

Foszfor tartalmú CDK9 kinázgátló vegyületek előállítása

Doktori tézisek

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. Bevezetés, irodalmi áttekintés

Doktori munkám fő célkitűzése új típusú, hatékony CDK9 kináz gátló vegyületek, mint potenciális AIDS ellenes hatóanyagok, előállítása volt. 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 Supérieur 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.

1.1. 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. A CDK-k releváns célpontjai a gyógyszerkutatásnak, mivel fontos szerepet játszanak különböző proliferatív (pl.: tumoros) és gyulladásos megbetegedésekben. Sokfajta CDK létezik, melyek 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.

Az eddigi ismeretek alapján négy fő területen lehet a CDK9 alkalmas terápiás célpont. Az első és talán legfontosabb a HIV-1 fertőzés és ezen keresztül az AIDS betegség. A második a kóros szívnagyobbodás (cardiac hypertrophy). A CDK9 és ciklin partnerei bizonyos anti-apoptotikus jelútvonalakat aktiválnak tumoros sejtekben, így a CDK9 gátlásával a tumoros sejtek elpusztíthatóak. Végül, a CDK9 bizonyos gyulladásos betegségekben is szerepet játszik.

A CDK9 enzim egy dimert alkot ciklin partnereinek (ciklin (Cyc) T1, T2a és b, K) egyikével. A CDK9/CycT komplexek kb. 80 %-ában a CycT1 található, a HIV-1 fertőzés esetén is ez a fajta komplex kerül reflektorfénybe. A CDK9/CycT1 legfontosabb feladata az RNS polimeráz II nagyobbik alegységének foszforilációja a C-terminálison, a foszforiláció következtében az RNS polimeráz II megkezd a virális genom átírását.

1.2. A HIV vírus és az AIDS

A HIV fertőzés során a T-sejtek aktiválódása után a CDK9/CycT1 képes foszforilálni az RNS polimeráz II C-terminálisát, így a polimeráz képes lesz a virális mRNS elkészítésére.

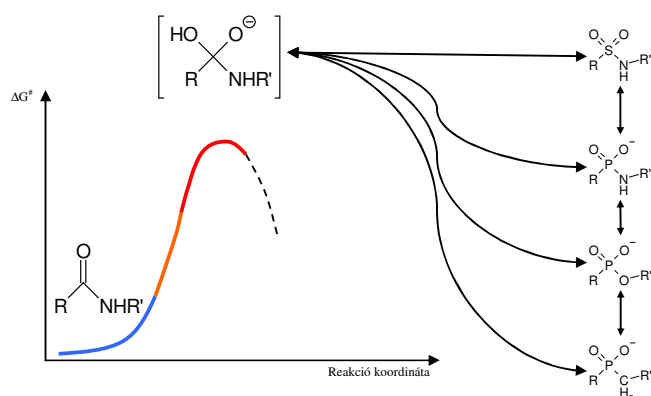
A Tat virális fehérje kivételével a résztvevő proteinek a gazdasejtben egyébként is meglévő sejtalkotók. A vírus saját céljaira felhasználja a gazdasejt jelátviteli útvonalaival (*hostcell signalling*). Munkám egyik alapfeltevése erre alapulóan az volt, hogy a CDK9 kináz gátlásával a HIV vírus szaporodása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

1.3. (6-Fenil-pirimidin-4-il)-fenilamin alapvázra épülő CDK9 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. Az általam előállított vegyületek, az irodalomból ismert (6-fenil-pirimidin-4-il)-fenilamin alapvázú, CDK9 gátlóként bemutatott vegyületek továbbfejlesztett változatai. Az ismert példák csupán néhány alapvető változtatásra terjednek ki, mind a 6-fenil, mind a fenilamin gyűrűn. A közzétett biológiai eredmények alapján az eddig ismert vegyületekkel összehasonlítva sokkal nagyobb CDK9 szelektivitást mutattak. Mindemellett úgy gondoltuk, hogy még számos szubsztitúciós lehetőség maradt az ismert vegyületek körén kívül, így ezekre a molekulákra koncentráltam a doktori munkám során.

1.4. Az átmeneti állapot analógia és alkalmazása

Az átmeneti állapot analógia elmélete és gyakorlati megvalósítása sok évtizedre nyúlik vissza. A munkám szempontjából legfontosabb típus, a peptid-kötés hidrolízisekor fellépő átmeneti állapottal analóg szerkezetek. A peptid-kötés hidrolízisekor a karbonil 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. A foszfonamidátok ilyenét alkalmazását már közel harminc éve megvalósították.



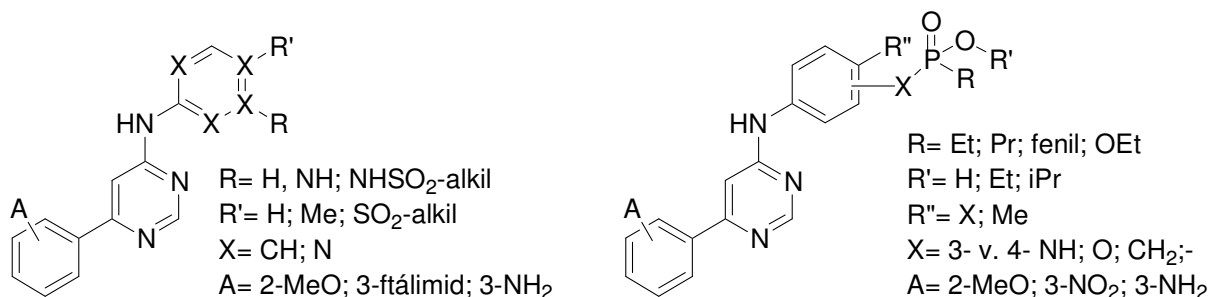
Egy tíz évvel későbbi tanulmányban W. E. Moree megmutatta, hogy az elektron eloszlások alapján a foszfonamidát az, amely a legjobban hasonlít a peptid-kötés átmeneti állapotára. Továbbá javaslatot tett a szulfonamidok átmeneti állapot analójként való alkalmazására. Pár évvel később kiterjesztették ezt az elméletet úgy, hogy a tetravalens

átmeneti állapottal a foszfonamidátokon és a szulfonamidokon kívül, a foszfonátok és a foszfinátok is izosztérek, így szükségképpen ezek a csoportok egymással is izosztér viszonyban állnak.

