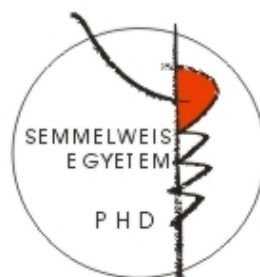


Pirido[2,3-*b*]pirazinok, mint tumorellenes hatású vegyületek, és aszimmetrikus kondenzációs reakcióik izoméria viszonyai

Doktori értekezés

Dr. Kékesi László

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kéri György, egyetemi tanár, D.Sc.

Hivatalos bírálók: Dr. Majer Zsuzsa, egyetemi docens, Ph.D
Dr. Czompa Andrea, egyetemi adjunktus, Ph.D

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szökő Éva, egyetemi tanár, D.Sc.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Nyitrai József, egyetemi tanár, D.Sc.
Dr. Dombi György, egyetemi tanár, D.Sc.

Budapest
2014

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés (irodalmi háttér)	7
2.1. A daganatos megbetegedések és a hagyományos kemoterápia	7
2.2. A szerzett rezisztencia és a rezisztenciáért felelős sejtek	10
2.2.1. A célzott terápia és a szerzett rezisztencia	10
2.2.2. A rezisztenciáért felelős, tumor-iniciáló sejtek (daganat őssejtek)	14
2.3. A sejtes alapú, fenotipikus tesztelés és klonalitás vizsgálata	20
2.4. Kémiai áttekintés: tumorellenes hatású [6+6] tagú kondenzált gyűrűs, nitrogén tartalmú vegyületek és a pirido[2,3- <i>b</i>]pirazinok	22
2.4.1. Tumorellenes hatású [6+6] tagú kondenzált gyűrűs, nitrogén tartalmú vegyületek	22
2.4.2. A pirido[2,3- <i>b</i>]pirazinok	23
3. Célkitűzések	30
4. Módszerek	32
4.1. Kémiai módszerek	32
4.2. Biológiai módszerek	35
4.3. Az Akt1 kinázgátló hatású A-674563 (1) és A-443654 (2) jelű anyag, és a 2,3,7-tri(2-tienil)pirido[2,3- <i>b</i>]pirazin (3) előállítása	38
4.3.1. Az A-443654 (<i>S</i>)-1-(1 <i>H</i> -indol-3-il)-3-[[5-(3-metil-1 <i>H</i> -indazol-5-il)piridin-3-il]oxi]propán-2-amin (2) előállítása	40
4.3.2. Az A-674563 (<i>S</i>)-1-[[5-(3-metil-1 <i>H</i> -indazol-5-il)piridin-3-il]oxi]-3-fenilpropán-2-amin (1) előállítása	49
4.3.3. A 2,3,7-Tri(2-tienil)pirido[2,3- <i>b</i>]pirazin (3) előállítása	55
4.4. Az irodalomból ismert kinázgátló hatású anyagok szerkezetének kombinálása új származékok tervezéséhez, és fókuszált vegyülettár előállítása az új szerkezet köré	57
4.4.1. A [4-(piperidin-1-il)fenil]etándion monohidrát (25) előállítása	59
4.4.2. Diszubsztituált 7-brómpirido[2,3- <i>b</i>]pirazin származékok előállítása	60
4.4.3. Monosubsztituált 7-brómpirido[2,3- <i>b</i>]pirazin származékok előállítása	62
4.4.4. Boronsav-pinakol-észter kialakítása az indazol származékokon	67

4.4.5. 7-es helyzetben szubsztituált pirido[2,3- <i>b</i>]pirazin származékok szintézise Stille-reakcióval	69
4.4.6. 7-es helyzetben szubsztituált pirido[2,3- <i>b</i>]pirazin származékok szintézise Suzuki-reakcióval	71
4.4.7. 4-[7-(1 <i>H</i> -indol-5-il)pirido[2,3- <i>b</i>]pirazin-3-il]anilin (35) előállítása	85
4.4.8. Az aktív 31n molekulán savamid- és észter funkciós csoportok kialakítása oldékonyság javítása érdekében	85
4.5. A kondenzációs reakció regioizomériájának vizsgálata, szelektivitásának optimalizálása	89
5. Eredmények	92
5.1. Fókuszált vegyülettár előállítása a 29a új szerkezet köré	92
5.2. Regioszelektív szintézis és a regioizomerek azonosítása	103
5.3. Az előállított származékok Akt1, EGFR kináz-gátlása és kináz-gátló profilja ¹⁰⁷	
5.4. Klonalitás vizsgálat	109
6. Megbeszélés	110
6.1. Szerkezet-hatás összefüggés	110
6.2. Regioszelektív szintézis és a regioizomerek azonosítása	113
6.3. Biokémiai mérések és a klonalitás vizsgálat	117
7. Következtetések	119
8. Összefoglalás	122
9. Summary	123
10. Irodalomjegyzék	124
11. Saját publikációk jegyzéke	139
12. Köszönetnyilvánítás	140
13. Mellékletek	141

1. Rövidítések jegyzéke

Ab/Am	antibiotikum / antimikotikum
ADME	abszorpció, disztribúció, metabolizáció és exkréció – felszívódás, eloszlás, metabolizmus, kiürülés; legfontosabb farmakokinetikai jellemzők
Akt	protein kináz B, v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 (Ak egértenyészet és thymoma rövidítéséből)
ALK	anaplasztikus limfóma kináz
BRAF	rapidly accelerated fibrosarcoma B – szerin/treonin kináz
DAD	diode array detector – diódasoros detektor
DBAD	di- <i>terc</i> -butil-azodikarboxilát
(dba) ₃ Pd ₂ (0)	trisz(dibenzilidén-aceton)-dipalládium(0)
DBU	1,8-diazabiciklo[5.4.0]undec-7-én
DIPÉ	diizopropil-éter
DKM	diklórmétán
DMSO	dimetilszulfoxid
DME	dimetoxietán
DMF	dimetilformamid
DPP-IV	dipeptidil peptidáz IV
DTT	ditiotreitól
EC ₅₀	félhatásos koncentráció (az a koncentráció, amellyel a maximális biológiai hatás felét kiválthatjuk)
EGFR	epidermal growth factor receptor – epidermális növekedési faktor receptor
ES	elektrospray
FBS	fetal bovine serum - magzati marha szérum
FtsZ	Filament temperature sensitive protein Z – bakteriális sejtosztódásban résztvevő fehérje
HEPES	4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetánszulfonsav
hGnRH	human gonadotropin-releasing hormone – reprodukciós szabályozásban résztvevő peptidhormon

HMBC	heteronuclear multiple bond correlation – két-három kötés távolságban lévő ^1H - ^{13}C csatoló partnerek meghatározására használt mágnesesrezonancia módszer
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence – három kötés távolságban lévő ^1H - ^{13}C csatoló partnerek meghatározására használt mágnesesrezonancia módszer
hNK-3	humán neurokinin-3
hTRPV1	human transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 – humán kapszaicin receptor
HPLC	high performance liquid chromatography – nagy teljesítményű folyadékkromatográfia
HSQC	heteronuclear single quantum coherence – egy kötés távolságban lévő ^1H - ^{13}C csatoló partnerek meghatározására használt mágnesesrezonancia módszer
IMAP	immobilized metal ion affinity-based fluorescence polarization – foszfortartalmú vegyületek kimutatására alkalmazott fluoreszcens immobilizált fémion vizsgálat
IP	prosztaciklin receptor
IPA	izopropanol (izopropil-alkohol)
IUPAC	international union of pure and applied chemistry – tiszta és alkalmazott kémia nemzetközi uniója; az egységes nemzetközi kémiai nevezéktan megalkotója
LCMS	nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiával összekapcsolt tömegspektrometria
MAP	mitogén-aktivált protein
MIC_{max}	az a legkisebb koncentráció, amivel maximális gátlást érhetünk el
MTS	medium throughput screening – közepes áteresztőképességű tesztelés
NMR	nuclear magnetic resonance – mágneses magrezonancia
NOE	nuclear Overhauser effect – térközelség meghatározására használt mágnesesrezonancia módszer
NSCLC	Non-small cell lung carcinoma – nem kissejtes tüdőcarcinóma
PBS	phosphate buffered saline - izotóniás foszfát pufferelt vizes sóoldat

PI3K	phosphoinositide 3-kinase – foszfoinozitol 3-kináz
(PPh ₃) ₄ Pd(0)	tetrakis(trifenilfoszfán)-palládium(0)
(PPh ₃) ₂ Pd(II)Cl ₂	bisz(trifenilfoszfán)-palládium(II)-diklorid
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute által kifejlesztett médium
SQD	single quadrupole detection – egyszeres kvadrupól detektor
<i>t</i> -Boc	<i>tert</i> -butoxikarbonil védőcsoport
TEA	triethylamin
TFE	trifluorecetsav
THF	tetrahydrofuran
TIS	tumor iniciáló sejtek
TKI	tirozin-kináz inhibitor
UV	ultraviola – ibolyántúli
VRK	vékonyréteg-kromatográfia

2. Bevezetés (irodalmi háttér)

A modern rákkutatás egyik új irányzata, hogy a gyógyszeres kezeléssel a tumoros sejtpopuláció azon kis részhalmozát célozzuk, mely a hatékony kezelés után jelentkező problémaért, a daganat kiújulásáért felelős. A munkánk során célunk az volt, hogy olyan új, szabadalmaztatható hatóanyag molekulákat fejlesszünk ki, amelyek daganatos betegségekben potenciálisan a rezisztenciát okozó sejteket is gátolni tudják. Ezt egy olyan előszűrő technikával közelítettük meg, melyben fenotípusos szűrés során – egy MTS (Medium Throughput Screening) szűrés segítségével – szerzett rezisztenciával rendelkező sejtvonalat gátló hatóanyagokat kerestünk. A megközelítés alapja az volt, hogy az érzékeny és rezisztens sejteket is gátló vegyületek rendelkezhetnek olyan hatásspektrummal, amely a megnövekedett rezisztenciával rendelkező rezisztenciát okozó sejtek gátlására is alkalmas lehet.

Az MTS szűrésben több mint 1100 ismert, jeltovábbítási rendszerhez kapcsolódó, tumor-terápiás célpontot jelentő kinázgátló szer származékait vizsgáltuk, melyek egy rendelkezésünkre álló vegyülettár részét képezték. Az irodalomból ismert, hogy az Akt kináz gátlása növeli a rezisztenciát okozó sejtek érzékenységet, [1] ezért a vegyülettárunk többek közt ismert Akt kinázgátló hatású anyagokat és ezek származékaikat is tartalmazta.

Előállítottam három Akt kinázgátló hatással rendelkező molekulát, majd ezek szerkezetének kombinálásával új, de az eredeti molekulákkal hasonlóságot mutató származékokat készítettem. A találatok alapján további fejlesztést végeztem. A biológiai vizsgálatok során rezisztens sejteket is gátolni képes származékok kerültek ki. Néhány ígéretes molekulát a rezisztencia-ozó sejtek gátlásának modellezésére használt klonalitás tesztben vizsgáltunk. A szintézis során felmerülő regioizomériai problémát megoldottam és az eredmények alapján egyértelmű szerkezet-hatás összefüggést állítottam fel.

2.1. A daganatos megbetegedések és a hagyományos kemoterápia

A daganat vagy tumor a test bármely részén feltűnő rosszindulatú szövetszaporulat. A sejtek kontrollálatlan osztódása jellemzi, mely halálos kimenetelű megbetegedéshez vezet. A fejlett országokban a legnagyobb egészségügyi problémát jelenti, a daganatos megbetegedések és halálesetek több mint fele ezekben az

országokban fordul elő – jelenleg minden negyedik halálesetért a tumoros megbetegedések felelősek. [2, 3] Világszerte az éves daganatos megbetegedések száma 12,7 millió, daganatos betegségek okozta halálesetek száma pedig 7,6 millió. [2] Sok országban a daganat a második helyen áll a halálozási okok között. [2]

A sejtburjánzás bármelyik testszövetben jelentkezhet. A kontrollálatlan növekedés az onkogének aktiválódása és az antionkogének szuppressziója következtében kialakuló folyamatos proliferációs jelek sejtszétódást stimuláló hatásának következménye. A lokális invázió során a tumor a szomszédos szövetekbe terjed, a metasztatizálás során pedig a vér- vagy nyirokkeringésbe kerülve képezhet távoli áttéteket a test több pontján. A kiváltó okok között szerepelhetnek fizikai, kémiai és biológiai hatások, például radioaktív sugárzás, bizonyos kémiai anyagok, dohányzás, étkezési szokások, fertőzések. [4]

A daganatok genomikai hibákra visszavezethető betegségek. Amikor egy normál sejt tumorsejtté alakul, több gén szintű változás és az irodalomban túlélési faktorként említett növekedési faktor aktiváció következik be. Ez a változás adja a daganatnak azt a stratégiát, ami által korlátlanul növekedhet. A tumorsejtek nem a szervezettől teljesen idegen elemek, hanem az őket körülvevő sejtekkel, szövetekkel sok szempontból rokon sejtek. A környezetüktől azonban folyamatosan függetlenné válnak, a normál sejtekhez képest egyéb élettani különbségek is jellemzőek lesznek rájuk, és tumorspecifikus antigének jelenhetnek meg a felszínükön. Mégis, sokszor nehéz molekuláris különbséget találni a normál sejtek és daganatsejtek között. [5]

A daganatterápia három fő ága a lokális sebészi és sugárterápia, illetve a szisztémás gyógyszeres kezelés, a kemoterápia. A citosztatikumok alkalmazhatóságát az adja, hogy bár képesek reakcióba lépni a sejtciklus bármelyik fázisában lévő sejttel, hatásukat főként a gyorsan osztódó sejteken fejtik ki. A kemoterápiás szereket támadáspontjuk alapján csoportosíthatjuk. Az alkilálószerrek, mint például a buszulfán, klorambucil, streptozotocin, temozolomid reaktív alkil-csoportot tartalmaznak, melyek kötődni tudnak a sejt molekuláinak nukleofil csoportjaihoz, elsősorban a DNS bázisok amino-csoportjaihoz. A platinaszármazékok, mint cisplatin, carboplatin, oxaliplatin, szatraplatin kovalens DNS keresztkötések révén fejtik ki hatásukat. Az antimetabolitok gátolják a sejtek nukleotid-bioszintézisét. Ilyen például a metotrexát, ami egy dihidrofolát-reduktáz gátló, a pemetrexed antifolát analóg, az 5-fluorouracil egy

timidilát-szintáz gátló, valamint ide tartoznak a nukleinsav és nukleozid analógok, mint például a citarabin 6-tiopurinok és a gemcitabine, továbbá a kladribin, egy purin (deoxiadenozin) analóg. A topoizomerázzal kölcsönható epipodofillotoxinok, antracéndionok, antraciklinek, kamptotecinek – melyek általában természetes eredetűek – megváltoztatják ezen enzim topológiáját, ezáltal a DNS kettős hélix szerkezetét. Mikrotubulusokra ható, mitózis gátló szerek a taxánok, vinka alkaloidok, az esztramusztin-foszfát, epotilonok vagy a criptoficin 52. Ezek gátolják a sejt működését a sejtosztódásban, transzportfolyamatokban, jelátviteli útvonalakban. [6, 7]

Egyéb kemoterápiás szerek az L-aszparagináz, amely az L-aszparagin raktárakat emészt fel; bleomicin, amely szabad oxigén gyököket képez, [8] ezáltal bontva a DNS-t; valamint a prokarbazin, ami egy nem-klasszikus alkilálószer.

Bizonyos daganatok – mint a mell-, prosztatata- vagy méhnyakrák – reagálnak hormon tartalmú szerekre. Ezek közé tartoznak az ösztrogén receptorra ható szerek (pl. tamoxifen), luteinizáló hormont felszabadító hormon agonisták illetve antagonisták, aromatáz-gátlók, antiandrogének, ösztrogének, androgének, szomatosztatin analógok, progesztációs szerek.

A tumorsejtek mellett a gazdaszervezet funkciói is befolyásolhatók. A szervezet saját sejtjei által termelt citokinek alapvető szerepet játszanak a gyulladási folyamatokban és az immunválasz kialakításában. Az interferonok fokozzák az immuneffektor-sejtek hatékonyságát, de közvetlenül a daganatra ható, sejtosztódást gátló és sejtölő hatásuk is van. Az interleukinokat a fehérvérsejtek termelik, feladatuk szintén az immunválasz hatékonyságának növelése. A tumorok beereződését, így az oxigén- és tápanyagellátást az antiangiogén terápia gátolja.

Néhány hatóanyag a tumorok véredényképződését csökkenti. Ilyen a monoklonális antitest bevacizumab, vagy a kinázgátló sorafenib a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor jelátviteli útjának gátlásán keresztül, továbbá a thalidomid immunmodulátor.

A génterápiás megközelítés során például antiszenz oligonukleotidot juttatnak a sejtekbe, ami az mRNS érését vagy funkcióját gátolja, így megakadályozza az adott onkogén expresszióját. Például a Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) fehérje mennyisége csökkenthető a szenz mRNS-hez kötődve, ami csökkenti a tumorsejtek védelmét az apoptózissal szemben.

Használatos a gyakorlatban daganatmegelőző védőoltás is a bakteriális vagy vírusos fertőzésekkel összefüggő daganatok esetén (*Helicobacter pylori*, Hepatitis B és C, humán papillomavírusok). [9]

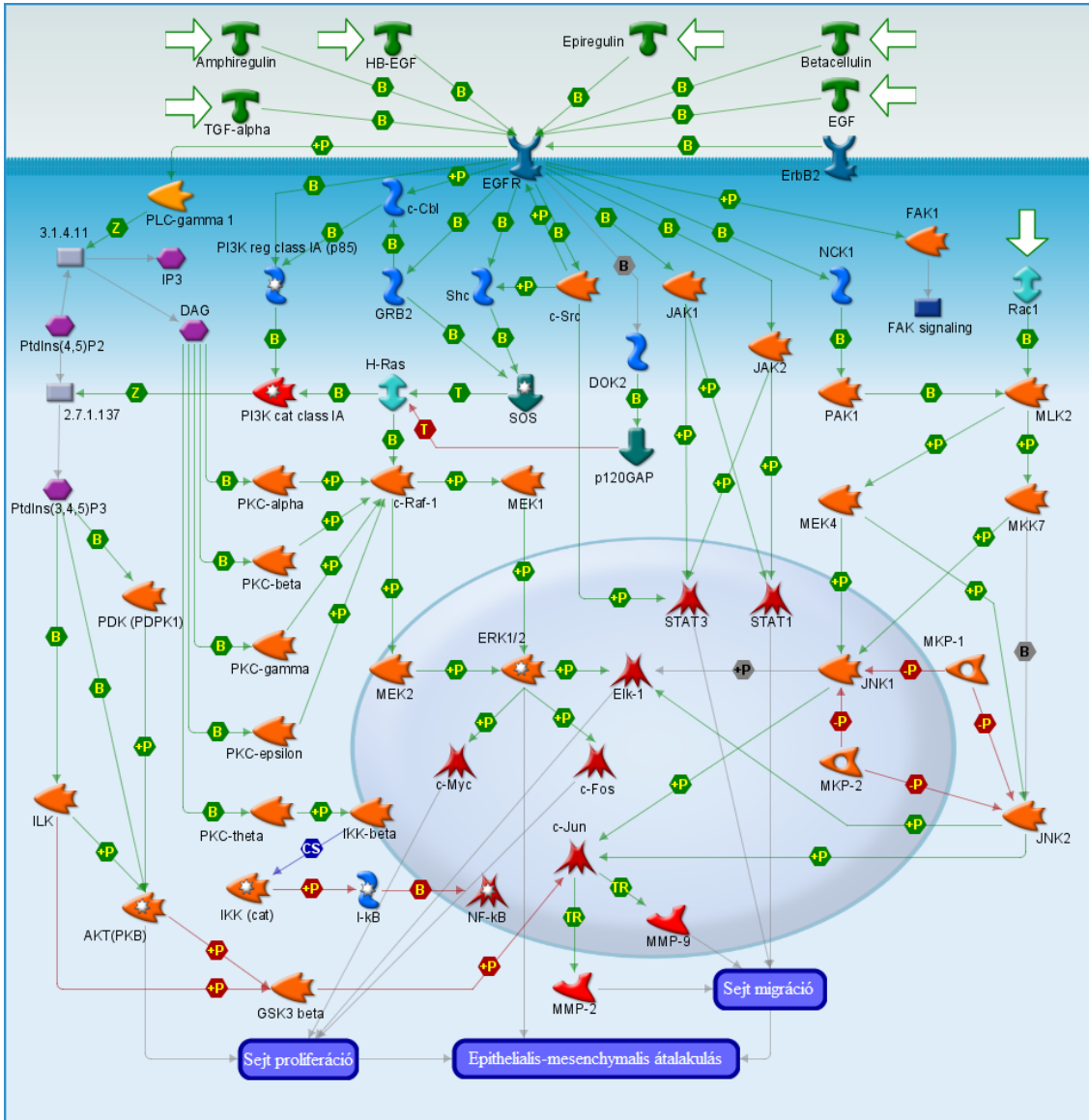
2.2. A szerzett rezisztencia és a rezisztenciáért felelős sejtek

2.2.1. A célzott terápiák és a szerzett rezisztencia

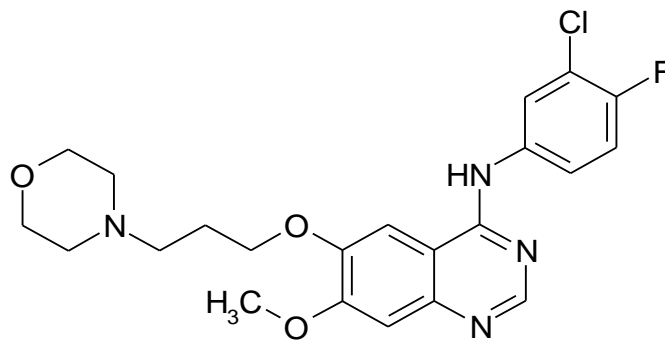
A sejtek között vagy a sejten belül működő jeltovábbítási hálózat zavartalan működése szabályozza a normál sejtek fiziológiás működését és osztódását. Ha ennek a rendszernek valamelyik eleme hibásan működik, a keletkező hamis jel a vele kapcsolatban álló enzimek révén egy jeltovábbítási kaszkádot indíthat el, ezzel a sejt patológiás működését, például kontrollálatlan sejtosztódást válthat ki. A daganatos betegségek jelentős részének hátterében jeltovábbítási problémák, pl. hamis túlélési vagy proliferációs jelek állnak. A rendellenesen működő szabályzó elemek, legtöbbször enzimek ellen fejlesztett hatóanyagok célzott terápiát tesznek lehetővé, hatékonyabbá téve ezzel a kezelést és csökkentve a lehetséges mellékhatások kockázatát. Számos jelátviteli út aktivációja kiválthatja a sejtek proliferációját. [10] Néhány ilyen útvonalat szemléltet az 1. ábra.

A normál és gyorsan osztódó sejtek közti különbség még jobban kihasználható a túlélési faktorok jelátviteli útvonalait célzó szerekkel. Ilyen kis molekulájú tirozinkináz-gátlószer a gefitinib, erlotinib, imatinib, dasatinib, lapatinib, sunitinib, sorafenib. A jelátviteli folyamatok szintén támadhatóak monoklonális antitestekkel, mint a cetuximab, panitumumab, trastuzumab, bevacizumab. A bortezomib a fehérjék lebontásában szerepet játszó proteaszóma specifikus inhibitora.

A gefitinib (2. ábra) egy kismolekulás tirozin-kináz inhibitor (TKI), az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) tirozin kináz doménjének első szelektív gátlószere. [12] A gefitinibet jelenleg több, mint 64 országban forgalmazzák. Európában a gefitinibet 2009 óta alkalmazzák NSCLC-ben a kezelés minden vonalában olyan betegeken, akikben EGFR mutáció található. Az ismert platina-származékokkal (cisplatin, carboplatin) kombinációs kezelésben jelentősen javította a progressziómentes túlélést a mutációt tartalmazó betegeknél. [13, 14] EGFR mutációt tartalmazó, előrehaladott NSCLC-ben első vonalbeli szerként nagyon kedvező klinikai eredményeket mutat, és jól tolerálható. [15]

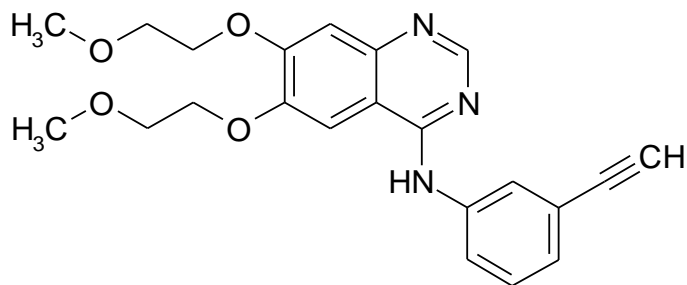


1. ábra. Az epidermális növekedési faktor receptorhoz kötődő jelentősebb jelátviteli útvonalak, amelyeknek szerepük lehet a daganatképződésben. [11]



2. ábra. A gefitinib (Iressa[®]) szerkezete.

A gefitinibet az erlotinib (3. ábra) EGFR-gátló szer követte. Reverzibilis módon gátolja a receptor adenosin trifoszfát (ATP) kötőhelyét. [16] Az erlotinib klinikai vizsgálatokban növelte tüdőkarcinómás betegek túlélését. Az erlotinib a placebo-csoporthoz képest 11 %-kal növelte a progressziómentes túlélést. [17] Kemoterápiás kezeléssel (gemcitabin plusz ciszplatin vagy carboplatin) kombinációban alkalmazva az erlotinib 26%-kal növelte a progressziómentes túlélést az erlotinib kezelés nélküli kemoterápiával szemben. [18] Az amerikai egyesült államokbeli *U.S. Food and Drug Administration* gyógyszertervezési hivatal 2005-ben engedélyezte az erlotinibet kombinációban alkalmazva gemcitabinnal a lokálisan előrehaladott, nem operálható vagy áttétes hasnyálmirigy-rák kezelésére. [19]



3. ábra. Az erlotinib (Tarceva[®]) szerkezete.

Az EGFR gátlószerrek – mint az erlotinib – hatékonyak az érzékenyítő mutációt hordozó NSCLC sejteken, de nem hatékonyak a vad típusú EGFR-t tartalmazókon. [14] Az EGFR tirozin-kináz inhibitorokat, mint a gefitinib és az erlotinib, széles körűen alkalmazzák NSCLC-ben. Az EGFR aktiváló mutációit – például exon 19 deléción vagy exon 21 L858R pont mutáció – tartalmazó daganatok jól reagálnak ezekre a szerekre. Irodalomból és a klinikai gyakorlatból egyaránt ismert probléma a hatékony gefitinib vagy erlotinib kezelés utáni visszaesés, avagy a szerzett rezisztencia. [20] Ez sokféle mechanizmussal megtörténhet. A betegek 50-60 %-ában ez a rezisztencia az EGFR exon 20-on történő T790M úgynevezett „gatekeeper” mutációjával valósul meg. Az egyik, rezisztenciához kapcsolódóan gyakran vizsgált sejtvonal a humán NSCLC PC9 sejtvonal, amely exon 19 deléción mutációt hordoz. [21-23]

Az afatinib (Giotrif[®]) és a dacomitinib második generációs irreverzibilis EGFR TKI-ok. A dacomitinib jelenleg klinikai kipróbáláson van. Antitumor hatásukat magas koncentrációban kimutatták az EGFR T790M mutációt tartalmazó tüdőkarcinómában.

[24-26] Hatásuk mégis százszor kisebb a T790M mutációval rendelkező sejteken, mint az aktiváló mutációval rendelkezőkön. [27, 28]

Az IL-6R/JAK1/STAT3 jelátviteli út vonal potenciális terápiás célpont lehet a T790M EGFR mutációval rendelkező daganatokban. Ezen út vonal gátlásával növelhetjük az irreverzibilis EGFR tirozin-kináz inhibitorok hatékonyságát. A gyógyszeres kezelés hatására bekövetkező STAT3 aktiváció egy fontos *de novo* rezisztencia mechanizmus a T790M mutációt tartalmazó tüdőrákban. [21]

Az erlotinib jelenlétében bekövetkező rezisztenciáért alternatív HER3/HER2 illetve Akt jelátviteli út vonal aktiváció is felelős lehet. [29]

A dacomitinib egy irreverzibilis pan-ErbB gátlószer, mely hatásos gefitinibre rezisztens, mutáns ErbB2-t vagy T790M mutáns EGFR-t tartalmazó tüdőrákban. A WZ4002 T790M mutáns sejteket képes gátolni, de nem gátolja az ErbB2 foszforilációt. Ezen szerekekkel való kezeléssel elkerülhető a T790M mutáció okozta rezisztencia, de az inzulin-szerű növekedési faktor receptor (IGF1R) és az ERK jelátviteli út vonal aktivációján keresztül újabb rezisztencia jelentkezik. Ezen szerekek IGF1R vagy MEK inhibitorral együtt alkalmazva modellrendszerben meggátolták a rezisztens sejtek kialakulását. [30]

A rezisztenciáért a T790M mutáción kívül a MET kináz génjének amplifikációja is felelős lehet. Az Src kináz aktiváció — MET amplifikációval — jelentősen emelkedett gefitinib-rezisztens HCC827 GR sejtekben a gefitinib-érzékeny HCC827 sejtekhez képest. A HCC827 GR sejtek Src aktivációja MET inhibitorral megszüntethető, de gefitinibvel csupán csak részlegesen. Az Src aktiváció ezekben a sejtekben ezért valószínűleg jelentősebben függ a MET út vonaltól, mint az EGFR út vonaltól. Viszont az Src aktiváció nem különbözött a gefitinib-rezisztens PC9/ZD és gefitinib-érzékeny PC9 sejtekben. Src inhibitorok gátolják az Akt és Erk út vonalakat, így gátolják a sejtosztódást és indukálják az apoptózist. A MET amplifikációval rendelkező, gefitinib-rezisztens sejtvonalak esetében ezért az Src célpontul szolgálhat. [31]

A szerzett rezisztencia hátterében az a jelenség állhat, hogy a tumorsejtek egy kis hányada mindig túléli a kezelést, és ezért rezisztens kiújulást vagy áttétet okozhat. Ennek a kis hányadnak az aránya különböző külső és belső tényezőktől függ. [32] Ezen sejtek több daganatos átalakuláshoz szükséges túlélési faktort fejeznek ki

(expresszálnak), és védettebbek, mint a terápiára érzékeny tumorsejtek, ami a teljes gyógyuláshoz vezető terápiát megghiúsítja. Ezek a rezisztenciát okozó sejtek többfajta túlélési faktoraiknak köszönhetően alkalmazkodhatnak és túlélhetik még a sugárterápiát vagy a kemoterápiát is, megfelelő körülmények között a tumor kiújulását okozva. Ha a daganatsejt populációnak meghatározott mutációja vagy génamplifikációja van, az első generációs tumor nagy része a meghatározó (driving force) mutációt célzó gátló hatóanyagokkal eltávolítható. Ezt követően azonban egy második generációs populáció nőhet ki, amelyet egy eddig nem gátolt jelátviteli út vezérel. Ezeket a jeleket együtt, egyszerre kell gátolnunk, hogy eltávolítsuk az első kezelésre rezisztens sejteket. Mivel a normál szöveti sejtek nem függenek ezektől a jelektől, szelektív módon túlélhetik a kezelést. [33]

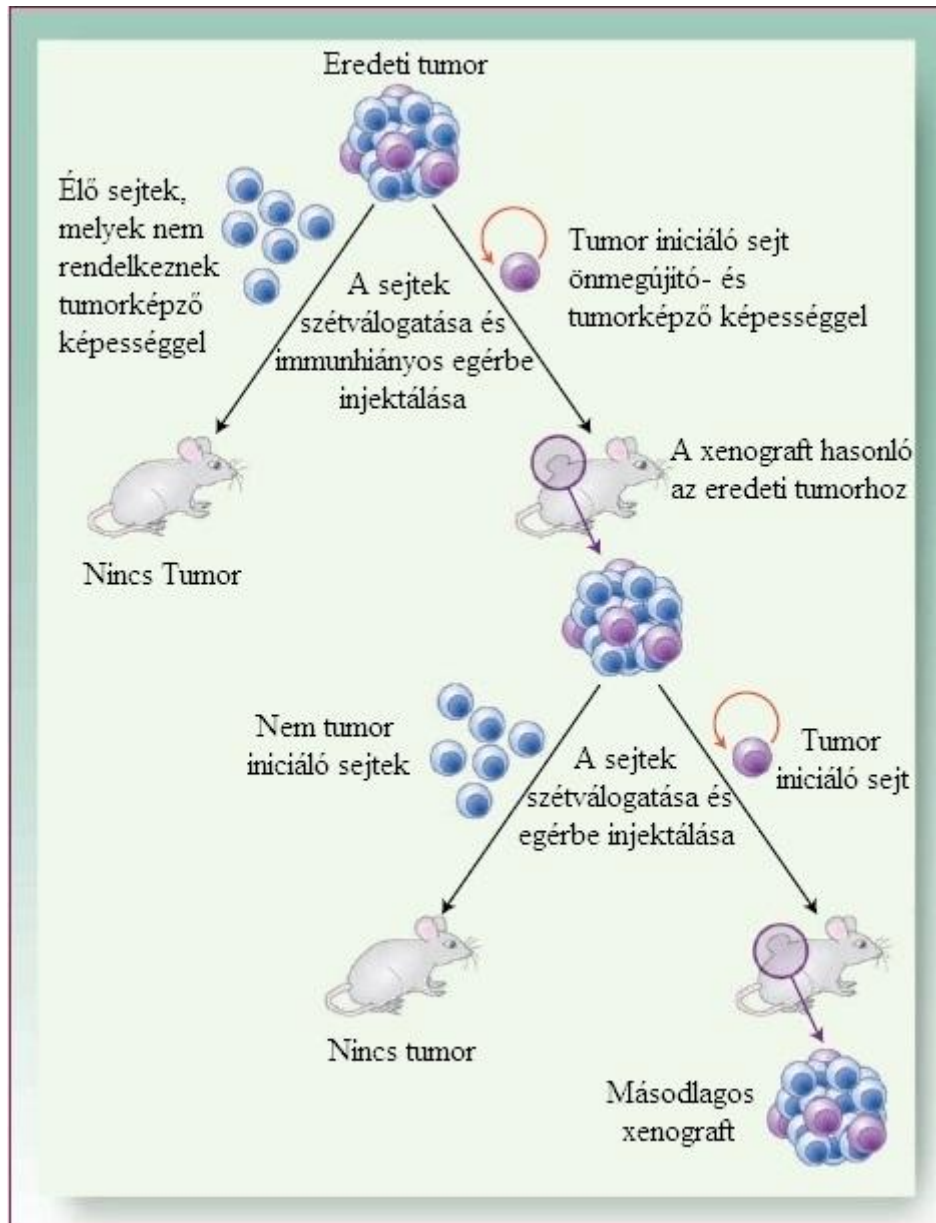
2.2.2. A rezisztenciáért felelős, tumor-iniciáló sejtek (daganat őssejtek)

A daganatos megbetegedések a vezető halálokok közé tartoznak, amiben nagy szerepe van a kezelési módszerek korlátozott hatásosságának. A kemoterápiás kezelés során jelenleg a probléma általában nem csak a hatóanyagra adott elsődleges válasz vagy tumorgátló hatás hiányában van, hanem jelentős problémát okoz a hatékony kezelés utáni visszaesés vagy a tumor kiújulása, amiben az úgynevezett tumor-iniciáló sejteknek (TIS; tumor-initiating cells) kritikus szerepet tulajdonítanak. [34-36] Az irodalom tumor őssejteknek (cancer stem cells; CSCs), vagy rezisztenciáért felelős sejteknek is említi őket. Az elmélet megmagyarázhatja az onkológiai gyógyszerfejlesztés egy fontos ellentmondását: a tumor válasz aránya sokszor nincs összefüggésben a gyógyulás arányával. A klinikai fejlesztés során ugyanis a tumort legnagyobb mértékben csökkentő szereket részesítették előnyben. Ez a módszer azonban figyelmen kívül hagyja, hogy ezeket a kezeléseket leginkább épp a tumor-iniciáló sejtek élik túl. [37] Ezek a daganatsejtek tumorképződést indítanak, iniciálnak, azáltal, hogy önmegújításon és elköteleződésen mennek keresztül, hasonlóképpen, mint a normál őssejtek. Az így keletkező gyorsan osztódó, érett daganatsejtek nem rendelkeznek ezekkel a tulajdonságokkal. [38] A kialakuló tumor jelentős morfológiai, molekuláris, funkcionális és fenotípusos heterogenitást mutat. [34] A TIS-ek a daganat egy kis sejtpopulációját képezik, amely képes egyrészt önmagát reprodukálni a fejlődőképesség elvesztése nélkül, másrészt a tumorszövetet újra létrehozni és fenntartani. Bizonyos tumorokban a TIS-ek előfordulása illetve heterogenitása magas,

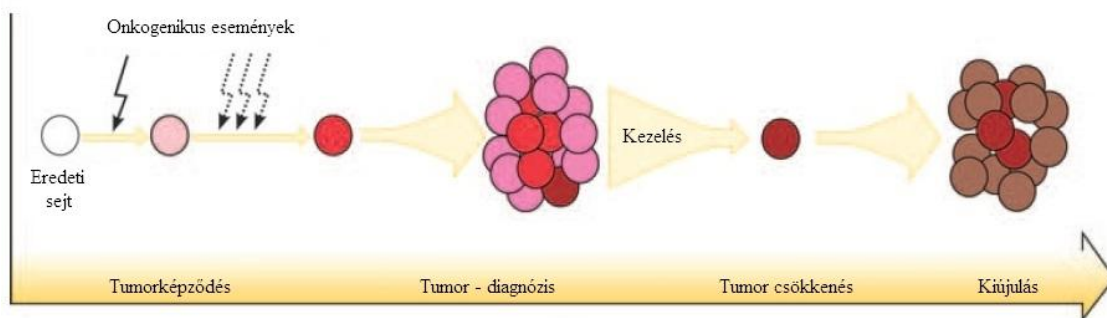
és számos rossz prognózisú daganat nagyobb arányban tartalmaz TIS-eket. [38, 39] Jellemzőjük az önmegújítás, nem pedig a magas a proliferációs képesség. [34, 40] Ezáltal a tumorok heterogének a bennük található sejtek *in vitro* klónképző, *in vivo* tumorképző képességüket tekintve is. [33, 41, 42]

Az érett daganatsejtekkel ellentétben ezen sejteknek magas a kolonizáló képességük. Immunszupprimált egerekbe emberi daganatszövetből származó sejtszuspenziót injektálva ezen sejtek nagyobb arányban képesek a kolonizációra illetve tumorképzésre. Aszimmetrikus sejtosztódás révén a differenciálódás az egyik sejtben gátolva van, továbbá létrejön egy differenciált leánysejt. [34] A keletkező leánysejt hordozza a proliferáció képességét, de nem képes iniciálni a daganatot. [43] Az így keletkező tumor szövettanilag hasonlít arra a tumorra, melyből származik. A másodlagos tumorok, melyek az izolált TIS-ekből fejlődnek ki, fenotípusosan másolják az eredeti tumort és gyakran kitermelik az elsődleges tumorban megfigyelhető heterogén sejttípusokat. [38] A gyakorlatban a TIS populáció beazonosítható ezen a képességek alapján (4. ábra). [33]

Ez a tumor-iniciáló sejtekről szóló elmélet megváltoztatta a tumorkeltésről, daganatfejlődésről és a terápiás szerzett rezisztenciáról alkotott korábbi elképzeléseket, és az új, TIS-eket célzó terápia kifejlesztését tekinti megoldásnak. Ha egy daganatos beteg reagál is a rendelkezésre álló terápiák egyikére (mint kemoterápia, radioterápia és célzott hatóanyagok), a kezdeti javulás után sok esetben gyors visszaesés következik be. [34] Ezen, ma már széleskörűen elfogadott elmélet szerint az elsődleges kezelést néhány tumor-iniciáló sejt túléli, és reprodukciójuk folyamán a daganat kiújul. [33] A tumor regenerálásához pedig csupán néhány ilyen sejtre van szükség (5. ábra). [44] A kezeléssel a tumorsejtek ezen részhalmazát is el kell távolítani. A normál daganatsejteket célzó jelenlegi terápia ilyen hatóanyagokkal való kiegészítése (például a TIS funkcióiban kritikus szerepet betöltő jelátviteli útvonalakon keresztül ható gyógyszerekkel) ugrásszerű fejlődést eredményezhet a klinikai kezelésre adott válaszban és a daganatterápiában. [37]



4. ábra. A tumor-iniciáló sejtek sorozatos átültetés folyamán is tumorképző képességük maradnak. [43]



5. ábra. A kiújulás mechanizmusa a nagy ellenálló képességgel rendelkező tumor-iniciáló sejtek révén. [33]

A célzott daganatellenes hatóanyagokat egy – egy onkogén által kódolt fehérje illetve az onkogenikus jeltől függő tumorsejtek ellen tervezték, így a többfajta tumorgént tartalmazó TIS-ek meglehetősen érzéketlenek lehetnek ezekre a szerekre, de az érzékenység változatosságot mutathat a TIS-ek között is, ahogy a normál őssejtek esetében is látható. Ha számos éretlen sejt található egy tumoros mintában (valószínűsíthetően nagy arányban tartalmaz TIS-eket), a daganat valószínűleg a kezelés után kiújul, és újabb, még agresszívebb kezelésre van szükség. [34]

A TIS-ek biológiájában jelentős meghatározó tényezők a differenciálódás szabályzó elemei. Ha az érett daganatsejtek rendelkeznek azzal a képességgel, hogy visszaalakulnak TIS-ekké, ez a plaszticitás megghiúsítaná, hogy a tumorokat csupán a TIS-ek eltávolításával gyógyítsuk. A TIS-ek terápiai eltávolítását regeneráció követné a differenciálódott állományból, így okozva klinikai visszaesést. Az optimális terápiai kezelésnek valószínűleg tartalmaznia kell TIS-eket és a normál tumorsejteket célzó ágenseket is. [45]

Az elmülethez kapcsolódó egyik korai közlemény John Dick nevéhez fűződik, aki a 90-es évek közepén beazonosított egy lehetséges daganatőssejt hierarchiát, ami követte a normál haematopoetikus őssejt (hematopoetic stem cells; HSCs) hierarchiáját. Vizsgálatát akut mieloid leukémiában végezte, immunhiányos egérmodellt alkalmazva. Kimutatta, hogy a CD34+/CD38– leukémia sejteknek csak egy kis hányada rendelkezik azzal a képességgel, hogy egérbe injektálva tumort képezzen. [43, 46]

A normál őssejtek differenciálódási folyamatához hasonlóan (totipotens, pluripotens, multipotens differenciálódási szakasz) a tumor-iniciáló sejtekben is lezajlik egy elköteleződési átalakulás. A humán akut mieloid leukémia egy hierarchikus

rendszerben szerveződik, melynek tetején egy primitív hematopoetikus sejt áll. Ezek a sejtek elkülöníthetők speciális sejtfelszíni fenotípusos jellemzőik alapján. A daganatok egy része – de nem minden daganat – ezen hierarchikus módon szerveződik. [43] A leukémiában kimutatott hierarchikus szerveződés mintájára hasonló modelleket vizsgáltak szolid tumorokban is, TIS-ekkel a hierarchia tetején. [46-48] Ez a differenciálódási folyamat klonális evolúció néven ismert. Klonális evolúcióban – új klónok folyamatos kifejlődése során – kialakulnak új genetikai és epigenetikus változások. A környezeti kényszer a daganatsejt populáció folyamatos alkalmazkodását eredményezi. Ez az alkalmazkodás megváltoztathatja a proliferációt, metasztázis (áttét-) képző képességet vagy a gyógyszer-érzékenységet. [33]

TIS-ben gazdag populációt sok más humán sejtszaporulatból is izoláltak. Az első szolid daganatból származó TIS-eket emlőtumorban azonosították 2003-ban, [49] majd TIS-et azonosítottak agydaganatból, [50] vastagbélből, [51] melanómából, [52] hasnyálmirigyből, [53] prosztatából, [54] petefészekből, [55] májból, [56] tüdőből, [57] és gyomorrákból, [58] fej-, nyak rákból, [59] mesenchymalis sejtekből [60] is.

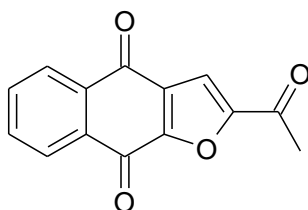
A számos TIS-sel kapcsolatos publikáció a TIS-ek úgynevezett fenotipikus markerrel (TIS-ekre jellemző sejtfelszíni jelző molekulák) történő beazonosítására koncentrált. [43] A tumor-iniciáló sejtek azonosítására több marker alkalmazása ismeretes. A TIS-ek és a normál szöveti őssejtek sejtfelszíni markereinek különbségei lehetővé teszik a TIS-ek elkülönítését a nem tumorképző megfelelőjüktől. [37] Sikeresen izoláltak tumor-iniciáló sejteket szolid tumorokból megfelelő sejtfelszíni markert használva. [34] Ezek a markerek célpontok is lehetnek monoklonális antitest alapú terápiában. A CD133 glikoprotein marker eredetileg primitív hematopoetikus őssejt, és neurális (idegi) őssejt beazonosítójaként (markereként) volt ismert. Expressziója azonban összefüggésbe hozható a tumor méretével, a nyirok- illetve vérkeringésbe jutással, és a prognózissal. [61] A CD44 antigén és az aldehid dehidrogenáz-1 (ALDH1) enzim jelenléte is szignifikáns összefüggést mutat a daganat kiújulás-képességével. [62] Az ABCB1 és ABCG2 (ATP-binding cassette sub-family B és G) transzporterek expressziója összefüggésben van a tumorsejtek differenciálódási fokával: a kevésbé differenciálódott sejtek több markert expresszálnak. [63] A BMI1 onkogén (B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog) expressziója

megtalálható tumorképző képességgel rendelkező emlőrák sejteken, és összefüggésbe hozható a tumor agresszivitásával. [64, 65]

A TIS-ek a kemo- és sugárterápiára mutatott nagyobb rezisztenciával jellemezhetőek. A citotoxikus ágensek vagy ionizáló sugárzás hatásossága gyakran a belső vagy szerzett rezisztencia függvénye. A rezisztencia sejtes mechanizmusa lehet megnövekedett DNS károsodás felismerés és javítás, sejtciklus ellenőrzési pontok megváltozása, sejtciklus kinetika, csökkent tumor apoptotikus jelátviteli utak, citotoxikus terápiás ágensek csökkent felhalmozódása energia-függő transzporterek fokozott működésének következtében és specifikus hatóanyag bontó enzimek expressziója. A gyorsan osztódó sejtek közismerten érzékenyebbek a citotoxikus terápiára, mint a nem-osztódó sejtek. A TIS-et célzó terápiás stratégiában célpontul szolgálhatnak azok a jelátviteli utak, melyek a TIS-ek kemo- és radioterápiás rezisztenciáját szabályozzák, így a gátolt TIS rezisztencia mechanizmusok nagyobb gyógyulási arányt eredményezhetnek a citotoxikus terápiában. [37, 66] Az irodalomban eddig leírt önreprodukáló jelátviteli utak közé tartoznak: Wnt (emlőtumor, krónikus mieloid leukémia; CML, akut mieloid leukémia; AML), Hedgehog útvonal (emlőtumor, hasnyálmirigy rák, glioblasztóma, CML, vastagbél rák), Notch útvonal (vastagbél rák, emlőtumor, glioblasztóma), BMI1 (egér akut mieloid leukémia, emlőtumor, fej-, nyak laphám rák, glioblastoma, akut mieloid leukémia), PTEN (egér leukémia, emlőtumor), BMP (glioblastoma), TGF- β (glioblastoma). [38, 43] A jelátviteli utak kombinációinak célzása hatásosabb lehet, mint önmagában gátolni egyetlen jelátviteli utat. [67] Ha a normál őssejteket is megöljük a tumor-iniciáló sejtekkel együtt, az a normális regeneráció krónikus elvesztését okozhatja, [34] ezért a tumor-iniciáló sejtek rezisztencia mechanizmusaiban szereplő jelátviteli utakat kellően nagy terápiás ablakkal rendelkező szerekkel kell gátolni.

A 2-acetilnafto[2,3-*b*]furán-4,9-dion egy irodalomban leírt daganat őssejt gátlására is használt vegyület. Bár toxikusnak bizonyult, mert a normál sejteket ugyanolyan mértékben öli, mint a tumorsejteket, [68] de a tumorsejtek elpusztításához sokkal rövidebb behatási idő is elegendő (1. táblázat). Ez a tulajdonság speciális farmakokinetikai profíllal kihasználható. [69]

1. táblázat. Az első 24 órában a naftofurándion származék szelektíven gátolja a daganatsejteket.



