

Paramágneses nitroxidok szintézise és vizsgálata: kettős hatású vegyületek (K 81123)

Záró beszámoló

(2010.02.01-2014.12.31.)

Témavezető:

Dr. Hideg Kálmán (PhD, DSc)

PTE, ÁOK, Szerves és Gyógyszerkémiai Intézet
7624 Pécs, Szigeti út 12.
Tel. / Fax: 36-72-536-219
E-mail: kalman.hideg@aok.pte.hu

Bevezetés

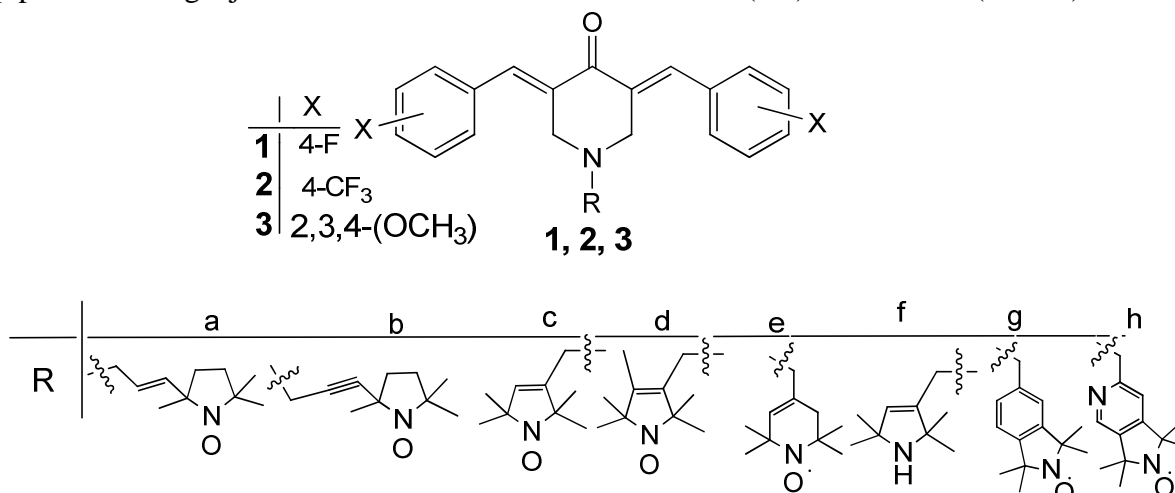
A stabilis nitroxid szabad gyökök több diszciplína (biofizika, kémia, biológia, anyagtudományok) számára is nagy jelentőséggel bírnak. A felfedezésük óta eltelt csaknem 60 évben számos új nitroxidot szintetizáltak, ugyanakkor reakcióikat csak az utóbbi 30 évben tanulmányozták részletesebben orosz, francia, holland, német, japán, osztrák, ausztrál, amerikai és magyar kutatók. A szerves szintetikus kémia módszereinek időközbeni fejlődése és az alkalmazási területek változatos igényei továbbra is állandó kihívást jelentenek a területen dolgozó kutatók számára, így a Pécsi Tudományegyetemen működő kutatócsoportunk számára is. A most lezárult pályázatunk keretében elsősorban piperolin, piperolidin, piperidin és tetrahidropiridin nitroxidon alapuló kettőshatású vegyületek szintézisét és vizsgálatát valósítottuk meg: így a.) nitroxidokkal módosított kardioprotektív szerek, b.) nitroxidokkal módosított neuroprotektív szerek, c.) nitroxidokkal módosított PARP-inhibítorok d.) nitroxidokkal módosított daganatellenes szerek, e.) mitokondriumra ható szerek szintézisét és vizsgálatát.

Továbbá új spinjelző vegyületek szintézisét valósítottuk meg különös tekintettel az azid-acetilén 1,3-dipoláris cikloaddíció alkalmazására. Ezen kívül nitroxidokkal anellált karbo- és heterociklussal kondenzált nitroxidokat, mint lehetséges építőköveket állítottunk elő, valamint fizikai kémiai/anyagtudományi kutatások céljából orosz kutatókkal együttműködve biradikális vegyületeket vizsgáltunk. Természetesen a fent felsorolt tématerületek között – az alkalmazott szintetikus módszerekből eredően - számos átfedés van.

