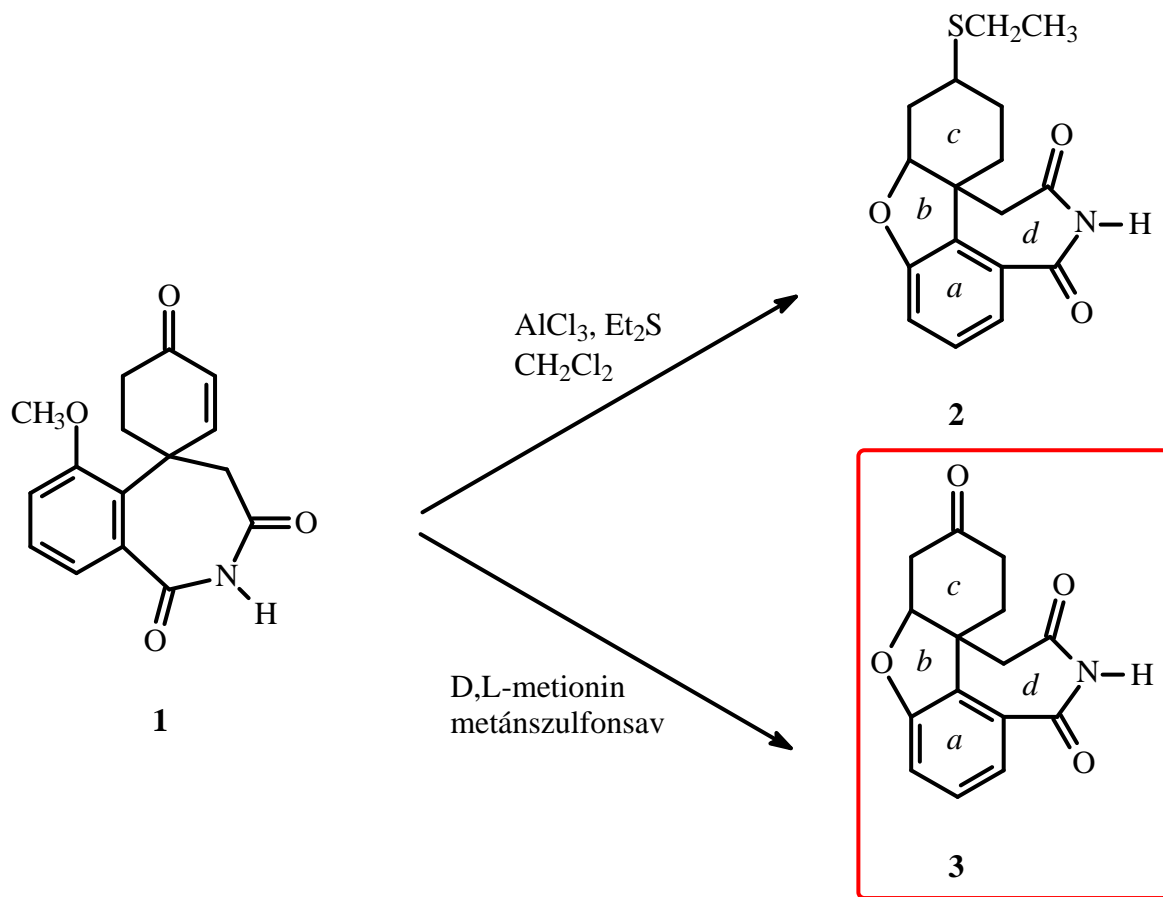


OTKA (68734) zárójelentés, 2011.

1. Galanthamin és származékai

A 2007., 2008. évben sikerült olyan mennyiségű spirociklohexenon intermediert (1) előállítanunk, hogy az egy metoxycsoportot tartalmazó vegyületek szintézise során néhány gyűrűzárási kísérletet kipróbálhassunk (1. ábra).



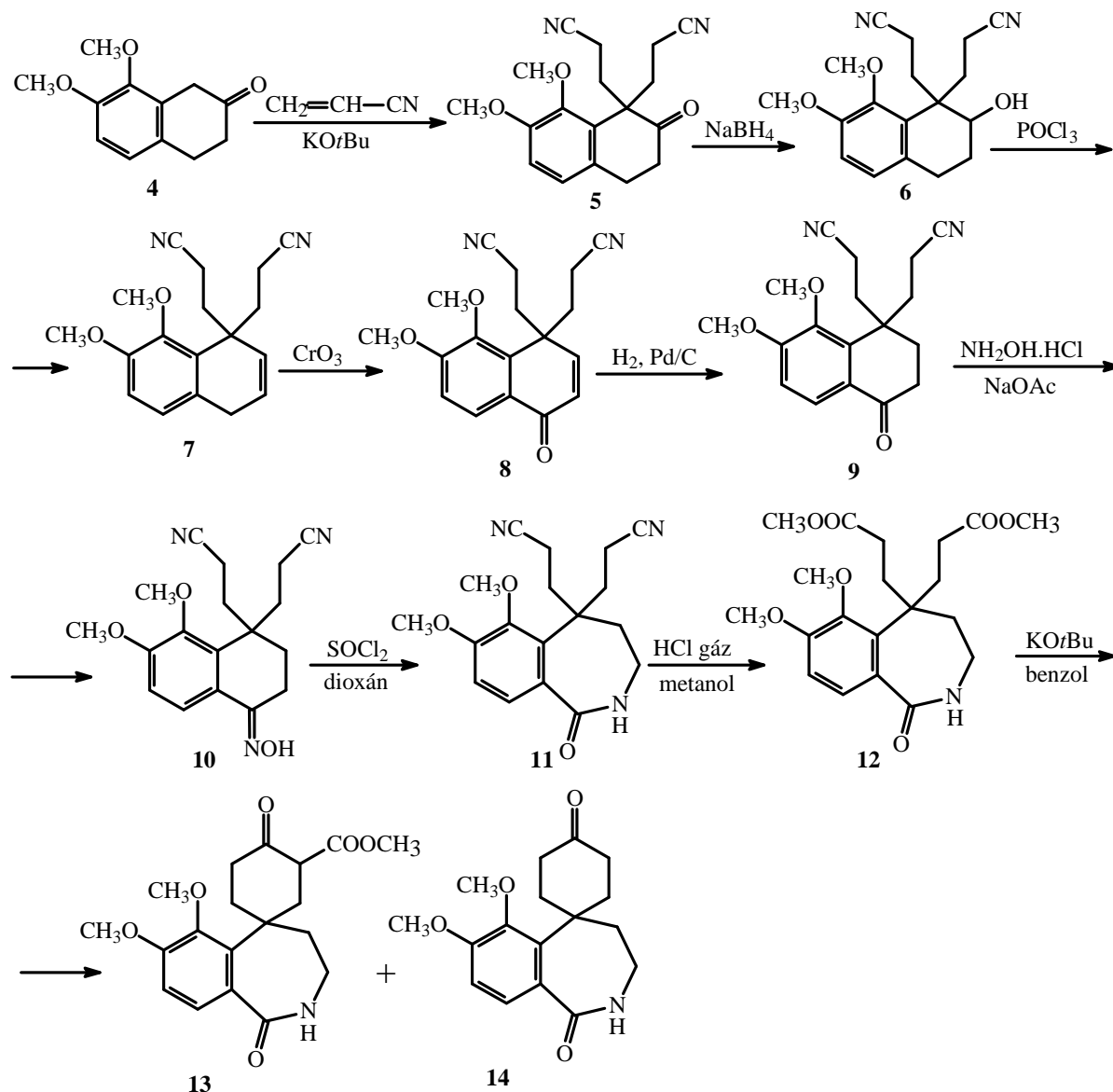
1. ábra

Bór-tribromidot alkalmazva csak azonosíthatatlan bomlástermékek keverékéhez jutottunk, aluminium(III)-klorid/dietil-szulfid reagens felhasználása azonban már érdekes eredményhez vezetett. A reakció során nem a várt tetracyklosos ketonhoz (3) jutottunk, hanem a 2 vegyület volt kinyerhető. Bár ebben a ketocsoport helyén etiltiocsoport található, de ez az *első eset*, hogy a galanthamin és származékai kutatásának témakörében sikerült eljutnunk a fontosabb Amaryllidaceae alkaloidokra (galanthamin, lycoramin, narwedín, stb.) jellemző tetracyklushoz.

