

Tumorelles hatású kinázgátló vegyületek előállítása és vizsgálata

Doktori értekezés

dr. Baska Ferenc

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Órfi László, egyetemi docens, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Krajsovsky Gábor, egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Keserű György Miklós, főigazgató, D.Sc.

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

Budapest
2014

1. TARTALOMJEGYZÉK

1. TARTALOMJEGYZÉK	2
2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
3. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
3.1 A kinázok	8
3.2 A B-RAF kináz szerepe a tumorok kialakulásában	10
3.2.1 Szakirodalomban publikált B-RAF gátló vegyületek és csoportosításuk kötődési módjuk szerint.....	11
3.3 Az FLT3 kináz funkciója és leukémiákban betöltött szerepe	14
3.3.1 Szakirodalomban publikált FLT3 gátló vegyületek	17
4. CÉLKITŰZÉSEK	21
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	22
5.1 Potenciális B-RAF gátló vegyületek vizsgálata	23
5.1.1 Molekulamodellzés és dokkolás	23
5.1.2 A vegyületek B-RAF gátló hatásának meghatározása <i>in vitro</i> biokémiai módszer segítségével	24
5.1.3 Felhasznált sejtvonalak és módszerek	24
5.1.4 Sejtvonalakon történő IC ₅₀ meghatározás	25
5.1.5 A vegyületek kötődési kinetikájának vizsgálata.....	25
5.2 Sztiril-kinazolin származékok előállítása és vizsgálata	26
5.2.1 Sztiril-kinazolin származékok kináz szeletivitásának vizsgálata	27
5.2.2 Sztiril-kinazolin származékok hatásának vizsgálata biokémiai módszerek segítségével.....	27
5.2.3 Vegyületek vizsgálata MV4-11 humán akut mieloid leukémia és mutáns vagy vad típusú p53 sejtvonalakon	28
5.2.4 Apoptózis/nekrózis vizsgálata áramlási citometria (FACS) módszerével	29
5.2.5 A CP-31398 referenciavegyület és az egyik analóg hatása a p53 fehérje expressziójára	29
5.2.6 A sztiril-kinazolin származékok PAMPA vizsgálata	29
6. EREDMÉNYEK	31
6.1 Potenciális B-RAF gátló vegyületek vizsgálata	31
6.1.1 Molekulamodellzés és dokkolás	31

6.1.2 A vegyületek B-RAF gátló hatásának meghatározása <i>in vitro</i> biokémiai módszer segítségével	33
6.1.3 Tumorellenes hatás (IC ₅₀ érték) meghatározása öt sejtvonalon	35
6.1.4 A kötődési kinetika vizsgálata.....	37
6.1.5 A 4-fenoxikinolin származékok hatása c-MET kinázon	38
6.2 Sztiril-kinazolin származékok előállítása és biológiai vizsgálata	40
6.2.1 A CP-31398 azonosítójelű validációs vegyület előállítása az általam kidolgozott módszer alapján.....	40
6.2.2 Szubsztituált sztiril-kinazolinok előállítása a validációs vegyületre kidolgozott szintézis alapján.....	41
6.2.2.1 Metil-kinazolon intermedierek előállítása szubsztituált antranilsavakból	41
6.2.2.2 Sztiril-kinazolon intermedierek előállítása szubsztituált benzaldehidekből és tiofén-2-karbaldehidből.....	44
6.2.2.3 Sztiril-pirimidin intermedier előállítása 4-klórbenzaldehid felhasználásával	53
6.2.2.4 Szubsztituált 2-[(<i>E</i>)-2-(fenil)vinil]-4-klórkinazolin és 4-klór-2-[(<i>E</i>)-2-(2-tenil)vinil]kinazolin intermedierek előállítása.....	54
6.2.2.5 Sztiril-pirimidin intermedier klórozása	57
6.2.2.6 Szubsztituált sztiril-kinazolin végtermékek előállítása	58
6.2.2.7 Sztiril-pirimidin végtermékek szintézise	96
6.2.3 Sztiril-kinazolin származékok szelektivitásának vizsgálata kinázpanel segítségével.....	97
6.2.4 Sztiril-kinazolin származékok hatásának vizsgálata biokémiai módszerek segítségével.....	99
6.2.4.1 A vegyületek hatása FLT3(ITD) kinázon.....	99
6.2.5 Vegyületek vizsgálata MV4-11 akut mieloid leukémia sejtvonalon.....	107
6.2.6 Vegyületek vizsgálata p53 mutáns sejtvonalakon.....	108
6.2.7 Apoptózis/nekrózis vizsgálata áramlási citometria (FACS) módszerével ...	109
6.2.8 A vegyületek PAMPA vizsgálata	110
7. MEGBESZÉLÉS	112
7.1 B-RAF gátló vegyületek vizsgálata	112

7.2 Sztiril-kinazolin származékok előállítása és vizsgálata	113
8. KÖVETKEZTETÉSEK	120
8.1 B-RAF gátló vegyületek vizsgálata	120
8.2 Sztiril-kinazolin származékok előállítása és vizsgálata	120
9. ÖSSZEFOGLALÁS	123
10. SUMMARY	124
11. IRODALOMJEGYZÉK	125
12. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	142
13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	145

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Abl	Abelson kináz
ADP	Adenozin-difoszfát
Akt	Anti-apoptotikus kináz
ALL	Akut limfoblasztos leukémia
AML	Akut mieloid leukémia
ATP	Adenozin-trifoszfát
AXL	Tyrosine-protein kinase receptor UFO – UFO receptor tirozin kináz
B-RAF(V600E)	V600E mutáns B-RAF kináz
CDK9	Cyclin dependent kinase 9 – ciklin dependens kináz 9
c-Kit	Sejtnövekedés faktor receptor
c-MET	MET receptor tirozin kináz, másik nevén: HGFR – hepatocita növekedési faktor receptor
CML	Krónikus mieloid leukémia
CSFR (FMS)	Colony stimulating factor 1 receptor – kolónia stimuláló faktor receptor
CSNK1A1	Casein kinase 1, alpha 1-like – kazein kináz 1 alfa 1
DFG	Aszparaginsav-fenilalanin-glicin aminosav hármasszoros a kináz katalitikus régióján
DIPEA	Diizopropil-etilamin
DMF	Dimetil-formamid
DMSO	Dimetil-szulfoxid
DNS	Dezoxiribonukleinsav
DTT	1,4-Ditiotreitol
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav
EGFR	Epidermal growth factor receptor – epidermális növekedési faktor receptor
ERK	Extracellular signal regulated kinase - extracelluláris szignál regulált kináz
ESI	Electrospray ionization - Elektrospray ionizáció
FACS	Fluorescence-activated cell sorting – áramlási citometria
FBS	Fetal bovine serum – magzati borjú szérum
FGFR	Fibroblast growth factor receptor - fibroblaszt növekedési receptor
FL / FLT3L	FLT3 ligandum
FLT1 / FLT4	FMS-like tyrosine kinase 1 / 4 - FMS szerű tirozin kináz 1 / 4
FLT3	FMS-like tyrosine kinase 3 - FMS szerű tirozin kináz 3
FP	Fluorescence Polarization - Fluoreszcencia polarizáció
GAK	Cyclin G associated kinase – Ciklin G kapcsolt kináz
HEPES	4-(2-Hidroxietil)-1-piperazin-etánszulfonsav
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2 - Humán epidermális növekedési faktor receptor 2
HPLC	High-performance liquid chromatography - Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

IC ₅₀	A maximális gátlás felének eléréséhez szükséges koncentráció
IMAP	Immobilized metal-ion affinity-based fluorescence polarization - Immobilizált fémion alapú fluoreszcencia polarizáció
ITD	Internal tandem duplication – belső tandem duplikáció
KID	Kinase insert domain - Kináz inzert domén
MAPK	Mitogen-activated protein kinases - Mitogén aktivált protein kinázok
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase - Mitogén aktivált protein kináz kináz
MS	Mass spectrometry - Tömegspektrometria
NMR	Nuclear Magnetic Resonance - Mágneses magrezonancia
PAK	P21 protein activated kinase - p21 fehérje aktivált kináz
PAMPA	Parallel artificial membrane permeability assay - Parallel mesterséges membrán permeabilitási módszer
PBS	Foszfát pufferelt fiziológias sóoldat
PDB	Protein Data Bank – Fehérje adatbázis
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor – Vérlemezke eredetű növekedési faktor receptor
P _e	Permeabilitás (10 ⁻⁶ cm/s)
PI	Propidium-jodid
PI3K	Phosphatidylinositide 3 kinase – Foszfatidil inozitol 3 kináz
POCl ₃	Foszforil-klorid
RET	Ret proto-oncogene receptor tyrosine kinase - Ret protoonkogén receptor tirozin kináz
RIOK1	RIO kinase 1 – Rio kináz 1
Src	Proto-oncogene c-Src – Src tirozin kináz
VEGFR2	Vascular endothelial growth factor receptor 2 - Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor 2
VRK	Vékonyréteg kromatográfia
wt	wild type – vad típusú

3. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A daganatos megbetegedés a leggyakoribb halálokok egyike Magyarországon és a világ többi országában is. Az egyre korszerűbb szűrési- és diagnosztikai módszereknek köszönhetően bizonyos tumorok még a betegség kialakulásának korai fázisban felismerhetők, azonban gyakran a korai műtéti eltávolítás illetve kemoterápiás kezelés sem garantálja a hosszú távú teljes tünetmentességet. A kutatások során bebizonyosodott, hogy a rosszindulatú tumorok kialakulását részben a sejten belüli, illetve a sejtek közötti jeltovábbítási folyamatok abnormális működése eredményezi. Amennyiben ezen folyamatokba sikerül oly módon beavatkozni, amellyel megszüntethető a sejtet osztódásra készítő jelsorozat, a sejtosztódás leáll, és a sejt elpusztul apoptózis következtében.

A sejtfelszíni receptorok által közvetített jelek különböző foszforilációs kaszkádok közvetítésével jutnak el a sejtmagba. A mechanizmus kulcsfontosságú enzimejei a kináz fehérjék, és az ismert onkogének egy része általában valamilyen kináz enzimet kódol. A modern gyógyszerkutatás ezért javarészt kinázgátló molekulák fejlesztésére összpontosít, mivel a különböző jelátviteli utak szelektív gátlása sokkal előnyösebb lehet az egyelőre még széles körben használt citotoxikus szereknél, valamint ezek a molekulák általában kedvezőbb mellékhatásprofilal is rendelkeznek.

A kinázokkal és kinázgátlókkal egyetemi hallgatóként, TDK munkám keretében kerültem először kapcsolatba, jelenlegi témavezetőm irányításával. Akkori feladatom potenciális RAF gátló molekulák előállítását volt, melyből a szakdolgozatom is készült „RAF kináz gátló molekulák szintézise” címmel. A B-RAF kináz a mai napig kiemelt téma tudományos műhelyünkben, ezért kutatásaim kezdetén potenciális B-RAF gátló vegyületek kötődésének modellezésével és biológiai hatásprofiljának vizsgálatával foglalkoztam. Doktori munkám nagyobb részét viszont olyan molekulák szintézise képezte, melyek kinázgátló profilja eredetileg nem volt ismert az irodalomban. Az első vegyületek előállítását követően célpontként azonosítottuk az FLT3 kinázt, valamint a vizsgálatok során arra is fény derült, hogy egy szelektív FLT3 inhibitor molekulacsaládot sikerült létrehozni.

Jelen értekezés „a B-RAF- és az FLT3 kinázgátlók fejlesztése” kutatási témákban eddig elért eredményeimet foglalja össze.

3.1 A kinázok

A kinázok az egyik legnagyobb fehérjecsaldót alkotják az emberi genomban. Funkciójukat tekintve olyan fehérjék, melyek specifikus szubsztrátjukra (fehérje, peptid, lipid, szénhidrát) foszfát csoportot visznek fel az ATP γ -foszfát csoportját felhasználva [1]. A protein kinázok által katalizált foszforiláció a szubsztrát fehérjén egy meghatározott aminosavon történik, leggyakrabban szerinen, treoninon vagy tirozinon, ritkább esetben hisztidinen. Ennek megfelelően beszélhetünk szerin/treonin, tirozin és hisztidin protein kinázokról [2, 3]. Jelenleg mintegy 500-550 kináz ismert, ezek működésük során többlépcsős jelátviteli útvonalakon keresztül szabályozzák a sejtek reagálását egy külső jelre, ingerre. Olyan fontos folyamatokat is befolyásolhatnak, mint a sejtosztódás vagy a programozott sejthalál. Több betegség (rosszindulatú daganatok, gyulladásos folyamatok, bakteriális- és vírusos fertőzések) esetén kimutatták, hogy annak hátterében valamely kináz mutáció során bekövetkezett túlműködése vagy funkcióvesztése áll, ezért a gyógyszerkutatók kiemelkedő célpontjai közé tartoznak [4, 5].

Az utóbbi években számos kinázinhibitor (imatinib, sorafenib, gefitinib, erlotinib, lapatinib, vemurafenib, sunitinib) került forgalomba, mint daganatellenes hatású vegyület [6-11], a klinikai- és preklínikai fejlesztés alatt lévő vegyületek száma pedig évről évre jelentős mértékben növekszik. A gyógyszerként alkalmazott és jelenleg fejlesztés alatt álló kinázgátló molekulák a fehérjéhez való kötődésük módja szerint két nagy csoportra oszthatók, beszélhetünk reverzibilisen- és irreverzibilisen kötődő inhibitorokról. A reverzibilis inhibitorokat négy csoportba sorolják: I-es, I 1/2-es, II-es és III-as típusú kinázgátlók, míg az irreverzibilis inhibitoroknak egy csoportja létezik: az enzimhez kovalensen kötődő molekulák [12, 13].

Mivel a fehérjék elsősorban ATP-t használnak sejten belüli energiaforrásként, a legtöbb reverzibilis gátló molekula az enzim ATP kötőhelyén fejt ki hatását a kináz aktív vagy inaktív állapotában. Az aktív konformációban a katalitikus hurkon lévő ún. DFG aminosavhármass (aszparaginsav, fenilalanin, glicin) magnézium ionokon keresztül elektrosztatikus kölcsönhatásba lép az ATP γ -foszfát csoportjával és a fenilalanin aminosav fenil gyűrűjének térállása (DFG-in konformáció) stabilizálja ezt az aktív állapotot [14]. Azokat az inhibitorokat, melyek ehhez a DFG-in aktív állapothoz kötődnek, I-es típusú kinázgátlóknak nevezzük [15].

A I ½-es típusú kinázgátlók szintén a kináz aktív állapotához (DFG-in) kötődnek és a kötődési kinetikájuk szerint gyors kötődési profil jellemzi ezeket a molekulákat. Szerkezetüket tekintve annyiban különböznek az I-es típustól, hogy az alapvázhoz egy további aromás gyűrű (linker) kapcsolódik a megfelelő pozícióban, melyen egy vagy több hidrogénhíd kötés(ek) kialakítására alkalmas donor-akceptor (például: amid, karbamid) funkciós csoport(ok) található. Fontos kiemelni, hogy ez a típusú gátlás csak olyan kinázok esetén fordulhat elő, ahol az ún. *gatekeeper* rész kisméretű aminosavat jelent. A kötőhelyen emiatt elérhetővé válik egy hidrofób zseb (hátsó zseb, „*back pocket*”), mellyel kölcsönhatásba lép az aromás linker, miközben a hidrogénhíd donor-akceptor csoport pedig a DFG motívummal alakít ki kötéseket. Az új kölcsönhatási lehetőségek jelentős javulást hoznak a szelektivitásban, mivel a nagyobb méretű *gatekeeper* aminosavval rendelkező kinázok esetén ez a hátsó zseb nem elérhető, és a nagyobb térkitöltésű molekulák nem tudnak bekötődni a kötőhelyre [16].

A reverzibilisen kötődő kinázgátlók második legnagyobb csoportja (II-es típusú kinázgátlók) olyan molekulákat tartalmaz, melyek megakadályozzák a fehérje aktív állapotba jutását és stabilizálják az inaktív ún. DFG-out konformációt. Ezek a molekulák már nem csak az ATP kötőhellyel lépnek kölcsönhatásba, hanem az inaktív állapotban (DFG-out) elérhető nagy hidrofób zsebbel is, amit allosztérikus- vagy mély zsebnek („*deep pocket*”) is hív a szakirodalom. Ez a hidrofób zseb csak az inaktív konformációs állapotban hozzáférhető, mert a DFG motívum fenilalanin aminosavja térben más helyzetben áll az aktív állapothoz képest (~10 Å eltérés). Kötődési kinetikát tekintve ezek az inhibitorok is ATP kompetitívek, viszont a hidrofób kölcsönhatások az allosztérikus zsebbel jobb szelektivitást, lassú kötődési- és disszociációs profilt eredményeznek [17].

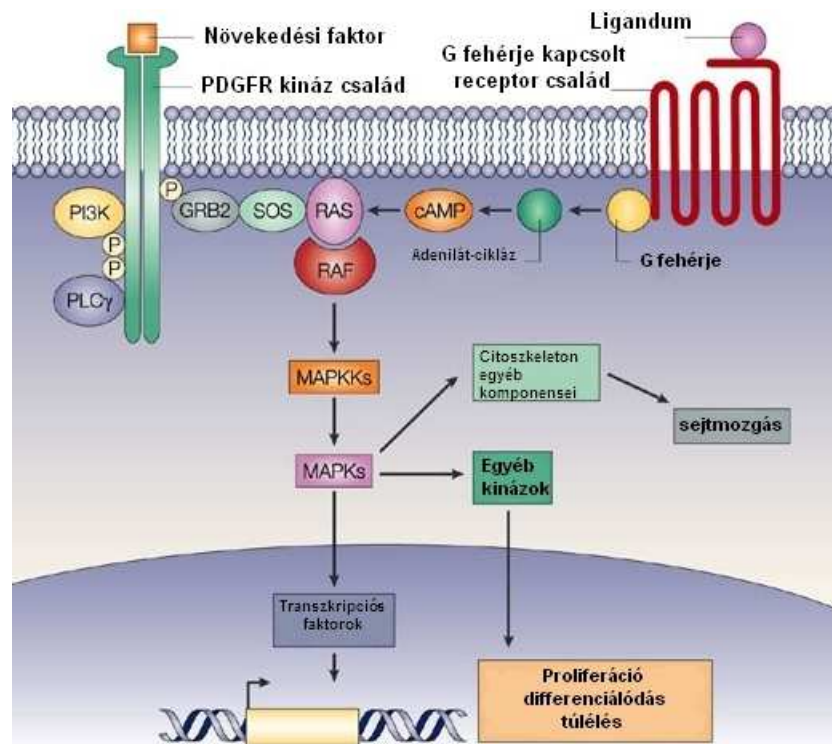
A reverzibilis inhibitorok harmadik csoportjába a nem ATP kompetitív inhibitorok (III-as típusú kinázgátlók) tartoznak, ezek a gátlómolekulák az ATP kötőhelytől függetlenül fejtik ki hatásukat és allosztérikus módon befolyásolják a fehérje működését. Szelektivitás szempontjából ez a legjobb csoport, mert olyan kötőhelyen kötődnek, mely csak az adott kinázra jellemző [18-20].

Az irreverzibilis kinázgátlók csoportját olyan molekulák alkotják, melyek kovalens kötést létesítenek a fehérje ún. aktív régiójával [21-22]. A leggyakoribb, hogy a vegyület tartalmaz egy α , β telítetlen karbonil csoportot és konjugált addíciós reakció

(Michael addíció) játszódik le a kötőhely és a ligandum között. A fehérje részéről a támadó nukleofil csoport általában a ciszteinen lévő szulfhidril csoport [23]. A szakirodalomban eddig EGFR, VEGFR2 és HER2 receptoron ható irreverzibilis kinázgátló molekulákat publikáltak [24-27].

3.2 A B-RAF kináz szerepe a tumorok kialakulásában

Az egyik leginkább vizsgált jelátviteli útvonal a RAS/RAF/MEK/ERK kaskád, mely a sejtmembránon lévő receptoroktól továbbít információkat a sejtmag irányába (1. ábra), ezáltal szabályozva a sejtproliferációt, differenciálódást és a sejtek túlélését [28]. A kaskád tagja a B-RAF kináz is, mely a szerin/treonin protein kinázok családjába tartozik [29].



1. ábra A RAS/RAF jelátviteli útvonal [30].

A B-RAF kináz mutáció során bekövetkező kóros aktiválódása több daganat kialakulásának a hátterében is állhat, de különösen gyakori melanómák, vastagbél- és pajzsmirigy tumorok esetén [31]. A kinázt illetve a jelátviteli útvonalat aktiválhatják más kórosan aktív kinázok, mint például az FLT3, PDGFR, EGFR és a HER2 receptor

is [32, 33]. A B-RAF leginkább előforduló mutációja az ún. V600E (korábban V599E-nek is publikált) pontmutáció, mely az elsődleges szerkezetben bekövetkező glutaminsav – valin cserét jelenti a 600-as pozícióban [34]. Mivel a V600E mutáció előfordulása melanómák esetén közel 60%-os, a B-RAF(V600E) gátló vegyületek fejlesztése nagy jelentőséggel bír a melanómák kezelése szempontjából [35].

3.2.1 Szakirodalomban publikált B-RAF gátló vegyületek és csoportosításuk kötődési módjuk szerint

A gyors kötődési kinetikával rendelkező B-RAF gátló vegyületeket két nagyobb csoportra oszthatjuk. Beszélhetünk az ATP kötőhely adenin kötő részével kölcsönható származékokról (**I-V**) [36-40], illetve a DFG motívummal hidrogénhid kötéseket kialakító szulfonamid funkciós csoportot tartalmazó molekulákról (**VI, VII, VIII, IX**) [41-45].

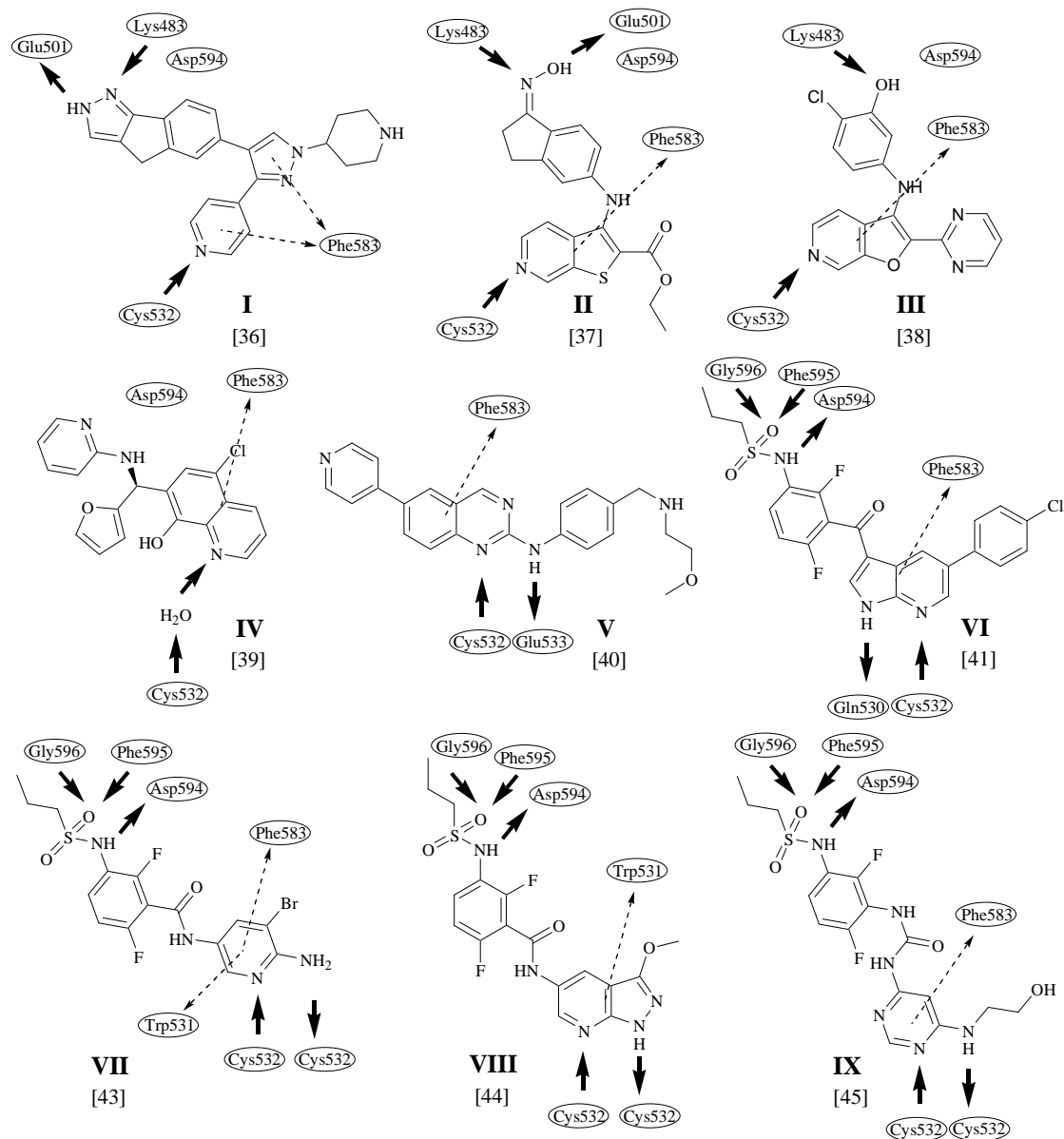
Bár ezek a molekulák különböző alapvázakat és különböző szubsztituenseket tartalmaznak, közös jellemzőjük, hogy az alapvázuk egy 2,8-3,22 Å hosszúságú hidrogénhid kötést létesít a fehérje ún. *hinge (forgópánt)* régiójával. A hidrogénhid kialakulhat közvetlenül a molekula és a fehérje között, illetve egy vízmolekula közvetítésével (2. ábra, **IV**) is. A kötőhelybe való illeszkedést tovább stabilizálja a Phe583 valamint a Trp531 aminosavakkal kialakuló π - π kölcsönhatás (2. ábra). Ha a molekulák hidrofób kölcsönhatásait nézzük, szintén sok közös pont található, melyek az alábbiak: Ala481, Ile527, Thr529, Trp531, Phe583 and Ile463.

A fő különbség az, hogy a vegyületek egyik csoportja az N terminálison elhelyezkedő Lys483, illetve az α C-hélixen megtalálható Glu501 aminosavakkal létesít kötést, míg a szulfonamid csoportot tartalmazó vegyületek az aktivációs hurkon található DFG motívum aminosavjaival lépnek kölcsönhatásba [36-45].

A vemurafenib (**VI**), valamint a **VII**-es, **VIII**-as és **IX**-es számmal jelzett vegyületek (2. ábra) azon kívül, hogy kölcsönhatásba lépnek a DFG motívummal valamint a hátsó zsebbel, a propil csoportok révén további hidrofób kölcsönhatásban vesznek részt a kötőhely hátsó részével, mely az α C-hélix pár Angströmös eltolódásának köszönhetően érhető el [41-45].

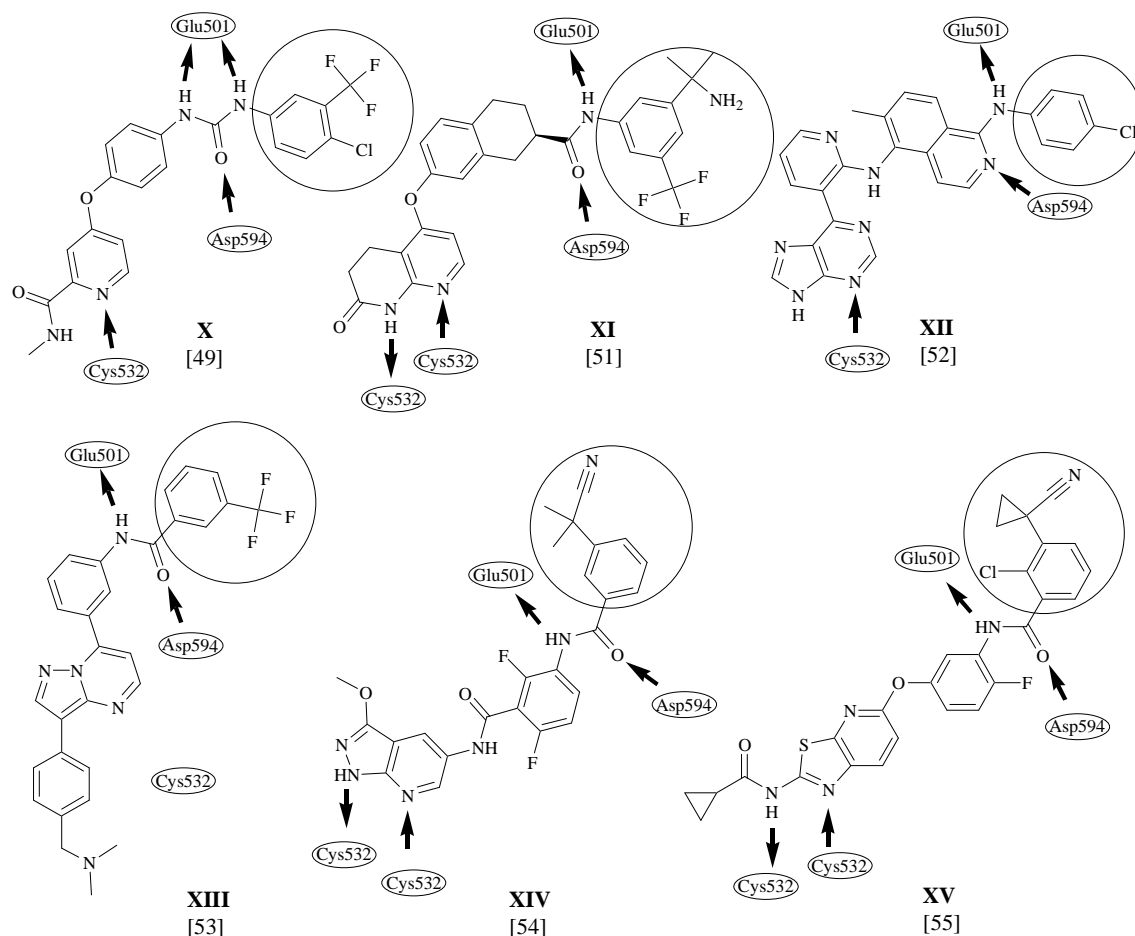
A B-RAF esetén az ún. gatekeeper motívum egy treonin (Thr529) aminosavat jelent, mely kisméretű aminosavnak számít [46]. A hátsó hidrofób zseb elérhető, tehát

kialakulhatnak a I ½-es típusra jellemző kölcsönhatások és a szulfonamid csoportot tartalmazó molekulák ezért a I ½-es inhibitorok közé sorolhatók [47].



2. ábra I-es és I ½-es típusú B-RAF inhibitorok főbb kötődési pontjai. A vastag fekete nyilak a receptor és ligandum között kialakuló hidrogénhíd kötések, a szaggatott nyilak a π - π kölcsönhatásokat jelölik.

Szerkezetüket tekintve a II-es típusú B-RAF inhibitorok (3. ábra) egy korábban meghatározott farmakofór alapján épülnek fel: alapváz, linker, hidrogénhíd akceptor, hidrogénhíd donor és egy nagyobb térkitöltésű hidrofób csoport [48].



3. ábra II-es típusú B-RAF inhibitorok fő kölcsönhatás pontjai a fehérjével. A hidrogénhíd kötések vastag fekete nyíl jelöli, míg a bekarikázott motívumok az allosztérikus zsebbel kölcsönható csoportokat.

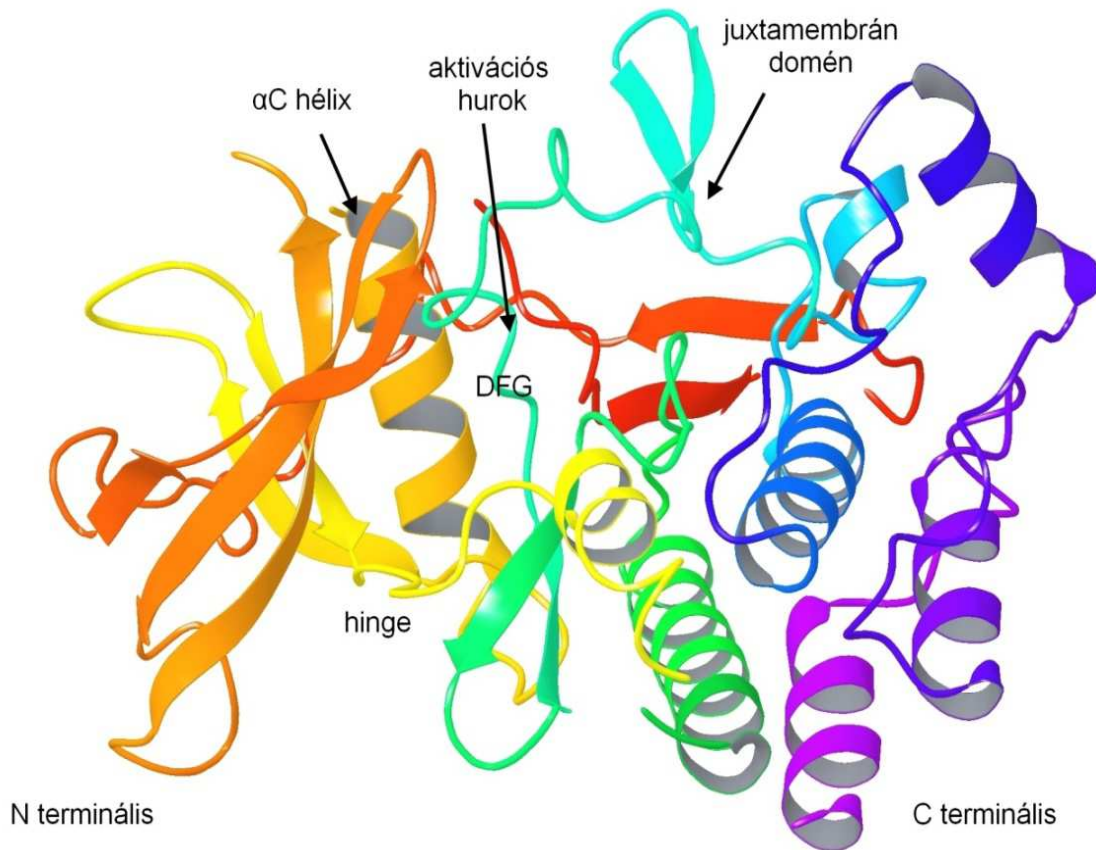
Az alapvázat gyakran *hinge*-hez kötődő motívumnak is nevezik, mivel a hidrogénhíd kölcsönhatás a B-RAF-on az esetek döntő többségében (sorafenib (**X**), **XI**-es, **XII**-es, **XIV**-es és **XV**-ös vegyület) kialakul (3. ábra) annak ellenére, hogy ez nem esszenciális kritérium a II-es típusú gátlók esetén (**XIII**-as vegyület) [49-55].

A DFG motívummal és az α C hélixen megtalálható Glu501 aminosavval létrejövő 2-3Å hosszú hidrogénhíd kötések viszont az összes molekula esetén megfigyelhetők (3. ábra), ahogy az allosztérikus zsebbel (“deep pocket”) kialakuló hidrofób kölcsönhatások is [49-55].

Az allosztérikus zsebbel és a DFG motívummal létrejövő kölcsönhatásokért felelős funkciós csoportok beépítése alapvető feltétel nemcsak B-RAF inhibitorok esetén, hanem más enzimeken ható molekuláknál is [56-59].

3.3 Az FLT3 kináz funkciója és leukémiákban betöltött szerepe

Az FLT3 egy tirozin kináz, mely a receptor kinázok harmadik alcsaládjába tartozik és szerkezetét tekintve a c-Kit, a CSFR (más néven: FMS) valamint PDGF receptor kinázokhoz áll közel [60]. A fehérje három fő szerkezeti elemre osztható, beszélhetünk extracelluláris, transzmembrán és intracelluláris részéről. Az extracelluláris részt öt immunglobulin szerű (ún. „Ig-like”) domén építi fel, ezt követi a rövid transzmembrán rész. Intracellulárisan található a juxtamembrán (JM) domén és a két tirozin kináz domén (TKD), melyet az ún. kináz inzert domén (KID) választ el egymástól [61, 62]. Az FLT3 ATP kötőhelye az N- és C terminális között található (4. ábra), melyet a kötőhelyre jellemző szerkezeti elemek határolnak (hinge régió, aktivációs hurok, DFG motívum és az α C-hélix) [63].

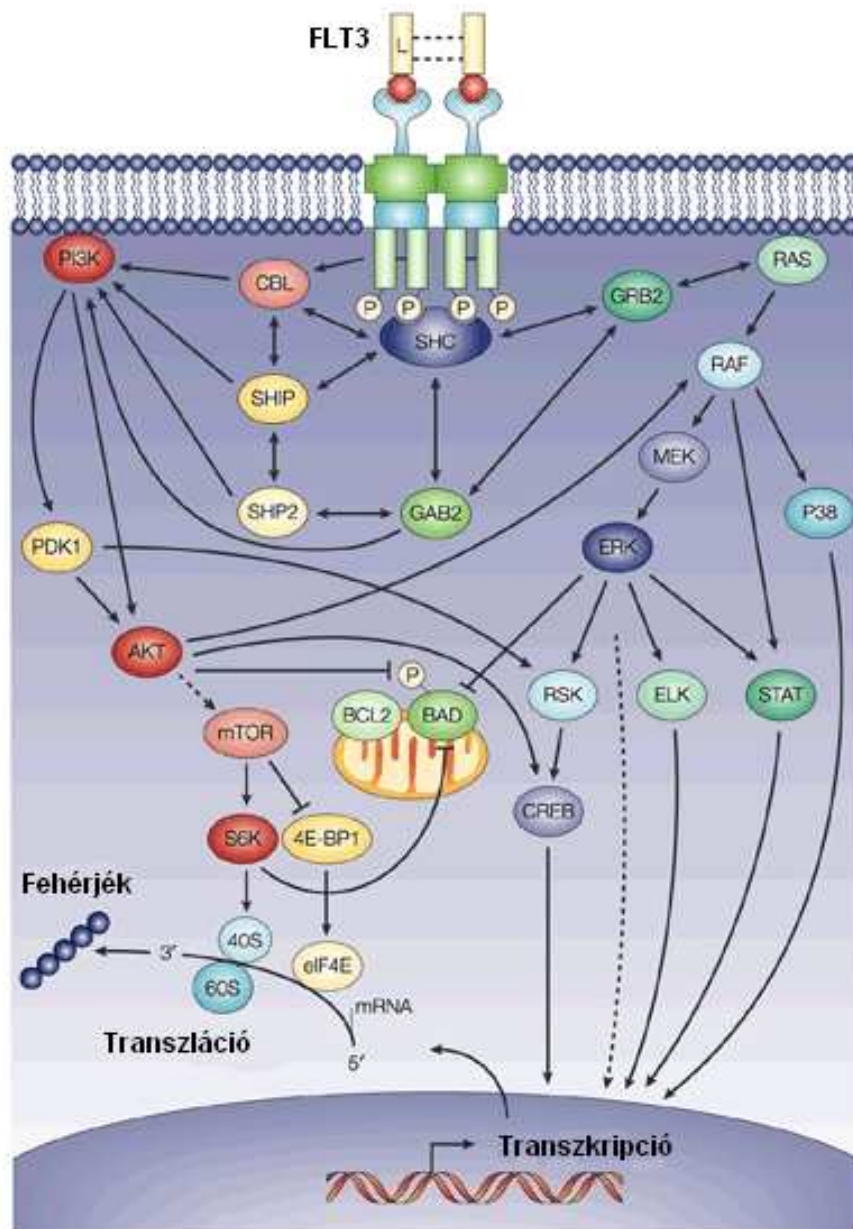


4. ábra Az FLT3 kináz 3D szerkezete (PDB ID: 1RJB).

Az emberi szervezetben az éretlen vörsejtek expresszálják legnagyobb mértékben az FLT3 kinázt és az enzim rendeltetésszerű működése fontos az őssejtek és az

immunrendszer homeosztázisának fenntartásához [64-66]. Kisebb mértékben ugyan expresszálják a placenta és az ivarmirigyek sejtei, valamint az idegsejtek az agyban, azonban az FLT3 pontos szerepe ezen sejtek esetén még nem tisztázott [67].

A fehérje alapállapotban monomer formában van jelen a sejtmembránon, aktivációját az FLT3 ligandum (FL, FLT3L) váltja ki normál fiziológiás körülmények között. Az FLT3L egy citokin, mely az immunválasz kialakulásában játszik fontos szerepet. Bekötődésével konformációváltozást indukál, az FLT3 kináz dimerizálódik és ez az intracelluláris rész foszforilációjához vezet [68].



5. ábra Az FLT3 receptor által aktivált jelátviteli útvonalak [69].

Az aktiválódott FLT3 kináz több jelátviteli útvonalon keresztül képes a sejtmag irányába eljuttatni az információt (5. ábra). A két legfontosabb ilyen útvonal a PI3K/Akt és a MAPK (RAS, RAF, MEK, ERK), melyeken keresztül szabályozható a transzkripció, a transláció, a differenciálódás és az apoptózis [69].

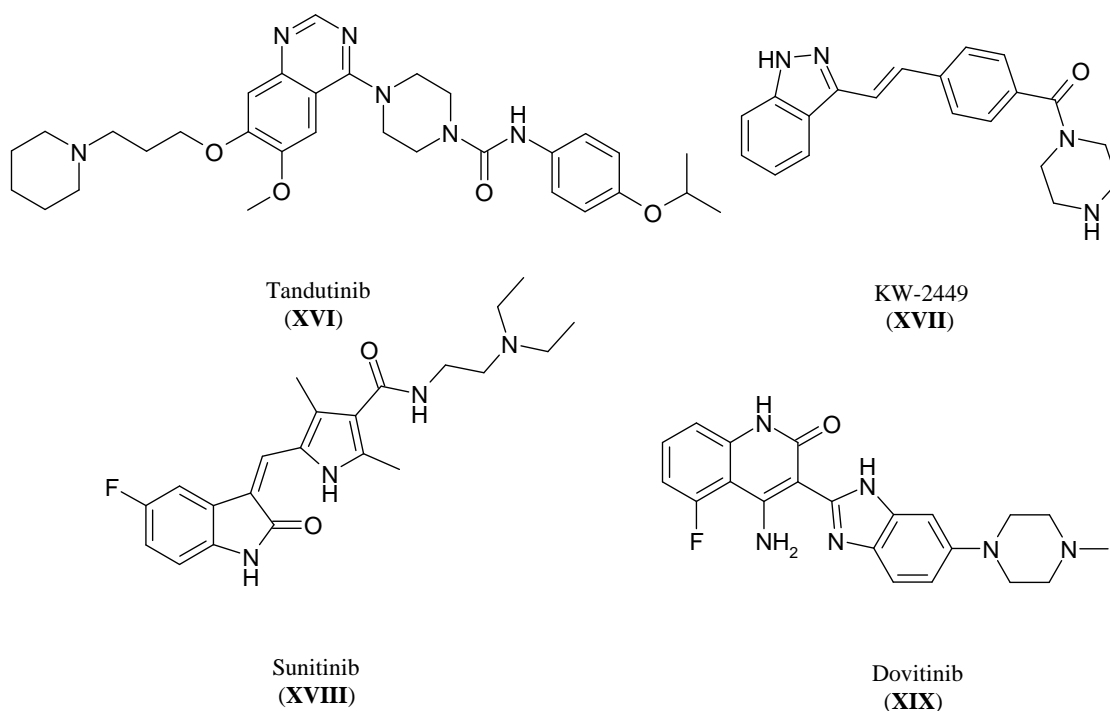
Kórtani szerepét tekintve, az FLT3 kináz fokozott expressziója figyelhető meg a vérképző rendszer rosszindulatú daganataiban. Különösen gyakori (~70-100%) akut mieloid leukémiában (AML), de krónikus mieloid (CML)- és akut limfoblasztos leukémia (ALL) esetén is igazolást nyert a fokozott expresszió [70, 71]. A daganatos megbetegedések hátterében azonban nem csak a fehérje vad típusának (FLT3 wild type) megnövekedett expressziója vagy az FLT3L ligandum fokozott termelése állhat, hanem a mutáció hatására bekövetkező kóros kináz aktivitás is [72, 73]. A kináz mutációi közül a legjelentősebb és leggyakoribb (~23 % AML esetén) az ún. belső tandem duplikáció (ITD: internal tandem duplication), mely a fehérje juxtamembrán doménjét kódoló exonon jön létre [74]. Az ITD hossza betegenként változó lehet, általában 3 és 400 bázispár között mozog [75]. Az FLT3 juxtamembrán doménje felelős a kináz ún. öngátló (autoinhibíció) funkciójáért, a bekövetkező ITD mutáció pedig kiüti ezt a gátló mechanizmust és ez a fehérje szabályozatlan működéséhez vezet [63, 76].

A másik gyakori (~7 % AML- és 3% ALL esetén) FLT3 aktiváló mutáció a kináz doménen bekövetkező D835 pontmutáció [77, 78]. Az elsődleges szerkezetben, a 835-ös pozícióban eredetileg egy aszparaginsav található, melynek szubsztitúciója tirozinra a leggyakoribb, de valinra, hisztidinre, glutaminra és aszparaginra is cserélődhet [79]. A 835-ös aszparaginsav az aktivációs hurok része, mely pár aminosavra található a kináz DFG motívumától. Az inaktív aktivációs hurok akadályozza meg az ATP és a szubsztrát bekötődését, ezáltal az enzim aktiválódását. Az FLT3L bekötődése esetén bekövetkezik az autofoszforyláció, az aktivációs hurok aktív állapotba kerül és megszűnik a gátló hatása. Mutáció esetén ez a hatás szintén megszűnik, ezért a kináz folyamatosan aktív állapotban marad [80].

Mivel az FLT3 kiemelkedő szerepet játszhat leukémiák (AML, CML, ALL) kialakulásában, ezért validált célpontnak tekinthető és gátlása fontos kezelési mód lehet különösen AML esetén. Rezisztencia és túlélés szempontjából az ITD mutációnak a legrosszabb a prognózisa, ezért nagy igény mutatkozik szelektív FLT3(ITD) gátló molekulákra [81].

3.3.1 Szakirodalomban publikált FLT3 gátló vegyületek

Az ismert FLT3 gátló vegyületek nagy része multikináz inhibitor és nem kizárólag az FLT3 ellen fejlesztették ki. Gátló hatásukra a későbbi karakterizálás és szelektivitás meghatározása során derült csak fény. Bár a klinikai vizsgálatok alapján AML esetén igazolást nyert hatékonyságuk, sokszor kedvezőtlen mellékhatás profiljuk és a jelentkező toxicitás miatt további vizsgálatokra és fejlesztésre van szükség [82].



6. ábra Szakirodalomban leírt FLT3 inhibitorok szerkezete.

A kinazolin alapvázval rendelkező tandutinib (XVI) (6. ábra) hatékony inhibitora az FLT3-nak ($IC_{50} = 220$ nM), viszont a receptor kinázok harmadik alcsoportjába tartozó enzimeket (PDGFR β , FGFR, VEGFR, c-Kit) is jelentős mértékben ($IC_{50} = 170 - 200$ nM) gátolja [83]. A klinikai (fázis I) vizsgálatok során 40 AML-el vagy mielodiszplázias szindrómával diagnosztizált beteget vizsgáltak, és orális adagolás mellett a maximálisan tolerálható napi dózist 525 mg-nak állapították meg. Ezen értéknél vagy felette már jelentős izomgyengeség, kimerültség jelentkezett a betegeknél. Bár a vegyület farmakokinetikai tulajdonságai nem megfelelőek és kizárólag az FLT3(ITD) mutációval rendelkező betegek esetén volt némileg hatékony, az

alkalmazott kemoterápiás szerek mellett jelenleg kombinációs terápiában tesztelik a pontosabb hatás feltérképezése céljából [84, 85].

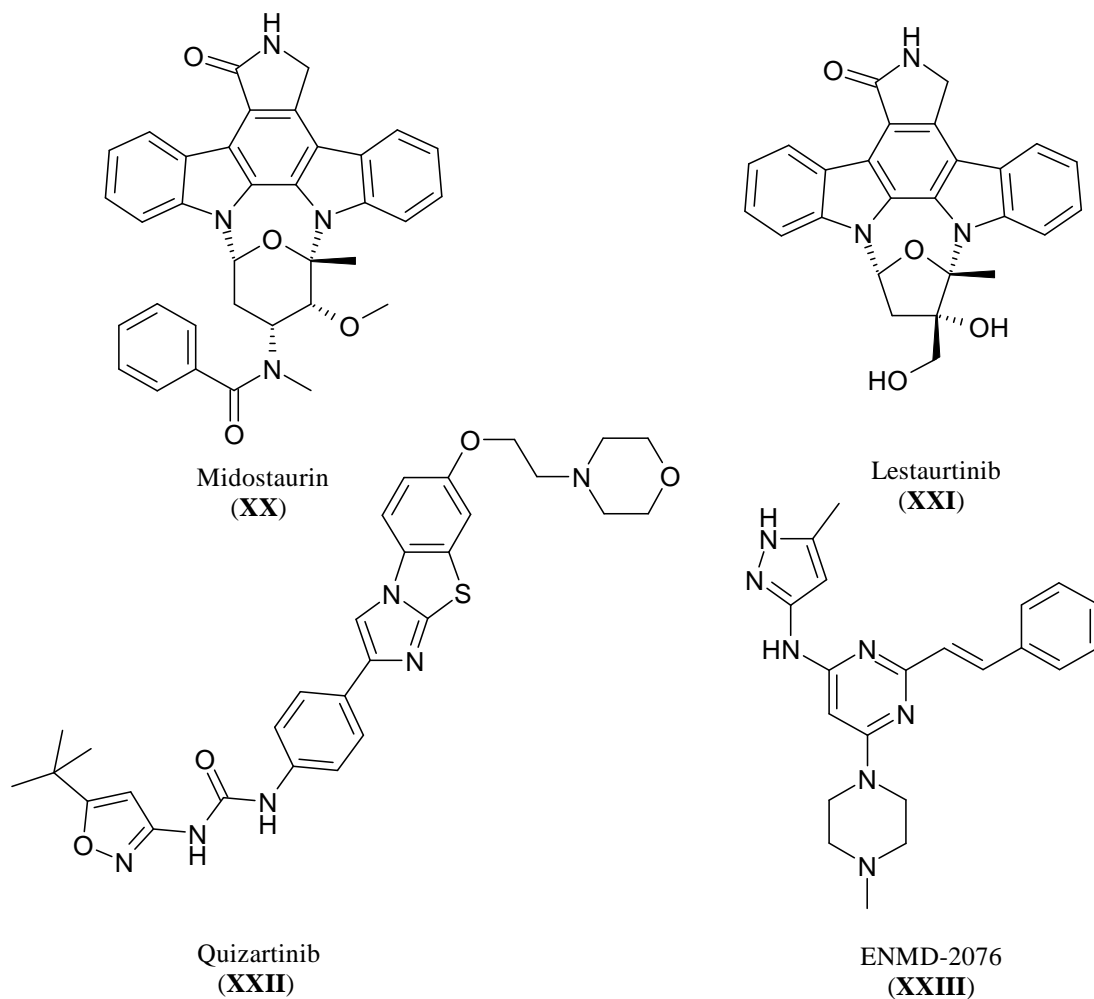
A KW-2449 (**XVII**) jelű vegyületet (6. ábra) eredetileg FLT3 gátlónak fejlesztették ($IC_{50}= 6,6$ nM), viszont ez is egy több célponton (Abl $IC_{50}= 14$ nM, Aurora $IC_{50}= 48$ nM, c-Kit $IC_{50}= 300$ nM) ható kinázinhibitor [86]. A fázis I vizsgálatok során 37 betegből mindössze 8-nál mutatott jelentős hatást, mint utóbb kiderült, a 8 betegből 5-nél diagnosztizáltak az FLT3(ITD) mutációt. A kísérletekből az is kiderült, hogy a molekulával fiziológias körülmények között csak kismértékben sikerült gátolni az FLT3-at, tehát valamilyen farmakokinetikai oka lehet, hogy az ígéretes enzimgátlás ellenére nem bizonyult elég hatékonynak a vegyület [87].

Az oxindol alapvázú sunitinib (**XVIII**) (6. ábra) ma már egy forgalomban lévő gyógyszer, melyet áttétes vesedaganatok esetén, valamint gasztrointesztinális- és neuroendokrin tumorok kezelésére használnak [88]. A sunitinib szintén egy multikináz inhibitor, és az újabb vizsgálatok szerint nagyjából 150 kinázt gátol [89]. Az FLT3 kinázt nanomólos tartományban gátolja (wt FLT3 $IC_{50}= 250$ nM, FLT3(ITD) $IC_{50}=50$ nM, FLT3(D835) $IC_{50}= 30$ nM), és a fázis I vizsgálatok során is ígéretes eredményeket produkált, mert 200 mg napi dózis felett több mint 50%-os FLT3 gátlást mértek *in vivo* [90, 91].

