



2,3-Bisz(3-arylakrilamido)borostyánkősav származékok, mint lehetséges GP enzim inhibitorok szintézise

**Készítette:
Béke Ferenc
II. éves vegyész M.Sc. hallgató**

**Témavezető:
Dr. Juhász László
egyetemi adjunktus**

Debreceni Egyetem

2014

Tartalom

1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. Cukorbetegség és típusai	5
2.2. Glükóz anyagcséréje.....	7
2.3. Glikogén foszforiláz enzim.....	8
2.4. Glikogén foszforiláz inhibitorok.....	9
3. Célkitűzés	11
3.1. Célvegyületek retroszintetikus analízise	12
4. Saját kísérleti munka	15
4.1. Kísérleti rész.....	23
5. Összefoglalás	32
6. Irodalom.....	34

Köszönetnyilvánítás

Köszönetem fejezem ki témavezetőmnek, **Dr. Juhász László** egyetemi adjunktusnak, aki bevezetett a szerves kémiai kutatómunkába, munkámat irányította, és értékes útmutatásaival, szakmai tapasztalatával segített a munkám során tapasztalt problémák megoldásában, valamint e dolgozat összeállításában.

Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Patonay Tamás** tanszékvezető egyetemi tanárnak, aki lehetővé tette, hogy tudományos diákköri munkámat a Debreceni Egyetem Szerves Kémia Tanszékén folytathassam.

Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Somsák László** egyetemi tanárnak, amiért lehetővé tette, hogy kutatómunkámat a Gliko-biokémiai kutatócsoportjában végezhessem.

Köszönetem fejezem ki *Szennyes Eszter*, *Kaszás Tímea* és *Szabó Erzsébet Katalin* PhD hallgatóknak, akik a munkában nyújtott mindennapi segítségük mellett biztattak ezen dolgozat elkészítésére.

Köszönetet mondok a laboratórium dolgozóinak és hallgatóinak, hogy a munkához szükséges feltételek megteremtésén túl jó kedélyükkel is támogattak.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni a családomnak, és a barátaimnak az elmúlt időszakban nyújtott támogatást.

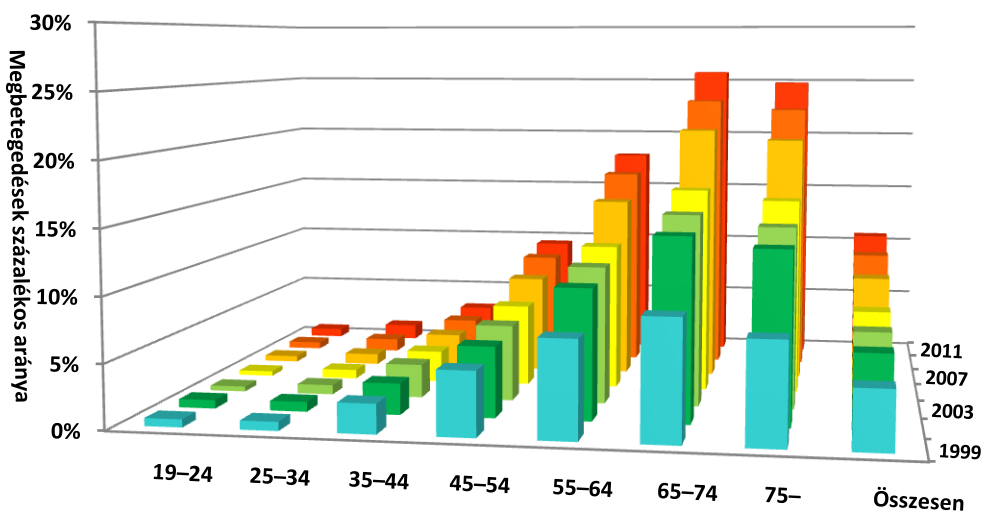
1. Bevezetés

A cukorbetegség napjaink egyik legsúlyosabb egészségügyi problémája, melyben a fejlett nyugati társadalmak lakosságának 6-10%-a szenved.¹ Treadway és munkatársai által 2001-ben közölt epidemiológiai előrejelzés alapján 2025-re a betegségben szenvedők számát 300 millió főre becsülték,² azonban számításaik túl óvatosnak bizonyultak, mivel az International Diabetes Federation (IDF) 2013-as felmérése alapján a betegek száma meghaladta a 381 millió főt, és a szervezet becslései szerint 2035-re 592 millió főre nőhet (**1. táblázat**).³

IDF régió	2013 (millió fő)	2035 (millió fő)	Növekedés (%)
Afrika	19,8	41,4	109
Közel-Kelet és Észak-Afrika	34,6	67,9	96
Délkelet-Ázsia	72,1	123	71
Dél- és Közép-Amerika	24,1	38,5	60
Távol-Kelet és Nyugat-Óceánia	138,2	201,8	46
Észak-Amerika és Karib-térség	36,7	50,4	37
Európa és FÁK	56,3	68,9	22
Világ	381,8	591,9	55

1. táblázat: Diabetes mellitusban szenvedők száma

Hazánkban is hasonló tendencia figyelhető meg, mivel 1999-ben a felnőtt lakosság 4,6%-nál diagnosztizálták a betegséget, addig 2011-ben ez az arány már 10,7%-ra emelkedett, így a betegek száma meghaladta a 865 ezer főt (**1. ábra**).⁴ Az érintett korosztályok mindegyikében nőtt a megbetegedés aránya, de jellemzően a 45 év feletti korosztályt sújtja, valamint esetükben tapasztalható a legnagyobb növekedés. Meg kell jegyeznünk, hogy a 25-34 év közötti korcsoport esetében is jelentős a növekedés, közel kétszeresére nőtt 12 év alatt a betegek aránya.



1. ábra: Magyarországon regisztrált cukorbeteg aránya korcsoportonként

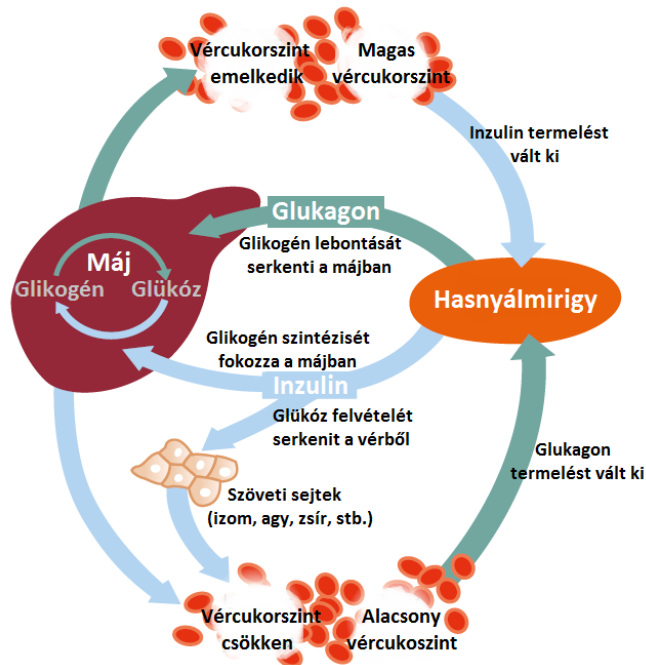
A betegség hosszútávon súlyos szövődményeket okoz (látászervi, idegrendszeri és veseműködési zavarok, valamint kiemelten a szív- és érrendszeri megbetegedések), amelyek által közvetetten az egyik leggyakoribb halálórá válik. 2013-ban világszerte mintegy 5,1 millió haláleset hozható összefüggésbe a cukorbetegséggel, addig Magyarországon ugyanebben az évben több mint 7500 elhalálozást jegyeztek fel.³

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Cukorbetegség és típusai

A cukorbetegség a glükóz anyagcsere krónikus zavarát jelenti. Szervezetünk energiaháztartásában e vegyület központi szerepet játszik és szoros összefüggésben áll a fehérje és a lipid anyagcserével, így a glükóz anyagcsere zavara kihat a fent említett két vegyülettípus anyagcseréjére is.

A vércukorszint szabályozása a glükóz és a glikogén metabolizmus kölcsönhatásával történik, mely folyamatokat a hasnyálmirigyben termelődő hormonok (inzulin, glukagon és szomatosztatin) szabályozzák. Az inzulin a glikogén szintézisét, a glukagon pedig ennek lebontását serkenti (2. ábra). Ha e hormonok termelődése és/vagy velük szembeni érzékenység csökken, akkor a vércukorszint kórosan megváltozik – megemelkedik – így cukorbetegség alakul ki.⁵



2. ábra: Inszulin és glukagon szerepe a vércukorszint szabályozásban

A cukorbetegséget két fő típusra oszthatjuk aszerint, hogy a szervezet termel inzulint vagy nem. Ez alapján megkülönböztetünk inzulinfüggő – vagy I. típusú – és nem inzulinfüggő – azaz II. típusú – *diabetes mellitust*.

Az inzulinfüggő diabetest (Insulin Dependent Diabetes Mellitus – IDDM) a csökkent inzulintermelés vagy akár az inzulin termelés teljes hiánya jellemzi, ez a kórállapot leggyakrabban gyermek- és fiatalkorban alakul ki. Ezzel szemben a II. típusú cukorbetegség (Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus – NIDDM) jellemzője a rendellenes inzulinszekréció és/vagy az inzulinrezisztancia, mely többnyire felnőttkorban (40 év felett) alakul ki, azonban napjainkban fiatal kori előfordulása is egyre gyakoribb. A cukorbetegségben szenvedők több mint 90%-a az utóbbi, II. típusú diabetes mellitusban szenved.⁶

A cukorbetegség kialakulásának pontos biokémiai háttere mai napig felderítetlen, ezáltal gyógyítására sincs mód. Tüneti kezelés során az emelkedett vércukorszintet próbálják csökkenteni, valamint normál homeosztatikus tartományban stabilizálni különböző hatóanyagokkal. A forgalomban lévő vércukorszint csökkentő készítmények számos nem kívánatos mellékhatásán felül azonban a legnagyobb problémát az jelenti, hogy a betegek mintegy 40%-nak esetében hatástalannak bizonyultak.⁷ Mindezek következményeként a nagy

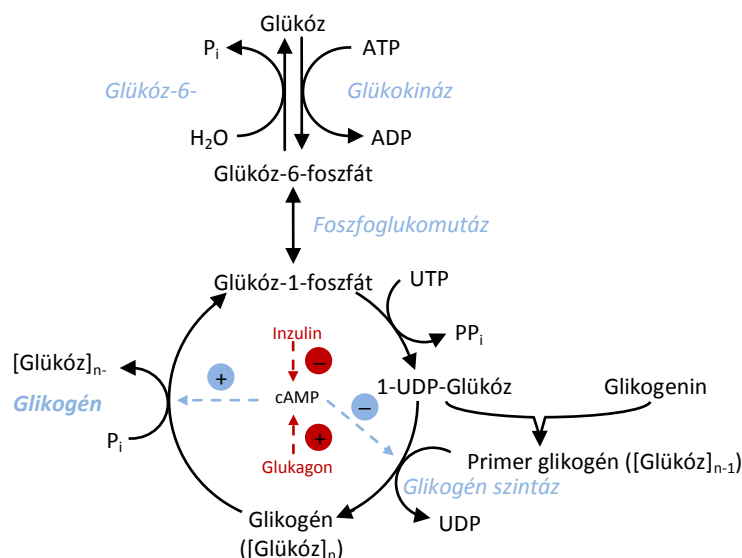
hatékonyságú és célzott hatásmechanizmusú antihyperglükémiás vegyületek fejlesztése a gyógyszerfejlesztés egyik legjelentősebb kihívása.

