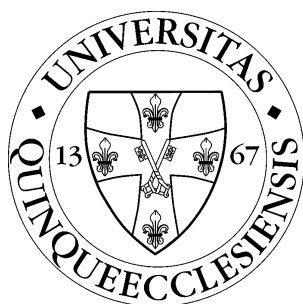


Nitroxidokkal és elővegyületeikkel módosított PARP inhibitorok szintézise és vizsgálata

Szuroczki Péter

Vegyész MSc

Pécsi Tudományegyetem Természettudományi Kar



Témavezetők:

Dr. Kálai Tamás egyetemi tanár

PTE-ÁOK Szerves és Gyógyszerkémiai Intézet

Kégl Tímea tudományos segédmunkatárs

PTE-TTK Kémia Intézet Szervetlen Kémia Tanszék

2014

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék	1
2. Fontosabb rövidítések jegyzéke	2
3. Bevezetés	3
4. Előzmények.....	4
4.1. A PARP enzimek működése és PARP gátlás.....	4
4.2. Nitroxid szabad gyökök, mint antioxidáns vegyületek	8
5. Célkitűzések.....	10
6. Saját eredmények.....	12
6.1. PARP gátlók szintézise 8-karbamoilkinolinból	12
6.2. 8-Karbamoilkinoxalin alapú PARP gátlók szintézise	15
6.3. Benzimidazol-4-szulfonamid váz szintézise	17
6.4 4-Kinazolinon vázas vegyületek szintézise	18
7. Biológiai vizsgálatok és dokkolás.....	19
7.1. A sejtbiológiai mérések elve	19
7.2. Dokkolás	20
7.3. Eredmények.....	21
8. Kísérleti rész	30
9. Összefoglalás.....	39
10. Irodalomjegyzék.....	42
11. Köszönetnyilvánítás	44

2. Fontosabb rövidítések jegyzéke

2-Py: 2-piridil-csoport

AcOH: ecetsav

ADP: adenzin-difoszfát

ATP: adenzin-trifoszfát

Bu: butil-csoport

DIPEA: diizopropil-etilamin

DMF: *N,N*-dimetilformamid

DMSO: dimetil-szulfid

DNS: dezoxi-ribonukleinsav

EtOAc: etil-acetát

IC₅₀: félhatásos gátló koncentráció

Me: metil-csoport

MNNG: 1-metil-2-nitro-1-nitrozóguanidin

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium-bromid

NAD⁺: nikotinsavamid-adenin-dinukleotid

NIS: *N*-jódszukcinimid

NMR: mágneses magrezonancia spektroszkópia

PARG: poli(ADP-ribóz)-glikohidroláz

PARP: poli(ADP-ribóz)-polimeráz

Ph: fenil-csoport

RNS: reaktív nitrogénszármazék

ROS: reaktív oxigénszármazék

TBAF: tetrabutyl-ammónium-fluorid

TEMPO: 1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-piperidin

TFAA: trifluorecetsav

Tmob: 1,3,5-trimetoxi-benzil csoport

3. Bevezetés

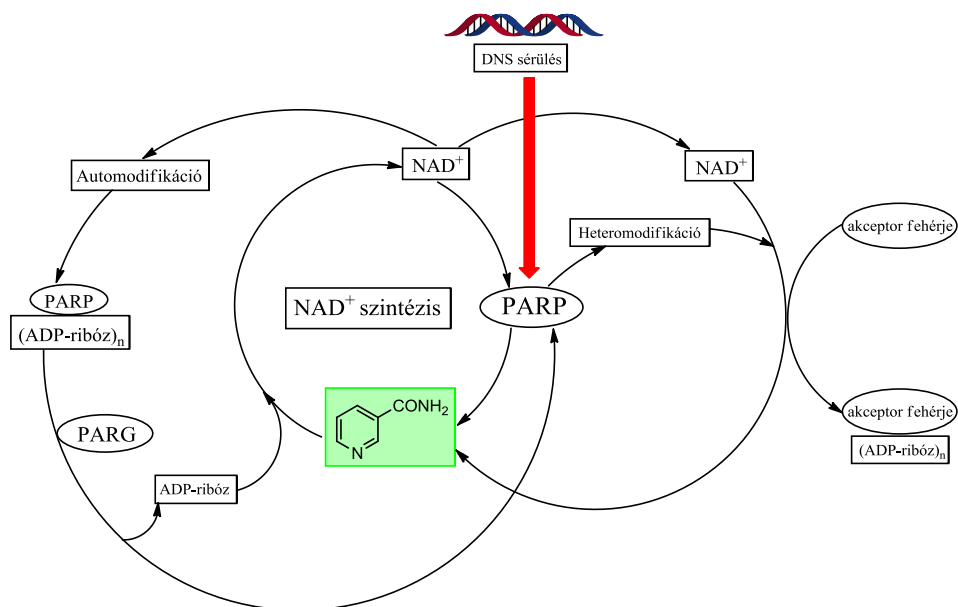
A Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Szerves és Gyógyszerkémiai Intézetében több mint ötven éve végeznek tudományos kutatómunkát a biológiailag aktív heterociklusos vegyületek területén. Az 1970-es évektől Dr. Hideg Kálmán és munkatársai Magyarországon elsőként kezdtek foglalkozni paramágneses öt és hattagú nitroxidok szintézisével. A stabilis nitroxid szabad gyököket először, mint spinjelzőket alkalmazták fehérjék biofizikai vizsgálataiban. Később számos új felhasználási területük vált ismertté. Használhatók antioxidánsként, szerves kémiai reakciókban prooxidánsként, továbbá alkalmasak ferromágneses sajátsággal bíró anyagok előállítására is. Alkalmazásuk analitikai vizsgálatokban is terjedőben van, mint spincsapda és redox indikátorok. Biológiailag aktív vegyületekbe építve őket, az eredeti terápiás hatás megtartása mellett azoknak antioxidáns tulajdonságot kölcsönöznek.

Az elmúlt években a Szerves és Gyógyszerkémiai Intézetben számos heterociklusokhoz kapcsolt, illetve kondenzált stabilis nitroxid szabad gyökös vegyületet szintetizáltak és vizsgáltak, kiemelt figyelmet fordítva a kardioprotektív vegyületekre. Ezen munkák eredményeként több közlemény, szakdolgozat és PhD értekezés készült. Diákkörösként munkám során új nitroxidokkal és szekunder-amin elővegyületeikkel módosított kinolin, kinoxalin, 4-kinazolinon és benzimidazol alapvázak, várhatóan PARP inhibitor hatással rendelkező bioaktív vegyületeket állítottam elő.

4. Előzmények

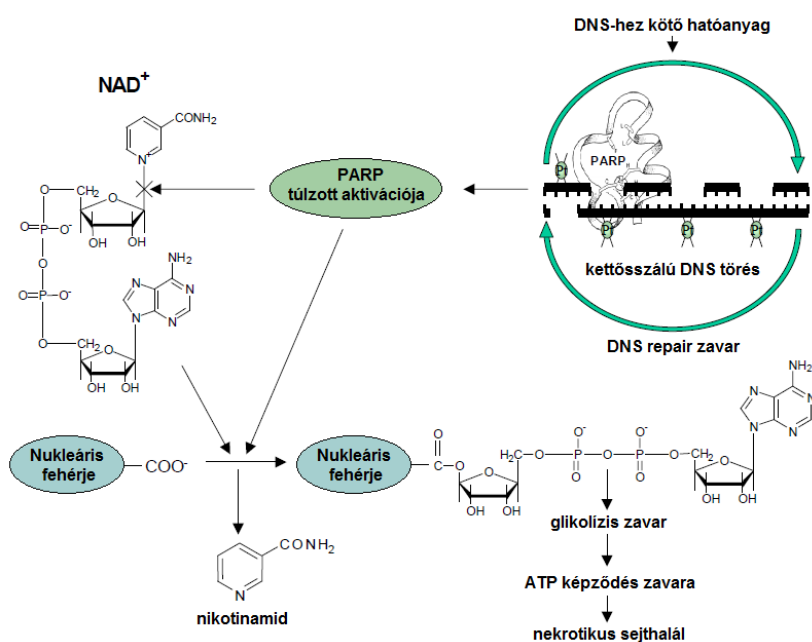
4.1. A PARP enzimek működése és PARP gátlás

A szabad gyökök, reaktív oxigén és nitrogén származékok (ROS, RNS), a különböző nagy energiájú sugárzások (UV, ionizáló sugárzások) és kemoterápiás szerek (ciszplatin, temozolomid) hatására az eukarióta sejtekben létrejövő DNS lánc törések javításában fontos szerepet tölt be a poli(ADP-ribóz)-polimeráz (PARP) enzimcsalád.¹ Ezen enzimek működésük közben, poli(ADP-ribóz) egységeket kapcsolnak a DNS-hez kötött fehérjékhez. Mára az enzimesoport tizenhét tagját sikerült azonosítani (többek között: PARP-1, PARP-2, Tankyrase-1, TiPARP és vPARP), mégis a legtöbb vizsgálatot a PARP-1-el és a PARP-2-vel végzik. A DNS lánc sérülése aktiválja az enzimet, amely első lépésben nikotinsavamid-adenin-dinukleotidot (NAD^+) hasít nikotinamidra és ADP-ribózra, majd a poli(ADP-ribóz) láncot kapcsol a DNS-hez kötődő fehérjék (kaspáz, hisztonok, topoizomerázok, DNS-polimerázok, PARP) aszpartát és glutamát oldalláncainak karboxil-csoportjaihoz (heteromodifikáció). A láncvégi ADP-ribóz egységek 2'-hidroxilcsoportjaihoz további poli(ADP-ribóz) egységek kapcsolódhatnak, így akár 200 monomerből álló polimer lánc is létrejöhet. Egy másik enzim, a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG) a polimerláncok folyamatos bontását végzi, így ellensúlyozva a PARP működését. A PARP enzim maga is tud poli(ADP-ribózilálódni) (automodifikáció). A folyamat eredményeként a PARP inaktívvá válik. Ha azonban a PARG nem talál elegendő bontható polimert, akkor a poli(ADP-ribózilált) PARP-ot hasítja el, így a PARP ismét aktiválódik. Ezen körfolyamat biztosítja fízíológíás körülmények között a biológiai rendszer egyensúlyát. (1. ábra)²



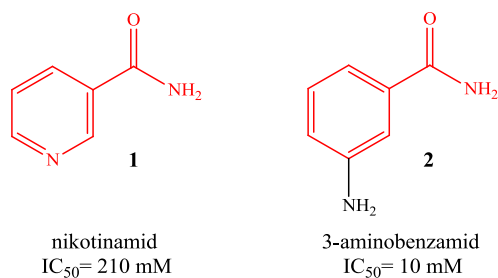
1. ábra: PARP-PARG rendszer működése

Nagyfokú DNS károsodás esetén a biológiai rendszer egyensúlya megbomlik. A PARP feléli a sejt NAD^+ és ATP készleteit, ennek következtében nekrotikus sejthalál áll be (2. ábra)². A nekrozis során a sejt membránrendszere károsodik, így a sejt tartalma a környező szövetekbe ürül. Ez a folyamat a környező sejteket is károsítja, ellentétben a természetes sejthalállal az apoptózissal, amikor is a sejt a környező sejtek károsítása nélkül, meghatározott módon kerül lebontásra.



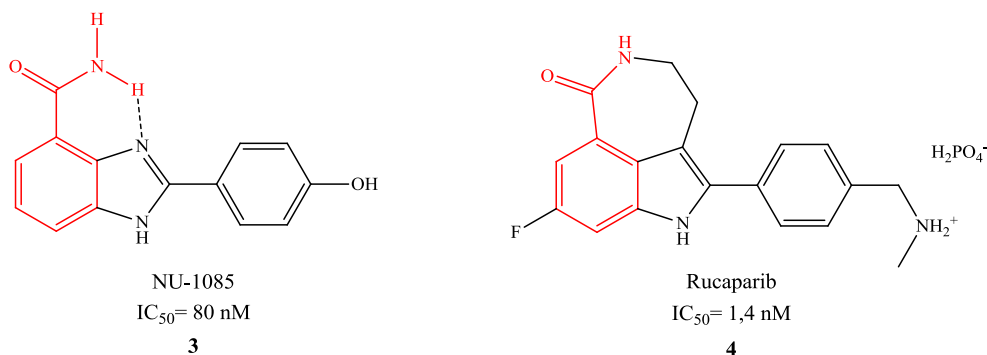
2. ábra: PARP túlműködése

A PARP első vizsgálatai során bebizonyosodott, hogy a NAD^+ hasításából származó nikotinamid (1) az enzim természetes inhibitora, valamint hogy a karbociklusos 3-aminobenzamid (2) hatékonyabb PARP gátló. További vizsgálatok bebizonyították, hogy a DNS metilező kemoterápiás szerek (temozolomid, dakarbazin) hatékonysága PARP inhibitorok jelenlétében számottevően nő. A nikotinamid, mint terápiás szer alkalmazása nem volt lehetséges, mivel nem bizonyult elég specifikusnak, valamint terápiás dózisa túl magas lett volna. A 3-aminobenzamid állatkísérletekben hatástalannak bizonyult.³



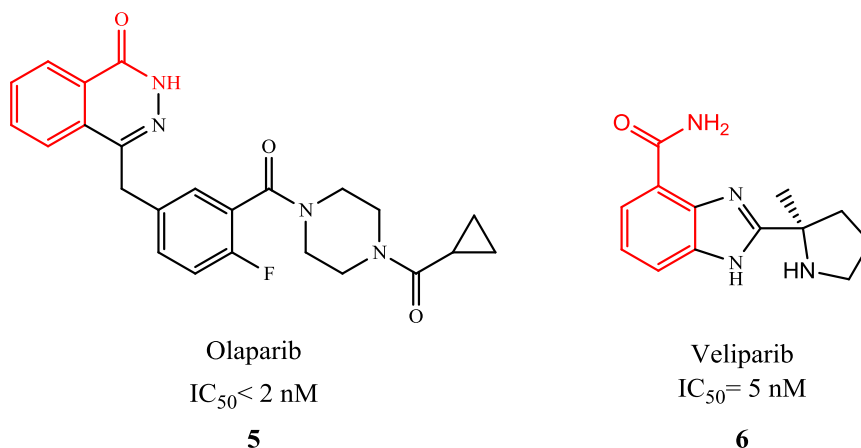
3. ábra: Magas IC_{50} értékű PARP-gátlók

A potenciálisan hatékony szerkezetek kutatása során megállapították, hogy az aromás gyűrűhöz kapcsolódó intramolekuláris hidrogénhíddal feszített savamid (NU-1085 3), vagy heterociklusos gyűrű részét képező laktám funkciós csoport (Rucaparib 4) meglete elengedhetetlen. A benzimidazol-vázás NU-1085 röntgenkristallográfiás vizsgálata során meghatározták a PARP-1 enzim katalitikus centrumában a kötődésben szerepet játszó aminosavakat. A savamid csoport a hidrogénhíd kötések alakít ki a GLY-863-al és a SER-904-el, a heteroaromás gyűrű π - π kölcsönhatást a TYR-907-el. Ezek a vegyületek már DNS metilező ágensek alkalmazása nélkül is hatékony antitumor szereknek bizonyultak.³



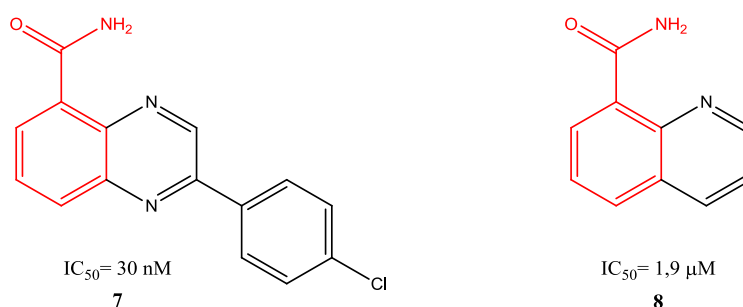
4. ábra: Alacsony IC_{50} értékű PARP-gátlók

Klinikai vizsgálatokban során a Pfizer által fejlesztett Rucaparib, mint intravénás hatóanyag egyéb antitumor szerekkel kombinálva alkalmasnak bizonyult a melanoma kezelésére. Önálló hatóanyagként alkalmazva klinika II. fázisba jutott. A 4-ftalazinon-vázis Olaparib (5) önálló hatóanyagként per os alkalmazható, a kombinált kezelés vizsgálatai klinika II. fázisban folynak. A benzimidazol származék Veliparib (6) per os különböző típusú daganatok kezelésére alkalmas.⁴



5. ábra: Ftalazinon és benzimidazol vázas PARP-gátlók.