2. Célkitűzések

Doktorranduszi munkám új típusú, hatékony CDK9 kináz gátló vegyületek, mint potenciális AIDS ellenes hatóanyagok előállítására irányult. A Semmelweis Egyetem KKK Racionális Hatóanyagfejlesztő Laboratórium munkájába bekapcsolódva egy olyan kémiai eljárás kidolgozása volt a feladatom, 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.

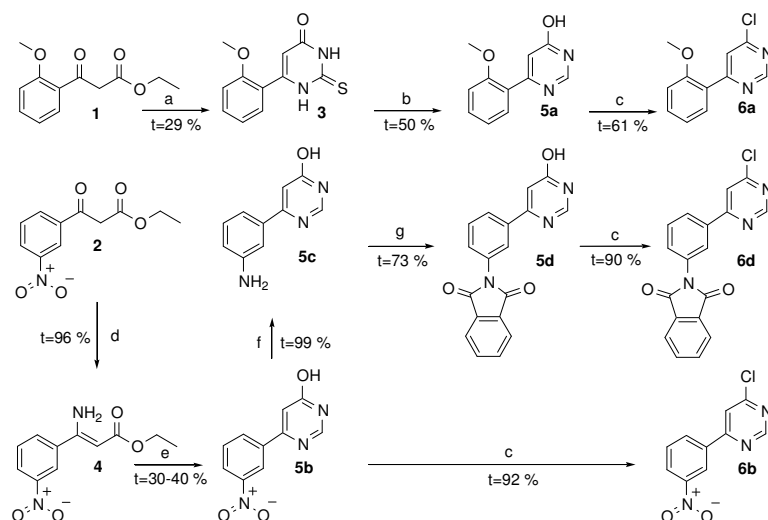
Munkám fő célkitűzése az volt, hogy az irodalomból már ismert, illetve általunk előállított szulfonamid tartalmú CDK9 gátló vegyületek alapján olyan új foszfortartalmú molekulákat állítsak elő, amelyek hasonló módon gátolják e kináz működését. Az átmeneti állapot analógia elmélete alapján a szulfonamidokkal 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 legyen 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 hatású vegyületeket sejt alapú HIV proliferációs vizsgálatokban is vizsgáltuk.



3. Eredmények és megbeszélés

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

Az irodalmi adatok alapján a 6-fenil gyűrű esetén csak két szubsztituensre szűkítettük a munkát és ezzel a két szubsztituenssel (2-metoxi és 3-nitro) dolgoztunk ki egy-egy, a Suzuki-reakciót elkerülő szintézist.



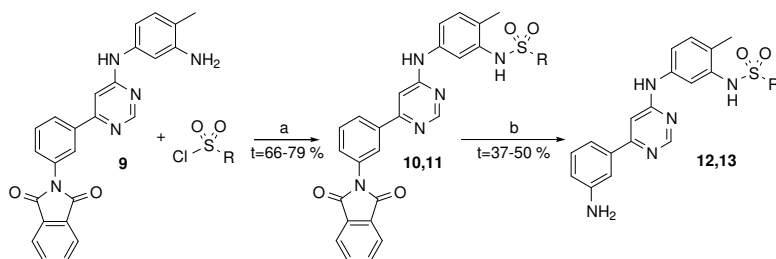
3-1. ábra. Két különböző pirimidin szintézis; a = tiokarbamid, EtOH; b = Raney-Nikkel, 2 M NaOH; c = SOCl₂ vagy POCl₃, DMAP, toluol; d = NH₄OAc, EtOH; e = formamidin acetát, formamid; f = H₂/Pd/C, MeOH; g = ftálsav anhidrid, pTsOH, DMF.

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 – a pirimidin két szubsztitúciója – kialakításának sorrendje meghatározott.

3.2. 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. A nitro funkciót redukálni kellett, hogy a megfelelő szulfonsav kloriddal való acilezés után kialakuljon a kívánt szulfonamid szerkezet (3-2. 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. Az anilin oldali nitro csoportot redukáltam, majd acileztem mezil ill. propilszulfonsav kloriddal.



3-2. ábra Szulfonamid származékok előállítására; 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.

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

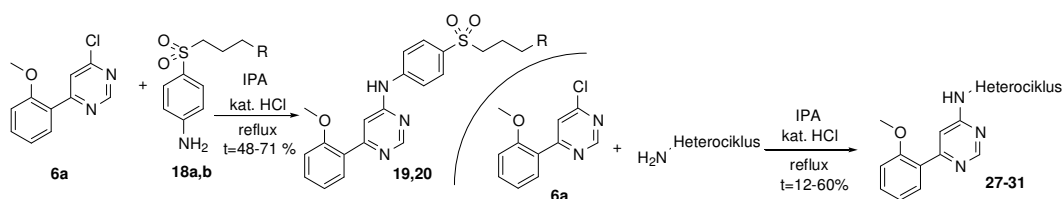
A szulfonil származékok esetén nem volt ilyen egyszerű a helyzet. Az anilint úgy kellett kialakítani, hogy a kapcsoláskor már rajta legyen a megfelelő szulfonil származék. Az előállított két anilint (**18a,b**) kapcsolam, ezúttal a 4-klór-6-(2-metoxifenil)-pirimidinhez **6a** (3-3. ábra). A két végterméket (**19, 20**) CDK9 enzimátikus esszében vizsgáltuk.