Ezek után különböző *O*-demetilézéseket vizsgáltunk. A telítetlen spiroketont (1) reagáltattuk AlCl₃-dal szobahőmérsékleten vagy melegen, tiokarbamid vagy dietilszulfid jelenlétében és

anélkül, valamint BF_3 -éteráttal. A reakciók során többnyire csak a változatlan kiindulási anyagokat kaptuk vissza, vagy bomlás történt. Végül is D,L-metionin és metánszulfonsav szobahőmérsékleten történt reakciója eredményezte a várt **3** tetraciklust. A tiszta terméket 23,5%-os termeléssel állítottuk elő, de már a 92,8%-kal kinyerhető nyerstermék is kellő tisztaságú volt a további reakciókhoz.

A hexahidrobenzofuro-benzo[c]azepin tetraciklus sikeres előállítása bizonyítja az általunk kidolgozott, egyszerű reakciólépésekből álló szintézis-stratégia helyességét.



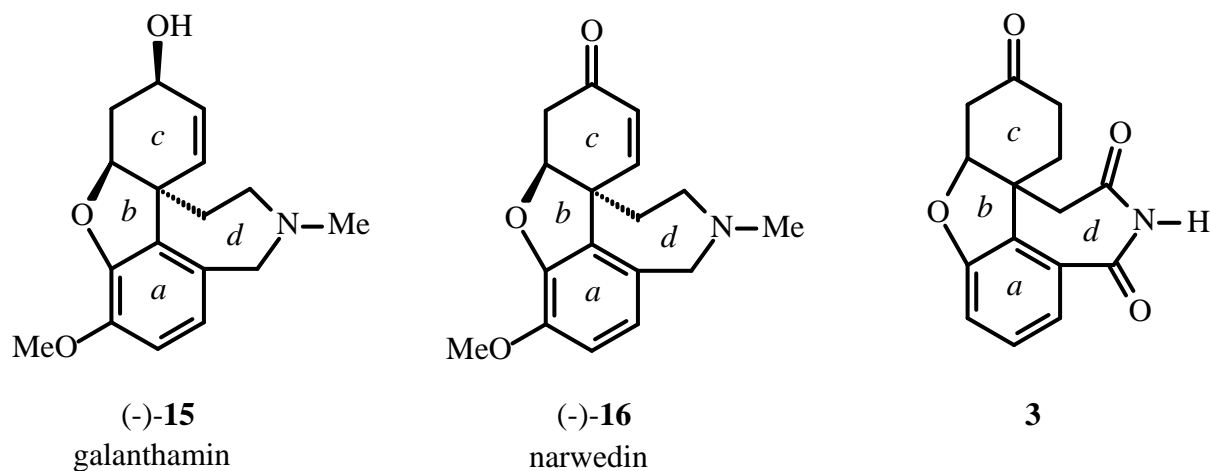
2. ábra

A 2009. év első félévében kutatásainkat kiterjesztettük a *narwedin*hez vezető kulcsintermedier, a metoxicsoportot is tartalmazó **hexahidrobenzofurobenzo[c]azepin** tetraciklushoz vezető reakcióút kidolgozására. Ebben az esetben a szintézis kiinduló anyaga a két metoxicsoporttal helyettesített 7,8-dimetoxi-2-tetralon (**4**) volt. A reakciókat a korábban

már bemutatott, egyszerű lépésekből álló és olcsó reagenseket felhasználó szintézisúton végeztük (2. ábra).

A 7,8-dimetoxi-2-tetralon (4) 1-es helyzetben történt ciánilezésével kapott bisz(cianoetil)-tetralon (5) oxocsoportját redukáltuk nátriumbórhidrid segítségével, majd a kapott hidroxivegyület (6) dehidratálása eredményezte a várt 1,4-dihidronaftalin-származékot (7). Ezt allil-helyzetben króm-trioxiddal oxidáltuk, majd a telítetlen oxoszámazékot (8) csontszenes palládium katalizátor jelenlétében légköri nyomáson hidrogénezve eljutottunk a 4,4-bisz(cianoetil)-5,6-dimetoxi-1-tetralonhoz (9). Ezt hidroxil-aminnal reagáltatva megkaptuk a megfelelő oximot (10), melynek Beckmann-átrendeződése a várt benzo[c]azepinonszármazékhoz (11) vezetett. A két nitril-csoportot ezután Pinner-reakcióval metil-észterekké alakítottuk és a diészter (12) Dieckmann-kondenzációját kálium-*tercier*-butilát jelenlétében végrehajtva két különböző terméket kaptunk: a várt β -oxoészter (13) mellett kisebb mennyiségben a már demetoxikarbonileződött spirociklohexanon (14) is izolálható volt.

Mindkét spirovegyület (13, 14) a **galanthaminhoz** illetve **prekurzorához**, a **narwedinhoz** vezető út fontos intermedierének tekinthető.



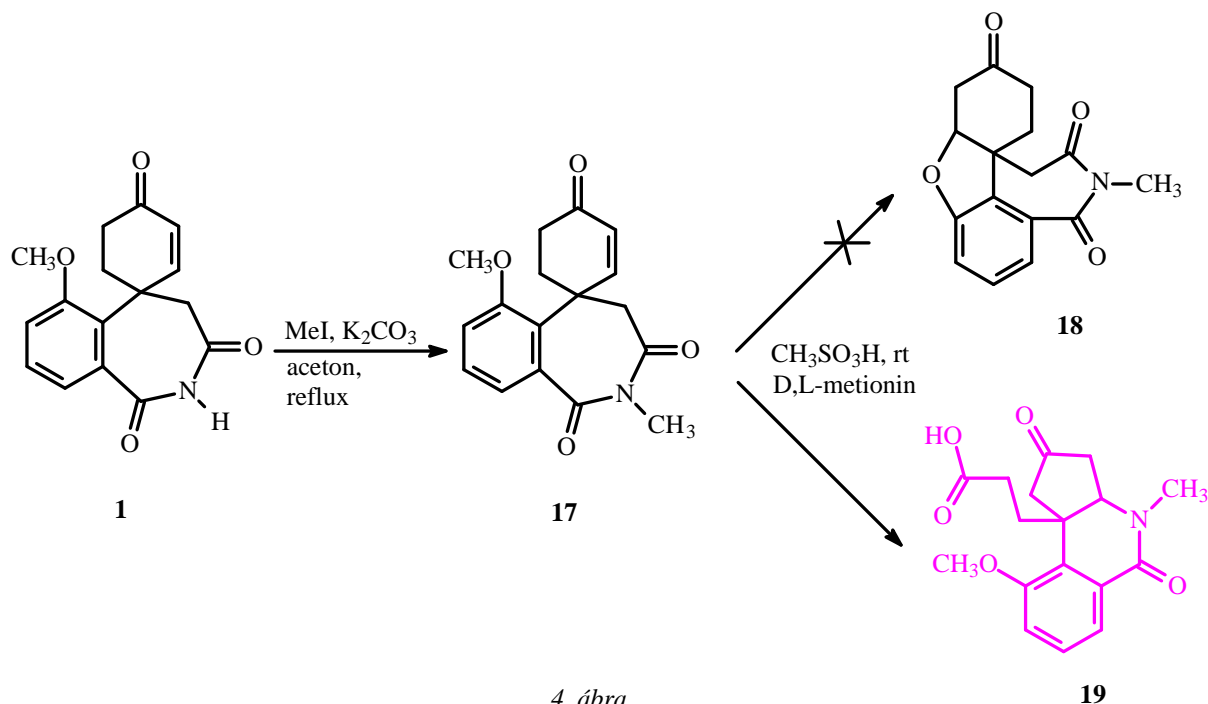
3. ábra

Már korábban, a jelen pályázati project-ben bemutattuk azt a retroszintetikus reakcióutat, melyet az Alzheimer kór kezelésére alkalmas alkaloid, a galanthamin (15) (3. ábra) szintézisére kutatócsoportunkban Szántay Csaba akadémikus irányításával kidolgoztunk.

