

Lineáris és multikomponensű szintézisutak alkalmazása farmakofór vegyületkönyvtárak felépítéséhez: a lombiktól a cél felé

Ph.D. értekezés tézisei

Madácsi Ramóna

Témavezetők:

Dr. Kanizsai Iván

Prof. Dr. Wölfling János



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Szerves Kémiai Tanszék

SZTE Kémia Doktori Iskola

Szeged

2021

„A kutatás vagy fejlesztés célratörő tanulás és kreatív munka összehangolt egysége.”

(Simonyi Károly)

1. Bevezetés és célkitűzések

A preparatív szerves kémia eszköztárát is felhasználó gyógyszerkémia végső célja hatékony szintézismódszerekkel előállítható, humán gyógyászati hatással rendelkező, piacképes vezérmolekula kiválasztása a szerkezet-hatás összefüggések alapján felépített sokszínű és nagy tagszámú vegyületkönyvtárakból.

Abban az esetben, amikor a gyógyítandó betegség multifaktoriális (több daganatos és neurodegeneratív betegségnél fennálló jelenség), optimális a fenotípusos gyógyszerkutatás irányelveit szem előtt tartva (a nagy áteresztőképességű teszteléssel és a mechanizmusalapú megközelítéssel szemben) *in vitro* sejtes biológiai vizsgálatokkal tesztelni és minősíteni az előállított új vegyületeket, majd feltárni az aktivitás *in vivo* hátterét, a lehetséges támadási célpontokat és a biológiai hatásmechanizmust. A „hit-to-lead” fejlesztés során a kiszűrt szerkezetek optimalálásával juthatunk el a vezérmolekulához („lead”) majd pedig a gyógyszerjelölt „kandidánshoz”. A fejlesztés célja a szelektivitás és a metabolikus stabilitás növelése, a nem kívánatos mellékhatások csökkentése/megszüntetése, illetve a megfelelő biohasznosulás elérése.

Doktori munkám célja új, tumorelles hatású kismolekulás vegyületkönyvtárak tervezése és felépítése lineáris (S_N , S_NAr) és multikomponensű reakciók (Gewald-3CR és Betti-3CR) felhasználásával.

A szintetikus/gyógyszerkémiai munka alappillérei a következők voltak:

1. Piperidin vázzal kondenzált heterociklusok; 1,2,3,4-tetrahidro(izo)kinolin, 2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol és 4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-*c*]piridin vázas szulfonamidok előállítása, morfológiai optimalizáció a szerkezet-hatás összefüggések ismeretében (S_N reakciók, Gewald-3CR).
2. *N*-Aril-szubsztituált izoindol-1,3-dionokból kiindulva C-4 és C-5 pozícióban NH funkcionizált ftalimid könyvtár felépítése (S_NAr).
3. 8-Hidroxikinolin vázgegyégekből kiindulva C-7 (*orto*)-szerkezet-módosított 8-hidroxikinolin vázgegyéget tartalmazó származékok szintézise (Betti-3CR).

