

Bruckner-termi előadások

Órfi László

■ Semmelweis Egyetem GYTK, Gyógyszerési Kémiai Intézet

Kinázgátló kismolekulák fejlesztése

A protein kináz enzimek a biológiai jelátviteli folyamatokban részt vevő protein-szubsztrát molekulák (sokszor más enzimek) bizonyos aminosavait (elsősorban tirozint, szerint, treonint) ATP felhasználásával foszforilálják. A humán genom program nyomán a kinázok családjának 518 tagja vált ismertté, ezeket szerkezeti rokonságuk alapján szemléletesen „kinázfa” (humán kinom) formájában ábrázolják. A sejtosztódásban, sejt differenciálódásban és morfogenezisben kulcsregulátor funkciót betöltő tirozin kinázok családjába 58 enzim tartozik. Kóros túlműködésük vagy mutációjuk proliferációs betegségekhez, például daganatos megbetegedésekhez vezethet. A forgalomban levő kinázinhibitor gyógyszerek zöme tirozin kinázgátló. Az eddigiekben az ismert kinázok közül 244-et sikerült kapcsolatba hozni valamilyen megbetegedéssel. Kóros kináz működés nemcsak daganatokban figyelhető meg, ezt immunológiai, metabolikus és fertőző megbetegedésekben is kimutatták. Ezzel magyarázható, hogy jelenleg a gyógyszerkutatásban vizsgált célmolekulák kb. 25%-a kináz. [1]

A kinázinhibitorok kutatására kidolgozott és a gyakorlatban megvalósított racionális hatóanyag-fejlesztő stratégiánk számos eredményt hozott, amelyek közül, a teljesség igénye nélkül, a következő példákat emeltem ki: Flk1/VEGFR-gátlók, EGFR-inhibitorok, AXL kinázinhibitorok, FGFR-inhibitorok kifejlesztése (1. ábra). Potenciális tbc-ellenes hatású kinázgátlókat fejlesztettünk a *Mycobacterium tuberculosis* PknG- (bakteriális) kináz enzimeje ellen, valamint HIV-1 vírusellenes hatású, szabadalmaztatott, szelektív CDK9- (gazdasejt) kinázinhibitorokat.

Célkitűzéseink

Kutatásaink alapvető célja: terápiás szempontból releváns kinázok által mediált, kó-

ros jelátviteli folyamatok vizsgálata, és ezen kóros folyamatok (különösen a daganatok, mikrobiális fertőzések és gyulladáások) kismolekulájú kinázinhibitorokkal történő gátlása és a sikeres vegyületek humán terápiában alkalmazható gyógyszerekké fejlesztése.

Hatóanyag-fejlesztési stratégiánk fő elemei:

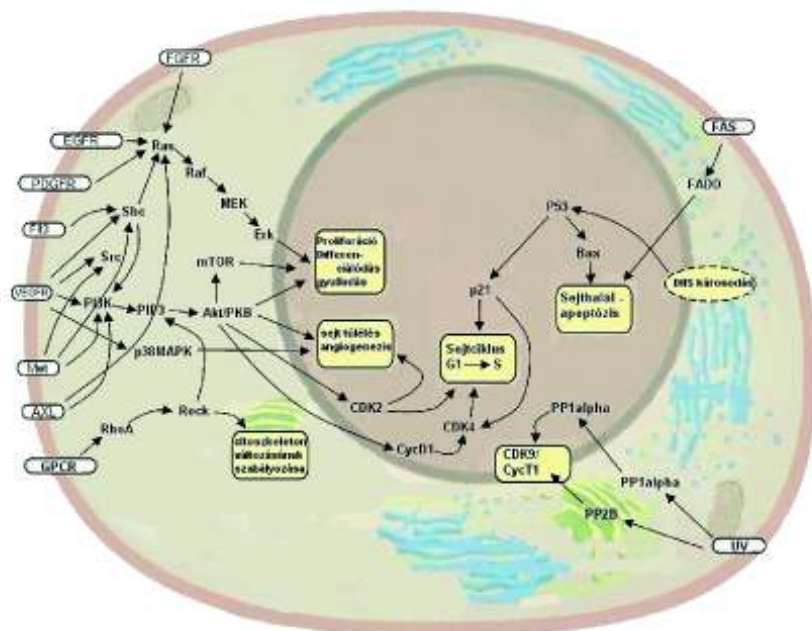
- Fókuszált kinázinhibitor vegyülettár létrehozása (NCL™) és alkalmazása a hatóanyagkutatásban.
- Ligandum alapú (QSAR, QSPR) prediktív farmakofór és ADMET modellek kidolgozása és alkalmazása virtuális szűrésre, szelekcióra.
- Tervezés-szűrés-szintézis-biológiai tesztelés-modellezés ciklusokban iteratív hatóanyag fejlesztés (4–5 ciklus; 1,5–2 év).
- A célmolekula 3D szerkezetének ismeretében virtuális szűrés dokkolással.

A fókuszált kinázinhibitor vegyülettár (Nested Chemical Library, NCL™)

Az általunk létrehozott vegyülettár magját, a *validációs vegyülettárat* az ismert kinázinhibitorok képezik, ezek az ún. *validációs anyagok*, melyeket a hatóanyag-keresésen („hit finding”) kívül referenciaanyagokként is felhasználunk, a kináz célpontok kémiai validálására, illetve a biokémiai tesztelésnél (*Chemical Validation Library, CVL*). Ebben a csoportba kerül minden gyógyszerként bevezetett, illetve klinikai kipróbálási fázisban levő vegyület és a szakirodalomban közölt legígéretesebb vegyületek. Alapelvünk, hogy lehetőleg a gyógyszer-célpontnak tekinthető („drugable”) összes kináz ellen álljon rendelkezésre inhibitor. A CVL-be a még nem publikált, saját fejlesztésű vezetőmolekulák is folyamatosan bekerülnek.

A validációs anyagok közvetlen analóg-

1. ábra. Az általunk vizsgált jelátviteli útvonalak





jaikkal együtt a *kiterjesztett validációs vegyülettár* alkotják (*Extended Validation Library, EVL*). Ebben a vegyülettárban már új, szabadalmaztatható szerkezeti analógok is vannak. Az alapstruktúrák még továbbfejlesztett analógjai, melyek többsége szabadalmaztatható, és már lényegesen diverzebb szerkezetek, a *fő vegyülettárba* kerülnek (*Master Library*). A fő vegyülettárat virtuálisan kibővítettük a kémiai szakirodalomból ismert összes szerkezettel, amelyek ugyan nem állnak szubsztanciaként rendelkezésre, de a számítógépes tervezés során ezek még mindig megbízhatóbbak, mint a számítógéppel generálható, közel végtelen ($\sim 10^{60}$) számú kismolekula-szerkezet. Ez utóbbiak szintetikus előállíthatóságára ugyanis nincs garancia. A fő vegyülettár (>17000 anyag) jelenleg több mint 110 heterociklusos alapváz (core structure) köré csoportosítható. [2][3]

