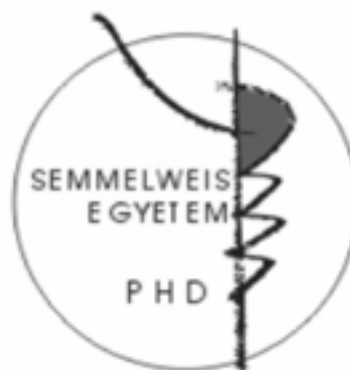


Pentaciklusos alkaloid-analógok szintézise, fizikokémiai és farmakológiai vizsgálata

Doktori tézisek

Bubenyák Máté Dániel

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Noszál Béla egyetemi tanár, D.Sc.

Hivatalos bírálók: Pápayné Dr. Sár Cecília egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Czompa Andrea egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Bagdy György egyetemi docens, D.Sc.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kecskeméti Valéria egyetemi tanár, D.Sc.
Dr. Perjési Pál egyetemi tanár, D.Sc.

Budapest
2011

Összefoglaló

A kinazolinokarbolin-vázás rutekarpin és evodiamin (*Evodia rutaecarpa*) a tradicionális kínai népi gyógyászati szerek fő alkaloid komponensei. A kilencvenes évek új farmakológiai kutatásai derítették fel ezen pentaciklusos alkaloidok számos értékes hatását. Az evodiamin több rákos sejtvonalon tapasztalható szelektív tumorgátló és antimetasztatikus tulajdonsága miatt ígéretes fejlesztések vezérmolekulává vált.

Szintetikus munkánk során a kinazolinokarbolin-vázás és rokon szerkezetű alkaloidok ill. hasonló hatású gyógyszermolekulák struktúráinak szerkezeti elemeit ötvözve, bioizoszter helyettesítésekkel új hibrid molekulák előállítását valósítottuk meg. Előállítottuk az indolo-pirrolokinazolonvázás 8-norrutekarpint, amely a rutekarpin és a luotonin A hibrid molekulája. Totálszintézist dolgoztunk ki az indolo-piridobenzotiazin és a 12-azaindolo-piridobenzotiazin előállítására a rutekarpin és a piroxikám szerkezeti elemeinek kombinálásával. A rutekarpin és a 8-norrutekarpin szerkezetén végrehajtott bioizoszter helyettesítésekkel két új, heterokondenzált pentaciklust, az 5-szulfarutekarpint és az 5-szulfa-8-norrutekarpint nyertünk. Ezen bioizoszter struktúrák szintézis-intermediereiként előállítottunk két új triciklust, a piridobenzotiadiazint és a pirrolo-benzotiadiazint. A szintetizált triciklusokat, illetve pentaciklusokat változatos szubsztituensekkel, illetve szolubilizáló csoportokkal ellátva farmakológiai vizsgálatokra alkalmas sorozatokat kaptunk. A nuklefin (*Nauclea latifolia*) előállítására alternatív szintézisutat dolgoztunk ki. Elsőként publikáltuk az indolilkinazolon-vázás bouchardatin (*Bouchardata neurococca*) szintézisét.

A szintetizált intermedierek fizikokémiai tulajdonságait vizsgálva meghatároztuk a 2,3-polimetilén-benzotiadiazinok pK_s értékeit. ¹H NMR technikával megmértük öt triciklusos vegyület proton/deuteron cseresebességi állandóit. Meghatároztuk hét fenilhidrazon-származék Z/E geometriai izomereinek oldószerfüggő egyensúlyi arányát poláris és apoláris oldószerekben.

Munkánkat az előállított vegyületek *in vitro* farmakológiai vizsgálataival egészítettük ki a Gyógyszerhatástani Intézet munkatársaival együttműködve. HeLa sejtvonal életképességét az evodiamin hatásához hasonló mértékben öt vegyületünk gátolta. Nyolc vegyületünk az evodiaminnal azonos nagyságrendben indukált apoptózist HeLa sejtvonalon.

Summary

Quinazolinocarboline rutaecarpine and evodiamine (*Evodia rutaecarpa*) are main alkaloid components of traditional Chinese folk-remedies. Several new valuable activity of these pentacyclic alkaloids have been discovered by pharmacological researches in the 1990s. Evodiamine exhibited selective antitumor and antimetastatic effects on several cancer cell lines and became lead structure of anticancer agents.

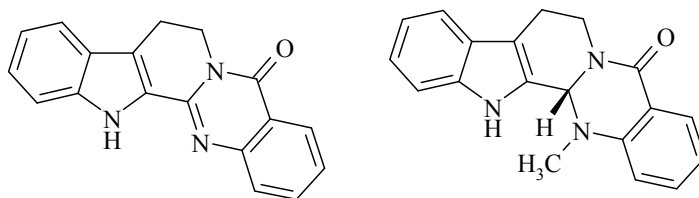
During our synthetic research we achieved to gain alkaloid hybrid derivatives by combining the structural elements of quinazolinocarbolines with analogous alkaloids or drug molecules having similar effects by bioisosteric replacements. 8-norrutaecarpine, a hybrid molecule of rutaecarpine and luotonin A containing the indolo-pyrroloquinazolinone ring system has been synthesized. The hybrids of rutaecarpine and piroxicam bearing the indolo-pyridobenzothiazine and the 12-azaindolo-pyridobenzothiazine structures were prepared on two alternative routes. Two new heterocondensed pentacyclic compounds, 5-sulfarutaecarpine and 5-sulfa-8-norrutaecarpine were reached via bioisosteric replacement on the structure of rutaecarpine and 8-norrutaecarpine. Two new tricyclic ring systems, pyrido-benzothiadiazine and pyrrolo-benzothiadiazine were produced as intermediaries of these pentacyclic molecules. Series of substituted derivatives were prepared for pharmacological studies by modification of the structures with various substituents and solubilizing groups. During our work alternative way for synthesis of nauclefine (*Nauclea latifolia*) was laboured, and we published the synthesis of indolilquinazolinone derivative bouchardatine (*Bouchardata neurococca*) for the first time.

Some of the physicochemical attributes of the synthesized intermediaries were defined, such as the pKa constants of 2,3-polymethylene-benzothiadiazines. Proton/deuteron exchange kinetic constants of active methylene-groups of five tricyclic compounds were measured by ¹H NMR technique. Solvent-dependent ratio of the *Z/E* isomers of phenylhydrazone-derivatives in polar and apolar solvents were determined.

In the case of 18 produced compounds our work was completed by *in vitro* pharmacological studies performed within co-operation with the *Institute of Pharmacology*. The viability of HeLa cells was inhibited by five of our compounds to similar extent as the effect of evodiamine. Eight of our compounds induced apoptosis on HeLa cells to similar extent as evodiamine.

Bevezetés

Értekezésem kidolgozása során a *Semmelweis Egyetem Gyógyszerészi Kémiai Intézet* és a *Chinoin Gyógyszergyár* kutatási együttműködésében folyó szintetikus vizsgálat-sorozatba kapcsolódhattam be. Ezen kutatások során a nitrogénhídfős vegyületek vizsgálatában számos eredeti eljárás és szabadalom kidolgozása valósult meg, sikerült eredeti szintézisutat találni a kinazolinokarbolin alkaloidok, köztük a rutekarpin és származékai előállítására, amely a Merck index minősítése szerint máig a legegyszerűbb és leggazdaságosabb totálszintézis. A kinazolinokarbolin-vázás alkaloidok, a rutekarpin és az evodiamin tradicionális népi gyógyászati szerek fő alkaloid komponensei, amelyeket már évezredek óta alkalmaznak a keleti orvoslásban. Az *Evodia rutaecarpa* szárított termése („Wu-Chu-Yu”) a 200 kiemelt és legszélesebb körben alkalmazott kínai gyógytermék egyike, amelynek fő hatóanyagai a rutekarpin, az evodiamin, illetve ezek szubsztituált származékai.



