

Új, melanóma elleni hatóanyagok tervezése, szintézise és vizsgálata

Doktori tézisek

Dr. Garamvölgyi Rita

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Hrabák András, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Dibó Gábor, C.Sc., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Szökő Éva, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Dombi György, D.Sc., egyetemi tanár
Dr. Krajsovsky Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2016

1. BEVEZETÉS

A rák olyan betegségek gyűjtőfogalma, melyek közös tulajdonsága az abnormális sejtosztódás, a sejtek szomszédos szövetekbe és a test távolabbi részeibe történő terjedése. A tumorok kialakulása során külső és/vagy belső hatásokra olyan mutációk jönnek létre a szervezetben, melyek a sejtciklus szabályozásában résztvevő molekulák funkcióját befolyásolják, és a sejtosztódás szabályozásának felborításával kontrollálatlan sejtproliferációhoz vezetnek.

A tumoros megbetegedések napjaink vezető halálakai között vannak Magyarországon éppúgy, mint a világ fejlett és fejlődő országaiban általában. A rák előfordulása világszerte növekvő tendenciát mutat, melynek háttérében a világ népességének növekedése és elöregedése, illetve az olyan ismert kockázati tényezők elterjedése áll, mint a dohányzás, a túlsúly és a fizikai aktivitás hiánya. Kiemelkedő fontosságú a betegség háttérében zajló sejtbioológiai folyamatok és a külső/belső kockázati tényezők megismerése, hogy ezáltal hatékonyabban előzhessük meg a betegség kialakulását és olyan új gyógyszereket tervezhessünk, melyek megakadályozzák a daganatok növekedését és terjedését.

1.1. A melanóma

A melanóma a hámréteg pigmenttermelő sejtjeiből, a melanocitákból kiinduló rosszindulatú daganatos megbetegedés. A melanociták a bőr felső rétegének bazális felszínén helyezkednek el, és fő feladatuk az ultraibolya sugárzással szembeni védekezés. Az UV sugárzás elősegíti a bőrben a rosszindulatú elváltozások létrejöttét azáltal, hogy serkenti a növekedési hormonok termelődését, csökkenti a bőr védelmében szerepet játszó immunválaszokat és hatására DNS-károsító reaktív oxigéngyökök jönnek létre. A reaktív oxigéngyökök anti-apoptotikus hatása révén az érintett melanocita nem pusztul el, így további DNS károsodásnak van kitéve, mely végül malignus transzformációhoz vezethet.

A melanóma kialakulását genetikai és környezeti faktorok együttesen határozzák meg. Az UV sugárzás a legismertebb környezeti faktor, mely szerepet játszik a betegség kialakulásában. A melanómára való hajlamot befolyásoló legfontosabb egyéni tényezők többek között a fenotípus, a nagyszámú benignus, atipusos anyajegy jelenléte, melanóma előfordulása a családban, korábbi melanómás megbetegedés, immunszuppresszió, illetve a szoláriumhasználat.

A melanóma incidenciája világszerte emelkedik, évente közel 200 000 új esetet diagnosztizálnak.

1.2. Terápiás lehetőségek

A betegek életkilátásait döntően befolyásolja, hogy a diagnózis felállításakor mennyire előrehaladott a betegség. A lokális melanóma megbetegedések esetén 98,3% az ötéves túlélési arány, ám ez jelentősen csökken regionális (62,4%) és távoli áttétes (16,0%) betegek esetében.

Az 1970-es évek közepéig a sebészi beavatkozás nyújtotta az egyetlen terápiás lehetőséget a melanómás betegek kezelésére. A dakarbazin (1975) és a magas dózisú interleukin-2 (1998) kezelés engedélyezésével lehetővé vált az előrehaladott melanóma szisztémás kezelése, azonban csak a betegek kevesebb, mint 20%-ánál van mérhető terápiás válasz.