Kezelési idő	IC ₅₀ (μM)				
	Normál sejtek			Daganatsejtek	
	CD34 ⁺ eritroid csontvelő sejtek	CD34 ⁺ mieloid csontvelő sejtek	PBMC ^a	DU145 (prosztatata)	HT29 (vastagbél)
4-12 óra				<0,2	<0,5
12-24 óra	>30	>30	14	<0,2	<0,5
72 óra			3		

^aperipheral blood mononuclear cell (limfocita, monocita, makrofág)

2.3. A sejtes alapú, fenotipikus tesztelés és klonalitás vizsgálat

A legsikeresebb gyógyszerek kétharmada eredetileg fenotipikus szűrés eredményéből nőtt ki (vagyis a hatásmechanizmus ismerete nélkül, összetett biológiai rendszerre – például sejttenyészetre – gyakorolt hatását vizsgálva), vagy ismert hatású természetes vegyületek származéka. [70] Jelenleg a gyógyszerkutatói fejlesztések az új pathomechanizmushoz kapcsolódó molekuláris célpontokra koncentrálnak, miközben a gyógyszerjelölt vegyületek klinikai fázisba lépésének feltétele nem a célpontkiválasztáson, hanem a biológiai betegségmodelleken mutatott hatáson és biztonságon alapszik (bár a gyógyszer engedélyeztetéshez szükséges a molekuláris hatásmechanizmus legalább részleges ismerete). Léteznek azonban olyan megközelítések, ahol a vegyületek kiválasztása összetett sejtes rendszeren alapuló betegségmodellekben mutatott hatásuk alapján történik. A sejtes rendszereken végzett gyógyszerkutatói jelentősen csökkentheti az új hatóanyag kifejlesztésének idejét és költségét. [71]

A konkrét célpont elleni hatóanyagfejlesztés előfeltétele a célpont validálása, vagyis kulcsfontosságú szerepének igazolása az adott betegségben. Sok hatóanyag viszont annak köszönheti hatását, hogy egyszerre több mint egy molekuláris célpontot

gátol. Több célpont kombinált hatása a rendszer jellegű működés révén – mint például a kináz enzimek jeltovábbítási rendszere – nagyobb jelentőséggel bír, mint egyetlen célpont önmagában. Ezért minden egyedi célpont kombináció maga is hatástanilag egy releváns célpontnak tekinthető. [72] A célpontokat külön-külön validálni, és az ellenük fejlesztett hatóanyagokat célpontonként külön-külön optimalizálni kell. A fenotipikus hatásokra optimalizált találati molekulák ezzel szemben a legelőnyösebb kombinációban gátolják a releváns célpontokat. [71] Bár a módszernek jóval kisebb az áteresztőképessége, de több száz lehetséges célpont iránt érzékeny. Azonosításukkal számos, az adott betegségben szerepet játszó jelátviteli útvonalat és mechanizmust tárhatunk fel. [73, 74] Ezek megismerése az alap kutatás tekintetében is jelentős lehet, csak úgy, mint a második generációs hatóanyagok kifejlesztésének szempontjából. [71] A célpontok beazonosítására különböző módszerek ismertek. [75] Például ATP-kötő fehérjék meghatározására alkalmas eljárás során a hatékony molekulákat a hatás elvesztése nélkül hordozóhoz kötik, majd a sejtenyészetekből vagy szövetből származó lizátum eluálása után a kötődő fehérjét leoldják és beazonosítják. [76]

Sok ígéretes vegyület ott bukik el, amikor a mellékhatásokért felelős, nem megjósolható aktivitást mutat, ami csupán a szélesebb körű biológiai vizsgálatok során derül ki. Meglepően sok forgalomban lévő gyógyszerről mutatnak ki addig nem ismert biológiai hatást. [77, 78] A fenotipikus technikával beazonosíthatóak olyan addig ismeretlen jelátviteli utak vagy célpontok, melyek érdemben kölcsönhatásba kerülnek az addig feltárt mechanizmusokkal. Ezáltal a találatok a kellő szelektivitás szempontjából is szűrhetőek az adott sejt szintjén.

A hatóanyagok gyógyszeryszerűség szempontjából is jól előszűrhetőek sejtes rendszerű megközelítésben. A mérési módszerből következik, hogy az eredményes anyagok kellően oldhatóak (az adott rendszerben elérhető a hatékony koncentráció), ha szükséges, be tudnak lépni a sejtbe, nem toxikusak, és rendelkeznek a szükséges biológiai hatással. Az így kiválasztott vegyületek meglehetősen előrehaladott találatoknak számítanak, és jobb eséllyel fejleszthetők vezérmolekulákká, mint a kevésbé szelektív rendszer segítségével kiválogatott nagyszámú találat. [71]

A daganatkutatásban különböző, humán tumorokból származó sejtek összeállíthatók olyan modellé, amellyel megbízható, automatizált vizsgálati rendszerek

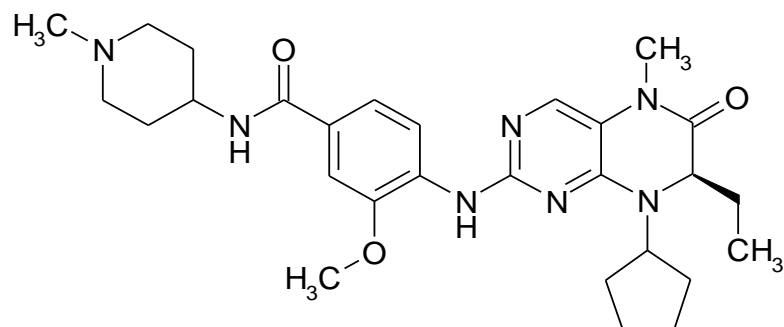
állíthatóak be. [73, 79] A sejtes rendszerű vizsgálat használható szerkezet-hatás összefüggés vizsgálatra is, ami hatékony optimalizálást tesz lehetővé. [80]

A TIS sajátossága a klónképző képesség. A TIS-ek jelenléte egy daganatsejt populációban azzal a sejtszámmal mérhető, ami ahhoz szükséges, hogy új tumor kialakítására legyen képes. [45] A klonalitás- vagy klónképző vizsgálat egy *in vitro*, sejt túlélést vizsgáló teszt. A mérés lényegében minden sejtet azon szempontból vizsgál, hogy ionizáló sugárzással vagy citotoxikus szerekkel történő kezelés után képes-e a korlátlan sejtosztódásra. [81]

2.4. Kémiai áttekintés: tumorelles hatású [6+6] tagú kondenzált gyűrűs, nitrogén tartalmú vegyületek és a pirido[2,3-*b*]pirazinok

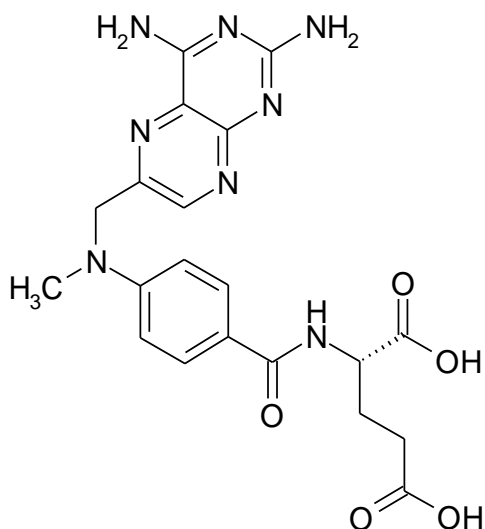
2.4.1. Tumorelles hatású [6+6] tagú kondenzált gyűrűs, nitrogén tartalmú vegyületek

Daganatgátló hatású vegyületek között több, [6+6] tagú kondenzált gyűrűs, nitrogén tartalmú szerkezet ismeretes. A BI 2536 (6. ábra) egy dihidropteridinon-származék kismolekulás kináz inhibitor. ATP kompetitor, ami a polo-like kináz 1-et (PLK1) gátolja *in vitro* és *in vivo* is. IC₅₀ értéke 0,83 nM. 10.000-szer szelektívebb enzimatis aktivitást mutat PLK1-re, mint a legtöbb vizsgált, nem-PLK kinázra (Met és PI3K α kinázokra egy nagyságrenddel kisebb a szelektivitása). [82] Sejtkultúra vizsgálatokban a BI 2536 számos humán daganatsejtvonal szaporodását gátolta 2 - 25 nM-os tartományban, függetlenül a sejtek szöveti eredetétől és az onkogenikus állapotától. Immunhiányos egereken végzett humán karcinóma xenograft modellekben, toxicitásmentes dózisban hatásosnak bizonyult erős tumor növekedést gátló vagy a tumort csökkentő hatással. Klinikai I fázisban jól tolerálhatónak bizonyult. Fő mellékhatása dóziszfüggő és visszafordítható neutropénia (ami egy várható eredmény ezeknél a típusú vegyületeknél) [83]. Jelenleg klinika II fázisban van akut mieloid leukémia, NSCLC, hasnyálmirigy és prosztatata neoplazma, emlődaganat, endometriális daganat, fejnyak rák, melanóma, petefészek rák és szarkóma kórképekben. [84, 85]



6. ábra. A BI 2536 szerkezete.

Az antimetabolit és antifolát vegyület metotrexát (7. ábra) heterokondenzált pirazin gyűrűt tartalmazó tumorellenes szer. Elsősorban akut limfoblasztos leukémiában használják. [86, 87]



7. ábra. A metotrexát szerkezete.

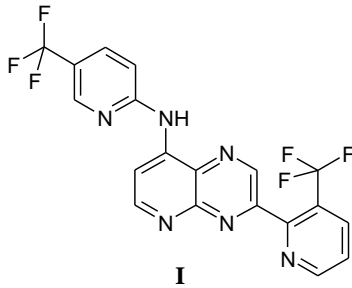
2.4.2. A pirido[2,3-*b*]pirazinok

A szintén nitrogén tartalmú, [6+6] kondenzált gyűrűs piridopirazin alapszerkezet gyakran fordul elő gyógyszerkémiailag vegyületekben, különösen a pirido[2,3-*b*]pirazinok (8. ábra).

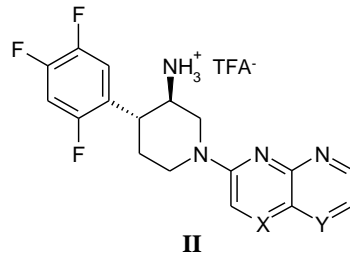
Miokardiális infarktuszban a PI3K izoenzim gátlószerekként vizsgáltak aminopirido[2,3-*b*]pirazin-diil-dibenzén-diol származékokat. Bár ezek a vegyületek nem mutattak jelentős hatást, aminopteridin-diil-dibenzén-diol származékuk jó gátlószerekké bizonyult. [88] A 3-[3-(trifluorometil)piridin-2-il]-N-[5-(trifluorometil)piridin-2-il]pirido[2,3-*b*]pirazin-amin (**I**) hatékony TRPV1 antagonist (hTRPV1 IC₅₀ = 0,23 nM)

fájdalomcsillapításban. [89] Kettes típusú diabetes mellitusban hatékony dipeptidil peptidáz IV gátlószerek és szelektívek egyéb peptidázokkal szemben 4-(2,4,5-trifluorofenil)piridin-3-amin (**II**) származékaik (DPP-IV $IC_{50} = 7 - 130$ nM). [90] Az SRI-3072 (**III**) jelű vegyület ($MIC_{max} = 0,15$ mg / L) és származékai jelentős *Mycobacterium tuberculosis* (TBC) növekedés gátló hatást, illetve az osztódásban szerepet játszó FtsZ enzim gátló hatást mutattak. [91, 92] A fenil-N-(fenilpropil)pirido[2,3-*b*]pirazin-8-karboxamid (**IV**) humán neurokinin-3 receptor antagonistá hatását vizsgálták (hNK-3 kötés $K_i = 1,67$ μ M). [93] GnRH antagonistá hatással rendelkező származékok (**V**) is ismertek (hGnRH $IC_{50} = 0,4$ nM). [94] Wnt/ β -katenin jelátviteli út gátlószereiként ismertek különböző 2-oxi-3-(feniletinil)pirido[2,3-*b*]pirazin (**VI**) származékok. [95] A 7-szubsztituált 2,3-di(2-tienil vagy 2-furil)pirido[2,3-*b*]pirazin (**VII**) származékok ismert Akt1 kinázgátlók. [96] Anaplasztikus limfóma kináz inhibitor hatású egy 1-benzil-7-fenil-1,2,3,4-tetrahidropirido[2,3-*b*]pirazin (**VIII**) származék ($IC_{50} = 3$ nM). [97] Pulmonális fibrózis kezelésre indikált IP receptor gátló hatása van difenil-tetrahidropirido[2,3-*b*]pirazin (**IX**) származékoknak. [98] A 4-[3-(4-fluorfenil)pirido[2,3-*b*]pirazin-2-il]-N-izopropil-piridin-2-amin (**X**) p38 α MAP kináz inhibitor hatású ($IC_{50} = 0,038$ nM). [99] BRAF inhibitor hatásúak a 1-{4-[(oxopirido[2,3-*b*]pirazin-8-il)oxi]fenil}karbamid (**XI**) származékok daganatterápiában (legjobb hatás $IC_{50} = 2$ nM). [100]

2,3,7-Tri(2-tienil)pirido[2,3-*b*]pirazin (9. ábra) Akt1 (PKB) kinázgátlószerként ismert, és PKB α -t kifejező MCF-7 sejteken 0,1 μ M EC_{50} értéket mutatott. [96] A sejtfelszíni markerek (CD133⁺) alapján kiválogatott rezisztenciát okozó sejtek Akt kináz gátlásának hatására (SH-6 inhibitor) nagyobb érzékenységet mutatnak, csökken a migrációs és inváziós készségük, továbbá ezen sejtek proliferációja és túlélése az Akt kináz aktivációjához köthető. [1]

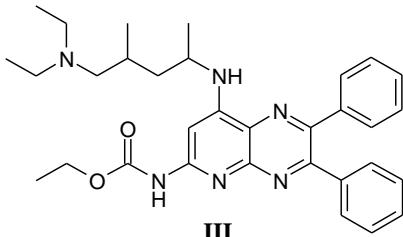


hTRPV1 IC₅₀ = 0,23 nM



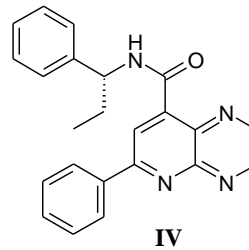
X = N, Y = C vagy X = C, Y = N

DPP-4 IC₅₀ = 7 - 130 nM

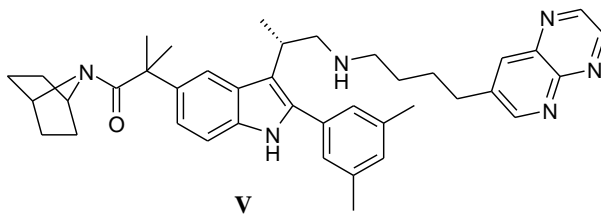


SRI-3072

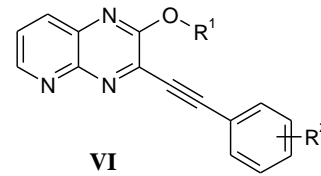
TBC MIC₉₉ = 0,15 mg / L



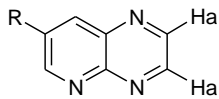
hNK-3 kötés K_i = 1,67 M



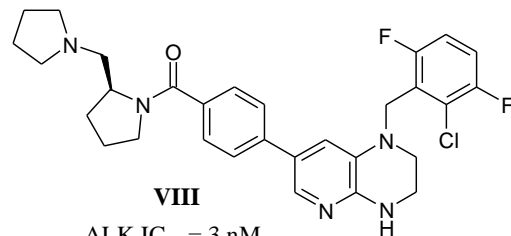
hGnRH IC₅₀ = 0,4 nM



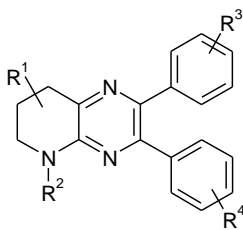
Wnt/b-katenin jelátviteli út gátlószer



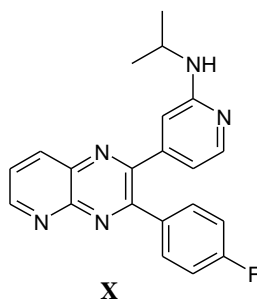
Ha = tienil vagy furil
Akt1 kináz gátlók



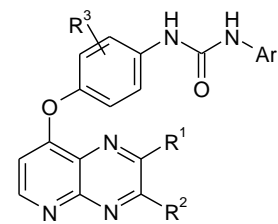
ALK IC₅₀ = 3 nM



IP receptor gátló



MAP kináz IC₅₀ = 0,038 nM

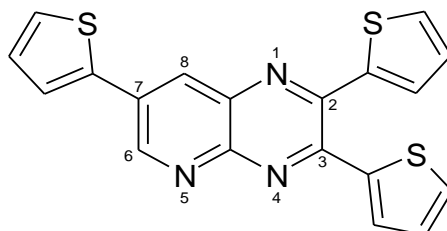


R¹, R² = H, oxo, metil,
amin, trifluorometil,
heterociklusos gyűrű
BRAF IC₅₀ = 2 nM

8. ábra. Orvosbiológiai hatással rendelkező pirido[2,3-*b*]pirazin származékok.

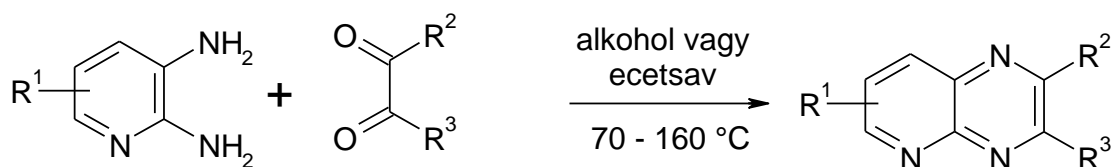
Munkánk során több, mint 1100 vegyületet tartalmazó vegyülettárunkat teszteltük fenotipikus rendszerben, és a vegyülettárunk többek közt ismert Akt kinázgátló hatású anyagokat és ezek származékaikat is tartalmazták, melyek kiindulási alapját képezték egy kisebb, fókuszált vegyületcsoport szintézisének. Három Akt1 gátló vegyületet állítottunk elő: az A-674563 és A-443654 egy vegyületcsaládba tartozik (39. oldal, 17. ábra), míg a 2,3,7-tri(2-tienil)pirido[2,3-*b*]pirazin más alapszerkezettel rendelkezik.

A-443654 májsejtekben gátolja mind az EGF-stimulált sejtciklust, és az AKT-szubsztrát glikogén szintáz kináz-3-t. [101] Indukálja az Akt Ser-473 foszforilációját, az Akt indukciója pedig PI3K vagy mTORC2 függő. [102] Továbbá az Aurora A szabályozásán keresztül gátolja a sejtosztódást. [103]



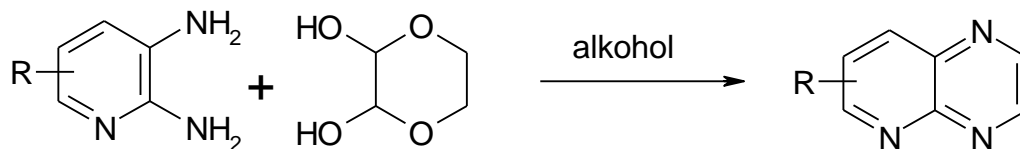
9. ábra. 2,3,7-Tri(2-tienil)pirido[2,3-*b*]pirazin.

A pirido[2,3-*b*]pirazin alapszerkezet korábbi szintetikus módszereiben az alapváz kialakítása piridin-2,3-diamin- és oxovegyületek kondenzációjával történt. A diamin-vegyületet lehet kondenzálni vicinális dioxo-vegyülettel (melyek előállíthatóak α -hidroxiketon-származékokból is mangán-dioxidos oxidációval [104]), alkoholban vagy ecetsavban, forralással vagy mikrohullámú reaktorban (10. ábra). [99] Amennyiben az R^2 és R^3 szubsztituens különböző, regioizomer keverék keletkezik.



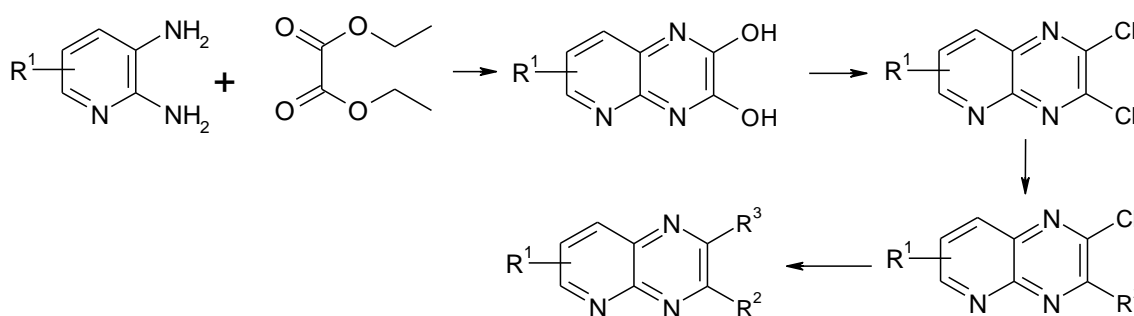
10. ábra. Pirido[2,3-*b*]pirazinok előállítása kondenzációval.

2,3-dihidroxi-1,4-dioxánnal való reakcióban a dihidroxi-reagens maszkírozott aldehidként viselkedik. A dioxán-vegyület hidrolízisét követő kondenzációban a piridopirazin termék pirazingyűrűje szubsztituátlan marad (11. ábra). [93]



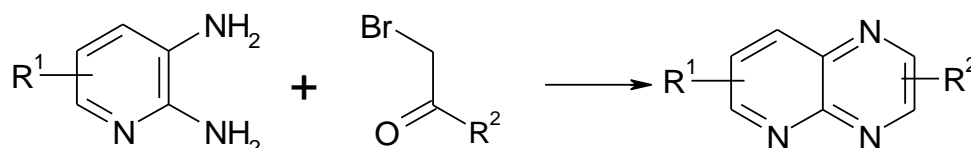
11. ábra. Pirido[2,3-*b*]pirazinok előállítása dioxin származékok kondenzációjával.

Oxalát észterrel kondenzálva az alapváz dihidroxi-származéka keletkezik. A hidroxil - klór csere után keletkező klórszármazék 3-as helyzetű, aktívabb klórja szelektíven reagál Suzuki-reakcióban, így a pirazin-gyűrűbe beépíthető két különböző szubsztituens (12. ábra). [98]



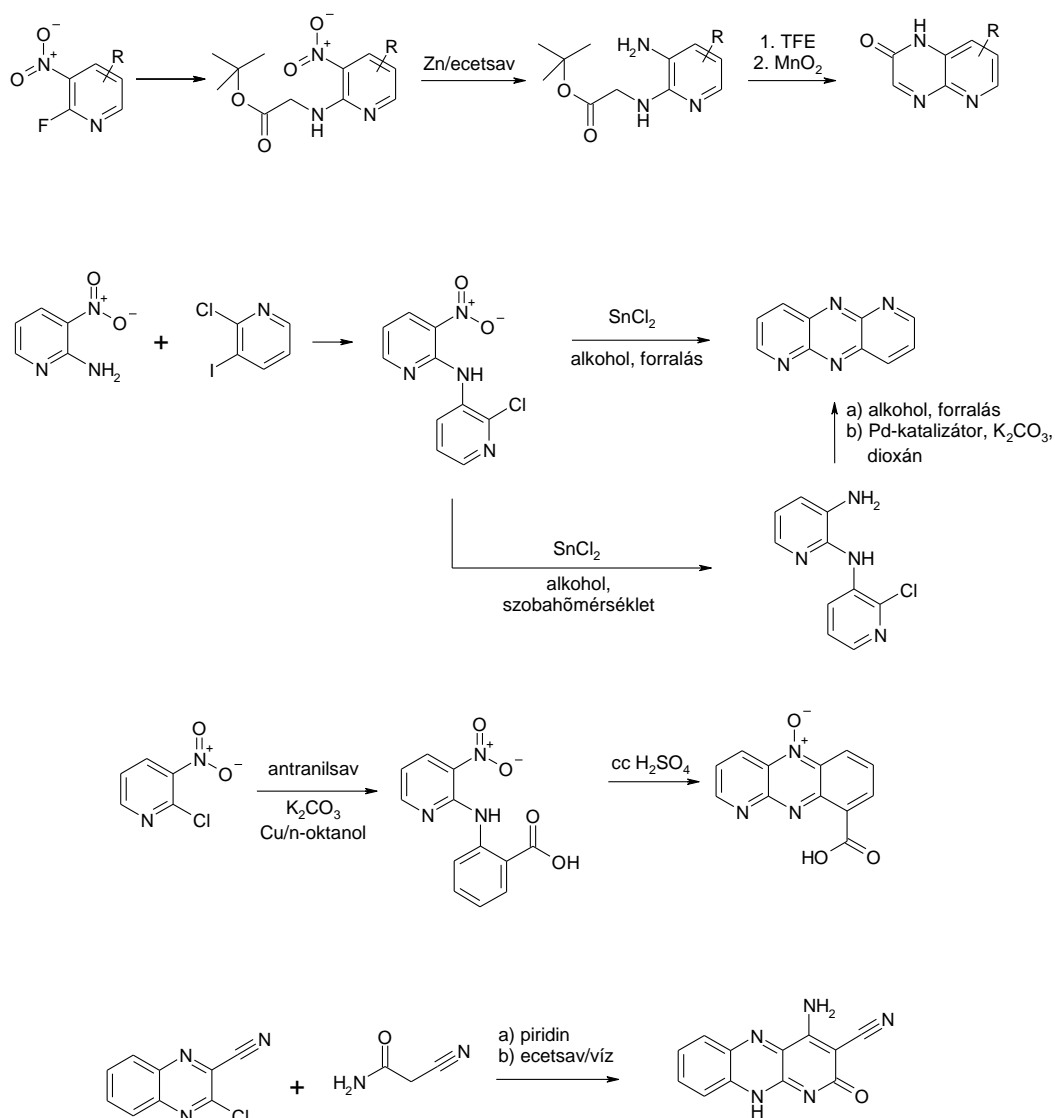
12. ábra. Pirido[2,3-*b*]pirazinok előállítása oxalát észter kondenzációjával.

Kialakítható a szerkezet a diamin-vegyület és halogén-ke-ton-származék reakciójával is, szerves vagy szervetlen bázis mellett. Az oxovegyület és az egyik amin funkciós csoport kondenzációja, továbbá a másik amin alkilezése és az ezt követő oxidáció révén alakul ki a gyűrűrendszer. Ebben a reakcióban szintén regioizomer keverék keletkezik (13. ábra). [89, 105]



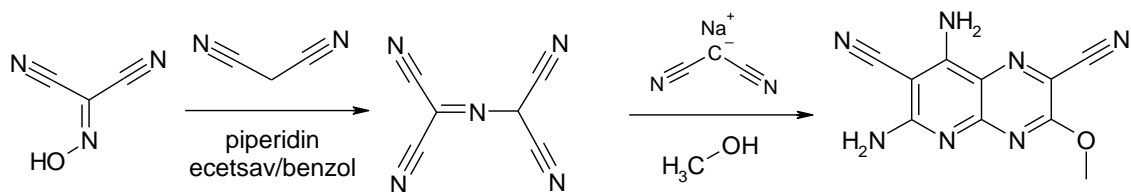
13. ábra. Pirido[2,3-*b*]pirazinok előállítása brómke-ton származékból.

Pirido[2,3-*b*]pirazin és egyéb kondenzált származékai előállíthatóak egyéb piridin- vagy pirazin-származékból is, amikor a 2- és 3- pozícióból legfeljebb csak az egyik helyen található amin-csoport. Ebben az esetben a piridin vagy pirazin valamilyen más (mint halogén, amin, nitro, nitril) funkciós csoport tartalmaz az adott két pozícióban. A reakciópartnernek pedig szintén tartalmaznia kell amint vagy a fenti funkciós csoportok egyikét (esetleg észtert vagy savamidot). A gyűrűrendszer ilyen módon való kialakítása egy vagy két lépésben történhet (14. ábra). [106-109]



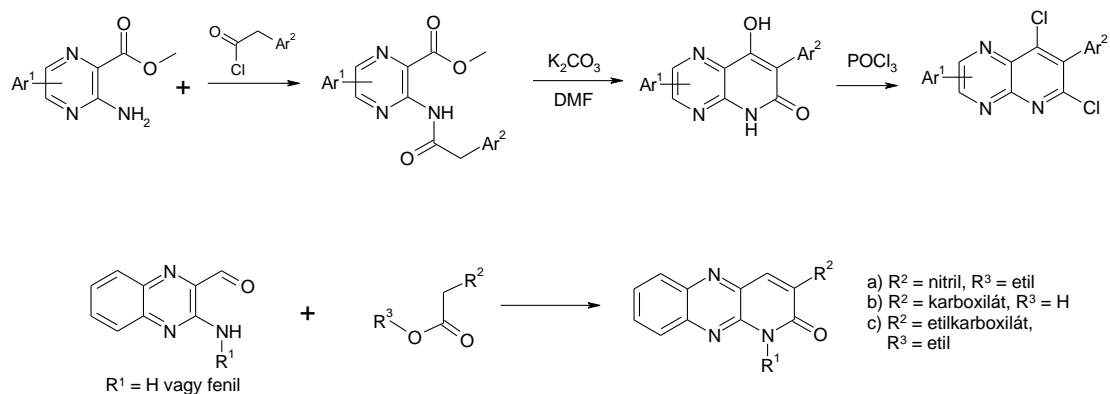
14. ábra. Pirido[2,3-*b*]pirazinok előállítása halogént tartalmazó piridin vagy pirazin molekulákból kiindulva.

Pirido[2,3-*b*]pirazin előállítható még (hidroxiamino)malonitrilből és két malonitril molekulából (15. ábra). [110]



15. ábra. Pirido[2,3-*b*]pirazinok előállítása malonitril kondenzációval.

3-aminopirazin-2-karboxilátok vagy aldehidek a megfelelő oxovegyülettel erős bázisok hatására aromás gyűrűzárással pirido[2,3-*b*]pirazinná kapcsolnak (16. ábra). [111, 112]



16. ábra. Pirido[2,3-*b*]pirazinok előállítása amino-pirazinból kiindulva.

3. Célkitűzések

A munka során új, szabadalmaztatható antitumor hatású gyógyszerhatóanyag-molekulák előállításán dolgoztunk. Célunk az volt, hogy olyan szerkezeteket találjunk, amelyek daganatos betegségekben potenciálisan rezisztenciát okozó sejteket is gátolnak. Ezt egy olyan előszűrő technikával közelítettük meg, melyben – egy MTS szűrés segítségével – szerzett rezisztenciával rendelkező sejtvonalat gátló hatóanyagokat kerestünk. Az MTS szűrésben több mint 1100 ismert, jeltovábbítási rendszerhez kapcsolódó, tumor-terápiás célpontot jelentő kinázgátló szer származékainak daganatos sejtvonalakat gátló hatását vizsgáltuk, melyek egy rendelkezésünkre álló vegyülettár részét képezték. Célunk az volt, hogy az úgynevezett „hit” vegyületek, azaz a leghatékonyabb találati molekulák szerkezetéből kiindulva új, szabadalmaztatható, hatékony molekulákat fejlesszünk ki. A találatok alapján több irányú fejlesztést végeztünk. Néhány ígéretes molekulát a rezisztencia-ozó sejtek gátlásának modellezésére használt klonalitás tesztben vizsgáltunk. A vegyülettárban szereplő kinázgátló anyagok referenciaanyagként szolgáltak, illetve ezen vegyületek többségét munkacsoportunk kémiai származékképzés céljából állította elő.

Első lépésként az irodalomból ismert három Akt kinázgátló hatással rendelkező molekulát, az A-674563 (**1**), az A-443654 (**2**) jelű vegyületet és a 2,3,7-tri(2-tienil)pirido[2,3-*b*]pirazint (**3**) állítottam elő (17.-18. ábra, 39. oldal). A következő lépésben az első két molekula közös alapszerkezetét megváltoztatva, a harmadik alapszerkezetével kombinálva új, de az eredeti molekulákkal szerkezeti hasonlóságot mutató származékokat készítettem. Az MTS mérés során az új származékok közül PC9 daganatos sejtvonalat és erlotinibre rezisztensé tett variánsát (PC9-ER) egyaránt gátló származékokat sikerült beazonosítani.

A munka következő fázisában az előbb említett biológiai eredmények figyelembe vételével, a jobb hatás és az ezért felelős szerkezeti kritériumok felderítése céljából újabb származékokat állítottam elő. Ezek szintézisekor a szerkezet-hatás összefüggésének megállapítása céljából nagyobb kémiai diverzitásra törekedtem. Az előállított vegyületek biológiai tulajdonságait munkacsoportunk vizsgálta. Ezen eredmények ismeretében tovább pontosítottam a szerkezet-hatás összefüggését, és ez alapján terveztem a további származékokat. A legjobb hatású vegyületet a

gyógyszer-szerűséghez szükséges ADME paraméterek javítása érdekében vízoldhatóságot javító szubsztituensek bevitelével tovább optimalizáltam.

A szerkezet-hatás összefüggés alapján hatékony szerkezetek szintéziséhez egy aszimmetrikus terméket eredményező kondenzációs lépés szükséges, melynek eredményeképpen két különböző térszerkezetű termék, regioizomer képződhet. Ahhoz, hogy a vegyületek előállítása során csökkentsem vagy teljesen elkerüljem a nem kívánt mellékterméket, a kondenzációs reakció körülményeit optimalizáltam, a két termék elválasztására módszert dolgoztam ki, és a kívánt izomer tényleges szerkezetét munkacsoportunk kétféle analitikai módszerrel igazolta.

A munka során az alábbiakat tűztük ki célul:

1. Az irodalomból ismert kinázgátló hatású A-674563 (1), A-443654 (2) és 2,3,7-tri(2-tienil)pirido[2,3-*b*]pirazin (3) molekulák előállítására megfelelő, optimalizált módszer kidolgozását;
2. Az újdonságérték kívánalmainak megfelelő mértékű változtatással az alapszerkezetből származtatott hatékony vegyületek tervezését, és fókuszált vegyülettár szintézisét az új szerkezet köré;
3. Az előállított származékok biológiai hatásprofiljának meghatározását elsősorban sejtes vizsgálatokban;
4. A biológiai eredmények alapján a hatásért felelős szerkezeti elemek felderítését, és az így nyert információ alapján további, jobb biológiai hatással rendelkező származékok tervezését és szintézisét;
5. A biológiai aktivitással rendelkező molekulák olyan származékainak előállítását, amelyek várhatóan jobb ADME paraméterekkel rendelkeznek, elsősorban a jobb vízoldhatóságon keresztül;
6. A szintézis során felmerülő regioizoméria kérdésének tisztázását: az izomerek elválasztásának kidolgozását, az elválasztott izomerek szerkezetének igazolását, a reakciókörülmények hatásának vizsgálatát az izomerek keletkezésének szelektivitására, a reakció során a kívánt izomer arányát növelő körülmények optimalizálását, a két izomer biológiai hatásban mutatkozó eltérésének vizsgálatát;
7. Néhány vegyület rezisztencia-ozó sejtekre kifejtett hatásának igazolását klonalitás vizsgálatokban.

4. Módszerek

4.1. Kémiai módszerek

A munka során támpontul szolgáló irodalmi adatokat a SciFinder ScholarTM (Chemical Abstracts Service, American Chemical Society), Reaxys[®], SciVerse[®] (Elsevier Properties SA), és a PubMed – National Center for Biotechnology Information (National Library of Medicine) adatbázisokból gyűjtöttem. Szabadalmak keresésére és letöltésére ezeken kívül az Esp@cenet (European Patent Office), FreePatentsOnline.com, és WIPO (World Intellectual Property Organization) adatbázisokat használtam.

A vegyületek elnevezését a IUPAC szabályok szerint az ACD/Name[®] V9.06 (Advanced Chemistry Development Inc.) program segítségével végeztem, a magyar kémiai helyesírás szabályainak alkalmazásával.

A szintézisek során klasszikus oldat-, és folyadékfázisú szerves kémiai szintetikus eljárásokat alkalmaztam, laboratóriumi üvegeszközökben. A kiinduló anyagokat a Sigma-Aldrich Kft, Merck Kft, Molar Chemicals Kft, Alfa Aesar GmbH&Co KG, Matrix Scientific, TCI Europe N.V. és Apollo Scientific Ltd cégektől szereztem be és további tisztítás nélkül használtam fel őket a szintézisek során.

A reakciók nyomon követésére vékonyréteg-kromatográfiát (VRK) használtam, melyhez 254 nm-es hullámhosszú UV fényre aktivált DC Kieselgel 60 Merck VRK lapot alkalmaztam. A kromatogram kifejlesztésére eluensként n-hexán/etil-acetát, kloroform/metanol, illetve toluol/metanol megfelelő elegyét, etil-acetátot és kloroformot önmagában, illetve ezen elegyek 1% trietilamint tartalmazó oldatát használtam. A detektálást 254 nm, és 366 nm hullámhosszú UV fényel, illetve kémiai módszerekkel (ninhidrin-, 2,4-dinitrofenilhidrazin-, difenilkarbazon- [113] és foszformolibdénsav oldatok, illetve jódgőz alkalmazásával) végeztem.

A vegyületek tisztítását átkristályosítással, illetve 1 mm rétegvastagságú 254 nm-es hullámhosszú UV fényre aktivált Merck PLC Kieselgel 60 rétegen preparatív vékonyréteg kromatografálással, vagy oszlop-kromatográfiával végeztem. Az

oszlopkromatográfiás tisztításhoz Kieselgel 60 (szemcseméret: 0,063 – 0,2 mm) töltetet használtam.

Analitikai módszerek:

Az LCMS analízist Waters Alliance 2795 típusú fordított fázisú, Waters 996 DAD UV detektorral felszerelt nagyhatékonyságú folyadékkromatográffal összekapcsolt Waters Acqity SQD tömegspektrométerrel végeztük. Waters XBridge C18 (50 x 4,6 mm, 3,5 µm) típusú kolonnát használtunk gradiens módban 2 ml/perc áramlás sebességgel.

I. eljárás (savas elúció):

(A) oldószer: víz + 0,05 % HCOOH

(B) oldószer: 100 % acetonitril

Futási idő: 7 perc

Gradiens:	t(min)	A %	B %
	0,00	95	5
	0,50	95	5
	5,50	5	95
	6,00	5	95
	6,50	95	5
	7,00	95	5

II. eljárás (bázikus elúció):

(A) oldószer: 5 mM NH₄HCO₃

(B) oldószer: 100 % acetonitril

Futási idő: 7 perc

Gradiens:	t(min)	A %	B %
	0,00	95	5
	0,50	95	5
	5,50	5	95
	6,00	5	95
	6,50	95	5
	7,00	95	5

III. eljárás (az izoméria arány vizsgálatához használt bázikus elúció):

(A) oldószer: 5 mM NH₄HCO₃

(B) oldószer: 100 % acetonitril

Futási idő: 13 perc

Gradiens:	t(min)	A %	B %
	0,00	95	5
	0,50	95	5
	10,00	35	65
	11,00	5	95
	12,00	5	95
	12,50	95	5
	13,00	95	5

Injektálás: 5 µg.

Az oldószereket a Sigma-Aldrich Kft-től szereztük be (Acetonitrile G Chromasolv (34998), Formic acid extra pure (27001)). A desztillált vizet Milli-Q Academic equipment-el állítottuk elő. Ahol külön nem jelöljük, ott a I. eljárást használtuk.

A tömegspektrométer adatai:

ionizáció: ES+/ES-, forrás hőmérséklet: 110 °C, deszolvatációs hőmérséklet: 250 °C, deszolvatálási gáz: 500 l/perc, kúp gáz: 80 l/perc, kapilláris: 3000 V, kúpfeszültség: 30 V, extraktor: 6 V Rf, lencsék: 0,1 V, felvétel tartomány: 80-tól 1000 m/z-ig 1 másodpercenként, inter-scan késés: 0,1 másodperc.

A ¹H-NMR analízist Bruker DRX-300 (300 MHz) típusú készülékkel végeztük, 25 °C-on. Oldószerek, ha külön nem jelöltük, DMSO-*d*₆-t használtunk.

A regioizomerek ¹H- és ¹³C-NMR vizsgálatát Varian Inova (500 MHz) típusú készülékkel, ¹⁵N-NMR vizsgálatát pedig Bruker Avance III (400 MHz) készülékkel végeztük. Oldószerek deuterio-kloroformot (kloroform-*d*-t) használtunk. A mérést az EGIS szerkezetkutatási osztálya végezte.

Olvadáspontokat Büchi Melting Point B-540 készülékkel határoztam meg. A megadott olvadáspont értékek nem korrigáltak.

A röntgenkristallográfiás mérést az EGIS szerkezetkutatói osztálya végezte. A mérés grafit monokromatikus Cu-K α sugárzással működő Rigaku RAXIS RAPID imaging plate area detektorral felszerelt készülékkel történt. Kristályparaméterek meghatározását négy ismétléssel végeztük, 300 másodperces besugárzással. A kristály-detektor távolság 127,40 mm volt.

A biológiai mérésekre leadott vegyületek LCMS illetve $^1\text{H-NMR}$ vizsgálatokon mért tisztasága 90 % és 100 % között volt.

Az általános recepttel leírt vegyületek kitermeléseit 1,00 mmol kiindulási anyagra számolva adtam meg.

Vízoldhatóság mérés:

Az anyagok 5 mM DMSO-ban oldott törzsoldatából 333 μl végtérfogatban 120 μM -os oldatokat készítettünk DMSO-ban, pH = 7,4 PBS pufferben és pH = 2,0 foszfát pufferben (Phosphate buffer solution pH 2.0 Ph. Eur 5.0). A mintákat 16 óráig állni hagytuk, majd 3700 rpm-en 30 percig centrifugáltuk.

Az anyagok görbe alatti területét HPLC-UV gradiens elúciós módszerrel határoztuk meg, Waters Alliance 2795 és Waters 996 PDA detektor segítségével. Oszlop Waters XBridge C18 (50 x 4,6 mm, 4,6 μm). Az eluálás során az I. eljárást használtuk.

A minták oldhatóságát a 120 μM -os DMSO oldat görbe alatti területéhez viszonyítva határoztuk meg három mérést követően. A mérések között a minták 24 órát álltak szobahőmérsékleten.

A doktori értekezésben szereplő vegyületek:

Az irodalomban eddig nem ismert, saját közti-termékek: **15, 26b-d, 27b-p, 36a-c.**

Az irodalomban eddig nem ismert, szabadalmaztatható saját végtermékek: **29a-f, 30a-d, 31a-t, 32a-b, 33a-v, 34a-c, 35, 37a-e, 38.**

4.2. Biológiai módszerek

Az *in vitro* modellben MTS előszűrést alkalmaztunk, amelyben szerzett rezisztenciával rendelkező sejtvonalat gátló hatóanyagokat kerestünk. A megközelítés

alapja az volt, hogy az érzékeny és rezisztens sejteket is gátló vegyületek rendelkezhetnek olyan hatásspektrummal, amely a megnövekedett rezisztenciával rendelkező TIS-ek gátlására is alkalmas lehet. Olyan anyagokat kerestünk tehát, melyek nem csupán erlotinib-érzékeny, de az erlotinib rezisztenciáért felelős, szerzett EGFR mutációt tartalmazó NSCLC sejtvonalon is hatnak. Fenotípusos szűrés során PC9 sejtvonalat és PC9-ER erlotinib-rezisztens variánsát használtuk. A PC9-ER sejtek erlotinib-rezisztenciáját tartós erlotinib inkubációval hozták létre. Az egyik beazonosított genotípusos változás, ami a PC9-ER sejtekben az erlotinib rezisztenciáért felelős lehet, a T790M mutáció. [114] De számos, eddig azonosítatlan mechanizmus állhat a rezisztencia hátterében, akár más jellegű EGFR génmódosulás.

A biológiai méréseket az alábbiak szerint végezte a munkacsoportunk:

A biológiai mérésekhez a reagenseket a Sigma-Aldrich Kft, Invitrogen Co és a Gibco cégektől szereztük be.

Lumineszcens sejt túlélés (viabilitás) vizsgálat:

A sejtvitalitás vizsgálatához a NSCLC elváltozásokat modellező adherens PC9 és erlotinib-rezisztens variánsát, a PC9-ER sejtvonalat használtuk. A sejtvonalakat a Cancer Research UK London Research Institute, Signal Transduction Laboratory bocsátotta rendelkezésünkre. A PC9-ER sejtvonal erlotinib rezisztenciájának kialakítását a Cancer Research UK London Research Institute, Signal Transduction Laboratory végezte és ellenőrizte. A sejteket RPMI-1640 médiumban tenyésztettük. A médium 10 % FBS-t és 1 % Ab/Am-ot tartalmazott. A sejteket felhasználásig 37 °C-on, 5 %-os CO₂ termosztátban tartottuk.

A sejtenyészetekből egysejtszuszpenziót készítettünk, és lyukanként (well) ezer sejtet pipettáztunk 384-es fehér mikrolemezekre (CulturPlate, PerkinElmer, Waltham, MA). Másnap a sejteket a megfelelő gátlószerekből készült hígítási sorral kezeltük (30 µM-tól induló, 10 pontos, harmadoló hígítási sor) A sejtek életképességét, valamint az EC₅₀ értékét 72 óra után a CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega Corp.) kit segítségével határoztuk meg a gyártó leírásának megfelelően. A vizsgálat az életképes sejtek számát határozza meg az ATP jelenlétének közvetett kimutatása révén. A reakció során a luciferáz enzim Mg²⁺ és ATP jelenlétében a luciferin mono-oxidációját katalizálja, melynek során oxiluciferin keletkezik. A kimutatás során az

oxiluciferin lumineszcenciáját mértük Analyst[®] GT Multimode Reader (Molecular Devices) segítségével. Az EC₅₀ meghatározás során a dózis-hatás görbét az XLfit (IDBS) programmal generáltuk.

Biokémiai mérések:

Akt kináz (IMAP mérés):

6 µL szubsztrátot, ATP-oldatot, puffert, 8 nL inhibitor DMSO-s oldatát és 2 µl kinázt pipettáztunk 384-es mikrolemez lyukaiba. Reakció puffer összetétele: pH 7,5, 20 mM HEPES, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 0,01 % Triton X-100. Végkoncentrációk: Akt kináz 18 nM, ATP 47,1 µM, biotinilált szubsztrát 280 nM, szreptavidin-XL665 35 nM. IMAP kötő reagens (R7284) 1:800 arányban hígítva IMAP pufferrel (R7282:R7283 3:1). 60 perces, szobahőmérsékletű inkubáció után mértük a fluoreszcencia polimerizációt és a fluoreszcencia intenzitást.

EGFR kináz (Transcreener):

Három különböző mérést végeztünk EGFR, EGFR(L858R), EGFR(L858R_T790M) enzimeken a gyártó leírásának megfelelően. EGFR koncentráció: 16/25/3 nM, szubsztrát koncentráció (Poly Glu-Tyr 4:1): 0,5/0,5/0,05 mg/ml, ATP koncentráció: 7,52/10/10 µM. Reakció puffer: pH 7,5, 20 mM HEPES, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 2 mM MnCl₂, 0,01 V/V % NP40. Inkubációs idő 60 perc. A reakciót 8 µl ADP detektációs eleggyel állítottuk le (detektációs puffer, 9,12/11,8/11,8 µg/ml ADP2 Ab, 3 nM ADP Alexa633 tracer). A fluoreszcencia polarizációt és intenzitást Analyst GT readerrel mértük.

A **33a** molekula 456 kinázon mért aktív hely vezérelt, kompetíciós kötődési vizsgálata a Kinexus Bioinformatics Corporation KINEX[™] protein kinase microarray based small molecule inhibitor profiling platform szolgáltatása volt.

Klonalitás vizsgálat:

A klonalitás vizsgálattal meghatározhatjuk a sejtek klonális proliferációs képességét HCC827 EGRF mutációt tartalmazó sejtvonalon adott gátlószer mellett. A sejteket 10 % FBS-sel és 1 % Ab/Am-mal kiegészített RPMI-1640 médiumban 70 %-os konfluenciáig tenyésztettük, majd megszámoltuk a sejteket és 1 ml térfogatban

300 mm-es Petri-csészébe mértük úgy, hogy a sejtszám 1500, 750 illetve 375 legyen. Minden kísérletet kétszeresen (duplikátum) végeztünk. 24 órás, 37 °C-on történő inkubációt követően a sejteket a megfelelő gátlószerezrel kezeltük plató-koncentrációban (az a koncentráció, amely felett a vizsgált sejtek magasabb százalékos gátlása nem volt elérhető). 72 órás inkubációt követően a használt médiumot leszívtuk és friss médiummal láttuk el a sejteket, melyet 4 naponta cseréltünk. A 14. illetve 21. napon (általában ezen időpontokban jelentek meg a körülbelül 50 sejtből álló kolóniák) a sejtekről ismételtelen leszívtuk a médiumot és a sejtekhez 4 °C-os fixáló reagenst adtunk (50 % etanol, 0,25 % 1,9-dimetil-metilén kék). 40 perc szobahőmérsékleten történő inkubációt követően a reagenst leszívtuk, az edényeket PBS-sel mostuk, majd a kolóniákat manuálisan megszámloltuk. A túlélő frakciót (keletkezett klónok száma a kezelést követően a kontrollhoz viszonyítva) a következő összefüggés szerint határoztuk meg:

$$\text{túlélő frakció (\%)} = \left[\frac{\text{(klónok száma a kezelést követően)}}{\text{(klónok száma a kontrollban)}} \right] \cdot 100$$

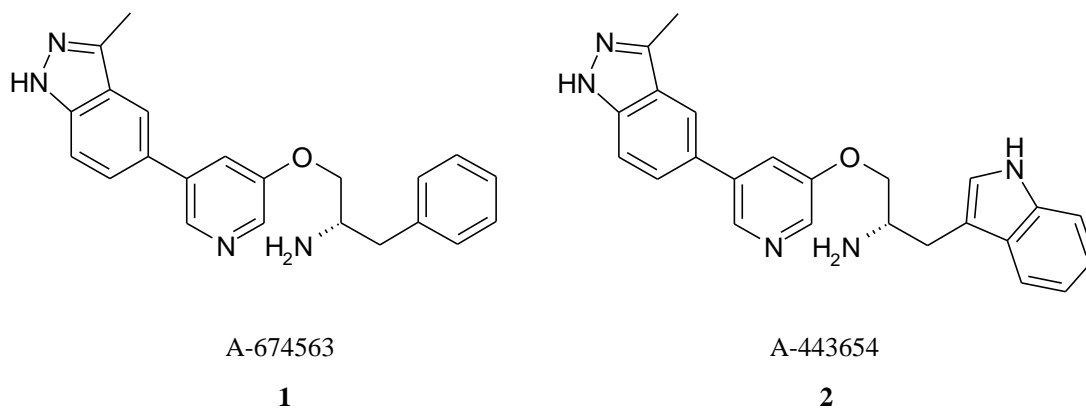
A biokémiai mérések eredményeinek szórása 5 % alatt, a sejtes mérések esetén pedig 10 % alatt volt.

