

Válasz Kálai Tamás egyetemi tanár bírálatára

Mindenekelőtt köszönöm Kálai Tamás professzor úrnak, az MTA doktorának disszertációm alapos bírálatára fordított idejét, a dicsérő észrevételeket és a kritikai megjegyzéseket is.

A bírálatban felsorolt megjegyzésekkel egyetértek, a kérdésekre az alábbiakban válaszolok.

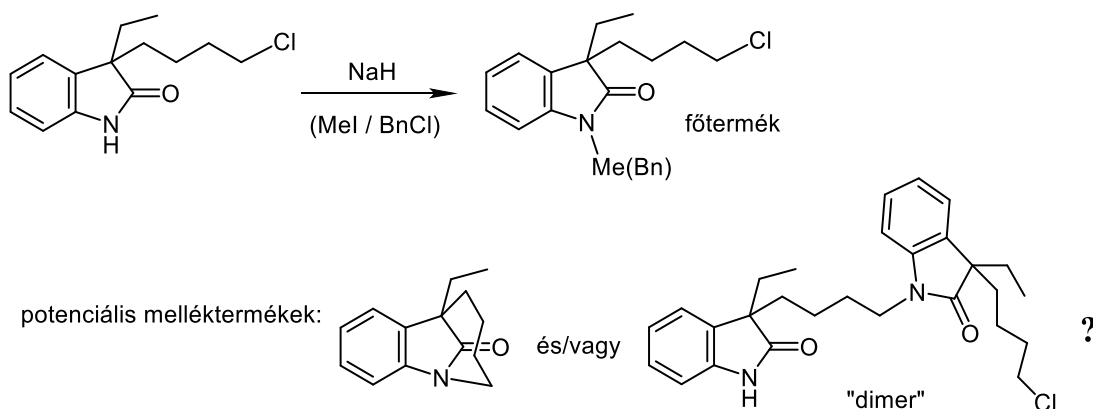
1. Kérdés: Az oxindol sók közül a Jelölt a Li sókat alkalmazta szubsztrátként alkilezési reakciókban. A Jelölt, ill. munkatársai próbálkoztak-e magnézium sókkal vagy van-e erre irodalmi adat?

Válasz: Az oxindolok alkilezési reakciói mintegy 100 évre visszamenően jellemzően nátrium- vagy káliumiont tartalmazó bázisokkal vannak leírva. Ezeknél a reakciónál visszatérő probléma a nitrogénatomon lejátszódó alkileződés mint konkurens reakció, illetve adott esetben a 3-as helyzetű szénatom kétszeres alkileződése, ezáltal többkomponensű termékkeverékek képződése. A nátriumiont tartalmazó bázisok helyett lítiumvegyületek alkalmazásához az az elképzelés vezetett minket, hogy a lítiumvegyület által deprotonált nitrogénatomot gyenge nukleofilnek gondoltuk a deprotonált 3-as helyzetű szénatomhoz képest, és azt vártuk, hogy a szénatom aktívabb lesz alkilezési reakciókban. Egy irodalmi utalás (A. S. Kende et al. *Synth. Comm.* **1982**, 12, 1) ezt a várakozásunkat megerősítette, és lítiumiont tartalmazó bázisokkal (BuLi, LDA) a reakciót valóban sikerült szelektíven a C(3) pozícióban végrehajtani.

A malonészternek és származékainak magnézium sók és tercier amin jelenlétében (elsősorban MgCl_2 és Et_3N) történő deprotonálása ismert az irodalomban (M. W. Rathke et al. *Synth. Comm.* **1985**, 15, 1039; D. J. Krysan *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 3303), bár itt a magnézium szerepe nem analóg a nátrium és lítium fenti szerepével. Az oxindolok irodalmában nem találtunk erre példát, és mi sem próbálkoztunk ilyen reakcióval. Az említett cikkek ugyan C-alkilezési reakciókról számolnak be, de az enyhe körülmények (0°C) és magas hozamok miatt érdemes lehet oxindolok alkilezésére is kipróbálni a deprotonálásnak ezt a módját.

