Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

IZOCIANID ALAPÚ EGYEDÉNYES MÓDSZEREK KIDOLGOZÁSA

Demjén András

TÉMAVEZETŐK:

Prof. Dr. Wölfling János
tanszékvezető egyetemi tanár

Dr. Kanizsai Iván
Avidin Kft.

Dr. Puskás László
Avidin Kft.

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Szerves Kémiai Tanszék

SZTE Kémia Doktori Iskola

Szeged

2018

1. Bevezetés és célkitűzések

A szerves kémiai kutatások, fejlesztések egyik legfőbb célja a szintézismódszerek hatékonyságának növelése, mely egyfelől konvergens vagy divergens szintézisutak megvalósításával, másfelől új, a korábbinál hatékonyabb reagensek vagy reakciók kifejlesztésével és optimalizálásával lehetséges. Az egyedényes („one-pot”) eljárások olyan nagy hatékonyságú szintézismódszerek, melyek során több egymást követő reakciólépés a keletkező intermedierek izolálása nélkül egy reakciótérben megy végbe. A kivitelezés szempontjából megkülönböztethetünk szekvenciális és tandem egyedényes protokollokat; míg a szekvenciális egyedényes eljárás köztitermékeinek képződését újabb reagens hozzáadása és/vagy a reakciókörülmények megváltozása követheti, addig a tandem reakciók során az egyes részlépések további reagensek hozzáadása nélkül, automatikusan indukálják a következő részlépés lejátszódását. A tandem transzformációk közé sorolható multikomponensű reakciók (MCRs) által legalább három kiindulási komponens egy lépésben történő, de több konszekutív részfolyamaton keresztüli kombinálódásával egy olyan összetett molekula jön létre, melyben a kiindulási komponensek összes (vagy legtöbb) atomja megtalálható. A multikomponensű reakciók kiemelt helyet foglalnak el a gyógyszerkémia eszköztárában, mivel a kiindulási anyagok variálása révén rövid idő alatt nagy tagszámú és diverzitású molekulakönyvtár egyszerű, akár automatizált felépítését teszik lehetővé.

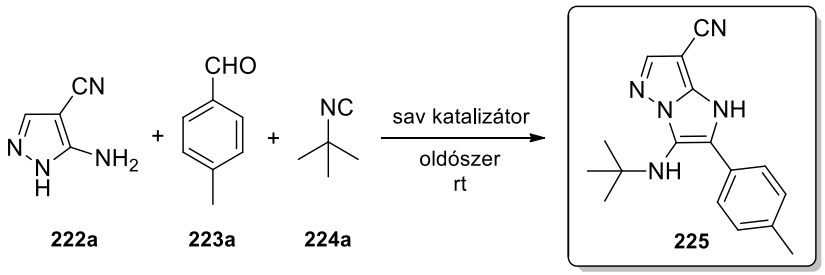
Az irodalmi előzmények ismeretében doktori munkám célja egyrészt új, várhatóan tumorellenes hatású imidazo[1,2-*b*]pirazolok izocianid alapú multikomponensű szintézise, másrészt egy *N,N'*-diszubsztituált guanidinek előállítását célzó új típusú, izocianid alapú, szekvenciális egyedényes szintézismódszer kifejlesztése volt.

2. Vizsgálati módszerek

A szintetikus munka során a reakciók többségét millimólos mennyiségben hajtottuk végre. A reakciókat vékonyréteg-kromatográfiával, illetve esetenként HPLC-vel követtük. Az előállított vegyületeket oszlopkromatográfiával (szilikagél, alumínium-oxid) vagy egyszerű szűréssel és átkristályosítással tisztítottuk. A termékek szerkezetét egy- és kétdimenziós NMR spektroszkópiai technikák, valamint tömegspektrometria felhasználásával határoztuk meg.

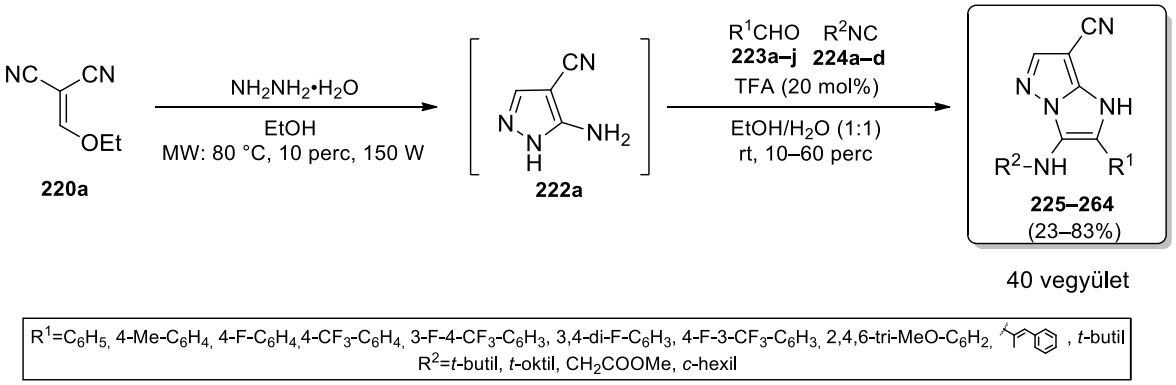
3. Új tudományos eredmények*

3.1. Először az 5-aminopirazol-4-karbonitril (**222a**) Groebke-Blackburn-Bienaymé három-komponensű reakcióit (GBB-3CR) tanulmányoztuk. Egy modellreakción keresztül [*p*-tolualdehid (**223a**) és *terc*-butil-izocianid (**224a**) komponensek, 1. ábra] Brønsted- és Lewis-sav katalizátorok tesztelésével, különböző oldószerek alkalmazásával, valamint a katalizátor mennyiségének változtatásával meghatároztuk az optimális reakciókörülményeket (20 mol% TFA, EtOH/víz 1/1, szobahőmérséklet, 15 perc).



