



**Természetes eredetű, potenciálisan biológiailag aktív *O*- és *C*-
prenilezett flavanonok szintézise**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Kenéz Ágnes

Témavezető: Prof. Dr. Antus Sándor

**Synthesis of naturally occurring *O*- and *C*-prenylated flavanones
with potential biological activity**

PhD theses

Ágnes Kenéz

Supervisor: Prof. Dr. Sándor Antus

Debreceni Egyetem
Természettudományi Kar
Debrecen, 2007

1. Az értekezés előzményei és célkitűzései

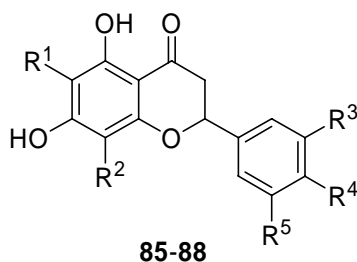
A flavonoidok a növényvilág azon fenolos komponensei közé tartozó *O*-heterociklusos vegyületek igen elterjedt csoportját alkotják, amelyek difenilpropán vázat (C₆-C₃-C₆) tartalmaznak. Nemcsak a növények változatos színvilágának kialakításában vesznek részt, de sokrétű biológiai aktivitásuk révén az emberi szervezetre is jótékony hatást gyakorolnak. Csoportosításuk nagy számuk és változatos szerkezetük miatt többféle szempont szerint történhet. A flavonoidok legjelentősebb képviselői közé tartoznak a flavanonok, a flavanonolok, a flavonok, a flavonolok és az antocianidinek.

A természetben elterjedt flavanonok általában alkil oldalláncot, főként metil-, prenil-és geranil-egység(ek)et hordoznak vagy a gyűrűhöz (*C*-alkil) vagy hidroxil csoporthoz (*O*-alkil) kapcsolva. Ezen csoportok változatos szubsztitúciója révén nagyszámú természetes flavanonszármazék létezik. Az izolált származékok szerkezetfelderítése mellett számos esetben a szerkezetbizonyító szintézist is megoldották, valamint a biológiai aktivitással is rendelkező flavanonok körében hatás-szerkezet összefüggésekre irányuló vizsgálatok is készültek.

A prenilcsoporttal és annak gyűrűzáródásával képződő, 2,2-dimetil-2*H*-pirán struktúrával rendelkező természetes flavanonok túlnyomó része *C*-prenilezett származék, melyek többsége sokrétű biológiai aktivitással is jellemezhető. Legtöbbjükre a flavonoidvázból eredő antioxidáns hatás a jellemző, de több közleményben számolnak be számottevő antibakteriális, antivirális, tumorelles, antifungális, anti-HIV aktivitásról valamint enzimműködést befolyásoló hatásról is.

Doktori munkámban a *Monotes engleri* növény diklórmétanos extraktumából izolált 4 prenilezett flavanon (**85-88**) szintézisét és hatás-szerkezet összefüggések vizsgálatához szükséges analogonok előállítását tűztük ki célul. Értekezésemben ezen *O*- és *C*-prenilezett flavanonok szintéziséről

valamint különböző *Candida* fajokon tanulmányozott antifungális hatásukról számolok be.



1. Táblázat: *Monotes engleri*-ből izolált flavanonok

	Név	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
85	Selinone	H	H	H	OPre	H
86	Monotesone A	H	H	OH	OPre	H
87	Lonchocarpol A	Pre	Pre	H	OH	H
88	Monotesone B	Pre	Pre	OH	H	OH

Pre =

2. Az alkalmazott vizsgálati módszerek

Szintetikus munkánk során a modern preparatív szerves kémia makro-, félmikro- és mikromódszereit egyaránt alkalmaztuk. A reakciók követésére, az anyagok tisztaságának ellenőrzésére vékonyréteg kromatográfiát, míg a reakcióelegyek tisztítására a klasszikus és flash oszlopkromatográfiát, preparatív vékonyréteg kromatográfiát valamint kristályosítást használtunk. Az előállított vegyületeink karakterizálására, azonosítására és szerkezetük igazolására a hagyományos analitikai eljárások (elemanalízis, olvadáspont, és fajlagos forgatóképesség meghatározása) mellett rutinszerűen alkalmaztuk a modern tömegspektrometriát, IR, egydimenziós NMR spektroszkópiai módszereket.

