



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

OTDK Dolgozat

α -Hidroxi-biszfoszfónát típusú vegyületek előállítása és vizsgálata

Tóth Szigfrid Boldizsár

BSc. IV. évfolyam, vegyészmérnök szak

Témavezető

Dr. Keglevich György

Egyetemi tanár

Konzulens

Szalai Zsuzsanna

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Szerves Kémia és Technológia Tanszék

Utolsó módosítás dátuma

2024.05.23

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, *Dr. Keglevich György* Tanár Úrnak, valamint konzulensemnek *Szalai Zsuzsanna* PhD-hallgatónak, hogy a kutatócsoportban dolgozhattam és készíthettem el a Dolgozatom.

Szeretném továbbá megköszönni *Dr. Keglevich György* Tanár Úrnak és *Szalai Zsuzsanna* PhD-hallgatónak a munkám során nyújtott végtelen türelmüket, hasznos tanácsaikat és folyamatos, értékes segítségüket, tapasztalatukat.

További köszönettel tartozom konzulensem, *Szalai Zsuzsanna* PhD-hallgatónak fáradhatatlan segítségéért, a HPLC-MS mérések elvégzéséért és szakmai tanácsaiért; *Dr. Drahos Lászlónak* a HRMS mérések elvégzéséért; *Tóth Lászlóné Erzsébetnek* a DSC görbék felvételéért; *Dr. Konstantin Karaghiosoff* és *Dr. Czugler Mátyás* professzoroknak az egykristály röntgendiffrakciós analízis elvégzéséért; valamint *Dr. Bősze Szilviának* és *Oláhné Dr. Szabó Ritának* a citotoxicitási vizsgálatokért.

Köszönöm *Csuka Anita* technikusnak és a kutatócsoportban dolgozóknak a segítséget, valamint, hogy kérdéseimmel mindig fordulhattam hozzájuk.

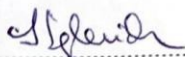
Végül, de nem utolsó sorban, szeretném megköszönni családomnak, hogy tanulmányaim elvégzéséhez biztosították számomra a megfelelő háttért, és hogy mindig számíthattam rájuk.

Nyilatkozatok

Témavezetői nyilatkozat a dolgozat beadhatóságáról

Alulírott *Dr. Keglevich György* témavezető nyilatkozom, hogy *Tóth Szigfrid Boldizsár* (Neptun kódja: U5KYEYV) *α -Hidroxi-biszfoszfónát típusú vegyületek előállítása és vizsgálata* című dolgozata a hallgató témavezetése mellett önállóan készített írásműve és megfelel a BME Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar Szakdolgozat és diplomamunka szabályzatban előírt tartalmi és formai követelményeknek, így a dolgozat beadható.

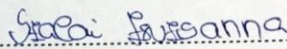
Budapest, 2023. 10. 04.


.....
Dr. Keglevich György

Konzulensi nyilatkozat a dolgozat beadhatóságáról

Alulírott *Szalai Zsuzsanna* konzulens nyilatkozom, hogy *Tóth Szigfrid Boldizsár* (Neptun kódja: U5KYEYV) *α -Hidroxi-biszfoszfónát típusú vegyületek előállítása és vizsgálata* című dolgozata a hallgató konzultációval segített munkája alapján készített írásmű, amely szakmai tartalma alapján beadható.

Budapest, 2023. 10. 04.


.....
Szalai Zsuzsanna

Hallgatói nyilatkozat a dolgozat önálló tevékenységéről

Alulírott *Tóth Szigfrid Boldizsár* hallgató (Neptun kód: U5KYEV) nyilatkozom, hogy az *α -Hidroxi-biszfoszfónát típusú vegyületek előállítása és vizsgálata* című dolgozatom készítése során betartottam a szerzői jogról szóló 1999. évi LXXVI. tv. szabályait, valamint a BME TVSZ és a BME Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kara által előírt, a dolgozat készítésére vonatkozó szabályokat, különösen a hivatkozások és idézések tekintetében.

Tudomásul veszem, hogy szakdolgozat esetén plágiumnak/szerzői jogsértésnek számít:

- szó szerinti idézet közlése idézőjel és hivatkozás megjelölése nélkül;
- tartalmi idézet hivatkozás megjelölése nélkül;
- más szerző publikált gondolatainak saját gondolatként való feltüntetése.

Tudomásul veszem, hogy a dolgozatban közölt módszerek, eredmények a kutatásban, fejlesztésben résztvevő kutatók és intézmények/cégek közös szellemi tulajdonát képezik, ezek hasznosítása, publikálása, csak az összes érintett egyetértésével történhet meg.

Kijelentem továbbá, hogy a dolgozat készítése során a konzulenszt, illetve a témavezetőt nem tévesztettem meg.

Budapest, 2023. 10. 04.

Tóth Szigfrid Boldizsár
Tóth Szigfrid Boldizsár

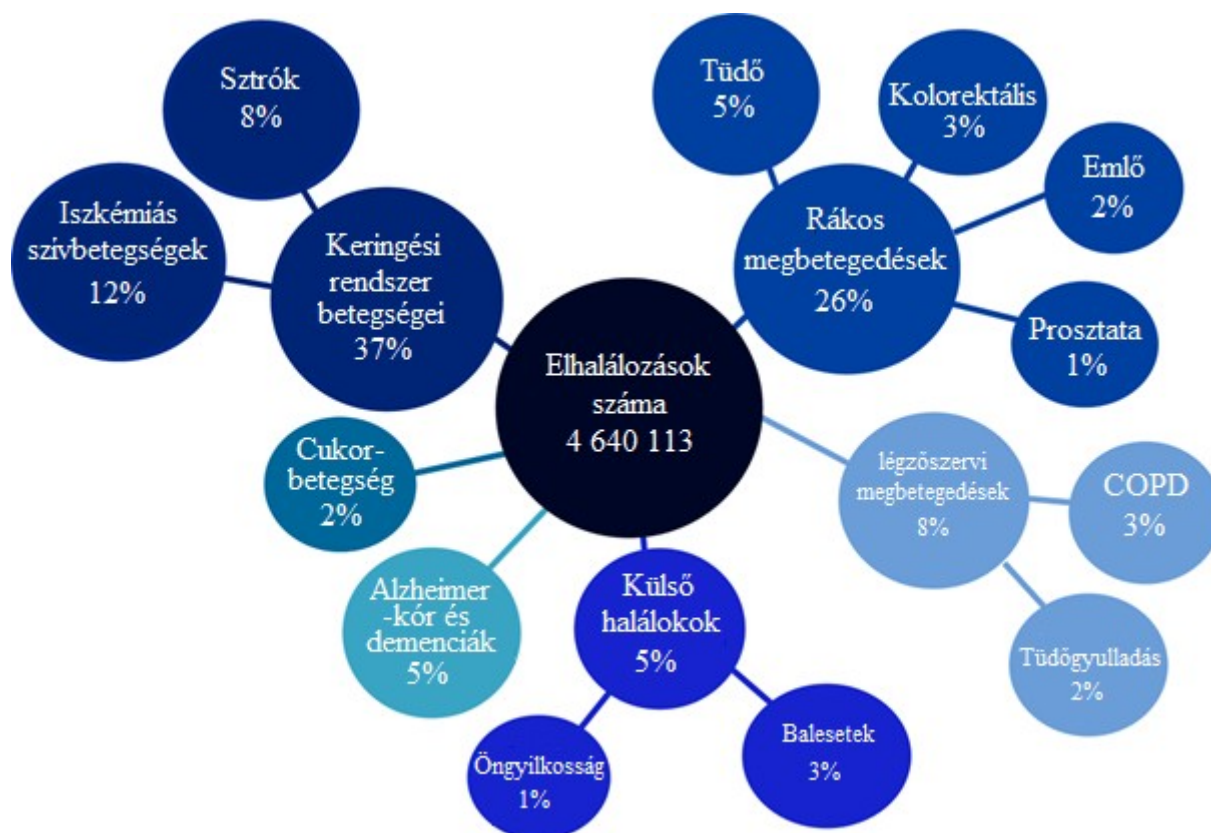
Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás	2
Nyilatkozatok	3
Tartalomjegyzék.....	5
1. Bevezetés	6
2. Irodalmi áttekintés	8
2.1. A biszfoszfonátok és történetük.....	8
2.2. A biszfoszfonátok előállítása	10
2.3. Michaelis-Arbuzov- és Pudovik-reakció.....	13
2.4. Tanszéki előzmény	17
3. Saját munka	19
3.1 Célkitűzés	19
3.2. α -Oxofoszfonátok előállítása Arbuzov-reakcióval.....	19
3.3. Dimetil-acetilfoszfonát reakciója dialkil-foszfítokkal és diarilfoszfin-oxidokkal ..	20
3.4. Dietil-benzoilfoszfonát reakciója diarilfoszfin-oxidokkal.....	23
3.4. Röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálat.....	24
3.5. A termékek bioaktivitásának vizsgálata.....	27
4. Kísérletek részletes leírása.....	31
4.1. A mérések során alkalmazott készülékek ismertetése.....	31
4.2. Előiratok.....	32
4.3. Egykristály röntgen diffrakciós vizsgálatok.....	39
4.3. In Vitro Citosztázis Assay	41
5. Összefoglalás	42
Irodalomjegyzék.....	44

1. Bevezetés

A világunk jelen korában igen fejlett időszakát éli, ennek ellenére sajnálatosan még mindig rengeteg betegség követel milliónyi emberéletet. A történelem során lejátszódott ipari forradalmakkal együtt járt környezetünk fokozott szennyezése, pusztítása, amely különféle káros anyagok kibocsátását jelenti. Ez azonban nem egyedüli okozója a betegségeknek, korunkban rengeteg olyan könnyen elérhető árucikk szerezhető be, amik ehhez hozzájárulnak.

Európai szinten és világszinten is a szív és érrendszeri betegségek okozzák a legtöbb halálesetet. Második helyen a különböző típusú rákos megbetegedések állnak. Egy 2017-es Európa szintű felmérés szerint a szív és érrendszeri megbetegedések a 4,6 millió összes halálozás 37 százalékáért feleltek, míg a rákos megbetegedések a 26 százalékáért. **(1. ábra)** ^[1] Magyarországon egy 2014-ben végzett felmérés szerint a szív és érrendszeri megbetegedések nők esetében a halálozások 55 százalékáért felelősek, férfiak esetében 45 százalékáért. A daganatos megbetegedések és komplikációikból származó elhalálozások a nők 23 százalékát, míg a férfiak 29 százalékát érintik.^[2]



1. ábra: Európai országok fő elhalálozási okai 2017-ben ^[1]

Egy tudatosabb életmód nagyban hozzájárulhatna ezeknek az adatoknak a változtatásához, viszont nem tekinthetünk el az örökletes és időskorral kialakuló betegségek létezésétől sem. Utóbbi a biszfoszfónátok, dronátok révén kapcsolódik Dolgozatom témájához, ugyanis az említett hatóanyagokat csontritkulás és daganatos megbetegedések kezelésében lehet alkalmazni.

A Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Szerves Kémia és Technológia Tankszékének Környezetbarát és Foszforkémiai Kutatócsoportja már több mint egy évtizede foglalkozik biszfoszfonsav-származékok kutatásával, különböző származékok szintézisével, a reakciók optimalizálásával és környezetbarátabbá tételével. A kutatási témák között a hidroxibiszfoszfónát típusú vegyületek előállítása is szerepel, amely témába én is becsatlakoztam. Kutatómunkám során Arbuzov-reakcióval előállított α -oxofoszfónátok dialkil-foszfítokkal és szekunder foszfin-oxidokkal történő Pudovik-reakcióját tanulmányoztam. A munka során a katalizátor mennyiségének reakcióra gyakorolt hatását, valamint az átrendeződéssel képződött melléktermékek képződését vizsgáltam. Az így szintetizált biszfoszfónátok tanulmányozásának egyik célja, hogy megfelelő biológiai aktivitással rendelkező vegyületeket lehessen előállítani.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A biszfoszfონátok és történetük

A biszfoszfónátok viszonylag nagy múlttal rendelkeznek, korábban az irodalomban difoszfónátként is utaltak rájuk. Az 1800-as években állították elő az első dronát vegyületeket, viszont a gyógyászatban csak az elmúlt 50 évben kezdték vizsgálni farmakológiai hatásukat. Kezdetben korróziógátlóként, valamint komplexáló ágensként alkalmazták őket, ezen tulajdonságukat még a textilipar és az olajipar használta ki, valamint műtrágyák készítésében is fontos szerepet töltöttek be. Továbbá „vízlágyító” képességük megakadályozza a kalcium-karbonát kicsapódását, amit kelátképző képességük révén érnek el. [3]

Napjainkban egy sereg dronátot tartalmazó gyógyszer van forgalomban, amelyekre jellemző a bennük található P-C-P kötés. A természetben található pirofoszfátok (difoszfátok) stabil analógjainak mondhatók a biszfoszfónátok. A legegyszerűbb ilyen pirofoszfát típusú vegyületek a difoszfát sók, amelyek szervezetünk biokémiai folyamataiban képződnek. Egyik felismert hatásuk, hogy endogén „vízlágyítók”, ami alapján a meszesedéssel kapcsolatban vizsgálták a szóban forgó vegyületek szerepkörét. A dronátok fizikai-kémiai úton fejtik ki meszesedés gátló hatásukat, miután adszorbeálódtak valamilyen ásványi felületre, gátolják a kristály növekedését. Ez a felfedezés ahhoz vezetett, hogy mint az analógnak tekinthető vegyületeknek, a biszfoszfónátoknak a biológiai hatását is vizsgálni kezdték. Az első ilyen cikket 1968-ban publikálták. [3]

A kezdeti tanulmányok megmutatták, hogy a biszfoszfónátok nem csak a lágyyszöveti meszesedést képesek megakadályozni, hanem gátolni tudják a csontok, valamint porcok rendellenes mineralizációját. Nagy mérföldkő volt a történetükben az a felfedezés, amikor egy újszerű tulajdonságukat találták meg, amiben hasonlítanak a difoszfát sókra. Ez a tulajdonság, hogy képesek meggátolni a hidroxipatit kristályok pusztulását. Csontreszorpció gátló hatásukat emiatt is kezdték el vizsgálni. Az osteoclastok által előidézett csontbontás ellen ígéretesnek bizonyultak a biszfoszfónátok. [3]

A csontreszorpció egy olyan folyamat, amelynek során az osteoclastok, azaz a csontfaló sejtek lebontják a csontszövetet. Ez azzal jár, hogy a szervezet számára felszabadul a csontállományban tárolt kalcium. Az ezzel ellentétes folyamatot csontosodásnak nevezzük, amiért az osteoblastok felelősek. Szervezetünkben a két folyamat szabályozásáért a remodeling a felelős, ami próbálja fenntartani a csontunk szilárdságát és az ionháztartást. Viszont

hormonális, valamint életkori változások során a két folyamat egyensúlya felborulhat. Ennek következménye lehet csonttrikulás vagy a Paget-kór. [4]