Eredmények összefoglalása

-Kettőshatású, daganatellenes vegyületek vizsgálata:

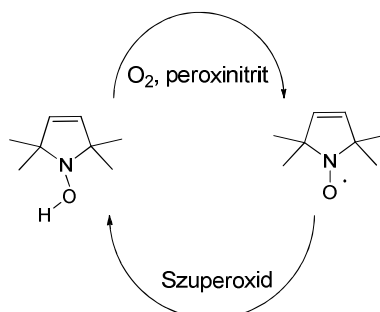
Számos 3,5-bisz(arilidén)-4-piperidon vegyület szintézisét végeztük el és szerkezet-hatás összefüggéseket vizsgálatunk. Ennek során az arilidén csoport szubsztituenseit (**1,2,3**) és a piperidon nitrogénjének alkilezésére használt nitroxidokat (a-h) változtattuk (1. ábra).¹



1. ábra: Paramágnesesen módosított 3,5-bisz(arilidén)-4-piperidon származékok.

A vegyületek közül az **1c** (HO-3867) bizonyult a leghatásosabbnak. A HO-3867 vegyületről bebizonyosodott, hogy igen sokoldalú. Kuppusamy professzor csoportjával együttműködve úgy találtuk, hogy STAT3 inhibitor hatásúak és a petefészek daganatok áttéteit gátolták állatkísérletes modellekben a “fatty acid synthase” és a “focal adhesion kinase” gátlásával.^{2,3,4} Erről a mesterséges kurkumin származékról az is kiderült, hogy sokkal jobb az bioabszorpciós tulajdonságai, mint a kurkuminnak, kevésbé toxikus mint a H-4073 vegyület

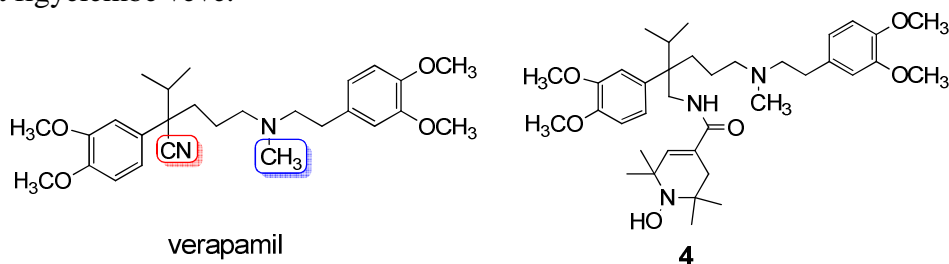
(1 és R=H)⁵, továbbá hatékonyan bizonyult a ciszplatin rezisztens rákos sejtvonalakkal szemben is.⁶ Ennek a vegyületnek további érdekes sajátsága volt, hogy kiváló kardioprotektív szer is. Egér modellen *in vivo* csökkentette a doxorubicin okozta szívkárosodást⁷ és a másodlagos pulmonáris hipertónia kialakulását is megakadályozta. Az amerikai kutatócsoport vizsgálata szerint a kurkuminszármazékhoz kapcsolt nitroxid eliminálja a peroxinitritet (2. ábra), amely a humán tüdőartéria simaizmainak proliferációjáért felelős.⁸



2. ábra: A nitroxid szerepe a peroxinitrit eliminációjában.

-Keringésre ható szerek módosítása nitroxidokkal és elővegyületeikkel

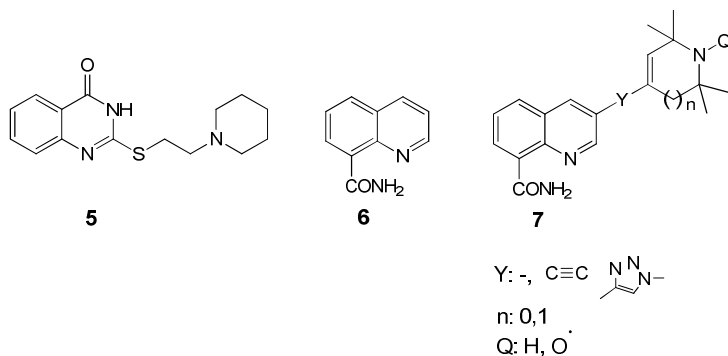
A verapamil, mint kalciumcsatorna blokkoló szívgyógyszert a 3. ábrán megjelölt csoportokon módosítottunk. Az előállított vegyületek közül a **4** származék bizonyult a leginkább hatásosnak mind a szuperoxid, mind peroxid gyökök eliminációját és a **4** vegyület toxicitását figyelembe véve.⁹