Vegyületeink antifungális hatásának vizsgálatát a Debreceni Egyetem Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszékén végeztük, különböző *Candida* fajokon agardiffúziós módszerrel. Sabouraud-dextróz (SDB) tápoldatban 37 °C-on 18 óráig tenyésztett élesztősejteket 1% agar tartalmazó SDA-ban (Sabouraud-dextróz-agar) szuszpenzáltunk (végső sejtkoncentráció: 3 x 10⁶ sejt/mL) és szilárd agarlemezre öntöttük. A vizsgálandó anyagokat 70%-os etanol és 1,5 térfogat% DMSO keverékében feloldottuk (c = 10, 25, 50 és 100

$\mu\text{g/mL}$), és az oldószer vakmintájával valamint a kontrollként alkalmazott nystatin illetve flukonazol mintáival együtt 24-48 órán át inkubálva teszteltük az antifungális hatásukat.

3. Az értekezés új tudományos eredményei

A dolgozatban természetes eredetű, potenciális antifungális hatással rendelkező természetes *O*- és *C*-prenilezett flavanonszármazékok és analogonjaik szintézisét mutatjuk be, valamint hatás-szerkezet összefüggéseket feltáró farmakológiai vizsgálataik eredményeiről számolunk be.

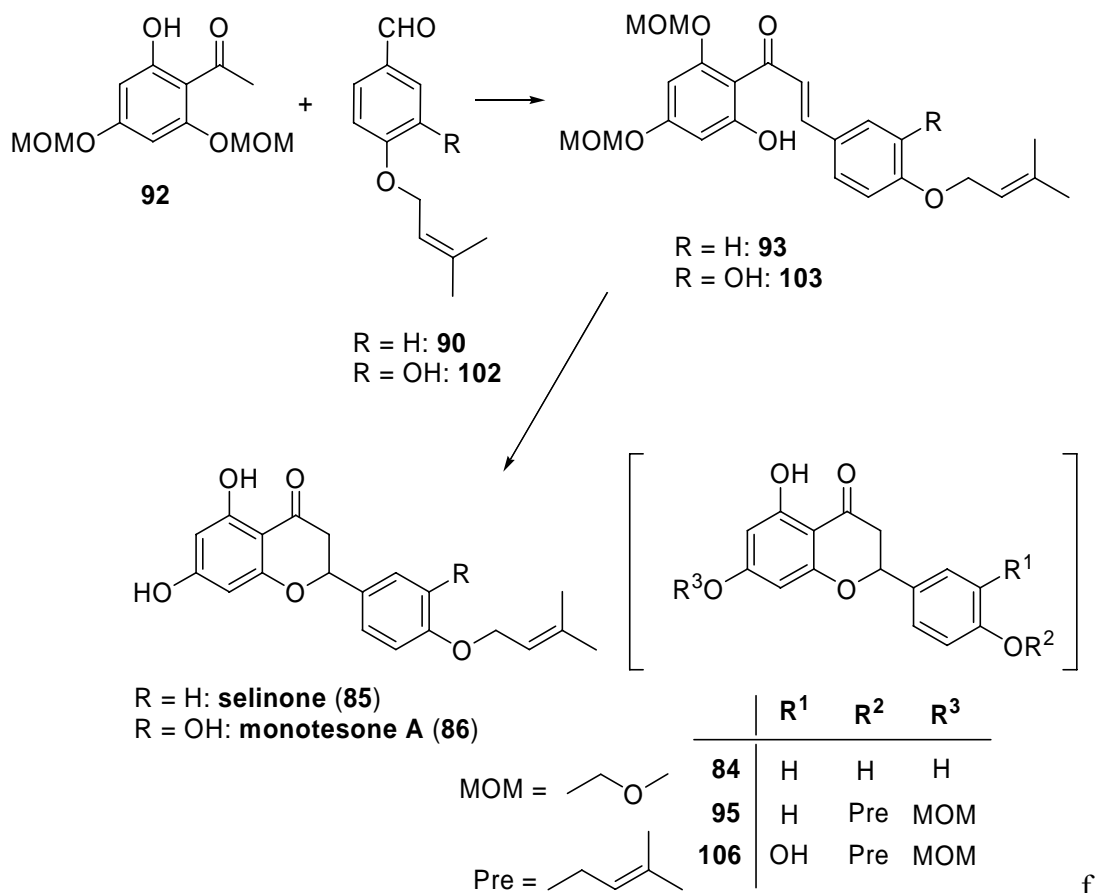
3.1. *O*-prenilezett flavanonok szintézise