1. ábra

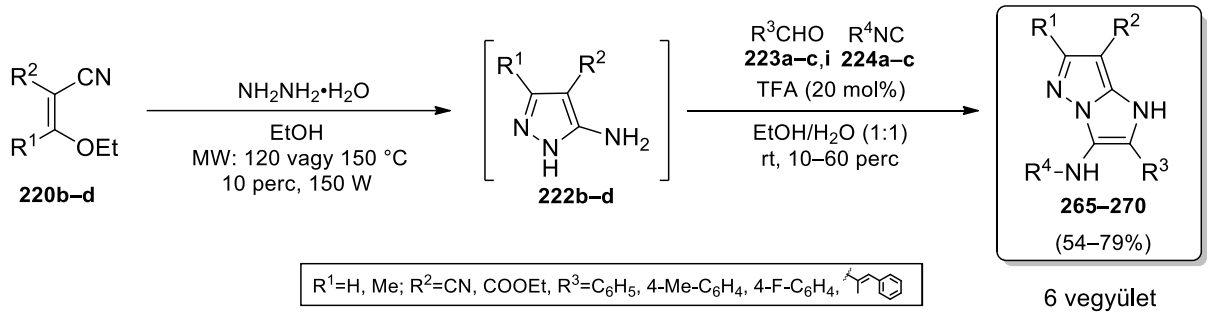
3.2. A **222a** aminopirazol *in situ* előállítását az optimalizált GBB-reakciólépéssel összekapcsolva 40 új imidazo[1,2-*b*]pirazol-7-karbonitril származék (**225–264** vegyületek) szekvenciális egyedényes, kétlépéses szintézisét valósítottuk meg (2. ábra). Az aromás és alifás aldehidek (**223a–j**), valamint alifás *tercier*, *szekunder* és *primer* izocianidok (**224a–d**) felhasználásával nyert **225–264** biciklusokat alacsony-jó hozammal (23–83%) izoláltuk. Jelentős szubsztituenshatást nem tapasztaltunk, azonban metil-izocianoacetát (**224c**) alkalmazásakor rendszerint nagyobb mértékű melléktermék-képződés mellett alacsonyabb termeléseket értünk el.



2. ábra

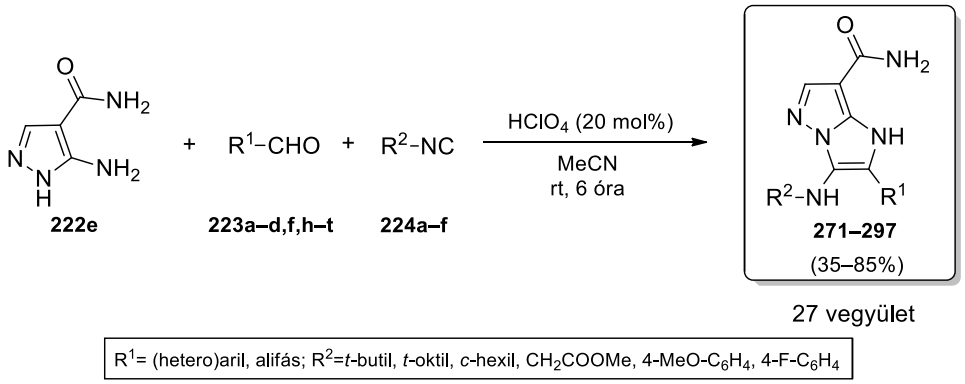
* A vegyületszámozás megegyezik a disszertációban alkalmazottal

3.3. A szekvenciális egyedényes, kétlépéses eljárást a megfelelő **220b–d** vegyületből kiindulva multiszubsztituált új imidazo[1,2-*b*]pirazol-7-karbonitrilek és -etil-észterek (**265–270** termékek) szintézisére is kiterjesztettük (3. ábra). A **222b–d** aminopirazolok *in situ* képzése 10 perces mikrohullámú besugárzás mellett magasabb hőmérsékletet (120 vagy 150 °C) igényelt. Megfigyeltük, hogy míg az elektronküldő metil szubsztituens ($R^1 = CH_3$) jelenléte kedvezően befolyásolja a reakció hatékonyságát, addig az R^2 nitril funkció etiloxikarbonil csoportra cserélése jelentősen nem változtat az elérhető hozamokon.



