

DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**ÚJ, NITROXIDOKKAL MÓDOSÍTOTT
HETEROCIKLUSOK ÉS KARBOCIKLUSOK SZINTÉZISE**

Kulcsár Győző

Programvezető: Prof. Dr. Deli József

Témavezető: Prof. Dr. Hideg Kálmán

Intézetigazgató: Prof. Dr. Kálai Tamás



Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
Szerves és Gyógyszerkémiai Intézet

Pécs
2013

I. Bevezetés

A heterociklusos szerves vegyületek kutatása évtizedes hagyományokkal rendelkezik a Pécsi Tudományegyetem Szerves és Gyógyszerkémiai Intézetében. Az 1970-es évektől dr. Hideg Kálmán és munkatársai Magyarországon elsőként kezdtek foglalkozni a stabilis szabad gyökökkel módosított vegyületek szintézisével és ezek spinjelzőként történő alkalmazásával.

A téma jelentőségét igazolja, hogy az elmúlt évtizedekben a stabilis szabadgyökös vegyületek kutatása mind Magyarországon, mind világviszonylatban önálló diszciplínává fejlődött az orvostudomány, a fizika és a kémia interdiszciplináris területeként.

Korábban, az 1970-80-as években a stabilis nitroxid szabad gyököket főként *in vitro* spinjelzőként használták fehérjék szerkezetének és funkciójának vizsgálatára. A biológiai alkalmazhatóságot késleltette az a hiedelem, hogy a nitroxid szabad gyökök ugyanolyan károsak az élő szervezet folyamataira, mint a reaktív szabad gyökök ($\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ stb.). Az elmúlt évtizedekben azonban más kutatócsoportok és Intézetünk eredményei is bebizonyították, hogy ezek a vegyületek és diamágneses amin-prekurzorai antioxidáns hatással, szuperoxid-diszmutáz-szerű (SOD) és kataláz-hatással is rendelkeznek. Az utóbbi tény magyarázza, hogy a paramágneses csoport az egyelektron-átmenettel járó folyamatokba (mint amilyen az élő szervezetben lejátszódó oxidációs-redukciós folyamatok nagy része) be tud kapcsolódni. Az Intézetben előállított 2,2,5,5-tetrametil-pirrol(id)in, valamint 2,2,6,6-tetrametil-piperidin gyűrűt tartalmazó vegyületekről, illetve ezek oxidált származékairól bebizonyosodott, hogy antioxidáns hatásúak. Más heterociklusos, biológiailag aktív vegyületekbe beépítve ezeket az egységeket, a terápiás hatás megtartása mellett az alapvegyület antioxidáns tulajdonsággal bővül. Az eddigi tapasztalatok azt mutatták, hogy a nitroxidgyűrű a terápiába fontos új farmakofór csoportként vonulhat be. Ezért az újabb 2,2,5,5-tetrametil-pirrol(id)in, és 2,2,6,6-tetrametil-piperidin nitroxid-származékok előállítása érdekes és izgalmas kihívás.

A fentiekben leírt alkalmazásokon túl a stabilis nitroxid szabad gyököket használják a polimer-iparban, az anyagtudományi kutatásokban, a szerves kémiában kooxidánsként, ESR-kontraszt-anyagként és az analitikai kémiában redox-szenzorként, illetve gyökcsapdaként is.

Diákkörösként, majd PhD hallgatóként kapcsolódhattam be a kutatócsoport munkájába. A PhD-értekezésemben ez idő alatt előállított vegyületek szintézisét, és az ezekkel végzett vizsgálatok eredményeit foglalom össze.

