

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**ÖTTAGÚ N,O-HETEROCIKLUSOS ÖSZTRADIOL
SZÁRMAZÉKOK SZINTÉZISE**

Kovács Ferenc

Témavezető:

Dr. Frank Éva

egyetemi docens



Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Molekuláris és Analitikai Kémiai Tanszék

SZTE Kémia Doktori Iskola

Szeged

2024

1. Bevezetés és célkitűzések

A szteroidok a természetes szénvegyületek élettani szempontból egy fontos csoportját alkotják. A félszintetikus és szintetikus származékaik kutatása a modern gyógyszeripar egyik kiemelkedő irányává vált. A félszintetikus származékok szintézise során gyakran alkalmazott módszer a molekula-hibridizáció, amely során a szteránvázon (kondenzáltan, közvetlenül vagy egy linkeren keresztül kapcsolódva) egy farmakofór (jellemzően heterociklusos) molekularesz kialakítása valósul meg. Az új heterociklus kiépítését a hormonkötés szempontjából kulcsfontosságú szerepet betöltő 3-as vagy a 17-es pozíción, illetve a szomszédos szénatomokon célszerű végrehajtani, ezáltal a hormonhatás elvesztése mellett gyakran új főhatás előtérbe kerülése érhető el.

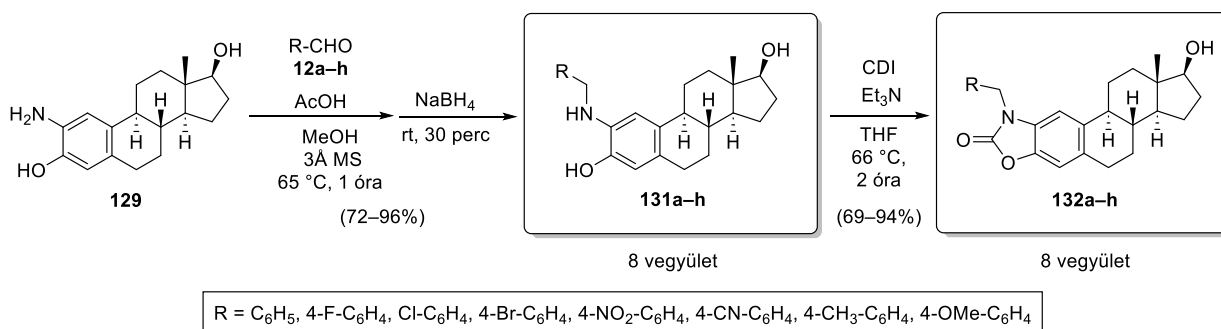
Az irodalmi előzmények ismeretében a doktori munkám célja a szakirodalomban még nem ismert, várhatóan tumorellenes hatást mutató ösztránvázas vegyületek szintézise volt. A gyógyszerkémiailag szempontból kiemelt jelentőséggel bíró öttagú, két heteroatomot tartalmazó *N,O*-heterociklusokat (oxazol, izoxazol és oxazolon) a szteránváz A-gyűrűjén, [2,3]-kondenzáltan terveztük kialakítani. A molekulatervezéskor egy diverz molekulakönyvtár felépítésére törekedtünk, amely során fontos szempont volt, hogy a célvegyületek többsége eleget tegyen a *Lipinski*-féle farmakokinetikai paramétereknek, ezáltal gyógyszereszerű hatóanyagokhoz jussunk. Célunk volt a reakciókörülmények (alkalmazott reagensek minősége, mennyisége, hőmérséklet, oldószer) optimalizálása, a céltermékek tisztítása, valamint azok szerkezetigazolása. További szándékaink között szerepelt a szintetizált anyagok *in vitro* farmakológiai vizsgálata is, amelyet a Szegedi Tudományegyetem Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszékének biológus munkatársai végeztek el.

2. Vizsgálati módszerek

A szintetikus munka során a reakciók többségét millimólos méretben hajtottuk végre. A reakciók lejátszódását vékonyréteg-kromatográfiával (VRK) követtük. Az előállított vegyületeket normál fázisú oszlopkromatográfiával vagy flash-kromatográfiával, illetve átkristályosítással tisztítottuk. A termékek szerkezetét nagyműszeres analitikai technikák (^1H - és ^{13}C -NMR és ESI-MS) segítségével igazoltuk. A molekulatervezéshez és a farmakokinetikai paraméterek becsléséhez a Chemaxon gyártó Chemicalize szoftverét használtuk fel.

3. Saját új tudományos eredmények*

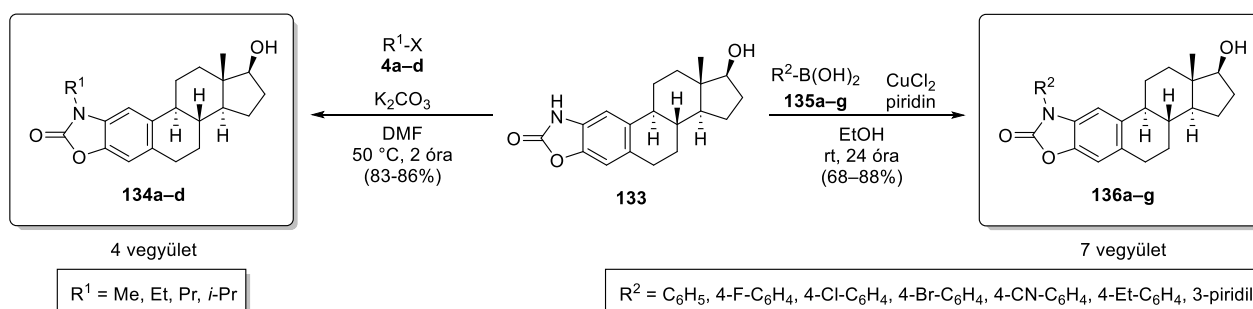
3.1. Az öszttron nitrálásával, majd konszekutív redukciójával nyert 2-aminösztadiol (**129**) és szubsztituált benzaldehidek (**12a–h**) reduktív aminálásával szekunder aminok (**131a–h**) szintézisét valósítottuk meg (1. ábra). A reakciókörülmények benzaldehyddel (**12a**) történő optimalizálása során megfigyeltük, hogy katalitikus mennyiségű ecetsav és molekulaszita alkalmazásával az iminképzési részlepes reakcióideje 1 órára csökkenthető. Redukciót, majd tisztítást követően a szubsztituensek minőségétől függetlenül jó-kiváló hozamokkal (72–96%) jutottunk a célvegyületekhez. (1. publikáció)