A terápiás célpontok közül egy lehetőséget jelent a máj glükóz termelésének szabályozása, mely folyamat sebesség meghatározó lépését a glikogén foszforiláz (GP) enzim katalizálja. Az enzim szelektív gátlásával lehetőség nyílik a máj glükóz termelésének visszaszorítására, ezáltal a vércukorszint csökkentésére.^{2,8,9}

2.2. Glükóz anyagcseréje

Szervezetünk meghatározó energiaforrása a glükóz, amelynek kémiai energiáját lipidek és glikogén formájában képes raktározni. A glikogén a máj, a vázizom és az agy szöveteiben megtalálható poliszacharid, amelyből közvetlenül glükóz szabadítható fel, így a lipideknél gyorsabban mozgósítható energiaraktárt képvisel. Ennek ellenére energia kisebb hányada raktározódik glikogén formájában, mivel kis energiasűrűsége miatt nagy helyszükséglettel rendelkezik.¹⁰

A glikogén szintézise során a megfelelő glükóz-gradiens fenntartására a sejtekben a glükóz foszforilálódik, először glükóz-6-foszfát képződik, melyből a foszoglukomutáz enzim



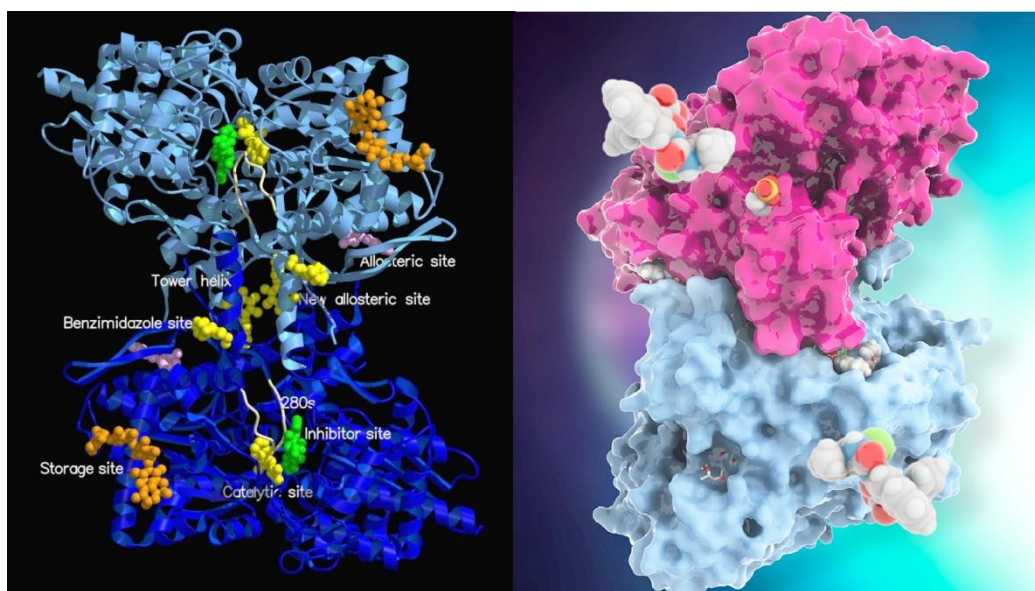
3. ábra: Glikogén szintézis és lebontása

hatására glükóz-1-foszfáttá alakul. A glikogén szintézis prekursora az aktivált glükóz, az 1-UDP-glükóz, amely uridin-trifoszfátból és glükóz-1-foszfátból keletkezik. A glikogén szintáz enzim az 1-UDP-glükózt egy legalább négy glükóz egységet tartalmazó oligomerhez tudja kapcsolni, melyet a lánc kezdetén a glikogenin fehérje biztosít. A lánc elágazásait a glikogén-1,6-transzferáz enzim hozza létre (**3. ábra**).¹⁰

Ezzel ellentétes folyamat a glikogén lebontása, amely első lépésében a glikogén foszforiláz enzim a glikogénlánc 1,4-glikozidos kötéseit képes foszforilitikusan hasítani, anorganikus foszfát jelenlétében. A képződő termék a glükóz-1-foszfát és az egy glükóz egységgel rövidebb glikogén lánc. A lebontás során keletkező glükóz-1-foszfátot a foszfoglukomutáz enzim glükóz-6-foszfáttá alakítja, amely a májban a glükóz-6-foszfátáz hatására glükózzá hidrolizál és a véráramba kerül.¹⁰

2.3. Glikogén foszforiláz enzim

Az emlős szervezetekben a GP enzim három formában található meg (izoenzimek), melyeket az izolálásuk szervéből fakadóan „izom”, „agy” és „máj” glikogén foszforiláz enzimnek nevezünk. Mindhárom izoenzim két azonos alegységből áll, mely alegységek molekulatömege 97500 Da.⁸

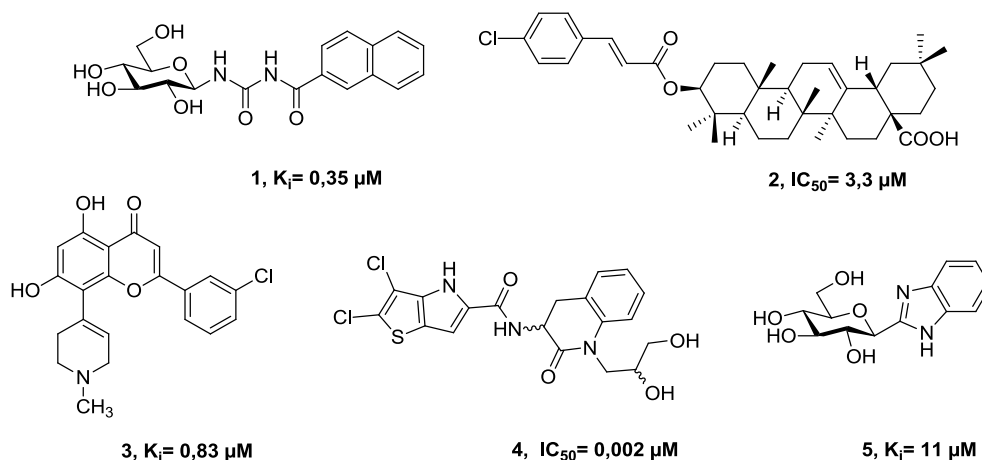


4. ábra: A GP enzim szerkezetének szalag és van der Waals felszíni modellje

A biológiai vizsgálatok során leggyakrabban a nyúl vázizomból kinyerhető enzimet használják, mivel ezen enzim aktív centruma azonos a humán máj GP enzim aktív centrumával (4. ábra). A fehérje röntgenkristallográfiás vizsgálatok során hat kötőhelyet azonosítottak az enzim szerkezetében (katalitikus, allosztérikus, glikogén, inhibitor, új allosztérikus és benzimidazol kötőhely), melyekhez kis molekulatömegű szerves vegyületeket kapcsolva lehetőség van az enzim működésének szabályozására.¹¹

2.4. Glikogén foszforiláz inhibitorok

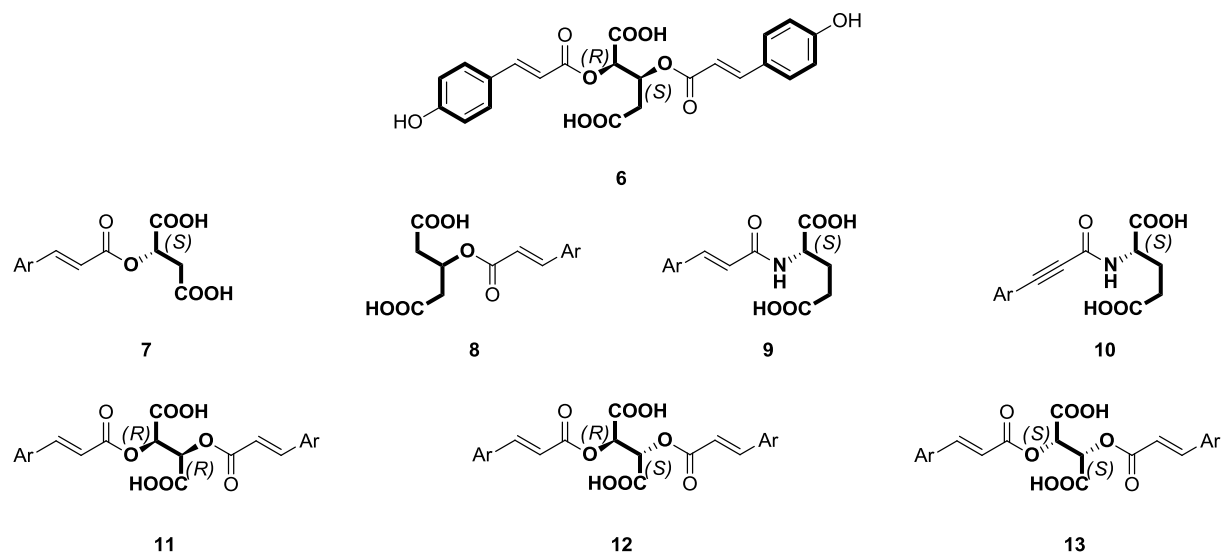
Az elmúlt 20 évben nemzetközi és hazai kutatók nagy számban szintetizáltak olyan vegyületeket, melyek a GP enzim hatásos inhibitorainak bizonyultak.^{12,13} Ezek közül kötőhelyenként egy-egy nagy inhibitor állandóval rendelkező vegyületet emelnék ki (5. ábra). A katalitikus kötőhely nagy aktivitású inhibitorai a N-β-D-glükopiranozil-N'-acil-karbamidok (1), az allosztérikus kötőhelyhez változatos szerkezetű molekulák, például pentaciklusos triterpenoid típusú vegyületek (2) kapcsolódnak nagy affinitással. Inhibitor kötőhelyhez kapcsolódva a flavopiridol típusú vegyületek (3), míg az új allosztérikus kötőhelyen a tienopirrolvázis származékok (4) mutatnak jó gátló hatást. Az eddig vizsgálatok során csak az 5 glükóz származék kapcsolódását tapasztalták a benzimidazol kötőhelyen.^{11,12,13}



5. ábra: A GP enzim különböző kötőhelyeihez kapcsolódó inhibitorok

Furukawa és munkatársai 2005-ben számoltak be a No. 138354 jelű gombatörzs által termelt FR258900 kódjelű vegyületről (6, 6. ábra),^{14,15} amely *in vitro* és *in vivo* körülmények között is a glikogén foszforiláz enzim inhibitora ($\text{IC}_{50} = 2.5 \mu\text{M}$; HLGPa¹⁴ $K_i = 0.46 \mu\text{M}$;

RMGPb¹⁶). A GP enzimmel képzett komplex röntgendiffrakciós vizsgálata azt mutatta, hogy a vegyület az enzim allosztérikus kötőhelyéhez kapcsolódik.¹⁶ Ezen vegyület szerkezet-hatás összefüggéseinek megértésére kutatócsoportunkban számos analóg származékot állítottak elő.^{17,18} E vegyületek részletes szerkezet-hatás összefüggés vizsgálata alapján megállapítható, hogy az inhibitor aktivitást jelentősen befolyásolja a származékokban található acil funkciók száma, az acil funkciók aromás gyűrűin lévő szubsztituensek jellege, száma és pozíciója, valamint az alapváz sztereogén centrumainak konfigurációja (**2. táblázat**).^{17,18} Az enzimkinetikai mérések alapján az egy acil funkciót tartalmazó származékok (**7 - 10**) esetében igen kis mértékű aktivitás vagy az aktivitás teljes hiánya valósul meg.