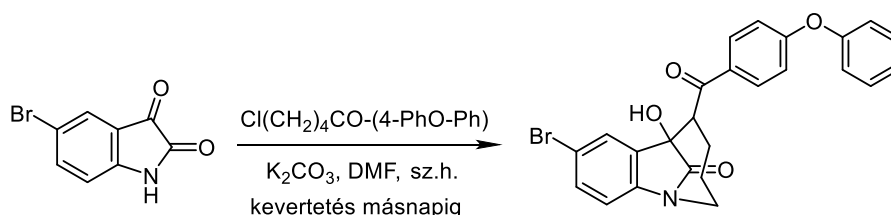
2. Kérdés: A 26. ábrán (29. o.) közölt N-szubsztituált piperazinok szintézisének első (a) lépésénél tapasztaltak-e intramolekuláris vagy intermolekuláris alkileződést, utóbbi esetben pl. dimerek képződését metileződés, ill. benzileződés helyett?

Válasz: A kérdés tehát az N-alkilezési reakció alábbi potenciális melléktermékeire vonatkozik.



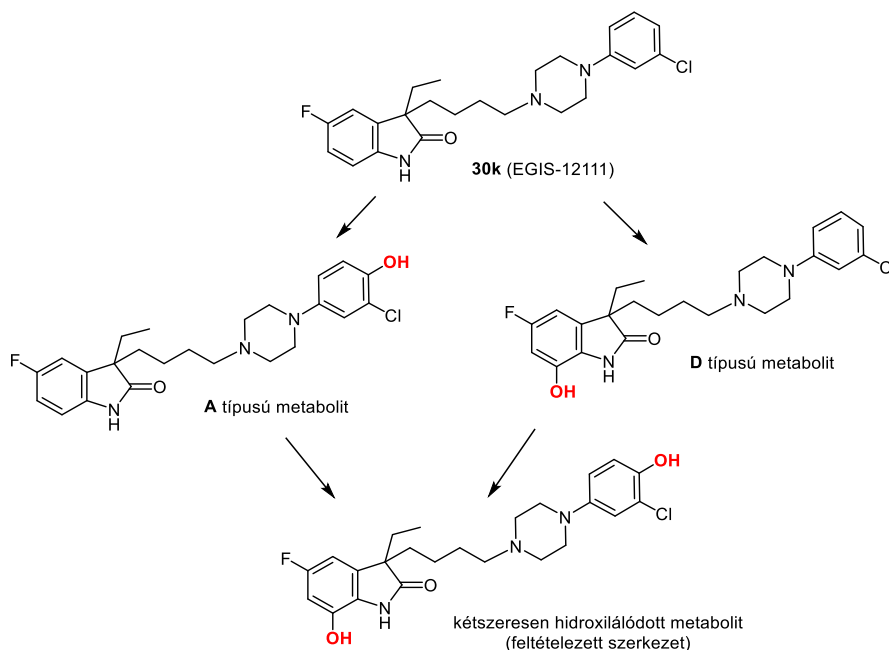
Mind az áthidalt héttagú gyűrűs, mind a dimerszerű termék keletkezését elvben lehetségesnek tartom. Ezek keletkezését a nyers termékekben mindazonáltal nem tapasztaltuk, legalábbis vékonyréteg kromatográfiával látható mennyiségben megjelenő, kinyerésre érdemes mennyiségű melléktermékeként nem. Nyomnyi mennyiségben történő esetleges keletkezésük a nyers termékek célzott LC-MS vizsgálatával lenne feltérképezhető. Ilyen kísérletet nem végeztünk, mivel a reakcióelegy feldolgozását követően a várt *N*-metil, illetve *N*-benzil termék kromatográfiás tisztítás nélkül is olyan minőségben keletkezett 76, ill. 86 % hozammal, hogy 1 % feletti szennyező nem volt bennük. Ennek magyarázatát abban látom, hogy a metil-jodid, illetve a benzil-klorid – amelyeket ráadásul 1,2 ekv mennyiségben alkalmaztunk – lényegesen aktívabb alkilezőszerek, mint a klórbutil szerkezeti rész.

