

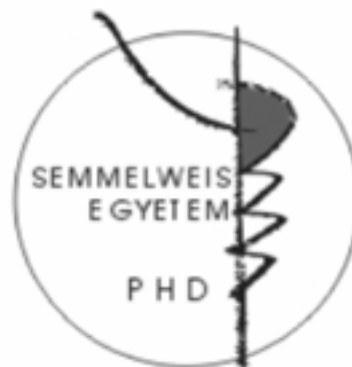
c-Met és EGFR kinázt célzó multikináz gátló vegyületek előállítása és biokémiai vizsgálata

Doktori tézisek

Szokol Bálint

Semmelweis Egyetem

Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kéri György, egyetemi tanár, D.Sc.

Hivatalos bírálók: Dr. Hosztafi Sándor, C.Sc.
Dr. Majer Zsuzsa, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tekes Kornélia, Ph.D.

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Huszthy Péter, D.Sc.
Dr. Klebovich Imre, D.Sc.

Budapest
2014

1. Bevezetés

Kutatómunkánk fő célja az volt, hogy olyan újszerű vegyületeket állítsunk elő, melyek egyszerre két, a tüdőrákok kialakulásában kulcsszerepet játszó „driver” onkogén kinázt (EGFR és c-Met) gátolnak, megakadályozva a külön-külön célpontok ellen szelektív gátlószerekkel szemben kialakult rezisztencia létrejöttét és gátolják a már rezisztens tumorsejtek szaporodását. Az újszerű vegyületeket ismert molekulák szerkezetéből, többféle fókuszált vegyülettárak szintézisével fejlesztettük ki, *in silico* számításokat, illesztéseket is felhasználva. Munkánk során olyan származékot is sikerült kifejleszteni, mely Pt-hordozóhoz köthető, így e származék alkalmas sejtszelektív biokonjugátum készítésére.

1.1. A tumoros megbetegedések mértéke és terápiája

A tumoros betegségek felismerése és gyógyítása régóta komoly kihívás az orvostudomány számára, napjainkban is évente 1,6 millió új beteget regisztrálnak évente csak az Egyesült Államokban és nagyjából 70 000 beteget Magyarországon. A rákos megbetegedések jelentős részét férfiak esetén a hámeredetű tüdőrákok teszik ki, míg nők esetén a tüdőrák a mellrák után második helyen áll. A

tumorsejtek jeltovábbítási mechanizmusaikban túlélési jelként gyakran foszforilációt végző kináz enzimeket használnak, melyek gátlásával a tumorsejtek szaporodása megállítható, kedvezőbb esetben pedig a tumorsejtek elpusztíthatóak. A kinázok ezért a rákgyógyítás szempontjából a leggyakoribb terápiás célpontokká nőttek ki magukat az elmúlt évtizedben, melynek eredményeként napjainkra huszonhat, kinázgátláson alapuló gyógyszer került forgalomba és több száz vegyület áll klinikai vizsgálatok alatt. A 2005-ben indult Cancer Genome Atlas kutatási program részeként több száz genetikus mutációt tártak fel, ami fontos mérföldkövet jelent számos új, rák elleni gyógyszer fejlesztéséhez. Az eddig összegyűlt ismeretanyag alapján 138 tumorképződésért felelős driver (hajtó) gént tartanak nyilván, melyekből 64 onkogén és 74 tumor szupresszor gén. E gének 12 jeltovábbítási útvonalat fednek le.

