

Stabilis nitroxid szabad gyökök szintézise és alkalmazása

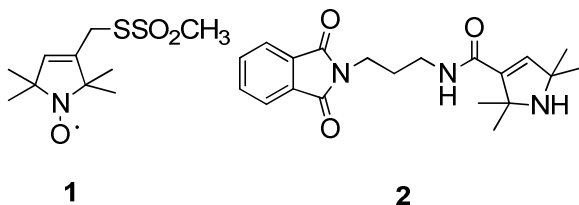
BOGNÁR Balázs, P. SÁR Cecília, H. HANKOVSKY Olga, KÁLAI Tamás és HIDEG Kálmán*

PTE ÁOK Szerves és Gyógyszerkémiai Intézet, Szigeti út 12, 7624 Pécs, Magyarország

1. Bevezetés

A Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karán a Szerves és Gyógyszerkémiai Intézetben (korábban POTE Központi Kutató Labor, Kémia) az 1970-es években kezdtünk foglalkozni a stabilis nitroxid szabad gyökök kémiájával. Akkoriban a szerves kémiának ez egy új és unikálisnak mondható területe volt, hiszen Rosantsev és munkatársai csak 15 évvel korábban közölték az első eredményeiket¹ és Magyarországon addig ezt a témát senki nem művelte. Ugyanakkor a világon is csak néhány kutatócsoport foglalkozott és foglalkozik a nitroxidok kémiájával.

1979-ben kutatócsoportunk szervezte meg az első Nemzetközi Nitroxid Konferenciát, a nyolcvanas években pedig számos eredmény született. Ezek közül a legfontosabb az **1** (HO-225)² reverzibilis metántioszulfonát SH-specifikus spinjelző vegyület és a klinikai kipróbálás III. fázisáig jutott **2** (H-2545)³ szívgyógyszer szintézise volt (1. Ábra).



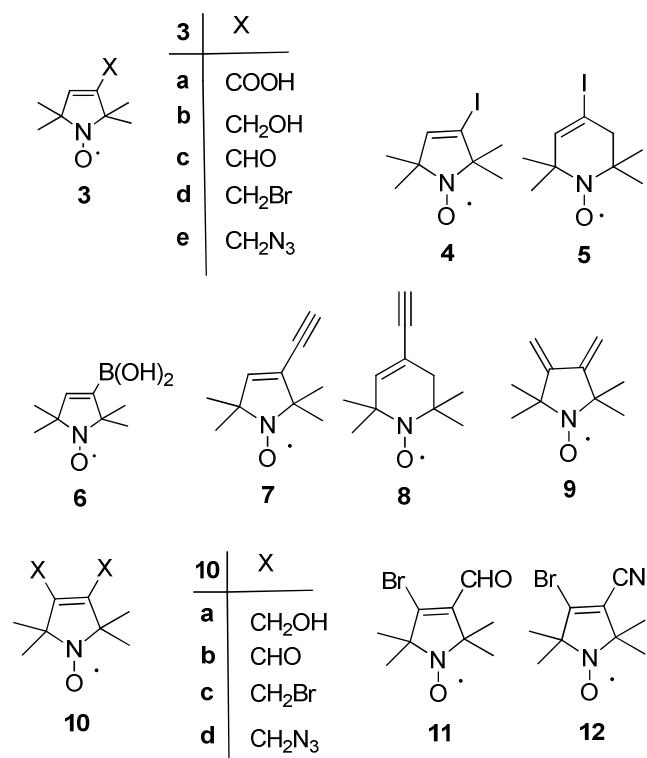
1. Ábra. SH-specifikus spinjelző (**1**) és keringésre ható gyógyszer-jelölt (**2**).

Az 1980-as és 90-es években a stabilis nitroxidok kémiája és alkalmazása jelentős fejlődésen ment keresztül. A nitroxidokat nem csak spin-jelzőként⁴ hanem újabban ko-oxidánsként,⁵ redox-szenzorként,⁶ SOD-mimetikumként,⁷ antioxidánsként,⁸ polimerizációs inhibítorként⁹ is használják. Az utóbbi időben számos összefoglaló közlemény és monográfia jelent meg a stabilis nitroxidok szintéziséről és alkalmazásáról.^{10,11} Jelen összefoglaló cikkünkben legutóbbi összefoglaló közleményünk¹² óta az újabb spinjelző vegyületek, kettőshatású bioaktív vegyületek, kettős (fluoreszcens és spin) szenzorok területén közölt fontosabb eredményeket foglaljuk össze.

2. Eredmények

2.1. Kulcsintermedierek, valamint karbociklusokhoz és heterociklusokhoz kapcsolt nitroxidok szintézise

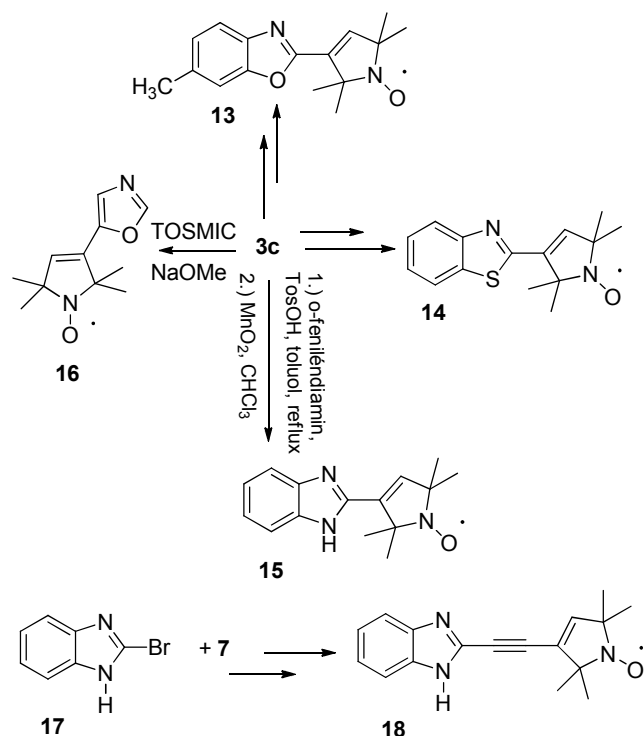
A korábban közölt 3-szubsztituált pirrolin-nitroxidokon (**3a-e**)^{13,14} túl az utóbbi időben számos új mono- és diszubsztituált nitroxidot, mint fontos paramágneses építőkövet, szintetizáltunk. Így említjük **4** és **5** monojódi vegyületeket,¹⁵ **6** paramágneses boronsavat,¹⁶ **7** és **8** acetilén-vegyületeket,¹⁷ **9** diént,¹⁷ **10** 3,4-diszubsztituált pirrolinokat,¹⁷ **11** β -bróm- α,β -telítetlen-aldehidet és **12** β -bróm- α,β -telítetlen-nitrilt.¹⁸ (2. Ábra).



2. Ábra. Néhány paramágneses kulcsvegyület.