6. ábra: Az FR258900 vegyület és az előállított analógjainak szerkezete

Aril	#	7	8	9	10	11	12	13
	a	<i>n.i.</i>	<i>n.i.</i>	<i>n.i.</i>	<i>n.i.</i>	<i>n.i.</i>	-	800
	b	<i>n.i.</i>	630	<i>n.i.</i>	-	300	71,4	109
	c	1000	-	<i>n.i.</i>	<i>n.i.</i>	28,5	3,36	29,1

2. táblázat: FR258900 analógok inhibitor állandói GP enzimmel szemben (K_i , [μM])

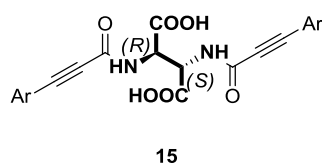
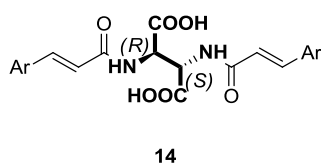
Egyértelmű összefüggést nem tudtak megállapítani arra vonatkozóan, hogy milyen hatást gyakorol az aktivitásra az észter funkció helyettesítése amid funkcióval, illetve az acil funkcióban a kettőskötés helyettesítése hármaskötéssel. A két acil funkciót tartalmazó származékok (**11, 12**

és **13**) esetében az acil funkció aromás gyűrűinek szubsztituáltsága nagymértékben befolyásolja az aktivitást. Mindhárom sztereoizomer esetében azonos hatás érvényesül, a szubsztituálatlan fenil-, a 4-hidroxi- és végül a 4-hidroxi-3-metoxi szubsztituált fenil származékok sorrendjében nő az aktivitás. Ez a hatás magyarázható az aromás mag növekvő elektronsűrűségével – amely növeli a π - π kölcsönhatások erősségét – valamint a poláros funkciós csoportok jelenléte miatt kialakuló H-kötések tovább fokozzák az enzim-inhibitor komplex stabilitását. Nem meglepő módon azt tapasztalták, hogy az azonos acil funkciókat tartalmazó, de különböző térszerkezetű borkősav származékok aktivitása jelentősen eltér, azonban annál meglepőbb felismerés volt, hogy rendre a legnagyobb aktivitással az összességében akirális, *mezo* térszerkezetű izomer (**13a, b, c**) rendelkezik.^{18,19}

3. Célkitűzés

Az eddigi munkánk során feltártuk az aromás gyűrű szubsztitúciójának és az acil csoportok számának hatását a vegyületek GP enzimmel szemben mutatott gátlására, azonban az észter – amid cserét nem tudtuk tanulmányozni, mivel az egy acil csoportot tartalmazó vegyületeink nem mutattak enzimgátló aktivitást. Így célul tűztük ki olyan analogonok szintézisét (**14, 15**), melyekben a borkősav molekula hidroxil csoportjai helyett amino csoportok találhatóak. (7. ábra) Kóňa és munkatársai a GP enzim allosztérikus inhibitoraira kidolgoztak egy kvantitatív 3D szerkezet-hatás összefüggés (3D QSAR) modellt, amely igen jó közelítéssel jósolja meg **6** analóg vegyületek inhibitor állandóját. Ezen modell alapján a **14-15** analógokra jósolt inhibitor állandók rendre nagyobbak, tehát kisebb aktivitással rendelkeznek, mint a **11-13** származékok.¹⁹

(3. táblázat)



Aril	#	14	15
	a	491	901
	b	67	403

7. ábra: Célvegyületek szerkezete

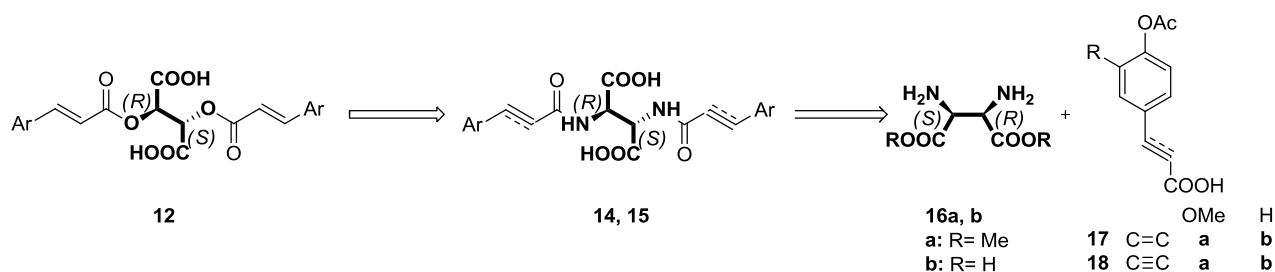
3. táblázat: Számolt inhibitor állandók (K_i , [μ M])

Mivel a modell tanítókészletében a **7-13** származékok, és nem diamid típusú vegyületek szerepelnek, így a jósolt értékek pontossága bizonytalan. Ezért a vegyületek szintézisével és enzimkinetikai vizsgálatával pontosabban fényt deríthetünk a hidrolitikusan stabilabb amid

csoport enzimgátlásra gyakorolt hatására, valamint a kidolgozott 3D QSAR modell alkalmazhatóságára.

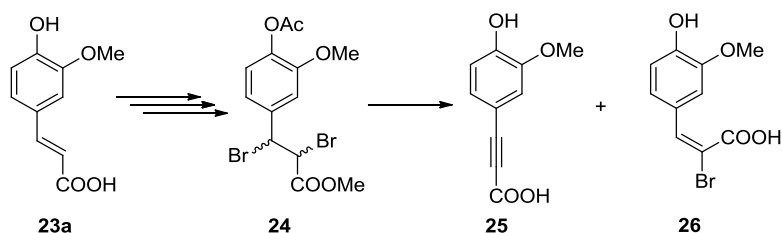
3.1. Célvegyületek retroszintetikus analízise

A kívánt vegyületek előállítására legkézenfekvőbb átalakítás a megfelelő diaminok (**16a, b**) acilezése karbonsavakkal, melyek az aril gyűrű szubsztituenseitől és az oldallánc telítettségétől függően szubsztituált fahéj- (**17a, b**), illetve fenil-propinsav (**18a, b**) származékok lehetnek (**8. ábra**).



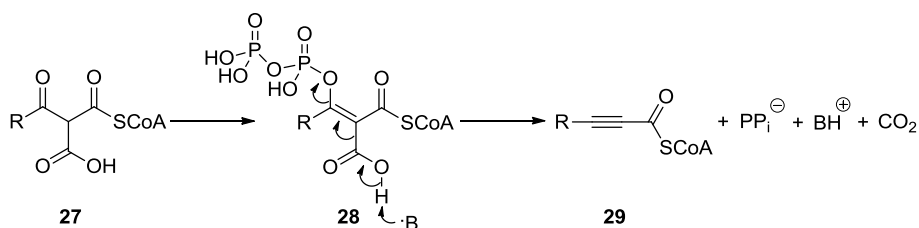
8. ábra: Diamidok retroszintetikus analízise

Ezen retroszintetikus analízis alapján a célvegyületeink előállításához 1,4-dimetil-2,3-diamino-butándioátra (**16a**) vagy 2,3-diamino-bután-1,4-disavra (**16b**) van szükségünk. Mivel e vegyületek hozzáférése erősen korlátozott, ezért előállításukat fumársavból (**22b**) kiindulva elsősorban az 1,4-dimetil-2,3-dibróm-butándioát (**21a**) intermediereken keresztül kívántuk megvalósítani (**9. ábra**).



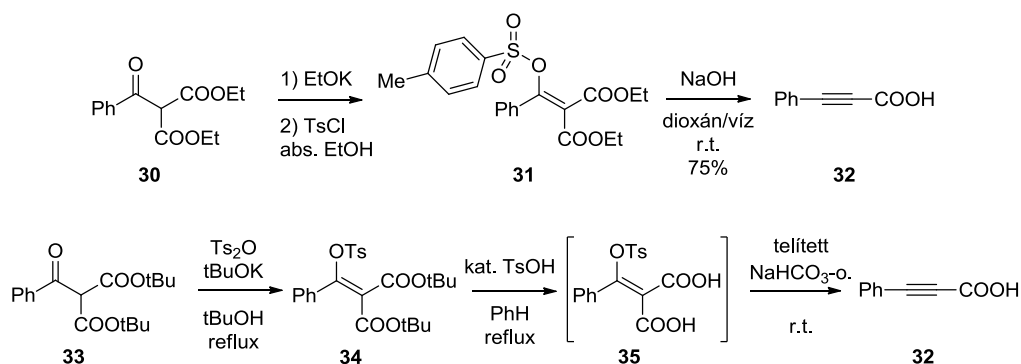
11. ábra: Szubsztituált fenil-propinsavak előállításának nehézségei

Ezen problémák elkerülésére más szintézis utakat kerestünk, amelyek közül egy igen enyhe körülményeket alkalmazó reakciósort találtunk. Fleming és munkatársai az acetilén kötés bioszintézisének mechanizmusát tanulmányozták és kémiai szintézissel 1963-ban igazolták Wakil és Ganguly által felvetett mechanizmust.²² Az elmélet szerint acilmalonátokból (**27**) kiindulva, enol-pirofoszfát intermedieren (**28**) keresztül keletkezik a hármaskötés (**29**) dekarboxilatív eliminációval. (**12. ábra**) A folyamat hajtóereje az entrópia nagymértékű növekedése, mivel egy kiindulási vegyületből három termék molekula keletkezik.



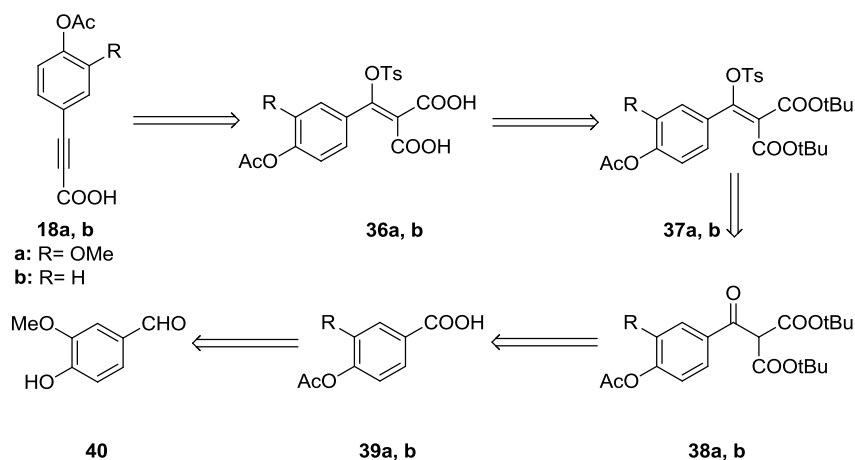
12. ábra: Acetilén kötés bioszintézise acilmalonátokból

Ennek igazolására kémiai szintézist dolgoztak ki, mely során dietil-benzoil-malonátból (**31**) tozil-kloriddal képezték az enol-szulfonát intermediert (**32**), majd ezt szobahőmérsékleten lúgos hidrolízisnek alávetve jó termeléssel nyerték a fenil-propinsavat (**33**).²² Később az átalakítást szintetikusán is alkalmazható módszerré fejlesztették (**13. ábra**).^{23,24}



13. ábra: Fleming által kifejlesztett propinsav szintézis

A biztató eredmények ismeretében a szubsztituált fenil-propinsavakat (**18a, b**) az alábbi retroszintetikus útvonalon kívántuk előállítani (**14. ábra**).

