

PhD ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Nitroxidokhoz és elővegyületeikhez kapcsolt heterociklusok szintézise:  
új, bioaktív és szenzor vegyületek előállítása**

**Bognár Balázs**

**Programvezető és a Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Sümegi Balázs  
Témavezető: Prof. Dr. Kálai Tamás**



**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar  
Szerves és Gyógyszerkémiai Intézet**

**Pécs  
2009**

## 1. Bevezetés, előzmények

A heterociklusos vegyületek területén csaknem ötven éve végeznek tudományos kutatómunkát a Pécsi Tudományegyetem Szerves és Gyógyszerkémiai Intézetében (korábban POTE, Központi Kutató Laboratórium, Kémia), különös tekintettel a várhatóan biológiailag aktív vegyületek szintézisére. Az 1970-es évek közepétől Dr. Hideg Kálmán, Dr. H. Hankovszky Olga és munkatársaik a paramágneses pirrolin, pirrolidin és piperidin nitroxidok szintézisével kezdtek foglalkozni. Az azóta eltelt időszakban számos spincsapdát, spinjelölt biomolekulát (aminosavak, zsírsavak, stb.), két módszerrel (ESR és fluoreszcencia) követhető kettős indikátort és farmakológiailag aktív szabad gyökös vegyületet állítottak elő az intézetben. Más kutatócsoportok, ill. kutatócsoportunk megfigyelései alapján állíthatjuk, hogy a 2,2,5,5-tetrametilpirrol(id)in, 2,2,6,6-tetrametilpiperidin gyűrűkkel, ill. ezek oxidált származékaival történő módosítás kedvezően befolyásolja a módosított alapmolekula aktivitását és hatásspektrumát. A korábbi megfigyelések alapján érdekes feladatnak tűnt olyan biológiailag aktív vegyületek szintézise, amelyek az eredeti vegyület hatásának megtartása mellett antioxidáns hatásúak is.

Az elmúlt két évtizedben sorra jelentek meg olyan közlemények, amelyek a nitroxidok klasszikus alkalmazásán (spinjelölés) túl egyéb (pl. kooxidáns, kontrasztanyag, spincsapda, polimerkémiai segédanyag, szerves ferromágnes) alkalmazását is tárgyalják, de kimutatták azt is, hogy ezek a vegyületek, valamint amin prekursoraik antioxidáns hatással, szuperoxid dizmutáló és kataláz hatással is rendelkeznek.

Bár a stabilis nitroxidok már mintegy 50 éve ismertek kémiájuk – a szabad gyök jelenlétében elvégezhető átalakítások korlátozott volta miatt – még mindig unikálisnak számít és számos problémát, kihívást jelent a kémikus számára.

Diákkörösként 2003-ban kapcsolódtam be a PTE ÁOK Szerves és Gyógyszerkémiai Intézetének kutatói tevékenységébe, majd 2006-tól már mint PhD hallgató folytattam a megkezdett munkát. Disszertációm alapját az elmúlt 5 évben előállított és vizsgált vegyületek képezik.