Érdekességgéppen megjegyzem, hogy az áthidalt gyűrűs szerkezetre rákeresve egyetlen vegyület van leírva az irodalomban (M. Smet et al. *Synlett* **2004**, *13*, 2388), mint az alábbi reakció váratlan terméke:



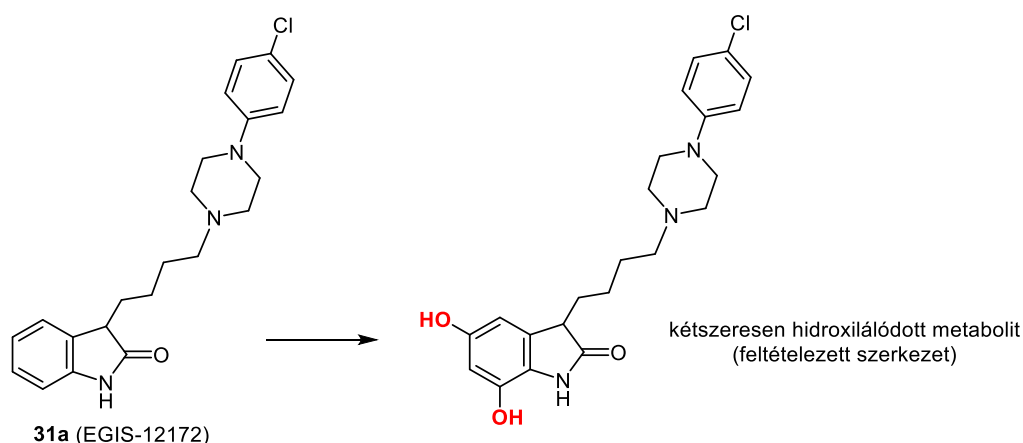
3. Kérdés: A Jelölt említi, hogy az arilpiperazin és oxindol egységet tartalmazó gyógyszerjelöltek vagy az arilpiperazin vagy az oxindol aromás gyűrűn monohidroxilálódnak. Találtak-e olyan metabolitot, amely mind a két aromás gyűrűn hidroxilálódott?

Válasz: A kérdés teljesen jogos, valóban több vegyület esetén is tapasztaltuk, hogy a nagyobb mennyiségben keletkező elsődleges metabolitok, vagyis a valamelyik aromás gyűrűn monohidroxilálódott vegyületek mellett jóval kisebb, de kimutatható mennyiségben keletkeztek mindkét aromás gyűrűn hidroxilálódott metabolitok is. Ilyenek csak olyan anyavegyületek esetén keletkeztek, amelyeknél mindkét gyűrűn volt hidroxileződésre hajlamos (*orto* vagy *para*, illetve 5-ös vagy 7-es) pozícióban halogén szubsztituenst nem tartalmazó aromás szénatom.



Konkrét példaként a fenti **30k** (EGIS-12111) vegyület említhető meg, melynél több különböző kétszeresen hidroxilált metabolit is detektálható, de ezek közül csak egy van jelen érdemleges mennyiségben. Ennek mennyisége kb. tízszerese a többi kétszeresen hidroxilezett terméknek, és ez MS fragmentáció alapján egyértelműen tartalmaz hidroxilcsoportot mind a fenilpiperazin, mind az oxindol egységen. Valószínűsíthető szerkezete a fenti ábrán látható, de ez teljes bizonyossággal csak referens vegyület előállításával lenne igazolható.

Érdekességgéppen megemlíthető, hogy pl. az oxindol aromás gyűrűjén halogén szubsztituenst nem tartalmazó **31a** (EGIS-12172) vegyület esetén olyan kétszeresen hidroxileződött metabolitot is észleltünk, amelyben MS fragmentáció alapján mindkét hidroxilcsoport egyértelműen az oxindol gyűrűhöz kapcsolódott. Ennek feltételezett szerkezete az alábbi:



4. Kérdés: Az elsődleges metabolitokból milyen másodlagos metabolitok képződnek?

Válasz: A HPLC-MS/MS méréseket *in vitro* körülmények között, patkány máj hepatocita sejteken történő inkubációt követően végeztük, és észleltünk Fázis II metabolitokat is. Pl. a **31a** (EGIS-12172, ld. fent) vegyület esetében detektáltuk az egyszeresen hidroxilált metabolitok glükuronid konjugátumát, és nagyon kis mennyiségben szulfát konjugátumát is.

5. Kérdés: A fent említett metabolitok szerkezetének feltárására kidolgozott relatív retenciók időközön alapuló módszer a Jelölt véleménye szerint mennyire extrapolálható más, aromás egységet tartalmazó vegyületek hidroxilezett metabolitjaira? Történtek-e erre vonatkozó kísérletek?

