

1. és 2. altéma: Ferrocén-szubsztituált heterociklusok szintézise, szerkezetfelderítése és komplex nagyműszeres szerkezetvizsgálata

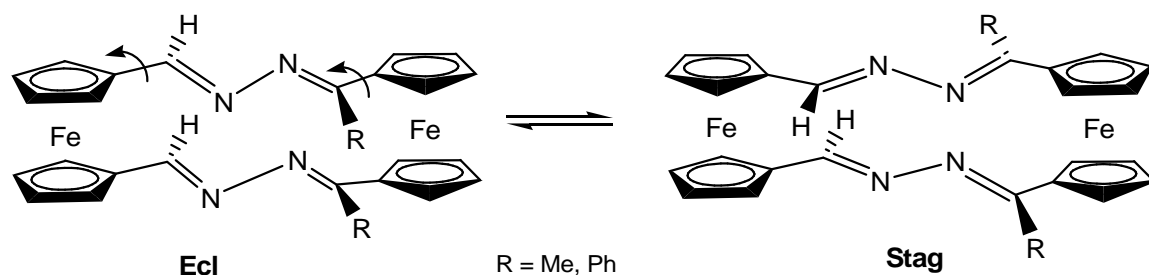
a) Báziskatalizált Claisen-Schmidt kondenzációval szintetizáltunk *mono*- és *bisz*-ferrocenil-metilén-cikloalkanonokat és ferrocenilmetilidén-benzilidén analógokat, tanulmányoztuk a konjugációs viszonyokat és ezzel összefüggésben térszerkezetüket (konfigurációjukat és konformációjukat). Spektroszkópiai tulajdonságaikat összehasonlítottuk a benzilidén-analógokéval [1].

b) Etil- α -azido- β -ferrocenilakrilát iminofoszfóránjából kiindulva elektronhiányos reagensekkel változatos szintéziseket valósítottunk meg. Dimetil-acetiléndikarboxiláttal az azido prekursor 1,3-dipoláris cikloaddícióval 1-(α - etoxikarbonil- β -ferrocenilvinil)-4,5-*bisz*-(metoxikarbonil)-1,2,3-triazollá alakult, míg az azidból trifenilfoszfínnal készült iminofoszfórán reakciója két termékhez vezetett. Az aktivált elektronhiányos szén-szén hármaskötés és az elektronküldő ferrocenil csoporttal szubsztituált elektrondús C=C kettőskötés [2+2] cikloaddícióját követően az intermedier ciklobutén gyűrűfelnyílása a 4-ferrocenil-1-etoxikarbonil-2,3-*bisz*-(metoxikarbonil)-1-amino-1,3-butadién vízre érzékeny iminofoszfóránját szolgáltatta, mely az oldószerben jelenlevő vízzel hidrolizálva stabilizálódott. A párhuzamosan lejátszódó reakcióban a [2+2] cikloaddíció a szubsztrát formális P=N kettőskötésén játszódott le, és az így keletkezett négytagú gyűrű felnyílása egy stabil nyíltláncú foszforilidet eredményezett. A termékek térszerkezetét IR, NMR és egykristály röntgendiffrakciós módszerekkel határoztuk meg.

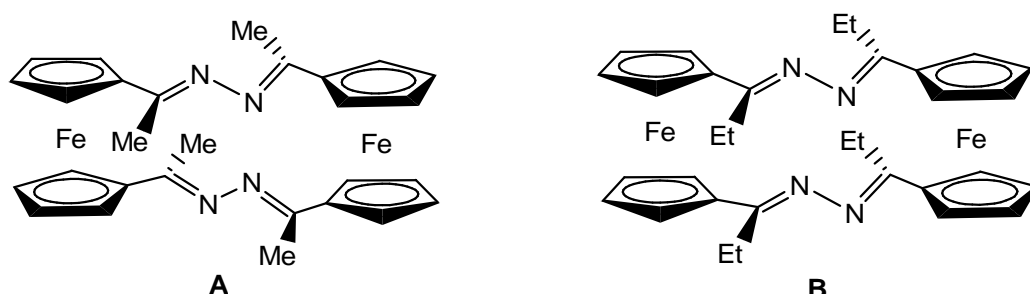
Az iminofoszfórán prekuzort aromás savkloridokkal reagáltatva *aza*-Wittig reakcióban keletkező imidoil kloridok etilklorid kilépésével járó gyűrűzáródásával néhány új ferrocenilmetilén-szubsztituált oxazolozhoz jutottunk. Fenilizocianáttal etanol, ill. víz jelenlétében végezve a reakciót ferrocenilmetilén-szubsztituált 2-etoxiimidazolont, ill. hidantoint és 2-(aminofenil)imidazolont kaptunk. A hatástani szempontból is ígéretes termékek szerkezetét IR és NMR spektroszkópiai módszerekkel igazoltuk [2].

c) Acetilferrocénből és 1,1'-diacetilferrocénből kiindulva glioxilsavas aldol addíciót követően hidrazinnal kivitelezett gyűrűzárással és dehidratálással előállítottuk az 1-[piridazin-3(2H)-on-6-il]ferrocént és az 1,1'-*bisz*[piridazin-3(2H)-on-6-il]ferrocént. Utóbbi vegyület mellett keletkezett egy piridazinnal szubsztituált ferrocenil-hidrazon és egy szimmetrikus szerkezetű, két piridazinilferrocén egységet tartalmazó azin is, melynek diallilszármazékában a röntgendiffrakciós vizsgálat lépcsőzetes π - π kölcsönhatás létrejöttét igazolta. Az 1,1'-*bisz*[piridazin-3(2H)-on-6-il]ferrocént felhasználtuk új típusú ferrocenofánok szintéziséhez. A molekulában levő két laktám NH csoportot fázistranszfer körülmények között alifás és aralkil típusú dibromvegyülettel végrehajtott dialkilezéssel és diallilszármazékának un. Grubbs 2-típusú ruténium-dikarbenoid katalizátor segítségével etilén-vesztéssel járó metatézissel áthidaltuk. Diklórmetánban Grubbs 1 típusú ruténium monokarbenoid katalizátor jelenlétében a diallil vegyület dezallileződését és metilén-hidas ferrocenofán képződését tapasztaltuk. A termékek szerkezetét IR és NMR spektroszkópiai módszerekkel igazoltuk [3].

