

**SEMMELWEIS EGYETEM**  
**DOKTORI ISKOLA**

**Ph.D. értekezések**

**2509.**

**SIPOS ANNA**

**A gyógyszerészeti tudományok korszerű kutatási irányai**  
című program

Programvezető: Dr. Antal István, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Örfi László, egyetemi tanár

# Új és szelektív daganatellenes CDK9- és FLT3- inhibitorok azonosítása és biológiai validálása

Doktori értekezés

**Sipos Anna**

Semmelweis Egyetem  
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Prof. Dr. Órfi László MSc, PhD, dr. habil egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Futosi Krisztina, Ph.D., egyetemi adjunktus  
Dr. Sziksz Erna, Ph.D., törzskönyvezési munkatárs

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Szökő Éva, az MTA tagja, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Láng Orsolya, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Pozsgai Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Budapest  
2020

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>Rövidítések jegyzéke .....</b>	<b>6</b>
<b>1 Bevezetés .....</b>	<b>9</b>
1.1 A jelátviteli utak résztvevői a kinázok .....	9
1.2 Kinázok, mint a tumoros megbetegedések kulcsfontosságú szereplői .....	9
1.3 CDK9 kináz .....	10
1.3.1 A CDK9 biológiai hatásmechanizmusa .....	11
1.3.2 A CDK9 jelentősége.....	12
1.3.3 Ismert CDK9-inhibitorok és szerepük klinikai vizsgálatokban .....	14
1.4 A TRAIL és daganatellenes hatásának mechanizmusa .....	18
1.5 Az FLT3 és daganatellenes hatásának mechanizmusa .....	20
1.5.1 Az FLT3 jellemzői .....	20
1.5.2 Az FLT3 ligandja, valamint fiziológias és patológias funkciói .....	21
1.5.3 Az FLT3 mutációi .....	21
1.5.4 Az <i>FLT3</i> mint prognosztikai marker .....	22
1.5.5 Az FLT3-inhibitorok .....	23
<b>2 Célkitűzések.....</b>	<b>29</b>
<b>3 Módszerek.....</b>	<b>31</b>
3.1 Vegyületek, vegyszerek .....	31
3.2 Vegyületek minőségellenőrzése.....	31
3.3 Fluoreszcencia polarizáción alapuló mérések - IMAP (Immobilized Metal Assay for Phosphochemicals).....	31
3.4 High-Throughput kináz szelektivitási profil meghatározása (KINOMEscan™)	33
3.5 Sejtvonalak, sejtenyésztés.....	33
3.6 Lumineszcens sejtvitalitás vizsgálat .....	35
3.7 <i>In vitro</i> klonalitás vizsgálat.....	35
3.8 Apoptotikus DNS-fragmentáció meghatározása áramlásos citometriával .....	36
3.9 Az apoptózis vizsgálata áramlási citométerrel Annexin V-FITC és propidium-jodid kettős jelölt sejteken .....	37

3.10	A sejtciklus vizsgálata áramlási citométerrel BrdU és propidium-jodid kettős jelöléssel .....	37
3.11	Kaspáz-3/7 aktivitás mérése lumineszcens tálcaleolvasóval .....	38
3.12	Kaspáz-3/9 aktivitásmérés fluoreszcens tálcaleolvasóval .....	38
3.1	Western blot analízis .....	39
3.2	Egér xenograft modell .....	39
3.3	Farmakokinetikai vizsgálat .....	40
3.4	Kinetikai oldhatóság vizsgálat .....	41
3.5	Permeabilitás vizsgálat (PAMPA) .....	41
3.6	Dokkolás .....	42
3.7	Statisztikai vizsgálat .....	43
<b>4</b>	<b>Eredmények.....</b>	<b>45</b>
4.1	A 4, 6-diszubsztituált pirimidin származékok vizsgálata .....	45
4.1.1	Célfehérje alapú hatóanyagfejlesztés (biokémiai kináz vizsgálati módszer optimalizálása).....	45
4.1.2	A potenciális CDK9-inhibitorok antiproliferatív hatása tumoros sejtvonalakon.....	48
4.1.3	A 20-as lead molekula szelektivitási profilja .....	50
4.1.4	Virtuális tesztelés – <i>in silico</i> dokkolás .....	51
4.1.5	Fehérjeszintű, illetve sejtciklus-változások szelektív CDK9-inhibitor hatására MCF7 sejtvonalon .....	52
4.1.6	Apoptózis indukció U266 myelóma multiplex sejtvonalon .....	55
4.1.7	TRAIL-rezisztens sejtvonal érzékenyítése CDK9-gátlóval .....	56
4.1.8	20-as anyag és leghatékonyabb analógjainak korai ADME paramétereinek.....	61
4.2	Sztiril-kinazolinok biológiai vizsgálata .....	62
4.2.1	Rekombináns kináz vizsgálatok .....	62
4.2.2	Vegyületek vizsgálata humán sejtvonalakon .....	64
4.2.3	A leghatékonyabb analógok korai ADME paramétereinek meghatározása. ....	66
4.2.4	A lead molekula szelektivitási profiljának meghatározása .....	67
4.2.5	A lead molekula inhibíciós módjának meghatározása .....	69
4.2.6	Sejtpusztulás mechanizmusának vizsgálata MV4-11 akut myeloid leukémia vonalon .....	70

4.2.7	A III-as lead molekula farmakokinetikai paramétereit és <i>in vivo</i> vizsgálata	72
<b>5</b>	<b>Megbeszélés</b>	<b>75</b>
5.1	4, 6-diszubsztituált pirimidin alapszerkezetű vegyületek kutatási eredményei	76
5.2	A sztiril-kinazolinok megbeszélése	81
<b>6</b>	<b>Következtetés</b>	<b>86</b>
6.1	Következtetések a 4, 6-diszubsztituált pirimidin alapszerkezetű vegyületek esetében.	86
6.2	Következtetések a sztiril-kinazolinok esetében.	87
<b>7</b>	<b>Összefoglalás</b>	<b>88</b>
<b>8</b>	<b>Summary</b>	<b>89</b>
<b>9</b>	<b>Irodalomjegyzék</b>	<b>90</b>
<b>10</b>	<b>Publikációs jegyzék</b>	<b>119</b>
10.1	Disszertációhoz kapcsolódó publikációk jegyzéke	119
10.2	Disszertációtól független publikációk jegyzéke	120
<b>11</b>	<b>Köszönetnyilvánítás</b>	<b>121</b>
	<b>Függelék</b>	<b>123</b>

## Rövidítések jegyzéke

rövidítés	magyarázat
ADME-T	<u>A</u> bszorpció (felszívódás), <u>D</u> isztribúció (megoszlás), <u>M</u> etabolizmus, <u>E</u> xkréción (kiválasztás), <u>T</u> oxicitás szavak rövidítéséből képzett mozaikszó
AIDS	szerzett immunhiányos tünetegyüttes
ALL	akut limfoblasztos leukémia
AML	akut myeloid leukémia
Annexin V-FITC	annexin V konjugált (fluoreszcein izotiocianát)
ATCC	amerikai típusú sejt kultúra gyűjtemény
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
CAK	ciklin-dependens kinázt aktiváló kináz
CDK	ciklin-dependens kináz
c-FLIP	sejtes FLICE-inhibitor fehérje
c-KIT	hízó/össejt növekedési faktor receptor
CLL	krónikus limfocitás leukémia
C <sub>max</sub>	maximum koncentráció
CML	krónikus myeloid leukémia
CMML	krónikus myelo-monocitás leukémia
CR	teljes remisszió
CTD	karboxil-terminális domén
Cyc	ciklin
CSFR	kolónia stimuláló faktor receptor
DD	haláldomén
DFG motívum	aszparaginsav-fenilalanin-glicin aminosav hármasa
DISC	apoptózist indukáló szignálkomplex
DMSO	dimetil-szulfoxid
DNS	Dezoxiribonukleinsav
DTT	1,4-ditiotreitol
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
F (%)	orális biohasznosulás
FACS	áramlási citometria
FADD	FAS fehérjéhez kötődő haláldomén
FBS	magzati borjú szérum
FI	fluoreszcencia intenzitás
FLT3	FMS-szerű tirozin kináz 3
FLT3-TKD	FLT3 tirozin kináz domén
FLT3-ITD	FLT3 belső tandem duplikáció

FLT3wt	vad típusú FLT3
FP	fluoreszcencia polarizáció
GIST	gasztrointesztinális sztróma tumor
HEPES	4-(2-Hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav
HIV	humán immundeficiencia vírus
HMA	hypomethylating agent
HPLC	nagyfelbontású folyadékkromatográfia
HPLC-MS	tömegspektrométerrel kapcsolt HPLC
h. r. TRAIL	rekombináns TRAIL (114-281 as. extracelluláris domén TRAIL)
HTS	nagy áteresztőképességű (molekula) szűrés
IAP	apoptózis gátló fehérje
IC <sub>50</sub>	50%-os gátlás eléréséhez szükséges koncentráció
IMAP	immobilizált fémion esszé foszforil csoport kimutatására
JM	a sejtmembránhoz közel eső (peptid)
K <sub>M[ATP]</sub>	az ATP Michealis konstansa
K <sub>M app</sub>	látszólagos K <sub>M</sub> érték
logP	megoszlási hányados logaritmus
Mcl-1	Myeloid sejt leukémia szekvencia 1 (fehérje)
MDS	myelodiszpláziás szindróma
MM	myelóma multiplex
mP	a polarizáció mérésére használatos P mértékegység ezred része
MS	tömegspektrométer
MTS	közepes áteresztőképességű (molekula) szűrés
NSCLC	
OS	teljes túlélés
p53	tumor protein p53 gén
PAMPA	parallel mesterséges membrán permeabilitás vizsgálat
PARP	poli-(ADP-ribóz)-polimeráz
PBS	foszfát-pufferelt sóoldat
PCR	polimeráz láncreakció
PDGF	vérlemezke eredetű növekedési faktor
PDGFR	vérlemezke eredetű növekedési faktor receptor
P <sub>e</sub>	Permeabilitás (10 <sup>-6</sup> cm/s)
PI	propidiumjodid
pRb	retinoblasztoma protein
P-TEFb	pozitív transzkripciós elongációs faktor-b
RB	retinoblasztoma gén
RET	glia sejt vonalból származó neurotróp faktor receptor
RNSP-II	RNS polimeráz II
RNS	ribonukleinsav

RTK	receptor tirozin kinázok
S/B	jel/háttér arány
S/N	jel/zaj arány
SCID	súlyos kombinált immunhiány
Smac/DIABLO	második mitokondriális kaszpázaktivátor/alacsony PI értékű IAP-kötő fehérje
T $\frac{1}{2}$	plazmabeli felezési idő
TBS	Tris pufferelt sóoldat
TBST	TBS-Tween 20 oldat
TF	túlélő frakció (%)
TFIIH	humán transzkripció faktor II
TK	tirozin-kináz
TKD	tirozin kináz domén
TKI	tirozin kináz inhibitor
TNF	tumor nekrozis faktor
TRAIL	TNF-rokon apoptózis indukáló ligand
VEGFR	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor 2
wt	vad típusú
XIAP	X kromoszómával kapcsolt anti-apoptotikus protein
Z'	jeltartomány együttható
$\Delta S$	jel intenzitás változás



# 1 Bevezetés

A szervezet a működését a sejtek közötti kommunikáció-jelekkel, jelutakkal, döntésekkel és végrehajtandó programokkal biztosítja. A sejt-kommunikációban kialakuló zavarbetegségek kialakulásához vezethet, mint pl. a daganatos megbetegedések.

Külső vagy belső mutagén és karcinogén hatásokra zavar alakulhat ki a DNS szerkezetében (mutáció, deléción, amplifikáció, transzlokáció, inzerción stb.), illetve a funkciójában (metiláció, hisztonacetiláció). A növekedési faktorok termelése, proliferáció serkentése, apoptózis gátlása, DNS hibajavítás csökkentése, érellátás biztosítása, invázió és metasztatizálás következményeként daganat alakulhat ki a szervezetben. A daganatos megbetegedés a második vezető halálok a világon, 2018-ban 9,6 millió ember halálát okozva mind a fejlődő, mind pedig a fejlett országokban<sup>1-3</sup>. A Globocan legfrissebb adatai szerint 2018-ban Magyarországon 77454 új daganatos esetet és 33010 halálesetet regisztráltak<sup>4</sup>. A terápiás célpontok, és az engedélyezett gyógyszerek listája sem teljes, további munkára ösztönözve a kutatókat.

## 1.1 A jelátviteli utak résztvevői a kinázok

A kináz olyan enzim, mely foszfátcsoport átadására képes molekuláról egy meghatározott szubsztrátra, ez a folyamat a foszforiláció. Az adott molekula foszforilációs állapota is befolyásolja az enzim aktivitását, reakciókészségét és más molekulákhoz való kötődési képességét. Így a kinázok elengedhetetlen szerepet töltenek be a metabolizmusban, sejtszignalizációs folyamatokban, poszttranszlációs módosításokban, sejten belüli transzportfolyamatokban, szekréciós és számos más folyamatban, vagyis az emberi szervezet működésének nagyon fontos résztvevői<sup>5</sup>.

A kinázokban fellépő mutáció teljes vagy részleges funkcióvesztéshez vezet, ami számos megbetegedést (diabétesz, kardiovaszkuláris-, ideg- vagy immunrendszert érintő, különféle gammaglobulinémia), valamint daganatos megbetegedéseket (leukémiát, neuroblasztómát és glioblasztómát) okozhat<sup>6</sup>.

## 1.2 Kinázok, mint a tumoros megbetegedések kulcsfontosságú szereplői

A daganatos sejtekre jellemző megnövekedett kináz aktivitás<sup>7</sup> számos onkogenikus sejt-funkciót indukálhat<sup>8</sup>. A megnövekedett aktivitást számtalan tényező okozhatja.

Genetikai eltérés, megnövekedett autokrin vagy parakrin ligand általi stimuláció, csökkent foszfatáz aktivitás vagy megnövekedett strukturális stabilitás, melyet többek között a megnövekedett mennyiségű chaperon fehérjék okozhatnak<sup>9</sup>.

Jelen tudásunk alapján egyre nagyobb megbízhatósággal állíthatjuk, ismerjük azoknak a géneknek a többségét, amelyek mutációi, működési zavarai a daganatok kialakulásáért felelősek. Ezeket a géneket „driver” géneknek nevezzük, a patogénikus mutációkat „driver” mutációknak. 2013-ban 138 driver gént és 1,5 millió mutációt azonosítottak<sup>10</sup>. Egy daganatban akár 3-4 driver gén is aktiválódhat, ezek a daganat növekedésével, terjedésével változhatnak. A szekvenálási technológiák fejlődése révén mára lehetővé vált, hogy a „driver” géneket – a teljes molekuláris profilt – azonosítsuk a beteg szövettani mintájában. Az információ klinikai hasznosításához azonban meg kellett születnie egy új tudományágnak, a molekuláris info-bionikának is. A humán genom 538 protein kinázt kódol<sup>11</sup>, amelyek közül 31 a Vogelstein-modell által meghatározott 54 onkogén molekula közé tartozik<sup>12</sup>. Annak felismerése okán, hogy számos daganat tartalmaz aktiváló mutációkat „driver” génekben, amelyek kinázokat kódolnak, a kismolekulás kináz inhibitorok célpontjaivá váltak a gyógyszerfejlesztéseknek<sup>13</sup>. A Bcr-Abl tirozin-kinázt gátló daganatellenes gyógyszer imatinib átütő klinikai sikere a 2000-es évek elején egy új korszakot teremtett a mutáns kinázok célzott terápiájában<sup>14</sup>.

Jelenleg 125 célzott gyógyszer, köztük több kináz inhibitor (dasatinib, erlotinib, everolimus, gefitinib, imatinib, lapatinib, nilotinib, sorafenib, szunitinib, temsirolimus, vemurafenib)<sup>15-20</sup> került forgalomba és további több száz hatóanyag érhető el klinikai vizsgálatokban, mint daganatellenes hatású vegyület.

Doktori munkám során számos kinázzal foglalkoztam, disszertációmban a ciklin-dependens kináz 9 (CDK9) - és FMS-szerű tirozin kináz 3 (FLT3) -kináz inhibitorok vizsgálatát tárgyalom.

### **1.3 CDK9 kináz**

A CDK9 a ciklin-dependens kinázok (CDK) közül a szerin/ treonin-kinázok közé tartozik, aktivációjukhoz egy ún. ciklin alegységre is szükség van. Számos CDK létezik, mind más és más funkcióval rendelkeznek. Funkciójuk alapján 2 féle, sejtciklust, illetve transzkripciót szabályozó CDK-t különböztethetünk meg. A CDK9 a sejtnövekedés,

sejtdifferenciáció, és a virális patogenezis genetikai programjaihoz szükséges RNS-ek szintézisét promotálja.

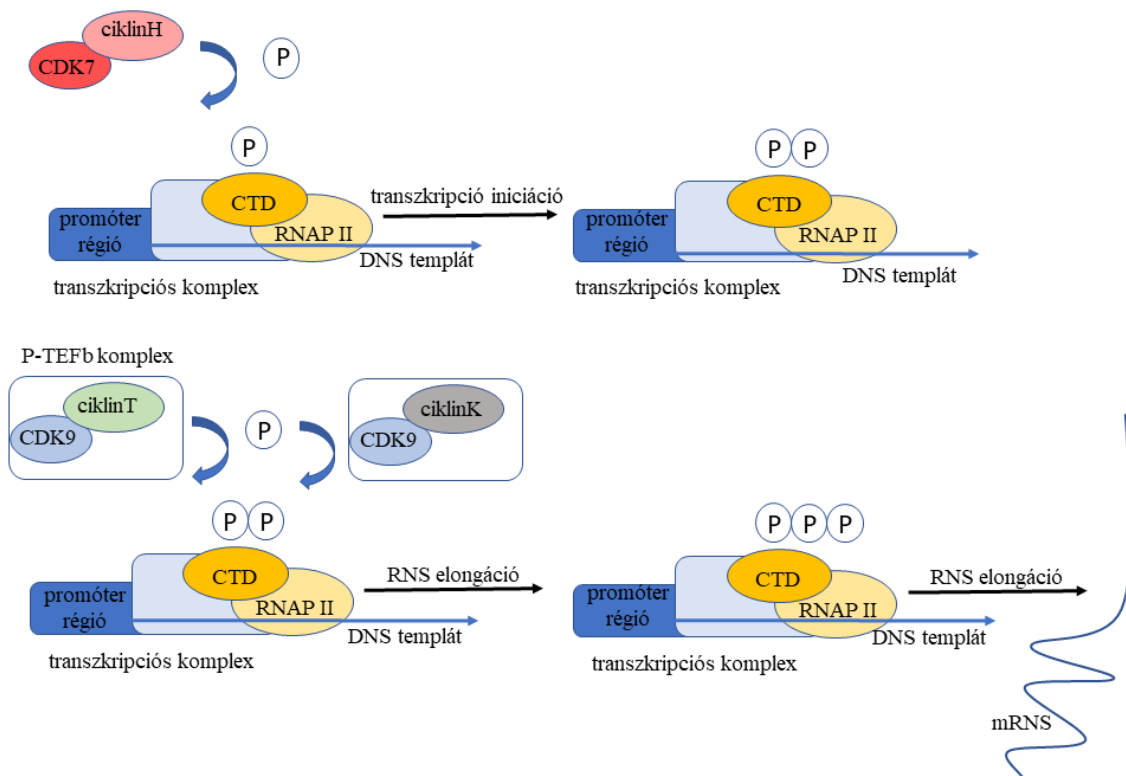
A szerkezetében fellelhető Pro-Ile-Thr-Ala-Leu-Arg-Glu motívum alapján PITALRE-ként azonosították a fehérjét<sup>21</sup>. Kromoszomális térképezést és a foszforilációs oldalláncok vizsgálatát is elvégezték a fehérjén<sup>22-24</sup>. Az AIDS betegséggel kapcsolatos vizsgálatok során a PITALRE-t a pozitív transzkripciós elongációs faktor-b (P-TEFb) katalitikus alegységeként azonosították<sup>25-27</sup>. Ezt követően azonosították a különböző ciklineket, mint ciklin T1, T2a és T2b. Egy évvel később fedezték fel, hogy a CDK9 a ciklinK-val is képezhet komplexet *in vivo*.

Két izoformája létezik a CDK9 proteinek, a 42kDa izoforma (CDK9<sub>42</sub>) és a 55kDa izoforma (CDK9<sub>55</sub>)<sup>28, 29</sup>. Habár a foszforilációs mintázatuk egyedi, különböző a lokalizációjuk és expressziós mintázatuk. Ez azt sugallja, hogy a két izoformát meg kell különböztetni, azonban még nincsenek a mai napig sem karakterizálva az irodalomban. Dolgozatomban nem teszek különbséget a két izoforma között.

### 1.3.1 A CDK9 biológiai hatásmechanizmusa

Tehát a P-TEFb katalitikus alegysége, amely a ciklinT-vel komplexet képezve foszforilálja az RNS polimeráz II (RNSP-II) karboxil-terminális domént (CTD), az RNS transzkripció szabályozását végzi első sorban. Az RNSP-II CTD-je tandem ismétlődő aminosav YSPTSPS szekvenciát tartalmaz, amely esszenciális a polimeráz funkcióhoz *in vivo*<sup>30</sup>. A CTD hiperfoszforilált állapotba kell kerülnön, hogy az elongációt szabályozhassa<sup>31</sup>. Több, mint 50 foszforilációs hellyel rendelkezik, a szerin a legkitüntetettebb szerepű<sup>32</sup>. Két fő foszforilációs hely létezik az egyik a Ser5 (YSPTSer5PS), melyet a CDK7<sup>33, 34</sup>, a másik pedig a Ser2 (YSer2PTSPS), amelyet a CDK9 képes foszforilálni. Először a CDK7/ciklin H komplex foszforilálja a Ser5-öt, mely lehetővé teszi az RNSP-II aktivációját<sup>35-37</sup>. Ezt követően a Ser5-foszforilált RNSP-II stimulálja az RNS-transzkripciót<sup>36, 38</sup>, az elongációt azonban nem. Az elongációs szakasz a Ser2 P-TEFb általi foszforilálásával indulhat meg<sup>39-43</sup>. Kimondhatjuk, hogy a CDK9/ciklinT, vagy CDK9/ciklinK komplex esszenciális a sejtek mRNS szintéziséhez **(1. ábra)** mindamelllett a P-TEFb-nek a pre-mRNS splicingban is van funkciója. A transzkripció megfelelő szabályozásához elengedhetetlen a P-TEFb aktivitásának dinamikus és pontos regulációja.

Az mRNS szint meghatározza a különböző proteinek expressziós fokát, így befolyásolva a proliferációs és apoptotikus jelátviteli folyamatokat a sejtekben.



1. ábra: A CDK9 hatásmechanizmusa és jelentősége. Saját rajz.

### 1.3.2 A CDK9 jelentősége

Ahogy a rákos megbetegedések egyik karakterisztikája a hiperplázia, úgy a szív betegségeinek egyik jellemzője a hipertrófia (terminálisan differenciált kardiomiociták méretének növekedése). Az infarktus és a szívelégtelenség kockázatát növeli a miokardiális hipertrófia. Hipertrófia során a globális mRNS-szint és a proteinszintézis nő, nem meglepő, hogy a szabályozás kulcsfontosságú molekulái között van a humán transzkripció faktor II (TFIIH) és a P-TEFb, így a hipertrófia kezelésének egyik gyógyszer-célpontja a CDK9. Napjainkig egyetlen CDK-inhibitor a flavopiridolt vizsgálták hipertrófia modellben<sup>44</sup>.

A CDK9-inhibitorok gyulladáscsökkentő hatását leginkább *in vivo* CDK9-deficiens egér kísérletekben lehetne vizsgálni, azonban nagyon nehéz CDK9-deficiens élő állatot létrehozni<sup>45</sup>. Irodalmi adatok is bizonyítják, hogy a CDK9-inhibitorok hatására az

nukleáris faktor kappa-béta (NF- $\kappa$ B)-indukált transzkripció csökken, vagyis gyulladáscsökkentő hatásúak<sup>46</sup>.

A CDK9 jelentőségére a HIV-vel kapcsolatos kutatások mutattak rá. Mivel a genetikailag flexibilis vírusok direkt targetálása során rendkívül gyorsan rezisztencia alakulhat ki, fontossá vált, hogy az antivirális kemoterápia számára a gazdaszervezetben azonosítsanak megfelelő targetálható célpontokat. Több HIV-1 transzkripciót gátló stratégia és célpont vizsgálata folyik napjainkban is. A HIV-1 esetén a virális replikációban régóta bizonyított a P-TEFb szerepe<sup>27</sup>. A P-TEFb legrelevánsabb az AIDS ellenes korszerű hatékony terápiában a HIV-1 vírus esetén, azonban fontos megemlíteni jelentőségét más vírusokkal kapcsolatban is, mint pl.: az Epstein-Barr vírus<sup>47</sup>, valamint az I-es típusú T-limfotrofikus vírus. A CDK9 kináz nagyon hasonló szerepet játszik a különböző herpesz vírusok (Herpes Simplex Virus 1<sup>48</sup>) és citomegalovírus (Human Cytomegalo Virus<sup>49</sup>) fertőzése során. A CDK9-inhibitorok hatékony antiretrovirális szerek, gátolják a rezisztencia kialakulását.

Terápiás szempontból a sejtciklus szabályozása, ezáltal a sejtciklust szabályozó ciklin-CDK komplexek fontos célpontjaivá váltak a kezdeti kutatásoknak. A kutatások eredményei azt bizonyították, hogy a sejtciklust szabályozó individuális CDK-k gátlása a magas funkcionális redundancia és a kompenzációs mechanizmusok miatt terápiás szempontból nem optimális. Az elmúlt évtizedben a transzkripciót szabályozó ciklin-CDK komplexek, mint a CDK9-ciklinT1 és a CDK7-ciklinH1 váltak fontos célponttá a rákkutatásban. Azonban míg a CDK7 ciklindependens-kináz aktiváló kinázként (CAK) ismert, a CDK9-ciklinT1 komplexnek az RNSP-II foszforilációjában van lényeges szerepe, gátlásával az RNS szintézis csökken, ezáltal bizonyos anti-apoptotikus proteinek expressziója csökken. Továbbá azt is bizonyították, hogy a komplex gátlása a kaszpáz-kaskádon keresztül elindítja a p53-független apoptózist. Az **1. táblázat**ban tüntettem fel a CDK9 aberrációját tumoros megbetegedések esetén.