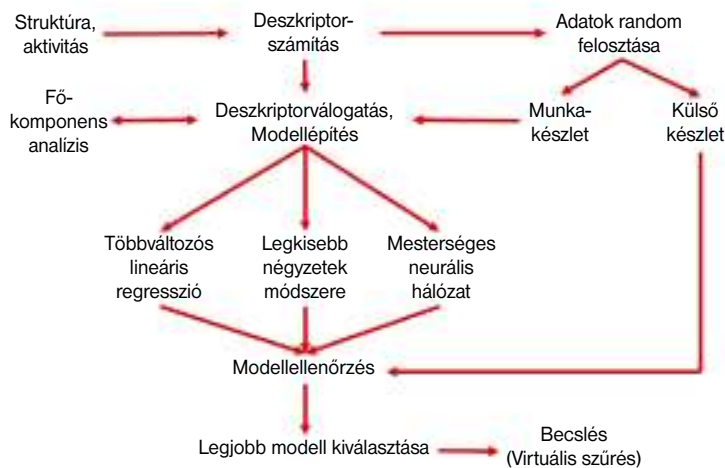
Ligandum alapú (QSAR, QSPR), prediktív farmakofór és ADMET modellek

Bár napjainkig több ezerre nőtt a röntgendiffrakcióval jellemzett kináz szerkezetek száma, általában az újabb, potenciális gyógyszer-célpontnak tekinthető kinázok azonosítását követően ritkán áll rögtön rendelkezésre a kristályosított kinázdomén röntgenszerkezete. (Vannak olyan kinázok, melyeknek egyáltalán nem oldható meg a kristályosítása.) Ezekben az esetekben számítógépes dokkolási vizsgálatokat csak homológ modellezéssel becsült 3D kináz szerkezet felhasználásával lehet végezni, aminek a megbízhatósága a kristályszerkezeti adatoknál lényegesen kisebb. A másik probléma, hogy nem tudjuk meghatározni egzakt módon, hogy a HTS-sel talált inhibitorok melyik kinázinhibitor kötődési típus képviselői.

A fenti tényekből kiindulva dolgoztuk ki ligandumalapú farmakofór modelljeinket. [4] Ligandum alapú modellhez egy, minimálisan 100–200 molekulaszereket és ahhoz tartozó hatástani adatot (% inhibíció, IC_{50} vagy K_i) tartalmazó adatpárok-ból álló adatbázisra van szükség. A jó modell létrehozásának alapvető feltétele, hogy kémiai és biológiai adataink egyaránt megbízhatóak legyenek, különben a közmondásos „garbage in – garbage out” lesz az eredmény. [5]

A gyógyszerkutatás alaptétele, hogy a gyógyszermolekula kémiai szerkezete, ebből adódó fizikai kémiai tulajdonságai és biológiai hatása között összefüggés van. Ahhoz, hogy ezt az összefüggést számítógéppel

Ligandum alapú farmakofór modell



2. ábra. A ligandum alapú QSPAR modellezés vázlata

géppel viszonylag egyszerűen fel tudjuk térképezni (korrelációvizsgálat), mind a szerkezetet, mind a fizikai kémiai tulajdonságokat, mind a biológiai hatást valahogyan számszerűsíteni kell, és az adatokat el kell tárolni. [6]

Grafikus szerkezet-hatás adatbázis

A vegyülettárunk kémiai szerkezeteit, az ezekhez kapcsolódó biológiai és fizikokémiai adatokat (pl. olvadáspont-, $\log P$ -, $\log S$ -, UV-, HPLC-, MS-, NMR- és készletadatok) egy saját fejlesztésű, folyamatosan frissített, grafikus MySQL-adatbázisban tároljuk. A számított molekulaleíró értékeket és az ezek felhasználásával kifejlesztett modelleket, szintén ebben gyűjtöttük össze. [7][8][9]

Molekulaleírók (molekuláris deszkriptorok)

A vegyületek szerkezetének leírására és összehasonlítására a szerkezetből számítható molekuláris deszkriptorokat használtuk. Pár száz deszkriptort számoló, saját fejlesztésű szoftverünkön (3DNET4W) kívül felhasználtuk a QSAR számolásokban használatos, csaknem összes deszkriptort (>1600) számító Dragon szoftvert is, melynek tesztelésében és javításában részt vettünk.

A biológiai hatást a %-os inhibíció, IC_{50} , ill. K_i értékekkel jellemzik, melyeket a számításokhoz egységesen pIC_{50} értékekkel számoltunk át. [10]

A szerkezet-hatás összefüggések

A szerkezet-hatás összefüggések felállításához az általánosan használt matematikai

statisztikai algoritmusokat építettük be a szoftverünkbe: részleges legkisebb négyzetek módszere (PLS, Partial Least Squares), többszörös lineáris regresszió (MLR, Multiple Linear Regression), mesterséges ideghálózat (szoftver-algoritmus, ANN, Artificial Neural Network) stb.

A modellezés folyamata a következő: A szerkezet-hatás adatbázisunkban tárolt szerkezetek molekuláris deszkriptoraiból és az anyagok biológiai hatóértékeiből az adott farmakofórnak megfelelő adathalmazt ki-exportáljuk a QSAR-szoftverünk bemeneti fájl formátumába. A bemenő adathalmazt véletlenszerűen felosztjuk külső ellenőrző (external validation) és munka halmaz(ok)-ra. A modell optimalizálása a munka halmazon folyik, a külső ellenőrző halmaz csak a kész farmakofór modell becslőképességének ellenőrzésére szolgál. A munka halmazt a szoftver véletlenszerűen tanuló- és kiértékelő halmazokra bontja (learning set, test set). Az aktuális tanuló halmaz felhasználásával, a molekuláris leírók különböző kombinációival, függvényillesztés történik az adatokra, a kiértékelő halmaz adatait a szoftver az aktuális becslés „jó-ságának” jellemzésére használja. A becslőképességet Q^2 és SDEP (standard deviation error of prediction) értékekkel jellemezzük. A biológiai hatással legjobban korreláló molekuláris leírókat szekvenciális, illetve genetikus algoritmus alkalmazásával válogatjuk ki. A függvényillesztésre aktuálisan alkalmazott módszert a felhasználó választhatja meg. A modelloptimalizálás során az előírt becslőképességi értéket elérő modelleket összegyűjtjük, majd ebből a modellbankból újabb véletlenszerű felosztásokat követő optimalizálással választjuk ki a legjobban becslő modelleket, melyeket külső ellenőrzéssel és véletlen korreláció tesztekkel validálunk. Az így nyert



