

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Die Thesen der Doktorarbeit (Ph.D)

**Kísérletek glikozilidén-spiro-heterociklusok
előállítására**

**Untersuchungen zur Herstellung von Glycosylden-
spiro-Heterozyklen**

Páhi, András

Témavezető/Doktorvater: Dr. Somsák, László



DEBRECENI EGYETEM/UNIVERSITÄT DEBRECEN

Kémiai Tudományok Doktori Iskola/Chemische Graduiertenschule

Debrecen, 2014

1. Az értekezés előzményei és célkitűzései

A spirociklusok olyan vegyületek, melyben a gyűrűk egy közös sp^3 hibridállapotú szénatomon keresztül kapcsolódnak.

A spiroszármazékokat gyakran használja fel az optikai, az elektronikai és a gyógyszeripar. Az optikai felhasználás alapja az, hogy bizonyos vegyületek fény vagy hő hatására reverzibilisen elveszítik színüket, ezt használják fel a fényre sötétedő lencsék készítésénél. Az elektronikai felhasználás kis molekulatömegű, kettő vagy több π -elektronrendszert tartalmazó részek spirociklizációján alapul. Ilyen vegyületeket használnak például a szerves fényemittáló eszközök (OLED), napelemek gyártásánál.

A gyógyászati szempontból fontos természetes és szintetikus anyagok között is számos spirovegyület fordul elő. A hidantocidin egy anomer-spirociklus, mely a spiroszénhidrát származékokra irányította a figyelmet, és számos kutatást indított el. A benzopirán és a szukcinimid spiroheterociklusos származékai aldóz redukáz inhibitorok, melyekkel kezelhetőek a cukorbetegség szövődményei.

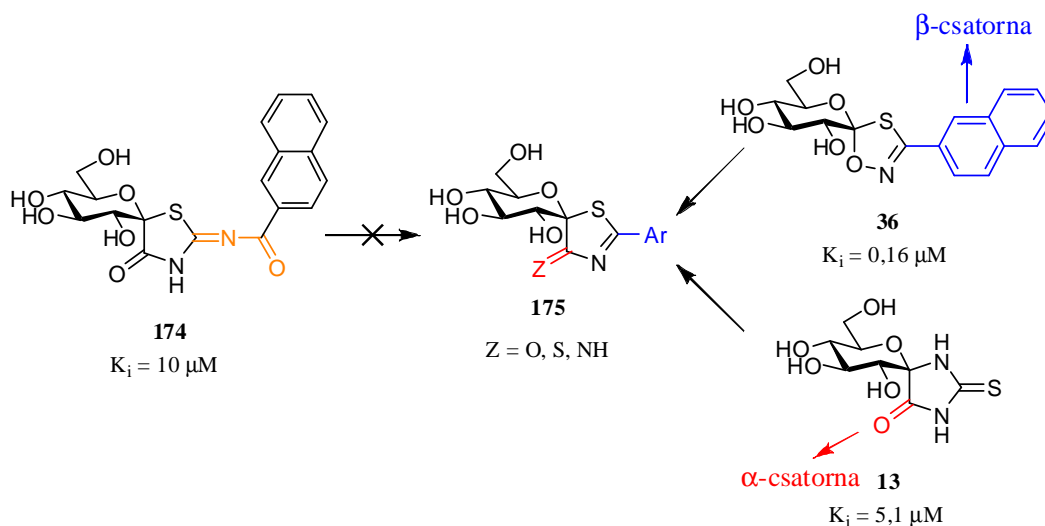
A cukorbetegség (diabetes mellitus) napjaink egyik leggyorsabban terjedő népbetegsége, melyre jelenleg oki gyógymód nincs. Az elhúzódó betegség legnagyobb kockázata a szövődmények megjelenése, ezért az orvosok egyetértenek abban, hogy tüneti kezelésként a normálhoz közeli vércukorszint fenntartására kell törekedni. A jelenleg kapható hipoglikémiás szerek azonban az esetek harmadában hatástalannak bizonyulnak, számos mellékhatással rendelkeznek és a hatásos szerek huzamosabb használatakor tolerancia lép fel.