### 1. táblázat: CDK9 aberrációja tumoros megbetegedések esetén.

expresszió foka	daganattípus
erősen expresszált	CLL <sup>1</sup> , MM <sup>250</sup>
különböző expressziós szintek, melyek korrelálnak a limfoid differenciációval/aktivációval és a malignus transzformációval	limfóma <sup>51</sup>
az expresszió korrelál a differenciáció grade-jével	neuroblasztóma és primer neuroektodermális tumorok <sup>52</sup>
misszensz mutáció (D323N)	tüdő adenocarcinoma <sup>53</sup>

#### 1.3.3 Ismert CDK9-inhibitorok és szerepük klinikai vizsgálatokban

A kismolekulás inhibitorok igen hatékonyak bizonyultak a daganatterápiában. A **TG02** hatékony CDK9-inhibitor, azonban nem specifikus, hiszen egyéb kinázokhoz is kötődik, mint pl. a Janus Kináz 2 (JAK2) és az FLT3<sup>54</sup>. A TG02 egy makrociklus, mely CDKI-73-hoz és a 2,4,5-(trisubsztituált-pirimidin) származékhoz hasonlóan fenilamino-pirimidin vázzal rendelkezik. A CDK9-ciklinT1-en mért IC<sub>50</sub> értéke 3nM<sup>55</sup>. Ezt a molekulát nem CDK9-inhibitornak fejlesztették. Képes aktiválni a kaszpáz-3-at és csökkenti az anti-apoptotikus Mcl-1 protein szintjét, ezáltal apoptózist indukál emlő, vastagbél és leukémia tumorsejtben<sup>56</sup>. Klinikai fázis I-es vizsgálatokat végeztek a TG02-vel többek között CLL<sup>57</sup> és glioblastoma<sup>58</sup> kezelésében. Egyéb fenilamino-pirimidin vázzal rendelkező, ATP kötőhelyen ható CDK9-inhibitorok a LDC000067 és a szubsztituált 4-(tiazol-5-il)-2-(fenilamino)pirimidin) antitumor hatást mutattak az Mcl-1 anti-apoptotikus fehérje downregulációján keresztül különböző tumoros sejtvonalakon, mint méhnyak, tüdő, emlő és leukémia<sup>59</sup>. Ezek a fenilamino-pirimidin vázzal rendelkező molekulák ígéretes lead vegyületeknek tekinthetők a CDK9-inhibitorok között. A *Scutellaria balcalensis* növényből származó flavonoid a **Wogonin** is CDK9-inhibitornak tekinthető. A flavopiridolhoz hasonló szerkezete van, blokkolja az RNSP-II CTD-jén a Ser2-n történő foszforilációt, amelynek eredményeként a leukémiás T-sejtek apoptózisát eredményezi *in vitro*<sup>60</sup>.

A **flavopiridol** egy pan-CDK-inhibitor, mégis a legtöbbször használt validációs vegyület CDK9-vizsgálatok során (IC<sub>50</sub>= 2,5 nM), sőt, I-es és II-es fázisú klinikai vizsgálatok

---

<sup>1</sup> krónikus limfocitás leukémia

<sup>2</sup> myelóma multiplex

tárgya.  $IC_{50}$  értékeit a CDK1, CDK2, CDK5 és CDK7 esetében, 10-100 nM tartományban mérték. A CLL-ben nincs aberráns sejtciklus, így a sejtciklust szabályozó CDK-ciklin komplexek célzása nem hatékony, azonban a neoplasztikus sejtek apoptózis-rezisztensek, és a flavopiridol az apoptózissal összefüggő proteinek transzkripciójának megváltoztatásán keresztül fejtette ki hatását. CLL-ben bizonyos anti-apoptotikus fehérjék expressziója magas, a CDK9-inhibitor flavopiridol gátolja az RNSP-II CTD Ser-2-n történő foszforilációját, így csökkentve az RNS-szintézist, ezáltal az Mcl-1 és X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) anti-apoptotikus proteinek expresszióját. Azt is bizonyították, hogy a flavopiridol a kaszpáz-kaszkádon keresztül elindítja a p53-független apoptózist CLL-ben. A CDK9 és a ciklinekkel képzett komplexei bizonyítottan anti-apoptotikus jelátviteli utakat aktiválnak elsősorban myelóma és CLL tumorokban. Az Mcl-1 downregulációja egyedül is elegendő az apoptózishoz akut limfoblasztos leukémiában (ALL) és CLL-ben is. Az első egyértelmű klinikai aktivitást a CDK-inhibitorok közül a flavopiridol mutatta a refrakter, magas rizikójú CLL-ben.

A **roscovitín** (seliciclib v. CYC202, 4) szintén pan-CDK-inhibitor,  $IC_{50}$  értékeit a CDK1 CDK2, CDK5, CDK7 és CDK9 esetében, 200-2700 nM tartományban mérték<sup>61</sup>, azonban a CDK4 és CDK6 esetében az  $IC_{50}$  érték meghaladja a 100 $\mu$ M-t. Gátolja a retinoblasztoma protein (pRB) és az RNSP-II foszforilációját, szerepelt klinikai fázis II. vizsgálatokban nem kissejtes tüdő carcinoma (NSCLC) és nazofaringeális daganat esetében<sup>62</sup>. HIV fertőzésre gyakorolt hatását is vizsgálták<sup>63</sup>.

A **dinaciclíb** szintén potens pan-CDK-inhibitor,  $IC_{50}$  értékeit a CDK1, CDK2, CDK5 és CDK9 esetében 1-4 nM tartományban határozták meg. Klinikai fázis III. vizsgálatokba lépett 2012-ben CLL kezelésében<sup>64</sup>.

Az **SNS-032** szintén pan-CDK-inhibitor az alábbi  $IC_{50}$  értékeket mérték a felsorolt CDK-k esetében; CDK2, ( $IC_{50}$ :38 nM), CDK7 ( $IC_{50}$ :62 nM), és CDK9 ( $IC_{50}$ :4 nM). Preklinikai vizsgálatok bizonyították, hogy mind a sejtciklust, mind pedig a transzkripciót is gátolja a vegyület<sup>65</sup>. Klinikai fázis I. vizsgálatokat végeztek vele CLL és myelóma multiplex (MM) kezelésben<sup>64, 50</sup>. Az ismert CDK9-inhibitorokat az alábbi **2. táblázatban** összesítettem.

**2. táblázat: Ismert CDK9-inhibitorok.**

inhibitor név	típus/vegyületcsoport	célpont	referencia
flavopiridol/alvocidib	ATP-kompetitív/flavonoid	CDK2, CDK4, CDK6, CDK9	66
P276-00	ATP-kompetitív /flavon	CDK1, CDK4, CDK9	67
meriolin	ATP-kompetitív/aminopirimidin-indol	CDK1, CDK4, CDK9	68
roscovitin/CYC202/ seliciclib/CYC065	ATP-kompetitív /trisubsztituál-purin	CDK5, CDK2, CDK1, CDK7, CDK9	69-71
dinacliclib (SCH 727965)	ATP-kompetitív /pirimidin	CDK9, CDK1, CDK2, CDK5	72
CDKI-73	ATP-kompetitív /pirimidin	CDK9	56
SNS-032/BMS-387032	ATP-kompetitív /tiazol	CDK2, CDK7, CDK9	55
AT7519	ATP-kompetitív /pirazol	CDK2, CDK9, CDK5, CDK4	73
ZK304709/MTGI/ ZK-CDK	ATP-kompetitív	CDK1, CDK2, CDK4, CDK7, CDK9	74
AZD5438	ATP-kompetitív /pirimidin	CDK1, CDK2, CDK9	75
BAY-1000394/roniciclib	ATP-kompetitív /pirimidin	CDK1, CDK4, CDK9	76

Napjainkig több mint 20 CDK-inhibitor került különböző tumoros betegeknél fázis I. és II. vizsgálatokba (**3. táblázat**).



**3. táblázat: Főbb CDK-inhibitorok klinikai vizsgálatokban tumortípusok szerint.** ABC<sup>3</sup>, ABL<sup>4</sup>, ALL<sup>5</sup>, AML<sup>6</sup>, CLL<sup>7</sup>, NHL<sup>8</sup>, NSCLC<sup>9</sup>, PPC<sup>10</sup>, RMM<sup>11</sup>, SAT<sup>12</sup>

név	célpont	fázis	tumortípus
flavopiridol	CDK1, CDK2, CDK4, CDK6	II	AML <sup>77</sup> , PPC <sup>78</sup> , CLL <sup>79</sup>
flavopiridol	CDK7, CDK9, GSK3β	I	RMM <sup>80</sup> , NHL <sup>81</sup> , CLL, AML <sup>82</sup> , ALL <sup>83</sup> , ABLs <sup>83</sup>
dinaciclib	CDK1, CDK2, CDK5, CDK9	II	ABC <sup>84</sup> , NSCLC <sup>85</sup> , AML <sup>86</sup> , ALL <sup>86</sup>
dinaciclib	CDK1, CDK2, CDK5, CDK9	I	CLL <sup>87</sup> , RMM <sup>88</sup>
seliciclib	CDK1, CDK2, CDK5, CDK7	I	SAT <sup>89, 90</sup>
SNS-032	CDK1, CDK2, CDK4, CDK7, CDK9	I	SAT <sup>91</sup> , CLL <sup>50</sup> , RMM <sup>50</sup>
RGB-286638	CDK1, CDK2, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK9	I	SAT <sup>92</sup>

---

<sup>3</sup> előrehaladott emlőcarcinoma

<sup>4</sup> akut bifenotipikus leukémia

<sup>5</sup> akut limfoblasztos leukémia

<sup>6</sup> akut myelogén leukémia

<sup>7</sup> krónikus limfocitás leukémia

<sup>8</sup> non-Hodgkin limfóma

<sup>9</sup> nem kissejtes tüdő carcinoma

<sup>10</sup> elsődleges peritoneális carcinoma

<sup>11</sup> relapszus myelóma multiplex

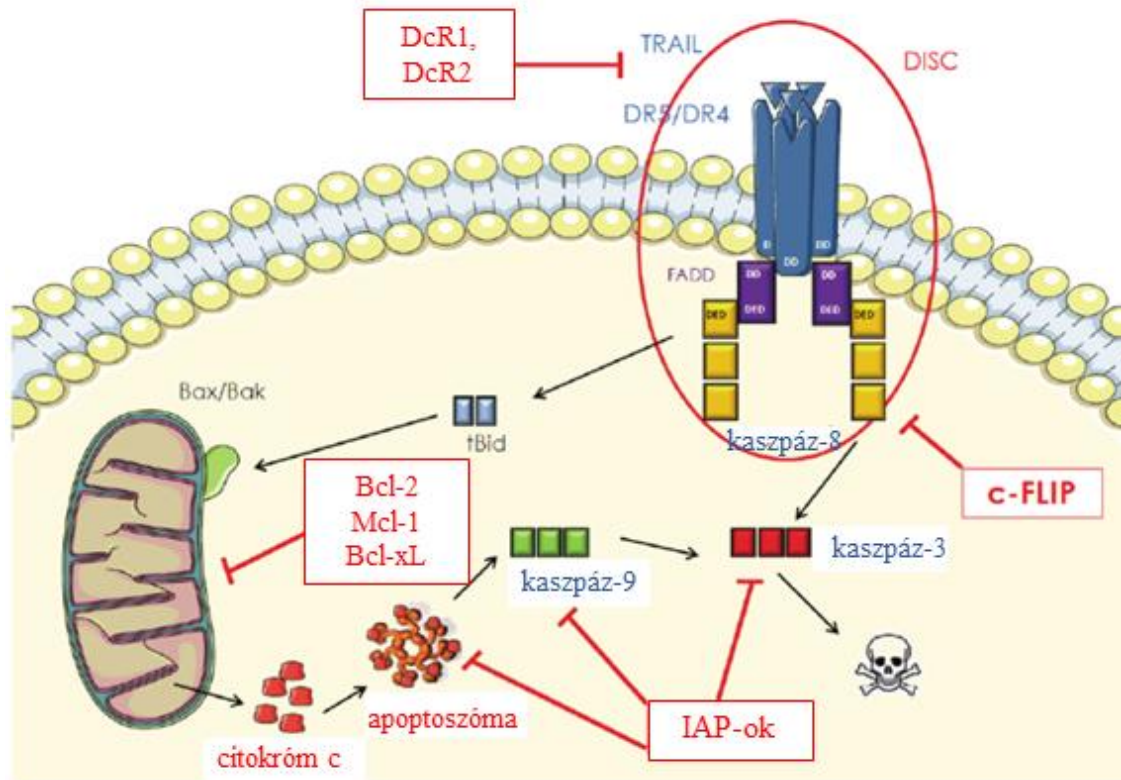
<sup>12</sup> szolid előrehaladott tumor

#### 1.4 A TRAIL és daganatellenes hatásának mechanizmusa

A TNF-related apoptózis-indukáló ligand (TRAIL) a TNF receptorcsaládba tartozik, a 4-es típusú halálreceptorhoz (DR4)<sup>93</sup>, az 5-ös típusú halálreceptorhoz (DR5)<sup>94</sup>, valamint két ún. decoy, vagy csali receptorokhoz (DcR1, DcR2) kötődik. Az álreceptorok ugyan megkötik a TRAIL-t, de apoptózist nem indukálnak a sejtben. Az aktiválódás során receptor trimerizációt követően a receptorok intracelluláris haláldoménjei és a hozzájuk kapcsolódó adaptor proteinek apoptózist indukáló szignálkomplexbé (DISC) rendeződnek<sup>95-99</sup>. A komponensek tehát oligomerizált receptorok, FAS-asszociált haláldomént (DD) tartalmazó adaptor molekulák (FADD), iniciátor kaspázok (kaspáz-8, vagy kaspáz-10).

Annak érdekében, hogy ne legyen túlzott a TRAIL-indukált apoptózis, több szabályozó mechanizmust fejlesztettek ki a tumoros sejtek, melyek negatívan szabályozzák a TRAIL működését (**2. ábra**). A sejtés FLICE-inhibitor fehérje (c-FLIP) a kaspáz-8-cal versenyez, hogy a FADD-hoz kössön, így gátolva a kaspáz-8 aktiválódását, azaz az apoptózis indukcióját<sup>100</sup>. Az apoptózist gátló proteinek (IAP, apoptosis inhibitor protein)<sup>101</sup> közül a legjelentősebb apoptózis antagonist az X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)<sup>102</sup>. Megkülönböztetjük az apoptózis I-es és II-es típusú jelútját. Az I-es típusú sejtekben a DISC-ben olyan mennyiségű kaspáz-8 aktiválódik, amely közvetlenül képes aktiválni az effektor kaspázokat, így legyőzi a XIAP antiapoptotikus hatását. A II-es típusú sejtekben azonban az aktiválódó kaspáz-8 mennyisége nem elegendő a kaspázkaskád elindításához a XIAP ellenében, így szükséges a mitokondriális út bekapcsolása is. Ennek során a kaspáz-8 hasítja a Bid-et (BH3 jellegű Bcl-2 családba tartozó fehérje), így létrejön a tBid, amely kapcsolódik a molekulacsalád további proapoptotikus tagjához a Bax-hoz, vagy a Bak-hoz, mely a külső mitokondriális membrán permeabilizációjához vezet. A mitokondriumból kiszabaduló fehérjék a SMAC-ok (Second mitochondria-derived activator of caspases) és a citokróm c. A citokróm c az APAF-1-hez (apoptotic protease activating factor-1) és a pro-kaspáz-9-hez kötődik és kialakítják az apoptoszómának nevezett fehérje komplexet, így további iniciátor kaspáz aktivitást eredményeznek. A II-es típusú sejtekben, a TRAIL-indukált apoptózis elleni rezisztencia az anti-apoptotikus fehérjéknek – a Bcl-2 család tagjainak, (Bcl-2, Bcl-xL és Mcl-1) – magas expressziós szintjével magyarázható. Ezek antagonizálják a mitokondriális külső membrán permeabilizációját, ezáltal az apoptotikus faktorok

citokróm c és a második mitokondriális kaszpázaktivátor/ alacsony PI értékű IAP-kötő fehérje (Smac/DIABLO) felszabadulását<sup>103</sup>. Ezzel szemben az I-es típusú sejtekben a mitokondriumtól független apoptózist a Bcl-2 anti-apoptotikus fehérjék nem gátolják. A mechanizmust a **2. ábra** foglalja össze.



**2. ábra: Rezisztencia mechnizmusok a TRAIL-indukált apoptózis során<sup>104</sup>.**

A tumoros megbetegedések során alkalmazott konvencionális kemoterápia egyik legnagyobb gátja napjainkban is a rezisztencia kialakulása. Az apoptózis belső, p53-mediált útja gyakran “bénult” tumoros megbetegedéseknél<sup>105</sup>. A kezdetekben azt feltételezték, hogy a rezisztens tumorok esetén megoldást jelenthet a külső apoptotikus jelátviteli út aktiválása. Így a TNF-szupercsalád képviselői attraktív célpontjaivá váltak a kutatásoknak, azonban a CD95L és a TNF szisztémás kezeléseik sikertelenek lettek az általuk okozott komoly toxicitás következtében<sup>106, 107</sup>. A külső apoptotikus jelátviteli utat elindító legjobban jellemzett molekula a TRAIL<sup>108, 109</sup>. Mivel a TRAIL szelektíven csak a tumoros sejtekben indít p53-független apoptózist, a normál sejtekben nem, fontos célponttá vált a gyógyszerkutatásban. TRAIL-receptor antagonistákkal végeztek klinikai vizsgálatokat. Sajnos ezek a terápiás szerek nagyon limitált előnyt mutattak<sup>110</sup>, ami

összefügg azzal a ténnyel, hogy ugyan a TRAIL több sejtvonalon mind *in vitro* mind pedig *in vivo* apoptózist indukál, a primer tumorok és sejtvonalak 50%-a TRAIL-rezisztens<sup>111</sup>. A TRAIL-rezisztencia hátterében számos faktor állhat, például a különböző tumoros megbetegedések esetén más és más az anti- és proapoptotikus proteinek expressziós szintje. A kombinációs terápiák szenzitizáló ágensek használatával lehetőséget nyújtanak a TRAIL-ellenes rezisztencia leküzdésére, így pedig a tumoros sejtek szelektív elpusztítására<sup>108</sup>.

Lemke és mtsai. bebizonyították, hogy a PIK-75 molekula szenzitizálja a TRAIL-rezisztens A549 nem-kissejtes tüdő karcinóma sejtvonalat TRAIL-indukált apoptózisra CDK9-gátláson keresztül. Ennek hátterében az Mcl-1 downregulációja mellett a c-FLIP szuppressziója áll<sup>112</sup>.

## **1.5 Az FLT3 és daganatellenes hatásának mechanizmusa**

### **1.5.1 Az FLT3 jellemzői**

Az fms like tyrosine kinase-3 (FLT-3), vagy fetal liver kinase-2 (Flk2) egy 993 aminosavból álló 112804 Da molekulásúlyú protein, mely a receptor tirozin kinázok (RTK) 3-as családjába tartozik<sup>113</sup>. A fehérjét kódoló gén a 13q12 kromoszómaregiónban helyezkedik el. Szerkezetileg rokonságot mutat a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF), kolónia stimuláló faktor-1-gyel (CSF1) és a őssejt növekedési faktor receptorral (KIT) liganddal<sup>113</sup>. Ezen RTK-ok szerkezetére jellemző, hogy az extracelluláris régióban öt immunoglobulin szerű domént tartalmaznak, az intracelluláris régióban a két tirozin kináz domént pedig egy specifikus hidrofil kináz inzert domén (KID) választja el a juxtamembrán doméntól (JM)<sup>114, 115</sup>. A JM fontos szerepet játszik az FLT3 autoinhibíciós folyamataiban. Az FLT3 ATP-kötőhelyét a következő szerkezeti elemek határolják: hinge régió, aktivációs hurok, DFG motívum, valamint  $\alpha$ C hélix<sup>116</sup>. Az FLT3 legmagasabb mértékben az éretlen vérsejteken expresszálódik és kitüntetett szerepet játszik a csontvelői hematopoetikus őssejtek differenciációjában és túlélésében<sup>117-119</sup>. Az FLT3 expresszióját leírták a CD34-pozitív csontvelői sejtekben- és főtális májsejtekben, továbbá a legtöbb blaszt sejtekben AML-ben és B-sejtes akut limfoblasztos leukémiában (B-ALL-ben).

### 1.5.2 Az FLT3 ligandja, valamint fiziológias és patológias funkciói

Az FLT3 receptor ligandja az FLT3L citokin, mely a primitív hematopoietikus progenitor sejtek proliferációjában, túlélésében és differenciációjában játszik fontos szerepet. Az FLT3 alapállapotban monomer formában van jelen, a receptor-ligand kötődést a receptor intracelluláris részének konformációváltozása és dimerizációja követi<sup>120</sup>. A citoplazmában számos proteint foszforilál (SHC, SHP-2, SHIP, Cbl, Cbl-b, Gab1 és Gab2), amit a downstream szignalizációs útvonalak (Ras/ Raf/ MAPK, STAT5 és PI3K/ Akt) aktivációja követ, így szabályozza a transzkripció, transláció, differenciáció és apoptózis folyamatait<sup>121</sup>.

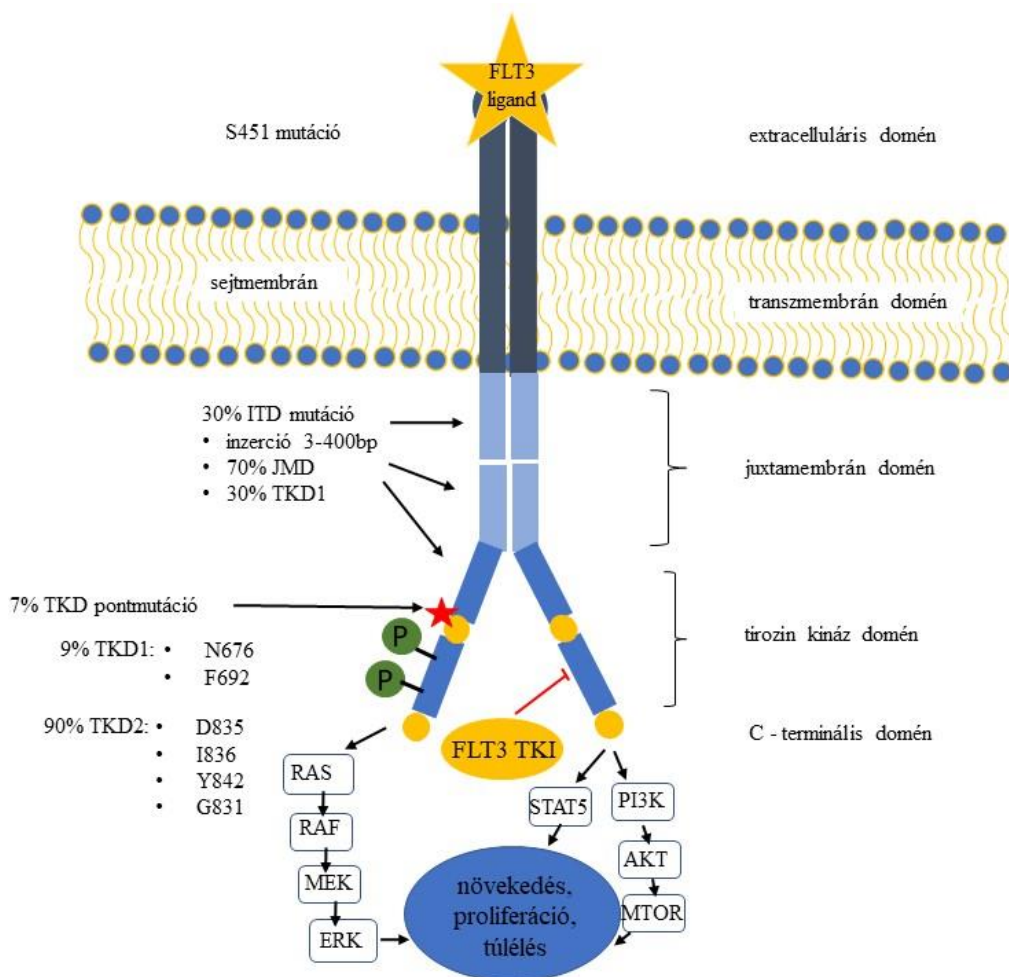
Az FLT3 kináz funkciójából következik, hogy mind az overexpressziója, mind pedig a mutációja az egyik leggyakrabban előforduló jelenségek közé tartozik a hematopoietikus rendszer daganatos elváltozásai között<sup>122-124</sup>. Az FLT3 fokozott expressziója figyelhető meg AML-ben, de krónikus myeloid (CML)- és akut limfoblasztos leukémia (ALL) esetén is igazolt. Daganatos betegségeknél nem csak a vad típusú FLT3 kináz és ligandjának fokozott expressziója figyelhető meg, hanem a kinázban bekövetkező mutációk hatására kialakult kóros kináz aktivitás is<sup>122-124</sup>.

### 1.5.3 Az FLT3 mutációi

Az FLT3-at érintő mutációk az AML betegségek 30%-ában fordulnak elő. A leggyakoribb FLT3 mutáció az internal tandem duplication elváltozás (ITD). A *de novo* kialakult AML-ek negyedében van jelen<sup>122</sup>, az ITD mutáció különböző hosszúságú (3 és 400 bázispár) lehet<sup>125</sup> és a JM domén meghosszabbodását eredményezi. Mivel a JM-domén felelős a kináz autoinhibíciós funkciójáért, ezért a JM-t érintő ITD mutáció a kináz szabályozatlan működését eredményezi<sup>126, 127</sup>. Az ITD mutációk 70%-ban a JM-domént, 30%-ban pedig a tirozin kináz domént (TKD-t) érintik<sup>128</sup>.

A TKD-t érintő pontmutációk, amelyek a receptor aktivációs hurkát érintik, kevésbé gyakoriak. Az összes AML-es megbetegedés 7%-ban, az ALL-ben 3%-ban fordul elő<sup>129, 130</sup>. A TKD elsődleges szerkezetében történő mutáció során, a D835-ös pozícióban az aszparaginsav szubsztitúciója történik meg. Tirozin, valin, hisztidin, glutamin és aszparagin is lehet a szubsztituens. Normál esetben az aktivációs hurok inaktív állapotban van, a ligand és az ATP kötődés hatására kerül aktivált állapotba, így beindul az autofoszforiláció és aktiválódnak a downstream jelátviteli útvonalak. Az aktivációs

hurkot érintő mutáció eredményeként az aktivációs hurok folyamatosan aktív állapotban van, vagyis a D835Y pontmutáció megnövekedett protein aktivitást eredményez<sup>131</sup> (3. ábra). A TKD mutációk 90%-ban az aktivációs hurkot, a TKD2-t és 9%-ban a TKD1-et, valamint 1-2%-ban az extracelluláris- és a JM-domént is érintheti<sup>131, 128, 132</sup>.



**3. ábra: FLT3 tirozin kináz 5 funkcionális doménjét érintő mutációk és az aktivált jelátviteli útvonalak hatása. Saját rajz.** A receptor-ligand kötődést a receptor intracelluláris részének konformációváltozása és dimerizációja majd a downstream szignalizációs útvonalak (Ras/ Raf/ MAPK, STAT5 és PI3K/ AKT) aktivációja követi, így szabályozva a növekedés, proliferáció és túlélés folyamatait.