Az értékes hatóanyagok nem csak a csontállomány ritkulása ellen használhatók, hanem a csontok daganatos elváltozásainak kezelésében is. Ennek mechanizmusa teljesen hasonló az előzőekben leírtakhoz. A biszfoszfonátok kötődnek a csontállomány felületéhez, majd a csontfaló sejtekbe endocitózissal kerülnek, ahol gátolják az osteoclastok működését, csökkentik az élettartamukat, valamint szaporodásukat, ezáltal redukálva a csontreszorpciót. A csökkentett felszívódás azt jelenti, hogy ha jelen van daganatos csontszövet a szervezetben, ennek a felszívódását, illetve ezáltal az áttét képződés esélyét is csökkentik. [5]

Molekuláris szinten vizsgálva a dronsavak működését, három nagy csoportot különböztethetünk meg, melyeket első, második és harmadik generációs vegyületeknek nevezünk. Az első csoportba azok a vegyületek tartoznak, amelyeknél a központi szénatomon helyet foglaló szubsztituensben nincs jelen N-atom (pl. Clodronát és Etidronát). A második generációs vegyületek azok, amelyek oldalláncukban tartalmazzak nitrogént (pl. Pamidronát és Alendronát), a harmadik csoportot pedig azok a vegyületek alkotják, amelyek N-heterociklusos helyettesítőt tartalmazzak a központi C-atomon (pl.: Risedronát és Zoledronát). Az első generációs vegyületek a pirofoszfáthoz hasonlóan hatnak. Különböző metabolikus utakon keresztül az ATP nem hidrolizálható analógjaiba épülnek. Feltételezhetően ezek a metabolitok halmozódnak fel a csontfaló sejtekben. A felhalmozódás gátolja az osteoclastok működését. A második és harmadik csoport tagjai, az előzővel ellentétben nem metabolitként fejtik ki a gátló hatásukat, hanem metabolikus reakciókat zavarnak meg. Pontosabban a mevalonát útvonalat, ami a koleszterin és egyéb szterinek előállításáért felelős. A különböző nitrogén tartalmú biszfoszfonátok gátolják az enzimek működését, amik a csontfaló sejtek fontos folyamatait szabályozzák, pl. a sejt morfológiát, citoskeletális rendeződést és a membrán tulajdonságokat. [6]

A biszfoszfonátok legnagyobb sikerei közé tartoznak a rendellenes csontreszorpció problémák gyógyításai. Ezek olyan betegségek, ahol az osteoclastok túlműködést mutatnak, mint a Paget-kór, áttétes csontdaganat, rosszindulatú daganatos megbetegedések hiperkalcémiája, valamint a csonttrikulás. 11 Dronsav-származék van forgalomban különböző országokban, közöttük a legjelentősebbek az Etidronát, Clodronát, Tiludronát, Pamidronát, Alendronát, Ibandronát, Risedronát, Zoledronát. A betegek általában infúzió keresztül kapják a hatóanyagot, amely manapság legtöbbször Pamidronát vagy Zolderonsav. A legfejlettebbnek

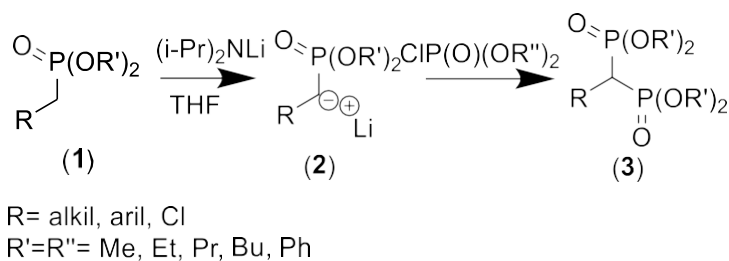
a Zoledronát tekinthető, ugyanis a csont környékén lévő sejtekben minimális kárt okoz és emellett a legjobb gátló hatással is rendelkezik. [4]

2.2. A biszfoszfónátok előállítása

Az irodalomban számos előállítási módszer található különböző biszfoszfónát vegyületekre. Két fő csoportot különböztethetünk meg a központi szénatomon jelenlévő hidroxil-csoport jelenléte vagy távolléte szerint. A metilénbiszfoszfónátokat, amelyek központi szénatomjukon nem tartalmaznak hidroxilcsoportot, valamint az α -hidroxil-metilénbiszfoszfónátokat, amelyek rendelkeznek ezzel. [7]

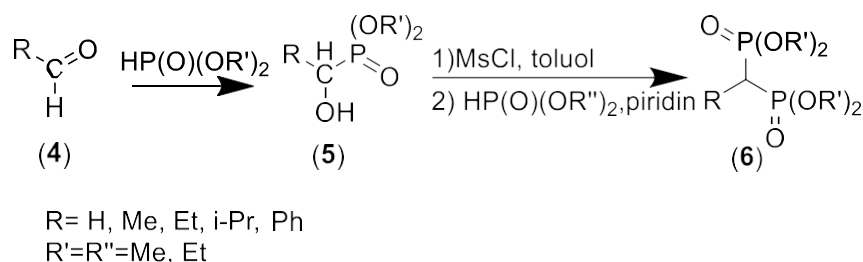
A metilénbiszfoszfónát-származékok előállítása három jellemző módon történhet: dijódmétán felhasználásával Arbuzov-reakción keresztül, dialkil-foszfítok aldehidre történő addíciójával, vagy egy lítium organikus vegyület alkalmazásával történő átalakítással. [7]

A litiált intermedieren keresztüli reakció kiindulási anyaga dialkil-foszfónát (1), amit lítium-diizopropil-amiddal reagáltatva litiált dialkil-foszfónátot kapunk. Az intermedier (2) a kiindulási anyaggal tovább reagálva adja az α -szubsztituált-metilénbiszfoszfonsav-észtert (3). (2. ábra) [8]



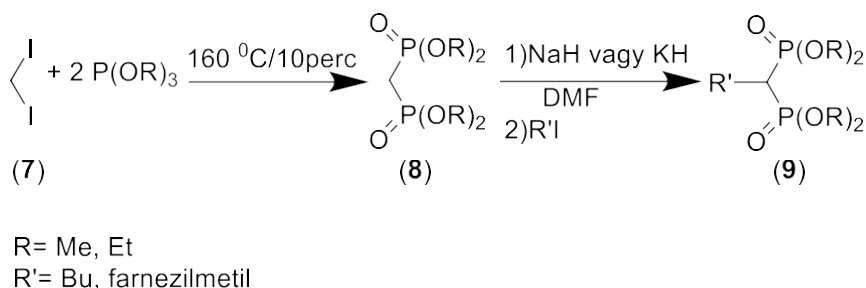
2. ábra: Litiált intermedieren keresztüli biszfoszfónát előállítás [8]

Egy 1993-ban publikált közlemény szerint aldehdből (4) kiindulva, dialkil-foszfittal egy addíciós lépésen keresztül α -hidroxifoszfónát (5) keletkezik. A hidroxifoszfónát hidroxilcsoportját először egy jó távozó csoporttá kell alakítani, majd így a feltételezések szerint, készséggel reagál az aktivált komplex egy következő dialkil-foszfittal. A keletkező termék pedig a tetszőlegesen szubsztituált metilén-biszfoszfónát (6) lehet. (3. ábra) [9]



3. ábra: Feltételezett biszfoszfónát szintézis one-pot reakcióban ^[9]

Az Arbuzov-reakción keresztüli utat választva, dijódmétánt (7) reagáltatnak 2 ekvivalens trialkil-foszfittal. A metilén-biszfoszfónát származék (8) ezután a központi szénatomján keresztül C-alkilezési reakcióba vihető. Végeredményként pedig egy tetszőlegesen szubsztituált terméket (9) kapunk. (4. ábra) ^[10]

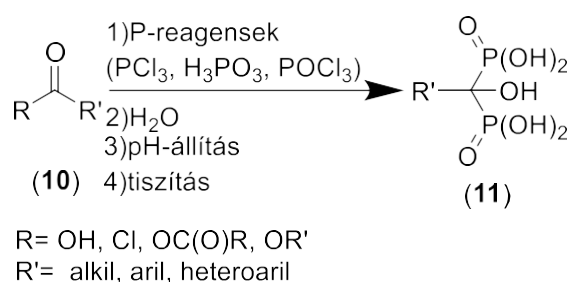


4. ábra: Dijódmetán és trialkil-foszfitek Arbuzov-reakciója ^[10]

Az α -hidroxil-metilénbiszfoszfónátok előállítását két jellemzőbb kategóriába sorolhatjuk, ezek a „direkt” (5. ábra) és „indirekt” (6. ábra) szintetikus utak. Előbbi módszer szerint egy karbonsavat vagy sav-származékot reagáltatnak különböző foszfor-reagensekkel. Utóbbi esetben pedig a karbonsav-kloridot Michaelis-Arbuzov reakcióba viszik, és az így kapott α -oxofoszfónáton Pudovik-reakciót hajtanak végre dialkil-foszfítokkal vagy szekunder foszfín-oxidokkal. ^{[11][12]}

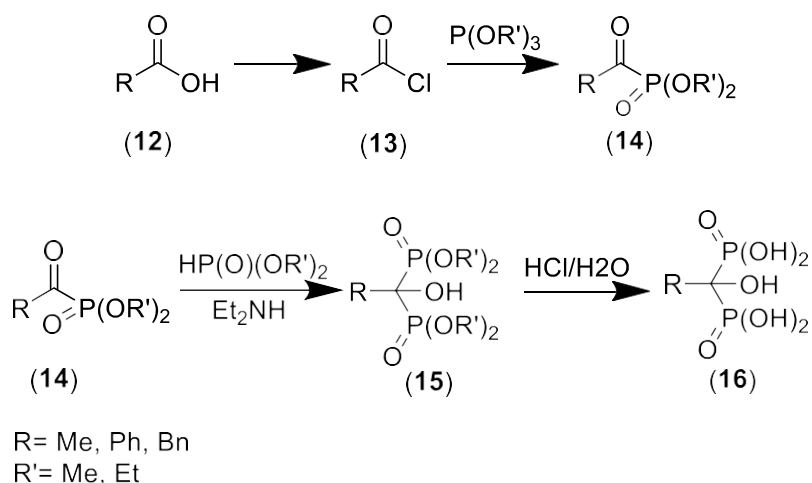
A „direkt” eljárás (5. ábra) az ipar által előnyben részesített reakció, mivel kevesebb lépésből és tisztítási folyamatból megvalósítható, mint az „indirekt”. A karbonsav, savklorid vagy savanhidrid (10) reakciója különböző foszfor-reagensekkel, melyek lehetnek foszfor-halogenidek (jellemzően foszfor-triklorid vagy foszfor-oxiklorid) és foszforosav, az α -hidroximetilénbiszfoszfónát (11) termékhez vezet. (5. ábra) Ezzel a módszerrel hidrolízis után a végtermékünkhöz juthatunk. Metánszulfonsav, toloul, klórbenzol, n-oktán gyakori oldószerei a szintézisnek. Dietil-karbonát használata is előfordul az irodalomban „zöld” oldószer vizsgálatként. A megtalálható hőmérséklet adatok 60-100 °C-os tartományba esnek. A leírt reakcióidők szélesebb skálán mozognak, pár órától pár napig is tarthat a reakció. A hidrolízis

után egy pH beállítási lépés szerepel. A kapott termék ilyenkor még nyerste terméknek minősül és további tisztítási lépésre vagy lépésekre szorul (átkristályosítás vagy kicsapás). A „direkt” előállítási módszer hátrányai közé tartozik, hogy a reakcióelegy heterogén, viszkózussá válik és ezáltal egyre nehezebben lesz keverhető. További probléma a környezeti terhelés. Az eljárás során ugyanis sósav gáz szabadul fel, amit tovább fokoz a foszfor-reagensek feleslegben történő alkalmazása, mivel ezek a felszabaduló gáz mennyiségét jelentősen növelik. Tehát összességében egy heves reakcióról beszélünk, ami megfelelő szabályozást, hűtést igényel a biztonságos végrehajtás érdekében. Ez laborméreteknél még viszonylag könnyen megoldható, iparban viszont már gondot okozhat. [11-14]



5. ábra: Direkt eljárással előállított hidroxibiszfoszfonátok [12]

Az „indirekt” eljárás (6. ábra) során két jellegzetes átalakításról beszélhetünk, a Michaelis-Arbuzov-reakcióról, valamint az azt követő Pudovik-reakcióról. Először savkloridot (13) állítunk elő egy tetszőleges karbonsavból (12). A kapott savklorid és trialkil-foszfít Michaelis-Arbuzov-reakciója során kapjuk az α -ketofoszfónátot (14). Ezután a karbonilcsoporton dialkil-foszfít addíciós reakciója megy végbe. A keletkező tetszőlegesen szubsztituált tetraalkil-biszfoszfonát (15) vegyületből pedig savas hidrolízist követően kapjuk a megfelelő dronsavat (16). (6. ábra) [8] [11] [12] [15]

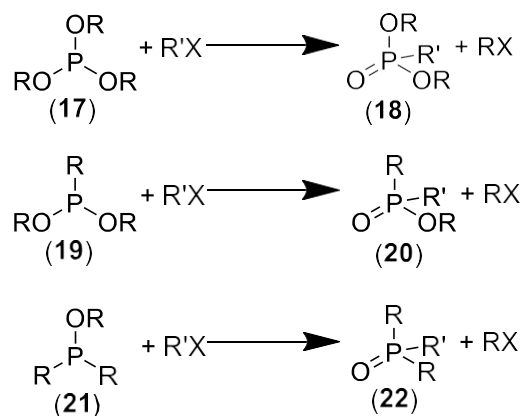


6. ábra: Indirekt módszerrel előállított dronsav származékok ^[12]

2.3. Michaelis-Arbuzov- és Pudovik-reakció

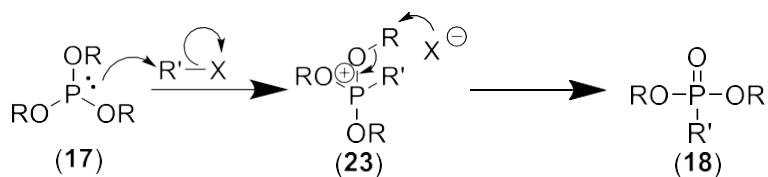
A Michaelis-Arbuzov-reakció, rövidebben Arbuzov-reakció az irodalomban 1898 óta ismert és dokumentált. August Michaelis fedezte fel először és tanulmányozta, majd munkásságát Aleksandr Arbuzov folytatta és jegyezte le részletesebben. A foszfororganikus kémia egyik legjobban vizsgált reakciója, melyet széles körben használnak különböző foszfonátok, foszfinátok, foszfinsav észterek és foszfin-oxidok szintézisében. ^[16]

Az Arbuzov-reakció egy rendkívül sokoldalú reakció szén-foszfor kötés kialakításában, mely során egy háromértékű foszforsav-észter és egy alkil-halogenid reagálnak, ötértékű foszforvegyületet eredményezve egy új alkil-halogenid képződése mellett. Legegyszerűbb esetben, az átalakulás egy alkil-halogenid és trialkil-foszfít (17) között megy végbe, dialkil-alkilfoszfonát (18) keletkezésével. A foszfít-észterekből (17) foszfonátok (18), a foszfonitokból (19) foszfinátok (20) keletkeznek, a foszfinitek (22) pedig foszfin-oxidokká (23) alakulnak. Általánosan elmondható, hogy az alkil-halogenid alkilcsoportja kapcsolódik a foszforhoz, miközben az onnan leváló alkilcsoport a halogénnel sót képez. (7. ábra) ^[16-18]



