\pi$ -elektrona s položaja B na položaj A. A je proton-donor, B je proton-akceptor. Keto-enol i keto-iminol tautomerije primjeri su prototropije (Raczynska i sur., 2005).

#### 1.1.2. Mehanizam tautomerizacije

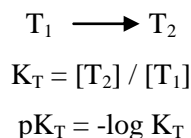
Prototropička tautomerizacija odvija se u molekulama s amfiprotičnim svojstvima. Amfiprotične molekule posjeduju kiseli fragment koji može otpustiti proton i bazični fragment koji ga može primiti (Filipović i Lipanović, 1995). U plinovitoj fazi ili aprotičnim otapalima proton se prenosi intramolekulski, dakle s jednog dijela molekule na drugi. Polarna protična otapala služe kao katalizatori procesa tautomerizacije izmjenjujući protone s molekulom (Raczynska i sur., 2005).

U vodenom mediju, molekule vode stvaraju kompleks s tautomernom molekulom i olakšavaju tautomerizaciju formirajući tzv. *vodeni most* (Sun i sur., 2005). Molekula vode uzima proton s kiselog centra tautomerne molekule, potom vlastiti proton predaje susjednoj molekuli u lancu, koja svoj proton predaje bazičnom centru. Katalitička aktivnost vode može se pripisati stabilizaciji parcijalnog naboja u prijelaznom stanju pomoću vodikovih veza te optimiziranju geometrije prijelaznog stanja (D'Cunha i sur., 2013). Direktni prijenos protona zahtijeva formiranje četveročlanog prstena u prijelaznom stanju, što je energetske nepovoljno u odnosu na šesteročlani ili osmeročlani prsten koji se formiraju nastankom mosta od jedne ili dviju molekula vode. Tako most od jedne ili dviju voda značajno snižava energetske barijeru konverzije tautomera (Valadbeigi i Farrokhpour, 2015).

Kiseline i baze također su katalizatori tautomerne konverzije. Kiselo katalizirana reakcija uključuje protoniranje bazičnog centra od strane opće kiseline te transfer protona s kiselog centra na konjugiranu bazu (Lienhard i Wang, 1969). Suprotno tome, u bazno kataliziranoj reakciji opća baza uzima proton kiselim centru i potom konjugirana kiselina predaje proton bazičnom centru (Perrin, 1989). Isti procesi, ali obrnutim redoslijedom, odvijaju se kod ketonizacije (povratka u keto oblik) (Chiang i sur., 1988).

### 1.1.3. Ravnotežne reakcije tautomerizacije

Kvantitativni opis konverzije tautomera daje ravnotežna konstanta tautomerizacije  $K_T$ , koja odgovara omjeru ravnotežnih koncentracija tautomera pod određenim uvjetima (Raczyńska i sur., 2005).



Sljedeća jednadžba pokazuje ovisnost  $pK_T$  o standardnim molarnim Gibbsovim energijama ( $\Delta G$ ) obaju tautomera.  $R$  je opća plinska konstanta, a  $T$  apsolutna temperatura.

$$pK_T = [\Delta G(T_2) - \Delta G(T_1)] / (2,303RT)$$

Konstanta ravnoteže za reakciju tautomerizacije ovisi o razlici Gibbsovih energija tautomera, odnosno o njihovoj relativnoj stabilnosti. Dakle, određivanje Gibbsove energije svakog tautomera omogućuje predviđanje udjela svakog tautomera u smjesi (Filipović i Lipanović, 1995).

## 1.2. Keto-enolna i keto-iminolna tautomerija

### 1.2.1. Relativna stabilnost tautomera

Keto-enolna tautomerija opsežno je istraživana. U većini slučajeva utvrđeno je da je keto oblik značajno stabilniji od enola. To se objašnjava činjenicom da kisik kao najelektronegativniji element uzima  $\pi$ -elektrone i formira dvostruku vezu sa susjednim ugljikom (Raczyńska i sur., 2005).

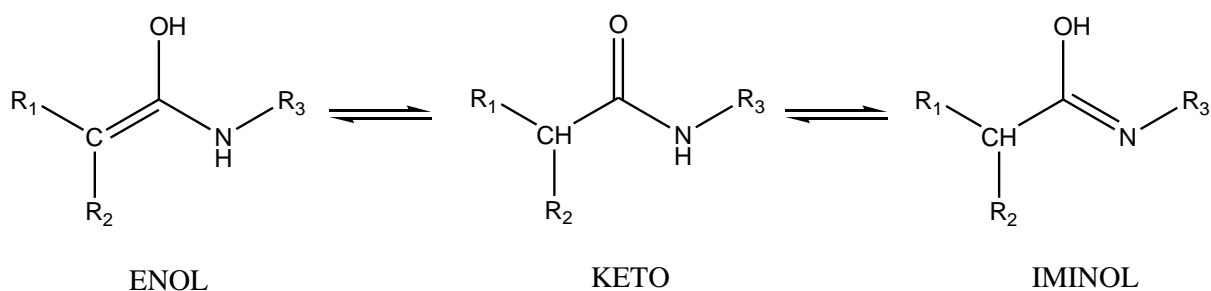
Relativna stabilnost keto oblika u odnosu na enol veća je kod derivata karboksilnih kiselina (esteri i amidi), nego kod aldehida i ketona zbog učinka elektron-donorske alkoksi ili amino skupine (Eberlin i Williams, 2002; Rappoport i Yamataka, 2000; Sklenak i sur., 1998). Te molekule postoje u otopini ili plinovitoj fazi gotovo isključivo u keto obliku (McCann i sur., 2015; Eberlin i Williams, 2002).

Iznimke od ovog pravila su molekule u kojima je enolni oblik stabiliziran jer omogućuje aromatizaciju ili produženu konjugaciju (npr. fenol) ili formiranje intramolekulske vodikove veze (npr. acetilaceton)

(McCann i sur., 2015). Prisutnost elektron akceptora (poput  $\text{NO}_2$  skupina) na  $\alpha$ -ugljikovom atomu stabilizira enolni tautomer jer omogućava delokalizaciju elektrona u enolnom obliku. Također, sterički učinci i elektrostatsko odbijanje mogu doprinijeti stabilizaciji, odnosno destabilizaciji enola, npr. u slučaju  $\alpha$ -nitroketona (Angelini i sur., 2007). Istraživanjima keto-iminolnih tautomera uočeno je da stabilnost keto oblika vrijedi i u ovom slučaju (Sun i sur., 2005; Sklenak i sur., 1998; Sigel i Martin, 1982). Logično je pretpostaviti da ista pravila vrijede za keto-iminolne, kao i za keto-enolne sustave.

### 1.2.2. Kompeticija enola i iminola u amidnim molekulama

Molekule koje u strukturi sadrže  $-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$  fragment podliježu i enolizaciji i iminolizaciji, odnosno mogu postojati u tri tautomerna oblika. Enolizacija i iminolizacija kompetitivni su procesi (Sklenak i sur., 1998). Zastupljenost pojedinog oblika ovisi o njihovoj relativnoj stabilnosti (Filipović i Lipanović, 1995).



Slika 1. Keto-enolna i keto-iminolna tautomerija u molekulama s  $\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}$  fragmentom.

Već je spomenuto da će u ovakvim molekulama daleko najstabilniji (time i najzastupljeniji) biti keto oblik. Međutim, zanimljivo je pitanje relativne razlike u stabilnosti između enolnog ili iminolnog oblika. Na primjeru najjednostavnije molekule s traženim fragmentom, acetamida, utvrđeno je da je iminol stabilniji od enola (Sklenak i sur., 1998), što je kasnije uočeno i na drugim sustavima poput sukcinimida (Valadbeigi i Farrokhpour, 2015) i hidantoina (Allegretti i sur., 2000). Međutim, obrnut je slučaj otkriven kod barbiturine kiseline, kod koje je enolni oblik stabilniji od iminolnog (Delchev, 2004; Senthilkumar i Kolandaivel, 2002). Takvi rezultati upućuju na zaključak da relativna stabilnost enola u odnosu na iminol ovisi o strukturnim svojstvima molekule, kao što su supstituenti, mogućnost produžene konjugacije ili stvaranja intramolekulske vodikove veze. Manipuliranjem strukture molekule može se postići promjena stabilnosti, a time i zastupljenosti pojedinih tautomernih oblika u određenim uvjetima.

### 1.3. Značaj tautomerizacije

#### 1.3.1. Važnost tautomerizacije u kemiji i biologiji

Određivanje dominantnog tautomernog oblika i/ili udjela tautomera u smjesi značajno je u organskoj kemiji, biokemiji, farmaceutskoj kemiji, tehnologiji, molekularnoj biologiji i drugim područjima (Raczyńska i sur., 2005). Tautomeri se međusobno razlikuju po fizikalno-kemijskim osobinama i reaktivnosti (Guasch i sur., 2015).

Enoli i iminoli podložni su nukleofilnom napadu zbog prisutnosti C=C i C=N dvostrukih veza (D'Cunha i sur., 2013). Istraživanja upućuju na enol kao reaktivni međuprodukt u određenim reakcijama, poput halogeniranja (Eberlin i Williams, 2002), dekarboksilacije dikarboksilnih kiselina, reduktivne debrominacije karboksilnih kiselina, nitrozilacije malonske kiseline, adicija alkohola na ketene, adicije vode na ketenimine i elektrofilne supstitucije na malonamidu, fotolize dienona u prisutnosti amina ili adicije tritilnog kationa na acetanhidrid (Sklenak i sur., 1998). Iminol je reaktivna specija u reakcijama kloriranja amida (Šakić i sur., 2014). Tautomerizacija također utječe na stabilnost molekule. Određeni tautomerni oblik može npr. biti podložniji reakciji na zraku (Pertejo i sur., 2014), što ima veliku važnost u farmaceutskoj tehnologiji i oblikovanju lijekova.

Tautomerni oblici razlikuju se u najstabilnijoj konformaciji koju poprimaju. Budući da konformacija određuje prostorni oblik molekule, ona je važna za interakcije s drugim molekulama, kao što su enzimi i receptori. Nadalje, tautomerizacija dušičnih baza može rezultirati genskim mutacijama zbog pogrešnog sparivanja prilikom sinteze DNA (Wojnarowska i sur., 2011). Tautomerizacija utječe i na najvažnije i najraširenije molekule s amidnim skupinama u organizmu - peptide i proteine. Enolizacija amidnih skupina može dovesti do racemizacije peptida *in vivo*. *D*-enantiomeri aminokiselina primijećeni su u životinjskim tkivima (Rappoport i Yamataka, 2000).

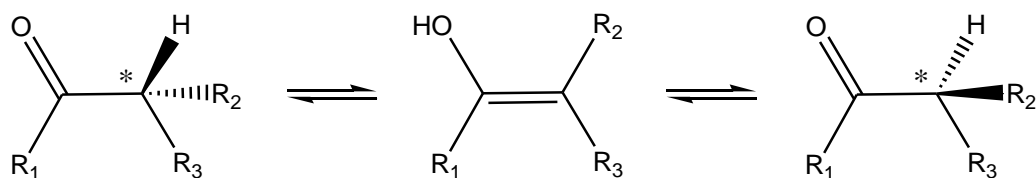
#### 1.3.2. Racemizacija

Racemizacija kiralnih molekula od iznimne je važnosti za farmaceutsku kemiju. Kiralne molekule odnose se kao lik i njegova zrcalna slika. Najčešći oblik kiralnosti posjeduju molekule s asimetričnim ugljikovim atomom, tj. ugljikovim atomom za kojeg su vezana četiri različita atoma ili skupine. Dvije molekule koje se razlikuju samo u prostornom rasporedu dviju skupina na asimetričnom C atomu međusobno su kiralne i nazivaju se enantiomerima. Smjesa jednakih udjela oba enantiomera naziva se racemičnom smjesom. Racemizacija je proces u kojem enantiomerno čisti spoj (koji sadrži samo jedan enantiomer) prelazi u racemičnu smjesu (Pine, 1994).

Enantiomeri imaju identična sva fizikalna i kemijska svojstva, osim reaktivnosti s drugim kiralnim molekulama. U kiralnom okolišu kakvo je ljudsko tijelo, enantiomeri mogu imati različita farmakokinetička i farmakodinamička svojstva, a samim time i različite terapijske ili neželjene učinke.

Razlike mogu proizlaziti iz interakcija s enzimima, receptorima, transportnim proteinima ili DNA (Smith, 2009).

Preduvjet za racemizaciju je enantiomerizacija, tj. mogućnost pretvorbe jednog enantiomera u drugi. Jedan od mogućih mehanizama enantiomerizacije je tautomerizacija.



Slika 2. Enolizacija kao mehanizam racemizacije

Eliminacijom protona gubi se kiralni centar. Prilikom ponovne ketonizacije proton može prići ugljikovu atomu s obje strane molekule, dovodeći do inverzije konfiguracije u 50% slučajeva.