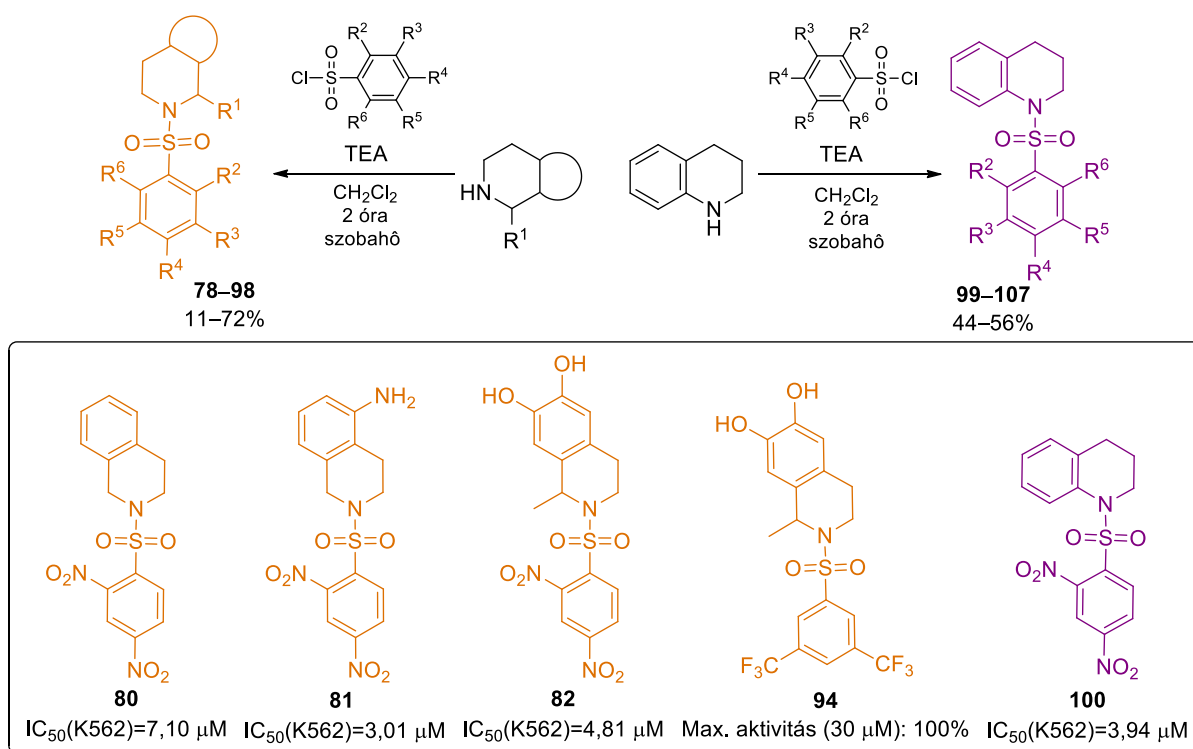
2. Anyagok, módszerek

Munkánk során a reakciók többségét millimólos mérettartományban hajtottuk végre. A reakciókat VRK-val illetve HPLC-vel követtük. Célvegyületeinket oszlopkromatográfiával (Szilikagél 40–63 vagy 60–200 μm), Teledyne Isco CombiFlash® R_f kromatográfával (szilikagél, Redisept™), vagy egyszerű szűréssel és/vagy átkristályosítással tisztítottuk. Az

előállított vegyületeket olvadáspontjukkal, IR, MS, és egy- illetve kétdimenziós NMR spektroszkópiai technikákkal, indokolt esetben egykristály röntgenkristallográfiás mérésekkel jellemeztük. A reakciók kivitelezésénél és a tisztítási eljárások során használt vegyszerek és oldószerek kereskedelmi forgalomból (Sigma-Aldrich, Alfa Aesar, AK Scientific, Fluorochem, Combi-Blocks, Apollo Scientific, Molar) származtak. A szintetizált származékok biológiai aktivitását az Avidin Kft. biológus munkatársai vizsgálták. Az IC₅₀-ek meghatározását és a szerkezet-hatás összefüggések megállapítását velük együttműködve végeztük, GraphPad Prism 4 szoftvert használva.

3. Eredmények*

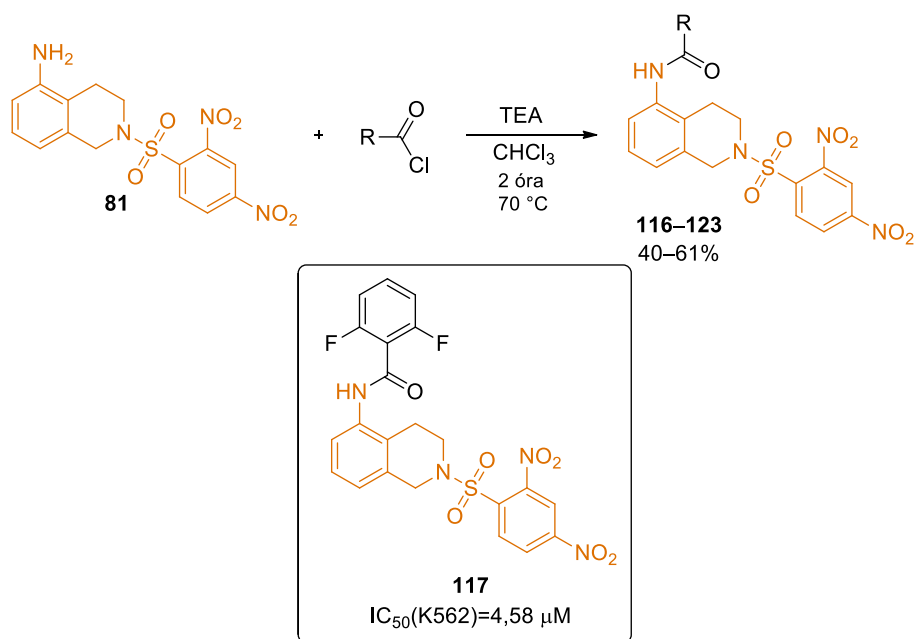
3.1. Citotoxikus karakterű, piperidinnel kondenzált heterociklus alapú szulfonamid vegyületeknyvtárakat fejlesztettünk. Az S_N kapcsolásokkal harminc 1,2,3,4-tetrahydrokinolin-, 1,2,3,4-tetrahydroizokinolin- és 2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indolvas szulfonamidot (**78–107**) állítottunk elő (reakciókörülmények: TEA, DKM, 2 óra, szobahőmérséklet; 100% konverzió). A nyers reakcióelegyeket oszlopkromatográfiával tisztítva 11–72% hozammal nyertük a tiszta termékeket (1. ábra). A **78–107** vegyületek *in vitro* MTS assay-ben K562 tumorsejtvonalon mérsékelt-közepes citotoxikus aktivitást mutattak.



1. ábra

* A vegyületszámolás megegyezik a disszertációban alkalmazottal.

