

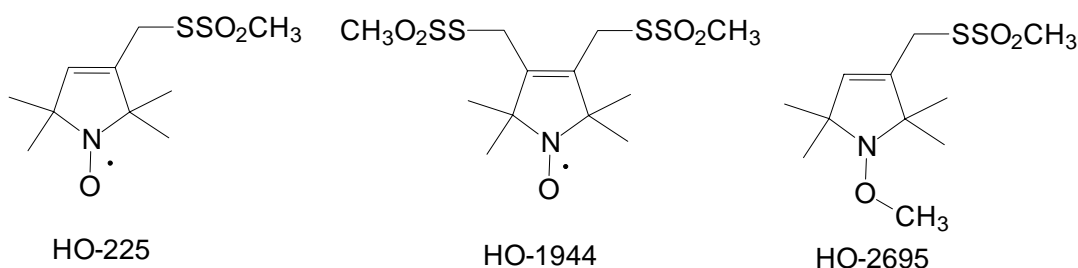
**Beszámoló az „Új bioaktív, anellált nitrogén heterociklusos
vegyületek kutatása” c. T48334 OTKA pályázat keretében végzett
munkáról**

Témavezető: Dr. Hideg Kálmán
egyetemi tanár
PTE ÁOK Szerves és Gyógyszerkémiai Intézet
7624 Pécs, Szigeti út 12.
Tel: (72) 536-221
E-mail: kalman.hideg@aok.pte.hu

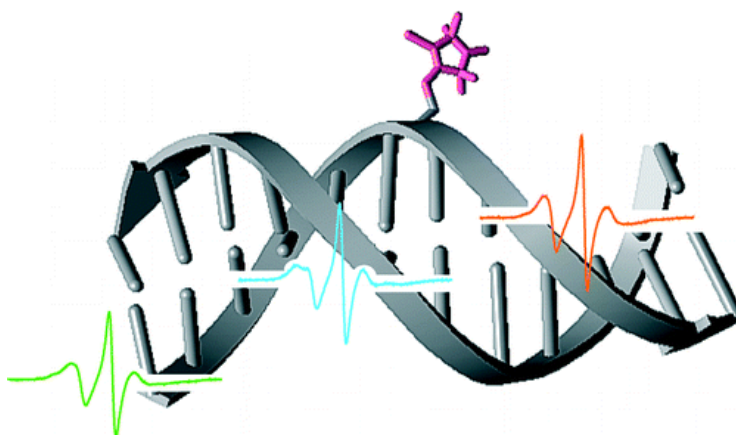
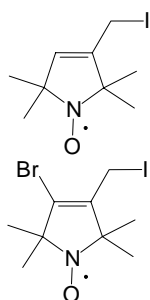
A szabadgyökös stabilis nitroxid vegyületeket felfedezésük óta, (kb. 60 éve) széles körben használják, mint spinjelző vegyületeket, antioxidáns anyagokat, redox szenzorokat, kooxidánsokat, műanyagipari segédanyagokat és szerves ferromágnesek építőanyagait. Intézetünkben – orvostudományi karon dolgozván - érdemben az első három területtel foglalkozunk. Jelen pályázat lejártával e három területen elért legfontosabb eredményeinket foglaljuk össze. Szinte mindhárom alkalmazásnak fontos közös vonása, hogy olyan új vegyületeket állítottunk elő, ahol a nitroxidok - amelyek önmaguk is heterociklusok – sokszor további heterociklusokhoz kapcsolódnak.

1.) Spinjelző vegyületek szintézise és alkalmazása:

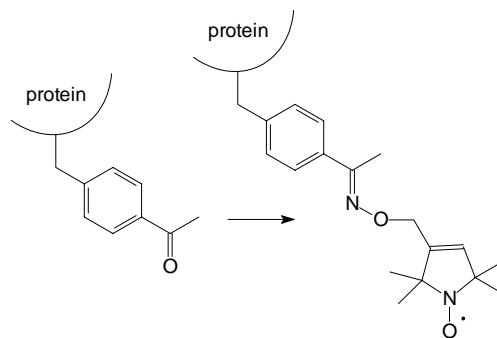
Az intézetben korábban leírt HO-225 vegyületet a UCLA kutatóival együttműködésben a T4 lizozim G és B héliceinek módosítására használtuk.^{1,2} Német kutatókkal együttműködve elkészült a spinjelző vegyület röntgenkristallográfiás vizsgálata is.³ Ennek a vegyületnek egy továbbfejlesztett változata a HO-1944 vegyület, amely alkalmas keresztkötések létrehozására és fehérjék dinamikájának részletesebb tanulmányozására.⁴ A HO-2695 metántioszulfonátot a G- és F-aktin konformációs vizsgálatánál távolságmérésre használtuk a HO-225-tel együtt alkalmazva Los Angeles-i kutatókkal.⁵