3. ábra Verapamil és módosítása nitroxid elővegyületével

-PARP inhibitorok szintézise és vizsgálata

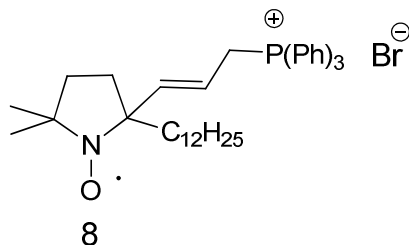
A korábban szintetizált L-2286-ról (**5**) sikerült bebizonyítani patkány állatmodellen, hogy a PARP inhibitorok ugyan nem okoztak vérnyomáscsökkenést, de a PARP enzim gátlása egyben a protein kinázok aktiválása (AKT-1, GSK-3 β , FKHR, PKC ϵ , és HSP90) és gátlása (PKC- α/β II, - ζ/λ) révén megakadályozza a hipertenzív kardiopathia kialakulását.¹⁰ Vizsgáltuk a 8-karboxamidokinolin (**6**) és a 3-as helyzetben nitroxiddal módosított 8-karboxamido kinolin (**7**) NMNG-vel és hidrogénperoxiddal szembeni védőhatását WRL-68 májsejteken. Bár **6** vegyületnél jobban védtek a paramágnesesen módosított kinolinok, az új vegyületek azonban nem érték el a korábban közölt PARP inhibitorok hatását (4. ábra).¹¹



4. ábra: PARP inhibitorok

- Mitokondriumban akkumululáló kettős hatású vegyületek szintézise

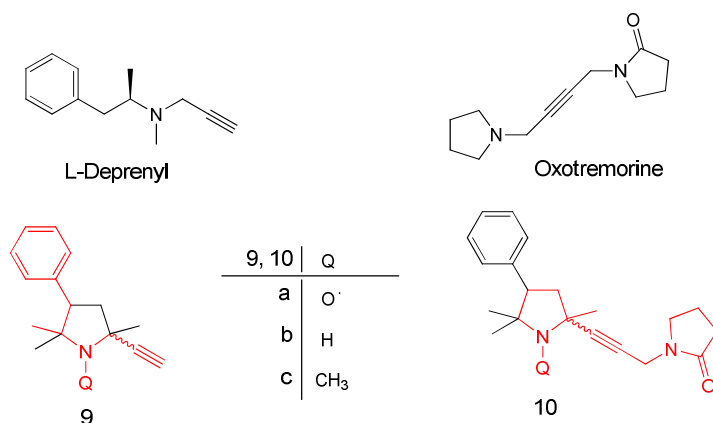
Az intézetünkben előállított, lipofil SOD-hatással rendelkező vegyületről (8) a PTE ÁOK Biokémia és Orvosi Kémiai Intézet munkatársaival együttműködve megállapítottuk, hogy mitokondriális duzzadást, a mitokondium membránpotenciáljának összeomlását idéz elő és ez által elősegíti a nekrotikus sejthalált. Ezen megfigyeléseknek a daganatos sejtek célzott elpusztításában lehet a későbbiekben jelentősége (5. ábra).¹²



5. ábra: Lipofil SOD mimetikum

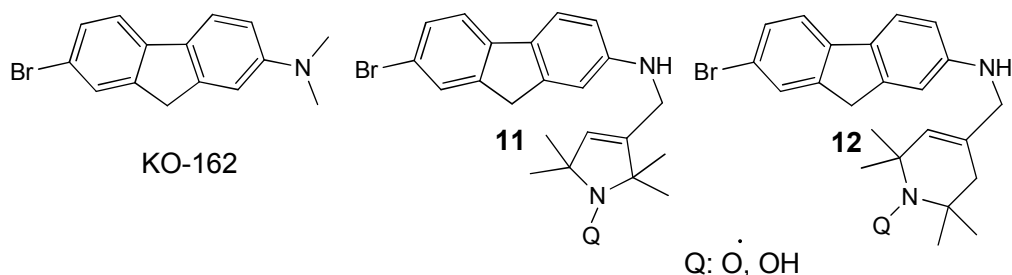
- A központi idegrendszerre ható, neuroprotektív szerek szintézise

Nitronokból Grignard-reakciók segítségével a deprenil illetve az oxotremorin paramágneses analogonjait és azok diamágneses származékait (9a, b, c, 10a, b, c) állítottuk elő. Ez új megközelítést jelent ezen típusú vegyületek szintézisében, és bár biológiai vizsgálatok nem készültek, hisszük, hogy az új vegyületek ötvözhetik a MAO-B inhibitor és az antioxidáns hatást (6. ábra).¹³