### 1.3.3. Ilustracija važnosti tautomerizacije – slučaj talidomida

O važnosti stereokemije i racemizacije u farmaciji ne može se raspravljati bez spominjanja talidomida. Talidomid je kiralni lijek koji se primjenjuje kao racemična smjesa *R* i *S* talidomida. Od 1956. do 1961. godine koristio se kao sedativ i antiemetik. Posebno se često propisivao trudnicama (Kim i Scialli, 2011). Njegova široka upotreba u Europi, Australiji i Japanu rezultirala je rođenjem 10.000 djece s fokomelijom, sindromom koji se manifestira kao malformacije i redukcija udova, te s raznim drugim poremećajima vida, sluha, kardiovaskularnog i reproduktivnog sustava (Kim i Scialli, 2011; Teo i sur., 2004). Tragedija je postala poznata pod nazivom talidomidska katastrofa. Kasnijim ispitivanjima teratogeni se učinak pripisao *S*-enantiomeru talidomida, dok se *R*-talidomid smatra sigurnim i zaslužnim za sedativno djelovanje. Terapijska primjena enantiomerno čistog *R*-talidomida nije moguća zbog brze racemizacije u organizmu, koju kataliziraju bazični medij i serumski albumin. Upravo je keto-enolna tautomerija glavni mehanizam racemizacije (Tian i sur., 2012). Talidomidska katastrofa osvijestila je postojanje dramatičnih razlika u djelovanju enantiomernih molekula i potrebu ispitivanja farmakokinetike i farmakodinamike svakog enantiomera. Proizvođači lijekova danas moraju obaviti kompletnu stereokemijsku karakterizaciju kiralnih lijekova, kako se tragedija ovakvih razmjera ne bi nikada ponovila (Salvadori i sur., 1989).

### 1.3.4. Tautomerizacija u farmaceutskoj kemiji

Fragment CH-C(=O)-NH prisutan je u velikom broju farmakološki aktivnih tvari, koje pripadaju različitim terapijskim skupinama. Osim već spomenutog talidomida, tu su citostatici



anagrelid, borteomib i vorinostat; antiandrogeni flutamid, finasterid i dutasterid; antibiotici poput penicilinskih derivata i cefalosporina te nitrofurantoin i kloramfenikol; antituberkulotici cikloserin i terizidon; antiretrovirotik maravirok; antivirusici zanamivir i oseltamivir; antidiabetici pioglitazon i roziglitazon; antidijaroik racekadotril; analgetik paracetamol; lokalni anestetici lidokain, bupivakain i prilokain; analeptik modafinil; antiepileptici piracetam, levetiracetam i lakozamid; sedativi/hipnotici benzodiazepini; antidepresiv agomelatin; antiparkinsonici bromokriptin i ropinirol te mnogi drugi. Za neke lijekove, poput prilokaina (Heshmatipour i sur., 2016), postoje istraživanja tautomernih oblika, dok za većinu ne. Ovaj rad usredotočit će se na istraživanja stabilnosti tautomera benzodiazepina, skupine lijekova koji primarno djeluju kao anksiolitici i sedativi/hipnotici.

#### 1.4. Benzodiazepini

##### 1.4.1. Povijest benzodiazepina

Benzodiazepini su kao molekule od interesa prepoznati sredinom 1950-ih. Sternbach i suradnici sintetizirali su prvi komercijalni benzodiazepin klordiazepoksid transformacijom kinazolin-3-oksida s metilaminom. Klordiazepoksid je pokazao sedativno, miorelaksirajuće i antikonvulzivno djelovanje. 1960. godine registriran je pod trgovačkim imenom Librium® (Sternbach, 1971). Sternbach i njegov tim nastavili su razvijati derivate klordiazepoksida i 1963. na tržište je pušten diazepam (Valium®), koji je do današnjeg dana ostao najkorišteniji lijek iz ove skupine (Sternbach, 1979). Od tada je sintetizirano na tisuće benzodiazepinskih derivata, i preko stotinu spojeva registrirano je za terapijsku uporabu u različitim zemljama svijeta. Pojava benzodiazepina izazvala je revoluciju na polju psihofarmakologije, prvenstveno u terapiji anksioznih poremećaja. Diazepam se pokazao jednako učinkovitim, ali značajno sigurnijim od do tad prevladavajućeg fenobarbitala. Benzodiazepini danas imaju status vodećih lijekova u području psihofarmakologije (López-Muñoz i sur., 2011).

##### 1.4.2. Upotreba benzodiazepina u Hrvatskoj

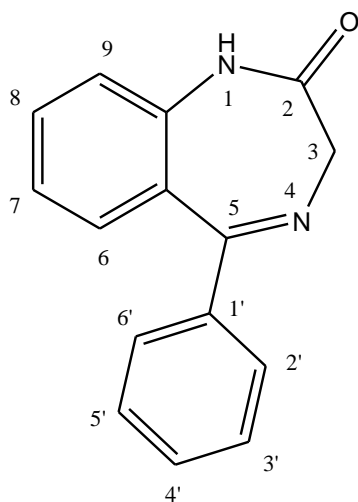
ATK (anatomsko-terapijsko-kemijski) sustav klasifikacije lijekova svrstava benzodiazepine u skupinu N (lijekovi s učinkom na živčani sustav), u podskupinu N05 (psiholeptici) (Ivančan i sur., 2015). U Republici Hrvatskoj psiholeptici zauzimaju drugo mjesto na popisu najkorištenijih lijekova po ukupnoj potrošnji u 2015. godini (102,14 definiranih dnevnih doza po tisuću stanovnika po danu), te na trećem mjestu po financijskoj potrošnji (324 milijuna kuna) (www.halmed.hr). 73% potrošnje psiholeptika otpada na anksiolitike, a gotovo cjelokupna potrošnja anksiolitika otpada na benzodiazepine, prvenstveno diazepam (ukupno četvrto mjesto potrošnje lijekova u 2015. godini). Vodeći lijekovi po financijskoj potrošnji u ovoj skupini su: diazepam (36. mjesto s potrošnjom od 30,5 milijuna kuna), zatim alprazolam (25 milijuna kuna) i oksazepam (16 milijuna kuna). Prema izvješću HALMED-a potrošnja anksiolitika od 2010. do 2014. godine porasla je za 3,4%. Potrošnja hipnotika i

sedativa također bilježi porast u navedenom razdoblju i 2014. godine iznosila je 13,2 definirane dnevne doze/1000 stanovnika/dan, odnosno 21,2 milijuna kuna (Draganić i sur., 2016).

#### 1.4.3. 1,4-diazepinska struktura

1,4-diazepinski prsten u farmaceutskoj kemiji smatra se „privilegiranom strukturom“ (Smith i sur., 2014; Meanwell i Walker, 2008; Ellman, 1996). Termin privilegirana struktura skovao je Evans 1988. godine i definirao ga kao strukturu iz koje se mogu razviti ligandi za različite receptore (Evans i sur., 1988). Privilegirana struktura je molekulska osnova. Nadodavanjem elemenata osnovnoj strukturi dobiva se spektar molekula s različitim svojstvima koje imaju različit terapijski učinak (Smith i sur., 2014).

1,4-diazepinski derivati imaju peptidomimetičko djelovanje. 1,4-diazepinski prsten jest okosnica koja omogućuje projekciju supstituenata u prostor, oponašajući prostorni razmještaj bočnih ogranaka aminokiselina u proteinskim domenama poput  $\beta$ -okreta ili  $\alpha$ -uzvojnice. To omogućuje diazepinskom lijeku vezanje za aktivna mjesta enzima ili receptora (Meanwell i Walker, 2008). Budući da je za mogućnost vezanja ključan prostorni razmještaj supstituenata na prstenu, očita je važnost konformacija i konfiguracija molekula.



Slika 3. Osnovna struktura 1,4-benzodiazepin-2-ona s numeriranim atomima.

#### 1.4.4. Mehanizam djelovanja

Mehanizam djelovanja benzodiazepina je depresija središnjeg živčanog sustava vezanjem na  $GABA_A$  receptor.  $GABA_A$  receptor je o ligandu ovisan ionski kanal koji se sastoji od 5 proteinskih podjedinica koje okružuju središnju poru propusnu za kloridne ione. Ligand  $GABA_A$  receptora je GABA (gamaaminomaslačna kiselina), inhibitorni neurotransmitor u središnjem živčanom sustavu.

Vežanje GABA-e dovodi do otvaranja kanala i ulaska kloridnih aniona u neuron, što rezultira hiperpolarizacijom i smanjenom podražljivošću neurona. Benzodiazepini su alosterički modulatori GABA<sub>A</sub> receptora. Vežu se za tzv. benzodiazepinsko vezno mjesto na spojištu  $\alpha$  i  $\gamma 2$  podjedinica (vezno mjesto za GABA-u je na spojištu  $\alpha$  i  $\beta$ ). Vežanjem pojačavanju učinak GABA-e, utječući na frekvenciju otvaranja kanala (Trevor, 2015).

#### 1.4.5. Benzodiazepini u farmaceutskoj kemiji

Osnovni učinci 1,4-benzodiazepin-2-ona su: sedacija, hipnoza, amnezija, anestezija, miorelaksacija i antikonvulzivno djelovanje. Najpoznatiji su i najčešće korišteni kao anksiolitici i sedativi/hipnotici, u terapiji anksioznih poremećaja i napadaja panike, posttraumatskog stresnog poremećaja, opsesivno-kompulzivnog poremećaja, nesanice i poremećaja spavanja. Također su korisni u odvikavanju od ovisnosti o alkoholu i drugim sedativima/hipnoticima. Poznato je da lorazepam potiskuje simptome delirium tremensa. U psihijatriji se mogu koristiti i kod maničnih poremećaja ili hiperekscitabilnosti uzrokovane drogama, te kao dijagnostička sredstva. Diazepam, nordiazepam, oksazepam, lorazepam i nitrazepam su među komercijalno najčešće korištenim sedativima i hipnoticima (Trevor, 2015). Učinak anterogradne amnezije koristi se u premedikaciji prije operacija ili neugodnih dijagnostičkih zahvata. Diazepam i lorazepam primjenjuju se i kao anestetici, ali uvijek u kombinaciji s drugim lijekovima (Eilers i Yost, 2015). U liječenju epilepsije i drugih konvulzivnih napadaja koriste se klonazepam, diazepam, lorazepam, nitrazepam i klorazepat. Imaju primjenu i kao miorelaksansi u terapiji neuromuskularnih poremećaja (Porter i Meldrum, 2015). Lorazepam i diazepam koriste se također za prevenciju povraćanja kod kemoterapije (McQuaid, 2015).

Potencijal primjene 1,4-benzodiazepin-2-ona mnogo je veći od njihove današnje uloge depresora središnjeg živčanog sustava. U istraživanjima su benzodiazepinski derivati pokazali antiproliferativno djelovanje na stanice melanoma i HeLa stanice, citotoksični učinak na stanice zaražene virusom hepatitisa B i na stanice Burkittovog limfoma, inhibiciju histonske deacetilaze, cisteinskih proteaza, kaspaza i g-sekretaze, antagonističko djelovanje na CGRP receptore, receptore bradikinina i endotelina. To upućuje na moguću primjenu ovih derivata u liječenju tumora, imunodeficijencija, Alzheimerove bolesti, malarije, migrene, boli i upale te kardiovaskularnih i bubrežnih bolesti (Spencer i sur., 2010). Srodne 1,4-diazepinske strukture do sad su potvrđene kao antagonisti kolecistokininskih receptora A i B (potencijalna terapija gastroezofagealne refluksne bolesti i karcinoma jednjaka), antagonisti neurokinina, antagonisti HIV transaktivatora Tat i inhibitori reverzne transkriptaze (terapija AIDS-a), antagonisti oksitocina, antagonisti čimbenika aktivacije trombocita i inhibitori GpIIb/IIIa receptora (antikoagulacijsko djelovanje), agonisti  $\kappa$  opioidnih receptora (analgetsko djelovanje), inhibitori Ras farnezil transferaze, blokatori kalcijevih kanala, inhibitori fosfodiesteraze IV, inhibitori Src tirozin kinaze, inhibitori gastrina te mogući lijekovi za sistemski eritematozni lupus i reumatoidni artritis (Horton i sur., 2003; Ellman, 1996).

Heteroaromatski diazepini inhibitori su bromodomena, proteinskih struktura prisutnih u velikom broju transkripcijskih faktora i regulatora aktivnosti kromatina, zbog čega se ispituju kao potencijalni lijekovi za određene tipove karcinoma (Smith i sur., 2014).

S druge strane, benzodiazepini su ozloglašeni zbog razvoja ovisnosti kod redovite primjene. Nagli prestanak uzimanja ovih lijekova dovodi do sindroma ustezanja. Odvikavanje je dugotrajno, a mora se provoditi polako, uz postupno smanjivanje doze i vanjsku potporu ([www.benzo.org.uk](http://www.benzo.org.uk)). Rastući je problem korištenje ovih lijekova kao rekreacijske droge ([www.benzo.org.uk](http://www.benzo.org.uk)) ili facilitatora zločina, prvenstveno silovanja i pljački (Kim i sur., 2016). U posljednjih desetak godina u internetskoj prodaji pojavili su se tzv. „dizajnerski“ benzodiazepini. To su benzodiazepinski derivati koji nisu registrirani za upotrebu farmakoterapiji, ali nisu ni na popisu nedozvoljenih supstanci. Prodaju se preko interneta kao „kemikalije za kemijska istraživanja“, a upotrebljavaju se kao rekreacijske droge ili u kriminalne svrhe (Høiset i sur., 2016; Moosmann i sur., 2014).

