

Ph.D. értekezés tézisei

**ÖSZTRÁNVÁZAS AZA- ÉS OXACIKLUSOS VEGYÜLETEK
RÉGIÓSZELEKTÍV SZINTÉZISE**

Molnár Barnabás

TÉMAVEZETŐ:

Dr. Frank Éva

egyetemi docens



Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Szerves Kémiai Tanszék

SZTE Kémia Doktori Iskola

Szeged

2022

1. Bevezetés és célkitűzések

A szteroidok tetraciklusos polikondenzált ciklopentano-perhidrofenantrén alapvázal bíró vegyületcsaládot alkotnak, és kulcsfontosságú szerepet töltenek be az emberi szervezet egészséges működésében. A szteránvázon található egyes funkció csoportok kémiai minősége, térállása és elhelyezkedése alapvetően befolyásolhatja a biológiai viselkedést. A modern gyógyszerkutatás egyik kiemelt kutatási területe új, (fél)szintetikus szteroidszármazékok előállítás, melyek változatos daganatos megbetegedések kezelésére lehetnek alkalmasak. Az alapváz stratégiaileg megválasztott helyeinek módosítása által megszüntethető, vagy erősen visszaszorítható a hormonális mellékhatás, és lehetőség nyílik sejtosztódásgátló vagy direkt citotoxikus hatást kifejtő új szteroidalapú gyógyszerek szintézisére.

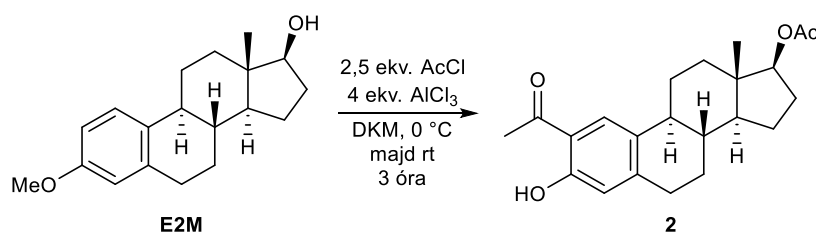
A fenti célra kiváló választás lehet az ösztron vagy az ösztradiol, hiszen a nemzetközi irodalom és a Szteroidkémiai Kutatócsoport korábbi eredményei között is szerepelnek rákellenes hatással bíró ösztrogének. Az ösztránváz aromás A-gyűrűjének átalakítására ugyanakkor jóval kevesebb szakirodalmi példa lelhető fel, mint más alapváz vagy D-gyűrűn módosított származékokra, emiatt jó kiindulási alapnak gondoltuk annak módosítását a további kutatásokhoz. Terveink között szerepelt az A-gyűrű régió szelektív módosítása, a multikomponensű reakciók végrehajthatóságának feltérképezése, valamint természetes flavonoid-szteroid hibridek előállítás is. Az így nyert vegyületeket minden esetben szeretnénk volna tisztán izolálni, a reakció körülményeket pedig optimalizálni. Szintén terveink között szerepelt a molekulák szerkezetének egyértelmű igazolása nagyműszeres analitikai mérésekkel, valamint az összes származékot *in vitro* farmakológiai vizsgálatokra kívántuk küldeni együttműködő partnereink részére. További célunk volt az esetleg jelentkező szubsztituens-hatások és/vagy szerkezet-hatás összefüggések leírása.

2. Vizsgálati módszerek

Az átalakításokat jellemzően millimólos vagy kisebb mennyiségekben hajtottuk végre, kivéve a kiindulási anyagok méretnövelt szintéziseit, melyeket grammos tételben végeztünk. A reakciókat vékonyréteg-kromatográfiával (VRK) követtük, néhány esetben pedig zárt rendszerben, mikrohullámú (MW) besugárzással melegítettük a reakcióelegyet. Az előállított vegyületeket oszlop-kromatográfia segítségével tisztítottuk, a termékek szerkezetét pedig nagyműszeres (^1H - és ^{13}C -NMR, ESI-MS) analízissel igazoltuk.