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 és a 2,4-diamino-[1,3,5]triazint kapcsolam a 4-klór-6-(2-metoxifenil)-pirimidinnel (**6a**). A piridinek és a

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-yl	355

pirimidin mind elérhetőek voltak a kereskedelemben, viszont a triazin ilyen formában nem, ez utóbbi a 2-klór-4,6-dinitro-[1,3,5]triazinból egy lépésben előállítható. A heterociklusos származékok CDK9 gátló hatása úgy tűnik függ a heteroatomok pozíciójától és számától.



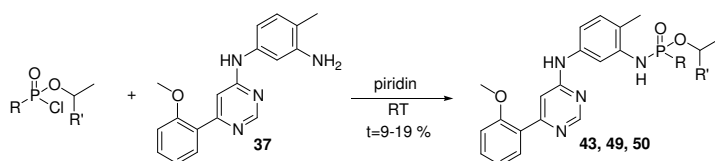
3-3. ábra Szulfonil és heterociklusos származékok előállítására, R= dimetilamin v. pirrolidin; Heterociklus= 2-, 3-, 4-amino-piridin; 2-amino-pirimidin; 2,4-diamino-[1,3,5]triazin.

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

A kén tartalmú inhibitorok szintézisekor gyakori probléma volt a kis mértékű vízoldhatóság. Ez elsősorban nem a kémiai szintéziseket, hanem a biológiai vizsgálatokat nehezítette. E problémát javítandó merült fel a különböző foszfortartalmú csoportok alkalmazása. Mint azt a 1.4 fejezetben már ismertettem, feltételezhető, hogy a foszfamidátok bioizosztériát mutatnak a szulfonamidokkal. 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 propil származékon kívül az etil és a fenil származékok előállítását is célul tűztem ki.

A foszfamidátoknál ugyanazt a stratégiát követtem, mint a szulfonamidoknál: előállítottam a teljes gyűrű-rendszert tartalmazó anilint, majd azt acileztem a megfelelő foszfonsav kloriddal. Ez utóbbiak előállítását két lépésben oldottam meg: először a szubsztituált foszfonsav észtereket állítottam elő az etil, ill., propil-bromidból és trietil- ill., triizopropil-foszfítból un. Arbuzov vagy Michaelis-Arbuzov reakció segítségével. A fenilfoszfonát kereskedelmi forgalomban van. Majd a savklorid előállításához kellett olyan eljárást találnom, amely lehetőleg specifikusan csak az egyik észtert alakítja kloriddá. Ezt sikerült is megvalósítani oxalil-kloriddal szobahőmérsékleten.

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 (3-4 ábra). Ez várható volt az irodalmi adatok alapján ti. a foszfamidát P-N kötése nagyon könnyen hidrolizál. Az előállított három vegyületet CDK9 gátló hatását megvizsgáltuk. Az eredmények azt mutatják, hogy az előállított foszfamidátok hatása lényegesen elmarad a szulfonamidokétól.



3-4. ábra A foszfamidátok előállítása.

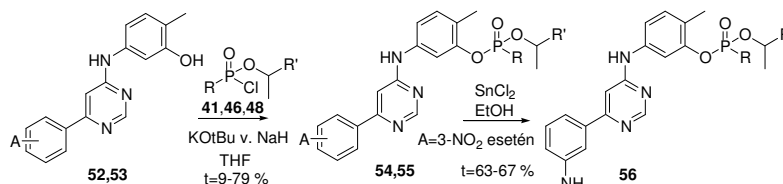
no	R	R'	CDK9/CycT1 IC ₅₀ (nM)
43	propil	Me	3 170
49	etil	H	1 450
50	fenil	H	5 240

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

A foszfónátok előállításának tervezésekor szerencsés helyzetben voltam, hiszen a reaktív 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 könnyen kapcsolható a klórpirimidinekkel, egységesen a kívánt termék (**52**, **53**) keletkezik.

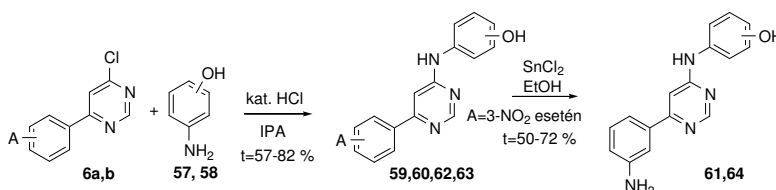
A Suzuki-oldalon 2-metoxi szubsztituenset tartalmazó fenol esetén az acilezést akár NaH, akár KOTBu segítségével el lehet végezni. A 3-nitro szubsztituens esetén csak a KOTBu vezetett eredményre (3-5. ábra).

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



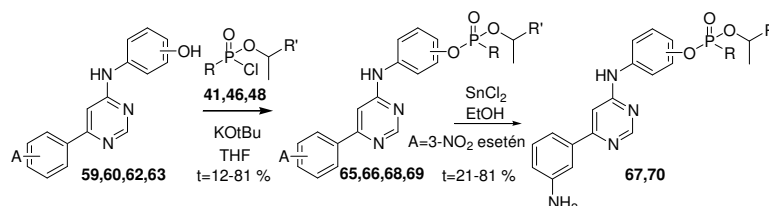
3-5. ábra A fenolok acilezése foszfonsav kloridokkal; R=etil (**a**), propil (**b**), fenil (**c**); A=2-metoxi (**52**, **54**), 3-nitro (**53**, **55**), 3-amino (**56**).