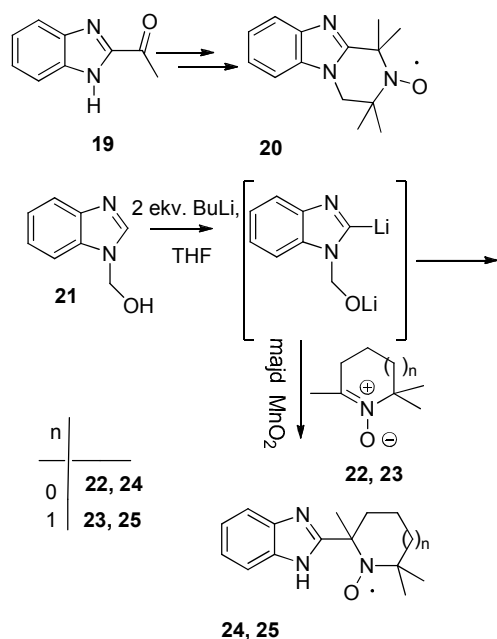
A paramágneses aldehdből (**3c**) **13** benzoxazolt, **14** benzotiazolt, **15** benzimidazolt és **16** oxazolt szintetizáltunk,¹⁵ folytatva az intézet 1970-es években a benzazolok területén közölt munkáit.¹⁹ A 2-brómbenzimidazolt **7** vegyülettel reagáltatva Sonogashira-kapcsolással **18** paramágneses 2-etinilbenzimidazol-származékot állítottuk elő (3. Ábra).²⁰

* Főszerző. Tel.: (72) 536-221; fax: (72) 536-219 ; e-mail: kalman.hideg@aok.pte.hu



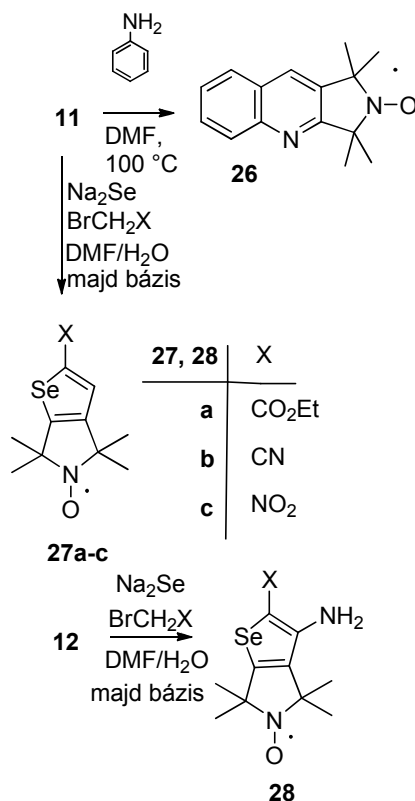
3. Ábra. Nitroxidokhoz kapcsolt benzazolok és oxazol szintézise.

A paramágnesesen módosított benzimidazolok közül **19** 2-acetilbenzimidazolból több lépésben keresztül előállított **20** 1,1,3,3-tetrametil-3,4-dihidropirazino[1,2-a]benzimidazol-2-iloxil gyököt említjük. A **21** vegyületből nyerhető fémorganikus benzimidazol származékból és **22**, **23** nitronokból **24**, **25** pH-szenzorként használható benzimidazolokat kaptunk²⁰ (4. Ábra).



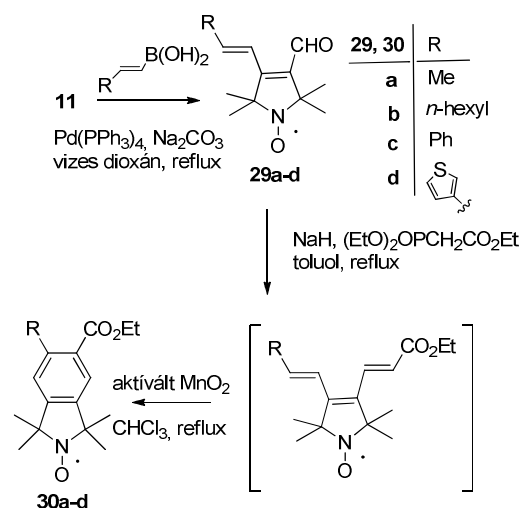
4. Ábra. Paramágneses benzimidazolok szintézise.

A **11** aldehid kulcsvegyületnek bizonyult **26** pirrolo[3,4-b]kinolin¹⁵ vázas vegyület és **27a-c** 2-szubsztituált szelenolo[2,3-c]pirrolók előállításához. A **12** nitrilből **28a-c** 2,3-diszubsztituált-szelenolo[2,3-c]pirrolokhoz jutottunk²¹ (5. Ábra).



5. Ábra. Kinolinnal és szelenofénnel kondenzált pirrolin-nitroxid szintézise.

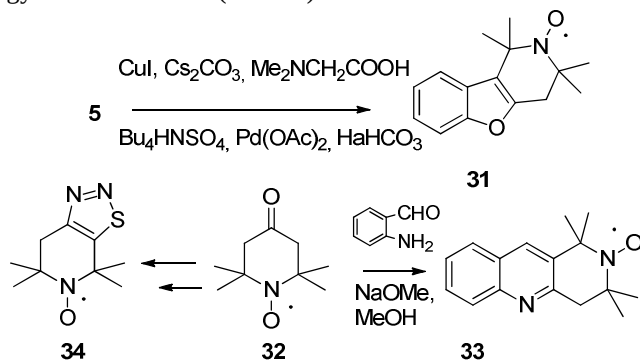
A β -bróm- α,β -telítetlen aldehid (**11**) 5,6-diszubsztituált izoindolin-nitroxidok (**30a-d**) szintéziséhez szintén kulcsvegyületnek bizonyult. Ezt a vegyületet vinilboronsavakkal reagáltatva, majd **29a-d** aldehidek Horner-Wadsworth-Emmons-reakciójával kapott trién elektro ciklizációjára és az azt követő oxidáció **30a-d** izoindolinokat szolgáltatva (6. Ábra).²²



6. Ábra. Izoindolin-nitroxidok szintézise pirrolin-nitroxidokból.

Közepes illetve gyenge termeléssel sikerült **5** jódvegyületből **31** 1,1,3,3-tetrametil-1,2,3,4-tetrahidro-2H-benz[4,5]furo[3,2-c]piridin-2-iloxil gyököt, valamint **32** 4-oxo-TEMPO-ból **33** 1,1,3,3-tetrametil-3,4-dihidrobenz[b][1,6]naftiridin-2-iloxil gyököt és **34** 4,4,6,6-

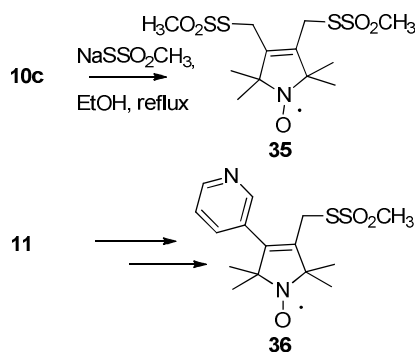
tetrametil-6,7-dihidro-[1,2,3]tiadiazol[5,4-c]piridin-5-iloxil gyököt előállítani¹⁵ (7. Ábra).



7. Ábra. Tetrahidropiridin-nitroxiddal kondenzált heterociklusok szintézise.