#### 1.5.4 Az *FLT3* mint prognosztikai marker

Az AML-es betegek kor, általános állapot, fehérvérsejtszám, és citogenetikai profil alapján különböző prognosztikai csoportokba sorolhatóak<sup>133</sup>. A prognosztikai faktorok hozzáértő meghatározása az AML-es betegek kezelésének centrális kérdése. Az, hogy

prognosztizálható legyen, egyes betegek esetében milyen eséllyel alakulhat ki rezisztencia egy adott terápiára, illetve a kezelés milyen mortalitást eredményezhet (treatment related mortality; TRM) rendkívül fontos a klinikusok számára. Ennek alapján döntenek, hogy milyen intenzitású kezelést, milyen kemoterápiát, allogén hematopoetikus őssejttranszplantációt (HSCT), illetve, hogy konvencionális, vagy új terápiát alkalmaznak az adott betegnél. A molekuláris genetika fejlődésével – génexpressziós profil analízis vizsgálatok, majd a teljesgenom-szekvenálás – sikerült bizonyos rekurrens, visszatérő genetikai aberrációkat azonosítani, melyek főleg az FLT3, vegyes leszármazású leukémia (MLL), nukleofozmin (NPM1), CCAAT enhancer binding protein alpha (CEPBA), valamint a c-KIT gének eltérései és ezek kombinációi<sup>134</sup>. Így ezen gének vizsgálata világszerte ajánlott, sőt mára minden AML-es beteg esetében kötelező az FLT3 státuszának vizsgálata<sup>135-137</sup>.

### **1.5.5 Az FLT3-inhibitorok**

A RTK inhibitorokat számos különböző szolid és hematológiai tumoros megbetegedés esetében használták sikeresen<sup>14</sup>. Az FLT3 mutációk gyakori előfordulását, valamint prognosztikai értékét figyelembe véve az FLT3 potenciális terápiás célpontnak tekinthető<sup>122</sup>. A friss kutatási eredmények azt mutatják, hogy az FLT3-at célzó terápiás hatékonyságú inhibitorok fejlesztésére nagy energiákat fordítottak, jelenleg is több klinikai vizsgálat van folyamatban<sup>138-142</sup>. A kezdeti első generációs FLT3-inhibitorok alkalmazása esetén tapasztalt toxicitás, szuboptimális farmakokinetikai eredmények, az off-target hatások után a klinikai vizsgálatok izgalmas eredményeket szültek.

Az FLT3-inhibitorokat lehet monoterápiás szerként, kombinációs terápiában konvencionális kemoterápia mellett, valamint allogénikus őssejttranszplantációt követően (HSCT) is alkalmazni.

A vizsgált első generációs inhibitorok a szunitinib, tandutinib, sorafenib, midostaurin és a lestaurtinib nem specifikusan az FLT3 targetálására lettek kifejlesztve, több kulcs enzimet, mint pl.: Jak2, PDGFR, VEGFR és KIT is gátolnak. A második generációs FLT3-inhibitorok pedig quizartinib és a crenolanib, amelyek specifikusan FLT-3 gátlására tervezett inhibitorok.

### 1.5.5.1 Elsőgenerációs tirozinkináz-inhibitorok

A **tandutinib** nanomoláris koncentrációban ( $IC_{50}=220$  nM) az FLT3-at és további receptor kinázokat (PDGFR $\beta$ , FGFR, VEGFR, c-Kit) is hasonló koncentrációban ( $IC_{50}=170-200$  nM) gátol<sup>143</sup>. A kedvezőtlen farmakokinetikai paraméterei ellenére is több klinikai vizsgálatban szerepelt kombinációs terápiaként több daganatos elváltozás esetében<sup>144, 145</sup>.

A **szunitinib** közel 150 kinázt gátol, a daganatnövekedésben, a neoangiogenesisben és a daganatáttétek progressziójában szerepet játszó receptor-tirozinkinázok (RTK) gátlója<sup>146</sup>. Kimutatták, hogy a szunitinib gátolja a PDGFR-t, a vascularis endothelialis növekedési faktor receptorokat (VEGFR1, VEGFR2 és VEGFR3), a KIT-et; az FLT3-at, CSF-1R-t és a glia sejtvonalból származó neurotróp faktor receptort (RET). Az FLT3 kinázt nanomólos tartományban gátolja (FLT3wt  $IC_{50}=250$  nM, FLT3-ITD  $IC_{50}=50$  nM, FLT3-D835Y  $IC_{50}=30$  nM), és a fázis I vizsgálatok során is ígéretes volt<sup>147</sup>. Forgalomban lévő gyógyszer, mely áttétes vesedaganatok, gasztrointesztinális sztróma tumor (GIST) és neuroendokrin tumorok kezelésére használnak<sup>148</sup>.

A **sorafenib** tirozin kináz inhibitor (TKI), mely gátolja a RAF, c-KIT, VEGFR, PDGFR és FLT3-ITD kinázokat, először hepatocelluláris és vesesejtes carcinoma terápiájában használták. 2008-as fázis I vizsgálatban monoterápiás szerként használva relapszusos, vagy refrakter (r/r) FLT3-ITD-pozitív AML-es betegeknél a leukémiás blasztok szignifikáns csökkenését érték el mind a csontvelőben, mind pedig a perifériás vérben, néhány betegnél CR-t lehetett elérni<sup>149-151</sup>. 13 r/r FLT3-ITD-pozitív AML beteggel végzett fázis II vizsgálatban 90%-ban lehetett elérni CR-t. Az igen lenyűgöző kezdeti sikerek után a betegek nagy része a remissziót követően 72 napon belül relapszusba került. A kezelés sikertelenségének hátterében feltehetően az FLT3 TKD-jében kialakult D835Y és a D835H mutációk állhattak. Kombinációs terápiában alkalmazva a sorafenibet cytarabinnal és idarubicinnel indukciós és konszolidációs terápiában 18 betegből 18 FLT3-ITD- pozitív AML betegnél sikerült CR-t<sup>152</sup> elérni, azonban 9 hónappal a kezelést követően a betegek több mint felénél relapszus következett be. Rendkívül érdekes, hogy a relapszusos minták genomszekvenálása azt mutatta, hogy nem alakult ki az FLT3 TKD-ben új mutáció. Alternatív rezisztencia mechanizmusok, mint pl.: a megnövekedett FLT3 ligand mennyiség állhat a kialakult rezisztencia hátterében<sup>153</sup>. Jelenleg olyan kombinációs



terápiák kimenetelét vizsgálják, melyeknél hipometiláló ágenseket alkalmaznak sorafenibbel kombinálva, és így nem tapasztalták az FLT3 ligand szintjének emelkedését. A fázis II vizsgálatok (sorafenib+azaticidin) azt mutatják, hogy 43% r/r AML betegből, 16%-nál CR-t, míg 27%-nál CR-t nem, csak inkomplett sejtszám regenerációt lehetett elérni<sup>154</sup>.

A **lestaurtinib** egy másik nem-specifikus TKI, mely hatékonyan gátolja az FLT3 kinázt ( $IC_{50}=2-3nM$ ), mutáns és vad típusú AML sejtvonalak esetében is jelentős antiproliferatív hatást mutatott<sup>155</sup>. Akárcsak a sorafenib esetében, a korai fázis vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy hatékonyan, tranziens javulást – a cirkuláló és csontvelői myeloblasztok csökkenését – eredményez a szer használata. Viszonylag jól tolerálható, hányinger, hányás alakult ki a kezelés során<sup>156</sup>. FLT3-mutáns fiatal AML betegeknél kombinációs terápiában alkalmazva 85%-ban nőtt a túlélés.

Szintén nem specifikus TKI a **midostaurin**, mely monoterápiában alkalmazva szignifikáns átmeneti javulást eredményez AML betegek kezelésénél, fázis II vizsgálat során 20 betegből 14-nél 50%-kal csökkent a perifériás blaszt sejtek aránya, a mellékhatásprofil is kedvező volt, azonban nagyon hamar kialakult a szerzett rezisztencia<sup>157</sup>. A kombinációs terápiában alkalmazott szer hatásáról több klinikai vizsgálat eredménye is átfogó képet ad, ezek az eredmények sokkal jobbak, mint amiket a szert monoterápiában alkalmazva lehetett elérni. Fázis I és fázis I/II vizsgálatok melyek midostaurint azacitidinnel kombinálva alkalmaztak, kimutatták, hogy hatásos és tolerálható a kombináció<sup>158</sup>.

### 1.5.5.2 Második generációs FLT3-inhibitorok

A **quizartinib** a második generációs FLT3-inhibitorok közé tartozik, azaz specifikusan az FLT3-gátlására tervezték, hogy minél inkább redukálni lehessen az off-target hatások miatt kialakult toxicitást. A másik nagy előnye a korábban tárgyalt szerekkel szemben, hogy jó a biohasznosulása, valamint a plazma felezési idő több mint 24 óra. 76 r/r AML beteggel végzett fázis I vizsgálat eredménye szerint FLT3 mutációs státusztól függetlenül 30%-os volt a hematológiai terápiás válasz, 13%-nál CR-t, 17%-nál inkomplett remissziót értek el. Az FLT3-ITD mutáns betegek esetében a hematológiai válasz 53%-ra emelkedett, 23%-nál CR alakult ki<sup>159</sup>. Az FLT3-ITD mutáns esetekben megfigyelt előnyök, vagy off-target hatások, vagy pedig az FLT3 TK jelátviteli utak upregulációjával

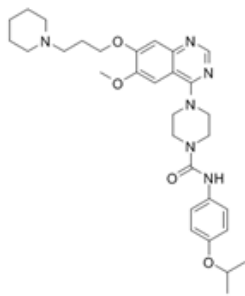
magyarázható<sup>160</sup>. Az FLT3 ITD-pozitív AML betegek esetében a medián remissziós idő öt hét, azaz nagyon gyorsan kialakul a rezisztencia<sup>161</sup>. Az N676, F691 és D835 pozíciókban kialakult mutációk lehetnek felelősek a quizartinibbel szemben kialakult rezisztenciáért<sup>162, 163</sup>.

A szelektív FLT3-gátló quizartinib gátolja a c-KIT-et is<sup>164</sup> mely esszenciális a normál eritropoezis és megakariocita funkció eléréséhez<sup>165</sup>. Így bizonyos mértékben a csontvelői funkció szuppresszálása is megfigyelhető a terápia következményeként.

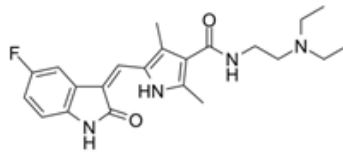
FLT3-ITD-pozitív AML, myelodiszplázias szindrómás (MDS) vagy CML betegekké végzett fázis I/II vizsgálatban (NCT01892371) a quizartinibet kombinációs terápiában alkalmazták hipometiláló szerrel (hypomethylating agent; HMA) és így 82% volt a kialakult hematológiai válasz<sup>166</sup>.

A **crenolanib** második generációs FLT3 TKI, mely monoterápiás szerként is az FLT3-ITD és FLT3-TKD mutációk jelenléte esetén is hatékony, az F691L mutáció esetén ugyan kisebb a potenciálja és szintén gátolja a c-KIT-et<sup>167, 168</sup>. Smith és mtsai. által végzett vizsgálatok során nem sikerült olyan TKD mutációt azonosítani, mely rezisztens lenne a crenolanibra<sup>169</sup>. Rendkívül fontos ez az eredmény, hiszen az eddigi FLT3-inhibitorok adminisztrációja során mindig kialakult a szerzett TKD mutáció okozta rezisztencia. Jelenleg több AML klinikai vizsgálatban szerepel a crenolanib monoterápiás szerként illetve kombinációs terápiában is indukciós (NCT02283177)<sup>170</sup> és re-indukciós kemoterápiás szerekkel (NCT02626338)<sup>171</sup>.

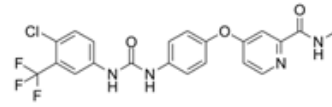
Az általam részletezett FLT3-inhibitorokat a **4. ábrán** foglaltam össze, valamint az **5. ábrán** AML betegség, FLT3- és FLT-ITD- elváltozást hordozó AML esetében világviszonylatban végzett klinikai vizsgálatok számát összesítettem a ClinicalTrials.gov alapján, rámutatva arra, hogy az FLT3-inhibitorok vizsgálata milyen kiemelkedő kutatási terület napjainkban.



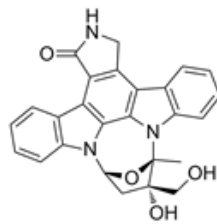
tandutinib



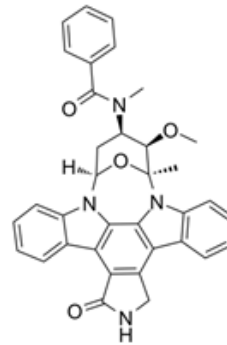
szunitinib



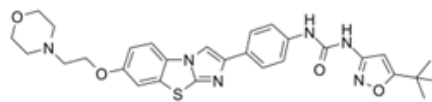
sorafenib



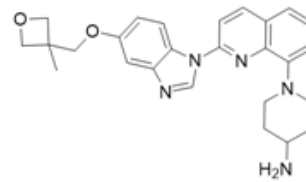
lestaurtinib



midostaurin

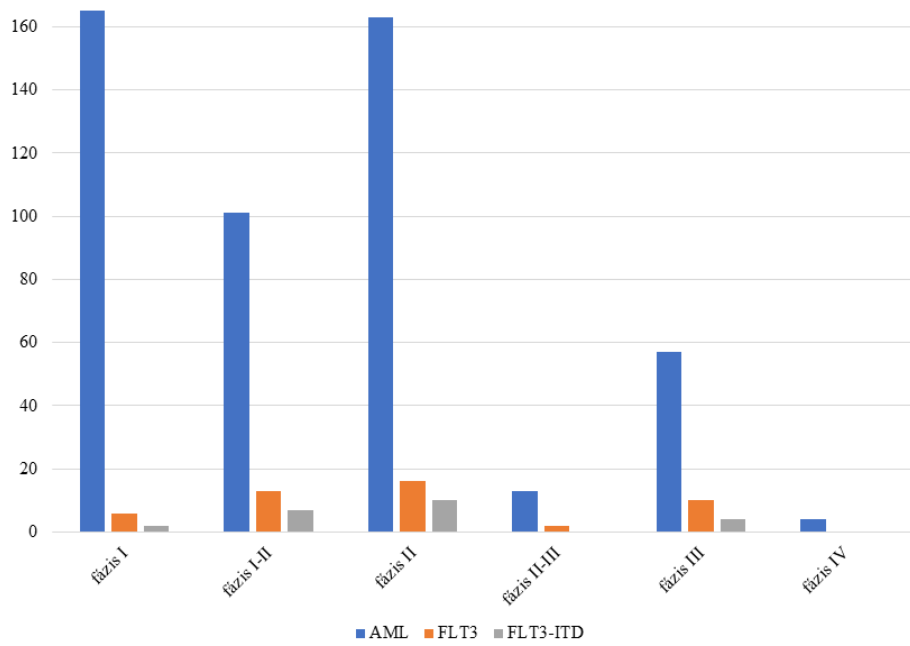


quizartinib



crenolanib

#### 4. ábra: FLT3-inhibitorok.



**5. ábra: AML betegség, FLT3- és FLT-ITD- elváltozást hordozó AML esetében végzett klinikai vizsgálatok száma világviszonylatban.**

## 2 Célkitűzések

A gyógyszerkutatás korai fázisában az elsődleges cél olyan molekula azonosítása, amely a gyógyszerfejlesztés során preklinikai, klinikai kutatási fázisba kerülhet. Doktori munkám első szakaszában új és szelektív daganatellenes CDK9-inhibitorok azonosítása és biológiai validálása a cél. Feladatom részleteiben:

1. célzott fehérje alapú biokémiai rendszerekben nagyszámú származékok (fókuszált vegyülettár) tesztelése a minél hatékonyabb és szelektívebb molekulák azonosítása érdekében, a célzott fehérjealapú teszteléshez nagy, illetve közepes áteresztőképességű (HTS/ MTS) biokémiai tesztrendszerek beállítása: CDK9, CDK4, CDK2 kináz-aktivitási tesztek optimalizálása és validálása
2. fehérjealapú biokémiai tesztek során azonosított találati molekulák hatékonyságának vizsgálata sejtes rendszerekben
3. biokémiai- és sejtes tesztekben azonosított leghatékonyabb lead vegyület szelektivitási profiljának a részletesebb meghatározása
4. a lead vegyület biológiai hatásmechanizmusának vizsgálata
5. a lead molekula hatásának vizsgálata a h. r. TRAIL-indukált apoptózisra (kombinációs kezelés)

További kutatómunkám során az akut myeloid leukémia nemrég azonosított célpontjának, az FLT3 kináznak a potenciális inhibitorainak *in vitro* és *in vivo* vizsgálata a feladatom. Kutatási eredmények igazolták, hogy a quizartinib vegyülettel szemben rezisztencia alakul ki FLT3-D835Y mutációt hordozó betegek esetében. Ez a tudományos tény meghatározta a témában történő további kutatási irányt. Célkitűzéseim:

1. célfehérje alapú hatóanyag fejlesztéshez szükséges biokémiai rendszerek optimalizálása és validálása; FLT3 kinázaktivitási tesztek optimalizálása és validálása a vad típusú, illetve ITD vagy D835Y mutációt hordozó enzimekre
2. inhibitorok validálása sejtes rendszerekben
3. a lead vegyület szelektivitási profiljának a meghatározása
4. a lead molekulák kötődési módjának vizsgálata

5. MV4-11 FLT3 ITD-mutáns akut myeloid leukémia sejtvonalon a hatásmechanizmus vizsgálata
6. leghatékonyabb analógok gyógyszerszerűség szempontjából fontos korai ADME paramétereinek meghatározása
7. a lead molekula farmakokinetikai paramétereinek meghatározása és *in vivo* vizsgálata

## 3 Módszerek

### 3.1 Vegyületek, vegyszerek

Munkám során a Vichem Chemie Kutató Kft. vegyészei által szintetizált vegyületeket használtam és vizsgáltam.

A kezelőszerek mindegyikéből 5 mM-os törzsoldatot készítettünk dimetil-szulfoxidban (DMSO, Sigma-Aldrich). Az oldatokat szobahőmérsékleten tároltuk, felhasználáskor a médiumban hígítva készítettük el a megfelelő végkoncentrációjú oldatot, ügyelve arra, hogy a DMSO töménysége ne legyen 0,1%-nál (V/V) magasabb. A kísérleteinkhez Eppendorf, Sarstedt és VWR műanyagárut használtunk.

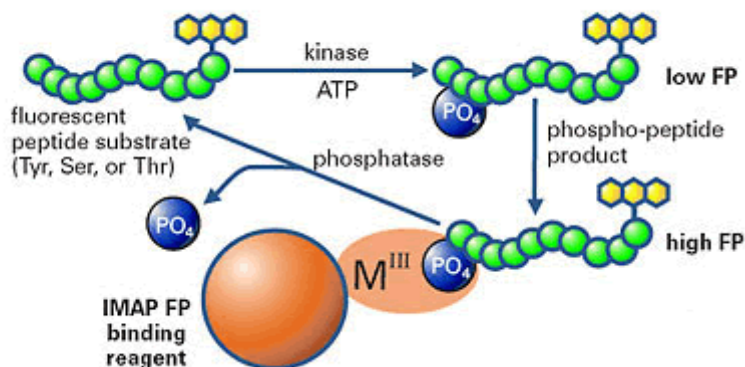
### 3.2 Vegyületek minőségellenőrzése

Az analitikus kollégák különböző módszerekkel (tömegspektrométerrel kapcsolt HPLC (HPLC-MS), mágneses magrezonancia (NMR) igazolták a szintetizált vegyületek kémiai szerkezetét. Az oldatok hatóanyagtartalmát háromhavonta ellenőriztük. Minden kísérlethez 98% fölötti tisztaságú oldatot használtunk.

### 3.3 Fluoreszcencia polarizáción alapuló mérések - IMAP (Immobilized Metal Assay for Phosphochemicals)

A szintetizált inhibitorok hatását 6 különböző rekombináns enzimen (FLT3wt, FLT3-ITD, FLT3-D835Y, CDK2, CDK4, CDK9), a Molecular Devices által kifejlesztett IMAP<sup>®</sup> módszerrel vizsgáltuk. A módszer lényegét a **6. ábra** mutatja be. A rekombináns kinázt és ATP-t tartalmazó reakcióelegyhez egy fluoreszcens festékkel konjugált peptid szubsztrátot adunk, ami foszforilálatlan állapotában alacsony fluoreszcencia-polarizáció értéket produkál. Amennyiben az enzim foszforilálja a jelölt szubsztrátot, az a foszfocsoporton keresztül egy nanogyöngyhöz rögzített háromértékű fémionhoz kötődik, ettől lecsökken a mobilitása, ami magas polarizációs jelet eredményez. A jel nagyságából az enzimműködés sebességére/ intenzitására lehet következtetni.

## IMAP FP



**6. ábra: A fluoreszcencia polarizáció alapuló IMAP-módszer: IMAP FP binding reagent: IMAP-kötő reagens (nanogyöngy a hozzá rögzített fémmionnal), FP: fluoreszcencia-polarizáció<sup>172</sup>**

A vizsgálatokat alacsony fehérjekötő képességű 384 lyukú **Corning®** mikrotiter lemezen végeztük. Az egypontos screening esetén 10 µM végkoncentrációban alkalmaztuk a hatóanyagokat, míg az IC<sub>50</sub> értékek meghatározásához harmadoló hígítással 12 pontos hígítási sorozatot készítettünk (12,5 µM – 0,00007 µM tartományban).

Az FLT3-kinázok reakcióihoz TAMRA fluoreszcens festékekkel konjugált specifikus peptid szubsztrátot használtunk 400 nM koncentrációban. A szubsztrát aminosav-szekvenciája a következő volt: GEEPLYWSFPAKKK-NH<sub>2</sub> (GeneCust; Europe). Az FLT3wt mérések esetében az assay komponensei: 20 nM FLT3 enzim, 400 nM fluoreszcensen jelölt szubsztrát, 17 µM ATP (=K<sub>M[ATP]</sub>), valamint 20 mM HEPES pH=8 kináz puffer, 1 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM MnCl<sub>2</sub> és 0,01% Brij 35. Az FLT3-ITD mérések esetében az assay komponensei: 50 nM FLT3-ITD enzim, 400 nM fluoreszcensen jelölt szubsztrát, 5,10 µM ATP (=K<sub>M[ATP]</sub>), valamint 20 mM HEPES pH=8 kináz puffer, 1 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM MnCl<sub>2</sub> és 0,01% Brij 35. Az FLT3D-835Y mérések esetében az assay komponensei: 5 nM FLT3-D835Y enzim, 400 nM fluoreszcensen jelölt szubsztrát, 1,32 µM ATP (=K<sub>M[ATP]</sub>), valamint 20 mM HEPES pH=8 kináz puffer, 1 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM MnCl<sub>2</sub> és 0,01% Brij 35. A reakciót 2 µL enzim hozzáadásával indítottuk el, majd a vizsgált vegyületekkel egy órán át szobahőmérsékleten inkubáltunk. A reakciót 10 µL IMAP detektáló oldattal állítottuk le. A detektáló oldat két különböző puffer meghatározott arányú keverékéből, valamint



szintén meghatározott arányban hozzáadott nanorészecskéből állt: (pufferA 60% : pufferB 40%; nanorészecskék aránya 1:1200). A fluoreszcencia-polarizációt egy óra inkubációt követően Analyst® GT Multimode Reader segítségével mértük ( $\lambda_{\text{ex}} = 550/10$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 590/10$  nm, dikroikus tükör: 561 nm). Az IC<sub>50</sub> görbék illesztését és az IC<sub>50</sub> értékek számítását Microsoft Excel és XLfit v5.1.0 (IDBS, Surrey, UK) programmal végeztük.

### **3.4 High-Throughput kináz szelektivitási profil meghatározása (KINOMEscan™)**

A KINOMEscan® kötődési vizsgálatokat a DiscoverX cég végezte el, a szakirodalomban publikált módszer szerint, 451 releváns kinázon 5  $\mu\text{M}$  inhibitor koncentráció mellett<sup>173</sup>.

### **3.5 Sejtvonalak, sejtenyésztés**

A sejtes assay-ben a vegyületek teszteléséhez a Vichem Kémiai Kutató Kft. tulajdonában lévő különböző genetikai profilú sejtvonalakat használtam. A **4. táblázat**ban foglaltam össze a kísérletek során használt sejtvonalak nevét, eredetét és a tenyésztés körülményeit.

#### 4. táblázat: Sejtvonalak neve, eredete és a tenyésztési körülmények.

név	szövet/eredet/típus	médium	forrás
A549	tüdő epitél	RPMI 1640; 10 % FBS; 1% antibiotikum/antimikotikum	ATCC
H1650	tüdő epitél	RPMI 1640; 10 % FBS; 1% antibiotikum/antimikotikum	I. számú Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet
H1975	tüdő epitél	RPMI 1640; 10 % FBS; 1% antibiotikum/antimikotikum	Cancer Research UK London Research Institute
HCC827	tüdő epitél	RPMI 1640; 10 % FBS; 1% antibiotikum/antimikotikum	ATCC
H358	tüdő epitél	RPMI 1640; 10 % FBS; 1% antibiotikum/antimikotikum	ATCC
PC9	tüdő heterogén kerek- és orsósejtes	RPMI 1640; 10 % FBS; 1% antibiotikum/antimikotikum (Ab/Ab) (v/v)	Cancer Research UK London Research Institute
PC9-ER	tüdő heterogén kerek- és orsósejtes	RPMI 1640; 10 % FBS; 1% antibiotikum/antimikotikum (v/v)	Cancer Research UK London Research Institute
MCF7	emlő epitél	RPMI 1640; 20 % FBS; 1% antibiotikum/antimikotikum	ATCC
HepG2	máj epitél-szerű	RPMI 1640; 10 % FBS; 1% antibiotikum/antimikotikum	Enzimológiai Intézet
ATRFLOX	vastagbél epitél	McCoy's 5a; 10 % FBS; 1% antibiotikum/antimikotikum	Innsbruck Medical University
Hct116 wt	vastagbél epitél	RPMI 1640; 10 % FBS; 1% antibiotikum/antimikotikum	ATCC
HT29	vastagbél epitél	RPMI 1640; 10 % FBS; 1% antibiotikum/antimikotikum	ATCC
Panc-1	hasnyálmirigy epitél	DMEM; 10 % FBS; 1% antibiotikum/antimikotikum	I. számú Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet
PC3	prosztata epitél	HAM's F12K; 7 % FBS; 1% antibiotikum/antimikotikum	ATCC
Jurkat	vér T limfocita	RPMI 1640; 10 % FBS; 1% antibiotikum/antimikotikum	ATCC
KMS12-BM	vér MM	RPMI 1640; 20 % FBS; 1% antibiotikum/antimikotikum	Innsbruck Medical University
OPM2	vér MM	RPMI 1640; 20 % FBS; 1% antibiotikum/antimikotikum	Innsbruck Medical University
RPMI-8226	vér MM	RPMI 1640; 20 % FBS; 1% antibiotikum/antimikotikum	Innsbruck Medical University
U266	vér MM	RPMI 1640; 20 % FBS; 1% antibiotikum/antimikotikum	Innsbruck Medical University
A431	bőr epitél	DMEM; 10 % FBS; 1% antibiotikum/antimikotikum	ECACC
HeLa	méhnyak epitél	DMEM; 10 % FBS; 1% antibiotikum/antimikotikum (Ab/Ab) (v/v)	I. számú Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet
U937	pleurális effúzió, limfocita, myeloid	RPMI 1640; 10 % FBS; 1% antibiotikum/antimikotikum	I. számú Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet
K562	pleurális effúzió, csontvelő	RPMI 1640; 10 % FBS; 1% antibiotikum/antimikotikum (Ab/Ab) (v/v)	I. számú Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet
MV4-11	vér makrofág	IMDM; 20 % FBS; 1% antibiotikum/antimikotikum	CLS
HS-5	csontvelő, stróma	DMEM; 10 % FBS; 1% antibiotikum/antimikotikum	Innsbruck Medical University

A sejteket 37°C-on, 5%-os CO<sub>2</sub> termosztátban tartottuk. A sejtvonalakat rendszeresen teszteltük *Mycoplasma spp.* fertőzésre.