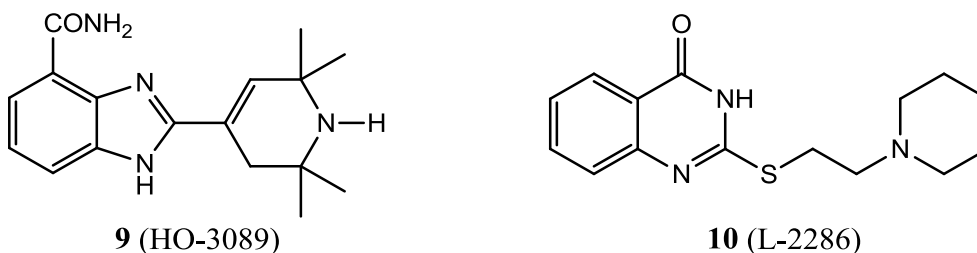
Kinoxalin alapvázát tartalmaz a Sunderland és munkatársai által leírt 2-(4-klórfeil)-5-karbamoilkinoxalin (7)⁵, valamint kinolin alapvázát a Lord és munkatársai által közölt 8-karbamoilkinolin (8)⁶.



6. ábra: Kinoxalin és kinolin vázas PARP gátlók

4.2. Nitroxid szabad gyökök, mint antioxidáns vegyületek

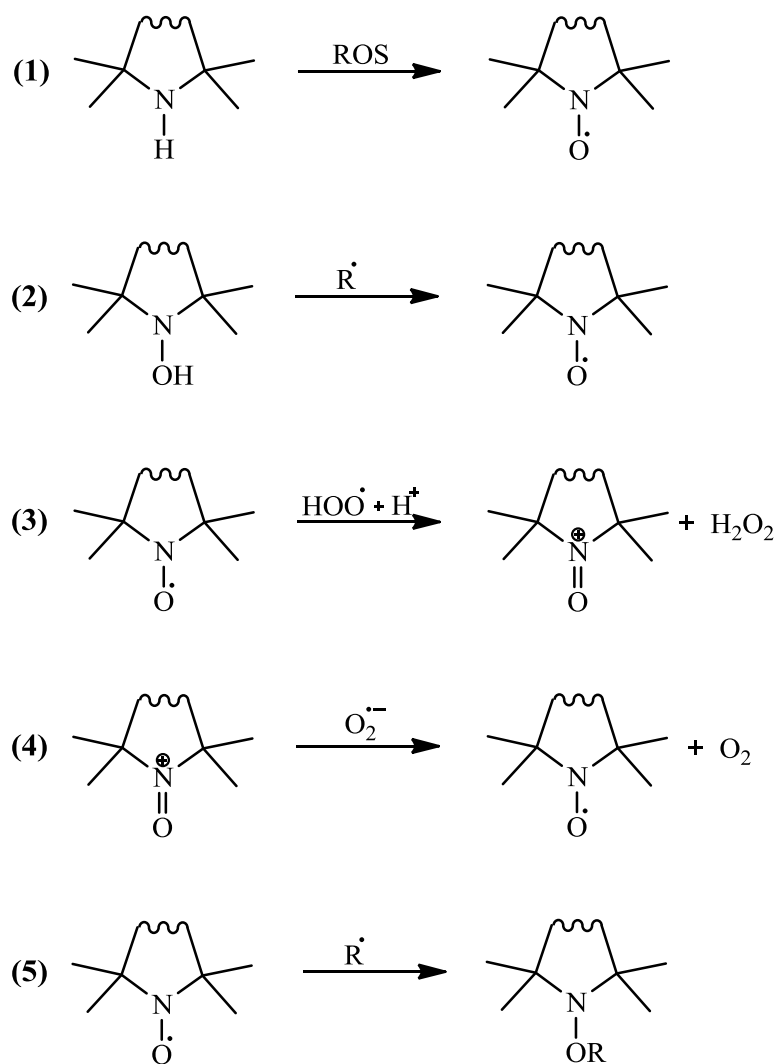
A PTE-ÁOK Szerves és Gyógyszerkémiai Intézetében korábban is számos nitroxidokkal, szekunder-amin és hidroxil-amin elővegyületeikkel módosított bioaktív vegyületet szintetizáltak (verapamil, amiodaron, ebselen származékok).⁷⁻⁹ A közelmúltban nitroxidokkal módosított PARP gátlókat is szabadalmaztattak.^{10,11} (**9**, **10**). (7. ábra)



7. ábra: az intézetben előállított PARP gátlók

Ezen vegyületek tervezésének az volt a koncepciója, hogy a DNS lánc törést és a PARP aktivációját szabad gyökös folyamatok váltják ki. Ha a szabad gyököket hidroxilaminnal, vagy sztérikusan gátolt aminnal csapdázni tudjuk, a kettős hatású vegyületekkel a PARP enzim gátlása mellett a kiváltó ok, vagyis a szabad gyökök egyensúlyi koncentrációja is csökkenthető.

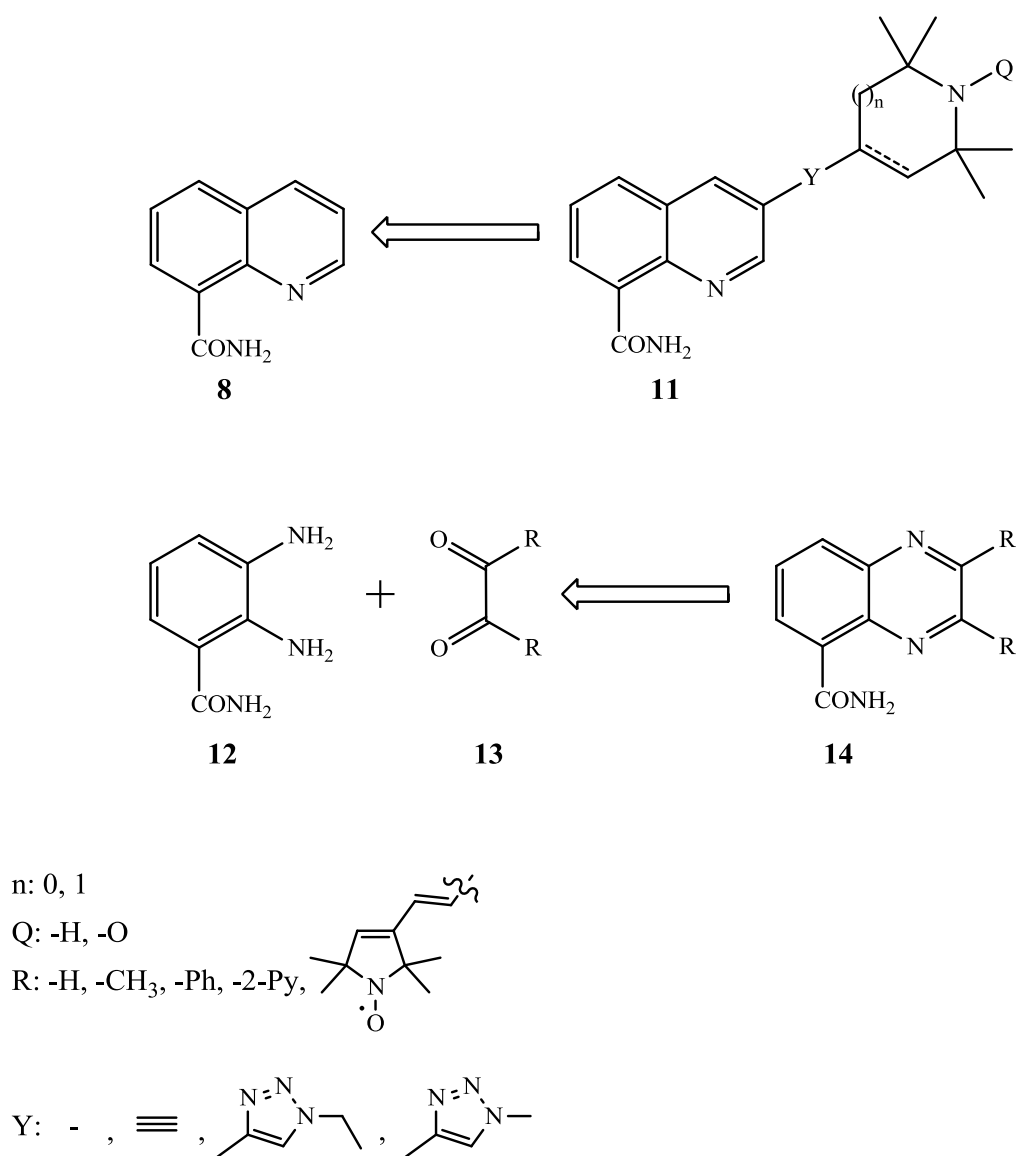
A nitroxid szabad gyökök és diamágneses prekurzoraik a szervezetben nem enzimatisz antioxidánsként viselkednek. A szekunder-amin és hidroxilamin vegyületek a reaktív oxigén és nitrogén származékokkal (ROS, RNS), valamint alkil gyökökkel reagálva nitroxid szabad gyökké oxidálódnak (8. ábra, 1, 2 reakcióegyenlet)¹². A metilcsoportok árnyékoló hatásának köszönhetően, a keletkezett nitroxid szabad gyök viszonylag inert marad. A nitroxidok képesek a szuperoxid gyököt diszmutálni (3, 4)¹³, valamint csapdázni alkil gyököket is, miközben O-alkilezett termék keletkezik (5)¹⁴.



8. ábra: Nitroxidok és prekurzoraik reakciói

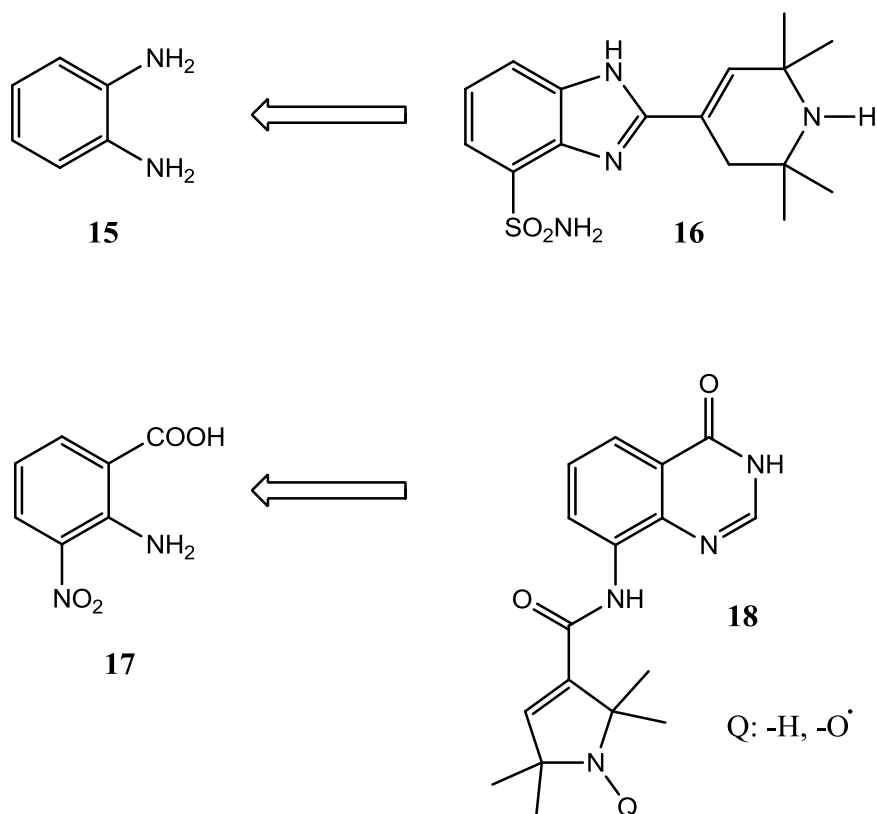
5. Célkitűzések

Feladatomban 8-karbamoilkinolin (**11**), 5-karbamoilkinoxalin (**14**), benzimidazol-4-szulfonamid (**16**) és 4-kinazolinon (**18**) típusú, várhatóan PARP inhibitor hatással rendelkező új vegyületek szintézise volt. A Lord és munkatársai által közölt 8-karbamoilkinolint (**8**)⁶, nitroxidokkal és elővegyületeikkel kívántuk módosítani, hogy a PARP gátló és antioxidáns szerkezeti részt tartalmazó **11** vegyületekhez jussunk előzetes tesztelés céljából. A 2,3-helyzetben módosított 5-karbamoilkinoxalinokról (**14**) feltételeztük, hogy PARP inhibitor hatást mutathatnak. (9. ábra)



9. ábra: Célkitűzések I.

A Szerves és Gyógyszerkémiai Intézetben korábban szintetizált benzimidazol és 4-kinazolinon alapvázát tartalmazó hatásos PARP gátlók körét a **16** benzimidazol-4-szulfonamiddal és a 8-as helyzetben nitroxiddal módosított 4-kinazolinon származékkal (**18**) kívántuk bővíteni. (10. ábra)

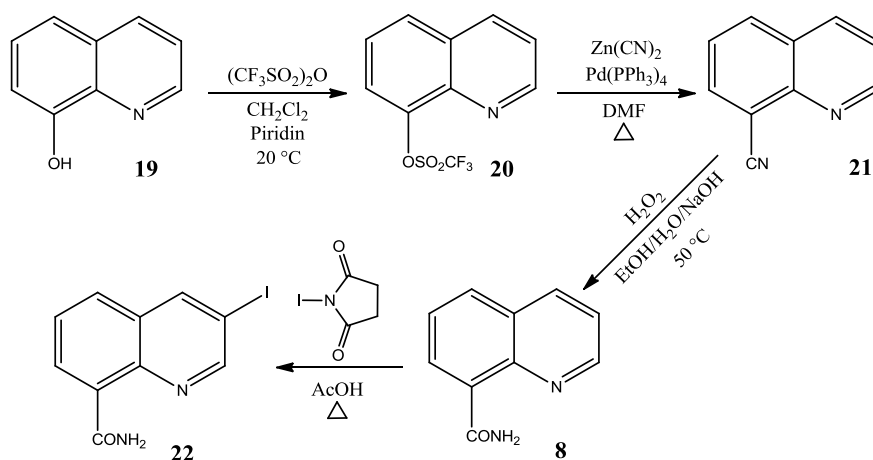


10. ábra: Célkitűzések II.