Tehát előállítottam az előző fejezetben tárgyalt foszfonamidátok foszfónát analógjait. Továbbá, mivel a reakciók kivitelezhetősége és a vegyületek preparálhatósága lényegesen jobb volt a foszfonamidátokhoz képest, úgy határoztam, hogy a foszfónátok közül megpróbálok több variációt is elkészíteni. A foszfónátokon nem változtattam, hanem a fenolos OH pozícióját variáltam (3-6. ábra).



3-6. ábra További fenolok előállítása: meta (**57**, **59**, **60**, **61**) és para (**58**, **62**, **63**, **64**) helyzetű fenolok; A=2-metoxi (**59**, **62**), 3-nitro (**60**, **63**), 3-amino (**61**, **64**).

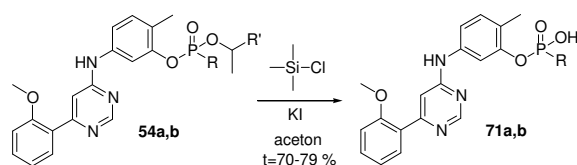
Az előállított fenolokat aztán a fent leírt módon acileztem a foszfonsav kloridokkal (3-7. ábra).



3-7. ábra A meta (**59**, **61**, **65**, **66**, **67**) és para (**62**, **64**, **68**, **69**, **79**) helyzetű foszfónátok előállítása; R=etil (**a**), propil (**b**), fenil (**c**); A=2-metoxi (**59**, **62**, **65**, **68**), 3-nitro (**66**, **69**), 3-amino (**67**, **70**).

no	A	R	R'	CDK9/CycT1 IC ₅₀ (nM)	no	A	R	R'	CDK9/CycT1 IC ₅₀ (nM)
59	2-MeO	-	-	224	62	2-MeO	-	-	70
61	3-NH ₂	-	-	877	64	3-NH ₂	-	-	651
65a	2-MeO	etil	H	400	68a	2-MeO	etil	H	360
65b	2-MeO	propil	Me	1 180	68b	2-MeO	propil	Me	407
65c	2-MeO	fenil	H	3 100	68c	2-MeO	fenil	H	2 840
66a	3-NO ₂	etil	H	>10 000	69a	3-NO ₂	etil	H	>10 000
66b	3-NO ₂	propil	Me	>10 000	69b	3-NO ₂	propil	Me	>10 000
66c	3-NO ₂	fenil	H	>10 000	70a	3-NH ₂	fenil	H	3 840
67a	3-NH ₂	etil	H	1 800	70b	3-NH ₂	etil	Me	6 060
67b	3-NH ₂	propil	Me	6 430					
67c	3-NH ₂	fenil	H	5 330					

Két vegyület esetén az alkil foszfonát észterek specifikus hidrolízisét is sikerült megvalósítani (3-8. ábra).



3-8. ábra Specifikus alkil észter hidrolízis.

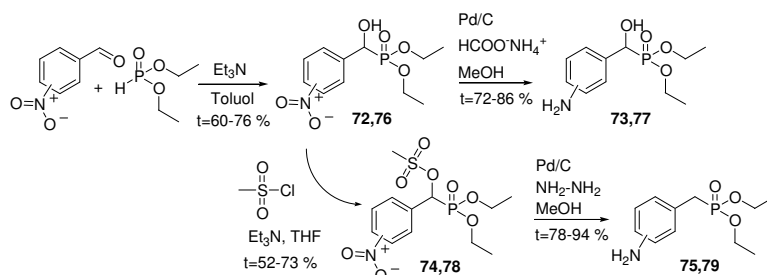
no	R	R'	CDK9/CycT1 IC ₅₀ (nM)
54a	etil	H	813
71a		-	1 490
54b	propil	Me	3 057
71b		-	1 457

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.

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

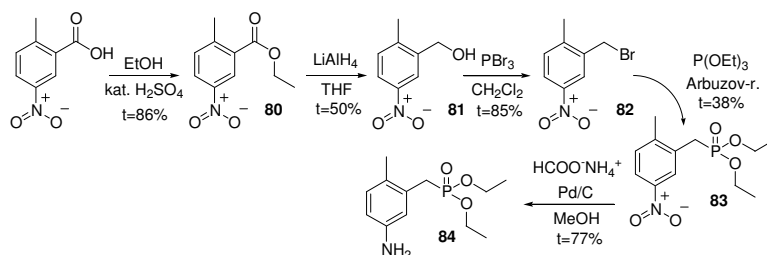
A foszfonamidátok és a foszfonátok mellett a harmadik izosztér csoport a foszfinátok. Előállításukhoz a legalkalmasabb reakciónak – első közelítésben – a Pudovik-reakció tűnt, mivel a megfelelő benzaldehydekek nagyrészt a kereskedelemben elérhetőek. Az eddig előállított foszfonamidátokkal és foszfonátokkal izosztér foszfinátok, a megfelelő nitro-benzaldehydekből és H-foszfinátokból előállítható. Mivel a H-foszfinátok előállítása nem egyszerű, először a dietil foszfittal végeztem el a reakciókat, kipróbálándó a Pudovik-reakció alkalmasságát. A 3-nitro-benzaldehydből, ill. a 4-nitro-benzaldehydből képeztem a Pudovik-

adduktot. A keletkező hidroxi csoportokat mezileztem, majd katalitikus hidrogénezéssel egyidejűleg a mezil-oxi csoport eliminálható valamint a nitro-csoport redukálható. Ha a hidroxi-csoport mezilezését elhagyjuk és a hidrogénezés során hidrogén forrásként ammónium formiátot használunk, akkor olyan anilint kapunk, melyen megmarad az α -hidroxi csoport (3-9. ábra).