A biológiai hatás növelése érdekében a kiválasztott legpotensebb **81** vegyület ($IC_{50}=3,01 \mu M$) C-5 primer aminocsoportját acileztük: $CHCl_3$ -ban TEA alkalmazása mellett $70^\circ C$ -on 2 óra alatt további nyolc analógot állítottunk elő. A **116–123** 2-(2,4-Dinitrofenilszulfonil)-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-5-amid származékokat egyszerű szűréssel 40–61% hozammal nyertük (2. ábra). A **116–123** vegyületek minden esetben gyengébb eredményt mutattak, mint a **81** vegyület ($IC_{50}=4,58$ –(>30) μM).

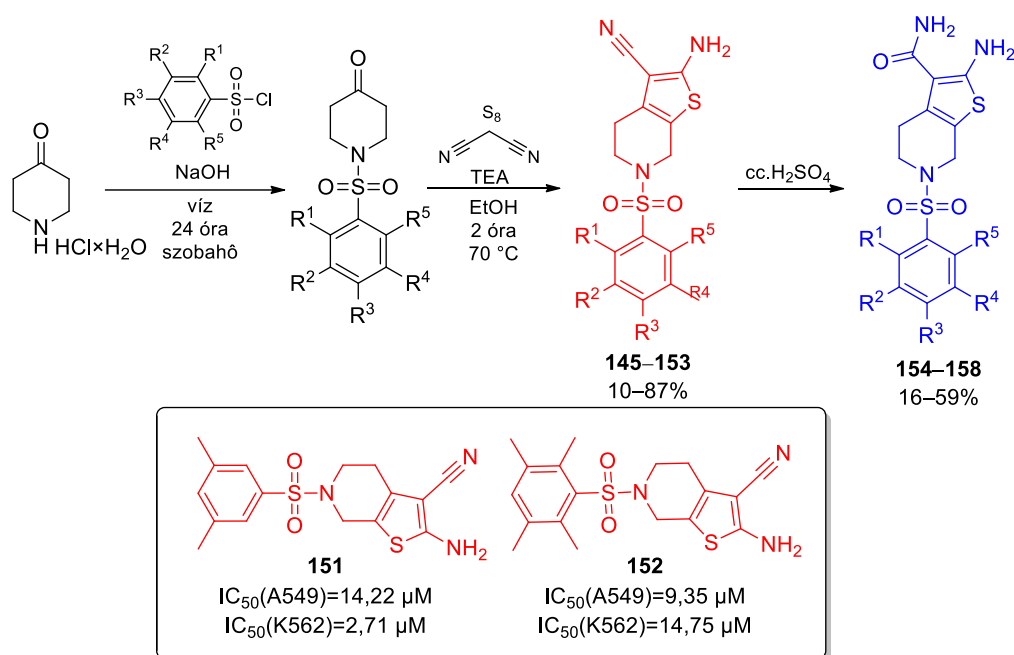


2. ábra

A kiválasztott **81** “hit” vegyületet több sejtvonalon is teszteltük *in vitro* és *in vivo* kísérletekben. A molekula kedvezőtlen oldhatósági és felszívódási profilja, valamint az egészséges sejtekre kifejtett nem elhanyagolható toxikus hatása miatt a vegyületkönyvtár további fejlesztését leállítottuk.

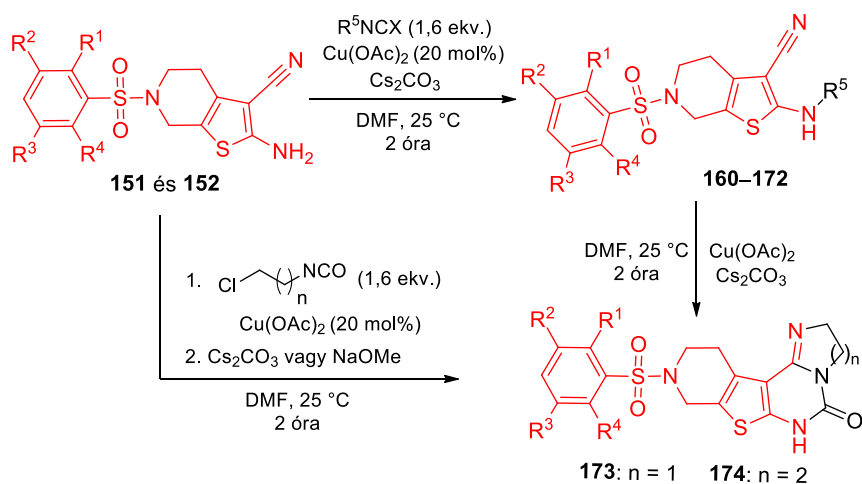
3.2. A Szulfonamid könyvtárát 4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-*c*]piridin vázas vegyületcsaláddal bővítettük ki. A 4-piperidionból kiindulva szulfonsav-kloridokkal a **134–142** *N*-védett piperidinokat állítottuk elő (hozam: 10–69%). Ezeket mint kiindulási vegyületeket hasznosítottuk Gewald-3CR-ban és kilenc **145–153** 4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-*c*]piridin vázas karbonitrilt szintetizáltunk 10–84% hozammal. Reprezentatív karboxamid példaként öt, **154–158** 4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-*c*]piridin-karboxamidot is előállítottunk a megfelelő aminonitrilek savas hidrolízisével (16–59% hozam, 3. ábra).