II. Célkitűzés

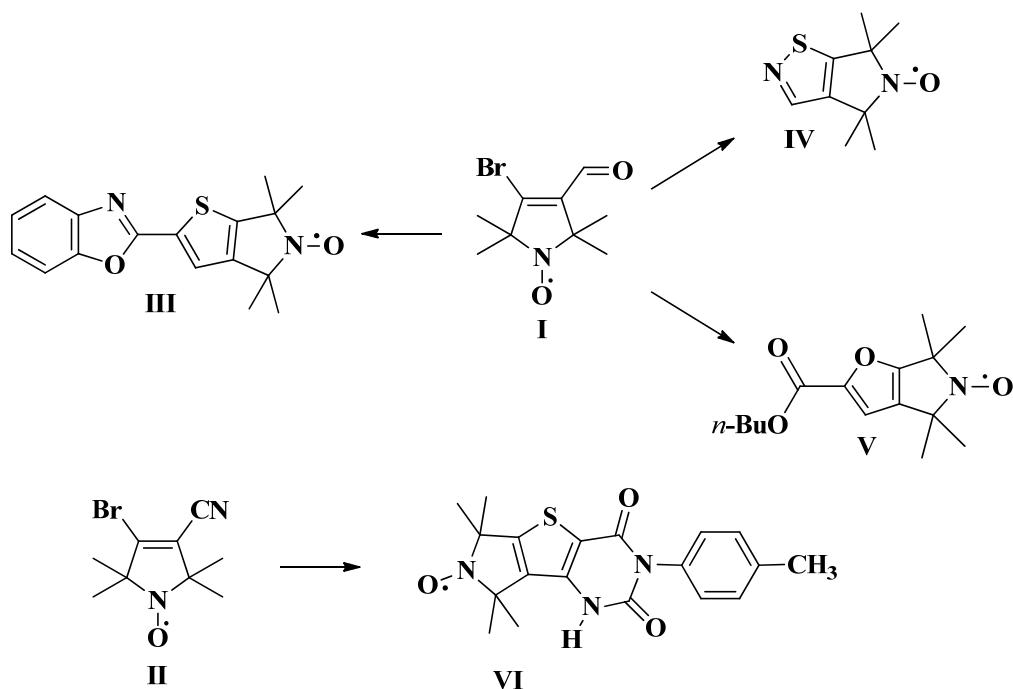
1. Új, paramágneses pirrolinvázis vegyületekkel anellált 5- és 6-tagú karbo- és heterociklusos vegyületek előállítása.¹
2. Biológiailag aktív flavonoidok és polifenolos molekulák paramágnesesen módosított származékainak előállítása a flavonoid-gyűrűrendszer B és C gyűrűjének módosításával.² Karbo- és heterociklusokhoz és flavonszármazékokhoz egy kovalens kötéssel kapcsolódó pirrolin- és pirrolidinvázis vegyületek szintézise.³
3. Új, dia- és paramágneses kinazolinon-vázis poli(ADP-ribóz)-polimeráz (PARP)-gátló és kardioprotektív típusú vegyületek előállítása és vizsgálata.⁴

III. Alkalmazott vizsgálati módszerek

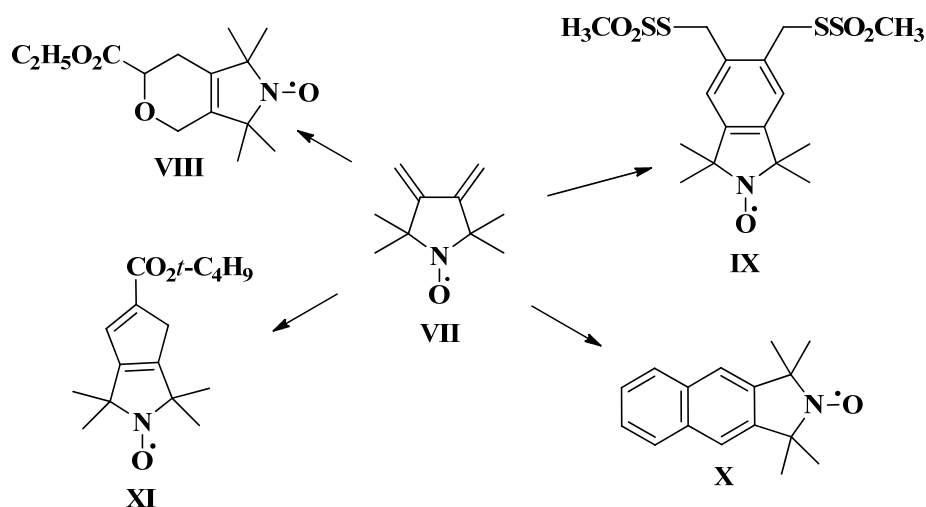
Kísérleteink során a modern preparatív szerves kémiai makro és félmikro módszereit alkalmaztuk. A vegyületeket Merck 60 (0,040-0,063 mm) szilikagélen tisztítottuk flash-oszlopkromatográfiás módszerrel, az anyagok tisztaságát Merck GF₂₅₄ vékonyréteg-kromatográfiás lapon ellenőriztük. Az olvadáspontokat Boetius olvadáspont-mérővel határoztuk meg. A vegyületek mikroanalízisét Fisons EA 1110 CHNS elemanalizátorral végeztük. A tömegspektrumok Finnigan Automass-Multi készüléssel készültek. Az NMR vizsgálatok Varian Unity Inova 400 WB spektrométeren készültek, a jel eltolódást tetrametil szilánhoz (TMS) viszonyítottuk. Az infravörös spektroszkópiás méréseket IR Spekord M85 készüléken végeztük KBr küvettákkal. Az elektronspin rezonancia (ESR) spektrumokat Miniscope MS 200 készüléken 10⁻⁴ M koncentrációjú CHCl₃ oldatban vettük fel. A paramágneses vegyületek a nitroxidokra jellemző triplett vonalat adtak, (a_N=14,0-16,5G). Az értekezés alapjául szolgáló *in vivo* és *in vitro* vizsgálatokat a PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetében, illetve a PTE ÁOK I. sz. Belgyógyászati Klinikán végezték.