A dovitinib (**XIX**) nevű vegyületet (6. ábra) myeloma multiplex ellen fejlesztették, és a szelektivitás vizsgálatok során megállapították, hogy többcélponton ható kinázgátló, mely jelentős mértékben ($IC_{50}< 100$ nM) gátolja a receptor tirozin kinázok harmadik alcsaládjába tartozó enzimeket. Az FLT3 kinázon 1 nM-os IC_{50} értéket mértek és a vegyület rendkívül hatékony volt FLT3-at expresszáló MV4-11 sejtvonalon ($IC_{50}= 13$ nM), valamint xenograft modellben is [92, 93].

A midostaurin (**XX**) és a lestaurtinib (**XXI**) (7. ábra) szintén egy nem szelektív FLT3(ITD) és FLT3(D835) gátló molekula, mindkettő szintetikus staurosporin analóg és széles spektrumát gátolják a kinázoknak [94, 95]. A midostaurin a preklinikai vizsgálatok során 30 nM-os IC_{50} értékkel gátolta az FLT3(ITD) foszforilációját és nagymértékű apoptózist váltott ki FLT3 mutáns sejtvonalon [96]. A vegyület klinikai (fázis II) vizsgálatokban is jól teljesített: 20 résztvevő betegből 14 esetén a perifériás blasztsejtek 50%-os csökkenését mutatták ki, viszonylag kedvező mellékhatásprofil regisztrálása mellett [97]. A lestaurtinib a midostaurinhoz képest hatékonyabb FLT3

kinázon (IC_{50} = 2-3 nM), az AML sejtvonalak esetén nagyobb mértékű citotoxicitás (IC_{50} = 2-3 nM) is jellemzi, valamint a vad típus- és az ITD mutációt tartalmazó sejtvonalakon is jelentős hatást mutatott [98]. A klinikai vizsgálatok során 14 betegen monoterápiás szerként tesztelték. Öt betegnél több mint 50%-al csökkent a perifériás blasztsejtek száma és egy beteg esetén a csontvelőben található blasztsejtek száma is 5% alá esett. A betegek jól tolerálták a vegyületet, mellékhatásként enyhe gyengeség, hányinger és hányás jelentkezett [99].



7. ábra Szakirodalomban leírt FLT3 inhibitorok szerkezete.

A quizartinib (**XXII**) a második olyan FLT3 inhibitor (7. ábra), melyet eredetileg FLT3 ellen fejlesztettek és teszteltek, akárcsak a KW-2449-et (6. ábra). Jobb szelektivitás profillal rendelkezik, mint a többi publikált gátlómolekula. Az FLT3(ITD) fehérjét 1,1 nM-os IC_{50} értékkel, a vad típusú fehérjét pedig 4,2 nM-os IC_{50} értékkel gátolja, míg az FLT3-al rokon receptor kinázokon (c-Kit, PDGFR β , RET) egy

nagyságrenddel rosszabb a hatása, az FLT1, FLT4, VEGFR kinázokon pedig már két nagyságrend a különbség [100]. A klinikai vizsgálatok során 76 betegből 23 (30%) jól reagált a kezelésre, ebből 10 (13%) esetén teljes és 13 (17%) esetén részleges volt a remisszó. Az FLT3(ITD) pozitív betegeknél volt hatékonyabb a vegyület, 17 páciensből 9 (53%) pozitívan reagált a kezelésre, míg a mutációt nem tartalmazó betegek esetén 37-ből mindössze 5 (14%). A klinikai vizsgálatok tehát jól korreláltak a biokémiai tesztekkel, és a gyógyszerjelölt molekula különösen FLT3(ITD) pozitív betegek esetén alkalmazható. A maximum tolerálható dózist napi 200 mg-ban állapították meg és a megfigyelt mellékhatások tekintetében is ígéretes molekulának számít [101]. A további klinikai vizsgálatok jelenleg is folyamatban vannak.

A sztiril-pirimidin alapvázú ENMD-2076 (**XXIII**) jelű vegyületet (7. ábra) Aurora A gátlóként ($IC_{50} = 14$ nM) publikálták. A szelektivitás vizsgálatok során azonban jóval több célpontot is azonosítottak. Lényegében azonos hatásfokkal ($IC_{50} = 10-60$ nM) gátol egyéb kinázokat (RET, Src, VEGFR2, PDGFR α , FMS) ráadásul egy nagyságrenddel jobban gárolja az FLT3-at ($IC_{50} = 1,86$ nM), mint az Aurora A-t [102].

4. CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám során olyan tumorelles hatású kinázgátló molekulák előállítását és vizsgálatát tűztem ki célul, melyek hatékonyan gátolják a tumoros sejtvonalak növekedését és képesek programozott sejthalált indukálva elpusztítani a daganatsejteket. A Vichem Chemie Kutató Kft. és a Semmelweis Egyetem Kooperációs Kutató Központ munkájába bekapcsolódva a munkám egyik fő célkitűzése B-RAF gátló vegyületek azonosítása volt, mivel a B-RAF inhibitorok fejlesztése a mai napig kiemelt területet képvisel a gyógyszerkutatásban. Célom volt:

1. A szakirodalomban publikált B-RAF gátló molekulák kötődésének vizsgálata, majd az adatokat felhasználva a kutatócsoport által előállított vegyületek kötődési módjának meghatározása molekulamodellézés segítségével.
2. Az *in silico* eredmények validálása *in vitro* biokémiai módszerek felhasználásával.
3. A molekulák hatásának vizsgálata B-RAF kinázt expresszáló sejtvonalakon.
4. A vegyületek kötődési kinetikájának a vizsgálata.

Másik fő célom szabadalmaztatható kinázgátló molekulák előállítása és szerkezet-hatás összefüggések vizsgálata volt. A CP-31398 azonosítószámú sztiril-kinazolin analógot 1999-ben publikálták, mint p53 fehérjére ható (aktiváló és expressziót fokozó) kémiai ágenst [103]. A CP-31398 kinázgátló hatását nem vizsgálták, noha több ismert inhibitor is (gefitinib, erlotinib, tandutinib, vandetanib) vele azonos kinazolin alapvázal rendelkezik. Ezért feladatomb volt:

1. A CP-31398 vegyület előállítása és egy sztiril-kinazolin vegyülettár létrehozása.
2. A vegyületek kinázgátló profiljának meghatározása.
3. Szerkezet-hatás összefüggések vizsgálata *in vitro* biokémiai tesztrendszer segítségével.
4. A molekulák hatásának vizsgálata tumor sejtvonalakon.
5. A vegyületek penetrációs tulajdonságának meghatározása PAMPA módszer felhasználásával

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A szintézisekhez szükséges kiindulási vegyületeket és a felhasznált oldószereket a Sigma-Aldrich Kft, a Merck Kft, a Molar Chemicals Kft, az Alfa Aesar GmbH&Co és az Apollo Scientific Ltd cégektől szereztük be. A szintézisek során további tisztítás nélkül használtuk fel őket.

Az előállított vegyületeket az IUPAC szabályok szerint neveztük el az ACD/Name® V9.06 (Advanced Chemistry Development Inc.) program segítségével, a magyar kémiai helyesírás szabályainak megfelelően.

A reakciókat vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel (VRK) követtük, melyhez 0,2 mm rétegvastagságú Merck VRK lapot (Silicagel 60 F₂₅₄) használtunk.

A vegyületek tisztítását oszlopkromatográfia (Töltet: Silicagel 60, 0,063 - 0,2 mm szemcseméret) alkalmazásával, illetve 1 mm-es rétegvastagságú (Silicagel 60 F₂₅₄) Merck preparatív rétegen végeztük. Az olvadáspontokat BÜCHI B-540 típusú készüléken mértük.

Műszeres analitikai módszerek:

A kromatogramok és tömegspektrumok egy Waters Alliance 2795 típusú HPLC és Waters 996 diódasoros UV detektorral összekapcsolt Waters Acquity SQD (ESI) LCMS rendszeren készültek. A megadott retenciós idők fordított fázisú XBridge RP C18 5 cm x 4,6 mm, 5 µm típusú kolonnára vonatkoznak. Kolonnahőmérséklet: 23 °C.

A mintákból injektált mennyiség: 5 µl (1 mg/ml töménységű DMSO/acetonitril oldat). Felhasznált eluensek: (A): MilliQ víz/ 0,1 % hangyasav; (B): acetonitril. A futtatás ideje 7 perc volt gradiens elúció mellett. Alkalmazott gradiens: 0 perc 5% B, 0,5 perc 5% B, 5,5 perc 95% B, 6 perc 95% B, 6,5 perc 5% B, 7 perc 5% B. Áramlási sebesség: 2 ml/perc.

A H¹-NMR analízist Bruker AC-300 (300 MHz) típusú készülékkel végeztük, 25 °C-on. Oldószernek DMSO-d₆-ot használtunk.

A dolgozat terjedelmére vonatkozó előírások miatt a részletes analitika bemutatására csak korlátozott mértékben volt lehetőségem, ezért az Eredmények fejezetben az NMR spektrumok asszignációja csak felsorolás szintű.

A biológiai mérésekre leadott vegyületek HPLC-MS illetve NMR vizsgálatokon mért tisztasága 90 % és 100 % között volt.

5.1 Potenciális B-RAF gátló vegyületek vizsgálata

A Vichem Chemie Kutató Kft. és a Max Planck intézet együtt fejlesztett ki AXL kinázon ható vegyületeket, és a közös munka eredményeként 450 darab szulfonamid származékot szabadalmaztattak [104, 105]. Tekintve, hogy a szulfonamid rész a B-RAF gátló vegyületek nagy részénél előfordul, irodalmi analógia alapján 12 vegyületet kiválasztva, többféle módszerrel megvizsgáltam illetve modelleztem ezen vegyületek B-RAF gátló hatását.

5.1.1 Molekulamodellőzés és dokkolás

Az *in silico* kísérletekhez a Schrödinger Suite programcsomag 2009-es és 2010-es verzióját használtuk [106]. A kötődés modellezését egy korábban meghatározott B-RAF – inhibitor fehérjeszerkezeten (PDB azonosító: 4E4X) végeztük, melyet a Protein Data Bank adatbázisból töltöttünk le. A Protein Preparation Wizard modullal előkészítettük a fehérjét a dokkoláshoz; feltöltöttük a szerkezetet a hiányzó hidrogénnel, a kristályszerkezetben lévő vízmolekulákat eltávolítottuk és optimalizáltuk a szerkezetet az ImPref modul felhasználásával. A vizsgált vegyületek 3D szerkezetét a LigPrep modullal határoztuk meg úgy, hogy a protonáltsági állapotot $\text{pH} = 7,0 \pm 2,0$ közöttire állítottuk.

A dokkolás előtt modelleztük a kötőhelyet a Glide modul ún. Receptor Grid Generation funkciója segítségével. Középpontnak a fehérjeszerkezetben lévő molekulát állítottuk be és kijelöltünk két farmakofór pontot is feltétel gyanánt. Mindkét pont a kináz ATP kötőhelyéhez kapcsolódik. Az egyik az N terminális részen található hinge régió 532-es számú cisztein aminosavja, a másik a katalitikus hurkon lévő DFG motívum 596-os számú glicinje. A szoftvert úgy állítottuk be, hogy csak azokat a konformereket írja ki eredményként, melyeknél a megjelölt pontok közül legalább az egyikkel hidrogénhid kölcshatást modellez a program.

Az összes modul esetén a Schrödinger által írt OPLS_2005 erőteret használtuk.

5.1.2 A vegyületek B-RAF gátló hatásának meghatározása *in vitro* biokémiai módszer segítségével

A vad típusú B-RAF és B-RAF(V600E) mutáns fehérje (ProQinase) enzim aktivitás vizsgálatát 384 lyukú mikrolemezen (Corning 3676) 10 μ l térfogatban végeztük el. A vegyületeket 12 különböző hígításban adtuk hozzá az egyes csövekhez. A méréshez felhasznált puffer az alábbi összetevőkből állt: 50 mM pH 7,5 HEPES, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂ and 0,01 V/V% Brij35. A fehérjék végkoncentrációja 6 nM volt vad típusú B-RAF és 10 nM mutáns B-RAF(V600E) esetén. Szubsztrátként MEK1(K97M)-et használtunk 0,01 μ g/ μ l (vad típus) és 0,02 μ g/ μ l (V600E mutáns) koncentrációban. Az ATP végkoncentrációja megegyezett a látszólagos K_{mATP} értékével: vad típus esetén ez 2,1 μ M, V600E mutáns esetén 3,6 μ M volt.

Az enzimreakciót 60 percig inkubáltuk, majd 10 μ l ADP detektáló oldatot adtunk hozzá az alábbi összetételek szerint:

Vad típusú B-RAF: detektáló puffer (20 mM pH 7,5 HEPES, 40 mM EDTA, 0,02 V/V% Brij35) + 12 μ g/ml ADP2 Ab + 3 nM ADP Alexa633 Tracer.

Mutáns B-RAF(V600E): detektáló puffer + 18 μ g/ml ADP2 Ab + 3 nM ADP Alexa633 Tracer.

Analyst GT készüléken mértük a fluoreszcencia polarizációt. Két párhuzamos mérést végeztünk.

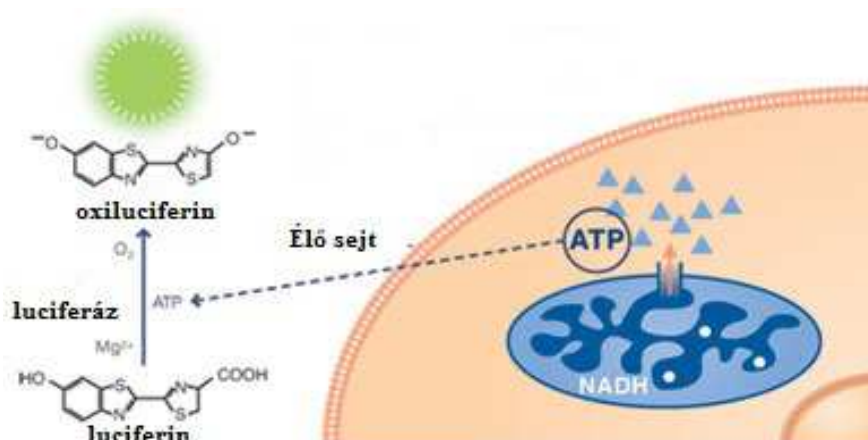
5.1.3 Felhasznált sejtvonalak és módszerek

A B-RAF (V600E) mutáns HT29 vastagbélrák sejtvonalat az American Type Culture Collection (Manassas, VA) intézettől vásároltuk, míg a melanóma sejtvonalakhoz való hozzáférést (UACC257, A375p) Axel Ullrich Professzor (Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried, Németország) kutatócsoportja biztosította. A vad típusú B-RAF-ot expresszáló melanóma sejtvonalakat (MeWo, M24met), Hegedűs Balázs (Semmelweis Egyetem, Budapest) és B.M. Müller (Scripps Research Institute, La Jolla, CA) kutatócsoportjától szereztük be. Az A375p sejteket DMEM (Gibco) médiumban tenyésztettük, a többi sejtvonal esetén pedig RPMI 1640 médiumot (Gibco) használtunk 10%-os magzati borjú szérum (Gibco) és mikoplazma ellenes antibiotikum (Gibco)

jelenlétében. A sejtvonalakat 37 °C-on inkubáltuk 5% szén-dioxidot tartalmazó atmoszférában.

5.1.4 Sejtvonalakon történő IC₅₀ meghatározás

A sejttenyészetekből sejtszuspenziót készítettünk, és csövenként ezer sejtet pipettáztunk a 384-es mikrolemezekre. Másnap kezeltük őket a vizsgálandó anyagokból készült tízpontos hígítási sorral (1,5 nM – 30 µM). 72 órás inkubációt követően a relatív sejtdenzitást az ún. „CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay” (Promega, Madison, WI) segítségével mértük. A lumineszcencia mértékét Analyst GT (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) készülékkel olvastuk le. A módszer lényege, hogy a reagensek segítségével meghatározható a metabolikusan aktív sejtek száma az általuk termelt ATP kimutatásával. Az ATP katalizálja a luciferin átalakulását oxiluciferinné, ami a lumineszcens jelet adja (8. ábra) [107]. A különböző koncentrációknál mért viabilitás értékekre görbét illesztettünk, majd meghatároztuk az 50 %-os gátláshoz tartozó koncentráció értékeket. Két párhuzamos mérést végeztünk.



8. ábra A CellTiter-Glo módszer működési elve [107].

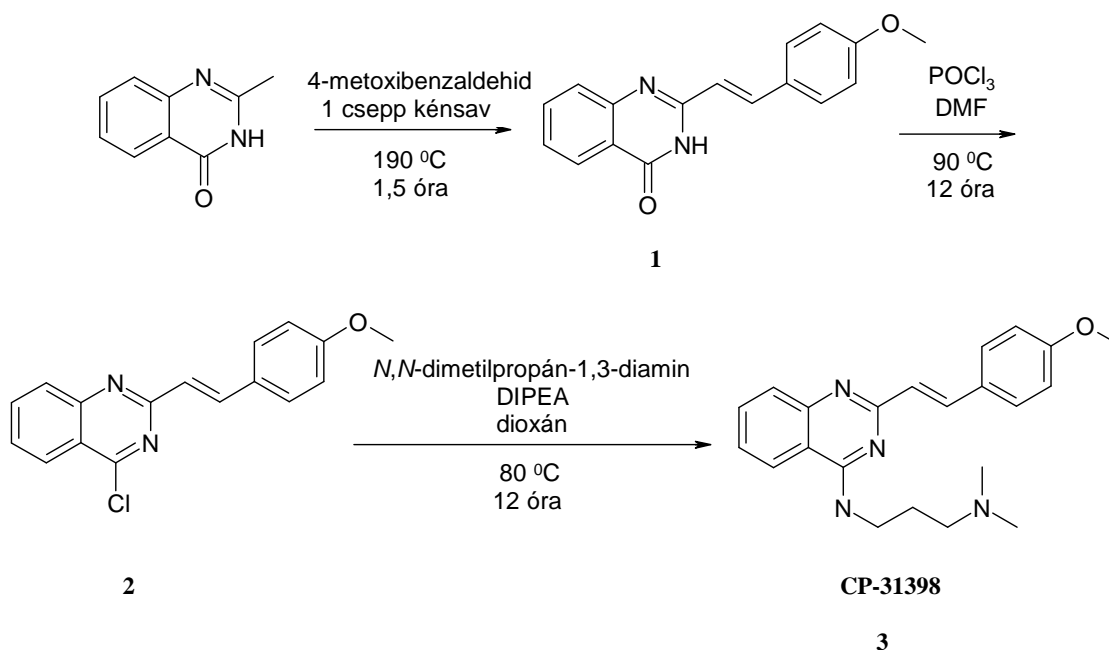
5.1.5 A vegyületek kötődési kinetikájának vizsgálata

Lehetőségem volt a B-RAF gátló vegyületek kötődési kinetikáját is tanulmányozni, melyhez a mérést a Proteros Biostructures GmbH végezte el az általuk publikált és rendszeresen alkalmazott ún. “reporter displacement assay” segítségével [108]. A módszer lényege, hogy egy fluoreszcens festékkel jelzett molekula leszorítását mérik az idő függvényében. A kísérlet során a vad típusú- és V600E mutáns B-RAF enzimet

festékekkel jelölt kismolekulával inkubálták 40 percig. Miután kialakult a fehérje - jelzett molekula komplex, hozzáadták az inhibitorokat négy különböző (30 μM , 10 μM , 3,3 μM , 1,1 μM) koncentrációban, majd három különböző inkubációs időt (8 perc, 30 perc, 90 perc) követően meghatározták a leszorítás százalékos mértékét.

5.2 Sztiril-kinazolin származékok előállítása és vizsgálata

A CP-31398 azonosítószámú referenciavegyület előállításához szükséges irodalmi adatok összegyűjtését a Scifinder ScholarTM és a Reaxys adatbázisokat felhasználva végeztem. Bár az adott vegyület képlete 1999-ben egy Science cikkben [103], 2000-ben pedig egy szabadalomban [109] is megjelent, előállítására recept a munkám kezdetéig (2007) nem volt leírva, kizárólag biológiai hatást vizsgáló cikkek voltak publikusak. Ezért irodalmi analógiák alapján eljárást dolgoztam ki a vegyület előállítására (9. ábra).

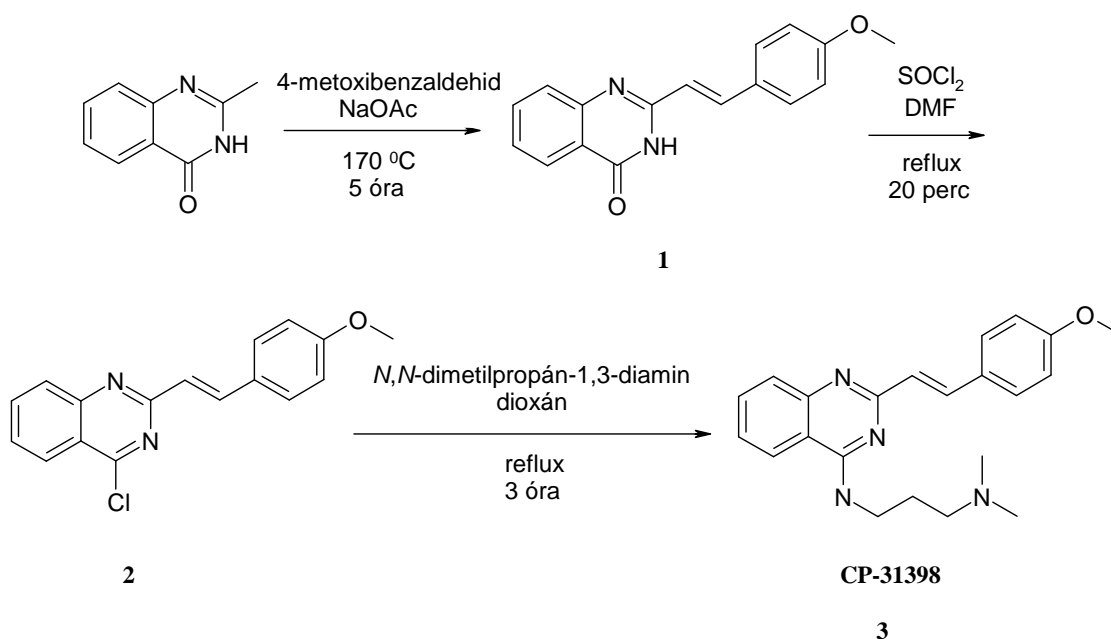


9. ábra A CP-31398 referenciavegyületre kidolgozott szintézis.

Kiindulási vegyületeként a 2-metilkinazolin-4(3H)-on származékot használtam, melynek aktív metilcsoportjára ömlesztéssel kondenzáltam a 4-metoxibenzaldehidet savas katalízis mellett. A kapott sztiril-kinazolon (1) intermediert szuszpendáltam foszforil-kloridban, majd katalitikus mennyiségű DMF hozzáadását követően 90 °C-on kevertetve nyertem az imin-klorid származékot (2). A kívánt végterméket (3)

szubsztitúciós reakcióban állítottam elő, dioxánban oldottam az imin-kloridot (**2**) és a primer aminnal (*N,N*-dimetilpropán-1,3-diaminnal) reagáltattam.

A CP-31398 referenciavegyület előállítását 2012-ben publikálták először [110]. Az irodalomban leírt, a 10. ábrán látható módszer azonos alapanyagokból, azonos intermediereken keresztül, de eltérő kivitelezésben állítja elő a kívánt vegyületet. (Az irodalomban közölt és az általam kidolgozott eljárás termelése közel azonos.)



10. ábra A CP-31398 referenciavegyület 2012-ben publikált szintézise [110].

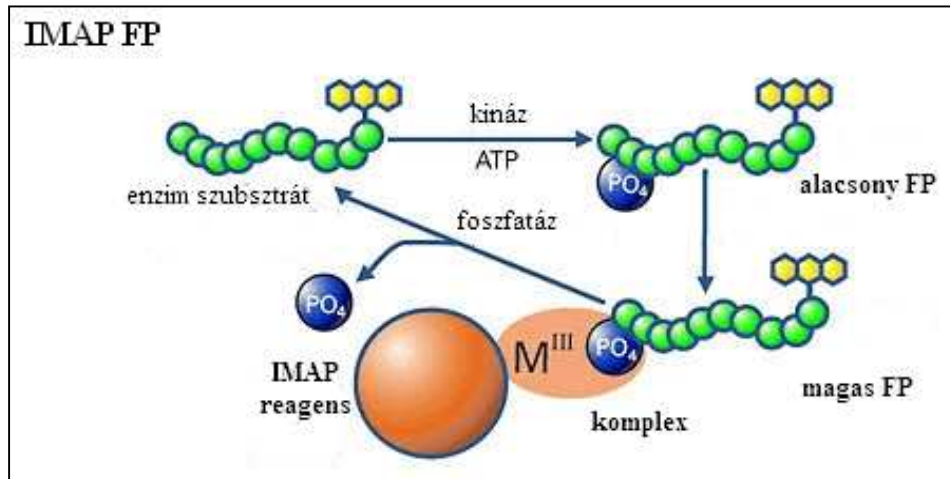
5.2.1 Sztiril-kinazolin származékok kináz szeletivitásának vizsgálata

A KINOMEscan® kötődési vizsgálatokat a DiscoverX cég végezte el, a szakirodalomban publikált módszer szerint, 450 releváns kinázon [111].

5.2.2 Sztiril-kinazolin származékok hatásának vizsgálata biokémiai módszerek segítségével

Az FLT3(ITD) kinázon a méréseket az ún. IMAP (Immobilized Metal ion Affinity-based fluorescence Polarization) módszerrel végeztük. A módszer működési elve az, hogy az enzimreakció (11. ábra) során az FLT3 egy olyan módosított peptidszubsztrátját használjuk, melyen fluoreszcens jelölés található. A kináz ATP jelenlétében

foszforilálja a szubsztrátot és ehhez a foszfát csoporthoz kötődik az IMAP reagens. Az így előállított komplex esetén, a fluoreszcensen jelzett szubsztrát szabad rotációja gátolt és ennek következtében nő a fény polarizációja [112].



11. ábra Az IMAP működési mechanizmusa [112].

Az előszűrés során meghatároztuk egy koncentrációban (10 μM) az enzimgátlás százalékos értékét, míg az IC_{50} méréseknél 12 különböző koncentrációt használtunk. A pontokra görbét illesztettünk, majd meghatároztuk az 50 %-os gátláshoz tartozó koncentráció értékét. IC_{50} méréseket csak azoknál az anyagoknál végeztünk, ahol a 10 μM -os koncentrációban az enzimgátlás mértéke meghaladta a 75%-os értéket. Az egy pontos és az IC_{50} mérések során is két párhuzamos mérést végeztünk.

5.2.3 Vegyületek vizsgálata MV4-11 humán akut mieloid leukémia és mutáns vagy vad típusú p53 sejtvonalakon

Az MV4-11 sejteket IMDM médiumban (Gibco) tenyésztettük. Az A431 (epidermális karcinóma) sejtvonal esetén DMEM (Gibco), a többi sejtvonalnál (HCT116 vastagbél, HT29 vastagbél, MCF7 emlő) pedig RPMI1640 tápoldatot (Gibco) használtunk 10%-os FBS (Gibco) és mikoplazma ellenes antibiotikum/antimikotikum (Gibco) jelenlétében. A sejtvonalakat 37 °C-on inkubáltuk 5% szén-dioxidot tartalmazó atmoszférában. Az IC_{50} méréseket az 5.1.4. pontban leírtak szerint végeztük.

5.2.4 Apoptózis/nekrózis vizsgálata áramlási citometria (FACS) módszerével

40000 sejtet raktunk ki 24 lyukú szövettenyésztő edénybe, majd a letapadásukat követően (16 órás inkubálás) a vegyületek korábban meghatározott IC₅₀ koncentrációival kezeltük őket. 48 órás inkubáció után az apoptózis/nekrózis mértékét áramlási citométerrel (FACSCalibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) mértük.

A nekrózis arányának meghatározásához a fixálatlan sejteket 10 µg/ml-es propidium-jodid oldattal megfestettük és 1 ml PBS-ben szuszpendáltuk. A PI pozitív sejtek mennyisége alapján következtettünk a nekrózissal elpusztult sejtek arányára.

Az apoptózis vizsgálata során a sejteket 70%-os etanolban -20 °C-on fixáltuk. A fixálást követően a sejteket 10 µg/ml RNázt tartalmazó 200 mM-os 7,8-as pH értékű citrát-foszfát pufferben inkubáltuk 30 percig, majd propidium-jodiddal megfestettük a DNS-t. Az apoptózis arányát a szub G1 tartományban megjelenő események alapján határoztuk meg.

Két párhuzamos mérést végeztünk. Az eredményeket a CellQuest programmal értékeltük ki.

5.2.5 A CP-31398 referenciavegyület és az egyik analóg hatása a p53 fehérje expressziójára

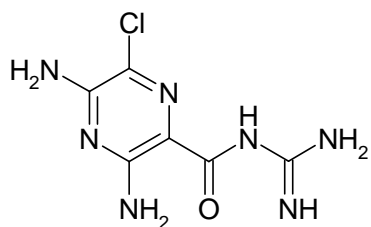
A kísérletet a szakirodalomban publikált módszer szerint végeztük *western blot* módszer segítségével [113].

5.2.6 A sztiril-kinazolin származékok PAMPA vizsgálata

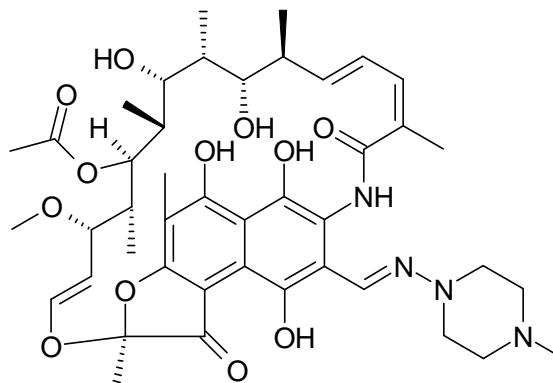
PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) módszerrel a passzív permeabilitást tudjuk meghatározni transzporterek és efflux rendszerek jelenléte nélkül.

A kísérletekhez a BD Biosciences lipid-réteggel előre ellátott mikrolemezeit használtuk, ezzel biztosítva a kísérletek reprodukálhatóságát, megbízhatóságát. Belső referenciaként négy vegyületet választottunk ki, ezek a permeabilitás szempontjából különböző típusokat képviselnek (12. ábra). A vizsgálandó anyagokat 2 % DMSO-t tartalmazó PBS pufferben (pH 7,4) oldottuk úgy, hogy a végkoncentráció 200 µM-os legyen. Az így készített oldatokból 300 µl-t vittünk fel a donor mikrolemezen található csövekbe, az akceptor mikrolemez csöveibe pedig 200 µl PBS-t töltöttünk. A lemezeket

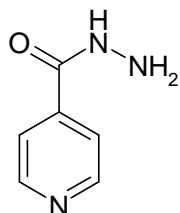
összerakásukat követően 5 órán keresztül 25 °C-on inkubáltuk, majd meghatároztuk a mesterséges membránnal (lipidekkel impregnált szűrő) elválasztott oldatok koncentrációját UV spektrofotométerrel (alkalmazott hullámhossz: 254 és 364 nm).



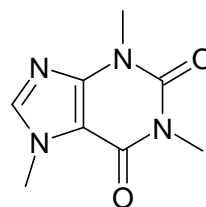
Amilorid



Rifampicin



Izoniazid



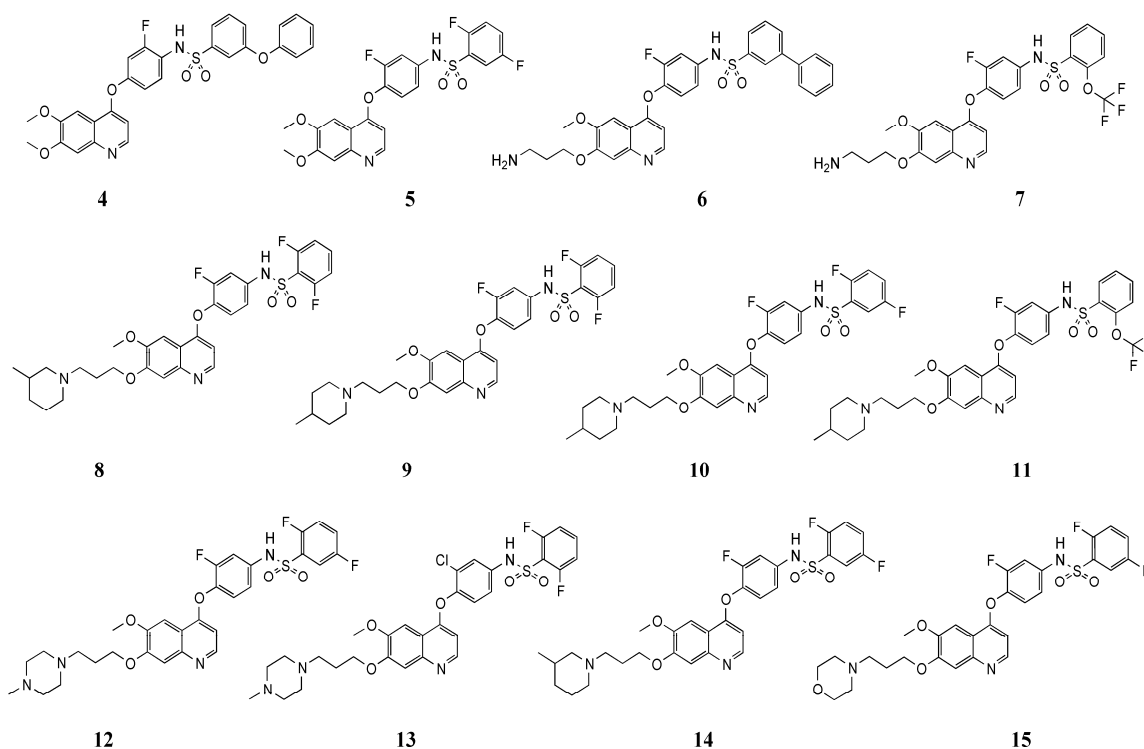
Koffein

12. ábra PAMPA vizsgálatokhoz használt referenciavegyületek

6. EREDMÉNYEK

6.1 Potenciális B-RAF gátló vegyületek vizsgálata

A B-RAF gátló vegyületek kötődését első körben molekulamodellező módszerekkel vizsgáltuk. A modellezésre kiválasztott 12 szulfonamid származék (**4-15**) (13. ábra) fő kötődési pontjait az 1. táblázat, a kinázon mért IC₅₀ értékeket a 2. táblázat tartalmazza.



13. ábra A kiválasztott szulfonamidok szerkezete.

6.1.1 Molekulamodellés és dokkolás

Kötődés a *hinge*-hez:

A vegyületek nagy részénél kimutatható a hidrogénhíd kötés az ATP kötőhely ún. *hinge* régiójával (1. táblázat). A 2-3Å hosszú kötésben akceptor szerepet tölt be a kinolin gyűrű nitrogénje, mely az 532-es cisztein amidcsoportjával lép kölcsönhatásba. Négy vegyület (**4**, **7**, **10**, **11**) esetén nem találtunk hidrogénhíd kölcsönhatást annak ellenére sem, hogy a kinolin gyűrű térben közel helyezkedik a *hinge*-hez.

Vegyületek		Hidrogénhíd kötések			Hidrofób kölcsönhatási pontok				
ID	Docking score (kcal/mol)	Hinge Cys532	DFG Asp594	DFG Gly596	Ile463	Ala481	Ile527	Trp531	Phe583
4	-5,307		x			x		x	x
5	-8,290	x			x	x	x	x	x
6	-5,674	x			x	x	x	x	x
7	-5,981				x	x	x	x	x
8	-9,384	x	x		x	x	x	x	x
9	-8,553	x			x	x	x	x	x
10	-10,512		x	x	x	x	x	x	x
11	-5,916				x	x		x	x
12	-11,176	x	x	x	x	x	x	x	x
13	-10,767	x	x	x	x	x	x	x	x
14	-11,167	x	x	x	x	x	x	x	x
15	-10,548	x	x	x	x	x	x	x	x

1. táblázat Dokkolási eredmények B-RAF kinázon.

Kötődés a DFG motívumhoz:

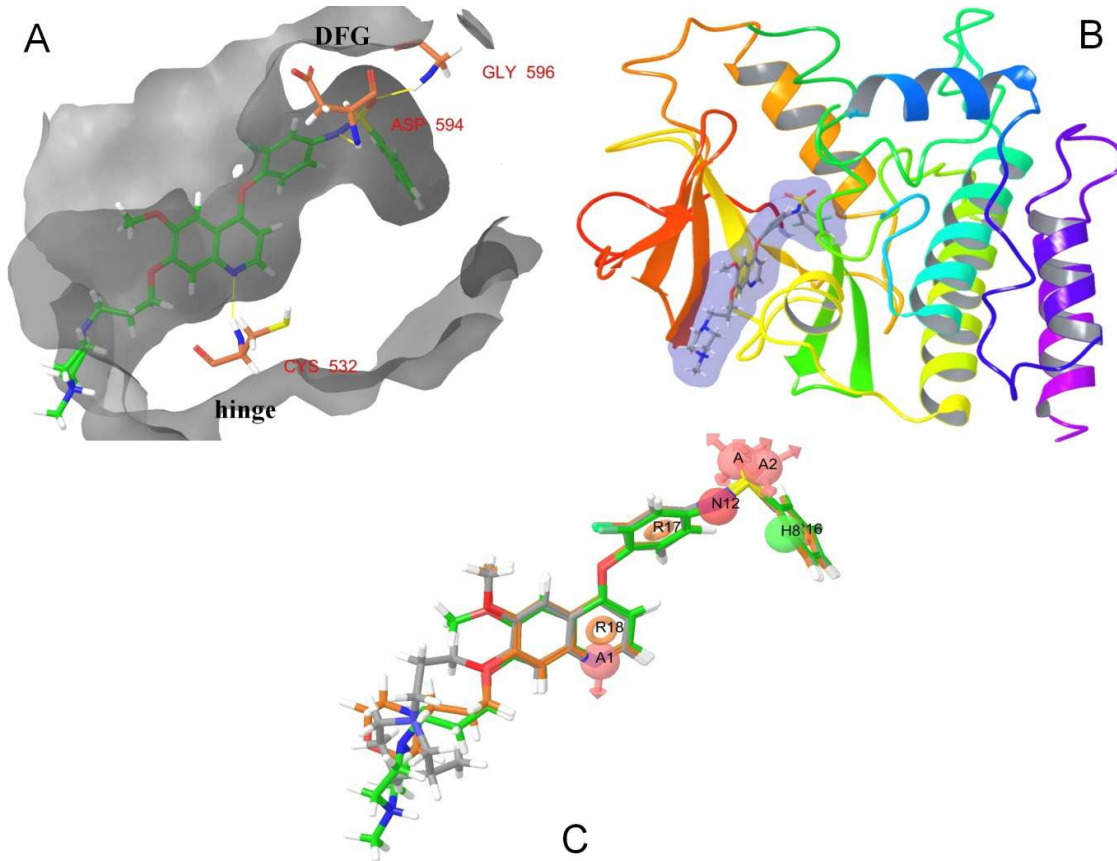
A kötődés szerint I ½-es típusú kinázgátlók közös jellemzője, hogy a molekulában lévő szulfonamid rész kölcsönhatásba lép az aktivációs hurkon lévő DFG motívummal. A vizsgált vegyületeink esetén is ki tudtuk mutatni ezt a típusú hidrogénhíd kölcsönhatást. A szulfonamid amidcsoportja felelős a DFG motívum aszparaginsavjával (Asp594) kialakuló interakcióért, míg az egyik oxocsoportja akzeptorként viselkedik a glicin (Gly596) amidcsoportjával szemben. A kevésbé hatásos vagy hatástalannak becsült vegyületeknél (**4-7, 9, 11**) vagy csak az aszparaginsavval vagy egyáltalán nem tudunk kölcsönhatást kimutatni a DFG motívummal.

Hidrofób kölcsönhatások a kötőhellyel:

A kristályszerkezetek alapján meghatároztuk az irodalmi anyagokra jellemző hidrofób kölcsönhatási pontokat, melyek az alábbiak: Ile463, Ala481, Leu514, Ile527, Trp531, Cys532, Phe583 és Phe595. A saját anyagaink esetén azt vizsgáltuk, hogy kölcsönhatásba lépnek-e ezekkel az aminosavakkal, illetve megvannak-e a π - π interakciók az aromás gyűrűk között. Nyolc vegyület (**8-15**) esetén kimutatható a π - π kölcsönhatás a DFG motívum fenil-alanin aminosavjával és további három vegyület esetén (**10, 11, 15**) az 583-as fenil-alaninnal is. A szoftveresen meghatározott hidrofób kölcsönhatásokat az 1. táblázat szemlélteti.

A Glide szoftverrel végzett modellezések alapján azt mondhatjuk, hogy a score érték alapján a **12**-es vegyületnek a legnagyobb a kötődési affinitása. A 14. ábrán tüntettük fel

a vegyület kötődését az ATP kötőhelyhez (A) és a kötőhely elhelyezkedését a fehérjén a bekötődött vegyülettel együtt (B).

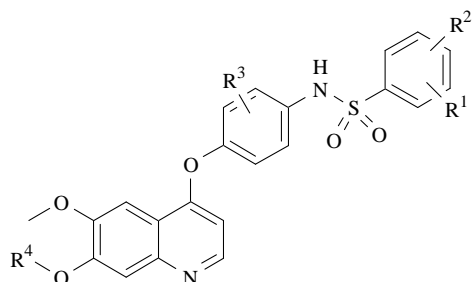


14. ábra (A) A 12-es vegyület dokkolása B-RAF kinázon. A kialakuló hidrogénhíd kötések a sárga vonal jelöli. (B) A 12-es vegyület illeszkedése az N- és C terminális között található ATP kötőhelyen. (C) A vegyületek farmakofór pontjai három vegyületen bemutatva: 12 (zöld), 14 (szürke) és 15 (narancssárga).

6.1.2 A vegyületek B-RAF gátló hatásának meghatározása *in vitro* biokémiai módszer segítségével

A biokémiai vizsgálatokhoz Sorafenib-et használtunk referenciaként. A beállított rendszerben a Sorafenib 0,11 μM -os IC_{50} értékkel gátolta a vad típusú és 0,07 μM -os értékkel a mutáns B-RAF(V600E) kinázt (2. táblázat). A kutatócsoportunk által előállított vegyületek közül öt molekula (10, 12-15) esetén nanomólos IC_{50} értékeket mértünk, hat származék (4-9) nem mutatott kiemelkedő hatást és egy vegyület (11) teljesen hatástalannak bizonyult (2. táblázat). A méréseink jó korrelációt mutatnak a

dokkolási eredményekkel (1. táblázat), mivel az 1 mikromól gátlóérték alatti vegyületek kapták a legjobb score értékeket is.



Vegyület	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	wt B-RAF IC ₅₀ (μM)	B-RAF(V600E) IC ₅₀ (μM)
4	3-O-fenil	H	3-F	-CH ₃	12,45	12,09
5	2-F	5-F	2-F	-CH ₃	1,51	0,81
6	2-O-CF ₃	H	2-F		20,46	17,27
7	3-Fenil	H	2-F		1,89	3,52
8	2-F	6-F	2-F		2,11	0,78
9	2-F	6-F	2-F		1,96	1,62
10	2-F	5-F	2-F		0,12	0,17
11	2-O-CF ₃	H	2-F		>23,00	>23,00
12	2-F	5-F	2-F		0,10	0,09
13	2-F	6-F	2-Cl		0,42	0,68
14	2-F	5-F	2-F		0,21	0,14
15	2-F	5-F	2-F		0,36	0,45
Sorafenib (X)					0,11	0,07

2. táblázat A táblázatban feltüntetett IC₅₀ értékeket Transcreener® ADP2 FP módszerrel határoztuk meg.

A közepes vagy rosszabb hatású vegyületek -5 és -9 közötti score értékeket kaptak, akárcsak a hatástalan **11**-es molekula. A biokémiai- és molekulamodellező vizsgálatok alapján megállapítható, hogy ha a fenil gyűrűn lévő R^1 és R^2 szubsztituens nagyobb térkitöltésű, az szignifikánsan csökkenti, illetve megszünteti a B-RAF gátló hatást. A szubsztituensek helyzete szintén fontos. A fenil gyűrűn orto (2-es) pozícióban lévő fluor atom mindenképp szükséges a hatáshoz, míg a második fluor esetén a meta (5-ös) helyzet a kedvezőbb.

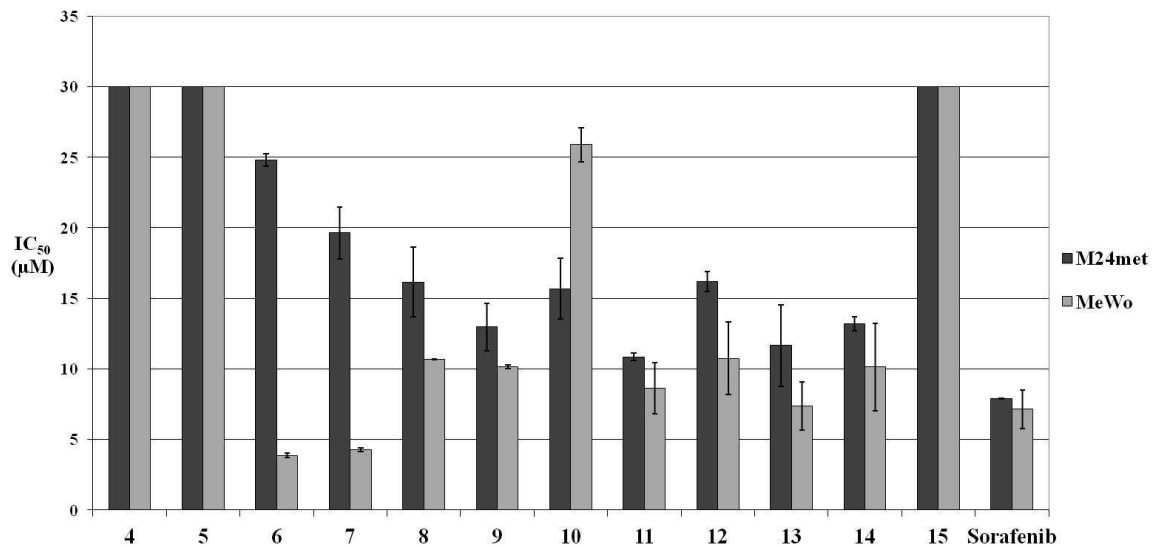
Megállapíthatjuk továbbá, hogy a flexibilis oldallánc nem csak az oldhatóság növelése szempontjából fontos, hanem megemeli a vegyületek enzimgátló hatását is, önmagában azonban nem elegendő a szubmikromólos (**6-9**) hatáshoz.

A Phase szoftver által végzett farmakofór analízis is megerősítette a dokkolás és az enzimikus mérés alapján meghatározott eredményeket és a számítógép segítségével egy hétpontos farmakofór modellt (14/C ábra) generáltunk. A kötődés szempontjából a hét kulcspont a következő: három hidrogénhid akceptor (A1, A2, A3), egy hidrofób csoport (H8), egy negatív töltésű csoport (N12) és a három aromás gyűrű (R16, R17, R18) térbeli elhelyezkedése. A szoftver nem jelölte esszenciális szubsztituensnek az oldalláncot, viszont a kötődésvizsgálatok alapján azt mondhatjuk, hogy az oldallánc az ATP kötőhely ún. oldószer csatornájába (solvent channel) illeszkedik.

6.1.3 Tumorelles hatás (IC_{50} érték) meghatározása öt sejtvonalon

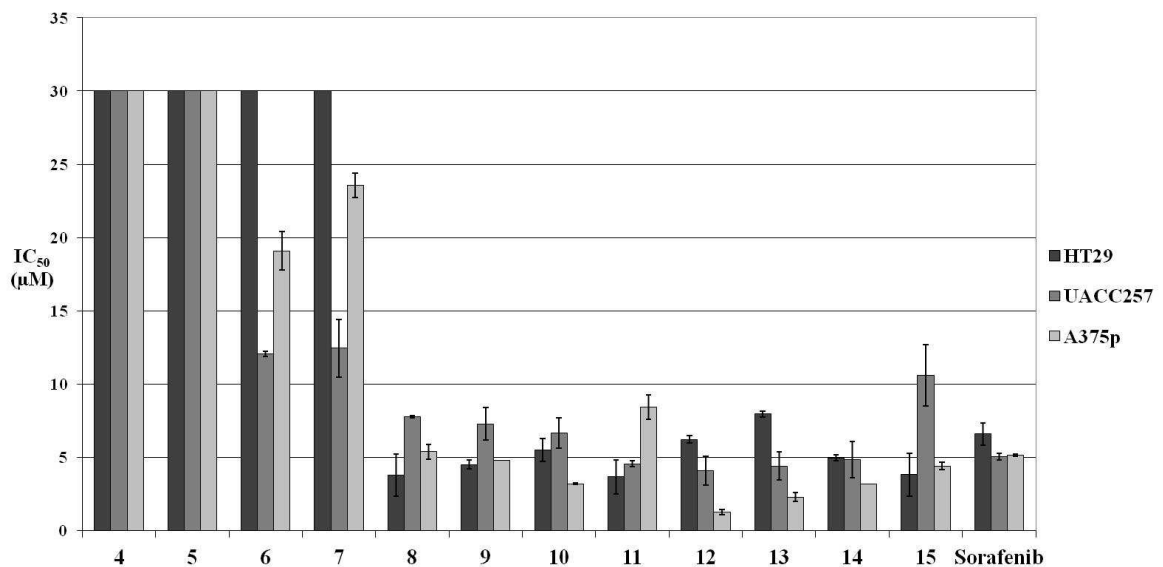
A vegyületek (**4-15**) tumorelles hatását öt különböző sejtvonalon (négy melanóma és egy vastagbélrák) teszteltük. Két melanóma sejtvonalnál (MeWo, M24met) vad típusú B-RAF fehérje expressziót mutattak ki, míg a HT29, az UACC257 és az A375p tumoros sejtvonalak V600E mutációt tartalmaznak [114-116].

Három vegyület (**4, 5, 15**) nem mutatott érdemi hatást ($IC_{50} > 30 \mu M$) a vad típust tartalmazó sejteken és a többi molekula sem volt annyira hatékony ($IC_{50} = 3,85-26 \mu M$). Külön figyelmet érdemel a **6**-os és **7**-es származék, mivel lényegesen jobb hatást mutattak a MeWo sejtvonalon, mint az M24met-en (15. ábra). A **15**-ös vegyület az *in vitro* enzimikus mérés szerint $0,36 \mu M$ -os IC_{50} értékkel rendelkezik vad típusú kinázon (2. táblázat), viszont a sejtvonalakon mégsem mutatott hatást (15. ábra).



15. ábra IC₅₀ mérések a vad típusú B-RAF-ot expresszáló sejtvonalakon.

Azonos módon vizsgáltuk a vegyületek hatását a V600E mutáns sejtvonalakon is (16. ábra). Két vegyület (4, 5) nem mutatott hatást egyik sejten sem (IC₅₀ > 30 µM) és további két vegyület (6, 7) volt hatástalan HT29 vastagbélrák sejteken, viszont kismértékben gátolták az UACC257 és A375p melanóma sejteket.



16. ábra IC₅₀ mérések V600E mutációt tartalmazó sejtvonalakon.

A többi molekulánál közel azonos vagy jobb gátlóhatást (IC₅₀ = 1,5-7 µM) mértünk, mint a sorafenib esetén (IC₅₀ > 5 µM).

6.1.4 A kötődési kinetika vizsgálata

A kötődési kinetika vizsgálatok során azt mértük, hogy a vegyületek (4-15) milyen mértékben képesek leszorítani egy fluoreszcens festékkel jelzett referencia molekulát, és ami még fontosabb, hogy ez a leszorítás hogyan változik az idő függvényében. Ezzel a vizsgálattal megállapítható, hogy a vegyületek kinetikailag melyik kinázgátló típusba tartoznak. Az I-es és I ½-es típusra jellemző a gyors kötődés és disszociáció, ezért rövid inkubációs időt követően is beáll az egyensúly a kötődésben. Ezzel ellentétben a II-es típusú kinázgátlók lassú kötődésű inhibitorok és jóval lassabb a kötőhelyről a disszociáció is. Ez azt eredményezi, hogy a maximális leszorítást csak hosszabb inkubációs időt követően érik el.