A cukorbetegség úgynevezett nem inzulinfüggő típusában megemelkedik a máj glükóztermelése, amely két folyamatból tevődik össze, a glikogenolízisből és a glükoneogenezisből. A glikogén foszforiláz (GP) enzim inhibitoraival formálisan a glikogenolízis folyamata gátolható, de kimutatták, hogy a glükoneogenezisben keletkezett glükóz is áthalad a glikogenolízisen, így egyszerre mindkét folyamatba be lehet avatkozni. Ha a glikogénből nem tud glükóz-1-foszfát (Glc-1-P) keletkezni, akkor csökken a vérben lévő glükóz szintje, ezáltal lehetőség nyílna a cukorbetegség kezelésére.

A GP enzimnek számos inhibitora ismert, mint például *N*-glikozil-*N'*-acil-karbamidok, *N*- és *C*-glikozil-heterociklusok, iminocukrok és anomer spiroszármazékok. Doktori munkám során új anomer spirociklusok előállítását vizsgáltam*. Célul tűztük ki a jó GP gátló hatású spirovegyületek előnyös szerkezeti elemeit együttesen tartalmazó származékok szintézisét (1. ábra). A spiro-tiohidantoin (**13**) jó gátlási tulajdonságát az **oxo csoport** α -csatornába való

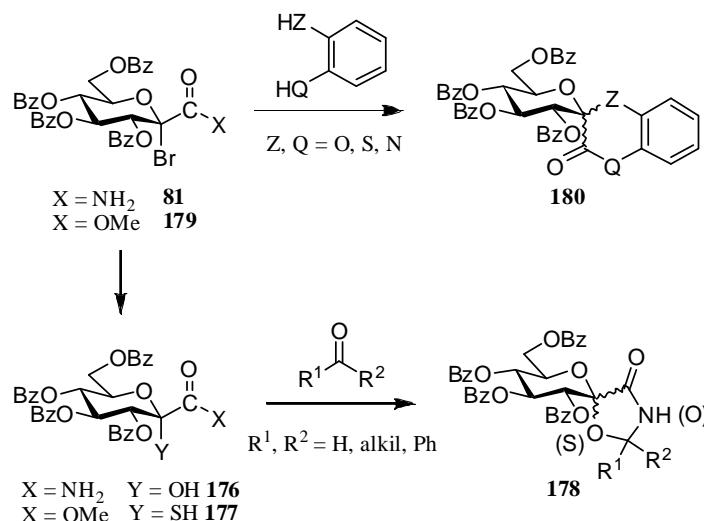
* A tézisben a dolgozatban megadott vegyületszámokat alkalmaztam

irányultságának köszönheti. A spiro-oxatiazolinnál (**36**) ez a szerkezeti elem hiányzik, viszont a hármasképzőben nagy térkitöltésű apoláros csoporttal rendelkeznek, ami az enzim β -csatornájában tud elhelyezkedni. Az acilimino-tiazolon (**174**) az enzim mindkét csatornája irányában tartalmaz megfelelő csoportokat, azonban az =NCO- rész jelenléte kedvezőtlen hatással lehet a kötődésre. Ezért célul tűztük ki a **175** típusú spirovegyületek szintézisét.



1. ábra: A célmolekulák tervezése

Vizsgálni kívántunk további spirociklizációs lehetőségeket is a **175** vegyület kiindulási anyagából: bróm származékok (**81**, **179**) reakcióját bifunkciós aromás rendszerekkel, illetve a **176**, **177** vegyületek gyűrűzárását keton vagy aldehid beépüléssel (2. ábra).



2. ábra: Tervezett spirociklizációk

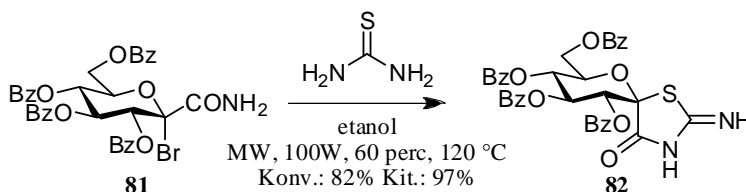
2. Alkalmazott vizsgálati módszerek

Munkánk során a szerves kémia makro-, félmikro és mikromódszereit alkalmaztuk. A reakciókat vékonyréteg kromatográfiával követtük. A kapott vegyületeket oszlopkromatográfiás módszerrel, valamint átkristályosítással tisztítottuk. Az előállított molekulák fizikai állandóit olvadáspont és forgatóképesség mérésével határoztuk meg. A vegyületek szerkezetét $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ és tömegspektrometriás módszerekkel igazoltuk.