6. Saját eredmények

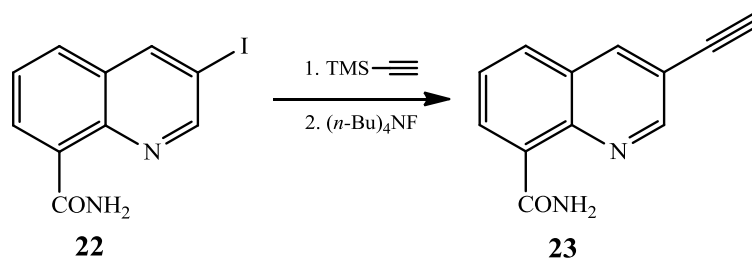
6.1. PARP gátlók szintézise 8-karbamoilkinolinból

Először a szintézisekhez szükséges, már korábban közölt intermediereket állítottuk elő. A **19** 8-hidroxi-kinolinból kiindulva három lépésben képeztük a **8** 8-karbamoilkinolint, melyet *N*-jód-szukcinimiddal (NIS) ecetsavas közegben reflux hőmérsékleten, nitrogén atmoszféra alatt reagáltatva kaptuk meg a 3-as helyzetben jódózott terméket (**22**).⁶ (11. ábra)



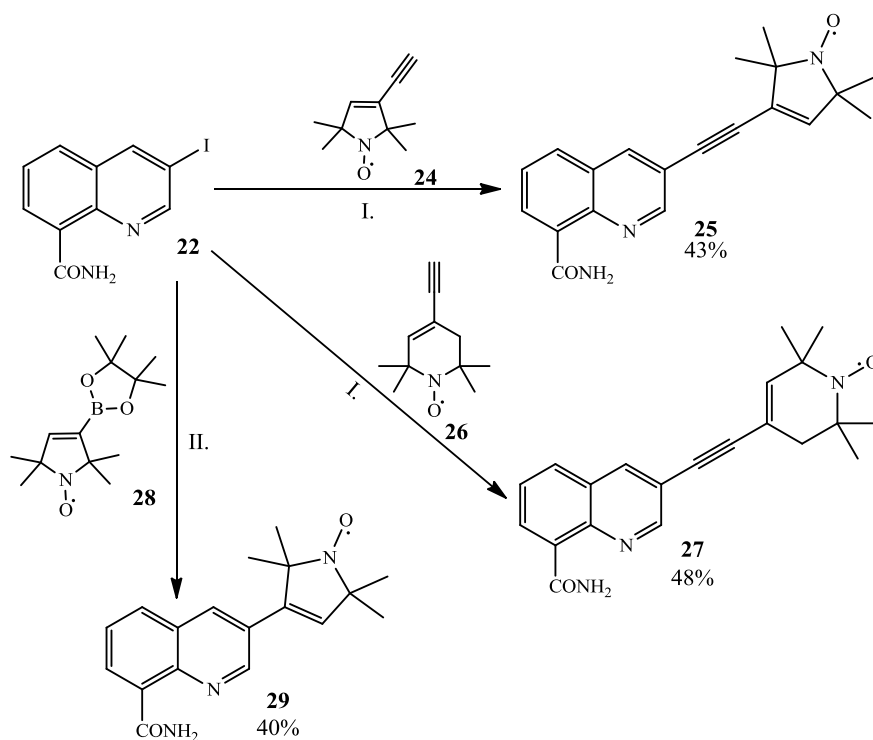
11. ábra: 3-Jód-8-karbamoilkinolin szintézise

A továbbiakban ezt a vegyületet Sonogashira reakcióval, tetrahydrofuranban (THF), réz(I)-jodid és $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ katalizátor mellett diizopropil-amin jelenlétében reagáltattuk trimetilszilil-acetilénnel. A védőcsoportot tetrabutil-ammonium-fluoriddal távolítottuk el, így jutva a **23** acetilén származékhoz.⁶ (12. ábra)



12. ábra: 3-etinil-8-karbamoilkinolin szintézise

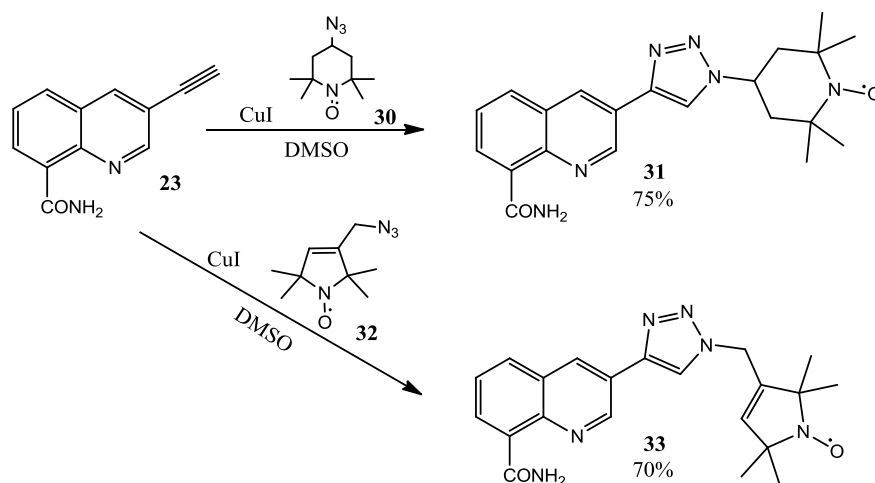
A **22** 3-jód-8-karbamoilkinolint szintén Sonogashira reakcióban kapcsoltuk öttagú **(24)**¹⁵ és hattagú **(26)**¹⁶ nitroxidokkal, így kapva a **25**, **27** vegyületeket. Továbbá Suzuki reakcióban vizes dioxánban, Pd(PPh₃)₄ katalizátor és Na₂CO₃ jelenlétében kapcsoltuk **28** boronsavval¹⁷, így jutva el a **29** termékhez. (13. ábra)



I: Pd(PPh₃)₂Cl₂, CuI, (*i*-Pr)₂NH, THF, 45 °C, 2 h; II: Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, dioxán, H₂O, Δ, 3 h

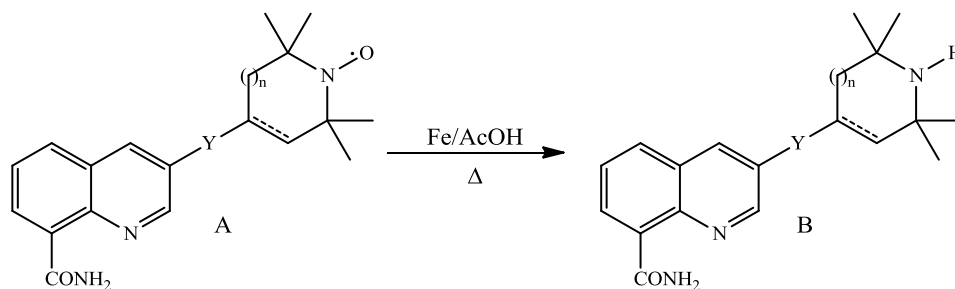
13. ábra: 8-Karbamoilkinolin-származékok szintézise keresztkapcsolási reakciókban

A **31** és **32** triazol vegyületeket a **23** acetilén és a megfelelő azidok (**30**, **32**)¹⁸ 1,3-dipoláris cikloaddíciójával (click-reakció) kaptuk 0,3 ekvivalens réz(I)-jodid jelenlétében dimetil-szulfoxidban, inert atmoszféra alatt 40 °C-on.¹⁹ (14. ábra)



14. ábra: 8-Karbamoilkinolin származékok szintézise click-reakcióban

A **25**, **27**, **29**, **31**, **33** vegyületek nitroxid funkciós csoportjait vaspór-jégegettel redukáltuk szekunder-aminná,²⁰ NMR és biológiai vizsgálatok céljából. Így nyerve változó hozamokkal a **34**, **35**, **36**, **37**, **38** vegyületeket. (15. ábra)

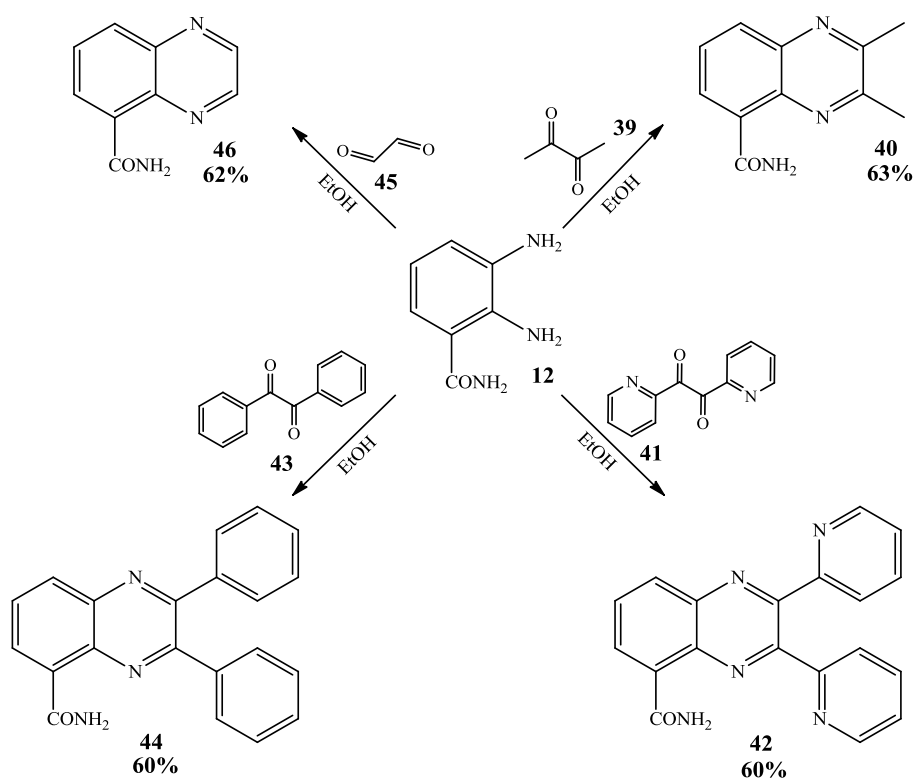


A	B	Y	%
25	34	$-\zeta-C\equiv C-\zeta-$	40
27	35	$-\zeta-C\equiv C-\zeta-$	47
29	36	$---$	36
31	37		25
33	38		22

15. ábra: Nitroxidok redukciója szekunder-aminokká

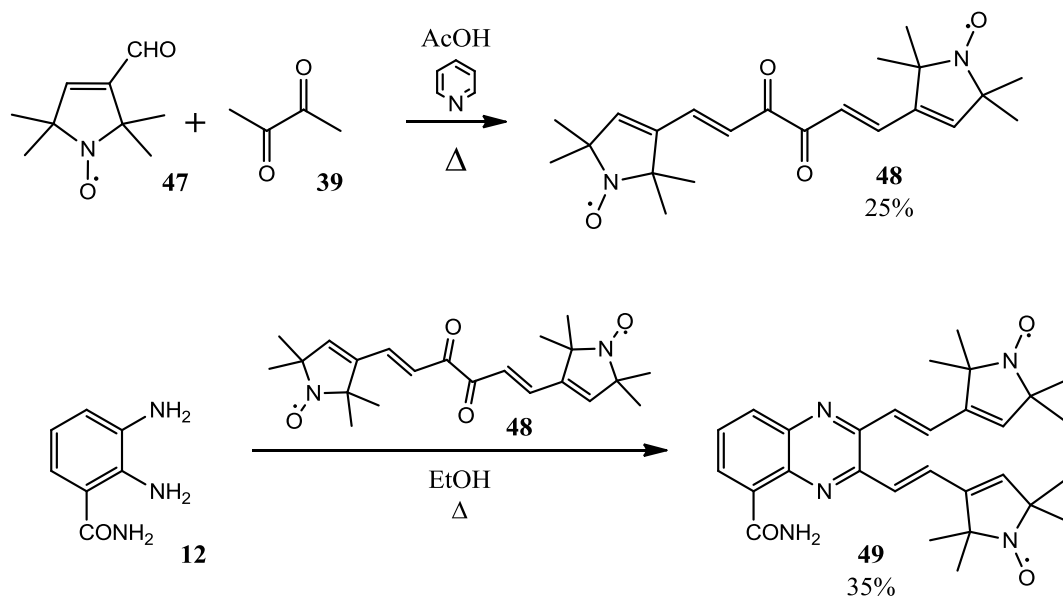
6.2. 5-Karbamoilkinoxalin alapú PARP gátlók szintézise

Az 5-Karbamoilkinoxalin-vázis vegyületek előállítása során a 2,3-diaminobenzamidból²¹ (**12**) indultunk ki, melyet etanolban reagáltattunk but-2,3-dionnal (**39**), 2,2'-piridillel (**41**), benzillal (**43**), valamint glioxállal (**45**). Ezen gyűrűzárási reakciók eredményeként jó hozammal jutottunk 2,3-diszubsztituált 5-karbamoilkinoxalinokhoz. (**40**, **42**, **44**, **46**). (16. ábra)



16. ábra: Kinoxalin-5-karboxamid származékok szintézise

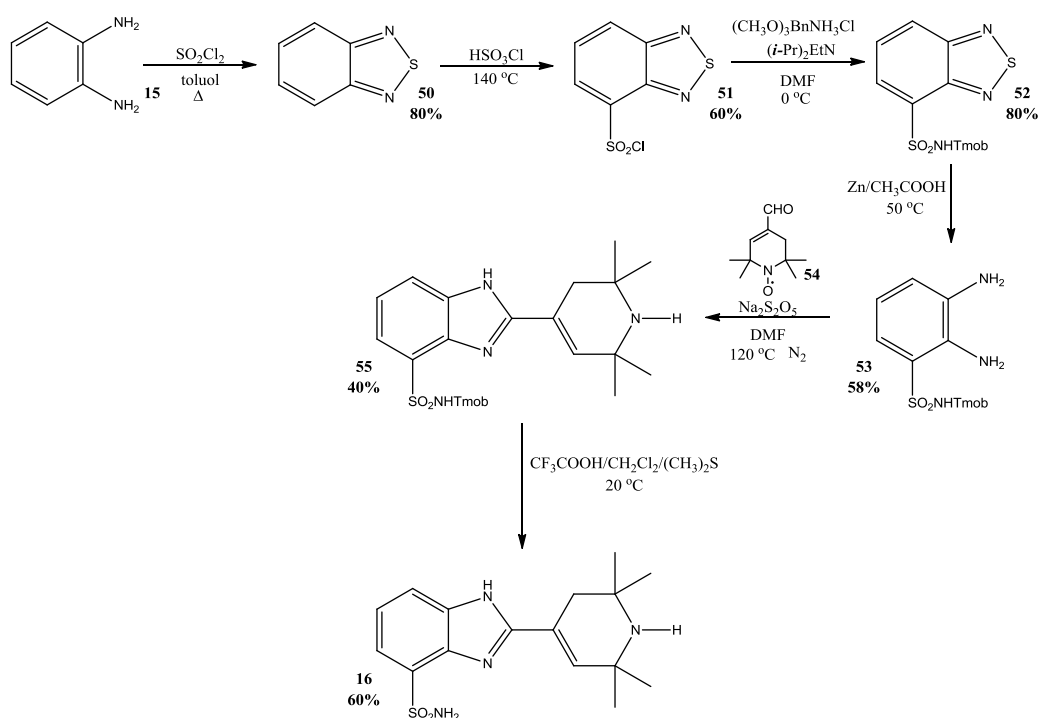
A 2,3-helyzetben öttagú gyűrűs nitroxidokkal szubsztituált biradikális kinoxalin származékot (**49**) a paramágneses 3,4-dion (**48**) és 2,3-diaminobenzamid (**12**) reakciójában nyertük. A diont Ozturk²² és munkatársai által közölt módszerrel állítottuk elő but-2,3-dion (**39**) és a megfelelő aldehyd (**47**)²³ kondenzációjával. (17. ábra)



17. ábra: Biradikális kinoxalin származék szintézise

8.3 Benzimidazol-4-szulfonamid váz szintézise

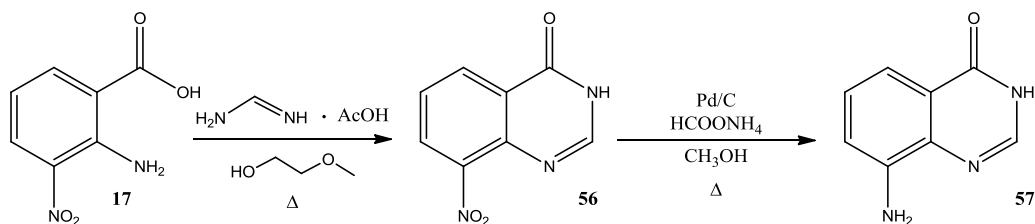
A HO-3089 4-karbamoil-benzimidazol (**9**)¹⁰ származék az intézet egyik leghatékonyabb PARP inhibitor vegyületének bizonyult. A vegyület szulfonamid analogonját (**16**) orto-feniléndiaminból (**15**) kiindulva szintetizáltuk. Első lépésben tionil-kloriddal képeztük az **50**²⁴ tiadiazolt, ezt klór-kénsavval reagáltatva kaptuk a **51** szulfonsav-kloridot. A **52** védett szulfonamid képzése után a tiadiazol gyűrű felnyitásával kapott **53** diamint izolálás nélkül az **54**²⁵ paramágneses aldehiddel reagáltatva állítottuk elő az **55**¹⁰ benzimidazolt. Végül a trimetoxi-benzil védőcsoportot eltávolítva jutottunk a kívánt termékhez (**16**)²⁶. (18.ábra)



18. ábra: Benzimidazol-4-szulfonamid származék előállítása

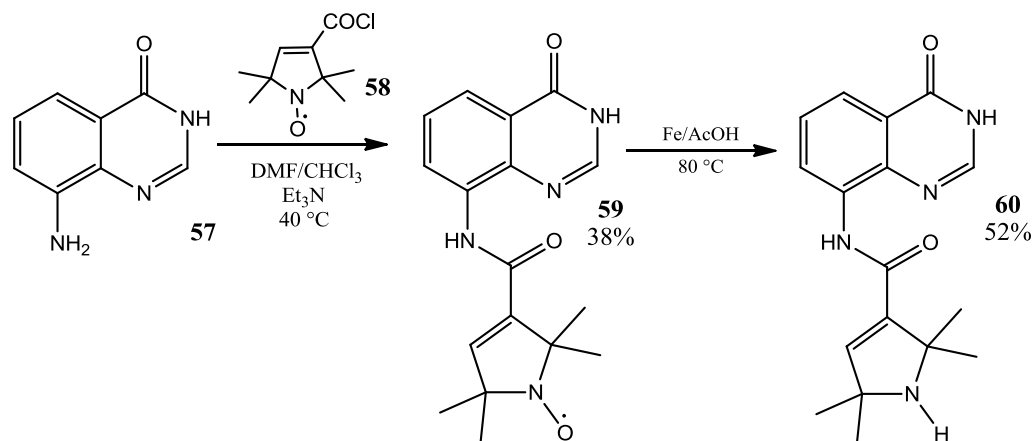
6.4 4-Kinazolinon vázas vegyületek szintézise

Először a 8-amino-4-kinazolinon (**43**) kulcs intermediert szintetizáltuk a már közölt módszerrel. A 3-nitro-antranilsavat (**17**) 2-metoxi-etanolban reagáltattuk formamidin-acetáttal, majd a gyűrűzárási reakció termékét (**56**)²⁷ palládium-csontszénnel, ammónium-formiát jelenlétében redukáltuk 8-amino-4-kinazolinonná (**57**)²⁸. (17. ábra)



19. ábra: 8-amino-4-kinazolinon szintézise

A 8-amino-4-kinazolinont (**57**) dimetil-formamid, kloroform elegyében reagáltattuk, (**58**)²⁹ paramágneses savkloriddal. trietil-amin bázis jelenlétében. Az így nyert vegyületet (**59**) kromatográfias tisztítás után vaspör, jégecettel redukáltuk (**60**) szekunder-aminná²⁰.