Ez a vizsgálat lényegesen gyorsabb és költségkímélőbb, mint a röntgenkristallográfia, mégis megbízható eredményt adhat a vegyületek kinázgátló típusát illetően. A vizsgálatokhoz a sorafenibet (X) választottuk referenciaként, mivel validáltan II-es típusú kinázgátló lassú kötődési kinetikával. A kísérlet eredményeit a 3. és 4. táblázat illusztrálja.

Vegyület	vad típusú B-RAF											
	8 perc				30 perc				90 perc			
	30 μM	10 μM	3,3 μM	1,1 μM	30 μM	10 μM	3,3 μM	1,1 μM	30 μM	10 μM	3,3 μM	1,1 μM
Sorafenib	92,9	79,1	51,6	13,1	96,1	92,7	78,9	38,1	95,4	97,4	89,5	63,1
4	53,4	29,7	13,4	8,5	47,6	29,9	11,4	-0,8	45,2	24,7	8,8	7,8
5	87,9	77,5	47,7	17,4	88,3	72,6	46,3	22,1	88,5	76,4	50,1	26,3
6	51,4	20,9	4,3	2,4	54,5	16,4	3,9	0,0	56,2	17,7	1,6	-3,5
7	87,4	71,5	41,9	29,6	89,2	71,4	41,7	31,3	87,2	73,7	49,1	24,4
8	95,2	89,5	76,5	50,9	93,3	89,6	78,0	52,6	96,8	91,5	76,1	57,6
9	94,4	88,9	72,7	51,3	94,0	90,9	72,9	54,5	93,7	89,5	74,5	57,7
10	90,0	72,9	43,9	33,0	92,0	75,3	50,0	34,6	92,2	75,3	52,6	31,0
11	47,6	22,7	4,0	3,5	51,0	24,4	5,5	1,0	48,7	25,6	1,3	-0,6
12	96,7	95,2	88,6	80,2	95,0	96,1	90,8	78,7	97,5	94,6	88,8	82,0
13	98,2	92,2	86,4	69,4	96,7	95,8	87,7	71,6	95,1	93,7	87,5	74,0
14	96,2	95,1	88,7	80,0	97,3	98,2	90,2	83,2	97,1	94,9	89,7	80,7
15	94,7	91,5	81,6	69,6	95,4	90,3	85,6	75,4	95,3	93,9	85,6	77,7

3. táblázat A vad típusú B-RAF esetén mért leszorítási értékek (%) a koncentráció és az idő függvényében.

A sorafenib esetén jól látható a rá jellemző lassú kötődés. Vad típusú B-RAF esetén a 8 perces inkubációs időt követően mindössze 13,1 % a leszorítás 1,1 μM -ban, 30 perc után ez az érték már 38,1 %, míg 90 perc után 63,1 % (3. táblázat).

V600E mutáns fehérje esetén a leszorítás 31,3 % 8 percnél, 64 % 30 percnél és 84,3 % 90 percnél (4. táblázat). Ezzel szemben az általunk előállított vegyületek (12-15) mindhárom inkubációs időt követően közel azonos leszorítást mutattak 1,1 μM -ban (3. és 4. táblázat). Ez azt jelenti, hogy az egyensúly rövid inkubációs időt követően beállt, tehát a vegyületek kötődését gyors kinetika jellemzi.

Alacsonyabb koncentrációknál több vegyület (4-7, 10, 11) is gyenge leszorítást mutatott, ez magyarázható a korábban meghatározott alacsonyabb enzimgátló értékekkel (2. táblázat). Ha a két kináz közötti értékeket nézzük megállapítható, hogy kinetikában nincs különbség a vad típusú- és a mutáns B-RAF(V600E) között, viszont a vegyületek kötődési affinitása valamivel nagyobb a mutáns esetén (3. és 4. táblázat).

Vegyület	mutáns B-RAF(V600E)											
	8 perc				30 perc				90 perc			
	30 μM	10 μM	3,3 μM	1,1 μM	30 μM	10 μM	3,3 μM	1,1 μM	30 μM	10 μM	3,3 μM	1,1 μM
Sorafenib	98,6	91,7	76,2	31,3	97,2	96,4	92,7	64,0	97,8	96,5	93,9	84,3
4	63,8	47,4	26,4	6,9	63,5	41,6	21,1	11,5	60,7	42,7	21,4	8,5
5	92,8	80,1	57,9	35,7	91,2	79,6	56,7	29,4	89,5	80,1	56,4	27,3
6	71,8	41,3	22,8	8,3	70,9	42,9	15,9	11,3	71,5	44,5	16,0	11,2
7	93,5	83,8	73,7	57,0	92,7	86,8	71,6	55,0	95,4	91,4	75,8	52,0
8	94,0	92,9	81,0	63,9	95,6	93,3	83,7	65,3	96,2	92,9	81,3	65,5
9	96,3	92,2	80,5	64,6	95,5	93,3	82,3	62,9	95,1	93,6	82,6	62,9
10	92,3	77,1	61,6	38,2	93,1	82,1	68,0	39,5	91,8	82,7	64,8	39,6
11	66,7	42,4	18,7	8,2	66,1	45,1	21,1	11,0	72,9	49,1	19,9	2,9
12	96,0	95,0	91,6	84,8	97,2	97,4	91,7	85,0	96,0	96,9	93,7	84,1
13	94,4	92,2	87,6	78,8	96,0	93,5	89,7	81,7	96,0	93,8	88,6	78,1
14	97,5	94,5	92,7	85,1	95,7	95,5	91,0	87,6	95,1	96,8	91,2	85,3
15	94,8	92,1	88,5	77,3	94,9	93,4	87,4	81,7	94,6	93,7	89,0	80,8

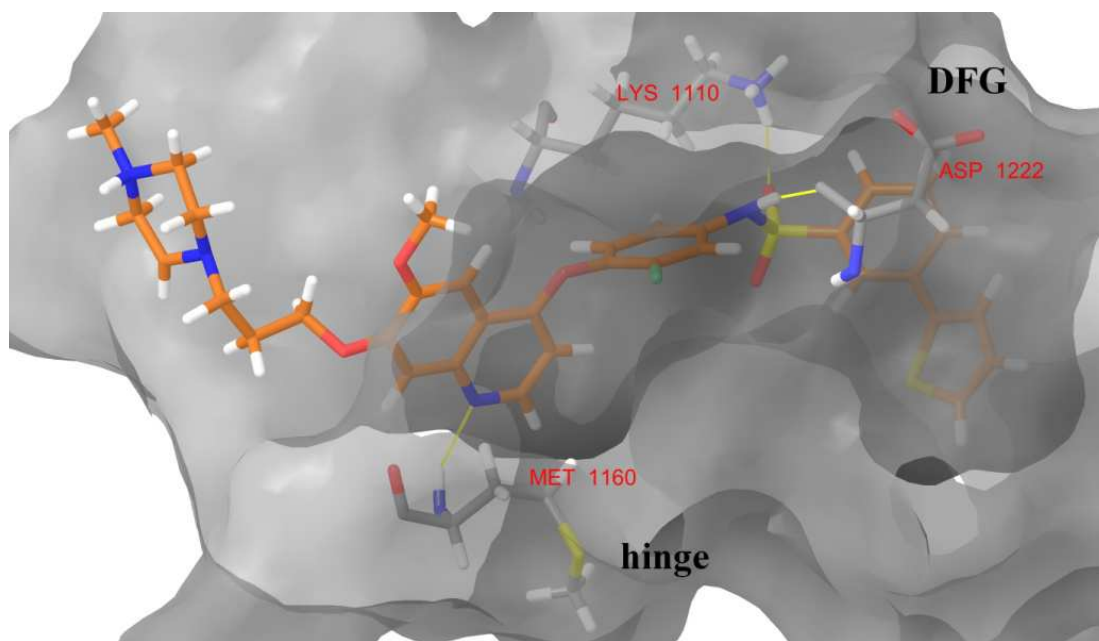
4. táblázat A V600E mutáns B-RAF esetén mért leszorítási értékek (%) a koncentráció és az idő függvényében.

6.1.5 A 4-fenoxikinolin származékok hatása c-MET kinázon

A vegyületek (4-15) B-RAF kinázon történő vizsgálata során megállapítottuk, hogy a nagyobb térkitöltésű szubsztituenst (R16-os gyűrű) tartalmazó vegyületek (4,6,7,11) hatása csökken vagy megszűnik (2. táblázat). Ezért ezeket a molekulákat elküldtük

szelektivitás vizsgálatra. Az általunk mért eredményeknek megfelelően jóval gyengébb hatást (enzimgátlás < 50 %) mértek B-RAF kinázon, ezzel szemben c-MET-en az enzimgátlás nagyobb volt, mint 90 %. A magyarázatot ezúttal is a molekulák kötődésében kerestük, melynek modellezéséhez ismét a Schrödinger Glide programot használtuk az 5.1.1 fejezetben leírtak szerint annyi különbséggel, hogy a molekulák protonáltságát pH = 7,4-re állítottuk be és nem használtunk farmakofór feltételt a dokkoláshoz. A fehérje 3D szerkezetét a PDB adatbázisból töltöttük le (PDB azonosító: 3LQ8).

A kötődés modellezése során megállapítottuk, hogy létrejönnek az ATP kompetitív inhibitorokra jellemző kölcsönhatások: hidrogénhid és hidrofób kölcsönhatások a *hinge* régióval, a DFG motívummal, valamint egy hidrogénhid az α C helix közelében elhelyezkedő Lys1110 aminosavval (17. ábra) is.



17. ábra Nagy térkitöltésű szubsztituens-tartalmazó 4-fenoxikinolin dokkolása c-MET kinázon.

Szembevetendő különbség a B-RAF kinázzal szemben, hogy a c-MET kináz hidrofób zsebének mérete a nagyobb térkitöltésű aromás csoportok kötődését is lehetővé teszi (17. ábra). Ilyen szubsztituensek alkalmazásával tehát javítható a szelektivitás a kisebb zsebet tartalmazó kinázokkal szemben.

A modellezés során kapott eredményeket és a foretinib szerkezetét felhasználva kutatócsoportunk új, c-MET gátló vegyületeket szintetizált.

6.2 Sztiril-kinazolin származékok előállítása és biológiai vizsgálata

6.2.1 A CP-31398 azonosítójelű validációs vegyület előállítása az általam kidolgozott módszer alapján

2-[(*E*)-2-(4-metoxifenil)vinil]kinazolin-4(3*H*)-on (1)

Bemértem 1,70 g (10 mmol) 2-metilkinazolont mikrohullámú készülékhez használatos reakciócsőbe és hozzá pipettáztam 2,18 g (1,95 ml, 15 mmol) 4-metoxibenzaldehydet (p-ánizsaldehyd). Alapos keverés után 1 csepp tömény kénsavat adtam a reakcióelegyhez és zárt rendszerben másfél órán keresztül 190 °C-on reagáltattam az anyagokat Personal Chemistry, Emrys™ Creator mikrohullámú reaktorban. A terméket 5%-os NaHCO₃-tal mostam, majd DMF-ből kristályosítottam. A szűrés során éterrel eldörzsöltem, majd vákuum alatt szárítottam.

Termék: 1,60 g sárga por. Termelés: 57 %. Op: 298-300 °C (DMF)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,25 (bs, 1H); 8,09 (d, J= 7,50 Hz, 1H); 7,90 (d, J= 16,20 Hz, 1H); 7,79 (t, J= 7,50 Hz, 1H); 7,63 (m, 3H); 7,45 (t, J= 7,20 Hz, 1H); 7,02 (d, J= 8,40 Hz, 2H); 6,87 (d, J= 16,20 Hz, 1H); 3,78 (s, 3H)

LCMS (ESI) *m/z* 279,3 (M+H)⁺; 277,0 (M-H)⁻; számított: 278,1 Rt: 3,42 perc

4-klór-2-[(*E*)-2-(4-metoxifenil)vinil]kinazolin (2)

Az előző lépésben előállított vegyület (1) teljes mennyiségét felhasználtam a klórozási lépéshez: 1,60 g (5,7 mmol) kinazolon származékot szuszpendáltam 20 ml foszforil-kloridban. Katalitikus mennyiségű DMF hozzáadása után 12 órát forraltam a reakcióelegyet. Melegítés hatására a kiindulási vegyület már a reakció kezdetén beoldódott. A reakciót vékonyréteg-kromatográfiával (VRK) követtem, eluensként kloroform/metanol 9:1 arányú elegyét használtam. A bepárlást követően a terméket feloldottam kloroformban. A szerves fázist hideg vízzel és 10 %-os NaHCO₃ oldattal mostam, majd MgSO₄-tal kevertetve szárítottam. Az oldatot bepároltam és a terméket bomlékonysága miatt azonnal elreagáltattam primer aminnal.

Termék: 1,16 g narancssárga por. Termelés: 68 %

***N,N*-dimetil-*N'*-{2-[(*E*)-2-(4-metoxifenil)vinil]kinazolin-4-il}propán-1,3-diamin (3)**

A kiindulási imin-klorid származékból (2) feloldottam 0,72 g-ot (2,4 mmol) 20 ml vízmentes dioxánban. A kissé zavaros oldathoz 0,51 g-ot (0,68 ml, 2,4 mmol)

diizopropil-etilamint pipettáztam, melynek hatására az oldat kitisztult. 0,49 gramm (0,60 ml, 4,8 mmol) *N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin hozzáadását követően a lombikot átöblítettem argonnal, majd 12 órán keresztül 80 °C-on kevertetem a reakcióelegyet. A bepárlást követően az anyagot kloroform/metanol 9:1 arányú elegyét felhasználva oszlopon tisztítottam. A szabad bázist etanolban oldottam és ekvivalens mennyiségben adtam hozzá fumársavat. Rövid kevertetést követően az oldatot bepároltam és a sötét etil-acetátos mosást követően szűrtem.

Termék: 0,66 g sárga por (1,5 ekv. fumársav só). Termelés: 51 %. Op: 168-173 °C

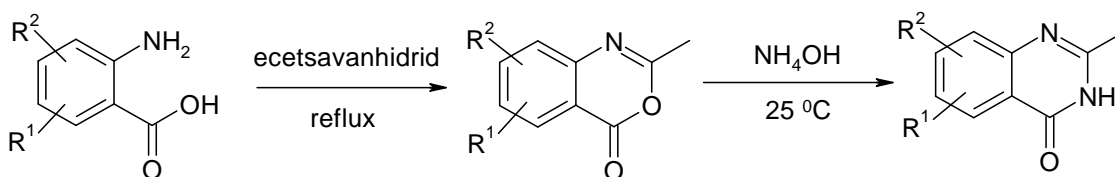
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,30 (bs, 1H); 8,18 (d, J= 8,16 Hz 1H); 7,87 (d, J= 15,87, 1H); 7,72 (t, J= 7,98 Hz, 1H); 7,65 (m, 3H); 7,43 (t, J= 7,23 Hz, 1H); 7,00 (m, 3H); 6,57 (bs, 3H); 3,80 (s, 3H); 3,69 (m, 2H); 2,84 (t, J= 7,02 Hz, 2H); 2,50 (s, 6H); 1,99 (t, J= 7,32 Hz, 2H)

LCMS (ESI) *m/z* 363,3 (M+H)⁺; 361,2 (M-H)⁻; számított: 362,2 Rt: 0,45; 2,19 perc

6.2.2 Szubsztituált sztiril-kinazolinok előállítása a validációs vegyületre kidolgozott szintézis alapján

6.2.2.1 Metil-kinazolon intermedierek előállítása szubsztituált antranilsavakból

A vegyületek előállítása minden esetben a megfelelően szubsztituált antranilsavból történt, a feltüntetett reakcióút (18. ábra) szerint.



18. ábra Kinazolon intermedier előállítása szubsztituált antranilsavakból.

1 mmol antranilsavat szuszpendáltam 35 ml ecetsavanhidridben és 3-4 órát 130 °C-on forraltam. A kiindulási vegyület a melegítés hatására beoldódott, a reakciót pedig VRK-val (eluens: hexán/etil-acetát 2:1) követtem. A reakcióelegyet visszahűttem szobahőmérsékletre, majd a bepárlást követően a bepárlási maradékot hexán/éter 2:1 arányú elegyével mostam. Az előállított 1,3-benzoxazin-4-ont (1 mmol) szuszpendáltam 80 ml tömény ammónia oldatában és szobahőmérsékleten kevertetem egy éjszakán keresztül. A reakció végbemenetelét VRK-val ellenőriztem, toluol/metanol 4:1 arányú

elegyét használva eluensként. Az erősen csapadékos reakcióelegyhez 10 %-os NaOH oldatot öntöttem, melynek hatására a csapadék beoldódott és az oldat kitisztult. Jégeccettel az oldat pH-ját pH ~ 7-re állítottam be és a kivált anyagot szűrtem, majd vízzel mostam. 1 napig exszikkátorban szárítottam.

A **2-metilkinazolin-4(3H)-on (16)** intermedier újbóli előállításától eltekintettem, mert kutatócsoportunk korábban már nagy mennyiségben és megfelelő tisztaságban előállította.

6-klór-2-metilkinazolin-4(3H)-on (17)

Bemérés: 10,00 g (58,3 mmol) 2-amino-5-klórbenzoesav. Termék: 8,76 g fehér por.

Kitermelés: 77 %. Op: 271-272 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 7,98 (s, 1H); 7,76 (d, J= 8,58 Hz, 1H); 7,57 (d, J= 8,73 Hz, 1H); 2,34 (s, 3H)

LCMS (ESI) *m/z* 195,0 (M+H)⁺; 192,9 (M-H)⁻; számított: 194,0 Rt: 2,43 perc.

7-klór-2-metilkinazolin-4(3H)-on (18)

Bemérés: 5,00 g (29,1 mmol) 2-amino-4-klórbenzoesav. Termék: 3,60 g fehér por.

Kitermelés: 64 %. Op: 266-267 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,05 (d, J= 8,49 Hz, 1H); 7,60 (d, J= 1,62 Hz, 1H); 7,46 (dd, J¹= 8,49 Hz, J²= 1,83 Hz, 1H); 2,34 (s, 3H)

LCMS (ESI) *m/z* 195,1 (M+H)⁺; 192,9 (M-H)⁻; számított: 194,0 Rt: 2,48 perc.

6-fluor-2-metilkinazolin-4(3H)-on (19)

Bemérés: 5,00 g (32,2 mmol) 2-amino-5-fluorbenzoesav. Termék: 3,50 g fehér por.

Kitermelés: 61 %. Op: 258-259 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,29 (bs, 1H); 7,68 (m, 3H); 2,34 (s, 3H)

LCMS (ESI) *m/z* 179,2 (M+H)⁺; 176,9 (M-H)⁻; számított: 178,1 Rt: 2,01 perc.

6-bróm-2-metilkinazolin-4(3H)-on (20)

Bemérés: 6,00 g (27,7 mmol) 2-amino-5-brómbenzoesav. Termék: 5,69 g fehér por.

Kitermelés: 86 %. Op: 297-298 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,13 (d, J= 2,25 Hz, 1H); 7,88 (dd, J¹= 8,67 Hz, J²= 2,34 Hz, 1H); 7,50 (d, J= 8,67 Hz, 1H); 2,33 (s, 1H)

LCMS (ESI) *m/z* 239,1 (M+H)⁺; 236,8 (M-H)⁻; számított: 238,0 Rt: 2,52 perc.

6,8-dibróm-2-metilkinazolin-4(3H)-on (21)

Bemérés: 6,00 g (20,3 mmol) 2-amino-3,5-dibrómbenzoészav. Termék: 6,38 g világossárga por. Kitermelés: 99 %. Op: 310-311 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,14 (s, 1H); 8,09 (s, 1H); 2,32 (s, 3H)

LCMS (ESI) *m/z* 318,9 (M+H)⁺; 316,7 (M-H)⁻; számított: 317,9 Rt: 3,27 perc.

8-bróm-2-metilkinazolin-4(3H)-on (22)

Bemérés: 10,00 g (46,3 mmol) 2-amino-3-brómbenzoészav. Termék: 9,16 g világosbarna por. Kitermelés: 83 %. Op: 253-254 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,41 (bs, 1H); 8,09 (m, 1H); 8,06 (m, 1H); 7,34 (t, J= 7,77 Hz, 1H); 2,38 (s, 3H)

LCMS (ESI) *m/z* 238,9 (M+H)⁺; 236,9 (M-H)⁻; számított: 238,0 Rt: 2,58 perc.

2-metil-7-nitrokinazolin-4(3H)-on (23)

Bemérés: 5,00 g (27,4 mmol) 2-amino-4-nitrobenzoészav. Termék: 5,50 g sárga por. Kitermelés: 98 %. Op: 286-287 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,40 (bs, 1H); 8,29 (d, J= 9,06 Hz, 1H); 8,26 (s, 1H); 8,16 (dd, J¹= 8,64 Hz, J²= 2,19 Hz, 1H); 2,40 (s, 3H)

LCMS (ESI) *m/z* 206,2 (M+H)⁺; 203,9 (M-H)⁻; számított: 205,1 Rt: 2,34 perc.

2-metil-6,7-dimetoxikinazolin-4(3H)-on (24)

Bemérés: 5,00 g (25,3 mmol) 2-amino-4,5-dimetoxibenzoészav. Termék: 4,60 g fehér por. Kitermelés: 83 %. Op: 296-297 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,00 (bs, 1H); 7,39 (s, 1H); 7,05 (s, 1H); 3,88 (s, 3H); 3,85 (s, 3H); 2,31 (s, 3H)

LCMS (ESI) *m/z* 221,2 (M+H)⁺; 219,0 (M-H)⁻; számított: 220,1 Rt: 0,45; 1,78 perc.

2-metil-benzo[g]kinazolin-4(3H)-on (25)

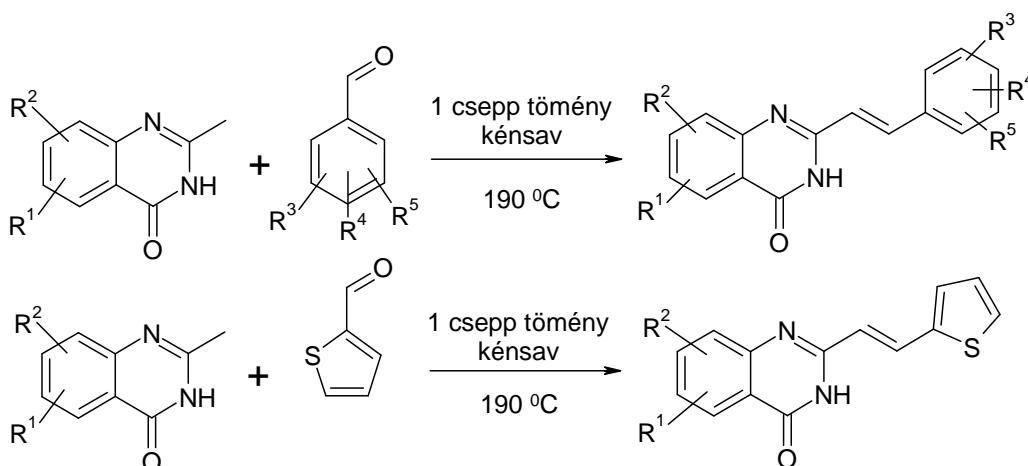
Az Alfa Aesartól vásárolt 3-amino-2-naftalinsav ~85 %-os tisztaságú volt a kiindulási anyagra nézve.

Bemérés: 5,00 g (26,7 mmol) 3-amino-2-naftalinsav (~85%-os). Termék: 4,60 g világosbarna por. Kitermelés: 63 % (A várt termékre számolva.).

LCMS (ESI) *m/z* 211,2 (M+H)⁺; 208,9 (M-H)⁻; számított: 210,1 Rt: 2,40 perc (várt izomer), 2,61 perc (szennyező melléktermék). Tisztaság: 77%, 23%-ban melléktermék szennyezi a vegyületet.

Az intermedier tisztításától eltekintettem, mert a soron következő reakciólépést (19. ábra) követően a kívánt termékek (**57-61**) DMF-ből kristályosodnak, míg a szennyező az oldatban marad.

6.2.2.2 Sztiril-kinazonon intermedierek előállítása szubsztituált benzaldehidekből és tiofén-2-karbaldehidből



19. ábra Kulcsintermedierek előállítása mikrohullámú szintézis alkalmazásával.

A korábban előállított szubsztituált 2-metilkinazolin-4(3*H*)-on intermedierekből bemértem 1 mmol mennyiséget mikrohullámú készülékhez használatos reakciósőbe és hozzámértem 1,5 mmol-t a szubsztituált benzaldehid származékokból. Alapos összekeverés után 1 csepp tömény kénsavat adtam a keverékekhez és másfél órán keresztül 190 °C-on reagáltattam az anyagokat Personal Chemistry, Emrys™ Creator mikrohullámú reaktor (a fűtés erőssége: 150W, a reakció során mért nyomás: 1-7 bar volt) segítségével (19. ábra). VRK-s futtatást (eluens: kloroform/ metanol 9:1) követően a nyers termékeket 5%-os NaHCO₃-tal mostam. A végtermékeket DMF-ből kristályosítottam, szűrtem és éteres mosást követően vákuum alatt szárítottam.

2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]kinazolin-4(3*H*)-on (**26**)

Bemérés: 3,00 g (18,7 mmol) **16**; 3,48 g (28,0 mmol) 4-fluorbenzaldehyd. Termék: 3,27 g barna por. Kitermelés: 66 %. Op: 286-287 °C (DMF)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,33 (bs, 1H); 8,11 (d, *J*= 8,10 Hz, 1H); 7,95 (d, *J*= 16,11 Hz, 1H); 7,83 (t, *J*= 7,11 Hz, 1H); 7,75 (m, 3H); 7,48 (t, *J*= 7,20 Hz, 1H); 7,30 (t, *J*= 8,70 Hz, 2H); 6,99 (d, *J*= 16,20 Hz, 1H)

LCMS (ESI) *m/z* 267,2 (M+H)⁺; 264,9 (M-H)⁻; számított: 266,1 Rt: 3,57 perc.

2-[(E)-2-(3-fluorfenil)vinil]kinazolin-4(3H)-on (27)

Bemérés: 1,00 g (6,2 mmol) **16**; 1,15 g (9,3 mmol) 3-fluorbenzaldehyd. Termék: 0,56 g barna por. Kitermelés: 34 %. Op: 276-277 °C (DMF)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,00 (bs, 1H); 8,12 (d, J= 7,41 Hz, 1H); 7,97 (d, J= 16,14 Hz, 1H); 7,83 (t, J= 6,66 Hz, 1H); 7,71(d, J= 7,50 Hz, 1H); 7,50 (m, 4H); 7,26 (m, 1H); 7,10 (d, J= 16,38 Hz, 1H)

LCMS (ESI) *m/z* 267,2 (M+H)⁺; 264,9 (M-H)⁻; számított: 266,1 Rt: 3,61 perc.

2-[(E)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]kinazolin-4(3H)-on (28)

Bemérés: 1,20 g (7,5 mmol) **16**; 1,59 g (11,2 mmol) 3,4-difluorbenzaldehyd. Termék: 1,20 g barna por. Kitermelés: 56 %. Op: 310-311 °C (DMF)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,36 (bs, 1H); 8,12 (d, J= 7,80 Hz, 1H); 7,92 (d, J= 15,90 Hz, 1H); 7,80 (m, 2H); 7,68 (d, J= 8,10 Hz, 1H); 7,52 (m, 3H); 7,04 (d, J= 16,50 Hz, 1H)

LCMS (ESI) *m/z* 285,1 (M+H)⁺; 283,1 (M-H)⁻; számított: 284,1 Rt: 3,69 perc.

2-[(E)-2-(4-metilszulfanilfenil)vinil]kinazolin-4(3H)-on (29)

Bemérés: 3,00 g (18,7 mmol) **16**; 4,27 g (28,0 mmol) 4-(metilszulfanil)benzaldehyd. Termék: 4,58 g sötétsárga por. Kitermelés: 83 %. Op: 269-270 °C (DMF)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,27 (bs, 1H); 8,13 (d, J= 7,47 Hz, 1H); 7,90 (d, J= 16,14 Hz, 1H); 7,79 (t, J= 7,33 Hz, 1H); 7,63 (m, 3H); 7,38 (t, J= 7,27 Hz, 1H); 7,13 (d, J= 7,50 Hz, 2H); 6,92 (d, J= 16,20 Hz, 1H); 2,51 (s, 3H)

LCMS (ESI) *m/z* 295,1 (M+H)⁺; 293,1 (M-H)⁻; számított: 294,1 Rt: 3,82 perc.

2-[(E)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]kinazolin-4(3H)-on (30)

Bemérés: 1,05 g (6,5 mmol) **16**; 1,91 g (9,7 mmol) 3,4,5-timetoxibenzaldehyd. Termék: 1,00 g sárga por. Kitermelés: 46 %. Op: 275-276 °C (DMF)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,24 (bs, 1H); 8,10 (d, J= 7,20 Hz, 1H); 7,90 (d, J= 16,20 Hz, 1H); 7,80 (t, J= 6,54 Hz, 1H); 7,65 (d, J= 7,20 Hz, 1H); 7,47 (t, J= 6,56 Hz, 1H); 7,00 (d, J= 17,85 Hz, 1H); 6,99 (s, 2H); 3,85 (s, 6H); 3,71 (s, 3H)

LCMS (ESI) *m/z* 339,2 (M+H)⁺; 337,0 (M-H)⁻; számított: 338,1 Rt: 3,30 perc.

2-[(E)-2-(4-izopropilfenil)vinil]kinazolin-4(3H)-on (31)

Bemérés: 1,20 g (7,5 mmol) **16**; 1,66 g (11,2 mmol) 4-izopropilbenzaldehyd. Termék: 0,90 g sárga por. Kitermelés: 41 %. Op: 240-242 °C (DMF)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,32 (bs, 1H); 8,10 (d, J= 7,50 Hz, 1H); 7,93 (d, J= 15,90 Hz, 1H); 7,80 (t, J= 6,00 Hz, 1H); 7,67 (d, J= 7,80 Hz, 1H); 7,59 (d, J= 7,60 Hz, 2H); 7,47 (t, J= 6,90 Hz, 1H); 7,34 (d, J= 7,89 Hz, 2H); 7,00 (d, J= 16,05 Hz, 1H); 2,90 (m, 1H); 1,23 (m, 6H).

LCMS (ESI) *m/z* 291,2 (M+H)⁺; 289,2 (M-H)⁻; számított: 290,1 Rt: 4,31 perc.

2-[(E)-2-[4-(metilszulfonil)fenil]vinil]kinazolin-4(3H)-on (32)

Bemérés: 1,00 g (6,2 mmol) **16**; 1,71 g (9,3 mmol) 4-(metilszulfonil)benzaldehyd. Termék: 1,30 g világosbarna por. Kitermelés: 64 %. Op: 310-311 °C (DMF)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,42 (bs, 1H); 8,15 (d, J= 3,00 Hz, 1H); 8,01 (m, 3H); 7,91 (d, J= 8,40 Hz, 2H); 7,83 (t, J= 7,74 Hz, 1H); 7,71 (d, J= 7,95 Hz, 1H); 7,52 (t, J= 7,05 Hz, 1H); 7,19 (d, J= 16,23 Hz, 1H); 3,26 (s, 3H)

LCMS (ESI) *m/z* 327,1 (M+H)⁺; 325,0 (M-H)⁻; számított: 326,1 Rt: 2,96 perc.

2-[(E)-2-(2-tenil)vinil]kinazolin-4(3H)-on (33)

Bemérés: 1,20 g (7,5 mmol) **16**; 1,25 g (11,2 mmol) 2-tiofénkarbaldehyd. Termék: 0,79 g barna por. Kitermelés: 41 %. Op: 261-262 °C (DMF)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,30 (bs, 1H); 8,09 (m, 2H); 7,79 (t, J= 7,20 Hz, 1H); 7,66 (m, 2H); 7,46 (m, 2H); 7,16 (bs, 1H); 6,78 (d, J= 15,90 Hz, 1H)

LCMS (ESI) *m/z* 255,1 (M+H)⁺; 253,1 (M-H)⁻; számított: 254,1 Rt: 3,36 perc.

6-klór-2-[(E)-2-(4-metoxifenil)vinil]kinazolin-4(3H)-on (34)

Bemérés: 3,00 g (15,4 mmol) **17**; 3,14 g (23,1 mmol) 4-metoxibenzaldehyd. Termék: 4,58 g sárga por. Kitermelés: 95 %. Op: 318-319 °C (DMF)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,40 (bs, 1H); 8,01 (d, J= 1,50 Hz, 1H); 7,91 (d, J= 16,20 Hz, 1H); 7,81 (d, J= 2,10 Hz, 1H); 7,66 (d, J= 8,70 Hz, 1H); 7,61 (d, J= 8,40 Hz, 2H); 7,02 (d, J= 8,40 Hz, 2H); 6,85 (d, J= 15,90 Hz, 1H); 3,81 (s, 3H)

LCMS (ESI) *m/z* 313,1 (M+H)⁺; 310,9 (M-H)⁻; számított: 312,1 Rt: 4,07 perc.

2-[(E)-2-(4-fluorfenil)vinil]-6-klórkinazolin-4(3H)-on (35)

Bemérés: 1,10 g (5,6 mmol) **17**; 1,04 g (8,4 mmol) 4-fluorbenzaldehyd. Termék: 1,07 g sárga por. Kitermelés: 64 %. Op: 334-336 °C (DMF)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,47 (bs, 1H); 8,04 (d, J= 2,40 Hz, 1H); 7,95 (d, J= 16,20 Hz, 1H); 7,82 (dd, J₁= 8,70 Hz, J₂= 2,40 Hz, 1H); 7,72 (m, 3H); 7,30 (t, J= 8,70 Hz, 2H); 6,95 (d, J= 16,20 Hz, 1H)

LCMS (ESI) *m/z* 301,2 (M+H)⁺; 298,9 (M-H)⁻; számított: 300,1Rt: 4,13 perc.

2-[(*E*)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]-6-klórkinazolin-4(3*H*)-on (36)

Bemérés: 1,40 g (7,2 mmol) **17**; 1,53 g (10,8 mmol) 3,4-difluorbenzaldehyd. Termék: 1,59 g sárga por. Kitermelés: 70 %. Op: 330-331 °C (DMF)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,48 (bs, 1H); 8,03 (s, 1H); 7,89 (d, J= 16,20 Hz, 1H); 7,79 (m, 2H); 7,68 (d, J= 8,70 Hz, 1H); 7,53 (m, 2H); 6,99 (d, J= 16,20 Hz, 1H)

LCMS (ESI) *m/z* 319,0 (M+H)⁺; 317,1 (M-H)⁻; számított: 318,0 Rt: 4,21 perc.

6-klór-2-[(*E*)-2-(4-metilszulfanilfenil)vinil]kinazolin-4(3*H*)-on (37)

Bemérés: 1,10 g (5,6 mmol) **17**; 1,27 g (8,4 mmol) 4-(metilszulfanil)benzaldehyd. Termék: 1,45 g sárga por. Kitermelés: 79 %. Op: 317-318 °C (DMF)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,38 (bs, 1H); 8,02 (s, 1H); 7,91 (d, J= 16,14 Hz, 1H); 7,80 (d, J= 8,61 Hz, 1H); 7,67 (d, J= 8,67 Hz, 1H); 7,59 (d, J= 7,98 Hz, 2H); 7,33 (d, J= 7,92 Hz, 2H); 6,95 (d, J= 16,02 Hz, 1H); 2,52 (s, 3H)

LCMS (ESI) *m/z* 329,1 (M+H)⁺; 327,1 (M-H)⁻; számított: 328,0 Rt: 4,38 perc.

6-klór-2-[(*E*)-2-(4-izopropilfenil)vinil]kinazolin-4(3*H*)-on (38)

Bemérés: 1,00 g (5,1 mmol) **17**; 1,13 g (7,6 mmol) 4-izopropilbenzaldehyd. Termék: 1,19 g sárga por. Kitermelés: 72 %. Op: 277-278 °C (DMF)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,25 (bs, 1H); 8,03 (d, J= 2,40 Hz, 1H); 7,93 (d, J= 16,15 Hz, 1H); 7,82 (dd, J¹= 8,76 Hz, J²= 2,51 Hz, 1H); 7,68 (d, J= 8,75 Hz, 1H); 7,57 (d, J= 8,12 Hz, 2H); 7,34 (d, J= 8,13 Hz, 2H); 6,94 (d, J= 16,14 Hz, 1H); 2,92 (m, 1H); 1,22 (d, J= 6,90 Hz, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 325,1 (M+H)⁺; 323,1 (M-H)⁻; számított: 324,1 Rt: 4,77 perc.

6-klór-2-[(*E*)-2-[4-(metilszulfonil)fenil]vinil]kinazolin-4(3*H*)-on (39)

Bemérés: 1,00 g (5,1 mmol) **17**; 1,41 g (7,6 mmol) 4-(metilszulfonil)benzaldehyd. Termék: 1,00 g sárga por. Kitermelés: 55 %. Op: 313-315 °C (DMF)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,48 (bs, 1H); 8,05 (d, J= 2,39 Hz, 1H); 7,99 (m, 3H); 7,91 (m, 2H); 7,85 (dd, J¹= 8,75 Hz, J²= 2,46 Hz, 1H); 7,72 (d, J= 8,73 Hz, 1H); 7,16 (d, J= 16,20 Hz, 1H); 3,25 (s, 3H)

LCMS (ESI) *m/z* 361,0 (M+H)⁺; 359,0 (M-H)⁻; számított: 360,0 Rt: 3,42 perc.

6-klór-2-[(*E*)-2-(2-tenil)vinil]kinazolin-4(3*H*)-on (40)

Bemérés: 1,00 g (5,1 mmol) **17**; 0,85 g (7,6 mmol) 2-tiofénkarbaldehyd. Termék: 1,04 g sárga por. Kitermelés: 71 %. Op: 321-322 °C (DMF)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,40 (bs, 1H); 8,12 (d, J= 15,60 Hz, 1H); 8,02 (s, 1H); 7,81 (d, J= 8,40 Hz, 1H); 7,68 (m, 2H); 7,49 (s, 1H); 7,16 (m, 1H); 6,72 (d, J= 15,60 Hz, 1H)

LCMS (ESI) *m/z* 289,0 (M+H)⁺; 287,0 (M-H)⁻; számított: 288,0 Rt: 3,99 perc.

7-klór-2-[(*E*)-2-(4-metoxifenil)vinil]kinazolin-4(3*H*)-on (41)

Bemérés: 1,00 g (5,1 mmol) **18**; 1,03 g (7,6 mmol) 4-metoxibenzaldehyd. Termék: 1,40 g sárga por. Kitermelés: 88 %. Op: 312-313 °C (DMF)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,37 (bs, 1H); 8,09 (d, J= 8,40 Hz, 1H); 7,92 (d, J= 16,20 Hz, 1H); 7,68 (d, J= 2,1 Hz, 1H); 7,62 (d, J= 8,70 Hz, 2H); 7,48 (dd, J¹= 8,46 Hz, J²= 1,98 Hz, 1H); 7,03 (d, J= 8,72 Hz, 2H); 6,85 (d, J= 16,20 Hz, 1H); 3,82 (s, 3H)

LCMS (ESI) *m/z* 313,2 (M+H)⁺; 311,0 (M-H)⁻; számított: 312,1 Rt: 4,14 perc.

2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]-7-klórkinazolin-4(3*H*)-on (42)

Bemérés: 1,00 g (5,1 mmol) **18**; 0,94 g (7,6 mmol) 4-fluorbenzaldehyd. Termék: 1,35 g vajszerű por. Kitermelés: 88 %. Op: 325-326 °C (DMF)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,46 (bs, 1H); 8,90 (d, J= 8,40 Hz, 1H); 7,96 (d, J= 16,20 Hz, 1H); 7,73 (m, 3H); 7,51 (dd, J¹= 8,40 Hz, J²= 1,80 Hz, 1H); 7,31 (t, J= 8,70 Hz, 2H); 6,94 (d, J= 16,20 Hz, 1H)

LCMS (ESI) *m/z* 301,2 (M+H)⁺; 298,9 (M-H)⁻; számított: 300,1 Rt: 4,22 perc.

6-fluor-2-[(*E*)-2-(4-metoxifenil)vinil]kinazolin-4(3*H*)-on (43)

Bemérés: 2,00 g (11,2 mmol) **19**; 2,28 g (16,8 mmol) 4-metoxibenzaldehyd. Termék: 2,50 g sárga por. Kitermelés: 75 %. Op: 298-299 °C (DMF)

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 12,35 (bs, 1H); 7,90 (d, $J=16,20$ Hz, 1H); 7,71 (m, 3H); 7,61 (d, $J=8,70$ Hz, 2H); 7,03 (d, $J=8,70$ Hz, 2H); 6,84 (d, $J=16,20$ Hz, 1H); 3,81 (s, 3H)

LCMS (ESI) m/z 297,2 (M+H) $^+$; 294,9 (M-H) $^-$; számított: 296,1 Rt: 3,70 perc.

6-fluor-2-[(E)-2-(4-fluorfenil)vinil]kinazolin-4(3H)-on (44)

Bemérés: 1,00 g (5,6 mmol) **19**; 1,04 g (8,4 mmol) 4-fluorbenzaldehyd. Termék: 1,49 g sárga por. Kitermelés: 94 %. Op: 309-311 °C (DMF)

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 12,42 (bs, 1H); 7,93 (d, $J=16,20$ Hz, 1H); 7,72 (m, 5H); 7,30 (t, $J=8,70$ Hz, 2H); 6,95 (d, $J=16,20$ Hz, 1H)

LCMS (ESI) m/z 285,2 (M+H) $^+$; 282,9 (M-H) $^-$; számított: 284,1 Rt: 3,79 perc.

6-fluor-2-[(E)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]kinazolin-4(3H)-on (45)

Bemérés: 1,10 g (5,6 mmol) **19**; 1,19 g (8,4 mmol) 3,4-difluorbenzaldehyd. Termék: 1,34 g sárga por. Kitermelés: 79 %. Op: 299-300 °C (DMF)

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 12,44 (bs, 1H); 7,88 (d, $J=16,20$ Hz, 1H); 7,65 (m, 4H); 7,51 (m, 2H); 6,98 (d, $J=15,90$ Hz, 1H)

LCMS (ESI) m/z 303,1 (M+H) $^+$; 300,9 (M-H) $^-$; számított: 302,1 Rt: 3,90 perc.

6-fluor-2-[(E)-2-(4-izopropilfenil)vinil]kinazolin-4(3H)-on (46)

Bemérés: 1,00 g (5,6 mmol) **19**; 1,24 g (8,4 mmol) 4-izopropilbenzaldehyd. Termék: 1,28 g sárga por. Kitermelés: 74 %. Op: 244-245 °C (DMF)

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 12,40 (bs, 1H); 7,91 (d, $J=16,20$ Hz, 1H); 7,71 (m, 3H); 7,58 (d, $J=8,10$ Hz, 2H); 7,33 (d, $J=8,10$ Hz, 2H); 6,94 (d, $J=15,90$ Hz, 1H); 2,92 (m, 1H); 1,22 (d, 6,90 Hz, 6H)

LCMS (ESI) m/z 309,1 (M+H) $^+$; 307,1 (M-H) $^-$; számított: 308,1 Rt: 4,45 perc.

6-bróm-2-[(E)-2-(4-metoxifenil)vinil]kinazolin-4(3H)-on (47)

Bemérés: 1,50 g (6,3 mmol) **20**; 1,27 g (9,4 mmol) 4-metoxibenzaldehyd. Termék: 1,80 g sárga por. Kitermelés: 80 %. Op: 324-325 °C (DMF)

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 12,39 (bs, 1H); 8,16 (s, 1H); 7,95 (s, 1H); 7,90 (m, 1H); 7,61 (m, 3H); 7,03 (d, $J=8,40$ Hz, 2H); 6,85 (d, $J=15,90$ Hz, 1H); 3,82 (s, 3H)

LCMS (ESI) m/z 357,2 (M+H) $^+$; 355,3 (M-H) $^-$; számított: 356,0 Rt: 4,15 perc.

6-bróm-2-[(E)-2-(4-fluorfenil)vinil]kinazolin-4(3H)-on (48)

Bemérés: 1,50 g (6,3 mmol) **20**; 1,16 g (9,4 mmol) 4-fluorbenzaldehyd. Termék: 1,50 g sárga por. Kitermelés: 69 %. Op: 340-341 °C (DMF)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,47 (bs, 1H); 8,18 (d, J= 2,40 Hz, 1H); 7,97 (m, 1H); 7,92 (s, 1H); 7,73 (m, 2H); 7,61 (d, J= 8,70 Hz, 1H); 7,30 (t, J= 9,00 Hz, 2H); 6,95 (d, J= 16,20 Hz, 1H)

LCMS (ESI) *m/z* 345,0 (M+H)⁺; 343,1 (M-H)⁻; számított: 344,0 Rt: 4,22 perc.

6-bróm-2-[(E)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]kinazolin-4(3H)-on (49)

Bemérés: 1,00 g (4,2 mmol) **20**; 0,89 g (6,3 mmol) 3,4-difluorbenzaldehyd. Termék: 1,09 g sárga por. Kitermelés: 72 %. Op: 337-338 °C (DMF)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,47 (bs, 1H); 8,18 (s, 1H); 7,94 (m, 2H); 7,78 (t, J= 9,30 Hz, 1H); 7,61 (d, J= 8,70 Hz, 1H); 7,52 (m, 2H); 6,99 (d, J= 15,90 Hz, 1H)

LCMS (ESI) *m/z* 363,0 (M+H)⁺; 360,8 (M-H)⁻; számított: 362,0 Rt: 4,30 perc.

6-bróm-2-[(E)-2-(2-tenil)vinil]kinazolin-4(3H)-on (50)

Bemérés: 1,10 g (4,6 mmol) **20**; 0,77 g (6,9 mmol) 2-tiofénkarbaldehyd. Termék: 1,10 g barna por. Kitermelés: 72 %. Op: 326-327 °C (DMF)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,41 (bs, 1H); 8,16 (s, 1H); 8,13 (d, J= 15,59 Hz, 1H); 7,92 (dd, J¹= 8,70 Hz, J²= 2,41 Hz, 1H); 7,70 (d, J=4,80 Hz, 1H); 7,59 (d, J= 8,70 Hz, 1H); 7,49 (d, J= 3,30 Hz, 1H); 7,16 (dd, J¹= 4,80 Hz, J²= 3,60 Hz, 1H); 6,72 (d, J= 15,60 Hz, 1H)

LCMS (ESI) *m/z* 333,0 (M+H)⁺; 331,0 (M-H)⁻; számított: 332,0 Rt: 4,08 perc.

6,8-dibróm-2-[(E)-2-(4-fluorfenil)vinil]kinazolin-4(3H)-on (51)

Bemérés: 2,00 g (6,3 mmol) **21**; 1,17 g (9,4 mmol) 4-fluorbenzaldehyd. Termék: 1,82 g barna por. Kitermelés: 68 %. Op: 319-321 °C (DMF)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,50 (bs, 1H); 8,21 (s, 1H); 8,13 (s, 1H); 7,92 (d, J= 15,99 Hz, 1H); 7,73 (m, 2H); 7,28 (m, 2H); 6,93 (d, J= 16,44 Hz, 1H)

LCMS (ESI) *m/z* 422,9 (M+H)⁺; 420,8 (M-H)⁻; számított: 421,9 Rt: 4,93 perc.

8-bróm-2-[(E)-2-(4-fluorfenil)vinil]kinazolin-4(3H)-on (52)

Bemérés: 1,50 g (6,3 mmol) **22**; 1,17 g (9,4 mmol) 4-fluorbenzaldehyd. Termék: 1,41 g barna por. Kitermelés: 65 %. Op: 289-290 °C (DMF)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,34 (bs, 1H); 8,11 (t, J= 6,51 Hz, 2H); 7,97 (d, J= 16,08 Hz, 1H); 7,74 (dd, J¹= 8,61 Hz, J²= 5,61 Hz, 2H); 7,38 (t, J= 7,80 Hz, 1H); 7,31 (t, J= 8,82 Hz, 2H); 6,95 (d, J= 16,14 Hz, 1H)

LCMS (ESI) *m/z* 345,0 (M+H)⁺; 343,0 (M-H)⁻; számított: 344,0 Rt: 4,28 perc.

2-[(*E*)-2-(4-metoxifenil)vinil]-7-nitrokinazolin-4(3*H*)-on (53)

Bemérés: 2,30 g (11,2 mmol) **23**; 2,28 g (16,8 mmol) 4-metoxibenzaldehyd. Termék: 1,98 g sárga por. Kitermelés: 54 %. Op: 342-344 °C (DMF)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,56 (bs, 1H); 8,30 (s, 1H); 8,28 (d, J= 9,81 Hz, 1H); 8,13 (d, J= 7,5 Hz, 1H); 7,98 (d, J= 15,60 Hz, 1H); 7,62 (d, J= 7,50 Hz, 2H); 7,03 (d, J= 7,5 Hz, 2H); 6,86 (d, J= 16,20 Hz, 1H); 3,82 (s, 3H)

LCMS (ESI) *m/z* 324,2 (M+H)⁺; 322,0 (M-H)⁻; számított: 323,1 Rt: 3,96 perc.

2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]-7-nitrokinazolin-4(3*H*)-on (54)

Bemérés: 1,00 g (4,9 mmol) **23**; 0,91 g (7,3 mmol) 4-fluorbenzaldehyd. Termék: 1,51 g világosbarna por. Kitermelés: 100 % (oldószer szennyezi). Op: 338-339 °C (DMF)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,65 (bs, 1H); 8,32 (m, 2H); 8,17 (dd, J¹= 8,70 Hz, J²= 2,16 Hz, 1H); 8,02 (d, J= 16,20 Hz, 1H); 7,74 (q, J= 5,58 Hz, 2H); 7,32 (t, J= 8,70 Hz, 2H); 6,97 (d, J= 16,20 Hz, 1H)

LCMS (ESI) *m/z* 312,2 (M+H)⁺; 310,0 (M-H)⁻; számított: 311,1 Rt: 4,01 perc.

6,7-dimetoxi-2-[(*E*)-2-(4-metoxifenil)vinil]kinazolin-4(3*H*)-on (55)

Bemérés: 1,80 g (8,2 mmol) **24**; 1,67 g (12,3 mmol) 4-metoxibenzaldehyd. Termék: 1,40 g világosbarna por. Kitermelés: 50 %. Op: 309-311 °C (DMF)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,10 (bs, 1H); 7,84 (d, J= 16,20 Hz, 1H); 7,56 (d, J= 8,10 Hz, 2H); 7,43 (s, 1H); 7,11 (s, 1H); 7,00 (d, J= 8,10 Hz, 2H); 6,79 (d, J= 15,90 Hz, 1H); 3,91 (s, 3H); 3,87 (s, 3H); 3,80 (s, 3H)

LCMS (ESI) *m/z* 339,3 (M+H)⁺; 337,1 (M-H)⁻; számított: 338,1 Rt: 3,26 perc.

6,7-dimetoxi-2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]kinazolin-4(3*H*)-on (56)

Bemérés: 1,60 g (7,3 mmol) **24**; 1,35 g (10,9 mmol) 4-fluorbenzaldehyd. Termék: 2,1 g világosbarna por. Kitermelés: 88 %. Op: 318-320 °C (DMF)

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 7,88 (d, $J= 16,11$ Hz, 1H); 7,69 (m, 2H); 7,45 (s, 1H); 7,30 (t, $J= 8,91$ Hz, 2H); 7,14(s,1H); 6,91(d, $J= 16,17$ Hz, 1H); 3,91 (s, 3H); 3,87 (s, 3H)

LCMS (ESI) m/z 327,2 (M+H) $^+$; 325,0 (M-H) $^-$; számított: 326,1 Rt: 3,40 perc.

2-[(*E*)-2-(4-metoxifenil)vinil]benzo[g]kinazolin-4(3*H*)-on (57)

Bemérés: 1,00 g (4,7 mmol) **25** (77%-os); 0,96 g (7,0 mmol) 4-metoxibenzaldehyd.

Termék: 1,10 g sárga por. Kitermelés: 93 % (A várt termékre számolva). A várt termék DMF-ből kristályosodik. Op: 293-296 °C (DMF)

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 12,05 (bs, 1H); 8,80 (s, 1H); 8,19 (m, 2H); 8,08 (d, $J= 7,71$ Hz, 1H); 7,95 (d, $J= 16,35$ Hz, 1H); 7,60 (m, 4H); 7,04 (d, $J= 6,81$ Hz, 2H); 6,89 (d, $J= 16,02$ Hz, 1H); 3,82 (s, 3H)

LCMS (ESI) m/z 329,2 (M+H) $^+$; 327,0 (M-H) $^-$; számított: 328,1 Rt: 4,03 perc.

2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]benzo[g]kinazolin-4(3*H*)-on (58)

Bemérés: 1,00 g (4,7 mmol) **25** (77%-os); 0,87 g (7,0 mmol) 4-fluorbenzaldehyd.

