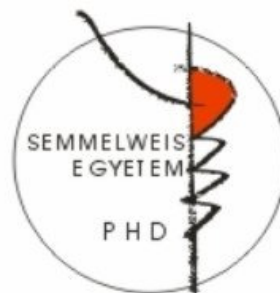


Foszfor tartalmú CDK9 kinázgátló vegyületek előállítása

Doktori értekezés

Németh Gábor

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Kotschy András igazgató, D.Sc.
Dr. Tétényi Péter egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Török Tamás egyetemi tanár, D.Sc.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Huszthy Péter egyetemi tanár, D.Sc.
Dr. Klebovich Imre egyetemi tanár, D.Sc.

Budapest

2012

1. Tartalomjegyzék:

1.	<i>Tartalomjegyzék:</i>	2
2.	<i>Rövidítések jegyzéke:</i>	4
3.	<i>Bevezetés, irodalmi áttekintés</i>	6
3.1.	Kinázok	7
3.2.	Ciklin dependens kinázok és a CDK9	8
3.3.	A HIV vírus és az AIDS	10
3.4.	CDK9 inhibitorok	12
3.5.	(6-Fenil-pirimidin-4-il)-fenilamin alapvázra épülő CDK9 inhibitorok	14
3.6.	A periódusos rendszer 15. eleme a foszfor	16
3.7.	Foszfor tartalmú gyógyszer hatóanyagok	17
3.7.1.	Nitrogén mustárok: ciklofoszfamid, ifoszfamid	17
3.7.2.	Vízoldhatóságot javító foszfor tartalmú funkciócsoportot tartalmazó gyógyszer hatóanyagok	18
3.7.3.	Szervezetünk építőelemeit mimikáló foszfortartalmú gyógyszerhatóanyagok.....	20
3.7.4.	Egyéb.....	22
3.8.	Foszfortartalmú vegyületek a kináz gátlók területén	23
3.9.	Az átmeneti állapot analógia és alkalmazása	25
3.10.	Foszfamidátok, foszfonátok és foszfinátok	27
4.	<i>Célkitűzések</i>	29
5.	<i>Anyagok és módszerek</i>	30
6.	<i>Eredmények</i>	31
6.1.	A 6-fenil-4-klór-pirimidinek előállítása.	31
6.2.	Szulfonamid, szulfonil csoportot, illetve heterociklust tartalmazó CDK9 inhibitorok előállítása.	31
6.3.	Foszfamidát tartalmú inhibitorok előállítása (Ar-N-P)	32
6.4.	Foszfonát tartalmú inhibitorok előállítása (Ar-O-P)	38
6.5.	Foszfinát tartalmú inhibitorok előállítása (Ar-CH₂-P)	51
6.6.	Aril-foszfinát tartalmú inhibitorok előállítása (Ar-P)	76
7.	<i>Megbeszélés</i>	89
7.1.	A 6-fenil-4-klór-pirimidinek előállítása [85]	89
7.2.	Szulfonamid, szulfonil csoportot, illetve heterociklust tartalmazó CDK9 inhibitorok előállítása.	91
7.3.	Foszfamidát tartalmú inhibitorok előállítása (Ar-N-P)	94
7.4.	Foszfonát tartalmú inhibitorok előállítása (Ar-O-P)	100
7.5.	Foszfinát tartalmú inhibitorok előállítása (Ar-CH₂-P)	104
7.6.	Aril-foszfinát tartalmú inhibitorok előállítása (Ar-P)	114

7.7.	Egyéb biológiai vizsgálatok.....	118
7.7.1.	K _i meghatározás és ATP kompetíció vizsgálat.....	118
7.7.2.	Kötődési vizsgálat.....	121
7.7.3.	Kináz szelektivitás.....	122
7.7.4.	Sejt alapú toxicitás vizsgálat.....	127
7.7.5.	HIV szaporodás vizsgálat.....	130
8.	<i>Következtetések</i>	132
9.	<i>Összefoglalás</i>.....	136
10.	<i>Summary</i>	137
11.	<i>Irodalomjegyzék</i>.....	138
12.	<i>Saját publikációk jegyzéke</i>.....	147
13.	<i>Köszönetnyilvánítás</i>	149

2. Rövidítések jegyzéke:

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome, Szerzett immunhiányos tünetegyüttes
ATP	Adenosine triphosphate, adenzin trifoszfát
AUC	Area under the curve, görbe alatti terület
cAMP	Ciklikus adenzin monofoszfát
CD4	Cluster of Differentiation 4, az immunrendszert alkotó sejtek pl. T-sejtek, felszínén található glikoprotein
CDK	Cyclin Dependent Kinase, ciklin függő kináz
CEM-GFP	Zöld fluoreszcens fehérjével jelölt sejtvonalak, HIV szaporodás vizsgálatához fejlesztve
CHK1	Sejtciklust szabályozó szerin/treonin kináz
ClogP	Az oktanol-vízmegoszlási hányados logaritmusának számítógép által becsült értéke
ClogS	A vízben való oldhatóság logaritmusának számítógép által becsült értéke
Cmax	A vérplazmában mért maximális hatóanyag koncentráció
CML	Chronic Myeloid Leukemia, krónikus mieloid leukémia
CTD	C-Terminal Domain, C-terminális rész
Cyc	Cyclin, ciklin
CYP450	Citokrom P450 enzimrendszer
DEE	Dietiléter
DMAP	N,N-dimetilaminopiridin
DMF	N,N-dimetilformamid
DMSO	Dimetilszulfoxid
DMSO-d6	Deuterált dimetilszulfoxid
DNS	Dezoxiribonukleinsav
EGFR	Epidermális növekedési faktor receptor
ESI	Elektron Spray Ionizáció
Et ₃ N	Trietilamin
EtOH	Etanol
HAART	Highly Active Anti Retroviral Therapy, Nagyon aktív anti-retrovirális terápia
HCV	Human Cytomegalovirus
HIF-1	Hypoxia-inducible factor 1
HIV	Human Immunodeficiency Virus, emberi immunhiányt-előidéző vírus
IC ₅₀	A maximális hatás felének eléréséhez szükséges koncentráció
IMAP	Immobilized Metal ion Affinity-based fluorescence Polarization
IPA	2-Propanol, izopropanol

iv	Intravénás
K_i	Az enzim és inhibitorának disszociációs egyensúlyi állandója
K_m	Enzim reakcióra vonatkozó egyensúlyi állandó Michaelis-Menten kinetika esetén
LAP	Leucin Aminopeptidase
LC-MS	Folyadék kromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria
LDC	Lead Discovery Center
LTR, DNS LTR	Long Terminal Repeat
Mcl-1	Myeloid cell leukemia sequence 1
MCPBA	meta-Klórperbenzoesav
MeCN	Acetonitril
MeOH	Metanol
mRNS	Messenger RNS, hírvivő RNS
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromide redukálásán alapuló detektálási rendszer
MW	Mikrohullámú reaktorban végzett reakció
NARTI	(NRTI) Nucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitor, Nukleozid analóg reverz transzkriptáz inhibitor
NF- κ B	Nuclear Factor-KappaB
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, Mágneses Magrezonancia
NNRTI	Non-Nucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitor, Nem-nukleozid analóg reverz transzkriptáz inhibitor
Op	Olvadáspont
Pd/C	10 m/m%-os Csontoszenes palládium
PITALRE	A CDK9 korábbi elnevezése
P-TEFb	Positive Transcriptionl Elongational Factor b a CDK9/cyclinT1 komplex alternative megnevezése
RNS	Ribonukleinsav
RT	Szobahőmérséklet
Rt	Retenció idő
t=	A reakció termelése
Tat	Trans Activator of Transcription
THF	Tetrahidrofurán
UNAIDS	Az ENSZ AIDS-cel foglalkozó szervezete
VRK	Vékonyréteg Kromatográfia

3. Bevezetés, irodalmi áttekintés

Doktoranduszi munkám fő célkitűzése az volt, hogy új típusú, hatékony CDK9 kináz gátló vegyületeket, mint potenciális AIDS ellenes hatóanyagokat állítsak elő. A doktori disszertációmban bemutatott munkát két fő helyszínen valósítottam meg. Az egyik a Semmelweis Egyetem Kooperációs Kutató Központ Racionális Hatóanyagfejlesztő Laboratóriuma, a másik a franciaországi École National Supérieure de Chimie de Montpellier. A munka nagy részét Budapesten végeztem, de a tíz hónapos francia ösztöndíj nélkül ez a dolgozat soha nem jött volna létre.

Mivel a kémiai munkát több helyen végeztem, a vegyületek jellemzése az adott intézményekben rendelkezésre álló műszerekkel, a helyi szokásoknak megfelelően történt, így a kísérleti rész nem teljesen uniformizált. Franciaországban két NMR készülék állt rendelkezésre, melyek proton, szén és foszfor spektrumok felvételére is alkalmasak voltak. A budapesti laborban működő NMR készülék csak proton és szén mérésekre alkalmas, ezért a foszfor NMR méréseket más intézményekben kellett elvégezni, így a reakciók NMR-rel történő követésére itthon nem volt lehetőségem.

A vegyületeket néhány kivételtől eltekintve magam állítottam elő. Az alkil foszfonitek és alkil foszfonátok, illetve az ezekből képzett egyes intermedierek és végtermékek a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Szerves Kémia és Technológia Tanszékén készültek.

A biológiai vizsgálatokat biológus munkatársaim, illetve együttműködő partnerek végezték el. A CDK9 enzim vizsgálatokat, valamint a sejtes toxicitás vizsgálatokat a Kooperációs Kutató Központ laborjában végezték. A kináz szelektivitás vizsgálatokat a Proteros biostructures GmbH (Martinsried, Németország) végezte. A HIV szaporodás vizsgálatok a Johan Béla Országos Epidemiológiai Központ Mikrobiológiai kutatócsoport laborjában történtek.

3.1. Kinázok

A kinázok olyan enzimfehérjék, amelyek az ATP terminális vagy γ foszfát csoportját egy másik molekulára (pl. fehérjére, lipidre, cukorra), viszik át. Funkciójuk alapján foszfortranszferázként is említik őket. A különböző kinázok specifikusan csak a rájuk jellemző szubsztrátokat tudják foszforilezni. Az emberi genomban eddig több mint 500 kináz gént azonosítottak [1]. A protein kinázok a sejten belüli jelátvitel kulcsenzimeik és nagyon fontos terápiás célpontok. A betegség-mechanizmusok jelentős részének hátterében jelátviteli zavarok, többnyire kináz enzimek rendellenes működése szerepel, az onkogének legnagyobb része kinázt kódol, és a tumorok túléléséért felélős ún. túlélési faktorok is kináz enzimek [2].

A protein kinázok csoportosítása sokféleképpen lehetséges, itt csak az értekezés szempontjából legfontosabb szempontokat tekintem át.

A protein kinázok két fő csoportba sorolhatók az alapján, hogy a szubsztrát milyen aminosavjára kerül a foszfát csoport. E szerint beszélhetünk tirozin kinázokról valamint szerin/treonin kinázokról. Az eddig gyógyszerként forgalomba került 15 kináz gátlóból 11 gyógyszerhatóanyag fő molekuláris célpontjai tirozin kinázok, 4 gyógyszer célpontja viszont szerin/treonin kináz [3].

A sejten belüli elhelyezkedésük alapján megkülönböztetünk receptor kinázokat, melyek a sejt felszíni receptorokra jellemző módon a sejtmembránba ágyazva helyezkednek el. Sejten belüli részük tartalmazza az ún. kináz domént, amely képes a citoszolban lévő másik szubsztrát-fehérjét, (többnyire egy másik kinázt) foszforilezni. A foszforilálódás következtében a citoszolban lévő kináz aktívvá válik és ATP jelenlétében foszforilál egy újabb kinázt. Ez a jelkaskád, mely tulajdonképpen a szignál transzdukció egészen a DNS átíródásig viszi a jelet, ahol már a sejt magban lévő kinázokról beszélhetünk.

Funkciójuk is szerteágazó, egyes kinázok a sejtek proliferációját serkentik, mások a differenciált sejt funkciókat, vagy a metabolizmust regulálják, vannak olyanok melyek az apoptózis (programozott sejthalál) szabályozásában vesznek részt, megint mások a sejt ciklust szabályozzák.

3.2. *Ciklin dependens kinázok és a CDK9*

Az eddig összegyűlt tudás alapján egyértelmű, hogy a sejtosztódás folyamata hogyan szabályozott a ciklin dependens kinázok (Cyclin Dependent Kinase – CDK) aktivációja és inaktivációja által. A CDK-k szerin/treonin kinázok, melyek aktiválásához egy ún. ciklin alegységre is szükség van [4]. A CDK-k releváns célpontjai a gyógyszerkutatásnak, mivel fontos szerepet játszanak különböző proliferatív (pl.: tumoros) és gyulladáshoz vezető betegségekben. A fejezet címéből is következik, hogy sok fajta CDK létezik. Ezek funkciója más és más, így mindegyik különböző fajta betegség kezelésében lehet fontos. Ennek ellenére nagyon kevés olyan hatóanyag van, amely csak az egyik vagy másik CDK-t gátolná szelektíven. A CDK1-6 kinázok elsősorban a sejtciklus szabályozásában vesznek részt, míg a CDK7, 8 és 9 a transzkripció szabályozásában játszanak fontos szerepet. A különböző CDK-k biológiai szerepéről és működéséről számos publikáció született, jómagam is készítettem egy rövid összefoglalót a témáról [5], így e helyütt csak a dolgozat szempontjából fontos CDK9 enzim részletes ismertetésére térek ki. Ismertek még a CDK10 és 11 kinázok, melyek szintén a sejtciklus szabályozásában vesznek részt.

A CDK9 legfontosabb feladata az RNS polimeráz II nagyobbik alegységének foszforilációja a C-terminálison, a foszforiláció következtében az RNS polimeráz II leválik az iniciációs komplexről és megkezdődik az átírást. A CDK9 enzimet korábban PITALRE megnevezéssel is illették. Azonosítása és publikálása az 1990-es évek elején történt [6]. Két izoenzimje ismert: a CDK9-42, mely elsősorban a lépben és a herékben expresszálódik; valamint a CDK9-55, mely a tüdő, a máj és az agy szöveteire jellemző [7]. A HIV-1 fertőzések során a kisebbik CDK9-42 izoforma válik dominánssá [8]. A CDK9 enzim egy dimert alkot ciklin partnereinek (ciklin (Cyc) T1, T2a és b, K) egyikével. Az így létrejött molekulát pozitív elongációs faktor b-nek hívják (Positive Elongation Factor b – P-TEFb). A CDK9/CycT komplexek kb. 80 %-ában a CycT1 található, a HIV-1 fertőzés esetén is ez a fajta komplex kerül reflektorfénybe. Mindmáig semmilyen mutációt vagy amplifikációt nem találtak a *cdk9* génben [9]. A dolgozat további részében a rövidség kedvéért a CDK9/ciklinT1 (P-TEFb) komplexet CDK9 néven fogom említeni, a szakirodalomban is bevett gyakorlatnak megfelelően. Ugyan a CDK9 fehérje működését gátló szerek képezik a dolgozat tárgyát, de a CDK9

önmagában nem működőképes, mindig szükséges egy ciklin fehérje jelenléte, így a valóságnak megfelelőbb, ha a két fehérje komplexéről beszélek.

Az eddigi ismeretek alapján négy fő területen lehet a CDK9 alkalmas terápia célpont [10]: az első és talán legfontosabb a HIV-1 fertőzés és ezen keresztül az AIDS betegség. Ennek részletes magyarázata a 3.3 fejezetben található.

A második a kóros szívnagyobbodás (cardiac hypertrophy). A CDK9 funkciója még nem teljesen felderített, de két mechanizmust feltételeznek a téma szakértői: a) a P-TEFb magasabb aktivitása az emelkedett CycT1 miatt olyan gének átíródását is támogatja, melyek korábban már átíródtak; b) ahogy más szívnagyobbodást okozó hatások, úgy a P-TEFb is specifikus szívizom növekedést serkentő géneket aktivál [11].

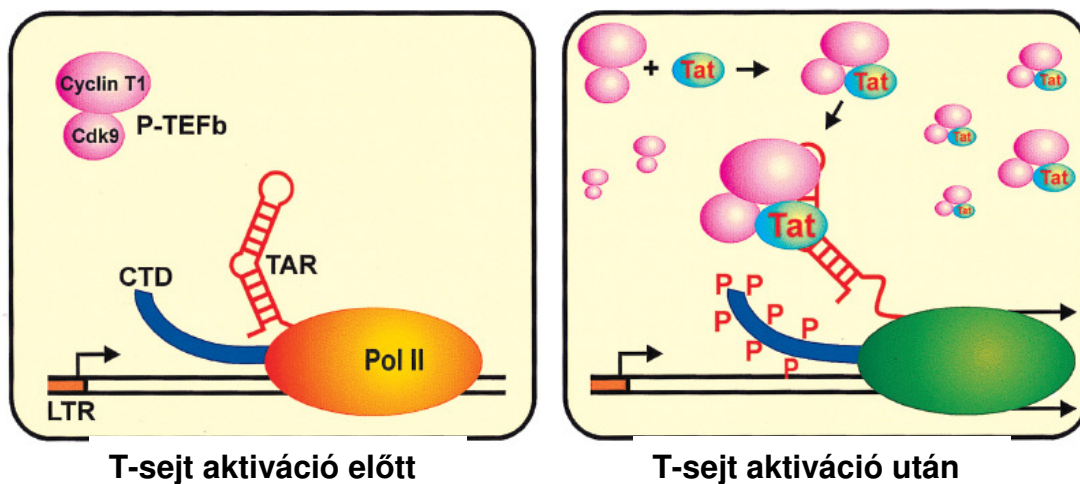
A CDK9 és ciklin partnerei bizonyos anti-apoptotikus jelútvonalakat aktiválnak tumoros sejtekben, elsősorban mielóma és CLL tumorokban. Így a CDK9 gátlásával a tumoros sejtek elpusztíthatóak [12]. Az anti-apoptotikus jel az Mcl-1 nevű anti-apoptotikus fehérje, melyről már bizonyították, hogy az expressziójának *si*RNS technikával történő gátlása a mitokondrium membránjának depolarizációjához vezet, ami apoptózist indít el [13]. A CDK9 gátlásának az Mcl-1 expressziójára, illetve a kaspáz függő apoptózisra gyakorolt hatását – többek közt – egy általam is előállított vegyülettel* bizonyították [14], azonban az elmúlt néhány évtől eltekintve a tumorok gyógyításában elsősorban a sejtciklust szabályozó CDK-k kerültek a kutatások középpontjába.

A CDK9 bizonyos gyulladáscsökkentő betegségeken is szerepet játszik. Egy nemrég publikált tanulmány szerint a flavopiridol a CDK9 gátláson keresztül fejt ki gyulladáscsökkentő hatását oly módon, hogy csökkenti az NF- κ B indukált transzkripciót. A szerzők szerint a kis koncentrációban (100 nM) alkalmazott flavopiridol alkalmas lehet a gyulladáscsökkentő betegségek kezelésére, a toxikus hatások bekövetkezése nélkül [15].

* A vegyület a dolgozat 7.4 fejezetében 59-es számon szerepel.

3.3. A HIV vírus és az AIDS

A HIV (Human Immunodeficiency Virus) egy retrovírus, s mint ilyen a fehérjeburokban RNS formában tartalmazza a genetikai információt. Gazdasejtnek CD4 sejt felszíni fehérjét expresszáló, elsősorban segítő T-sejteket választ. A vírus – felületén található fehérjéi segítségével – a gazdasejt felületén található kemokin receptorokhoz és a CD4 fehérjéhez kapcsolódik. Miután a vírus és a gazdasejt membránjai összeolvadnak a virális RNS bekerül a sejt plazmába. A plazmában a virális RNS-ről ún. provirális DNS másolat készül, mely bejutva a sejt magba beépül a gazdasejt genomjába. A T-sejtek aktiválódása előtt a virális DNS LTR (Long Terminal Repeat) szakaszairól rövid szekvenciák íródnak át. Ezek a rövid RNS darabok segítik a Tat (Trans-Activator of Transcription) fehérjék sokszorozódását. A TAR nevű RNS szabályozó elem (naszcens RNS darab) gátolja a polimeráz (Pol II) működését (1. ábra bal oldali kép). Amint a T-sejtek aktiválódnak a CDK9-cyclinT1 (P-TEFb) szint megemelkedik, valamint a Tat fehérjék száma is megnő. A P-TEFb, a Tat és a TAR által létrehozott komplex képes foszforilálni az RNS polimeráz II C-terminálisát (CTD). Így a polimeráz képes lesz a teljes hosszúságú mRNS elkészítésére [16].

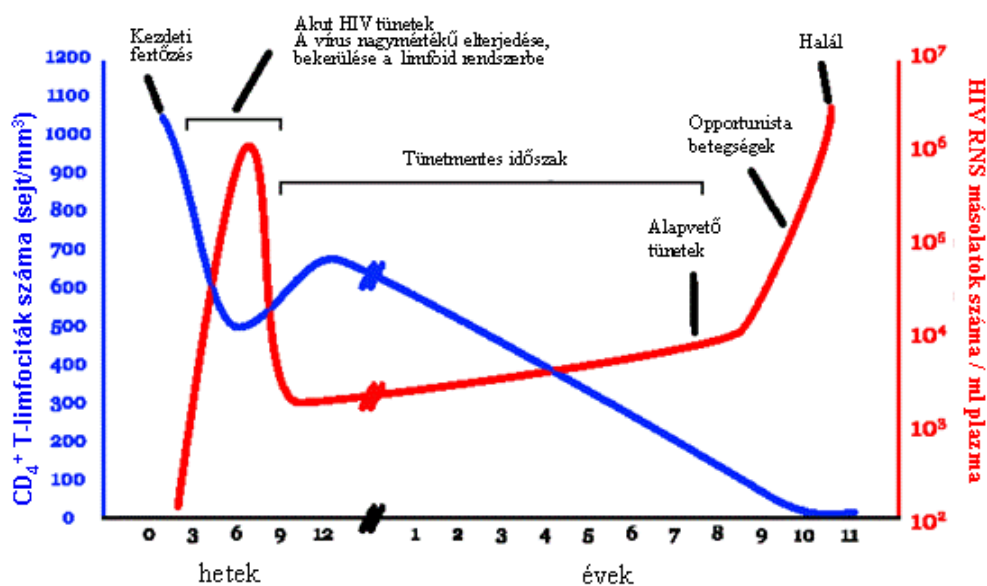


1. ábra A CDK9 kináz szerepe a HIV vírus szaporodásában [16].

A Tat virális fehérje kivételével a résztvevő proteinek a gazdasejtben egyébként is meglévő sejtalkotók. A vírus saját céljaira felhasználja a gazdasejt jelátviteli útjait (*hostcell signalling*). Munkám egyik alapfeltevése erre alapulóan az volt, hogy a CDK9 kináz gátlásával a HIV vírus szaporodása megakadályozható, de legalábbis lassítható.

A CDK9 kináz nagyon hasonló szerepet játszik a herpesz vírus (Herpes Simplex Virus 1, HSV1) fertőzése során [17]. Citomegalovírus (Human Cytomegalo Virus, HCMV) fertőzések esetén is kimutatták szerepét, mely azonban ott nem esszenciális [18].

A HIV fertőzés az évek multával az AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) betegség kialakulásához vezet. A betegség kialakulásának három fő szakasza van. A fertőzést követően kb. három hónap múlva a vírusok nagy számban szabadulnak fel és a segítő T-sejtek száma csökken. Ebben a kezdeti, akut szakaszban az immunrendszer még többé-kevésbé úrrá tud lenni a fertőzésen és a vírusszám csökkenése mellett a segítő T-sejtek száma növekszik. A krónikus szakasz során, mely akár tíz évig is elhúzódhat, a felszabaduló vírusok száma monoton növekszik, míg a segítő T-sejteké monoton csökken. Mikor a segítő T-sejtek száma eléri a 200-500 sejt/mm³ vér szintet (egészséges embernél 1200-1300 sejt/mm³ vér) az immunrendszer már nem képes ellensúlyozni a vírus szaporodását és kialakul az AIDS betegség [19]. A folyamat szemléltető ábrája a 2. ábrán látható.



2. ábra A HIV fertőzés és az AIDS kialakulása. (forrás: <http://fohn.net/history-of-aids/Hiv-timecourse.gif> hozzáférés: 2010. 12. 23.)

Az UNAIDS (az ENSZ AIDS-el foglalkozó szervezete) 2010-ben megjelent legújabb jelentése szerint 2009-ben 33,3 millió HIV fertőzött ember élt a Földön, melyből 2,6 millió új fertőzött volt. Annak ellenére, hogy az új fertőzések és az AIDS-el kapcsolatos halálozások száma csökken, az összes fertőzött egyének száma tovább nő. Ugyan a

különböző megelőzési módszerek és a retrovirális terápiák (pl. reverz transzkriptáz inhibitorok, proteáz inhibitorok) egyre több országban elérhetőek, a HIV fertőzés még mindig nagyon aktuális témája a gyógyszerkutatásnak [20].

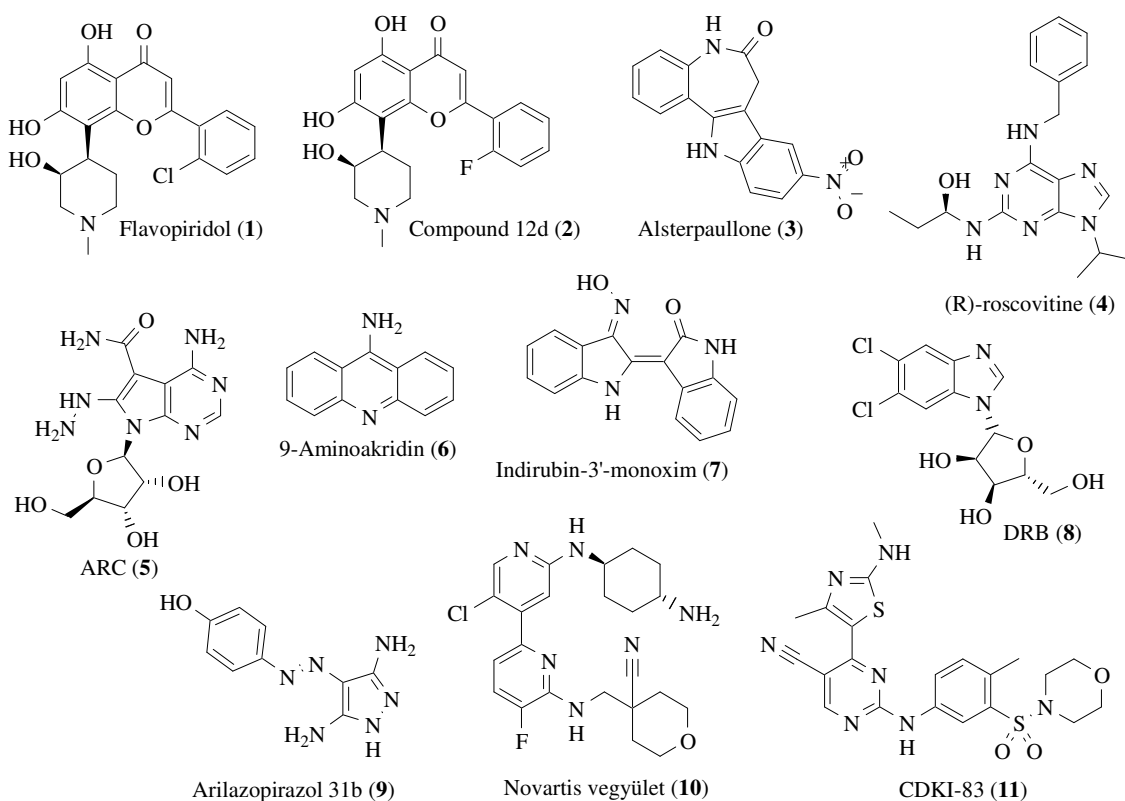
A HIV fertőzésnek és a kialakult AIDS betegségnek jelenleg nincs gyógymódja. Mindaddig nem sikerült megfelelően hatékony oltóanyagot előállítani és gyógyszeres kezeléssel sem sikerült a betegséget gyógyítani. Az eddigi legeredményesebb kezelés az ún. HAART (Highly Active Anti Retroviral Therapy), amely alkalmas a betegség lefolyásának lassítására, de gyógyítására nem [20]. A HAART kezelés során a beteg egy gyógyszerkocktétl kap, amely két összetevőt, egy nukleozid analóg reverz transzkriptáz inhibitor (Nucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitor, NARTI vagy NRTI) és egy proteáz inhibitor, illetve egy nem-nukleozid reverz transzkriptáz inhibitor (Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor, NNRTI) közül az egyiket.

3.4. CDK9 inhibitorok

A legismertebb CDK9 inhibitor a flavopiridol (**1**), ami egy pan-CDK inhibitor, mégis a legtöbbször használt referencia vegyület CDK9 vizsgálatok során ($IC_{50}= 2,5$ nM), mi több, I-es és II-es fázisú klinikai vizsgálatok tárgya. A flavopiridol CDK9/CycT1-gyel alkotott kristályszerkezetét már megfejtették [21]. Új származékait is publikálták már, melyeknek a szelektivitása jobb és toxikus hatásuk is kisebb, a leghatékonyabb vegyületet „compound 12d” (**2**) néven említik a szerzők ($IC_{50}= 2,8$ nM) [22]. A paulonok CDK9 működését gátló hatását már a 90-es években felfedezték és még a mai napig folyamatosan fejlesztik őket. A legfrissebb publikáció szerint az alterspaulont (**3**) tekintik a legjobb származéknak, amely mikromól alatti koncentrációban is hatékonyan gátolja a HIV-1 szaporodását [23].

A roscovitine (seliciclib v. CYC202, **4**) egy másik pan-CDK inhibitor, IC_{50} értékei a CDK1, CDK2, CDK5, CDK7 és CDK9 esetében is a 200-500 nM tartományban mozognak [24]. HIV fertőzésre gyakorolt hatását is vizsgálták [25]. Egy nukleotid analóg az ARC (**5**) nevű vegyület alacsony ($IC_{50}= 0,3$ μ M) koncentrációban gátolja a HIV-1 transzkripciót CEM-GFP sejteken; a kísérletben a roscovitine (**4**) volt a referencia vegyület ($IC_{50}= 4,4$ μ M). Mindemellett az ARC (**5**) a hepatitis C vírus (HCV) szaporodását is gátolta [26].

Egy érdekes tanulmány bemutatta, hogy a HIV-1 szaporodása függ a sejt kultúra feletti légtér oxigén koncentrációjától. Alacsony oxigén-szint (3 %) mellett a P-TEFb aktivitás sokkal alacsonyabb volt, mint normál oxigén koncentráció mellett (21 %). Az eredmények azt mutatták, hogy a HIV-1 replikációban résztvevő egyéb molekulák, mint pl. a CDK2 vagy az NF- κ B aktivitása nem változott. Mivel a CDK2 nem esszenciális a sejt ciklushoz [27], valamint a CDK1 át tudja venni a szerepét [28], javasolták a CDK2 gátlását – önállóan vagy együtt a CDK9 gátlással – terápiás lehetőségként, különösen alacsony oxigénkoncentráció esetén. Az ARC (5) HIV-1 szaporodást gátló hatása lényegesen gyengébb volt alacsony oxigén szint mellett a kisebb P-TEFb aktivitás miatt (3 % O₂ IC₅₀ = 3,0 μ M; 21 % O₂ IC₅₀ = 0,7 μ M) [29].



3. ábra Ismert CDK9 inhibitorok szerkezete.

A 9-aminoakridin (6) mutat némi HIV-1 szaporodást gátló hatást, annak ellenére, hogy nem CDK9 inhibitornak, hanem p53 aktivátornak tartják [30]. Az indirubin-3'-monoximot (7) leírták, mint P-TEFb inhibitor [31], noha tradicionális kínai gyógyszer hatóanyagként a CDK9-en kívül számos más kinázt is gátol, mint a Notch1-et [32], a p38 MAPK-t [33], a GSK3- β -át [34].

Ismert két kis molekulájú CDK9 inhibitor, melyek mutatnak némi szelektivitást a többi CDK-val szemben (DRB, **8** [35] és arilazopirazol 31b, **9** [36]); mindkettő nukleotid analóg. Egy tanulmány javaslatot tett arra, hogy a kis molekulájú P-TEFb inhibitorokat – mint a flavopiridol (**1**), roscovitine (**4**), DRB (**8**) – HIV-1 szaporodás gátlására lehet használni. Ugyanakkor felhívták a figyelmet a vizsgált vegyületek hosszú távú toxikus hatására [37].

A Novartis nemrég publikussá vált szabadalma több mint 300 bipiridin típusú vegyületet tartalmaz. A leghatékonyabb molekulák pikomólos IC_{50} -nel rendelkeznek. A szabadalomból sajnos nem derül ki, hogy más CDK-kat milyen mértékben gátolnak a vegyületek. A legjobb CDK9 gátló vegyület (**10**) IC_{50} = 150 pM [38].

Az általam vizsgált vegyületcsaládhoz hasonló molekulát vizsgáltak a Nottingham Egyetemen. A CDKI-83-nak nevezett vegyület (**11**) nagyon hatékony CDK9 gátló (K_i = 21 nM) és a CDK1 kivételével (K_i = 72 nM) a többi CDK-val szemben szelektívnek tekinthető (CDK2 K_i = 232 nM; CDK4 K_i = 290 nM; CDK7 K_i = 405 nM). A vizsgált egyéb kinázok közül leginkább a cSrc-ot gátolta (80 %-os gátlás 5 μ M-ban). A vegyület koncentrációfüggő módon gátolta az Mcl-1 fehérje expresszióját és ugyan ilyen módon kaszpáz függő apoptózist okozott tumoros sejteken [39].

Az eddig említett vegyületek szerkezetei a 3. ábrán láthatóak.

Az itt felsorolt CDK9 inhibitorokon kívül még egy említésre méltó vegyületcsalád ismert. A munkám szempontjából ez a legfontosabb, így a következő fejezetet ennek szentelem.

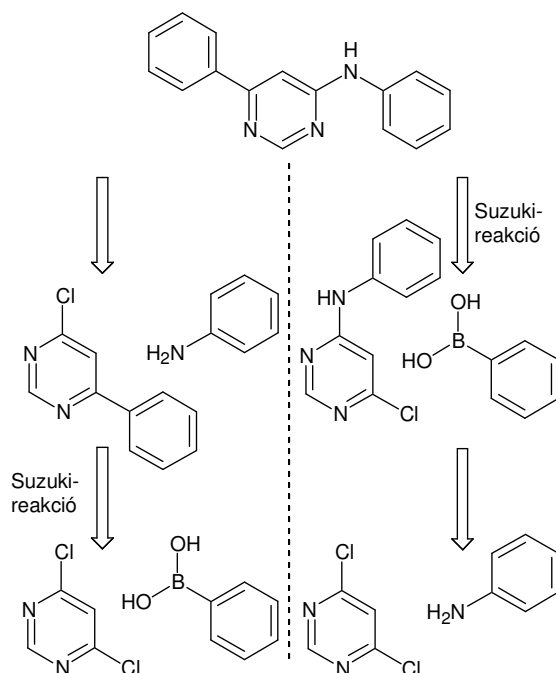
3.5. (6-Fenil-pirimidin-4-il)-fenilamin alapvázra épülő CDK9 inhibitorok

Az ezredforduló óta több száz olyan enzim inhibitor szerkezete vált publikussá, amelyek a 4-amino-6-fenil-pirimidin alapvázra épülnek. Ezen vegyületek szerkezete, az alapváztól eltekintve, nagyon különböző és biológiai hatásuk is nagyon szerteágazó: van közöttük vanilloid receptor 1 inhibitor [40], a koleszterin felszívódását módosító

vegyületek [41], dipeptidil peptidáz IV inhibitorok [42], számos kináz inhibitor pl., efrin receptor tirozin kináz és HIF-1 [43] és CHK1 [44] inhibitorok.

A fentiek alapján látható, hogy a CDK9 validált célpont lehet több betegségben is, ugyanakkor egyetlen specifikus vagy legalább szelektív inhibitor sem volt elérhető a munka megkezdésének időpontjában [45]. Két szabadalmi bejelentés képezi kiindulási alapját doktori munkámnak, melyek ugyanazokat a vegyületeket tartalmazzák, és 2005-ben, ill. 2006-ban váltak publikussá [46]. Mintegy kétszáz (6-fenil-pirimidin-4-il)-fenilamin alapvázú vegyületet az első bejelentésben CDK9 gátlóként HIV-1 gátlás és tumor-terápia területre védték le, majd a második bejelentésben gyulladásozó betegségekre. A szabadalmi példák csupán néhány alapvető változtatásra terjednek ki, mind a 6-fenil, mind a fenilamin gyűrűn. A közzétett biológiai eredmények alapján – már amennyire egy szabadalomtól ez elvárható – az eddig ismert vegyületekkel összehasonlítva sokkal nagyobb CDK9 szelektivitást mutattak. Úgy gondoltuk, hogy még számos szubsztitúciós lehetőség maradt a szabadalom oltalmi körén kívül, így ezekre a molekulákra koncentráltam a doktori munkám során. A vegyületek szintéziséről egy külön publikáció is megjelent a szabadalom feltalálójától, ezt foglalja össze a 4. ábra [47]. A szerzők két reakciólépés két lehetséges kombinációját mutatják be, és ezek felcserélhetőségére tesznek javaslatot. A kiindulási vegyület a 4,6-diklórpirimidin, melyet az egyik esetben először Suzuki-reakcióban kapcsolnak szubsztituált vagy szubsztituálatlan fenil gyűrűvel, míg a másik esetben a megfelelő anilinnel kapcsolják sav vagy bázis katalizált reakcióban. Másodsorra a Suzuki-reakció termékét kapcsolják anilinnel, illetve az anilinnel kapcsolt pirimidint reagáltatják boronsavval Suzuki-reakcióban.

A munka kezdetén az előállítandó származékok szerkezetét úgy korlátoztam, hogy a 6-fenil gyűrűn (Suzuki-oldal) csak a 2-metoxi, illetve a 3-nitro/amin szubsztituenseket fogom előállítani. Az anilin oldalon a legjobb vegyületek para vagy meta helyzetű alkil szulfonamid csoportot tartalmaztak. Munkámat e két tartalmú csoportok variálásával kezdtem, majd – a következő fejezetekben bemutatott elvek alapján – foszfor tartalmú izosztérjeivel foglalkoztam.



4. ábra A (6-fenil-pirimidin-4-il)-fenilamin alapváz előállítása.

3.6. A periódusos rendszer 15. eleme a foszfor

A foszfor a periódusos rendszer 15. eleme. Egyetlen stabil izotópjának tömegszáma 31, elektronszerkezete $1s^2, 2s^2, 2p^6, 3s^2, 3p_x^1, 3p_y^1, 3p_z^1, (3d^0)$, relatív atomtömege 30,973762, oxidációs foka III vagy V lehet. Huszonhárom ismert radioaktív izotópja (^{24}P -től ^{46}P -ig) közül a legfontosabb a ^{32}P , mely tiszta β -sugárzó (1,71 MeV), felezési ideje 14,26 nap, illetve a ^{33}P , mely kicsit gyengébb β -sugárzó (0,25 MeV), felezési ideje 25,34 nap [48].

A foszfort elsőként Henning Brandt alkimista állította elő 1669-ben egy szokatlan és kellemetlen eljárással. Vizeletet rothasztott napokig, majd melegítve pasztává sűrítette. A sűrítményt redukzív körülmények közt, magas hőmérsékleten desztillálta. A párlat egy fehér viaszszerű paszta ($\alpha\text{-P}_4$, fehér foszfor), mely a levegővel érintkezve a sötétben világított (az elemi foszfor oxidációját kísérő kemilumineszcencia) [49]. Az elem neve is ebből a jelenségből ered: a görög $\phi\omega\sigma$ phos-fény és $\phi\omega\rho\sigma$ phoros-hordozó szavak összetételéből, mely egyébként a Vénusz ókori görög neve [50].

A foszfor előfordulásáról, szerves és szervetlen kémiájáról, sztereokémiájáról, felhasználásáról, stb. könyvtárakat lehetne megtölteni, ezért én csak három – a dolgozat szempontjából fontos – tulajdonságát emelem ki.

A ^{31}P -nek $\frac{1}{2}$ a magspinkvantszám, így mint NMR aktív mag, nagyban megkönnyíti a vegyületek szerkezet azonosítását, reakciók követését.

A P=O kettős kötés nagyon erős ($\Delta H^0 = 544 \text{ kJ/mol}$), ezért sok reakció alapszik azon, hogy a III-értékű foszfor egy P=O kötés létesítésével V-értékűvé alakul. Ilyen reakciók pl. a Wittig és az Arbuzov reakciók. Különleges kémiai viselkedéséhez hozzájárul a betöltetlen d-pálya, ezért tüntettem fel az elektronszerkezet leírásánál is.

A foszfor szervezetünk legfontosabb alkotóelemeiben megtalálható (pl. csontok, fogak, ATP, DNS, RNS, foszfolipidek), egy felnőtt szervezetben kb. 0,7 kg foszfor van jelen, szinte kivétel nélkül foszfát sók és észterek formájában. Annak ellenére, hogy szervezetünkben ilyen általánosan előfordul a foszfor, nagyon kevés gyógyszerhatóanyag molekula tartalmazza.

3.7. Foszfor tartalmú gyógyszer hatóanyagok

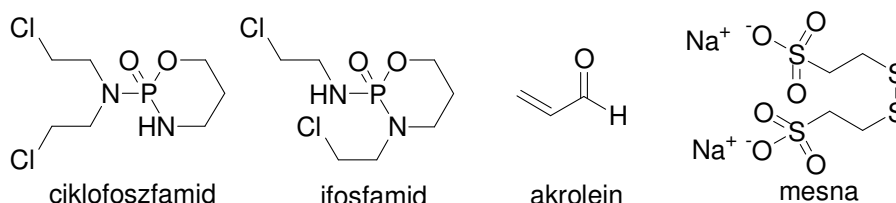
Ebben a fejezetben nem csak a foszfortartalmú hatóanyagokat gyűjtöttem össze, hanem azok metabolizmusáról, szervezeten belüli sorsáról is szólok néhány szót. Ezzel is megpróbálom szemléltetni azt, hogy egy foszfortartalmú vegyület lehet gyógyszereszerű, nem toxikus, gyógyításra alkalmas vegyület. A felsorolás nem teljeskörű, terjedelmi okokból csak néhány példát mutatok be minden csoportban. A hatóanyag nevek után zárójelben a piacra történő bevezetés évét tüntettem fel. A fejezet fő forrásaként a Vizi E. Szilveszter által szerkesztett Humán farmakológia c. könyvet használtam [51], amennyiben más irodalmi forrást is figyelembe vettem, akkor azt a szokott módon jelölöm.

3.7.1. Nitrogén mustárok: ciklofoszfamid, ifoszfamid

Az alkilező ágensek a DNS-t alkilezik. A ciklofoszfamid foszfor tartalmú csoportjának fontos szerepe van a metabolizmus során kialakuló aktív alkilező termék keletkezésében, s így hozzájárul a bizonyos fokú szelektivitás létrejöttéhez. Az

ifoszfamid metabolizmusa hasonlóan történik, mivel azonban a CYP450 aktiválódás lassabb az eltérő helyzetű klóretil csoportok miatt, nagyobb dózis szükséges.

Ismert egy másik metabolikus út is, melynek során akrolein keletkezik, ami urotoxicitáshoz vezet. Ennek ellensúlyozására mesna-t adnak, amely a vese tubulosokban monomerizálódik és inaktív adduktot képez az akroleinnel.



5. ábra A ciklofoszfamid, az ifoszfamid, az akrolein és a mesna szerkezete.

3.7.2. Vízoldhatóságot javító foszfor tartalmú funkciós csoportot tartalmazó gyógyszer hatóanyagok.

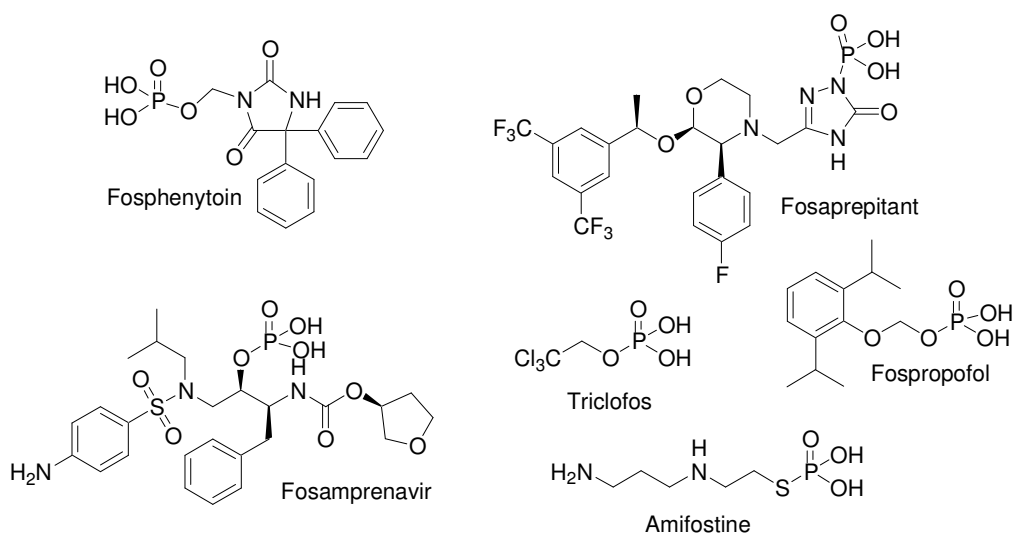
Az ilyen típusú hatóanyagok a foszfor tartalmú gyógyszerkincs legnépesebb csoportja, melynek minden tagja prodrug. A hatékony vegyület a foszfor tartalmú csoport lehasadása után alakul ki. A foszfor tartalmú csoport jellemzően foszforsav vagy foszfonsav, természetesen ettől eltérő változatokkal is találkozhatunk. Gyakori eset, hogy egy már bevezetett hatóanyag *foszforosított* változata szintén megjelenik a piacon. A terápiás területek tekintetében nem behatárolható az alkalmazásuk.

Amifostine (1995): sejtprotektív hatású gyógyszeradalék, melyet DNS-hez kötődő citosztatikumokkal adnak, pl.: ciklofoszfamiddal, vagy ciszplatinnal. A neuropeniához kapcsolódó láz és fertőzés, valamint a Pt-tartalmú szerek által okozott nefrotoxicitás csökkentésére alkalmas. Az amifostine egy szerves tiofoszfát prodrug, amely a szervezetben alkalikus foszfatáz (alkaline phosphatase) hatására hidrolizál az aktív citoprotektív tiol metabolitra és foszforsavra. A nem rosszindulatú szövetek szelektív védelmét annak tulajdonítják, hogy a normál szövetekben az alkalikus foszfatázok aktivitása magasabb, ez megemeli a pH-t, továbbá könnyíti az érfalak áteresztő képességét.

Fosamprenavir (2003): vízoldható amprenavir prodrug. Proteáz inhibitor, melyet antivirális (HIV) szerként alkalmaznak. A szervezetben a foszfát csoport hidrolízisével amprenavirrre és foszforsavvá alakul [52].

Fosaprepitant (2008): az aprepitant vízoldható prodrugja. Infúzió formájában adagolják. Az aprepitant egy P-anyag (*substance P*) antagonistája, hatását a neurokinin 1 (NK1) receptor gátlásán keresztül éri el. Kemoterapiás és prosztoperatív hányinger, ill. hányás ellen adják. Az aprepitant elsősorban a CYP3A4-en keresztül metabolizál, másodsorban pedig a CYP1A2-n és CYP2C19-en keresztül. Hét, gyenge aktivitású metabolitját azonosították a plazmából. Mivel gyenge CYP3A4 inhibitor, együttes kezelés során emelheti a CYP3A4-en keresztül metabolizáló hatóanyagok plazmakoncentrációját [53].

Fosphenytoin (1996): vízoldható phenytoin prodrug, amelyet epilepsziás rohamok csillapítására csak kórházakban alkalmaznak. A phenytoin a feszültségfüggő Na-csatornákra hat, csökkenti a sejtek nagy frekvenciájú repetitív tüzelését. Mivel a phenytoin felszívódása rendkívül lassú a gyomor- és a bélfalán keresztül, célszerű volt egy vízoldhatóbb változat előállítását. Metabolizmusa során kvantitatívan foszforsavvá, formaldehiddé és phenytoinná alakul.



6. ábra A vízoldhatóságot fokozó csoportot tartalmazó hatóanyagok.

Fospropofol (2008): vízoldható propofol prodrug. A propofol egy általános érzéstelenítő hatású sebészeti altatószer. A vízoldható prodrug a májban alkalikus foszfatázok hatására foszforsavvá, formaldehiddé és propofollá bomlik. A propofol a továbbiakban glükuroniddá és kinol-glükuroniddá metabolizál [54].

Triclofos: második vonalbeli altató, a májban metabolizál triklóretanollá, amely az aktív hatóanyag. Lehetséges májkárosító és addiktív hatása miatt hosszú időn keresztül nem adható [55].

3.7.3. Szervezetünk építőelemeit mimikáló foszfortartalmú gyógyszerhatóanyagok

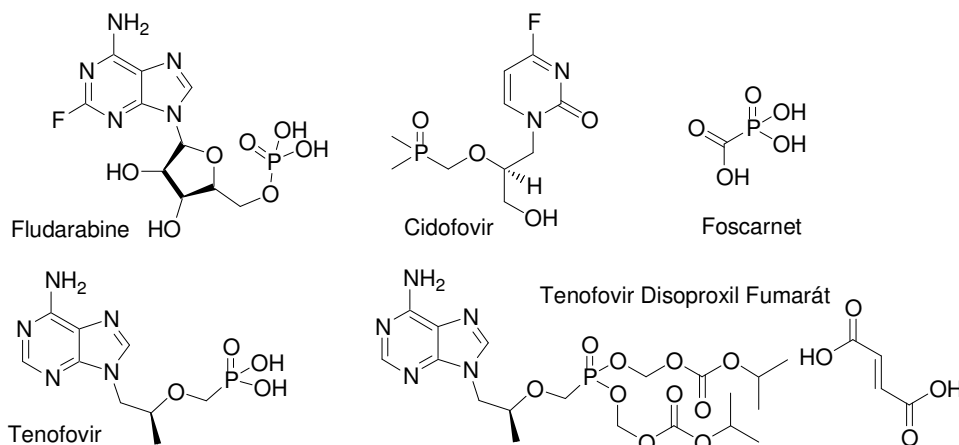
A biológiai szervezetekben sok helyen található foszfor tartalmú vegyület. Ez elsősorban a foszforsav valamilyen formájában (foszfátok) jelenik meg. A legfontosabbak az ATP, a DNS és RNS láncok, a csontszövetben található foszfátok és a foszfolipidek. Ezen vegyületeket illetve ezek építőelemeit mimikáló hatóanyagok már kifejlesztésre kerültek és jelenleg is forgalomban vannak.

Nukleotid analógok:

Fludarabin (1991): purin analóg, gátolja a ribonukleotid reduktáz és a DNS-polimeráz működését. A plazmában először defoszforilálódik, majd nukleozidként a sejtbe lépve trifoszfáttá alakul, amely csak lassan ürül ki a sejtből. A trifoszfát a sejtbe beépülve megállítja a DNS szál továbbépülését, valamint a szálak összekapcsolódását. Továbbá gátolja a DNS excíziós javító mechanizmusát.

Cidofovir (1996): Aciklusos nukleozid származék. A foszfin-oxid csoportnak köszönhetően elkerüli a vírus-indukált foszforilációt (nem úgy mint az aciclovir) [56]. A difoszforilált aktív metabolit sejten belüli féléletideje 17-30 óra.

Tenofovir (2001): Az adenozin monofoszfát analógja. A HIV gyógyszereként izopropoxi-karboniloximetil észterként védve, fumarát sóként forgalmazzák. A szervezetbe kerülve az észtereket az észterázok lehasítják, majd a szervezet kinázai kétszer foszforilálják. Az így létrejövő aktív metabolit, a tenofovir difoszfát, kompetitív a dezoxiadenozin trifoszfáttal. A virális DNS szintézise során, a lánc végére beépülve blokkolja a továbbépülést, mert hiányzik a 3'-hidroxi csoportja. Így gátolja a reverz tranzkriptáz működését. Sem a gyógyszerforma, sem az aktív metabolit nem szubsztrátja a citokróm P450-nek. A szervezetből főként vizelettel, 70-80 %-ban tenofovirként ürül [57].



7. ábra Nukleotid analóg hatóanyagok.

Pirofoszfát analóg:

Foscarnet (1991): szervesetlen pirofoszfátot mimikáló vegyület, amely gátolja a herpeszvírusok és a HIV replikációját. Nem metabolizálódik a fertőzött sejtekben, hanem változatlan formában fejt ki hatását. Reverzibilisen kötődik a herpeszvírus DNS-polimeráz, ill. a HIV reverz transzkriptáz pirofoszfát kötő helyéhez, így gátolva a trifoszfát nukleozidok pirofoszfát hasítását.

Biszfoszfónátok:

A biszfoszfónátok szintén a szervezetünkben található pirofoszfátot mimikálják, azonban célszerűnek találok külön kezelni az előző csoporttól. A biszfoszfónátok a csont anyagcserébe avatkoznak be többféle módon. Közös jellemzőjük, hogy gátolják az osteoclastok működését, aktivitását, növekedését. A korai származékok pl.: etidronate, a csont mineralizációját is gátolja, így mellékhatásként fonalas szerkezetű csontszövetet okozhat. A későbbi biszfoszfónátok úgymint clodronate (klór tartalmú), tiludronate (kén tartalmú), majd a még modernebb amin csoportot tartalmazó hatóanyagoknál ezt a mellékhatást sikerült kiküszöbölni. Az előbi két vegyület kb. tízszer, az amin tartalmúak ezerszer hatékonyabak az etidronate-nál.

Per os adagolás esetén csak 1-5 % szívódik fel a két foszfónát csoporton lévő két negatív töltés miatt. Hasonló oknál fogva a csontszöveteken kívül semmilyen más szövetbe nem tud behatolni. A felszívódott hatóanyag 50-60 %-a azonnal a csontszövethez kötődik, a maradék pedig változatlan formában a vesén keresztül kiürül.

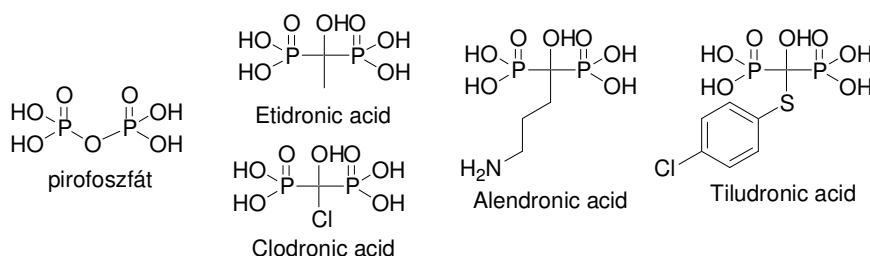
A csontba beépült biszfoszfonátok kiürülése nagyon hosszú folyamat $t_{1/2} = \text{kb.}10 \text{ év}$ az alendronate esetében. A legfontosabb származékok felsorolásszerűen:

Etidronic acid / etidronate (1977, Didronel);

Alendronic acid / alendronate (1995, Fosamax)

Clodronic acid / clodronate (Bonafos, csak UK, Kanada, Olaszország)

Tiludronic acid / tiludronate (1997, Skelid)



8. ábra A pirofoszfát és néhány a piacra bevezetett biszfoszfonát.

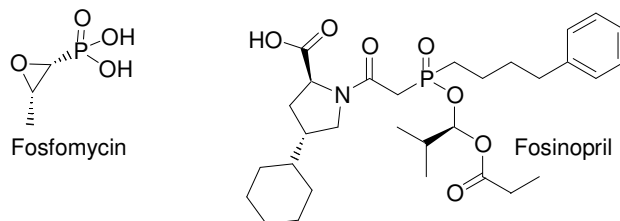
Az utóbbi időben tumor elleni terápiában is felmerült a használatuk [58].