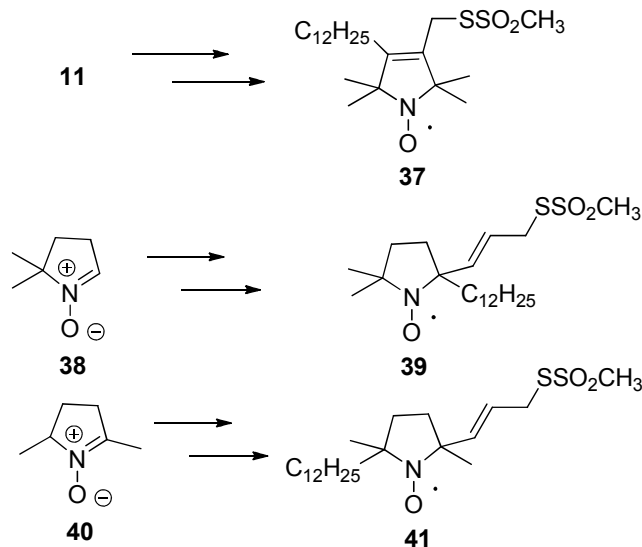
2.2. Új spinjelző vegyületek

A dibromvegyületből (10c) kiindulva már korábban előállítottuk 35 bisz-metántioszulfonát spinjelző reagenst,¹⁷ amelyet Hubbell és kutatócsoportja alkalmazott lizozim cisztein pontmutánsaiban keresztkötő spinjelölésre.²³ Az új reagens, pl. az i és i+3 vagy i és i+4 helyeken cisztein pontmutánsokat tartalmazó α -hélix jelölésével alkalmassá válik a mikroszekundum időskálán bekövetkező fehérje konformációs változások követésére és a spinjelző saját mozgásának csökkentése révén pontosabb távolságmérést tesz lehetővé. Ezt a spinjelzőt sikerrel alkalmazta Fajer és csoportja izomfehérje vizsgálatára is.²⁴ Hasonló előnyökkel rendelkezik 1 spinjelzőhöz képest 11 vegyületből előállított, 4-es helyzetben piridin gyűrűt tartalmazó 36 vegyület,²⁵ amely a piridingyűrű másodlagos kölcsönhatásai révén „pányvázza ki” a spinjelzőt (8. Ábra).



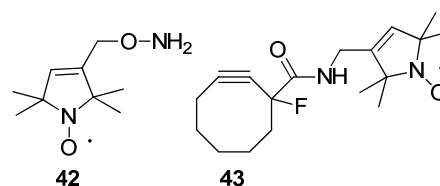
8. Ábra. Új, SH-specifikus spinjelzők.

A β -brom- α,β -telítetlen aldehidből Suzuki-kapcsolással, majd a funkciós csoportok átalakításával alakítottuk ki 37 lipofil spinjelző vegyületet, melyben a lipofil lánc a pirrolin nitroxid 3-as és 4-es pozícióiban található.²⁶ Természetesen más lesz a spinjelző orientációja, ha 38 és 40 nitronokból kiindulva Grignard-reakcióval és funkciós csoport átalakításokkal a 2,2-, illetve a 2,5-pozíciókban alakítjuk ki a lipofil láncot, mint 39 és 41 spinjelzők esetében (9. Ábra).



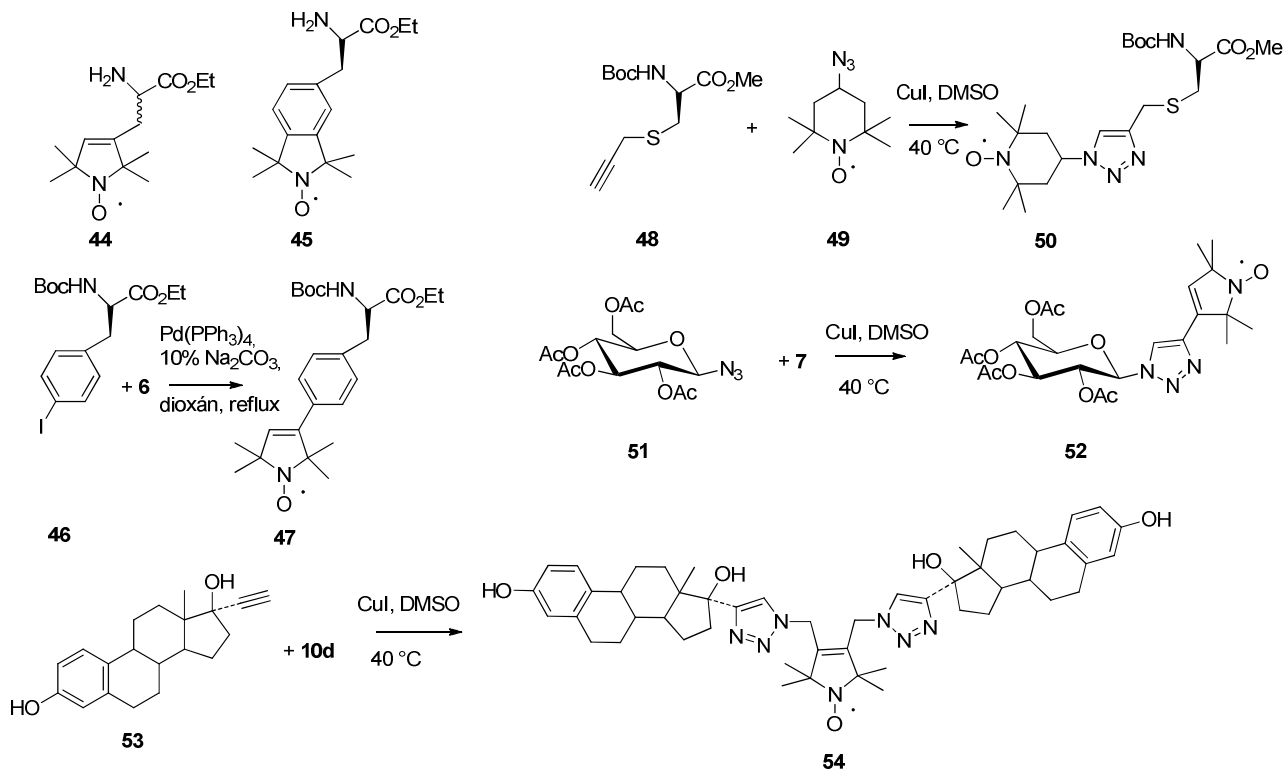
9. Ábra. Lipofil oldalláncú, SH-specifikus spinjelzők.

A hagyományos spinjelzés mellett egyre szélesebb körben terjedt el az ún. ortogonális spinjelzés, vagyis nem-természetes aminosavak hely- és funkcióspecifikus módosítása nitroxidokkal. Így Hubbell kutatócsoportjával együttműködve 42 spinjelző vegyülettel lizozim fehérje *p*-acetil-fenilalaninnal módosított pontmutánsát jelöltük,²⁷ míg 43 vegyülettel *p*-azidofenilalanint tartalmazó lizozim pontmutánsát módosítottunk Cu(I) iont nem igénylő click-reakcióval²⁸ (10. Ábra).



10. Ábra. Ortogonális spinjelző vegyületek.

A fehérjék paramágneses módosításának másik lehetséges módja, hogy az L-aminosavakat előzetesen módosítsuk spinjelzőkkel. Az első, nem természetes paramágneses aminosavat (44) mintegy 30 éve közöltük, melyet O'Donnell-szintézissel állítottunk elő.²⁹ Legutóbb 45 izoindolin oldalláncot tartalmazó nem-természetes aminosav szintézisét és rezolválását közöltük a BME kutatóival együttműködve.³⁰ A Pd(0)- és Cu(I)-katalizált kapcsolási reakciók enyhe reakciókörülményei lehetővé teszik, hogy természetes L-aminosavakat módosítsunk nitroxidokkal a racemizáció veszélye nélkül. Így 46 védett *p*-jódifenilalaninból 6 vegyülettel 47 paramágneses L-fenilalaninhoz jutottunk,³⁰ ill. védett *S*-propargil-L-ciszteint (48) 4-azido-TEMPO-val³¹ (49) reagáltatva 50 paramágneses aminosavat kaptunk click-reakcióval.³² Megjegyezzük, hogy click-reakcióval nemcsak aminosavakat, de más biomolekulákat is módosíthatunk. Például 1- β -D-azido-2,3,4,6-tetraacetyl-D-glükóz (51) és 7 reakciójával 52 vegyülethez jutottunk, ill. 10d vegyülettel a 17 α -etinilösztadiolt (53) reagáltatva 54 vegyületet kaptunk (11. Ábra).