20. ábra: 4-Kinazolinon vázas vegyületek szintézise

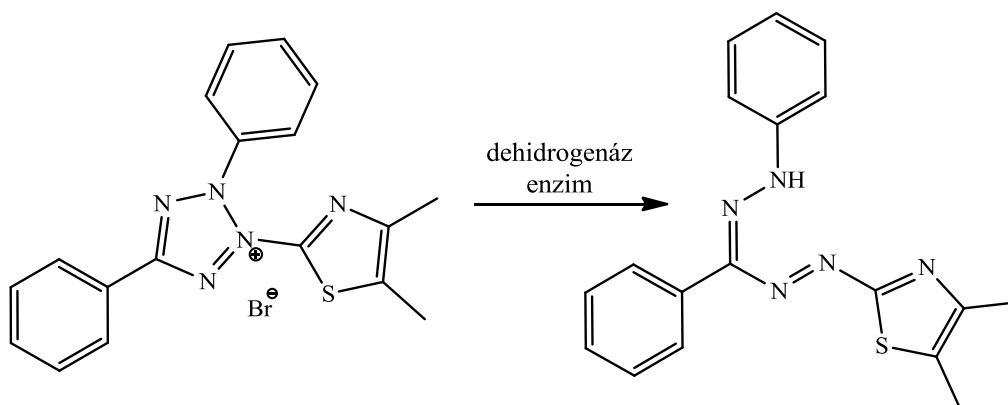
7. Biológiai vizsgálatok és dokkolás

7.1. A sejtbiológiai mérések elve

Az általunk szintetizált vegyületek sejtvédő hatását 1-metil-2-nitro-1-nitrozoguanidin (MNNG), mint DNS metilező ágens jelenlétében WRL-68 humán májsejt-vonalon vizsgálták a PTE-ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetében a már közölt eljárás szerint.¹⁶

A mérések során a 96 lyukú lemezekben tenyésztett sejteket MNNG-el kezelték, a vizsgált vegyületek különböző koncentrációjának jelenlétében. Ezt követően 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromidot (MTT) adtak a mintákhoz. Az élő sejtek az MTT-t felveszik, majd a mitokondriumban enzimatikus úton kék színű formazánná redukálják. A képződött formazán mennyisége arányos a még élő sejtek számával. A minták formazán koncentrációját spektrofotometriás méréssel határozhatjuk meg, 550 nm hullámhosszon. Minél nagyobb számban élték túl a sejtek a MNNG-el való kezelést, annál hatékonyabbnak tekintjük a vizsgált vegyületet.¹⁰

Az átlagos túlélések minden esetben hat párhuzamos mérés átlagaként adódtak. A mérési eredmények szignifikanciáját t-próbával ellenőriztük. A t-próba során 0,001 és 0,005 szignifikancia szinteken fogadtuk el az adott vegyület hatékonyságát. (jelölésük ** és ***)



21. ábra: Az MTT⁺ redukciója formazánná

7.2 Dokkolás

A modern gyógyszerkutatás egyik költségkímélő és nagy hatékonyságú módszere a dokkolás, amikor is egy fehérje ismert aktív centruma és egy kis molekula részvételével létrejött komplex legalacsonyabb energiaszintjéhez tartozó elrendeződéseket keressük. A számított másodlagos kölcsönhatások és biológiai vizsgálatok eredményeinek felhasználásával meghatározhatjuk a hatásos funkciós csoportokat és szerkezeteket.

A dokkolásos számításokat a Schrödinger 2014 programcsomag Glide moduljának (Grid-based Ligand Docking with Energetics) segítségével végeztük SP (standard-precision) módban. A kiértékeléshez és az ábrák elkészítéséhez a Maestro modult használtuk.

A Glide modul az OPLS-AA molekulamechanikai erőter segítségével képes meghatározni egy receptor molekula (pl.: fehérje) és egy, vagy több ligandum molekula között kialakuló kedvező kölcsönhatásokat (pl.: hidrogénhid kötések, π - π kölcsönhatások).

A tényleges dokkolás előtt a vizsgált fehérje (*Gallus gallus* PARP-1 enzimének katalitikus fragmense, 3PAX) röntgenkrisztallográfiás szerkezetét az RCSB PDB honlapjáról töltöttük le, majd előkészítettük a dokkolásra. A röntgenkrisztallográfiás szerkezeten ellenőriztük a kötésrendet, eltávolítottuk a kristályszerkezetből a vízmolekulákat és pótoltuk a hiányzó hidrogéneket. Továbbá ellenőriztük az N- és C-terminális aminosavak helyességét.

A dokkolásra előkészített fehérjén kiválasztottuk azokat az aminosavakat, amelyekről feltételeztük, hogy kölcsönhatást alakíthatnak ki a vizsgált ligandummal. A letölthető röntgenkrisztallográfiás szerkezet gyakran tartalmaz egy már ismert ligandumot (mint az általunk vizsgált 3PAX esetében is a 3-metoxibenzamidot), így könnyebben dokkolhatunk az ismert aktív centrumra.

A tényleges dokkolás során először a program konformációanalízist végez. A vizsgált ligandum egy merev központi részéhez (core region) kapcsolódó valamennyi, kovalens kötés mentén elforgatható szerkezeti rész vizsgálatával sorra veszi a lehetséges konformereket és kiszűri a legkedvezőbbeket. Ezt követően többlépéses hierarchikus szűrést végez. Az algoritmus először a fehérje felszíne és az arra kifeszített háló pontjai közti távolságokat veti össze a ligandum középpontja és felszíne közti távolságokkal. Majd a konformerek átmérője (két legtávolabbi atom távolsága) alapján szelektál. Végül a konformer átmérője körüli forgatás során fellépő hidrofób, hidrogénhid és fémion-ligandum kölcsönhatásokat összegzi és súlyozza a szterikus faktorokkal. Az így nyert szerkezeteken az algoritmust (scoring function) ismét lefuttatja a program, de már nagyobb pontossággal.

Az ismételt szűrés után elfogadott szerkezeteken energiainimalizálást hajtunk végre, mely során figyelembe vesszük a Coulomb és van der Waals kölcsönhatásokat is. Végül az összes kölcsönhatás figyelembevételével a program kiszámolja a Glide Score függvény értékét. A függvény a van der Waals, Coulomb, lipofil, hidrogénhid és fémion-ligandum kölcsönhatásokat összegzi, továbbá sztérikus faktorokkal súlyozza. Minél kisebb értéket kapunk eredményül, annál erősebben kötődik a ligandum a receptorhoz.

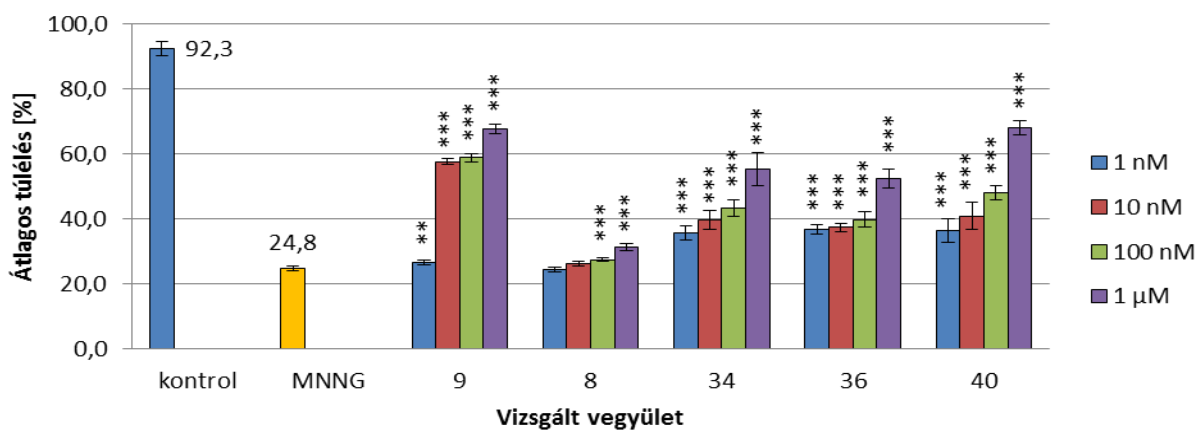
Az eredmények megjelenítésekor a ligandum 4 Å környezetében elhelyezkedő aminosavakat tüntettük fel, hárombetűs rövidítésüknek és sorszámuknak megfelelően. Piros színnel a negatív, sötétkékkel a pozitív töltésű aminosavakat jelöltük. Világoskékkel a hidrofíl, zölddel a hidrofób aminosavakat. A glicin fehér jelölést kapott. A hidrogénhid kölcsönhatásokat nyilak jelzik. Zöld szakaszok jelölik az aromás gyűrűk között fellépő π - π kölcsönhatásokat.³⁰

7.3. Eredmények

Az MNNG indukálta sejthalál vizsgálatok során 0,05 μ M koncentrációjú MNNG hatásának tették ki a mintákat, a vizsgált vegyületek 1, 10, 100 nM és 1 μ M koncentrációinak jelenlétében, 24 órán át. A kontroll minta sejtjeit nem kezelték, továbbá referenciaként a már korábban leírt **9** (HO-3089) PARP inhibitor hatású 4-karbamoil-benzimidazol származékot és a **8** 8-karbamoilkinolint is vizsgálták. A **8** vegyület 1 nM és 10 nM koncentrációban alkalmazva nem mutatott védőhatást.

A **34**, **36**, **40** vegyületek mutatták a legnagyobb védőhatást. Az átlagos túlélések mindhárom esetben 50 % fölötti értékek voltak. A **40** 2,3-dimetil-5-karbamoilkinoxalin kiemelkedő védőhatást (68 %) mutatott. Mindhárom vegyület hatásosabbnak bizonyult, mint a **8** 8-karbamoilkinolin, valamint 1 nM koncentráció mellett védőhatásuk meghaladta a **9** referenciavegyületét is. Koncentrációjuk növelésével sejtvédő hatásuk is nőtt.(1. diagram)

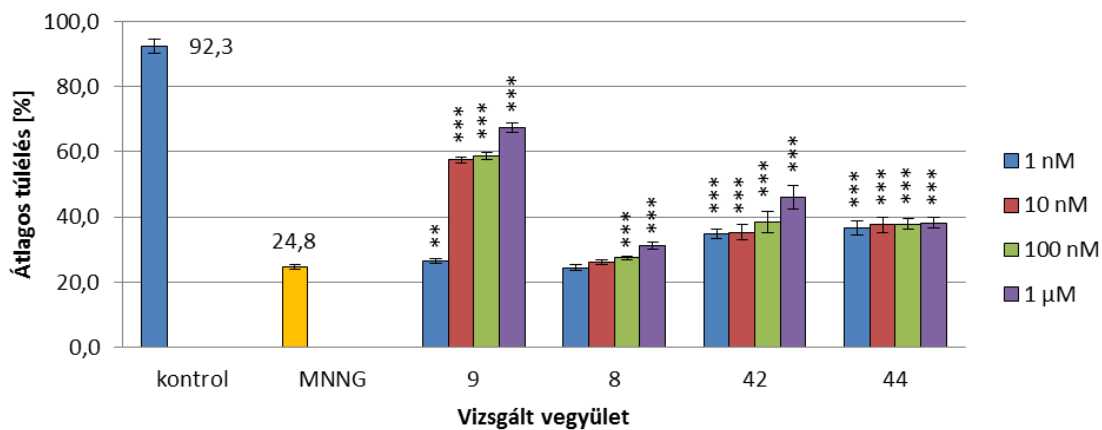
MNNG sejthalál kísérlet



1. diagram

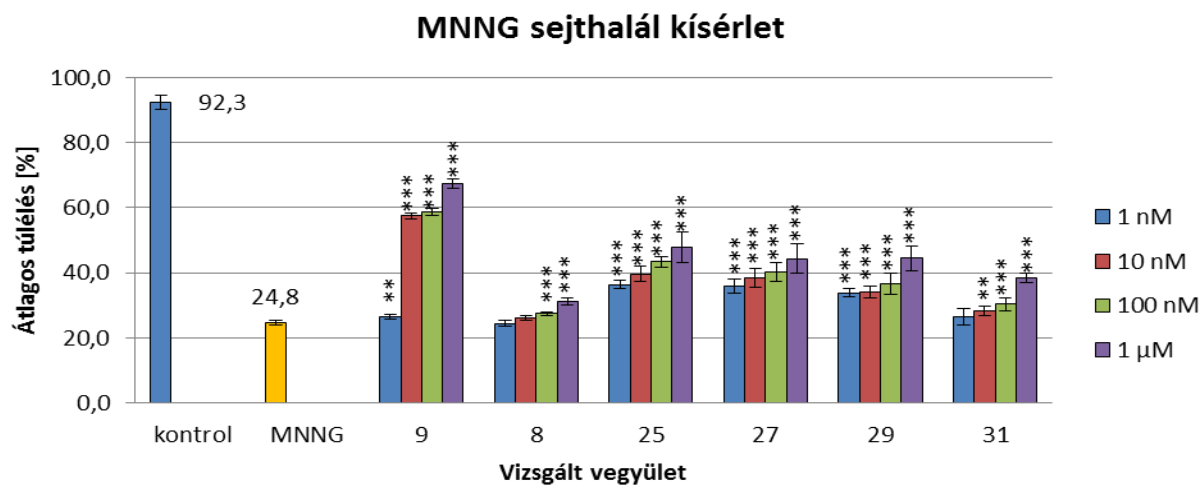
A **42**, **44** kinoxalin származékok alacsonyabb védőhatást mutattak, mégis hatékonyabbnak bizonyultak, mint a **8** 8-karbamoilkinolin és 1 nM koncentrációban védőhatásuk meghaladta a **9** referenciavegyületét. A **34**, **36**, **40** vegyületekkel ellentétben azonban koncentrációjuk növelésével sejtvédő hatásuk nem nőtt. (2. diagram)