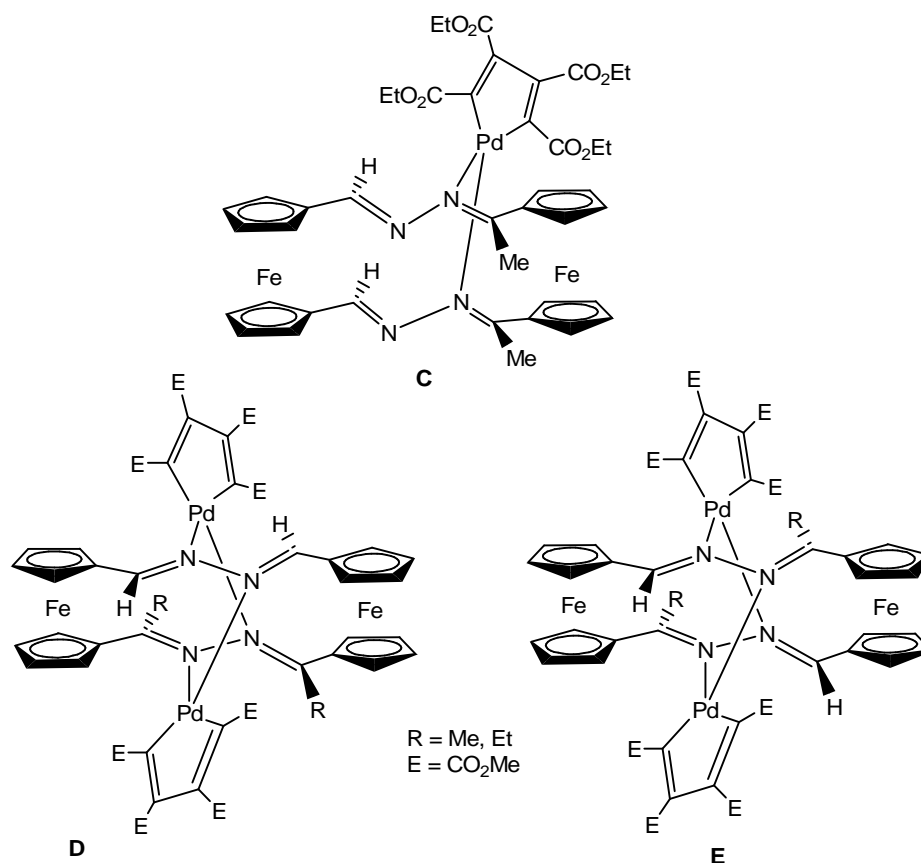
d) Különböző 1,1'-diacilferrocéneket (acil = formil, acetyl, benzoil) hidrazinnal kondenzáltatva előállítottunk új, két ferrocén egységet tartalmazó makrociklusos ferrocenofánokat. Hőmérsékletfüggő NMR mérések és DFT számítások alapján valószínűsítettük, hogy azok az áthidaló 2,3-diazabutadién láncok, melyekben legalább az egyik azometin csoporthoz hidrogén kapcsolódik, szabadon foroghatnak, s ez a makrociklusos rendszer nyitott és fedett konformációja között biztosít szabad átmenetet (**Ecl** \leftrightarrow **Stag**). Az elméletileg kapott molekuladinamikai modell szerint ez a belső molekuláris mozgás két fázisban, két átmeneti állapotban és egy lokális minimumon keresztül halad, oly módon, hogy a nagy térkitöltésű csoport (metil, fenil) a saját pozícióját a makrociklusos gyűrűn kívüli félfordulattal, a hidrogén pedig a gyűrűn belüli félfordulattal változtatja. Megállapítottuk, hogy – ezzel a képpel összhangban – a két metil-csoporttal szubsztituált lánc hasonló rotációja erősen gátolt. Röntgendiffrakciós mérésekkel kimutattuk, hogy a tetrametil-szubsztituált makrociklus olyan két enantiomer racemátja, melyek centroszimmetrikus nyitott konformációval rendelkeznek [4].



e) A [4] közlemény megjelenése óta NMR shiftreagens technikával oldatban is sikerült kimutatnunk az **A** makrociklus két enantiomerjének a jelenlétét. E résztema folytatásaként Friedel-Crafts acilezéssel előállítottunk két új diacilferrocént, nevezetesen az 1,1-dipropionilferrocént és az 1-formil-1'propionilferrocént, melyekből hidrazinnal további makrociklusokat kaptunk. Röntgendiffrakció segítségével megállapítottuk, hogy a tetraetil-szubsztituált makrociklusos ferrocenofán (**B**) – a fentebb említett tetrametil analóggal ellentétben – fedett konformációjú, belső szimmetriákkal rendelkező *mezo* diasztereomerként szelektíven képződik. Az új termékek részletes szerkezetvizsgálatáról és a diasztereospecifikus reakciók feltételezett mechanizmusáról egy cikk előkészítése folyamatban van.



f) A fent ismertetett makrociklusos ferrocenofánokból, mint potenciális négyfogú nitrogén-donor ligandumokból, *tris*-dibenzilidénaceton-dipalládium [$\text{Pd}_2(\text{dba})_3$] és dialkil acetiléndikarboxilát segítségével sikerült szintetizálnunk egy *mezo* szerkezetű monopalladol- (**C**) és egy sor racém dipalladol komplexet (pl. **D**, **E**), melyekben a sík tetragonális koordináltságú Pd(II) centrumok egy-egy öttagú gyűrűben foglalnak helyet. Megállapítottuk, hogy a kizárólag *mezo* diasztereomerként előforduló tetraetil-szubsztituált ferrocenofán (**B**) azonos körülmények között egyáltalán nem képez komplexet. Továbbá azt is megfigyeltük, hogy az egy merev $[-\text{C}(\text{R})=\text{N}-\text{N}=\text{C}(\text{R})-]$ és egy flexibilis $[-\text{C}(\text{H})=\text{N}-\text{N}=\text{C}(\text{H})-]$ láncot tartalmazó – ezért átmenetileg a tükörszimmetrikus *mezo* formában is előforduló – dialkil-szubsztituált makrociklusok Pd-katalízis hatására két N-N kötés reverzibilis hasadásával járó gyűrűtranszformációval átalakulnak a megfelelő centroszimmetrikus, két flexibilis láncot $[-\text{C}(\text{R})=\text{N}-\text{N}=\text{C}(\text{H})-]$ és $[-\text{C}(\text{H})=\text{N}-\text{N}=\text{C}(\text{R})-]$ tartalmazó diasztereomerré. Az új típusú reakciót DFT számításokkal értelmeztük. Az itt ismertetett eredményekről egy közlemény írása folyamatban van.



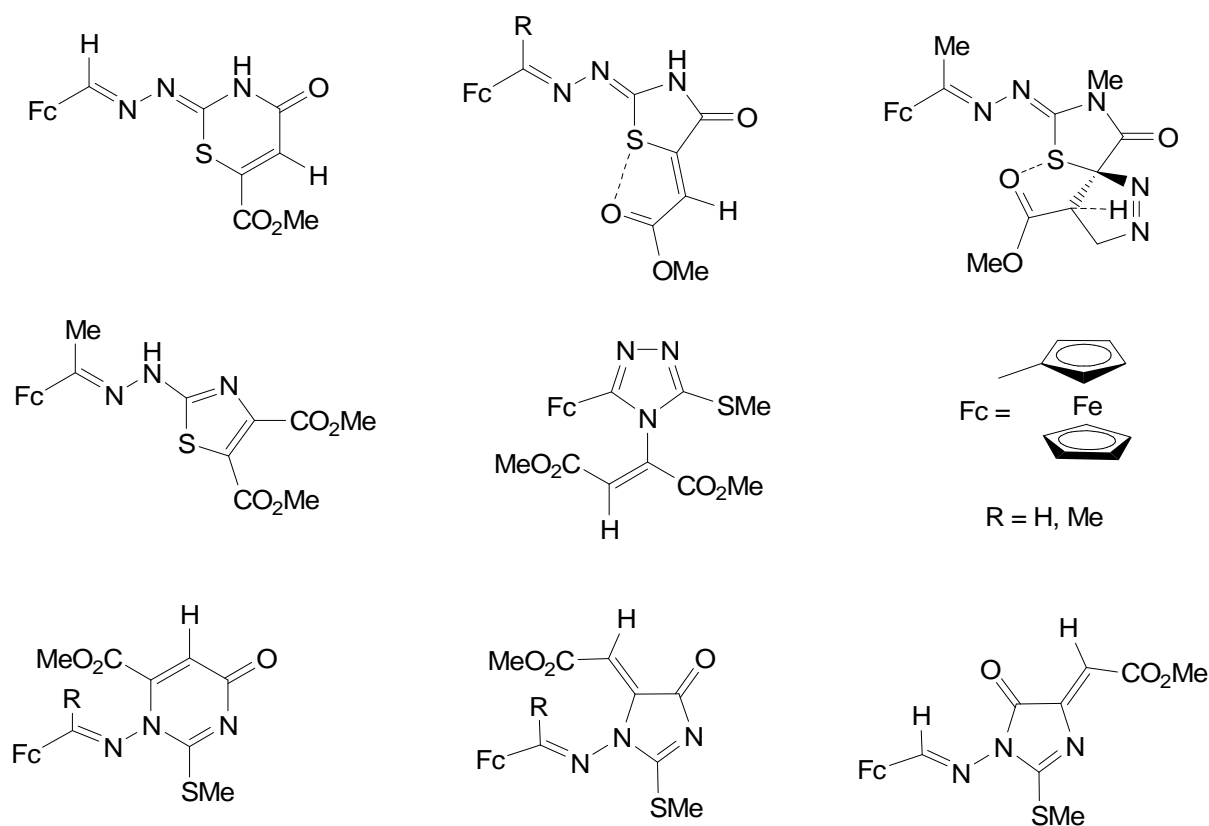
g) Formilferrocén és az aromás gyűrűn O-, ill. N- tartalmú csoportokat tartalmazó acetofenonok kondenzációjával változatosan szubsztituált, többek között szénhidrát molekularészt is tartalmazó Fc-CH=CH-CO-Ar típusú ferrocenil-kalkonokat állítottunk elő, acetilferrocénből kiindulva pedig számos izomer Fc-CO-CH=CH-Ar típusú vegyületet. E vegyületek farmakológiai hatását az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban vizsgálták. (A biológiai vizsgálatok eredményeit lásd a 3. altémánál.) A szintetikus munkáról és a biológiai vizsgálatok eredményeiről egy, már nyomdában levő közleményben [5] számoltunk be. A kalkonokat hidrazinnal és fenilhidrazinnal jégecetben kondenzáltatva előállítottunk N-acetil- és N-fenilpirazolinokat. Dinamikus NMR mérésekkel megállapítottuk, hogy a proton- és szénrezonanciában egyaránt jelentkező jelfelhasadásokért mintegy 90%-ban a molekuláris aszimmetria, 10%-ban a nagy térkitöltésű ferrocenil-csoport részben gátolt rotációja a felelős. Néhány új vegyület szilárdfázisú szerkezetét egykristály-röntgendiffrakcióval határoztuk meg [6].