Arról is beszámoltunk, hogy a szintézist, melyet egyszerű reakciólépések és könnyen hozzáférhető reagensek alkalmazásával terveztünk megvalósítani, először modelvegyületeken hajtottuk végre. Az eredményes reakciókat ezután már metoxiszubsztituenst is tartalmazó alkalmas intermedierekre is kiterjesztve, leírtuk a galanthamin-típusú *Amaryllidaceae*

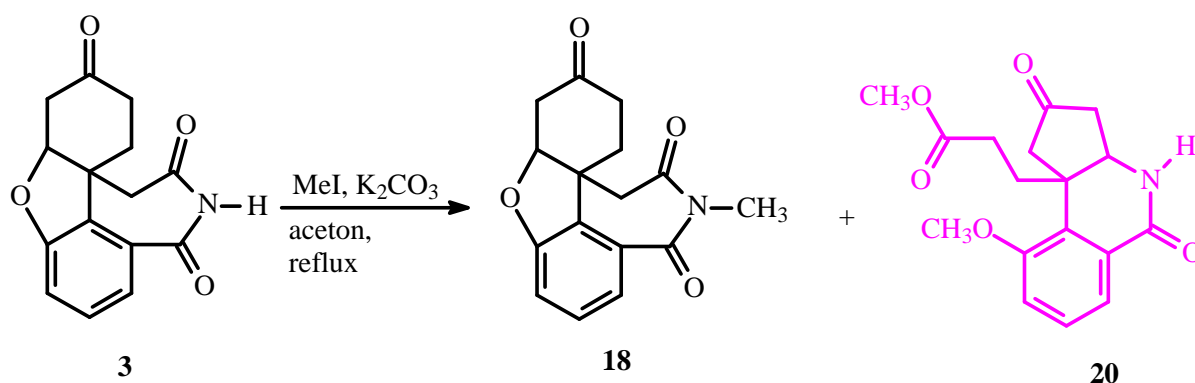
alkaloidokra jellemző hexahidrobenzofurobenzazepin tetraciklus (**3**) sikeres előállítását, mely igazolta a megtervezett szintézis-stratégia helyességét.

A galanthamin irodalomban leírt szintéziseinek többsége a kvaterner szénatom kialakítására a biomimetikus intramolekuláris fenolos oxidációt alkalmazza és ezeknél a kulcsintermedier a narwedín (**16**), mely egyúttal a galanthamin biogenezisének is fontos közti terméke. Ennek fényében a szintézis során következő feladatunk a **3** tetraciklus azepin nitrogénen metilezett származékának (**18**) előállítása volt (4. ábra).



Így először az **1** spiroketont metil-joddal kálium-karbonát jelenlétében acetonos reflux körülményei között metilezve 53%-os termeléssel jutottunk a megfelelő *N*-metil-származékhoz (**17**). Az *N*-metil-spirovegyület (**17**) metánszulfonsavban metionin jelenlétében végrehajtott reakciója nem a várt metilezett tetraciklust (**18**) eredményezte, hanem 34%-os termeléssel egy anomális átrendeződéssel keletkezett más jellegű triciklusos vegyületet (**9**), egy az irodalomban nem ismert ciklopentanoizokinolin-diont sikerült a reakcióelegyből izolálni.

Ezután a **3** tetraciklust közvetlenül próbáltuk metilezni az azepin nitrogénen az előző metilezéskor leírt reakciókörülmények között (5. ábra).



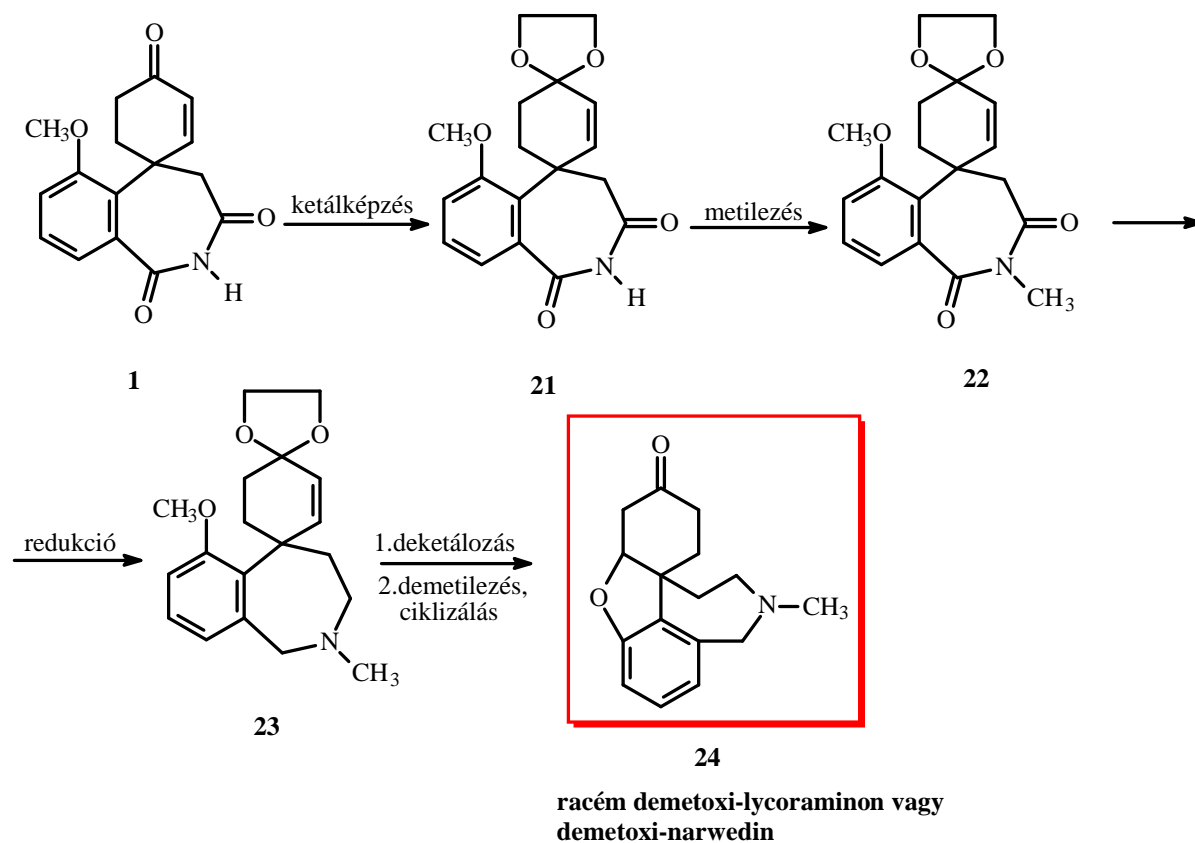
5. ábra

A reakcióban 19%-os termeléssel sikerült a várt *N*-metil-hexahidrobenzofurobenzazepinon származékhoz (**18**) eljutni, azonban meglepetésünkre ebben az esetben is ugyanolyan gyűrűrendszert tartalmazó vegyületet (**20**) izoláltunk 18%-os termeléssel, mint az előző reakcióban (4. ábra: **19**). A **19** és **20** anomális termékek keletkezése mechanizmusának vizsgálata jelenleg is folyamatban van.

Tekintettel a tapasztalt átrendeződésekre, ezután más módszerrel, a tetraciklus prekursorának tekinthető spirovegyületből (**1**) kerülőúton próbáltunk eljutni a célvegyületünkhöz (6. ábra).