MNNG sejthalál kísérlet



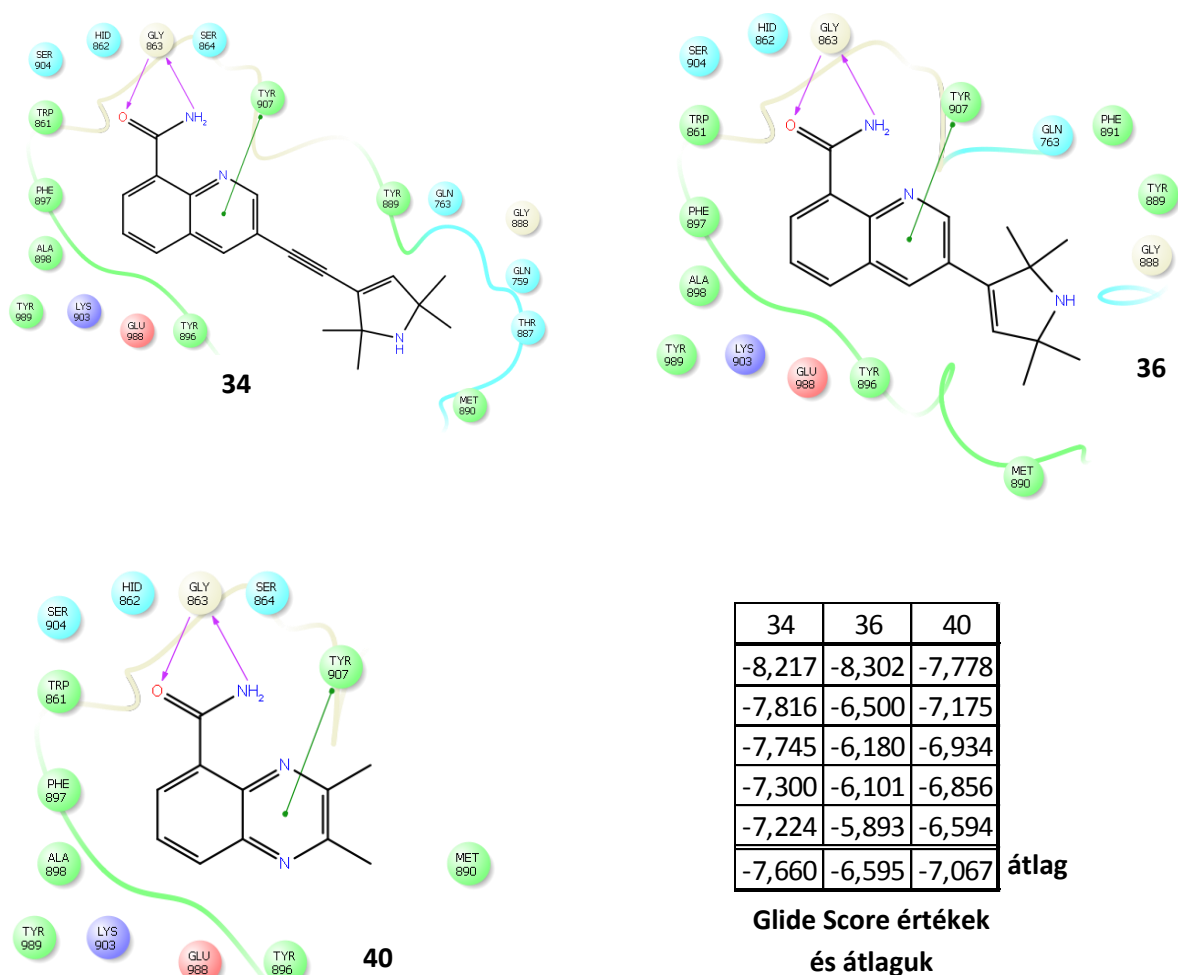
2. diagram

A 25, 27, 29, kinolin vázas vegyületek védőhatása még mindig jónak mondható, azonban a 31 triazol származék 1 nM koncentrációban már hatástalannak bizonyult és ez a vegyület rendelkezett a legkisebb sejtvédő hatással (39 %) (3. diagram)



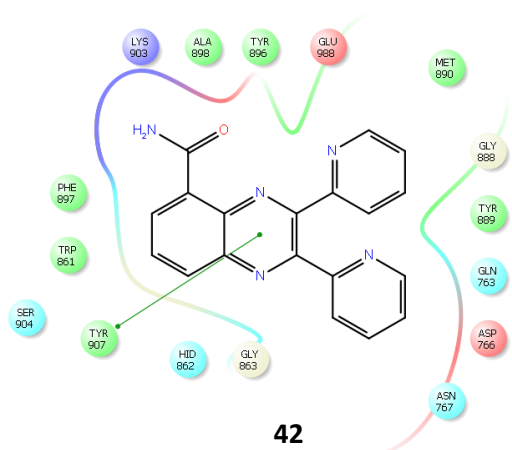
3. diagram

A dokkolások eredményei alátámasztják a biológiai vizsgálatokat. A három leghatékonyabb vegyület (**34**, **36**, **40**) karbamoil csoportja a PARP-1 enzim aktív centrumában a GLY 863-al alakít ki kettős hidrogénhid kölcsönhatást, továbbá heteroaromás gyűrűjük a TYR 907-el π - π kölcsönhatást. A vegyületek öt legkedvezőbb fehérje-ligandum komplexéhez tartozó Glide Score értékek átlaga jól korrelál a sejt-kísérletek eredményeivel. (22. ábra)

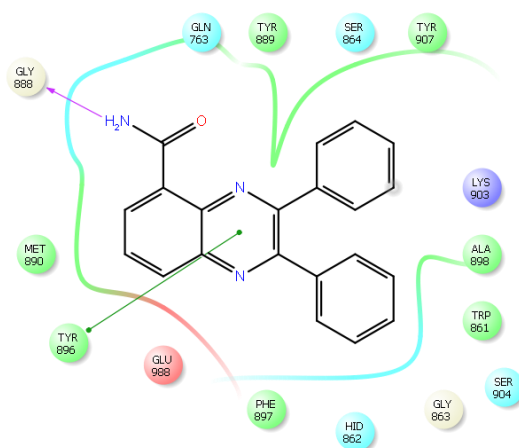


22. ábra: A dokkolás eredményei I.

A **42-es**, **44-es** kinoxalin származékok nagy térkitöltésű szubsztituensei gátolják a kötődést a GLY 863-hoz. A **42-es** vegyület még képes kialakítani a kedvező π - π kölcsönhatást a TYR 907-el, míg a **44-es** difenil-kinoxalin már nem. Helyette karbamoil csoportjával a GLY 888-hoz kötődik hidrogénhíd kölcsönhatással és π - π kölcsönhatást alakít ki a TYR 896-al.



42



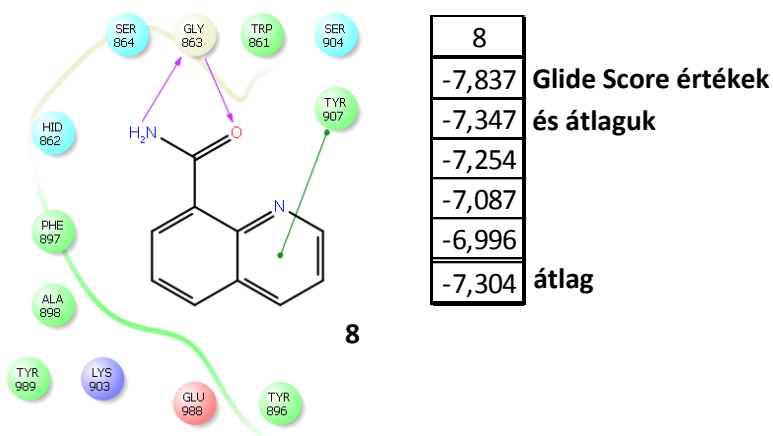
44

42	44
-6,969	-7,162
-6,945	-7,109
-6,777	-6,933
-6,734	-6,872
-6,676	-6,693
-6,820	-6,954
átlag	

**Glide Score értékek
és átlaguk**

23. ábra: A dokkolás eredményei II.

A **8-as** 8-karbamoilkinolinnak, a dokkolás eredményei alapján szintén a hatásos vegyületek csoportjába kéne tartoznia, hiszen hidrogénhíd kölcsönhatást alakít ki a GLY 863-al és π - π kölcsönhatást a TYR 907-el, számított Glide Score értéke is alacsonyabb a **42**, **44** diszubsztituált vegyületekénél.



24. ábra: A dokkolás eredményei III.

Magyarázatként szolgálhat a vegyületek lipofilitásának különbözősége. A Crippen-féle fragmens alapú számításos módszer felhasználásával (CambridgeSoft ChemBioOffice 12.0) kiszámítottuk a vizsgált vegyületek logP értékeit. A leghatásosabb vegyületek (**9, 34, 36, 40**) logP értékeinél kisebb, vagy számottevően nagyobb logP értékekkel rendelkező vegyületek kevésbé bizonyultak hatásosnak.

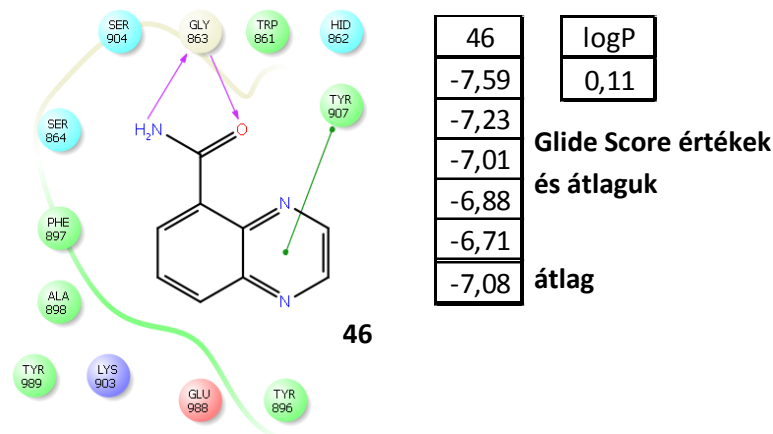
A vegyület lipofilitása erősen befolyásolja a biológiai membránokon való áthatolóképességet. A PARP enzim nagy mennyiségben a sejtmagban van jelen, így a lipofilitás jelentősen befolyásolhatja az adott vegyület hatékonyságát.

vegyület	logP
8	1,02
9	1,19
34	1,97
36	1,71
40	1,52
42	2,48
44	4,31

1. táblázat

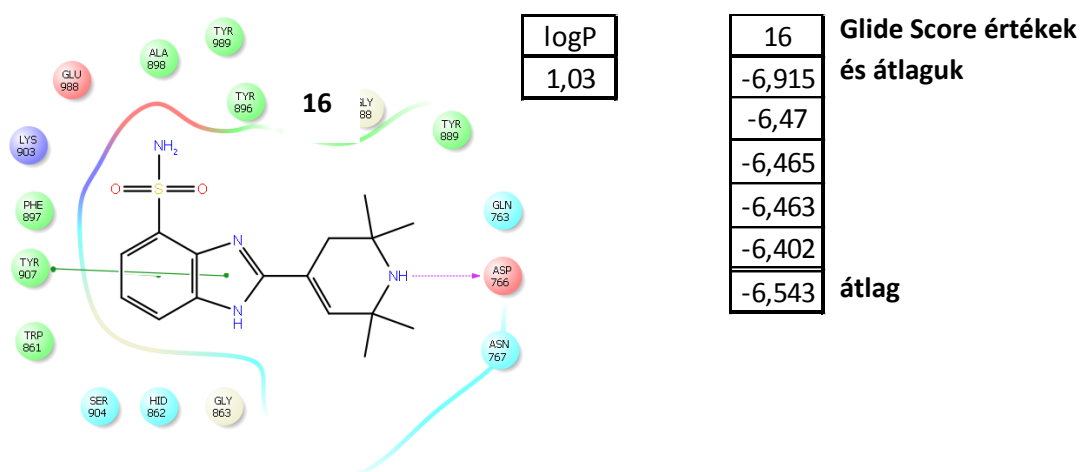
A sejtbiológia vizsgálatokban nem tesztelt vegyületek dokkolását is elvégeztük.

A **46**-os 5-karbamoilkinoxalin a GLY 863-al alakít ki kettős hidrogénhid kölcsönhatást valamint a TYR 907-el π - π kölcsönhatást, Glide Score értékei kedvezőek. A számított logP értéke azonban igen alacsony, 0,11. Sejtvédő hatása várhatóan csekély lesz.

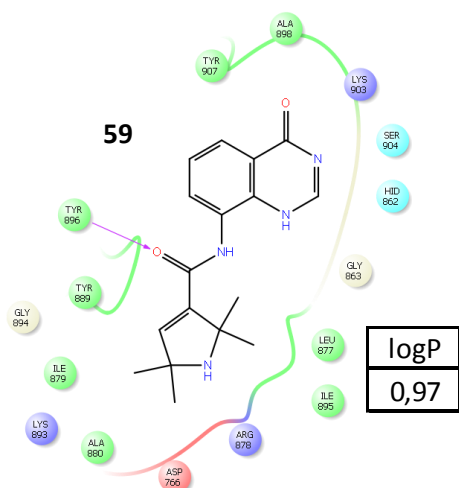
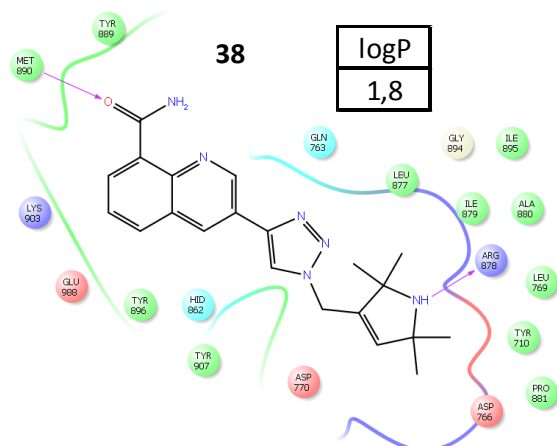
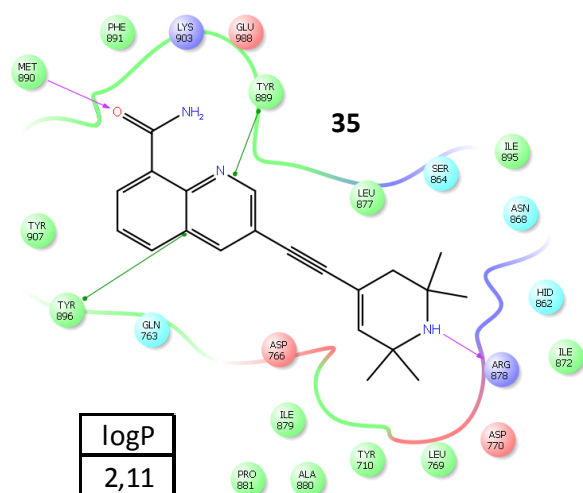


25. ábra: A dokkolás eredményei IV.

A **16-os**, **35-ös**, **38-as** és **59-es** vegyületek Glide Score értékeinek átlaga a legmagasabb. A **16-os** szulfonamid a TYR 907-el alakít ki π - π kölcsönhatást, az ASP 766-al hidrogénhíd kölcsönhatást. LogP értéke a 8-karbamoilkinolinével (**8**) közel megegyező. A **35-ös** acetilénvegyület TYR 896-al alakít ki π - π kölcsönhatást, továbbá a MET 890-el és ARG 878-al hidrogénhíd kölcsönhatást. LogP értéke viszonylag magas. A **38-as** triazol a MET 890-el és az ARG 878-al képez hidrogénhíd kötést. Az **59-es** 4-kinazolinon származék csupán a TYR 896-al képez hidrogénhíd kötést. LogP értéke igen alacsony.



26. ábra: A dokkolás eredményei V.