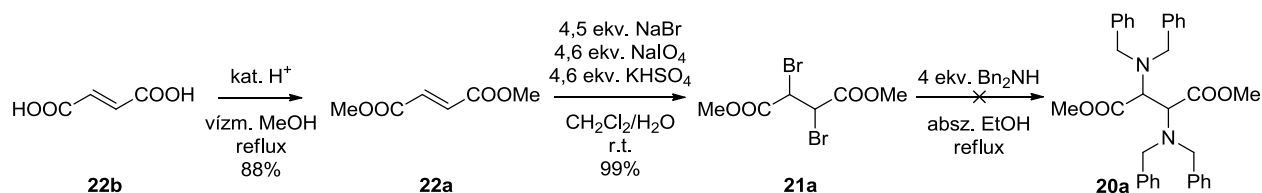


14. ábra: Szubsztituált fenil-propinsavak retroszintetikus útvonala

4. Saját kísérleti munka

A célvegyületek alapvázának előállítását a **15. ábrán** látható úton kezdtük meg. Első lépésben a fumársav karboxil csoportjait metil-észter formában védtük le. A savkatalizált észteresítési reakció jó hozammal szolgáltatotta a kívánt dimetil-fumarátot (**22a**). A kettőskötésre történő bróm addíciót elemi brómmal próbáltuk megvalósítani diklórmetánban, illetve jégecetben, azonban a nagy brómfelesleg ellenére is lassú reakciót és alacsony konverziót tapasztaltunk. Mindez magyarázható az elektron hiányos alkén csökkent reaktivitásával. Némi irodalomkutatás követően Komakia és munkatársai által alkalmazott brómozási körülményekre

esett választásunk.²⁵ Ezzel a módszerrel a kívánt dibrom származékot (**21a**) kitűnő hozamban izoláltuk.



15. ábra: Alapváz sikertelen előállítási útvonala

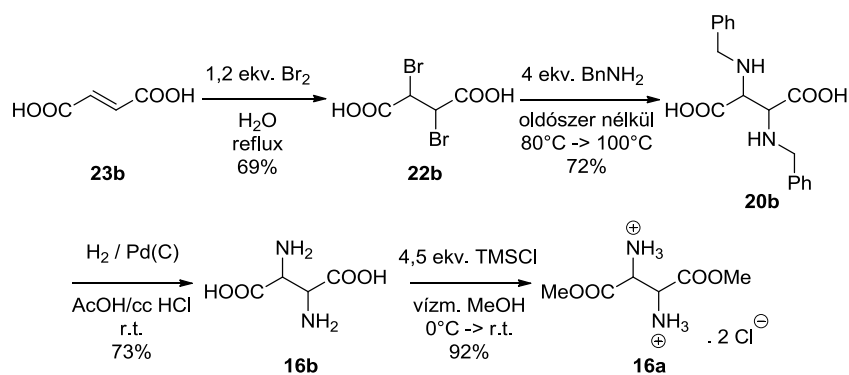
A **21a** vegyületet diaminálási reakcióját dibenzil-aminnal (Bn_2NH) próbáltuk, mivel Kasina és munkatársai²⁶ hasonló szerkezetű vegyületek előállításához sikeresen alkalmazta a reagenst, azonban esetünkben a kívánt átalakítást nem sikerült elérni, komplex reakció elegyet kaptunk, melyet kromatográfiásan nem tudtunk komponenseire szétválogatni.

További irodalomkutatás során rátaláltunk a kívánt alapváz szintézisére,²⁷⁻²⁹ amely meglepő módon védetlen karboxil csoportok jelenlétében kivitelezzi az átalakításokat (**16. ábra**). Első lépésben erőteljes körülmények között reagáltattuk a fumársav (**22b**) vizes szuszpenzióját elemi bróm feleslegével. Konverzió szempontjából lényeges a reakció homogenitását és a bróm feleslegét fenntartani, ami ilyen tömény, az átalakulás előrehaladtával kristályosodó reakcióelegy esetén nehezen kivitelezhető, azonban az indokoltnál nagyobb mennyiségű oldószer alkalmazása jelentősen rontja a reakció hozamát.

Az irodalmi kitermeléshez közelítő, közepes hozamban nyertük a **21b** dibromidot, melyet további tisztítás nélkül használtunk fel a következő lépésben. Amino funkció bevitelére benzil-amin (BnNH_2) reagens feleslegét alkalmaztuk oldószer nélkül, ez esetben is igen tömény reakcióelegyet kaptunk, melynek feldolgozása után jó hozammal izoláltuk a megfelelő **19b** dibenzilamino származékot. A benzil védőcsoportok hidrogenolitikus hasítását erőteljesen savas közegben hajtottuk végre, palládium-csontszén katalizátor jelenlétében atmoszférikus nyomáson. Ezen hidrogénezési reakció lassan játszódott le (több nap), továbbá vékonyréteg kromatográfiás követése is problémát jelentett, mivel a termék több funkciós csoportján protonálható, illetve deprotonálható, így nem egységes foltként jelent meg, azonban a reakció végeztével a **16b** aminosavat jó hozammal izoláltuk.

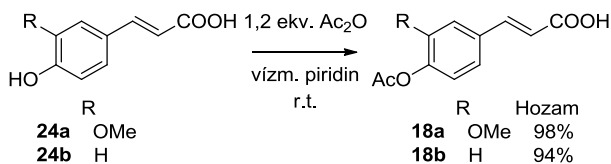
Későbbiekben szükségünk volt a **16a** védett aminosav előállítására is, amit vízmentes metanolban feleslegben vett trimetil-szilil-kloriddal (TMSCl) jelenlétében állítottunk elő.

Ez esetben sem volt egyértelmű a reakció előrehaladása, egy éjszakán át kevertetve fehér csapadék vált ki, és vékonyréteg kromatográfiásan szintén többkomponensűnek láttuk a reakcióelegyet. További nagy mennyiségű reagens hozzáadásával több nap után sem változott a reakcióelegy összetétele, végül a reakció egy részletének NMR vizsgálatával felismertük, hogy a reakció lejátszódott és egységesen a várt termék képződött. Feldolgozás után kiváló hozammal nyertük a **16a** védett származék dihidrokloridját (**16. ábra**).



16. ábra: Alapváz előállítási útvonala

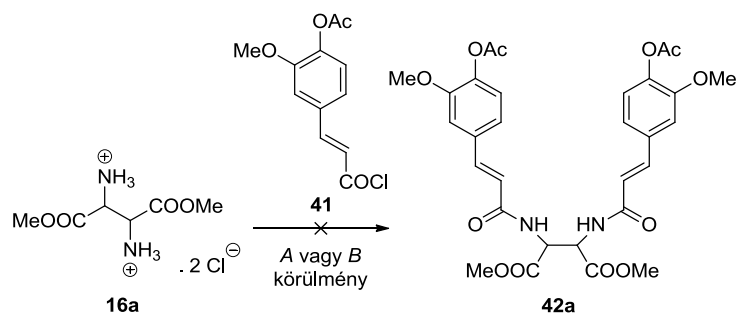
Az amidkötés kialakítása előtt szükséges volt a szabad fenolos hidroxilcsoporttal rendelkező fahéjsav származékok védelme. Védőcsoportként az acetil funkciót választottuk, mivel könnyen felvihető védőcsoport és szelektíven hasítható az amid funkció jelenlétében. A ferulesav (**23a**) és *para*-kumarinsav (**23b**) acetilezését feleslegben vett ecetsavanhidriddel, vízmentes piridinben szobahőmérsékleten hajtottuk végre. Az acetilezett karbonsavakat (**17a, b**) kiváló hozamokkal izoláltuk (**17. ábra**).



17. ábra: Fahéjsav származékok fenolos hidroxil csoportjainak védelme

A megfelelő amidok előállítását először Schotten-Baumann körülmények között kívántuk végrehajtani. (**18. ábra**) Az acilezési reakcióhoz előbb az **17a** karbonsavat alakítottuk át

megfelelő savkloriddá (**41**), tionil-klorid feleslegében történő forralással. Nagy feleslegben alkalmaztuk az acilezőszert tekintve, hogy az ilyen típusú savkloridok hidrolitikus stabilitása kisebb, mint a megfelelő aroil-kloridoké, azonban a reagens nagy feleslegének ellenére sem tapasztaltuk a kívánt diamid (**42**) képződését.



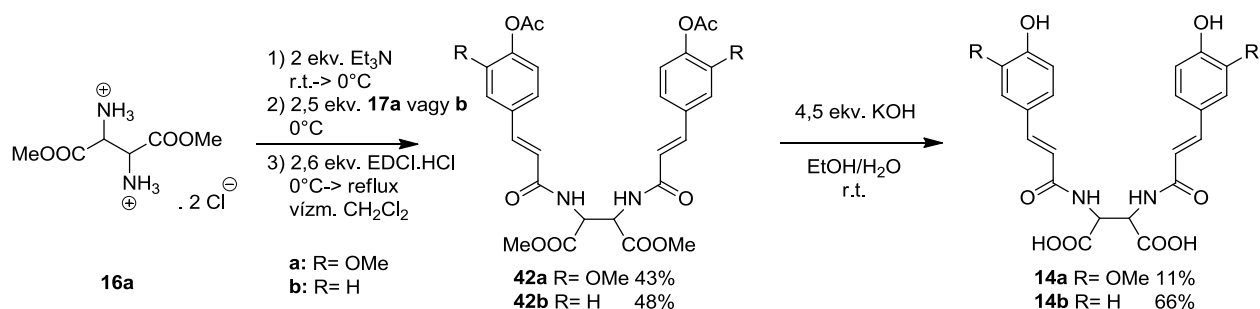
18. ábra: Sikertelen acilezési kísérletek

A: 6 ekv. **41**, PhMe/NaHCO₃, 0°C->r.t.

B: 2,5 ekv. **41**, 5mol% DMAP, 5 ekv. Et₃N, vízm. CH₂Cl₂, 0°C->r.t.

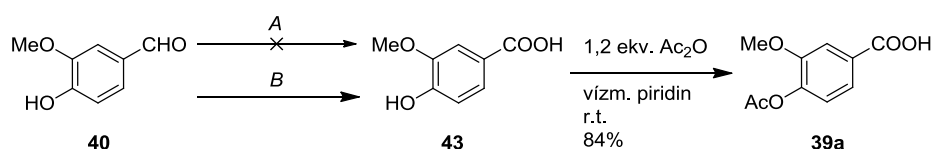
Korábbi munkánk¹⁸ során dimetil-glutamát *N*-acilezését sikeresen kiviteleztek savkloridokkal. Ekkor az acilezés szintén feleslegben vett savkloriddal történt - bár ez az A körülményektől jóval kisebb felesleget jelentett – vízmentes diklór-metánban, 4-dimetilamino-piridin (DMAP) katalizátor jelenlétében. Megismételve a reakciót e körülmények között sem tapasztaltuk a megfelelő **42a** diamid képződését (**18. ábra**).

Az irodalomban hasonló szerkezeti egységet tartalmazó vegyületek előállításáról Charvat és munkatársai számoltak be.³⁰ Közleményükben diamin-dihidrokloridokat acileztek benzoe- és fahéjsav származékokkal, karbonsav aktiválószerként [1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)-karbodiimid]-hidroklorid (EDCI.HCl) reagenst alkalmaztak, a kívánt diamidokat pedig közepes hozamban izolálták. Követve ezt a módszert, a kívánt termékeket (**42a, b**) oszlopkromatográfiás tisztítás után közepes hozammal izoláltuk. (**19. ábra**) A célvegyületek (**14a, b**) a védett származékok kálium-hidroxidos elszappanosításával nyertük gyenge és közepes hozamban. Reakcióelegyek feldolgozása után oszlopkromatográfiás tisztítás helyett vízből történő átkristályosítás mellett döntünk, ezzel indokolható az alacsony kihozatal.