IV. Új tudományos eredmények

1. Vizsgáltuk, hogy a nitroxid-funkció irreverzibilis károsodása nélkül milyen reakciók hajthatók végre. Számos paramágnesesen módosított biológiailag aktív vegyület előállítására került sor és a kapott termékek közül több biológiai vizsgálata is megtörtént együttműködő partnereink révén. A **I** β -bróm- α,β -telítetlen aldehid, a **VII** szimmetrikus dién, illetve a **II** nitril-vegyületek fontos kulcs-intermedierek voltak pirrolin-nitroxidokkal anellált gyűrűrendszerek kialakításában. Gyűrűzárási reakciókban előállítottuk többek között a **III** 2'-tienil-2-benzoxazol, **IV** izotiazol, **V** furán-butil-észter és a **VI** tieno[3,2-d]pirimidin-származék heterociklusokat.

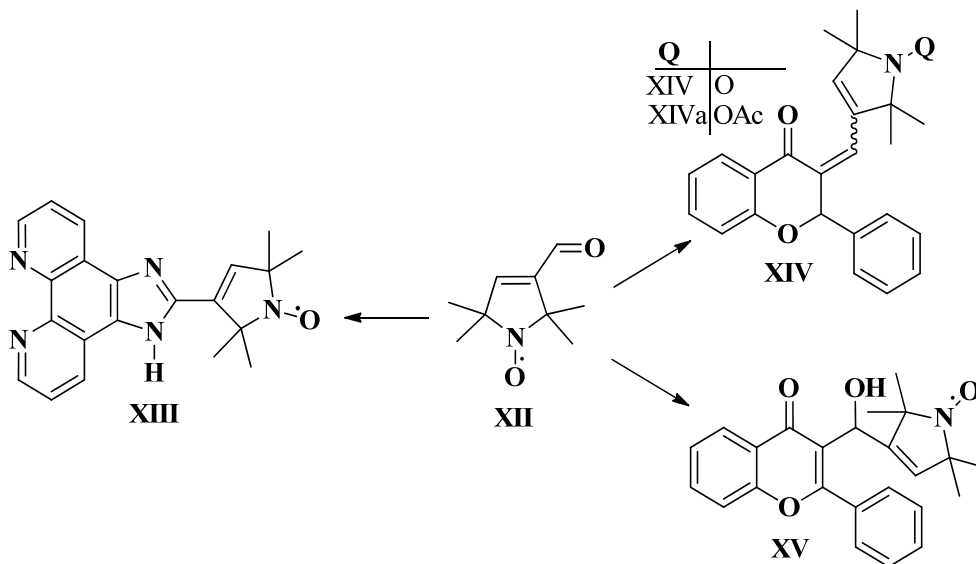


A **VII** szimmetrikus diénből kiindulva homo- és hetero-Diels-Alder reakciókban a **VIII** pirano[3,4-c]pirrol-, **IX** keresztkötő tiolspecifikus biszmetántioszulfonát-, **X** naftalin-, **XI** ciklopentadién-származékokat állítottuk elő.



2. A **XII** paramágneses aldehyd-származék változatos kapcsolási reakciók elvégzését tette lehetővé. Sikeresen előállítottunk a többgyűrűs **XIII** imidazo-fenantrolin-származékokat.