3. Új tudományos eredmények

3.1 (1*R*)-1,5-Anhidro-2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil-D-glucitol-spiro-[1,5]-2-acil(vagy szulfonil)imino-1,3-tiazolidin-4-onok szintézise

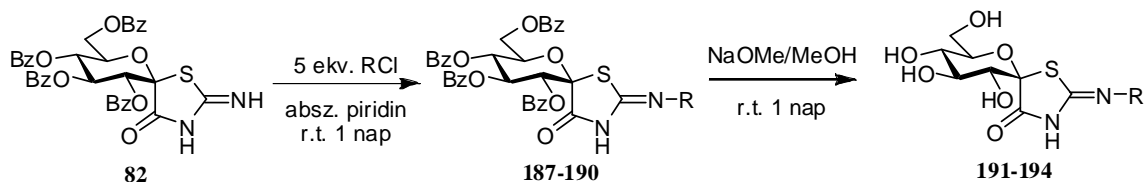
Az 1*R*-1,5-anhidro-2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil-D-glucitol-spiro-[1,5]-2-imino-1,3-tiazolidin-4-on (**82**) szintézisét mikrohullámú körülmények között optimalizáltuk. Az eredetileg 5 napos reakcióidőt 60 percre rövidítettük, mely mellett a konverziót (72% \rightarrow 82%) és a kitermelést (82% \rightarrow 97%) is növelni tudtuk. (3. ábra).



3. ábra: A glükopiranozilidén-spiro-imino-tiazolidin (**82**) optimalizált előállítása

A tiazolidin származékok körét kibővítettük az 1*R*-1,5-anhidro-2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil-D-glucitol-spiro-[1,5]-2-acil(vagy szulfonil)imino-1,3-tiazolidin-4-onokkal (**187-190**), majd a biológiai vizsgálatokhoz a védőcsoportokat Zemplén körülmények között eltávolítottuk (**191-194**) (4. ábra).

Vizsgáltuk a C-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil-1-bróm-1-dezoxi- β -D-glükopiranozil)formamid (**81**) és a metil-C-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil-1-bróm-1-dezoxi- β -D-glükopiranozil)formiát (**179**) gyűrűzárási reakcióit tiobenzamid, tioszemikarbazid, guanidin, benzamidin és ammónium-ditiokarbamát reagensekkel is, de ezek a reakciók sikertelennek bizonyultak.

