

Válasz

Mátyus Péter, az MTA doktorának, egyetemi tanárnak „*Kondenzáltvázas kén- és nitrogéntartalmú heterociklusos vegyületek szintézise és kémiai átalakítása*” című MTA doktori értekezéséről írt bírálatára

Köszönettel tartozom Tisztelt Bírálómnak, hogy mélyreható alaposággal végigtanulmányozta értekezésemet. Megtisztelőnek tartom dicsérő szavait.

Szerkesztési és formai megjegyzéseire az alábbiakban válaszolok:

Bírálóm hiányolja, hogy a reakciósémákon nincsenek hozamok és az értekezés kísérleti részt nem tartalmaz. Teljes mértékben egyetértek a hozamok feltüntetésének hiányával kapcsolatban. A kísérleti rész beillesztésére terjedelmi okok miatt nem kerülhetett sor. Az egyes vegyületek előállítására vonatkozó általános, rövid leírás viszont az értekezés terjedelmét nem növelte volna jelentősen. A felvetett hiányosságokat részben enyhíti, hogy értekezésem 1. sz. melléklete az értekezés alapját tartalmazó közleményeinket tartalmazza abban a sorrendben, ahogy disszertációmiban szerepelnek.

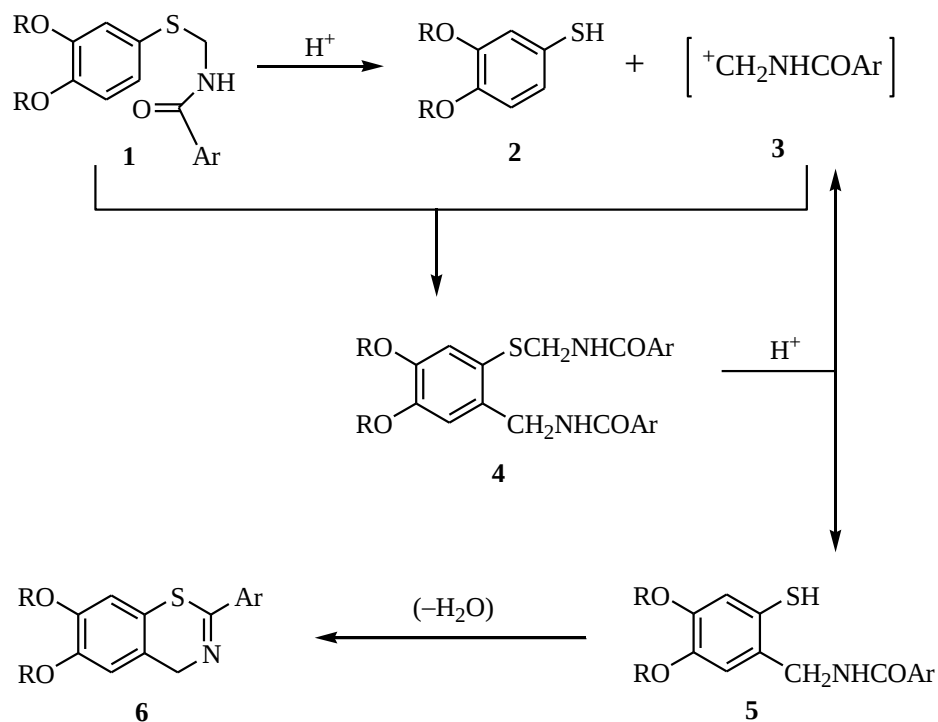
A bírálatban feltett kérdésekre és észrevételekre az alábbiakban válaszolok:

- 1. Megállapította, hogy 2H- és 4H-benzotiazinok (IV, illetve III, 5. ábra) keletkezési aránya a VII prekursor Q szubsztituensétől jelentősen függ, hogyan magyarázza ennek okát? Ugyanebben a reakció típusban, mindkét sorozatban, a gyűrűzárás a metoxisoporttal orto-helyzetű szénatommal is végbemehetne, különösen kis térigényű Q szubsztituens esetén, nem tapasztalta ilyen termékek keletkezését? (E kérdés érvényes a 7. ábrára vonatkoztatva is).*
- 2. Az 1) pont szerinti gyűrűzárási reakció intermolekuláris mechanizmusát keresztezett kísérlettel erősítette meg (10. ábra), a bemutatott kísérlet azonban csak azt igazolja, hogy a reakció intermolekulárisan is lejátszódik, ugyanakkor nem zárja ki azt, hogy részben intramolekulárisan is történik. Ugyanehhez kapcsolódóan kérdezem: a 2w és 2z vegyületek 45:55 arányát (és a 11. ábrán szereplő 2ae 2b vegyületek arányát, amit nem is ad meg) hogyan értelmezi ?*

Válasz: Mivel az 1. és 2. kérdések összefüggnek egymással, válaszaimat együtt adom meg.