3.1.1. Racém selinone, monotesone A valamint analogonjaik szintézise

A már korábban is ismeretes selinone racemátjának szintézisét elsőként Wagner és mtsai valósították meg a nehezen hozzáférhető floracetofenon 4-*O*- β -neohesperidozidból kiindulva. A klasszikus kalkonképzés-gyűrűzárás szekvencia során fellépő veszteségek, valamint a cukorrész nehézkes lehasítása miatt ez a módszer preparatív szempontból nem túl hatékony, így célszerűnek láttuk új szintézisút kidolgozását. Két módszert is kidolgoztunk és a hatékonyabb utat kiterjesztettük az új *O*-prenilezett flavanonszármazék (a monotesone A és analogonjai) szintézisére is.

Az első módszer során a megfelelő prenilezett benzaldehydekek és a metoximetil csoportokkal részlegesen blokkolt floracetofenon Claisen-Schmidt reakciójába képződő kalkonokból „védőcsoport-hasítás-gyűrűzárás” szekvenciával kívántuk a két természetes flavanonszármazékot előállítani. Ezen próbálkozásunk nem vezetett sikerre, mivel a védőcsoportok savas hidrolízissel történő lehasítása során fellépő problémák miatt a (\pm)-selinone-t csak igen szerény hozammal [(\pm)-**85**] (13%), a monotesone A esetében pedig csak annak 7-metoximetil-éterét (**106**) (55%) sikerült izolálnunk (**1. ábra**).