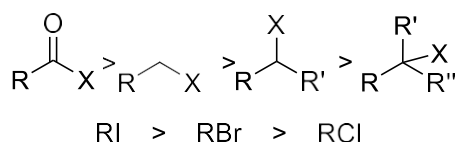
7. ábra: Michaelis-Arbuzov-reakciók ^{[17][18]}

A Michaelis-Arbuzov-reakció során SN₂ típusú nukleofil támadást indít a foszfor reagens (17, 19, 21) magányos elektronpárja az alkil-halogenid α-helyzetű szénatomján. A támadás eredményeként egy foszfónium-só (23) keletkezik, mint intermedier. A halogenid ion SN₂ támadást indít az intermedierben található egyik alkoxi-csoportra, aminek hatására pedig kialakul P=O kötéssel rendelkező foszfonát termék (18) és az új alkil-halogenid. (8. ábra) ^{[17][18]}



8. ábra: Michaelis-Arbuzov reakció mechanizmusa ^[16]

A szerves halogéntartalmú vegyületek reaktivitását tekintve elmondható, hogy általánosan a tercier alkil-halogenidek, aril-halogenidek és vinil-halogenidek nem reaktívak. Figyelemre méltó kivételt képeznek a tritil-halogenidek. Heterociklust tartalmazó vagy aktivált aril-halogenidek képesek reagálni. Az irodalomban leírták a jódbenzol és szubsztituált származékainak fotolitikus körülmények között történő reakcióját. Szekunder alkil-halogenidek gyakran nem vihetők Arbuzov-reakcióba. Reakcióikban alkéneket képeznek, mint melléktermékek. Allil-halogenidek, primer alkil-halogenidek és acil-halogenidek esetében könnyen játszódnak le a reakciók. Arilcsoport egyedüli jelenléte esetén, a reakcióban egy stabil foszfónium-só képződik és normál körülmények között nem lehet tovább haladni a szintézissel. A szerves halogéntartalmú vegyületek reaktivitási viszonyát a 9. ábrán szemléltettem. ^[16]

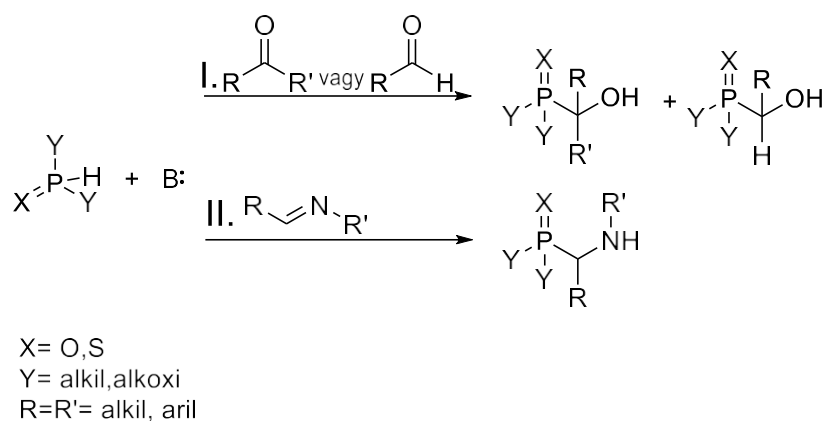


9. ábra: Relatív reakcióképességi sorrend ^[16]

A reakciókban használt foszfortartalmú szerves vegyületek általános képlete a következő: $\text{Y}_1\text{Y}_2\text{P-OR}$, ahol Y_1 és Y_2 lehetnek különböző vagy megegyező alkil-, alkoxi- vagy ariloxicsoportok. A reaktivitást vizsgálva általánosan elmondható, hogy az elektronszívó csoportok lassítják, míg az elektronküldő csoportok növelik a reakciósebességet. Ez összhangban van azzal a feltételezéssel, miszerint a reakció sebességét meghatározó lépés a foszforreagens nukleofil támadása az alkil-halogeniden. A reakció alifás csoportok esetén zökkenőmentesen lejátsszódik. A foszfit-észterek (17) a legkevésbé reakciókészek az irodalomban leírt reagensek között. Reakciókban foszfonátok (18) keletkeznek, ennek eléréshez viszont 120-160 °C-os fűtés is szükséges lehet. A foszfit-észtereknél reaktívabb vegyületek a foszfonitok (19), reakcióik végterméke a foszfinátok (20). Az utolsó jelentős csoport, a foszfinitek (21), a legreaktívabb reagensek. Reakciójuk során már 45 °C-on foszfin-oxidokat (22) lehet előállítani. (7. ábra) ^{[16] [19] [20]}

Pudovik először 1950-ben kezdte el kutatni a később róla elnevezett reakciót. Pudovik-addícióként is utalnak rá az irodalomban. A dialkil-foszfitok addíciója karbonil-csoportot tartalmazó vegyületre α -hidroxifoszfonátokat képez. (10. ábra, I. reakció) Abramov egy hasonló addíciós reakciót fedezett fel trialkil-foszfitok és karbonilvegyületek között, így a szerves foszforvegyületek addícióját telítetlen aktivált rendszerekre (alkének, alkinek, ketonok, aldehidek és iminek) szokták Pudovik-Abramov-reakcióként is illetni. Belátható, hogy a Pudovik-reakció egy közvetlen és erőteljes módszer foszfor-szén kötések kialakítására. ^[21-23]

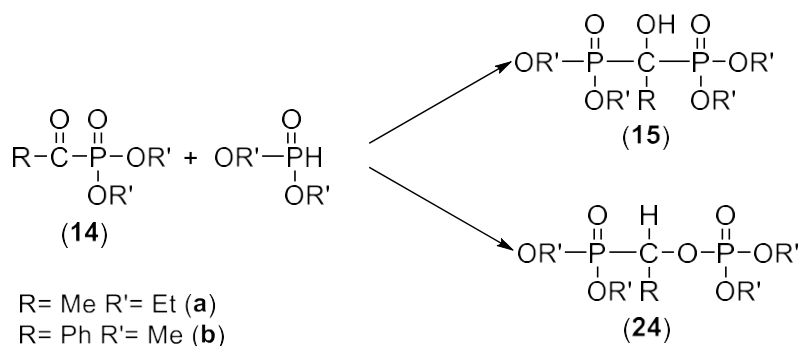
A szerves foszforvegyületek kémiájában a Pudovik-reakció egy sokszínű szintézisút és α -amino-metilfoszfonátok előállítására is használható. Bázikus körülmények között a dialkil-foszfit egy iminben található szén-nitrogén kettős kötésére addícionálódik, ezt hidrofoszfonilezési reakciónak is nevezhetjük. (10. ábra, II. reakció) ^{[21][22]}



10. ábra: Pudovik-reakciók [23]

Martin Kabachnik és Ellis Fields 1952-ben Pudovik kutatásaitól függetlenül egy szorosan kapcsolódó reakciót írtak le, melyben három komponens, egy amin, foszfit és szerves karbonilcsoportot tartalmazó vegyület kondenzációja megy végbe. Ezt a reakciót Kabachnik-Fields reakciónak hívják. [21] [22]

α -Hidroxi-biszfoszfónátok is előállíthatóak Pudovik módszerével. McConnel és Coover kutatásában dietil-acetilfoszfónát (**14a**) dialkil-foszfitokkal történő reakciója bázikus körülmények között α -szubsztituált-hidroxi-biszfoszfónátokhoz (**15a**) vezetett. (11. ábra) A reakciót dietil-aminnal katalizálták és 70 °C-on kevertették. Egy későbbi kutatásban felfedezték, hogy átrendeződés is lejátszódhat, ami során foszfónát-foszfát (**24a**) képződik. Az átrendeződést úgy próbálták elkerülni, hogy a reakció hőmérsékletét 80 °C alatt tartották, majd 0 °C-on történő kristályosítással jutottak a termékhez. Nicholson és Vaughn 1971-ben egy jól körbejárt módszert dolgozott ki, tisztább hidroxi-biszfoszfónát (**15b**) kíméletes körülmények között történő előállításáról. Dibutil-amin és dimetil-foszfit éteres oldatához csepegtettek dimetil-benzoilfoszfónátot (**14b**) 0 °C-on. (11. ábra) [23-26]



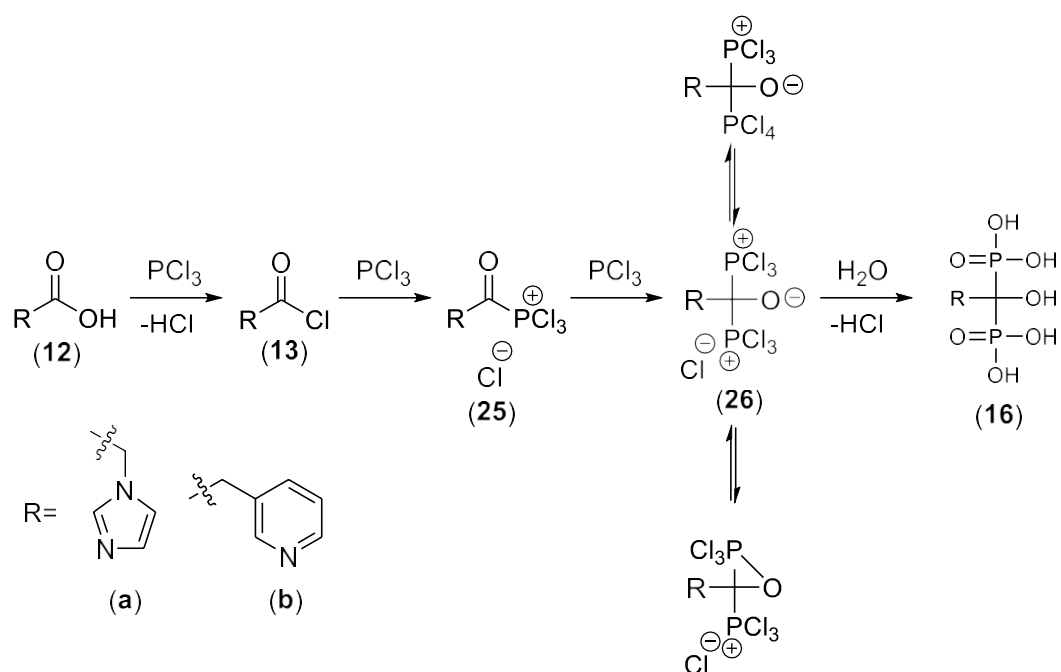
11. ábra: α -oxofoszfónátok és dialkil-foszfitok Pudovik-reakciója [26]

2.4. Tanszéki előzmény

A Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Szerves Kémia és Technológia Tankszékének Környezetbarát és Foszforkémiai Kutatócsoportja másfél évtizede foglalkozik a biszfoszfónátok és vegyületcsaládjuk kutatásával. A hatóanyagok előállításának tanulmányozása, a reakció körülmények optimalizálása, valamint új előállítási lehetőségek kutatása már 2008 óta folyik a kutatócsoportban. [27]

A legelső tanszéki kutatás során zoledronsav és risendronsav előállítását vizsgálták. Az irodalomban létező leírásai az előállításoknak, nem adtak egyhangúan tiszta képet a körülményekről és termelési adatokról. A célkitűzés ezen okból kifolyólag, egy reprodukálható, optimális reakciókörülményekkel, molarányokkal és reakcióidővel rendelkező leírás megalkotása volt. [28]

A szintézist metánszulfonsavas közegben vizsgálták. A kiindulási karbonsavat különböző molarányokban reagáltatták foszfor-trikloriddal foszforosav jelenlétében 80 °C-on. A különböző molarányokat és reakciókörülményeket vizsgálva, arra a következtetésre jutottak, hogy a foszforosav nem vesz részt a reakcióban, amit alacsony nukleofilitásával lehet magyarázni. Az optimális foszfor-triklorid mennyisége 3,1 mólekvalens, a reakcióidő pedig 3 óra. A reakciót hidrolízis, majd pH állítás követte. Tisztítási lépésként sósav oldatból történő átkristályosítást alkalmaztak. Ezt a módszert későbbiekben kiterjesztették első és második generációs dronsavakra is. Feltételezett mechanizmus, hogy a karbonsav (**12a-b**) és a foszfor-triklorid reakciójában képződő savkloridon (**13a-b**) keresztül megy végbe a reakció. A savklorid karbonilcsoportján támad egy újabb foszfor-triklorid molekula, így acil-foszfóniumsót (**25a-b**) eredményezve. Egy harmadik foszfor-triklorid molekula valószínűleg ismét a karbonilcsoporton támad, így biszfoszfónium (**26a-b**) köztitermékhez vezetve, ami hidrolízist követően α -hidroxi-metilénbiszfoszfonsavat (**16a-b**) eredményez. (**12. ábra**) [28]



12. ábra: Biszfoszonsavak képződésének feltételezett mechanizmusa

Későbbi kutatásokban, már nem csak optimális körülmények keresése volt a célkitűzés, hanem alternatív körülmények és oldószerek használata. A kutatócsoportban hangsúlyt fektettek a „zöld” oldószerek vizsgálatára és alkalmazására is. Dietil-karbonát alkalmazása metánszulfonsavat helyettesítő oldószerként vagy ezen vegyületek valamilyen arányú keveréke, egy példa a tanszéken végzett zöld kutatások közül. ^[29]

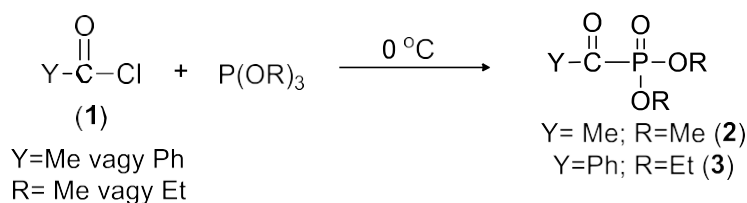
3. Saját munka

3.1 Célkitűzés

A kutatómunkám során szintetizált valamennyi vegyületet „indirekt” úton állítottam elő. Ezek sémája követte az α -oxofoszfónát (2) előállítását Michaelis-Arbuzov reakcióval savkloridokból. Ezeket kiindulási anyagként Pudovik-reakcióba vittem, így kapva tetszőleges, szimmetrikus, illetve aszimmetrikus α -hidroxibiszfoszfónát (3) típusú vegyületeket (addukt), illetve azok átrendeződött származékait (4). Célunk volt különböző, az irodalomban eddig még nem közölt vegyületek előállítása, és a reakció körülményeinek optimalizálása a kétféle termék képződésére (addukt és átrendezett). A hőmérséklet, a reakcióidő és a katalizátor mennyiségét vizsgáltuk, hogy milyen módon befolyásolja az addukt (3) és átrendeződött változatának (4) arányát. Ezzel kapcsolatban a csoportunkban már születtek korábban eredmények, melyeket hasznosíthattunk a kutatás során. ^[30] A munka célja ezen felül minden előállított vegyületünk (3 és 4) biológia aktivitásának vizsgálata volt különböző tumoros sejtvonalakon (humán emlő adenokarcinóma, prosztatás kissejtes karcinóma, tüdő laphámsejtes karcinóma, epidermoid karcinóma sejtvonal), valamint a kristályos származékok egykristály röntgendiffrakciós analízise is terveink részét képezte.