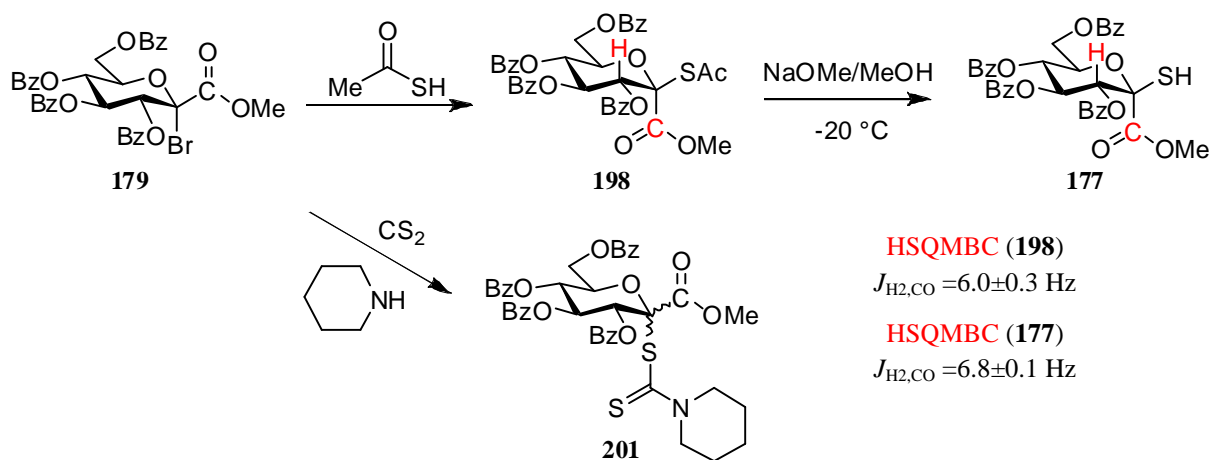


Sor	R	Vegyület	Kitermelés (%)	Vegyület	Kitermelés (%)
1	4-Me-C ₆ H ₄ -CO	187	53	191	43
2	Ph-SO ₂	188	55	192	98
3	1-naftil-SO ₂	189	45	193	96
4	2-naftil-SO ₂	190	62	194	98

4. ábra: Iminotiazolidin-4-on (**82**) acilezése és a termékek védőcsoportjainak eltávolítása

3.2 Metil-*C*-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil-1-bróm-1-dezoxi- β -D-glükopiranozil)formiát (**179**) reakciói *S*-nukleofilekkel

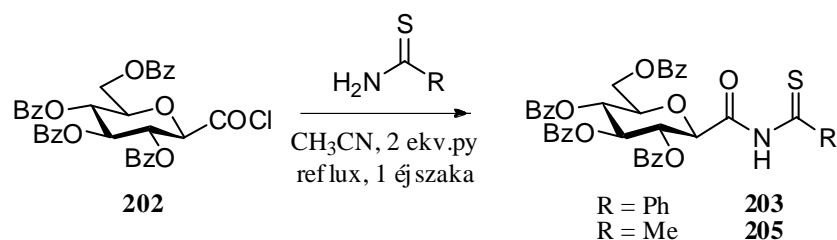
Metil-*C*-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil-1-bróm-1-dezoxi- β -D-glükopiranozil)formiát (**179**) és *S*-nukleofilek reakciójában előállítottuk a metil(1*R*-2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil-1-acetiltio-1-dezoxi- β -D-glükopiranozil)formiátot (**198**) és a metil(1*RS*-2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil-1-dezoxi-1-piperidinkarboditioát- β -D-glükopiranozil)formiátok anomer keverékét (**201**). A **198** származék *S*-acetil csoportjának szelektív eltávolításával kaptuk a metil-(1*R*-2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil-1-dezoxi-1-tio- β -D-glükopiranozil)formiátot (**177**). **177** és **198** esetében HSQMBC módszerrel állapítottuk meg az anomer konfigurációt (5. ábra). Kísérleteket végeztünk a **177** vegyület gyűrűzárására benzonitrillel bázikus közegben, illetve ciklohexanonnal savas közegben, azonban ezek a kísérletek eredménytelenek voltak.



5. ábra: Metil-glükopiranozil-formiát (**179**) és *S*-nukleofilek reakciói

3.3 *N*-tioacil-*C*-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil- β -*D*-glükopiranozil)formamidok előállítása és átalakításai

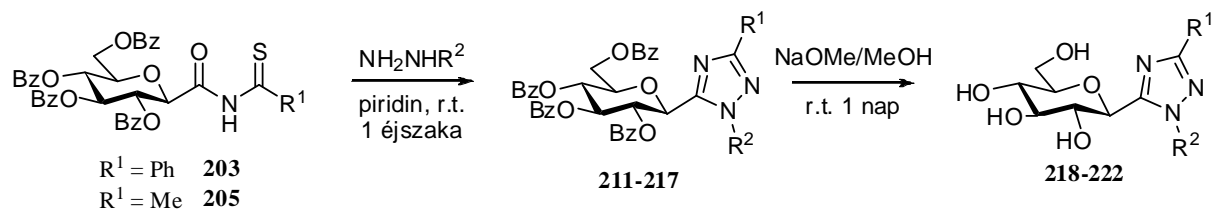
A) A *C*-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil- β -*D*-glükopiranozil)-formil kloriddal (**202**) absz. acetonitrilben, piridin bázist alkalmazva tiobenzamiddal kaptuk az *N*-tiobenzoil-*C*-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil- β -*D*-glükopiranozil)formamidot (**203**), tioacetamiddal pedig az *N*-tioacetyl-*C*-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil- β -*D*-glükopiranozil)formamidot (**205**) (6. ábra).