1.2. A szerzett rezisztencia kialakulása

Megfigyelték, hogy a betegek egy csoportja, bár reagál az EGFR gátlókkal történő kezelésre, később rezisztencia alakul ki, hónapokkal később a tumor kiújul és ekkor már az EGFR gátlók teljesen elvesztik a hatásukat. Az egyik leggyakoribb ok a T790M mutáció (tirozin/metionin csere) – e mutáció a

másodlagosan rezisztens sejtek 50 %-ban megtalálható- illetve más mutációk (D761Y, L747S, T854A) is felelősek. (kb. 5%) A szerzett rezisztencia nemcsak mutáns EGFR segítségével, hanem EGFR-t aktiváló kerülő útvonalak használatával („onkogén kapcsoló”) is történhet, ezáltal a tumorsejt EGFR függetlenné válik. Az NSCLC (nem-kissejtes tüdő karcinóma) tumorokban az esetek 18-20 százalékában fordul elő c-Met amplifikáció, mely a erlotinib/gefitinib rezisztenciát okozó PI3K jelút aktiválásához vezet, miközben a jelút az EGFR kinázzal rokon HER3-től is függővé válik. A c-Met, EGFR és a Her3 kapcsolatát számos kutatás bizonyította és nyilvánvalóvá vált, hogy ezekben a tumorokban nem elég az egyes onkogének gátlása, hanem a c-Met és EGFR együttes gátlása révén érhetjük el a tumorsejtek elpusztítását.

1.3. A sejtpecifikus biokonjugátumok

A klinikai fejlesztés alatt álló kinázgátlók jelentős része széles spektrumú inhibitor, ami a gyógyszer elleni rezisztencia miatt előnyös, viszont hátrány a nem kívánatos célpontok gátlása miatt fellépő mellékhatások miatt. E mellékhatások jelentősen korlátozzák a klinikai alkalmazást, azonban sejt és szervspecifikus hordozókkal a mellékhatások jelentősen

csökkenthető. A hordozók között a leggyakoribbak a liposzómák és makromolekuláris konjugátumok, melyek - a megfelelő szerveget célozva - képesek a liposzómába csomagolt, vagy a hordozóhoz kötött gyógyszert célba juttatni. Új megközelítést jelent a nem toxikus platina-hordozóhoz köthető gyógyszer-molekulák fejlesztése. Az ULSTM segítségével olyan biokonjugátumok készíthetőek, melyekre egyszerre gyógyszer-molekula, antitest, vagy a hatóanyag felszabadulásáért felelős vagy sejtspecifikus makromolekula is köthető, így a biokonjugátum szerv és sejtszelektívvé tehető.

2. Célkitűzések

Tudományos munkám céljaként új, EGFR és c-Met kinázt egyszerre gátló vegyületek előállítását tűztem ki. Feladatom volt, hogy a klinikailag releváns c-Met gátlókat is előállítsak, melyeket a későbbi enzimes és sejtes vizsgálatokhoz referencia vegyületként használtunk, illetve e szerkezetek több ponton történő módosításával próbáltam mindkét kináz gátlására alkalmas származékokat előállítani. A vegyületek kötődését mindkét kináz esetén számítógépes predikciókkal is vizsgáltuk. Céлом volt, hogy olyan származékokat is előállítsak, melyek alkalmasak platina hordozóhoz kötéshez.

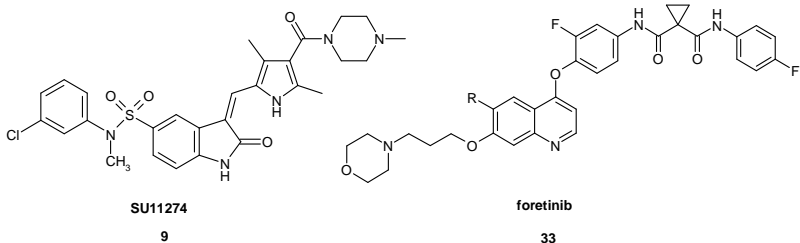
3. Módszerek

3.1. Biológiai, kémiai módszerek és *in silico* módszerek

A referencia vegyületeket, származékaikat és az eddigi szerkezetektől eltérő, újszerű vegyületeket klasszikus szerves kémiai módszerekkel állítottuk elő, irodalmi leírás és azok analógiái alapján. A biológiai módszereket tekintve, első megközelítés szerint a vegyületeket *in vitro* enzimes vizsgálatoknak vetettük alá, majd a hatékony vegyületeket klinikailag releváns tumorsejt vonalakon is teszteltük. A leghatékonyabb vegyületeket klasszikus biokémiai módszerekkel (Western blot, FACS, enzimkinetika mérés) jellemeztük. A számítógépes illesztéshez szakirodalomból származó röntgenkristallográfiai adatokat használtunk.