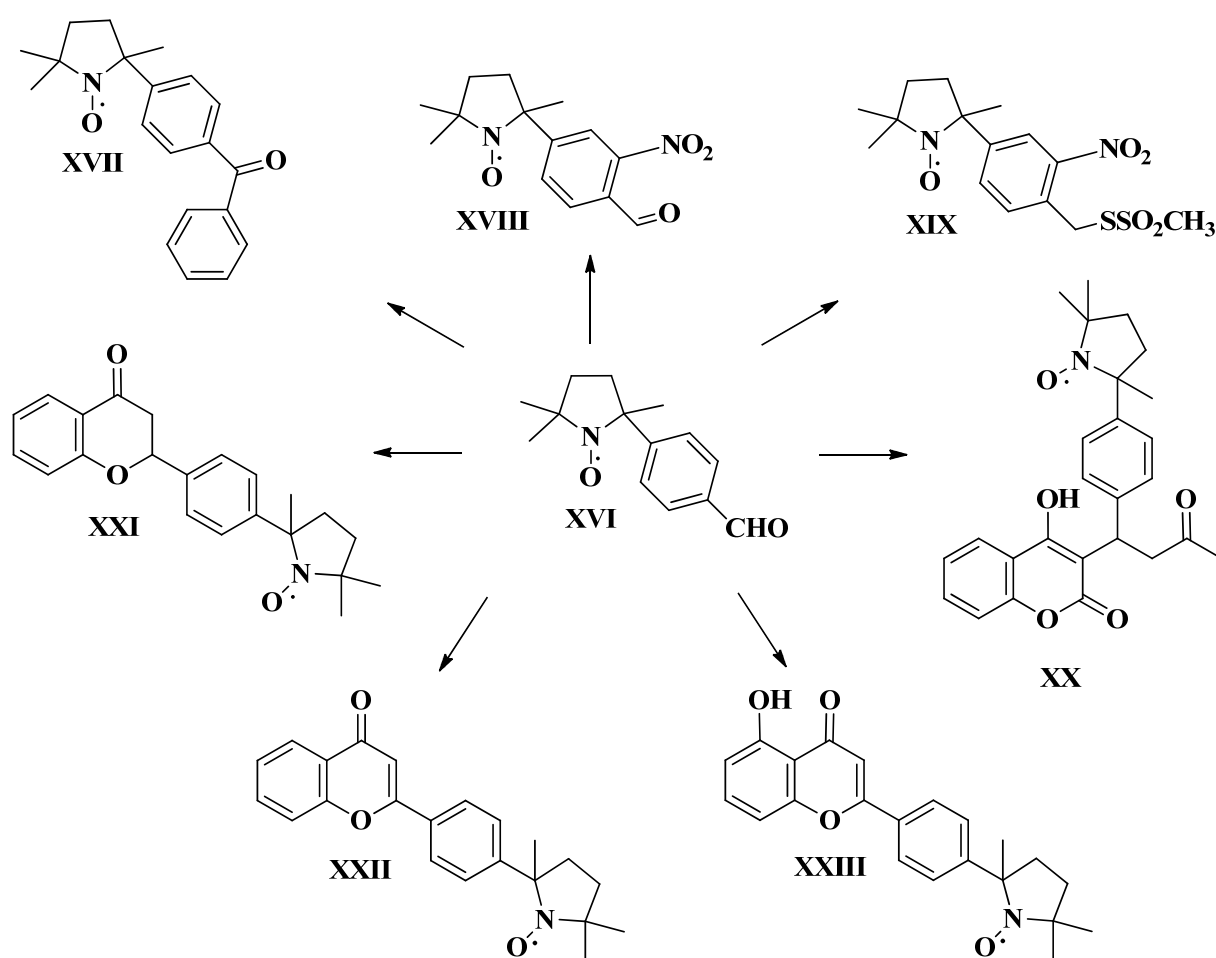
A flavonoid-származékok kiterjedt fiziológiai hatásuk miatt ígéretes területnek ígérkeztek, ezért a **XII** pirrolin-nitroxidból kiindulva a 'C' gyűrűn módosított vegyületeket szintetizáltunk, mint a **XIV** paramágneses flavanon-, **XV** paramágneses flavon-származékok.