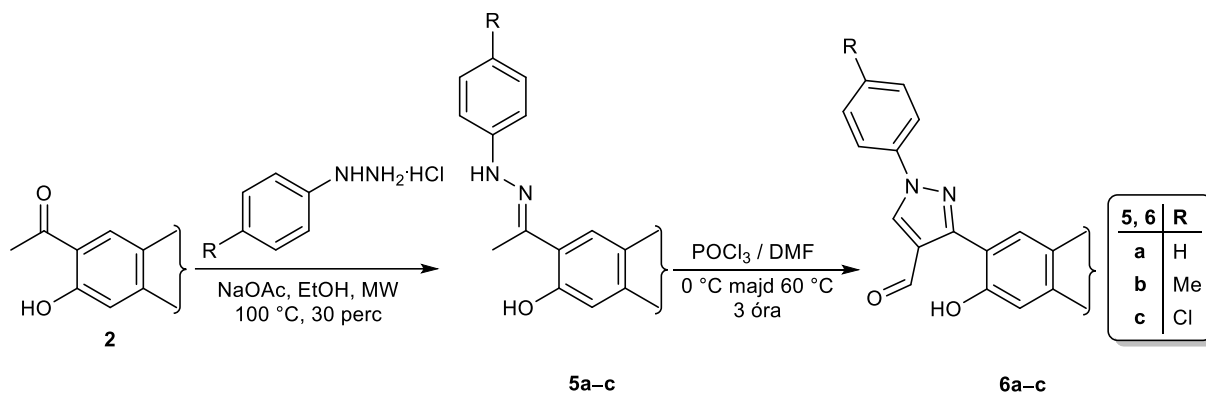
3. Új tudományos eredmények*

3.1. Az ösztradiol-3-metiléterből (**E2M**) *Friedel-Crafts* reakcióban, nagy AlCl_3 felesleg hatására végbemenő *in situ* demetilézéssel egyidejűleg jó hozammal (80%) nyertük a 2-acetil-ösztradiol-17 β -acetátot (**2**), mely a további átalakítások kulcsfontosságú kiindulási alapanyaga volt (1. ábra).



1. ábra

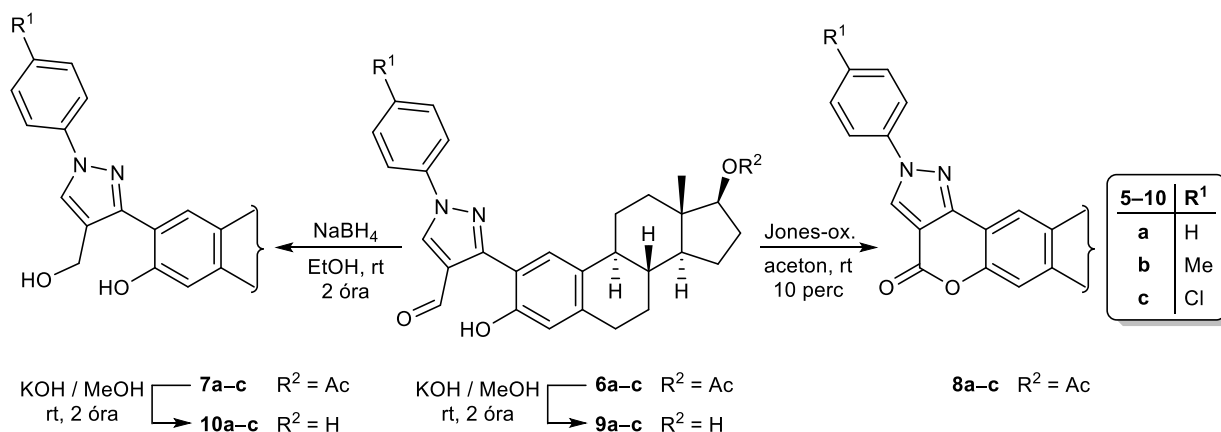
3.2. Az így kapott metilketont *para*-helyzetben szubsztituált fenilhidrazinok hidroklorid-sóival reagáltattuk, nátrium-acetát bázis jelenlétében, etanolos közegben. A reakciót MW besugárzással melegítve jelentősen nagyobb konverziót értünk el, sokkal rövidebb reakcióidő mellett a hagyományos fűtési technikákhoz képest. A hidrazonokat (**5a–c**, 75–78%) szűrést követően *Vilsmeier-Haack* reakciónak vetettük alá, így a megfelelő formilpirazolokhoz (**6a–c**, 72–78%) jutottunk (2. ábra).



2. ábra

3.3. A vizsgált vegyületkönyvtár bővítésének céljából redoxireakciókat hajtottunk végre a formilpirazolokon (**6a–c**). Nátrium-bórhidrides redukcióval primer alkoholokat (**7a–c**, 77–87%), míg *Jones*-oxidációval pirazolokumarin-ösztradiol hibrideket (**8a–c**, 69–73%) kaptunk. Az összes származékot dezacetilezni szeretnénk volna, de a laktonok esetén a gyűrűnyitási mellékreakció igen jelentőssé vált, és a reciklizációs próbálkozásaink