1. ábra

3.2. A szekunder aminok (**131a–h**) ciklizációját 1,1'-karbonil-diimidazollal (CDI) valósítottuk meg, amely trietil-amin (TEA) bázis jelenlétében THF-ban történő forralás mellett 2–3 óra alatt a megfelelő *N*-benzil-oxazolont célvegyületeket (**132a–h**) szolgáltatva (1. ábra). A gyűrűzárást 2-aminoösztadiolon (**129**) is végrehajtottuk, amely egy, a nitrogénatomon szubsztituenset nem tartalmazó oxazolont eredményezett (**133**). (1. publikáció)

3.3. Ez utóbbi gyűrűs karbamátból (**133**) kiindulva alkil-halogenidekkel (**4a–d**), bázikus körülmények között végrehajtott alkilezési reakciók során *N*-alkil származékokat (**134a–d**) szintetizáltunk (2. ábra).

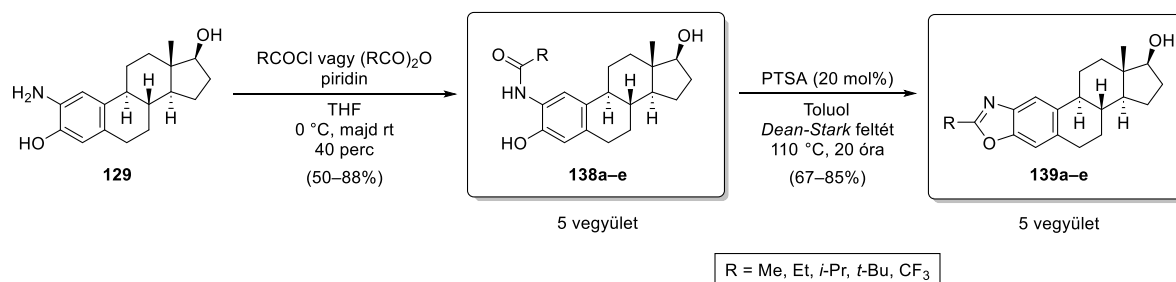


2. ábra

* A vegyületszámozás megegyezik a disszertációban alkalmazottal

Egy fenil-boronsavval (**135a**) végzett modellreakció segítségével a ciklusos karbamát (**133**) *N*-fenil származékának (**136a**) előállításí lehetőségét vizsgáltuk *Chan-Evans-Lam* keresztkapcsolási reakció alkalmazásával (2. ábra). A reakciókörülmények optimalizálása során szignifikáns oldószerhatást tapasztaltunk: poláros aprotikus oldószer (DMF, DMSO) esetén nem tapasztaltunk konverziót, míg poláros protikus oldószer (EtOH) alkalmazásakor az átalakítás teljesen lejártszódot és a **136a** vegyületet 81%-os izolált hozammal eredményezte. Az optimalizált protokollt követve egyéb elektronsződő és elektronszőzó csoportokkal szubsztituált (hetero)aril-boronsavak (**135b–g**) felhasználásával 6 további *N*-(hetero)aril analogont (**136b–g**) szintetizáltunk, melyeket kromatográfiás tisztítást követően közepes-jó (67–88%) termelésekkel nyertük (2. ábra).

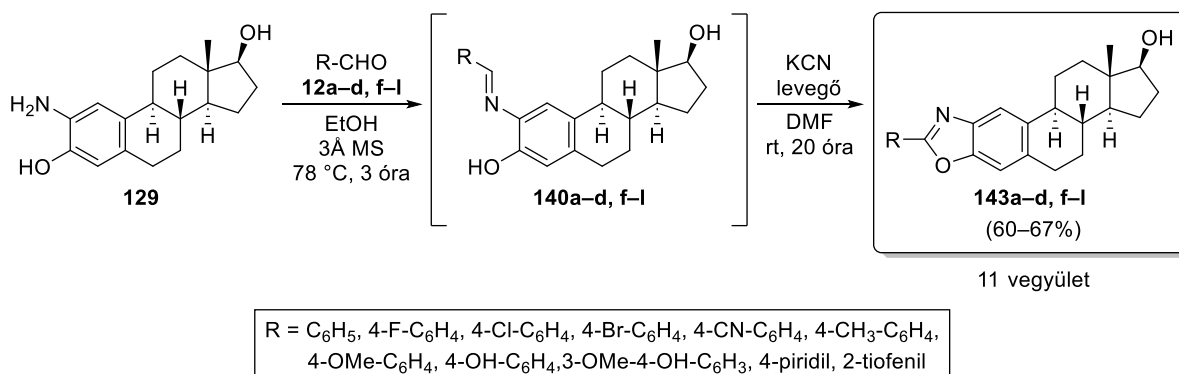
3.4. Bemutattuk, hogy a 2-aminoösztadiol trietil-ortoformiáttal végrehajtott ciklizációja vízmentes körülmények között szubsztituátlan oxazol vegyület (**137**) képződését eredményezte. Az oxazol 2-es pozíciójában alkil (Me, Et, *i*-Pr, *t*-Bu), illetve CF₃ szubsztituenszt tartalmazó analogonok szintézisét is tanulmányoztuk. Az amidképzések során a megfelelő sav-klorid/sav-anhidrid reagens felhasználásával *N*-acil-ösztadiolokhoz (**138a–e**) jutottunk közepes-jó izolált hozamokkal (50–88%). Az amidok dehidrociklizációja során megfigyeltük, hogy a reakció során képződő víz eltávolításával (*Dean-Stark*-feltét alkalmazása) a gyűrűzárás teljessé tehető, és a céltermékek (**139a–e**) kromatográfiás tisztítást követően jó hozamokkal (67–85%) nyerhetők (3. ábra). (**3. publikáció**)