A sejtek passzálásakor, valamint kísérletek indításakor adherens kultúrák esetében a sejt kultúrát steril foszfát-pufferelt sóoldattal (PBS-sel) mostuk, majd 0,1%-os tripszin-EDTA vagy EDTA oldattal (Lonza) néhány percig 37°C -on inkubáltuk, majd médiumban mostuk. A sejtdenzitást tripánkékes sejtszámlálást követően állítottuk be. A sejtszámot Bürker-kamrával/Invitrogen Countess II FL Automated Cell Counterrel határoztuk meg.

### **3.6 Lumineszcens sejtviabilitás vizsgálat**

Sejtvonalanként egysejtsuszpenziót készítettünk, majd 1000 sejtet pipettáztunk lyukanként 30 µl térfogatban 384 lyukú sejtenyésztő mikrolemezre (Perkin Elmer). Másnap a sejteket a tesztelendő vegyületekkel kezeltük a kívánt végkoncentrációban. A sejteket 37°C-on, 5%-os CO<sub>2</sub> tartalom mellett 72 óráig inkubáltuk. Az inkubációs idő leteltével a sejtek életképességét CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay kit (Promega Corp., Madison, USA) segítségével határoztuk meg a gyártó instrukcióit követve. Ez a mérési technológia az élő sejtek számát a jelen lévő ATP mennyiségéből indirekt módon határozza meg. A metodika biokémiai alapja az, hogy Mg<sup>2+</sup> és ATP jelenlétében a luciferáz enzim a luciferin mono-oxigenizációját katalizálja, ennek révén oxiluciferin keletkezik, amelyet detektálni tudunk. A lumineszcens szignált TECAN Evolution Plate Reader-rel olvastuk le. Az egyponos mérésekben 75% feletti inhibíciót eredményező anyagok esetén meghatároztuk az IC<sub>50</sub> értékét, melyhez 30 µM-tól induló, 10 pontos, harmadoló hígítási sort készítettünk. Az így meghatározott koncentrációkénti százalékos gátlás adatok alapján Microsoft Excel és XLfit v5.1.0 (IDBS, Surrey, UK) szoftver segítségével görbét generáltunk és meghatároztuk az anyagok IC<sub>50</sub> értékét.

### **3.7 *In vitro* klonalitás vizsgálat**

A klonogén rendszerben meghatározhatjuk a sejtek hosszútávú túlélését adott inhibitorral történő előkezelést követően. A sejteket 70%-os konfluencia eléréséig tenyésztettük, majd a megfelelő médiumban egysejtsuszpenziót készítettünk. 3000 sejtet pipettáztunk 6 cm-es Petri csészékbe. Másnap a sejteket az IC<sub>50</sub>-nek megfelelő koncentrációban kezeltük, inhibitoronként három párhuzamosban. 72 óra elteltével

médiumcserét végeztünk, hogy eltávolítsuk a kezelőszereket és megszabaduljunk az elhalt sejtektől. Ezt követően a médiumot 4 naponta cseréltük, egészen addig (14-21 nap), amíg a minimum 50 sejtnyi, szabad szemmel is jól látható kolóniák meg nem jelentek. Ekkor a médiumot leszívtuk, a sejteket PBS-el mostuk, majd 1 ml jéghideg fixáló reagenst (50% etanol, 50% PBS és 0,25% 1, 9-dimetil-metilén kék, Sigma) adtunk hozzájuk. 40 percig a sejteket szobahőmérsékleten fixáltuk, végül a kék kolóniákat fotóztuk. A kolóniák számából a sejtek hosszútávú túlélésére következtettünk.

### **3.8 Apoptotikus DNS-fragmentáció meghatározása áramlások citometriával**

Az MCF7 sejteket (n=40000) 24 lyukú lemezekben szélesztettük. Másnap kezeltük, adott szerre vonatkozó sejt specifikus IC<sub>50</sub> koncentrációval a sejteket. 24 órás inkubációt követően a kultúrákból egysejtes szuszpenziót készítünk, centrifugálást (300x g, 3 perc) követően a felülúszót elöntjük és a pelletet -20°C-os, 70%-os alkoholban fixáltuk. Az etanol fixálja a szerkezetet, ezért a mosási lépésnél az apoptózis során keletkezett DNS-fragmentumok eltávolíthatóak. Másnap a már fixált mintákat újra centrifugáltuk, majd 750 µl alkalikus extrakciós pufferben (200 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/citromsav (pH=7,8) és 100 µg/ml végkoncentrációban RNáz A-t (Sigma) vettük fel. Szobahőmérsékleten inkubáltuk a mintákat 30 percet, végül propidium-jodiddal (PI; 5 µg/ ml, Sigma) festettük a DNS-t<sup>174</sup>. A propidium-jodid egy DNS-interkaláló festék, melynek fluoreszcencia intenzitása jelentősen megnő, amint a DNS-hez kötődik.

Az áramlási citométerrel a sejtek állapotát és tulajdonságait fényszórásuk és fluoreszcencia intenzitásuk segítségével határozzuk meg. A kis szögű előre fényszórás a sejt mérettel arányos, az oldalra fényszórás a sejt granuláltságát jellemzi. A DNS-hez kötött festék fluoreszcenciája pedig a sejt DNS-tartalmával arányos. Az apoptotikus populáció (subG1 populáció, azaz a fragmentálódott DNS-t tartalmazó sejtek) arányát áramlási citométerrel (FACSCalibur) határoztuk meg a. Minden mérést kétszer ismételtünk meg. A citometriás méréssel nyert grafikonon az x-tengelyen a sejtek nagyságával arányos előre fényszórás lehet látni, az y tengelyen pedig a propidium-jodid fluoreszcenciáját. A mérés szempontjából releváns sejteket a megfelelő mérési-kapuk által lehet kiválasztani. A kapun belül találhatóak az ép és az apoptotikus sejtek, a kapun kívül pedig az igen kis fényszórású vagy fluoreszcenciájú sejtörmelék, DNS-fragmentek. A hisztogram abszcisszáján a sejtek DNS-tartalmával arányos fluoreszcencia intenzitás

szerepel logaritmikus skálán ábrázolva, az oordinátán pedig a sejtszám van megjelenítve. Az apoptotikus, azaz csökkent DNS-tartalmú sejtek populációja a normál sejtek G1 fázisában lévő sejtek alatt található meg a fluoreszcenciát jelölő tengelyen. A kiértékelést CellQuest Pro (BD) szoftverrel végeztük. Az eredményeket 10%-os szórás alatt fogadtuk el. A vizsgálathoz pozitív kontrollként staurosporint használtunk 100 nM végkoncentrációban, mely széles körben alkalmazott, széles spektrumú kináz-inhibitor, apoptózis-indukáló szer.

Ugyanebben a mérési mintában vizsgálhattuk a sejtciklust is a G1, S, G2/M populációkra kapukat illesztettünk, könnyen számszerűsíthetővé vált a sejtek fázisonkénti megoszlása.

### **3.9 Az apoptózis vizsgálata áramlási citométerrel Annexin V-FITC és propidium-jodid kettős jelölt sejteken**

96 lyukú mikrotiter lemezre lyukanként 50000 MV4-11 sejtet pipettáztunk, majd a kívánt koncentrációban kezeltük az inhibitorokkal. Pozitív kontrollként staurosporint (Sigma) használtunk. 24 órás inkubációt követően a sejteket centrifugáltuk, PBS-el mostuk és mintánként 30 µl pufferben (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>) vettük fel. Ezt követően 1,5 µl Annexin V-FITC konjugátumot és 3 µl propidium-jodidot (10 µg/µl végkoncentráció) (Life Technologies) pipettáztunk minden egyes mintába. 10-15 perc szobahőmérsékleten történő inkubációt követően mintánként 5000 eseményt mértünk meg áramlási citométerrel (BD Accuri™ C6 Flow Cytometer; automata mintavevő). A megfelelő kapukat beállítva, kizártuk a mérésből a sejtörmelékeket, illetve a kompenzáció beállítását követően azonosíthattuk a festetlen élő (AN<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>), a korai apoptotikus (AN<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) és a kései apoptotikus (AN<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) populációkat.

### **3.10 A sejtciklus vizsgálata áramlási citométerrel BrdU és propidium-jodid kettős jelöléssel**

MCF7 sejteket 0,25 és 0,5 µM **20**-as vegyülettel kezeltük 24 órát. A sejteket 10 µM 5-bromo-2'-deoxyuridinnel (BrdU) inkubáltuk 30 percig 37 °C-on. A sejteket gyűjtöttük, majd 70%-os etanollal fixáltuk, 30 percig jégen inkubáltuk. Ezt követően PBS-sel mostuk, reszuszpendáltuk a sejteket 2 M aq HCl-ban, majd 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk (DNS denaturálás). A sejteket neutralizáltuk 0,1 M-os Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>-dal, centrifugálást követően 0,5% Tween-20 és 1% BSA-tartalmú PBS-sel mostuk. Anti-

BrdU FITC-jelölt antitesttel (1:50, Becton-Dickinson) 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk a sejteket. A sejteket PBS-sel mostuk, 0,5 mg/mL végkoncentrációban RNáz A-t (Sigma) pipettáztunk mintánként. A sejtek arányát az egyes sejtciklusban áramlási citométerrel (FACSCalibur, Becton Dickinson) 5 µg /mL propidium jodid jelenlétében határoztuk meg a mintában<sup>175</sup>. 5-bromo-2'-deoxiuridin-fluoreszein, klón BMC 9318; (Roche Applied Science).

### **3.11 Kaszpáz-3/7 aktivitás mérése lumineszcens tálcaleolvasóval**

5000 MV4-11 sejtet pipettáztunk lyukanként 96 lyukú mikrotiter lemezre, majd másnap a megfelelő koncentrációban kezeltük az inhibitorokkal. A mintákat 24 óráig 37°C-on inkubáltuk. Az assay-ben szunitinibet használtunk pozitív kontrollként. A kaszpáz-3/7 aktivitást a Caspase-Glo® 3/7 Assay-vel (Promega) határoztuk meg a gyártó instrukcióit követve. A lumineszcens szignált TECAN Evolution készülékkel olvastuk le.

### **3.12 Kaszpáz-3/9 aktivitásmérés fluoreszcens tálcaleolvasóval**

A mérés alapját az képezi, hogy a kaszpáz-3 és kaszpáz-9 enzim mesterséges szubsztrátjának hasításakor felszabaduló fluoreszcens termék detektálásán keresztül meghatározható az enzimaktivitás.

A mintákat mosást követően kaszpáz aktiváló pufferben gyűjtjük (10mM KCl, 5mM HEPES, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 10% szukróz, 0,1% CHAPS és 5mM DTT; pH=7,4), majd 96 lyukú tálcára pipettázzuk a sejteket. Az Ac-DEVD-AMC (a kaszpáz-3 esetében), vagy az Ac-LEHD-AMC (a kaszpáz-9 esetében) szubsztrátot a rendszerhez adjuk (25µM) a megfelelő reakciópufferben (25 mM PIPES, 2 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, pH 7.3), illetve (100 mM HEPES, pH 7.5; 0.5 mM EDTA; 20 % glycerol, 5 mM DTT), majd 37°C-on 30 percig inkubáljuk. Miután a kaszpáz-3 és kaszpáz-9 hasította a mesterséges szubsztrátot a keletkező AMC (amino-metil kumarin) 380 nm-en gerjesztve 460 nm-en fluoreszcenciát bocsát ki. A fluoreszcencia értékeket a Fluoroskan Ascent microplate readerrel határoztuk meg (Labsystems). A spektrofluorométer az AMC felszabadulása során keletkezett fluoreszcencia növekedést méri.

### 3.1 Western blot analízis

A kezelési idő leteltével a sejteket PBS-sel mostuk, majd edényenként 100 µl lízis pufferrel lizáltuk (3 mM TRIS, 150 mM NaCl, 1% TRITON-X 100, 10% glicerol, 1 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF) és proteázgátló koktél (Sigma)). Bradford-módszerrel (Protein-assay, Bio-Rad) meghatároztuk a minták fehérjetartalmát, majd 5x Laemmli pufferben (BioRad) 97°C-on denaturáltuk a fehérjéket. Az SDS-gélelektroforézist 8% illetve 16% akrilamid-tartalmú gélen végeztük (130V, 120 perc), 20, illetve 30 µg fehérjét vittünk fel mintánként, mólsúly-sztenderdek ProSieve QuadColor (4,6-300 kDa, Lonza) markert használtunk. Az SDS gélről a fehérjéket blottoló készülékkel (BioRad; 2 óra, 400 mA) vittük át polivinilidén-difluorid (PVDF) membránra (BioRad; Immun-Blot PVDF Membrane For Protein Blotting). A nem specifikus kötőhelyek blokkolására 5% (m/V) BSA (bovine serum albumin) tartalmú TBS-Tween 20 oldat (TBST)-pufferrel (0,1 % Tween-20, 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 136 mM NaCl, 2 mM KCl) mostuk a membránt. Kísérleteinkhez a következő nyúl anti-humán ellenanyagokkal inkubáltuk 4°C-on, egy éjszakán át a membránt: hasított kaszpáz-3, kaszpáz-7, kaszpáz-9, hasított PARP, c-FLIP; klón D16A8 és XIAP, (1:1000, Cell Signaling), β-aktin, klón C4; Mcl-1, klón S-19; CDK9, klón D-7, valamint egér anti-humán α-tubulin, klón 6-11B-1 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology), RNS polimeráz-II ppS5 és ppS2 (1:2000, Bethyl Laboratories) és RNS polimeráz-II, klón ARNA-3, (1:1000, Millipore) és p53, klón DO-1 (1:1000, Dr. B. Vojtěšek, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic). A másodlagos antitest tormaperoxidáz (HRP)-konjugált anti-nyúl IgG (1:2000, Cell Signaling). Előhívás ECL Advanced Western Blotting Detection kit (Amersham Biosciences) segítségével, autoradiográfiás filmen.

### 3.2 Egér xenograft modell

Az *in vivo* kísérletekhez 10-12 hetes hím súlyos kombinált immunhiány (SCID) egereket (C.B-17/lcr-Prkdcscid/lcr1coCr1) használtunk. Az immunhiányos állatokat speciális patogén-mentes környezetben neveltük, egy tenyésztődobozban maximum 10 állatot tartottunk. A humán MV4-11 sejteket szérumentes IMDM médiumban mostuk, majd egysejtes szuszpenziót készítettünk. Csoportonként 11 egérnek  $2 \times 10^6$  sejtet fecskendeztünk be intraperitonealisan. A beoltást követő 19. napon az állatokat random kezelt és kontroll csoportokba soroltuk. A III-as számú anyagot 30 mM-os

koncentrációban szolubilizáltuk 1% DMSO- és 45 µg/ml aszkorbinsav-tartalmú szérumentes IMDM médiumban. A kezelt csoportba tartozó állatok 17 mg/kg **III**-as számú anyagot kaptak intraperitoneálisan, kétnaponta, míg a kontroll csoport csak a vivőanyagot. Az állatok állapotát 2 hétig követtük, testtömegüket és a tumortérfogatokat (térfogat = szélesség<sup>2</sup> x hossz x  $\pi/6$ ) folyamatosan monitoroztuk. A kísérleteket a beoltás után 17 nappal fejeztük be, a tumorokat eltávolítottuk és meghatároztuk a tömegüket. Az állatok elhelyezése, gondozása és a kísérletek kivitelezése az Országos Onkológiai Intézet által meghatározott, ellenőrzött, valamint a Pest Megyei Kormányhivatal által felülvizsgált, jóváhagyott protokollja szerint történt (nyilvántartási szám (engedélyszám): PEI/001/2574-6/2015).

### **3.3 Farmakokinetikai vizsgálat**

A **III**-as számú anyag farmakokinetikai paramétereinek vizsgálata 5-6 hetes NMRI outbred hím egereken történt (Toxicop, Hungary). Az állatokat random két csoportba osztottuk az (intravénás (iv) és orális (po) adminisztrációhoz). Az anyagot fiziológiás sóoldatban oldottuk és a farokvénába injektáltuk 3 mg/kg, vagy orálisan adagoltuk 10 mg/kg koncentrációban. A cervikális diszlokációt követően a vért a vena cavából gyűjtöttük az adminisztrációt követő 1. (csak iv), 5., 15., 30., 60., 120., 240., és 480. percben. Minden időpontban 3 állatot vizsgáltunk. A vért szeparáltuk és a plazmát -20°C-on tároltuk. A számolást a PKsolver<sup>176</sup> szoftver segítségével végeztük. Az állatok tartása, a kísérletek kivitelezése protokoll szerint történt. A kísérleti protokollt a Semmelweis Egyetem „Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága”, valamint a Pest Megyei Kormányhivatal vizsgálta felül és hagyta jóvá (nyilvántartási szám (engedélyszám): XIV-I-001 / 22103-4 / 2012).

A plazma inhibitor-tartalmát tömegspektrometriai módszerrel határoztuk meg. Belső sztenderdként 10 µl 5000 ng/ml koncentrációjú imatinib-d8-oldatot adtunk hozzá a szérum mintákhoz. Az analitokat acetonitrillel extraháltuk, majd a felülúszót bepároltuk nitrogén atmoszféra alatt. 20 µl aliqout-ot analizáltunk LC-MS-sel, miután visszaoldottuk 100 µl HPLC eluenssel.

A HPLC rendszer egy Perkin Elmer Series 200 LC pumpából és automata mintavevőből állt. A detektálás egy API 4000 Q TRAP típusú tömegspektrométerrel történt, mely egy elektroporlasztásos ionizáló (Applied Biosystems/MDS Sciex) forrással működött. Az



analitokat reverz fázisú folyadékkromatográfiával, Merck Purospher Star C18 oszlopon (55x2 mm, 3 mm) választottuk el gradiens eluálással. 100 mM ammónium-acetát/0,1% ecetsav vizes oldata és acetonitril/0,1% ecetsav elegy volt a mobilfázis, az áramlási sebesség pedig 200 µl/min volt. Az analitokat „multiple reaction monitoring” (MRM) módban vizsgáltuk, 361,5-316,3 fragmentációs csatornán a **III**-as vegyület és 502–394 fragmentációs csatornán a belső sztenderd esetén. A tömegspektrométer használatakor a következők voltak a beállítások: köpenygáz áramlási sebessége 10 egység; kollíziós gáz közepes beállítás; 4,0 kV a porlasztó feszültség; 100°C az ion forrás hőmérséklete; és 20 V a declustering feszültség erőssége.

A mennyiségi meghatározás külső kalibrációs módszerrel történt. A kalibrációs pontokat különböző ismert koncentrációjú **III**-as anyagot tartalmazó szérumminták alapján határoztuk meg 1-600 ng/ml tartományban.

### **3.4 Kinetikai oldhatóság vizsgálat**

Az adott vegyületek 100% DMSO-ban oldott 5 mM-os törzsoldatából 200 µM-os vagy 120 µM-os oldatokat hígítottunk PBS-ben (pH=7,4 és pH=2,0). Az így elkészített oldatokat szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd másnap a felülúszóból 40 µl-t injektáltunk HPLC rendszerbe. Waters 2795 HPLC, Waters 996 PDA UV-detektor X-Bridge C18 3,5µm 4,6x50mm oszlop. Oldat A: MilliQ víz (MilliPore) + 0,1% hangyasav, oldat B: acetonitril (HPLC grade, Sigma-Aldrich) futási idő: 7,00 perc, áramlási sebesség = 2,0 ml/min.

A mennyiségi meghatározáshoz kontrollként 200 vagy 120 µM -os oldatot készítettünk tiszta DMSO-ban, és a kromatogramok görbe alatti területét (AUC) hasonlítottuk össze.

### **3.5 Permeabilitás vizsgálat (PAMPA)**

A permeabilitás vizsgálatokhoz Paralell Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA; BD Gentest) 96-lyukú mikrotiter lemezt használtunk, a gyártó ajánlásainak figyelembevételével. A méréshez 5 mM-os törzsoldatokból (DMSO) 200 µM-os oldatokat készítettünk PBS-ben, ügyelve arra, hogy az oldatok DMSO-tartalma ne haladja meg a 2%-ot. A PAMPA mikrotiter lemezeket a mérés előtt 30 percet inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ezt követően a donor (alsó) lemezre lyukanként 300 µl 200 µM-os mintát, valamint a felső (akceptor) mikrotiter lemezre lyukanként 200 µl PBS-t

pipettáztunk. Az akceptor mikrotiter lemezt a donor mikrotiter lemezbe helyeztük, majd 5 óra inkubációt (szobahőmérséklet, sötét) követően a mikrotiter lemezeket szétválasztottuk. Az oldatok abszorbanciáját 210 nm és 580 nm közötti hullámhosszokon (UV/VIS) mértük meg spektrofotométerrel. Referencianyagként amiloridot (negatív kontroll) és koffeint (pozitív kontroll) használtunk. A penetráció értékét a következő lépések alapján számoltuk ki:

1. Először kiszámoltuk a kapott abszorbancia adatok alapján a donor ( $C_d$ ) és akceptor ( $C_a$ ) lyukakban levő oldatok inhibitor koncentrációját:

$$C_d = C_0 \times (A_d - A_p / A_0 - A_p) \text{ illetve } C_a = C_0 \times (A_a - A_p / A_0 - A_p)$$

ahol  $C_0$  a kiindulási koncentráció,  $A_d$  a donor minta,  $A_a$  az akceptor minta,  $A_0$  a kiindulási minta, és  $A_p$  a tiszta puffer – jelen esetben a 2% DMSO tartalmú PBS–abszorbancia értéke.

2. A koncentrációk ismeretében meghatároztuk az egyensúlyi koncentrációt ( $C_{eq}$ ):

$$C_{eq} = (C_d \times V_d + C_a \times V_a) / (V_d + V_a)$$

ahol  $V_d$ : a donor, és  $V_a$ : az akceptor lyukba mért térfogat, mintánként.

3. Az egyensúlyi koncentráció meghatározásával, a következő képlet segítségével ki tudtuk számolni a permeabilitás (penetrancia) ( $P_e$ ) értékét:

$$P_e = -\ln(1 - C_a / C_{eq}) / S \times (1 / V_d + 1 / V_a) \times t$$

ahol  $S$ : a mesterséges membrán felülete négyzetcentiméterben, és  $t$ : az inkubációs idő.

### 3.6 Dokkolás

A vegyületek kötődésének modellezését és a kötődési affinitás előrejelzését a Schrödinger Suite programcsomag 2009-es verziójával végeztük<sup>177</sup>. A dokkoláshoz a CDK9 kináz - flavopiridol fehérjeszerkezetet a Protein Data Bank adatbázisból töltöttük le (PDB azonosító: 3RJB). A Protein Preparation Wizard modullal előkészítettük a fehérjét: eltávolítottuk a kristályszerkezetben lévő vízmolekulákat, a szerkezeten megjelenítettük a hiányzó hidrogéneket, majd optimalizáltuk az intra- és intermolekuláris hidrogénhid kötéseket.

A vegyületek 3D szerkezetét a LigPrep modullal határoztuk meg 7,4-es pH-n, OPLS\_2005 erőteret alkalmazva.

A kötőhelyet a Glide modul ún. Receptor Grid Generation funkciójával modelleztük. Modellvegyületnek a fehérjeszerkezetben lévő flavopiridolt állítottuk be, és a szoftvert normál pontosság (SP mode) beállítása mellett használtuk. A dokkolás során csak azokat a konformereket mentettük el, melyek a legalacsonyabb  $\Delta G$  (score) értéket kapták.

### 3.7 Statisztikai vizsgálat

Minden vizsgálat esetében az egyes kísérletek átlagát, és azok szórását tüntettük fel (átlag  $\pm$  SD).

A rekombináns kináz vizsgálatoknál meghatároztuk az ún.  $Z'$  értéket, amely a mérés megbízhatóságáról ad információt. A  $Z$  értéket az alábbi összefüggés alapján számítottuk:  $Z' = 1 - ((3SD_{\max} + 3SD_{\min}) / (AV_{\max} - AV_{\min}))$ , ahol  $SD_{\max}$  a pozitív,  $SD_{\min}$  a negatív kontroll szórása, míg  $AV_{\max}$  a pozitív,  $AV_{\min}$  a negatív kontroll átlaga. Abban az esetben, ha a  $Z'$  érték  $\geq 0,5$ , a mérés megbízhatónak tekinthető. Azokat az eredményeket, ahol a mérés  $Z'$  értéke  $< 0,5$  volt, nem fogadtuk el megbízhatónak. Az  $IC_{50}$  értékeket nem-lineáris regresszió módszerével határoztuk meg.

A kombinációs kezelések és az állatkísérletek esetén a normalitást Shapiro-Wilk's tesztel ellenőriztük. A kiértékelésénél nem-paraméteres tesztelésre van szükség, a két vizsgálati csoport esetén ezért Mann-Whitney-tesztet használtunk. U a próbastatisztika értéke, Z a normál eloszláshoz való közelítés értéke; szignifikáns különbségnek azokat az eseteket tüntettük fel, ahol  $p \leq 0,05$ .