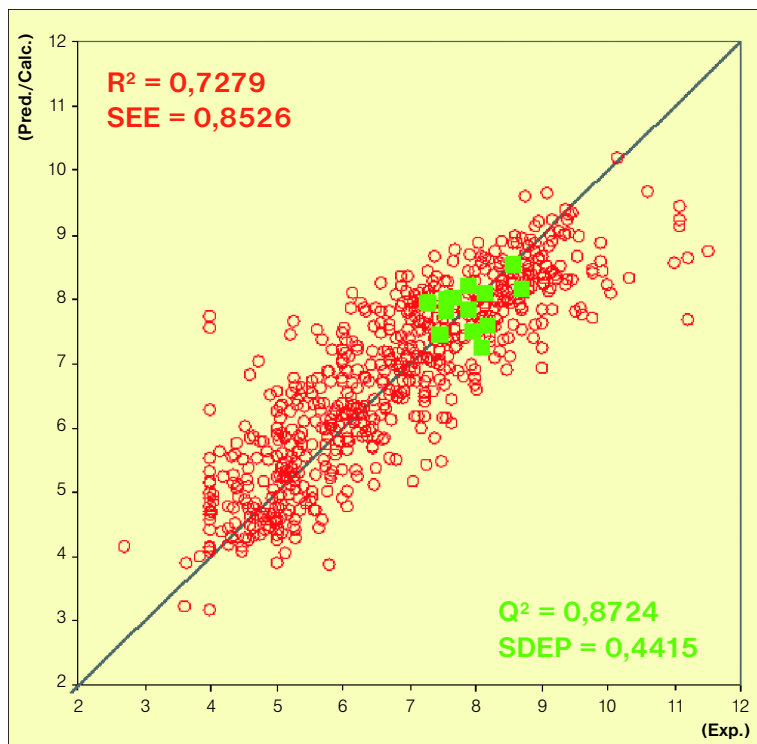
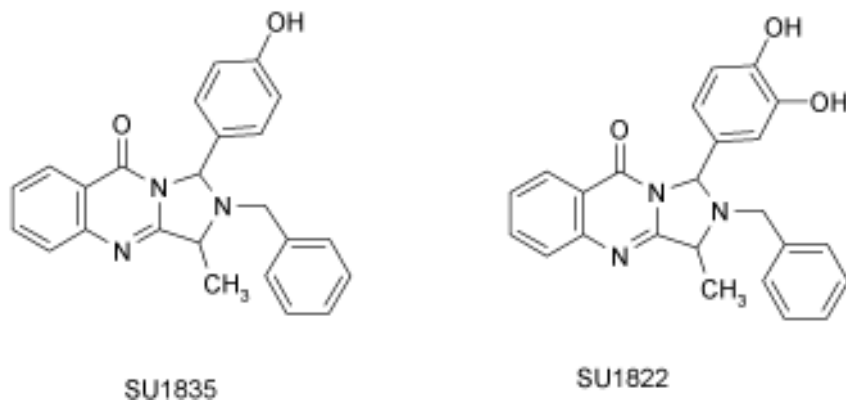
modelleket használtak virtuális szűrésre (2. ábra). [11]

Tervezés-szűrés-szintézis-biológiai tesztelés-modellezés ciklusok – iteratív hatóanyag-fejlesztés

Alapfeltevésünk az volt, hogy mivel a kinázok rokon szerkezetű fehérjék, a kötőhelyeik szerkezete is hasonló, így inhibitoraik szerkezetei is hasonlóak. Ezt az elgondolást alátámasztották az I. típusú, általános kinázinhibitorok, például a staurosporinok vagy a bisz-indolil-maleinimid-származékok, amelyek a legtöbb ismert protein kinázt igen alacsony koncentrációban gátolják, és amelyeket ezért a biokémiai kináztesztokban általános referenciaanyagokként használnak. Az I. típusú kinázinhibitorok többségénél például ránézésre is látszik az ATP-vel való hasonlóság. Az is ismert, hogy egy apró szerkezeti változtatás, például egy metilcsoport („magic methyl”) beépítése drámai változást okozhat a hatásban, illetve a szelektivitásban (lásd imatinib). Feltételeztük továbbá, hogy az adott kinázon hatást mutató vegyületek szerkezete optimalizálható a kívánt hatás, illetve hatásspektrum irányába.

Az iterációs hatóanyag-fejlesztés kiindulási feltétele a biológiai célmolekula, illetve az erre kidolgozott biokémiai assay rendelkezésre állása. [12][13] Első lépésként a validációs vegyülettár hatóanyagait teszteljük le, ezzel validáljuk az assayt, és referenciaanyagokhoz is jutunk. A következő lépésben a kiterjesztett validációs vegyülettárat vagy a fő vegyülettár anyagait teszteljük. Gyakorlati tapasztalataink szerint a fő vegyülettárunk tesztelésekor a találati arány (*hit rate*), az eddig vizsgált kináz célmolekulák többsége esetén, elérte a minimum 2–3%-ot, ami biztosította a megfelelő mennyiségű adatot a farmakofór modellezéshez.

3. ábra. Flk1/VEGFR TK-gátló vezetőmolekulák szerkezete (SUGEN, 1996)



4. ábra. EGFR TK-gátló molekulák hatásának becslése ligandum alapú farmakofór modellel (piros: modellkészítésre felhasznált ismert EGFR TK-inhibitorok; zöld: virtuális teszteléssel talált benzo-tieno-pirimidinek)

A farmakofór modellek felhasználásával virtuális szűrés végzünk, melynek során a becülhető ADMET tulajdonságokat is figyelembe vesszük. A virtuális hiteket szintetizáljuk, és újabb ciklusban vizsgáljuk. Az új szerkezetekkel és a biológiai eredményekkel folyamatosan bővítjük és újraszámoljuk a farmakofór modellt. Egy-egy kutatási ciklus kb. 3 hónapot vesz igénybe, szabadalmaztatható optimalizált vegyület-családot általában 5–6 ciklusban lehet kifejleszteni. [14]

Szűrés a célmolekula 3D szerkezete alapján

Amennyiben a biológiai mérés kis átbotósátóképességű volt, viszont a célmoleku-

la megbízható 3D szerkezete rendelkezésre áll, akkor a fő vegyülettárunk anyagait dokkolással szűrtük. Dokkolásra az Autodock és a Schrödinger szoftvereket alkalmaztuk. [15]

Tumorelles vegyületek

Flk1/VEGFR TK-gátlók

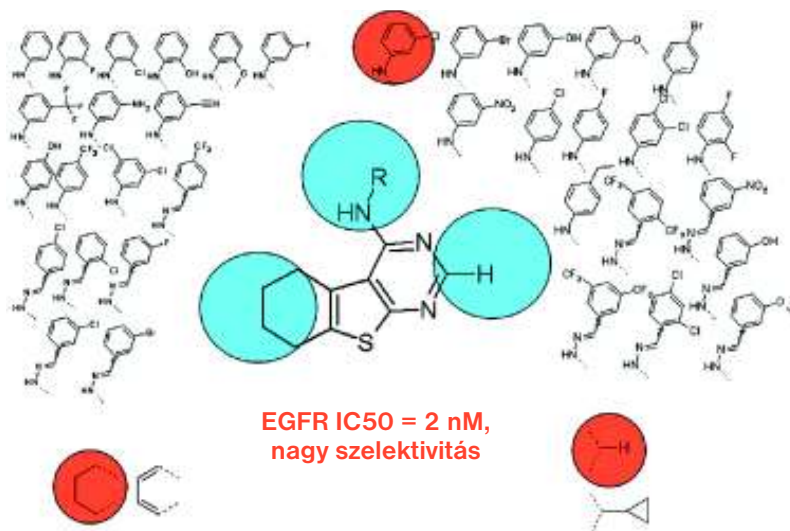
Kinázinhibitor vegyülettárunk egyik első sikeres felhasználása a VEGF egyik receptorának, az Flk1- (humán: KDR-) kináz szabadalmaztatható gátlószereinek felfedezését eredményezte. A vegyületek angiogenezis-gátlóként elnyomták szolid tumorok növekedését rágcsálókban (3. ábra). [16]

