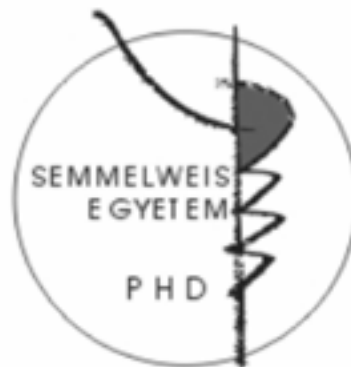


Tumorellenes hatású kinázgátló vegyületek előállítása és vizsgálata

Doktori tézisek

dr. Baska Ferenc

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



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

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

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

Budapest
2014

1. BEVEZETÉS

A daganatos megbetegedés a leggyakoribb halálokok egyike Magyarországon és a világ többi országában is. Az egyre korszerűbb szűrési- és diagnosztikai módszereknek köszönhetően bizonyos tumorok még a betegség kialakulásának korai fázisban felismerhetők, azonban gyakran a korai műtéti eltávolítás illetve kemoterápiás kezelés sem garantálja a hosszú távú teljes tünetmentességet. A kutatások során bebizonyosodott, hogy a rosszindulatú tumorok kialakulását részben a sejten belüli, illetve a sejtek közötti jeltovábbítási folyamatok abnormális működése eredményezi.

A sejtfelszíni receptorok által közvetített jelek különböző foszforilációs kaszkádok közvetítésével jutnak el a sejtmagba. A mechanizmus kulcsfontosságú enzimejei a kináz fehérjék, és az ismert onkogének egy része általában valamilyen kináz enzimet kódol. A modern gyógyszerkutatás ezért javarészt kinázgátló molekulák fejlesztésére összpontosít.

Kutatásaim kezdetén potenciális B-RAF gátló vegyületek kötődésének modellezésével és biológiai hatásprofiljának vizsgálatával foglalkoztam. Doktori munkám nagyobb részét viszont olyan molekulák szintézise képezte, melyek kinázgátló profilja eredetileg nem volt ismert az irodalomban. Az első vegyületek előállítását követően célpontként

azonosítottuk az FLT3 kinázt, és a vizsgálatok során arra is fény derült, hogy egy szelektív FLT3 inhibitor molekulacsaládot sikerült létrehozni.

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

1.1. A B-RAF kináz szerepe a tumorok kialakulásában

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

A B-RAF kináz mutáció során bekövetkező kóros aktiválódása több daganat kialakulásának a hátterében is állhat de különösen gyakori melanómák, vastagbél- és pajzsmirigy tumorok esetén. A B-RAF leginkább előforduló mutációja az ún. V600E (korábban V599E-nek is publikált) pontmutáció, mely az elsődleges szerkezetben bekövetkező glutaminsav – valin cserét jelenti a 600-as pozícióban. Mivel a mutáció előfordulása melanómák esetén közel 60%-os, a B-

RAF(V600E) gátló vegyületek fejlesztése nagy jelentőséggel bír melanómák kezelése szempontjából.

1.2. Az FLT3 kináz funkciója és leukémiákban betöltött szerepe

Az FLT3 egy tirozin kináz, mely a receptor kinázok harmadik alcsaládjába tartozik és szerkezetét tekintve a c-Kit, az FMS (más néven: CSFR) valamint PDGF receptor kinázokhoz áll közel. Az emberi szervezetben az éretlen vérsejtek expresszálják legnagyobb mértékben és az enzim rendeltetészerű működése fontos az őssejtek valamint az immunrendszer homeosztázisának fenntartásához.

A fehérje alapállapotban monomer formában van jelen a sejtmembránon, aktivációját az FLT3 ligandum (FLT3L, FL) bekötődése váltja ki normál fiziológias körülmények között. A bekövetkező konformációváltozás során a fehérje dimerizálódik és ez az intracelluláris rész foszforilációjához vezet. Az aktiválódott FLT3 kináz több jelátviteli útvonalon keresztül képes a sejttag irányába eljuttatni az információt. A két legfontosabb ilyen útvonal a PI3K/Akt és a MAPK (RAS/RAF/MEK/ERK), melyeken keresztül szabályozható a transzkripció, a transláció, a differenciálódás és az apoptózis.