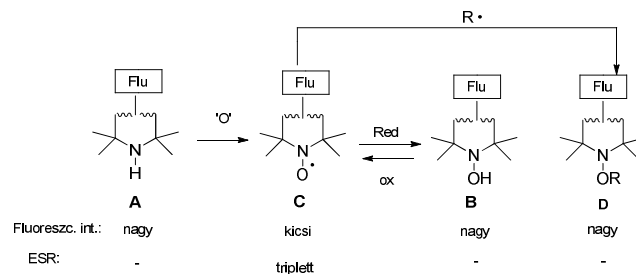


11. Ábra. Biomolekulák (aminosavak, szteroidok, szénhidrátok) módosításai nitroxidokkal.

2.3. Kettős (fluoreszcens és spin) szenzorok szintézise és alkalmazása

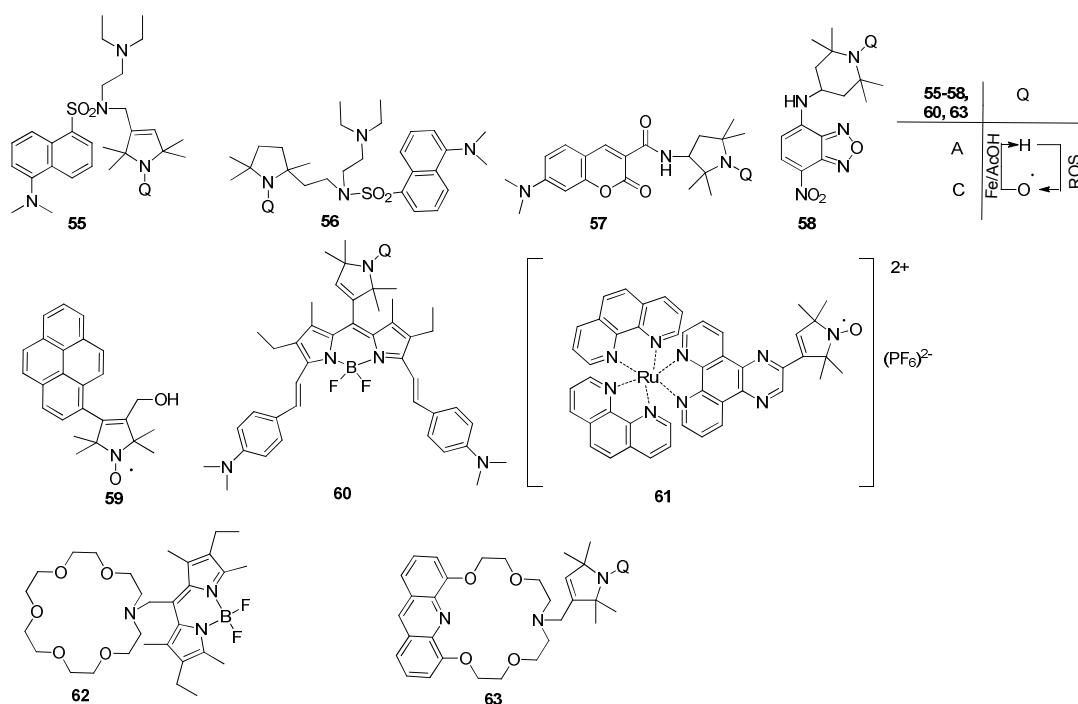
A nitroxidok csökkentik vagy kioltják a fluoreszcens festékek fluoreszcenciáját, még akkor is, ha nem kötik össze a nitroxidot és a fluorofort kovalens kötéssel. A fluoreszcencia kioltás négy fő mechanizmus szerint történhet:³³ Förster-mechanizmus (rezonancia energia transzfer), Dexter-mechanizmus, elektroncserélődéssel járó szingulett-triplett átmenet (intersystem crossing) és töltések szétválásával járó elektronátmenet. Green a di-*tert*-butilnitroxidok kioltási mechanizmusára az elektroncserélődéssel járó szingulett-triplett átmenetet valószínűsítette.³⁴ Ez az intramolekuláris fluoreszcencia kioltással bíró vegyületcsalád azért kapott jelentős figyelmet, mert számos analitikai alkalmazása lehetséges. A nitroxid oxidációs állapota ugyanis jelentősen befolyásolja a fluoreszcencia intenzitását. Az **A**, **B**, **D** szerkezetű diamágneses molekulák ugyanis erősebben (akár több nagyságrenddel nagyobb a kvantumhatásfok) fluoreszkálnak, mint a paramágneses **C** szerkezetű vegyületek (12. Ábra). Az ilyen típusú fluorofor-nitroxid vegyületeket - mivel a változás mind ESR, mind fluoreszcencia spektroszkópiával követhető - kettősen jelölő reagenseknek vagy kettős szenzoroknak nevezték el. Az intézetben számos nitroxid-fluorofor adduktot állítottunk elő.³⁵ Ezek közül a legsikeresebb a danzil fluorofort, pirrolin nitroxidot és vízzoldhatóságot biztosító dietilaminoetil-oldalláncot tartalmazó **55** „Danepy”-nek keresztelt vegyület volt (13. Ábra) amelyet növényfiziológiai vizsgálatokban az MTA SZBK kutatóival sikeresen használtuk szingulett oxigén kimutatására.³⁶ A Danepyhez (**55**) képest **56** danzilszármazék a fluorofort és az oldalláncot a pirrolidin gyűrű 2-es pozíciójában tartalmazta (a kialakuló nitroxid gyökhöz közelebb),

azonban **56** szingulett oxigén hatására kevésbé jelentős fluoreszcencia változást mutatott.³⁷



12. Ábra. A kettős (fluoreszcens és spin) szenzorok működési elve.

A danzilszármazékokon túl kumarin (**57**), nitrobenzofurazan (**58**) és pirén (**59**) fluorofórokhoz kapcsoltuk a pirrolin, pirrolidin és piperidin nitroxidokat.³⁸ Ezek hátránya, hogy alacsony (<600 nm) hullámhosszon emittálnak (1. táblázat). A biológiai alkalmazások sok esetben preferálják, ha a gerjesztés és az emisszió a szövetek által kevésbé elnyelt hosszú hullámhosszú tartományban (600 nm-) történik. Így a hosszú hullámhosszon emittáló BODIPY festékekhez (**60**) és a Ru-fenantrolin komplexhez (**61**) kapcsoltuk a nitroxidokat. Ezek közül **60** vegyület jó redox szenzornak bizonyult, mert aszkorbát hatására a fluoreszcencia intenzitása 1,3-szorosára nőtt, ugyanakkor **61** vegyületnél azt találtuk, hogy képes a DNS-be kaltrálódni. A fluoreszcencia intenzitásának növekedése mellett az immobilizáció jelentkezett az ESR spektrumban is.³⁹ A kettős szenzorok mellett BODIPY koronaéter származékot (**62**) és a BME kutatóival együttműködve akrinid fluorofort (**63**) tartalmazó ionofor vegyületeket szintetizáltunk.^{40,41}



13. Ábra. Nitroxidokkal és elővegyületeikkel módosított fluorofor és ionofor vegyületek.