Válasz: A relatív retenciók időközön alapuló metabolit azonosítási módszerünk felfedezése az oxindolszármazékokhoz köthető. Részben ezért, részben a vegyületcsaládban előállított több száz molekula és az ebből adódóan megalapozott megállapítások miatt publikáltuk a megfigyelést az oxindolok példáján. Tapasztalataink szerint ugyanakkor a módszer több más vegyületcsaládnál is jól alkalmazható volt. Például az Egis korábbi originális kutatásában kiemelt szerepet játszó 2,3-benzodiazepin származékok esetében is hasonló összefüggések rajzolódtak ki, de sajnos az originális kutatás leállítása miatt a referens vegyületek előállítására ebben a családban már nem maradt lehetőségünk, így ezek az eredmények publikálatlanok maradtak.

6. Kérdés: Van-e arra magyarázat, hogy a Porsolt-féle kényszerített úszási teszten a racém vegyület (EGIS-12233) szignifikánsan hatékonyabb volt, mint az enantiomerek (EGIS-12901, ill. 12902) külön-külön? Valamilyen szinergizmus áll fenn? Ennek felderítésére történtek-e kísérletek?

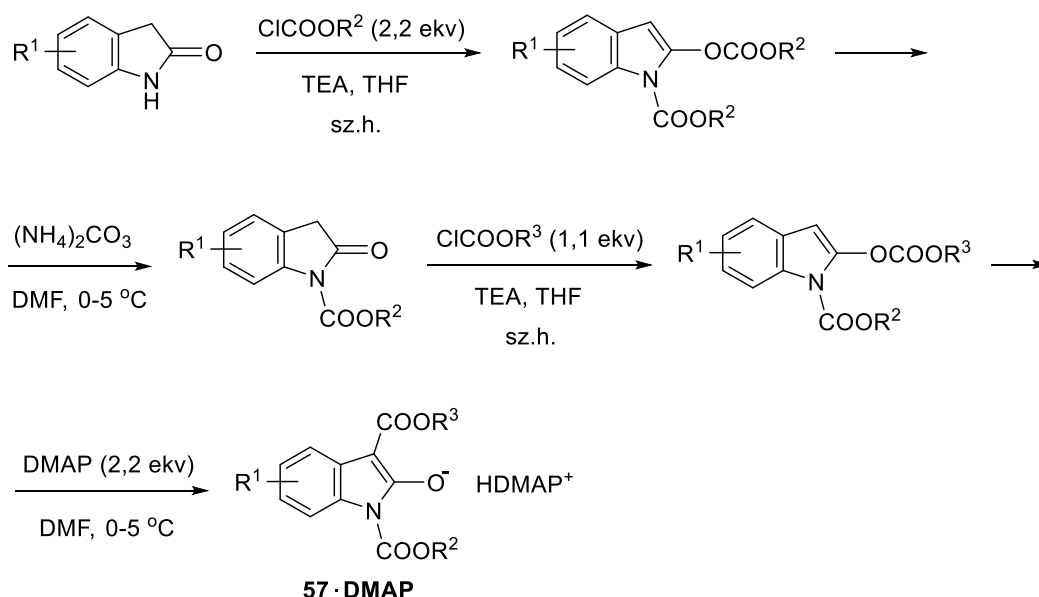
Válasz: Az eredmény minket is meglepett.

teszt kategóriája	teszt neve	EGIS-12233 (racém)	EGIS-12901 (+)	EGIS-12902 (-)
anxiolitikus tesztek	emelt keresztlabirintus teszt (patkány, p.o., MED, mg/tkg)	0,03	≤ 0,01	≤ 0,01
	emelt keresztlabirintus teszt (egér, i.p., MED, mg/tkg)	0,3	≤ 0,3	3
	Vogel-féle ivási konfliktus teszt (patkány, i.p., mg/tkg)	5	10	> 10
	fény-sötét teszt (egér, i.p., MED, mg/tkg)	1	0,3	> 10
	mCPP-indukált fény-sötét teszt (patkány, i.p., MED, mg/tkg)	3	0,3	> 10
antidepressz- száns tesztek	Porsolt-féle kényszerített úszási (FST) teszt (egér, i.p., MED, mg/tkg)	3	> 30	> 30
	Tanult kilátástalanság) teszt (patkány, MED, mg/tkg)	n.a.	10	n.a.