6. ábra: Glükopiranozil-formil klorid (**202**) és tioacetamid/tiobenzamid reakciói

Az oxidatív gyűrűzárási kísérletek (PIDA, NBS, $\text{Pb}(\text{OAc})_4$) nem a kívánt terméket eredményezték.

B) A **203** és **205** esetében hidrazin származékokkal gyűrűt zártunk, és a megfelelő 5-(2',3',4',6'-tetra-*O*-benzoil- β -*D*-glükopiranozil)-1,2,4-triazolokat (**213-217**) állítottuk elő (7. ábra).

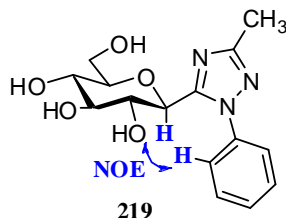


Sor	Kiindulási vegyület	R ¹	R ²	Termék	Kitermelés (%)	Termék	Kitermelés (%)
1	203	Ph	H	211	35		
2	205	Me	H	212	57		
3	203	Ph	Ph	213	90	218	83
4	205	Me	Ph	214	65	219	96
5	203	Ph	C ₂ H ₄ -OH	215	90	220	98
6	203	Ph	4-NO ₂ -C ₆ H ₄		nincs átalakulás		
7	203	Ph	4-Me-C ₆ H ₄ -SO ₂	211	62*		
8	203	Ph	^t Bu	216	60	221	99
9	203	Ph	3-Cl-C ₆ H ₄	217	72	222	99

* Diszubsztituált triazol, levált a tozil csoport, a végtermékben R² = H

7. ábra: *N*-tioacil-*C*-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil- β -*D*-glükopiranozil)formamidok (**203**, **205**) és hidrazin-származékok reakciói

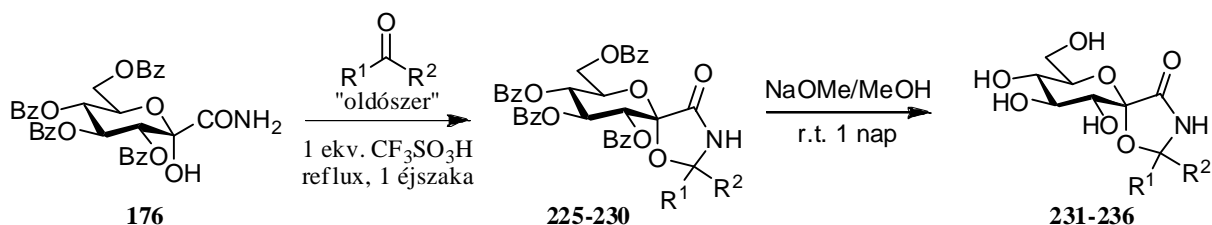
Szubsztituált hidrazinokkal a C=O és C=S csoportok eltérő reaktivitása miatt csak egy regioizomer terméket kaptunk, melynek szerkezetét **219** esetében ROESY NMR vizsgálattal állapítottuk meg (8. ábra). Zemplén-féle debenzoilezéssel kaptuk a **218-222** vegyületeket.



8. ábra: A **219** vegyület szerkezetét igazoló NOE effektus

3.4 (1'S)-2',3',4',6'-tetra-*O*-benzoil-1',5'-anhidro-D-glucitol-spiro-[1',5]-2,2-diszubsztituált-oxazolidin-4-onok előállítás

A *C*-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil-1-hidroxi-β-D-glükopiranozil)formamidot (**176**) absz. THF-ben vagy toluolban trifluormetánszulfonsav mellett ketonokkal reagáltatva előállítottuk az (1'S)-2',3',4',6'-tetra-*O*-benzoil-1',5'-anhidro-D-glucitol-spiro-[1',5]-2,2-diszubsztituált-oxazolidin-4-onokat (**225-230**) (9. ábra). Ezen reakciók gyűrűzárási mechanizmusára javaslatot tettünk, majd itt is elvégeztük a védőcsoportok eltávolítását, és megkaptuk a **231-236** vegyületeket.