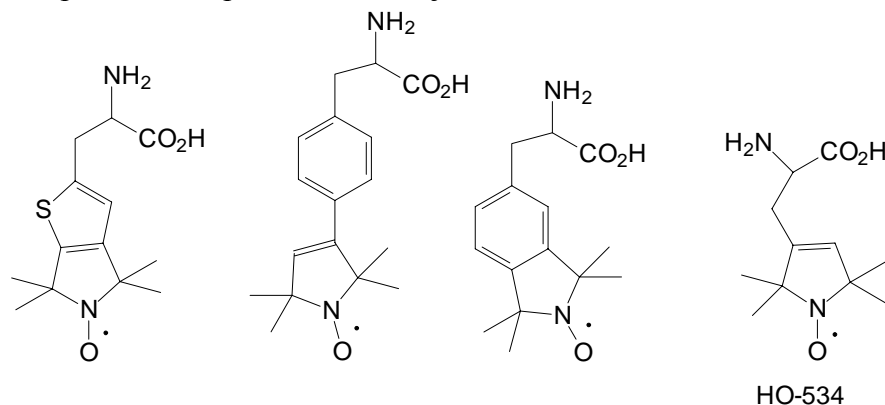
-A paramágneses jódvegyületeket, mint irreverzibilis SH jelölőket Qin professzor kutatócsoportjával együttműködve SH csoportot tartalmazó nukleinsavak spinjelölésére használtuk.⁶⁻⁸



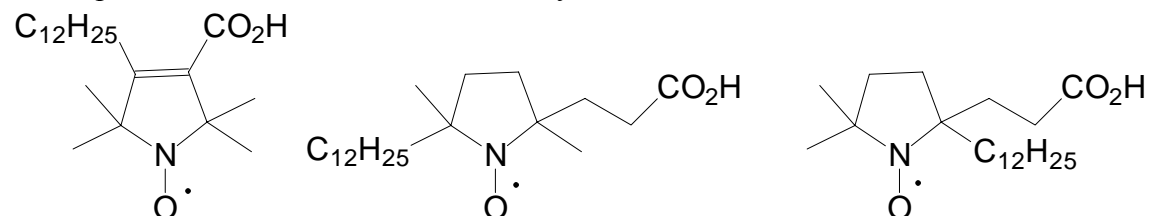
-A paramágneses hidroxilaminokat pontmutációval bevitt, karbonilcsoport oldalláncot tartalmazó fehérjék módosítására használtuk.⁹



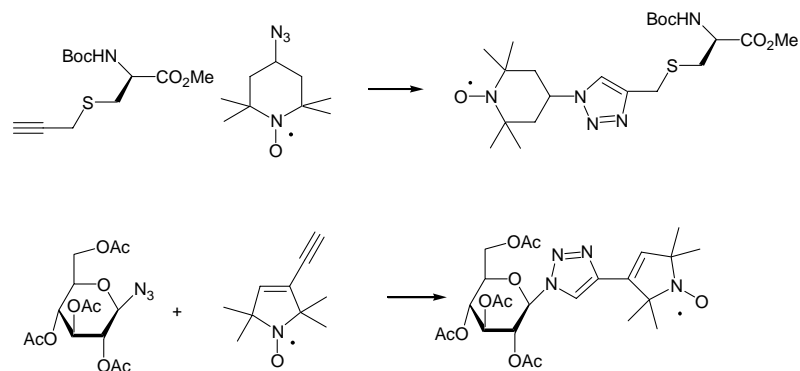
-Izoindolin nitroxidot, nitroxiddal módosított fenilalanint és tiofényűrűvel anellált paramágneses aminosavakat állítottunk elő és hazai kutatócsoport (BMGE, Prof. Fogassy Elemér és mtsai) segítségével rezolváltuk azokat.¹⁰ A HO-534 aminosavat német kutatókkal kooperációban építettük be fehérjébe.¹¹



-Kutatásaink során paramágneses zsírsavakat szintetizáltunk, amelyek a zsírsav szénláncát 3,4-, 2,2- és 2,5-szubsztituensként tartalmazzák.¹² Német kutatók a 2,2-pozícióban zsírsav láncot hordozó nitroxiddal is bizonyították hogy a mitokondriális UCP2 protein rendelkezik zsírsav-kötőhellyel.¹³