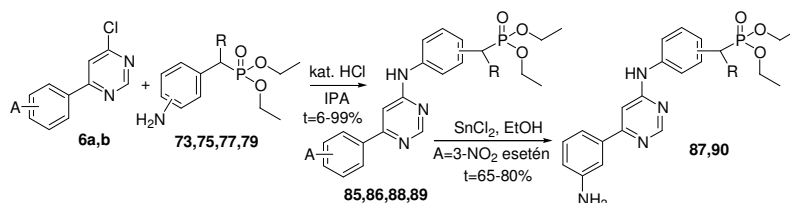
3-9. ábra Meta (72,73,74,75), ill. para (76,77,78,79) benzil-foszfónát anilinek előállítása.

A 4-es pozícióban metil szubsztituenst tartalmazó anilin előállítása a fenti módszerrel nem lehetséges az aldehid hiánya miatt. A problémát a 3-10. ábra látható szintézissel sikerült áthidalni.

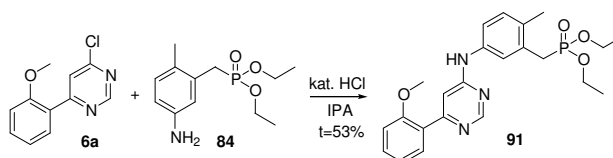


3-10. ábra A 4-metil szubsztituenst tartalmazó anilin előállítása.

Az előállított vegyületek (3-11. ábra és 3-12. ábra) CDK9 gátló hatását megvizsgáltuk és néhány vegyület esetén igen alacsony IC_{50} értékeket mértünk. Ahhoz képest, hogy ezek a vegyületek csak a reakciók kipróbálása céljából készültek, igen jó biológiai hatást mutattak.



3-11. ábra A meta (85, 86, 87) és para (88, 89, 90) helyzetű benzil-foszfínátok előállítása; R=H (a), OH (b); A=2-metoxi (85, 88), 3-nitro (86,89), 3-amino (87, 90).



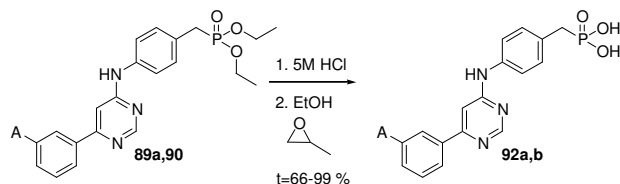
3-12. ábra A 4-metil szubsztituenst tartalmazó benzil-foszfónát előállítása.

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

Két vegyület esetében sikerült megvalósítani a foszfonát észterek hidrolízisét. Jelen esetben egyszerűbb dolgom volt, mint korábban, mivel a foszfonátok két azonos észter csoportját kellett egyszerre eltávolítanom. A hidrolízis 5 M-os vizes

sósavban való forralás során ment végbe. A végtermékkel söt képző sósav molekulák eltávolítását kémiai úton, propilén-oxiddal végeztem el (3-13.

ábra).



3-13. 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.

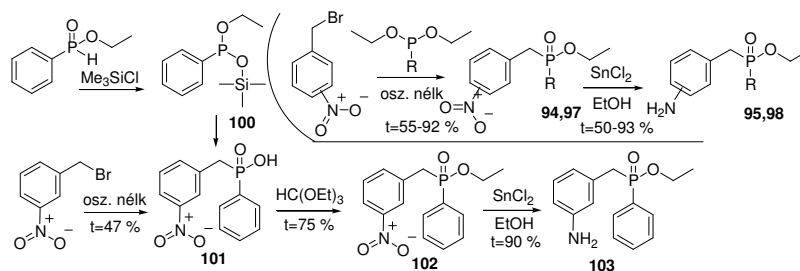
Az eddig bemutatott foszfonamidátokkal és foszfonátokkal megkezdett sorba valójában nem ezek a vegyületek illeszkednek, hanem ezek foszfinát származékai. A vegyületek előállításához – mint azt már e fejezet elején is említettem – H-foszfinátokra volt szükség (csak a fenil-foszfinát vásárolható meg, az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

E problémát úgy lehetett elkerülni, hogy a **91**-es vegyületnél alkalmazott módon (3-10. ábra) a nitro-benzil bromidot reagáltattam a H-foszfinátok előállítása során keletkező

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

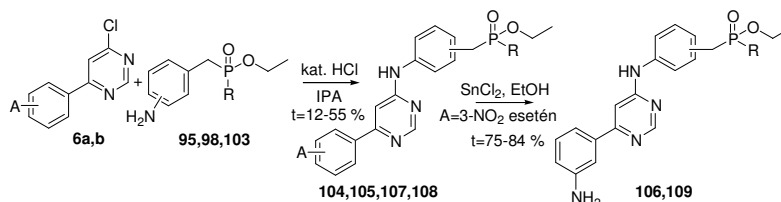
no	A	CDK9/CycT1 IC ₅₀ (nM)
89a	NO ₂	>14 000
92a		2 100
90	NH ₂	3 110
92b		1 130

foszfonitokkal Arbuzov reakcióban. A nitro csoport redukciója minden esetben ón(II) kloriddal történt (3-14. ábra).



3-14. ábra A meta (94,95,103) és para (97,98) benzil-foszfínát anilinek előállítása, R= etil (a), propil (b).