4.3. Az Akt1 kinázgátló hatású A-674563 (1) és A-443654 (2) jelű anyag, és a 2,3,7-tri(2-tienil)pirido[2,3-*b*]pirazin (3) előállítása

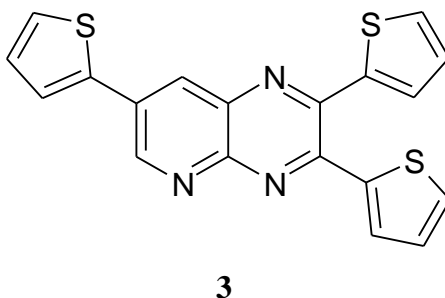
Vegyülettárunk részeként, referencia anyagnak, előállítottam három, irodalomból már ismert kinázgátló hatású vegyületet. A vegyületeket ismert Akt1 kinázgátló hatásuk miatt választottuk ki. Az előállítás során tapasztalatot szereztem ezen vegyületek szintézisében, új származékok előállítására módszereket tudtam kidolgozni, továbbá a szintézis folyamán előállított intermedierek felhasználhatóak voltak a fókuszált vegyülettár építésében is.

Az A-674563 (1) és az A-443654 (2) számú vegyületeket (17. ábra) Thomas és munkatársai illetve Woods és munkatársai által közölt módszer alapján állítottam elő. [115, 116] Ahol a közleményben található módszer nehezen volt reprodukálható, vagy eltérő szintézis úton olyan intermedierekhez lehetett jutni, amely utat nyitott új származékok gyorsabb előállítására, ott eltértem az irodalomban megadott módszertől. A kereskedelemben nem hozzáférhető vagy gazdaságosabban előállítható

intermediereket elkészítettem. A 2,3,7-tri(2-tienil)pirido[2,3-*b*]pirazint (**3**) (18. ábra) Kawakami és munkatársai által közölt módszer alapján állítottam elő. [96]

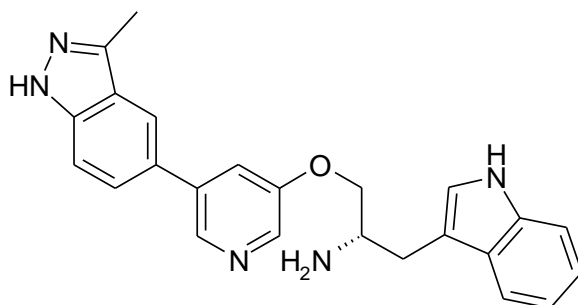


17. ábra. Az A-674563 (**1**) és A-443654 (**2**) jelű Akt1 gátló hatású anyagok ($K_i = 1,10$ nM és 0,16 nM).



18. ábra. Az Akt gátló hatású [96] 2,3,7-tri(2-tienil)pirido[2,3-*b*]pirazin (**3**) (*in vitro* inhibíció (10 μ M) = 88 %; sejtes mérés: $EC_{50} = 0,1$ μ M).

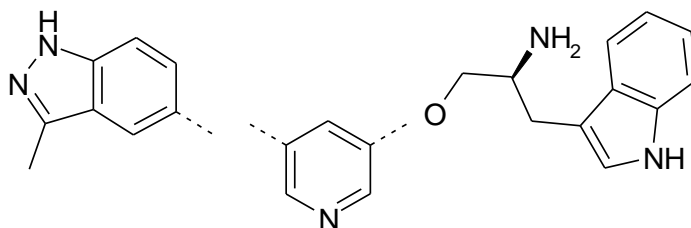
4.3.1. Az A-443654 (S)-1-(1*H*-indol-3-il)-3-[[5-(3-metil-1*H*-indazol-5-il)piridin-3-il]oxi]propán-2-amin (2) előállítása



A-443654

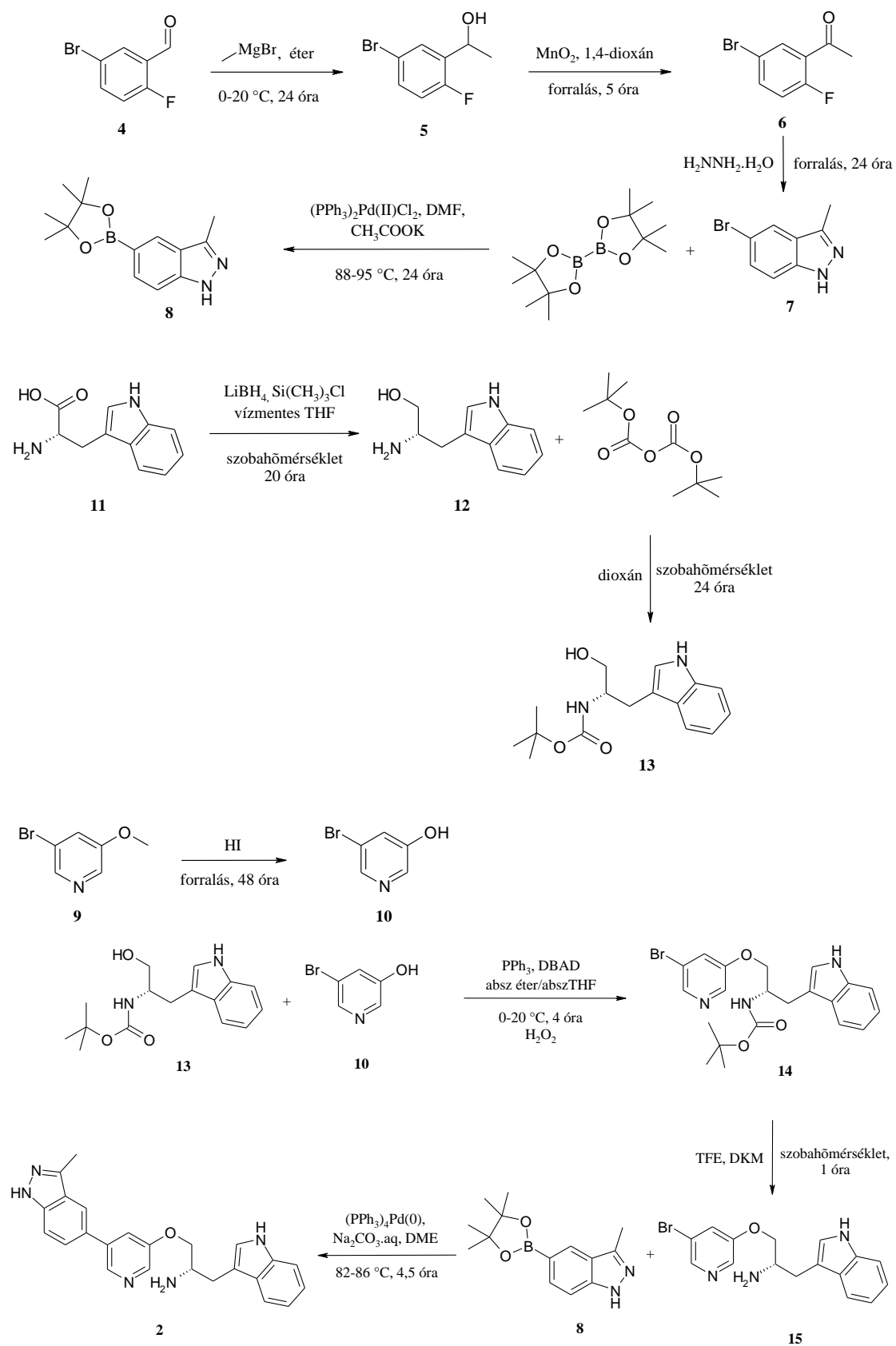
2

A vegyületet három különböző szerkezeti elem felépítésével és azok összekapcsolásával szintetizáltam (19. ábra).



19. ábra. A 2 vegyületet felépítő szerkezeti elemek.

A 3,5-diszubsztituált piridint 3-metil-1*H*-indazol-5-il-csoporttal, illetve oxigénen keresztül kapcsolt 2-amino-3-(1*H*-indol-3-il)propán-1-ol (12) csoporttal helyettesítettem. A 12 alkohol vegyület (triptofanol) amin-csoporton védett származékát (13) Mitsunobu-reakcióval, a 3-metil-1*H*-indazol-5-il-csoportot pedig (3-metil-1*H*-indazol-5-il)-boronsav-pinakol-észterének (8) segítségével, Suzuki-reakcióban kapcsoltam az 5-brómpiridin-3-olhoz (10) (az irodalomból ismert Stille-kapcsolástól itt eltértem, aminek magyarázatát lásd a 4.4.4. pontban) (20. ábra).



20. \u00e1bra. Az A-443654 (2) vegy\u00fclet el\u00f3\u00e1ll\u00edt\u00e1sa.

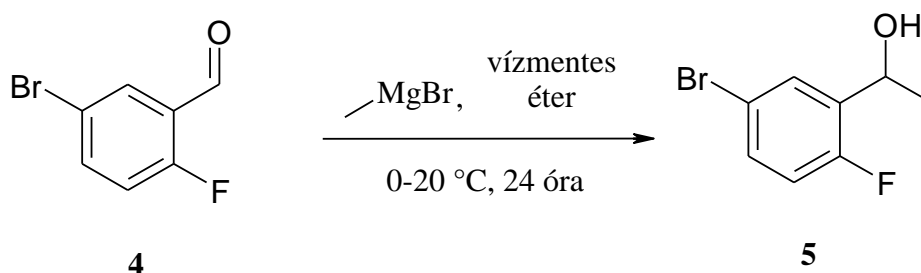
Az **10** fenol vegyület kereskedelemben nem volt beszerezhető, ezért azt 3-bróm-5-metoxipiridin (**9**) hidrogén-jodidos demetilizésével állítottam elő. [117]

A **8** boronsav-észter vegyület irodalomban nem volt ismert. Előállításához a kereskedelmi forgalomban kapható 3-bróm-6-fluor-benzaldehydből (**4**) indultam ki, amelynek dietil-éterben végzett, metil-magnézium-bromidos Grignard-reakciójával kaptam az **5** alkoholt. A keletkező alkoholt mangán-dioxiddal dioxános oldatban forralva **6** ketonná oxidáltam. A molekulában található fluor-csoport, és a keton-csoport hidrazinnal forralva gyűrűzáródási reakcióban adja a **7** indazol származékot. [116] A reagens szintézisének utolsó lépéseként a **7** vegyületből DMF oldatában bisz(pinakolato)diboránnal, kálium-acetát mellett, $(PPh_3)_2Pd(II)Cl_2$ katalizátorral állítottam elő a **8** boronsav észtert. [118]

Az N-*t*-Boc-2-amino-3-(1*H*-indol-3-il)propán-1-ol (**13**) szintézisét L-triptofánból (**11**) kiindulva végeztem. Mivel az irodalmi módszert nem tudtam jó minőségben reprodukálni, ennél a szintézisnél az aminosav redukcióját végeztem el első lépésben, majd ez után védtem a primer amin *t*-Boc védőcsoporttal. Az aminosavat THF oldatában lítium-[tetrahydrido-borát(III)]-tal, trimetilszilil-klorid mellett redukáltam alkohollá. [119] Ezután di-*tert*-butoxikarbonil-karbonáttal a primer amincsoportra *tert*-butoxikarbonil védőcsoportot kapcsoltam szobahőmérsékletű reakcióban, dioxános oldatban. [120]

Először a **10** fenolt kapcsoltam össze a **13** alkohol vegyülettel (**14**), majd a jobb preparálhatóság céljából a védőcsoportot eltávolítva sósav-sót képeztem az anyagból (**15**). A Mitsunobu-reakciót DBAD és trifenilfoszfán jelenlétében végeztem vízmentes dietil-éterben. [115] Ezek után kapcsoltam a **15** és **8** vegyületeket. A Suzuki-reakciót dimetoxi-etánban végeztem $(PPh_3)_4Pd(0)$ katalizátort alkalmazva, nátrium-karbonát vizes oldatát használva bázisként, inert atmoszférában. [121]

1-(5-Bróm-2-fluorfenil)etanol (**5**) előállítása



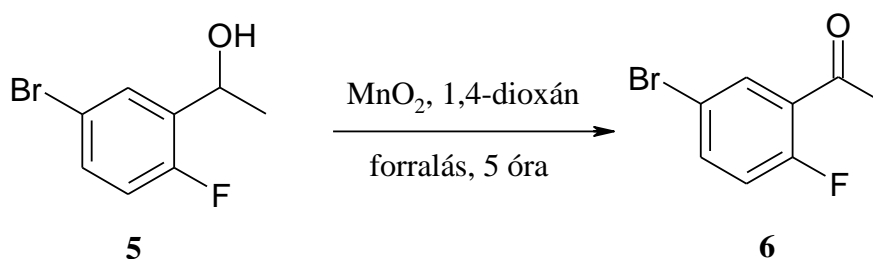
10,00 g (49,26 mmol) **4** aldehidet 250 ml-es gömblombikban feloldottam 60 ml vízmentes dietil-éterben, majd argon atmoszférában hozzácepegettem 38 ml, 1,4 M-os metil-magnézium-bromid dietil-éteres oldatát (53,20 mmol), jeges hűtés közben. Az elegyet hagytam felmelegedni szobahőmérsékletűre és 24 órát kevertetem. Ezután hozzáadtam 100 ml 1 N sósavat, és a kiváló fehér kristályokat szűrtem. A szűrlet szerves és vizes fázisát elválasztó tölcserrel különválasztottam, a vizes fázist 3 x 50 ml dietil-éterrel kiráztam. Az egyesített szerves fázisokat telített NaCl oldattal összeráztam, vízmentes MgSO₄-on szárítottam, majd szűrés után vákuumban bepároltam. A keletkező sárga olajat oszlopkromatográfiásan tisztítottam (töltet: 145 g Szilikagél 60, eluens hexán : etil-acetát 5:1).

Termék: 8,46 g halványsárga olaj. Kitermelés: 78,4 %.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 7.63 (dd, $J^1 = 6,57$ Hz, $J^2 = 2,40$ Hz, 1H), 7,45-7,47 (m, 1H), 7,13 (dd, $J^1 = 10,17$ Hz, $J^2 = 8,73$ Hz, 1H), 5,42 (d, $J = 3,63$ Hz, 1H), 4,92-4,95 (m, 1H), 1,33 (d, $J = 6,42$ Hz, 3H).

LCMS nem ionizál, Rt: 3,46 min.

1-(5-Bróm-2-fluorfenil)etanon (**6**) előállítása



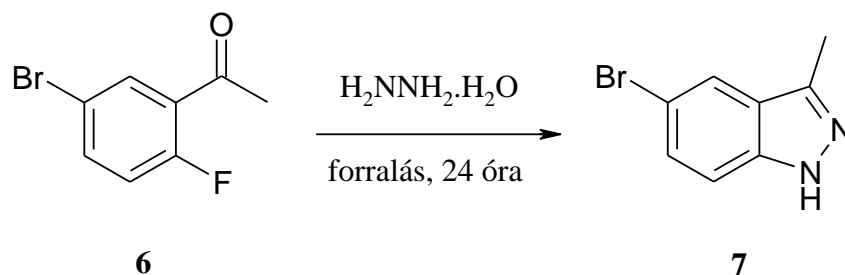
Az előző reakcióban előállított **5** alkohol-származék 8,41 g-ját (38,40 mmol) gömblombikban feloldottam 130 ml 1,4-dioxánban, majd hozzáadtam 57,00 g (655,17 mmol) aktivált mangán-dioxidot. Az elegyet 5 órán át forraltam. Lehűtés után 100 ml etil-acetáttal hígítottam, celiten szűrtem, és etil-acetáttal négyszer mostam. A szűrletet vákuumban bepároltam, és exsikkátorban, foszfor-pentoxid felett tömegállandóságig szárítottam.

Termék: 6,77 g, szobahőmérséklet körül olvadó sötétsárga kristály. Kitermelés: 81,3 %.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 7,91 (dd, $J^1 = 6,45$ Hz, $J^2 = 2,61$ Hz, 1H), 7,82-7,85 (m, 1H), 7,36 (dd, $J^1 = 10,74$ Hz, $J^2 = 8,79$ Hz, 1H), 2,59 (s, 3H).

LCMS nem ionizál, Rt: 3,80 min.

5-Bróm-3-metil-1H-indazol (7) előállítása



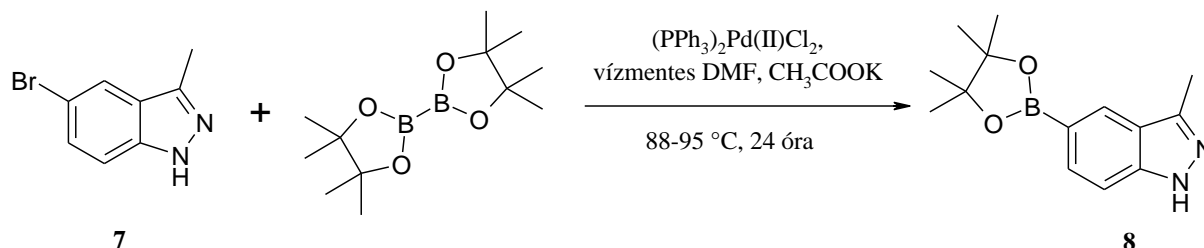
250 ml-es gömblombikba bemértem 90 ml 98 %-os hidrazin-hidrátot, és hozzáadtam 5,37 g (24,75 mmol) előző reakcióban előállított **6** ketont. Az oldatot 24 órán át forraltam. Lehűtés után szűrtem, vízzel háromszor mostam, majd exsikkátorban, foszfor-pentoxid felett tömegállandóságig szárítottam.

Termék: 2,61 g barna kristályos anyag. Kitermelés: 50,0 %. Olvadáspont: 155,1 - 157,0 °C. Irodalmi olvadáspont: nem található adat.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 12,80 (br s, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,44 (d, $J = 9,12$ Hz, 1H), 7,41 (d, $J = 9,09$ Hz, 1H), 2,47 (s, 3H).

LCMS m/z 211 ($\text{M} + \text{H}$)⁺, Rt: 3,41 min.

(3-Metil-1H-indazol-5-il)-boronsav-pinakol-észter (8) előállítása



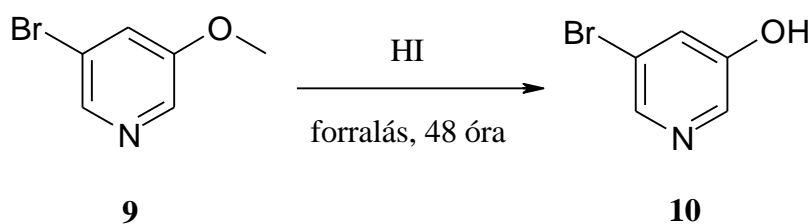
2,11 g (10,00 mmol) előző reakcióban előállított **7** bróm-metilindazolt és 140 mg (0,20 mmol) $(\text{PPh}_3)_2\text{Pd}(\text{II})\text{Cl}_2$ -ot argonnal kiöblített kétnyakú gömblombikban feloldottam 40 ml vízmentes DMF-ben, és egy órát kevertettem szobahőmérsékleten. Hozzáadtam 3,23 g (12,72 mmol) bisz(pinakolato)diboránt és 3,46 g (35,31 mmol) kálium-acetátot, majd 88 - 95°C-on 24 órát kevertettem. Az elegyet lehűtöttem, celiten szűrtem, etil-acetáttal háromszor mostam, és a szűrletet vákuumban bepárooltam. Az így kapott sárga kristályokat hexánból átkristályosítottam, és exsikkátorban, parafinorgács felett tömegállandóságig szárítottam.

Termék: 1,28 g fehér, kristályos anyag. Kitermelés: 49,6 %. Olvadáspont: 107,5 - 109,4 °C. Irodalmi olvadáspont: nem található adat.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 12,80 (s, 1H), 8,05 (s, 1H), 7,58 (d, $J = 7,85$ Hz, 1H), 7,40 (d, $J = 7,88$ Hz, 1H), 1,30 (s, 12H), 1,14 (s, 3H).

LCMS m/z 258 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$, Rt: 3,75 min.

5-Brómpiridin-3-ol (10) előállítása



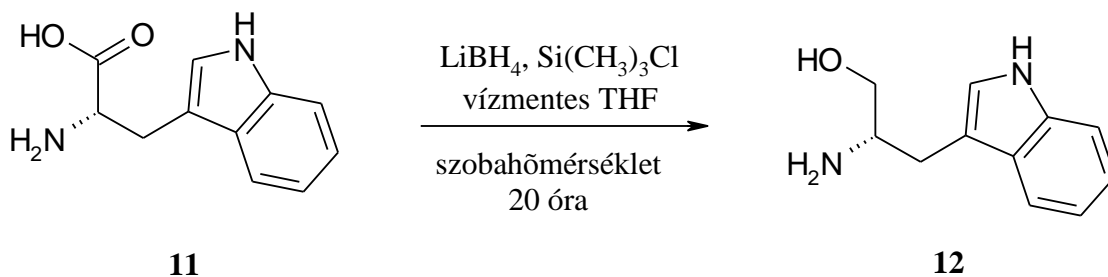
10,00 g (53,19 mmol) **9** metoxi-származékot gömblombikban 35 ml hidrogén-jodid 57 %-os vizes oldatában oldottam, és 48 órát forraltam. Az elegyet hűtöttem, hűtés közben hozzáadtam 190 ml 2 N NaOH-ot, és NaHCO_3 -tal pH ~8 körülire állítom. A kivált kristályokat szűrtem, 3 x 15 ml etil-acetáttal mostam. A kristályokat exsikkátorban, foszfor-pentoxid felett tömegállandóságig szárítottam.

Termék: 6,10 g barnászörös kristályos anyag. Kitermelés: 65,9 %. Olvadáspont: 168,8 - 170,0 °C. Irodalmi olvadáspont: 162 - 164 °C. [122]

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 10,48 (s, 1H), 8,14-8,16 (m, 2H), 7,42-7,44 (m, 1H).

LCMS m/z 174 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$, Rt: 2,12 min.

(S)-2-Amino-3-(1H-indol-3-il)propán-1-ol (12) előállítása



1,80 g (81,82 mmol) lítium-[tetrahidrido-borát(III)]-ot gömblombikban feloldottam 130 ml vízmentes THF-ben és hozzácepegtettem 19 ml (151,12 mmol) klór-

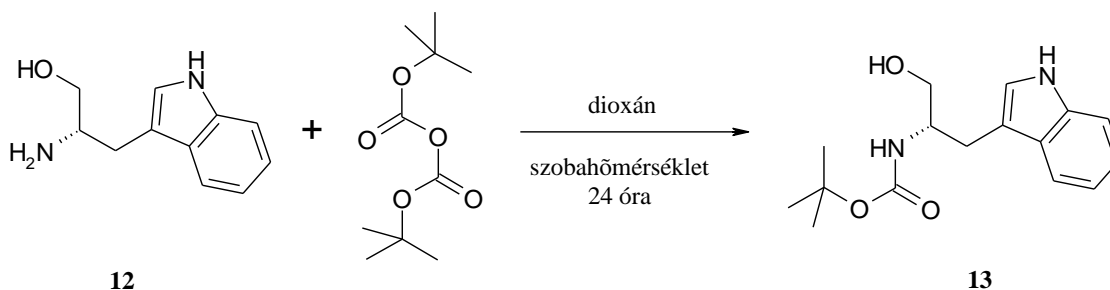
trimetilszilánt. Ezután egy adagban hozzáadtam 8,00 g (39,22 mmol) **11** L-triptofán aminosavat. A fehér szuszpenziót 20 órán át kevertetem szobahőmérsékleten. Az elegyhez addig adtam metanolt, amíg gázfejlődés volt tapasztalható (körülbelül 25 ml), ezután az elegyet vákuumban bepároltam. A maradékot 160 ml 3,6 N NaOH-ban oldottam. Az anyagot a vizes fázisból 3 x 160 ml DKM-mel kiráztam, az egyesített szerves fázisokat telített NaCl oldattal összeráztam, az elválasztott szerves fázist MgSO₄-on szárítottam, majd vákuumban bepároltam. A szilárd anyagot DIPÉ-vel eldörzsöltem és kiszűrtem.

Termék: 6,53 g por. Kitermelés: 87,6 %. Olvadáspont: 76,0 - 77,2 °C. Irodalmi olvadáspont: 77 - 78 °C [123]

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 10,37 (s, 1H), 8,70-8,73 (m, 2H), 7,09 (d, *J* = 7,72 Hz, 1H) 6,88 (d, *J* = 8,02 Hz, 1H), 6,48-6,63 (m, 3H), 3,74-3,75 (m, 1H), 2,90 (dd, *J*¹ = 10,20 Hz, *J*² = 4,82 Hz, 1H), 2,77 (dd, *J*¹ = 10,20 Hz, *J*² = 6,63 Hz, 1H), 2,05-2,37 (m, 3H).

LCMS *m/z* 191 (M + H)⁺, Rt: 0,46 és 1,45 min.

***tert*-Butil-[[*(S)*-2-hidroxi-1-(1*H*-indol-3-ilmetil)etil]karbamát} (**13**) előállítása**



6,50 g (34,21 mmol) **12** redukált triptofán-származékot gömblombikban feloldottam 130 ml 1,4-dioxánban, hozzáadtam 7,46 g (34,22 mmol) di-*tert*-butoxikarbonilkarbonátot, és szobahőmérsékleten kevertetem 24 órát. Az oldatot vákuumban bepároltam. A szilárd anyagot DIPÉ-vel eldörzsöltem és kiszűrtem.

Termék: 8,90 g sárga kristályos anyag. Kitermelés: 89,7 %. Olvadáspont: 122,2 - 124,1 °C. Irodalmi olvadáspont: 122 - 123 °C [124]

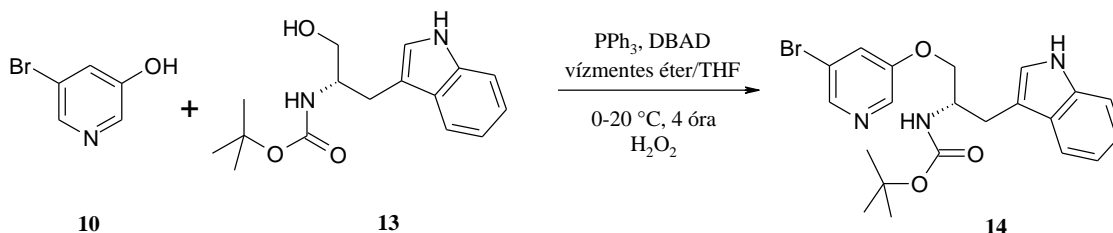
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 10,74 (s, 1H), 7,57 (d, *J* = 7,71 Hz, 1H), 7,32 (d, *J* = 7,92, 1H), 7,02-7,06 (m, 2H), 6,96 (t, *J* = 7,29 Hz, 1H), 6,48 (d, *J* = 7,89 Hz, 1H),

4,60 (t, $J = 5,49$ Hz, 1H), 3,63-3,66 (m, 1H), 3,35-3,38 (m, 2H), 2,85-2,89 (m, 1H), 2,67-2,70 (m, 1H), 1,35 (s, 9H).

LCMS m/z 291 ($M + H$)⁺, Rt: 3,34 min.

tert-Butil-((*S*)-2-[(5-brómpiridin-3-il)oxi]-1-(1*H*-indol-3-ilmetil)etil}karbamát)

(14) előállítása



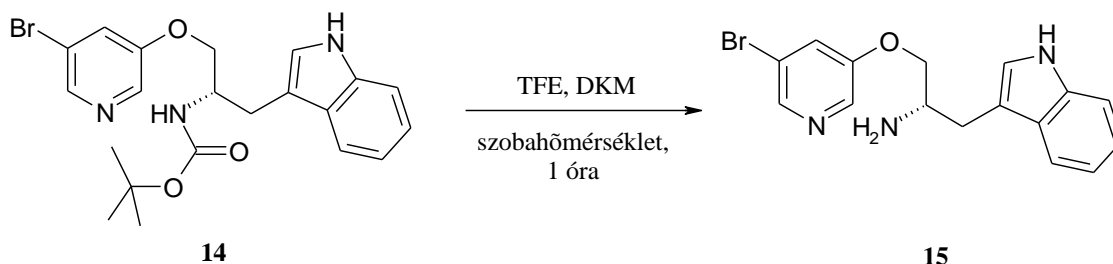
6,48 g (24,73 mmol) trifenilfoszfánt gömblombikban feloldottam 40 ml vízmentes dietil-éter és 8 ml vízmentes THF elegyében, majd argon atmoszférában, jeges hűtés közben hozzáadtam 5,70 g (24,78 mmol) DBAD-t, és az elegyet 20 percig kevertettem. Hozzáadtam 6,64 g (22,90 mmol) **13** triptofanolt, és tovább kevertettem 20 percet. Hozzáadtam 3,98 g (22,87 mmol) **10** hidroxipiridin származékot, és a reakcióelegyet hagytam felmelegedni szobahőmérsékletre. 4 óra után tíz csepp 30 %-os hidrogén-peroxidot adtam az elegyhez, és 20 ml vizet hozzáadva kevertettem 15 percet. A reakcióelegyet 10 ml etil-acetáttal kiráztam. A szerves fázist telített NaCl oldattal összeráztam, az elválasztott szerves fázist MgSO₄-on szárítottam, majd vákuumban bepároltam. A maradékot oszlopkromatográfiával tisztítottam (töltet: 300 g Szilikagél 60, eluens: hexán:etil-acetát: 1:1).

Termék: 5,10 g sárga por. Kitermelés: 49,9 %. Olvadáspont: 74,0 - 75,9 °C. Irodalmi olvadáspont: nem található adat.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 10,81 (s, 1H), 8,27 (s, 2H), 7,63-7,66 (m, 1H), 7,56 (d, $J = 7,69$, 1H), 7,33 (d, $J = 8,50$, 1H), 7,14 (br s, 1H), 7,06 (t, $J = 7,34$ Hz, 1H), 6,95-6,98 (m, 2H), 4,02-4,06 (m, 3H), 2,91-2,94 (m, 2H), 1,36 (s, 9H).

LCMS m/z 446 ($M + H$)⁺, Rt: 4,37 min.

(S)-1-[(5-Brómpiridin-3-il)oxi]-3-(1H-indol-3-il)propán-2-amin (15) előállítása



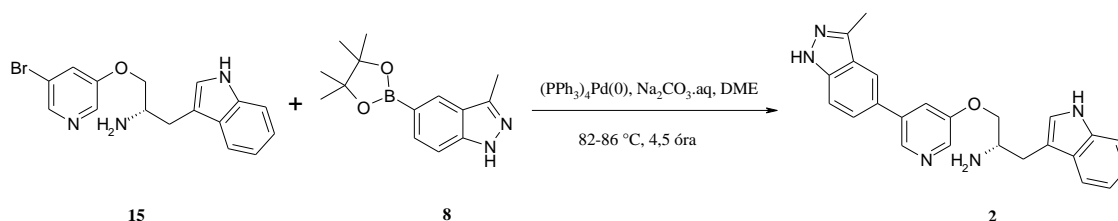
4,50 g (10,09 mmol) **14** *t*-Boc védett származék kiindulási anyagot gömblombikban feloldottam 15 ml DKM-ben, majd keverés közben hozzáadtam 15 ml TFE-t. Egy órás szobahőmérsékletű keverés után az oldatot vákuumban bepároltam. A maradékot vízmentes etil-acetátban oldottam, majd sósavval telített etil-acetátot adtam hozzá. A kivált kristályokat vákuumban szűrtem, anyalúggal kétszer, etil-acetáttal és dietil-éterrel egyszer mostam. A kristályokat exszikkátorban, foszfor-pentoxid felett tömegállandóságig szárítottam. A további veszteség elkerülése érdekében a terméket további tisztítás nélkül használtuk fel.

Termék: 1,20 g kristályos anyag/por. Kitermelés: 31,1 %.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 11,03 (s, 1H), 8,37 (br s, 2H), 8,33-8,35 (m, 2H), 7,71-7,72 (m, 1H), 7,62 (d, $J = 7,83$ Hz, 1H), 7,38 (d, $J = 8,04$ Hz, 1H), 7,28 (d, $J = 2,07$ Hz, 1H), 7,10 (t, $J = 7,80$ Hz, 1H), 7,00 (t, $J = 7,23$ Hz, 1H), 4,39 (dd, $J^1 = 10,47$ Hz, $J^2 = 2,82$ Hz, 1H), 4,10-4,15 (m, 1H), 3,76 (br s, 1H), 3,10-3,20 (m, 2H).

LCMS m/z 346 ($M + H$) $^+$, Rt: 3,36 min (III. eljárás).

(S)-1-(1H-Indol-3-il)-3-[[5-(3-metil-1H-indazol-5-il)piridin-3-il]oxi]propán-2-amin (2) előállítása



384 mg (1,00 mmol) **15** brómvegyületet argonnal kiöblített kétnyakú gömblombikban feloldottam 10 ml DME-ben, és hozzáadtam 124 mg (1,17 mmol) vízmentes Na₂CO₃-ot, 94 mg (0,08 mmol) (PPh₃)₄Pd(0) katalizátort, és szobahőmérsékleten kevertettem 20 percet. Hozzáadtam 302 mg (1,17 mmol) **8** boronsav-észtert és 2,0 ml vizes oldatban

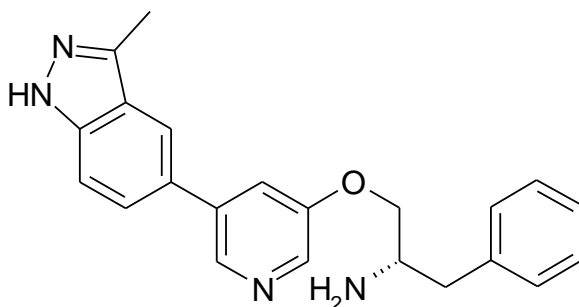
248 mg (2,34 mmol) vízmentes Na₂CO₃-ot. 82 - 86 °C-on kevertetem 4,5 órát. Az elegyet vákuumban bepároltam. A maradékot oszlopkromatográfiásan tisztítottam (töltet: 33 g Szilikagél 60, eluens: kloroform : metanol: 8:1).

Termék: 41 mg fehér kristályos anyag. Kitermelés: 10,3 %. Olvadáspont: 118,9 - 120,5 °C. Irodalmi olvadáspont: nem található adat.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,75 (s, 1H), 10,88 (s, 1H), 8,54 (s, 1H), 8,32 (s, 1H), 8,27 (d, *J* = 2,43 Hz, 1H), 8,08 (s, 1H), 7,64 (m, 2H), 7,56 (t, *J* = 7,26 Hz, 2H), 7,34 (d, *J* = 7,95 Hz, 1H), 7,21-7,22 (m, 2H), 7,06 (d, *J* = 7,42 Hz, 1H), 6,96 (d, *J* = 7,38 Hz, 1H), 4,02-4,08 (m, 2H), 3,44 (m, 1H), 2,99 (dd, *J*¹ = 14,19 Hz, *J*² = 6,00 Hz, 1H), 2,86 (dd, *J*¹ = 14,23 Hz, *J*² = 7,11 Hz, 1H), 2,49 (s, 3H).

LCMS *m/z* 398 (M + H)⁺, Rt: 3,04 min (III. eljárás).

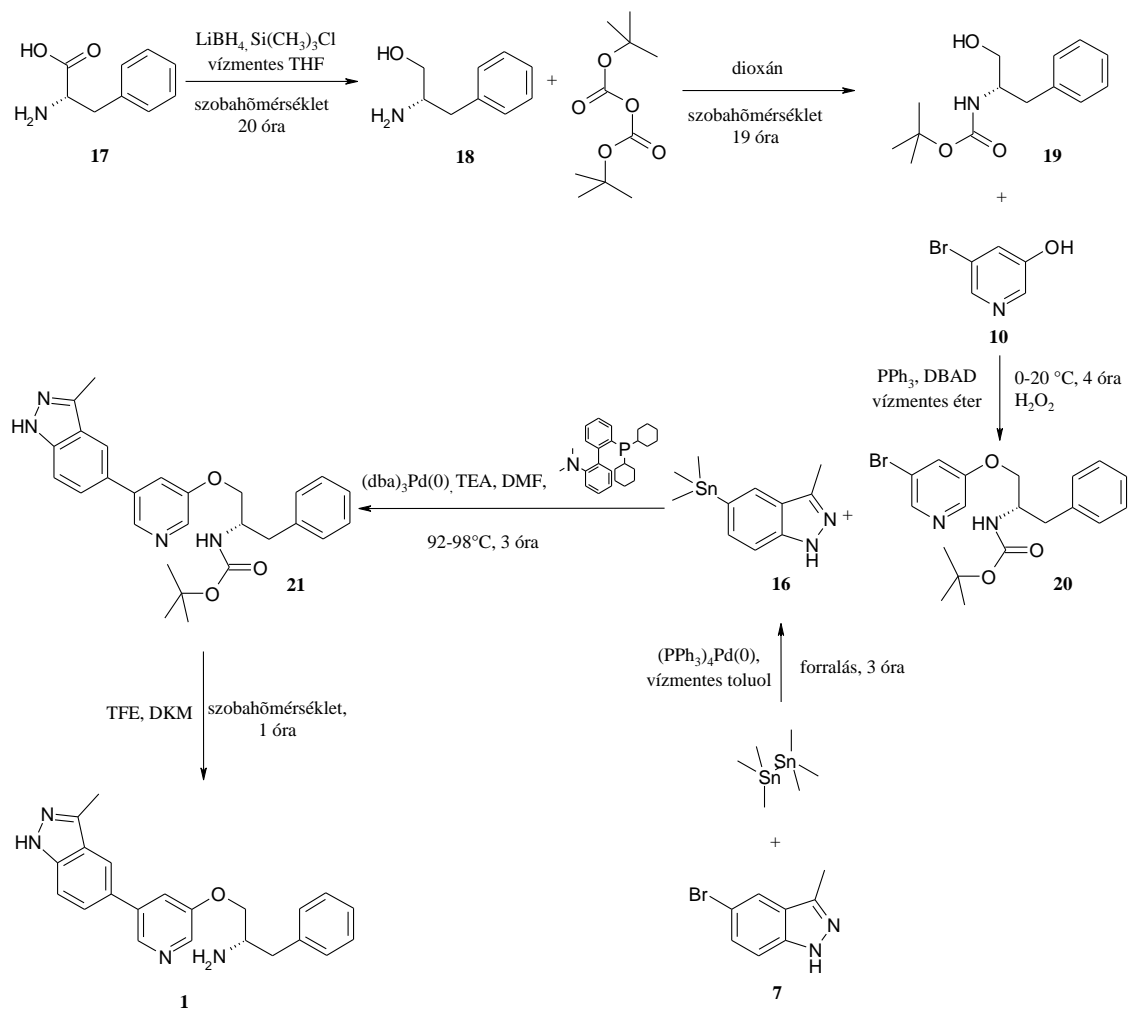
4.3.2. Az A-674563 (S)-1-[[5-(3-metil-1*H*-indazol-5-il)piridin-3-il]oxi]-3-fenilpropán-2-amin (1) előállítás



A-674563

1

A vegyületet szintén három szerkezeti elem összekapcsolásával állítottam elő. A különbség a két szintézis út között, hogy ebben az esetben Suzuki-kapcsolás helyett Stille-kapcsolást alkalmaztam, illetve a védőcsoport levételére más szintetikus fázisban került sor. Ebben az esetben kisebb mértékben tértem el az irodalmi szintézis úttól (21. ábra).



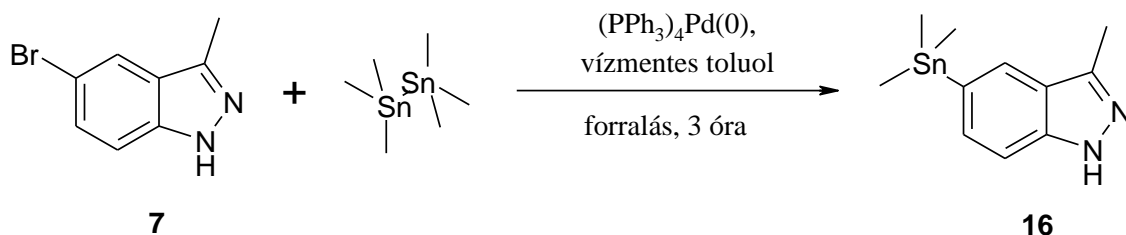
21. ábra. Az A-674563 (**1**) vegyület előállítása.

A Stille-kapcsoláshoz a **7** indazol vegyület **16** trimetilsztannil-származékát kellett előállítani, amit hexametildisztannánnal szintetizáltam vízmentes toluolban, $(\text{PPh}_3)_4\text{Pd}(0)$ katalizátort használva. [115]

Az *N*-*t*-Boc-2-amino-3-fenilpropán-1-ol (**19**) szintézisét L-fenilalaninból (**17**) kiindulva végeztem. Az előállítás az L-triptofánból kiinduló származék analógiájára történt.

A *t*-Boc-védőcsoportot nem távolítottuk el a Mitsunobu-reakció után, csak a Stille-kapcsolást követően. A Stille-kapcsolást $(\text{dba})_3\text{Pd}_2(0)$ katalizátort használva végeztem DMF-ben, trietilamin bázis és 2-diciklohexilfoszfano-2'-(*N,N*-dimetilamino)bifenil jelenlétében 95 °C-on. [115]

3-Metil-5-(trimetilsztannil)-1H-indazol (16) előállítása



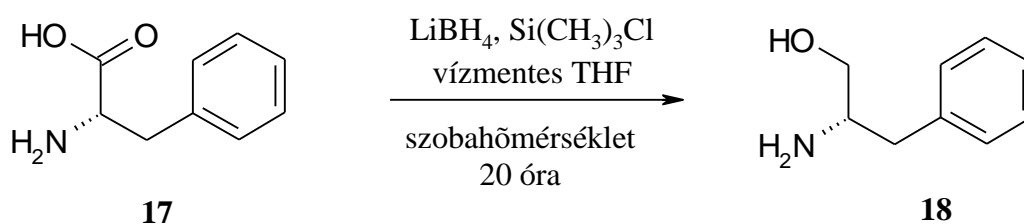
4,00 g (18,96 mmol) **7** indazol vegyületet argonnal kiöblített kétnyakú gömblombikban feloldottam 60 ml vízmentes toluolban, 2,02 g (1,75 mmol) $(\text{PPh}_3)_4\text{Pd}(0)$ katalizátort hozzáadtam, és kevertettem 30 percet szobahőmérsékleten, argon atmoszférában. Hozzáadtam 6,22 g (18,96 mmol) hexametildisztannánt, és 3 órát forraltam. Az elegyet lehűtöttem, celiten szűrtem, és 4 x 20 ml toluollal mostam. A szűrletet vákuumban bepárooltam, a maradékot oszlopkromatográfiával tisztítottam (töltet: 130 g Szilikagél 60, eluens: hexán:etil-acetát: 1:1).

Termék: 3,83 g rózsaszín kristályos anyag. Kitermelés: 68,4 %. Olvadáspont: 144,9-146,2 °C. Irodalmi olvadáspont: nem található adat.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 12,52 (s, 1H), 7,79 (s, 1H), 7,44 (d, $J = 8,13$ Hz, 1H), 7,38 (d, $J = 8,13$ Hz, 1H), 2,49 (s, 3H), 0,29 (s, 9H).

LCMS m/z 293 ($\text{M} + \text{H}$)⁺, Rt: 4,33 min.

(S)-2-Amino-3-fenilpropán-1-ol (18) előállítása



2,80 g (127,27 mmol) lítium-[tetrahidrido-borát(III)]-ot gömblombikban feloldottam 90 ml vízmentes THF-ben és szobahőmérsékleten hozzácsepegtettem 30 ml (238,61 mmol) klór-trimetilszilánt. Ezután hozzáadtam 10,00 g (60,61 mmol) **17** L-fenilalanin aminosavat egy adagban. A fehér szuszpenzót 20 órán át kevertettem szobahőmérsékleten. Az elegyhez addig adtam metanolt, amíg gázfejlődés volt tapasztalható (körülbelül 60 ml), ezután az elegyet vákuumban bepárooltam. A maradékot 200 ml 3,6 N NaOH-ban oldottam. Az anyagot 3 x 200 ml DKM-mel

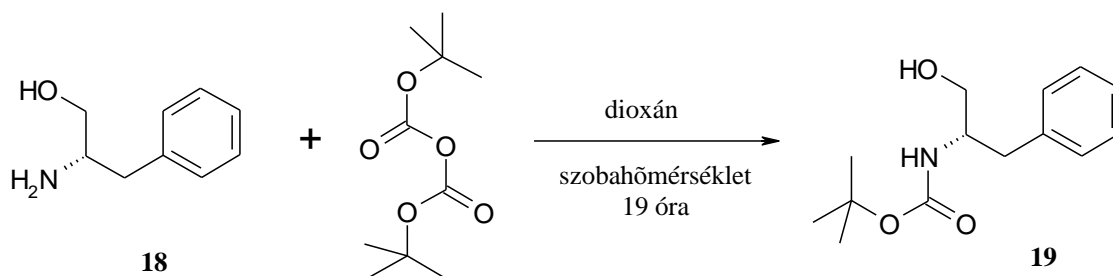
kiráztam, az egyesített szerves fázisokat telített NaCl oldattal összeráztam, az elválasztott szerves fázist MgSO₄-on szárítottam, majd vákuumban bepároltam. A szilárd anyagot DIPÉ-vel eldörzsöltem és kiszűrtem.

Termék: 4,14 g fehér kristályos anyag. Kitermelés: 45,2 %. Olvadáspont: 87,8 - 89,6 °C. Irodalmi olvadáspont: 91 - 92 °C [125]

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 7,21–7,19 (m, 2H), 7,12–7,70 (m, 3H), 3,88–3,85 (m, 1H), 3,64–3,62 (m, 2H), 3,10–3,08 (m, 1H), 2,91–2,90 (m, 1H), 2,66–2,64 (m, 1H), 2,00 (br s, 2H).

LCMS *m/z* 152 (M + H)⁺, Rt: 0,46 min.

tert-Butil-[[*(S)*-1-benzil-2-hidroxietyl]karbamát} (19) előállítása



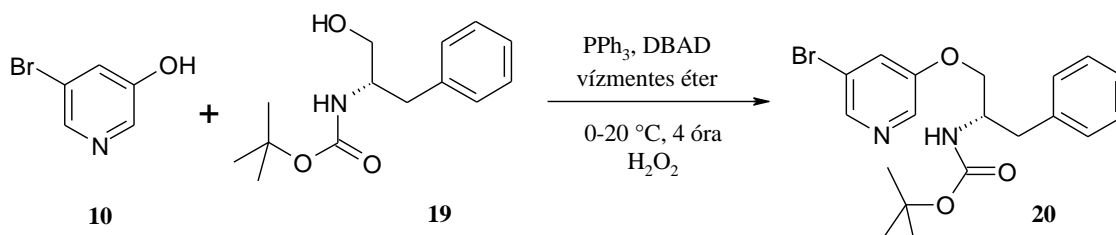
2,04 g (13,51 mmol) **18** fenilalaninolt gömblombikban feloldottam 160 ml 1,4-dioxánban. Hozzáadtam 2,95 g (13,53 mmol) di-*tert*-butoxikarbonil-karbonátot, és szobahőmérsékleten kevertettem 19 órát. Az oldatot vákuumban bepároltam. A szilárd anyagot DIPÉ-vel eldörzsöltem és kiszűrtem.

Termék: 3,01 g fehér kristályos anyag. Kitermelés: 88,8 %. Olvadáspont: 93,2 - 94,1 °C. Irodalmi olvadáspont: 94 - 95 °C [126]

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,60-8,62 (m, 1H), 7,15–7,28 (m, 5H), 4,71-4,72 (m, 1H), 3,64-3,66 (m, 1H), 3,26–3,60 (m, 2H), 2,79–2,84 (m, 2H), 1,31 (s, 9H).

LCMS *m/z* 252 (M + H)⁺, Rt: 3,36 min.