Termék: 1,01 g sárgásbarna por. Kitermelés: 88 % (A várt termékre számolva). A várt termék DMF-ből kristályosodik. Op: 344-346 °C (DMF)

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 11,50 (bs, 1H); 8,82 (s, 1H); 8,31 (s, 1H); 8,22 (d, $J= 6,96$ Hz, 1H); 8,09 (d, $J= 7,80$ Hz, 1H); 7,97 (d, $J= 16,71$ Hz, 1H); 7,64 (m, 4H); 7,32 (t, $J= 8,79$ Hz, 2H); 7,01 (d, $J= 16,02$ Hz, 1H)

LCMS (ESI) m/z 317,2 (M+H) $^+$; 315,0 (M-H) $^-$; számított: 316,0 Rt: 4,18 perc.

2-[(*E*)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]benzo[g]kinazolin-4(3*H*)-on (59)

Bemérés: 1,00 g (4,7 mmol) **25** (77%-os); 1,00 g (7,0 mmol) 3,4-difluorbenzaldehyd.

Termék: 1,12 g barna por. Kitermelés: 92 % (A várt termékre számolva). A várt termék DMF-ből kristályosodik. Op: >350 °C (DMF)

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 9,39 (bs, 1H); 8,84 (s, 1H); 8,32 (m, 2H); 8,10 (d, $J= 7,75$ Hz, 1H); 7,94 (d, $J= 15,90$ Hz, 1H); 7,82 (m, 1H); 7,62 (m, 4H); 7,06 (d, $J= 16,13$ Hz, 1H)

LCMS (ESI) m/z 335,3 (M+H) $^+$; 333,0 (M-H) $^-$; számított: 334,1 Rt: 4,28 perc.

2-[(E)-2-(4-klórfenil)vinil]benzo[g]kinazolin-4(3H)-on (60)

Bemérés: 1,00 g (4,7 mmol) **25** (77%-os); 1,32 g (9,4 mmol) 4-klórbenzaldehyd.

Termék: 0,91 g sárga por. Kitermelés: 76 % (A várt termékre számolva). A várt termék

DMF-ből kristályosodik. Op: 340-343 °C (DMF)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,50 (bs, 1H); 8,82 (s, 1H); 8,24 (s, 1H); 8,19 (d, J= 7,38 Hz, 1H); 8,10 (d, J= 7,95 Hz, 1H); 7,99 (d, J= 15,93 Hz, 1H); 7,70 (m, 3H); 7,55 (m, 3H); 7,60 (d, J= 16,26 Hz, 1H)

LCMS (ESI) *m/z* 333,1 (M+H)⁺; 330,9 (M-H)⁻; számított: 332,1 Rt: 4,53 perc.

2-[(E)-2-(2-tenil)vinil]benzo[g]kinazolin-4(3H)-on (61)

Bemérés: 1,00 g (4,7 mmol) **25** (77%-os); 0,79 g (7,0 mmol) 2-tiofénkarbaldehyd.

Termék: 0,69 barna por. Kitermelés: 63 % (A várt termékre számolva). A várt termék

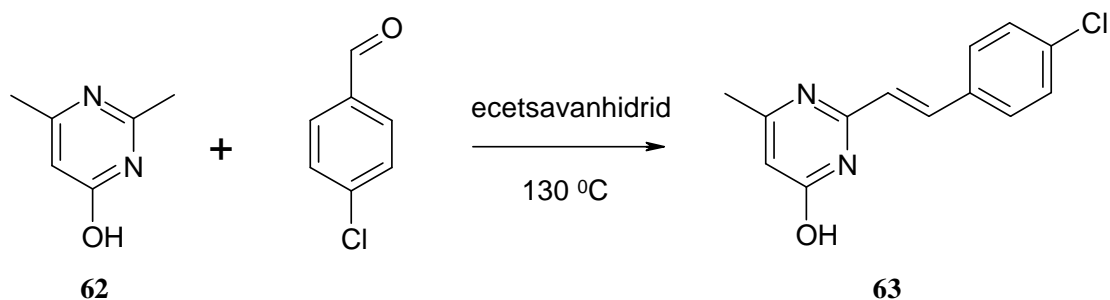
DMF-ből kristályosodik. Op: 290-292 °C (DMF)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,06 (bs, 1H); 8,80 (s, 1H); 8,19 (m, 3H); 8,08 (d, J= 8,25 Hz, 1H); 7,67 (m, 2H); 7,56 (t, J= 7,50 Hz, 1H); 7,50(s, 1H); 7,16 (t, J= 3,90 Hz, 1H); 6,77 (d, J= 15,60 Hz, 1H)

LCMS (ESI) *m/z* 305,0 (M+H)⁺; 303,1 (M-H)⁻; számított: 304,1 Rt: 4,04 perc.

6.2.2.3 Sztiril-pirimidin intermedier előállítása 4-klórbenzaldehyd felhasználásával

A kiindulási 2,6-dimetil-4-hidroxipirimidint (**62**) a Sigma Aldrich Kft.-től vásároltuk.



20. ábra Sztiril-pirimidin származék előállítása.

A 2,6-dimetil-4-hidroxipirimidinből 1,00 grammot (8 mmol) szuszpendáltam 30 ml ecetsavanhidridben és hozzáadtam 1,24 gramm (8 mmol) 4-klórbenzaldehydet. A keveréket 130 °C-on forraltam. Az anyagok melegítés hatására beoldódtak. A reakciót (20. ábra) VRK segítségével követtem (eluens: kloroform/metanol 9:1). A reakció 3 nap alatt ment végbe. Az oldatot bepároltam, az anyagot pedig DMF-ből kristályosítottam, szűrtem majd éterrel mostam. 1 napig exsikkátorban szárítottam.

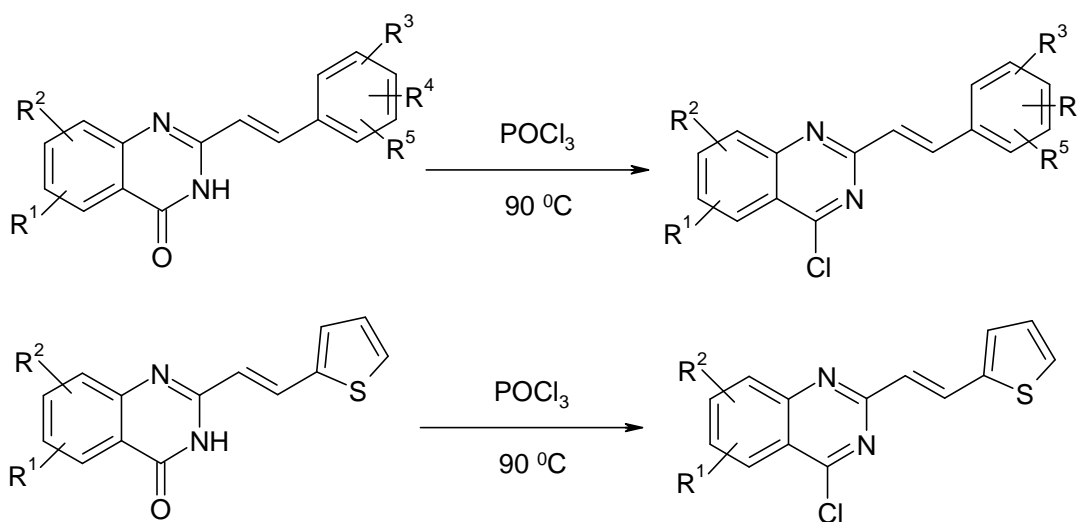
2-[(E)-2-(4-klórfenil)vinil]-6-metilpirimidin-4-ol (63)

Bemérés: 1,00 g (8,0 mmol) **63**; 1,68 g (12,0 mmol) 4-klórbenzaldehyd. Termék: 0,43 g világosbarna por. Kitermelés: 22 %. Op: 244-245 °C (DMF)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,34 (bs, 1H); 7,83 (d, J= 15,90 Hz, 1H); 7,65 (d, J= 8,1 Hz, 2H); 7,50 (d, J= 7,80 Hz, 2H); 6,90 (d, J= 16,20 Hz, 1H); 6,08 (s, 1H); 2,21 (s, 3H)

LCMS (ESI) *m/z* 247,1 (M+H)⁺; 245,1 (M-H)⁻; számított: 246,1 Rt: 3,18 perc.

6.2.2.4 Szubsztituált 2-[(E)-2-(fenil)vinil]-4-klórkinazolin és 4-klór-2-[(E)-2-(2-tenil)vinil]kinazolin intermedierek előállítás



21. ábra A vegyületek klórozása foszforil-klorid alkalmazásával.

A vegyületek klórozását kétféle módon végeztem. Az esetek döntő többségében tiszta foszforil-kloridban (20-30 ml) elkevertem a kinazolon származékot (1 mmol) és katalitikus mennyiségű DMF-et adtam a szuszpenzióhoz (21. ábra). Pár származék esetén toluolban szuszpendáltam a kinazolont (1 mmol), 1,5 mmol mennyiségű dimetilamino-piridint adtam az elegyhez és végül hozzácsepegtettem 3 mmol foszforil-kloridot. Mindkét esetben 90 °C-on kevertetem az oldatokat 12 órán keresztül. Melegítés hatására a kiindulási vegyületek a reakció kezdetén beoldódtak. A feldolgozás során az oldatokat bepároltam és a termékeket kloroformban oldottam. Vízzel és 10 %-os NaHCO₃ oldattal mostam a szerves fázist, majd MgSO₄-tal kevertetve szárítottam. A termékek tisztaságát VRK-val (eluens: kloroform/metanol 9:1) ellenőriztem. Sokszor már a vékonyrétegen történő futtatás során is megjelent a

kiindulási anyag (bomlástermék) foltja, ezért analitikai vizsgálatokat (LCMS, NMR) nem végeztem, hanem a preparálást követően az imin-kloridokat elreagáltattam.

2-[(E)-2-(4-fluorfenil)vinil]-4-klórkinazolin (64)

Bemérés: 1,60 g (6,0 mmol) **26**. Termék: 1,71 g narancssárga por. Kitermelés: 100 %.

2-[(E)-2-(3-fluorfenil)vinil]-4-klórkinazolin (65)

Bemérés: 0,57 g (2,1 mmol) **27**. Termék: 0,53 g barna por. Kitermelés: 88 %.

2-[(E)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]-4-klórkinazolin (66)

Bemérés: 1,20 g (4,0 mmol) **28**. Termék: 0,84 g barna por. Kitermelés: 69 %.

4-klór-2-[(E)-2-[4-(metilszulfanil)fenil]vinil]kinazolin (67)

Bemérés: 1,10 g (3,7 mmol) **29**. Termék: 1,16 g narancssárga por. Kitermelés: 100 %.

4-klór-2-[(E)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]kinazolin (68)

Bemérés: 1,00 g (2,9 mmol) **30**. Termék: 0,70 g narancssárga por. Kitermelés: 68 %.

2-[(E)-2-(4-izopropilfenil)vinil]-4-klórkinazolin (69)

Bemérés: 0,90 g (3,1 mmol) **31**. Termék: 0,84 g narancssárga por. Kitermelés: 88 %.

4-klór-2-[(E)-2-[4-(metilszulfonil)fenil]vinil]kinazolin (70)

Bemérés: 1,30 g (4,0 mmol) **32**. Termék: 0,89 g barna por. Kitermelés: 65 %.

4-klór-2-[(E)-2-(2-tenil)vinil]kinazolin (71)

Bemérés: 0,79 g (3,1 mmol) **33**. Termék: 0,61 g barna por. Kitermelés: 72 %.

4,6-diklór-2-[(E)-2-(4-metoxifenil)vinil]kinazolin (72)

Bemérés: 1,22 g (3,9 mmol) **34**. Termék: 1,29 g narancssárga por. Kitermelés: 100 %.

2-[(E)-2-(4-fluorfenil)vinil]-4,6-diklórkinazolin (73)

Bemérés: 1,49 g (5,3 mmol) **35**. Termék: 1,60 g narancssárga por. Kitermelés: 100 %.

2-[(E)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]-4,6-diklórkinazolin (74)

Bemérés: 1,50 g (4,7 mmol) **36**. Termék: 1,57 g barna por. Kitermelés: 99 %.

4,6-diklór-2-[(E)-2-[4-(metilszulfanil)fenil]vinil]kinazolin (75)

Bemérés: 1,45 g (4,4 mmol) **37**. Termék: 1,50 g narancssárga por. Kitermelés: 98 %.

2-[(E)-2-(4-izopropilfenil)vinil]-4,6-diklórkinazolin (76)

Bemérés: 1,10 g (3,4 mmol) **38**. Termék: 1,14 g narancssárga por. Kitermelés: 98 %.

4,6-diklór-2-[(E)-2-[4-(metilszulfonil)fenil]vinil]kinazolin (77)

Bemérés: 1,00 g (2,8 mmol) **39**. Termék: 0,95 g barna por. Kitermelés: 89 %.

4,6-diklór-2-[(E)-2-(2-tenil)vinil]kinazolin (78)

Bemérés: 1,04 g (3,6 mmol) **40**. Termék: 0,79 g barna por. Kitermelés: 72 %.

4,7-diklór-2-[(E)-2-(4-metoxifenil)vinil]kinazolin (79)

Bemérés: 1,35 g (4,3 mmol) **41**. Termék: 1,42 g narancssárga por. Kitermelés: 100 %.

2-[(E)-2-(4-fluorfenil)vinil]-4,7-diklórkinazolin (80)

Bemérés: 1,30 g (4,3 mmol) **42**. Termék: 1,37 g vajszínű por. Kitermelés: 100 %.

6-fluor-4-klór-2-[(E)-2-(4-metoxifenil)vinil]kinazolin (81)

Bemérés: 1,00 g (3,4 mmol) **43**. Termék: 0,99 g narancssárga por. Kitermelés: 94 %.

6-fluor-2-[(E)-2-(4-fluorfenil)vinil]-4-klórkinazolin (82)

Bemérés: 1,49 g (5,2 mmol) **44**. Termék: 1,48 g narancssárga por. Kitermelés: 94 %.

6-fluor-2-[(E)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]-4-klórkinazolin (83)

Bemérés: 1,28 g (4,2 mmol) **45**. Termék: 1,30 g narancssárga por. Kitermelés: 97 %.

6-fluor-2-[(E)-2-(4-izopropilfenil)vinil]-4-klórkinazolin (84)

Bemérés: 1,30 g (4,2 mmol) **46**. Termék: 1,00 g narancssárga por. Kitermelés: 73 %.

6-bróm-4-klór-2-[(E)-2-(4-metoxifenil)vinil]kinazolin (85)

Bemérés: 1,00 g (2,8 mmol) **47**. Termék: 0,99 g narancssárga por. Kitermelés: 94 %.

6-bróm-2-[(E)-2-(4-fluorfenil)vinil]-4-klórkinazolin (86)

Bemérés: 1,20 g (3,5 mmol) **48**. Termék: 1,24 g világosbarna por. Kitermelés: 98 %.

6-bróm-2-[(E)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]-4-klórkinazolin (87)

Bemérés: 0,95 g (2,6 mmol) **49**. Termék: 0,96 g barna por. Kitermelés: 97 %.

6-bróm-4-klór-2-[(E)-2-(2-tenil)vinil]kinazolin (88)

Bemérés: 1,10 g (3,3 mmol) **50**. Termék: 0,95 g narancssárga por. Kitermelés: 82 %.

6,8-dibróm-2-[(E)-2-(4-fluorfenil)vinil]-4-klórkinazolin (89)

Bemérés: 1,10 g (2,3 mmol) **51**. Termék: 0,96 g barna por. Kitermelés: 95 %.

8-bróm-2-[(E)-2-(4-fluorfenil)vinil]-4-klórkinazolin (90)

Bemérés: 1,40 g (4,0 mmol) **52**. Termék: 1,40 g barna por. Kitermelés: 95 %.

4-klór-2-[(E)-2-(4-metoxifenil)vinil]-7-nitrokinazolin (91)

Bemérés: 1,50 g (4,6 mmol) **53**. Termék: 1,57 g narancssárga por. Kitermelés: 100 %.

2-[(E)-2-(4-fluorfenil)vinil]-4-klór-7-nitrokinazolin (92)

Bemérés: 1,60 g (5,1 mmol) **54**. Termék: 1,40 g sárga por. Kitermelés: 83 %.

4-klór-6,7-dimetoxi-2-[(E)-2-(4-metoxifenil)vinil]kinazolin (93)

Bemérés: 1,50 g (4,4 mmol) **55**. Termék: 1,30 g narancssárga por. Kitermelés: 83 %.

2-[(E)-2-(4-fluorfenil)vinil]-4-klór-6,7-dimetoxikinazolin (94)

Bemérés: 1,50 g (4,6 mmol) **56**. Termék: 1,58 g narancssárga por. Kitermelés: 100 %.

4-klór-2-[(E)-2-(4-metoxifenil)vinil]benzo[g]kinazolin (95)

Bemérés: 1,10 g (3,3 mmol) **57**. Termék: 0,81 g narancssárga por. Kitermelés: 71 %.

2-[(E)-2-(4-fluorfenil)vinil]-4-klór-benzo[g]kinazolin (96)

Bemérés: 1,20 g (3,8 mmol) **58**. Termék: 0,98 g narancssárga por. Kitermelés: 77 %.

2-[(E)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]-4-klór-benzo[g]kinazolin (97)

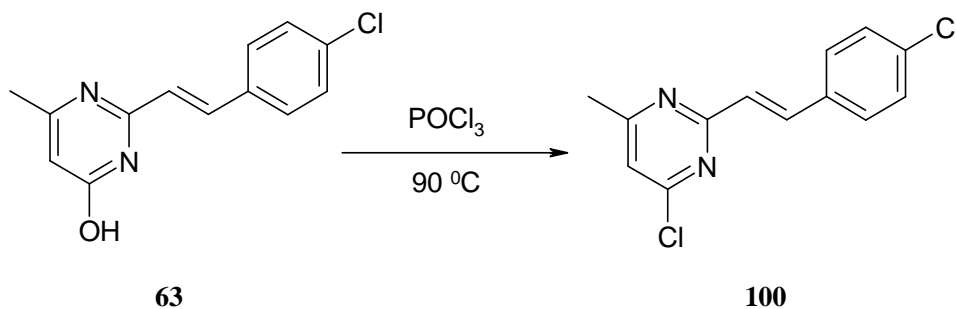
Bemérés: 1,00 g (3,0 mmol) **59**. Termék: 1,06 g narancssárga por. Kitermelés: 99 %.

4-klór-2-[(E)-2-(4-klórfenil)vinil]benzo[g]kinazolin (98)

Bemérés: 0,90 g (2,7 mmol) **60**. Termék: 0,732 g narancssárga por. Kitermelés: 77 %.

4-klór-2-[(E)-2-(2-tenil)vinil]benzo[g]kinazolin (99)

Bemérés: 0,69 g (2,3 mmol) **61**. Termék: 0,74 g barna por. Kitermelés: 100 %.

6.2.2.5 Sztiril-pirimidin intermedier klórozása

22. ábra Imin-klorid kialakítása a sztiril-pirimidin származék esetén.

Toluolban szuszpendáltam a 0,39 g (1,6 mmol) kiindulási anyagot (**63**) és 0,29 g (2,3 mmol) dimetilamino-piridint. Ezt követően 0,96 g (0,59 ml, 6,3 mmol) foszforil-kloridot csepegtettem a reakcióelegyhez és 90 °C-on kevertetem 12 órán keresztül (22.

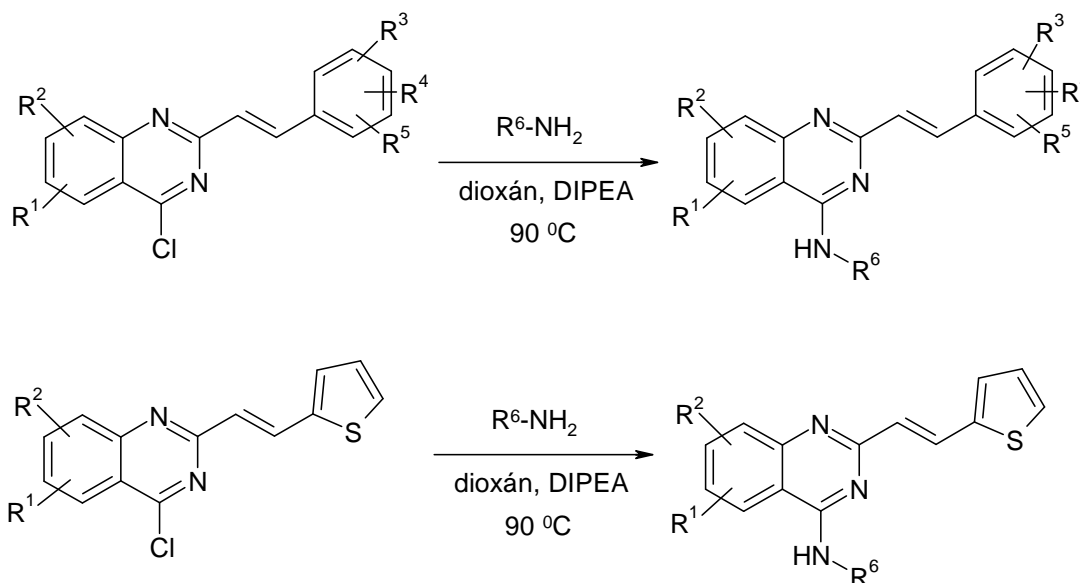
ábra). A bepárlást követően a terméket oldottam kloroformban és vízzel, majd 10 %-os NaHCO₃ oldattal mostam a szerves fázist. Az oldatot MgSO₄-tal kevertetem, majd a szűrés és a bepárlás után a terméket exszikkátorban szárítottam. A termék tisztaságát VRK-val (eluens: kloroform/metanol 9:1) ellenőriztem.

4-klór-2-[(E)-2-(4-klórphenil)vinil]-6-metilpirimidin (100)

Bemérés: 0,39 g (1,6 mmol) **63**. Termék: 0,34 g narancssárga por. Kitermelés: 81 %.

6.2.2.6 Szubsztituált sztiril-kinazolin végtermékek előállítása

Az imin-klorid származékból feloldottam 1 mmol-t 10 ml vízmentes dioxánban. A kissé zavaros oldathoz 1 mmol diizopropil-etilamint adtam, melynek hatására az oldat kitisztult. A megfelelő primer amin származékból 2 mmol-t pipettáztam a reakcióelegyhez, majd a lombikot átöblítettem argonnal. 12 órán keresztül 90 °C-on kevertetem az oldatot, a reakciót (23. ábra) kloroform/metanol 9:1 arányú elegyét használva vékonyrétegen követtem.



23. ábra Sztiril-kinazolin végtermékek előállítása.

A feldolgozás során az oldatot bepároltam, majd a különböző származékok esetén mennyiségtől függően oszlopon és/vagy preparatív vékonyrétegen tisztítottam a vegyületeket. Eluensként minden esetben kloroform/metanol 9:1 arányú elegyét használtam. A termékeket szabad bázis vagy só (sósav só, oxálsav só, citromsav só, fumársav só és trifluoecetsav só) formájában preparáltam. A sóképzés során a szabad

bázist feloldottam etanolban, majd ekvivalens mennyiségben adtam hozzá a megfelelő savat. Sósavas sók preparálása esetén 4M HCl-t tartalmazó dioxánt használtam. Az így kapott oldatot bepároltam, a keletkező sót etil-acetátos mosást követően szűrtem.

A sóként preparált termékek esetén a termeléseket a sóra vonatkoztatva adtam meg.

2-[(*E*)-2-(4-metoxifenil)vinil]-*N*-(3-morfolin-4-il-propil)kinazolin-4-amin (101)

Bemérés: 0,45 g (1,5 mmol) **2**; 0,43 g (3,0 mmol) 3-(morfolin-4-il)propán-1-amin.

Termék: 0,098 g sárga por (oxálsav só). Kitermelés: 13 %.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,66 (bs, 1H); 8,24 (d, J= 7,74 Hz, 1H); 7,96 (d, J= 15,78 Hz, 1H); 7,79 (t, J= 7,65 Hz, 1H); 7,69 (m, 3H); 7,51 (t, J= 7,05 Hz, 1H); 7,03 (m, 3H); 3,81 (s, 3H); 3,73 (m, 6H); 2,95 (m, 6H); 2,05 (m, 2H)

LCMS (ESI) *m/z* 405,4 (M+H)⁺; 403,1 (M-H)⁻; számított: 404,2 Rt: 0,46; 2,03; 2,21 perc.

***N*-[3-(4-metilpiperazin-1-il)-propil]-2-[(*E*)-2-(4-metoxifenil)vinil]kinazolin-4-amin (102)**

Bemérés: 0,41 g (1,4 mmol) **2**; 0,44 g (2,8 mmol) 3-(4-metilpiperazin-1-il)propán-1-amin. Termék: 0,140 g sárga por (oxálsav só). Kitermelés: 28 %.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,93 (bs, 1H); 8,28 (d, J= 8,04 Hz, 1H); 8,14 (d, J= 15,51 Hz, 1H); 7,93 (t, J= 7,50 Hz, 1H); 7,72 (m, 3H); 7,64 (t, J= 7,41 Hz, 1H); 7,10 (d, J= 16,11 Hz, 1H); 7,02 (d, J= 8,04 Hz, 2H); 3,81 (s, 3H); 3,64 (m, 2H); 3,02 (m, 4H); 2,76 (m, 2H); 2,66 (m, 4H); 2,62 (s, 3H); 1,94 (m, 2H)

LCMS (ESI) *m/z* 418,3 (M+H)⁺; 416,1 (M-H)⁻; számított: 417,3 Rt: 0,46; 1,71; 2,13 perc.

***N'*-{2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]kinazolin-4-il}-*N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin (103)**

Bemérés: 0,52 g (1,8 mmol) **64**; 0,37 g (3,6 mmol) *N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,127 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 20 %. Op: 114-117 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,28 (t, J= 5,01 Hz, 1H); 8,16 (d, J= 8,19 Hz, 1H); 7,89 (d, J= 15,87 Hz, 1H); 7,75 (m, 3H); 7,67 (t, J= 8,55 Hz, 1H); 7,45 (t, J= 7,08 Hz, 1H); 7,25 (t, J= 8,76 Hz, 2H); 7,09 (d, J= 15,93 Hz, 1H); 3,66 (q, J= 6,12 Hz, 2H); 2,43 (t, J= 6,81 Hz, 2H); 2,23 (s, 6H); 1,86 (m, 2H)

LCMS (ESI) *m/z* 351,3 (M+H)⁺; 349,1 (M-H)⁻; számított: 350,2 Rt: 0,46; 2,19 perc.

***N,N*-dietyl-*N'*-{2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]kinazolin-4-il}propán-1,3-diamin (104)**

Bemérés: 0,52 g (1,8 mmol) **64**; 0,47 g (3,6 mmol) *N,N*-dietylpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,214 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 31 %. Op: 158-160 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 10,10 (bs, 1H); 8,43 (bs, 1H); 8,24 (d, J= 8,10 Hz, 1H); 7,93 (d, J= 15,90 Hz, 1H); 7,77 (m, 3H); 7,67 (d, J= 7,50 Hz, 1H); 7,47 (t, J= 6,90 Hz, 1H); 7,25 (t, J= 9,00 Hz, 2H); 7,10 (d, J= 15,90 Hz, 1H); 3,73 (q, J= 5,73 Hz, 2H); 3,09 (m, 6H); 2,09 (m, 2H); 1,18 (t, J= 6,90 Hz, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 379,4 (M+H)⁺; 377,1 (M-H)⁻; számított: 378,2 Rt: 0,45; 1,97; 2,28 perc.

2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]-*N*-(3-morfolin-4-il-propil)kinazolin-4-amin (105)

Bemérés: 0,52 g (1,8 mmol) **64**; 0,52 g (3,6 mmol) 3-(morfolin-4-il)propán-1-amin.

Termék: 0,418 g sárga por (oxálsav só). Kitermelés: 48 %.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,54 (bs, 1H); 8,23 (d, J= 8,13 Hz, 1H); 7,95 (d, J= 15,87 Hz, 1H); 7,79 (m, 3H); 7,71 (d, J= 7,74 Hz, 1H); 7,50 (t, J= 7,62 Hz, 1H); 7,27 (t, J= 8,79 Hz, 2H); 7,14 (d, J= 15,90 Hz, 1H); 3,75 (m, 6H); 3,01 (m, 6H); 2,06 (m, 2H)

LCMS (ESI) *m/z* 393,4 (M+H)⁺; 391,1 (M-H)⁻; számított: 392,2 Rt: 0,46; 1,93; 2,21 perc.

***N'*-{2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]kinazolin-4-il}-*N,N*-dimetiletán-1,2-diamin (106)**

Bemérés: 0,33 g (1,2 mmol) **64**; 0,21 g (2,4 mmol) *N,N*-dimetiletán-1,2-diamin.

Termék: 0,185 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 46 %. Op: 152-154 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,17 (bs, 1H); 8,16 (s, 1H); 7,90 (d, J= 15,93 Hz, 1H); 7,73 (m, 3H); 7,68 (m, 1H); 7,45 (m, 1H); 7,27 (m, 2H); 7,10 (d, J= 15,81 Hz, 1H); 3,75 (m, 2H); 2,60 (m, 2H); 2,28 (s, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 337,3 (M+H)⁺; 335,0 (M-H)⁻; számított: 336,2 Rt: 0,45; 2,03 perc.

***N,N*-dietyl-*N'*-{2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]kinazolin-4-il}etán-1,2-diamin (107)**

Bemérés: 0,33 g (1,2 mmol) **64**; 0,28 g (2,4 mmol) *N,N*-dietyl-1,2-diamin. Termék:

0,161 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 37 %. Op: 90-92 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,21 (bs, 1H); 8,15 (d, J= 7,68 Hz, 1H); 7,90 (d, J= 15,81 Hz, 1H); 7,70 (m, 4H); 7,45 (m, 1H); 7,25 (t, J= 8,25 Hz, 2H); 7,10 (d, J= 16,14 Hz, 1H); 3,72 (m, 2H); 2,73 (m, 2H); 2,63 (m, 4H); 1,04 (t, J= 6,77 Hz, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 365,3 (M+H)⁺; 363,0 (M-H)⁻; számított: 364,2 Rt: 0,44; 2,11 perc.

***N*¹,*N*¹-dietyl-*N*⁴-{2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]kinazolin-4-il}pentán-1,4-diamin (108)**

Bemérés: 0,33 g (1,2 mmol) **64**; 0,38 g (2,4 mmol) *N*¹,*N*¹-dietylpentán-1,4-diamin.

Termék: 0,197 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 40 %.

Op: 112-114 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,30 (d, J= 7,62 Hz, 1H); 7,73 (m, 6H); 7,44 (m, 1H); 7,24 (t, J= 8,28 Hz, 2H); 7,08 (d, J= 15,84 Hz, 1H); 4,66 (m, 1H); 2,50 (m, 6H); 1,62 (m, 4H); 1,29 (m, 3H); 0,90 (t, J= 6,68 Hz, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 407,3 (M+H)⁺; 405,3 (M-H)⁻; számított: 406,3 Rt: 0,45; 2,08; 2,40 perc.

***N*'-{2-[(*E*)-2-(3-fluorfenil)vinil]kinazolin-4-il}-*N,N*-dimetylpropán-1,3-diamin (109)**

Bemérés: 0,26 g (0,9 mmol) **65**; 0,18 g (1,8 mmol) *N,N*-dimetylpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,166 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 53 %. Op: 95-96 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,32 (bs, 1H); 8,18 (d, J= 6,39 Hz, 1H); 7,89 (d, J= 15,72 Hz, 1H); 7,72 (m, 2H); 7,53 (m, 4H); 7,20 (m, 2H); 3,67 (m, 2H); 2,49 (m, 2H); 2,26 (m, 6H); 1,88 (m, 2H)

LCMS (ESI) *m/z* 351,3 (M+H)⁺; 349,0 (M-H)⁻; számított: 350,2 Rt: 0,45; 2,13 perc.

***N,N*-dietyl-*N*'-{2-[(*E*)-2-(3-fluorfenil)vinil]kinazolin-4-il}propán-1,3-diamin (110)**

Bemérés: 0,26 g (0,9 mmol) **65**; 0,23 g (1,8 mmol) *N,N*-dietylpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,062 g világossárga por (HCl só). Kitermelés: 17 %.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 15,00 (bs, 1H); 10,49 (s, 1H); 10,41 (bs, 1H); 8,64 (d, J= 6,78 Hz, 1H); 8,37 (d, J= 15,90 Hz, 1H); 7,98 (m, 2H); 7,66 (m, 4H); 7,40 (m, 2H); 3,95 (m, 2H); 3,24 (m, 2H); 3,10 (m, 4H); 2,17 (m, 2H); 1,21 (t, J= 6,79 Hz, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 379,4 (M+H)⁺; 377,4 (M-H)⁻; számított: 378,2 Rt: 0,45; 1,90; 2,27 perc.

***N*'-{2-[(*E*)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]kinazolin-4-il}-*N,N*-dimetylpropán-1,3-diamin (111)**

Bemérés: 0,20 g (0,7 mmol) **66**; 0,14 g (1,4 mmol) *N,N*-dimetylpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,141 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 55 %. Op: 96-98 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,30 (bs, 1H); 8,16 (d, $J= 7,89$ Hz, 1H); 7,87 (d, $J= 4,14$ Hz, 1H); 7,83 (s, 1H); 7,71 (m, 2H); 7,47 (m, 3H); 7,16 (d, $J= 15,87$ Hz, 1H); 3,66 (q, $J= 5,73$ Hz, 2H); 2,40 (t, $J= 6,54$ Hz, 2H); 2,21 (s, 6H); 1,85 (m, 2H)

LCMS (ESI) m/z 369,2 (M+H) $^+$; 367,2 (M-H) $^-$; számított: 368,2 Rt: 0,45; 1,95; 2,20 perc.

***N,N*-dietyl-*N'*-{2-[(*E*)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]kinazolin-4-il}propán-1,3-diamin**

(112)

Bemérés: 0,20 g (0,7 mmol) **66**; 0,18 g (1,4 mmol) *N,N*-dietylpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,154 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 56 %. Op: 128-130 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,37 (s, 1H); 8,19 (d, $J= 7,80$ Hz, 1H); 7,87 (m, 2H); 7,70 (m, 2H); 7,47 (m, 3H); 7,17 (d, $J= 15,90$ Hz, 1H); 3,70 (m, 2H); 2,76 (m, 6H); 1,94 (m, 2H); 1,06 (t, $J= 6,87$ Hz, 6H)

LCMS (ESI) m/z 397,3 (M+H) $^+$; 395,4 (M-H) $^-$; számított: 396,2 Rt: 0,46; 2,07; 2,31 perc.

***N'*-{2-[(*E*)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]kinazolin-4-il}-*N,N*-dimetiletán-1,2-diamin (113)**

Bemérés: 0,20 g (0,7 mmol) **66**; 0,12 g (1,4 mmol) *N,N*-dimetiletán-1,2-diamin.

Termék: 0,136 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 55 %. Op: 97-98 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,18 (d, $J= 8,22$ Hz, 1H); 8,13 (s, 1H); 7,86 (m, 2H); 7,74 (m, 2H); 7,47 (m, 3H); 7,17 (d, $J= 15,84$ Hz, 1H); 3,76 (q, $J= 6,24$ Hz, 2H); 2,59 (t, $J= 6,42$ Hz, 2H); 2,26 (s, 6H)

LCMS (ESI) m/z 355,2 (M+H) $^+$; 353,2 (M-H) $^-$; számított: 354,2 Rt: 0,46; 1,77; 2,14 perc.

***N,N*-dietyl-*N'*-{2-[(*E*)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]kinazolin-4-il}etán-1,2-diamin (114)**

Bemérés: 0,20 g (0,7 mmol) **66**; 0,16 g (1,4 mmol) *N,N*-dietylétán-1,2-diamin. Termék:

0,188 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 70 %. Op: 102-103 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,29 (bs, 1H); 8,18 (d, $J= 7,71$ Hz, 1H); 7,87 (m, 2H); 7,75 (m, 2H); 7,48 (m, 3H); 7,18 (d, $J= 15,87$ Hz, 1H); 3,80 (m, 2H); 2,76 (m, 6H); 1,09 (t, $J= 6,71$ Hz, 6H)

LCMS (ESI) m/z 383,2 (M+H) $^+$; 381,3 (M-H) $^-$; számított: 382,2 Rt: 0,45; 1,87; 2,24 perc.

***N,N*-dimetil-*N'*-(2-*{(E)*-2-[4-(metilszulfanil)fenil]vinil}kinazolin-4-il)propán-1,3-diamin (115)**

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **67**; 0,12 g (1,2 mmol) *N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,080 g sárga por (oxálsav só). Kitermelés: 28 %.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,43 (bs, 1H); 8,23 (s, 1H); 7,90 (d, J= 16,17 Hz, 1H); 7,68 (m, 4H); 7,47 (t, J= 6,97 Hz, 1H); 7,30 (d, J= 7,13 Hz, 2H); 7,13 (d, J= 15,24 Hz, 1H); 3,74 (m, 2H); 3,20 (m, 2H); 2,78 (s, 6H); 2,55 (s, 3H) 2,11 (m, 2H)

LCMS (ESI) *m/z* 379,2 (M+H)⁺; 377,2 (M-H)⁻; számított: 378,2 Rt: 0,45; 1,89; 2,15; 2,34 perc.

***N,N*-dimetil-*N'*-(2-*{(E)*-2-[4-(metilszulfanil)fenil]vinil}kinazolin-4-il)etán-1,2-diamin (116)**

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **67**; 0,11 g (1,2 mmol) *N,N*-dimetiletán-1,2-diamin.

Termék: 0,083 g sárga por (1,0 ekv. fumársav só). Kitermelés: 29 %. Op: 196-200 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,28 (bs, 1H); 8,17 (d, J= 7,83 Hz, 1H); 7,88 (d, J= 15,30 Hz, 1H); 7,66 (m, 4H); 7,44 (t, J= 7,02 Hz, 1H); 7,29 (d, J= 7,11 Hz, 2H), 7,10 (d, J= 16,05 Hz, 1H); 6,57 (s, 2H); 3,85 (m, 2H); 3,90 (m, 2H); 2,48 (s, 9H)

LCMS (ESI) *m/z* 365,2 (M+H)⁺; 363,3 (M-H)⁻; számított: 364,2 Rt: 0,45; 2,25 perc.

***N,N*-dietil-*N'*-(2-*{(E)*-2-[4-(metilszulfanil)fenil]vinil}kinazolin-4-il)etán-1,2-diamin (117)**

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **67**; 0,14 g (1,2 mmol) *N,N*-dietiletán-1,2-diamin. Termék: 0,043 g sárga por (trifluoecetsav só). Kitermelés: 14 %.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,99 (bs, 1H); 9,73 (bs, 1H); 8,36 (d, J= 7,86 Hz, 1H); 8,27 (d, J= 15,63 Hz, 1H); 8,02 (t, J= 6,90 Hz, 1H); 7,83 (d, J= 8,13 Hz, 1H); 7,73 (m, 3H); 7,40 (d, J= 7,86 Hz, 2H); 7,25 (d, J= 15,66 Hz, 1H); 4,21 (m, 2H); 3,47 (m, 2H); 3,32 (m, 4H); 2,55 (s, 3H); 1,24 (t, J= 6,45 Hz, 6H).

LCMS (ESI) *m/z* 393,2 (M+H)⁺; 391,2 (M-H)⁻; számított: 392,2 Rt: 0,45; 2,05; 2,35 perc.

***N,N*-dimetil-*N'*-(2-*{(E)*-2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil}kinazolin-4-il)propán-1,3-diamin (118)**

Bemérés: 0,16 g (0,4 mmol) **68**; 0,08 g (0,8 mmol) *N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,036 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 21 %. Op: 123-124 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,32 (bs, 1H); 8,19 (d, $J=7,56$ Hz, 1H); 7,85 (d, $J=15,24$ Hz, 1H); 7,73 (m, 1H); 7,65 (m, 1H); 7,45 (t, $J=6,84$ Hz, 1H); 7,14 (d, $J=15,90$ Hz, 1H); 7,02 (s, 2H); 3,86 (s, 6H); 3,69 (s, 3H); 3,33 (m, 2H); 2,68 (m, 2H); 2,41 (s, 6H); 1,94 (m, 2H)

LCMS (ESI) m/z 423,3 (M+H) $^+$; 421,1 (M-H) $^-$; számított: 422,2 Rt: 0,44; 2,12 perc.

***N,N*-dietyl-*N'*-{2-[(*E*)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]kinazolin-4-il}propán-1,3-diamin (119)**

Bemérés: 0,16 g (0,4 mmol) **68**; 0,10 g (0,8 mmol) *N,N*-dietylpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,122 g sárga por (citromsav só). Kitermelés: 47 %.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,39 (bs, 1H); 8,22 (d, $J=6,95$ Hz, 1H); 7,88 (d, $J=15,72$ Hz, 1H); 7,74 (m, 1H); 7,68 (m, 1H); 7,47 (t, $J=6,75$ Hz, 1H); 7,20 (m, 3H); 7,04 (s, 2H); 3,86 (s, 6H); 3,70 (s, 3H); 3,44 (m, 2H); 3,22 (m, 2H); 3,12 (m, 4H); 2,60 (m, 4H); 2,09 (m, 2H); 1,19 (t, $J=6,15$ Hz, 6H)

LCMS (ESI) m/z 451,3 (M+H) $^+$; 449,1 (M-H) $^-$; számított: 450,3 Rt: 0,45; 1,90; 2,20 perc.

2-[(*E*)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-*N*-[3-(morfolin-4-il)-propil]kinazolin-4-amin (120)

Bemérés: 0,16 g (0,4 mmol) **68**; 0,12 g (0,8 mmol) 3-(morfolin-4-il)propán-1-amin.

Termék: 0,199 g sárga por (citromsav só). Kitermelés: 76 %.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 10,80 (bs, 2H); 8,30 (bs, 1H); 8,19 (d, $J=7,14$ Hz, 1H); 7,86 (d, $J=16,17$ Hz, 1H); 7,74 (m, 1H); 7,67 (m, 1H); 7,47 (t, $J=6,72$ Hz, 1H); 7,16 (d, $J=15,54$ Hz, 1H); 7,02 (s, 2H); 3,87 (s, 6H); 3,70 (s, 3H); 3,66 (m, 4H); 3,43 (m, 2H); 2,73 (m, 4H); 2,63 (m, 4H); 2,58 (m, 2H); 1,97 (m, 2H)

LCMS (ESI) m/z 465,3 (M+H) $^+$; 463,1 (M-H) $^-$; számított: 464,2 Rt: 0,45; 1,86; 2,13 perc.

***N'*-{2-[(*E*)-2-(4-izopropilfenil)vinil]kinazolin-4-il}-*N,N*-dimetylpropán-1,3-diamin (121)**

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **69**; 0,12 g (1,2 mmol) *N,N*-dimetylpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,119 g világossárga por (2,0 ekv. fumársav só). Kitermelés: 33 %.

Op: 208-213 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,52 (bs, 1H); 8,20 (d, J= 8,34 Hz, 1H); 7,89 (d, J= 15,84 Hz, 1H); 7,71 (m, 2H); 7,62 (d, J= 8,03 Hz, 2H); 7,45 (t, J= 7,79 Hz, 1H); 7,29 (d, J= 7,93 Hz, 2H); 7,09 (d, J= 15,92 Hz, 1H); 6,57 (s, 4H); 3,69 (q, J= 5,70 Hz, 2H); 2,88 (m, 3H); 2,54 (s, 6H); 2,01 (m, 2H); 1,23 (d, J= 6,90 Hz, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 375,3 (M+H)⁺; 373,3 (M-H)⁻; számított: 374,3 Rt: 0,44; 2,38; 2,53 perc.

***N,N*-dietyl-*N'*-{2-[(*E*)-2-(4-izopropilfenil)vinil]kinazolin-4-il}propán-1,3-diamin (122)**

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **69**; 0,16 g (1,2 mmol) *N,N*-dietylpropán-1,3-diamin. Termék: 0,127 g világossárga por (1,4 ekv. fumársav só). Kitermelés: 37 %.

Op: 175-177 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,40 (bs, 1H); 8,24 (d, J= 8,22 Hz, 1H); 7,91 (d, J= 15,86 Hz, 1H); 7,74 (m, 2H); 7,63 (d, J= 7,75 Hz, 2H); 7,46 (t, J= 7,44 Hz, 1H); 7,30 (d, J= 7,88 Hz, 2H); 7,09 (d, J= 15,83 Hz, 1H); 6,60 (s, 2,8H); 3,73 (m, 2H); 3,06 (m, 2H); 2,95 (m, 4H); 2,90 (m, 1H); 2,08 (m, 2H); 1,20 (d, J= 6,60 Hz, 6H); 1,17 (t, J= 6,90 Hz, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 403,5 (M+H)⁺; 401,6 (M-H)⁻; számított: 402,3 Rt: 0,46; 2,34; 2,59 perc.

***N'*-{2-[(*E*)-2-(4-izopropilfenil)vinil]kinazolin-4-il}-*N,N*-dimetiletán-1,2-diamin (123)**

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **69**; 0,11 g (1,2 mmol) *N,N*-dimetiletán-1,2-diamin. Termék: 0,085 g világossárga por (1,7 ekv. fumársav só). Kitermelés: 25 %.

Op: 164-168 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,33 (bs, 1H); 8,17 (d, J= 8,11 Hz, 1H); 7,79 (d, J= 15,89 Hz, 1H); 7,72 (m, 2H); 7,61 (d, J= 7,86 Hz, 2H); 7,44 (t, J= 7,43 Hz, 1H); 7,29 (d, J= 7,80 Hz, 2H); 7,09 (d, J= 15,75 Hz, 1H); 6,58 (s, 3,5H); 3,87 (m, 2H); 2,96 (m, 2H); 2,91 (m, 1H); 2,55 (s, 6H); 1,22 (d, J= 6,90 Hz, 6H).

LCMS (ESI) *m/z* 361,4 (M+H)⁺; 359,4 (M-H)⁻; számított: 360,2 Rt: 0,45; 2,18; 2,45 perc.

***N,N*-dietyl-*N'*-{2-[(*E*)-2-(4-izopropilfenil)vinil]kinazolin-4-il}etán-1,2-diamin (124)**

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **69**; 0,14 g (1,2 mmol) *N,N*-dietylétán-1,2-diamin. Termék: 0,045 g világossárga por (2,0 ekv. fumársav só). Kitermelés: 12 %. Op: 171-173 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,42 (bs, 1H); 8,17 (d, J= 8,19 Hz, 1H); 7,89 (d, J= 16,01 Hz, 1H); 7,74 (m, 2H); 7,60 (d, J= 8,09 Hz, 2H); 7,45 (t, J= 6,74 Hz, 1H); 7,30 (d, J= 8,07 Hz, 2H); 7,10 (d, J= 15,95 Hz, 1H); 6,58 (s, 4H); 3,87 (m, 2H); 3,04 (m, 2H); 2,91 (m, 5H); 1,23 (d, J= 6,90 Hz, 6H); 1,13 (t, J= 6,90 Hz, 6H)
LCMS (ESI) *m/z* 389,3 (M+H)⁺; 387,4 (M-H)⁻; számított: 388,3 Rt: 0,45; 2,35; 2,55 perc.

***N,N*-dimetil-*N'*-(2-*{(E)*-2-[4-(metilszulfonil)fenil]vinil}kinazolin-4-il)propán-1,3-diamin (125)**

Bemérés: 0,30 g (0,9 mmol) **70**; 0,18 g (1,8 mmol) *N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin.
Termék: 0,080 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 22 %. Op: 88-90 °C
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,35 (t, J= 4,68 Hz, 1H); 8,19 (d, J= 8,19 Hz, 1H); 7,96 (m, 5H); 7,73 (m, 2H); 7,48 (t, J= 7,92 Hz, 1H); 7,33 (d, J= 16,00 Hz, 1H); 3,68 (q, J= 6,14 Hz, 2H); 3,25 (s, 3H); 2,43 (t, J= 6,85 Hz, 2H); 2,23 (s, 6H); 1,87 (m, 2H)

LCMS (ESI) *m/z* 411,1 (M+H)⁺; 409,1 (M-H)⁻; számított: 410,2 Rt: 0,45; 1,95 perc.

***N,N*-dimetil-*N'*-(2-*{(E)*-2-[4-(metilszulfonil)fenil]vinil}kinazolin-4-il)etán-1,2-diamin (126)**

Bemérés: 0,30 g (0,9 mmol) **70**; 0,16 g (1,8 mmol) *N,N*-dimetiletán-1,2-diamin.
Termék: 0,108 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 30 %. Op: 186-188 °C
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,22 (bs, 1H); 8,19 (s, 1H); 7,97 (m, 5H); 7,73 (m, 2H); 7,49 (t, J= 7,69 Hz, 1H); 7,33 (d, J= 15,97 Hz, 1H); 3,77 (q, J= 6,00 Hz, 2H); 3,25 (s, 3H); 2,60 (t, J= 6,79 Hz, 2H); 2,27 (s, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 397,1 (M+H)⁺; 395,1 (M-H)⁻; számított: 396,2 Rt: 0,39; 1,78 perc.

2-*{(E)*-2-[4-(metilszulfonil)fenil]vinil}-*N*-propilkinazolin-4-amin (127)

Bemérés: 0,30 g (0,9 mmol) **70**; 0,10 g (1,8 mmol) propán-1-amin. Termék: 0,114 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 34 %. Op: 145-147 °C
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,26 (m, 2H); 7,95 (m, 5H); 7,70 (m, 2H); 7,50 (t, J= 6,79 Hz, 1H); 7,33 (d, J= 15,92 Hz, 1H); 3,63 (q, J= 6,00 Hz, 2H); 3,25 (s, 3H); 1,74 (m, 2H); 1,00 (t, J= 7,2 Hz, 3H)

LCMS (ESI) *m/z* 368,2 (M+H)⁺; 366,1 (M-H)⁻; számított: 367,1 Rt: 2,76 perc.

***N,N*-dimetil-*N'*-{2-[(*E*)-2-(2-tenil)vinil]kinazolin-4-il}propán-1,3-diamin (128)**

Bemérés: 0,20 g (0,7 mmol) **71**; 0,14 g (1,4 mmol) *N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,063 g sárga por (1,7 ekv. fumársav só). Kitermelés: 16 %. Op: 200-203 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,33 (bs, 1H); 8,20 (d, J= 8,30 Hz, 1H); 8,04 (d, J= 15,53 Hz, 1H); 7,69 (m, 2H); 7,59 (d, J= 4,63 Hz, 1H); 7,45 (m, 2H); 7,13 (t, J= 4,58 Hz, 1H); 6,84 (d, J= 15,66 Hz, 1H); 6,57 (s, 3,4H); 3,68 (q, J= 5,40 Hz, 2H); 2,86 (t, J= 7,20 Hz, 2H); 2,53 (s, 6H); 1,99 (m, 2H)

LCMS (ESI) *m/z* 339,2 (M+H)⁺; 337,2 (M-H)⁻; számított: 338,2 Rt: 0,45; 2,00 perc.

***N,N*-dietyl-*N'*-{2-[(*E*)-2-(2-tenil)vinil]kinazolin-4-il}propán-1,3-diamin (129)**

Bemérés: 0,20 g (0,7 mmol) **71**; 0,18 g (1,4 mmol) *N,N*-dietylpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,059 g sárga por (1,8 ekv. fumársav só). Kitermelés: 15 %. Op: 162-165 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,39 (bs, 1H); 8,22 (d, J= 7,88 Hz, 1H); 8,05 (d, J= 15,46 Hz, 1H); 7,69 (m, 2H); 7,59 (d, J= 5,13 Hz, 1H); 7,44 (m, 2H); 7,13 (t, J= 4,04 Hz, 1H); 6,85 (d, J= 15,77 Hz, 1H); 6,59 (s, 3,70H); 3,70 (m, 2H); 3,07 (m, 2H); 3,00 (m, 4H); 2,04 (m, 2H); 1,15 (t, J= 6,90 Hz, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 367,3 (M+H)⁺; 365,3 (M-H)⁻; számított: 366,2 Rt: 0,44; 2,09 perc.

***N,N*-dimetil-*N'*-{2-[(*E*)-2-(2-tenil)vinil]kinazolin-4-il}etán-1,2-diamin (130)**

Bemérés: 0,20 g (0,7 mmol) **71**; 0,12 g (1,4 mmol) *N,N*-dimetiletán-1,2-diamin.

Termék: 0,065 g sárga por (1,9 ekv. fumársav só). Kitermelés: 17 %.

Op: 170-173 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,34 (bs, 1H); 8,17 (d, J= 7,43 Hz, 1H); 8,06 (d, J= 15,62 Hz, 1H); 7,70 (m, 2H); 7,60 (d, J= 4,09 Hz, 1H); 7,43 (m, 2H); 7,13 (t, J= 4,43 Hz, 1H); 6,84 (d, J= 15,69 Hz, 1H); 6,58 (s, 3,8H); 3,85 (m, 2H); 2,97 (m, 2H); 2,53 (s, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 325,2 (M+H)⁺; 323,2 (M-H)⁻; számított: 324,1 Rt: 0,44; 1,91 perc.