Az 1960-as években Szabó és Vinkler foglalkozott behatóan az N-(3,4-dialkoxi-fenil-tio-metil)-benzamidok foszforil(V)-kloridos gyűrűzárási reakciójával és próbálták igazolni a nem várt 2-fenil-4H-1,3-benzotiazinok keletkezését (J. Szabó, E. Vinkler, *Acta Chim. Hung.* **1962**,

34, 447-454; *Magyar Kémiai Folyóirat* **1962**, 68, 279-283.). Véleményük szerint a savamid-tioéter savas hasítási termékei közül a karbókation szubsztitúciós reakcióba lép a változatlan savamid-tioéterrel a **4** keletkezése közben. A savas hasításkor keletkező tiofenolszármazék a 2-fenil-4*H*-1,3-benzotiazint adja (további bizonyítékul a **4** vegyületet nem csak feltételezték, hanem előállították).



1. ábra

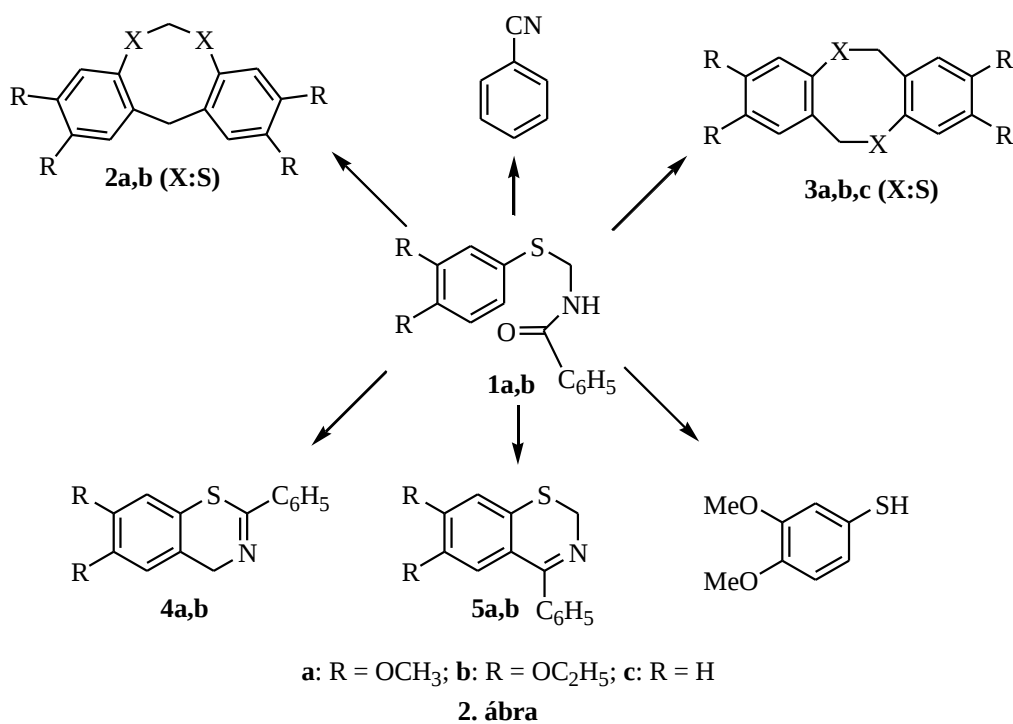
A fenti cikkekben leírták, hogy a savamid-tioéterek gyűrűzárása protonkatalizált intermolekuláris átrendeződésével játszódik le. Későbbi közleményeinkben (J. Szabó, L. Fodor, I. Varga, P. Sohár, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1976**, 88, 149-153.; J. Szabó, L. Fodor, I. Varga, E. Vinkler, P. Sohár, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1977**, 92, 317-322.; J. Szabó, L. Fodor, I. Varga, E. Vinkler, P. Sohár, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1977**, 93, 403-407.; J. Szabó, L. Fodor, E. Szücs, G. Bernáth, P. Sohár, *Pharmazie* **1983**, 39, 41-42.) a reakciót elvégeztük piridinben, így a savas hasítás kizárásával csak a 2*H*-1,3-benzotiazinokat nyertük, továbbá az izolációs technika fejlődésével a foszforil(V)-kloridos gyűrűzársnál eltérő arányban mindkét 1,3-benzotiazin izomert megkaptuk.