h) Formil- és acetyl csoportokkal szubsztituált fenotiazinok és ferrocének kondenzációs reakcióit tanulmányozva megállapítottuk, hogy a kétszeres aldol típusú addíciók második lépésében résztvevő enolát anionok reaktivitása észrevehetően meghaladja az első lépésben résztvevőket. Az így jelentkező szubsztrát-szelektivitást, az oldószer-hatást is figyelembevéve, DFT számításokkal [B3LYP/6-31G(d,p)] értelmeztük. Az enolát részletre számított HOMO-populáció értékek, mint jól használható reaktivitás-indexek, minden modell esetén a kísérletileg tapasztalt reakciókészséggel jó összhangban voltak. Az eredmények azt is egyértelműen mutatják, hogy a ferrocenil csoport rendkívül hatékony elektronküldő és elektron-transzmitter tulajdonsággal rendelkezik [7].

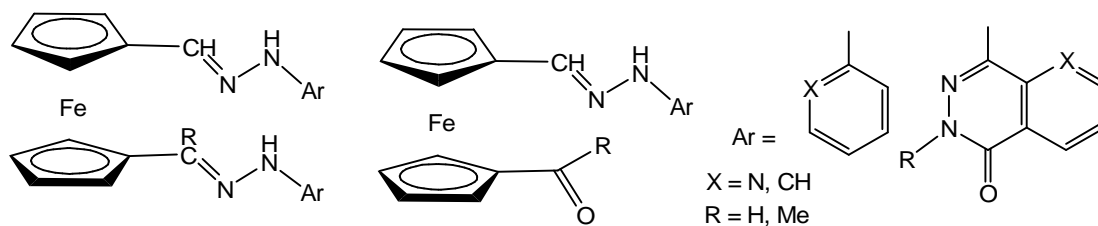
i) Általunk előállított kalkonokat hidrazinnal és metilhidrazinnal reagáltatva ferrocenil- és aril/hetaril-szubsztituált pirazolinokhoz és pirazolokhoz jutottunk, melyek szerkezetét IR és NMR spektroszkópiai vizsgálatokkal bizonyítottuk. A ferrocenil csoportot tartalmazó kalkon reakciójának kivételével a hidrazinnal kivitelezett gyűrűzárásokat minden esetben egy retro-Mannich típusú fragmentáció kísérte, melyben hidrazon és a megfelelő aril-metil keton, ill. annak hidrazon/azin származéka keletkezett. A metilhidrazinnal végzett savkatalizált reakciókban egyes esetekben regioizomerek képződését,

valamint spontán aromatiszációt tapasztaltunk. Megállapítottuk, hogy a pirazolinok oxidációját a nitrogénhez kapcsolódó szubsztituens jelentősen befolyásolja. Az említett reakciókban észlelt szubsztituensfüggő reaktivitást és regioszelektivitást az oldószer-hatást is figyelembevéve DFT számításokkal [B3LYP/6-31G(d,p)] értelmeztük. Az eredmények a pirazolok/pirazolinok kémiájára általánosan kiterjeszthetők [8]. A kalkonok ciklizációs reakcióit arilhidrazinokkal is elvégeztük, és az aril-csoport szubsztituenseinek függvényében tanulmányoztuk az így kapott pirazolinok oxidációját különböző oxidálószerrel (pl. diciano-diklórkinonnal). A kísérleti tapasztalatokat a fent említett módon DFT számításokkal értelmeztük. Az eredményekből egy kézirat megírása folyamatban van [9].

j) Előállítottuk a formil- és acetilferrocén tiokarbazonjának S-metil származékát és vizsgáltuk e vegyületek ciklizációs reakcióit dimetil-acetiléndikarboxiláttal (DMAD). A konjugált addícióval, kondenzációval és oxidatív gyűrűzárással lejátszódó reakciókban egy sor változatos szerkezetű, és biológiai szempontból is érdekes, új ferrocén-tartalmú heterociklusos vegyület, mint 1,3-tiazion-, tiazol-, tiazolon-, 1,2,4-triazol-, pirimidon- és imidazolonszármazék képződött. Egy exociklusos kettős kötetést tartalmazó imidazolomból diazometánnal kivitelezett 1,3-dipoláris cikloaddícióval előállítottunk egy pirazolin és tiazolon gyűrűt tartalmazó spirovegyületet is. Az új vegyületek szerkezetét IR, NMR és röntgendiffrakciós mérésekkel igazoltuk. Az eredményekből egy közlemény előkészületben van.



k) A diformil- és 1-acetil-1'-formilferrocénből kondenzációs reakciók révén heterociklusos dihidrazonokat és 1'-formil/1'-acetil-1-hidrazonokat szintetizáltunk, majd változatos kísérleti körülmények között tanulmányoztuk cikloaddíciós reakciókészségüket. Ezek a hidrazonok és dihidrazonok a másik Cp-gyűrűn nem szubsztituált monohidrazonoktól eltérően dimetil-fumaráttal-, maleáttal-, acetiléndikarboxiláttal és ω -nitrosztirollal az általunk vizsgált körülmények között (pl. reflux acetonitrilben) nem adnak cikloaddíciós termékeket. Ezt a határozott reaktivitásbeli különbséget DFT számításokkal [B3LYP/6-31G(d,p)] kapott molekuláris és lokális reaktivitási adatok [kémiai potenciál (μ), keménység (η), Fukui indexek (f)] kielégítően alátámasztják. Az eredményekből egy kézirat előkészítése folyamatban van.



3. altéma: Ferrocénszármazékok tumorelles hatásának vizsgálata *in vitro*, HL-60 humán leukémia sejtvonalon.

MÓDSZEREK:

A ferrocéntartalmú vegyületek tumorelles hatását a sejtek életképességének meghatározásával, MTT módszer segítségével vizsgáltuk szenzitív és rezisztens HL-60 humán leukémia sejtvonalon (HL-60/control, HL-60/MDR1 és HL-60/MRP1).

A sejtek fenntartása 10% FCS-t tartalmazó RPMI 1640 médiumban történt, a kísérleteket 96 lyukú szövettenyésztő lemezben végeztük, 5000 sejt/lyuk kiindulási sejtszámmal.

A sejteket 3 órán át 37°C-on inkubáltuk a ferrocéntartalmú vegyületek oldataival FCS-mentes RPMI 1640 médiumban. Kontrollként kezeletlen sejtek szolgáltak. A kezelést követő mosás után a sejteket 72 óráig továbbtenyésztettük 10% FCS-t tartalmazó RPMI 1640 médiumban. Az élő sejtek kontrollhoz viszonyított mennyiségét MTT-tesztel határoztuk meg. Két kísérlet eredményeit átlagoltuk, meghatároztuk az adott vegyületre jellemző 50%-os gátlási koncentrációt (IC_{50}), illetve egyes vegyületeknél a toxicitás mértékét (LD_{50}). Amennyiben az IC_{50} érték 10^{-7} – 10^{-6} M-os nagyságrendbe esik, abban az esetben már hatékony tumorgátló szerről beszélhetünk.