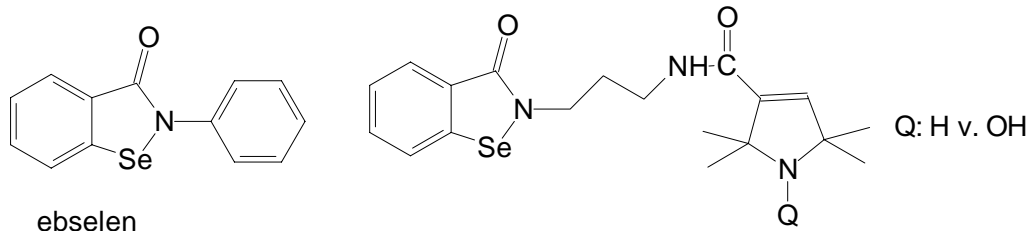


-,Click” reakciópartnereket szintetizáltunk, így pl. aminosavak, szénhidrátok módosítására nyílik lehetőség 1,3-dipoláris cikloaddícióban.¹⁴

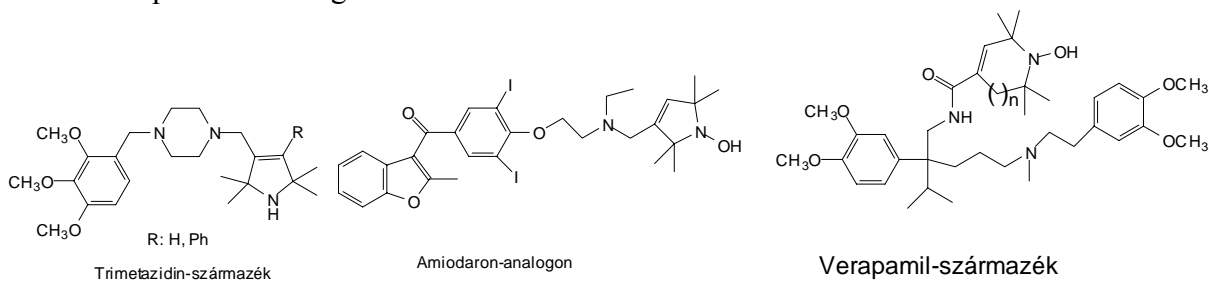


2.) Kettős hatású gyógyszermolekulák szintézise

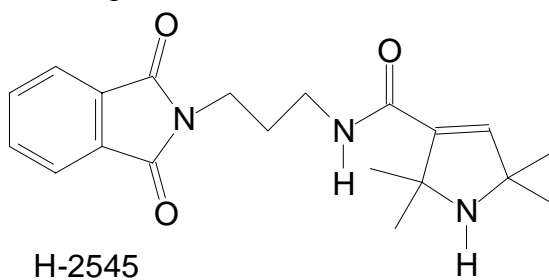
- Az Ebselen *N*-szubsztituensének módosításával olyan új glutation-peroxidáz szerű hatással rendelkező, vízoldható vegyületeket állítottunk elő, amelyek potenciozták a glutation-peroxidáz hatást. Mivel maga az Ebselen is antioxidáns, így egy vegyületbe több támadáspontú antioxidáns hatást „sűrítünk”.^{15,16}



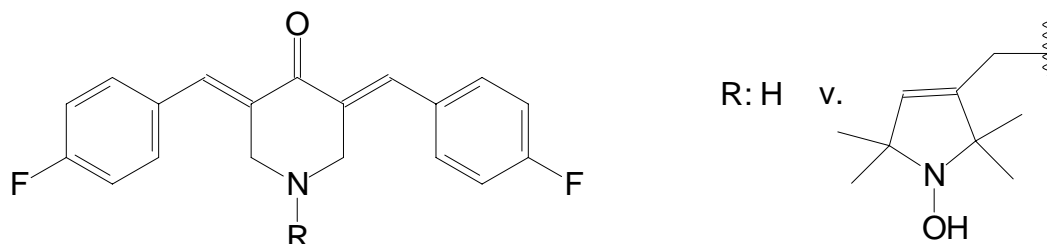
- Amerikai és magyar kutatókkal együttműködve a trimetazidin,^{17,18} amiodaron,^{19, 20} és verapamil^{21,22} keringésre ható szereket módosítottuk. Az előállított mintegy 40-50 vegyületből az alábbiakat találták a leghatékonyabbnak izolált szíven végzett ischemia/reperfúziós vizsgálatokban:



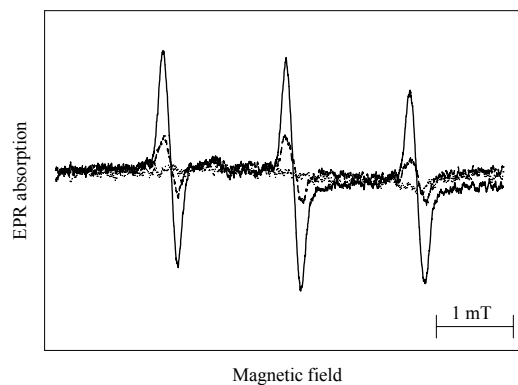
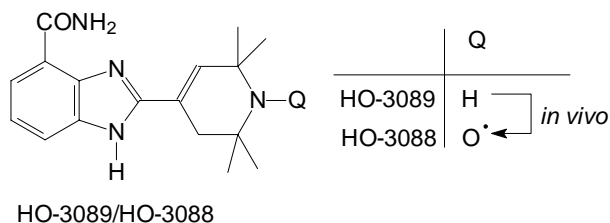
-Az intézetben korábban előállított kardioprotektív és antioxidáns H-2545 vegyülettel végzett vizsgálatokban a kísérleti gyógyszer patkány szív modellen csökkentette a doxorubicin okozta kardiomiopátiát.^{23,24}



-Új, kurkuminoid származékokat állítottunk elő. A Davis Heart and Lung Intézet (Columbus, Ohio State University, USA) kutatóival (Prof. P. Kuppusamy) együttműködve azt találtuk, hogy a diamágneses származék *in vivo* gátolta a daganatos sejtek szaporodását, a pirrolingyűrűvel módosított származék gátolta az érfalak simaizomsejtjeinek proliferációját (reszthenozist).²⁵⁻²⁷

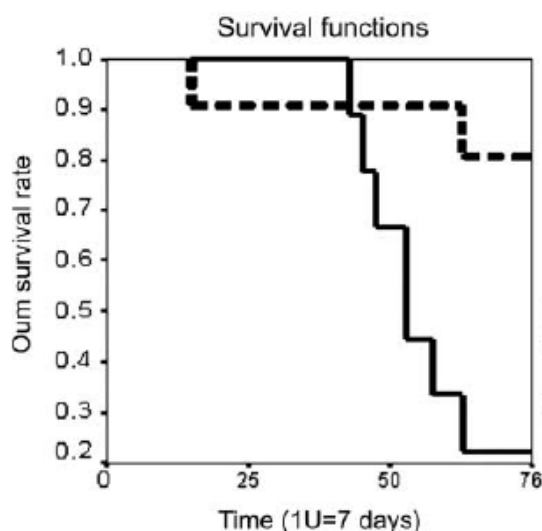
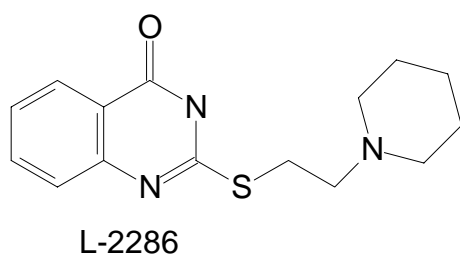


-Új kinazolin és 4-karboxamidobenzimidazol-származékokat állítottunk elő. A 4-karboxamidobenzimidazol származék (HO-3089), jelentős PARP gátló és e mellett antioxidáns hatású, mert *in vivo* gyökké metabolizálódik patkányban.^{28,29}



A HO-3089-cel kezelt patkány vizeletének ESR spektroszkópiás vizsgálata. Jelmagyarázat: (···) vizeletminta az ip. injekció előtt, (---) az ip. injekció után 4h keresztül gyűjtött vizelet és (—) ugyanez a minta + PbO₂-s oxidáció.

- A korábbi munkánkban közölt L-2286 PARP enzim gátlót³⁰ magyar kutatókkal (PTE ÁOK Biokémiai Int. és I. sz. Belklinika) tovább vizsgáltuk és megállapítottuk, hogy PARP gátláson kívül más jelátviteli utakat is befolyásol.³¹⁻³³ Az L-2286 kísérleti gyógyszerrel kezelt magas vérnyomásos patkányok a kifejtett kardioprotektív hatás révén hosszabb ideig éltek (ld. Kaplan –Meier túlélési görbe) mint a megfelelő kontrollcsoport.³⁴



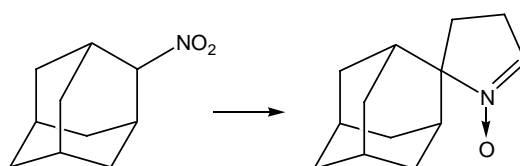
Spontán magas vérnyomásban szenvedő patkányok túlélési görbéi. A kezelt csoport (---) 5mg/kg L-2286-t kapott orálisan 46 héten keresztül, míg a kontrollcsoport (—) kezeletlen volt.