1. ábra: A rutekarpin és az (S)-evodiamin szerkezete.

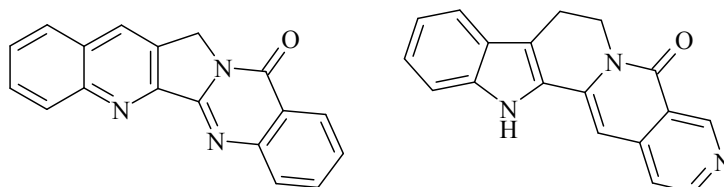
A rutekarpin szintetikus előállítására igen nagyszámú eljárásváltozatot dolgoztak ki a Nobel-díjas *Robinson* totálszintézisétől *Jan Bergman*, a svéd *Karolinska Intézet* kémia professzorának megközelítéséig. A kinazolinokarbolinok farmakológiai értékelése a modern tudomány vizsgáló módszereivel csak a kilencvenes évektől bontakozott ki. A vizsgálatok egyrészt igazolták a természetes növényi kivonatok gyógyító hatásait, másrészt olyan felfedezéseket tettek, amelyek következtében e molekulák új gyógyszerfejlesztések vezérmolekuláivá váltak.

A rutekarpin a CGRP felszabadulást stimulálva a vanilloid receptor 1-es altípusát aktiválva jelentős antihipertenzív hatással rendelkezik. Megállapították gyulladásgátló hatását is, amely a szelektív és igen erős COX-2 izoenzim-gátló hatásnak köszönhető.

Japán kutatók a rákos sejtek metasztázis-képző képességét jellemző migrációvizsgálat során megállapították, hogy az evodiamin egyedülálló, a ráksejtekre szelektív, nem-citotoxikus antimetasztatikus hatással rendelkezik. 2001 után az evodiamin ezirányú farmakológiai kutatása jelentősen kibővült, számos daganatos sejtvonalon pozitív eredménnyel tesztelték.

Célkitűzések

A heterociklusos kémia területén a *Gyógyszerészi Kémiai Intézetben* felhalmozott tapasztalatokra és eredményekre támaszkodva a rutekarpin-típusú alkaloidok totálszintézis intermediereinek kémiai reaktivitás vizsgálatait terveztük meg, ennek során a rokon gyűrűrendszerek, izoszter és bioizoszter származékok előállítását is terveinkbe illesztettük. Munkánk során új reakcióutakat terveztünk eredeti, irodalmilag új gyűrűrendszerek kiépítésére, amelyek segítségével a sokrétű biológiai hatással rendelkező rutekarpinnal, evodiaminnal, luotonin A-val és nuklefinnel analóg alapstruktúrák szelektívebb, hatékonyabb heterociklusos változatait, jobb vízoldékonysággal rendelkező származékait sikerült kifejleszteni, amelyek magukban hordozzák az evodiaminra jellemző daganatellenes farmakológiai jellemzőket. A természetes alkaloidok ezen csoportjára olyan alternatív szintézisutakat szándékoztunk felderíteni, amelyek az eddiginél gazdaságosabb, könnyen és olcsón hozzáférhető alapanyagokból kiinduló, illetve új szubsztitúciós lehetőségeket biztosító előállítást tesznek elérhetővé.



2. ábra: A luotonin A és a nuklefin szerkezete.

A szintetikus munkánk eredményeként előállított új struktúrák figyelemreméltó fizikokémiai tulajdonságainak feltérképezését és jellemzését is el kívántuk végezni.

Célunk volt továbbá, hogy munkánkat farmakológiai vizsgálatokkal egészítsük ki, így ellenőrizve az előállított vegyületek tumorgátló és apoptózist indukáló hatását. Farmakológiai vizsgálatként célul tűztük ki a HeLa sejtek életképességének változására, valamint indukált apoptózis mérésére, illetve kaszpáz-3 enzimaktivitás változásának követésére irányuló mérések elvégzését.

Módszerek

A szintetizált termékek azonosításához felhasznált szerkezetvizsgáló módszerek

A szerves szintézisek során a reakciók előrehaladtát megfelelő időközönként, a reakcióelegyből közvetlenül vett minták vékonyréteg kromatográfiás (VRK) vizsgálatával követtük. Szilikagél lapokon (Merck) benzol:metanol 4:1 arányú elegyét használtuk futtatóreagensnek, előhívószernek Dragendorff-reagenst és ninhidrint alkalmaztunk. Az intermedierek és a végtermékek olvadáspontját Stuart Scientific SMP készülékkel határoztuk meg; az UV-

spektrumokat UNICAM SP-800 és Jasco V-550 spektrofotométerrel vettük fel. Az IR spektrumokat PYE UNICAM SP-1100 IR-spektrofotométerrel vettük fel KBr pasztillából.

A vegyületek NMR-spektrumait Varian Unity Inova 400, 500 és 600 MHz (Palo Alto, CA) készülékeken mértük meg DMSO-*d*₆-ban, D₂O-ban, egyes esetekben CDCl₃-ban. Ahol szükséges volt, ott ¹H spektrum mellett ¹³C spektrumot is detektáltunk, illetve egyes esetekben 1D NOESY és kétdimenziós homo- és heteronukleáris technikákat is alkalmaztunk (2D COSY, HSQC és HMBC). A mérési eredmények kiértékeléséhez Varian VnmrJ és Mestre-C 4.8.6.0 (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spanyolország) szoftvereket használtunk.

Az ¹H NMR-pH titrálásokat egy mintacsőben végeztük el 2 mM-os koncentrációban 25 °C-on, 0,15 M ionerősség (NaCl) mellett H₂O:D₂O 9:1 oldatban. Az *in situ* pH érték követését trimetilamin, TRIS, imidazol, ecetsav, klórecetsav és diklórecetsav (c=1 mmol/dm³) alkalmazásával biztosítottuk.

A tömegspektrumokat Agilent 6410B tripla kvadrupól készülékkel határoztuk meg, elektronspray ionizációt (ESI) alkalmazva, az eredményeket Masshunter B.01.03 szoftverrel értékeltük. Elemanalizist (C, H, N) a Chinoi Gyógyszergyár Perkin Elmer 2400 CHN analizátorával végeztünk; a számolt értékektől az eltérés a következő szórás értékeken belül esett: C: ± 0,30; H: ± 0,21; N: ± 0,26%.