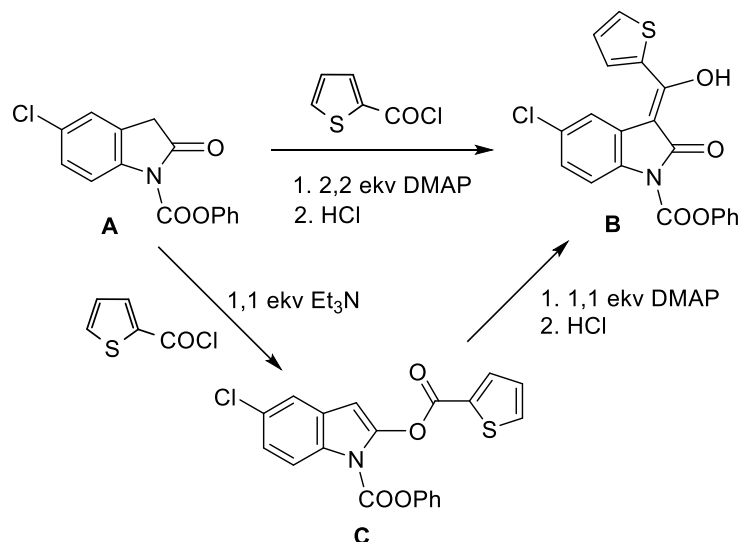
Figyelembe véve, hogy az EGIS-12901 a többi anxiolitikus és antidepresszáns teszten kivétel nélkül mindegyiken hatékony volt, az enantiomere (EGIS-12902) viszont egyiken sem, a meglepetés voltaképpen nem is az, hogy a racém vegyület (EGIS-12233) hatékony volt a Porsolt-teszten, hanem inkább az, hogy az EGIS-12901 az alkalmazott dózisban nem hatott. Ennek felderítésére az EGIS-12901 Porsolt-tesztjét tulajdonos cégünk, a Servier laborjában is elvégezték, ott magasabb, 50 mg-os dózisban szignifikáns hatást mutatott, ami inkább megfelelt a várakozásunknak. A vegyület további fejlesztése esetén a helyzet pontosabb körüljárása valóban szükséges lett volna, pl. egyes mérések megismétlésével, illetve annak felderítésével, hogy a racém vegyületben az enantiomerek nem befolyásolják-e egymás felszívódását. Mivel azonban az EGIS-12901 fejlesztését a disszertációban is említett, *in vitro* mérések alapján valószínűsített kardiovaszkuláris mellékhatásai miatt leállítottuk, a teljes feltérképezésre nem volt módunk.

7. Kérdés: Az 5-klóroxindol-1,3-dikarboxamidok előállításánál az enolátot (**57** • **DMAP**) a 4-dimetilaminopiridin sójaként izolálták. Más, olcsóbb tercier aminok alkalmazására történtek-e próbálkozások?

Válasz: A disszertációmban az **57 · DMAP** vegyület kiindulási anyag volt, ennek előállítása, illetve az ahhoz fűződő kísérleti tapasztalatok Porcs-Makkay Márta kolléganőm PhD dolgozatához vezetnek vissza, az alábbi szintéziséra szerint:



A tenidap szintézise során kolléganőm próbálta az alábbi ábra szerinti **A** vegyületet DMAP helyett az olcsóbb TEA-nal (2,2 ekv) közvetlenül **B** vegyületté alakítani, azonban nem járt sikerrel, többkomponensű elegyhez jutott. 1,1 ekv használata esetén **C** vegyületet sikerült tisztán kinyernie. A **C** származékából TEA-nal nem sikerült az $O \rightarrow C(3)$ acilvándorlást végrehajtani.



Ezzel szemben DMAP (2,2 ekv) használatával az **A** vegyületből jó hozammal kapta közvetlenül a **B** terméket. Ennek hátterében valószínűleg az áll, hogy a DMAP mint számos különböző reakciótípus, köztük alkoholok és aminok acilezési reakcióinak közismert katalizátora, olyan tulajdonságokat hordoz, amelyeket a TEA nem (ld. pl. G. Höfle et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1978**, 17, 569). Összehasonlítva a piridinnel, az acilezési reakciókban megközelítőleg 10^4 -szer aktívabb katalizátor.