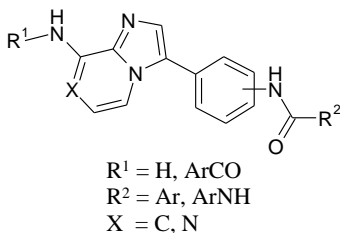
A melanóma patomechanizmusának kutatása és megismerése célzott terápia kifejlesztését tette lehetővé. A MAPK (Ras-Raf-MEK-ERK) jelátviteli útvonal kiemelt célpont a célzott hatóanyagok tervezésében, mivel ez a leggyakrabban érintett útvonal melanómában. A vemurafenib (PLX4032) 2011-es engedélyezése és bevezetése mérföldkőnek számít a melanóma terápiájában, mivel ez az első olyan célzott

hatóanyag, amely szelektíven gátolja a mutáns B-Raf fehérje működését. 2013-ban egy újabb mutáns B-Raf-gátló hatóanyag, a dabrafenib (GSK2118436) kapott forgalomba hozatali engedélyt. A 2013-ban bevezetésre került trametinib (GSK1120212) az első szelektív, allosztérikus MEK kinázgátló, melyet a metasztázisos melanómával rendelkező betegek kezelésére alkalmaznak.

Az immunterápia fejlődése újabb lehetőséget teremtett a célzott hatóanyagok mellett az előrehaladott melanóma kezelésében. A CTLA-4 és PD-1 elleni antitestek (ipilimumab, pembrolizumab, nivolumab) az immunrendszer T-sejtjeinek aktiválása révén képesek fokozni a tumorelles immunválaszt.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatási munkám során imidazo[1,2-*a*]piridin- és imidazo[1,2-*a*]pirazin-vázás diarilamid vagy diarilkarbamid molekularészt tartalmazó vegyületek előállítását tűztem ki célul (**1. ábra**). Az irodalomban leírt rokon vegyületek relatíve kis száma indokoltá tette a vegyületcsalád tanulmányozását, különös tekintettel a tumorgátló hatékonyság vizsgálatára.



1. ábra. Az előállított imidazo[1,2-*a*]piridin és imidazo[1,2-*a*]pirazin származékok általános szerkezete.

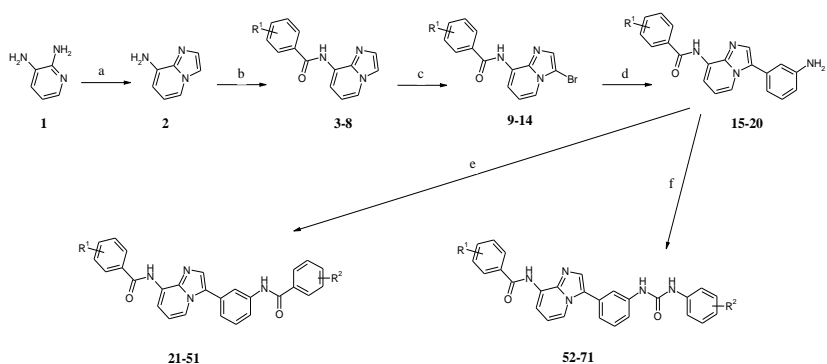
Céloom volt:

- a tervezett származékok előállításához megfelelő reakcióutak kidolgozása,
- az elkészült vegyületek analitikai karakterizálása,
- egy irodalmi példa előállítása a biológiai hatékonyság összehasonlítása céljából,
- az elkészült vegyületek proliferációgátló képességének meghatározása *BRAF* mutáns A375P melanóma sejtvonalon,
- a szerkezet-hatás összefüggések felderítése a melanóma sejteken mért tumorgátló hatás alapján,
- a vegyületek kinázgátló hatékonyságának meghatározása B-Raf(wt) és B-Raf(V600E) kinázokon,
- néhány kiválasztott vegyület antiproliferatív hatásának meghatározása tüdőkarcinóma és kolorektális karcinóma sejtpanelen.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