EGFR TK-inhibitorok

Az EGFR kóros működése számos daganatos megbetegedés hátterében kimutatható: például nem-kissejtes tüdőrák, glioblastóma multiformis, vastagbélrák és egyéb „szolid tumorok” esetében. [17]

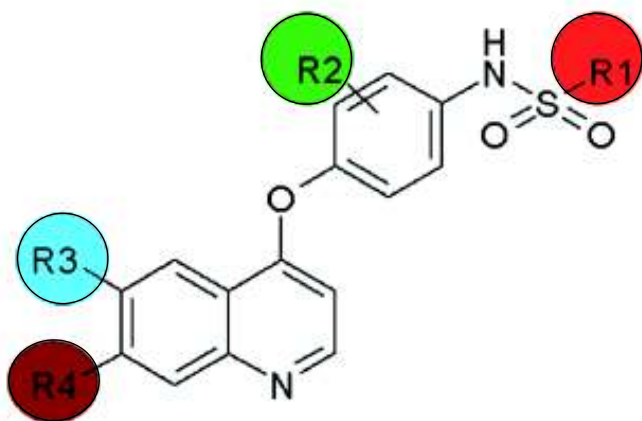
Több mint hatszáz, diverz szerkezetű EGFR TK-gátló molekula adatainak felhasználásával validált farmakofór modellt készítettünk (4. ábra). [18]

Ennek segítségével EGFR TK-gátlásra virtuális szűrés végztünk, melynek eredményeként vegyülettárunkban szabadalmaztatható, szelektív EGFR-gátló benzo-tieno-pirimidin-származékokat azonosít-



5. ábra. EGFR TK-gátló benzo-tieno-pirimidin vegyülettár

1. Szulfonamid
2. p-Amino-fenol szubsztituensek
3. Oldallánc 6-os pozícióban
4. Oldallánc 7-es pozícióban



6. ábra. Szabadalmaztatott AXL kinázgátlók általános szerkezete

tottunk (5. ábra). Sem a vegyületcsalád képviselői, sem a részstruktúra nem szerepelt a modellkészítésre használt halmazban. A biokémiai tesztben a kiválasztott hatékony vegyületek között 2nM IC_{50} -értékű vegyületet is találtunk. A vegyületcsaládot további új származékokkal bővítettük, és hazai és nemzetközi szabadalmi bejelentésekben védtük. [19][20][21][22]

AXL kinázinhibitorok

A Max Planck Intézet kutatói az AXL (RTK-) kináz megnövekedett expresszióját mutatták ki számos, fokozottan invazív, nagy motilitású emlőtumor sejtípusban. Az AXL kináz működésének több úton történő kikapcsolása (domináns negatív AXL-mutáns, antitest, siRNS) az invazivitás és motilitás csökkenését okozta. Ez-

úton validálták, hogy az AXL kináz potenciális célpont lehet a metasztatikus emlőrák kezelésében. Kutatási együttműködésünk során letesztelték kinázinhibitor vegyülettárunkat, és AXL kinázinhibitor hatású, ciano-kinolin alapvázú molekulákat találtak. Ezek közül az NA80x1 és az SKI-606 (Bosutinib) mutatták a legerősebb gátlást. A vegyületek relatív kinázszelektivitásának affinitás-kromatográfiával történő meghatározásához (soklépéses szintézissel) előállítottuk mindkét vegyület aminoszubsztituált származékát. A vegyületek hatásosságának és sokirányú vizsgálatának eredményei alapján célul tűztük ki a meglévő vegyületeknél hatékonyabb, szabadalmaztható, AXL kinázgátló vegyületek előállítását és optimalizálását.

Először nagyszámú, szabadalmaztható

ciano-kinolin-származékot állítottunk elő, de ezek mindegyike gyengébb hatású volt, mint a Bosutinib (IC_{50} : 690nM). Az eredeti struktúrától eltávolodva, a cianofunkciót elhagyva, az irodalomban leírt fenoxi-kinolinok között a Bosutinibnél háromszor hatékonyabb, de rosszul oldható származékot találtunk. Ennek az alapstruktúrának a módszeres változtatásával két szabadalomban védett, AXL kinázgátló vegyületcsaládot fejlesztettünk ki (6. ábra). A két szabadalomban leírt, legjobb 461 vegyület közül 28 vegyület mutatott 50 nM alatti (a legjobb, 16 nM) IC_{50} -értékeket, és 51 anyag mutatott minimum tízszeres AXL-inhibitor hatást a Bosutinibhez képest. A vegyületek több más daganatellenes célpont-kinázt is gátolnak az AXL kinázon kívül, így daganatos sejtvonalakban apoptózist okoznak. A legjobb anyagok preklinikai és in vivo vizsgálatra kerültek. A humán klinikai vizsgálatok folyamatban vannak. [23][24][25]

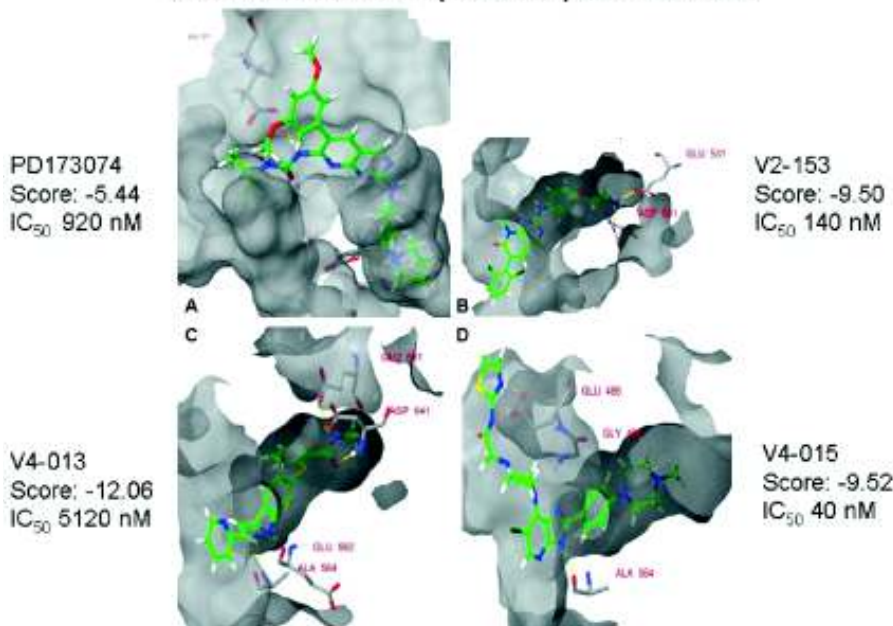
FGFR4-inhibitorok

A fibroblaszt növekedési faktor receptor-4 tirozin-kináz (FGFR4) túlműködése vagy mutációja számos daganatban kimutatható, ami potenciális terápiás célponttá teszi. Magyar-szingapúri kutatási együttműködésünk célkitűzése az volt, hogy kinázinhibitor vegyülettárunk (NCL™) felhasználásával és hatóanyag-fejlesztési stratégiánk alkalmazásával FGFR4-inhibitorokat találjunk, és ezek daganatellenes hatását FGFR4-expresszáló emlőráksejteken igazoljuk.