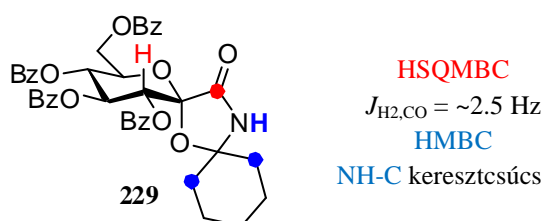
Sor	R ¹	R ²	Oldószer	Termék	Kitermelés (%)	Termék	Kitermelés (%)
1	Me	Me	aceton	225	58*	231	94
2	Me	Me	aceton	225	89		
3	Et	Me	etil-metil-keton	226	92**	232	96
4	Et	Et	THF	227	69	233	91
5	-(CH ₂) ₄ -		THF	228	86	234	91
6	-(CH ₂) ₅ -		toluol	229	69	235	96
7	-(CH ₂) ₆ -		toluol	230	71	236	77

* 0.1 ekv. CF₃SO₃H

** epimer keverék

9. ábra: *C*-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil-1-hidroxi-β-D-glükopiranozil)formamid (**176**) és ketonok reakciói

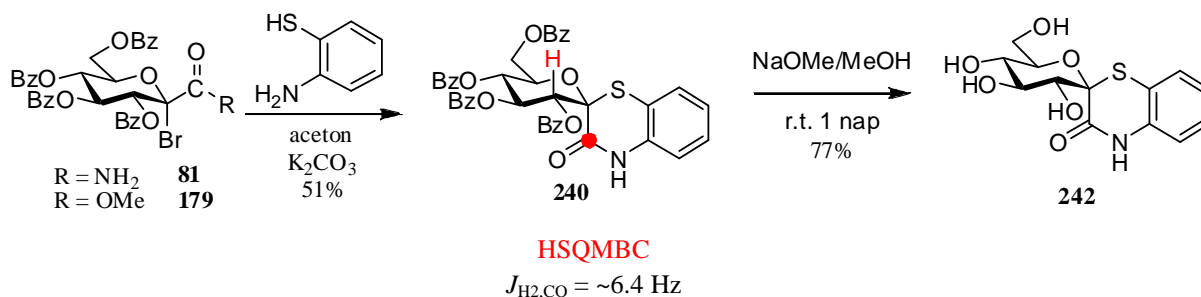
A **229** vegyület esetében HSQMBC és HMBC vizsgálatokkal megállapítottuk az anomer konfigurációt, illetve megerősítettük az oxazolin szerkezetet (10. ábra).



10. ábra: A **229** vegyület szerkezetét igazoló HSQMBC és HMBC eredmények

3.5 (1'*R*)-2',3',4',6'-tetra-*O*-benzoil-1',5'-anhidro-D-glucitol-spiro[1',2]-1,4-benzotiazin-3(4H)-on előállítása

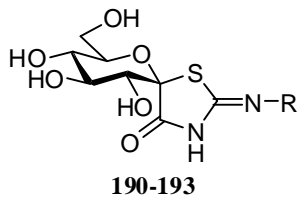
Bifunkciós aromás vegyületek közül vizsgálatokat végeztünk az *ortho*-fenilén-diamin, 2-aminofenol és a 2-aminotiofenol gyűrűzárására. A metil-*C*-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil-1-brom-1-dezoxi- β -D-glükopiranozil)formiát (**179**) és a 2-aminotiofenol közötti reakció vezetett eredményre, melynél az (1'*R*)-2',3',4',6'-tetra-*O*-benzoil-1',5'-anhidro-D-glucitol-spiro[1',2]-1,4-benzotiazin-3(4H)-ont (**238**) kaptuk. Ezen esetben is megvizsgáltuk az anomer konfigurációt HSQMBC módszerrel, majd eltávolítottuk a védőcsoportot, mely a **242** vegyületet eredményezte (11. ábra).



