

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**Antibiotikum analógok és származékok előállítása
Diels–Alder cikloaddíciós reakciók segítségével**

Fejes Zsolt

Témavezető: Dr. Herczegh Pál



DEBRECENI EGYETEM
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2010

Témavezető:

Prof. Dr. Herczegh Pál, az MTA doktora

Doktori iskola:

Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A szigorlati bizottság elnöke:

Prof. Dr. Tószaki Árpád, az MTA doktora

A szigorlati bizottság tagjai:

Prof. Dr. Kövér Katalin, az MTA doktora

Dr. Kovács Imre, kandidátus

A védési bizottság elnöke:

Prof. Dr. Tószaki Árpád, az MTA doktora

Opponensek:

Dr. Berényi Sándor, kandidátus

Dr. Agócs Attila, Ph.D.

A védési bizottság tagjai:

Prof. Dr. Kövér Katalin, az MTA doktora

Dr. Kovács Imre, kandidátus

A védezés helye és ideje:

DE OEC Egyetemi Gyógyszertár előadóterme

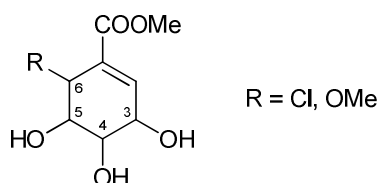
2011. február 18., 13:00

I. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A Diels–Alder cikloaddíció felfedezése óta rendkívüli jelentőségre tett szert a szerves kémiában. Ennek oka elsősorban az, hogy egyre több olyan, főként természetes eredetű biológiailag aktív vegyületet írnak le, melyek többgyűrűs szerkezeti elemeinek felépítésére a szén–szén kötés kialakítására és heterociklusok előállítására alkalmas Diels–Alder reakció kiválóan megfelel. Igen fontos szempont, hogy a cikloaddíció során egy lépésben akár négy kiralitáscentrum is keletkezhet. Segítségével szintetizáltak már szteránvázás vegyületeket, alkaloidokat és sok más egyéb természetes molekulát. A reakció egyre nagyobb számban képezi tárgyát az elméleti kémiával foglalkozó közleményeknek is, melyek elősegítik a reakció természetének jobb megismerését és lehetővé teszik annak a szintetikus kémiában történő optimális felhasználását. A Diels–Alder reakció az élő szervezetekben is végbemehet (Diels–Alderázok által), erre számos másodlagos metabolit szerkezete enged következtetni.

Doktori disszertációm két fő részre tagolódik, közös elemük a Diels–Alder cikloaddíciók alkalmazása. Az első részben célom Diels–Alder cikloaddíció segítségével a perikozin antibiotikumok áthidalt gyűrűs analógjának előállítása volt egy potenciálisan biológiailag aktívabb vegyület létrehozásának céljából.

A perikozinok (**1. ábra**) természetes eredetű ciklohexénvázás vegyületek, melyek *in vitro* körülmények között citotoxikus hatást mutatnak patkányból izolált P388 limfocitás leukémia sejtekben. A perikozin A (**1. ábra**, R=Cl, 3*S*,4*S*,5*S*,6*S* konfiguráció) *in vivo* is hatásos, ezenkívül a HBC-5 és SNB-75 emberi tumorsejtek növekedését is szelektíven gátolja.



1. ábra: a perikozinok általános szerkezeti képlete

A dolgozat második részében polién makrolid antibiotikumok hetero-Diels–Alder reakcióban való részvételét, s az addíció regioszelektivitását vizsgáltam.

A poliének [4+2] típusú cikloaddíciói a kifejezetten kevésbé tanulmányozott reakciók körébe tartoznak, a gyűrűs poliének, mint például a polién makrolidok cikloaddícióit pedig még egyáltalán nem vizsgálták. A polién makrolidok jelenleg a gombás fertőzések elleni küzdelemben alkalmazott antibiotikumok közül a legfontosabbak. Szerkezetileg egy makro-

lakton gyűrű jellemzi őket, mely Diels–Alder reakcióra alkalmas 3–8 konjugált szén-szén kettőskötést tartalmaz.