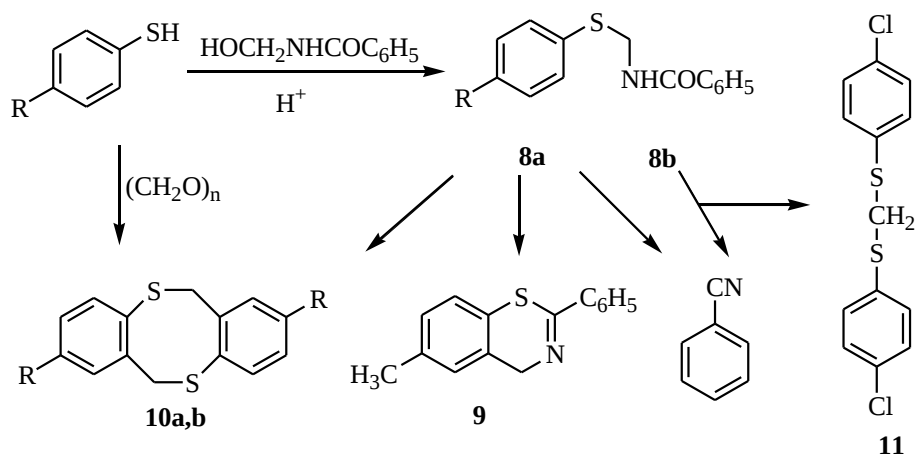
Az 1,3-benzotiazin gyűrűzársai reakcióknál azt tapasztaltuk, hogy a termelést a Q-szubsztituens elektronikus, és szterikus tulajdonságai egyaránt befolyásolják. Ha a Q elektronküldő csoport (pl. Q = Me), növekszik a 2*H*-izomer termelése is. Viszont ha Q o-szubsztituált-fenil csoport, szterikus gátlás miatt mindkét izomer képződésének esélye csökken és így alacsonyabb a reakció hozama. Határesetként említem a Q = 2,6-Me₂C₆H₃

származékot, amikor gyűrűzárásnál csak a 4*H*-1,3-benzotiazin izomer képződött nagyon gyenge (0,55%) termeléssel.

Az értekezés **5. és 7. ábráján** vázolt gyűrűzárási reakcióknál nem tapasztaltuk a metoxi csoporttal *o*-helyzetű szénatomon történő gyűrűzárást, míg a **9. ábrán** a 3-metoxi-tiofenolból kiinduló 1,3-benzotiazin gyűrűzárásoknál a metoxi-csoporthoz képest *o*-, és *p*-helyzetű szénatomon is végbement a gyűrűzárás.

Tapasztalataink szerint az aromás gyűrűn elektronküldő csoport hiányában a foszforil(V)-kloridos gyűrűzárás nem játszódik le. Így nem sikerült benzotiazin gyűrűt nyerni a tiofenolból, ill. *p*-klór-tiofenolból előállított megfelelő savamid-tioéter típusú vegyületből foszforil(V)-kloriddal. A savamid-tioéterek 1,3-benzotiazinná alakulása mellett/helyett tanulmányoztuk egyéb reakcióikat, melyek értekezésemben nem szerepelnek (P. Sohár, I. Kövesdi, J. Szabó, Á. Katócs, L. Fodor, E. Szücs, G. Bernáth, J. Tamás, *Magn. Reson. Chem.* **1989**, 27, 760-766; *Magyar Kémiai Folyóirat* **1990**, 96, 114-121.) Az alábbi ábrákon (**2-3. ábra**) a savamid-tioéterek bomlásával keletkező reakciótermékek közül a tiofenol-származékokon, benzonitril-származékokon túl a két dibenzo-ditiocin izomer képződése említésre méltó. Összefoglalva, ha a benzotiazin gyűrűzárás elektronikus okok miatt nem kedvezményezett, a savamid-tioéterek bomlásával melléktermékek keletkeznek.