A 2,2,5-trimetil-1-pirrolin-1-oxid nitronból (TMPO) Grignard reakcióval előállított **XVI** paramágneses benzaldehyd kulcsintermedierek bizonyult további flavon-származékok és más bioaktív vegyületek szintéziséhez. Többek között a benzaldehyd funkciót további Grignard reakcióban fotoaktiválható benzofenonná (**XVII**) alakítottuk, több lépéses reakcióban előállítottuk a **XVIII** paramágneses 2-nitro-benzaldehydet és a **XIX** metántioszulfonát-reagenst. A tiolszulfonát-reagensek képesek reverzibilis diszulfid-hidakat kialakítani cisztein-

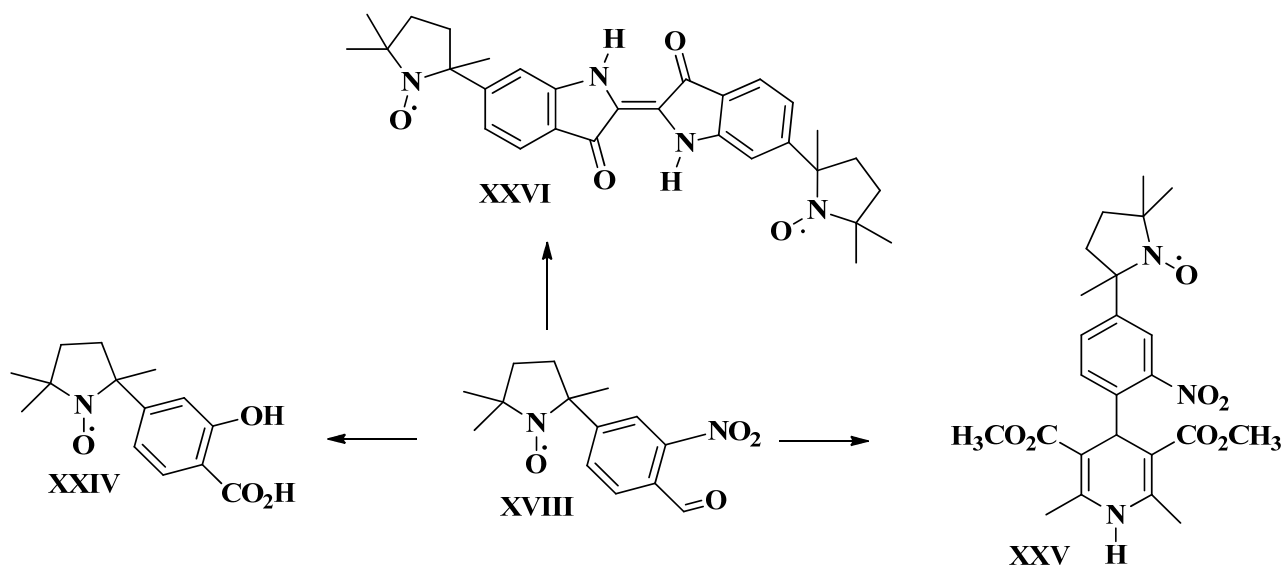
oldalláncok SH-csoportjával, a **XIX**-es származékban a nitrocsoport másodlagos kötések révén eredményesen csökkentheti a nitroxid saját rotációját, ami az ESR vizsgálatok értelmezését megkönnyítheti.

Sikeresen előállítottuk vízben végzett Michael-addícióval a **XX** paramágneses Warfarin-analogont. Bázikus közegben végzett kondenzációs, majd gyűrűzárási lépésekkel kaptuk a **XXI** flavanon-származékot. A **XXII** és **XXIII** flavon vegyületek előállítása során az aldehidet oxidáltuk benzooesavvá, majd ennek savklorid-származékát használtuk kiindulási anyagként az acilezési reakciókhoz. A **XXII**-ot acilezési reakciót követő Baker-Venkataraman átrendeződéssel, majd savkatalizált gyűrűzárással alakítottuk ki.