#### 1.4.6. Tautomerizacija diazepina

Sukladno poznatim zakonitostima, tautomerizacija benzodiazepina omogućena je ako postoji produžena konjugacija ili vodikova veza koja snižava energiju sustava (Meanwell i Walker, 2008). Također je predloženo da OH skupina na položaju C3 olakšava enolizaciju (Redshaw i sur., 2008). U literaturi je detaljno istražena imin-enamin tautomerizacija različitih diazepinskih derivata (Pertejo i sur., 2014), dok o keto-enol i keto-iminol tautomerizaciji nema mnogo radova. Također, enolizacija i iminolizacija primijećene su i analizirane na 1,5-benzodiazepinima (Okovytyy i sur., 2010).

Tautomerni oblici benzodiazepina uočeni su prilikom istraživanja svojstava tih molekula. Enolizacija je opisana kao brza reakcija čiji je produkt (enol) nestabilan i brzo se pretvara u keto oblik (Redshaw i sur., 2008). Spektrofotometrijskim ispitivanjima otopina oksazepama i lorazepama primijećeno je stvaranje N1=C2 veze (Yang, 1994). Na temelju otkrića formiranja iminola i enola nakon deprotonacije u bazičnim uvjetima, keto-enolna tautomerija predložena je kao mogući mehanizam racemizacije oksazepama u alkalnim otopinama (Yang i Bao, 1994). U novijem radu enolni tautomer nordiazepama identificiran je u razgrađenim uzorcima diazepama podrijetlom iz otpadnih voda. Mogućnost postojanja tautomera benzodiazepina kao polutanata u vodama i tlu ima značajne implikacije za ekologiju (Redshaw i sur., 2008).

Tautomerizacija je također primijećena prilikom istraživanja mehanizama reakcija. Keto-enolna tautomerija predlaže se kao mehanizam deuteriranja benzodiazepina u bazičnom mediju (Yang i Bao, 1994; Yang, 1997). Etiliranje benzodiazepin-2-ona na položaju N1 odvija se preko iminolnog međuprodukta. (Mishra i sur., 2006) Enol diazepama predložen je kao međuprodukt u reakciji kloriranja na položaju C3 (Nanda i sur., 1999).

Keto-enolna tautomerija iskorištena je u sintezi benzodiazepina obilježenih deuterijem ili tricijem. U deuteriranom mediju događat će se izmjena vodika na C3 za deuterij, što će rezultirati

obilježavanjem benzodiazepina. Također, moguće je sintetizirati benzodiazepin koji je deuterijem ili tricijem obilježen na svim mogućim položajima, a potom u vodenom mediju ukloniti deuterij ili tricij samo s položaja C3 (Yang, 1997). Ovakvim postupcima mogu se proučavati izotopni efekti u enzimskim reakcijama metabolizma ili zakonitosti fragmentacije u masenoj spektrometriji (Yang i sur., 1996).

Pirol(2,1-c)-1,4-benzodiazepini, potencijalni protutumorski lijekovi, ilustriraju važnost tautomerizacije za terapijsko djelovanje benzodiazepina. Mehanizam djelovanja temelji se na umetanju u mali utor dvostruke uzvojnice DNA, selektivno za određene sekvence nukleotida. Za vezanje lijeka važan je položaj elektrofilnog centra na 1,4-diazepinskom prstenu. Iminski oblik je podložan nukleofilnom napadu (Pertejo i sur., 2014; Rahman i sur., 2011).

#### 1.4.7. Racemizacija benzodiazepina

*In vivo* studije pokazuju razliku u farmakokinetici i farmakodinamici enantiomera benzodiazepina. *S*(+) enantiomeri lorazepam i oksazepam lakše istiskuju diazepam i flurazepam s receptora na sinapsama iz mozga štakora, nego *R*(-) enantiomeri (Nguyen i sur., 2006; Lu i Yang, 1990). Vezanje benzodiazepina na GABA<sub>A</sub> receptor je stereoselektivno: *S*(+) enantiomeri vežu se većim afinitetom od *R*(-) enantiomera (Papini i sur., 2006; Salvadori i sur., 1989). Isto vrijedi i za vezanje na bromodomene, jer je primijećeno da *R*-enantiomeri određenih eksperimentalnih benzodiazepina ulaze u sterički sukob s aminokiselinskim ostacima na bromodomenama (Guasch i sur., 2015). Eksperimenti *in vivo* na štakorima potvrđuju postojanje razlike u djelovanju pojedinih enantiomera (Bogatskii i sur., 1974). Stereoselektivnost je uočena i kod esteraza miša – jetrene esteraze prvenstveno hidroliziraju *R*(-) oksazepam acetat, dok hidrolaze mozga preferiraju *S*(+) enantiomer (Yang i Lu, 1989). Enantiomeri se također razlikuju u afinitetu vezanja za prijenosni protein albumin (Nguyen i sur., 2006), što utječe na njihovu koncentraciju u plazmi, raspodjelu, metabolizam i eliminaciju.

*In vitro* mjerenja pokazala su da racemizacija lorazepama prati kinetiku prvog reda te da je brža u otapalima veće polarnosti i na višoj temperaturi. Brzinu racemizacije mogu smanjiti jake elektron-donorske ili elektron-akceptorske skupine na položaju N1, supstitucije na aromatskom prstenu i sterički učinci (Lu i Yang, 1990). Mehanizam racemizacije dugo je vremena bio nepoznat. Dominantna pretpostavka bila je otvaranje prstena i formiranje iminoaldehidnog međuprodukta (Yang i Lu, 1989), no ona je kasnije odbačena. Danas je pretpostavljeni mehanizam keto-enolna tautomerija (Yang i Bao, 1994).

## 2. Obrazloženje teme

Proučavanje tautomerizacije farmaceutika značajno je iz više razloga. Mala promjena oblika molekule može imati veliki utjecaj na afinitet vezanja za biološke mete u organizmu (transportere, enzime i receptore). Nadalje, preraspodjela elektrona u molekuli, uzrokovana procesom tautomerizacije, mijenja reaktivnost, time i stabilnost, djelovanje i metabolizam farmaceutika. Zatim, tautomerizacija je povezana s drugim važnim strukturnim promjenama, poput enantiomerne odnosno stereokemijske konverzije. Talidomidska katastrofa bolna je lekcija farmaciji o važnosti potpune karakterizacije svih mogućih oblika molekule, uključujući i enantiomere i tautomere. Ista molekula u različitom obliku ima različit učinak na ljudski organizam. Tipične mete lijekova (enzimi i receptori) kiralne su molekule i kao takve su stereoselektivne prema drugim kiralnim molekulama.

U literaturi postoje dokazi koji upućuju na enole i iminole kao reaktivne oblike benzodiazepina, odgovorne za određene farmakološke učinke i racemizaciju. Otvorenim ostaje pitanje termodinamke i kinetike reakcija tautomerizacije. Sami tautomeri benzodiazepinskih molekula do sad su u literaturi samo usputno spominjani, ali nikad detaljnije proučavani.

U ovom će se radu kvantno-kemijskim izračunima odrediti ravnotežni omjeri keto oblika, enola i iminola koji koegzistiraju u otopini svakog pojedinog benzodiazepina, odnosno procijeniti udio svakog tautomera i njihove relativne stabilnosti, s namjerom određivanja prevladavajuće forme i vjerojatnosti tautomerne konverzije. Ti podatci omogućit će procjenu sklonosti benzodiazepina određenim vrstama reakcija i produblјivanje saznanja o njihovom ponašanju izvan i unutar ljudskog organizma. Također, pokušat će pronaći povezanost između strukture i stabilnosti svakog tautomera, upućujući na strukturne elemente koji se trebaju ugraditi/izbaciti kako bi svojstva molekule konvergirala u željenom smjeru.

Eksperimentalno proučavanje enola i iminola otežano je zbog njihove nestabilnosti (brze konverzije u keto oblik) te zbog vrlo malog udjela u tautomernom sastavu benzodiazepina. Računalna kemija pruža izvrsnu mogućnost karakterizacije nestabilnih i kratkoživućih specija i omogućuje uvid u taj često zanemaren aspekt kemije lijekova.

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Računalna kemija

Računalna kemija bavi se proučavanjem kemijskih struktura i reakcija pomoću računalnih modela, bez potrebe za eksperimentalnim radom. Omogućuje određivanje energije molekule i drugih svojstava povezanih s energijom koristeći zakone fizike. Molekulsko-mehanički programi koriste zakone klasične (njutnovske) fizike. Kvantno-mehanički programi, korišteni u ovom radu, temelje se na zakonima kvantne mehanike.

#### 3.2. Konformacijska analiza

Za usporedbu Gibbsovih energija tautomernih oblika diazepina potrebno je identificirati najstabilnije rotacijske konformere (rotamere) svake tautomerne specije, tj. pronaći rotamere najniže energije. Rotacijski konformeri pretvaraju se jedan u drugi rotacijom oko jednostrukih veza. Broj mogućih konformacija molekule ovisi o njezinoj veličini i broju međusobno različitih atoma. Jednostavni benzodiazepini poput lorazepama imaju mali broj jednostrukih veza oko kojih je moguća slobodna rotacija, dakle i mali broj konformera. U tom slučaju, konformacijska analiza provedena je „ručno“, generirajući sve moguće konformere u programu za vizualizaciju struktura GaussView. Za identifikaciju konformera većih molekula poput etil loflazepata korišten je računalni program PCMODEL. PCMODEL je program za molekulsko modeliranje namijenjen proučavanju organskih i anorganskih molekula. Omogućuje brzo i temeljito provođenje konformacijske analize kombinirajući dva pristupa: rotaciju veza za prethodno definirane kutove i stohastičku pretragu u kojoj se nasumično mijenjaju koordinate određenih atoma kako bi se molekuli promijenio oblik. Ručnom ili računalnom pretragom dobiju se početne strukture molekula. Početna struktura se zatim računalno optimizira kako bi se pronašle stabilne strukture.

#### 3.3. Geometrijska optimizacija strukture

Geometrijska optimizacija je proces traženja stacionarnih točaka na plohi potencijalne energije (PES – Potential Energy Surface). Ploha potencijalne energije je složena matematička funkcija koja opisuje ovisnost energije o udaljenostima između atoma u molekuli. Stacionarne točke su mjesta na plohi potencijalne energije u kojima je gradijent energije jednak nuli. Gradijent energije je prva derivacija energije u odnosu na promjene međuatomskih udaljenosti. Stacionarna točka koja se nalazi u minimumu na plohi potencijalne energije odgovara jednoj stabilnoj konformaciji molekule. Na plohi potencijalne energije neke molekule postoji velik broj lokalnih minimuma. U ovom radu bilo je potrebno pronaći konformaciju najniže energije, dakle globalni minimum.

Početna struktura molekule, preuzeta iz baze podataka ili generirana u programu za vizualizaciju poput GaussViewa, ne odgovara nužno stabilnoj konformaciji, tj. najbližem lokalnom minimumu. Lokalni minimum traži se geometrijskom optimizacijom, iteracijskim postupkom kojim se koordinate atoma mijenjaju u smjeru snižavanja energije sustava. Mijenjanjem atomskih koordinata mijenjaju se geometrijski parametri molekule (duljine veza, vezni i diedarski kutevi, rotacije). Svaku promjenu atomskih koordinata prati promjena energije, što se očituje u iznosu prve derivacije energije. Negativna vrijednost gradijenta energije označava smanjenje energije sustava i znak je kretanja u dobrom smjeru. Postupak je završen kad se iznos prve derivacije spusti ispod određenog konvergencijskog praga, tj. postane približno jednak nuli.

### 3.4. Izračun Gibbsove energije

Sljedeći je korak provođenje frekvencijskog računa. Frekvencijskim računom izračunavaju se više derivacije energije u ovisnosti o međuatomskim udaljenostima, čime se dobivaju vibracije atoma u molekuli. Frekvencijski račun nužan je za potvrdu da optimizirana struktura odgovara minimumu na plohi potencijalne energije (sve vibracije moraju biti pozitivne) te za računanje Gibbsove energije molekule. Minimum na plohi potencijalne energije daje iznos ukupne elektronske energije molekule, dakle ne uzima u obzir vibracijsko gibanje. Molekule u stvarnosti nikada nisu u mirovanju, već se uvijek nalaze u nekom vibracijskom stanju. Elektronskoj energiji pribraja se energija najnižeg vibracijskog stanja (tzv. korekcija nulte točke). Zatim se tome pribraja doprinosi translacijskog, rotacijskog i vibracijskog gibanja koji proizlaze iz frekvencijskog računa. Time se dobiju entalpija i entropija. Gibbsova energija odgovara entalpiji umanjenoj za umnožak entropije i temperature. Analiza je provedena na temperaturi od 298.15 K i tlaku od 1 atm, koristeći pritom osnovne izotope za svaki element.

### 3.5. Solvacijski račun

Frekvencijskim računom dobiju se vrijednosti Gibbsove energije za molekulu u plinovitoj fazi, odnosno u vakuumu. Za procjenu Gibbsove energije molekule u nekom otapalu potrebno je provesti solvacijski račun. Otapalo stupa u interakciju s molekulom i utječe na njezinu energiju i preferiranu konformaciju. U ovom radu primijenjen je implicitan pristup solvaciji, gdje se računaju interakcije molekule u solvacijskoj šupljini s okolnim medijem, koji je definiran vrijednošću dielektrične konstante  $\epsilon$ . Za svaku strukturu optimiziranu u vakuumu, izračunata je korekcija Gibbsove energije u vodi ( $\epsilon = 78,4$ ) i pribrojena Gibbsovoj energiji u vakuumu kako bi se dobila konačna vrijednost.