3.7.4. Egyéb

Fosinopril (1991): ACE (angiotenzin konvertáló enzim) gátló, prodrug. Bizonyos szívbetegségek esetén is alkalmazzák. Az egyetlen foszfinát tartalmú ACE gátló, amelynek aktív formája, a fosinoprilat nem a foszfor rész lehasadásával jön létre. A karbonsav funkcióval rendelkező ACE gátlókhöz hasonlóan a fosinoprilátnak is rossz az orális bioelérhetősége, ezért foszfin észterként egy lipofil oldalláncot építettek be a molekulába, amely a kívánt irányban változtatja meg a fosinopril oldhatósági tulajdonságait. Orális adagolás során minden esetben a dózis 36 %-a szívódik fel. A májban a foszfinát észter hidrolizál fosinopriláttá, amelynek 95 %-a kötődik a plazmafehérjékhez. A kísérletek alapján (i.v. adagolás) úgy tűnik, hogy a fosinoprilat glükuronid konjugációja (20-30 %) és a p-hidroxi metabolitja (1-5 %) a fosinoprilból és nem a fosinoprilátból keletkezik. A p-hidroxi metabolit ugyanolyan aktív, mint a fosinoprilat, míg a glükuronid konjugátum hatástalan. Az alkalmazott hatóanyag kb. fele a vizelettel, másik fele pedig a széklettel ürül.

Fosfomicin (1996): széles spektrumú antibiotikum. Nincs mellékhatása, de rezisztencia alakul ki ellene. Kovalensen kötődik az epoxid a foszfoenolpiruvát aktív centrumában

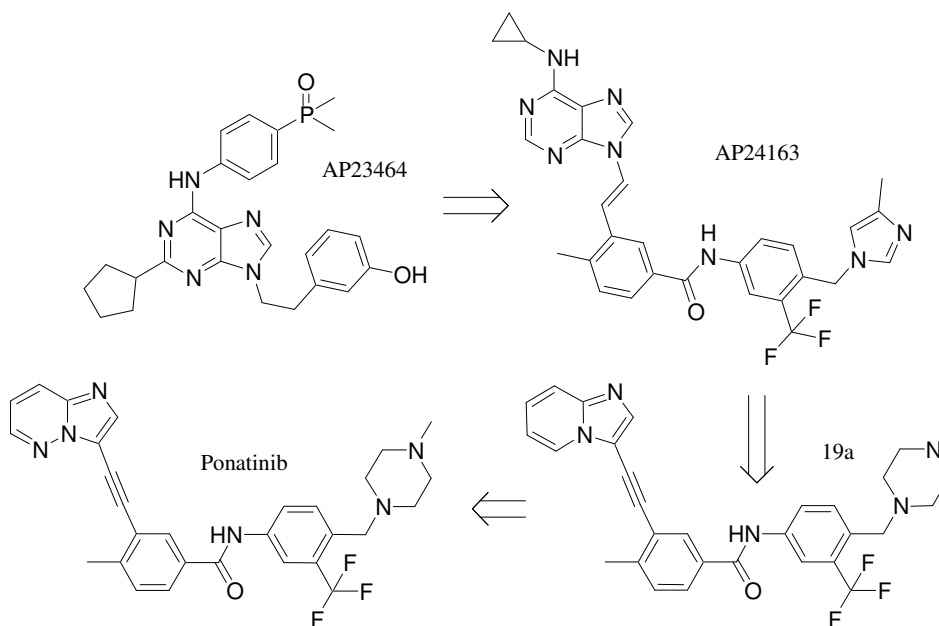
található ciszteinjéhez. Antimetabolitként hat. A fosfomycin aktív transzporttal, glicerofoszfát transzporterrel jut a baktériumba. A rezisztencia kialakulása során mutációval a nem esszenciális transzporter inaktiválódik.



9. ábra Egyébb foszfor tartalmú hatóanyagok.

3.8. Foszfortartalmú vegyületek a kináz gátlók területén

Napjainkig a piacra bevezetett kinázgátló gyógyszer hatóanyagok egyike sem tartalmaz foszfort, azonban a klinikai vizsgálatokat elért vegyületek közt már találhatunk ilyeneket. A *fostamatinib* egy Syk inhibitor [59], amely az R-406 kódjelű hatóanyag prodrug-jaként klinika II. fázisban van reumatoid arthritisz ellen [60]. Az irodalomból ismert egy kináz gátló vegyület (AP23464), melyen egy dimetilfoszfin-oxid csoport található. Az általam fellelt publikus adatok alapján nem eldönthető, hogy ez mennyiben járul hozzá a kinázgátló hatáshoz [61]. Bár az AP23464 vegyülettel rengeteg vizsgálatot elvégeztek gyógyszer nem lett belőle. A hatóanyag tervezés későbbi fázisaiban a foszfin-oxid csoportot elhagyták (10. ábra) [62], jelenleg *ponatinib* (AP24534) néven klinika II. vizsgálatokat végeznek vele rezisztens CML és Philadelphia kromoszóma pozitív akut limfoid leukémia (Ph+ ALL) ellen, mint BCR-Abl kinázgátló [63]. Több éve ismert, hogy az EGFR gátló *gefitinib*-bel is folytak olyan kísérletek, hogy a vízdoldhatóságot fokozandó, foszfor tartalmú csoportokat kötöttek a molekula különböző részeire, az előző példát meg sem közelítő sikerrel [64].



10. ábra Az AP23464 fejlesztése ponatinibbé.

Az eddig felsorolt példák esetében a foszfortartalmú csoportok kizárólag a vízdoldhatóság javításával a felszívódás során játszottak szerepet; prodrug-ot képeztek velük (lásd 3.7.2 fejezet).

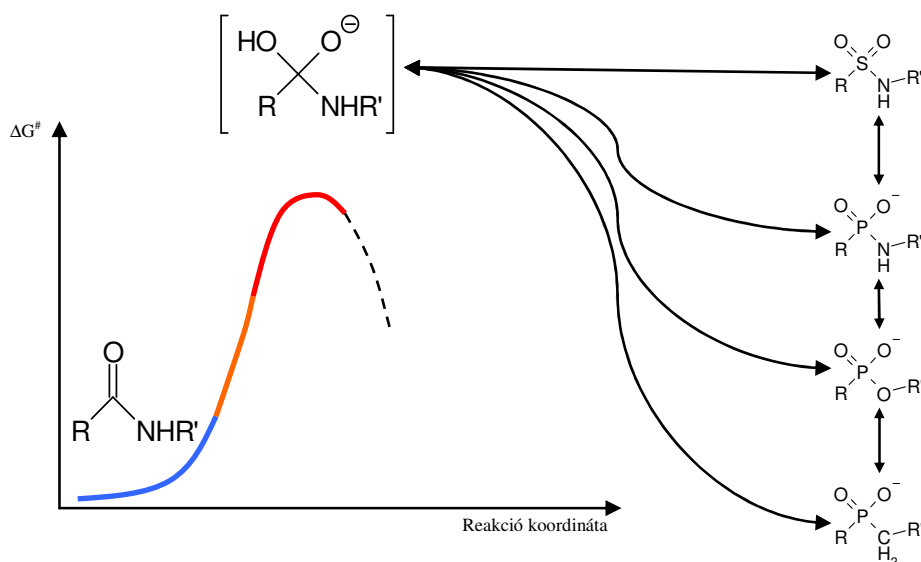
Néhány kevésbé sikeres vegyület a szerkezet építőelemeit próbálja mimikálni (lásd 3.7.3 fejezet). A kinázgátló kutatás hajnalát megelőzően is voltak már próbálkozások, hogy az ATP módosításával ériék el a kívánt hatást. Módosítások az ATP mindhárom alegységén történtek, azonban számunkra csak a trifoszfát mimikálása a fontos, mint a foszforhoz kapcsolódó oxigének lecserélése pl. kénre [65]. Előállították a cAMP foszfonát analógiát is [66]. Ezek azonban nem hozták meg a várt sikert.

A foszfortartalmú vegyületek jeltovábbítási terápiában betöltött szerepét jól összefoglalta Harry R. Hudson 2008-ban [67]. Azonban ő, és szerzőtársai elsősorban a biológiai hatás oldaláról közelítették meg a témát, továbbá nem az általam alkalmazott csoportosítást használták.

Az biztosan kijelenthető, hogy a rengeteg próbálkozás ellenére igazán komoly sikert csak a fostamatinib ért el, de ebben az esetben is a foszfortartalmú csoportról csak, mint prodrug képző ágens beszélhetünk.

3.9. Az átmeneti állapot analógia és alkalmazása

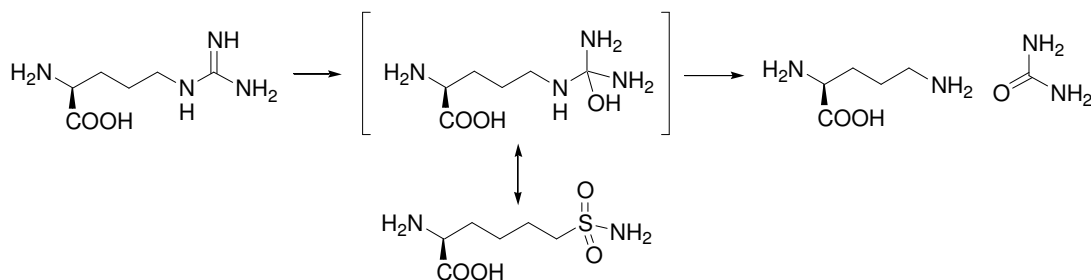
Az átmeneti állapot analógia elmélete és gyakorlati megvalósítása sok évtizedre nyúlik vissza [68]. A munkám szempontjából legfontosabb típus, a peptid-kötés hidrolízisekor fellépő átmeneti állapottal analóg szerkezetek. A peptid-kötés hidrolízisekor a szénatom sp^2 -ből sp^3 hibridállapotba kerül, azonban ez a tetravalens állapot instabil, és a C-N kötés felhasadásával stabilizálódik. Az átmeneti állapot analógia elve alapján olyan molekulákkal gátolni lehet a peptidázok működését, melyek tér- és elektron szerkezete hasonlít erre az instabil tetravalens állapotra, ám az adott kémiai és biológiai környezetben stabilak (11. ábra). A foszfonamidátok ilyenén alkalmazását már közel harminc éve megvalósították [69].



11. ábra Átmeneti állapot analógok Moree szerint.

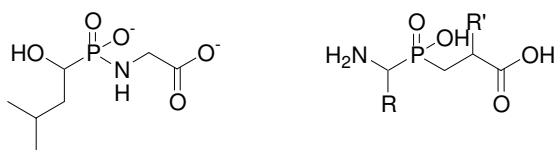
Egy tíz évvel későbbi tanulmányban W. E. Moree megmutatta, hogy az elektron eloszlások alapján a foszfonamidát az, amely a legjobban hasonlít a peptidkötés átmeneti állapotára. Továbbá javaslatot tett a szulfonamidok átmeneti állapot analóggként való alkalmazására, mivel az is nagy hasonlóságot mutat, mind a peptid-kötés hidrolízisekor fellépő átmeneti állapottal, mind a foszfonamidátokkal [70]. Pár évvel később kiterjesztették ezt az elméletet úgy, hogy tetravalens átmeneti állapottal a foszfonamidátokon és a szulfonamidokon kívül, a foszfonátok és a foszfinátok is izosztérek [71], így szükségképpen ezek a csoportok egymással is izosztér viszonyban állnak.

Szulfonamid átmeneti állapot analóg nem sok ismert és azok nagy része sem a peptidkötést mimikálja, hanem az arginin guanidin csoportját, így argináz inhibitorként viselkednek. A guanidin hidrolízise során egy fém ionhoz kötött hidroxid ion nukleofil támadást intéz a guanidin szénatomjára, s így jön létre egy tetraédes átmeneti állapot. Ez a hidrolízis során ornitinné és karbamiddá bomlik el (12. ábra). A szulfonamid tartalmú vegyület a tetraédes átmeneti állapottal mutat izosztériát [72].



12. ábra Szulfonamid típusú átmeneti állapot analógia.

Az előállított foszfor tartalmú peptid analógok többé-kevésbé aktívak voltak a molekuláris célpontjaikon, így némi tendencia felfedezhető a szerkezet-hatás összefüggésben. Grembecka és munkatársai összehasonlították néhány foszfonamidsav (phosphonamidic acid) és foszfinsav hatását, mint leucin aminopeptidáz (LAP) inhibitor (13. ábra). Úgy találták, hogy egyetlenegy foszfonamidsav dipeptid (LeuPNHGly) volt stabil pH=8,5-nél, ami szükséges a LAP enzim működéséhez. Meghatározták a vegyületek K_i értékeit. A foszfonamidsav esetén ez az érték 4,88 μM volt, míg a foszfinsavak esetén 65-330 nM között mozogtak a különböző dipeptidek minőségétől, illetve a diasztereomerek és enantiomerek arányától függően [73].

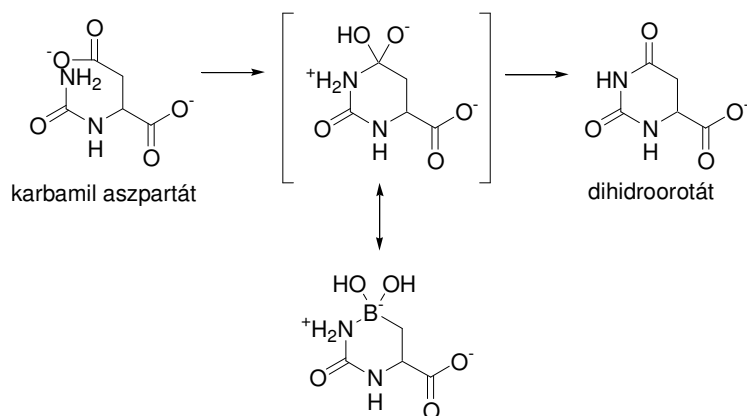


13. ábra LAP inhibitorok: a LeuPNHGly valamint a foszfin sav dipeptidek általános képlete.

Egy másik tanulmányban a foszfonamidsav és a foszfonsav dipeptid analógokat hasonlították össze. A vegyületek a D-Ala-D-Ala analógjaiként, VanX inhibitorként készültek. A VanX egy Zn(II) metalloenzim, amely baktériumokban a D-Ala-D-Ala hidrolizálását végzi. Úgy találták, hogy a foszfonamidsav ($K_i=36 \mu\text{M}$) kb. tízszer alacsonyabb dózisban hat az enzimre, mint a foszfonsav ($K_i=400 \mu\text{M}$) származék [74].

Mindegyik esetben a foszfonamidsav mutatta a legjobb gátló hatást, viszont a P-N kötés gyengesége miatt nagyon könnyen bomlanak ezek a vegyületek. A legtöbb esetben a molekulák csak pH=7 környékén, egy szűk tartományban stabilak. Ez utóbbi tényt egyébként saját tapasztalataim is alátámasztják. A legstabilabb foszfortartalmú átmeneti állapot analógok a foszfinsav származékok a P-C kötés stabilitása miatt.

Van egy csoportja az átmeneti állapot analógoknak, amely a dolgozat szempontjából kevésbé fontos, de annál érdekesebb. A dihidroorotáz (dihydroorotase, DHO) a karbamil aszpartátot alakítja dihidroortáttá. Az átalakulás során fellépő pszeudo-peptidkötést mimikálják boronsavval (14. ábra). Az előállított vegyületek biológiai hatása elenyésző [75].



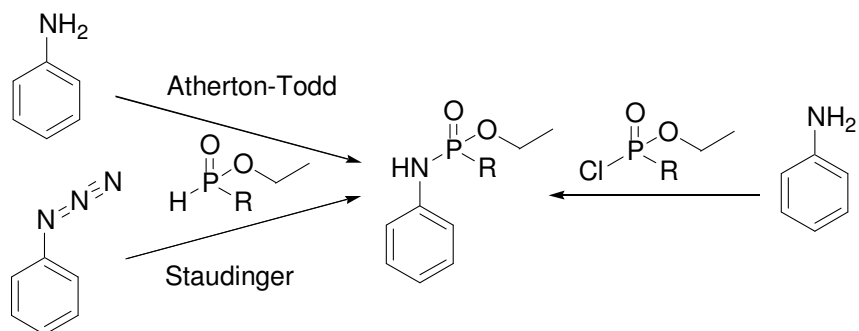
14. ábra Boron sav átmeneti állapot analóg.

3.10. Foszfamidátok, foszfonátok és foszfinátok

A 3.5 fejezetben említett *N*-(3/4-aminofenil)alkilszulfonamidok átmeneti állapot analógia szerinti foszfor tartalmú megfelelői ismert vegyületek, rengeteg publikáció foglalkozik előállításukkal, hasznosításukkal. Ugyanakkor, ha a 3.5 fejezet szerint ezekhez az anilinekhez hozzákapcsoljuk a pirimidin gyűrűt, akkor csak egy-egy, a teljes molekulát tekintve merőben eltérő szerkezetű, más területen alkalmazott vegyület található az irodalomban.

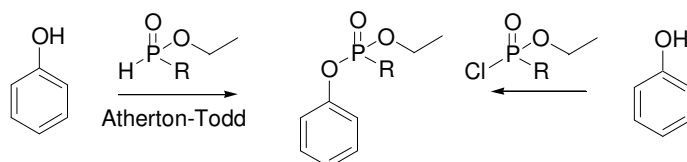
A foszfamidátok előállítására számos módszer ismert (15. ábra). Régóta alkalmazott eljárás, amikor egy preparált foszfonsav kloriddal acilezik a megfelelő amint [76]. Ennek egy szellemes egyszerűsítése az Atherton–Todd reakció, melynek során a H-

foszfinátból *in situ* keletkező foszfonsav klorid acilezi az amint [77]. Előállíthatók azidok és H-foszfinátok Staudinger-reakcióval is [78].



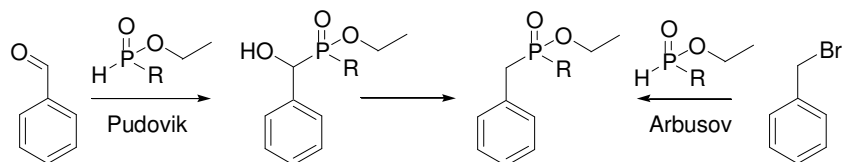
15. ábra Néhány tipikus foszfonamidát előállítási módszer.

A foszfonátok előállítására is alkalmas az Atherton-Todd reakció [79], illetve az izolált foszfonsav kloriddal történő acilezés (16. ábra) [80].



16. ábra Két foszfonát előállítási módszer.

A foszfinátok előállítása az előzőektől kissé különbözik (17. ábra). Alkalmas módszer a Pudovik reakció, amelyben aldehidre addicionálnak H-foszfinátot [81], majd a keletkező α -hidroxi csoportot eliminálni lehet a molekulából [82]. Ez utóbbi reakció azonban csak foszfonátok esetén ismert. A vegyületek előállíthatóak Arbuzov-reakcióval, amikor benzil halogenid vegyületeket reagáltatnak III vegyértékű foszforral [83].

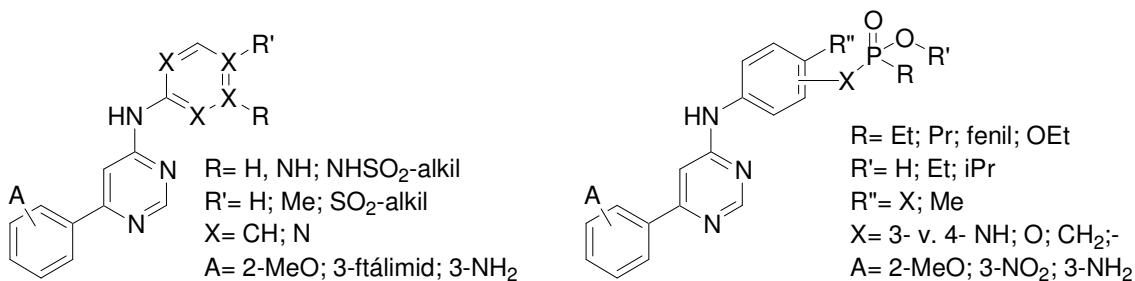


17. ábra Foszfinátok előállítására használt módszerek.

4. Célkitűzések

Doktoranduszi munkám új típusú, hatékony CDK9 kináz gátló vegyületek, mint potenciális AIDS ellenes hatóanyagok előállítására irányult. A Semmelweis Egyetem KKK Racionális Hatóanyagfejlesztő Laboratórium munkájába bekapcsolódva feladatom volt egy olyan kémiai eljárás kidolgozása, melynek segítségével olcsó reagensekből, grammos tételben is kivitelezhető reakciókkal lehet előállítani szubsztituált 6-fenil-4-klór-pirimidineket. Az előállított intermedierekből néhány szulfonamid, szulfonil, illetve heterociklusos származék előállítása is feladatom volt.

Munkám fő célkitűzése az volt, hogy az irodalomból már ismert, illetve általunk előállított szulfonamid tartalmú CDK9 gátló vegyületek alapján olyan új foszfortartalmú molekulákat állítsak elő, amelyek hasonló módon gátolják e kináz működését. Az átmeneti állapot analógia elmélete alapján a szulfonamidokkal izosztér foszfonamidát, foszfonát és foszfinát csoportok alkalmazásával kívántam igazolni, hogy a fenti molekula csoportok nem csak izosztérjei, hanem bioizosztérjei is egymásnak. Célom volt az is, hogy egy olyan hatékony kinázgátló vegyületet alkossak, amelyben a foszfor tartalmú molekularész nem csak a vízdoldhatóság fokozásához járul hozzá, hanem a molekula szerves részeként, elengedhetetlen szerepe van a biológiai hatás elérésében is. Az elkészített vegyületek biológiai hatását – első körben – házon belül CDK9/ciklinT1 enzimátikus vizsgálatok során mértük. Később különböző sejtes vizsgálatokat végeztünk. A legjobb vegyületeket sejt alapú, HIV proliferációs vizsgálatokban is tanulmányoztuk.



18. ábra Az előállítani kívánt vegyületek általános képletei.

5. Anyagok és módszerek

Az összes reagenst és oldószert a Sigma-Aldrich Kft.-től, az AlfaAesar Ltd.-től, ill. az Apollo Ltd.-től vásároltuk és további tisztítás és kezelés nélkül használtuk fel. Az olvadáspontokat egy BUCHI B-540 készüléken határoztuk meg. Az adatok nem korrigáltak. A kromatográfiás elválasztások Silica gel 60 tölteten ill. Silica gel 60 F254 1 mm preparatív vékonyréteg lapon történtek (Merck). Az NMR spektrumok több készüléken készültek:

A ^1H -300 MHz; ^{31}P -121 MHz; ^{13}C -75 MHz mérések egy BRUKER AC 300 készüléken készültek.

A ^1H -400 MHz; ^{31}P -162 MHz; ^{13}C -101 MHz mérések egy BRUKER AC 400 készüléken készültek.

A ^1H -250 MHz; ^{31}P -101 MHz; ^{13}C -63 MHz mérések egy BRUKER AC 250 készüléken készültek.

A ^1H -600 MHz; ^{31}P -242 MHz mérések egy VARIAN Unity Inova 600 készüléken készültek.

A kémiai eltolódásokat parts per million-ban (δ) adtam meg a TMS-hez ($\delta = 0,00$ ppm) viszonyítva a ^1H és ^{13}C méréseknél, illetve a 85 %-os H_3PO_4 -hoz ($\delta = 0,00$ ppm) a ^{31}P méréseknél. Az electrospray ionizációs tömeg spektrumok egy Waters 2795 HPLC és Waters 996 fotodiódasoros detektorral kapcsolt Micromass ZMD 2000 LC-MS rendszeren készültek, amelyet a vegyületek tisztaságának meghatározására is használtunk. A retenciós idők egy Supelco Discovery C18, 5 cm x 4.6 mm, 5 μm oszlopra vonatkoznak. Az eluens víz / 0.05 % HCOOH , illetve MeCN / 0.05 % HCOOH volt gradiensben. Az alkalmazott térfogatáram 2 ml / perc volt. Minden minta esetében a beadagolt mennyiség 3 μg volt. Mikrohullámú reaktorok: a 0.2-20 ml tartományban egy Personal Chemistry, EmrysTM Creator reaktort, míg a 30-1000 ml tartományban egy Milestone Inc., Ethos MicroSYNTH Labstation reaktort alkalmaztunk. A sorszámozott vegyületek elnevezése a IUPAC Szerves Kémiai Nomenklatúrabizottságának 1993-as ajánlása alapján, az ACD/Name szoftver segítségével történt [84]. A disszertáció terjedelmére vonatkozó szabályok miatt a Kísérleti részben a részletes analitikai eredmények ismertetésére csak korlátozottan volt lehetőségem, így az NMR spektrumok asszignációja csak felsorolás szerű.

6. Eredmények

6.1. A 6-fenil-4-klór-pirimidinek előállítása.

A 7.1 fejezetben leírt vegyületek (3, 4, 5a, 5b, 5c, 5d, 6a, 6b, 6d) szintézise a publikált módszerekkel történt [85].

6-(2-Metoxifenil)-2-tioxo-2,3-dihidropirimidin-4(1H)-on (3);

3-Amino-3-(3-nitro-fenil)-akrilsav etil észter (4);

6-(2-Metoxifenil)pirimidin-4-ol (5a);

6-(3-Nitrofenil)pirimidin-4-ol (5b);

6-(3-Aminofenil)pirimidin-4-ol (5c);

2-[3-(6-Hidroxipirimidin-4-il)fenil]-1H-izoindol-1,3(2H)-dion (5d);

4-Klór-6-(2-metoxifenil)pirimidin (6a);

4-Klór-6-(3-nitrofenil)pirimidin (6b);

2-[3-(6-Klórpirimidin-4-il)fenil]-1H-izoindol-1,3(2H)-dion (6d).

6.2. Szulfonamid, szulfonil csoportot, illetve heterociklust tartalmazó CDK9 inhibitorok előállítása.

A 7.2 fejezetben leírt vegyületek (8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17a, 17b, 18a, 18b, 19, 20, 27, 28, 29, 30, 31) szintézise a publikált módszerekkel történt [5].

2-(3-{6-[(4-Metil-3-nitrofenil)amino]pirimidin-4-il}fenil)-1H-izoindol-1,3(2H)-dion (8);

2-(3-{6-[(3-Amino-4-metilfenil)amino]pirimidin-4-il}fenil)-1H-izoindol-1,3(2H)-dion (9);

N-[5-({6-[3-(1,3-Dioxo-1,3-dihidro-2H-izoindol-2-il)fenil]pirimidin-4-il}amino)-2-metilfenil]metánszulfonamid (10);

N-[5-({6-[3-(1,3-Dioxo-1,3-dihidro-2H-izoindol-2-il)fenil]pirimidin-4-il}amino)-2-metilfenil]propán-1-szulfonamid (11);

- N-(5-{{6-(3-Aminofenil)pirimidin-4-il}amino}-2-metilfenil)methánszulfonamid (12);**
- N-(5-{{6-(3-Aminofenil)pirimidin-4-il}amino}-2-metilfenil)propán-1-szulfonamid (13);**
- N-{{4-{{(3-Klórpropil)tio}fenil}acetamid (15);**
- N-{{4-{{(3-Klórpropil)szulfonil}fenil}acetamid (16);**
- N-(4-{{3-(Dimetilamino)propil}szulfonil}fenil)acetamid (17a);**
- N-{{4-{{(3-Pirrolidin-1-ilpropil)szulfonil}fenil}acetamid (17b);**
- 4-{{3-(Dimetilamino)propil}szulfonil}anilin (18a);**
- 4-{{(3-Pirrolidin-1-ilpropil)szulfonil}anilin (18b);**
- N-(4-{{3-(Dimetilamino)propil}szulfonil}fenil)-6-(2-metoxifenil)pirimidin-4-amin (19);**
- 6-(2-Metoxifenil)-N-{{4-{{(3-pirrolidin-1-ilpropil)szulfonil}fenil}pirimidin-4-amin (20);**
- 6-(2-Metoxifenil)-N-piridin-2-ilpirimidin-4-amin (27);**
- 6-(2-Metoxifenil)-N-piridin-3-ilpirimidin-4-amin (28);**
- 6-(2-Metoxifenil)-N-piridin-4-ilpirimidin-4-amin (29);**
- N-{{6-(2-Metoxifenil)pirimidin-4-il}pirimidin-2-amin (30);**
- N-{{6-(2-Metoxifenil)pirimidin-4-il}-1,3,5-triazin-2-amin (31).**

6.3. Foszfamidát tartalmú inhibitorok előállítása (Ar-N-P)

Etil propilfoszfinát (34): A vegyület előállítása az irodalomból ismert módszerrel történt [86].

(5-Amino-2-metil-fenil) izobutil karbamát az izobutil (5-nitro-2-metil-fenil) karbamáton keresztül (35):

1,52 g 2-metil-5-nitro anilint (10,0 mmol) feloldottam 50 ml száraz piridinben, majd hozzáadtam az izobutil kloroformátot 1,50 g (1,42 ml, 11,0 mmol). A reakcióelegyet egy éjszakán keresztül kevertetem szobahőmérsékleten, majd szárazra pároltam. A

nyers terméket 1 M vizes sósav oldatban szuszpendáltam, a terméket szűrés után exikkátorban P₂O₅ felett szárítottam. Ezután a vegyület általában elegendően tiszta, de IPA-ból átkristályosítható. Halványsárga por; 1,92 g (76 %).

$O_p=118^\circ\text{C}$ (IPA).

¹H-NMR (400 MHz): CDCl₃; δ(ppm): 8,74(s, 1H); 7,8(dd, ³J_{HH}=8,3 Hz, ⁴J_{HH}=2,3 Hz, 1H), 7,23(d, ³J_{HH}=8,6 Hz, 1H); 6,45(s, 1H); 3,94(d, ³J_{HH}=6,8 Hz, 2H); 2,29(s, 3H); 1,95(m, 1H); 0,92(d, ³J_{HH}=6,8 Hz, 6H).

A 1,92 g védett anilint (7,6 mmol) feloldottam 150 ml MeOH-ban és hozzáadtam 0,20 g 10 m/m %-os csontszenes palládiumot. A reakcióelegyet légköri nyomáson, szobahőmérsékleten hidrogéneztem. Miután a számított mennyiségű hidrogén elfogyott, a katalizátort kiszűrtem, MeOH-lal mostam. A MeOH-os szűrlet bepárolása után 1,35 g rózsaszín-barna port kaptam (80 %).

$O_p=100-101^\circ\text{C}$ (MeOH).

¹H-NMR (250 MHz): CDCl₃; δ(ppm): 7,34(s, 1H); 6,94(d, ³J_{HH}=8,0 Hz, 1H); 6,38(dd, ³J_{HH}=8,0 Hz, ⁴J_{HH}=2,3 Hz, 1H); 6,37(d, ⁴J_{HH}=2,3 Hz, 1H); 3,97(d, ³J_{HH}=6,8 Hz, 2H); 3,05(széles s, 2H); 2,17(s, 3H); 2,00(m, 1H); 0,99(d, ³J_{HH}=6,8 Hz, 6H).

Izobutil (5-[[6-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]amino]-2-metilfenil)karbamát (36):

A **35** anilint (0,222 g, 1 mmol) és a 4-klór-6-(2-metoxifenil)-pirimidint (**6a**, 0,221 g, 1 mmol) feloldottam 20 ml IPA-ban és hozzáadtam 4 ml sósavval telített IPA-t. A reakcióelegyet 4 órán keresztül refluxáltattam, bepárlás után telített vizes NaHCO₃-ban szuszpendáltam (20 ml). A vizes oldatot EtOAc-tal extraháltam (3x20 ml), az egyesített szerves fázisokat telített sós vízzel mostam, Na₂SO₄-on szárítottam, végül bepároltam. A nyers terméket acetonitrilből átkristályosítottam, 0,305 g krémszínű por (75 %).

$O_p=155^\circ\text{C}$ (MeCN).

¹H-NMR (400 MHz): DMSO; δ(ppm): 9,58(s, 1H); 8,84(s, 1H); 8,66(d, ⁵J_{HH}=1,2 Hz, 1H); 7,95(dd, ³J_{HH}=7,8 Hz, ⁴J_{HH}=1,8 Hz, 1H); 7,68(d, ⁴J_{HH}=2,3 Hz, 1H); 7,40-7,52(m, 3H); 7,18(d, ³J_{HH}=7,6 Hz, 1H); 7,14(d, ³J_{HH}=8,8 Hz, 1H), 7,07(dt, ³J_{HH}=7,6 Hz, ⁴J_{HH}=1,0 Hz, 1H), 3,9(s, 3H); 3,86(d, ³J_{HH}=6,8 Hz, 2H); 2,17(s, 3H); 1,92(m, 1H); 0,94(d, ³J_{HH}=6,8 Hz, 6H).

MS[ES⁺, Q-TOF]: M+H⁺=407,25 m/z, 2 M+H⁺=813,41 m/z

N¹-[6-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]-4-metilbenzol-1,3-diamin (37):

A **36** védett anilint (0,300 g, 0,74 mmol) feloldottam EtOH és víz 4:1 elegyébenben (50 ml) és hozzáadtam 0,207 g KOH-ot (3,7 mmol). A reakcióelegyet egy éjszakán keresztül forraltam, majd miután kihült bepároltam. A nyers terméket 30 ml vízben szuszpendáltam, hozzáadtam 0,5 ml EtOAc-ot és 15 percig kevertettem. A kiszűrt terméket dietil éterrel mostam. 0,203 g fehér por (90 %).

Op=168°C (víz, EtOAc).

¹H-NMR (400 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm) = 9,19(s, 1H); 8,54(s, 1H); 7,85(dd, ³J_{HH}=7,6 Hz, ⁴J_{HH}=1,8 Hz, 1H); 7,37(dt, ³J_{HH}=8,4 Hz, ⁴J_{HH}=1,8 Hz, 1H); 7,31(d, ⁴J_{HH}=1,3 Hz, 1H); 7,08(d, ³J_{HH}=7,6 Hz, 1H), 6,99(t, ³J_{HH}=7,6 Hz, 1H); 6,86(s, 1H); 6,79(d, ³J_{HH}=8,1 Hz, 1H); 6,66(d, ³J_{HH}=7,8 Hz, 1H); 4,79(széles s, 2H); 3,81(s, 3H); 1,95(s, 3H).

MS[ES⁺, Q-TOF]: M+H⁺=307,18 m/z.

Etil (4-metil-3-nitrofenil)karbamát (38):

A 4-metil-3-nitro-anilint (**7**, 1,2 g, 10 mmol) feloldottam 50 ml vízmentes pirdinben, majd 0 °C-on hozzáadtam 1,188 g klórhangyasav etil észtert (11 mmol). Az addíció után szobahőmérsékleten kevertettem az elegyet 2,5 órán keresztül, majd bepároltam. A bepárlási maradékot 1 M vizes sósavban felvettem (50 ml), a kivált csapadékot leszűrtem, exikkátorban P₂O₅ felett szárítottam, 2,356 g (84 %) fehér por.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm) = 10,00(s, 1H); 8,19(s, 1H); 7,62(d, ³J_{HH}=8,3 Hz, 1H); 7,40(d, ³J_{HH}=8,4 Hz, 1H); 4,15(q, ³J_{HH}=7,0 Hz, 2H); 2,44(s, 3H); 1,50(t, ³J_{HH}=7,0 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 3,74 perc; (ESI): m/z = 225 [M + H]⁺.

Etil (3-amino-4-metilfenil)karbamát (39):

A **38** nitro vegyületet (1,88 g, 8,39 mmol) feloldottam MeOH-ban (100 ml) és hozzáadtam 0,19 g 10 m/m %-os csontszénés palládiumot. A reakcióelegyet légköri nyomáson, szobahőmérsékleten hidrogéneztem. Miután a számított mennyiségű hidrogén elfogyott, a katalizátort kiszűrtem, MeOH-lal mostam. A szűrlet bepárolása után a várt terméket preparáltam 1,522 g (94 %).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 , $\delta(\text{ppm}) = 9,15(\text{s}, 1\text{H}); 6,78(\text{s}, 1\text{H}); 6,76(\text{d}, ^3J_{\text{HH}}=8,0 \text{ Hz}, 1\text{H}); 6,53(\text{d}, ^3J_{\text{HH}}=8,0 \text{ Hz}, 1\text{H}); 4,75(\text{széles s}, 2\text{H}); 4,00-4,10(\text{m}, 2\text{H}); 1,97(\text{s}, 3\text{H}); 1,22(\text{t}, ^3J_{\text{HH}}=7,0 \text{ Hz}, 3\text{H})$.

LC-MS: $R_t = 1,92$ perc; (ESI): $m/z = 195 [M + H]^+$.

Általános recept az Arbuzov reakcióhoz:

A trialkil foszfitot (50 mmol) és a megfelelő alkil halogenidet (200 mmol) néhány napig olajfürdben $130\text{ }^\circ\text{C}$ -on, vagy mikrohullámú reaktorban $150\text{ }^\circ\text{C}$ -on 4 óráig kevertetem. A reakció befejeztével az elegyet vákuum-desztillációval tisztítottam. A keletkező alkil foszfonátok minden esetben színtelen olajok voltak. A reakciók hozamát és a vegyületek jellemzését lásd külön.

Propil-foszonsav diizopropil észter (41):

Triizopropil-foszfit (**40**) és propil-bromid Arbuzov-reakciója után 6,551 g, (63 %) színtelen olajat preparáltam.

$F_p=72-76\text{ }^\circ\text{C}$ (3,35 mbar).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz): CDCl_3 , $\delta=30,3$ ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz): CDCl_3 , $\delta(\text{ppm}) = 4,60-4,70(\text{m}, 2\text{H}); 1,55-1,70(\text{m}, 4\text{H}); 1,20-1,30(\text{m}, 12\text{H}); 0,92-1,00(\text{m}, 3\text{H})$.

Etil-foszonsav dietil észter (45):

Trietil-foszfit (**32**) és etil-bromid (**44**) Arbuzov-reakciója után 2,656 g, (32 %) színtelen olajat preparáltam. A vegyületet csak egyszer állítottam elő, utána készen megvásároltam.

$F_p=60\text{ }^\circ\text{C}$ (3,5 mbar).

$^{31}\text{P-NMR}$ (101 MHz): CDCl_3 , $\delta=34,6$ ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz): CDCl_3 , $\delta(\text{ppm}): 3,85-4,00(\text{m}, 4\text{H}); 1,58(\text{dq}, ^2J_{\text{PH}}=18,2 \text{ Hz}, ^3J_{\text{HH}}=7,5 \text{ Hz}, 2\text{H}); 1,17(\text{t}, ^3J_{\text{HH}}=7,1 \text{ Hz}, 6\text{H}); 1,02(\text{dt}, ^3J_{\text{PH}}=19,9 \text{ Hz}, ^3J_{\text{HH}}=7,6 \text{ Hz}, 3\text{H})$.

Általános recept az alkil és aril foszonsav kloridok előállításához:

Az alkil vagy aril dialkil foszfonátot (5 mmol) és egy csepp vízmentes DMF-et feloldotam 5 ml vízmentes CH_2Cl_2 -ban. Az elegyet lehűtöttem $0\text{ }^\circ\text{C}$ -ra és hozzáadtam

1,9 g oxalil-kloridot (1,27 ml, 15 mmol). Az alkil foszfonátok esetén 5-6 órát kevertettem szobahőmérsékleten, az aril foszfonát esetén 24 órát forraltam az elegyet. Miután a reakció lejátszódott az elegyet bepároltam, majd még két alkalommal lepároltam róla CH_2Cl_2 -t. A savkloridokat további tisztítás nélkül használtam. A reakciók hozama minden esetben kb. 90 % volt. A vegyületek jellemzését lásd külön.

Propil-foszonsav klorid izopropil észter (42):

^{31}P -NMR (162 MHz): CDCl_3 ; $\delta=43,2$ ppm.

^1H -NMR (250 MHz): CDCl_3 ; $\delta(\text{ppm})$: 4,80-4,95(m, 1H); 1,95-2,13(m, 2H); 1,55-1,80(m, 2H), 1,20-1,40(m, 6H); 0,90-1,05(m, 3H).

Etil-foszonsav klorid etil észter (46):

^{31}P -NMR (162 MHz): CDCl_3 ; $\delta=46,7$ ppm.

^1H -NMR (400 MHz): CDCl_3 ; $\delta(\text{ppm})$: 4,10-4,30(m, 2H); 2,00-2,15(m, 2H); 1,28-1,38(m, 3H); 1,13-1,27(m, 3H).

Fenil-foszonsav klorid etil észter (48):

^{31}P -NMR (162 MHz): CDCl_3 ; $\delta=29,3$ ppm.

^1H -NMR (250 MHz): CDCl_3 ; $\delta(\text{ppm})$: 7,75-7,95(m, 2H); 7,50-7,6(m, 1H); 7,35-7,5(m, 2H); 4,25-4,45(m, 2H); 1,43(t, $^3J_{\text{HH}}=7,1$ Hz, 3H).

Általános recept a foszfonamidát tartalmú inhibitorok előállításához:

Az **37**anilint (0,061 g, 0,2 mmol) feloldottam 5 ml piridinben, hozzáadtam a megfelelő **42**, **46**, **48** foszonsav kloridot (0,4 mmol), majd a reakcióelegyet 50 °C-on kevertetem 24 órán keresztül nitrogén atmoszférában. A reakcióelegyet bepároltam, majd a bepárlási maradékot telített vizes NH_4Cl -ban (10 ml) szuszpendáltam. Az elegyet CH_2Cl_2 -nal extarháltam (3x20 ml); az egyesített szerves fázisokat 1 M vizes NaOH-dal (2x10 ml) és telített sós vízzel (30 ml) mostam, Na_2SO_4 -on szárítottam, végül bepároltam. A nyers terméket preparatív VRK lapon tisztítottam, az eluens 100 % EtOAc volt. A megfelelő tisztaság eléréséhez két-három futtatásra volt szükség. A tiszta terméket MeOH-lal lemostam a szilikagélről. Amennyiben a kromatográfia után a termék tartalmazott valamennyi foszonsav szennyezőt (a kromatográfia során bekövetkező hidrolízisből eredően), akkor a terméket feloldotam CH_2Cl_2 -ban (20 ml),

mostam 1 M vizes NaOH-dal (20 ml), Na₂SO₄-ton szárítottam és bepároltam. A tiszta terméket minden esetben acetonitrilből történő átkristályosítás után kaptam. A reakciók hozamát és a vegyületek jellemzését lásd külön.

Izopropil N-(5-{{6-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il}amino}-2-metilfenil)-P-propilfoszfonamidát (43): A 37 anilin és 42 foszfonsav klorid reakciójával. Termelés: 0,008 g krémszínű por (9 %).

Op=151 °C (MeCN).

³¹P-NMR (162 MHz): DMSO-d₆; δ=29,3 ppm.

¹H-NMR (400 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,52(s, 1H); 8,62(s, 1H); 7,92(d, ³J_{HH}=6,1 Hz, 1H); 7,6(s, 1H); 7,42-7,48(m, 1H); 7,41(s, 1H); 7,27(d, ³J_{HH}=6,1 Hz, 1H); 7,17(d, ³J_{HH}=8,6 Hz, 1H); 7,04-7,10(m, 2H); 6,38(d, ³J_{HH}=7,1 Hz, 1H); 4,57-4,67(m, 1H); 3,89(s, 3H); 2,19(s, 3H); 1,70-1,90(m, 2H); 1,48-1,60(m, 2H); 1,24(dd, ⁴J_{PH}=25,2 Hz, ³J_{HH}=6,1 Hz, 6H); 1,0(dt, ⁴J_{PH}=40,6 Hz, ³J_{HH}=7,2 Hz, 3H).

MS[ES⁺, Q-TOF]: M+H⁺=455,27 m/z.

Etil P-etil-N-(5-{{6-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il}amino}-2-metilfenil)-foszfonamidát (49): A 37 anilin és 46 foszfonsav klorid reakciójával. Termelés: 0,014 g krémszínű por (17 %).

Op= ~szobahőmérséklet, amorf.

³¹P-NMR (162 MHz): DMSO-d₆; δ=32,1 ppm.

¹H-NMR (400 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,58(s, 1H); 8,62(d, ⁴J_{HH}=1,1 Hz, 1H); 7,91(dd, ³J_{HH}=7,7 Hz, ⁴J_{HH}=1,8 Hz, 1H); 7,56(d, ⁴J_{HH}=2,0 Hz, 1H); 7,42-7,48(m, 1H); 7,41(d, ⁴J_{HH}=1,1 Hz, 1H); 7,31(dd, ³J_{HH}=8,3 Hz, ⁴J_{HH}=2,0 Hz, 1H); 7,17(d, ³J_{HH}=7,7 Hz, 1H); 7,04-7,10(m, 2H); 6,48(d, ²J_{PH}=7,3 Hz, 1H); 3,95-4,01(m, 2H); 3,88(s, 3H); 2,19(s, 3H); 1,75-1,90(m, 2H); 1,25(t, ³J_{HH}=6,8 Hz, 3H); 1,05(dt, ³J_{PH}=19,7 Hz, ³J_{HH}=7,6 Hz, 3H).

MS[ES⁺, Q-TOF]: M+H⁺=427,23 m/z; 2 M+H⁺=853,35 m/z.

Etil P-fenil-N-(5-{{6-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il}amino}-2-metilfenil)-foszfonamidát (50): A 37 anilin és 48 foszfonsav klorid reakciójával. Termelés: 0,017 g krémszínű por (18 %).

$O_p=172^\circ\text{C}$ (MeCN).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz): DMSO- d_6 : $\delta=17,2$ ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz): DMSO- d_6 ; $\delta(\text{ppm})$: 9,46(s, 1H); 8,58(s, 1H); 7,91(d, $^3J_{\text{HH}}=9,2$ Hz, 1H), 7,82(dd, $^3J_{\text{PH}}=12,8$ Hz, $^3J_{\text{HH}}=7,2$ Hz, 2H); 7,53-7,59(m, 2H); 7,46-7,53(m, 2H); 7,45(t, $^3J_{\text{HH}}=8,4$ Hz, 1H); 7,36(s, 1H); 7,26(d, $^3J_{\text{HH}}=7,7$ Hz, 1H); 7,17(d, $^3J_{\text{HH}}=8,5$ Hz, 1H); 7,08(t, $^3J_{\text{HH}}=7,4$ Hz, 1H); 6,99-7,05(m, 2H); 4,10(dq, $^3J_{\text{PH}} \approx ^3J_{\text{HH}} \approx 7,2$ Hz, 2H); 3,88(s, 3H); 2,19(s, 3H); 1,29(t, $^3J_{\text{HH}}=7,2$ Hz, 3H).

$\text{MS}[\text{ES}^+, \text{Q-TOF}]$: $\text{M}+\text{H}^+=475,21$ m/z; 2 $\text{M}+\text{H}^+=949,39$ m/z.

6.4. Foszfónát tartalmú inhibitorok előállítása (Ar-O-P)

5-[[6-(2-Metoxifenil)pirimidin-4-il]amino]-2-metilfenol (52): A publikált módszer szerint állítottam elő a molekulát [5].

2-Metil-5-[[6-(3-nitrofenil)pirimidin-4-il]amino]fenol (53):

A molekula előállítása **52**-es vegyületével azonos módon történt: 0,677 g 5-amino-2-metil-fenol (**51**, 5,5 mmol) és 1,178 g 4-klór-6-(3-nitrofenil)-pirimidin (**6b**, 5 mmol) reakciójában. Termelés: 0,757 g sárga por (47 %)

$O_p=240-245^\circ\text{C}$ (MeCN).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; $\delta(\text{ppm})$: 9,58(s, 1H); 9,34(s, 1H); 8,81(s, 1H); 8,73(s, 1H); 8,43(s, 1H); 8,36(s, 1H); 7,83(s, 1H); 7,34(s, 1H); 7,26(s, 1H); 7,00(s, 2H); 2,09(s, 3H). Minden jel burkológörbe jellegű.

LC-MS : $R_t=3,44$ perc; (ESI): $m/z = 323$ $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Általános recept a foszfónátok előállításához:

A megfelelő fenolt (0,5 mmol) feloldottam 25 ml vízmentes THF-ben és hozzáadtam 0,067 g KOtBu-ot (0,6 mmol). Az elegyet 30 percig kevertetem szobahőmérsékleten, majd hozzáadtam a megfelelő foszfonsav kloridot (0,75 mmol). A reakcióelegyet szobahőmérsékleten egy éjszakán keresztül kevertetem, majd bepároltam. A bepárlási maradékot 2 M vizes NaOH oldatban (30 ml) felvettem és EtOAc-tal extraháltam (3x70 ml). Az egyesített szerves fázisokat telített sós vízzel mostam, MgSO_4 -on szárítottam, végül bepároltam. A további tisztítási lépéseket, illetve a termeléseket és az anyagok jellemzését lásd külön.

Etil 5-{{6-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il}amino}-2-metilfenil etilfoszfonát (54a): Az **52** fenol és a **46** foszfonsav klorid reakciója. Oszlopkromatográfiás tisztítás 100 % EtOAc → EtOAc:MeOH=1:1 eluenssel. Az összepárolt frakciókból acetonitrillel kristályosítottam a tiszta terméket: 0,062 g fehér por (29 %).

$O_p = 134-135^\circ\text{C}$ (MeCN).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 30,9 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): 9,76(s, 1H); 8,68(s, 1H); 7,95(dd, $^3J_{\text{HH}}=7,7$ Hz, $^4J_{\text{HH}}=1,7$ Hz, 1H); 7,75(s, 1H); 7,43-7,51(m, 3H); 7,21(d, $^3J_{\text{HH}}=8,0$ Hz, 1H); 7,19(d, $^3J_{\text{HH}}=8,0$ Hz); 7,08(t, $^3J_{\text{HH}}=7,9$ Hz, 1H); 4,07-4,20(m, 2H); 3,9(s, 3H); 2,2(s, 3H); 1,97(dq, $^2J_{\text{PH}}=17,8$ Hz, $^3J_{\text{HH}}=7,6$ Hz, 2H); 1,25(t, $^3J_{\text{HH}}=7,0$ Hz, 3H); 1,16(dt, $^3J_{\text{PH}}=20,6$ Hz, $^3J_{\text{HH}}=7,6$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz): DMSO; δ (ppm): 160,2(1C); 159,4(1C); 157,7(1C); 157,5(1C); 148,5(d, $^2J_{\text{PC}}=9,5$ Hz, 1C); 138,8(d, $^4J_{\text{PC}}=1,5$ Hz, 1C); 131,2(1C); 131,0(1C); 130,1(1C); 125,7(1C); 122,3(d, $^3J_{\text{PC}}=4,4$ Hz, 1C); 120,6(1C); 115,7(1C); 112,1(1C); 111,4(d, $^3J_{\text{PC}}=2,9$ Hz, 1C); 107,2(1C); 62,1(d, $^2J_{\text{PC}}=6,6$ Hz, 1C); 55,7(1C); 18,4(d, $^1J_{\text{PC}}=140,5$ Hz, 1C); 16,2(d, $^3J_{\text{PC}}=5,1$ Hz, 1C); 15,5(1C); 6,5(1C).

$\text{MS}[\text{ES}^+, \text{Q-TOF}]$: $\text{M}+\text{H}^+=428,12$ m/z; $2 \text{M}+\text{H}^+=855,27$ m/z.

Izopropil 5-{{6-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il}amino}-2-metilfenil propilfoszfonát (54b): Az **52** fenol és a **41** foszfonsav klorid reakciója. Oszlopkromatográfiás tisztítás 100 % EtOAc-tal. Az összepárolt frakciókból diizopropil éterrel kristályosítottam a tiszta terméket: 0,118 g fehér por (52 %).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 28,5 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): 9,71(s, 1H); 8,67(d, $^5J_{\text{HH}}=1,0$ Hz, 1H); 7,95(dd, $^3J_{\text{HH}}=7,7$ Hz, $^4J_{\text{HH}}=1,8$ Hz, 1H); 7,77(s, 1H); 7,44-7,48(m, 2H); 7,45(d, $^5J_{\text{HH}}=1,2$ Hz, 1H); 7,21(d, $^3J_{\text{HH}}=7,8$ Hz, 1H); 7,18(d, $^3J_{\text{HH}}=7,6$ Hz, 1H); 7,09(t, $^3J_{\text{HH}}=6,7$ Hz, 1H); 4,65-4,75(m, 1H); 3,91(s, 3H); 2,19(s, 3H); 1,88-1,99(m, 2H); 1,56-1,71(m, 2H); 1,28(d, $^3J_{\text{HH}}=6,1$ Hz, 3H); 1,18(d, $^3J_{\text{HH}}=6,1$ Hz, 3H); 1,02(dt, $^3J_{\text{HH}}=7,4$ Hz, $^4J_{\text{PH}}=1,4$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz): DMSO; δ (ppm): 160,2(1C); 159,4(1C); 157,6(1C); 157,5(1C); 148,6(d, $^2J_{\text{PC}}=8,6$ Hz, 1C); 138,8(d, $^4J_{\text{PC}}=1,2$ Hz, 1C); 131,2(1C); 131,0(1C); 130,1(1C);

125,7(1C); 122,3(d, $^3J_{PC}=5,5$ Hz, 1C); 120,6(1C); 115,6(1C); 112,1(1C); 111,6(1C); 107,1(1C); 70,5(d, $^2J_{PC}=6,7$ Hz, 1C); 55,7(1C); 27,8(d, $^1J_{PC}=139,7$ Hz, 1C); 23,7(d, $^3J_{PC}=4,3$ Hz, 1C); 23,5(d, $^3J_{PC}=4,3$ Hz, 1C); 15,9(d, $^2J_{PC}=5,5$ Hz, 1C); 15,6(1C); 14,9(d, $^3J_{PC}=17,2$ Hz, 1C).

MS[ES⁺, Q-TOF]: M+H⁺=456,17 m/z; 2 M+H⁺=911,36 m/z.

Etil 5-[[6-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]amino]-2-metilfenil fenilfoszfonát (54c): Az **52** fenol és a **48** foszfonsav klorid reakciója. Oszlopkromatográfiás tisztítás EtOAc:hexán = 9:1 eluenssel. Az összepárolt frakciókból acetonitrillel kristályosítottam a tiszta terméket: 0,021 g fehér por (9 %).

Op= 146°C (MeCN).

^{31}P -NMR (162 MHz): DMSO-d₆; δ : 14,7 ppm.

1H -NMR (400 MHz): DMSO-d₆; δ (ppm): 9,69(s, 1H); 8,62(s, 1H); 7,95(dd, $^3J_{HH}=7,5$ Hz, $^4J_{HH}=1,7$ Hz, 1H); 7,83-7,89(m, 2H); 7,76(s, 1H); 7,67-7,73(m, 1H); 7,58-7,63(m, 2H); 7,44-7,48(m, 1H); 7,42(s, 1H); 7,40-7,42(m, 1H); 7,18(d, $^3J_{HH}=8,6$ Hz, 2H); 7,09(t, $^3J_{HH}=7,3$ Hz, 1H); 4,21(m, 2H); 3,90(s, 3H); 2,15(s, 3H); 1,29(t, $^3J_{HH}=7,0$ Hz, 3H).

MS[ES⁺, Q-TOF]: M+H⁺=476,1 M/z; 2 M+H⁺=951,25 m/z.

Etil 2-metil-5-[[6-(3-nitrofenil)pirimidin-4-il]amino]fenil etilfoszfonát (55a): Az **53** fenol és a **46** foszfonsav klorid reakciója. A terméket acetonitrilből átkristályosítottam, 0,177 g halványsárga por (79 %)

Op= 194-195°C (MeCN).

^{31}P -NMR (243 MHz): DMSO-d₆; δ : 29,8 ppm.

1H -NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ (ppm): 9,9(s, 1H); 8,83(s, 1H); 8,76(s, 1H); 8,46(d, $^3J_{HH}=7,6$ Hz, 1H); 8,36(d, $^3J_{HH}=7,9$ Hz, 1H); 7,84(t, $^3J_{HH}=7,9$ Hz, 1H); 7,74(s, 1H); 7,46(d, $^3J_{HH}=7,9$ Hz, 1H); 7,32(s, 1H); 7,23(d, $^3J_{HH}=8,1$ Hz, 1H); 4,07-4,19(m, 2H); 2,21(s, 3H); 1,91-2,07(m, 2H); 1,25(t, $^3J_{HH}=7,0$ Hz, 3H); 1,13(dt, $^3J_{PH}=20,5$ Hz, $^3J_{HH}=7,6$ Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 4,05 perc; (ESI): m/z = 443 [M + H]⁺.

Izopropil 2-metil-5-[[6-(3-nitrofenil)pirimidin-4-il]amino]fenil propilfoszfonát (55b): Az **52** fenol és a **41** foszfonsav klorid reakciója. A terméket acetonitrilből átkristályosítottam, 0,111 g halványsárga por (47 %)

$O_p = 164-166^\circ\text{C}$ (MeCN).

