

RĪGAS TEHNISKA UNIVERSITĀTE
RIGA TECHNICAL UNIVERSITY

Dina TRIFANOVA

**I GRUPAS METABOTROPO GLUTAMĀTA
RECEPTORU NEKONKURĒJOŠO
ANTAGONISTU SINTĒZE**

THE SYNTHESIS OF NONCOMPETITIVE ANTAGONISTS OF GROUP I
METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTORS

Promocijas darba kopsavilkums

Summary of Doctoral Theses

Rīga 2006

Problēmas būtība un aktualitāte

Metabotropie glutamāta receptori (mGluR) ir G-proteīn-sajūgtie receptori un tie modulē neironālo aktivitāti centrālajā un perifērajā nervu sistēmā.

Līdz šim klonēti astoņi mGluR, kurus, balstoties uz to sekvenču homoloģiju, farmakoloģiju un to lomu signālu pārnēsē, iedala trīs grupās: I grupa (mGluR1 un mGluR5), II grupa (mGluR2 un mGluR3) un III grupa (mGluR4, mGluR6-8).

Atklāti daudzi mGluR antagonisti un tos var iedalīt divās klasēs pēc to receptora inhibēšanas veida. Konkurējošie antagonisti saistās glutamāta saistīšanās vietā un lielākā daļa no tiem ir konformacionāli ierobežoti aminoskābju analogi. Diemžēl šādu savienojumu terapeitisko potenciālu un praktisko lietderību ierobežo izteikti zemā biopieejamība. Ierobežotas iespējas nokļūt centrālajā nervu sistēmā (CNS) un, pats galvenais, to zemā selektivitāte attiecībā uz individuāliem mGluR dēļ glutamātu saistīšanās vietas lielās savstarpējās līdzības mGluR saimē. Pēdējos gados atklāti daudzi nekonkurējošie mGluR ligandi - gan pozitīvie, gan negatīvie allostēriskie modulatori, kuri saistās receptora transmembrānas domēnā. Allostērisko modulatoru dizaina iespējas ļauj būtiski uzlabot gan selektivitāti uz mGluR apakštipiem, gan vielu biopieejamību CNS, un, salīdzinot ar agrāko konkurējošo ligandu pieeju, jaunatklātais mGluR pozitīvās un negatīvās allostēriskās modulēšanas pētījumu lauks paver plašākas iespējas efektīvāku CNS zāļu vielu radīšanā.

mGluR antagonistiem paredzama svarīga loma daudzu psihiatrisko un neiroloģisko slimību ārstēšanā, ieskaitot, sāpes, neurodeģenerāciju, epilepsiju, izziņas traucējumus, zāļu atkarību, trauksmes stāvokli, Parkinsona slimību un šizofrēniju.

Neskatoties uz intensīvu darbu gan akadēmiskajās laboratorijās, gan farmaceitiskajās kompānijās, pašlaik klīniskajiem pētījumiem pieejami tikai daži mGluR1 un mGluR5 antagonisti. Turklāt, neskatoties uz savienojumu augsto selektivitāti, tie galvenokārt uzrāda salīdzinoši sliktas farmakokinētiskās īpašības un zemu biopieejamību, tāpēc neviens no savienojumiem līdz šim nav izgājis visas klīnisko pētījumu fāzes, lai kļūtu par medicīnisko preparātu.

Izstrādātais promocijas darbs veltīts jaunu, farmakoloģiski aktīvu I grupas mGluR nekonkurējošo antagonistu sintēzei.

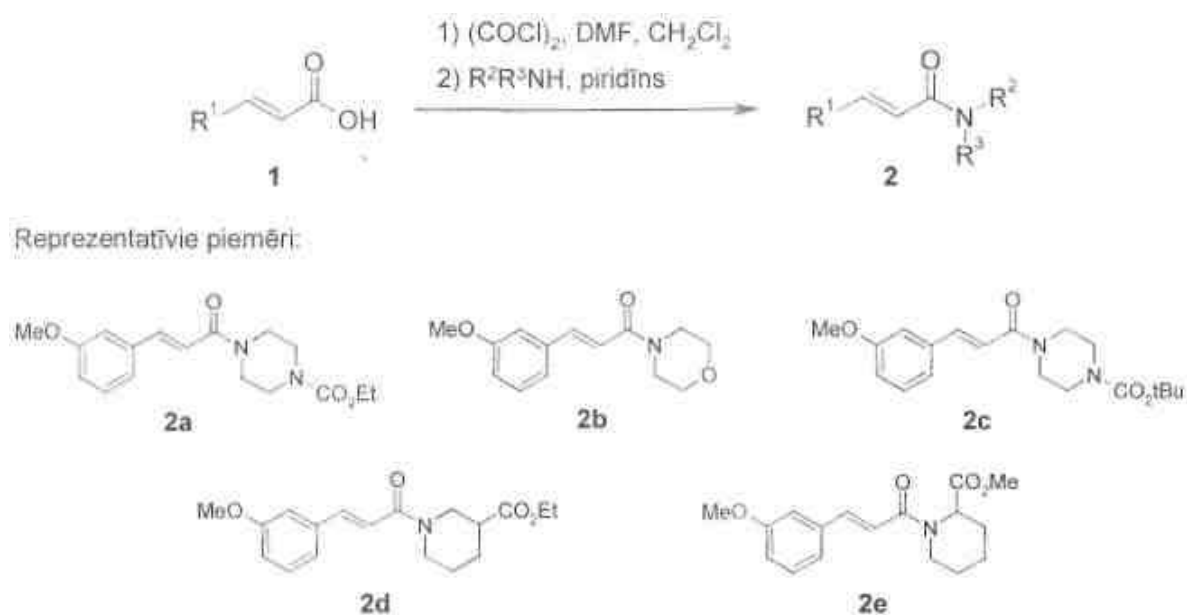
Darba mērķi

Promocijas darba galvenais uzdevums ir attīstīt jaunu nekonkurējošu I grupas glutamāta receptoru antagonistu sintēzi. Tā īstenošanai nepieciešams:

1. Izanalizēt publikāciju un patentu datus par mGluR1 un mGluR5 nekonkurējošajiem antagonistiem.
2. Veikt jaunu struktūru dizainu uz pazīstamo mGluR5 nekonkurējošo antagonistu bāzes, lai pārbaudītu hipotēzi, ka arī karbonilgrupa var darboties kā ūdeņraža saites akceptors mGluR5 antagonistu farmakoforajā modelī.
3. Sintezēt aizvietotus α,β -nepiesātināto karbonskābju amīdus un α,β -nepiesātinātos ketonus un, izmantojot *in vitro* aktivitātes datus, veikt šo savienojumu struktūras-aktivitātes sakarību analīzi.
4. Balstoties uz iegūtajām struktūras-aktivitātes sakarībām, izstrādāt potenciāli aktīvu α,β -nepiesātināto ketonu konformacionālo analogu - ciklopropilketonu sintēzi.
5. Izstrādāt sintēzes metodes 3-arilaizvietotu α,β -nepiesātināto ketonu konformacionāli ierobežotu analogu iegūšanai 3-acil-2*H*-hromēnu rindā un veikt savienojumu struktūras-aktivitātes sakarību analīzi.

Darba rezultāti

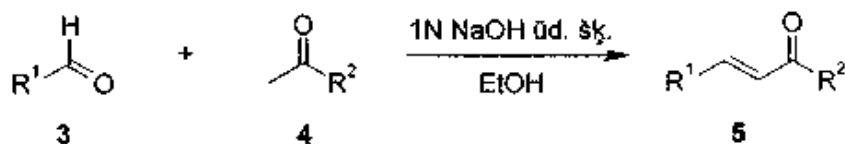
Ņemot vērā to, ka jau iepriekš bija patentēti un aprakstīti dažādi ariletēnil- un ariletinil-piridīni ar augstu mGluR5 modulatoru aktivitāti, jaunu mGluR5 antagonistu dizains tika sākts ar šo struktūru farmakoforā modeļa izveidošanu. Balstoties uz plaši atbalstīto koncepciju par ūdeņraža saites nozīmi efektīvu mGluR5 ligandu sadarbībā ar receptoru, tika piedāvāts aizstāt piridīna gredzenu ar citu ūdeņraža saites akceptoru. Kā alternatīvs ūdeņraža saites akceptors varētu darboties amidogrupas skābekļa atoms. Veicot molekulu dizainu, kā vienkāršākie no potenciāli aktīviem savienojumiem izrādījās α,β -nepiesātinālo karbonskābju amīdi **2**, kuri iegūti amidēšanas reakcijā no attiecīgajām α,β -nepiesātinātām karbonskābēm **1** un otrējiem amīniem (1. attēls).



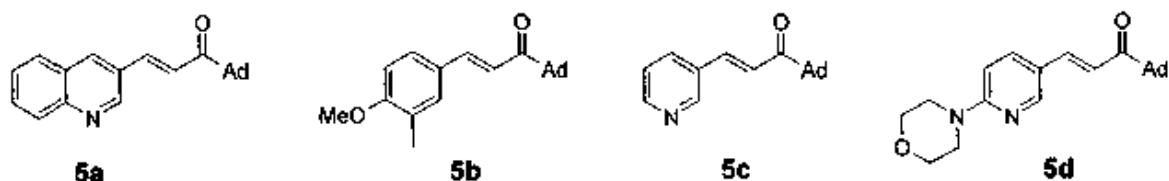
1. att. α,β -Nepiesātināto karbonskābju amīdu **2** iegūšanas shēma

Neviens no amīdiem **2** neuzrādīja augstu afinitāti uz mGluR5 receptoriem (IC₅₀, [³H]MPEP, rmGluR5). Radioligandu vislabāk izspiež savienojums **2a** (IC₅₀=13 μM), kura aktivitāti daļēji nodrošina piperazīna etoksikarbonilgrupa. Jāatzīmē savienojuma **2b** vērā ņemamā funkcionālā aktivitāte (IC₅₀=12 μM; [Ca²⁺]_i, rmGluR5), kas tikai nedaudz atpaliek no amīda **2a** līmeņa (IC₅₀<10 μM). Nelielu saistīšanās afinitāti uz mGluR1 uzrādīja tikai savienojumi **2b** un **2c** (IC₅₀=30 un 44 μM, attiecīgi). Savukārt, augstākā funkcionālā aktivitāte uz mGluR1 piemīt amīdiem **2d** un **2e** (IC₅₀ = 6 un 7 μM), kuri satur estera grupu piperidīna cikla 2. vai 3. pozīcijā. Tā kā otrējie amīdi **2** neuzrādīja augstu mGluR1 vai mGluR5 modulatoru aktivitāti, darbs šajā virzienā netika turpināts.

Turpinot aktivitātes uzlabošanas iespēju meklējumus, savienojumu **2** amidogrūpa tika nomainīta pret ketogrūpu. α,β -Nepiesātinātie ketoni **5** iegūti aromātisko aldehīdu **3** kondensācijas reakcijā ar attiecīgajiem metilketoniem **4** (2. attēls).



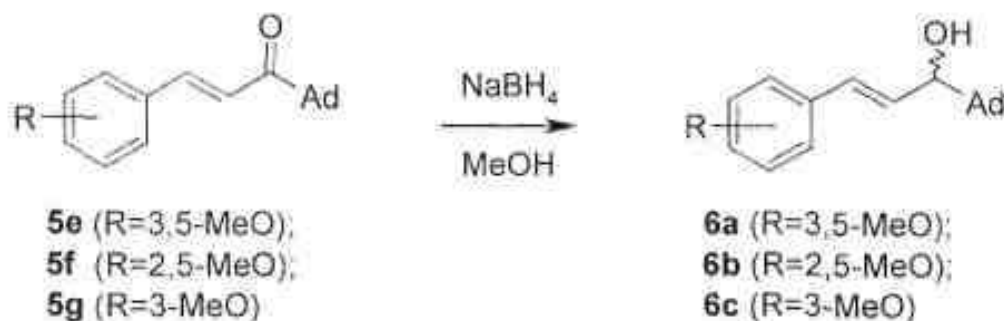
Reprezentatīvie piemēri:



2. att. α,β -Nepiesātināto ketonu **5** iegūšana

α,β -Nepiesātināto ketonu **5** *in vitro* pētījumi parādīja, ka savienojumiem piemīt augsta aktivitāte uz mGluR1. No sintezēto propenonu **5** struktūras-aktivitātes sakarību analīzes izriet, ka, salīdzinot *t*-butil-, *c*-propil- un adamantanil-ketonus, aktīvāki savienojumi vienmēr iegūti adamantanilketonu rindā. Šāds rezultāts, balstoties uz molekulāro modelēšanu, atbilst visizplatītākajam priekšstatam par receptora uzbūvi. Receptora transmembrānas proteīna struktūrā atrodas izteikts hidrofobais apgabals, kurā labi iederas tādi apjomīgi, lipofili aizvietotāji kā adamantāna tricikls. Ņemot vērā to, ka adamantanilgrūpa izrādījās optimāls aizvietotājs propenonu **5** augstas mGluR1 afinitātes nodrošināšanai, galvenokārt tika modificēta propenona **5** aromātiskā aizvietotāja daļa. Labāku aktivitāti uzrādīja savienojumi, kuri satur aizvietotājus aromātiskā gredzena 3., 4. un/vai 5. pozīcijā. Heteroatoma klātbūtne aromātiskajā sistēmā paaugstina savienojumu aktivitāti. Nomainot benzola gredzenu pret slāpekli saturošu heterociklu, piem., hinolīnu, iegūts savienojums **5a** ar ļoti augstu saistīšanās afinitāti ($IC_{50}=0.02 \mu\text{M}$; [^3H]R214127, rmGluR1) un augstu funkcionālo aktivitāti ($IC_{50}=0.03 \mu\text{M}$; IP, rmGluR1). Interesanti, ka savienojuma afinitāte uz mGluR5 arī ir submikromolārā līmenī, tomēr funkcionālā aktivitāte ir zema ($IC_{50} = 8 \mu\text{M}$; [Ca^{2+}]_i, hmGluR5). Iegūtie savienojumi saglabā arī augstu aktivitāti uz humanizētiem mGluR1 receptoriem, piem., propenoni **5c** un **5d** uzrāda $IC_{50}=0.14$ un $0.20 \mu\text{M}$, attiecīgi.