***tert*-Butil-((*S*)-1-benzil-2-[(5-brómpiridin-3-il)oxi]etil)karbamát (20) előállítása**



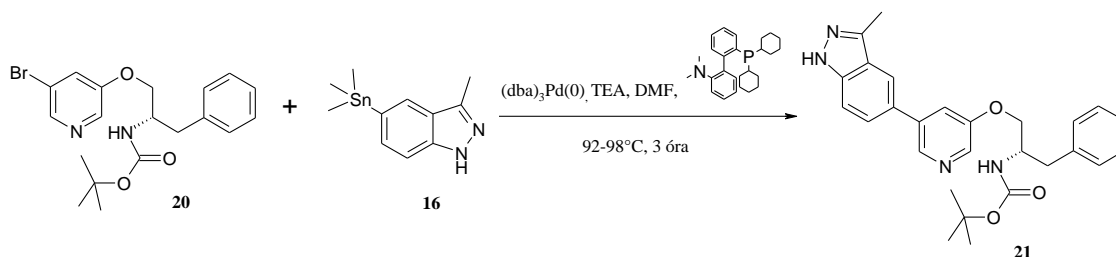
3,40 g (12,98 mmol) trifenilfoszfánt gömblombikban feloldottam 20 ml vízmentes dietil-éterben, majd argon atmoszférában, jeges hűtés közben hozzáadtam 2,99 g (13,00 mmol) DBAD-t, és az elegyet 20 percig kevertettem. Hozzáadtam 3,01 g (11,99 mmol) **19** hidroxi-vegyületet, és tovább kevertettem 15 percet. Hozzáadtam 2,09 g (12,01 mmol) **10** fenolos hidroxi-vegyületet, és a reakcióelegyet hagytam felmelegedni szobahőmérsékletre. 4 óra után tíz csepp 30 %-os hidrogén-peroxidot adtam az elegyhez, és 20 ml vizet hozzáadva kevertettem 15 percet. A reakcióelegyet 10 ml etil-acetáttal kiráztam. A szerves fázist telített NaCl oldattal összeráztam, az elválasztott szerves fázist MgSO_4 -on szárítottam, majd vákuumban bepároltam. A maradékot oszlopkromatográfiával tisztítottam (töltet: 470 g Szilikagél 60, eluens: hexán:etil-acetát: 1:1).

Termék: 2,23 g fehér kristályos anyag. Kitermelés: 45,7 %. Olvadáspont: 81,3 - 82,8 °C. Irodalmi olvadáspont: nem található adat.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 8,36-8,37 (m, 1H), 8,14-8,15 (m, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,19-7,30 (m, 5H), 4,75 (br s, 1H), 4,18-4,20 (m, 1H), 3,79-3,81 (m, 2H), 2,92-2,94 (m, 2H), 1,45 (s, 9H).

LCMS m/z 407 ($\text{M} + \text{H}$)⁺, Rt: 4,56 min.

***tert*-Butil-[[(*S*)-1-benzil-2-[[5-(3-metil-1*H*-indazol-5-il)-piridin-3-il]oxi]etil]karbamát (21) előállítása**



2,23 g (5,48 mmol) **20** brómvegyületet feloldottam argonnal kiöblített kétnyakú gömblombikban 35 ml DMF-ben, hozzáadtam 0,50 g (0,55 mmol) (dba)₃Pd₂(0) katalizátort és 0,22 g (0,55 mmol) 2-diciklohexilfoszfano-2'-(*N,N*-dimetilamino)bifenilt, majd az elegyet egy órán át szobahőmérsékleten kevertetem. Hozzáadtam 1,50 g (5,08 mmol) **16** trimetilsztannil-vegyületet és 0,78 ml (5,57 mmol) TEA-t. A reakcióelegyet 3 órán át 92 - 98 °C-on kevertetem. A reakcióelegyet hagytam szobahőmérsékletűre lehűlni, celiten szűrtem, 4 x 15 ml DMF-fel mostam, a szűrleteket egyesítettem és az elegyet vákuumban bepároltam. A maradékot oszlopkromatográfiával tisztítottam (töltet: 150 g Szilikagél 60, eluens: hexán:etil-acetát: 1:1).

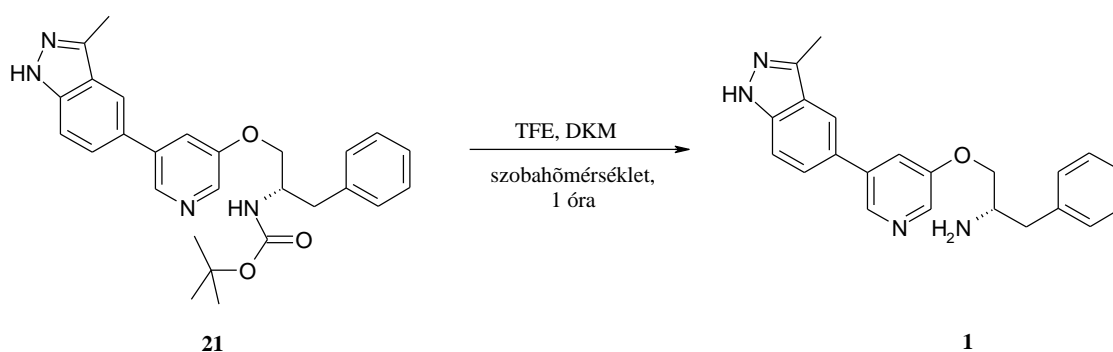
Termék: 1,50 g halványsárga olajos anyag. Kitermelés: 59,9 %.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,71 (s, 1H), 8,55 (s, 1H), 8,25 (s, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,71 (s, 1H), 7,67-7,76 (m, 1H), 7,55 (d, *J* = 8,52 Hz, 1H), 7,16-7,32 (m, 5H), 7,02 (d, *J* = 8,11 Hz, 1H), 4,00-4,15 (m, 3H), 2,88-2,99 (m, 1H), 2,71-2,82 (m, 1H), 2,55 (s, 3H), 1,32 (s, 9H).

LCMS *m/z* 459 (M + H)⁺, Rt: 3,68 min.

(S)-1-{{5-(3-Metil-1*H*-indazol-5-il)piridin-3-il}oxi}-3-fenilpropán-2-amin (1)

előállítás



1,50 g (3,28 mmol) **21** *t*-Boc védett származék kiindulási anyagot gömblombikban 5 ml DKM-ben feloldottam, majd 5 ml TFE hozzáadva egy órát kevertetem szobahőmérsékleten. Az elegyet vákuumban bepároltam, a maradékot 20 ml vízben oldottam, NaHCO₃-tal semlegesítettem és 4 x 20 ml etil-acetáttal kiráztam. Az egyesített szerves oldatot megszűrtem, MgSO₄-on szárítottam és sósavval telített etil-acetáttal sósav sót képeztem. A kiváló halványsárga kristályokat kiszűrtem és IPA-ban

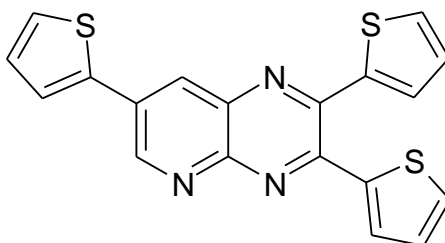
átkristályosítottam. Szűrés után a kristályokat exszikkátorban tömegállandóságig szárítottam.

Termék: 166 mg halványsárga kristályos anyag. Kitermelés: 14,6 %. Olvadáspont: 186,0 - 187,9 °C. Irodalmi olvadáspont: nem található adat.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 8,79 (d, $J = 1,50$, 1H), 8,52 (br s, 2H), 8,47 (d, $J = 1,26$, 1H), 8,20 (s, 1H), 8,10 (br s, 1H), 7,68 (dd, $J^1 = 47,4$ Hz, $J^2 = 9,30$ Hz, 2H), 7,25-7,40 (m, 5H), 4,38-4,42 (m, 1H), 4,16-4,28 (m, 1H), 3,70-3,82 (m, 1H), 2,99-3,12 (m, 2H), 2,56 (s, 3H).

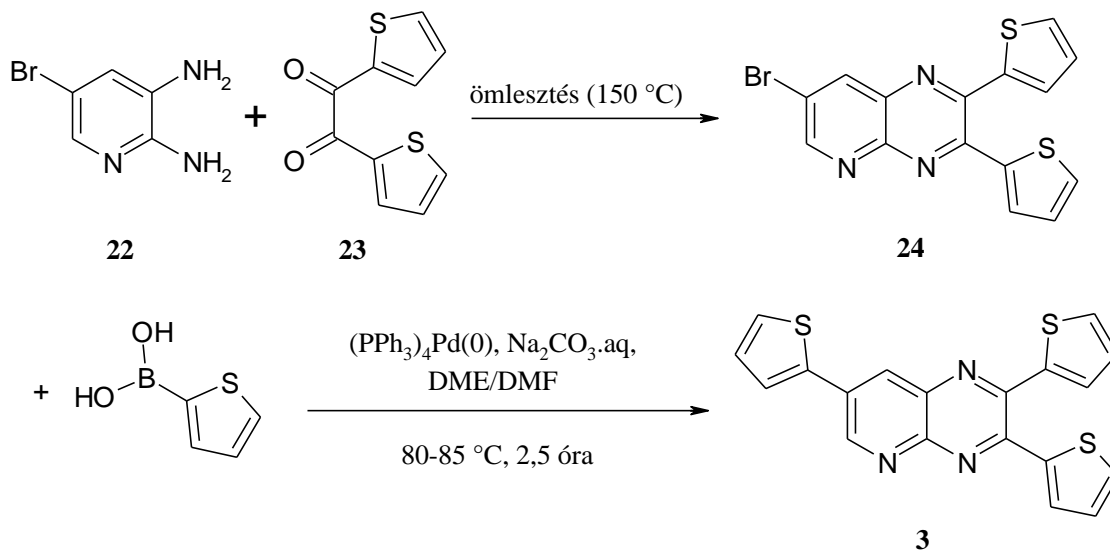
LCMS m/z 359 ($\text{M} + \text{H}$)⁺, Rt: 0,48 és 2,03 min.

4.3.3. A 2,3,7-Tri(2-tienil)pirido[2,3-*b*]pirazin (3) előállítása



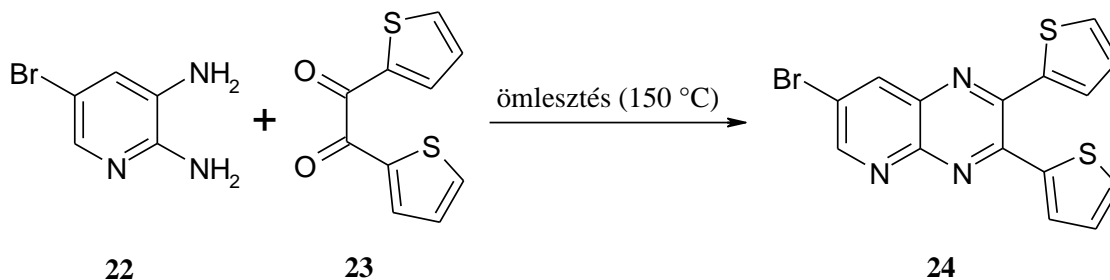
3

A vegyület előállítását két lépésben végeztem: először a pirido[2,3-*b*]pirazin gyűrűrendszert alakítottam ki 5-brómpiridin-2,3-diamin (**22**) és 1,2-di(2-tienil)etándion (**23**) 150 °C-os ömlesztéssel végzett kondenzációjával. A terméket további feldolgozás és tisztítás nélkül használtam fel. Ezután az így kapott szubsztituált **24** 7-brómpirido[2,3-*b*]pirazin vegyület bróm-szubsztituensét Suzuki-rakcióban DME és DMF oldószerkelegyen, $(\text{PPh}_3)_4\text{Pd}(0)$ katalizátort használva, Na_2CO_3 bázis vizes oldatával, inert atmoszférában a megfelelő boronsav vegyülettel 2-tienil-csoportra cseréltem (22. ábra). [96]



22. ábra. A 3 vegyület előállítása.

7-bróm-2,3-di(2-tienil)pirido[2,3-*b*]pirazin (24) előállítása



510 mg (2,71 mmol) **22** diamin-vegyület és 602 mg (2,71 mmol) **23** dioxo-vegyület keverékét gömblombikban megömlesztettem 150 °C-on. A visszahűtött olvadék megszilárdult. A terméket további feldolgozás és tisztítás nélkül használtam fel.

Termék: 1,01 g zölde barna por. Kitermelés: 99 %. Olvadáspont: 181,1 - 182,5 °C.

Irodalmi olvadáspont: nem található adat.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 9,17 (d, $J = 2,40$ Hz, 1H), 8,82 (d, $J = 2,40$ Hz, 1H), 7,86-7,90 (m, 2H), 7,34 (d, $J = 3,57$ Hz, 1H), 7,31 (d, $J = 3,12$ Hz, 1H), 7,10-7,18 (m, 2H).

LCMS m/z 374 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$, Rt: 4,62 min.

2,3,7-Tri(2-tienil)pirido[2,3-*b*]pirazin (3) előállítása



446 mg (1,19 mmol) **24** bróm-vegyületet argonnal kiöblített kétnyakú gömblombikban feloldottam 15 ml DME és 2 ml DMF elegyében és hozzáadtam 111 mg (0,10 mmol) $(\text{PPh}_3)_4\text{Pd}(0)$ katalizátort. Szobahőmérsékleten kevertettem 15 percet, majd hozzáadtam 188 mg (1,47 mmol) (2-tienil)-boronsavat és 336 mg (3,17 mmol) Na_2CO_3 -ot 1,5 ml vizes oldatban. A reakcióelegyet 2,5 órán át kevertettem 80 - 85 °C-on. Az elegyet lehűtöttem, majd 10 ml etil-acetátot adtam hozzá, és celiten szűrtem, 4 x 5 ml etil-acetáttal mostam. Az egyesített etil-acetátos fázisokat telített Na_2CO_3 és NaCl oldattal kiráztam. A szerves fázist MgSO_4 , Szilikagél (750 mg) és aktív szén (30 mg) hozzáadása után kevertettem, szűrtem, és vákuumban bepároltam. A szilárd anyagot DIPÉ-vel eldörzsöltem és kiszűrtem.

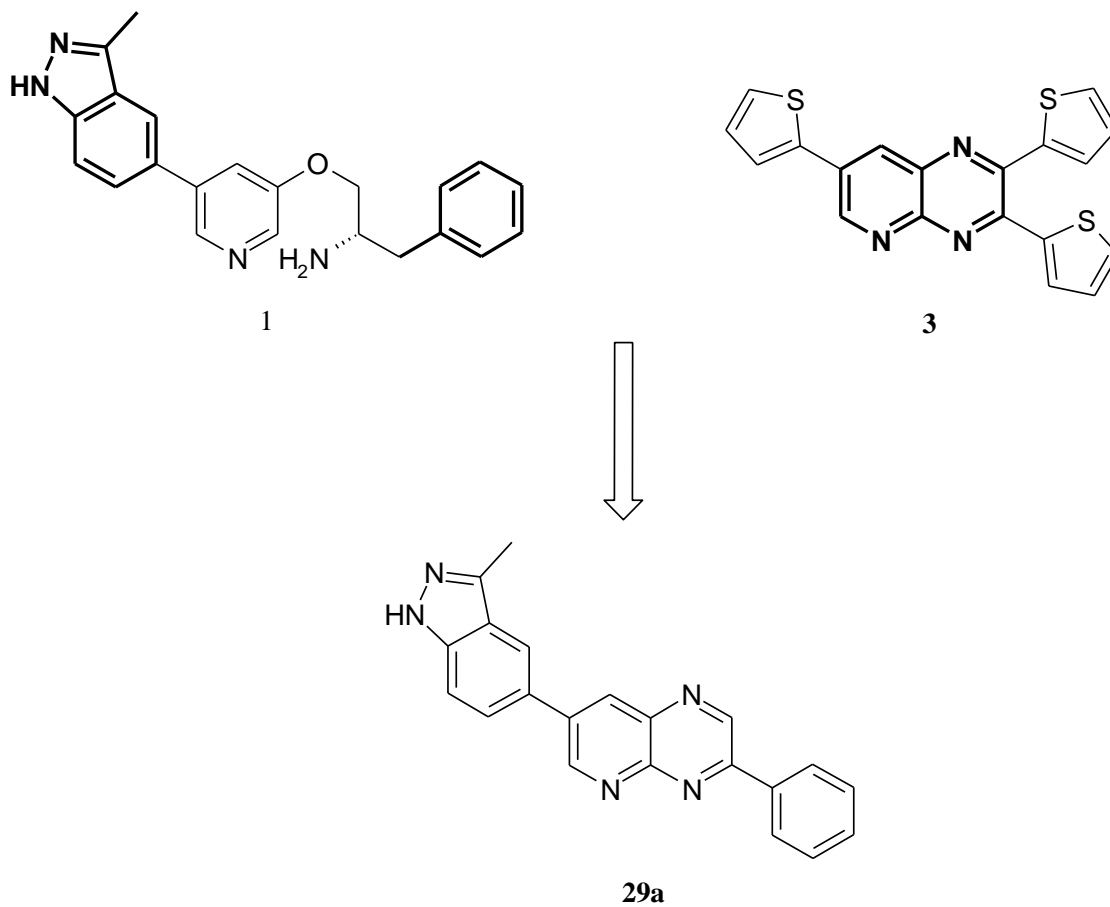
Termék: 316 mg rozsdabarna por. Kitermelés: 70,6 %. Olvadáspont: 215,3 - 216,9 °C. Irodalmi olvadáspont: nem található adat.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 9,39 (d, $J = 2,37$ Hz, 1H), 8,52 (d, $J = 2,37$ Hz, 1H), 7,63 (d, $J = 3,63$ Hz, 1H), 7,56 (t, $J = 5,30$ Hz, 2H), 7,49 (d, $J = 5,04$ Hz, 1H), 7,41 (t, $J = 3,17$ Hz, 2H), 7,21 (t, $J = 4,35$ Hz, 1H), 7,09 (t, $J = 4,39$ Hz, 1H), 7,04 (t, $J = 4,39$ Hz, 1H).

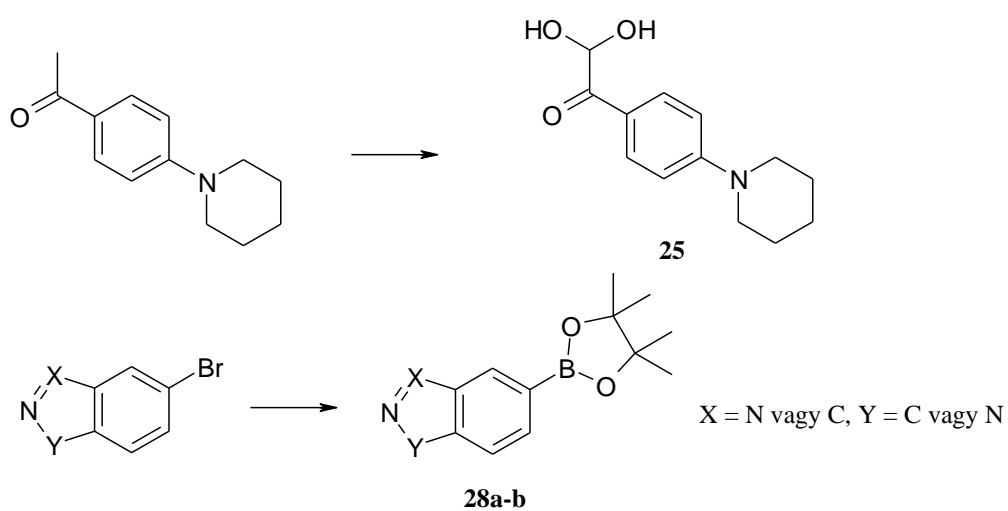
LCMS m/z 378 ($\text{M} + \text{H}$)⁺, Rt: 4,84 min.

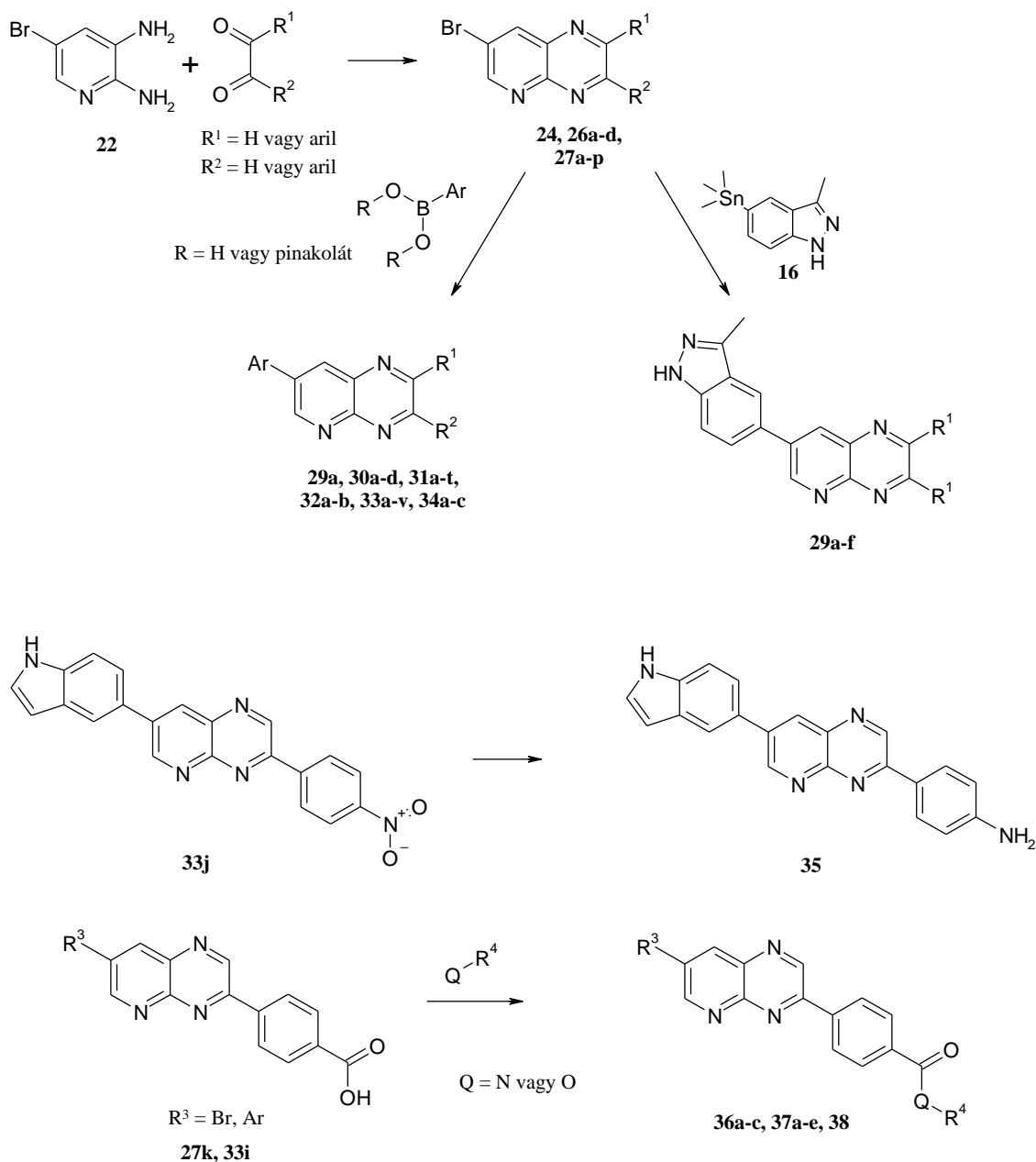
4.4. Az irodalomból ismert kinázgátló hatású anyagok szerkezetének kombinálása új származékok tervezéséhez, és fókuszált vegyülettár előállítása az új szerkezet köré

Az irodalmi adatok alapján Akt gátló hatású **1** A-674563 számú vegyület és a **3** pirido[2,3-*b*]pirazin vegyület szerkezetét kombinálva új típusú vegyületet terveztem (**29a**) (23. ábra). Ez a vegyület szolgált alapszerkezetként a későbbi származékok előállításához. Az alapváz szubsztituenseit változtatva fókuszált vegyülettárat állítottam elő (24. ábra).



23. ábra. Új szerkezet származtatása ismert Akt kinázgátló anyagok szerkezetéből.

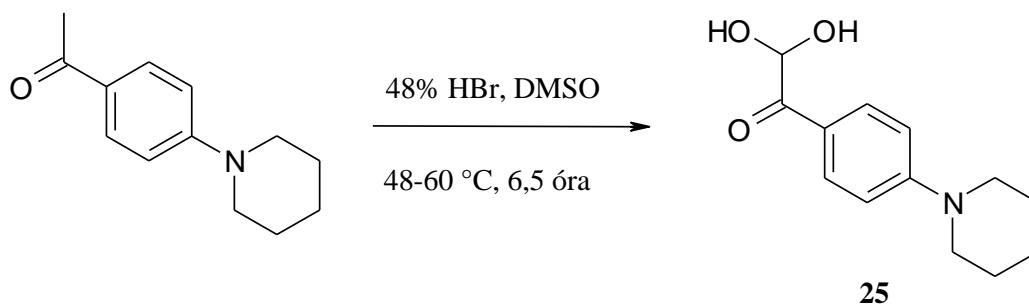




24. ábra. Szabadalmazható származékok általános előállítási sémája.

4.4.1. A [4-(piperidin-1-il)fenil]etándion monohidrát (25) előállítása

A kereskedelemben nem beszerezhető [4-(piperidin-1-il)fenil]etándion előállításánál a kereskedelemben beszerezhető 1-[4-(piperidin-1-il)fenil]etanonból indultam ki. Irodalmi módszer szerint 48 %-os vizes hidrogén-bromidot használva, DMSO oldatban végzett oxidációval állítottam elő a **25** vegyület, melyet monohidrát formájában izoláltam. [127, 128]



3,00 g (14,78 mmol) 1-[4-(piperidin-1-il)fenil]etanont háromnyakú csiszolatos gömblombikban feloldottam 33 ml DMSO-ban. Az oldatot felmelegítettem 45 - 50 °C-ra, majd hozzácepegettem 5,00 ml (44,15 mmol) 48 %-os vizes hidrogén-bromidot, ügyelve, hogy a hőmérséklet ne emelkedjen 60 °C fölé. Az elegyet 58 - 75 °C-on kevertetem 2,5 - 5 órát. A reakcióelegyet jégre öntöttem, és kétszer kiráztam 30 ml etil-acetáttal. Az etil-acetátos fázist 20 ml telített NaCl oldattal mostam, MgSO₄-on szárítottam, majd vákuumban bepároltam. A szilárd anyagot DIPÉ-vel eldörzsöltem és kiszűrtem.

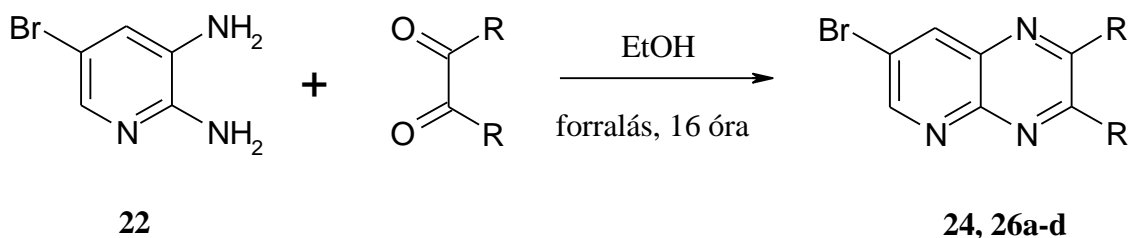
Termék: 1,48 g narancssárga por. Kitermelés: 46,3 %. Olvadáspont: 95,4 - 97,7°C. Irodalmi olvadáspont: nem található adat.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆ + TFE) δ ppm 9,56 (s, 1H), 7,93-7,96 (m, 2H), 6,99-7,02 (m, 2H), 3,45-3,48 (m, 2H), 1,52-1,69 (m, 8H).

LCMS *m/z* 236 (M + H)⁺, Rt: 3,09 min (III. eljárás).

4.4.2. Diszubsztituált 7-brómpirido[2,3-*b*]pirazin származékok előállítása

A pirido[2,3-*b*]pirazin gyűrűrendszert a megfelelő, szimmetrikus, vicinális dioxo-vegyület és a **22** diamin-vegyület etanolos forralással végzett kondenzációjával alakítottam ki.



A dioxo-vegyületből (1 mmol) gömblombikban 0,4 M-os etanolos oldatot készítettem, hozzáadtam 0,95 ekvivalens 5-brómpiridin-2,3-diamint, majd 16 órát forraltam. Az

elegyet lehűtöttem, szűrtem, etanollal mostam, és exsikkátorban, foszfor-pentoxid felett tömegállandóságig szárítottam.

Az így előállított termékek:

7-bróm-2,3-difenilpirido[2,3-*b*]pirazin (26a)

Termék: 213 mg halványsárga por. Kitermelés: 62,0 %. Olvadáspont: 149,1 - 149,6 °C.

Irodalmi olvadáspont: 150-152 °C [129]

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,26 (d, *J* = 1,53 Hz, 1H), 8,95 (d, *J* = 1,47 Hz, 1H), 7,48-7,53 (m, 4H), 7,36-7,45 (m, 6H).

LCMS *m/z* 362 (M + H)⁺, Rt: 4,61 min.

7-bróm-2,3-bisz(4-metilfenil)pirido[2,3-*b*]pirazin (26b)

Termék: 270 mg drapp színű por. Kitermelés: 72,7 %. Olvadáspont: 157,3 - 158,3 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,22 (d, *J* = 2,37 Hz, 1H), 8,90 (d, *J* = 2,37 Hz, 1H), 7,43 (d, *J* = 8,01 Hz, 2H), 7,40 (d, *J* = 7,98 Hz, 2H), 7,21 (d, *J* = 8,00 Hz, 4H), 2,34 (s, 6H).

LCMS *m/z* 390 (M + H)⁺, Rt: 5,12 min.

7-bróm-2,3-bisz(4-fluorfenil)pirido[2,3-*b*]pirazin (26c)

Termék: 304 mg halványsárga por. Kitermelés: 80,4 %. Olvadáspont: 161,5 - 162,5 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,26 (d, *J* = 2,40 Hz, 1H), 8,95 (d, *J* = 2,40 Hz, 1H), 7,52-7,61 (m, 4H), 7,26 (t, *J* = 8,87 Hz, 4H).

LCMS *m/z* 398 (M + H)⁺, Rt: 4,68 min.

2,2'-(7-brómpirido[2,3-*b*]pirazin-2,3-diil)bisz(4-brómfenol) (26d)

Termék: 332 mg citromsárga színű por. Kitermelés: 63,3 %. Olvadáspont: 255,0 - 256,5 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,92 (br s, 2H), 9,27 (d, *J* = 2,08 Hz, 1H), 8,97 (d, *J* = 2,28, 1H), 7,50-7,55 (m, 2H), 7,33-7,37 (m, 2H), 6,67-6,71 (m, 2H).

LCMS *m/z* 552 (M + H)⁺, Rt: 4,49 min.

7-bróm-2,3-di(2-tienil)pirido[2,3-*b*]pirazin (24)

Termék: 268 mg zölde barna por. Kitermelés: 75,3 %. Olvadáspont: 181,1 - 182,5 °C.

Irodalmi olvadáspont: nem található adat.

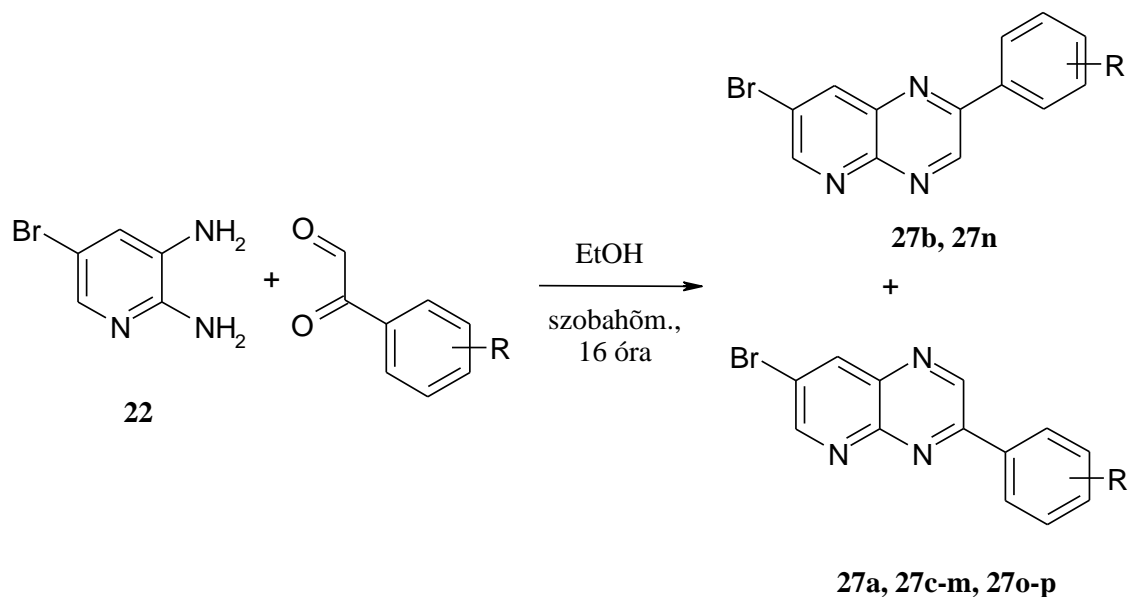
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,17 (d, *J* = 2,40 Hz, 1H), 8,82 (d, *J* = 2,40 Hz, 1H), 7,86-7,90 (m, 2H), 7,34 (d, *J* = 3,57 Hz, 1H), 7,31 (d, *J* = 3,12 Hz, 1H), 7,10-7,18 (m, 2H).

LCMS *m/z* 374 (M + H)⁺, Rt: 4,62 min.

4.4.3. Monoszubsztituált 7-brómpirido[2,3-*b*]pirazin származékok előállítása

Amennyiben a 4.4.2. pontban említett reakciót nem azonos szubsztituensekkel ellátott vicinális dioxo-vegyülettel végezzük (az értekezés tárgyát képező vegyületek esetében az egyik oxo-csoport szénatomja szubsztituálatlan), reakciótermékként két lehetséges regioizomer keletkezik (89. oldal, 25. ábra). Ezen regioizomerek keletkezésének aránya a reakció hőmérsékletével és az oldószer savasságával befolyásolható (lásd 5.2.). Munkám során a kétféle izomer között oldhatósági különbség volt tapasztalható. A 4.4.2. pontban leírt reakcióban használt etanol forráspontján (78 °C) a különböző szubsztituensekkel rendelkező feniletándion-származékokkal végzett kondenzációs reakciók általában minor komponensként a 2 helyzetben helyettesített pirido[2,3-*b*]pirazint eredményezték. A szobahőmérsékleten végzett reakció során mutatkozó nagyobb szelektivitás és az oldhatóságbeli különbség lehetővé tette, hogy az etanolból javarészt kiváló, 3 helyzetben szubsztituált piridopirazin terméket kiszűrés után az esetek többségében tisztán kapjuk meg. Abban az esetben, amikor ilyen módon nem kellő tisztaságú anyagot kaptam, a terméket kromatográfiásan tisztítottam.

A reakcióidőt és a kívánt szelektivitást figyelembe véve a reakciókat az optimálisnak talált szobahőmérsékleten végeztem.



A feniletándion-származékból (1 mmol) gömblombikban 0,4 M-os etanolos oldatot készítettem, hozzáadtam 0,95 ekvivalens **22** diamin-vegyületet, majd 16 órát kevertettem szobahőmérsékleten. Az elegyet lehűtöttem, szűrtem, etanollal mostam, és exsikkátorban, foszfor-pentoxid felett tömegállandóságig szárítottam.

Az így előállított termékek:

A 7-bróm-3-fenilpirido[2,3-*b*]pirazin és a 7-bróm-2-fenilpirido[2,3-*b*]pirazin vegyületeket egy reakcióban állítottuk elő, és preparatív VRK segítségével választottuk el (1 mm PLC Szilikagél 60 F254; eluens: kloroform: metanol 100:1).

7-bróm-3-fenilpirido[2,3-*b*]pirazin (**27a**)

Termék: 201 mg halványsárga por. Kitermelés: 74,0 %. Olvadáspont: 168,6 - 169,5 °C.

Irodalmi olvadáspont: 168 °C [130]

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 9,75 (s, 1H), 9,26 (d, $J = 2,43$ Hz, 1H), 8,91 (d, $J = 2,43$ Hz, 1H), 8,39-8,42 (m, 2H), 7,63-7,64 (m, 3H).

LCMS m/z 286 ($M + H$) $^+$, Rt: 3,79 min.

7-bróm-2-fenilpirido[2,3-*b*]pirazin (**27b**)

Termék: 5,71 mg halványsárga por. Kitermelés: 2,1 %. Olvadáspont: 154,5 - 155,0 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 9,80 (s, 1H), 9,21 (d, $J = 2,46$ Hz, 1H), 8,92 (d, $J = 2,46$ Hz, 1H), 8,34-8,38 (m, 2H), 7,61-7,67 (m, 3H).

LCMS m/z 286 (M + H) $^+$, Rt: 3,88 min.

7-bróm-3-(2-metoxifenil)pirido[2,3-*b*]pirazin (27c)

Termék: 125 mg tört fehér por. Kitermelés: 41,5 %. Olvadáspont: 197,8 - 198,6 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 9,47 (s, 1H), 9,24 (s, 1H), 8,90 (s, 1H), 7,89 (d, $J = 6,30$ Hz, 1H), 7,60 (t, $J = 6,60$ Hz, 1H), 7,29 (d, $J = 7,80$ Hz, 1H), 7,20 (t, $J = 6,90$ Hz, 1H), 3,93 (s, 3H).

LCMS m/z 316 (M + H) $^+$, Rt: 3,86 min.

7-bróm-3-(3-klórfenil)pirido[2,3-*b*]pirazin (27d)

Termék: 246 mg drapp színű por. Kitermelés: 80,5 %. Olvadáspont: 207,2 - 208,0 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 9,79 (s, 1H), 9,28 (s, 1H), 8,94 (s, 1H), 8,45 (s, 1H), 8,38 (d, $J = 6,36$ Hz, 1H), 7,66-7,69 (m, 2H).

LCMS m/z 320 (M + H) $^+$, Rt: 4,24 min.

7-bróm-3-(4-metilfenil)pirido[2,3-*b*]pirazin (27e)

Termék: 223 mg barna por. Kitermelés: 78,1 %. Olvadáspont: 196,3 - 198,2 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 9,72 (s, 1H), 9,23 (d, $J = 2,28$ Hz, 1H), 8,89 (d, $J = 2,22$ Hz, 1H), 8,32 (d, $J = 8,07$ Hz, 2H), 7,45 (d, $J = 8,01$ Hz, 2H), 2,42 (s, 3H).

LCMS m/z 300 (M + H) $^+$, Rt: 4,15 min.

7-bróm-3-(4-fluorfenil)pirido[2,3-*b*]pirazin (27f)

Termék: 193 mg barna por. Kitermelés: 66,7 %. Olvadáspont: 198,1 - 200,2 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 9,74 (s, 1H), 9,25 (d, $J = 2,13$ Hz, 1H), 8,91 (d, $J = 2,04$ Hz, 1H), 8,45-8,50 (m, 2H), 7,48 (t, $J = 8,76$ Hz, 2H).

LCMS m/z 304 (M + H) $^+$, Rt: 3,87 min.

7-bróm-3-(4-klórfenil)pirido[2,3-*b*]pirazin (27g)

Termék: 261 mg tört fehér por. Kitermelés: 85,6 %. Olvadáspont: 222,4 - 223,3 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,76 (s, 1H), 9,26 (d, *J* = 1,89 Hz, 1H), 8,92 (d, *J* = 1,89 Hz, 1H), 8,44 (d, *J* = 8,46 Hz, 2H), 7,71 (d, *J* = 8,40 Hz, 2H).

LCMS *m/z* 320 (M + H)⁺, Rt: 4,22 min.

7-bróm-3-[4-(trifluormetil)fenil]pirido[2,3-*b*]pirazin (27h)

Termék: 227 mg világosbarna por. Kitermelés: 67,7 %. Olvadáspont: 207,9 - 208,5 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,82 (s, 1H), 9,30 (d, *J* = 2,13 Hz, 1H), 8,96 (d, *J* = 2,01 Hz, 1H), 8,61 (d, *J* = 8,13 Hz, 2H), 8,00 (d, *J* = 8,13 Hz, 2H).

LCMS *m/z* 354 (M + H)⁺, Rt: 4,38 min.

4-(7-brómpirido[2,3-*b*]pirazin-3-il)fenol (27i)

Termék: 228 mg zöldsárga por. Kitermelés: 79,5 %. Olvadáspont: 304,1 - 307,7 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 10,23 (br s, 1H), 9,65 (s, 1H), 9,10 (d, *J* = 1,80 Hz, 1H), 8,83 (d, *J* = 1,62 Hz, 1H), 8,29 (d, *J* = 8,58 Hz, 2H), 6,99 (d, *J* = 8,46 Hz, 2H).

LCMS *m/z* 302 (M + H)⁺, Rt: 3,19 min.

7-bróm-3-(4-metoxifenil)pirido[2,3-*b*]pirazin (27j)

Termék: 160 mg barnássárga por. Kitermelés: 53,4 %. Olvadáspont: 169,2 - 172,4 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,70 (s, 1H), 9,20 (d, *J* = 2,04 Hz, 1H), 8,85 (d, *J* = 2,04 Hz, 1H), 8,39 (d, *J* = 6,64 Hz, 2H), 7,18 (d, *J* = 6,56 Hz, 2H), 3,90 (s, 3H).

LCMS *m/z* 316 (M + H)⁺, Rt: 3,83 min.

4-(7-brómpirido[2,3-*b*]pirazin-3-il)benzoésav (27k)

Termék: 165 mg világosbarna por. Kitermelés: 52,6 %. Olvadáspont: 323,2 - 324,8 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 13,5 (br s, 1H), 9,81 (s, 1H), 9,30 (s, 1H), 8,96 (s, 1H), 8,52 (d, *J* = 7,44 Hz, 2H), 8,17 (d, *J* = 6,96 Hz, 2H).

LCMS *m/z* 330 (M + H)⁺, Rt: 3,23 min.

7-bróm-3-(4-nitrofenil)pirido[2,3-*b*]pirazin (27l)

A regioizomer-szennyezéstől oszlopkromatográfiával tisztítottuk meg (töltet: 280 g Szilikagél 60, eluens: kloroform)

Termék: 220 mg halvány narancssárga por. Kitermelés: 69,7 %. Olvadáspont: 283,7-286,1 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,86 (s, 1H), 9,33 (d, *J* = 2,43 Hz, 1H), 9,00 (d, *J* = 2,43 Hz, 1H), 8,68 (d, *J* = 8,88 Hz, 2H), 8,47 (d, *J* = 8,88 Hz, 2H).

LCMS *m/z* 331 (M + H)⁺, Rt: 3,82 min.

A 7-bróm-3-(4-piperidin-1-il-fenil)-pirido[2,3-*b*]pirazin és a 7-bróm-2-(4-piperidin-1-il-fenil)-pirido[2,3-*b*]pirazin vegyületeket egy reakcióban állítottam elő, és preparatív VRK segítségével választottam el (1 mm PLC Szilikagél 60 F254; eluens: kloroform: metanol 100:1).

7-bróm-3-[4-(piperidin-1-il)fenil]pirido[2,3-*b*]pirazin (27m)

Termék: 193 mg sötét narancssárga por. Kitermelés: 55,0 %. Olvadáspont: 199,4 - 200,1 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,63 (s, 1H), 9,14 (d, *J* = 2,37 Hz, 1H), 8,77 (d, *J* = 2,43 Hz, 1H), 8,28 (d, *J* = 8,94 Hz, 2H), 7,10 (d, *J* = 9,06 Hz, 2H), 3,32-3,43 (m, 4H), 1,52-1,68 (m, 6H).

LCMS *m/z* 370 (M + H)⁺, Rt: 9,37 min (III. eljárás).

7-bróm-2-[4-(piperidin-1-il)fenil]pirido[2,3-*b*]pirazin (27n)

Termék: 106 mg narancssárga por. Kitermelés: 30,1 %. Olvadáspont: 203,4 - 203,9 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,69 (s, 1H), 9,07 (d, *J* = 1,77 Hz, 1H), 8,76 (d, *J* = 1,83 Hz, 1H), 8,23 (d, *J* = 8,64 Hz, 2H), 7,09 (d, *J* = 8,76 Hz, 2H), 3,17-3,40 (m, 4H), 1,58-1,66 (m, 6H).

LCMS *m/z* 370 (M + H)⁺, Rt: 9,96 min (III. eljárás).

7-bróm-3-[4-(morfolin-4-il)fenil]pirido[2,3-*b*]pirazin (27o)

Termék: 229 mg narancsszínű por. Kitermelés: 65,1 %. Olvadáspont: 244,9 - 247,0 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 9,66 (s, 1H), 9,16 (d, $J = 2,22$ Hz, 1H), 8,79 (d, $J = 2,13$ Hz, 1H), 8,32 (d, $J = 8,67$ Hz, 2H), 7,14 (d, $J = 8,73$ Hz, 2H), 3,75-3,78 (m, 4H), 3,29-3,32 (m, 4H).

LCMS m/z 371 (M + H) $^+$, Rt: 3,71 min.

7-bróm-3-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)pirido[2,3-*b*]pirazin (27p)

Termék: 143 mg narancsszínű por. Kitermelés: 43,7 %. Olvadáspont: 217,0 - 219,4 °C.

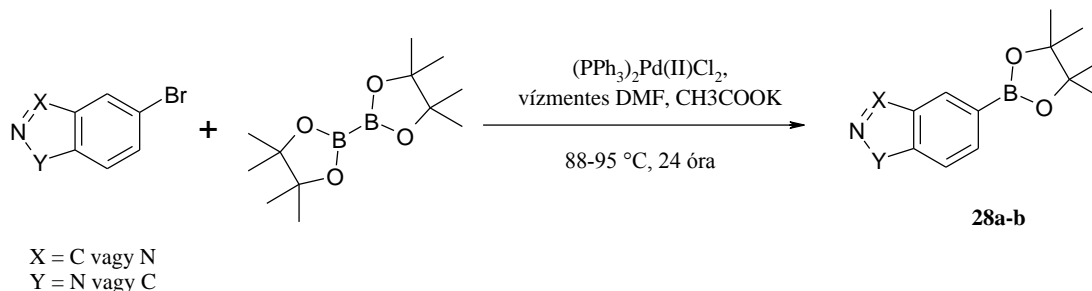
^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 9,67 (s, 1H), 9,20 (d, $J = 1,98$ Hz, 1H), 8,84 (d, $J = 1,92$ Hz, 1H), 7,93 (br s, 2H), 7,09 (d, $J = 9,00$ Hz, 1H), 4,30-4,38 (m, 4H).

LCMS m/z 344 (M + H) $^+$, Rt: 380 min.

4.4.4. Boronsav-pinakol-észter kialakítása az indazol származékokon

Az aromás szén-szén kötés kialakításához Stille-, és Suzuki-reakciókat használtam. A Stille-reakcióhoz a 4.3.2. pontban leírt **16** trimetilsztannil-származékot kellett előállítani reagensként, a Suzuki-reakcióban pedig boronsav-, és boronsav-pinakol-észter-származékokat használtam. A kereskedelemben nem beszerezhető boronsav-származékok előállításánál a kereskedelemben beszerezhető, megfelelő helyen szubsztituált brómindazolokból indultam ki. A reakciót bisz(pinakoláto)diboránnal végeztem $(\text{PPh}_3)_2\text{Pd}(\text{II})\text{Cl}_2$ katalizátor jelenlétében, DMF oldatban. [118, 131]

Az irodalmi leírást követve az első néhány származékot Stille-reakcióval állítottam elő, [115] majd a fejlesztés során preparáltam a **7** indazol vegyület boronsav-származékát is (**8**), ami jól használhatónak bizonyult Suzuki-reakcióban. A Suzuki-reakcióval végzett kapcsolás könnyebben tisztíthatónak bizonyult, továbbá a Stille-reakcióhoz szükséges ón tartalmú intermedierből keletkező veszélyes hulladék környezetvédelmi szempontból előnytelenebb a boronsav-származékokkal szemben; valamint az esetleges fémszennyezés-maradékok a kromatográfiai analitikai műszereket rongálhatják és a biológiai méréseket zavarhatják. Ezek miatt az okok miatt a továbbiakban az aromás szén-szén kötés kialakítására a Suzuki-reakciót használtam.



A bróm-indazolból (1 mmol) argonnal kiöblített kétnyakú gömblombikban 0,25 M-os vízmentes DMF-es oldatot készítettem és 0,02 ekvivalens $(\text{PPh}_3)_2\text{Pd(II)Cl}_2$ -ot hozzáadva egy órát kevertettem szobahőmérsékleten, argon atmoszférában. Hozzáadtam 1,3 ekvivalens bisz(pinakolato)diboránt és 3,5 ekvivalens kálium-acetátot, majd 88-95°C-on 24 órát kevertettem. Az elegyet lehűtöttem, celiten szűrtem, etil-acetáttal háromszor mostam, és a szűrletet vákuumban bepárooltam. Az így kapott sárga kristályokat hexánból átkristályosítottam, és exsikkátorban, foszfor-pentoxid felett tömegállandóságig szárítottam.