Kórtani szerepét tekintve, az FLT3 kináz fokozott expressziója figyelhető meg a vérképző rendszer rosszindulatú daganataiban, és különösen gyakori (~70-100%) akut mieloid leukémiában (AML). Mutációi közül a két legjelentősebb és leggyakoribb az ún. belső tandem duplikáció (ITD: internal tandem duplication), valamint a kináz doménon bekövetkező D835 pontmutáció.

Rezisztencia és túlélés szempontjából az ITD mutációnak a legrosszabb a prognózisa, ezért nagy igény mutatkozik szelektív FLT3(ITD) gátló molekulákra.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A Vichem Chemie Kutató Kft. és a Semmelweis Egyetem Kooperációs Kutató Központ munkájába bekapcsolódva a munkám egyik fő célkitűzése B-RAF gátló vegyületek azonosítása volt, mivel a B-RAF inhibitorok fejlesztése a mai napig kiemelt területet képvisel a gyógyszerkutatásban. Céлом volt:

1. A szakirodalomban publikált B-RAF gátló molekulák kötődésének vizsgálata, majd az adatokat felhasználva a kutatócsoport által előállított vegyületek kötődési módjának meghatározása molekulamodellézés segítségével.

2. Az *in silico* eredmények validálása *in vitro* biokémiai módszerek felhasználásával.
3. A molekulák hatásának vizsgálata B-RAF kinázt expresszáló sejtvonalakon.
4. A vegyületek kötődési kinetikájának a vizsgálata.

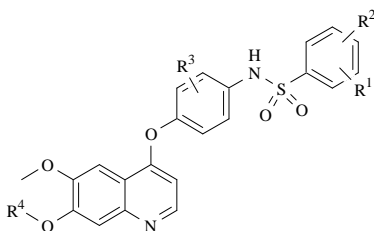
Másik fő célom szabadalmaztatható kinázgátló molekulák előállítására és szerkezet-hatás összefüggések vizsgálata volt. A CP-31398 azonosítószámú sztiril-kinazolin analógot 1999-ben publikálták, mint p53 fehérjére ható (aktiváló és expressziót fokozó) kémiai ágenszt [103]. A CP-31398 kinázgátló hatását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

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

3. MÓDSZEREK

3.1. Potenciális B-RAF gátló vegyületek vizsgálata

A Vichem Chemie Kutató Kft. és a Max Planck intézet együtt fejlesztett ki AXL kinázon ható vegyületeket, és a munka eredményeként 450 darab szulfonamid származékot szabadalmaztattak. Tekintve, hogy a szulfonamid rész a B-RAF gátló vegyületek nagy részénél is előfordul, ezért 12 vegyületet (1. ábra) kiválasztva többféle módszerrel megvizsgáltam illetve modelleztem ezen vegyületek B-RAF gátló hatását.



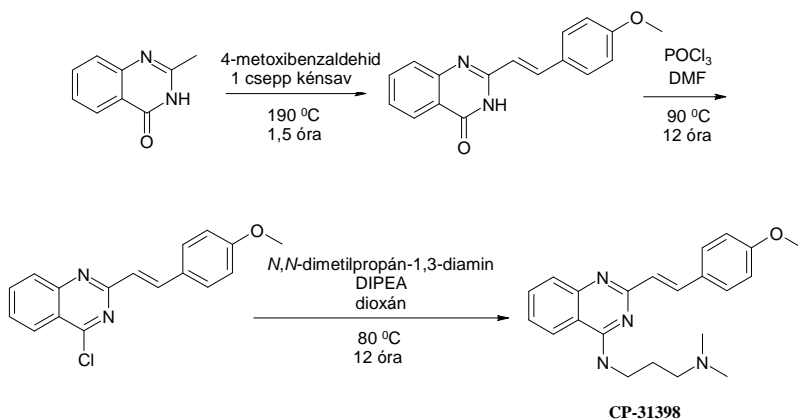
1. ábra A B-RAF gátló vegyületek általános szerkezete

