

Vázmódosított ösztron származékok átmenetifém- katalizált átalakításai

Doktori értekezés tézisei

Traj Péter

Témavezető:

Dr. Mernyák Erzsébet
egyetemi adjunktus, PhD



Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Molekuláris és Analitikai Kémiai Tanszék
Kémia Doktori Iskola

Szeged

2024

1. Bevezetés és célkitűzés

A gyógyszerkutatás egyik célja a tumoros megbetegedések kezelésére alkalmas, szelektíven ható gyógyszerhatóanyagok kifejlesztése. A jelenleg forgalomban lévő, daganatterápiában alkalmazott készítmények alkalmazhatóságát/felhasználhatóságát korlátozza számos mellékhatásuk.

Több ösztron-alapú tumorelleses hatóanyag található a szakirodalomban, azonban ösztrogén mellékhatásuk miatt ezek a vegyületek nem jutottak el a klinikai alkalmazásig. Az ösztrogén hatás az ösztránváz 13-as szénatomjának inverziójával megszüntethető, a megváltozott konformációjú 13 α -ösztroon származékok a továbbiakban nagyon alacsony affinitást mutatnak az ösztrogén receptorokhoz. Az így nyerhető szteroidok kiindulási alapot adhatnak ösztroon-alapú, szelektív, hormonálisan inaktív tumorelleses vegyületek kifejlesztéséhez.

Ezen előzményekből kiindulva, doktori munkám célja antiproliferatív hatással rendelkező, nem hormonhatású új vázmódosított ösztroon származékok szintézise volt. Az ösztrogén hatás kiküszöböléséhez 13-epimer származékokat választottunk kiindulási vegyületnek. Olyan palládium-katalizált átalakításokat terveztünk a szteroidok aromás gyűrűjén, amelyek végrehajtásához nincs szükség a szteroid előhalogénezésére. Olyan irányító csoportok beépítésére gondoltunk a fenolos hidroxilcsoport módosításával, amelyek lehetővé teszik *orto*-helyzetű C–H aktiválási reakciók végrehajtását. Célunk volt továbbá a 3-OH jó távozó csoporttá való alakítása is, keresztkapcsolási reakciók végrehajtása céljából. A 17-keto és 17-dezoxi származékok szubsztrátumként való alkalmazásának a későbbi szerkezet-hatás összefüggések levonása volt a célja. A fenolos hidroxilcsoport éteresítését is terveztük, réz-katalízissal diaril-éterek szintézise céljából.