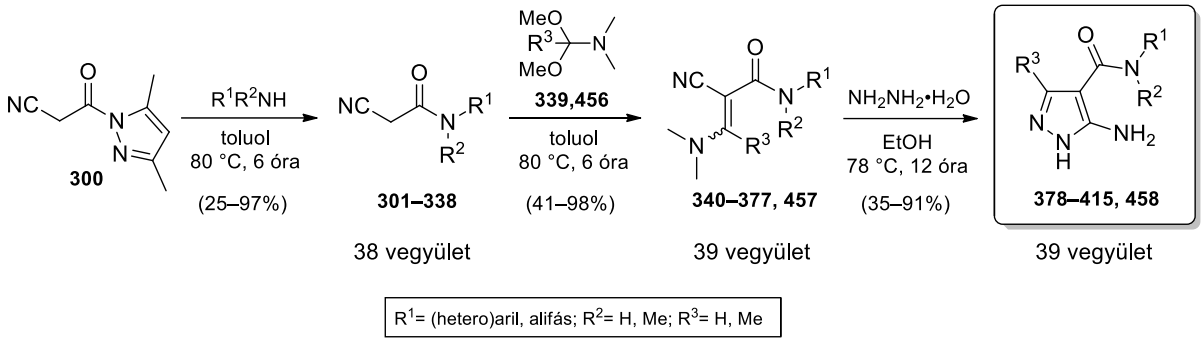
3. ábra

3.4. Az 5-aminopirazol-4-karboxamid (**222e**), aromás, illetve alifás aldehidek és izocianidok GBB-reakciójával, módosított reakciókörülmények között (20 mol% $HClO_4$, MeCN, rt, 6 óra) 27 új imidazo[1,2-*b*]pirazol-7-karboxamid származékot szintetizáltunk (**271–297** vegyületek, 4. ábra). Megfigyeltük, hogy aromás aldehidek alkalmazásával magasabb hozamok érhetők el (46–85%), mint alifás aldehidekkel (35–56%). Az izocianid kémiai minősége a reakció hatékonyságát nagymértékben nem befolyásolta.



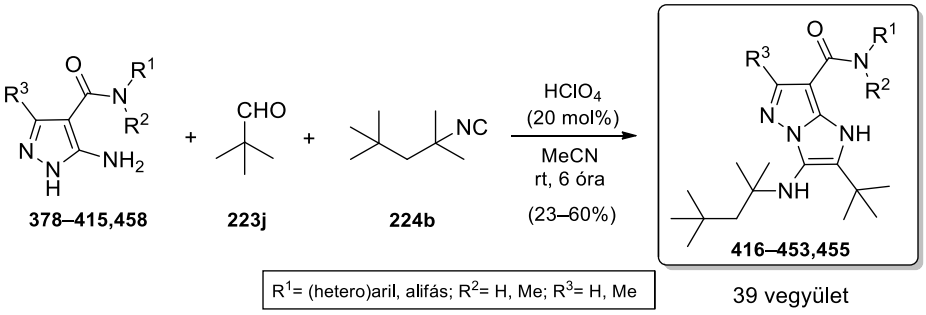
4. ábra

3.5. Az imidazo[1,2-*b*]pirazol-7-karboxamid molekulakönyvtár bővítéséhez 39 C-4 helyzetben *szekunder* és *tercier* karboxamid csoportokkal szubsztituált aminopirazol származékot (**378**–**415** és **458**) állítottunk elő. A háromlépéses szintézis során először a **300** ciánecetsav származék és különböző aminok nukleofil szubsztitúciós reakciójával a **301**–**338** ciánacetamid analógokat szintetizáltuk, melyeket *N,N*-dimetilformamid-dimetil-acetállal (**339**) vagy *N,N*-dimetilacetamid-dimetil-acetállal (**456**) a **340**–**377** és **457** énamin származékokká alakítottunk. Végül az énaminok és hidrazin-monohidrát gyűrűzárási reakciója vezetett a **378**–**415** és **458** aminopirazol-4-karboxamid termékekhez. (5. ábra).



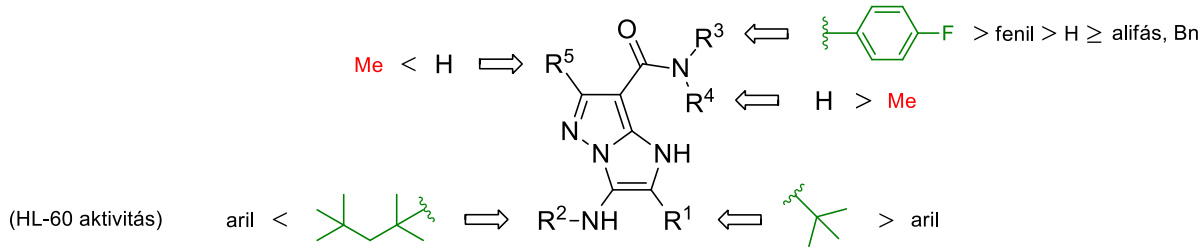
5. ábra

3.6. A 3.4. tézispontban ismertetett **271**–**297** imidazo[1,2-*b*]pirazol termékek mellett a **378**–**415** és **458** aminopirazol-4-karboxamid, pivalaldehid (**223j**) és *terc*-oktil-izocianid (**224b**) komponensek GBB-reakciójával további 39 új imidazo[1,2-*b*]pirazol-7-karboxamid származékot készítettünk (6. ábra). Emellett Eschweiler-Clarke reakcióval egy *terc*-oktilamino funkción *N*-metilezett analógot is előállítottunk (**454** vegyület). A termékeket közepes hozammal (23–60%) nyertük.