3. ábra

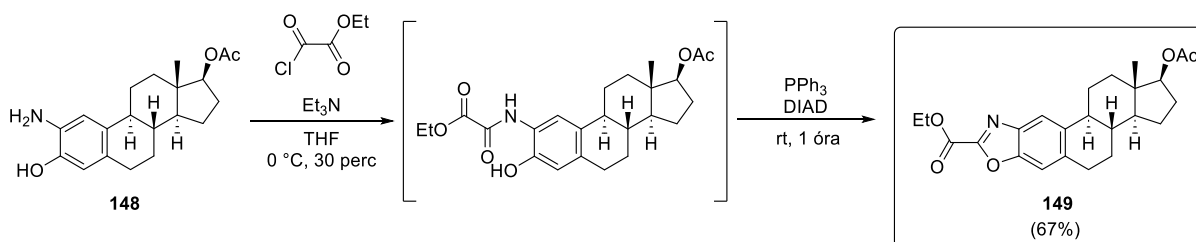
3.5. A molekulakönyvtár bővítéséhez 11 további (hetero)aril-szubsztituált származékot (**143a–d, f–l**) állítottunk elő (4. ábra). A kétlépéses szintézis során először a 2-aminoösztadiol (**129**) és (hetero)aril-aldehidek kondenzációs reakciójával *Schiff*-bázisokat szintetizáltunk, melyek oxidatív ciklizációját nukleofil katalízissal (KCN) segítettük elő. A reakció sebessége és az alkalmazott KCN mennyisége között egyértelmű kapcsolatot fedeztünk fel: katalitikus

menyiségű KCN esetén a reakció rendkívül lassúnak bizonyult, míg sztöchiometrikus mennyiségben történő alkalmazása esetén 20 óra reakcióidőt követően a kiindulási anyag teljes átalakulását figyeltük meg. A célvegyületeket oszlopkromatográfiás tisztítást és átkristályosítást követően 60–67%-os hozamokkal izoláltuk. (3. publikáció)



4. ábra

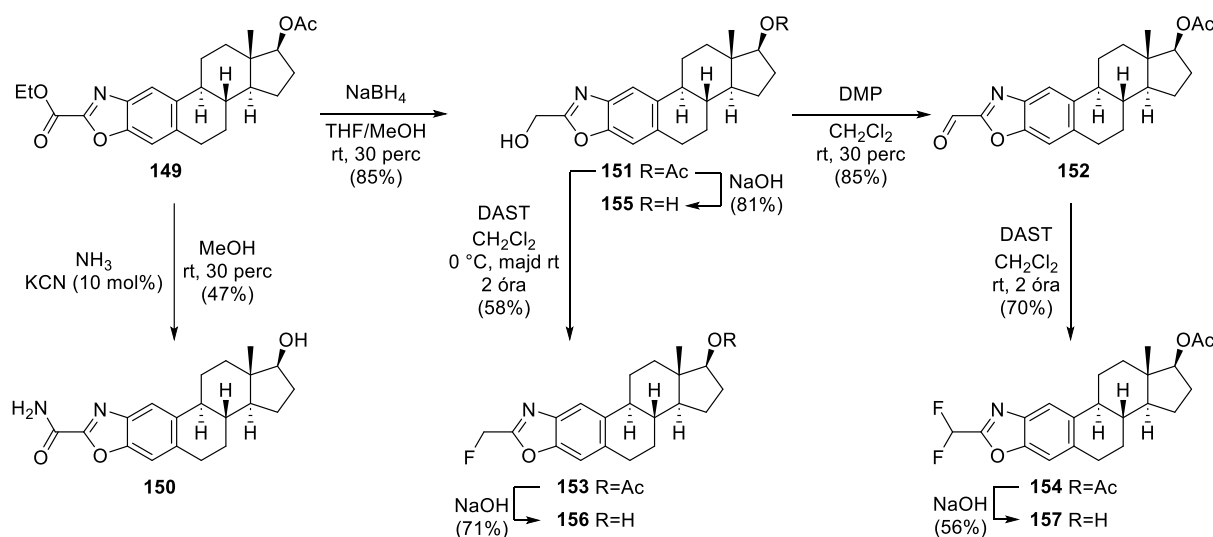
3.6. További analogonok szintéziséhez felhasználható 2'-etilkarboxi-oxazol (149) prekursor szintézisét valósítottuk meg etil-2-klór-2-oxoacetát és 2-aminoösztadiol-17-acetát (148) reakciójából képezhető amid gyűrűzárásával (5. ábra). Bebonyítottuk, hogy az amid oxazolá történő 5-exo-trig ciklizációja intramolekuláris Mitsunobu-reakcióval kemoszelektíven megvalósítható, szemben a korábban alkalmazott *p*-toluolszulfonsavval (PTSA) elősegített gyűrűzárással, amely kizárólag egyéb melléktermékek (pl.: oxazin-2,3-dion) képződését eredményezte. A reakciókörülmények további optimalizálása révén kifejlesztettünk egy szekvenciális egyedényes módszert, amellyel a 149-es prekuzort 67%-os hozammal sikerült izolálnunk. (3. publikáció)