Az előállított 14 vegyület biológiai vizsgálata során a **151** és **152** aminonitril mutatott mérsékelt citotoxikus aktivitást (**151**, $IC_{50}(A549)=14,22 \mu M$, $IC_{50}(K562)=2,71 \mu M$; **152**, $IC_{50}(A549)=9,35 \mu M$, $IC_{50}(K562)=14,75 \mu M$).



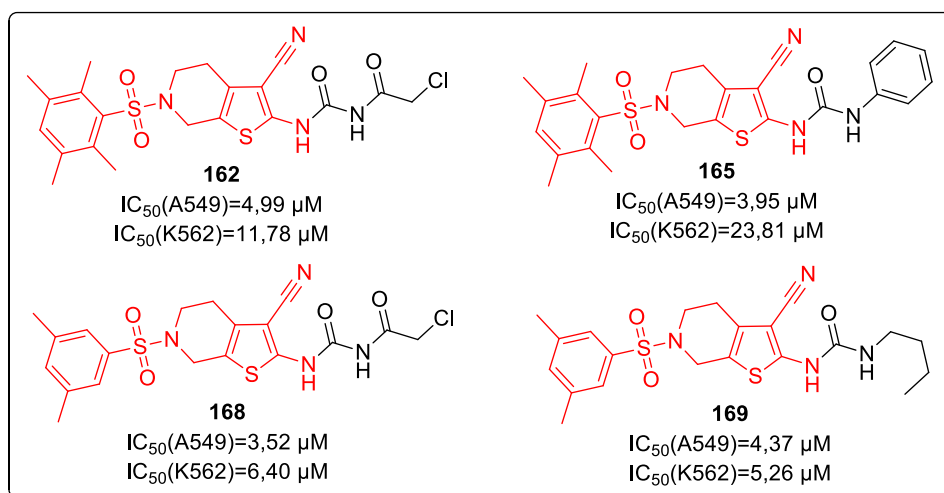
3. ábra.

A biológiai hatás növelése érdekében a két legpotensebb vegyület C–2 amino funkcióját tovább derivatizáltuk. A **151** és **152** aminonitrilekből kiindulva, különböző izocianátokkal abszolútizált DMF-ben $Cu(OAc)_2$ Lewis-sav katalizátor jelenlétében szobahőmérsékleten 2 óra alatt 17–69% hozammal nyertük a **160–172** (tio)karbamidokat. Továbbá klóralkil-izocianátokkal (2-klóretil- és 3-klórpropil-) dominó gyűrűzárási reakcióban (kétlépéses és szekvenciális, „one pot” módszerek) a **173** (54%) és **174** (61%) tetraciklust szintetizáltuk (4. ábra).



4. ábra

Az előállított **160–174** származékok esetében nem tapasztaltunk jelentős aktivitás-növekedést a **151** és **152** analóghoz képest (A549 sejtvonalra legaktívabb a **168**, $IC_{50}=3,52$ μ M; K562 sejtvonalra legaktívabb a **169**, $IC_{50}=5,26$ μ M) (5. ábra). A vizsgált **145–174** tiofénvázis szulfonamidok mérsékelt tumorellenes potenciálja és a kötőszöveti sejteken kedvezőtlen mellékhatás-profilja miatt a további fejlesztést leállítottuk.



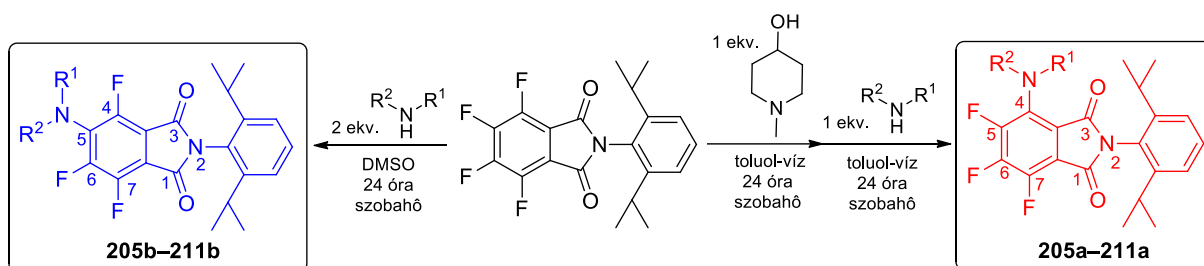
5. ábra

3.3. A citotoxikus ftálimid projekt fejlesztési programját egy hatékony, C-4-szubsztituált izoindolin-1,3-dionra szelektív S_NAr reakcióval egészítettük ki. A korábbi eredmények alapján a 2-(2,6-diizopropilfenil)-4,5,6,7-tetrafluor-izoindolin-1,3-dionból kiindulva primer és szekunder aminokkal S_NAr reakcióban egy nagy tagszámú és diverz molekulakönyvtárat hoztunk létre citotoxikus tesztelésre (C-4- és C-5-szubsztituált ftálimidek). A kapcsolások során minden esetben regioizomer elegy keletkezett, amelyek szétválasztására egyedi tisztítási módszereket kellett kifejlesztenünk Teledyne Isco CombiFlash® R_f flash kromatográfra optimalva.