1. Módszer



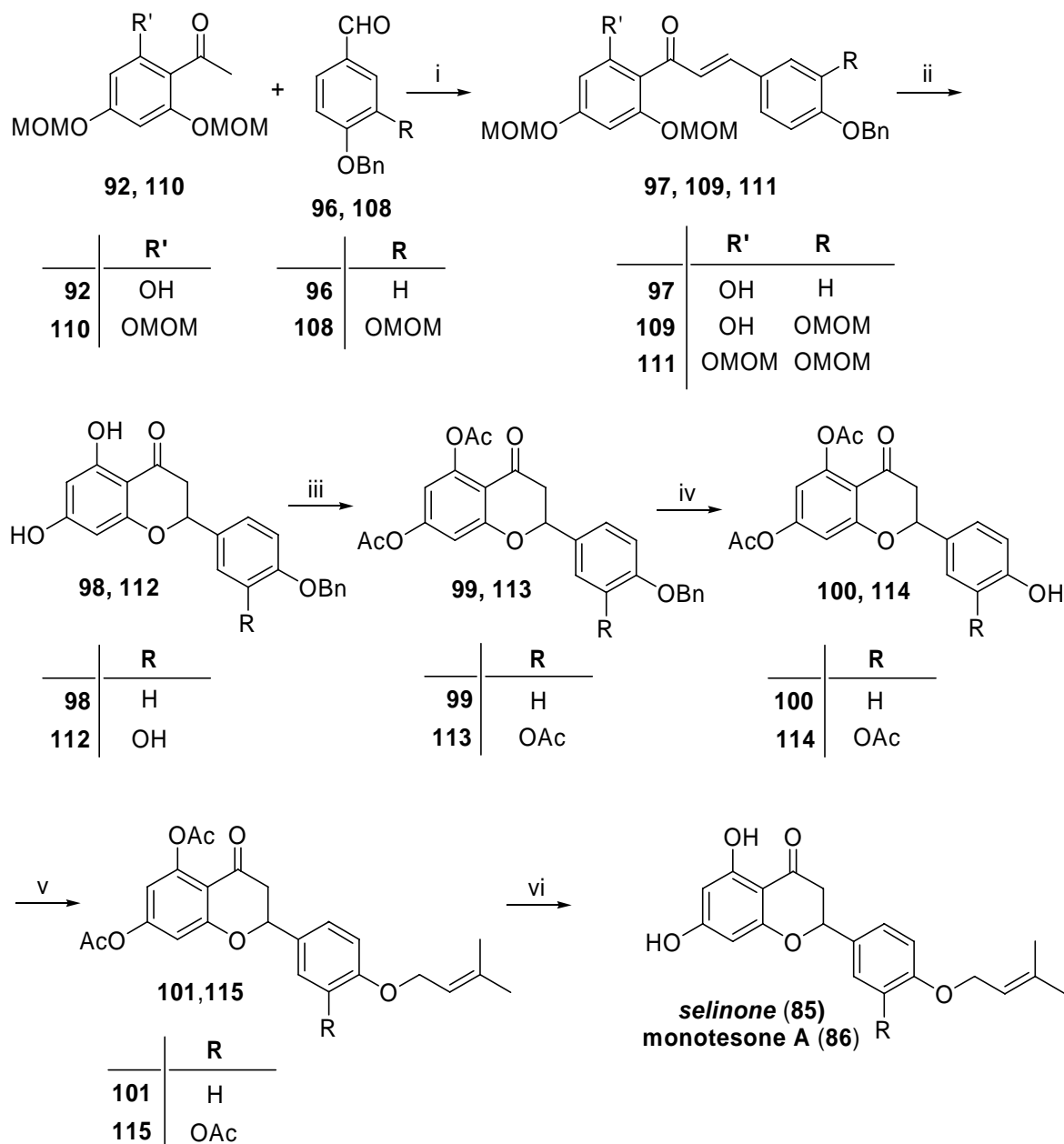
1. ábra

Védőcsoport stratégiánkat megváltoztatva, a második szintézisúton a prenilcsoport kiépítését a flavanonvázon, Mitsunobu körülmények között valósítottuk meg (**2. ábra**). Ennek érdekében a megfelelő benzaldehyde négyes helyzetű hidroxilcsoportját benzil védőcsoporttal védtük, amely a kalkonkapcsolás és a megfelelő hidroxiflavanon előállítása során mind savas mind lúgos közegben során stabil maradt. A peracetilezett flavanonszármazékokról katalitikus hidrogénezéssel távolítottuk el a benzilcsoportot, és az így kapott szabad hidroxil funkcióra Mitsunobu körülmények között vezettük be a prenil csoportot. Az így nyert peracetátok Zemplén-féle elszappanosítása után sikeresen izoláltuk a kívánt selinone [(±)-

85] és monotesone A [(±)-**86]** racemátjait, melyek spektroszkópai adatai jó egyezést mutattak a természetes származékokéval.

A selinone balra- és jobbraforgató enantiomerjeinek [(-)-**85**, (+)-**85]** szintézisét is megkíséreltük, ezen törekvéseink jelenleg is folyamatban vannak.

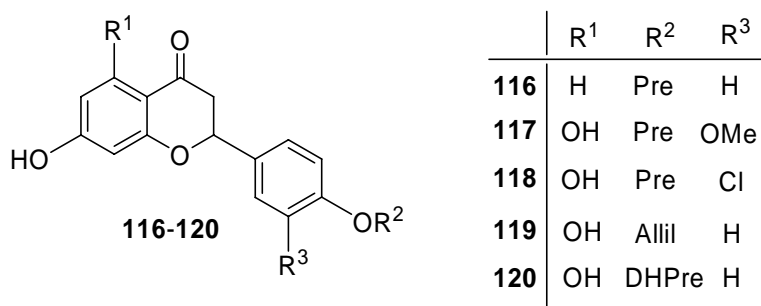
2. Módszer



i: KOH, etanol/25°C, ii: 1. 10%-os HCl, metanol/Δ 2. NaOAc, metanol/Δ; iii: Ac₂O, vízm. piridin/25°C; iv: H₂-Pd/C, metanol/25°C; v: 3-metilbut-2-én-1-ol, Ph₃P, DIAD, vízm.. THF/25°C; vi: NaOMe, vízm. metanol/25°C

2. ábra

A farmakológiai vizsgálatokhoz különbözően szubsztituált selinone és monotesone A analogonokat (**116-120**) állítottunk elő a fent említett módszerekkel (**3. ábra**).