Vizsgálataink szerint **62** vegyület Li^+ , Na^+ és Mg^{2+} ionokra mutatott fluoreszcencia serkentést, míg **63** vegyület Mg^{2+} , Ca^{2+} és Zn^{2+} ionokra mutatott fluoreszcencia intenzitásnövekedést (13. Ábra).

1. Táblázat. Az 55-63 kettős szenzorok és fluoroionoforok gerjesztési és emissziós hullámhosszai.

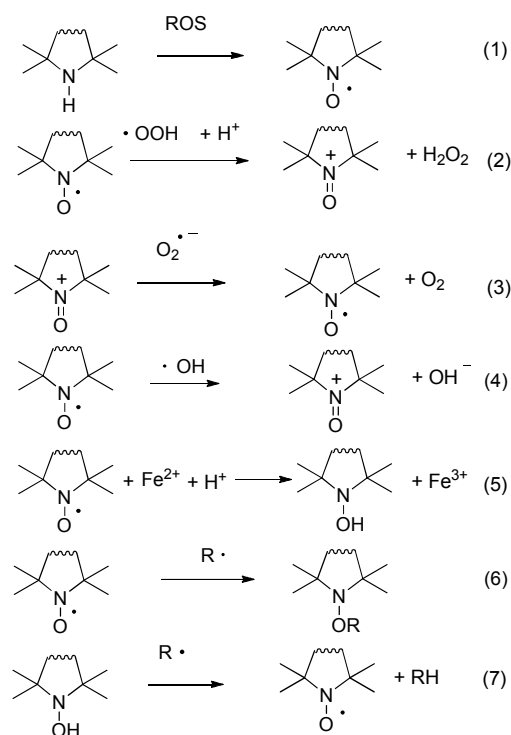
Vegyület	$\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ (nm)	oldószer
55A	342/552	puffer (pH = 7)
56A	342/540	puffer (pH = 7)
57A	412/461	acetonitril
58A	473/529	acetonitril
59	347/386	acetonitril
60A	642/788	metanol
61	453/600	metanol
62	533/552	acetonitril
63A	387/442	acetonitril

2.4. Kettős hatású antioxidáns vegyületek szintézise és vizsgálata

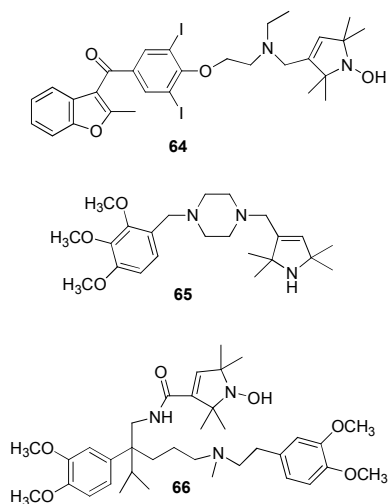
Az 1990-es években ismerték fel, hogy a nitroxidok kis móltömegű, „nem-vitamin típusú” antioxidáns molekuláknak tekinthetők,⁴² bár a vizsgálatok nagyrészt a 4-hidroxi-TEMPO-ra korlátozódtak.⁴³ Intézetünk kutatói és biológiai vizsgálatokat végző partnereink ismerték fel, hogy az antioxidáns (gyökfogó) sajátság akkor hatékony, ha a keletkező káros oxigén és nitrogén szabad gyököket (ROS és RNS) azok rövid életideje miatt a keletkezés

helyén (*in statu nascendi*) elimináljuk. Ehhez viszont az szükséges, hogy a gyökfogót szövetspecifikusan akkumulálódó biomolekulához (főleg a terápiában már használt és jól bevált gyógyszer-molekula) kapcsoljuk. A nitroxidok és diamágneses elővegyületeik lehetséges „gyökfogó” reakcióit a 14. ábra mutatja be. A szterikusan gátolt amin képes a reaktív oxigén származékokat csapdázni, miközben nem toxikus stabilis nitroxid szabad gyök képződik (1).⁴⁴ A nitroxid képes a szuperoxid gyököt (2,3)⁴⁵ és a hidroxilgyököt dizmutálni (4) ill. az átmenetifémionokat oxidálni (5), ezáltal meggátolva részvételüket a Fenton-típusú reakcióban. A stabilis nitroxidok széncentrumú gyökökkel rekombinálódhatnak (6), míg a hidroxilaminok szabad gyököket képesek redukálni, miközben ők nitroxidokká oxidálódnak (7). Ezen reakcióknak köszönhető, hogy állatkísérletes modellben bizonyítottuk, hogy **2** (H-2545) vegyület képes a doxorubicin és a daunorubicin metabolizmusa során keletkező káros szabad gyököket eliminálni és ezáltal csökkenteni a mellékhatásként jelentkező patológiás elváltozást (szívizom károsodást) anélkül, hogy a doxorubicin/daunorubicin hatását csökkentette volna.⁴⁶

Munkánk során a terápiában használatos szívgyógyszereket módosítottunk nitroxidokkal és elővegyületeikkel, így az amiodaront, a trimetazidint és a verapamilt. A PTE ÁOK Biokémia és Orvosi Kémia Intézet munkatársaival azt találtuk, hogy **64** amiodaron analagon kevésbé volt toxikus, mint az „eredeti” amiodaron.^{47,48} Kuppusamy és munkatársai azt találták, hogy **65** módosított trimetazidin-származékkal és **66** verapamil analogonnal kezelt patkányok iszkémia/reperfúzió során kisebb mértékű szívizom elhalást szenvedtek, mint a kezeletlen illetve az alapgyógyszerekkel (trimetazidin, verapamil) kezelt állatok (15. Ábra).⁴⁹⁻⁵²



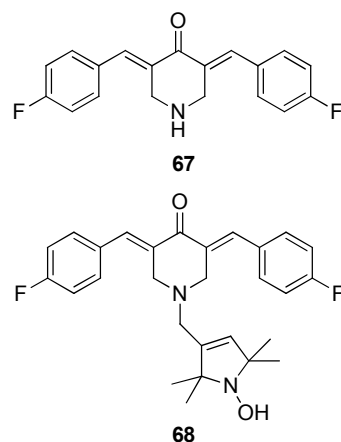
14. Ábra. A nitroxidok és elővegyületeik káros szabad gyök elimináló mechanizmusai.



15. Ábra. A klinikai gyakorlatban használt, keringésre ható szerek (amiodaron **64**, trimetazidin **65** és verapamil **66**) nitroxid elővegyületekkel módosított származékai és analogonjai.

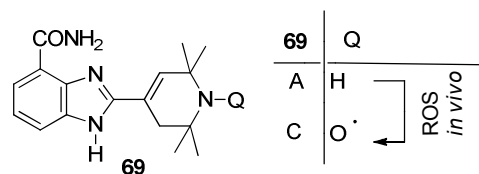
Amerikai kutatókkal együttműködve állapítottuk meg, hogy **67** daganatellenes 3,5-diaril-piperidon vegyületnél kedvezőbb hatású **68** (HO-3867) vegyület. Mindkét 3,5-diarilpiperidon származék a STAT3 aktiválását gátolja a patológiás jelátviteli folyamatok során a daganatos sejtekben és a rákos sejtek apoptózisát indukálja. Ugyanakkor **68** vegyület az antioxidáns hatású (proton és elektrondonor) hidroxilamin révén megvédi az egészséges sejteket a daganatterápia során keletkező ROS-ok káros hatásától.^{53,54} Kiderült az is, hogy **68** vegyület gátolta a petefészek rákból kiinduló áttétek képződését a FAK

(Focal Adhesion Kinase) és FAS (Fatty Acid Synthase) gátlásán keresztül (16. Ábra).⁵⁵ A modern terápiában egyre nagyobb szerepet kapnak a patológiás jelátviteli folyamatok gátlására tervezett/talált kismolekulák.