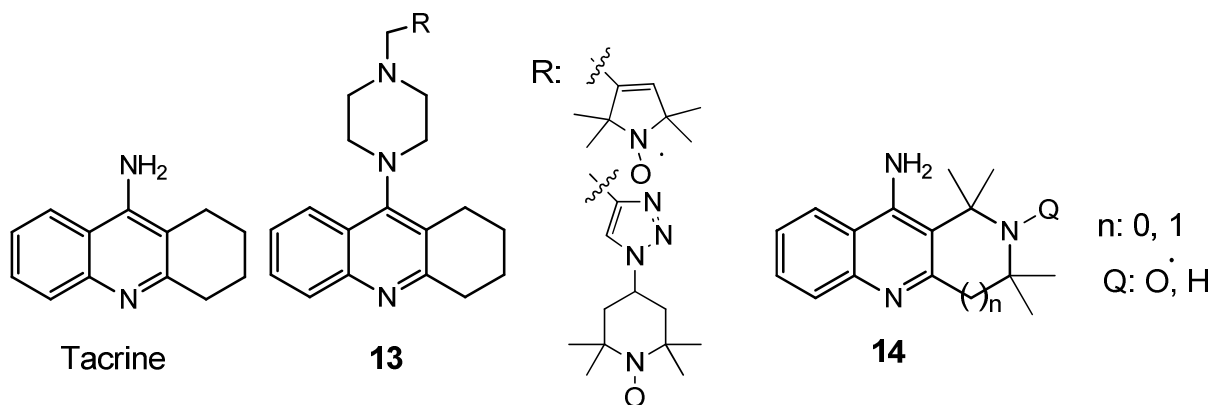
6. ábra: MAO-B inhibitorok és analogonjaik

Elkészítettük 7-brom-9-aminofluorén nitroxiddal módosított változatát. Az alapvegyületről, a 7-brom-9-dimetilaminofluorénról (KO-162) kiderült, hogy az Alzheimer kialakulásában szerepet játszó β -amyloid plakkok képződését megakadályozza, ugyanakkor ha nitroxidokkal ill. az *N*-hidroxilamin elővegyületeivel módosítjuk a fluorént akkor gyulladásgátló, oxidatív stresszt védő vegyületekhez (11,12) juthatunk, ahogy ezt John Voss kutatócsoportjával kooperálva bizonyítottuk (7. ábra).^{14,15}



7. ábra. β -amyloid plakkok képződését akadályozó vegyület (KO-162) és paramágneses analogjai.

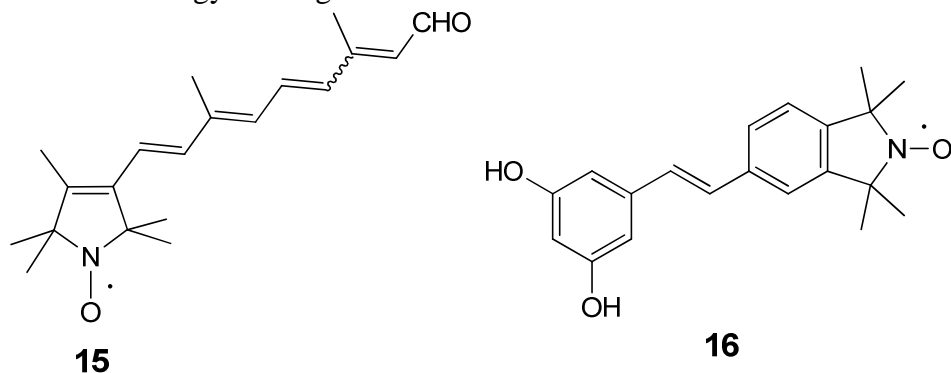
Az Alzheimer palliatív terápiájában használatos Takrin számos analogonját állítottuk elő. A University of California Davis ill. a Stanfordi Egyetem kutatóival együttműködve megállapítottuk, hogy az acetilkolinészteráz inhibíciós sajátosságokat, a ROS elimináló képességeket illetve a dokkolásos számításokat is figyelembe véve a **13** típusú vegyületek voltak hatásosak, míg a **14** típusú vegyületeknek csak ROS elimináló tulajdonságai voltak, a kolinészteráz enzimet - nem kis meglepetésünkre - nem gátolták (8. ábra).¹⁶