$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 27,6 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): 9,85(s, 1H); 8,82(s, 1H); 8,74(s, 1H); 8,45(d, $^3J_{\text{HH}}=7,8$ Hz, 1H), 8,35(dd, $^3J_{\text{HH}}=7,4$ Hz, $^4J_{\text{HH}}=1,4$ Hz, 1H); 7,83(t, $^3J_{\text{HH}}=8,0$ Hz, 1H); 7,74(s, 1H); 7,44(d, $^3J_{\text{HH}}=8,1$ Hz, 1H); 7,36(s, 1H); 7,21(d, $^3J_{\text{HH}}=8,3$ Hz, 1H); 4,65-4,72(m, 1H); 2,19(s, 3H); 1,86-1,98(m, 2H); 1,58-1,66(m, 2H); 1,27(d, $^3J_{\text{HH}}=6,1$ Hz, 3H); 1,17(d, $^3J_{\text{HH}}=6,1$ Hz, 3H); 1,01(t, $^3J_{\text{HH}}=7,1$ Hz, 3H).

LC-MS: $R_t = 4,55$ perc; (ESI): $m/z = 271$ [M + H] $^+$.

5-[[6-(3-Aminofenil)pirimidin-4-il]amino]-2-metilfenil etil etilfoszfonát (56a): Az **55a** nitro-foszfonátot (0,049 g, 0,11 mmol) feloldottam 20 ml MeOH és 10 ml CH_2Cl_2 elegyében, hozzáadtam 0,069 g annónium formiátot (1,1 mmol) és 0,005 g 10 m/m %-os csontszén-palládiumot. A reakcióelegyet argon atmoszférában, szobahőmérsékleten kevertetem egy éjszakán keresztül. A redukció végeztével a katalizátort kiszűrtem, MeOH-lal mostam, a szűrletet bepároltam. A maradékot telített vizes Na_2CO_3 oldatban felvettem (30 ml), EtOAc-tal extraháltam (3x70 ml). Az egyesített szerves fázisokat telített sós vízzel mostam (50 ml), MgSO_4 -on szárítottam. Bepárlás után a terméket IPA/hexán elegyéből kristályosítottam: 0,031 g piszkosfehér por (67 %)

$O_p = 148-150^\circ\text{C}$ (IPA, hexán).

$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 29,9 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): 9,66(s, 1H); 8,63(s, 1H); 7,70(s, 1H); 7,42(d, $^3J_{\text{HH}}=7,6$ Hz, 1H); 7,28(s, 1H); 7,19(d, $^3J_{\text{HH}}=8,4$ Hz, 1H); 7,00-7,20(m, 3H); 6,60-6,70(m, 1H); 5,24(széles s, 2H); 4,11(q, $^3J_{\text{HH}}=6,7$ Hz, 2H); 2,18(s, 3H); 1,89-2,19(m, 2H); 1,23(t, $^3J_{\text{HH}}=6,7$ Hz, 3H); 1,14(dt, $^3J_{\text{PH}}=20,4$ Hz, $^3J_{\text{HH}}=7,4$ Hz, 3H).

LC-MS: $R_t = 2,69$ perc; (ESI): $m/z = 413$ [M + H] $^+$.

5-[[6-(3-Aminofenil)pirimidin-4-il]amino]-2-metilfenil izopropil propilfoszfonát (56b): Az **55b** nitro-foszfonátot (0,094 g, 0,2 mmol) feloldottam 20 ml MeOH és 10 ml

CH₂Cl₂ elegyében, hozzáadtam 0,126 g annónium formiátot (2,0 mmol) és 0,010 g 10 m/m %-os csontszemes palládiumot. A reakcióelegyet argon atmoszférában, szobahőmérsékleten kevertetem éjszakán keresztül. A redukció végeztével a katalizátort kiszűrtem, MeOH-lal mostam, a szűrletet bepároltam. A maradékot telített vizes Na₂CO₃ oldatban felvettem (30 ml), EtOAc-tal extraháltam (3x70 ml). Az egyesített szerves fázisokat telített sós vízzel mostam (50 ml), MgSO₄-on szárítottam. Bepárlás után a termék sósav sóját EtOAc-ból leválasztottam (sósavval telített EtOAc-tal), szűrtem, DEE-rel mostam: 0,060 g sárga por (63 %).

Op= 165°C Dec (EtOAc).

³¹P-NMR (243 MHz): DMSO-d₆; δ: 27,7 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 11,00(s, 1H); 8,82(s, 1H); 7,73(széles s, 2H); 7,20-7,60(m, 7H); 6,00(széles s, 2H); 4,65-4,70(m, 1H); 2,22(s, 3H); 1,89-2,21(m, 2H); 1,60-1,65(m, 2H); 1,27(d, ³J_{HH}=5,6Hz, 3H); 1,18(d, ³J_{HH}=5,6Hz, 3H) 1,14(t, ³J_{HH}=6,8 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 3,08 perc; (ESI): m/z = 441 [M + H]⁺.

Általános recept a 3 és 4-[(6-fenilpirimidin-4-il)amino]fenolok előállításához (59, 60, 62, 63): 50 ml IPA-ban feloldottam 0,60 g **57** vagy **58** amino-fenolt (5,5 mmol) és 1,10 g **6a** avagy 1,18 g **6b** klór-pirimidint (5,0 mmol), hozzáadtam 5 ml HCl-val telített IPA-t, majd az elegyet 1,5-2 óráig refluxáltattam. A kihűlt elegyet bepároltam, telített vizes NaHCO₃-ban (30 ml) szuszpendáltam és EtOAc-tal extraháltam (3x70 ml). Az egyesített szerves fázisokat telített sós vízzel mostam (50 ml), MgSO₄-on szárítottam, bepároltam. A további tisztítási lépéseket, illetve a termeléseket és az anyagok jellemzését lásd külön.

3-[[6-(2-Metoxifenil)pirimidin-4-il]amino]fenol (59): Az általános recept szerint **6a** klór-pirimidin és az **57** anilin reakciójával. Acetonitrilből átkristályosítottam, 0,923 g sárga por (63 %). A publikálttal azonos módon [5].

3-[[6-(3-Nitrofenil)pirimidin-4-il]amino]fenol (60): Az általános recept szerint **6b** klór-pirimidin és az **57** anilin reakciójával. Acetonitrilből átkristályosítottam, 1,17 g sárga por (76 %).

Op= 250-252°C (MeCN).

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 10,31(széles s, 1H); 9,5(széles s, 1H); 8,82(s, 1H); 8,78(s, 1H); 8,43(d, ³J_{HH}=7,8 Hz, 1H); 8,38(d, ³J_{HH}=7,8 Hz, 1H); 7,86(t, ³J_{HH}=7,9 Hz, 1H); 7,58(s, 1H); 7,33(s, 1H); 7,08-7,33(m, 2H); 6,5(d, ³J_{HH}=7,8 Hz, 1H).

LC-MS: R_t = 3,20 perc; (ESI): m/z = 309 [M + H]⁺.

4-{{6-(2-Metoxifenil)pirimidin-4-il}amino}fenol (62): Az általános recept szerint **6a** klór-pirimidin és az **58** anilin reakciójával. Acetonitrilből átkristályosítottam, 0,835 g barna por (57 %).

Op= 249°C (MeCN).

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,29(s, 1H); 9,2(s, 1H); 8,58(s, 1H); 7,91(d, ³J_{HH}=6,6 Hz, 1H); 7,38-7,5(m, 3H); 7,29(s, 1H); 7,15(d, ³J_{HH}=8,3 Hz, 1H); 7,06(t, ³J_{HH}=7,5 Hz, 1H); 6,75(d, J_{AABB}=8,7 Hz, 2H); 3,86(s, 3H).

LC-MS: R_t = 0,45 perc; 1,85 perc; 2,27 perc; (ESI): m/z = 294 [M + H]⁺.

4-{{6-(3-Nitrofenil)pirimidin-4-il}amino}fenol (63): Az általános recept szerint **6b** klór-pirimidin és az **58** anilin reakciójával. Dietil éterből szűrtem, 1,263 g sárga por (82 %).

Op= 242-243°C (DEE).

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,49(széles s, 2H); 8,79(s, 1H); 8,66(s, 1H); 8,41(d, ³J_{HH}=6,3 Hz, 1H); 8,34(d, ³J_{HH}=7,4 Hz, 1H); 7,82(t, ³J_{HH}=7,5 Hz, 1H); 7,41(d, J_{AABB}=7,0 Hz, 2H); 7,22(s, 1H); 6,77(d, J_{AABB}=7,5 Hz, 2H).

LC-MS: R_t = 2,85 perc; (ESI): m/z = 309 [M + H]⁺.

Általános recept a fenolok és foszfonátok nitro csoportjának redukciójához: A nitro vegyületet és 4 mólekvalens SnCl₂-ot etanolban (annyi, amennyi a nitro vegyületet feloldja) refluxoltattam 4-6 órán keresztül. Az elegyet bepároltam, majd 2 M vizes NaOH oldatban szuszpendáltam. A csapadékot szűrtem, EtOAc-tal mostam; a szűrletet EtOAc-tal extraháltam (3x). Az egyesített szerves fázisokat telített sós vízzel mostam, MgSO₄-on szárítottam, bepároltam. A tiszta amint minimális mennyiségű EtOH-ban feloldottam, sósavval telített dioxánnal leválasztottam a sósav sóját, bepároltam, toluolt lepároltam róla, végül dietil éterben szuszpendáltam és szűrtem. A termeléseket és az anyagok jellemzését lásd külön.

3-[[6-(3-Aminofenil)pirimidin-4-il]amino]fenol (61): A **60** nitro vegyület (0,050 g, 0,16 mmol) redukciója, sötétbarna por, termelés: 0,036 g (72 %).

O_p = 150-151°C (DEE).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO-d₆; δ (ppm): 9,48(s, 1H); 9,36(s, 1H); 8,65(s, 1H); 7,27(s, 1H); 7,26(s, 1H); 7,00-7,21(m, 5H); 6,68(d, $^3J_{\text{HH}}=6,8$ Hz; 1H); 6,64(d, $^3J_{\text{HH}}=7,7$ Hz; 1H); 5,60(széles s, 2H).

LC-MS: R_t = 0,47 perc; 2,00 perc; (ESI): m/z = 279 [M + H]⁺.

4-[[6-(3-Aminofenil)pirimidin-4-il]amino]fenol (64): A **63** nitro vegyület (0,050 g, 0,16 mmol) redukciója, sötétbarna por, termelés: 0,025 g (50 %).

O_p = 228-230°C (DEE).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO-d₆; δ (ppm): 9,40(s, 1H); 9,34(s, 1H); 8,56(s, 1H); 7,38(d, $J_{\text{AABB}}=8,6$ Hz, 2H); 7,30(s, 1H); 7,04-7,17(m, 2H); 6,97(s, 1H); 6,76(d, $J_{\text{AABB}}=8,7$ Hz, 2H); 6,68(d, $^3J_{\text{HH}}=7,3$ Hz, 1H); 5,50(széles s, 2H).

LC-MS: R_t = 0,46 perc és 1,86 perc; (ESI): m/z = 279 [M + H]⁺.

Etil 3-[[6-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]amino]fenil etilfoszfonát (65a): A foszfonátok előállításának általános receptje alapján 0,060 g **59** fenol (0,2 mmol) és 0,047 g **46** foszfonsav klorid (0,3 mmol) reakciójával. A terméket preparatív VRK lapon tisztítottam, eluens: 100 % EtOAc. A termék 0,049 g (59 %) alacsony olvadáspontú világosbarna anyag.

O_p = ~szobahőmérséklet.

$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz): DMSO-d₆; δ : 33,0 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO-d₆; δ (ppm): 9,77(s, 1H), 8,72(s, 1H), 7,96(dd, $^3J_{\text{HH}}=7,7$ Hz, $^4J_{\text{HH}}=1,7$ Hz, 1H); 7,73(s, 1H); 7,53(d, $^3J_{\text{HH}}=8,3$ Hz, 1H); 7,48(s, 1H); 7,47(dt, $^3J_{\text{HH}}=8,4$ Hz, $^4J_{\text{HH}}=1,8$ Hz, 1H); 7,32(t, $^3J_{\text{HH}}=8,3$ Hz, 1H); 7,19(d, $^3J_{\text{HH}}=8,3$ Hz, 1H); 7,08(t, $^3J_{\text{HH}}=7,4$ Hz, 1H); 6,83(d, $^3J_{\text{HH}}=8,1$ Hz, 1H); 4,09-4,20(m, 2H); 3,91(s, 3H); 1,86-2,00(m, 2H); 1,26(t, $^3J_{\text{HH}}=7,0$ Hz, 3H); 1,13(dt, $^3J_{\text{PH}}=20,4$ Hz, $^3J_{\text{HH}}=7,6$ Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 2,77 perc; (ESI): m/z = 414 [M + H]⁺.

Izopropil 3-[[6-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]amino]fenil propilfoszfonát (65b): A foszfonátok előállításának általános receptje alapján 0,060 g **59** fenol (0,2 mmol) és

0,055 g **41** foszfonsav klorid (0,3 mmol) reakciójával. A terméket preparatív VRK lapon tisztítottam, eluens: 100 % EtOAc. A termék 0,058 g (66 %) alacsony olvadáspontú világosbarna anyag.

O_p = ~szobahőmérséklet.

$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 30,3 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): 9,76(s, 1H); 8,71(s, 1H); 7,96(dd, $^3J_{\text{HH}}=7,7$ Hz, $^4J_{\text{HH}}=1,6$ Hz, 1H); 7,73(s, 1H); 7,43-7,54(m, 2H); 7,48(s, 1H); 7,32(t, $^3J_{\text{HH}}=8,2$ Hz, 1H); 7,19(d, $^3J_{\text{HH}}=8,3$ Hz, 1H); 7,08(t, $^3J_{\text{HH}}=7,4$ Hz, 1H); 6,83(d, $^3J_{\text{HH}}=8,0$ Hz, 1H); 4,65-4,77(m, 1H); 3,91(s, 3H); 1,83-1,93(m, 2H), 1,54-1,67(m, 2H); 1,28(d, $^3J_{\text{HH}}=6,2$ Hz, 3H); 1,22(d, $^3J_{\text{HH}}=6,2$ Hz, 3H); 1,00(t, $^3J_{\text{HH}}=7,2$ Hz, $^4J_{\text{PH}}=1,0$ Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 3,16 perc; (ESI): m/z = 442 [M + H] $^+$.

Etil 3-[[6-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]amino}fenil fenilfoszfonát (65c): A foszfonátok előállításának általános receptje alapján 0,060 g **59** fenol (0,2 mmol) és 0,061 g **48** foszfonsav klorid (0,3 mmol). A terméket preparatív VRK lapon tisztítottam, eluens: EtOAc:hexán=1:1. A termék 0,037 g (40 %) alacsony olvadáspontú világosbarna anyag.

O_p = ~szobahőmérséklet.

$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 17,1 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): 9,75(s, 1H); 8,68(s, 1H), 7,95(dd, $^3J_{\text{HH}}=7,5$ Hz, $^4J_{\text{HH}}=1,3$ Hz, 1H); 7,84(dd, $^3J_{\text{PH}}=13,5$ Hz, $^3J_{\text{HH}}=7,2$ Hz; 2H); 7,75(s, 1H) ; 7,65-7,71(m, 1H), 7,55-7,62(m, 2H); 7,4-7,5(m, 2H); 7,45(s, 1H); 7,28(t, $^3J_{\text{HH}}=8,1$ Hz, 1H); 7,18(d, $^3J_{\text{HH}}=8,1$ Hz, 1H); 7,08(t, $^3J_{\text{HH}}=7,3$ Hz, 1H); 6,79(d, $^3J_{\text{HH}}=8,1$ Hz, 1H); 4,15-4,25(m, 2H); 3,90(s, 3H); 1,29(t, $^3J_{\text{HH}}=7,2$ Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 3,14 perc; (ESI): m/z = 462 [M + H] $^+$.

Etil 3-[[6-(3-nitrofenil)pirimidin-4-il]amino}fenil etilfoszfonát (66a): A foszfonátok előállításának általános receptje alapján 0,090 g **60** fenol (0,29 mmol) és 0,068 g **46** foszfonsav klorid (0,44 mmol) reakciója. A terméket acetonitrilből átkristályosítottam: 0,075 g (60 %) sárga por.

O_p = 142-144 °C (MeCN).

³¹P-NMR (243 MHz): DMSO-d₆; δ: 33,0 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,96(s, 1H), 8,83(s, 1H); 8,80(s, 1H); 8,47(d, ³J_{HH}=7,7 Hz, 1H); 8,37(d, ³J_{HH}=8,0 Hz, 1H); 7,85(t, ³J_{HH}=8,0 Hz, 1H); 7,75(s, 1H); 7,53(d, ³J_{HH}=7,7 Hz, 1H); 7,41(s, 1H); 7,35(t, ³J_{HH}=8,1 Hz, 1H); 6,87(d, ³J_{HH}=7,7 Hz, 1H); 4,08-4,2(m, 2H); 1,87-2,01(m, 2H); 1,26(t, ³J_{HH}= 7,0 Hz, 3H); 1,13(dt, ³J_{PH}=20,5 Hz, ³J_{HH}=7,6 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 3,79 perc; (ESI): m/z = 429 [M + H]⁺.

Izopropil 3-[[6-(3-nitrofenil)pirimidin-4-il]amino}fenil propilfoszfonát (66b): A foszfonátok előállításának általános receptje alapján 0,090 g **60** fenol (0,29 mmol) és 0,081 g **41** foszfonsav klorid (0,44 mmol). A terméket acetonitrilből átkristályosítottam: 0,057 g (60 %) sárga por.

O_p= 163-164 °C (MeCN).

³¹P-NMR (243 MHz): DMSO-d₆; δ: 27,4 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 10,04(s, 1H); 8,84(s, 1H), 8,79(s, 1H); 8,47(d, ³J_{HH}=7,5 Hz, 1H); 8,37(d, ³J_{HH}=8,1 Hz, 1H); 7,85(t, ³J_{HH}=8,0 Hz, 1H); 7,76(s, 1H); 7,53(d, ³J_{HH}=8,1 Hz, 1H); 7,44(s, 1H); 7,34(t, ³J_{HH}=8,1 Hz, 1H); 6,86(d, ³J_{HH}=7,8 Hz, 1H); 4,68-4,75(m, 1H); 1,84-1,96(m, 2H); 1,57-1,65(m, 2H); 1,28(d, ³J_{HH}=6,0 Hz, 3H); 1,22(d, ³J_{HH}=6,0 Hz, 3H); 1,00(t, ³J_{HH}=7,1 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 4,28 perc; (ESI): m/z = 457 [M + H]⁺.

Étil 3-[[6-(3-nitrofenil)pirimidin-4-il]amino}fenil fenilfoszfonát (66c): A foszfonátok előállításának általános receptje alapján 0,102 g **60** fenol (0,33 mmol) és 0,102 g **48** foszfonsav klorid (0,54 mmol). A terméket acetonitrilből átkristályosítottam: 0,083 g (53 %) drapp por.

O_p= 162-164 °C (MeCN).

³¹P-NMR (243 MHz): DMSO-d₆; δ: 17,2 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,94(s, 1H), 8,83(s, 1H), 8,77(s, 1H); 8,42(dd, ³J_{PH}=27,2 Hz, ³J_{HH}=7,1 Hz, 2H); 7,80-7,90(m, 3H); 7,76(s, 1H); 7,65-7,7(m, 1H), 7,55-7,65(m, 2H), 7,47(d, ³J_{HH}=7,2 Hz, 1H); 7,38(s, 1H), 7,31(t, ³J_{HH}=7,5 Hz, 1H); 6,82(d, ³J_{HH}=7,4 Hz, 1H); 4,18-4,24(m, 2H); 1,29(t, ³J_{HH}=6,2 Hz, 3H).

LC-MS: $R_t = 4,28$ perc; (ESI): $m/z = 457 [M + H]^+$.

Etil 3-[[6-(3-aminofenil)pirimidin-4-il]amino}fenil etilfoszfonát (67a): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján 0,055 g **66a** nitro vegyület (0,13 mmol) redukciója. Termelés: 0,042 g sárga por (74 %).

$O_p = 205-206$ °C (DEE).

$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 33,1 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): 10,94(s, 1H), 8,85(s, 1H); 7,77(s, 1H); 7,73(széles s, 2H); 7,55-7,62(m, 2H), 7,36-7,42(m, 2H); 7,39(s, 1H); 6,96(d, $^3J_{\text{HH}}=8,1$ Hz, 1H); 5,50(széles s, 2H); 4,05-4,21(m, 2H); 1,90-1,99(m, 2H); 1,26(t, $^3J_{\text{HH}}=7,0$ Hz, 3H); 1,13(dt, $^3J_{\text{PH}}=20,5$ Hz, $^3J_{\text{HH}}=7,7$ Hz, 3H).

LC-MS: $R_t = 0,43$ perc; 2,48 perc; 2,57 perc; (ESI): $m/z = 399 [M + H]^+$.

Izopropil 3-[[6-(3-aminofenil)pirimidin-4-il]amino}fenil propilfoszfonát (67b): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján 0,133 g **66b** nitro vegyület (0,29 mmol) redukciója. Termelés: 0,109 g zöldessárga por (81 %).

$O_p = 148-150$ °C (DEE).

$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 30,4 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): 10,35(s, 1H); 8,72(s, 1H); 7,70(s, 1H); 7,30-7,60(m, 3H); 7,20-7,30(m, 3H); 7,06(széles s, 1H); 6,84(széles s, 1H); 4,67(széles s, 1H); 3,70(széles s, 2H₂); 1,75-1,90(m, 2H); 1,50-1,60(m, 2H), 1,24(s, 3H); 1,19(s, 3H); 0,96(széles s, 3H).

LC-MS: $R_t = 3,00$ perc; (ESI): $m/z = 427 [M + H]^+$.

Etil 3-[[6-(3-aminofenil)pirimidin-4-il]amino}fenil fenilfoszfonát (67c): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján 0,065 g **66c** nitro vegyület (0,14 mmol) redukciója. Termelés: 0,051 g sárga por (76 %).

$O_p = 214-215$ °C (DEE).

$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 17,3 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 10,89(s, 1H), 8,82(s, 1H); 7,50-7,90(m, 10H); 7,30-7,50(m, 3H); 6,91(d, ³J_{HH}=7,8 Hz, 1H); 5,40(széles s, 2H); 4,15-4,26(m, 2H); 1,29(t, ³J_{HH}=6,9 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 2,96 perc; (ESI): m/z = 447 [M + H]⁺.

Etil 4-{{6-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il}amino}fenil etilfoszfonát (68a): A foszfonátok előállításának általános receptje alapján 0,033 g **59** fenol (0,11 mmol) és 0,06 g **46** foszfonsav klorid (0,17 mmol) reakciója. A terméket preparatív VRK lapon tisztítottam, eluens: 100 % EtOAc. A termék 0,022 g (48 %) alacsony olvadáspontú világosbarna anyag.

Op= ~szobahőmérséklet.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,64(s, 1H); 8,67(s, 1H); 7,95(dd, ³J_{HH}=7,6 Hz, ⁴J_{HH}=1,5 Hz, 1H); 7,69(d, J_{AABB}=8,8 Hz, 2H); 7,45(dt, ³J_{HH}=8,6 Hz, ⁴J_{HH}=1,5 Hz, 1H); 7,42(s, 1H); 7,18(d, J_{AABB}=8,3 Hz, 2H); 7,17(d, ³J_{HH}=7,8 Hz, 1H); 7,08(t, ³J_{HH}=7,5 Hz, 1H); 4,04-4,16(m, 2H); 3,90(s, 3H); 1,83-1,98(m, 2H); 1,24(t, ³J_{HH}=7,0 Hz, 3H); 1,11(dt, ³J_{PH}=20,3 Hz, ³J_{HH}=7,6 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 2,70 perc; (ESI): m/z = 414 [M + H]⁺.

Izopropil 4-{{6-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il}amino}fenil propilfoszfonát (68b): A foszfonátok előállításának általános receptje alapján 0,100 g **59** fenol (0,34 mmol) és 0,094 g foszfonsav klorid **41** (0,51 mmol) reakciója. A terméket preparatív VRK lapon tisztítottam, eluens: 100 % EtOAc. A termék 0,020 g (13 %) sárg por.

Op= 119-121 °C (CH₂Cl₂).

³¹P-NMR (243 MHz): DMSO-d₆; δ: 30,6 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,63(s, 1H); 8,67(s, 1H); 7,95(d, ³J_{HH}=6,8 Hz, 1H); 7,69(J_{AABB}=7,4 Hz, 2H); 7,35-7,50(m, 2H); 7,15-7,18(m, 3H); 7,05-7,13(m, 1H); 4,60-4,70(m, 1H); 3,9(s, 3H); 1,81-1,90(m, 2H); 1,49-1,70(m, 2H); 1,27(d, ³J_{HH}=5,1 Hz, 3H); 1,20(d, ³J_{HH}=5,1 Hz, 3H); 0,99(t, ³J_{HH}=6,6 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 3,07 perc; (ESI): m/z = 442 [M + H]⁺.

Etil 4-{{6-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il}amino}fenil fenilfoszfonát (68c): A foszfonátok előállításának általános receptje alapján 0,033 g **59** fenol (0,11 mmol) és

0,035 g **48** foszfonsav klorid (0,17 mmol). A terméket preparatív VRK lapon tisztítottam, eluens: EtOAc:hexán=1:1. A termék 0,041 g (81 %) alacsony olvadáspontú világosbarna anyag.

O_p = ~szobahőmérséklet.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): 9,63(s, 1H), 8,66(s, 1H); 7,94(dd, $^3J_{\text{HH}}=7,7$ Hz, $^4J_{\text{HH}}=1,2$ Hz, 1H); 7,82(dd, $^3J_{\text{PH}}=13,3$ Hz, $^3J_{\text{HH}}=7,1$ Hz, 2H); 7,60-7,75(m, 3H); 7,50-7,60(m, 2H); 7,45(t, $^3J_{\text{HH}}=7,8$ Hz, 1H); 7,40(s, 1H); 7,17(d, $^3J_{\text{HH}}=8,3$ Hz, 1H); 7,13(d, $J_{\text{AABB}}=8,5$ Hz, 2H); 7,07(t, $^3J_{\text{HH}}=7,6$ Hz, 1H); 4,13-4,22(m, 2H); 3,88(s, 3H); 1,27(t, $^3J_{\text{HH}}=7,0$ Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 3,06 perc; (ESI): m/z = 462 [M + H] $^+$.

Etil 4-[[6-(3-nitrofenil)pirimidin-4-il]amino]fenil etilfoszfonát (69a): A foszfonátok előállításának általános receptje alapján 0,150 g **60** fenol (0,49 mmol) és 0,115 g **46** foszfonsav klorid (0,74 mmol) reakciója. A terméket acetonitrilből átkristályosítottam: 0,085 g (41 %) sárga por.

O_p = 187 °C (MeCN).

$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 33,2 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): 9,81(s, 1H); 8,86(s, 1H); 8,75(s, 1H); 8,45(d, $^3J_{\text{HH}}=7,8$ Hz, 1H); 8,36(d, $^3J_{\text{HH}}=8,1$ Hz, 1H); 7,84(t, $^3J_{\text{HH}}=8,0$ Hz, 1H); 7,71(d, $J_{\text{AABB}}=8,8$ Hz, 2H); 7,34(s, 1H); 7,19(d, $J_{\text{AABB}}=8,5$ Hz, 2H); 4,04-4,19(m, 2H); 1,90(dq, $^3J_{\text{PH}}=7,6$ Hz, $^3J_{\text{HH}}=7,6$ Hz, 2H); 1,25(t, $^3J_{\text{HH}}=7,0$ Hz, 3H); 1,12(dt, $^3J_{\text{PH}}=20,4$ Hz, $^3J_{\text{HH}}=7,6$ Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 3,63 perc; (ESI): m/z = 429 [M + H] $^+$.

Izopropil 4-[[6-(3-nitrofenil)pirimidin-4-il]amino]fenil propilfoszfonát (69b): A foszfonátok előállításának általános receptje alapján 0,154 g **60** fenol (0,50 mmol) és 0,138 g **41** foszfonsav klorid (0,75 mmol) reakciója. A terméket acetonitrilből átkristályosítottam: 0,029 g (12 %) krémszínű por.

O_p = 187 °C (MeCN).

$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 27,6 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,86(s, 1H), 8,82(s, 1H); 8,75(s, 1H); 8,45(d, ³J_{HH}=7,3 Hz, 1H); 8,36(d, ³J_{HH}=7,6 Hz, 1H); 7,84(t, ³J_{HH}=8,0 Hz, 1H); 7,71(d, J_{AABB}=8,1 Hz, 2H); 7,36(s, 1H); 7,18(d, J_{AABB}=8,1 Hz, 2H); 4,60-4,70(m, 1H), 1,81-1,93(m, 2H); 1,55-1,63(m, 2H); 1,27(d, ³J_{HH}=5,8 Hz, 3H); 1,20(d, ³J_{HH}=5,7 Hz, 3H); 1,00(t, ³J_{HH}=6,6 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 4,20 perc; (ESI): m/z = 457 [M + H]⁺.

Etil 4-{{6-(3-aminofenil)pirimidin-4-il}amino}fenil etilfoszfonát (70a): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján 0,067 g **69a** nitro vegyület (0,16 mmol) redukciója. Termelés: 0,043 g sárga por (62 %).

O_p= 207-209 °C (DEE).

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,63(s, 1H); 8,64(s, 1H); 7,68(d, J_{AABB}=8,7 Hz, 2H); 7,28(s, 1H), 7,09-7,19(m, 5H); 6,68(d, ³J_{HH}=6,4 Hz, 1H); 5,26(széles s, 2H), 4,40-4,17(m, 2H); 1,83-1,98(m, 2H); 1,24(t, ³J_{HH}=7,05 Hz, 3H); 1,11(dt, ³J_{PH}=12,7 Hz, ³J_{HH}=7,6 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 0,43 perc 2,28 perc; 2,47 perc; (ESI): m/z = 399 [M + H]⁺.

Izopropil 4-{{6-(3-aminofenil)pirimidin-4-il}amino}fenil propilfoszfonát (70b): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján 0,076 g **69b** nitro vegyület (0,17 mmol) redukciója. Termelés: 0,016 g sárga por (21 %).

O_p= 150-160 °C (DEE).

³¹P-NMR (243 MHz): DMSO-d₆; δ: 27,6 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,62(s, 1H), 8,64(s, 1H); 7,68(d, J_{AABB}=8,9 Hz, 2H); 7,28(s, 1H); 7,12-7,23(m, 4H); 7,09(s, 1H, H12); 6,68(d, ³J_{HH}=5,6 Hz, 1H); 5,26(széles s, 2H), 4,64-4,71(m, 1H), 1,81-1,9(m, 2H), 1,58-1,63(m, 2H), 1,27(d, ³J_{HH}=6,2 Hz, 3H); 1,20(d, ³J_{HH}=6,2 Hz, 3H); 1,00(t, ³J_{HH}=6,3 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 2,78 perc (ESI): m/z = 427 [M + H]⁺.

5-{{6-(2-Metoxifenil)pirimidin-4-il}amino}-2-metilfenil hidrogén etilfoszfonát (71a): Vízmentes acetonban (20 ml) feloldottam 0,179 g trimetilszilil kloridot (0,21 ml, 1,65 mmol) és 0,274 g kálium jodidot (1,65 mmol). Az elegyet fél órán keresztül keverttem szobahőmérsékleten, majd hozzáadtam az **54a** etil etilfoszfonát (0,235 g,

0,55 mmol) acetonos oldatát (30 ml). Az addíció után a reakcióelegyet 20 órán keresztül refluxáltattam, majd bepároltam. A bepárlási maradékot telített vizes ammónium klorid oldatban szuszpendáltam és hozzáadtam 0,5 ml EtOAc-ot. A szuszpenziót egy órán keresztül kevertetem szobahőmérsékleten, majd szűrtem és dietil éterrel mostam. Az így preparált tiszta termék 0,154 g sárga por volt (70 %).

$O_p = 240-242$ °C (víz).

$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 26,9 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; 110 °C, δ (ppm): 10,02(széles s, 1H); 8,71(s, 1H); 7,85(d, $^3J_{\text{HH}}=7,8$ Hz, 1H); 7,61(s, 1H); 7,40-7,55(m, 3H); 7,41(s, 1H); 7,2(d, $^3J_{\text{HH}}=7,4$ Hz, 1H); 7,11(t, $^3J_{\text{HH}}=7,4$ Hz, 1H); 4,89(széles s, 1H); 3,91(s, 3H); 2,24(s, 3H); 1,77-1,92(m, 2H); 1,17(dt, $^3J_{\text{PH}}=19,9$ Hz, $^3J_{\text{HH}}=7,6$ Hz, 3H).

LC-MS: $R_t = 2,43$ perc; (ESI): $m/z = 400$ [M + H] $^+$.

5-[[6-(2-Metoxifenil)pirimidin-4-il]amino]-2-metilfenil hidrogén propilfoszfonát (71b): A hidrolízis a **71a**-nál leírt módszer szerint végeztem **54b** izopropil propilfoszfonátból (0,05 g, 0,11 mmol). Ez esetben az izolált termék 0,036 g barna por volt (79 %).

$O_p = 170$ °C (víz).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 26,6 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): 10,48(széles s, 1H); 8,81(s, 1H); 7,78(d, $^3J_{\text{HH}}=7,4$ Hz, 1H); 7,57(s, 1H); 7,56(t, $^3J_{\text{HH}}=7,5$ Hz, 1H); 7,49(d, $^3J_{\text{HH}}=8,2$ Hz, 1H); 7,32(s, 1H); 7,25(d, $^3J_{\text{HH}}=8,4$ Hz, 1H); 7,24(d, $^3J_{\text{HH}}=8,6$ Hz, 1H); 7,14(t, $^3J_{\text{HH}}=7,5$ Hz, 1H); 3,50(s, 1H); 3,90(s, 3H); 2,21(s, 3H); 1,77-1,86(m, 2H); 1,58-1,67(m, 2H); 1,01(t, $^3J_{\text{HH}}=7,1$ Hz, 3H).

LC-MS: $R_t = 2,53$ perc; (ESI): $m/z = 414$ [M + H] $^+$.

6.5. Foszfínát tartalmú inhibitorok előállítása (Ar-CH₂-P)

Dietil [hidroxi(3-nitrofenil)metil]foszfonát (72): Toluolban (50 ml) feloldottam 7,55 g 3-nitro-benzaldehidet (50 mmol), 7,59 g dietil foszfitot (55 mmol) és 5,56 g trietilamint (55 mmol), majd az elegyet egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten kevertetem. Az elegyhez vizet (50 ml) adtam, majd elválasztás után a szerves fázist 1 M-os vizes sósav

oldattal mostam (50 ml). Az egyesített vizes fázisokat toluollal extraháltam (1x30 ml). Az egyesített szerves fázisokat telített sós vízzel mostam (50 ml), MgSO₄-on szárítottam. Bepárlás után a nyers terméket toluolból átkristályosítottam, szűrés után dietil éterrel mostam. 11,04 g (76 %) halványsárga port preparáltam.

O_p= 92 °C (toluol).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 19,8 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 8,28(d, ⁴J_{HH}=1,6 Hz, 1H); 8,14(d, ³J_{HH}=8,0 Hz, 1H), 7,86(d, ³J_{HH}=7,5 Hz, 1H); 7,65(t, ³J_{HH}=7,9 Hz, 1H); 6,52(dd, ³J_{PH}=14,5 Hz, ³J_{HH}=5,9 Hz, 1H); 5,2(dd, ²J_{PH}=14,1 Hz, ³J_{HH}=5,9 Hz, 1H); 3,90-4,04(m, 4H); 1,16(t, ³J_{HH}=7,0 Hz, 6H).

LC-MS: R_t = 2,83 perc; (ESI): m/z = 290 [M + H]⁺.

Dietil [(3-aminofenil)(hidroxi)metil]foszfonát (73): Metanolban (100 ml) feloldottam 1,445 g dietil [hidroxi(3-nitrofenil)metil]foszfonátot (**72**, 5 mmol) és 3,150 g ammónium formiátot (50 mmol). Az elegyhez Ar-atmoszféra alatt hozzáadtam 0,145 g 10 m/m %-os csontszénés palládiumot. Az elegyet egy nap intenzív kevertetés után celliten szűrtem, kevés metanollal mostam, majd a szűrletet bepároltam. A bepárlási maradékot telített vizes Na₂CO₃-ban felvettem (50 ml), EtOAc-tal extraháltam (3x50 ml). Az egyesített szerves fázisokat telített sós vízzel mostam (100 ml), MgSO₄-on szárítottam. Bepárlás után a várt terméket sárga olajként izoláltam (0,936 g, 72 %).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 21,1 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 6,93(t, ³J_{HH}=7,7 Hz, 1H); 6,65(d, ⁴J_{HH}=1,5 Hz, 1H), 6,54(d, ³J_{HH}=7,3 Hz, 1H); 6,44(d, ³J_{HH}=7,8 Hz, 1H); 5,92(dd, ³J_{PH}=16,7 Hz, ³J_{HH}=5,5 Hz, 1H); 5,00(széles s, 2H); 4,7(dd, ²J_{PH}=13,1 Hz, ³J_{HH}=5,5 Hz, 1H); 3,82-3,99(m, 4H); 1,15(dt, ³J_{HH}=7,0 Hz, ⁴J_{PH}=10,6 Hz, 6H).

LC-MS: R_t = 0,48 perc; 1,49 perc; 2,18 perc; (ESI): m/z = 260 [M + H]⁺.

(Dietoxifoszforil)(3-nitrofenil)metil metánszulfonát (74): THF-ben (25 ml) feloldottam 1,445 g dietil [hidroxi(3-nitrofenil)metil]foszfonátot (**72**, 5 mmol) és 0,606 g trietilamint (0,83 ml, 6 mmol), az elegyet 0 °C-ra hűtöttem és hozzáadtam 0,63 g metánszulfonsav kloridot (0,43 ml, 5,5 mmol). A reakcióelegyet 2 órán keresztül kevertettem szobahőmérsékleten, majd bepároltam. A bepárlási maradékot víz és

EtOAc között megosztottam (50-50 ml), majd a vizes fázist EtOAc-tal extraháltam (2x50 ml). Az egyesített szerves fázisokat 1 M vizes sósav (50 ml), telített vizes NaHCO₃ (50 ml) oladatokkal és telített sós vízzel (50 ml) mostam, MgSO₄-on szárítottam. Bepárlás után a tiszta terméket dietil éterből szűrtem ki; 1,343 g (73 %) fehér por.

O_p= 81-82 °C (DEE).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 13,2 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 8,33(s, 1H); 8,25(d, ³J_{HH}=8,0 Hz, 1H), 7,93(d, ³J_{HH}=7,4 Hz, 1H); 7,75(t, ³J_{HH}=8,0 Hz, 1H); 6,35(d, ²J_{PH}=15,9 Hz); 3,96-4,14(m, 4H); 3,22(s, 3H); 1,18(dt, ³J_{HH}=7,0 Hz, ⁴J_{PH}=10,0 Hz, 6H).

LC-MS: R_t = 3,33 perc; (ESI): m/z = 368 [M + H]⁺.

Dietil (3-aminobenzil)foszfonát (75): Metanolban (20 ml) feloldottam 0,367 g (Dietoxifoszforil)(3-nitrofenil)metil metánszulfonátot (**74**, 1 mmol), majd az elegyhez Ar-atmoszféra alatt hozzáadtam 0,037 g 10 m/m %-os csontszénés palládiumot. Végül belecsepegtettem 2 ml 70 %-os hidrazin hidrátot. Az elegyet egy nap intenzív kevertetés után celliten szűrtem, kevés metanollal mostam, majd a szűrletet bepárooltam. A bepárlási maradékot telített vizes NaHCO₃-ban felvettem (20 ml), EtOAc-tal extraháltam (3x20 ml). Az egyesített szerves fázisokat telített sós vízzel mostam (30 ml), MgSO₄-on szárítottam. Bepárlás után a várt terméket halványsárga olajként izoláltam (0,190 g, 78 %).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 25,5 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 8,20(széles s, 2H); 7,17(t, ³J_{HH}=7,7 Hz, 1H); 6,81-6,88(m, 3H); 3,93(dq, ³J_{PH}≈³J_{HH}=7,1 Hz, 4H); 3,14(d, ²J_{PH}=21,6 Hz, 2H); 1,16(t, ³J_{HH}=7,0 Hz, 6H).

LC-MS: R_t = 0,46 perc; 1,89 perc; (ESI): m/z = 244 [M + H]⁺.

Dietil [hidroxi(4-nitrofenil)metil]foszfonát (76): A **72**-es meta helyzetű származéknál leírtakkal azonos módon 7,55 g 4-nitro-benzaldehidből (50 mmol) kiindulva hajtottam végre a reakciót. A reakcióelegy fent leírtak szerinti feldolgozása után a terméket dietil éterből kristályosítottam, 8,67 g (60 %) halványsárga port preparáltam.

$O_p = 88-90\text{ }^\circ\text{C}$ (DEE).

$^{31}\text{P-NMR}$ (242 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 19,4 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): 8,21(d, $J_{\text{AABB}}=8,6\text{ Hz}$, 2H); 7,68(dd, $J_{\text{AABB}}=8,9\text{ Hz}$, $J=2,2\text{ Hz}$, 2H); 6,50(dd, $^4J_{\text{PH}}=14,6\text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}}=5,7\text{ Hz}$, 1H); 5,18(dd, $^2J_{\text{PH}}=15,4\text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}}=5,7\text{ Hz}$); 3,90-4,05(m, 4H); 1,16(dt, $^3J_{\text{HH}}=7,0\text{ Hz}$, $J=3,0\text{ Hz}$, 6H).

LC-MS: $R_t = 2,84$ perc; (ESI): $m/z = 290$ [M + H] $^+$.

Dietil [(4-aminofenil)(hidroxi)metil]foszfonát (77): A reakciót a **73**-as meta helyzetű származéknál leírtakkal azonos módon hajtottam végre 1,50 g dietil [hidroxi(4-nitrofenil)metil]foszfonátból (**76**, 5,19 mmol) kiindulva. A tiszta terméket dietil éterből szűrve sárga porként izoláltam (1,16 g, 86 %).

$O_p = 157-158\text{ }^\circ\text{C}$ (DEE).

$^{31}\text{P-NMR}$ (242 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 21,8 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): 7,07(dd, $J_{\text{AABB}}=8,3\text{ Hz}$, $J=1,7\text{ Hz}$, 2H); 6,50(d, $J_{\text{AABB}}=8,3\text{ Hz}$, 2H); 5,80(széles s, 1H); 5,03(széles s, 2H); 4,66(d, $^2J_{\text{PH}}=11,7\text{ Hz}$); 3,90-4,01(m, $^3J_{\text{HH}}=7,2\text{ Hz}$, 2H); 3,70-3,90(m, $^3J_{\text{HH}}=7,2\text{ Hz}$, 2H); 1,18(t, $^3J_{\text{HH}}=7,0\text{ Hz}$, 3H); 1,11(t, $^3J_{\text{HH}}=7,0\text{ Hz}$, 3H).

LC-MS: elbomlik, $R_t = 0,45$ perc; (ESI): $m/z = 242$ [M – H₂O + H] $^+$.

(Dietoxifoszforil)(4-nitrofenil)metil metánszulfonát (78): A **74**-es meta helyzetű származéknál leírtakkal azonos módon 1,445 g dietil [hidroxi(4-nitrofenil)metil]foszfonátból (**76**, 5 mmol) kiindulva hajtottam végre a reakciót. 0,954 g halványsárga port izoláltam (52 %).

$O_p = 79-80\text{ }^\circ\text{C}$ (DEE).

$^{31}\text{P-NMR}$ (242 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 12,9 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): 8,28(d, $J_{\text{AABB}}=8,7\text{ Hz}$, 2H); 7,74(dd, $J_{\text{AABB}}=8,8\text{ Hz}$, $J=2,0\text{ Hz}$, 2H); 6,33(d, $^2J_{\text{PH}}=16,7\text{ Hz}$, 1H); 3,96-4,12(m, 4H); 3,23(s, 3H, H8); 1,18(dt, $^3J_{\text{HH}}=7,0\text{ Hz}$, $J=4,2\text{ Hz}$, 6H).

LC-MS: $R_t = 3,34$ perc; (ESI): $m/z = 368$ [M + H] $^+$.

Dietil (4-aminobenzil)foszfonát (79): A **75**-ös meta helyzetű származéknál leírtakkal azonos módon, kétszeres mennyiségű 0,734 g (dietoxifoszforil)(4-nitrofenil)metil metánszulfonátból (**78**, 2 mmol) kiindulva hajtottam végre a reakciót. Bepárlás után a várt terméket kaptam 0,456 g fehér por formájában (94 %).

Op= 90-91 °C (EtOAc).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 26,7 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 6,90(dd, $J_{\text{AABB}}=8,3$ Hz, $J=2,2$ Hz 2H); 6,49(d, $J_{\text{AABB}}=8,3$ Hz, 2H); 4,92(széles s, 2H); 3,90(dq, $^3J_{\text{PH}}=7,3$ Hz, $^3J_{\text{HH}}=7,2$ Hz, 4H); 2,97(d, $^2J_{\text{PH}}=20,6$ Hz, 2H); 1,16(t, $^3J_{\text{HH}}=7,0$ Hz, 6H).

LC-MS: $R_t = 0,45$ perc; 1,69 perc; (ESI): $m/z = 244$ [M + H]⁺.

Etil 2-metil-5-nitrobenzoát (80): Vízmentes etanolban (200 ml) feloldottam 5,000 g 2-metil-5-nitro-benzoésavat (27,6 mmol) és 2 ml 98 %-os kénsavat. Az elegyet egy nap forralás után bepároltam. A bepárlási maradékot EtOAc-ban feloldottam (200 ml) és 1 M vizes NaOH oldattal (2x50 ml) és telített sóoldattal mostam, MgSO₄-on szárítottam. Bepárlás után a tiszta terméket kaptam; 4,978 g sárga kristály (86 %). A NaOH-os fázisokból savanyítás után visszanyerhető a reagálatlan 2-metil-5-nitro-benzoésav, kb. 0,5 g.

¹H-NMR (400 MHz): CDCl₃; δ(ppm): 8,75(d, $^4J_{\text{HH}}=2,5$ Hz, 1H); 8,23(dd, $^3J_{\text{HH}}=8,3$ Hz, $^4J_{\text{HH}}=2,5$ Hz, 1H); 7,43(d, $^3J_{\text{HH}}=8,4$ Hz, 1H); 4,42(q, $^3J_{\text{HH}}=7,4$ Hz, 2H); 2,72(s, 3H); 1,44(t, $^3J_{\text{HH}}=7,1$ Hz, 3H).

LC-MS: $R_t = 4,11$ perc; (ESI): $m/z =$ nem ionizál.

(2-Metil-5-nitrofenil)metanol (81): A **80** 2-metil-5-nitro-benzoésav etil észtert (4,967 g; 23,8 mmol) feloldottam 100 ml száraz THF-ban és 0°C-ra hűtöttem. Ezen a hőmérsékleten kb. egy óra alatt apránként hozzáadagoltam 3,612 g LiAlH₄-et (95,1 mmol), majd 2,5 órát kevertettem szobahőmérsékleten. Ezt követően 2-propanolt csepegtettem az elegybe, amíg az pezsgett, majd 2 M vizes NaOH-ot (50 ml) adtam hozzá. A kivált géles csapadékot celliten szűrtem, EtOAc-tal mostam. A szűrletet EtOAc-tal extraháltam (3x75 ml), majd az egyesített szerves fázisokat telített sós vízzel mostam (100 ml), MgSO₄-on szárítottam. Bepárlás után a várt terméket dietiléterből szűrtem. 1,97 g narancssárga por (50 %).

$O_p = 159-162$ °C (DEE).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz): CDCl_3 ; $\delta(\text{ppm})$: 7,87(s, 1H); 7,71(dd, $^3J_{\text{HH}}=8,1$ Hz, $^4J_{\text{HH}}=2,3$ Hz, 1H); 7,25(d, $^3J_{\text{HH}}=8,1$ Hz, 1H); 4,73(s, 2H); 2,36(s, 3H); 1,52(széles s, 1H).

LC-MS: $R_t = 3,43$ perc; (ESI): m/z = molekulaion nem látszik, feltételezhetően az LC-n átalakul.

2-(Brómmetil)-1-metil-4-nitrobenzol (82): A **81** (2-Metil-5-nitrofenil)metanolt (0,200 g; 1,2 mmol) feloldottam 20 ml vízmentes THF-ban és lehűtöttem -10°C -ra. Az elegyhez hozzáadtam 0,162 g PBr_3 -ot (0,056 ml ; 0,6 mmol), majd szobahőmérsékleten kevertetem 1,5 órán keresztül, végül a reakcióelegyet bepároltam. A bepárlási maradékot feloldottam EtOAc és THF 2:1 elegyében (80 ml), majd vízzel (2x30 ml) és telített sóoldattal (30 ml) mostam, MgSO_4 -on szárítottam. Bepárlás után a várt terméket dietiléterből szűrtem; 0,233 g sárga por (85 %).

$O_p = 195-198$ °C (DEE).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz): CDCl_3 ; $\delta(\text{ppm})$: 7,81(d, $^4J_{\text{HH}}=2,1$ Hz, 1H); 7,72(dd, $^3J_{\text{HH}}=7,9$ Hz, $^4J_{\text{HH}}=2,1$ Hz, 1H); 7,25(d, $^3J_{\text{HH}}=8,2$ Hz, 1H); 4,52(s, 2H); 2,43(s, 3H).

LC-MS: Annyira reaktív ez az intermedier, hogy az LCMS körülményei közt nem vizsgálható.

Dietil (2-metil-5-nitrobenzil)foszfonát (83): A **82** 2-(brómmetil)-1-metil-4-nitrobenzolt (0,23 g, 1 mmol) szuszpendáltam 4 ml trietil foszfitban (23 mmol) és zárt rdényben mikrohullámú reaktorban melegítettem 100 °C-on 10 percig. Az elegyet 0 °C-ra hűtöttem és 1 ml 36 %-os sósavat adtam hozzá. Fél óra kevertetés után a terméket EtOAc és THF 2:1 elegyével extraháltam (3x20 ml). Az egyesített szerves fázisokat telített NaHCO_3 -tal (20 ml) és telített sós vízzel (20 ml) mostam, MgSO_4 -on szárítottam, végül bepároltam. A terméket dietil éterből kristályosítottam; 0,11 g narancssárga por (38 %).

$O_p = 117-119$ °C (DEE).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO-d_6 ; $\delta(\text{ppm})$: 7,77(s, 1H); 7,67(d, $^3J_{\text{HH}}=8,0$ Hz, 1H); 7,39(d, $^3J_{\text{HH}}=8,0$ Hz, 1H); 3,90-4,03(m, 4H); 3,40(d, $^2J_{\text{PH}} \sim 22,0$ Hz, 2H); 2,43(s, 3H); 1,18(t, $^3J_{\text{HH}}=7,0$ Hz, 6H).

LC-MS: $R_t = 4,18$ perc; (ESI): $m/z =$ nem ionizál.

Dietil (5-amino-2-metilbenzil)foszfonát (84): Metanolban (20 ml) feloldottam a **83** dietil (2-metil-5-nitrobenzil)foszfonátot (0,100 g, 0,36 mmol), hozzáadtam 0,227 g ammónium formiátot (3,60 mmol), majd argon atmoszféra alatt 0,01 g 10 m/m %-os csontszeszes palládiumot. Az elegyet 20 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem, majd celliten kiszűrtem a katalizátort, MeOH-lal mostam. A szűrletet bepároltam, majd EtOAc-ban (50 ml) feloldottam. Ezt az elegyet mostam telített NaHCO_3 -tal (20 ml) és telített sóoldattal (20 ml), MgSO_4 -on szárítottam. A bepárlás utáni nyers terméket további tisztítás nélkül használtam; 0,071 g sárga olaj (77 %).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; $\delta(\text{ppm})$: 6,78(d, $^3J_{\text{HH}}=8,0$ Hz, 1H); 6,45(t, $^4J_{\text{HH}}=2,5$ Hz, 1H); 6,35(dt, $^3J_{\text{HH}}=8,0$ Hz, $^4J_{\text{HH}}=2,3$ Hz, 1H); 4,77(széles s, 2H); 3,85-3,98(m, 4H); 2,98(d, $^2J_{\text{PH}}=21,6$ Hz, 2H); 2,13(s, 3H); 1,17(t, $^3J_{\text{HH}}=7,0$ Hz, 6H).

LC-MS: $R_t = 0,45$ perc és 2,16 perc; (ESI): $m/z = 258$ [M + H] $^+$.

Általános recept a 6-fenil-4-klór-pirimidinek (6a és 6b) és az amino-benzil foszfonátok kapcsolásához: Az anilint feloldottam minimális mennyiségű EtOH-ban és hozzáadtam néhány csepp (kb. 0,1 ml) sósavval telített dioxánt. Az elegyet bepároltam, majd 30 ml toluolt lepároltam róla. Az anilin sósav sójához hozzáadtam a **6a** vagy **6b** klór-pirimidint, majd az elegyet 3-24 óráig refluxáltatam 35 ml IPA-ban (VRK-val követtem a reakciót, eluens: Toluol:MeOH = 4:1). A kihűlt elegyet bepároltam, telített vizes NaHCO_3 -ban (30 ml) szuszpendáltam és EtOAc-tal extraháltam (3x70 ml). Az egyesített szerves fázisokat telített sós vízzel (50 ml) mostam, MgSO_4 -on szárítottam, bepároltam. A bemérések pontos értékét, a további tisztítási lépéseket, illetve a termeléseket és az anyagok jellemzését lásd külön.

Dietil (3-[[6-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]amino]benzil)foszfonát (85): Az általános kapcsolási recept alapján 0,165 g (0,75 mmol) 4-klór-6-(2-metoxifenil)pirimidin (**6a**) és 0,252 g (0,9 mmol) **75** anili*HCl felhasználásával végeztem a reakciót. A nyers terméket preparatív VRK lapon tisztítottam, az eluens EtOAc:EtOH = 9:1 volt. A terméket MeOH-lal leoldottam. Bepárlás után a maradékot felvettem EtOAc-ban (100 ml), 1 M vizes sósavval (100 ml), telített vizes NaHCO_3 -tal (100 ml) és telített sós vízzel mostam, MgSO_4 -on szárítottam. Bepárlás után 0,041 g sárga port izoláltam (13 %).

$O_p = 217-218$ °C (EtOAc).

$^{31}\text{P-NMR}$ (121 MHz): CDCl_3 ; δ : 29,4 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): 9,62(s, 1H); 8,68(s, 1H); 7,94(dd, $^3J_{\text{HH}}=7,7$ Hz, $^4J_{\text{HH}}=1,5$ Hz, 1H); 7,55-7,66 (m, 2H); 7,45(s, 2H); 7,27(t, $^3J_{\text{HH}}=7,7$ Hz, 1H); 7,18(d, $^3J_{\text{HH}}=8,3$ Hz, 1H); 7,08(t, $^3J_{\text{HH}}=7,5$ Hz, 1H); 6,93(d, $^3J_{\text{HH}}=7,6$ Hz, 1H); 3,80-4,00(m, 4H); 3,90(s, 3H); 3,20(d, $^2J_{\text{PH}}=22,1$ Hz, 2H); 1,18(t, $^3J_{\text{HH}}=7,0$ Hz, 6H).

LC-MS : $R_t = 2,58$ perc és $2,73$ perc; (ESI): $m/z = 428$ [M + H] $^+$.

Dietil (3-[[6-(3-nitrofenil)pirimidin-4-il]amino]benzil)foszfonát (86a): Az általános kapcsolási recept alapján $0,230$ g ($0,98$ mmol) 4-klór-6-(3-nitrofenil)pirimidin (**6b**) és $0,408$ g ($1,46$ mmol) **75** anili*HCl felhasználásával végeztem a reakciót. A nyers terméket acetonitrilből átkristályosítottam, szűrés után dietil éterrel mostam. $0,228$ g sárga port izoláltam (53 %).

$O_p = 188-190$ °C (MeCN).

$^{31}\text{P-NMR}$ (242 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 25,6 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): 9,83(s, 1H); 8,83(s, 1H); 8,76(s, 1H); 8,47(d, $^3J_{\text{HH}}=7,6$ Hz, 1H); 8,36(d, $^3J_{\text{HH}}=7,9$ Hz, 1H); 7,83(t, $^3J_{\text{HH}}=7,9$ Hz, 1H); 7,59-7,70(m, 2H); 7,40(s, 1H); 7,29(t, $^3J_{\text{HH}}=7,5$ Hz, 1H); 6,97(d, $^3J_{\text{HH}}=6,9$ Hz, 1H); 3,92-4,03(m, 4H); 3,24(d, $^2J_{\text{PH}}=21,5$ Hz, 2H); 1,19(t, $^3J_{\text{HH}}=6,9$ Hz, 6H).