A dolgozatban bemutatott több csoport (különböző vegyületek és koncentrációk) összehasonlítása során elért eredményeink statisztikai analíziséhez a normalitást Shapiro-Wilk's tesztel ellenőriztük. A statisztikai összehasonlítására varianciaanalízist ANOVA vizsgálatot alkalmaztunk. ANOVA esetén az elsőfajú hiba esélyének növelése nélkül két általánosan elfogadott megközelítés létezik a post-hoc, valamint a kontraszt vizsgálat. Mivel csak gyenge hipotéziseink vannak a vizsgálat eredményére vonatkozóan, post-hoc vizsgálatot célszerű alkalmazni és ezzel szigorúbb megkövetéseket is adunk a szignifikanciára nézve. Post-hoc tesztek esetén szóráshomogenitás esetén

alkalmazhatunk többek között LSD tesztet, Bonferonni korrekciót, Tukey tesztet, Sheffe, vagy akár Hochberg's GT2 és Babriel's tesztet. Szóráshomogenitás megszegése esetén Tamhane's T2, Dunett's tesztet, vagy akár Games-Howell tesztet, bár utóbbi túlzottan megengedő. A szóráshomogenitás a változóink vizsgálata során Levene-teszt alapján igazolhatóak. Post-hoc vizsgálatra esetünkben érdemes megfontolni a Bonferonni korrekció alkalmazását, azonban tudnunk kell, hogy az elsőfajú hibát ezzel ugyan megoldjuk, de a másodfajú hiba növekszik, így talán mégis célszerűbb Tukey tesztet végezni, ami alkalmazható szerencsére, ugyanis az elemszámaink azonosak. A hatásnagyság megállapításához  $\omega^2$  mutatót alkalmazzuk, mivel az elemszámok azonosak és a mutató kevésbé torzított, mivel figyelembe veszi az elemszámot is.

$$\omega^2 = \frac{SS_M - (df_M)MS_R}{SS_T + MS_R}$$

Szignifikáns eltérésnek azt tekintettük, ahol  $p \leq 0,05$ . A statisztikai kiértékeléseket az SPSS szoftver segítségével végeztük.

## 4 Eredmények

### 4.1 A 4,6-diszubsztituált pirimidin származékok vizsgálata

Disszertációmban a 4,6-diszubsztituált pirimidin származékok vizsgálatával elért kutatási eredményeimet szeretném bemutatni. A **20**-as lead vegyület jelenleg klinikai fejlesztés alatt áll.

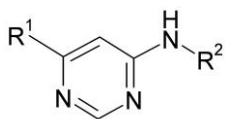
#### 4.1.1 Célfehérje alapú hatóanyagfejlesztés (biokémiai kináz vizsgálati módszer optimalizálása)

Elsődleges feladatomban volt a célfehérje alapú tesztelésre alkalmas vizsgálati módszer optimalizálása. Az eukarióta CDK9/ciklinT1, CDK4/ciklinD1 és CDK2/ciklinA2 kináz komplexekre MTS/HTS rendszerben is alkalmazható biokémiai IMAP (Immobilized Metal Assay for Phosphochemicals) technológia alapú enzim tesztrendszert optimalizáltam.

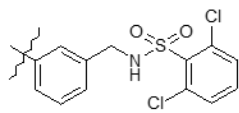
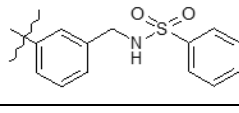
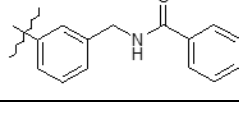
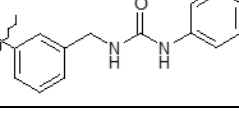
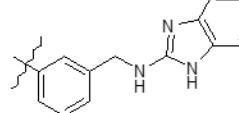
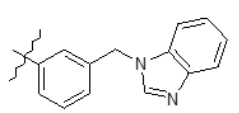
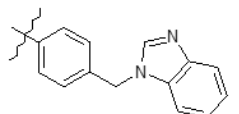
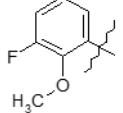
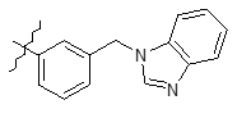
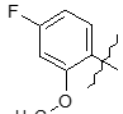
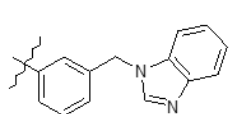
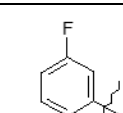
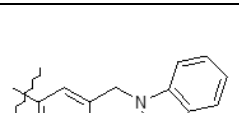
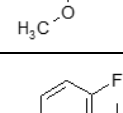

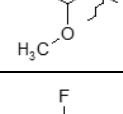
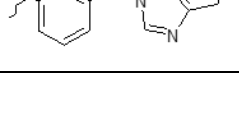
##### 4.1.1.1 Biokémiai tesztelés – az inhibitorok szelektivitásának meghatározása

Az 4,6-diszubsztituált pirimidin vegyülettár 70 molekulája esetében a CDK9-enzimen vizsgáltam a gátló hatást. A hatás mértékének meghatározásához 2 szűrőt használtam. Az előszűrés során minden vegyületet egy koncentrációban, 10  $\mu$ M-ban vizsgáltam, majd hatástalan, közepesen hatékony és hatékony molekulacsoportokat különítettem el. Ezt követően a minimum 75%-os gátló hatást mutató 23 molekula hatásának koncentrációfüggését vizsgáltam 12 ponton, így meghatároztam a molekulák  $IC_{50}$  értékét. A leghatékonyabb CDK9-inhibitorok esetében meghatároztam a CDK2- és a CDK4-enzimeken is az  $IC_{50}$  értékeket. Ezek alapján, egyfajta szelektivitási profilt állítottunk fel (**5. táblázat**). Referenciavegyületként a korábban publikált LDC000067-es anyagot használtuk<sup>178</sup>.

**5. táblázat: Az 1-23. anyagok CDK2, CDK4 és CDK9 enzimekre gyakorolt gátló hatása:** A gátlás mértékét az IC<sub>50</sub> (μM) értékek mutatják. (n=3, átlag ± SD)



vegyület	R1	R2	CDK9 CycT1	CDK2 CycA2	CDK4 CycD1
LDC000067			0,05 ± 0,02	0,81 ± 0,42	11,24 ± 1,46
1	2-metoxifenil	3-nitrofenil	1,12 ± 0,27	3,24 ± 0,93	>12,50
2	2-metoxifenil	3-aminofenil	0,08 ± 0,03	2,7 ± 1,45	10,37 ± 3,01
3	2-metoxifenil		0,14 ± 0,04	0,07 ± 0,02	4,47 ± 1,62
4	2-metoxifenil		0,07 ± 0,03	0,11 ± 0,01	6,85 ± 2,16
5	2-metoxifenil		0,13 ± 0,03	0,48 ± 0,13	11,06 ± 2,48
6	2-metoxifenil		0,08 ± 0,08	3,61 ± 0,34	>12,50
7	2-metoxifenil		0,11 ± 0,04	0,42 ± 0,07	4,13 ± 0,11
8	2-metoxifenil		0,13 ± 0,17	0,54 ± 0,05	8,49 ± 2,23
9	2-metoxifenil		0,21 ± 0,07	1,45 ± 0,41	>12,50
10	2-metoxifenil		0,81 ± 0,23	1,98 ± 0,4	>12,50
11	2-metoxifenil		0,77 ± 0,26	4,62 ± 1,71	>12,50

12	2-metoxifenil		$2,28 \pm \text{ND}$	$7,5 \pm 1,3$	$2,31 \pm 0,8$
13	2-metoxifenil		$1,29 \pm 0,51$	$8,66 \pm 1,94$	$1,14 \pm 0,26$
14	2-metoxifenil		$0,57 \pm 0,14$	$7,70 \pm 2,49$	$>12,50$
15	2-metoxifenil		$0,93 \pm 0,33$	$4,32 \pm 0,48$	$9,7 \pm 2,44$
16	2-metoxifenil		$0,24 \pm 0,03$	$0,76 \pm 0,02$	$5,63 \pm 2,22$
17	2-metoxifenil		$0,01 \pm <0,001$	$0,99 \pm 0,06$	$>12,50$
18	2-metoxifenil		$1,09 \pm 0,13$	$8,18 \pm 1,42$	$11,08 \pm 2,46$
19			$0,80 \pm 0,01$	$10,54 \pm 2,78$	$>12,50$
20			$0,01 \pm <0,001$	$1,17 \pm 0,22$	$>12,50$
21			$0,04 \pm <0,001$	$1,36 \pm 0,1$	$>12,50$
22			$0,02 \pm <0,001$	$0,39 \pm 0,04$	$10,7 \pm 3,11$
23			$0,13 \pm 0,11$	$2,26 \pm 1,19$	$>12,50$

#### **4.1.2 A potenciális CDK9-inhibitorok antiproliferatív hatása tumoros sejtvonalakon**

Proliferációs tesztekben vizsgáltuk a biokémiai kináz assay-k alapján a 4 leghatékonyabb származékot (**17, 20, 21 és 22**) a korábban publikált LDC000067-es anyagot használva referenciaként a rendszerünkben. Annak érdekében, hogy az esetleges szövettípushoz rendelhető inhibitor-érzékenységet meg tudjuk figyelni, egy 21 sejtvonalból álló panelt használtunk, amiben teljesen különböző hisztopatológiai típusú és genetikai profilú vonalak szerepeltek pl. HCT116 vastagbél karcinóma (vad típusú és p53 mutáns), MCF7 emlő karcinóma (vad típusú, p53 mutáns, pRb pozitív, ER pozitív), A549 tüdő karcinóma vagy PC9 és PC9-ER (erlotinib rezisztens) izogenikus tüdő karcinóma sejtvonalak. A sejteket 72 órán át kezeltük és a sejtproliferáció mértékét CellTiter-Glo teszt segítségével határoztuk meg. A szériából a **20**-as számú bizonyult a leghatékonyabbnak. Drámaian csökkentette a sejtvitalitást minden sejtvonalon, a legtöbb esetben szubmikromoláris tartományban volt a meghatározott IC<sub>50</sub> érték (**6. táblázat**).

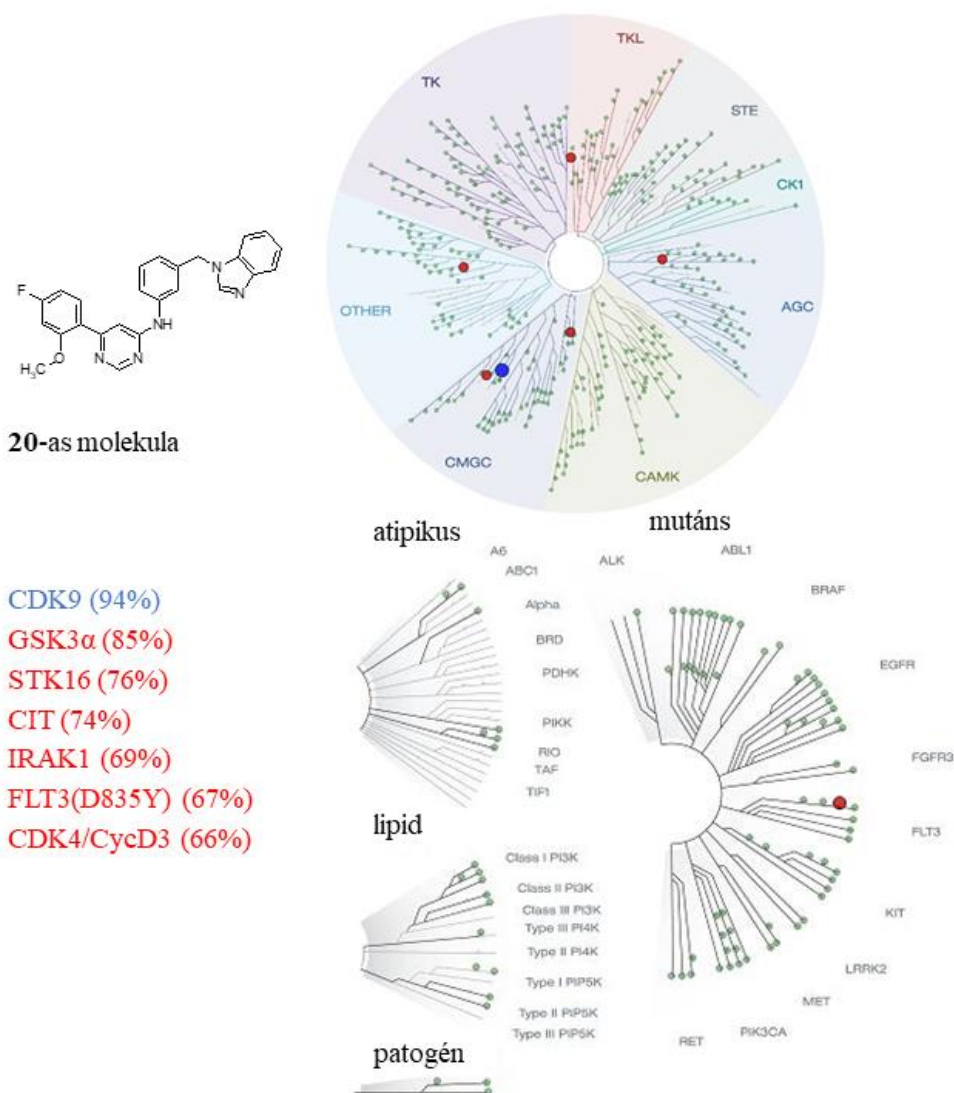


**6. táblázat: A 4 lead molekula 21 tumoros sejtvonalon mért IC<sub>50</sub> értékei. A tumoros sejtvonalakat 72 órán át inkubáltuk az inhibitorokkal. (n=3, átlag ± SD)**

Sejtvonalak (név/eredet)		IC <sub>50</sub> (μM) átlag ± SD				
		LDC000067	17	20	21	22
A549	tüdő	14,87 ± 0,61	1,24 ± 1,21	0,63 ± 0,10	1,10 ± 0,12	3,04 ± 1,37
H1650	tüdő	9,77 ± 0,46	1,51 ± 0,69	1,30 ± 0,58	1,81 ± 0,29	5,28 ± 0,45
H1975	tüdő	4,44 ± 0,21	0,54 ± 0,32	0,34 ± 0,10	1,07 ± 0,41	1,62 ± 0,28
HCC827	tüdő	7,33 ± 0,32	0,66 ± 0,03	0,58 ± 0,13	1,63 ± 0,05	1,95 ± 0,31
H358	tüdő	6,13 ± 0,62	0,68 ± 0,14	0,33 ± 0,01	1,18 ± 0,27	1,68 ± 0,61
PC9	tüdő	11,29 ± 1,82	1,54 ± 0,38	0,73 ± 0,04	2,75 ± 1,01	3,82 ± 0,68
PC9-ER	tüdő	16,79 ± 1,38	2,38 ± 0,09	0,69 ± 0,20	2,34 ± 0,43	6,17 ± 0,25
MCF7	emlő	16,28 ± 1,44	0,80 ± 0,01	0,61 ± 0,22	1,41 ± 0,02	2,18 ± 0,49
HepG2	máj	26,47 ± 2,96	2,88 ± 0,25	1,13 ± 0,30	2,99 ± 0,42	5,40 ± 0,69
ATRFLOX	vastagbél	6,79 ± 4,55	0,50 ± 0,03	0,29 ± 0,04	1,35 ± 0,45	3,34 ± 0,09
Hct116wt	vastagbél	6,04 ± 0,05	0,42 ± 0,02	0,29 ± 0,03	1,12 ± 0,05	1,17 ± 0,11
HT29	vastagbél	6,34 ± 0,70	0,52 ± 0,04	0,49 ± 0,17	1,06 ± 0,13	2,54 ± 0,11
Panc-1	hasnyálmirigy	8,88 ± 0,02	0,90 ± 0,11	0,47 ± 0,24	2,21 ± 0,40	3,10 ± 0,04
PC3	prosztata	8,93 ± 1,22	0,95 ± 0,08	0,45 ± 0,39	3,13 ± 0,05	4,81 ± 0,55
Jurkat	vér	3,90 ± 0,01	0,81 ± 0,05	0,54 ± 0,17	1,73 ± 0,41	1,55 ± 0,04
KMS12-BM	vér	ND	0,97 ± 0,21	0,39 ± 0,04	1,22 ± 0,08	ND
OPM2	vér	ND	0,36 ± 0,20	0,17 ± 0,08	0,80 ± 0,09	ND
RPMI-8226	vér	15,96 ± 1,05	0,74 ± 0,43	0,58 ± 0,34	0,93 ± 0,38	3,36 ± 0,03
U266	vér	5,63 ± 0,31	0,57 ± 0,01	0,29 ± 0,06	0,88 ± 0,09	2,10 ± 0,20
A431	bőr	5,73 ± 0,51	0,58 ± 0,10	0,40 ± 0,07	1,27 ± 0,36	1,53 ± 0,11
HeLa	méhnyak	5,51 ± 0,43	0,77 ± 0,06	0,26 ± 0,09	1,51 ± 0,19	2,17 ± 0,30

### 4.1.3 A 20-as lead molekula szelektivitási profilja

A leghatékonyabbnak ítélt **20**-as vegyület szelektivitási profilját a DiscoverRx cég az ún. KINOMEScan® technikával határozta meg. A kísérlet során 451 kinázon vizsgálták az anyag kötődését 5 µM-os koncentrációban. Az eredmények alapján a **20**-as anyag a kinázoknak mindössze 1,5%-ához kötődött, első sorban a CDK9-hez, kisebb mértékben a GSK3α; a STK16; a CIT; az IRAK1; az FLT3(D835Y) és a CDK4 kinázokhoz. Az eredményeket **7. ábra** tartalmazza.



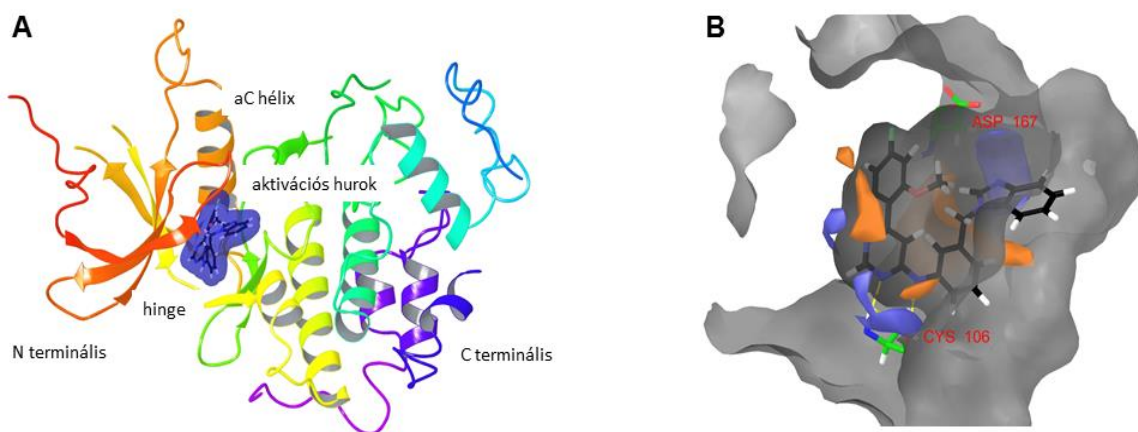
**7. ábra:** A 20-as vegyület szelektivitási profiljának bemutatása a 451 kinázt tartalmazó kinázfán (klinikailag releváns, mutáns, lipid, atipikus és patogén kinázok). A célpontfehérjéket kék és piros pöttyök jelölik, zárójelben tüntettem fel a kötődés százalékos mértékét.

#### 4.1.4 Virtuális tesztelés – *in silico* dokkolás

A **20**-as vegyület kötődésének modellezését és a vegyületek (1-23) kötődési affinitás előrejelzését a Schrödinger Suite programcsomag 2009-es (update 2) verziójával végeztük<sup>177</sup>. A CDK9 dokkolás eredménye a 4 kiemelt (**17-20-21-22**-es vegyületek) CDK9-inhibitor esetében a **7. táblázat**ban található. A docking score érték, melynek mértékegysége kcal/mol arról ad információt, hogy milyen a kötődés energia mérlege. Minél negatívabb az érték, annál stabilabb komplex jön létre (enzim és ligand között). A referenciavegyületek (LDC000067 és flavopiridol) és a vizsgált vegyületek kötődési értékei hasonlóak, ebből arra következtetünk, hogy a vegyületek hatékony inhibitorai a CDK9-nek, egybevágvva a biokémia tesztben kapott eredményekkel. **20**-as vegyület a CDK9 protein ATP-kötő zsebébe kötődik, hasonló módon, mint több más CDK-inhibitor. A pirimidin gyűrű 3-as nitrogénje H-híd kötést formál, az anilin pedig egy másik H-híd kötést alakít ki a Cys106 aminosavval a hinge régióban. A benzimidazol rész a kötőzseb hidrofíli részével lép kölcsönhatásba, míg a 6-fenil gyűrű a hidrofób kötőzsebbe illeszkedik be (**8. ábra**).

**7. táblázat: A 17-20-21-22-es vegyületek docking értékei a CDK9-kinázon. A kötődés mértékét a docking értékek mutatják.**

Vegyület	LDC000067	flavopiridol	<b>17</b>	<b>20</b>	<b>21</b>	<b>22</b>
docking score érték (kcal/mol)	-9,989	-8,723	-9,307	-9,382	-7,096	-7,463



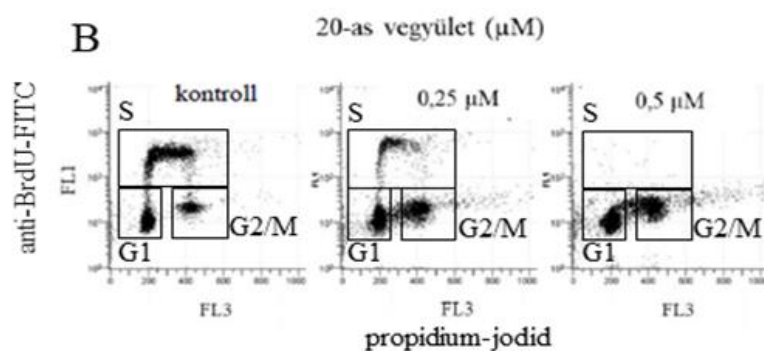
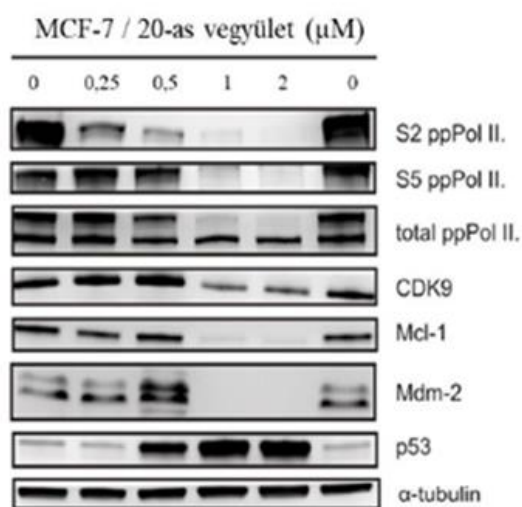
**8. ábra: CDK9 komplexben a 20-as vegyülettel:** (A) A 20-as vegyület a CDK9 fehérje ATP-kötő helyére kötődik. (B) A Cys106-ossal kialakuló hidrogénhídkötéseket sárga vonalak jelölik, a hidrofób (narancssárga) és hidrofil (kék) kölcsönható régiókat szintén feltüntettük.

#### 4.1.5 Fehérjeszintű, illetve sejtciklus-változások szelektív CDK9-inhibitor hatására MCF7 sejtvonalon

A sejtszámcsökkenés mechanizmusát MCF7 emlőtumor sejtvonalon vizsgáltuk. A transzkripció iniciációjához szükséges, hogy az RNSP-II legnagyobb alegységének C-terminális doménjét (CTD) kinázok foszforilálják. Iniciációkor a humán transzkripció faktor II (TFIIH) komplex CDK7 alegysége a CTD heptapeptidek 5. szerin (Ser-5) aminosavait foszforilálja, az elongáció kezdeti fázisában pedig a P-TEFb komplex CDK9 alegysége foszforilálja a 2. pozícióban levő szerineket (Ser-2). Ennek megfelelően az iniciációra jellemző pSer-5 forma figyelhető meg, míg az elongációra jellemző pSer-2 forma mutatható ki. Western blot analízissel elvégeztük néhány fehérje 20-as származék hatására bekövetkező fentebb említett aktivitás és stabilitás szempontjából fontos foszforilációs (RNSP-II-Ser-2/ RNSP-II-pSer-2 és RNSP-II-Ser-5/ RNSP-II-pSer-5) és fehérjeexpressziós (CDK9, Mcl-1, Mdm-2 és p53) vizsgálatát. Szignifikáns dózisfüggő csökkenését figyeltük meg az RNSP-II C-terminális doménjén a Ser-2 foszforilációjának, már 0,25  $\mu$ M koncentrációban alkalmazva a 20-as vegyületet, így kimondhatjuk, hogy gátolja a CDK9 aktivitását, ezáltal az RNS-transzkripció elongációját. Továbbá megfigyeltük a Ser-5 csökkent foszforilációját is nagyobb dózisokban alkalmazva a 20-as származékot, vagyis a 20-as vegyület gátolja már az RNSP-II aktivációt is. Ezen felül

kimutattuk, az anti-apoptotikus Mcl-1 protein és az Mdm-2 ubikvitin ligáz csökkent expresszióját, a tumor szuppresszor (p53) akkumulációját, valamint a CDK9 protein mennyiségének csökkenését is (**9. ábra A**). A p53 fehérje alap esetben igen alacsony szinten van jelen a sejtben, hiszen az Mdm-2 ubiquitilálja, azonban ha az RNS-transzkripció gátolt, a p53 felszabadul az Mdm-2 gátlás alól, így a tumorszuppresszor akkumulációja figyelhető meg a sejtben<sup>179</sup>. A p53 fehérje a P21 gén promóter régiójához kötődve indukálja annak transzkripcióját, amely a sejtciklus leállítását szabályozza<sup>180</sup>. A **20-as** anyag sejtciklust érintő hatását is megvizsgáltuk (**9. ábra B**). Áramlási citometriás eljárással vizsgálva, DNS-kötő PI-festést követően az eredmények alapján megállapítottuk, hogy a kezelés hatására változik a sejtek megoszlása a sejtciklus egyes fázisaiban. A sejtciklus kinetikájának és a DNS-szintézis ráta vizsgálatának egyik gold standard technikája a PI-BrdU (BrdU: 5-bromo-2'-deoxiuridin, szintetikus timidin-nukleozid analóg) kettős jelölés. Előbbi a sejtek teljes DNS-tartalmával, utóbbi a proliferáló sejtek frissen szintetizálódó DNS-tartalmával ad arányos jelet. Az igen érzékeny technológiával kimutattuk, hogy már 0,25  $\mu$ M kezelőszer hatására gátolt a DNS-szintézis (S-fázis), amely hatás tovább fokozódik 0,5 $\mu$ M koncentrációjú kezelőszer hatására, ahogy az is egyértelműen látszik, hogy a sejtek a G2/M fázisban akkumulálódnak.