3. ábra: Selinone és monotesone A analogonok

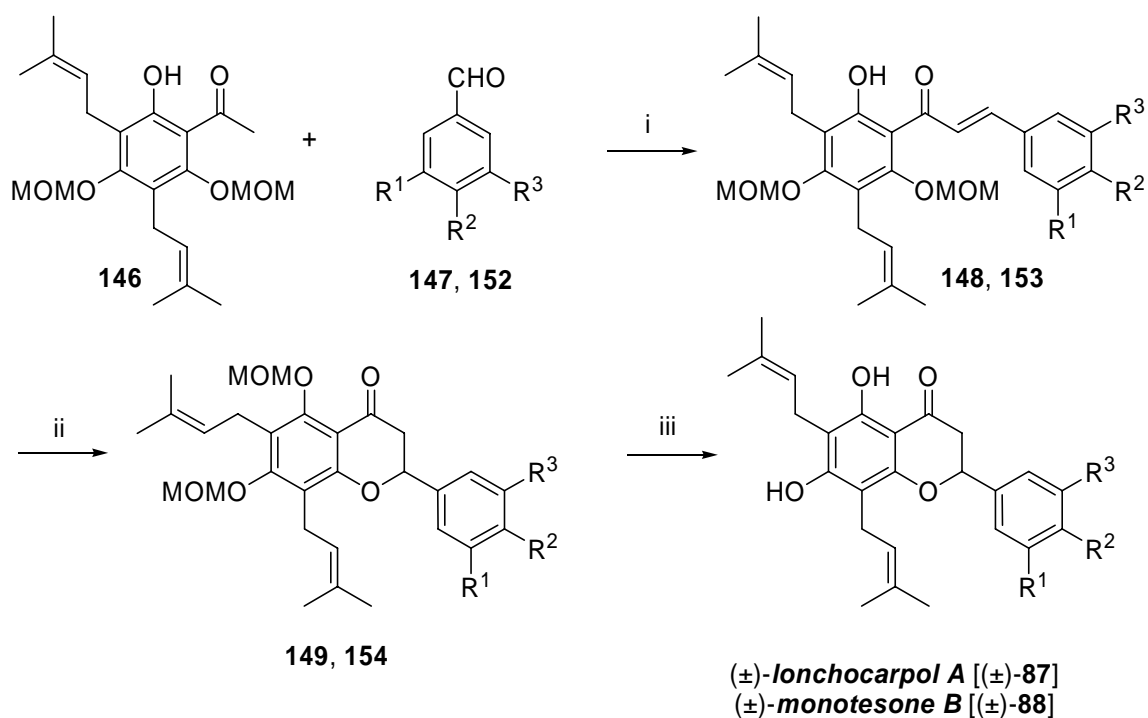
3.2. C-prenilezett flavanonok szintézise

3.2.1. Racém lonchocarpol A, monotesone B valamint analogonjaik szintézise

Hostettmann kutatócsoportja az *O*-prenilezett flavanonok, a racém selinone [(±)-**85**] és a (-)-monotesone A [(-)-**86**] mellett két *C*-prenilezett származékot, a már ismert lonchocarpol A [(±)-**87**] és az új monotesone B [(±)-**88**] racemátját izolálta. Mivel a lonchocarpol A mutatott némi antifungális hatást a *Candida albicans*-sal szemben valamint más tanulmányok is potenciális antifungális hatású anyagként említik, a hatás-szerkezet összefüggéseket feltáró farmakológiai vizsgálataink teljessé tételéhez megvalósítani ezen származékok és analogonjaik szintézisét is.