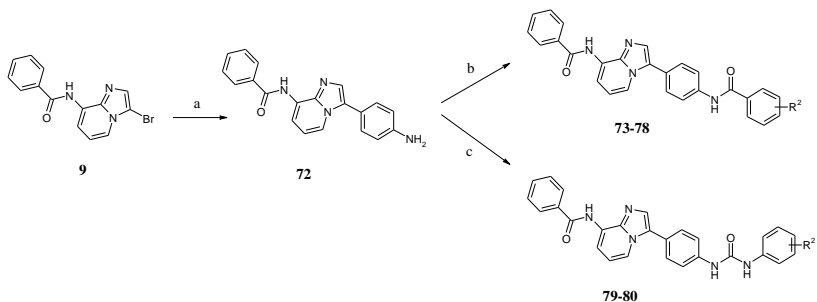
3.1. A vegyületek szintézise

Az *meta* szubsztituált imidazo[1,2-*a*]piridin származékok előállítására kidolgozott szintézisutat a **2. ábra** szemlélteti.



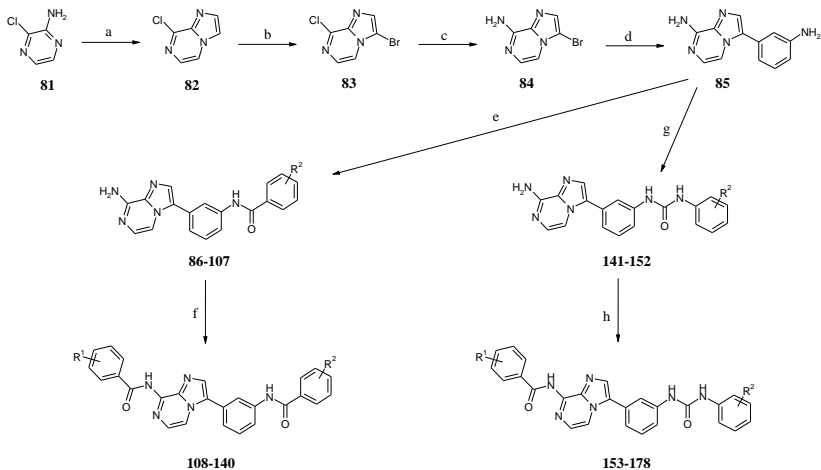
2. ábra. A *meta* szubsztituált imidazo[1,2-*a*]piridin származékok előállítása. Reagensek és reakciókörülmények: (a) 50%-os vizes klóracetaldehid oldat, EtOH, forralás, 3,5 óra, 58%; (b) benzooesav, EDCI, piridin, 40 °C, 4 óra, 36-86%; (c) *N*-brómszukcinimid, CH₂Cl₂, 25 °C, 30 perc, 69-94%; (d) (3-aminofenil)boronsav, Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, 1,4-dioxán, H₂O, mikrohullámú reaktor, 140 °C, 1,5 óra, 27-69%; (e) benzooesav származék, EDCI, piridin, 70 °C, 2 óra, 52-84%; (f) aril-izocianát származék, vízmentes piridin, 25 °C, 2 óra, 56-90%.

A *para* szubsztituált imidazo[1,2-*a*]piridin származékok előállítását a **3. ábra** mutatja.



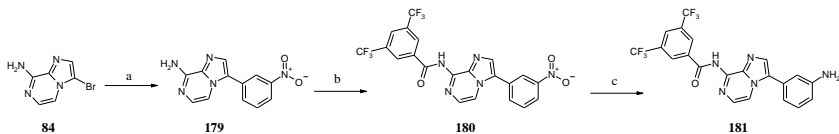
3. ábra. Az *para* szubsztituált imidazo[1,2-*a*]piridin származékok előállítása. Reagensok és reakciókörülmények: (a) 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolán-2-il)anilin, Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, 1,4-dioxán, H₂O, mikrohullámú reaktor, 140 °C, 2 óra, 36%; (b) benzoészav származék, EDCI, piridin, 70 °C, 2 óra, 45-73%; (c) aril-izocianát származék, vízmentes piridin, 25 °C, 2 óra, 40-58%.