A vizsgálandó vegyületek kiválasztásához, illetve a tesztelendő minták számának csökkentéséhez, 3D célmolekula-szerkezet alapú szűrést terveztünk. Mivel a célmolekula 3D kristályszerkezete nem áll rendelkezésre, ezért a közeli homológ, FGFR1 kristályszerkezetét használtuk fel a virtuális tesztelés során. A bővített validációs vegyülettárunk ~2000 szerkezetének Schrödinger programcsomaggal végzett virtuális tesztelése (dokkolása) után, a 19 legjobbnak becsült potenciális inhibitor mellé véletlenszerűen kiválasztottunk 10 molekulát negatív kontrollként, amiket a dokkolás gyenge hatásúnak ítélt. Mind a 19 pozitív hatásúnak becsült vegyület hatásos volt FGFR4-tesztekben, ezek közül a legjobb, a V4-015, 40 nM IC_{50} -értékű volt (7. ábra). Négy vegyület (V4-015, V2-153, V4-013, V4-007) MDA-MB453 emlőráksejteken is jelentős aktivitást mutatott. A V4-015 vegyület apoptotikus hatású, növeli a kaspáz 3/7 aktivitást, és gátolja a sejtek migrációját, ezért a vegyület továbbfejlesztését tervezzük. [26]



A PD173074 REFERENCIA-ANYAG ES A LEGJOBB HIT-MOLEKULAK DOKKOLVA AZ FGFR1 (PDB:3C4F) KÖTŐHELYÉRE



7. ábra. Virtuális screening alapján talált FGFR-gátló hatású vegyületek

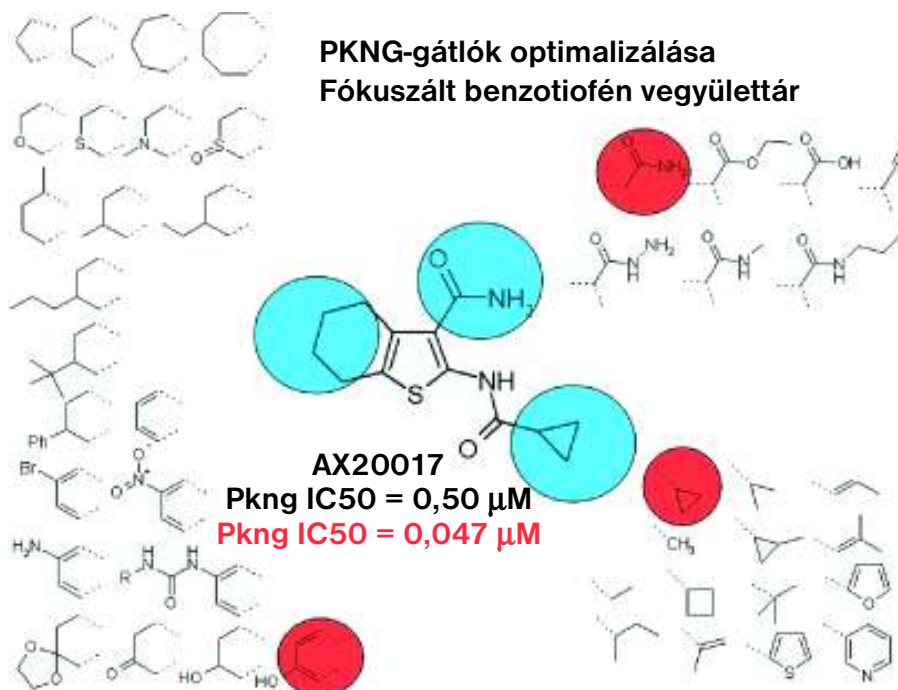
Kórokozókra ható kinázgátlók

Potenciális tbc-ellenes hatású PknG kinázgátlók

M. smegmatis és *M. bovis* esetében kimutatták, hogy a makrofágban a fagoszómába kerülő *Mycobacterium tuberculosis* túlélését az általa termelt bakteriális PknG (szerin-treonin-kináz) enzim segíti elő, ami gátolja a baktériumot tartalmazó fagoszóma és a lizoszóma fúzióját. Több mód-

szerral igazolták, hogy a PknG gátlása esetén, a bekövetkező fúziót követően, a lizoszómális enzimek megemésztik a baktériumot. A hatóanyag-fejlesztés ezen a területen több szempontból is ígéretesnek látszott. A PknG (és a többi 10) bakteriális kináz igen alacsony (< 30%) homológiát mutat a megfelelő humán kinázokkal, ezért esély látszott szelektív, csekély mellékhatást okozó szer kifejlesztésére. A másik előnynek az új hatásmód látszott, azaz,

8. ábra. PKNG-gátlók fejlesztése

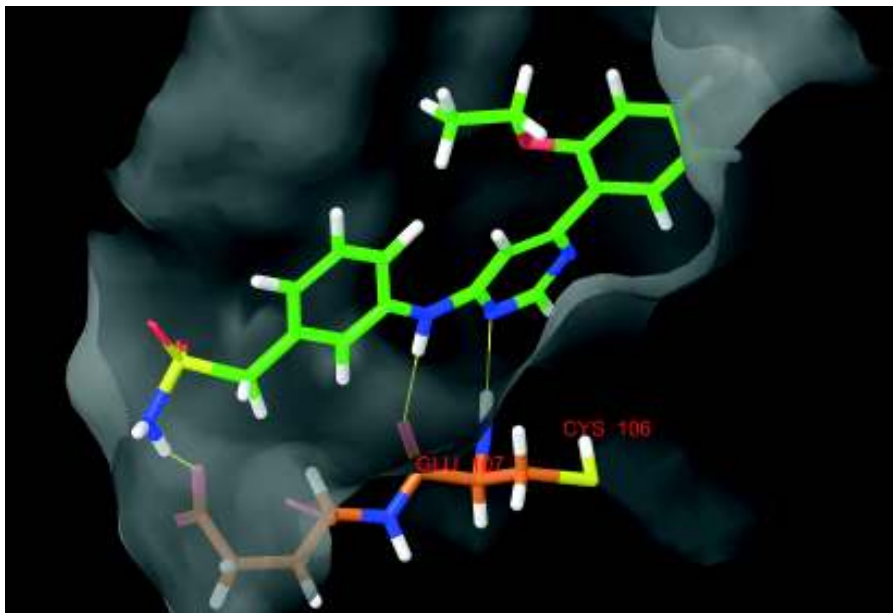


hogy a kinázgátló csak „lefegyverzi” a baktériumot, amit ezután a gazdszervezet könnyen elpusztít. [27]