A kezdeti vegyületkönyvtár felépítésében alkalmazott optimálás nélküli reakciókkal (reakciókörülmények: 2 ekvivalens amin, diklórmétán oldószer, szobahőmérséklet, 24 óra) minden esetben a C-5 szubsztituált, inaktív (**b**) regioizomer kialakulása a kedvezményezett. A körülményes izolálás és a biológiai eredmények miatt indokoltá vált az **a** regioizomerre szelektív S_NAr fejlesztése. Hét amint kiválasztva változtattuk az oldószert, az adalékanyagot, a koncentrációt és a hőmérsékletet. A reakciók lejátszódását, a reakcióelegy összetételét/regioizomer arányt HPLC-vel követtük.

Egy kétlépéses, szekvenciális, *orto* (C-4)-szelektív S_NAr -t fejlesztettünk ki, ahol az 1,3-aminoalkohol segédanyaggal képzett köztiterméken keresztül irányítottuk az átalakulást. Számos finomítást végrehajtva (additív minőség, additív ekvivalencia és reakcióidő) jutottunk

az új, „fordított” regio szelektivitású S_NAr reakcióhoz (reakció körülmények: 1 ekvivalens 1-metil-4-hidroxipiperidin mint additív, 1 ekvivalens amin, toluol-víz (1:1), szobahőmérséklet, 48 óra). Minden esetben jó-kiváló regio szelektivitást (**a** regioizomer aránya (HPLC): 79–91%) és jó-kiváló konverziót (HPLC: 86–100%; izolált hozamok: 38–63%) értünk el. A fejlesztési folyamat során megtaláltuk a **b** izomerre szelektív S_NAr reakció általánosan alkalmazható körülményét is: 2 ekvivalens amin, DMSO, szobahőmérséklet, (teljes konverzió (HPLC): 93–100%, **b** regioizomer aránya (HPLC): 73–97%) (6. ábra).

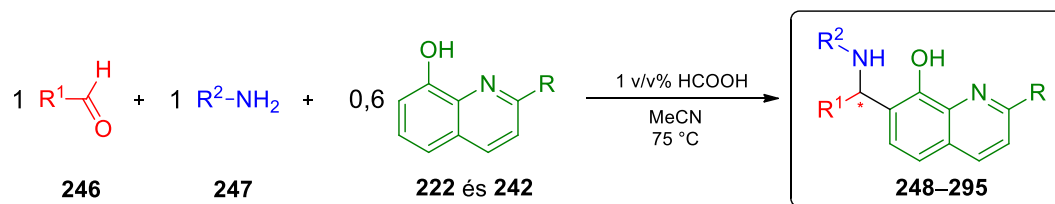


6. ábra

Az előállított C-4 (**205a–211a**) regioizomerek több tumorsejtvonalon is jelentős citotoxikus aktivitást mutattak, és minden esetben aktívabbak voltak, mint a C-5 (**b**) izomerek (C-4 (**a**): $IC_{50}(K562)$ 1,09–(>100), $IC_{50}(HepG2)$ 2,56–(>100), $IC_{50}(HT168)$ 2,14–(>100); C-5 (**b**): $IC_{50}(K562)$ 39,99–(>100), $IC_{50}(HepG2)$ 6,06–(>100), $IC_{50}(HT168)$ 28,47–(>100)).

3.4. Célunk egy új, citotoxikus karakterű 8-hidroxikinolin vázegységet tartalmazó heterociklus könyvtár előállítása volt. Először egy 15 tagú (**248–262**) alapkönyvtárat hoztunk létre. Az előzetes citotoxicitási vizsgálatok (humán leukémia (K562 és HL-60) sejtvonalak) során a vegyületek nem mutattak aktivitást. Ezzel szemben U251 MG glioblasztóma sejteken végzett citoprotekciós vizsgálat a **248–262** vegyületből 13 szubmikromoláris aktivitású analógot eredményezett ($IC_{50}=0,106–0,687 \mu M$).