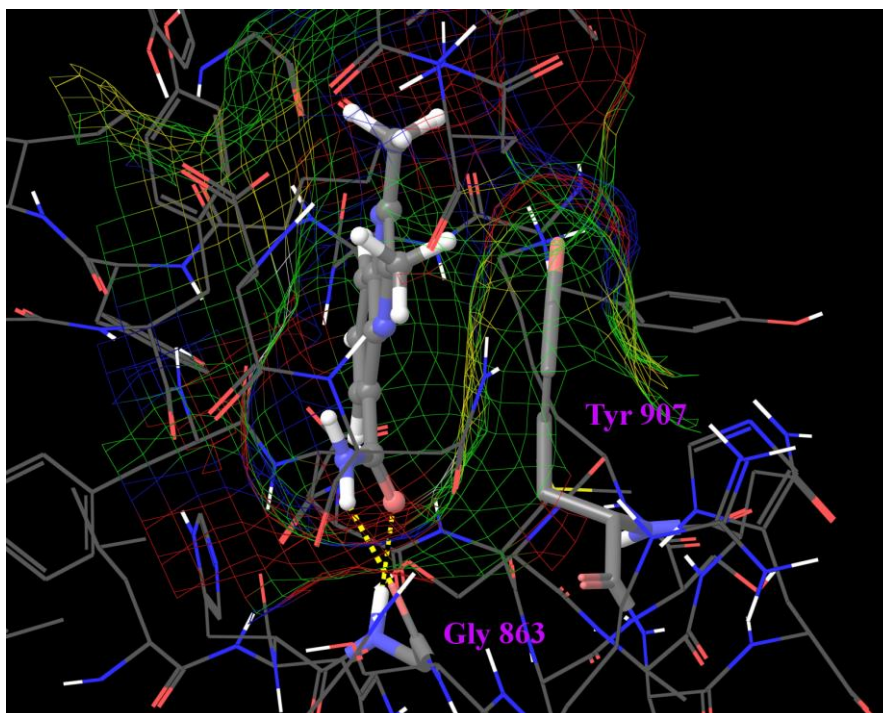
35	38	59
-6,819	-6,465	-6,785
-6,567	-6,454	-6,775
-6,337	-6,161	-6,547
-6,168	-6,117	-6,37
-5,98	-5,986	-6,054
-6,3742	-6,2366	-6,5062

**Glide Score értékek
és átlaguk**

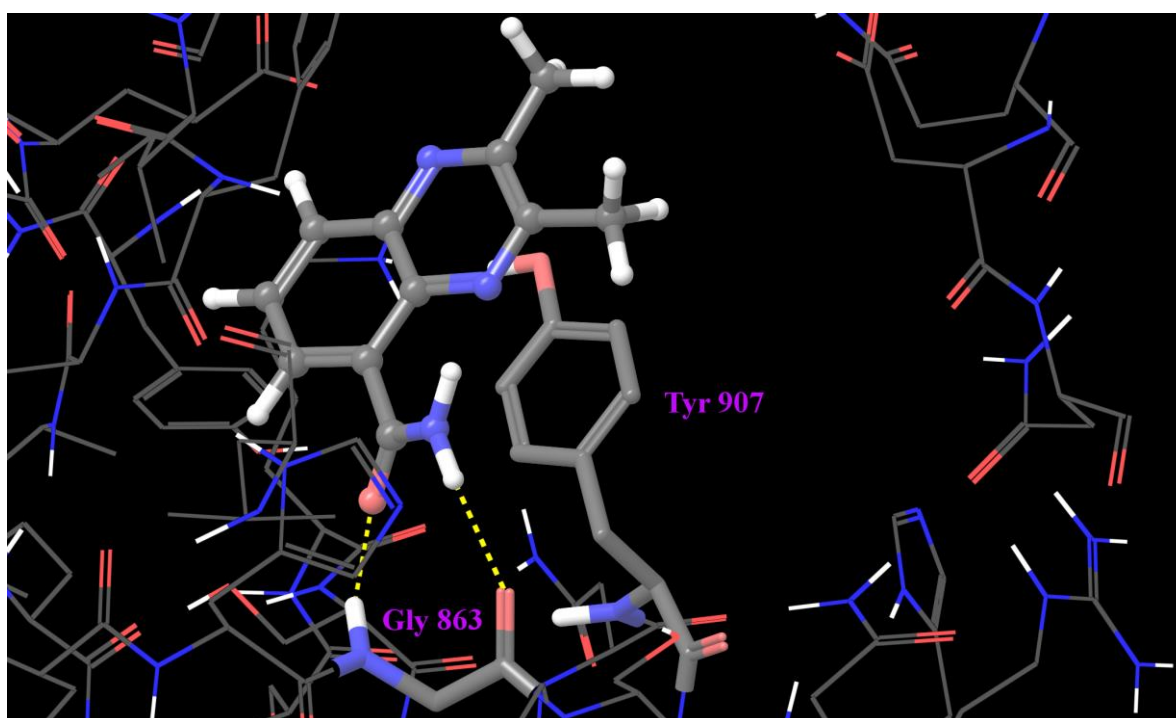
átlag

27. ábra: A dokkolás eredményei VI.

A dokkolások és a logP értékek alapján várhatóan ezen vegyületek sem rendelkeznek megfelelő sejtvédő hatással.



28. ábra: A leghatásosabb vegyület (**40**) elhelyezkedése a PARP-1 aktív centrumában



29. ábra: A 2,3-dmetil-8-karbamoilkinoxalinnal (**40**) kölcsönhatásba lépő aminosavak

8. Kísérleti rész

A vegyületek olvadáspontjait Boetius olvadáspontmérő készülékkel határoztuk meg. Az értékek nem korrigáltak. A tömegspektrumok VG TRIO-2 és Thermoquest Multi készülékekkel készültek, elektron impakt ionizációval. A ^1H NMR spektrumok felvétele Varian ^{UNITY}INOVA 400WB és Bruker Avance 3 Ascend 500 készülékekkel történt. A mérésekhez CDCl_3 , CD_3OD és D_2O oldószereket használtunk, a mérések referenciája $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ volt. Az elemanalízis méréseket EA1110 CHNS elemanalizátorral végeztük. Az IR spektrumokat Spekord 85 M készülékkel nujolban és ZnSe ATR mérőfejjel felszerelt Bruker Alpha FT-IR készülékkel, vettük fel. A vegyületeket Merck szilikagélen (40-63 μm szemcseméret) tisztítottuk. A vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatokat műanyag fóliás GF₂₅₄ Merck-szilikagél lapokon végeztük. A **8**,⁶ **12**,²¹ **17**,¹⁰ **20**,⁶ **21**,⁶ **22**,⁶ **23**,⁶ **24**,¹⁵ **26**,¹⁶ **28**,¹⁷ **30**,¹⁸ **32**,¹⁸ **47**,²³ **50**,²⁴ **51**,²⁴ **54**,²⁵ **56**,²⁷ **57**,²⁸ **58**,²⁹ vegyületeket a korábban leírtaknak megfelelően állítottuk elő. A többi reagenst, oldószert a Reanal, Fluka vagy Aldrich cégektől szereztük be.

A biológiai vizsgálatok során használt WRL-68 sejtek az American Type Culture Collection-től (ATCC) lettek beszerezve. A spektrofotometriai mérések Anthos Labtech 2010 ELISA reader készülékkel történtek 550 nm-en.

Általános leirat a Sonogashira-kapcsoláshoz (25, 27)

A **22** vegyület (596 mg; 2,0 mmol) száraz THF-os (10 ml) oldatához CuI (54 mg; 0,28 mmol), $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (40 mg; 0,06 mmol) és diizopropil-amint (2,7 ml) adtunk és az elegyet 45 °C-on 30 percig kevertettük nitrogén gáz alatt. Ehhez adtuk hozzá az acetilén vegyület; **24** (493 mg; 3,0 mmol) vagy **26** (535 mg; 3,0 mmol) THF-os (5 ml) oldatát. Ezután a reakcióelegyet 45 °C-on kevertettük további két órán át. Az oldatot celiten szűrtük, bepároltuk. A maradékot oszlopkromatográfiásan (Hexán/EtOAc) tisztítottuk.

3-((1-Oxil-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrol-3-il)etinil)kinolin-8-karboxamid gyök (25): 288 mg (43%), halványsárga kristályos anyag; op.: 196 °C; R_f : 0,67 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1). IR (nujol): 3310, 1680, 1640, 1615, 1575 cm^{-1} . MS (EI) m/z (%): 334 (M^+ , 2), 320 (12), 304 (52), 129 (100). Elemanalízis: $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2$ Számított: C 71,84; H 6,03; N 12,57; Mért: C 71,68; H 6,01; N 12,60.

3-((1-Oxil-2,2,6,6-tetrametil-1,2,3,6-tetrahidropiridin-4-il)etnil)kinolin-8-

karboxamid gyök (27): 334 mg, (48%), sárga kristályos anyag; op.: 183°C; R_f: 0,65 (CHCl₃/MeOH 9:1). IR (nujol): 3200, 1660, 1585, 1595, 1560 cm⁻¹. MS (EI) m/z (%): 348 (M⁺, 6), 318 (100), 129 (75). Elemanalízis: C₂₁H₂₂N₃O₂ Számított: C 72,39; H 6,36; N 12,06; Mért: C 72,44; H 6,34; N 12,04.

3-(1-Oxil-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrol-3-il)kinolin-8-karboxamid gyök szintézise (29): A **22** vegyület (596 mg; 2.0 mmol) dioxános (10 ml), deoxigenizált (N₂ átbuborékolatás 10 percen át) oldatához Pd(PPh₃)₄ (100 mg; 0,09 mmol) katalizátort adtunk, majd a **28** pinakol-boronátot (532 mg; 2 mmol) és 10%-os vizes Na₂CO₃ oldatot (5 ml). A reakcióelegyet nitrogén alatt három órán át kevertettük reflux hőmérsékleten. A reakció lejátszódása után az oldószereket lepároltuk, a maradékot CHCl₃-ban (20 ml) feloldottuk és vízzel (10 ml) mostuk. A szerves fázist MgSO₄-on szárítottuk, szűrtük, bepároltuk. A terméket oszlopkromatográfiásan (Hexán/EtOAc) tisztítottuk. 236 mg, (40%), halványsárga kristályos anyag; op.: 148 °C R_f: 0,51 (CHCl₃/MeOH 9:1). IR (nujol): 3300, 1675, 1580, 1625, 1570 cm⁻¹. MS (EI) m/z (%): 310 (M⁺, 10), 280 (20), 277 (36), 172 (100), 129 (70). Elemanalízis: C₁₈H₂₁N₃O₂ Számított: C, 69.66; H, 6.50; N, 13.54; Mért: C 69,71; H 6,48; N 13,50.

Általános leirat a click-reakcióhoz (31, 33)

A bombacsőbe mért **23** acetilén vegyület (196 mg; 1,0 mmol) és 4-azido-TEMPO (**30**) (197 mg; 1 mmol), vagy **32** azid (195 mg; 1 mmol) száraz DMSO-os (5 ml), deoxigenizált (N₂ átbuborékolatás 15 percen át) oldatához CuI-ot (57 mg; 0,3 mmol) adtunk. A reakcióelegyet 40 °C-on kevertettük 2 órán át. A reakcióelegyhez vizet (20 ml) adtunk. A kiváló csapadékot üvegszűrőn szűrtük, CHCl₃-ban (10 ml) oldottuk. A vizes fázist CHCl₃-mal (3 x 10 ml) extraháltuk. Az egyesített szerves fázisokat sós vízzel mostuk, MgSO₄-on szárítottuk, bepároltuk. A terméket oszlopkromatográfiásan (CHCl₃/Et₂O) tisztítottuk.

3-(1-(1-Oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)kinolin-8-karboxamid gyök (31): 295 mg (75 %) sárga kristályos anyag; op.: 234 °C; R_f: 0,57 (CHCl₃/MeOH, 9:1). IR (nujol): 3320, 1690, 1525, 1640, 1585 cm⁻¹. MS (EI) m/z (%): 393 (M⁺, 2), 363 (5), 140 (18), 124 (100). Elemanalízis: C₂₁H₂₅N₆O₂ Számított: C 64,10; H 6,40; N 21,36 Mért: C 64,12; H 6,35; N 21,37.

3-(1-((1-Oxil-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-3-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)kinolin-8-karboxamid gyök (33): 274 mg (70 %) halványsárga kristályos anyag; op.: 119 °C; R_f: 0,59 (CHCl₃/Et₂O/MeOH, 4:1,5:0,5). IR (ATR) 3392, 2957, 2918, 2872, 1647, 1570 cm⁻¹. MS (EI) m/z (%): 391 (M⁺, 2), 361 (14), 184 (14), 142 (100). Elemanalízis: C₂₁H₂₃N₆O₂ Számított C 64,43; H 5,92; N 21,47; Mért: C 64,53; H 6,02; N 21,03.

Nitroxidok redukciója aminokká, általános leírat a (34, 35, 36, 37, 38, 60) vegyületek szintézisére: A **25** (167 mg; 0,5 mmol) vagy **27** (174 mg; 0,5 mmol) vagy **29** (155 mg; 0,5 mmol) vagy **31** (197 mg; 0,5 mmol) vagy **33** (196 mg; 0,5 mmol) vagy **59** (164 mg; 0,5 mmol) vegyületet feloldottuk jégcetben (5 ml), majd Fe port (280 mg, 5,0 mmol) adtunk az oldathoz és 30 percen át kevertettük 60 °C-on. A reakció lejátszódása után az elegyet hagytuk kihűlni. Vízzel (10 ml) hígítottuk, a vizes oldatot dekantáltuk a vasporról, majd a vasport további 10 ml vízzel mostuk. Az egyesített vizes fázisokat egy 100 ml-es főzőpohárban szilárd K₂CO₃ hozzáadásával lúgosítottuk pH=10-ig. A vizes fázist háromszor 10 ml kloroformmal extraháltuk, a szerves fázist MgSO₄-on szárítottuk, szűrtük, bepároltuk és oszlopkromatográfiásan (CHCl₃/Et₂O vagy CHCl₃/MeOH) tisztítottuk.

3-((2,2,5,5-Tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-3-il)etinil)kinolin-8-karboxamid (34): 61 mg; (40 %) fehér kristályos anyag; op.: 162-163 °C, R_f: 0,37 (CHCl₃/MeOH, 9:1). IR (nujol): 3320, 1670, 1635, 1620, 1650, 1570 cm⁻¹. MS (EI) m/z (%): 319 (M⁺, 1), 304 (100), 245 (18), 144 (30). Elemanalízis: C₂₀H₂₁N₃O Számított: C 75,21; H 6,63; N 13,16; Mért: C 75,20; H 6,62; N 13,17. ¹H NMR (CD₃OD) δ: 1,33 (s, 6H), 1,44 (s, 6H), 6,16 (s, 1H), 7,75 (t, *J*= 7,9 Hz, 1H), 8,14 (dd, *J*₁= 6,9 Hz, *J*₂= 1,3 Hz, 1H), 8,54 (d, *J*= 2,1 Hz, 1H), 8,67 (dd, *J*₁= 5,9 Hz, *J*₂= 1,5 Hz, 1H), 9,00 (d, *J*= 1,8 Hz, 1H) ppm.

3-((2,2,6,6-tetrametil-1,2,3,6-tetrahidropiridin-4-il)etinil)kinolin-8-karboxamid

(35): 78 mg (47 %) halványsárga kristályos anyag op.: 162 °C, R_f: 0,57 (CHCl₃/MeOH, 9:1). IR (ATR) 3295, 2961, 2200, 1674, 1567. MS (EI) m/z (%): 333 (M⁺ 5), 318 (100), 301 (8), 284 (20), 257 (36), 232 (50). Elemanalízis: C₂₁H₂₃N₃O Számított: C 75,65; H 6,95; N 12,60 Mért: C 75,60; H 6,98; N 12,72. ¹H NMR δ: 1,26 (s, 6H), 1,31 (s, 6H), 2,16 (s, 2H) 6,28 (s, 1H), 7,72 (t, J=7,9 Hz, 1H), 7,97 (d, J=8,1 Hz, 1H), 8,34 (s, 1H), 8,86 (d, J= 7,3 Hz, 1H), 8,93 (s, 1H) ppm.

3-(2,2,5,5-Tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrol-3-il)kinolin-8-karboxamid (36): 53

mg; (36%) fehér kristályos anyag; op.: 140-141 °C, R_f: 0,21 (CHCl₃/MeOH, 9:1). IR (nujol): 3310, 1670, 1650, 1590, 1575 cm⁻¹. MS (EI) m/z (%): 295 (M⁺ <1), 280 (100), 254 (72), 265 (7), 221 (16). Elemanalízis: C₁₈H₂₁N₃O Számított: C 73,19; H 7,17; N 14,23; Mért: C 73,25; H 7,14; N 14,20. ¹H NMR (CD₃OD) δ: 1,42 (s, 6H), 1,54 (s, 6H), 6,21 (s, 1H), 7,72 (t, J= 8 Hz, 1H), 8,18 (dd, J₁= 6,7 Hz, J₂=1,5 Hz, 1H), 8,42 (d, J= 2,3 Hz, 1H), 8,65 (dd, J₁= 5,9 Hz, J₂=1,5 Hz, 1H), 9,08 (d, J= 2,5 Hz, 1H) ppm.