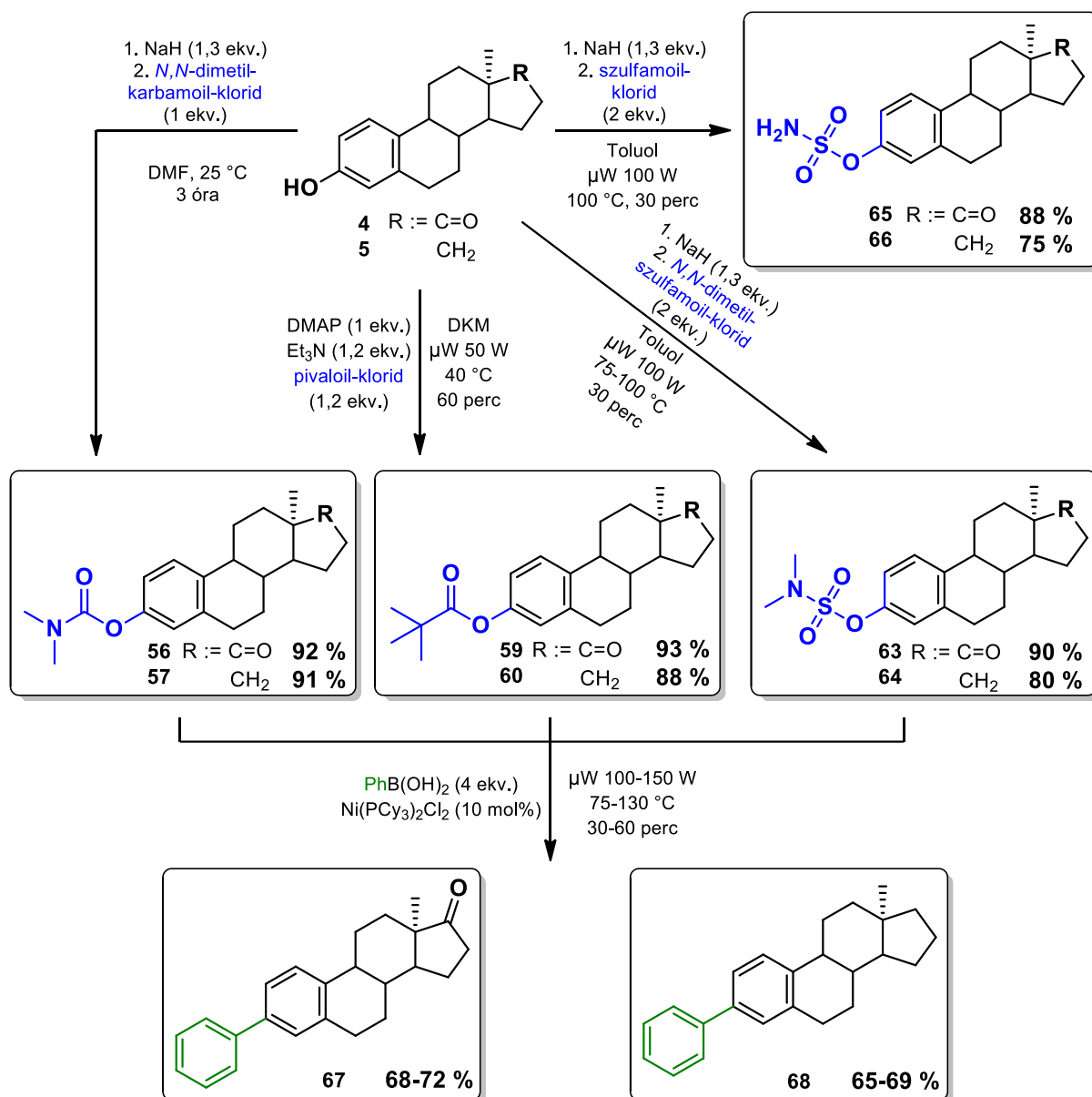
Hagyományos melegítés helyett törekedtünk az enyhébb körülmények, valamint a mikrohullámú technikák alkalmazására. A reakciók során a céltermékek szerkezetét nagyműszeres analitikai módszerekkel (1D-NMR, MS) határoztuk meg. Az előállított vegyületek *in vitro* sejtosztódást gátló hatásának vizsgálatát humán adherens női reprodukív rendszeri daganatos sejtvonalakon az SZTE GYTK Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézetében végezték el.

2. Anyagok, módszerek

A reakciókat millimólos mennyiségben hajtottuk végre, a reakciók monitorozását vékonyréteg-kromatográfiával végeztük. Ehhez Kieselgel 60 F₂₅₄ (MERCK), 0,2 mm vastagságú lapokat használtunk. Az elkészült kromatogramokat 2,5 g P₂O₅·24 MoO₃·H₂O, 25 mL 85 %-os H₃PO₄, 25 mL víz összetételű eleggyel fújtuk le, majd 10 percig 100–120 °C-on melegítettük. A kromatogram foltjainak előhívása elemi I₂, illetve 254 vagy 365 nm hullámhosszúságú UV-fényben is megtörtént. Az irányító csoportok beépítését, a palládium-katalizált C–H aktiválást és a Suzuki-Miyaura keresztkapcsolást mikrohullámú reaktorban (CEM, Discover SP készülék) hajtottuk végre, míg a Chan-Lam kapcsolást szobahőmérsékleten végeztük. Célvegyületeinket oszlopkromatográfiával (40–63 µm szemcseméretű Kieselgel 60 MERCK állófázissal töltött oszlop), egyszerű szűréssel és/vagy átkristályosítással tisztítottuk meg. Az előállított vegyületeket olvadáspontjukkal (Kofler-blokkon, korrekció nélkül), MS (Finnigan TSQ-7000 tripla kvadrupól tömegspektrométerrel), és egy- illetve kétdimenziós NMR spektroszkópiai technikákkal jellemeztük (Bruker DRX-500 spektrométerrel). A felhasznált vegyszerek és oldószerek kereskedelmi forgalomból (Sigma-Aldrich, Alfa Aesar, Fluorochem, Molar) származtak. Az előállított vegyületek biológiai hatásvizsgálatát az SZTE GYTK Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet munkatársai végezték.

