

***N*-tartalmú heterociklusok szintézise 1,3-dikarbonil részegységet tartalmazó Mannich szubsztrátok diverzitás-orientált transzformációival**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Makra Zsófia

Témavezető:

Dr. Kanizsai Iván



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Szerves Kémiai Tanszék

SZTE Kémia Doktori Iskola

Szeged

2023

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A modern gyógyszerkutatásnak köszönhetően új, évről-évre mind hatékonyabb megoldások születnek a súlyos kórképek meggyógyítására és szövődményekkel járó betegségekből való felépülési esély növelésére. Ahhoz, hogy új gyógyszerjelöltek álljanak rendelkezésre, egy hatékony szintetikus szerves kémiai kutatás és fejlesztés kulcsfontosságú, könnyen kivitelezhető, iparosítható, egyedényes, többlépéses szintézisutak tervezésével és megvalósításával.

Az α -(di)karbonil- β -amino vázas Mannich termékek szerkezeti adottságuknak köszönhetően kiváló kiindulási anyagok lehetnek inter- vagy intramolekuláris gyűrűzárással *N*-tartalmú (kondenzált) hetero(poli)ciklusok felépítéséhez. Doktori munkám célja az említett Mannich prekursorok továbbalakítási lehetőségeinek bővítése, hatékony, akár egyedényes, többlépéses reakciók kivitelezése, valamint új, egyedi szubsztitúciós mintázattal rendelkező bioaktív *N*-tartalmú heterociklusok létrehozása.

Mannich prekursorok felhasználásával a következő szintetikus munka kivitelezését terveztük és valósítottuk meg:

- 1) IBX/NIS indukálta oxidatív ciklizációval imidazollal kondenzált gyűrűs vegyületek, imidazo[1,2-*a*]piridin, pirimidin és pirazin analógok előállítása; egyedényes eljárás kidolgozása; egyes biciklusok transzformációs lehetőségeinek demonstrálása.
- 2) szekvenciális egyedényes eljárással, oxidatív, intramolekuláris annulációt követően redukív gyűrűhasítással 4,5-diszubsztituált 2-aminoimidazol szerkezeteket kialakítani, majd a kiválasztott 2-aminoimidazolokból szintetikus tengeri alkaloid analógokat és egyéb citotoxikus vegyületeket képezni.
- 3) új C-C kötés kialakítása trialkilfoszfin indukált reakcióval, az átalakulás kimenetelének vizsgálata aldehid komponens jelenlétében, illetve anélkül.

2. ANYAGOK, MÓDSZEREK

Doktori munkám során a reakciók többsége millimólos mennyiségben került kivitelezésre. A kiindulási anyagok átalakulását vékonyréteg-kromatográfiával, esetenként HPLC vagy HPLC-MS mérés segítségével követtük. A célvegyületek elválasztását oszlopkromatográfiával (szilikagél; Merck, 60 Å, 0,063–0,200 mm) esetenként flash-kromatográfiával (Teledyne Isco CombiFlash *Rf* készülék; szilikagéllal töltött RediSep *Rf* oszlopok) és/vagy egyszerű szűréssel, további tisztítását átkristályosítással végeztük. A termékeket egy- és kétdimenziós NMR