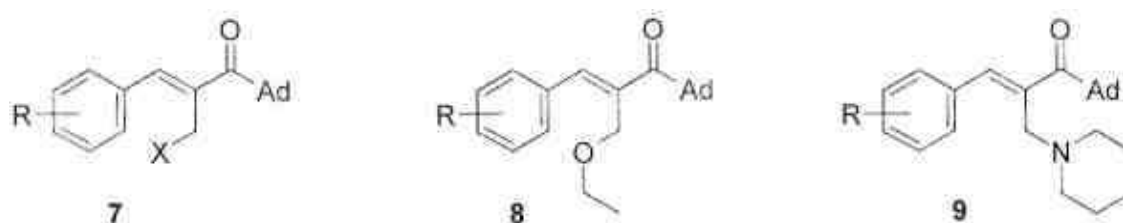
Lai pārlicinātos vai karbonilgrupai ir noteicoša loma savienojumu aktivitātes nodrošināšanā, un vai līdzīgu saistīšanos ar mGluR receptoriem nevar nodrošināt hidroksigrupa, propenoni **5e-g** reducēti par α,β -nepiesātinātiem spirtiem **6a-c** (3. attēls).



3. att. Propenonu **5c-g** reducēšana par α,β -nepiesātinātiem spirtiem **6a-c**

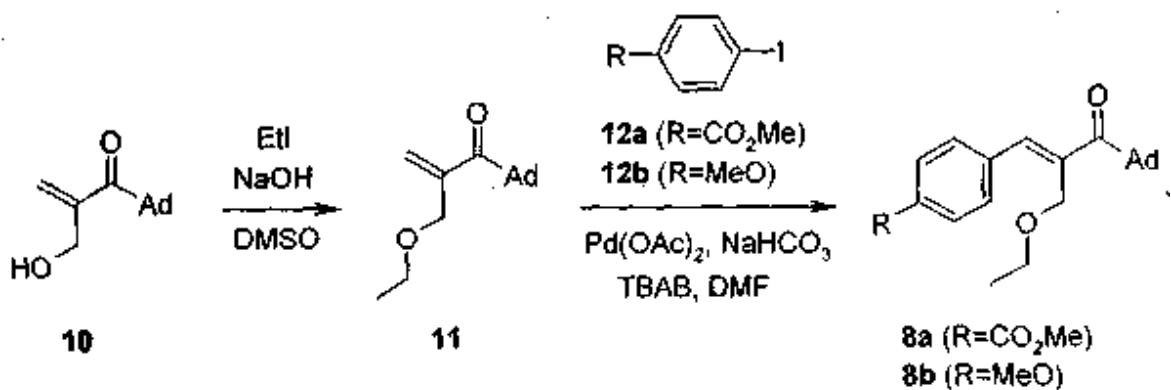
Kā varēja sagaidīt, attiecīgie α,β -nepiesātinātie spirti **6a-c** bija neaktīvi uz mGluR5 un neuzrādīja saistīšanās afinitāti uz mGluR1. Savienojumiem piemīt salīdzinoši zema funkcionālā aktivitāte (IC_{50} =40, 19 un 33 uM, attiecīgi) uz mGluR1. Iegūtie rezultāti apstiprināja izveidotās koncepcijas pareizību un veicināja pētījumus iesāktajā virzienā.

Lai tālāk attīstītu propenonu mGluR1 antagonistu farmakoforo modeli, bija nepieciešams sintezēt nepiesātinātos ketonus **7**, kas satur aizvietotāju pie C-2 atoma. Tika ielānots iegūt etoksimetil- un piperidin-1-il-metil-atvasinājumus **8** un **9** (4. attēls), izmantojot pieejamās izejvielas.



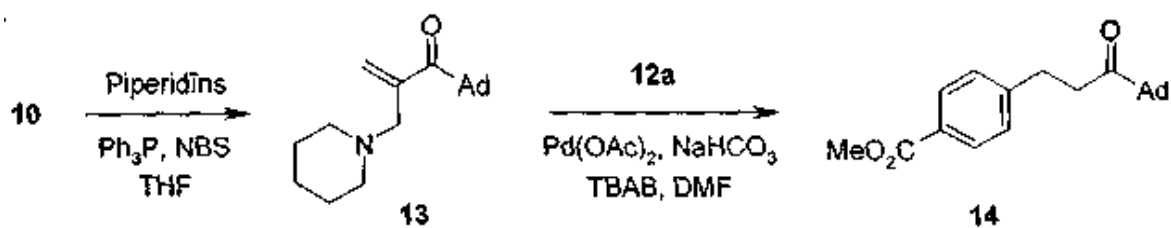
4. att. 2-Aizvietotie α,β -nepiesātinātie ketoni **7-9**

2-Aizvietotus α,β -nepiesātinātos ketonus **8a,b** iespējams iegūt ariljodīdu **12a,b** un vinilketona **11** Heka reakcijā. Tā savienojums **10**, alkilējot ar etiljodīdu dimetilsulfoksīdā nātrija hidroksīda klātbūtnē, tika pārvērsts par etilēteri **11**, kura Heka reakcijā ar ariljodīdiem **12a,b** iegūti vēlami aizvietotie arilketoni **8a** un **8b** (5. attēls).



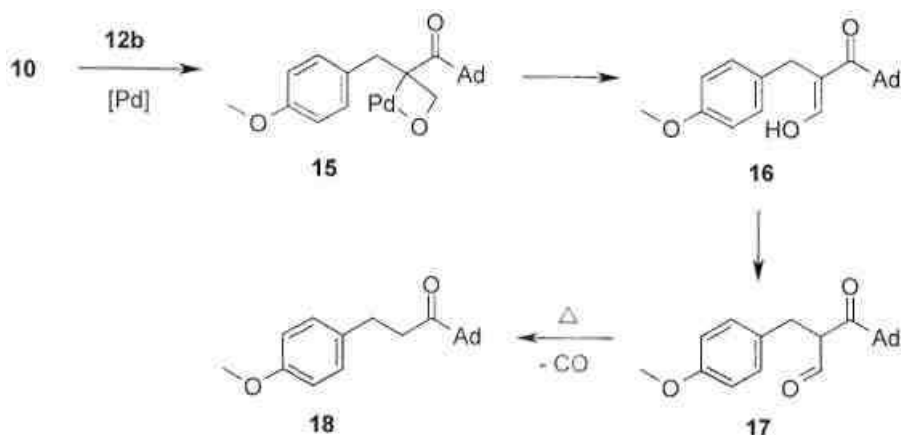
5. att. Vinilketona **11** un ariljodīdu **12a,b** Heka reakcija

Lai iegūtu piperidīnīl-atvasinājumu **9**, alilspirts **10** tika pārvērsts par alilamīnu **13**, taču nākošajā stadijā - Heka reakcijā - vēlamais savienojums **9** neveidojās. Kā vienīgais reakcijas produkts izdalīts adamantanilketons **14** (6. att.).



6. att. Piperidīnīlanaloga **13** un ariljodīda **12a** Heka reakcija

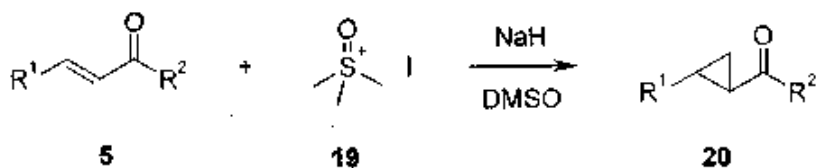
Analoģiskos apstākļos alilspirta **10** Heka reakcijā ar jodbenzolu **12b** tika iegūts propanons **18** un 4,4'-dimetoksibifenils. Šādu reakcijas iznākumu var skaidrot ar palladacikla **15** veidošanos un tai sekojošu β -hidrīda eliminēšanos no metilēngrupas, kas atrodas pie skābekļa atoma. Hidroksivinilketons **16** izomerizējas par formilketonu **17**, kurš dekarbonilējoties dod propanonu **18** (7. attēls). Izmainīt reducējošās eliminēšanas virzienu šādu substrātu Heka reakcijā praktiski nav iespējams.



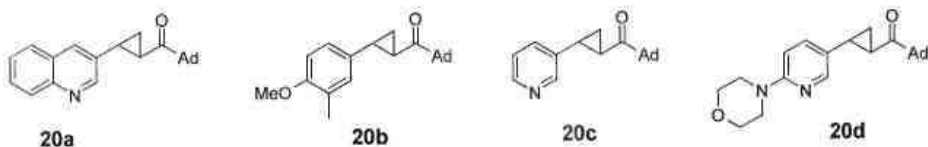
7. att. Savienojuma **18** veidošanas

Iegūtie atvasinājumi **8a** un **8b** uzrādīja ļoti zemu mGluR1 un mGluR5 aktivitāti. Savienojuma **8a** mGluR1 antagonista aktivitāte nepārsniedza 16 μM (IP, rmGluR1), bet saistīšanās afinitāte bija vēl vājāka, $\text{IC}_{50}=82 \mu\text{M}$ ($[^3\text{H}]\text{R214127}$, rmGluR1). Arī afinitāte uz mGluR5 bija zema, $\text{IC}_{50}=59 \mu\text{M}$ ($[^3\text{H}]\text{MPEP}$, rmGluR5). Savienojums **8b** vispār nesaistījās ar mGluR1 receptūru, savukārt, tā afinitāte uz mGluR5 nepārsniedza 60 μM līmeni. Tālāka α,β -nepiesātināto ketonu **7** otrās pozīcijas modificēšana netika turpināta.

α,β -Nepiesātinātie ketoni ir labi Mihaela akceptori un šādas vielas potenciāli var viegli metabolizēties. Lai turpinātu ketonu **5** modificēšanu ar mērķi uzlabot savienojumu farmakokinētiskās īpašības, tika izanalizētas iespējamās savienojumu **5** konformācijas un veikts telpiski līdzīgu struktūru dizains. Konformacionāli vistuvākie analogi izrādījās ciklopropilketoni **20**, kas tika iegūti propenonu **5** reakcijā ar *in situ* ģenerētu dimetilsulfoksonija metilīdu (8. attēls).



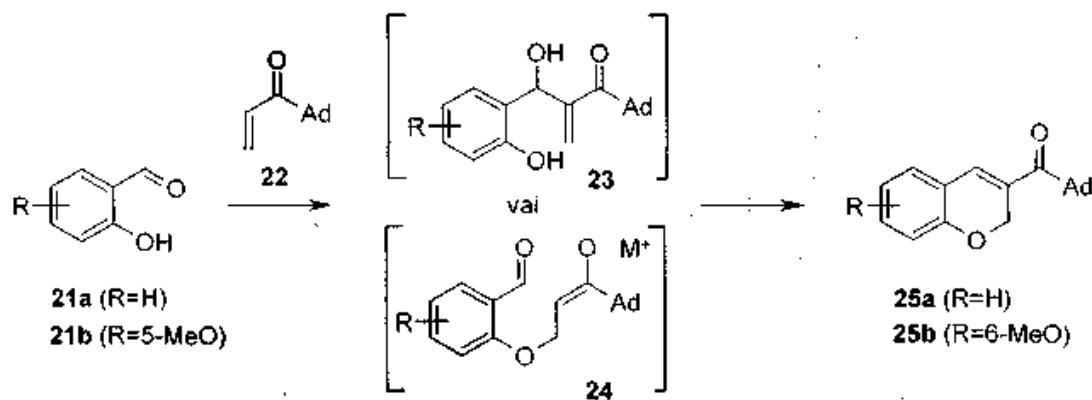
Reprezentatīvie piemēri:



8. att. Ciklopropilketonu **20** iegūšana

Ciklopropilketoni **20** tāpat kā tiem atbilstošie propenoni **5** uzrādīja augstu *in vitro* mGluR1 aktivitāti. Ketoniem **20a-c**, salīdzinot ar savienojumiem **5a-c**, raksturīga nedaudz zemāka saistīšanās afinitāte uz žurku receptoriem, bet augstāka aktivitāte uz humanizētiem mGluR1. Labāku saistīšanās afinitāti uzrāda savienojumi **20a** un **20d** ($IC_{50}=0.14$ un $0.02 \mu M$). Tie saglabā augstu funkcionālo aktivitāti arī uz humanizētiem mGluR1 ($IC_{50}=0.27$ un $0.11 \mu M$).

Otrs propenonu **5** konformacionālo analogu sintēzes virziens balstīts uz C=C saites iekļaušanu cikliskā sistēmā. Konformacionāli tuvākie ketonu **5** cikliskie analogi ir 1-(2H-hromen-3-il)-metanoni **25**. To sintēzei piemērota likās Beilisa-Hilmana reakcija (9. attēls, caur starpproduktu **23**). Diemžēl, ja aldehīda **21** molekulā nav elektronakceptoru aizvietotāju, reakcija noris lēni un produkta iznākumi ir ļoti zemi. Reakciju nav iespējams novest līdz galam arī sakarā ar vinilketona **22** vieglo dimerizēšanos un polimerizēšanos. Hromēnus **25** var iegūt arī aldehīdu **21** un vinilketona **22** reakcijā bāziskos apstākļos, kas piemēroti Mihaela pievienošanās un iekšmolekulāras kondensācijas realizēšanai (9. attēls, caur starpproduktu **24**). Tā, sildot benzaldehīda **21a** un vinilketona **22** šķīdumu DMF nātrija hidrīda klātbūtnē, iegūts 3-adamantanilkarbonil-2H-hromēns (**25a**). Tomēr arī šajā gadījumā reakcija negāja līdz galam un produkta iznākums bija ļoti zems.