Az így előállított termékek:

(1H-Indazol-5-il)-boronsav-pinakol-észter (28a)

Termék: 124 mg fehér kristályos anyag. Kitermelés: 50,7 %. Olvadáspont: 160,8 - 162,7 °C. Irodalmi olvadáspont: nem található adat.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 13,1 (br s, 1H), 8,15 (s, 1H), 8,10 (s, 1H), 7,60 (d, $J = 7,89$ Hz, 1H), 7,52 (d, $J = 7,92$ Hz, 1H), 1,31 (s, 12H).

LCMS m/z 244 ($\text{M} + \text{H}$)⁺, Rt: 3,61 min.

(1H-Indazol-6-il)-boronsav-pinakol-észter (28b)

A terméket oszlopkromatográfiásan tisztítottam (töltet: 220 g Szilikagél 60, eluens kloroform : metanol 15:1).

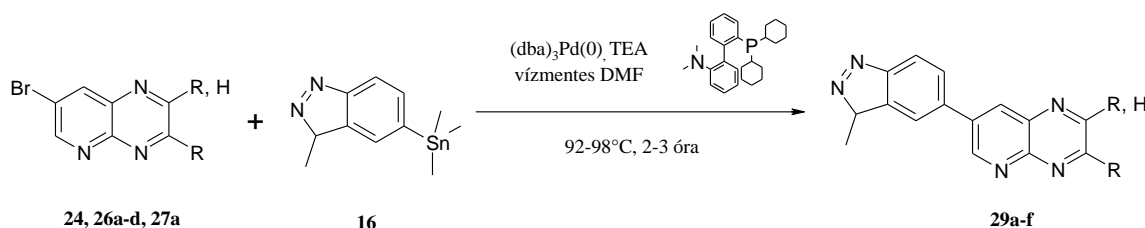
Termék: 137 mg fehér kristályos anyag. Kitermelés: 56,0 %. Olvadáspont: 93,8 - 95,6 °C. Irodalmi olvadáspont: nem található adat.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 13,14 (s, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,86 (s, 1H), 7,75 (d, $J = 6,24$ Hz, 1H), 7,37 (d, $J = 6,27$ Hz, 1H), 1,33 (s, 12H).

LCMS m/z 244 ($\text{M} + \text{H}$)⁺, Rt: 3,66 min.

4.4.5. 7-es helyzetben szubsztituált pirido[2,3-*b*]pirazin származékok szintézise Stille-reakcióval

A 7-(3-metil-1*H*-indazol-5-il)pirido[2,3-*b*]pirazinok előállítását 7-brómpirido[2,3-*b*]pirazinokból végeztem, az esetek egy részében Stille-reakcióval. A reakciót a **16** indazol vegyülettel végeztem, vízmentes DMF-ben, katalitikus mennyiségű (dba)₃Pd₂(0) katalizátor és 2-diciklohexilfoszfano-2'-(*N,N*-dimetilamino)bifenil segítségével, TEA mellett inert atmoszférában. [115]



A 7-brómpirido[2,3-*b*]pirazin-származékból (1 mmol) argonnal kiöblített kétnyakú gömblombikban 0,05 M-os vízmentes DMF oldatot készítettem, hozzáadtam 0,2 ekvivalens (dba)₃Pd₂(0) katalizátort és 0,1 ekvivalens 2-diciklohexilfoszfano-2'-(*N,N*-dimetilamino)bifenilt, majd szobahőmérsékleten kevertetem argon atmoszférában 90 percet. Hozzáadtam 0,9 ekvivalens **16** trimetilsztannil-származékot és 1,2 ekvivalens TEA-t, és 2 - 3 órát kevertetem 92 - 98 °C-on. Az elegyet lehűtöttem, szűrtem celiten, 4 x 15 ml DMF-fel mostam, majd a szűrletet vákuumban bepároltam. A maradékot 30 ml THF-ben oldottam, 5 g bázikus alumínium-oxidon átengedtem, 40 ml THF-fel mostam, majd az oldatot vákuumban bepároltam. A maradékot oszlopkromatográfiásan tisztítottam (töltet: 250-szeres tömegű bázikus alumínium-oxid, eluens gradiens hexán : etil-acetát 1:1, majd tiszta etil-acetát, majd etil-acetát + 1% TEA). [132, 133]

Az így előállított termékek:

7-(3-metil-1*H*-indazol-5-il)-3-fenilpirido[2,3-*b*]pirazin (29a)

Termék: 115 mg sárga por. Kitermelés: 37,7 %. Olvadáspont: 286,4 - 288,2 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,81 (s, 1H), 9,75 (s, 1H), 9,67 (d, *J* = 2,40 Hz, 1H), 8,84 (d, *J* = 2,37 Hz, 1H), 8,45 (br s, 2H), 8,42 (s, 1H), 7,99 (dd, *J*¹ = 8,40 Hz, *J*² = 1,05 Hz, 1H), 7,62-7,67 (m, 4H), 2,61 (s, 3H).

LCMS *m/z* 338 (M + H)⁺, Rt: 3,61 min.

7-(3-metil-1*H*-indazol-5-il)-2,3-difenilpirido[2,3-*b*]pirazin (29b)

Termék: 178 mg sárga por. Kitermelés: 47,9 %. Olvadáspont: 271,2 - 272,4 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,82 (s, 1H), 9,63 (d, *J* = 2,52 Hz, 1H), 8,85 (d, *J* = 2,49 Hz, 1H), 8,42 (s, 1H), 7,98 (dd, *J*¹ = 8,70 Hz, *J*² = 1,55 Hz, 1H), 7,66 (d, *J* = 8,49 Hz, 1H), 7,49-7,54 (m, 4H), 7,44-7,35 (m, 6H), 2,58 (s, 3H).

LCMS *m/z* 414 (M + H)⁺, Rt: 4,24 min.

7-(3-metil-1*H*-indazol-5-il)-2,3-bisz(4-metilfenil)pirido[2,3-*b*]pirazin (29c)

Termék: 279 mg sárga por. Kitermelés: 70,2 %. Olvadáspont: 249,3 - 252,5 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,80 (s, 1H), 9,64 (d, *J* = 2,49 Hz, 1H), 8,84 (d, *J* = 2,46 Hz, 1H), 8,45 (s, 1H), 7,99 (d, *J* = 8,79 Hz, 1H), 7,64 (d, *J* = 8,70 Hz, 1H), 7,42-7,47 (m, 4H), 7,21 (d, *J* = 7,86 Hz, 4H), 2,60 (s, 3H), 2,35 (s, 6H).

LCMS *m/z* 442 (M + H)⁺, Rt: 4,71 min.

2,3-bisz(4-fluorfenil)-7-(3-metil-1*H*-indazol-5-il)pirido[2,3-*b*]pirazin (29d)

Termék: 205 mg sárga por. Kitermelés: 50,6 %. Olvadáspont: 289,5 - 292,4 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,82 (s, 1H), 9,69 (d, *J* = 2,40 Hz, 1H), 8,90 (d, *J* = 2,34 Hz, 1H), 8,48 (s, 1H), 8,01 (d, *J* = 9,06 Hz, 1H), 7,66-7,56 (m, 5H), 7,24-7,30 (m, 4H), 2,60 (s, 3H).

LCMS *m/z* 450 (M + H)⁺, Rt: 4,36 min.

2,2'-[7-(3-metil-1*H*-indazol-5-il)pirido[2,3-*b*]pirazin-2,3-diil]bisz(4-brómfenol) (29e)

Termék: 226 mg sötét narancssárga por. Kitermelés: 41,7 %. Olvadáspont: 190,2 - 191,3 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,82 (s, 1H), 9,96 (br s, 2H), 9,68 (d, *J* = 2,21 Hz, 1H), 8,91 (d, *J* = 2,56 Hz, 1H), 8,47 (s, 1H), 8,00 (dd, *J*¹ = 8,53 Hz, *J*² = 1,45 Hz, 1H), 7,65 (d, *J* = 8,42 Hz, 1H), 7,56-7,58 (m, 2H), 7,32-7,38 (m, 2H), 6,72 (d, *J* = 2,76 Hz, 1H), 6,70 (d, *J* = 2,76 Hz, 1H), 2,60 (s, 3H).

LCMS *m/z* 602 (M + H)⁺, Rt: 4,16 min.

7-(3-metil-1*H*-indazol-5-il)-2,3-di(2-tienil)pirido[2,3-*b*]pirazin (29f)

Termék: 282 mg narancssárga por. Kitermelés: 73,6 %. Olvadáspont: 285,0 - 287,5 °C.

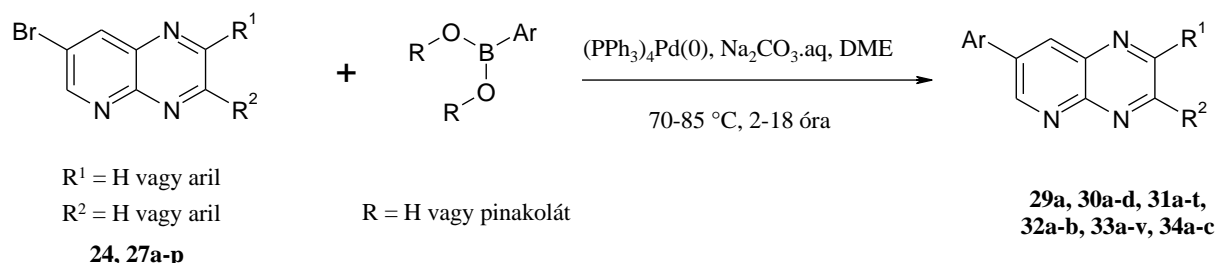
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,81 (s, 1H), 9,61 (d, *J* = 2,49 Hz, 1H), 8,77 (d, *J* = 2,49 Hz, 1H), 8,47 (s, 1H), 8,00 (dd, *J*¹ = 8,70 Hz, *J*² = 1,68 Hz, 1H), 7,87 (dd, *J*¹ = 5,01 Hz, *J*² = 1,10 Hz, 2H), 7,63 (d, *J* = 8,91 Hz, 1H), 7,36 (dd, *J*¹ = 3,66 Hz, *J*² = 1,02 Hz, 1H), 7,31 (dd, *J*¹ = 3,72 Hz, *J*² = 1,11 Hz, 1H), 7,10-7,19 (m, 2H), 2,60 (s, 3H).

LCMS *m/z* 426 (M + H)⁺, Rt: 3,53 min.

4.4.6. 7-es helyzetben szubsztituált pirido[2,3-*b*]pirazin származékok szintézise Suzuki-reakcióval

A 7-es helyzetben aromás szubsztituenssel rendelkező pirido[2,3-*b*]pirazinok előállítását 7-brómpirido[2,3-*b*]pirazinokból kiindulva végeztem, az esetek többségében Suzuki-reakcióval.

A 7-bróm-pirido[2,3-*b*]pirazinok és a megfelelő boronsav-vegyületek kapcsolását DME oldatban, (PPh₃)₄Pd(0) katalizátor és vizes nátrium-karbonát bázis mellett, inert atmoszférában végeztem.



A 7-brómpirido[2,3-*b*]pirazin-származékból (1 mmol) argonnal kiöblített kétnyakú gömblombikban 0,06 M-os DME oldatot vagy szuszpenziót készítettem (egyes esetekben DMF hozzáadásával segítetttem az oldódást), hozzáadtam 0,03 ekvivalens (PPh₃)₄Pd(0) katalizátort, és az elegyet egy órán át kevertetem szobahőmérsékleten. Ezután hozzáadtam 1,5 ekvivalens boronsav-vegyületet és 2,75 ekvivalens, 0,66 M-os, vizes Na₂CO₃ oldatot, és 75 - 85 °C-on kevertetem 2 - 18 órát. Az elegyet lehűtöttem, szűrtem, a leszűrt nyerterméket háromszor mostam telített Na₂CO₃ oldattal és vízzel, majd exsikkátorban, foszfor-pentoxid felett tömegállandóságig szárítottam. Amennyiben szükséges volt (a reakció során kivált a palládium katalizátor, vagy nem

volt megfelelő a tisztaság), a terméket átkristályosítással, preparatív VRK segítségével vagy oszlopkromatográfiásan tisztítottam. [121]

Az így előállított termékek:

7-(3-metil-1*H*-indazol-5-il)-3-fenilpirido[2,3-*b*]pirazin (29a)

A kristályokat acetonitrilben forraltam 2 órát, szűrtem, vízzel mostam, és exsikkátorban, foszfor-pentoxid felett tömegállandóságig szárítottam.

Termék: 206 mg sárga por. Kitermelés: 61,0 %. Olvadáspont: 286,4 - 288,2 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,81 (s, 1H), 9,75 (s, 1H), 9,67 (d, *J* = 2,40 Hz, 1H), 8,84 (d, *J* = 2,37 Hz, 1H), 8,45 (br s, 2H), 8,42 (s, 1H), 7,99 (dd, *J*¹ = 8,40 Hz, *J*² = 1,05 Hz, 1H), 7,61-7,70 (m, 4H), 2,61 (s, 3H).

LCMS *m/z* 338 (M + H)⁺, Rt: 3,61 min.

7-(2-metilfenil)-2,3-di(2-tienil)pirido[2,3-*b*]pirazin (30a)

Termék: 242 mg sárga por. Kitermelés: 62,6 %. Olvadáspont: 170,7 - 172,8 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,13 (s, 1H), 8,44 (s, 1H), 7,86 (s, 2H), 7,50 - 7,35 (m, 5H), 7,28 (s, 1H), 7,15 (br s, 2H), 2,36 (s, 3H).

LCMS *m/z* 386 (M + H)⁺, Rt: 5,04 min.

7-(4-metilfenil)-2,3-di(2-tienil)pirido[2,3-*b*]pirazin (30b)

Termék: 178 mg zöldessárga por. Kitermelés: 46,2 %. Olvadáspont: 187,9 - 188,4 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,48 (s, 1H), 8,68 (s, 1H), 7,94 - 7,80 (m, 4H), 7,35-7,40 (m, 3H), 7,29 (s, 1H), 7,15 (br s, 2H), 2,40 (s, 3H).

LCMS *m/z* 386 (M + H)⁺, Rt: 5,13 min.

7-(4-klórfenil)-2,3-di(2-tienil)pirido[2,3-*b*]pirazin (30c)

Termék: 261 mg narancssárga por. Kitermelés: 64,3 %. Olvadáspont: 198,2 - 199,6 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,49 (s, 1H), 8,76 (s, 1H), 8,07 (d, *J* = 7,87 Hz, 2H), 7,87 (s, 2H), 7,63 (d, *J* = 7,74 Hz, 2H), 7,37 (s, 1H), 7,30 (s, 1H), 7,16 (br s, 2H).

LCMS *m/z* 406 (M + H)⁺, Rt: 5,17 min.

3-[2,3-di(2-tienil)pirido[2,3-*b*]pirazin-7-il]anilin (30d)

Termék: 272 mg narancssárga por. Kitermelés: 70,3 %. Olvadáspont: 244,8 - 246,1 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,38 (s, 1H), 8,53 (s, 1H), 7,86 (s, 2H), 7,36 (s, 1H), 7,29 (s, 1H), 7,06-7,12 (m, 5H), 6,71 (d, *J* = 6,31 Hz, 1H), 5,30 (s, 2H).

LCMS *m/z* 387 (M + H)⁺, Rt: 3,94 min.

3-fenil-7-(4-metoxifenil)pirido[2,3-*b*]pirazin (31a)

Termék: 216 mg barna por. Kitermelés: 68,9 %. Olvadáspont: 217,5 - 218,4 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,72 (s, 1H), 9,54 (s, 1H), 8,73 (s, 1H), 8,41 (d, *J* = 6,48 Hz, 2H), 7,99 (d, *J* = 8,31 Hz, 2H), 7,61-7,67 (m, 3H), 7,16 (s, 1H), 7,13 (s, 1H), 3,85 (s, 3H).

LCMS *m/z* 314 (M + H)⁺, Rt: 4,11 min.

3-fenil-7-(4-klórfenil)pirido[2,3-*b*]pirazin (31b)

Termék: 211 mg zöld por. Kitermelés: 66,4 %. Olvadáspont: 252,9 - 254,2 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,76 (s, 1H), 9,56 (s, 1H), 8,83 (s, 1H), 8,43 (d, *J* = 7,53 Hz, 2H), 8,07 (d, *J* = 7,50 Hz, 2H), 7,58-7,66 (m, 5H).

LCMS *m/z* 318 (M + H)⁺, Rt: 4,49 min.

7-[4-(benziloxi)fenil]-3-fenilpirido[2,3-*b*]pirazin (31c)

Termék: 43 mg sárga por. Kitermelés: 10,9 %. Olvadáspont: 229,8 - 230,0 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,71 (s, 1H), 9,54 (d, *J* = 2,06 Hz, 1H), 8,72 (s, 1H), 8,41 (d, *J* = 6,77 Hz, 2H), 7,98 (d, *J* = 8,46 Hz, 2H), 7,60-7,67 (m, 3H), 7,50 (d, *J* = 7,27 Hz, 2H), 7,42 (t, *J* = 7,21 Hz, 2H), 7,35 (t, *J* = 6,93 Hz, 1H), 7,22 (d, *J* = 8,46 Hz, 2H), 5,23 (s, 2H).

LCMS *m/z* 390 (M + H)⁺, Rt: 4,78 min.

7-[3-(etiltio)fenil]-3-fenilpirido[2,3-*b*]pirazin (31d)

Termék: 299 mg barna por. Kitermelés: 86,9 %. Olvadáspont: 140,8 - 142,0 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,77 (s, 1H), 9,56 (d, *J* = 2,43 Hz, 1H), 8,87 (d, *J* = 2,46 Hz, 1H), 8,40-8,45 (m, 2H), 7,90 (t, *J* = 1,82 Hz, 1H), 7,79-7,81 (m, 1H), 7,60-

7,69 (m, 3H), 7,53 (t, $J = 7,73$ Hz, 1H), 7,44-7,46 (m, 1H), 3,14 (q, $J = 7,35$ Hz, 2H), 1,30 (t, $J = 7,32$ Hz, 3H).

LCMS m/z 344 (M + H)⁺, Rt: 4,72 min.

3-(3-fenilpirido[2,3-*b*]pirazin-7-il)benzonnitril (31e)

Termék: 71 mg fakó sárga por. Kitermelés: 23,1 %. Olvadáspont: 236,2 - 238,9 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,78 (s, 1H), 9,61 (d, $J = 2,43$ Hz, 1H), 8,96 (d, $J = 2,34$ Hz, 1H), 8,57 (s, 1H), 8,42-8,46 (m, 2H), 8,39 (d, $J = 8,16$ Hz, 1H), 7,98 (d, $J = 7,71$ Hz, 1H), 7,80 (t, $J = 8,02$ Hz, 1H), 7,61-7,70 (m, 3H).

LCMS m/z 309 (M + H)⁺, Rt: 3,82 min.

3-fenil-7-(piridin-4-il)pirido[2,3-*b*]pirazin (31f)

Termék: 222 mg fehér por. Kitermelés: 78,0 %. Olvadáspont: 255,9 - 257,8 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,80 (s, 1H), 9,65 (d, $J = 2,43$ Hz, 1H), 9,02 (d, $J = 2,43$ Hz, 1H), 8,78 (d, $J = 5,97$ Hz, 2H), 8,43-8,47 (m, 2H), 8,08 (d, $J = 6,03$ Hz, 2H), 7,64-7,67 (m, 3H).

LCMS m/z 285 (M + H)⁺, Rt: 2,43 min.

3-fenil-7-(piridin-3-il)pirido[2,3-*b*]pirazin (31g)

Az oldószer 6 ml DMF-et is tartalmazott.

Termék: 141 mg szürke por. Kitermelés: 49,7 %. Olvadáspont: 230,1 - 232,6 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,78 (s, 1H), 9,61 (s, 1H), 9,24 (s, 1H), 8,95 (s, 1H), 8,71 (d, $J = 4,38$ Hz, 1H), 8,44 (br s, 3H), 7,59-7,66 (m, 4H).

LCMS m/z 285 (M + H)⁺, Rt: 2,67 min.

3-fenil-7-(6-fluorpiridin-3-il)pirido[2,3-*b*]pirazin(31h)

Termék: 186 mg halványzöld por. Kitermelés: 61,7 %. Olvadáspont: 291,8 - 294,1 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,78 (s, 1H), 9,60 (d, $J = 2,28$ Hz, 1H), 8,94 (dd, $J^1 = 8,55$ Hz, $J^2 = 2,28$ Hz, 2H), 8,67 (dt, $J^1 = 8,25$ Hz, $J^2 = 2,19$ Hz, 1H), 8,42-8,45 (m, 2H), 7,64-7,66 (m, 3H), 7,43 (dd, $J^1 = 8,58$ Hz, $J^2 = 2,64$ Hz, 1H).

LCMS m/z 303 (M + H)⁺, Rt: 3,53 min.

3-fenil-7-[2-(piperazin-1-il)piridin-4-il]pirido[2,3-*b*]pirazin (31i)

A kristályokat 70 ml kloroform : metanol 6:1 elegyben oldottam, celiten szűrtem, az oldószerleggyel mostam, majd vákuumban bepároltam.

Termék: 302 mg sárga por. Kitermelés: 82,0 %. Olvadáspont: 182,8 - 185,8 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,79 (s, 1H), 9,61 (d, *J* = 2,37 Hz, 1H), 8,96 (d, *J* = 2,13 Hz, 1H), 8,43-8,46 (m, 2H), 8,28 (d, *J* = 5,19 Hz, 1H), 7,56-7,66 (m, 4H), 7,37 (s, 1H), 7,24 (d, *J* = 5,67 Hz, 1H), 3,54-3,58 (m, 4H), 2,80-2,84 (m, 4H).

LCMS *m/z* 369 (M + H)⁺, Rt: 0,45; 2,30; 2,47 min.

3-fenil-7-(kinolin-3-il)pirido[2,3-*b*]pirazin (31j)

A terméket DMF-ben forraltam 2 órát, szűrtem, vízzel mostam és exszikkátorban, foszfor-pentoxid felett tömegállandóságig szárítottam.

Termék: 151 mg szürke por. Kitermelés: 45,1 %. Olvadáspont: 304,2 - 305,1 °C.

¹H NMR (300 MHz, TFA) δ ppm 10,39 (s, 2H), 9,07 (s, 1H), 9,01 (s, 1H), 8,83 (s, 1H), 8,77 (s, 1H), 7,46-7,52 (m, 3H), 7,40 (t, *J* = 6,84 Hz, 1H), 7,23 (t, *J* = 6,84 Hz, 1H), 6,83 (d, *J* = 6,62 Hz, 1H), 6,76-6,79 (m, 2H).

LCMS *m/z* 335 (M + H)⁺, Rt: 3,61 min.

3-fenil-7-(kinolin-6-il)pirido[2,3-*b*]pirazin (31k)

A terméket DMF-ben forraltam 2 órát, szűrtem, vízzel mostam és exszikkátorban, foszfor-pentoxid felett tömegállandóságig szárítottam.

Termék: 260 mg zöldessárga por. Kitermelés: 78,6 %. Olvadáspont: 272,8 - 274,5 °C.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 9,80 (s, 1H), 9,76 (s, 1H), 8,97-9,05 (m, 2H), 8,74 (s, 1H), 8,45-8,53 (m, 4H), 8,19-8,24 (m, 1H), 7,55-7,75 (m, 4H).

LCMS *m/z* 335 (M + H)⁺, Rt: 3,12 min.

3-fenil-7-(izokinolin-5-il)pirido[2,3-*b*]pirazin (31l)

Termék: 200 mg zöldes barna por. Kitermelés: 59,8 %. Olvadáspont: 197,5 - 199,7 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,82 (s, 1H), 9,48 (s, 1H), 9,34 (d, *J* = 2,04 Hz, 1H), 8,73 (d, *J* = 1,98 Hz, 1H), 8,57 (d, *J* = 6,00 Hz, 1H), 8,46-8,48 (m, 2H), 8,33 (d, *J*

= 8,10 Hz, 1H), 8,05 (d, $J = 6,60$ Hz, 1H), 7,89 (t, $J = 7,80$ Hz, 1H), 7,78 (d, $J = 5,88$ Hz, 1H), 7,66-7,69 (m, 3H).

LCMS m/z 335 (M + H)⁺, Rt: 2,83 min.

3-fenil-7-(1H-indol-4-il)pirido[2,3-b]pirazin (31m)

Termék: 258 mg sárga por. Kitermelés: 80,0 %. Olvadáspont: 255,9 - 256,6 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,47 (s, 1H), 9,76 (s, 1H), 9,53 (s, 1H), 8,73 (s, 1H), 8,44 (d, $J = 6,30$ Hz, 2H), 7,63-7,66 (m, 3H), 7,54-7,60 (m, 2H), 7,42 (d, $J = 7,20$ Hz, 1H), 7,31 (t, $J = 7,50$ Hz, 1H), 6,71 (s, 1H).

LCMS m/z 323 (M + H)⁺, Rt: 3,93 min.

3-fenil-7-(1H-indol-5-il)pirido[2,3-b]pirazin (31n)

Termék: 268 mg vörösbarna por. Kitermelés: 83,1 %. Olvadáspont: 281,2 - 283,7 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,31 (s, 1H), 9,72 (s, 1H), 9,61 (d, $J = 2,28$ Hz, 1H), 8,73 (s, 1H), 8,42 (d, $J = 6,27$ Hz, 2H), 8,22 (s, 1H), 7,60-7,74 (m, 4H), 7,58 (s, 1H), 7,46 (t, $J = 2,55$ Hz, 1H), 6,58 (s, 1H).

LCMS m/z 323 (M + H)⁺, Rt: 3,93 min.

3-fenil-7-(1H-indol-6-il)pirido[2,3-b]pirazin (31o)

A terméket DMF-ben forraltam 2 órát, szűrtem, vízzel mostam és exszikkátorban, foszfor-pentoxid felett tömegállandóságig szárítottam.

Termék: 231 mg sárga por. Kitermelés: 71,7 %. Olvadáspont: 299,4 - 302,3 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,36 (s, 1H), 9,73 (s, 1H), 9,60 (s, 1H), 8,74 (s, 1H), 8,42 (br s, 2H), 8,00 (s, 1H), 7,50-7,78 (m, 5H), 7,49 (s, 1H), 6,53 (s, 1H).

LCMS m/z 323 (M + H)⁺, Rt: 4,04 min.

3-fenil-7-(1H-indol-7-il)pirido[2,3-b]pirazin (31p)

Termék: 223 mg sárga por. Kitermelés: 69,2 %. Olvadáspont: 258,8 - 259,2 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,42 (s, 1H), 9,79 (s, 1H), 9,46 (s, 1H), 8,73 (s, 1H), 8,74 (s, 1H), 8,45 (d, $J = 5,40$ Hz, 2H), 7,64-7,69 (m, 3H), 7,39-7,42 (m, 2H), 7,22 (t, $J = 7,65$ Hz, 1H), 6,62 (s, 1H).

LCMS m/z 323 (M + H)⁺, Rt: 4,18 min.

3-fenil-7-(1-metil-1*H*-indol-5-il)pirido[2,3-*b*]pirazin (31q)

A reakcióidő 24 óra volt.

Termék: 285 mg zöld por. Kitermelés: 84,7 %. Olvadáspont: 229,7 - 231,4 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,73 (s, 1H), 9,62 (d, *J* = 2,28 Hz, 1H), 8,76 (d, *J* = 2,37 Hz, 1H), 8,43 (s, 1H), 8,41 (s, 1H), 8,23 (s, 1H), 7,81 (d, *J* = 8,52 Hz, 1H), 7,59-7,66 (m, 4H), 7,44 (d, *J* = 2,97 Hz, 1H), 6,57 (d, *J* = 2,88 Hz, 1H), 3,87 (s, 3H).

LCMS m/z 337 (M + H)⁺, Rt: 4,31 min.

3-fenil-7-(1*H*-indazol-5-il)pirido[2,3-*b*]pirazin (31r)

A reakcióidő 3 nap volt. A terméket DME-vel is mostam és exszikkátorban, foszforpentoxid felett tömegállandóságig szárítottam.

Termék: 35 mg sárgásbarna por. Kitermelés: 10,8 %. Olvadáspont: 303,4 - 306,4 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 13,26 (br s, 1H), 9,75 (s, 1H), 9,63 (s, 1H), 8,81 (s, 1H), 8,44 (s, 3H), 8,22 (s, 1H), 8,00 (s, 1H), 7,75 (s, 1H), 7,64 (br s, 3H).

LCMS m/z 324 (M + H)⁺, Rt: 3,40 min.

3-fenil-7-(1*H*-indazol-6-il)pirido[2,3-*b*]pirazin (31s)

Termék: 33 mg sárga por. Kitermelés: 10,1 %. Olvadáspont: 309,0 - 311,2 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 13,36 (br s, 1H), 9,76 (s, 1H), 9,63 (s, 1H), 8,86 (s, 1H), 8,43 (br s, 2H), 8,18 (s, 1H), 8,13 (s, 1H), 7,97 (d, *J* = 5,79 Hz, 1H), 7,73 (d, *J* = 6,84 Hz, 1H), 7,64 (br s, 3H).

LCMS m/z 324 (M + H)⁺, Rt: 3,49 min.

7-(1,3-benzodioxol-5-il)-3-fenilpirido[2,3-*b*]pirazin (31t)

A reakcióhoz egy ekvivalenssel több boronsav-származékot, két ekvivalenssel több Na₂CO₃-ot és 0,03 ekvivalenssel több katalizátort adtam.

Termék: 112 mg zöld por. Kitermelés: 34,3 %. Olvadáspont: 251,9 - 253,3 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,72 (s, 1H), 9,51 (s, 1H), 8,73 (s, 1H), 8,41 (br s, 2H), 7,55-7,70 (m, 4H), 7,52 (d, *J* = 7,68 Hz, 1H), 7,12 (d, *J* = 7,65 Hz, 1H), 6,13 (s, 2H).

LCMS *m/z* 328 (M + H)⁺, Rt: 4,06 min.

2-fenil-7-(1*H*-indol-5-il)pirido[2,3-*b*]pirazin (32a)

Termék: 171 mg zölde sárga por. Kitermelés: 53,0 %. Olvadáspont: 274,0 - 276,2 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,32 (s, 1H), 9,71 (s, 1H), 9,56 (d, *J* = 2,43 Hz, 1H), 8,74 (d, *J* = 2,40 Hz, 1H), 8,37-8,40 (m, 2H), 8,22 (s, 1H), 7,73 (dd, *J*¹ = 8,45, *J*² = 1,51, 1H), 7,61-7,65 (m, 2H), 7,60 (d, *J* = 6,75, 2H), 7,46 (s, 1H), 6,58 (d, *J* = 2,50 Hz, 1H).

LCMS *m/z* 323 (M + H)⁺, Rt: 3,92 min.

7-(1*H*-indol-5-il)-2-[4-(piperidin-1-il)fenil]pirido[2,3-*b*]pirazin (32b)

Termék: 302 mg sötét narancsszínű por. Kitermelés: 74,4 %. Olvadáspont: 410+ °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,31 (s, 1H), 9,61 (s, 1H), 9,43 (d, *J* = 2,40 Hz, 1H), 8,62 (d, *J* = 2,10 Hz, 1H), 8,26 (d, *J* = 9,00 Hz, 2H), 8,19 (s, 1H), 7,71 (d, *J* = 8,70 Hz, 1H), 7,59 (d, *J* = 8,40 Hz, 1H), 7,45 (d, *J* = 2,70 Hz, 1H), 7,11 (d, *J* = 9,00 Hz, 2H), 6,57 (d, *J* = 2,40 Hz, 1H), 3,37 (s, 4H), 1,62 (s, 6H).

LCMS *m/z* 406 (M + H)⁺, Rt: 4,36 min.

7-(1*H*-indol-5-il)-3-(2-metoxifenil)pirido[2,3-*b*]pirazin (33a)

Termék: 209 mg sárga por. Kitermelés: 59,4 %. Olvadáspont: 252,6 - 253,4 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,31 (s, 1H), 9,59 (s, 1H), 9,45 (s, 1H), 8,72 (s, 1H), 8,21 (s, 1H), 7,92 (d, *J* = 7,20 Hz, 1H), 7,71-7,73 (m, 1H), 7,60 (d, *J* = 7,50 Hz, 2H), 7,46 (s, 1H), 7,29 (d, *J* = 7,89 Hz, 1H), 7,21 (t, *J* = 3,31 Hz, 1H), 6,58 (s, 1H), 3,94 (s, 3H).

LCMS *m/z* 353 (M + H)⁺, Rt: 3,93 min.

7-(1*H*-indol-5-il)-3-(3-klórfenil)pirido[2,3-*b*]pirazin (33b)

A terméket DMF-ben forraltam 2 órát, szűrtem, vízzel mostam és exsikkátorban, foszfor-pentoxid felett tömegállandóságig szárítottam.

Termék: 210 mg sárga por. Kitermelés: 58,8 %. Olvadáspont: 276,0 - 277,1 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,31 (s, 1H), 9,75 (s, 1H), 9,63 (s, 1H), 8,74 (s, 1H), 8,46 (s, 1H), 8,39 (br s, 1H), 8,23 (s, 1H), 7,60-7,80 (m, 4H), 7,46 (s, 1H), 6,59 (s, 1H).

LCMS *m/z* 357 (M + H)⁺, Rt: 4,35 min.

7-(1*H*-indol-5-il)-3-(4-metilfenil)pirido[2,3-*b*]pirazin (33c)

Termék: 218 mg sárga por. Kitermelés: 64,9 %. Olvadáspont: 315,3 - 316,8 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,36 (s, 1H), 9,70 (s, 1H), 9,59 (d, *J* = 1,86 Hz, 1H), 8,71 (d, *J* = 1,74 Hz, 1H), 8,33 (d, *J* = 7,80 Hz, 2H), 8,21 (s, 1H), 7,74 (d, *J* = 8,37 Hz, 1H), 7,58 (d, *J* = 8,25 Hz, 1H), 7,44-7,46 (m, 3H), 6,58 (s, 1H), 2,44 (s, 3H).

LCMS *m/z* 337 (M + H)⁺, Rt: 4,20 min.

3-(4-fluorfenil)-7-(1*H*-indol-5-il)pirido[2,3-*b*]pirazin (33d)

Termék: 104 mg sárga por. Kitermelés: 30,7 %. Olvadáspont: 300,0 - 301,9 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,33 (s, 1H), 9,72 (s, 1H), 9,61 (s, 1H), 8,73 (s, 1H), 8,46-8,49 (m, 2H), 8,22 (s, 1H), 7,73 (d, *J* = 8,13 Hz, 1H), 7,59 (d, *J* = 8,07 Hz, 1H), 7,45-7,51 (m, 3H), 6,58 (s, 1H).

LCMS *m/z* 341 (M + H)⁺, Rt: 4,00 min.

7-(1*H*-indol-5-il)-3-(4-klórfenil)pirido[2,3-*b*]pirazin (33e)

Termék: 260 mg zölde barna por. Kitermelés: 72,9 %. Olvadáspont: 288,3 - 289,3 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,33 (s, 1H), 9,73 (s, 1H), 9,62 (d, *J* = 1,74 Hz, 1H), 8,73 (d, *J* = 1,74 Hz, 1H), 8,45 (d, *J* = 8,34 Hz, 2H), 8,22 (s, 1H), 7,69-7,75 (m, 3H), 7,59 (d, *J* = 8,52 Hz, 1H), 7,45-7,46 (m, 1H), 6,58 (s, 1H).

LCMS *m/z* 357 (M + H)⁺, Rt: 4,32 min.

7-(1*H*-indol-5-il)-3-[4-(trifluormetil)fenil]pirido[2,3-*b*]pirazin (33f)

Termék: 233 mg barnás zöld por. Kitermelés: 59,7 %. Olvadáspont: 301,6 - 302,9 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,33 (s, 1H), 9,79 (s, 1H), 9,65 (s, 1H), 8,76 (s, 1H), 8,62 (d, *J* = 7,74 Hz, 2H), 8,23 (s, 1H), 8,00 (d, *J* = 7,74 Hz, 2H), 7,75 (d, *J* = 8,43 Hz, 1H), 7,60 (d, *J* = 8,43 Hz, 1H), 7,46 (s, 1H), 6,58 (s, 1H).

LCMS *m/z* 391 (M + H)⁺, Rt: 4,45 min.

4-[7-(1*H*-indol-5-il)pirido[2,3-*b*]pirazin-3-il]fenol (33g)

A sötétzöld port DMF-ben forraltam 2 órát, szűrtem, vízzel mostam és exszikkátorban, foszfor-pentoxid felett tömegállandóságig szárítottam.

Termék: 112 mg sárgászöld por. Kitermelés: 33,0 %. Olvadáspont: 410+ °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,29 (s, 1H), 10,20 (br s, 1H), 9,62 (s, 1H), 9,53 (s, 1H), 8,66 (s, 1H), 8,30 (d, *J* = 6,25 Hz, 2H), 8,18 (s, 1H), 7,68-7,71 (m, 1H), 7,57-7,60 (m, 1H), 7,45 (s, 1H), 7,00 (d, *J* = 6,24 Hz, 2H), 6,57 (s, 1H).

LCMS *m/z* 339 (M + H)⁺, Rt: 3,32 min.

7-(1*H*-indol-5-il)-3-(4-metoxifenil)pirido[2,3-*b*]pirazin (33h)

Termék: 249 mg zöld por. Kitermelés: 70,6 %. Olvadáspont: 321,8 - 324,2 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,32 (s, 1H), 9,68 (s, 1H), 9,56 (s, 1H), 8,69 (s, 1H), 8,40 (d, *J* = 8,40 Hz, 2H), 8,20 (s, 1H), 7,71 (d, *J* = 8,31 Hz, 1H), 7,59 (d, *J* = 8,31 Hz, 1H), 7,46 (s, 1H), 7,19 (d, *J* = 8,40 Hz, 2H), 6,57 (s, 1H), 3,89 (s, 3H).

LCMS *m/z* 353 (M + H)⁺, Rt: 3,91 min.

4-[7-(1*H*-indol-5-il)pirido[2,3-*b*]pirazin-3-il]benzoészav (33i)

Termék: 172 mg sárga por. Kitermelés: 47,0 %. Olvadáspont: 410+ °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,40 (s, 1H), 9,76 (s, 1H), 9,63 (s, 1H), 8,75 (s, 1H), 8,47 (s, 2H), 8,22 (s, 1H), 8,16 (br s, 2H), 7,73 (s, 1H), 7,60 (br s, 1H), 7,46 (s, 1H), 6,58 (s, 1H).

LCMS *m/z* 367 (M + H)⁺, Rt: 3,33 min.

7-(1*H*-indol-5-il)-3-(4-nitrofenil)pirido[2,3-*b*]pirazin (33j)

Az oldószer 1 ml DMF-et is tartalmazott.

Termék: 344 mg barnászörös por. Kitermelés: 93,8 %. Olvadáspont: 341,4 - 342,5 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,33 (s, 1H), 9,83 (s, 1H), 9,68 (s, 1H), 8,78 (s, 1H), 8,68 (d, *J* = 7,23 Hz, 2H), 8,47 (d, *J* = 7,20 Hz, 2H), 8,26 (s, 1H), 7,76 (d, *J* = 7,62 Hz, 1H), 7,61 (d, *J* = 7,65 Hz, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,59 (s, 1H).

LCMS *m/z* 368 (M + H)⁺, Rt: 4,05 min.

7-(1*H*-indol-5-il)-3-[4-(piperidin-1-il)fenil]pirido[2,3-*b*]pirazin (33k)

Termék: 259 mg narancsszínű por. Kitermelés: 63,9 %. Olvadáspont: 410+ °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,30 (s, 1H), 9,61 (s, 1H), 9,50 (d, *J* = 2,40 Hz, 1H), 8,63 (d, *J* = 2,40 Hz, 1H), 8,29 (d, *J* = 8,82 Hz, 2H), 8,17 (s, 1H), 7,70 (d, *J* = 8,70 Hz, 1H), 7,58 (d, *J* = 8,40 Hz, 1H), 7,44 (br s, 1H), 7,12 (d, *J* = 9,00 Hz, 2H), 6,57 (d, *J* = 2,10 Hz, 1H), 3,39 (s, 4H), 1,63 (s, 6H).

LCMS *m/z* 406 (M + H)⁺, Rt: 4,20 min.

7-(1*H*-indol-5-il)-3-[4-(morfolin-4-il)fenil]pirido[2,3-*b*]pirazin (33l)

Termék: 293 mg barnás narancssárga por. Kitermelés: 71,9 %. Olvadáspont: 289,9 - 292,5 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,29 (s, 1H), 9,64 (s, 1H), 9,52 (s, 1H), 8,65 (s, 1H), 8,33 (d, *J* = 6,70 Hz, 2H), 8,18 (s, 1H), 7,70 (d, *J* = 6,26 Hz, 1H), 7,58 (d, *J* = 6,20 Hz, 1H), 7,45 (s, 1H), 7,15 (d, *J* = 6,70 Hz, 2H), 6,57 (s, 1H), 3,78 (br s, 4H), 3,31 (br s, 4H).

LCMS *m/z* 408 (M + H)⁺, Rt: 3,73 min.

3-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)-7-(1*H*-indol-5-il)pirido[2,3-*b*]pirazin (33m)

Termék: 183 mg homoksárga por. Kitermelés: 48,2 %. Olvadáspont: 277,2 - 279,0 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,30 (s, 1H), 9,65 (s, 1H), 9,56 (d, *J* = 1,80 Hz, 1H), 8,68 (s, 1H), 8,20 (s, 1H), 7,93-7,95 (m, 2H), 7,71 (d, *J* = 8,46 Hz, 1H), 7,59 (d, *J* = 8,49 Hz, 1H), 7,42 (s, 1H), 7,10 (d, *J* = 9,00 Hz, 1H), 6,57 (s, 1H), 4,36-4,37 (m, 4H).

LCMS *m/z* 381 (M + H)⁺, Rt: 3,85 min.

3-(3-klórfenil)-7-(3-metil-1*H*-indazol-5-il)pirido[2,3-*b*]pirazin (33n)

A terméket DME-vel mostam, majd DMF-ben forraltam 2 órát, szűrtem, vízzel mostam és exszikkátorban, foszfor-pentoxid felett tömegállandóságig szárítottam.

Termék: 149 mg sárga por. Kitermelés: 40,1 %. Olvadáspont: 338,2 - 340,6 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,55 (br s, 1H), 9,69 (s, 1H), 9,65 (s, 1H), 8,78 (s, 1H), 8,43 (s, 1H), 8,36 (s, 2H), 7,94 (d, *J* = 8,31 Hz, 1H), 7,65-7,67 (m, 3H), 2,62 (s, 3H).

LCMS *m/z* 372 (M + H)⁺, Rt: 3,90 min.

3-(4-fluorfenil)-7-(3-metil-1*H*-indazol-5-il)pirido[2,3-*b*]pirazin (33o)

A terméket DME-vel is mostam és exszikkátorban, foszfor-pentoxid felett tömegállandóságig szárítottam.

Termék: 42 mg barnássárga por. Kitermelés: 11,7 %. Olvadáspont: 291,8 - 294,8 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,80 (br s, 1H), 9,74 (s, 1H), 9,67 (s, 1H), 8,83 (s, 1H), 8,50 (br s, 2H), 8,43 (s, 1H), 7,98 (d, *J* = 7,29 Hz, 1H), 7,64-7,67 (m, 1H), 7,47-7,51 (m, 2H), 2,60 (s, 3H).

LCMS *m/z* 356 (M + H)⁺, Rt: 3,57 min.

7-(3-metil-1*H*-indazol-5-il)-3-(4-metoxifenil)pirido[2,3-*b*]pirazin (33p)

Termék: 109 mg barnássárga kristályos anyag/por. Kitermelés: 29,6 %. Olvadáspont: 269,2 - 272,0 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,80 (br s, 1H), 9,69 (s, 1H), 9,61 (s, 1H), 8,78 (s, 1H), 8,41 (br s, 3H), 7,96 (d, *J* = 7,67 Hz, 1H), 7,64 (d, *J* = 7,14 Hz, 1H), 7,19 (d, *J* = 7,98 Hz, 2H), 3,89 (s, 3H), 2,60 (s, 3H).

LCMS *m/z* 368 (M + H)⁺, Rt: 3,48 min.

7-(3-metil-1*H*-indazol-5-il)-3-[4-(morfolin-4-il)fenil]pirido[2,3-*b*]pirazin (33q)

Az oldószer 10 ml DMF-et is tartalmazott

Termék: 215 mg narancssárga por. Kitermelés: 50,9 %. Olvadáspont: 265,5 - 268,4 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,80 (s, 1H), 9,66 (s, 1H), 9,57 (d, *J* = 2,19 Hz, 1H), 8,74 (d, *J* = 2,07 Hz, 1H), 8,40 (s, 1H), 8,33 (d, *J* = 8,73 Hz, 2H), 7,95 (d, *J* = 8,70

Hz, 1H), 7,63 (d, $J = 8,70$ Hz, 1H), 7,16 (d, $J = 8,79$ Hz, 2H), 3,77-3,78 (m, 4H), 3,28-3,30 (m, 4H), 2,60 (s, 3H).

LCMS m/z 423 (M + H)⁺, Rt: 3,35 min.

7-(1*H*-indazol-5-il)-3-(3-klórfenil)pirido[2,3-*b*]pirazin (33r)

Termék: 76 mg halványsárga por. Kitermelés: 21,3 %. Olvadáspont: 317,1 - 319,1 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 13,27 (br s, 1H), 9,78 (s, 1H) 9,65 (s, 1H), 8,83 (s, 1H), 8,46 (s, 2H), 8,41 (br s, 1H), 8,22 (s, 1H), 8,01 (br s, 1H), 7,76 (br s, 1H), 7,68 (s, 2H).

LCMS m/z 358 (M + H)⁺, Rt: 3,78 min.

3-(4-fluorfenil)-7-(1*H*-indazol-5-il)pirido[2,3-*b*]pirazin (33s)

Termék: 36 mg halványsárga por. Kitermelés: 10,5 %. Olvadáspont: 323,8 - 325,4 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 13,29 (br s, 1H), 9,73 (s, 1H) 9,61 (s, 1H), 8,79 (s, 1H), 8,46 (s, 3H), 8,21-8,22 (m, 1H), 7,99 (d, $J = 6,27$ Hz, 1H), 7,74 (d, $J = 6,33$ Hz, 1H), 7,43-7,54 (m, 2H).

LCMS m/z 342 (M + H)⁺, Rt: 3,47 min.

3-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)-7-(1-metil-1*H*-indol-5-il)pirido[2,3-*b*]pirazin (33t)

Termék: 269 mg sárga por. Kitermelés: 68,4 %. Olvadáspont: 274,8 - 275,3 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,66 (s, 1H), 9,58 (br s, 1H), 8,71 (br s, 1H), 8,21 (s, 1H), 7,93-7,95 (m, 2H), 7,79 (d, $J = 8,64$ Hz, 1H), 7,64 (d, $J = 8,70$ Hz, 1H), 7,43 (d, $J = 2,40$ Hz, 1H), 7,11 (d, $J = 9,00$ Hz, 1H), 6,57 (d, $J = 2,10$ Hz, 1H), 4,35-4,36 (m, 4H), 3,87 (s, 3H).

LCMS m/z 395 (M + H)⁺, Rt: 4,23 min.

3-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)-7-(1*H*-indol-6-il)pirido[2,3-*b*]pirazin (33u)

Termék: 291 mg barnás sárga por. Kitermelés: 76,6 %. Olvadáspont: 346,2 - 347,2 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,34 (s, 1H), 9,67 (s, 1H), 9,56 (d, $J = 1,83$ Hz, 1H), 8,70 (d, $J = 1,80$ Hz, 1H), 7,96-7,98 (m, 3H), 7,74 (d, $J = 8,04$ Hz, 1H), 7,62 (d, J

= 8,10 Hz, 1H), 7,47-7,48 (m, 1H), 7,11 (d, $J = 9,00$ Hz, 1H), 6,53 (s, 1H), 4,36-4,37 (m, 4H).

LCMS m/z 381 (M + H)⁺, Rt: 3,98 min.

3-(4-fluorfenil)-7-(1H-indazol-6-il)pirido[2,3-*b*]pirazin (33v)

Termék: 25 mg halványsárga por. Kitermelés: 7,2 %. Olvadáspont: 314,9 - 316,8 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 13,30 (br s, 1H), 9,77 (s, 1H), 9,63 (s, 1H), 8,86 (s, 1H), 8,51 (s, 2H), 8,18 (s, 1H), 8,13-8,14 (m, 1H), 7,97 (d, $J = 7,14$ Hz, 1H), 7,73 (d, $J = 7,26$ Hz, 1H), 7,48-7,50 (m, 2H).

LCMS m/z 342 (M + H)⁺, Rt: 3,53 min.

***N*-(2-aminoetil)-4-[7-(1H-indol-5-il)pirido[2,3-*b*]pirazin-3-il]benzamid (34a)**

A terméket oszlopkromatográfiásan tisztítottam (töltet: 250-szeres tömegű Szilikagél 60, eluens kloroform - kloroform : metanol 5:1 + 1% TEA gradiens).