3. Az új tudományos eredmények tézisszerű összefoglalása

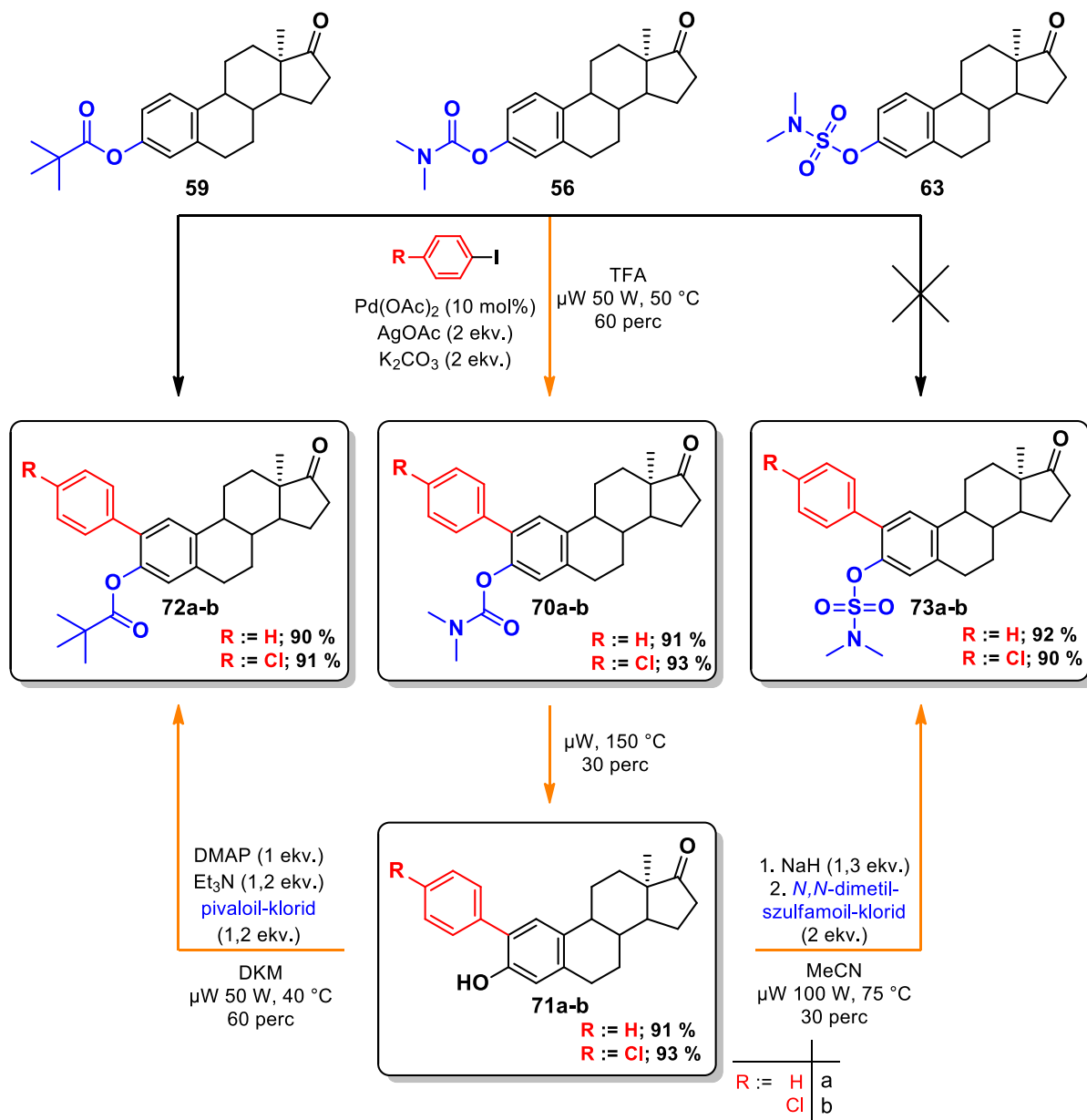
3.1. A 3-hidroxi-13 α -ösztro-1,3,5(10)-trién-17-on (4) és 5 17-dezoxi származékának fenolos hidroxilcsoportját duális (irányító és jól távozó tulajdonságok) funkciócsoportokra alakítottuk át, majd Suzuki–Miyaura keresztkapcsolással bifenil származékokat állítottunk elő. A kiindulási 4 és 5 szteroidok aromás A-gyűrűjén a C-3 fenolos hidroxilcsoportot derivatizáltuk, a deprotonálást követően észter csoportokat alakítottunk ki és 75–92 %-os hozammal nyertük a kívánt **56–66** termékeket. A „zöld kémia” alapelveinek alkalmazása érdekében az aril-halogenidek helyett fenol-észterekből kiindulva Ni(PCy₃)Cl₂ katalizátor jelenlétében fenil-boronsavakkal végeztük el a megfelelő bifenil-származékok szintézisét (1. ábra). [1]