A DMAP, mint az acilvándorlás hatékony katalizátora megjelenik az oxindol vegyületcsalád irodalmában is (E. M. Beccalli et al. *Tetrahedron* **1993**, 49, 4741). A tenidap szintézisével foglalkozó

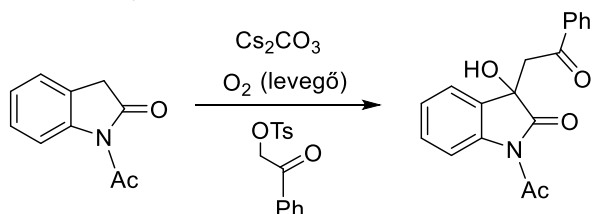
szabadalmakban (S. B. Kadin EP 153818, **1985**; Th. Ch. Crawford EP 155828, **1985**; S. B. Kadin EP 156603, **1985**) megemlítenek ugyan több más amint is, amelyek jelenlétében elvégezhető az 1-karbamoiloxindol 3-as helyzetű acilezése, de példát kizárólag a DMAP-re adnak. Feltehetően a többi amin katalitikus hatása lényegesen gyengébb.

A későbbi kísérletek során ezért az **57** vegyületek szintézisének utolsó lépésében – amely szintén $O \rightarrow C(3)$ acilvándorlás – is a DMAP volt a preferált katalizátor. A termékeket célszerű volt a stabilis $HDMAP^+$ sóként (**57** · **DMAP**) izolálni, és a disszertációban szereplő további reakciókat ebből a sóból kiindulva végrehajtani.

8. Kérdés: A jelölt értekezésében említi az oxindolok (értekezés 25. o.) és az analóg diazaoxindolok esetében is (értekezés 79. o.), hogy az oxindolok C3 Li-sóinak, ill. a diazaoxindolok C5 Li-sóinak alkilezésekor inert körülményeket kell alkalmazni, mert alkileződés helyett hidroxileződés következik be. Mi lehet ennek a reakciónak a mechanizmusa?

Válasz: A feltételezett mechanizmus magyarázatára a dolgozatban terjedelmi okokból nem tértem ki, csak utaltam 75. hivatkozásként egy 1966-ban megjelent cikkre (G. A. Russell et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 5491). A szerzők 1,1-diaril- és 1,1,1-triarilalkánok bázis jelenlétében, a levegő oxigénje hatására bekövetkező oxidációs reakcióját vizsgálták részletesen. A reakció mechanizmusaként azt feltételezték, hogy a bázis hatására keletkező karbanionból (R^-) elektrontranszfer folyamatban (oxigénnek, vagy más jelenlévő molekulának történő egy-elektron átadással) a megfelelő gyök ($R^\cdot$) keletkezik, amely már képes oxigénnel reagálva peroxid gyököt ($R-O-O^\cdot$) adni. Ez a gyök több, a reakciókörülményektől és a jelenlévő vegyületektől függő lépésben a megfelelő alkohollá ($R-OH$) alakul.

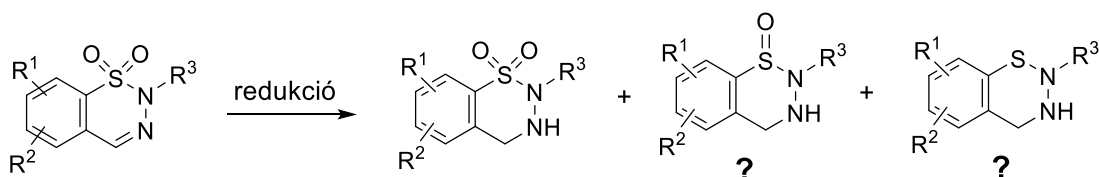
Erre a típusú reakcióra az oxindolok családjában is van példa az irodalomban (M. Bai et al. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14, 1395). 1-Acetiloxindol 3-as helyzetű acilezése során 3-acil-3-hidroxi termékeket preparáltak a szerzők, az alábbi ábra szerint:



A fentiek alapján saját reakciónkban is hasonló mechanizmust feltételezek.

9. Kérdés: A benzotiadiazin-dioxid redukciója közben tapasztalták-e benzotiadiazin-oxid vagy benzotiadiazin képződését?

Válasz: A kérdés tehát általános képlettel, R^1-R^3 szubsztituensekkel felírva az, hogy az ábrán kérdőjellel jelölt származékok keletkeznek-e.