Az imidazo[1,2-*a*]pirazin származékok előállítása az imidazo[1,2-*a*]piridineknél ismertetett reakcióssal analóg módon nem vezetett eredményre, így ezeket a vegyületeket a **4. ábra** alapján állítottam elő.



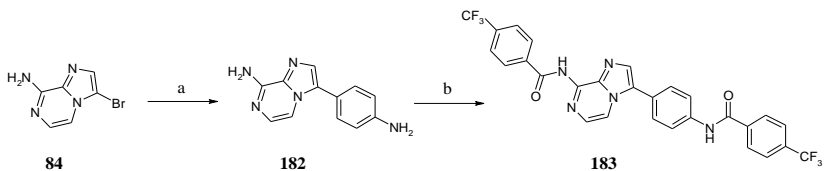
4. ábra. Az imidazo[1,2-*a*]pirazin származékok előállítása. Reagensok és reakciókörülmények: (a) 2-bróm-1,1-dietoxietán, 48%-os vizes hidrogénbromid oldat, forralás, 1,5 óra, NaHCO₃/IPA, majd **81**, forralás, 3 óra, 73%; (b) *N*-brómszukcinimid, CH₂Cl₂, 25 °C, 3 óra, 93%; (c) 25%-os vizes NH₄OH oldat, IPA, mikrohullámú reaktor, 120 °C, 3 óra, 85%; (d) (3-aminofenil)boronsav, Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, 1,4-dioxán, H₂O, mikrohullámú reaktor, 140 °C, 1,5 óra, 75%; (e) benzoészav származék, EDCI, piridin, 40 °C, egy éjszaka, 35-70%; (f) benzoészav származék, EDCI, piridin, 70 °C, 6 óra, 11-81%; (g) aril-izocianát származék, vízmentes piridin, 25 °C, 2 óra, 20-69%; (h) benzoészav származék, EDCI, piridin, 70 °C, 6 óra, 10-64%.

A **181** vegyület előállítása az előbbieken ismertetett módon nem volt kivitelezhető, így arra külön reakcióutat dolgoztam ki (**5. ábra**).



5. ábra. *N*-[3-(3-aminofenil)imidazo[1,2-*a*]pirazin-8-il]-3,5-bisz(trifluormetil)-benzamid (**181**) előállítása. Reagensek és reakciókörülmények: (a) (3-nitrofenil)boronsav, Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, 1,4-dioxán, H₂O, mikrohullámú reaktor, 140 °C, 1,5 óra, 57%; (b) 3,5-bisz(trifluormetil)benzoesav, EDCI, piridin, 70 °C, 2 óra, 36%; (c) H-Cube[®], oszlop: 10% Pd/C, eluens: etanol/etil-acetát, 25 °C, 12%.

Az irodalomban ismert imidazo[1,2-*a*]pirazin származék (**183**, **6. ábra**) a tervezett vegyületek legközelebbi szerkezeti analógjának tekinthető, így fontos volt ennek előállítása a biológiai hatékonyság összehasonlítása céljából.



6. ábra. Az irodalomban ismert imidazo[1,2-*a*]pirazin származék (**183**) előállítása. Reagensek és reakciókörülmények: (a) 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolán-2-il)anilin, Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, 1,4-dioxán, H₂O, mikrohullámú reaktor, 140 °C, 1,5 óra, 72%; (b) 4-(trifluormetil)benzoesav, EDCI, piridin, 70 °C, 4 óra, 75%.