6. ábra

3.7. Az előállított imidazo[1,2-*b*]pirazolokat (**225**–**297** és **416**–**455**) az Avidin Kft. munkatársai *in vitro* citotoxicitási vizsgálatoknak vetették alá különböző humán és egér tumorsejtvonalakon. Egyes imidazo[1,2-*b*]pirazol-7-karboxamid származékok potens tumorellenes hatást mutattak. Az imidazo[1,2-*b*]pirazol-7-karboxamidok (**271**–**297** és **416**–**455**) biológiai eredményei alapján szerkezet-hatás összefüggéseket állapítottunk meg (7. ábra). A *primer* karboxamid származékok (**271**–**297**: R^3,R^4,R^5=H) közül a legjelentősebb tumorellenes aktivitást a **292** vegyület mutatta (R^1=*t*-butil, R^2=*t*-oktil). Aromás csoportokkal szubsztituált analógok (R^1 és/vagy R^2 = aril) egy nagyságrenddel gyengébb hatást mutattak, vagy inaktívnak bizonyultak. A **292** vegyület karboxamid funkcióján *N*-alkil vagy *N*-benzilcsoportok jelenléte hasonló vagy csökkent aktivitáshoz vezetett (**416**–**423** vegyületek), azonban fenilcsoport beépítése a HL-60 sejtvonalon mért citotoxikus hatást pozitívan befolyásolta. *p*-Fluorfenil szubsztituenssel a tumorellenes hatást tovább növeltük: a **440** vegyület (R^1=*t*-butil, R^2=*t*-oktil, R^3=4-F-C_6H_4, R^4,R^5=H) HL-60 sejtvonalon nanomólos koncentrációban mutatott szelektív HL-60 aktivitást. A **440** vezérmolekula („lead”) *terc*-oktilamino-csoportjának (R^2NH) *N*-metilezése (**454** vegyület), *tercier* karboxamid funkció kialakítása (**453**: R^1=*t*-butil, R^2=*t*-oktil, R^3=4-F-C_6H_4, R^4=Me, R^5=H), vagy 6-os helyzetben metilcsoport jelenléte (**455**: R^1=*t*-butil, R^2=*t*-oktil, R^3=4-F-C_6H_4, R^4=H, R^5=Me) a citotoxikus aktivitás csökkenését vagy elvesztését eredményezte.

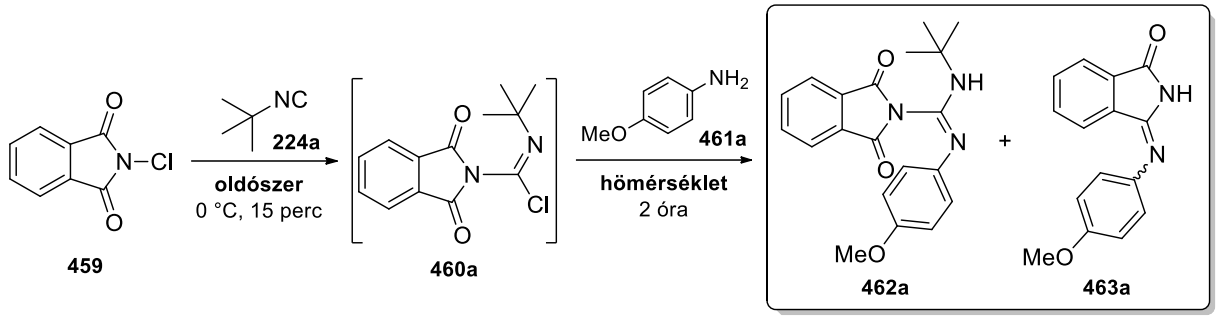


7. ábra

3.8. A kísérleti munka harmadik részében egy *N,N'*-diszubsztituált guanidinek előállítására alkalmas izocianid alapú szekvenciális egyedényes módszert fejlesztettünk ki.

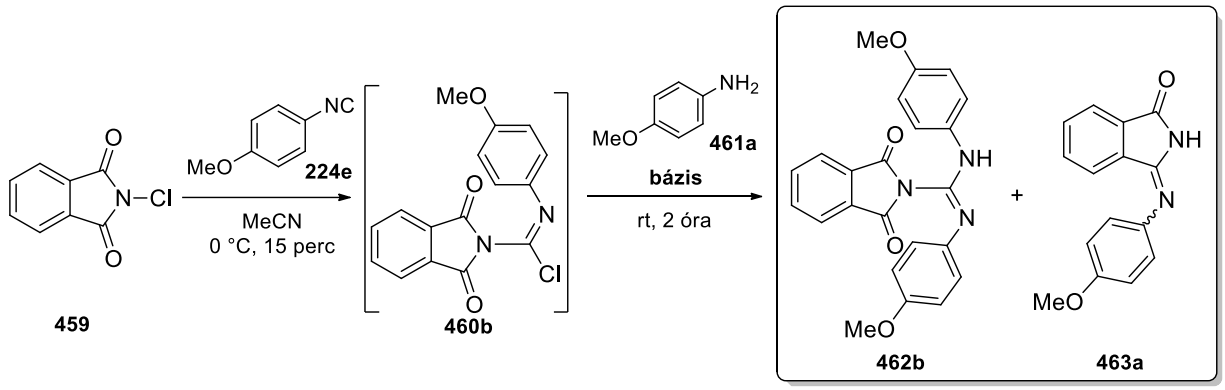
Egy modellreakció segítségével *N*-ftaloilguanidinek *N*-klórftálimidből, izocianidokból és aminokból történő kétlépéses, szekvenciális egyedényes előállítási lehetőségét vizsgáltuk: a *terc*-butil-izocianid (**224a**) és *p*-anizidin (**461a**) komponensek felhasználásával végrehajtott reakció során a várt **462a** *N*-ftaloilguanidin mellett a **463a** izoindolinon terméket izoláltuk (8. ábra). A reakciókörülmények optimalizálása során szignifikáns oldószerhatást tapasztaltunk: apoláris oldószerek és éterek esetén a reakció főtermékeként a **463a** izoindolinon keletkezett,