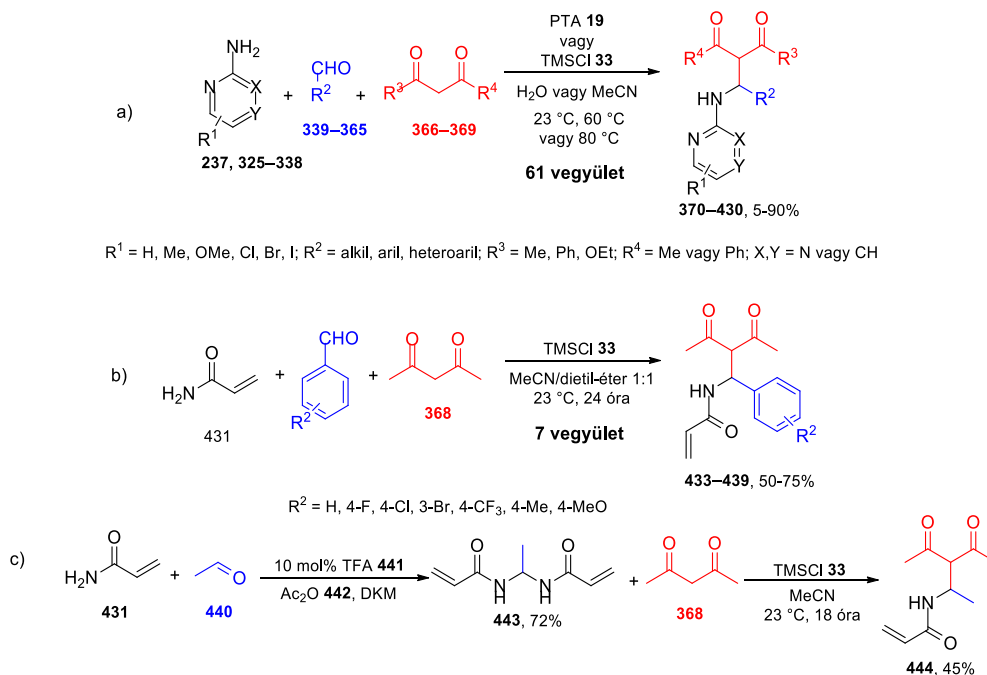
spektroszkópiai technikák segítségével, olvadáspont, IR meghatározásával, HRMS adatokkal, valamint egyes származékoknál röntgenkristallográfiás mérésekkel jellemeztük. A reakciók kivitelezésénél és a tisztítási eljárások során kereskedelmi forgalomból származó reagenseket (néhány kivételtől eltekintve) és oldószereket alkalmaztunk, melyeken további tisztítást nem végeztünk. Az egyes szintetizált vegyületek citotoxikus aktivitásának meghatározását az Avidin Kft. biológus munkatársai végezték el.

3. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

3.1. 69 tagú Mannich prekursor vegyületkönyvtár felépítése

A **237** és **325–338** 2-amino szubsztituált primer heteroaromás aminok, **339–365** alifás és aromás aldehidek, valamint etil-benzoilacetát (**366**), etil-acetoacetát (**367**), acetilaceton (**368**) vagy 1,3-difenil-1,3-propándion (**369**) transzformációival a **370–430** Mannich könyvtárat építettük fel, a kívánt termékeket 5-90%-os izolált hozammal nyertük. A Mannich három komponensű reakciókat (M-3CR) katalitikus mennyiségű PTA vagy TMSCl jelenlétében valósítottuk meg (*1. ábra, a*).

Az akrilamid egységet tartalmazó **433–439** Mannich prekursorokat 50–75% hozammal izoláltuk (reakciókörülmények: TMSCl, MeCN/Et₂O oldószerkegy, szobahőmérséklet, 24 óra; *1. ábra, b*). Az alifás Mannich szubsztrát előállítását M-3CR-rel eredménytelennek bizonyult, így a **444** prekursor szintézisét *N,N*-aminálon keresztül valósítottuk meg (*1. ábra, c*).



1. ábra.

3.2. Oxidatív, intramolekuláris gyűrűzárási módszer kifejlesztése

Az oxidatív gyűrűzárási módszer fejlesztésekor a tesztreakcióban a **370** Mannich szubsztrátot 2,5 ekvivalens PIDA-val (**88**) és 1,5 ekvivalens NIS-sel (**161**) kezeltük acetonitrilben 45 °C-on. 2,5 óra elteltével teljes átalakulást tapasztaltunk, a termék izolálását követően 1D és 2D NMR spektroszkópiás analízissel a **445** imidazo[1,2-*a*]pirimidin szerkezetet bizonyítottuk.

Az optimális reakciókörülmény meghatározása céljából különböző oldószereket (poláris-protikus, poláris-aprotikus és apoláris), hőmérsékletet és koncentrációt teszteltünk. Ezután a hipervalens jódvegyületeket, és halogén tartalmú segédanyagokat és mennyiségüket változtatva a legeredményesebbnek az 1,1 ekvivalens mennyiségben használt IBX (**108**) és 1,5 ekvivalens NIS (**161**) bizonyult, 80% HPLC-s hozamot adva (kalibrált meghatározás; optimális reakciókörülmény: 1,1 ekvivalens IBX, 1,5 ekvivalens NIS, DMA, 80 °C, 30 perc).