Farmakológiai vizsgálatok módszerei, anyagai és készülékei

HeLa méhnyakrák sejtek életképességének meghatározása proapoptotikus hatás vizsgálata céljából

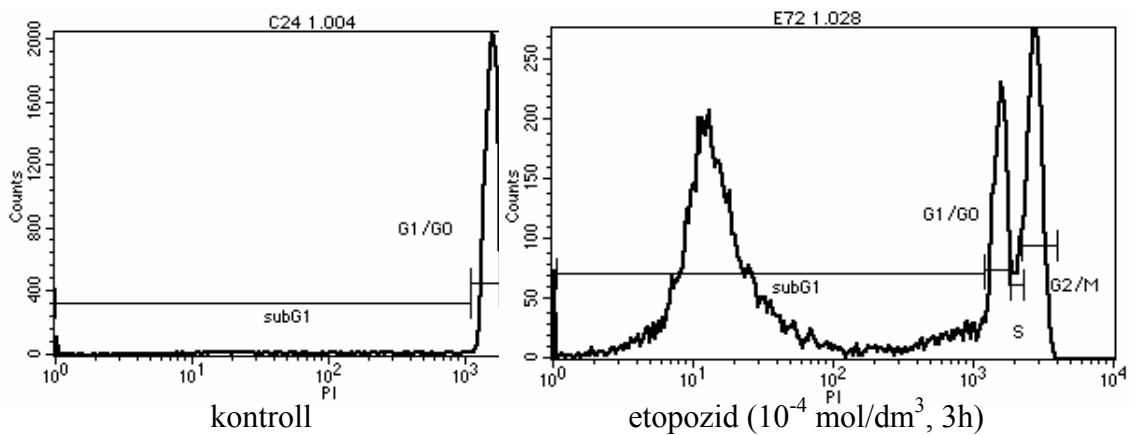
96 lyukú lemezen, lyukanként 5000 HeLa sejtet kezeltünk a médium (99 %) – DMSO (1 %) elegyben oldott anyagainkkal 48 órán keresztül. Az inkubációs idő végén tetrazólium sóval (XTT) kezeltük a sejteket, ELISA kiolvasó készülék segítségével meghatároztuk a túlélő sejtek számát, amit összehasonlítva az üres (megfelelő hígítású DMSO-val kezelt) kísérlettel, következtetni tudunk a sejtek osztódási képességének változására.

A kísérleti protokoll:

1. Oldatok:

- Médium: DMEM + 10 % FBS + 2 mmol/dm³ L-glutamin + gentamicin.
- XTT: 0,9 mg/ml, frissen oldva a médiumban (enyhe melegítéssel).
- PMS (fenazin metosulfát): 3mmol/dm³ törzsoldat desztillált vízben oldva, tárolás -20°C-on.
- Vegyületek: 10⁻², 10⁻³ és 10⁻⁴ mol/dm³ koncentrációban DMSO-ban oldva, tárolás -20°C-on.

2. Kezelés: 5000 HeLa sejt/lyuk, átlátszó, 96-lyukú lemezen. A sejtszám-abszorbancia összefüggés linearitásának megállapításához ötpontos kalibrációt vettünk fel 10000-625 sejt tartományban, felező hígítással. Kezelés a sejtek lemezre helyezését követő napon az adott vegyület



3. ábra: Az áramlási citométer által szolgáltatott görbe. G2/M: kétszeres kromatinú sejtek, G1/G0: egyszeres kromatinú sejtek, subG1: apoptotikus sejtek.

10^{-4} , 10^{-5} illetve 10^{-6} mol/dm³ koncentrációjával 48 órán keresztül. A vegyületek törzsoldatait felhasználás előtt médiummal százszoros térfogatra hígítottuk, majd az így kapott oldattal kezeltük a sejteket 200 µL térfogatban.

3. *Feldolgozás, mérés:* A sejtek életképességét a kezelési idő eltelte után XTT redukációs módszerrel határoztuk meg. A sejteken lévő folyadékot 100 µL friss médiumra cseréltük, majd 50 µL XTT oldatot adtunk hozzá (0,9 mg/ml XTT médiumban oldva + PMS ötvenszeres hígításban). Mérés ELISA kiolvasó készüléken 450 nm-en, háttérmérés: 620 nm-en, félóránként.

A nukleoszomális DNS-fragmentáció detektálása áramlási citométerrel

Az áramlási citométeres vizsgálat során lehetőségünk van meghatározni a fragmentálódott DNS-t tartalmazó sejtek arányát mintánkban. Mivel a DNS-fragmentáció az apoptózissal elpusztult sejtekre jellemző csupán, a sejtenyészetben meghatározhatjuk a kezelés során indukált programozott sejthalál mértékét. Pozitív kontrollként evodiamin és rutekarpin mellett etopozidot is használtunk.

A kezelési protokoll:

1. *Oldatok:* a.) Médium: DMEM + 10 % FBS + 2 mmol/dm³ L-glutamin + gentamicin.
b.) Vegyületek: 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} mol/dm³ koncentrációban DMSO-ban oldva, tárolás -20°C-on.
2. *Kezelés:* 100.000 HeLa sejt/minta, kezelés az adott vegyület 10^{-4} , 10^{-5} illetve 10^{-6} mol/dm³ koncentrációjával 72 órán keresztül.
3. *Alkoholos fixálás:* 2×10^5 sejtet fixálunk 1 ml -20°C-os 70 %-os etanolban, majd 30 perc állás szobahőmérsékleten.
4. *Festés:* A sejteket centrifugáljuk, az üledékre 1 ml extrakciós puffert öntünk (200 mmol/dm³ Na₂HPO₄, pH 7,8-ra állítva 200 mmol/dm³ citromsavval + 0,1 mg/ml RNáz A). Szobahőmérsékleten 15 perc állás után 10 µg propidium-jodidot adunk hozzá, majd 15 perc állás.
5. *Mérés:* Áramlási citométerrel, az FL2 fluoreszcencia-csatorna adatait regisztrálva (logaritmusikus és lineáris skálán is). A jelkaput egyrészt a sejtnagyság (FSC) – FL2 log skálájú diagra-

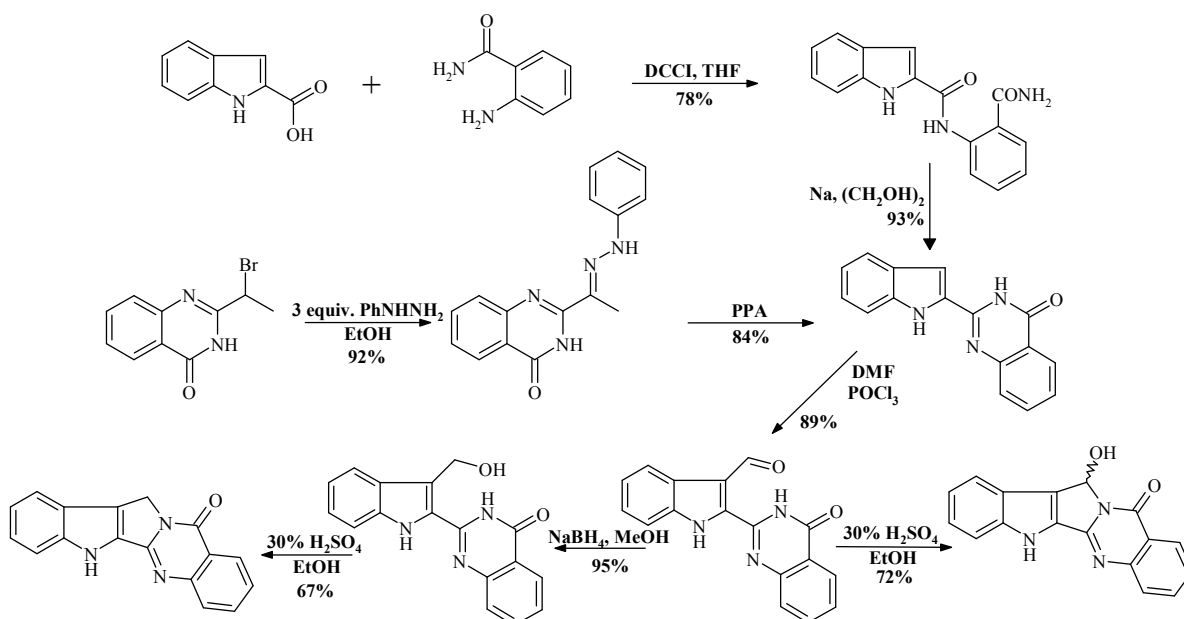
mon (törmelékkizárás), másrészt a lineáris jelterület – jelszélesség diagramon (összetapadt sejtek kizárása) állítottuk fel.