Az anyagok biológiai vizsgálatát *in vitro* biokémiai módszerek, tumoros sejtvonalakon történő tesztelés és kötődéskinetika vizsgálatok felhasználásával végeztük.

3.2. Sztiril-kinazolin származékok előállítása és vizsgálata

A CP-31398 azonosítószámú referenciavegyület előállításához szükséges irodalmi adatok összegyűjtését a

Scifinder ScholarTM és a Reaxys adatbázisokat felhasználva végeztem. Bár az adott vegyület képlete 1999-ben egy Science cikkben, 2000-ben pedig egy szabadalomban is megjelent, előállítására recept a munkám kezdetéig (2007) nem volt leírva. Kizárólag biológiai hatásprofil vizsgáló cikkek voltak publikusak. Ezért irodalmi analógiák alapján eljárást dolgoztam ki a vegyület előállítására (2. ábra).



2. ábra A CP-31398 referenciavegyületre kidolgozott szintézis.

A szubsztituált sztiril-kinazolin analógokat a validációs vegyületre kidolgozott szintézis alapján állítottam elő.

Az anyagok biológiai hatását kinázpanel, *in vitro* biokémiai módszerek, tumoros sejtvonalakon történő tesztelés, áramlási citometria (FACS) valamint permeabilitás mérések felhasználásával vizsgáltuk.

4. EREDMÉNYEK

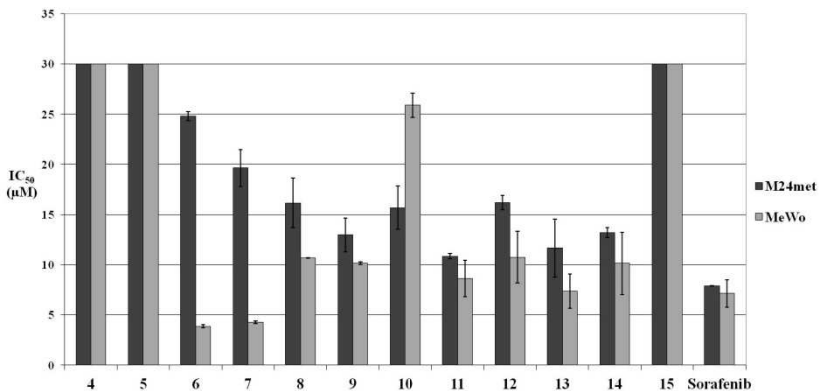
4.1. Potenciális B-RAF gátló vegyületek vizsgálata

A B-RAF gátló vegyületek kötődését első körben molekulamodellező módszerekkel vizsgáltuk.

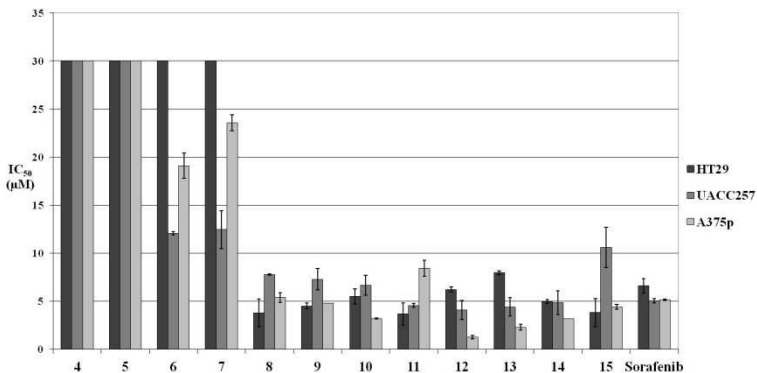
A molekulák dokkolása során kimutathatóak voltak az irodalmi B-RAF gátlókra jellemző kölcsönhatások: hidrogénhid kötések az ATP kötőhely ún. *hinge* régiójával, valamint a DFG motívummal, és a hidrofób kölcsönhatások az ATP kötőhely aminosavjaival.