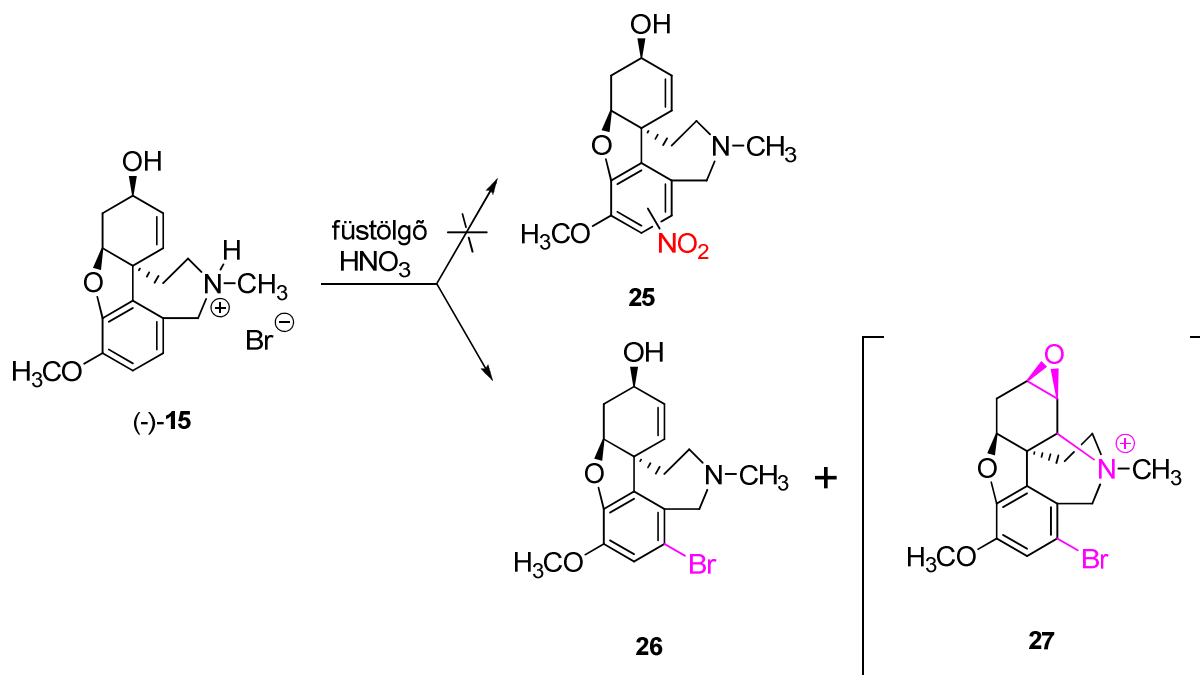
Így először **1** spiroketont ketállá (**21**) alakítottuk etilénlikolt alkalmazva különböző módszerekkel, majd a ketállal védett spiroketont az előzőekben már ismertetett egyszerű reakcióban metileztük. A kapott *N*-metil-spiroketált (**22**) ezután litium-alumínium-hidriddel redukálva eljutottunk a **23** kulcsintermedierhez, melyről metánszulfonsavban racém metionin jelenlétében sikerült a ketál védőcsoportot eltávolítani és ebben a savas közegben egyúttal lejátszódott a tervezett demetilezési-ciklizálási reakciót. A reakció eredményeképpen a várt racém demetoxi-lycoraminonhoz vagy másképpen demetoxi-dihidro-narwedinhoz (**24**) jutottunk.

Ez utóbbi narwedin-származék szintézisével eljutottunk a galanthaminnal kapcsolatos kutatásaink egyik igen fontos céljához.



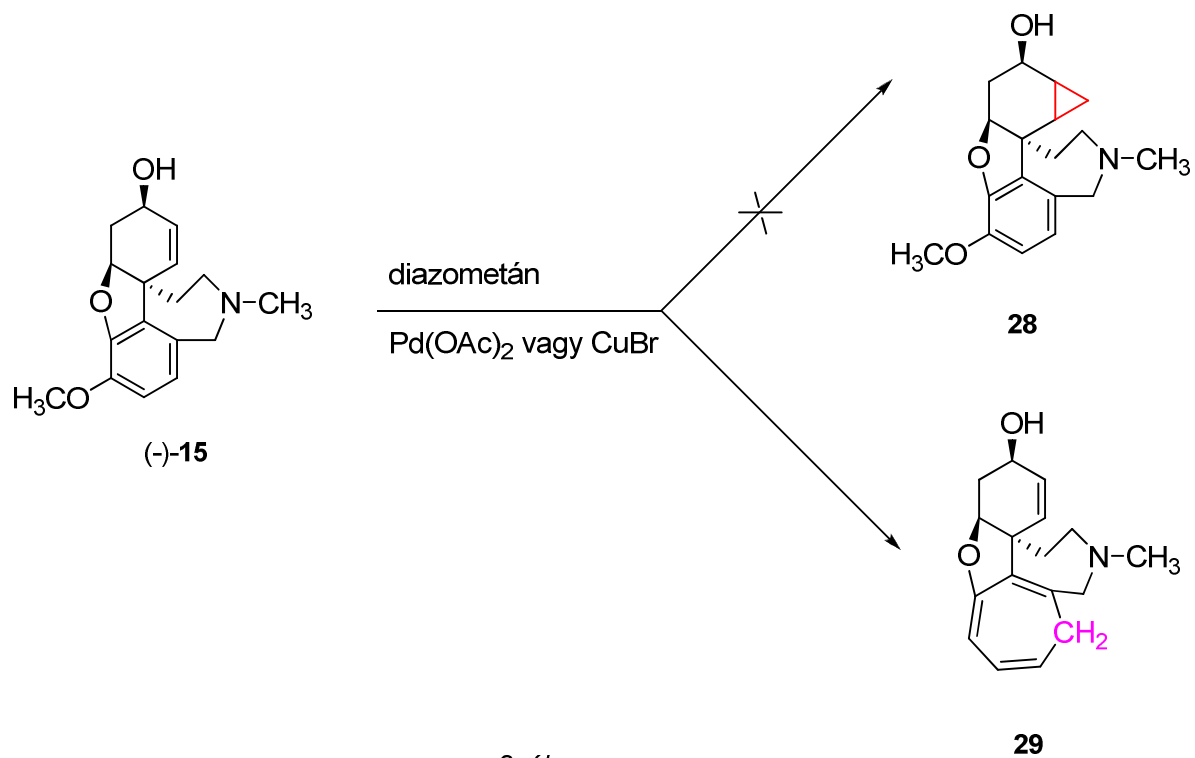
6. ábra

A kutatásaink során sikerült néhány új galanthamin-származékot előállítanunk, így pl. galanthamin-hidrobromid (**15**) füstöltgő salétromsavas nitrálása nem a várt nitro-származékot (**25**), hanem oxidációval a megfelelő bróm-vegyületet (**26**) eredményezte (7. ábra).



7. ábra

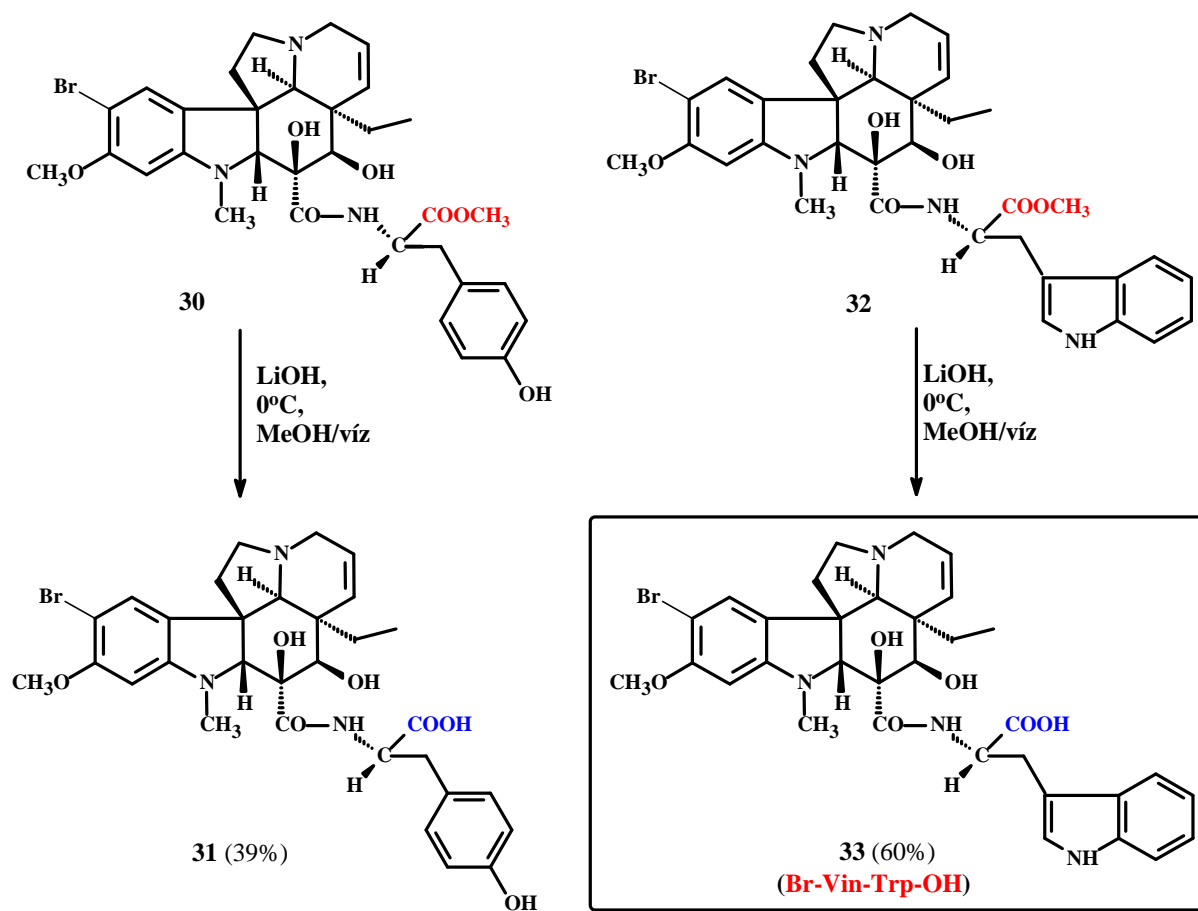
A reakció nyerstermékéből sikerült kimutatni egy további érdekes mellékterméket (**27**). Diazometánnal reagáltatva megkíséreltünk a kettős kötésre ciklopropángyűrűt kialakítani és így **28** vegyületet előállítani. A reakcióban azonban metilén-beékelődés történt és így az aromás gyűrű helyett cikloheptatrién-gyűrűt tartalmazó galanthamin-származékhoz (**29**) jutottunk.



