Új kinázgátló vegyületek kombinációs rákterápiához

Doktori tézisek

Gyulavári Pál

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Témavezető:	Vántus Tibor Ph.D. tud. főmunkatárs
Hivatalos bírálók:	Tábi Tamás Ph.D. docens
	Wunderlich Lívius Ph.D. adjunktus
Szigorlati bizottság elnöke:	Tretter László D.Sc. egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai:	Balla András Ph.D. docens
	Micsonai András Ph.D. tanársegéd

Budapest
2019

1. Bevezetés

A különféle rákos elfajulások korunk legmagasabb morbiditású betegségei közé tartoznak. Közös jellemzőjük a sejtek korlátlan osztódása. Súlyos problémává -rosszindulatúvá- akkor válnak, mikor a ráksejtek kiszakadnak szöveti környezetükből és ún. áttéteket képeznek más szervek szöveteiben. Az áttétes szervek funkciója romlik, ami végül a beteg halálát okozza. A rákos elfajulások sok szempontból heterogének, de az elmúlt harminc évben világossá vált, hogy ezek közül a legfontosabb genetikai sokféleségük. Ma már ismert, hogy a különféle genetikai elváltozások és az általuk eredményezett hibás működésű fehérjék irányítják a ráksejtek szüntelen osztódását. Genetikai elváltozások számos külső és belső hatásra keletkezhetnek, de az egészséges sejtek hibajavító mechanizmusai korrigálják őket. Kritikus számú és minőségű hiba megmaradása azonban rákossá teszi a sejtet. A humán genom fehérjét kódoló génjei közül meglepően kevésnek a hibája (mintegy 140) játszik döntő szerepet a rákok túlnyomó többségében. E megváltozott gének és fehérjék az úgynevezett „driver”-ek.

A driver gének között meglepően nagy számban találjuk kinázok génjeit. A kinázok olyan enzimfehérjék, melyek egy foszfo-csoportot (PO_3) képesek áthelyezni más makromolekulákra és így azok működését befolyásolni. Sorban egymást foszforiláló kinázok alkotják a sejtek legjelentősebb intracelluláris jelpályáit, melyek a sejtfunciókat -köztük a sejtosztódást- szabályozzák. Más kinázok közvetlenül a sejtfunkciókat végző makromolekulákat irányítják. Ez utóbbira példák az Auróra kinázok.

Az Auróra kinázok minden emberi sejt osztódásának vezérlésében kulcsszerepet játszanak. Három paralóg fehérje tartozik a családba, amelyek közül a két legfontosabb az „A” és „B” jelű kináz. Az Auróra A a sejt mikrotubulus vázrendszerének központjául szolgáló centroszóma osztódásáért és a belőle kiinduló mikrotubulus orsók felépüléséért felel. Az Auróra B kináznak három funkciója is van: 1) a

sejtosztódás előtt megkettőződött DNS állomány kromoszómákba kondenzálódását, 2) a korrekt mikrotubulus orsó-kromoszóma kapcsolatok kiépülését és 3) magát az utódsejtek fizikai szétválását, a citokinézist vezényli le.

Az Auróra kinázok hibás (alul, vagy túl) működése a kromoszómák - és így a gének- egyenlőtlen eloszlását vonja maga után az utódsejtekben. Így az Auróra kinázok hibás működése aktívan hozzájárul a genetikai elváltozások gyarapodásához a ráksejtekben. Bár jelen ismereteink szerint egyik Auróra kináz sem driver, számos ráktípusban tapasztalható hibás működésük. Ezen kívül a sejtosztódásban (ami ahogy az imént láttuk, a ráksejtek legalapvetőbb tulajdonsága) betöltött központi szabályzó szerepük és a tény, hogy gyógyszerhatóanyagokkal gátolható működésük mégis ígéretes terápiás célpontokká teszi őket. Sok laboratóriumi eredmény támasztja alá, hogy az Auróra kinázok gátlása valóban sejthalált -apoptózist- indukál ráksejtekben. Ugyanakkor máig nem egyértelmű, hogy melyik paralóg, az Auróra A vagy B a jobb célpont, esetleg mindkettő gátlása szükséges a maximális rákellenes hatás eléréséhez.