***N'*-{6-klór-2-[(*E*)-2-(4-metoxifenil)vinil]kinazolin-4-il}-*N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin (131)**

Bemérés: 0,87 g (2,6 mmol) **72**; 0,53 g (5,2 mmol) *N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,35 g citomsárga por (oxálsav só). Kitermelés: 28 %.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,46 (bs, 1H); 8,35(s, 1H); 7,91 (d, $J= 15,87$ Hz, 1H); 7,77 (d, $J= 8,91$ Hz, 1H); 7,68 (m, 3H); 7,01 (m, 3H); 3,81 (s, 3H); 2,72 (m, 2H); 3,19 (m, 2H); 2,79 (s, 6H); 2,08 (m, 2H)

LCMS (ESI) m/z 397,1 (M+H) $^+$; 394,9 (M-H) $^-$; számított: 396,2 Rt: 0,46; 1,95; 2,13 perc.

***N,N*-dietyl-*N'*-{6-klór-2-[(*E*)-2-(4-metoxifenil)vinil]kinazolin-4-il}propán-1,3-diamin (132)**

Bemérés: 0,60 g (1,8 mmol) **72**; 0,47 g (3,6 mmol) *N,N*-dietylpropán-1,3-diamin.
Termék: 0,20 g citomsárga por (HCl só). Kitermelés: 29 %.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 10,07 (bs, 1H), 8,48 (bs, 1H); 8,41 (d, $J= 1,74$ Hz, 1H); 7,91 (d, $J= 15,90$ Hz, 1H); 7,75 (dd, $J^1= 8,91$ Hz, $J^2= 1,98$ Hz, 1H); 7,67 (m, 3H); 6,99(m, 3H); 3,80 (s, 3H); 3,73 (m, 2H); 3,14 (m, 6H); 2,11 (m, 2H); 1,20 (t, $J= 7,14$ Hz, 6H)

LCMS (ESI) m/z 348,1 (M+H) $^+$; 345,9 (M-H) $^-$; számított: 347,1 Rt: 0,46; 2,18; 2,36 perc.

6-klór-2-[(*E*)-2-(4-metoxifenil)vinil]-*N*-(3-morfolin-4-il-propil)kinazolin-4-amin (133)

Bemérés: 0,60 g (1,8 mmol) **72**; 0,52 g (3,6 mmol) 3-(morfolin-4-il)propán-1-amin.
Termék: 0,35 g citomsárga por (szabad bázis). Kitermelés: 44 %. Op: 180-181 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,33(s, 1H); 8,24 (t, $J= 5,07$ Hz, 1H); 7,85 (d, $J= 15,84$ Hz, 1H); 7,64 (m, 4H); 6,97 (m, 3H); 3,80 (s, 3H); 3,61 (m, 6H); 2,43 (m, 6H), 1,86 (m, 2H)

LCMS (ESI) m/z 439,2 (M+H) $^+$; 437,0 (M-H) $^-$; számított: 438,2 Rt: 0,45; 2,04; 2,30 perc.

***N'*-{2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]-6-klórkinazolin-4-il}-*N,N*-dimetylpropán-1,3-diamin (134)**

Bemérés: 3,30 g (10,3 mmol) **73**; 2,10 g (20,6 mmol) *N,N*-dimetylpropán-1,3-diamin.
Termék: 1,7 g citomsárga por (1,0 ekv. fumársav só). Kitermelés: 33 %.

Op: 195-199 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,37 (bs, 2H); 7,91 (d, $J= 15,84$ Hz, 1H); 7,75 (m, 3H); 7,68 (d, $J= 8,88$ Hz, 1H); 7,25 (t, $J= 9,00$ Hz, 2H); 7,09 (d, $J= 15,90$ Hz, 1H);

6,55 (s,2H); 3,67 (q, J= 6,30 Hz, 2H); 2,71 (t, J= 6,90 Hz, 2H); 2,42 (s, 6H); 1,95 (m, 2H)

LCMS (ESI) m/z 381,3 (M+H)⁺; 379,0 (M-H)⁻; számított: 380,2 Rt: 0,46; 1,96; 2,29 perc.

***N,N*-diethyl-*N'*-{2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]-6-klórkinazolin-4-il}propán-1,3-diamin (135)**

Bemérés: 0,46 g (1,4 mmol) **73**; 0,36 g (2,8 mmol) *N,N*-diethylpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,20 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 35 %. Op: 128-130 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,37 (bs, 1H); 8,33 (s, 1H); 7,90 (d, J= 15,87 Hz, 1H); 7,76 (m, 3H); 7,67 (d, J= 8,88 Hz, 1H); 7,25 (t, J= 8,73 Hz, 2H); 7,08 (d, J= 15,87 Hz, 1H); 3,65 (q, J= 6,54 Hz, 2H); 2,58 (m, 6H); 1,85 (m, 2H); 0,99 (t, J= 6,90 Hz, 6H)

LCMS (ESI) m/z 409,2 (M+H)⁺; 407,1 (M-H)⁻; számított: 408,2 Rt: 0,46; 2,21; 2,39 perc.

2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]-*N*-(3-morfolin-4-il-propil)-6-klórkinazolin-4-amin (136)

Bemérés: 0,46 g (1,4 mmol) **73**; 0,40 g (2,8 mmol) 3-(morfolin-4-il)propán-1-amin.

Termék: 0,35 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 59 %. Op: 179-180 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,36 (s, 1H); 8,30 (bs, 1H); 7,89 (d, J= 15,69 Hz, 1H); 7,73 (m, 4H); 7,24 (t, J= 8,19 Hz, 2H); 7,08 (d, J= 16,05 Hz, 1H); 3,66 (m, 2H); 3,57 (m, 4H); 2,38 (m, 6H); 1,86 (m, 2H)

LCMS (ESI) m/z 423,3 (M+H)⁺; 421,0 (M-H)⁻; számított: 422,2 Rt: 0,58; 2,08; 2,41 perc.

***N'*-{2-[(*E*)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]-6-klórkinazolin-4-il}-*N,N*-dimethylpropán-1,3-diamin (137)**

Bemérés: 0,60 g (1,8 mmol) **74**; 0,37 g (3,6 mmol) *N,N*-dimethylpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,40 g vajszerű por (1,0 ekv. fumársav só). Kitermelés: 43 %. Op: 177-181 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,40 (bs, 1H); 8,38 (s,1H); 7,89 (m, 2H); 7,74 (m, 2H); 7,47 (m, 2H); 7,16 (d, J= 15,84 Hz, 1H); 6,54 (s, 2H); 3,66 (m, 2H); 2,71 (t, J= 6,84 Hz, 2H); 2,42 (s,6H); 1,94 (t, J= 6,93 Hz, 2H)

LCMS (ESI) m/z 403,1 (M+H)⁺; 401,2 (M-H)⁻; számított: 402,1 Rt: 0,46; 2,03; 2,36 perc.

***N,N*-dietyl-*N'*-{2-[(*E*)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]-6-klórkinazolin-4-il}propán-1,3-diamin (138)**

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **74**; 0,16 g (1,2 mmol) *N,N*-dietylpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,11 g vajsínű por (szabad bázis). Kitermelés: 43 %. Op: 100-102 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,40 (bs, 1H); 8,34 (s, 1H); 7,87 (m, 2H); 7,71 (m, 2H); 7,48 (m, 2H); 7,16 (d, J= 15,84 Hz, 1H); 3,66 (m, 2H); 2,60 (m, 6H); 1,87 (m, 2H); 1,00 (m, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 431,1 (M+H)⁺; 429,2 (M-H)⁻; számított: 430,2 Rt: 0,45; 2,20; 2,45 perc.

***N'*-{2-[(*E*)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]-6-klórkinazolin-4-il}-*N,N*-dimetiletán-1,2-diamin (139)**

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **74**; 0,11 g (1,2 mmol) *N,N*-dimetiletán-1,2-diamin.

Termék: 0,05 g vajsínű por (oxálsav só). Kitermelés: 17 %.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,56 (bs, 1H); 8,32 (s, 1H); 7,92 (m, 2H); 7,77 (m, 2H); 7,53 (m, 2H); 7,20 (d, J= 15,63Hz, 1H); 4,00 (bs, 2H); 3,41 (m, 2H); 2,89 (s, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 389,1 (M+H)⁺; 387,1 (M-H)⁻; számított: 388,1 Rt: 0,45; 2,05; 2,37 perc.

***N,N*-dietyl-*N'*-{2-[(*E*)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]-6-klórkinazolin-4-il}etán-1,2-diamin (140)**

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **74**; 0,14 g (1,2 mmol) *N,N*-dietylétán-1,2-diamin. Termék: 0,035 g vajsínű por (oxálsav só). Kitermelés: 12 %.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,60 (bs, 1H); 8,31 (s, 1H); 7,83 (m, 4H); 7,53 (m, 2H); 7,20 (d, J= 16,08 Hz, 1H); 6,00 (bs, 2H); 4,01 (m, 2H); 3,40 (m, 2H); 3,27 (m, 4H); 1,23 (m, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 417,2 (M+H)⁺; 415,2 (M-H)⁻; számított: 416,2 Rt: 0,45; 2,25; 2,50; 2,83 perc.

***N^l,N^l*-dietyl-*N^l*-{2-[(*E*)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]-6-klórkinazolin-4-il}pentán-1,4-diamin (141)**

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **74**; 0,19 g (1,2 mmol) *N^l,N^l*-dietylpentán-1,4-diamin.

Termék: 0,089 g vajsínű por (oxálsav só). Kitermelés: 27 %.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 9,58 (bs, 1H); 8,48 (s, 1H); 8,03 (d, $J=8,13$ Hz, 1H), 7,90 (m, 2H); 7,77 (m, 2H); 7,58 (bs, 1H); 7,47 (q, $J=8,44$ Hz, 1H); 7,17 (d, $J=15,90$ Hz, 1H); 4,70 (m, 2H); 3,04 (m, 6H); 1,70 (m, 2H); 1,31 (d, $J=6,30$ Hz, 3H); 1,10 (t, $J=6,30$ Hz, 6H)

LCMS (ESI) m/z 459,2 (M+H) $^+$; 457,2 (M-H) $^-$; számított: 458,2 Rt: 0,45; 2,52; 2,63 perc.

2-[(E)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]-6-klór-4-(1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]dekán-8-il)-kinazolin (142)

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **74**; 0,17 g (1,2 mmol) 1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]dekán. Termék: 0,043 g vajsínű por (szabad bázis). Kitermelés: 16 %.

Op: 163-165 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 7,90 (m, 3H); 7,80 (s, 2H); 7,58 (m, 1H); 7,46 (q, $J=9,03$ Hz, 1H); 7,23 (d, $J=15,54$ Hz, 1H); 3,96 (s, 4H); 3,83 (m, 4H); 1,88 (m, 4H)

LCMS (ESI) m/z 444,2 (M+H) $^+$; számított: 443,1 Rt: 3,63 perc.

2-[(E)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]-6-klór-4-[(2S)-2-(pirrolidin-1-il-metil)pirrolidin-1-il]kinazolin (143)

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **74**; 0,19 g (1,2 mmol) 1-[(2S)-2-pirrolidin-1-il-metil]pirrolidin. Termék: 0,033 g vajsínű por (szabad bázis). Kitermelés: 12 %.

Op: 94-96 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,21 (s, 1H); 7,87 (d, $J=15,90$ Hz, 1H); 7,74 (m, 3H); 7,46 (m, 2H); 7,17 (d, $J=15,91$ Hz, 1H); 4,88 (bs, 1H); 4,08 (m, 1H); 3,93 (m, 1H); 2,82 (d, $J=9,90$ Hz, 1H); 2,57 (m, 5H); 2,00 (m, 4H); 1,71 (m, 4H)

LCMS (ESI) m/z 455,1 (M+H) $^+$; számított: 454,2 Rt: 2,66 perc.

2-[(E)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]-6-klór-4-[(2R)-2-(pirrolidin-1-il-metil)pirrolidin-1-il]kinazolin (144)

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **74**; 0,19 g (1,2 mmol) 1-[(2R)-2-pirrolidin-1-il-metil]pirrolidin. Termék: 0,043 g vajsínű por (szabad bázis). Kitermelés: 16 %.

Op: 115-117 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,21 (d, $J=1,47$ Hz, 1H); 7,87 (d, $J=16,20$ Hz, 1H); 7,75 (m, 3H); 7,47 (m, 2H); 7,17 (d, $J=15,60$ Hz, 1H); 4,88 (bs, 1H); 4,10 (m,

1H); 3,93 (m, 1H); 2,82 (dd, $J^1 = 11,73$ Hz, $J^2 = 3,09$ Hz, 1H); 2,54 (m, 5H); 2,00 (m, 4H); 1,71 (m, 4H)

LCMS (ESI) m/z 455,2 (M+H)⁺; számított: 454,2 Rt: 2,62 perc.

***N'*-(6-klór-2-*{(E)-2-[4-(metilszulfanil)fenil]vinil}*kinazolin-4-il)-*N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin (145)**

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **75**; 0,12 g (1,2 mmol) *N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,183 g sárga por (1,3 ekv. fumársav só). Kitermelés: 54 %.

Op: 205-208 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,37 (d, $J = 1,80$ Hz, 2H); 7,88 (d, $J = 15,89$ Hz, 1H); 7,74 (dd, $J^1 = 8,91$ Hz, $J^2 = 1,95$ Hz, 1H) 7,66 (m, 3H); 7,29 (d, $J = 8,28$ Hz, 2H); 7,09 (d, $J = 15,90$ Hz, 1H); 6,56 (s, 2,6H); 3,66 (q, $J = 5,70$ Hz, 2H); 2,76 (t, $J = 6,90$ Hz, 2H); 2,51 (s, 3H); 2,46 (s, 6H); 1,96 (m, 2H)

LCMS (ESI) m/z 413,2 (M+H)⁺; 411,3 (M-H)⁻; számított: 412,2 Rt: 0,46; 2,11; 2,46 perc.

***N,N*-dietil-*N'*-(6-klór-2-*{(E)-2-[4-(metilszulfanil)fenil]vinil}*kinazolin-4-il)propán-1,3-diamin (146)**

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **75**; 0,16 g (1,2 mmol) *N,N*-dietilpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,100 g sárga por (1,2 ekv. fumársav só). Kitermelés: 29 %.

Op: 149-152 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,43 (bs, 1H); 8,38 (s, 1H); 7,89 (d, $J = 15,90$ Hz, 1H); 7,69 (m, 4H); 7,29 (d, $J = 7,51$ Hz, 2H); 7,09 (d, $J = 15,86$ Hz, 1H); 6,56 (s, 2,5H); 3,69 (m, 2H); 2,90 (m, 2H); 2,87 (m, 4H); 2,50 (s, 3H); 1,99 (m, 2H); 1,09 (t, $J = 6,6$ Hz, 6H)

LCMS (ESI) m/z 441,2 (M+H)⁺; 439,2 (M-H)⁻; számított: 440,2 Rt: 0,46; 2,23; 2,56 perc.

***N'*-(6-klór-2-*{(E)-2-[4-(metilszulfanil)fenil]vinil}*kinazolin-4-il)-*N,N*-dimetiletán-1,2-diamin (147)**

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **75**; 0,11 g (1,2 mmol) *N,N*-dimetiletán-1,2-diamin.

Termék: 0,085 g sárga por (1,3 ekv. fumársav só). Kitermelés: 26 %. Op: 201-204 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,40 (bs, 1H); 8,34 (s, 1H); 7,90 (d, $J= 15,90$ Hz, 1H); 7,69 (m, 4H); 7,29 (d, $J= 7,79$ Hz, 2H); 7,09 (d, $J= 16,08$ Hz, 1H); 6,57 (s, 2,6H); 3,83 (m, 2H); 2,89 (m, 2H); 2,50 (s, 9H)

LCMS (ESI) m/z 399,2 (M+H) $^+$; 397,2 (M-H) $^-$; számított: 398,1 Rt: 0,46; 2,01; 2,41 perc.

***N,N*-dietyl-*N'*-(6-klór-2- $\{(E)$ -2-[4-(metilsulfanyl)fenil]vinil}kinazolin-4-il)etán-1,2-diamin (148)**

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **75**; 0,14 g (1,2 mmol) *N,N*-dietylétán-1,2-diamin. Termék: 0,127 g sárga por (1,0 ekv. fumársav só). Kitermelés: 39 %. Op: 144-147 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,45 (bs, 1H); 8,31 (s, 1H); 7,89 (d, $J= 15,70$ Hz, 1H); 7,75 (m, 2H); 7,62 (d, $J= 8,28$ Hz, 2H); 7,30 (d, $J= 8,22$ Hz, 2H); 7,09 (d, $J= 15,89$ Hz, 1H); 6,57 (s, 2H); 3,79 (m, 2H); 2,93 (m, 2H); 2,80 (q, $J= 6,60$ Hz, 4H); 1,06 (t, $J= 6,90$ Hz, 6H)

LCMS (ESI) m/z 427,2 (M+H) $^+$; 425,2 (M-H) $^-$; számított: 426,2 Rt: 0,46; 2,22; 2,52 perc.

***N'*-(2- $\{(E)$ -2-[4-(izopropil)fenil]vinil]-6-klórkinazolin-4-il)-*N,N*-dimetylpropán-1,3-diamin (149)**

Bemérés: 0,25 g (0,7 mmol) **76**; 0,14 g (1,4 mmol) *N,N*-dimetylpropán-1,3-diamin. Termék: 0,054 g sárga por (1,5 ekv. fumársav só). Kitermelés: 13 %. Op: 167-170 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,36 (bs, 2H); 7,89 (d, $J= 15,49$ Hz, 1H); 7,74 (d, $J= 8,17$ Hz, 1H); 7,67 (d, $J= 8,80$ Hz, 1H); 7,61 (d, $J= 7,12$ Hz, 2H); 7,29 (d, $J= 7,30$ Hz, 2H); 7,07 (d, $J= 15,69$ Hz, 1H); 6,56 (s, 3H); 3,67 (q, $J= 5,40$ Hz, 2H); 2,91 (m, 1H); 2,76 (m, 2H), 2,46 (s, 6H); 1,96 (m, 2H); 1,21 (d, $J= 6,57$ Hz, 6H)

LCMS (ESI) m/z 409,3 (M+H) $^+$; 407,4 (M-H) $^-$; számított: 408,2 Rt: 2,77 perc.

***N,N*-dietyl-*N'*-(2- $\{(E)$ -2-[4-(izopropil)fenil]vinil]-6-klórkinazolin-4-il)propán-1,3-diamin (150)**

Bemérés: 0,25 g (0,7 mmol) **76**; 0,18 g (1,4 mmol) *N,N*-dietylpropán-1,3-diamin. Termék: 0,086 g sárga por (1,0 ekv. fumársav só). Kitermelés: 22 %. Op: 148-152 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,41 (t, $J= 5,2$ Hz, 1H); 8,37 (s, 1H); 7,90 (d, $J= 15,85$ Hz, 1H); 7,74 (dd, $J^1= 8,84$ Hz, $J^2= 2,26$ Hz, 1H); 7,68 (d, $J= 8,85$ Hz, 1H); 7,61 (d, $J= 8,15$ Hz, 2H); 7,29 (d, $J= 8,16$ Hz, 2H); 7,07 (d, $J= 15,88$ Hz, 1H); 6,56 (s, 2H);

3,69 (q, J= 6,59 Hz, 2H); 2,91 (m, 3H); 2,84 (m, 4H); 1,99 (m, 2H); 1,22 (d, J= 6,60 Hz, 6H); 1,09 (t, J= 7,20 Hz, 6H)

LCMS (ESI) m/z 437,3 (M+H)⁺; 435,5 (M-H)⁻; számított: 436,2 Rt: 2,88 perc.

***N'*-(2-*{(E)-2-[4-(izopropil)fenil]vinil}*}-6-klórkinazolin-4-il)-*N,N*-dimetiletán-1,2-diamin (151)**

Bemérés: 0,25 g (0,7 mmol) **76**; 0,12 g (1,4 mmol) *N,N*-dimetiletán-1,2-diamin.

Termék: 0,089 g sárga por (1,4 ekv. fumársav só). Kitermelés: 23 %.

Op: 222-227 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,37 (t, J= 5,30 Hz, 1H); 8,33 (d, J= 2,25 Hz, 1H); 7,90 (d, J= 15,88 Hz, 1H); 7,74 (dd, J¹= 8,86 Hz, J²= 2,26 Hz, 1H); 7,68 (d, J= 8,86 Hz, 1H); 7,61 (d, J= 8,16 Hz, 2H); 7,29 (d, J= 8,17 Hz, 2H); 7,08 (d, J= 15,89 Hz, 1H); 6,57 (s, 2,8H); 3,83 (q, J= 5,72 Hz, 2H), 2,92 (m, 1H); 2,88 (m, 2H); 2,47 (s, 6H); 1,22 (d, J= 6,92 Hz, 6H)

LCMS (ESI) m/z 395,3 (M+H)⁺; 393,4 (M-H)⁻; számított: 394,2 Rt: 2,73 perc.

***N,N*-dietyl-*N'*-(2-*{(E)-2-[4-(izopropil)fenil]vinil}*}-6-klórkinazolin-4-il)etán-1,2-diamin (152)**

Bemérés: 0,25 g (0,7 mmol) **76**; 0,16 g (1,4 mmol) *N,N*-dietyl-1,2-diamin. Termék: 0,100 g sárga por (1,2 ekv. fumársav só). Kitermelés: 25 %. Op: 186-190 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,49 (bs, 1H); 8,31 (d, J= 1,94 Hz, 1H); 7,90 (d, J= 16,10 Hz, 1H); 7,75 (dd, J¹= 8,83 Hz, J²= 1,98 Hz, 1H); 7,68 (d, J= 8,91 Hz, 1H); 7,59 (d, J= 8,01 Hz, 2H); 7,29 (d, J= 8,05 Hz, 2H); 7,07 (d, J= 15,90 Hz, 1H); 6,57 (s, 2,4H); 3,82 (q, J= 5,40 Hz, 2H); 2,97 (m, 3H); 2,84 (m, 4H); 1,22 (d, J= 6,88 Hz, 6H); 1,10 (t, J= 7,09 Hz, 6H)

LCMS (ESI) m/z 423,3 (M+H)⁺; 421,3 (M-H)⁻; számított: 422,2 Rt: 2,80 perc.

***N'*-(6-klór-2-*{(E)-2-[4-(metilszulfonil)fenil]vinil}*}-kinazolin-4-il)-*N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin (153)**

Bemérés: 0,20 g (0,5 mmol) **77**; 0,10 g (1,0 mmol) *N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,138 g sárga por (szabad bázis). Kitermelés: 62 %.

Op: 168-171 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,37 (bs, 2H); 7,96 (m, 5H); 7,77 (d J= 9,00 Hz, 1H); 7,69 (d, J= 9,00 Hz, 1H); 7,31 (d, J= 16,11 Hz, 1H); 3,66 (q, J= 5,40 Hz, 2H); 3,24 (s, 3H); 2,43 (m, 2H); 2,23 (s, 6H); 1,86 (m, 2H)

LCMS (ESI) *m/z* 445,2 (M+H)⁺; 443,2 (M-H)⁻; számított: 444,1 Rt: 0,44; 1,89; 2,07 perc.

***N,N*-dietyl-*N'*-(6-klór-2-*{(E)*-2-[4-(metilszulfonil)fenil]vinil}kinazolin-4-il)propán-1,3-diamin (154)**

Bemérés: 0,20 g (0,5 mmol) **77**; 0,13 g (1,0 mmol) *N,N*-dietylpropán-1,3-diamin. Termék: 0,110 g sárga por (0,3 ekv. fumársav só). Kitermelés: 43 %. Op: 139-144 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,48 (bs, 1H); 8,39 (d, J= 2,1 Hz, 1H) 7,98 (m, 5H); 7,77 (dd, J¹= 8,94 Hz, J²= 2,19 Hz, 1H); 7,71 (d, J= 8,78 Hz, 1H); 7,31 (d, J= 15,93 Hz, 1H); 6,54 (s, 0,6H); 3,70 (q, J= 5,10 Hz, 2H); 3,24 (s, 3H); 2,81 (m, 6H); 1,95 (m, 2H); 1,07 (t, J= 7,20 Hz, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 473,2 (M+H)⁺; 471,3 (M-H)⁻; számított: 472,2 Rt: 0,45; 2,04; 2,17 perc.

***N'*-(6-klór-2-*{(E)*-2-[4-(metilszulfonil)fenil]vinil}kinazolin-4-il)-*N,N*-dimetylétán-1,2-diamin (155)**

Bemérés: 0,20 g (0,5 mmol) **77**; 0,09 g (1,0 mmol) *N,N*-dimetylétán-1,2-diamin. Termék: 0,122 g sárga por (szabad bázis). Kitermelés: 57 %. Op: 228-231 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,39 (d, J= 1,93 Hz, 1H); 8,29 (t, J= 5,01 Hz, 1H); 7,95 (m, 5H); 7,77 (dd, J¹= 8,91 Hz, J²= 2,15 Hz, 1H); 7,70 (d, J= 8,86 Hz, 1H); 7,31 (d, J= 15,90 Hz, 1H); 3,75 (q, J= 5,54 Hz, 2H); 3,24 (s, 3H); 2,59 (t, J= 6,29 Hz, 2H); 2,26 (s, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 431,1 (M+H)⁺; 429,2 (M-H)⁻; számított: 430,1 Rt: 0,44; 1,91; 2,06 perc.

***N,N*-dietyl-*N'*-(6-klór-2-*{(E)*-2-[4-(metilszulfonil)fenil]vinil}kinazolin-4-il)etán-1,2-diamin (156)**

Bemérés: 0,15 g (0,4 mmol) **77**; 0,12 g (1,0 mmol) *N,N*-dietylétán-1,2-diamin. Termék: 0,109 g sárga por (1,1 ekv. fumársav só). Kitermelés: 47 %. Op: 205-208 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,57 (bs, 1H); 8,35 (d, J= 1,80 Hz, 1H); 7,95 (m, 5H); 7,78 (dd, J¹= 8,73 Hz, J²= 1,63 Hz, 1H); 7,71 (d, J= 8,85 Hz, 1H); 7,33 (d, J=

16,00 Hz, 1H); 6,58 (s, 2,2H); 3,84 (q, J= 5,70 Hz, 2H); 3,24 (s, 3H); 3,00 (t, J= 6,71 Hz, 2H); 2,86 (q, J= 7,18 Hz, 4H); 1,10 (t, J= 6,90 Hz, 6H)

LCMS (ESI) m/z 459,2 (M+H)⁺; 457,2 (M-H)⁻; számított: 458,2 Rt: 2,18 perc.

***N'*-{6-klór-2-[(*E*)-2-(2-tenil)vinil]kinazolin-4-il}-*N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin (157)**

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **78**; 0,12 g (1,2 mmol) *N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,092 g sárga por (szabad bázis). Kitermelés: 41 %. Op: 92-94 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,34 (d, J= 1,53 Hz, 2H); 8,03 (d, J= 15,60 Hz, 1H); 7,73 (dd, J¹= 8,94 Hz, J²= 1,98 Hz, 1H); 7,68 (m, 2H); 7,42 (d, J= 3,21 Hz, 1H); 7,13 (t, J= 4,35 Hz, 1H); 6,82 (d, J= 15,57 Hz, 1H); 3,63 (q, J= 6,15 Hz, 2H); 2,39 (t, J= 7,05 Hz, 2H); 2,21 (s, 6H); 1,83 (m, 2H)

LCMS (ESI) m/z 373,2 (M+H)⁺; 371,2 (M-H)⁻; számított: 372,1 Rt: 0,46; 2,07 perc.

***N,N*-dietil-*N'*-{6-klór-2-[(*E*)-2-(2-tenil)vinil]kinazolin-4-il}propán-1,3-diamin (158)**

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **78**; 0,16 g (1,2 mmol) *N,N*-dietilpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,089 g sárga por (szabad bázis). Kitermelés: 37 %.

Op: 109-111 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,50 (bs, 1H); 8,47 (bs, 1H); 8,38 (d, J= 1,71 Hz, 1H); 8,07 (d, J= 15,74 Hz, 1H); 7,76 (dd, J¹= 9,00 Hz, J²= 2,01 Hz, 1H); 7,66 (d, J= 8,85 Hz, 1H); 7,61 (d, J= 5,10 Hz, 1H); 7,44 (d, J= 3,09 Hz, 1H); 7,14 (t, J= 3,82 Hz, 1H); 6,83 (d, J= 15,63 Hz, 1H); 3,70 (q, J= 6,43 Hz, 2H); 2,70 (m, 6H); 1,90 (m, 2H); 1,03 (t, J= 7,12 Hz, 6H)

LCMS (ESI) m/z 401,3 (M+H)⁺; 399,2 (M-H)⁻; számított: 400,1 Rt: 0,45; 2,17 perc.

***N'*-{6-klór-2-[(*E*)-2-(2-tenil)vinil]kinazolin-4-il}-*N,N*-dimetiletán-1,2-diamin (159)**

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **78**; 0,11 g (1,2 mmol) *N,N*-dimetiletán-1,2-diamin.

Termék: 0,102 g narancssárga por (szabad bázis). Kitermelés: 48 %. Op: 168-169 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,36 (d, J= 2,10 Hz, 1H); 8,22 (t, J= 4,89 Hz, 1H); 8,03 (d, J= 15,61 Hz, 1H); 7,73 (dd, J¹= 8,86 Hz, J²= 2,21 Hz, 1H); 7,65 (d, J= 8,88 Hz, 1H); 7,59 (d, J= 4,98 Hz, 1H); 7,41 (d, J= 3,33 Hz, 1H); 7,13 (t, J= 3,60 Hz, 1H); 6,82 (d, J= 15,62 Hz, 1H); 3,71 (q, J= 6,30 Hz, 2H); 2,60 (t, J= 6,90 Hz, 2H); 2,25 (s, 6H)

LCMS (ESI) m/z 359,2 (M+H)⁺; 357,2 (M-H)⁻; számított: 358,1 Rt: 0,45; 2,00 perc.

***N,N*-dietyl-*N'*-{6-klór-2-[(*E*)-2-(2-tenil)vinil]kinazolin-4-il}etán-1,2-diamin (160)**

Bemérés: 0,20 g (0,65 mmol) **78**; 0,14 g (1,2 mmol) *N,N*-dietylétán-1,2-diamin. Termék: 0,077 g sárga por (szabad bázis). Kitermelés: 31 %. Op: 93-95 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,31 (d, J= 1,98 Hz, 2H); 8,04 (d, J= 15,60 Hz, 1H); 7,74 (dd, J¹= 8,88 Hz, J²= 2,08 Hz, 1H); 7,87 (d, J= 8,95 Hz, 1H); 7,60 (d, J= 5,04 Hz, 1H); 7,38 (d, J= 3,24 Hz, 1H); 7,13 (dd, J¹= 4,94 Hz, J²= 3,67 Hz, 1H); 6,83 (d, J= 15,59 Hz, 1H); 3,68 (q, J= 5,70 Hz, 2H); 2,74 (m, 2H); 2,62 (m, 4H); 1,03 (t, J= 6,9 Hz, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 387,2 (M+H)⁺; 385,3 (M-H)⁻; számított: 386,1 Rt: 0,45; 2,12 perc.

***N'*-{7-klór-2-[(*E*)-2-(4-metoxifenil)vinil]kinazolin-4-il}-*N,N*-dimetylpropán-1,3-diamin (161)**

Bemérés: 0,42 g (1,3 mmol) **79**; 0,26 g (2,6 mmol) *N,N*-dimetylpropán-1,3-diamin. Termék: 0,198 g vajsínű por (szabad bázis). Kitermelés: 38 %. Op: 132-133 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,39 (bs, 1H); 8,19 (d, J= 7,98 Hz, 1H); 7,88 (d, J= 15,57 Hz, 1H); 7,64 (m, 3H); 7,47 (d, J= 8,10 Hz, 1H); 6,99 (m, 3H); 3,80 (s, 3H); 3,64 (m, 2H); 2,42 (m, 2H); 2,23 (s, 6H); 1,85 (m, 2H)

LCMS (ESI) *m/z* 397,3 (M+H)⁺; 395,0 (M-H)⁻; számított: 396,2 Rt: 0,44; 2,01; 2,29 perc.

***N,N*-dietyl-*N'*-{7-klór-2-[(*E*)-2-(4-metoxifenil)vinil]kinazolin-4-il}propán-1,3-diamin (162)**

Bemérés: 0,42 g (1,3 mmol) **79**; 0,34 g (2,6 mmol) *N,N*-dietylpropán-1,3-diamin. Termék: 0,045 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 8 %. Op: 170-172 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 10,10 (bs, 1H); 8,57 (s, 1H); 8,30 (d, J= 8,40 Hz, 1H); 7,92 (d, J= 15,90 Hz, 1H); 7,67 (m, 3H); 7,49 (d, J= 7,5 Hz, 1H); 6,99 (m, 3H); 3,80 (s, 3H); 3,72 (m, 2H); 3,09 (m, 6H); 2,09 (m, 2H); 1,19 (t, J= 6,91 Hz, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 425,3 (M+H)⁺; 423,1 (M-H)⁻; számított: 424,2 Rt: 0,45; 2,05; 2,37 perc.

7-klór-2-[(*E*)-2-(4-metoxifenil)vinil]-*N*-(3-morfolin-4-il-propil)kinazolin-4-amin (163)

Bemérés: 0,42 g (1,3 mmol) **79**; 0,37 g (2,6 mmol) 3-(morfolin-4-il)propán-1-amin. Termék: 0,224 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 39 %. Op: 187-188 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,31 (bs, 1H); 8,21 (d, J= 8,61 Hz, 1H); 7,86 (d, J= 15,96 Hz, 1H); 7,64 (m, 3H); 7,47 (d, J= 8,34 Hz, 1H); 6,96 (m, 3H); 3,80 (s, 3H); 3,66 (m, 2H); 3,57 (m, 4H); 2,40 (m, 6H); 1,86 (m, 2H)

LCMS (ESI) *m/z* 439,3 (M+H)⁺; 437,1 (M-H)⁻; számított: 438,2 Rt: 0,45; 1,95; 2,30 perc.

7-klór-*N*-[3-(4-metilpiperazin-1-il)propil]-2-[(*E*)-2-(4-metoxifenil)vinil]kinazolin-4-amin (164)

Bemérés: 0,42 g (1,3 mmol) **79**; 0,41 g (2,6 mmol) 3-(4-metilpiperazin-1-il)propán-1-amin. Termék: 0,128 g vajszerű por (szabad bázis). Kitermelés: 22 %. Op: 127-128 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,29 (bs, 1H); 8,20 (d, J= 7,23 Hz, 1H); 7,87 (d, J= 15,99 Hz, 1H); 7,65 (m, 3H); 7,46 (d, J= 8,55 Hz, 1H); 6,95 (m, 3H); 3,81 (s, 3H); 3,66 (m, 2H); 2,41 (m, 6H); 2,32 (m, 4H); 2,13 (s, 3H), 1,85 (m, 2H)

LCMS (ESI) *m/z* 452,3 (M+H)⁺; 450,0 (M-H)⁻; számított: 451,2 Rt: 0,45; 1,91; 2,25 perc.

***N'*-{2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]-7-klórkinazolin-4-il}-*N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin (165)**

Bemérés: 0,25 g (0,8 mmol) **80**; 0,16 g (1,6 mmol) *N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin. Termék: 0,124 g vajszerű por (szabad bázis). Kitermelés: 40 %. Op: 162-163 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,43 (bs, 1H); 8,21 (d, J= 8,46 Hz, 1H); 7,09 (d, J= 15,78 Hz, 1H); 7,76 (m, 2H); 7,68 (s, 1H); 7,49 (d, J= 7,95 Hz, 1H); 7,25 (m, 2H); 7,08 (d, J= 15,90 Hz, 1H); 3,64 (m, 2H); 2,42 (m, 2H); 2,22 (s, 6H); 1,85 (m, 2H)

LCMS (ESI) *m/z* 385,3 (M+H)⁺; 383,0 (M-H)⁻; számított: 384,2 Rt: 2,13; 2,29 perc.

***N,N*-dietyl-*N'*-{2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]-7-klórkinazolin-4-il}propán-1,3-diamin (166)**

Bemérés: 0,25 g (0,8 mmol) **80**; 0,21 g (1,6 mmol) *N,N*-dietylpropán-1,3-diamin. Termék: 0,09 g vajszerű por (szabad bázis). Kitermelés: 27 %. Op: 84-85 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,44 (bs, 1H); 8,20 (d, J= 6,99 Hz, 1H); 7,90 (d, J= 16,56 Hz, 1H); 7,75 (m, 2H); 7,68 (s, 1H); 7,50 (d, J= 8,34 Hz, 1H); 7,25 (m, 2H); 7,07 (d, J= 15,90 Hz, 1H); 3,65 (m, 2H); 2,57 (m, 6H); 1,85 (m, 2H); 0,98 (t, J= 6,78 Hz, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 413,3 (M+H)⁺; 411,1 (M-H)⁻; számított: 412,2 Rt: 2,36 perc.

2-[(E)-2-(4-fluorfenil)vinil]-7-klór-N-(3-morfolin-4-il-propil)kinazolin-4-amin (167)

Bemérés: 0,25 g (0,8 mmol) **80**; 0,23 g (1,6 mmol) 3-(morfolin-4-il)propán-1-amin.

Termék: 0,179 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 52 %.

Op: 195-196 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,35 (bs, 1H); 8,23 (d, J= 8,16 Hz, 1H); 7,89 (d, J= 15,75 Hz, 1H); 7,76 (m, 2H); 7,67 (s, 1H); 7,50 (d, J= 8,58 Hz, 1H); 7,25 (t, J= 7,11 Hz, 2H); 7,07 (d, J= 15,81 Hz, 1H); 3,66 (m, 2H); 3,56 (m, 4H); 2,39 (m, 6H); 1,86 (m, 2H)

LCMS (ESI) *m/z* 427,3 (M+H)⁺; 425,0 (M-H)⁻; számított: 426,2 Rt: 2,31 perc.

2-[(E)-2-(4-fluorfenil)vinil]-7-klór-N-[3-(4-metilpiperazin-1-il)propil]kinazolin-4-amin (168)

Bemérés: 0,25 g (0,8 mmol) **80**; 0,25 g (1,6 mmol) 3-(4-metilpiperazin-1-il)propán-1-amin. Termék: 0,189 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 54 %.

Op: 195-197 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,35 (bs, 1H); 8,22 (d, J= 8,70 Hz, 1H); 7,89 (d, J= 15,99 Hz, 1H); 7,76 (m, 2H); 7,68 (s, 1H); 7,49 (d, J= 8,01 Hz, 1H); 7,25 (m, 2H); 7,07 (d, J= 15,48 Hz, 1H); 3,66 (m, 2H); 2,41 (m, 6H); 2,31 (m, 4H); 2,13 (s, 3H); 1,84 (m, 2H)

LCMS (ESI) *m/z* 440,3 (M+H)⁺; 438,0 (M-H)⁻; számított: 439,2 Rt: 2,23 perc.

N'-{6-fluor-2-[(E)-2-(4-metoxifenil)vinil]kinazolin-4-il}-N,N-dimetilpropán-1,3-diamin (169)

Bemérés: 0,50 g (1,6 mmol) **81**; 0,32 g (3,2 mmol) *N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,150 g sárga por (szabad bázis). Kitermelés: 25 %.

Op: 106-108 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,16 (t, J= 6,45 Hz, 1H); 8,02 (dd, J¹= 9,93 Hz, J²= 2,58 Hz, 1H); 7,85 (d, J= 15,87 Hz, 1H); 7,71 (m, 1H); 7,61 (m, 3H); 7,02 (m, 3H); 3,80 (s, 3H); 3,64 (q, J= 6,54 Hz, 2H); 2,38 (t, J= 6,99 Hz, 2H); 2,20 (s, 6H); 1,84 (m, 2H)

LCMS (ESI) *m/z* 381,3 (M+H)⁺; 379,0 (M-H)⁻; számított: 380,2 Rt: 0,46; 1,98; 2,21 perc.

***N,N*-dietyl-*N'*-{6-fluor-2-[(*E*)-2-(4-metoxifenil)vinil]kinazolin-4-il}propán-1,3-diamin (170)**

Bemérés: 0,50 g (1,6 mmol) **81**; 0,41 g (3,2 mmol) *N,N*-dietylpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,170 g sárga por (szabad bázis). Kitermelés: 26 %. Op: 100-103 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,28 (bs, 1H); 8,07 (dd, *J*¹= 9,87 Hz, *J*²= 2,10 Hz, 1H); 7,87 (d, *J*= 15,90 Hz, 1H); 7,72 (m, 1H); 7,61 (m, 3H); 6,99 (m, 3H); 3,80 (s, 3H); 3,69 (m, 2H); 3,38 (m, 6H); 1,94 (m, 2H); 1,09 (t, *J*= 6,96 Hz, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 409,2 (M+H)⁺; 407,1 (M-H)⁻; számított: 408,2 Rt: 0,47; 2,05; 2,30 perc.

6-fluor-2-[(*E*)-2-(4-metoxifenil)vinil]-*N*-(3-morfolin-4-il-propil)kinazolin-4-amin (171)

Bemérés: 0,50 g (1,6 mmol) **81**; 0,46 g (3,2 mmol) 3-(morfolin-4-il)propán-1-amin.

Termék: 0,270 g sárga por (szabad bázis). Kitermelés: 40 %.

Op: 193-194 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,11 (t, *J*= 4,83 Hz, 1H); 8,04 (dd, *J*¹= 9,96 Hz, *J*²= 2,52 Hz, 1H); 7,84 (d, *J*= 15,87 Hz, 1H); 7,71 (m, 1H); 7,60 (m, 3H); 6,97 (m, 3H); 3,80 (s, 3H); 3,67 (q, *J*= 6,57 Hz, 2H); 3,57 (m, 4H); 2,42 (m, 6H); 1,86 (m, 2H)

LCMS (ESI) *m/z* 423,3 (M+H)⁺; 421,0 (M-H)⁻; számított: 422,2 Rt: 0,45; 1,93; 2,25 perc.

***N'*-{6-fluor-2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]kinazolin-4-il}-*N,N*-dimetylpropán-1,3-diamin (172)**

Bemérés: 0,55 g (1,8 mmol) **82**; 0,36 g (3,6 mmol) *N,N*-dimetylpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,260 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 39 %.

Op: 147-149 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,24 (bs, 1H); 8,07 (dd, *J*¹= 9,81 Hz, *J*²= 2,01 Hz, 1H); 7,89 (d, *J*= 15,87 Hz, 1H); 7,75 (m, 3H); 7,64 (m, 1H); 7,24 (t, *J*= 8,73 Hz, 2H); 7,08 (d, *J*= 15,90 Hz, 1H); 3,66 (q, *J*= 6,36 Hz, 2H); 2,55 (m, 2H); 2,32 (s, 6H); 1,91 (m, 2H)

LCMS (ESI) *m/z* 369,3 (M+H)⁺; 367,1 (M-H)⁻; számított: 368,2 Rt: 0,45; 1,85; 2,22 perc.

***N,N*-dietyl-*N'*-{6-fluor-2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]kinazolin-4-il}propán-1,3-diamin (173)**

Bemérés: 0,55 g (1,8 mmol) **82**; 0,47 g (3,6 mmol) *N,N*-dietylpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,350 g világossárga por (HCl só). Kitermelés: 45 %.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 10,15 (bs, 1H); 8,42 (bs, 1H); 8,15 (dd, *J*¹= 9,78 Hz, *J*²= 2,13 Hz, 1H); 7,93 (d, *J*= 15,96 Hz, 1H); 7,75 (m, 3H); 7,65 (m, 1H); 7,25 (t, *J*= 8,76 Hz, 2H); 7,10 (d, *J*= 15,93 Hz, 1H); 3,73 (q, *J*= 5,70 Hz, 2H); 3,05 (m, 6H); 2,08 (m, 2H); 1,18 (t, *J*= 6,78 Hz, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 397,4 (M+H)⁺; 395,1 (M-H)⁻; számított: 396,2 Rt: 0,46; 2,01; 2,29 perc.

6-fluor-2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]-*N*-(3-morfolin-4-il-propil)kinazolin-4-amin (174)

Bemérés: 0,55 g (1,8 mmol) **82**; 0,52 g (3,6 mmol) 3-(morfolin-4-il)propán-1-amin.

Termék: 0,137 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 19 %.

Op: 154-155 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,17 (bs, 1H); 8,06 (dd, *J*¹= 9,93 Hz, *J*²= 2,52 Hz, 1H); 7,87 (d, *J*= 15,93 Hz, 1H); 7,74 (m, 3H); 7,64 (m, 1H); 7,25 (t, *J*= 8,79 Hz, 2H); 7,08 (d, *J*= 15,90 Hz, 1H); 3,67 (q, *J*= 6,03 Hz, 2H); 3,57 (t, *J*= 4,44 Hz, 4H); 2,40 (m, 6H); 1,86 (m, 2H)

LCMS (ESI) *m/z* 411,3 (M+H)⁺; 409,1 (M-H)⁻; számított: 410,2 Rt: 0,47; 2,22 perc.

***N'*-{6-fluor-2-[(*E*)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]kinazolin-4-il}-*N,N*-dimetylpropán-1,3-diamin (175)**

Bemérés: 0,25 g (0,8 mmol) **83**; 0,16 g (1,6 mmol) *N,N*-dimetylpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,191 g vajsínű por (szabad bázis). Kitermelés: 62 %.

Op: 113-116 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,21 (bs, 1H); 8,06 (d, *J*= 9,69 Hz, 1H); 7,86 (m, 1H); 7,82 (s, 1H); 7,73 (m, 1H); 7,67 (m, 1H); 7,48 (m, 2H); 7,15 (d, *J*= 15,93 Hz, 1H); 3,64 (m, 2H); 2,40 (m, 2H); 2,21 (s, 6H); 1,85 (m, 2H)

LCMS (ESI) *m/z* 387,3 (M+H)⁺; 385,0 (M-H)⁻; számított: 386,2 Rt: 0,45; 1,99; 2,22 perc.

***N,N*-diethyl-*N'*-{6-fluor-2-[(*E*)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]kinazolin-4-il}propán-1,3-diamin (176)**

Bemérés: 0,25 g (0,8 mmol) **83**; 0,21 g (1,6 mmol) *N,N*-diethylpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,195 g vajsínű por (szabad bázis). Kitermelés: 59 %. Op: 112-114 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,26 (bs, 1H); 8,06 (d, J= 9,39 Hz, 1H); 7,86 (m, 2H); 7,74 (s, 1H); 7,66 (m, 1H); 7,52 (m, 1H); 7,46 (m, 1H); 7,16 (d, J= 15,78 Hz, 1H); 3,66 (m, 2H); 2,62 (m, 6H); 1,88 (m, 2H); 1,01 (t, J= 6,87 Hz, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 415,3 (M+H)⁺; 413,1 (M-H)⁻; számított: 414,2 Rt: 0,45; 1,97; 2,32 perc.

***N'*-{6-fluor-2-[(*E*)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]kinazolin-4-il}-*N,N*-dimetiletán-1,2-diamin (177)**

Bemérés: 0,25 g (0,8 mmol) **83**; 0,14 g (1,6 mmol) *N,N*-dimetiletán-1,2-diamin.

Termék: 0,157 g vajsínű por (szabad bázis). Kitermelés: 53 %. Op: 158-160 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,12 (bs, 1H); 8,07 (d, J= 10,32 Hz, 1H); 7,87 (m, 1H); 7,82 (s, 1H); 7,73 (m, 1H); 7,67 (m, 1H); 7,51 (m, 1H); 7,44 (d, J= 8,61 Hz, 1H); 7,16 (d, J= 15,51 Hz, 1H); 3,74 (m, 2H); 2,59 (m, 2H); 2,26 (s, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 373,2 (M+H)⁺; 371,0 (M-H)⁻; számított: 372,2 Rt: 0,44; 1,76; 2,18 perc.

***N,N*-diethyl-*N'*-{6-fluor-2-[(*E*)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]kinazolin-4-il}etán-1,2-diamin (178)**

Bemérés: 0,25 g (0,8 mmol) **83**; 0,18 g (1,6 mmol) *N,N*-diethylétán-1,2-diamin. Termék: 0,185 g vajsínű por (szabad bázis). Kitermelés: 58 %. Op: 120-123 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,18 (bs, 1H); 8,04 (d, J= 9,45 Hz, 1H); 7,85 (m, 2H); 7,73 (d, J= 4,83 Hz, 1H); 7,66 (d, J= 8,28 Hz, 1H); 7,48 (m, 2H); 7,16 (d, J= 15,69 Hz, 1H); 3,71 (m, 2H); 2,73 (m, 2H); 2,62 (m, 4H); 1,02 (t, J= 6,89 Hz, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 401,3 (M+H)⁺; 399,0 (M-H)⁻; számított: 400,2 Rt: 0,45; 2,02; 2,28 perc.

***N^l,N^l*-diethyl-*N^l*-{6-fluor-2-[(*E*)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]kinazolin-4-il}pentán-1,4-diamin (179)**

Bemérés: 0,25 g (0,8 mmol) **83**; 0,25 g (1,6 mmol) *N^l,N^l*-diethylpentán-1,4-diamin.

Termék: 0,154 g vajsínű por (szabad bázis). Kitermelés: 44 %. Op: 127-130 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,21 (d, $J=9,87$ Hz, 1H); 7,85 (m, 3H); 7,72 (d, $J=4,23$ Hz, 1H); 7,66 (d, $J=8,31$ Hz, 1H); 7,53 (m, 1H); 7,46 (d, $J=8,43$ Hz, 1H); 7,15 (d, $J=16,02$ Hz, 1H); 4,63 (m, 1H); 3,31 (m, 2H); 2,50 (m, 4H); 1,61 (m, 4H); 1,28 (m, 3H); 0,91 (t, $J=6,28$ Hz, 6H)

LCMS (ESI) m/z 443,3 (M+H) $^+$; 441,1 (M-H) $^-$; számított: 442,2 Rt: 0,45; 2,20; 2,50 perc.

***N'*-(6-fluor-2-*{(E)-2-[4-(izopropil)fenil]vinil}kinazolin-4-il)-N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin (180)**

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **84**; 0,12 g (1,2 mmol) *N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin. Termék: 0,078 g sárga por (1,5 ekv. fumársav só). Kitermelés: 23 %. Op: 172-176 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,27 (bs, 1H); 8,08 (dd, $J^1=9,84$ Hz, $J^2=2,22$ Hz, 1H); 7,88 (d, $J=16,00$ Hz, 1H); 7,74 (m, 1H); 7,67 (m, 1H); 7,61 (d, $J=8,00$ Hz, 2H); 7,29 (d, $J=7,95$ Hz, 2H); 7,07 (d, $J=15,89$ Hz, 1H); 6,56 (s, 3H); 3,68 (q, $J=5,48$ Hz, 2H); 2,91 (m, 1H); 2,81 (t, $J=7,45$ Hz, 2H); 2,49 (s, 6H); 1,98 (t, $J=6,30$ Hz, 2H); 1,22 (d, $J=6,88$ Hz, 6H)

LCMS (ESI) m/z 393,3 (M+H) $^+$; 391,4 (M-H) $^-$; számított: 392,2 Rt: 2,63 perc.

***N'*-(6-fluor-2-*{(E)-2-[4-(izopropil)fenil]vinil}kinazolin-4-il)-N,N*-dimetiletán-1,2-diamin (181)**

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **84**; 0,10 g (1,2 mmol) *N,N*-dimetiletán-1,2-diamin. Termék: 0,091 g sárga por (1,4 ekv. fumársav só). Kitermelés: 28 %. Op: 125-130 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,27 (bs, 1H); 8,04 (d, $J=8,53$ Hz, 1H); 7,89 (d, $J=16,40$ Hz, 1H); 7,72 (m, 1H); 7,67 (m, 1H); 7,61 (d, $J=7,86$ Hz, 2H); 7,29 (d, $J=6,94$ Hz, 2H); 7,07 (d, $J=15,73$ Hz, 1H); 6,57 (s, 2,7H); 3,84 (m, 2H); 2,89 (m, 3H); 2,47 (s, 6H); 1,22 (d, $J=6,30$ Hz, 6H)

LCMS (ESI) m/z 379,3 (M+H) $^+$; 377,2 (M-H) $^-$; számított: 378,2 Rt: 2,51; 2,59 perc.