## 2. Célkitűzés

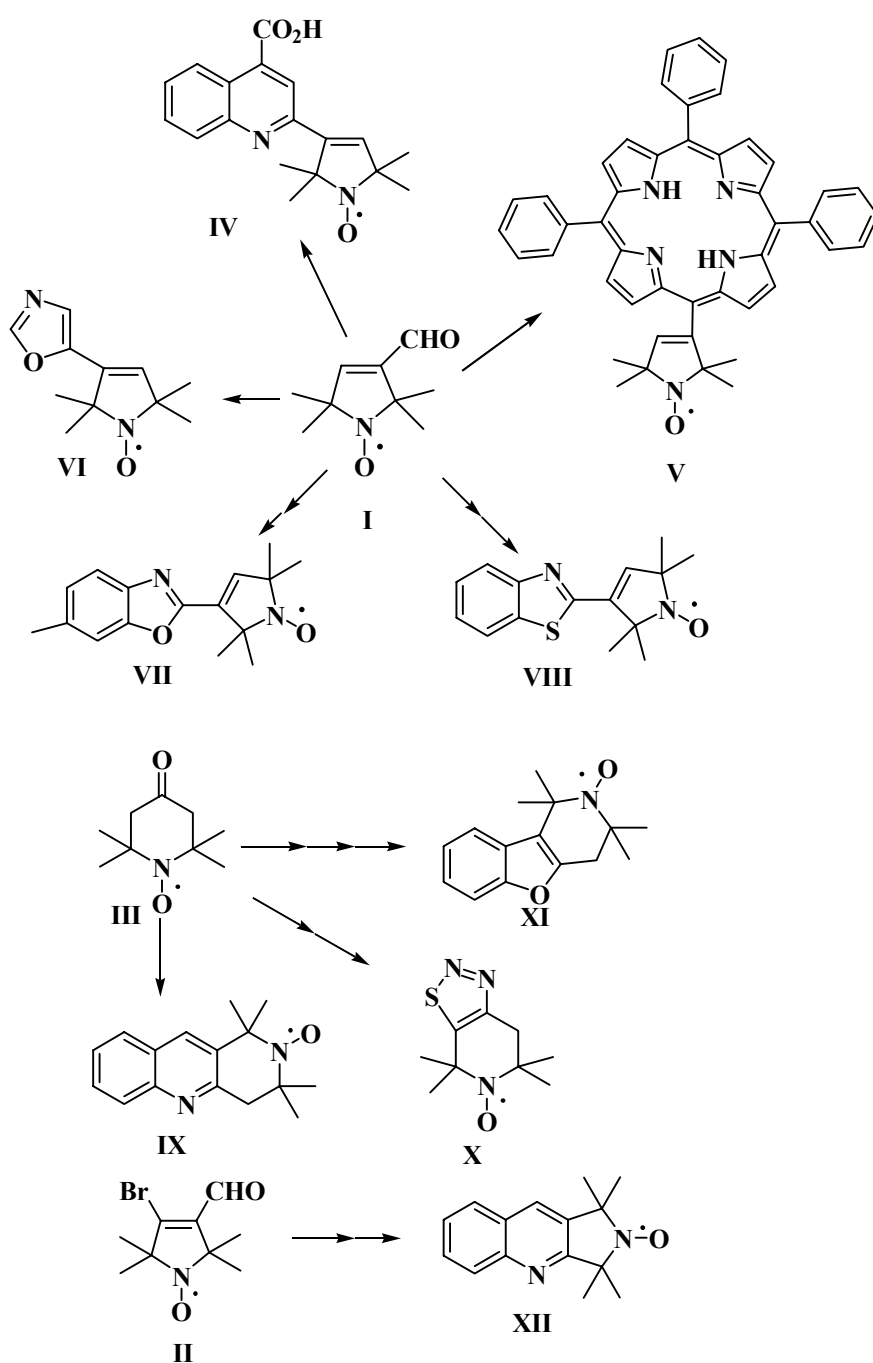
1. Új szintetikus módszerek keresése a szén-szén, vagy szén-heteroatom kötésen keresztül, a heteroatomot tartalmazó gyűrűhöz kapcsolt, vagy a gyűrűvel anellált nitroxidok szintézisére.
2. Más-más hullámhosszon gerjeszthető és emittáló kettős (spin és fluoreszcens) szenzorvegyületek szintézise.
3. Az antiaritmiás gyógyszerek Vaughan Williams osztályozás szerinti III. osztályba sorolt amiodaront, valamint a IV. osztályba tartozó verapamilt módosítottuk sztérikusan gátolt, 5- és 6-tagú nitroxidokkal és prekursoraikkal. Reményeink szerint az új származékok megtartják az alapvegyületek kedvező hatásait, és azok hatásspektrumát antioxidáns tulajdonsággal bővítik.