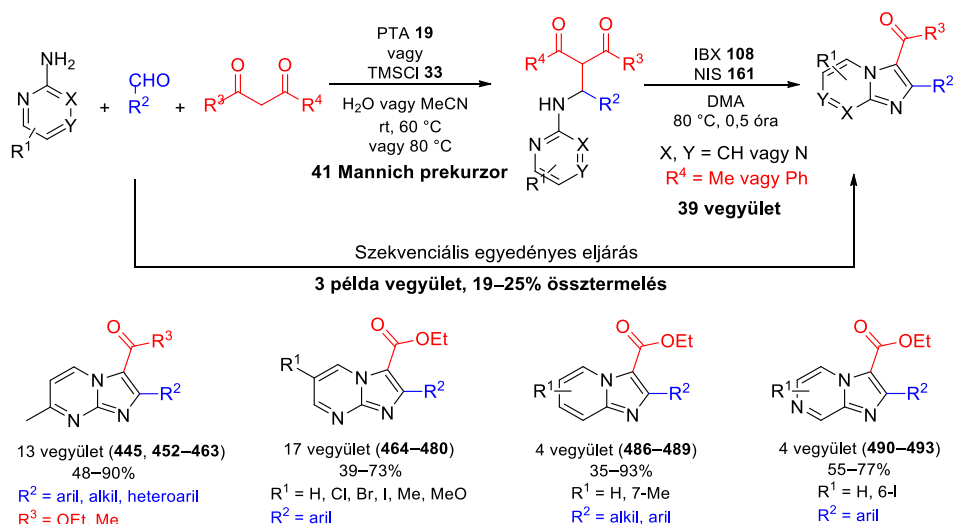
3.3. Di- és triszubsztituált imidazo[1,2-*a*]pirimidinek, piridinek és pirazinok előállítása oxidatív gyűrűzárással; Szekvenciális egyedényes eljárás bemutatása; Továbbalakítás

Az optimális reakciókörülménnyel (1,1 ekv. IBX, 1,5 ekv. NIS, DMA, 80 °C, 30 perc) 30 tagból álló, színes (változatos) szubsztitúciós mintázattal rendelkező **445** és **452–480** imidazo[1,2-*a*]pirimidin könyvtárat szintetizáltunk (2. *ábra*). Rögzített 2-amino-6-metilpirimidin egység beépítésével ($R^1 = 7\text{-Me}$) 13 analógot szintetizáltunk, majd a vegyületcsalád citotoxikus karakterizálása miatt további 17 származékot állítottunk elő törekedve a minél magasabb diverzitás elérésére. A vegyületek termelési eredményét vizsgálva szignifikáns szubsztituens függést nem tapasztaltunk, a kapott hozamok között nagy volt a szórás.

Az oxidatív gyűrűzárási módszert felhasználtuk a **486–493** imidazo[1,2-*a*]piridin és imidazo[1,2-*a*]pirazin analógok előállítására is (2. *ábra*).

Az Avidin Kft. biológus munkatársai a vegyületek citotoxikus aktivitásának vizsgálatát elvégezték, de a származékok jelentős tumorellenes aktivitást nem mutattak.

Három kiválasztott biciklus esetében bemutattuk a szekvenciális, egyedényes előállítást is (2. *ábra*). Amin komponensként a 2-amino-4-metilpirimidint, 2-amino-4-metilpiridint vagy 2-aminopirazint választottuk, majd 4-trifluorometil-benzaldehiddel és etil-benzoilacetáttal *in situ* képzett Mannich prekürzornál az oxidatív gyűrűzárási optimális körülményeit alkalmazva 19–25%-os össztermeléssel jutottunk a kívánt imidazo[1,2-*a*]pirimidin, piridin és pirazin vázas vegyületekhez.



2. ábra.

Továbbalakítási lehetőségként négy kiválasztott vegyületnél a megfelelő karbonsavak (észter funkció hidrolízise) és karboxamidok (peptidkapcsolás) előállítását is megvalósítottuk.

3.4. Az oxidatív gyűrűzárás feltételezett mechanizmusának kísérletes bizonyítása

Az oxidatív gyűrűzárási módszer tanulmányozása során bizonyítást nyert, hogy a víz, mint nukleofil jelenléte nem befolyásolja a reakciót, nagy mennyiségben a reakcióterben lévő jodónium ion azonban gátolja. TEMPO hozzáadása a reakció hozamára nem hatott, így feltételeztük, hogy a folyamat ionos jellegű. Az oxidálószer és/vagy a segédanyag elhagyása Knoevenagel-típusú termék képződéséhez vezetett, melyről bizonyítottuk, hogy a Mannich kiindulási anyag termikus bomlásának következtében jön létre és nem, mint intermediér szerepel a reakcióban.