3.2. A vegyületek vizsgálata

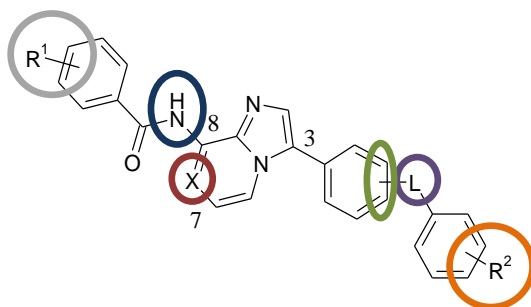
Az elkészült vegyületeink *in vitro* tumorgátló hatékonyságát a *BRAF(V600E)* mutáns A375P humán rosszindulatú melanóma sejtvonalon vizsgáltuk. Referenciaanyagok alkalmazásával (sorafenib, vemurafenib) minden esetben validáltuk az elvégzett mérések megbízhatóságát.

Az Európai Unió által támogatott PRIMES és Lungtarget pályázatok révén lehetőségünk volt néhány kiválasztott vegyület hatását megvizsgálni különböző tüdőkarcinóma és kolorektális karcinóma sejtvonalakon. Ezen mérésekkel arra kerestük a választ, hogy a vegyületek melanóma sejtvonalon mért potens antiproliferatív hatása különböző eredetű, illetve más genetikai háttérrel rendelkező sejtvonalak esetében is manifesztálódik-e. A leghatékonyabb vegyületek esetében további vizsgálatokat végeztünk annak érdekében, hogy felderítsük azok hatásmechanizmusát. Mivel az A375P sejtvonala esetében a kóros sejtproliferáció hátterében a *BRAF* gén mutációja áll, kézenfekvő volt megvizsgálni a vegyületeink enzimgátló képességét a vad típusú és a V600E mutáns B-Raf fehérjén. Referenciaanyagként az ismert B-Raf-gátló vemurafenibet alkalmaztuk.

4. EREDMÉNYEK

A megfelelő reakcióutak kidolgozásával 5-6 szintetikus lépésben sikerült előállítanom a tervezett vegyületeket a forgalomban kapható kiindulási anyagokból. Egy irodalomban ismert referenciaanyag mellett 59 db imidazo[1,2-*a*]piridin és 94 db imidazo[1,2-*a*]pirazin származékot állítottam elő.

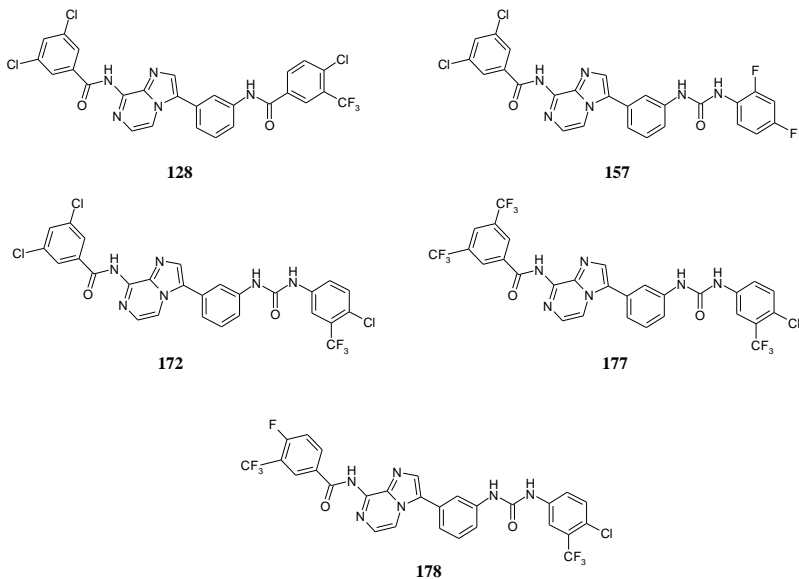
A vegyületek *in vitro* proliferációgátló hatását az A375P humán rosszindulatú melanóma sejtvonalon vizsgáltuk. Az alábbi ábra azt szemlélteti, hogy milyen változtatásokat végeztem annak érdekében, hogy felderítsem a vegyületcsalád szerkezet-hatás összefüggéseit.