Konformacijska analiza određenih molekula provedena je koristeći program PCMODEL. Zadane postavke pretrage bile su: polje sila MMX, pretraživanje po vezama, unutar 10 kcal/mol od najstabilnije pronađene strukture. Geometrijske optimizacije, frekvencijski račun i solvacijski računi provedeni su uz upotrebu programskog paketa Gaussian09. Za vizualizaciju rezultata korišten je program GaussView. (Gaussian, Inc., Carnegie Office Park, Pittsburgh, PA.) Svi računi provedeni su na klasteru Isabella Sveučilišnog računalnog centra (SRCE) u Zagrebu ([www.srce.hr](http://www.srce.hr)) i klasteru Andrija Zavoda za organsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu ([andrija.pharma.hr](http://andrija.pharma.hr)). Za optimizaciju struktura korišten je DFT funkcional M06, zbog njegove točnosti u predviđanju Gibbsovih energija tautomerizacije (McCann i sur., 2015.) Za opis molekulskih orbitala korišten je bazni skup 6-31+G(d,p).

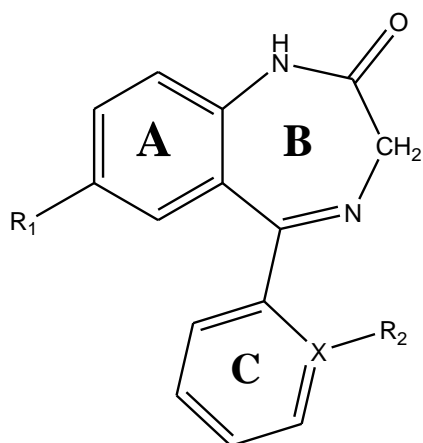
## 4. Rezultati i rasprava

Ukupno 31 struktura različitih 1,4-benzodiazepin-2-ona uključena je u istraživanje, s obzirom na dva kriterija: klinička primjena (ili biološka aktivnost dokumentirana u literaturi) i prisutnost fragmenta  $-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$  u strukturi. Molekule su podijeljene u tri skupine prema sličnosti strukturnih elemenata: „klasični“ 1,4-benzodiazepin-2-oni, heteroaromatski 1,4-diazepin-2-oni i 3-supstituirani 1,4-benzodiazepin-2-oni. Određene su Gibbsove energije keto, enolnog i iminolnog tautomera svake molekule te je izračunata relativna Gibbsova energija enola i iminola (razlika energija enola/iminola i pripadnog keto oblika). Za sve tautomere provedena je konformacijska analiza i za usporedbu je korišten najstabilniji konformer. U daljnjem tekstu razmatrat će se utjecaj pojedinih strukturnih elemenata na relativnu stabilnost tautomera.

U svim skupinama primarno se provodi usporedba energija molekula u plinovitoj fazi, tj. u vakuumu. Time se demonstriraju intrinzički supstitucijski efekti u molekulskom sustavu, neovisno o utjecaju otapala, kao i o pogreškama solvatacijskih modela. Ipak, implicitna solvatacija provedena je za sve molekule te je razmotren utjecaj vodenog medija.

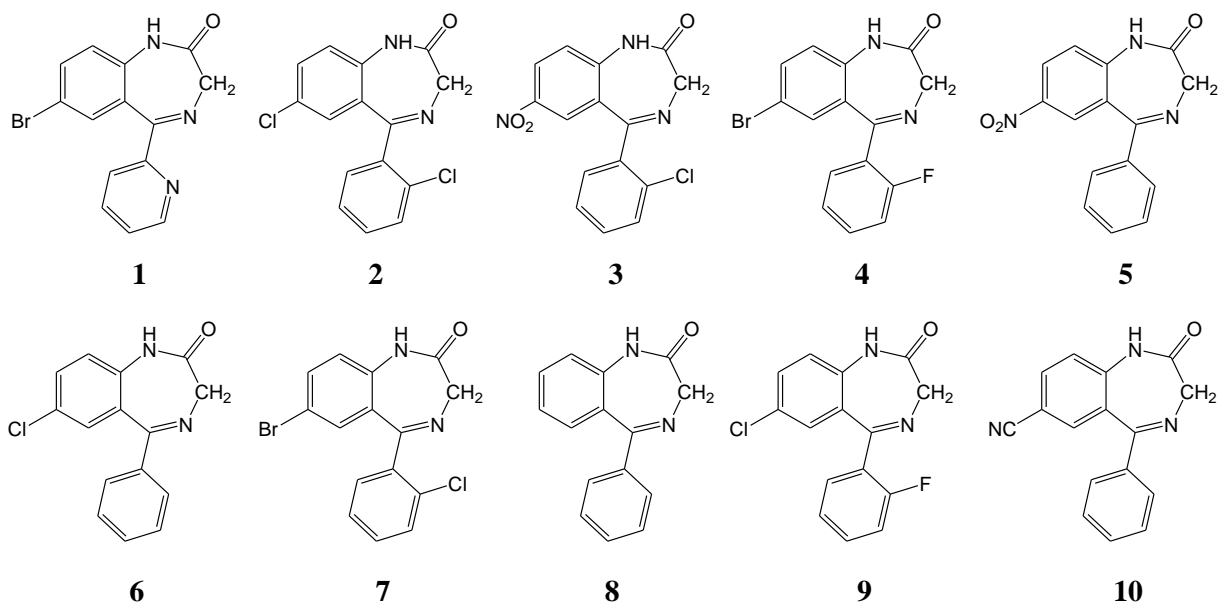
### 4.1. Klasični 1,4-benzodiazepin-2-oni

U skupinu klasičnih 1,4-benzodiazepin-2-ona svrstane su molekule s fuzioniranim benzenskim prstenom i metilenskom skupinom na položaju C3 (Slika 4.).



Slika 4. Osnovna struktura klasičnih 1,4-benzodiazepin-2-ona. X = C ili N,  $R_1 = \text{Cl}, \text{Br}, \text{NO}_2, \text{CN}$  ili H,  $R_2 = \text{F}, \text{Cl}$ , ili H.

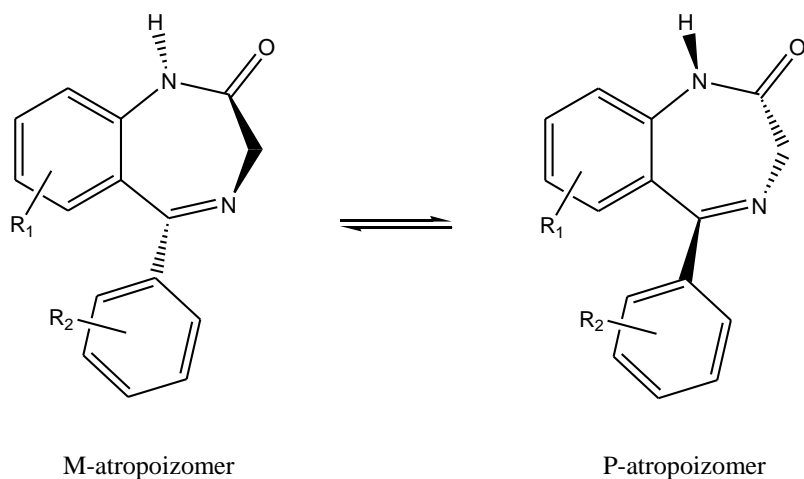
U istraživanje je uključeno deset molekula koje se razlikuju po supstituiranom prstenu na položaju C5 (fenil ili piridin) te po prisutnosti i vrsti supstituenata na položajima C7 i C2' (halogen, nitro ili cijano skupina) (Slika 5.).



Slika 5. Strukture biološki aktivnih 1,4-benzodiazepin-2-ona.

Razmatraju se molekule koje su u kliničkoj primjeni (1-7) i primjeri iz literature potvrđene biološke aktivnosti (8-10) (Karpińska i sur., 2012; Spencer i sur., 2011; Chouinard i sur., 1999). Poznato je da supstituenti imaju velik utjecaj na farmakološku aktivnost benzodiazepina, jer se ovi lijekovi vežu na receptorska mjesta osjetljiva na male strukturne promjene (Smith i sur., 2014). Afinitet vezanja i intenzitet farmakološkog učinka povećavaju elektron-akceptor na položaju C7 i halogen na položaju C2' (Sternbach, 1971). Utjecaj supstituenata na relativnu stabilnost tautomera benzodiazepina nije ranije istraživano.

Provedena je računalna analiza svih konformera keto, enolnih i iminolnih tautomera promatranih molekula i predviđene su njihove Gibbsove energije (Tablica 1.). Prilikom provođenja konformacijske analize razmotrena je torzijska kiralnost, odnosno atropoizomerizam molekula diazepina (Slika 6.). Atropoizomerizam je vrsta kiralnosti koja se javlja kada ograničenje rotacije oko jednostruke veze omogućuje razdvajanje dvaju izomera (Pine, 1994).



Slika 6. Torzijska kiralnost 1,4-benzodiazepin-2-ona

1,4-diazepinski prsten zauzima iskrivljenu konformaciju lađe, gdje metilenska skupina C3 izlazi izvan ravnine fuzioniranog benzenskog ili heteroaromatskog prstena. Moguća su dva konformera, koji se razlikuju u orijentaciji metilenske skupine. Opisuje ih diedarski kut C2-C3-N4-C5 (Paizs i Simonyi, 1999). Konformer s negativnim diedarskim kutom označava se stereodeskriptorom M (minus), a konformer s pozitivnim kutom označava se s P (plus) (Testa i sur., 2016). M i P konformeri zrcalne su slike, iako molekula nema asimetrični ugljikov atom. Konformacijskom analizom potvrđeno je da su M i P konformeri 3-nesupstituiranih diazepina izoenergetski.

Tablica 1. 1,4-benzodiazepin-2-oni (gdje je moguće navedeno je i nezaštićeno i trgovačko ime) i relativne Gibbsove energije keto, enolnog i iminolnog tautomera izračunate na M06/6-31+G(d,p) teorijskoj razini. Relativne Gibbsove energije u modelnom otapalu (voda,  $\epsilon = 78,4$ ) navedene su u zagradama.

BENZODIAZEPINI	$\Delta G_{298}$ (kJ/mol)		
	keto	iminol	enol
<b>1</b> , bromazepam (Lexaurin®)	0,0 (0,0)	41,3 (46,1)	93,0 (99,9)
<b>2</b> , delorazepam (Dadumir®)	0,0 (0,0)	40,3 (46,9)	93,9 (100,1)
<b>3</b> , klonazepam (Rivotril®)	0,0 (0,0)	37,5 (44,0)	89,8 (95,1)
<b>4</b> , flubromazepam (Flubromazepam®)	0,0 (0,0)	39,4 (46,0)	93,2 (99,2)
<b>5</b> , nitrazepam (Cerson®)	0,0 (0,0)	43,6 (51,8)	106,0 (110,6)
<b>6</b> , nordiazepam (Nordaz®)	0,0 (0,0)	45,6 (53,0)	108,3 (113,6)
<b>7</b> , fenazepam (Fenazepam®)	0,0 (0,0)	39,5 (41,0)	94,2 (95,7)
<b>8</b> , 1,4-benzo- diazepin-2-on	0,0 (0,0)	42,0 (48,9)	97,2 (103,1)
<b>9</b> , N-desalkil- flurazepam	0,0 (0,0)	39,0 (45,8)	93,9 (99,7)
<b>10</b> , 7-cijano-1,4- benzodiazepin-2-on	0,0 (0,0)	38,3 (46,5)	95,5 (101,7)

Keto tautomer stabilniji je od enola i iminola u svih deset slučajeva, što je i očekivano s obzirom na literaturne podatke. Relativne Gibbsove energije iminola variraju od +37,5 kJ/mol (klonazepam, 3) do +45,6 kJ/mol (nordiazepam, 6) Takav uzak raspon od 8,1 kJ/mol može se pripisati očekivanoj pogrešci računa relativnih Gibbsovih energija, što navodi na zaključak da su bilo kakvi elektronski ili sterički utjecaji supstituenata na stabilnost iminola zanemarivi. Supstitucijom na položajima C7 ili C2' nije moguće stabilizirati iminolnu speciju.

Suprotno tome, relativne Gibbsove energije enola kreću se od +89,8 kJ/mol (klonazepam, 3) do +108,3 kJ/mol (nordiazepam, 6). Raspon stabilnosti enola iznosi 18,5 kJ/mol i upućuje na postojanje

određenog supstitucijskog efekta. Iz redoslijeda stabilnosti enola ( $3 < 1 < 4 < 9 < 2 < 7 < 10 < 8 < 5 < 6$ ) proizlazi da supstituent na položaju C2' ima stabilizacijski učinak na enolni oblik, dok ga supstituent na položaju C7 destabilizira. U svakom slučaju, iznosi relativnih Gibbsovih energija enola toliko su visoki da se može zaključiti da enolni tautomer nije prisutan u tautomernoj smjesi benzodiazepina, tj. da je njegov udio zanemariv.