LC-MS : $R_t = 3,66$ perc; (ESI): $m/z = 443$ [M + H] $^+$.

Dietil [hidroxi(3-[[6-(3-nitrofenil)pirimidin-4-il]amino]fenil)metil]foszfonát (86b): Az általános kapcsolási recept alapján $0,230$ g ($0,98$ mmol) 4-klór-6-(3-nitrofenil)pirimidin (**6b**) és $0,433$ g ($1,46$ mmol) **73** anili*HCl felhasználásával végeztem a reakciót. A nyers terméket acetonitrilből átkristályosítottam, szűrés után dietil éterrel mostam. $0,329$ g sárga port izoláltam (73 %).

$O_p = 191$ °C (MeCN).

$^{31}\text{P-NMR}$ (242 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 20,8 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): 9,85(s, 1H); 8,84(s, 1H); 8,77(s, 1H); 8,48(d, $^3J_{\text{HH}}=7,8$ Hz, 1H); 8,36(dd, $^3J_{\text{HH}}=8,1$ Hz, $^4J_{\text{HH}}=1,5$ Hz, 1H); 7,84(t, $^3J_{\text{HH}}=8,0$ Hz, 1H); 7,69-7,78(m, 2H); 7,41(s, 1H); 7,33(t, $^3J_{\text{HH}}=8,1$ Hz, 1H); 7,12(d, $^3J_{\text{HH}}=7,4$ Hz, 1H);

6,21(dd, $^3J_{\text{PH}}=16,2$ Hz, $^3J_{\text{HH}}=5,5$ Hz, 1H); 4,95(dd, $^2J_{\text{PH}}=13,4$ Hz, $^3J_{\text{HH}}=5,5$ Hz, 1H); 3,88-4,06(m, 4H); 1,18(t, $^3J_{\text{HH}}=6,9$ Hz, 6H).

LC-MS: $R_t = 3,26$ perc; (ESI): $m/z = 459$ [M + H]⁺.

Dietil (3-{{6-(3-aminofenil)pirimidin-4-il}amino}benzil)foszfonát (87a): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján 0,100 g **86a** nitro vegyület (0,23 mmol) redukciója. Termelés: 0,075 g sárga por (73 %).

Op= 186 °C (DEE).

^{31}P -NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ : 28,5 ppm.

^1H -NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ (ppm): 11,02(s, 1H); 8,84(s, 1H); 7,45-7,70(m, 5H); 7,30-7,40(m, 3H); 7,05-7,15(m, 1H); 3,95-4,00(m, 4H); 3,26(d, $^2J_{\text{PH}}=21,0$ Hz, 2H); 1,19(s, 6H).

LC-MS: $R_t = 2,38$ perc és 2,48 perc; (ESI): $m/z = 413$ [M + H]⁺.

Dietil [(3-{{6-(3-aminofenil)pirimidin-4-il}amino}fenil)(hidroxy)metil]foszfonát (87b): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján 0,100 g **86b** nitro vegyület (0,22 mmol) redukciója. Termelés: 0,082 g sárga por (80 %).

Op= 265-267 °C (DEE).

^{31}P -NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ : 23,6 ppm.

^1H -NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ (ppm): 11,14(s, 1H); 8,86(s, 1H); 7,10-7,80(m, 9H); 6,00(széles s, 3H); 4,98(d, $^2J_{\text{PH}}=13,2$ Hz, 1H); 3,95-4,00(m, 4H); 1,17(s, 6H).

LC-MS: $R_t = 2,01$ perc és 2,23 perc; (ESI): $m/z = 429$ [M + H]⁺.

Dietil (4-{{6-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il}amino}benzil)foszfonát (88a): Az általános kapcsolási recept alapján 0,221 g (1,0 mmol) 4-klór-6-(2-metoxifenil)pirimidin (**6a**) és 0,419 g (1,5 mmol) **79** anili*HCl felhasználásával végeztem a reakciót. A nyers terméket acetonitrilből átkristályosítottam. 0,212 g sárga port izoláltam (50 %).

Op= 151 °C (MeCN).

^{31}P -NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ : 25,9 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,57(s, 1H); 8,66(s, 1H); 7,93(d, ³J_{HH}=7,5 Hz, 1H); 7,62(d, J_{AABB}=8,2 Hz, 2H); 7,43(t, ³J_{HH}=8,4 Hz, 1H); 7,42(s, 1H); 7,22(dd, J_{AABB}=8,4 Hz, ⁴J_{PH}=1,8 Hz, 2H); 7,16(d, ³J_{HH}=8,3 Hz, 1H); 7,06(t, ³J_{HH}=7,5 Hz, 1H); 3,90-3,99(m, 4H); 3,88(s, 3H, H₂O); 3,15(d, ²J_{PH}=21,2 Hz, 2H); 1,17(t, ³J_{HH}=7,0 Hz, 6H).

LC-MS: R_t = 2,41 perc és 2,56 perc; (ESI): m/z = 428 [M + H]⁺; 426 [M – H]⁻.

Dietil [hidroxi(4-{{6-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il}amino}fenil)metil]foszfonát (88b): Az általános kapcsolási recept alapján 0,221 g (1,0 mmol) 4-klór-6-(2-metoxifenil)pirimidin (**6a**) és 0,44 g (1,5 mmol) **77** anili*HCl felhasználásával végeztem a reakciót. A nyers terméket először hexán/DCM-ből, majd acetonitrilből átkristályosítottam. 0,140 g sárga port izoláltam (32 %).

O_p= 195-196 °C (MeCN).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 21,0 ppm (82 %) és 7,4 ppm (18 %).

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,62 (s, 1H); 8,69(s, 1H); 7,95(d, ³J_{HH}=5,2 Hz, 1H); 7,55-7,7(m, 2H); 7,3-7,5(m, 4H); 7,18(d, ³J_{HH}=6,4 Hz, 1H); 7,08(s, 1H); 6,09(d, ³J_{PH}=12,4 Hz, 1H); 4,88(d, ²J_{PH}=11,1 Hz, 1H); 3,9-4,05(m, 7H); 1,17(s, 6H). A jelek burkológörbe szerűek, melegítésre bizonyos jelek szétválnak kb. 3:1 arányban. Feltételezem, hogy a molekulák egy részében az OH hidrogén hidat képez a foszfor oxigénjével, és ez okozza a furcsa spektrumokat. Az α-hidroxi nélküli származékoknál nem talákoztam ezzel a jelenséggel.

LC-MS: R_t = 0,46 perc, 2,14 perc és 2,32 perc; (ESI): m/z = 444 [M + H]⁺; 442 [M – H]⁻.

Dietil (4-{{6-(3-nitrofenil)pirimidin-4-il}amino}benzil)foszfonát (89a): Az általános kapcsolási recept alapján 0,236 g (1,0 mmol) 4-klór-6-(3-nitrofenil)pirimidin (**6b**) és 0,419 g (1,5 mmol) **79** anili*HCl felhasználásával végeztem a reakciót. A feldolgozás során az általános recepttől eltértem, mert a vizes NaHCO₃ szuszpenziót nem extraháltam, hanem 0,5 ml EtOAc-ot adtam hozzá és 0 °C-on kevertettem 30 percen keresztül. A kivált csapadékot szűrtem és dietil éterrel mostam; 0,44 g sárga por (99,5 %).

O_p= 204 °C (víz, EtOAc).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 25,8 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,81(s, 1H); 8,81(s, 1H); 8,75(s, 1H); 8,43(d, ³J_{HH}=7,7 Hz, 1H); 8,35(d, ³J_{HH}=8,1 Hz, 1H); 7,83(t, ³J_{HH}=7,9 Hz, 1H); 7,65(d, J_{AABB}=8,1 Hz, 2H); 7,36(s, 1H); 7,25(dd, J_{AABB}= 8,7 Hz, J=2,1 Hz, 2H); 3,89-4,00(m, 4H); 3,18(d, ²J_{PH}=21,2 Hz, 2H); 1,17(t, ³J_{HH}=7,0 Hz, 6H).

LC-MS: R_t = 3,62 perc; (ESI): m/z = 443 [M + H]⁺; 441 [M – H]⁻.

Dietil [hidroxi(4-[[6-(3-nitrofenil)pirimidin-4-il]amino}fenil)metil]foszfonát (89b):

Az általános kapcsolási recept alapján 0,220 g (0,93 mmol) 4-klór-6-(3-nitrofenil)pirimidin (**6b**) és 0,363 g (1,4 mmol) **77** anili*HCl felhasználásával végeztem a reakciót. A nyers terméket először oszlopkromatográfiásan tisztítottam (eluens 100 % EtOAc), majd a megfelelő frakciók összepárlása után kapott terméket acetonitrilből átkristályosítottam; 0,024 g halványsárga port izoláltam (6 %).

O_p= 205 °C, dec. (MeCN).

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,81(s, 1H); 8,82(s, 1H); 8,78(s, 1H); 8,45(s, 1H); 8,37(s, 1H); 7,84(s, 1H); 7,69(s, 2H); 7,4(széles s, 3H); 6,11(d, ³J_{PH}=14,7 Hz, 1H); 4,90(d, ²J_{PH}=9,8 Hz, 1H); 3,98(széles s, 4H); 1,18(széles s, 6H). A spektrumra ugyanaz jellemző, mint **88b** esetében.

LC-MS: R_t = 3,22 perc; (ESI): m/z = 459 [M + H]⁺; 457 [M – H]⁻.

Dietil (4-[[6-(3-aminofenil)pirimidin-4-il]amino}benzil)foszfonát (90): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján 0,300 g **89a** nitro vegyület (0,68 mmol) redukciója. Termelés: 0,182 g sárga por (65 %).

O_p= 62-65 °C (EtOAc); amorf.

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 25,8 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,57(s, 1H); 8,64(s, 1H); 7,62(d, J_{AABB}=8,2 Hz, 2H); 7,21-7,27(m, 3H); 7,09-7,16(m, 3H); 6,67(d, ³J_{HH}=6,8 Hz, 1H); 5,26(széles s, 2H); 3,88-3,99(m, 4H); 3,15(d, ²J_{PH}=21,2 Hz, 2H); 1,17(t, ³J_{HH}=7,0 Hz, 6H).

LC-MS: R_t = 0,46 perc, 2,22 perc és 2,44 perc; (ESI): m/z = 413 [M + H]⁺; 411 [M – H]⁻.

Dietil (5-[[6-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]amino]-2-metilbenzil)foszfonát (91): Az általános kapcsolási recept alapján 0,165 g (0,75 mmol) 4-klór-6-(2-metoxifenil)pirimidin (**6a**) és 0,072 g (0,25 mmol) dietil (5-amino-2-metilbenzil)foszfonát (**84**) sósav sóját reagáltattam. A nyers terméket preparatív VRK lapon tisztítottam, az eluens EtOAc:hexán = 8:1 volt. A szilikagélről MeOH-lal oldottam le a terméket. Bepárlás után 0,04 g sárga port izoláltam (53 %).

$O_p = 134-137\text{ }^\circ\text{C}$ (MeOH).

$^{31}\text{P-NMR}$ (242 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 28,9 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): 9,56(s, 1H); 8,56(s, 1H); 7,93(dd, $^3J_{\text{HH}}=7,7$ Hz, $^4J_{\text{HH}}=1,5$ Hz, 1H); 7,41-7,56(m, 3H); 7,42(s, 1H); 7,17(d, $^3J_{\text{HH}}=8,3$ Hz, 1H); 7,13(d, $^3J_{\text{HH}}=8,1$ Hz, 1H); 7,07(t, $^3J_{\text{HH}}=7,4$ Hz, 1H); 3,89-4,00(m, 4H); 3,89(s, 3H); 3,17(d, $^2J_{\text{PH}}=21,6$ Hz, 2H); 2,29(s, 3H); 1,18(t, $^3J_{\text{HH}}=7,0$ Hz, 6H).

LC-MS : $R_t = 2,92$ perc; (ESI): $m/z = 442$ [M + H] $^+$.

(4-[[6-(3-Nitrofenil)pirimidin-4-il]amino]benzil)foszfonsav (92a): A vegyületet a publikált módszer módosításával állítottam elő [87]. 0,100 g **89a** dietil foszfonátot (0,23 mmol) 5 M vizes sósavban (30 ml) forraltam 24 órán keresztül. Az elegyet bepároltam, majd vízben felvettem (25 ml) és dietil éterrel mostam (3x100 ml). A víz bepárlása után toluolt lepároltam a termékről (20 ml). A száraz terméket 5 ml vízmentes EtOH-ban felvettem és $-9\text{ }^\circ\text{C}$ -ra hűtöttem, majd hozzáadtam 0,5 ml propilén oxidot. 15p kevertetés után a kivált csapadékot szűrtem, dietil éterrel mostam. A várt terméket sárga porként preparáltam, 0,059g (66 %).

$O_p = 265-270\text{ }^\circ\text{C}$, dec. (EtOH).

$^{31}\text{P-NMR}$ (242 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 20,1 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): 10,48(s, 1H); 8,79(s, 1H); 8,77(s, 1H); 8,39(dd, $^3J_{\text{HH}}=^3J_{\text{HH}}=7,8$ Hz, 2H); 7,85(t, $^3J_{\text{HH}}=8,0$ Hz, 1H); 7,63(d, $J_{\text{AABB}}=7,8$ Hz, 2H); 7,15(s, 1H); 7,24(d, $J_{\text{AABB}}=7,5$ Hz, 2H); 5,2(széles s, 2H); 2,93(d, $^2J_{\text{PH}}=21,4$ Hz, 2H).

LC-MS : $R_t = 2,40$ perc; (ESI): $m/z = 387$ [M + H] $^+$.

(4-[[6-(3-Aminofenil)pirimidin-4-il]amino}benzil)foszfonsav (92b): A **92a** vegyületnél leírtakkal azonos módon 0,128 g **90** dietil foszfonátból (0,31 mmol) kiindulva végeztem a reakciót. Termelés: 0,110 g sárga port izoláltam (99 %)

Op> 300 °C (EtOH).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 20,4 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 11,08(s, 1H); 8,73(s, 1H); 7,52(d, J_{AABB}=8,1 Hz, 2H); 7,38-7,48(m, 3H); 7,24(d, J_{AABB}=8,1 Hz, 2H); 7,12-7,20(m, 1H); 7,14(s, 1H); 6,30(széles s, 4H); 2,98(d, ²J_{PH}=21,4 Hz, 2H).

LC-MS: R_t = 0,46 perc és 1,64 perc; (ESI): m/z = 357 [M + H]⁺.

Etil etil(3-nitrobenzil)foszfinát (94a): 1,08 g 3-nitro-benzil bromidot (5,0 mmol) és 1,125 g dietil etilfoszfonitot (7,5 mmol) oldószer nélkül összemértem, majd folyamatos argon áramlás mellett 140 °C-on kevertettem egy órán keresztül. Miután az elegy lehült 60-70 °C-ra 5 ml CHCl₃-mal hígítottam. Tovább hűtöttem az elegyet 0 °C-ra és hozzáadtam 2 ml 5 M vizes sósavat, pár perc kevertetés után az elegyet vízzel hígítottam (10 ml), majd CHCl₃-mal kiráztam (3x50 ml). Az egyesített szerves fázisokat 2 M vizes NaOH oldattal (2x50 ml) és telítet sóoldattal (50 ml) mostam, MgSO₄-on szárítottam. Bepárlás után az elegyet 100 ml MeOH-ban feloldottam és aktív szénnel derítettem. A MeOH bepárlása után 0,846 g sárga olajat izoláltam (66 %), amit további tisztítás nélkül használtam fel.

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 54,9 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 8,18(s, 1H); 8,10(d, ³J_{HH}=7,0 Hz, 1H); 7,73(d, ³J_{HH}=7,2 Hz, 1H); 7,62(t, ³J_{HH}=7,5 Hz, 1H); 3,80-4,00(m, 2H); 3,40(d, ²J_{PH}=16,4 Hz, 2H); 1,60-1,70(m, 2H); 1,16(s, 3H); 1,00(dt, ³J_{PH}=18,1 Hz, ³J_{HH}=7,4 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 2,91 perc; (ESI): m/z = 258 [M + H]⁺.

Etil (3-nitrobenzil)propilfoszfinát (94b): A 3-nitro-benzil bromidot (2,51 g; 11,6 mmol) és a dietil propilfoszfonitot (2,61 g; 17,4 mmol) a **94a**-nál leírtak szerint reagáltattam. A feldolgozás után 2,88 g barna olajat izoláltam (92 %).

³¹P-NMR (121 MHz): CDCl₃; δ: 50,8 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): CDCl₃; δ(ppm): 8,17(d, ⁴J_{HH}=1,2 Hz, 1H); 8,11(d, ³J_{HH}=6,9 Hz, 1H); 7,70(d, ³J_{HH}=7,5 Hz, 1H); 7,54(t, ³J_{HH}=7,2 Hz, 1H); 3,94-4,16(m, 2H); 3,27(d, ²J_{PH}=15,6 Hz, 2H); 1,56-1,80(m, 4H); 1,27(t, ³J_{HH}=6,9 Hz, 3H); 1,02(t, ³J_{HH}=7,2 Hz, 3H).

Etil (3-aminobenzil)etilfoszfinát (95a): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján 0,837 g **94a** nitro vegyület (3,26 mmol) redukálásával a szabad amint preparáltam. Termelés: 0,690 g sárga olaj (93 %).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 56,1 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 6,92(s, 1H); 6,47(s, 1H); 6,41 (s, 2H); 5,07(széles s, 2H); 3,80-3,90(m, 2H); 2,97(d, ²J_{PH}=16,5 Hz, 2H); 1,50-1,60(m, 2H); 1,18(s, 3H); 0,97(dt, ³J_{PH}=17,6 Hz, ³J_{HH}~8,7 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 0,45 perc és 1,73 perc; (ESI): m/z = 228 [M + H]⁺.

Etil (3-aminobenzil)propilfoszfinát (95b): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján 2,88 g **94b** nitro vegyület (10,6 mmol) redukciójával nyertem a szabad amint. Termelés: 2,148 g sárga olaj (84 %).

³¹P-NMR (121 MHz): CDCl₃; δ: 53,1 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): CDCl₃; δ(ppm): 7,07(t, ³J_{HH}=7,8 Hz, 1H); 6,68(d, ⁴J_{HH}=1,5 Hz, 1H); 6,63(d, ³J_{HH}=8,4 Hz, 1H); 6,60(d, ³J_{HH}=8,4 Hz, 1H); 3,95-4,05(m, 2H); 3,03(d, ²J_{PH}=16,8 Hz, 2H); 1,50-1,70(m, 4H); 1,26(t, ³J_{HH}=7,2 Hz, 3H); 0,96(t, ³J_{HH}=6,9 Hz, 3H).

Etil etil(4-nitrobenzil)foszfinát (97a): 1,296 g 4-nitro-benzil bromidot (6,0 mmol) és 1,35 g dietil etilfoszfonitot (9,0 mmol) a **94a** vegyületnél leírtak szerint reagáltattam. Az azonos feldolgozás után 0,847 g sárga olajat preparáltam (55 %).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 54,7 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 8,18(d, J_{AABB}=7,6 Hz, 2H); 7,55(d, J_{AABB}=6,6 Hz, 2H); 3,90-3,93(m, 2H); 3,39(d, ²J_{PH}=16,8 Hz, 2H); 1,60-1,68(m, 2H); 1,16(t, ³J_{HH}=6,8 Hz, 3H); 1,00(dt, ³J_{PH}=18,1 Hz, ³J_{HH}=7,4 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 2,88 perc; (ESI): m/z = 258 [M + H]⁺.

Etil (4-nitrobenzil)propilfoszfinát (97b): 1,296 g 4-nitro-benzil bromidot (6,0 mmol) és 1,476 g dietil propilfoszfonitot (9,0 mmol) a **94a** vegyületnél leírtak szerint reagáltattam. Az azonos feldolgozás után 1,426 g barna olajat preparáltam (88 %).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 53,1 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 8,18(d, J_{AABB}=7,6 Hz, 2H); 7,55(d, J_{AABB}=7,5 Hz, 2H); 3,90-3,95(m, 2H); 3,39(d, ²J_{PH}=17,0 Hz, 2H); 1,55-1,65(m, 2H); 1,40-1,50(m, 2H); 1,13-1,22(m, 3H); 0,93(széles s, 3H).

LC-MS: R_t = 3,16 perc; (ESI): m/z = 272 [M + H]⁺.

Etil (4-aminobenzil)etilfoszfinát (98a): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján 0,843 g **97a** nitro vegyület (3,28 mmol) redukciója után a szabad amint preparáltam. Termelés: 0,375 g barna olaj (50 %).

LC-MS: R_t = 0,44 perc; (ESI): m/z = 228 [M + H]⁺.

Etil (4-aminobenzil)propilfoszfinát (98b): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján 1,42 g **97a** nitro vegyület (3,28 mmol) redukcióját követően a szabad amint preparáltam. Termelés: 1,005 g barna olaj (80 %).

LC-MS: R_t = 0,44 perc és 1,89 perc; (ESI): m/z = 242 [M – H]⁺.

Etil trimetilszilil fenilfoszfonit (100): Az **99** etil fenilfoszfinátot (1,020 g; 6,0 mmol) feloldottam 20 ml vízmentes THF-ban, majd hozzáadtam 0,707 g trietilamint (0,97 ml, 7,0 mmol) és 0,76 g trimetilszilil kloridot (0,89 ml, 7,0 mmol). Az elegyet szobahőmérsékleten kevertetem egy órán keresztül, majd a kivált csapadékot kiszűrtem. A szűrletet bepároltam, hozzáadtam 30 ml toluolt és ezt is lepároltam róla. A kapott nyers terméket (sárga olaj) további tisztítás nélkül, a teljes mennyiséget azonnal felhasználtam (lásd **101** előállítás).

Fenil(3-nitrobenzil)foszfinsav (101): A frissen elkészített, **100** trimetilszilil csoporttal aktivált fenilfoszfináthoz hozzáadtam 1,080 g 3-nitro-benzil bromidot (5,0 mmol) és oldószer nélkül, argon áramoltatás mellett 140 °C-on kevertetem 4,5 órán keresztül. Miután az elegy lehült 60-70 °C-ra 5 ml CHCl₃-mal hígítottam, majd a szobahőmérsékeltű elegyhez további 50 ml CHCl₃-ot adtam. Az oldatot vízzel mostam (3x50 ml), majd 2 M vizes NaOH oldattal extraháltam (3x50 ml). A lúgos fázist 37 %-os sósav oldattal savanyítottam (pH=3), majd CHCl₃-mal extraháltam (3x50 ml). Az

egyesített szerves fázisokat telítet sóoldattal (50 ml) mostam, MgSO₄-on szárítottam. Bepárlás után 0,645 g sárga port preparáltam (47 %).

O_p= 127-128 °C (CHCl₃).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 54,9 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 8,03(d, ³J_{HH}=5,4 Hz, 1H); 7,98(s, 1H); 7,45-7,75(m, 7H), 3,43(d, ²J_{PH}=17,3 Hz, 2H).

LC-MS: R_t = 2,62 perc; (ESI): m/z = 278 [M + H]⁺.

Etil fenil(3-nitrobenzil)foszfinát (102): A **101** fenilfoszfinsavat (0,880 g; 3,18 mmol) feloldottam 10 ml DMF-ben, hozzáadtam 4,706 g trietil ortoformiátot (5,28 ml, 31,80 mmol) és egy csepp trifluorecetsavat. Az elegy 168 órán keresztül keveredett 80 °C-on, majd bepároltam. A bepárlási maradékot 2 M vizes NaOH oldatban (50 ml) felvettem és EtOAc-tal extraháltam (3x75 ml). Az egyesített szerves fázisokat telített sóoldattal (50 ml) mostam, MgSO₄-on szárítottam. Bepárlás után 0,729 g sárga olajat kaptam (75 %).

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 8,03(d, ³J_{HH}=5,1 Hz, 1H); 8,00(s, 1H); 7,60-7,75(m, 2H); 7,45-7,60(m, 5H); 3,80-3,97 és 3,60-3,75(2xm, 2x1H); 3,66(d, ²J_{PH}=17,3 Hz, 2H); 1,18(t, ³J_{HH}=6,9 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 3,45 perc; (ESI): m/z = 306 [M + H]⁺.

Etil (3-aminobenzil)fenilfoszfinát (103): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján 0,72 g **102** nitro vegyület (2,36 mmol) redukcióját követően az amin sósav sóját preparáltam. Termelés: 0,586 g sárga olaj (90 %).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 41,5 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 8,9(széles s, 2H); 7,63-7,77(m, 2H); 7,57(d, ³J_{HH}=5,9 Hz, 1H); 7,40-7,60(m, 2H); 7,15(t, ³J_{HH}=7,0 Hz, 1H); 6,80-7,00(m, 2H); 6,83(d, ³J_{HH}=4,8 Hz, 1H); 3,75-3,85 és 3,85-3,95(2xm, 2x1H); 3,42(d, ²J_{PH}=17,2 Hz, 2H); 1,16(t, ³J_{HH}=6,7 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 0,45 perc és 2,28 perc; (ESI): m/z = 276 [M + H]⁺.

Etil etil(3-{{6-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il}amino}benzil)foszfinát (104a): Az általános kapcsolási recept alapján 0,075 g (0,34 mmol) 4-klór-6-(2-metoxifenil)pirimidin (**6a**) és 0,108 g (0,41 mmol) **95a** anili*HCl felhasználásával

végeztem a reakciót. A nyers terméket preparatív VRK lapon tisztítottam, az eluens EtOAc:EtOH = 8:1 + 1 v/v% AcOH volt. A terméket MeOH-lal leoldottam. Bepárlás után a maradékot felvettem EtOAc-ban (100 ml), 0,1 M vizes ecetsavval (3x30 ml), telített vizes NaHCO₃-tal (100 ml) és telített sós vízzel (100 ml) mostam, MgSO₄-on szárítottam. Bepárlás után 0,045 g sárga port izoláltam (32 %).

Op= ~szobahőmérséklet.

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 55,6 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,62(s, 1H); 8,67(s, 1H); 7,94(d, ³J_{HH}=6,2 Hz, 1H); 7,55-7,68(m, 2H); 7,45(s, 2H); 7,27(t, ³J_{HH}= 7,7 Hz, 1H); 7,17(d, ³J_{HH}=7,5 Hz, 1H); 7,08(t, ³J_{HH}= 7,5 Hz, 1H); 6,93(d, ³J_{HH}=7,6 Hz, 1H); 3,80-4,00(m, 2H); 3,90(s, 3H); 3,17(d, ²J_{PH}=16,5 Hz, 2H); 1,50-1,70(m, 2H); 1,18(t, ³J_{HH}= 7,0 Hz, 3H); 1,00(dt, ³J_{PH}=17,6 Hz, ³J_{HH}=7,2 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 2,56 perc; (ESI): m/z = 412 [M + H]⁺.

Etil (3-{{6-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il}amino}benzil)propilfoszfinát (104b): Az általános kapcsolási recept alapján 0,170 g (0,77 mmol) 4-klór-6-(2-metoxifenil)pirimidin (**6a**) és 0,229 g (0,83 mmol) **95b** anili*HCl felhasználásával végeztem a reakciót. A nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottuk, az eluens 100 % EtOAc-tól EtOAc:EtOH = 1:1-ig gradiensben volt. A várt terméket tartalmazó frakciók bepárlása után 0,16 g sárga olajat izoláltunk (50 %).

Op= ~szobahőmérséklet.

³¹P-NMR (121 MHz): CDCl₃; δ: 52,5 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,67(s, 1H); 8,68(s, 1H); 7,94(d, ³J_{HH}=6,2 Hz, 1H); 7,55-7,68(m, 2H); 7,45(s, 2H); 7,28(t, ³J_{HH}= 7,1 Hz, 1H); 7,17(d, ³J_{HH}=8,0 Hz, 1H); 7,09(t, ³J_{HH}= 6,8 Hz, 1H); 6,93(d, ³J_{HH}=5,8 Hz, 1H); 3,89(s, 5H); 3,16(d, ²J_{PH}=16,5 Hz, 2H); 1,35-1,70(m, 4H); 1,18(t, ³J_{HH}= 6,8 Hz, 3H); 0,92(széles s, 3H).

LC-MS: R_t = 2,75 perc; (ESI): m/z = 426 [M + H]⁺.

Etil fenil(3-{{6-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il}amino}benzil)foszfinát (104c): Az általános kapcsolási recept alapján 0,157 g (0,71 mmol) 4-klór-6-(2-metoxifenil)pirimidin (**6a**) és 0,332 g (1,07 mmol) **103** anili*HCl felhasználásával

végeztem a reakciót. A nyers terméket preparatív VRK lapon tisztítottam, az eluens EtOAc:EtOH = 8:1 + 1 v/v% AcOH volt. A terméket MeOH-lal leoldottam. Bepárlás után a maradékot felvettem EtOAc-ban (100 ml), 0,1 M vizes ecetsavval (3x30 ml), telített vizes NaHCO₃-tal (100 ml) és telített sós vízzel (100 ml) mostam, MgSO₄-on szárítottam. Bepárlás után 0,094 g sárga port izoláltam (29 %).

Op= 103-104 °C (EtOAc).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 41,5 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,56(s, 1H); 8,64(s, 1H); 7,93(d, ³J_{HH}=6,2 Hz, 1H); 7,30-7,75(m, 8H); 7,00-7,20(m, 4H); 6,73(d, ³J_{HH}=3,9 Hz, 1H); 3,80-3,88 és 3,90-4,00(2xm, 2x1H); 3,90(s, 3H); 3,42(d, ²J_{PH}=17,3 Hz, 2H); 1,18(t, ³J_{HH}= 6,0 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 2,92 perc; (ESI): m/z = 460 [M + H]⁺.

Etil etil(3-{{6-(3-nitrofenil)pirimidin-4-il}amino}benzil)foszfinát (105a): Az általános kapcsolási recept alapján 0,118 g (0,5 mmol) 4-klór-6-(3-nitrofenil)pirimidin (6b) és 0,158 g (0,6 mmol) 95a anili*HCl felhasználásával végeztem a reakciót. A nyers terméket acetonitrilből átkristályosítottam: 0,118 g sárga por (55 %).

Op= 189-190 °C (MeCN).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 55,8 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,81(s, 1H); 8,84(s, 1H); 8,76(s, 1H); 8,48(d, ³J_{HH}=6,9 Hz, 1H); 8,36(d, ³J_{HH}=7,5 Hz, 1H); 7,84(t, ³J_{HH}=7,7 Hz, 1H); 7,55-7,65(m, 2H); 7,41(s, 1H); 7,30(t, ³J_{HH}=7,2 Hz, 1H); 6,99(d, ³J_{HH}=4,8 Hz, 1H); 3,90-4,00(m, 2H); 3,19(d, ²J_{PH}=16,5 Hz, 2H); 1,60-1,70(m, 2H); 1,19(t, ³J_{HH}= 6,3 Hz, 3H); 1,01(dt, ³J_{PH}=17,7 Hz, ³J_{HH}=8,8 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 3,41 perc; (ESI): m/z = 427 [M + H]⁺.

Etil (3-{{6-(3-nitrofenil)pirimidin-4-il}amino}benzil)propilfoszfinát (105b): Az általános kapcsolási recept alapján 0,220 g (0,93 mmol) 4-klór-6-(3-nitrofenil)pirimidin (6b) és 0,250 g (1,04 mmol) 95b anili*HCl felhasználásával végeztem a reakciót. A feldolgozás annyiban eltért az általános recepttől, hogy a NaHCO₃-os szuszpendálás

után az elegyhez 0,5 ml EtOAc-ot adtunk, majd 30 perc kevertetés után szűrtük. A nyers terméket acetonitrilből átkristályosítottam: 0,12 g sárga por (29 %).

$O_p = 173-176$ °C (MeCN).

$^{31}\text{P-NMR}$ (242 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 54,3 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): 9,82(s, 1H); 8,84(s, 1H); 8,76(s, 1H); 8,48(d, $^3J_{\text{HH}}=6,8$ Hz, 1H); 8,36(d, $^3J_{\text{HH}}=6,2$ Hz, 1H); 7,83(t, $^3J_{\text{HH}}=7,7$ Hz, 1H); 7,55-7,65(m, 2H); 7,42(s, 1H); 7,30(s, 1H); 6,99(s, 1H); 3,90-4,00(m, 2H); 3,18(d, $^2J_{\text{PH}}=16,7$ Hz, 2H); 1,50-1,70(m, 4H); 1,19(s, 3H); 0,93(s, 1H).

LC-MS : $R_t = 3,63$ perc; (ESI): $m/z = 441$ [M + H] $^+$.

Etil fenil(3-{{6-(3-nitrofenil)pirimidin-4-il}amino}benzil)foszfinát (105c): Az általános kapcsolási recept alapján 0,118 g (0,5 mmol) 4-klór-6-(3-nitrofenil)pirimidin (6b) és 0,187 g (0,6 mmol) **103** anili*HCl felhasználásával végeztem a reakciót. A nyers terméket acetonitrilből átkristályosítottam: 0,101 g sárga por (43 %).

$O_p = 188-190$ °C (MeCN).

$^{31}\text{P-NMR}$ (242 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 41,7 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): 9,76(s, 1H); 8,84(s, 1H); 8,73(s, 1H); 8,48(d, $^3J_{\text{HH}}=6,3$ Hz, 1H); 8,36(d, $^3J_{\text{HH}}=7,1$ Hz, 1H); 7,84(t, $^3J_{\text{HH}}=6,6$ Hz, 1H); 7,65-7,75(m, 2H); 7,40-7,60(m, 5H); 7,39(s, 1H); 7,18(t, $^3J_{\text{HH}}=6,9$ Hz, 1H); 6,79(d, $^3J_{\text{HH}}=5,1$ Hz, 1H); 3,90-3,95 és 3,80-3,85(2xm, 2x1H); 3,45(d, $^2J_{\text{PH}}=17,3$ Hz, 2H); 1,18(s, 3H).

LC-MS : $R_t = 3,83$ perc; (ESI): $m/z = 475$ [M + H] $^+$.

Etil (3-{{6-(3-aminofenil)pirimidin-4-il}amino}benzil)etilfoszfinát (106a): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján 0,099 g **105a** nitro vegyület (0,23 mmol) redukcióját követően 0,079 g sárga port preparáltam (79 %).

$O_p = 208-211$ °C (DEE).

$^{31}\text{P-NMR}$ (242 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 55,6 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): 11,09(s, 1H); 8,84(s, 1H); 7,50-7,80(m, 5H); 7,30-7,45(m, 3H); 7,09(d, $^3J_{\text{HH}}=5,4$ Hz, 1H); 5,30(széles s, 2H); 3,80-3,95(m, 2H); 3,22(d, $^2J_{\text{PH}}=16,2$ Hz, 2H); 1,60-1,67(m, 2H); 1,18(t, $^3J_{\text{HH}}=6,7$ Hz, 3H); 1,00(dt, $^3J_{\text{PH}}=17,6$ Hz, $^3J_{\text{HH}}=7,2$ Hz, 3H).

LC-MS: $R_t = 0,45$ perc és $2,06$ perc és $2,35$ perc; (ESI): $m/z = 397 [M + H]^+$.

Etil (3-{{6-(3-aminofenil)pirimidin-4-il}amino}benzil)propilfoszfinát (106b): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján $0,100$ g **105b** nitro vegyület ($0,23$ mmol) redukciója után $0,079$ g sárga port izoláltam (77%).

$O_p = 206-208$ °C (DEE).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): $11,02$ (s, 1H); $8,83$ (s, 1H); $7,65-7,75$ (m, 2H); $7,50-7,65$ (m, 3H); $7,30-7,45$ (m, 3H); $7,05-7,15$ (m, 1H). $5,47$ (széles s, 2H); $3,85-4,00$ (m, 2H); $3,21$ (d, $^2J_{\text{PH}}=15,9$ Hz, 2H); $1,60-1,70$ (m, 2H); $1,45-1,55$ (m, 2H); $1,17$ (t, $^3J_{\text{HH}}=6,9$ Hz, 3H); $0,93$ (t, $^3J_{\text{HH}}=6,3$ Hz, 3H).

LC-MS: $R_t = 0,43$ perc és $2,37$ perc és $2,55$ perc; (ESI): $m/z = 411 [M + H]^+$.

Etil (3-{{6-(3-aminofenil)pirimidin-4-il}amino}benzil)fenilfoszfinát (106c): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján $0,080$ g **105c** nitro vegyület ($0,17$ mmol) redukciójával a várt terméket: $0,068$ g sárga port állítottam elő (84%).

$O_p = 208-209$ °C (DEE).

$^{31}\text{P-NMR}$ (242 MHz): DMSO- d_6 ; δ : $41,7$ ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): $10,82$ (s, 1H); $8,80$ (s, 1H); $7,45-7,75$ (m, 10H); $7,20-7,45$ (m, 3H); $6,89$ (d, $^3J_{\text{HH}}=6,0$ Hz, 1H). $4,25$ (széles s, 2H); $3,80-3,85$ és $3,90-3,95$ (2xm, 2x1H); $3,48$ (d, $^2J_{\text{PH}}=17,3$ Hz, 2H); $1,18$ (t, $^3J_{\text{HH}}=5,4$ Hz, 3H).

LC-MS: $R_t = 2,73$ perc; (ESI): $m/z = 445 [M + H]^+$.

Etil etil(4-{{6-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il}amino}benzil)foszfinát (107a): Az általános kapcsolási recept alapján $0,110$ g ($0,5$ mmol) 4-klór-6-(2-metoxifenil)pirimidin (**6a**) és $0,158$ g ($0,6$ mmol) **98a** anili*HCl felhasználásával végeztem a reakciót. A nyers terméket preparatív VRK lapon tisztítottam, kétszeri eluálással. Eluens 1: 100% EtOAc, eluens 2: EtOAc:EtOH=8:1. A terméket MeOH-lal leoldottam. Bepárlás után $0,028$ g sárga amorf anyagot izoláltam (14%).

$O_p = \sim$ szobahőmérséklet

$^{31}\text{P-NMR}$ (242 MHz): DMSO- d_6 ; δ : $55,6$ ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,61(s, 1H); 8,67(s, 1H); 7,94(d, ³J_{HH}=7,1 Hz, 1H); 7,63(d, J_{AABB}=7,3 Hz, 2H); 7,40-7,50(m, 2H); 7,23(d, J_{AABB}=6,6 Hz, 2H); 7,19(t, ³J_{HH}=8,1 Hz, 1H); 7,07(d, ³J_{HH}=6,6 Hz, 1H); 3,85-4,00(m, 5H); 3,13(d, ²J_{PH}=16,6 Hz, 2H); 1,50-1,65(m, 2H); 1,18(t, ³J_{HH}=6,6 Hz, 3H); 0,98(dt, ³J_{PH}=17,4 Hz, ³J_{HH}=8,4 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 2,5 perc; (ESI): m/z = 412 [M + H]⁺.

Etil (4-[[6-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]amino]benzil)propilfoszfinát (107b): Az általános kapcsolási recept alapján 0,110 g (0,5 mmol) 4-klór-6-(2-metoxifenil)pirimidin (**6a**) és 0,167 g (0,6 mmol) **98b** anili*HCl felhasználásával végeztem a reakciót. A nyers terméket preparatív VRK lapon tisztítottam, kétszeri eluálással. Eluens 1: 100 % EtOAc, eluens 2: EtOAc:EtOH=8:1. A terméket MeOH-lal leoldottam. Bepárlás után 0,026 g sárga amorf anyagot izoláltam (12 %).

Op= ~szobahőmérséklet

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 54,1 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,61(s, 1H); 8,67(s, 1H); 7,94(d, ³J_{HH}=6,2 Hz, 1H); 7,63(d, J_{AABB}=7,2 Hz, 2H); 7,40-7,50(m, 2H); 7,22(d, J_{AABB}=6,8 Hz, 2H); 7,15-7,20(m, 1H); 7,07(t, ³J_{HH}=6,6 Hz, 1H); 3,85-4,00(m, 5H); 3,12(d, ²J_{PH}=16,3 Hz, 2H); 1,35-1,70(m, 4H); 1,18(t, ³J_{HH}=6,6 Hz, 3H); 0,92(széles s, 3H).

LC-MS: R_t = 2,48 perc és 2,68 perc; (ESI): m/z = 426 [M + H]⁺.

Etil etil(4-[[6-(3-nitrofenil)pirimidin-4-il]amino]benzil)foszfinát (108a): Az általános kapcsolási recept alapján 0,118 g (0,5 mmol) 4-klór-6-(3-nitrofenil)pirimidin (**6b**) és 0,158 g (0,6 mmol) **98a** anili*HCl felhasználásával végeztem a reakciót. A nyers terméket acetonitrilből átkristályosítottam, 0,104 g sárga port preparáltam (49 %).

Op= 226 °C (MeCN).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 55,6 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,8(s, 1H); 8,82(s, 1H); 8,76(s, 1H); 8,44(d, ³J_{HH}=6,8 Hz, 1H); 8,36(d, ³J_{HH}=6,3 Hz, 1H); 7,84(t, ³J_{HH}=6,3 Hz, 1H); 7,65(d, J_{AABB}=6,2 Hz, 2H); 7,35(s, 1H); 7,25(d, J_{AABB}=5,4 Hz, 2H); 3,90-3,95(m, 2H); 3,14(d,

$^2J_{\text{PH}}=16,4$ Hz, 2H); 1,50-1,70(m, 2H); 1,18(széles s, 3H); 0,99(dt, $^3J_{\text{PH}}=17,4$ Hz, $^3J_{\text{HH}}=8,7$ Hz, 3H).

LC-MS: $R_t = 3,33$ perc; (ESI): $m/z = 427$ [M + H]⁺.

Etil (4-{{6-(3-nitrofenil)pirimidin-4-il}amino}benzil)propilfoszfinát (108b): Az általános kapcsolási recept alapján 0,118 g (0,5 mmol) 4-klór-6-(3-nitrofenil)pirimidin (6b) és 0,167 g (0,6 mmol) **98b** anili*HCl felhasználásával végeztem a reakciót. A nyers terméket acetonitrilből átkristályosítottam, 0,085 g sárga port preparáltam (39 %).

Op= 219-220 °C (MeCN).

$^{31}\text{P-NMR}$ (242 MHz): DMSO-d₆; δ : 54,3 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO-d₆; δ (ppm): 9,80(s, 1H); 8,82(s, 1H); 8,76(s, 1H); 8,44(d, $^3J_{\text{HH}}=6,4$ Hz, 1H); 8,36(d, $^3J_{\text{HH}}=6,8$ Hz, 1H); 7,84(t, $^3J_{\text{HH}}=7,1$ Hz, 1H); 7,66(d, $J_{\text{AABB}}=7,0$ Hz, 2H); 7,35(s, 1H); 7,25(d, $J_{\text{AABB}}=5,7$ Hz, 2H); 3,90-3,95(m, 2H); 3,13(d, $^2J_{\text{PH}}=16,2$ Hz, 2H); 1,45-1,63(m, 4H); 1,18(széles s, 3H); 0,99(széles s, 3H).

LC-MS: $R_t = 3,58$ perc; (ESI): $m/z = 441$ [M + H]⁺.

Etil (4-{{6-(3-aminofenil)pirimidin-4-il}amino}benzil)etilfoszfinát (109a): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján 0,081 g **108a** nitro vegyület (0,19 mmol) redukcióját követően 0,062 g sárga port preparáltam (75 %).

Op= 152-155 °C (DEE).

$^{31}\text{P-NMR}$ (242 MHz): DMSO-d₆; δ : 55,3 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO-d₆; δ (ppm): 11,09(s, 1H); 8,82(s, 1H); 7,50-7,70(m, 5H); 7,25-7,50(m, 4H); 4,50(széles s, 2H); 3,90-3,95(m, 2H); 3,17(d, $^2J_{\text{PH}}=15,6$ Hz, 2H); 1,55-1,65(m, 2H); 1,18(t, $^3J_{\text{HH}}=7,0$ Hz, 3H); 0,99(dt, $^3J_{\text{PH}}=17,4$ Hz, $^3J_{\text{HH}}=8,7$ Hz, 3H).

LC-MS: $R_t = 0,44$ perc, 2,09 perc és 2,29 perc; (ESI): $m/z = 397$ [M + H]⁺.

Etil (4-{{6-(3-aminofenil)pirimidin-4-il}amino}benzil)propilfoszfinát (109b): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján 0,063 g **108b** nitro vegyület (0,14 mmol) redukciójával 0,053 g barna port preparáltam (85 %).

Op= 200 °C (DEE).

$^{31}\text{P-NMR}$ (242 MHz): DMSO-d₆; δ : 54,0 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 11,20(s, 1H); 8,85(s, 1H); 7,50-7,70(m, 5H); 7,25-7,50(m, 4H); 4,50(széles s, 2H); 3,80-4,10(m, 2H); 3,17(d, ²J_{PH}=16,2 Hz, 2H); 1,55-1,60(m, 2H); 1,40-1,50(m, 2H); 1,18(t, ³J_{HH}=7,0 Hz, 3H); 0,92(t, ³J_{HH}=7,0 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 0,42 perc, 2,36 perc és 2,51 perc; (ESI): m/z = 411 [M + H]⁺.

Etil etil(2-metil-5-nitrobenzil)foszfinát (110): A **82** brómbenzolt (1,150 g, 5,0 mmol) és 1,294 g dietil etilfoszfonitot (7,5 mmol) oldószer nélkül, argon áramoltatása mellett 140 °C-os olajfürdőben kevertetem 7 órán keresztül. A reakcióelegyet a **94a**-nál leírtak szerint dolgoztam fel. Végül 0,918 g barna olajat izoláltam (68 %).

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 7,78(s, 1H); 7,66(d, ³J_{HH}=6,9 Hz, 1H); 7,38(d, ³J_{HH}=7,2 Hz, 1H); 3,80-4,10(m, 2H); 3,30(H8 jeleit elfedi a DMSO víz jel); 2,44(s, 3H); 1,65-1,70(m, 2H); 1,13(t, ³J_{HH}=6,9 Hz, 3H); 1,04(dt, ³J_{PH}=17,7 Hz, ³J_{HH}=8,1 Hz, 3H).

Etil (5-amino-2-metilbenzil)etilfoszfinát (111): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján 0,900 g **110** nitro vegyület (3,32 mmol) redukcióját követően a szabad amint preparáltam. Termelés: 0,411 g barna olaj (51 %).

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 6,78(d, ³J_{HH}=7,1 Hz, 1H); 6,45(s, 1H); 6,34(d, ³J_{HH}=5,8 Hz, 1H); 4,70(széles s, 2H); 3,80-4,00(m, 2H); 2,97(d, ²J_{PH}=16,7 Hz, 2H); 1,91(s, 3H); 1,55-1,75(m, 2H); 1,16(széles s, 3H); 1,00(t, ³J_{HH}=7,5 Hz, 3H). A ¹H-NMR alapján a vegyület csak kb. 50 % tisztaságú.

LC-MS: R_t = 0,44 perc; (ESI): m/z = 242 [M + H]⁺.

Etil etil(5-{{6-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il}amino}-2-metilbenzil)foszfinát (112): Az általános kapcsolási recept alapján 0,117 g (0,5 mmol) 4-klór-6-(2-metoxifenil)pirimidin (**6a**) és 0,296 g (1,07 mmol) **111** anili*HCl felhasználásával végeztem a reakciót. A nyers terméket preparatív VRK lapon tisztítottam. Az eluens EtOAc:EtOH=8:1 volt. A terméket MeOH-lal leoldottam. Bepárlás után 0,053 g sárga port izoláltam (24 %).

O_p=94 °C, amorf (CH₂Cl₂).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 55,6 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,53(s, 1H); 8,64(s, 1H); 7,92(d, ³J_{HH}=6,8 Hz, 1H); 7,40-7,60(m, 4H); 7,00-7,20(m, 3H); 3,85-3,90(m, 5H); 3,13(d, ²J_{PH}=16,3 Hz, 2H); 2,30(s, 3H); 1,60-1,80(m, 2H); 1,15(t, ³J_{HH}=6,3 Hz, 3H); 1,03(dt, ³J_{PH}=17,0 Hz, ³J_{HH}=8,5 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 2,78 perc; (ESI): m/z = 426 [M + H]⁺.

Etil etil(2-metil-5-[[6-(3-nitrofenil)pirimidin-4-il]amino]benzil)foszfinát (113): Az általános kapcsolási recept alapján 0,118 g (0,5 mmol) 4-klór-6-(3-nitrofenil)pirimidin (**6b**) és 0,208 g (0,75 mmol) **111** anili*HCl felhasználásával végeztem a reakciót. A nyers terméket acetonitrilből átkristályosítottam: 0,033 g sárga por (15 %).

Op= 200-203 °C (MeCN).

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,72(s, 1H); 8,84(s, 1H); 8,72(s, 1H); 8,49(d, ³J_{HH}=6,8 Hz, 1H); 8,35(d, ³J_{HH}=6,7 Hz, 1H); 7,83(t, ³J_{HH}=8,1 Hz, 1H); 7,52(s, 1H); 7,47(d, ³J_{HH}=6,9 Hz, 1H); 7,38(s, 1H); 7,15(d, ³J_{HH}=6,9 Hz, 1H); 3,80-4,00(m, 2H); 3,17(d, ²J_{PH}=15,7 Hz, 2H); 2,31(s, 3H); 1,60-1,80(m, 2H); 1,15(t, ³J_{HH}=6,3 Hz, 3H); 1,05(dt, ³J_{PH}=17,9 Hz, ³J_{HH}=8,9 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 3,04 perc; (ESI): m/z = 441 [M + H]⁺.

Etil (5-[[6-(3-aminofenil)pirimidin-4-il]amino]-2-metilbenzil)etilfoszfinát (114): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján 0,023 g **113** nitro vegyület (0,05 mmol) redukciójával nyertem a tiszta terméket 0,018 g sárga por formájában (81 %).

Op= 180-181 °C (MeOH).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 55,7 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 10,93(s, 1H); 8,81(s, 1H); 7,40-7,70(m, 5H); 7,10-7,40(m, 3H); 4,20(széles s, 2H); 3,80-4,00(m, 2H); 3,19(d, ²J_{PH}=14,7 Hz, 2H); 2,34(s, 3H); 1,60-1,80(m, 2H); 1,15(t, ³J_{HH}=6,3 Hz, 3H); 1,04(dt, ³J_{PH}=17,7 Hz, ³J_{HH}=9,0 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 0,53 perc és 1,18 perc; (ESI): m/z = 411 [M + H]⁺.

Dietil {1-[(dietoxifoszforil)oxi]-1,2-bis(3-nitrofenil)-2-oxoetil}foszfonát (115): 1,855 g 3-nitro benzoésav kloridot (10,0 mmol) és a 2,324 g trietil foszfitot (2,4 ml, 14,0

mmol) oldószer nélkül kevertetem szobahőmérsékleten 3 órán keresztül. Az elegyet 0 °C-ra hűtöttem, majd 5 M vizes sósav oldatot (2 ml) adtam hozzá. 10 perc kevertetés után további 10 ml vizet adtam az elegyhez, és CH₂Cl₂-nal extraháltam (3x20 ml). Az egyesített szerves fázisokat 1 M-os vizes NaOH oldattal (20 ml) és telített sós vízzel (20 ml) mostam, MgSO₄-on szárítottam. A bepárlási maradékot dietil éterből kristályosítottam. 0,753 g fehér port szűrtem ki.

Op= 110-112 °C (DEE).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 10,2 ppm (d, ³J_{PP}=5,3 Hz); -6,2 ppm (d, ³J_{PP}=5,5 Hz).

¹H-NMR (600 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 8,39(d, ³J_{HH}=8,4 Hz, 1H); 8,35(s, 1H); 8,34(d, ³J_{HH}=9,0 Hz, 1H); 8,31(s, 1H); 7,99(d, ³J_{HH}=7,8 Hz, 1H); 7,91(d, ³J_{HH}=7,8 Hz, 1H); 7,80(t, ³J_{HH}=8,0 Hz, 1H), 7,71(t, ³J_{HH}=8,0 Hz, 1H); 4,20-4,13(m, 2H); 4,12-4,05(m, 2H); 4,06-4,00(m, 2H); 3,85-3,78 és 3,78-3,72(két m, 2H); 1,24(t, ³J_{HH}=7,2 Hz, 3H); 1,23(t, ³J_{HH}=7,2 Hz, 3H); 1,15(t, ³J_{HH}=7,2 Hz, 3H); 1,02(t, ³J_{HH}=7,2 Hz, 3H).

¹³C-NMR (75,5 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): A spektrum bonyolultsága miatt a teljes aszignációt nem tudtam kivitelezni. Azonban az egyértelműen azonosítható jelek megfelelnek a feltételezett szerkezetnek.

LC-MS: R_t = 3,89 perc; (ESI): m/z = 575 [M + H]⁺.

Dietil [(diatoxifoszforil)oxi](3-nitrofenil)metil}foszfonát (116): 10 ml vízmentes CH₂Cl₂-hoz hozzáadtam 0,54 ml vízmentes DMSO-t (7,61 mmol) és lehűtöttem -78 °C-ra, hozzáadtam 0,48 g oxalilkloridot (0,33 ml, 3,81 mmol) és 5 percig kevertetem az elegyet. Ezután, továbbra is -78 °C-on, 15 perc alatt belecsepegtettem 0,50 g **72** α-hidroxi-3-nitrobenzil-foszfonát (1,73 mmol) CH₂Cl₂-os oldatát (10 ml), majd 30 perccel később hozzáadtam 1,75 g trietilamint (2,4 ml, 17,3 mmol). Az elegyet hagytam szobahőmérsékletre melegedni. Egy nap keveredés után a reakcióelegyet vízzel (10 ml), 1 M vizes sósav (10 ml) és telített vizes NaHCO₃ (10 ml) oldatokkal mostam, MgSO₄-on szárítottam. Bepárlás után a nyers terméket preparatív VRK lapon tisztítottam. Az eluens 100 % EtOAc volt. Kétszeri futtatás után az anyagot MeOH-lal leoldottam a szilikagélről. 0,126 g sárga port izoláltam, ami nem a várt termék.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 8,34(s, 1H); 8,25(d, ³J_{HH}=7,1 Hz, 1H); 7,94(d, ³J_{HH}=5,7 Hz, 1H); 7,74(t, ³J_{HH}=7,8 Hz, 1H); 5,92(dd, ²J_{PH}~³J_{PH}=13,1 Hz, 1H); 3,95-4,15(m, 6H); 3,85-3,95(m, 2H); 1,15-1,25(m, 9H); 1,05-1,15(m, 2H).

¹³C-NMR (75,5 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 147,1(s, 1C); 137,1(s, 1C); 134,6(d, ³J_{PC}=5,0 Hz, 1C); 130,4(s, 1C); 124,1(s, 1C); 122,6(d, ³J_{PC}=5,6 Hz, 1C); 72,8(dd, ¹J_{PC}=166,6 Hz, ²J_{PC}=6,7 Hz, 1C); 63,5-64,5(m, 4C); 16,1-16,7(m, 4C).

LC-MS: R_t = 3,4 perc; (ESI): m/z = 426 [M + H]⁺.

6.6. Aril-foszfinát tartalmú inhibitorok előállítása (Ar-P)

Általános recept a H-foszfinátok és aromás halogenidek palládium katalizált kapcsolásához:

A megfelelő benzolhalogenidet (4 mmol) feloldottam 15-20 ml vízmentes toluolban, majd hozzáadtam rendre a megfelelő H-foszfinátot (4,4 mmol), 1,212 g trietiamint (1,66 ml, 12 mmol) és 0,123 g tetrakis(trifenilfoszfin)palládium(0)-t (0,08 mmol). Az elegyet argon atmoszférában refluxáltattam 20 órán keresztül, majd a lehűlt elegyből kiszűrtem a kivált csapadékot. A szűrletet bepároltam, majd EtOAc-ban feloldottam (100 ml) és 1 M vizes sósavval (50 ml), 2 M vizes NaOH-dal (50 ml) és telített sóoldattal (50 ml) mostam, MgSO₄-on szárítottam, végül bepároltam. A bemérések pontos értékét, a további tisztítási lépéseket, illetve a termeléseket és az anyagok jellemzését minden esetben külön adom meg.