a: R = CH₃; b: R = Cl

3. ábra

Mivel japán szerzők közleményükben a savamid-tioéterek 4*H*-1,3-benzotiazinná alakítását intramolekuláris átrendeződésként írták le (I. Ito, N. Oda, T. Keda, K. Tanaka, *Yakugaku Zasshi* **1975**, 95, 1396-1399.), felülvizsgáltuk reakcióikat, valamint újabb savamid-tioétereket is bevontunk a gyűrűzárási reakciók tanulmányozásába (értekezés **9. ábra: 1w,z**, **8. ábra: 1u**, **10. ábra: 1w, 1ab**, **11. ábra: 1b, 1 ac** vegyületek).

A **10. ábrán** leírt **2z** vegyület az **1ab** savamid-tioéterből képződő karbókation csak az **1w** szubsztitúciós reakciójával és annak gyűrűzárásával keletkezhet. Ebben az esetben is a gyűrűzárás intermolekuláris jellegét kívántuk bizonyítani (**10. ábra**). A **11. ábrán** vázolt **2ac** és **2b** (1:5) vegyületek közül a **2b** csak intermolekuláris átrendeződéssel képződhet.

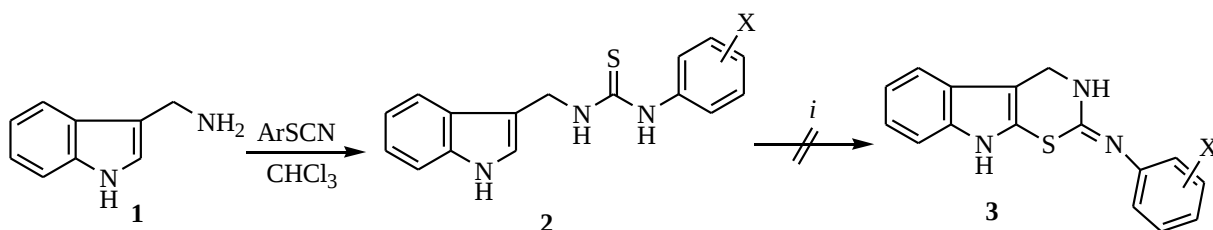
3. A munka gyógyszerkémiailag szempontból legérdekesebb, és perspektívájában is ígéretes részét a tiazinoindolokkal kapcsolatos eredményei jelentik (2.1.4. fejezet). Nevezetesen a munka során brasszinin és ciklobasszinin analógokat állított elő-utóbbiak esetében, a tiazingyűrű kialakítását kiválóan oldotta meg fenil-trimetil-ammónium-tribromiddal a megfelelő tiobenzamidok Hugerschhoff-oxidatív gyűrűzárása révén- közülük több is jelentős tumorsejt gátló hatást mutatott (1. táblázat, 22. oldal). Értéklése szerint a legjelentősebbnek a **20** 2-feniliminotiazin származék tekinthető, még a ciszplatint is meghaladó hatással. Véleményem szerint, a **17a** és **17b** vegyületek (brasszinin 2-indol analógjai) szintén (vagy akár még inkább) érdekesek, hiszen a vizsgált mindhárom tumor sejtvonalon jelentős gátló hatást mutatnak. Szerintem a **17** vegyületek kiváló hatása szinte várható is, köszönhetően ditiokarbamát szerkezetüknek (s nem meglepő gyűrűzárt párjaik jóval gyengébb hatása; vö. brasszinin - ciklobasszinin hatását), mindezért magam a **17** vegyületek további származékait is vizsgálatra érdemesnek tartanám. Indokolt lenne a **20** [5,6-b]