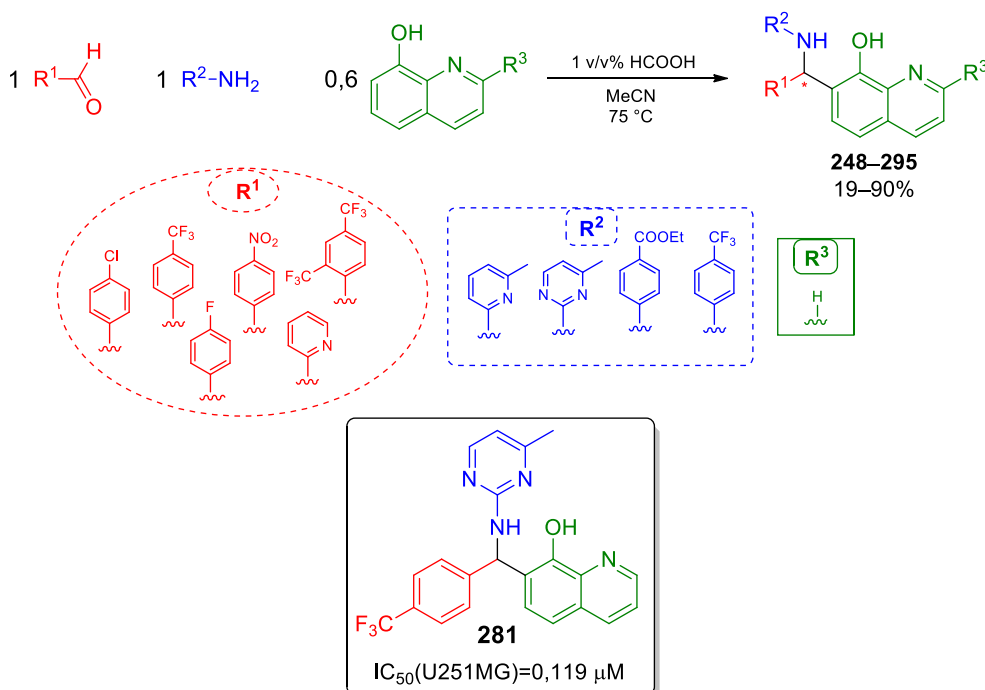
A későbbi célirányos fejlesztési/kivitelezési szakaszban a kiépítendő szubsztitúciós mintázat alapját az előzetes teszteredmények adták meg, a három komponensű reakciót kis módosítás mellett alkalmaztuk. Betti-3CR-el összesen 48, 8-hidroxikinolin vázegységet tartalmazó heterociklust állítottunk elő (**248–295** vegyületek, reakció körülmények: 1 mmol aldehid, 1 ekvivalens amin, 0,6 ekvivalens kinolin, 1 v/v% HCOOH, 75 °C, MeCN) 12–90% hozammal (7. ábra).



R¹: fenil, 4-CF₃-C₆H₄, 2-piridil, 4-F-C₆H₄, 4-NO₂-C₆H₄, 4-(*i*PrO)-C₆H₄, 4-(CF₃O)-C₆H₄, 3-CF₃-C₆H₄, 3-F-5-CF₃-C₆H₄, 3,5-diCF₃-C₆H₃, 4-F-3-CF₃-C₆H₃, 2,4-diCF₃-C₆H₃, 3,4-diF-C₆H₃, 4-SF₅-C₆H₄, 4-I-C₆H₄, 4-Br-C₆H₄
R²: fenil, 4-COOEt-C₆H₄, 4-COOH-C₆H₄, 2-piridil, izoxazol, 5-*t*Bu-izoxazol, 5-Me-izoxazol, 6-Me-C₅H₃N, pirimidil, 3-Me-C₅H₃N, 4-Me-C₅H₃N, 4-Me-C₄H₂N₂, 5-Br-C₄H₂N
R: H, Me

7. ábra

A végpontjelzéses citoprotekciós vizsgálat során a 48 vegyületből kilenc mutatott jelentős aktivitást (**251, 264, 265, 267, 268, 281, 282, 287, 290**; IC₅₀=0,70–0,12 μM) (8. ábra). Ezek közül számos más *in vitro* és *in vivo* teszt vezetett végül a **281** vezérmolekula kiválasztásához.

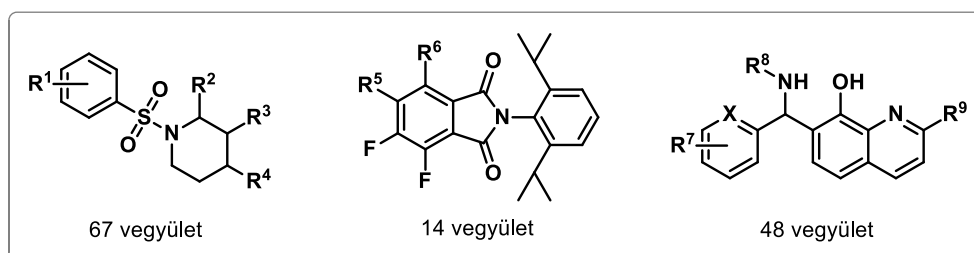


8. ábra

A későbbiekben iparilag alkalmazható, GMP-kompatibilis *R*- és *S*- enantioszelektív szintézismódszert is kidolgoztunk. A **281** vegyület eutomerjének (*R*-enantiomer) humán klinika fázis I/A vizsgálata sikeresen lezárult, a következő klinikai vizsgálat (Fázis I/B és II) előkészítése folyamatban van.