3-(1-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)kinoline-8-karboxamid

(37): 47 mg (25%) fehér kristályos anyag; op(3HCl só): 228-230 °C , R_f:0,37 (CHCl₃/MeOH 2:1). IR (ATR) 3294, 2963, 2924, 2853, 1666, 1598, 1572 cm⁻¹. MS (EI) m/z (%): 378 (M⁺ 4), 363 (8), 124 (100). ¹H NMR (D₂O) δ: 1,51 (s, 6H), 1,60 (s, 6H), 2,16 (t, J= 14,5 Hz, 2H), 2,41 (d, J= 13,5 Hz, 2H), 5,19 (t, J= 12,5 Hz, 1H), 7,55 (t, J= 7,7 Hz, 1H), 7,90 (d, J= 8,3 Hz, 1H), 8,04 (d, J= 7,1 Hz, 1H), 8,42 (s, 2H), 8,81 (s, 1H) ppm.

3-(1-((2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrol-3-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-

il)kinoline-8-karboxamid (38): 41 mg (22%) fehér kristályos anyag; op.: 198-200 °C, R_f:0,40 (CHCl₃/MeOH 2:1). IR (ATR) 3284, 3140, 2961, 2922, 1669, 1599, 1572 cm⁻¹. MS (EI) m/z (%): 376 (M⁺ 15), 361 (31), 224 (72), 108 (100). ¹H NMR (D₂O) δ: 1,48 (s, 6H), 1,52 (s, 6H) 5,23 (s, 2H), 5,58 (s, 1H), 7,67 (t, J= 7,5 Hz, 1H), 8,07 (d, J= 8,1 Hz, 1H), 8,23 (d, J= 7 Hz, 1H), 8,52 (s, 1H), 8,69 (s, 1H) 9,09 (s, 1H) ppm.

2,2,5,5-tetrametil-N-(4-oxo-3,4-dihidrokinazolin-8-il)-2,5-dihidro-1H-pirrol-3-karboxamid (60): 81 mg (52%) fehér kristályos anyag. op.: 249 °C, R_f: 0,47 (CHCl₃/MeOH 9:1). IR (ATR) 3369, 3173, 3041, 2959, 2910, 1675, 1622, 1560 cm⁻¹. MS (EI) m/z (%): 297 (70), 188 (100), 161 (13), 136 (28), 108 (34). ¹H NMR (DMSO d₆) δ: 1,26 (s, 6H), 1,40 (s, 6H), 7,49 (t, J= 8,0 Hz, 1H) 7,80 (d, J= 8,0 Hz, 1H), 8,24 (s, 1H), 8,63 (d, J= 7,9Hz, 1H), 9,61 (s, 1H) ppm.

2,3-Diszubsztituált kinoxalin-5-karboxamidok szintézise, általános leirat a (40, 42, 44, 46) vegyületek szintézisére: A 12 vegyület (750 mg; 5,0 mmol) etanolos (10 ml) oldatához hozzáadtuk a megfelelő 2,3-diont (5,0 mmol; 431 mg **39**, vagy 1061 mg **41**, vagy 1050 mg **43**, vagy 290 mg **45**). A reakcióelegyet 1 órán át refluxoltattuk, majd bepároltuk. A maradékot oszlop kromatográfiával (Hexán/EtOAc) tisztítottuk.

2,3-Dimetilkinoxalin-5-karboxamid (40) 634 mg (63%), halványsárga kristályos anyag; op.: 137 °C R_f: 0,62 (CHCl₃/MeOH 9:1); IR (nujol): 3290, 1660, 1590, 1540, 1575 cm⁻¹. MS (EI) m/z (%): 201 (M⁺, 53), 185 (16), 158 (100), 75 (29). Elemanalízis: C₁₁H₁₁N₃O Számított: C 65,66; H 5,51; N 20,88; Mért: C 65,61; H 5,53; N 20,85. ¹H NMR (CD₃OD) δ: 2,76 (s, 3H), 2,81 (s, 3H), 7,82 (t, J= 8 Hz, 1H), 8,15 (dd, J₁= 6,8 Hz, J₂= 1,5 Hz, 1H), 8,58 (dd, J₁= 6,0 Hz, J₂= 1,5 Hz, 1H) ppm.

2,3-Di(piridin-2-il)kinoxalin-5-karboxamid (42): 982 mg, (60%), halványsárga kristályos anyag; op.: 228 °C; R_f: 0,52 (CHCl₃/MeOH 9:1); IR (nujol): 3350, 1670, 1590, 1560, 1540 cm⁻¹. MS (EI) m/z (%): 327 (M⁺, 58), 326 (M-1⁺, 100), 308 (15), 284 (81), 78 (53). Elemanalízis: C₁₉H₁₃N₅O Számított: C 69,71; H 4,00; N 21,39; Mért: C 69,68; H 3,98; N 21,41. ¹H NMR (CD₃OD) δ: 7,38-7,43 (m, 2H), 7,95-7,99 (m, 3H), 8,03-8,07 (m, 2H), 8,29-8,35 (m, 2H), 8,42 (dd, J₁= 6,9 Hz, J₂= 1,5 Hz, 1H), 8,75 (dd, J₁= 5,9 Hz, J₂= 1,5 Hz, 1H) ppm.

2,3-Difenilkinoxalin-5-karboxamid (44): 976 mg, (60%), halványsárga kristályos anyag; op.: 252 °C; R_f: 0,52 (CHCl₃/Et₂O 2:1); IR (nujol): 3350, 1680, 1620, 1585, 1560 cm⁻¹ MS (EI) m/z (%): 325 (M⁺, 43), 307 (22), 282 (62), 280 (82), 76 (100); Elemanalízis: C₁₉H₁₃N₅O Számított: C 71,73; H 4,60; N 18,04; Mért: C 71,70; H 4,61; N 18,08. ¹H NMR (CD₃OD) δ: 7,35-7,45 (m, 6H), 7,53-7,55 (m, 4H), 7,97 (t, *J*= 7,5 Hz, 1H), 8,36 (dd, *J*₁= 6,9 Hz, *J*₂= 1,5 Hz, 1H), 8,71 (dd, *J*₁= 3,9 Hz, *J*₂= 1,5 Hz, 1H) ppm.

Kinoxalin-5-karboxamid (46): 538 mg (62%) halványsárga kristályos anyag; op.: 207 °C; R_f: 0,59 (CHCl₃:Et₂O:MeOH 4:1,5:0,5). IR (ATR) 3299, 3145, 1691, 1575, 1491 cm⁻¹. Elemanalízis: C₉H₇N₃O Számított: C 62,42; H 4,07; N 24,27 Mért: C 62,50; H 4,12; N 24,31. MS (EI) m/z (%): 173 (M+1⁺ 100), 157 (48), 130 (78), 129 (64). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 7,98 (t, *J*= 7,9 Hz, 1H), 8,28 (dd, *J*₁= 8,3 Hz, *J*₂= 1,2 Hz, 1H), 8,51 (dd, *J*₁= 7,3 Hz, *J*₂= 1,2 Hz, 1H), 9,07 (dd, *J*₁= 7,9 Hz, *J*₂= 1,6 Hz, 2H) ppm.

1,6-Bisz(1-oxil-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrol-3-il)hexa-1,5-dién-3,4-dion kettősgyök (48) szintézise: (47) paramágneses aldehid (1682 mg; 10 mmol) száraz metanolos (40 ml) oldatához 2,3-butadiont (0,7 ml; 10 mmol), piperidint (1,1 ml; 11,1 mmol) és ecetsavat (0,7 ml; 12,2 mmol) adtunk. A reakcióelegyet 6 órán át refluxoltattuk nitrogén atmoszféra alatt, kevertetés mellett. A reakcióelegyet bepároltuk, oszlopkromatográfiával (Hexán/Et₂O) tisztítottuk. 965 mg, (25%), narancsvörös kristályos anyag. op.: 193-195 °C; R_f: 0,45 (Hexán/EtOAc 2:1). IR (ATR) 2974, 2932, 1769, 1717, 1678, 1605, 1584 cm⁻¹. MS (EI) m/z (%): 386 (M⁺ 7), 372 (2), 178 (11), 163 (100) 135 (29).

2,3-Bisz(2-(1-oxil-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrol-3-il)vinil)kinoxalin-5-karboxamid kettősgyök (49) szintézise: 12 aromás diamin (302 mg; 2 mmol) metanolos (15 ml) oldatához hozzáadtuk a 48 paramágneses diont (773 mg; 2 mmol). A reakcióelegyet 2 órán át refluxoltattuk. A kivált sárga kristályos anyagot üvegszűrőn szűrtük. A visszamaradt anyalúgot bepároltuk és oszlopkromatográfiával (Hexán/Et₂O) tisztítottuk. 351 mg (35%), sárga kristályos anyag. op.: 224 °C, R_f: 0,75 (CHCl₃/Et₂O/MeOH, 4:1,5:0,5). IR (ATR) 3376, 2977, 2930, 1674, 1624, 1589, 1560, 1459 cm⁻¹. MS (EI) m/z (%): 501 (M⁺ 18), 471 (14), 441 (8), 426 (10), 191 (54), 91 (100). Elemanalízis: C₂₉H₃₅N₅O₃ Számított: C 69,44; H 7,03; N 13,96 Mért: C 69,48; H 7,11; N 13,92.

***N*-(2,4,6-trimetoxibenzil)benzo[*c*][1,2,5]tiadiazol-4-szulfonamid (52) szintézise:**

2,4,6-Trimetoxi-benzilamin-hidroklorid(935 mg; 4 mmol) DMF-es (15 ml) oldatához 0 °C-on hozzáadtunk (1,7 ml, 10 mmol) DIPEA-t, majd csepegtetőtölcséren keresztül részletekben **51** szulfonsavklorid (940 mg; 4 mmol) DMF-el (12 ml) készült oldatát. A reakcióelegyet 2 órán át kevertettük 0 °C-on. Az oldószert lepároltuk, a visszamaradt anyagot kloroformban 25 ml oldottuk, NaHCO₃ oldattal (10 ml) és desztillált vízzel (10 ml) mostuk, MgSO₄-on szárítottuk. A nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottuk (CHCl₃/MeOH). 1,26 g (80%) sárga kristályos anyag. op.: 192-194 °C, R_f: 0,75 (CHCl₃/Et₂O 2:1) IR (ATR) 3321, 2923, 2851, 1658, 1596, 1129, 651 cm⁻¹. MS (EI) *m/z* (%): 395 (M⁺ 22), 196 (100), 181 (33). Elemanalízis: C₁₆H₁₇N₃O₅S₂ Számított: C 48,60; H 4,33; N 10,63; S 16,22. Mért: 48,67; H 4,29; N 10,65; S 16,18.¹H NMR (CDCl₃) δ: 3,60 (s, 9H), 4,28 (d, *J*= 6,4 Hz, 2H), 5,43 (s, 2H), 6,09 (t, *J*= 8,7 Hz, 1H), 7,59 (t, *J*= 7,1 Hz, 1H), 8,02 (d, 8,8 Hz, 1H); 8,14 (d, 7,1 Hz, 1H) ppm.

2,3-Diamino-*N*-(2,4,6-trimetoxibenzil)benzolszulfonamid (53) szintézise: 52

vegyület (1265 mg; 3,2 mmol) ecetsavas (15 ml) oldatát 50 °C-ra melegítettük, majd kevertetés mellett a 10 percen keresztül cinkport (1000 mg; 16 mmol) adagoltunk az oldathoz. A reakcióelegyet egy órán át kevertettük 50 °C-on. Az reakcióelegy lehűlése után metanollal hígítottuk, celiten szűrtük. A szerves fázishoz telített NaHCO₃ oldatot (50 ml) és EtOAc-al (3x20 ml) extraháltuk. Az egyesített szerves fázisokat MgSO₄-on szárítottuk, bepároltuk. Az így visszamaradt bomlékony, narancsvörös anyagot 680 mg (58%) izolálás nélkül vittük tovább.

2-(2,2,6,6-Tetrametil-1,2,3,6-tetrahidropiridin-4-il)-*N*-(2,4,6-trimetoxibenzil)-1H-benzo[*d*]imidazol-4-szulfonamid (55): **53** diamin (680 mg 1,9 mmol) és **54** paramáneses aldehyd (346 mg 1,9 mmol) DMF-es (10 ml) oldatát bombacsőbe töltöttük és 10 percen át deoxigenizáltuk nitrogén gáz átbuborékoltatásával. A reakcióelegyhez (435 mg 2,3 mmol) Na₂S₂O₅-ot adtunk. A reakcióelegyet a bombacső lezárása után 4 órán át melegítettük olajfürdőn 120 °C-on. A reakcióelegyet bepároltuk, a visszamaradt nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottuk. (CHCl₃/MeOH)

A termék 390 mg (40%) sárga kristályos anyag. op.: 176-177 °C, R_f : 0,21 (CHCl₃/MeOH 9:1) IR (ATR) 3310, 2880, 2836, 1650, 1599, 1499, 1309, 1129 cm⁻¹. MS (EI) m/z (%): 514 (M⁺ 18), 499 (100), 333 (7), 303 (5), 239 (31), 181 (74). Elemanalízis: C₂₆H₃₄N₄O₅S Számított: C 60,68; H 6,66; N 10,89; S 6,23 Mért: C 60,73; H 6,71; N 10,85; S 6,25.

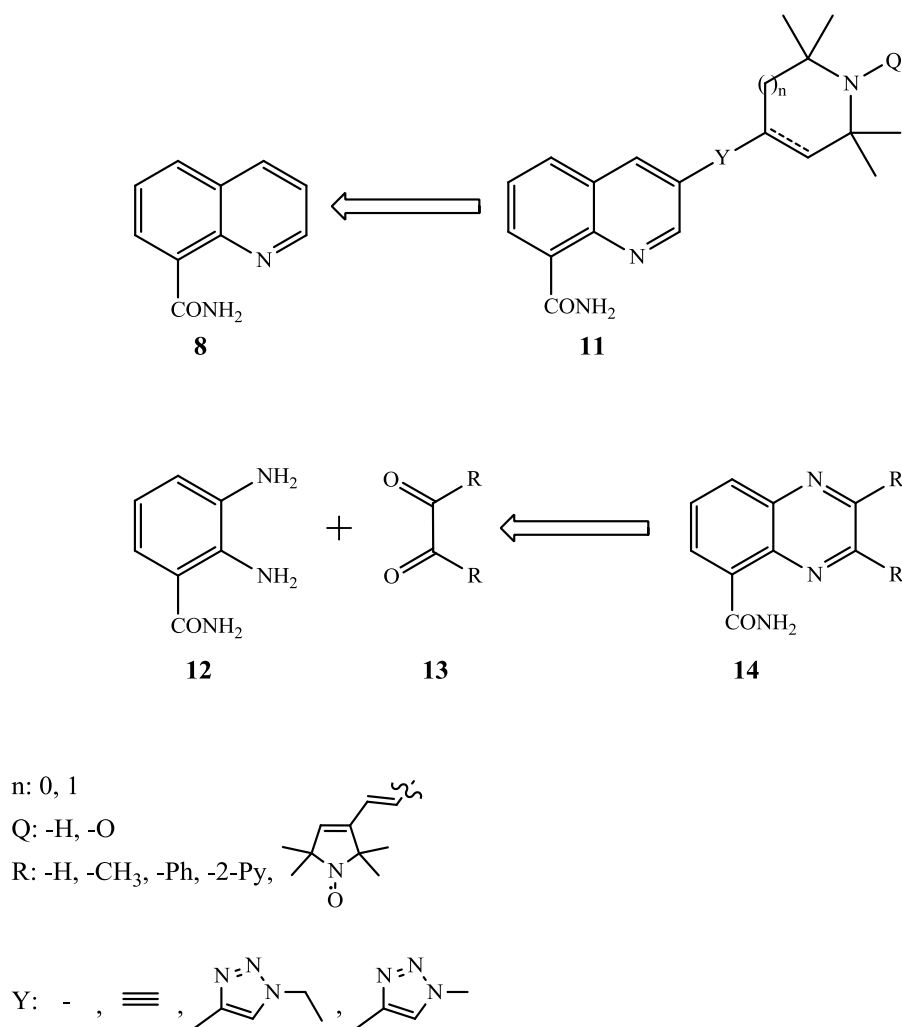
2-(2,2,6,6-Tetrametil-1,2,3,6-tetrahidropiridin-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-4-szulfonamid szintézise (16): TFAA (2,2 ml), CH₂Cl₂ és dimetil-szulfid (0,25 ml) elegyéhez egy részletben hozzáadtuk az 55 védett szulfonamidot (300 mg, 0,58 mmol). A reakcióelegyet 25 °C-on kevertettük 3 órán át. Az oldószereket lepároltuk vákuum alatt, a maradékot trietil-aminnal semlegesítettük, kloroformmal hígítottuk. A szerves fázist vízzel mossuk. A vizes fázist CHCl₃/MeOH elegyével extraháltuk. Az egyesített szerves fázisokat MgSO₄-on szárítottuk, szűrtük, bepároltuk. A nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottuk. A termék 115 mg (60%) halványsárga kristályos anyag; op.: 260 °C fölött, R_f : 0,42 (CHCl₃/MeOH 2:1) IR (ATR) 3284, 3127, 2958, 2916, 2849, 1656, 1516, 1320, 1136 cm⁻¹. MS (EI) m/z (%): 334 (M⁺ 10), 320 (21), 319 (100), 253 (24), 238 (27), 223 (48). 196 (21). Elemanalízis: C₁₆H₂₂N₄O₂S Számított: C 57,46; H 6,63; N 16,75; S 9,59 Mért: C 57,40; H 6,59; N 16,69; S 9,63. ¹H NMR (D₂O) δ : 1,50 (s, 6H), 1,60 (s, 6H), 2,81 (s, 2H), 6,89 (s, 1H), 7,48 (t, J = 8 Hz, 1H), 7,80-7,84 (m, 2H) ppm.