A biokémiai vizsgálatokhoz sorafenib-et használtunk referenciaként. A beállított esszében a sorafenib 0,11 μM -os IC_{50} értékkel gátolta a vad típusú és 0,07 μM -os értékkel a mutáns B-RAF(V600E) kinázt. A kutatócsoportunk által előállított vegyületek közül öt molekula esetén nanomólos IC_{50} értékeket mértünk ($\text{IC}_{50} < 0,68 \mu\text{M}$), hat származék nem mutatott kiemelkedő hatást ($\text{IC}_{50} = 1\text{-}20 \mu\text{M}$) és egy vegyület teljesen hatástalannak ($\text{IC}_{50} > 23 \mu\text{M}$) bizonyult.

Az anyagok hatását vizsgáltuk vad típusú B-RAF és mutáns B-RAF(V600E) fehérjét expresszáló tumorsejtovonalakon (3. és 4. ábra) is.



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



4. ábra IC₅₀ mérések V600E mutációt tartalmazó sejtvonalakon.

A vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy a vad típusú B-RAF kinázt expresszázó sejtvonalakon (MeWo, M24met) az anyagok kevésbé vagy egyáltalán nem hatottak, míg a V600E mutációt tartalmazókon (HT29, A375p, UACC257) jó hatás mutatkozott. Ez azért érdekes, mert az enzimátikus vizsgálatok kimutatták, hogy a hatékony vegyületek közel azonos mértékben hatnak a vad típusú- és a mutáns fehérjén.

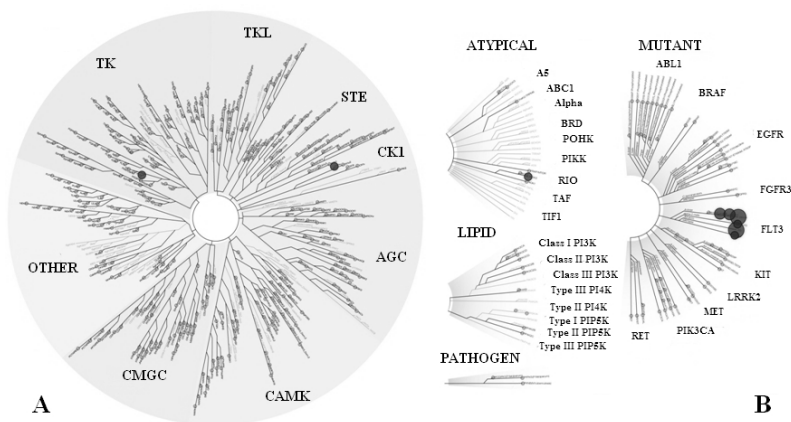
A különböző hatás oka egy ismert jelenség a vad típusú B-RAF enzimet expresszázó sejteknél (például a vemurafenib esetén is), melyet a szakirodalom több közleményben is tárgyal. A biológiai tesztek (siRNS és *western blot*) során megállapították, hogy ez a fokozott aktiváció a RAF kináz másik két típusának, az A- és C-RAF kináznak köszönhető.

A vegyületekkel kötődéskinetika vizsgálatokat végeztünk, melyek alapján megállapítottuk, hogy a vegyületek gyors kötődési kinetikával rendelkeznek. A dokkolás eredményeire valamint az irodalmi hasonlóságokra alapozva végül a I ½-es típusú kinázgátlók közé soroltuk be a vegyületeinket.