3.2. A c-Met gátló referencia vegyületek előállítás

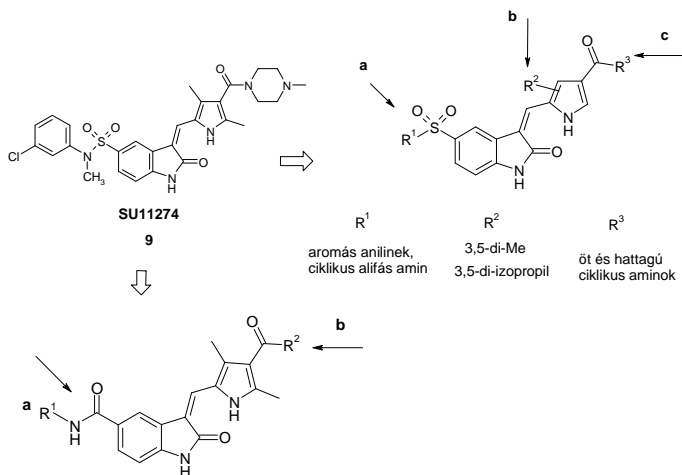
A sejtes és enzimes mérések validálásához referenciaként használt vegyületekre is szükség volt, ezért két c-Met gátló vegyület, SU11274 (**9**), foretinib (**33**) is előállítottam. (1. ábra)



1. ábra. c-Met kinázgátló hatású referencia anyagok

3.3. Fókuszált vegyülettár előállítása

A SU11274 három szerkezeti részén változtatva fókuszált vegyülettárat állítottam elő. (2. ábra).



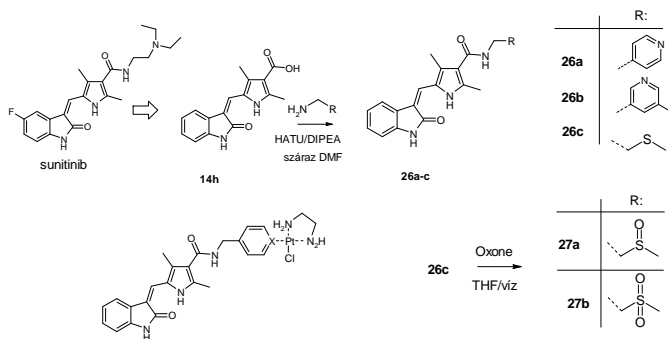
2. ábra. SU11274 szerkezeti változtatásai

A referencia vegyületek szerkezetén az alábbi módosításokat végeztem: **a.** Az 5-ös szulfonamid anilin részét változtattam, **b.** a pirrol alkilcsoportjait; **c.** a pirrol-karboxamid részt.

Folytatásként az 5-szulfonamid szerkezeti elemet 5-karboxamid csoportra cseréltem és az **a.** 5-ös karboxamid részén, illetve a **b.**, pirrol-karboxamid részén változtattam. (2. ábra)