8. ábra: Tacrine és paramágneses analógjai

-Paramágneses antioxidáns analogonok szintézise

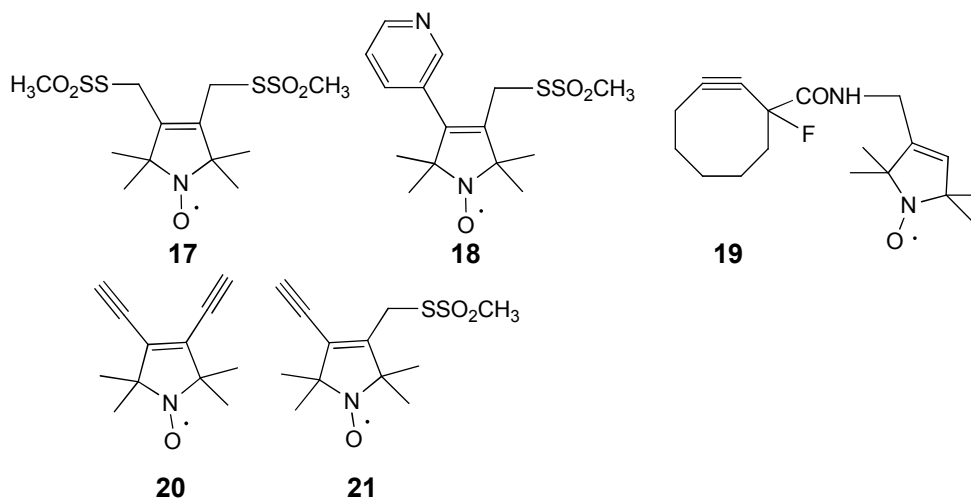
A **15** retinal származékot abból a megfontolásból szintetizáltuk, hogy hasznos lehet rodopszin ill. bakteriorodopszin szubsztrát- fehérje kölcsönhatás vizsgálatánál (9. ábra).¹⁷ Nitroxidokkal ill. elővegyületeikkel módosított rezveratrol származékokat is előállítottunk Heck- és Suzuki-keresztkapcsolási reakciókkal. Az új rezveratrol analogonokat LPS-indukált makrofág sejteken előidézett gyulladásos folyamatokkal teszteltük a PTE ÁOK Biokémia és Orvosi Kémia Intézet kutatóival együttműködésben. Azt találtuk, hogy a **16** vegyület mutatta a legjobb antioxidáns és gyulladásgátló hatást.¹⁸



9. ábra: Paramágneses retinal és rezveratrol analogonok

-Spinjelző vegyületek szintézise

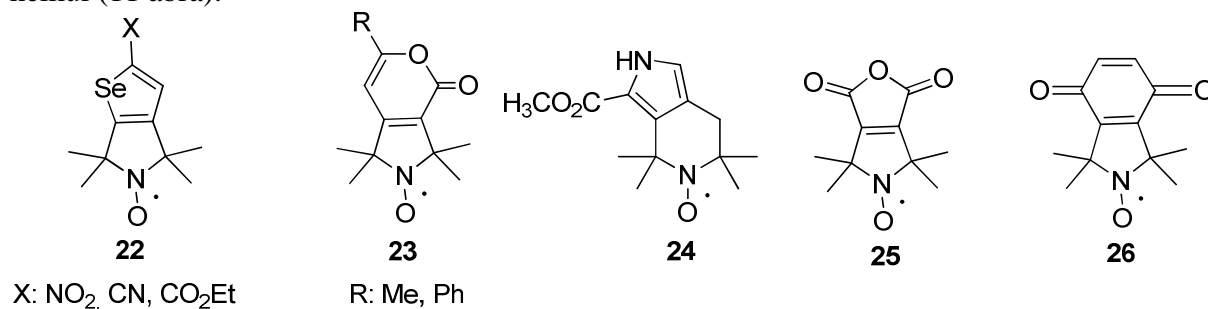
Az utóbbi években az intézetünk figyelme főleg a keresztköti spinjelző vegyületek irányába fordult. Így a csaknem 15 éve közölt¹⁹ **17** keresztköti spinjelző vegyületet csak a közelmúltban alkalmazta Prof. W. Hubbell kutatócsoportja T4 lizozim α -hélixének i. és i+3./i+4. helyre beépített cisztein pontmutánsainak módosítására. A merev spinjelzővel könnyebbé vált a távolságmérés ill. a mikroszekundumos időskálán történő fehérje konformációs változások követése.²⁰ Prof. P. Fajer tropomiozin mutánsok jelölésére és fehérjedinamikai tulajdonságainak vizsgálatára használta **17** vegyületet.²¹ Az utóbbi idők újabb fejlesztése a **18** vegyület, amely SH-specifikus spinjelzőként a piridin oldallánc miatt mozgási szabadsági fokait tekintve korlátozott, így jól alkalmazható NMR és ESR fehérjedinamikai vizsgálatokban.²² Bioortogonális spinjelölésre alkalmas, ciklooktin alapú azidospecifikus spinjelző vegyületet szintetizáltunk (**19**). Ennek alkalmazhatóságát bebizonyítottuk azidofenilalanint tartalmazó T4 lizozim mutáns fehérjén is.²³ Legutóbb Bestmann-Ohira reagens alkalmazásával sikerült keresztkötésre alkalmas spinjelző vegyületeket előállítanunk (**20, 21**) (10. ábra).²⁴