A hatóanyag-fejlesztés egy 55 000 vegyületet tartalmazó vegyülettár tesztelésével indult (Axxima AG). Gyógyszerkémiai optimalizálással sikerült kifejlesztünk egy szelektív PknG-gátló, tetrahydro-benzo[b]tiofén alapvázis vezetőmolekulát (AX20017), melynek IC₅₀-értéke ~500 nM volt. A vegyület úgy pusztította el a *M. bovis* baktériumot a gazdasejtekben, hogy a PknG enzim gátlásával elősegítette a fagoszóma-lizoszóma fúziót, ugyanakkor a makrofágokra nem volt toxikus. Az anyag mikroszomális stabilitása viszont gyenge volt. A vezetőmolekula és az új követőmolekulák előállításai módszereit munkacsoportunk dolgozta ki. [28] A fejlesztés során több iterációs ciklusban igen nagyszámú (ezernél több) új analógot fejlesztettünk ki. Farmakofór modellt készítettünk, amit a mért inhibitorhatás és ADME-tulajdonságok figyelembevételével folyamatosan továbbfejlesztettünk. Az AX20017-ből kiinduló optimalizációval nyert, 4,5,6,7-tetrahydro-benzo[b]tiofén vegyületsorozat leg-hatékonyabb képviselője 47nM IC₅₀-értékkel gátolta a PknG enzimet. A kiindulási anyaghoz képest lényegesen stabilabb származékokat is sikerült előállítani. Az általunk tervezett, in vivo vizsgálatban is vizsgált, AX14585 tetrahidropirán-analóg vegyület mikroszomális stabilitása az AX20017 stabilitásának kétszerese volt. [29] Az első szabadalmunk 287 kémiai példája között a különféle módon szubsztituált tetrahydro-benzotiofén-származékokon kívül heteroatomot tartalmazó analóg (O,S,N) és triciklusos származékok is voltak (8. ábra). [30]

A második, továbbfejlesztett, aromás származékokat is tartalmazó vegyületsorozat hatékonyságát újabb nagyságrenddel sikerült növelni, így például a halogénezett fenolanalógokkal 5 nM IC₅₀-értékig jutottunk. A vegyületsorozat újabb szabadalmában 718 kémiai példa szerepel. [31] A hatékony molekulák mellett a PknG enzimre nem ható szerkezetek is bekerültek vegyülettárunkba és adatbázisunkba. Ezek között találtuk virtuális teszteléssel a fentebb említett, szelektív EGFR-gátló, triciklusos származékokat is, melyeket továbbfejlesztettünk, és szabadalmaztattunk. [19]

A vegyületsorozat értékes, gyógyszereszerű tulajdonságai, több más vegyületsorozatunk mellett, hozzájárultak az ún. „mesterkulcs”- (masterkey) koncepció kidolgozásához, aminek az a lényege, hogy az alapváz alkalmasan megválasztott „dekoráció-



ID	Docking Score	IC50 (nM)
1	-10,866	28
2	-9,306	37
3	-9,279	40
4	-8,910	45
5	-8,272	1020
6	-7,900	2200
7	-8,199	7200
8	-7,657	9330
9	-9,095	>10 000
10	-6,857	>10 000
11	-8,214	>10 000
12	-8,523	>10 000
13	-6,963	>10 000
14	No pose recorded	>10 000

9. ábra. Több száz vegyület virtuális szűrése történt a Schrödinger Suite 2009 program-csomaggal (PDB ID: 3BLQ – CDK9/CycT1 structure in complex with ATP). A kötődés modellezése az ATP-kötőhelyen (CYS106 – Hinge régió). A legjobbnak becsült vegyület (1-gyel jelölt) 28 nM-os IC50-értéket mutatott kináz assayben

jával” eltérő kinázok gátlószereit lehet kifejleszteni, már biztosított szabadalmi védelem mellett.

CDK9-inhibitorok és ezek potenciális terápiás alkalmazhatósága

A sejtosztódás folyamatában a CDK9-kináznak a *transzkripció szabályozásában* van szerepe, az RNS-polimeráz II nagyobbik alegységét foszforilálja a C-terminálison, minek következtében az RNS-polimeráz II az iniciációs komplexről leválik, és megkezdődik az átírást. Két ismert izoformája közül a kisebb, a CDK9-42 játszik szerepet a HIV-1 fertőzésekben. Az eddigi vizsgálatok potenciális célmolekulának tekintik a CDK9 enzimet még a kóros szívnyagyobbodás, bizonyos tumorok (pl. mielóma) és gyulladásos betegségek terápiájában is. [32]

A CDK9 legismertebb gátlószere az általános CDK-gátló flavopiridol (IC₅₀: 2nM), melynek CDK9/CycT1-gyel alkotott kristályszerkezete ismert. A flavopiridolon kívül nagyszámú más inhibitor is ismert (roscovitine, paullonok stb.), ezekben mind közös, hogy nagyon kevésbé szelektívek. 2006-ban viszont két, 4-amino-6-fenil-pirimidin alapvázra épített, több száz, szelektív CDK9-inhibitor közlő szabadalom vált publikussá (9. ábra). A szabadalmak nem fedték le a szerkezetre építhető, általunk hatékonyan becsült vegyületek kémiai terét. Az új, szintetizálható vegyületek körét felmérve, a megfelelő 4-klór-6-(szubsztituált-fenil)-pirimidin kulcsintermedierek előállítására egyszerű szintetikus eljárásokat dolgoztunk ki, és ezekből fókuszált ve-

gyülettárat állítottunk elő. Az új vegyületek megmért CDK-9-gátló hatását figyelembe véve, a szerkezeteket tovább optimalizáltuk. A vegyületek hatását CDK (CDK1,2,3,4,5,6,7, és 9) kináz paneleken vizsgálva, CDK9 enzimre szelektív anyagokat találtunk, melyek hatása összemérhető volt az irodalomból ismert anyagokéval, illetve azokat meg is haladták (IC₅₀: 610–27 nM). A vegyületcsalád HIV-1 vírus szaporodását gátló hatását HIV-1 sejtekkel fertőzött sejt kultúrában igazoltuk, ezt követően a hatékony anyagokat szabadalmaztattuk. A vezető molekulák preklinikai vizsgálati folyamatban vannak. [33] [34]

Köszönetnyilvánítás. A szerző köszönetet mond az idézett művekben szereplő összes társszerzőnek.

IRODALOM

[1] Wu P., Nielsen T. E., Clausen M. H.: Small-molecule kinase inhibitors: an analysis of FDA-approved drugs, *Drug Discov. Today*, (2016) 21, (1)5, /1–10.

[2] Keri G., Szekelyhidi Z., Banhegyi P., Varga Z., Hegyemi Barakonyi B., Szantai Kis C., Hafenbradl D., Klebl B., Muller G., Ullrich A., Eros D., Horvath Z., Greff Z., Marosfalvi J., Pato J., Szabadkai I., Szilagyi I., Szege-di Z., Varga I., Waczek E., Orfi L.: Drug discovery in the kinase inhibitory field using the Nested Chemical Library (TM) technology., *Assay Drug Dev. Techn.* (2005) 3(5), 543–551.