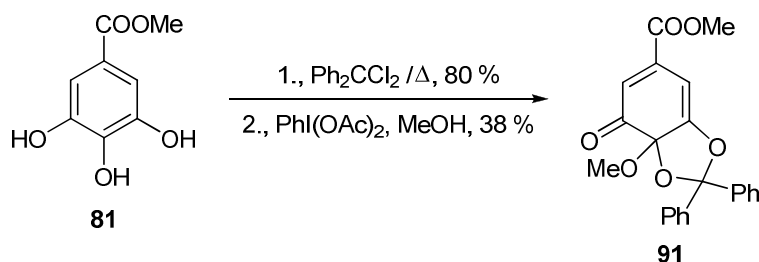
II. ALKALMAZOTT KÍSÉRLETI ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

A szintetikus munka során preparatív szerves kémiai módszereket alkalmaztam. A reakciók követésére, a vegyületek tisztaságának ellenőrzésére vékonyréteggromatográfiát, használtam, a nyerstermékek tisztítására flash oszlopkromatográfiát alkalmaztam. Az előállított vegyületek szerkezetének meghatározása egy- és többdimenziós (^1H – ^1H COSY, ^{13}C – ^1H HSQC, NOESY) NMR spektroszkópia, UV-látható spektroszkópia, CD spektroszkópia és röntgendiffrakció, valamint MALDI-TOF és ESI-TOF tömegspektrometria segítségével történt. A vegyületek jellemzésére emellett alkalmaztam olvadáspont- és fajlagos forgatóképességmérést is.

III. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

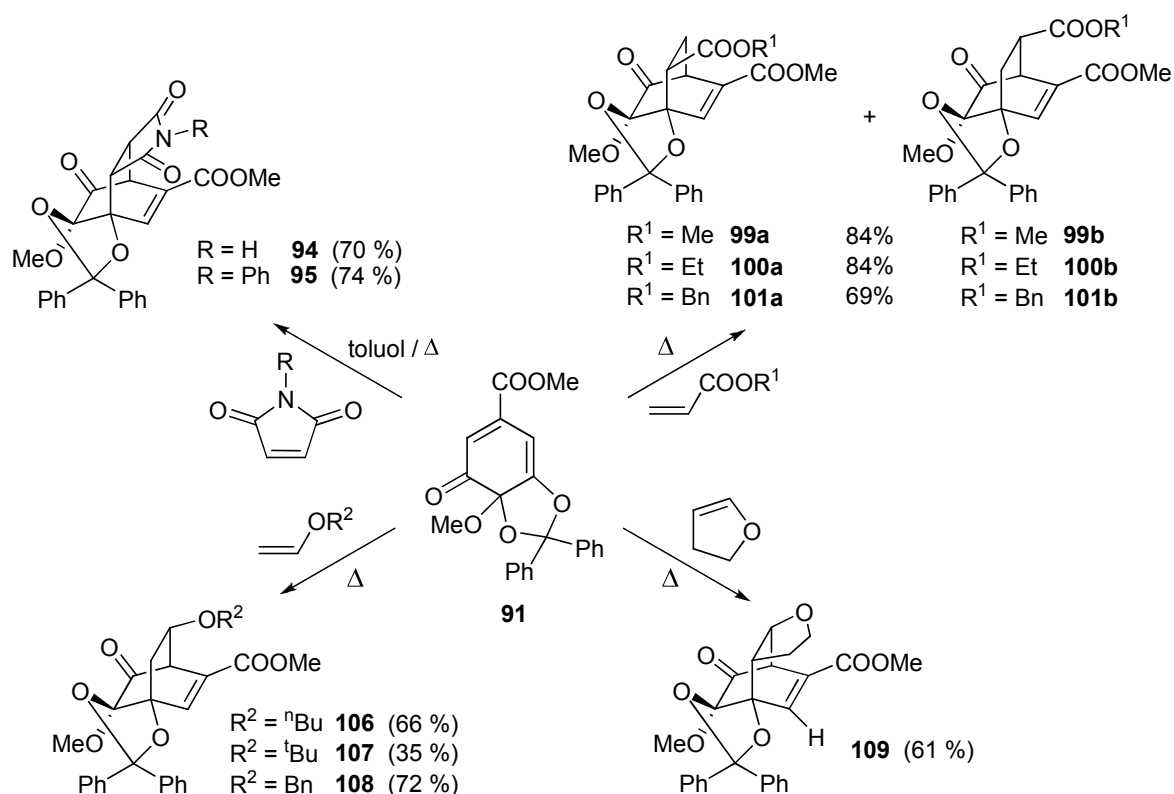
III.1. Egy új, áthidalt gyűrűs perikozin analóg előállítása