Az elmúlt másfél évtizedben több tucat célzottan Auróra kinázgátló hatóanyagot fejlesztettek ki, de egy kivételével mind elbukott a klinikai vizsgálatok során. Jelenleg sincs Auróra kinázgátló alapú engedélyezett gyógyszer a piacon.

Sajnos az ismert driver fehérjék ellen általában is kevés célzott hatóanyag áll az onkológusok rendelkezésére. Ráadásul a ráksejtekben az új genetikai elváltozások is gyorsabban halmozódnak fel (például az Auróra kinázok hibás működésének hatására), ezért rezisztencia is gyorsabban alakul ki a gyógyszerekkel szemben. Az egyik lehetséges kiutat a már meglévő hatóanyagok kombinálása jelentheti, ami szerencsés esetekben szinergisztikus. Szinergizmus akkor áll fenn, ha egy hatóanyag kombináció hatékonyabb, mint az egyes hatóanyagok külön-külön mért hatásának az összege.

2. Célkitűzések

Habár az Auróra kinázok ígéretes gyógyszercélpontok, jelenleg még sincs engedélyezett gátlószerük. Éppen ezért doktori munkám témájául az Auróra kinázgátlók vizsgálatát választottuk. A Vichem Kft. molekulatárjában korábban azonosítottak egy benzotiofén-3-karboxamid alapvázú kismolekula családot, amelyek jól gátolták az Auróra kinázokat. Doktori munkám során két feladatot tűztem ki célul:

I) A benzotiofén-3-karboxamid analógok részletes vizsgálatát számos *in vitro* és sejtes kísérleti rendszerben. Az Auróra kinázgátló hatás bizonyítását és a leghatékonyabb, vezérmolekula kiválasztását.

II) A vezérmolekula vizsgálatát hatóanyag-kombinációs kísérletekben.

3. Anyagok és módszerek

Sejtvonalak

Munkámhoz az ATCC-ből származó HCT 116 és HT-29 humán vastagbélrák sejtvonalakat használtam melyeket a forgalmazó által ajánlott (10% (V/V) magzati borjú savóval és antibiotikummal kiegészített) sejttenyésztő médiumban neveltem párásított, 5% CO_2-t tartalmazó atmoszférájú inkubátorban az előírásoknak megfelelően.

Gátlószerek és rekombináns enzimek

A kísérletekhez használt benzotiofén-3-karboxamid alapú hatóanyagokat a Vichem Kft-ben szintetizálták. A referencia Auróra gátlóként használt VX-680, MLN8054 és MLN8237 hatóanyagokat a Selleck Chemicals-tól (LLC, USA) illetve a Sigma-Aldrich-tól vásároltuk. Minden hatóanyagot 5 mM-os DMSO törzsoldatban tároltunk és tisztaságukat háromhavonta HPLC-vel ellenőriztük.

A rekombináns Auróra A enzim a Proteros Biostructures-től, az Auróra B a SignalChem-től (lot: E021-1) származott.

Sejt életképesség mérés

A ráksejtek életképességét a gátlószerek jelenlétében klasszikus MTT módszerrel mértem meg 96 lukú lemezeken. A kezelt kultúrákról minden médiumot eltávolítottam és 50 µl, 2 mg/ml koncentrációjú MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium bromid) oldattal 1,5 órán át 37°C-on inkubáltam őket. A formazán kristályokat szolubilizáltam (2-propanol, 1 mM HCl és 10% (V/V) Triton X-100), majd megmértem az oldat abszorpcióját két hullámhosszon. A 635 nm-es adatokat (referencia hullámhossz) kivontam az 570 nm-es adatokból. Az így nyert nyers adatokból a kontrollokhoz viszonyított IC_{50} értékeket Excel (Microsoft) és XLfit 5.1.0 (IDBS, Surrey, UK) szoftverekkel határoztam meg.

In vitro rekombináns enzimgátlás mérés

A vásárolt rekombináns enzimekkel optimalizált összetételű pufferben futtattam a reakciókat 384 lukú lemezeken (Corning 3676). Az ATP koncentrációt külön kísérletben mindkét kináznak a saját $K_{M[ATP]}$ értékére állítottuk be. Az enzimreakció működését IMAP (Molecular Devices) rendszerrel detektáltuk. A nyers adatokból a kontrollokhoz viszonyított IC_{50} értékeket Excel (Microsoft) és XLfit 5.1.0 (IDBS, Surrey, UK) szoftverekkel határoztam meg.