## 3. Alkalmazott vizsgálati módszerek

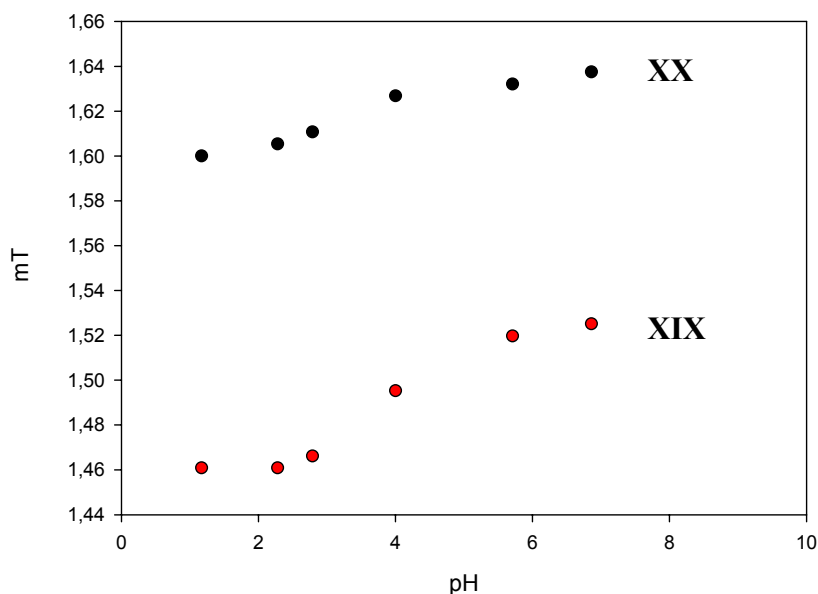
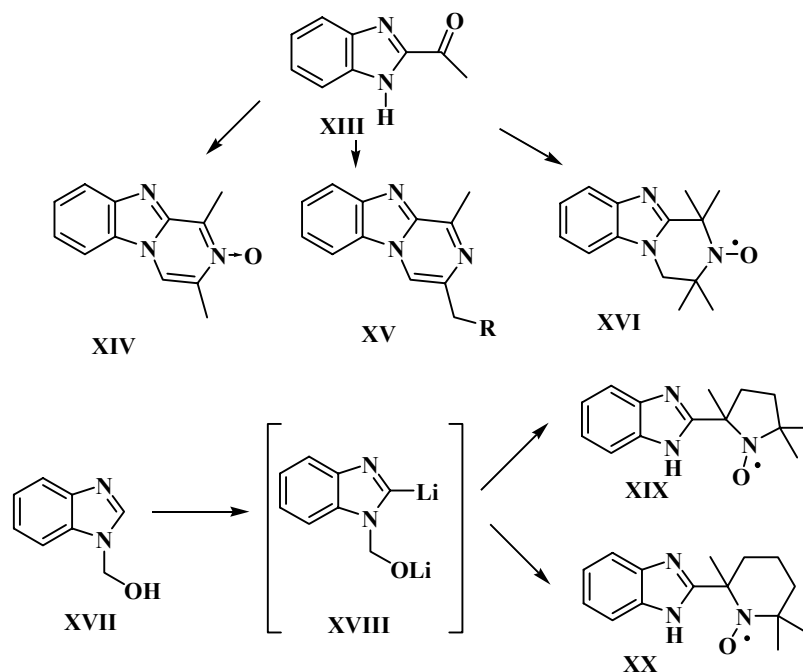
A tézisekben közölt vegyületek előállítására a modern preparatív szerves kémia makro és félmikro módszereit alkalmaztuk. A kémiai reakciók követésére vékonyréteg-kromatográfiát, az anyagok tisztítására oszlopkromatográfiát használtuk. Az anyagok tisztaságának ellenőrzését vékonyréteg-kromatográfiával és olvadáspontméréssel végeztük. Az előállított vegyületek szerkezetét IR,  $^1\text{H}$ - és  $^{13}\text{C}$ -NMR, ESR valamint tömegspektroszkópiai módszerekkel igazoltuk. A vegyületek alkalmazásakor és vizsgálata során az alkalmazástól függően steady-state ill. időfelbontásos optikai spektroszkópiai módszereket, ESR-t, pásztázásos mikroszkópiát, *in vivo* és/vagy *in vitro* biológiai vizsgálatokat alkalmaztunk. Az értekezés alapjául szolgáló cikkek biológiai vizsgálatait a PTE-ÁOK Biokémia és Orvosi Kémia Intézetében, és az Ohio-i Egyetem „Davis Lung and Heart” Kutatóintézetében végezték.

#### 4. Új tudományos eredmények

1. Klasszikus szintetikus módszerekkel a paramágneses aldehidekből (**I**, **II**), valamint ketonból (**III**) paramágnesesen módosított kinolinokat (**IV**, **IX**, **XII**) szintetizáltunk. Továbbá az  $\alpha,\beta$ -telítetlen-aldehidből kiindulva porfirint (**V**), oxazolt (**VI**), és benzazolokat (**VII**, **VIII**), míg a ketonból kiindulva tiadiazolt (**X**) és bezofuránnal anellált nitroxidot (**XI**) állítottunk elő. Ezek a heterociklusokhoz kapcsolt nitroxidok reményeink szerint enzimgátlóként (pl. kináz gátlók) vagy antioxidáns kismolekulaként hasznosíthatók.<sup>1</sup>