EREDMÉNYEK:

I. Aminosav-származékok

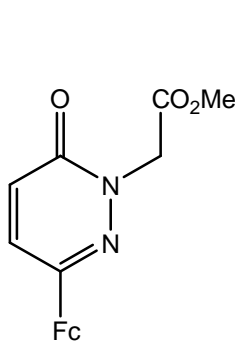
A ferrocénkarbonsav aminosav-származékai (Fc-CO-Gly, Fc-CO-Pro és Fc-CO-Phe, előállításukat ld. a 4. altémánál) nem gátolták a HL-60 sejtek proliferációját 10^{-11} M– 10^{-3} M közötti koncentráció-tartományban.

II. Ferrocéntartalmú hidrazonszármazékok

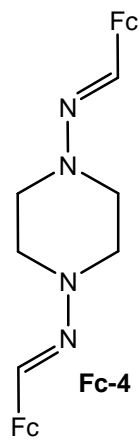
Vizsgáltuk formilferrocénből előállítható hidrazonszármazékok (**Fc-3–Fc-7**) tumorelles hatását HL-60 sejtvonalon. **Fc-4** és **Fc-6** DMSO-ban sem oldódott, így IC_{50} értéket nem tudtunk mérni. **Fc-3** oldódott vizes közegben is, azonban ez a vegyület nem gátolta a HL-60 sejtek szaporodását a vizsgált koncentráció-tartományban (10^{-11} – 10^{-3} M). **Fc-5** és **Fc-7** már határozottan gátolta a HL-60 sejtek proliferációját (IC_{50} =39,47 μ M, ill. 42,56 μ M).

III. Ferrocéntartalmú imidazol- oxazol- és fenotiazinszármazékok

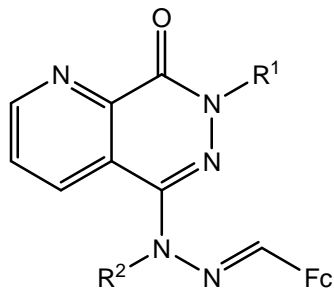
A harmadik csoport vegyületei közül a tumorsejtek növekedését gátló aktivitást mutattak **Fc-8**, **Fc-9a**, **Fc-9b** és **Fc-11** származékok [21]. Még nagyobb aktivitást találtunk **Fc-10**, ill. az 1,1' diszubsztituált ferrocenil-fenotiazin származék (**Fc-13**) és a két ferrocén egységet tartalmazó **Fc-14** vegyület esetében (1. táblázat).



Fc-3

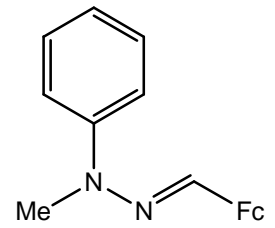


Fc-4

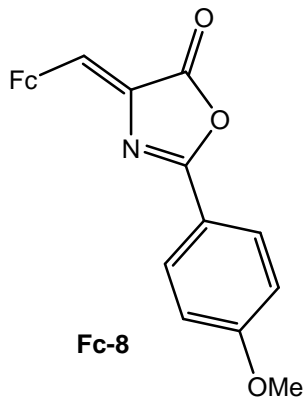


Fc-5

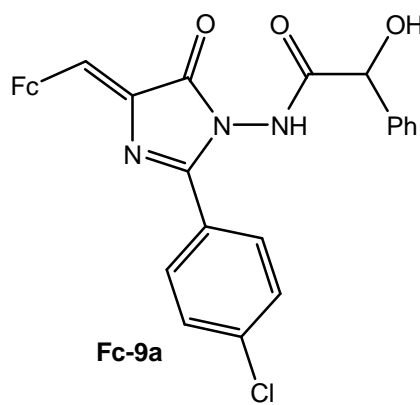
Fc-6



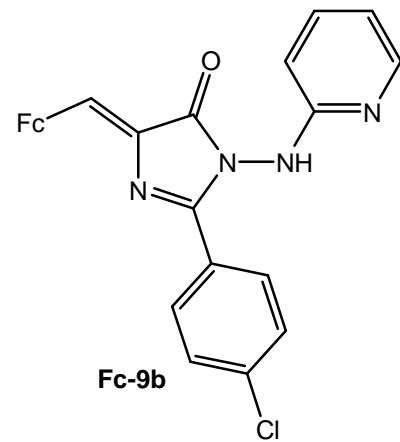
Fc-7



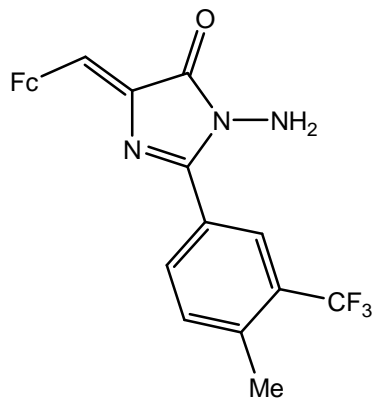
Fc-8



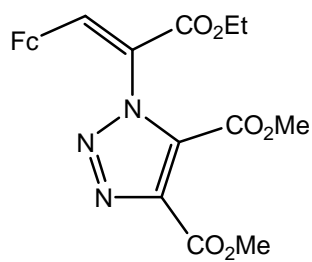
Fc-9a



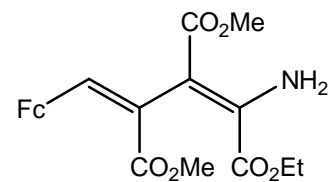
Fc-9b



Fc-10



Fc-11



Fc-12

Vizsgált anyagok I

<i>Vegyület</i>	<i>IC₅₀(1) μM</i>	<i>IC₅₀(2)</i>
Fc-8	2,07	4,32
Fc-9a	4,89	2,61
Fc-9b	3,79	3,30
Fc-10	1,14	1,90
Fc-11	1,96	3,74
Fc-12	66,35	>80
Fc-13	0,26	0,24
Fc-14	1,53	0,35

1. táblázat A III. csoport ferrocénvegyületeinek IC₅₀ értékei

IV. Kalkonok és cukorszármazékaik

A ferrocenil-fenil-kalkonszármazékok (**Fc-15–Fc-18**) hatékonyan gátolták a HL-60 sejtek szaporodását, egy nagyságrenddel jobban, mint az analóg difenil-kalkonok (2. táblázat). Ebben a sorozatban legjobbnak a fenilgyűrűn hidroxicsoportot tartalmazó **Fc-20** vegyület bizonyult, de a többi kalkonszármazék is alacsony IC₅₀ értékkel jellemezhető. A vegyületekben sem az oxigén és a kettőskötés egymáshoz viszonyított helyzete, sem a fenil/*p*-metoxi-fenil szubsztituens nem befolyásolja a biológiai hatást. A fenilgyűrűn acetilezett cukor-molekularészt (**Fc-21**: tetra-O-acetil-glükózil-; **Fc-19**: tetra-O-acetil-galaktozil) hordozó kalkon-vegyületek a többi kalkonhoz hasonló aktivitást mutattak, szemben a szabad cukor-részt (**Fc-22**: glükóz; **Fc-23**: galaktóz) tartalmazó származékokkal, amelyek csak két nagyságrenddel nagyobb koncentrációban voltak hatásosak [5].