míg poláris aprotikus közeg főként az **462a** guanidin képződésének kedvezett. A legmegfelelőbb oldószernek az abszolút acetonitrilt találtuk (**462a**: 75% (HPLC)). A szubsztitúciós lépés szobahőmérsékleten bizonyult a leghatékonyabbnak; a hőmérséklet csökkentésével vagy emelésével nem értünk el hozamnövekedést.



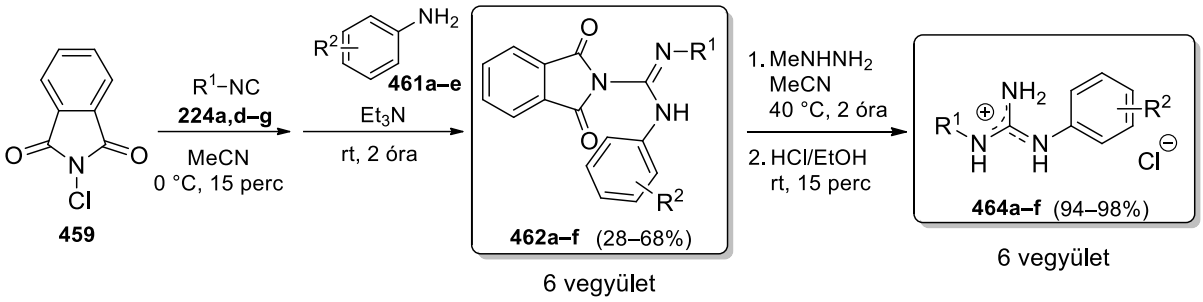
8. ábra

3.9. Tanulmányoztuk a reakció kiterjeszthetőségét aromás izocianidokra. A modellreakciót az optimalizált reakciókörülmények között (MeCN oldószer, **461a** hozzáadását követően szobahőmérséklet) 4-metoxifenil-izocianiddal (**224e**) elvégezve a várt **462b** *N*-ftaloilguanidin helyett a **463a** izoindolinon termék keletkezését tapasztaltuk (9. ábra). A reakciósor részlépéseinek vizsgálata során megállapítottuk, hogy az *N*-klórftálimid és a **224e** izocianid reakciója stabilis, izolálható **460b** adduktot eredményezett. Megfigyeltük, hogy a **460b** imidoil-klorid *in situ* képzését követően a reakcióelegyhez megfelelő bázist (és **461a** *p*-anizidint) hozzáadva a szubsztitúciós reakciólépés a távozó sósav semlegesítésén keresztül elősegíthető. A leghatékonyabb adaléknak a trietilamin (TEA) bizonyult (**462b**: 48% (HPLC)). Az alkalmazott bázis erőssége és a **462b**:**463a** termékarány között összefüggést nem találtunk.



9. ábra

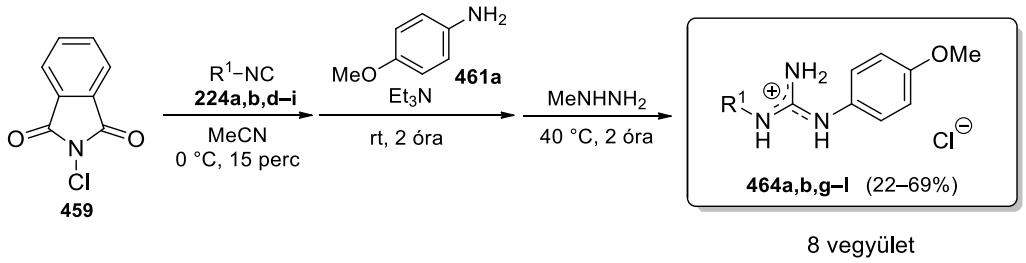
3.10. Az optimalizált protokollt követve (MeCN, 0 °C–rt, TEA a második lépésben) alifás, benzil- és aromás izocianidok (**224a,d–g**), valamint elektronküldő és -vonzó csoportokkal szubsztituált anilinek (**461a–e**) felhasználásával hat, elektronikus szempontból eltérő tulajdonságú **462a–f** *N*-ftaloilguanidin származékot szintetizáltunk (28–68%), majd vizsgáltuk a ftaloilcsoport eltávolíthatóságát; a **462a–f** termékeket metilhidrazinnal 40 °C-on, 2 óra reakcióidő alatt teljes konverzióval alakítottuk át a **464a–f** *N,N'*-diszubsztituált guanidinekké (10. ábra). Megfigyeltük, hogy a **462a–f** guanidinek szubsztituáltsága a reakció hatékonyságára nem gyakorol hatást: a **464a–f** termékeket – melyeket a könnyebb izolálás érdekében sósavas sóvá alakítottunk – kiváló termelésekkel (94–98%) nyertük.