1. ábra

3.2. A biológiai hatás növelése érdekében az előállított 56, 59 és 63 fenol-észterek *ortho*-irányító tulajdonságát kihasználva C-2 helyzetbe fenil- és *para*-klór-fenil csoportokat építettünk be palládium-katalizált C–H aktiválással. A 63 szulfamát esetében nem volt járható ez a szintézisút, ezért a *N,N*-dimetil-karbamoil-csoport szelektív hasításával nyertük a 70a-b 2-aryl-3-hidroxi-származékokat, amelyek utólagos szulfamoilezésével a kívánt 73a-b termékek kiváló hozammal állíthatók elő. A karbamoilcsoport szelektív hasítását mikrohullámú reaktorban 150 °C-on, 30 perces reakcióidővel valósítottuk meg. A módszer érdekessége, hogy a hasítást eddig a reakcióelegy feldolgozását követő NaOH etanolos oldatban történő több órás

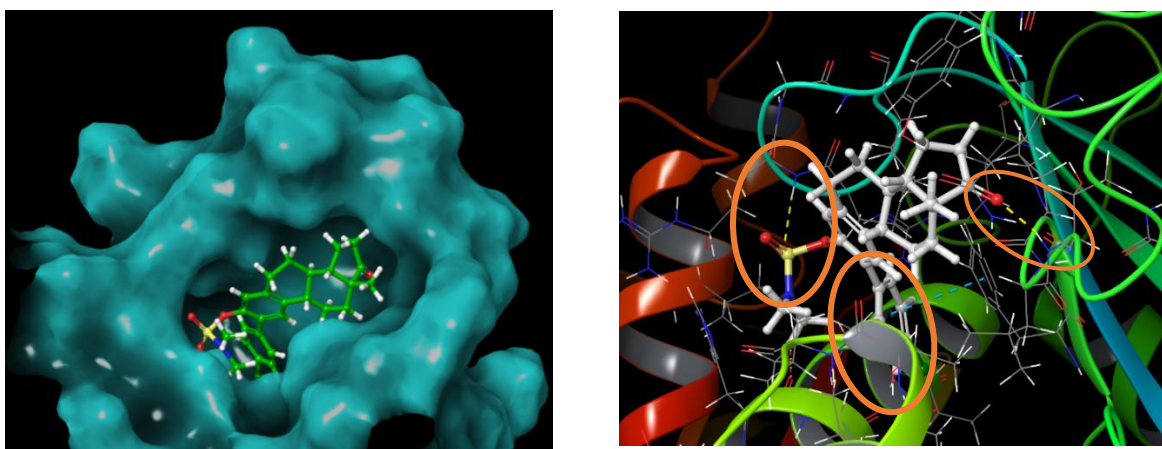
forralással lehetett megvalósítani. Az általunk alkalmazott egyedényes tandem reakcióval, mikrohullámú reaktorban kontrollálható a hasítás, ezáltal a tervezett vegyületek egyszerűbben előállíthatók (2. ábra). [1]