Veća stabilnost iminola u odnosu na enol može se objasniti većom kiselošću N1 u odnosu na C3 položaj. Ravnotežna konstanta tautomerizacije povezana je s ravnotežnom konstantom disocijacije kiseline, prema sljedećim izrazima:

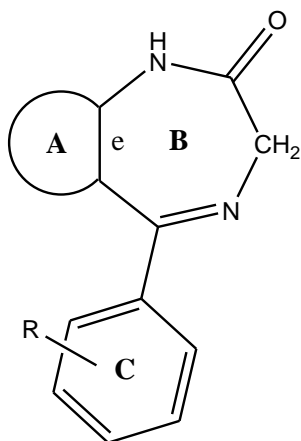
$$pK_T = pK_a(T_1) - pK_a(T_2)$$

$$pK_T = [\Delta G(T_1) - \Delta G(T_2)] / (2,303RT) \quad (\text{Raczyńska i sur., 2005}),$$

gdje je  $\Delta G(T)$  promjena Gibbsove energije za reakciju deprotonacije tautomera, R opća plinska konstanta, a T apsolutna temperatura. Udio pojedinog tautomera u ravnotežnoj smjesi ovisi o sposobnosti kiselog centra (N1 ili C3) da otpusti proton. Budući da dušik ima manji afinitet prema protonu u odnosu na ugljik (Hare i sur., 2001), lakše se formira amidat-anion, a analogno tome i iminol. Određene reakcije, poput alkiliranja, aminiranja i halogeniranja benzodiazepina, odvijaju se dominantno na položaju N1 (Archer i Sternbach, 1968). Kiselost N1 dušika mogla bi objasniti regioselektivnost tih reakcija. Moguće je da se reakcije na N1 odvijaju preko iminolnog međuprodukta, koji je dobar nukleofil i reaktivniji od keto oblika.

#### 4.2. Heteroaromatski 1,4-diazepin-2-oni

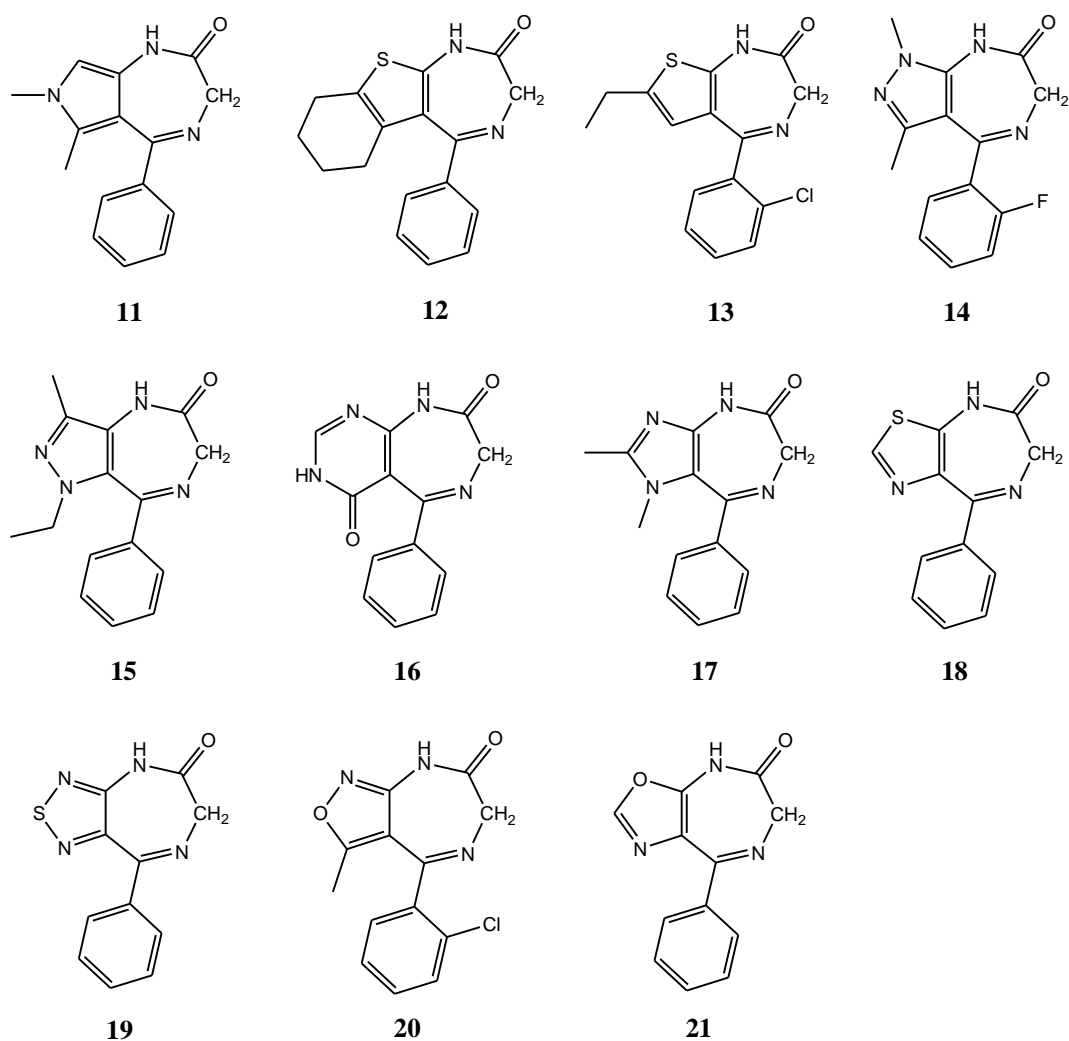
U drugu skupinu svrstani su spojevi koji imaju 1,4-diazepinski kostur s kojime je preko *e* veze fuzioniran heterociklički aromatski prsten. (Slika 7.)



Slika 7. Opća struktura heteroaromatskog [e] 1,4-diazepin-2-ona. Prsten A je heteroaromatski prsten, fuzioniran za diazepin na *e* vezi.

Spojevi iz ove skupine primjeri su farmakološki aktivnih molekula s fuzioniranim pirolom (premazepam), tiofenom (bentazepam, klotiazepam), i pirazolom (ripazepam). Također, u analizu su uvrštene molekule navedene u literaturi kao kandidati za farmakološka istraživanja, s fuzioniranim pirimidinom, imidazolom, tiazolom, tiadiazolom, izoksazolom i oksazolom (Walser i Fryer, 1991) (Slika 8.).

U slučajevima klotiazepama i zolazepama u računu su korišteni N-demetilirani oblici koji mogu tvoriti iminole. Reakcija N-dealkilacije važna je metabolička reakcija u ljudskom organizmu, kojoj podliježu i benzodiazepini (Rendić, 2016; Coutts i sur., 1994). Produkti N-dealkilacije često zadržavaju metaboličku aktivnost (Chouinard i sur., 1999). Analogno prvoj skupini, zanemaren je atropoizomerizam 1,4-diazepinskog prstena jer su M i P izomeri 3-nesupstituiranih heteroaromatskih diazepina izoenergetski. Rezultati relativnih Gibbsovih energija druge skupine prikazani su u tablici 2.



Slika 8. Strukture heteroaromatskih 1,4-diazepin-2-ona

Tablica 2. Heteroaromatski 1,4-diazepin-2-oni (gdje je moguće navedeno je i nezaštićeno i trgovačko ime) i relativne Gibbsove energije keto, enolnog i iminolnog tautomera izračunate na M06/6-31+G(d,p) teorijskoj razini. Relativne Gibbsove energije u modelnom otapalu (voda,  $\epsilon = 78,4$ ) navedene su u zagradama.

BENZODIAZEPINI	$\Delta G_{298}$ (kJ/mol)		
	keto	iminol	enol
<b>11</b> , premazepam	0,0 (0,0)	41,6 (47,7)	102,6 (110,8)
<b>12</b> , bentazepam (Thiadipone®)	0,0 (0,0)	32,4 (35,4)	104,1 (110,1)
<b>13</b> , N-demetil- klotiazepam (Clozan)	0,0 (0,0)	30,0 (32,7)	102,1 (109,1)
<b>14</b> , N-demetil- zolazepam (*Telazol)	0,0 (0,0)	22,6 (32,1)	103,3 (105,6)
<b>15</b> , ripazepam	0,0 (0,0)	35,7 (41,6)	105,6 (113,0)
<b>16</b> , pirimido-1,4- diazepin-2-on	0,0 (0,0)	51,5 (44,7)	96,1 (98,0)
<b>17</b> , imidazo-1,4- diazepin-2-on	0,0 (0,0)	47,6 (42,4)	105,3 (113,4)
<b>18</b> , tiazolo-1,4- diazepin-2-on	0,0 (0,0)	26,2 (30,7)	98,4 (102,7)
<b>19</b> , tiadiazolo-1,4- diazepin-2-on	0,0 (0,0)	44,7 (39,2)	82,4 (87,6)
<b>20</b> , izoksazolo-1,4- diazepin-2-on	0,0 (0,0)	44,1 (37,8)	83,4 (91,9)
<b>21</b> , oksazolo-1,4- diazepin-2-on	0,0 (0,0)	21,8 (22,9)	103,0 (107,2)

Keto oblik je i u drugoj skupini najstabilnija specija. Relativne Gibbsove energije iminola variraju od +21,8 kJ/mol (oksazolo-derivat, **21**) do +51,5 kJ/mol (pirimido-derivat, **16**). Široki raspon energija (29,7 kJ/mol) upućuje na utjecaj heterocikla na stabilnost iminolne specije. U odnosu na molekule prve skupine, vidljivo je povećanje stabilnosti iminola. Manje razlike u energijama keto i iminolnog tautomera znače veći udio, a time i veću značajnost, iminola u tautomernoj smjesi.



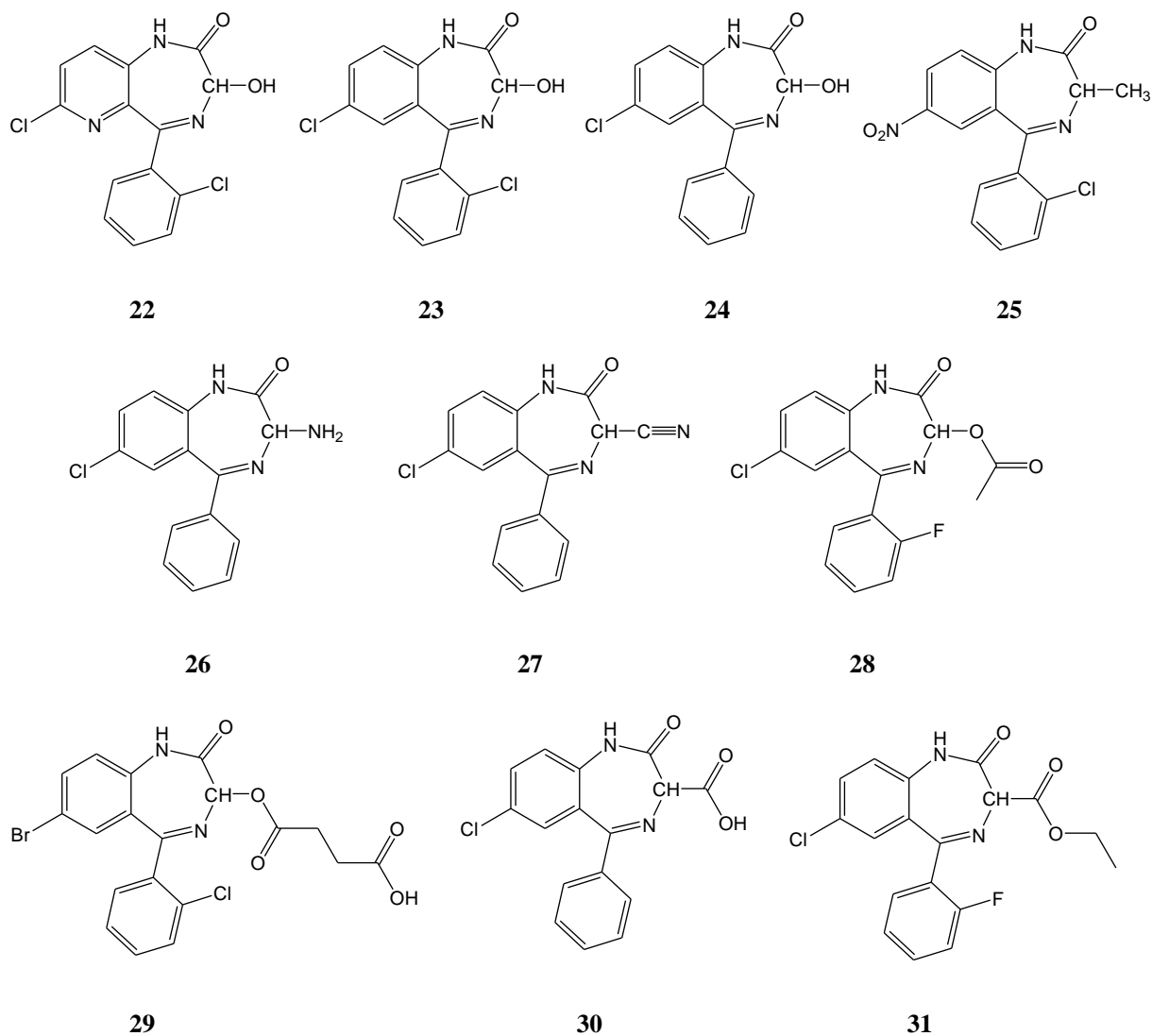
Relativne Gibbsove energije enolnog tautomera kreću se od +82,4 kJ/mol (tiadiazolo-derivat, 19) do +105,6 kJ/mol (ripazepam, 15). Raspon energija i u ovom je slučaju previše širok da bi se zanemario (23,2 kJ/mol) te heteroaromatski prsten ima utjecaja i na enolnu speciju. Međutim, relativne Gibbsove energije enola druge skupine iznosom su vrlo slične energijama enola prve skupine. Definitivan zaključak o utjecaju pojedinog heterocikla na enol nije moguć. Analogno prvoj skupini, relativne Gibbsove energije od 80 do 100 kJ/mol označavaju da je udio enola u smjesi tautomera zanemariv.