Áramlási citometriás mérés

A 24 lukú lemezen kezelt sejtkultúrákat minden felülúszóval és mosó oldattal együtt mintatartó csövekbe mértem és propídium-jodiddal (a DNS tartalom vizsgálata esetén) vagy propídium-jodid és Annexin V-FLUOS kombinációjával (az apoptózis vizsgálat esetén) jelöltem. A jelölt minták fluoreszcenciáját FACSCalibur áramlási citométerrel és CellQuest Pro szoftverrel (BD Biosciences) mértem meg. A kiértékelés szintén CellQuest Pro illetve Excel (Microsoft) programokkal történt.

Western blot analízis

A 60 mm-es petri csészéken nevelt és kezelt sejtkultúrákat jéghideg RIPA pufferrel (50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% (V/V) NP-40, 0,5% (V/V) nátrium-deoxikolát, 0,1% (V/V) SDS, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM nátrium-ortovanadát, 200 µM PMSF és 0,5% (V/V) proteáz inhibitor koktél (Calbiochem)) lizáltuk. A mintákat a szokott módon előkészítettük és futtattuk 10%-os SDS-gélen, PVDF membránra blottoltuk és ellenanyagokkal inkubáltuk (1° -éjszakán át, 4°C / HRP-konjugált 2° -egy óra, szobahőmérséklet). Az ellenanyagokat a CellSignaling Technologies-tól (Danvers, MA, USA) és a Sigma-Aldrich-tól (St. Louis, MO, USA) vásároltuk. Az ellenanyagokkal jelölt fehérjéket röntgenfilmen (CL-XPosure Films, Thermo Scientific, MA, USA) vizualizáltuk kemilumineszcens oldat segítségével (Western Lightning Plus-ECL, PerkinElmer).

Fluoreszcens mikroszkópia

A 96 lukú Ibidi μ-lemezen (89626) nevelt és kezelt sejtkultúrákat 4%-os (V/V) formalin oldattal fixáltam (10 perc, szobahőmérséklet), 0,1%-os Triton X-100 detergenssel permeabilizáltam (10 perc, szobahőmérséklet), majd ellenanyagokkal inkubáltam (1° -éjszakán át, 4°C / fluoreszcens festékkel konjugált 2° -egy óra, szobahőmérséklet). Ezután a sejtmagokat 1 µg/ml végkoncentrációjú DAPI oldattal (10 perc, szobahőmérséklet) festettem és a mintákat Zeiss Axiovert 200M fluoreszcens mikroszkóppal, AxioVision 3.1 szoftver segítségével vizsgáltam meg. Az egyes fluoreszcens festésekről készült képekből FIJI szoftverrel készítettem kompozit képet.

Hatóanyag kombinációs kísérletek

Minden kombináció esetén a hatóanyagok 1:1 arányú keverékéből (illetve monoterápiában a két hatóanyagból külön-külön) készítettem tíz tagú, harmadoló hígítási sort, amivel a 96 lukú lemezre kihelyezett sejtkultúrákat kezeltem. A sejt életképesség mérés a fent ismertetett MTT módszerrel történt.

A nyers adatokat 0 és 1 közé normáltam, majd CompuSyn® v1.0 szoftverrel (ComboSyn Inc.) analizáltam. A program a kezelések IC_{50} értéknél vett kombinációs indexét (CI) adja eredményül, ami CI>1 érték esetén antagonizmust, CI=1 esetén additív hatást, CI<1 érték esetén szinergizmust jelez.

Statisztikai analízis

A feltüntetett adatok kevés kivétellel legalább három független mérés átlagai.

Minden rekombináns enzimgátlás mérés esetén kiszámoltuk a Z' értéket: $Z'=1-((3SD_{max}+3SD_{min})/(AV_{max}-AV_{min}))$ ahol is az SD szórást, az AV átlagot jelöl. Csak azoknak az enzimgátlás-méréseknek az adatait fogadtuk el, amelyeknek a Z' értéke 0,5-nél nagyobb volt.