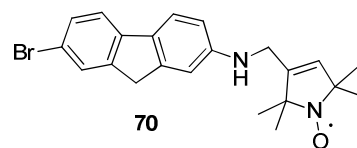
16. Ábra. Daganatellenes 3,5-diaril-piperidonok.

Az utóbbi két évtized egyik legszélesebb körben kutatott enzimes családját a DNS-javító PARP (poliADP polimeráz) enzimes család, amelyek aktiválódása nem programozott sejtpusztulást eredményezhet. A PARP enzim DNS károsodás hatására (szabad gyökök, alkilező szerek stb.) aktiválódik, természetes inhibitora a nikotinsavamid. A nikotinsavamidnál sokkal hatékonyabb PARP-gátlónak bizonyultak egyes heterociklusos amidok és laktámok.⁵⁶ Intézetünkben számos gyökfogó nitroxiddal ill. nitroxid prekuzorral módosított PARP inhibitor szintetizáltunk abból a megfontolásból, hogy a PARP enzim gátlása mellett annak aktivációját előidéző szabad gyököket is csapdázzuk (elimináljuk).⁵⁷ Az egyik legsikeresebb PARP inhibitornak **69A** (HO-3089) 4-karboxamido-benzimidazolt tartalmazó vegyület bizonyult (17. Ábra), melyről bebizonyosodott, hogy *in vivo* nitroxiddá metabolizálódik.⁵⁸



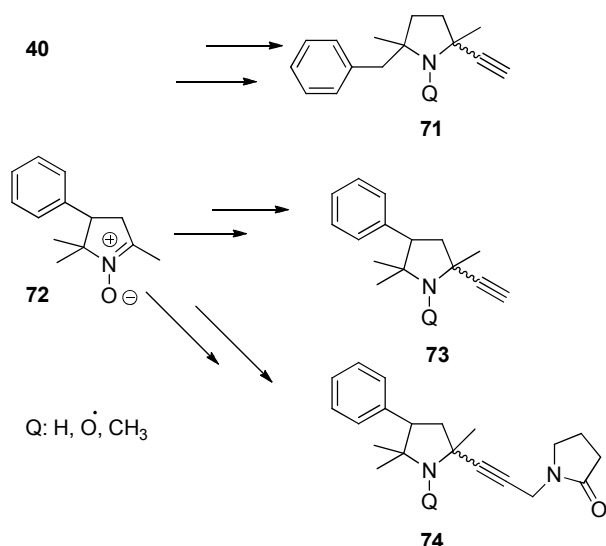
17. Ábra. „Nitroxid-alapú” PARP-gátló és gyökcsapda.

Voss professzor kutatócsoportjával együttműködve néhány nitroxiddal és nitroxid elővegyülettel módosított fluorén-származékot teszteltünk, mint anti-Alzheimer hatású vegyületet. A leghatásosabbnak **70** (HO-4160) vegyület bizonyult, amely antioxidáns hatása mellett gátolta a β -amiloid plakkok képződését is (18. Ábra).^{59,60}



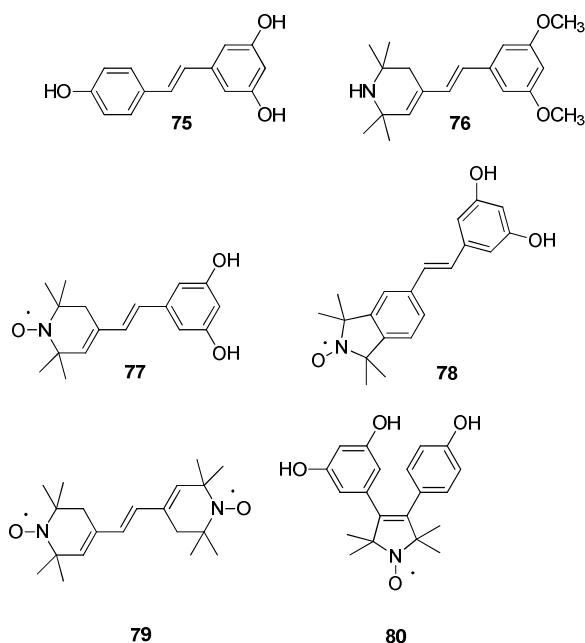
18. Ábra. Kettős hatású (β -amiloid plakkok képződését gátló és antioxidáns) vegyület.

Intézetünkben **40** és **72** nitronokból kiindulva Grignard-reakciókkal **71** és **73** paramágneses deprenil analogonokat valamint a **74** paramágneses oxotremorin analogont és ezek diamágneses származékait állítottuk elő, mint potenciális MAO-bénítók (19. Ábra).⁶¹



19. Ábra. Nitroxidokkal módosított MAO-bénítók.

Intézetünkben előállítottuk a rezveratrol (**75**) paramágneses analogonjait (**76-80**) védett fenolszármazékok Suzuki- és Heck-kapcsolási reakcióival (20. Ábra). Az előállított új vegyületek nem haladták meg a rezveratrol ABTS-gyökkation redukáló képességét, viszont lipopoliszacharid indukálta makrofág sejteken kiváltott gyulladásos folyamatokban a TNF- α képződését **76**, **78** és **79** vegyületek jobban gátolták, mint a rezveratrol (**75**). Ugyanakkor **80** vegyület nem mutatott érdemleges, gyulladáscsökkentő hatást.⁶²



20. Ábra. Paramágneses rezveratrol analogonok.

3. Előretékinés

A stabilis nitroxid szabad gyökök kémiája mintegy 50 évre tekint vissza, és még számos kihívást tartogat. Az ESR spektroszkópia rohamos fejlődése a spinjelző vegyületek újabb generációját, de legalábbis “problémára szabását” igényli. Előbb-utóbb a nitroxidok és elővegyületeik farmakofor csoportokként kerülnek bevezetésre. Itt a kérdés az, hogy mikor és mely gyógyszercég fogja ezt megtenni. A nitroxidok egyre növekvő szerepet játszanak majd az anyagtudományokban is, mint szerves alapú mágnesek építőkövei. Mi, a PTE ÁOK Szerves és Gyógyszerkémiai Intézet munkatársai úgy gondoljuk, hogy ez egy olyan téma terület, amelynek még néhány évtizedes távlati lehetnek, tehát Magyarországon is érdemes művelni.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetünket szeretnénk kifejezni az Országos Tudományos Kutatási Alapnak az általa nyújtott támogatásokért (OTKA T048334, OTKA-NKTH K67597 és K 81123). Hálával tartozunk a közleményeinkben szereplő társszerzőknek, akik az előállított vegyületek biológiai vagy spektroszkópiai vizsgálatát végezték.