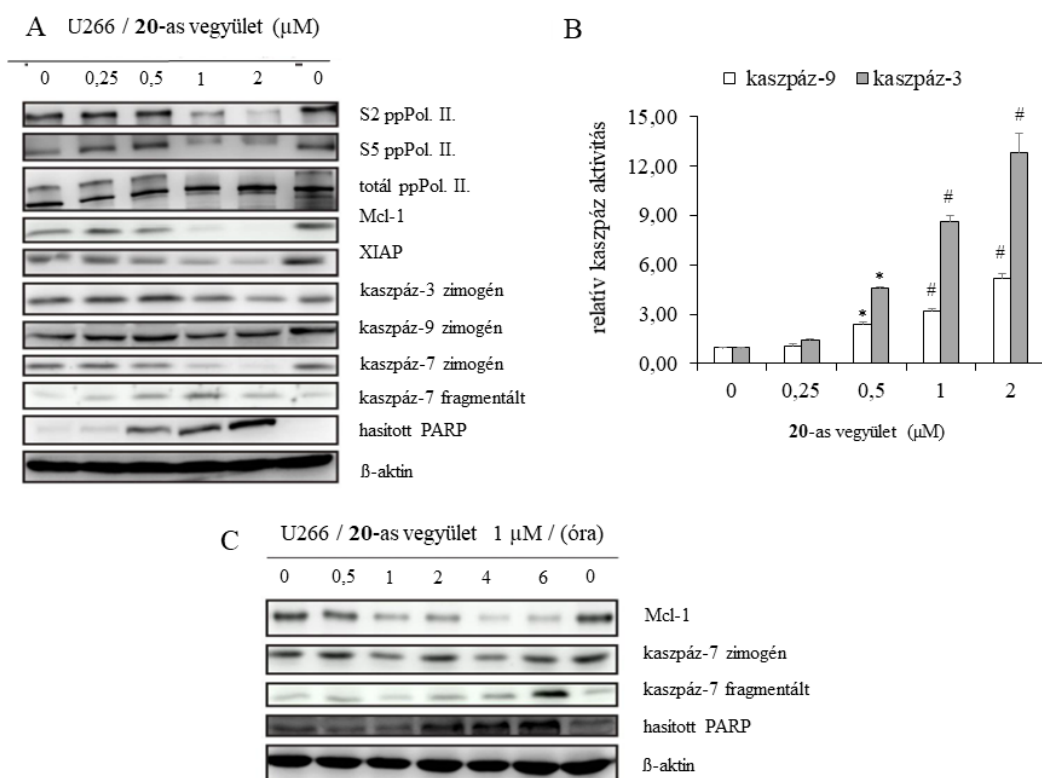
A



**9. ábra: Foszforilációs és expressziós változások vizsgálata Western blot technikával, valamint áramlási citometriás sejtciklus-mérés a 20-as vegyülettel történő kezelést követően MCF7 sejtvonalon:** (A) A CDK9 és más, transzkripcióval kapcsolatos proteinek Western blot analízise különböző koncentrációban alkalmazott 24 órás kezelést követően.  $\alpha$ -tubulin a belső kontroll, aminek az expressziós szintjét a kezelés nem befolyásolja, így mennyiségi összehasonlításra használható a minták között. B) A 20-as vegyület hatásának vizsgálata áramlási citometriás eljárással az MCF7-sejtek eloszlására a sejtciklus különböző fázisaiban (G1, S, G2/M) 24 óra inkubációt követően. PI szignál (FL3 csatornán mért jel) és 5-bromo-2'-deoxiuridin (BrdU) szignál (FL1 csatornán mért jel).

#### 4.1.6 Apoptózis indukció U266 myelóma multiplex sejtvonalon

U266 sejteket inkubáltunk **20**-as anyaggal 24 órát, majd a CDK9-inhibíciót és különböző, az apoptózis folyamatában szerepet játszó proteinek expressziós szintjét vizsgáltuk Western blot analízissel. Az RNSP-II foszforilációs státusza konzisztens volt a korábbi, az MCF7 sejtvonalon végzett kísérleteink során kapott eredményekkel, amelyek szerint már 1  $\mu$ M koncentrációban is szignifikánsan csökkent a foszforilációs szint. A kezelés hatására megfigyelhető volt az Mcl-1 és a XIAP anti-apoptotikus fehérjék downregulációja, valamint a kaspáz-3, -7 (effektor) és -9 (iniciátor) aktivációja és a PARP hasadása. A kaspáz-3 és -9 aktiválódást fluorimetriás enzim-aktivitás mérőrendszerben is megvizsgáltuk, ahol dózisfüggő kaspázaktivitást detektáltunk. 1  $\mu$ M koncentrációjú kezelőszer hatására vizsgáltuk az apoptózis időfüggését is. Már 2 óra elteltével detektáltunk apoptózist, egyértelműen látszik, hogy csökkent az anti-apoptotikus Mcl-1 szint, valamint nőtt a hasított kaspáz-7 és PARP szintje. (**10. ábra**).



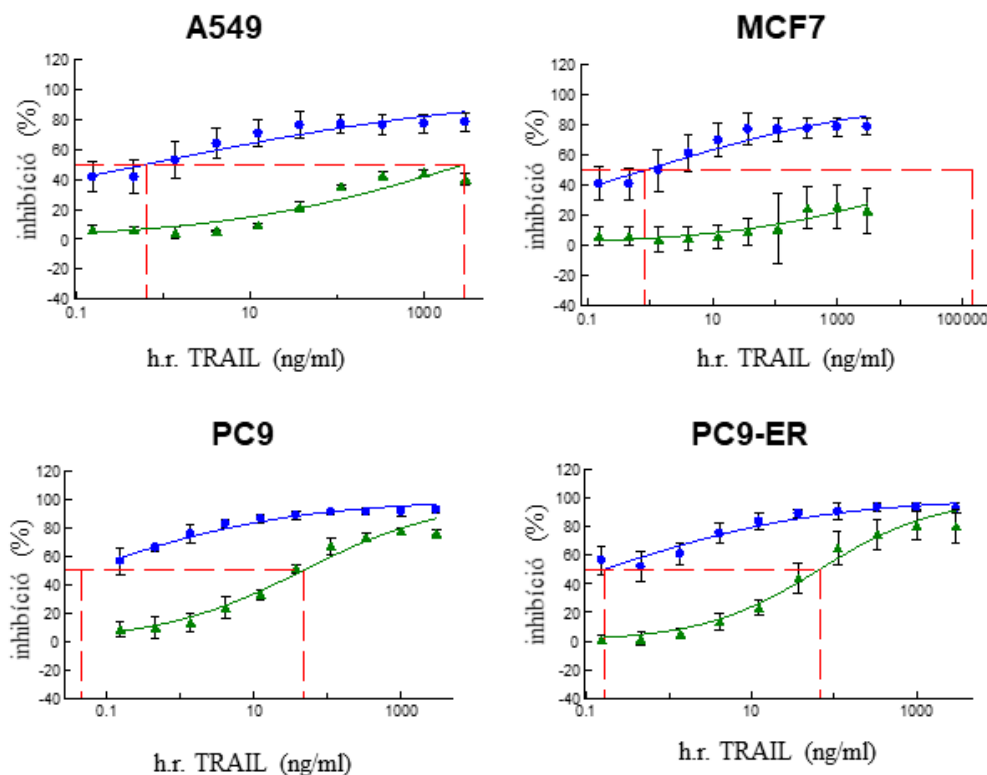
**10. ábra: Apoptózis-indukció U266 myelóma multiplex sejtvonalon:** (A) A 20-as anyaggal 24 óráig különböző koncentrációban kezelt U266 sejtek protein immunoblot analízise. (B) A sejtlizátumokban kaszpáz-3 és kaszpáz-9 aktivitás mérése fluorogén tetrapeptid szubsztrátot Ac-DEVD-AMC/ Ac-LEHD-AMC alkalmazva (n=3, átlag + SD). ANOVA vizsgálatot alkalmaztunk Tukey HSD *post-hoc* teszttel a szignifikancia meghatározásához a kezeletlen mintához képest. A szignifikáns eltéréseket csillaggal jelöltem \*p<0,05; #p<0,001. (C) Kaszpáz-7 aktiválódásnak és a PARP hasadásának időfüggése 1  $\mu\text{M}$  kezelőszer jelenlétében. Belső kontroll  $\beta$ -aktin.

#### 4.1.7 TRAIL-rezisztens sejtvonal érzékenyítése CDK9-gátlóval

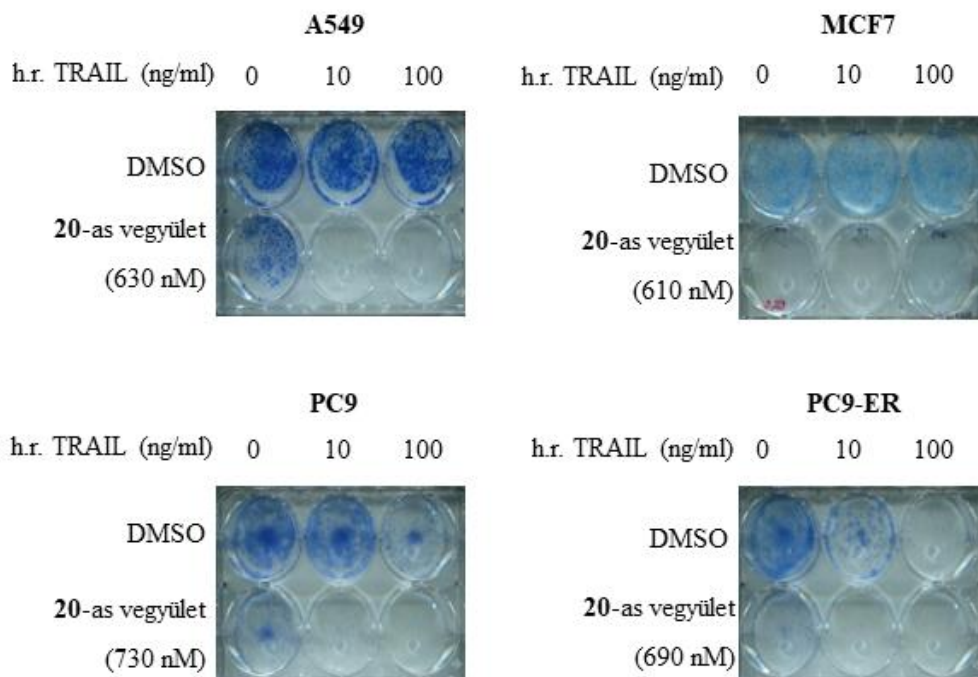
Szerettük volna vizsgálni, hogy az általunk fejlesztett szelektív CDK9-inhibitor esetében szintén kimutatható-e az irodalmakból ismert szinergizmus a TRAIL-lel. TRAIL-szenzitív és -rezisztens daganatos sejtvonalakból álló panelt állítottunk össze, a sejteket h. r. TRAIL-lel, illetve az általunk fejlesztett szelektív inhibitorral kombinációban kezeltük a következők szerint. TRAIL-szenzitív PC9, PC9-ER és a TRAIL-rezisztens A549 és MCF7 sejtvonalakat a korábban meghatározott  $\text{IC}_{50}$  dózissal előinkubáltuk 1



órán át a **20**-as vegyülettel, majd különböző koncentrációkban (0,1-10000 ng/ml) h. r. TRAIL-lel kezeltük a sejteket, és 72 óra elteltével meghatároztuk a viabilitást (**11. ábra**). A mért viabilitás értékek alapján egyértelmű, hogy mind a TRAIL-érzékeny, mind a TRAIL-rezisztens tumoros sejtvonalaknál szinergizmus figyelhető meg. A h. r. TRAIL-t már 10ng/ml koncentrációban alkalmazva a tumoros sejtek közel 100%-os pusztulását figyeltük meg proliferációs tesztekben és klonogénikus rendszerben (**12. ábra**).

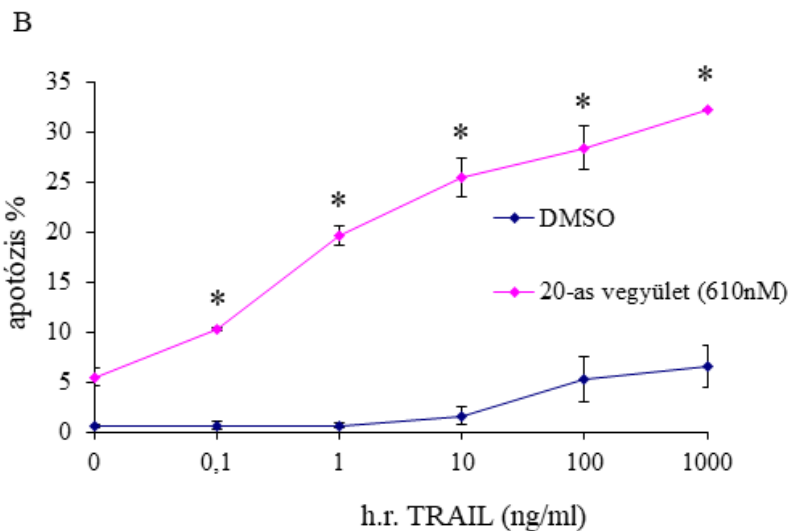
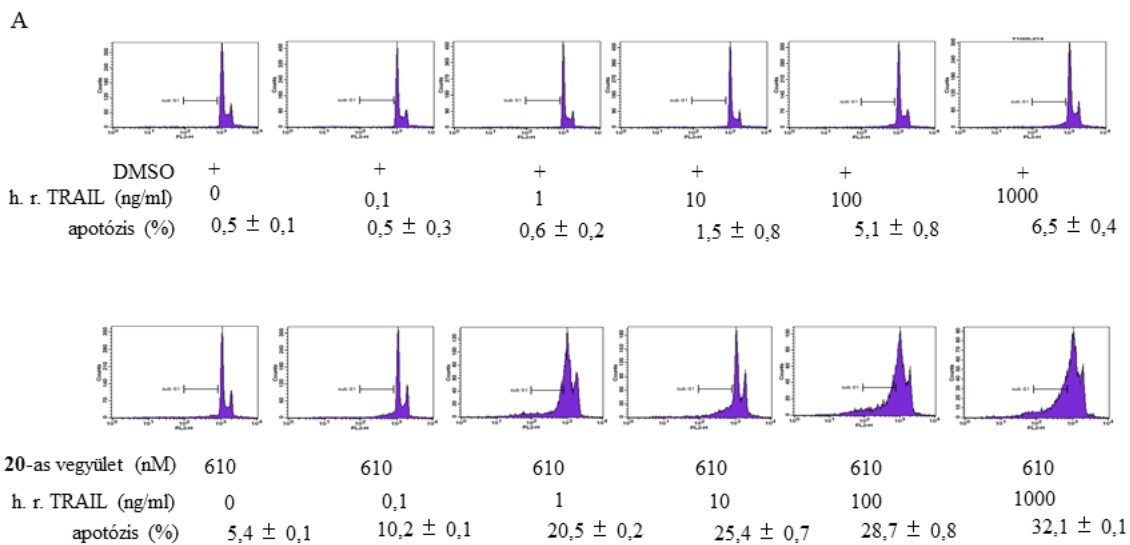


**11. ábra: A 20-as lead molekula és a h. r. TRAIL szinergizmusa.** Az eredmények átlagértékek és szórás adatokkal együtt vannak feltüntetve. Minden egyes IC<sub>50</sub> értéket legalább 3 független kísérlet eredménye alapján határoztunk meg. Zöld vonal jelöli a különböző koncentrációban alkalmazott h. r. TRAIL kezelés, míg a kék vonal jelöli a kombinációs kezelés hatására kialakult %-os proliferációgátlást. A piros vonal szemlélteti az előkezelés okozta drasztikus IC<sub>50</sub>-csökkenést.



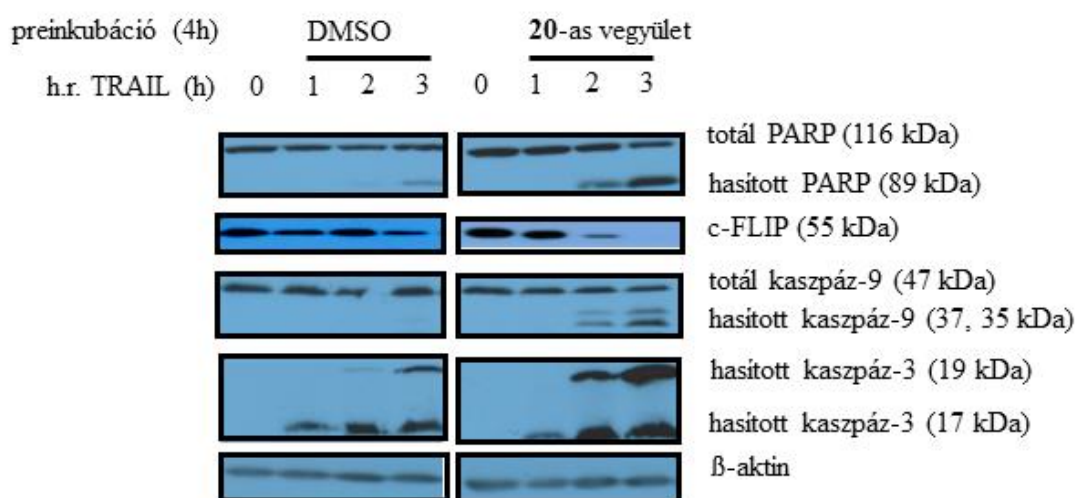
**12. ábra: Hosszútávú túlélés vizsgálata klonogenikus tesztben.** A549, MCF7, PC9 és PC9-ER sejteket a **20**-as anyaggal kezeltünk (IC<sub>50</sub> koncentrációban) 1 óráig, majd 72 órán keresztül stimuláltuk h. r. TRAIL-lel (10 vagy 100 ng/ml). A hosszútávú túlélést 7 nap elteltével vizualizáltuk metilénkék festék segítségével. A két független kísérlet egyike szerepel az ábrán.

Következő kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy a TRAIL-rezisztens MCF7 sejtek esetében a kombinációs kezelés hatására detektálható-e az apoptózisra jellemző DNS-fragmentáció a kezeléseket követő 24. órában. Az MCF7 sejtvonalat a korábban meghatározott IC<sub>50</sub> dózissal előinkubáltuk 1 órán át a **20**-as vegyülettel, majd különböző koncentrációkban (0,1-10000 ng/ml) h. r. TRAIL-lel kezeltük a sejteket és 24 óra elteltével meghatároztuk az apoptózis mértékét PI-festéssel a subG1 frakció alapján. Az MCF7 sejtvonal még 1000 ng/ml-es h. r. TRAIL koncentrációra sem érzékeny, minimális apoptózis detektálható, bizonyítva azt, hogy az MCF7 sejtvonal TRAIL-rezisztens. Azonban a **20**-as vegyülettel történő kombinációs kezelés esetén már 0,1 ng/ml h. r. TRAIL koncentrációra is érzékeny. 1 ng/ml koncentrációnál 20%, 100 ng/ml esetén pedig meghaladja a 30%-ot az apoptotikus sejtek aránya. Azaz dózisfüggő növekedést tapasztaltunk a subG1 sejtpopuláció méretében a **20**-as vegyület és h. r. TRAIL kombinációs kezelés hatására (**13. ábra**).



**13. ábra: Az apoptózis mértékének meghatározása kombinációs kezelést követően. (A)** A hisztogramok ábrázolják az áramlási citometriás mérési eredményeket. Az analízist a CellQuest szoftverrel végeztem. **(B)** a subG1 frakció mérete grafikonon ábrázolva. Az adatok jelentése: átlag  $\pm$  SD; n=3; \*p<0,05. ANOVA vizsgálatot alkalmaztunk Tukey HSD post hoc teszttel a szignifikancia meghatározásához a h.r. TRAIL-lel kezelt mintához képest a **20**-as vegyület és h. r. TRAIL kombinációs kezelés esetén.

Az apoptózis folyamatában szerepet játszó proteinek expressziós szintjét Western blot analízissel vizsgáltuk. MCF7-sejteket inkubáltunk 610 nM **20**-as lead vegyülettel (IC<sub>50</sub>) 4 órán keresztül, majd ezt követően stimuláltuk a sejteket h. r. TRAIL-lel (10 ng/ml) különböző ideig. Korábbi eredményeinkkel konzisztens eredményeket kaptunk, a kezelések hatására megfigyelhető volt a kaspáz-3 és -9 aktivációja és a PARP hasadása már 2 óra elteltével, valamint a c-Flip anti-apoptotikus fehérje down regulációja (**14. ábra**).



**14. ábra: MCF7 sejtek Western blot analízise h. r. TRAIL és CDK9i kombinációs kezelést követően. A két független kísérlet egyike szerepel az ábrán.**

#### 4.1.8 20-as anyag és leghatékonyabb analógjainak korai ADME paraméterei

A molekulák oldhatóságát 2 különböző pH-n mértük meg HPLC-vel. Az anyagok mérsékeltén oldódnak pH=7,4-en, a **20**-as molekula oldhatósága is sokkal jobb pH=2-n mérve (8. táblázat).

**8. táblázat: A 20-as anyag és leghatékonyabb analógjainak oldhatósága.**

vegyület	oldhatóság pH=7,4 ( $\mu\text{M}$ )	oldhatóság pH=2,0 ( $\mu\text{M}$ )	vegyület	oldhatóság pH=7,4 ( $\mu\text{M}$ )	oldhatóság pH=2,0 ( $\mu\text{M}$ )
LDC000067	>200	187	12	5	>200
1	3	187	13	7	>200
2	190	>200	14	11	>200
3	156	190	15	3	112
4	29	>200	16	11	>200
5	7	>200	<b>17</b>	8	>200
6	<1	4	18	<1	>200
7	>200	>200	19	46	>200
8	77	>200	<b>20</b>	2	>200
9	7	>200	<b>21</b>	3	>200
10	9	>200	<b>22</b>	19	>200
11	7	>200	23	4	>200

A permeabilitás jellemzésére a **20**-as vegyület lipid membránon történő passzív átjutását vizsgáltuk. A módszer során speciális inzerteket tartalmazó 96-lyukú plate-eket használtunk. Az inzertek egy sejtmembránt modellező réteget tartalmaznak, amelyen keresztül megtörténhet a gyógyszerjelölt molekulák transzportja. A kísérlethez a szakirodalomból ismert referencia vegyületeket használtunk. Pozitív kontrollként a jól penetráló koffeint, míg negatív kontrollként a kevésbé jól penetráló amiloridot használtuk. A vegyület penetrációs képességét a „Módszerek” című fejezetben közölt képlet szerint határoztuk meg. A koffein  $7 \pm 0,42 \times 10^{-6}$  cm/s, az amilorid  $0,04 \pm <0,001 \times 10^{-6}$  cm/s, a **20-as** lead vegyület mérsékelt penetrációs értékkel jellemezhető,  $P_c=3,4 \pm 0,72 \times 10^{-6}$  cm/s.

## 4.2 Sztiril-kinazolinok biológiai vizsgálata

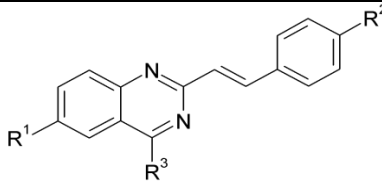
### 4.2.1 Rekombináns kináz vizsgálatok

Elsődleges feladatomban volt az eukarióta FLT3wt, FLT3-ITD és FLT3-D835Y kinázokra MTS/HTS rendszerben is alkalmazható biokémiai enzim tesztrendszer optimalizálása. Kétféle rendszer beállítását végeztem, Transcreeper® (BellBrook Labs), és IMAp® (Immobilized Metal Assay for Phosphochemicals, Molecular Devices). A kezdeti validálási eredmények alapján a további teszteléshez az IMAp® módszert választottuk. Az AML-es betegségek esetében szerzett rezisztencia hátterében sokszor a D835 pozícióban kialakult mutáció áll, így vizsgálataink során az FLT3-D835Y mutáns enzimre fókuszáltam.

A sztiril-kinazolin vegyülettár minden molekuláját (181 db) a FLT3-D835Y enzimen vizsgáltam. Az előszűrést 10  $\mu$ M koncentrációban végeztem, és a 75%-nál hatékonyabb gátló hatást mutató molekulákra meghatároztam az IC<sub>50</sub> értéket. A mért eredményeket a Függelékben található **13. táblázatban** foglaltam össze.

A **9. táblázatban** szerepelnek a széria leghatékonyabbnak ítélt molekulái (I-XIII.), amelyek gátló hatását mindhárom FLT3-enzimen meghatároztuk. A megadott értékek között dőlt betűvel jelöltem azokat a mérési eredményeimet, amelyek közlésre kerültek korábban is<sup>181</sup>, de szükségesnek tartottam megmutatni az összefüggések bemutatásának és a munka átláthatóságának érdekében.

9. táblázat: Az I-XIII. anyagok FLT3wt, FLT3-ITD és FLT3-D835Y enzimekre gyakorolt gátló hatása. Az eredmények átlag  $\pm$  SD; n=3.

				FLT3 inhibíció (IC <sub>50</sub> $\mu$ M)		
vegyület	R1	R2	R3	FLT3wt	FLT3-ITD	FLT3-D835Y
tandutinib				0,29 $\pm$ <0,001	0,27 $\pm$ 0,04	9,22 $\pm$ 2,73
quizartinib				0,17 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ <0,001	1,33 $\pm$ 0,28
I.	H	4-F	N,N-dimetiletán-1,2-diamin	7,02 $\pm$ 1,60	0,76 $\pm$ 0,02	0,56 $\pm$ 0,18
II.	H	4-metilszulfanil	N,N-dimetiletán-1,2-diamin	6,78 $\pm$ 0,88	0,48 $\pm$ 0,04	0,34 $\pm$ 0,15
III.	H	4-izopropil	N,N-dimetiletán-1,2-diamin	3,50 $\pm$ 0,50	0,20 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,04
IV.	H	4-metilszulfonil	N,N-dimetiletán-1,2-diamin	2,40 $\pm$ 0,26	0,33 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,02
V.	Cl	4-F	N,N-dimetilpropán-1,3-diamin	24,9 $\pm$ 5,35	0,91 $\pm$ 0,56	0,79 $\pm$ 0,01
VI.	Cl	4-metilszulfanil	N,N-dimetiletán-1,2-diamin	3,40 $\pm$ 0,69	0,62 $\pm$ 0,28	0,10 $\pm$ 0,01
VII.	Cl	4-izopropil	N,N-dimetiletán-1,2-diamin	3,62 $\pm$ 0,57	0,41 $\pm$ 0,10	0,08 $\pm$ 0,03
VIII.	Cl	4-metilszulfonil	N,N-dimetilpropán-1,3-diamin	11,37 $\pm$ 0,02	0,87 $\pm$ 0,33	0,20 $\pm$ 0,02
IX.	Cl	4-metilszulfonil	N,N-dimetiletán-1,2-diamin	3,66 $\pm$ 0,69	0,24 $\pm$ 0,11	0,03 $\pm$ 0,00
X.	Cl	4-metilszulfonill	N,N-dietiletán-1,2-diamin	6,13 $\pm$ 1,06	0,44 $\pm$ 0,32	0,07 $\pm$ <0,001
XI.	F	4-izipropil	N,N-dimetiletán-1,2-diamin	7,08 $\pm$ 1,16	1,36 $\pm$ 0,41	0,19 $\pm$ 0,07
XII.	F	4-izopropil	N,N-dietiletán-1,2-diamin	18,92 $\pm$ 5,43	1,67 $\pm$ 1,57	0,24 $\pm$ 0,01
XIII.	Br	4-metoxi	N,N-dietilpropán-1,3-diamin	>12,50	1,95 $\pm$ 0,70	1,07 $\pm$ 0,00

A kináz assay-k eredményei alapján elmondhatjuk, hogy a leghatékonyabbnak ítélt inhibitorok egyaránt nanomólos koncentrációban gátolják az FLT3-ITD és az FLT3-D835Y mutáns enzimeket, az FLT3 vad típusú enzimen pedig egy, néhol két nagyságrenddel kevésbé hatnak, tehát szelektívek. Hatásuk sokkal jobb, mint a referenciavegyületként használt tandutinib és quizartinib vegyületeké.