462a,464a: R^1=*t*-Bu, R^2=4-MeO-C_6H_4; **462b,464b**: R^1=4-MeO-C_6H_4, R^2=4-MeO-C_6H_4; **462c,464c**: R^1=4-MeO-C_6H_4, R^2=4-Br-C_6H_4; **462d,464d**: R^1=*c*-hexil, R^2=3,5-di-Me-C_6H_4; **462e,464e**: R^1=Bn, R^2=4-F-C_6H_4; **462f,464f**: R^1=4-F-C_6H_4, R^2=C_6H_5

10. ábra

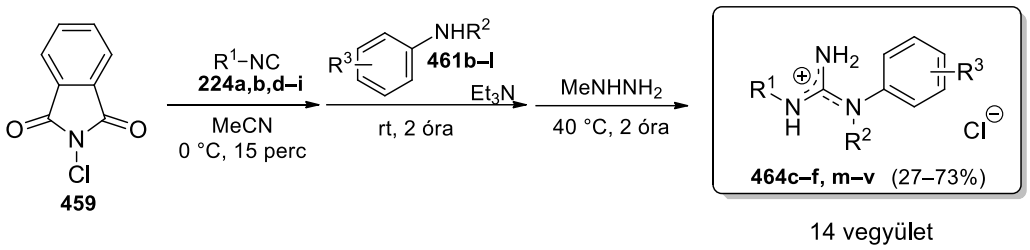
3.11. Az *N,N'*-diszubsztituált guanidinek szintézisét egy *N*-ftaloilguanidinek izolálását mellőző háromlépéses szekvenciális egyedényes protokollá fejlesztettük, mellyel először alifás és aromás izocianidok (**224a,b,d–i**), valamint *p*-anizidin (**461a**) felhasználásával 8 *N,N'*-diszubsztituált guanidint állítottunk elő (11. ábra). Megfigyeltük, hogy az izocianidok nukleofil karaktere a hozamokat jelentősen befolyásolja: a legjobb izolált termeléseket benzil- és alifás izocianidok felhasználásakor értük el (51–69%), míg aromás izocianidok alacsonyabb hozamokat eredményeztek (22–48%). Aromás izocianidok esetén a **463a** izoindolinon melléktermék mellett *N*-aril-*N'*-(4-metoxifenil)-karbamidok képződését figyeltük meg.



R^1=*t*-butil, *t*-oktil, *c*-hexil, Bn, 4-MeO-C_6H_4, 4-F-C_6H_4, 3,4,5-tri-MeO-C_6H_2, 4-NO_2-C_6H_4

11. ábra

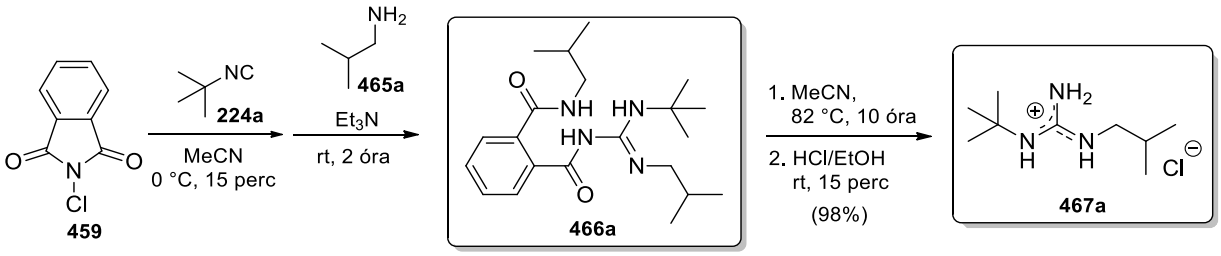
3.12. A háromlépéses szekvenciális egyedényes módszerrel elektronküldő és elektronvonzó csoportokkal szubsztituált anilinek (**461b–l**) és a izocianidok (**224a,b,d–i**) felhasználásával 14 *N,N'*-szubsztituált guanidint állítottunk elő (27–73%) (12. ábra). Megállapítottuk, hogy az anilin szubsztituenseinek (R^3) elektronikus tulajdonsága – a nitrocsoport kivételével – a reakció hatékonyságát jelentősen nem befolyásolja. Egy példán keresztül megmutattuk, hogy az eljárás *N,N,N'*-triszubsztituált guanidinek szintézisére is alkalmazható (**464n** vegyület: R^2=Me). Heteroaromás aminok (2-aminopiridin, 2-aminotiazol és 3-aminoizoxazol) esetén a várt guanidin céltermékek helyett a megfelelő **463** izoindolinon melléktermékek képződését tapasztaltuk.