<i>Vegyület</i>	<i>IC₅₀(1) μM</i>	<i>IC₅₀(2)</i>
1,3-difenil-kalkon	10,19	7,21
1-(<i>p</i> -metoxifenil)-3-fenil-kalkon	19,22	17,94
Fc-15	3,54	2,66
Fc-16	3,54	2,89
Fc-17	4,66	3,1
Fc-18	4,6	3,0
Fc-19	4,49	3,87
Fc-20	1,79	1,75
Fc-21	5,01	2,92
Fc-22	243	288,7
Fc-23	216,8	314,2

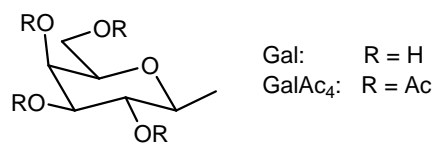
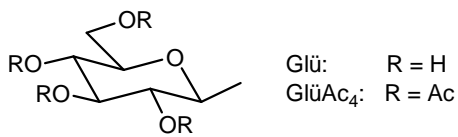
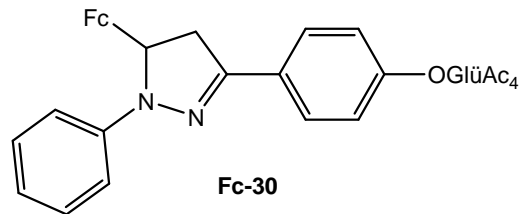
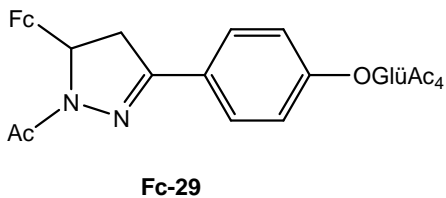
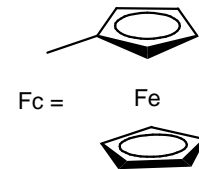
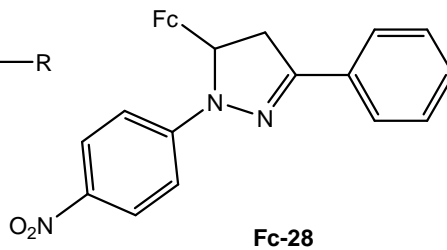
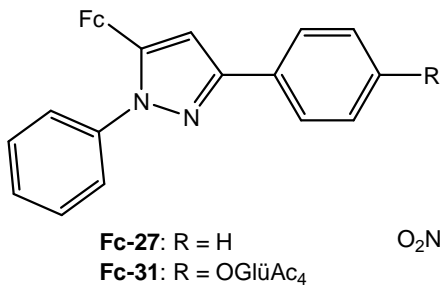
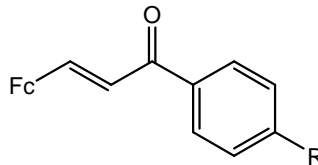
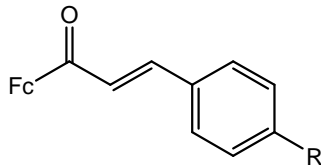
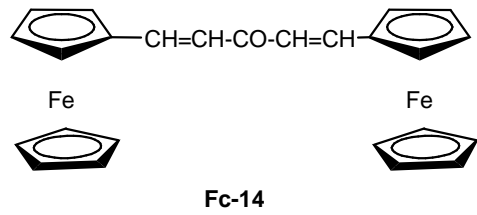
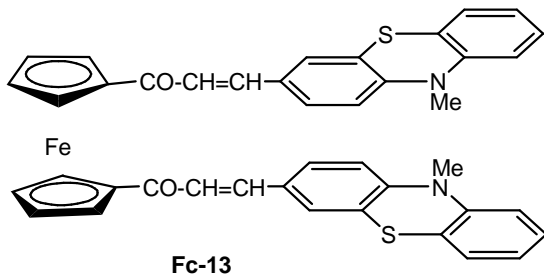
2. táblázat Kalkonok, ferrocéntartalmú kalkonok és cukorszármazékaik IC₅₀ értékei

IVa. Ferrocéntartalmú kalkonok hatása multidrug-rezisztens HL-60 sejtekre

A ferrocénszármazékok hatását HL-60/MDR1 és HL-60/MRP1 sejteken vizsgáltuk. Valamennyi vizsgált vegyület esetében azt tapasztaltuk, hogy a ferrocénszármazékok citosztatikus hatásúak rezisztens sejtekre is (3. táblázat).

	<u>HL-60/MDR1</u>		<u>HL-60/MRP1</u>	
	<i>IC₅₀(rezisztens) μM</i>	<i>IC₅₀ (szenzitív)</i>	<i>IC₅₀(rezisztens)</i>	<i>IC₅₀ (szenzitív)</i>
Fc-20	3,9	1,79	5,06	1,79
Fc-24	2,27	2,58	2,27	2,58
Fc-21	3,96	5,01	12,82	5,01
Fc-19	4,18	4,9	3,03	4,9

3. táblázat Ferrocénszármazékok IC₅₀ értékei multidrug rezisztens HL-60 sejteken



Vizsgált anyagok II

IVb Ferrocéntartalmú cukorszármazékok toxicitása

A ferrocéntartalmú cukorszármazékok és kalkonok toxicitását 3 órás kezelés után vizsgáltuk szenzitív HL-60 sejteken. Megállapítottuk, hogy sem a kalkon, sem a pirazol-részt tartalmazó cukorszármazékok nem toxikusak. A cukrot nem tartalmazó kalkonok esetében kis mértékű citotoxicitást tapasztaltunk [5].

V. Nitrogéntartalmú származékok

Ebben a csoportban eddig 4 pirazolszármazék és két kalkon típusú vegyület hatását vizsgáltuk (4. táblázat). A fenilgyűrűn amin-szubsztituált ferrocenil-kalkonok (**Fc-25** és **Fc-26**) jó hatásfokkal gátolták a HL-60 sejtek szaporodását [20]. A szénhidráttal szubsztituált N-fenil-pirazolin/pirazol vegyületpár (**Fc-30** és **Fc-31**) nem gyakorolt hatást a HL-60 sejtekre [5, 22], valamivel jobb gátló hatása volt az N-acetil-pirazolin származéknak (**Fc-29**). Hatékonyak bizonyult viszont az 5-ferrocenil-1,3-difenil-pirazol (**Fc-27**).

Vegyület	$IC_{50}(1)\mu M$	$IC_{50}(2)$
Fc-25	3,29	1,38
Fc-26	3,38	3,73
Fc-27	4,31	2,79
Fc-28	>100	>400
Fc-29	21,04	52,24
Fc-30	>100	>100
Fc-31	>400	>100

4. táblázat Nitrogéntartalmú ferrocenilkalkonok és ferrocenil-pirazol(in)ok IC_{50} értékei

VI. A ferrocén-karbonsav és ferrocenil-akrilsav oligoarginin konjugátumai

Ferrocéntartalmú peptidkonjugátumok szintézise

Peptidek

RRRR = Arg₄

RRRRRR = Arg₆

RRRRRRRR = Arg₈

TRGRSRGRSGR = TRG

Az oligoarginineket szilárd fázisú peptidszintézissel állítottuk elő, Rink Amide gyantán (0.64 mmol/g), Fmoc^tBu stratégiával. A peptideket RP-HPLC segítségével tisztítottuk és liofilizáltuk.

A TRG peptidet szilárd fázisú peptidszintézissel állítottuk elő, MBHA gyantán (0.62 mmol/g) Boc/Bzl stratégiával. A peptidet a gyantáról HF segítségével hasítottuk le p-krezol gyökfogó jelenlétében. A peptidet RP-HPLC segítségével tisztítottuk és liofilizáltuk

Ferrocén-karbonsav konjugátumok

A konjugátumokat szilárd fázison készítettük. A terminális aminocsoport védőcsoportjának hasítása után a ferrocén-karbonsavat az aktuális kapcsoló reagensek segítségével konjugáltuk a gyantán levő peptidhez (oligoarginineknél: DIC/HOBt, TRG peptidnél HBTU/HOBt/DIEA). A sikeres reakcióhoz 2-3 óra illetve megismételt kapcsolás szükséges. A kapcsolás sikerességét Kaiser-tesztel ellenőriztük. Ezután a konjugátumokat a peptideknek megfelelő módszerrel hasítottuk le a gyantáról, RP-HPLC módszerrel tisztítottuk és liofilizáltuk.

Ferrocenil-akrilsav konjugátumok

A ferrocenil-akrilsav peptidkonjugátumait oldatban szintetizáltuk, hexa- és oktaarginin peptidekkel készültek, BOP/HOBt/DIEA kapcsoló reagensek segítségével, dimetilformamidban. A peptidhez képest 20% feleslegben adtuk a reagenseket és a ferrocenil-akrilsavat, majd néhány óra elteltével még egyszer ugyanannyi reagenst és ferrocenil-akrilsavat adtunk. Az oldószert vákuumban eltávolítottuk és a terméket RP-HPLC segítségével nyertük ki, majd liofilizáltuk.