Az apoptózis vizsgálat esetén kétmintás *t*-próbával határoztam meg a minták különbségének szignifikanciáját ($p < 0,05$).

4. Eredmények

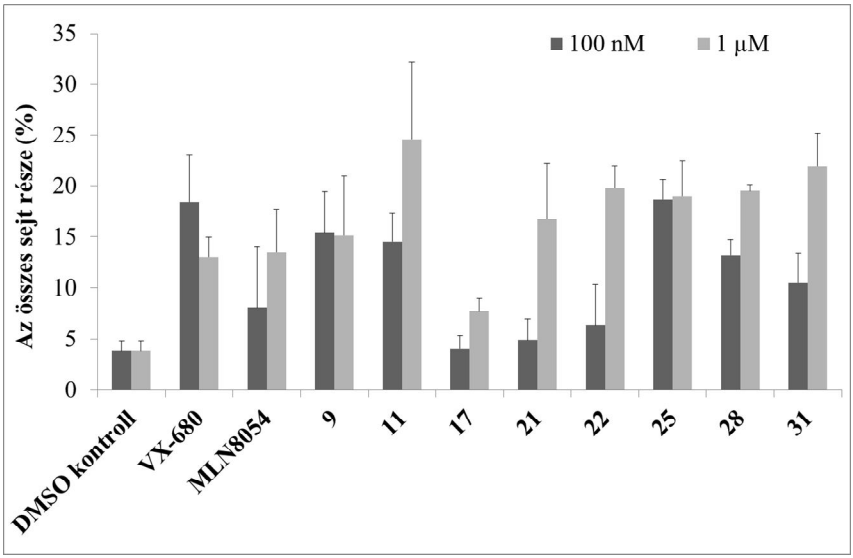
A Vichem Kft. molekulatárjában azonosított benzotiofén-3-karboxamid alapvázú kismolekulák közül 84-nek vizsgáltam meg az életképességre gyakorolt hatását HCT 116 sejteken. A 84 molekula között igen kis szerkezetbeli különbségek voltak, ami egyértelmű, szép szerkezet-hatás összefüggések felállítását tette lehetővé. Több molekula is a referencia Auróra kinázgátlókkal megegyező erősségben gátolta a sejtek életképességét, ezek közül a nyolc legjobbat vizsgáltam tovább. A vastagbélrák eredetű HCT 116 sejtekkel ellentétben e nyolc kiválasztott hatóanyag nem gátolta számottevően a primer humán fibroblaszt sejtkultúrák életképességét.

Az *in vitro* rekombináns enzimgátlás mérésben a nyolc kiválasztott hatóanyag mindegyike a referencia Auróra kinázgátlókkal hasonló erősségben gátolta az Auróra A és B kinázok működését. Számottevő különbséget viszont nem tapasztaltam az egyes anyagok hatása között.

Az Auróra B gátlásának biztos jele a citokinézis elmaradása és a sokmagvú (azaz emelkedett DNS tartalmú) sejtek megjelenése a kultúrában. Ezt elméletileg mind a nyolc kiválasztott hatóanyagnak el kellett volna érnie. Az áramlási citométeres mérésben viszont csak öt hatóanyag gátolta 100 nM koncentrációban 24 óra után a citokinézist (hasonlóan az Auróra A és B kettősgátló VX-680 referenciaanyaghoz), a másik három csak 1 μM koncentrációban (hasonlóan az Auróra A szelektív MLN8054 referenciaanyaghoz).

Ugyanezt a mintázatot tapasztaltam fluoreszcens mikroszkópos felvételeken a sejtmagok sokszorozódását figyelve 100 nM és 1 μM koncentrációban, 24 óra után.

Mi több, a nyolc kiválasztott hatóanyag közül ugyanaz az öt indukált apoptózist 100 nM koncentrációban, amelyek gátolták a citokinézist és sokmagvú sejteket hoztak létre. Ugyanakkor 1 μM koncentrációban már mindegyik vizsgált anyag indukált apoptózist (1. Ábra). Megjegyzendő, hogy az apoptózis megjelenéséhez a 24 vagy 48 órás kezelés nem volt elég, az csak 72 óra után indukálódott a sokmagvú sejtekben.