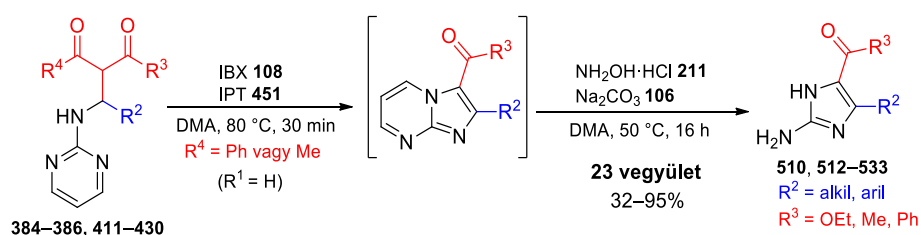
A feltételezett mechanizmus szerint az oxidatív gyűrűzárás az α -C-atom jódosásával indul, melyet az aminofil IBX indukálta amino-imino átalakulás követ, majd N-nukleofil támadást és retro-Claisen-Schmidt reakciót követően alakulhat ki a kívánt biciklus.

3.5. Szekvenciális, egyedényes eljárás kidolgozása: oxidatív gyűrűzárási és redukív hasítási szekvencia; 4,5-diszubsztituált 2-aminoimidazolok előállítása

Az egyedényes, kétlépéses módszer kidolgozásakor az oxidatív gyűrűzárási lépésben a NIS (161) reagens IPT-re (451) történő cseréje a kívánt biciklust 94%-os izolált hozammal biztosította. Ilyen eredmény mellett a további tesztreakciókban a biciklust mint intermediert nem izoláltuk és a szekvenciális, egyedényes eljárás második, redukív gyűrűnyitási szekvenciájára fókuszáltunk, ahol különböző szekunder aminokat, hidrazinokat és hidroxilamint teszteltünk bázis nélkül vagy szervetlen/szerves bázisok jelenlétében. Ennél a

szakasznál a hidroxilamin hidroklorid/nátrium karbonát reagens kombináció (10/10 ekvivalens) bizonyult a legeredményesebbnek 50 °C/16 órás kevertetés után.

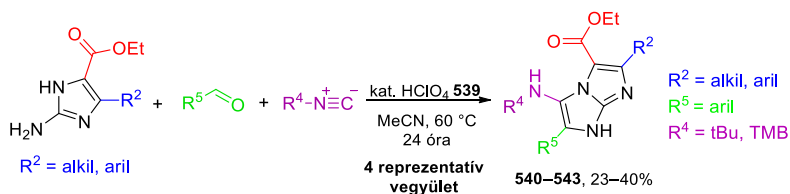
Ezen körülményeket alkalmazva az egyedényes eljárással 23, 4,5-diszubsztituált 2-aminoimidazol vegyületet szintetizáltunk a megfelelő **384–386** és **411–430** Mannich prekursorokból kiindulva (3. ábra). Az R^2 = különböző elektronszívó és elektronküldő csoportokkal ellátott aromás és aliciklusos funkciók és R^3 = OEt, Me vagy Ph, hozamra gyakorolt hatását vizsgálva megállapítottuk, hogy az R^2 = elektronszívó csoporttal rendelkező aromás esetében magasabb, míg az elektronküldő funkcióval ellátott aromás, illetve alifás szubsztituensekkel alacsonyabb hozamok érhetőek el. Az R^3 = fenil a hozamokat szintén csökkentette.



3. ábra.

3.6. 4,5-diszubsztituált 2-aminoimidazolok átalakítása citotoxikus vizsgálatokhoz