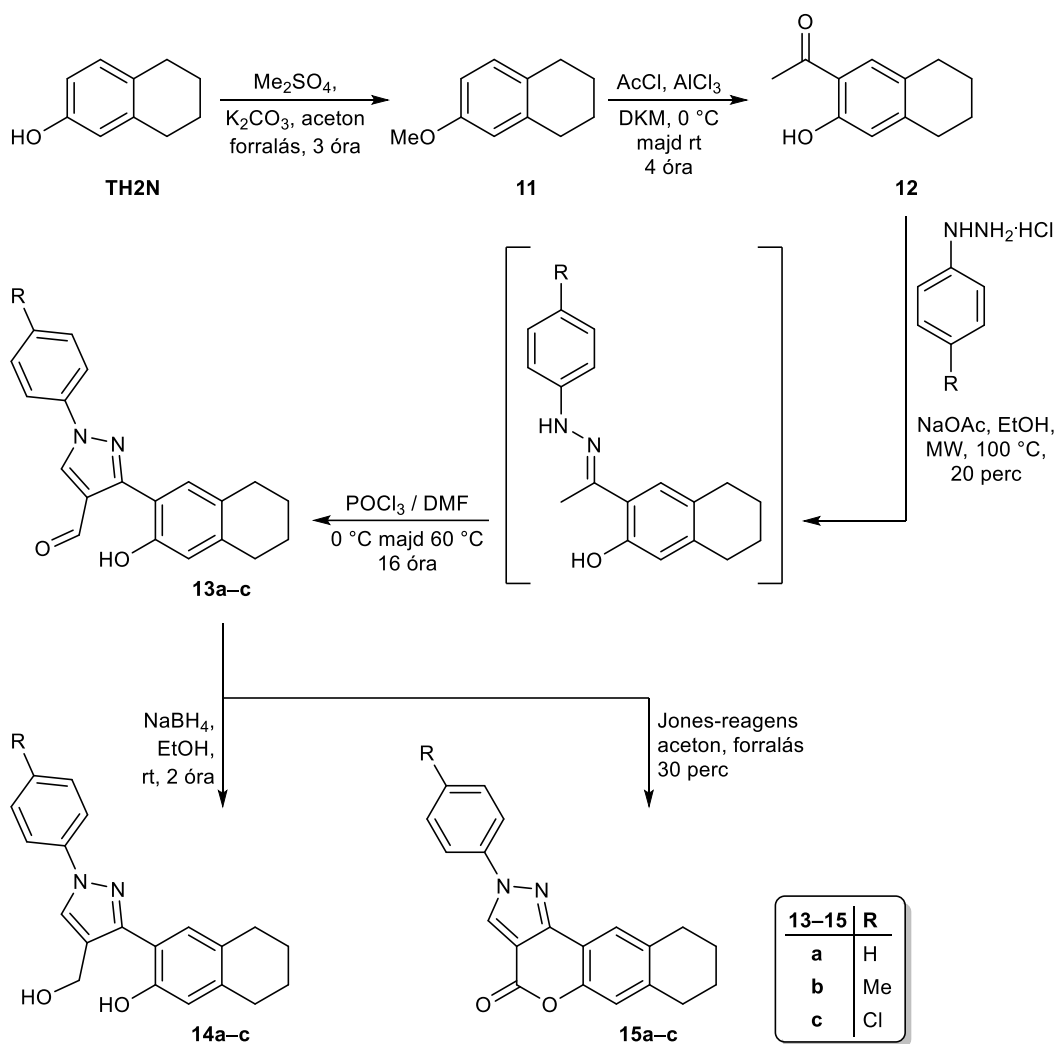
sikertelennek bizonyultak. Emiatt végül csak **6a–c** és **7a–c** vegyületek esetén hajtottuk végre ezt az átalakítást, így jutva a megfelelő 17-OH vegyületekhez (**9a–c** és **10a–c**, 3. ábra).