7. **ábra.** Az előállított vegyületek általános szerkezete.

A vizsgált változtatások a következők voltak (**7. ábrán** balról jobbra haladva):

- a benzoilcsoport szubsztituense(i) (R^1),
- a központi vázhoz 8-as helyzetben kapcsolódó aminocsoport szubsztitúciója,
- a központi váz 7-es pozíciójában szén vagy nitrogén található,
- a központi vázhoz 3-as helyzetben kapcsolódó benzolgyűrű *meta* vagy *para* helyzetben szubsztituált,
- a linker (L) csoport (amid vagy karbamid),
- a linkerhez kapcsolódó benzolgyűrű szubsztituense(i) (R^2).



8. ábra. A kutatás során előállított leghatékonyabb vegyületek (**128**, **157**, **172**, **177**, **178**) szerkezete.

Az elvégzett kémiai változtatásokkal sikerült felderíteni, hogy mely szerkezeti elemeknek van kiemelkedő szerepe a hatás kialakításában. Az elkészült származékok közül a **128**, **157**, **172**, **177** és **178** vegyületek mutatták a legerősebb proliferációgátló hatást 0,06 μM alatti IC_{50} értékkel (**8. ábra**).

A melanóma kialakulásának hátterében igen gyakran a B-Raf fehérje kóros működése áll, ezért meghatároztuk a leghatékonyabb vegyületek kinázgátló képességét B-Raf(wt) és B-Raf(V600E) fehérjéken (**1. táblázat**).

1. táblázat. A kiválasztott vegyületek antiproliferatív hatása az A375P melanóma sejtvonalon és enzimgátló hatása a B-Raf(wt) és B-Raf(V600E) kinázokon.

| No. | IC ₅₀ (μM) | | |
|-------------|-----------------------|-----------|--------------|
| | A375P | B-Raf(wt) | B-Raf(V600E) |
| 128 | 0,04 | >12,5 | >12,5 |
| 157 | 0,06 | >12,5 | >12,5 |
| 172 | 0,03 | >12,5 | >12,5 |
| 177 | 0,01 | >12,5 | >12,5 |
| 178 | 0,06 | >12,5 | 5,01 |
| vemurafenib | 0,37 | 1,14 | 0,28 |

Lehetőségünk nyílt arra, hogy a legígéretesebb vegyületeket különböző tüdő (A549, H358, PC9, PC9-ER) és vastagbél tumor sejtvonalakon (HCT116, HKE3) is megvizsgáljuk. Az eredményeinket a **2. táblázat** foglalja össze.

2. táblázat. A kiválasztott vegyületek antiproliferatív hatása tüdőkarinóma és kolorektális karinóma sejtvonalakon.

| No. | IC ₅₀ (μM) | | | | | |
|------------|-----------------------|------|-------|--------|---------|-------|
| | A549 | H358 | PC9 | PC9-ER | HCT 116 | HKE3 |
| 128 | 3,23 | 4,21 | 3,61 | 3,63 | 1,81 | 0,83 |
| 157 | 2,61 | 4,17 | 2,77 | 2,56 | 0,88 | 0,62 |
| 172 | 8,44 | 8,58 | 11,58 | 8,01 | 9,51 | 10,02 |
| 177 | 10,43 | 7,55 | 11,57 | 14,62 | 5,31 | 6,35 |

5. KÖVETKEZTETÉSEK

Az előállított vegyületek A375P humán melanóma sejtvonalon mért IC_{50} értékei alapján az alábbi következtetések vonhatók le a szerkezet-hatás összefüggésekkel kapcsolatban.