[3] Keri G., Bokonyi G., Waczek E., Greff Z., Eros D., Szantai-Kis C., Hegyemi-Barakonyi B., Ullrich A., Orfi L.: Nested Chemical Library of Kinase Inhibitors and Pharmacophore Modelling, *J. Pept. Sci.* (2004) 10, 249.

[4] Kövesdi I., Dominguez-Rodriguez M.F., Orfi L., Nár-ay-Szabó G., Varró A., Papp J. Gy., Mátyus P.: Application of neural networks in structure-activity relationships, *Med. Res. Rev.* (1999) 19(3), 249–269.

[5] Kövesdi I., Kéri Gy., Orfi L.: Method For Generating A Quantitative Structure Property Activity Relationship US2004199334 (2004), WO02082329, (2002), EP1402454 (2004).

[6] Kövesdi I., Orfi L.: Információtechnológia a gyógyszerkutatásban In: Dinya E (szerk.) *Humán gyógyszerfejlesztés, A molekulatervezéstől a terápiáig*, Budapest, Medicina Könyvkiadó, 2006. 29–64. (ISBN: 9632429982) [7] Eros D., Keri G., Kovessi I., Szantai

Kis C., Meszaros G., Orfi L.: Comparison of predictive ability of water solubility QSPR models generated by MLR, PLS and ANN methods, *Mini-Rev. Med. Chem.* (2004) 4(2), 167–177.

[8] Szantai Kis C., Kovessi I., Keri G., Orfi L.: Validation subset selections for extrapolation oriented QSPAR models, *Mol Divers* (2003) 7(1), 37–43.

[9] Eros D., Kovessi I., Orfi L., Takacs Novak K., Acsady G., Keri G.: Reliability of logP predictions based on calculated molecular descriptors: A critical review, *Curr. Med. Chem.* (2002) 9(20), 1819–1829.

[10] L. Orfi, I. Kövesdi: Lead search, selection and optimization, in *silico* (virtual) screening. In: Keri Gy., Toth I. (szerk.): *Molecular pathomechanisms and new trends in drug research*. London; New York: CRC Press – Taylor and Francis Group, 2003. 166–177. (ISBN: 0415277256 ; 9780415277259)

[11] Szantai Kis Cs.: Szerkezet-hatás összefüggések vizsgálata a kinázgátlók körében. PhD-értekezés, Semmelweis Egyetem, Gyógyszertudományok Doktori Iskola, 2007.

[12] Varkondi E., Schafer E., Bokonyi Gy., Gyokeres T., Orfi L., Petak I., Pap A., Szokoloczi O., Keri Gy., Schwab R.: Comparison of ELISA-based tyrosine kinase assays for screening EGFR inhibitors, *J. Recept. Signal. Tr. R.* (2005) 25(1), 45–56.

[13] Varkondi E., Pinter E., Robert K., Schwab R., Breza N., Orfi L., Keri G., Petak I.: Biochemical assay-based selectivity profiling of clinically relevant kinase inhibitors on mutant forms of EGF receptor *J. Recept. Signal. Tr. R.* (2008) 28(3), 295–306.

[14] Gy. Kéri, L. Orfi, G. Németh: *Kinase Inhibitors in Signal Transduction Therapy* In: Klebl B, Müller G, Hamacher M (szerk.) *Protein Kinases as Drug Targets* Weinheim: Wiley – VCH Verlag GmbH – KGaA, 2011. 115–144. (ISBN:978-3-527-31790-5)

[15] Baska E., Szabadkai I., Sipos A., Breza N., Szantai-Kis C., Kékesi L., Garamvölgyi R., Nemes Z., Baska E., Neumann L., Torka R., Ullrich A., Kéri Gy., Orfi L.: Pharmacophore and binding analysis of known and novel B-RAF kinase inhibitors, *Curr. Med. Chem.* (2014) 21(17), 1938–1965.

[16] Strawn L. M., McMahon G., App H., Schreck R., Kuchler W. R., Longhi MP, Hui TH, Tang C, Levitzki A, Gazit A, Chen I, Keri Gy, Orfi L, Risau W, Flamme I, Ullrich A, Hirth KB, Shawver: LK Flk-1 as a Target for Tumor Growth Inhibition, *Cancer Res.* (1996) 56(15), 3540–3345.

[17] Hegyemi-Barakonyi B., Eros D., Szantai-Kis C., Breza N., Banhegyi P., Szabo G. V., Varkondi E., Petak I., Orfi L., Keri Gy.: Tyrosine kinase inhibitors – Small molecular weight compounds inhibiting EGFR. *Curr. Opin. Mol. Ther.* (2009) 11(3), 308–321.