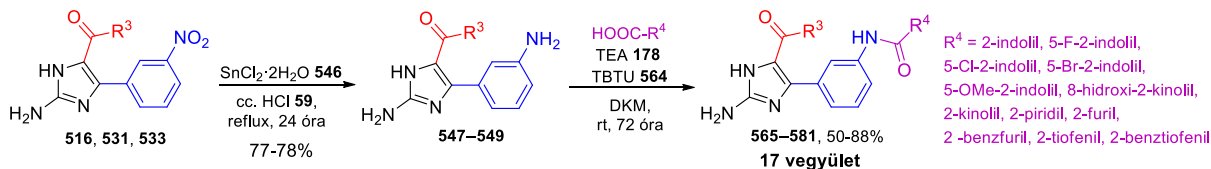
A kiválasztott 2-aminoimidazolokat felhasználva, izocianid alapú, háromkomponensű reakcióval (Groebke-Blackburn-Bienaymé, GBB-3CR) alkil és aril funkciókkal dekorált, C-5 amin egységet tartalmazó **540–543** 5:5 kondenzált 1*H*-imidazo[1,2-*a*]imidazol származékokat állítottunk elő perklórsav katalizátor jelenlétében, szűréssel izolálva 23–40% hozammal (4. ábra). Az előállított tetraszubsztituált származékok citotoxikus vizsgálatát az Avidin Kft. biológus munkatársai elvégezték, de a vegyületek a mért koncentráció tartományban (1–30 μM) inaktívnak bizonyultak ($IC_{50} > 30 \mu\text{M}$).



4. ábra.

A szintetikus/természetben előforduló tengeri szivacs alkaloidok sok esetben tumorellenes hatást mutatnak, ezért egy citotoxikus hatásvizsgálatra az általunk előállított 2-AI entitásokat tengeri szivacs alkaloid származékokká alakítottuk. A C-5 karbonil funkciót, valamint C-4 3-

nitrofenil egységet tartalmazó 2-aminoimidazol vegyületek nitro csoportjait aminná redukáltuk, majd peptidkapcsolással különböző (szubsztituált) indol, kinolin, piridin, furán, benzofurán, tiofén vagy benzotiofén heterociklus egységet tartalmazó karbonsavakkal karboxamidokat képeztünk. Az így előállított 17 vegyületet az Avidin Kft biológus munkatársai A549, HepG2, HL60, 3T3 és 4T1 sejtvonalakon vizsgálták. A C-5 karbonil funkció: etilészter és acetyl vagy benzoil csoport vagy az R⁴ heterociklus részegységek bevezetése a származékok tumorsejtekre gyakorolt biológiai hatását érdemben nem befolyásolta (5. ábra).



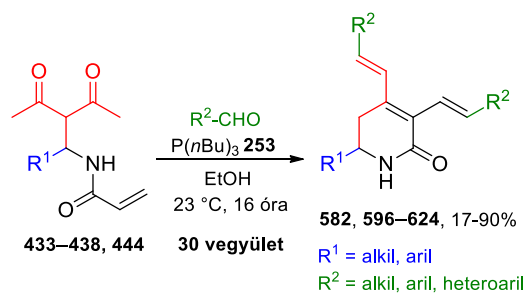
5. ábra

3.7. Új C-C kötés kialakítása, intramolekuláris gyűrűzárás foszfin indukálta transzformációval

A modell reakcióban egy akrilamid egységet tartalmazó Mannich prekuzort 2,5 ekvivalens aldehiddel reagáltattunk, katalitikus mennyiségű tri-butilfoszfin (**253**) jelenlétében. A reakciót EtOH-ban tesztelve – meglepetésünkre – a várt Stetter, MBH vagy IMBH adduktok helyett egyedi szubsztituens mintázatú 5,6-dihidropiridin-2(1*H*)-on szerkezet alakult ki. A reakció optimális körülményeinek meghatározása céljából növeltük a tri-butilfoszfin mennyiségét, valamint különböző oldószereket és egyéb foszfin és foszfit reagenseket teszteltünk, majd megállapítottuk, hogy a gyűrűzárást biztosító dominó kaszkád csak primer alkoholokban és a **253** jelenlétében játszódik le.

3.8. 5,6-dihidropiridin-2(1*H*)-on vegyületkönyvtár létrehozása

A megállapított optimális körülmények mellett (1,2 ekvivalens tri-butilfoszfin, EtOH, szobahőmérséklet, 16 órás kevertetés) egy 30 tagú, C-3 és C-4 szimmetrikusan dekorált 5,6-dihidropiridin-2(1*H*)-on vegyületkönyvtárat (**582**, **596–624**) építettünk fel 17–90% izolált hozammal (6. ábra). Az R¹ = alifás és különböző elektronszívó vagy elektronszállító csoporttal ellátott aromás, R² = aromás, aliciklusos és heterociklusos (3-furil, 3-tiofenil, 3-benzotiofenil) funkciókat variáltuk.