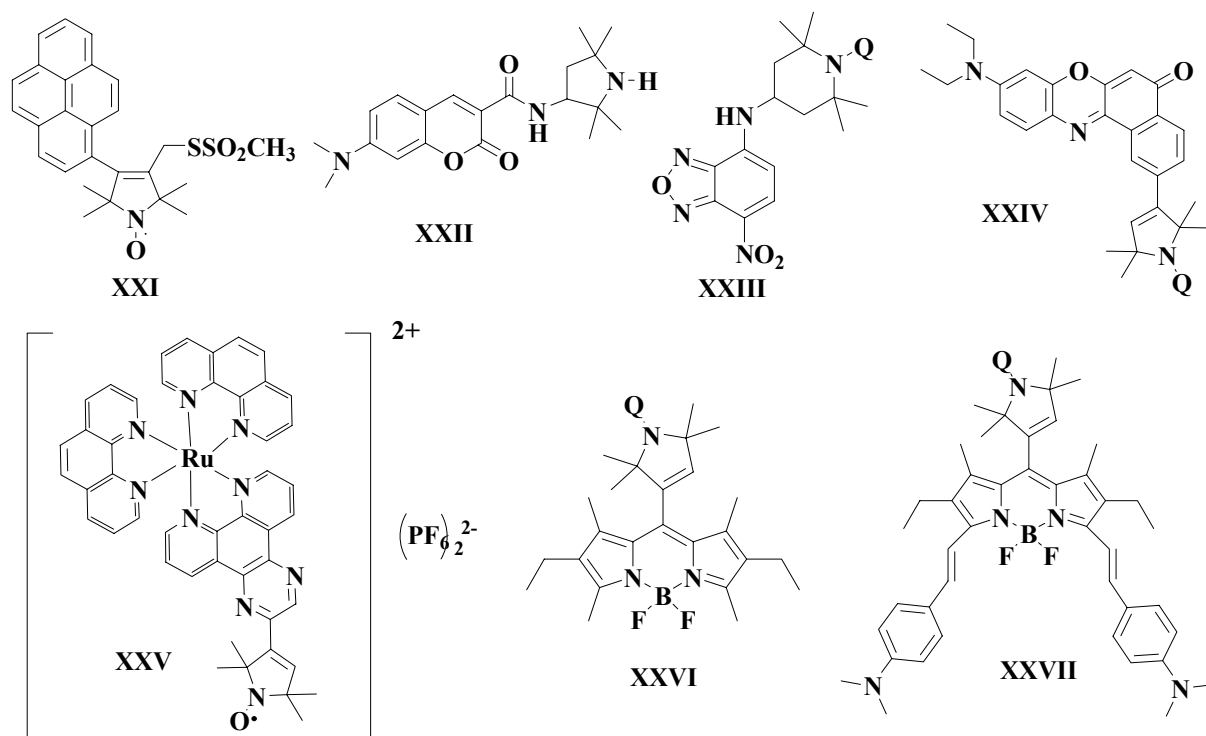


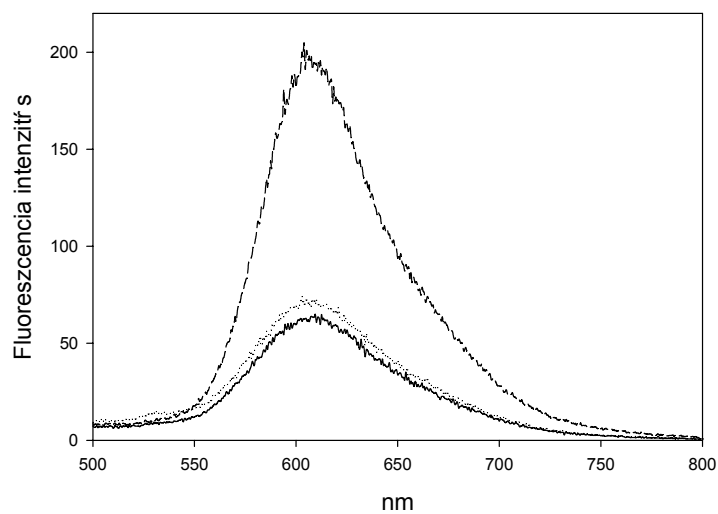
2. 1-(1*H*-benzimidazol-2-il)etanonból (XIII) kiindulva új, pirazino[1,2-*a*]benzimidazolokat szintetizáltunk (XIV, XV, XVI). A tetrahidropirazino[1,2-*a*]benzimidazol-vázás nitroxid (XVI) pH-szenzorként nem vált be, a hidroximetil-benzimidazolt (XVII) litiálva, majd elektrofilekkel reagáltatva 2-szubsztituált benzimidazolokat állítottunk elő, közülük a XIX és XX vegyületek ESR spektruma pH függést mutatott, a pH 2-6 közötti tartományban.<sup>2</sup>