1-Oxil-2,2,5,5-tetrametil-N-(4-oxo-1,4-dihidrokinazolin-8-il)-2,5-dihidro-1H-pirrol-3-karboxamid gyök (59) szintézise: 57 amin (325 mg; 2 mmol) száraz DMF/CHCl₃ elegyével (25 ml) készült oldatához trietil-amint (222 mg 2,2 mmol) adtunk. Az oldathoz 40 °C-on kevertetés közben 58 paramágneses savklorid (405 mg, 2mmol) DMF-es (5 ml) oldatát csepegtettük. A reakcióelegyet 3 órán át kevertettük, bepároltuk, a maradékot kloroformban (20 ml) feloldottuk. A szerves fázist MgSO₄-on szárítottuk, szűrtük, bepároltuk. A nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottuk. (CHCl₃/Et₂O). A termék 250 mg (38%) sárga kristályos anyag; op.: 223 °C, R_f : 0,7 (CHCl₃/MeOH 9:1). IR (ATR) 3373, 3172, 3042, 1679, 1621, 1572 cm⁻¹. MS (EI) m/z (%): 296 (16), 241 (11), 214 (100), 161 (18), 111 (20). Elemanalízis: C₁₇H₁₉N₄O₃ Számított: C 62,37; H 5,85; N 17,11 Mért: C 62,28; H 5,93; N 17,16.

Általános leirat a WRL-68 sejtvonal tenyésztéséhez, H₂O₂ és MNNG indukálta sejthalállal szembeni protektív hatás vizsgálatához: A sejtvonalakat 5% CO₂ tartalmú humidifikált atmoszféra alatt 37 °C-on tenyésztették 1% antibiotikumot és 10% magzati borjú szérumot (FCS) tartalmazó DMEM médiumban 3 napig. A sejteket 96 lyukú lemezre helyezték. A kiindulási sejtszám minden lyukban $2,5 \times 10^4$ volt. A sejtek egy éjszakára 5% CO₂ tartalmú humidifikált atmoszféra alatt voltak. Másnap 0,3 mM koncentrációjú H₂O₂, vagy 0,05 μ M koncentrációjú MNNG oldattal és a vizsgált vegyületek, valamint a **19** referencia vegyület 1, 10, 100 nM és 1 μ M koncentrációjú oldatával kezeltük őket. A H₂O₂ esetében 4 óra, a MNNG esetében 24 óra elteltével a médiumot eltávolítottuk, ezt követően 0,5%-os MTT⁺ festék vizes oldatával kezeltük a mintákat. További 3 óra inkubáció után a vízben oldhatatlan kék színű formazán festéket savas izopropanol oldatban oldottuk fel. A minták abszorbanciáját 550 nm hullámhosszon mértük. Hat párhuzamos mérés eredménye került kiértékelésre.

9. Összefoglalás

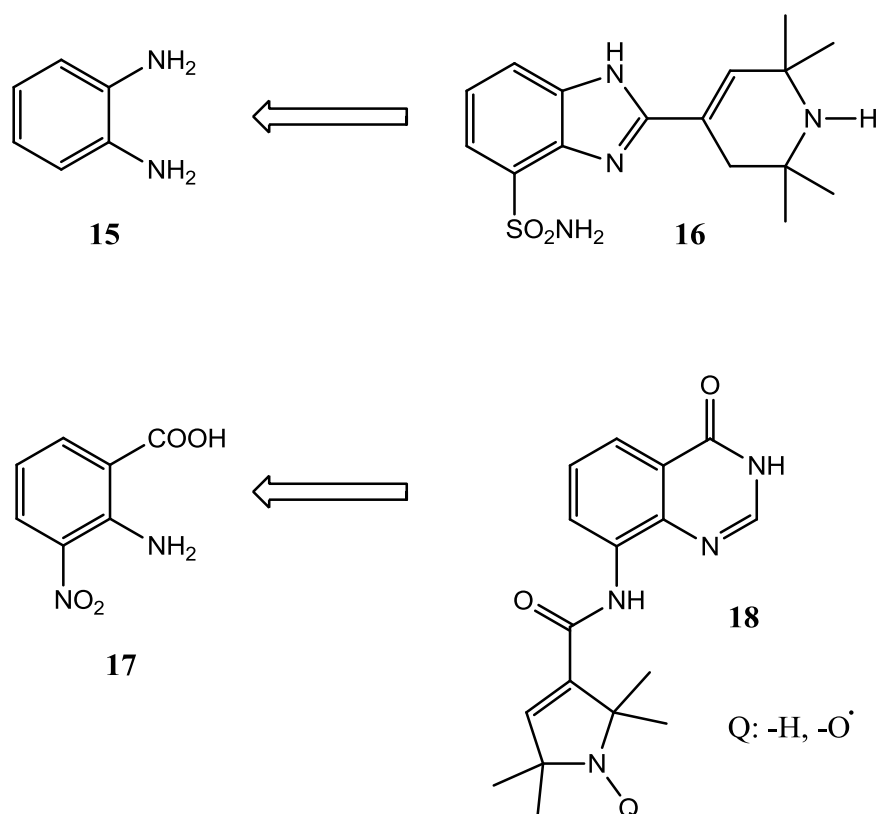
8-karbamoilkinolinból (**8**) kiindulva, Shonogashira-, Suzuki- és click-reakciókkal, 3-helyzetben öt- és hattagú-nitroxidokkal, valamint azok szekunder-amin elővegyületeivel módosított, várhatóan PARP inhibitor hatást mutató vegyületeket szintetizáltunk. 2,3-Diaminobenzamidból (**12**) kiindulva, hagyományos gyűrűzárási reakciókban állítottuk elő az 5-karbamoilkinoxalint, illetve 2,3-helyzetben metil, fenil és 2-piridil csoportokkal módosított származékait. (28. ábra)



30. ábra: A szintetikus munka eredményei

Orto-feniléndiaminból (**15**) kiindulva sikeresen állítottuk elő a már hatékonynak bizonyult **9** benzimidazol származék szulfonamid analogonját (**16**). 2-Nitro-antranilsavból (**17**) szintetizáltuk a **18** 4-kinazolinon származékokat.

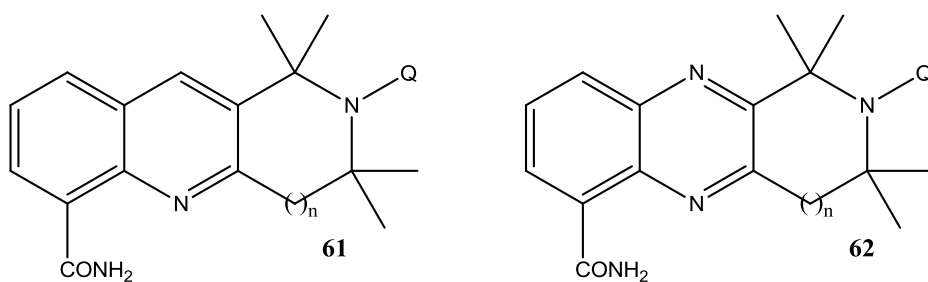
A vegyületek sejtvédő hatását 1-metil-2-nitro-1-nitrozoguanidinnel (MNNG), mint DNS metilező ágenssel szemben vizsgálták WRL-68 humán májsejt-vonalon. Valamennyi vizsgált vegyület hatékonyabbnak bizonyult, mint a **8** 8-karbamoilkinolin továbbá 1 nM koncentráció mellett egy kivételével mindegyik meghaladta a **9** 4-karbamoil-benzimidazol származék hatékonyságát. A **35** 2,3-dimetil-5-karbamoilkinoxalin 1 μ M koncentrációban alkalmazva bizonyult a leghatékonyabbnak.



31. ábra: A szintetikus munka eredményei

A dokkolás eredményei jól alátámasztották a sejtbiológiai vizsgálatok tapasztalatait. A hatékony PARP inhibitor vegyületek karbamoil funkciós csoportja a GLY 863-al alakít ki hidrogénhíd kötést, valamint heteroaromás gyűrűje a TYR 907-el π - π kölcsönhatást az enzim aktív centrumában. A logP számítások eredményei alapján a vegyületek lipofilitása nagymértékben befolyásolja azok hatékonyságát.

Ezen eredmények alapján a jövőben tervezzük öt- és hattagú gyűrűs nitroxidokkal és szekunder-amin elővegyületeikkel anellált 8-karbamoilkinolin és 5-karbamoilkinoxalin származékok szintézisét és vizsgálatát. (21. ábra)



Q: -H, -O[•]
n: 0, 1

32 ábra: Nitroxidokkal és szekunder-amin elővegyületeikkel anellált kinolin és kinoxalin vázas vegyületek

10. Irodalomjegyzék

1. Iwashita, A.; Hattori, K.; Yamamoto, H.; Ishida, J.; Kido, Y.; Kamijo, K.; Murano, K.; Miyeka, H.; Kinoshita, T.; Warizaya, M.; Ohkubo, M.; Matsuoka, M.; Mutoh, S. *FEBS Letters* **2005**, 579, 1389-1393.
2. Nguewa, P. A. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **2005**, 88, 143-172.
3. Curtin, J. Nicola; Csaba Szabo *Mol Aspects Med* **2013**, 34, 1217-1256.
4. Underhill, C.; Toulmonde, M.; Bonnefoi, H. *Annals of Oncology* **2011**, 22, 268-297.
4. Schlitzer, M. *Arch. Pharm. Chem. Life sci.* **2008**, 34, 149-163.
5. Sunderland, P. T.; Woon, E. C. Y.; Dhami, A.; Bergin, A. B.; Mahon, M. F.; Wood, P. J.; Jones, L. A.; Tully, S. R.; Lloyd, M. D.; Thompson, A. S.; Javaid, H.; Marti, N. M. B.; Threadgill M. D. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 2049-2059.
6. Lord, A.M.; Mahon MF.; Lloyd, MD.; Threadgill, MD.; *J. Med. Chem.* **2009**, 54, 868-874.
7. Bogнар, B.; Shabnam, A.; Kuppusamy, M. L.; Karuppaiyah, S.; Khan, M.; Jekő, J.; Hankovszky, O.; Kálai, T.; Kuppusamy, P.; Hideg, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 2954-2963.
8. Kálai, T.; Várbiro, G.; Bognár, Z.; Pálfi, A.; Hantó, K.; Bognár, B.; Ösz, E.; Sümegi, B.; Hideg, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 2629-2636.
9. Kalai, T.; Mugesh, G.; Roy, G.; Siels, H.; Berente, Z.; Hideg, K. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 3564-3569.
10. Kálai, T.; Balog, M.; Szabó, A.; Gulyás, G.; Jekő, J.; Sümegi, B.; Hideg, K. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 1619-1629.
11. Kulcsár, G.; Kálai, T.; Ösz, E.; Sár, C. P.; Jekő, J.; Sümegi, B.; Hideg, K. *ARKIVOC* **2003**, 5, 121-131.
12. Twomey, P.; Taira, J.; DeGraff, W.; Mitchell, J. B.; Russo, A.; Krishna, M. C.; Hankovszky, H. O.; Frank, L.; Hideg, K. *Free Rad. Biol. Med.* **1997**, 22, 909-916.
13. Krishna, M.C.; Russo, A.; Mitchel J.B.; Goldsein, S.; Hafini, H.; Samuni, A. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 26026-26031.
14. Johnson, C. G.; Caron, S.; Blough, N.V. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 867-872.

15. Kálai, T.; Balog, M.; Jekő, J.; Hideg, K. *Synthesis* **1999**, 973-980.
16. Gannett, P.M.; Darian, E.; Powell, J.H.; Johnson, E.M. *Synthetic Communications* **2001**, 31, 2137-2141.
17. Kálai, T.; Jekő, J.; Hideg, K. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 8395.
18. Hideg, K.; Hankovszky, H. O.; Tigyi, J. *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1977**, 92, 85-87.
19. Kálai, T.; Hubbell, W.L.; Hideg, K.; *Synthesis* **2009** 1336-1341.
20. Sár, P. C.; Kálai, T.; Bárász, M. N.; Jerkovich, Gy.; Hideg, K. *Synth. Comm.* **1995**, 25, 2929-2940.
21. Arienti, K.L.; Brunmark, A.; Axe, F.; McClure, K.; Lee, A.; Blevitt, J.; Neff, D.K.; Huang, L.M.; Crawford, S.; Pandit, C.R.; Karlsson, L.; Breitenbucher, J.G. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 1873-1885.
22. Ozturk, G.; Karakas, D.; Karadag, F; Ozturk, G; Yorgun, C. *J Fluorescence* **2012**, 22, 1159-1164.
23. Hideg, K; Hankovszky, H. O.; Lex, L.; Kulcsár, Gy *Synthesis* **1980**, 911-914.
24. Rosen, M. D.; Simon, Z. M.; Tarantino, K. T.; Zhao, L. X.; Robinowitz, M. H. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 1219-1221.
25. Hideg, K.; Csekő, J.; Hankovszky, H. O.; Sohár, P. *Can J. Chem.* **1986**, 1482-1490.
26. Videnov, G.; Aleksiev, B.; Stoev, M.; Paipanova, T.; Jung, G. *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, 941-945.
27. Gomtsyan, A; Bayburt, E.K.; Schmidt, R. G.; Zheng, G. Z.; Perner, R. J.; Didomenico, S.; Koenig, J. R.; Turner, S.; Jinkerson, T.; Drizin, I.; Hannick, S.M.; Macri B. S.; McDonald, H.A.; Honore, P.; Wismer, C. T.; Marsh, K. C.; Wetter, J.; Stewart, K. D.; Oie, T.; Jarvis, M. J.; Surowy, C. S.; Faltynek, C. R.; Lee, C-H. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 744-752.
28. Kulkarni, S. S.; Singh, S.; Shah, J. R.; Low, W-K.; Talele T. T. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 50, 264-273.
29. Rozantsev, E. G. *Free Nitroxyl Radicals*, Plenum press, New York, N. Y. **1970**.
30. Schrödinger Glide 6.3 User Manual

11. Köszönetmondás

Köszönetet mondok témavezetőimnek Dr. Kálai Tamás egyetemi tanárnak a kémiai tudományok doktorának és Kégl Tímea tudományos segédmunkatársnak munkám szakmai irányításáért, Dr. Hideg Kálmán egyetemi tanárnak és Pápayné Dr. Sár Cecília egyetemi docensnek munkám támogatásáért. Köszönöm Dr. Bognár Balázs adjunktus mindennapi munkámban nyújtott segítségét. Köszönet illeti a laboratórium volt és jelenlegi munkatársait, Balog Máriát, Horváthné Csokona Violát, Henglné Mernye Lillát, Kis Krisztinát, Kneif Adriennét, Fekete Tímeát, Bös Tamást a kiindulási vegyületek szintézisében nyújtott segítségükért és az elemanalízis mérésekért.

A biológiai vizsgálatokat Dr. Sümegi Balázsnak és kutatócsoportjának (PTE-ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet) köszönöm. A mágneses magrezonancia-spektroszkópiai (^1H -NMR) vizsgálatokat Dr. Gulyás Gergelynek (PTE-ÁOK Farmakognózi Tanszék), a tömegspektrometriai vizsgálatokat Dr. Jekő Józsefnek (Alkaloida Rt., Tiszavasvári) köszönöm.