19. ábra: Diamidok előállítása és védőcsoportjaik eltávolítása

Az oldalláncban hármaskötést tartalmazó amidok (**15a**, **b**) szintéziséhez szükséges propionsavakat (**18a**, **b**) az irodalmban ismert módszerek szerint kívántuk előállítani. A **15a** származék előállítását vanillinból (**40**) kiindulva vanillinsavon (**43**) keresztül kíséreltük meg előállítani. Minkyung és munkatársai által alkalmazott körülmények között³¹ (**20. ábra**) végezve a reakciót, többszöri próbálkozás után sem sikerült a várt terméket (**43**) tiszta formában izolálnunk, szemben a klasszikus körülményeket alkalmazó módszerrel,³² mikor is kiváló hozamban izoláltuk a vanillinsavat.

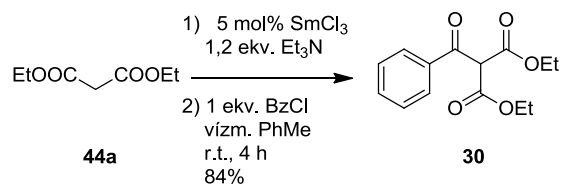


20. ábra: Védett vanillinsav előállítása

A: 2,5 mol% Pd(C) , 10 mol% NaBH_4 , 3 ekv. KOH , $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$, r.t., levegő, Ø
 B: $\text{AgOH}/\text{Ag}_2\text{O}$, NaOH , 65°C , 92%

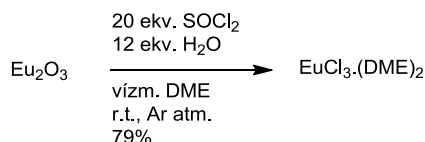
Következő lépésben a vanillinsav (**43**) fenolos hidroxil csoportját acetileztük vízmentes piridinben, ecetsavanhidrid feleslegével, így a védett vanillinsavat (**39a**) kiváló hozamban nyertük, amit további tisztítás nélkül használtunk fel a célvegyületünk előállításához.

A szintézis következő lépését Zhou és munkatársai alkalmazott módszerrel próbáltuk meg kivitelezni,³³ akik sikeresen alkalmaztak lantanoida-sókat katalizátorként β -dikarbonil típusú vegyületek C-acilezésére. Tapasztalataik szerint erre a célra legmegfelelőbb a vízmentes szamárium-triklorid volt (**21. ábra**).



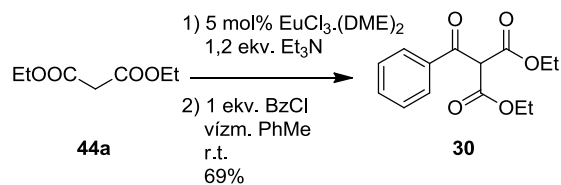
21. ábra: Dietil-malonát C-acilezése Zhou módszerével

Vízmentes szamárium-klorid nem állt rendelkezésünkre, de mivel ismeretes, hogy a lantanoida(III)-ionok stabilis β -diketonáto komplexeket képeznek, és a komplexek stabilitása nő – a periódus adott tartományán belül – a lantanoida(III)-ionok méretével, ezért más lantanoida-ionok is felhasználhatóak. A szamárium periódusbeli közvetlen szomszédja az európium, így európium(III)-klorid alkalmazásával kíséreltük meg az átalakítást. A vízmentes európium(III)-kloridot a megfelelő oxidból Dell'Amico és munkatársai által leírt módszert követve állítottuk elő,³⁴ mely az irodalmi adatoknak teljes reprodukálhatóságát mutatta. (**22. ábra**).



22. ábra: Vízmentes európium(III)-klorid előállítása

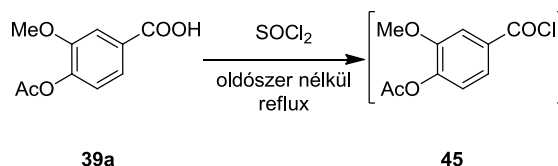
Az így előállított vízmentes sóban egy európium(III)-ionhoz két dimetoxi-etán ligandum koordinálódik, mely só alkalmazásával a Zhou által ismertett körülmények között jó hozamban kaptuk a dietil benzoil-malonátot (**30**). Tehát az előállított katalizátorral is elérhető a kívánt átalakítás, de alacsonyabb hozammal (**23. ábra**).



23. ábra: Európium katalizátor alkalmazása C-acilezésre

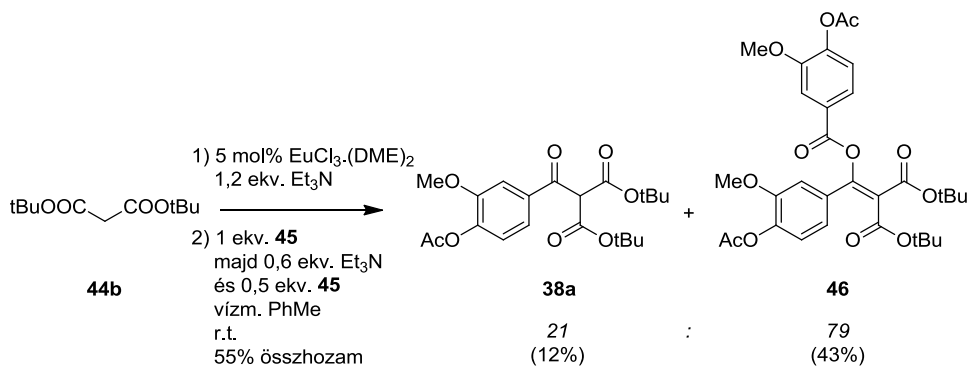
Mindezek után megpróbáltuk a szubsztituált propinsav (**18a**) szintézisében alkalmazni a katalizátort. A védett vanillinsavból (**39a**) tionil-klorid feleslegében forralva nyertük a megfelelő

savkloridot (**45**), amit a tionil-klorid feleslegének eltávolítása után tisztítás nélkül használtunk fel a ditercbutil-malonát (**42b**) acilezésére (**24. ábra**).



24. ábra: Védett vanillinsav-klorid előállítása

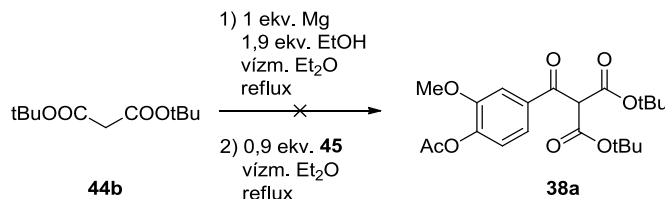
Zhou körülményei között, katalizátorunkkal végezve a reakciót két új termék képződését tapasztaltuk – amikről feltételeztük, hogy egymás tautomerjei – de a kiindulási anyag (**44b**) teljes mennyisége nem alakult át. További fél ekvivalens **45** savkloridot adtunk a reakcióelegyhez, azonban ennek hatására sem alakult át a kiindulási anyag (**44b**). A reakcióelegy feldolgozása és oszlopkromatográfiás tisztítása után izoláltuk a két terméket, amelyek oldatfázisban sem alakultak egymásba. A termékek NMR spektroszkópiái és tömegspektrometriás vizsgálatai után kiderült, hogy a malonát C-acilezésével képződő **38a** termék O-acilezése is lejátszódott (**43**) (**25. ábra**).



25. ábra: Európium katalizátor alkalmazása **44b** acilezésére

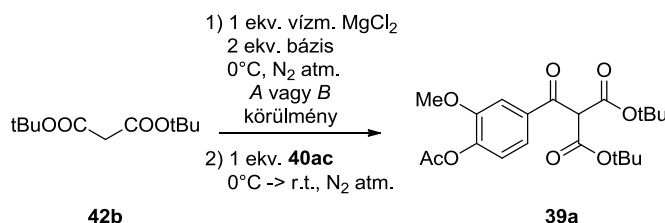
A reakciót megismételtük egy ekvivalens savkloriddal – 0°C-on becsepegtetve – azonban ekkor is tapasztaltuk az O-acilezett termék (**46**) keletkezését a malonát teljes átalakulásának hiányában. Mindez azzal magyarázható, hogy a keletkező **38a** termék keto-enol tautomériája az aromás mag nagy elektronsűrűsége miatt az enol forma irányában van eltolódva, továbbá a **44b** malonát C-acilezése ezen körülmények között valószínűleg lassabban játszódik le, mint a **38a** termék O-acilezése.

Megpróbáltuk az átalakítást Reynolds és Hauser körülményei között is végrehajtani,³⁵ azonban többkomponensű reakcióelegy képződött, ami magyarázható az acetoxi csoport hidrolízisével ezen körülmények között (**26. ábra**).



26. ábra: Malonát sikertelen C-acilezése Reynolds és Hauser módszerével

Rathke és munkatársai malonátok C-acilezését vizsgálták különböző Lewis-savak jelenlétében.³⁶ Az alkalmazott fém-kloridok közül csak vízmentes magnézium-kloriddal sikerült végrehajtani az átalakítást, de a reakció hozamát nagymértékben befolyásolta az oldószer polaritása és az alkalmazott bázis erőssége. Az általuk ismertetett körülmények között végrehajtva a reakciót gyenge, valamint jó hozamban nyertük a kívánt terméket (**38a**, **27. ábra**).



27. ábra: Malonát C-acilezése Rathke módszerével

A: bázis= piridin, vízm. CH_2Cl_2 ; 25%

B: bázis= Et_3N , vízm. MeCN; 73%

A **38a** vegyület enol-szulfonát származékká (**37a**) történő átalakítását még nem sikerült megvalósítani, az ehhez szükséges reagensek és körülmények vizsgálata folyamatban van.

Kísérleti rész

Általános kísérleti módszerek:

Az analitikai vékonyréteg kromatográfiás vizsgálatokhoz Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) lemezt, az oszlopkromatográfiás elválasztáshoz Kieselgel 60 (Reanal) adszorbenst használtunk. A vékonyréteg kromatogramokat különböző előhívószerekkel és UV-fénnyel tettük láthatóvá. Az ¹H és ¹³C NMR spektrumokat Bruker WP-360 és Avance-400 készüléken vettük fel CDCl₃, d₆-DMSO és D₂O oldószerekben, d₁₂-tetrametil-szilán vagy d₄-metanol belső standard jelenlétében. A kémiai eltolódásokat (δ) ppm-ben, a csatolási állandókat (J) Hz-ben adtuk meg.

Dimetil-fumarát (22a)

Fumársavat (7,00 g; 60,3 mmol) vízmentes metanolban (120 cm³) szobahőmérsékleten szuszpendáltunk, majd 0,2 cm³ tömény kénsavat hozzá adva kalcium-kloridos csővel ellátott visszafolyó hűtő alatt forraltuk a kiindulási anyag teljes konverziójáig. Ezt követően az oldószert vákuumban bepároltuk, a maradékot 200 cm³ etil-acetátban oldottuk és az oldatot telített NaHCO₃-oldattal savmentesre mostuk. A szerves fázist MgSO₄-al szárítottuk, a szárítószert kiszűrtük és a szűrletet bepárolva 7,72 g (88%) fehér szilárd anyagot kaptunk.