2. ábra

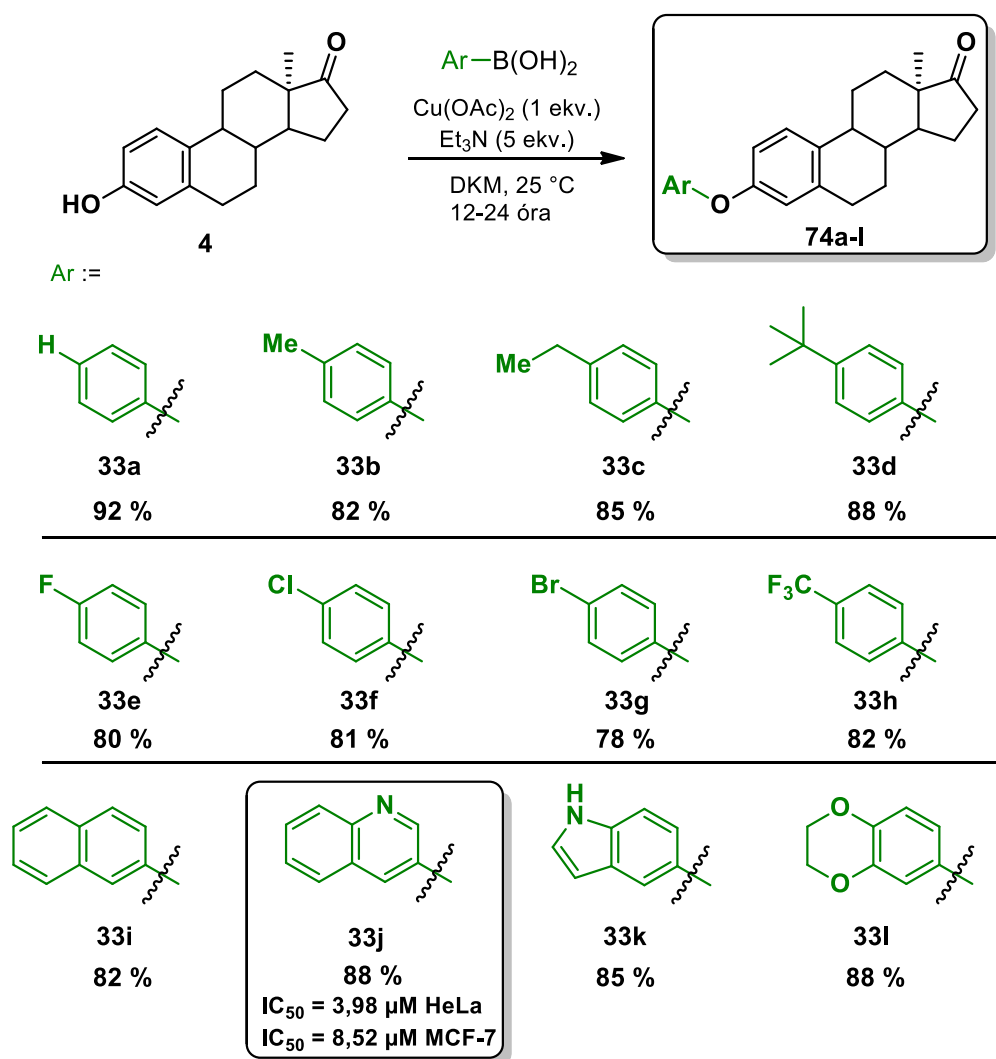
3.3. Számításos kémiai vizsgálatokkal dokkolásokat végeztünk a β -tubulin fehérje taxol kötőhelyén és 10 Å-s környezetében az általunk előállított 63, 73a-b szulfamát származékokkal. Megvizsgáltuk a ligandumok kötődését és feltérképeztük a kötőzsebben a ligandumok és a fehérje főbb kölcsönhatásait. Először letöltöttük a fehérje-taxol komplex (PDB: 5SYF) szerkezetét PDB adatbázisból, majd pótoltuk a hiányzó hidrogéneket, oldalláncokat, loopokat. Ezután beállítottuk a biológiai környezetnek megfelelő protonáltsági állapotot, majd fiziológiás sókoncentrációjú vízdobozba helyeztük és 5ns-os molekuladinamikai futást végeztünk 315 K-en. Az így kapott relaxált szerkezet az a célfehérje, aminek a taxol kötőzsebébe dokkoltuk a LigPrep modullal előkészített szulfamátokat. A ligandumok dokkolásához a Glide programot használtuk XP (extra precision) protokollal. A ligandum legjobb dokkolási pózait használtuk kiindulási szerkezetnek a későbbi 500ns-os MD-i futásokhoz.