A perikozin analóg előállítását egy egyszerű, akirális vegyületből, a metil-gallátból (**81**) kiindulva valósítottam meg. A kiindulási vegyület kiválasztásakor annak egyszerű szerkezete és könnyű elérhetősége mellett a szubsztituenseket tekintve a perikozinokkal való analógia játszott szerepet. A szintézis egyik kulcslépését, a dezaromatizációt **81** védett származékán hajtottam végre, az oxidáció a **91**-es racém ciklohexadién származékot eredményezte (**2. ábra**).



2. ábra: **81** oxidatív dezaromatizációja

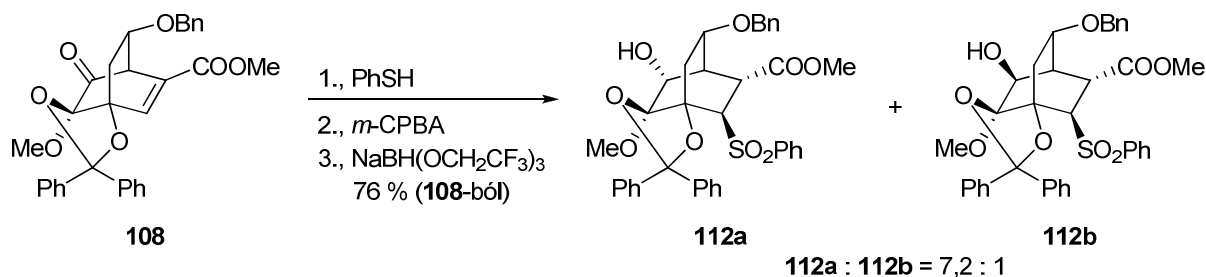
91 szubsztituenseinek elektronos tulajdonságait figyelembe véve normál és inverz elektronszükségletű Diels–Alder cikloaddíciókban is részt vehet. Ennek igazolására elektronban szegény és gazdag dienofilekkel is képeztem **91**-ből adduktumokat (**94**–**109**, **3. ábra**), s kvantumkémiai számításokkal megállapítottam a reakciók elektronszükségletét.



3. ábra: **91** Diels–Alder reakciói

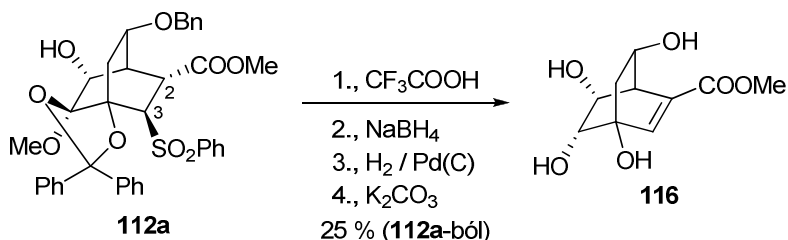
Az inverz reakciókban képződött termékek mindegyike ellentmondott a Houk-szabálynak, azaz nem a várt regioizomer keletkezett. A **108**-as adduktumon végzett elméleti számításokkal egy másodlagos kötőerőt fedeztünk fel, mely a szabálytól való eltérést okozhatja.

A **108**-as köztitermékben hét lépéssel előállítottam egy áthidalt gyűrűs perikozin analógot. **108** szén-szén kettőskötésének védelme tiofenol sztereoszelektív konjugált addíciójával, s az így kapott tioéter oxidációjával történt. Az oxocsoport redukcióját végrehajtva jutottam a **112a** és **112b** diasztereomerekhez (4. ábra), melyeket szétválasztottam. A jó sztereoszelektivitás és reprodukálhatóság érdekében az oxocsoport redukciójára többféle reagenst ($NaBH_4$, $LiBH_4$, $BH_3 \cdot DMS$, $NaBH_3CN$, $NaBH(OAc)_3$, $NaBH_4/CeCl_3$, $NaBH(OCH_2CF_3)_3$) is kipróbáltam. **112b** szerkezetét röntgendiffrakciós méréssel igazoltam.