3.2. α -Oxofoszfónátok előállítása Arbuzov-reakcióval

Az α -oxofoszfónátokat (2 és 3) a korábban ismertett Arbuzov-reakció segítségével állítottuk elő. (13. ábra) A megfelelő savkloridhoz (acetil- vagy benzoil-klorid) (1) csepegtettük a trialkil-foszfítot 0 °C-on, kb. fél óra alatt. Az adagolás során heves gázfejlődés volt tapasztalható. Ezután a reakcióelegyet hagytuk szobahőmérsékletre melegedni, ezt követően pedig még 8 órán keresztül kevertettük. Végül, az acetilfoszfónátot (2) vákuumdesztillációval, a benzoilfoszfónátot (3) pedig oszlopkromatográfiával tisztítottuk meg szilikagél állófázison, diklórmétán (DKM)-MeOH 97:3 térfogatarányú eluenst alkalmazva. A termékeket (2 és 3) jó termeléssel kaptuk és ³¹P NMR spektroszkópiával, valamint folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektroszkópiával (HPLC-MS) azonosítottuk. (1. táblázat)



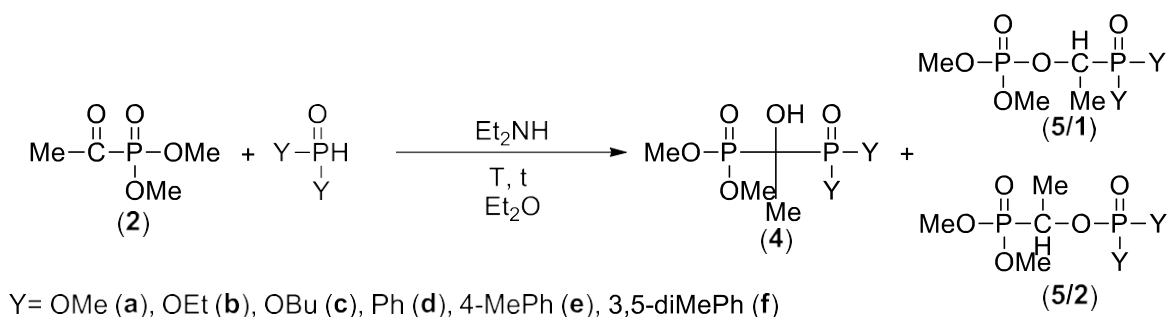
13. ábra: Az α -oxofoszfónátok előállítása

1. táblázat: Az előállított α -oxofoszfónátok tulajdonságai

Termék	Y	R	Termelés [%]	$\delta_{^{31}\text{P}}$	$\delta_{^{31}\text{P}}^{\text{lit.}}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	Ref.
2	Me	Me	70	-1,10	-0,95	153	[15]
3	Ph	Et	73	-1,30	-1,31	243	[31]

3.3. Dimetil-acetilfoszfónát reakciója dialkil-foszfítokkal és diarilfoszfin-oxidokkal

A Pudovik-reakciók vizsgálatát dimetil-acetilfoszfónát (**2**) dialkil-foszfítokkal, illetve diarilfoszfin-oxidokkal történő átalakításával kezdtük. Reagensként dimetil-, dietil- és dibutil-foszfítot, valamint difenil-, di-4-tolil-, illetve bisz-3,5-dimetilfenilfoszfin-oxidot alkalmaztunk. (**14. ábra**) A reakciókat éteres közegben hajtottuk végre 0°C -on, dietil-amin bázis jelenlétében. Az adduktok (**4**) átrendeződésének hajlandóságát a reakcióidő, a hőmérséklet és katalizátor mennyiségének változtatásával vizsgáltuk. A reakció végbemenetele után az elegyet bepároltuk. Ezt követően 2-3 cm szilikagélen átszűrtük, majd az így kapott nyersanyag ^{31}P NMR spektruma alapján megállapítottuk a termékelegy százalékos összetételét. A kapott eredményeket a **2. táblázatban** foglaltam össze.



14. ábra: Dimetil-acetilfoszfónát Pudovik-reakciója

2. táblázat: Dimetil-acetilfoszfonát Pudovik-reakció termékek összesítő táblázata

Sorszám	Y	T(°C)	t	Katalizátor	Termékösszetétel (%) ^[a]			Termelés
				(%)	4	5/1	5/2	(%)
1	MeO	0	8h	5	100	-	-	68 (4a)
2	MeO	0	8h	40	-	100		75 (5a)
3	EtO	0	8h	5	100	-	-	80 (4b)
4	EtO	0	8h	40	60	32	8	-
5	EtO	26	3nap	40	-	83	17	87 (5b)
6	BuO	0	8h	5	100	-	-	66 (4c)
7	BuO	0	8h	40	50	34	16	-
8	BuO	26	3nap	40	-	81	19	70 (5c)
9	Ph	0	8h	40	100	-	-	64 (4d)
10	4-MePh	0	8h	40	100	-	-	62 (4e)
11	3,5-diMePh	0	8h	40	100	-	-	69 (4f)

^[a] A ³¹P NMR spektrum relatív intenzitásai alapján.

Dimetil-acetilfoszfonát és dimetil-foszfit reakciójában, 5% dietil-aminnal kizárólag a várt biszfoszfonát (4a) képződött 8 órás reakcióidő után. (2. táblázat, 1. sor) A katalizátor mennyiségét 40%-ra növelve a reakcióelegyben, szelektíven már csak az átrendeződött foszfonát-foszfatot (5a) kaptuk. (2. táblázat, 2. sor)

Dietil-foszfit reagenst alkalmazva, 5% bázis jelenlétében, 8 óra kevertetés után a reakció szintén szelektíven a kívánt hidrox-biszfoszfonáthoz (4b) vezetett. (2. táblázat, 3. sor) 40%-ra emelve a katalizátor mennyiségét 8 óra után még az addukt (4b) volt nagyobb mennyiségben jelen a termékelegyben. (2. táblázat, 4. sor) A teljes átrendeződést 72 óra szobahőmérsékleten történő kevertetés után sikerült elérni. (2. táblázat, 5. sor)

Dibutil-foszfitral is az előzőhöz hasonló eredményt kaptunk. 5% Dietil-amin jelenléte a reakcióelegyben kizárólag az addukt (4c) képződését eredményezte. (2. táblázat, 6. sor) 40%-ra emelve a katalizátor mennyiségét azt tapasztalhattuk, hogy a biszfoszfonát (4c) és a

foszfónát-foszfátok (**5c**) 1:1 arányban voltak jelen a reakcióelegyben. (**2. táblázat, 7. sor**) A reakciót megismételve 3 napos szobahőmérsékleten történő keveréssel, ugyancsak elmondható, hogy csak az átrendeződött vegyületek (**5c**) voltak jelen a reakcióelegyben. (**2. táblázat, 8. sor**)

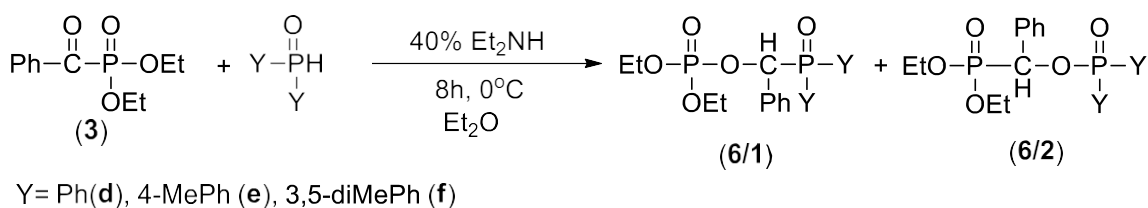
A dietil- és dibutil-foszfittal végzett reakciónál az átrendeződött vegyületek (**5**) között jelen volt mindkét lehetséges izomer (**5b-c/1** és **5b-c/2**). Láthatjuk, hogy mindkét esetben az adduktok (**4b** és **4c**) a MeO csoportokat tartalmazó foszforfunkció irányába rendeződnek át, ezt azzal magyarázhatjuk, hogy a MeO csoport kevésbé elektronküldő, mint az EtO vagy BuO, így ez a P atom parciálisan pozitívabb, ezért a központi szén atomhoz kapcsolódó parciálisan negatív oxigén atom ebbe az irányba fordul szívesebben, így az **5/1** származékok aránya nagyobb a termékelegyben.

Ezután a dimetil-acetilfoszfónátot (**2**) különböző diarilfoszfin-oxid származékokkal (Y=Ph, 4-MePh, 3,5-diMePh) is reakcióba vittük. Ezekben az esetekben 40% katalizátor alkalmazásakor sem tapasztaltunk átrendeződést, 0 °C-on éteres közegben. (**2. táblázat, 9-11. sor**) Az ily módon előállított termékek (**4d-f**) fehér kristályos vegyületek, valószínű, hogy a kristályosodás gyorsabban végbemegy a reakcióelegyben, mint az átrendeződési reakció és szilárd formában már nem alakulnak át a termékek (**4d-f**).

A nyerstermékeket szilikagél állófázison (eluens: DKM-MeOH 97:3) oszlopkromatográfiás módszerrel, illetve átkristályosítással tisztítottuk. Az adduktra és átrendeződött izomerjeire számított termelés a **2. táblázatban** látható módon 62-87%-os intervallumba esett. Minden vegyületet ³¹P, ¹³C és ¹H NMR, valamint HRMS segítségével jellemeztünk. A kristályos komponensek esetében olvadáspontot is megadtunk, illetve egykristály röntgendiffrakciós analízist is végeztünk.

3.4. Dietil-benzoilfoszfonát reakciója diarilfoszfin-oxidokkal

A munkát dietil-benzoilfoszfonát (3) és diarilfoszfin-oxidok Pudovik-reakcióinak vizsgálatával folytattuk. (15. ábra) Az átalakításokat éteres közegben végeztük 0 °C-on 40% dietil-amin jelenlétében, a reakcióidő 8 óra volt. Bepárlást követően az elegyet 2-3 cm szilikagélen átszűrtük, majd a nyerstermékelegy százalékos összetételét a ^{31}P NMR spektrumok relatív intenzitás értékei alapján határoztuk meg. Az eredményeket a 3. táblázat tartalmazza.



15. ábra: Dietil-benzoilfoszfonát Pudovik-reakciója diarilfoszfin-oxidokkal

3. táblázat: Dietil-benzoilfoszfonát és diarilfoszfin-oxidok reakcióinak eredményei

Sorszám	Y	Termékösszetétel (%) ^[a]		Termelés (%)
		6/1	6/2	
1	Ph	60	40	70 (6d)
2	4-MePh	88	12	65 (6e/1)
3	3,5-diMePh	77	23	72 (6f/1)

^[a] A ^{31}P NMR spektrum relatív intenzitásai alapján.

A reakciók során az adduktok egyik esetben sem keletkeztek, kizárólag az átrendeződött izomerek (6) képződése volt megfigyelhető. A megnövekedett átrendeződési hajlam a központi szénatomhoz kapcsolódó fenilcsoport elektronszívó képességével, illetve a P-O kötés kialakulásakor felszabaduló energiával magyarázható, amely közel 400 kJ/mol. ^[32] Ezekben az esetekben oxigén az EtO csoportokat tartalmazó P funkció irányába fordul be, ennek valószínűleg szterikus okai vannak.

A termékeket (6) oszlopkromatográfiás módszerrel tisztítottuk meg szilikagél állófázison, DKM-MeOH 97:3 térfogatarányú eluent alkalmazva. A vegyületeket jó termeléssel (65-72%) kaptuk. A 6d/1 és 6d/2 izomereket egymástól ilyen körülmények között

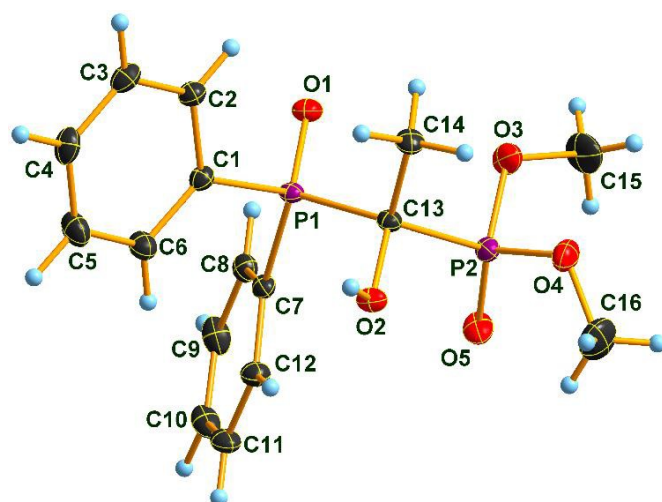
nem tudtuk elválasztani, jellemzésüket 6:4 arányú keverékként végeztük el. Az **6e** és **6f** vegyületek esetében a **6/1** izomereket tisztán ki tudtuk nyerni és jellemezni ^{31}P , ^{13}C és ^1H NMR, valamint HRMS segítségével.

3.4. Röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálat

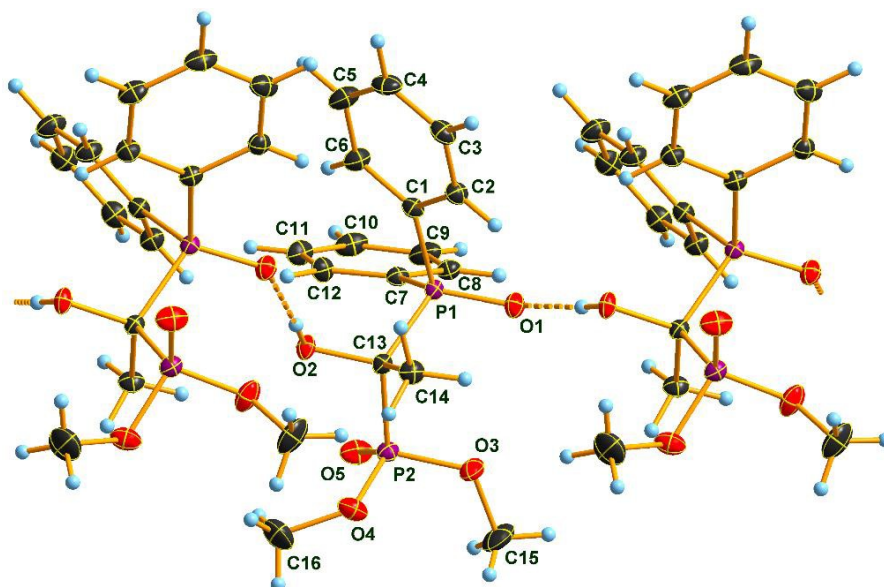
A röntgendiffrakció egy igen változatos vizsgálati módszer a modern tudomány világában, amelyet a természettudományok valamennyi ágában használnak. Az anyag halmazállapotától és tulajdonságaitól függően igen különböző vizsgálati módszereket alakítottak ki. Kristályos anyagok vizsgálatára az egykristály diffrakciós módszert fejlesztették ki, ami ismeretlen kristályszerkezetű egykristályok hatékony szerkezetmeghatározásában használhatók. [33]