Druga skupina diazepina potvrđuje da se na stabilnost tautomera može utjecati modifikacijom strukture. Uvođenjem heteroaromatskog prstena umjesto benzena stabilizira se iminol, bez da se značajnije poremeti (ne)stabilnost enola. Posljedica toga mogla bi biti veća podložnost molekule reakcijama na dušikovu atomu (poput već spomenutih reakcija alkiliranja, aminiranja i halogeniranja), uz istodobno onemogućavanje procesa koji zahtijevaju enolni međuprodukt.

#### 4.3. 3-supstituirani 1,4-benzodiazepin-2-oni

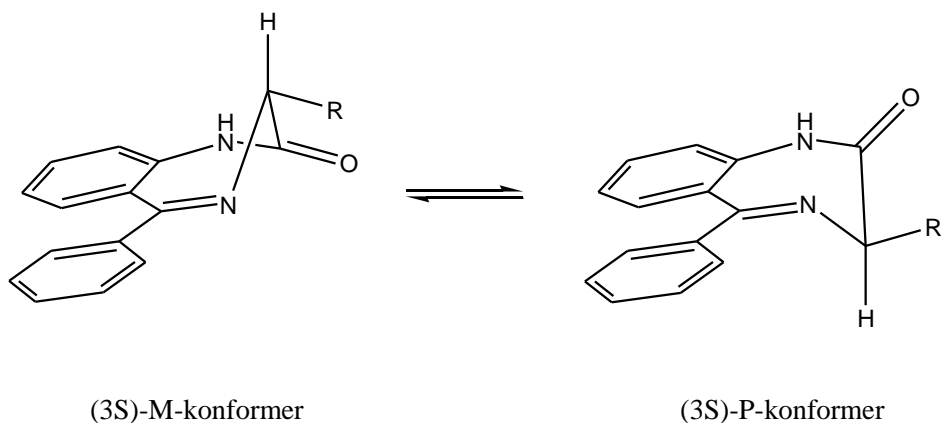
U treću skupinu svrstani su 1,4-benzodiazepin-2-oni sa supstituentom na položaju C3. Kao i kod predhodnih skupina, neki benzodiazepini koriste se u kliničkoj praksi (23, 24, 30 i 31), dok su ostale bioaktivne tvari opisane u literaturi (Høiseth i sur., 2016; Park i sur., 2012; Spencer i sur., 2010). Promatrani su supstituenti različitih kemijskih karakteristika: metilna, hidroksilna, alkoksi, amino, cijano i karbonilna skupine (slika 9.).

C3 supstituent ima značajan utjecaj na farmakodinamiku i farmakokinetiku molekule. Pokazalo se da alkilni supstituent smanjuje aktivnost lijeka. OH skupina modulira aktivnost, npr. smanjujući antikonvulzivno djelovanje, dok istovremeno umanjuje poremećaje koordinacije pokreta pacijenta (Bogatskii i sur., 1974). Također, OH skupina ubrzava metabolizam i eliminaciju lijeka iz organizma (Karpínska i sur., 2012). Utjecaj C3 supstituenta na stabilnost tautomera benzodiazepina do sad nije ispitan.



Slika 9. Strukture 3-supstituiranih 1,4-benzodiazepin-2-ona

U ovoj skupini prilikom provođenja konformacijske analize potrebno je uzeti u obzir stereokemiju molekule. Supstitucijom na C3 položaju u molekulu se uvodi novi kiralni centar. 3-supstituirani diazepin može postojati u četiri konfiguracije, koje su međusobno dijastereomeri i imaju različite energije. M i P konformacije više nisu izoenergetske jer supstituent preferira pseudoekvatorijalni položaj. S-enantiomer preferirat će konformaciju M, a R-enantiomer P (Paizs i Simonyi, 1999) (Slika 10.).



Slika 10. Atropoizomeri 3S-benzodiazepina. M-konformer ima supstituent u pseudoekvatorijalnom položaju, dok je kod P-konformera supstituent smješten pseudoaksijalno.

Atropoizomerizam je značajan u interakciji lijeka s kiralnim molekulama u organizmu. Pokazalo se da serumski albumin i GABA<sub>A</sub> receptor vežu M-benzodiazepine većim afinitetom (Testa i sur., 2016; Sabia i sur., 2014). S druge strane, α1 kiseli glikoprotein preferira vezanje P-benzodiazepina (Smith, 2009). Budući da je preferirani atropoizomer definiran stereokemijom C3 kiralnog centra, racemizacija će imati utjecaja na vezanje benzodiazepina za mete u organizmu. Računi su provedeni na *S*-enantiomeru svake molekule, uzimajući u obzir ekvivalentnost energija *S* i *R* enantiomera. Za svaku molekulu izračunata je energija i M i P atropoizomera. U svim slučajevima najstabilniji atropoizomer bio je onaj koji ima supstituent u pseudoekvatorijalnom položaju. Rezultati relativnih Gibbsovih energija treće skupine prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. 3-supstituirani 1,4-benzodiazepin-2-oni (gdje je moguće navedeno je i nezaštićeno i trgovačko ime) i relativne Gibbsove energije keto, enolnog i iminolnog tautomera izračunate na M06/6-31+G(d,p) teorijskoj razini. Relativne Gibbsove energije u modelnom otapalu (voda,  $\epsilon = 78,4$ ) navedene su u zagradama.

BENZODIAZEPINI	$\Delta G_{298}$ (kJ/mol)		
	keto	iminol	enol
<b>22</b> , lopirazepam	0,0	38,2	82,2
	(0,0)	(42,4)	102,2
<b>23</b> , lorazepam (Lorsilan®)	0,0	41,5	87,7
	(0,0)	(49,6)	(108,1)
<b>24</b> , oksazepam (Praxiten®)	0,0	44,1	89,5
	(0,0)	(50,5)	(110,6)
<b>25</b> , meklonazepam	0,0	41,0	94,1
	(0,0)	(46,8)	(97,7)
<b>26</b> , 3-amino-7-kloro- 1,4-benzodiazepin-2-on	0,0	43,0	74,4
	(0,0)	(48,1)	(102,0)
<b>27</b> , 3-cijano-7-kloro- 1,4-benzodiazepin-2-on	0,0	39,1	48,0
	(0,0)	(47,8)	(64,1)
<b>28</b> , 3-acetoksi-2'- fluoro-7-kloro-1,4- benzodiazepin-2-on	0,0	39,5	89,4
	(0,0)	(47,2)	(102,5)
<b>29</b> , cinazepam	0,0	42,5	82,1
	(0,0)	(35,6)	(101,9)
<b>30</b> , klorazepat (Tranxene®)	0,0	35,3	14,8
	(0,0)	(46,4)	(43,7)
<b>31</b> , etil-loflazepat (Victan®)	0,0	38,8	24,8
	(0,0)	(50,2)	(55,3)

Analogno dvjema prijašnjim skupinama, i u trećoj skupini najstabilniji je keto oblik. Relativne Gibbsove energije iminolne specije variraju od +35,3 kJ/mol (klorazepat, 30) do +44,1 kJ/mol (oksazepam, 24). Iminoli treće skupine energijom odgovaraju iminolima nesupstituiranih benzodiazepina, a raspon energija iznosi samo 8,8 kJ/mol (ulazi u pogrešku računa). Stoga se isključuje utjecaj C3 supstituenta na stabilnost iminola.

U trećoj skupini uočljiv je najveći raspon relativnih Gibbsovih energija enolne specije. Relativna Gibbsova energija najstabilnijeg enola (klorazepat, 30) iznosi samo +14,8 kJ/mol, dok za najmanje stabilan enol (meklonazepam, 25) relativna Gibbsova energija iznosi čak +94,1 kJ/mol. Raspon od 79,3 kJ/mol nedvojbeno dokazuje utjecaj C3 supstituenta na stabilnost enola. Velike varijacije stabilnosti mogu se objasniti velikim razlikama kemijskih karakteristika supstituenata.

Spomenuto je da je enolni tautomer moguće stabilizirati elektron-akceptorskim supstituentom na  $\alpha$ -ugljičkovom atomu, jer to omogućava delokalizaciju elektrona C=C veze. Najmanje stabilan enol (meklonazepam, 25) na položaju C3 ima supstituiranu metilnu skupinu, koja je vrlo slab induktivni elektron-donor i ne omogućuje rezonantnu stabilizaciju enola (Pine, 1994). Relativna Gibbsova energija enola meklonazepama stoga odgovara energijama nesupstituiranih benzodiazepina. Drugim riječima, enol je u ovom slučaju zanemariva specija.

Enoli 3-hidroksi i 3-alkoksi benzodiazepina (22, 23, 24, 28, 29) tek su neznatno stabilniji od enola nesupstituiranih benzodiazepina. S relativnim Gibbsovima energijama u rasponu od +82,2 kJ/mol do +89,5 kJ/mol, još uvijek nisu značajni u smjesi tautomera. Iako je OH skupina zbog elektronegativnosti kisika induktivni elektron-akceptor, zbog slobodnog elektronskog para također djeluje kao rezonantni elektron-donor. Moguće je da zbog dvojakog učinka ne uspijeva značajno stabilizirati enol. Također, O-H...O vodikova veza između C3 supstituenta i kisika vezanog na C2 formira se i u keto i u enolnom obliku, tako da ne omogućava stabilizaciju enola u odnosu na keto speciju.

Relativna Gibbsova energija amino-derivata (26) iznosi +74,4 kJ/mol. Na temelju tog podatka ne može se jasno odrediti utjecaj amino skupine. No, u usporedbi sa strukturno najbližijim 3-hidroksibenzodiazepinom, oksazepamom (24), amino skupina snižava energiju enolnog tautomera za 15 kJ/mol. Amino skupina slična je po kemijskim karakteristikama OH skupini, međutim snažnije stabilizira enol. Moguće je da razlog tomu djelomično leži u samoj prirodi skupine, a djelomično u vodikovim vezama. Veza OH...N prisutna u enolu snažnija je od NH...O veze u keto obliku. Budući da je relativna Gibbsova energija enola manja od 80 kJ/mol, njegov udio više se ne može zanemariti, međutim bit će vrlo malen.

Cijano skupina snižava energiju enola na +48 kJ/mol, što se približava stabilnosti iminola. U ovom slučaju enol više nije zanemariva specija, nego se mora uzeti u obzir prilikom razmatranja sastava tautomerne smjese. Objašnjenje utjecaja cijano skupine može se pronaći u uspostavljanju produžene konjugacije koja omogućuje delokalizaciju elektrona.

Najsnažniji utjecaj na stabilnost enola vidljiv je u molekulama s karboksilnom skupinom na C3 položaju (klorazepat, 30 i etil-loflazepat, 31). Vrijednosti relativnih Gibbsovih energija od samo +14,8 kJ/mol, odnosno +24,8 kJ/mol, označavaju da u tim molekulama enol nije samo prisutna, već i značajna specija. Karboksilna skupina snažan je elektron-akceptor i uspostava enolne C=C veze dovodi do stvaranja konjugiranog sustava koji je vrlo stabilan. Ove dvije molekule također su jedine od promatranih u kojima je stabilnost enola veća od stabilnosti iminola. Posljedica toga mogla bi biti

promjena u odvijanju kemijskih reakcija, tako da primarni produkt alikiliranja ili halogeniranja bude C-supstituirani diazepam umjesto N-supstituiranog. Ipak, u obzir se moraju uzeti i sterički i drugi efekti, tako da provjera te hipoteze može biti predmet budućih istraživanja.

Niže vrijednosti energija enola pogodovat će i enantiomernoj konverziji. Može se očekivati brza racemizacija i nemogućnost primjene enantiomerno čistog lijeka. Međutim, racemizacija je uočena i kod molekula s OH skupinom kao supstituentom, premda su njihovi enoli ipak veoma nestabilni. Računalna analiza uspoređivala je stabilnosti izolirane molekule u vakuumu i vodi. U tim uvjetima rezultati navode na zaključak da će enantiomerni prijelaz biti otežan ili gotovo onemogućen. Racemizacijske reakcije eksperimentalno su proučavane u drugačijim uvjetima. Promjena otapala ili temperature imat će značajan učinak na formiranje enola. Također, reakcijske barijere igraju ulogu u kontroli brzine reakcija, ukazujući na potrebu za nastavkom istraživanja na ovom polju.

#### 4.4. Solvatacijski učinci

Promjena Gibbsove energije za reakciju solvatacije benzodiazepina negativna je za sve promatrane molekule. Vodeni medij stabilizira benzodiazepine interakcijama s hidrofilnim centrima molekule (atomi dušika i kisika). Međutim, stabilizacija keto oblika generalno je veća od stabilizacije enola ili iminola. Krajnji rezultat je destabilizacija enola i iminola, odnosno otežavanje keto-enolne i keto-iminolne konverzije. Rezultati sugeriraju da bi udio tautomera u vodenom okolišu (npr. u ljudskom organizmu) bio još manji nego što je predviđeno računima u vakuumu. Ipak, pri tome nisu uračunati čimbenici poput temperature tijela ili prisutnosti drugih kemijskih specija koje bi mogle utjecati na benzodiazepine. Također, u ovom radu molekule su samo implicitno solvatirane. Supramolekulski pristup, tj. kombinacija implicitne solvatacije i eksplicitnog modeliranja interakcija molekula vode s benzodiazepinima, bolje bi opisao mehanizme stabilizacije i konkretna djelovanja vode na promatranu molekulu.