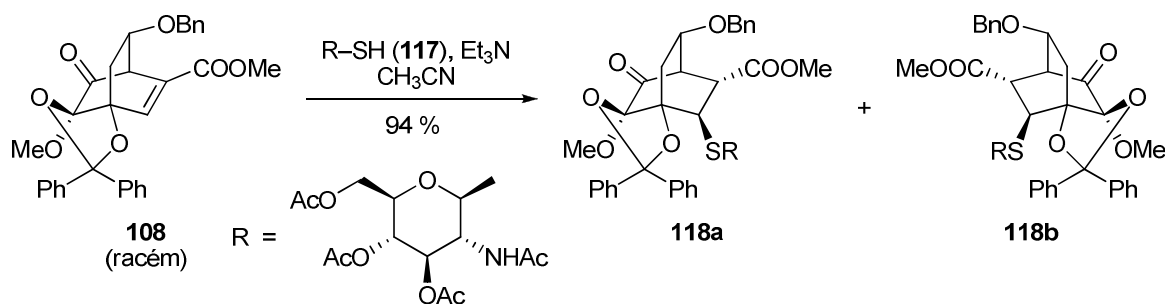
4. ábra

112a-t acetálszerkezetét savasan elhidrolizálva, a keletkező α -hidroxiketon NaBH_4 -tal történő sztereoszelektív redukciójával, a benzilcsoport katalitikus hidrogénezéssel történő eltávolításával, majd a fenilszulfonil-csoport bázikus eliminációjával jutottam a tervezett áthidalt gyűrűs perikozin analóghoz (**116**) (**5. ábra**). **116** többféle sejtvonalon (HeLa, HEL, CRFK, MDCK, Vero) sem mutatott citotoxikus hatást.



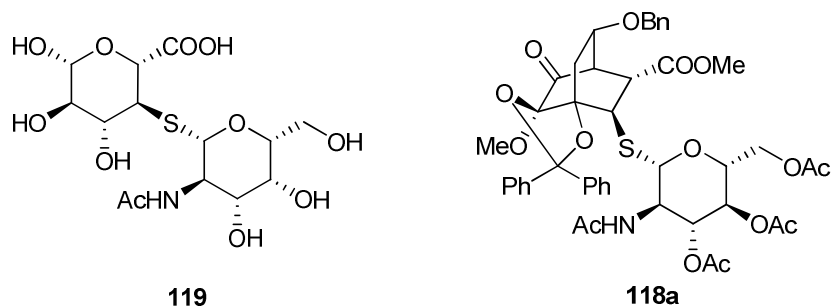
5. ábra

116 enantiomertiszta formájának előállítása céljából a **108**-as racém Diels–Alder adduktumot egy királis, enantiomertiszta tiocukorral (**117**) reagáltatva jutottam el a **118a** és **118b** diasztereomerekhez (**6. ábra**), melyeket egymástól elválasztottam.



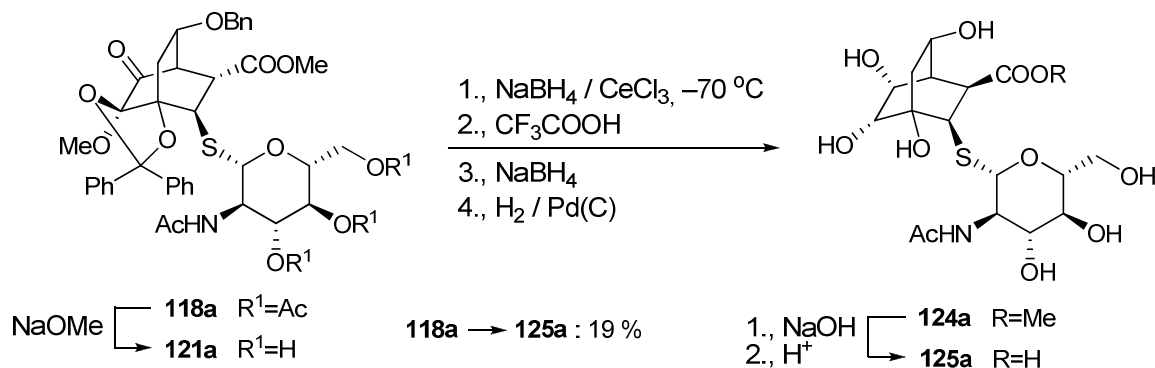
6. ábra

Az időközben tett megállapítás, miszerint **116** biológiailag inaktív, törekvésemet céltalanná tette. Mivel **118a** és **118b** pszeudotiodiszacharidnak tekinthető, s hasonlóságot mutat az irodalomban leírt, gyenge kondroitin liáz inhibítorként viselkedő **119**-hez (**7. ábra**), alternatív felhasználásként felvetődött **118a** és **118b** (megfelelő kémiai átalakítások utáni) liázgátlóként való hasznosítása.