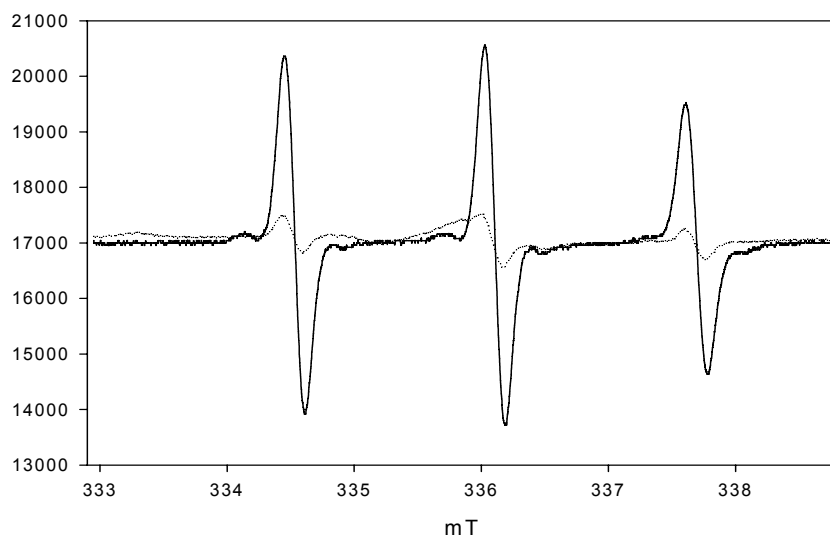
A XIX és XX nitroxidok ESR csatolásának változása a pH függvényében.

2. A fluorofor vegyületekhez kapcsolt nitroxidok dinamikus kioltási mechanizmusban csökkentik a fluoreszcenciát. Ha a nitroxid hidroxilaminná redukálódik vagy széngyökkel rekombinálódik, a fluoreszcencia felerősödik. Ezek a folyamatok mind ESR spektroszkópiával, mind fluoreszcencia spektroszkópiával követhetővé válnak, ezért nevezik ezeket a vegyületeket kettős szenzor vegyületeknek. Intézetünkben számos, különböző hullámhosszon fluoreszkáló donor-akceptor vegyületet állítottak elő korábban. Célunk új, más-más hullámhosszokon (370-790 nm) emittáló kettős (spin és fluoreszcens) szenzorok kifejlesztése volt, amelyek a legkülönbözőbb alkalmazási területeken teszik lehetővé a redox folyamatok követését. Az előállított pirén (XXI), kumarin (XXII), nitrobenzofurazán (XXIII), Nílus-vörös (XXIV), fenantrolin (XXV), BODIPY származékok (XXVI, XXVII) közül a konjugált BODIPY (XXVII) származék tűnt a legjobb redox szenzornak. A különböző származékok vizsgálata alapján a kettős szenzor vegyületek érzékenysége annál nagyobb, minél közelebb van egymáshoz a donor és az akceptor molekularész.<sup>3</sup> A XXV vegyület alkalmas lehet kettős szálú DNS vizsgálatára, mivel a komplex fluoreszcenciájának intenzitása jelentősen nő a DNS-hez való kötődés során, továbbá az ESR triplett jel anizotróppá válása következtében a kötődés ESR spektroszkópiával is követhető (38. ábra).





*A XXV emissziós spektruma: 50  $\mu\text{M}$  XXV (50 mM NaCl and 5 mM Tris) pufferben (—), 50  $\mu\text{M}$  XXV és 1,0 mM nátrium-aszorbát pufferben (···), 50  $\mu\text{M}$  XXV és 270  $\mu\text{M}$  DNS pufferben (---),  $\lambda_{\text{ex}}$ : 453 nm.*