Kaspáz-3 enzimaktivitás mérése

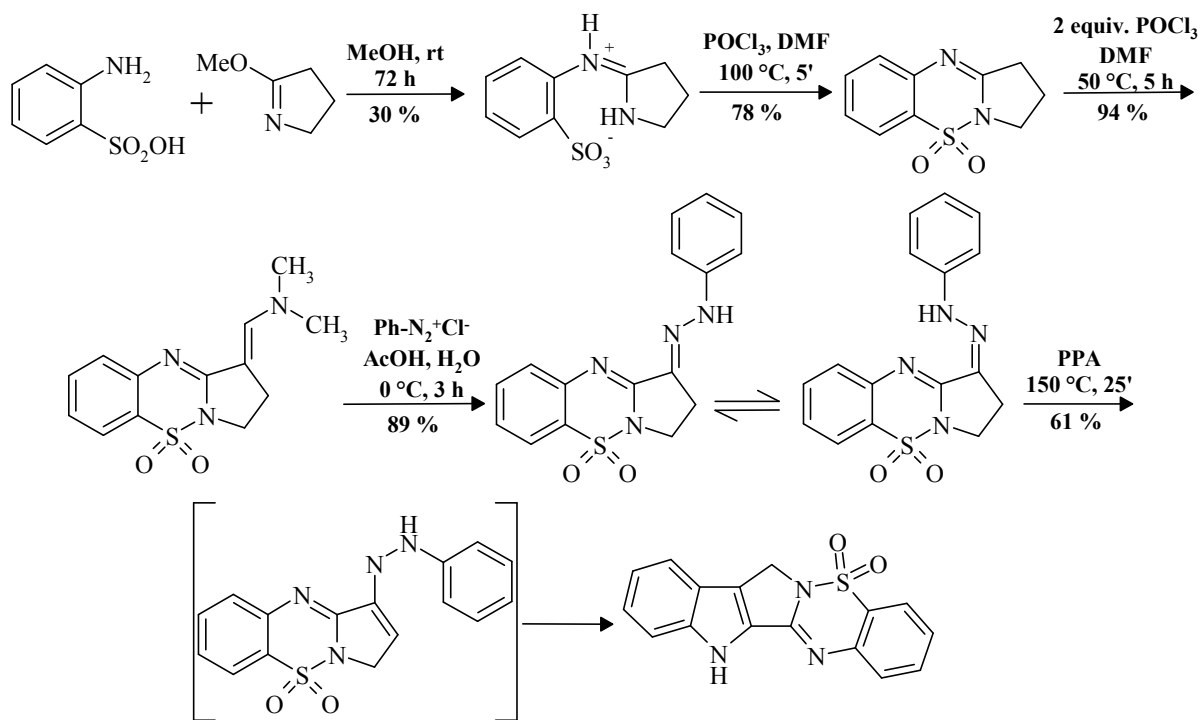
Izolált prokaspáz-3 enzimet kezeltünk a vegyületeink 10^{-6} mol/dm³ koncentrációjú oldatával 24 órán keresztül, majd mesterséges kaspáz-3 szubsztrátot, Ac-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-metilkumarint (Ac-DEVD-AMC) adtunk a rendszerhez. A szubsztrátból az aktiválódott kaspáz-3 enzim mennyiségével arányos mennyiségű fluoreszcens 7-amido-4-metilkumarin (AMC) szabadult fel, amit fluoreszcencia spektroszkópiával detektáltunk. A mérés egyéb körülményeit a hivatkozott szakirodalom szerint állítottuk be.

Eredmények, következtetések

Munkánk során a kinazolinokarbolin alkaloidok gyűrűhomológ és heteroatomokkal helyettesített származékainak előállítására dolgoztunk ki új, ill. módosított eljárásokat. A gyűrűrendszerben végrehajtott bioizoszter helyettesítésekkel (aza-analógok, illetve savamid-szulfonamid szubsztitúció), nor-, és szeko-származékok előállításával, valamint szolubilizáló csoportok bevitelére alkalmas reakcióutak kidolgozásával lehetőségünk nyílt a természetes alkaloidoknál kedvezőbb farmakokinetikai profillal rendelkező, új heterociklusos gyűrűrendszereket tartalmazó farmakonok kialakítására, és szerkezet-hatás összefüggéseik szélesebb körű vizsgálatára. Az aktív molekulák célirányos fejlesztésére új származékképzési útvonalakat derítettünk fel és dolgoztunk ki.



4. ábra: 8-norrutekarpin és 7-hidroxi-8-norrutekarpin előállítása bouchardatinon keresztül.



5. ábra: 5-szulfa-8-norruetekarpin szintézise pirrolo-benzotiadiazinon keresztül.