N,N*-dietil-*N'*-(6-fluor-2-*{(E)-2-[4-(izopropil)fenil]vinil}kinazolin-4-il)etán-1,2-diamin (182)

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **84**; 0,14 g (1,2 mmol) *N,N*-dietiletán-1,2-diamin. Termék: 0,086 g sárga por (1,5 ekv. fumársav só). Kitermelés: 25 %. Op: 148-153 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,36 (bs, 1H); 8,02 (d, $J=7,36$ Hz, 1H); 7,89 (d, $J=15,53$ Hz, 1H); 7,73 (m, 1H); 7,66 (m, 1H); 7,60 (d, $J=7,60$ Hz, 2H); 7,30 (d, $J=7,21$

Hz, 2H); 7,08 (d, J= 15,27 Hz, 1H); 6,59 (s, 3H); 3,83 (m, 2H); 3,01 (m, 3H); 2,88 (m, 4H); 1,22 (d, J= 6,60 Hz, 6H); 1,12 (t, J= 6,60 Hz, 6H)

LCMS (ESI) m/z 407,3 (M+H)⁺; 405,4 (M-H)⁻; számított: 406,3 Rt: 2,67 perc.

***N'*-{6-bróm-2-[(*E*)-2-(4-metoxifenil)vinil]kinazolin-4-il}-*N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin (183)**

Bemérés: 0,40 g (1,0 mmol) **85**; 0,20 g (2,0 mmol) *N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,091 g sárga por (oxálsav só). Kitermelés: 17 %.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,48 (d, J= 1,50 Hz, 1H); 8,32 (t, J= 5,67 Hz, 1H); 7,86 (m, 2H); 7,64 (d, J= 8,55 Hz, 2H); 7,58 (d, J= 8,85 Hz, 1H); 6,97 (m, 3H); 3,80 (s, 3H); 3,66 (q, J= 6,39 Hz, 2H); 2,50 (m, 2H); 2,28 (s, 6H); 1,88 (m, 2H)

LCMS (ESI) m/z 441,3 (M+H)⁺; 439,0 (M-H)⁻; számított: 440,1 Rt: 0,46; 1,96; 2,36 perc.

***N'*-{6-bróm-2-[(*E*)-2-(4-metoxifenil)vinil]kinazolin-4-il}-*N,N*-diethylpropán-1,3-diamin (184)**

Bemérés: 0,98 g (2,6 mmol) **85**; 0,67 g (5,2 mmol) *N,N*-diethylpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,18 g sárga por (szabad bázis). Kitermelés: 15 %. Op: 96-98 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,49 (s, 1H); 8,41 (bs, 1H); 7,88 (m, 2H); 7,65 (d, J= 8,61 Hz, 2H); 7,58 (d, J= 8,85 Hz, 1H); 6,99 (m, 3H); 3,80 (s, 3H); 3,68 (q, J=5,61 Hz, 2H); 2,90 (m, 6H); 1,98 (m, 2H); 1,11 (t, J= 6,06 Hz, 6H)

LCMS (ESI) m/z 469,3 (M+H)⁺; 467,0 (M-H)⁻; számított: 468,2 Rt: 0,45; 2,26; 2,45 perc.

6-bróm-2-[(*E*)-2-(4-metoxifenil)vinil]-*N*-(3-morfolin-4-il-propil)kinazolin-4-amin (185)

Bemérés: 0,40 g (1,0 mmol) **85**; 0,28 g (2,0 mmol) 3-(morfolin-4-il)propán-1-amin.

Termék: 0,020 g fehér por (szabad bázis). Kitermelés: 4 %. Op: 188-190 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,48 (s, 1H); 8,27 (bs, 1H); 7,84 (m, 2H); 7,63 (d, J= 8,43 Hz, 2H); 7,57 (d, J= 8,85 Hz, 1H); 6,97 (m, 3H); 3,80 (s, 3H); 3,65 (m, 2H); 3,59 (m, 4H); 2,41 (m, 6H); 1,87 (m, 2H)

LCMS (ESI) m/z 483,3 (M+H)⁺; 481,0 (M-H)⁻; számított: 482,1 Rt: 0,45; 2,12; 2,37 perc.

***N'*-{6-bróm-2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]kinazolin-4-il}-*N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin (186)**

Bemérés: 0,40 g (1,1 mmol) **86**; 0,22 g (2,2 mmol) *N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,214 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 45 %.

Op: 152-154 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,50 (d, J= 1,86 Hz, 1H); 8,39 (t, J= 5,1 Hz, 1H); 7,87 (m, 2H); 7,77 (m, 2H); 7,61 (d, J= 8,88 Hz, 1H); 7,25 (t, J= 8,79 Hz, 2H); 7,08 (d, J= 15,93 Hz, 1H); 3,67 (q, J= 5,76 Hz, 2H); 2,65 (m, 2H); 2,39 (s, 6H); 1,92 (m, 2H)

LCMS (ESI) *m/z* 429,3 (M+H)⁺; 427,0 (M-H)⁻; számított: 428,1 Rt: 0,45; 2,17; 2,33 perc.

***N'*-{6-bróm-2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]kinazolin-4-il}-*N,N*-dietilpropán-1,3-diamin (187)**

Bemérés: 0,40 g (1,1 mmol) **86**; 0,28 g (2,2 mmol) *N,N*-dietilpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,105 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 21 %. Op: 97-99 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,47 (d, J= 1,71 Hz, 1H); 8,41 (bs, 1H); 7,90 (d, J= 15,96 Hz, 1H); 7,87 (m, 1H); 7,76 (m, 2H); 7,60 (d, J= 8,85 Hz, 1H); 7,25 (t, J= 8,76 Hz, 2H); 7,08 (d, J= 15,93 Hz, 1H); 3,66 (q, J= 5,64 Hz, 2H); 2,64 (m, 6H); 1,87 (m, 2H); 1,01 (t, J= 7,05 Hz, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 457,3 (M+H)⁺; 455,0 (M-H)⁻; számított: 456,1 Rt: 0,44; 2,24; 2,44 perc.

6-bróm-2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]-*N*-(3-morfolin-4-il-propil)kinazolin-4-amin (188)

Bemérés: 0,40 g (1,1 mmol) **86**; 0,32 g (2,2 mmol) 3-(morfolin-4-il)propán-1-amin.

Termék: 0,047 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 9 %. Op: 185-187 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,50 (s, 1H); 8,34 (bs, 1H); 7,87 (m, 2H); 7,76 (t, J= 6,66 Hz, 2H); 7,60 (d, J= 8,79 Hz, 1H); 7,25 (t, J= 8,34 Hz, 2H); 7,07 (d, J= 15,78 Hz, 1H); 3,66 (m, 2H); 3,59 (m, 4H); 2,43 (m, 6H); 1,87 (m, 2H)

LCMS (ESI) *m/z* 471,2 (M+H)⁺; 469,0 (M-H)⁻; számított: 470,1 Rt: 0,45; 2,05; 2,37 perc.

***N'*-{6-bróm-2-[(*E*)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]kinazolin-4-il}-*N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin (189)**

Bemérés: 0,24 g (0,6 mmol) **87**; 0,12 g (1,2 mmol) *N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,115 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 43 %. Op: 111-114 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,49 (s, 1H); 8,36 (bs, 1H); 7,85 (m, 3H); 7,61 (d, J= 8,28 Hz, 1H); 7,53 (m, 1H); 7,46 (m, 1H); 7,15 (d, J= 15,96 Hz, 1H); 3,64 (m, 2H); 2,41 (m, 2H); 2,22 (s, 6H); 1,85 (m, 2H)

LCMS (ESI) *m/z* 447,1 (M+H)⁺; 445,1 (M-H)⁻; számított: 446,1 Rt: 0,46; 2,13; 2,36 perc.

***N'*-{6-bróm-2-[(*E*)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]kinazolin-4-il}-*N,N*-diethylpropán-1,3-diamin (190)**

Bemérés: 0,24 g (0,6 mmol) **87**; 0,16 g (1,2 mmol) *N,N*-diethylpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,160 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 56 %. Op: 101-104 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,48 (s, 1H); 8,44 (bs, 1H); 7,86 (m, 3H); 7,61 (d, J= 8,61 Hz, 1H); 7,53 (m, 1H); 7,47 (d, J= 8,55 Hz, 1H); 7,16 (d, J= 15,30 Hz, 1H); 3,65 (m, 2H); 2,63 (m, 6H); 1,87 (m, 2H); 1,01 (t, J= 6,56 Hz, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 475,3 (M+H)⁺; 472,9 (M-H)⁻; számított: 474,1 Rt: 0,46; 2,26; 2,47 perc.

***N'*-{6-bróm-2-[(*E*)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]kinazolin-4-il}-*N,N*-dimetiletán-1,2-diamin (191)**

Bemérés: 0,24 g (0,6 mmol) **87**; 0,11 g (1,2 mmol) *N,N*-dimetiletán-1,2-diamin.

Termék: 0,110 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 42 %. Op: 174-177 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,52 (s, 1H); 8,28 (bs, 1H); 7,86 (m, 3H); 7,61 (d, J= 8,49 Hz, 1H); 7,51 (m, 1H); 7,46 (m, 1H); 7,15 (d, J= 15,75 Hz, 1H); 3,73 (m, 2H); 2,58 (m, 2H); 2,25 (s, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 433,1 (M+H)⁺; 431,0 (M-H)⁻; számított: 432,1 Rt: 0,46; 2,16; 2,38 perc.

***N'*-{6-bróm-2-[(*E*)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]kinazolin-4-il}-*N,N*-diethyltán-1,2-diamin (192)**

Bemérés: 0,24 g (0,6 mmol) **87**; 0,14 g (1,2 mmol) *N,N*-diethyltán-1,2-diamin. Termék:

0,120 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 43 %. Op: 119-122 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,47 (s, 1H); 8,34 (bs, 1H); 7,86 (m, 3H); 7,61 (d, $J= 8,52$ Hz, 1H); 7,48 (m, 2H); 7,16 (d, $J= 15,84$ Hz, 1H); 3,70 (m, 2H); 2,72 (m, 2H); 2,61(m, 4H); 1,02 (t, $J= 6,79$ Hz, 6H)

LCMS (ESI) m/z 461,2 (M+H) $^+$; 459,0 (M-H) $^-$; számított: 460,1 Rt: 0,46; 2,29; 2,51 perc.

***N'*-{6-bróm-2-[(*E*)-2-(2-tenil)vinil]kinazolin-4-il}-*N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin (193)**

Bemérés: 0,95 g (2,7 mmol) **88**; 0,55 g (5,4 mmol) *N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,337 g narancssárga por (szabad bázis). Kitermelés: 30 %. Op: 96-98 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,47 (s, 1H); 8,35 (bs, 1H); 8,04 (d, $J= 15,60$ Hz, 1H); 7,84 (dd, $J^1= 8,79$ Hz, $J^2= 1,05$ Hz, 1H); 7,58 (m, 2H); 7,42 (d, $J= 3,12$ Hz, 1H); 7,13 (t, $J= 4,11$ Hz, 1H); 6,82 (d, $J= 15,63$ Hz, 1H); 3,62 (q, $J= 6,03$ Hz, 2H); 2,38 (t, $J= 6,87$ Hz, 2H); 2,20 (s, 6H); 1,83 (m, 2H)

LCMS (ESI) m/z 417,1 (M+H) $^+$; 415,2 (M-H) $^-$; számított: 416,1 Rt: 0,46; 1,83; 2,18 perc.

***N'*-{6,8-dibróm-2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]kinazolin-4-il}-*N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin (194)**

Bemérés: 0,24 g (0,5 mmol) **89**; 0,10 g (1,0 mmol) *N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,125 g sárga por (szabad bázis). Kitermelés: 49 %. Op: 126-128 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,50 (bs, 2H); 8,25 (s, 1H); 7,94 (d, $J= 15,84$ Hz, 1H); 7,79 (m, 2H); 7,25 (m, 2H); 7,09 (d, $J= 16,08$ Hz, 1H); 3,65 (m, 2H); 2,39 (m, 2H); 2,21 (s, 6H); 1,84 (m, 2H)

LCMS (ESI) m/z 507,1 (M+H) $^+$; 504,8 (M-H) $^-$; számított: 506,0 Rt: 3,35 perc.

***N'*-{6,8-dibróm-2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]kinazolin-4-il}-*N,N*-diethylpropán-1,3-diamin (195)**

Bemérés: 0,24 g (0,5 mmol) **89**; 0,13 g (1,0 mmol) *N,N*-diethylpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,093 g sárga por (szabad bázis). Kitermelés: 35 %. Op: 100-103 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,54 (bs, 1H); 8,49 (s, 1H); 8,26 (s, 1H); 7,95 (d, $J= 15,69$ Hz, 1H); 7,78 (m, 2H); 7,25 (t, $J= 7,86$ Hz, 2H); 7,09 (d, $J= 15,93$ Hz, 1H); 3,66 (m, 2H); 2,56 (m, 6H); 1,84 (m, 2H); 0,99 (t, $J= 6,89$ Hz, 6H)

LCMS (ESI) m/z 535,1 (M+H) $^+$; 532,8 (M-H) $^-$; számított: 534,0 Rt: 3,52 perc.

***N'*-{6,8-dibróm-2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]kinazolin-4-il}-*N,N*-dimetiletán-1,2-diamin (196)**

Bemérés: 0,24 g (0,5 mmol) **89**; 0,09 g (1,0 mmol) *N,N*-dimetiletán-1,2-diamin.

Termék: 0,108 g sárga por (szabad bázis). Kitermelés: 44 %. Op: 159-161 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,53 (s, 1H); 8,42 (bs, 1H); 8,26 (s, 1H); 7,95 (d, J= 15,75 Hz, 1H); 7,78 (m, 2H); 7,25 (t, J= 8,19 Hz, 2H); 7,09 (d, J= 15,78 Hz, 1H); 3,74 (m, 2H); 2,58 (m, 2H); 2,25 (s, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 493,1 (M+H)⁺; 490,8 (M-H)⁻; számított: 492,0 Rt: 3,43 perc.

***N'*-{6,8-dibróm-2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]kinazolin-4-il}-*N,N*-dietiletán-1,2-diamin (197)**

Bemérés: 0,24 g (0,5 mmol) **89**; 0,12 g (1,0 mmol) *N,N*-dietiletán-1,2-diamin. Termék: 0,109 g sárga por (szabad bázis). Kitermelés: 42 %. Op: 123-125 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,48 (bs, 2H); 8,26 (s, 1H); 7,94 (d, J= 15,78 Hz, 1H); 7,76 (m, 2H); 7,25 (t, J= 7,47 Hz, 2H); 7,09 (d, J= 15,90 Hz, 1H); 3,69 (m, 2H); 2,71 (m, 2H); 2,58 (m, 4H); 1,01 (t, J= 6,78 Hz, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 521,1 (M+H)⁺; 518,9 (M-H)⁻; számított: 520,0 Rt: 3,61 perc.

***N'*-{8-bróm-2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]kinazolin-4-il}-*N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin (198)**

Bemérés: 0,70 g (1,9 mmol) **90**; 0,39 g (3,8 mmol) *N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin. Termék: 0,428 g sárga por (szabad bázis). Kitermelés: 53 %. Op: 212-215 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,60 (bs, 1H); 8,28 (d, J= 8,43 Hz, 1H); 8,09 (d, J= 7,50 Hz, 1H); 7,99 (d, J= 15,90 Hz, 1H); 7,85 (d, J= 6,00 Hz, 1H); 7,82 (d, J= 5,80 Hz, 1H); 7,37 (t, J= 7,90 Hz, 1H); 7,25 (t, J= 8,82 Hz, 2H); 7,12 (d, J= 15,90 Hz, 1H); 3,74 (q, J= 6,35 Hz, 2H); 3,12 (m, 2H); 2,71 (s, 6H); 2,10 (m, 2H)

LCMS (ESI) *m/z* 429,2 (M+H)⁺; 427,2 (M-H)⁻; számított: 428,1 Rt: 2,68 perc.

***N'*-{8-bróm-2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]kinazolin-4-il}-*N,N*-dimetiletán-1,2-diamin (199)**

Bemérés: 0,70 g (1,9 mmol) **90**; 0,33 g (3,8 mmol) *N,N*-dimetiletán-1,2-diamin. Termék: 0,340 g sárga por (szabad bázis). Kitermelés: 43 %. Op: 137-140 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,32 (bs, 1H); 8,20 (d, J= 8,28 Hz, 1H); 8,08 (d, J= 6,72 Hz, 1H); 7,95 (d, J= 15,84 Hz, 1H); 7,77 (m, 2H); 7,28 (t, J= 7,83 Hz, 1H); 7,24

(t, J= 8,75 Hz, 2H); 7,11 (d, J= 16,03 Hz, 1H); 3,75 (m, 2H); 2,61 (t, J= 6,72 Hz, 2H); 2,28 (s, 6H)

LCMS (ESI) m/z 415,2 (M+H)⁺; 413,2 (M-H)⁻; számított: 414,1 Rt: 2,87 perc.

***N,N*-dimetil-*N'*-{2-[(*E*)-2-(4-metoxifenil)vinil]-7-nitrokinazolin-4-il}propán-1,3-diamin (200)**

Bemérés: 0,56 g (1,6 mmol) **91**; 0,32 g (3,2 mmol) *N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,331 g sárga por (szabad bázis). Kitermelés: 51 %.

Op: 195-197 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,66 (bs, 1H); 8,41 (d, J= 9,03 Hz, 1H); 8,34 (d, J= 1,92 Hz, 1H); 8,15 (dd, J¹= 8,91 Hz, J²= 1,95 Hz, 1H); 7,93 (d, J= 15,84 Hz, 1H); 7,66 (d, J= 8,49 Hz, 2H); 7,01 (m, 3H); 3,81 (s, 3H); 3,67 (q, J= 5,82 Hz, 2H); 2,41 (t, J= 6,93 Hz, 2H); 2,22 (s, 6H); 1,86 (m, 2H)

LCMS (ESI) m/z 408,3 (M+H)⁺; 406,1 (M-H)⁻; számított: 407,2 Rt: 0,45; 2,20; 2,38 perc

***N,N*-dietil-*N'*-{2-[(*E*)-2-(4-metoxifenil)vinil]-7-nitrokinazolin-4-il}propán-1,3-diamin (201)**

Bemérés: 0,56 g (1,6 mmol) **91**; 0,41 g (3,2 mmol) *N,N*-dietilpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,250 g sárga por (szabad bázis). Kitermelés: 36 %.

Op: 221-223 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 10,10 (bs, 1H); 8,84 (bs, 1H); 8,53 (d, J= 9,00 Hz, 1H); 8,36 (d, J= 2,10 Hz, 1H); 8,17 (dd, J¹= 8,70 Hz, J²= 2,10 Hz, 1H); 7,98 (d, J= 15,90 Hz, 1H); 7,70 (d, J= 8,70 Hz, 2H); 7,03 (d, J= 13,65 Hz, 1H); 6,99 (d, J= 6,57 Hz, 2H); 3,81 (s, 3H); 3,17 (m, 2H); 3,10 (m, 4H); 2,12 (m, 2H); 1,20 (t, J= 7,20 Hz, 6H)

LCMS (ESI) m/z 436,3 (M+H)⁺; 434,1 (M-H)⁻; számított: 435,2 Rt: 0,44; 2,29; 2,49 perc

***N'*-{2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]-7-nitrokinazolin-4-il}-*N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin (202)**

Bemérés: 0,47 g (1,4 mmol) **92**; 0,28 g (2,8 mmol) *N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,030 g sárga por (szabad bázis). Kitermelés: 5 %.

Op: 178-179 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,73 (bs, 1H); 8,43 (d, $J=8,94$ Hz, 1H); 8,35 (s, 1H); 8,18 (dd, $J^1=8,79$ Hz, $J^2=1,38$ Hz, 1H); 7,96 (d, $J=15,90$ Hz, 1H); 7,78 (m, 2H); 7,26 (t, $J=8,61$ Hz, 2H); 7,12 (d, $J=15,90$ Hz, 1H); 3,67 (q, $J=5,73$ Hz, 2H); 2,47 (m, 2H); 2,56 (s, 6H); 1,88 (m, 2H)

LCMS (ESI) m/z 396,3 (M+H) $^+$; 394,1 (M-H) $^-$; számított: 395,2 Rt: 0,44; 2,24; 2,45 perc

***N,N*-diethyl-*N'*-{2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]-7-nitrokinazolin-4-il}propán-1,3-diamin (203)**

Bemérés: 0,34 g (1,0 mmol) **92**; 0,26 g (2,0 mmol) *N,N*-diethylpropán-1,3-diamin. Termék: 0,072 g sárga por (oxálsav só). Kitermelés: 14 %.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 10,00 (bs, 1H); 8,86 (bs, 1H); 8,52 (d, $J=5,58$ Hz, 1H); 8,38 (s, 1H); 8,20 (d, $J=6,87$ Hz, 1H); 8,02 (d, $J=15,63$ Hz, 1H); 7,82 (m, 2H); 7,27 (t, $J=8,25$ Hz, 2H); 7,14 (d, $J=15,84$ Hz, 1H); 3,77 (m, 2H); 3,22 (m, 2H); 3,13 (m, 4H); 2,11 (m, 2H); 1,19 (t, $J=6,78$ Hz, 6H)

LCMS (ESI) m/z 424,3 (M+H) $^+$; 422,0 (M-H) $^-$; számított: 423,2 Rt: 0,45; 2,45; 2,60 perc

***N,N*-dimethyl-*N'*-{6,7-dimethoxy-2-[(*E*)-2-(4-metoxifenil)vinil]kinazolin-4-il}propán-1,3-diamin (204)**

Bemérés: 0,44 g (1,2 mmol) **93**; 0,24 g (2,4 mmol) *N,N*-dimethylpropán-1,3-diamin. Termék: 0,283 g sárga por (citromsav só). Kitermelés: 38 %.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 10,80 (bs, 2H); 8,08 (bs, 1H); 7,82 (d, $J=15,69$ Hz, 1H); 7,63 (m, 3H); 7,10 (s, 1H); 6,98 (m, 3H); 3,90 (s, 6H); 3,80 (s, 3H); 3,70 (m, 2H); 3,15 (m, 2H); 2,76 (s, 6H); 2,59 (m, 4H); 2,07 (m, 2H)

LCMS (ESI) m/z 423,3 (M+H) $^+$; 421,1 (M-H) $^-$; számított: 422,2 Rt: 0,45; 2,08; 2,35 perc.

***N,N*-diethyl-*N'*-{6,7-dimethoxy-2-[(*E*)-2-(4-metoxifenil)vinil]kinazolin-4-il}propán-1,3-diamin (205)**

Bemérés: 0,44 g (1,2 mmol) **93**; 0,31 g (2,4 mmol) *N,N*-diethylpropán-1,3-diamin. Termék: 0,342 g sárga por (citromsav só). Kitermelés: 44 %.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,00 (bs, 2H); 8,05 (bs, 1H); 7,83 (d, J= 16,02 Hz, 1H); 7,62 (m, 3H); 7,10 (s, 1H); 6,95 (m, 3H); 3,90 (s, 6H); 3,80 (s, 3H); 3,45 (m, 2H); 3,25 (m, 4H); 2,59 (m, 6H); 1,18 (t, J= 6,88 Hz, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 451,3 (M+H)⁺; 449,2 (M-H)⁻; számított: 450,3 Rt: 0,46; 2,28; 2,43 perc.

***N'*-{2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]-6,7-dimetoxikinazolin-4-il}-*N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin (206)**

Bemérés: 0,50 g (1,4 mmol) **94**; 0,28 g (2,8 mmol) *N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin.
Termék: 0,023 g sárga por (oxálsav só). Kitermelés: 3 %.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,31 (bs, 1H); 7,95 (d, J= 14,01 Hz, 1H); 7,77 (m, 2H); 7,64 (s, 1H); 7,27 (t, J= 8,34 Hz, 2H); 7,16 (s, 1H); 7,09 (d, J= 16,05 Hz, 1H); 3,91 (s, 6H); 3,73 (m, 2H); 3,20 (m, 2H); 2,79 (s, 6H); 2,07 (m, 2H)

LCMS (ESI) *m/z* 411,3 (M+H)⁺; 409,1 (M-H)⁻; számított: 410,2 Rt: 0,45; 1,98; 2,30 perc.

***N,N*-dietil-*N'*-{2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]-6,7-dimetoxikinazolin-4-il}propán-1,3-diamin (207)**

Bemérés: 0,50 g (1,4 mmol) **94**; 0,36 g (2,8 mmol) *N,N*-dietilpropán-1,3-diamin.
Termék: 0,041 g sárga por (oxálsav só). Kitermelés: 6 %.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,34 (bs, 1H); 7,91 (d, J= 15,81 Hz, 1H); 7,76 (m, 2H); 7,65 (s, 1H); 7,27 (t, J= 7,86 Hz, 2H); 7,16 (s, 1H); 7,09 (d, J= 15,51 Hz, 1H); 3,91 (s, 6H); 3,73 (m, 2H); 3,21 (m, 2H); 3,13 (m, 4H); 2,08 (m, 2H); 1,18 (t, J= 6,03 Hz, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 439,3 (M+H)⁺; 437,0 (M-H)⁻; számított: 438,2 Rt: 0,46; 2,10; 2,38 perc.

2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]-6,7-dimetoxi-*N*-(3-morfolin-4-il-propil)kinazolin-4-amin (208)

Bemérés: 0,60 g (1,7 mmol) **94**; 0,49 g (3,4 mmol) 3-(morfolin-4-il)propán-1-amin.
Termék: 0,010 g sárga por (szabad bázis). Kitermelés: 1 %.

Op: 190-192 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 7,86 (bs, 1H); 7,79 (d, J= 15,90 Hz, 1H); 7,74 (m, 2H); 7,58 (s, 1H); 7,24 (m, 2H); 7,09 (s, 1H); 7,02 (d, J= 16,20 Hz, 1H); 3,89 (s, 6H); 3,64 (m, 2H); 3,58 (m, 4H); 2,40 (m, 6H); 1,87 (m, 2H)

LCMS (ESI) *m/z* 453,4 (M+H)⁺; 451,1 (M-H)⁻; számított: 452,2 Rt: 0,45; 2,28 perc.

***N,N*-dimetil-*N'*-{2-[(*E*)-2-(4-metoxifenil)vinil]benzo[g]kinazolin-4-il}propán-1,3-diamin (209)**

Bemérés: 0,27 g (0,8 mmol) **95**; 0,16 g (1,6 mmol) *N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,251 g sárga por (citromsav só). Kitermelés: 52 %.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,10 (bs, 2H); 8,86 (s, 1H); 8,69 (bs, 1H); 8,24 (s, 1H); 8,04 (m, 2H); 7,94 (d, J= 16,38 Hz, 1H); 7,69 (m, 2H); 7,59 (m, 2H); 7,05 (m, 3H); 3,81 (s, 3H); 3,52 (m, 2H); 3,17 (m, 2H); 2,76 (s, 6H); 2,57 (m, 4H); 2,12 (m, 2H)

LCMS (ESI) *m/z* 413,3 (M+H)⁺; 411,1 (M-H)⁻; számított: 412,3 Rt: 0,46; 2,42; 2,57 perc.

***N,N*-dietil-*N'*-{2-[(*E*)-2-(4-metoxifenil)vinil]benzo[g]kinazolin-4-il}propán-1,3-diamin (210)**

Bemérés: 0,27 g (0,8 mmol) **95** + 0,21 g (1,6 mmol) *N,N*-dietilpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,254 g sárga por (citromsav só). Kitermelés: 50 %.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,08 (bs, 2H); 8,89 (s, 1H), 8,72 (bs, 1H); 8,24 (s, 1H); 7,99 (m, 3H); 7,68 (d, J= 6,18 Hz, 2H); 7,58 (m, 2H); 7,06 (m, 3H); 3,81 (s, 3H); 3,30 (m, 2H); 3,22 (m, 2H); 3,11(m, 4H); 2,56(m, 4H); 2,12 (m, 2H); 1,18 (t, J= 6,74 Hz, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 441,4 (M+H)⁺; 439,2 (M-H)⁻; számított: 440,3 Rt: 0,45; 2,50; 2,65 perc.

***N'*-{2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]benzo[g]kinazolin-4-il}-*N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin (211)**

Bemérés: 3,50 g (10,4 mmol) **96**; 2,12 g (20,8 mmol) *N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin.

Termék: 1,433 g sárga por (1,3 ekv. fumársav só). Kitermelés: 25 %.

Op: 218-222 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,90 (s, 1H); 8,73 (bs, 1H); 8,25 (s, 1H); 8,03 (m, 2H); 7,96 (d, J= 15,90 Hz, 1H); 7,80 (m, 2H); 7,57 (m, 2H); 7,26 (t, J= 8,79 Hz,

2H); 7,17 (d, J= 15,86 Hz, 1H); 6,57 (s, 2,7H); 3,77 (m, 2H); 2,85 (t, J= 6,54 Hz, 2H); 2,50 (s, 6H); 2,04 (m, 2H)

LCMS (ESI) m/z 401,3 (M+H)⁺; 399,1 (M-H)⁻; számított: 400,2 Rt: 0,46; 2,18; 2,48 perc.

***N,N*-diethyl-*N'*-{2-[(*E*)-2-(4-fluorfenil)vinil]benzo[g]kinazolin-4-il}propán-1,3-diamin (212)**

Bemérés: 0,32 g (0,9 mmol) **96**; 0,23 g (1,8 mmol) *N,N*-diethylpropán-1,3-diamin.
Termék: 0,303 g sárga por (citromsav só). Kitermelés: 54 %.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,08 (bs, 2H); 8,89 (s, 1H); 8,74 (bs, 1H); 8,27 (s, 1H); 8,02 (m, 3H); 7,81 (m, 2H); 7,57 (m, 2H); 7,27 (m, 2H); 7,16 (d, J= 15,66 Hz, 1H); 3,82 (m, 2H); 3,24 (m, 2H); 3,12 (m, 4H); 2,59 (m, 4H); 2,11 (m, 2H); 1,18 (t, J= 6,78 Hz, 6H)

LCMS (ESI) m/z 429,3 (M+H)⁺; 427,1 (M-H)⁻; számított: 428,2 Rt: 0,45; 2,45; 2,60 perc.

***N'*-{2-[(*E*)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]benzo[g]kinazolin-4-il}-*N,N*-dimethylpropán-1,3-diamin (213)**

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **97**; 0,12 g (1,2 mmol) *N,N*-dimethylpropán-1,3-diamin.
Termék: 0,150 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 60 %.

Op: 188-190 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,87 (s, 1H); 8,67 (bs, 1H); 8,25 (s, 1H); 8,05 (d, J= 8,73 Hz, 1H); 8,02 (d, J= 8,64 Hz, 1H); 7,88 (m, 2H); 7,52 (m, 4H); 7,10 (d, J= 15,90 Hz, 1H); 3,74 (q, J= 6,30 Hz, 2H); 2,46 (m, 2H); 2,24 (s, 6H); 1,92 (m, 2H)

LCMS (ESI) m/z 419,3 (M+H)⁺; 417,3 (M-H)⁻; számított: 418,2 Rt: 0,45; 2,25; 2,50 perc.

***N,N*-diethyl-*N'*-{2-[(*E*)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]benzo[g]kinazolin-4-il}propán-1,3-diamin (214)**

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **97**; 0,16 g (1,2 mmol) *N,N*-diethylpropán-1,3-diamin.
Termék: 0,143 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 54 %.

Op: 136-138 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,87 (s, 1H); 8,75 (bs, 1H); 8,26 (s, 1H); 8,07 (d, J= 7,89 Hz, 1H); 8,02 (d, J= 8,49 Hz, 1H); 7,92 (m, 2H); 7,54 (m, 4H); 7,21 (d, J= 15,90 Hz, 1H); 3,76 (m, 2H); 2,71 (m, 6H); 1,95 (m, 2H); 1,05(t, J= 6,84 Hz, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 447,3 (M+H)⁺; 445,3 (M-H)⁻; számított: 446,2 Rt: 0,46; 2,38; 2,56 perc.

***N'*-{2-[(*E*)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]benzo[g]kinazolin-4-il}-*N,N*-dimetiletán-1,2-diamin (215)**

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **97**; 0,10 g (1,2 mmol) *N,N*-dimetiletán-1,2-diamin.

Termék: 0,051 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 21 %.

Op: 204-205 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,90 (s, 1H); 8,51 (t, J= 6Hz, 1H); 8,26 (s, 1H); 8,05 (t, J= 9,12 Hz, 2H); 7,90 (m, 2H); 7,54 (m, 4H); 7,21 (d, J= 15,82 Hz, 1H); 3,83 (q, J= 6,00 Hz, 2H); 2,65 (t, J= 6,90 Hz, 2H); 2,29 (s, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 405,3 (M+H)⁺; 403,3 (M-H)⁻; számított: 404,2 Rt: 0,46; 2,17; 2,41 perc.

***N,N*-dietyl-*N'*-{2-[(*E*)-2-(3,4-difluorfenil)vinil]benzo[g]kinazolin-4-il}etán-1,2-diamin (216)**

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **97**; 0,14 g (1,2 mmol) *N,N*-dietyl-1,2-diamin. Termék: 0,137 g világossárga por (szabad bázis). Kitermelés: 53 %.

Op: 90-92 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,87 (s, 1H); 8,60 (bs, 1H); 8,26 (s, 1H); 8,07 (d, J= 8,46 Hz, 1H); 8,01 (d, J= 8,28 Hz, 1H); 7,92 (d, J= 15,61 Hz, 1H); 7,84 (d, J= 9,43 Hz, 1H); 7,53 (m, 4H); 7,22 (d, J= 15,77 Hz, 1H); 3,81 (q, J= 5,40 Hz, 2H); 2,85 (m, 2H); 2,68 (m, 4H); 1,06 (t, J= 7,20 Hz, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 433,3 (M+H)⁺; 431,3 (M-H)⁻; számított: 432,2 Rt: 0,46; 2,32; 2,49 perc.

***N'*-{2-[(*E*)-2-(4-klórfenil)vinil]benzo[g]kinazolin-4-il}-*N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin (217)**

Bemérés: 0,21 g (0,6 mmol) **98**; 0,12 g (1,2 mmol) *N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,200 g sárga por (oxálsav só). Kitermelés: 66 %.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8.93 (s, 1H); 8.83 (bs, 1H); 8.28 (s, 1H); 8.07 (m, 2H); 7.98 (d, J=15,87 Hz, 1H); 7.79 (d, J= 6,75 Hz, 2H); 7.59 (m, 2H); 7.50 (d, J= 6,36 Hz, 2H); 7.23 (d, J= 16,08 Hz, 1H); 3.81 (m, 2H); 3.23 (m, 2H); 2.79 (s, 6H); 2.15 (m, 2H)

LCMS (ESI) *m/z* 417,3 (M+H)⁺; 415,1 (M-H)⁻; számított: 416,2 Rt: 0,45; 2,45; 2,62 perc.

***N,N*-diethyl-*N'*-{2-[(*E*)-2-(4-klórphenil)vinil]benzo[g]kinazolin-4-il}propán-1,3-diamin (218)**

Bemérés: 0,21 g (0,6 mmol) **98**; 0,16 g (1,2 mmol) *N,N*-diethylpropán-1,3-diamin. Termék: 0,260 g sárga por (oxálsav só). Kitermelés: 81 %.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,97 (bs, 2H); 8,28 (s, 1H); 8,04 (m, 3H); 7,79 (d, J= 8,16 Hz, 2H); 7,59 (m, 2H); 7,50 (d, J= 8,28 Hz, 2H); 7,24 (d, J= 15,93 Hz, 1H); 3,84 (m, 2H); 3,26 (m, 2H); 3,14 (m, 4H); 2,15 (m, 2H); 1,92 (t, J= 6,88 Hz, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 445,3 (M+H)⁺; 443,1 (M-H)⁻; számított: 444,2 Rt: 0,44; 2,54; 2,70 perc.

***N,N*-diethyl-*N'*-{2-[(*E*)-2-(4-klórphenil)vinil]benzo[g]kinazolin-4-il}etán-1,2-diamin (219)**

Bemérés: 0,31 g (0,9 mmol) **98**; 0,21 g (1,8 mmol) *N,N*-diethylétán-1,2-diamin. Termék: 0,266 g narancssárga por (oxálsav só). Kitermelés: 57 %.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,90 (bs, 1H); 8,88 (s, 1H); 8,32 (s, 1H); 8,08 (m, 2H); 7,99 (d, J= 16,32 Hz, 1H); 7,78 (d, J= 7,62 Hz, 2H); 7,60 (m, 2H); 7,50 (d, J= 7,17 Hz, 2H); 7,24 (d, J= 16,11 Hz, 1H); 4,09 (m, 2H); 3,45 (m, 2H); 3,28 (m, 4H); 1,25 (t, J= 6,68 Hz, 6H)

LCMS (ESI) *m/z* 431,3 (M+H)⁺; 429,1 (M-H)⁻; számított: 430,2 Rt: 0,45; 2,47; 2,63 perc.

***N,N*-dimethyl-*N'*-{2-[(*E*)-2-(2-tenil)vinil]benzo[g]kinazolin-4-il}propán-1,3-diamin (220)**

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **99**; 0,12 g (1,2 mmol) *N,N*-dimethylpropán-1,3-diamin. Termék: 0,09 g narancssárga por (0,5 ekv. fumársav só). Kitermelés: 34 %.

Op: 150-153 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,90 (s, 1H); 8,78 (bs, 1H); 8,23 (s, 1H); 8,06 (m, 3H); 7,54 (m, 3H); 7,43 (s, 1H); 7,15 (s, 1H); 6,88 (d, $J=15,44$ Hz, 1H); 6,54 (s, 1H); 3,75 (m, 2H); 2,64 (m, 2H); 2,37 (s, 6H); 1,96 (m, 2H)

LCMS (ESI) m/z 389,2 (M+H) $^+$; 387,2 (M-H) $^-$; számított: 388,2 Rt: 0,45; 2,13; 2,33 perc.

***N,N*-dietil-*N'*-{2-[(*E*)-2-(2-tenil)vinil]benzo[g]kinazolin-4-il}propán-1,3-diamin (221)**

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **99**; 0,16 g (1,2 mmol) *N,N*-dietilpropán-1,3-diamin.
Termék: 0,123 g narancssárga por (1,0 ekv. fumársav só). Kitermelés: 39 %. Op: 125-131 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,90 (s, 1H); 8,78 (bs, 1H); 8,24 (s, 1H); 8,06 (m, 3H); 7,57 (m, 3H); 7,43 (s, 1H); 7,15 (s, 1H); 6,89 (d, $J=15,57$ Hz, 1H); 6,57 (s, 2H); 3,77 (m, 2H); 2,96 (m, 2H); 2,88 (m, 4H); 2,04 (m, 2H); 1,12(t, $J=6,98$ Hz, 6H)

LCMS (ESI) m/z 417,2 (M+H) $^+$; 415,2 (M-H) $^-$; számított: 416,2 Rt: 0,44; 2,39 perc.

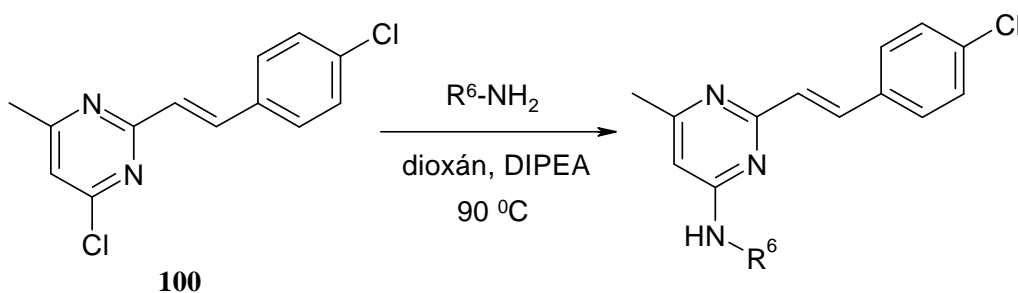
***N,N*-dimetil-*N'*-{2-[(*E*)-2-(2-tenil)vinil]benzo[g]kinazolin-4-il}etán-1,2-diamin (222)**

Bemérés: 0,20 g (0,6 mmol) **99**; 0,09 g (1,2 mmol) *N,N*-dimetiletán-1,2-diamin.
Termék: 0,097 g narancssárga por (1,0 ekv. fumársav só). Kitermelés: 33 %. Op: 156-162 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,88 (s, 1H); 8,68(bs, 1H); 8,24 (s, 1H); 8,07 (m, 3H); 7,60 (s, 1H); 7,54 (m, 2H); 7,43 (s, 1H); 7,14 (s, 1H); 6,89 (d, $J=14,76$ Hz, 1H); 6,58 (s, 2H); 3,92 (m, 2H); 2,94 (m, 2H); 2,56 (s, 6H)

LCMS (ESI) m/z 375,2 (M+H) $^+$; 373,2 (M-H) $^-$; számított: 374,2 Rt: 0,44; 1,89; 2,22 perc.

6.2.2.7 Sztiril-pirimidin végtermékek szintézise



24. ábra Sztiril-pirimidin származékok szintézise.

Az imin-klorid származékból (**100**) feloldottam 1 mmol-t 10 ml vízmentes dioxánban. A kissé zavaros oldathoz 1 mmol diizopropil-etilamint adtam, melynek hatására az oldat kitisztult. A primer aminből 2 mmol-t pipettáztam a reakcióelegyhez és a lombikot átöblítettem argonnal. 12 órán keresztül 90 °C-on kevertettem az oldatot. A reakciót (24. ábra) vékonyréteg segítségével követtem, futtatószerként kloroform/metanol 9:1 arányú keverékét használtam. A feldolgozás során az oldatot bepároltam, majd az anyagot oszlopon tisztítottam. Az eluens kloroform/metanol 9:1 arányú elegye volt. A szabad bázist feloldottam etanolban, majd ekvivalens mennyiségben adtam hozzá fumársavat. Rövid kevertetés után az oldatot bepároltam és a söt etil-acetátos mosást követően szűrtem.

***N'*-{2-[(*E*)-2-(4-klórfeil)vinil]-6-metilpirimidin-4-il}-*N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin (223)**

Bemérés: 0,17 g (0,6 mmol) **100**; 0,12 g (1,2 mmol) *N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin.

Termék: 0,09 g sárga por (1,5 ekv. fumársav só). Kitermelés: 30 %. Op: 103-108 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 7,75 (s, 1H); 7,69 (d, J= 8,04 Hz, 2H); 7,45 (d, J= 8,31 Hz, 2H); 7,30 (bs, 1H); 7,00 (d, J= 16,00 Hz, 1H); 6,58 (s, 3H); 6,20 (s, 1H); 3,39 (m, 2H); 2,88 (t, J= 7,20 Hz, 2H); 2,58 (s, 6H); 2,23 (s, 3H); 1,86 (m, 2H)

LCMS (ESI) *m/z* 331,2 (M+H)⁺; számított: 330,2 Rt: 0,45; 2,18 perc.

***N'*-{2-[(*E*)-2-(4-klórfeil)vinil]-6-metilpirimidin-4-il}-*N,N*-dimetiletán-1,2-diamin (224)**

Bemérés: 0,17 g (0,6 mmol) **100**; 0,09 g (1,2 mmol) *N,N*-dimetiletán-1,2-diamin.

Termék: 0,06 g sárga por (1,5 ekv. fumársav só). Kitermelés: 20 %. Op: 158-162 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 7,76 (s, 1H); 7,69 (d, J= 8,58 Hz, 2H); 7,44 (d, J= 7,48 Hz, 2H); 7,23 (bs, 1H); 7,00 (d, J= 16,29 Hz, 1H); 6,58 (s, 3H); 6,22 (s, 1H); 3,53 (m, 2H); 2,71 (m, 2H); 2,41 (s, 6H); 2,23 (s, 3H)

LCMS (ESI) *m/z* 317,2 (M+H)⁺; számított: 316,1 Rt: 0,46; 2,11 perc.

6.2.3 Sztiril-kinazolin származékok szelektivitásának vizsgálata kinázpanel segítségével

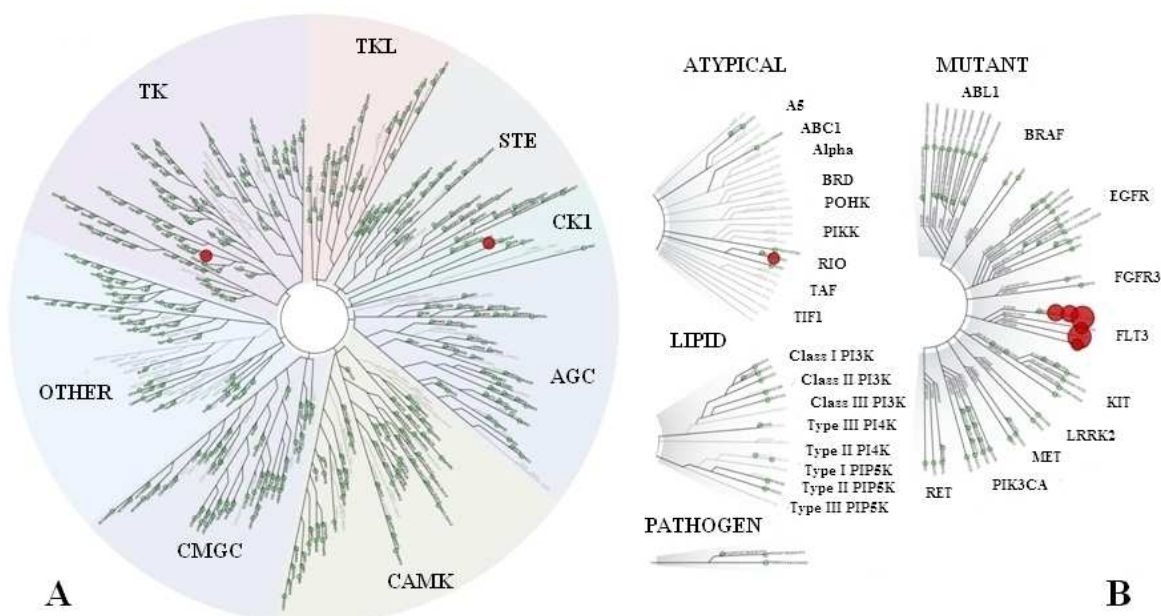
Az előállított sztiril-kinazolin vegyületcsalád első képviselői (**3**, **131**, **132**, **183**, **184**) közül az egyik származékot (**184**) elküldtük szelektivitás tesztelésre, melyet a

DiscoverX cég végzett el az ún. KINOMEScan[®] módszerével. A kísérlet során 450 kinázon vizsgálták az anyag kötődését 5 μ M-os koncentráció mellett.

Kináz neve	Csoportosítás	Kináz család	Kötődés (%)
FLT3	TK	PDGFR	81
FLT3(D835H)	TK	PDGFR	97,1
FLT3(D835Y)	TK	PDGFR	94,6
FLT3(ITD)	TK	PDGFR	95,8
FLT3(K663Q)	TK	PDGFR	80
FLT3(N841I)	TK	PDGFR	95
CSNK1A1	CK1	CK1	77
GAK	Más	NAK	65
RIOK1	Atípusos	RIO	63

5. táblázat A 184-es vegyület kináz szelektivitása 450 kinázon.

A kapott eredmények (5. táblázat) alapján megállapítható, hogy az általam előállított vegyület (184) a vad típusú- és mutáns FLT3 kinázokhoz kötődik (25. ábra), illetve kisebb mértékben kötődhet a CSNK1A1, GAK és RIOK1 fehérjékhez. Ez azért fontos eredmény, mert az eddig ismert FLT3 gátló molekulák nem szelektívek, és igen jó hatást mutatnak a PDGFR család többi képviselőjén (c-KIT, PDGFR, CSFR) is.



25. ábra A 184-es vegyület szelektivitásának bemutatása a kinázfán. Az A ábrán a célpont fehérjék láthatók, míg a B ábrán már a kötődés százalékos értéke szerint jelöltem a fehérjéket.

6.2.4 Sztiril-kinazolin származékok hatásának vizsgálata biokémiai módszerek segítségével

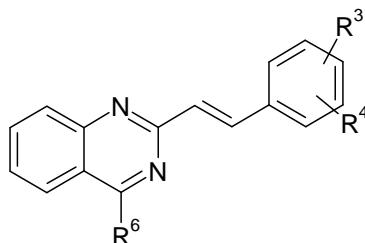
A kötődési vizsgálat során kijött eredményeket enzimatiskus mérésekkel validáltuk. A molekula szerkezetének méretéből és jellegéből arra következtettünk, hogy hatását az ATP-vel kompetitív módon fejt ki, ezért olyan módszert választottunk, amely képes meghatározni, hogy a vegyületek a kináz aktivitását milyen mértékben befolyásolják. Választásunk a fluoreszcencia polarizáción alapuló IMAP módszerre esett, mivel a kutatócsoportunk más kinázok (CDK9, Akt, PAK, c-Met) esetén már sikerrel alkalmazta ezt a módszert. A kötődési vizsgálat során az egyik legjobb eredményt az FLT3 ún. ITD mutáns változata adta. Mivel ennek a mutációnak a leggyakoribb az előfordulása FLT3 kináz és akut mieloid leukémia esetén, a módszert erre a fehérjére állítottuk be.

6.2.4.1 A vegyületek hatása FLT3(ITD) kinázon

Az előállított vegyületeket egy pontban teszteltük 10 μ M-os koncentrációban. A célunk ezzel az volt, hogy kiszűrjük a hatástalan molekulákat és csak a legjobb vegyületek kerüljenek az időigényesebb és precízebb IC₅₀ mérésekbe. Az egyponτος előszűrést követően a molekulákat három csoportra osztottuk. A 75 %-os gátlóértéknél kisebb értéket produkáló vegyületeket hatástalannak tekintettük, a 75-85 % közöttieket közepes hatásúaknak (a táblázatokban sárga színnel jelölt értékek), míg a 85 % felettieket kiváló hatású (zöld színnel jelölt értékek) származékoknak.

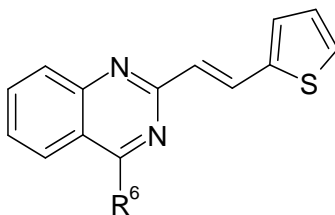
A CP-31398 jelű validációs vegyület (**3**) közepes hatásúnak bizonyult FLT3(ITD) kinázon (6. táblázat), ezért megvizsgáltam annak a lehetőségét, hogy a molekulát milyen irányban lehet módosítani ahhoz, hogy az jobb hatást eredményezzen. Mivel a szubsztituált származékok szintézisét az antranilsav benzoxazinon gyűrűbe zárásával majd kinazolonná alakításával kezdtem, a szelektivitás vizsgálatok során pedig a brómot tartalmazó származék erős kötődést mutatott, kézenfekvőnek bizonyult, hogy különböző szubsztituált antranilsavakból állítsak elő kinazolin származékokat. További lehetséges módosításként merült fel a 4-metoxibenzaldehid cseréje más benzaldehid származékokra, valamint az oldhatóságot is javító oldallánc hosszának növelése és csökkentése is.

A referenciavegyület mintájára előállítottam 27 darab származékot, melyeknél az aldehid- és az oldallánc részeket módosítottam. A biológiai eredményeket a 6. és 7. táblázat foglalja össze.



Szám	R ³	R ⁴	R ⁶	FLT3(ITD) gátlás 10 μM-ban (%)	FLT3 (ITD) IC ₅₀ (μM)
3	4-Metoxi	H	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	78,9	3,62
101	4-Metoxi	H	3-(morfolin-4-il)propán-1-amin	56,4	
102	4-Metoxi	H	3-(4-metilpiperazin-1-il)propán-1-amin	33,0	
103	4-F	H	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	89,6	3,08
104	4-F	H	<i>N,N</i> -dietilpropán-1,3-diamin	83,5	6,02
105	4-F	H	3-(morfolin-4-il)propán-1-amin	53,3	
106	4-F	H	<i>N,N</i> -dimetiletán-1,2-diamin	86,1	0,76
107	4-F	H	<i>N,N</i> -dietiletán-1,2-diamin	74,7	
108	4-F	H	<i>N',N'</i> -diethylpentán-1,4-diamin	63,6	
109	3-F	H	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	68,0	
110	3-F	H	<i>N,N</i> -dietilpropán-1,3-diamin	47,1	
111	3-F	4-F	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	71,5	
112	3-F	4-F	<i>N,N</i> -dietilpropán-1,3-diamin	70,4	
113	3-F	4-F	<i>N,N</i> -dimetiletán-1,2-diamin	96,0	2,75
114	3-F	4-F	<i>N,N</i> -dietiletán-1,2-diamin	90,1	3,25
115	4-Metilszulfanil	H	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	83,9	3,07
116	4-Metilszulfanil	H	<i>N,N</i> -dimetiletán-1,2-diamin	92,3	0,55
117	4-Metilszulfanil	H	<i>N,N</i> -dietiletán-1,2-diamin	89,3	1,29
121	4-Izopropil	H	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	85,0	1,27
122	4-Izopropil	H	<i>N,N</i> -dietilpropán-1,3-diamin	88,5	1,51
123	4-Izopropil	H	<i>N,N</i> -dimetiletán-1,2-diamin	99,8	0,20
124	4-Izopropil	H	<i>N,N</i> -dietiletán-1,2-diamin	95,4	0,65
125	4-Metilszulfonil	H	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	86,9	1,51
126	4-Metilszulfonil	H	<i>N,N</i> -dimetiletán-1,2-diamin	96,1	0,33
127	4-Metilszulfonil	H	propán-1-amin	78,2	4,51

6. táblázat A kinazolin gyűrűn szubsztituátlan molekulák biológiai hatása.