Mind a keringésre ható szereknél, mind a PARP inhibitoroknál, mind a curcuminoid származékoknál bebizonyosodott, hogy a nitroxidokkal és elővegyületeikkel módosított gyógyszerek az eredeti alapterápiás hatást nem változtatták meg, sőt növelték a molekula antioxidáns hatékonyságát és beigazolódni látszik az a paradigma, hogy a káros RNS- és ROS-okat *in statu nascendi* kell eliminálni.

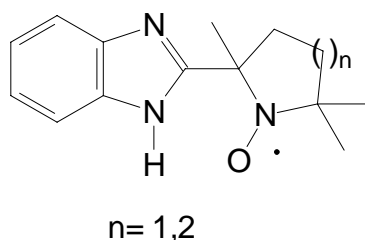
Izraeli kutatókkal együtt megállapítottuk, hogy a nitroxidok képesek az $\cdot\text{NO}_2$, $\text{CO}_3^{\cdot-}$ és a protonált szuperoxid HO_2^{\cdot} eliminációjára, utóbbi esetben az aktivitás erősen függ a szubsztituensek jellegétől és a gyűrű tagszámától.³⁵

3.) Szenzorvegyületek:

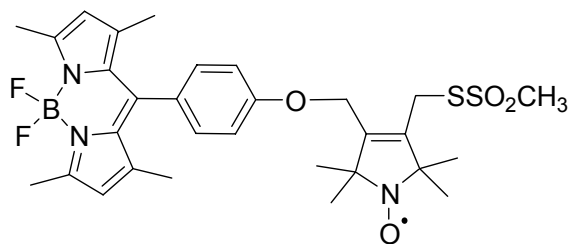
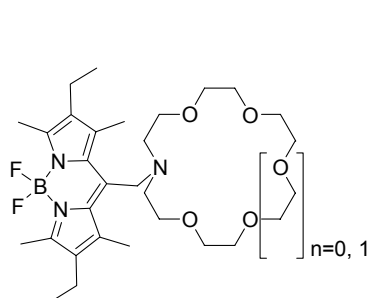
- 2-Nitroadamantánból kiindulva lipofil, spincsapdázásra alkalmas nitronokat állítottunk elő.³⁶



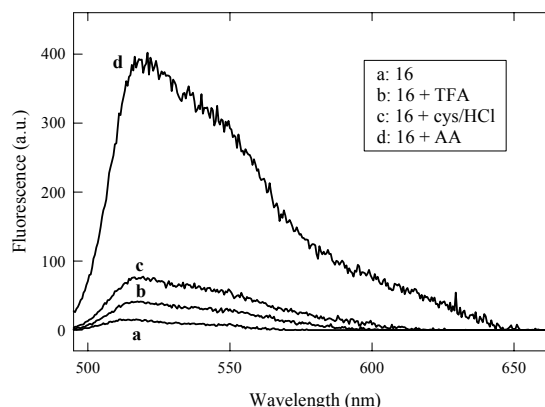
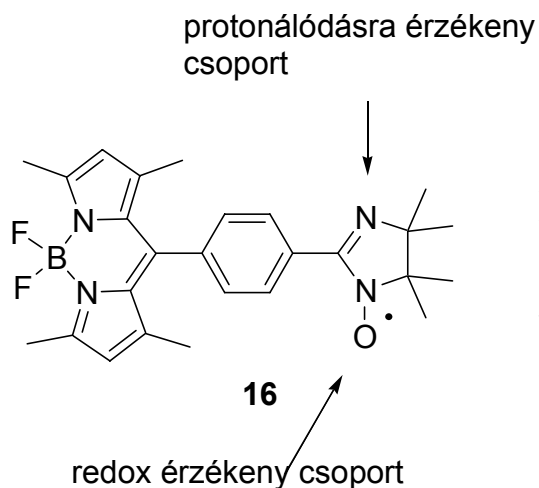
-Számos nitroxidhoz kapcsolt benzotiazol, benzimidazol származékot állítottunk elő. A benzimidazollal 2-es helyzetben szubsztituált pirrolin nitroxidok ESR spektrumának csatolás értéke pH függést mutatott pH = 2-7 tartományban.³⁷



- A BODIPY fluoroforhoz kapcsolt alkálifémion szenzorokat és kettősen (spin és fluoreszcencia) jelölő vegyületeket szintetizáltunk.³⁸ A koronaéter származékoknál tapasztalt fluoreszcencia kioltást a fotoindukált elektrontranszfer okozza. Ez az elektrontranszfer fémion komplexálása esetén megszűnik, így a fluoreszcencia intenzitása megnövekszik. Az iminonitroxid funkciót tartalmazó BODIPY festék esetében a kioltásért a nitroxid gyök és az iminonitrogénre történő elektrontranszfer a felelős. Ha a nitroxidot redukáljuk és az iminonitrogént protonáljuk a fluoreszcencia intenzitás újra megnő.