3.4. Platina hordozóhoz köthető származékok előállítása

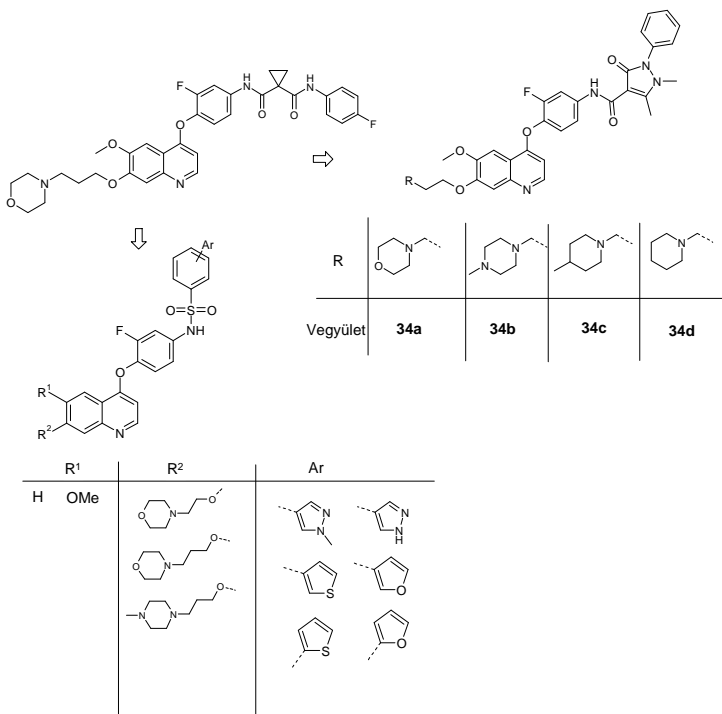
A sunitinib (Sutent®) szerkezetéből kiindulva olyan származékokat állítottam elő, melyek Pt(II)hordozóhoz köthetőek. A Sutent alapvázra a platínával komplexképzésre alkalmas piridingyűrűt építettem.



3. ábra. A Pt-hordozóhoz köthető származékok előállítása

3.5. A 4-fenoxikinolin vázas származékok

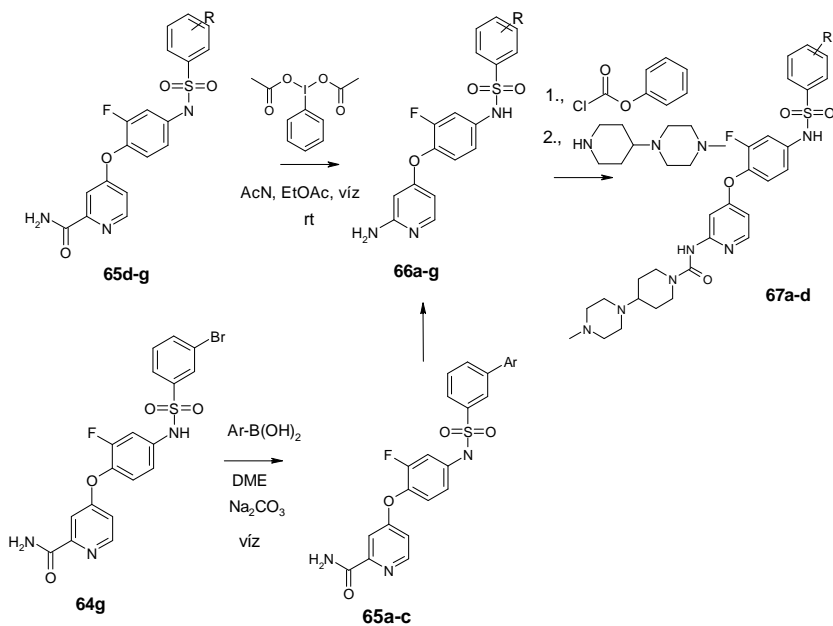
A foretinib két szerkezeti részén (6 és 7-es helyzetű oldalláncon és a karboxamid részen) változtatva fókuszált vegyülettárat állítottam elő.