## 5. Zaključak

Neke molekule mogu egzistirati u više tautomernih oblika. Prototropičkom tautomerizacijom dobivaju se varijante molekule koje se razlikuju u položaju vodikovog iona (protona) i jedne dvostruke veze. Keto-enolna i keto-iminolna tautomerija u kompeticiji su kod molekula s primarnim ili sekundarnim amidom koje imaju barem jedan vodikov atom na  $\alpha$ -ugljikovu atomu. Među takvim molekulama su i benzodiazepini.

Interakcija bilo koje egzogene supstance sa složenom mrežom receptora i enzima u ljudskom organizmu ovisi o njezinoj strukturi, obliku, veličini, i fizikalno-kemijskim obilježjima. Različiti tautomeri imaju različiti oblik, raspodjelu elektrona, nukleofilnost/elektrofilnost pojedinih atoma itd. Tautomerizacija može čak dovesti do promjene stereokemije u strukturi, a poznato je da različiti stereoizomeri različito djeluju na biološke molekule organizma. Stoga je važno proučiti zakonitosti i posljedice tautomerne konverzije u molekulama koje se koriste kao lijekovi. Do sad nije provedeno istraživanje stabilnosti tautomera benzodiazepina.

Benzodiazepini su najrašireniji i najkorisniji lijekovi među anksioliticima i sedativima/hipnoticima, a uz to imaju i mnogo drugih primjena. Njihova molekulska struktura optimalna je za konstrukciju peptidomimetika i liganada za različite receptore. Diazepinski derivati imaju potvrđeno djelovanje na najrazličitije biološke mete u organizmu i potencijal primjene u liječenju širokog spektra bolesti, od karcinoma do Alzheimerove demencije. Budući da su to privilegirane strukture, s brojnim metama farmakološkog djelovanja, a ujedno i jedni od najpropisivanijih lijekova, nužno je dubinsko poznavanje njihovih kemijskih karakteristika.

Proučavanje enola i iminola *in vitro* otežano je jer su to nestabilne specije koje se brzo pretvaraju u keto oblik. *In silico* metode pružaju izvrsne mogućnosti predviđanja relativnih energija i odnosa među tautomerima. Računalnim programima locirana je najstabilnija konformacija triju tautomera 31 molekule benzodiazepina, izračunata standardna molarna Gibbsova energija i promjena Gibbsove energije za reakciju solvatacije.

Rezultati studije pokazali su da keto oblik dominira u svim slučajevima. U skupini klasičnih 1,4-benzodiazepin-2-ona relativne Gibbsove energije enola previsoke su kako bi imao udjela u tautomernoj smjesi. Iminol, premda nestabilniji od keto oblika, dovoljno je stabilan da bude prisutan u smjesi, iako u vrlo malom udjelu. Učinci C7 i C2' supstituenata su slabi. U skupini heteroaromatskih 1,4-diazepin-2-ona prisutnost heterocikla rezultirala je povećanjem stabilnosti iminola, dok su energije enola ostale relativno nepromijenjene. Iz toga proizlazi zaključak da su heteroaromatski diazepini skloniji od klasičnih reakcijama na N1 položaju, dok se reakcije na C3 ne mogu odvijati ni u jednom slučaju. Uvođenje C3 supstituenta donijelo je najveće promjene u stabilnosti enola, dok su iminoli ostali nezahvaćeni njegovim utjecajem. Promatrani supstituenti, uz iznimku metilne skupine, snižavali su energije enola. Stabilizacijski učinak varirao je od neznatnog (hidroksi), preko umjerenog (amino i cijano) do snažnog (karboksi). Uspostavom produljene konjugacije postignuta je inverzija redoslijeda

stabilnosti, te je enol uspio premašiti iminol. Nedvojbeno je demonstriran učinak supstituenata na karakteristike molekule. Dobiveni rezultati u skladu su s eksperimentalno dobivenim podacima o postojanju tautomernih oblika benzodiazepina. Podudaraju se s tezom o stabilizaciji tautomernih specija putem produžene konjugacije ili elektron-delokalizacijskih učinaka. Solvatacija stabilizira sve specije, no najsnažniji učinak je na keto obliku.

Ovisno o željenim karakteristikama, moguće je dizajnirati molekulu koja će biti podložnija iminolizaciji, odnosno enolizaciji. Bude li u interesu farmaceutskom kemičaru kreirati diazepinsku molekulu skloniju reakcijama na položaju N1, ili se zbog dizajna aktivnog mjesta molekulskih meta (enzima, receptora) pokaže potreba za nukleofilnim centrom na dušiku, cilj se može postići fuzioniranjem heterocikla za diazepin. S druge strane, pomicanje nukleofilnog centra na C3, olakšavanje reakcija na ugljiku ili brza racemizacija postići će se odabirom ispravnog C3 supstituenta.

Sljedeći korak u istraživanju tautomerizacije benzodiazepina mogao bi obuhvaćati ispitivanje mehanizma tautomerne konverzije, uz računanje energetske barijere, kako bi se dobila ideja o kinetici tautomerizacijskih reakcija.



## **6. Zahvale**

Zahvaljujem svima koji su mi pomogli i podržavali me tijekom pisanja ovog rada. Na prvom mjestu to je prof. dr. sc. Valerije Vrček, koji je nesebično podijelio svoje bogato znanje i iskustvo. Hvala mu na uloženom vremenu i strpljenju. Također, hvala dr. sc. Davoru Šakiću koji je uvijek bio na raspolaganju sa svojim savjetima i uputama.

## 7. Literatura

- Allegretti PE, Labadie GR, González Sierra M, Furlong JJP. Mass spectrometric analysis and theoretical calculations of the occurrence of tautomeric structures of hydantoins. *Afinidad LVII*, 2000, 485, 41-49.
- Angelini G, De Maria P, Fontana A, Pierini M, Siani G. Ionization and tautomerization of 2-nitrocyclohexanone in aqueous solution. *J Org Chem*, 2007, 72, 4039-4047.
- Archer GA, Sternbach LH. The chemistry of benzodiazepines. *Chem Rev*, 1968, 68, 747-784.
- Benzodiazepines: How they work and how to withdraw, 2002., [www.benzo.org.uk](http://www.benzo.org.uk), pristupljeno 16.4.2017.
- Bogatskii AV, Andronati SA, Vikhlyayev YI, Zhilina ZI, Klygul' TA, Ryakhin VF. 1,4-benzodiazepines, their cyclic homologs and analogs XVI. Synthesis, properties, and pharmacological activity of 3-substituted 1,2-dihydro-3h-1,4-benzodiazepin-2-ones. *Khim Farm Zh+*, 1974, 8, 13-18.
- Chiang Y, Kresge AJ, Santaballa JA, Wirzl J. Ketonization of acetophenone enol in aqueous buffer solutions. Rate-equilibrium relations and mechanism of the "uncatalyzed" reaction. *J Am Chem Soc*, 1988, 110, 5506-5510.
- Chouinard G, Lefko-Singh K, Teboul E. Metabolism of anxiolytics and hypnotics: benzodiazepines, buspirone, zopiclone, and zolpidem. *Cell Mol Neurobiol*, 1999, 19, 533-552.
- Coutts RT, Su P, Baker GB. Involvement of CYP2D6, CYP3A4, and other cytochrome P-450 isozymes in N-dealkylation reactions. *J Pharmacol Toxicol*, 1994, 31, 177-186.
- D'Cunha C, Morozov AN, Chatfield DC. Theoretical study of HOCl-catalyzed keto-enol tautomerization of  $\beta$ -cyclopentanedione in an explicit water environment. *J Phys Chem A*, 2013, 117, 8437-8448.
- Delchev VB. DFT ab initio study of the keto-enol tautomerism of barbituric acid. *J Struct Chem*, 2004, 45, 570-578.
- Draganić P, Žeželić S, Oštarčević S, Kraljević A. Potrošnja lijekova u Hrvatskoj 2010. – 2014. Zagreb, Agencija za lijekove i medicinske proizvode, 2016, str. 117-179.

Eberlin A, Williams LH, Halogenation of enol tautomers of 2-cyanoacetamide and malonamic acid. *J Chem Soc, Perkin Trans. 2*, 2002, 7, 1316-1319.

Eilers H, Yost S. General anesthetics. U: Basic and clinical pharmacology 13th edition. Katzung BG, Trevor AJ, ured., McGraw-Hill Education, 2015, str. 421-439.

Ellman JA. Design, synthesis, and evaluation of small-molecule libraries. *Acc Chem Res*, 1996, 29, 132-143.

Evans BE, Rittle KE, Bock MG, DiPardo RM, Freidinger RM, Whitter WL, Lundell GF, Veber DF, Anderson PS, Chang RSL, Lotti VJ, Cerino DJ, Chen TB, Kling PJ, Kunkel KA, Springer JP, Hirshfieldt J. Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists. *J Med Chem*, 1988, 31, 2235-2246.

Filipović I, Lipanović S. Opća i anorganska kemija. Zagreb, Školska knjiga, 1995, str. 432-566.

Gaussian 09, Revision A.02, Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Scalmani G, Barone V, Mennucci B, Petersson GA, Nakatsuji H, Caricato M, Li X, Hratchian HP, Izmaylov AF, Bloino J, Zheng G, Sonnenberg JL, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Vreven T, Montgomery JA Jr, Peralta JE, Ogliaro F, Bearpark M, Heyd JJ, Brothers E, Kudin KN, Staroverov VN, Kobayashi R, Normand J, Raghavachari K, Rendell A, Burant JC, Iyengar SS, Tomasi J, Cossi M, Rega N, Millam NJ, Klene M, Knox JE, Cross JB, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW, Martin RL, Morokuma K, Zakrzewski VG, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Dapprich S, Daniels AD, Farkas Ö, Foresman JB, Ortiz JV, Cioslowski J, Fox D J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

GaussView, Version 5, Dennington R; Keith T; Millam J. Semichem Inc., Shawnee Mission, KS, 2009.

Guasch L, Peach ML, Nicklaus MC. Tautomerism of warfarin: combined chemoinformatics, quantum chemical, and nmr investigation. *J Org Chem*, 2015, 80, 9900-9909.

Guasch L, Yapamudiyansel W, Peach ML, Kelley JA, Barchi Jr. JJ, Nicklaus MC. Experimental and chemoinformatics study of tautomerism in a database of commercially available screening samples. *J Chem Inf Model*, 2016, 56, 2149-2161.

Hare MC, Marimanikkuppam SS, Kass SR. Acetamide enolate: formation, reactivity, and proton affinity. *Int J Mass Spectrom*, 2001, 210, 153-163.

Heshmatipour F, Beyramabadi A, Morsali A, Heravi MM. A DFT study on the geometry, spectroscopic properties, and tautomerization of the local anaesthetic drug prilocaine. *J Struct Chem*, 2016, 57, 1096-1103.

Høiseth G, Tuv SS, Karinen R. Blood concentrations of new designer benzodiazepines in forensic cases, *Forensic Sci Int*, 2016, 268, 35-38.

Horton DA, Bourne GT, Smythe ML. The combinatorial synthesis of bicyclic privileged structures or privileged substructures. *Chem Rev*, 2003, 103, 893–930.

Ivančan V, Makar-Aušperger K, Bilušić M, Lovrenčić-Huzjan A, Herceg M. Živčani sustav. U: Farmakoterapijski priručnik 7. izdanje. Francetić i sur., urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2015, str. 597-707.

Izvešće o potrošnji lijekova u Republici Hrvatskoj u 2015. godini, 2016., [www.halmed.hr](http://www.halmed.hr), pristupljeno 15.4.2017.

Karpińska G, Mazurek AP, Dobrowolski JC. On substituent effect on the benzodiazepinone system. *Comput Theor Chem*, 2012, 993, 13-19.

Kim JK, Scialli AR. Thalidomide: the tragedy of birth defects and the effective treatment of disease. *Toxicol Sci*, 2011, 122, 1-6.

Kim J, Yum H, Jang M, Shin I, Yang W, Baek S, Suh JH, Lee S, Han SB. A comprehensive and sensitive method for hair analysis in drug-facilitated crimes and incorporation of zolazepam and tiletamine into hair after a single exposure. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408, 251-263. Lienhard GE, Wang TC. On the Mechanism of Acid-Catalyzed Enolization of Ketones. *J Am Chem Soc*, 1969, 91, 1146-1153.

Klaster Andrija, 2011., <http://andrija.pharma.hr/Andrija/HOME.html>, pristupljeno 23.04.2017.

Klaster Isabella, 2007., <http://www.srce.hr/isabella>, pristupljeno 23.04.2017.