A kutatómunka során előállított vegyületek közül három potenciális származék (**4d**, **4e** és **4f**) volt alkalmas egykristály röntgendiffrakciós vizsgálatra. A legtöbb termékünk olaj formájában jelent meg, míg **4d-f** anyagok kristályos formát mutattak. E kettő közül, acetontól történő átkristályosítási lépések után **4d** és **4e** vegyületeket megfelelő kristályminőségben és szerkezetben kaptuk, hogy az egykristály röntgendiffrakciós módszerrel analizálni lehessen. A vizsgálat eredményeként a két termékünk (**4d** és **4e**) molekulaszerkezetéről és kristályszerkezetéről kaphattunk információt. (16-19. ábra) A méréseket Dr. Konstantin Karaghiosoff külföldi együttműködő partnerünk végezte, a kiértékelésekben pedig Dr. Czugler Mátyás professzor volt segítségünkre. [34]

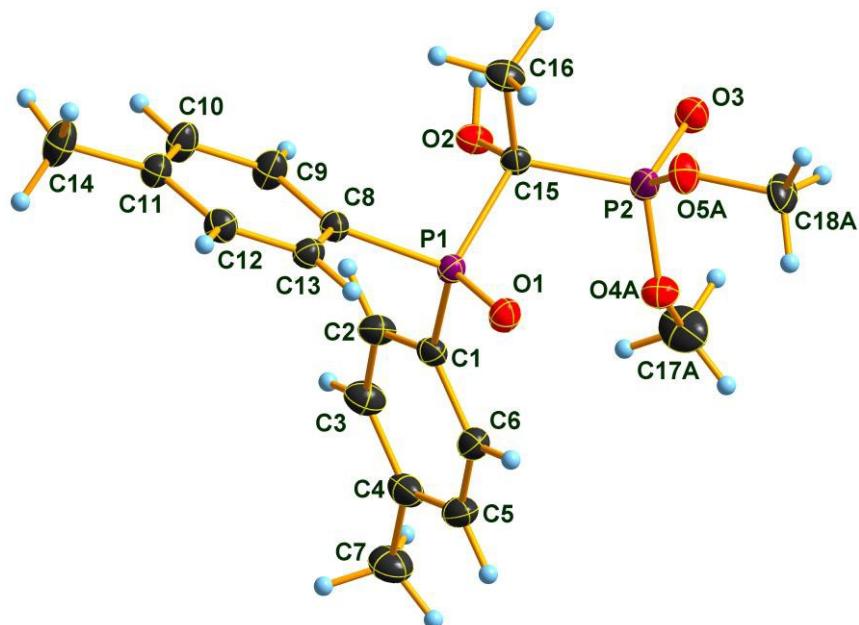
Megállapítottuk, hogy **4d** vegyület esetében a molekulák egymáshoz lineárisan kapcsolódnak, H-kötéseken keresztül. (16-17. ábra) **4e** Vegyület esetében pedig a kristályrácsban dimereket alkotnak, amelyek egymáshoz szintén H-kötésekkel kapcsolódnak. (18-19. ábra)



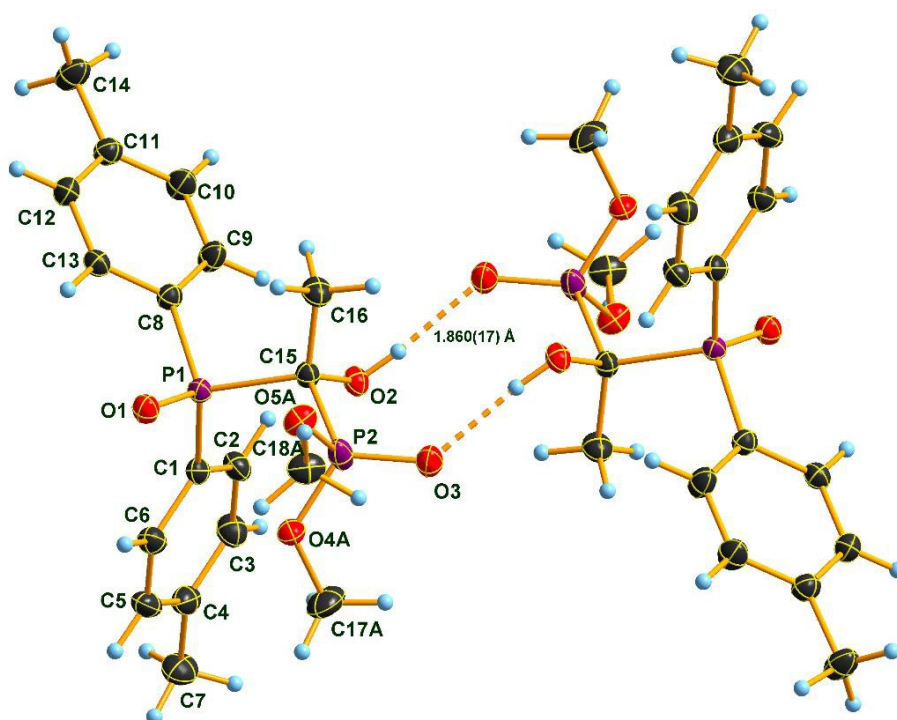
16. ábra: Dimetil-1-difenilfoszfinoil-1-hidroxi-etilfoszfonát (**4d**) molekulaszerkezete



17. ábra: Dimetil-1-difenilfoszfinoil-1-hidroxi-etilfoszfonát (**4d**) molekulák hidrogén-kötéseken keresztül történő lineáris kapcsolódása



18. ábra: Dimetil-1-bisz(4-metilfenil)-foszfinoil-1-hidroxi-etilfoszfonát (**4e**) molekulaszerkezete.

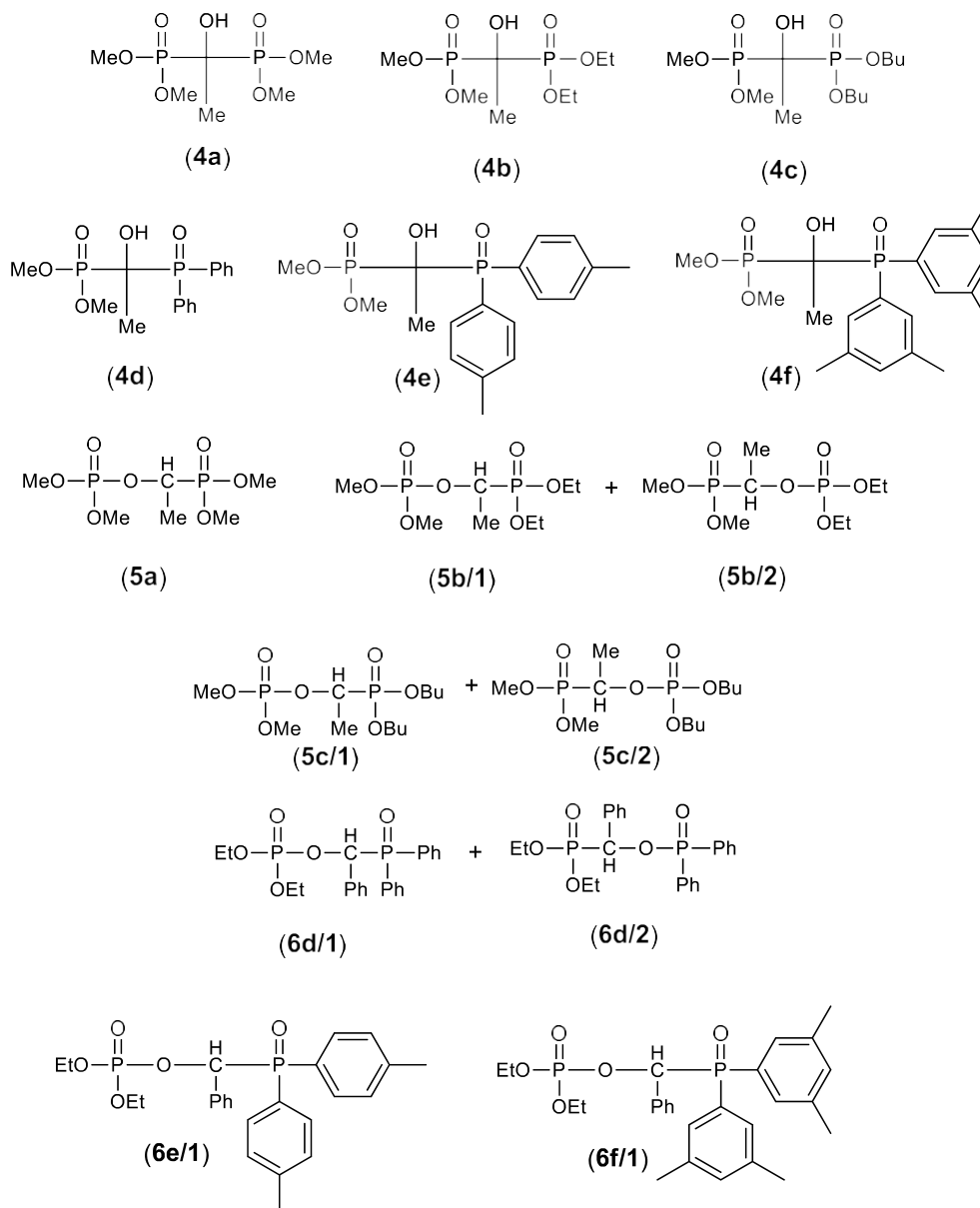


19. ábra: Dimetil-1-bisz(4-metilfenil)-foszfinoil-1-hidroxi-etilfoszfonát (**4e**) molekulák hidrogén-kötésen keresztül történő kapcsolódása, dimerek létrehozásával

A kristályszerkezetben két addukt (**4e**) molekula képez dimert egy acetón molekulával. Az acetón molekula az átláthatóság kedvéért kimaradt az ábráról. (**18-19. ábra**)

3.5. A termékek bioaktivitásának vizsgálata

A munka során egy 15 tagú vegyülettárat szintetizáltunk, ami a **20. ábrán** látható. Valamennyi hidroximetilénbiszfoszfonsav származékot (**4a-f**), illetve az átrendeződött specioseket is (**5a-c**, **6d**, **6e/1**, **6f/1**) citotoxicitási vizsgálatnak vetettük alá.



20. ábra: 15 Tagból álló vegyülettár

A citotoxicitási vizsgálatokat rutinszerűen használják kemoterápiás gyógyszerek rákos sejtekkel szembeni hatékonyságának kiszámítására. A citotoxicitás értékelésére az MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium bromid) -tesztet használják, amely a sejtek életképességének meghatározására szolgáló módszer. A vizsgálat egy bizonyos szakaszában

MTT festékkel kezeljük a sejteket, amelyet az élő sejtek mitokondriális reduktáz enzimjei formazánná alakítanak. A reakciót színváltozás kíséri, amelyet DMSO oldatban kimutathatunk és fotometriás módszerrel számszerűen meg is határozhatunk. [35]

A kísérleteket MDA-MB 231 emlő adenokarcinóma, A431 epidermoid karcinóma, PC-3 prosztata adenokarcinóma és Ebc-1 tüdő laphámsejtes karcinóma sejtvonalakon végeztük el, és megállapítottuk a citosztázis (%) és 50 %-os inhibitor-koncentráció (IC_{50}) értékeket. Az eredményeket a **4. és 5. táblázatokban** foglaltam össze. Citosztázis alatt a sejtek növekedésének és szaporodásának gátlását értjük. Az IC_{50} egy kvantitatív mérőszám, amely azt jelzi, hogy egy adott hatóanyagból mennyi szükséges egy adott biológiai folyamat vagy biológiai komponens *in vitro* 50%-os gátlásához.

Az eredmények azt mutatták, hogy számos vegyület citosztatikus hatást váltott ki a humán tumorsejtvonalakon. Figyelembe véve a citosztázis értékek százalékos arányát $c=50\ \mu M$ koncentrációnál, arra a következtetésre jutottunk, hogy **5b** és **6f-1** vegyületek mérsékelt citosztatikus hatást fejtettek ki a sejteken. **4b** Addukt hatékony volt az A431 humán epidermoid karcinóma sejteken, és 49,9 %-os citosztázist mutatott. **6d** Származék magasabb citosztázist indukált MDA-MB 231 humán emlő adenokarcinóma és Ebc-1 humán tüdőkarcinóma sejteken (48,9, illetve 45,3%-os citosztázis), míg **6e-1** kiemelkedő hatást váltott ki ezeken a sejtvonalakon (citosztázis=69,9, illetve 72,4%). Összességében az MDA-MB 231 humán emlő adenokarcinóma sejtvonal bizonyult a legérzékenyebbnek az összes hatékony vegyületre. A $c=50\ \mu M$ koncentráció melletti citosztázis értékeket a **4. táblázat** tartalmazza.

A fentebb leírt tendencia beigazolódott, amikor a hatást a számított IC_{50} értékek alapján határoztuk meg. Míg **4a-f** és **5a-c** vegyületek nem voltak túl effektívek, addig **6d**, **6e-1**, **6f-1** vegyületeknél nagyobb citosztatikus hatást figyeltünk meg.

6f-1 Származéknak kisebb volt a citosztatikus hatása ($IC_{50}=99,5-115,8\ \mu M$), míg az **6e-1** komponens kifejezettebb citosztázist indukált az A431 sejteken ($IC_{50}=40,4\ \mu M$). Az MDA-MB 231 és Ebc-1 sejteken a leghatékonyabbnak ($IC_{50}=37,8$ és $25,9\ \mu M$) **6e-1** vegyület bizonyult. A vegyületek IC_{50} értékeit az **5. táblázat** foglalja össze. A daunomycint, egy gyakran használt referenciavegyületet, szintén teszteltünk az általunk alkalmazott sejtvonalakon. A részletek az **5. táblázat** „a” lábjegyzetében találhatók. [36] [37]

4. táblázat: Biszfoszfonát vegyületek tumorsejtkultúrákon vizsgált citosztázis hatása

Vegyület	Citosztázis (%) [c = 50 µM]			
	Sejtvonal			
	MDA-MB 231	PC-3	Ebc-1	A431
4b	19,7	14,7	34,4	49,9
5b	26,1	15,3	23,9	38,3
6d	48,9	33,2	32,5	45,3
6e/1	69,2	14,9	72,4	0,0
6f/1	39,3	13,5	40,0	0,4

5. táblázat: A vegyületek tumorsejtkultúrákon vizsgált IC₅₀ értékei

Vegyület	IC ₅₀ (μM)			
	Sejtvonal			
	MDA-MB 231	PC-3	Ebc-1	A431
4a	>250	>250	>250	>250
4b	>250	>250	>250	>250
4c	>250	>250	>250	>250
4d	>250	>250	>250	>250
4e	>250	>250	>250	>250
4f	>250	>250	>250	>250
5a	>250	>250	>250	>250
5b	>250	>250	>250	>250
5c	>250	>250	>250	>250
6d	76,7	>250	99,5	40,4
6e/1	37,8	149,5	25,9	>250
6f/1	100,7	115,8	94,1	110,7

^[a] Összehasonlítás céljából a fenti sejtvonalak esetében a Daunomycin referenciavegyület IC₅₀ értékei sorra: 0,20, 4,0, 1,2 és 0,7 μM [36], [37].

A mérések eredményei alapján összességében megállapítható, hogy hatékonyak az aromás egységekkel rendelkező átrendeződött vegyületek mutatkoztak. A vizsgálatokat Dr. Bösze Szilvia és Oláhné Dr. Szabó Rita segítségével végeztük, az ELKH Peptidkémiai Kutatócsoportjával együttműködésben.