5. ábra

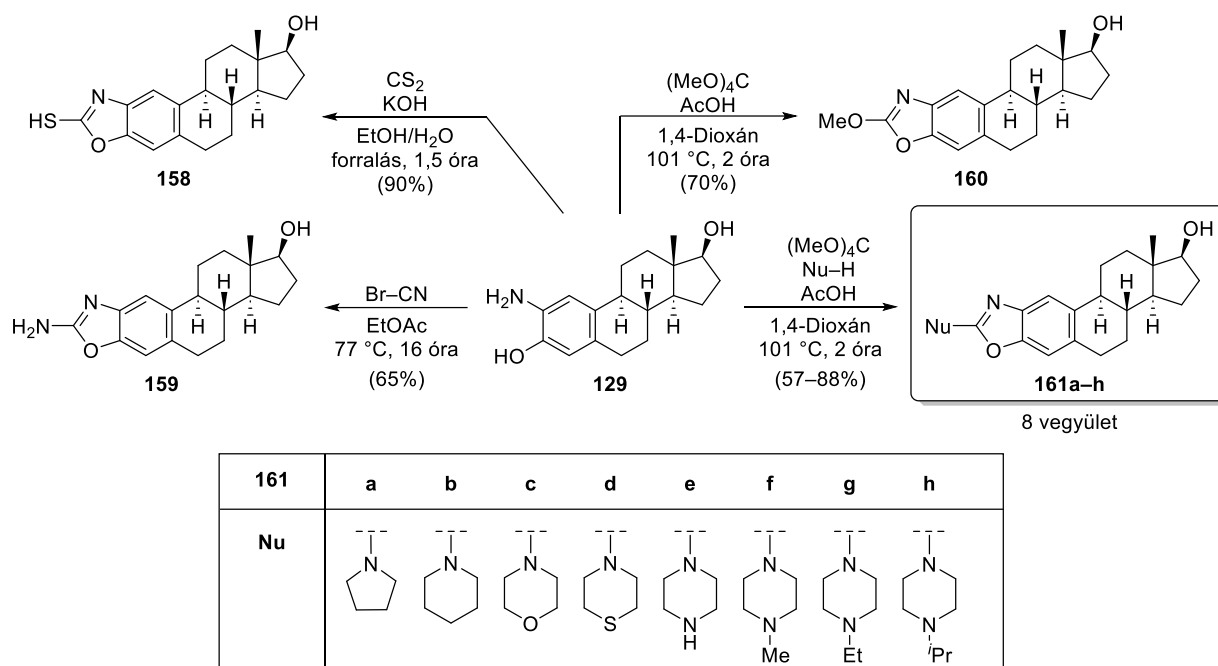
A 149-es vegyületből funkciós csoport-átalakítási stratégiákat alkalmazva 8 további analogonhoz jutottunk (6. ábra). A prekuzor ammóniával történő reakciója egy karboxamid származékot szolgáltatott (150). Igazoltuk, hogy a 149 etilészter funkciós csoportja kemoszelektíven redukálható NaBH₄-del, a megfelelő hidroximetil származékot (151)

eredményezve, amelyből *Dess-Martin*-oxidációval formil-oxazol (**152**) képezhető. Dietilamino-kén-trifluorid (DAST) nukleofil fluorozó ágens felhasználásával fluormetil (**153**) és difluormetil származékokat (**154**) is szintetizáltunk. A reakciósor lezáró lépésében a 17-acetát védőcsoport eltávolítását valósítottuk meg, amelyhez a NaOH felhasználását találtuk ideálisnak, szemben a kezdeti próbareakciók során alkalmazott LiOH-dal, amely az oxazolgyűrű felnyílását eredményezte. (**3. publikáció**)