Az előállított anilineket az eddig is alkalmazott 4-klór-6-fenil-pirimidinekkel kapsoltam (3-15. ábra), majd az elkészült vegyületek CDK9 gátló hatását a szokott módon mértük.



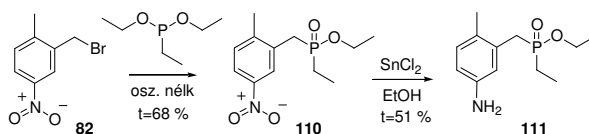
3-15. ábra A meta (104, 105, 106) és para (107, 108, 109) helyzetű benzil-foszfínátok előállítása; R=etil (a), propil (b), fenil (c); A=2-metoxi (104, 107), 3-nitro (105, 108), 3-amino (106, 109).

no	A	R	CDK9/CycT1 IC ₅₀ (nM)	no	A	R	CDK9/CycT1 IC ₅₀ (nM)
104a	2-MeO	etil	188	107a	2-MeO	etil	743
104b	2-MeO	propil	296	107b	2-MeO	propil	652
104c	2-MeO	fenil	517	108a	3-NO ₂	etil	7 774
105a	3-NO ₂	etil	6 432	108b	3-NO ₂	propil	5 525
105b	3-NO ₂	propil	8 056	109a	3-NH ₂	etil	7 533
105c	3-NO ₂	fenil	>12 500	109b	3-NH ₂	propil	7 474
106a	3-NH ₂	etil	327				
106b	3-NH ₂	propil	682				
106c	3-NH ₂	fenil	1 019				

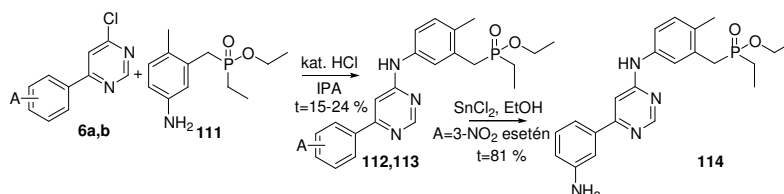
Az eredmények alapján a foszfor további szubsztitúciója – foszfonát helyett foszfínát – sokat javított a vegyületek hatásán. A 2-metoxi-fenil származékok közül az etil és a propil szubsztitúció gyakorlatilag nem befolyásolja a hatást, mindkét vegyület 300 nM alatti IC₅₀-nel rendelkezik. A fenil szubsztituens 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.

A kezdeti célkitűzés alapján olyan vegyületet kell előállítani, amelynek anilin oldalán meta pozícióban egy metilén-foszfínát, míg para helyzetben egy metil csoport található. Az anilin előállítása a 91-nél bemutatott módon, a 2-(brómmetil)-1-metil-4-nitrobenzol (82) és az

etil-foszfinit Arbuzov-reakciójával történt (3-16. ábra). Különbség csak a hosszabb reakcióidőben és a gyengébb kitermelésben volt (3-17. ábra).



3-16. ábra A 4-metil szubsztituenszt tartalmazó benzil-foszfinit anilin előállítás.



3-17. ábra A 4-metil szubsztituenszt tartalmazó benzil-foszfinit végtermékek előállítása; A=2-metoxi (112), 3-nitro (113).

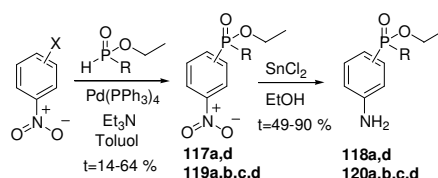
A nehéz preparálhatóság ellenére a vegyületek nagyon jó CDK9 inhibitorok. A 112 2-metoxi és a 114 3-amino származékok gyakorlatilag egyforma enzimgátlást mutattak, ami alig marad el a legjobb vegyületek hatásától.

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

3.6. Aril-foszfinit tartalmú inhibitorok előállítása (Ar-P)

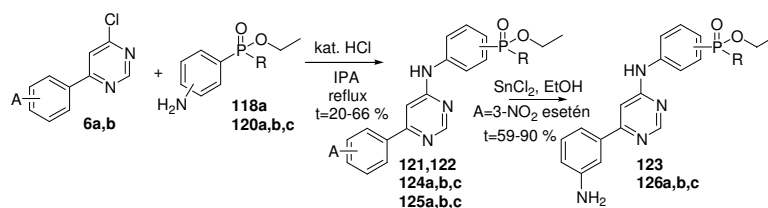
Felmerült az az ötlet, hogy a foszfinit illetve foszfinit csoportot közvetlenül az aromás gyűrűhöz kapcsoljam, elhagyván az NH, az O, ill. a metilén csoportokat. Az így kialakítandó molekulák csak korlátozott mértékben lesznek izosztér viszonyban a szulfonamidokkal, de a szerkezet-hatás összefüggések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

A vegyületek előállítása palládium katalizált nukleofil szubsztitúcióval történt. 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-foszfinitok voltak (3-18. ábra).



3-18. ábra A meta (117, 118) és para (119, 120) helyzetű fenilfoszfinitok és foszfinitok előállítása; R= etil (a), propil (b), fenil (c), etoxi (d).

A H-foszfinitokkal képzett vegyületekkel az eddigiekhez hasonlóan a foszfor szubsztituenseinek enzimgátlásra gyakorolt hatására voltam kíváncsi, míg a dietil foszfittal előállított vegyületekkel a szabad sav – észter közötti különbséget próbáltam feltérképezni.



3-19. ábra A meta (**118**, **121**, **122**, **123**) és para (**120**, **124**, **125**, **126**) helyzetű fenil foszfinátok előállítása; R=etil (a), propil (b), fenil (c); A=2-metoxi (**121**, **124**), 3-nitro (**122**, **125**), 3-amino (**123**, **126**).