3. ábra

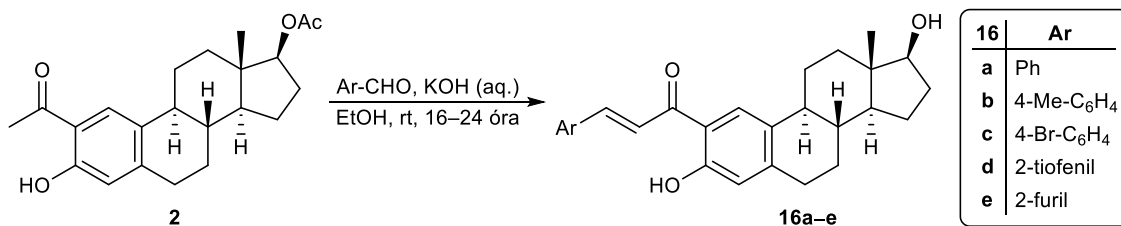
3.4. A szerkezet-hatás összefüggések feltérképezése céljából a formilpirazolok előállítását végrehajtottuk 5,6,7,8-tetrahidro-2-naftol (**TH2N**) kiindulási anyagból is, mely az ösztránváz A- és B-gyűrűk modelljeként szolgált. A **TH2N** dimetil-szulfátos metilezését követően a kapott metil-étert (**11**) a szteroidokkal azonos körülmények mellett *Friedel-Crafts* reakciónak vetettük alá, és közepes hozammal nyertük a szükséges kiindulási metilketont (**12**, 69%). Szintén a korábbiakkal azonos körülmények mellett próbáltuk végrehajtani a hidrazonképzést és a *Vilsmeier-Haack* reakciót is, de a kismolekulás származékok esetén a hidrazont nem tudtuk izolálni. A nyers reakcióelegyet így közvetlenül, tisztítás nélkül vittük tovább, amely negatív hatással volt a formilpirazolok (**13a–c**) végső hozamaira (34–41%). A redoxi-átalakításokat ebben az esetben is elvégeztük, így a megfelelő primer alkoholokhoz (**14a–c**, 66–83%) és laktonokhoz (**15a–c**, 51–64%) jutottunk, de a *Jones*-oxidáció során forralni kellett az elegyet a teljes konverzió eléréséhez, ami viszont a melléktermék-képződés miatt szintén hozamcsökkenéshez vezetett (4. ábra).

3.5. Az *in vitro* farmakológiai vizsgálatok eredményei alapján az oldallánc benzolgyűrűjének szubsztitúciója szinte minden esetben rontott a szelektivitáson. A kismolekulás származékok között csupán néhány vegyület bizonyult aktívnak, ráadásul a szteránváz párhoz jobban eredményeket értek el. A biológiai vizsgálatok eredményeinek tükrében a kisebb alapvázal bíró vegyületek szintézisét a későbbiekben elvetettük.



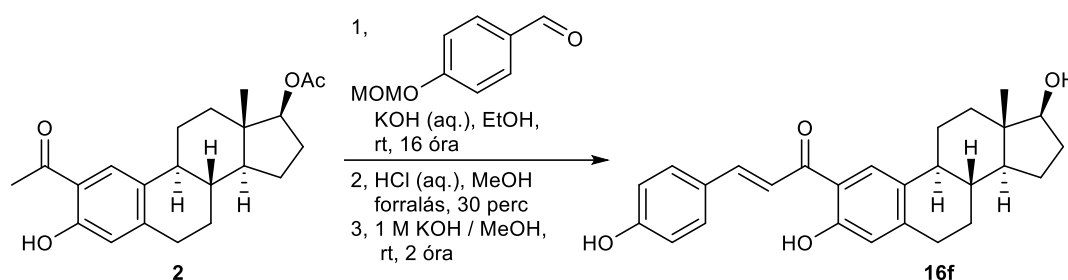
4. ábra

3.6. A 2-acetil-ösztadiol-17 β -acetátot (**2**) *Claisen-Schmidt* kondenzációs reakcióba vittük változatos *para*-helyzetben szubsztituált benzaldehid-származékokkal és heteroaromás aldehidekkel, így közepes-jó hozamokkal (69–86%) nyertük a megfelelő kalkonokat, kivéve a *para*-brómozott vegyületet (**16c**, 24%). Az NMR mérések alapján a főtermék egyértelműen a *transz*-izomer, az alkalmazott erősen bázikus közeg hatására pedig minden esetben végbement a 17-es helyzetű dezacetileződés is (5. ábra).



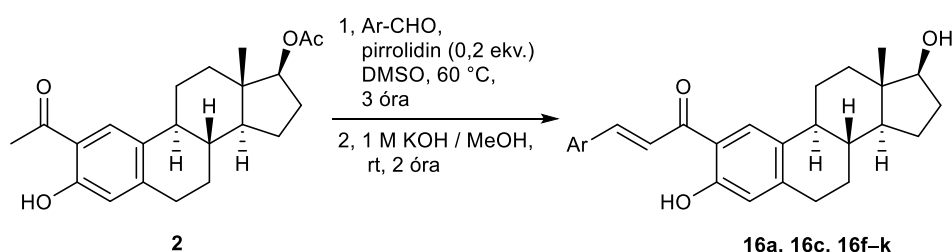
5. ábra

3.7. A fenolos OH-csoportot tartalmazó aldehidekkel egyáltalán nem tapasztaltunk konverziót, még a reakcióparaméterek (bázis minősége, oldószer, hőmérséklet, stb.) változtatására sem. A *para*-hidroxibenzaldehiddől előállított, metoximetil (MOM) védőcsoporttal védett aldehid-származékkal ugyanakkor sikeresen elő tudtuk állítani a kívánt kalkont (**16f**, 68%, 6. ábra). Jelentős flavanon melléktermék-képződést tapasztaltunk a védőcsoport savas eltávolítása során, de ez erősen bázikus közegben, reverzibilis gyűrűnyitási reakcióban elbonthatónak bizonyult.