Szám	R ⁶	FLT3(ITD) gátlás 10 μM-ban (%)	FLT3 (ITD) IC ₅₀ (μM)
128	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	74,5	
129	<i>N,N</i> -diethylpropán-1,3-diamin	62,6	
130	<i>N,N</i> -dimetiletán-1,2-diamin	78,6	3,13

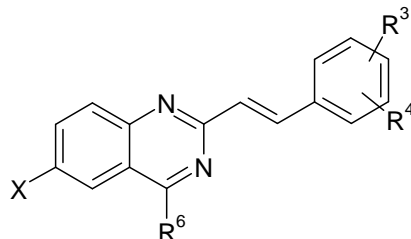
7. táblázat A kinazolin gyűrűn szubsztituátlan molekulák biológiai hatása.

Az eredményekből kitűnik, hogy a benzaldehyd rész esetén a fenil gyűrű és annak a para helyzetű szubsztitúciója a preferált, mivel a meta helyzetben fluort tartalmazó származékok (**109**, **110**) még csak közepes mértékű gátló hatást sem mutattak 10 μM-ban, ahogy a tenil gyűrűt tartalmazó származékoknál (**128-130**) sem jelentkezett szignifikáns különbség a hatásban. Érdekes viszont, hogy a diszubsztituált származékok (**111-114**) közül a rövidebb oldalláncot tartalmazó molekulák (**113**, **114**) magas gátlóértéket produkáltak. Jól látszik az is, hogy az aldehid részen a 4-izopropil (**121-124**), a 4-metilszulfonil (**125**, **126**) és a 4-metilszulfanil (**115-117**) csoportot tartalmazó vegyületek a legjobbak, és minél rövidebb a terciér amint tartalmazó oldallánc, annál jobb a hatás.

További három származék (**118**, **119**, **120**) készült 3,4,5-trimetoxi-benzaldehyd felhasználásával is, azonban ezek a vegyületek már egyáltalán nem mutattak hatást (FLT3(ITD) gátlás 10 μM-ban <10%) a kinázon.

Következő lépésként azt vizsgáltam, hogy milyen módon befolyásolja a kinazolin gyűrű szubsztituáltsága az FLT3(ITD) gátló hatást. Mivel az első molekulák közül négy (**131**, **132**, **183**, **184**) is tartalmazott a 6-os pozícióban klór vagy bróm atomot, és a DiscoverX panelen a brómot tartalmazó molekulán keresztül mutattuk ki először a sztiril-kinazolinok FLT3 gátló hatását, feltételezhető, hogy a 6-os pozícióba akár nagyobb térkitöltésű csoport is beépíthető a hatékonyság nagymértékű csökkenése nélkül.

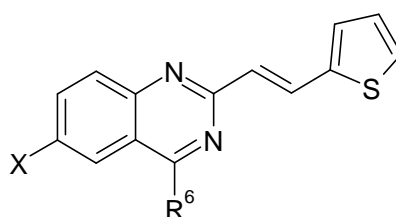
A rendelkezésemre álló 2-aminobenzoesavakból előállítottam további bróm és klór atommal szubsztituált származékokat és a szintézishez felhasználtam új oldalláncokat is. A halogénnel szubsztituált molekulák eredményeit a 8. és 9. táblázatok foglalják össze.



Szám	X	R ³	R ⁴	R ⁶	FLT3(ITD) gátlás 10 μM-ban (%)	FLT3 (ITD) IC ₅₀ (μM)
131	Cl	4-Metoxi	H	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	100,0	1,91
132	Cl	4-Metoxi	H	<i>N,N</i> -dietilpropán-1,3-diamin	79,1	2,53
133	Cl	4-Metoxi	H	3-(morfolin-4-il)propán-1-amin	77,1	8,66
134	Cl	4-F	H	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	79,2	0,91
135	Cl	4-F	H	<i>N,N</i> -dietilpropán-1,3-diamin	73,3	
136	Cl	4-F	H	3-(morfolin-4-il)propán-1-amin	11,5	
137	Cl	3-F	4-F	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	67,5	
138	Cl	3-F	4-F	<i>N,N</i> -dietilpropán-1,3-diamin	53,2	
139	Cl	3-F	4-F	<i>N,N</i> -dimetiletán-1,2-diamin	96,8	2,23
140	Cl	3-F	4-F	<i>N,N</i> -diेतiletán-1,2-diamin	72,2	
141	Cl	3-F	4-F	<i>N</i> ¹ , <i>N</i> ¹ -dietilpentán-1,4-diamin	55,3	
142	Cl	3-F	4-F	1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]dekán	3,6	
143	Cl	3-F	4-F	1-[(2 <i>S</i>)-pirrolidin-2-il-metil]pirrolidin	5,8	
144	Cl	3-F	4-F	1-[(2 <i>R</i>)-pirrolidin-2-il-metil]pirrolidin	6,0	
145	Cl	4-Metilszulfanil	H	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	75,1	1,46
146	Cl	4-Metilszulfanil	H	<i>N,N</i> -dietilpropán-1,3-diamin	80,3	4,70
147	Cl	4-Metilszulfanil	H	<i>N,N</i> -dimetiletán-1,2-diamin	82,1	0,61
148	Cl	4-Metilszulfanil	H	<i>N,N</i> -diेतiletán-1,2-diamin	80,8	1,33
149	Cl	4-Izopropil	H	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	89,9	1,27
150	Cl	4-Izopropil	H	<i>N,N</i> -dietilpropán-1,3-diamin	85,4	2,96
151	Cl	4-Izopropil	H	<i>N,N</i> -dimetiletán-1,2-diamin	89,9	0,41
152	Cl	4-Izopropil	H	<i>N,N</i> -diेतiletán-1,2-diamin	94,4	1,40
153	Cl	4-Metilszulfonil	H	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	94,4	0,87
154	Cl	4-Metilszulfonil	H	<i>N,N</i> -dietilpropán-1,3-diamin	92,1	1,98
155	Cl	4-Metilszulfonil	H	<i>N,N</i> -dimetiletán-1,2-diamin	91,0	0,24
156	Cl	4-Metilszulfonil	H	<i>N,N</i> -diेतiletán-1,2-diamin	92,1	0,44

169	F	4-Metoxi	H	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	93,2	1,35
170	F	4-Metoxi	H	<i>N,N</i> -dietilpropán-1,3-diamin	81,0	4,13
171	F	4-Metoxi	H	3-(morfolin-4-il)propán-1-amin	52,3	
172	F	4-F	H	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	84,2	4,33
173	F	4-F	H	<i>N,N</i> -dietilpropán-1,3-diamin	92,3	4,76
174	F	4-F	H	3-(morfolin-4-il)propán-1-amin	52,9	
175	F	3-F	4-F	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	52,5	
176	F	3-F	4-F	<i>N,N</i> -dietilpropán-1,3-diamin	54,1	
177	F	3-F	4-F	<i>N,N</i> -dimetiletán-1,2-diamin	53,1	
178	F	3-F	4-F	<i>N,N</i> -diेतiletán-1,2-diamin	55,4	
179	F	3-F	4-F	<i>N',N'</i> -dietilpentán-1,4-diamin	37,7	
180	F	4-Izopropil	H	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	100,0	1,26
181	F	4-Izopropil	H	<i>N,N</i> -dimetiletán-1,2-diamin	100,0	0,58
182	F	4-Izopropil	H	<i>N,N</i> -diेतiletán-1,2-diamin	100,0	0,87
183	Br	4-Metoxi	H	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	97,7	1,16
184	Br	4-Metoxi	H	<i>N,N</i> -dietilpropán-1,3-diamin	92,4	2,01
185	Br	4-Metoxi	H	3-(morfolin-4-il)propán-1-amin	53,4	
186	Br	4-F	H	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	88,9	1,51
187	Br	4-F	H	<i>N,N</i> -dietilpropán-1,3-diamin	82,7	3,71
188	Br	4-F	H	3-(morfolin-4-il)propán-1-amin	37,1	
189	Br	3-F	4-F	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	80,6	5,95
190	Br	3-F	4-F	<i>N,N</i> -dietilpropán-1,3-diamin	67,6	
191	Br	3-F	4-F	<i>N,N</i> -dimetiletán-1,2-diamin	70,9	
192	Br	3-F	4-F	<i>N,N</i> -diेतiletán-1,2-diamin	64,6	

8. táblázat A kinazolin gyűrű 6-os helyzetében halogénatomot tartalmazó származékok biológiai hatása.



Szám	X	R ⁶	FLT3(ITD) gátlás 10 μM-ban (%)	FLT3 (ITD) IC ₅₀ (μM)
157	Cl	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	82,7	3,80
158	Cl	<i>N,N</i> -dietilpropán-1,3-diamin	81,0	>12,00
159	Cl	<i>N,N</i> -dimetiletán-1,2-diamin	85,3	1,55

160	Cl	<i>N,N</i> -dietiletán-1,2-diamin	99,3	2,17
193	Br	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	86,0	2,81

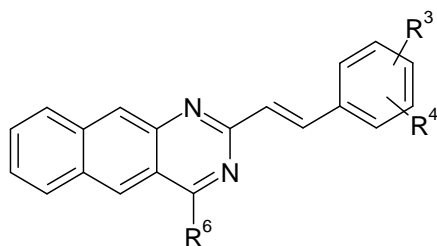
9. táblázat A kinazolin gyűrű 6-os helyzetében halogénatomot tartalmazó tenil származékok biológiai hatása.

Az eredmények azt mutatják, hogy a kinazolin gyűrű 6-os helyzetében lévő halogénatomok a hatást csak kismértékben befolyásolják, és inkább az aldehid valamint az oldallánc rész az, amely a hatást jelentősen megváltoztatja.

A kiterjedtebb szerkezet-hatás összefüggések megállapítása céljából előállítottam olyan származékokat is, melyek a kinazolin gyűrű 7-es helyzetében tartalmaznak klór atomot (**161-168**) illetve nitrocsoportot (**200-203**). Ezek a vegyületek csak kis mértékben, vagy egyáltalán nem mutattak hatást FLT3 kinázon. A klór atomot tartalmazó vegyületek (**161-168**) esetén a gátlás 10 μ M-ban kisebb volt, mint 50 %, a nitrocsoportot tartalmazó vegyületeknél (**200-203**) pedig kisebb, mint 26 %. Az aldehid komponens illetve az oldallánc módosításával még ez a kismértékű hatás is teljesen eltűnt. Előállítottam 8-as pozícióban brómot tartalmazó származékokat (**198, 199**) is, azonban a hatás szempontjából a 8-as pozíció sem preferált és az enzimgátlás minden esetben kisebb volt, mint 65 %.

Ezt követően próbálkoztam a kinazolin gyűrűn, többszörösen szubsztituált vegyületek előállításával és vizsgálatával. A biokémiai vizsgálatok azonban azt mutatták, hogy a 6,8-dibróm (**194-197**) és a 6,7-dimetoxi (**204-208**) csoportokat tartalmazó vegyületek sem mutatnak érdemi hatás (<30%).

Felmerült az ötlet, hogy a triciklusos származékok hatását is vizsgáljuk, ezért előállítottam 14 db benzo[g]kinazolin származékot (10. és 11. táblázat) is. Bár az eddig előállított vegyületeknél látszott, hogy a hatás szempontjából előnytelen, ha a 7-es pozícióban szubsztituens van, az újabb aromás gyűrű a planáris szerkezete révén hozzájárulhat a receptorral való π - π kölcsönhatás kialakulásához. Az ATP kompetitív kinázgátlók körében gyakori, hogy a hidrogénhid kötésekén kívül π - π interakció is rögzíti a ligandumot a kötőhelyen.



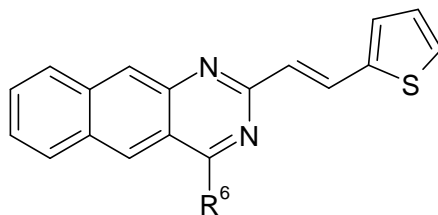
Szám	R ³	R ⁴	R ⁶	FLT3(ITD) gátlás 10 μM-ban (%)	FLT3 (ITD) IC ₅₀ (μM)
209	4-Metoxi	H	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	55,8	
210	4-Metoxi	H	<i>N,N</i> -dietilpropán-1,3-diamin	73,2	
211	4-F	H	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	81,1	>12,00
212	4-F	H	<i>N,N</i> -dietilpropán-1,3-diamin	53,7	
213	3-F	4-F	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	29,3	
214	3-F	4-F	<i>N,N</i> -dietilpropán-1,3-diamin	47,2	
215	3-F	4-F	<i>N,N</i> -dimetiletán-1,2-diamin	32,1	
216	3-F	4-F	<i>N,N</i> -dietiletán-1,2-diamin	22,0	
217	4-Cl	H	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	24,9	
218	4-Cl	H	<i>N,N</i> -dietilpropán-1,3-diamin	53,2	
219	4-Cl	H	<i>N,N</i> -dietiletán-1,2-diamin	95,5	>12,00

10. táblázat A benzo[g]kinazolin alapvázat tartalmazó vegyületek biológiai hatása.

A szubsztituált benzaldehidekkel kondenzált származékoknál gyenge hatást tudtunk kimérni (10. táblázat), egyedül két vegyület (**211**, **219**) mutatott enzimgátlást 10 μM-ban. A 6,7-dimetoxi- és 7-nitrokinazolinokhoz képest ez mégis némi előrelépés, mivel ott egyik vegyület gátlóértéke sem lépte át a 30%-os küszöböt.

A 12 pontos IC₅₀ mérések alapján viszont ezek a vegyületek is hatástalannak mondhatók, mivel a többször megismételt mérést követően is 12 μM-nál nagyobb volt a meghatározott IC₅₀ érték.

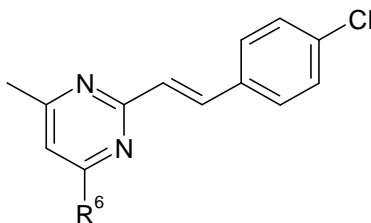
Érdekes, hogy a kisebb térkitöltésű tiofén-karbaldehiddel kondenzált származékok már kiváló enzimgátlást (11. táblázat) mutattak és az IC₅₀ értékük is elfogadhatónak mondható.



Szám	R ⁶	FLT3(ITD) gátlás 10 μM-ban (%)	FLT3 (ITD) IC ₅₀ (μM)
220	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	100,0	1,03
221	<i>N,N</i> -dietilpropán-1,3-diamin	100,0	2,33
222	<i>N,N</i> -dimetiletán-1,2-diamin	100,0	1,21

11. táblázat A benzo[g]kinazolin alapvázat tartalmazó vegyületek biológiai hatása.

Az ENMD-2076 (**XXIII**) (7. ábra) vegyülethez hasonlóan előállítottam két sztiril-pirimidin származékot (**223**, **224**) is, de a vegyületek hatáserőssége elhanyagolható volt a sztiril-kinazolin származékokéhoz képest (12. táblázat).



Szám	R ⁶	FLT3(ITD) gátlás 10 μM-ban (%)	FLT3 (ITD) IC ₅₀ (μM)
223	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	29,4	
224	<i>N,N</i> -dimetiletán-1,2-diamin	64,8	

12. táblázat Sztiril-pirimidinek biológiai hatása.

Az *in vitro* biokémiai eredményekből jól látszik, hogy a hatás és a szelektivitás fontos kritériuma a kinazolin alapváz és a szubsztituált sztiril csoport, ahogy az oldhatóságot jelentősen befolyásoló oldallánc megléte és mérete is.

6.2.5 Vegyületek vizsgálata MV4-11 akut mieloid leukémia sejtvonalon

Megvizsgáltuk az anyagok hatását az MV4-11 akut mieloid leukémia sejtvonalon. Az MV4-11-en való vizsgálat azért fontos, mert ennél a sejtvonalnál korábban kimutatták az FLT3 ITD mutációját és a fehérje fokozott expresszióját [117].

Szám	MV4-11 IC ₅₀ (µM)	Szórás	Szám	MV4-11 IC ₅₀ (µM)	Szórás	Szám	MV4-11 IC ₅₀ (µM)	Szórás
3	1,16	0,26	130	0,52	0	172	1,04	0,10
101	2,78	0,48	134	0,44	0,17	173	2,12	0,09
103	0,37	0,10	135	1,85	1,25	177	1,81	1,43
104	1,13	0,18	139	0,51	0,02	183	0,83	0
106	0,32	0,01	140	1,12	0,03	184	2,34	1,32
107	0,99	0,85	145	0,29	0,06	186	0,39	0,06
109	2,73	1,25	146	0,74	0,12	187	1,86	1,05
112	2,78	0,24	147	0,38	0,46	189	0,45	0,15
113	1,54	1,00	148	0,17	0,01	191	0,98	1,22
114	0,52	0,02	149	0,40	0,31	209	1,05	0
115	0,72	0,17	150	0,79	0,44	210	0,55	0,09
116	0,25	0,06	151	0,03	0,00	211	1,06	0,37
117	0,73	0,02	153	0,10	0,09	214	1,39	0,03
121	0,58	0,06	155	0,01	0,01	215	2,37	1,26
122	0,79	0,24	157	1,96	1,18	216	1,46	0,27
123	0,15	0,17	158	3,22	0,99	218	1,26	0,04
125	0,41	0,13	159	0,75	0,49	219	1,27	0,61
126	0,20	0,16	160	0,31	0,02	220	0,48	0,07
127	0,21	0	169	1,48	0	221	0,30	0,31
128	0,98	0,09	170	1,71	1,08	222	0,33	0,06

13. táblázat A vegyületek hatása MV4-11 sejtvonalon.

Ezért főleg azokat az anyagokat vizsgáltuk, melyek jelentősen gátolták a kinázt az enzimatis mérésekben. Az eredményeket a 13. táblázat foglalja össze.

A jobb áttekinthetőség végett a táblázatban sárga színnel jelöltük a 0,5 és 1 µM közötti, zöld színnel pedig a 0,5 µM alatti IC₅₀ értékeket. Az eredményekből kitűnik, hogy a molekulák igen hatékonyak a sejtvonalon, ezzel egyben megerősítik a biokémiai vizsgálatokban meghatározott eredményeket és az FLT3 kináz túlélésében betöltött szerepét az MV4-11 sejtekben.

6.2.6 Vegyületek vizsgálata p53 mutáns sejtvonalakon

A szelektivitás vizsgálatok (450 kináz) alapján ugyan kiderült, hogy a molekulák szelektív FLT3 gátlók, azonban egy sejtben a kinázokon kívül jóval több célpont is előfordul.

Szám	A431 IC ₅₀ (μM)	Szórás	MCF7 IC ₅₀ (μM)	Szórás	HT29 IC ₅₀ (μM)	Szórás
3	8,25	0,79	17,41	10,93	25,07	6,97
101	ND	ND	ND	ND	ND	ND
103	8,05	2,14	10,69	4,13	12,04	2,26
104	6,73	0,20	8,94	1,14	ND	ND
106	9,80	0,14	15,30	7,96	20,23	9,42
107	9,87	0,10	11,46	4,59	17,41	2,50
109	3,61	2,43	8,40	6,55	ND	ND
134	1,84	0,18	7,85	0,84	7,08	1,80
135	5,14	0,32	7,00	2,53	10,26	1,28
170	ND	ND	ND	ND	ND	ND
172	ND	ND	ND	ND	14,64	3,45
177	7,78	0,70	9,43	0,47	9,33	1,97
183	3,77	1,21	8,54	1,06	6,57	0,89
184	4,62	0,94	9,51	0,44	9,26	4,19
186	1,73	0,39	12,39	11,08	2,66	0,24
187	6,10	3,46	8,01	1,53	9,92	0,69
189	1,93	0,43	5,91	0,54	4,77	2,17
191	3,71	0,38	6,32	1,71	5,36	0,05
209	1,58	0,10	3,10	0,38	3,78	0,62
210	1,61	0,13	3,16	0,38	3,49	0,50
211	1,63	0,15	3,65	0,13	6,87	1,75
218	1,70	0,09	3,90	0,99	5,40	2,64
219	2,69	0,71	4,86	2,00	3,83	0,29

14. táblázat A vegyületek hatása p53 mutáns sejtvonalakon. Az ND (not determined) jelölés esetén a molekula az 1 pontos (10 μM) mérés esetén nem érte el a 75%-os gátlóértéket, ezért IC₅₀ mérésre nem került kiválasztásra.

A különböző típusú daganatsejtek teljesen eltérő genetikai állományúak is lehetnek, emiatt a molekuláris biológiai profiljuk is különbözik.

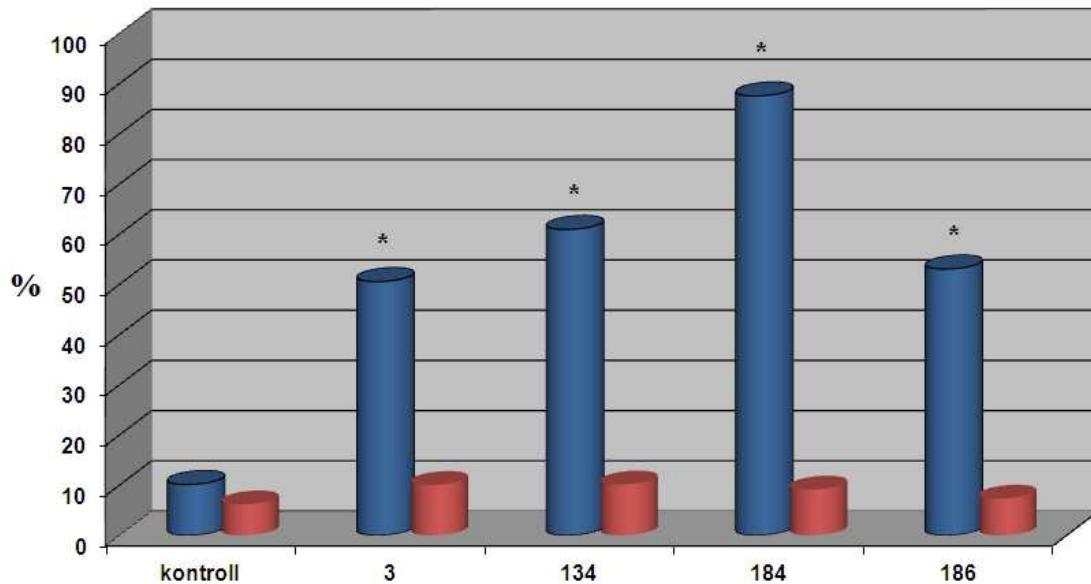
Mivel az irodalomban publikált CP-31398 (3) referenciamolekula hatást fejt ki a p53 fehérjén, logikusnak tűnt, hogy néhány anyag esetén megvizsgáljuk olyan sejtvonalakon

(A431, MCF7, HT29) a hatást, amelyek bizonyítottan p53 mutációt tartalmaznak és emiatt az egyik legfontosabb tumor szupresszor fehérje nem képes betölteni eredeti funkcióját.

Az eredményekből (14. táblázat) az látszik, hogy ezeken a sejteken lényegesen gyengébb a vegyületek hatása ($IC_{50} \gg 1 \mu M$), mint az FLT3 kinázt expresszáló MV4-11 sejteken.

6.2.7 Apoptózis/nekrózis vizsgálata áramlási citometria (FACS) módszerével

Áramlási citometria segítségével meghatározható, hogy a sejtek pusztulása milyen folyamat (apoptózis, nekrosis) következtében jön létre. Ennek az ismerete azért is fontos, mert egyben következtetni lehet egyfajta toxicitásra is. Ha egy molekula nekrotizist vált ki tumoros sejteken, az nagy valószínűséggel az egészséges sejteket is pusztítja majd, mivel nem programozottan történik a sejthalál. Apoptózist kiválthatunk onkogének gátlásával (elnyomásával), illetve a tumor szupresszor gének aktiválásával (gátlás feloldásával).



26. ábra A mért százalékos apoptózis (kék) és nekrosis (piros) ábrázolása

(*: $P \leq 0,05$). Kontroll: kezeletlen sejtek esetén mért arány.

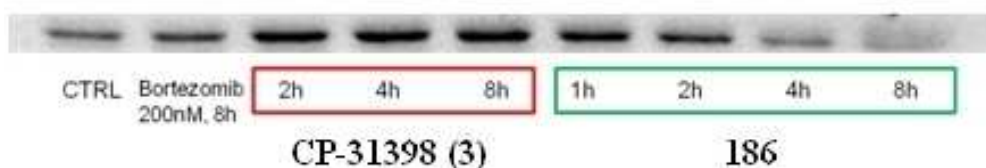
A HCT116 sejt vonalon mért eredmények alapján megállapítható, hogy a sejtek apoptózissal pusztulnak el, mert a kontrollhoz képest az apoptózis százalékos aránya

(26. ábra) nőtt meg szignifikáns mértékben. Minimális mértékű (7-10%) nekrozist is megfigyeltünk, azonban ez a kezeletlen kontroll esetén is kimérhető volt (15. táblázat).

Apoptózis (%)			Nekrózis (%)	
HCT116		SZÓRÁS	HCT116	SZÓRÁS
ctrl	10,14	1,38	6,18	3,14
3	50,57	2,62	10,06	0,18
134	60,95	4,21	10,16	0,25
184	87,55	1,43	9,12	1,15
186	53,07	5,55	7,34	0,62

15. táblázat A FACS-al mért apoptózis és nekrozis százalékos értékei.

Az apoptózisra a magyarázat a HCT116 sejtvonal molekuláris profiljában rejlik, ugyanis p53 mutációt tartalmaz. A FACS módszer mellett western blot segítségével vizsgáltuk a referenciavegyület és az egyik analóg (**186**) hatását a p53 fehérje expressziójára.



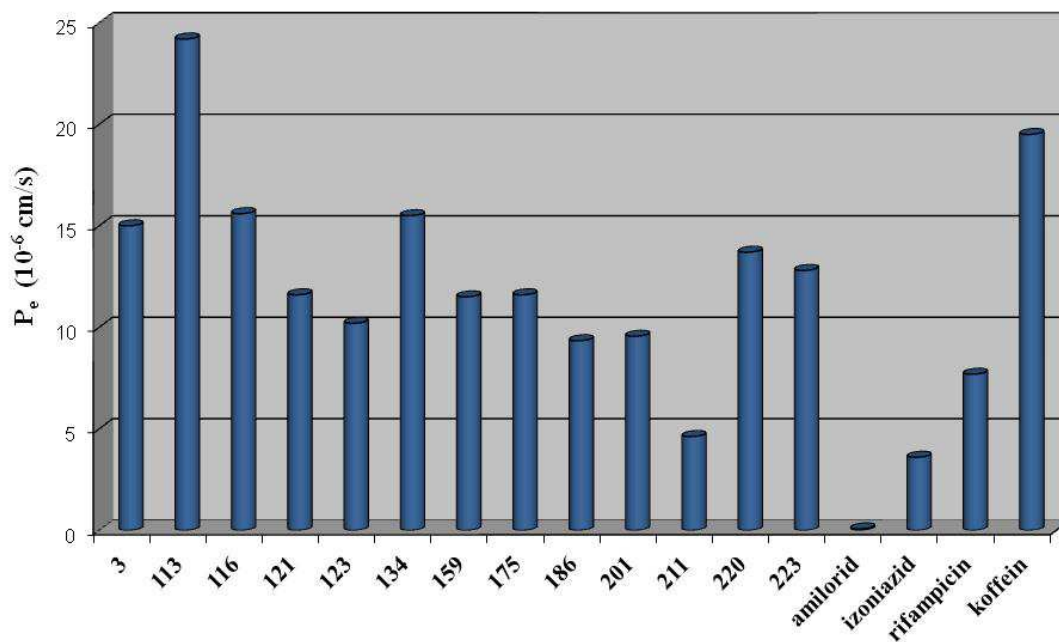
27. ábra A referenciavegyület és a **186** azonosítójelű analóg p53 expresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata.

A 27. ábrán jól látszik, hogy mindkét vegyület alkalmazása esetén megnőtt a fehérje expressziója a kezeletlen- és a bortezomib kontrollokhoz képest. A **186**-as anyag esetén 2 órás inkubációs időt követően már beindul a sejtpusztulás, valószínűleg emiatt csökkent a kimutatott fehérje mennyisége is.

6.2.8 A vegyületek PAMPA vizsgálata

A gyógyszerkutatás korai fázisában lényeges feladat a potenciális gyógyszerjelölt molekulák felszívódási tulajdonságának előrejelzése. Erre jó lehetőséget ad egy lipidmembrán-permeabilitási modellrendszer, az ún. PAMPA módszer, mely széles körben alkalmazott, nagy átteresztőképességű és könnyen reprodukálható.

A mérésre a molekulákat oldhatóságuk meghatározását követően választottuk ki.



28. ábra A molekulák permeabilitás eredményei.

A mért permeabilitás eredményeket a 28. ábra mutatja. A koffein már kiemelkedő permeabilitással rendelkező molekulának mondható, ahogy a rifampicin is a jobb permeabilitású gyógyszerek közé tartozik. Saját fejlesztésű molekuláink értékeit egy kivételtől (**211**) eltekintve a két referencia közé mértük, ezért elmondható, hogy a vegyületek jó permeabilitási értékekkel bírnak és a passzív transzportal történő átjutásuk a membránon nem akadályozott.

7. MEGBESZÉLÉS

7.1 B-RAF gátló vegyületek vizsgálata

Doktori munkám egyik célja az volt, hogy a kutatócsoport által előállított vegyületek kötődését és hatását vizsgáljam B-RAF kinázon. A PDB adatbázist felhasználva megvizsgáltuk az összes röntgendiffrakcióval meghatározott fehérje – ligandum komplexet és összehasonlítottuk a különböző szerkezetű molekulák kötődési pontjait. Külön figyelmet szenteltünk a szulfonamid származékoknak (2. ábra – **VI-IX**), mert a vegyületek közös jellemzője, hogy jobb a szelektivitásuk a többi gátlómolekulával szemben.

A Vichem Chemie Kutató Kft. vegyülettárában több olyan molekula is található, mely szulfonamid csoportot tartalmaz. A szakirodalomban publikált B-RAF gátló vegyületekre leginkább a 4-fenoxikinolin alapvázú vegyületek hasonlítottak, ezért 450 db kinolinszármazék közül, az irodalmi hasonlóságok alapján kiválasztottunk 12 db vegyületet részletesebb vizsgálatok céljából. Ahhoz, hogy össze tudjuk hasonlítani a vegyületek kötődését az irodalmi szulfonamid származékokéval, a kiválasztott vegyületek kötődését modelleztem B-RAF kinázon. A dokkolás során nyert információt *in vitro* biokémiai és sejtes módszerekkel is validáltuk. A modellezés és a biokémiai eredmények között igen jó korreláció mutatkozott és a hatékony molekuláknál előrejelzett kötődések is egybevágtak az irodalmi anyagoknál leírt kötődési módokkal. A sejtes vizsgálatok során viszont azt tapasztaltuk, hogy a vad típusú B-RAF-ot expresszáló sejtvonalakon (MeWo, M24met) az anyagok kevésbé vagy egyáltalán nem hatottak, míg a V600E mutációt tartalmazókon (HT29, A375p, UACC257) jó hatás mutatkozott.

Ez azért érdekes, mert a biokémiai vizsgálatok kimutatták, hogy a vegyületek közel azonos mértékben hatnak a vad típusú- és a mutáns enzim esetén. Megfigyeltük, hogy bizonyos anyagoknál (**6**, **7**, **10**) még a két vad típusú sejtvonal között is szignifikáns különbség van a mért IC₅₀ értékek között.

Ez a jelenség többféle módon is magyarázható. Egyrészt a sejtek más jelátviteli útvonalon is eljuttathatják az információt a sejtmagba, másrészt a hatáskülönbség oka lehet a kialakult rezisztencia.

A szakirodalomban a vad típusú B-RAF kinázt expresszázó sejtek egy különleges tulajdonságát publikálták a V600E mutációt tartalmazókkal szemben. B-RAF gátló vegyületek alkalmazása esetén a mutáns sejtek pusztulásnak indultak, ezzel szemben a vad típust tartalmazó sejteknél proliferációt és sejtosztódást figyeltek meg, ráadásul ez az ún. „RAF inhibitor indukált” MAPK útvonal aktiválás jellemző volt a normál sejtekre is. A tesztek (siRNS és western blot) során megállapították, hogy a fokozott aktiváció a RAF kináz másik két típusának, az A- és C-RAF kináznak köszönhető [116]. Ugyanezt a jelenséget leírták a vemurafenib (2. ábra – VI) esetén is, ahol a B-RAF gátlás miatt fellépő C-RAF (RAF1) aktiváció váltotta ki a fokozott proliferációt [118]. A publikált eredmények nagyban alátámasztják az M24met és MeWo sejtek esetén általunk is tapasztalt lényeges hatáscsökkenést.

A kötődéskinetika vizsgálatokat követően megállapíthatjuk, hogy a vegyületek gyors kötődési profillal rendelkeznek. Mivel kinetika szempontjából nincs különbség az I-es és I ½-es inhibitorok között, a dokkolás eredményeire és az irodalmi hasonlóságokra alapozva a I ½-es típusú kinázgátlók közé soroltuk be a molekuláinkat.

A kísérletek alapján elmondhatjuk, hogy B-RAF kinázon a hatás nagymértékben függ a fenil-szulfonamid rész szubsztituenseinek méretétől és az oldhatóságot is befolyásoló oldalláncától.

Kutatócsoportunk továbbfejlesztette a vegyületcsaládot nagy térkitöltésű csoportok bevitelével. Bár a B-RAF hatás így megszűnt, sikerült szubmikromólos IC₅₀ értékkel bíró c-MET gátló molekulákat tervezni, közel azonos kötődési móddal. A c-MET gátló vegyületek előállítását és vizsgálatát egy nemzetközi folyóiratban publikáltuk, a vizsgálatok részletes leírása viszont nem képezi a dolgozat tárgyát [119].

7.2 Sztiril-kinazolin származékok előállítása és vizsgálata

A munkámat a témában a CP-31398 validációs vegyület (3) előállításával kezdtem. A legegyszerűbb és leggyorsabb szintézisnek a 2-metilkinazolonból kiinduló reakcióút tűnt, mivel így három lépésben előállítható a kívánt termék. Az aldehiddel történő kondenzáció mikrohullámú reaktorban rövid idő alatt (1,5 - 2 óra) végbemegy, viszonylag jó termeléssel. A klórozási lépésnél problémaként merült fel, hogy az imin-klorid intermedier könnyen hidrolizál, emiatt a feldolgozást követően a műszeres

analitikai vizsgálatokat (LCMS, NMR) mellőzve elreagáltattam az intermediereket a megfelelő primer aminokkal. A reakció VRK-s monitorozása közben azt tapasztaltam, hogy a jelentős méretű termékfolt mellett megjelenik ~10-20 %-ban a bomlástermék foltja és ~10 %-ban marad kiindulási imin-klorid származék is a reakcióelegyben. Ezért a bepárlást követően a terméket oszlopkromatográfia segítségével tisztítottam, majd sóként preparáltam.

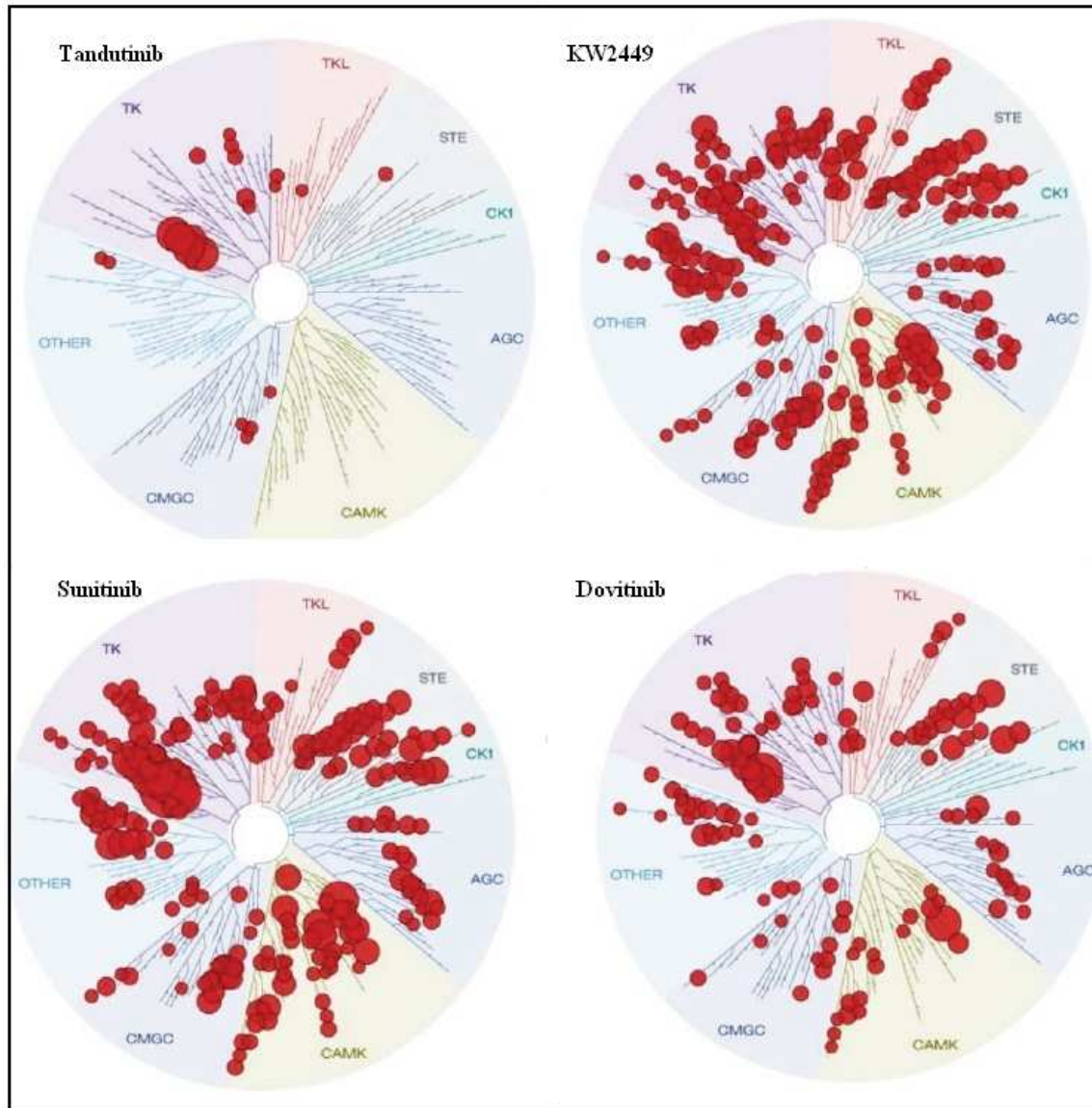
A referenciavegyületből levezetett származékok előállítása során ugyanezt a szintézisutat alkalmaztam és változó kitermelések mellett sikerült a megfelelő tisztaságú végtermékeket preparálni.

Az első öt származék közül kiválasztott vegyületet (**184**) egy olyan kinázpanelre küldtük el, amely 450 kinázt tartalmaz, és segítségével meg lehet határozni, hogy a vegyület mely kinázokhoz kötődik. Ez azért fontos, mert egy vegyület hatását alapvetően két módszerrel lehet mérni. Az egyik az ún. kötődési affinitás mérése, melynek során a molekula kötődését vizsgáljuk, a másik lehetőség az enzimaktivitás gátlásának vizsgálata. Célszerű a két módszert egymás mellett alkalmazni, mivel az aktivitás gátlásának meghatározásával csak olyan vegyületek adnak pozitív eredményt, melyek az ATP kötőhellyel lépnek interakcióba (például az I-es, I ½-es, II-es típusú kinázgátlók). A nem ATP kompetitív inhibitorok (III-as típusú- és kovalens kinázgátlók) esetén a kötődési affinitás vizsgálata a célravezetőbb [120]. Mivel az előállított vegyületeinkről akkor még nem tudtuk, hogy melyik típusba tartoznak, a kötődési vizsgálat tűnt a legésszerűbbnek, mivel az egy allosztérikus kinázgátló esetén is kimutatja a kötődést, attól függetlenül, hogy melyik kötőhelyre kötődik be a molekula.

A kapott eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a sztiril-kinazolin származékunk 450 kináz közül mindössze négy esetén mutatott 60% feletti kötődést 5 μ M-os inhibitor-koncentráció mellett (5. táblázat). A 60-80% közötti eredményt már elfogadhatónak ítéltük meg, azonban jól látszott az is, hogy a legnagyobb kötődést (> 90%) az FLT3 kináz bizonyos mutációi (ITD, D835H, D835Y, N841I) esetén mérték.

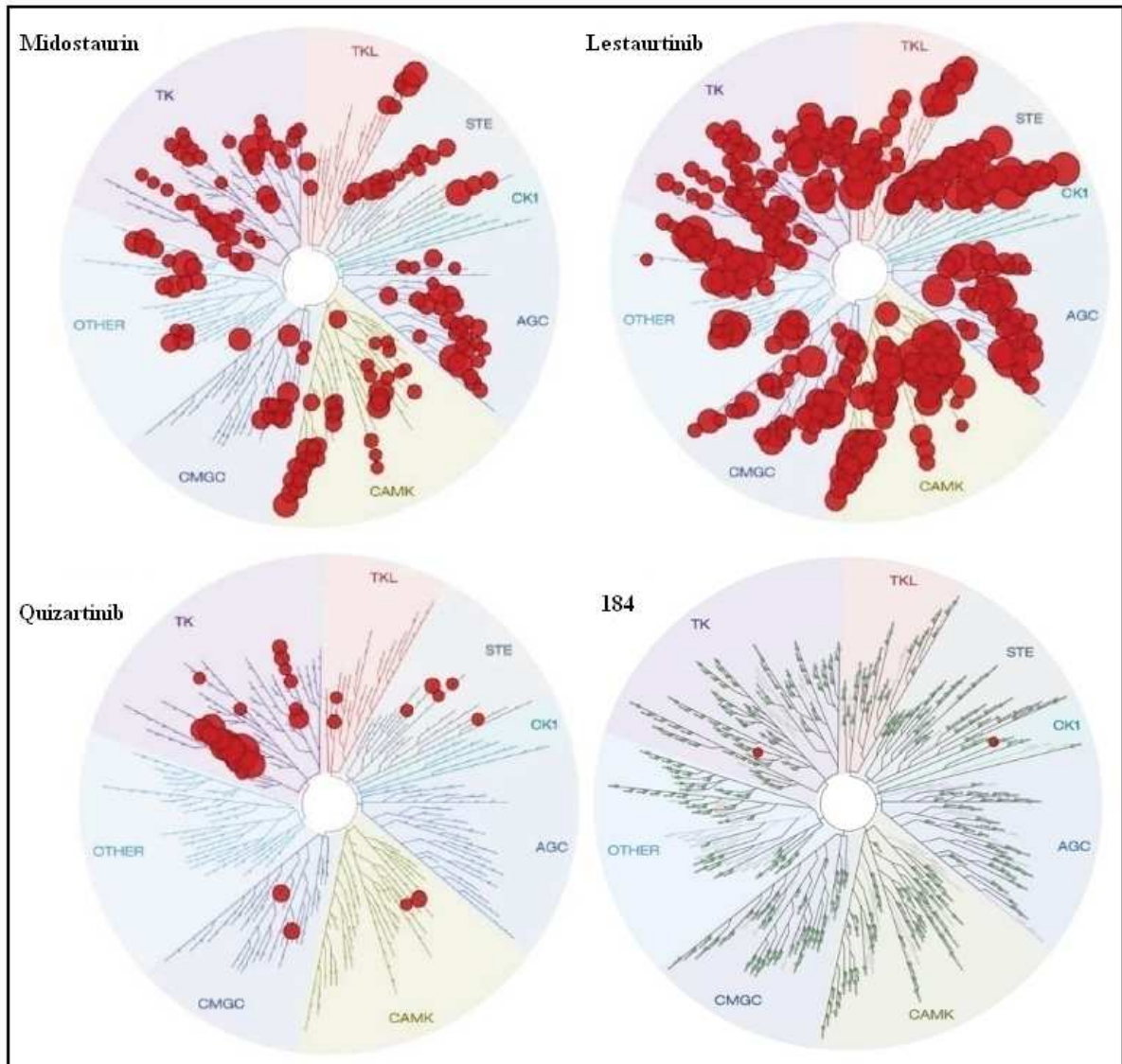
Ez teljesen egyedi esetnek számít, mivel a mai napig nincs olyan publikált FLT3 gátló vegyület, mely ne hatna legalább a PDGFR kinázcsalád többi enzimjén (c-Kit,

PDGFR, CSFR) vagy egyéb rokon kinázokon. Az FLT3 gátló molekulák szelektivitásprofilját a 29. és 30. ábra mutatja be.



29. ábra Irodalmi FLT3 gátló vegyületek szelektivitási profilja [121].

Bár legjobb vegyületeink IC_{50} értéke (200-500 nM) csak a tandutinib publikált gátlóértékével (200 nM) versenyezhet, és a klinikai vizsgálatok alatt lévő többi inhibitorhoz képest (1-50 nM) egy-két nagyságrendnyi különbség is van, sokkal szelektívebbek az irodalmi molekuláknál.



30. ábra Irodalmi FLT3 gátló vegyületek szelektivitási profilja [121] összehasonlítva az egyik saját molekulával (**184**).

Az új vegyületek előállítása során arra törekedtem, hogy minél jobban feltérképezhető legyen a szerkezet-hatás összefüggés, és esetleg magyarázatot találjak a nagymértékű szelektivitásra.

Az újonnan előállított származékok közül további 30 vegyület esetén vizsgáltuk a szelektivitást egyrészt validálás céljából, másrészt kíváncsiak voltunk, hogy a különböző szubsztituensek hogyan befolyásolják a molekulák ezen tulajdonságát. A mérések 40 klinikailag releváns kinázon történtek (Proteros Selectivity Panel) 10 μ M-os vegyületkoncentráció mellett. A vizsgálatok eredményei alapján elmondható, hogy a szelektivitás nem változott, és a megnövelt koncentráció ellenére sem értek el a

molekulák 75% feletti gátlóértéket a vizsgált kinázokon. A részletes eredmények bemutatásától a dolgozat formai követelményei miatt eltekintek.

A tumoros sejtvonalakon végzett proliferációs vizsgálatok megerősítették a biokémiai hatásprofil alapján várható eredményt. Az MV4-11 akut mieloid leukémia sejtvonalon a vegyületek nanomólos tartományban gátolták a sejtosztódást, míg a p53 mutáns sejteken (A431, HT29, MCF7) egy vagy több nagyságrenddel rosszabb hatást mértünk. Az AML sejtvonalon mért lényegesen jobb hatásnak az oka, hogy a vegyületek gátolják az FLT3(ITD) kinázt és ezen a sejtvonalon az ITD az ún. driver (irányító) mutáció [122]. Ez annyit jelent, hogy az ITD mutáció miatt jutottak növekedési előnyhöz a sejtek és a kináz gátlásával a sejtek elpusztíthatók.

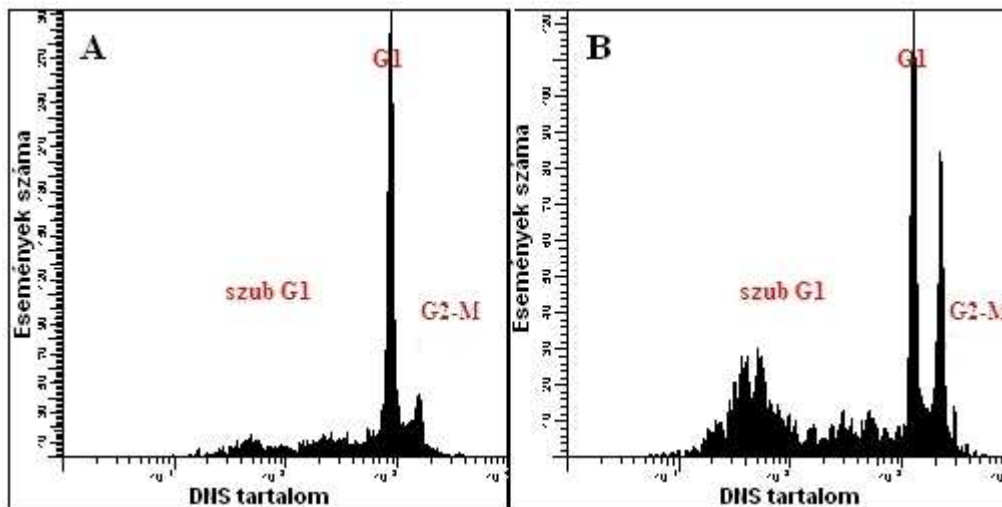
A szakirodalom szerint a referenciavegyület **(3)** képes a funkcióját veszített mutáns p53 fehérjét aktiválni valamint expresszióját fokozni [103]. A kísérletet reprodukálva, HCT116 sejtvonalon a p53 fehérje szintjének növekedését kimutattuk a referencia **(3)** és az egyik saját vegyületünk **(186)** esetén. A vegyületeken végzett módosítások ellenére a kölcsönhatás a p53 fehérjével megmaradt, amit alátámaszt a sejtvonalakon (A431, HT29, MCF7) mért gátlás is. A p53 mutációt tartalmazó sejteken a gyengébb hatás oka, hogy azokon bizonyítottan más jelátviteli útvonalak is aktívak. A HT29 sejtvonal B-RAF(V600E) mutációt tartalmaz [123], az MCF7 sejtek esetén PI3K mutációról és Akt1 amplifikációról [124], az A431 sejtek esetén pedig EGFR overexpresszióról beszélhetünk [125]. Ezek a kinázok a jelátviteli útvonalakon keresztül képesek gátolni a p53 működését az MDM2 fehérjén keresztül vagy akár hibás jelek generálása útján fenntartani a fokozott sejtproliferációt, tehát önmagában nem elegendő a p53 fehérjére gyakorolt hatás. A vegyületeink szelektivitás adataiból pedig kiderült, hogy nem gátolják ezeket a kinázokat.

Felmerült bennünk a kérdés, hogy a sejtes vizsgálatoknál tapasztalt sejtpusztulást apoptózis váltotta-e ki, vagy rosszabb esetben nekrozis történt-e. Ha a sejtet kóros behatás éri, ion- és víz háztartása felborul és a sejt állománya denaturálódik, akkor nekrozisról beszélhetünk. Mivel a nekrozis passzív folyamat, a sejtnek nincs ráhatása arra, hogy az miként jön létre. Ezzel szemben az apoptózis programozottan zajlik és a sejt által vezérelt. A kutatás korai fázisában ezt fontos meghatározni, mert nem

mindegy, hogy egy vegyületsalád milyen módon avatkozik be a sejtek folyamataiba és kóros pusztulást eredményez-e.

A kísérleteinkhez HCT116 sejtvonalat használtunk. A nekrozis arányának meghatározásához az anyagokkal kezelt és kontroll sejteket fixálatlan formában propidium-jodiddal inkubáltuk. A propidium-jodid egy gyakran használt festék a biokémiában, mert sztöchiometrikus módon képes beépülni a DNS láncba. Az élő sejtek viszont kipumpálják magukból és csak az elpusztult sejtek adnak PI pozitív festődést, így következtetni lehet azok mennyiségére. A vegyületek (**3**, **134**, **184**, **186**) vizsgálata során 7-10 % nekrozist állapítottunk meg az összes sejtre vonatkoztatva, a kezeletlen kontroll sejtek esetén pedig 6%-ot. Ebből arra következtettünk, hogy az anyagok hatására nem nőtt érdemben a nekrotizáló sejtek aránya az élő sejtekhez képest.

Az apoptózis mérése során a kontroll (DMSO) és kezelt sejtek DNS tartalom szerinti megoszlásának arányát vizsgáltuk. A programozott sejthalál során jellemző jelenség, hogy a sejt a saját DNS-ét endonuklázok segítségével fragmentálja, ezért a sejtek diploid DNS állománya fokozatosan csökken.



31. ábra A kontroll (DMSO) esetén mért DNS tartalom megoszlása (**A**) és a **186** vegyület (**B**) DNS tartalom megoszlása 48 órás inkubációs időt követően.

Áramlási citometria segítségével nyomon követhető az apoptotikus (szubdiploid - szub G1), a normál (diploid - G1), ill. az osztódó (tetraploid - G2-M) sejtek aránya. A nekrozis során a degradáció véletlenszerű, nem pedig programozott, ezért a mérést nem zavarja. Akárcsak a nekrozis meghatározásnál, ebben az esetben is PI festést

alkalmaztunk azzal a különbséggel, hogy előbb etanollal fixáltuk a sejteket, majd a fragmentált DNS kivonását citrát-foszfát puffer + RNáz felhasználásával végeztük. A fixálás miatt az összes sejt elpusztult és PI pozitív festődésű, viszont az apoptózis során keletkezett DNS fragmensek miatt a sejtekben lévő DNS-hez kötődő propidium-jodid mennyisége csökkent. Az eredményeket FACS hisztogramon ábrázolva (31. ábra) leolvastuk az apoptózis arányát a szub G1 tartományban megjelenő jelek alapján.