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**).

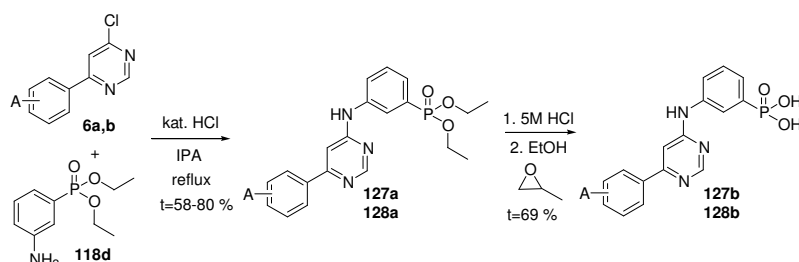
A dietil észter csoportokat az előző fejezetben leírtakkal azonos módon savas közegben hidrolizáltam el, így könnyen tudtam preparálni a szabad savat.

no.	A		CDK9/CycT1 IC ₅₀ (nM)
127a	2-MeO	észter	1 040
127b	2-MeO	sav	170
128a	3-NO ₂	észter	>10 000
128b	3-NO ₂	sav	4 100
129a	2-MeO	észter	1 020
129b	2-MeO	sav	580
130	3-NO ₂	észter	>10 000
131a	3-NH ₂	észter	>10 000
131b	3-NH ₂	sav	3 320

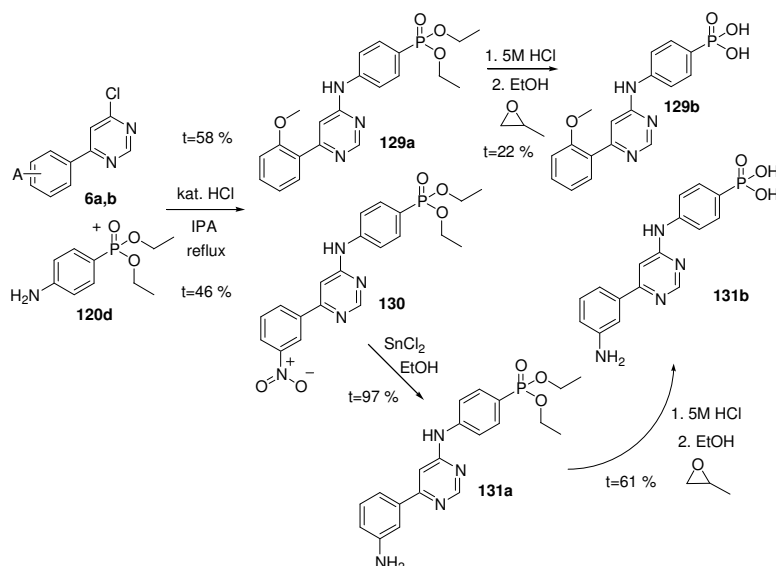
preparálni a szabad savat.

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 legszembeűnőbb (**128a,b**). Az eddig bemutatott vegyületek esetén a nitro csoportot tartalmazó molekulák 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.



3-20. ábra A meta helyzetű fenil foszfonátok előállítása és hidrolízise.



3-21. ábra A para helyzetű fenil foszfonátok előállítása és hidrolízise.

3.7. Egyéb biológiai vizsgálatok.

3.7.1. K_i meghatározás

Az eddig megmért IC_{50} értékek nem univerzális, minden kísérleti módszerben azonos számértékek, hanem csak az adott kísérleti rendszerben igazak. 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, értéke mindentől független, reális összehasonlítást tesz lehetővé két molekula hatását illetően. A pontos K_i számítást bonyolultsága miatt itt nem részletezem. Ugyanakkor az ATP kompetitív inhibitorokra igaz az az egyszerű szabály (Cheng-Prusoff egyenlet

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[ATP]}{K_m}}, \text{ hogy ha az } IC_{50} \text{ mérés}$$

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

során az ATP koncentrációja megegyezik a K_m -mel, akkor a vegyület K_i -je fele az IC_{50} -nek. A két módszerrel számított adatok jó egyezést mutatnak.

3.7.2. HIV szaporodás vizsgálat

A mérés tulajdonképpen egy túlélés vizsgálat 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 ezen vizsgálatok részletes tárgyalásától eltekintek.