4.2. Sztiril-kinazolin származékok előállítása és vizsgálata

Az általam kidolgozott szintézissel előállítottam a kívánt referenciaanyagot valamint további 122 db sztiril-kinazolin és 2 db sztiril-pirimidin származékot.

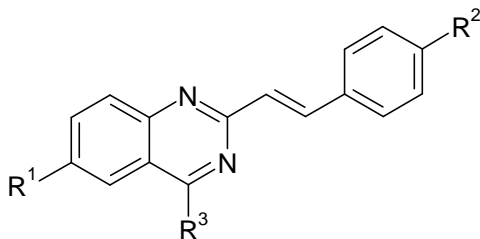
A DiscoverX cég által végzett kináz szelektivitás vizsgálatok alapján célpontként az FLT3 kinázt (5. ábra) azonosítottuk. Mutáns FLT3 kinázok esetén a kötődés >90% 5 μ M-os vegyületkoncentráció mellett. Kisebb mértékben ugyan kötődött a CSNK1A1 (77%), GAK (65%) és RIOK1 (63%) fehérjékhez, azonban 5 μ M-os koncentrációnál ez már nem mondható jelentősnek.



5. ábra A szelektivitás bemutatása kinázfán. Az A ábrán a célpont fehérjék láthatók, míg a B ábrán már a kötődés százalékos értéke szerint jelöltem a fehérjéket.

Az előállított vegyületeket egy pontban teszteltük 10 μ M-os koncentrációban. A célunk ezzel az volt, hogy kiszűrjük a hatástalan molekulákat és csak a legjobb vegyületek

kerüljenek az időigényesebb és precízebb IC₅₀ mérésekbe. A legjobb FLT3(ITD) gátló vegyületeink IC₅₀ értékét az 1. táblázat szemlélteti.



ID	R ¹	R ²	R ³	FLT3(ITD) gátlás 10 μM-ban (%)	FLT3(ITD) IC ₅₀ (μM)
106	H	4-F	<i>N,N</i> -dimetiletán-1,2-diamin	86,1	0,76
116	H	4-Metilsulfánil	<i>N,N</i> -dimetiletán-1,2-diamin	92,3	0,55
123	H	4-Izopropil	<i>N,N</i> -dimetiletán-1,2-diamin	99,8	0,2
124	H	4-Izopropil	<i>N,N</i> -dietiletán-1,2-diamin	95,4	0,65
126	H	4-Metilsulfónil	<i>N,N</i> -dimetiletán-1,2-diamin	96,1	0,33
134	Cl	4-F	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	79,2	0,91
147	Cl	4-Metilsulfánil	<i>N,N</i> -dimetiletán-1,2-diamin	82,1	0,61
151	Cl	4-Izopropil	<i>N,N</i> -dimetiletán-1,2-diamin	89,9	0,41
153	Cl	4-Metilsulfónil	<i>N,N</i> -dimetilpropán-1,3-diamin	94,4	0,87
155	Cl	4-Metilsulfónil	<i>N,N</i> -dimetiletán-1,2-diamin	91,0	0,24
156	Cl	4-Metilsulfónil	<i>N,N</i> -dietiletán-1,2-diamin	92,1	0,44
181	F	4-Izopropil	<i>N,N</i> -dimetiletán-1,2-diamin	100,0	0,58
182	F	4-Izopropil	<i>N,N</i> -dietiletán-1,2-diamin	100,0	0,87

1. táblázat A legjobb FLT3(ITD) gátló vegyületek biológiai hatása.

Megvizsgáltuk az anyagok hatását az MV4-11 akut mieloid leukémia sejtvonalon. Az MV4-11-en való vizsgálat azért fontos, mert ennél a sejtvonalnál korábban kimutatták az

FLT3(ITD) mutációját és a fehérje fokozott expresszióját. Az FLT3 kinázon ható molekulák nagy része jelentős tumorelles hatást mutatott a sejtvonalon ($IC_{50} < 1 \mu M$), ami korrelációban áll a biokémiai vizsgálatokkal.