Etil etil(3-nitrofenil)foszfinát (117a): A palládium katalizált kapcsolás általános receptje alapján 0,996 g 3-nitro-jódbenzol (4,0 mmol) és 0,537 g etil etilfoszfinát (4,4 mmol) reakciója. Bepárlás után a terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam, eluens: hexán:EtOAc=1:8→100 % EtOAc gradiensben. A megfelelő frakciók összepárlása után 0,14 g sárga olajat preparáltam (14 %).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 45,8 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 8,40-8,50(m, 2H); 8,14(t, ³J_{PH}~³J_{HH}=7,7 Hz, 1H); 7,86(t, ³J_{HH}=8,5 Hz, 1H); 3,80-3,90 és 3,95-4,00(2xm, 2x1H); 1,95-2,25(m, 2H); 1,22(s, 3H); 0,96(dt, ³J_{PH}=19,1 Hz, ³J_{HH}=9,0 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 2,83 perc; (ESI): m/z = 244 [M + H]⁺.

Dietil (3-nitrofenil)foszfonát (117d): A palládium katalizált kapcsolás általános receptje alapján, 2,5-szeres mennyiséggel végeztéma reakciót: 2,490 g 3-nitro-jódbenzol (10,0 mmol); 1,518 g dietilfoszfit (1,42 ml, 11,0 mmol); 3,030 g trietiamin (4,15 ml, 30,0 mmol) és 0,308 g tetrakis(trifenilfoszfin)palládium(0) (0,2 mmol) reakciója 50 ml toluolban. Bepárlás után a terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam, eluens: hexán:EtOAc=1:1→100 % EtOAc gradiensben. A megfelelő frakciók összepárlása után 0,951 g sárga olajat preparáltam (37 %).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 13,5 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 8,47(d, ³J_{HH}=8,6 Hz, 1H); 8,40(d, ³J_{PH}=14,2 Hz, 1H); 8,14(dd, ³J_{PH}=12,3 Hz, ³J_{HH}=7,5 Hz, 1H); 7,86(dt, ³J_{HH}=8,5 Hz, ⁴J_{PH}=4,1 Hz, 1H); 4,00-4,15(m, 4H); 1,26(t, ³J_{HH}=7,0 Hz, 6H).

LC-MS: R_t = 3,20 perc; (ESI): m/z = 260 [M + H]⁺.

Etil (3-aminofenil)etilfoszfinát (118a): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján 0,105 g **117a** nitro vegyület (0,43 mmol) redukciójával 0,078 g (85 %) szabad amint preparáltam sárga olaj formájában.

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 48,3 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 7,10-7,20(m, 1H); 6,93(d, ³J_{PH}=12,9 Hz, 1H); 6,70-6,88(m, 2H); 5,34(széles s, 2H); 3,70-3,80 és 3,85-3,95(2xm, 2x1H); 1,75-1,85(m, 2H); 1,19(t, ³J_{HH}=6,9 Hz, 3H); 0,94(dt, ³J_{PH}=18,5 Hz, ³J_{HH}=7,4 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 2,03 perc; (ESI): m/z = 214 [M + H]⁺.

Dietil (3-aminofenil)foszfonát (118d): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján 0,804 g **117d** nitro vegyület (3,1 mmol) redukcióját követően a szabad amint preparáltam. Termelés: 0,638 g sárga olaj (90 %).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 16,4 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 7,25-7,50(m, 4H); 5,80(széles s, 2H); 3,95-4,05(m, 4H); 1,24(t, ³J_{HH}=7,1 Hz, 6H).

LC-MS: R_t = 2,34 perc; (ESI): m/z = 230 [M + H]⁺.

Etil etil(4-nitrofenil)foszfinát (119a): A palládium katalizált kapcsolás általános receptje alapján 2,5-szeres mennyiséggel végeztéma reakciót: 2,020 g 4-nitro-

brómbenzol (10,0 mmol) és 1,342 g etil etilfoszfinát (11,0 mmol) 3,030 g trietiamin (4,15 ml, 30,0 mmol) és 0,308 g tetrakis(trifenilfoszfin)palládium(0) (0,2 mmol) reakciója 50 ml toluolban. Bepárlás után a terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam, eluens: hexán:EtOAc=1:1→EtOAc:EtOH=9:1 gradiensben. A megfelelő frakciók összepárlása után 1,312 g sárga olajat preparáltam (54 %), amely állás során kristályosodik.

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 45,7 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 8,36(d, J_{AABB}=6,7 Hz, 2H); 8,02(dd, ³J_{PH}~J_{AABB}=9,0 Hz, 2H); 3,8-3,9 és 3,92-4,0(2xm, 2x1H); 1,93-2,05(m, 2H); 1,21(t, ³J_{HH}=6,8 Hz, 3H); 0,95(dt, ³J_{PH}=19,2 Hz, ³J_{HH}=8,0 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 2,86 perc; (ESI): m/z = 244 [M – H]⁺.

Etil (4-nitrofenil)propilfoszfinát (119b): A palládium katalizált kapcsolás általános receptje alapján 2,5-szeres mennyiséggel végeztéma reakciót: 2,020 g 4-nitrobrómbenzol (10,0 mmol) és 1,496 g etil propilfoszfinát (11,0 mmol) 3,030 g trietiamin (4,15 ml, 30,0 mmol) és 0,308 g tetrakis(trifenilfoszfin)palládium(0) (0,2 mmol) reakciója 50 ml toluolban. Bepárlás után a terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam, eluens: hexán:EtOAc=1:1→100 % EtOAc gradiensben. A megfelelő frakciók összepárlása után 1,305 g sárga olajat preparáltam (54 %).

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 8,35(d, J_{AABB}=6,8 Hz, 2H); 8,02(dd, ³J_{PH}~J_{AABB}=9,0 Hz, 2H); 3,97(q, ³J_{HH}=6,9 Hz, 1H); 3,81(q, ³J_{HH}=7,0 Hz, 1H); 1,95-2,05(m, 2H); 1,30-1,50(m, 2H); 1,20(t, ³J_{HH}=6,8 Hz, 3H); 0,92(t, ³J_{HH}=6,5 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 3,22 perc; (ESI): m/z = 258 [M + H]⁺.

Etil fenil(4-nitrofenil)foszfinát (119c): A palládium katalizált kapcsolás általános receptje alapján 2,5-szeres mennyiséggel végeztéma reakciót: 2,020 g 4-nitrobrómbenzol (10,0 mmol) és 1,870 g etil fenilfoszfinát (11,0 mmol) 3,030 g trietiamin (4,15 ml, 30,0 mmol) és 0,308 g tetrakis(trifenilfoszfin)palládium(0) (0,2 mmol) reakciója 50 ml toluolban. Bepárlás után a terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam, eluens: hexán:EtOAc=1:1→100 % EtOAc gradiensben. A megfelelő frakciók összepárlása után 1,849 g sárga olajat preparáltam (64 %).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 29,7 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 8,33(d, J_{AABB}=6,1 Hz, 2H); 8,04(dd, ³J_{PH}~J_{AABB}=9,5 Hz, 2H); 7,81(dd, ³J_{PH}~J_{AABB}=9,2 Hz, 2H); 7,60-7,65(m, 1H); 7,50-7,65(m, 2H); 4,00-4,10(m, 2H); 1,31(t, ³J_{HH}=6,7 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 3,49 perc; (ESI): m/z = 292 [M + H]⁺.

Dietil (4-nitrofenil)foszfonát (119d): A palládium katalizált kapcsolás általános receptje alapján 5-szörös mennyiséggel végeztem a reakciót: 5,050 g 4-nitro-brómbenzol (25,0 mmol) és 3,795 g dietilfoszfit (27,5 mmol) 6,060 g trietiamin (8,30 ml, 60,0 mmol) és 0,616 g tetrakis(trifenilfoszfin)palládium(0) (0,4 mmol) reakciója 100 ml toluolban. Bepárlás után a terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam, eluens: hexán:EtOAc=1:1→100 % EtOAc gradiensben. A megfelelő frakciók összepárlása után 3,948 g sárga olajat preparáltam (61 %).

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 8,35(dd, J_{AABB}=8,7 Hz, ⁴J_{PH}=3,1 Hz, 2H); 7,99(dd, J_{AABB}=8,7 Hz, ³J_{PH}=12,5 Hz, 2H); 4,00-4,10(m, 4H); 1,25(t, ³J_{HH}=7,0 Hz, 6H).

LC-MS: R_t = 3,25 perc; (ESI): m/z = 260 [M + H]⁺.

Etil (4-aminofenil)etilfoszfinát (120a): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján 1,302 g **119a** nitro vegyület (5,36 mmol) redukciója után a szabad amint preparáltam. Termelés: 0,654 g sárga olaj (49 %).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 48,8 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 7,32(dd, ³J_{PH}~J_{AABB}=8,4 Hz, 2H); 6,61(d, J_{AABB}=5,7 Hz, 2H); 5,73(széles s, 2H); 3,65-3,75 és 3,75-3,85(2xm, 2x1H); 1,72-1,75(m, 2H); 1,16(széles s, 3H); 0,91(dt, ³J_{PH}=18,3 Hz, ³J_{HH}=8,4 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 2,16 perc; (ESI): m/z = 214 [M + H]⁺.

Etil (4-aminofenil)propilfoszfinát (120b): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján 1,300 g **119b** nitro vegyület (5,06 mmol) redukciója után a szabad amint preparáltam. Termelés: 0,985 g sárga olaj (86 %).

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 7,32(dd, ³J_{PH}~J_{AABB}=9,0 Hz, 2H); 6,60(d, J_{AABB}=5,7 Hz, 2H); 5,70(széles s, 2H); 3,60-3,75 és 3,80-3,85(2xm, 2x1H); 1,70-1,80(m, 2H); 1,25-1,40(m, 2H); 1,16(széles s, 3H); 0,90(széles s, 3H).

LC-MS: R_t = 2,53 perc; (ESI): m/z = 228 [M + H]⁺.

Etil (4-aminofenil)fenilfoszfinát (120c): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján 1,809 g **119c** nitro vegyület (6,22 mmol) redukcióját követően a szabad amint preparáltam. Termelés: 1,435 g sárga por (88 %).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 33,6 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 7,68(dd, ³J_{PH}~³J_{HH}=9,1 Hz, 2H); 7,40-7,60(m, 3H); 7,37(dd, ³J_{PH}~J_{AABB}=9,4 Hz, 2H); 6,60(d, J_{AABB}=5,9 Hz, 2H); 5,79(széles s, 2H); 3,85-3,95(m, 2H); 1,24(széles s, 3H).

LC-MS: R_t = 2,83 perc; (ESI): m/z = 262 [M + H]⁺.

Dietil (4-aminofenil)foszfonát (120d): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján 3,947 g **119d** nitro vegyület (15,2 mmol) redukcióját követően a nyers terméket toluolból átkristályosítottam. Termelés: 1,807 g sárga por (52 %).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 20,3 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 7,31(dd, ³J_{PH}=12,5 Hz, J_{AABB}=8,5 Hz, 2H); 6,60(d, J_{AABB}=8,5 Hz, ⁴J_{PH}=3,7 Hz, 2H); 5,77(széles s, 2H); 3,80-4,00(m, 4H); 1,18(t, ³J_{HH}=7,0 Hz, 6H).

LC-MS: R_t = 2,48 perc; (ESI): m/z = 230 [M + H]⁺.

Etil etil(3-{[6-(3-metoxifenil)pirimidin-4-il]amino}fenil)foszfinát (121): Az általános kapcsolási recept alapján 0,057 g (0,26 mmol) 4-klór-6-(2-metoxifenil)pirimidin (**6a**) és 0,077 g (0,31 mmol) **118a** anili*HCl felhasználásával végeztem a reakciót. A nyers terméket acetonitrilből átkristályosítottam: 0,035 g sárga port izoláltam (34 %).

Op= 155 °C (MeCN).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 47,7 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,85(s, 1H); 8,72(s, 1H); 7,85-8,10(m, 3H); 7,40-7,55(m, 3H); 7,28-7,40(m, 1H); 7,14-7,25(m, 1H); 7,02-7,12(m, 1H); 3,91(s, 3H); 3,80-4,00(m, 2H); 1,80-1,95(m, 2H); 1,23(széles s, 3H); 0,97(dt, ³J_{PH}=17,3 Hz, ³J_{HH}=6,4 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 2,56 perc; (ESI): m/z = 398 [M + H]⁺.

Etil etil(3-[[6-(4-nitrofenil)pirimidin-4-il]amino}fenil)foszfinát (122): Az általános kapcsolási recept alapján 0,073 g (0,31 mmol) 4-klór-6-(3-nitrofenil)pirimidin (**6b**) és 0,091 g (0,37 mmol) **118a** anili*HCl felhasználásával végeztem a reakciót. A nyers terméket acetonitrilből átkristályosítottam: 0,066 g sárga port izoláltam (52 %).

$O_p = 211$ °C (MeCN).

$^{31}\text{P-NMR}$ (242 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 47,5 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): 10,07(s, 1H); 8,83(s, 1H); 8,81(s, 1H); 8,47(d, $^3J_{\text{HH}}=6,6$ Hz, 1H); 8,37(d, $^3J_{\text{HH}}=6,9$ Hz, 1H); 8,00-8,10(m, 2H); 7,85(t, $^3J_{\text{HH}}=7,2$ Hz, 1H); 7,45-7,55(m, 1H); 7,30-7,45(m, 2H); 3,80-3,90 és 3,90-4,00(2xm, 2x1H); 1,80-2,00(m, 2H); 1,23(széles s, 3H); 0,99(dt, $^3J_{\text{PH}}=18,3$ Hz, $^3J_{\text{HH}}=8,7$ Hz, 3H).

LC-MS: $R_t = 3,55$ perc; (ESI): $m/z = 413$ [M + H] $^+$.

Etil (3-[[6-(4-aminofenil)pirimidin-4-il]amino}fenil)etilfoszfinát (123): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján 0,048 g **122** nitro vegyület (0,12 mmol) redukcióját végeztem el. Termelés: 0,040 g sárga por (80 %).

$O_p = 213-214$ °C (DEE).

$^{31}\text{P-NMR}$ (242 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 47,2 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): 11,06(s, 1H); 8,87(s, 1H); 8,00-8,15(m, 2H); 7,75-7,85(m, 2H); 7,55-7,62(m, 2H); 7,38-7,50(m, 3H); 5,30(széles s, 2H); 3,80-3,85 és 3,95-4,00(2xm, 2x1H); 1,88-1,93(m, 2H); 1,23(széles s, 3H); 0,98(dt, $^3J_{\text{PH}}=18,7$ Hz, $^3J_{\text{HH}}=6,8$ Hz, 3H).

LC-MS: $R_t = 2,37$ perc; (ESI): $m/z = 383$ [M + H] $^+$.

Etil etil(4-[[6-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]amino}fenil)foszfinát (124a): Az általános kapcsolási recept alapján 0,110 g (0,5 mmol) 4-klór-6-(2-metoxifenil)pirimidin (**6a**) és 0,150 g (0,6 mmol) **120a** anili*HCl felhasználásával végeztem a reakciót. A nyers terméket preparatív VRK lapon tisztítottam. Az eluens 100 % EtOAc + 1 v/v % AcOH volt. A terméket MeOH-lal leoldottam. Bepárlás után 0,075 g sárga port izoláltam (38 %).

$O_p = 151-153$ °C (MeOH).

$^{31}\text{P-NMR}$ (242 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 47,3 ppm.

¹H-NMR (600 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,95(s, 1H); 8,74(s, 1H); 7,94(dd, ³J_{HH}=7,8 Hz, ⁴J_{HH}=2,0 Hz, 1H); 7,88(dd, J_{AABB}=8,4 Hz, ⁴J_{PH}=2,4 Hz, 2H); 7,65(dd, J_{AABB}=8,4 Hz, ³J_{PH}=10,8 Hz, 2H); 7,51(s, 1H); 7,44(t, ³J_{HH}=7,2 Hz, 1H); 7,17(d, ³J_{HH}=8,4 Hz, 1H); 7,06(t, ³J_{HH}=7,2 Hz, 1H); 3,88(s, 3H); 3,70-3,78 és 3,85-3,92(2xm, 2x1H); 1,77-1,90(m, 2H); 1,17(t, ³J_{HH}=7,2 Hz, 3H); 0,93(dt, ³J_{PH}=18,6 Hz, ³J_{HH}=7,8 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 2,60 perc; (ESI): m/z = 398 [M + H]⁺.

Etil (4-{{6-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il}amino}fenil)propilfoszfinát (124b): Az általános kapcsolási recept alapján 0,110 g (0,5 mmol) 4-klór-6-(2-metoxifenil)pirimidin (**6a**) és 0,132 g (0,6 mmol) **120b** anili*HCl felhasználásával végeztem a reakciót. A nyers terméket preparatív VRK lapon tisztítottam. Az eluens 100 % EtOAc volt. A terméket MeOH-lal leoldottam. Bepárlás után 0,041 g sárga port izoláltam (20 %).

O_p = 85 °C (MeOH).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 45,7 ppm.

¹H-NMR (600 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,94(s, 1H); 8,74(s, 1H); 7,94(dd, ³J_{HH}=7,8 Hz, ⁴J_{HH}=1,2 Hz, 1H); 7,88(dd, J_{AABB}=8,4 Hz, ⁴J_{PH}=2,4 Hz, 2H); 7,65(dd, J_{AABB}=9,0 Hz, ³J_{PH}=10,8 Hz, 2H); 7,51(s, 1H); 7,44(t, ³J_{HH}=7,8 Hz, 1H); 7,17(d, ³J_{HH}=8,4 Hz, 1H); 7,06(t, ³J_{HH}=7,8 Hz, 1H); 3,88(s, 3H); 3,68-3,76 és 3,84-3,90(2xm, 2x1H); 1,76-1,88(m, 2H); 1,30-1,48(m, 2H); 1,17(t, ³J_{HH}=7,2 Hz, 3H); 0,89(t, ³J_{HH}=7,8 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 2,82 perc; (ESI): m/z = 412 [M + H]⁺.

Etil fenil(4-{{6-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il}amino}fenil)foszfinát (124c): Az általános kapcsolási recept alapján 0,110 g (0,5 mmol) 4-klór-6-(2-metoxifenil)pirimidin (**6a**) és 0,179 g (0,6 mmol) **120c** anili*HCl felhasználásával végeztem a reakciót. A nyers terméket acetonitrilből átkristályosítottam: 0,129 g halványsárga port izoláltam (58 %).

O_p = 197-198 °C (MeCN).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 32,0 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,97(s, 1H); 8,77(s, 1H); 7,96(d, ³J_{HH}=7,4 Hz, 1H), 7,85-7,95(m, 2H); 7,70-7,80(m, 4H); 7,40-7,60(m, 5H); 7,19(d, ³J_{HH}=7,7 Hz, 1H); 7,09(t, ³J_{HH}=7,2 Hz, 1H); 3,90-3,80(m, 2H); 3,90(s, 3H); 1,29(t, ³J_{HH}=7,0 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 3,06 perc; (ESI): m/z = 446 [M + H]⁺.

Etil etil(4-{{6-(3-nitrofenil)pirimidin-4-il}amino}fenil)foszfinát (125a): Az általános kapcsolási recept alapján 0,118 g (0,5 mmol) 4-klór-6-(3-nitrofenil)pirimidin (**6b**) és 0,150 g (0,6 mmol) **120a** anili*HCl felhasználásával végeztem a reakciót. A nyers terméket acetonitrilből átkristályosítottam: 0,135 g sárga port izoláltam (66 %).

O_p= 241-242 °C (MeCN).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 47,4 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 10,20(s, 1H); 8,85(s, 2H); 8,48(d, ³J_{HH}=6,3 Hz, 1H); 8,37(d, ³J_{HH}=5,7 Hz, 1H), 7,30-7,70(m, 3H); 7,60-7,70(m, 2H); 7,40-7,50(m, 1H); 3,76-3,79 és 3,90-3,93(2xm, 2x1H); 1,83-1,87(m, 2H); 1,20(széles s, 3H); 0,96(dt, ³J_{PH}=18,3 Hz, ³J_{HH}=9,3 Hz, 3H).

LC-MS: R_t = 3,57 perc; (ESI): m/z = 413 [M + H]⁺.

Etil (4-{{6-(3-nitrofenil)pirimidin-4-il}amino}fenil)propilfoszfinát (125b): Az általános kapcsolási recept alapján 0,118 g (0,5 mmol) 4-klór-6-(3-nitrofenil)pirimidin (**6b**) és 0,167 g (0,6 mmol) **120b** anili*HCl felhasználásával végeztem a reakciót. A nyers terméket acetonitrilből átkristályosítottam: 0,059 g halványsárga port izoláltam (28 %).

O_p= 207-209 °C (MeCN).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 45,9 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 10,20(s, 1H); 8,85(s, 2H); 8,48(d, ³J_{HH}=6,5 Hz, 1H); 8,37(d, ³J_{HH}=7,3 Hz, 1H), 7,75-7,95(m, 3H); 7,65-7,75(m, 2H); 7,48(s, 1H); 3,75-3,80 és 3,90-3,95(2xm, 2x1H); 1,83-1,89(m, 2H); 1,40-1,45(m, 2H); 1,20(széles s, 3H); 0,92(széles s, 3H).

LC-MS: R_t = 3,87 perc; (ESI): m/z = 427 [M + H]⁺.

Etil fenil(4-{{6-(3-nitrofenil)pirimidin-4-il}amino}fenil)foszfinát (125c): Az általános kapcsolási recept alapján 0,118 g (0,5 mmol) 4-klór-6-(3-nitrofenil)pirimidin (**6b**) és

0,179 g (0,6 mmol) **120c** anili*HCl felhasználásával végeztem a reakciót. A nyers terméket acetonitrilből átkristályosítottam: 0,149 g halványsárga port izoláltam (65 %).

$O_p = 243$ °C (MeCN).

$^{31}\text{P-NMR}$ (242 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 32,1 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): 10,37(s, 1H); 8,84(s, 2H); 8,47(d, $^3J_{\text{HH}}=5,7$ Hz, 1H); 8,36(d, $^3J_{\text{HH}}=6,3$ Hz, 1H), 7,90-8,00(m, 2H); 7,60-7,90(m, 5H); 7,40-7,60(m, 4H); 3,80-4,05(m, 2H); 1,30(t, $^3J_{\text{HH}}=7,5$ Hz, 3H).

LC-MS : $R_t = 4,02$ perc; (ESI): $m/z = 461$ [M + H] $^+$.

Etil (4-{{6-(3-aminofenil)pirimidin-4-il}amino}fenil)etilfoszfinát (126a): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján 0,108 g **125a** nitro vegyület (0,26 mmol) redukcióját végeztem el. Termelés: 0,084 g sárga por (77 %).

$O_p = 136-138$ °C (DEE).

$^{31}\text{P-NMR}$ (242 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 47,7 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): 10,88(s, 1H); 8,87(s, 1H); 7,92-7,96(m, 2H); 7,83-7,87(m, 2H); 7,70-7,75(m, 2H); 7,59-7,62(m, 1H); 7,42-7,47(m, 2H); 4,00(széles s, 2H); 3,80-3,90 és 3,90-4,00(2xm, 2x1H); 1,85-1,89(m, 2H); 1,21(széles s, 3H); 0,96(dt, $^3J_{\text{PH}}=18,5$ Hz, $^3J_{\text{HH}}=8,0$ Hz, 3H).

LC-MS : $R_t = 2,23$ perc és 2,39 perc; (ESI): $m/z = 383$ [M + H] $^+$.

Etil (4-{{6-(3-aminofenil)pirimidin-4-il}amino}fenil)propilfoszfinát (126b): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján 0,039 g **125b** nitro vegyület (0,09 mmol) redukcióját végeztem el. Termelés: 0,035 g sárga por (90 %).

$O_p = 140-142$ °C (DEE).

$^{31}\text{P-NMR}$ (242 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 45,7 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): 10,75(s, 1H); 8,87(s, 1H); 7,90-7,93(m, 2H); 7,69-7,82(m, 4H); 7,55-7,60(m, 1H); 7,35-7,44(m, 2H); 3,68(széles s, 4H); 1,83-1,87(m, 2H); 1,40-1,44(m, 2H); 1,21(t, $^3J_{\text{HH}}=7,0$ Hz, 3H); 0,92(t, $^3J_{\text{HH}}=7,0$ Hz, 3H).

LC-MS : $R_t = 2,61$ perc; (ESI): $m/z = 397$ [M + H] $^+$.

Etil (4-[[6-(3-aminofenil)pirimidin-4-il]amino]fenil)fenilfoszfinát (126c): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján 0,132 g **125c** nitro vegyület (0,29 mmol) redukcióját hajtottam végre. Termelés: 0,073 g sárga por (59 %).

$O_p = 131-134$ °C (DEE).

$^{31}\text{P-NMR}$ (242 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 33,0 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): 9,98(s, 1H); 8,73(s, 1H); 7,99(d, $^3J_{\text{HH}}=5,4$ Hz, 1H); 7,71-7,76(m, 5H); 7,55-7,60(m, 3H); 7,10-7,35(m, 4H); 6,70-6,75(m, 1H); 5,29(széles s, 2H); 3,97-4,01(m, 2H); 1,29(t, $^3J_{\text{HH}}=6,7$ Hz, 3H).

LC-MS: $R_t = 2,81$ perc; (ESI): $m/z = 431$ [M + H] $^+$.

Dietil (3-[[6-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]amino]fenil)foszfonát (127a): Az általános kapcsolási recept alapján 0,121 g (0,55 mmol) 4-klór-6-(2-metoxifenil)pirimidin (**6a**) és 0,218 g (0,82 mmol) **118d** anili*HCl felhasználásával végeztem a reakciót. A nyers terméket DIPE-ben eldörzsöltem, szűrtem: 0,132 g halványsárga port izoláltam (58 %).

$O_p = 122-123$ °C (DIPE).

$^{31}\text{P-NMR}$ (242 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 17,0 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): 9,87(s, 1H); 8,74(s, 1H); 8,10(d, $^3J_{\text{PH}}=15,4$ Hz, 1H); 8,06(d, $^3J_{\text{HH}}=8,4$ Hz, 1H); 7,97(d, $^3J_{\text{HH}}=7,5$ Hz, 1H); 7,44-7,55(m, 3H); 7,32(dd, $^3J_{\text{PH}}=12,6$ Hz, $^3J_{\text{HH}}=7,4$ Hz, 1H); 7,19(d, $^3J_{\text{HH}}=8,3$ Hz, 1H); 7,09(t, $^3J_{\text{HH}}=7,4$ Hz, 1H); 3,98-4,09(m, 4H); 3,91(s, 3H); 1,26(t, $^3J_{\text{HH}}=7,0$ Hz, 6H).

LC-MS: $R_t = 2,70$ perc; (ESI): $m/z = 414$ [M + H] $^+$.

(3-[[6-(2-Metoxifenil)pirimidin-4-il]amino]fenil)foszfonsav (127b): A **92**-es vegyületeknél leírt módszer szerint 0,05 g **127a** észter (0,12 mmol) hidrolízisét végeztem el. A preparált tiszta termék 0,03 g sárga port volt (69 %).

$O_p = 250-253$ °C (dec) (EtOH).

$^{31}\text{P-NMR}$ (242 MHz): DMSO- d_6 ; δ : 10,9 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): 11,41(s, 1H); 8,91(s, 1H); 8,00(d, $^3J_{\text{PH}}=14,0$ Hz, 1H); 7,91(d, $^3J_{\text{HH}}=4,9$ Hz, 1H); 7,77(d, $^3J_{\text{HH}}=7,4$ Hz, 1H); 7,61(t, $^3J_{\text{HH}}=7,6$ Hz, 1H); 7,40-7,55(m, 2H); 7,45(s, 1H); 7,27(d, $^3J_{\text{HH}}=8,2$ Hz, 1H); 7,17(t, $^3J_{\text{HH}}=7,4$ Hz, 1H); 5,75(széles s, 2H); 3,91(s, 3H).

LC-MS: $R_t = 0,47$ perc és $1,92$ perc; (ESI): $m/z = 358 [M + H]^+$; $356 [M - H]^-$.

Dietil (3-{{6-(3-nitrofenil)pirimidin-4-il}amino}fenil)foszfonát (128a): Az általános kapcsolási recept alapján $0,249$ g ($1,06$ mmol) 4-klór-6-(3-nitrofenil)pirimidin (**6b**) és $0,421$ g ($1,59$ mmol) **118d** anili*HCl felhasználásával végeztem a reakciót. A nyers terméket DIPE-ben eldörzsöltem, szűrtem: $0,364$ g sárga port izoláltam (80%).

$O_p = 206-208$ °C (DIPE).

$^{31}\text{P-NMR}$ (242 MHz): DMSO- d_6 ; δ : $16,9$ ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): $10,04$ (s, 1H); $8,84$ (s, 1H); $8,82$ (s, 1H); $8,47$ (d, $^3J_{\text{HH}}=7,8$ Hz, 1H); $8,37$ (d, $^3J_{\text{HH}}=7,2$ Hz, 1H); $8,13$ (d, $^3J_{\text{PH}}=14,7$ Hz, 1H); $8,04$ (d, $^3J_{\text{HH}}=8,1$ Hz, 1H); $7,86$ (t, $^3J_{\text{HH}}=8,1$ Hz, 1H); $7,53$ (dt, $^3J_{\text{HH}}=7,8$ Hz, $^4J_{\text{PH}}=5,2$ Hz, 1H); $7,40$ (s, 1H); $7,19$ (dd, $^3J_{\text{PH}}=12,9$ Hz, $^3J_{\text{HH}}=7,4$ Hz, 1H); $4,00-4,10$ (m, 4H); $1,26$ (t, $^3J_{\text{HH}}=6,9$ Hz, 6H).

LC-MS: $R_t = 3,85$ perc; (ESI): $m/z = 429 [M + H]^+$; $427 [M - H]^-$.

(3-{{6-(3-Nitrofenil)pirimidin-4-il}amino}fenil)foszfonsav (128b): A **92**-es vegyületeknél leírt módszer szerint $0,05$ g **127a** észter ($0,12$ mmol) hidrolízisét végeztem el. A preparált tiszta termék $0,03$ g sárga port volt (69%).

$O_p > 350$ °C (EtOH).

$^{31}\text{P-NMR}$ (242 MHz): DMSO- d_6 ; δ : $11,6$ ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO- d_6 ; δ (ppm): $10,16$ (s, 1H); $8,82$ (s, 2H); $8,43$ (d, $^3J_{\text{HH}}=7,7$ Hz, 1H); $8,38$ (d, $^3J_{\text{HH}}=8,1$ Hz, 1H); $8,00$ (d, $^3J_{\text{PH}}=14,7$ Hz, 1H); $7,94$ (d, $^3J_{\text{HH}}=7,8$ Hz, 1H); $7,86$ (t, $^3J_{\text{HH}}=8,0$ Hz, 1H); $7,33-7,49$ (m, 3H); $5,27$ (széles s, 2H).

LC-MS: $R_t = 2,50$ perc; (ESI): $m/z = 373 [M + H]^+$; $371 [M - H]^-$.

Dietil (4-{{6-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il}amino}fenil)foszfonát (129a): Az általános kapcsolási recept alapján $0,097$ g ($0,44$ mmol) 4-klór-6-(2-metoxifenil)pirimidin (**6a**) és $0,174$ g ($0,66$ mmol) **120d** anili*HCl felhasználásával végeztem a reakciót. A nyers terméket DIPE-ben eldörzsöltem, szűrtem: $0,106$ g sárga port izoláltam (58%).

$O_p = 151$ °C (DIPE).

$^{31}\text{P-NMR}$ (242 MHz): DMSO- d_6 ; δ : $17,9$ ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,97(s, 1H); 8,78(s, 1H); 7,98(dd, ³J_{HH}=7,7 Hz, ⁴J_{HH}=1,5 Hz, 1H); 7,92(dd, J_{AABB}=8,5 Hz, ⁴J_{PH}=3,5 Hz, 2H); 7,67(dd, ³J_{PH}=12,6 Hz, J_{AABB}=8,5 Hz, 2H); 7,55(s, 1H); 7,47(dd, ³J_{HH}=7,7 Hz, ³J_{HH}=7,2 Hz, 1H); 7,19(d, ³J_{HH}=8,3 Hz, 1H); 7,09(t, ³J_{HH}=7,2 Hz, 1H); 3,94-4,05(m, 4H); 3,92(s, 3H); 1,24(t, ³J_{HH}=7,0 Hz, 6H).

LC-MS: R_t = 2,82 perc; (ESI): m/z = 414 [M + H]⁺; 412 [M – H]⁻.

(4-[[6-(2-Metoxifenil)pirimidin-4-il]amino]fenil)foszfonsav (129b): A **92**-es vegyületeknél leírt módszer szerint 0,077 g **129a** észter (0,19 mmol) hidrolízisét végeztem el. A preparált tiszta termék 0,015 g sárga port volt (22 %).

O_p > 350 °C (EtOH).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 10,7 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 9,85(s, 1H); 8,74(s, 1H); 7,90(d, ³J_{HH}=6,5 Hz, 1H); 7,52-7,80(m, 4H); 7,40-7,50(m, 2H); 7,19(d, ³J_{HH}=8,0 Hz, 1H); 7,09(dd, ³J_{HH}=7,0 Hz, ³J_{HH}=6,6 Hz, 1H); 4,60(széles s, 2H); 3,91(s, 3H).

LC-MS: R_t = 0,46 perc és 1,83 perc; (ESI): m/z = 358 [M + H]⁺; 356 [M – H]⁻.

Dietil (4-[[6-(3-nitrofenil)pirimidin-4-il]amino]fenil)foszfonát (130): Az általános kapcsolási recept alapján 0,250 g (1,06 mmol) 4-klór-6-(3-nitrofenil)pirimidin (**6b**) és 0,422 g (1,59 mmol) **120d** anili*HCl felhasználásával végeztem a reakciót. A nyers terméket DEE-ben eldörzsöltem, szűrtem, majd acetonitrilből átkristályosítottam: 0,209 g sárga port izoláltam (46 %).

O_p = 219 °C (MeCN).

³¹P-NMR (242 MHz): DMSO-d₆; δ: 17,7 ppm.

¹H-NMR (300 MHz): DMSO-d₆; δ(ppm): 10,30(s, 1H); 8,85(s, 2H); 8,48(d, ³J_{HH}=7,7 Hz, 1H); 8,37(d, ³J_{HH}=7,9 Hz, 1H); 7,94(dd, J_{AABB}=8,2 Hz, ⁴J_{PH}=3,1 Hz, 2H); 7,85(t, ³J_{HH}=8,0 Hz, 1H); 7,68(dd, ³J_{PH}=12,5 Hz, J_{AABB}=8,4 Hz, 2H); 7,51(s, 1H); 3,94-4,05(m, 4H); 1,24(t, ³J_{HH}=7,0 Hz, 6H).

LC-MS: R_t = 3,87 perc; (ESI): m/z = 429 [M + H]⁺; 427[M – H]⁻.

Dietil (4-[[6-(3-aminofenil)pirimidin-4-il]amino]fenil)foszfonát (131a): A fenolok és foszfonátok redukciójának általános receptje alapján 0,140 g **130** nitro vegyület (0,33

mmol) redukcióját követően a szabad amint preparáltam. Termelés: 0,127 g sárga por (97 %).

$O_p = 174-175$ °C (EtOAc).

$^{31}\text{P-NMR}$ (242 MHz): DMSO-d₆; δ : 17,8 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO-d₆; δ (ppm): 9,99(s, 1H); 8,75(s, 1H); 7,91(dd, $J_{\text{AABB}}=8,5$ Hz, $^4J_{\text{PH}}=3,5$ Hz, 2H); 7,67(dd, $^3J_{\text{PH}}=12,5$ Hz, $J_{\text{AABB}}=8,5$ Hz, 2H); 7,31(s, 1H); 7,23(s, 1H); 7,10-7,20(m, 2H); 6,65-6,71(m, 1H); 5,30(széles s, 2H); 3,94-4,04(m, 4H); 1,23(t, $^3J_{\text{HH}}=7,0$ Hz, 6H).

LC-MS: $R_t = 2,56$ perc; (ESI): $m/z = 399$ [M + H]⁺; 397[M – H][–].

(4-[[6-(3-Aminofenil)pirimidin-4-il]amino}fenil)foszfonsav (131b): A **92**-es vegyületeknél leírt módszer szerint 0,086 g **131a** észter (0,22 mmol) hidrolízisét végeztem el. A preparált tiszta termék 0,046 g sárga port volt (61 %).

$O_p > 350$ °C (EtOH).

$^{31}\text{P-NMR}$ (242 MHz): DMSO-d₆; δ : 12,0 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): DMSO-d₆; δ (ppm): 10,63(s, 1H); 8,83(s, 1H); 7,83(dd, $J_{\text{AABB}}=8,4$ Hz, $^4J_{\text{PH}}=2,7$ Hz, 2H); 7,64-7,72(m, 4H); 7,51(t, $^3J_{\text{HH}}=7,9$ Hz, 1H); 7,37(s, 1H); 7,26(t, $^3J_{\text{HH}}=7,5$ Hz, 1H); 5,70(széles s, 4H).

LC-MS: $R_t = 0,45$ perc és 1,07 perc; (ESI): $m/z = 343$ [M + H]⁺; 341 [M – H][–].

7. Megbeszélés

7.1. A 6-fenil-4-klór-pirimidinek előállítása [85].

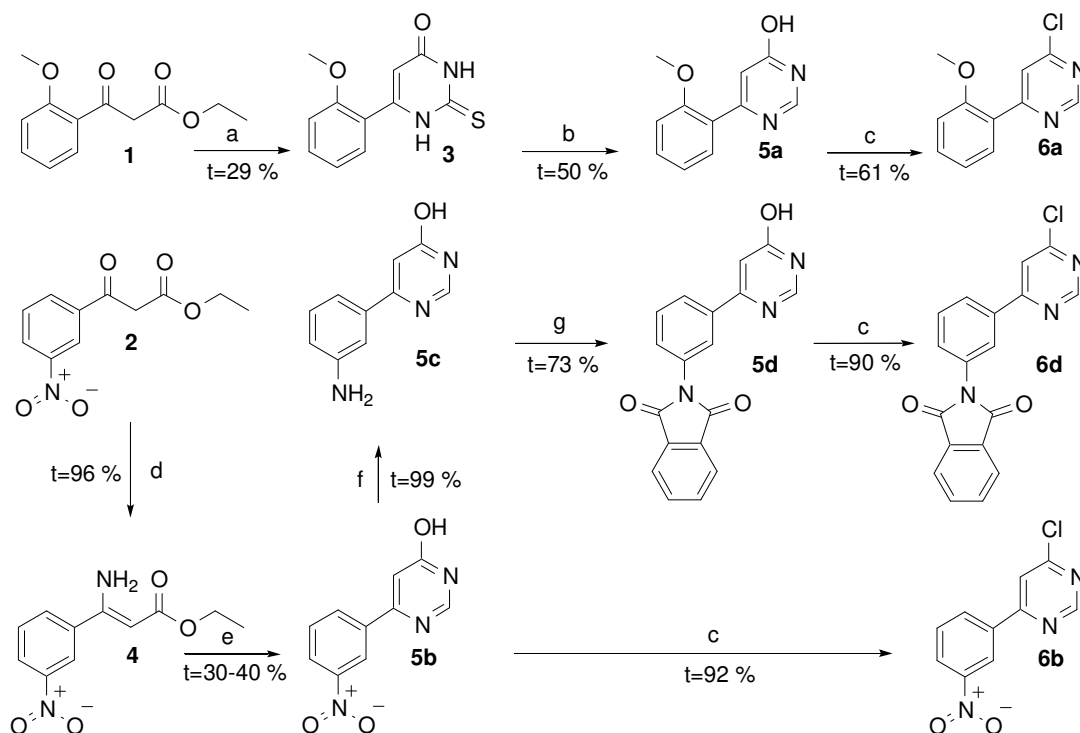
Mint azt a 3.5 fejezetben már jeleztem, a 6-fenil gyűrű esetén csak két szubsztituensre szűkítettük a munkát és ezzel a két szubsztituenssel (2-metoxi és 3-nitro) kellett megoldani a Suzuki-reakciót elkerülő szintézist. A fejlesztést Varga Zoltán kollégámmal együtt végeztük úgy, hogy én elsősorban a 3-nitro származékkal foglalkoztam, ő pedig a 2-metoxi változattal. Mivel a végtermékekhez mindkét intermediert használtam, így mindkét szintézist ismertetem.

Két reakcióút kidolgozására azért volt szükség, mert a 6-fenil csoport szubsztituense erős befolyással bír a gyűrűzárási reakcióra. Ezek a reakciók nem érzékenyek az oxigénre vagy a nedvességre, továbbá nem igényelnek semmilyen speciális reagenst vagy katalizátort. Az egyetlen hátrányuk a Suzuki-reakcióval szemben az, hogy a kiindulási vegyület meghatározza a 6-fenil gyűrű szubsztituensét valamint, hogy a C-C és a C-N kötések kialakításának sorrendje meghatározott.

A 3-nitro-fenil származék szintézise esetén (19. ábra, d, e) a kiindulási vegyület a 3-(3-nitro-fenil)-3-oxo-propionsav etil észter (**2**) volt. A β -keto funkciót ammónium acetáttal amináltam etanolban. A **4** akrilát E és Z izomereinek keverékét reagáltattam formamidin acetáttal formamidban 180 °C-on. E gyűrűzárást olajfürdőben néhány órát vesz igénybe, míg mikrohullámú reaktorban egy óra alatt lejátszódik, szintén 180 °C-on. A nyers termékből átkristályosítás után kaptam a kívánt **5b** pirimidinolt.

A 2-metoxi-fenil származék szintéziséhez (19. ábra a, b) a 3-(2-metoxi-fenil)-3-oxo-propionsav etil észter (**1**) nem volt kereskedelmi forgalomban elérhető, ezért előállítását magunk végeztük el 2-metoxi-acetofenonból. A **2** β -keto-észtert nem izoláltuk, hanem egy egyszerű vizes mosás után etanolban kondenzáltuk a tiokarbamiddal nátrium etilát jelenlétében. A reakció négy nap forralás után volt teljes. A kondenzációt mikrohullámú reaktorban, 150 °C-on végezve, mindössze négy óra szükséges a gyűrűzáráshoz. E két lépés együttes kitermelése kb. 30 % volt. A tioxo csoportot Raney-Nikkel katalizátorral végzett redukció során távolítottuk el a molekuláról. A reakció 6-7 órát vesz igénybe,

mialatt a katalizátort kis adagokban adjuk a reakcióelegyhez mindaddig, amíg a kiindulási vegyület el nem tűnik. Ekkor az elegyet szűrtük, majd a szűrletből savanyítás hatására kivált a kívánt **5a** pirimidinol, melyet szűrés után 50 %-os termeléssel preparáltunk.



19. ábra. Két különböző pirimidin szintézis; a = tiokarbamid, EtOH; b = Raney-Nikkel, 2 M NaOH; c = SOCl_2 vagy POCl_3 , DMAP, toluol; d = NH_4OAc , EtOH; e = formamidin acetát, formamid; f = $\text{H}_2/\text{Pd/C}$, MeOH; g = ftálsav anhidrid, pTsOH, DMF.

Mindkét gyűrűzárási módszerrel az **5** 6-fenilpirimidin-4-ol-t állítottuk elő, a **2** β -keto észterre nézve egyforma termeléssel (30–40 %). A $^1\text{H-NMR}$ vizsgálatok alapján a vegyület enol formáját preparáltuk, ahogyan az az ábrákon látható.

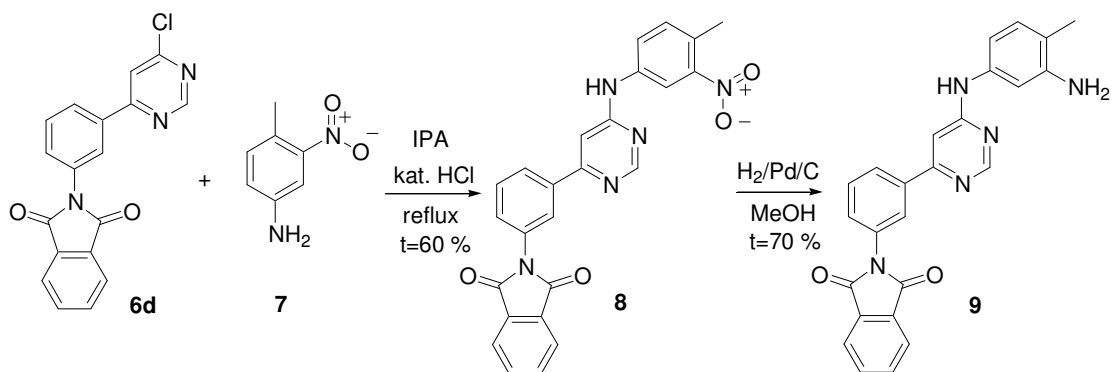
Ha az anilinnel kapcsolt molekula 6-fenil gyűrűjén 3-amin csoportot szeretnénk a 3-nitro helyett, akkor célszerű ezt az átalakítást, illetve az anilin megvédését pirimidinol fokon elvégezni. Katalitikus hidrogénezést alkalmaztunk a nitro funkció redukálásához. Tapasztalataink szerint az amin csoport megvédésére jelen esetben a ftalil védőcsoport a legalkalmasabb, miután az összes további kémiai módosításnak ellenáll, illetve eltávolítása is problémamentes hidrazinolízissal (19. ábra f, g).

Az utolsó lépés a **6** klór-pirimidin kulcs intermedier előállításához egy klórozás (19. ábra c). Ez a reakció több klórozó ágenssel is működik, én a gyakorlatban két módszert

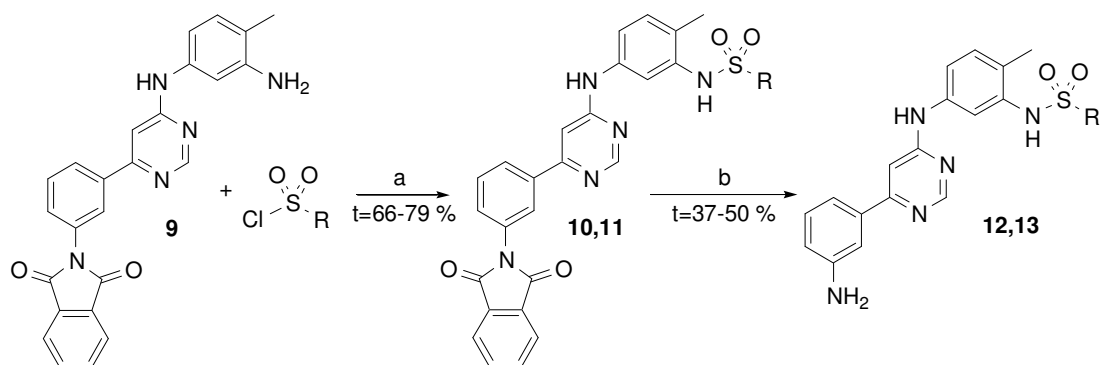
alkalmaztam rutinszerűen: számított mennyiségű foszforoxid-trikloriddal és N,N-dimetil-4-aminopiridinnel, illetve nagy feleslegű tionilkloriddal. Ez utóbbi esetben katalitikus mennyiségű N,N-dimetilformamid alkalmazása gyorsítja a reakciót, noha alkalmazása nem szükségszerű. A két módszer a fenil-gyűrű szubsztituensétől függő termeléssel adja a kívánt **6a**, **6b**, **6d** klór-pirimidint.

7.2. Szulfonamid, szulfonil csoportot, illetve heterociklust tartalmazó CDK9 inhibitorok előállítása.

A klór-pirimidinek előállítása után megnyílt a lehetőség a különböző származékok szintézisére. A szulfonamidok köréből két vegyületet állítottam elő: egy metil és egy propil szulfonamidot. Mindkét esetben 3-amino csoport volt a 6-fenil gyűrű szubsztituense. A ftalil csoporttal védett 6-(3-amino-fenil)-4-klór-pirimidinnel (**6d**) kapcsoltam a 4-metil-3-nitro-fenilaminnal (**7**). A nitro funkciót redukálni kellett (20. ábra), hogy a megfelelő szulfonsav kloriddal való acilezés után kialakuljon a kívánt szulfonamid szerkezet (21. ábra). A klór-pirimidin amin csoportjának korábbi redukciójára és ftalilezésére azért volt szükség, hogy ennél a lépésnél a molekula két végén található nitro/amin funkciós csoportokat meg tudjam különböztetni. Tehát, a **6d** klór-pirimidin és a **7** anilin kapcsolását 2-propanolban sav katalízissel végeztem el. Az anilin oldali nitro csoportot katalitikus hidrogénezéssel redukáltam, majd acileztem metil ill. propilszulfonsav kloriddal, piridinben. A ftalil védőcsoport eltávolítását hidrazinolízissel etanolban végeztem, a terméket sósav sóként preparáltam.



20. ábra Az anilin intermedier előállítása.



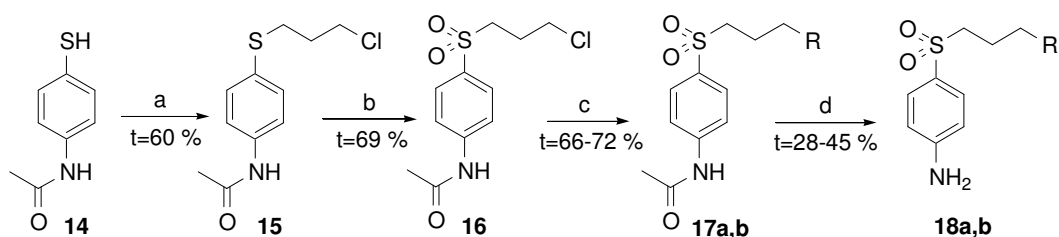
21. ábra Szulfonamid származékok előállítása; a = száraz piridin, RT; b = hidrazin hidrát, EtOH/DMF; az R metil vagy propil.

Mind a ftalilezett, mind a védetlen forma CDK9 gátló hatását megvizsgáltuk. Azt az érdekes megfigyelést tettük, hogy a metil szulfonamid esetén a ftalilezett, míg a propil szulfonamid esetén a védetlen változat volt hatásosabb (1. Táblázat).

1. Táblázat Szulfonamid származékok biológiai hatása.

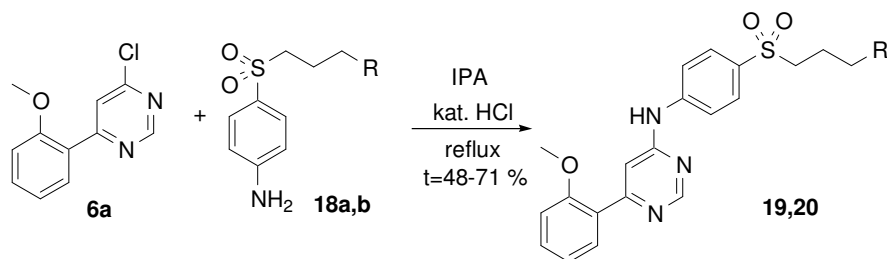
no	R	CDK9/CycT1 IC ₅₀ (nM)
10	metil	39
11	n-propil	186
12	metil	129
13	n-propil	27

A szulfonil származékok esetén nem volt ilyen egyszerű a helyzet. Az anilint úgy kellett kialakítani, hogy a kapcsoláskor már rajta legyen a megfelelő szulfonil származék. Ezt úgy valósítottam meg, hogy a **14** N-acetilezett 4-amino-tiofenolt alkileztem klór-bróm propánnal, majd a merkaptó funkciót (**15**) oxidáltam meta-klór-perbenzoesavval szulfonillá (**16**). A klór-propánt reagáltattam kétféle szekunder aminnal (dimetil-aminnal **17a** és pirrolidinnel **17a**), végül eltávolítottam az acetyl védőcsoportot (**22. ábra**).



22. ábra Szulfonil származékok intermedierének előállítása; a = NaH, 1-bróm-3-klór-propán, THF; b = MCPBA, CHCl₃; c = RH, EtOH vagy KI, MeCN MW reaktorban; d = 70 % metánszulfonsav, 60 °C, 18 óra; az R = dimetilamin vagy pirrolidin.

Az így kapott **18** anilint kapcsoltam, ezúttal a 4-klór-6-(2-metoxifenil)-pirimidinhez **6a** (23. ábra). A két végterméket CDK9 enzimátikus esszében vizsgáltuk (2. Táblázat).



23. ábra Szulfonil származékok előállítása.

2. Táblázat Szulfonil származékok biológiai hatása.

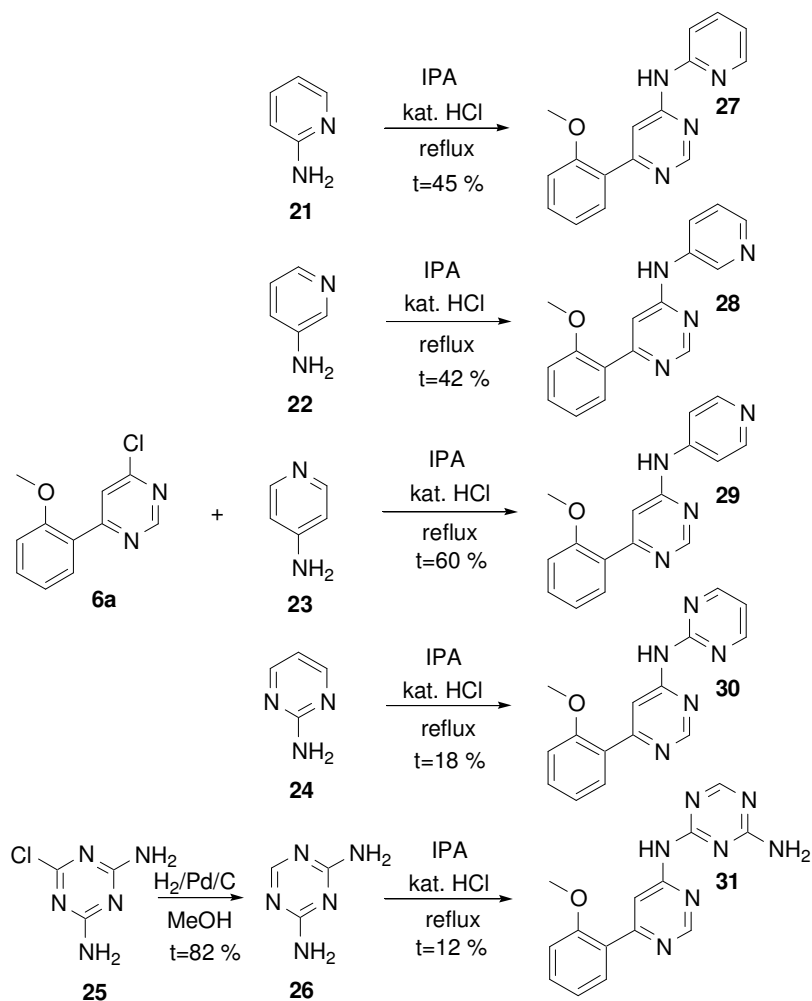
no	R	CDK9/CycT1 IC ₅₀ (nM)
19	dimetilamin	310
20	pirrolidin	390

A heterociklusos származékok esetén a 2-, 3-, 4-amino-piridint, a 2-amino-pirimidint (**21-24**) és a 2,4-diamino-[1,3,5]triazint kapcsoltam (**26**) a 4-klór-6-(2-metoxifenil)-pirimidinnel (**6a**) 2-propanolban savkatalízissal. A piridinek és a pirimidin mind elérhetőek voltak a kereskedelemben, viszont a triazin ilyen formában nem. Azonban a szükséges reagens a 2-klór-4,6-dinitro-[1,3,5]triazinból (**25**) katalitikus hidrogénezéssel egy lépésben előállítható (24. ábra).

A heterociklusos származékok CDK9 gátló hatása úgy tűnik, hogy függ a heteroatomok pozíciójától és számától (3. Táblázat).

3. Táblázat A heterociklusos származékok biológiai hatása.

no	Heterociklus	CDK9/CycT1 IC ₅₀ (nM)
27	2-piridil	42
28	3-piridil	174
29	4-piridil	144
30	2-pirimidinil	>1 000
31	4-amino-[1,3,5]- -triazin-2-il	355



24. ábra A heterociklusos származékok előállítása.

7.3. Foszfamidát tartalmú inhibitorok előállítása (Ar-N-P)

A kén tartalmú inhibitorok szintézisekor gyakori probléma volt a kismértékű vízoldhatóság. Ez elsősorban nem a kémiai szintéziseket, hanem a biológiai vizsgálatokat nehezítette. E problémát javítandó merült fel a különböző foszfortartalmú csoportok alkalmazása. A bioizosztéria ilyenén alkalmazását más esetben már kihasználtam bioaktív anyagok – aminosav analógok – szintézisének [87]. Az ott alkalmazott elvek alapján, illetve azok továbbgondolásával jutottam el az itt bemutatandó heteroatom cseréhez. Az alapelveket a 3.9 fejezetben már ismertettem.