11. ábra: A benzotiazin (**240**) kialakítása és védőcsoportjainak eltávolítása

3.6. Az új vegyületek GP gátló hatása

A védőcsoport nélküli származékokkal való enzimkinetikai vizsgálatokat a nyúl vázizomból izolált glikogén foszforiláz *b* enzimmal (RMGP*b*) végezték a Debreceni Egyetem Orvosi Vegytani Intézetében. A **190-193** vegyületek a mikromólos tartományban (29-153 μM) gátolják a GP enzimet (12. ábra). A többi származék esetében (**218-222**, **231-236**, **242**) a biológiai vizsgálatok nem mutattak ki gátló tulajdonságot (625 μM koncentrációig).



Vegyület	R	K _i (μM)
190	4-Me-C ₆ H ₄ -CO	35 ± 3.1
191	Ph-SO ₂	143 ± 21
192	1-naftil- SO ₂	29 ± 3.7
193	2-naftil- SO ₂	153 ± 23

12. ábra: Iminotiazolidin-4-on származékok (**190-193**) GP enzimmel szembeni gátlási állandói

4. Az eredmények alkalmazási lehetőségei

Az RMGPb enzimmel szemben gátló hatást mutató molekulák további vizsgálatokat követően terápiás szerként alkalmazhatóak lehetnek a II. típusú cukorbetegség tüneti kezelésére. A GP enzimmel szemben hatástalan vegyületek felhasználási lehetősége például SGLT2 inhibítorként, glükozidáz inhibítorként, gombaellenes, baktérium- és vírusellenes szerekként való hasznosítás, amihez további biológiai vizsgálatok szükségesek.

5. Dokumentált tudományos eredmények/ Dokumentierte wissenschaftliche Ergebnisse

Referált, nemzetközi folyóiratokban megjelent/elfogadott tudományos közlemények adatai

Die Daten der in internationalen Zeitschriften publizierten/akzeptierten wissenschaftlichen Publikationen

Az értekezés anyagához kapcsolódó közlemények/Die zur Dissertation gehörenden Publikationen

- 1) **A. Páhi**; K. Czifrák; K. E Kövér; L. Somsák

Anomeric Spirocycles by Solvent Incorporation: Reactions of *O*-Peracylated (Glyculopyranose and Glyculopyranosyl Bromide)onamide Derivatives with Ketones

Carbohydrate Research, (2014) Doi: 10.1016/j.carres.2014.04.003.

IF: 2.044 (2012)

- 2) K. Czifrák; **A. Páhi**; Sz. Deák; A. Kiss-Szikszai; K. E Kövér; T. Docsa; P. Gergely; K.-M. Alexacou; M. Papakonstantinou; D. D Leonidas; S. E Zographos; E. D Chrysinia; L. Somsák

Glucopyranosylidene-spiro-iminothiazolidinone, a New Bicyclic Ring System: Synthesis, Derivatization, and Evaluation for Inhibition of Glycogen Phosphorylase by Enzyme Kinetic and Crystallographic Methods

Bioorganic & Medicinal Chemistry, Doi: 10.1016/j.bmc.2014.05.076

IF: 2.903 (2012)

Egyéb közlemények/Weitere Publikationen

- 3) S. Kun, É. Bokor, G. Varga, B. Szócs, **A. Páhi**, K. Czifrák, M. Tóth, L. Juhász, T. Docsa, P. Gergely, L. Somsák

New synthesis of 3-(β -D-glucopyranosyl)-5-substituted-1,2,4-triazoles, nanomolar inhibitors of glycogen phosphorylase

European Journal of Medicinal Chemistry, 76 (2014) 567-579.

IF: 3.499 (2012)

Szabadalmi bejelentés/Patentanmeldung

- 4) Somsák L.; Bokor É.; Tóth M.; Juhász L.; Czifrák K.; Kónya B.; Kun S.; **Páhi A.**; Szócs B.; Varga G.; Kóder L.-né; Nagy K.-né; Gergely P.; Docsa T.

Glikogén foszforiláz inhibitorok

P1100602 alapszámú magyar szabadalmi bejelentés, 2011.