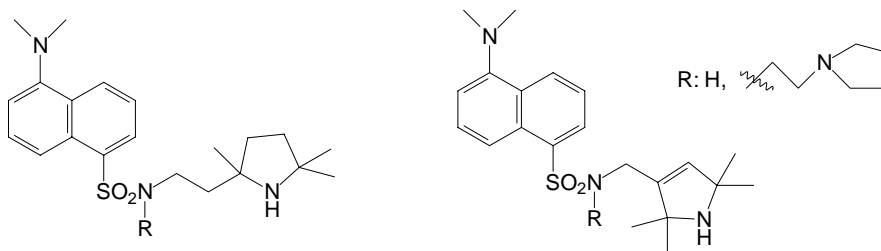


kettősen (spin és fluoreszcens) jelölő reagens

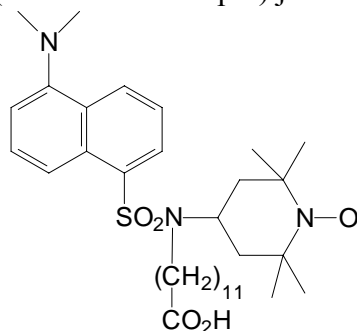


A **16** vegyület fluoreszcencia serkentése jó szelektivitást mutatott aszkorbinsavra, ami mind a nitroxid redukcióját mind az imino-nitrogén protonálását elvégzi.

- Az MTA SZBK kutatóival a korábban előállított és újonnan szintetizált (a pirrolidingyűrűhöz a 2-es helyzetben kapcsolódó fluorofor) kettős-szenzor ROS csapdákat vizsgáltunk. Megállapítottuk, hogy a fluorofor-nitroxid közelsége növeli a szenzor érzékenységét, a dietilaminoetil származékok főleg a szingulet oxigénre érzékenyek, míg a bázisos oldallánc nélküliek a szingulet oxigén és szuperoxid gyökianion csapdázásával is fluoreszcencia csökkenést eredményeznek.³⁹

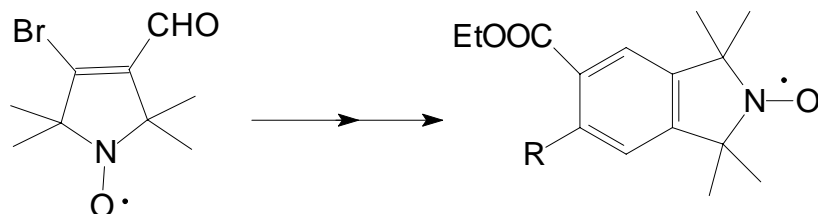


- Olasz és izraeli kutatókkal β -lactoglobulin lipofil kötőhelyeit jelöltük és vizsgáltuk, alkil karbonsavat hordozó kettősen (fluoreszcens és spin) jelölő reagenssel.⁴⁰

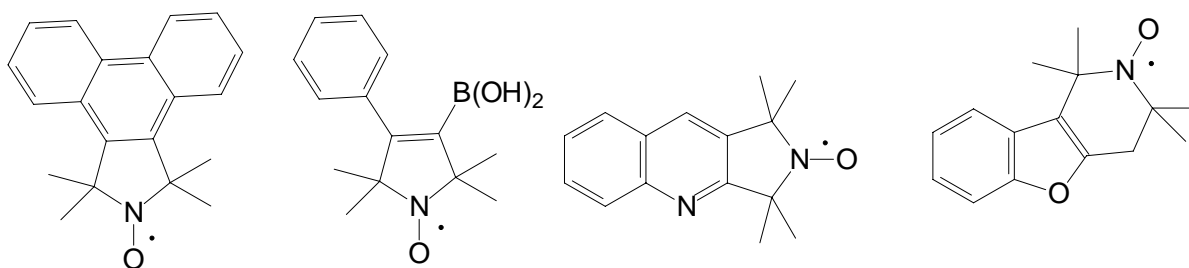


4.) Új, policiklusos paramágneses heterociklusok:

- Új módszert dolgoztunk ki izoindolin nitroxidok szintézisére: β -bróm- α,β -telítetlen-aldehidből Wittig-reakcióval és Suzuki-reakció kombinációjával, majd az azt követő elektrociklizációs és oxidációs reakcióval 5,6-diszubsztituált izoindolin nitroxidokhoz juthatunk.⁴¹ Az eljárást a *SYNFACTS* újság is idézi.⁴²



- Új, paramágneses boronsavak, karbociklusokhoz és heterociklusokhoz kondenzált öt- és hattagú nitroxidok széles körének előállítására alkalmas szintéziseket írtunk le.^{43,44} Ezek néhány reprezentatív példája:



A nitroxidokkal végzett munkánk eredményeiről és azok biológiai vonatkozásairól összefoglaló közleményben is beszámoltunk.⁴⁵

Az elkövetkezőkben az itt leírt munka folytatásának támogatására új OTKA pályázatot nyújtottunk be, hogy az eddigi kutatási eredményeket újabb bioaktív vegyületekkel bővítve, további nemzetközi érdeklődést kiváltó eredményeket érjünk el hazai és külföldi kutatótársainkkal.