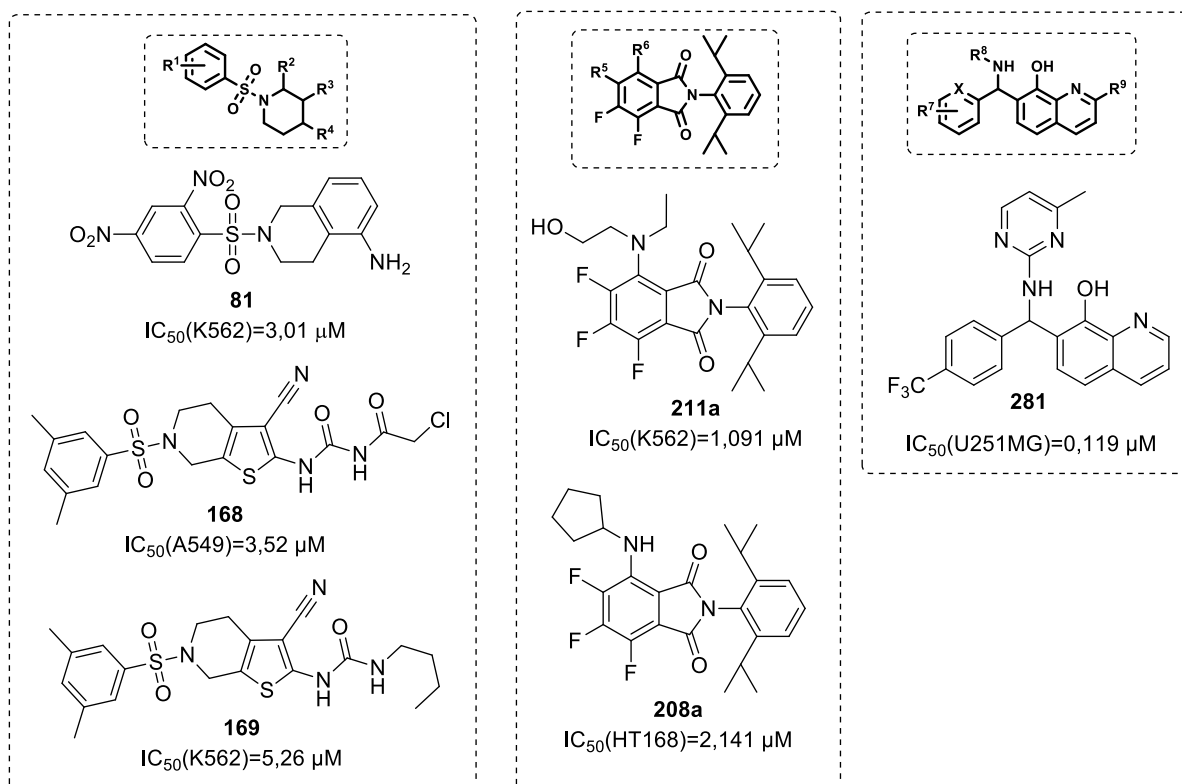
4. Összefoglalás

Kísérleti munkánk során 129 piperidin vázzal kondenzált heterociklusos szulfonamidot, *N*-aril-szubsztituált 1,3-izindolont és 8-hidroxi-kinolin vázegyiséget tartalmazó származék szintézisét valósítottuk meg S_N , S_NAr és Gewald- (G-3CR), illetve Betti-reakció (Betti-3CR) alkalmazásával (9. ábra).



9. ábra

A vizsgált négy vegyületcsalád legnagyobb (elérhető) citotoxikus illetve citoprotektív hatást mutató származékait a 10. ábrán emeltük ki.



10. ábra

A tézisek alapját képező tudományos közlemények:

1. Puskás LG, Fehér LZ, Vizler C, Ayaydin F, Rásó E, Molnár E, Magyary I, Kanizsai I, Gyuris M, **Madácsi R**, Fábíán G, Farkas K, Hegyi P, Baska F, Ozsvári B, Kitajka K. Polyunsaturated fatty acids synergize with lipid droplet binding thalidomide analogs to induce oxidative stress in cancer cells; *Lipids Health Dis.* **2010**, *9*, 56.

IF: 2,239

2. **Madácsi R**, Kanizsai I, Fehér LZ, Gyuris M, Ozsvári B, Erdélyi A, Wölfling J, Puskás LG. Aromatic sulfonamides containing a condensed piperidine moiety as potential oxidative stress-inducing anticancer agents; *Med. Chem.* **2013**, *9*, 911–919.

IF: 1,373

3. **Madácsi R**, Gyuris M, Kanizsai I, Sipos P, Wölfling J, Puskás LG. 4-Amino-5,6,7-trifluor-ftálimidek előállítása, *in vitro* és *in vivo* biológiai vizsgálata; *Magy. Kém. Foly.* **2014**, *120*, 95–101.

IF: -

4. **Madácsi R**, Gyuris M, Wölfling J, Puskás LG, Kanizsai I. Highly regioselective 4-hydroxy-1-methylpiperidine mediated aromatic nucleophilic substitution on a perfluorinated phthalimide core; *J. Fluorine Chem.* **2018**, *212*, 38–44.

IF: 2,055

5. Kanizsai I, **Madácsi R**, Hackler L Jr, Gyuris M, Szebeni GJ, Huzián O, Puskás LG. Synthesis and Cytoprotective Characterization of 8-Hydroxyquinoline Betti Products; *Molecules* **2018**, *23*, 1934.

IF: 3,060

6. **Madácsi R**, Traj P, Hackler LJr., Nagy LI, Kari B, Puskás LG, Kanizsai I. Synthesis and biological evaluation of 4,5,6,7-tetrahydrothieno [2,3-c]pyridine-based β -aminonitriles and their derivatives; β -amino carboxamides, (thio)ureas and tetracycles; *J. Heterocyclic Chem.* **2020**, *57*, 635-652.