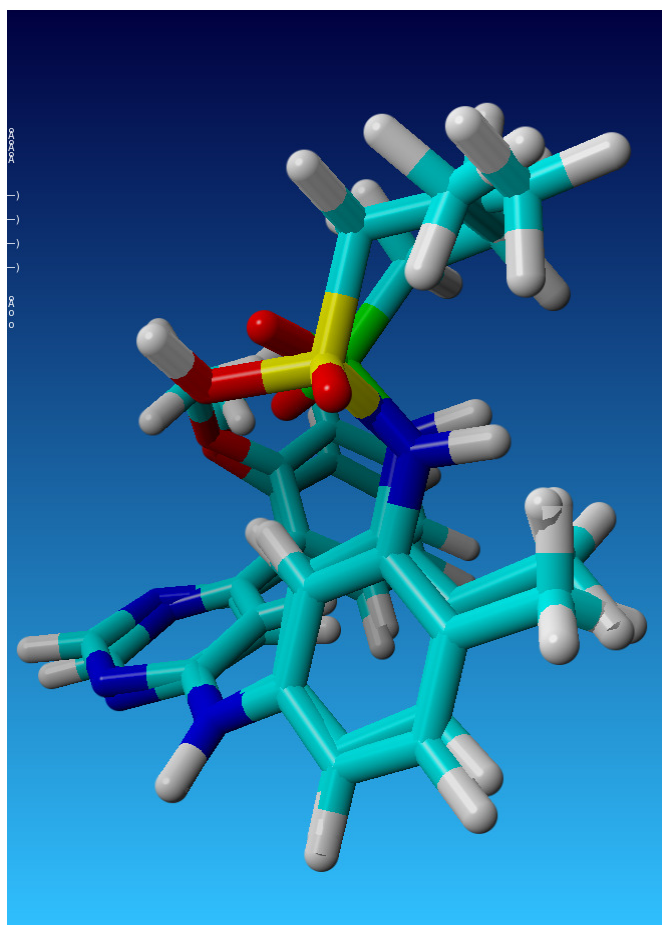
Az előző fejezetben bemutatott két szulfonamid közül a propil-szulfonamidot választottam ki, mint modell vegyületet. A foszfamidát esetében egy dolgot kívántam megváltoztatni, mégpedig azt, hogy a Suzuki oldalon a 3-amino szubsztituens, helyett

2-metoxi legyen, így egyszerűsítve egy kicsit a kémiai szintézist. Azért a propil származékot választottam a metillel szemben, mert az irodalmi adatok, és a korábbi tapasztalatok alapján, minél nagyobb alkil vagy aril szubsztituensek vannak a foszfor atomon, annál stabilabb lesz a molekula.

A hipotézist alátámasztandó, először a számítógépet hívtam segítségül. Összehasonlítottam a szulfonamid modell vegyület és a tervezett foszfonamidát logP és oldhatósági értékeit. A számított értékeket ahol lehetett összehasonlítottam a Lipinski féle 5-ös szabály (*Rule of five*) vonatkozó értékeivel [88]. Az összehasonlításból látszik, hogy az oldhatóság kis mértékben, a logP érték fél nagyságrenddel javul, ugyanakkor a molekulatömeg nem változik (4. Táblázat).

4. Táblázat Egy szulfonamid és egy foszfonamidát oldhatóságának és logP-jének összehasonlítása.

	Szulfonamid	Foszfonamidát	Lipinski szabály
ClogP	5,361	4,795	<5
M	412	412	<500
ClogS	-4,968	-4,785	

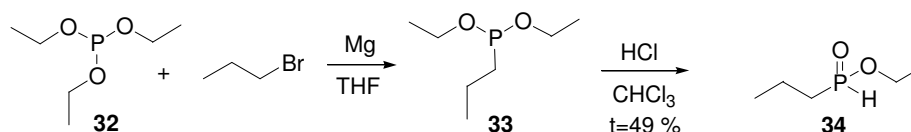


25. ábra Egy szulfonamid és egy foszfonamidát geometriai optimalizált szerkezete egymásra illesztve.

A két molekula térszerkezetét úgy hasonlítottam össze, hogy az ACD9 nevű program [84] segítségével geometriai optimalizációt hajtottam végre, majd a szerkezeteket a Yasara nevű programmal [89] egymásra illesztettem (25. ábra). A két molekula nagyon jól illeszkedik egymásra a vizsgálat tárgyát képező funkciócsoportok esetén is.

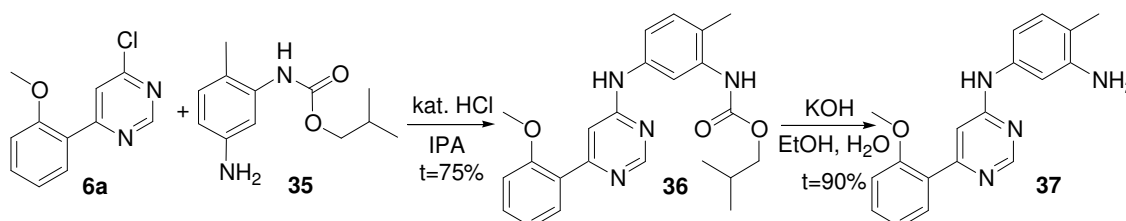
A biztató számítógépes vizsgálatok után tehát a következő célkitűzés a propil-szulfonamidát foszfor analógjának előállítása volt. Kézenfekvő és rendkívül elegáns megoldásnak tűnt az Atherton-Todd reakció alkalmazása [77]. A reakció során a propil-foszfinátot kell átalakítani tulajdonképpen foszfinsav kloriddá, amely bázis jelenlétében képes acilezni anilineket.

Ehhez a propil-foszfinátot kellett előállítani (26. ábra), mert a kereskedelemben nem elérhető. Az előállítás két lépésben történik. Az első egy Grignard-reakció, melyben a propil-bromidból képzett Grignard reagens reagál a trietil-foszfittal. A második lépésben a keletkező dietil propilfoszfonit savas hidrolízisével kaptam az etil propilfoszfinátot [86].



26. ábra Propilfoszfinát előállítása.

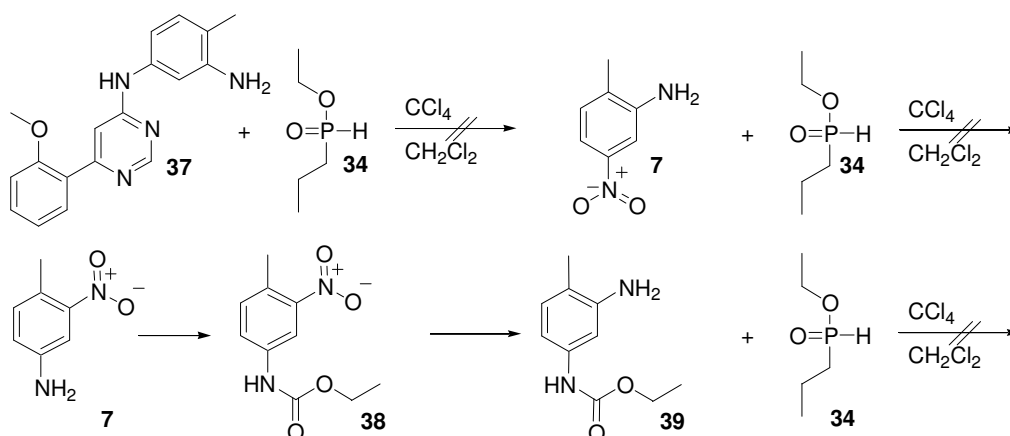
Többféle képpen próbáltam előállítani a kívánt vegyületet, de mindannyiszor sikertelenül. Elsőként a szulfonamidokhoz hasonlóan, az utolsó lépésben akartam a foszfonamidátot kialakítani. Ehhez a gyűrűrendszert úgy alakítottam ki, hogy az egyik felén védett **35** diamino vegyületet kapcsoltam a **6a** klór-pirimidinnel, végül lúgos hidrolízissel eltávolítottam a távozó csoportot (27. ábra).



27. ábra A 2-metoxi szubsztituentet tartalmazó anilin modell vegyület előállítása.*

* A **37**-es anilin előállítása másként történt, mint a **9**-es anilin esetében. Ennek magyarázata, hogy előbbi Montpellierben, utóbbit pedig Budapesten készítettem az adott helyen elérhető reagenskészletből.

Később a 2-metil-5-nitro-anilinhez próbáltam kapcsolni a foszfinátot, majd a nitro csoport redukciója után kívántam a megfelelő klór-pirimidinhez kapcsolni. Végül a 4-metil-3-nitro-anilint megvédtem klór-hangyasav-etil észterrel, a nitro csoportot redukáltam és ehhez próbáltam kapcsolni a foszfinátot (28. ábra).

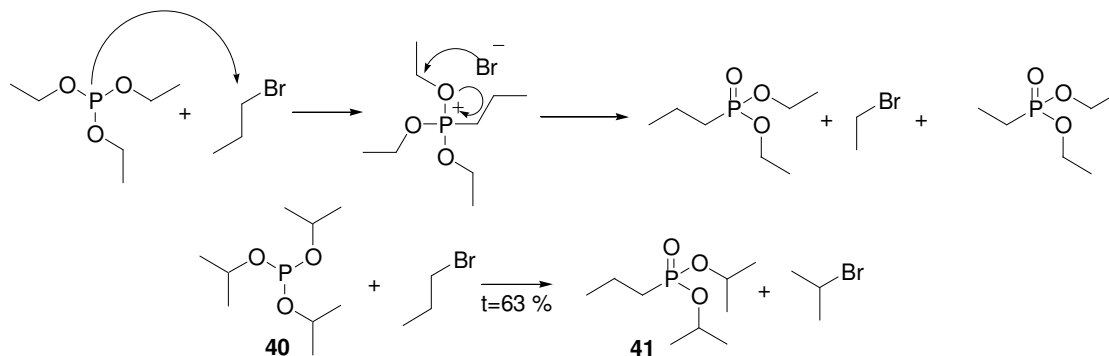


28. ábra Kísérletek foszfonamidátok előállítására Atherton-Todd reakcióval.

Az Atherton-Todd reakció sikertelensége okán más megoldást kellett keresni. Arra a kérdésre, hogy a klórozási lépés, vagy az acilezés nem ment, ekkor még ugyan nem tudtam választ adni, de feltételeztem, hogy a körülmények megfelelő megválasztásával az anilinszármazék a foszfonsav kloriddal reagáltatható.

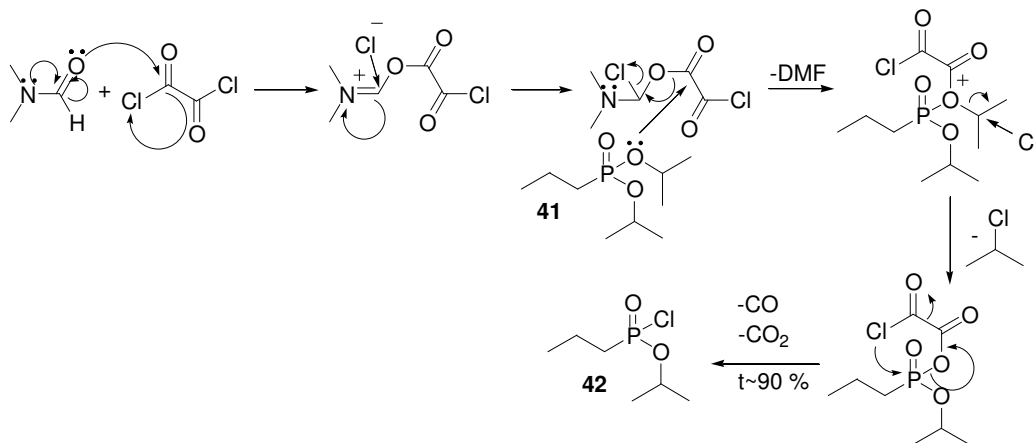
Első lépésként a foszfonsav klorid előállítását oldottam meg más módon. Ez esetben a H-foszfinát helyett a propilfoszfonsav dietil észterét állítottam elő az előzőekben is használt propil-bromidból és trietil-foszfítból. Ám ezúttal Grignard-reakció helyett az un. Arbuzov vagy Michaelis-Arbuzov reakció segítségével [90]. E reakció során a trialkil-foszfít nemkötő elektronpárja nukleofil támadást intéz az alkil halogenid α szénatomjára. A felszabaduló halogenid anion ionpárt képez a pozitív töltésűvé vált foszforral. Az elektronhiányos foszfor és a nagy elektronegativitású oxigéneknek köszönhetően az alkoxi csoportok α szénatomja annyira elektrofillé válik, hogy a halogenid ionnal egy nukleofil szubsztitúció játszódik le. Az elektronszerkezet rendeződése után így megkapjuk a kívánt alkilfoszfonátot, illetve melléktermékként alkil halogenidet (29. ábra). A reakció mechanizmusából következően pl. a trietil-foszfíthoz elegendő csak katalitikus mennyiségű etil-halogenidet adni, ha dietil etilfoszfonátot szeretnénk előállítani. Ezen okok alapján magyarázható az is, hogy miért kaptam vegyes terméket (dietil propilfoszfonát és dietil etilfoszfonát) a propil-bromid és

a trietil-foszfít reakciójában (29. ábra). A problémát úgy sikerült megoldani, hogy triizopropil-foszfítot használtam. Mivel a keletkező 2-bróm-propán sokkal kevésbé reaktív, mint az 1-bróm-propán, így egységes terméket kaptam.



29. ábra Arbuzov reakció mechanizmusa és a propil foszfonát előállítása.

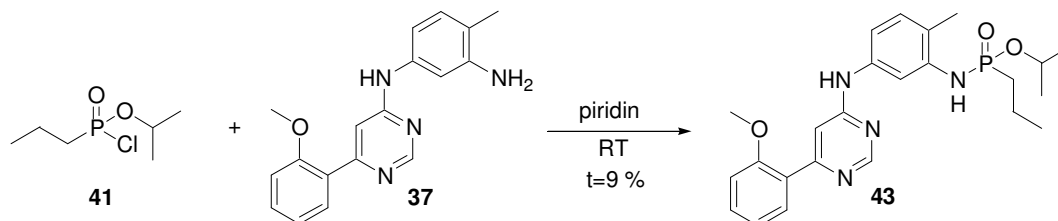
A savklorid előállításához olyan eljárást kellett találnom, amely lehetőleg specifikusan csak az egyik észtert alakítja kloriddá. Ezt sikerült is megvalósítani oxalil-kloriddal szobahőmérsékleten. A reakció mechanizmusa azonos a karbonsav észterek klórozásával (30. ábra), ezért az elegyhez katalitikus mennyiségű dimetil-formamidot is adtam.



30. ábra A foszfonsav észter klórozásának feltételezhető mechanizmusa

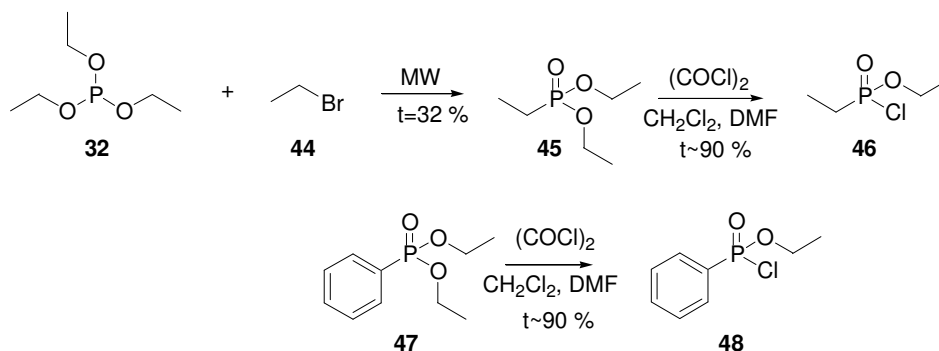
Miután a savklorid a kezemben volt, megpróbáltam acilezni a megfelelő anilin származékot. A reakciót piridinben végezve, bár igen gyenge termeléssel, de sikerült előállítani a kívánt vegyületet **43** (31. ábra). A reakció sikerességéből arra következtetésre jutottam, hogy az Atherton-Todd reakciók esetén már a savklorid sem jött létre, ezért nem ment a reakció. A termék preparálása kromatográfiás tisztítást igényelt, amelynek vesztesége számottevő volt. A maradék termék mellett a kiindulási

anilin egy jelentős részét is visszakaptam, noha a feldolgozás előtt a reakcióelegyből már nem tudtam kimutatni. Ez várható volt az irodalmi adatok alapján ti. a foszfonamidát P-N kötése nagyon könnyen hidrolizál.



31. ábra A propil foszfonamidát előállítás.

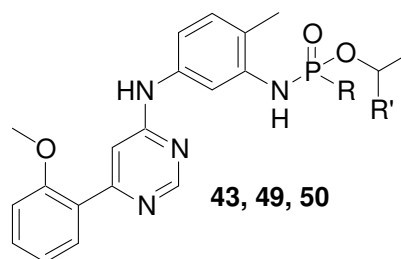
A sikeren felbuzdulva, illetve az Arbuzov-reakcióból megmaradt dietil etilfoszfonáttal (**45**), illetve a kereskedelmi dietil fenilfoszfonáttal (**47**) elvégeztem a fent leírt klórozást (32. ábra) és acilezést a **43** foszfonamidát szintézisével azonos módon. Tehát sikerült előállítanom az etil-foszfonamidátot (**49**), valamint a fenil-foszfonamidátot (**50**). A fenil származék klórozása kissé erélyesebb körülményeket igényel, mint az alkil variációk. Ellenben a foszfonamidát stabilitása nagyobb, így a reakció termelése is magasabb volt. Az előállított három vegyületet CDK9 gátló hatását megvizsgáltuk. Az eredmények azt mutatják, hogy az előállított foszfonamidátok hatása lényegesen elmarad a szulfonamidokétól (5. Táblázat).



32. ábra Foszfonsav kloridok előállítása.

5. Táblázat A foszfonamidátok biológiai hatása.

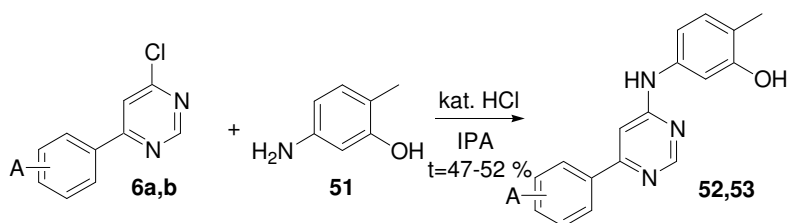
no	R	R'	CDK9/CycT1 IC ₅₀ (nM)
43	propil	Me	3 170
49	etil	H	1 450
50	fenil	H	5 240



Mivel a vegyületek preparálhatósága meglehetősen nehézkes, stabilitásuk egy *in vivo* rendszerben erősen kérdéses és biológiai hatásuk sem ígéretes, úgy figyelmemet inkább az imént tárgyalt vegyületek foszfonát analógjainak szintézisére fordítottam.

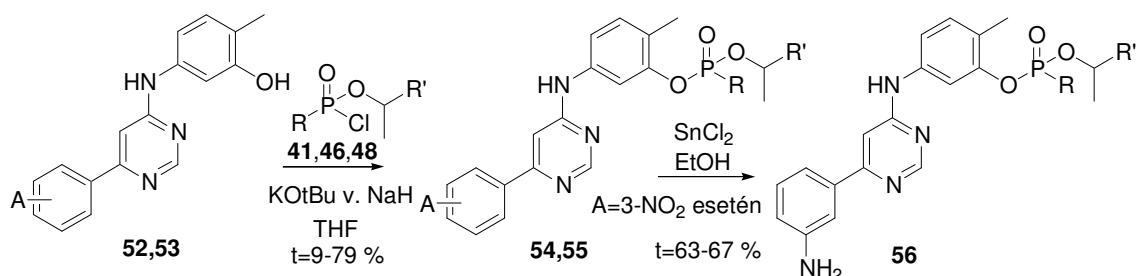
7.4. Foszfónát tartalmú inhibitorok előállítása (Ar-O-P)

A foszfonátok előállításának tervezésekor szerencsés helyzetben voltam, hiszen az aktív foszfor tartalmú intermedier már rendelkezésemre állt. Azonban az eddig használt anilin fenol változatát elő kellett állítani. Ez nagyon egyszerűen ment, hiszen az 5-amino-2-metil-fenol (**51**) könnyen kapcsolható a klór-pirimidinekkel (4-klór-6-(2-metoxifenil)-pirimidin **6a**, 4-klór-6-(3-nitrofenil)-pirimidin **6b**), savkatalízis mellett egységesen a kívánt terméket (**52**, **53**) kaptam (33. ábra).



33. ábra A fenolos OH-t tartalmazó alapváz előállítása, A= 2-metoxi (**52**) vagy 3-nitro (**53**).

A Suzuki-oldalon 2-metoxi szubsztituenset tartalmazó fenol esetén az acilezést akár NaH, akár K₂OtBu segítségével el lehet végezni. A 3-nitro szubsztituens esetén csak a K₂OtBu vezetett eredményre. A szulfonamidoknál alkalmazott módszerrel ellentétben a 3-nitro csoportot nem szükséges hidroxipirimidin fokon aminná redukálni, majd ftalil csoporttal megvédeni (19. ábra), mivel a foszfonát mellett a nitro csoport redukciója probléma nélkül megoldható volt (34. ábra).



34. ábra A fenolok acilezése foszfonsav kloridokkal; A= 2-metoxi (52→54) vagy 3-nitro (53→55).

Tehát előállítottam az előző fejezetben tárgyalt foszfonamidátok foszfonát analógjait (A= 2-MeO; R= etil, propil, fenil), ezek kináz esszében mért hatását a 6. Táblázat tartalmazza. Továbbá, mivel a reakciók kivitelezhetősége és a vegyületek preparálhatósága lényegesen jobb volt a foszfonamidátokhoz képest, úgy határoztam, hogy a foszfonátok közül megpróbálok több variációt is elkészíteni. A foszfonátokon nem változtattam, hanem a fenolos OH pozícióját variáltam, illetve a Suzuki-oldalon nem csak a 2-metoxi szubsztituenst alkalmaztam, hanem a 3-nitro, ill. 3-amino csoportot is.

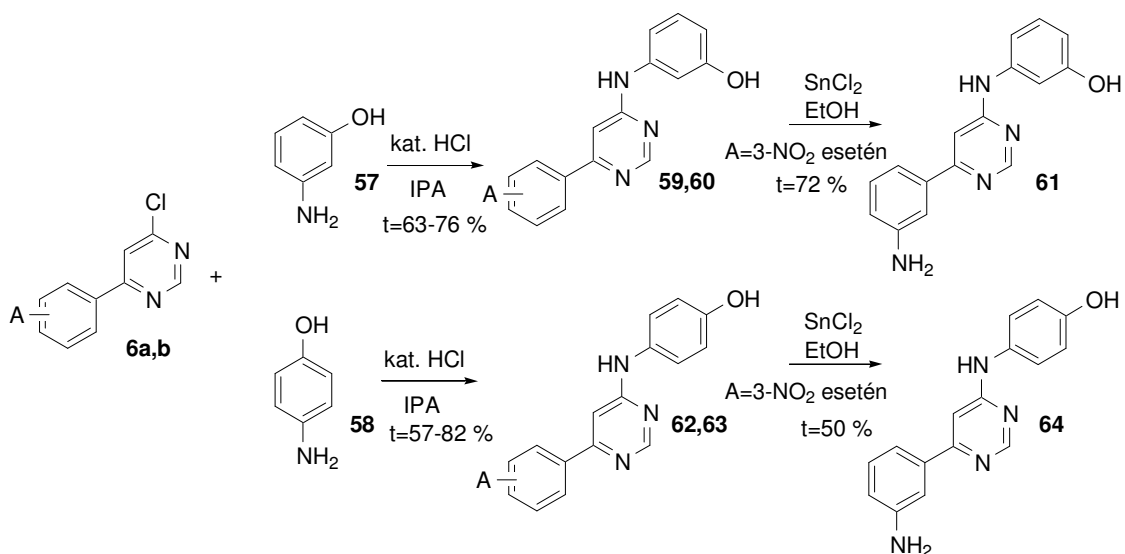
6. Táblázat A fenol intermedier és a foszfonátok biológiai hatása.

no	A	R	R'	CDK9/CycT1 IC ₅₀ (nM)
52	2-MeO	-	-	381
54a	2-MeO	etil	H	813
54b	2-MeO	propil	Me	3 057
54c	2-MeO	fenil	H	4 137
55a	3-NO ₂	etil	H	>10 000
55b	3-NO ₂	propil	Me	>10 000
56a	3-NH ₂	etil	H	870
56b	3-NH ₂	propil	Me	5 385

A fenolok esetében nem csak a korábban kidolgozott eljárás volt alkalmazható, miszerint felépítem a teljes heterociklusos gyűrű-rendszert, majd az utolsó lépésben egy acilezéssel kapcsolom a foszfortartalmú csoportot. A szintézis úgy is megvalósítható, hogy a fenolt acilezem a foszfonsav kloriddal. Ekkor a pirimidin gyűrűhöz kapcsolandó amin funkció nitro csoportként maszkírozva van. A nitro-fenil foszfonát redukciója után keletkező anilin kapcsolható a klór-pirimidinekkel. Ezen eljárás kidolgozásának az volt az elsődleges célja, hogy a nagyobb mennyiségben elkészített amino-fenil foszfonátokat az eddig említettektől eltérő klór-pirimidinekkel kapcsoljam, így növelvén az előállított molekulacsalád Suzuki-oldali diverzitását. Azonban ez utóbbi változtatásokra végül nem került sor, mivel nem a foszfonát típusú vegyületek bizonyultak a legjobbaknak.

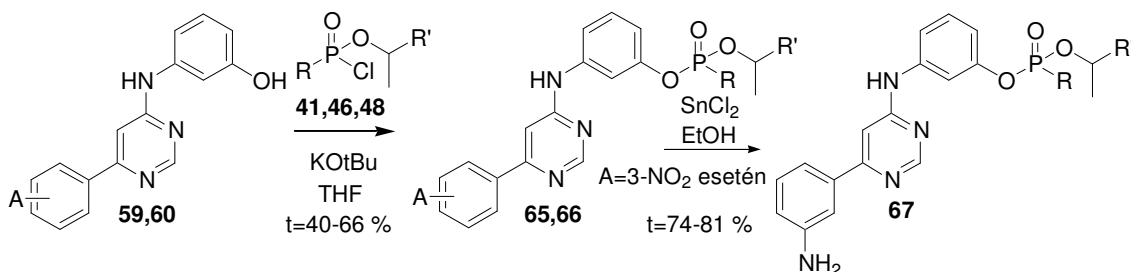
Kétféle aminofenolt használtam, a már említett 5-amino-2-metil-fenolon (**51**) kívül: a 3-amino-fenolt (**57**), és a 4-amino-fenolt (**58**). A klór-pirimidinekhez való kapcsolásuk a 33. ábrán láthatóval azonos módon történt. A 4-klór-6-(3-nitrofenil)-pirimidinnel (**6b**) kapcsolt két amino-fenol (**57** és **58**) esetén a nitro csoport redukcióját is elvégeztem (**61**,

64 (35. ábra), és az így kapott vegyületek biológiai hatását is vizsgáltuk (7. és 8. Táblázat).



35. ábra További fenolok előállításása; A=2-metoxi: **6a**, **59**, **62**; A=3-nitro: **6b**, **60**, **63**.

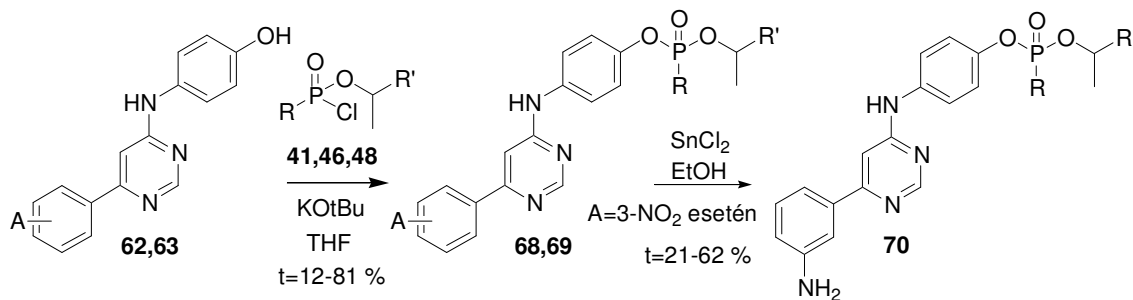
Az előállított fenolokat aztán a fent leírt módon (34. ábra) acileztem a foszfonsav kloridokkal. A reakciókat mind a meta (36. ábra), mind a para (37. ábra) szubsztitúciók esetén azonos módon kiviteleztem.



36. ábra Meta helyzetű fenolok acilezése foszfonsav kloridokkal; A= 2-metoxi (**59**→**65**) vagy 3-nitro (**60**→**66**).

7. Táblázat Meta helyzetű fenolok és foszfonátok biológiai hatása.

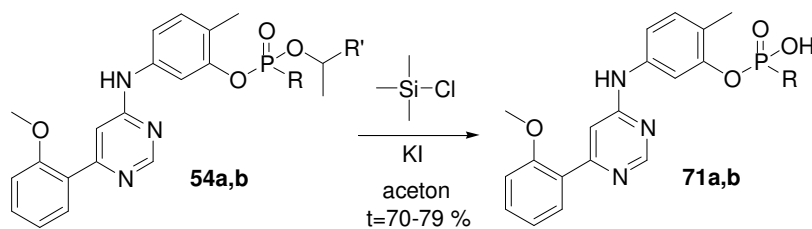
no	A	R	R'	CDK9/CycT1 IC ₅₀ (nM)
59	2-MeO	-	-	224
61	3-NH ₂	-	-	877
65a	2-MeO	etil	H	400
65b	2-MeO	propil	Me	1 180
65c	2-MeO	fenil	H	3 100
66a	3-NO ₂	etil	H	>10 000
66b	3-NO ₂	propil	Me	>10 000
66c	3-NO ₂	fenil	H	>10 000
67a	3-NH ₂	etil	H	1 800
67b	3-NH ₂	propil	Me	6 430
67c	3-NH ₂	fenil	H	5 330



37. ábra Para helyzetű fenolok acilezése foszfoszav kloridokkal; A= 2-metoxi (62→68) vagy 3-nitro (63→69)

8. Táblázat Para helyzetű fenolok és foszfonátok biológiai aktivitása.

no	A	R	R'	CDK9/CycT1 IC ₅₀ (nM)
62	2-MeO	-	-	70
64	3-NH ₂	-	-	651
68a	2-MeO	etil	H	360
68b	2-MeO	propil	Me	407
68c	2-MeO	fenil	H	2 840
69a	3-NO ₂	etil	H	>10 000
69b	3-NO ₂	propil	Me	>10 000
70a	3-NH ₂	etil	H	3 840
70b	3-NH ₂	propil	Me	6 060



38. ábra Specifikus alkil észter hidrolízis.

9. Táblázat Foszfonsavak biológiai hatása.

no	R	R'	CDK9/CycT1 IC ₅₀ (nM)
54a	etil	H	813
71a		-	1 490
54b	propil	Me	3 057
71b		-	1 457

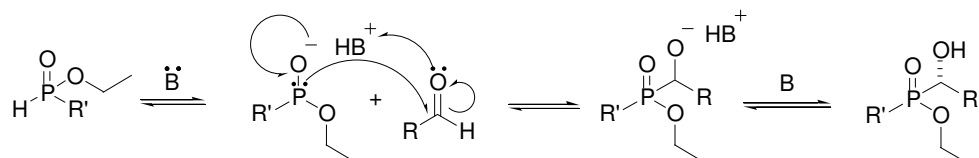
Két vegyület esetén az alkil foszfonát észterek specifikus hidrolízisét is sikerült megvalósítani (38. ábra). A hidrolízis tulajdonképpen egy Arbuzov reakció: a trimetil-szilil klorid acilezi a P=O oxigént, s így a foszfor pozitív töltésűvé válik. A jodid anion elég nukleofil ahhoz, hogy az alkil észter oxigén melletti szénatomjára – ami kellően elektrofil – betámadjon. Az Arbuzov reakció mechanizmusánál bemutatott módon (29. ábra) az alkil-halogenid eliminálódik, majd a trimetil-szilil csoport távozása és az elektronszerkezet visszarendeződése után megkapjuk a foszfonát monoésztert (**71**).

A vegyületek CDK9 gátló hatásának vizsgálata után bizonyos szerkezet-hatás összefüggések egyértelműen észrevehetőek: a nitro-csoportot tartalmazó molekulák gyakorlatilag hatástalanok; a 2-metoxi és 3-amino-csoportok esetén a biológiai hatás az utóbbinál rendre gyengébb, s ez a különbség számottevő. A foszfor szubsztituáltsága egyértelműen hatással van a biológiai aktivitásra, mégpedig az etil, propil, fenil sorrendben csökken a CDK9 gátló képesség. A foszfonát pozíciója nem befolyásolja szignifikáns mértékben az enzimgátló hatást, ti. az előző két tényező hatása mellett ez utóbbi elhanyagolható. Az alkil észter hidrolízise – érdekes módon – az etil-foszfonát esetében rontotta, a propil-foszfonát esetében javította a hatást, bár az eredmények közti különbség nem jelentős.

7.5. Foszfínát tartalmú inhibitorok előállítása (*Ar-CH₂-P*)

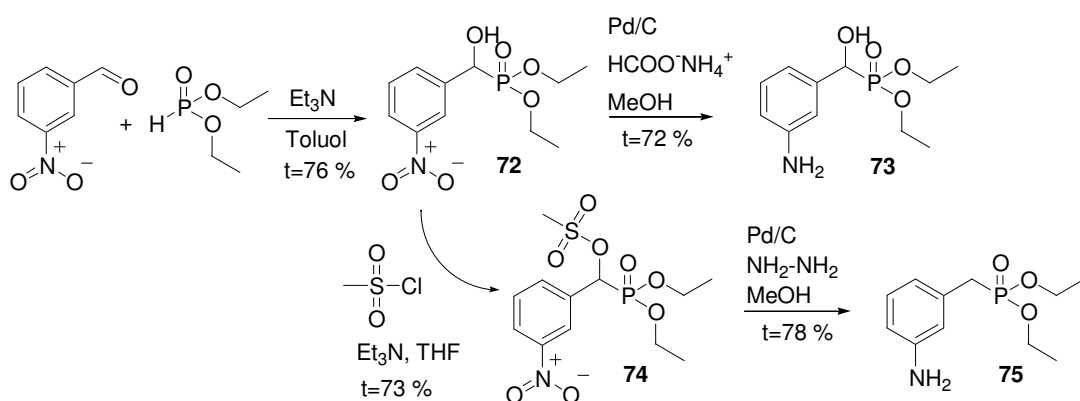
A foszfonamidátok és a foszfonátok mellett a harmadik izosztér csoport a foszfínátok. Előállításukhoz a legalkalmasabb reakciónak – első közelítésben – a Pudovik-reakció

túnt [91]. Egy H-foszfinát vagy egy foszfit aldehidre történő addíciója. Tulajdonképpen ez egy egyensúlyi reakció, amely gyakorlatilag teljes mértékben eltolódik az addukt irányába, ám megfelelő reagensekkel az egyensúly megléte igazolható [92]. A Pudovik-reakció azért tűnt kézenfekvőnek, mert a megfelelő benzaldehydeek nagyrészt a kereskedelemben elérhetőek, a H-foszfinátok pedig a bemutatott módszerrel előállíthatóak (lásd 7.3 fejezet, Propilfoszfinát előállítása.).

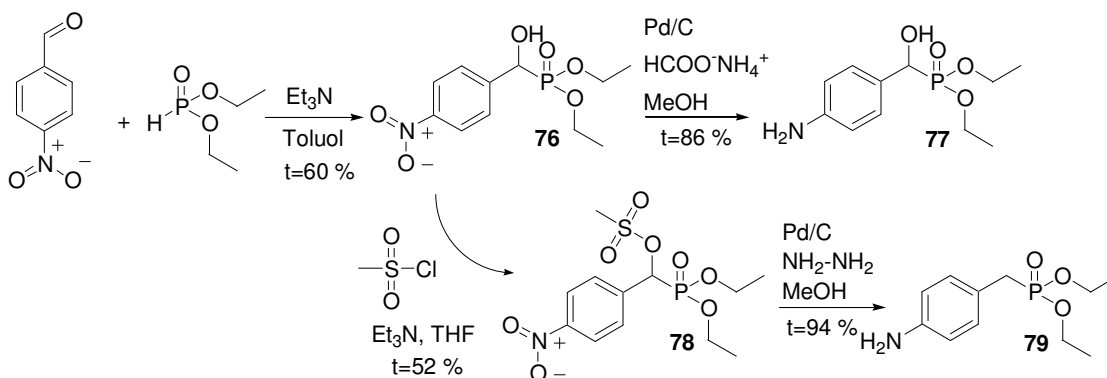


39. ábra A Pudovik reakció mechanizmusa, R= alkil v. aril; R'= O-alkil/aril v. alkil/aril; B= bázis.

Az eddig előállított foszfonamidátokkal és foszfonátokkal izosztér foszfinátok, a megfelelő nitro-benzaldehydekből és H-foszfinátokból állíthatók elő. Mivel a H-foszfinátok preparálása nem egyszerű, először a dietil foszfittal végeztem el a reakciókat, kipróbálendő a Pudovik-reakció alkalmasságát. A 3-nitro-benzaldehydből, ill. a 4-nitro-benzaldehydből képeztem a Pudovik-adduktot. A keletkező hidroxil csoportokat mezileztem, majd katalitikus hidrogénezéssel egyidejűleg a mezil-oxi csoport eliminálható valamint a nitro-csoport redukálható. Ha a hidroxil-csoport mezilezését elhagyjuk és a hidrogénezés során hidrogén forrásként ammónium formiátot használunk, akkor olyan anilint kapunk, melyen megmarad a hidroxil-metil csoport.

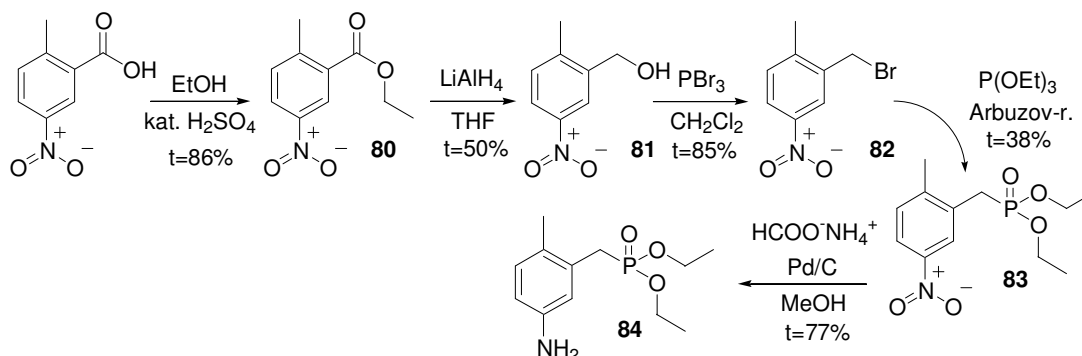


40. ábra Meta helyzetben metil-foszfonát csoportot tartalmazó anilinek előállítása.



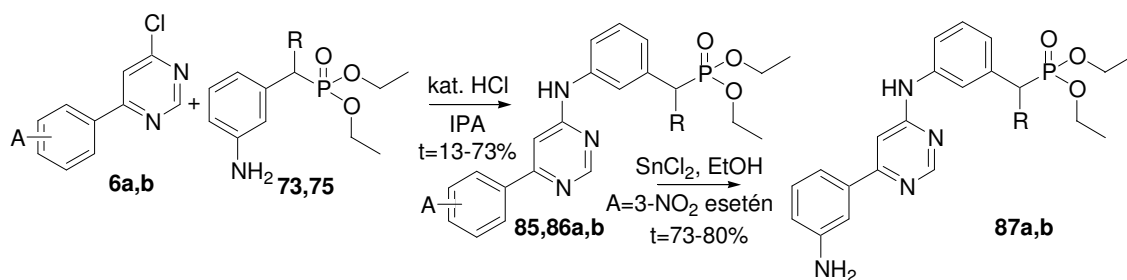
41. ábra Para helyzetben metil-foszfónát csoportot tartalmazó anilinek előállítása.

A 4-es pozícióban metil szubsztituenst tartalmazó anilin előállítása a fenti módszerrel nem lehetséges az aldehid hiánya miatt. A problémát úgy sikerült orvosolni, hogy 2-metil-5-nitro-benzoésavat észtereztem etanolban. Az észtert LiAlH_4 -del hidroximetillé redukáltam, majd PBr_3 -mal benzil bromiddá alakítottam. Ez utóbbit mikrohullámú reaktorban trietil-foszfittal reagáltattam, majd az Arbuzov-reakció után a nitro-csoportot redukáltam (42. ábra).

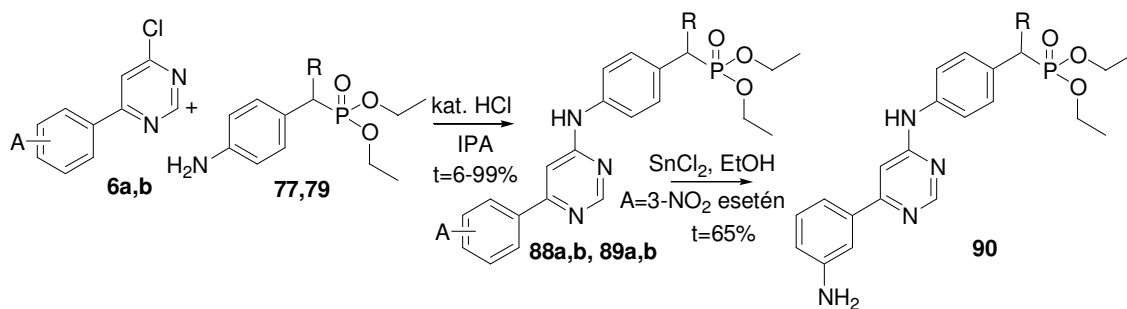


42. ábra A 4-metil szubsztituenst tartalmazó anilin előállítása.

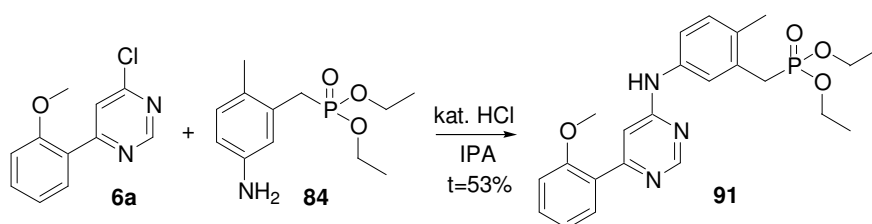
A 4-metil szubsztituenst tartalmazó anilint csak a 4-klór-6-(2-metoxifenil)-pirimidinnel kapcsoltam (45. ábra), míg a másik négy foszfónátos anilint mind a **6a** 2-metoxifenil, mind a **6b** 3-nitrofenil klór-pirimidinnel (43. ábra és 44. ábra). Az előállított vegyületek CDK9 gátló hatását megvizsgáltuk és néhány vegyület esetén igen alacsony IC_{50} értékeket mértünk. Ahhoz képest, hogy ezek a vegyületek csak a reakciók kipróbálása miatt készültek el, igen jó biológiai hatást mutattak.



43. ábra A meta helyzetű metilén ill. α -hidroxi metilén foszfonátok előállítása.



44. ábra A para helyzetű metilén ill. α -hidroxi metilén foszfonátok előállítása.



45. ábra A 4-metil szubsztituenst tartalmazó metilén foszfonát előállítása.

Az elvégzett *in vitro* vizsgálatok alapján (10. Táblázat) erre a vegyületcsoportra is igaz az a szerkezet-hatás összefüggés, amit már korábban felismertem, ugyanakkor néhány érdekes dolog is látszik az eredményekből. Az a trend továbbra is felfedezhető, hogy a 2-metoxi-fenil típusú vegyületek a legjobbak, a 3-nitro csoportot tartalmazók gyakorlatilag hatástalanok, míg a 3-amino-fenil tartalmú vegyületek közepesen hatnak. Ami érdekes, hogy a **87a** vegyület, ami egy 3-amino csoportot tartalmaz a Suzuki oldalon, az eddig bemutatott foszfortartalmú vegyületek közül a leghatékonyabb! Egy másik érdekes eredmény a **89b** vegyület hatása, amely annak ellenére, hogy 3-nitro csoportot tartalmaz, mégis 4 577 nM-os IC₅₀-nel rendelkezik. Feltételezésem szerint ez a kivételes hatás az anilin oldali fenol gyűrűt és a foszfor atomot összekötő metilén csoporton található hidroxi funkciós csoport okozza. Ugyanakkor ennek a hidroxi csoportnak a hatása pont ellentétes – rontja a hatást – a meta szubsztituált származékoknál. Tehát, a vizsgált hidroxi csoport para helyzetű szubsztitúciónál javítja,

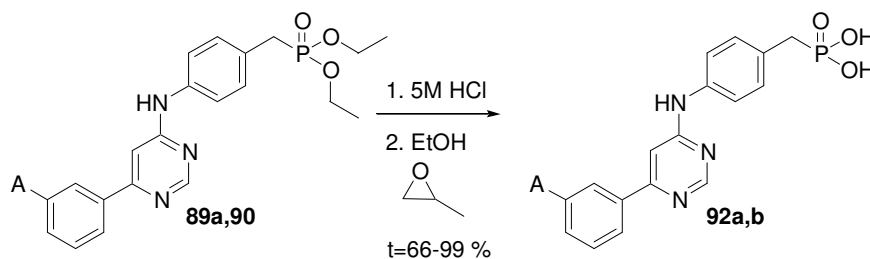
meta helyzetű szubsztitúciónál pedig rontja az enzimhez való kötődést, s így az *in vitro* hatást.

10. Táblázat A metilén ill. α -hidroxi metilén foszfonátok biológiai hatása.

no	Szubsztitúció helyzete	A	R	CDK9/CycT1 IC ₅₀ (nM)
85	meta	2-MeO	H	333
86a	meta	3-NO ₂	H	9 870
86b	meta	3-NO ₂	OH	>14 000
87a	meta	3-NH ₂	H	179
87b	meta	3-NH ₂	OH	1 401
88a	para	2-MeO	H	490
88b	para	2-MeO	OH	510
89a	para	3-NO ₂	H	>14 000
89b	para	3-NO ₂	OH	4 577
90	para	3-NH ₂	H	3 110
91		2-MeO	-	5 220

A foszfonamidátok és foszfonátok esetén első számú modellvegyületként előállított 4-metil szubsztituenst tartalmazó származékoknak megfelelő metil foszfonát, a **91**-es vegyület, csak gyenge-közepes eredményt produkált. Ez a várakozásaimtól kissé elmaradt.

Két vegyület esetében sikerült megvalósítani a foszfonát észterek hidrolízisét (46. ábra). Jelen esetben egyszerűbb dolgom volt, mint korábban, mivel a foszfonátok két azonos észter csoportját kellett hidrolizálnom. A hidrolízis 5 M-os vizes sósavban való forralás során ment végbe. A végtermékkel só képző sósav molekulák eltávolítását kémiai úton, propilén-oxiddal végeztem el [87].



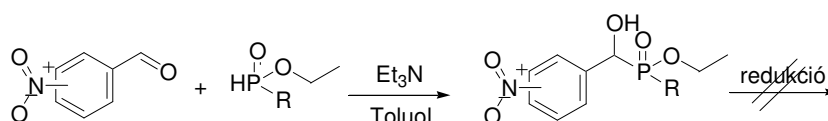
46. ábra Két foszfonát hidrolízise; A=NO₂ **89a** → **92a**; A=NH₂ **90** → **92b**.

Ahogy az várható volt a vegyületek hatása sokat javult. A nitro csoport esetén (**89a**→**92a**) a hatástalan észterből egy közepes hatású sav lett. Az anilin esetén (**90**→**92b**) a hatás megváltozása nem volt ilyen drámai, de az IC₅₀ számértékében bekövetkezett javulás így is jelentősnek mondható (11. Táblázat).

11. Táblázat A benzil-foszfonsavak biológiai hatása.

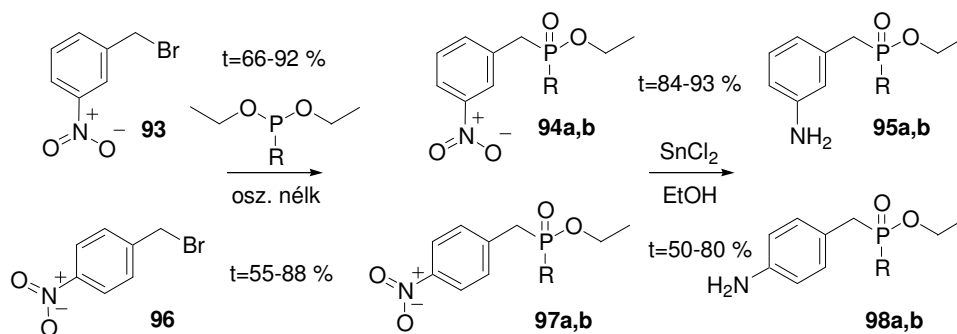
no	A	CDK9/CycT1 IC ₅₀ (nM)
89a	NO ₂	>14 000
92a		2 100
90	NH ₂	3 110
92b		1 130

Az eddig bemutatott foszfonamidáttal és foszfonáttal megkezdett sorba valójában nem ezek a vegyületek illeszkednek, hanem ezek foszfinát származékai. A vegyületek előállításához – mint azt már e fejezet elején is említettem – a 7.3 fejezetben leírt H-foszfinátokra volt szükség (csak a fenil-foszfinát vásárolható meg, az etil és a propil nem). A H-foszfinátok és a nitro-benzaldehidek Pudovik-reakciója sikerrel járt, azonban a redukciók minden esetben kudarcba fulladtak (47. ábra).

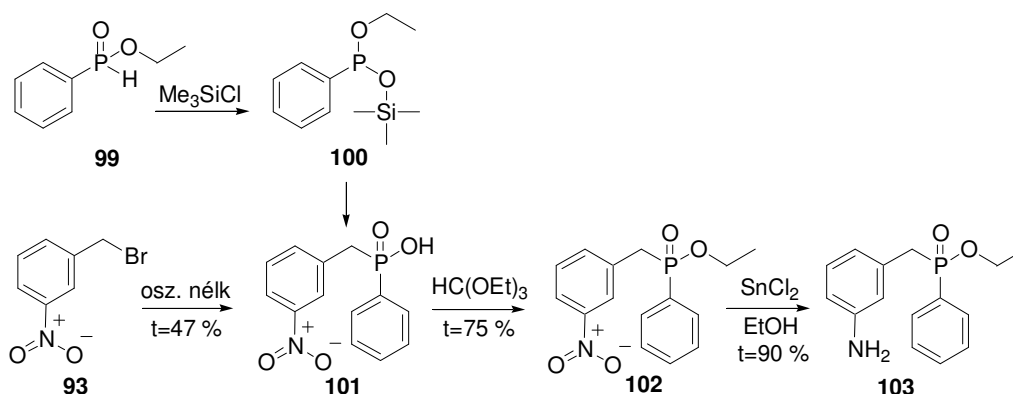


47. ábra A benzil-foszfinátok sikertelen előállítása.

E problémát úgy lehetett elkerülni, hogy a **91**-es vegyületnél alkalmazott módon (42. ábra) a nitro-benzil bromidot reagáltattam a H-foszfinátok előállításánál keletkező foszfonitokkal (26. ábra) Arbuzov reakcióban. A foszfonitok izolálása értelemeszerűen csak az etil és a propil szubsztituensek esetén merült fel, hiszen csak ezek származékainak előállítása történt házon belül (48. ábra). A fenil szubsztituens esetében a H-foszfinátot *in situ* visszaalakítottam a reaktív, trivalens foszfonittá trimetil-szilil kloriddal, majd az Arbuzov reakció után keletkező foszfonsavat észterezni kellett (49. ábra). A nitro csoport redukciója minden esetben ón(II) kloriddal történt.

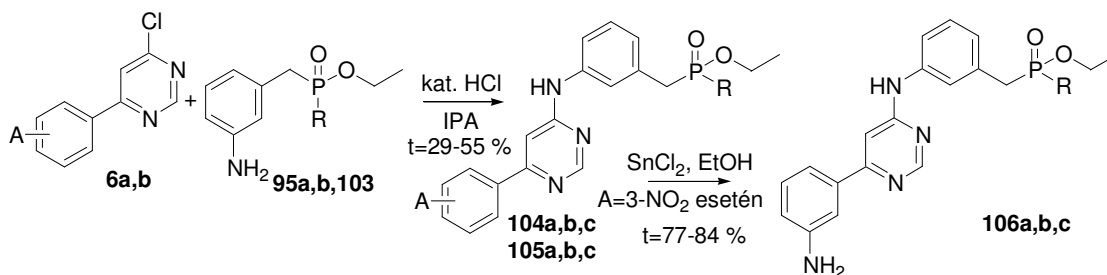


48. ábra A meta és para benzil-foszfinát anilinek előállítása, R= etil (a) és propil (b).



49. ábra A meta helyzetű fenil-foszfinát előállítása.

Az előállított anilineket az eddig is alkalmazott 4-klór-6-(2-metoxifenil)-pirimidinnel (**6a**), ill. a 4-klór-6-(3-nitrofenil)-pirimidinnel (**6b**) kapcsoltam. Valamint a 3-nitro szubsztituenst ón(II) kloriddal aminná redukáltam (meta szubsztitúció: 50. ábra; para szubsztitúció: 51. ábra). Az előállított vegyületek CDK9 gátló hatását a szokott módon mértük (12. és 13. Táblázat).

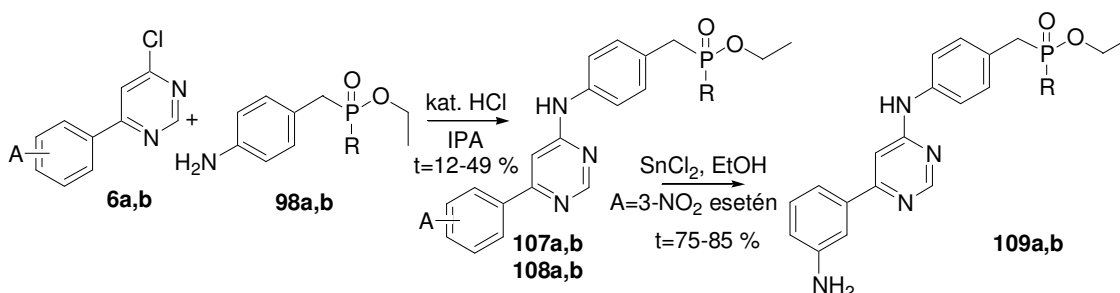


50. ábra A meta helyzetű benzil-foszfinátok előállítása; R=etil (a), propil (b), fenil (c); A=2-metoxi (104), 3-nitro (105), 3-amino (106).

12. Táblázat A meta helyzetű benzil-foszfinátok biológiai hatása.

no	A	R	CDK9/CycT1 IC ₅₀ (nM)
104a	2-MeO	etil	188
104b	2-MeO	propil	296
104c	2-MeO	fenil	517
105a	3-NO ₂	etil	6 432
105b	3-NO ₂	propil	8 056
105c	3-NO ₂	fenil	>12 500
106a	3-NH ₂	etil	327
106b	3-NH ₂	propil	682
106c	3-NH ₂	fenil	1 019

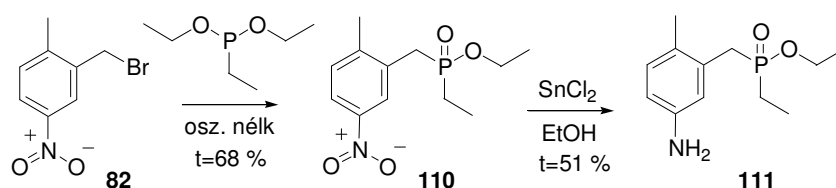
Az eredmények alapján a foszfor további szubsztitúciója – foszfonát helyett foszfinát – sokat javított a vegyületek hatásán. A 2-metoxi-fenil származékok közül az etil és a propil szubsztitúció gyakorlatilag nem befolyásolja a hatást, mindkét vegyület 300 nM alatti IC₅₀-nel rendelkezik, amire az eddig bemutatott foszfor tartalmú vegyületek közt csak egy (**87a**) példa volt. A fenil szubsztituens esetén mért 1 µM alatti IC₅₀ is egyedülállóan jó eredmény a hasonló vegyületekkel összehasonlítva. A 3-nitro-fenil származékok az eddigi tapasztalatoknak megfelelően gyakorlatilag hatástalanok. A 3-amino-fenil vegyületek szintén nagyon jó hatást mutattak, a korábbi származékokkal összehasonlítva.