10. ábra: Új spinjelző vegyületek

- Nitroxidokkal anellált karbo- és heterociklusok szintézise

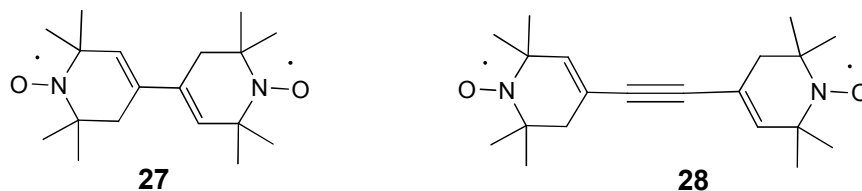
Intézetünk egyik unikális kutatási területe a pirrolinnal és tetrahidropiridinnel kondenzált karbo- és heterociklusok szintézise, amely kb. 15 éves múltra tekint vissza és a legjobb tudásunk szerint ezt a területet csak Ausztráliában művelik, de ott csak az izoindolin nitroxidok körére szorítkozik a kutatás. Ezen vegyületek jelentősége, hogy a kettőshatású vegyületek és spinjelzők szintéziséhez új építőelemként szolgálhatnak. Az utóbbi években például selenolo[2,3-c]pirrol-vázás (**22**)²⁵ tetrahidropirano[2,4-c]pirrol-vázás (**23**),²⁶ pirrolo[3,4-c]piridin-vázás (**24**)²⁷ szintézisét közöltük, továbbá leírtuk **25** anhidridet és **26** kinont is.²⁶ Utóbbit intramolekuláris metatézissel állítottuk elő, és legjobb tudásunk szerint ez volt az első leírt példa a Grubbs II katalizátor nitroxid jelenlétében történő alkalmazására, szerencsére a reakciópartnerek irreverzibilis károsodása nélkül (11 ábra).



11. ábra: Nitroxidokkal kondenzált karbo- és heterociklusok

-Biradikális vegyületek szintézise és vizsgálata

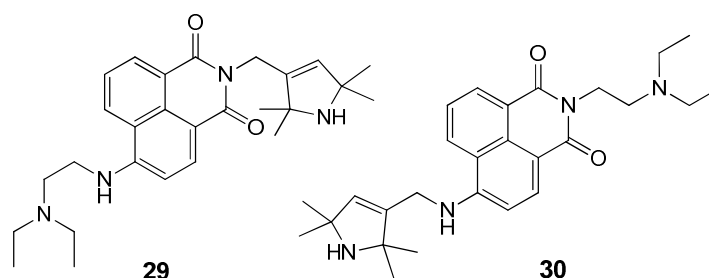
A korábban közölt **27** és **28** biradikális vegyületekről megállapítottuk orosz kutatókkal együttműködve ESR és röntgen diffrakciós mérések alapján, valamint kvantumkémiai számításokkal is alátámasztva, hogy a két biradikálisban a nitroxid csatolási állandói különböznek. Ugyanakkor a rotációs energiáját **27** esetében 19.2 kJ/mol, **28** esetében viszont csak 4 kJ/mol (12. ábra).²⁸



12. ábra: Biradikális vegyületek

-Kettősen jelölő vegyületek szintézise és vizsgálata

Naftálimid alapú kettősszenzor vegyületeket (**29**, **30**) állítottunk elő növényfiziológiai kutatások céljából (13. ábra). Megállapítottuk, hogy a **29** vegyületnek jó penetrációs tulajdonságai vannak, könnyen áthatol a kloroplasztisz membránokon, ugyanakkor az $^1\text{O}_2$ hatására csak kis fluoreszcencia csökkenés következik be. Ugyanakkor a **30** vegyület jelentős fluoreszcencia csökkenést mutat $^1\text{O}_2$ hatására, viszont a kloroplasztiszok membránján nem hatol át. Így utóbbi vegyület alkalmas lehet annak a vizsgálatára, hogy a $^1\text{O}_2$ kilép-e a kloroplasztiszokból. Eddigi vizsgálataink alapján a génregulációs változásokat nem az $^1\text{O}_2$ váltja ki közvetlenül, ahogy ezt dohánylevél modellen bizonyítottuk.²⁹