Az imidazo[1,2-*a*]piridin származékok esetében megállapítható, hogy:

- az R^2 szubsztituensnek fontos szerepe van a hatás kialakításában,
- a diarilkarbamid származékok általánosságban jobb proliferációgátló hatást mutattak, mint a diarilamid származékok,
- az R^1 szubsztituens változtatása a diarilamid származékok esetében igen, a diarilkarbamid származékok esetében nem befolyásolta a biológiai aktivitást,
- az imidazo[1,2-*a*]piridin vázhoz 3-as helyzetben, közvetlenül kapcsolódó fenil gyűrűn található linker csoport elhelyezkedése (*meta* vagy *para*) a hatást bizonyos esetekben javítja, míg más esetekben rontja vagy nem befolyásolja.

Az imidazo[1,2-*a*]pirazin származékok esetében megállapítható, hogy:

- a linker (L) és az ahhoz kapcsolódó szubsztituált fenil gyűrű jelenléte elengedhetetlen a hatáshoz,
- a megfelelő R² szubsztituens alkalmazása fontos a hatás eléréséhez,
- a központi váz 8-as helyzetéhez kapcsolódó nitrogénen lévő benzoil csoport jelenléte nem esszenciális az antiproliferatív hatás létrejöttéhez, de jelentősen javíthatja azt,
- a benzoil csoport R¹ szubsztituenseit tekintve a leghatékonyabb vegyületek a 3,5-diklór, illetve a 3,5-bisz(trifluorometil) származékok közül kerültek ki,
- a linker kiválasztásának tekintetében nem vonható le egyértelmű következtetés, mind az amid, mind az karbamid származékok körében vannak kiemelkedően aktív vegyületek.

A megfelelő imidazo[1,2-*a*]piridin és imidazo[1,2-*a*]pirazin származékok összehasonlításával megállapítható, hogy a váz 7-es pozíciójában levő nitrogénnek döntő szerepe van a biológiai hatás kialakításában.

Az elkészített származékok közül a **128**, **157**, **172**, **177** és **178** vegyületek mutatták a legerősebb proliferációgátló hatást (IC₅₀ értékük rendre 0,04 μM, 0,06 μM, 0,03 μM, 0,01 μM és 0,06 μM).

A legjobb vegyületek két nagyságrenddel hatékonyabbnak bizonyultak, mint az irodalomban ismert legközelebbi analóg (**183**), és egy nagyságrenddel erősebb proliferációgátló hatást mutattak a jelenleg melanóma ellen klinikumban alkalmazott vemurafenibnél.

A vizsgált vegyületek hatásmechanizmusa még nem tisztázott, az elvégzett *in vitro* biokémiai vizsgálatok alapján azt állapíthatjuk meg, hogy a kiemelt vegyületek nem a B-Raf kináz gátlásán keresztül fejtik ki a melanóma sejteken tapasztalt potens antiproliferatív hatást.

A tüdőkarcinóma, kolorektális karcinóma és melanóma sejtvonalakon mért eredmények összehasonlítása azt mutatja, hogy a kiemelt vegyületek szelektíven gátolják a melanóma sejtek osztódását a vizsgált 7 sejtvonal közül. Ebből az eredményből arra is következtethetünk, hogy a vegyületek nem általános citotoxikus hatással rendelkeznek.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertáció témájában megjelent közlemények:

Garamvölgyi R, Dobos J, Sipos A, Boros S, Illyés E, Baska F, Kékesi L, Szabadkai I, Szántai-Kis Cs, Kéri Gy, Órfi L. (2016) Design and synthesis of new imidazo[1,2-*a*]pyridine and imidazo[1,2-*a*]pyrazine derivatives with antiproliferative activity against melanoma cells. *Eur J Med Chem*, 18: 623-643. (IF: 3,447)

Baska F, Szabadkai I, Sipos A, Breza N, Szántai-Kis Cs, Kékesi L, **Garamvölgyi R**, Nemes Z, Baska F, Neumann L, Torka R, Ullrich A, Kéri Gy, Órfi L. (2014) Pharmacophore and Binding Analysis of Known and Novel B-RAF Kinase Inhibitors. *Curr Med Chem*, 21: 1938-1965. (IF: 3,853)