R^1=*t*-butil, *t*-oktil, *c*-hexil, Bn, 4-MeO-C_6H_4, 4-F-C_6H_4, 3,4,5-tri-MeO-C_6H_2, 4-NO_2-C_6H_4;
R^2=H, Me; R^3= H, 4-F, 4-Br, 3-I, 4-CF_3, 4-CN, 4-NMe_2, 2,4-di-F, 3,5-di-Me, 4-Me-3-NO_2

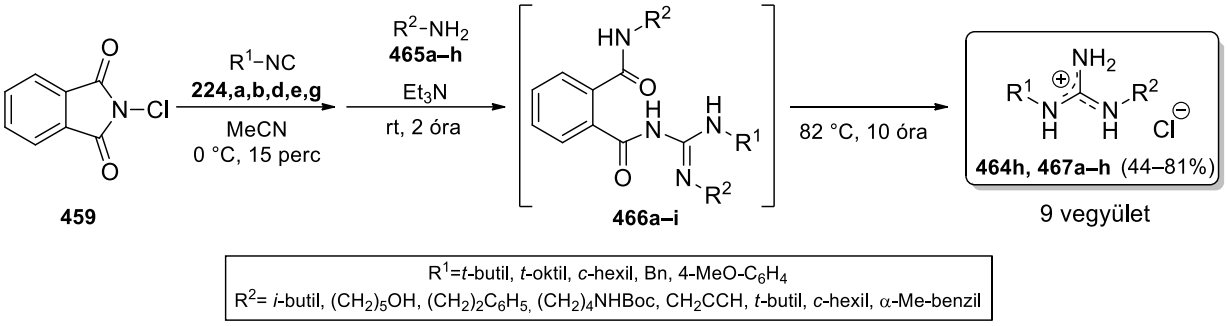
12. ábra

3.13. Vizsgáltuk a reakció kiterjeszthetőségét alifás aminokra. Meglepő módon az *N*-klórftálimid, *terc*-butil-izocianid és alifás izobutilamin reakciója a **466a** terméket eredményezte, melyet a várt *N*-ftaloilguanidin izobutilaminnal végbemenő *in situ* gyűrűfelnyílásával magyaráztunk (13. ábra). Mivel a gyűrűfelnyílást alacsony hőmérsékleten (-40°C) sem sikerült megakadályoznunk, a **467a** *N,N'*-diszubsztituált guanidin előállítását végül az izolált **466a** termék intramolekuláris nukleofil szubsztitúció révén végbemenő debenzoilezésével, hidrazin mellőzésével valósítottuk meg (13. ábra).



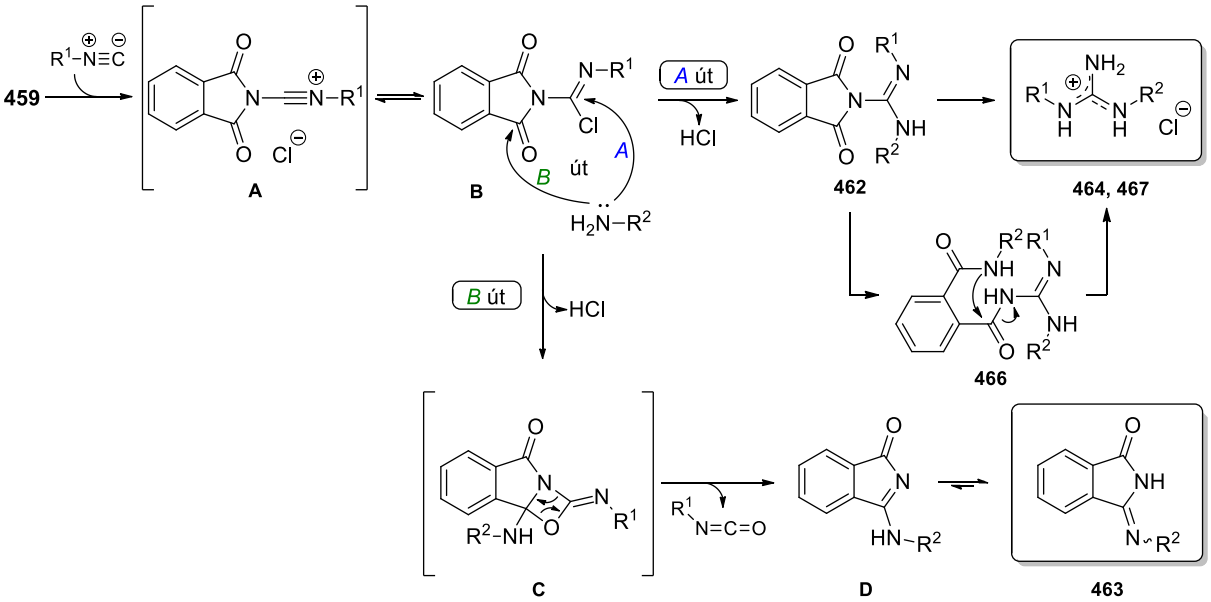
13. ábra

3.14. Alifás aminok sikeres alkalmazása céljából a háromlépéses szekvenciális egyedényes protokollt módosítottuk: a második lépés során 2,2 ekvivalens **465** amint alkalmaztunk, illetve a képződő **466** intermediert egyszerű forralással alakítottuk át a megfelelő **467** *N,N'*-diszubsztituált guanidinné. A módosított eljárással különböző *primer* alifás és benzil-aminok felhasználásával 9 guanidin származékot állítottunk elő (44–81%) (14. ábra).



14. ábra

3.15. A reakció mechanizmusára javaslatot tettünk, melynek lényege az *N*-klórftálimid és izocianid α-addíciós reakciójával kialakuló **B** imidoil-klorid intermedierre történő amin támadás, mely az imidoil szénatomonon (*A* út) vagy a ftálimid karbonilcsoportján (*B* út) egyaránt megvalósulhat, a megfelelő **462** *N*-ftaloilguanidin vagy **463** izoindolinon keletkezését eredményezve (15. ábra). A retro [2+2] cikloaddíció-szerű átrendeződéssel járó *B* reakcióút során izocianát keletkezését feltételeztük, melyet egy kontroll kísérlettel igazoltunk. A mechanizmus további alátámasztására a **B** imidoil-klorid intermedier képződését is bizonyítottuk.