13. ábra: Naftálimid alapú kettős szenzorok

Összefoglalás

A most lezárult OTKA pályázat keretében számos biológiailag aktív molekulát (kardio- és neuroprotektív szereket, PARP inhibitorokat, antioxidánsokat, daganatellenes vegyületeket) módosítottunk nitroxidokkal és elővegyületeikkel. Az általános tapasztalat az volt, hogy a vegyületek megtartották eredeti hatásukat (pl. verapamil), ugyanakkor az alpmolekula ROS elimináló tulajdonságait javították, toxicitását csökkentették (pl. HO-3867). A legnagyobb áttörést az utóbbi vegyülettel értünk el és talán klinikai vizsgálatokra is sor kerülhet vele. Ezen túlmenően spinjelzők, biradikális vegyületek, paramágneses karbo- és heterociklusos vegyületek szintézisével is foglalkoztunk. A pályázat keretében mintegy 160 új vegyületet szintetizáltunk és az elvégzett munka során számos tapasztalatot szereztünk a nitroxidok továbbalakításai, kémiai tulajdonságaik megismerése terén. Eredményeinket 26 megjelent közleményben és egy összefoglaló közleményben³⁰ (Σ IF.: 94,15) hazai és külföldi konferenciákon ismertettük. A nitroxidok szerteágazó alkalmazási lehetőségeinek további vizsgálatához és új paramágneses vegyületek szintéziséhez kérjük a továbbiakban is az NKFI Alap támogatását kutatócsoportunk számára.