7. ábra

118a-t és **118b**-t dezacetileztem, majd a **116** előállításánál ismertetett kémiai átalakításokkal analóg módon előállítottam **125a**-t és **125b**-t (8. ábra). (**125b** előállítása, mely megegyezik **125a**-ével, az egyszerűség kedvéért nincs feltüntetve.)



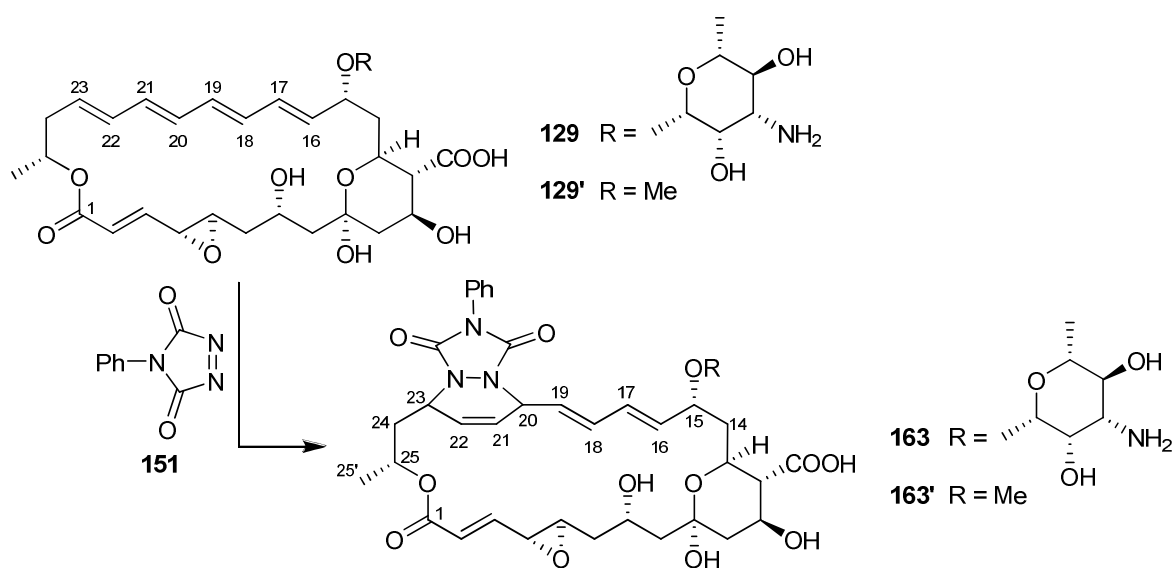
8. ábra

125a és **125b** inhibíciós állandó (K_i) értékei rendre 0,9 és 8,2 mM-nak adódtak, melyek gyenge gátló hatásra engednek következtetni.

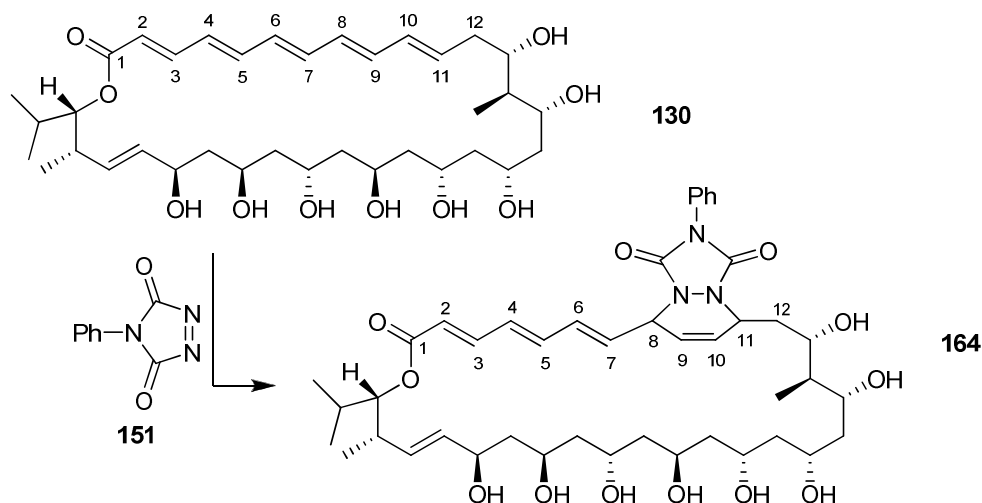
III.2. Polién makrolidok Diels–Alder reakciója