Termék: 13 mg narancssárga por. Kitermelés: 3,2 %. Olvadáspont: 235,1 - 236,4 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,35 (s, 1H), 9,78 (s, 1H), 9,63 (s, 1H), 8,75 (s, 2H), 8,50-8,53 (m, 2H), 8,23 (s, 1H), 8,10-8,13 (m, 2H), 7,74 (d, $J = 7,77$ Hz, 1H), 7,60 (d, $J = 8,13$ Hz, 1H), 7,46 (s, 1H), 6,58 (s, 1H), 3,37-3,39 (m, 2H), 3,25 (s, 2H), 2,81-2,82 (m, 2H).

LCMS m/z 409 (M + H)⁺, Rt: 2,37; 2,57min.

***N*-(2-acetamidoetil)-4-[7-(1H-indol-5-il)pirido[2,3-*b*]pirazin-3-il]benzamid (34b)**

Termék: 334 g sárga por. Kitermelés: 74,0 %. Olvadáspont: 286,5 - 288,0 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,33 (s, 1H), 9,78 (s, 1H), 9,64 (s, 1H), 8,75 (br s, 2H), 8,51 (br s, 2H), 8,24 (s, 1H), 8,10-8,00 (m, 3H), 7,70-7,76 (m, 1H), 7,57-7,63 (m, 1H), 7,46 (s, 1H), 6,58 (s, 1H), 3,15-3,35 (m, 4H), 1,83 (s, 3H).

LCMS m/z 451 (M + H)⁺, Rt: 2,89 min.

***tert*-Butil-{[2-({4-[7-(1H-indol-5-il)pirido[2,3-*b*]pirazin-3-il]benzoil}amino)etil]karbamát} (34c)**

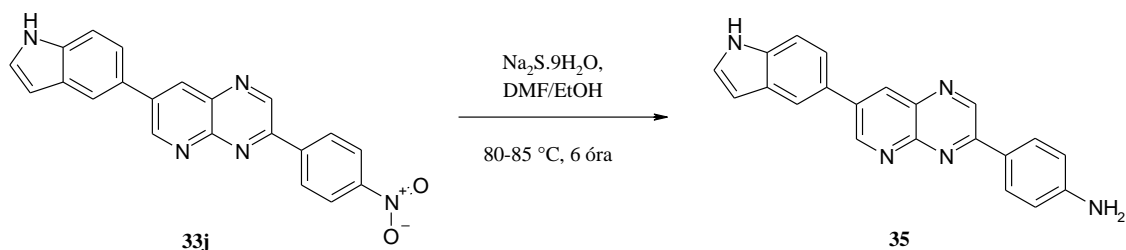
Termék: 26 mg zöldessárga por. Kitermelés: 5,2 %. Olvadáspont: 222,2 - 223,8 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 11,32 (s, 1H), 9,78 (s, 1H), 9,64 (s, 1H), 8,75 (s, 1H), 8,65 (br s, 1H), 8,51 (d, $J = 7,17$ Hz, 2H), 8,23 (s, 1H), 8,08 (d, $J = 6,99$ Hz, 2H), 7,75 (d, $J = 8,13$ Hz, 1H), 7,60 (d, $J = 8,13$ Hz, 1H), 7,46 (s, 1H), 6,94 (br s, 1H), 6,58 (s, 1H), 3,30-3,32 (m, 2H), 3,16-3,17 (m, 2H), 1,39 (s, 9H).

LCMS m/z 509 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$, Rt: 3,61 min

4.4.7. 4-[7-(1H-indol-5-il)pirido[2,3-b]pirazin-3-il]anilin (35) előállítás

7-(1H-indol-5-il)-3-(4-nitrofenil)pirido[2,3-b]pirazinból DMF és etanol oldószerkegyben, nátrium-szulfiddal állítottam elő a 4-[7-(1H-indol-5-il)pirido[2,3-b]pirazin-3-il]anilint.



2,00 g (5,45 mmol) **33j** nitro-vegyületet gömbömbikban szuszpendáltam 50 ml DMF és 50 ml etanol elegyében, és 80 - 85 °C-on kevertetem. Hozzáadtam 2,50 g (10,42 mmol) nátrium-szulfid nonahidrátot 150 ml etanos szuszpenzióban, majd 6 órán keresztül óránként 2,50 g (6 · 10,42 mmol) szilárd nátrium-szulfidot. A reakcióelegyet lehűtöttem, és szűrtem. A kiszűrt kristályokat 180 ml vízben 1 órát kevertetem, majd szűrtem, kétszer vízzel és háromszor etil-acetáttal mostam, a kristályokat exsikkátorban, foszfor-pentoxid felett tömegállandóságig szárítottam.

Termék: 1,48 g vörös por. Kitermelés: 80,4 %. Olvadáspont: 336,6 - 338,4 °C.

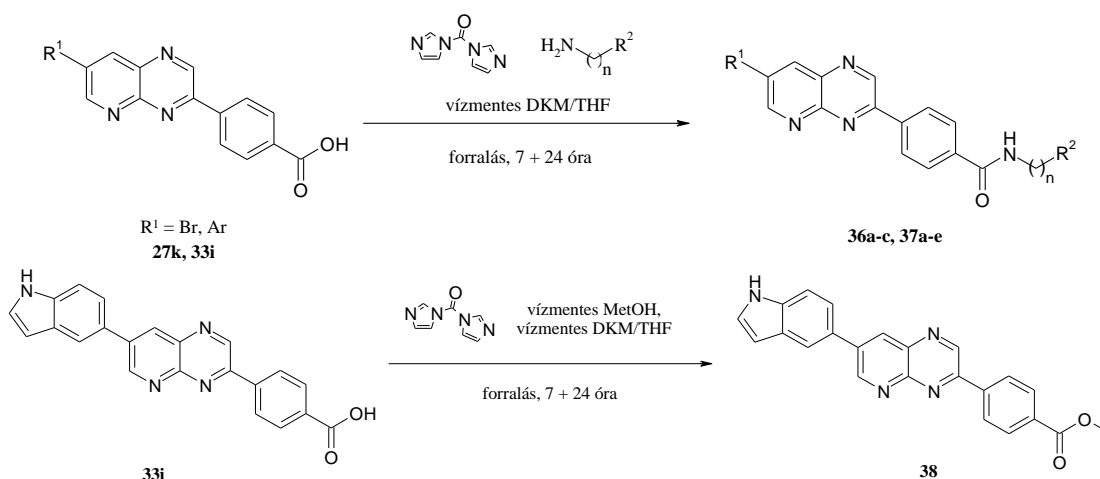
^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 11,27 (s, 1H), 9,55 (s, 1H), 9,47 (s, 1H), 8,60 (s, 1H), 8,11-8,19 (m, 3H), 7,68 (d, $J = 7,32$ Hz, 1H), 7,58 (d, $J = 7,35$ Hz, 1H), 7,44 (s, 1H), 7,75 (m, 2H), 6,56 (s, 1H), 5,88 (s, 2H).

LCMS m/z 338 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$, Rt: 3,33 min.

4.4.8. Az aktív **31n** molekulán savamid- és észter funkciós csoportok kialakítása oldékonyság javítása érdekében

Az aktív **31n** vegyület karboxilcsoportot tartalmazó származékát (**33i**) is preparáltam. Ezen a csoporton savamid kötések kialakításával sóképzésre alkalmas, védett vagy szabad amino-csoportot tartalmazó oldalláncokat vittem a molekulába (a kétféle

szintézis-stratégiát lásd 101. oldal, 27. ábra); továbbá a karboxil-csoport metil-észter származékát is előállítottam. Ehhez a megfelelő karbonsavat 1,1'-karbonil-diimidazollal vízmentes DKM és THF oldószerkelegben aktív savimidazoliddá alakítottam. [134] Az így aktivált karbonsav-származékot reagáltattam el a megfelelő aminnal illetve alkohollal.



A megfelelő karbonsav-származékból (1 mmol) gömblombikban 0,01 M-os oldatot vagy híg szuszpenziót készítettem vízmentes DKM és vízmentes THF 1:1 arányú elegyében és hozzáadtam 1,1 ekvivalens 1,1'-karbonil-diimidazolt. 7 órát forraltam, majd hozzáadtam 1,16 ekvivalens megfelelő vízmentes amin vagy alkoholt 0,5 M-os vízmentes THF oldatban. Az elegyet 24 órát forraltam, majd (a kiindulási karbonsav-származék tömegének 20-szorosával azonos mennyiségű) bázikus alumínium-oxid töltetű oszlopon átfolyattam. Az oldatot vákuumban bepároltam, a maradékot pedig oszlopkromatográfiásan tisztítottam (töltet: 350-szeres tömegű Szilikagél 60, eluens kloroform : metanol 20:1 - 10:1 - 10:1 + 1% TEA gradiens).

Az így előállított termékek:

***N*-(2-aminoetil)-4-(7-brómpirido[2,3-*b*]pirazin-3-il)benzamid (36a)**

20 ekvivalens amin felesleget használtam.

Termék: 339 mg halványsárga por. Kitermelés: 91,1 %. Olvadáspont: 410+ °C.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 9,82 (s, 1H), 9,29 (s, 1H), 8,95 (br s, 2H), 8,52 (d, $J = 7,32$ Hz, 2H), 8,13 (d, $J = 7,29$ Hz, 2H), 3,55 (s, 2H), 3,44-3,46 (m, 2H), 3,08-3,12 (m, 2H).

LCMS m/z 372 (M + H)⁺, Rt: 0,45; 2,28; 2,48 min.

***N*-(2-acetamidoetil)-4-(7-brómpirido[2,3-*b*]pirazin-3-il)benzamid (36b)**

Termék: 144 mg világosbarna por. Kitermelés: 34,8 %. Olvadáspont: 283,4 - 285,4 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,81 (s, 1H), 9,28 (s, 1H), 8,94 (s, 1H), 8,75 (br s, 1H), 8,45-8,55 (m, 2H), 8,01-8,11 (m, 3H), 3,26-3,34 (m, 2H), 3,20-3,26 (m, 2H), 1,83 (s, 3H).

LCMS m/z 414 (M + H)⁺, Rt: 2,68 min.

***terc*-Butil-[(2-([4-(7-brómpirido[2,3-*b*]pirazin-3-il)benzoil]amino)etil)karbamát] (36c)**

Termék: 207 mg halványsárga por. Kitermelés: 43,8 %. Olvadáspont: 231,6 - 233,7 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,81 (s, 1H), 9,28 (s, 1H), 8,94 (s, 1H), 8,65 (s, 1H), 8,50 (d, *J* = 7,33 Hz, 2H), 8,08 (d, *J* = 7,36 Hz, 2H), 6,93 (s, 1H), 3,36-3,40 (m, 2H) 3,14-3,16 (m, 2H), 1,38 (s, 9H).

LCMS m/z 472 (M + H)⁺, Rt: 3,55 min.

***N*-[3-(dimetilamino)propil]-4-[7-(1*H*-indol-5-il)pirido[2,3-*b*]pirazin-3-il]benzamid (37a)**

Termék: 30 mg sárga por. Kitermelés: 6,7 %. Olvadáspont: 153,6 - 156,9 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,31 (s, 1H), 9,78 (s, 1H), 9,62 (s, 1H), 8,80 (s, 1H), 8,71 (s, 1H), 8,49 (d, *J* = 7,14 Hz, 2H), 8,22 (s, 1H), 8,08 (d, *J* = 7,20 Hz, 2H), 7,73 (d, *J* = 7,95 Hz, 1H), 7,58 (d, *J* = 7,89 Hz, 1H), 7,44 (s, 1H), 6,57 (s, 1H), 3,16-3,17 (m, 2H), 2,25-2,30 (m, 2H), 2,14 (br s, 6H), 1,70 (br s, 2H).

LCMS m/z 451 (M + H)⁺, Rt: 0,44; 2,38; 2,63 min.

4-[7-(1*H*-indol-5-il)pirido[2,3-*b*]pirazin-3-il]-*N*-[2-(piperidin-1-il)etil]benzamid (37b)

Termék: 79 mg sárga por. Kitermelés: 16,5 %. Olvadáspont: 174,2 - 177,0 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,32 (s, 1H), 9,78 (s, 1H), 9,64 (s, 1H), 8,75 (s, 1H), 8,60 (br s, 1H), 8,51 (d, *J* = 6,39 Hz, 2H), 8,23 (s, 1H), 8,08 (d, *J* = 6,51 Hz, 2H),

7,74 (d, $J = 7,23$ Hz, 1H), 7,60 (d, $J = 7,65$ Hz, 1H), 7,46 (s, 1H), 6,58 (s, 1H), 3,41-3,42 (m, 2H), 2,41-2,43 (m, 6H), 1,51 (br s, 4H), 1,39 (br s, 2H).

LCMS m/z 477 (M + H)⁺, Rt: 0,46; 2,51; 2,73 min.

4-[7-(1H-indol-5-il)pirido[2,3-*b*]pirazin-3-il]-N-[2-(morfolin-4-il)etil]benzamid (37c)

Termék: 91 mg narancssárga por. Kitermelés: 19,0 %. Olvadáspont: 129,0 - 132,1 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,31 (s, 1H), 9,77 (s, 1H), 9,63 (s, 1H), 8,74 (s, 1H), 8,59 (s, 1H), 8,50 (d, $J = 6,45$ Hz, 2H), 8,23 (s, 1H), 8,08 (d, $J = 6,45$ Hz, 2H), 7,71 (d, $J = 7,74$ Hz, 1H), 7,60 (d, $J = 7,71$ Hz, 1H), 7,45 (s, 1H), 7,03 (br s, 1H), 6,58 (s, 1H), 3,08-3,50 (m, 7H), 2,34-2,60 (m, 4H).

LCMS m/z 479 (M + H)⁺, Rt: 0,46; 2,41; 2,64 min.

4-[7-(1H-indol-5-il)pirido[2,3-*b*]pirazin-3-il]-N-[3-(4-metilpiperazin-1-il)propil]benzamid (37d)

Termék: 30 mg sárga por. Kitermelés: 5,9 %. Olvadáspont: 252,4 - 254,0 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,33 (s, 1H), 9,78 (s, 1H), 9,64 (s, 1H), 8,75 (s, 1H), 8,70 (br s, 1H), 8,51 (d, $J = 7,80$ Hz, 2H), 8,23 (s, 1H), 8,08 (d, $J = 7,80$ Hz, 2H), 7,75 (d, $J = 8,52$ Hz, 1H), 7,60 (d, $J = 8,25$ Hz, 1H), 7,46 (s, 1H), 6,58 (s, 1H), 2,32-2,37 (m, 10H), 2,14-2,15 (m, 3H), 1,71 (t, $J = 6,45$ Hz, 2H), 1,03 (d, $J = 6,00$ Hz, 2H).

LCMS m/z 506 (M + H)⁺, Rt: 0,45; 2,13; 2,43 min.

4-[7-(1H-indol-5-il)pirido[2,3-*b*]pirazin-3-il]-N-[2-(1-metilpirrolidin-2-il)etil]benzamid (37e)

Termék: 95 mg sárga por. Kitermelés: 20,0 %. Olvadáspont: 164,6 - 167,2 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,32 (s, 1H), 9,77 (s, 1H), 9,64 (s, 1H), 8,75 (s, 1H), 8,68 (br s, 1H), 8,51 (d, $J = 7,62$ Hz, 2H), 8,23 (s, 1H), 8,07 (d, $J = 7,95$ Hz, 2H), 7,74 (d, $J = 8,49$ Hz, 1H), 7,60 (d, $J = 8,43$ Hz, 1H), 7,46 (s, 1H), 6,58 (s, 1H), 3,27-3,35 (m, 2H), 2,91-2,98 (m, 1H), 2,23 (s, 3H), 1,86-2,10 (m, 4H), 1,59-1,66 (m, 2H), 1,43-1,52 (m, 2H).

LCMS m/z 477 (M + H)⁺, Rt: 0,45; 2,46; 2,68 min.

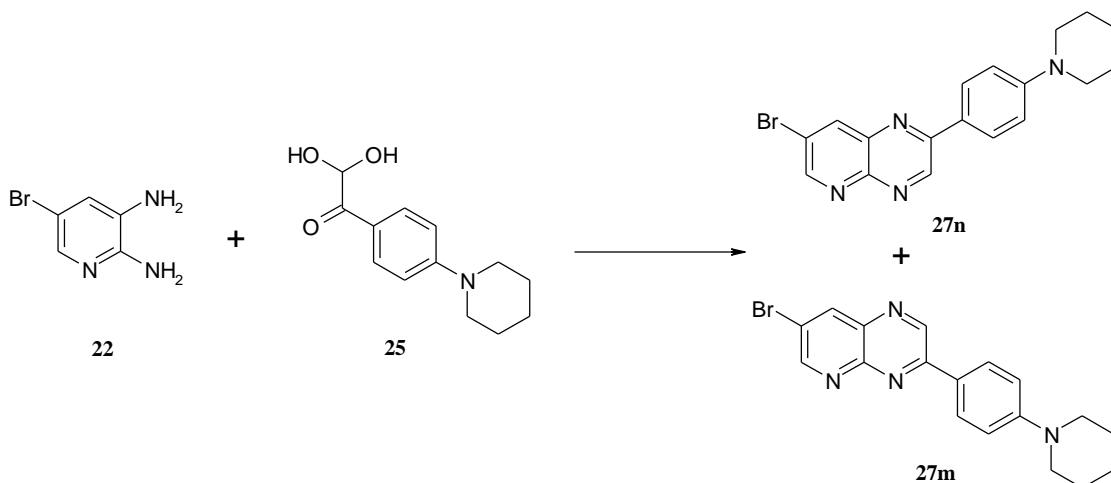
metil-{4-[7-(1*H*-indol-5-il)pirido[2,3-*b*]pirazin-3-il]benzoát} (38)

Termék: 50 mg citromsárga por. Kitermelés: 13,2 %. Olvadáspont: 271,5 - 272,2 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,32 (s, 1H), 9,77 (s, 1H), 9,64 (s, 1H), 8,74 (s, 1H), 8,55 (d, *J* = 7,71 Hz, 2H), 8,23 (s, 1H), 8,19 (d, *J* = 7,77 Hz, 2H), 7,74 (d, *J* = 8,07 Hz, 1H), 7,60 (d, *J* = 8,37 Hz, 1H), 7,46 (s, 1H), 6,58 (s, 1H), 3,92 (s, 3H).

LCMS *m/z* 381 (M + H)⁺, Rt: 3,93 min.

4.5. A kondenzációs reakció regioizomériájának vizsgálata, szelektivitásának optimalizálása



25. ábra. A vizsgált kondenzációban kétféle regioizomer keletkezésére van lehetőség.

Különböző tényezők hatását vizsgáltam a reakció szelektivitására: hőmérséklet, sav-bázis katalízis, kiinduló anyagok feleslege és vízmegkötő molekulaszita. Továbbá vizsgáltam a termékek hőstabilitását, és azt, hogy a regioizomerek hő hatására izomerizálódhatnak-e. A regioizomerek szerkezetét NMR analízis és röntgenkristallográfia segítségével igazoltuk, és azonosítottunk bizonyos reakciókörülmények között keletkező két bomlásterméket.

A vizsgálat során mind a két kiinduló anyagból 42,6 mM-os DMF-es, TFE-s és ecetsavas törzsoldatot készítettem. A DMF alkalmas volt a szokásosan alkalmazott reakcióhőmérsékleteken való vizsgálathoz (-25 - 120 °C). Ezeket azonos térfogatban zárt edényekbe szétmértem, esetenként a katalizátort a piridin-2,3-diamin komponens

oldatához adtam (0,5 M-os azonos oldószerből készített törzsoldatból, tömeg szerint bemérve). **22** három, **25** pedig egy bázikus nitrogént tartalmaz, ezért a savas katalízis hatásának vizsgálatakor a legalacsonyabb savkoncentráció esetében öt ekvivalens ecetsavat használtam. A kiindulási anyagok feleslegének vizsgálatakor a megfelelő törzsoldatból háromszoros mennyiséget mértem be. Az edényeket a vizsgálni kívánt hőmérsékleten temperáltam, majd a hőmérséklet beálltával a két, kiindulási anyagot tartalmazó oldatot elegyítettem. A HPLC méréshez minden alkalommal 200 µl mintát vettünk, amit 3,00 ml acetonitrillel hígítottunk. TFE-t tartalmazó minta esetén az acetonitril 300 µl TEA-t is tartalmazott. A mérés során ezen oldatokból 10 µl mintát injektáltunk. A mérést a III. eljárás szerint végeztük.

A bomlástermék azonosítása ^1H NMR és LCMS mérés segítségével történt.

A **27m** vegyület röntgenkrisztallográfiás szerkezetazonosítása során használt kristály adatai: a méréshez használt egykristályt az anyag 1,4-dioxános oldatából kristályosítottuk 9 nap alatt. A $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{Br}$ összegképletű, vörös, lapos kristály hozzávetőleges méretei 1,60 x 0,27 x 0,04 mm. A kristályt kaktusz tüskére erősítve vizsgáltuk. A mérésekhez Rigaku RAXIS RAPID imaging plate area detektort használtunk, grafit monokróm Cu- K_α besugárzással. Az indexelést 4 oszcillációval végeztük, az expozíció 300 másodperc volt. A kristály-detektor távolság 127,40 mm volt. A cellaállandó és az adatgyűjtéshez használt orientációs mátrix egy $a = 5,0325(7)$ Å, $b = 11,1293(15)$ Å, $\beta = 96,771(7)^\circ$, $c = 28,520(4)$ Å, $V = 1586,2(4)$ Å³ méretű primitív monoklonikus cellát határozott meg. A tércsoport: P21/n (#14). A szerkezet krisztallográfiás adatait a Cambridge Crystallographic Data Centre-ben letétbe helyeztük CCDC 901358 számon.

A 4.4.3. pontban leírt reakciók fő komponensként keletkező regioizomer röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálatát a szubsztituátlan **27a** származék esetében is elvégeztük. A röntgenkrisztallográfia során használt kristály adatai: a méréshez használt egykristályt az anyag toluolos oldatából kristályosítottuk 14 nap alatt. A $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{N}_3\text{Br}$ összegképletű, színtelen, lapos kristály hozzávetőleges méretei 2,00 x 0,11 x 0,07 mm. A kristályt kaktusz tüskére erősítve vizsgáltuk. A mérésekhez Rigaku RAXIS RAPID imaging plate area detektort használtunk, grafit monokróm Cu- K_α besugárzással. Az indexelést 4 oszcillációval végeztük, az expozíció 60 másodperc volt. A kristály-detektor távolság 127,40 mm volt. A cellaállandó és az adatgyűjtéshez használt

orientációs mátrix egy $a = 12,1154(7) \text{ \AA}$, $b = 7,4094(4) \text{ \AA}$, $\beta = 96,771(7)^\circ$, $c = 25,4854(13) \text{ \AA}$, $V = 2287,8(2) \text{ \AA}^3$ méretű primitív ortorombuszos cellát határozott meg. A tércsoport: Pbc_a (#61).

5. Eredmények

5.1. Fókuszált vegyülettár előállítás a 29a új szerkezet köré

Az irodalmi adatok alapján Akt gátló hatású 2,3,7-tri(2-tienil)pirido[2,3-*b*]pirazin és A-674563 számú vegyület szerkezetéből kombinálva új, szabadalmaztatható származékokat állítottam elő (lásd 4.4).

A kiindulási szerkezet (**29a**) szubsztituensein az alábbi módosításokat végeztem:

- I. 2-es helyzetű hidrogén helyettesítése aromás- vagy heteroaromás-gyűrűkkel;
- II. 3-as helyzetű fenil-csoport cseréje heteroaromás-gyűrűkre, illetve szubsztituált fenil-csoportra; továbbá lehet szubsztituálatlan a 3-as pozíció;
- III. 7-es helyzetű metilindazol gyűrű helyettesítése más aromás és heteroaromás gyűrűkkel.

Az alapszerkezetet a felsorolt pontokon változtatva vizsgáltuk a módosítások hatását a biológiai eredményekre. A legjobb hatású származékokat kiválasztottam, és ezek szerkezetét vettem alapul a következő módosításhoz. Ilyen iterációs ciklusokon keresztül jutottam a leghatékonyabb származékokhoz.

Mivel célunk volt, hogy olyan vegyületeket állítsunk elő, melyek az erlotinibre érzékeny és az arra rezisztens sejtvonalakat egyaránt gátolják, ezért az összehasonlítás céljából meghatároztuk az erlotinib EC_{50} értékét az általunk használt rendszerben. Meghatároztuk továbbá a két, kiindulási alapot szolgáltató Akt gátló vegyület EC_{50} értékét, hogy meg tudjuk állapítani, hogy az új szerkezetek eredményeztek-e jobb hatást (2. táblázat).

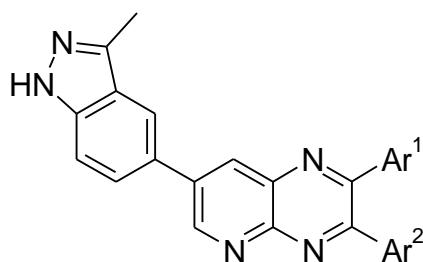
2. táblázat. A referencia anyagok hatása PC9 és PC9-ER sejtvonalakon.

Vegyület	PC9 (EC_{50} ; μ M)	PC9-ER (EC_{50} ; μ M)
Erlotinib	0,005	5,65
A-674563 (1)	0,91	0,82
3	>30	15,64

1. Az első iterációs ciklusban a pirazin gyűrű 2, 3 helyzetű szimmetrikus szubsztitúciójával foglalkoztam. Előállítottam a következő öt származékot: difenil,

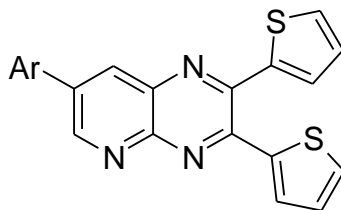
bisz(4-metilfenil), bisz(4-fluorfenil), bisz(3-bróm-6-hidroxifenil), di(2-tienil). Ez az öt anyag a vegyülettárunk részét képezte, melyet két sejtvonalon MTS szűrővel vizsgáltunk. A kiindulási alapszerkezetű **29a** vegyület hatékonynak bizonyult, és bár a para-fluorfenil-származék jobb hatást mutatott a többinél, a 2-helyzetű szubsztitúció általánosan rontott a vegyületek hatásán (3. táblázat). Ezen vegyületek előállításához az analóg irodalmi módszert követve Stille-reakciót alkalmaztam. [115] A megfelelő boronsav-származék előállítása után viszont a **29a** vegyület előállítható volt Suzuki-reakcióval is. Mivel a Suzuki-reakció előnyösebbnek bizonyult (lásd 4.4.4.), a tovább szintéziseket ezzel a kapcsolási módszerrel végeztem. Ezen felül előállítottam négy di(2-tienil)-származékot, melyek szintén a vegyülettár részét képezték. Ezeket a vegyületeket Suzuki-reakcióval állítottam elő, és a 7-es pozícióban különböző szubsztituált fenil-gyűrűket tartalmaztak. A 2,3-diszubsztituált származékok metilindazol gyűrűjének cseréje tovább rontotta a hatást (4. táblázat).

3. táblázat. A 2,3-diszubsztituált indazol származékok hatása PC9 és PC9-ER sejteken.



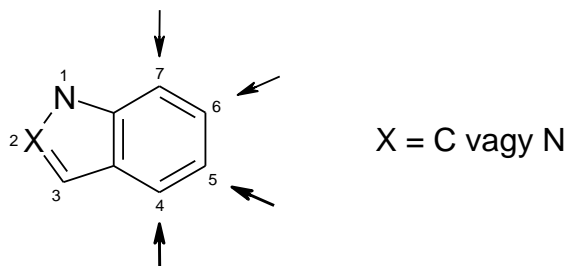
Vegyület	Ar ¹	Ar ²	PC9 (EC ₅₀ , μM)	PC9-ER (EC ₅₀ , μM)
29a	H		1,86	2,34
29b			>30	21,97
29c			11,60	18,27
29d			6,90	5,74
29e			>30	>30
29f			10,77	11,01

4. táblázat. A 2,3-diszubsztituált tienil-származékok hatása PC9 és PC9-ER sejteken.



Vegyület	Ar	PC9 (EC ₅₀ , μM)	PC9-ER (EC ₅₀ , μM)
30a		>30	>30
30b		>30	>30
30c		>30	>30
30d		>30	>30

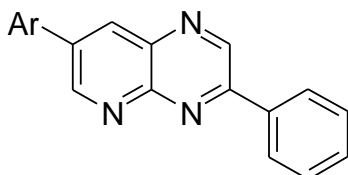
2. A második iterációs ciklusban a **29a** szerkezet további változtatásával folytattam a fejlesztést. A 7-es helyzetű metilindazol gyűrűt helyettesítettem más aromás és heteroaromás gyűrűkkel. Az előállított húsz származék biológiai mérése alapján kiderült, hogy csak azok a származékok hatásosak, amelyekben a 7-es helyzetű, nitrogént tartalmazó heteroaromás rendszer indol vagy indazol (5. táblázat). Továbbvizsgálva az is kiderült, hogy az indol és indazol gyűrűk kapcsolódási helye is meghatározó a hatás szempontjából: a hatásos származékok a 4- illetve 5-indolil- és 5-indazolil-szubsztituáltak (26. ábra).



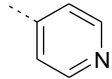
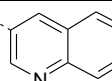
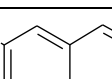
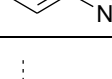
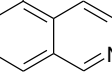
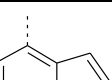
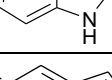
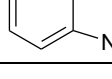
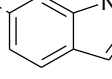
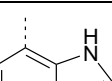
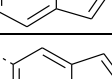
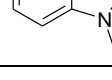
26. ábra. Az indol és indazol gyűrűk kapcsolódási helye meghatározó a hatás szempontjából.

A hatás szerkezeti feltételeinek további vizsgálata kimutatta, hogy az indol/indazol gyűrű 1-nitrogénnek szubsztituálatlanak kell lennie: ha a nitrogénhez kapcsolódó hidrogént metil-csoporttal helyettesítjük, a biológiai hatás ismét csökken.

5. táblázat. A pirido[2,3-*b*]pirazin alapváz 7-es helyzetű szubsztituensének változtatása.



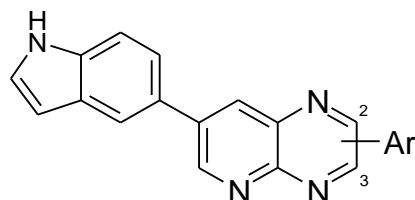
Vegyület	Ar	PC9 (EC ₅₀ , μM)	PC9-ER (EC ₅₀ , μM)
29a		1,86	2,34
31b		11,88	18,72
31c		>30	>30
31a		>30	5,06
31d		9,35	6,17
31e		9,63	8,82
31g		11,30	11,11
31h		>30	>30
31i		6,29	8,96

31f		>30	>30
31j		>30	>30
31k		>30	>30
31l		>30	30,00
31m		0,78	2,56
31n		0,36	4,43
31o		>30	>30
31p		>30	>30
31q		>30	>30
31r		1,28	1,39
31s		>30	>30
31t		>30	>30

3. Mint az első pontban láthattuk, a diszubsztituált pirazint tartalmazó vegyületek rosszabb hatással rendelkeztek, mint a 3-as helyzetben monosubsztituált **29a** származék. Következő lépésben azt vizsgáltuk, hogy ha a monosubsztituált származék nem 3-as, hanem 2-es helyzetben tartalmaz subsztituenst, az hogyan befolyásolja a sejtek gátlását. Két, az addigi mérések alapján hatékony szerkezeten hajtottam végre ezt

a módosítást. Az eredmények azt mutatták, hogy a monoszubsztituált származék esetében is rontja a hatást a 2-es szubsztitúció (6. táblázat).

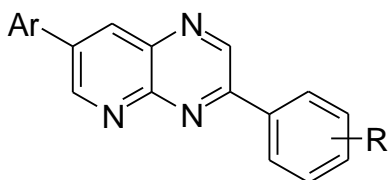
6. táblázat. Az aromás szubsztituens áthelyezése 3-helyzetből 2-helyzetbe.



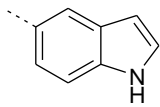
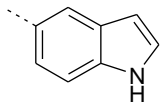
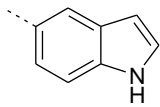

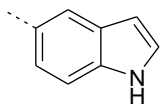

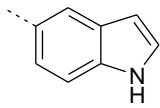

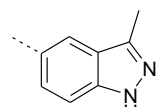
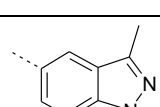
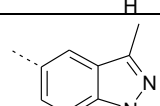

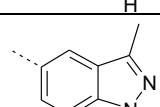
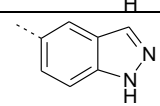
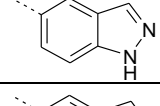
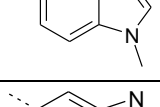

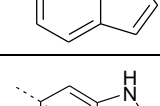

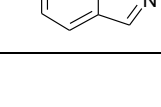
Vegyület	Pozíció	Ar	PC9 (EC ₅₀ , μM)	PC9-ER (EC ₅₀ , μM)
31n	3		0,36	4,43
32a	2		18,42	23,02
33k	3		0,14	0,20
32b	2		9,03	12,88

4. A harmadik iterációs ciklusban a 3-as helyzetű fenil-csoportra építettem különböző szubsztituenseket. Huszonhárom ilyen vegyületet állítottam elő. 2-es, 3-as és 4-es helyzetben monoszubsztituált származékokat állítottam elő. A szubsztituensek halogén-, hidroxi-, metoxi-, metil-, trifluormetil-, amin-, nitro- és karboxil-csoportok, valamint piperidin és morfolin gyűrűk voltak. A fenil-gyűrű 3,4-etiléndioxi-szubsztitúciójával egy biciklus származékot is készítettem. Több molekula esetén előállítottam a 7-es helyzetű indol-5-il, indazol-5-il, indol-6-il, indazol-6-il, 3-metilindazol-5-il, és 1-metilindol-5-il változatot (7. táblázat).

7. táblázat. A 3-fenil-csoport szubsztitúciójának hatása a PC9 és PC9-ER sejtek proliferáció gátlásra.



Vegyület	Ar	R szubsztituens pozíciója	R	PC9 (EC ₅₀ , μM)	PC9-ER (EC ₅₀ , μM)
31n		-	H	0,36	4,43
33a		2	OCH ₃	0,10	0,36
33b		3	Cl	0,87	1,29
33c		4	CH ₃	>30	>30
33d		4	F	0,94	1,02
33e		4	Cl	>30	>30
33f		4	CF ₃	7,89	10,01
33g		4	OH	4,31	9,10
33h		4	OCH ₃	1,11	9,40
33i		4	COOH	>30	>30

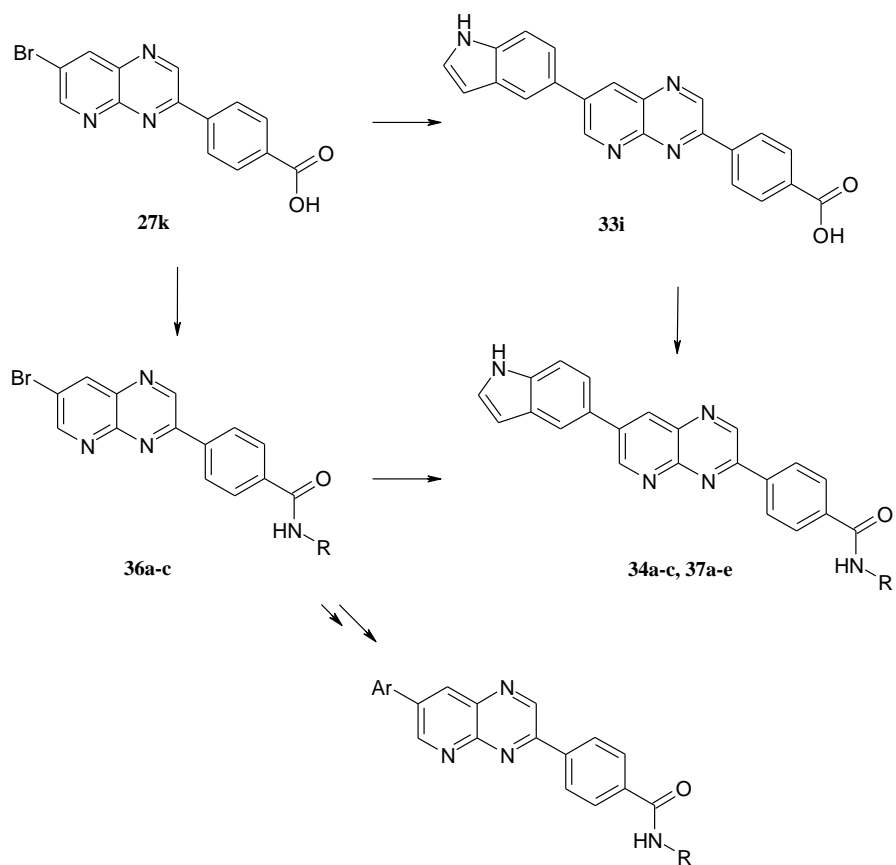
35		4	NH ₂	10,33	5,53
33j		4	NO ₂	>30	>30
33k		4		0,14	0,20
33l		4		0,32	0,59
33m		3,4		0,09	0,15
33n		3	Cl	>30	>30
33o		4	F	25,03	27,58
33q		4		2,33	17,95
33p		4	OCH ₃	0,53	0,47
33s		4	F	>30	>30
33r		3	Cl	0,25	0,30
33t		3,4		0,49	0,57
33u		3,4		10,55	13,45
33v		4	F	>30	>30

5. A fejlesztés negyedik lépésében a célom az volt, hogy olyan oldalláncokat vigyek a molekulába, amely annak vízoldhatóságát javítja. Az oldhatóság az egyik legfontosabb

fizikai-kémiai sajátosság, ami a vegyületek szerkezetbeli sorsát alapvetően meghatározza. Az anyagok rossz oldhatósága egyrészt hibás eredményeket okozhat a biológiai vizsgálat során, másrészt ronthatja a vegyületek ADME paramétereit. Az oldhatóság javítására használt, kémiai átalakítással megvalósítható módszerek egyike a szolubilizációs csoportok bevezetése. Ezekkel módosíthatjuk a vegyületek ionizációs sajátosságait vagy lipofilitását. [135]

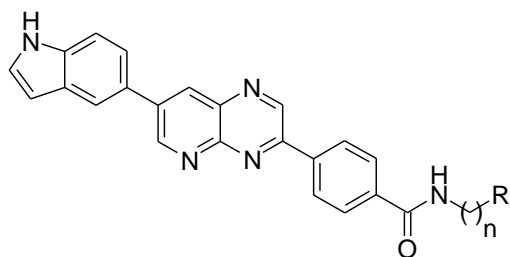
Ilyen származékok előállításához bázikus, alifás amin-csoportot tartalmazó oldalláncokat alkalmaztam, amelyek sóképzésre is alkalmasak lehetnek. Nyolc ilyen vegyületet készítettem el. A **34a**, **34b** és **34c** számú anyagok előállítása esetében a 4.4.8.-ben leírt acilezési reakciót a Suzuki-kapcsolást megelőző lépésben, a brómvegyülettel végeztem. Az így kapott intermediereken keresztül más 7-es helyzetű helyettesítővel rendelkező molekulákhoz juthatunk (ezen molekulák nem képezik a doktori értekezés témáját). A másik öt származék a **33i** vegyületből készült (27. ábra). Továbbá előállítottam egy észter származékot is (8. táblázat).

A vegyületek vízdoldhatóságát 7,4-es és 2,0-es pH-n mértük (1. melléklet). A vizes oldatok koncentrációját a 8. táblázatban tüntettem fel. Az alifás amint tartalmazó származékok vízdoldhatósága mindkét pH-n javult a **31n** kiindulási vegyülethez képest, savas pH-n nagyobb mértékben. Az amid származékok vízdoldhatósága pH 7,4-en javult, de savas pH-n szignifikánsan nem változott (**34b**, **34c**). A **38** észter-származék vízdoldhatósága a kiindulási vegyülettel megközelítőleg azonos mindkét pH-n.



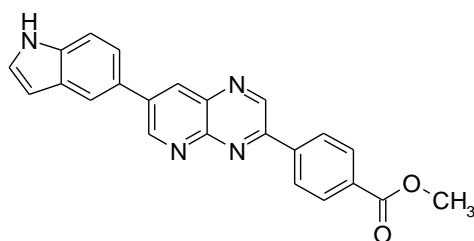
27. ábra. A benzamid származékok előállításának kétféle reakcióútja.

8. táblázat. Vízoldhatóságot növelő csoportok bevitelének hatása a PC9 és PC9-ER sejtek proliferáció gátlására és a vízoldhatóság 7,4 és 2,0 pH-n.



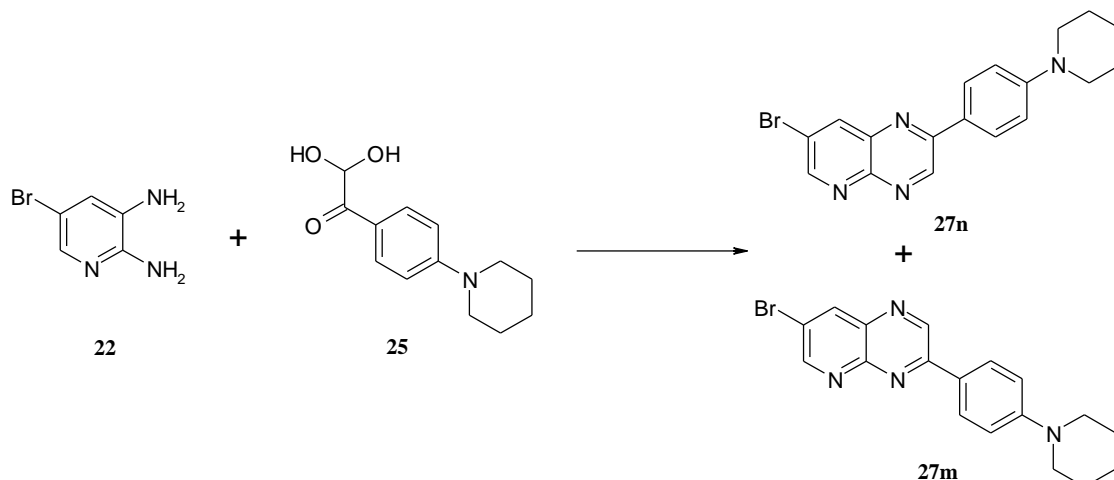
	n	R	PC9 (EC ₅₀ , μM)	PC9-ER (EC ₅₀ , μM)	Vízoldhatóság (μM, pH=7,4)	Vízoldhatóság (μM, pH=2,0)
31n^a	-	-	0,36	4,43	4,01	6,65
34a	2	NH ₂	27,72	19,65	30,49	19,30
34b	2		4,13	>30	23,13	5,00
34c	2		6,91	24,29	24,42	4,05
37c	2		3,62	11,34	8,52	100,92
37e	2		2,87	5,99	55,18	121,19
37a	3	N(CH ₃) ₂	2,93	4,54	22,00	111,59
37b	2		3,19	3,97	18,68	116,63
37d	3		2,72	4,71	24,03	119,04

^aa szerkezetet lásd 95. oldal, 5. táblázat.



Vegyület	PC9 (EC ₅₀ , μM)	PC9-ER (EC ₅₀ , μM)	Vízoldhatóság (μM, pH=7,4)	Vízoldhatóság (μM, pH=2,0)
38	16,36	29,67	6,08	6,67

5.2. Regioszelektív szintézis és a regioizomerek azonosítása



A hőmérséklet hatása a regioszelektivitásra

Szobahőmérsékleten és a fölött az izomerek aránya megközelítően 1:1 volt, de csökkentve a hőmérsékletet **27m** aránya nőtt, a reakció sebesség viszont csökkent (9. táblázat). A hőmérséklet emelésével (70 °C és 120 °C) bomlástermékek megjelenése volt tapasztalható.

9. táblázat. A kondenzáció szelektivitása különböző hőmérsékleteken (oldószer DMF).

	-25 °C	0 °C	Szobahőmérséklet	70 °C	120 °C
27m:27n	93:7	71:29	58:42	42:58	42:58
Reakció idő	60 nap ^a	25 nap	8 nap	3 óra	< 20 perc

^aA reakció nem teljes, **22** 42 %-a illetve **25** 44 %-a jelen van a reakcióelegyben

A sav-bázis katalízis hatása a regioszelektivitásra

Ecetsavban **27m** nagyobb arányban keletkezett, mint DMF-ben. Az erősebben savas TFE-ben a szelektivitás tovább nőtt. DMF-fel hígítva a TFE-t csökkent a szelektivitás. A legjobb eredményt 0 °C-on, tiszta TFE oldószerben tudtam elérni. Megállapítottam, hogy a reakciósebesség savas közegben megnövekedett (10. táblázat). Bázikus katalizátort (DBU) használva bomlástermékek megjelenése volt tapasztalható.

10. táblázat. A kondenzáció szelektivitása savas oldószerekben.

	ecetsav ^a	TFE:DMF 1:3 ^a	TFE:DMF 3:1 ^a	TFE ^a	TFE (0 °C)
27m:27n	84:16	79:21	92:8	96:4	98:2
Reakcióidő	40 perc	1,5 óra	<20 perc	<20 perc	5 óra

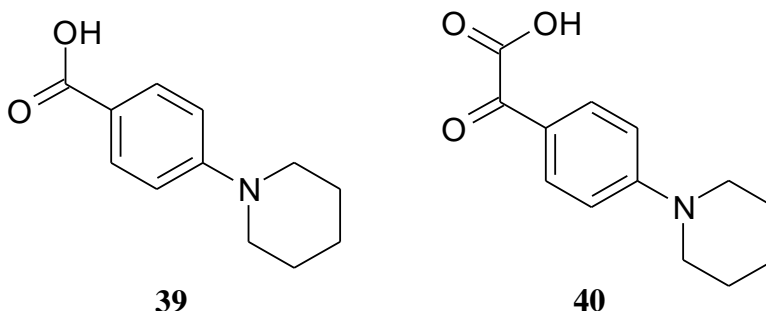
^aszobahőmérséklet

További tényezők szelektivitásra gyakorolt hatásának vizsgálata

Vizsgáltam vízmegkötő molekulaszitának és a kiinduló anyagok feleslegének hatását. A regioizomériát befolyásoló egyéb tényezőt nem találtam (lásd 6.2.).

Bomlástermékek azonosítása és a megmaradt kiindulási anyagok mennyiségének meghatározása

Bizonyos reakció körülmények között **25** bomlást szenvedett (28. ábra; részletesen lásd 6.2.).



28. ábra. A **25** vegyület bomlástermékei.

A 4-(piperidin-1-yl)benzoésav (**39**) bomlástermék azonosítása ¹H-NMR és LCMS mérés segítségével történt.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,14 (br s, 1H, COOH), 7,74 (d, *J* = 8,40 Hz, 2H, 2-CH + 6-CH) 6,92 (d, *J* = 8,40 Hz, 2H, 3-CH + 5-CH), 3,32 (m, 4H, 2-CH₂ + 6-CH₂-piperidin), 1,58 (m, 6H, 3-CH₂ + 4-CH₂ + 5-CH₂-piperidin).

LCMS *m/z* 206 (M + H)⁺, Rt: 3,06 min.

Az oxo[4-(piperidin-1-yl)fenil]ecetsav (**40**) bomlástermék termék azonosítása LCMS mérés segítségével történt.

LCMS m/z 234 ($M + H$)⁺, Rt: 3,54 min.

A -25 °C-on végzett mérés során a kondenzációs reakció nem zajlott le teljes mértékben. 60 nap után a kiinduló anyagok mennyisége nem csökkent tovább. Az LCMS kromatogram segítségével, az elnyeléssel arányos csúcs alatti terület alapján határoztuk meg az el nem reagált kiindulási anyag mennyiségét. A kiindulási értéket azonos koncentrációjú kiindulási anyagot tartalmazó minta külön mérésével határoztuk meg.

Az 5-brómpiridin-2,3-diamin két csúcsot adott a kromatogramon, ezek összegét használtuk a számításhoz: $(5164,76 + 9253,00) / (7895,39 + 26859,23) \cdot 100 = 41 \%$.

Az érték a [4-(piperidin-1-il)fenil]etándion esetén: $8942,57 / 20187,38 \cdot 100 = 44\%$.

A regioizomerek azonosítása

A regioizomerek jellemzése HPLC retenciós idejükkal (retenciós idők: **27m** 9,37 perc, **27n** 9,96 perc) és az NMR spektrumaikkal történt. Tömegspektrometriás fragmenseikben és az UV spektrumaikban nem mutatkozott szignifikáns különbség.

A **27m** vegyület NMR mérési eredményei:

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 9,33 (s, 1H, 2-CH), 9,07 (d, $J = 2,40$ Hz, 1H, 6-CH), 8,51 (d, $J = 2,40$ Hz, 1H, 8-CH), 8,23 (d, $J = 9,10$ Hz, 2H, 2'-CH + 6'-CH), 6,99 (d, $J = 9,00$ Hz, 2H, 3'-CH + 5'-CH), 3,37 (m, 4H, 2-CH₂ + 6-CH₂-piperidin), 1,70 (m, 4H, 3-CH₂ + 5-CH₂-piperidin), 1,66 (m, 2H, 4-CH₂-piperidin).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): 154,81 (6-C), 154,49 (8a-C), 153,45 (4'-C), 149,69 (4a-C), 144,76 (2-C), 139,21 (8-C), 135,98 (3-C), 129,28 (2'-C + 6'-C), 123,91 (1'-C), 118,83 (7-C), 114,67 (3'-C + 5'-C), 48,74 (2-C + 6-C-piperidin), 25,38 (3-C + 5-C-piperidin), 24,30 (4-C-piperidin).