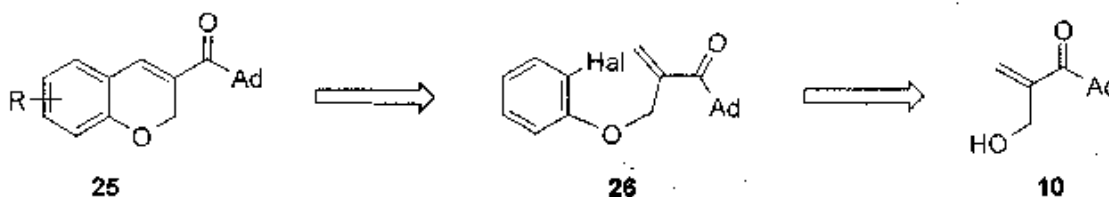


9. att. 2H-Hromēnu **25a,b** iegūšana

Lai novērtētu optimizācijas iespējas, izdarīti vairāki benzaldehīda **21b** un vinilketona **22** reakcijas eksperimenti, izmantojot gan bāziskos, gan Beilisa-Hilmana reakcijas apstākļus. Novērots, ka produkta veidošanās notiek ātrāk, ja izmanto Beilisa-Hilmana reakcijas apstākļus hloroformā, kā arī, ja reakciju veic THF-H₂O maisījumā NaOH klātbūtnē. Diemžēl 2-hidroksi-5-metoksibenzaldehīda (**21b**) un adamantanil-vinilketona (**22**) reakcijas produkta iznākumi bija tik niecīgi, ka to nebija racionāli izdalīt.

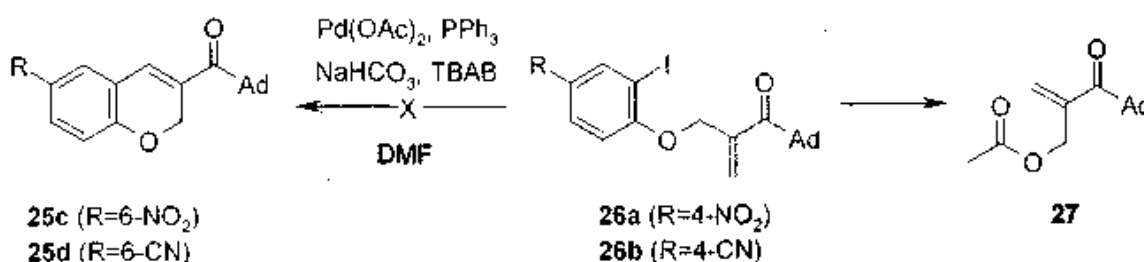
Neskatoties uz sintēzes grūtībām, tika nolemts turpināt pētījumus, jo savienojums **25a** uzrādīja labu *in vitro* mGluR1 antagonista aktivitāti ar $IC_{50}=1.6 \mu M$ (IP, rmGluR1), $IC_{50}=2.2 \mu M$ ($[^3H]$ R214127, rmGluR1) un $IC_{50}=39 \mu M$ ($[^3H]$ MPEP, rmGluR5).

Lai gan pastāvēja iespēja, ka var notikt savienojuma **26** *endo*-nevis vēlamā *exo*-ciklizācija, kā alternatīvs ceļš hromēnu **25** iegūšanai pārbaudīta alkēnu **26** iekšmolekulāra Heka reakcija (10. attēls).



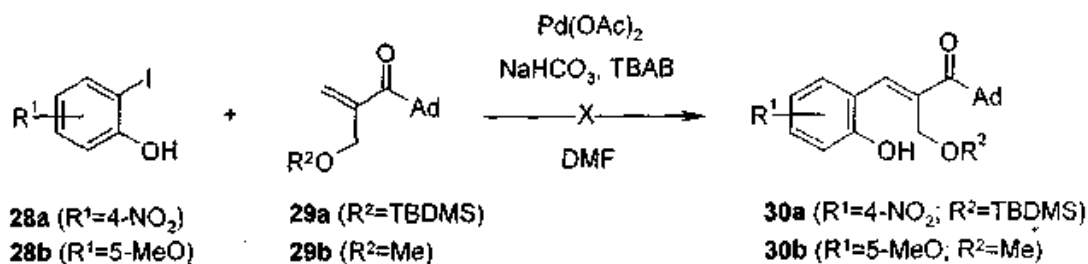
10. att. 3-Adamantan-1-il-karbonil-2*H*-hromēnu **25** iegūšanas retrosintētiskais ceļš

Alkēni **26** iegūti Mitsunobu reakcijā no attiecīgajiem halogēnfenoliem un propenona **10**. Mēģinājums ariljodīdu **26a** un **26b** iekšmolekulāra Heka reakcijā iegūt savienojumus **25c** un **25d** bija neveiksmīgs (11. attēls). Kā vienīgais reakcijas produkts izdalīts alilesteris **27**, kura veidošanos var izskaidrot ar fenolāta atšķelšanos no izejvielas **26a,b** un acetoksigrupas pievienošanas. Vienīgais acetoksigrupas avots reakcijas vidē ir $Pd(OAc)_2$ un tas izskaidro produkta **27** niecīgo iznākumu. Šajā gadījumā savienojumi **26a,b** darbojās kā pallādijs katalizētas alilēšanas reakcijas substrāti.



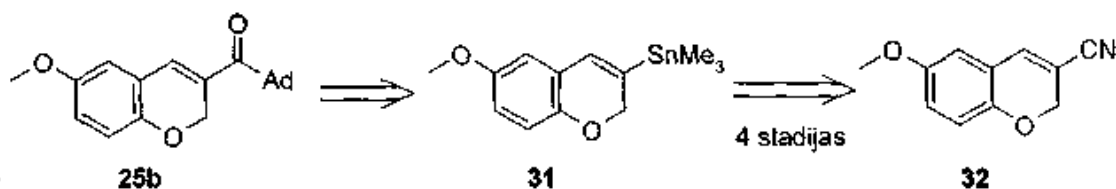
11. att. Etiķskābes 2-(adamantān-1-karbonil)alilestera (**27**) veidošanās Heka reakcijā

Veikti mēģinājumi iegūt hromēnus **25**, ejot pretējā virzienā - vispirms realizēt Heka reakciju un tad ciklizēt starpproduktu Mitsunobu reakcijā. Kā piemērots savienojums tika izraudzīts TBDMS-aizsargāts alilspirts **29a**. Diemžēl Heka reakcijas apstākļos **29a** ar ariljodīdu **28b** nereaģēja. To varētu skaidrot ar brīvas fenolgrupas klātbūtni un stēriski apjomīgās TBDMS aizsarggrupas ietekmi. Tomēr arī alilketona **29b** un jodfenola **28b** Heka reakciju neizdevās realizēt un vēlamais produkts **30b** neveidojās (12. attēls).



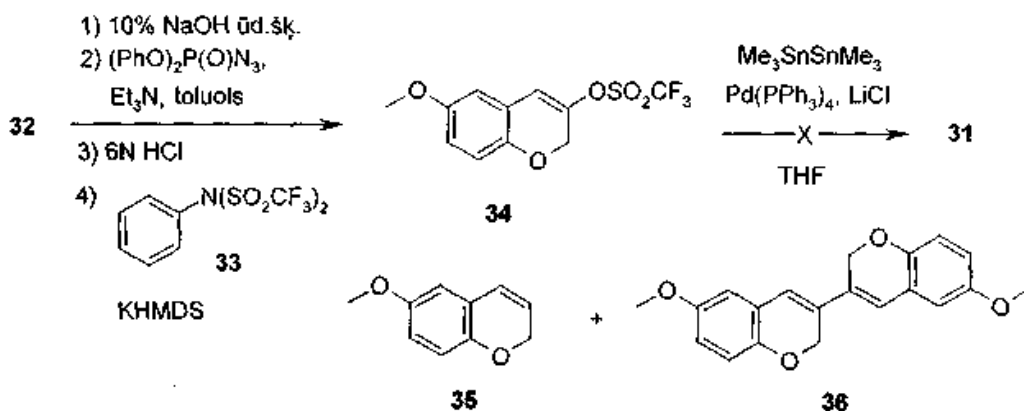
12. att. Jodfenola **28a,b** Heka reakcija ar vinilketoniem **29a,b**

Pēc neveiksmīgas Heka reakcijas izmantošanas hromēnu sintēzē, tika mainīta savienojumu **25** sintēzes koncepcija. Kā viens no risinājumiem tika pieņemta alvas organiskā savienojuma **31** Stilles reakcija ar adamantānkarbonskābes hlorīdu (13. attēls).



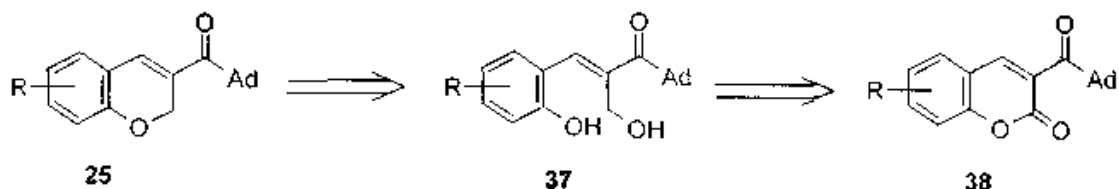
13. att. Hromena **25b** retrosintētiskā analīze

Alvas organisko savienojumu **31** bija plānots iegūt no attiecīgā triflāta **34**, kurš tika pagatavots no nitrila **32** trijās stadijās pēc literatūrā aprakstītas metodes. Triflāta **34** reakcijā ar heksametilodialvu $\text{Pd(PPh}_3)_4$ klātbūtnē trimetilalvas savienojumu **31** iegūt neizdevās (14. attēls). Tika atgūtas abas izejvielas, kā arī novērota reducēšanas produkta **35** un dimēra **36** veidošanās. Trimetilalvas atlikumu neizdevās ievadīt arī, izmantojot tādas reaģentu sistēmas kā Bu_3SnH , LDA, CuCN un heksametilodialva, *n*-BuLi, CuBr M_2S .



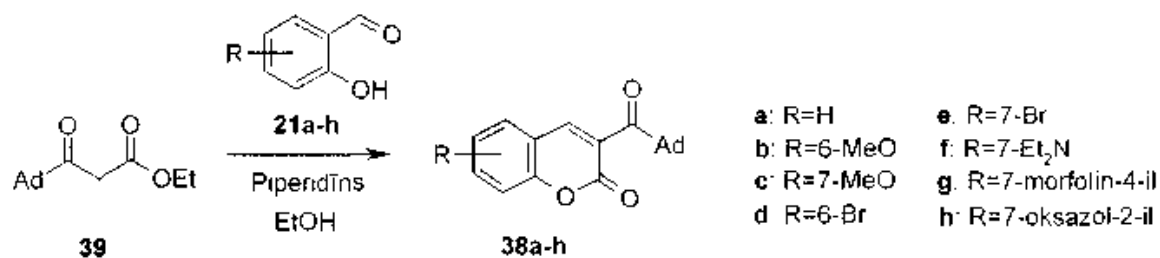
14. att. Alvas organiska savienojuma **31** sintēzes ceļš

Pēc visiem neveiksmīgajiem mēģinājumiem iegūt trimetilalvas savienojumu **31**, novērtētas alternatīvas hromēnu **25** sintēzes iespējas. Viens no retrosintētiskajiem ceļiem ir iekšmolekulāra 2-((*E*)-3-hidroksipropenil)fenola **37** ētera saites veidošanās (15. attēls). Savukārt, fenolus **37** iespējams iegūt, reducējot kumarīnus **38**.



15. att. Hromēnu **25** iegūšanas retrosintētiskā analīze

3-(Adamantanil-1-karbonil)-hromen-2-oni **38a-h** iegūti no attiecīgajiem *o*-hidroksi-benzaldehīdiem **21a-h** un adamantan-1-il-2-ketopropionskābes etilestera (**39**), izmantojot Knēvenāgela kondensācijas apstākļus, vārot etanolā piperidīna klātbūtnē (16. attēls).



16. att. Kumarīnu **38a-h** iegūšana Knēvenāgela reakcija

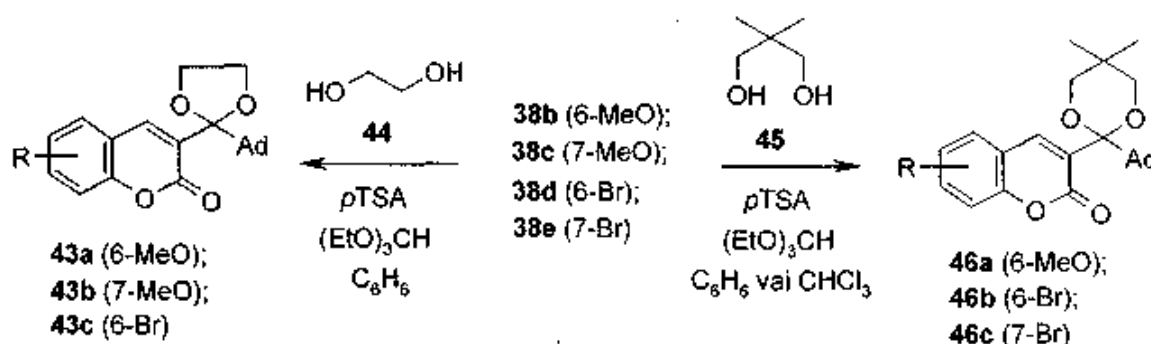
Azakumarīns **42** 3-formil-4-hidroksipiridīna (**40**) un ketoestera **39** reakcijā neveidojās. Tas izskaidrojams ar ciklizācijai neizdevīgā izomēra **41** rašanos Knēvenāgela kondensācijā. Savienojuma **41** izomerizācija un ciklizācija realizēta, vārot tetrahidrofurānā NaH klātbūtnē (17. attēls).