- López-Muñoz F, Álamo C, García-García P. The discovery of chlordiazepoxide and the clinical introduction of benzodiazepines: Half a century of anxiolytic drugs. *J Anxiety Disord*, 2011, 25, 554-562.
- Lu XL, Yang SK. Resolution of enantiomeric lorazepam and its acyl and O- methyl derivatives and racemization kinetics of lorazepam enantiomers. *J Chromatogr*, 1990, 535, 229-238.
- McCann BW, McFarland S, Acevedo O. Benchmarking continuum solvent models for keto–enol tautomerizations. *J Phys Chem A*, 2015, 119, 8724-8733.
- McQuaid KR. Drugs used in the treatment of gastrointestinal diseases. U: Basic and clinical pharmacology 13th edition. Katzung BG, Trevor AJ, ured., McGraw-Hill Education, 2015, str. 1052-1079.
- Meanwell NA, Walker MA. 1,4-diazepines. U: Comprehensive heterocyclic chemistry III. Katritzky AR, Ramsden CA, Scriven EFV, Taylor RJK, ured., Elsevier Ltd., 2008, str. 183-235.
- Mishra JK, Rao JS, Sastry GN, Panda G. Regioselective aminoethylation of 1,4-benzodiazepin-2-one under conventional heating and microwave irradiation. *Tetrahedron Lett*, 2006, 47, 3357-3360.
- Moosmann B, Bisel P, Auwärter V. Characterization of the designer benzodiazepine diclazepam and preliminary data on its metabolism and pharmacokinetics. *Drug Test Anal*, 2014, 6, 757-763.
- Nanda N, Sheshadri BS, Mayanna SM. Mechanism of oxidation of diazepam by 1-chlorobenzotriazole in acidic medium. A kinetic approach. *React Kine Catal Lett*, 1999, 67, 35-41.
- Nguyen LA, He H, Pham-Huy C. Chiral drugs: an overview. *Int J Biomed Sci*, 2006, 2, 85-100.
- Okovytyy SI, Sviatenko LK, Gaponov AA, Kasyan LI, Tarabara IN, Leszczynski J. DFT Study on tautomerism of dihydro-2H-1,5-benzodiazepin-2-ones and dihydro-2H-1,5-benzodiazepine-2-thiones. *Eur J Org Chem*, 2010, 2, 280-291.
- Paizs B, Simonyi M. Ring inversion barrier of diazepam and derivatives: An Ab Initio Study. *Chirality*, 1999, 11, 651–658.

Papini O, Bertucci C, Pereira da Cunha S, Guinaim dos Santos NA, Lanchote VL. Quantitative assay of lorazepam and its metabolite glucuronide by reverse-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry in human plasma and urine samples. *J Pharmaceut Biomed*, 2006, 40, 389-396.

Park JY, Jin KB, Hyun MH. Liquid chromatographic resolution of 3-amino-1,4-benzodiazepin-2-ones on crown ether-based chiral stationary phases. *Chirality*, 2012, 24, 427-431.

Perrin CL. Proton Exchange in Amides: Surprises from Simple Systems. *Acc Chem Res*, 1989, 22, 268-275.

Pertejo P, García-Valverde M, Peña P, Cordero NA, Torroba T, González-Ortega A. Experimental and theoretical studies on the effect of the oxo group in 1,4-benzodiazepines. *Org Biomol Chem*, 2014, 12, 4905-4916.

Pine SH. Organska kemija. Zagreb, Školska knjiga, 1994, str. 163-175.

Porter RJ, Meldrum BS. Antiseizure drugs. U: Basic and clinical pharmacology 13th edition. Katzung BG, Trevor AJ, ured., McGraw-Hill Education, 2015, str. 396-420.

Raczyńska ED, Kosińska W, Ośmiałowski B, Gawinecki R. Tautomeric equilibria in relation to pi-electron delocalization. *Chem Rev*, 2005, 105, 3561-3612.

Rahman KM, James CH, Thurston DE. Observation of the reversibility of a covalent pyrrolobenzodiazepine (PBD) DNA adduct by HPLC/MS and CD spectroscopy. *Org Biomol Chem*, 2011, 9, 1632-1641.

Rappoport Z, Yamataka H. Calculated amide/enol of amide energy differences for several interesting amide systems. *Chem Commun*, 2000, 21, 2101-2102.

Redshaw CH, Cooke MP, Talbot HM, McGrath S, Rowland SJ. Low biodegradability of fluoxetine HCl, diazepam and their human metabolites in sewage sludge-amended soil. *J Soils Sediments*, 2008, 8, 217-230.

Rendić SP. Biotransformation of xenobiotics – metabolism, biological effects and interactions of drugs, other xenobiotics and endobiotics. Zagreb, 2016, objavljeno na:  
<https://www.researchgate.net/publication/297599237>

Sabia R, Ciogli A, Pierini M, Gasparini F, Villani C. Dynamic high performance liquid chromatography on chiral stationary phases. Low temperature separation of the interconverting enantiomers of diazepam, flunitrazepam, prazepam and tetrazepam. *J Chromatogr A*, 2014, 1363, 144-149.

Salvadori P, Bertucci C, Domenici E, Giannaccini G. Chiral 1,4-benzodiazepin-2-ones: relationship between stereochemistry and pharmacological activity. *J Pharmaceut Biomed*, 1989, 7, 1735-1742.

Sayle RA. So you think you understand tautomerism?. *Comput Aided Mol Des*, 2010, 24, 485-496.

Senthilkumar K, Kollandaivel P. Quantum chemical studies on tautomerism of barbituric acid in gas phase and in solution. *J Comput Aid Mol Des*, 2002, 16, 263-272.

Sigel H, Martin B. Coordinating properties of the amide bond. Stability and structure of metal ion complexes of peptides and related ligands. *Chem Rev*, 1982, 82, 385-426.

Sklenák S, Apeloig Y, Rappoport Z. Calculated pK<sub>a</sub> values for enols of carboxylic acid derivatives HC=C(OH)X (X = OH, NH<sub>2</sub>, NMe<sub>2</sub>, OMe, OCHO, F, Cl, Br). *J Am Chem Soc*, 1998, 120, 10359-10364.

Smith SG, Sanchez R, Zhou MM. Privileged diazepine compounds and their emergence as bromodomain inhibitors. *Chem Biol*, 2014, 21, 1-11.

Smith SW. Chiral toxicology: it's the same thing...only different. *Toxicol Sci*, 2009, 110, 4-30.

Spencer J, Rathnam RP, Chowdhry BZ. 1,4-benzodiazepin-2-ones in medicinal chemistry. *Future Med Chem*, 2010, 2, 1441-1449.

Spencer J, Rathnam RP, Harvey AL, Clements CJ, Clark RL, Barrett MP, Wong PE, Male L, Coles SJ, Mackay SP. Synthesis and biological evaluation of 1,4-benzodiazepin-2-ones with antitrypanosomal activity. *Bioorgan Med Chem*, 2011, 19, 1802-1815.

Sternbach LH. 1,4-benzodiazepines. Chemistry and some aspects of the structure- activity relationship. *Angew Chem internat Edit*, 1971, 10, 34-43.

Sternbach LH. The benzodiazepine story. *J Med Chem*, 1979, 22, 1-7.

Sun Y, Li H, Liang W, Han S. Theoretical study of the effect of water in the process of proton transfer of glycineamide. *J Phys Chem B*, 2005, 109, 5919-5926.

Šakić D, Šonjić P, Tandarić T, Vrček V. Chlorination of N- methylacetamide and amide-containing pharmaceuticals. Quantum-chemical study of the reaction mechanism. *J Phys Chem A*, 2014, 118, 2367-2376.

Teo SK, Colburn WA, Tracewell WG, Kook KA, Stirling DI, Jaworsky MS, Scheffler MA, Thomas SD, Laskin OL. Clinical pharmacokinetics of thalidomide. *Clin Pharmacokinet*, 2004, 43, 311-327.

Testa B, Vistoli G, Pedretti A. Mechanisms and pharmaceutical consequences of processes of stereoisomerisation — A didactic excursion, *Eur J Pharm Sci*, 2016, 88, 101-123.

Tian C, Xiu P, Meng Y, Zhao W, Wang Z, Zhou R. Enantiomerization mechanism of thalidomide and the role of water and hydroxide ions. *Chem Eur J*, 2012, 18, 14305-14313.

Trevor AJ. Sedative-hypnotic drugs. U: Basic and clinical pharmacology 13th edition. Katzung BG, Trevor AJ, urednici, McGraw-Hill Education, 2015, str. 369-383.

Valadbeigi Y, Farrokhpour H. Simple and water-assisted tautomerism in succinimide. *Struct Chem*, 2015, 26, 539-545.

Walser A, Fryer RI. Hetero ring[e] [1,4]diazepines. U: Chemistry of heterocyclic compounds. Fryer RI, urednik, John Wiley & Sons, Ltd., 1991, str. 947-1052.

Wojnarowska Z, Paluch M, Pionteck J. The tautomerization phenomenon of glibenclamide drug monitored by means of volumetric measurements. *J Chem Phys*, 2011, 135, 214506.

Yang SK. Base-catalysed rearrangement of temazepam. *J Pharmaceut Biomed*, 1994, 12, 209-219.

Yang SK. Base-catalyzed keto-enol tautomerism of diazepam. *J Chin Chem Soc - Taip*, 1997, 44, 401-406.

Yang SK, Bao Z. Base-catalyzed racemization of 3-O-acyloxazepam, *Chirality*, 1994, 6, 321-328.



Yang SK, Lu XL. Racemization kinetics of enantiomeric oxazepam and stereoselective hydrolysis of enantiomeric oxazepam 3-acetates in rat liver microsomes and brain homogenate. *J Pharm Sci*, 1989, 78, 789-795.

Yang SK, Tang R, Pu QL. Synthesis of 3-deuterated diazepam and nordiazepam 4-oxides and their use in the synthesis of other 3-deuterated derivatives. *J Labelled Compd Rad*, 1996, 38, 753-759.

## 8. Sažetak

Barbara Pem

### Računalna studija tautomerizacije benzodiazepina

Tautomerizacija je ravnotežni proces u kojem sudjeluju različiti oblici jedne molekule, a koji se razlikuju u položaju vodikovog atoma i dvostruke veze. Molekule koje sadrže -CH-C(=O)-NH- fragment mogu postojati u tri tautomerna oblika: keto, enol i iminol. Među takvim molekulama značajni su benzodiazepini kao jedni od najpropisivanih psihofarmaceutika. Potpuna karakterizacija tautomera važna je za razumijevanje fizikalno-kemijskih svojstava, reaktivnosti i stereokemije molekula. Cilj ovog istraživanja je usporedba Gibbsovih energija tautomera benzodiazepina i određivanje učinka pojedinih strukturnih elemenata na njihovu stabilnost. Istraživanje je provedeno *in silico* jer računalne metode omogućavaju proučavanje nestabilnih molekula. Gibbsove energije tautomera izračunate su za 31 različit benzodiazepin koristeći M06/6-31+G(d,p) teorijsku razinu u vakuumu i modelnom otapalu (voda,  $\epsilon = 78,4$ ). Keto oblik pokazao se najstabilnijim u svim slučajevima. Klasični (3-nesupstituirani) benzodiazepini postoje samo u keto i iminolnom obliku, budući da je enol izrazito nestabilan. Supstituenti na položajima C7 i C2' nemaju značajni utjecaj na relativnu stabilnost tautomera. Zamjena fuzioniranog benzenskog prstena heterociklom stabilizira iminol, dok enol ostaje nestabilan i stoga nije relevantna ravnotežna specija. C3 supstituent ne mijenja stabilnost iminola, no ima izrazit utjecaj na stabilnost enolnog oblika. Najjači stabilizacijski utjecaj primijećen je kod karboksilnog supstituenta, a umjeren kod amino i cijano skupine. Solvatacija generalno stabilizira keto oblik u odnosu na ostale tautomere. Rezultati mogu imati značajne implikacije na razvoj novih diazepinskih derivata, jer supstitucijski efekti na stabilnost tautomera mogu uzrokovati promjenu reaktivnosti i farmakoloških svojstava lijekova.

Ključne riječi: tautomerizacija, enolizacija, iminolizacija, benzodiazepini, računalna studija

## 9. Summary

Barbara Pem

### A computational study of tautomerism in benzodiazepines

Tautomerisation is an equilibrium process that involves different forms of a single molecule, which differ only in the position of one hydrogen atom and a double bond. Molecules that possess a -CH-C(=O)-NH- fragment can exist in three tautomeric forms: keto, enol and iminol. This fragment is present in benzodiazepines, some of the most commonly prescribed psychiatric drugs. Complete characterization of tautomers is important for the understanding of physicochemical properties, reactivity and stereochemistry of a molecule. This study seeks to compare the Gibbs energies of benzodiazepine tautomers and to determine the effects of particular structural elements on their stability. It was performed *in silico*, since computational methods enable the study of unstable molecules. The Gibbs energies of tautomers were calculated for 31 different benzodiazepines using M06/6-31+G(d,p) level of theory, both in gas-phase and model solvent (water,  $\epsilon = 78,4$ ). Keto form was determined to be the most stable in all cases. Classical (3-unsubstituted) 1,4-benzodiazepin-2-ones only exist as keto or iminol forms, while the enol form is extremely unstable. Substituents on C7 and C2' positions do not have a significant effect on the relative stability of tautomers. Exchanging the fused benzene ring with a heterocycle stabilises the iminol form, while keeping the enol unstable. C3 substituent has no effect on the stability of the iminol form, but has an enormous influence on the stability of the enol. The greatest stabilizing effect was noted in benzodiazepines with carboxy substituent, and a moderate one with amino and cyano groups. Solvent effects mostly stabilize keto forms in relation to other tautomers. These results could have significant implications in the design of novel benzodiazepine analogues, because substituent effects on the stability of tautomers might result in changes to reactivity and pharmacological properties of pharmaceuticals.

Keywords: tautomerism, enolization, iminolization, benzodiazepines, computational study