NOE: 9,33-(8,51, 8,23).

COSY: 9,07-8,51, 8,23-6,99, 3,37-1,70-1,66.

HSQC (140 Hz): 9,33-144,76, 9,07-154,81, 8,51-139,21, 8,23-129,28, 6,99-114,67, 3,37-48,74, 1,70-25,38, 1,66-24,30.

HMQC (140 Hz, 8 Hz): 9,33-(154,49, 135,98), 9,07-(149,69, 139,21, 118,83), 8,51-(154,81, 149,69, 118,83), 8,23-(153,45, 129,28),

6,99-(123,91, 114,67), 3,37-(153,45, 48,74, 25,38, 24,30), 1,70-(48,74, 24,30), 1,66-25,38.

¹⁵N-HMBC (90 Hz, 5 Hz, a400): 9,33-(332,0, 303,7), 9,07-316,5, 6,99-77,3.

A **27n** vegyület NMR mérési eredményei:

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 9,45 (s, 1H, 3-CH), 9,00 (d, *J* = 2,20 Hz, 1H, 6-CH), 8,53 (d, *J* = 2,00 Hz, 1H, 8-CH), 8,10 (d, *J* = 8,90 Hz, 2H, 2'-CH + 6'-CH), 6,99 (d, *J* = 8,80 Hz, 2H, 3'-CH + 5'-CH), 3,36 (m, 4H, 2-CH₂ + 6-CH₂-piperidin), 1,71 (m, 4H, 3-CH₂ + 5-CH₂-piperidin), 1,66 (m, 2H, 4-CH₂-piperidin).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): 153,34 (4'-C), 153,12 (2-C), 152,84 (6-C), 148,43 (4a-C), 146,00 (3-C), 139,23 (8-C), 138,05 (8a-C), 128,87 (2'-C + 6'-C), 124,13 (1'-C), 121,05 (7-C), 114,89 (3'-C + 5'-C), 48,86 (2-C + 6-C-piperidin), 25,37 (3-C + 5-C-piperidin), 24,30 (4-C-piperidin).

NOE: 9,45-8,10.

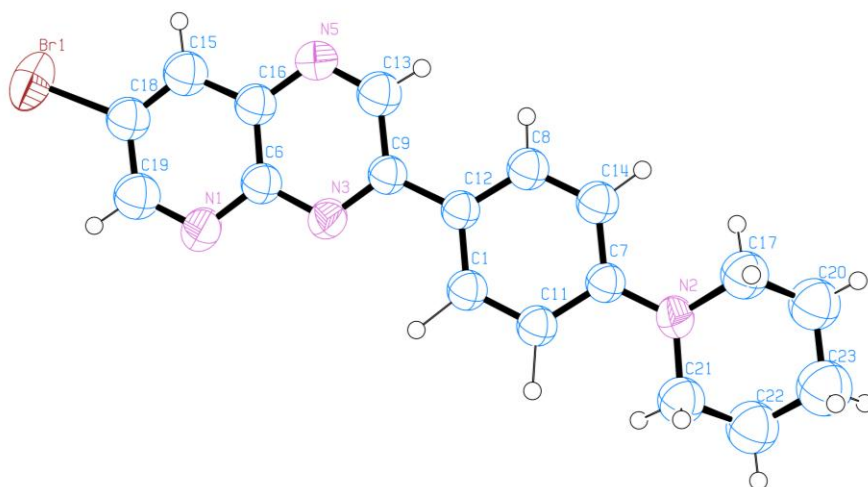
COSY: 9,00-8,53, 8,10-6,99, 3,36-1,71-1,66.

HSQC (140 Hz): 9,45-146,00, 9,00-152,84, 8,53-139,23, 8,10-128,87, 6,99-114,89, 3,36-48,86, 1,71-25,37, 1,66-24,30.

HMQC (140 Hz, 8 Hz): 9,45-(153,12, 148,43), 9,00-(148,43, 139,23, 121,05), 8,53-(152,84, 148,43, 121,05), 8,10-(153,34, 153,12, 128,87), 6,99-(124,13, 114,89), 3,36-(153,34, 48,86, 25,37, 24,30), 1,71-(48,86, 25,37, 24,30), 1,66-(48,86, 25,37).

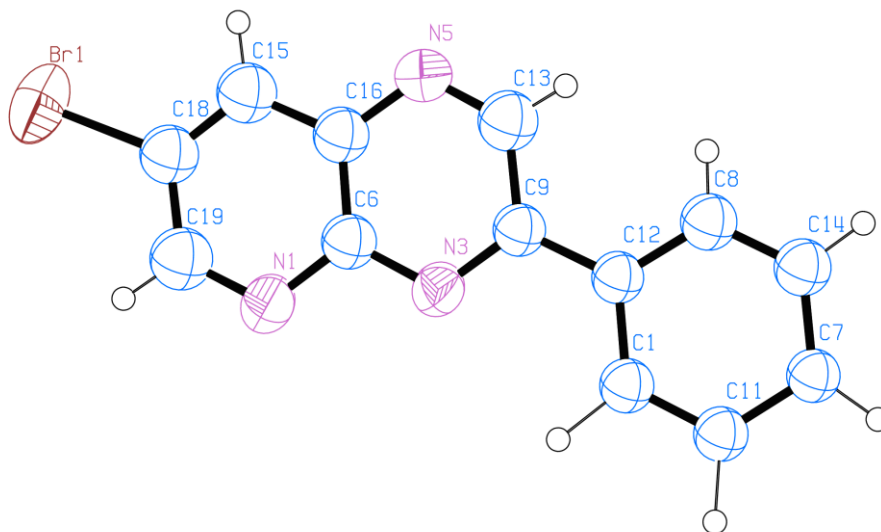
¹⁵N-HMBC (90 Hz, 5 Hz, a400): 9,45-(328,5, 309,8), 9,00-317,3, 6,99-76,3, 1,71-76,3.

27m izomer szerkezetét röntgen krisztallográfiával is bizonyítottuk (29. ábra).



29. ábra. **27m** izomer szerkezete.

Röntgen krisztallográfiával bizonyítottuk továbbá **27a** szerkezetét (30. ábra).



30. ábra. Az alkalmazott reakció körülményekben (4.4.3. pont) fő tömegében keletkező regioizomer. A kisebb mennyiségben keletkező regioizomer etanolos átkristályosítással eltávolítható.

5.3. Az előállított származékok Akt1, EGFR kináz-gátlása és kináz-gátló profilja

A molekuláris hatásmechanizmus felderítése céljából vizsgáltuk a molekulák kinázgátló hatását. Mivel a találati molekulát két Akt1 kinázgátló hatású molekula szerkezetéből származtattuk, a molekulák egy részét ezen az enzimen vizsgáltuk (11. táblázat).

A fejlesztés során biológiai visszacsatolást egy EGFR mutációt tartalmazó, erlotinib-rezisztens sejtvonalat gátló fenotipikus mérés szolgáltatta, ezért a vegületcsalád 15 legjobb hatású tagjait vad típusú EGFR enzimen, illetve L858R és L858R/T790M mutációt tartalmazó EGFR enzimeken vizsgáltuk, mely két mutáció a sejtvonalakban található volt (12. táblázat).

11. táblázat. Az előállított vegyületek Akt1 enzimgátló hatása (inhibíció % 1 és 10 μ M-ban).

Vegyület	Akt1 inhibíció	Vegyület	Akt1 inhibíció
	1 μ M	31h	10 %
1	90 %	31i	25 %
2	100 %	31k	13 %
30d	17 %	31l	8 %
33a	3 %	31n	8 %
33r	11 %	31q	6 %
33i	18 %	31r	9 %
34b	1 %	31t	12 %
37e	-5 % ^a	33c	-4 % ^a
	10 μ M	33d	6 %
29a	32 %	33e	20 %
29b	9 %	33f	15 %
29c	16 %	33g	22 %
29d	6 %	33h	7 %
29f	-10 % ^a	33l	-7 % ^a
31f	10 %	33q	1 %
31g	10 %		

^aa negatív eredmények a mérés hibájának tulajdoníthatók.

12. táblázat. A vegyületek EGFR enzimgátló hatása (inhibíció % 10 μ M-ban).

Vegyület	EGFR – vad típusú	EGFR – L858R mutáns	EGFR – L858R/T790M mutáns
Gefitinib	105,2 ^a		
Pelitinib		105,8 ^a	137,0 ^a
Erlotinib	105,4 ^a	109,0 ^a	79,8
1	-0,4 ^a	18,5	68,9
29a	24,2	23,9	12,7
31m	-10,7 ^a	2,4	40,7
31r	11,4	14,5	12,6
33a	-41,7 ^a	0,6	9,5
33b	-1,1 ^a	2,2	12,1
33d	7,8	-6,8 ^a	17,6
33g	0,9	-54,9 ^a	20,6
33k	4,2	13,2	15,1
33l	33,3	17,1	34,1
33m	-15,5 ^a	10,0	11,5
33p	34,3	22,6	24,6
33q	41,0	13,9	26,0
33r	23,5	27,8	8,7
33t	0,7	16,2	8,2
37b	19,6	37,2	21,7

^aa negatív és 100 % feletti eredmények a mérés hibájának tulajdoníthatók.

A **33a** molekulát vizsgáltuk egy aktív hely vezérelt, kompetíciós kötődési mérésben 456 kinázon és tumorokban előforduló mutánsaikon. A maradék aktivitás 1 μM koncentrációban minden kinázon 46 % felett volt (2. melléklet).

5.4. Klonalitás vizsgálat

Néhány vegyületet, melyek mind a PC9, mind a PC9-ER sejtvonalakon jó hatást mutattak, klonalitás tesztben vizsgáltuk HCC827 EGRF mutációt tartalmazó sejtvonalon (13. táblázat).

13. táblázat. Klonalitás vizsgálat EGFR mutációt tartalmazó, HCC827 sejtvonalon.

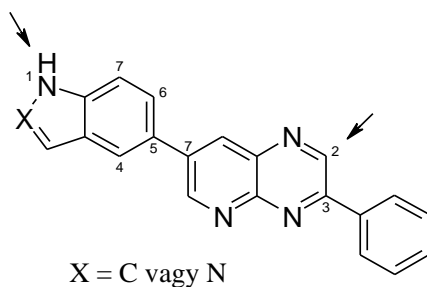
Vegyület	Kezelési koncentráció (μM)	Túlélő frakció (%)
Kontroll		100
Gefitinib	1,25	23,08
29a	3,20	23,58
31n	0,31	31,88
31r	0,62	31,50
33a	1,25	3,32
33l	0,31	7,02
33q	1,25	12,17
33r	1,25	4,14

6. Megbeszélés

Doktori munkám célja ismert Akt gátló hatású 2,3,7-tri(2-tienil)pirido[2,3-*b*]pirazin és A-674563 anyagok szerkezetből kiindulva új, a szakirodalomban eddig nem ismert szerkezetű, a tumorsejteken végzett fenotipikus tesztelés alapján biológiai aktivitással rendelkező pirido[2,3-*b*]pirazin alapvázú anyag, és eköré fókuszált vegyülettár előállítás, valamint a szintézis során fellépő regioizoméria analízise, befolyásolása, és a szintézis szempontjából való optimalizálása volt. A vegyületek biológiai hatását, és a regioizomerek analitikai vizsgálatát kutatócsoportunk vizsgálta.

6.1. Szerkezet-hatás összefüggés

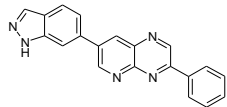
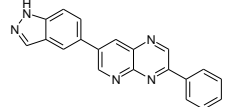
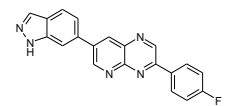
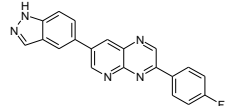
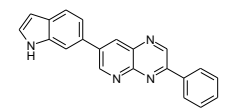
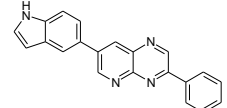
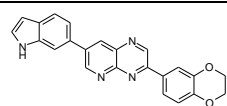
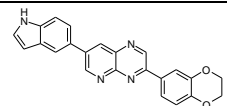
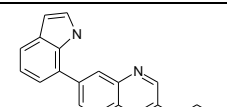
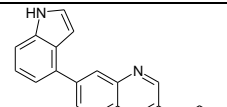
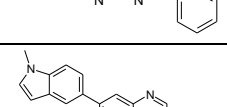
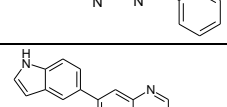
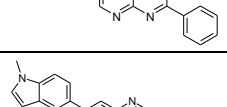
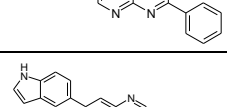
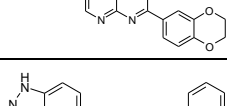
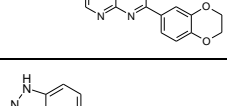
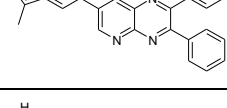
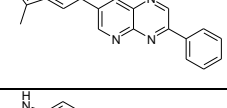
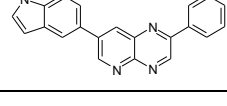
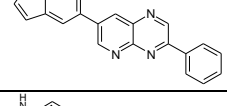
Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a biológiai hatásért felelős szerkezeti elemek a következők:



- a) a pirido[2,3-*b*]pirazin alapváz 2-es pozíciója szubsztituálatlan legyen;
- b) a 7-es helyzetben lévő szubsztituens 4-indolil, 5-indolil vagy 5-indazolil heteroaromás gyűrű legyen, aminek az 1-es pozícióban lévő nitrogénje szubsztituálatlan, tehát a megfelelő pozícióban lévő NH esszenciális;
- c) a 3-as pozícióban a vizsgáltak közül a legjobb hatással a **33m** vegyületben található 2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il-csoport rendelkezik. A 3-as helyzet szubsztituálatlansága és a vízdoldhatóság javítása céljából a 3-fenil-csoportra bevitt oldalláncok rontottak a hatáson.

Az egy-egy szerkezeti pont változtatásának a vegyületek sejtsztódás gátló képességére gyakorolt hatását a 14. táblázatban mutatom be.

14. táblázat. Szerkezet-hatás összefüggés az EC₅₀ értékek alapján^a

	Szerkezet	PC9 (μM)	PC9- ER (μM)		Szerkezet	PC9 (μM)	PC9-ER (μM)
31s		>30	>30	31r		1,28	1,39
33v		>30	>30	33s		>30	>30
31o		>30	>30	31n		0,36	4,43
33u		10,55	13,45	33m		0,09	0,15
31p		>30	>30	31m		0,78	2,56
31q		>30	>30	31n		0,36	4,43
33t		0,49	0,57	33m		0,09	0,15
29b		>30	21,97	29a		1,86	2,34
32a		18,42	23,02	31n		0,36	4,43
32b		9,03	12,88	33k		0,14	0,20

^aA soronként ábrázolt párok szerkezete egy-egy ponton tér el. Ennek az eltérésnek a sejtsztódás gátlásra gyakorolt hatását az EC₅₀ értékek mutatják.

A pirido[2,3-*b*]pirazin alapváz 2-es pozíciója

A **29b-f** és a **30a-d** vegyületek vizsgálata során kiderült, hogy a 2,3-helyzetben diszubsztituált alapváz nem kedvez a hatásnak. A monoszubsztituált származékok közül 2 illetve 3-as helyzetű fenil- és 4-(piperidin-1-il)fenil- szubsztituált származékok kerültek összehasonlításra a hatás szempontjából. Az 2-es pozíciójában szubsztituálatlan gyűrűt tartalmazó anyag hatékonyabbnak bizonyult.

A 7-es helyzetben lévő szubsztituens

A karbociklussal helyettesített származékok nem voltak hatásosak. A nitrogén tartalmú heterociklusok közül a 6 tagú monociklusok (piridin) és a 6+6 tagú kondenzált gyűrűkkel (kinolin, izokinolin) helyettesített származékok sem mutattak hatást. A hatásos szerkezetek 5+6 tagú nitrogén tartalmú gyűrűt (indol, indazol) tartalmaztak, míg a szintén 5+6 tagú 1,3-benzodioxol gyűrű csökkenti a hatást. Az indol/indazol gyűrűk kapcsolódási helye is befolyásolja a hatást: a 4 és 5-ös helyzetben kapcsolódó gyűrűk voltak hatásosak. A nitrogén metilezése jelentősen csökkenti a biológiai hatást. Ebből következően a megfelelő térhelyzetben lévő, szubsztituálatlan nitrogén meghatározó a hatás szempontjából.

A 3-es helyzetű fenil-gyűrű szubsztitúciója

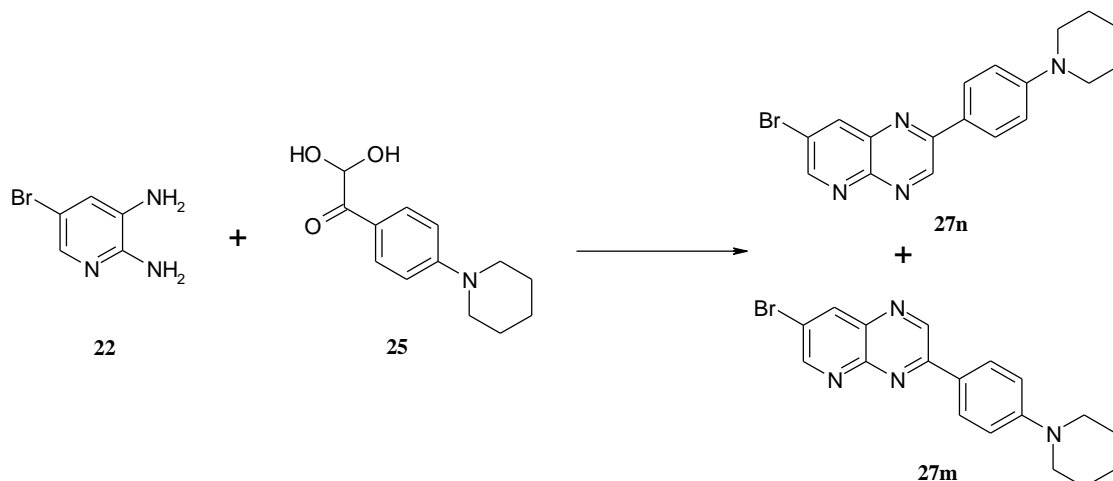
A fenil-gyűrű 2-es helyzetű metoxi-szubsztitúciója növelte a hatást mindkét sejtvonalon. A 3-as helyzetű klór-szubsztitúció az indol- és indazol-származékoknál növelte a hatást, ám a metilindazol származék esetében a vegyület hatástalannak mutatkozott. A 4-es pozícióban a trifluormetil-, hidroxil-, metoxi-, amin-, de legfőképp a klór-, metil-, karboxil- és nitro-csoportok csökkentették a hatást mindkét sejtvonalon. A 4-es helyzetű fluor a PC9-ER sejtvonalon mutatott hatást javította, a piperidin és morfolin gyűrűk pedig mindkét sejtvonalon kedvezőek voltak a hatás szempontjából; valamint a 4-metoxi-származék a metilindazol származék esetében jobb hatásúnak mutatkozott a szubsztituálatlan fenil-analógjához képest. A legkedvezőbb a 3,4-etiléndioxi-szubsztitúció volt (**33m**, EC₅₀ PC9: 0,09 μM; PC9-ER: 0,15 μM).

A bázikus oldallánc illetve észter kötés bevitele 4-es pozícióba általánosan rontott a hatáson, a legjobb hatású származékok EC₅₀ értéke 2,7 és 4,7 μM között volt (**37a**, **37b**, **37d**).

6.2. Regioszelektív szintézis és a regioizomerek azonosítása

A felállított szerkezet-hatás összefüggésből kiderült, hogy a hatást jelentősen befolyásolja, hogy a pirido[2,3-*b*]pirazin alapváz pirazin gyűrűje 2-es, 3-as vagy mindkét pozícióban szubsztituált-e. Amennyiben a gyűrű csak az egyik pozícióban szubsztituált, a 4.4.3. pontban leírt szintézis módszerrel a reakcióban mind a két regioizomer keletkezik. A munka során szerzett tapasztalat szerint az esetek többségében az a regioizomer keletkezik túlnyomó többségben, amelyből kiindulva a jobb biológiai hatású vegyületet állíthattuk elő. Szintén tapasztalat volt, hogy a nem kívánt regioizomer oldhatósága általában jobb, így a szintézis során jól használható elválasztási módszer volt, hogy a reakcióelegyből kiváló terméket az oldószerből kiszűrtük, így megszabadulhattunk az oldatban maradt mellékterméktől. Az izomerek keletkezésének aránya azonban függött attól, hogy a szubsztituens aromás gyűrű milyen helyettesítő csoportokat tartalmazott. Ezért bizonyos esetekben az elválasztás bonyolultabbá vált, és a nagyobb mennyiségben keletkező melléktermék rontotta a kitermelést. Ennek következtében felmerült az igény, hogy olyan reakciókörülményeket dolgozzunk ki, amelyben szelektíven a kívánt izomer keletkezik.

Az 5-brómpiridin-2,3-diamin és [4-(piperidin-1-il)fenil]etándion monohidrátjának kondenzációjában a keletkező két izomer (7-bróm-2- vagy 3-[4-(piperidin-1-il)fenil]pirido[2,3-*b*]pirazin) az addig használt reakciókörülmények között összemérhető mennyiségben keletkezett (31. ábra), így az ezek arányát befolyásoló tényezők szignifikánsan vizsgálhatóak voltak. Ezt a reakciót használtam modellként, feltételezve, hogy más aromás oxoacetaldehidek aldehid- és keton-csoportjának és a diamin-vegyület kondenzációjának szelektivitására adott tényezők azonos módon hatnak. Az izoméria viszonyokat LCMS mérés segítségével követtük.



31. ábra. A diamin- és dioxo-vegyület kondenzációs reakciójában két regioizomer keletkezése lehetséges.

Mind a kiindulási anyagok, mind a termékek maradék nélkül oldódtak a vizsgálati körülmények között, továbbá az általunk előállított molekulák közül ezen két regioizomert lehetett legjobban elválasztani a vizsgált HPLC rendszerekben.

A hőmérséklet hatása a regioszelektivitásra

Az oldatban végzett reakciók szokásosan alkalmazott reakcióhőmérséklet-tartományában végeztem a vizsgálatokat: $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, szobahőmérséklet ($22\text{ }^{\circ}\text{C}$), $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $120\text{ }^{\circ}\text{C}$. 70 és $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on azonos izomer arány mutatkozott: **27m:27n** = 42:58. Mindkét hőmérsékleten egy új, bomlástermékre utaló csúcs megjelenése volt tapasztalható a HPLC kromatogramon. A kiindulási anyagok hőstabilitásának vizsgálata során kiderült, hogy míg **22** stabil (két csúcs 0,52 és 2,67 percnél), addig **25** esetében (retenciós idő 5,29 perc) bomlás volt tapasztalható 2,5 órás, $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os melegítés hatására. Analitikai vizsgálatok alapján a keletkező bomlástermék a 4-(piperidin-1-il)benzoésav (**39**) volt (104. oldal, 28. ábra).

Szobahőmérsékleten az izomer arány 58:42-re változott. A reakció teljes lejátszódása előtt két új csúcs jelent meg a kromatogramon (retenciós idő 6,45 perc és 8,45 perc). Ezek tömege 18 és 36 Daltonnal volt nagyobb (sorrendben 404 illetve 386) a várt termék(ek) tömegénél. A két csúcs a reakció végére egyéb melléktermékek keletkezése nélkül eltűnt, amiből feltételezhető, hogy ez a két vegyület a kondenzáció vízeliminációt megelőző köztiterméke.

0 °C-on a reakció szelektívebb volt **27m**-re, **27m:27n** aránya 71:29 volt. Ezen a hőmérsékleten azonban a reakcióidő 25 napra nőtt. Tovább csökkentve a hőmérsékletet, -25 °C-on a szelektivitás tovább nőtt, de a reakciósebesség jelentősen csökkent: 60 nap után az izomer arány 93:7 volt, de a reakció ennyi idő után gyakorlatilag megállt. **22** kiindulási 42%-a, **25** kiindulási 44%-a nem tűnt el a reakcióelegyből (103. oldal, 9. táblázat).

A sav-bázis katalízis hatása a regioszelektivitásra

Ezután a sav és bázis katalízis szelektivitására gyakorolt hatását vizsgáltam DMF oldatban. 10 % DBU a **25** dioxo-vegyület részleges bomlását okozta. Két új csúcs megjelenése volt tapasztalható a kromatogramon (3,06 perc és 3,54 perc). Az egyik a korábban is említett **39**, a másik vegyület tömegspektrometriásan mért tömege 233 Dalton. A bomlástermék moltömegeből valószínűsíthető, hogy ez az anyag az oxo(4-piperidin-1-il-fenil)ecetsav (**40**; 104. oldal, 28. ábra).

Öt ekvivalens ecetsav a **27m:27n** izomer arányt 58:42-ről 70:30-ra változtatta. Ezután az oldószert lecserélve a reakciót ecetsavban végeztem. Ebben az esetben az arány 84:16 volt. Még magasabb szelektivitás volt elérhető erősebb sav – TFE oldószerként való használatkor; az izomer arány 96:4 volt. Nem csak a szelektivitás volt növelhető a savas oldószerek alkalmazásával, de a reakcióidő is lecsökkent. Vizsgáltam továbbá, hogy a nagy feleslegben alkalmazott TFE oldószerben lévő koncentrációja, hogyan befolyásolja a szelektivitást. A DMF-fel hígított TFE oldószerben a szelektivitás csökkent (104. oldal, 10. táblázat).

Az előbbieket értelmében az alacsonyabb hőmérséklet növeli a szelektivitást, ezért vizsgáltam az izomerek arányát TFE-ben, 0 °C-on. **27m:27n** 98:2-nek adódott.

A savas közeg hatása a szelektivitásra azzal magyarázható, hogy az [4-(piperidin-1-il)fenil]etándion DMF-es oldatban monohidrát formában van. A reakció szelektivitása az aldehid- és keton-csoport reaktivitás különbségéből adódna, de a monohidrát forma csökkenti az aldehid reaktivitását. NMR méréseink alapján kiderült, hogy az aldehid és monohidrátjának egyensúlya savas közegben az aldehid forma felé tolódik el. Az így megnövekedett reaktivitás-különbség miatt az aktívabb aldehid funkciós-csoport gyorsabban reagál el a diamin aktívabb 3-amin csoportjával. [136]

További tényezők szelektivitásra gyakorolt hatásának vizsgálata

Vizsgáltam továbbá a kiindulási anyagok feleslegének hatását. Mindkét kiinduló anyag háromszoros feleslegének külön-külön vizsgált hatására nem mutatkozott szignifikáns különbség az ekvivalens mennyiségű kiindulási anyagokhoz képest. Szintén nem okozott szelektivitásbeli különbséget, ha molekulaszitát alkalmaztam a reakcióban keletkező víz megkötésére. A regioizomerek nem bomlottak és nem izomerizálódtak 20 órás, 70 °C-os vizes DMF-ben való melegítés hatására sem.

A regioizomerek azonosítása

A regioizomerek jellemzése HPLC retenciós idejükkel (retenciós idők: **27m** 9,37 perc, **27n** 9,96 perc) és az NMR spektrumaikkal történt. Tömegspektrometriás fragmenseikben és az UV spektrumaikban nem mutatkozott szignifikáns különbség.

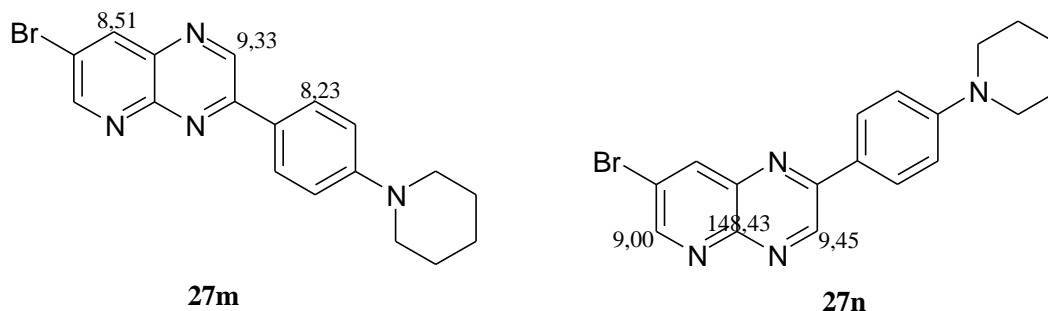
27m izomer NOE vizsgálata során – amivel térközelséget határoztunk meg – a 2-CH (9,33) erős keresztcsúcsot adott a fenil-csoport 2'-CH (8,23) atommal, és egy gyenge keresztcsúcsot a 8-CH (8,51) atommal. Ez a gyenge keresztcsúcs következteteni enged a 2-CH és a 8-CH térbeli közelségére. Mivel ez a keresztcsúcs nem található meg **27n** izomer NOE spektrumában, így **27m** szerkezete bizonyítható (15. táblázat).

27n izomer HMQC mérése – amivel a három kötés távolságban lévő ^1H - ^{13}C csatoló partnereket azonosítjuk – kimutatta, hogy 3-CH (9,45) csatol a N^4CN^5 szénatommal (148,43), ami szintén csatol 6-CH (9,00) atommal. Azonban **27m** izomer HMQC mérésekor 2-CH (9,33) csak egy nagyon gyenge csatolást ad 4a-C szénatommal (149,69). Következésképpen 2-CH és 4a-C több, mint három kötés távolságban van egymástól, ami **27n** izomer szerkezetét bizonyítja (15. táblázat).

27m izomer szerkezetét röntgen krisztallográfiával is bizonyítottuk. Az eredmények igazolták, hogy **27m** szerkezete a 7-bróm-3-[4-(piperidin-1-il)fenil]pirido[2,3-*b*]pirazin, tehát az az izomer, amikor **22** 3-amino-csoportja reagál **25** aldehid-csoportjával, és a 2-amino-csoport a keton-csoporttal.

A 4.4.3. pontban leírt reakciók fő komponensként keletkező regioizomer röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálatát a szubsztituálatlan fenil-származék esetében is elvégeztük. Az eredmények igazolták, hogy a főtermék **27a** szerkezete a 7-bróm-3-fenilpirido[2,3-*b*]pirazin, tehát az az izomer, amikor a 3-aminocsoport reagál az aldehid-csoporttal, és a 2-amino-csoport a keton-csoporttal.

15. táblázat. Az izomerek szerkezetének igazolása a NOE és HMQC NMR adatokkal.



	NOE	HMQC
27m	9,33 - (8,51, 8,23)	(140 Hz, 8 Hz): 9,33-(154,49, 135,98), 9,07-(149,69, 139,21, 118,83), 8,51-(154,81, 149,69, 118,83), 8,23-(153,45, 129,28), 6,99-(123,91, 114,67), 3,37-(153,45, 48,74, 25,38, 24,30), 1,70-(48,74, 24,30), 1,66-(25,38)
27n	9,45 - 8,10	(140 Hz, 8 Hz): 9,45-(153,12, 148,43), 9,00-(148,43, 139,23, 121,05), 8,53-(152,84, 148,43, 121,05), 8,10-(153,34, 153,12, 128,87), 6,99-(124,13, 114,89), 3,36-(153,34, 48,86, 25,37, 24,30), 1,71-(48,86, 25,37, 24,30), 1,66-(48,86, 25,37)

6.3. Biokémiai mérések és a klonalitás vizsgálat

Bár a vegyületek szerkezetét két irodalmi Akt1 gátlószer szerkezetéből származtattam, a vizsgált anyagok inhibíciós értéke még 10 μ M-ban is kisebb volt 32 %-nál. Bár az A-674563 számú Akt referencia anyag mindkét sejtvonalon jól hatott, a piridopirazin alapvázú Akt gátló hatástalan volt, és az általunk előállított vegyületcsalád sem hatott Akt kinázon. Ebből arra következtethetünk, hogy a sejtosztódás gátlása ebben a sejtszisztémában nem az Akt kinázon keresztül valósul meg, és az A-674563 hatása is valamilyen egyéb hatásmechanizmuson alapszik.

Bár mindkét sejtvonal tartalmaz EGFR mutációt, a vegyületeink hatástalanok voltak enzimikus EGFR teszteken. A vegyületek 10 μ M-os koncentrációban 41 %-nál kisebb inhibíciót mutattak mind vad típusú, mind L858R, mind pedig L858R/ T790M mutáns enzimeken. Az irodalomban leírt A-674563 számú vegyület szintén hatástalan volt mind a három enzimén (vad típusú: -0,4 %, L858R mutáns: 18,5 %, L858R/T790M mutáns: 68,9 %). Ebből arra következtethetünk, hogy az erlotinib-rezisztens sejtvonalat gátló hatás nem az L858R/T790M mutáns EGFR gátlásán keresztül valósul meg.

33a kinázgátló profilja alapján valószínűsíthető, hogy a célpont nem kináz. A hatásmechanizmus felderítése jelenleg további kutatások tárgyát képezi.

Hét vegyületet vizsgáltunk klonalitás tesztben. Azt vizsgáltuk, hogy a szerzett rezisztenciával rendelkező PC9-ER sejteket gátló anyagok milyen mértékben képesek gátolni a HCC827 sejteket. Ez a sejtvonala EGFR mutációt tartalmaz, ezért kontrollként a gefitinibet használtuk. A gefitinib kezelést a sejtek 23,08 %-a élte túl. Az általunk vizsgált vegyületek közül a **31n** (31,88 %), a **31r** (31,50 %) és a **29a** (23,58 %) vegyületek esetében magasabb volt a túlélő sejtek aránya a gefitinibhez képest. A **33q** (12,17 %), a **33l** (7,02 %) **33r** (4,14 %) és **33a** (3,32 %) vegyületek vizsgálatakor viszont kisebb volt a kezelés után életben maradt sejtek aránya.

7. Következtetések

Az értekezésben bemutatott eredmények alapján a következő megállapításokat tehetjük:

1. Előállítottam 166 milligramm A-674563, 41 milligramm A-443654 jelű Akt1-gátló hatású anyagot, 446 milligramm 2,3,7-tri(2-tienil)pirido[2,3-*b*]pirazin Akt-gátló hatású anyagot.
2. Előállítottam 43 és 252 milligramm, eddig nem ismert 7-(3-metil-1*H*-indazol-5-il)-3-fenilpirido[2,3-*b*]pirazint, amelyben megtartottam a 2,3,7-tri(2-tienil)pirido[2,3-*b*]pirazin pirido[2,3-*b*]pirazin alapvázát, a három tiofén szubsztituens pedig a A-674563 mintájára (mintha a 2-[(piridin-3-il)oxi]etánamin alapvázat cseréltem volna pirido[2,3-*b*]pirazinra), 2-hidrogén, 3-fenil és 7-(3-metil-1*H*-indazol-5-il)-csoportokra cseréltem.
3. A fenti vegyület szubsztituenseit az alapgyűrű 2, 3 és 7 pozícióiban változtattam. A szintetikus munka során előállítottam összesen hatvanhárom új molekulát.
4. Egy iterációs ciklusban csak az egyik szubsztituenset változtattam, és a további szintetikus munkát a legjobb hatású vegyületek szerkezete alapján terveztem. Az így kapott vegyületek biológiai hatásossága alapján — erlotinib-érzékeny és -rezisztens PC9 sejtek gátlása — öt ilyen fejlesztési ciklusban határoztam meg szerkezet-hatás összefüggést. Ez alapján kiderült, hogy a hatásért felelős szerkezeti feltételek a következők: a) a pirido[2,3-*b*]pirazin alapváz 2-es pozíciójában hidrogénatom legyen; b) a 3-es pozícióban lévő szubsztituensek közül a legjobb hatással a 2,3-dihidro-1,4-benzodioxinil rendelkezik a vizsgáltak közül; c) a 7-es pozícióban a nitrogén tartalmú [5+6] tagú heterociklusos gyűrűk (indol, indazol) voltak hatásosak. Ezen gyűrűk szubsztituens pozíciói is kritikusak voltak a hatás megőrzésében: a 4 és 5-ös helyzetben kapcsolódó gyűrűk nitrogén atomja volt a megfelelő helyzetben. Amennyiben az 1-es helyzetű nitrogént metil-csoporttal szubsztituáltam, a hatás jelentősen csökkent. Ebből következik, hogy a megfelelő helyzetben lévő, szubsztituálatlan nitrogén jelentősen javítja a hatást.
5. A molekula jobb vízoldhatósága érdekében a pirido[2,3-*b*]pirazin 3-as helyzetében található fenil-gyűrű para helyzetébe alifás-amin csoportot tartalmazó oldalláncokat

vittem be. Ezek némileg csökkentették a vegyületek hatásosságát, de a vízoldhatóságot javították, és lehetőséget teremtettek, hogy a vegyületekből vízoldható sókat lehessen készíteni. Ezek közül a legjobb biológiai hatást a savamid kötésen keresztül kapcsolódó 2-(piperidin-1-il)etil-szubsztituens bevitele eredményezte (**37b**, EC₅₀ PC9: 3,19 μM; PC9-ER: 3,97 μM). Továbbá előállítottam egy észter csoportot tartalmazó származékot is, de ez a vegyület nem volt kellően hatásos.

Az eddig előállított, sóképzésre alkalmas származékok kisebb biológiai hatással rendelkeznek az eredeti molekulákhoz képest, ezért a jobb oldhatóságú származékok előállítása további fejlesztés tárgyát képezi.

6. A szintetikus munka során fellépő regio szelektivitási kérdés a szerkezet hatás összefüggés megállapítás alapján nagy jelentőséggel bír: a keletkező két regioizomer eltérő biológiai hatását méréseinkkel igazoltuk. Az izomerek a különböző dioxo-származékok esetén más-más arányban keletkeznek. Az esetek többségében az általam használt körülmények között az egyik izomer jelentős többségben keletkezik. A doktori munkám során felderítettem, hogy ebben az izomerben a pirido[2,3-*b*]pirazin alapszerkezet 3-as helyzetében található a fenilgyűrű, amit NMR mérésekkel és röntgenkristallográfiával egyértelműen igazoltunk. Abban az esetben, amikor a szokásos körülmények között a két regioizomer összemérhető mennyiségben keletkezik, a reakciót a jobb kitermelés és tisztíthatóság érdekében szükségessé vált szelektívebbé tenni. Erre kidolgoztam egy módszert, mely szerint a reakciót TFE-ben, alacsonyabb hőmérsékletben végezzük, a reakció nem csak jelentősen szelektívebb lesz, de sokkal nagyobb reakciósebességgel zajlik le. A vizsgálatok során a szobahőmérsékleten, DMF-ben végzett reakció 8 nap alatt zajlott le, az izomerek aránya pedig közel 1:1 volt. TFE-ben 0°C-on a reakció 5 óra alatt lezajlott, és a nem kívánt izomer csupán 2 %-ban keletkezett. A reakcióhőmérséklet további csökkentése azért nem volt indokolt, mert egyrészt a TFE -15,4 °C-on eléri a fagyáspontját, másrészt a további szelektivitás előnye a túlzottan megnőtt reakcióidő hátrányát vonja maga után. Továbbá az ilyen tisztasággal nyert termék átkristályosítással vagy kromatográfiával könnyen tisztítható.

7. A legjobb hatású vegyület **33m** nagyságrendileg ugyanolyan mértékben gátolta az erlotinib-érzékeny sejtvonalat, mint az erlotinib (**33m** 0,09 μM , erlotinib 0,005 μM) de az erlotinib-rezisztens sejtvonalat több, mint 30-szoros mértékben (**33m** 0,15 μM , erlotinib 5,65 μM). Ez alapján kijelenthetjük, hogy sikerült olyan anyagot kifejlesztenünk, amely az erlotinib-érzékeny és az erlotinibre-rezisztensé váló sejtvonalak gátlására egyaránt alkalmas.
8. Azon molekulákat, melyek nem csak a PC9 sejtvonalon, de a szerzett-rezisztenciával rendelkező PC9-ER erlotinib-rezisztens mutánson is hatásosak voltak, klonalitás tesztben vizsgáltuk. Ennek során azt derítettük fel, hogy a szerzett rezisztenciával rendelkező sejteket gátló anyagok milyen mértékben képesek gátolni a HCC827, EGFR mutációt tartalmazó sejteket. Az előállított anyagok közül a **29a**, **31n**, **31r**, **33a**, **33l**, **33q** és **33r** anyagokat mértük. Ennek eredményeképpen azt találtuk, hogy a kontrollként használt, klinikumban alkalmazott EGFR gátló TKI gefitinibhez képest (23,08 %) a **33r** (4,14 %) és **33a** (3,32 %) vegyületek közel egy nagyságrenddel kevesebb túlélő, klónképzésre alkalmas, rezisztens sejtet eredményeztek a kezelés után. Az anyagok hatásosnak bizonyultak a klónképző sejtek számának visszaszorítására.
9. A két tumoros sejtvonal EGFR mutáns sejtvonal volt, a kiindulási molekulánk pedig két Akt1 gátló hatású vegyület származéka. Néhány fontosabb vegyületet megvizsgáltunk vad típusú, L858R és L858R/T790M mutáns EGFR biokémiai tesztekben, Akt1 kinázon, továbbá a **33a** vegyület széles körű kináz profilját is feltártuk. A rezisztensé váló sejtek gátlásának hatásmechanizmusa nem ezen enzimek gátlásán keresztül valósul meg. A hatásmechanizmus felderítése további kutatási munkát igényel.

A doktori munkám során feltárt szerkezet-hatás összefüggés, a molekulák biológiai hatékonysága és a szintézis során problémaként fellépő regioszelektivitás optimalizálása lehetővé teszi, hogy ezen szubmikromólos gátlószerek ígéretes lehetőséget nyújtsanak új tumorelleses gyógyszerek kifejlesztéséhez.

8. Összefoglalás

Doktori munkám során racionális gyógyszerhatóanyag kutatásban vettem részt, ezen belül rezisztencia-okozó sejt gátló hatású anyagot állítottam elő, szerkezet-hatás összefüggést állítottam fel a hatékonyabb származékok kifejlesztése érdekében, és a szintézis során felmerülő regioizomériai kérdéseket tisztáztam. A rezisztencia-okozó sejtek szerepet játszanak a daganatok kialakulásában, és a hatásos kezelés utáni kiújulásban, így ezek eltávolítása terápiás jelentőségű. A legjobb hatású vegyületekből PCT szabadalmi bejelentés készült.

Munkám során előállítottam három ismert Akt1-kinázgátló hatású anyagot, az A-674563 és A-443654 jelű vegyületeket és a 2,3,7-tri(2-tienil)pirido[2,3-*b*]pirazin vegyületet, majd ezek alapvázát kombinálva néhány származékot, amelyek egy közepes hatékonyságú biológiai mérés (Medium Throughput Screening, MTS) tárgyát képező vegyülettárba kerültek daganatos sejt vonalat gátló hatás vizsgálata céljából. A találati molekulák kétféle daganatos sejt vonalon – egy erlotinib-érzékeny PC9 sejt vonalon, és erlotinib-rezisztens mutánsán – lettek megmérve, és az eredmények alapján szerkezet-hatás összefüggést állítottam fel, ami alapján a további szintéziseket terveztem, melynek során a szubsztituensek szisztematikus cseréjével állítottam elő új származékokat. Ezek a szerkezetek a szakirodalom számára eddig ismeretlen, szabadalmaztatható struktúrák.

A szintézis során az alapszerkezet kétféle regioizomerjének keletkezésére van mód egy kondenzációs lépés kapcsán. A kívánt, biológiai hatással rendelkező származék szerkezetének igazolása és a reakciókörülmények szelektivitásra gyakorolt hatásának vizsgálata is a munkám tárgyát képezte. A regioizomerek elválasztására módszert dolgoztam ki, és a szintetikus lépés körülményeinek regioizomériára gyakorolt hatását vizsgálva a reakciót optimalizáltam.

A legjobb hatású szerkezetet alapul véve várhatóan jobb ADME paraméterekkel (elsősorban oldhatóság) rendelkező származékokat állítottam elő. Néhány, a fent említett sejt vonalakon ígéretes hatást mutató anyagot rezisztencia-okozó sejt gátlást vizsgáló modellen, klonalitás tesztben vizsgáltuk. Ennek során olyan vegyületeket találtunk, melyek hatására a kezelés után közel egy nagyságrenddel kisebb volt a túlélő, klónképzésre alkalmas, rezisztens sejtek száma a kontrollként használt, klinikumban alkalmazott gefitinibhez képest.

9. Summary

The subject of my Ph.D. research was the development of novel pharmaceutical agents against resistance-causing cancer cells, structure-activity relationships were established to aid development of more effective derivatives, and the issue of regioisomerism of the synthesis was studied. The resistance-causing cells play important role in the formation and the relapse of tumours, therefore elimination of these cells has clinical relevance. We filed a PCT patent application which covers the best compounds.

At first I synthesized three known Akt1-kinase inhibitors, the compound A-674563, A-443654 and 2,3,7-tri-2-thienylpyrido[2,3-*b*]pyrazine. In the next step I combined the structural elements of these molecules and some pyrido[2,3-*b*]pyrazine derivatives were prepared which were a part of a compound library. The whole library was tested on cancer cell lines in a medium throughput phenotypic screen and pyrido[2,3-*b*]pyrazines emerged as hit molecules. The hit molecules were tested on erlotinib-sensitive PC9 and erlotinib-resistant PC9-ER cells. Structure-activity relationships were established based on the biological results, and further syntheses of analogues were designed. Novel, patentable derivatives were prepared by change of moieties of pyrido[2,3-*b*]pyrazine core.

Two possible regioisomers form often in the synthetic procedure. The structure of the isomer, which has required biological effect, and selectivity of the condensation reaction was studied. A method has been worked out to separate regioisomers, and the optimal reaction conditions were explored.

Based on the structure of the most effective compounds new derivatives were prepared to improve the aqueous solubility. Biological evaluation of all compounds was made by the screen on previously mentioned cells. Some compounds of promising effect were tested in clonogenic assay which is a model of inhibiting resistance-causing cells. This test measures the survival of resistant fraction of cells after treatment. We found compounds which were more effective, by approximately an order of magnitude, than the clinically used gefitinib.

10. Irodalomjegyzék

- [1] Eyler CE, Foo WC, LaFiura KM, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. (2008) Brain cancer stem cells display preferential sensitivity to Akt inhibition. *Stem Cells*, 26(12): 3027-3036.
- [2] Jemal A, Freddie Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. (2011) Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*, 61(2): 69-90.
- [3] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. (2013) Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*, 63(1): 11-30.
- [4] Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB.(2008) Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm. Res.* 25(9): 2097-2116.
- [5] Kopper L. A daganatokról általában. In: Kopper L, Jeney A (szerk.), *Onkológia - a géntől a betegágyig*. Medicina Könyvkiadó Zrt, Budapest, 2002: 21-24.
- [6] Jeney A. A daganatok gyógyszeres terápájának elvi alapjai. In: Kopper L, Jeney A (szerk.), *Onkológia - a géntől a betegágyig*. Medicina Könyvkiadó Zrt, Budapest, 2002: 287-318.
- [7] Jeney A. A génállományt károsító és módosító gyógyszerek. Kralovánszky J, Katona Cs. Nukleotid bioszintézis gátlók. Jeney A. Topoizomeráz gátlók. Kovács P. A mitotikus orsót gátló gyógyszerek. In: Jeney A, Kralovánszky J (szerk.), *Onkofarmakológia*. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2009: 237-338.
- [8] Yen HC, Chang HM, Majima HJ, Chen FY, Li SH. (2005) Levels of reactive oxygen species and primary antioxidant enzymes in WI38 versus transformed WI38 cells following bleomycin treatment. *Free Radic Biol Med*, 38(7): 950-959.
- [9] Sznol M, Takimoto CH, NG CM, El-Khoueiry A, Lenz HJ, Tew KD, Reed E, Saif MW, Chu E, Rasheed ZA, Rubin EH, Lee JJ, Harris LN, Lorusso PM, Ryan AJ, Boerner SA, Herbst RS, Cohen SJ, Cohen RB, Meropol NJ, Gore D, Baylin SB, Herman JG, Molineaux CJ, Crews CM, Copur MS, Rose M, Gettinger SN, Sondak VK, Daud AI, Lotze MT, Stein CYA, Benimetskaya L, Kornblum NS, Mani S, Chau CH, Figg WD, RobinsonMK, Borghaei H, Adams GP, Weiner LM, Lowy DR, Schiller JT, Goetz MP, Erlichman C, Loprinzi CL, Simon RM. Pharmacology of cancer chemotherapy. In: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. (szerk.)