17. att. 3-Adamantān-1-karbonilpirano[3,2-*c*]piridin-2-ona(**42**) iegūšana

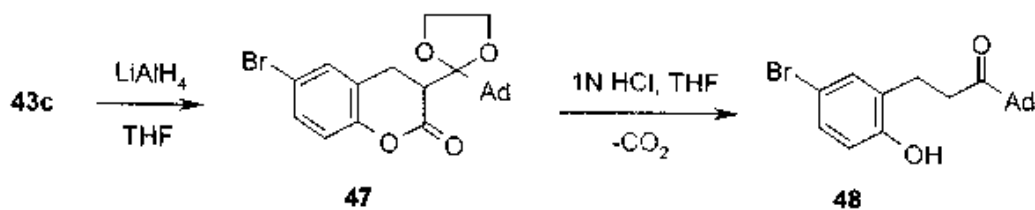
Kumarīniem **38a-h** raksturīga negaidīti augsta funkcionālā aktivitāte un saistīšanās afinitāte uz žurku mGluR1 receptoriem. Aktīvākais savienojums **38c** uzrādīja funkcionālo aktivitāti $IC_{50}=0.06 \mu M$ un saistīšanās afinitāti $IC_{50}=0.29 \mu M$. Nomainot savienojuma **38c** 7-MeO grupu pret 7-dietilamino-grupu, savienojuma **38f** augstā funkcionālā aktivitāte saglabājas. Iegūtie *in vitro* pētījumu rezultāti pārlicinoši demonstrē, ka 7. pozīcijas aizvietotājam ir izšķiroša mGluR1 antagonistu farmakofora loma kumarīnu **38** rindā. Visi sintezētie kumarīni **38** izrādījās selektīvi uz žurku mGluR1 receptoriem, aktivitāte uz humanizētajiem receptoriem bija zemāka un neviena savienojuma IC_{50} nesasniedza $10 \mu M$ līmeni hmGluR1 antagonisma testos.

Lai selektīvi noreducētu kumarīna **38** laktona grupu, bija nepieciešams aizsargāt 3. pozīcijas karbonilgrupu. Vispirms izmantota dioksolāna aizsardzība, kuru ērti uzlikt, vārot reakcijas maisījumu benzolā *p*-toluolsulfonskābes un trietilortoformiāta klātbūtnē (18. attēls). Tālāko reakciju gaitā ketogrupas 1,3-dioksolāna aizsardzība izrādījās nepiemērota sakarā ar nevēlamu blakusreakciju norisi. Ievērojami efektīvāka visās turpmākajās reakcijās bija dimetildioksanil aizsarggrupa.



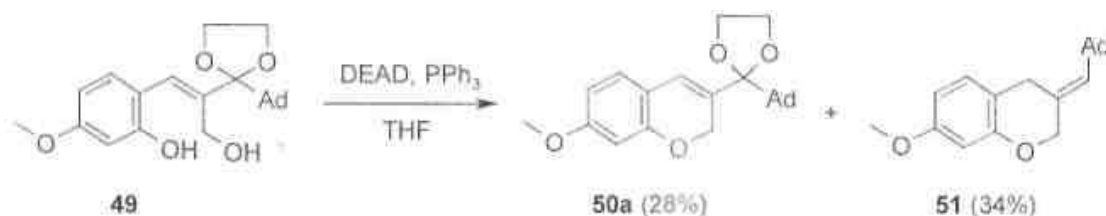
18. att. Kumarīnu **38b-e** 3. pozīcijas karbonilgrupas aizsardzība

Kumarīni **43a-c** un **46a-c** reducēti par attiecīgajiem aizsargātajiem alilspirtiem, izmantojot LiAlH₄ vai DIBAL. Reducējot 6-bromatvasinājumu **43c**, ar 54% iznākumu iegūts laktons **47** (19. attēls). Pēc savienojuma **47** hidrolīzes ar 1N HCl/THF izdalīts propanons **48**, kura veidošanos var izskaidrot ar savienojuma **47** vienlaicīgu dioksolāna grupas hidrolīzi un laktona atvēršanos. Tā rezultātā veidojas β -ketokarbonskābe, kurai dekarboksilējoties, rodas produkts **48**.



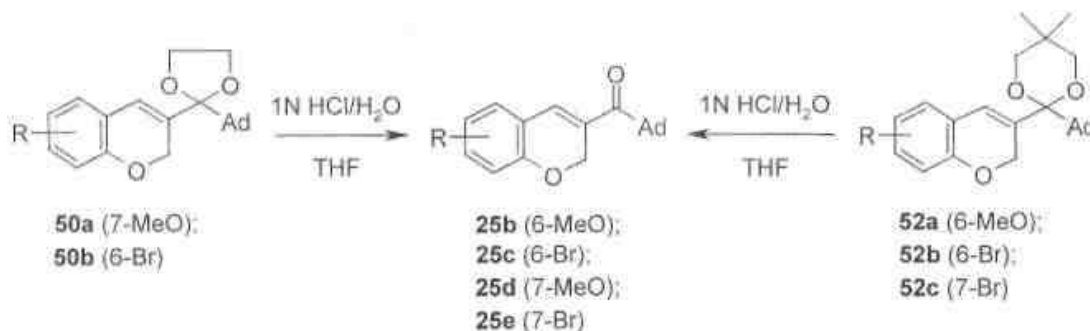
19. att. Kumarīna **43c** reducēšana

Iegūto aizsargāto alilspirtu ciklizēšana realizēta klasiskajos Mitsunobu reakcijas apstākļos. Alilspirta **49** ciklizācijas reakcijā, kā blakusprodukts veidojās alkeniladamantāna atvasinājums **51** (20. attēls), kura struktūra apstiprināta ar GC-MS, bet C=C saites konfigurācija noteikta ar PMR, balstoties uz novēroto Overhauzera efektu.



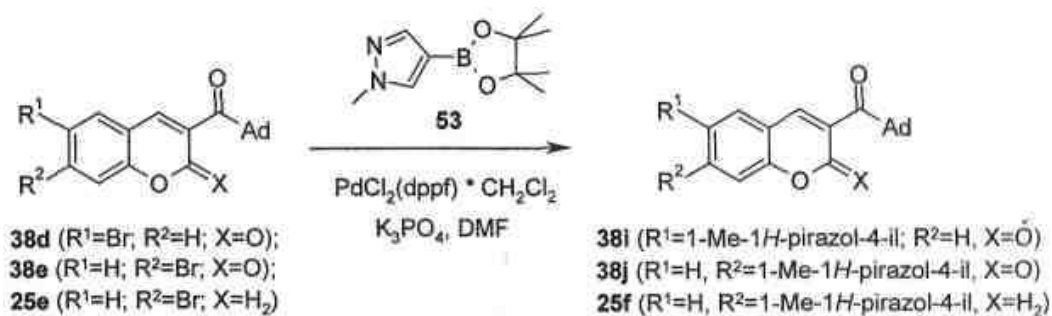
20. att. Savienojuma **49** iekšmolekulara Mitsunobu reakcija

Pēc hromēnu **50a,b** un **52a-c** aizsarggrupas noņemšanas ar $1\text{N HCl}/\text{THF}$, izdalīti mērķa savienojumi **25b-e** (21. attēls).



21. att. Hromēnu **25b-e** iegūšana no savienojumiem **50a,b** un **52a-c**

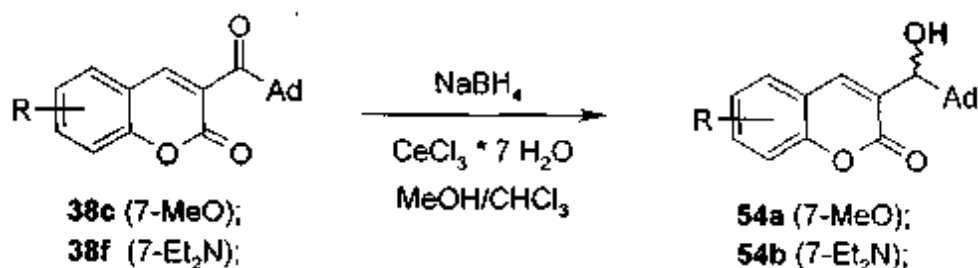
Bromaizvietotie kumarīni **38d**, **38e** un hromēns **25e** izmantoti tālākai pamat-struktūras funkcionalizēšanai. Viena no veiksmīgākajām funkcionalizēšanas reakcijām izrādījās bromatvasinājumu **38d**, **38e** un **25e** Suzuki-Mijauras reakcija ar pirazolil-borskābes pinakolēsteri **53** (22. attēls).



22. att. Kumarīnu **38i,j** un hromēna **25f** iegūšana

Hromēnu **25a-f** *in vitro* pētījumi parādīja, ka savienojumiem piemīt samērā augsta antagonistu aktivitāte un saistīšanās afinitāte uz mGluR1. Labāko funkcionālo aktivitāti ($\text{IC}_{50}=0.38 \mu\text{M}$) un saistīšanās afinitāti ($\text{IC}_{50}<1.0 \mu\text{M}$) uzrādīja savienojums **25d**. Tā 6-metoksi-analogs **25b** uzrādīja nedaudz zemāku saistīšanās afinitāti ($\text{IC}_{50}=3.8 \mu\text{M}$). Līdzīgi kumarīnu **38** struktūras-aktivitātes sakarībām arī hromēnu **25** atvasinājumi, kuri satur aizvietotāju 7. stāvoklī ir ievērojami aktīvāki kā to 6-aizvietotie analogi. Pārbaudot iegūtos savienojumus uz hmGluR1, izrādījās, ka to aktivitāte uz humanizētiem receptoriem ir apmēram 20 reizes zemāka. Piemēram, savienojumu **25b** un **25f** aktivitāte bija $23 \mu\text{M}$ un $28 \mu\text{M}$ līmenī, attiecīgi. Tā kā hromēnu atvasinājumi **25** un attiecīgie kumarīni **38** bija aktīvi tikai uz žurku receptoriem, šo struktūru tālāka attīstīšana tika pārtraukta.

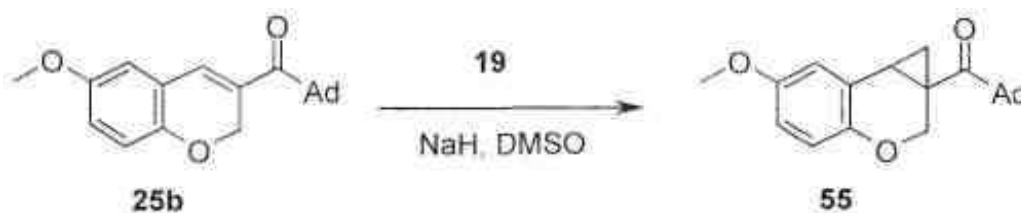
Sakarā ar to, ka kumarīni **38** bija ievērojami aktīvāki kā tiem atbilstošie hromēni **25**, bija nepieciešams noskaidrot vai abos gadījumos tieši 3. pozīcijas karbonilgrupa un tās orientācija telpā nodrošina savienojumu aktivitāti. Konformāciju analīze parādīja, ka kumarīnu **38** karbonilgrupa ir nedaudz pagriezta ārpus cikla plaknes. Pastāvēja varbūtība, ka šādā konformācijā aktivitāti nosaka laktona cikla karbonils, kurš arī potenciāli varētu saistīties ar receptoru, darbojoties kā ūdeņraža saites akceptors. Lai to pārbaudītu, 3. pozīcijas karbonilgrupa tika noreducēta, izmantojot NaBH_4 cērija trihlorīda klātienē. Visi 3-(1-hidroksietil)-hromen-2-oni **54a,b** iegūti ar augstiem iznākumiem (23. attēls).



23. att. Kumarīnu **38c,f** reducēšana

Savienojumi **54a,b** bija neaktīvi gan uz mGluR1, gan mGluR5 receptoriem, apstiprinot karbonilgrupas izšķirošo lomu mGluR1 antagonistu aktivitātes nodrošināšanā.

Lai izmainītu hromēna **25** konformāciju tā, lai karbonilgrupa varētu pagriezties ārpus cikla plaknes līdzīgi kumarīnam **38**, izmantota savienojuma **25b** C=C dubultsaites ciklopropanēšana (24. attēls).



24. att. Hromēna **25b** ciklopropanēšana

Iegūtais tricikliskais ketons **55** uzrādīja ievērojami zemāku aktivitāti uz hmGluR1 ($IC_{50}=40 \mu M$). Jāatzīmē, ka rezultātu nevar korekti interpretēt, jo savienojuma **55** iespējamās konformācijas tomēr ievērojami atšķiras no kumarīna **38** konformācijas.