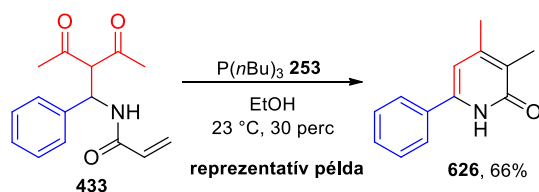
6. ábra

3.9. A domino szintézisút feltételezett mechanizmusa

A többlépéses kaszkád folyamat feltételezésünk alapján EtOH-ban, retro-Claisen folyamattal indul, melyet a foszfin mediálta IMBH transzformáció követ. Wittig kapcsolással, laktám-laktim tautomériával, majd az ezt követő vinil-aldol reakción és újbóli tautomérián keresztül történő stabilizációval alakulhat ki a kívánt multisubsztituált 5,6-dihidropiridin-2(1H)-on származék.

3.10. Piridin-2(1H)-on vegyület előállítása

A **433** szubsztrát 1,2 ekvivalens tri-butilfoszfin jelenlétében aldehid komponens hozzáadása nélkül, EtOH-ban a **626** 3,4-dimetil-6-fenilpiridin-2(1H)-ont adja (7. ábra, a szerkezetet 1D és 2D NMR technikákkal és HRMS méréssel igazoltuk). Ebben az esetben feltételezésünk szerint a termék keletkezése alternatív szintézisúton, retro-Claisen/IMBH/foszfin hidrolízis/auto-oxidáció szekvenciákon keresztül valósulhat meg.

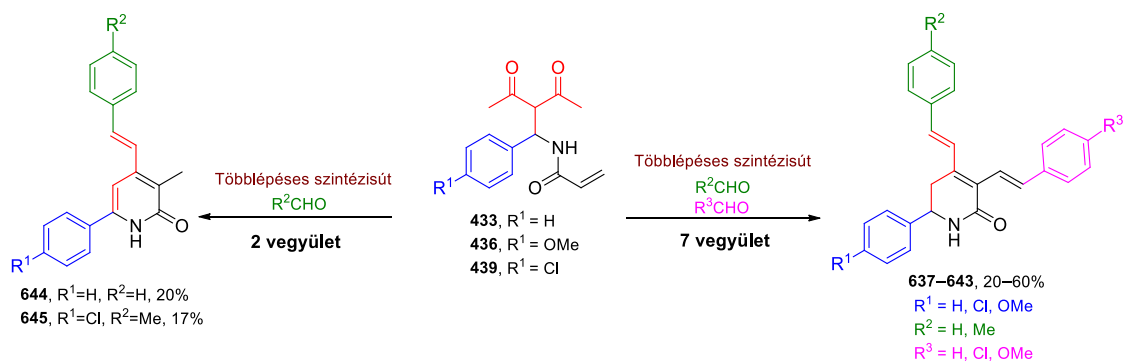


7. ábra.

3.11. A diverzitás kiterjesztése

A diverzitás kiterjesztése céljából kidolgoztuk a nem szimmetrikusan, C-3, C-4 és C-6 triszubsztituált 5,6-dihidropiridin-2(1H)-on származékok többlépéses előállítását is (8. ábra). A retro-Claisen-Schmidt indukcióval kapott intermedierekre Claisen-Schmidt kondenzációval egy aromás aldehidet kapcsoltunk, majd az adott adduktokat tri-butilfoszfin jelenlétében egy másik benzaldehiddel reagáltatva további hét, **637–643** nem szimmetrikusan szubsztituált 5,6-dihidropiridin-2(1H)-on származékot nyertünk 20–60% izolált hozammal.

A Claisen-Schmidt adduktból aldehid jelenléte nélkül, foszfin indukcióval további két, nem szimmetrikusan szubsztituált **644** és **645** piridin-2(1*H*)-on vegyületet állítottunk elő. A kidolgozott módszer a kívánt vegyületek teljes régió- és kemoszelektív szintézisét lehetővé teszi.



8. ábra.

A doktori értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Zs. Makra**, L. G. Puskás, I. Kanizsai, A convenient approach for the preparation of imidazo[1,2-*a*]-fused bicyclic frameworks via IBX/NIS promoted oxidative annulation

Org. Biomol. Chem. **2019**, *17*, 9001–9007.