4. ábra 4-fenoxikinolin vázas származékok előállítása

3.6. 2-Aminopiridin, piridin-2-karboxamid és 2-karbamid származékok

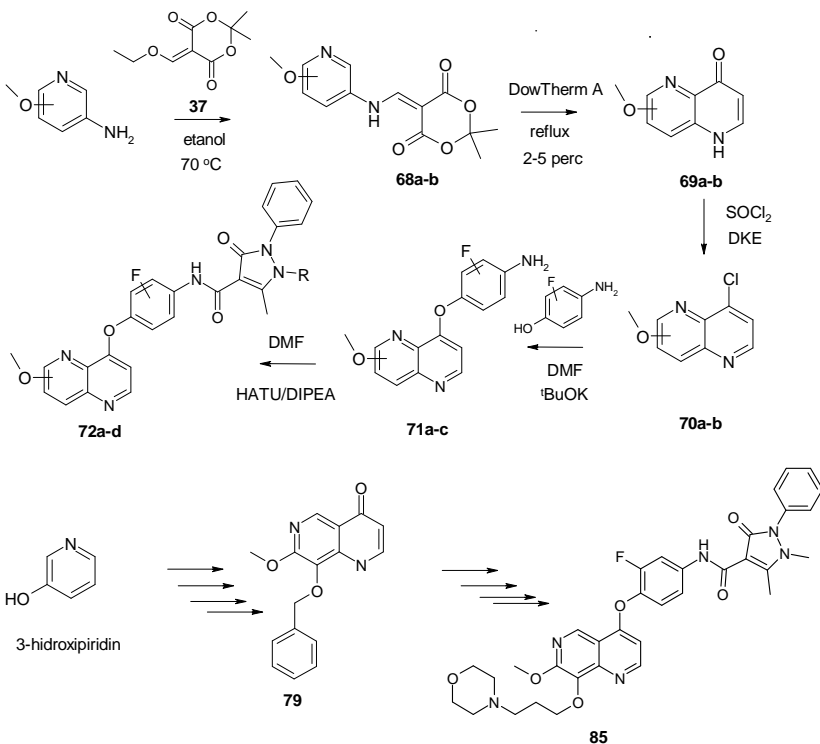
A c-Met gátló BMS-777607 és a golvatinib (E7050) szerkezetéből kiindulva, 2-aminopiridin vázat tartalmazó vegyületeket is előállítottam, hogy ezen vegyületek esetében is vizsgáljam a c-Met és az EGFR gátló hatást.



5. ábra 2-aminopiridin, piridin-2-karboxamid és 2-karbamid származékok előállítása

3.7. 1,5 és 1,6-naftiridin vázas vegyületek

Tudományos munkám során a kinolin vázzal bioizosztér 1,5- és 1,6-naftiridin vázas vegyületeket is előállítottam.



6. ábra 1,5 és 1,6-naftiridin vázas vegyületek előállítása

4. Eredmények

4.1. A c-Met, EGFR, InsR kinázok gátlása és a HCC827, H1993 sejtek viabilitására gyakorolt hatás

A c-Met és az EGFR enzimes vizsgálatokhoz különböző EGFR gátló (erlotinib, afatinib) és c-Met gátló (crizotinib, BMS777607) vegyületeket használunk. Az indol-2-on és a 2-aminopiridin vázat tartalmazó vegyületek nem voltak hatásosak c-Met kinázon, így ezeket a származékokat nem vizsgáltuk behatóbban. Az 1,5- és 1,6-naftiridinvázis vegyületek közül csak a **72a** vegyület ($IC_{50} = 32$ nM) és a **72d** ($IC_{50} = 445$ nM) mutatott c-Met gátló hatást.