4. Kísérletek részletes leírása

4.1. A mérések során alkalmazott készülékek ismertetése

A ^{31}P , ^{13}C , ^1H NMR spektrumok Bruker 300, illetve 500 típusú (^{31}P : 121,5 MHz, ^{13}C : 75,5 MHz, ^1H : 300 MHz, illetve ^{31}P : 202,4 MHz, ^{13}C : 125,7 MHz, ^1H : 500 MHz) spektrométerrel készültek, deuterált kloroformban, a csatolási állandók Hz-ben értendők.

A folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás (HPLC-MS) mérések Shimadzu LCMS-2020 típusú készülékkel készültek 50-1000 m/z tartományban, amely Reprospher 100 C18 (5 μm ; 100x3mm) oszlopot, pozitív és negatív kettős ionforrást (DUIS $\pm$) és kvadrupól MS analizátort tartalmaz.

A pontostömeg meghatározás nagyfelbontású Waters QTOF Premier (Manchester,UK) tömegspektrométeren, pozitív elektroporlasztásos üzemmódban történt.

Az olvadáspont meghatározás Setaram DSC92 típusú készülékkel történt, inert nitrogén atmoszférában.

4.2. Előiratok

Dimetil-acetilfoszfonát (2) előállítása

Trimetil-foszfítot (0,05 mol; 5,9 ml) lassan csepegtetünk 0 °C-ra hűtött acetyl-kloridhoz (0,05 mol; 3,6 ml) intenzív kevertetés mellett. Az összes trimetil-foszfít beadagolása után (körülbelül fél óra), az elegyet hagyjuk szobahőmérsékletre melegedni, és még 8 órán keresztül kevertetjük. A terméket vákuumdesztillációval tisztítjuk (fp. 110-112 °C/20 Torr; fp. ^[15] 82-84 °C/6 Torr).

Termelés: 5,3 g (70%); ³¹P NMR (CDCl₃) δ -1,1; δ ^[15] -0,95; [M+H]⁺=153).

Dietil-benzoilfoszfonát (3) előállítása

Trietil-foszfítot (0,05 mol; 8,6 ml) lassan csepegtetünk 0 °C-ra hűtött benzoil-kloridhoz (0,05 mol; 5,8 ml) intenzív kevertetés mellett. Az összes trimetil-foszfít beadagolása után (körülbelül fél óra), reakciót szobahőmérsékleten folytatjuk 8 órán keresztül. A terméket oszlopkromatográfiás módszerrel tisztítjuk szilikagél állófázison, diklórmétán-metanol 97:3 arányú eluenssel.

Termelés: 8,8 g (73%); ³¹P NMR (CDCl₃) δ -1,3; δ ^[31] -1,3; [M+H]⁺=243.

Tetrametil-α-hidroxi-etilidénbiszfoszfonát (4a)

Dimetil-foszfítot (2,2 mmol; 0,20 ml) dietil-éter (10 ml) és dietil-amin (0,11 mmol; 0,01 ml) 0 °C-ra hűtött elegyéhez adunk. Intenzív kevertetés mellett az elegyhez csepegtetjük a dimetil-acetilfoszfonát (2,2 mmol; 0,33 g) 3 ml dietil-éterrel készült oldatát. A reakciót 8 órán keresztül, 0 °C-on folytatjuk, majd az elegyet bepároljuk. A terméket oszlopkromatográfiás módszerrel tisztítjuk szilikagél állófázison, diklórmétán-metanol 97:3 arányú eluenst alkalmazva.

Termelés: 0,40 g (68%), ³¹P NMR (CDCl₃) δ 22,3 ^[26] δ_P 22,0; ¹³C NMR (CDCl₃) δ 20,0 (t, J = 2,2 Hz, CCH₃), 54,2 és 54,3 (t, J = 3,5 Hz, 4 OCH₃), 71,7 (t, J = 156,8 Hz, CCH₃); ¹H NMR (CDCl₃) δ 1,70 (t, J = 16,2 Hz, 3H, CCH₃), 3,88–3,93 (m, 12H, OCH₃); [M + H]⁺ = 263; [M + Na]⁺_{mért} = 285,0272; [M + Na]⁺_{mért} = 285,0269.

Dietil-dimetil- α -hidroxi-etilidénbiszfoszfónát (4b)

Dietil-foszfítot (2,2 mmol; 0,28 ml) dietil-éter (10 ml) és dietil-amin (0,11 mmol; 0,01 ml) 0 °C-ra hűtött elegyéhez adunk. Intenzív kevertetés mellett az elegyhez csepegtetjük a dimetil-acetilfoszfónát (2,2 mmol; 0,33 g) 3 ml dietil-éterrel készült oldatát. A reakciót 8 órán keresztül, 0 °C-on folytatjuk, majd az elegyet bepároljuk. A terméket oszlopkromatográfiás módszerrel tisztítjuk szilikagél állófázison, diklórmétán-metanol 97:3 arányú eluenst alkalmazva.

Termelés: 0,51 g (80%), ^{31}P NMR (CDCl_3) δ_{P1} 19,9 és δ_{P2} 22,7 (d, $^2J_{\text{PP}} = 40,1$ Hz),^[38] δ_{P1} 20,6 és δ_{P2} 23,4 ($^2J_{\text{PP}} = 39,3$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 16,4 (d, $J = 5,6$ Hz, 2 CH_2CH_3), 20,4 (s, CCH_3), 54,2 és 54,3 (d, $J = 7,1$ Hz, 2 OCH_3), 63,7 és 63,8 (d, $J = 4,9$ Hz, 2 OCH_2), 71,6 (t, $J = 156,4$ Hz, CCH_3); ^1H NMR (CDCl_3) δ 1,37 (t, $J = 7,0$ Hz, 6H, CH_2CH_3), 1,68 (t, $J = 16,1$ Hz, 3H, CCH_3), 3,88 (d, $J = 10,5$ Hz, 6H, OCH_3), 4,21–4,32 (m, 4H, OCH_2); $[\text{M} + \text{H}]^+ = 291$; $[\text{M} + \text{Na}]^+$ mért = 313,0573; $[\text{M} + \text{Na}]^+$ számított = 313,0582.

Dibutil-Dimetil- α -hidroxi-etilidénbiszfoszfónát (4c)

Dibutil-foszfítot (2,2 mmol; 0,43 ml) dietil-éter (10 ml) és dietil-amin (0,11 mmol; 0,01 ml) 0 °C-ra hűtött elegyéhez adunk. Intenzív kevertetés mellett az elegyhez csepegtetjük a dimetil-acetilfoszfónát (2,2 mmol; 0,33 g) 3 ml dietil-éterrel készült oldatát. A reakciót 8 órán keresztül, 0 °C-on folytatjuk, majd az elegyet bepároljuk. A terméket oszlopkromatográfiás módszerrel tisztítjuk szilikagél állófázison, diklórmétán-metanol 97:3 arányú eluenst alkalmazva.

Termelés: 0,50 g (66%), ^{31}P NMR (CDCl_3) δ_{P1} 19,8 és δ_{P2} 22,8 (d, $^2J_{\text{PP}} = 39,3$ Hz),^[39] δ_{P1} 20,4 és δ_{P2} 23,3 ($^2J_{\text{PP}} = 40,1$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 13,6 (s, 2 CH_2CH_3), 18,6 (s, 2 CH_2CH_3), 20,1 (s, CCH_3), 32,5 (d, $J = 5,5$ Hz, 2 OCH_2CH_2), 54,0–54,1 és 54,2–54,3 (m, 2 OCH_3), 67,4 (m, 2 OCH_2), 71,7 (t, $J = 156,1$ Hz, CCH_3); ^1H NMR (CDCl_3) δ 0,96 (t, $J = 7,4$ Hz, 6H, 2 CH_2CH_3), 1,38–1,50 (m, 4H, CH_2CH_3), 1,63–1,78 (m, 3 + 4H, $\text{CCH}_3 + \text{OCH}_2\text{CH}_2$), 3,89 (dd, $J_1 = 10,5$ Hz, $J_2 = 1,6$ Hz, 6H, OCH_3), 4,16–4,23 (m, 4H, OCH_2); $[\text{M} + \text{H}]^+ = 347$; $[\text{M} + \text{Na}]^+$ mért = 369,1209; $[\text{M} + \text{Na}]^+$ számított = 369,1208.

Dimetil-1-difenilfoszfinoil- α -hidroxi-etilfoszfonát (4d)

Difenilfoszfin-oxidot (2,2 mmol; 0,44 g) dietil-éter (10 ml) és dietil-amin (0,88 mmol; 0,09 ml) 0 °C-ra hűtött elegyéhez adunk. Intenzív kevertetés mellett az elegyhez csepegtetjük a dimetil-acetilfoszfonát (2,2 mmol; 0,33 g) 3 ml dietil-éterrel készült oldatát. A reakciót 8 órán keresztül, 0 °C-on folytatjuk, majd az elegyet bepároljuk. A fehér kristályos terméket szűrtük, dietil-éterrel mostuk, majd acetontól történő átkristályosítással tisztítottuk.

Termelés: 0,50 g (64%), op: 131–132 °C; ^{31}P NMR (CDCl_3) δ_{P1} 23,9 és δ_{P2} 29,0 (d, $^2J_{\text{PP}} = 25,4$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 20,3 (s, CCH_3), 53,9 és 54,0 (d, $J = 7,4$ Hz, 2 OCH_3), 74,8 (dd, $J_1 = 154,6$ Hz, $J_2 = 79,0$ Hz, CCH_3), 127,8 és 128,2 (d, $J = 11,7$ Hz, 2 C_γ), 130,4 (dd, $J_1 = 96,9$ Hz, $J_2 = 5,5$ Hz, C_α), 130,8 (d, $J = 98,1$ Hz, C_α), 131,6 és 131,8 (d, $J = 2,8$ Hz, 2 C_δ), 132,4 és 132,7 (d, $J = 8,6$ Hz, 2 C_β); ^1H NMR (CDCl_3) δ 1,65 (t, $J = 15,6$ Hz, 3H, CCH_3), 3,44 és 3,70 (d, $J = 10,6$ Hz, 6H, OCH_3), 7,40–7,61 (m, 6H, ArH), 8,09 és 8,18 (dd, $J_1 = 11,1$ Hz, $J_2 = 6,9$ Hz, 4H, ArH_β); $[\text{M} + \text{H}]^+ = 355$; $[\text{M} + \text{Na}]^+_{\text{mért}} = 377,0681$; $[\text{M} + \text{Na}]^+_{\text{számított}} = 377,0684$.

Dimetil-[(1-bisz(4-metilfenil)foszfinoil)-(α -hidroxietyl)]-foszfonát (4e)

Bisz-4-metilfenilfoszfin-oxidot (2,2 mmol; 0,50 g) dietil-éter (10 ml) és dietil-amin (0,88 mmol; 0,09 ml) 0 °C-ra hűtött elegyéhez adunk. Intenzív kevertetés mellett az elegyhez csepegtetjük a dimetil-acetilfoszfonát (2,2 mmol; 0,33 g) 3 ml dietil-éterrel készült oldatát. A reakciót 8 órán keresztül, 0 °C-on folytatjuk, majd az elegyet bepároljuk. A fehér kristályos terméket szűrtük, dietil-éterrel mostuk, majd acetontól történő átkristályosítással tisztítottuk.

Termelés: 0,52g (62%), op: 153–154 °C; ^{31}P NMR (CDCl_3) δ_{P1} 24,0 és δ_{P2} 30,2 (d, $^2J_{\text{PP}} = 29,0$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 20,6 (s, CCH_3), 21,5 (s, 2 ArCH_3), 53,9 és 54,0 (d, $J = 7,4$ Hz, 2 OCH_3), 74,6 (dd, $J_1 = 153,7$ Hz, $J_2 = 76,3$ Hz, CCH_3), 127,1 (dd, $J_1 = 99,4$ Hz, $J_2 = 4,9$ Hz, C_α), 127,2 (d, $J = 100,9$ Hz, C_α), 128,7 és 128,9 (d, $J = 12,1$ Hz, 2 C_γ), 132,4 és 132,7 (d, $J = 9,1$ Hz, 2 C_β), 142,1 és 142,3 (d, $J = 2,9$ Hz, 2 C_δ); ^1H NMR (CDCl_3) δ 1,61 (t, $J = 15,4$ Hz, 3H, CCH_3), 2,39 (s, 6H, ArCH_3), 3,55 és 3,67 (d, $J = 10,6$ Hz, 6H, OCH_3), 7,27–7,29 (m, 4H, ArH), 7,92 és 8,03 (dd, $J_1 = 11,0$ Hz, $J_2 = 8,0$ Hz, 4H, ArH_β); $[\text{M} + \text{H}]^+ = 383$; $[\text{M} + \text{Na}]^+_{\text{mért}} = 405,1003$; $[\text{M} + \text{Na}]^+_{\text{számított}} = 405,0997$.

Dimetil-[(1-bisz(3,5-dimetilfenil)foszfinoil)-(α-hidroxietyl)]-foszfonát (4f)

Bisz-3,5-dimetilfenilfoszfin-oxidot (2,2 mmol; 0,56 g) dietil-éter (10 ml) és dietil-amin (0,88 mmol; 0,09 ml) 0 °C-ra hűtött elegyéhez adunk. Intenzív kevertetés mellett az elegyhez csepegtetjük a dimetil-acetilfoszfonát (2,2 mmol; 0,33 g) 3 ml dietil-éterrel készült oldatát. A reakciót 8 órán keresztül, 0 °C-on folytatjuk, majd az elegyet bepároljuk. A fehér kristályos terméketszűrtük, dietil-éterrel mostuk, majd acetonból történő átkristályosítással tisztítottuk.

Termelés: 0,62g (69%), op: 161–162 °C; ^{31}P NMR (CDCl_3) δ_{P1} 24,3 és δ_{P2} 30,0 (d, $^2J_{\text{PP}} = 29,0$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 20,7 (s, CCH_3), 21,3 (s, 4 ArCH_3), 53,8 és 54,0 (d, $J = 7,4$ Hz, 2 OCH_3), 74,7 (dd, $J_1 = 153,6$ Hz, $J_2 = 76,3$ Hz, CCH_3), 129,9 és 130,1 (d, $J = 8,7$ Hz, 2 C_β) 130,2 (dd, $J_1 = 95,7$ Hz, $J_2 = 5,1$ Hz, C_α), 130,5 (d, $J = 96,0$ Hz, C_α), 133,4 és 133,5 (d, $J = 3,0$ Hz, 2 C_δ), 137,4 és 137,7 (d, $J = 12,4$ Hz, 2 C_γ); ^1H NMR (CDCl_3) δ 1,65 (t, $J = 14,7$ Hz, 3H, CCH_3), 2,36 (d, $J = 5,5$ Hz, 12H, ArCH_3), 3,52 és 3,70 (d, $J = 10,6$ Hz, 6H, OCH_3), 7,14 (s, 2H, ArH_δ), 7,67 és 7,77 (d, $J = 11,3$ Hz, 4H, ArH_β); $[\text{M}+\text{H}]^+ = 411$; $[\text{M}+\text{Na}]^+_{\text{mért}} = 433,1312$; $[\text{M}+\text{Na}]^+_{\text{számított}} = 433,1310$.