A kontrollhoz képest lényegesen nagyobb volt a mért apoptózis a kezelt sejteken, így sikerült bizonyítani, hogy négy különböző szubsztituenst tartalmazó analóg is programozott sejthalált indukál, és a sejteken érdemben nem lép fel nekrozis az anyagok hozzáadását követően sem.

A PAMPA mérésekkel a vegyületek penetrációs tulajdonságát vizsgáltuk. A módszerrel meghatározható a molekulák passzív transzporttal történő transzcelluláris átjutása és a kutatás korai fázisában az sem elhanyagolható tény, hogy egy gyors, viszonylag könnyen kivitelezhető eljárásról beszélünk. A méréshez igyekeztünk olyan referenciaanyagokat kiválasztani, melyek permeabilitás (P_e) szempontjából külön csoportokat képviselnek. A koffein egy nagy permeabilitással rendelkező molekula, valamint a rifampicin is annak mondható, bár a meghatározott P_e értéke durván a fele a koffeinének (28. ábra). Az izoniazid már gyengébb P_e értéket mutatott, míg az amilorid egy kifejezetten rossz permeabilitással bíró molekula (28. ábra).

A saját vegyületeink vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a molekulák permeabilitási értékük szempontjából meglehetősen egységes képet mutatnak. Három esetet leszámítva a mért P_e érték 10 felett van, ami már igen jó permeabilitást jelent és ezek közül egy vegyület (**113**) pedig kiemelkedő értéket mutatott. A legrosszabb eredményt a **211**-es benzo[g]kinazolin analóg produkálta, ami nem meglepő, mert a benzaldehidekkel kondenzált benzo[g]kinazolin származékok jelentős részét már a PAMPA méréseket megelőzően kisselektáltuk a nem megfelelő oldhatóságuk miatt. A tiofén-karbaldehiddel reagáltatott triciklusok viszont jobban oldódtak és a mérésre kiválasztott **220**-es vegyület P_e értéke is azt mutatta, hogy ezek az analógok már jóval kedvezőbb P_e tulajdonsággal rendelkeznek, akár csak a kinazolin alapvázal rendelkező vegyületek.

8. KÖVETKEZTETÉSEK

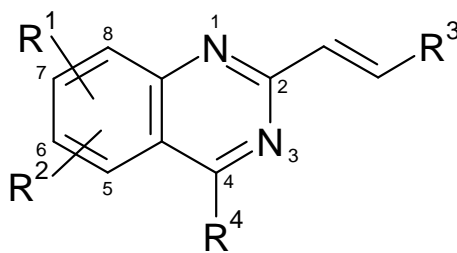
8.1 B-RAF gátló vegyületek vizsgálata

- A molekulamodellálás során megállapítottuk, hogy a vizsgált molekulák a kináz ATP kötőhelyéhez kötődnek, és a kinázgátlókra jellemző kölcsönhatások alakulnak ki.
- A biokémiai vizsgálatok alapján elmondhatjuk, hogy a molekulák azonos mértékben hatnak a vad típusú és a mutáns B-RAF kinázon.
- A legjobb molekulákkal hatékonyan gátoltuk a V600E mutációt tartalmazó tumoros sejtvonalak növekedését, a vad típust expresszáló sejtvonalakon viszont az anyagok kevésbé vagy egyáltalán nem hatottak.
- Kötődéskinetika vizsgálatokkal meghatároztuk a molekulák kötődési profilját és a korábbi eredményeket felhasználva besoroltuk őket a I^{1/2}-es kinázgátlók közé.

A dolgozatban bemutatott eredményekből egy publikáció született a *Current Medicinal Chemistry* című folyóiratban [47].

8.2 Sztiril-kinazolin származékok előállítása és vizsgálata

Az *in vitro* biokémiai eredmények (százalékos enzimgátlás és IC₅₀) alapján az alábbi következtetések vonhatók le szerkezet-hatás összefüggések szempontjából (32. ábra):



32. ábra

- A kinazolin gyűrű mindenképp kell az FLT3 gátló hatáshoz, a pirimidinek hatástalanok.
- A kinazolin fenil gyűrűje szubsztituens nélkül vagy egyszeresen szubsztituált formában preferált, a többszörösen szubsztituált termékek már hatástalanok.

- Halogénatom beépítése a 6-os pozíciójába a hatást érdemben nem befolyásolja, bár a fluor tartalmú származékok valamivel rosszabbak, mint a brómot vagy klórt tartalmazó molekulák.
- A 7-es vagy 8-as pozícióban szubsztituált termékek hatástalanok.
- A benzo[g]kinazolin alapú molekulák benzaldehiddel kondenzált származékai hatástalanok, tehát a triciklusos struktúra beépítése sem előnyös.
- Az R^3 csoport lehet szubsztituált fenil- vagy tiofén gyűrű is. A szubsztituátlan kinazolin vegyületeknél a fenil gyűrű esetén jobb a hatás, viszont a triciklusos, a 6-os helyzetben brómot vagy klórt tartalmazó származékoknál a tiofén gyűrűvel rendelkező molekulák is hatásosak.
- Az R^3 csoport esetén a monoszubsztituált aromás gyűrű esetén mérhető a legerősebb hatás, a 3,4-diszubsztituált fenil csoportot tartalmazó származékoknál jelentősen csökken, a 3,4,5-triszubsztituáltak esetén pedig teljesen megszűnik.
- Az R^3 fenil gyűrűn para helyzetben funkciós csoportot vagy halogénatomot tartalmazó vegyületek hatása a legjobb, meta pozícióban lévő szubsztituens esetén a hatás nagymértékben csökken. Legelőnyösebb szubsztituensek para helyzetben: az izopropil, a metilszulfanil- és a metilszulfonil funkciós csoportok.
- Az R^4 csoport a hatást és az oldhatóságot döntően befolyásoló, tercier aminocsoportot tartalmazó oldallánc. A hatás szempontjából a rövidebb (*N,N*-dimetilétán-1,2-diamin, *N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin) az előnyös. A hosszabb (*N,N*-diethylpropán-1,3-diamin, *N',N'*-diethylpentán-1,4-diamin), vagy nagyobb térkitöltésű csoportot (morfolin, *N*-metilpiperazin, pirrolidin) tartalmazó oldalláncoknál a hatás lecsökken, illetve megszűnik.
- A sztiril-kinazolin alapváz és az oldallánc megléte esszenciális a hatáshoz. Vizsgáltuk az oldallánc nélküli sztiril-kinazonokat, illetve készült pár olyan származék is, ahol a kettős kötés katalitikus hidrogénezéssel történt redukciója során szubsztituált 2-(2-feniletil)kinazonok keletkeztek. Ezek az anyagok teljesen hatástalanok voltak FLT3 kinázon, ezért részletes bemutatásuk nem képezi a dolgozat részét.

A szelektív kinázgátlás nagy előny, mert a mellékhatások a szelektív gátlószer alkalmazásával jelentősen csökkenthetők. Klinikai vizsgálat alatt jelenleg nincs olyan

FLT3 gátló molekula, amely kedvező szelektívprofilal rendelkezne, ezért a legígéretesebb FLT3 gátló származékainkkal további vizsgálatokat (*in vivo* toxicitás, ADME paraméterek meghatározása) tervezünk. A disszertációban tárgyalt vegyületekből és eredményekből magyar szabadalmi bejelentés készült [126] és 2014. augusztus 9-ig a magyar elsőbbségi dátumra hivatkozva PCT bejelentés is benyújtásra kerül.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

Doktoranduszi munkám során a gyógyszerkutató korai fázisában vettem részt, és racionális gyógyszertervezés segítségével kináz fehérjék gátlására fejlesztettünk ki hatékony vegyületeket. Kutatásaim két részre oszthatók.

Az egyik fő célkitűzésem a melanómák és vastagbél daganatok kialakulásában kulcsszerepet játszó B-RAF kináz és gátló vegyületeinek vizsgálata volt. Az irodalomban publikált származékok kötődésének vizsgálatát követően, a szerkezeti hasonlóság alapján kiválasztottam 12 db szulfonamid származékot, majd molekulamodellés felhasználásával feltérképeztem a vegyületek lehetséges kötődési pontjait és kötődési affinitását. Az *in silico* eredményeket biokémiai tesztrendszer segítségével validáltuk, majd a molekulákat B-RAF kinázt expresszáló sejtvonalakon teszteltük. A vegyületek közül öt analóg alacsony koncentrációban gátolta a B-RAF kinázt és a sorafenibbel azonos mértékben gátolták a tumorsejtvonalak növekedését is. A kinetikai vizsgálat segítségével meghatároztuk a vegyületek kötődés kinetikai profilját és besoroltuk őket a I ½-es kinázgátlók közé.

A másik fő célkitűzésem szabadalmaztatható kinázgátló molekulák előállítására és szerkezet-hatás összefüggések vizsgálata volt. A szakirodalomban publikált, p53 fehérjére ható, CP-31398 jelű sztiril-kinazolin szintézise és kinázgátló profilja az irodalomban még nem volt ismert. Az általam kidolgozott szintézissel előállítottam a kívánt referenciaanyagot valamint további 122 db sztiril-kinazolin és 2 db sztiril-pirimidin származékot. Az első öt vegyület egyikének kinázgátló profilját a DiscoverX cég határozta meg 450 releváns kinázon. Célpontként az FLT3 kinázt azonosították, ami azért meglepő, mivel a mai napig nincs olyan publikált FLT3 gátló vegyület, mely ne hatna a kinázok harmadik alcsaládjának többi enzimjén. Ez az eredmény további kutatást tett indokolttá. Biokémiai módszert (IMAP) állítottunk be a pontos enzimgátlás meghatározására és a mért eredmények alapján szerkezet-hatás összefüggéseket állapítottunk meg. A sztiril-kinazolinok sejtekre gyakorolt hatását tumoros sejtenyészeteken mértük és áramlási citométerrel kimutattuk, hogy programozott sejthalált indukálnak. A PAMPA vizsgálat segítségével pedig információt nyertünk a molekulák penetrációs készségét illetően.

Az FLT3 témában elért eredményeim alapján 2013-ban egy magyar szabadalmi bejelentés készült.

10. SUMMARY

During my PhD research I was involved in early stage drug discovery and with the use of rational drug design we have developed effective kinase inhibitors. My work can be divided into two parts.

My first objective was to examine the B-RAF kinase, which plays a key role in the pathomechanisms of human melanomas and colon cancers, and its well known inhibitors. After the analysis of the binding modes of published inhibitors I have selected twelve molecules from a compound library based on structural similarity. Using molecular modeling methods I have determined the possible binding mode and binding affinity of these compounds. The *in silico* results were confirmed by kinase assays and the compounds were also tested on cell lines expressing wild type and mutant B-RAF kinase. After the measurement of binding kinetics we concluded that our compounds belong to the family of type I $\frac{1}{2}$ kinase inhibitors.

The second part of my research was to synthesize kinase inhibitors and investigate the structure-activity relationships of the compounds. The synthesis and the kinase inhibitory profile of the published p53 activator compound CP-31398 had not been described. Therefore I have developed a process to synthesize this reference compound and further styryl-quinazoline and styryl-pyrimidine derivatives. One molecule was tested on a panel containing 450 different kinases and showed great affinity (>90%) towards mutant FLT3 kinases only. It means that we were able to find a highly selective FLT3 inhibitor, which represents novelty in the literature. The inhibitory effect of the developed compounds were tested in IMAP assay for a detailed structure-activity relationship study. Inhibitors with low IC₅₀ values were selected for tests on various tumor cell lines and using flow cytometry we verified that the compounds induce apoptosis instead of necrosis. The permeability of the molecules were determined with PAMPA assay and the gained information can greatly assist our further experiments.

My results about the selective FLT3 inhibitors were used to file a patent application in the Hungarian Intellectual Property Office in 2013.

11. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Klebl BM, Müller G. (2005) Second-generation kinase inhibitors. *Expert Opin Ther Targets*, 9: 975-993.
- [2] Dhanasekaran N, Premkumar Reddy E. (1998) Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene*, 17: 1447-1455.
- [3] Besant PG, Tan E, Attwood PV. (2003) Mammalian protein histidine kinases. *Int J Biochem Cell Biol*, 35: 297-309.
- [4] Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298: 1912-1934.
- [5] Levitzki A. (2003) Protein kinase inhibitors as a therapeutic modality. *Acc Chem Res*, 36: 462-469.
- [6] Capdeville R, Silberman S, Dimitrijevic S. (2002) Imatinib: the first 3 years. *Eur J Cancer*, 38: S77-82.
- [7] Hahn O, Stadler W. Sorafenib. (2006) *Curr Opin Oncol*, 18: 615-621.
- [8] 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: 13306-13311.
- [9] Burris HA. (2004) Dual kinase inhibition in the treatment of breast cancer: initial experience with the EGFR/ErbB-2 inhibitor lapatinib. *Oncologist*, 9: S10-15.
- [10] Bollag G, Tsai J, Zhang J, Zhang C, Ibrahim P, Nolop K, Hirth P. (2012) Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 11: 873-886.

[11] Gan HK, Seruga B, Knox JJ. (2009) Sunitinib in solid tumors. *Expert Opin Investig Drugs*, 18: 821-834.

[12] Bogoyevitch MA, Fairlie DP. (2007) A new paradigm for protein kinase inhibition: blocking phosphorylation without directly targeting ATP binding. *Drug Discovery Today*, 12: 622-632.

[13] Mah R, Thomas JR, Shafer CM. (2014) Drug discovery considerations in the development of covalent inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 24: 33-39.

[14] Kornev AP, Haste NM, Taylor SS, Eyck LF. (2006) Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 17783-17788.

[15] Zhang J, Yang PL, Gray NS. (2009) Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer*, 9: 28-39.

[16] Zuccotto F, Ardini E, Casale E, Angiolini M. (2010) Through the "gatekeeper door": exploiting the active kinase conformation. *J Med Chem*, 53: 2681-2694.

[17] Liu Y, Gray NS. (2006) Rational design of inhibitor that bind to inactive kinase conformations *Nat Chem Biol*, 2: 358-364.

[18] Burke JR, Pattoli MA, Gregor KR, Brassil PJ, MacMaster JF, McIntyre KW, Yang X, Iotzova VS, Clarke W, Strnad J, Qiu Y, Zusi FC. (2003) BMS-345541 is a highly selective inhibitor of I kappa B kinase that binds at an allosteric site of the enzyme and blocks NF-kappa B-dependent transcription in mice. *J Biol Chem*, 278: 1450-1456.

[19] Martinez A, Alonso M, Castro A, Pérez C, Moreno FJ. (2002) First non-ATP competitive glyco gen synthase kinase 3 beta (GSK-3beta) inhibitors: thiadiazolidinones (TDZD) as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *J Med Chem*, 45: 1292-1299.

[20] Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*, 351: 95-105.

- [21] Liu Q, Sabnis Y, Zhao Z, Zhang T, Buhrlage SJ, Jones LH, Gray NS. (2013) Developing irreversible inhibitors of the protein kinase cysteinome. *Chem Biol*, 20: 146-159.
- [22] Carmi C, Lodola A, Rivara S, Vacondio F, Cavazzoni A, Alfieri RR, Ardizzoni A, Petronini PG, Mor M. (2011) Epidermal growth factor receptor irreversible inhibitors: chemical exploration of the cysteine-trap portion. *Mini Rev Med Chem*, 11: 1019-1030.
- [23] Garuti L, Roberti M, Bottegoni G. (2011) Irreversible protein kinase inhibitors. *Curr Med Chem*, 18: 2981-2994.
- [24] Kwak EL, Sordella R, Bell DW, Godin-Heymann N, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Driscoll DR, Fidias P, Lynch TJ, Rabindran SK, McGinnis JP, Wissner A, Sharma SV, Isselbacher KJ, Settleman J, Haber DA. (2005) Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102: 7665-7670.
- [25] Kobayashi S, Ji H, Yuza Y, Meyerson M, Wong KK, Tenen DG, Halmos B. (2005) An alternative inhibitor overcomes resistance caused by a mutation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res*, 65: 7096-7101.
- [26] Rabindran SK, Discafani CM, Rosfjord EC, Baxter M, Floyd MB, Golas J, Hallett WA, Johnson BD, Nilakantan R, Overbeek E, Reich MF, Shen R, Shi X, Tsou, HR, Wang YF, Wissner A. (2004) Antitumor activity of HKI-272, an orally active, irreversible inhibitor of the HER-2 tyrosine kinase. *Cancer Res*, 64: 3958-3965.
- [27] Wissner A, Fraser HL, Ingalls CL, Dushin RG, Floyd MB, Cheung K, Nittoli T, Ravi MR, Tan X, Loganzo F. (2007) Dual irreversible kinase inhibitors: quinazoline-based inhibitors incorporating two independent reactive centers with each targeting different cysteine residues in the kinase domains of EGFR and VEGFR-2. *Bioorg Med Chem*, 15: 3635-3648.
- [28] Peyssonnaud C, Eychène A. (2001) The RAF/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell*, 93: 53-62.

[29] Sridhar SS, Hedley D, Siu LL. (2005) RAF kinase as a target for anticancer therapeutics. *Mol Cancer Ther*, 4: 677-685.

[30] Dibb NJ, Dilworth SM, Mol CD. (2004) Switching on kinases: oncogenic activation of BRAF and the PDGFR family. *Nat Rev Cancer*, 4: 718-727.

[31] Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancers. *Nature*, 417: 949-954.

[32] Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Kempf RC, Long J, Laidler P, Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Stivala F, Mazzarino MC, Donia M, Fagone P, Malaponte G, Nicoletti F, Libra M, Milella M, Tafuri A, Bonati A, Bäsecke J, Cocco L, Evangelisti C, Martelli AM, Montalto G, Cervello M, McCubrey JA. (2011) Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany NY)*, 3: 192-222.

[33] McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, Lee JT, Chang F, Bertrand FE, Navolanic PM, Terrian DM, Franklin RA, D'Assoro AB, Salisbury JL, Mazzarino MC, Stivala F, Libra M. (2006) Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv Enzyme Regul*, 46: 249-279.

[34] Garnett MJ, Marais R. (2004) Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell*, 6: 313-319.

- [35] Cohen Y, Xing M, Mambo E, Guo Z, Wu G, Trink B, Beller U, Westra WH, Ladenson PW, Sidransky D. (2003) BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 95: 625-627.
- [36] Newhouse BJ, Hansen JD, Grina J, Welch M, Topalov G, Littman N, Callejo M, Martinson M, Galbraith S, Laird ER, Brandhuber BJ, Vigers G, Morales T, Woessner R, Randolph N, Lyssikatos J, Olivero A. (2011) Non-oxime pyrazole based inhibitors of B-RAF kinase. *Bioorg Med Chem Lett*, 21: 3488-3492.
- [37] Buckmelter AJ, Ren L, Laird ER, Rast B, Miknis G, Wenglow sky S, Schlachter S, Welch M, Tarlton E, Grina J, Lyssikatos J, Brandhuber BJ, Morales T, Randolph N, Vigers G, Martinson M, Callejo M. (2011) The discovery of furo[2,3-c]pyridine-based indanone oximes as potent and selective B-RAF inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 21: 1248-1252.
- [38] Ren L, Wenglow sky S, Miknis G, Rast B, Buckmelter AJ, Ely RJ, Schlachter S, Laird ER, Randolph N, Callejo M, Martinson M, Galbraith S, Brandhuber BJ, Vigers G, Morales T, Voegtli WC, Lyssikatos J. (2011) Non-oxime inhibitors of B-RAF(V600E) kinase. *Bioorg Med Chem Lett*, 21: 1243-1247.
- [39] Qin J, Xie P, Ventocilla C, Zhou G, Vultur A, Chen Q, Liu Q, Herlyn M, Winkler J, Marmorstein R. (2012) Identification of a novel family of BRAF(V600E) inhibitors. *J Med Chem*, 55: 5220-5230.
- [40] Vasbinder MM, Aquila B, Augustin M, Chen H, Cheung T, Cook D, Drew L, Fauber BP, Glossop S, Grondine M, Hennessy E, Johannes J, Lee S, Lyne P, Mörtl M, Omer C, Palakurthi S, Pontz T, Read J, Sha L, Shen M, Steinbacher S, Wang H, Wu A, Ye M. (2013) Discovery and Optimization of a Novel Series of Potent Mutant B-RAF(V600E) Selective Kinase Inhibitors. *J Med Chem*, 56: 1996-2015.
- [41] Tsai J, Lee JT, Wang W, Zhang J, Cho H, Mamo S, Bremer R, Gillette S, Kong J, Haass NK, Sproesser K, Li L, Smalley KS, Fong D, Zhu YL, Marimuthu A, Nguyen H, Lam B, Liu J, Cheung I, Rice J, Suzuki Y, Luu C, Settachatgul C, Shellooe R, Cantwell J, Kim SH, Schlessinger J, Zhang KY, West BL, Powell B, Habets G, Zhang C, Ibrahim

PN, Hirth P, Artis DR, Herlyn M, Bollag G. (2008) Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-RAF kinase with potent antimelanoma activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 3041-3046.

[42] Bollag G, Hirth P, Tsai J, Zhang J, Ibrahim PN, Cho H, Spevak W, Zhang C, Zhang Y, Habets G, Burton EA, Wong B, Tsang G, West BL, Powell B, Shellooe R, Marimuthu A, Nguyen H, Zhang KY, Artis DR, Schlessinger J, Su F, Higgins B, Iyer R, D'Andrea K, Koehler A, Stumm M, Lin PS, Lee RJ, Grippo J, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, Chapman PB, Flaherty KT, Xu X, Nathanson KL, Nolop K. (2010) Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature*, 467: 596-599

[43] Ren L, Ahrendt KA, Grina J, Laird ER, Buckmelter AJ, Hansen JD, Newhouse B, Moreno D, Wenglowky S, Dinkel V, Gloor, SL, Hastings G, Rana S, Rasor K, Risom T, Sturgis HL, Voegtli WC, Mathieu S. (2012) The discovery of potent and selective pyridopyrimidin-7-one based inhibitors of B-RAFV600E kinase. *Bioorg Med Chem Lett*, 22: 3387-3391.

[44] Wenglowky S, Ahrendt KA, Buckmelter AJ, Feng B, Gloor SL, Gradl S, Grina J, Hansen JD, Laird ER, Lunghofer P, Mathieu S, Moreno D, Newhouse B, Ren L, Risom T, Rudolph J, Seo J, Sturgis HL, Voegtli WC, Wen Z. (2011) Pyrazolopyridine inhibitors of B-RAFV600E. Part 2: structure-activity relationships. *Bioorg Med Chem Lett*, 21: 5533-5537.

[45] Mathieu S, Gradl SN, Ren L, Wen Z, Aliagas I, Gunzner-Toste J, Lee W, Pulk R, Zhao G, Aliche B, Boggs JW, Buckmelter AJ, Choo EF, Dinkel V, Gloor SL, Gould SE, Hansen JD, Hastings G, Hatzivassiliou G, Laird ER, Moreno D, Ran Y, Voegtli WC, Wenglowky S, Grina J, Rudolph J. (2012) Potent and selective aminopyrimidine-based B-Raf inhibitors with favorable physicochemical and pharmacokinetic properties. *J Med Chem*, 55: 2869-2881.

[46] Roskoski R Jr. (2010) RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 399: 313-317.

- [47] Baska F, Szabadkai I, Sipos A, Breza N, Szantai-Kis C, Kékesi L, Garamvölgyi R, Nemes Z, Baska F, Neumann L, Torka R, Ullrich A, Kéri G, Orfi L. (2014) Pharmacophore and Binding Analysis of Known and Novel B-RAF Kinase Inhibitors. *Curr Med Chem*, 21: 1938-1965.
- [48] Okram B, Nagle A, Adrián FJ, Lee C, Ren P, Wang X, Sim T, Xie Y, Wang X, Xia G, Spraggon G, Warmuth M, Liu Y, Gray NS. (2006) A general strategy for creating "inactive-conformation" abl inhibitors *Chem Biol*, 13: 779-786.
- [49] Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, Schwartz B, Simantov R, Kelley S. (2006) Discovery and development of Sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 5: 835-844.
- [50] Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R. (2004) Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*, 116: 855-867
- [51] Gould AE, Adams R, Adhikari S, Aertgeerts K, Afroze R, Blackburn C, Calderwood EF, Chau R, Chouitar J, Duffey MO, England DB, Farrer C, Forsyth N, Garcia K, Gaulin J, Greenspan PD, Guo R, Harrison SJ, Huang SC, Iartchouk N, Janowick D, Kim MS, Kulkarni B, Langston SP, Liu JX, Ma LT, Menon S, Mizutani H, Paske E, Renou CC, Rezaei M, Rowland RS, Sintchak MD, Smith MD, Stroud SG, Tregay M, Tian Y, Veiby OP, Vos TJ, Vyskocil S, Williams J, Xu T, Yang JJ, Yano J, Zeng H, Zhang DM, Zhang Q, Galvin KM. (2011) Design and optimization of potent and orally bioavailable tetrahydronaphthalene RAF inhibitors. *J Med Chem*, 54: 1836-1846
- [52] Smith AL, DeMorin FF, Paras NA, Huang Q, Petkus JK, Doherty EM, Nixey T, Kim JL, Whittington DA, Epstein LF, Lee MR, Rose MJ, Babij C, Fernando M, Hess K, Le Q, Beltran P, Carnahan J. (2009) Selective inhibitors of the mutant B-RAF pathway: discovery of a potent and orally bioavailable aminoisoquinoline. *J Med Chem*, 52: 6189-6192.

- [53] Berger DM, Torres N, Dutia M, Powell D, Ciszewski G, Gopalsamy A, Levin JJ, Kim KH, Xu W, Wilhelm J, Hu Y, Collins K, Feldberg L, Kim S, Frommer E, Wojciechowicz D, Mallon R. (2009) Non-hinge-binding pyrazolo[1,5-a]pyrimidines as potent B-RAF kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 19: 6519-6523.
- [54] Wenglowsky S, Moreno D, Laird ER, Gloor SL, Ren L, Risom T, Rudolph J, Sturgis HL, Voegtli WC. (2012) Pyrazolopyridine inhibitors of B-RAF(V600E). Part 4: rational design and kinase selectivity profile of cell potent type II inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 22: 6237-6241.
- [55] Okaniwa M, Hirose M, Imada T, Ohashi T, Hayashi Y, Miyazaki T, Arita T, Yabuki M, Kakoi K, Kato J, Takagi T, Kawamoto T, Yao S, Sumita A, Tsutsumi S, Tottori T, Oki H, Sang BC, Yano J, Aertgeerts K, Yoshida S, Ishikawa T. (2012) Design and synthesis of novel DFG-out RAF/vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) inhibitors. 1. Exploration of [5,6]-fused bicyclic scaffolds. *J Med Chem*, 55: 3452-3478.
- [56] Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. (2000) Structural Mechanism for STI-571 Inhibition of Ablason Tyrosine Kinase. *Science*, 289: 1938-1942.
- [57] Lowinger TB, Riedl B, Dumas J, Smith R. (2002) Design and Discovery of Small Molecules Targeting Raf-1 Kinase. *Curr Pharm Des*, 8: 2269-2278.
- [58] Manley PW, Bold G, Brügger J, Fendrich G, Furet P, Mestan J, Schnell C, Stolz B, Meyer T, Meyhack B, Stark W, Strauss A, Wood J. (2004) Advances in the structural biology, design and clinical development of VEGF-R kinase inhibitors for the treatment of angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1697: 17-27.
- [59] Kufareva I, Abagyan R. (2008) Type-II kinase inhibitor docking, screening, and profiling using modified structures of active kinase states. *J Med Chem*, 51: 7921-7932.
- [60] Rosnet O, Bühring HJ, Marchetto S, Rappold I, Lavagna C, Sainty D, Arnoulet C, Chabannon C, Kanz L, Hannum C, Birnbaum D. (1996) Human FLT3/FLK2 receptor

tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia*, 10: 238-248.

[61] Rosnet O, Birnbaum D. (1993) Hematopoietic receptors of class III receptor-type tyrosine kinases. *Crit Rev Oncog*, 4: 595-613.

[62] Scheijen B, Griffin JD. (2002) Tyrosine kinase oncogenes in normal hematopoiesis and hematological disease. *Oncogene*, 21: 3314-3333.

[63] Griffith J, Black J, Faerman C, Swenson L, Wynn M, Lu F, Lippke J, Saxena K. (2004) The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell*, 13: 169-178.

[64] deLapeyrière O, Naquet P, Planche J, Marchetto S, Rottapel R, Gambarelli D, Rosnet O, Birnbaum D. (1995) Expression of Flt3 tyrosine kinase receptor gene in mouse hematopoietic and nervous tissues. *Differentiation*, 58: 351-359.

[65] Brasel K, Escobar S, Anderberg R, de Vries P, Gruss HJ, Lyman SD. (1995) Expression of the flt3 receptor and its ligand on hematopoietic cells. *Leukemia*, 9: 1212-1218.

[66] Turner AM, Lin NL, Issarachai S, Lyman SD, Broudy VC. (1996) FLT3 receptor expression on the surface of normal and malignant human hematopoietic cells. *Blood*, 88: 3383-3890.

[67] Maroc N, Rottapel R, Rosnet O, Marchetto S, Lavezzi C, Mannoni P, Birnbaum D, Dubreuil P. (1993) Biochemical characterization and analysis of the transforming potential of the FLT3/FLK2 receptor tyrosinekinase. *Oncogene*, 8: 909-918.

[68] Meshinchi S, Appelbaum FR. (2009) Structural and functional alterations of FLT3 in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*, 15: 4263-4269.

[69] Stirewalt DL, Radich JP. (2003) The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer*, 3: 650-665.

[70] Drexler HG. (1996) Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. *Leukemia*, 10: 588-599.

[71] Ozeki K, Kiyoi H, Hirose Y, Iwai M, Ninomiya M, Kodera Y, Miyawaki S, Kuriyama K, Shimazaki C, Akiyama H, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Ueda R, Ohno R, Emi N, Naoe T. (2004) Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. *Blood*, 103: 1901-1908.

[72] Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T, Misawa S. (1996) Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 10: 1911-1918.

[73] Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Saito H, Ueda R, Ohno R, Naoe T. (2001) Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*, 97: 2434-2439.

[74] Levis M, Small D. (2003) FLT3: ITD does matter in leukemia. *Leukemia*, 17: 1738-1752.

[75] Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, Löffler H, Sauerland CM, Serve H, Büchner T, Haferlach T, Hiddemann W. (2002) Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood*, 100: 59-66.

[76] Hubbard SR. (2004) Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5: 464-471.

[77] Whitman SP, Ruppert AS, Radmacher MD, Mrózek K, Paschka P, Langer C, Baldus CD, Wen J, Racke F, Powell BL, Kolitz JE, Larson RA, Caligiuri MA, Marcucci G, Bloomfield CD. (2008) FLT3 D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression signature among younger adults with de

novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking FLT3 internal tandem duplications. *Blood*, 111: 1552-1559.

[78] Wang W, Wang XQ, Xu XP, Lin GW. (2010) Prevalence and prognostic significance of FLT3 gene mutations in patients with acute leukaemia: analysis of patients from the Shanghai Leukaemia Co-operative Group. *J Int Med Res*, 38: 432-442.

[79] Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Saito H, Ueda R, Ohno R, Naoe T. (2001) Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*, 97: 2434-2439.

[80] Schmidt-Arras D, Schwäble J, Böhmer FD, Serve H. (2004) Flt3 receptor tyrosine kinase as a drug target in leukemia. *Curr Pharm Des*, 10: 1867-1883.

[81] Ishida H, Isami S, Matsumura T, Umehara H, Yamashita Y, Kajita J, Fuse E, Kiyoi H, Naoe T, Akinaga S, Shiotsu Y, Arai H. (2008) Novel and orally active 5-(1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyrimidine derivatives as selective FLT3 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 18: 5472-5477.

[82] Grunwald MR, Levis MJ. (2013) FLT3 inhibitors for acute myeloid leukemia: a review of their efficacy and mechanisms of resistance. *Int J Hematol*, 97: 683-694.

[83] Kelly LM, Yu JC, Boulton CL, Apatira M, Li J, Sullivan CM, Williams I, Amaral SM, Curley DP, Duclos N, Neuberg D, Scarborough RM, Pandey A, Hollenbach S, Abe K, Lokker NA, Gilliland DG, Giese NA. (2002) CT53518, a novel selective FLT3 antagonist for the treatment of acute myelogenous leukemia (AML). *Cancer Cell*, 1: 421-432.

[84] DeAngelo D.J, Stone RM, Heaney ML, Nimer SD, Paquette RL, Klisovic RB, Caligiuri MA, Cooper MR, Lecerf JM, Karol MD, Sheng S, Holford N, Curtin PT, Druker BJ, Heinrich MC. (2006) Phase 1 clinical results with tandutinib (MLN518), a novel FLT3 antagonist, in patients with acute myelogenous leukemia or high-risk

myelodysplastic syndrome: safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Blood*, 108: 3674-3681.

[85] Fathi A, Levis M. (2011) FLT3 inhibitors: A story of the Old and the New. *Curr Opin Hematol*, 18: 71-76.

[86] Shiotsu Y, Kiyoi H, Ishikawa Y, Tanizaki R, Shimizu M, Umehara H, Ishii K, Mori Y, Ozeki K, Minami Y, Abe A, Maeda H, Akiyama T, Kanda Y, Sato Y, Akinaga S, Naoe T. (2009) KW-2449, a novel multikinase inhibitor, suppresses the growth of leukemia cells with FLT3 mutations or T315I-mutated BCR/ABL translocation. *Blood*, 114: 1607-1617.

[87] Pratz KW, Cortes J, Roboz GJ, Rao N, Arowojolu O, Stine A, Shiotsu Y, Shudo A, Akinaga S, Small D, Karp JE, Levis M. (2009) A pharmacodynamic study of the FLT3 inhibitor KW-2449 yields insight into the basis for clinical response. *Blood*, 113: 3938-3946.

[88]<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2006/ucm108583.htm>

[89] Anastassiadis T, Deacon SW, Devarajan K, Ma H, Peterson JR. (2011) Comprehensive assay of kinase catalytic activity reveals features of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol*, 29: 1039-1045.

[90] O'Farrell AM, Abrams TJ, Yuen HA, Ngai TJ, Louie SG, Yee KW, Wong LM, Hong W, Lee LB, Town A, Smolich BD, Manning WC, Murray LJ, Heinrich MC, Cherrington JM. (2003) SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. *Blood*, 101: 3597-3605.

[91] O'Farrell AM, Foran JM, Fiedler W, Serve H, Paquette RL, Cooper MA, Yuen HA, Louie SG, Kim H, Nicholas S, Heinrich MC, Berdel WE, Bello C, Jacobs M, Scigalla P, Manning WC, Kelsey S, Cherrington JM. (2003) An innovative phase I clinical study demonstrates inhibition of FLT3 phosphorylation by SU11248 in acute myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res*, 9: 5465-5476.

[92] Trudel S, Li ZH, Wei E, Wiesmann M, Chang H, Chen C, Reece D, Heise C, Stewart AK. (2005) CHIR-258, a novel, multitargeted tyrosine kinase inhibitor for the potential treatment of t(4;14) multiple myeloma. *Blood*, 105: 2941-2948.

[93] Weisberg E, Barrett R, Liu Q, Stone R, Gray N, Griffin JD. (2009) FLT3 inhibition and mechanisms of drug resistance in mutant FLT3-positive AML. *Drug Resist Updat*, 12: 81-89.

[94] Fabbro D, Buchdunger E, Wood J, Mestan J, Hofmann F, Ferrari S, Mett H, O'Reilly T, Meyer T. (1999) Inhibitors of protein kinases: CGP 41251, a protein kinase inhibitor with potential as an anticancer agent. *Pharmacol Ther*, 82: 293-301.

[95] Fathi AT, Levis M. (2009) Lestaurtinib: a multi-targeted FLT3 inhibitor. *Expert Rev Hematol*, 2: 17-26.

[96] Weisberg E, Boulton C, Kelly LM, Manley P, Fabbro D, Meyer T, Gilliland DG, Griffin JD. (2002) Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Cancer Cell*, 1: 433-443.

[97] Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, Galinsky I, Estey E, Nimer SD, Grandin W, Lebwohl D, Wang Y, Cohen P, Fox EA, Neuberg D, Clark J, Gilliland DG, Griffin JD. (2005) Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood*, 105: 54-60.

[98] Levis M, Allebach J, Tse KF, Zheng R, Baldwin BR, Smith BD, Jones-Bolin S, Ruggeri B, Dionne C, Small D. (2002) A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood*, 99: 3885-3891.

[99] Smith BD, Levis M, Beran M, Giles F, Kantarjian H, Berg K, Murphy KM, Dausies T, Allebach J, Small D. (2004) Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*, 103: 3669-3676.

[100] Zarrinkar PP, Gunawardane RN, Cramer MD, Gardner MF, Brigham D, Belli B, Karaman MW, Pratz KW, Pallares G, Chao Q, Sprankle KG, Patel HK, Levis M, Armstrong RC, James J, Bhagwat SS. (2009) AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, 114: 2984-2992.

[101] Cortes JE, Kantarjian H, Foran JM, Ghirdaladze D, Zodelava M, Borthakur G, Gammon G, Trone D, Armstrong RC, James J, Levis M. (2013) Phase I Study of Quizartinib Administered Daily to Patients With Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia Irrespective of FMS-Like Tyrosine Kinase 3-Internal Tandem Duplication Status. *J Clin Oncol*, 31: 3681-3687.

[102] Fletcher GC, Brokx RD, Denny TA, Hembrough TA, Plum SM, Fogler WE, Sidor CF, Bray MR. (2011) ENMD-2076 is an orally active kinase inhibitor with antiangiogenic and antiproliferative mechanisms of action. *Mol Cancer Ther*, 10: 126-137.

[103] Foster BA, Coffey HA, Morin MJ, Rastinejad F. (1999) Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science*, 286: 2507-2510.

[104] Ullrich A, Knyazev P, Zhang Y, Kéri Gy, Örfi L, Szabadkai I. (2009) Quinoline derivatives as Axl kinase inhibitors. *PCT Int. Appl. WO 2009127417*.

[105] Ullrich A, Torka R, Zhang Y, Kéri Gy, Örfi L, Szabadkai I. (2011) Quinolinyloxyphenylsulfonamides. *PCT Int. Appl. WO 2011045084*.

[106] Schrödinger Suite 2009 update 2 és Suite 2010 programcsomagok, Schrödinger LLC, Licenz tulajdonos: Racionális Hatóanyagtervező Laboratórium – Kooperációs Kutató Központ, Semmelweis Egyetem, Budapest és az EGIS Gyógyszergyár Nyrt., Szerkezetkutató Osztály, Budapest.

[107] <http://www.promega.co.uk/products/pm/celltiter-glo>

[108] Neumann L, von König K, Ullmann D. (2011) *Methods in Enzymology*, Academic Press: Burlington, 493: 299-320.

[109] Coffrey HA, Connel RD, Foster BA, Rastinejad F. (2000) Methods and compositions for restoring conformational stability of a protein of the p53 family. PCT Int. Appl. WO 200032175.

[110] Sutherland HS, Hwang IY, Marshall ES, Lindsay BS, Denny WA, Gilchrist C, Joseph WR, Greenhalgh D, Richardson E, Kestell P, Ding A, Baguley BC. (2012) Therapeutic reactivation of mutant p53 protein by quinazoline derivatives. *Invest New Drugs*, 30: 2035-2045.

[111] Fabian MA, Biggs WH 3rd, Treiber DK, Atteridge CE, Azimioara MD, Benedetti MG, Carter TA, Ciceri P, Edeen PT, Floyd M, Ford JM, Galvin M, Gerlach JL, Grotzfeld RM, Herrgard S, Insko DE, Insko MA, Lai AG, Lélías JM, Mehta SA, Milanov ZV, Velasco AM, Wodicka LM, Patel HK, Zarrinkar PP, Lockhart DJ. (2005) A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat Biotechnol*, 23: 329-336.

[112] <http://www.moleculardevices.com/Products/Assay-Kits/Enzymes/IMAP-Assays.html>

[113] Wang W, Takimoto R, Rastinejad F, El-Deiry WS. (2003) Stabilization of p53 by CP-31398 inhibits ubiquitination without altering phosphorylation at serine 15 or 20 or MDM2 binding. *Mol Cell Biol*, 23: 2171-2181.

[114] Zheng B, Jeong HJ, Asara MJ, Yuan YY, Granter RS, Chin L, Cantley CL. (2009) Oncogenic B-RAF negatively regulates the tumor suppressor LKB1 to promote Melanoma cell proliferation. *Mol Cell*, 33: 237-247.

[115] Röring M, Herr R, Fiala GJ, Heilmann K, Braun S, Eisenhardt AE, Halbach S, Capper D, von Deimling A, Schamel WW, Saunders DN, Brummer T. (2012) Distinct requirement for an intact dimer interface in wild-type, V600E and kinase-dead B-RAF signalling. *EMBO J*, 31: 2629-2647.

[116] Carnahan J, Beltran JP, Babij C, Le Q, Rose JM, Vonderfecht S, Kim LJ, Smith LA, Nagapudi K, Broome AM, Fernando M, Kha H, Belmontes B, Radinsky R, Kendall

R, Burgess LT. (2010) Selective and Potent RAF Inhibitors Paradoxically Stimulate Normal Cell Proliferation and Tumor Growth. *Mol Cancer Ther*, 9: 2399-2410.

[117] Quentmeier H, Reinhardt J, Zaborski M, Drexler HG. (2003) FLT3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines. *Leukemia*, 17: 120-124.

[118] Halaban R, Zhang W, Bacchiocchi A, Cheng E, Parisi F, Ariyan S, Krauthammer M, McCusker JP, Kluger Y, Sznol M. (2010) PLX4032, a selective BRAFV600E kinase inhibitor, activates the ERK pathway and enhances cell migration and proliferation of BRAFwt melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res*, 23: 190-200.

[119] Szokol B, Gyulavári P, Kurkó I, Baska F, Szántai-Kis Cs, Greff Z, Órfi Z, Peták I, Ullrich A, Órfi L, Vántus T, Kéri Gy. (2014) Discovery and biological evaluation of novel dual EGFR/c-Met inhibitors. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 5: 298-303.

[120] Lebakken CS, Hee Chol Kang, Vogel KW. (2007) A fluorescence lifetime based binding assay to characterize kinase inhibitors. *J Biomol Screen*, 12: 828-841.

[121] Davis MI, Hunt JP, Herrgard S, Ciceri P, Wodicka LM, Pallares G, Hocker M, Treiber DK, Zarrinkar PP. (2011) Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol*, 29: 1046-1051.

[122] O'Farrell AM, Abrams TJ, Yuen HA, Ngai TJ, Louie SG, Yee KW, Wong LM, Hong W, Lee LB, Town A, (2003) Smolich BD, Manning WC, Murray LJ, Heinrich MC, Cherrington JM. SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. *Blood*, 101: 3597-3605.

[123] Benlloch S, Payá A, Alenda C, Bessa X, Andreu M, Jover R, Castells A, Llor X, Aranda I, Massutí B. (2006) Detection of BRAF V600E Mutation in Colorectal Cancer : Comparison of Automatic Sequencing and Real-Time Chemistry Methodology. *J Mol Diagn*, 8: 540–543.

[124] Hollestelle A, Nagel JH, Smid M, Lam S, Elstrodt F, Wasielewski M, Ng SS, French PJ, Peeters JK, Rozendaal MJ, Riaz M, Koopman DG, Ten Hagen TL, de Leeuw BH, Zwarthoff EC, Teunisse A, van der Spek PJ, Klijn JG, Dinjens WN, Ethier SP,

Clevers H, Jochemsen AG, den Bakker MA, Foekens JA, Martens JW, Schutte M. (2010) Distinct gene mutation profiles among luminal-type and basal-type breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat*, 121: 53-64.

[125] Alanazi I, Ebrahimie E, Hoffmann P, Adelson DL. (2013) Combined gene expression and proteomic analysis of EGF induced apoptosis in A431 cells suggests multiple pathways trigger apoptosis. *Apoptosis*, 18: 1291-1305.

[126] Baska F, Kéri Gy, Órfi L, Bánhegyi P, Kékesi L, Zsákai L. (2013) Styryl quinazoline derivatives as pharmaceutically active agents. *Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala, Ügyiratszám: P1300477/1. Benyújtás dátuma: 2013. augusztus 9*

12. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE**A disszertáció témájában megjelent közlemények:**

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: 1938-1965. (IF: 4,070)

Szokol B, Gyulavári P, Kurkó I, **Baska F**, Szántai-Kis Cs, Greff Z, Órfi Z, Peták I, Ullrich A, Órfi L, Vántus T, Kéri Gy. (2014) Discovery and biological evaluation of novel dual EGFR/c-Met inhibitors. *ACS Med Chem Lett*, 5: 298-303. (IF: 3,311)

Szokol B, Gyulavári P, **Baska F**, Kurkó I, Greff Z, Szántai-Kis Cs, Órfi Z, Peták I, Ullrich A, Vántus T, Kéri Gy, Órfi L. (2013) EGFR/c-Met kettősgátlók fejlesztése és biokémiai vizsgálata. *Acta Pharm Hung*, 83: 121-133.

Baska F, Székely ER, Szántai-Kis Cs, Bánhegyi P, Hegymegi-Barakonyi B, Németh G, Breza N, Zsákai L, Greff Z, Pató J, Kéri Gy, Órfi L. (2013) *Mycobacterium tuberculosis* ellenes hatóanyagok fejlesztése és szerkezet-hatás összefüggéseinek vizsgálata. *Acta Pharm Hung*, 83: 88-95.

A disszertáció témájában beadott szabadalom:

Baska F, Órfi L, Kéri Gy, Bánhegyi P, Kékesi L, Zsákai L. (2013) Styryl quinazoline derivatives as pharmaceutically active agents. Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala, Ügyiratszám: P1300477/1. Benyújtás dátuma: 2013. augusztus 9.

A PCT szabadalmi bejelentés 2014. augusztus 9-ig kerül benyújtásra.

A disszertáció témájától független közlemények:

Borbély G, Szabadkai I, Horváth Z, Markó P, Varga Z, Breza N, **Baska F**, Vántus T, Huszár M, Geiszt M, Hunyady L, Buday L, Órfi L, Kéri Gy. (2010) Small-Molecule Inhibitors of NADPH Oxidase 4. *J Med Chem*, 53: 6758-6762. (IF: 5,207)

Németh G, Varga Z, Greff Z, Bencze G, Sipos A, Szántai-Kis Cs, **Baska F**, Gyuris Á, Kelemenics K, Szathmáry Z, Minárovits J, Kéri Gy, Órfi L. (2011) Novel, Selective CDK9 Inhibitors for the Treatment of HIV Infection. *Curr Med Chem*, 18: 342-358. (IF: 4,859)

Szente V, **Baska F**, Zelkó R, Süvegh K.: Prediction of the drug release stability of different polymeric matrix tablets containing metronidazole. (2011) *J Pharm Biomed Anal*, 54: 730-734. (IF: 2,967)

Baska F, Szántai-Kis Cs, Greff Z, Marosfalvi J, Varga Z, Kéri Gy, Órfi L. (2010) P21-aktivált kináz gátlók vizsgálata „in silico” módszerek felhasználásával. *Acta Pharm Hung*, 80: 155-161.

Ho HK, Németh G, Ng YR, Pang E, Szántai-Kis C, Zsákai L, Breza N, Greff Z, Horváth Z, Pató J, Szabadkai I, Szokol B, **Baska F**, Orfi L, Ullrich A, Kéri G, Chua BT. (2013) Developing FGFR4 Inhibitors As Potential Anti-Cancer Agents Via In Silico Design, Supported by In Vitro and Cell-Based Testing. *Curr Med Chem*, 20: 1203-1217. (IF: 4,070)

Tóth G, **Baska F**, Schretner A, Rácz A, Noszál B. (2013) Site-specific basicities regulate molecular recognition in receptor binding: in silico docking of thyroid hormones. *Eur Biophys J*, 42: 721-730. (IF: 2,274)

Kékesi L, Sipos A, Németh G, Pató J, Breza N, **Baska F**, Orfi 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: 6152-6155. (IF: 2,338)

Zsákai L, Németh G, Szántai-Kis Cs, Greff Z, Horváth Z, Szokol B, **Baska F**, Boon TC, Órfi L, Kéri Gy. (2013) Potenciális antitumor hatású FGFR inhibitorok fejlesztése. *Acta Pharm Hung*, 83: 47-56.

Konferencia előadások, poszterek:

Baska F, Órfi L. Heterociklusos kinázgátló vegyületek szintézise és fejlesztése. Semmelweis Egyetem, PhD Tudományos Napok 2008. április 10-11.

Baska F. PknG kináz inhibitorok kötődésének vizsgálata fehérjekrisztallográfiás módszerrel Műszaki Kémiai Napok, Veszprém 2009. április 21-23.

Baska F, Greff Z, Bánhegyi P, Kéri Gy, Órfi L PknG inhibitorok szintézise és kötődésének vizsgálata. Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet, 60 éves évforduló - MTA ülés 2009. december 1.

Baska F, Órfi L. Kötőhely – ligandum kölcsönhatások feltérképezésének lehetőségei - molekulamodellés. Semmelweis Egyetem, Gyógyszerkutató és fejlesztő szakirányú továbbképzés, 2010.

Baska F, Szabadkai I, Erős D, Waczek F, Greff Z, Kékesi L, Garamvölgyi R, Torka R, Ullrich A, Kéri Gy, Órfi L. Binding studies of new potential allosteric kinase inhibitors. Schrödinger User Group Meeting, Budapest, Nov 23. 2010.

Baska F, Eros D, Szabadkai I, Wáczek F, Greff Z, Kéri Gy, Órfi L. Docking studies of potential allosteric kinase inhibitors. 6. PhD-Symposium, Vienna, June16-17, 2010.

Szente V, **Baska F, Zelkó R, Süvegh K.** Prediction of the physical stability of polymeric matrix tablets containing metronidazole. 6. PhD-Symposium, Vienna, June16-17, 2010.

Belle R, **Baska F, Órfi Z, Szántai-Kis Cs, Sipos A, Breza N, Borbély G, Péntes K, Órfi L, Kéri Gy.** Characterization of p53 activator compounds which inhibit a survival factor as well. 22nd IUBMB& 37th FEBS Congress, Sevilla, September 4th - 9th, 2012.

13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Dr. Órfi László témavezetőmnek, az évek során adott hasznos tanácsokat és segítséget valamint, hogy lehetővé tette számomra a magas színvonalú kutatómunkába való bekapcsolódást.

Köszönettel tartozom Dr. Kéri Györgynek a Vichem Chemie Kft ügyvezető igazgatójának, hogy kutatásaimhoz stabil háttérrel biztosított és, hogy a szintetikus munkát a cég laborjában végezhettem.

Köszönet illeti Dr. Greff Zoltánt, aki rengeteg és nélkülözhetetlen szakmai tanáccsal látott el az évek során és idejét nem sajnálva átnézte dolgozatom kémiai részét.

Hálás köszönet illeti Szabadkai Istvánt, aki a B-RAF gátló vegyületek előállítása mellett átnézte a disszertációm és tanácsaival segítette annak befejezését.

Nagyon köszönöm Dr. Illyés Eszternek, Dr. Szilágyi Ildikónak és Boros Sándornak a vegyületek analitikai mérését és a kiértékelésekben nyújtott segítséget.

Köszönöm Dr. Szántai-Kis Csabának, a Vichem Chemie Kft. biológia részlegvezetőjének, hogy beszélgetéseink során mindig hasznos tanácsokkal látott el a biológiai mérésekkel kapcsolatban.

Szeretném megköszönni a Vichem Chemie Kft. biológus csapatának, Belle Rékának, Bökönyi Gyöngyinek, Breza Nórának, Dr. Dobos Juditnak, Kurkó Ibolyának, Nádudvari Renátának, dr. Órfi Zoltánnak, Péntes Kingának, Sipos Annának és Zsákai Liliának a gyors és precíz méréseket, valamint a vegyületek biológiai vizsgálata során nyújtott összes szakami segítséget.

Köszönet illeti Dr. Dancsó András és Dr. Kövesdi Istvánt, hogy lehetőséget biztosítottak számomra az EGIS Gyógyszergyárban a molekulamodellezés elvégzéséhez.

Köszönöm közvetlen kollégáimnak, dr. Wácsek Frigyesnek, dr. Garamvölgyi Ritának, dr. Nemes Zoltánnak, Ézsiás Editnek, Szebeni Krimhildának és Gregus Zoltánnénak a napi labormunkában nyújtott segítséget, nagyban hozzájárultak ahhoz, hogy kellemes légkörben végezhettem a munkám.

Végül, de nem utolsó sorban nagyon köszönöm menyasszonyomnak, családomnak és barátaimnak a biztatást valamint, hogy mellettem álltak az évek során.