A peptidek és konjugátumok tisztaságának ellenőrzése RP-HPLC-vel történt, azonosításuk pedig tömegspektrometriával (ESI-MS).

A sejtproliferációt mind a ferrocén-karbonsav, mind a ferrocenil-akrilsav gátolta ($IC_{50} = 850 \mu\text{M}$, ill. $17 \mu\text{M}$) 3 óra kezelés után. Mivel a vegyületek csak DMSO-ban oldódtak, ezért közvetlenül nem alkalmasak *in vivo* tumorellenes hatás tesztelésére. A vízdoldékonyság növelése és a sejtekbe való bejutás elősegítésének érdekében elkészítettük a ferrocén-karbonsav és a ferrocenil-akrilsav peptidkonjugátumait Arg₆ és Arg₈ peptidekkel. A konjugátumok vízben oldódtak, tumorellenes hatásuk HL-60 sejteken 1 nagyságrenddel jobbnak bizonyult a ferrocén-karbonsavénál, a peptid hosszától függően (Arg₈>Arg₆) növelve a ferrocén-karbonsav hatékonyságát [10, 18, 19]. A ferrocenil-akrilsav esetében a peptidhez való konjugálás csökkentette a vegyület hatékonyságát [20].

4. altéma: Ferrocén-szubsztituált aminosavak és ferrocén-diamidok előállítása aminokarbonilezési reakciók útján

Jelen program keretében sikeresen alkalmaztuk a palládium-katalizált karbonilezést ferrocenoil-aminosav-észterek előállítására (I, II), nem szimmetrikusan szubsztituált 1,1'-ferrocénszármazékok szintézisére (III), a szteránváz és a ferrocénváz összekapcsolására (IV). A karbonilezés során a reakcióelegyben az aril/alkenil-jodidból, a palládium-tartalmú katalizátor-prekursorból és szén-monoxidból kialakuló acil-palládium komplex rendkívül reakcióképes acilezőszer, mely reakcióba lép különböző nukleofil reagensekkel. A folyamat karbonsavszármazékok képződéséhez vezet.

Az első három esetben elektrofil reakciópartnerként a jód-ferrocén (I, II), illetve az 1,1'-dijód-ferrocén (III) szerepelt, míg az utolsó szintézisben egy ferrocén-tartalmú kalkon játszott a nukleofil reagens szerepét és lépett reakcióba az elektrofil szteránváz asz alkenil-halogenidekkel.

I. Jód-ferrocén aminokarbonilezése bázikus oldalláncot nem tartalmazó aminosav-észterek mint nukleofil reagensek jelenlétében

A jód-ferrocén különböző aminosav-észterek mint nukleofil reagensek jelenlétében lejátszódó aminokarbonilezési reakcióiban kitűnő hozammal tudtunk előállítani néhány már ismert és két eddig még nem közölt ferrocenoil-aminosav-észtert. Az észterek lúgos körülmények között történő hasításával a szabad karboxilcsoportot tartalmazó származékokhoz jutottunk [13, 27].

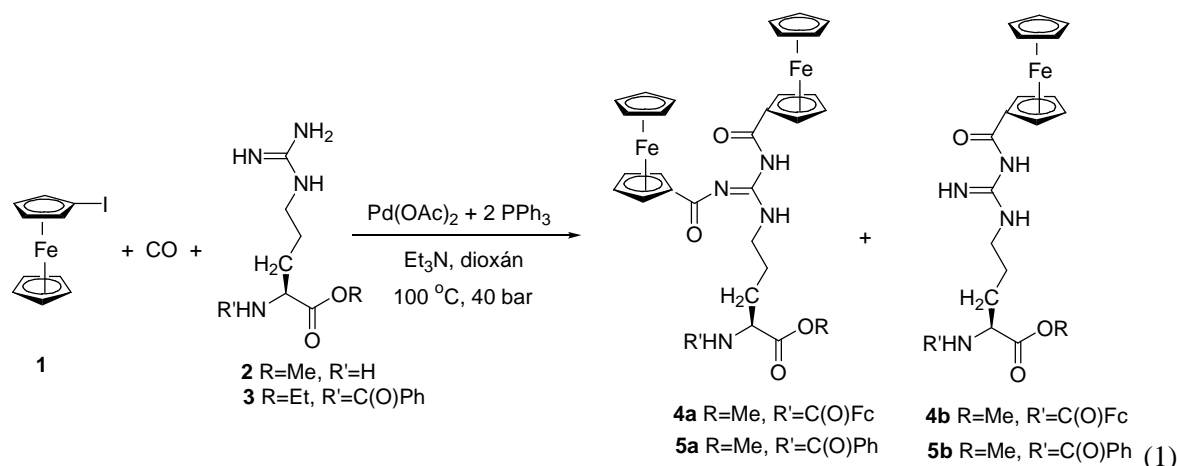
Mivel a nyomás alatti karbonilezés során általában kettős karbonilezéssel képződő, ketoamid típusú vegyületek kialakulására is van lehetőség, megkíséreltük ezen, eddig ismeretlen vegyületek szintézisét is. A korábbi eredményekkel ellentétben nem a hőmérséklet, hanem a bázis változtatása vezetett eredményre: DBU jelenlétében a bázis koncentrációjától függő szelektivitással képződtek a ketoamid-típusú származékok.

A reakcióban két új termék keletkezését is tapasztaltuk. A spektroszkópiai vizsgálatok alapján a termékek a DBU és az acil-palládium komplex reakciójában képződő amid- illetve ketoamid származékok. A reakció során az acilezést a kétgyűrűs DBU hídjának felhasadása kíséri.

Tapasztalatainkat felhasználva módszert dolgoztunk ki az (1'-acetyl-ferrocenoil)-aminosavak metil-észtereinek jód-ferrocénből történő előállítására. A vegyületeket a homogénkatalitikus karbonilezéssel kapott ferrocenoil-aminosavészterek acilezésével nyertük. Az acetyl csoport átalakításával várhatóan kedvező biológiai hatással rendelkező oldallánc kiépítésére, míg az aminosav-oldallánc továbbépítésével a sejtbe való bejutást elősegítő peptid kialakítására lesz lehetőség.

II. Jód-ferrocén aminokarbonilezése arginin mint nukleofil reagens jelenlétében

A bázikus oldalláncot tartalmazó arginin reakciója alapvetően abban tér el a fent ismertetett folyamatoktól, hogy a karbonilezés során kialakuló és acilezőszerként működő acil-palládium komplex elvileg bármelyik bázikus csoporttal reakcióba léphet, így várhatóan bonyolult termékegyesek képződésével is számolnunk kell.



A karbonilezés során támadható bázikus csoportok számának csökkentése céljából az Arg-OMe (**2**) mellett az α -pozícióban benzoilcsoporttal védett arginin-etil-észter (**3**) reakcióját is vizsgáltuk. A reakciók érdekessége, hogy a jód-ferrocén/nukleofil aránytól függetlenül a fő termék **2** jelenlétében lejátszódó karbonilezésnél a három (**4a**), **3** reakciójában pedig a két ferrocenoilcsoportot tartalmazó származék (**5a**). A reakcióelegyekből még egy-egy jelentősebb mennyiségben képződő származékot sikerült elkülönítenünk. Ezek pontos szerkezetazonosítása még folyamatban van. Az NMR-vizsgálatok alapján azonban úgy tűnik, hogy az Arg-OMe két (**4b**), illetve az α -pozícióban benzoilcsoporttal védett arginin-etil-észter egy ferrocenoilcsoportot tartalmazó származékáról (**5b**) van szó [16].

III. Nem szimmetrikusan szubsztituált 1,1'-ferrocén-származékok szintézise

Az 1,1'-dijód-ferrocén (**11**) aminok jelenlétében lejátszódó karbonilezése során nagy aminfelesleg, magas hőmérséklet és hosszú reakcióidő alkalmazásával a megfelelő diamidok a fő termékek. Ezeket a vegyületeket sikerült jó hozammal (70-92%) izolálnunk.