anellált származék [6,5-*b*] analógjának vizsgálata is - megtörtént-e ? Azért is így gondolom, mert e vegyületek *in vivo* körülmények között további aktív származékokká metabolizálódhatnak. Érdekes lett volna/lenne a **20** vegyülettel izomer **42a-c** fenilimino származékok vizsgálatára is sort keríteni. Jelölt a dolgozatban nem elemzi vegyületeinek feltételezett hatásmechanizmusát, és a hivatkozott saját közleményben (Bioorg. Med. Chem. Lett 2006) is csak rövid utalást tesz arra, hogy azok az NF-κB vonalon hathatnak és további vizsgálatokat is említ. Történtek-e ilyenek, s milyen eredménnyel? Véleményem szerint a brasszinin által képviselt indolil-ditiokarbamátok jelentősége abban is lehet, hogy várhatóan az Nrf2 (NF-E2-related factor 2) - Keap1 rendszerre, közelebbről az Nrf2/Keap1 kapcsolatra gátló hatást fejthetnek ki, mely detoxifikáló és citoprotektív hatást eredményez. Foglalkoztak/nak-e ilyen irányú kiterjesztéssel?

Válasz:

Bírálóm érdekesnek tartaná az értekezésben **20** vegyület antiproliferatív hatás vizsgálatát (értekezés **28. ábra**) az izomer **42a-c** (2-fenilimino-1,3-tiazino[5,4-*b*]indolszármazékokra (**40. ábra**) is kiterjeszteni. A vizsgálatokat elvégeztük, de farmakológus kollégák értékelhető hatást nem találtak, így disszertációmban csak előállításuk szerepel.

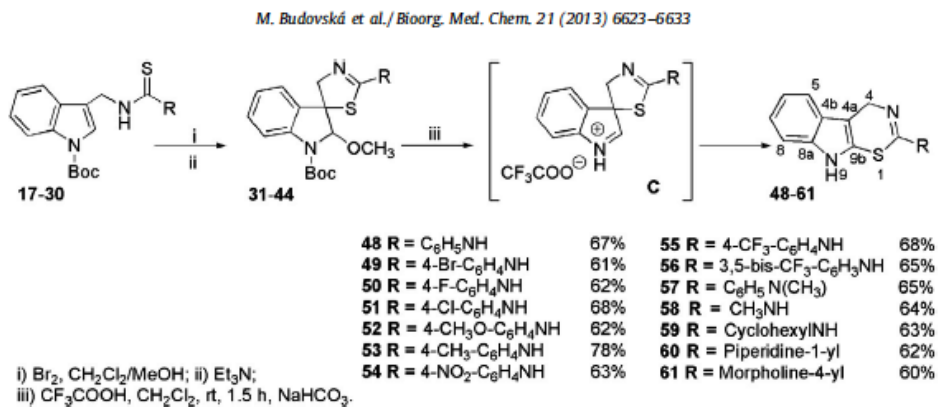
Bírálóm indokoltan tartaná a **20** [5,6-*b*] anellált származék [6,5-*b*] analogonjának vizsgálatát is. Természetesen kísérleteket végeztünk az alábbi ábrán látható analogon **3**, 2-fenilimino-1,3-tiazino[6,5-*b*]indol vegyületek előállítására a megfelelő tiokarbamid **2** származékok gyűrűzárásával. A reakció kivitelezésére számos reakciókörülményt megpróbáltunk, sajnos az általunk végzett reakciókkal nem sikerült gyűrűt zárni vagy a kívánt terméket izolálni (**4. ábra**).



i
 CH₂Cl₂, PhMe₃NBr₃, szobahő, 45 másodperc
 Br₂, ecetsav
 piridinium-tribromid, CH₂Cl₂
 NBS, CH₂Cl₂
 NIS, CH₂Cl₂
 NCS, CH₂Cl₂

4. ábra

Az elmúlt évben a tématerületen dolgozó szlovák kutatócsoport kerülőúton, az indol nitrogénen történő védőcsoport kialakításával egy spirociklusos köztiterméken keresztül előállította az alábbi vegyületeket, melyek az opponensem által előrevetített jó *in vitro* antiproliferatív hatással rendelkeznek.



Scheme 3.