- Rosantsev, E. G. *Free Nitroxide Radicals*, Plenum Press: New York, **1970**.
- Berliner, L. J.; Grünwald, J.; Hankovszky, H. O.; Hideg, K. *Anal. Biochem.* **1982**, *119*, 450-455.
- Hankovszky, H. O.; Hideg, K.; Bódi, I.; Frank, L. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1138-1152.
- Hideg, K.; Hankovszky, H. O. *In Biol. Magnetic Res.*; Berliner L. J. and Reuben J. Eds.; Plenum Press: New York, **1989**, Vol. 8, pp 427-488.
- Zhang, B.; Cui, Y.; Jiao, N. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 4498-4500.
- Hirosawa, S.; Arai, S.; Takeoka, S. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 4845-4847.
- Cheng, G.; Lopez, M.; Zielonka, J.; Hauser, A. D.; Joseph, J.; McAllister, D.; Rowe, J. J.; Sugg, S. L.; Williams, C. L.; Kalyanaraman, B. *Cancer Biol. Ther.* **2011**, *12*, 707-717.
- Yoshitomi, T.; Hirayama, A.; Nagasaki, Y.; *Biomaterials* **2011**, *32*, 8021-8028.
- Krol, P.; Chmielarz, P. *Polimery*, **2011**, *56*, 349-359.
- Likhtenshtein, G. I.; Yamauchi, J.; Nakatsui, S.; Smirnov, A. I. Tamura, R. *Nitroxides* Wiley-VCH: Weinheim, 2008.
- Hicks, R. *Stable Radicals: Fundamentals and Applied Aspects of Odd-Electron Compounds*, Wiley: Chichester, 2010.
- Hideg, K.; Kálai, T.; Sár, P. C. *J. Heterocyclic Chem.* **2005**, *42*, 437-450.
- Hideg, K.; Hankovszky, H. O.; Lex, L.; Kulcsár, Gy. *Synthesis*, **1980**, 911-914.
- Hankovszky, H. O.; Hideg, K.; Lex, L. *Synthesis*, **1980**, 914-916.
- Kálai, T.; Bognár, B.; Jekő, J.; Hideg, K. *Synthesis* **2006**, 2573-2579.
- Kálai, T.; Jekő, J.; Hideg, K. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 8395-8398.
- Kálai, T.; Balog, M.; Jekő, J.; Hideg, K. *Synthesis* **1999**, 973-980.
- Kálai, T.; Balog, M.; Jekő, J.; Hideg, K. *Synthesis* **1998**, 1476-1482.
- Hankovszky, H. O.; Hideg, K.; Lex, L.; Földesi, A.; Sohár, P. *J. Chem. Soc., Perkin. I.*, **1980**, 699-704.
- Bognár, B.; Kálai, T.; Hideg, K. *Synthesis* **2008**, 2439-2445.

21. Kálai, T.; Bagi, N.; Jekő, J.; Berente, Z.; Hideg, K. *Synthesis* **2010**, 1702-1706.
22. Kálai T.; Jekő, J.; Hideg, K. *Synthesis*, **2009**, 2591-2595.
23. Fleissner, M. R.; Bridges, M. D.; Brooks, E. K.; Cascio, D.; Kálai, T.; Hideg, K.; Hubbell, W. L. *PNAS* **2011**, *108*, 16241-16246.
24. Rayes, R. F.; Kálai, T.; Hideg, K.; Geeves, M. A.; Fajer, P. G. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e21277.
25. Fawzi, N. L.; Fleissner, M. R.; Anthi, N. J.; Kálai, T.; Hideg, K.; Hubbell, W. L.; Clore, G. M. *J. Biomol. NMR*, **2011**, *51*, 105-114.
26. Balog, M.; Abé, C.; Kálai, T.; Steinhoff, H.J.; Jekő, J.; Hideg, K. *Synthesis* **2007**, 1663-1670.
27. Fleissner, M. R.; Brustad, E. M.; Kálai, T.; Altenbach, C.; Cascio, D.; Peters, F. B.; Hideg, K.; Schultz, P. G.; Hubbell, W. L. *PNAS* **2009**, *106*, 21637-21642.
28. Kálai, T.; Fleissner, M. R.; Jekő, J.; Hubbell, W. L.; Hideg, K. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 2747-2749.
29. Lex, L.; Hideg, K.; Hankovszky, H. O. *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 1448-1451.
30. Kálai, T.; Schindler, J.; Balog, M.; Fogassy, E.; Hideg, K. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 1094-1100.
31. Hideg, K.; Hankovszky, H. O.; Tigyi, J. *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, **1977**, *92*, 85-87.
32. Kálai, T.; Hubbel, W. L.; Hideg, K. *Synthesis* **2009**, 1336-1341.
33. Green, S. A.; Simpson, D. J.; Zhou, G.; Ho, P. S.; Blough, N. V. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7337-7346.
34. Green, J. A.; Singer, L. A.; Parks, J. H. *J. Chem. Phys.* **1973**, *58*, 2690-2695.
35. Likhtenshtein, G. I.; Bogatyrenko, V. R.; Kulikov, A. V.; Hideg, K.; Hankovszky, H. O.; Lukoianov, N. V.; Kotelnikov, A. I.; Taneshelchuk, B. S. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, **1980**, *253*, 481-484.
36. Kálai, T.; Hideg, E.; Vass, I.; Hideg, K. *Free Rad. Biol. Med.* **1998**, *24*, 649-652.
37. Hideg, E.; Kálai, T.; Kos, P.; Asada, K.; Hideg, K. *Photochem. Photobiol.* **2006**, *82*, 1211-1218.
38. Bognár, B.; Ósz, E.; Hideg, K.; Kálai, T. *J. Heterocyclic Chem.* **2006**, *43*, 81-86.
39. Bognár, B.; Jekő, J.; Kálai, T.; Hideg, K. *Dyes and Pigments* **2010**, *87*, 218-224.
40. Kálai, T.; Hideg, K. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 10352-10360.
41. Kertész, J.; Bognár, B.; Kormos, A.; Móczár, I.; Baranyai, P.; Kubinyi, M.; Kálai, T.; Hideg, K.; Huszthy, P. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 8860-8864.
42. Rhodes, C. J. *Toxicology of the human environment*, Taylor and Francis: London, **2000**.
43. Toru, Y.; Nagasaki, Y. *Nanomedicine* **2011**, *6*, 509-518.
44. Twomey, P.; Taira, J.; DeGraff, W.; Mitchell, J. B.; Russo, A.; Krishna, M. C.; Hankovszky, H. O.; Frank, L.; Hideg, K. *Free Rad. Biol. Med.* **1997**, *22*, 909-916.
45. Krishna, M. C.; Russo, A.; Mitchell, J. B.; Goldstein, S.; Dafni, H.; Samuni, A. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 26026-26031.
46. Hideg, K.; Kálai, T. *Cardiovasc. Toxicol.* **2007**, *7*, 160-164.
47. Kálai, T.; Várbiro, G.; Bognár, Z.; Pálfi, A.; Hantó, K.; Bognár, B.; Ósz, E.; Sümegi, B.; Hideg, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 2629-2636.
48. Bognár, Z.; Kálai, T.; Pálfi, A.; Hantó, K.; Bognár, B.; Márk, L.; Szabó, Z.; Tapodi, A.; Radnai, B.; Sárszegi, Zs.; Szántó, Á.; Jr. Gallyas, F.; Hideg, K.; Sümegi, B.; Várbiro, G. *Free Rad. Biol. Med.* **2006**, *41*, 835-848.
49. Kutala, V. K.; Khan, M.; Mandal, R.; Ganesan, L. P.; Tridandapani, S.; Kálai, T.; Hideg, K.; Kuppusamy, P. *J. Pharm. Exp. Ther.* **2006**, *317*, 921-928.
50. Kálai, T.; Khan, M.; Balog, M.; Kutala, K. V.; Kuppusamy, P.; Hideg, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5510-5516.
51. Bognár, B.; Ahmed, S.; Kuppusamy, M. L.; Selvendrian, K.; Khan, M.; Jekő, J.; Hankovszky, H. O.; Kálai, T.; Kuppusamy, P.; Hideg, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 2954-2963.
52. Mandal, R.; Kutala, V. K.; Khan, M.; Mohan, I. K.; Varadharaj, S.; Sridhar, A.; Carnes, C. A.; Kálai, T.; Hideg, K.; Kuppusamy, P. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *323*, 119-127.
53. Selvendrian, K.; Ahmed, S.; Dayton, A.; Kuppusamy, M. L.; Tazi, M.; Bratasz, A.; Tong, L.; Rivera, K.; Kálai, T.; Hideg, K.; Kuppusamy, P. *Free Rad. Biol. Med.* **2010**, *48*, 1228-1235.
54. Kálai, T.; Kuppusamy, M. L.; Balog, M.; Selvendrian, K.; Rivera, K. B.; Kuppusamy, P.; Hideg, K. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5414-5421.
55. Selvendiran, K.; Ahmed, S.; Dayton, A.; Ravi, Y.; Kuppusamy, M. L.; Bratasz, A.; Rivera, B. K.; Kálai, T.; Hideg, K.; Kuppusamy, P. *Mol. Cancer Res.* **2010**, 1188-1197.
56. Canan, S.; Maegley, K.; Curtin, N. *In Poly(ADP-ribose) Polymerase: Methods and Protocols*, Tulin A. V. Ed., Humana Press: New York, **2011**, pp 463-489.
57. Kulcsár, Gy., Kálai, T., Ósz, E., Sár, P. C., Jekő, J., Sümegi, B., Hideg, K. *Arkivoc* **2003**, (v), 121-131.
58. Kálai, T., Balog, M., Szabó, A., Gulyás, G., Jekő, J., Sümegi, B., Hideg, K. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1619-1629.
59. Kálai, T.; Petrlova, J.; Balog, M.; Aung, H. H.; Voss, J. C.; Hideg, K. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 1348-1355.
60. Jitka Petrlova; Tamás Kálai; Izumi Maezawa; Robin Altman; Ghimire Harishchandra; Hyun-Seok Hong; Daniel A. Bricarello; Atul N. Parikh; Gary A. Lorigan; Lee-Way Jin; Kálmán Hideg; John C. Voss *PLoS ONE*, **2012**, *7*, e35443.
61. P. Sár, C.; Kálai, T.; Jekő, J.; Hideg, K. *Arkivoc* **2012**, (v) 47-59.
62. Kálai, T.; Borza, E.; Antus, Cs.; Radnai, B.; Gulyás-Fekete, G.; Fehér, A.; Sümegi, B.; Hideg, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 7311-7317.