Két polién makrolid antibiotikumot, a natamicint (v. pimaricint, **129**) és a flavofungint (**130**) reagáltattam egy reaktív azadienofillel, a 4-fenil-1,2,4-triazolin-3,5-dionnal (**151**).

129 esetében a **163**-as (9. ábra), **130** esetében a **164**-es (10. ábra) cikloadduktumot izoláltam, melyek szerkezetét tömegspektrometria, valamint UV- és NMR-spektroszkópia segítségével derítettem fel. Megállapítottam, hogy mindkét reakció regio- és diasztereoselektív módon ment végbe.



9. ábra: a natamicin (**129**) cikloaddíciós reakciója **151**-gyel, valamint a modellreakció



10. ábra: a flavofungin (**130**) cikloaddíciós reakciója **151**-gyel

Elméleti számítások segítségével megvizsgáltuk a natamicin modelljének (**129'**) és **151**-nek a cikloaddícióját (9. ábra), s megállapítottuk, hogy az alkalmazott módszertől függetlenül – a kísérletes tapasztalattal összhangban – a C₈–C₁₁ diénrész részvételével létrejövő átmeneti állapot a legstabilabb. Ezenkívül megállapítottuk azt is, hogy **163** konformációja jelentősen eltér **129**-étől.

A flavofungin esetében is elemeztük a lehetséges átmeneti állapotokat. Az alkalmazott módszertől függő eredményt kaptunk, csak a PM3 és a HF/6-31G módszert tartalmazó ONIOM számítások eredménye egyezett a kísérleti tapasztalattal. Különböző poliénkarbonsavakat, mint a flavofungin elméleti modelljeit használva megvizsgáltuk a lakton karbonilcsoportjának irányító hatását.

Teszteltük **163** és **164** gombaellenes hatását is. **163** gyakorlatilag nem mutatott antifungális aktivitást, **164** aktivitása pedig a vizsgált gombatörzstől függően **130**-hoz viszonyítva csökkent, illetve megszűnt.

IV. ÖSSZEFOGLALÁS

Doktori munkám első részében Diels–Alder reakció segítségével állítottam elő a természetes eredetű perikozinok áthidalt gyűrűs, biciklo[2.2.2]oktén vázas analógját.

A perikozin analóg előállítását egy egyszerű, aromás vegyületből kiindulva valósítottam meg. A szintézis kulcslépése egy oxidatív dezaromatizáció illetve egy regio- és diasztereoszelektív Diels–Alder cikloaddíció volt.

Az öt kiralitáscentrummal rendelkező célvegyület előállítását metil-gallátból kiindulva kilenc, teljes vagy jó diasztereoselektivitású reakciólépésen keresztül valósítottam meg. A vegyület többféle sejtvonalon sem bizonyult citotoxikusnak.

Részletesen tanulmányoztam a dezaromatizációval képződött ciklohexadienon (dién) köztitermék [4+2] típusú cikloaddíciókban való részvételét is, mely vizsgálathoz kvantum-kémiai számítások eredményeit is felhasználtam. Megállapítottam, hogy a dién mind normál, mind inverz elektronszükségletű Diels–Alder reakciókban részt vehet. Az inverz elektronszükségletű reakciókban tapasztalt regioszelektivitás nem követi a Houk-szabályt. Ennek okát, a másodlagos kölcsönhatások jelentőségét, a benzil-vinil-éterrel képzett adduktumon végzett elméleti kémiai számításokkal tártuk fel.

A racém ciklohexadienon köztitermékéből két enantiomertiszta, potenciálisan kondroitin liáz inhibitor tulajdonságú pszeduotiodiszacharidot állítottam elő. A vegyületek gyenge inhibíciós képességet mutattak.