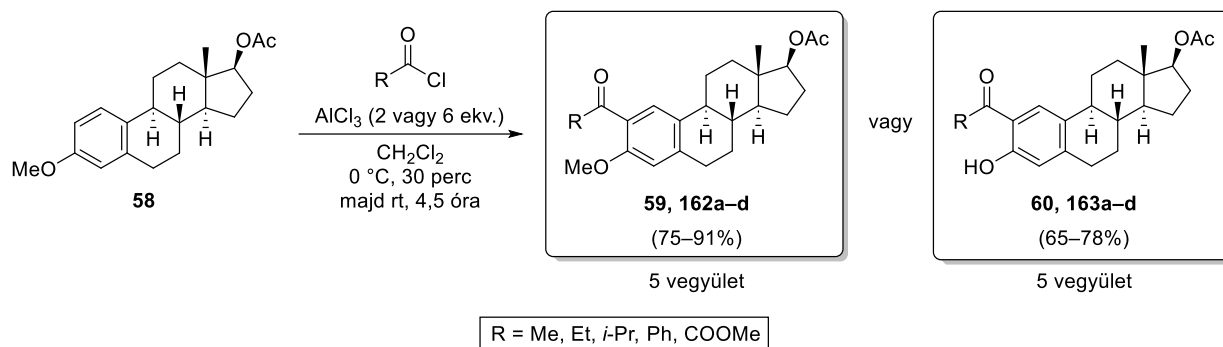
6. ábra

3.7. A **129**-es vegyület szén-diszulfid (CS₂), brómcján (BrCN) és tetrametil-ortokarbonát elektrofil ágensekkel történő ciklizációjával 2'-tiol (**158**), 2'-amino (**159**) és 2'-metoxi analogonokat (**160**) is előállítottunk (7. ábra). Az utóbbi vegyület gyűrűs aminokkal történő aromás nukleofil szubsztitúciós reakcióit tanulmányozva oldószerhatást figyeltünk meg: kloroform oldószert 1,4-dioxánra cserélve a reakcióidő 16–20 órától 1–2 órára csökkent, melyet a kiindulási anyag 1,4-dioxánban való jobb oldhatóságával és az oldószer magasabb forráspontja miatt alkalmazható magasabb hőmérséklet okozta reakciósebesség-növekedéssel magyaráztunk. (**3. publikáció**)



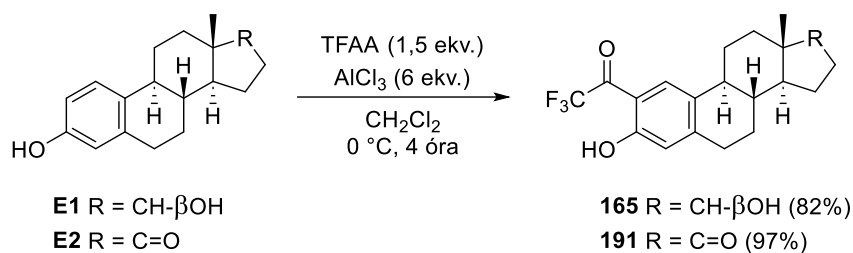
7. ábra

3.8. 3-Metoxiösztadiol-17-acetát (**58**) és acetil-klorid modellreakcióján keresztül tanulmányoztuk az alkalmazott oldószer *Friedel-Craft* acilezésre és a termék konzekutív demetileződési reakciójára kifejtett hatását. Etanollal stabilizált oldószerek (diklórmetán, kloroform, klórbenzol) esetén a sav-klorid feleslegben történő alkalmazása mellett sem tapasztaltuk a kiindulási anyag teljes konverzióját, míg nitrometánban és kloroformban a képződő metiléter intermedier (**59**) demetileződése nem valósult meg. Amilénnel-stabilizált diklórmetán alkalmazásával mind a *Friedel-Crafts* acilezés, mind a demetileződés 4,5 óra alatt lejátszódott. Az optimalizált reakciókörülmények mellett (1,5 ekv. sav-klorid, 6 ekv. AlCl_3 , amilénnel stabilizát CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C}$ 30 perc, majd rt., 4 óra) további alifás és aromás sav-kloridok felhasználásával 2-acil-ösztadiol-17-acetát analogonok (**163a-d**) jó hozamú (65–80%) szintézisét valósítottuk meg (8. ábra). A *Lewis*-sav mennyiségének 2 ekvivalensre történő csökkentésével a megfelelő metilétereket (**162a-d**) is jó–kiváló (75–92%) hozamokkal izoláltuk.



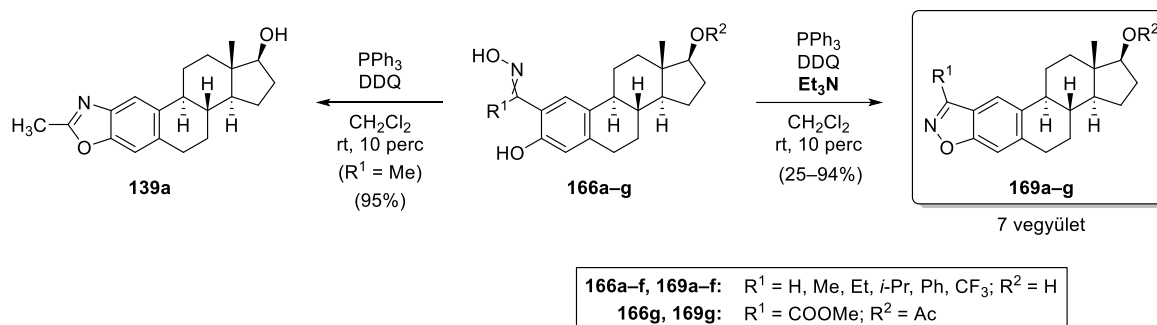
8. ábra

Bemutattuk, hogy a módszer trifluoecetsav-anhidrid (TFAA) felhasználásával ösztradiol (**E2**) és ösztron (**E1**) szubsztrátumokkal egyaránt megvalósítható (9. ábra). A hőmérséklet megfelelő kontrollálásával az egyéb mellékreakciók (észterképződés, *Wagner-Meerwein*-átrendeződés) visszaszoríthatók és a céltermékek (**165** és **191**) jó-kiváló hozamokkal előállíthatók. (2. publikáció)