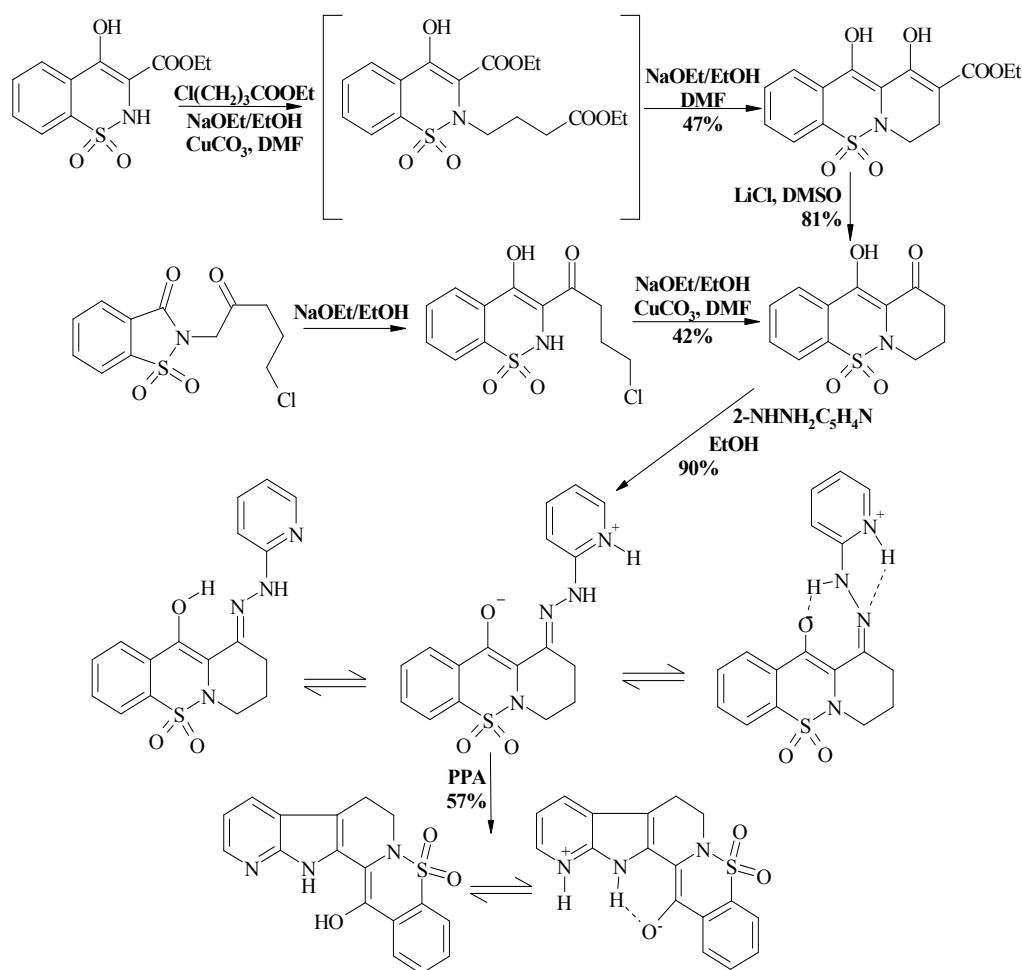
A 8-norruetekarpint két alternatív úton is sikerült előállítanunk. Indol-2-karbonsav és antranilamid kondenzációjával indolil-kinazolonhoz jutottunk, amelyet 2-bróm-etil-kinazonon fenilhidrazinnal történő reagáltatása során, a nukleofil szubsztitúciót követő autooxidációs folyamat eredményeképpen képződő fenilhidrazon származék polifoszorsavban végzett Fischer-indol lebontásával is előállítottunk. Az indolil-kinazonon Vilsmeier-Haack formilezésével szelektíven a 3-formil származékot kaptuk, amely redukció és savas gyűrűzárás útján 8-norruetekarpinhoz (14-nor-luotoninhoz) vezetett. Közvetlen gyűrűzárással a 6-hidroxi-8-norruetekarpint (14-norluotonin B-t) nyertük. Így két természetes alkaloid vázrendszerének közös szerkezeti analógjait szintetizáltuk.

A gyulladáscsökkentő hatással rendelkező benzotiazinok és benzotiadiazinok számos gyógyszer alapvázát alkotják és COX-1/2 inhibitor hatás révén a prosztaglandin PG-E2-n és a PG-E4-en hatva gátolják a rákos sejtek migrációját és a metasztázisok képződését. A kinazonon, a benzotiazin ill. benzotiadiazin szerkezeti elemek bioizoszter jellegét mérlegelve olyan új heterociklusos származékokat terveztünk, amelyekben a pentaciklusos alkaloidok vázrendszerében a kinazonon egységet a fenti izoszter struktúrákkal helyettesítettük.

Ortanilsavat 2-metoxi-3,4-dihido-5H-pirrollal kondenzáltatva a kapott szulfonsav származékot foszforoxi-trikloriddal ciklizáltuk. A pirrolobenzotiadiazin aktív metilénsoport reaktivitása nem elegendő a közvetlen azokapcsolás megvalósításához, ezért aktiváló szubsztituensként formilcsoportot kívántuk kialakítani Vilsmeier-Haack formilezés útján. Termékként a nagy stabilitású és nehezen hidrolizálható dimetilaminometilén származékot kaptuk. A vegyü-

let reakciója diazónium sókkal jó termeléssel vezetett a kívánt fenilhidrazon származékokhoz és az aktiváló csoport egyidejű eliminációja is megtörtént. A fenilhidrazon indollebontása a 8-nor-5-szulfarutekarpint szolgáltatta.

A szachariból induló piroxikám szintézis menetét követve új triciklusos gyűrűrendszert állítottunk elő, amelyet arilhidrazinokkal kondenzáltattunk. A keletkező arilhidrazonok különböző protonált formái között érdekes geometriai izomer egyensúlyokat azonosítottunk. A 2-piridilhidrazon származék indollebontása csak drasztikus reakciófeltételek mellett, közepes termeléssel szolgáltatta a piroxikám-rutekarpin bioizoszter hibrid pentaciklusos gyűrűrendszerét.

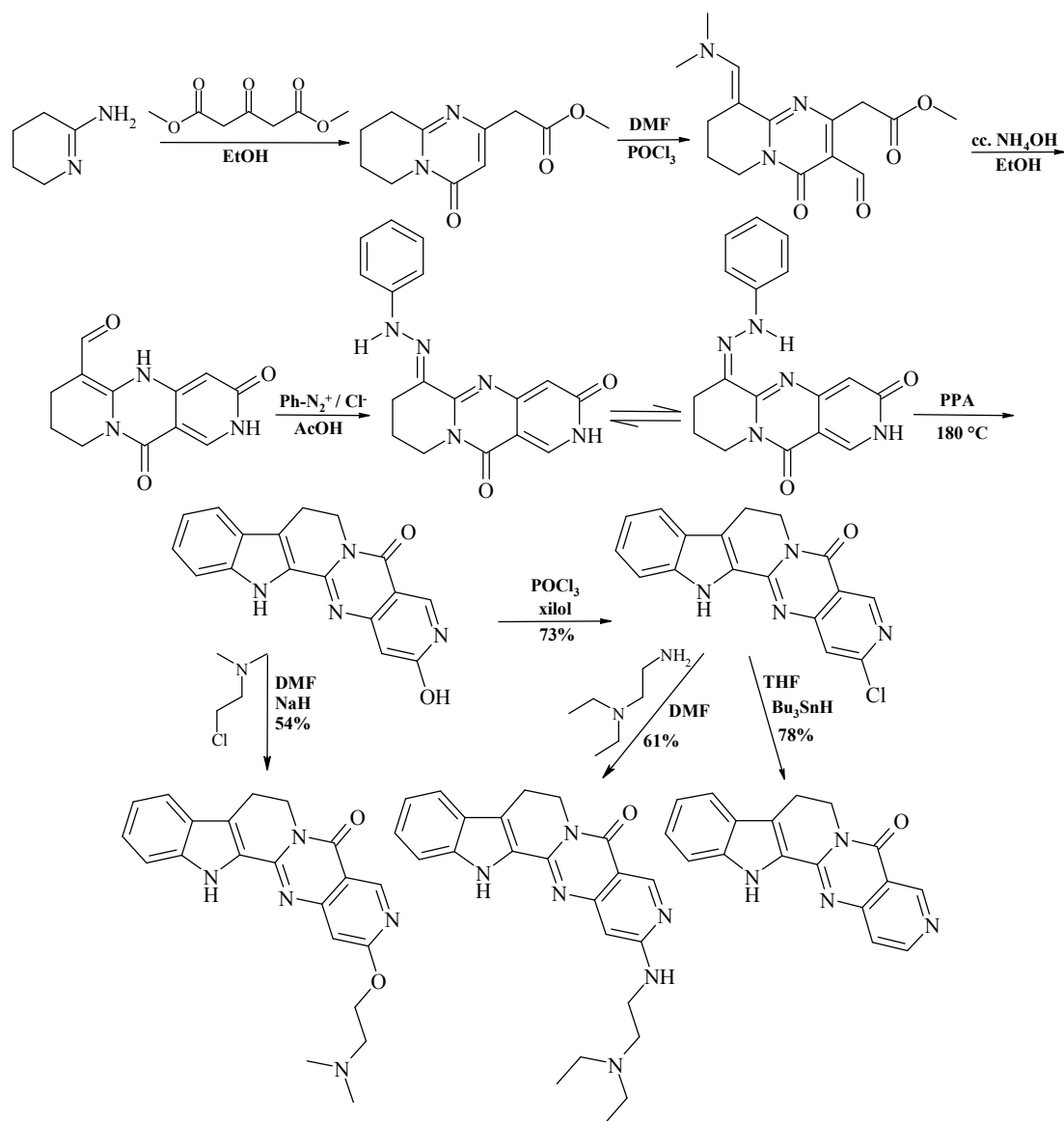


6. ábra: A rutekarpin és a piroxikám hibrid szerkezetének szintézise.