**51. ábra** A para helyzetű benzil-foszfinátok előállítása; R=etil (**a**), propil (**b**); A=2-metoxi (**107**), 3-nitro (**108**), 3-amino (**109**).**13. Táblázat** A para helyzetű benzil-foszfinátok biológiai hatása.

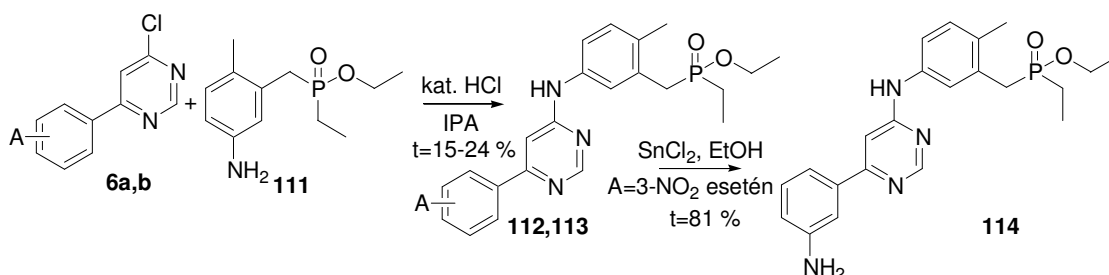
no	A	R	CDK9/CycT1 IC ₅₀ (nM)
107a	2-MeO	etil	743
107b	2-MeO	propil	652
108a	3-NO ₂	etil	7 774
108b	3-NO ₂	propil	5 525
109a	3-NH ₂	etil	7 533
109b	3-NH ₂	propil	7 474

Kissé meglepő módon a para helyzetű szubsztitúció jelentős mértékben rontotta a vegyületek enzimgátló képességét. Az a jelenség megmaradt, hogy az etil és a propil szubsztitúció nem okoz érdemi különbséget a biológiai hatásban. Azonban a nitro-csoport redukciója nem javítja a hatást, sőt a propil-foszfinát esetén még rontja is; erre korábban nem volt példa. A para helyzetű fenil-foszfinát származékokat nem állítottam elő, mert az eddigi tapasztalatok alapján nem vártam tőlük igazán jó hatást.

A kezdeti célkitűzés alapján olyan vegyületet kell előállítani, amelynek anilin oldalán meta pozícióban egy metilén-foszfinát, míg para helyzetben egy metil csoport található. A foszfonát modell vegyületnél (91) már kiderült, hogy a vegyülettípus előállítása a metil nélküli vegyületekhez képest lényegesen nehezebb. Az anilin előállítása a bemutatott módon, a 2-(brómmetil)-1-metil-4-nitrobenzol (82) és a megfelelő alkil-foszfonit Arbuzov-reakciójával történt (52. ábra). Különbség csak a hosszabb reakcióidőben és a gyengébb kitermelésben volt (53. ábra). A propil származék esetén a reakciók annyira rosszul mentek, hogy tiszta végtermékeket többszöri kísérlet ellenére sem tudtam preparálni.



52. ábra A 4-metil szubsztituenst tartalmazó benzil-foszfinát anilin előállítása.



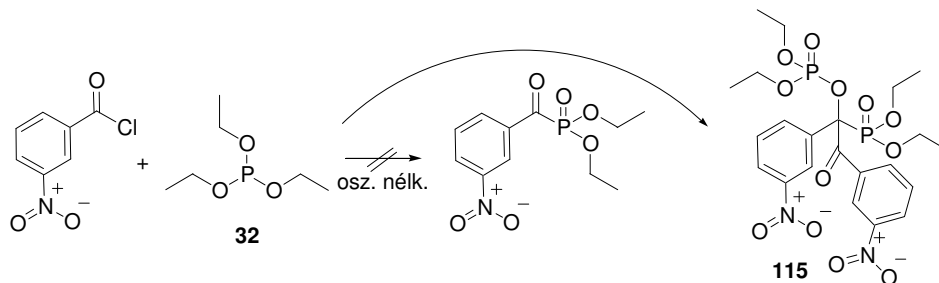
53. ábra A 4-metil szubsztituenst tartalmazó benzil-foszfinát végtermékek előállítása.

14. Táblázat Az előállított 4-metil szubsztituenst tartalmazó benzil foszfinátok biológiai hatása.

no	A	CDK9/CycT1 IC ₅₀ (nM)
112	2-MeO	366
113	3-NO ₂	7 022
114	3-NH ₂	346

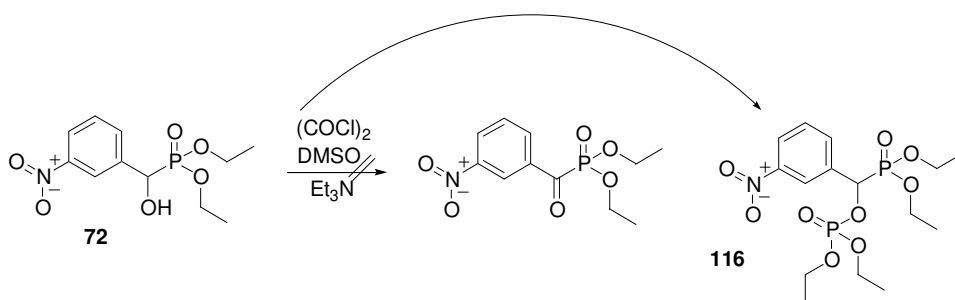
A nehéz preparálhatóság ellenére a vegyületek nagyon jó CDK9 inhibitorok. A **112** 2-metoxi és a **114** 3-amino származékok gyakorlatilag egyforma enzimgátlást mutattak, ami alig marad el a legjobb vegyületek hatásától (14. Táblázat).

A sorozatba beleillett volna egy olyan vegyületcsoport, amelyben a foszfort és az aromás gyűrűt összekötő szénatom karbonil csoportként van jelen. Ezt úgy próbáltam előállítani, hogy a 3-nitro-benzoosav kloridot reagáltattam trietil foszfittal (Arbuzov reakció) [93]. Azonban nem a várt α -keto foszfonátot izoláltam, hanem egy érdekes szerkezetű dimert (54. ábra). A reakció során egy α -keto foszfonát – a várt termék – oxo csoportjára addicionálódott egy trietil foszfit molekula, majd a nukleofillá váló α szénatom reagál egy benzoosav klorid karbonil szénatomjával. A klorid anion, mint távozó csoport az Arbuzov reakció mechanizmusánál már ismertetett módon a pozitív töltésű foszfóniumról eliminál egy etil csoportot, majd a foszfónium foszfát észterre rendeződik át [94]. Mivel hasonló reakció csak nitro szubsztituenst tartalmazó benzoosav kloriddal található az irodalomban, míg szubsztituálatlan benzoosav kloriddal a várt α -keto foszfonát keletkezik, feltételezem, hogy a nitro csoport elektronszívó hatása miatt játszódik le így a reakció.



54. ábra Benzoosav klorid reakciója trietil foszfittal, valamint a keletkezett termék szerkezete.

Az α -keto foszfonátot megpróbáltam még előállítani a fejezet elején bemutatott α -hidroxi-foszfonát Swern-oxidációjával [95], ám a reakció körülményei közt az imént beutatott reakcióhoz hasonló melléktermék keletkezett (55. ábra).



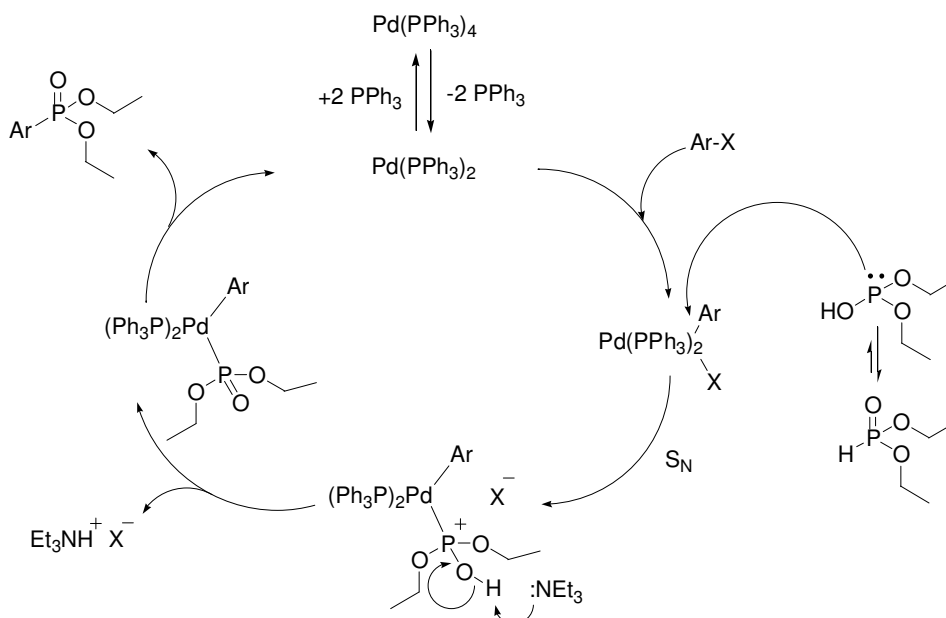
55. ábra Egy α -hidroxi-foszfonát sikertelen Swern-oxidációja.

7.6. Aril-foszfinát tartalmú inhibitorok előállítása (Ar-P)

Felmerült az az ötlet, hogy a foszfonát illetve foszfinát csoportot közvetlenül az aromás gyűrűhöz kapcsoljam, elhagyván az NH, az O, ill. a metilén csoportokat. Az így kialakítandó molekulák csak korlátozott mértékben lesznek izosztér viszonyban a szulfonamidokkal, de a szerkezet-hatás összefüggések megismerése céljából hasznosnak ítéltém e származékok előállítását.

A vegyületek előállítása palládium katalizált nukleofil szubsztitúcióval történt [96]. Az aromás halogenid (bróm vagy jód) elektrofilitásának növelését segíti a palládium(0)-val képzett komplex, a nukleofil ágens a dietil foszfit, valamint alkil és fenil H-foszfinátok voltak.

A H-foszfinátokkal képzett vegyületekkel az eddigiekhez hasonlóan a foszfor szubsztituenseinek enzimgátlásra gyakorolt hatására voltam kíváncsi, míg a dietil foszfittal előállított vegyületekkel a szabad sav – észter közti különbséget próbáltam feltérképezni.

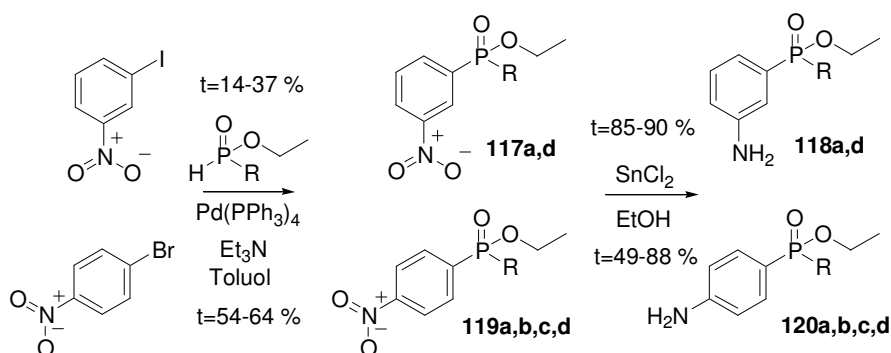


56. ábra A palládium katalizált P-C kapcsolás mechanizmusa Pirat szerint [97].

A vegyületek előállításában újdonságot csak a palládium katalizált reakció jelent, ennek egy feltételezhető mechanizmusát mutatja a 56. ábra. A reakciót aprotikus közegben, inert atmoszférában végeztem, továbbá minden esetben használtam bázist a keletkező

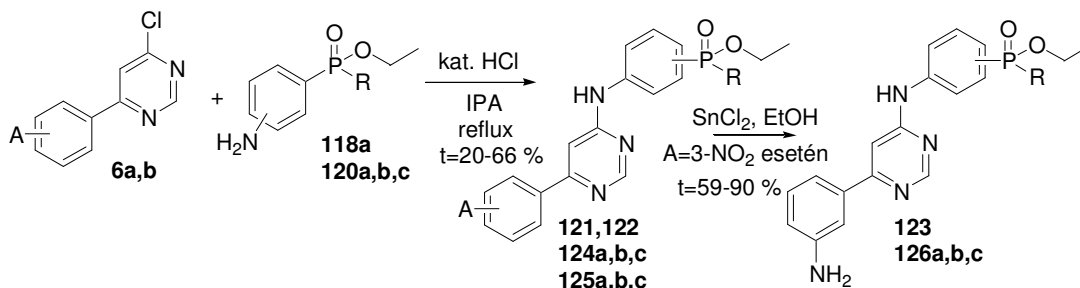
hidrogén halogenid megkötésére. A szubsztitúció után a nitro csoportból ón(II) kloriddal alakítottam ki az anilint, majd ezt kapcsoltam a klór pirimidinekkel a szokott módon.

Az alkil H-foszfinátok a már bemutatott módon készültek (26. ábra), a fenil H-foszfinát és a dietil foszfit pedig a kereskedelemben elérhető.



57. ábra Fenilfoszfinátok és foszfonátok előállítása; R= etil (a), propil (b), fenil (c), etoxi (d).

A 3-nitro-jódbenzol viselkedése a Pd katalizált reakcióban ambivalens. Míg az etil etilfoszfináttal és a dietilfoszfittal a reakció jól működik, addíg az etil propilfoszfináttal és az etil fenilfoszfináttal nem tudtam úgy elvégezni a reakciót, hogy tiszta terméket tudjak izolálni. Következésképpen a propil és a fenil szubsztituenssel a végtermékeket sem tudtam előállítani.



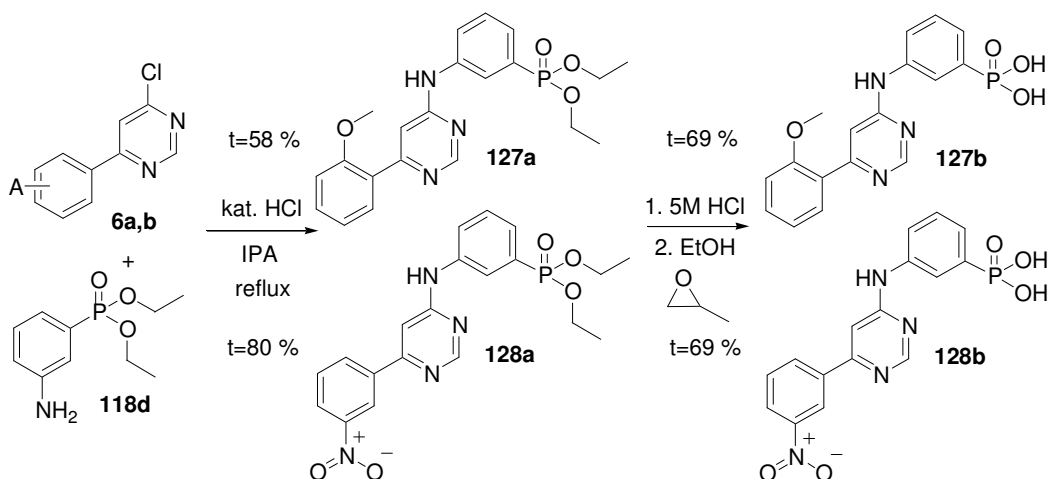
58. ábra Fenil foszfinátok előállítása.

A fenil-foszfinátok a biológiai hatás szempontjából nem hoztak átütő sikert. Érdekes módon a para helyzetű foszfinátok a hatásosabb vegyületek. Az R= fenil származék – melyet csak a para helyzetben sikerült elkészíteni – kivételesen hatékonynak bizonyult. A **124c** 2-metoxi-fenil származéka gyakorlatilag azonos hatást mutatott, mint a megfelelő **124a** R= etil foszfinát; a 3-amino-fenil verzió pedig jobbnak bizonyult hasonló relációban (**126a** és **126c**).

15. Táblázat A fenilfoszfinátok biológiai hatása.

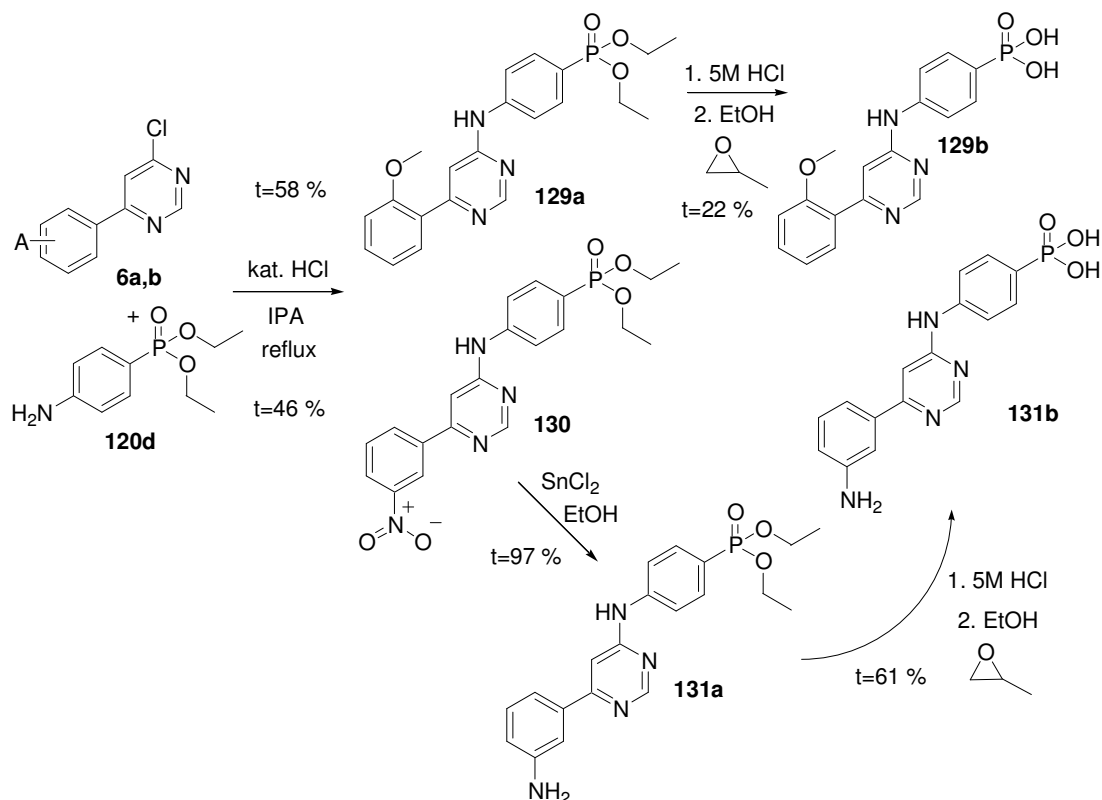
no	A	P-helyzete	R	CDK9/CycT1 IC ₅₀ (nM)
121	2-MeO	3	etil	842
122	3-NO ₂	3	etil	>12 500
123	3-NH ₂	3	etil	9 802
124a	2-MeO	4	etil	418
124b	2-MeO	4	propil	1 149
124c	2-MeO	4	fenil	523
125a	3-NO ₂	4	etil	>12 500
125b	3-NO ₂	4	propil	>12 500
125c	3-NO ₂	4	fenil	>12 500
126a	3-NH ₂	4	etil	>12 500
126b	3-NH ₂	4	propil	>12 500
126c	3-NH ₂	4	fenil	6 501

A dietil észter csoportokat az előző fejezetben leírtakkal azonos módon savas közegben hidrolizáltam el, így könnyen tudtam preparálni a szabad savat.



59. ábra A meta helyzetű fenil foszfonátok előállítása és hidrolízise.

Az *in vitro* vizsgálatokból kiderült, hogy a sav forma lényegesen alacsonyabb IC₅₀-nel rendelkezik, mint az észter. A jelenség az A= 3-nitro esetén a legszembetűnőbb. Az eddig bemutatott vegyületek esetén a nitro csoportot tartalmazó vegyületek gyakorlatilag hatástalanok voltak, az észter csoportok hidrolízise után már értékelhető hatást tudunk mérni. A legérdekesebb adat a **127b** vegyület IC₅₀-e, amely a legalacsonyabb érték a foszfortartalmú vegyületek közül.



60. ábra A para helyzetű fenilfoszfónatok előállítása és hidrolízise.

16. Táblázat A fenilfoszfónatok és foszfonsavak biológiai hatása.

no	A	P-helyzete		CDK9/CycT1 IC ₅₀ (nM)
127a	2-MeO	3	észter	1 040
127b	2-MeO	3	sav	170
128a	3-NO ₂	3	észter	>10 000
128b	3-NO ₂	3	sav	4 100
129a	2-MeO	4	észter	1 020
129b	2-MeO	4	sav	580
130	3-NO ₂	4	észter	>10 000
131a	3-NH ₂	4	észter	>10 000
131b	3-NH ₂	4	sav	3 320

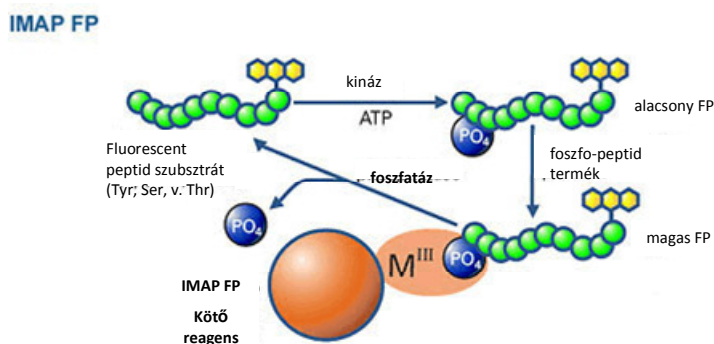
Ezen vegyületcsalád esetén is próbáltam előállítani a 4-metil szubsztituenst tartalmazó származékokat. Ugyan a szükséges 2-bróm vagy 2-jód-4-nitrotoluol könnyen beszerezhető, a palládium katalizált nukleofil szubsztitúció sajnos nem működött. Feltételezésem szerint a metil-csoport mind sztérikusan, mind elektronikusan rontja az orto helyzetű pozíció reaktivitását. Az adott csoporton belülről eltérő reaktivitás már a metilén (Ar-CH₂-P) származékok esetén is tapasztalható volt, ott azonban többé-kevésbé sikerült megoldani a problémát. Ebben az esetben számos próbálkozás után sem sikerült a foszforral kapcsolt nitro-toluolt izolálnom.

7.7. Egyéb biológiai vizsgálatok.

7.7.1. K_i meghatározás és ATP kompetíció vizsgálat.

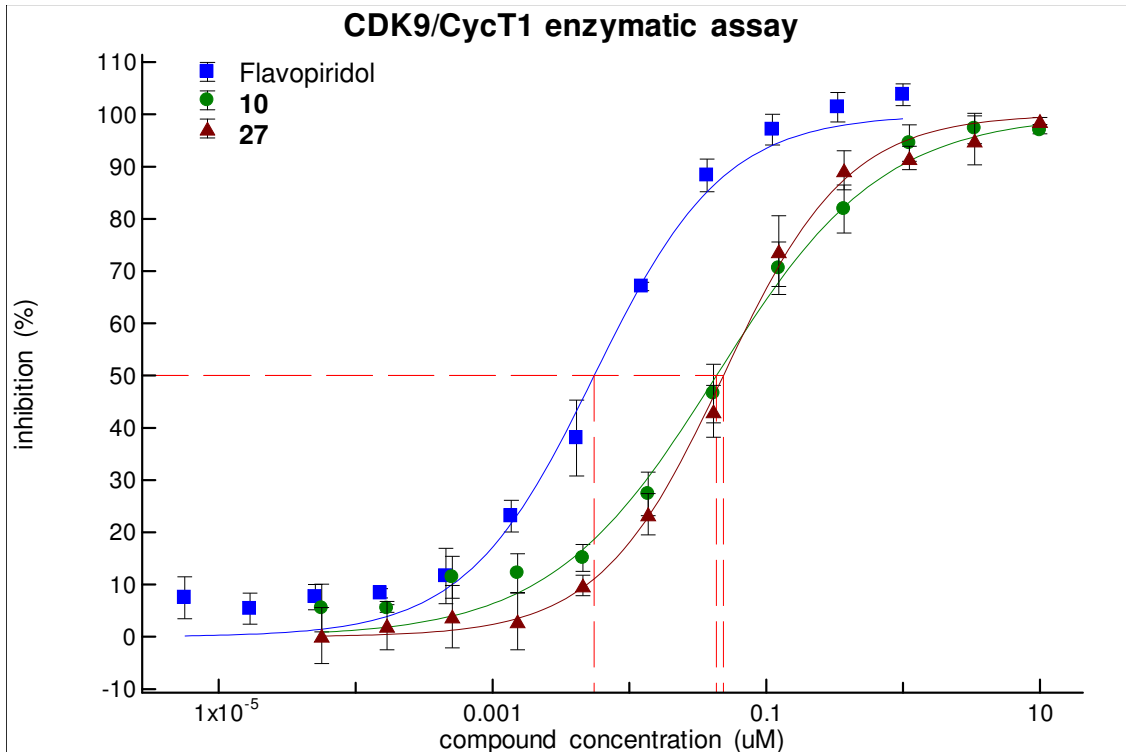
Az eddig megmért IC_{50} értékek nem univerzális, minden kísérleti módszerben azonos számértékek, hanem csak az adott kísérleti rendszerben igazak. Mivel minden mérést azonos módon végeztünk az eredmények összehasonlíthatóak, de a bevezetőben bemutatott irodalmi adatokkal már nem mutat teljesen reális képet egy ilyen összevetés. Az univerzális mérőszám a K_i érték, amely az inhibitor és az enzim asszociációjának, ill. disszociációjának egyensúlyi állandója. Kísérleti rendszertől függetlenül az adott inhibitor molekulára és az adott enzimre jellemző, dimenziója az IC_{50} -nel azonos módon koncentráció. A K_i érték az, amely mindentől független, reális összehasonlítást tesz lehetővé két molekula hatását illetően, ezért fontos a meghatározása. Eddig azzal a feltételezéssel éltem, hogy az előállított molekulák szubsztrát – jelen esetben ATP – kompetitív inhibitorok. Ennek eldöntése, illetve a K_i meghatározása egy kísérletben elvégezhető.

Az enzimátikus méréseket az ún. IMAP (Immobilized Metal ion Affinity-based fluorescence Polarization) módszerrel végeztük. Ennek elve, hogy a reakció során az enzim egy olyan módosított peptid szubsztrátját alkalmazzuk, amelyben egy fluoreszcens jelzés található. A peptid szekvenciát a kináz működése során foszforilálja. Ehhez a foszfát csoporthoz tud kötődni az IMAP reagens kelátképző fémionja. A nagyméretű IMAP reagens gátolja a szubsztrát rotációját, így a fluoreszcens jelzés növeli a fény polarizáltságát (61. ábra).



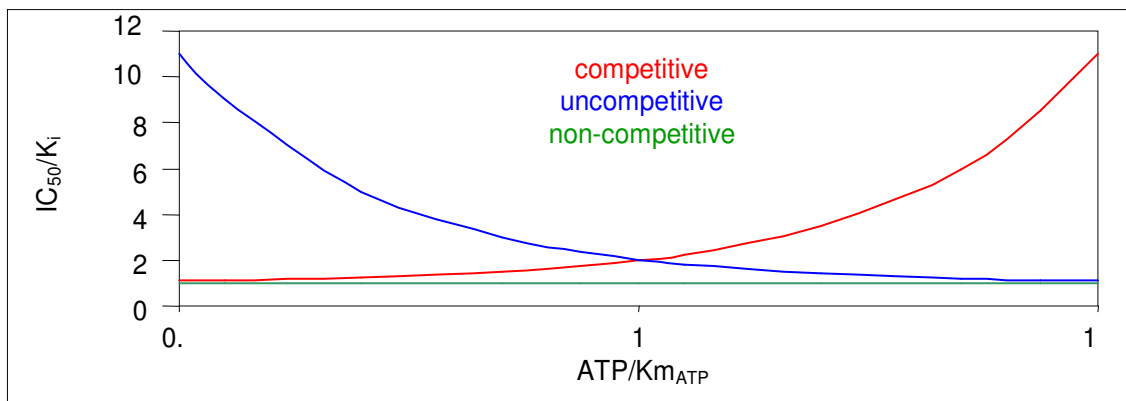
61. ábra Az IMAP módszer működési elve [98].

Az IC_{50} méréseknél 12 különböző koncentrációban megmértük az enzimgátlás %-os mértékét, a pontokra görbét illesztettünk, végül leolvastuk az 50 %-os gátláshoz tartozó vegyület koncentrációt.



62. ábra Két vegyület és a referenciaként használt flavopiridol IC_{50} görbéje.

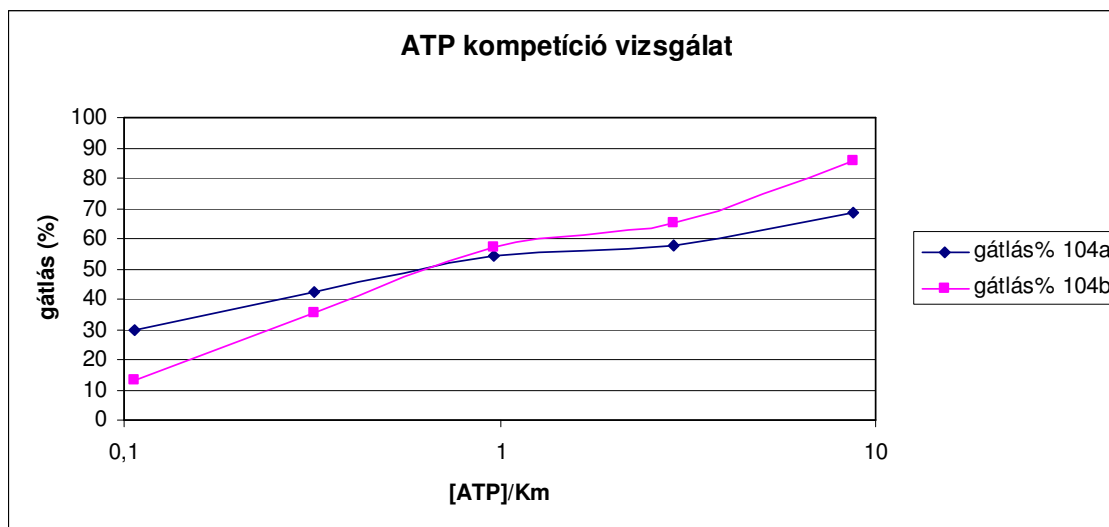
Az inhibitorokat az enzimhez való kötődésük mechanizmusa alapján három fő csoportra osztjuk: kompetitív, unkompetitív és nem kompetitív. A kinázgátlók esetén elsődleges kérdés az ATP-vel való versengés megállapítása. A különböző modalitású inhibitorok IC_{50} értékei a szubsztrát (ATP) koncentrációjával más és más összefüggést mutatnak (63. ábra) [99].



63. ábra A különböző modalitású inhibitorok enzim kinetikai viselkedése [100].

Az, hogy egy adott molekula milyen modalitású inhibitor eldönthető, ha megmérjük az enzimgátló képességét különböző ATP koncentrációk mellett. Két vegyületet választottam ki e vizsgálatra: a **104a** ($IC_{50}= 188 \text{ nM}$) és a **104b** ($IC_{50}= 299 \text{ nM}$) molekulákat. A mérés során 5 különböző ATP koncentrációt (a $K_m \pm$ két-két koncentráció), illetve 5 különböző vegyület koncentrációt ($IC_{50} \pm$ két-két koncentráció) vizsgáltunk. Ebből az adatmátrixból a megfelelő számításokkal kimutatható mind a kötődés modalitása, mind a kináz-inhibitor K_i értéke.

Az ATP kompetíció meglétét a 64. ábra mutatja. Az ábrázolt adatok nem teljesen egyeznek a fent bemutatott diagrammal. Az abszcissa tengely azonos skálázású, az ATP koncentráció és az ATP-kináz Michaelis-Menten egyensúlyi állandó hányadosát mutatja. Az ordinátán azonban én nem az IC_{50} és a K_i értékek hányadosát jelöltem, hanem a vegyület IC_{50} koncentrációja mellett mért különböző gátló értékeket. Az általam készített diagram ugyan kevesebb információt tartalmaz, mint az irodalomból idézett, de az egyértelműen látszik belőle, hogy az enzimgátló képesség nő az ATP koncentrációjával, tehát a vizsgált két vegyület ATP kompetitív [101].



64. ábra A két vegyület ATP kompetíció vizsgálatának eredménye 260 nM inhibitor koncentrációnál.

A pontos K_i számítás bonyolultsága miatt nem részletezem. Ugyanakkor a kompetitív inhibitorokra igaz az az egyszerű szabály (Cheng-Prusoff egyenlet $K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[ATP]}{K_m}}$),

hogy ha az IC_{50} mérés során az ATP koncentrációja megegyezik a K_m -mel, akkor a vegyület K_i -je fele az IC_{50} -nek [101]. A két módszerrel számított adatok jó egyezést mutatnak (17. Táblázat).

17. Táblázat A kiválasztott vegyületek K_i értékei.

no	IC_{50} (nM)	$K_i=IC_{50}/2$ (nM)	K_i (nM)
104a	188±53	94	115±17
104b	296±11	148	153±30

7.7.2. Kötődési vizsgálat.

Az eddig bemutatott *in vitro* eredmények mind egy ún. aktivitási vizsgálat során keletkeztek, vagyis azt mértük, hogy a vegyületek a kináz aktivitását milyen mértékben befolyásolják. Létezik egy másik fajta metodika, melynek során nem az enzim aktivitásának változását mérik, hanem a vegyület enzimhez való kötődését, ez az ún. kötődési vizsgálat. Lehetőségem nyílt néhány vegyületet megvizsgáltatni kötődési esszében a németországi Lead Discovery Center (LDC) intézetben. A munka akkori állása szerinti tíz legjobb vegyülettel végezték el a vizsgálatokat.

Az aktivitási vizsgálat nem minden esetben mutatja ki a klinikailag releváns hatást (nem ATP kompetitív vegyületeknél), ugyanakkor a kötődési vizsgálat pozitív eredménye sem jelent feltétlenül jó aktivitás gátlást, ezért a két fajta módszert érdemes egyszerre alkalmazni. Mindazonáltal, a két mérésnek egyforma eredményt kell adnia, a különböző mérési rendszerekből eredő különbségek ellenére [102]. Az én vegyületeim esetén az látható (18. Táblázat), hogy egyes molekulák esetén a két mérési eredmény között nagyságrendnyi eltérés is lehet. Mivel az aktivitási vizsgálat során egy végletekig leegyszerűsített rendszert használtunk, nem fordulhatott elő, hogy valamilyen biológiai, biokémiai okok miatt az aktivitást nem tudtuk észlelni. A kötődési vizsgálat három kivétellel az aktivitási vizsgálatnál lényegesen rosszabb, vagy annál lényegesen jobb eredményt mutat. A közel azonos eredmények (**54a**, **129a**, **129b**) nem szorulnak különösebb magyarázatra. Azokban az esetekben, amikor a kötődési vizsgálat lényegesen alacsonyabb IC_{50} -et mutat (**71b**, **88a**, **92b**, **127a**, **127b**), illetve ennek ellenkezőjét (**56a** és **88b**), a jelenség pontos megértése a rendelkezésemre álló adatokból nem lehetséges. A vegyületek szerkezete alapján nehéz bármilyen jellegzetességet felfedezni, ami esetleg befolyásolná a fenti jelenséget. Az ismeretlen valószínűségű

hipotézisek között egy röntgen diffrakcióval meghatározott inhibitor – fehérje komplex 3D szerkezet lenne alkalmas dönteni. Erre azonban nem volt lehetőségem.

18. Táblázat Néhány vegyület aktivitási és kötődési vizsgálatban mért IC₅₀-einek összehasonlítása.

no	CDK9/CycT1 IC ₅₀ (nM) aktivitás vizsg.	CDK9/CycT1 IC ₅₀ (nM) kötődés vizsg.
54a	970	1 367
56a	870	3 516
71b	1 450	39
88a	491	33
88b	570	3 438
92b	1 130	32
127a	1 040	19
127b	170	35
129a	1 020	873
129b	580	855

7.7.3. Kináz szelektivitás.

A kinázgátlókkal kapcsolatos egyik legfontosabb kérdés a szelektivitás. Ahogy azt már a 3.4 fejezetben is említettem, a legfontosabb az egyéb CDK-kal szembeni szelektivitás. A 7.2 fejezetben bemutatott, de foszfort még nem tartalmazó vegyületek jelentős részéről a teljes CDK profilt sikerült meghatározni (19. Táblázat). A foszfor tartalmú vegyületek esetén csak néhány példán volt lehetőségem a legfontosabb sejtciklust szabályozó kinázokkal való összehasonlítást elvégezni (20. Táblázat).

19. Táblázat Néhány vegyület CDK szelektivitási eredménye I.

no	IC ₅₀ (nM)							
	CDK1/ CycB	CDK2/ CycE	CDK3/ CycE	CDK4/ CycD1	CDK5/ p35	CDK6/ CycD1	CDK7/ CycH	CDK9/ CycT1
10	2 749	1 585	13 500	13 500	13 500	13 500	13 500	39
11	1 447	1 828	13 500	13 500	6 607	13 500	13 500	186
12	241	328	2 552	13 500	394	1 350	-	129
13	53	47	79	13 500	59	802	13 500	27
27	>1 350	>1 350	>1 350	-	>1 350	>1 350	>1 350	42
28	>1 000	>1 000	>1 000	>1 000	>1 000	>1 000	>1 000	174
29	1 419	281	>1 350	-	79	>1 350	>1 350	144
30	>1 350	>1 350	>1 350	>1 000	>1 350	>1 350	>1 000	>1 350
31	>1 000	>1 000	>1 000	>1 000	>1 000	>1 000	>1 000	355

20. Táblázat Néhány vegyület CDK szelektivitási eredménye II.

no	gátlási % a kinázoknál jelzett vegyületkoncentráció mellett				CDK9/ CycT1 IC ₅₀ (nM)
	CDK1/ CycB 3 μM	CDK2/ CycE 10 μM	CDK4/ CycD1 10 μM	CDK5/ p35 3 μM	
43	-	32 %	2 %	-	3 170
50	14 %	19 %	18 %	10 %	5 240
54a	6 %	1 % [#]	13 % [#]	2 %	813
54b	31 %	6 % [#]	21 %	8 %	3 057
54c	-	8 %	19 %	-	4 137
66b	-	-7 %	5 %	-	10 000
69b	-	-7 %	3 %	-	10 000
71b	42 %	34 %	46 %	25 %	1 457
88a	-	77 %	51 %	-	491
88b	-	94 %	68 %	-	510
90	-	14 %	30 %	-	3 110
127b	-	56 %	40 %	-	170
129a	-	69 %	22 %	-	1 020
131a	-	18 %	35 %	-	10 000
131b	-	98 %	67 %	-	3 320

#3 uM-ban

A CDK szelektivitás vizsgálaton átesett vegyületek egy részét egy tágabb kináz szelektivitási vizsgálatnak vettem alá. Ekkor 27 illetve 35 különböző túlélési jelnek tekinthető kinázon mértük a vegyületek aktivitását. Ez úgy történt, hogy mindegyik vizsgálendő molekulával – 10 μM koncentrációban – elvégeztek egy-egy aktivitási vizsgálatot. Az eredmény számértéke azt mutatja, hogy hány százalékkal csökkent az enzim aktivitása. Jelen esetben a sok alacsony gátlási érték a legjobb eredmény. Ez azt jelenti, hogy az általam előállított vegyületek szelektív CDK9 gátlók, legalábbis e kb. 30 kináz tekintetében.

A 27 kinázon vizsgált vegyületcsoport – foszfonamidátok és foszfonátok – két kináz esetében mutat szerkezet-hatás összefüggésre utaló hatást (a 25 és 75 % közötti gátlást sárga háttérrel, a 75 % feletti gátlást piros háttérrel emeltem ki). Ezek a c-Kit és a ROCK2 kinázok. Az adatok alapján úgy tűnik, hogy a Suzuki oldalon 3-nitro-fenil szubsztituenst tartalmazó vegyületek (**66b**, **69b**) nemcsak a CDK9 kináz esetében hatástalanok, hanem más kinázok esetén is. A vegyületcsoport egyetlen **71b** foszonsavja (**54b**-ből képzett) a c-Kit-et gátolja viszont a ROCK2-t csak kisebb mértékben, mint a

foszfónát észterek, ugyanakkor további két kinázon mértünk 25 % feletti gátlást: az ABL és az Aurora A kinázokon (21. Táblázat).

A 35 kinázon vizsgált molekulák közül az első három a metilén-foszfónatok csoportjába tartozik. A **88a** vegyület a Suzuki oldalon 2-metoxi csoportot tartalmazó, az anilin oldalon, para helyzetben CH₂-n keresztül kapcsolódó foszfónát dietil észter. A **88b** csak annyiban különbözik tőle, hogy CH₂ helyett CH-OH-t tartalmaz. E két vegyület szinte az összes vizsgált kinázon azonos mértékben hat. Kettő kivételével: az IRAK4 és a PLK3. Az IRAK4-en a hidroxil származék, a PLK3-on a szubsztituátlan metilén vegyület hat jobban. A **90**-es vegyület csupán annyiban különbözik **88a**-tól, hogy a Suzuki-oldalon 3-amino-fenil csoportot tartalmaz. Ennek ellenére kinázgátló képessége jelentősen különbözik. Mindössze három: a DDR1, az EGFR, és a Src kinázokat gátolja 25 % körüli mértékben.

A második négy vegyület az anilinhez közvetlenül kapcsolódó foszfónatokhoz tartozik. A **127b**, mint a legjobb foszfónat-tartalmú CDK9 gátló, az eddigi eredményektől kicsit eltérő kinázszelektivitást mutatott: az ABL-t és az Aurora A-t 50 % felett gátolta, továbbá az EGFR-t, a PIM1-et, a PKCa-t és a PLK3-at 25 % felett. Érdekes az Aurora A kinázon mért jelentős gátlás, mivel ez a kináz is a sejtciklus szabályozásában vesz részt a CDK-khoz hasonlóan. A para helyzetű **129a** dietil foszfónát vegyület 78 %-ban gátolja a cKit-et és 59 %-ban a PDGFR- β -t, valamint kis mértékben a b-Raf-ot és a Src-ot. A 2-metoxi csoportot 3-aminra cserélve (**131a**) a jelentős cKit gátlás eltűnik és a PDGFR- β gátlás is minimálisra (22 %) csökken. A kismértékű b-Raf gátlás megmaradt, ehhez társult a hasonló mértékű EGFR gátlás. Az észterek hidrolízisével keletkező sav (**131b**), amely számos kináz aktivitását jelentősen befolyásolja. Az Aurora A, az IRAK4 és a Syk kinázok esetén a gátlás 75 % feletti; 50 % felett gátolta a PDGFR- β és Src kinázokat, melyek mind fontos túlélési jelek (surviving factor) bizonyos fajta tumorokban.

Az eredmények alapján úgy tűnik, hogy a foszfónamidát, foszfónát és foszfinát észterek kevés CDK9-től különböző kinázon hatnak, s e hatás is egy-két nagyságrenddel gyengébb. Az aromás gyűrűhöz közvetlenül kapcsolt foszfónatok esetén a szelektivitás már csökken, de az egyéb kinázokat gátló képesség jelentősen elmarad a CDK9

gátlástól. Az észterekből képzett savak szelektivitása tovább romlik, és bizonyos esetekben már jelentős enzimgátló hatással rendelkeznek.

21. Táblázat A kináz szelektivitási vizsgálat eredménye I (gátlási %, 10 µM-os vegyület koncentrációnál)

no	43	50	54b	54c	66b	69b	71b
ABL	-4,71	5,96	5,19	-0,15	-7,12	-1,19	29,51
AKT1	1,07	-1,06	13,3	-0,11	-10,33	-2,35	9,08
AurA	-0,45	9,36	13,29	16,44	-4,99	-4,17	42
AXL	18,63	-3,03	-3,3	-5,75	-10,19	-0,91	0,31
CHK1	-2,39	12,14	6,79	8,07	-0,21	2,49	6,72
cKIT	48,63	39,07	34,85	44,74	8,2	9,22	47,79
c-MET	-6,5	-2,84	0,82	-2,16	-12,11	-7,82	20,28
CSK	-3,64	-0,59	-2,32	-12,78	-11,76	-7,68	-10,86
EGFR	-12,67	9,32	-14,47	-1,62	-23,13	-9,33	-11,92
ERBB2	12,63	4,16	3,35	-1,79	-3,56	2,62	4,79
FGFR3	-7,15	-8,79	-8,86	-6,11	-13,39	-14,54	17,14
FLT3	-11,57	-0,85	-8,11	-5,17	-9,97	-3,85	-3
IGF1-R	-10,14	-2,67	-10,12	-9,65	-13,71	-6,99	-11,49
INSR	-5,67	-1,2	-5,05	-7,18	-9,02	-9,38	-7,34
JAK3	-18,67	6,36	-8,93	-1,66	-10,74	-6,66	-0,55
MAPK-ERK1	-10,34	5,11	-7,85	-9,95	-14,43	-14,12	-4,04
PAK1	-13,89	-2,71	-13,61	-9,32	-12,83	-15,48	-11,18
PAK4	1,65	4,41	-0,09	-0,25	-1,52	-1,23	-4,26
PDGFR-?	-6,49	4,24	-7,57	-7,05	-8,7	-4,74	12,03
PIM1	-19,39	-6,77	-0,2	-8,64	-10,81	-22,3	2,71
PKCa	1,28	4,56	8,42	-5,8	0,02	-2,21	-11,72
PLK3	21,9	12,17	16,23	24,65	-0,97	6,39	22,84
ROCK 2	38,08	32,1	43,61	40,42	-11,62	2,14	19,23
SRC	3,03	9,91	4,49	2,79	-5,92	-1,49	1,79
SYK	1,96	4,74	0,15	5,61	-11,66	-8,93	11,3
VEGFR2	-6,3	-3,08	-3,56	-7,3	-1,97	-1,71	-0,9
ZIPK (DABK3)	-1,81	3,77	5,4	8,89	-4,97	-1,01	21,68

22. Táblázat A kináz szelektivitási vizsgálat eredménye II (gátlási %, 10 μ M-os vegyület koncentrációnál)

no	88a	88b	90	127b	129a	131a	131b
ABL	32,26	34,8	6,75	50,27	17,91	14,96	54,87
AKT1	1,82	-2,22	0,45	9,07	2,34	-2,04	-17,56
AurA	16,68	25,81	6,29	66,35	9,57	22,97	88,12
AXL	6,35	3,04	9,65	-0,36	3,51	4,09	26,19
B-RAF	17,65	12,24	6,42	-1,82	25,86	26,15	44,62
CHK1	4,75	8,05	5,59	1,86	5,81	8,21	23,1
cKIT	39,87	41,27	16,84	1,76	78,52	7,56	-10,21
c-MET	-3,22	-0,65	-4,34	17,88	1,88	-1,49	39,72
CSK	-0,02	-4,51	3,42	-3,72	0,9	-0,17	3,7
DDR1	29,68	28,05	27,03	-8,69	-	19,01	31,83
EGFR	23,67	26,35	30,9	25,2	4,91	26,76	35,35
ERBB2	1,31	20,02	3,02	19,04	21,89	5,87	-29,58
FGFR3	3,59	5,96	4,2	-1,33	1,97	6,96	0,88
FLT3	0,98	2,52	1,18	-0,23	9,71	2,91	-15,1
IKK- β	1,07	7,67	1,77	8,02	-	4,52	10,92
IGF1-R	-	-	-	-5,08	3,01	-	-
INSR	3,14	4,82	3,45	-0,88	0,66	6,53	40,98
IRAK4	10,43	52,86	5,79	12,31		11,87	76,8
JAK3	12,16	24,1	0,4	2,55	3,4	0,87	18,25
JNK1	2,98	8,53	6,86	-	-	6,63	22,17
MAPK-ERK1	0,41	2,86	-4,42	10,06	4,64	8,98	20,78
mTOR	5,2	11,33	11,49	-	-	5,99	5,5
PAK1	0,65	-2,92	5,97	3,09	-13,64	-12,38	34,21
PAK4	47,41	33,71	12,69	15,49	3,75	3,08	44,14
PDGFR- β	5,21	5,69	0,29	18,71	58,94	21,65	54,38
PIM1	10,98	17,05	0,92	29,66	-17,84	13,31	44,97
PKCa	-1,44	14,07	6,24	34,52	-11,45	6,75	40,39
PLK3	34,5	-0,9	-8,66	29,45	4,92	-5,77	28,64
RET	-3,32	0,09	0,11	6,2	-	2,28	40,06
ROCK 2	4,57	9,25	2,67	10,75	5,77	2,77	43,97
SRC	39,31	31,04	23,22	8,84	38,89	14,77	58,83
SYK	0,3	2,88	-0,55	-0,8	18,09	-2,07	94,37
TIE2	-1,95	5,41	1,32	-4,89	-	1,03	-7
VEGFR2	3,8	1,85	3,8	-4,24	2,52	5,79	0,19
ZIPK (DABK3)	-0,46	8	1,31	22,56	-0,51	1,66	61,99

7.7.4. Sejt alapú toxicitás vizsgálat.

Az előállított vegyületek közül 20-at lehetőségem volt néhány tumoros sejtvonalon vizsgálni. Ezek közül a legfontosabb a JURKAT, az MT4 és a H9 nevű sejtvonalak, amik közül a JURKAT egy halhatatlanná tett T-limfocita, így alkalmas a T-sejtek viselkedésének vizsgálatára, továbbá a T-sejtes leukémia vizsgálatára [103]. Ezen vizsgálatok során az első tulajdonságát használtam ki, mivel a HIV vírus először a T-limfocitákat támadja meg, ott kezd szaporodni (3.3 fejezet). Az MT4 [104], illetve a H9 [105] sejtvonalak pedig kimondottan HIV szaporodás vizsgálatokra lettek kitenyésztve. A HIV szaporodás gátlásának vizsgálata sejtes rendszerben megköveteli, hogy a vizsgálandó vegyület a gazdasejteket ne pusztítsa el, a kezeletlen kontrollal összehasonlítva az élő sejtek számát ne befolyásolja még hosszú expozíció (jelen esetben 7 nap) során sem.

A többi tumoros sejtvonalon végzett mérés a vegyületek mellékhatásainak felderítését szolgálták. A kb. 30 kinázon elvégzett szelektivitás vizsgálatból ugyan úgy tűnik, hogy a molekulák szelektív CDK9 gátlók, ez azonban egy sejtben előforduló összes lehetséges célpont (amelyen a vegyület biológiai hatást fejthet ki) számához képest elenyészően kicsiny merítés. A különböző fajta daganat-sejtek különböző fajta genetikai állományúak, s így molekuláris biológiai rendszereik is különbözőek. Ezért ez a sejtes vizsgálat alkalmas arra, hogy egy előzetes toxicitás vizsgálatnak tekintsük.

23. Táblázat Az MT4 és H9 sejtvonalakon elvégzett toxicitásvizsgálat eredménye.

no	Túlélő sejtek (%)				
	MT4 (MTT)			H9 (MTT)	
	2,0 μ M	1,0 μ M	0,5 μ M	1,0 μ M	0,5 μ M
flavopiridol	14	23	-	55	110
10	115	101	-	92	97
27	123	98	-	99	97
49	-	85	89		
54a	-	84	80		
56a	-	84	86		
71a	-	79	85		

Az MT4 és H9 sejtvonalakon határoztuk meg azt a koncentrációt, melynél a vegyületek még nem befolyásolják a sejtek proliferációját. Az így meghatározott koncentrációban vizsgáltuk a HIV szaporodás gátlást, melyet a következő fejezetben tárgyalok. Az általam előállított nem foszfor tartalmú molekulák (**10**, **27**) még 2 μ M-ban sem zavarják a sejtek növekedését, míg a flavopiridolról ez csak 0,5 μ M-ban mondható el.

Ugyanakkor, e vizsgálatok alapján a foszfortartalmú vegyületek (**49**, **54a**, **56a**, **71a**) enyhén toxikusak (23. Táblázat).

A többi sejtes vizsgálatnál a kezelési koncentráció – a kináz szelektivitás vizsgálatához hasonlóan – 10 μ M volt. A sejteket 72 óráig inkubáltuk a vegyületekkel, majd a kísérlet végén a még élő sejteket elpusztítottuk és mértük a belőlük kiszabaduló ATP mennyiségét (ez arányos a sejtszámmal).

A foszfonamidátok és foszfonátok sajnos jelentős mértékben gátolták a JURKAT sejtek növekedését. A többi sejtvonal közül is többnek a növekedését gátolják közepes mértékben. Külön kiemelendő a **66b** és **69b** molekulák, melyek konstitúciós izomerek. A kináz szelektivitási vizsgálat alapján egyik kinázon sem hatnak, még CDK9-en sem, a sejtes vizsgálatok alapján azonban mégis mutatnak valamilyen hatást. Az előbbi (meta szubsztitúció) több különböző szöveti eredetű tumor-sejt növekedését is gátolta, míg az utóbbi (para szubsztitúció), két sejtvonal kivételével teljesen hatástalan. Érdekes, hogy a **71b** sav a kináz vizsgálatok alapján kevésbé szelektív, mint az **54b** észter, mégis a sejtek növekedését kevésbé gátolja.

A benzil-foszfonátok nem befolyásolják érdemben egyik sejtvonal növekedését sem, a **91** 4-metil származék kivételével. Itt is az figyelhető meg, mint a foszfonátoknál, hogy míg a kináz vizsgálat alapján a **92b** sav kevésbé szelektív, addig itt nem toxikus.

Az aromás gyűrűhöz közvetlenül kapcsolódó foszfonátok esetén a kép nem egységes, de egy kivétellel (**127a** – A431) nem csökkentették a viabilitást 50 % alá, noha a kinázvizsgálatok alapján ez elképzelhető lett volna.

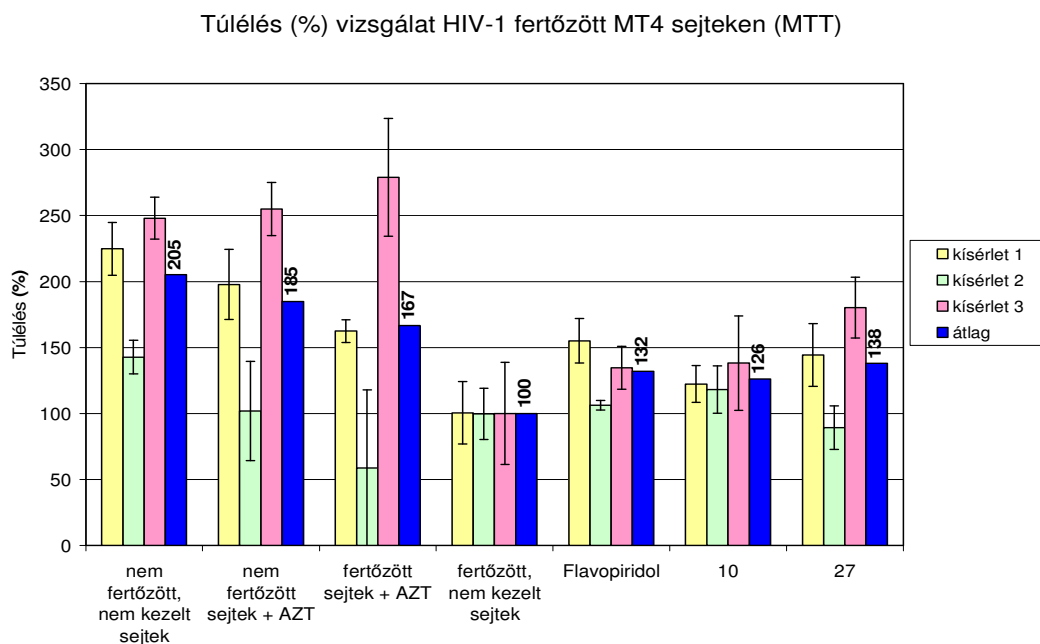
24. Táblázat A túlélő sejtek aránya a kezeletlen kontrollhoz (100 %) viszonyítva. A kezelési koncentráció 10 µM, az inkubáció ideje 72 óra, a mérés Cell-TiterGlo™ rendszerrel történt.