Mivel az irodalomban publikált CP-31398 vezérmolekula hatást fejt ki a p53 fehérjén, logikusnak tűnt, hogy néhány anyag esetén megvizsgáljuk olyan sejtvonalakon (A431, HCT116, HT29, MCF7) a hatást, melyek bizonyítottan p53 mutációt tartalmaznak és emiatt az egyik legfontosabb tumor szupresszor fehérje nem képes betölteni eredeti funkcióját. Ezekben a sejteken lényegesen gyengébbnek mértük a vegyületek hatását ($IC_{50} \gg 1 \mu M$), mint az FLT3 kinázt expresszáló MV4-11 sejteken.

Áramlási citométerrel vizsgáltuk, hogy a sejtek pusztulása milyen folyamat (apoptózis, nekrozis) következtében jön létre. A kapott eredmények alapján megállapítottuk, hogy a sejtek apoptózissal pusztulnak el, mivel a kezeletlen kontrollhoz képest az apoptózis százalékos aránya nőtt meg jelentős mértékben. Minimális (7-10%) nekrozist is megfigyeltünk, azonban ez a kezeletlen kontroll esetén is kimérhető volt.

A permeabilitási vizsgálatok (PAMPA) alapján elmondhatjuk, hogy a vegyületek jó penetrációs készséggel

bírnak és a passzív transzportal történő átjutásuk a membránon nem akadályozott.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

5.1. Potenciális B-RAF gátló vegyületek vizsgálata

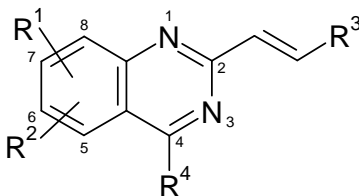
Molekulamodellözés felhasználásával feltérképeztem 12 db szulfonamid származék lehetséges kötődési pontjait és kötődési affinitását B-RAF kinázon. A modellezés során kapott eredményeket biokémiai esszérendszer segítségével validáltuk és öt alacsony gátlóértékkel ($IC_{50} < 0,68 \mu M$) bíró molekulát azonosítottunk. A vegyületeket B-RAF kinázt expresszáló sejtvonalakon teszteltük és megállapítottuk, hogy a legjobb anyagok a sorafenibbel azonos mértékben gátolták a mutáns B-RAF(V600E) tumorsejtvonalak növekedését.

Kötődés kinetikai vizsgálat segítségével meghatároztuk a vegyületek kötődés kinetikai profilját és besoroltuk őket a I $\frac{1}{2}$ -es kinázgátlók közé.

5.2. Sztiril-kinazolin származékok előállítása és vizsgálata

Az *in vitro* biokémiai eredményeket (százalékos enzimgátlás és IC_{50}) felhasználva az alábbi következtetéseket

vontuk le szerkezet-hatás összefüggés szempontjából (6. ábra):



6. ábra

- A kinazolin gyűrű mindenképp kell az FLT3 gátló hatáshoz, a pirimidinek hatástalanok.
- A kinazolin fenil gyűrűje szubsztituens nélkül vagy egyszeresen szubsztituált formában preferált, a többszörösen szubsztituált termékek már hatástalanok.
- Halogénatom beépítése a 6-os pozíciójába a hatást érdemben nem befolyásolja, bár a fluor tartalmú származékok valamivel rosszabbak, mint a brómot vagy klórt tartalmazó molekulák.
- A 7-es vagy 8-as pozícióban szubsztituált termékek hatástalanok.
- A benzo[g]kinazolin alapú molekulák benzaldehiddel kondenzált származékai hatástalanok, tehát a triciklusos struktúra beépítése sem előnyös.