Secinājumi

1. Aizstājot mGluR5 antagonistu - ariletēnilpiridīnu struktūrā galveno farmakoforo elementu - piridīna gredzenu ar acilgrupu, iegūti 3-aril- un 3-hetaril-propenoni, kuri atsevišķos gadījumos saglabā mGluR5 aktivitāti, tomēr zaudē selektivitāti un iegūst izteiktas mGluR1 antagonistu īpašības.
2. 1-Adamantanilgrupa, salīdzinājumā ar *t*-butil-, ciklopropil- un aril-grupām, dod vislielāko mGluR aktivitātes paaugstināšanos gan 3-aril- un 3-hetaril-propenonu, gan *trans*-2-aril-ciklopropilketonu rindā.
3. (*E*)-1-Adamantanil-3-aril-propenoni ir selektīvi mGluR1 nekonkurējošie antagonisti. Augstāko savienojumu aktivitāti ($IC_{50} < 100$ nM) nodrošina nelieli polāri aizvietotāji arilgrupas 3. un 4. stāvoklī.
4. Izmantojot (*E*)-1-adamantanil-3-aril-propenonu struktūru kā mGluR1 antagonistu modeli, veikts konformacionāli ierobežotu telpisko analoģu dizains un sintezēti sekojoši propenonu analogi - adamantānil-(*trans*--2-aril-ciklopropil)metanoni, 3-(adamantān-1-karbonil)-hromen-2-oni un adamantān-1-il-(2*H*-hromen-3-il)metanoni.
5. Adamantanil-(*trans*-2-aril-ciklopropil)metanoni, salīdzinot ar (*E*)-1-adamantanil-3-aril-propenoniem, ir perspektīva savienojumu klase jaunu efektīvu mGluR1 modulatoru izstrādāšanai ar uzlabotām farmakokinētiskajām un farmakoloģiskajām īpašībām.
6. Beilisa-Hilmana reakciju praktiski nevar izmantot aizvietotu adamantān-1-il-(2*H*-hromen-3-il)-metanonu sintēzei sakarā ar adamantānilgrupas stēriskiem efektiem, kas ievērojami samazina 1-adamantanil-propenona reaģētspēju.
7. Izstrādāta adamantān-1-il-(2*H*-hromen-3-il)metanonu sintēze piecās stadijās no 3-adamantan-1-il-3-oksopropionskābes etilestera un *o*-hidroksibenzaldehīdiem, izmantojot Knēvenāgela kondensāciju un iekšmolekulāru Mitsunobu reakciju. Metode ir vispārīga un pielietojama arī citu 3-acilaizvietotu 2*H*-hromēnu iegūšanai.
8. Lučes metode ($NaBH_4$, $CeCl_3 \cdot 7H_2O$, MeOH) ir efektīva izteikti lipofīlu, slikti šķīstošu karbonilsavienojumu reducēšanai, ja kā šķīdinātāju izmanto hloroforma-metanola (1:1) maisījumu. Paņēmienu priekšrocības nodemonstrētas, selektīvi reducējot adamantān-1-il-(2*H*-hromen-3-il)metanonu karbonilgrupu.
9. Adamantan-1-il-(2*H*-hromen-3-il)metanoni un Knēvenāgela kondensācijā iegūtie 7-aizvietotie-3-(adamantān-1-karbonil)-hromen-2-oni uzrāda augstu mGluR1 antagonistu aktivitāti uz žurku receptoriem, bet nav aktīvi uz humanizētiem mGluR1 receptoriem.

RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE
RIGA TECHNICAL UNIVERSITY

Dina TRIFANOVA

I GRUPAS METABOTROPO GLUTAMĀTA RECEPTORU NEKONKURĒJOŠO
ANTAGONISTU SINTĒZE

**THE SYNTHESIS OF NONCOMPETITIVE
ANTAGONISTS OF GROUP I METABOTROPIC
GLUTAMATE RECEPTORS**

Summary of Doctoral Theses

Promocijas darba kopsavilkums

Rīga 2006

Introduction

The metabotropic glutamate receptors (mGluRs) are G-protein coupled receptors that play important roles in the central nervous system. Eight subtypes have been identified and these are divided into three different groups depending on sequence similarity, pharmacology and transduction mechanisms: group I (mGluR1 and mGluR5), group II (mGluR2 and mGluR3) and group III (mGluR4, mGluR6-8).

A variety of antagonists at the group I mGluR have been described and these can be classified into two categories according to their mode of inhibition. Competitive antagonists are amino acid derivatives that interact competitively at the glutamate binding site located in the large extracellular N-terminal domain. Particularly for Group I receptors, selective competitive antagonists are very rare, they have low potency, generally show poor blood-brain barrier penetration and do not show subtype selectivity. Potent and subtype selective competitive ligands have not been identified. Recent advances have elucidated novel compounds with a non-competitive mode of inhibition and no structural analogies to amino acids. These compounds belong to high diverse chemical classes having high affinities and very low affinities at other metabotropic and ionotropic glutamate receptors. Because of the wide diversity, heterogeneous distribution and diverse physiological roles of mGluR subtypes, the opportunity exist for developing therapeutic agents that selectively interact with mGluRs involved in only one or a limited number of central nervous system functions.

Despite intense efforts both in academia and industry, to date only relatively few mGluR1 and mGluR5 antagonists are available. Moreover, these derivatives, regardless of their relatively high selectivity, generally show poor pharmacokinetic properties.

A large body of preclinical studies now suggests that ligands for specific mGluR subtypes have potential as treatment for a wide of psychiatric and neurological disorders, including depression, anxiety disorders, schizophrenia, chronic pain, epilepsy, Alzheimer's disease and Parkinson's disease. The development of potent and selective mGluR1 and mGluR5 antagonists as potential therapeutic agents has therefore been the focus of significant research.

The aim of the work

The main objective of the work is to develop the synthesis of novel noncompetitive antagonists of Group I metabotropic glutamate receptors. To achieve this goal it was necessary:

1. To review publications and patents on noncompetitive mGluR1 and mGluR5 antagonists.
2. To perform the design of new structures based on already known noncompetitive mGluR5 antagonists and to test whether the carbonyl group could act as an alternative hydrogen bond acceptor in the pharmacophore model of mGluR5 antagonists.
3. To synthesize α,β -unsaturated ketones and amides of α,β -unsaturated carboxylic acids and to perform the analysis of structure-activity relationships according to *in vitro* activity data.
4. To develop the synthesis of cyclopropyl ketones as potentially active conformational analogues of α,β -unsaturated ketones based on the results of structure-activity relationship analysis.
5. To develop the synthesis of conformationally constrained analogues of (*E*)-3-aryl-propenones - derivatives of 3-acyl substituted chromen-2-one and 3-acyl-chromene, and to perform the analysis of structure-activity relationships.

Results

Considering the recently published various arylethenyl- and arylethynyl-pyridines with potent mGluR5 modulatory activity, design of new mGluR5 antagonists has been started with the development of pharmacophore model for these structures. Based on the extensively accepted concept about the role of hydrogen bond in an efficient mGluR5 ligand-receptor interactions, it has been proposed to replace the pyridine ring with another hydrogen bond acceptor. The oxygen atom of an amide carbonyl group could be an alternative hydrogen bond acceptor. After accomplishment of molecule design, α,β -unsaturated carboxylic acid amides **2** proved to be the simplest of potentially active compounds. They were obtained in amidation reaction of corresponding α,β -unsaturated carboxylic acids **1** with secondary amines (Figure 1).

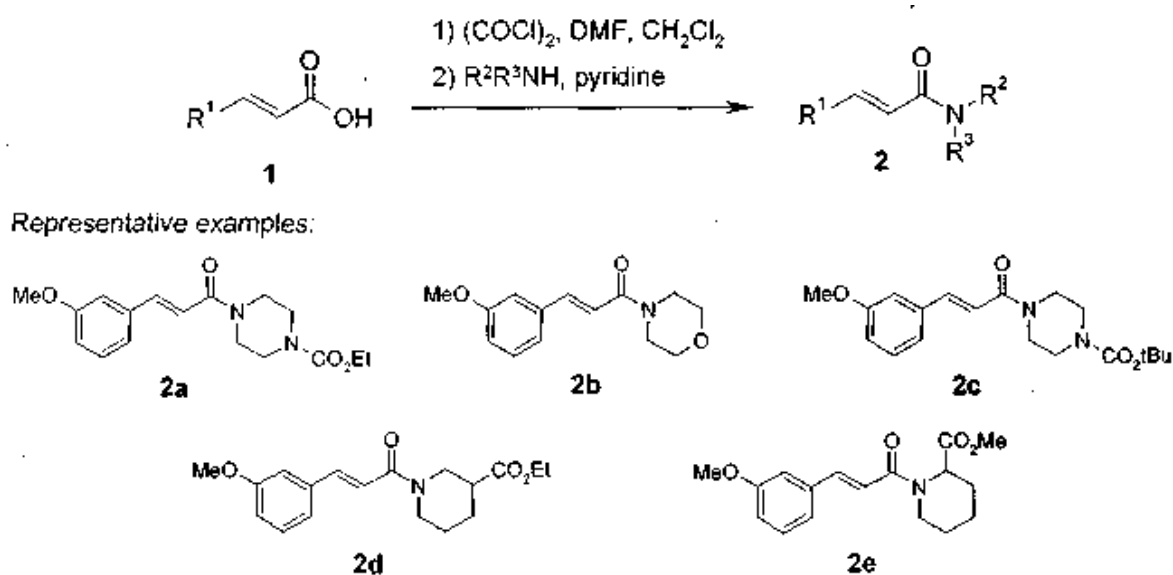


Figure 1. Synthesis of α,β -unsaturated carboxylic acid amides **2**

None of these synthesized amides **2** showed high affinity to the mGluR5 receptor (IC_{50} , [^3H]MPEP, mGluR5). Compound **2a** displaced the radioligand with $\text{IC}_{50}=13\ \mu\text{M}$ showing the best result, which was partially explained by piperazine ethoxycarbonyl group. It should be noted that compound **2b** showed considerable functional activity ($\text{IC}_{50}=12\ \mu\text{M}$; $[\text{Ca}^{2+}]_i$, mGluR5) that slightly differed from that of amide **2a** ($\text{IC}_{50}<10\ \mu\text{M}$). Low binding affinity to the mGluR1 was displayed by amides **2b** and **2c** ($\text{IC}_{50}=30$ and $44\ \mu\text{M}$, respectively). The highest functional activity to the mGluR1 was shown by amides **2d** and **2e** ($\text{IC}_{50}=6$ and $7\ \mu\text{M}$) bearing ester functionality in position 2 or 3 of the piperidine ring.

Since amides **2** did not produce high mGluR1 or mGluR5 modulatory activity, further modification of structures **2** was discontinued.

Looking for other ways to improve the activity, amido group of compounds **2** was replaced by ketone functional group. α,β -Unsaturated ketones **5** were obtained in condensation reaction of aldehydes **3** and corresponding methyl ketones **4** (Figure 2).

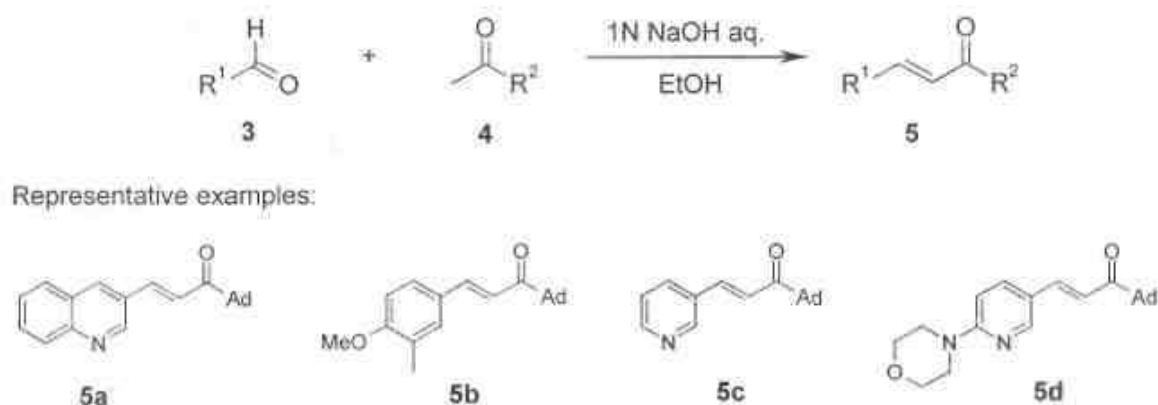


Figure 2. Preparation of α,β -unsaturated ketones **5**

The results of *in vitro* screening of α,β -unsaturated ketones **5** indicated that synthesized compounds possess high activity for the mGluR1. According to the structure-activity relationship analysis of propenones **5**, comparing activity of *t*-butyl-, *c*-propyl- and adamantanyl-ketones, more potent compounds were always obtained amongst adamantanyl ketone series. According to the molecular modeling these results are in agreement with the concept of receptor structure. A certain hydrophobic region is located in the transmembrane domain of the receptor, where bulky, lipophilic substituent such as adamantane tricycle fits easily. Considering that adamantanyl group proved to be the optimal substituent, providing high mGluR1 affinity of propenones **5**, modifications were mainly made at the aromatic ring. Compounds with ring substituents at positions 3, 4 and/or 5 displayed the highest activity. Activity increased in the presence of a heteroatom at aromatic ring. Replacement of phenyl ring by nitrogen heterocycle, for example, quinoline, led to a very potent compound **5a** with high binding affinity ($IC_{50}=0.02 \mu\text{M}$; [^3H]R214127, mGluR1) and functional activity ($IC_{50}=0.03 \mu\text{M}$; IP, mGluR1). Interestingly, affinity of compound **5a** to mGluR5 also is at submicromolar level, but functional activity is low ($IC_{50}=8 \mu\text{M}$; $[\text{Ca}^{2+}]_i$, hmGluR5). Synthesized compounds possessed also high antagonist activity on humanized mGluR1 receptors where compounds **5c** and **5d** displayed $IC_{50}=0.14$ and $0.20 \mu\text{M}$, respectively.

To verify the role of the carbonyl group and to see whether a free hydroxy group could also provide binding with mGluR1 receptors, propenones **5c-g** were reduced to α,β -unsaturated alcohols **6a-c** (Figure 3.).

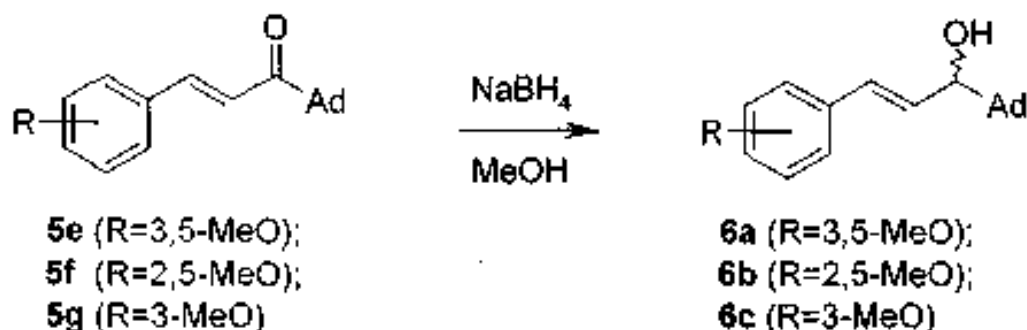


Figure 3. Reduction of propenones **5e-g** to α,β -unsaturated alcohols **6a-c**

As expected, corresponding α,β -unsaturated alcohols **6a-c** were inactive on mGluR5 and did not show binding affinity mGluR1. These compounds exhibited comparatively low functional activity (IC_{50} =40, 19 and 33 μM , respectively) on mGluR1. Such a result confirmed the concept and prompted us to continue research in aimed direction.