Dimetil-1-dimetilfoszfonoil-etilfoszfát (5a)

Dimetil-foszfitot (2,2 mmol; 0,20 ml) dietil-éter (10 ml) és dietil-amin (0,88 mmol; 0,09 ml) 0 °C-ra hűtött elegyéhez adunk. Intenzív kevertetés mellett az elegyhez csepegtetjük a dimetil-acetilfoszfonát (2,2 mmol; 0,33 g) 3 ml dietil-éterrel készült oldatát. A reakciót 8 órán keresztül, 0 °C-on folytatjuk, majd az elegyet bepároljuk. A terméket oszlopkromatográfiás módszerrel tisztítjuk szilikagél állófázison, diklórmétán-metanol 97:3 arányú eluenst alkalmazva.

Termelés: 0,43g (75%), ^{31}P NMR (CDCl_3) δ_{P1} 1,1 és δ_{P2} 22,5 (d, $^3J_{\text{PP}} = 30,1$ Hz),^[40] δ_{P1} 0,4 és δ_{P2} 21,9 (d, $^3J_{\text{PP}} = 29,3$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 16,6 (s, CCH_3), 53,4 és 53,6 (dd, $J_1 = 6,8$ Hz, $J_2 = 3,8$ Hz, 2 OCH_3); 54,4 és 54,6 (dd, $J_1 = 6,3$ Hz, $J_2 = 3,6$ Hz, 2 OCH_3), 69,1 (dd, $J_1 = 174,1$ Hz, $J_2 = 6,9$ Hz, CH); ^1H NMR (CDCl_3) δ 1,61 (dd, $J_1 = 16,7$ Hz, $J_2 = 7,1$ Hz, 3H, CCH_3), 3,77–3,84 (m, 12H, OCH_3), 4,63–4,91 (m, 1H, CH); $[\text{M}+\text{H}]^+ = 263$; $[\text{M}+\text{Na}]^+_{\text{mért}} = 285,0268$; $[\text{M}+\text{Na}]^+_{\text{számított}} = 285,0269$.

Dimetil-1-dietilfoszfonoil-etilfoszfát (5b-1) és Dietil-1-dimetilfoszfonoil-etilfoszfát (5b-2)

Dietil-foszfítot (2,2 mmol; 0,30 ml) dietil-éter (10 ml) és dietil-amin (0,88 mmol; 0,09 ml) 0 °C-ra hűtött elegyéhez adunk. Intenzív kevertetés mellett az elegyhez csepegtetjük a dimetil-acetilfoszfónát (2,2 mmol; 0,33 g) 3 ml dietil-éterrel készült oldatát. A reakciót 8 órán keresztül, 0 °C-on folytatjuk, majd az elegyet bepároljuk. A terméket oszlopkromatográfiás módszerrel tisztítjuk szilikagél állófázison, diklórmétán-metanol 97:3 arányú eluenst alkalmazva.

Termelés: 0,56g (87%), major (83%): ^{31}P NMR (CDCl_3) δ_{P1} 1,0 és δ_{P2} 20,0 ($^3J_{\text{PP}} = 31,3$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 16,38 és 16,43 (d, $J = 5,5$ Hz, 2 CH_2CH_3), 16,6 (s, CCH_3), 54,4 és 54,5 (d, $J = 6,2$ Hz, 2 OCH_3), 63,0 és 63,1 (d, $J = 6,5$ Hz, 2 OCH_2), 69,4 (dd, $J_1 = 174,5$ Hz, $J_2 = 6,8$ Hz, CH); ^1H NMR (CDCl_3) δ 1,32 (t, $J = 7,0$ Hz, 6H, CH_2CH_3), 1,54 (dd, $J_1 = 16,7$ Hz, $J_2 = 7,0$ Hz, 3H, CCH_3), 3,75 és 3,77 (d, $J = 11,5$ Hz, 6H, OCH_3), 4,13–4,20 (m, 4H, CH_2CH_3); 4,62–4,72 (m, 1H, CH); minor (17%): δ_{P1} –1,3 és δ_{P2} 22,6 ($^3J_{\text{PP}} = 31,0$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 16,0 (d, $J = 6,8$ Hz, 2 CH_2CH_3), 16,6 (s, CCH_3), 53,4 és 53,6 (d, $J = 6,5$ Hz, 2 OCH_3), 64,1 és 64,2 (d, $J = 6,1$ Hz, 2 OCH_2), 68,8 (dd, $J_1 = 174,1$ Hz, $J_2 = 7,0$ Hz, CH); ^1H NMR (CDCl_3) δ 3,80 és 3,81 (d, $J = 10,7$ Hz, 6H, OCH_3). A többi jel megegyezett a fő izomer jeleivel; $[\text{M}+\text{H}]^+ = 291$; $[\text{M}+\text{Na}]^+_{\text{mért}} = 313,0581$; $[\text{M}+\text{Na}]^+_{\text{számított}} = 313,0582$.

Dimetil-1-dibutylfoszfonoil-etilfoszfát (5c-1) és Dibutyl-1-dimetilfoszfonoil-etilfoszfát (5c-2)

Dibutyl-foszfítot (2,2 mmol; 0,43 ml) dietil-éter (10 ml) és dietil-amin (0,88 mmol; 0,09 ml) 0 °C-ra hűtött elegyéhez adunk. Intenzív kevertetés mellett az elegyhez csepegtetjük a dimetil-acetilfoszfónát (2,2 mmol; 0,33 g) 3 ml dietil-éterrel készült oldatát. A reakciót 8 órán keresztül, 0 °C-on folytatjuk, majd az elegyet bepároljuk. A terméket oszlopkromatográfiás módszerrel tisztítjuk szilikagél állófázison, diklórmétán-metanol 97:3 arányú eluenst alkalmazva.

Termelés: 0,53g (70%), major (81%) ^{31}P NMR (CDCl_3) δ_{P1} 1.1 és δ_{P2} 20.0 ($^3J_{\text{PP}} = 31.6$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 13,5 (s, 2 CH_2CH_3), 16,7 (s, CCH_3), 18,6 (s, 2 CH_2CH_3), 32,5 és 32,6 (d, $J = 3,2$ Hz, 2 OCH_2CH_2), 54,3–54,4 és 54,5–54,6 (m, 2 OCH_3), 66,4–66,9 (m, 2 OCH_2), 69,5 (dd, $J_1 = 174,6$ Hz, $J_2 = 6,9$ Hz, CH); ^1H NMR (CDCl_3) δ 0,96 (t, $J = 7,9$ Hz, 6H, CH_2CH_3), 1,40–1,47 (m, 4H, CH_2CH_3), 1,60 (dd, $J_1 = 16,5$ Hz, $J_2 = 7,1$ Hz, 3H, CCH_3), 1,67–1,72 (m, 4H, OCH_2CH_2), 3,80 és 3,83 (d, $J = 11,5$ Hz, 6H, OCH_3), 4,04–4,20 (m, 4H, OCH_2), 4,66–4,78 (m, 1H, CH); minor (19%) ^{31}P NMR (CDCl_3) δ_{P1} –0,9 és δ_{P2} 22,8 ($^3J_{\text{PP}} = 31,4$ Hz); ^{13}C NMR

(CDCl₃) δ 68,8 (dd, $J_1 = 174,1$ Hz, $J_2 = 7,1$ Hz, CH), A többi jel megegyezett a fő izomer jeleivel; ¹H NMR (CDCl₃) δ 3,85 és 3,86 (d, $J = 10,5$ Hz, 6H, OCH₃), A többi jel megegyezett a fő izomer jeleivel; [M+H]⁺ = 347; [M+Na]⁺_{mért} = 369,1201; [M+Na]⁺_{számított} = 369,1208.

Dietil-difenilfoszfinoil-benzilfoszfát (6d-1) és Dietil-difenil-foszfinoiloxi-benzilfoszfonát (6d-2)

Difenilfoszfin-oxidot (1,5 mmol; 0,30 g) dietil-éter (10 ml) és dietil-amin (0,60 mmol; 0,06 ml) 0 °C-ra hűtött elegyéhez adunk. Intenzív kevertetés mellett az elegyhez csepegtetjük a dietil-benzoilfoszfonát (1,5 mmol; 0,36 g) 3 ml dietil-éterrel készült oldatát. A reakciót 8 órán keresztül, 0 °C-on folytatjuk, majd az elegyet bepároljuk. A terméket oszlopkromatográfiás módszerrel tisztítjuk szilikagél állófázison, diklórmétán-metanol 97:3 arányú eluent alkalmazva.

Termelés: 0,47 g (70%), major (60%): ³¹P NMR (CDCl₃) δ_{P1} -1,5 és δ_{P2} 28,6 (³ $J_{PP} = 31,3$ Hz); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 15,6 és 15,8 (d, $J = 7,4$ Hz, 2 CH₂CH₃), 63,8 és 63,9 (d, $J = 6,0$ Hz, 2 OCH₂), 77,4 (dd, $J_1 = 85,7$ Hz, $J_2 = 7,9$ Hz, CH), Az aromás tartomány meglehetősen összetett volt δ 128,0–132,6 között; ¹H NMR (CDCl₃) δ 0,90 és 0,96 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H, CH₂CH₃), 3,41–3,70 (m, 4H, OCH₂), 6,06 (dd, $J_1 = 9,7$ Hz, $J_2 = 4,4$ Hz, 1H, CH), aromán tartomány: 7,15–7,98 (m, 15H, ArH); minor (40%): ³¹P NMR (CDCl₃) δ_{P1} 17,2 és δ_{P2} 34,7 (³ $J_{PP} = 26,7$ Hz); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 16,2 és 16,3 (d, $J = 5,8$ Hz, 2 CH₂CH₃), 63,3 és 63,5 (d, $J = 6,9$ Hz, 2 OCH₂), 72,0 (dd, $J_1 = 172,6$ Hz, $J_2 = 7,0$ Hz, CH), Az aromás tartomány meglehetősen összetett volt δ 128,0–132,6 között; ¹H NMR (CDCl₃) δ 1,09 és 1,18 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H, CH₂CH₃), 3,78–4,15 (m, 4H, OCH₂), 5,63 (dd, $J_1 = 13,5$ Hz, $J_2 = 11,2$ Hz, 1H, CH), aromán tartomány: 7,15–7,98 (m, 15H, ArH); [M+H]⁺ = 445; [M+Na]⁺_{mért} = 467,1154; [M+Na]⁺_{számított} = 467,1153.

Dietil-1-bisz-4-metilfenilfoszfinoil-benzilfoszfát (6e-1)

Bisz(4-metilfenil)foszfin-oxidot (1,5 mmol; 0,35 g) dietil-éter (10 ml) és dietil-amin (0,60 mmol; 0,06 ml) 0 °C-ra hűtött elegyéhez adunk. Intenzív kevertetés mellett az elegyhez csepegtetjük a dietil-benzoilfoszfonát (1,5 mmol; 0,36 g) 3 ml dietil-éterrel készült oldatát. A reakciót 8 órán keresztül, 0 °C-on folytatjuk, majd az elegyet bepároljuk. A terméket oszlopkromatográfiás módszerrel tisztítjuk szilikagél állófázison, diklórmétán-metanol 97:3 arányú eluent alkalmazva.

Termelés: 0,40 g (65%), ³¹P NMR (CDCl₃) δ_{P1} -1,3 és δ_{P2} 29,0 (³ $J_{PP} = 31,4$ Hz); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 15,6 és 15,7 (d, $J = 7,4$ Hz, 2 CH₂CH₃), 21,6 (d, $J = 9,8$ Hz, 2 ArCH₃), 63,8 és 63,9

(d, $J = 5,9$ Hz, 2 OCH₂), 77,6 (dd, $J_1 = 85,3$ Hz, $J_2 = 8,0$ Hz, CH), Az aromás tartomány meglehetősen összetett volt δ 124,6–142,9 között; ¹H NMR (CDCl₃) δ 0,94 és 1,00 (t, $J = 7,3$ Hz, 6H, CH₂CH₃), 2,35 és 2,42 (s, 6H, ArCH₃), 3,46–3,74 (m, OCH₂), 6,03 (dd, $J_1 = 9,8$ Hz, $J_2 = 4,5$ Hz, 1H, CH), aromás tartomány: 7,18–7,33 (m, 9H, ArH), 7,55 és 7,83 (dd, $J_1 = 11,1$ Hz, $J_2 = 8,1$ Hz, 4H, ArH β); [M+H]⁺ = 473; [M+Na]⁺_{mért} = 495,1467; [M+Na]⁺_{számított} = 495,1466.

Dietil-1-bisz-3,5-dimetilfenilfoszfinoil-benzilfoszfát (6f-1)

Bisz(3,5-dimetilfenil)foszfin-oxidot (1,5 mmol; 0,40 g) dietil-éter (10 ml) és dietil-amin (0,60 mmol; 0,06 ml) 0 °C-ra hűtött elegyéhez adunk. Intenzív kevertetés mellett az elegyhez csepegtetjük a dietil-benzoilfoszfonát (1,5 mmol; 0,36 g) 3 ml dietil-éterrel készült oldatát. A reakciót 8 órán keresztül, 0 °C-on folytatjuk, majd az elegyet bepároljuk. A terméket oszlopkromatográfiás módszerrel tisztítjuk szilikagél állófázison, diklórmetán-metanol 97:3 arányú eluenst alkalmazva.

Termelés: 0,42 g (72%), ³¹P NMR (CDCl₃) $\delta_{P1} -1,2$ és $\delta_{P2} 29,1$ ($^3J_{PP} = 30,9$ Hz); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 15,6 és 15,8 (d, $J = 7,5$ Hz, 2 CH₂CH₃), 21,2 (d, $J = 13,3$ Hz, 4 ArCH₃), 63,6 és 63,8 (d, $J = 5,9$ Hz, 2 OCH₂), 77,4 (dd, $J_1 = 84,8$ Hz, $J_2 = 8,0$ Hz, CH), Az aromás tartomány meglehetősen összetett volt δ 128,0–138,2 között; ¹H NMR (CDCl₃) δ 0,95 és 1,04 (t, $J = 7,4$ Hz, 6H, CH₂CH₃), 2,27 és 2,40 (s, 12H, ArCH₃), 3,48–3,76 (m, 4H, OCH₂), 6,06 (dd, $J_1 = 9,7$ Hz, $J_2 = 3,1$ Hz, 1H, CH), aromás tartomány: 7,22–7,34 (m, 9H, ArH), 7,61 (d, $J = 11,7$ Hz, 2H, ArH β); [M+H]⁺ = 501; [M+Na]⁺_{mért} = 523,1771; [M+Na]⁺_{számított} = 523,1779.

4.3. Egykristály röntgen diffrakciós vizsgálatok.

A röntgen diffrakciós vizsgálatokhoz szükséges kristályokat acetontól történő lassú kristályosítással nyertük. A kristályokat perfluorozott olajba juttattuk, majd a megfelelő egykristályt vékony üveghuzal tetejére rögzítettük. Oxford Xcalibur 3 típusú diffraktométeren történt az adatgyűjtés, ami Spellman generátorral (50 kV 40 ma) és Kappa CCD detektorral volt ellátva. Az adatgyűjtést Mo-K α ($\lambda = 0,71071 \text{ \AA}$) sugárzás mellett végeztük.