¹H-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 3,82 (3H, s, OCH₃); 6,87 (1H, s, H-2,3)

¹³C-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 52,42 (OCH₃); 133,51 (C-2,3); 165,48 (C=O)

1,4-Dimetil-2,3-dibróm-butándioát (21a)

Egy 25 cm³-es gömblombikba dimetil-fumarátot (23a; 144 mg; 1,0 mmol) és nátrium-bromidot (460 mg, 4,5 mmol) mértünk be, majd hozzáadtunk diklór-metánt (5 cm³) és desztillált vizet (5 cm³). Kevertetés közben kálium-hidrogénszulfátot (630 mg; 4,6 mmol), majd nátrium-perjodátot (1,00 g; 4,6 mmol) adtunk a reakcióelegyhez és folytattuk a reakció kevertetését szobahőmérsékleten. A reakció lejátszódása után diklór-metánnal hígítottuk (15 cm³) a reakcióelegyet, majd telített nátrium-szulfit oldattal extrahálva semlegesítettük a bróm feleslegét. A szerves fázist vízzel mostuk, szárítottuk MgSO₄-al, szűrtük, majd vákuumban bepároltuk, és 303 mg (99%) fehér szilárd anyagot kaptunk.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 3,86 (3H, s, OCH_3); 4,69 (1H, s, H-2,3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 41,52 (C-2,3); 53,64 (OCH_3); 167,08 (C=O)

2,3-Dibróm-bután-1,4-disav (21b)

KPG keverővel, intenzív hűtővel és csepegtetőtölcsérrel ellátott háromnyakú lombikba fumársavat (10,0 g; 86,2 mmol) mértünk be és desztillált vízben (20 cm^3) szuszpendáltattuk. Kevertetés közben a reakcióelegyet forráshőmérsékletre melegítettük, majd elemi brómot (5 cm^3 ; 97,2 mmol) a csepegtetőtölcséren keresztül gyors ütemben becsepegtettük. A bróm beadagolását követően 30 percig forraltuk, majd egy részletben brómot ($0,5\text{ cm}^3$; 9,7 mmol) adtunk a reakcióelegyhez és további 10 percig forraltuk. Ezt követően jeges vízben lehűtöttük a reakcióelegyet, a terméket szűrtük, és mostuk hideg vízzel. A terméket szobahőmérsékleten P_2O_5 felett vákuumban szárítottuk, és így 16,47 g (69%) fehér kristályos terméket kaptunk.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 4,94 (s, H-2,3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 43,62 (C-2,3); 171,26 (C=O)

2,3-Bisz(benzilamino)-bután-1,4-disav (19b)

KPG keverővel és hűtővel ellátott háromnyakú gömblombikba kalcium-hidridről frissen desztillált benzil-amint (47 cm^3 ; 431 mmol) mértünk be. Kevertetve 80°C -ra melegítettük és ezen a hőmérsékleten kis részletekben a 2,3-dibróm-butándisavat (**22b**; 15,0 g; 54,3 mmol) adagoltunk az aminhoz, ügyelve a heves gázfejlődésre. Beadagolás után a fürdő hőmérsékletét 100°C -ra emeltük és további két órát kevertettük, majd a reakcióelegyet desztillált vízzel (150 cm^3) hígítottuk. Aktív szén derítést követően celit ágyon szűrtük, mostuk kevés vízzel és a szűrletet tömény sósavval pH 3-ig savanyítottuk. A kivált csapadékot szűrtük, mostuk 2 M-os sósavval, majd vízzel. A krémszerű anyagot szobahőmérsékleten kálium-hidroxid, P_2O_5 és kalcium-klorid felett, vákuumban szárítottuk, és így 12,81 g (72%) amorf szilárd anyagot kaptunk.

$^1\text{H-NMR}$ ($d_6\text{-DMSO}$) δ (ppm): 3,25 (1H, s, NH); 3,73 (1H, d, $J = 13,5\text{ Hz}$, H-1'_A); 3,84 (1H, d, $J = 13,5\text{ Hz}$, H-1'_B); 3,97 (1H, s, H-2,3)

2,3-Diamino-bután-1,4-disav (16b)

Buborékszámológóval felszerelt hűtővel, keverőmaggal és gázbevezetővel ellátott háromnyakú lombikba bemértünk 2,3-bisz(benzilamino)-bután-1,4-disavat (**20b**, 11,87 g; 36,2 mmol), majd jégecetet (60 cm³) és tömény sósavat (50 cm³) adtunk hozzá. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertetve argongáz bevezetésével oxigénmentesítettük, majd palládium-csontszenet [1,2 g; 10%(m/m)] adtunk hozzá, és lassú ütemben hidrogéngázt buborékolattunk át a reakcióelegyen, a kiindulási anyag teljes átalakulásáig. Ezt követően celit ágyon kiszűrtük a katalizátort, mostuk jégecettel és vákuumban 60°C-os vízfürdőn bepároltuk. A maradékot hideg nátrium-hidroxid oldatban [10%(m/m)] feloldottuk és jégecettel pH 6-ig savanyítottuk. A kivált anyagot szűrtük, mostuk kevés jeges vízzel, és szobahőmérsékleten, kálium-hidroxid felett vákuumban szárítottuk. A termék (3,95g, 73%) fehér amorf szilárd anyag.

¹H-NMR (d₆-DMSO) δ (ppm): 3,24-3,25 (1H, dt, *J* = 3,2 Hz, 1,6 Hz, H-2,3); 4,81 (2H, s, NH₂)

(1,4-Dimetil-2,3-diamino-butándioát)-dihidroklorid (16a)

2,3-Diamino-bután-1,4-disavat (**16b**; 3,00 g; 20,3 mmol) vízmentes metanolban oldottunk (100 cm³) majd sós-jeges fürdő alkalmazásával lehűtöttük. Kevertetés közben, lassú ütemben trimetil-szilil-kloridot (TMSCl; 12,7 cm³; 91,2 mmol) csepegtettünk az oldathoz, majd hagytuk szobahőmérsékletre felmelegedni, és egy éjszakán át ezen a hőmérsékleten kevertettük. Az oldószert vákuumban bepároltuk, majd vízmentes metanolt (3x40 cm³) pároltuk le a sósav feleslegének eltávolítására és végül dietil-étert (3x40 cm³) a metanol nyomainak eltávolítására. A kapott higroszkópos szirupot vízmentes éter-hexán elegyből kristályosítottuk, így 4,68 g (92%) fehér szilárd anyagot kaptunk.

¹H-NMR: (d₆-DMSO): δ (ppm): 3,77 (3H, s, OCH₃); 4,90 (1H, s, H-2,3); 9,42 (3H, s, NH₃⁺)

¹³C-NMR (d₆-DMSO) δ (ppm): 52,27 (C-2,3); 53,86 (OCH₃); 165,46 (C=O)

Általános előírat fenolos hidroxil csoportok acetilezésére

A fenol (6 mmol) vízmentes piridinben (15 cm³) készült oldatához ecetsavanhidridet (0,68 cm³; 7,2 mmol) adtunk, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettük. A reakció végbemenetele után a piridint vákuumban bepároltuk, és toluolt (2 x 20 cm³) desztilláltunk le a maradékról. A terméket további tisztítás nélkül reagáltattuk tovább.

(2E)-3-(4-Acetoxy-3-metoxifenil)-prop-2-énsav (17a)

5,00 g (25,7 mmol) ferulesavból (**23a**) az általános előírat alapján 5,98 g (98%) fehér kristályos anyagot kaptunk.

¹H-NMR (d₆-DMSO) δ (ppm): 2,26 (3H, s, CH₃); 3,84 (3H, s, OCH₃); 6,59 (1H, d, J= 16,0 Hz, H-2); 7,12 (1H, d, J= 8,1 Hz, H-5'); 7,26 (1H, d, J= 8,0 Hz, H-6'); 7,48 (1H, s, H-2'); 7,58 (1H, d, J= 16,0 Hz, H-3); 12,39 (1H, s, COOH)

¹³C-NMR (d₆-DMSO) δ (ppm): 20,39 (CH₃); 55,98 (OCH₃); 111,83 (C-2'); 119,54 (C-2); 121,34 (C-6'); 123,19 (C-5'); 133,26 (C-1'); 140,80 (C-4'); 143,33 (C-3); 151,14 (C-3'); 167,59 (COCH₃); 168,40 (COOH)

(2E)-3-(4-Acetoxifenil)-prop-2-énsav (17b)

2,30 g (14 mmol) 4-hidroxi-fahéjsavból (**23b**) az általános előírat alapján 2,88 g (94%) fehér kristályos anyagot nyertünk.

¹H-NMR (d₆-DMSO) δ (ppm): 2,28 (3H, s, CH₃); 6,52 (1H, d, J= 16,0 Hz, H-2); 7,18 (2H, d, J= 8,4 Hz, H-3', -5'); 7,60 (1H, d, J= 16,0 Hz, H-3); 7,74 (1H, d, J= 8,4 Hz, H-2', -6'); 12,41 (1H, s, COOH)

¹³C-NMR (d₆-DMSO) δ (ppm): 20,87 (CH₃); 119,30 (C-2); 122,36 (C-2', -6'); 129,44 (C-3', -5'); 131,92 (C-1'); 142,97 (C-3); 151,82 (C-4'); 167,54 (COCH₃); 169,03 (COOH)

4-Acetoxy-3-metoxibenzoésav (39a)

2,10 g (12,5 mmol) 4-hidroxi-3-metoxibenzoésav (**43**) az általános előírat alapján 2,23 g (84%) fehér kristályos anyagot kaptunk.

¹H-NMR: (CDCl₃): δ (ppm): 2,35 (3H, s, CH₃); 3,91 (3H, s, OCH₃); 7,14 (1H, d, J=8,2 Hz, H-5); 7,71 (1H, d, J= 1,8 Hz, H-2); 7,76 (1H, dd, J= 8,2 Hz, 1,8 Hz, H-6)

¹³C-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 20,79 (CH₃); 56,23 (OCH₃); 113,96 (C-2); 123,11 (C-6); 123,60 (C-5); 128,02 (C-1); 144,53 (C-4); 151,30 (C-3); 168,62 (ArOCOCH₃); 171,45 (COOH)

Általános előírat a diamin acilezésére

Kiizzított gömblombikba bemértünk (1,4-dimetil-2,3-diamino-butándioát)-dihidrokloridot (**16a**; 0,498 g; 2,0 mmol) és vízmentes diklór-metánban (10 cm³) szuszpendáltuk. Hozzáadtunk kálium-hidroxidról desztillált trietil-amint (0,56 cm³; 4 mmol), és a reakcióelegyet ultrahangos fürdőben homogenizáltuk, majd sós-jeges fürdőn kevertetve lehűtöttük. A megfelelő karbonsavat (**17a** vagy **17b**; 5 mmol) hozzáadva ezen a hőmérsékleten tíz percig kevertettük, majd hozzáadtuk az [1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)-karbodiimid]-hidrokloridot (EDCI.HCl; 1,00 g; 5,2 mmol). A reagens feloldódását követően reflux hőmérsékleten kevertettük egy éjszakán át, majd a reakcióelegyet szilikagélre pároltuk és oszlopkromatográfiásan tisztítottuk.

1,4-Dimetil-2,3-bisz[{{(2E)-3-(4-acetoxi-3-metoxifenil)- prop-2-enoil}amino}butándioát (**42a**)

0,498 g (2,0 mmol) **16a**-ból és 1,18 g (5,0 mmol) **17a**-ból az általános előírat alapján 0,535 g (43%) halványsárga amorf szilárd anyagot kaptunk.