6. ábra

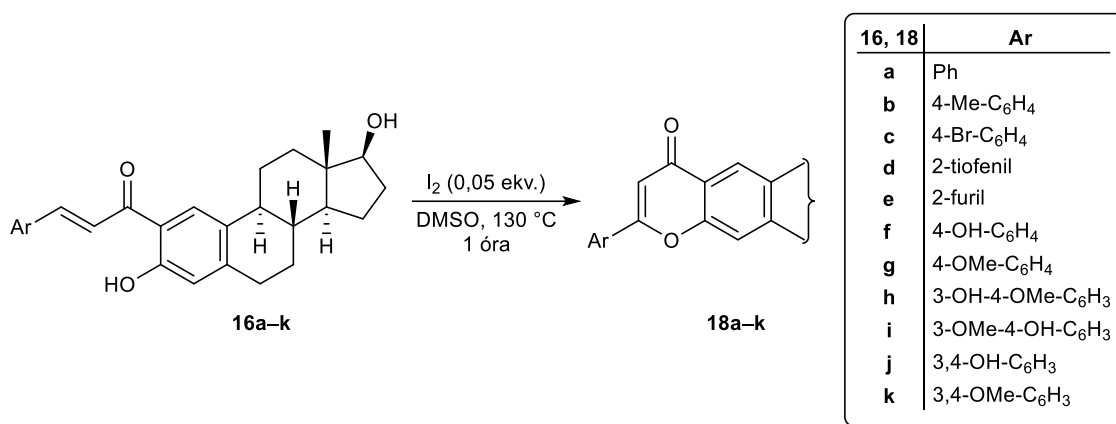
3.8. A sok reakciólépés, a hosszú reakcióidők és a karcinogén klórmetil-metiléter használata miatt alternatív szintetikus útvonalat kerestünk. 2-Acetil-ösztadiol-17 β -acetátot (**2**) dimetilszulfidos (DMSO) közegben, pirrolidin katalizátor jelenlétében közvetlenül reakcióba tudtuk vinni OH-csoportot (is) tartalmazó benzaldehid-származékokkal. A pirrolidin az *oxa-Michael* addíció jó katalizátorának bizonyult, így ebben az esetben is jelentős flavanon melléktermék volt jelen a reakcióelegyen, ami azonban metanolos KOH hatására felnyitható volt, így végső soron nem rontott a hozamértékeken. A reakciót megismételtük benzaldehiddel (**16a**), valamint *para*-brómbenzaldehiddel (**16c**) is, előbbi esetén a *Claisen-Schmidt* reakcióval összemérhető (73%), utóbbi esetén pedig több, mint kétszer jobb hozamot (58%) tudtunk elérni. A pirrolidin-DMSO rendszerrel közepes-jó (55–79%) hozamok mellett, néhány óra alatt, két lépésben tudtuk nyerni a kívánt kalkonokat (**16a**, **16c**, **16f–k**, 7. ábra).



| 16 | Ar |
|----|--|
| a | Ph |
| c | 4-Br-C ₆ H ₄ |
| f | 4-OH-C ₆ H ₄ |
| g | 4-OMe-C ₆ H ₄ |
| h | 3-OH-4-OMe-C ₆ H ₃ |
| i | 3-OMe-4-OH-C ₆ H ₃ |
| j | 3,4-OH-C ₆ H ₃ |
| k | 3,4-OMe-C ₆ H ₃ |

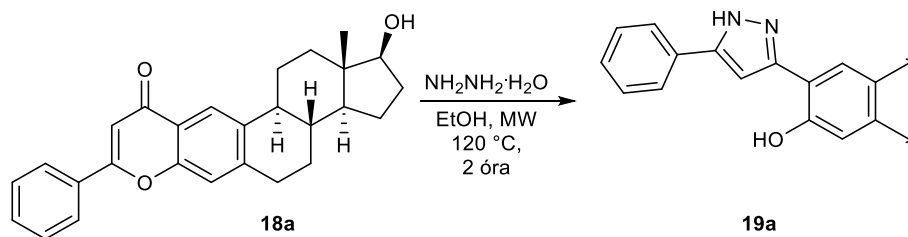
7. ábra

3.9. A kapott kalkonokat (**16a–k**) DMSO-s közegben, katalitikus mennyiségű elemi jód jelenlétében oxidatív ciklizációnak vetettük alá. A reakciót a körülmények optimalizációját követően 130 °C-on végeztük, és 1 óra alatt nyertük a megfelelő szteránvázas flavonokat (**18a–k**) közepes, esetenként kiváló hozamokkal (66–91%, 8. ábra).