8. ábra

2. Új vindolin és vinblasztin-származékok

A másik fő kutatási irány szerint elvégeztük néhány aminosavészterrel összekapcsolt vindolin észtercsoportjának hidrolízisét (9. ábra).

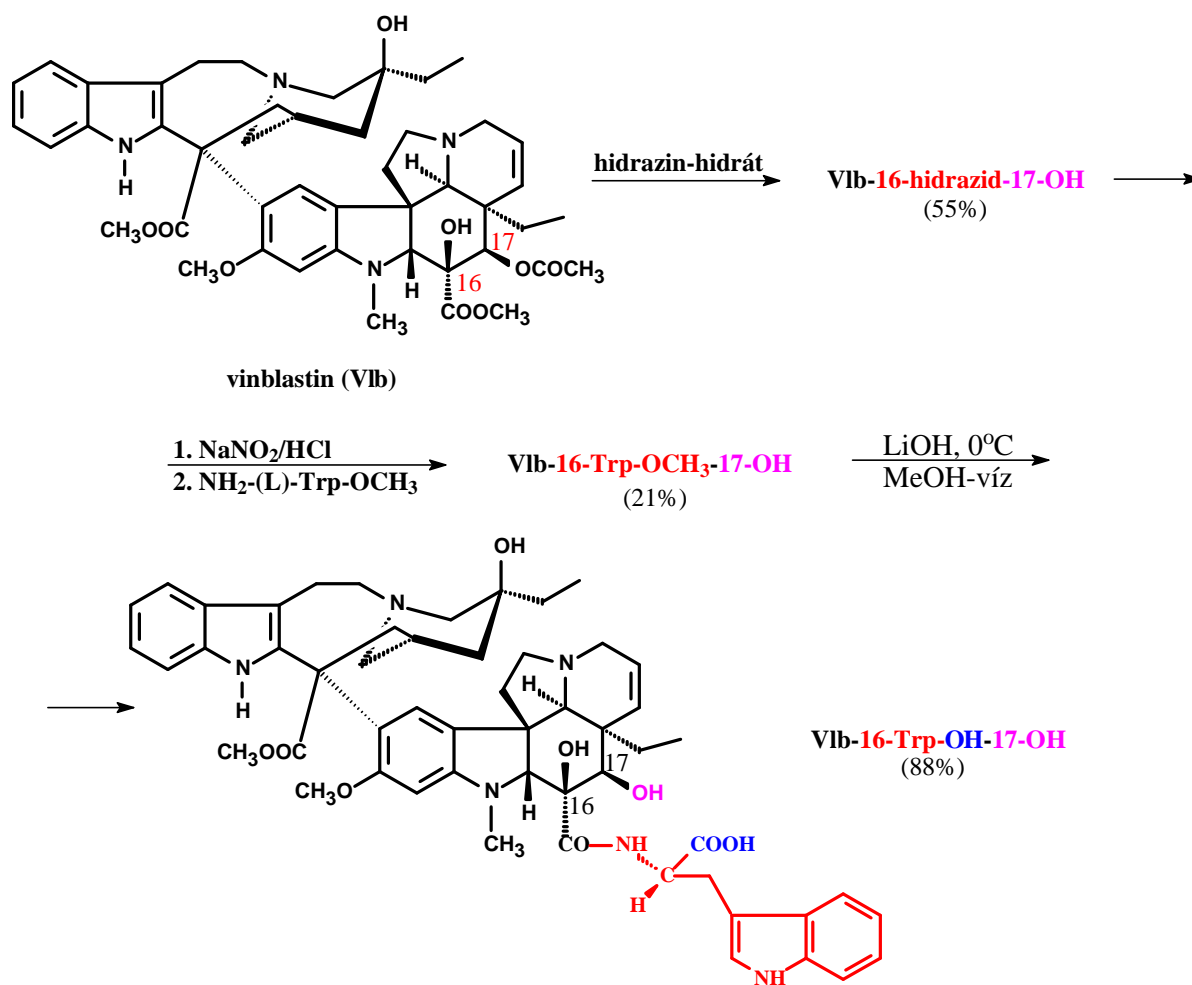


9. ábra

A kiindulási új vindolinszármazékokat az aromás A-gyűrű aromás elektrofil szubsztitúciós reakcióival nyertük, mely során a vindolin molekulán azonosítottuk a Reverdin-reakciónak nevezett átrendeződést.

A karboxilcsoport kialakítása lehetőséget adott arra, hogy a molekulát azonos aminosavakból álló 4, 6 vagy 8 tagú oligopeptidek *N*-terminális csoportjához lehessen kötni. Ennek segítségével ezek az u.n. hordozó peptidek (**carrier peptidek**) el tudják juttatni a rákellenes molekulát közvetlenül a sejtbe, ahol hatásukat kifejthetik. Ezzel a módszerrel csökkenhetnek a rákellenes anyagokra sajnos olyan sok esetben jellemző mérgező mellékhatások.

Ennek fényében elvégeztük az ábrán látható két származék, előbb a modelvegyületként alkalmazott **30** tirozinnal és a **32** triptofánnal összekapcsolt vindolin-származék hidrolízisét. A reakciót LiOH-dal 0°C-on metanol-víz elegyében hajtottuk végre és így a **31** valamint a **33** karbonsavakhoz jutottunk.



10. ábra

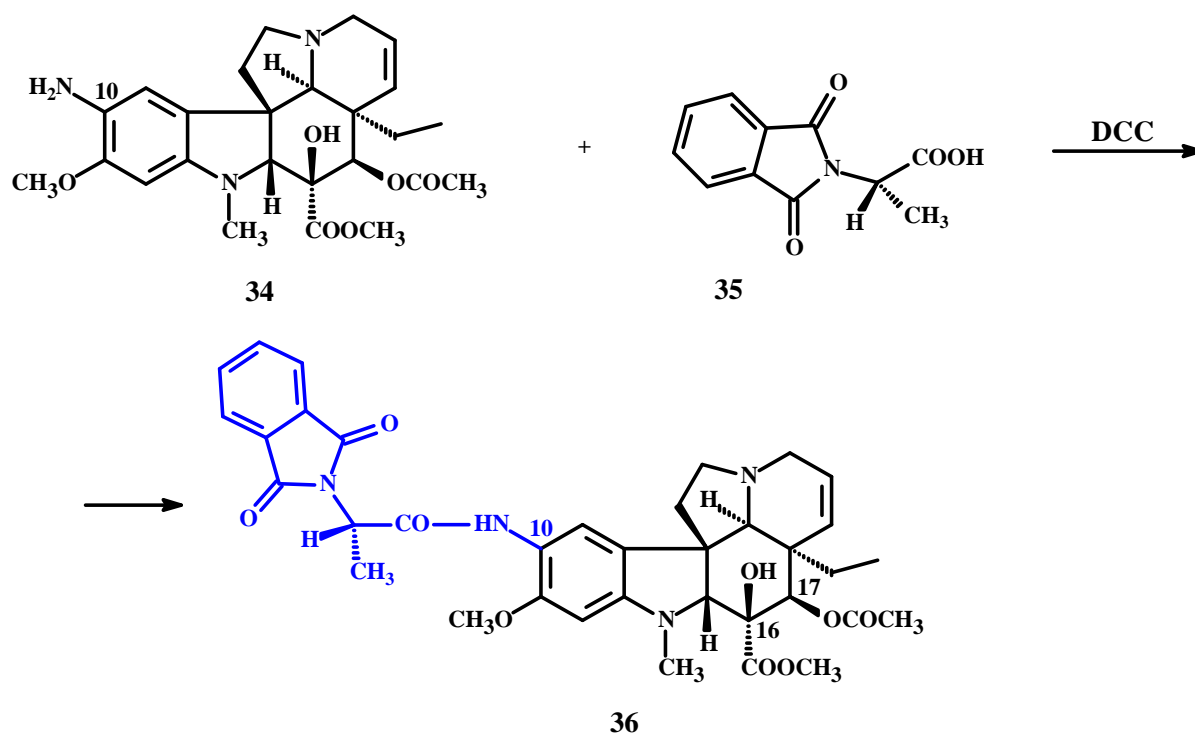
Hasonló vizsgálatokra a viblastint is összekapcsoltuk triptofán-metilészterrel (10. ábra). A reakciót a savazidos kapcsolás módszerével végeztük el. A hidrolízist is analóg módon elvégezve így olyan viblastin-származékhoz jutottunk, mely szintén hozzákapcsolható a megfelelő hordozó peptidhez.