A feltételezett hatásmechanizmust illetően hasonló szerkezetű vegyületek esetében leírták, hogy feltételezhetően az NF- κ B vonalon hatnak. A brassinin és analógon vegyületek esetén indolamin-2,3-dehidrogenáz (IDO, EC 1.13.11.42) gátló mechanizmust írtak le az irodalomban (P. Gaspari, T. Banerjee, W. P. Malachowski, A. J. Muller, J. D. Prendergast, J. DuHadaway, S. Bennett, A. M. Donovan, *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 684.; T. Banerjee, J. B. Duhadaway, P. Gaspari, E. Sutanto-Ward, D. H. Munn, A. L. Mellor, W. P. Malachowski, G. C. Prendergast, A. J. Muller, *Oncogene* **2008**, 27, 2851.). További kísérleteket az antiproliferatív hatás mechanizmusának pontosítására ezidáig nem végeztünk. Köszönöm opponensem javaslatát, lehetőségeink szerint a későbbiekben megpróbáljuk vegyületeink Nrf2/Keap1 kapcsolatra kifejtett hatását tanulmányozni. Itt említem meg azt is, hogy más (nem tizino-indol) vegyületeink között találtunk lényegesen jobb antiproliferatív hatással rendelkezőket, így intenzívebben azokat vizsgáljuk.

4. A benzotiazinokból és -tiazepinekből β -laktám gyűrű anellációját is elvégezte, mind lineárisan, mind angulárisan anellált vegyületeket is előállított, említve némely esetben az izokinolin analógok reakcióit is. Várt-e különbséget? Kérem, adjon egy rövid összefoglaló értékelést példák szisztematikus összehasonlításával: változik-e, ha igen, milyen szempontból változik a reakció a kétféle gyűrűrendszer esetében (más szavakkal: van-e a kénatomnak szerepe e reakciókban)?

Válasz: Az izokinolinok és a benzotiazinok reakcióinak összehasonlítása végigkíséri az elmúlt hat évtized kutatásait. A kénatom szerepe a legtöbb reakció esetén meghatározó, így az izokinolinoktól eltérően viselkednek, míg sok esetben a benzotiazinok az izokinolinokhoz hasonló vegyületeket adnak a reakciók során. Értékezésben szereplő néhány reakció ilyen csoportosításával próbálom Bírálóm kérdésére kissé kiterjesztve válaszolni.

Az első legjelentősebb különbség már a két gyűrűrendszer előállításánál mutatkozik. Az izokinolinok szintézisének alkalmazott *Bischler-Napieralski* gyűrűzárás az 1,3-benzotiazinok esetében, a kén-szén kötés hasadása miatt nagyrészt nem a várt irányban játszódik le (átrendeződéssel a 4H-, a várt reakció során a 2H-1,3-benzotiazinokat kaptuk, mindkét izomer az izokinolin „4-tianalogonjának tekinthető”).

A Staudinger reakció mindhárom gyűrűtípusnál β -laktám képződéssel jár (izokinolinoknál tapasztalható reakciósebesség eltérés a kén-szén, valamint a szén-szén kötések hosszában és szögében és az ebből adódó eltérő gyűrűfeszülésekben keresendő).

Lényegesen eltérően viselkednek a lineárisan-kondenzált-1,3-benzotiazin- β -laktámok, az angulárisan-kondenzált-1,3-benzotiazin- β -laktámok és az izokinolin- β -laktámok nátrium-metoxid hatására. A lineáris rendszereknél minden esetben számolni kell a kén-szén kötés felnyílásával, míg az anguláris-1,3-benzotiazinszármazékok és a megfelelő izokinolinok sok azonosságot mutatnak (az apróbb eltérések itt is visszavezethetők az előző bekezdésben említettekhez).

Az általunk vizsgált 1,3-benzotiazinok és DMAD reakciói a **134.**, **139.**, és **140. ábra** szerint a megfelelő izokinolinokkal megegyezően játszódnak le. A **136.** és **150. ábra** mutatja, hogy egyes 1,3-benzotiazin-származékok és DMAD reakciója eltérő reakciótermékeket eredményez.

5. A 89a-e és 90a-e vegyületek esetében megállapította azok dezmotrópiai viszonyát. A 90c és e enaminból DMSO oldatban állás közben izomerizációval megjelent az imin forma is (arány: 3:1), ugyanakkor az imin-formából nem képződött enamin forma. Vajon miért csak e két vegyület viselkedik így? A megfigyelést az enamin forma nagyobb stabilitásával értelmezi: a β -enamino észter formát mezoméria stabilizálja. Ha ez így van, miért nem keletkezik enamin az iminből, különösen dipoláris aprotikus oldószerben?