Az afrikai barack (*Nauclea latifolia*) gyökerének hántolt kérgéből izolálták 1975-ben az indolokinolizidin-vázis nukleofint, amelyre Bergman már 1983-as összefoglalójában felhívta a figyelmet. A rutekarpin egy N-atom helyzetében különbözik az antileukémiás hatású nukleofintól, ezért ismerve a nukleofin antineoplasztikus hatását, joggal feltételezte a rutekarpin-származékok várható hasonló tulajdonságait.

A két alkaloid hibrid alapvázának szintézisét kutatócsoportunk korábban publikálta. Jelenlegi munkánk során új totálszintézist dolgoztunk ki különböző szubsztituált származékok

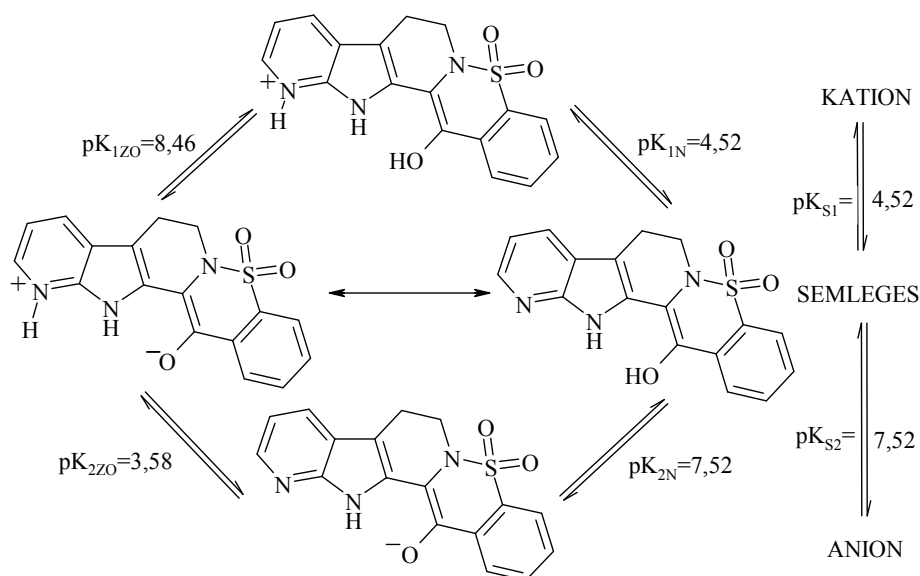
előállítására pirido-pirimidinek felhasználásával. A 4-oxo-pirido-pirimidin-2-ecetsavészter formilezésével és ammóniával történő ciklizálásával kapott triciklus azokapcsolása, majd a keletkező fenilhidrazon indollebontása az E-gyűrűn szubsztituált származékok kialakítására alkalmas 2-hidroxi-3-aza-rutekarpint szolgáltatta. Alifás linkereken keresztül oldékonyságot javító, sóképzésre alkalmas tercier amint kapcsoltunk a pentaciklusos vázrendszerhez.



7. ábra: A 2-hidroxi-3-azarutekarpin funkcionális átalakításai

Ausztrál kutatócsoport pK_s -predikciója vegyületünkre

Ausztrál és mexikói kutatók fejlesztettek ki a gyulladáscsökkentő oxikámok szerkezetére kvantumkémiai számításokon alapuló makroszkopikus és mikroszkopikus pK_s értékeket prediktáló módszert, amelyet öt oxikám mérési eredményei alapján validáltak. A piroxikám és a rutekarpin hibridmolekulájaként általunk előállított és publikált pentaciklus, a 14-hidroxi-12-azaindolopirido-1,2-benzotiazin 5,5-dioxid pK_s értékeinek meghatározására is végeztek számításokat. Az általuk közölt számított mikro-, és makroállandók láthatóak a 8. ábrán. Az állandók