A hordozó-peptidekkel kapcsolatos vizsgálatokat **Hudecz Ferenc** Professor Úr és kutatócsoportja (MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport) végezte oligoarginin-peptidek alkalmazásával. A molekulát a vízdékonyság, a sejtbe jutás és a szelektivitás növelése érdekében oligoarginin *N*-terminálisához kötötték. A 10-es helyen brómot és a 16-os karbonilcsoporton keresztül triptofánt tartalmazó (33), oligoargininnel kapcsolt vindolin humán leukémia (HL60) sejtvonalon mért IC₅₀ értékekről a következőkben számolhatok be. Maga a 10-bróm-vindolin, mely még nem tartalmazza a triptofán részt, elég magas IC₅₀ értéket mutatott. A 16-os helyre a triptofán bekacsolása már javította a vegyület aktivitását (IC₅₀ 89,5µM). A vegyületet az oligoarginin *N*-terminálisához kötve azonban lényegesen javult a sejtosztódás gátló hatás. A 8 argininegységet tartalmazó származék eredményezte a

legkisebb IC_{50} ($8,7 \mu M$) értéket, tehát ez a legaktívabb. Meg kell jegyezni, hogy a hordozópeptid természetesen önmagában hatástalan.

Igen fontos eredmény, hogy a konjugátum a szenzitív és a rezisztens humán leukémia 60 sejtekre egyaránt figyelemreméltó sejtproliferáció gátló hatással rendelkezik, közel azonos IC_{50} értékekkel ($5,5-8,7 \mu M$), ami arra utal, hogy a konjugátummal szemben nem alakul ki ilyen fajta rezisztencia.

A vinblasztin-származékok HL-60 humán leukémia sejtvonalon mért tumorellenes hatását is vizsgáltuk. A dezacetil-vinblasztin ($IC_{50} 0,004 \mu M$) a vinblasztin ($IC_{50} 1,26 \mu M$) degradációs terméke és aktív származéka a sejtben. Ennek megfelelően a dezacetil-vinblasztin, melyet mi is előállítottunk, gátolta legkisebb koncentrációban a tumorsejtek osztódását. A triptofánnal összekötött vegyület 3 nagyságrenddel nagyobb koncentrációban gátolta csak a sejtek proliferációját; alig volt hatásosabb a vinblasztin-szulfátnál. A molekula oligoarginin láncokkal történő összekapcsolása során azonban sikerült egy olyan új származékhoz jutni, mely az előzetes eredmények szerint szelektíven hat az gyorsabban osztódó molekulákra; ennek vizsgálata jelenleg folyamatban van.



11. ábra

Miután a 16-os helyzetben aminosavészterekkel kapcsolt vindolin-származékok között, mint ahogy azt az előzőekben már bemutattuk, több, jelentős citosztatikus hatású molekulát is találtunk, felmerült a lehetősége annak, hogy a vindolint más pozícióban is kapcsoljuk

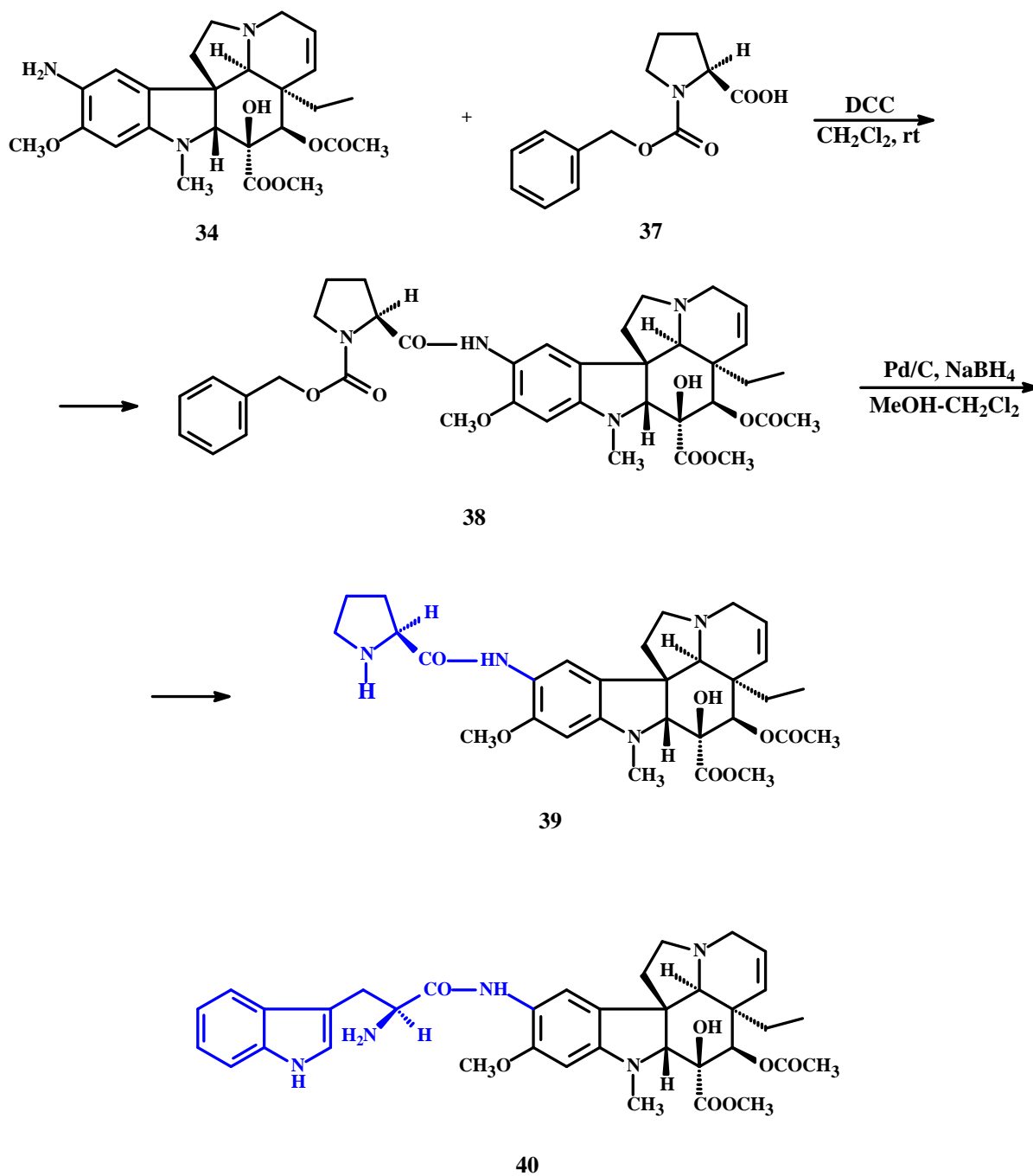
aminosavakkal. Erre a korábban bemutatott 10-amino szubsztituens kiépítése adott lehetőséget. Természetesen ebben az esetben a kapcsolás az aminosav C-terminálisán keresztül történik, vagyis a 10-amino-vindolin (**34**) nitrogéneken védett aminosavakkal történő acilezésével.