Alacsonyabb hőmérséklet és kisebb aminfelesleg alkalmazásával lehetővé vált egyes 1'-jód-ferrocén-karboxamid, illetve 1'-jód-ferrocén-glioxilamid vegyületek szintézise is. Az így nyert származékok alkalmasnak bizonyultak további, nem szimmetrikusan diszubsztituált vegyületeknek egy újabb palládium-katalizált lépésben történő előállítására. Ez a további lépés lehet egy újabb karbonilezési reakció, de lehet önvegyületek jelenlétében lejátszódó Stille kapcsolás, vagy fenil-ketonokhoz vezető, NaBPh₄ reagenssel lejátszódó karbonilezés is. Mindhárom reakciótípus szelektíven és jó hozammal vezetett a kívánt termékekhez.

Mindezek ellenére a két különböző amidocsoportot tartalmazó 1,1'-ferrocén diamidok szintézisére alkalmasabbnak bizonyult egy másik módszer. Ennek során az 1,1'-dijód-ferrocént két különböző amin együttes jelenlétében karbonileztük [11].

A legtöbb amin-pár esetében a reagensek megfelelő arányának megválasztásával sikerült elérnünk, hogy a nem szimmetrikus származékok legyenek a fő termékek. A módszernek több előnye is van a kétlépéses szintézissel szemben. Egyrészt, mivel az 1'-jód-ferrocén-karboxamid köztitermék elkülönítése nélkül dolgozunk, egy tisztítási lépéssel kevesebbre van szükség. Másrészt, mivel a köztitermék az első karbonilezési lépés viszonylag kis szelektivitása miatt csak közepes hozammal állítható elő, az egy lépéses szintézis hozama magasabb.

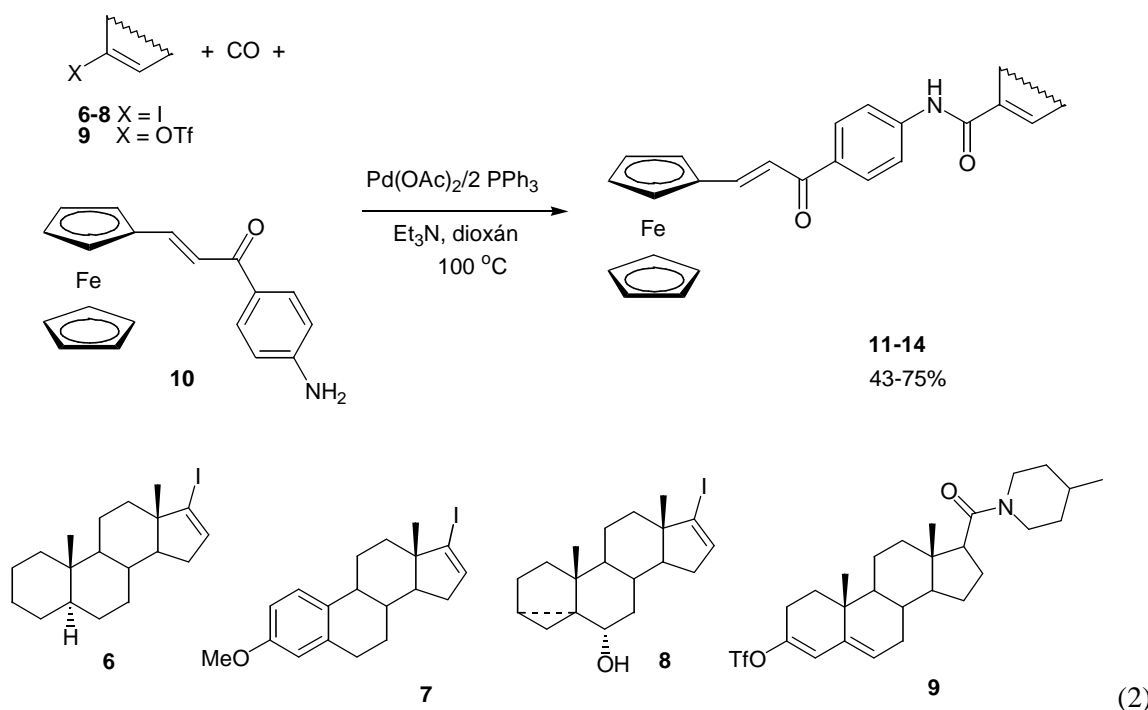
Az egy primer és egy szekunder amidocsoportot tartalmazó vegyületeknél mind oldatban, mind szilárd halmazállapotban intramolekuláris hidrogénhid kötés figyelhető meg a primer amid nitrogénjéhez kapcsolódó hidrogénatom, és a másik amidcsoport oxigénatomja között. A hidrogénhid jelenlétét oldatfázisban NMR és IR spektroszkópai módszerekkel, szilárd állapotban pedig röntgendiffrakciós vizsgálattal igazoltuk. Megmutattuk azt is, hogy az oldatban kialakult intramolekuláris hidrogénhid kötés kloridionok jelenlétében felhasad, a változás spektroszkópai módszerekkel követhető, tehát az előállított molekulák anionok jelenlétének detektálására is alkalmasak lehetnek.

Hasonló módszerrel, vagyis kétféle nukleofil reagens együttes jelenlétében különböző ferrocéntartalmú aminosavszármazékokat (GlyOMe—Fc—PheOMe, AlaOMe—Fc—PheOMe, PheOMe—Fc—MetOMe, GlyOMe—Fc—MetOMe) is előállítottunk.

IV. A ferrocénváz és a szteránváz összekapcsolása palládium-katalizált karbonilezés felhasználásával

Karbonilezési körülmények között a **6-8** szteránváz as alkenil-jodidok, illetve a **9** enol-triflát reakciója a **10** ferrocenil-kalkon jelenlétében a **11-14** származékokat szolgáltatta. A korábban tárgyalt karbonilezési reakciókhoz képest fontos eltérés, hogy az alkenil-származékok már atmoszférikus nyomáson is átalakíthatók (kettős karbonilezés viszont nyomás alatt sem következik be). A termékek szerkezetét az NMR mérések mellett **11** röntgendiffrakciós vizsgálata is alátámasztotta [15].

A karbonilezési reakció során nukleofil reakciópartnerként alkalmazott **10**-hez hasonló ferrocenil-kalkon vegyületek között ismertek antibakteriális, maláriaellenes, illetve tumorelles hatású származékok, a szteránváz hozzáépítése révén a lipofil jelleg növekedésével várható a biológiai hatás intenzitásának növekedése.



A vegyületek biológiai hatását az ELTE MTA Peptidkémiai Tanszéki Kutatócsoportjában jelenleg vizsgálják.

Irodalomjegyzék

Megjelent és közlés alatt lévő publikációk

1. P. Sohár, A. Csámpai, P. Perjési:

Synthesis and structure of some (*E*)-ferrocene-methylenecycloalkanones and their benzylidene analogues

ARKIVOC, **2003**, 114-120.

2 Csámpai, A., Túrós, Gy. I., Kudar, V., Simon, K., Oeynhausien, H., Wamhoff, H. and Sohár, P.: Ethyl- α -(Triphenylphosphoranylidene)amino- β -ferrocenylacrylate as a Starting Material for [2+2] Cycloadditions, Including Aza-Wittig Reaction

Eur. J. Org. Chem., **2004**, 717-723.

3. Csámpai, A., Abrán, Á., Kudar, V., Túrós, Gy., Wamhoff, H., Sohár, P.:

Synthesis, NMR, IR spectroscopic and X-ray study on novel [pyridazin-3(2H)-one-6-yl]ferrocenes and related ferrocenophanes. Study on ferrocenes. Part 14.

J. Organomet. Chem., **690**, 802-810, (2005).

4. Sohár, P., Csámpai, A., Abrán, Á., Túrós, Gy., Vass, E., Kudar, V., Újszászy, K., Fábíán, B.: Macrocyclic double ferrocenes. Their structure, and an IR and NMR Spectroscopic, X-ray Crystallographic, and Conformational and Dynamic Investigation.

Eur. J. Org. Chem., **2005**, 1659-1664.