8. ábra

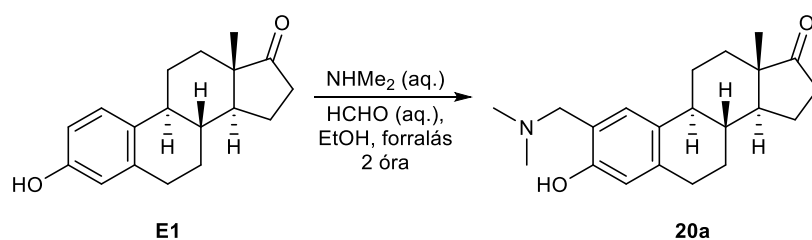
3.10. Kísérletet tettünk a flavonok pirazollá történő közvetlen átalakítására is, így a **18a** vegyületet hidrazin-hidráttal próbáltuk elreagáltatni. Hagyományos fűtési technikák mellett nem figyeltünk meg konverziót, és bár MW besugárzással sikeres volt az átalakítás, de 2 óra reakcióidő volt szükséges, nagy reaktánsfelesleg mellett (9. ábra). A kapott pirazol (**19a**, 78%) anomális NMR viselkedést mutatott, biológiailag pedig teljesen hatástalannak bizonyult, így további származékokat nem állítottunk elő.



9. ábra

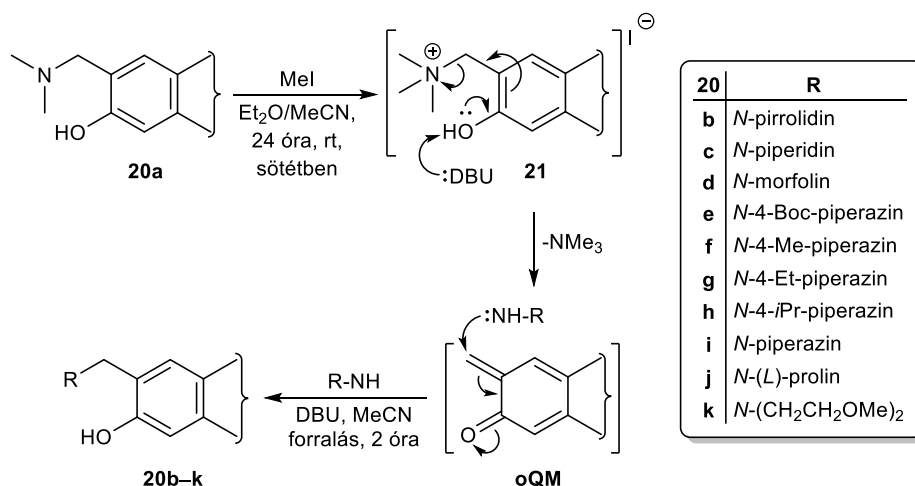
3.11. Az *in vitro* farmakológiai eredmények alapján az oldallánc benzolgyűrűjének szubsztitúciója ebben az esetben is rontott a szelektivitáson és/vagy a rákellenes hatáson. A kalkonok közül (némi váratlanul) egyik származék sem bizonyult igazán hatékonynak, a flavonok közül pedig a **18a–c** vegyületek mutattak jelentős és szelektív antiproliferatív hatást.

3.12. A multikomponensű reakciók feltérképezése során az ösztron (**E1**) dimetil-aminnal végzett *Mannich*-reakciója gyorsan és jó szelektivitással szolgáltatja a megfelelő 2-aminometilezett származékot (**20a**, 80%, *10. ábra*), az alkalmazott formaldehid forrástól függetlenül. Ciklusos aminok esetén ugyanakkor jóval hosszabb reakcióidő volt szükséges a teljes konverzióhoz, és sok esetben csak nagyon nehezen tisztítható régióizomerkeveréket kaptunk.