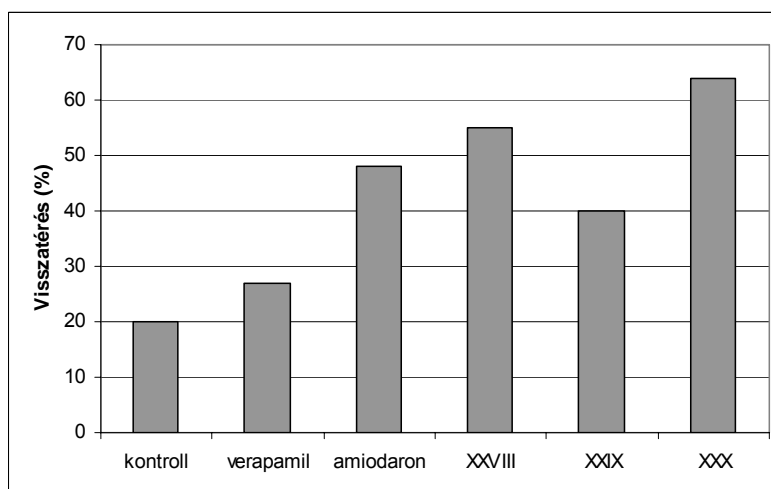
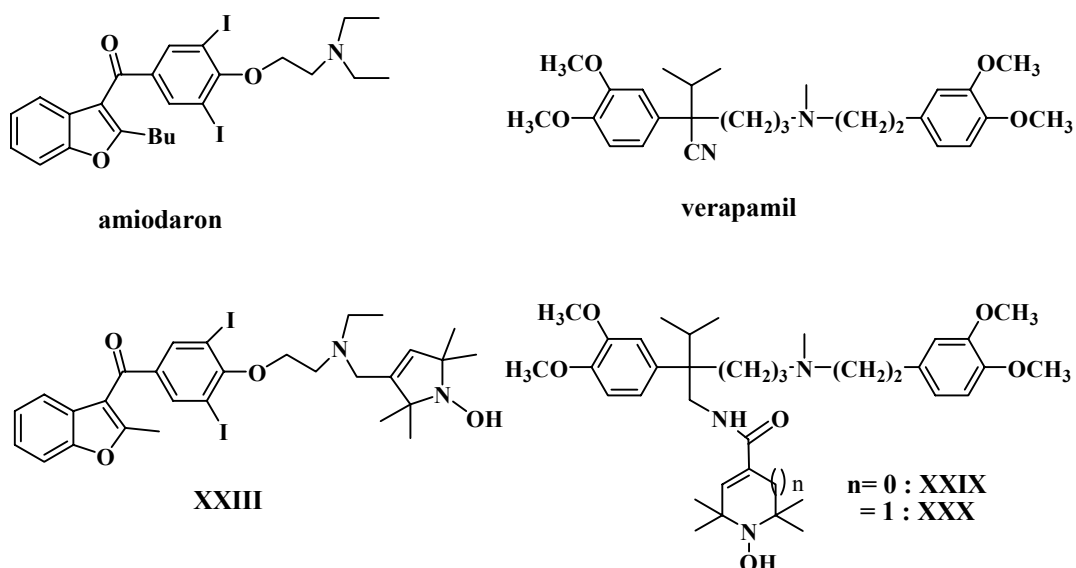


*50  $\mu\text{M}$  XXV (—), illetve 50  $\mu\text{M}$  XXV és 270  $\mu\text{M}$  DNS (···) ESR spektruma pufferben.*

3. 2-Metil-benzofuránból kiindulva dietil-aminoetil oldallácban módosított amidaron analogonokat állítottunk elő. Az elsődleges biológiai vizsgálatok (MPT, toxicitás, organikus foszfátok visszaállítása perfúzióban) alapján a **XXVIII** vegyület kedvezőbb toxicitási paraméterek mellett ugyanolyan hatékonysággal rendelkezett, mint az amidaron.<sup>4,5</sup>

Új, nitrilcsoportban és aminocsoportban módosított verapamil származékokat állítottunk elő, ezek az új vegyületek antioxidáns hatásúak voltak. Részletesebb *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokat alapján a **XXIX** és **XXX** hidroxilamin sók megtartották a verapamil  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna gátló hatását, és iszkémia/reperfúzió esetén az eredeti verapamilhoz képest kedvezőbben befolyásolták a Langendorff-szív fiziológiás paramétereit (49. ábra).

Intézetünk korábbi vizsgálatai és a fenti példák alapján megállapíthatjuk, hogy a gyógyszermolekulák nitroxidokkal ill. diamágneses prekuzoraikkal történő módosítása kedvezően befolyásolhatja a toxicitást és az alapvegyületek hatásspektrumát.<sup>6</sup>



Az amidaron, a verapamil és módosított származékaik hatása a Robinson-indexre.