A 2009. év első félévé során a vindolin nitrálásával kapott nitrovegyületet a korábban már ismertetett módon aminocsoporttá redukáltuk és a 10-amino-vindolint (**34**) modelvegyületként először L-ftálimido-alaninnal (**35**) reagáltattuk a legegyszerűbb módszerrel; DCC jelenlétében diklórmétánban szobahőfokon (11. ábra). A reakció a 10-es helyen aminocsoporthoz kötve ftálimidoalanint tartalmazó vindolint (**36**) eredményezett. Ebben az esetben a ftálimido-védőcsoport eltávolításától egyenlőre eltekintettünk; hidrazinos deftalioilezés esetén savhidrazid keletkezése, savas hidrolízist alkalmazva pedig a vindolin észtercsoportjainak hidrolízise volt várható az eddig eredmények és az irodalmi adatok alapján.

Éppen ezért a további nitrogéneken védett aminosavakkal történő reakciók vizsgálata során nem a ftálimido-védőcsoportot alkalmaztuk, hanem más módon eltávolítható védőcsoportokat tartalmazó aminosavakat választottunk. A reakciót először *N*-benziloxikarbonil-L-prolinnal (**37**) hajtottuk végre hasonló reakciókörülmények között, mint az *N*-ftálil-alaninnal. A reakció probléma nélkül a várt terméket (**38**) eredményezte (12. ábra). A védőcsoportot a már korábban is alkalmazott redukációs módszerrel távolítottuk el; ekkor csontszénese palládium katalizátor jelenlétében metanol-diklórmétán elegyében nátrium-bórhidriddel végeztük a reakciót. Így a 10-amino-vindolin *N*-L-prolil-származékához (**39**) jutottunk.

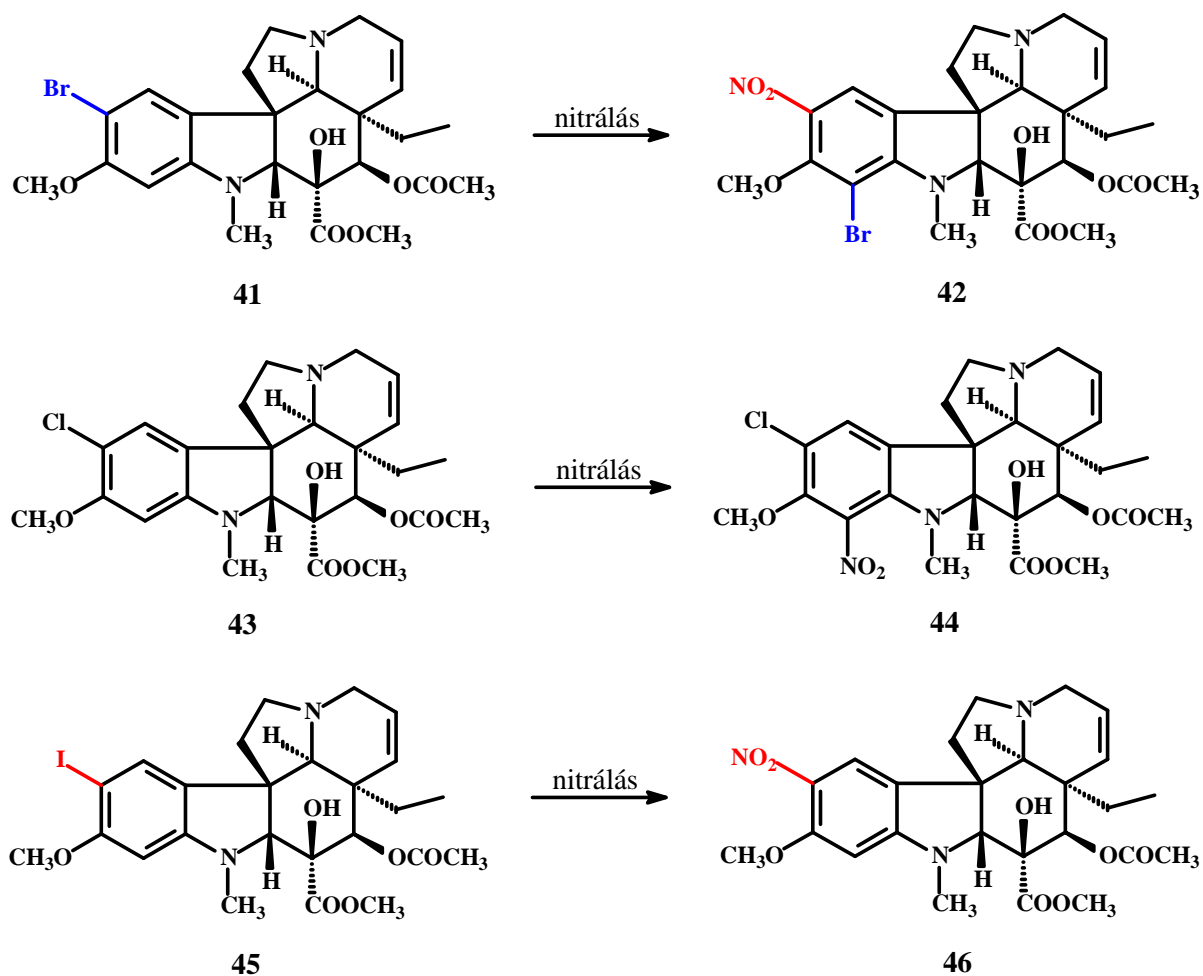
Következő aminosavnak az L-triptofánt választottuk. Az előzőekhez analóg módszerrel a 10-amino-vindolint DCC jelenlétében acileztük a nitrogéneken benziloxi-karbonil-csoporttal védett triptofánnal és a védőcsoport ismert módszerrel történt eltávolítása után ekkor is a várt termékhez (**40**) jutottunk.

A két új vindolinszármazék (**39**, **40**) az előzetes farmakológiai vizsgálatok szerint nem mutatott jelentős daganatellenes hatást.



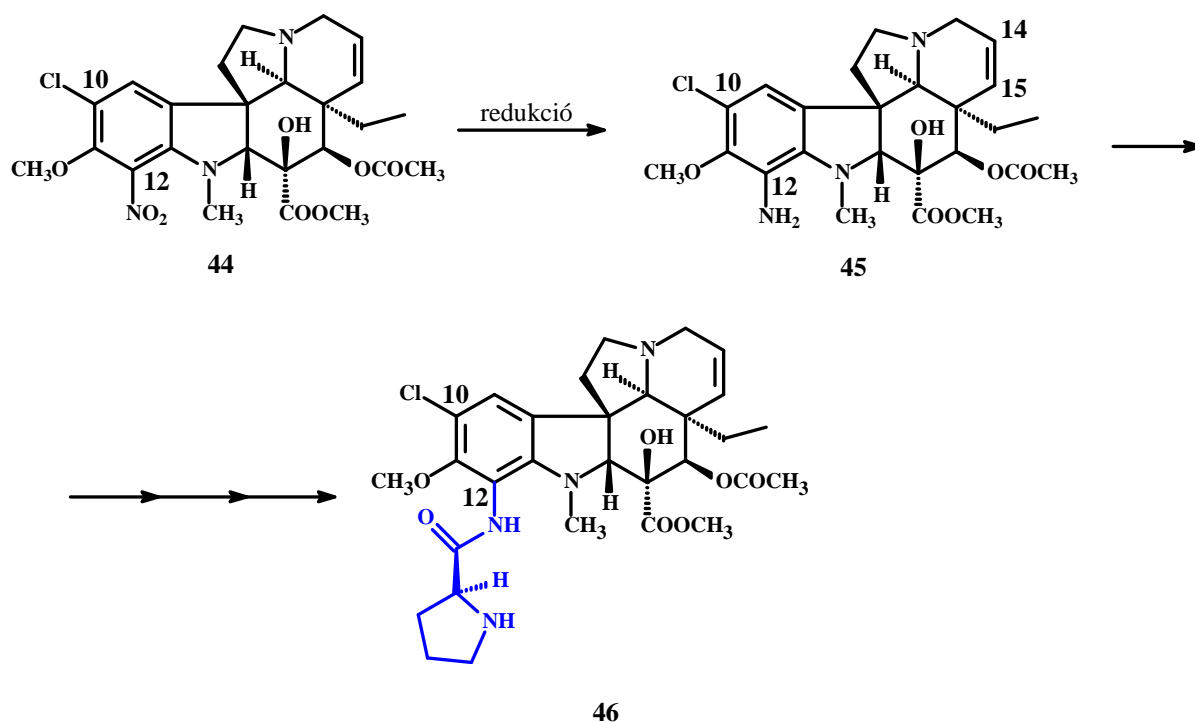
12. ábra

Miután a vindolint 10-es helyen is sikerült aminosavakkal kapcsolni, a 12-es hely aminosavakkal történő helyettesítése volt feladatunk. Először folytattuk a vindolin halogénezési reakcióit és a kapott halogénszármazékok nitrálását annak érdekében, hogy a 10-es helyzetet halogénatommal védve a molekula a 12-es helyén történjen a nitrálás (13. ábra).