Molekuladinamikai számításaink eredménye összhangban volt a biológiai eredményekkel, ugyanis a vizsgált szerkezetek közül a 2-(*para*-klórfenil)-3-(*N,N*-dimetilszulfamoiloxi)-13 α -ösztra-1,3,5(10)-trién-17-on (**73b**) kötődött szelektíven és legjobban a tubulin taxol kötőhelyéhez. Ennek oka, hogy a taxol kötőhelyénél talál a molekula egy hidrofób zsebet, amellyel a klórfenil-csoporttal befordul, a szulfamát csoport pedig kifelé néz. Itt kialakul egy „hidrofób π - π stacking” kölcsönhatás, amely a klóratom miatt erősebb, mint a fenilcsoportnál. Ezen kívül a számítások a ketocsoportnál egy H-híd kölcsönhatást mutattak a ketocsoport oxigénatomja és a fehérjét felépítő treonin aminosavja között. Mindezek együtt okozzák azt, hogy a vizsgált molekulánk szelektíven képes gátolni az 5SYF fehérje taxol kötőhelyét, ezáltal fejtve ki az antiproliferatív hatást (3. ábra). [2]



3. ábra

3.4. A 3-hidroxi-13 α -özsztra-1,3,5(10)-trién-17-onból (4) kiindulva Chan-Lam kapcsolással egy 12-tagú vegyületkönyvtárát szintetizáltunk 78–92 % hozammal. A *para* helyzetben elektronszívó funkciós csoportot tartalmazó boronsavak alkalmazásánál csökkent (12–14 óra), míg a *para* helyzetben elektronküldő funkciós csoportot tartalmazó reaktánsok alkalmazásánál 20 órára nőtt a reakcióidő. A naftil és a heterociklusos származékoknál 24 óra kellett a teljes konverzió eléréséhez. Szubsztituenshatást nem tapasztaltunk. Az irodalmi háttér és a kísérleti eredmények alapján javaslatot tettünk a reakciómechanizmusra (4. ábra). [3]



4. ábra

4. Az értekezés alapját képező közlemények (MTMT azonosító: 10069069)

1. **Traj P.**, Abdolkhaliq H. A., Németh A., Dajcs T. S., Tömösi F., Lanisnik-Rizner T., Zupkó I., Mernyák E. Transition metal-catalysed A-ring C–H activations and C(sp²)–C(sp²) couplings in the 13 α -oestrone series and *in vitro* evaluation of antiproliferative properties; *J Enz Inhib Med Chem*, **2021**, 36, 895–902. DOI: 10.1080/14756366.2021.1900165.