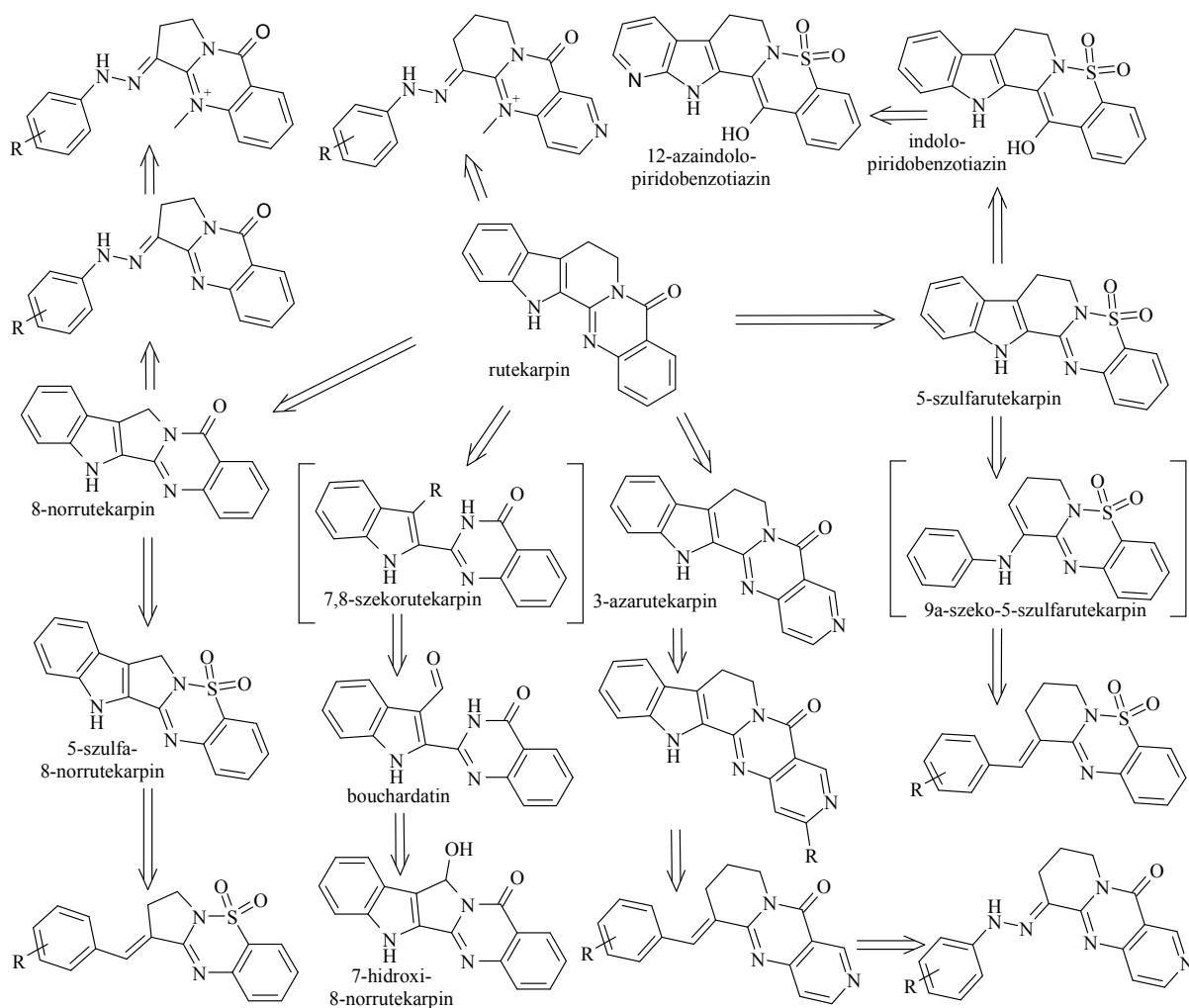


8. ábra: 14-hidroxi-12-azaindolopyrido-1,2-benzotiazin 5,5-dioxid (205) mikrospeciációs sémája, prediktált protonálódási mikro-, és makroállandói.

alapján elmondható, hogy az enolát-enol, majd piridin-piridinium a fő protonálódási útvonal, amely a semleges mikrorészecskén át vezet, tehát az ikerionos forma jelentősége elhanyagolható. A protonálható csoportok alapvető kémiai jellemzői alapján is ez az útvonal tűnik preferált-nak.

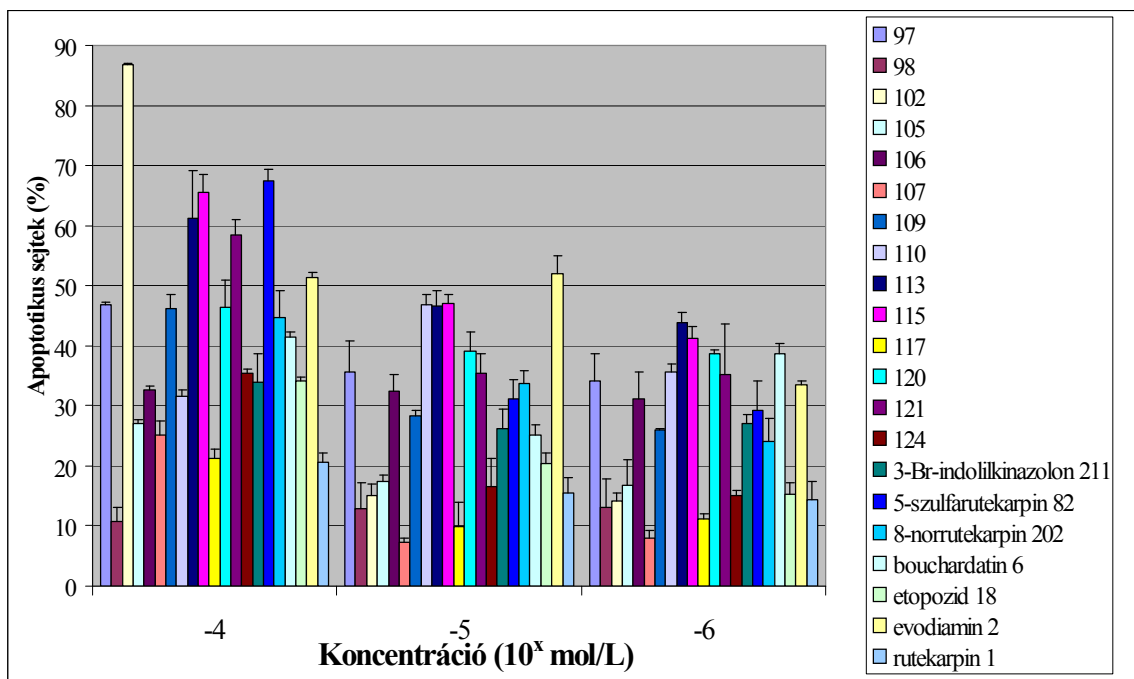
Összegzés

- A mackinazolinon és a dezoxivazicinon savamid-szulfonamid bioizoszter helyettesítésével előállítottunk két, az irodalomban eddig ismeretlen heterokondenzált triciklust (tetrahidropirido-benzotiadiazin, dihidropirrolo-benzotiadiazin).
- Alkaloidok szerkezetéből bioizoszter helyettesítésekkel öt új pentaciklusos vegyületet vezettünk le, megvalósítottuk szintézisüket, és előállítottuk néhány szubsztituált származékukat (5-szulfarutekarpin, 5-szulfa-8-norrutekarpin, 8-norrutekarpin, 7-hidroxi-8-norrutekarpin, indolo-piridobenzotiazin, 12-azaindolo-piridobenzotiazin).
- Két ismert pentaciklus szintézisére és szubsztituált származékaik előállítására alternatív utat fejlesztettünk ki (3-azarutekarpin és E-gyűrűn szubsztituált származékaik, luotonin A, luotonin B).
- Elsőként valósítottuk meg – két alternatív úton – egy természetes alkaloid, a bouchardatin totálszintézisét.
- Három triciklus szubsztituált aromás aldehidekkel kondenzált származékaiból 41 tagú vegyülettárat hoztunk létre.
- Négy triciklusból szubsztituált hidrazonszármazékok 62 tagú sorozatát állítottuk elő.
- Meghatároztuk a 2,3-polimetilén-benzotiadiazinok pK_s értékeit.



9. ábra Az előállított vegyületek bioszter származtatása rutekarpinból.
Hidrazonok, aldehidkondenzált triciklusok, pentaciklusok és a bouchardatin.

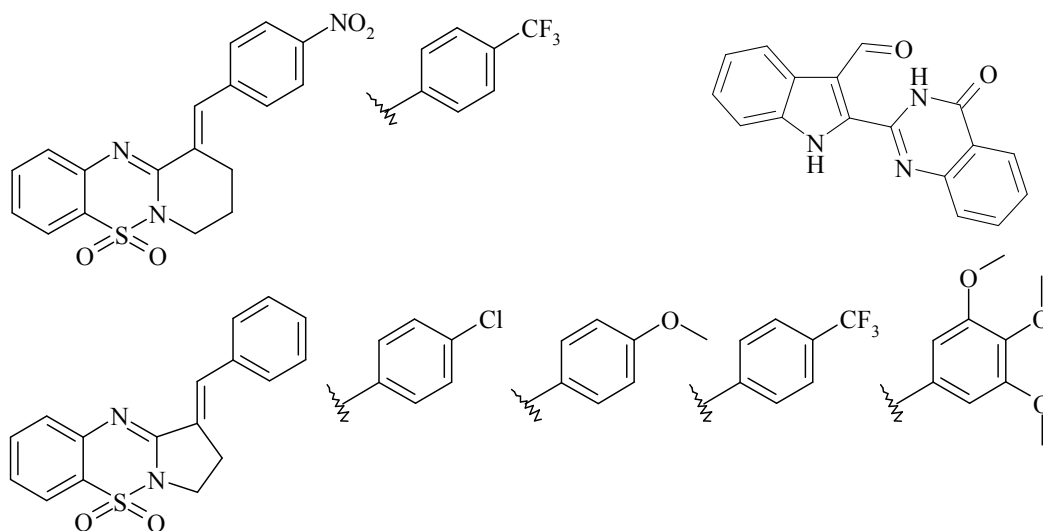
- Meghatároztuk a 2,3-polimetilén-benzotiadiazinok biciklusos prekursorainak oldószerfüggő konformációs átalakulásának sebességi állandóit.
- ^1H NMR technikával megmértük öt triciklusos vegyület aktív metilencsoportjának proton/deuteron cseresebességi állandóit.
- Meghatároztuk hét hidrazon-származék *Z/E* izomereinek oldószerfüggő arányát poláris és apoláris oldószerekben.
- Farmakológiai vizsgálataink során az általunk előállított 18 vegyülettel kezelt daganatsejtek életképességét, a vegyületeink apoptózis indukáló hatását HeLa méhnyakrák sejtvonalon, valamint a kaszpáz-3 enzim működését befolyásoló hatásukat vizsgáltuk *in vitro*. A HeLa sejtek életképességét az evodiamin hatásához hasonló mértékben öt vegyületünk gátolta, míg nyolc vegyületünk az evodiaminnal azonos nagyságrendben indukált apoptózist HeLa sejtvonalon. Az evodiamin többféle hatásmechanizmussal fejti ki rákellenes aktivitását (kaspáz-aktiválás, NF- κ B-reguláció, MAPK-gátlás, bcl/bax egyensúly befolyásolása, antioxidáns hatás). Kaspáz-3 aktivációt vizsgáló kísérletünk-