Az adatgyűjtés a CrysAlisPro szoftverrel történt. Multiscan módszerrel végeztük az abszorpciós korrekciót. A szerkezet megfejtése és finomítása SHELXS-97 program segítségével történt, a végső ellenőrzés PLATON programmal történt. [41-44]

6. Táblázat: Röntgen adatgyűjtés és szerkezet finomítás részletei

	4d	4e.0,5C ₃ H ₆ O
Empirikus képlet	C ₁₆ H ₂₀ O ₅ P ₂	C ₁₈ H ₂₄ O ₅ P ₂ ·0,5C ₃ H ₆ O
Molekula tömeg	354,26	411,35
T [K]	123 (2)	123 (2)
Kristály mérete [mm]	0,20 x 0,02 x 0,02	0,35 x 0,20 x 0,10
Kristály megjelenése	színtelen rúd	színtelen kocka
Kristályrendszer	monoklin	monoklin
Tércepoport	<i>P21/c</i>	<i>C2/c</i>
a[Å]	9,1252 (3)	13,8562 (3)
b[Å]	18,1309 (6)	10,4172 (2)
c[Å]	10,1680 (4)	28,5479 (7)
α[°]	90,0	90,0
β[°]	94,892 (3)	96,649 (2)
γ[°]	90,0	90,0
V[Å³]	1676,15 (10)	4092,97 (16)

<i>Z</i>	4	8
$\rho_{\text{számolt}}$ [g cm⁻³]	1,404	1,335
μ [mm⁻¹]	0,281	0,242
<i>F</i> (000)	744	1744
Θ tartomány [°]	2,24–25,24	2,45–25,24
Index tartományok	$-12 \leq h \leq 12$	$-17 \leq h \leq 17$

4.3. In Vitro Citosztázis Assay

Az in vitro citosztázis vizsgálatokat MDA-MB 231 humán emlő adenokarcinóma, PC-3 prosztata kissejtes karcinóma, tüdő laphámsejtes karcinóma, A431 epidermoid karcinóma sejtvonalakon végezték. A sejteket 10% FBS, 2 mM L-glutamin, penicillin (50 IU/mL)-sztreptomycin (50 µg/mL) antibiotikum keverék és 1 mM nátrium-piruvát és 1%-os nem esszenciális aminosav keverékével kiegészített DMEM közegében tenyésztették. A sejteket 37 °C-os 5% CO₂ tartalmú párás légkörben tárolták. Összefolyó sejttenyészetű állapot elérésekor tripszinezéssel gyűjtötték be a sejteket és felvitték őket 96 lyukú platekre. 37 °C-os környezetben 24 órán keresztül tartott a folyamat, majd a tenyészetű közegét eltávolították. Szérummentes közegben a sejtkultúrákat a különböző molekulák 2, 10, 50 és 250 µM koncentrációjú oldataival kezelték. (A kezelő oldat 1 V/V % DMSO-t tartalmazott). A kontroll sejteket ugyanolyan szérummentes közeggel vagy 1 V/V % DMSO oldatával kezelték megegyező körülmények között. Egy éjszakán keresztül tartó inkubálás után, szérummentes közeggel kétszer mosták a sejtkultúrákat majd hagyták őket szaporodni 72 óráig egy 10%-os szérumot tartalmazó közegben 37 °C-on. Minden sejtkultúrához MTT oldatot (0,37 mg/mL) juttattak és további 3 óráig inkubálták. 5 perc 900*g centrifugálási után a felszínen úszó réteget eltávolították. A keletkezett formázán kristályokat 100 µL DMSO oldatában oldották fel és ELISA Olvasó készülékkel mérték az optikai sűrűséget 540 nm-es detektálási hullámhosszon, 620 nm referencia hullámhossz mellett. A 620 nm-en kapott optikai sűrűség adatait kivonták az 540 nm-en kapott adatokból. Ezt a korrigált optikai sűrűséget felhasználva, a következő módon számolták a citosztázis hatást: ^[45-48]

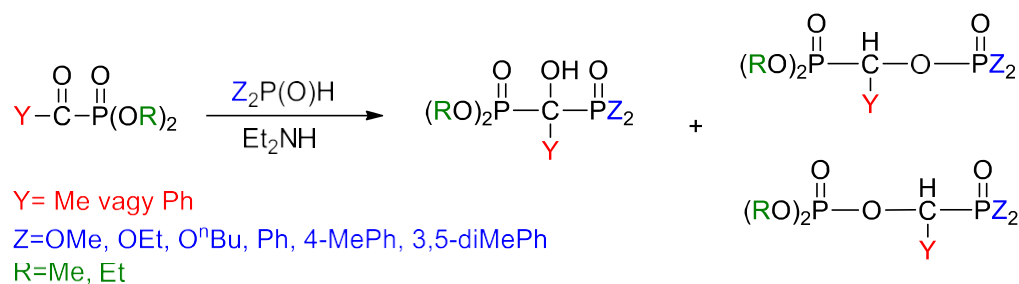
$$\text{Citosztázis (\%)} = [1 - (\text{OD}_{\text{kezelt}} / \text{OD}_{\text{kontroll}})] \times 100$$

ahol, az OD_{kezelt} a hatóanyaggal kezelt sejtkultúra optikai sűrűségi adata, az OD_{kontroll} pedig a kontroll plate optikai sűrűség adata. Minden esetben két egymástól független kísérletet végeztek, négy párhuzamos méréssel. A statisztikai adatok elemzését Student-féle t-próbával végezték 95%-os megbízhatósági szinten. Az 50%-os inhibitor koncentráció (IC₅₀) értékeket dózis-válasz görbe segítségével határozták meg. A citosztázist a koncentráció függvényeként ábrázolták, amire MicrocalTM Origin 2018 szoftverrel szigmoid-görbét illesztettek. ^{[48] [49]}

5. Összefoglalás

Az osteoporosis és más csontbetegségek (pl. daganatok) gyógyszeres kezelésében a biszfoszfonsav-származékok igen hatásosnak bizonyultak, ezért minél hatékonyabb előállításuk kulcsfontosságú feladat. A hatóanyagok leggyakoribb és az iparban is alkalmazott szintézise során valamilyen karbonsavat vagy savszármazékokat (savklorid, savanhidrid) reagáltatnak különböző P-reagensekkel, jellemzően foszfor-trikloriddal és foszforossavval. A vegyületek szintézisére más módszerek is rendelkezésünkre állnak. Az α -oxofoszfónátok és dialkil-foszfítok Pudovik-reakciójával hidroxi-metilénbiszfoszfónátokat állíthatunk elő, amelyből hidrolízissel nyerhetők az értékes drómsavak. A reakció viszont optimalizálásra szorul, ugyanis átrendeződés is kísérheti az addukt képződését. (21. ábra)

Kutatómunkám során acetyl-klorid, valamint benzoil-klorid trialkil-foszfítokkal történő Arbuzov-reakciójával α -oxofoszfónátokat képeztem, majd azokat dialkil-foszfítokkal ($Z=OMe, OEt, O^iBu$) és diarilfoszfin-oxidokkal ($Z=Ph, 4-MePh, 3,5-diMePh$) reagáltattam dietil-amin jelenlétében, különböző körülmények (hőmérséklet, oldószer és molarány) között, amikor is adduktok és átrendeződött származékok képződtek. A kétféle (addukt és átrendeződött) termék képződésére optimalizált körülményeket a katalizátor mennyiségének és a hőmérséklet változtatásával határoztuk meg, csoportunk előzményeit is felhasználva. [30] A módszerrel egy 15 tagú vegyülettárat (20. ábra) szintetizáltunk, amelyből a legtöbb származék még nem volt ismert az irodalomban.



21. ábra: Általános előállítási reakcióegyenlet

Az előállított vegyületeket ^{31}P , ^{13}C , 1H NMR és tömegspektroszkópiával (HRMS) jellemeztük, illetve adott esetben olvadáspontot is megadtunk, illetve egykristály röntgendiffrakciós analízist is végeztünk Dr. Konstantin Karaghiosoff és Dr. Czugler Mátyás professzor közreműködésével. Négy különböző sejtvonalon (humán emlő adenokarcinóma, prosztata kissejtes karcinóma, tüdő laphámsejtes karcinóma, epidermoid karcinóma sejtvonal) citotoxicitás vizsgálatoknak is alávetettük vegyületeinket. Az eredmények alapján

elmondhatjuk, hogy az aromás egységekkel rendelkező átrendeződött származékok mutatkoztak a leghatékonyabbnak. A vizsgálatok során Dr. Bősze Szilvia és Oláhné Dr. Szabó Rita voltak segítségünkre.

A munkából a közelmúltban nemzetközi folyóiratcikk^[50] is született, valamint 1 hazai szóbeli előadásnak és 2 poszterprezentációnak lettem társszerzője és Intézményi Tudományos Diákköri Konferencián III. helyezést értem el.

Irodalomjegyzék

1. https://www.oecd-ilibrary.org/sites/82129230-en/1/3/2/1/4/index.html?itemId=/content/publication/82129230-en&_csp=e7f5d56a7f4dd03271a59acda6e2be1b&itemIGO=oecd&itemContentType=book
2. https://www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0006/355983/Health-Profile-Hungary-Eng.pdf
3. Russel R. G. G.; *Bone*; **2011**; 49; 2.
4. Gyires K., Fürst Z; *Farmakológia; Medicina kiadó*; **2007**; 4; 886.
5. Fleisch H.; *Breast Cancer Res.*; **2002**; 4; 30.
6. Catterall J. B., Cawston T. E.; *Arthritis Res. Ther.*; **2003**; 5; 12.
7. Kosolapoff G. M.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1953**; 75; 1500.
8. Nguyen L. M., Niesor E., Bentzen; *C. L. J. Med. Chem.*; **1987**; 30; 1426.
9. Kruse L. I., Shah; *V. P. US 5204336*; **1993**.
10. Magnin D. R., Dickson J. K., Logan J. V., Lawrence R. M., Chen, Y., Sulsky R. B., Ciosek C. P., Biller S. A., Harrity T. W., Jolibois K. G., Kunselman L. K., Rich L. C., Slusarchyk D. A.; *J. Med. Chem.*; **1995**; 38; 2596.
11. Nagy D. I.; *Magyar Kémiai Folyóirat*; **2018**; 124; 6.
12. Nagy D. I., Grün A., Greiner I., Keglevich Gy.; *Current Org. Chem.*; **2017**; 21; 1567.
13. Hudson H. R., Wardle N. J., Blight S. W. A., Greiner I., Grün A., Keglevich Gy.; *Mini Rev. Med. Chem.*; **2012**; 12; 313.
14. Kieczkowski G. R., Jobson R. B., Melillo D. G., Reinhold D. F., Grenda V. J., Shinkai I.; *J. Org. Chem.*; **1995**; 60; 8310.
15. Grün A., Molnár G. I., Bertók B., Greiner I., Keglevich Gy.; *Heteroatom Chem.*; **2009**; 20; 350.
16. Bhattacharya A. K., Thyagarajan G.; *Chem. Rev.*; **1981**; 81; 415.
17. Arbuzov A. E.; *Russ. J. Phys. Chem. Soc.*; **1906**; 38; 687.
18. Arbuzov A. E.; *Chem. Zentr. II*; **1906**; 1639.
19. Plumb J. B., Griffin C. E.; *J. Org. Chem.*; **1962**; 27; 4711.
20. Plumb J. B., Obrycki R., Griffin C. E.; *J. Org. Chem.*; **1966**; 31; 2455.
21. Abell J. P., Hisashi Y.; *J. Am. Chem. Soc.*; **2008**; 130; 10521.
22. Pudovik A. N.; *Doklady Akad. Nauk. SSSR*; **1950**; 73; 499 [*Chem. Abstr.*; **1951**; 45; 2856].
23. <https://www.rsc.org/Merck-Index/reaction/r354/pudovik-reaction>
24. McConnel R. L., Coover H. W.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1956**; 78; 4450.
25. Fitch S. J., Moedritzer K.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1962**; 84; 1876.
26. Nicholson D. A., Vaughn H.; *J. Org. Chem.*; **1971**; 36; 3843.
27. Garadnay S., Grün A., Keglevich Gy., Neu J.; *Magyar szabadalmi bejelentés; HUP110007; Chem. Abstr.*; **2011**; 157; 356874
28. Keglevich Gy., Grün A., Aradi K., Garadnay S., Greiner I.; *Tetrahedron Lett.*; **2011**; 52; 2744.
29. Szalai Zs.; *Szakdolgozat*; **2019**; 12.
30. Szalai Zs., Keglevich Gy.; *Molecules*; **2021**; 26; 7575.
31. Huang Y.; *Adv. Synth. Cat.*; **2009**; 351; 1423.
32. Hartley S. B., Holmes W. S., Jacques J. K., Mole M. F., McCoubrey J. C.; *Quarterly Rev. Chem. Soc.*; **1963**; 17; 204.
33. Warren B. E.; *X-Ray Diffraction; Dover Publications*; **1990**.

34. DIAMOND; version 3.2i; Crystal Impact GbR:Bonn; Germany; **2014**.
35. van Meerloo J., Kaspers G. J. L., Cloos J.; *Cancer Cell Culture*; **2011**; 731; 237.
36. Berek-Nagy P. J., Tóth G., Bősze S., Horváth L. B., Darcsi A., Csíkos S., Knapp D.G., Kovács G. M., Boldizsár I.; *Phytochemistry*; **2021**; 190; 112851.
37. Anaya-Eugenio G. D., Rebollar-Ramos D., González M. C., Raja H., Mata R., Blanco E. J. C.; *Chemio-Biol. Int.*; **2019**; 311; 108798.
38. Turhanen P. A., Ahlgren M. J., Jarvinen T., Vepsäläinen J. J.; *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.*; **2001**; 170; 115.
39. Nikander H., Heikkilä-Hoikka M., Pohjala E., Hanhijarvi H., Lauren L.; *U.S. Patent; WO9211267*; **1992**.
40. Tromelin A., Elmanouni D., Burgada R.; *Phosphorus Sulfur Relat. Elem.*; **1986**; 27; 301.
41. CrysAlisPro 1.171.40.82a; Program package; Rigaku OD: Tokyo, Japan; **2020**.
42. Sheldrick G.M. SHELXS-97: Program for Crystal Structure Solution; University of Göttingen: Göttingen, Germany; **1997**.
43. Sheldrick G.M. SHELXL-97: Program for the Refinement of Crystal Structures; University of Göttingen: Göttingen, Germany; **1997**.
44. Spek A.L. PLATON: A Multipurpose Crystallographic Tool; Utrecht University: Utrecht, The Netherlands; **1999**.
45. Cailleau R., Olivé M., Cruciger Q. V.; *In Vitro*; **1978**; 14; 911.
46. Haigler H., Ash J. F., Singer S. J., Cohen S.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **1978**, 75, 3317.
47. Kaighn M. E., Narayan K. S., Ohnuki Y., Lechner J. F., Jones L. W.; *Investig. Urol.*; **1979**; 17; 16.
48. Fujita T., Kiyama M., Tomizawa Y., Kohno T., Yokota J.; *Int. J. Oncol.*; **1999**, 15, 927.
49. Denizot F., Lang R. J.; *J. Immunol. Methods*; **1986**; 89; 271.
50. Szalai Zs., Tóth B., Szabó R., Bősze Sz., Karaghiosoff K., Czugler M., Drahos L., Keglevich Gy.; *Molecules*; **2023**; 28; 6037.