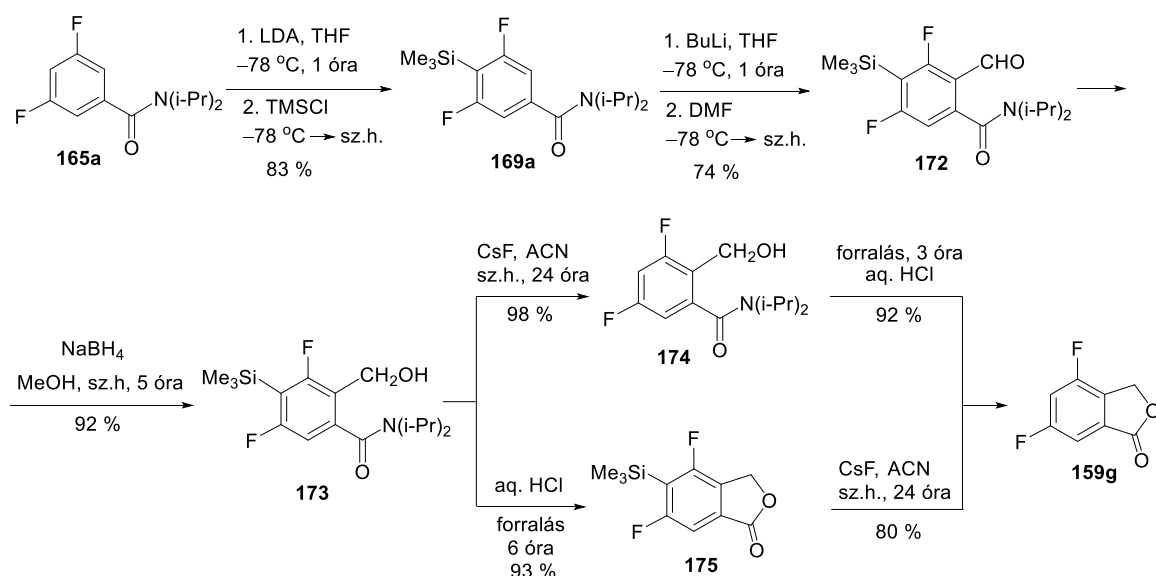


Ezt elvben lehetségesnek tartom, mindazonáltal keletkezésüket a reakciók nyers termékében egyik származék esetében sem tapasztaltuk, legalábbis vékonyréteg kromatográfiával látható mennyiségben megjelenő, kinyerésre érdemes mennyiségű melléktermékeként nem. Ez nem csak a fenti, 4-es helyzetben szubsztituátlan származékokra igaz, hanem a 4-metil, illetve 4-aril analogonokra is, melyek redukciós és egyéb reakcióiról két, a disszertáció megírása óta megjelent közleményünkben számoltunk be (I. Gyűjtő et al. *Synth. Comm.* **2019**, *49*, 3475; M. Porcs-Makkay et al. *Chemistry Select* **2019**, *4*, 8295).

A megfelelő benzotiadiazin-oxid vagy benzotiadiazin nyomnyi mennyiségben történő esetleges keletkezése a nyers termékek célzott LC-MS vizsgálatával lenne feltérképezhető, ilyen kísérletet nem végeztünk. Az irodalomban keresve nem találtam olyan forrást, amely benzotiadiazin-dioxidok, vagy akár általánosabban értelmezve (a heterogyrút „felhasználva”) benzolszulfonsav-hidrazidok hasonló redukciójáról számolna be.

10. Kérdés: A 108. ábrán ismertetett 4,6-difluorftalid szintézise (111. o.) mennyire méretnövelhető?

Válasz: Az ábrán látható szintézisút kísérleteink alapján a szintézisút első lépéseire vonatkoztatva 20-30 g-os, a végére vonatkoztatva kb. 5 g-os sarzsméretben jól kivitelezhető.



Hasonló reakciókkal szerzett tapasztalataink alapján a további méretnövelés is megoldhatónak látszik. A méretnövelés során előnyös lenne a butillítiumot hexillítiumra cserélni, abból a megfontolásból, hogy melléktermékként ne gázalmazállapotú bután, hanem inkább hexán keletkezzen. Vizsgálandó lenne továbbá, hogy a laborban gyakorlati okokból -78°C -on végzett adagolások magasabb hőmérsékleten, tehát kevesebb hűtési energia felhasználásával is kivitelezhetőek-e. Hasonlóan alacsony hőmérsékletű reakciók az Egis technikai felszereltsége mellett akár középüzemi méretig (több 10 kg-os sarzsméretig) is növelhetőek, a nagyüzemi gyártás feltételei az Egis-ben jelenleg még nem adóttak.

Budapest, 2020. február 20.

Volk Balázs