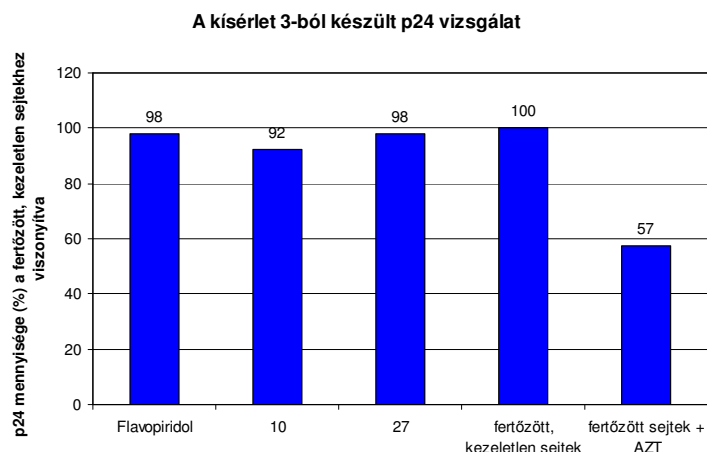
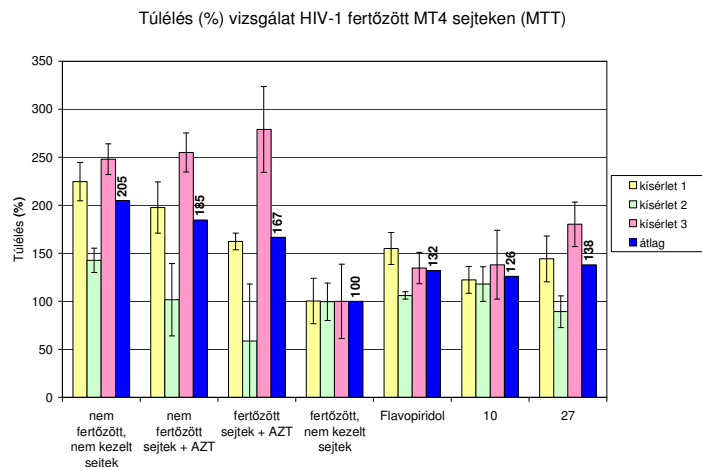
A két nem foszfor tartalmú vegyület esetén a sejteket 2,5 μM koncentrációjú vegyülettel kezeltük. Referenciaként flavopiridolt (0,25 μM -ban) és AZT-t (azidotimidin; 0,025 μM -ban) használtunk. Három ismétlés végeztünk, az ezekből számolt átlagok képezték az összehasonlítás alapját.

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 dönthető el, hogy a vírus szaporodását is gátoltuk-e vagy sem. 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. Mindkét vegyület és a flavopiridol is mindössze néhány százalékkal csökkentették a p24 fehérje mennyiségét. Feltételezésünk szerint ennek oka a meglehetősen magas vírus koncentráció volt. Ezt a hipotézis támasztja alá az AZT közepes hatása is.

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.



4. Következtetések

Doktori 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.

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.

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, melyeket csak rossz termeléssel sikerült előállítanom. Ezek biológiai hatása elmaradt a szulfonamidoknál mérttől. A szintetikus nehézségek és a nem túl biztató biológiai eredmények hatására figyelmemet 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 sejtotoxicitását, illetve a viabilitás mérésén alapuló indirekt vizsgálattal a 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 kémiaiag 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 μ M alatti IC_{50} -nel rendelkezik, ám összességében nem ez a vegyületcsalád bizonyult a legeredményesebb CDK9 gátlónak.

A fenil-foszfonátok előállításánál a céltom 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 szubsztituens 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. 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 foszfor tartalmú vegyületek tervezésénél célom volt, hogy olyan vegyületeket hozzak létre, amelyekben a foszfor tartalmú csoport hozzájárul a biológiai hatáshoz és nem csak a vízdoldhatóságot 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. Mivel a foszfortartalmú vegyületek kinázgátló hatása néhány kivételtől eltekintve gyengébb, mint a még foszfor nélküli intermediereké feltételezem, hogy a foszfor tartalmú csoport nem csak vízdoldhatóságot javító prodrugként funkcionál.

Másodszor, a foszfor tartalmú csoport kémiai stabilitásának vizsgálatával. A foszfonamidátok esetén könnyen elképzelhető, hogy az enzimatis 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 kináz gátlók hatástani és gyógyszereszerű 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.

5. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációt megalapozó publikációk: G Németh, Z Varga, Z Greff, G Bencze, A Sipos, C Szántai-Kis, F Baska, Á Gyuris, K Kelemenics, Z Szathmáry, J Minárovits, G Kéri, L Örfi; Selective and novel CDK9 inhibitors for the treatment of HIV infection. *Current Medicinal Chemistry*, **18**(3), 342-358, (2011).

Németh G, Varga Z, Greff Z, Kéri G, Örfi L; Eljárás 4-klór-6-(szubsztituált-fenil)-pirimidinek előállítására. *Acta Pharm. Hung.*, **80**(3),101-108, (2010).

ZM Jászay, G Németh, TS Pham, I Petneházy, A Grün, L Tőke; Catalytic enantioselective Michael addition in the synthesis of α -aminophosphonates. *Tetrahedron: Asymmetry*, **16**(23), 3837-3840, (2005).

Egyéb publikációk: Á Donkó; A Orient; PT Szabó; G Németh; T Vántus; G Kéri; L Órfi; L Hunyady; L Buday; M Geiszt; Detection of hydrogen peroxide by lactoperoxidase-mediated dityrosine formation. *Free Radical Research*, **43**(5), 440-445, (2009).

B Hegymegi-Barakonyi, R Székely, Z Varga, R Kiss, G Borbély, G Németh, P Bánhegyi, J Pató, Z Greff, Z Horváth, G Mészáros, J Marosfalvi, D Erős, C Szántai-Kis, N Breza, S Garavaglia, S Perozzi, M Rizzi, D Hafenbradl, M Ko, Y Av-Gay, BM Klebl, L Órfi, G Kéri; Signalling Inhibitors Against *Mycobacterium tuberculosis* – Early Days of a New Therapeutic Concept in Tuberculosis. *Current Medicinal Chemistry*, **15**(26), 2760-2770, (2008).

R Székely, F Wácsek, I Szabadkai, G Németh, B Hegymegi-Barakonyi, D Erős, B Szokol, J Pató, D Hafenbradl, J Satchell, B Saint-Joanis, ST Cole, L Órfi, BM Klebl, G Kéri; A novel drug discovery concept for tuberculosis: Inhibition of bacterial and host cell signalling. *Immunology Letters*, **116**(2), 225-231, (2008).

Szabadalom: 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.

Könyvfejezet: Protein Kinases as Drug Targets; (ed.: Klebl B.; Gerhard M.; Michael H.); G Kéri, L Órfi, G 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