A munka második részében két polién makrolid típusú antibiotikum, a natamicin és a flavofungin Diels–Alder reakcióját vizsgáltam. Mindkét makrolidra egy azadienofilt addícionáltam, s a termékek szerkezetét felderítve megállapítottam, hogy a reakció mindkét esetben regio- és diasztereoselektíven ment végbe. Elméleti kémiai számítások segítségével is kimutattuk, hogy az alkalmazott natamicin-modell esetében, összhangban a kísérleti ténnyel a cukorrésztől legtávolabb eső (C₂₀–C₂₃) diénrészlet a legreaktívabb. Flavofungin esetében a poliénkarbonsavakon, mint modellvegyületeken végzett számítások kimutatták a karbonilcsoport irányító hatását.

V. TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

V.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények

- 1., Zsolt Fejes, Attila Mándi, István Komáromi, Attila Bényei, Lieve Naesens, Ferenc Fenyvesi, László Szilágyi, Pál Herczegh
Synthesis of a pericosine analogue with a bicyclo[2.2.2]octene skeleton
Tetrahedron, **2009**, 65(39), 8171-8175.
IF: 3,219
- 2., Zsolt Fejes, Attila Mándi, István Komáromi, László Majoros, Gyula Batta, Pál Herczegh
A synthetic and *in silico* study on the highly regioselective Diels–Alder reaction of the polyenic antifungal antibiotics natamycin and flavofungin
Tetrahedron Letters, **2010**, 51(38), 4968-4971.
IF: 2,660 (2009)

V.2. Az értekezés témájában elhangzott előadások

- 1., Zs. Fejes, Gy. Gyémánt, L. Kandra, S. Antus, T. Kurtán, L. Szilágyi, F. Fenyvesi, L. Majoros, P. Herczegh
Synthesis of antibiotic analogs using cycloaddition reaction: the case of pericosin and flavofungin
3rd German-Hungarian Workshop – Synthesis, Isolation and Biological Activity of Natural Products, Paderborn, 2008.05.15-17.
- 2., Zs. Fejes, Gy. Gyémánt, L. Kandra, S. Antus, T. Kurtán, L. Szilágyi, F. Fenyvesi, L. Majoros, P. Herczegh
Synthesis of antibiotic analogs using cycloaddition reaction: the case of pericosin and flavofungin
Kisfaludy Lajos Alapítvány előadóülése, Budapest, 2009.03.09.
- 3., Fejes Zsolt, Mándi Attila, Komáromi István, Antus Sándor, Kurtán Tibor, Szilágyi László, Bényei Attila, Lieve Naesens, Fenyvesi Ferenc, Herczegh Pál
A perikozin antibiotikum analógjainak szintézise
MTA Antibiotikum és MTA Nukleotid Munkabizottsági Ülés, Debrecen, 2009.11.19-20.
- 4., Fejes Zsolt
Antibiotikumok szintézise és szerkezetmódosítása Diels–Alder reakcióval
MTA Szerves és Biomolekuláris Kémiai Bizottság Bruckner termi előadása, Budapest, 2010.05.28.

V.3. Az értekezés témájában bemutatott poszterek

- 1, P. Herczegh, Zs. Fejes
Synthesis of the analogues of the antibiotic pericosine
23rd IUPAC - International Symposium on the Chemistry of Natural Products, Firenze, 2002.07.28-08.02
- 2, P. Herczegh, Zs. Fejes
Synthesis of the analogues of the antibiotic pericosin
1st Austrian-Hungarian Carbohydrate Conference, Burg Schlaining, 2003.09.24-26.
- 3, Fejes Zsolt, Gyémánt Gyöngyi, Kandra Lili, Antus Sándor, Kurtán Tibor, Szilágyi László, Fenyvesi Ferenc, Herczegh Pál
Perikozin antibiotikum analógok szintézise
Vegyészkonferencia 2008, Hajdúszoboszló, 2008.06.19-21.

V.4. Egyéb közlemények

Sándor Kéki, Gyula Batta, Ilona Bereczki, Zsolt Fejes, Lajos Nagy, Ágnes Zajác, Lili Kandra, Imre Kiricsi, György Deák, Miklós Zsuga, Pál Herczegh
New types of α -amylase enzyme-inhibitory polysaccharides from D-glucal
Carbohydrate Polymers, **2006**, 63(1), 136-140.

IF: 1,784

Összesített IF: 7,663