1. Ábra Oldószer (DMSO) kontroll, referencia Auróra kinázgátlók és a nyolc kiválasztott benzotiofén-3-karboxamid által indukált apoptotizáló sejtek aránya két koncentrációban, 72 óra kezelés után.

A sejt életképesség és az apoptózis indukció vizsgálat alapján a nyolc kiválasztott hatóanyag közül a **25**-öst neveztem ki vezérmolekulának (2. Ábra). A **25**-ös már 100 nM-ban is indukált apoptózist, míg a **21**-es csak 1 μM koncentrációban. E két hatóanyag esetén végül western blot kísérletben is megvizsgáltam, hogyan befolyásolják az Auróra A és B kinázok működését élő sejtekben. Míg a **21**-es az Auróra A foszforilációját (és így aktivitását) már 500 nM koncentrációban gátolta, az Auróra B-ét még 1 μM koncentrációban is csak részlegesen. Ezzel szemben a **25**-ös -egybecsengve az áramlási citométeres mérésekkel- már 100 nM koncentrációban is gátolta mindkét Auróra kináz foszforilációját.

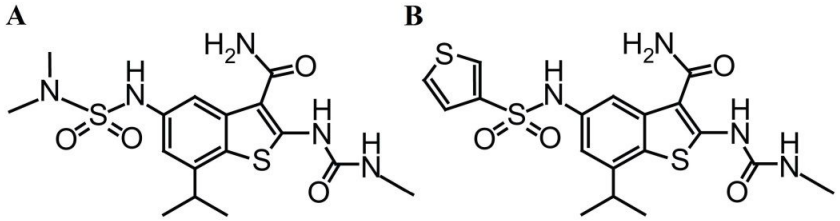
Végül második célomként megvizsgáltam a **25**-ös (és referencia Auróra kinázgátlóként a VX-680) hatását más célzott terápiás hatóanyagokkal kombinációban. Ezek közül hat hatóanyag típusról már kimutatták, hogy szinergizál Auróra kinázgátlókkal:

- GSK2126458, egy PI3K/mTOR gátló
- Erlotinib, egy EGFR gátló
- Trichostatin A, egy I-es és II-es típusú hiszton deacetiláz gátló
- Dasatinib, egy BCR/Abl és Src-család gátló
- Lonafarnib, egy farnezil-transzferáz gátló
- Carfilzomib, egy proteaszóma gátló

További két hatóanyagról nem állt rendelkezésre irodalmi adat:

- Crizotinib, egy ALK, ROS1 és c-Met gátló
- És természetesen a **34**-es jelzésű, saját fejlesztésű EGFR–c-Met kettősgátló

A **25**-ös a kombinációk zömében a VX-680-as referencia Auróra kinázgátlóval megegyező módon szinergizált a többi célzott hatóanyaggal. Mind a két Auróra kinázgátló mutatott szinergizmust továbbá a két c-Met gátló hatóanyaggal is.



2. Ábra A **21**-es (A) és **25**-ös (B) vegyületek kémiai szerkezete.

5. Következtetések

- A benzotiofén-3-karboxamid alapváz megfelelő alapot képez további Auróra kinázgátlók fejlesztéséhez. Több benzotiofén-3-karboxamid a referencia anyagokkal megegyező erősségben képes gátolni az Auróra A és B kinázok működését *in vitro* mérésben, továbbá csökkenteni humán vastagbél ráksejtek életképességét apoptózis indukálása révén.

- Az Auróra B kináz gátlása és a folyományaként jelentkező citokinézis gátlás és sokmagvúság szükséges és elégséges volt a HCT 116 sejtek apoptózisának indukálásához. Az Auróra A-ra szelektív hatóanyagok csak magasabb koncentrációban okoztak apoptózist, amikor már az Auróra B kinázt is gátolták.

- A **25**-ös vegyület egy teljesen új hatóanyag, amely a Vichem Kft. benzotiofén-3-karboxamidjai közül a legerősebb Auróra kinázgátló hatással bír, ezért ezt választottam vezérmolekulának.