Hivatkozások

1. Guo, Z.; Hideg, K.; Kálai, T.; Cascio, D.; Hubbell, W. L. *Protein Science* **2007**, *16*, 1069-1086.
2. Guo, Z.; Casio, D.; Hideg, K.; Hubbell, W. L. *Protein Science* **2008**, *17*, 228-239.
3. Zielke, V.; Eickmeier, H.; Hideg, K.; Reuter, H.; Steinhoff, H.J. *Crystal Structure Communications* **2008**, *64*, 586-589.
4. Bridges, M. D.; Hideg, K.; Hubbell, W. L.: *Appl. Magn. Resonance* **2009** (in press)
5. Shvetsov, A.; Stamm, J. D.; Phillips, M.; Warshaviak, D.; Altenbach, C.; Rubenstein, P. A.; Hideg, K.; Hubbell, W. L.; Reisler, E. *Biochemistry* **2006**, *45*, 6541-6549.
6. Cai, Q.; Kusnetzow, A. K.; Hubbell, W. L.; Haworth, I. S.; Gacho, G. P. C.; Eps, N. V.; Hideg, K.; Chambers, E. J.; Qin, P. Z. *Nucl. Acid Res.* **2006**, *34*, 4722-4730.
7. Cai, Q.; Kusnetzow, A.K.; Hideg, K.; Price, E.A.; Haworth, I.S.; Qin, P.Z. *Biophysical Journal* **2007**, *93*, 2110-2117.

8. Popova, A. M.; Kálai, T.; Hideg, K.; Qin, P. Z. *Biochemistry* **2009**, *48*, 8540-8550.
9. Fleissner, M.R.; Brustad, E. M.; Kálai, T.; Altenbach, C.; Cascio, D.; Peters, F.; Hideg, K. Schultz, P. G.; Hubbell, W. L. P. *Natl. Acad. Sci. USA* **2009** (in press)
10. Kálai, T.; Schindler, J.; Balog, M.; Fogassy, E.; Hideg, K. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 1094-1100.
11. Becker C. F. W.; Lausecker, K.; Balog, M.; Kálai, T.; Hideg, K. *Magn. Reson. Chem.* **2005**, *43*, S34-S39.
12. Balog, M.; Abé, C.; Kálai, T.; Steinhoff, H. J.; Jekő, J.; Hideg, K. *Synthesis* **2007**, 1663-1670.
13. Raju, N.; Spacek, T.; Jezek, J.; Leinisch, F.; Hideg, K.; Jezek, P.; Trommer, W. E.: *Applied Magnetic Resonance* **2006**, *30*, 373-383.
14. Kálai, T.; Hubbell, W. L.; Hideg, K. *Synthesis* **2009**, 1336-1341.
15. Hideg, K. *HU 200105050 A2 20050428, 2005* (magyar szabadalom)
16. Kálai, T.; Mugesh, G.; Roy, G.; Sies, H.; Berente, Z.; Hideg, K. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 3564-3569.
17. Kálai, T.; Khan, M.; Balog, M.; Kutala, K. V.; Kuppusamy, P.; Hideg, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5510-5516.
18. Kutala, V. K.; Khan, M.; Mandal, R.; Ganesan, L. P.; Tridandapani, S.; Kálai, T.; Hideg, K.; Kuppusamy, P.: *J. Pharm. Exp. Ther.* **2006**, *317*, 921-928.
19. Kálai, T.; Várbiro, G.; Bognár, Z.; Pálfi, A.; Hantó, K.; Bognár, B.; Ósz, E.; Sümegi, B.; Hideg, K. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, *13*, 2629-2636.
20. Bognár, Z.; Kálai, T.; Pálfi, A.; Hantó, K.; Bognár, B.; Márk, L.; Szabó, Z.; Tapodi, A.; Radnai, B.; Sárszegi, Zs.; Szántó, Á.; Jr. Gallyas, F.; Hideg, K.; Sümegi, B.; Várbiro, G. *Free Rad. Biol. Med.* **2006**, *41*, 835-848.
21. Mandal, R.; Kutala, V. K.; Khan, M.; Mohan, I. K.; Varadharaj, S.; Sridhar, A.; Carnes, C. A., Hideg, K.; Kuppusamy, P. *J. Pharm. Exp. Ther.* **2007**, *323*, 119-127.
22. Mohan, I. K.; Kahn, M.; Wisel, S.; Selvendiran, K.; Sridhar, A.; Carnes, C. A.; Bognár, B.; Kálai, T.; Hideg, K. Kuppusamy, P. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2009**, *296*, 140-151.
23. Deres, P.; Halmosi, R.; Tóth, A.; Kovács, K.; Pálfi, A.; Habon, T.; Czopf, L.; Kálai, T.; Hideg, K.; Sümegi, B.; Tóth, K. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2005**, *45*, 36-43.
24. Hideg, K.; Kálai, T. *Cardiovascular Toxicol.* **2007**, *7*, 160-164.
25. Selvendiran, K.; Tong, L.; Vishwanath, S.; Bratasz, A.; Trigg, N. J.; Kutala, V. K.; Hideg, K.; Kuppusamy, P. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 28609-28618.
26. Subramaniam, D.; May, R.; Sureban, S. M.; Lee, K. B.; George, R.; Kuppusamy, P.; Ramanujam, R. P.; Hideg, K.; Dieckgraefe, B. K.; Houchen, C. W.; Anant, S. *Cancer Research* **2008**, *68*, 1962-1969.
27. Selvendiran, K.; Kuppusamy, M. L.; Bratasz, A.; Tong, L.; Rivera, B. K.; Rink, C.; Sen, C. K.; Kálai, T.; Hideg, K.; Kuppusamy, P. *J. Pharm. Exp. Ther.* **2009**, *329*, 959-966.
28. Kálai, T.; Balog, M.; Szabó, A.; Gulyás, G.; Jekő, J.; Sümegi, B.; Hideg, K. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1619-1629.
29. Hideg, K.; Kálai, T.; Sümegi, B. **2007**, HU 200400883 A2 20070928 (magyar szabadalom)
30. Kulcsár, Gy.; Kálai, T.; Ósz, E.; Sár, P. C.; Jekő, J.; Sümegi, B.; Hideg, K. *Arkivoc* **2003**, 121-131.
31. Kovács, K.; Sümegi, B.; Tóth, A.; Deres, P.; Kálai, T.; Hideg, K.; Gallyas, F. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *71*, 441-452.