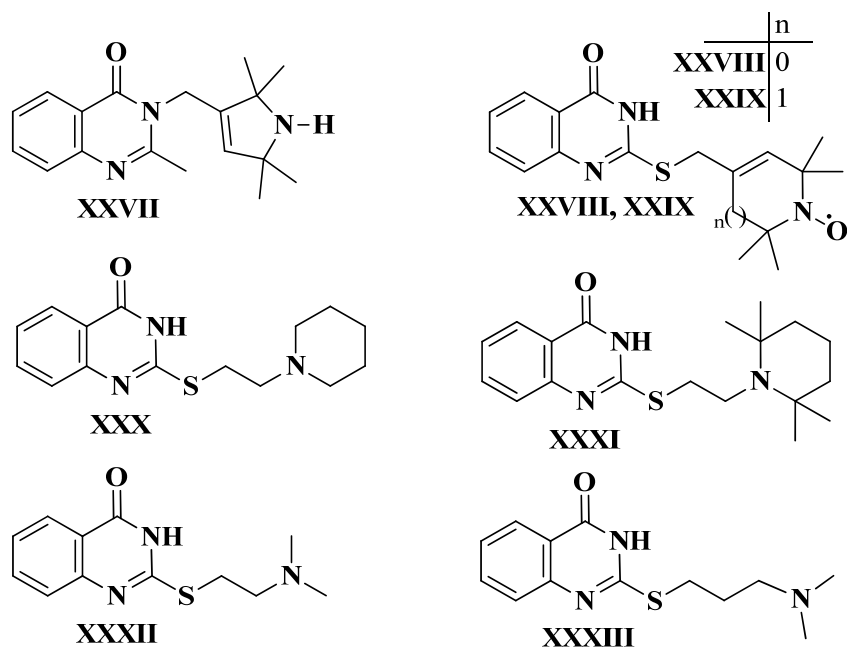


A **XVIII** jó kiindulási vegyületnek bizonyult további biológiailag aktív molekulák előállításához, ezek közül kiemelem a **XXIV** paramágneses-szalicilsav származékot, illetve a **XXV** Nifedipin-analogont, amely 1,4-dihidropiridin-típusú kalcium-antagonista. A **XXVI** biradikális indigószármazék előállítása a **XVI** nitro- és aldehidcsoportjainak *orto* helyzetére

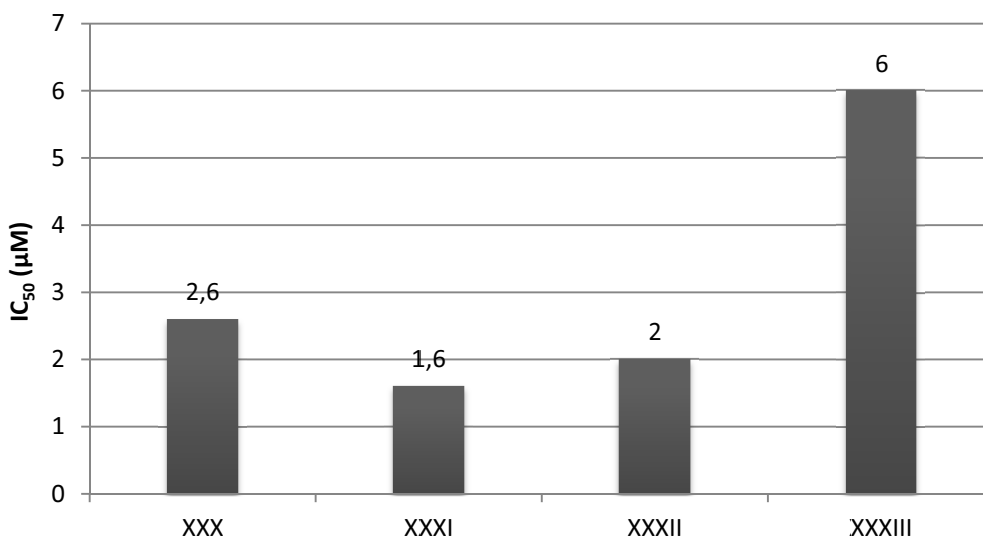
klasszikus szerkezetbizonyító szintézis, a kettősgyök képződését ESR spektroszkópiával is igazoltuk.



3. A kinazolin-4-on-vázás vegyületek többféle fiziológiai hatással is bírnak, stabilitásuk miatt is jelentős alapvegyületként szolgálnak gyógyszeripari alkalmazásokban. Célunk volt olyan paramágnesesen módosított származékok előállítása, amelyek eredményesen alkalmazhatóak PARP-gátló vegyületként. A laktám NH-csoportjának alkilezése a PARP-gátló hatás elvesztését okozta, így a **XXVII** 2-metil-kinazolinin-4-on-származék nem rendelkezett a kívánt hatással, ezért a további módosításokat a gyűrűrendszer 2-es pozíciójában végeztük.



Így előállítottuk többek között a **XXVIII** és **XXIX** paramágneses származékokat, azonban várakozásainkkal ellentétben ezen kinazolinon-származékok sem mutattak kiemelkedő hatást PARP gátlóként.