IF: 5,756

2. Hazhmat A., **Traj P.**, Szebeni G. J., Gémes N., Resch V., Paragi G., Mernyák E., Minorics R., Zupkó I., Investigation of the Antineoplastic Effects of 2-(4-Chlorophenyl)-13-Estrone Sulfamate against the HPV16-Positive Human Invasive Cervical Carcinoma Cell Line SiHa; *Int. J. Mol. Sci.*, **2023**, 24, 6625–6641. DOI: 10.3390/ijms24076625.

IF: 5,600 (2022)

3. Kovács É., Hazhmat A., Minorics R., **Traj P.**, Resch V., Paragi G., Bruszel B., Zupkó I., Mernyák E., Synthesis and Antiproliferative Activity of Steroidal Diaryl Ethers; *Molecules*, **2023**, 28, 1196–1211. DOI:10.3390/molecules28031196.

IF: 4,600 (2022)

Összesített IF: 15,956

5. Az értekezés alapját nem képező közlemények

1. Madácsi R., **Traj P.**, Hackler L. Jr., Nagy L. I., Kari B., Puskás L. G., 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. DOI: 10.1002/jhet.3800

IF: 1,484

2. Szabados M., Ádám A. A., **Traj P.**, Muráth Sz., Baán K., Bélteky P., Kónya Z., Kukovecz Á., Sipos P., Pálinkó I. Mechanochemical and wet chemical syntheses of CaIn-layered double

hydroxide and its performance in a transesterification reaction compared to those of other $\text{Ca}_2\text{M(III)}$ hydrocalumites (M: Al, Sc, V, Cr, Fe, Ga) and Mg(II)-, Ni(II)-, Co(II)- or Zn(II)-based hydrotalcites; *J Cat*, **2020**, 391, 282–297. DOI: 10.1016/j.jcat.2020.07.038

IF: 7,760

Összesített IF: 9,244

6. Konferencia-előadások:

1. **Traj P.**, Németh A., Dajcs T. S., Mernyák E. Átmenetifém-katalizált keresztkapcsolási és C–H aktiválási reakciók a 13α -ösztrom sorban; XLIII. Kémiai Előadói Napok, Szeged, **2020**.
2. **Traj P.**, Abdolkhaligb H. A., Kovács É., Zupkó I., Mernyák E. Chan-Lam kapcsolások 13α -ösztrom sorban; XLIV. Kémiai Előadói Napok, Szeged, **2021**.
3. **Traj P.**, Pd-katalizált C–H aktiválási reakciók fenolon; MTA Szteroid- és Terpenoidkémiai Munkabizottsági Ülés, Szeged, **2021**.

7. Konferencia-poszterek:

1. **Traj P.**, Abdolkhaligb H. A., Németh A., Dajcs T. S., Zupkó I., Mernyák E. Transition metal-catalyzed cross coupling and C–H activation reactions on 13α -estrone derivatives; 26th International Symposium on Analytical and Environmental Problems, Szeged, **2020**.
2. **Traj P.**, Mernyák E. Fenolok C–H aktiválási reakciói; XIV. Szent-Györgyi Albert konferencia, BME Budapest, **2021**.
3. Abdolkhaligb H. A., Mernyák E., **Traj P.**, Szabeni J. G., Minorics R., Zupkó I. Investigation of the anticancer potentials of the newly synthesized 13α -estrone derivatives; 11th ISCTICO-HUPHAR-IUPHAR Conference, Pécs, **2021**.
4. Resch V. E., **Traj P.**, Mernyák E., Paragi G. Computational study of modified steroids binding to microtubule; MTA Peptidkémiai Munkabizottság és MTA Kémiai Biológiai Munkabizottság Közös Tudományos Ülés, Balatonszemes, **2022**.