Válasz: Dezmotróp párok oldatban történő NMR vizsgálatára nem találtunk irodalmi példát. Feltételezéseink és tapasztalataink alapján, különböző oldószerekben (és esetenként kristályos formában is) hosszabb állást követően tautomer egyensúly alakul ki. Az NMR mérési adatok alapján az imin forma relatív stabilitását a folytonos konjugáció befolyásolhatja.

6. *Indolo[2,3-b][1,4]tiazepinekből melegítés hatására kén el iminációjával indolo[3,2-c] izokinolinok képződnek (87. és 88. ábrák), a plauzibilis mechanizmust termodinamikai stabilitás- különbséggel magyarázza, s alátámasztásul számított ΔG (szabadentalpia) értékeket ad meg. Ehhez szüksége volt entrópia adatokra is. Milyen módon számította az entrópiát, és azoknak milyen a hozzájárulásuk ΔG -hez? Vagy ΔG helyett valójában reakcióhőt (azaz ΔH -t) számolt? Mit gondol, a folyamat jelentős hajtóereje nem az indolo[3,2-c]izokinolinok aromaticitásával függ össze?*

Válasz: Az optimalizált szerkezeteken elvégzett frekvencia-számításokkal a szabadentalpia G értékek közvetlenül adódnak. Emellett a Gaussian program egy adott hőmérséklethez (298,15 K) tartozó további termokémiai adatokként az entalpia H értékeket és az entrópia S értékeket is kiszámolja, a $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ összefüggés alapján egy reakció hajtóerejének entrópia-változással kapcsolatos hozzájárulása könnyen megkapható. Mivel a ΔG érték is egyértelmű összhangban volt a kísérleti tapasztalattal, a $T\Delta S$ komponensre nem fordítottunk külön figyelmet. Ezt pótlendő a kérdésre válaszolva elmondható, hogy a $95h \rightarrow 100h + 1/8S_8$ reakció egy minimális entrópia-csökkenéssel jár ($\Delta S = -1,18$ cal/Mol K). Az adott hőmérsékleten $T\Delta S = -0,35$ kcal/Mol, így a $\Delta G = -26,72$ kcal/Mol érték figyelembe vételével a $\Delta H = -27,07$ kcal/Mol-nak adódik, vagyis a reakciót elsősorban az entalpia-változás kontrollálja, amit a kísérletben alkalmazott magasabb hőmérséklet sem befolyásol érdemben. Ennek alapján is megállapítható, hogy a hagyományos kémiai szemléleten alapuló várakozások szerint a tárgyalt kéneliminációs reakciók hajtóerejének egyértelműen az aromás szerkezet kialakulása tekinthető, ami elsősorban az entalpia változásában tükröződik.

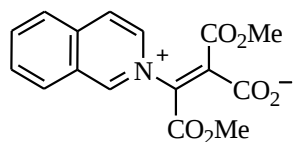
7. *Ugyancsak DFT számítás eredményére hivatkozik a β -laktámgyűrű epimerizációjának értelmezéséhez (76., 77. oldal, 2. táblázat), megemlítve, hogy az értékek metanolra vonatkoznak. Hogyan számolt oldószereffektust? További kérdésem ezzel kapcsolatban: a számítással kapott köztitermékek szerkezetét tekintve milyen mértékű a ketének preferenciája (131-133 vs 128-130), vagyis egyértelműen kizárható-e minden esetben a protonálódási-deprotonálódási út?*

Válasz: Az oldószer hatását a közeg dielektromos állandójának értékével, mint a közeg polaritását jellemző paraméterrel számoló IEFPCM (Integral Equation Formalism Polarizable Continuum Model) oldószermodell segítségével oly módon közelítettük, hogy a vákuumban kapott optimalizált szerkezetek energiáját B3LYP funkcionállal 6-31 G(d) bázison az említett, közeget egy poláros kontíniumként kezelő oldószermodell alkalmazása mellett számoltuk ki.