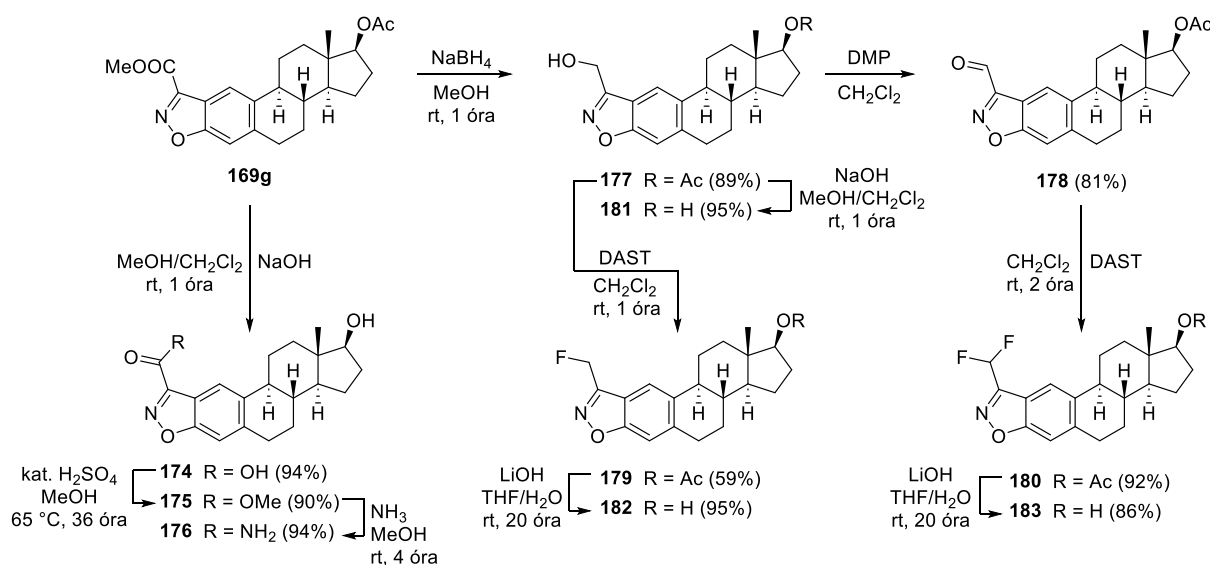
9. ábra

3.9. A 2-formil- és 2-acil-ösztradiol vegyületekkel (**55**, **163d**, **164a-c**, **165**) és hidroxilamin-hidrokloriddal oximképzési reakciókat valósítottunk meg. Megfigyeltük, hogy a sztérikusan gátoltabb **164b**, **164c** és **165** vegyületek esetén a kiindulási anyag teljes konverziója csak a reakcióhoz használt NaOAc bázis piridinre történő cseréjével, a hidroxilamin-hidroklorid reagens feleslegben történő alkalmazásával és a reakcióelegy forralásával érhető el. Vizsgáltuk a **166a-g** oximok PPh₃/DDQ reagenskombinációval elősegített gyűrűzárási reakcióit (10. ábra), amely során megfigyeltük, hogy az elektronküldő csoportokat (R = Me, Et, *i*-Pr) tartalmazó vegyületeknél a reakció kemoselektivitása irányítható: bázis alkalmazása nélkül a **166b** vegyület ciklizációja a **139a** oxazolt eredményezte, míg TEA bázis jelenlétében csak a **169b** izoxazol képződését tapasztaltuk. A **166a** aldoxim, illetve az elektronvonzó csoportokat (R = CF₃ vagy COOMe) tartalmazó **166f** és **166g** vegyületek esetén a bázis nem volt befolyásoló hatással a reakció kemoselektivitására, azonban a reakciósebességet egyértelműen megnövelte. (2. publikáció)