To improve the mGluR1 antagonist pharmacophore model it was necessary to synthesize unsaturated ketones **7** bearing a substituent at C-2 atom. Sequential attempts to synthesize the ethoxymethyl- and piperidin-1-yl-methyl-derivatives **8** and **9** from available starting materials were made (Figure 4).

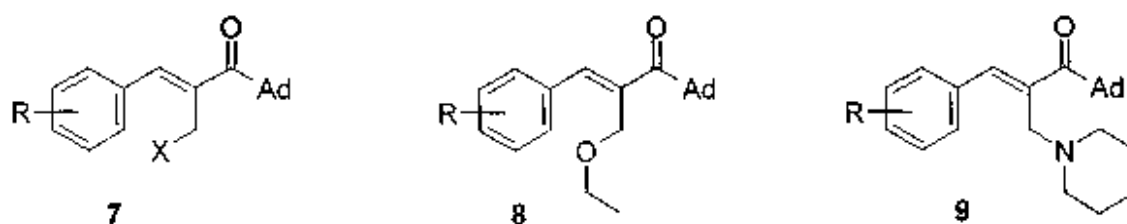


Figure 4. 2-Substituted α,β -unsaturated ketones **7-9**

2-Substituted α,β -unsaturated ketones **8a,b** could be prepared in Heck reaction of vinyl ketone **11** with aryl iodides **12a,b**. Alkylation of 10 with iodoethane in DMSO in the presence of NaOH followed by Heck reaction with aryl iodides **12a,b** yielded the desired substituted aryl ketones **8a** and **8b** (Figure 5).

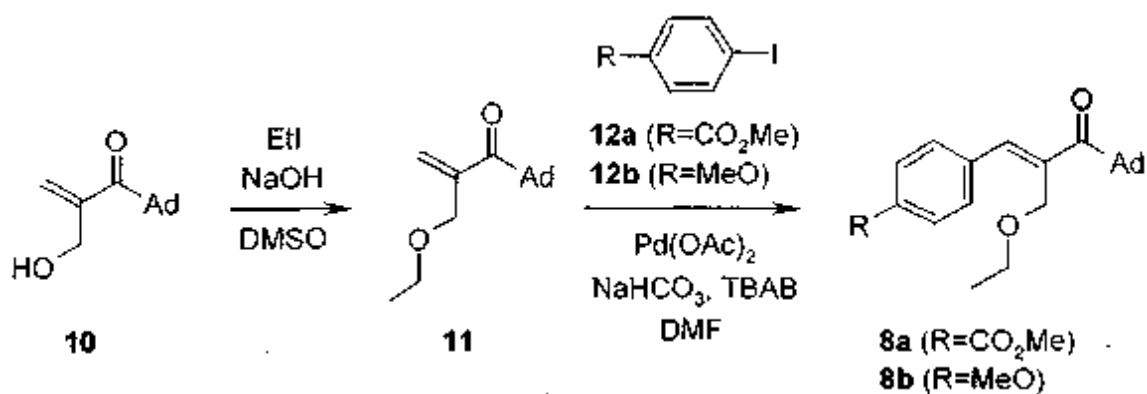


Figure 5. Heck reaction of vinyl ketone **11** and aryl iodides **12a,b**

In an attempt to obtain piperidin-1-ylmethyl-derivatives **9** by transforming allylic alcohol **10** to allylic amine **13** under Heck reaction conditions, the desired coupling product **9** was not formed. Adamantanyl ketone **14** was isolated as the only product (Figure 6).

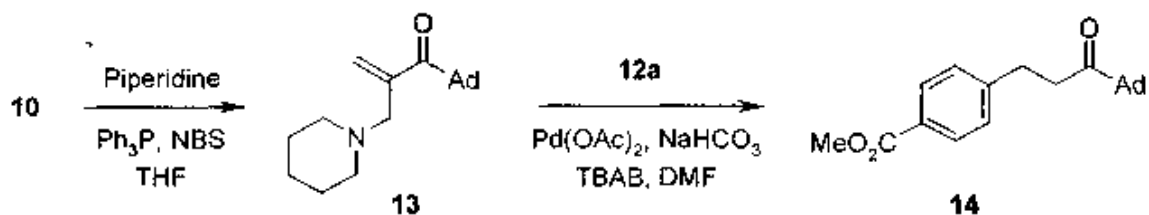


Figure 6. Heck reaction of piperidine analogue **13** and aryl iodide **12a**

Under analogous Heck reaction conditions propanone **18** and 4,4'-dimethoxy-biphenyl were obtained from allylic alcohol **10** and iodobenzene **12b**. Such result could be explained by palladacycle **15** formation and subsequent α,β -hydride elimination from the methylene group, which is adjacent to the oxygen atom, thus affording hydroxyvinyl ketone **16**. Isomerisation of **16** led to formyl ketone **17** which upon decarbonylation gave propanone **18** (Figure 7). It is practically impossible to change the direction of reductive elimination in Heck reaction of such substrates.

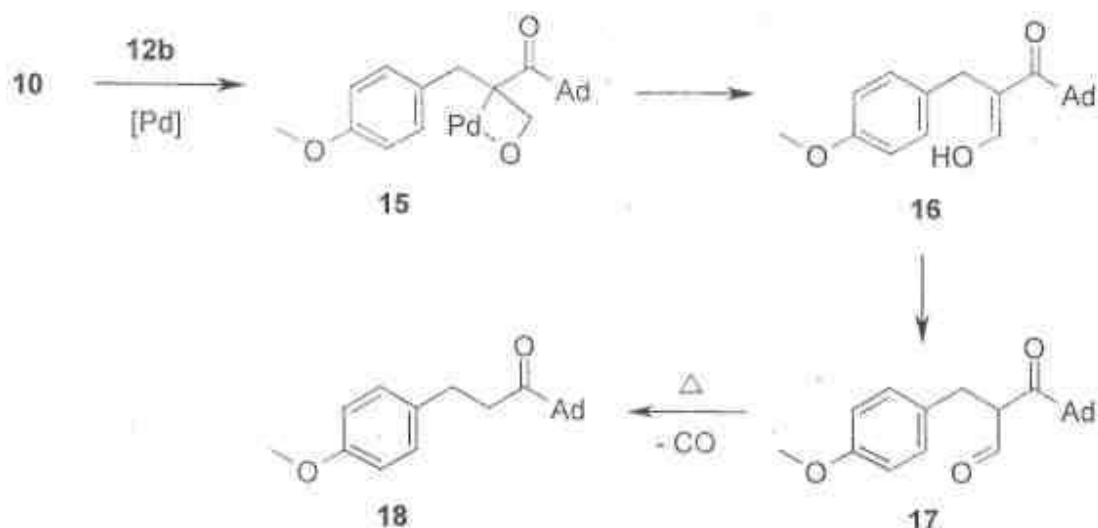
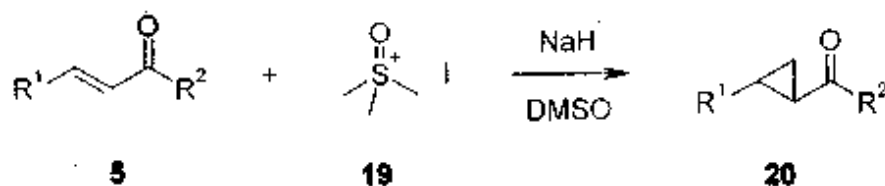


Figure 7. Proposed mechanism for the generation of ketone **18**

Compounds **8a** and **8b** showed very low activity on mGluR1 and mGluR5. Antagonist activity of compound **8a** was 16 μM (IC_{50} , IP, rmGluR1), and binding affinity was even lower, $\text{IC}_{50}=82 \mu\text{M}$ ($[^3\text{H}]\text{R214127}$, rmGluR1). Affinity for mGluR5 also was low, $\text{IC}_{50}=59 \mu\text{M}$ ($[^3\text{H}]\text{MPEP}$, rmGluR5). Compound **8b** did not bind with mGluR1, whereas, its affinity for mGluR5 did not exceed 60 μM . Further modifications at position 2 of α,β -unsaturated ketones **7** were not attempted.

α,β -Unsaturated ketones are good Michael acceptors and such compounds are prone to facile metabolism. To continue derivatization of ketones **5** in order to improve their pharmacokinetic properties, all possible conformations of compound **5** have been analyzed and spatially similar structures were designed. Conformationally related analogues proved to be cyclopropyl ketones **20** which were obtained in the reaction of propenones **5** with *in situ* generated dimethylsulfoxonium methylide (Figure 8).



Representative examples:

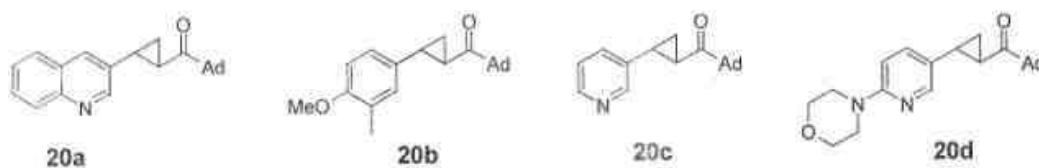


Figure 8. Preparation of cyclopropyl ketones **20**

Cyclopropyl ketones **20** like corresponding propenones **5** were endowed with great potency and selectivity for the mGluR1. Ketones **20a-c** in comparison to **5a-c** displayed slightly lower binding affinity to the rat mGluR1 and higher activity for humanized mGluR1. Compounds **20a** and **20d** possessed better binding affinity ($IC_{50}=0.14$ and $0.02 \mu\text{M}$) and they retained high functional activity also against humanized mGluR1 ($IC_{50}=0.27$ and $0.11 \mu\text{M}$).

Alternatively, a synthetic pathway to conformationally constrained analogues of propenones **5** incorporating C=C bond in the cyclic system was developed. Conformationally closest cyclic analogues of ketones **5** are 1-(2*H*-chromen-3-yl)-methanones **25**. Initially, we examined the Raylis-Hillman reaction of salicylaldehydes (**21a,b**) with 1-adamantan-1-yl-propenone (**22**) (Figure 9, via a compound **23**). Unfortunately, aldehyde **21** has no electron-withdrawing group, therefore the reaction proceeded very sluggishly and the yield was very low. Reaction was not completed because of facile dimerization and polymerization of vinyl ketone **22**. Chromenes **25** could be prepared in reaction of aldehydes **21** with vinyl ketone **22** under basic conditions, that are suitable for Michael addition and subsequent intramolecular condensation reactions (Figure 9, via a compound **24**). 3-Adamantanylcarbonyl-2*H*-chromene (**25a**) was prepared from benzaldehyde **21a** and vinyl ketone **22** in DMF in the presence of sodium hydride. Nevertheless, this reaction also did not proceed completely and compound **25a** was obtained in dramatically low yield.

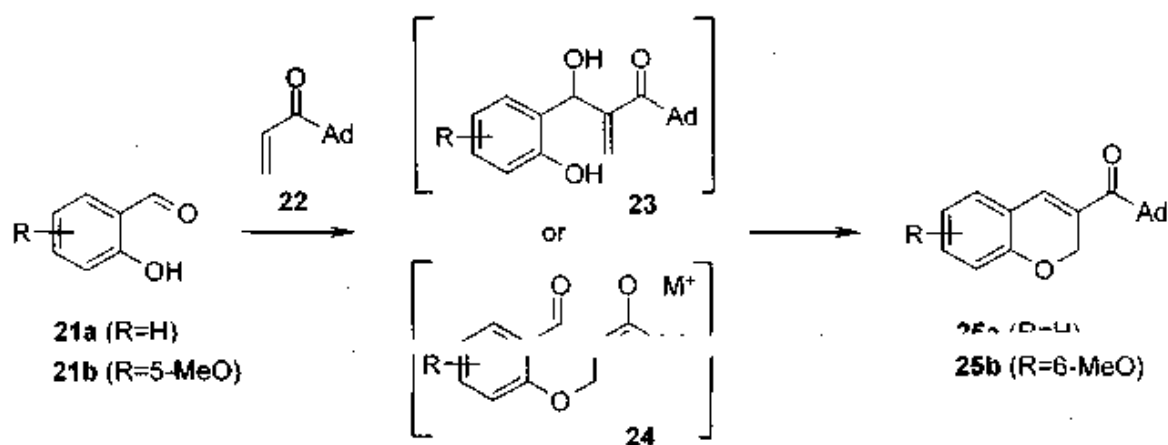


Figure 9. Synthesis of 2*H*-chromenes **25a,b**

Several reactions of benzaldehyde **21b** with vinyl ketone **22** were performed under Baylis-Hillman and base-induced reaction conditions to evaluate the potential of reaction optimization. Reaction proceeds faster in chloroform under Baylis-Hillman reaction

conditions and also if reaction is performed in a mixture of THF-H₂O in the presence of NaOH. Unfortunately, reaction of 2-hydroxy-5-methoxybenzaldehyde (**21b**) and adamantanyl-vinyl ketone (**22**) gave disappointingly low yield of product, isolation of which was not rational.

Chromene **25a** showed *in vitro* quite good mGluR1 antagonist activity with IC₅₀=1.6 μM (IP, rmGluR1), IC₅₀=2.2 μM ([³H]R214127, rmGluR1) and IC₅₀=39 μM ([³H]MPEP, rmGluR5) and it has been decided to continue research despite to synthetic problems.

Alternatively, a second synthetic route could utilize functionalized alkenyl iodobenzene derivatives **8** as intramolecular Heck reaction precursors. This reaction may proceed via *endo*- or desired *exo*-cyclization of compound **26** (Figure 10).