10. ábra: A vizsgált vegyületek proapoptotikus hatása HeLa sejtvonalon.

ben egyetlen vegyületünk sem mutatott szignifikáns hatást, így bizonyított, hogy ezek nem kaszpáz aktiválással fejtik ki citotoxikus hatásukat. A szintetizált vegyületek és az evodiamin szerkezeti összevetése arra utal, hogy az evodiaminban található redukált N-metil szerkezeti elem szükséges lehet e mechanizmus kiváltásához. A vizsgálatok során hatékony vegyületek alapszerkezetéből és szubsztituenseiből tudtunk a további fejlesztés irányaira is következtetéseket levonni.

Az előállított szubsztituált hidrazonszármazékok esetében kaszpáz-aktiváló hatás prediktálható Zhang és munkatársai eredményei alapján, ezért ezen anyagok szintén alkalmazhatók további farmakológiai screen-vizsgálatok elvégzésére, illetve az A-gyűrűn szubsztituált 8-norrutekarpin-, 13-N-metil-8-norrutekarpin-, 14-N-metilrutekarpin-, és 3-azarutekarpin-származékok előállítására.



11. ábra: HeLa sejtek nukleoszomális fragmentációját legalább 30 %-kal indukáló vegyületek.

Publikációs jegyzék

Az értekezés alapját képező publikációk

Közlemények

1. **Bubenyák, M.**; Pálfi, M.; Takács, M.; Béni, Sz.; Szökő, É.; Noszál, B.; Kökösi, J.
Synthesis of hybrids between the alkaloids rutaecarpine and luotonins A, B
Tetrahedron Lett. **2008**, *49*, 4937-4940.
IF: 2,538
Független idézetek: 4
2. **Bubenyák, M.**; Noszál, B.; Kóczyán, K.; Takács, M.; Béni, Sz.; Hermecz, I.; Kökösi, J.
Bioisosteric hybrids of two anti-inflammatory agents, rutaecarpine and piroxicam
Tetrahedron Lett. **2008**, *49*, 5711-5713.
IF: 2,538
Független idézetek: 1
3. **Bubenyák, M.**; Takács, M.; Blazics, B.; Rácz, Á.; Noszál, B.; Püski, L.; Kökösi, J.; Hermecz, I.
Synthesis of bioisosteric 5-sulfa-rutaecarpine derivatives
Arkivoc **2010**, *11*, 291-302.
IF: 1,090

Előadások, poszterek

1. **Bubenyák, M.**
Synthesis of pentacyclic alkaloid hybrid
Joint Meeting on Medicinal Chemistry (JMMC), Vienna, Austria (előadás)
2005. június 20-23.
2. **Bubenyák, M.**; Kökösi, J.; Noszál, B.
Synthesis of quinazolinocarboline alkaloid analogues
Joint Meeting on Medicinal Chemistry (JMMC), Portoroz, Szlovénia (poszter)
2007. június 17-21.
3. Szakács, Z.; Béni, Sz.; **Bubenyák, M.**; Kökösi, J.; Rácz, Á.; Noszál, B.
Protonation and dynamics in building blocks of benzothiadiazine analogues of anticancer alkaloids
SMASH Chamonix, Svájc (poszter)
2007. szeptember 15.
4. **Bubenyák, M.**; Kökösi, J.; Noszál, B.
Kinazolinokarbolin alkaloid analógok szintézise
Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIV., Budapest (poszter)
2009. november 15.

Az értekezéstől független publikációk

1. Takács, M.; **Bubenyák, M.**; Váradi, A.; Blazics, B.; Horváth, P.; Kökösi, J.
Synthesis of novel ceramide-like penetration enhancers
Tetrahedron Lett. **2011**, *52*, 1863-1865.
IF: 2,660

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom *Prof. Noszál Béla* dékán úrnak, témavezetőmnek, a *Gyógyszerészi Kémiai Intézet* igazgatójának, hogy intézetében végezhettem kutatásaimat, amelyekhez minden feltételt biztosított.

Dr. Kökösi József tudományos főmunkatársnak, hogy munkámat napi szinten segítette, felügyelte, koordinálta és hasznos tanácsaival támogatta.

A Gyógyszerészi Kémiai Intézet minden dolgozójának hasznos tanácsaikért, és gyakorlati segítségükért. *Dr. Rácz Ákosnak* és *Dr. Kiss Róbertnek* a munkámhoz nyújtott elméleti támogatásért, *Dr. Takács Máriának* és *Dr. Béni Szabolcsnak* az NMR vizsgálatokban, *Dr. Szakács Zoltánnak* és *Dr. Völgyi Gergelynek* a fizikokémiai vizsgálatokban, *Dr. Marosi Attilának* és *Pelhős Katalinnak* az UV vizsgálatokban nyújtott segítségükért.

Prof. Szökő Éva egyetemi tanárnak és *Dr. Pálfi Melindának*, a *Farmakológiai Intézet* munkatársainak a farmakológiai vizsgálatok elvégzéséért.

Dr. Hermeecz István akadémikusnak, a *Chinoin Gyógyszergyár* munkatársának az elem-
analízisek elvégzésének biztosításáért.

Dr. Blazics Balázsnak, a *Farmakognóziái Intézet* munkatársának az MS mérések elvégzéséért.

Győri Szilviának, *Lovász Virágnak*, *Sala Nicolásnak*, *Deme Mózesnek* a gyakorlati munkában nyújtott segítségükért.

Dr. Dredán Juditnak, *Dr. Bohus Eszternek*, *Ditzendy Orsolyának*, *Dr. Hosztafi Sándornak*, *Dr. Mazák Károlynak*, *Dr. Órfi Lászlónak* és *Solymos Dánielnek* dolgozatomhoz fűzött értékes észrevételeiért.

Végül szeretnék köszönetet mondani Szüleimnek a sok szeretetért, biztatásért és önzetlen segítségért, amit tőlük kaptam.