Szintézisünk kiindulási anyagai a floracetofenon és a szerkezetnek megfelelő benzaldehid származékok voltak. A floracetofenon *C*-prenilezését a Xiao [103] által leírt körülmények között végeztük, majd az így kapott 3,5-diprenilszármazék hidroxilcsoportjait részlegesen metoximetil csoporttal blokkoltuk. E származék (**146**) és a metoximetil csoportokkal védett benzaldehydekek (**147**, **152**) lúgos közegben történő Claisen-Schmidt reakciója a megfelelő kalkonokat szolgáltatta. E kalkonok gyűrűzárásával a megfelelő

flavanonokat kaptuk, melyek védőcsoportjait meglepő módon egyszerű savas hidrolízissel a molekula roncsolása nélkül nem tudtuk eltávolítani. A metoximetilcsoportok lehasítását a kutatócsoportunk által korábban is használt körülmények között; $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -tal, dimetilszulfid jelenlétében valósítottuk meg (4. ábra). Az így nyert C-prenilezett származékok spektroszkópai adatai jó egyezést mutatottak az izolált származékokéval.



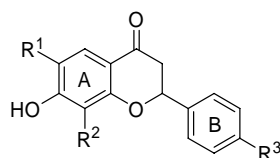
	R ¹	R ²	R ³
147	H	OMOM	H
148	H	OMOM	H
149	H	OMOM	H
152	OMOM	H	OMOM
153	OMOM	H	OMOM
154	OMOM	H	OMOM

	R ¹	R ²	R ³
87	H	OH	H
88	OH	H	OH

i: etanol, 50%-os KOH-oldat, 0 °C ii: NaOAc, etanol-víz/ Δ ; iii: $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, Me_2S , vízmentes CH_2Cl_2

4. ábra

A farmakológiai vizsgálatokhoz előállított analogonok (155-160) többsége a természetben is előforduló különbözően szubsztituált C-prenilezett származék, melyek szintézisét rezacetofenonból és a megfelelő benzaldehidekből kiindulva a fentiekhez hasonlóan végeztünk.



155-160	Triviális név	R ¹	R ²	R ³
155	bavachin	Pre	H	OH
156	izobavachin	H	Pre	OH
157	-	Pre	Pre	OH
158	-	Pre	H	H
159	Ovaliflavanon B	H	Pre	H
160	Ovaliflavanon A	Pre	Pre	H

5. ábra: Lonchocarpol A és monotesone B analogonok

3.3. Farmakológiai vizsgálatok eredményei

Hostettman és mtsai a selinone racemátját [(±)-**85**] találták a leghatásosabbnak (MIC: 10 µg/ml) a *Candida albicans*-sal szemben, míg a (-)-monotesone A [(-)-**86**] antifungális hatása (MIC: 20 µg/ml) kissé elmaradt e mögött. A C-prenilezett flavanonok közül csak a monotesone B [(±)-**88**] esetében írtak le némi aktivitást (MIC: 50 µg/ml).

Az általunk előállított természetes eredetű O- és C-prenilezett flavanonszármazékokat (**85-88**) és analogonjaikat (**116-120**, **155-160**) különböző *Candida* fajokon teszteltük, mely vizsgálatok eredményeit az 2. táblázatban foglaltuk össze. E táblázat adataiból egyértelműen kitűnik, hogy számottevő fungisztikus hatást a racém selinone [(±)-**85**] és a monotesone A [(±)-**86**] esetében tapasztaltunk, melyek szelektíven csak a *Candida albicans* (ATCC 10231) ellen bizonyultak hatásosnak és a többi *Candida* fajra nem mutattak aktivitást. A C-prenilezett természetes flavanonszármazékok, a racém