15. ábra

4. A doktori értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **A. Demjén**, M. Gyuris, J. Wölfling, L. G. Puskás, I. Kanizsai
   Facile synthesis of 1*H*-imidazo[1,2-*b*]pyrazoles *via* a sequential one-pot synthetic approach
   Beilstein J. Org. Chem. **2014**, *10*, 2338–2344.

   IF: 2,762

2. **A. Demjén**, A. Angyal, J. Wölfling, L. G. Puskás, I. Kanizsai
   One-pot synthesis of diverse *N,N′*-disubstituted guanidines from *N*-chlorophthalimide, isocyanides and amines via *N*-phthaloyl-guanidines
   Org. Biomol. Chem. **2018**, *16*, 2143–2149.

   IF: 3,564
   (2017)

3. **A. Demjén**, R. Alföldi, A. Angyal, M. Gyuris, L. Hackler, G. Szebeni, J. Wölfling, L. Puskás, I. Kanizsai
   Synthesis, Cytotoxic Characterization, and SAR Study of Imidazo[1,2-*b*]pyrazole-7-carboxamides
   Arch. Pharm. Chem. Life Sci. **2018**, *(közlésre elfogadva, DOI: 10.1002/ardp.201800062).*

   IF: 1,994
   (2017)

Összesített IF: 8,320

5. A doktori értekezés alapjául szolgáló előadások és poszterek

1. **A. Demjén**, M. Gyuris, L. G. Puskás, J. Wölfling, I. Kanizsai
   Synthesis of Imidazo[1,2-*b*]pyrazole Derivatives via GBU Reaction (poszter)
   9th International Congress of Young Chemists, Krakkó (Lengyelország), **2011**.

2. Gyuris M., **Demjén A**., Madácsi R., Puskás G. L., Wölfling J., Kanizsai I.
   Imidazo[1,2-*b*]pirazol származékok előállítása GBU reakcióval (poszter)
   MKE 1. Nemzeti Konferencia, Sopron, **2011**.

3. **Demjén A.**
   Tumorellenes hatású imidazo[1,2-*b*]pirazol molekulakönyvtár Groebke-Blackburn-Bienaymé reakción alapuló négykomponensű szintézise (előadás)
   Heterociklusos és Elemorganikus Kémiai Munkabizottság ülése, Balatonszemes, **2012**.

4. **A. Demjén**, L. G. Puskás, J. Wölfling, I. Kanizsai
   A facile three-component assembly of trisubstituted *N,N*-phthalylguanidine species (poszter)
   14th Belgian Organic Synthesis Symposium, Louvain-la-Neuve (Belgium), **2014**.

5. **Demjén A.**
   Az *N*-klórftálimidtől a guandinek felé (előadás)
   Szegedi Ifjú Szerves Kémikusok Támogatásáért Alapítvány 15. tudományos előadóülése, Szeged, **2016**.

6. **A. Demjén**, A. Angyal, L. G. Puskás, J. Wölfling, I. Kanizsai
   Novel Isocyanide-Based Approach for the Synthesis of *N,N'*-Disubstituted Guanidines through *N*-Phthaloylguanidines (poszter)
   27th European Colloquium on Heterocyclic Chemistry, Amsterdam (Hollandia), **2016**.

7. G. J. Szebeni, **A. Demjén**, I. Kanizsai, L. Hackler Jr., L. G. Puskás
   Small molecules DU192, DU283 and DU325 induce differentiation and apoptosis of human acute promyelocytic leukemia cells (poszter)
   Magyar Immunológiai Társaság 46. Vándorgyűlése, Velence, **2017**.

8. G. J. Szebeni, A. Demjén, I. Kanizsai, L. Hackler Jr., L. G. Puskás
   Imidazo[1,2-*b*]pyrazole-7-carboxamides: DU192, DU283 and DU325 induce differentiation and apoptosis of human acute promyelocytic leukemia cells (poszter)
   CYTO, Prága (Csehország), **2018**.

6. A doktori értekezéshez nem kapcsolódó közlemények

1. P. Bata, **A. Demjen**, F. Notheisz, A. Zsigmond
   Comparative study of immobilized phthalocyanines in oxidative degradation
   Open Catal. J. **2012**, *5*, 50–55.

   IF: –

2. A. Angyal, **A. Demjén**, J. Wölfling, L. G. Puskás, I. Kanizsai
   A green, isocyanide-based three-component reaction approach for the synthesis of multisubstituted ureas and thioureas
   Tetrahedron Lett. **2018**, *59*, 54–57.

   IF: 2,193
   (2017)

3. A. Angyal, **A. Demjén**, E. Wéber, A. K. Kovács, J. Wölfling, L. G. Puskás, I. Kanizsai
   Lewis acid-catalyzed diastereoselective synthesis of multisubstituted *N*-acylaziridine-2-carboxamides from 2*H*-azirines *via* Joullié-Ugi three-component reaction
   J. Org. Chem. **2018**, *83*, 3570–3581.

   IF: 4,849
   (2017)

Összesített IF: 7,042