4(3H)-kinazolinon származékok PARP gátló hatása in vitro, izolált patkány enzimen

Ezzel szemben a referenciavegyületként előállított nem gyökös típusú **XXX** *N*-etil-piperidin és **XXXI** *N*-etil-tetrametil-piperidin oldallánccal kapcsolt származékok bizonyultak a legelőnyösebbeknek. Összehasonlításképpen előállítottuk még a **XXXII** és **XXXIII** tercier amin származékokat is. Ezen vegyületek közül az egyszerűen előállítható **XXX** származék további állatkísérletes vizsgálatokban is eredményesnek bizonyult. Kimutatták, hogy infarktusos állatmodellen a szisztolés bal-kamrai funkciót eredményesebben állította helyre, mint az enalapril⁵, valamint infarktus során a más biokémiai jelátviteli folyamatok befolyásolása révén is kifejti hatását (*ex vivo* és *in vivo* modellen is előnyösen befolyásolta az Akt és p38-MAPK szignál rendszert⁶) a PARP-gátlás mellett. E mellett a **XXX** vegyület gátolta a proteinkináz C (panPKC, PKC α/β II, PKC δ és PKC ϵ) foszforilációját, ami a GSK-3 β antihipertrófiás faktor aktivációját eredményezte.⁷

Intézetünk korábbi, valamint a dolgozatomban felsorolt eredmények alapján bebizonyosodott, hogy a nitroxidokkal és elővegyületeikkel módosított biológiailag aktív molekulák az eredeti hatás megtartása, illetve sok esetben annak javulása mellett antioxidáns tulajdonsággal is gyarapodnak. Beigazolódni látszik az a paradigma, hogy a káros reaktív származékokat *in statu nascendi* kell eliminálni.

V. Irodalomjegyzék

V.1. A disszertáció alapjául szolgáló közlemények jegyzéke

1. Kálai, T.; Kulcsár, G.; Jekő, J.; Ósz, E.; Hideg, K. Synthesis and reactions of paramagnetic aromatic aldehydes as useful synthetic building blocks, *Synthesis-Stuttgart* **2004**, 2115-2120. IF.: 2.203
2. Kálai, T.; Kulcsár, G.; Ósz, E.; Jekő, J.; Sümegi, B.; Hideg, K. Synthesis of paramagnetic and diamagnetic flavones and flavanones, *Arkivoc* **2004**, (VII) 266-276. IF.: 0.418
3. Kulcsár, G.; Kálai, T.; Jekő, J.; Hideg, K. Synthesis of paramagnetic carbo- and heterocycles, *Synthesis-Stuttgart* **2003**, 1361-1366. IF.: 2.074
4. Kulcsár, G.; Kálai, T.; Ósz, E.; Sár, C.; Jekő, J.; Sümegi, B.; Hideg, K. Synthesis and study of new 4-quinazolinone inhibitors of the DNA repair enzyme poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), *Arkivoc* **2003**, (IV) 121-131. IF.: 0.392

V.2. A disszertációhoz szorosan nem kapcsolódó közlemények jegyzéke

5. Bartha, É.; Kiss, G. N.; Kálmán, E.; Kulcsár, G.; Kálai, T.; Hideg, K.; Habon, T.; Sümegi, B.; Tóth, K.; Halmosi, R. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **2008**, 52 (3), 253-261. IF: 2.290
6. Pálfi, A.; Tóth, A.; Hantó, K.; Deres, P.; Szabados, E.; Szereday, Z.; Kulcsár, G.; Kálai, T.; Hideg, K.; Gallyas, F., Jr.; Sümegi, B.; Tóth, K.; Halmosi, R. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **2006**, 41 (1), 149-159. IF: 4,859
7. Pálfi, A.; Tóth, A.; Kulcsár, G.; Hantó, K.; Deres, P.; Bartha, É.; Halmosi, R.; Szabados, E.; Czopf, L.; Kálai, T.; Hideg, K.; Sümegi, B.; Tóth, K. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2005**, 315 (1), 273-282. IF: 4.335