- A **25**-ös vegyület egyéb célzott hatóanyagokkal való kombinációban is Auróra kinázgátlóként viselkedett. Elsőként mutattam ki, hogy egy Auróra és egy c-Met kinázgátló együttes alkalmazása szinergisztikus lehet bizonyos körülmények között.

6. Saját publikációk jegyzéke

A disszertáció alapjául szolgáló publikációk:

1. Pál Gyulavári, Bálint Szokol, István Szabadkai, Diána Brauswetter, Péter Bánhegyi, Attila Varga, Péter Markó, Sándor Boros, Eszter Illyés, Csaba Szántai-Kis, Marcell Krekó, Zsófia Czudor, László Őrfi **(2018)** Discovery and optimization of novel benzothiophene-3-carboxamides as highly potent inhibitors of Aurora kinases A and B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 28(19), 3265-3270.
   DOI: 10.1016/j.bmcl.2018.05.064.
   IF: 2,442

2. Bálint Szokol, Pál Gyulavári, Ibolya Kurkó, Ferenc Baska, Csaba Szántai-Kis, Zoltán Greff, Zoltán Őrfi, István Peták, Kinga Pénzes, Robert Torka, Axel Ullrich, László Őrfi, Tibor Vántus and György Kéri **(2014)** Discovery and biological evaluation of novel dual EGFR/c-Met inhibitors. *ACS Medicinal Chemistry Letter* 5(4), 298-303.
   DOI: 0.1021/ml4003309
   IF: 3,120

3. Bálint Szokol, Pál Gyulavári, Ferenc Baska, Ibolya Kurkó, Zoltán Greff, Csaba Szántai-Kis, Zoltán Őrfi, István Peták, Axel Ullrich, Tibor Vántus, György Kéri and László Őrfi **(2013)** Development and biochemical characterization of EGFR/c-Met dual inhibitors. *Acta pharmaceutica Hungarica* 83(4), 121-33.

További publikációk:

4. Margita Márton, Nikolett Tihanyi, Pál Gyulavári, Gábor Bánhegyi, Orsolya Kapuy **(2018)** NRF2-regulated cell cycle arrest at early stage of oxidative stress response mechanism. *PLoS One* 13(11), e0207949
   DOI: 10.1371/journal.pone.0207949
   IF: 2,766

5. István Szabadkai, Robert Torka, Rita Garamvölgyi, Ferenc Baska, Pál Gyulavári, Sándor Boros, Eszter Illyes, Axel Choidas, Axel Ullrich and László Őrfi **(2018)** Discovery of N-[4-(Quinolin-4-yloxy)phenyl]benzenesulfonamides as Novel AXL Kinase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 61(14), 6277-6292.
   DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b00672.
   IF: 6,253

6. József Murányi, Attila Varga, Bianka Gurbi, Pál Gyulavári, Gábor Mező, Tibor Vántus **(2017)** In Vitro Imaging and Quantification of the Drug Targeting Efficiency of Fluorescently Labeled GnRH Analogues. *Journal of Visualized Experiments* 121 Paper: e55529.
   DOI: 10.3791/55529.
   IF: 1,184

7. József Murányi, Pál Gyulavári, Attila Varga, Györgyi Bökönyi, Henriette Tanai, Tibor Vántus, Domonkos Pap, Krisztina Ludányi, Gábor Mező and György Kéri **(2016)** Synthesis, characterization and systematic comparison of FITC-labelled GNRH-I, -II and -III analogues on various tumour cells. *Journal of Peptide Science* 22(8), 552-60.
   DOI 10.1002/psc.2904
   IF: 1,972

8. Attila Varga, Pál Gyulavári, Zoltán Greff, Krisztina Futosi, Tamás Németh, Laura Simon-Szabó, Krisztina Kerekes, Csaba Szántai-Kis, Diána Brauswetter, Márton Kokas, Gábor Borbély, Anna Erdei, Attila Mócsai, György Kéri, Tibor Vántus **(2015)** Targeting vascular endothelial growth factor receptor 2 and protein kinase D1 related pathways by a multiple kinase inhibitor in angiogenesis and inflammation related processes *in vitro*. *PLoS One* 10(4), e0124234.
   DOI: 10.1371/journal.pone.0124234.
   IF: 3,057