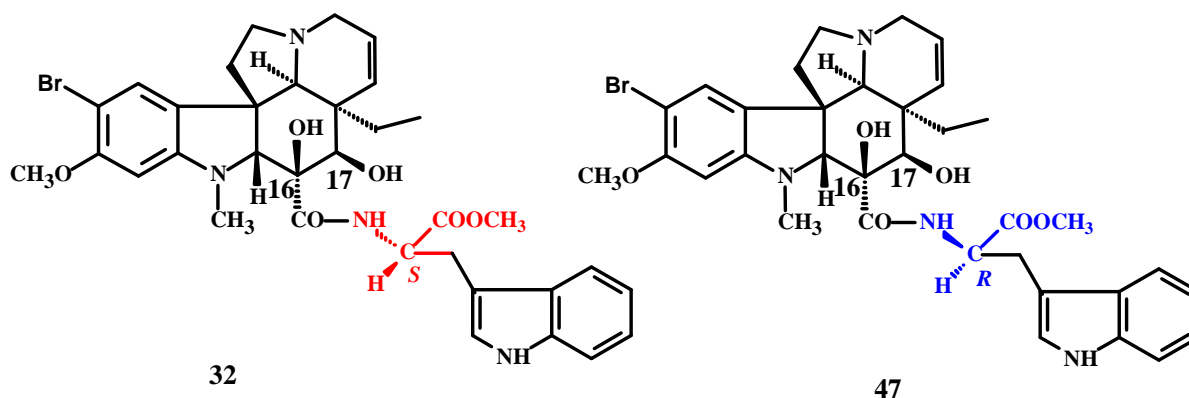
13. ábra

A **41** brómvegyület – mint már említettük – nitrálásakor nem a várt terméket eredményezte, hanem Reverdin-reakcióval a 10-nitro-12-bróm-származék (**42**) keletkezett. A klórvegyület (**43**) nitrálása a várt 10-klór-16 nitroszármazékhoz (**44**) vezetett, a jódvindolin (**45**) esetén pedig csak az *ipso*-szubsztitúció termékét, a 10-nitrovindolint (**46**) izoláltuk. További céljainkra a **44** 10-klór-12-nitro-vindolin volt alkalmas. A nitrocsoportot a már korábban ismertetett módszerrel redukáltuk és a 12-es helyzetű aminocsoporton a vindolint nitrogéneen védett L-prolinnal reagáltatva, majd a védőcsoportot eltávolítva a várt **46** célvegyülethez jutottunk, mely az aminosavat a tervezett 12-es helyen tartalmazta (14. ábra). Ezidáig azonban olyan redukációs módszert nem sikerült találnunk, amellyel a 10-es klóratomot a vindolin 14,15-helyzetű szén-szén kettős kötésének telítése nélkül el tudtuk volna távolítani.



14. ábra

Miután a 10-brom-17-dezacetilvindolinnak a 16-os észtercsoporton keresztül L-triptofánnal kapcsolt származéka (32) humán leukémia sejtvonalon jelentős daganatellenes hatást mutatott, felmerült az igénye annak, hogy fenti molekulát D-triptofánnal is összekapcsoljuk.

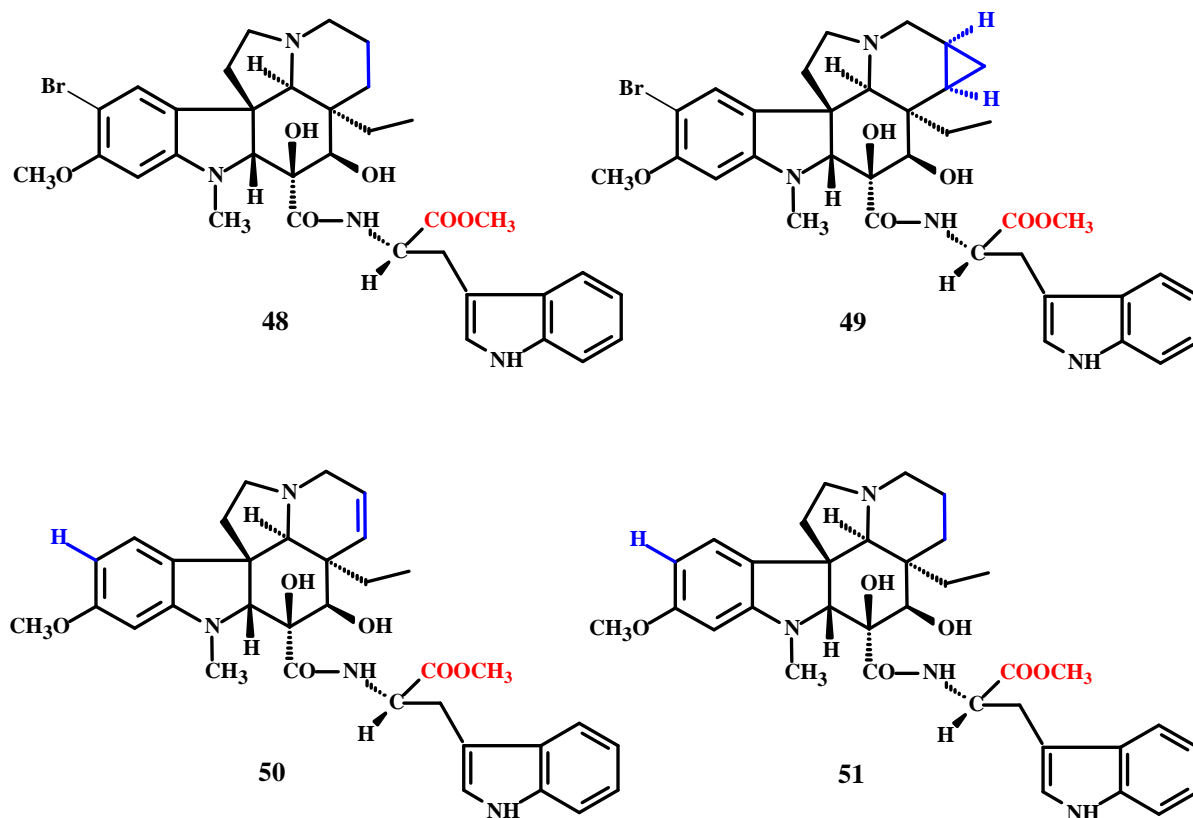


15. ábra

A reakciót a már korábban is bevált, azidos kapcsolással végeztük. A 16-os észtercsoportot savhidraziddá, utóbbit pedig savaziddá alakítottuk és ezt reagáltatva D-triptofán-metilészterrel jutottunk a 47 kapcsolt észterszármazékhoz (15. ábra). A 47 vegyületet az észtercsoport hidrolízise után Hudecz Ferenc Professor Úr kutatócsoportjában (MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport) hordozó peptiddal, oktaargininnel konjugálták és a biológiai vizsgálatok során

azt találták, hogy a molekula a L-karbonsavszármazéktól (33) eltérően nem humán leukémia sejteken, hanem emlőtumor sejteken mutat daganatellenes hatást.

Végezetül bemutatjuk azokat az új vindolin-származékokat, melyeket az általunk alkalmazott standard módszerekkel állítottunk elő a szerkezet-hatás tanulmányozása céljából (16. ábra).



16. ábra

Ezek: a 14,15-helyen telített dihidrovindolin-származék (48), ugyanebben a helyzetben ciklopropángyűrűvel kondenzált vindolint tartalmazó vegyület (49) és az 50 illetve 51 10-es helyen brómot **nem** tartalmazó új vindolinszármazékok.

Utóbbi vegyületek farmakológiai vizsgálatait jelenleg még folyamatban vannak.

Dr. Hazai László

témavezető

Budapest, 2012. január 12.