	43	50	54b	54c	56a	66b	69b	71b	88a	88b	90	91	92b	127a	127b	129a	131a	131b
JURKAT leukémia	17	66	20	11	67	45	75	52	93	101	96	61	94	70	80	77	92	-
H358 tüdő	57	70	42	36	60	35	60	107	102	91	111	51	96	72	86	80	116	109
HT29 vastagbél	72	93	44	83	87	72	101	103	85	87	93	70	95	97	114	79	101	95
MCF7 emlő	65	82	44	64	78	56	86	76	87	84	92	62	97	84	102	92	94	-
PC3 prosztata	60	89	27	57	61	20	94	91	87	81	101	71	92	73	98	93	103	-
PANC-1 hasnyál mirigy	62	84	64	80	103	80	108	92	113	111	109	76	92	60	99	71	111	-
H1666 tüdő	56	78	45	26	63	60	83	93	104	73	98	85	101	69	79	75	91	110
A549 tüdő	54	59	34	38	63	31	85	90	86	77	95	67	89	73	94	73	100	109
HCT116 vastagbél	41	89	35	45	59	31	86	104	53	71	85	88	101	71	95	75	103	96
HCT116 def vastagbél	85	93	30	77	64	20	93	100	87	81	94	82	87	82	104	104	102	89
SW480 vastagbél	78	85	63	77	70	59	101	101	80	94	93	65	103	75	95	91	110	92
H1993 tüdő	81	102	70	91	95	73	98	100	97	89	99	99	100	101	100	79	100	103
H1975 tüdő	117	103	57	111	98	59	107	92	81	91	93	58	93	94	117	116	97	95
H1650 tüdő	84	80	32	81	58	18	93	97	96	88	94	96	98	113	137	94	100	111
RKO vastagbél	50	73	6	32	51	11	90	102	81	80	84	54	108	68	91	93	76	89
A431 hám	74	112	65	48	37	66	97	60	103	111	116	81	111	12	102	68	115	-
MDA-MB-231 emlő	62	78	56	62	68	64	85	71	91	114	93	70	92	78	92	85	119	-
HCC827 tüdő	57	91	31	28	52	38	90	102	63	68	83	79	95	54	73	79	97	90

7.7.5. HIV szaporodás vizsgálat

A HIV szaporodási vizsgálatot elvégeztük az MT4 toxicitás vizsgálaton átesett vegyületekkel, egy már ismert, közvetett mérési módszerrel [106]. A mérés tulajdonképpen egy ugyanolyan túlélés vizsgálat, mint a toxicitási mérések, csak HIV fertőzött sejteken. Ha a vegyület gátolja a vírus szaporodását, akkor több sejt marad életben. Ezt a vizsgálatot egy előszűrőnek szántuk annak eldöntésére, hogy a vegyületek gyakorolnak-e bármilyen pozitív hatást a fertőzött sejtekre. A kísérleteket két csoportra érdemes bontani: 1. nem foszfor tartalmú vegyületek (**10**, **27**); 2. foszfor tartalmú vegyületek vizsgálata (**49**, **54a**, **56a**, **71a**). A foszfor tartalmú vegyületek nem mutattak értékelhető kuratív hatást a HIV fertőzött sejteken, így e vizsgálatok részletes tárgyalásától eltekintek.

A két nem foszfor tartalmú vegyület esetén a sejteket 2,5 μM koncentrációjú vegyülettel kezeltük. Referenciaként flavopiridolt (0,25 μM -ban) és AZT-t (azidotimidin vagy Zidovudine; 0,025 μM -ban; ez volt a piacra bevezetett első HIV/AIDS gyógyszer [107]) használtunk. Három ismétlést végeztünk, ezeket illetve az ebből számolt átlagokat a 65. ábra mutatja.

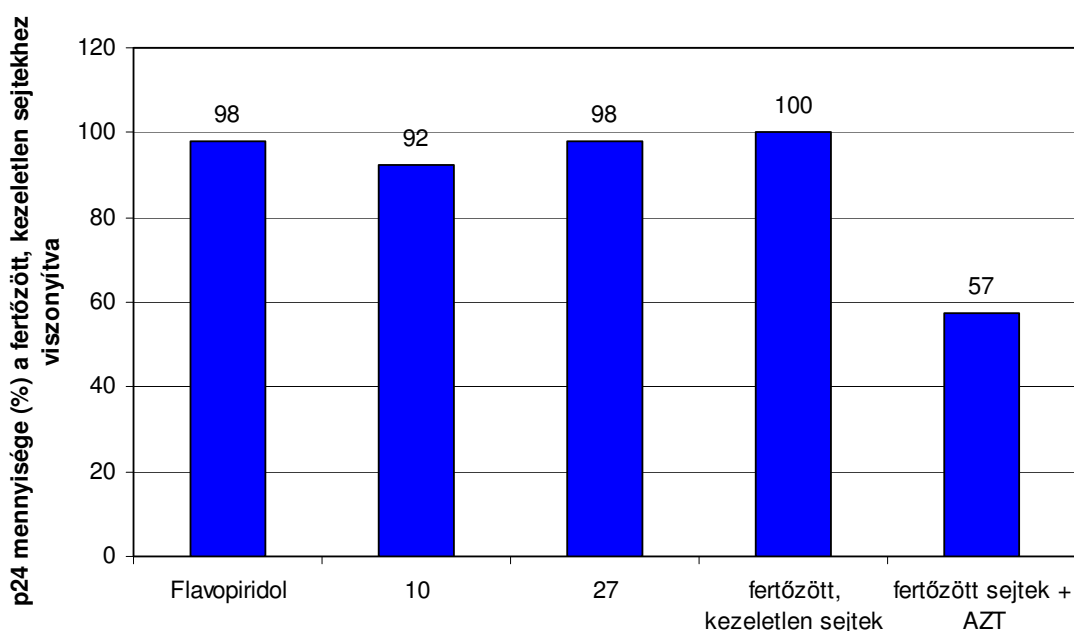


65. ábra Túlélés (%) vizsgálat HIV-1 fertőzött MT4 sejteken [5].

Az eredmények alapján megállapítható, hogy mind a két vizsgált vegyület a flavopiridollal – mint az egyik legismertebb CDK9 gátló hatóanyaggal – teljesen azonos hatást produkáltak, míg az AZT hatásától csak alig maradtak el. Ezen eredmények alapján nem eldönthető, hogy a vírus szaporodását is gátoltuk vagy nem. Az viszont egyértelműen kijelenthető, hogy a vegyületeknek védő hatása van.

Annak eldöntése, hogy a vegyületek gátolják-e a HIV vírus szaporodását a p24 fehérje termelődésének vizsgálata adhat választ. Mint ismeretes, a p24 fehérje a HIV kapszidjának egyik alkotója, mennyisége arányos a vírus szaporulattal [108]. Mindkét vegyület és a flavopiridol is mindössze néhány százalékkal csökkentették a p24 fehérje mennyiségét (66. ábra). Feltételezésünk szerint ennek oka a meglehetősen magas vírus koncentráció. Ezt a hipotézis támasztja alá az AZT közepes hatása is.

A kísérlet 3-ból készült p24 vizsgálat



66. ábra A p24 fehérje vizsgálat eredménye.

A fenti vizsgálatok alapján feltételezhető, hogy a **10**-es és **27**-es vegyületek gátolják a HIV szaporodását, és segítik a fertőzött sejtek túlélését. Annak tisztázása, hogy ezt mennyire a CDK9 működésének gátlása, illetve más humán vagy virális biomolekulákkal való kölcsönhatás eredményezi, további vizsgálatokat igényel.

8. Következtetések

Doktoranduszi munkám új típusú, hatékony CDK9 kináz gátló vegyületek, mint potenciális AIDS ellenes hatóanyagok előállítására irányult. A munkám elején kidolgozott intermedier előállítási módszer lehetővé tette, hogy egyszerűen, nagy mennyiségben állítsak elő 4-klór-6-(szubsztituált-fenil)-pirimidineket. A szintézisről egy rövid közlemény is született [85].

Az intermedierek felhasználásával előállítottam néhány szulfonamid, szulfonil ill. heterociklusos származékot. Ezek enzimatis vizsgálatok megtörtént. A legjobb vegyületek kináz szelektivitási profilját és sejt toxicitását vizsgáltuk. Két kiválasztott vegyület esetén a HIV szaporodás gátlást is tanulmányoztuk. E vizsgálatok alapján azt mondhatjuk, hogy a vizsgált molekulák szelektíven gátolják a CDK9/ciklinT1 működését *in vitro*, erre nem található példa az irodalomban. A mérések alapján a vegyületek nem toxikusak a vizsgált sejtvonalakon. Két vegyület HIV-1 szaporodást gátló képességét egy közvetett és egy közvetlen módszerrel vizsgáltuk. Mindkét módszer alapján kijelenthető, hogy a molekulák kuratív hatásúak: növelték a fertőzést túlélő sejtek számát és csökkentették a virális fehérjék termelődését, vagyis gátolták a vírus szaporodását. A munka ezen részéről – kiegészítve a munkacsoport által előállított más vegyületekkel – egy nemzetközi folyóiratban megjelent publikáció született [5]. A publikációban bemutatott vegyületek továbbfejlesztett, a disszertáció részét nem képező változataiból pedig egy szabadalmi bejelentés készült [109].

Az átmeneti állapot analógia elvénél bemutatottak szerint feltételeztem, hogy a szulfonamidokkal izosztér szerkezetű foszfonamidátok, foszfonátok és foszfinátok hasonló biológiai hatással fognak rendelkezni, vagyis bioizosztérek lesznek. Továbbá, hogy a jobb oldhatóságuk miatt kedvezőbb farmakokinetikai tulajdonságokkal fognak rendelkezni. Ez utóbbi feltételezés vizsgálatára végül nem volt lehetőségem, de remélhetőleg a hatóanyag-fejlesztés későbbi fázisában ezek a vizsgálatok el fognak készülni.

A munka ezen részét a foszfonamidátok előállításával kezdtem. Több, kudarcba fulladt kísérlet után, rendkívül rossz termeléssel végül sikerült három foszfonamidátot előállítani. Ezek biológiai hatása elmaradt a szulfonamidoknál mérttől.

A szintetikus nehézségek és a nem túl biztató biológiai eredmények hatására figyelememet inkább a foszfonátok előállítására koncentráltam. Ezen vegyületcsalád preparálhatósága lényegesen jobb, így 23 származékot tudtam előállítani. A legjobb hatású vegyületek kinázgátló hatása megközelítette a szulfonamidokét. Az előállított vegyületek lehetőséget adtak a szerkezet-hatás összefüggések vizsgálatára is. Így felismerhetővé vált, hogy a foszfor szubsztituáltsága, a foszfonát csoport kapcsolódásának helye, avagy a Suzuki oldali szubsztitúció hogyan befolyásolja az *in vitro* hatást. Két molekula esetén sikerült kivitelezni a foszfonát alkil észterének eltávolítását. Ezzel a lépéssel azonban nem sikerült tisztázni, hogy a sav vagy az észter hatékonyabb inhibitor, hiszen az egyik esetben romlott, a másik esetben javult a hatás.

A foszfonamidátok és a foszfonátok közül négy vegyületnek megvizsgáltuk a sejt-toxicitását, illetve a viabilitás mérésén alapuló indirekt HIV szaporodás gátló képességét. Sajnos a vizsgált MT4 sejtvonalon kis mértékű toxicitást mutattak. A HIV szaporodás vizsgálat során érdemben nem növelték a túlélő sejtek számát.

A harmadik izosztér csoport a foszfinátok előállítása kémiaiilag kissé ambivalens. Egyes származékok előállítása könnyen, jó termeléssel megvalósítható, míg más molekulák preparálása nehézkes, vagy kivitelezhetetlen. A 18 foszfinát mellett előállítottam még 11 benzil-foszfonátot. Ezen molekula család esetében több származék is igen alacsony koncentrációban gátolja a CDK9 működését ($IC_{50} = 150-300$ nM). Ez ugyan elmarad a legjobb nem foszfor-tartalmú molekulák hatásától ($IC_{50} < 50$ nM), de az először előállított foszfonamidátokénál ($IC_{50} = 1\ 500-5\ 250$ nM) egy nagyságrenddel nagyobb biológiai aktivitást jelent.

Két benzil foszfonát példáján vizsgáltam, hogyan változik a biológiai hatás az észter-sav relációban. Ezen a két példán egyértelmű, hogy a sav forma az észternél lényegesen jobb hatást mutat *in vitro*.

A kezdeti célkitűzések közt nem szerepelt a fenil-foszfinát ill. foszfonát származékok előállítása. Ebben az esetben a szulfonamidokkal nem teljesen izosztér szerkezetet hoztam létre. A molekulákat palládium katalizálta aromás nukleofil szubsztitúcióval állítottam elő. A foszfinátoknál tapasztaltakkal megegyezően bizonyos molekulák könnyen előállíthatóak, mások szintézise viszont csak nehezen kivitelezhető. Az

előállított 12 fenil-foszfinát közül néhány vegyület 1 μM alatti IC_{50} -nel rendelkezik, ám összességében nem ez a vegyületcsalád bizonyult a legeredményesebb CDK9 gátlónak.

A fenil-foszfonátok előállításánál a céloom elsősorban az észter-sav biológiai eredményekre gyakorolt hatásának vizsgálata volt. A sikeres hidrolízisek alapján egyértelmű az összefüggés, miszerint a foszfonsav mindig jobb hatású, mint a foszfonát észter.

A négy molekulacsoport mindegyikére igaz az a szerkezet-hatás összefüggés, hogy az etil szubsztituenszt tartalmazó foszfonamidát, foszfonát, foszfinát a legjobb hatású származék, függetlenül a molekula többi részétől. A propil szubsztituens általában kicsit gyengébb hatású, a fenil szubsztitúció pedig tovább rontja a hatást. Ha a Suzuki-oldali variációkat vizsgálva az figyelhető meg, hogy a 2-metoxi szubsztituens a legjobb. A 3-amino csoport általában kicsit rosszabb, mint a 2-metoxi, de sok – mindkét irányba – kiugró adat található a mérési eredmények között. A 3-nitro csoportot tartalmazó molekulák néhány kivételtől eltekintve gyakorlatilag hatástalanok.

Két vegyület esetében kísérletesen sikerült bizonyítani, hogy ATP kompetitívek. E két molekula esetén a K_i értékeket is meghatároztuk.

A kináz-profil vizsgálatok alapján kijelenthető, hogy a foszfonamidátok és foszfonátok alig gátolnak más kinázt a CDK9-en kívül. Ugyanakkor a foszfonsavak esetén a CDK9 szelektivitás jelentősen romlott.

A 18 tumoros sejtvonalon elvégzett toxicitás vizsgálat a kináz-profil alapján várhatóval ellentétes eredményt hozott. Azok a vegyületek, amelyek a CDK9-en kívül más kinázokat is gátoltak érdemben nem befolyásolták a sejtek növekedését. Ugyanakkor a szelektív CDK9 gátlónak tűnő vegyületek egyes sejtvonalakon kifejezetten toxikusnak mutatkoztak. Ezen ellentmondás háttérében számos ok rejtőzhet, ilyen lehet például a 3.2 fejezetben leírt CDK9 gátlással indukált, Mcl-1 expresszió csökkenésen keresztül zajló apoptózis. A jelenség pontos okának felderítése meghaladja e dolgozat kereteit.

A foszfor tartalmú vegyületek tervezésénél céloom volt, hogy olyan vegyületeket hozzak létre, amelyekben a foszfor tartalmú csoport hozzájárul a biológiai hatáshoz és nem csak a vízoldhatóságot javítja. Az eddigi eredmények alapján, kétféle okfejtés alapján is feltételezhető, hogy ez sikerült. Egyszer, a foszfor nélküli intermedierek biológiai hatásának vizsgálatával. A foszfonamidátok és foszfonátok esetén az összehasonlítás

egyszerű. A megfelelő anilin illetve fenolok enzimgátló hatása jobb vagy kb. azonos, mint a belőlük előállított foszfortartalmú vegyületeké. A foszfinátok esetén az összehasonlítás nehezebb, hiszen a disszertációban nem kerültek bemutatásra ilyen jellegű intermedierek megfelelő vegyületek, ugyanakkor megtalálhatóak a *Current Medicinal Chemistry* folyóiratban megjelent cikkemben [5]. Mivel a foszfortartalmú vegyületek kinázgátló hatása néhány kivételtől eltekintve gyengébb, mint a még foszfor nélküli intermediereké feltételezem, hogy a foszfor tartalmú csoport nem csak vízoldhatóságot javító prodrugként funkcionál.

Másodszor, a foszfor tartalmú csoport kémiai stabilitásának vizsgálatával. A foszfonamidátok esetén könnyen elképzelhető, hogy az enzimátikus reakció során a P-N kötés felhasad. Ez esetben az anilin hatásának megfelelő eredményeket várnék, ám attól lényegesen elmaradnak a tapasztaltak. A foszfonátok esetén a hidrolízis esetleg előfordulhat, azonban a tapasztalat nem a fenolokra jellemző rendkívül jó kináz gátló hatást mutatja. A foszfinátok és aril-foszfinátok és foszfonátok esetén kizárható a hidrolízis lehetősége.

A munka további folytatására, a kifejlesztett új típusú CDK9 kinázgátlók hatástani és gyógyszer szerű optimalizálására lehetőséget biztosít az, hogy mind az anilin-oldal, mind a Suzuki-oldal további szubsztituens variációi esetén a hatás – feltételezésem szerint – még javítható. A biológiai hatás további javítására módot adhat az enantiomerek szétválasztása, enantioszelektív szintézise, mellyel eddigi munkám során nem foglalkoztam.

9. Összefoglalás

Doktoranduszi munkám új típusú, hatékony CDK9 kináz gátló vegyületek, mint potenciális AIDS ellenes hatóanyagok előállítására irányult. Az irodalomból ismert CDK9 inhibitorok alapján terveztünk olyan származékokat, melyek a publikus vegyületeknél jobb és szelektívebb CDK9 gátlók. Ehhez kidolgoztunk egy eljárást a szükséges intermedierek speciális körülményeket nem igénylő szintéziséhez. Az előállított szulfonamid, szulfonil és heterociklusos származékok közül kettő nem csak a CDK9 kináz működését gátolja már alacsony koncentrációban is ($IC_{50} < 50$ nM), hanem a HIV vírus szaporodását is.

A szulfonamidok foszfor tartalmú analógjainak előállításával az volt a célom, hogy a biológiai hatás megtartása mellett, a farmakokinetikai tulajdonságokat javítsam, elsősorban a vízoldhatóságot. A foszfor tartalmú CDK9 inhibitorok biológiai hatása széles skálán mozog, azonban a legjobb biológiai hatású vegyületek enzim gátló képessége ($IC_{50} < 200$ nM) megközelíti a szulfonamidokét. Ezen vegyületek HIV szaporodás gátlás vizsgálatára csak részben került sor.

Összességében megállapítható, hogy azt a kezdeti célkitűzést, hogy a szulfonamidokat bioizosztér foszfor atomot tartalmazó csoportokra cseréljem, sikerült megvalósítani. A legjobb hatású foszfor tartalmú vegyületek enzimgátló hatása megközelíti a szulfonamidok kináz gátló hatását. Az átmeneti állapot analógia elve segítségével bemutatott izosztér viszonyok nemcsak peptidomimetikumok előállításánál alkalmazhatóak, hanem új kináz gátlók tervezésénél is segítséget nyújthatnak.

10. Summary

My PhD research was directed to synthesise novel and effective CDK9 kinase inhibitors, as potential drug candidates against AIDS. Based on CDK9 inhibitors known from the literature, more efficient and more selective derivatives of published compounds were designed. For this reason, a new synthetic approach for the necessary intermediates has been developed that do not require special conditions. Among the prepared sulfonamide, sulfonyl and heterocyclic derivatives two molecules inhibit the function of CDK9 in low concentration ($IC_{50} < 50$ nM), moreover they reduce the proliferation of HIV virus.

The aim of preparation of phosphorous analogues of sulfonamides was the construction of a molecule which has the same biological activity and better pharmacokinetic properties, especially better water solubility. Biological activity of phosphorous containing CDK9 inhibitors vary in a wide range, however the ability of the best ones to inhibit the enzyme activity is approximate ($IC_{50} < 200$ nM) to the sulfonamides. A few of them were tested in HIV proliferation assay.

All in all, it can be concluded that the initial objective, the replacement of sulfonamides with bioisosteric phosphorus containing moieties, was achieved. The best phosphonate and phosphinate type CDK9 inhibitors have commensurable biological activity with the sulfonamides. The isosteric relations described by the application of the theory of transition state analogy, not only, can be applied during the synthesis of peptidomimetics, but they can be useful in the design of novel kinase inhibitors.

11. Irodalomjegyzék

1. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S., The protein kinase complement of the human genome. *Science*, **298**(5600), 1912-1934, (2002).
2. Molecular Pathomechanisms and New Trends in Drug Research; (ed. György Kéri and István Tóth); György Kéri and István Tóth: Introduction – A breakthrough in modern drug research. pp 3-5. Taylor & Francis, London (2003); ISBN 0-415-27725-6.
3. Schwartz PA, Murray BW., Protein kinase biochemistry and drug discovery. *Bioorg. Chem.*, **39**(5-6),192-210, (2011).
4. van den Heuvel, S. *Cell-cycle regulation, WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, 2005.
5. Németh G, Varga Z, Greff Z, Bencze G, Sipos A, Szántai-Kis C, Baska F, Gyuris A, Kelemenics K, Szathmáry Z, Minárovits J, Kéri G, Orfi L., Novel, Selective CDK9 Inhibitors for the Treatment of HIV Infection. *Curr. Med. Chem.*, **18**(3), 342-358, (2011).
6. Graña X, De Luca A, Sang N, Fu Y, Claudio PP, Rosenblatt J, Morgan DO, Giordano A., PITALRE, a nuclear CDC2-related protein kinase that phosphorylates the retinoblastoma protein in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**(9), 3834-3838, (1994).
7. Shore SM, Byers SA, Dent P, Price DH., Characterization of Cdk955 and differential regulation of two Cdk9 isoforms. *Gene*, **350**(1), 51-58, (2005).
8. Shore SM, Byers SA, Maury W, Price DH. Identification of a novel isoform of Cdk9., *Gene*, **307**, 175-82, (2003).
9. Entrez Gene Name: CDK9 cyclin-dependent kinase 9; Entrez Gene ID: 102
10. a) Wang S, Fischer PM., Cyclin-dependent kinase 9: a key transcriptional regulator and potential drug target in oncology, virology and cardiology. *Trends Pharmacol Sci.*, **29**(6), 302-313, (2008).
- b) Romano1 G, Giordano A., Role of the cyclin-dependent kinase 9-related pathway in mammalian gene expression and human diseases. *Cell Cycle*, **7**(23), 3664-3668, (2008).
11. Krystof V, Chamrád I, Jorda R, Kohoutek J., Pharmacological Targeting of CDK9 in Cardiac Hypertrophy. *Med. Res. Rev.*, **30**(4), 646-666, (2010).
12. Liu X, Shi S, Lam F, Pepper C, Fischer PM, Wang S., CDKI-71, a novel CDK9 inhibitor, is preferentially cytotoxic to cancer cells compared to flavopiridol. *Int. J. Cancer.*, **130**(5):1216-1226, (2012).
13. Hussain SR, Cheney CM, Johnson AJ, Lin TS, Grever MR, Caligiuri MA, Lucas DM, Byrd JC., Mcl-1 is a relevant therapeutic target in acute and chronic lymphoid malignancies: down-regulation enhances rituximab-mediated apoptosis and complement-dependent cytotoxicity. *Clin. Cancer. Res.*, **13**(7), 2144-2150, (2007).

-
14. Natoni A, Murillo LS, Kliszczak AE, Catherwood MA, Montagnoli A, Samali A, O'Dwyer M, Santocanale C., Mechanisms of action of a dual Cdc7/Cdk9 kinase inhibitor against quiescent and proliferating CLL cells. *Mol. Cancer Ther.*, **10**(9), 1624-1634, (2011).
 15. Schmerwitz UK, Sass G, Khandoga AG, Joore J, Mayer BA, Berberich N, Totzke F, Krombach F, Tiegs G, Zahler S, Vollmar AM, Fürst R., Flavopiridol Protects Against Inflammation by Attenuating Leukocyte-Endothelial Interaction via Inhibition of Cyclin-Dependent Kinase 9. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **31**(2), 280-288, (2011).
 16. Price DH., P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol.*, **20**(8), 2629-2634, (2000).
 17. Durand LO, Roizman B., Role of cdk9 in the optimization of expression of the genes regulated by ICP22 of herpes simplex virus 1. *J. Virol.*, **82**(21), 10591-10599, (2008).
 18. Kapasi AJ, Clark CL, Tran K, Spector DH., Recruitment of CDK9 to the immediate-early viral transcriptosomes during human cytomegalovirus infection requires efficient binding to cyclin T1, a threshold level of IE2 86, and active transcription. *J. Virol.*, **83**(11), 5904-5917, (2009).
 19. M.C.I. Lipman, R. W. Baker and M.A. Johnson; with a foreword by P.A. Volberding. (2003). *An Atlas of Differential Diagnosis in HIV Disease, Second Edition*. CRC Press-Parthenon Publishers. pp. 22–27. ISBN 1-84214-026-4.
 20. http://www.unaids.org/globalreport/documents/20101123_GlobalReport_full_en.pdf
hozzáférés: 2011.01.23.
 21. Baumli S, Lolli G, Lowe ED, Troiani S, Rusconi L, Bullock AN, Debreczeni JE, Knapp S, Johnson LN., The structure of P-TEFb (CDK9/cyclin T1), its complex with flavopiridol and regulation by phosphorylation. *EMBO J.*, **27**(13), 1907-1918, (2008).
 22. Ali A, Ghosh A, Nathans RS, Sharova N, O'Brien S, Cao H, Stevenson M, Rana TM., Identification of Flavopiridol Analogues that Selectively Inhibit Positive Transcription Elongation Factor (P-TEFb) and Block HIV-1 Replication. *Chembiochem.*, **10**(12), 2072-2080, (2009).
 23. Guendel I, Agbottah ET, Kehn-Hall K, Kashanchi F., Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 by cdk inhibitors. *AIDS Res. Ther.*, **7**(1), 7, (2010).
 24. Hajdúch M, Havlíček L, Veselý J, Novotný R, Mihál V, Strnad M., Synthetic cyclin dependent kinase inhibitors. New generation of potent anti-cancer drugs. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **457**, 341-353, (1999).
 25. a) Kapasi AJ, Spector DH., Inhibition of the Cyclin-Dependent Kinases at the Beginning of Human Cytomegalovirus Infection Specifically Alters the Levels and Localization of the RNA Polymerase II Carboxyl-Terminal Domain Kinases cdk9 and cdk7 at the Viral Transcriptosome. *J. Virology*, **82**(1), 394-407, (2008).
b) Agbottah E, de La Fuente C, Nekhai S, Barnett A, Gianella-Borradori A, Pumfery A, Kashanchi F., Antiviral Activity of CYC202 in HIV-1-infected Cells. *J. Biol. Chem.*, **280**(4), 3029-3042, (2005).

-
26. Nekhai S, Bhat UG, Ammosova T, Radhakrishnan SK, Jerebtsova M, Niu X, Foster A, Layden TJ, Gartel AL., A novel anticancer agent ARC antagonizes HIV-1 and HCV. *Oncogene*, **26**(26), 3899–903 (2007).
27. Berthet C, Aleem E, Coppola V, Tessarollo L, Kaldis P., Cdk2 knockout mice are viable. *Curr. Biol.*, **13**(20), 1775-85, (2003).
28. Satyanarayana A, Hilton MB, Kaldis P., p21 Inhibits Cdk1 in the absence of Cdk2 to maintain the G1/S phase DNA damage checkpoint. *Mol. Biol. Cell*, **19**(1), 65–77, (2008).
29. Charles S, Ammosova T, Cardenas J, Foster A, Rotimi J, Jerebtsova M, Ayodeji AA, Niu X, Ray PE, Gordeuk VR, Kashanchi F, Nekhai S., Regulation of HIV-1 Transcription at 3 % Versus 21 % Oxygen Concentration. *J. Cell Physiol.*, **221**(2), 469-479 (2009).
30. Wu W, Kehn-Hall K, Pedati C, Zweier L, Castro I, Klase Z, Dowd CS, Dubrovsky L, Bukrinsky M, Kashanchi F., Drug 9AA reactivates p21/Waf1 and Inhibits HIV-1 progeny formation. *Virology J.*, **5**, 41, (2008).
31. Heredia A, Davis C, Bamba D, Le N, Gwarzo MY, Sadowska M, Gallo RC, Redfield RR., Indirubin-3'-monoxime, a derivative of a Chinese antileukemia medicine, inhibits P-TEFb function and HIV-1 replication. *AIDS*, **19**(18), 2087-2095, (2005).
32. Lee MJ, Kim MY, Mo JS, Ann EJ, Seo MS, Hong JA, Kim YC, Park HS., Indirubin-3'-monoxime, a derivative of a Chinese anti-leukemia medicine, inhibits Notch1 signaling. *Cancer Lett.*, **265**(2), 215-225, (2008).
33. Zhen Y, Sørensen V, Jin Y, Suo Z, Wiedłocha A., Indirubin-3'-monoxime inhibits autophosphorylation of FGFR1 and stimulates ERK1/2 activity via p38 MAPK. *Oncogene*, **26**(44), 6372-6385, (2007).
34. Zhang N, Jiang Y, Zou J, Zhang B, Jin H, Wang Y, Yu Q., 3D QSAR for GSK-3 beta inhibition by indirubin analogues. *Eur. J. Med. Chem.*, **41**(3), 373-378, (2006).
35. MacCallum DE, Melville J, Frame S, Watt K., Seliciclib (CYC202, R-Roscovitin) induces cell death in multiple myeloma cells by inhibition of RNA polymerase II-dependent transcription and down-regulation of Mcl-1. *Cancer Res.*, **65**(12), 5399-5407, (2005).
36. Krystof V, Cankar P, Frysová I, Slouka J, Kontopidis G, Dzubák P, Hajdúch M, Srovnal J, de Azevedo WF Jr, Orság M, Papskářová M, Rolcík J, Látr A, Fischer PM, Strnad M., 4-aryloxy-3,5-diamino-1H-pyrazole CDK inhibitors: SAR study, crystal structure in complex with CDK2, selectivity, and cellular effects. *J. Med. Chem.*, **49**(22), 6500-6509, (2006).
37. Biglione S, Byers SA, Price JP, Nguyen VT, Bensaude O, Price DH, Maury W., Inhibition of HIV-1 replication by P-TEFb inhibitors DRB, seliciclib and flavopiridol correlates with release of free P-TEFb from the large, inactive form of the complex. *Retrovirology*, **4**, 47, (2007).
38. Barsanti P, Hu C, Jin J, Keyes R, Kucejko R, Lin X, Pan Y, Pfister KB, Sendzik M, Suton J, Wan L., Pyridine and pyrazine derivatives as potent kinase modulators. PCT Int. Appl. WO2011/012661, **2011**, *Chem. Abstr.* **2011**, 154, 234744.

39. Liu X, Lam F, Shi S, Fischer PM, Wang S., In vitro antitumor mechanism of a novel cyclin-dependent kinase inhibitor CDKI-83. *Invest. New Drugs.*, 2011 Feb 18. [Epub ahead of print].
40. Norman MH, Zhu J, Fotsch C, Bo Y, Chen N, Chakrabarti P, Doherty EM, Gavva NR, Nishimura N, Nixey T, Ognyanov VI, Rzasa RM, Stec M, Surapaneni S, Tamir R, Viswanadhan VN, Treanor JJ., Novel vanilloid receptor-1 antagonists: 1. Conformationally restricted analogues of trans-cinnamides. *J. Med. Chem.*, **50**(15), 3497-3514, (2007).
41. Gardiner EM, Duron SG, Massari ME, Severance DL, Semple JE., Cellular cholesterol absorption modifiers. PCT Int. Appl. WO 2007008541, **2007**, *Chem. Abstr.* **2007**, 146, 156236.
42. Wright SW, Ammirati MJ, Andrews KM, Brodeur AM, Danley DE, Doran SD, Lillquist JS, Liu S, McClure LD, McPherson RK, Olson TV, Orena SJ, Parker JC, Roche BN, Soeller WC, Soglia CB, Treadway JL, Vanvolkenburg MA, Zhao Z, Cox ED., (3R,4S)-4-(2,4,5-Trifluorophenyl)-pyrrolidin-3-ylamine inhibitors of dipeptidyl peptidase IV: synthesis, in vitro, in vivo, and X-ray crystallographic characterization. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**(20), 5638-5642, (2007).
43. Bornmann W, Maxwell D, Peng Z, Guo L., Compositions and methods for inhibition of tyrosine kinases. PCT Int. Appl. WO2008030795, **2008**, *Chem. Abstr.* **2008**, 148, 355823.
44. Birault V, Woodland CA., Pyrimidin-4-yl-1H-indazol-5-yl-amines as CHK1 Kinases Inhibitors. PCT Int. Appl. WO2005103036, **2005**, *Chem. Abstr.* **2005**, 143,10834.
45. Klebl BM, Choidas A., CDK9/cyclin T1: a host cell target for antiretroviral therapy. *Future Virology*, **1**(3), 317-330, (2006).
46. a) Choidas, A.; Backes, A.; Cotten, M.; Engkvist, O.; Felber, B.; Freisleben, A.; Gold, K.; Greff, Z.; Habenberger, P.; Hafenbradl, D.; Hartung, C.; Herget, T.; Hoppe, E.; Klebl, B.; Missio, A.; Müller, G.; Schwab, W.; Zech, B.; Bravo, J.; Harris, J.; Le, J.; Macritchie, J., Pharmaceutically active 4,6-disubstituted aminopyrimidine derivatives as modulators of protein kinases. PCT Int. Appl. WO 2005026129, **2005**; *Chem. Abstr.* **2005**, 142, 336376.
- b) Wabnitz, P.; Schanerte, H.; Stumm, G.; Freitag, J., Pyrimidine-based CDK inhibitors for treating pain. PCT Int. Appl. WO 2006/125616, **2006**; *Chem. Abstr.* **2007**, 146, 781.
47. Hartung CG, Backes AC, Felber B, Missio A, Philipp A., Efficient microwave-assisted synthesis of highly functionalized pyrimidine derivatives. *Tetrahedron*, **62**(43), 10055-10064, (2006).
48. The Berkeley Laboratory Isotopes Project". http://ie.lbl.gov/education/parent/P_iso.htm hozzáférés: 2010.12.26.
49. Weeks, M. E., Discovery of the Elements, Journal of Chemical Education Publ., Easton, Pa., 1956; Phosphorous, pp. 109-139.
50. Greenwood, N. N. és Ernshaw, A., A foszfor, 647-748. oldal; Az elemek kémiája, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, 2004. Az eredeti mű: Chemistry of the Elements

2ed. By N.N. Greenwood and A. Earnshaw, Butterworth-Heinemann, Elsevier Science Ltd., 1997

51. Humán farmakológia – A racionális gyógyszerterápia alapjai. Szerk.: Vizi E. Szilveszter; Medicina, Budapest, 1997.

52. Molina JM., Efficacy and safety of once-daily regimens in the treatment of HIV infection. *Drugs*, **68**(5), 567-578, (2008).

53. Navari RM., Fosaprepitant: a neurokinin-1 receptor antagonist for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Expert. Rev. Anticancer Ther.*, **8**(11), 1733-1742, (2008).

54. Welliver M, Rugari SM., New drug, fospropofol disodium: a propofol prodrug. *AANA J.*, **77**(4), 301-308, (2009).

55. Sellers EM, Lang-Sellers M, Koch-Weser J., Comparative metabolism of chloral hydrate and triclofos. *J. Clin. Pharmacol.*, **18**(10), 457-461, (1978).

56. De Clercq E., Antivirals and antiviral strategies. *Nat. Rev. Microbiol.*, **2**(9), 704-720, (2004).

57. Fung HB, Stone EA, Piacenti FJ., Tenofovir Disoproxil Fumarate: A Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitor for the Treatment of HIV Infection. *Clin. Ther.*, **24**(10), 1515-1548, (2002).

58. Sun M, Iqbal J, Singh S, Sun L, Zaidi M., The crossover of bisphosphonates to cancer therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1211**, 107-112, (2010).

59. Bahjat FR, Pine PR, Reitsma A, Cassafer G, Baluom M, Grillo S, Chang B, Zhao FF, Payan DG, Grossbard EB, Daikh DI., An orally bioavailable spleen tyrosine kinase inhibitor delays disease progression and prolongs survival in murine lupus. *Arthritis Rheum.*, **58**(5), 1433-1444, (2008).

60. <http://www.astrazeneca.com/Research/Our-pipeline-summary> hozzáférés: 2011.01.22.

61. a) O'Hare T; Pollock R, Stoffregen EP, Keats JA, Abdullah OM, Moseson EM, Rivera VM, Tang H, Metcalf CA 3rd, Bohacek RS, Wang Y, Sundaramoorthi R, Shakespeare WC, Dalgarno D, Clackson T, Sawyer TK, Deininger MW, Druker BJ., Inhibition of wild-type and mutant Bcr-Abl by AP23464, a potent ATP-based oncogenic protein kinase inhibitor: implications for CML. *Blood*, **104**(8), 2532-2539, (2004).

b) Corbin AS, Demehri S, Griswold IJ, Wang Y, Metcalf CA 3rd, Sundaramoorthi R, Shakespeare WC, Snodgrass J, Wardwell S, Dalgarno D, Iulucci J, Sawyer TK, Heinrich MC, Druker BJ, Deininger MW., In vitro and in vivo activity of ATP-based kinase inhibitors AP23464 and AP23848 against activation-loop mutants of Kit. *Blood*, **106**(1), 227-234, (2005).

c) Azam M, Nardi V, Shakespeare WC, Metcalf CA 3rd, Bohacek RS, Wang Y, Sundaramoorthi R, Sliz P, Veach DR, Bornmann WG, Clarkson B, Dalgarno DC, Sawyer TK, Daley GQ., Activity of dual SRC-ABL inhibitors highlights the role of BCR/ABL kinase dynamics in drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **103**(24), 9244-9249, (2006).

-
62. Huang WS, Metcalf CA, Sundaramoorthi R, Wang Y, Zou D, Thomas RM, Zhu X, Cai L, Wen D, Liu S, Romero J, Qi J, Chen I, Banda G, Lentini SP, Das S, Xu Q, Keats J, Wang F, Wardwell S, Ning Y, Snodgrass JT, Broudy MI, Russian K, Zhou T, Commodore L, Narasimhan NI, Mohemmad QK, Iuliucci J, Rivera VM, Dalgarno DC, Sawyer TK, Clackson T, Shakespeare WC., Discovery of 3-[2-(imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)ethynyl]-4-methyl-N-{4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]-3-(trifluoromethyl)phenyl}benzamide (AP24534), a potent, orally active pan-inhibitor of breakpoint cluster region-abelson (BCR-ABL) kinase including the T315I gatekeeper mutant. *J. Med. Chem.*, **53**(12), 4701-4719, (2010).
63. <http://www.ariad.com/wt/tertiarypage/AP24534> hozzáférés: 2011.01.24.
64. Keenan TP, Shakespear WC., Heterocycles and uses thereof. PCT Int. Appl. WO 2004058267, **2004**; *Chem. Abstr.* **2004**, 141,123644.
65. Schlimme E, Lamprecht W, Eckstein F, Goody RS., Thiophosphate-analogues and 1-N-oxides of ATP and ADP in mitochondrial translocation and phosphoryl-transfer reactions. *Eur J Biochem.*, **40**(2):485-491, (1973).
66. Hillman JML, Roberts SM., Preparation of carbocyclic, phosphonate analogues of cyclic adenosine monophosphate (cAMP). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **24**, 3601-3608, (1997).
67. Wardle, N.J.; Bligh, S.W.A.; Hudson, H.R., Organophosphorus Compounds: Intervention in Mechanisms of Signal Transduction Relevant to Proliferative, Immunological and Circulatory Disorders. *Curr. Med. Chem.*, **15**(22), 2230-2257, (2008).
68. Wolfenden R., Transition state analogues for enzyme catalysis. *Nature*, **223**(5207), 704-705, (1969).
69. Bartlett PA, Marlowe CK., Phosphoramidates as transition-state analogue inhibitors of thermolysin. *Biochemistry*, **22**(20), 4618-4624, (1983).
70. Moree WJ, van der Marel GA, Liskamp RMJ., Peptides containing a sulfinamide or a sulfonamide moiety: new transition-state analogues. *Tetrahedron Lett.*, **32**(3), 409-412, (1991).
71. Moree WJ, van der Marel GA, van Boom JH, Liskamp RMJ., Peptides containing the novel methylphosphinamide transition-state isostere. *Tetrahedron*, **49**(47), 11055-11064, (1993).
72. Cama E, Shin H, Christianson DW., Design of amino acid sulfonamides as transition-state analogue inhibitors of arginase. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**(43), 13052-13057, (2003).
73. Grembecka J, Mucha A, Cierpicki T, Kafarski P., The most potent organophosphorus inhibitors of leucine aminopeptidase. Structure-based design, chemistry, and activity. *J. Med. Chem.*, **46**(13), 2641-2655, (2003).
74. Yang KW, Brandt JJ, Chatwood LL, Crowder MW., Phosphoramidate and phosphothioate dipeptides as potential inhibitors of VanX. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**(10), 1085-1087, (2000).

-
75. Kinder DH, Frank SK, Ames MM., Analogs of carbamyl aspartate as inhibitors of dihydroorotase: preparation of boronic acid transition-state analogs and a zinc chelator carbamylhomocysteine. *J. Med. Chem.*, **33**(2), 819-823, (1990).
76. Harger MJP, Westlake S., Photolysis of some unsymmetrical phosphinic azides in methanol: Relative migratory aptitudes of alkyl groups and phenyl in the curtius-like rearrangement. *Tetrahedron*, **38**(20), 3073-3078, (1982).
77. a) Atherton FR, Openshaw HT, Todd AR., Studies on phosphorylation. Part II. The reaction of dialkyl phosphites with polyhalogen compounds in presence of bases. A new method for the phosphorylation of amines. *J. Chem. Soc.*, 660-663, (1945).
- b) Atherton FR, Todd AR., Studies on phosphorylation. Part III. Further observations on the reaction of phosphites with polyhalogen compounds in presence of bases and its application to the phosphorylation of alcohols. *J. Chem. Soc.*, 674-678, (1947).
78. Wilkening I, Signore G, Hackenberg CPR., Synthesis of phosphoramidate peptides by Staudinger reactions of silylated phosphinic acids and esters. *Chem. Commun.*, **47**(1), 349-351, (2011).
79. Wang G, Shen R, Xu Q, Goto M, Zhao Y, Han LB., Stereospecific Coupling of H-Phosphinates and Secondary Phosphine Oxides with Amines and Alcohols: A General Method for the Preparation of Optically Active Organophosphorus Acid Derivatives. *J. Org. Chem.*, **75**(11), 3890-3892, (2010).
80. Lewis RE, Neverov AA, Brown RS., Mechanistic studies of La^{3+} and Zn^{2+} -catalyzed methanolysis of O-ethyl O-aryl methylphosphonate esters. An effective solvolytic method for the catalytic destruction of phosphonate CW simulants. *Org. Biomol. Chem.*, **3**(22), 4082-4088, (2005).
81. Pirat JL, Monbrun J, Virieux D, Volle JN, Tillard M, Cristau HJ., Diastereoselective addition of 2H-2-oxo-1,4,2-oxazaphosphinanes to aldehydes and imines. *J. Org. Chem.*, **70**(18), 7035-7041, (2005).
82. Takaki K, Itono Y, Nagafuji A, Naito Y, Shishido T, Takehira K, Makioka Y, Taniguchi Y, Fujiwara Y., Three-component coupling of acylphosphonates and two carbonyl compounds promoted by low-valent samariums: one-Pot synthesis of beta-hydroxyphosphonates. *J. Org. Chem.*, **65**(2), 475-481, (2000).
83. Walker CV, Caravatti G, Denholm AA, Egerton J, Faessler A, Furet P, García-Echeverría C, Gay B, Irving E, Jones K, Lambert A, Press NJ, Woods J., Structure-based design and synthesis of phosphinate isosteres of phosphotyrosine for incorporation in Grb2-SH2 domain inhibitors. Part 2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**(20), 2343-2346, (2000).
84. ACD/Name, version 9.07, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com, 2005.
85. Németh G, Varga Z, Greff Z, Kéri G, Orfi L., Eljárás 4-klór-6-(szubsztituált-fenil)-pirimidinek előállítására./Synthesis of 4-Chloro-6-(substituted-phenyl)-pyrimidines. *Acta Pharm. Hung.*, **80**(3), 101-108, (2010).

-
86. Petneházy I, Jászay ZM, Szabó A, Everaert K., Convenient One-Pot Synthesis of Phosphonites and H-Phosphinates. Convenient One-Pot Synthesis of Phosphonites and H-Phosphinates. *Synth. Comm.*, **33**(10), 1665-1674, (2003).
87. Jászay ZM, Németh G, Truong SP, Petneházy I, Grün A, Tóke L., Catalytic enantioselective Michael addition in the synthesis of α -aminophosphonates. *Tetrahedron: Asymmetry*, **16**(23), 3837-3840, (2005).
88. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **46**(1-3), 3-26, (2001).
89. Vriend G., WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.*, **8**(1), 52-56, (1990).
90. Arbuzov BA., Michaelis-Arbusow- und Perkow-Reaktionen. *Pure Appl. Chem.*, **9**(2), 307-336, (1964).
91. a) Pudovik AN, Arbuzov BA., Dokl. Akad. Nauk SSSR., **73**, 327, (1950).
b) Pudovik AN, Arbuzov BA., Zh. Obshch. Khim., **21**, 382, (1951).
92. Szymańska A, Szymczak M, Boryski J, Stawiński J, Kraszewski A, Collu G, Sanna G, Giliberti G, Loddo R, La Colla P., Aryl nucleoside H-phosphonates. Part 15: Synthesis, properties and, anti-HIV activity of aryl nucleoside 5'-alpha-hydroxyphosphonates. *Bioorg. Med. Chem.*, **14**(6), 1924-1934, (2006).
93. Sprecher M, Kost D., The Schmidt Reaction of Dialkyl Acylphosphonates. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**(3), 1016-1026, (1994).
94. Griffiths DV, Jamali HAR, Tebby JC., Reaction of phosphites with acid chlorides; phosphite attack at the carbonyl oxygen of α -ketophosphonates. *Phosphorus and Sulfur*, **11**(1), 95-99, (1981).
95. Mancuso AJ, Huang SL, Swern D., Research Article Oxidation of long-chain and related alcohols to carbonyls by dimethyl sulfoxide "activated" by oxalyl chloride. *J. Org. Chem.*, **43**(10), 2480-2482, (1978).
96. Cristau HJ, Pirat JL, Virieux D, Monbrun J, Ciptadi C, Bekro YA., Synthesis, reactivity and stereochemistry of new phosphorus heterocycles with 5- or 6-membered rings. *J. Organomet. Chem.*, **690**(10), 2472-2481, (2005).
97. Pirat JL, Monbrun J, Virieux D, Cristau HJ., Pallado-catalysed P-arylations and P-vinylation of 2-hydrogeno-2-oxo-1,4,2-oxazaphosphinanes. *Tetrahedron*, **61**(9), 7029-7036, (2005).
98. <http://www.moleculardevices.com/Products/Assay-Kits/Enzymes/IMAP-Assays.html>, hozzáférés: 2012.01.23.
99. Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery; Robert A. Copeland; chapter 3: eversible Modes of Inhibitor Interactions with Enzymes; 48-81; Wiley 2005, ISBN: 0-471-68696-4.

-
100. Neumann L, Sommer m-N, Baumann M, Schinzel S, Flicke B, Felden B, Klebl B, Hafenbradl D., Kinase Inhibitor Profiling: Theory and Praxis of Measuring True Selectivity. Az Axxima Pharmaceuticals AG brossúrása.
101. Cheng Y, Prusoff WH., Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.*, **22**(23), 3099-3108, (1973).
102. Lebakken CS, Hee Chol Kang, Vogel KW., A fluorescence lifetime based binding assay to characterize kinase inhibitors. *J. Biomol. Screen*, **12**(6), 828-841, (2007).
103. Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G., Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Cancer.*, **19**(5), 621-626, (1977).
104. Gyuris A, Vajda G, Földes I, Establishment of an MT4 cell line persistently producing infective HIV-1 particles. *Acta Microbiol. Hung.*, **39**(3-4), 271-279, (1992).
105. Chen TR., Karyotypic derivation of H9 cell line expressing human immunodeficiency virus susceptibility. *J Natl. Cancer Inst.*, **84**(24), 1922-1996, (1992).
106. Gyuris Á, Szlávik L, Minárovits J, Vasas A, Molnár J, Hohmann J., Activities of extracts of *Euphorbia hirta* L. Against HIV-1, HIV-2 and SIVmac251. *In Vivo*, **23**(3), 429-432, (2009).
107. Teixeira C, Gomes JR, Gomes P, Maurel F, Barbault F., Viral surface glycoproteins, gp120 and gp41, as potential drug targets against HIV-1: brief overview one quarter of a century past the approval of zidovudine, the first anti-retroviral drug. *Eur. J. Med. Chem.*, **46**(4), 979-992, (2011).
108. Novitsky V, Cao H, Rybak N, Gilbert P, McLane MF, Gaolekwe S, Peter T, Thior I, Ndung'u T, Marlink R, Lee TH, Essex M., Magnitude and frequency of cytotoxic T-lymphocyte responses: Identification of immunodominant regions of human immunodeficiency virus type 1 subtype C. *J. Virology*, **76**(20), 10155-10168, (2002).
109. Greff Z, Varga Z, Kéri G, Németh G, Órfi L, Szántai Kis C., 4-Phenylamino-pyrimidine derivatives having protein kinase inhibitor activity. PCT Int. Appl. WO 2011/077171, **2011**; *Chem. Abstr.* **2011**, 155,152538

12. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációt megalapozó publikációk:

Idegennyelvű folyóirat cikk:

Gábor Németh, Zoltán Varga, Zoltán Greff, Gyula Bencze, Anna Sipos, Csaba Szántai-Kis, Ferenc Baska, Ágnes Gyuris, Katalin Kelemenics, Zsuzsa Szathmáry, János Minárovits, György Kéri, László Órfi; Selective and novel CDK9 inhibitors for the treatment of HIV infection. *Current Medicinal Chemistry*, **18**(3), 342-358, (2011). IF.: 4,63 (2010)

Zsuzsa M. Jászay, Gábor Németh, Truong Son Pham, Imre Petneházy, Alajos Grün and László Tőke; Catalytic enantioselective Michael addition in the synthesis of α -aminophosphonates. *Tetrahedron: Asymmetry*, **16**(23), 3837-3840, (2005). IF.: 2.429

Magyar nyelvű cikk:

Németh Gábor, Varga Zoltán, Greff Zoltán, Kéri György, Órfi László; Eljárás 4-klór-6-(szubsztituált-fenil)-pirimidinek előállítására. *Acta Pharm. Hung.*, **80**(3), 101-108, (2010).

Egyéb publikációk:

Idegennyelvű folyóirat cikkek:

Ágnes Donkó; Anna Orient; Pál T. Szabó; Gábor Németh; Tibor Vántus; György Kéri; László Órfi; László Hunyady; László Buday; Miklós Geiszt; Detection of hydrogen peroxide by lactoperoxidase-mediated dityrosine formation. *Free Radical Research*, **43**(5), 440-445, (2009). IF.: 2,215

Bálint Hegymegi-Barakonyi, Rita Székely, Zoltán Varga, Róbert Kiss, Gábor Borbély, Gábor Németh, Péter Bánhegyi, János Pató, Zoltán Greff, Zoltán Horváth, György Mészáros, Jenő Marosfalvi, Dániel Erős, Csaba Szántai-Kis, Nóra Breza, S. Garavaglia, S. Perozzi, Menico Rizzi, Doris Hafenbradl, M. Ko, Y. Av-Gay, Bert M. Klebl, László Órfi and György Kéri; Signalling Inhibitors Against *Mycobacterium tuberculosis* – Early Days of a New Therapeutic Concept in Tuberculosis. *Current Medicinal Chemistry*, **15**(26), 2760-2770, (2008). IF.: 4.823

Rita Székely, Frigyes Wácsek, István Szabadkai, Gábor Németh, Bálint Hegymegi-Barakonyi, Dániel Erős, Bálint Szokol, János Pató, Doris Hafenbradl, Jacqueline Satchell, Brigitte Saint-Joanis, Stewart T. Cole, László Órfi, Bert M. Klebl and György Kéri; A novel drug discovery concept for tuberculosis: Inhibition of bacterial and host cell signalling. *Immunology Letters*, **116**(2), 225-231, (2008). IF.: 2.858

Szabadalom:

Greff Zoltán, Varga Zoltán, Kéri György, Németh Gábor, Órfi László, Szántai Kis Csaba; 4-Phenylamino-pyrimidine derivatives having protein kinase inhibitor activity. PCT Int. Appl. WO 2011/077171, **2011**; *Chem. Abstr.* **2011**, 155,152538.

Könyvfejezet:

Protein Kinases as Drug Targets; (ed.: Klebl B.; Gerhard M.; Michael H.); György Kéri, László Órfi, and Gábor Németh: chapter 4: Rational Drug Design of Kinase Inhibitors for Signal Transduction Therapy and chapter 5: Kinase Inhibitors in Signal Transduction Therapy; Wiley 2011, ISBN: 978-3-527-31790-5

13. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Órfi László témavezetőmnek, hogy lehetővé tette és segítette az elképzeléseim megvalósítását.

Köszönöm Dr. Kéri Györgynek a Kooperációs Kutatóközpont és a Vichem Kft vezetőjének, hogy stabil háttérrel biztosított a kutatáshoz.

Nagyon köszönöm Dr. Greff Zoltánnak azt a rengeteg, nélkülözhetetlen szakmai tanácsot, amik nagyban megkönnyítették az életemet. Külön köszönet illeti azért, hogy fáradtságos munkával betűről-betűre végigböngészte a dolgozatomat és ezzel hozzájárult a disszertáció szakmai színvonalának emeléséhez.

Köszönettel tartozom a Francia Köztársaság Kormányának, hogy nagylelkű ösztöndíjával biztosította 10 hónapos tanulmányutam anyagi fedezetét.

Köszönöm Dr. Jean-Luc Pirat-nak, Dr. Jean-Noël Volle-nak és Dr. David Virieux-nek, hogy a laborjukban tölthettem azt a 10 hónapot és szakmai tanácsaikkal nagyban hozzájárultak a dolgozat létrejöttéhez.

Hálás köszönet illeti Sebestyén Mónikát, aki diplomamunkája keretében biztosította számomra a 5.5 Foszfinát tartalmú inhibitorok előállítására (Ar-CH₂-P) és 5.6 Aril-foszfinát tartalmú inhibitorok előállítására (Ar-P) fejezetekben bemutatott vegyületek előállításához használt etil- és propil-foszfinitot és H-foszfinátokat. Valamint előállította a **94b** és **95b** intermediereket és a **104b** és **105b** végtermékeket. Köszönöm témavezetőinek Dr. Jászay Zsuzsának és Dr. Petneházy Imrének, hogy segítették munkáját és szakmai tanácsaikkal az én munkámat is támogatták.

Szeretném megköszönni Sipos Annának, hogy a biokémiai méréseket mindig gyorsan, precízen és jól végezte. Ezzel biztosítva a kiszámítható biológiai háttérrel, ami sokat segített a molekulák tervezésénél.

Köszönöm Bránné Németh Beának, Kurkó Ibolyának és Pénzes Kingának, hogy vegyületeimet megvizsgálták a sejtes mérésekben.

Nagyon köszönöm Dr. Béni Szabolcsnak, hogy mindig készségesen megmérte a ³¹P-NMR mintáimat.

Köszönöm Dr. Gyuris Ágnesnek és Kelemenics Katalinnak, hogy elvégezték a HIV szaporodás vizsgálatokat, és hogy lelkesedésükkel segítettek átlendülni egy holtponton. Köszönöm Dr. Szathmáry Zsuzsának, hogy mindezt lehetővé tette.

Köszönöm a Vichem Kft. összes munkatársának, hogy mindig segítettek, ha szükség volt rá. Kiemelve azokat, akikkel naponta együtt dolgozhattam: Farkasné Ézsiás Edit, Miklós Magdolna (Babi), Varga Zoltán és dr. Wáczeck Frigyes. Továbbá köszönöm Dr. Szántai-Kis Csabának, hogy mindig nyitott volt a kinázokkal és egyéb biológiai vizsgálatokkal kapcsolatos eszmefuttatásokra.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm feleségemnek, családomnak és a barátaimnak, hogy a hosszú évek során végig támogattak és bíztattak.