- DeVita Hellman, and Rosenberg's cancer Principles and Practice of Oncology, 8th edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2008: 385-589.
- [10] Kéri Gy, Ullrich A. Cancer as a communication disorder. In: Kéri Gy, Toth I (szerk.), Molecular pathomechanisms and new trends in drug research. Taylor & Francis, London, 2003: 227-247.
- [11] <http://pathwaymaps.com/maps/443/>
- [12] Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, Wilson R, Kris M, Varmus H. (2004) EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. Proc Natl Acad Sci U S A, 101(36): 13306-13311.
- [13] Chang CH, Chen KY, Young-Xu Y, Kurth T, Orav EJ, Yang PC, Chan KA. (2008) The safety and efficacy of gefitinib versus platinum-based doublets chemotherapy as the first-line treatment for advanced non-small-cell lung cancer patients in East Asia: a meta-analysis. Lung Cancer, 62(2): 242-252.
- [14] Mok TSK, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, Sunpaweravong P, Han B, Margono B, Ichinose Y, Nishiwaki Y, Ohe Y, Yang JJ, Chewaskulyong B, Jiang H, Duffield EL, Watkins CL, Armour AA, Fukuoka M. (2009) Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. N Engl J Med, 361(10): 947-957.
- [15] Sequist LV, Martins RG, Spigel D, Grunberg SM, Spira A, Jänne PA, Joshi VA, McCollum D, Evans TL, Muzikansky A, Kuhlmann GL, Han M, Goldberg JS, Settleman J, Iafrate AJ, Engelman JA, Haber DA, Johnson BE, Lynch TJ. (2008) First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations. J Clin Oncol, 26(15): 2442-2449.
- [16] Shchemelinin I, Šefc L, Nečas E. (2006) Protein kinase inhibitors. Folia Biol (Praha), 52(4): 137-48.
- [17] Cappuzzo F, Ciuleanu T, Stelmakh L, Cicenias S, Szczésna A, Juhász E, Esteban E, Molinier O, Brugger W, Melezínek I, Klingelschmitt G, Klughammer B, Giaccone G. (2010) Erlotinib as maintenance treatment in advanced non-small-cell lung cancer: a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 study. Lancet Oncol, 11(6): 521-529.

- [18] Mok TSK, Wu YL, Yu CJ, Zhou C, Chen YM, Zhang L, Ignacio J, Liao M, Srimuninnimit V, Boyer MJ, Chua-Tan M, Sriuranpong V, Sudoyo AW, Jin K, Johnston M, Chui W, Lee JS. (2009) Randomized, placebo-controlled, phase II study of sequential erlotinib and chemotherapy as first-line treatment for advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 27(30): 5080-5087.
- [19] <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-erlotinib-hydrochloride#Anchor-Pancreati-44285>
- [20] Costa DB, Nguyen KS, Cho BC, Sequist LV, Jackman DM, Riely GJ, Yeap BY, Halmos B, Kim JH, Jänne PA, Huberman MS, Pao W, Tenen DG, Kobayashi S. (2008) Effects of erlotinib in EGFR mutated non-small cell lung cancers with resistance to gefitinib. *Clin. Cancer Res*, 14(21): 7060-7067.
- [21] Kim SM, Kwon OJ, Hong YK, Kim JH, Solca F, Ha SJ, Soo RA, Christensen JG, Lee JH, Cho BC. (2012) Activation of IL-6R/JAK1/STAT3 signaling induces de novo resistance to irreversible EGFR inhibitors in non-small cell lung cancer with T790M resistance mutation. *Mol Cancer Ther*, 11(10): 2254-2264.
- [22] Riely GJ, Pao W, Pham D, Li AR, Rizvi N, Venkatraman ES, Zakowski MF, Kris MG, Ladanyi M, Miller VA. (2006) Clinical course of patients with non-small cell lung cancer and epidermal growth factor receptor exon 19 and exon 21 mutations treated with gefitinib or erlotinib. *Clin Cancer Res*, 12: 839-844.
- [23] Engelman JA, Jänne PA. (2008) Mechanisms of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 14(10): 2895-2899.
- [24] Kosaka T, Yamaki E, Mogi A, Kuwano H. (2011) Mechanisms of resistance to EGFR TKIs and development of a new generation of drugs in non-small-cell lung cancer. *J Biomed Biotechnol*, 2011: ID 165214.
- [25] Li D, Ambrogio L, Shimamura T, Kubo S, Takahashi M, Chirieac LR, Padera RF, Shapiro GI, Baum A, Himmelsbach F, Rettig WJ, Meyerson M, Solca F, Greulich H, Wong KK. (2008) BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene*, 27(34): 4702-4711.
- [26] Engelman JA, Zejnullahu K, Gale CM, Lifshits E, Gonzales AJ, Shimamura T, Zhao F, Vincent PW, Naumov GN, Bradner JE, Althaus IW, Gandhi L, Shapiro GI, Nelson JM, Heymach JV, Meyerson M, Wong KK, Jänne PA. (2007) PF00299804,

- an irreversible pan-ERBB inhibitor, is effective in lung cancer models with EGFR and ERBB2 mutations that are resistant to gefitinib. *Cancer Res*, 67(24): 11924-11932.
- [27] Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr, Di Maria MV, Veve R, Bremmes RM, Barón AE, Zeng C, Franklin WA. (2003) Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol*, 21(20): 3798-3807.
- [28] Takezawa K, Okamoto I, Tanizaki J, Kuwata K, Yamaguchi H, Fukuoka M, Nishio K, Nakagawa K. (2010) Enhanced anticancer effect of the combination of BIBW2992 and thymidylate synthase-targeted agents in non-small cell lung cancer with the T790M mutation of epidermal growth factor receptor. *Mol Cancer Ther*, 9(6): 1647-1656.
- [29] Tabara K, Kanda R, Sonoda K, Kubo T, Murakami Y, Kawahara A, Azuma K, Abe H, Kage M, Yoshinaga A, Tahira T, Hayashi K, Arao T, Nishio K, Rosell R, Kuwano M, Ono M. (2012) Loss of activating EGFR mutant gene contributes to acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung cancer cells. *PLoS One*, 7(7): e41017.
- [30] Cortot AB, Repellin CE, Shimamura T, Capelletti M, Zejnullahu K, Ercan D, Christensen JG, Wong KK, Gray NS, Jänne PA. (2012) Resistance to irreversible EGF receptor tyrosine kinase inhibitors through a multistep mechanism involving the IGF1R pathway. *Cancer Res*, 73(2): 834-843.
- [31] Yoshida T, Okamoto I, Okamoto W, Hatashita E, Yamada Y, Kuwata K, Nishio K, Fukuoka M, Jänne PA, Nakagawa K. (2010) Effects of Src inhibitors on cell growth and epidermal growth factor receptor and MET signaling in gefitinib-resistant non-small cell lung cancer cells with acquired MET amplification. *Cancer Sci*, 101(1): 167-172.
- [32] Schwab R, Pinter F, Moldavy J, Papay J, Strausz J, Kopper L, Keri G, Pap A, Petak I, Oreskovich K, Mangel L. (2005) Modern treatment of lung cancer: case 1. Amplification and mutation of the epidermal growth factor receptor in metastatic lung cancer with remission from gefitinib. *J Clin Oncol*, 23(30): 7736-7738.
- [33] Bomken S, Fišer K, Heidenreich O, Vormoor J. (2010) Understanding the cancer stem cell. *Br J Cancer*, 103(4): 439-445.

- [34] Zhou BB, Zhang H, Damelin M, Geles KG, Grindley JC, Dirks PB. (2009) Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 8(10): 806-823.
- [35] Cho RW, Clarke MF. (2008) Recent advances in cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev*, 18(1), 48-53.
- [36] Zhang M, Behbod F, Atkinson RL, Landis MD, Kittrell F, Edwards D, Medina D, Tsimelzon A, Hilsenbeck S, Green JE, Michalowska AM, Rosen JM. (2008) Identification of tumor-initiating cells in a p53-null mouse model of breast cancer. *Cancer Res*, 68(12): 4674-4682.
- [37] Diehn M, Cho RW, Clarke MF. (2009) Therapeutic implications of the cancer stem cell hypothesis. *Semin Radiat Oncol*, 19(2): 78-86.
- [38] Rosen JM, Jordan CT. (2009) The Increasing Complexity of the Cancer Stem Cell Paradigm. *Science*, 324(5935): 1670-1673.
- [39] Al-Hajj M, Becker MW, Wicha M, Weissman I, Clarke MF. (2004) Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev*. 14(1): 43-47.
- [40] Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM. (2006) Cancer stem cells-perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*, 66(19): 9339-9344.
- [41] Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA Jr, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. (2008) An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*, 2008, 321(5897):1807-1812.
- [42] Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Kamiyama H, Jimeno A, Hong SM, Fu B, Lin MT, Calhoun ES, Kamiyama M, Walter K, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Hartigan J, Smith DR, Hidalgo M, Leach SD, Klein AP, Jaffee EM, Goggins M, Maitra A, Iacobuzio-Donahue C, Eshleman JR, Kern SE, Hruban RH, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. (2008) Core signaling pathways in

- human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science*, 321(5897): 1801-1806.
- [43] O'Brien CA, Kreso A, Jamieson CH. (2010) Cancer Stem Cells and Self-renewal. *Clin Cancer Res*, 16(12): 3113-3120.
- [44] Huff CA, Matsui W, Smith BD, Jones RJ. (2006) The paradox of response and survival in cancer therapeutics. *Blood*, 107(2): 431-434.
- [45] Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA. (2009) Cancer stem cells: mirage or reality? *Nat Med*, 15(9): 1010-1012.
- [46] Bonnet D, Dick JE. (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, 3(7): 730-737.
- [47] Visvader JE, Lindeman GJ. (2008) Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat. Rev. Cancer*, 8(10): 755-768.
- [48] Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. (1994) A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367(6464): 645-648.
- [49] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 100(7): 3983-3988.
- [50] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumours. *Cancer Res*, 63(18): 5821-5828.
- [51] O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. (2007) A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, 445(7123): 106-110.
- [52] Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, Van Belle PA, Xu X, Elder DE, Herlyn M. (2005) A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res*, 65(20): 9328-9337.
- [53] Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C. (2007) Distinct populations of cancer stem cells determine tumor

- growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*, 1(3): 313-323.
- [54] Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. (2005) Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*, 65(23): 10946-10951.
- [55] Alvero AB, Chen R, Fu HH, Montagna M, Schwartz PE, Rutherford T, Silasi DA, Steffensen KD, Waldstrom M, Visintin I, Mor G. (2009) Molecular phenotyping of human ovarian cancer stem cells unravels the mechanisms for repair and chemoresistance. *Cell Cycle*, 8(1): 158-166.
- [56] Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO, Zheng BJ, Guan XY. (2007) Identification and characterisation of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology*, 132(7): 2542-2556.
- [57] Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, Conticello C, Ruco L, Peschle C, De Maria R. (2008) Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ*, 15(3): 504-514.
- [58] Fukuda K, Saikawa Y, Ohashi M, Kumagai K, Kitajima M, Okano H, Matsuzaki Y, Kitagawa Y. (2009) Tumor initiating potential of side population cells in human gastric cancer. *Int J Oncol*, 34(5): 1201-1207.
- [59] Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF, Ailles LE. (2007) Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(3): 973-978.
- [60] Wu C, Wei Q, Utomo V, Nadesan P, Whetstone H, Kandel R, Wunder JS, Alman BA. (2007) Side population cells isolated from mesenchymal neoplasms have tumor initiating potential. *Cancer Res*, 67(17): 8216-8222.
- [61] Wen L, Chen XZ, Yang K, Chen ZX, Zhang B, Chen JP, Zhou ZG, Mo XM, Hu JK. (2013) Prognostic value of cancer stem cell marker CD133 expression in gastric cancer: a systematic review. *PLoS One*, 8(3): e59154.
- [62] Okudela K, Woo T, Mitsui H, Tajiri M, Masuda M, Ohashi K. (2012) Expression of the potential cancer stem cell markers, CD133, CD44, ALDH1, and β -catenin, in primary lung adenocarcinoma-their prognostic significance. *Pathol Int*, 62(12): 792-801.

- [63] Jiang Y, He Y, Li H, Li HN, Zhang L, Hu W, Sun YM, Chen FL, Jin XM. (2012) Expressions of putative cancer stem cell markers ABCB1, ABCG2, and CD133 are correlated with the degree of differentiation of gastric cancer. *Gastric Cancer*, 15(4):440-450.
- [64] Kumamoto H, Ohki K. (2010) Detection of CD133, Bmi-1, and ABCG2 in ameloblastic tumors. *J Oral Pathol Med*, 39(1): 87-93.
- [65] Wang Y, Zhe H, Ding Z, Gao P, Zhang N, Li G. (2012) Cancer stem cell marker Bmi-1 expression is associated with basal-like phenotype and poor survival in breast cancer. *World J Surg*, 36(5):1189-1194.
- [66] Schatton T, Frank NY, Frank MH. (2009) Identification and targeting of cancer stem cells. *Bioessays*, 31(10): 1038-1049.
- [67] Mimeault M, Moore E, Moniaux N, Hénichart JP, Depreux P, Lin MF, Batra SK. (2006) Cytotoxic effects induced by a combination of cyclopamine and gefitinib, the selective hedgehog and epidermal growth factor receptor signaling inhibitors, in prostate cancer cells. *Int J Cancer*, 118(4): 1022-1031.
- [68] Takano A, Hashimoto K, Ogawa M, Koyanagi J, Kurihara T, Wakabayashi H, Kikuchi H, Nakamura Y, Motohashi N, Sakagami H, Yamamoto K, Tanaka A. (2009) Tumor-specific cytotoxicity and type of cell death induced by naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-diones and related compounds in human tumor cell lines: relationship to electronic structure. *Anticancer Res*, 29(1): 455-464.
- [69] Li CJ, Leggett D, Li Y, Li W. Novel methods for targeting cancer stem cells. WO 2011116399 számú PCT szabadalmi bejelentés. (2011)
- [70] Swinney DC, Anthony J. (2011) How were new medicines discovered? *Nat Rev Drug Discov*, 10(7): 507-519.
- [71] Butcher EC. (2005) Can cell systems biology rescue drug discovery? *Nat Rev Drug Discov*, 4(6): 461-467.
- [72] Kubinyi H. (1999) Drug research: myths, hype and reality. *Nat Rev Drug Discov*, 2(8): 665-668.
- [73] Kunkel EJ, Dea M, Ebens A, Hytopoulos E, Melrose J, Nguyen D, Ota KS, Plavec I, Wang Y, Watson SR, Butcher EC, Berg EL. (2004) An integrative biology approach for analysis of drug action in models of human vascular inflammation. *FASEB J*, 18(11): 1279-1281.

- [74] Butcher EC, Berg EL, Kunkel EJ. (2004) Systems biology in drug discovery. *Nat Biotechnol*, 22(10): 1253-1259.
- [75] Cujec TP. Cellular kinase targets and inhibitors, and methods for their use. WO 2003042369 számú PCT szabadalmi bejelentés. (2003)
- [76] Godl K, Missio A, Daub H, Stein-Gerlach M, Greff Z, Klebl B, Örfi L, Kéri Gy, Varga Z. Method for isolating ATP binding proteins by means of immobilized protein inhibitors. WO2004013633 számú PCT szabadalmi bejelentés. (2004)
- [77] Domino EF. (1999) History of modern psychopharmacology: a personal view with an emphasis on antidepressants. *Psychosom Med*, 61(5): 591-598.
- [78] Drews J. (2003) Strategic trends in the drug industry. *Drug Discov Today*, 8(9): 411-420.
- [79] Bhadriraju K, Chen CS. (2002) Engineering cellular microenvironments to improve cell-based drug testing. *Drug Discov Today*, 7(11): 612-620.
- [80] Kunkel EJ, Plavec I, Nguyen D, Melrose J, Rosler ES, Kao LT, Wang Y, Hytopoulos E, Bishop AC, Bateman R, Shokat KM, Butcher EC, Berg EL. (2004) Rapid structure-activity and selectivity analysis of kinase inhibitors by BioMAP analysis in complex human primary cell-based models. *Assay Drug Dev Technol*, 2(4): 431-441.
- [81] Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. (2006) Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*, 1(5): 2315-2319.
- [82] Steegmaier M, Hoffmann M, Baum A, Lénárt P, Petronczki M, Krssák M, Gürtler U, Garin-Chesa P, Lieb S, Quant J, Grauert M, Adolf GR, Kraut N, Peters JM, Rettig WJ. (2007) BI 2536, a potent and selective inhibitor of polo-like kinase 1, inhibits tumor growth in vivo. *Curr Biol*, 17(4): 316-322.
- [83] Strebhardt K, Ullrich A. (2006) Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 6(4): 321-330.
- [84] <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=bi2536>
- [85] Sebastian M, Reck M, Waller CF, Kortsik C, Frickhofen N, Schuler M, Fritsch H, Gaschler-Markefski B, Hanft G, Munzert G, von Pawel J. (2010) The efficacy and safety of BI 2536, a novel Plk-1 inhibitor, in patients with stage IIIB/IV non-small cell lung cancer who had relapsed after, or failed, chemotherapy: results from an open-label, randomized phase II clinical trial. *J Thorac Oncol*, 5(7): 1060-1067.

- [86] Dördelmann M, Reiter A, Zimmermann M, Fengler R, Henze G, Riehm H, Schrappe M. (1998) Intermediate dose methotrexate is as effective as high dose methotrexate in preventing isolated testicular relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*, 20(5): 444-450.
- [87] Chauvenet AR, Martin PL, Devidas M, Linda SB, Bell BA, Kurtzberg J, Pullen J, Pettenati MJ, Carroll AJ, Shuster JJ, Camitta B. (2007) Antimetabolite therapy for lesser-risk B-lineage acute lymphoblastic leukemia of childhood: a report from Children's Oncology Group Study P9201. *Blood*, 110(4): 1105-1111.
- [88] Palanki MS, Dneprovskaja E, Doukas J, Fine RM, Hood J, Kang X, Lohse D, Martin M, Noronha G, Soll RM, Wrasidlo W, Yee S, Zhu H. (2007) Discovery of 3,3'-(2,4-diaminopteridine-6,7-diyl)diphenol as an isozyme-selective inhibitor of PI3K for the treatment of ischemia reperfusion injury associated with myocardial infarction. *J Med Chem*, 50(18): 4279-4294.
- [89] Blum CA, Caldwell T, Zheng X, Bakthavatchalam R, Capitosti S, Briemann H, De Lombaert S, Kershaw MT, Matson D, Krause JE, Cortright D, Crandall M, Martin WJ, Murphy BA, Boyce S, Jones AB, Mason G, Rycroft W, Perrett H, Conley R, Burnaby-Davies N, Chenard BL, Hodgetts KJ. (2010) Discovery of novel 6,6-heterocycles as transient receptor potential vanilloid (TRPV1) antagonists. *J Med Chem*, 53(8): 3330-3348.
- [90] Cox JM, Harper B, Mastracchio A, Leiting B, Sinha Roy R, Patel RA, Wu JK, Lyons KA, He H, Xu S, Zhu B, Thornberry NA, Weber AE, Edmondson SD. (2007) Discovery of 3-aminopiperidines as potent, selective, and orally bioavailable dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 17(16): 4579-4583.
- [91] White EL, Suling WJ, Ross LJ, Seitz LE, Reynolds RC. (2002) 2-Alkoxy-carbonylaminopyridines: inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* FtsZ. *J Antimicrob Chemother*, 50(1): 111-114.
- [92] Mathew B, Srivastava S, Ross LJ, Suling WJ, White EL, Woolhiser LK, Lenaerts AJ, Reynolds RC. (2011) Novel pyridopyrazine and pyrimidothiazine derivatives as FtsZ inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 19(23): 7120-7128.
- [93] Giardina GA, Artico M, Cavagnera S, Cerri A, Consolandi E, Gagliardi S, Graziani D, Grugni M, Hay DW, Luttmann MA, Mena R, Raveglia LF, Rigolio R, Sarau HM, Schmidt DB, Zanoni G, Farina C. (1999) Replacement of the quinoline

- system in 2-phenyl-4-quinolinecarboxamide NK-3 receptor antagonists. *Farmaco*, 54(6): 364-374.
- [94] Young JR, Huang SX, Walsh TF, Wyvratt MJ, Yang YT, Yudkovitz JB, Cui J, Mount GR, Ren RN, Wu TJ, Shen X, Lyons KA, Mao AH, Carlin JR, Karanam BV, Vincent SH, Cheng K, Goulet MT. (2002) 2-Arylindoles as gonadotropin releasing hormone (GnRH) antagonists: optimization of the tryptamine side chain. *Bioorg Med Chem Lett*, 12(5): 827-832.
- [95] Gong YD, Dong MS, Lee SB, Kim N, Bae MS, Kang NS. (2011) A novel 3-arylethynyl-substituted pyrido[2,3,-b]pyrazine derivatives and pharmacophore model as Wnt2/ β -catenin pathway inhibitors in non-small-cell lung cancer cell lines. *Bioorg Med Chem*, 19(18): 5639-5647.
- [96] Kawakami J, Duncton M, Sherman D, He HY, Kiselyov A, Pytowski B. PKB inhibitors as anti-tumor agents. WO 2005007099 számú PCT szabadalmi bejelentés. (2005)
- [97] Webb TR, Slavish J, George RE, Look AT, Xue L, Jiang Q, Cui X, Rentrop WB, Morris SW. (2009) Anaplastic lymphoma kinase: role in cancer pathogenesis and small-molecule inhibitor development for therapy. *Expert Rev Anticancer Ther*, 9(3): 331-356.
- [98] Charlton, S. J.; LeBlanc, C.; McKeown, S. C. IP receptor agonist heterocyclic compounds WO 2012007539 számú PCT szabadalmi bejelentés. (2012)
- [99] Koch P, Jahns H, Schattel V, Goettert M, Laufer S. (2010) Pyridinylquinoxalines and pyridinylpyridopyrazines as lead compounds for novel p38 alpha mitogen-activated protein kinase inhibitors. *J Med Chem*, 53(3): 1128-1137.
- [100] Zambon A, Ménard D, Suijkerbuijk BM, Niculescu-Duvaz I, Whittaker S, Niculescu-Duvaz D, Nourry A, Davies L, Manne HA, Lopes F, Preece N, Hedley D, Ogilvie LM, Kirk R, Marais R, Springer CJ. (2010) Novel hinge binder improves activity and pharmacokinetic properties of BRAF inhibitors. *J Med Chem*, 53(15): 5639-5655.
- [101] Luo Y, Dixon CJ, Hall JF, White PJ, Boarder MR. (2007) A role for Akt in epidermal growth factor-stimulated cell cycle progression in cultured hepatocytes:

- generation of a hyperproliferative window after adenoviral expression of constitutively active Akt. *J Pharmacol Exp Ther*, 321(3): 884-891.
- [102] Han EK, Levenson JD, McGonigal T, Shah OJ, Woods KW, Hunter T, Giranda VL, Luo Y. (2007) Akt inhibitor A-443654 induces rapid Akt Ser-473 phosphorylation independent of mTORC1 inhibition. *Oncogene*, 26(38): 5655-5661.
- [103] Liu X, Shi Y, Woods KW, Hessler P, Kroeger P, Wilsbacher J, Wang J, Wang JY, Li C, Li Q, Rosenberg SH, Giranda VL, Luo Y. (2008) Akt inhibitor a-443654 interferes with mitotic progression by regulating aurora a kinase expression. *Neoplasia*, 10(8): 828-837.
- [104] Raw SA, Wilfred CD, Taylor RJ. (2004) Tandem oxidation processes for the preparation of nitrogen-containing heteroaromatic and heterocyclic compounds. *Org Biomol Chem*, 2(5): 788-796.
- [105] Meshram HM, Santosh Kumar G, Ramesh P, Chennakesava Reddy B. (2010) A mild and convenient synthesis of quinoxalines via cyclization–oxidation process using DABCO as catalyst. *Tetrahedron Lett*, 51(19):2580–2585.
- [106] Patriciu OI, Fînaru AL, Massip S, Léger JM, Jarry C, Guillaumet G. (2009) Efficient and selective method for the synthesis of dihydrodipyridopyrazines based on the Pd-catalysed amination of halopyridines. *Eur J Org Chem*, 2009(22): 3753-3764.
- [107] Varvaresou A, Iakovou K. (2002) Derivatives of 5-Oxy-pyrido[2,3-*b*]quinoxaline-9-carboxylic acid: A tricyclic system useful for the synthesis of potential intercalators. *J Heterocyclic Chem*, 39(6): 1173-1176.
- [108] Hennessy AJ, Jones GE, Markwell RE, Miles T, Pearson ND. Substituted (aza)-1-methyl-1*H*-quinolin-2-ones as antibacterials. WO 2010046388 számú PCT szabadalmi bejelentés. (2010)
- [109] Moustafa OS, Badr MZ, Kamel EM. (2000) Synthesis of new pyridoquinoxalines, thienopyridoquinoxalines and pyrimidothienopyridoquinoxalines. *Pharmazie*, 55(12): 896-899.
- [110] D'Souza JV. (1984) Pyrazine condensations from malononitrile. *J Indian Chem Soc*, 61(10): 885-887.

- [111] Crowley PJ, Lamberth C, Müller U, Wendeborn S, Nebel K, Williams J, Sageot OA, Carter N, Mathie T, Kempf HJ, Godwin J, Schneiter P, Dobler MR. (2010) Synthesis and fungicidal activity of tubulin polymerisation promoters. Part 1: pyrido[2,3-*b*]pyrazines. *Pest Manag Sci*, 66(2): 178-185.
- [112] Lippmann E, Teichert J. (1979) Synthese von Pyrido[2,3-*b*]chinoxalinen. *Zeitschrift für Chemie*, 19(11): 422.
- [113] Jun Yan. Using Boronic Acid as the Recognition and Signaling Moiety for Sugar Sensing. (Under the direction of Dr. Binghe Wang.), Dissertation submitted to the Graduate Faculty of North Carolina State University, Department of Chemistry, Raleigh. 87. oldal.
- [114] Ogino A, Kitao H, Hirano S, Uchida A, Ishiai M, Kozuki T, Takigawa N, Takata M, Kiura K, Tanimoto M. (2007) Emergence of epidermal growth factor receptor T790M mutation during chronic exposure to gefitinib in a non small cell lung cancer cell line. *Cancer Res*, 67(16): 7807-7814.
- [115] Thomas SA, Li T, Woods KW, Song X, Packard G, Fischer JP, Diebold RB, Liu X, Shi Y, Klinghofer V, Johnson EF, Bouska JJ, Olson A, Guan R, Magnone SR, Marsh K, Luo Y, Rosenberg SH, Giranda VL, Li Q. (2006) Identification of a novel 3,5-disubstituted pyridine as a potent, selective, and orally active inhibitor of Akt1 kinase. *Bioorg Med Chem Lett*, 16(14): 3740-3744.
- [116] Woods KW, Fischer JP, Claiborne A, Li T, Thomas SA, Zhu GD, Diebold RB, Liu X, Shi Y, Klinghofer V, Han EK, Guan R, Magnone SR, Johnson EF, Bouska JJ, Olson AM, de Jong R, Oltersdorf T, Luo Y, Rosenberg SH, Giranda VL, Li Q. (2006) Synthesis and SAR of indazole-pyridine based protein kinase B/Akt inhibitors. *Bioorg Med Chem*. 14(20): 6832-6846.
- [117] Koren AO, Horti AG, Mukhin AG, Gündisch D, Kimes AS, Dannals RF, London ED. (1998) 2-, 5-, and 6-Halo-3-(2(S)-azetidinylmethoxy)pyridines: Synthesis, affinity for nicotinic acetylcholine receptors, and molecular modeling. *J Med Chem*, 41(19): 3690-3698.
- [118] McCall JM, Romero DL, Kelly RC. Heterocyclic compounds for the inhibition of PASK. WO2012119046 számú PCT szabadalmi bejelentés. (2012)

- [119] Allin SM, Streetley GB, Slater M, James SL, Martin WP. (2004) A formal asymmetric synthesis of both enantiomers of the Erythrina alkaloid 3-demethoxyerythratidinone. *Tetrahedron Lett*, 45(28): 5493-5496.
- [120] Ragains JR, Winkler JD. (2006) Pseudosymmetry in azabicyclo[2.1.1]hexanes. A stereoselective construction of the bicyclic core of peduncularine. *Org Lett*, 8(20): 4437-4440.
- [121] Suzuki A. (1999) Recent advances in the cross-coupling reactions of organoboron derivatives with organic electrophiles, 1995–1998. *J Organomet Chem*, 576(1): 147-168.
- [122] Brenner E, Baldwin RM, Tamagnan G. (2004) Synthesis of a new precursor to the nicotinic receptor tracer 5-IA-85380 precursor using trimethylsilyl iodide as deblocking agent. *Tetrahedron Lett*, 45(18): 3607-3610.
- [123] Pyun DK, Lee CH, Ha HJ, Park CS, Chang JW, Lee WK. (2001) Synthesis of Substituted-(l)-Tryptophanols from an Enantiomerically Pure Aziridine-2-methanol. *Org Lett*, 3(26): 4197-4199.
- [124] Jiaranaikulwanitch J, Govitrapong P, Fokin VV, Vajragupta O. (2012) From BACE1 inhibitor to multifunctionality of tryptoline and tryptamine triazole derivatives for Alzheimer's disease. *Molecules*, 17(7): 8312-8333.
- [125] Karis ND, Loughlin WA, Jenkins ID. (2007) A facile and efficient method for the synthesis of novel pyridone analogues by aminolysis of an ester under solvent-free conditions. *Tetrahedron*, 63(50): 12303-12309.
- [126] Kishore Kumar GD, Baskaran S. (2005) A facile, catalytic, and environmentally benign method for selective deprotection of tert-butyldimethylsilyl ether mediated by phosphomolybdic acid supported on silica gel. *J Org Chem*, 70(11): 4520-4523.
- [127] Burns DM, He C, Li Y, Metcalf B, Qian DQ, Xu M, Yao W, Zhang C, Zhuo J. Imidazotriazines and imidazopyrimidines as kinase inhibitors. WO2008064157 számú PCT szabadalmi bejelentés. (2008)
- [128] Taylor EC, Pont JL, Warner JC. (1987) Heterodienophilic intramolecular diels-alder reactions of 1,2,4 triazines. : Synthesis of novel polycyclic condensed pyrazines and lumazines. *Tetrahedron*, 43(21): 5159-5168.

- [129] Li J, Jiang DN, Chen JX, Liu MC, Ding JC, Wu HY. (2011) Eco-friendly synthesis of quinoxaline derivatives by grinding under solvent-free conditions. *J Heterocycl Chem*, 48(2): 403-406.
- [130] Armand J, Chekir K, Pinson J. (1978) Electrochemical reduction of pyridopyrazines. *Can J Chem*, 56: 1804-1816.
- [131] Borhani DW, Calderwood DJ, Frank KE, Davis HM, Josephson NS, Skinner BS. Novel imidazothiazoles and imidazoxazoles. WO2008063287 számú PCT szabadalmi bejelentés. (2008)
- [132] Del Valle L, Stille JK, Hegedűs LS. (1990) Palladium-catalyzed coupling of allylic acetates with aryl- and vinylstannanes. *J Org Chem*, 55(10): 3019-3023.
- [133] Molnár Á. (2011) Efficient, selective, and recyclable palladium catalysts in carbon-carbon coupling reactions. *Chem Rev*, 111(3): 2251-2320.
- [134] Schuster I, Egger H. Acylated aminoalkanimidazoles and -triazoles. US5622982 számú szabadalmi bejelentés. (1997)
- [135] Bátori S. Fizikai-kémiai és ADME-tulajdonságok optimalása: szerkezeti szempontok. In: Keserű GyM (szerk.), *A gyógyszerkutatás kémiája*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 2011: 522-531.
- [136] Hughes RO, Walker JK, Cabbage JW, Fobian YM, Rogier DJ, Heasley SE, Blevis-Bal RM, Benson AG, Owen DR, Jacobsen EJ, Freskos JN, Molyneaux JM, Brown DL, Stallings WC, Acker BA, Maddux TM, Tollefson MB, Williams JM, Moon JB, Mischke BV, Rumsey JM, Zheng Y, Macinnes A, Bond BR, Yu Y. (2009) Investigation of aminopyridopyrazinones as PDE5 inhibitors: Evaluation of modifications to the central ring system. *Bioorg Med Chem Lett*, 19(15): 4092-4096.

11. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapját képező publikációk:

Kékesi L, Sipos A, Németh G, Pató J, Kéri Gy, Órfi L. Pyridopyrazines as anticancer agents. HU P1300006 számú magyar szabadalmi bejelentés. (2013 Január 7.)

Kékesi L, Sipos A, Németh G, Pató J, Breza N, Baska F, Órfi L, Kéri G. (2013) Synthesis and biological evaluation of novel pyrido[2,3-*b*]pyrazines inhibiting both erlotinib-sensitive and erlotinib-resistant cell lines. *Bioorg Med Chem Lett*, 23(22): 6152-6155. doi szám: 10.1016/j.bmcl.2013.09.005.

Kékesi L, Sipos A, Németh G, Pató J, Kéri Gy, Órfi L. Pyridopyrazines as anticancer agents. WO2014106763 számú nemzetközi szabadalmi bejelentés. (2014 Január 7.)

Kékesi L, Dancsó A, Illyés E, Boros S, Pató J, Greff Z, Németh G, Garamvölgyi R, Baska F, Órfi L, Kéri Gy. (2014) Preparation of pyrido[2,3-*b*]pyrazine ring system via regioselective condensation reaction. *Lett in Org Chem*, 11(9): 651-656. doi szám: 10.2174/1570178611666140606205028.

Kékesi L, Sipos A, Németh G, Dancsó A, Illyés E, Boros S, Breza N, Nemes Z, Hegymegi-Barakonyi B, Pató J, Greff Z, Kéri Gy, Órfi L. (2014) Erlotinib-érzékeny és erlotinib-rezisztens sejtvonalakat gátló pirido[2,3-*b*]pirazinok, és előállításuk régiószelektív kondenzációs reakcióval. *Acta Pharm Hung*, 84: - megjelenés alatt.

Az értekezés alapját nem képező publikációk:

Baska F, Szabadkai I, Sipos A, Breza N, Szántai-Kis Cs, Kékesi L, Garamvölgyi R, Nemes Z., Baska F, Neumann L, Torka R, Ullrich A, Kéri Gy, Órfi L. (2014) Pharmacophore and binding analysis of known and novel B-RAF kinase inhibitors. *Curr Med Chem*, 21(17): 1938-1965. doi szám: 10.2174/0929867321666140304152606.

12. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Prof. Kéri Györgynek, hogy irányításával az általa és Dr. Órfi László által létrehozott kutatócsoportban nemzetközi színvonalú tudományos kutatómunkában vehettem részt.

Köszönettel tartozom Dr. Pató Jánosnak, Dr. Greff Zoltánnak, Varga Zoltánnak és Dr. Dobos Juditnak a szakmai útmutatásért, és a disszertáció megírásában nyújtott segítségért és tanácsokért.

Köszönöm Dr. Németh Gábornak és Dr. Garamvölgyi Ritának a Stemkill pályázat irányítását, melynek keretében munkámat végezhettem, és köszönettel tartozom Sipos Annának a biológiai vizsgálatok elvégzéséért.

Köszönöm Dr. Illyés Eszternek, Boros Sándornak, Dr. Szilágyi Ildikónak és Varga Istvánnak az analitikai munkában, valamint Dancsó Andrásnak és Dr. Baska Ferencnek a röntgenkristallográfiás és analitikai munkában nyújtott segítséget, továbbá Dr. Nemes Zoltánnak az oldhatóság mérésekben nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Pató Jánosnak, Sipos Annának, Dr. Székely Ritának az MM4TB pályázatban végzett munkájukat, melynek néhány eredménye a disszertációban felhasználásra került.

Továbbá köszönettel tartozom Hegymegi-Barakonyi Bálintnak a munkát érintő informatikai segítségért.

Végül köszönettel tartozom valamennyi munkatársamnak, hogy segítőkész, baráti légkörben végezhettem doktori munkámat.

13. Mellékletek

1. melléklet

A **31n**, **34a-c**, **37a-e** és **38** vegyületek vízoldhatóság meghatározásának mérési adatai (maximum 120 μM).

Vegyület		UV elnyelés (görbe alatti terület)				Oldhatóság (μM , pH = 7,4)				Oldhatóság (μM , pH = 2,0)		
31n	DMSO	34429	32982	31737		7,76	1,69	2,59		5,23	3,95	10,78
	PBS	2225	465	685	Átlag	4,01			Átlag	6,65		
	PH2	1500	1085	2852	Szórás	3,27			Szórás	3,63		
					Szórás %	81,56			Szórás %	54,62		
34a	DMSO	18862	18472	17610		41,51	16,73	33,21		20,39	19,34	18,17
	PBS	6525	2576	4874	Átlag	30,49			Átlag	19,30		
	PH2	3205	2977	2666	Szórás	12,61			Szórás	1,11		
					Szórás %	41,37			Szórás %	5,76		
34b	DMSO	31389	30569	29390		19,15	31,75	18,48		0,51	4,23	10,25
	PBS	5008	8088	4527	Átlag	23,13			Átlag	5,00		
	PH2	133	1078	2511	Szórás	7,48			Szórás	4,92		
					Szórás %	32,32			Szórás %	98,39		
34c	DMSO	39437	38257	36503		10,19	45,49	17,59		0,00	7,94	4,22
	PBS	3349	14504	5350	Átlag	24,42			Átlag	4,05		
	PH2	0	2530	1284	Szórás	18,62			Szórás	3,97		
					Szórás %	76,23			Szórás %	97,98		

37a	DMSO	30150	29492	29351		27,82	19,47	18,70		112,51	113,26	108,99
	PBS	6991	4784	4574	Átlag	22,00			Átlag	111,59		
	PH2	28269	27836	26659	Szórás	5,06			Szórás	2,28		
					Szórás %	23,01			Szórás %	2,04		
37b	DMSO	38075	36376	35177		14,83	24,54	16,66		112,35	117,69	119,84
	PBS	4706	7439	4883	Átlag	18,68			Átlag	116,63		
	PH2	35649	35675	35130	Szórás	5,16			Szórás	3,85		
					Szórás %	27,63			Szórás %	3,30		
37c	DMSO	26618	25377	24482		11,07	7,71	6,79		100,03	100,10	102,63
	PBS	2455	1630	1385	Átlag	8,52			Átlag	100,92		
	PH2	22189	21169	20938	Szórás	2,25			Szórás	1,48		
					Szórás %	26,43			Szórás %	1,47		
37d	DMSO	35904	32681	30943		29,77	20,52	21,79		111,63	122,79	122,69
	PBS	8907	5588	5619	Átlag	24,03			Átlag	119,04		
	PH2	33400	33441	31637	Szórás	5,01			Szórás	6,41		
					Szórás %	20,87			Szórás %	5,39		
37e	DMSO	31682	30552	29496		60,75	52,20	52,59		119,48	121,72	122,36
	PBS	16040	13291	12926	Átlag	55,18			Átlag	121,19		
	PH2	31546	30990	30076	Szórás	4,83			Szórás	1,51		
38	DMSO	37593	36243	34821		6,24	4,08	7,92		3,78	4,40	11,83
	PBS	1954	1231	2298	Átlag	6,08			Átlag	6,67		
	PH2	1183	1328	3434	Szórás	1,93			Szórás	4,48		
					Szórás %	31,70			Szórás %	67,23		

2. melléklet

A **33a** vegyület aktív hely vezérelt, kompetíciós kötődés vizsgálata 456 kinázon és tumorokban előforduló mutánsaikon (1 μ M).

AAK1	100	PCTK2	100	DAPK3	90
ABL2	100	PCTK3	100	EGFR (L861Q)	90
ACVR1B	100	PDGFRB	100	JNK3	90
ACVR2B	100	PFPK5 (P.falciparum)	100	KIT (V559D,T670I)	90
ACVRL1	100	PFTK1	100	MEK1	90
ADCK4	100	PIK3C2B	100	MKK7	90
AKT1	100	PIK3CA	100	RSK2 (Kin.Dom.1-N-terminal)	90
ALK	100	PIK3CA (H1047L)	100	MAP4K3	89
ALK (C1156Y)	100	PIK3CA (I800L)	100	EGFR (E746-A750del)	88
ALK (L1196M)	100	PIM1	100	EGFR (G719S)	88
AMPK-alpha2	100	PIP5K1A	100	HPK1	88
ANKK1	100	PIP5K1C	100	MUSK	88
ASK2	100	PIP5K2C	100	PIK3C2G	88
AURKC	100	PKMYT1	100	SRPK1	88
AXL	100	PKN1	100	TAOK1	88
BIKE	100	PKN2	100	TXK	88
BLK	100	PLK1	100	FAK	87
BMPR1A	100	PRKCD	100	FGFR4	87
BMPR2	100	PRKCI	100	PIK3CG	87
BMX	100	PRKCQ	100	SRMS	87
BRAF	100	PRKG1	100	TIE1	87
BRAF (V600E)	100	PRKR	100	WEE2	87
BRSK1	100	PRKX	100	ABL1 (H396P)- phosphorylated	86
BRSK2	100	PRP4	100	BUB1	86
CAMK1	100	PYK2	100	CDK2	86
CAMK1D	100	RAF1	100	DAPK1	86
CAMK1G	100	RET	100	GSK3A	86
CAMK2G	100	RET (M918T)	100	MEK5	86
CAMKK1	100	RET (V804M)	100	MET (M1250T)	86
CAMKK2	100	RIOK1	100	PLK3	86
CASK	100	RIOK3	100	YANK3	86
CDC2L1	100	ROCK1	100	CAMK4	85
CDC2L2	100	ROCK2	100	EPHA1	85
CDC2L5	100	ROS1	100	EPHA3	85

CDK4-cyclinD1	100	RPS6KA4 (Kin.Dom.1-N-terminal)	100	LRRK2	85
CDK5	100	RPS6KA5 (Kin.Dom.1-N-terminal)	100	RIPK2	85
CDK8	100	RPS6KA5 (Kin.Dom.2-C-terminal)	100	TYK2 (JH1domain-catalytic)	85
CDKL1	100	RSK2 (Kin.Dom.2-C-terminal)	100	ABL1 (F317L)-nonphosphorylated	84
CDKL2	100	RSK3 (Kin.Dom.1-N-terminal)	100	AURKB	84
CDKL3	100	RSK3 (Kin.Dom.2-C-terminal)	100	DAPK2	84
CDKL5	100	SBK1	100	HIPK3	84
CHEK1	100	SGK	100	MAP4K5	84
CHEK2	100	SgK110	100	MEK2	84
CIT	100	SGK2	100	NEK7	84
CLK4	100	SIK	100	PLK2	84
CSF1R- autoinhibited	100	SIK2	100	EGFR	83
CSK	100	SLK	100	INSRR	83
CSNK1D	100	SNARK	100	LATS2	83
CSNK1G2	100	SNRK	100	MAP3K4	83
CSNK2A2	100	SRPK2	100	PIK3CA (Q546K)	83
CTK	100	SRPK3	100	PRKD1	83
DCAMKL1	100	STK35	100	RSK1 (Kin.Dom.1-N-terminal)	83
DCAMKL2	100	STK36	100	BMPR1B	82
DDR1	100	STK39	100	PKAC-alpha	82
DDR2	100	SYK	100	PLK4	82
DLK	100	TAK1	100	TAOK3	82
DMPK	100	TEC	100	TLK1	82
EGFR (G719C)	100	TGFBR1	100	MAP3K3	81
EGFR (L747-T751del,Sins)	100	TGFBR2	100	NEK5	81
EGFR (S752-I759del)	100	TIE2	100	RIPK1	81
EIF2AK1	100	TLK2	100	YSK4	81
EPHA2	100	TNIK	100	PRKD2	80
EPHA4	100	TNK1	100	QSK	80

EPHA5	100	TNK2	100	RET (V804L)	80
EPHA6	100	TRKA	100	AKT2	79
EPHA7	100	TRKB	100	ERK3	79
EPHA8	100	TRKC	100	NIK	79
EPHB1	100	TRPM6	100	NIM1	79
EPHB2	100	TSSK1B	100	PIK3CA (E545A)	79
EPHB3	100	TTK	100	CDK11	78
EPHB4	100	TYRO3	100	CSNK1A1L	78
ERBB2	100	ULK2	100	DYRK1B	78
ERBB4	100	VRK2	100	ERK4	78
ERK2	100	WNK1	100	RIOK2	78
ERK5	100	WNK3	100	RSK4 (Kin.Dom.1-N-terminal)	78
ERN1	100	YANK1	100	TESK1	78
FER	100	YANK2	100	EPHB6	77
FES	100	YES	100	FLT3 (D835H)	77
FGFR1	100	ZAK	100	LIMK2	77
FGFR2	100	ZAP70	100	AMPK-alpha1	76
FGFR3	100	CDK3	99	ARK5	76
FGR	100	EGFR (L858R)	99	DRAK2	76
FLT1	100	FLT3 (R834Q)	99	NEK3	76
FLT3	100	PHKG2	99	RIPK4	76
FLT3 (D835Y)	100	RIPK5	99	TYK2 (JH2domain-pseudokinase)	76
FLT3 (ITD)	100	ASK1	98	CSNK1A1	75
FLT3 (K663Q)	100	EGFR (L858R,T790M)	98	EGFR (L747- E749del, A750P)	75
FLT4	100	MEK4	98	MEK6	75
GCN2 (Kin.Dom.2,S808 G)	100	MST2	98	p38-beta	75
GRK4	100	RPS6KA4 (Kin.Dom.2-C- terminal)	98	RSK1 (Kin.Dom.2-C- terminal)	75
GRK7	100	RSK4 (Kin.Dom.2-C- terminal)	98	ABL1 (T315I)- nonphosphoryla ted	74
GSK3B	100	AKT3	97	ICK	74
HASPIN	100	BRK	97	MYO3B	74
HIPK1	100	BTK	97	CAMK2B	73
HIPK2	100	FRK	97	CLK3	73

HUNK	100	JNK2	97	CSNK1E	73
IGF1R	100	ABL1 (Y253F)- phosphorylated	96	DMPK2	73
IKK-alpha	100	DCAMKL3	96	DRAK1	73
IKK-beta	100	ERK1	96	LTK	72
IKK-epsilon	100	MKNK2	96	ERK8	71
INSR	100	MYLK4	96	LATS1	71
IRAK3	100	PHKG1	96	ABL1 (Q252H)- nonphosphoryla ted	70
IRAK4	100	PKAC-beta	96	AURKA	69
ITK	100	PRKD3	96	CSNK1G3	69
JAK1 (JH1domain- catalytic)	100	PRKG2	96	JAK1 (JH2domain- pseudokinase)	69
JAK3 (JH1domain- catalytic)	100	S6K1	96	PDGFRA	69
KIT (A829P)	100	STK16	96	PIK3CA (E542K)	69
KIT (D816H)	100	ABL1 (F317I)- nonphosphorylate d	95	PIK3CA (H1047Y)	69
KIT (D816V)	100	CDK9	95	KIT (V559D,V654A)	68
KIT (L576P)	100	JNK1	95	PKNB (M.tuberculosis)	68
KIT (V559D)	100	MAP3K2	95	ULK1	68
LCK	100	MET	95	ULK3	68
LIMK1	100	MST3	95	ABL1 (F317L)- phosphorylated	67
LRRK2 (G2019S)	100	NDR2	95	WEE1	67
LYN	100	NEK9	95	ABL1- phosphorylated	66
LZK	100	PIM3	95	CLK2	66
MAP3K1	100	CDK7	94	HCK	66
MAPKAPK2	100	FGFR3 (G697C)	94	KIT- autoinhibited	66
MAPKAPK5	100	FYN	94	PIK3CA (M1043I)	66
MARK2	100	JAK2 (JH1domain- catalytic)	94	PIK4CB	66
MARK3	100	MARK1	94	ABL1 (E255K)- phosphorylated	65

MARK4	100	MET (Y1235D)	94	ABL1 (M351T)-phosphorylated	65
MAST1	100	NDR1	94	MAP4K2	65
MELK	100	OSR1	94	ACVR2A	64
MINK	100	PIM2	94	CAMK2A	64
MKMK1	100	PRKCH	94	EGFR (T790M)	64
MLK1	100	TNNI3K	94	MERTK	64
MLK2	100	ABL1 (F317I)-phosphorylated	93	TAOK2	64
MLK3	100	DYRK2	93	ABL1 (T315I)-phosphorylated	63
MRCKA	100	EGFR (L747-S752del, P753S)	93	TBK1	63
MRCKB	100	GRK1	93	ADCK3	62
MST1R	100	HIPK4	93	CSNK1G1	62
MST4	100	LKB1	93	MEK3	62
MTOR	100	PFCDPK1 (P.falciparum)	93	ABL1 (H396P)-nonphosphorylated	61
MYLK2	100	PFTAIRE2	93	MLCK	61
MYO3A	100	SGK3	93	PIK3CA (E545K)	61
NEK1	100	YSK1	93	LOK	60
NEK10	100	ABL1 (Q252H)-phosphorylated	92	PIK3CD	59
NEK11	100	CAMK2D	92	CSNK2A1	58
NEK2	100	CDK4-cyclinD3	92	FLT3-autoinhibited	58
NEK4	100	ERBB3	92	PIK3CA (C420R)	58
NEK6	100	IRAK1	92	PIP5K2B	58
NLK	100	MAK	92	STK33	58
p38-alpha	100	MST1	92	CLK1	57
p38-gamma	100	p38-delta	92	GAK	57
PAK1	100	PRKCE	92	MYLK	56
PAK2	100	ACVR1	91	FLT3 (N841I)	55
PAK3	100	CSF1R	91	VEGFR2	54
PAK4	100	DYRK1A	91	MAP3K15	52
PAK6	100	KIT	91	MAP4K4	51
PAK7	100	PDPK1	91	PIK3CB	47
PCK1	100	SRC	91	ABL1-nonphosphorylated	46