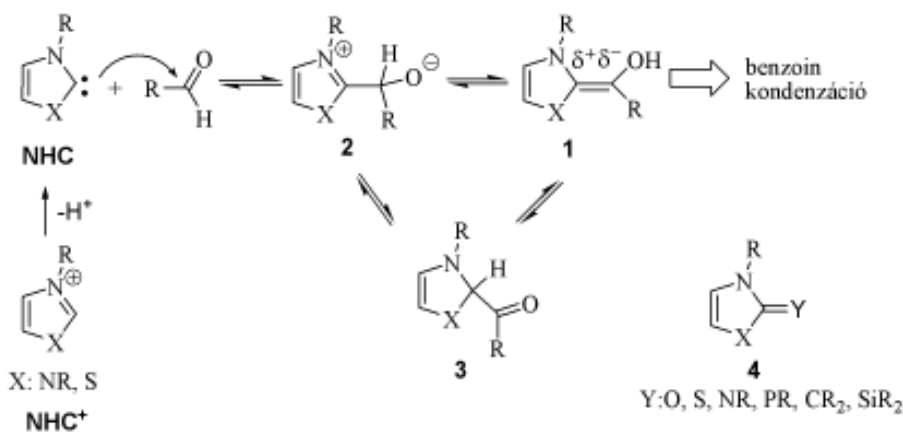
- [18] Szantai Kis C., Kovessi I., Eros D., Banhegyi P., Ullrich A., Keri G., Orfi L.: Prediction oriented QSAR modelling of EGFR inhibition. *Curr Med Chem.* (2006) 13(3), 277–287.
- [19] Banhegyi P., Keri G., Oerfi L., Szekelyhidi Zs., Waczek E.: Preparation of benzo[4,5]thieno[2,3-d]pyrimidin-4-ylamines as kinase inhibitors for treatment of proliferative diseases such as cancer. *WO 2009 104026 A1* (2009).
- [20] Banhegyi P., Keri G., Oerfi L., Szekelyhidi Zs., Waczek E.: Preparation of benzo[4,5]thieno[2,3-d]pyrimidines as tyrosine kinase inhibitors useful as therapeutic agents. *WO 2009104027 A1* (2009).
- [21] Banhegyi P., Keri G., Orfi L., Szekelyhidi Zs., Waczek E.: Medical use of tricyclic aromatic and saturated benzo[4,5]thieno-[2,3-d]pyrimidine derivs. and their pharmaceutically acceptable salts as tyrosine kinase inhibitors. *HU 2006000707 A2* (2009).
- [22] Bánhegyi, P.: Kinázgátló hatású benzotiofén-szár-mazékok tervezése és előállítása. PhD-értekezés, Semmelweis Egyetem, Gyógyszertudományok Doktori Iskola, 2008.
- [23] Zhang Y. X., Knyazev P. G., Cheburkin Y. V., Sharma K., Knyazev Y. P., Orfi L., Szabadkai I., Daub H., Keri G., Ullrich A.: AXL is a potential target for therapeutic intervention in breast cancer progression. *Cancer Res.* (2008) 68(6), 1905–1915.
- [24] Ullrich A., Torka R., Zhang Y., Keri Gy., Oerfi L., Szabadkai I.: Preparation of quinolinolxyphenylsulfonamides for treating and preventing hyperproliferative disorders. *WO 2011045084 A1* (2011), *US20 12277231 (A1)*, *EP2462117 (A1)*.
- [25] Ullrich A., Knyazev P., Zhang Y., Keri Gy., Oerfi L., Szabadkai I.: Preparation of quinoline derivatives as AXL kinase inhibitors. *WO 2009127417 A1* (2009), *US2011092503 (A1)*, *RU2010146474 (A)* *EP2262772 (A1)*; *EP2262772 (B1)*; *EP2262772 (B8)*.
- [26] H. K. Ho, G. Nemeth, Y. R. Ng, E. Pang, C. Szantai-Kis, L. Zsakai, N. Breza, Z. Greff, Z. Horvath, J. Pato, I. Szabadkai, B. Szokol, F. Baska, L. Orfi, A. Ullrich, G. Keri and B. T. Chua: Developing FGFR4 Inhibitors As Potential Anti-Cancer Agents Via In Silico Design, Supported by In Vitro and Cell-Based Testing. *Curr. Med. Chem.* (2013) 20(10), 1203–1217.
- [27] Magnet S., Hartkoorn R. C., Szekely R., Pato J., Triccas J. A., Schneider P., Szantai-Kis C., Orfi L., Chambon M., Banfi D., Bueno M., Turcatti G., Keri G., Cole S. T.: Leads for antitubercular compounds from kinase inhibitor library screens, *Tuberculosis* (2010) 90(6), 354–360.
- [28] Szekely R., Waczek E., Szabadkai I., Nemeth G., Hegyemi-Barakonyi B., Eros D., Szokol B., Pato J., Hafenbradl D., Satchell J., Saint-Joanis B., Cole S. T., Orfi L., Klebl B. M., Keri G.: A novel drug discovery concept for tuberculosis: Inhibition of bacterial and host cell signaling. *Immunol. Lett.* (2008) 116(2), 225–231.
- [29] Hegyemi-Barakonyi B., Szekely R., Varga Z., Kiss R., Borbely G., Nemeth G., Banhegyi P., Pato J., Greff Z., Horvath Z., Meszaros G., Marosfalvi J., Eros D., Szantai-Kis C., Breza N., Garavaglia S., Perozzi S., Rizzi M., Hafenbradl D., Ko M., Av-Gay Y., Klebl B. M., Orfi L., Keri G.: Signalling Inhibitors Against Mycobacterium tuberculosis – Early Days of a New Therapeutic Concept in Tuberculosis. *Curr. Med. Chem.* (2008) 15(26), 2760–2770.
- [30] Koul A., Klebl B., Mueller G., Missio A., Schwab W., Hafenbradl D., Neumann L., Sommer M.N., Mueller S., Hoppe E., Freisleben A., Backes A., Hartung C., Felber B., Zech B., Engkvist O., Keri G., Oerfi L., Banhegyi P., Greff Z.: Preparation of hetero-bicyclic fused thieno-pyran compounds as antibacterial, antiviral, antitumor, and pharmaceutically active agents *WO 2005023818 A2* (2005); *US2007275962 (A1)*; *EPI670804 (A2)*; *CA2572750 (A1)*; *AU2004270394 (A1)*.
- [31] Pato J., Keri G., Orfi L., Waczek E., Horvath Z., Banhegyi P., Szabadkai I., Marosfalvi J., Hegyemi-Barakonyi B., Szekelyhidi Zs., Greff Z., Choidas A., Bacher G., Missio A., Koul A.: Inhibitors of mycobacterial serine/threonine protein kinases for the treatment of mycobacterial infections. *US 20040171603 A1* (2004).
- [32] Németh G.: Foszfortartalmú CDK9 kinázgátló vegyületek előállítása. PhD-értekezés, Semmelweis Egyetem, Gyógyszertudományok Doktori Iskola, 2012.
- [33] Nemeth G., Varga Z., Greff Z., Bence G., Sipos A., Szantai-Kis C., Baska F., Gyuris A., Kelemenics K., Szathmary Z., Minarovits J., Keri G., Orfi L.: Novel, Selective CDK9 Inhibitors for the Treatment of HIV Infection. *Curr. Med. Chem.* (2011) 18(3), 342–358.
- [34] Greff Z., Varga Z., Keri Gy., Nemeth G., Oerfi L., Szantai Kis Cs.: Preparation of 4-phenylaminopyrimidine derivatives as protein kinase inhibitors *WO 2011077171 A1* (2011), *US2012258968 (A1)*, *EP2516405 (A1)*.

Kelemen Zsolt–Nyulászi László

■ BME Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék

Karbének szerepe molekulák reaktivitásának megváltoztatásában: előállítás, szerkezet – molekulahangolás

Az N-heterociklusos karbének (1. ábra: NHC) két vegyértékű szénatomot tartalmazó vegyületek, melyek nagy stabilitásuk és különleges szerkezeti sajátosságuk mellett számos felhasználhatóságuk miatt váltak napjaink egyik leginkább kutatott vegyületcsaládjává. Elektronszerkezetüket megvizsgálva megállapítható, hogy a szingulett karbének rendelkeznek egy σ -donor betöltött pályával és egy arra merőleges üres p_z pályával, mely π -akceptor képességgel rendelkezik. E két pálya együttes jelenlétének köszönhetően bizonyos hasonlóságot mutatnak a közismerten változatos katalitikus tulajdonsággal rendelkező átmeneti fémekkel. [1] Így például a vegyületek képesek egy adott molekula szokásos polarizációs viszonyait megváltoztatni (*umpolung*), ezáltal stabilizálva vagy éppen aktiválva azokat, ezáltal akár katalitikus folyamatokat megvalósítva. Az egyik leginkább vizsgált ilyen addukt az



1. ábra. Karbén-aldehid adduktok (1–3), egymásba alakulásuk lehetősége és a Breslow-intermediér analógok (4)

úgynevezett Breslow-intermediér [2] (1. ábra: 1), mely többek közt aldehidek karbén katalizált kondenzációjának a kulcs intermediere.

A Breslow által már az 50-es években fel-

vázolt mechanizmus szerint [2] a katalitikus ciklus első lépéseként az általában *in situ* deprotonálás útján előállított karbén betámad az aldehid karbonil szénatomjára (1. ábra), így egy úgynevezett kezdeti