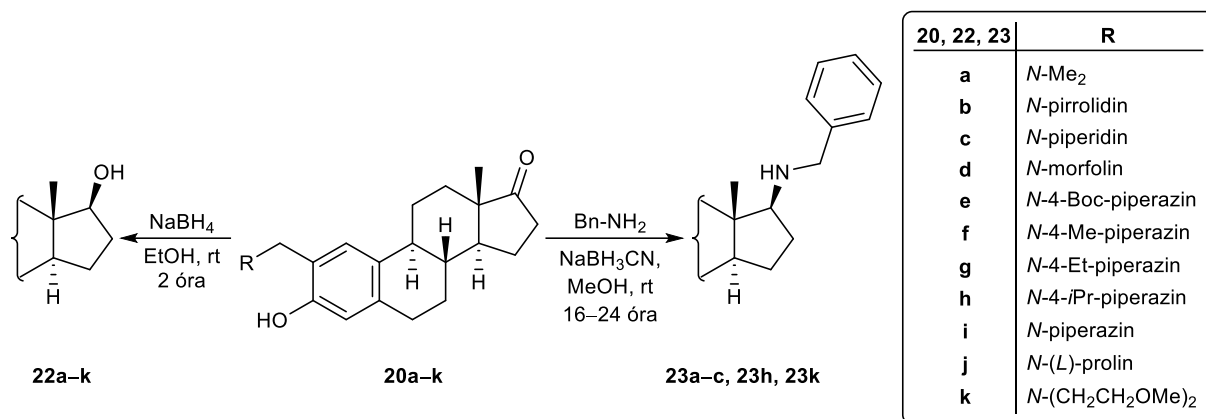
10. ábra

3.13. Alternatív szintetikus útvonalként a **20a** vegyület kvaternerezését követő *Hofmann*-elimináció által *in situ* képzett orto-kinon-metidre (oQM) történő *aza-Michael* addíciót azonosítottuk. A kvaternerezés metil-jodiddal közel kvantitatívan ment végbe, de a reakciót sötétben kell végezni, ugyanis a kvaterner ammónium-só fényre érzékenynek bizonyult. A pirrolidinnel végzett modellreakciók alapján a 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-én (DBU) bizonyult ideális bázisnak, és számos egyéb szekunder aminnal is végrehajtottuk a transzformációt. A reakciósor eredményeként közepes-jó hozamokkal (62–89%) nyertük a kívánt 2-aminometilezett ösztron-származékokat (**20b–k**, *11. ábra*).



11. ábra

3.14. Mivel a szteránváz 17-es ketocsoportja érintetlen maradt, a vizsgált vegyületek körét annak módosításával bővítettük. Nátrium-bórhidrides redukcióval a megfelelő szekunder alkoholokat (**22a–k**, 69–91%), míg benzil-aminnal végzett *Borch*-féle redukciós aminationalással a megfelelő 17-benzilezett származékokat (**23a–c**, **23h**, **23k**, 56–71%) nyertük (12. ábra). Utóbbi reakciót csak öt származék esetén hajtottuk végre, mert együttműködő partnereink gyógyszerkémiái paraméterek *in silico* modellezési eredményei alapján ezektől a vegyületektől vártunk kiemelt biológiai hatást.



12. ábra

3.15. Az *in vitro* sejtsztódás-gátlási vizsgálatok során rendre a dimetil- (**a**), pirrolidin- (**b**), *N-terc*-butoxikarbonilezett piperazin- (**e**) vagy dimetoxietán-oldalláncot (**k**) tartalmazó származékok bizonyultak a leghatékonyabbaknak. A 17-keton (**20a–k**) és 17-OH (**22a–k**) származékok között esetenként markánsan eltérő viselkedés volt tapasztalható, egyértelmű szerkezet-hatás összefüggés ebben az esetben nem állapítható meg. A 17-benzilezett vegyületek (**23a–c**, **23h**, **23k**) IC₅₀ értékeiben egy nagyságrendbeli ugrás volt megfigyelhető, de a szelektivitásukat teljesen elvesztették, feltehetően a megnövekedett lipofilitás miatt.

4. A doktori értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Barnabás Molnár**, Mohana Krishna Gopisetty, Dóra Izabella Adamecz, Mónika Kiricsi, Éva Frank

Multistep synthesis and *in vitro* anticancer evaluation of 2-pyrazolyl-estradiol derivatives, pyrazolocoumarin-estradiol hybrids and analogous compounds
Molecules, **2020**, 25, 4039.

IF = 4,412

2. **Barnabás Molnár**, Mohana K. Gopisetty, Ferenc István Nagy, Dóra Izabella Adamecz, Zsolt Kása, Mónika Kiricsi, Éva Frank

Efficient access to domain-integrated estradiol-flavone hybrids *via* the corresponding chalcones and their *in vitro* anticancer potential
Steroids, **2022**, 187, 109099.

IF = 2,760*

3. **Barnabás Molnár**, Njangiru Isaac Kinyua, Gergő Mótyán, Péter Leits, István Zupkó, Renáta Minorics, György T. Balogh, Éva Frank

Regioselective synthesis, physicochemical properties and anticancer activity of 2-aminomethylated estrone derivatives
The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, **2022**, 219, 106064.