A legjobb hatású vegyületek a 4-fenoxikinolin tartalmú vegyületek voltak. A foretinib szerkezete alapján elkészült **34a-d** származékok rendkívül alacsony gátlási értékeket mutattak, mind enzimes, mind sejtes vizsgálatokban. (rendre **34a-d** c-Met $IC_{50} = 5$ nM, 7nM, 15nM és 20nM, illetve H1993 $IC_{50} = 5$ nM, 2nM, 30nM és 74 nM) Hátrány, hogy alacsony koncentrációban (InsR $IC_{50} < 200$ nM gátolták az inzulin receptort és a NIH3T3 sejtvonalat ($IC_{50} = 45-74$ nM) A karboxamid szerkezeti alegység cseréje szulfonamid csoportra, bár csökkentette a c-Met gátló hatást, de megnövelte az EGFR gátló hatást. Három vegyület bizonyult a leghatékonyabbnak (**56a** c-Met $IC_{50} = 564$ nM, EGFRwt $IC_{50} = 84$ nM; **56b** c-Met $IC_{50} = 1048$ nM, EGFRwt $IC_{50} = 168$ nM; **56c** c-Met = 398 nM, EGFRwt $IC_{50} = 94$ nM). A

sejtes vizsgálatokban az **56c** HCC827 sejtvonalon $IC_{50} = 1,94 \mu M$, H1993 sejtvonalon $IC_{50} = 1,35 \mu M$ gátlóhatást mutatott.

Szerkezet-hatás összefüggés

A kinolin vázas vegyületek c-Met és EGFR gátló hatásért felelős szerkezeti részei:

a) 7-es pozícióban három szénatom hosszúságú 1-metilpiperazint tartalmazó oldallánc;

b) A biaril-szulfonamid rész 3-as helyzetében lévő ötagú, heteroaromás gyűrű szükséges;

c) a 3-as pozícióban a vizsgált vegyületek közül az 1-metil-1*H*-pirazol-4-il (**56a**), 3-furil (**56b**) és a 3-tenil (**56c**) gyűrűt tartalmazó vegyületek a leghatékonyabbak. Az oldalláncot nem tartalmazó származékok egyik kinázt sem gátolták.

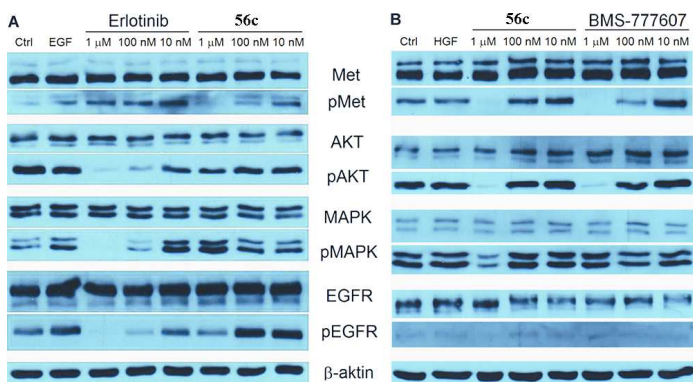
4.2. A leghatékonyabb vegyületek vizsgálata

Az esetleges toxikus mellékhatások feltérképezése miatt az **56c** (3-tienil) vegyületet egy 36 kinázból álló, klinikailag releváns kinázokat tartalmazó panelen vizsgáltuk. Bár a vegyület számos kinázt gátol egyszerre, hat kinázt - DDR1 (111 %), AXL (109 %), cKIT (91 %), ErbB2 (81 %), RET (78 %) és FLT3 (76 %) gátolt 75 % felett, 1 μM

vegyület-koncentráció esetén. A vegyületről megállapítottuk, hogy ATP-kompetitív természetű. A vizsgálat folyamán az EGFR_{wt} és c-Met enzimaktivitást (V_{max}) többféle ATP és kinázgátló-koncentráció mellett mértük meg, majd Lineweaver-Burk féle dupla reciprok grafikonon ábrázoltuk.

4.3. Western blot vizsgálat

Western blot analízissel kívántuk kideríteni, hogy vajon a vegyületek a sejten belül is gátolják a két enzim foszfolizációját. Az **56c** 3-tienil származék gátolta számottevően a sejten belüli c-Met és az EGFR foszforilációt és PI3K-Akt-mTOR, Ras-Raf-Mek-MAPK jelutak egy-egy tagjának autofoszforilációját.