#### **4.2.2 Vegyületek vizsgálata humán sejtvonalakon**

A kináz assay-k (FLT3wt, FLT3-ITD és FLT3-D835Y) alapján volt egy elképzelésünk az újonnan szintetizált inhibitorok hatékonyságát és szelektivitását illetően, célul tűztük ki a biokémiai aktivitás sejtes rendszerekben történő validálását. Először proliferációs tesztekben vizsgáltam a vegyülettárat, tandutinibet és quizartinibet használva referenciaként.

Az FLT3 variánsainak funkcióit legkiterjedtebben akut myeloid leukémiában (AML) vizsgálják<sup>182-184</sup>. Az összes AML eset 25%-ában kimutatható mutáns FLT3. Így egy kicsi, fókuszált sejtes panelt állítottunk össze, ami FLT3-függő és FLT3-független leukémia és nem leukémia sejtvonalakból állt. A sejteket 72 órán át kezeltük az inhibitorokkal és a viabilitást CellTiter-Glo<sup>®</sup> assay segítségével határoztuk meg (**10. táblázat**). Az anyagok drámaian csökkentették a sejtvitalitást az MV4-11 AML sejtvonalon (FLT3-dependens, FLT3-ITD mutáns és a fehérjét fokozottan expresszálja), a mért IC<sub>50</sub> értékek 0,01 és 2,34 µM között változtak. A szintetizált szériából az **IX**-es számú bizonyult a leghatékonyabbnak. Az FLT3-független K-562 és U-937 leukémia, valamint a HS-5 csontvelői stróma sejtvonalakon mért gátló hatás elenyésző volt.



**10. táblázat: Az inhibitorok humán leukémia és nem-leukémia tumoros és normál sejtvonalakon mért IC<sub>50</sub> értékei.** Az IC<sub>50</sub> (μM) eredmények átlag ± SD, minden esetben minimum 2 független kísérletben határoztuk meg az értékeket.

vegyület	inhibíció (IC <sub>50</sub> μM)			
	FLT3-függő leukémia	FLT3-független leukémia		csontvelői stróma
	MV4-11	K-562	U-937	HS-5
tandutinib	0,06 ± 0,05	9,21 ± 0,39	19,80 ± 6,50	11,37 ± 0,42
quizartinib	0,001 ± <0,001	10,33 ± 1,03	8,55 ± 1,60	2,98 ± 0,01
I.	0,32 ± 0,01	5,81 ± 1,43	10,90 ± 1,08	6,37 ± 0,20
II.	0,25 ± 0,06	5,21 ± 0,25	6,63 ± 1,61	4,00 ± 0,15
III.	0,03 ± 0,00	2,49 ± 0,34	3,53 ± 0,10	2,55 ± 0,64
IV.	0,05 ± 0,01	5,54 ± 1,00	11,32 ± 0,89	8,14 ± 0,19
V.	0,43 ± 0,16	2,04 ± 0,19	5,35 ± 1,06	3,03 ± 0,02
VI.	0,38 ± 0,46	3,00 ± 0,15	4,95 ± 0,24	3,30 ± 0,07
VII.	0,03 ± 0,01	2,87 ± 0,13	3,56 ± 0,28	3,03 ± 0,07
VIII.	0,10 ± 0,09	4,84 ± 1,37	9,02 ± 1,08	4,03 ± 0,25
IX.	0,01 ± 0,01	6,94 ± 0,38	12,29 ± 0,12	4,76 ± 1,00
X.	0,04 ± 0,01	2,59 ± 0,63	4,95 ± 1,18	4,09 ± 0,03
XI.	0,06 ± 0,06	4,03 ± 0,02	4,10 ± 0,50	3,28 ± <0,001
XII.	0,24 ± 0,13	2,12 ± 0,15	4,11 ± 0,56	3,36 ± 0,03
XIII.	2,34 ± 1,32	4,03 ± 0,23	6,36 ± 2,85	2,07 ± 0,06

### 4.2.3 A leghatékonyabb analógok korai ADME paramétereinek meghatározása

A következőkben gyógyszerfejlesztési szempontokat figyelembe véve néhány korai ADME paramétert vizsgáltunk. Megvizsgáltam a leghatékonyabb molekulák oldhatóságát és mesterséges lipid membránon történő penetrációját. A vegyületek ADME-paramétereit a **11. táblázat**ban foglaltam össze.

A molekulák oldhatóságát 2 különböző pH-n mértük meg HPLC-vel. Az anyagok megfelelően oldódnak pH=7,4-en, azonban mindegyik anyag oldhatósága jobb pH=2-n mérve, ami nem meglepő, hiszen szekunder és terciér aminocsoportokat tartalmaznak. A **III**-as lead vegyület fiziológiás pH-n elfogadható oldhatóságot mutat, mely 108  $\mu\text{M}$ .

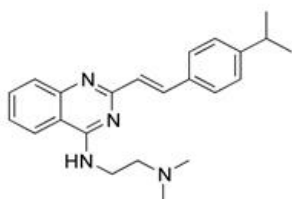
A molekulák permeabilitásra vonatkozó jellemzőit PAMPA módszerrel vizsgáltuk. Referenciavegyületként az eltérő penetrációs képességű koffeint és amiloridot használtuk. A sztiril-kinazolin vegyületek különböző penetrációs értékkel jellemezhetőek, néhányuk mérsékeltnek mondható (**VII.**, **VIII.**, **IX.**) a permeabilitása, azaz korlátozott mértékben képesek átjutni a plazmamembránon. A **III**-as lead vegyület, magas penetrációs értéket mutatott ( $P_e=5,85 \pm 0,98 \times 10^{-6}$  cm/s), ami jó eredménynek számít a membránon történő passzív transzport szempontjából. Az eredményeink alapján a szériában mért  $P_e$  értékek  $0,36 - 9,61 \times 10^{-6}$  cm/s között változnak.

**11. táblázat: Oldhatóság és passzív transzmembrán transzport.** Az eredmények átlagértékek és szórás adatokkal együtt vannak feltüntetve (átlag  $\pm$  SD), minden esetben minimum 2 független kísérletben határoztuk meg az értékeket.

vegyület	oldhatóság ( $\mu\text{M}$ )		$P_e$ [ $\times 10^{-6}$ cm/s]
	pH=7,4	pH=2,0	
I.	10	120	$9,61 \pm 1,45$
II.	116	119	$5,86 \pm 1,13$
<b>III.</b>	108	120	$5,85 \pm 0,98$
IV.	119	120	$1,42 \pm 0,15$
V.	56	113	$6,29 \pm 0,70$
VI.	8	94	$3,49 \pm 0,56$
<b>VII.</b>	12	110	$0,73 \pm 0,52$
VIII.	23	111	$0,61 \pm 0,20$
<b>IX.</b>	8	112	$0,36 \pm 0,16$
X.	12	115	$0,56 \pm 0,01$
XI.	5	119	$3,38 \pm <0,01$
XII.	36	120	$1,74 \pm 0,04$
XIII.	96	96	$5,35 \pm 0,05$
koffein			$5,84 \pm 0,11$
amilorid			$0,05 \pm <0,01$

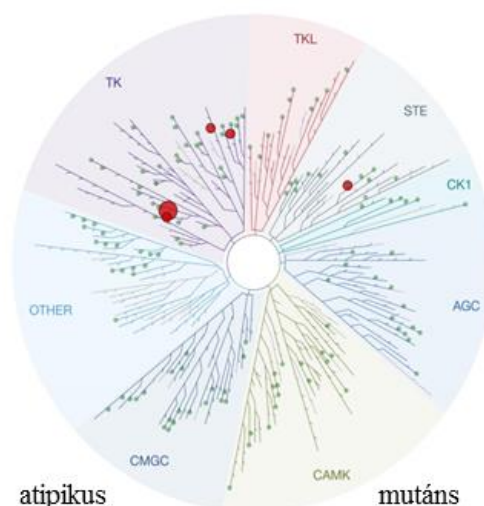
#### 4.2.4 A lead molekula szelektivitási profiljának meghatározása

Néhány molekula igen erős gátló hatást mutatott mind a rekombináns biokémiai, mind pedig a sejtes rendszerekben, ezért szükségesnek tartottuk validálni a lead molekuláink szelektivitását. A 4-izopropil származék (**III**-as) mutatta a legjobb oldhatósági és penetrációs értékeket, így ezt a molekulát választottuk ki a KINOMEscan™ kötődési assay-be vizsgálatra (**15. ábra**).



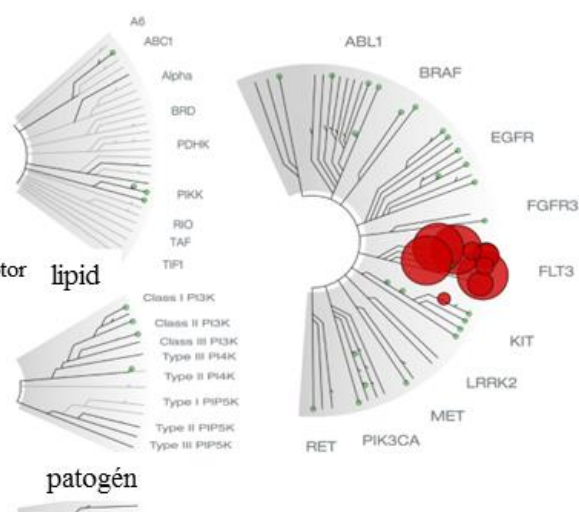
III-as molekula

FLT3(ITD/D835V)	(100%)	TK	PDGFR
FLT3(ITD)	(100%)	TK	PDGFR
FLT3(N841I)	(100%)	TK	PDGFR
FLT3(R834Q)	(100%)	TK	PDGFR
FLT3	(98%)	TK	PDGFR
FLT3(D835V)	(98%)	TK	PDGFR
FLT3(D835H)	(95%)	TK	PDGFR
FLT3(K663Q)	(93%)	TK	PDGFR
FLT3(D835Y)	(90%)	TK	PDGFR
MEK5	(82%)	STE	MAPKK
TRKA	(76%)	TK	TRK
KIT (D816V)	(69%)	TK	PDGFR
INSR	(68%)	TK	inzulin receptor
PDGFRB	(68%)	TK	PDGFR



atipikus

mutáns



lipid

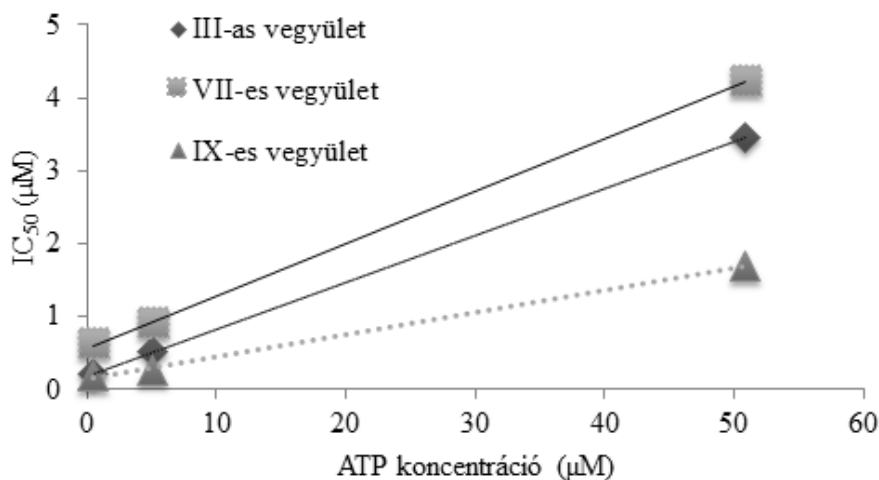
patogén

**15. ábra: A III-as vegyület szelektivitási profiljának bemutatása a 451 kinázt tartalmazó kinázfán (klinikailag releváns, mutáns, lipid, atipikus és patogén kinázok). A célpontfehérjéket piros pöttyök jelölik, zárójelben tüntettem fel a kötődés százalékos mértékét is.**

A III-as lead vegyület több mutáns FLT3-kinázhoz kötődik, bár kisebb mértékben kötődik a PDGFR család többi képviselőjéhez. A III-as lead molekulánk nagy mértékben kötődik a quizartinib-rezisztens FLT3-ITD/D835V kettős mutáns kinázhoz is.

#### 4.2.5 A lead molekula inhibíciós módjának meghatározása

Az inhibitorokat az enzimhez való kötődésük mechanizmusa alapján három fő csoportba sorolhatjuk: kompetitív, unkompetitív és nem kompetitív. A különböző modalitású inhibitorok  $IC_{50}$  értékei a szubsztrát (ATP) koncentrációjával más és más összefüggést mutatnak. Megvizsgáltuk a lead molekuláink (**III.**, **VII.** és **IX.**-es származékok) inhibíciós mechanizmusát FLT3-ITD mutáns enzimen. Ehhez a lead molekuláink  $IC_{50}$  értékeit biokémiai kináz enzim rendszerben különböző ATP koncentráció mellett mértük meg:  $K_m$ ATP (5,1  $\mu$ M),  $0,1 \times K_m$ ATP és  $10 \times K_m$ ATP. Az  $IC_{50}$  méréseket az egyes rekombináns kinázok  $K_m$  (Michaelis konstans) értékén futtattuk, ami egyedi és általában pár  $\mu$ M körüli érték. Az enzimkinetikai szakirodalom szerint  $K_m$  értéken futtatva a mérést a különféle hatásmechanizmusú inhibitorok  $IC_{50}$  értéke összehasonlíthatóvá válik. A teszteleseknél függ az  $IC_{50}$  érték az ATP koncentrációjától, amit úgy választunk meg, hogy  $[ATP]/K_m = 1$ .

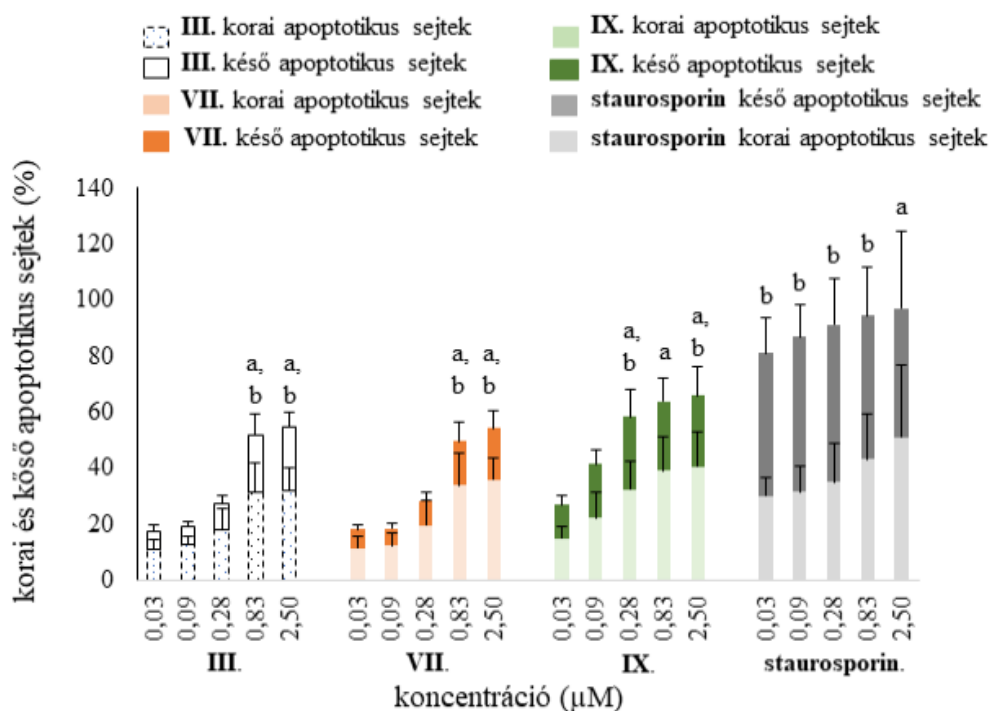


**16. ábra: Kötődési mód vizsgálata a rekombináns FLT3-ITD enzimen a III-as, VII-es és IX-es lead molekulák esetében.**

A **16. ábrán** szereplő eredmények azt mutatják, hogy magasabb ATP koncentráció mellett magasabbnak adódnak az  $IC_{50}$  értékek, tehát a származékaink ATP-kompetitív inhibitorok.

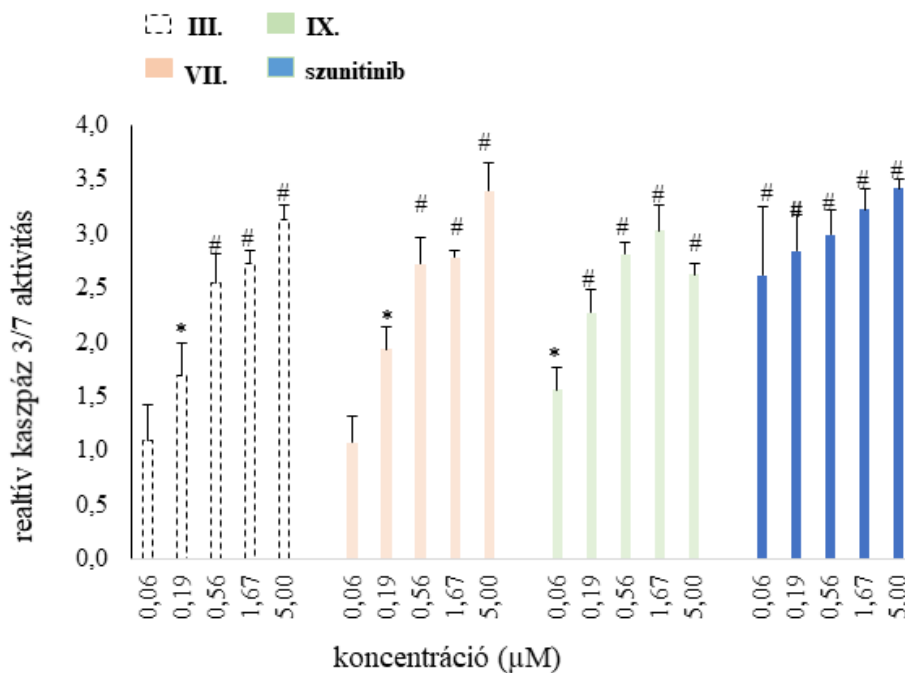
#### **4.2.6 Sejtpusztulás mechanizmusának vizsgálata MV4-11 akut myeloid leukémia vonalon**

Mivel reprodukálható antiproliferatív hatást tudunk kimutatni a **III**-as, **VII**-es és **IX**-es lead esetén az MV4-11 FLT3-ITD akut myeloid leukémia sejtvonalon, szeretnénk volna a hatásmechanizmust részletesebben vizsgálni. Vizsgálataink során a sejtpusztulási folyamatok közül az apoptózisra fókuszáltunk. A sejteket növekvő koncentrációban kezeltük a vegyületekkel, hogy ki tudjunk mutatni koncentrációfüggő indukált apoptózist, amelyet Annexin V-FITC (a foszfatidil-szerin transzlokációt, az apoptózis folyamatának korai markerét mutatja ki) és propidium-jodid kettős jelölést követően áramlási citométerrel vizsgáltunk. Referenciavegyületként staurosporint (általános apoptózis indukáló szer) használtunk a mérési rendszerben. A kezetlen sejtek nagy része (DMSO-t használtunk a kontrollban) élő sejtek populációja volt ( $82,6 \pm 3,6$  %) és nem mutattak sem Annexin V-FITC, sem pedig propidium-jodid pozitívítást. Ahogy vártuk, dózisfüggő növekedést tapasztaltunk viszont a korai, még élő ( $AN^+ PI^-$ ) és a kései, halott apoptotikus ( $AN^+ PI^+$ ) sejtpopulációban a kezeléseket követően (**17. ábra**).



**17. ábra: A III., VII. és IX-es lead vegyületekkel történő MV4-11 sejtvonalon történő apoptózis-indukáló hatásának kimutatása Annexin V-FITC és propidium-jodidos kettős jelöléssel:** A kezelőszereket a megadott koncentrációkban 24 órán alkalmaztuk. Az adatok jelentése: átlag + SD; n=3. ANOVA vizsgálatot alkalmaztunk Tukey HSD post hoc teszttel a szignifikancia meghatározásához a kezeletlen mintához képest (korai apoptózis esetén: <sup>a</sup> p<0,05; késő apoptózis esetén: <sup>b</sup> p <0,05).

Az apoptotikus jelátviteli útban a kaszpáz-3 és -7 a kulcs effektor kaszpáz, így a Caspase-Glo® 3/7 Assay-t használtuk, hogy meghatározhassuk a kezelések indukálta kaszpáz-3/7 aktivitást. Referencia vegyületeként a receptor tirozin kinázokat (RTK) gátló szunitinibet használtam. A rendszerben szignifikáns aktivitás-növekedést mértünk ki, már 0,185 μM koncentrációnál (**18. ábra**). A mért hatás igazolta, hogy a lead molekulák dózisfüggő apoptózist indukálnak az FLT3-ITD mutáns MV4-11 sejtvonalon.



**18. ábra: Kaspáz-3/7 aktivitás meghatározása III., VII. és IX-es lead vegyületekkel történő 24 órás kezelést követően.** Az adatok jelentése: átlag + SD; n=3. ANOVA vizsgálatot alkalmaztunk Tukey HSD post hoc teszttel a szignifikancia meghatározásához a kontroll kaspáz aktivitáshoz képest (\*p<0,05; #p<0,001).

#### 4.2.7 A III-as lead molekula farmakokinetikai paramétereit és *in vivo* vizsgálata

A III-as lead farmakokinetikai profilját 5-6 hetes outbred hím NMRI egereken végzett kísérletek alapján határoztuk meg. A III-as vegyületet intravénásan (3 mg/kg) vagy *per os* (10 mg/kg) adagoltuk, majd cervikális diszlokációt követően gyűjtöttük a vért plazmavizsgálat céljából. Az eredmények alapján mind az *iv* mind a *per os* elérhető csúcskoncentráció elég magas ahhoz, hogy a vegyület formulázás nélkül is hatékony legyen egér farmakológiai vizsgálatokban. A *per os* és *iv* kezelést jellemző plazmakoncentráció-görbék AUC-értékeinek aránya alapján meghatározott biohasznosulás 16%. (12. táblázat).



**12. táblázat: A III-as vegyület farmakokinetikai paramétereit intravénás és orális adminisztrációt követően. AUC<sup>13</sup>, C<sub>max</sub><sup>14</sup>, F%<sup>15</sup>, T<sub>max</sub><sup>16</sup>**

	egység	intravénás (3 mg/kg)	orális (10 mg/kg)
AUC	ng/mLh	1663±96	264±18
C <sub>max</sub>	ng/mL	399±56	16,6±1,9
T <sub>max</sub>	h	0,017	2
F%			16

A kedvező farmakokinetikai profil alapján a **III**-as számú molekula tumornövekedés gátló képességét szeretnénk vizsgálni AML xenograft modellben. 10-12 hetes hím SCID egereket szubkután beoltottunk MV4-11 AML sejtekkel. Az inokulációt követő 19. naptól az állatok súlyát kétnaponta mértük, valamint intraperitoneálisan kezeltük őket 17 mg/kg dózisban a **III**-as számú molekulával 16 napon keresztül. A kísérlet végére az MV4-11 tumorok a kezeletlen csoportban átlagosan 1393,13 mm<sup>3</sup> térfogatúra növekedtek. A **III**-as vegyülettel kezelt állatokban a tumor térfogata 48%-kal kisebb maradt (**19. ábra A**). A tumorok tömegét is megmértük az állatok eutanizációját követően, és ugyanilyen mértékű gátlást (49%) tapasztaltunk (**19. ábra B**). A kezelőszer ebben a dózisban nem okozott sem testsúlyvesztést, sem pedig mortalitást, nem toxikus (**14. táblázat**).