Ez a módszer az oldószer-molekulák szerkezetétől függetlenül csak a közeg polaritását jellemző dielektromos állandóját ($\epsilon_{\text{MeOH}}=32,63$) veszi figyelembe. Mivel a szerkezetek optimalizálása nem oldószermodell alkalmazása mellett történt, oldószer-hatást is tükröző frekvencia-számításokat nem lehetett végezni, ezért nem termokémiai adatokkal, hanem a teljes elektronenergia-változásokkal jellemeztük az izomerek relatív stabilitását. A kézenfekvőnek tűnő, deprotonálódáson és protonálódáson alapuló epimerizáció mellett lehetséges párhuzamos reakcióútként azért tételeztük fel a keténeken keresztül lejátszódó izomerizációt, mert a kondenzált benzotiazinok átalakulása (**54**→**125**) érzékelhetően gyorsabban játszódott le, mint az izokinolin analogonoké (**55**→**126**), ami arra utalt, hogy a kénatomnak a nátrium ionhoz történő koordinációja is szerepet játszhat az átalakulásnak legalábbis egy lehetséges módjában. Ennek megfelelően a feltételezett ketén intermedierek közül a trikoordinált nátrium-iont tartalmazó **132a** ($\text{X}=\text{CH}_2$) képződése jóval kevésbé kedvezményezett, mint a **131a** tiofenoláté ($\text{X}=\text{S}$). Mindemellett a **131-133**, ill. a **128-130** intermedierek relatív stabilitása alapján elmondható, hogy a deprotonálódási-protonálódási út minden esetben dominánsnak tekinthető a keténeken keresztül lejátszódó alternatív reakcióúttal szemben, valamint azt, hogy utóbbival elsősorban a kondenzált benzotiazinok izomerizációjánál kell számolni.

8. *Benzotiazinok és 1,4-benzotiazepinek reakcióját DMAD-tal ismerteti a 2.6. fejezetben. A bevezetőben azt írja, hogy Huisgen és munkatársai izokinolinok esetében a CCV és CCVI (133. ábra, 95. oldal) adduktok mint átmeneti állapotok jelenlétét igazolták? Ezt hogyan érti? Hiszen a két képlet egymással mezoméria viszonyban van! A 96. oldalon $\text{C}=\text{N}$ kötésre történő 1,4-cikloaddíciós reakciók' körére hivatkozik. Ez alatt pontosan mit ért? A 101. oldalon a 139. ábrán ismertetett reakciómechanizmus kapcsán 169a-d szerkezetekre mint átmeneti állapotokra hivatkozik, ezek azonban közti termékek (168 képletből kimaradt a kénatom; és a 169 és 168 típusú közti termékek képződéshez nem szükséges az imin enamin egyensúly feltételezése, hiszen egy ambidens reaktivitású rendszerrel van szó!).*

Válasz: Huisgen a **CCV** és **CCVI** mezomereket tételezte fel az izokinolin és DMAD reakciója során, melyek közül a **CCV** szerkezetű ikerionos vegyület szerkezetét alacsony hőmérsékleten ($-60\text{ }^{\circ}\text{C}$), éterben széndioxiddal nyert alábbi vegyület szerkezetének meghatározásával igazolta (viszonylag stabil, olvadáspontja: $83-84\text{ }^{\circ}\text{C}$).



Az értekezés **134. ábráján** irodalmi előzményként vázolt reakciókat 3,4-dihidro-izokinolinokkal Huisgen írta le először, melyben a képződő „1,4-dipól” a rendelkezésre álló DMAD mennyiségétől függően vagy azzal, vagy a dihidroizokinolinokkal reagált. Későbbi közleményükben beszámolnak ennek a dipólnak egy harmadik komponenssel, mint dipolarofillel való reakciójáról, amelyet azóta az 1,4-dipoláris cikloaddíciós reakción alapuló „egyedényes” eljárásokban előszeretettel használnak fel heterociklusok előállítására.

Sajnálom a 101. oldalon, a **139. ábrán** előforduló hibákat.

Végül ismételten megköszönöm Bírálóm részletes, alapos bírálatát, az értékes megjegyzéseket, kérdéseket, és azt, hogy támogatja a doktori értekezés nyilvános vitára bocsátását.

Gyula, 2014. április 28.

Fodor Lajos