5. V. Zsoldos-Mády, A. Csámpai, R. Szabó, F. Hudecz, E. Mészáros-Alapi, J. Pásztor and P. Sohár: Synthesis, structure and *in vitro* antitumor activity of some new glycoside derivatives of ferrocenyl-chalcones and ferrocenyl-pyrazolines.

ChemMedChem, **2006**, in press (cmdc200600052).

6. V. Kudar, V. Zsoldos-Mády, K. Simon, A. Csámpai and P. Sohár: Synthesis, IR-, NMR- and X-ray investigations on some novel N-hetaryl-dihydro-pyrazolyl ferrocenes and their aryl analogues. Study on ferrocenes, Part 16.

J. Organomet. Chem., **690**, 4018-4026 (2005).

7. T. Lovász, L. Găină, Gy. Túrós, A. Csámpai, D. Frigyes, B. Fábíán, I. A. Silberg and P. Sohár: Structure elucidation and DFT-study on substrate-selective formation of chalcones containing ferrocene and phenothiazine units. Study on ferrocenes, Part 17.

J. Mol. Struct., **751**, 100-108 (2005).

8. L. Găină, A. Csámpai, Gy. Túrós, T. Lovász, V. Zsoldos-Mády, I. A. Silberg and P. Sohár: (*E*)-3-(2-Alkyl-10H-Phenothiazin-3-yl)-1-arylprop-2-en-1-ones: Preparative, IR, NMR and DFT Study on their Substituent-Dependent Reactivity in Hydrazinolysis and Sonication-assisted Oxidation with Copper(II)-nitrate

Organic & Biomolecular Chemistry, **2006**, the revised version has been submitted (manuscript No.: B608455A).

9. O. Ozohanics, A. Csámpai, V. Zsoldos-Mády, D. Frigyes, V. Kudar and P. Sohár:

Ferrocenyl pyrazolines: Preparation, structure and DFT study on regioselective ring-closure and redox properties (összeállítás alatt)

10. Miklán Zs., Bánóczi Z., Reményi J., Hudecz F.: Synthesis of ferrocene containing peptide conjugates and their effect on human leukemia (HL-60) cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* (közlésre beküldve)

11. A. Kuik, Z. Szarka, R. Skoda-Földes, L. Kollár: Facile synthesis of unsymmetrically substituted ferrocene-1,1'-bis-carboxamides via homogeneous catalytic carbonylation
Lett. Org. Chem. **1**, 151-153 (2004).
12. Z. Szarka, A. Kuik, R. Skoda-Földes, L. Kollár: Aminocarbonylation of 1,1'-diiodoferrocene. Two-step synthesis of hetero-disubstituted ferrocene derivatives via homogeneous catalytic carbonylation/ coupling reactions
J. Organomet. Chem., **689**, 2770-2775 (2004).
13. A. Kuik, R. Skoda-Földes, J. Balogh, L. Kollár: Synthesis of ferrocenoyl amino acid derivatives via homogeneous catalytic aminocarbonylation
J. Organomet. Chem., **690**, 3237-3242 (2005).
14. A. Kuik, R. Skoda-Földes, A. C. Bényei, G. Rangits, L. Kollár: Formation of intramolecular hydrogen bonds in heterodisubstituted ferrocene diamides with a secondary and a tertiary amido group. X-ray structure of 1'-(N'-butyl-carbamoyl)-morpholino ferrocenecarboxamide
J. Organomet. Chem., **691**, 3037-3042 (2006).
15. J. Balogh, V. Zsoldos-Mády, D. Frigyes, A. C. Bényei, R. Skoda-Földes, P. Sohár: Synthesis of novel ferrocene labeled steroidal derivatives via palladium-catalysed carbonylation
J. Organomet. Chem. (közlésre előkészítve)
16. J. Balogh, R. Skoda-Földes, D. Frigyes, G. Rangits, L. Kollár: Aminocarbonylation of iodoferrrocene in the presence of arginine derivatives
J. Organomet. Chem. (összeállítás alatt)
17. A. Kuik, R. Skoda-Földes, Z. Berente, L. Kollár: Synthesis of 1,1'-heterodisubstituted ferrocenoyl amino acids via palladium-catalyzed carbonylation
J. Organomet. Chem., (összeállítás alatt)

Előadások, szakdolgozatok

18. Miklán, Zs. Ferrocéntartalmú peptid konjugátumok szintézise és hatásuk humán leukémia (HL-60) sejtekre. *Szakedolgozat*, ELTE TTK, Budapest. Megvédve: **2004**. Témavezető: Hudecz Ferenc
19. Miklán Zs., Reményi J., Bánóczy Z., Hudecz F.: Ferrocén-karbonsav argininben gazdag peptid konjugátumai; a konjugátumok hatása HL-60 sejtekre. Peptidkémiai és Nukleotidkémiai Munkabizottsági ülés, Balatonszemes, **2004**.
20. Szabó R., Zsoldosné Mády V., Reményi J., Miklán Zs., Alapi E., Csámpai A., Hudecz F., Sohár P.: Ferrocenil-kalkonok szintézise és hatásuk humán leukémia (HL-60) sejtekre. Vegyészkonferencia, Hajdúszoboszló, **2005**. 06. 28-30, poszter P-82. Abstr. p. 132.
21. Túrós Gy., Csámpai A., Szabó R., Reményi J., Györfi A., Hudecz F., Sohár P.: Ferrocén-subsztituált heterociklusos vegyületek szintézise és hatása szenzitív és rezisztens humán leukémia (HL-60) sejtekre. Vegyészkonferencia, Hajdúszoboszló, **2005**. 06. 28-30, poszter P-95. Abstr. p. 145.
22. V, Zsoldos-Mády, J. Pásztor, O. Ozohanics, A. Csámpai, R. Szabó, J. Reményi, F. Hudecz, P. Sohár: New ferrocenyl enones, pyrazolines, pyrazoles and their glycosides. Synthesis, structure, and *in vitro* antitumour activity. 13th FEChem Conference on Heterocycles in Bioorganic Chemistry, Sopron, Hungary, **2006**. 05. 28-31, poszter PO-50, Abstr. p. 96.

23. Csámpai A., Túrós Gy. I., Kovács D., Sohár P.: Application of Biginelli Reaction to the Synthesis of 3,4-dihydro-4/6-ferrocenylpyrimidine-2(1H)-ones and [3]ferrocenophane-containing *cis*-fused Hexahydropyrimido[4,5-d]pyrimidine-2,7(1*H*,3*H*)-diones
13th FEChem Conference on Heterocycles in Bioorganic Chemistry, Sopron, Hungary, **2006**. 05. 28-31, poszter PO-49, Abstr. p. 95.
24. Pásztor Judit: Új szénhidráttartalmú ferrocénszármazékok szintézise
Szakdolgozat, ELTE TTK, Budapest. Megvédve: **2006**. Témavezető: Zsoldosné Mády Virág
25. Ozohanics Oliver: Új ferrocéntartalmú heterociklusok szintézise és szisztematikus tömegspektrometriai vizsgálata
Szakdolgozat, ELTE TTK, Budapest. Megvédve: **2006**. Témavezetők: Zsoldosné Mády Virág és Frigyes Dávid
26. R. Skoda-Földes, Z. Szarka, A. Kuik, L. Kollár: Synthesis of ferrocene diamides via homogeneous catalytic carbonylation (PO127)
15th FEChem Conference on Organometallic Chemistry, Zurich, Switzerland, **2003**. 08. 10-15 (p)
27. Szarka Zs., Kuik Á., Skodáné Földes R.: Ferrocenoil-aminosavak homogénkatalitikus szintézise
MTA Peptidkémiai Munkabizottság ülése, Balatonszemes, **2004**. 05. 26.
28. Skodáné Földes R.
Homogénkatalitikus karbonilezés alkalmazása ferrocénszármazékok szintézisére
Bruckner-termi előadások, Budapest, **2005**. 04. 29.
29. Á. Kuik, R. Skoda-Földes, L. Kollár
Facile synthesis of unsymmetrically substituted ferrocene-1,1'-bis-carboxamides via homogeneous catalytic carbonylation
5th International School of Organometallic Chemistry, Camerino, Italy, **2005**. 09. 10-14.