IF: 3,890

2. **Zs. Makra**, A. Bényei, L. G. Puskás, I. Kanizsai, One-pot access towards 4,5-disubstituted 2-amino-1*H*-imidazoles starting from Mannich substrates and their transformation utilities

Eur. J. Org. Chem. **2020**, *2020*, 7184–7196.

IF: 3,261

3. **Zs. Makra**, R. Madácsi, T. A. Martinek, A. Bényei, L. G. Puskás, M. Gyuris, I. Kanizsai, Phosphine(III)-triggered one-pot domino sequences towards 5,6-dihydropyridine-2-(1*H*)-one and pyridine-2(1*H*)-one scaffolds

Adv. Synth. Catal. **2022**, *364*, 1–11.

IF: 5,981

4. N. Gémes, **Zs. Makra**, P. Neuperger, E. Szabó, J. Á. Balog, L. B. Flink, B. Kari, L. Hackler Jr, L. G. Puskás, I. Kanizsai, G. J. Szebeni, A cytotoxic survey on 2-amino-1*H*-imidazole based synthetic marine sponge alkaloid analogues

Drug. Dev. Res. **2022**, 1-17.

IF: 5,004

Összesített IF: 18,136

Konferencia-előadások


1. **Zs. Makra**, Imidazo[1,2-*a*]piridinek, pirimidinek és pirazinok előállítása IBX/NIS indukálta oxidatív gyűrűzárással; Heterociklusos és Elemorganikus Kémia Munkabizottság Ülése, Balatonszemes, **2019**.


2. **Zs. Makra**, Trialkil-foszfín indukálta dominó reakciók: 5,6-dihidropiridin-2(1*H*)-on és piridin-2(1*H*)-on származékok szintézise; Heterociklusos és Elemorganikus Kémia Munkabizottság Ülése, Balatonszemes, **2022**.


Konferencia-poszterek


1. **Zs. Makra**, L. G. Puskás, I. Kanizsai, IBX/NIS mediálta oxidatív intramolekuláris gyűrűzárások; MKE Vegyészkonferencia, Hajdúszoboszló, **2017**.
2. **Zs. Makra**, L. G. Puskás, I. Kanizsai, IBX/NIS induced oxidative intramolecular annulation; ESOC, Bécs, **2019**.
3. **Zs. Makra**, L. G. Puskás, I. Kanizsai, One-pot synthesis of 4,5-disubstituted 2-amino-1*H*-imidazoles from Mannich precursors; IBSC, Újvidék, **2021**.
4. **Zs. Makra**, R. Madácsi, T. Martinek, A. Bényei, L. G. Puskás, M. Gyuris, I. Kanizsai, Phosphine triggered domino transformations: synthesis of unique 5,6-dihydropyridine-2-(1*H*)-one and pyridine-2(1*H*)-one frameworks; BOSS, Namur, **2022**.
5. **Zs. Makra**, R. Madácsi, T. Martinek, A. Bényei, L. G. Puskás, M. Gyuris, I. Kanizsai, One-pot, multistep domino synthesis of trisubstituted 5,6-dihydropyridine-2-(1*H*)-one and pyridine-2(1*H*)-one scaffolds; Austrian Chemistry Days, Bécs, **2022**.


Alulírottak, mint Makra Zsófia jelölt *N-tartalmú heterociklusok szintézise 1,3-dikarbonil részegységet tartalmazó Mannich szubsztrátok diverzitás-orientált transzformációival* című doktori értekezéshez kapcsolódó *A cytotoxic survey on 2-amino-1H-imidazol based synthetic marine sponge alkaloid analogues*; *Drug Dev. Res.* 2022, 1–17 publikáció társszerzői ezúton nyilatkozunk arról, hogy az ehhez a publikációhoz és a jelölt 3.6 tézispontjához kapcsolódó szerves kémiai szintézisek eredményeinek elérésében a jelölt szerepe meghatározó fontosságú volt, ezért ezeket az eredményeket eddig nem használtuk fel tudományos fokozat megszerzésekor, s ezt a jövőben sem tesszük.


Gémes Nikolett..... 

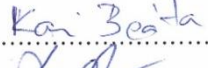
Makra Zsófia (jelölt)..... 


Neuperger Patrícia..... 


Szabó Enikő..... 


Balog József Ágoston..... 

Flink Lili Borbála..... 

Dr. Kari Beáta..... 

Dr. Hackler László..... 

Dr. Puskás László Géza..... 

Dr. Kanizsai Iván..... 

Dr. Szebeni Gábor János..... 