V.3. Előadások

8. *Synthesis and study of cardiac drugs modified with nitroxides and their precursors*
Kulcsár, G.; Kálai, T.; Fehér, G.; Koltai, K.; Tóth, K.; Sümegi, B.; Hideg, K.
EPR 2005, a Joint Conference of 11th In Vivo EPR Spectroscopy and Imaging and 8th International EPR Spin Trapping, Columbus, OH, USA, 2005. szeptember 4-8.
9. *Új, heterociklusokhoz kapcsolt nitroxidok szintézise*
Kulcsár, G.; Kálai, T.; Fehér, G.; Koltai, K.; Sümegi, B.; Tóth, K.; Hideg, K.
MTA Gyógyszerkémia Bizottság, Pécs, 2005. június 9.
10. *Paramágneses benzaldehidszármazékok szintézise és reakciói*
Kálai, T.; Kulcsár, G.; Ósz, E.; Jekő, J.; Hideg, K.
MTA Heterociklusos Munkabizottság, Balatonszemes, 2004. május 20-21.
11. *Paramágneses policiklusos vegyületek szintézise*
Kálai, T.; Kulcsár, G.; Balog, M.; Jekő, J.; Hideg, K.
MKE Vegyészkonferencia 2003, Hajdúszoboszló, 2003. június 26-28.
12. *Effect of PARP-inhibitors and ACE-inhibitors on the progression of isoproterenol-induced heart*
Bartha, E.; Halmosi, R.; Kulcsár, G.; Kiss, G. N.; Kálmán, E.; Sümegi, B.; Kálai, T.; Hideg, K.; Toth, K.
ECS Congress 2007, Bécs, Ausztria, 2007. szeptember 1-5.
13. *Kettős hatású nitroxid gyökök és prekurzoraik vizsgálata*
Kulcsár, G.; Kálai, T.; Fehér, G.; Koltai, K.; Sümegi, B.; Tóth, K.; Hideg, K.
MKE Vegyészkonferencia 2005, Hajdúszoboszló, Magyarország, 2005. június 28-30.
14. *4-Hydroxy coumarine derivatives' dual action of platelet aggregation and red blood cell deformability*
Fehér, G.; Koltai, K.; Késmarky, G.; Kulcsár, G.; Kálai, T.; Hideg, K.; Tóth, K.
Haemophilia & Thrombophilia (Clinical and genetical aspects) 2nd International Symposium, Pécs, 2004. szeptember 23-25.

15. *Synthesis and reactions of paramagnetic aromatic aldehydes as useful synthetic building blocks*

Kálai, T.; Kulcsár, G.; Jekő, J.; Ósz, E.; Hideg, K.

XXIth European Colloquium on Heterocyclic Chemistry, Sopron, 2004. szeptember 12-15.

16. *Új, kinazolinon típusú PARP inhibitorok szintézise és vizsgálata*

Kulcsár, G., Kálai, T.; Ósz, E.; P. Sár, C.; Jekő, J.; Sümegi, B.; Hideg, K.

MKE Vegyészkonferencia 2003, Hajdúszoboszló, 2003. június 26-28.

VI. Köszönetnyilvánítás

Ezen dolgozatot megalapozó kísérletes munkámat a PTE ÁOK Szerves és Gyógyszerkémiai Intézetében 2001. és 2007. között végeztem. Pályázati források: OTKA K81123, TÁMOP 4.2.1.B-10/2/KONV-2010-0002.

Köszönetet mondok dr. Hideg Kálmán és dr. Kálai Tamás egyetemi tanároknak, hogy éveken át segítették szakmai előmeneteletem. Köszönöm P. dr. Sár Cecília egyetemi docens mindig segítőkész támogatását, amellyel a laboratóriumi kutatómunkában és a közlemények elkészítésében is segítségemre volt egészen az alapoktól. Köszönetet mondok dr. Jekő Józsefnek a tömegspektrometriás mérésekért, valamint dr. Ósz Erzsébet[†] és dr. Berente Zoltán egyetemi docensnek az NMR vizsgálatokban nyújtott segítségükért.

Köszönöm dr. Sümege Balázs és dr. Tóth Kálmán professzor uraknak és munkatársaiknak a biológiai vizsgálatokban nyújtott segítségüket.

Köszönöm dr. Bognár Balázs egyetemi adjunktus, Balog Mária, Csokona Viola, Lamperth Éva, Lazsányi Noémi, Kish Krisztina vegyésztechnikusok munkáját és azt, hogy mindig összetartó és baráti légkört biztosítottak a laboratóriumban. Köszönöm dr. Deák Ivánné titkárnő, továbbá Sajóvölgyi Gábor kisegítő munkáját.

Köszönöm a PTE ÁOK Kóréletani és Gerontológia Intézet kollégáinak, hogy támogatást kaptam tőlük a dolgozatom befejezéshez és részese lehettem az Kóréletani Intézetben folyó magas szintű kutatómunkának.

Köszönöm családomnak, barátaimnak, hogy támogatásukkal elősegítették munkámat, lehetővé tették, hogy napi gondoktól mentesülve kutatómunkámra koncentrálhassak.