¹H-NMR: (CDCl₃): δ (ppm): 2,29 (3H, s, CH₃); 3,75-3,78 (6H, 2s, 2xOCH₃); 5,32 (1H, d, J= 6,7 Hz, H-2,3); 6,54 (1H, d, J= 15,6 Hz, H-2'); 6,98 (1H, d, J= 8,5 Hz, H-5''); 6,97-7,04 (2H, m, H-2'', -6''); 7,58 (1H, d, J= 15,5 Hz, H-3'), 7,60 (1H, m, NH)

¹³C-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 20,34 (CH₃); 52,88 (C-2,3); 55,03 (COOCH₃); 55,61 (ArOCH₃); 111,20 (C-2''); 119,66 (C-6''); 122,59 (C-2'); 123,26 (C-5''); 133,29 (C-1''); 140,93 (C-4''); 141,56 (C-3'); 151,08 (C-3''); 166,65 (CONH); 168,73 (ArOCOCH₃); 169,15 (C=O)

1,4-Dimetil-2,3-bisz[{{(2E)-3-(4-hidroxifenil)-prop-2-enoil}amino}butándioát (**42b**)

0,498 g (2,0 mmol) **16a**-ból és 1,03 g (5,0 mmol) **17b**-ból az általános előírat alapján 0,539 g (48%) fehér kristályos szilárd anyagot kaptunk.

¹H-NMR: (CDCl₃): δ (ppm): 2,30 (3H, s, CH₃); 3,79 (3H, s, OCH₃); 5,26 (1H, d, J= 6,5 Hz, H-2,3); 6,48 (1H, d, J= 15,6 Hz, H-2'); 7,10 (2H, d, J= 8,6 Hz, H-6'', -2''); 7,42 (1H, d, J= 6,6 Hz, NH); 7,52 (2H, d, J= 8,6 Hz, H-3'', -5''), 7,64 (1H, d, J= 15,6 Hz, H-3')

¹³C-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 21,28 (CH₃); 53,51 (C-2,3); 55,65 (COOCH₃); 119,36 (C-3'', -5''); 122,09 (C-2'); 129,12 (C-3'', -5''); 132,24 (C-1''); 141,45 (C-3'); 151,94 (C-4''); 166,77 (CONH); 169,23 (ArOCOCH₃); 169,32 (C=O)

Általános előírat védőcsoportok eltávolítására

0,5 mmol védett diamidot (**42a** vagy **b**) 5 cm³ etanolban oldottunk/szuszpendáltunk szobahőmérsékleten, majd kálium-hidroxid oldatot (2,25 cm³; 1 mol/dm³; 2,25 mmol) hozzáadva szobahőmérsékleten kevertettük az elegyet. A reakció lejátszódása után az oldatot jégecettel pH 5-ig savanyítottuk és vákuumban bepároltuk. A visszamaradt szilárd anyagot kevés vízből átkristályosítottuk.

2,3-Bisz[{{(2E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-prop-2-enoil}amino}bután-1,4-disav (**14a**)

0,492 g (0,804 mmol) **42a**-ból az általános előírat alapján 0,044 g (11%) fehér amorf szilárd anyagot kaptunk.

¹H-NMR: (D₂O): δ (ppm): 3,68 (3H, s, OCH₃); 4,92 (1H, s, H-2,3); 6,42 (1H, d, J= 15,7 Hz, H-2'); 6,75 (1H, d, J= 8,0 Hz, H-5''); 6,90-6,92 (2H, 2s, C-2'', -6''); 7,28 (1H, d, J= 15,8 Hz, H-3')

¹³C-NMR (D₂O) δ (ppm): 56,64 (OCH₃); 57,72 (C-2,3); 112,04 (C-2''); 116,39 (C-5''); 118,66 (C-2'); 123,48 (C-6''); 128,30 (C-1''); 142,47 (C-3'); 148,01 (C-4''); 148,46 (C-3''); 169,53 (CONH); 175,92 (COOH)

2,3-Bisz[{{(2E)-3-(4-hidroxifenil)-prop-2-enoil}amino}bután-1,4-disav (**14b**)

0,526 g (0,953 mmol) **42b**-ből az általános előírat alapján 0,279 g (66%) fehér amorf szilárd anyagot kaptunk.

¹H-NMR: (D₂O): δ (ppm): 4,91 (1H, s, H-2,3); 6,30 (1H, d, J= 15,8 Hz, H-2'); 6,69 (2H, d, J= 8,5 Hz, H-3'', -5''); 7,20 (2H, d, J= 8,9 Hz, C-2'', -6''); 7,23 (1H, d, J= 15,8 Hz, H-3')

¹³C-NMR (D₂O) δ (ppm): 57,46 (C-2,3); 116,61 (C-2'', 6''); 118,11 (C-2'); 127,66 (C-1''); 130,90 (C-3'', -5''); 142,38 (C-3'); 158,51 (C-4''); 169,60 (CONH); 175,61 (COOH)

4-Hidroxi-3-metoxibenzoészav (**43**)

Ezüst-nitrátot (2,67 g; 15,7 mmol) oldottunk desztillált vízben (16 cm³), majd kevertetés közben hozzá adtuk nátrium-hidroxid (0,67 g; 16,8 mmol) desztillált vízzel (6 cm³) készült oldatát. Öt perc elteltével kiszűrtük a csapadékot, mostuk desztillált vízzel (3 x 5 cm³), majd csapadékot szuszpendáltattuk nátrium-hidroxid (2,91 g; 72,75 mmol) vizes oldatában (30 cm³).

A szuszpenziót kevertetés közben 65°C-ra melegítettük, majd ezen a hőmérsékleten hozzáadtuk a vanillint (**40**; 2,28 g; 15,0 mmol). A reakció lejátszódása után kiszűrtük a fém ezüstöt, mostuk kevés forró vízzel és szűrleten keresztül gyors ütemben kén-dioxid gázt vezettünk át. Az így kapott oldatot tömény sósavval pH 3-ig savanyítottuk, majd egy éjszakán át hűtőszekrényben tároltuk. A kivált anyagot szűrtük, mostuk kevés jeges vízzel és P₂O₅ felett szobahőmérsékleten, vákuumban szárítottuk, így 2,31 g (92%) fehér szilárd anyagot kaptunk.

¹H-NMR: (CDCl₃): δ (ppm): 3,82 (3H, s, OCH₃); 6,86 (1H, d, *J*=8,4 Hz, H-5); 7,46 (2H, s, H-2, -6); 9,84 (1H, s, ArOH); 12,50 (1H, s, COOH)

¹³C-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 55,57 (OCH₃); 112,76 (C-2); 115,08 (C-5); 121,66 (C-1); 123,54 (C-5); 142,27 (C-3); 151,15 (C-4); 167,28 (COOH)

4-(Klórkarbonil)-3-metoxifenil-acetát (45)

A 4-acetoxi-3-metoxibenzoésavat (**39a**; 1,58 g; 7,5 mmol) oldottuk tionil-kloridban (25 cm³) és másfél órán át forráshőmérsékleten kevertettük. A reakció lejátszódása után 40°C-os fürdőn a tionil-klorid feleslegét vákuumban eltávolítottuk, és a maradékot további tisztítás nélkül, azonnal felhasználtuk a következő lépésben.

Bisz(1,2-dimetoxietán-κ²O,O')európium(III)-triklorid [EuCl₃.(DME)₂]

Kiizzított gömblombikban szuszpendáltattunk európium(III)-oxidot (0,352 g; 1 mmol) fémnátriumról frissen desztillált dimetoxi-etánban (5,6 cm³). A lombikra gumiszeptumot helyeztünk, argongázzal átöblítettük, és egy részletben tionil-kloridot (1,45 cm³; 20 mmol) adtunk az elegyhez. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettük és két óra alatt, részletekben desztillált vizet adtunk hozzá (0,216 cm³; 12 mmol), majd a beadagolást követően egy éjszakán át kevertettük. A reakció lejátszódása után az elegyet -25°C-ra hűtöttük, a kivált halvány rózsaszínű szilárd anyagot szűrtük, és így 0,693 g (79%) európium komplexet nyertünk.

FT-IR (KBr): 1077, 1035, 1013, 976, 854 cm⁻¹

Általános előírat malonátok $\text{EuCl}_3 \cdot (\text{DME})_2$ katalizált C-acilezésére

Kiizzított gömblombikban bemértünk vízmentes európium komplexet (11 mg; 0,025 mmol) és szobahőmérsékleten vízmentes toluolban (3 cm^3) szuszpendáltattuk. Kevertetés közben a malonátot (0,5 mmol), majd a trietil-amint ($0,086 \text{ cm}^3$; 0,6 mmol) adtuk a reakcióelegyhez. Öt perces kevertetés után a savklorid (0,55 mmol) vízmentes toluollal (2 cm^3) készült oldatát csepegtettük a reakcióelegyhez, és a reakciót tovább kevertettük szobahőmérsékleten. A reakció lejátszódása után kiszűrtük a katalizátort és a képződött trietil-ammónium-kloridot, melyet mostuk kevés vízmentes toluollal. A szűrletet extraháltuk telített nátrium-hidrogénkarbonát oldattal, szárítottuk MgSO_4 -al és vákuumban bepároltuk. Az így kapott nyersterméket oszlopkromatográfiásan tisztítottuk.

1,3-Dietil-2-benzoil-propándioát (31)

Dietil-malonátból (**44a**; $0,076 \text{ cm}^3$; 0,5 mmol) és benzoil-kloridból ($0,071 \text{ cm}^3$; 0,55 mmol) az általános előírat alapján 0,091 g (69%) színtelen szirupot kaptunk.

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3): δ (ppm): 1,12 (3H, t, $J = 7,1 \text{ Hz}$, CH_3); 1,27 (3H, m, CH_3); 3,37 (s, H-2); 4,13-4,29 (4H, m, CH_2); 5,29 (s, H-2); 7,35-7,64 (5H, m, aromás H); 13,42 (s, H-2)

1,3-Di-*terc*-butil-2-(4-acetoxi-3-metoxibenzoil)-propándioát (38a)

A) Di-*terc*-butil-malonátból (**44b**; $1,12 \text{ cm}^3$; 5,0 mmol) és a **45** savkloridból (1,58 g **39a**-ból, 7,5 mmol) az általános előírat alapján 0,238 g (12%) fehér kristályos anyagot kaptunk.

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3): δ (ppm): 1,46 (18H, s, CH_3); 2,32 (3H, s, COCH_3); 3,88 (3H, s, OCH_3); 5,06 (1H, s, H-2); 7,14 (1H, d, $J = 8,2 \text{ Hz}$, H-6'); 7,45 (1H, d, $J = 8,3 \text{ Hz}$, H-5'), 7,59 (1H, s, H-2')

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 20,55 (q, COCH_3); 27,73 (q, CCH_3); 55,97 (q, OCH_3); 63,88 (d, C-2); 83,14 (s, CCH_3); 111,75 (d, C-2'); 121,5 (dd, C-6'); 122,95 (d, C-5'); 134,57 (dd, C-1'); 144,27 (s, C-4'); 151,59 (s, C-3'); 164,04 (d, COOtBu); 168,20 (dd, ArOCOCH_3) 188,71 (dd, ArCO)

ESI-MS (m/z): 448 (M^+)

A **38a** terméken kívül ezzel a módszerrel az **1,3-di-*terc*-butil-2-[(4-acetoxi-3-metoxibenzoil)oxi]{4-acetoxi-3-metoxifenil}metilén]propándioát (46)** melléktermék is keletkezett 1,29 g (43%) mennyiségben.