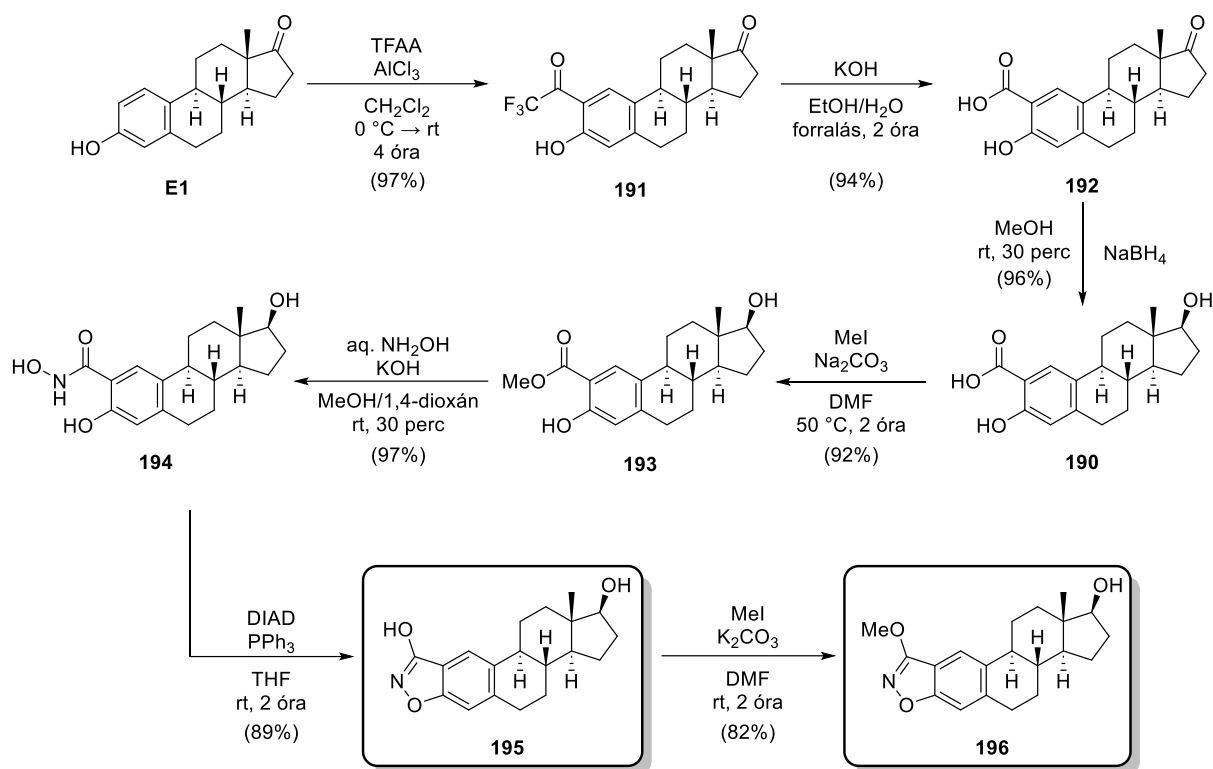
10. ábra

3.10. A **169g** prekuzorból kiindulva funkcióscsoport-átalakítások (amidképzés, redukció, oxidáció, deoxofluorozás) révén 10 további 3-szubsztituált izoxazol analogon szintézisét mutattuk be (11. ábra). (2. publikáció)



11. ábra

3.11. A **195** és **196** vegyületek szintézisére egy ősztronból (**E1**) kiinduló többlépéses lineáris szekvenciát dolgoztunk ki. Bebizonyítottuk, hogy a reakciósor kulcsintermedijének számító 2-karboxiősztron (**192**) előállításuk kiváló (94%) izolált hozammal 2-trifluoracetilősztronból (**191**) megvalósítható. Az egyes részlépések (redukció, észterezés, hidroxámsavképzés) optimalizálását követően intramolekuláris *Mitsunobu*-reakció révén előállítottuk a **195**-ös vegyületet, amelyből *Williamson*-éterszintézissel a metoxi analogont (**196**) is megkaptuk (12. ábra). (2. publikáció)



12. ábra

4. A farmakológiai vizsgálatok eredményei

Az előállított vegyületek *in vitro* farmakológiai vizsgálata során számos vegyület mutatott aktivitást. A benzoxazolon vegyületcsaládból a halogéntartalmú **131c** és **132b** vegyületek a DU-145 prosztatarák sejtvonalon $1\ \mu\text{M}$ körüli IC_{50} -értékeket mutatott, míg a nem szubsztituált karbamát (**133**) HeLa sejtvonalon bizonyult ígéretesnek. A benzoxazolonok közül a 2'-etil származék (**139b**) $2,04\ \mu\text{M}$ -os IC_{50} -értékével az MCF-7 mellrák sejtvonalon bizonyult a leghatásosabbnak, míg a piridil (**143k**), az amino (**159**) és az *N*-etil-piperazino származék (**161g**) A549, DU-145, HeLa és MCF-7 sejtvonalakon is $5\ \mu\text{M}$ körüli IC_{50} -értékekkel rendelkezett. A benzizoxazol molekulacsaládból az alkil-szubsztituált vegyületek (**169b**, **169c** és **169d**) egyértelműen kiemelkedtek, melyek közül az etil szubsztituenst tartalmazó **169c** származék említésre méltó, $1\ \mu\text{M}$ alatti IC_{50} -értékeket mutatott a DU-145, HeLa és MCF-7 sejtvonalakon egyaránt, a kiváló szelektivitás megőrzése mellett.

5. A doktori értekezés alapjául szolgáló közlemények (MTMT azonosító: 10069242)

1. **Ferenc Kovács**, Mohana K. Gopisetty, Dóra I. Adamecz, Mónika Kiricsi, Éva A. Enyedy, Éva Frank
Synthesis and Conversion of Primary and Secondary 2-Aminoestradiols into A-Ring-Integrated Benzoxazolone Hybrids and Their in Vitro Anticancer Activity
RSC Advances, **2021**, 11 (23), 13885–13896.
IF = 4,036
2. **Ferenc Kovács**, Dóra I. Adamecz, Ferenc I. Nagy, Benedek Papp, Mónika Kiricsi, Éva Frank
Diversity-Oriented Synthesis and In Vitro Anticancer Activity of Framework-Integrated Estradiol-Benzisoxazole Chimeras
Molecules, **2022**, 27 (21), 7456.
IF = 4,600
3. **Ferenc Kovács**, Ildikó Huliák, Hédi Árva, Mónika Kiricsi, Dóra Erdős, Marianna Kocsis, Gergely Takács, György T. Balogh, Éva Frank
Medicinal-Chemistry-Driven Approach to 2-Substituted Benzoxazole–Estradiol Chimeras: Synthesis, Anticancer Activity, and Early ADME Profile
ChemMedChem, **2023**, e202300352.
IF = 3,400*