## 5. Disszertáció alapjául szolgáló cikkek jegyzéke:

- 1 Synthesis of New, Paramagnetically Modified Heterocycles.  
Kálai, T.; Bognár, B.; Jekő, J.; Hideg, K. *Synthesis* **2006**, 2573-2579.  
If. 2,333 cit. 2
- 2 Synthesis of Benzimidazoles Condensed with, or Linked to, Nitroxides or Heterocyclic *N*-Oxides. Bognár, B.; Kálai, T.; Hideg, K. *Synthesis* **2008**, 2439-2445.  
If. 2,247 cit. 0
- 3 Synthesis of New Double (Spin and Fluorescence) Sensor Reagents and Labels.  
Bognár, B.; Ósz, E.; Hideg, K.; Kálai, T. *J. Heterocyclic Chem.* **2006**, 43, 81-86.  
If. 0,922 cit. 3
- 4 Synthesis and Evaluation of the Permeability Transition Inhibitory Characteristics of Paramagnetic and Diamagnetic Amiodarone Derivatives.  
Kálai, T.; Várbíró, G.; Bognár, Z.; Pálfi, A.; Hantó, K.; Bognár, B.; Ósz, E.; Sümegi, B.; Hideg, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 2629-2636.  
If. 2,286 cit. 4
- 5 Novel SOD-mimetic permeability transition inhibitor agent protects ischemic heart by inhibiting both apoptotic and necrotic cell death  
Bognár, Z.; Kálai, T.; Pálfi, A.; Hantó, K.; Bognár, B.; Márk, L.; Szabó, Z.; Tapodi, A.; Radnai, B.; Sárszegi, Z.; Szántó, Á.; Gallyas, F.; Hideg, K.; Sümegi, B.; Várbíró, G. *Free Rad. Biol. Med.* **2006**, 41, 835.  
If. 5,44 cit. 6
- 6 Cardioprotection by HO-4038, a novel verapamil derivative, targeted against ischemia and reperfusion-mediated acute myocardial infarction  
Mohan, I. K.; Khan, M.; Sheik Wisel, Selvendiran, K.; Sridhar, K.; Carnes, C. A.; Bognár, B.; Kálai, T.; Hideg, K.; Kuppusamy, P. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2009**, 296, 140.  
If. 3,643 cit. 1

## **Előadások, poszterek**

1. *Synthesis and Study of Paramagnetic and Diamagnetic Amiodarone Derivatives*  
Balázs Bognár, Zita Bognár, Gábor Várbíró, Tamás Kálai, Balázs Sümegi,  
Kálmán Hideg  
XXI. European Colloquium on Heterocyclic Chemistry, Sopron, 2004, September  
12-15.
2. *Synthesis and Study of Paramagnetic and Diamagnetic Amiodarone Derivatives*  
Tamás Kálai, Zita Bognár, Gábor Várbíró, Balázs Bognár, Anita Pálfi, Katalin Hantó,  
Balázs Sümegi and Kálmán Hideg  
JMMC, Vienna, Austria, June 20-23, 2005.
3. *Modification of Amiodarone with Nitoxides and their Diamagnetic Precursors*  
Tamás Kálai, Zita Bognár, Gábor Várbíró, Balázs Bognár, Anita Pálfi, Katalin Hantó,  
Balázs Sümegi and Kálmán Hideg  
EPR 2005, Columbus, Ohio, USA 2005. September 4-8.
4. *Aminoetil-oldallánokban helyettesített amiodaron származékok szintézise és vizsgálata*  
Bognár Balázs, Radnai Balázs, Tucsek Zsuzsanna, Bognár Zita, Kálai Tamás, Sümegi Balázs,  
Hideg Kálmán  
Centenárium Vegyészkonferencia, Sopron, 2007. május 29. – június 1.
5. *Nitroxidokkal és elővegyületeikkel módosított verapamil származékok szintézise és vizsgálata*  
Bognár Balázs, Rajarsi Mandal, Kálai Tamás, H. Hankovszky Olga, Periannan Kuppusamy,  
Hideg Kálmán  
Heterociklusos Kémiai Munkabizottság ülése, Balatonszemes, 2007. szeptember  
12-14.
6. *Aminoetil-oldallánokban helyettesített amiodaron-származékok szintézise és vizsgálata*  
Bognár Balázs, Kálai Tamás, Sümegi Balázs, Hideg Kálmán  
II. Szent-Györgyi Albert konferencia, BME, Budapest, 2008. március 7-8.