Synthesis and several utilization of stable nitroxide free radicals

Our laboratory has a long-standing interest in the synthesis and application of stable nitroxide free radicals. Among the first significant results we mention the synthesis of compound **1**² as a reversible SH specific spin label and **2** cardioprotective compound.³ In the present review we summarize the results of

last 5 years. The main interests of our laboratory are: synthesis of new paramagnetic, synthetic building blocks, new spin labels, synthesis of double (spin and fluorescence) sensors and synthesis of dual active drugs. For efficient application of nitroxides, mono- and disubstituted paramagnetic building

blocks **3-12** had to be synthesized.¹³⁻¹⁸ As all synthesis practically starts from 4-oxo-TEMPO (**32**),¹ it is a real chemical challenge to achieve nitroxides with various substituents in the presence of ambiphilic free radical moiety. We have worked out the synthesis of benzimidazole (**20**)²⁰, quinoline (**26**, **33**), benzofurane (**31**)¹⁵ and selenophene (**27**, **28**)²¹ anellated nitroxides. Starting from pyrroline nitroxide **11** a new procedure has been worked out to synthesize 5,6-disubstituted pyrroline nitroxides **30a-d**.²³ Among the new spin labels, we mention **35** reversible thiol-specific cross-linking spin label^{17, 23, 24} and compound **36** capable of further secondary interactions with side-chain of a protein.²⁵ For orthogonal, function-specific spin labeling we can use compounds **42** and **43**, as keton-specific and azide-specific spin labels.^{28, 29} Paramagnetic modifications of proteins can be achieved by incorporation of paramagnetic amino acids. These are available with O'Donnell reaction³⁰ followed by possible resolution³¹ or L-tyrosine can be modified by Suzuki and Sonogashira reaction (see compounds **45**, **47**).³¹ Amino acids and other biomolecules can be easily modified by 1,3-dipolar cycloaddition between azides and ethynyl compounds (see compounds **50**, **52**, **54**).³³ Nitroxides quench the fluorescence of dyes they attached to, and this fact can be utilized in detection of redox processes with fluorescence and EPR spectroscopy as well.³⁵ Because these alterations can be detected by two independent methods, these nitroxide-fluorophore adducts are called "double sensors". In the nitroxide-fluorophore adducts compounds as **A**, **B**, **D** forms are fluorescent and as a **C** form is not (Scheme 12). Several nitroxide and fluorophore adducts (**55-61**)³⁶⁻⁴⁰ were synthesized in our institute, with various excitation and emission parameters. Among the double sensors synthesized, compound **55** (called DanePy) was the most successful, as it was utilized *in vivo* ¹O₂ detection in plant leaves.³⁷ Beyond the synthesis of double sensors, we have made BODIPY and acridine based fluoroionophores (**62**, **63**) for sensing Li⁺, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ ions.^{41, 42} Nitroxides and their precursors are capable of quenching ROS and RNS species on diverse pathways (Scheme 14.), therefore they can be considered as a non-vitamin like, small antioxidant molecules.⁴²⁻⁴⁵ We have proved on animal model that compound **2** decrease the cardiovascular toxicity of anthracycline antibiotics⁴⁶ and modified cardiovascular drugs (**64-66**) have beneficial effect on infarct size of pretreated animals in an ischemia-reperfusion experiment.⁴⁷⁻⁵¹ Modification of anticancer drug **67** with reduced form of nitroxide, compound **68** also exhibited good anticancer activity but with less side-effects and toxicity.⁵³⁻⁵⁵ The dual-active drugs conception was applied on PARP inhibitors too. Compound **69A** combines PARP inhibitory activity with 4-carboxamido-benzimidazole unit, while the 2,2,6,6-tetramethyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine part has free radical scavenging capability, proven by EPR spectroscopy studies of excreted metabolites.⁵⁸ The modification of anti-Alzheimer experimental drug 2-dimethylamino-7-bromofluorene with a nitroxide also has beneficial effect on activity.⁵⁹ Compound **70** also can be applied for mapping β -amyloid plaques.⁶⁰ Paramagnetic analogues of deprenyl (**71, 73**) and oxotremorine (**74**) were synthesized from nitrones **40** and **72** with Grignard reaction.⁶¹ Recently we have synthesized the paramagnetic analogues of resveratrol (**76-80**), although these derivatives exhibited less antioxidant activity than resveratrol **75**.⁶² However, compounds **77** and **78** exhibited better anti-inflammatory activity than the resveratrol (**75**) itself in cell-line experiments. In summary, nitroxides, despite their 50 years history, offer many perspectives in the field of spin labeling, therapy, analytical chemistry and material sciences. Research groups from all over the world dealing with this topic sometimes feel that many problems has been dissolved, but still there are many challenges in the chemistry and applications of stable nitroxide free radicals.