32. Pálfi, A.; Tóth, A.; Hantó, K.; Deres, P.; Szabados, E.; Szereday, Z.; Kulcsár, Gy.; Kálai, T.; Hideg, K.; If. Gallyas, F.; Sümegi, B.; Tóth, K.; Halmosi, R. *J. Mol. Cell. Cardiology* **2006**, *41*, 149-159.
33. Bartha, E.; Kiss, N. Gy.; Kálmán, E.; Kulcsár, Gy.; Kálai, T.; Hideg, K.; Habon, T.; Sümegi, B.; Tóth, K.; Halmosi, R. *J. Cardiovasc. Pharm.* **2008**, *52*, 253-261.
34. Bartha, E.; Solti, I.; Kereskai, L.; Lantos, J.; Plozer, E.; Magyar, K.; Szabados, E.; Kálai, T.; Hideg, K.; Halmosi, R.; Sümegi, B.; Toth, K. *Cardiovasc. Res.* **2009**, *83*, 501-510.
35. Goldstein, S.; Samuni, A.; Hideg, K.; Merényi, G. *J. Phys. Chem. A.* **2006**, *110*, 3679-3685.
36. Sár, P. C.; Ósz, E.; Jekő, J.; Hideg, K. *Synthesis* **2005**, 255-260.
37. Bognár, B.; Kálai, T.; Hideg, K. *Synthesis* **2008**, 2349-2445.
38. Kálai, T.; Hideg, K. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 10352-10360.
39. Hideg, E.; Kálai, T.; Kos, P.; Asada, K.; Hideg, K. *Photochem. Photobiol.* **2006**, *82*, 1211-1218.
40. Lozinsky, E.; Iametti, S.; Barbiroli, A.; Likhtenstein, G. I.; Kálai, T.; Hideg, K.; Bonomi, F. *The Protein J.* **2006**, *25*, 1-15.
41. Kálai, T.; Jekő, J.; Hideg, K. *Synthesis* **2009**, 2591-2595.
42. *SYNFACTS* **2009**, *10*, 1098.
43. Kálai, T.; Jekő, J.; Berente, Z.; Hideg, K. *Synthesis* **2006**, 439-446.
44. Kálai, T.; Bognár, B.; Jekő, J.; Hideg, K. *Synthesis* **2006**, 2573-2579.
45. Hideg, K.; Kálai, T.; Sár, P. C. *J. Heterocyclic Chem.* **2005**, *42*, 437-450.