- Az R^3 csoport lehet szubsztituált fenil- vagy tiofén gyűrű is. A szubsztituálatlan kinazolin vegyületeknél a fenil gyűrű esetén jobb a hatás, viszont a triciklusos, a 6-os helyzetben brómot vagy klórt tartalmazó származékoknál a tiofén gyűrűvel rendelkező molekulák is hatásosak.
- Az R^3 csoport esetén a monoszubsztituált aromás gyűrű esetén mérhető a legerősebb a hatás, a 3,4-diszubsztituált fenil csoportot tartalmazó származékoknál drasztikusan csökken, a 3,4,5-triszubsztituáltak esetén pedig teljesen megszűnik.
- Az R^3 fenil gyűrűn para helyzetben funkciós csoportot vagy halogénatomot tartalmazó vegyületek hatása a legjobb, meta pozícióban lévő szubsztituens esetén a hatás nagymértékben csökken. Legelőnyösebb szubsztituensek para helyzetben az izopropil, a metilszulfanil- és a metilszulfonil funkciós csoportok.
- Az R^4 csoport a hatást és az oldhatóságot döntően befolyásoló terciér aminocsoportot tartalmazó oldallánc. A hatás szempontjából a rövidebb (*N,N*-dimetiletán-1,2-diamin, *N,N*-dimetilpropán-1,3-diamin) az előnyös. A hosszabb (*N,N*-diethylpropán-1,3-diamin, *N',N'*-diethylpentán-1,4-diamin), vagy nagyobb térkitöltésű csoportot

(morfolin, *N*-metilpiperazin, pirrolidin) tartalmazó oldalláncoknál a hatás lecsökken illetve megszűnik.

- A sztiril-kinazolin alapváz és az oldallánc megléte esszenciális a hatáshoz. Vizsgáltuk az oldallánc nélküli sztiril-kinazonokat, illetve készült pár olyan származék is, ahol katalitikus hidrogénezéssel kiredukáltam a kettős kötést. Ezek az anyagok teljesen hatástalanok voltak FLT3 kinázon.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertáció témájában megjelent közlemények:

Baska F, Szabadkai I, Sipos A, Breza N, Szántai-Kis Cs, Kékesi L, Garamvölgyi R, Nemes Z, Baska F, Neumann L, Torka R, Ullrich A, Kéri Gy, Örfi L. (2014) Pharmacophore and Binding Analysis of Known and Novel B-RAF Kinase Inhibitors. *Curr Med Chem*, 21: 1938-1965. (IF: 4,070)

Szokol B, Gyulavári P, Kurkó I, **Baska F**, Szántai-Kis Cs, Greff Z, Örfi Z, Petak I, Ullrich A, Örfi L, Vántus T, Kéri Gy. (2014) Discovery and biological evaluation of novel dual EGFR/c-Met inhibitors. *ACS Med Chem Lett*, 5: 298-303. (IF: 3,311)

Szokol B, Gyulavári P, **Baska F**, Kurkó I, Greff Z, Szántai-Kis Cs, Örfi Z, Peták I, Ullrich A, Vántus T, Kéri Gy, Örfi L. (2013) EGFR/c-Met kettősgátlók fejlesztése es biokémiai vizsgálata. Acta Pharm Hung, 83: 121-133.

Baska F, Székely ER, Szántai-Kis Cs, Bánhegyi P, Hegyemi-Barakonyi B, Németh G, Breza N, Zsákai L, Greff Z, Pató J, Kéri Gy, Örfi L. (2013) *Mycobacterium tuberculosis* ellenes hatóanyagok fejlesztése és szerkezet-hatás összefüggéseinek vizsgálata. Acta Pharm Hung, 83: 88-95.

A disszertáció témájában benyújtott szabadalom:

Baska F, Örfi L, Kéri Gy, Bánhegyi P, Kékesi L, Zsákai L. (2013) Styryl quinazoline derivatives as pharmaceutically active agents. Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala, Ügyiratszám: P1300477/1. Benyújtás dátuma: 2013. augusztus 9.

A PCT szabadalmi bejelentés 2014. augusztus 9-ig kerül benyújtásra.