Konferenciákon tartott előadások/Mündliche Präsentationen

- 1) **Páhi A.**, H.-J. Knölker, Tóth M.
Biológiailag aktív karbazol származékok palládium katalizálta szintézise
XXXII. Kémiai Előadói Napok, Szeged, 2009. október 26-29.
- 2) Somsák L., Bokor É., Czifrák K., Kónya B., Kun S., **Páhi A.**, Szócs B., Tóth M., Vidal S., Praly J.-P.:
Heterociklusos glükózszármazékok mint potenciális antidiabetikumok
MTA Kém. Tud. Oszt., Heterociklusos Kémiai Munkabizottsága előadóülése, Balatonszemes, 2010. május 19-21.
- 3) K. Czifrák, Sz. Deák, **A. Páhi**, E. D. Chrysina, K.-M. Alexacou, N. G. Oikonomakos, L. Somsák
New Glycopyranosylidene-spiro-heterocycles: Synthesis, Transformations, and Evaluation as Glycogen Phosphorylase Inhibitors
25th International Carbohydrate Symposium, Aug 1-6, 2010, Tokyo, Japan, Oral presentation A-02-005.
- 4) **Páhi A.**; Czifrák K.; E. Kövér K.; Somsák L.
(α -D-gliko-heptulopiranozil)onamidok reakciói ketonokkal
MTA Szénhidrát, Nukleinsav és Antibiotikum Munkabizottsági ülés, Debrecen, 2012 május 31-június 1.
- 5) **Páhi A.**; Czifrák K.; E. Kövér K.; Somsák L.
Anomeric Spirocycles by solvent incorporation: Reactions of O-peracylated (glyculopyranose)onamide derivatives with ketones
26th International Carbohydrate Symposium, Madrid, Spanyolország, 2012, július 22-27.
- 6) **A. Páhi**, L. Somsák
Attempts to prepare (2-thio-ulopyranosyl)onic acid derivatives
Annual Meeting of the Working Committee for Carbohydrates, Nucleic Acids and Antibiotics of the Hungarian Academy of Sciences, Mátrafüred, May 22–24, 2013.
- 7) B. Szócs, S. Kun, É. Bokor, K. E. Szabó, M. Tóth, K. Czifrák, L. Juhász, G. Varga, **A. Páhi**, T. Docsa, P. Gergely, L. Somsák
Synthesis of 3-glucopyranosyl-5-substituted-1,2,4-triazoles and their evaluation as glycogen phosphorylase inhibitors
Annual Meeting of the Working Committee for Carbohydrates, Nucleic Acids and Antibiotics of the Hungarian Academy of Sciences, Mátrafüred, May 22–24, 2013.

Konferenciákon bemutatott posztterek/Plakate

- 8) K. Czifrák, Sz. Deák, **A. Páhi**, E. D. Chrysina, K.-M. Alexacou, N. G. Oikonomakos, L. Somsák
New Glycopyranosylidene-spiro-heterocycles as potential Glycogen Phosphorylase Inhibitors
4th German-Hungarian Workshop, June 14-16, 2011, Debrecen, Hungary, PO-17.
- 9) K. Czifrák, Sz. Deák, **A. Páhi**, E. D. Chrysina, K.-M. Alexacou, N. G. Oikonomakos, L. Somsák
Synthesis of Glucopyranosylidene-spiro-thiazolones,
4th European Conference on Chemistry for Life Sciences (4ECCLS), Aug. 31-Sept. 3, 2011, Budapest, Hungary, P107.
- 10) É. Bokor, S. Kun, B. Szöcs, M. Tóth, K. Czifrák, L. Juhász, **A. Páhi**, M. Polyák, T. Docsa, P. Gergely, L. Somsák
3-(β-D-Glucopyranosyl)-5-substituted-1,2,4-triazoles as new nanomolar inhibitors of glycogen phosphorylase
5th European Conference on Chemistry for Life Sciences, Barcelona, Spain, June 10-12, 2013. P021, Abstracts book p. 94.
- 11) Kun S., Bokor É., Szöcs B., Tóth M., Czifrák K., Juhász L., Varga G., **Páhi A.**, Docsa T., Gergely P., Somsák L.
3-(β-D-Glükopiranozil)-5-szubsztituált-1,2,4-triazolok, a glikogén foszforiláz enzim új nanomólos inhibítorai
Magyar Kémikusok Egyesülete, Vegyészkonferencia 2013, Hajdúszoboszló, 2013. jún. 26-28. O-20, Előadás-összefoglalók 44. o.