lonchocarpol A [(±)-**87**] és a monotesone B [(±)-**88**] valamint analogonjaik racémátjai (**155-160**) esetében egyik fajnál sem tapasztaltunk gombaellenes aktivitást. A gombaellenes hatást mutató vegyületek, az *O*-prenilezett származékok, a (±)-selinone [(±)-**85**] és a (±)-monotesone A [(±)-**86**] analogonjainak tesztjei során egyértelműen kiderült, hogy a fungisztikus hatásért a racém selinone [(±)-**85**] szerkezete felelős. Ugyanis a 3'-helyzetben további hidroxilcsoportot tartalmazó racém monotesone-A [(±)-**86**] már jóval kisebb fungisztikus hatást mutatott a *Candida albicans*-sal (ATCC 10231) szemben. Megállapítottuk, hogy a preniloxi csoport módosítása (**119, 120**), az 5-hidroxi csoport hiánya (**116**) illetve a B-gyűrű szubsztituenseinek változtatása (**117, 118**) mind a fungisztikus hatás teljes megszűnését okozza.

2. Táblázat: A nystatin, flukonazol, a (±)-selinone [(±)-**85**], a (±)-monotesone A [(±)-**86**] és analogonjaik (**116-120**) biológiai aktivitásának vizsgálata agardiffúziós módszerrel. (Gátlási zóna: mm, mintakoncentráció: 100 µg/mL)
 Ca1 = *Candida albicans* (14053), Ca2 = *Candida albicans* (ATCC 10231), Ci = *Candida inconspicua*, Cd = *Candida dubliniensis* és Ck = *Candida krusei*.

Kód	Ca1	Ca2	Ci	Cd	Ck
nystatin	27	28	26	28	27
flukonazol	22	23	24	23	22
85	0	12	0	0	0
86	0	10	0	0	0
116	0	0	0	0	0
117	0	0	0	0	0
118	0	0	0	0	0
119	0	0	0	0	0
120	0	0	0	0	0

4. Publikációs lista/List of publications

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények/Papers related to the dissertation

1. Kenéz Á., Juhász L., Antus S.: „A simple synthesis of selinone, an antifungal component of *Monotes engleri*” *Heterocyclic Communications*, **8**, (6) 543-548 (2002)
2. Kenéz Á., Antus S.: „First Synthesis of (±)-Monotesone B and New Syntheses of (±)-Lonchocarpol A and (±)-Bavachin” *Natural Product Communications* **1**, (1) 51-55 (2006)
3. Á. Kenéz, Zs. Lestár, B. Lenkey, S. Antus: „Synthesis and structure-activity relationship study of monotesone-A, an antifungal component of *Monotes engleri*” (közlésre elfogadva/accepted for publication) *Natural Product Research* (2007)

Tudományos rendezvényeken bemutatott munkák/Lectures and posters presented at conferences and meetings

Előadások/Lectures

1. Kenéz Ágnes, Juhász László, Antus Sándor: *Monotes engleriből* izolált, antifungális hatású, *O-prenilezett* flavonoidok szintézise (*Gyógynövények kutatása és felhasználása 2002*; Kecskemét, 2002. november 13-15.)
2. Kenéz Ágnes, Juhász László, Antus Sándor: *Monotes engleriből* izolált, antifungális hatású, *prenilezett* flavonoidok szintézise (*MTA Flavonoidkémiai Munkabizottság Tudományos Előadóülése*, Budapest, KKKI, 2003. december 3.)

Posztterek/Posters

1. Á. Kenéz, L. Juhász, S. Antus: Simple Synthesis of *Selinone*, an Antifungal Component of *Monotes Engleri* (9th Blue Danube Symposium on Heterocyclic Chemistry; Tatranská Lomnica / Slovak Republic 2002.)
2. Kenéz Á., Juhász L., Antus Sándor: Antifungális hatású *monotesone-A* szintézise (*Vegyészkonferencia 2003*, Hajdúszoboszló, 2003. június 26-28.)
3. Kenéz Á., Lestár Zs., Lenkey B., Antus S.: Prenilezett flavanon származékok szintézise és gombaellenes hatásuk vizsgálata (*Vegyészkonferencia 2005*, Hajdúszoboszló, 2005, június 28-30.)
4. Á. Kenéz, Zs. Lestár, B. Lenkey, S. Antus: Synthesis of prenylated flavanone derivatives and study of their antifungal activity (11th Blue Danube Symposium on Heterocyclic Chemistry, Brno/Czech Republic 2005. aug.28-szept.1.)