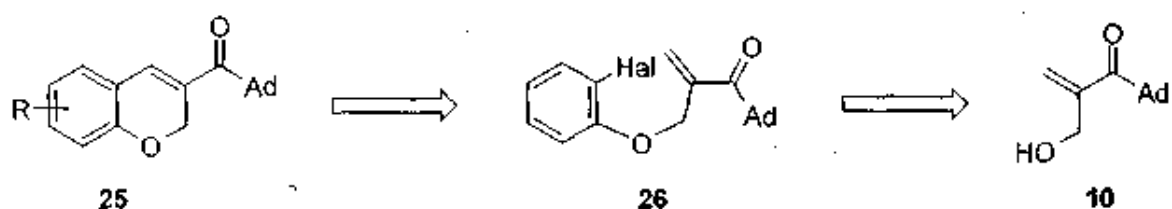


Figure 10. Retrosynthetic pathway to prepare 2H-chromene **25**

Alkenes **26** were obtained in Mitsunobu reaction from corresponding halobenzenes and propenone **10**. Unfortunately, substituted iodobenzene **26a,b** gave neither *endo*- nor *exo*-addition product **25c,d** of intramolecular Heck reaction (Figure 11). It should be noted that treatment of compound **26a** under Heck reaction conditions afforded only allylic acetate **27**, formation of which could be explained by phenolate cleavage from starting compound **26a,b** followed by addition of acetoxy group. The only source of acetoxy group in reaction medium is Pd(OAc)₂ and this can explain the low yield of product **27**. Here compounds **26a,b** act as substrates for palladium catalyzed allylation reaction.

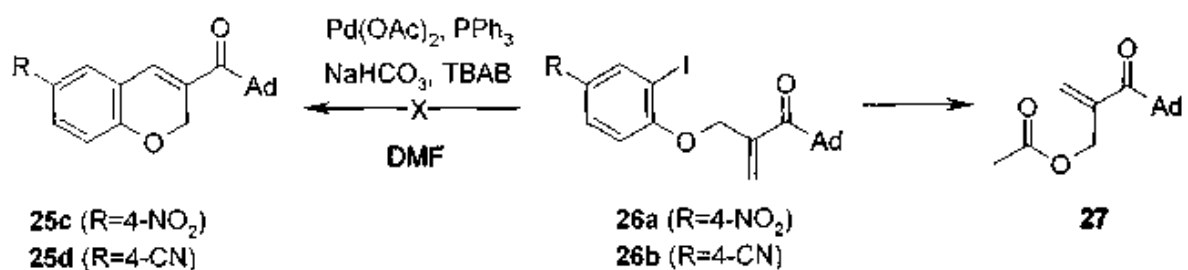


Figure 11. Formation of acetic acid allyl ester **27** in Heck reaction

To obtain chromenes **25** it has been proposed to perform the reactions in opposite way - first, a Heck reaction and secondly, cyclization of intermediate **30** in Mitsunobu reaction. TBDMS-protected allyl alcohol **29a** was selected as a suitable starting compound. Unfortunately, under Heck conditions the reaction of **29a** with iodoarene **28b** did not occur. That could be explained with the presence of a free hydroxy group and influence of bulky TBDMS group. Nevertheless, Heck reaction of allyl ketone **29b** and iodophenol **28b** also did not proceed and the desired product **30b** was not obtained (Figure 12).

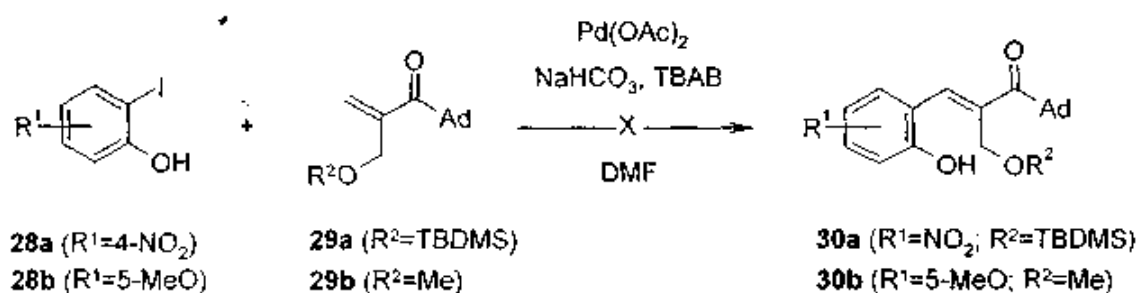


Figure 12. Heck reaction of iodophenols **28a,b** with vinyl ketones **29a,b**

Since chromenes appeared unavailable by Heck reaction, an alternative methods were searched. Another possible approach to chromenes **2** is Stille coupling of triflates **12** with corresponding acyl chloride **14** (Figure 13).

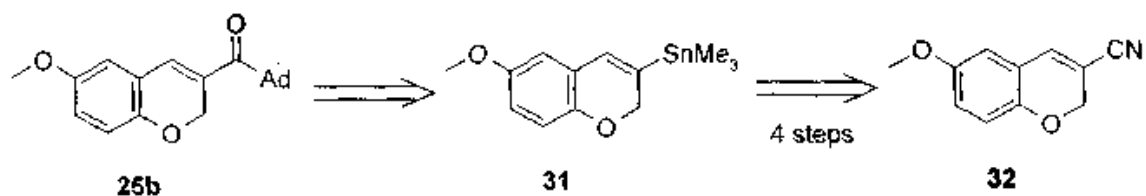


Figure 13. Retrosynthesis for the chromene **25b**

Trimethylstannane **31** was planned to be obtained from triflate **34**, which was prepared in a three-step procedure from nitrile **32** according to a literature procedure. Reaction of **34** with hexamethyldistannane in the presence of $\text{Pd(PPh}_3)_4$ led to the reduction and homocoupling products **35** and **36**, respectively, instead of the desired (6-methoxy-2*H*-chromen-3-yl)-trimethylstannane (**31**). No reaction occurred when **34** was treated with Me_3SnH , LDA, CuCN in THF or $\text{Me}_3\text{SnSnMe}_3$, *n*-BuLi, CuBr- Me_2S in THF.

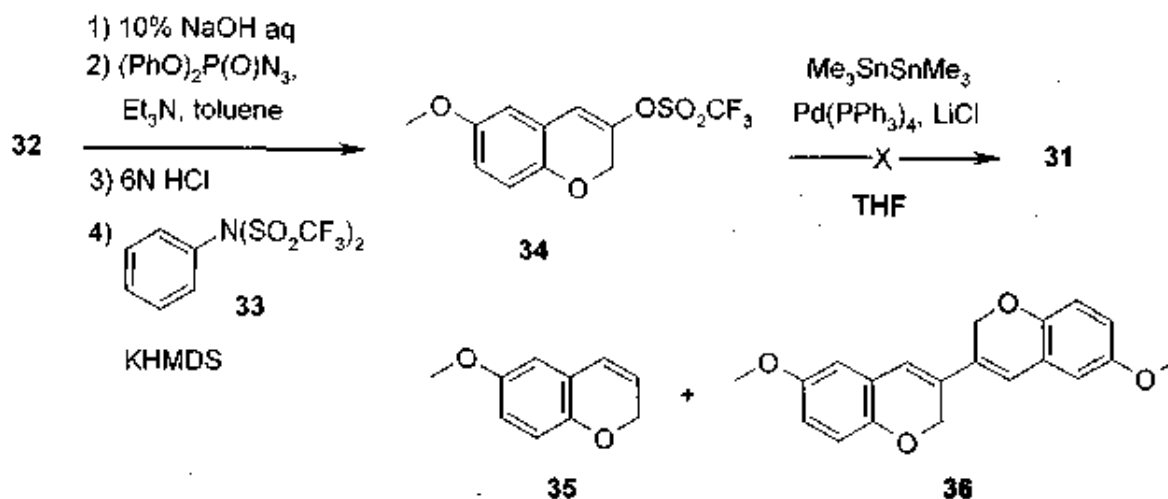


Figure 14. Synthesis pathway to trimethylstannane **31**

After all unsuccessful experiments to prepare trimethylstannane **31**, new alternative route was searched for the synthesis of chromenes **25**. One of retrosynthetic pathways is intramolecular ether bond formation of 2-((*E*)-3-hydroxypropenyl)phenol **37** (Figure 15). Phenols **37** could be obtained by reduction of coumarins **38**.

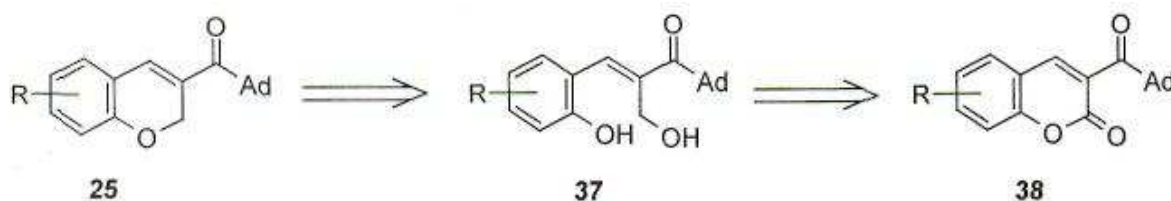


Figure 15. Retrosynthetic pathway to prepare chromene **25**

3-(Adamantane-1-carbonyl)-chromen-2-ones **38a-h** were prepared in the Knoevenagel condensation of corresponding *o*-hydroxy-benzaldehydes **21a-h** with ethyl 3-adamantan-1-yl-3-oxopropionate (**39**) in the presence of piperidine in good to moderate yields (16-95%) (Figure 16).

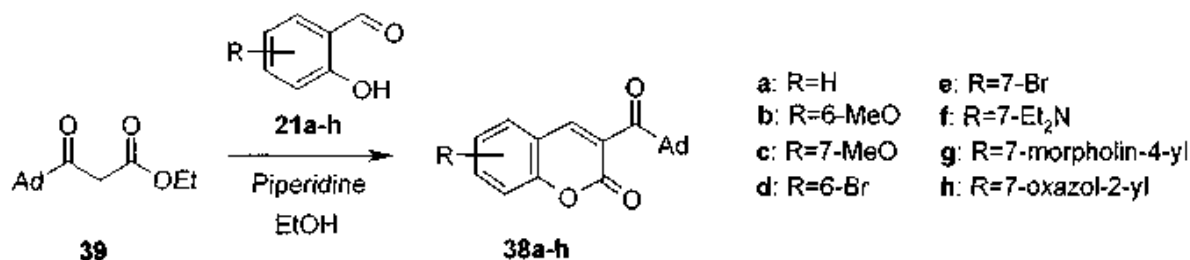


Figure 16. Synthesis of coumarins **38a-h** in reaction of Knoevenagel

Azacoumarin **42** was not formed in reaction of 3-formyl-4-hydroxypyridine (**40**). This could be explained by formation of isomer **41** what is unfavorable for subsequent cyclization. Isomerization and cyclization of compound **41** was performed in THF in the presence of NaH (Figure 17).

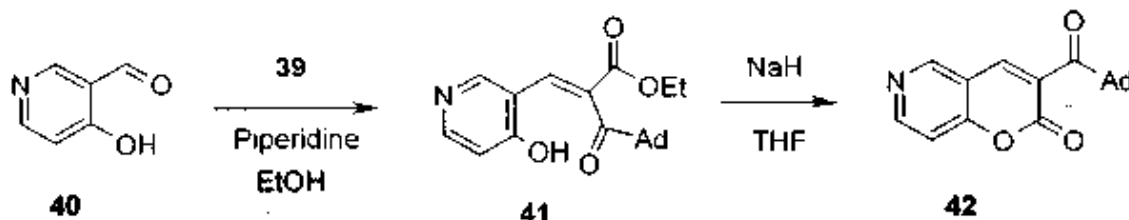


Figure 17. Preparation of 3-(adamantane-1-carbonyl)-pyrano[3,2-c]pyridin-2-one (**42**)

Coumarins **38a-h** showed surprisingly high functional activity and binding affinity for rat mGluR1 receptors. The most potent compound **38c** displayed functional activity with $IC_{50}=0.06 \mu\text{M}$ and binding affinity with $IC_{50}=0.29 \mu\text{M}$. Replacing 7-MeO group of compound **38c** by 7-diethylamino-group resulted in retaining of activity (derivative **38f**). *In vitro* results in series of coumarins **38** convincingly showed the crucial role of substituent at position 7 in the mGluR1 antagonist pharmacophore. All new coumarins **38** were selective against rat mGluR1 receptors and their activity to humanized receptors were lower, and none of compounds IC_{50} in hmGluR1 antagonist assays was as high as $10 \mu\text{M}$.

It was necessary to protect carbonyl group at position 3 to selectively reduce the lactone group of coumarin **38**. The first selected was 1,3-dioxolane protecting group, which was easy to introduce in the presence of *p*-toluenesulfonic acid and triethyl orthoformate in refluxing benzene (Figure 18). The 1,3-dioxolane protection proved to be inappropriate because of formation of undesirable byproducts in subsequent reactions. Dimethyldioxanyl group appeared to be more efficient as protecting group in all the following reactions.

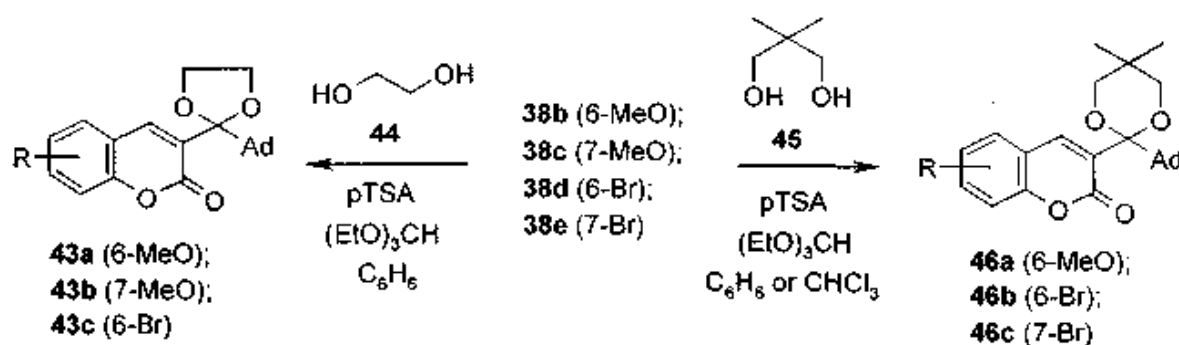


Figure 18. Protection of carbonyl function at position 3 in chromene **38b-e**

Coumarins **43a-c** and **48a-c** were reduced with LiAlH₄ or DIBAL to corresponding protected allyl alcohols. Reduction of 6-bromo-derivative **43c** gave lactone **47** in 54% isolated yield (Figure 19). After deprotection of compound **47** with 1N HCl/THF ketone **48** was obtained. Formation of ketone **48** can be explained by simultaneous hydrolysis of dioxolane protecting group and lactone cleavage of compound **47**. As a result, β -keto acid was formed and after subsequent decarboxylation, the product **48** was obtained.