7. ábra Az **56c** vegyület Western blot vizsgálata

4.4. Szóródási vizsgálat

A tumorsejtek mozgékonyságát és áttétképző képességét a DU145 prosztata tumorsejtvonal szóródási vizsgálata segítségével tanulmányoztuk. Megállapítottuk, hogy az **56c** származék a tumorsejtek HGF-indukálta szóródását sejtek $IC_{50} \sim 1,1 \mu\text{M}$ koncentrációban gátolta.

4.5. Platina hordozóhoz köthető származékok

A **26a** piridin származék bizonyult a legjobbnak a ULSTM-sel történő kapcsolás szempontjából, a komplex is jó termeléssel keletkezett, illetve kálium-rodaniddal történő hasítás is elvárásainknak megfelelően történt. A komplex módosított lizozimhoz kötve a Sutent®-hez képest 28-szoros dúsulást mutatott a HK2 immortalizált vesetubulus sejtekben.

5. Következtetések

Az értekezésben bemutatott eredmények alapján a következő megállapításokat tehetjük:

1. Előállítottam az SU11274 és a foretinib (XL-880) jelű c-Met gátló vegyületeket. A SU11274 szerkezetét három helyen (5-benzolszulfonamid, a pirrol-3,5-alkil, illetve a

- pirrol-3-karboxamid részén) módosítottam, a foretinib esetén két helyen (kinolin gyűrű 6-os és 7-es, illetve a benzolszulfonamid rész 3-as pozíciójában) módosítottam a molekulán.
2. A foretinib szerkezetét két helyen módosítva jutottam el azokhoz a származékokhoz, melyek a c-Met és az EGFR kinázt mikromol alatti IC_{50} értékkel gátolták. A kinolin vázat 2-aminopiridin, illetve 1,5- és 1,6-naftiridin vázzal helyettesítettem, azonban ezek a kettősgátlás szempontjából hatástalanok voltak. A szintetikus munka folyamán előállítottam összesen 130 darab új molekulát.
 3. Az AMG-458 klinikai c-Met gátló molekulán is megtalálható antipirinsavamid szerkezeti elemet a foretinib anilinekre építve rendkívül erős c-Met gátló hatású vegyületeket állítottam elő, melyek alacsony nanomólos IC_{50} értékkel gátolták a H1993 tumorsejtvonalat, viszont számottevően gátolták az inzulin receptort is.
 4. A 4-fenoxikinolin származékok egyaránt gátolták a c-Met és az EGFR kinázt az *in vitro* enzimes vizsgálatokban,

míg az InsR receptort kevésbé gátolták. A kiemelt vegyület (**56c**) hat kinázt gátolt 75 % felett a 34-ből.

5. Western blot vizsgálattal kimutattuk, hogy a kiemelt vegyület az EGFR amplifikált HCC827 és a c-Met amplifikált H1993 sejtvonalon gátolja a c-Met és az EGFR autofoszforylációját és számottevő apoptózist okoztak HCC827 sejtvonalon.

6. Előállítottam platina hordozóhoz köthető származékot, melyhez sikeresen ULS™ köthető és biokonjugátum készíthető. Vizsgálatok azt mutatták, hogy a biokonjugátum a kívánt módon feldúsul HK2 sejtekben.

A feltérképezett szerkezet-hatás összefüggés és a vegyületek biokémiai jellemzése alapján kijelenthetjük, hogy a doktori munkám során szintetizált vegyületek jó kiindulási pontot jelentenek új, rákellenes vegyületek fejlesztéséhez.