7. *Synthesis and application of double (spin and fluorescent) sensor reagents*  
Kálai, T.; Hideg, É.; Bognár, B.; Jekő, J.; Hideg, K.  
1st Hungarian –Singaporean Workshop on Drug Discovery and Biomaterials (proceedings)  
Hungarian Academy of Sciences, Budapest 2008, March 10-11.
8. *HO-4038, A Pro-antioxidant Modification of Verapamil Protects the Heart against Ischemia-Reperfusion Injury through its Antioxidant and Pro-survival Akt Activity*  
Iyyapu K Mohan, Mahmood Khan, Sheik Wisel, Karuppaiyah Selvendiran, Arun Sridhar, Cynthia A. Carnes, Balazs Bognar, Tamás Kálai, Kálmán Hideg, and Periannan Kuppusamy  
6th JSPS Core-to-Core Seminar, The Blackwell Inn, Columbus, Ohio, USA,  
2008. May 25-27.
9. *Paramágneses benzimidazol-származékok szintézise*  
Kálai Tamás, Bognár Balázs, Gulyás Gergely, Hideg Kálmán  
MKE Vegyészkonferencia, Hajdúszoboszló 2008. június 19-21.
10. *Nitroxidokkal és elővegyületeikkel módosított verapamil-származékok szintézise és vizsgálata*  
Bognár Balázs, Rajarsi Mandal, Kálai Tamás, H. Hankovszky Olga, Periannan Kuppusamy, Hideg Kálmán  
MKE Vegyészkonferencia, Hajdúszoboszló 2008. június 19-21.
11. *Vörös hullámhossz tartományban emittáló kettős (spin és fluoreszcens) szenzorok szintézise és vizsgálata*  
Bognár Balázs, Kálai Tamás, Jekő József, Hideg Kálmán  
Heterociklusos Kémiai Munkabizottság ülése, Balatonszemes, 2009. május 20-22.
12. *Synthesis and study of new paramagnetic and diamagnetic verapamil derivatives*  
Balázs Bognár, Rajarsi Mandal, Tamás Kálai, Olga H. Hankovszky, Periannan Kuppusamy, Kálmán Hideg  
Hungarian-Austrian-Czech-German-Greek-Italian-Polish-Slovak-Slovenian Joint Meeting on Medicinal Chemistry, ELTE, Budapest, 2009. június 24-27.

## **Köszönetmondás**

Köszönetet mondok dr. Kálai Tamás és dr. Hideg Kálmán egyetemi tanároknak, a kémiai tudományok doktorainak munkám szakmai irányításáért. Köszönöm dr. P. Sár Cecília egyetemi docensnek támogatását, és az évek során nyújtott segítségét. Köszönetet mondok dr. Jekő József főiskolai tanárnak a tömegspektrometriai mérésekért, dr. Ósz Erzsébetnek, dr. Berente Zoltánnak és Gulyás Gergelynek az NMR vizsgálatokért.

Köszönöm a hazai és külföldi együttműködő partnereknek Prof. Periannan Kuppusamy és munkatársainak (OSU, Columbus, USA), Prof. Sümegi Balázs és munkatársainak (PTE ÁOK) a biológiai vizsgálatokban nyújtott segítségét. Köszönöm dr. Fehér Andrea, Kulcsár Győző doktoranduszok és diákkörösök, Balog Mária, Csokona Viola, Kish Krisztina, Lamperth Éva, Lazsányi Noémi, Fekete Tímea, Bös Tamás vegyésztechnikusok, dr. Deák Ivánné titkárnő és Sajóvölgyi Gábor kisegítők munkáját. Köszönet illeti az intézet előző munkatársait dr. Hankovszky Olgát, dr. Lex Lászlót, dr. Csekő Józsefet, dr. Kulcsár Gyulát, Halász Aladárnét, Huszár Teréziát, Kneif Józsefnét, Lovas Lászlónét és Ott Miklósnét, akik nagyban hozzájárultak a téma megalapozásához az 1970-es és 80-as években. Köszönöm a POTE és a PTE ÁOK volt és jelenlegi vezetőinek, alkalmazottainak, hogy a kutatáshoz szükséges infrastruktúrát biztosították, valamint az OTKA T048334 és az OTKA NKTH 67597 anyagi támogatását.

Köszönöm hozzátartozóimnak, barátaimnak, akik az elmúlt években támogattak és a napi gondoktól mentesítve lehetővé tették, hogy a kutatómunkámra koncentrálhassak.