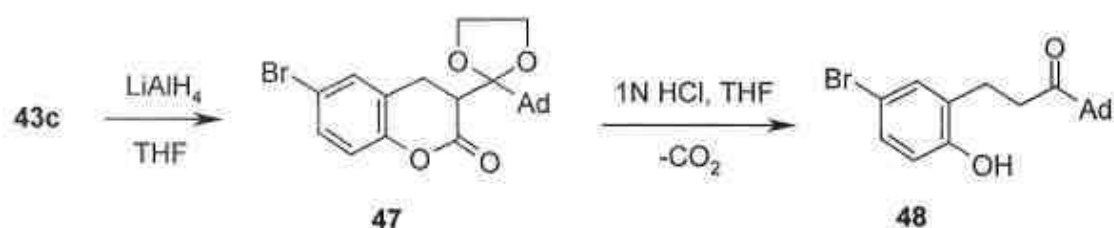


Figure 19. Reduction of chromen-2-one **43c**

Protected allyl alcohols were cyclized under Mitsunobu reaction conditions. During cyclization of allyl alcohol **49** alkenyladamantane derivative **51** was formed as a byproduct (Figure 20), structure of which was confirmed by GC-MS and the configuration of C=C double bond was determined based on the Nuclear Overhauser Effect.

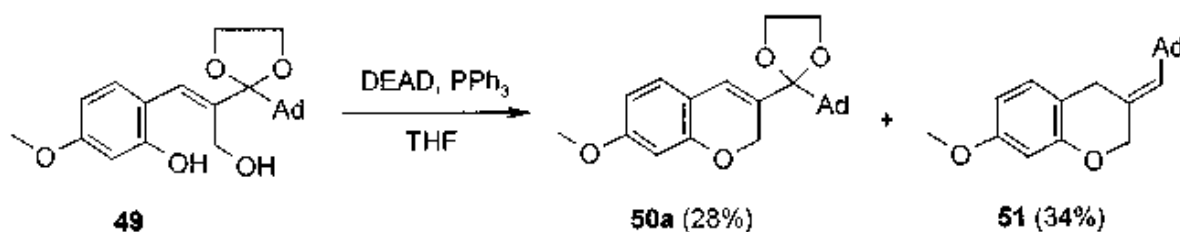


Figure 20. Intramolecular Mitsunobu reaction of allylic alcohol **49**

After the cleavage of protecting group in chromenes **50a,b** and **52a-c** with 1N HCl/THF the target compounds **25b-e** were isolated (Figure 21).

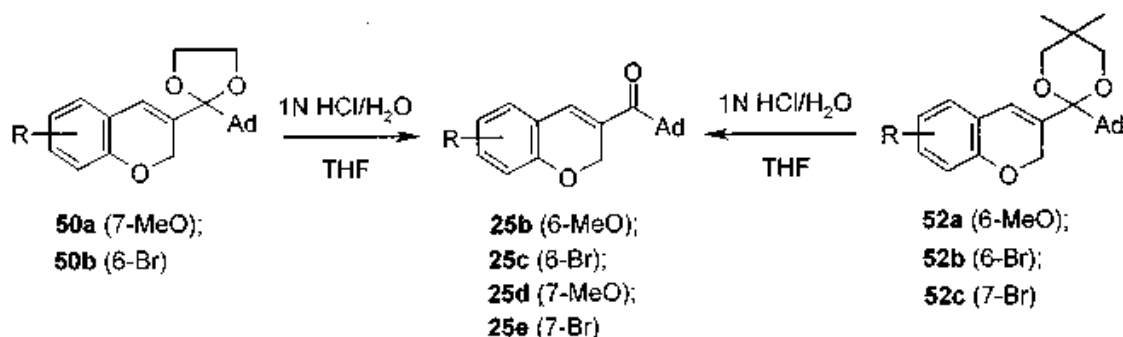


Figure 21. Synthesis of chromenes **25b-e** from compounds **50a,b** and **52a-c**

Bromoderivatives **38d**, **38e** and chromene **25e** were used in further structure functionalizations. One of the successful functionalization reactions was Suzuki-Miyaura reaction of bromoderivatives **38d**, **38e** and **25e** with pirazolylboronic pinacolate esters **53** (Figure 22).

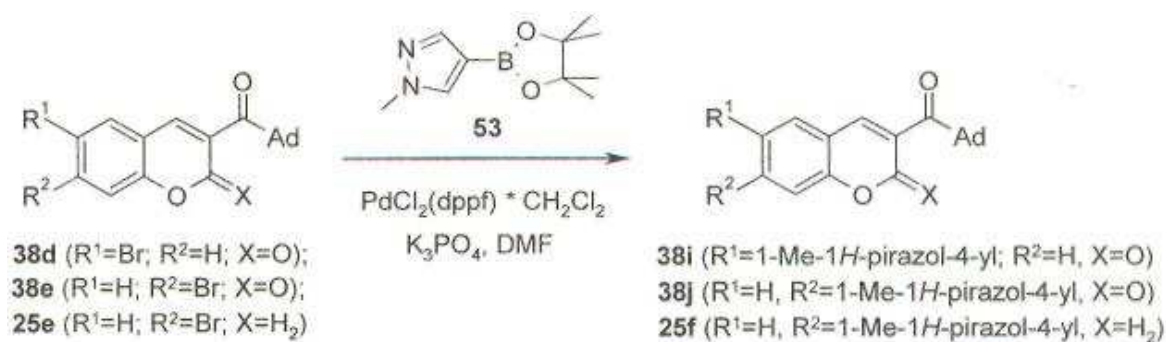


Figure 22. Preparation of coumarins **38i,j** and chromene **25f**

In vitro screening of chromenes **25a-f** showed that compounds display comparatively high antagonist activity and binding affinity on rmGluR1. Chromene **25d** showed the highest functional activity ($\text{IC}_{50}=0.38 \mu\text{M}$) and binding affinity ($\text{IC}_{50}<1.0 \mu\text{M}$). 6-Methoxy-analogue **25b** showed slightly decreased binding affinity ($\text{IC}_{50}=3.8 \mu\text{M}$). Similarly to structure-activity relationships of coumarins **38**, their chromene analogues **25** containing substituent at position **7** are considerably more potent than 6-substituted analogues. Activity for humanized mGluR1 was about 20-fold decreased, for example, compounds **25b** and **25f** showed $\text{IC}_{50}=23 \mu\text{M}$ and $28 \mu\text{M}$, respectively. Further development of these structures has been discontinued since both chromenes **25** and coumarins **38** were active only on rat receptors.

Coumarins **38** were considerably more potent than corresponding chromenes **25**, thereby it was necessary to elicit whether in both cases carbonyl group at position 3 and its orientation is providing activity of compounds. Conformational analysis showed that the carbonyl group in coumarin **38** was slightly out of ring plane. It seemed probably that the activity in such conformation was determined by lactone ring carbonyl which could potentially act as a hydrogen bond acceptor when interacting with receptor. To verify this assumption the carbonyl function of position 3 was reduced with NaBH_4 . 3-Hydroxymethyl-chromen-2-ones **54a,b** were obtained in high yields (Figure 23).



Figure 23. Reduction of coumarins **38c,f**

Compounds **54a-c** were inactive against mGluR1 and mGluR5 thus confirming the crucial role of 3-carbonyl group for providing antagonist activity on mGluR1.

To change the conformation of chromene **25** and to prepare compound where carbonyl group, similarly to coumarins **38**, would turn out of ring plane, cyclopropanation of C=C double bond was performed (Figure 24).

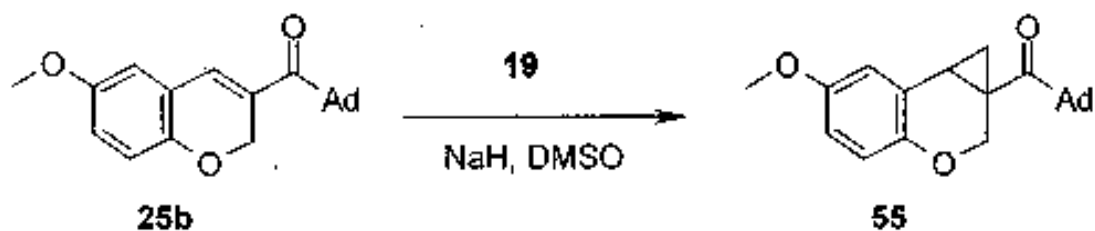


Figure 24. Cyclopropanation of chromene **25b**

Tricyclic ketone **55** showed substantially lower activity for hmGluR1 ($\text{IC}_{50}=40 \mu\text{M}$). It should be noted that is hard to interpret the result correctly, since the conformations of compound **55** and coumarin **38**, are considerably different.

Conclusions

1. Replacement of the main mGluR5 antagonist pharmacophore element of arylethenylpyridine structure - pyridine ring - with the acyl group led to 3-aryl and 3-heteroaryl-propenones, which partially retained activity against mGluR5, although compounds lost selectivity and obtained mGluR1 antagonist properties.
2. Introduction of adamantanyl group in 3-aryl- and 3-heteroaryl-propenone and *trans*-2-aryl-cyclopropylketone structures results in substantially higher activity comparing with *t*-butyl-, cyclopropyl- and aryl-groups.
3. (*E*)-1-Adamantanyl-3-aryl-propenones are selective noncompetitive mGluR1 antagonists. High activity ($IC_{50} < 100 \mu M$) of compounds is provided by small polar substituents at positions 3 and 4 of the aryl group.
4. Considering (*E*)-1-adamantanyl-3-aryl-propenone as the model structure of mGluR1 antagonist, conformationally constrained analogues - adamantanyl-(*trans*-2-aryl-cyclopropyl)methanones, 3-(adamantan-1-carbonyl)-chromen-2-ones and adamantan-1-yl-(*2H*-chromen-3-yl)methanones - were designed and synthesized.
5. Adamantanyl-(*trans*-2-aryl-cyclopropyl)methanones in comparison to (*E*)-1-adamantanyl-3-aryl-propenones are perspective for the development of new mGluR1 modulators with improved pharmacokinetic and pharmacological properties.
6. Baylis-Hillman reaction is not efficient for the synthesis of adamantan-1-yl-(*2H*-chromen-3-yl)-methanones because of the steric effects of adamantanyl group what remarkably decrease the reactivity of 1-adamantanyl-propenone.
7. The five step synthesis of adamantan-1-yl-(*2H*-chromen-3-yl)methanones from ethyl 3-adamantan-1-yl-3-oxopropionate and *o*-hydroxybenzaldehydes implementing Knoevenagel condensation and intramolecular Mitsunobu reaction was developed. Method is general and useful in the synthesis of other 3-acyl-sustituted *2H*-chromenes.
8. The procedure of Luche reduction ($NaBH_4$, $CeCl_3 \cdot 7H_2O$, MeOH) is effective for the reduction of poorly soluble, lipophilic carbonyl compounds, if performed in chloroform-methanol (1 : 1). The advantages of this approach were shown by selective reduction of carbonyl group in adamantan-1-yl-(*2H*-chromen-3-yl)methanones.
9. 7-Substituted-3-(adamantan-1-carbonyl)-chromen-2-ones which were obtained in Knoevenagel condensation and adamantan-1-yl-(*2H*-chromen-3-yl)methanones displayed high antagonist activity on rat mGluR1 receptors, but were not active against humanized mGluR1 receptors.

Darba aprobācija (Abstracts):

1. Trifanova D., Parsons C. G. R., Kauss V. Synthesis of 3-acyl-2H-1-benzopyran derivatives acting as selective noncompetitive mGluR1 antagonists// J. Mex. Chem. Soc. -2006. - 50. - Special Issue 1. - IUPAC ICOS-16. 16th International Conference on Organic Synthesis, Merida, Mexico, June 11-15, 2006.
2. Juste G., Trifanova D., Kauss V. Synthesis of substituted 2-acylbenzofuran derivatives// Book of Abstracts, Balticum Organicum Syntheticum, Tallinn, Estonia, June 25-29, 2006.

Publikācijas (Publications):

1. Pietraszek M, Gravius A., Schafer D., Weil T., Trifanova D., Danysz W. mGluR5, but not mGluR1, antagonists modifies MK-801-induced locomotor activity and deficit of prepulse inhibition// Neuropharmacology. - 2005. - 49. - 73.
2. Parsons C. G., Kalvinsh I., Kauss V., Trifanova D., Zemribo R., Danysz W., Henrich M., Weil T. Novel cyclic and acyclic propenones for treating CNS disorders// Patent WO2006/037996 (13.04.2006.).
3. Parsons C. G. R., Jirgensons A., Trifanova D., Kalvinsh I., Starchenkova I., Henrich M., Noeske T., Weil T., Kauss V., Danysz W. Chromenones and their use as modulators of metabotropic glutamate receptors// MERZ 57 PCT/ MALTA Application N. 3839 (filing date 21.10.05).
4. Noske T., Jirgensons A., Starchenkova I., Renner S., Jaunzeme I., Trifanova D., Bauer T., Shneider G., Parsons C. G., Weil T. Virtual Screening for Selective Allosteric mGluR1 Antagonists and Structure-Activity Relationship Investigations for Coumarine Derivatives// J. Med. Chem. (2006, submitted for publication).