IF: 1,484 (2019)

A tézisek alapját képező szabadalom:

1. Puskás LG, Szabó C, Kanizsai I, Gyuris M, **Madácsi R**, Ózsvári B, Fehér L, Tamás G. 8-Hydroxy-quinoline derivatives; WO Patent, **2011**, WO 2,011,148,208.

IF: -

Összesített IF: 10,211

Egyéb megjelent közlemények:

1. Zsigmond Á, **Madácsi R**, Notheisz F, Mernyák E, Joó F. Selective hydrogenations of steroids catalyzed by heterogenized Ru complexes; *React. Kinet. Catal. Lett.* **2006**, 87, 297–304.

IF: 0,490

2. Sipos P, Berkesi O, Tombácz E, Katona H, **Madácsi R**. The nature of interactions between iron(III) and the structure of the Fe(III)-chitosan "complex"; *Acta Pharm. Hung.* **2007**, 77, 165–175.

IF: 0,190

3. McAuley G, Schrag M, Sipos P, Sun SW, Obenaus A, Neelavalli J, Haacke EM, Holshouser B, **Madácsi R**, Kirsch W. Quantification of punctate iron sources using magnetic resonance phase; *Magn. Reson. Med.* **2010**, 63, 106–115.

IF: 3,267

4. Ózsvári B, Puskás LG, Nagy LI, Kanizsai I, Gyuris M, **Madácsi R**, Fehér LZ, Gerő D, Szabó C. A cell-microelectronic sensing technique for the screening of cytoprotective compounds; *Int. J. Mol. Med.* **2010**, 25, 525–530.

IF: 1,814

5. Gyuris M, **Madácsi R**, Puskás LG, Tóth GK, Wölfling J, Kanizsai I. Synthesis of 2-Amino-3-cyano-4H-chromene-4-carboxamide Derivatives by an Isocyanide-Based

Domino Conjugate Addition/O-Trapping Rearrangement Sequence; *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *46*, 848–851.

IF: 3,329

6. Nagy LI, Molnár E, Kanizsai I, **Madácsi R**, Ózsvári B, Fehér LZ, Fábíán G, Marton A, Vizler C, Ayaydin F, Kitajka K, Hackler LJr, Mátés L, Deák F, Kiss I, Puskás LG. Lipid droplet binding thalidomide analogs activate endoplasmic reticulum stress and suppress hepatocellular carcinoma in a chemically induced transgenic mouse model; *Lipids Health Dis.* **2013**, *12*, 175.

IF: 2,015

7. Hackler LJr, Gyuris M, Huzián O, Alföldi R, Szebeni GJ, **Madácsi R**, Knapp L, Kanizsai I, Puskás LG. Enantioselective Synthesis of 8-Hydroxyquinoline Derivative, Q134 as a Hypoxic Adaptation Inducing Agent; *Molecules*, **2019**, *24*, 4269.

IF: 3,267

Szabadalom:

1. Puskás LG, Kanizsai I, Gyuris M, **Madácsi R**, Ózsvári B, Fehér LZ, Fábíán G, Kitajka K. Use of trifluoro phthalimides for the treatment of cancerous diseases; WO patent, **2012**, WO 2,012,085,608.

IF: -

Konferencia-előadások:

1. Gyuris M, **Madácsi R**, Kanizsai I. Ac915/Ac929 anyagok és analógjaik szintézise, tisztítása és analitikája, nehézségek, további lehetőségek; Jedlik Ányos pályázati tudományos ülés, Szeged, **2010**.
2. **Madácsi R**. 4,5,6,7-Tetrahidrotieno[2,3-*c*]piridinek előállítása és citotoxikus hatásának vizsgálata; Heterociklusos és Elemorganikus Munkabizottság, Balatonszemes, **2012**.

Konferencia-poszterek:

1. Kanizsai I, Gyuris M, Fehér LZ, Ózsvári B, Molnár E, Fábián G, **Madácsi R**, Puskás LG. Lipid droplet interacting ER-stress inducing amino-trifluoro-phthalimides as cytotoxic agents; ESOC, Prága, **2009**.
2. Gyuris M, Kanizsai I, **Madácsi R**, Puskás LG, Tóth G, Wölfling J. Multicentrumú iminokromén-karboxamidok reakciója izocianidokkal; MKE Vegyészkonferencia és 53. Spektrokémiai Vándorgyűlés, Hajdúszoboszló, **2010**.
3. Gyuris M, Demjén A, **Madácsi R**, Puskás LG, Wölfling J, Kanizsai I. Imidazo[1,2-b]pirazol származékok előállítása GBU reakcióval; MKE 1. Nemzeti Konferencia, Sopron, **2011**.
4. **Madácsi R**, Wölfling J, Puskás LG, Kanizsai I. Investigation of S_NAr reactions of 2-(2,6-diisopropylphenyl)-4,5,6,7-tetrafluoroisoindoline-1,3-dione with amines; ICOS 20, Budapest, **2014**.
5. **Madácsi R**, Huzián O, Hackler LJr., Puskás LG, Kanizsai I. 8-Hidroxi-kinolin származékok szintézise, a lombiktól a cél felé; MKE Vegyészkonferencia, Hajdúszoboszló, **2017**.