IF = 5,011*

Összesített IF = 12,183*

MTMT azonosító: 10065235

5. A doktori értekezéshez nem kapcsolódó közlemények

1. Gergő Mótyán, **Barnabás Molnár**, János Wölfling, Éva Frank

Microwave-assisted stereoselective heterocyclization to novel ring D-fused arylpyrazolines in the estrone series
Molecules, **2019**, 24, 569.

IF = 3,267

2. Anita Kiss, Bianka Edina Herman, Tamás Görbe, Erzsébet Mernyák, **Barnabás Molnár**, János Wölfling, Mihály Szécsi, Gyula Schneider
Synthesis of novel 17-triazolyl-androst-5-en-3-ol epimers *via* Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition and their inhibitory effect on 17 α -hydroxylase/C17,20-lyase
Steroids, **2018**, 135, 79.

IF = 2,136

Összesített IF = 5,403

6. A doktori értekezés alapjául szolgáló előadások és poszterek

1. **Molnár Barnabás**, Frank Éva
2-Pirazolil-ösztadiol származékok, pirazolokumarin-ösztadiol hibridek és analóg modellvegyületeik előállítása
MTA Sztteroid- és Terpenoidkémiai Munkabizottsági ülése, Szeged, Magyarország, 2019. november 22.
2. **Molnár Barnabás**, Frank Éva
A-gyűrűn módosított ösztadiol származékok szintézise
Szegedi Ifjú Szerves Kémikusok Támogatásáért Alapítvány előadóülése, online, 2020. május 10.
3. **Molnár Barnabás**, Frank Éva
A-gyűrűn módosított ösztránvázas szteroidok: aminometil-, kalkon- és flavon-származékok szintézise
Szegedi Ifjú Szerves Kémikusok Támogatásáért Alapítvány előadóülése, online, 2021. május 25.
4. **Molnár Barnabás**, Frank Éva
2-Szubsztituált ösztránvázas vegyületek előállítása és továbbalakítása
MTA Sztteroid- és Terpenoidkémiai Munkabizottság ülése, online, 2021. december 6.

7. A doktori értekezéshez nem kapcsolódó előadások és poszterek

1. **Molnár Barnabás**, Mótyán Gergő, Frank Éva
Ösztránváz D-gyűrűjéhez kondenzált pirazolinok mikrohullámú szintézise
Szegedi Ifjú Szerves Kémikusok Támogatásáért Alapítvány előadóülése, Szeged, Magyarország 2016. május 12.
2. **Barnabás Molnár**, Gergő Mótyán, Éva Frank
Microwave-assisted synthesis of ring D-condensed pyrazolines in the estrone series
1st Hungarian-Norwegian Summer School on Bioactive Substance Research, Tromsø, Norvégia, 2016. július 11–26.
3. **Molnár Barnabás**, Mótyán Gergő, Frank Éva
Pirazolin-gyűrűvel módosított ösztrom származékok előállítása mikrohullámú aktiválással
XXXIII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Miskolc, Magyarország 2017. március 29–31.
4. **Molnár Barnabás**, Mótyán Gergő, Baji Ádám, Frank Éva
Pirazolin- és triazolgyűrűvel módosított ösztrom származékok előállítása mikrohullámú aktiválással
MKE Vegyészkonferencia, Hajdúszoboszló, Magyarország, 2017. június 19–21.
(poszter prezentáció)
5. **Molnár Barnabás**, Mótyán Gergő, Baji Ádám, Frank Éva
Ösztránváz D-gyűrűjéhez kondenzált N-heterociklusok előállítása
MTA Szteroid- és Terpenoidkémiai Munkabizottsági ülése, Szeged, Magyarország, 2017. november 27.
6. **Molnár Barnabás**, Mótyán Gergő, Baji Ádám, Frank Éva
Ösztránvázhoz kondenzált triazolok és analóg vegyületek szintézise
Szegedi Ifjú Szerves Kémikusok Támogatásáért Alapítvány előadóülése, Szeged, Magyarország, 2018. május 15.

7. **Barnabás Molnár**, Gergő Mótyán, Mohana K. Gopisetty, Mónika Kiricsi, Małgorzata A. Marć, Éva A. Enyedy, Éva Frank
Microwave-assisted synthesis of steroidal 5-aminopyrazoles and the evaluation of their cytotoxic effect *in vitro*
2nd Euro Chemistry Conference, Valencia, Spanyolország, 2019. június 17–19.
(poszter prezentáció)
-

Halmazott IF = 17,586*