Hivatkozások

1. Kálai, T.; Kuppusamy, M. L.; Balog, M.; Selvendrian, K.; Rivera, K. B.; Kuppusamy, P.; Hideg, K. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5414-5421.
2. Selvendiran, K.; Tong, L.; Bratasz, A.; Kuppusamy, M. L.; Ahmed, S.; Ravi, Y.; Trigg, N. J.; Rivera, B. K.; Kálai, T.; Hideg, K.; Kuppusamy, P. *Mol Cancer Ther.* **2010**, *5*, 1169-1179.
3. Selvendiran, K.; Ahmed, S.; Dayton, A.; Ravi, Y.; Kuppusamy, M. L.; Bratasz, A.; Rivera, B. K.; Kálai, T.; Hideg, K.; Kuppusamy, P. *Mol Cancer Res.* **2010**, 1188-1197.
4. Rath, K. S.; Naidu, S. K.; Lata, P.; Bid, H. K.; Rivera, B. K.; McCann, G. A.; Tierney, B. J.; ElNaggar, A. C.; Bravo, V.; Leone, G.; Houghton, P.; Hideg, K.; Kuppusamy, P.; Chon, D. E.; Selvendrian, K. *Cancer Research* **2014**, *74*, 2316-2327.
5. Dayton, A.; Selvendiran, K.; Kuppusamy, M. L.; Rivera, B. K.; Meduru, S.; Kálai, T.; Hideg, K.; Kuppusamy, P. *Cancer Biol Ther.* **2010**, *10*, 1027-1032.
6. Selvendrian, K.; Ahmed, S.; Dayton, A.; Kuppusamy, M. L.; Rivera, K. B.; Kálai, T.; Hideg, K.; Kuppusamy, P. *Cancer Biology & Therapy* **2011**, *12*, 837-845.
7. Dayton, A.; Selvendrian, K.; Meduru, S.; Khan, M.; Kuppusamy, M. L.; Naidu, S.; Kálai, T.; Hideg, K.; Kuppusamy, P. *J. Pharm. Exp. Ther.* **2011**, *339*, 350-357
8. Ravi, Y.; Selvendrian, K.; Naidu, S. K.; Meduru, S.; Citro, L. A.; Bognár, B.; Khan, M.; Kálai, Z.; Hideg, K.; Kuppusamy, P.; Sai-Sudhakar, C. B. *Hypertension* **2013**, *61*, 593-60.
9. Bognár, B.; Ahmed, S.; Kuppusamy, M. L.; Selvendrian, K.; Khan, M.; Jekő, J.; Hankovszky, H. O.; Kálai, T.; Kuppusamy, P.; Hideg, K. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2010**, *18*, 2954-2963.
10. Deres, L.; Bartha, E.; Palfi, A.; Eros, K.; Riba, A.; Lantos, J.; Kálai, T.; Hideg, K.; Sümegi, B.; Gallyas, F.; Tóth, K.; Halmosi, R. *PLOS ONE* **2014**, *9*, e102148.
11. Szuroczki, P.; Kégl, T.; Kálai, T.; Sümegi, B.; Hideg, K. Synthesis and study of new PARP inhibitors modified with nitroxides and their precursors (Poster at *ICOS 20*, Budapest, 2014, June 29-July 4).
12. Szabó, A.; Balog, M.; Mark, L.; Montsko, G.; Turi, Zs.; Jr. Gallyas, F.; Sümegi, B.; Kálai T.; Hideg, K.; Kovács, K. *Mitochondrion* **2011**, *11*, 476-487.
13. P. Sár, C.; Kálai, T.; Jekő, J.; Hideg, K. *Arkivoc* **2012**, (v), 47-59.
14. Kálai, T.; Petrlova, J.; Balog, M.; Aung, H. H.; Voss, J. C.; Hideg, K. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 1348-1355.
15. Petrlova, J.; Kálai, T.; Maezawa, I.; Altman, R.; Harishchandra, G.; Hong, H. S.; Bricarello, D. A.; Parikh, A. N.; Lorigan, G. A.; Jin, L. W.; Hideg, K.; Voss, J. C. *Plos One* **2012**, *7*, e35443.
16. Kálai, T.; Altman, R.; Maezawa, I.; Balog, M.; Morisseau, C.; Petrlova, J.; Hammock, D. B.; Jin, L. W.; Trudell, J. R.; Voss, C. J.; Hideg, K. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *77*, 343-350.
17. Kálai T.; Lazsányi, N.; Gulyás-Fekete, G.; Hideg, K. *Monatshefte für Chemie* **2014**, *145*, 651-656.
18. Kálai, T.; Borza, E.; Antus, Cs.; Radnai, B.; Gulyás-Fekete, G.; Fehér, A.; Sümegi, B.; Hideg, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 7311-7317.
19. Kálai, T.; Balog, M.; Jekő, J.; Hideg, K. *Synthesis* **1999**, 973-980.
20. Fleissner, M. R.; Bridges, M. D.; Brooks, E. K.; Cascio, D.; Kálai, T.; Hideg, K.; Hubbell, W. L. *PNAS* **2011**, *108*, 16241-16246.
21. Rayes, R. F.; Kálai, T.; Hideg, K.; Geeves, M. A.; Fajer, P. G. *Plos One* **2011**, *6*, e21277.
22. Fawzi, N. L.; Fleissner, M. R.; Anthis, N. J.; Kálai, T.; Hideg, K.; Hubbell, W. L.; Clore, G. M. *J. Biomol. NMR* **2011**, *51*, 105-114.
23. Kálai, T.; Fleissner, M. R.; Jekő, J.; Hubbell, W. L.; Hideg, K. *Tetrahedron Letters* **2011**, *52*, 2747-2749.
24. Úr, Gy.; Kálai, T.; Balog, M.; Gulyás Fekete G.; Hideg, K. Synthesis of 3,4-disubstituted pyrroline nitroxides with ethynyl functional group *Monatshefte für Chemie* (közlésre előkészítve)
25. Kálai, T.; Bagi, N.; Jekő, J.; Berente, Z.; Hideg, K. *Synthesis* **2010**, 1702-1706.
26. Kálai, T.; Bognár, B.; Zsolnai, D.; Berente, Z.; Hideg, K. *Synthesis* **2012**, 3655-3660.
27. Bognár, B.; Kálai, T.; Gulyás Fekete G.; Lazsányi, N.; Hideg, K. Synthesis of Azoles Condensed with, or Linked to Nitroxides *Synthesis*, **2015** (DOI:10.1055/s-0034-1379958)
28. Gromov, O. I.; Golubeva, E. N.; Khrustalev, V. N.; Kálai, T.; Hideg, K.; Kokorin, A. I. *Appl. Magn. Reson.* **2014**, *45*, 981-992.
29. Kálai, T.; Hideg, É.; Ayaydin, F.; Hideg, K. *Photochem. & Photobiol. Sciences* **2013**, *12*, 432-438.
30. Bognár, B.; P. Sár, C.; H. Hankovszky, O.; Kálai, T.; Hideg, K. *Magyar Kémiai Folyóirat* **2013**, *119*, 80-87.