Összesített IF = 12,036*

6. A doktori értekezéshez nem kapcsolódó közlemények

1. Éva A. Enyedy, Anett Giricz, Tatsiana V. Petrasheuskaya, János P. Mészáros, Nóra V. May, Gabriella Spengler, **Ferenc Kovács**, Barnabás Molnár, Éva Frank
Comparative Solutions Equilibrium Studies on Anticancer Estradiol-Based Conjugates and Their Copper Complexes
Inorganics, **2024**, 12(2), 49.
IF = 2,900*
2. János P. Mészáros, Hilda Kovács, Gabriella Spengler, **Ferenc Kovács**, Éva Frank, Éva A. Enyedy
A comparative study on the metal complexes of an anticancer estradiol-hydroxamate conjugate and salicylhydroxamic acid
Journal of Inorganic Biochemistry, **2023**, 244, 112223.
IF = 3,900*
3. Tatsiana V. Petrasheuskaya, **Ferenc Kovács**, Nóra Igaz, Andrea Rónavári, Bálint Hajdú, Laura Bereczki, Nóra V. May, Gabriella Spengler, Béla Gyurcsik, Mónika Kiricsi, Éva Frank, Éva A. Enyedy
Estradiol-Based Salicylaldehyde (Thio)semicarbazones and Their Copper Complexes with Anticancer, Antibacterial and Antioxidant Activities
Molecules, **2023**, 28, 54.
IF = 4,600*

4. Tatsiana V. Petrasheuskaya, **Ferenc Kovács**, Gabriella Spengler, Nóra V. May, Éva Frank, Éva A. Enyedy
A comparative study on the complex formation of 2-aminoestradiol and 2-aminophenol with divalent metal ions: solution chemistry and anticancer activity
Journal of Molecular Structure, **2022**, 1261, 132858.
IF = 3,800
5. Ádám Baji, **Ferenc Kovács**, Gergő Mótyán, Gyula Schneider, János Wölfling, Izabella Sinka, István Zupkó, Imre Ocsovszki, Éva Frank
Investigation of pH and substituent effects on the distribution ratio of novel steroidal ring D- and A-fused arylpyrazole regioisomers and evaluation of their cell-growth inhibitory effects in vitro
Steroids, **2017**, 126, 35–49.
IF = 2,523
6. Gergő Mótyán, **Ferenc Kovács**, János Wölfling, András Gyóvai, István Zupkó, Éva Frank
Microwave-assisted stereoselective approach to novel steroidal ring D-fused 2-pyrazolines and an evaluation of their cell-growth inhibitory effects in vitro
Steroids, **2016**, 112, 36–46.
IF = 2,282

Összesített IF = 20,005

7. A doktori értekezés alapjául szolgáló előadások és poszterek

1. **Kovács Ferenc**, Frank Éva
Ösztránváz A-gyűrűjéhez kondenzált oxazolok és izoxazolok régiószelektív szintézise
MTA Szteroid- és Terpenoidkémiai Munkabizottsági ülés, online, 2022. november 28.
2. **Kovács Ferenc**, Frank Éva
Ösztránváz vegyületek A-gyűrűjének módosítása öttagú, *N,O*-heterociklusokkal
MTA Szteroid- és Terpenoidkémiai Munkabizottsági ülés, online, 2021. december 6.
3. **Kovács Ferenc**, Frank Éva
Ösztránváz A-gyűrűjéhez kondenzált *N,O*-heterociklusok szintézise
A Szegedi Ifjú Szerves Kémikusok Támogatásáért Alapítvány előadóülése, online, 2020. május 18.

8. A doktori értekezéshez nem kapcsolódó előadások és poszterek

1. Tamás Pivarcsik, **Ferenc Kovács**, Gabriella Spengler, Éva Frank, Bernhard K. Keppler, Wolfgang Kandioller, Éva A. Enyedy
Half-sandwich Ru(II) and Rh(III) organometallic complexes with sterane-based bidentate ligands bearing (N,N) donor set

16th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, ISABC, Joánina, Görögország, 2023. június 11–14. (poszter prezentáció)

2. Tatsiana V. Petrasheuskaya, **Ferenc Kovács**, Nóra V. May, Andrea Rónavári, Mónika Kiricsi, Gabriella Spengler, Éva Frank, Éva A. Enyedy
Estradiol-based salicylaldehyde (thio)semicarbazones and their copper complexes with anticancer, antibacterial and antioxidant activities
International Symposium on Metal Complexes, ISMEC, Valencia, Spanyolország, 2022. június 5–8. (poszter prezentáció)
3. Tamás Pivarcsik, **Ferenc Kovács**, Gabriella Spengler, Éva Frank, Éva A. Enyedy
Sterane-based bidentate ligands with (N,N) donor set: synthesis, biological activity, solution chemistry and interaction with half-sandwich Ru and Rh cations
International Symposium on Metal Complexes, ISMEC, Valencia, Spanyolország, 2022. június 5–8. (poszter prezentáció)
4. János P. Mészáros, Hilda Kovács, Gabriella Spengler, **Ferenc Kovács**, Éva Frank, Éva A. Enyedy
Aqueous solution behaviour of half-sandwich Ru and Rh complexes of an salicylhydroxamic acid derivative
International Symposium on Metal Complexes, ISMEC, Valencia, Spanyolország, 2022. június 5–8. (poszter prezentáció)
5. Gergő Mótyán, **Ferenc Kovács**, János Wölfling, Éva Frank
Application of microwave irradiation for the stereoselective synthesis of androstenefused 2-pyrazolines
16th Tetrahedron Symposium - Challenges in Bioorganic & Organic Chemistry, Berlin, Németország, 2015. június 16–19. (poszter prezentáció)
6. Gergő Mótyán, Dóra Kovács, **Ferenc Kovács**, Gyula Schneider, Éva Frank
Stereoselective synthesis of new androstene-fused arylpyrazolines as potent antiproliferative agents
20th International Conference on Organic Chemistry, Budapest, Magyarország, 2014. június 29 – július 4.

Halmozott IF = 32,041