6. Saját publikációk jegyzéke

1. Bálint Szokol, Pál Gyulavári, Ibolya Kurkó, Ferenc Baska, Csaba Szántai-Kis, Zoltán Greff, Zoltán Örfi, István Peták, Kinga Pézses, Robert Torka, Axel Ullrich, László Örfi, Tibor Vántus, and György Kéri. (2014) Discovery and

Biological Evaluation of Novel Dual EGFR/c-Met Inhibitors. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, **5** (4): 298–303. (IF: 3,311)

2. Kenessey I, Keszthelyi M, Krámer Z, Berta J, Adám A, Dobos J, Mildner M, Flachner B, Cseh S, Barna G, Szokol B, Orfi L, Kéri G, Döme B, Klepetko W, Tímár J, Tóvári J. (2010) Inhibition of c-Met with the specific small molecule tyrosine kinase inhibitor SU11274 decreases growth and metastasis formation of experimental human melanoma. *Curr Cancer Drug Targets*. **10** (3):332-42. (IF: 4,771)

3. Harmsen S, Dolman ME, Nemes Z, Lacombe M, Szokol B, Pató J, Kéri G, Orfi L, Storm G, Hennink WE, Kok RJ. (2011) Development of a cell-selective and intrinsically active multikinase inhibitor bioconjugate. *Bioconjug Chem*. **22** (4): 540-5. (IF: 4,930)

Magyar nyelvű folyóirat cikkek:

4. Szokol Bálint, Gyulavári Pál, Kurkó Ibolya, Baska Ferenc, Szántai-Kis Csaba, Greff Zoltán, Örfi Zoltán, Peták István, Axel Ullrich, Örfi László, Vántus Tibor, Kéri György. (2013) *Acta Pharmaceutica Hungarica*, 83(4): 121-133.

Egyéb publikációk:

Ho HK, Német G, Ng YR, Pang E, Szántai-Kis C, Zsákai L, Breza N, Greff Z, Horváth Z, Pató J, Szabadkai I, Szokol B, Baska F, Órfi L, Ullrich A, Kéri G, Chua BT. Developing FGFR4 inhibitors as potential anti-cancer agents via in silico design, supported by in vitro and cell-based testing. (2013) *Curr Med Chem.***20** (10):1203-17. (IF: 4,070)

Dolman ME, van Dorenmalen KM, Pieters EH, Sparidans RW, Lacombe M, Szokol B, Orfi L, Kéri G, Bovenschen N, Storm G, Hennink WE, Kok RJ. Dendrimer-based macromolecular conjugate for the kidney-directed delivery of a multitargeted sunitinib analogue. (2012) *Macromol Biosci.* **12** (1):93-103. (IF: 3,742)

Dolman ME, Harmsen S, Pieters EH, Sparidans RW, Lacombe M, Szokol B, Orfi L, Kéri G, Storm G, Hennink WE, Kok RJ. Targeting of a platinum-bound sunitinib analog to renal proximal tubular cells.(2012) *Int. J. Nanomedicine.* **7**:417-33. (IF: 3,463)

Varga Z, Berényi S, Szokol B, Orfi L, Kéri G, Peták I, Hoell A, Bóta A. A closer look at the structure of sterically

stabilized liposomes: a small-angle X-ray scattering study.(2010) *J. Phys Chem B.* **114** (20):6850-4. (IF: 3,603)

Székely R, Wáczeck F, Szabadkai I, Németh Hegymegi-Barakonyi B, Eros D, Szokol B., Pató J, Hafenbradl D, Satchell J, Saint-Joanis B, Cole ST, Orfi L, Klebl BM, Kéri G.(2008) A novel drug discovery concept for tuberculosis: inhibition of bacterial and host cell signalling. *Immunol Lett.* **116** (2):225-31. (IF: 2,858)

Pete B, Szokol B., Toke L. A facile synthesis of 5(6)-(chloromethyl)benzimidazoles: Replacement of a sulfonic acid functionality by chlorine. (2008) *J. Het. Chem.* **45**:(2) 343-347. (IF: 0,899)

Pete B, Szöllösy Á, Szokol B. A facile synthesis of 4-, 6-, and 7-formyl-1*H*-indole-2-carboxilates: the CH₂SO₃H functionality as a masked formyl group (2006) *J. Het. Chem* **43**: (5) 1331–1335. (IF: 0,776)