¹H-NMR: (CDCl₃): δ (ppm): 1,36 (9H, s, CCH₃); 1,41 (9H, s, CCH₃); 2,30 (3H, s, COCH₃); 2,34 (3H, s, COCH₃); 3,81 (3H, s, OCH₃); 3,87 (3H, s, OCH₃); 7,04 (1H, d, *J*= 8,1 Hz, aromás H); 7,12-7,16 (3H, m, aromás H); 7,69 (1H, d, *J*= 10,6 Hz, aromás H); 7,74 (1H, d, *J*= 8,3 Hz, aromás H)

¹³C-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 20,75 (COCH₃); 27,70 (CCH₃); 27,99 (CCH₃); 56,09, 56,22 (2xCH₃); 82,58, 82,69 (CCH₃); 114,04; 122,24; 123,52 (aromás CH); 127,53; 128,07; 132,56; 141,71; 144,51; 151,03; 151,40; 156,23; 156,23; 161,88; 162,87; 163,63; 168,52; 168,63 (kvaterner szenek)

ESI-MS (*m/z*): 624 (MNa⁺); 1224 (M₂Na⁺)

B) Kiizzított gömblombikba bemértünk vízmentes magnézium-kloridot (0,238 g; 2,5 mmol) és vízmentes acetonitrilben (15 cm³) szuszpendáltattuk nitrogén atmoszféra alatt. Sós-jeges hűtés és kevertetés közben hozzá adtunk di-*terc*-butil-malonátot (**44b**; 0,56 cm³; 2,5 mmol), majd trietil-amint (0,70 cm³; 5,0 mmol). Tíz perces kevertetés után másfél óra alatt becsepegtettük a savklorid (**45**; 0,525 g **39a**-ból; 2,5 mmol) vízmentes acetonitrillel (25 cm³) készült oldatát. Becsepegtetést követően az elegyet hagytuk felmelegedni, és egy éjszakán át szobahőmérsékleten kevertettük. A reakcióelegyet vákuumban szárazra pároltuk, és a maradékot oldottuk etil-acetátban (50 cm³), az oldatot mostuk 2 M-os sósavval (2 x 15 cm³), majd telített NaHCO₃-oldattal (2x15 cm³), végül a szerves fázist MgSO₄-al szárítottuk. A szárítószeret kiszűrtük és a szűrletet vákuumban bepároltuk. A nyersterméket etanolból átkristályosítva 0,749 g (73%) fehér szilárd anyagot kaptunk.

5. Összefoglalás

Munkám célja volt a kutatócsoportunkban eddig előállított FR258900 analogonok szerkezet-hatás vizsgálatainak kiegészítése az észter funkció helyett hidrolitikusan stabilabb és térszerkezetileg merevebb amid funkciót tartalmazó vegyületek további szintézisével.

Az eddig előállított analógok közül a borkősav alapvázat (**11**, **12**, **13**) vegyületek mutattak inhibitor aktivitást a GP enzimmel szemben. Az egy acil funkciót tartalmazó analógok (**7**, **8**, **9**, **10**) azonban nem rendelkeztek számottevő aktivitással, így nem sikerült megállapítani az észter – amid funkció cseréjének, valamint az oldallánc többszörös kötésének hatását az inhibitor aktivitásra. Ezért célvegyületeinkben a **12** vegyület alapvázat adó *mezo*-borkősavat helyettesítettük 2,3-diamino-bután-1,4-disavval (**16b**). A vezérmolekula (**12c**) 4-hidroxi-3-metoxifahéjsav részletet tartalmaz acil funkcióként, ezért ferulesavval és 4-hidroxi-fahéjsavval acilezett diamid származékokat (**14a**, **14b**, **15a**, **15b**) kívántunk előállítani.

A korlátozottan hozzáférhető *mezo*-2,3-diamino-bután-1,4-disav (**16b**) előállítását a természetben nagy mennyiségben megtalálható fumársavból (**22b**) kiindulva először 1,4-dimetil-2,3-dibróm-butándioát (**21a**) intermediereken keresztül kívántuk megvalósítani, azonban nem jártunk sikerrel, viszont a védetlen karboxil csoportokat alkalmazó szintézis úton (**22b** – **21b** – **19b** – **16b**) a kívánt vegyületet sikeresen előállítottuk.

Az acilezési reakciók előtt a **16b** diamin karboxil csoportjait, és a ferulesav (**23a**) valamint a 4-hidroxi-fahéjsav (**23b**) szabad fenolos hidroxil csoportjait metil- (**16a**), illetve ecetsav-észter (**17a**, **b**) formájában védtük.

A célvegyületek előállítására irányuló acilezési kísérletek közül az aktiváló reagensként EDCI.HCl-t alkalmazó módszer vezetett célra, mely módszerrel a **42a** és **42b** származékokat karbonsavakból (**17a**, **b**) kiindulva közepes (43-48%) hozamban izoláltuk.

A védett diamid származékokból (**42a**, **b**) etanolos közegben, feleslegben vett kálium-hidroxid-oldattal reagáltatva gyenge és közepes hozamban izoláltuk a **14a** és **14b** célvegyületeket, mely vegyületek enzimkinetikai vizsgálata folyamatban van.

Az acil funkcióban található C=C kötést C≡C kötéssel helyettesítve kívántuk vizsgálni a lineárisabb struktúra inhibícióra gyakorolt hatását. Ilyen származékok (**15a**, **b**) szintéziséhez szükséges szubsztituált propinsavak (**18a**, **b**) hagyományos úton történő előállítása nehézkes, ezért más úton kívántuk meg kivitelezni előállításukat.

Az acetilének bioszintetikus képződéséhez hasonló átalakítássoron (**40** – **43** – **39a** – **45** – **38a** – **37a** – **36a** – **18a**) keresztül kezdtük meg a vegyületek (**18a**, **b**) előállítását. A kiindulási vegyület – a vanillin – ez esetben is a természetben nagy mennyiségben megtalálható, könnyen hozzáférhető. A **45** – **38a** átalakítást lantanoida(III)-ion katalizált reakcióban kívántuk megvalósítani. Ehhez eurórium(III)-oxidból előállítottuk a vízmentes eurórium-triklorid komplexet. Bizonyítottuk, hogy ezen katalizátor sikeresen alkalmazható a dietil-malonát C-acilezési reakciójában. Tudomásunk szerint a többi lantanoida(III)-kloriddal ellenben a fent említett eurórium-komplexet még nem alkalmazták ezen átalakításra. A **38a** vegyület előállítását eurórium-triklorid katalizált reakcióban nem sikerült kielégítően megvalósítani, mivel a képződő termék O-acilezése nagyobb sebességgel játszódik le, mint a **44b** C-acilezése, ami a szubsztrátunk elektronikus sajátásaival magyarázható. A **38a** előállítását vízmentes magnézium-klorid jelenlétében sikeresen kiviteleztek az irodalomban ismertett módszer alapján. A **38a** – **37a** átalakításhoz szükséges megfelelő reagensek és körülmények vizsgálata jelenleg is folyik.

6. Irodalom

1. [Diabetes Fact sheet, WHO](#)
2. Treadway JL; Mendys P; Hoover DJ; *Expert Opinion On Investigational Drugs*, **10**(3), 439-454 (2001).
3. [Diabetes Atlas 6th edition 2013, IDF](#)
4. [Egészségügyi Statisztikai Évkönyv 2012, KSH](#)
5. *Diabetes Mellitus*, Szerkesztette: Baranyi É., Samu A., Winkler G., Galenus Kiadó (2005).
6. *Tények és adatok*, Szerkesztette: Baranyai É.; Békefi D.; Fövényi J.; Kautzky L.; Takács J.; (1998).
7. Moller, D. E. *Nature*, 414, 821-827 (2001).
8. Oikonomakos, N.G. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **3**, 561-586 (2002).
9. McCormack, J.G.; Westergaard, N.; Kristiansen, M.; Brand, C.L.; Lau, J. *Curr. Pharm. Design*, **7**, 1451-1474 (2001).
10. Ádám V., Dux L., Faragó A., Fésüs L., Machovich R., Mandl J., Sümegi B., *Orvosi biokémia*, Ádám V. (Szerk.), ISBN: 963-242-902-8, Medicina Könyvkiadó (2006).
11. Somsák L., Bokor É., Czifrák K., Juhász L. and Tóth M. ; Carbohydrate Derivatives and Glycomimetic Compounds in Established and Investigational Therapies of Type 2 Diabetes Mellitus, *Topics in the Prevention, Treatment and Complications of Type 2 Diabetes*, Mark B. Zimering (Ed.), ISBN: 978-953-307-590-7, InTech (2011).
12. Somsak, L.; Nagy, V.; Hadady, Z.; Docsa, T.; Gergely, P., *Curr. Pharm. Des.*, **9** (15), 1177-1189 (2003).
13. Oikonomakos, N. G., Somsák, L., Advances in glycogen phosphorylase inhibitor design, *Current Opinion in Investigational Drugs*, **9**(4), 379-395 (2008).
14. Furukawa, S., Tsurumi, Y., Murakami, K., Nakanishi, T., Ohsumi, K., Hashimoto, M., Nishikawa, M., Takase, S., Nakayama, O., Hino, M.; *The Journal of Antibiotics*, **58**(8), 497-502 (2005).
15. Furukawa S.; Murakami K.; Nishikawa M., Nakayama, O.; *The Journal of Antibiotics*, **58**(8), 503-508 (2005).
16. Tiraidis, C., Alexacou, K.-M., Zographos, S. E., Leonidas, D. D., Gimisis, T., Oikonomakos, N. G.; *Protein Science*, **16**, 1773-1782 (2007).

17. Varga G., Docsa T., Gergely P., Juhász L., Somsák L., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 23(6), 1789-92 (2013).
18. L. Juhász, G. Varga, A. Sztankovics, F. Béke, T. Docsa, A. Kiss-Szikszai. P. Gergely, J. Kóňa, I. Tvaroška, L. Somsák, *ChemPlusChem*, 79, 1558-68 (2014).
19. A. McKenzie, *J. Chem. Soc., Trans.*, 101, 1196-1205 (1912).
20. I. Roberts, G. E. Kimball, *J. Am. Chem. Soc.*, 59 (5), 947-948 (1937).
21. S. Iguchi, H. Iwamura, M. Nishizaki, A. Hayashi, K. Senokuchi, K. Kobayashi, K. Sakaki, K. Hachiya, Y. Ichioka, M. Kawamura, *Chem. Pharm. Bull.*, 40(6), 1462-69 (1992).
22. I. Fleming, J. Harley-Mason, *J. Chem. Soc.*, 4771-4778 (1963).
23. I. Fleming, C. R. Owen, *J. Chem. Soc. C*, 2013-2017 (1971).
24. I. Fleming, C. Ramarao, *Org. Biomol. Chem.*, 2, 1504-1510 (2004).
25. A. Khazaei, M. A. Zolfigol, E. Kolvari, N. Koukabia, H. Soltania, F. Komakia, *Synthesis*, 21, 3672-3676 (2009).
26. S. Kasina, A. R. Fritzberg, D. L. Johnson, D. Eshima, *J. Med. Chem.* 29, 1933-40 (1986).
27. H. S. Rhinesmith, *Organic Synthesis*, 18, 17 (1938).
28. W. Wenner, *J. Org. Chem.*, 13 (1), 26-30 (1948).
29. H. McKennis Jr., A. S. Yard, *J. Org. Chem.*, 23 (7), 980-982 (1958).
30. T. T. Charvat, D. J. Lee, W. E. Robinson, A. R. Chamberlin, *Bioorg. Med. Chem.*, 14, 4552-67 (2006).
31. L. Minkyung et al, *Tet. Lett.*, 48(22), 3835-3839 (2007).
32. I. A. Pearl, *Organic Syntheses*, 30, 101 (1950).
33. Q. Shen, W. Huang, J. Wang, X. Zhou, *Org. Lett.*, 9, 4491-4494 (2007).
34. D. B. Dell' Amico, F. Calderazzo, C. della Porta, A. Merigo, P. Biagini, G. Lugli, T. Wagner, *Inorganica Chimica Acta*, 240, 1-3 (1995).
35. G. A. Reynolds, C. R. Hauser, *Org. Syn.*, 30, 70 (1950).
36. M. W. Rathke, P. J. Cowan, *J. Org. Chem.*, 50, 2622-24 (1984).