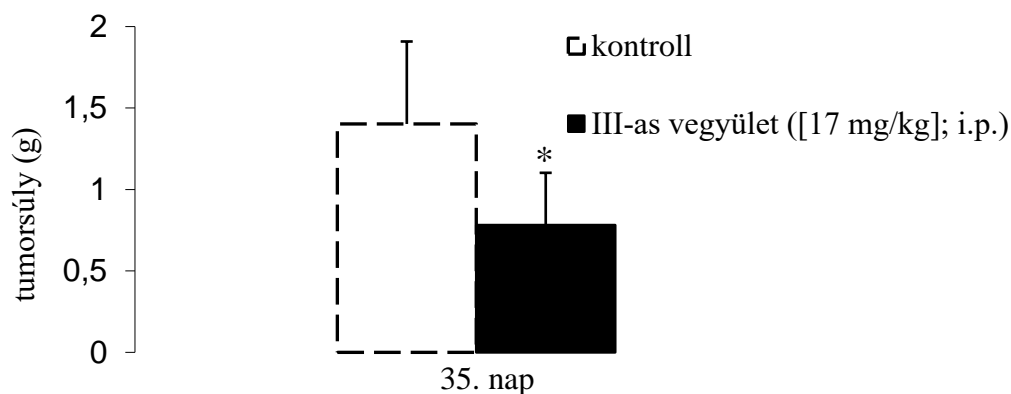
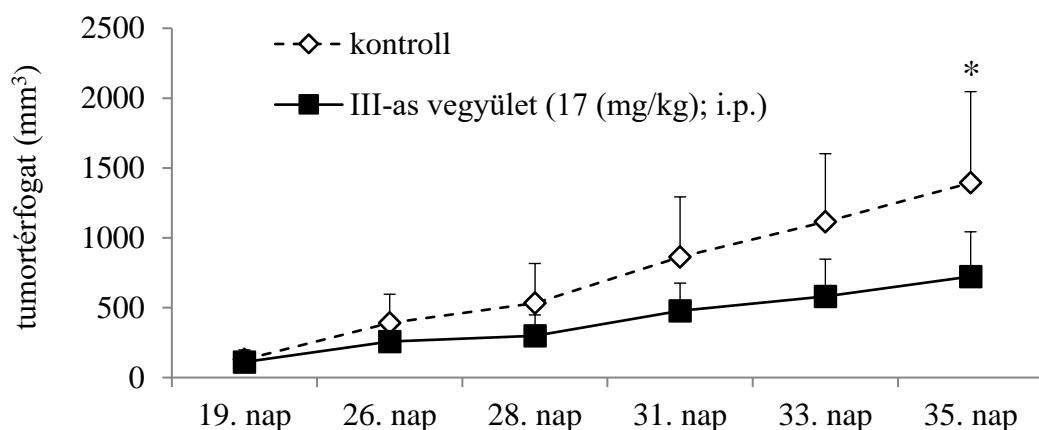
---

<sup>13</sup> hatásgörbe alatti terület

<sup>14</sup> maximum koncentráció

<sup>15</sup> orális biohasznosulás

<sup>16</sup> maximum koncentráció eléréséhez szükséges idő



**19. ábra: A III-as lead molekula szignifikánsan gátolja a tumornövekedést MV4-11 AML xenograft modellben. (A) A III-as vegyület hatására a tumornövekedésben csökkenést mutattunk ki *in vivo*. (térfogat = szélesség<sup>2</sup> x hossz x  $\pi/6$ ); átlag + SD; n=11; \*p<0,05). Mann-Whitney U-tesztet végeztünk. A tumortérfogat a kontroll csoportban 1306,952 mm<sup>3</sup> (medián), míg a kezelt csoportban 613,819 mm<sup>3</sup> (medián). U=14; Z=-3,053; p=0,002 (egyoldali); hatásereőség (r=0,637) erős (B) Tumorsúly a 35. napon (átlag + SD; n=11; \*p<0,05). Mann-Whitney U-tesztet végeztünk. A tumorsúly a kontroll csoportban 1,367 g (medián), míg a kezelt csoportban 0,687 g (medián). U=15; Z=-2,988; p=0,002 (egyoldali); hatásereőség (r=0,637) erős.**

## 5 Megbeszélés

Doktori munkám célja volt, hogy hatékony és új daganatellenes vegyületcsaládokat azonosítsak, és a biológiai hatásmechanizmusukat validáljam, így részt vehessek a korai gyógyszerfejlesztés fázisaiban. Első sorban CDK9- és FLT3-kináz inhibitorok vizsgálata volt a feladatomban.

A Ph.D. munkám célkitűzésében eredetileg megjelölt, biokémiai és sejtes rendszerekben igen hatékony CDK9-inhibitorok potenciális gyógyszermolekuláknak bizonyultak, ezekből nemzetközi szabadalmi bejelentés készült (WO/2011/077171)<sup>185</sup>. Az anyagok jelenleg klinikai fejlesztés alatt állnak, elért eredményeink tárgyalása képezi dolgozatom első felét.

Később az FLT3-kinázzal, az akut myeloid leukémia (AML) nemrég azonosított célpontjával kezdtem foglalkozni. Az FLT3-inhibitor kutatás irányítója kezdetektől Dr. Örfi László, az ebből készült nemzetközi szabadalmi bejelentésekben feltalálónként szerepelek (WO/2015/019121)<sup>186</sup>. Ebből a témából született eredményeimre és publikációmra<sup>187</sup> építettem disszertációm második részét.

A daganatok célzott kezelésének az egyik legnagyobb problémája, hogy még sikeres kezelés után is nagyon gyakran recidíva alakul ki, amely már rezisztens a korábbi terápiára. Ennek oka lehet például a daganatok molekuláris heterogenitása<sup>188-190</sup>. Ezek alapján egyértelmű, hogy új, terápiás szerek kutatása ma is kiemelkedően fontos.

A sikeres terápiás szerek közel kétharmada eredetileg fenotipikus szűrés alapján, (a hatásmechanizmus ismerete nélkül összetett biológiai rendszerre kifejtett hatást vizsgálva), vagy mint ismert hatású természetes vegyület származéka került fejlesztésre<sup>191</sup>. Napjainkban a gyógyszerfejlesztés az új molekuláris célpontokon hatékony molekulákra fókuszál, ahol elengedhetetlen a molekuláris célpont validálása. A gyógyszerjelölt vegyületek klinikai fázisba lépésének feltétele a betegségmodellen mutatott biztonságos hatáson múlik. A sejtes rendszereken végzett gyógyszerkutatás csökkentheti az új hatóanyag kifejlesztésének mind a költségét, mind pedig az idejét<sup>192</sup>. A daganatkutatásban különböző, humán tumorokból származó és normál sejtek összeállíthatók olyan modellé, amellyel megbízható, automatizált vizsgálati rendszerek állíthatók be<sup>193, 194</sup>.

## **5.1 4, 6-diszubsztituált pirimidin alapszerkezetű vegyületek kutatási eredményei - a CDK9 inhibitorokkal kapcsolatos eredmények megvitatása**

A CDK1-6 és a CDK10 a sejtciklus szabályozásában, míg a CDK7, 8, 9 és a CDK11, CDK12 és 13 a transzkripció szabályozásában játszanak szerepet. A CDK11 és CDK12 az RNS-splicing szabályozásában jut szerephez, míg a CDK5 és CDK10 neuronális funkcióval is bír<sup>195-197</sup>, így hatásuk igen diverz. Annak ellenére, hogy a CDK9 attraktív célpont a virális fertőzések, a daganatok, a kardiális hipertrófia és a gyulladások elleni küzdelemben, mind a mai napig nincs szelektív CDK9-inhibitor előrehaladott fejlesztési fázisban<sup>198</sup>. A szelektivitás kiemelkedően fontos kívánalom a CDK9-inhibitorok esetében, hiszen korábbi eredmények azt mutatják, hogy az off-target hatások, melyeket a CDK1, a CDK2 és a CDK4 gátlása okoz pl. a DRB, a roscovitin és a flavopriridol esetében is, veszélyeztetik a klinikai használhatóságuk lehetőségét<sup>178</sup>. A pan-CDK-inhibitorok okozta klinikai tünetek – a csontvelői myeloszuppresszió, a hányás, a hasmenés – hasonlóak a tradicionális kemoterápia mellékhatásaihoz. A CDK1/2-inhibitorok esetén a terápiás ablak szűkebb, így gátlásuk sokszor igen toxikus, ami a klinikai vizsgálatok befejezését jelentheti<sup>199</sup>. A CDK4/ 6-inhibitorok kevésbé toxikusak, hatásukra a retinoblasztoma protein (pRB) foszforilációja gátlódik, a sejtek G1 fázisban maradnak, klinikai tünet az enyhébb csontvelői szuppresszió<sup>200</sup>.

A CDK2/ ciklinE és a CDK4/ ciklinD a sejtciklus szabályozó CDK-komplexek közül igen fontosak, napjainkban kiemelkedően fontos kutatási terület a vizsgálatuk mind a biológia, mind a kémia területén<sup>201</sup>.

A szintetizált 4,6-diszubsztituált pirimidin alapszerkezetű vegyületek hatékonyságának ellenőrzésére biokémiai tesztrendszereket (CDK2, CDK4 és CDK9) állítottam be. A vizsgálati rendszer optimalizálásához a következő paramétereket kellett figyelembe vennem: a detektálóoldat összetevőinek optimalizálása, az optimális enzimkoncentrációk meghatározása, a reakciópuffer összetevőinek meghatározása, az ATP-koncentráció meghatározása, az optimális reakcióidő meghatározása. A tesztrendszer beállításakor a következő statisztikai paramétereket kell figyelembe venni: jelintenzitás, jel/háttér és jel/zaj arány. IMAP-technológia alapú enzim tesztrendszert optimalizáltam, az LDC000067 CDK9-inhibitor referencia vegyülettel validáltam.

Avval, hogy a CDK2, CDK4 és CDK9 biokémiai tesztrendszereket sikerült optimalizálnom és validálnom, lehetőségem nyílt a munkacsoportunkban több CDK9-inhibitor fejlesztésével kapcsolatos projektben – daganatterápiás és antivirális hatóanyagok fejlesztése – is részt venni. A CDK9-inhibitorok, mint potenciális AIDS- illetve myelóma multiplex-ellenes hatóanyagok előállítására irányuló vizsgálataink eredményei doktori dolgozatokban<sup>202, 203</sup> és több nemzetközi publikációban is bemutatásra kerültek<sup>204-206</sup>, így ezeket az eredményeket nem tárgyalom dolgozatomban.

A Ph.D. munkám következő lépéseként rekombináns CDK2, CDK4 és CDK9 enzimrendszerben a nagyhatékonyságú molekulaszűrésre alkalmas IMAP-módszerrel a Vichem Kft. tulajdonában levő fókuszált 4,6-diszubsztituált pirimidin alapszerkezetű molekula-könyvtárat vizsgáltam, ami nagyjából 70 vegyületet jelent. Az előszűrés során kiválogattuk azokat a vegyületeket, amelyek 75% felett gátolták a CDK9 működését, ez 23 vegyület volt. Ez 31%-os találati rátának felel meg, ami igen jó értéknek számít. A dózisfüggést vizsgáló kísérleteink alapján azt állapítottuk meg, hogy a **17, 20, 21, 22**-es molekulák a preklínkumban daganatok kezelésére használt LDC000067-es vegyülettel összemérhető mértékben gátolták a CDK9 enzimet<sup>178</sup>. A biokémiai kináz tesztek eredményei alapján a **20**-as vegyületet azonosítottuk a leghatékosabb és legszelektívebb CDK9-inhibitorként; a CDK2 és a CDK4 enzimen mért IC<sub>50</sub> értéke, kettő, illetve három nagyságrenddel magasabb.

A CDK2/ 4/ 9 biokémiai tesztek eredményei alapján kiválasztottuk a 4,6-diszubsztituált pirimidin alapszerkezetű molekulacsaládból a **17, 20, 21, 22**-es molekulákat, amelyeket a sejtvonalakon vizsgáltunk a tovább.

Annak érdekében, hogy az esetleges sejttípushoz rendelhető inhibitor érzékenységet meg tudjuk állapítani, egy különböző genetikai profilú és hisztopatológiai típusba sorolható, 21 tumoros sejtvonalból álló panelt használtunk. Meghatároztuk a **17, 20, 21, 22**-es molekulák IC<sub>50</sub> értékeit. Méréseink alapján az derült ki, hogy hasonló érzékenységet tapasztaltunk szinte minden tumoros sejttípusnál, vagyis genetikai profiltól és hisztopatológiai státusztól függetlenül hatékony sejtvitalitás csökkentő szerek az újonnan szintetizált származékok.

A biokémiai kináz és a sejtes rendszerekben mért kiemelkedő antitumor hatás alapján a kiválasztott **20**-as lead molekula esetében megvizsgáltattuk a molekula szelektivitási

profilját. A kötődési assay elvégzésére egy külső céget, a DiscovRx-et bízunk meg. Az eredmények alapján a **20**-as anyag a kinázok mindössze 1,5%-ához kötődött. Nagy jelentőségű ez az eredmény, hiszen a kereskedelmi forgalomban elérhető kináz-inhibitorok a kinom több mint 30% -át gátolják<sup>207</sup>. Fontos megjegyezni, hogy a legtöbb kereskedelemben elérhető, illetve publikált CDK-inhibitor, így a CDK9-inhibitorok is CDK1-gátlást is kifejtnek. A CDK1-gátlás fentebb említett toxicitást okoz, így számos inhibitor esetében ez a hatás a klinikai fázisvizsgálatok befejezését jelentheti<sup>200</sup>. A **20**-as lead vegyület nem kötődik a CDK1 enzimhez, így feltételezhetően biokémiai kináz assay-ban sem gátolja az aktivitását. Ahhoz, hogy a feltételezésünket be tudjuk bizonyítani, számos további kísérlet elvégzésre van szükség.

Miután a **20**-as vegyület *in vitro* hatékony CDK9-gátlószernek bizonyult, és igen jó antiproliferatív hatással bírt, valamint a szelektivitási profilja is kedvezőnek tűnt, biológiai hatásmechanizmusát részletesebben vizsgáltuk a jelátviteli útvonalakra fókuszálva néhány sejtvonal esetében. Kutatóintézetünkben korábban is kedvelt modell rendszerünk volt kedvező tenyésztési profilja miatt az MCF7 humán emlő daganat sejtvonal, mindemellett irodalmi adatok alapján az ösztrogén-pozitív emlődaganatok igen érzékenyek a CDK9-inhibitorokra<sup>208, 209</sup>, így vizsgálatainkat az MCF7 sejtvonalon folytattuk.

**20**-as vegyület hatására az RNSP-II C-terminális doménjén a Ser-2 foszforilációjának szignifikáns dózisfüggő csökkenését figyeltük meg. Nagyobb dózisokban alkalmazva a **20**-as származékot a Ser-5-nek is csökkent a foszforilációja. Habár ez a foszforilációs hely korábban csak a CDK7 funkcióhoz volt köthető, úgy tűnik, hogy nem csak a CDK7<sup>210</sup>, hanem a CDK9 és/ vagy a CDK12<sup>211</sup> is szerepet játszhat a foszforilációban. Az RNSP-II foszforilációjának blokkolása transzkripciógátlást eredményez, többek között az anti-apoptotikus Mcl-1 protein csökkent expresszióját, mely rövid életidejű és csökkenése triggereli az apoptózist<sup>212</sup>. Egy további rövid életidejű protein, az ubikvitin ligáz esetében csökkent expresszió, valamint a tumorszuppresszor p53 esetében akkumuláció figyelhető meg<sup>213, 214</sup>. Az, hogy a CDK-inhibitorok hatására a p53 akkumulálódik a sejtekben, több mint 20 év óta ismert tudományos tény, a hatásmechanizmus bizonyítása komplikált<sup>215, 216</sup>. Ahogy mi is, néhányan azt figyelték meg, hogy az Mdm-2 downregulációja lehet felelős a p53 stabilizációjáért és aktivációjáért<sup>213, 217</sup>, néhányan pedig azt írták le, hogy nem az Mdm-2 a CDK-inhibitorok elsődleges célpontja a p53 jelátviteli útvonalon<sup>218</sup>. A

diszkrepancia háttérben állhat az is, hogy alacsony dózisban a CDK-inhibitorok a p53 aktivitását növelik, magasabb dózisban pedig csökkent Mdm-2 szintet, és p53 stabilitást eredményeznek<sup>219</sup>. A legfrissebb kutatások arra világítanak rá, hogy az Mdm-2, Mdm-4 és p53 fehérjék extrém komplex fizikai és funkcionális interakciójának felderítése magyarázatot adhat a jövőben a hatásmechanizmus tisztázásra<sup>220</sup>. A CDK9-inhibíció hatására bekövetkezett p53 akkumuláció transzaktiválja a p21 sejtciklus inhibitor proteint, ami ennek következtében szintén akkumulálódik a sejtben<sup>175</sup>. Már 1  $\mu$ M koncentrációban alkalmazva a **20**-as-vegyület, a CDK9 proteinszint csökkenése volt megfigyelhető, mely változás valószínűleg annak a következménye, hogy a CDK9 az autofoszforilációs helyen (T186) a T loop-ban defoszforilálódott<sup>221</sup>, mely nem csak a P-TEFb aktivitás szempontjából fontos<sup>222</sup>, hanem a protein stabilitásának szempontjából is<sup>223</sup>.

Jól ismert tény, hogy a CDK2 és a CDK4 kritikus szerepet játszik a sejtciklusban a G1-S tranzícióban, azáltal, hogy foszforilálják a retinoblasztoma proteint (pRb), mely az E2F-mediált S-fázis specifikus gének transzkripcióját aktiválja<sup>224</sup>. Ennek egyértelmű jele a G1 fázisban történő sejtciklus blokk. Ezzel szemben a mi eredményeink azt mutatták, hogy a DNS-replikációt már 0,5  $\mu$ M koncentrációban is gátolta a **20**-as vegyület. Magasabb dózisokban az anyag hatására G2/ M fázisban akkumulálódtak a sejtek, ami valószínűleg, a sejtciklust szabályozó CDK-k gátlása miatt történt, amely hasonló az irodalomban korábban publikált Scholz és munkatársai eredményeinek esetében is<sup>74</sup>. Mikulits és társai is megfigyelték a roscovitin által okozott G2/ M ciklusblokkot, valamint az apoptózis indukcióját hepatocelluláris karcinóma modell rendszerben<sup>225</sup>.

A myelóma multiplex betegségben is a kezelés egy lehetséges célpontja a CDK9<sup>226-230</sup>, ezért a **20**-as anyag hatását vizsgáltuk U266 myelóma multiplex sejtvonalon *in vitro*. Az RNSP-II foszforilációs státusza konzisztens volt a korábbi, MCF7 sejtvonalon végzett kísérleteink során kapott eredményekkel.

Összefoglalásként megállapíthatjuk, hogy a **20**-as vegyület hatására az RNSP-II foszforilációjának dózisfüggő csökkenése, az anti-apoptotikus proteinek expressziós szintjének csökkenése, továbbá a kaszpáz-dependens apoptózis indukciója volt megfigyelhető, ami mind konzisztens a CDK9-gátlással kapott eredményekkel. Saját eredményeinkhez hasonlóakról számoltak be a dinaciclib estében Booher és

munkatársai<sup>231</sup> emlő daganatos sejtes eredményeik alapján, valamint Walsby és munkatársai<sup>56</sup> végül Shao és munkatársai<sup>232</sup> is vastagbél, leukémia és emlő daganatsejtekkel végzett kísérleteik eredményei alapján. Az LDC000067 esetében Albert és munkatársai is bizonyították a CDK9-inhibíció általi antitumor hatást, amely apoptózist okoz és a tumorszuppresszor p53 akkumulációját eredményezi emlő és tüdő tumor modelleken folytatott kísérletek eredményei alapján<sup>178</sup>.

Köztudott, hogy a TRAIL számos tumorsejt esetén apoptózist indukál, anélkül, hogy toxikus lenne *in vivo*. Azonban a sejtvonalak *in vitro* 50%-ban TRAIL-rezisztensek, TRAIL szenzitizáló ágensekre van szükség, hatékony tumorterápiához<sup>111</sup>.

Irodalmi adatok szerint, az SNS-032 a CDK9-gátláson keresztül szenzitizál TRAIL-indukált apoptózisra *in vitro*<sup>112</sup>. Hasonlóak Ding és munkatársai eredményei a wogonin kapcsán<sup>233</sup>, valamint Yuan és munkatársai által publikált eredmények a dinaciclib inhibitor esetében<sup>234</sup>. Ezek alapján szeretnénk volna megvizsgálni, hogy az általunk fejlesztett szelektív CDK9-inhibitor esetében szintén kimutatható-e ez a hatás. Ehhez egy TRAIL-szenzitív és -rezisztens sejtvonalakból álló panelt állítottunk össze. A mért viabilitás értékek alapján egyértelmű, hogy mind a TRAIL-érzékeny, mind pedig a TRAIL-rezisztens tumoros sejtvonalaknál szinergizmus figyelhető meg.

A kedvező eredmények alapján a **20**-as vegyület biológiai hatásmechanizmusának részletesebb vizsgálatát végeztük TRAIL-rezisztens MCF7 sejtvonalon. Ezek alapján elmondhatjuk, a **20**-as vegyület és a h. r. TRAIL kombinációs kezelés hatására apoptotikus folyamatok indultak be az TRAIL-rezisztens sejtekben. A Western blot analízis megerősítette az előbbi megállapításunkat. A CDK9-inhibitor **20**-as vegyület szenzitizál a TRAIL-indukált apoptózisra a TRAIL-rezisztens sejtvonalaknál a fentebb említett eredményekkel összhangban.

Az ADME vizsgálatok közé a vizsgált hatóanyag felszívódásával, szervezeten belüli eloszlásával, metabolizmusával, szervezetből való kiürülésével kapcsolatos kísérletek tartoznak. A **20**-as vegyület esetében két paramétert vizsgáltunk: az oldhatóságot és a membránon passzív transzporttal történő átjutást. Az eredmények alapján azt mondhatjuk el, hogy a **20**-as lead vegyület pH=2-n jó, valamint pH=7,4-en gyenge oldhatóságot mutat. Továbbá a **20**-as lead vegyület permeabilitása mérsékelt, azaz korlátozott mértékben képes átjutni a plazmamembránon, mégis hatékony antiproliferatív hatást fejtett ki a sejtes



rendszerünkben. Valószínűleg aktív transzporttal jutott be a sejtbe. Az oldhatóság és a permeabilitás igen fontos paraméterek már a korai gyógyszerfejlesztési fázisban, hiszen meghatározzák az anyagok adagolásának módját. A Biofarmáciai Osztályozási Rendszer (BCS) szerint a hatóanyagok oldhatóságuk és permeabilitásuk alapján csoportosíthatók<sup>235</sup>, a **20**-as vezér molekulát az eredmények alapján a II. osztályba sorolhatjuk. Az FDA által 1995 óta jóváhagyott hatóanyagok 90%-ának a vízoldhatósága, a permeabilitása, vagy mindkettő rossz. Irodalmi adatok szerint az új gyógyszermolekulák egyre nagyobb része vízben rosszul oldódó hatóanyag. Ezek 70 százaléka BCS II. osztályba tartozik<sup>236</sup>. Ez a tény azt vetíti előre, hogy a korai klinikai fejlesztéshez szükséges lesz az anyag formulázása.

Összességében kijelenthető, hogy gyógyszerszerűség szempontjából is megfelelő a szelektív CDK9-inhibitor **20**-as molekula a további kutatásokhoz.

## **5.2 A sztiril-kinazolinok megbeszélése - az FLT3 inhibitorokkal kapcsolatos eredmények megvitatása**

Az elmúlt 15 évben az FLT3-inhibitorok a gyógyszerfejlesztés középpontjában álltak. Az első generációs inhibitorok, mint a lestaurinib, a midostaurin, a szunitinib, és a tandutinib multitarget inhibitorok, monoterápiás szerként a klinikai vizsgálatok során nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket, egyértelművé vált, hogy nem hatékonyak és/ vagy nem tolerálhatóak. A második generációs inhibitorok, mint a quizartinib és a PLX3397 szelektívebbek, emiatt, ahogy várható volt, jobban tolerálhatóak abban a koncentrációban, amelyben az *in vivo* hatást eredményezik, a klinikai vizsgálatok során hatékonyak bizonyultak, különösen a quizartinib<sup>237</sup>. Sajnos az FLT3-inhibitorok, mint a sorafenib, szunitinib és a quizartinib adminisztrációját követően a tirozin kináz doménben (TKD) pontmutáció alakult ki, leggyakrabban a D835 oldalláncon<sup>129, 130</sup>. Az FLT3-inhibitor kezelés hatására kialakuló szerzett pontmutációk egyértelmű bizonyítékai annak, hogy az ITD mutáció, valamint az ITD/ D835 mutáció kombináció driverré teszik az *FLT3* gént AML, ALL és CLL betegségben<sup>238, 163</sup>. Továbbá az izolált FLT3-D835 mutáció (vagyis, amikor nincs jelen FLT3-ITD mutáció) a gyakorlatban egyes esetekben szintén driver mutációként funkcionál a betegségben<sup>129, 130</sup>.

A disszertációmban szereplő kutatási eredményeim értelmezéséhez szükségesnek tartom bemutatni néhány sorban a témában korábban elért eredményeinket. A feniletinil-

pirimidin vázú ENMD-2076 jelű vegyületet FLT3-inhibitorként írták le<sup>239</sup>. A hasonló szerkezetű, kinazolin alapú molekulának, a CP-31398-nak (amit az irodalomból p53-aktiváló és expressziót fokozó hatásáról ismerünk)<sup>240</sup> az interakcióját FLT3-mal nem vizsgálták. A két molekula szerkezeti hasonlósága miatt megvizsgáltuk a CP-31398 molekula FLT3-kináz enzimen mért *in vitro* gátló hatását, a vegyület IC<sub>50</sub> értéke 2,4 μM lett. Az FLT3-interakció tisztázása céljából kinazolin típusú fókuszált vegyülettár szintézisét és vizsgálatát terveztük. Az első szintetizált képviselők egyikéről, a **XIII**-as vegyületről a DiscoverX cég által a KINOMEscan® módszerével végzett kötődési vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy szelektív FLT3-inhibitor. Mindamellet, hogy a vegyület több mutáns FLT3-kináz hatékony inhibitora, nagyon fontos megjegyezni, hogy a receptor tirozin kinázok 3-as csoportjába tartozó többi kinázt (c-Kit, CSFR, PDGFR) nem gátolja, ahogyan egyéb más receptor tirozin kinázt sem. Ez egy nagyon biztató eredmény, hiszen a legtöbb kináz a kinom több mint 30% -át gátolja<sup>207</sup>. A korai tesztelések wt és ITD-mutáns enzimeken történtek, ezen eredmények egy része már egy korábbi dolgozatban bemutatásra kerültek<sup>181</sup>.

Kutatási eredmények igazolták, hogy a quizartinib vegyülettel szemben rezisztencia alakul ki FLT3-D835Y mutációt hordozó betegek esetében<sup>169</sup>. Ez a jelentős tudományos tény meghatározta a további kutatások irányát.

Az FLT3-D835Y mutáció az AML esetek 7%-ban fordul elő, driver mutációnak tekinthető, így a molekulák további tesztelését az FLT3-D835Y mutáns kinázon folytattuk. A célfehérje alapú hatóanyag fejlesztéshez elengedhetetlen az MTS/ HTS tesztelésre alkalmas módszer. Egy olyan módszert szerettem volna beállítani, amely általánosan alkalmazható, robosztus, homogén, miniatürizálható, nem radioaktív, nem igényel antitestet és jól reprodukálható.

A fókuszált sztiril-kinazolin alapszerkezetű molekulakönyvtárat vizsgáltam, ami 181 vegyületet tartalmazott. Az előszűrés során kiválogattuk azokat a vegyületeket, amelyek 75% felett gátolták az FLT3-D835Y enzim aktivációját, ez 66 db vegyület volt. Ez 37%-os találati rátának felel meg, ami igen jó aránynak számít. Következő lépésben a 75% feletti gátlást okozó molekulák esetében dóziszfüggést vizsgáló kísérleteket végeztem. A biokémiai kináz assay-k eredményei alapján elmondhatjuk, hogy a leghatékonyabbnak ítélt inhibitorok (I-XIII.) egyaránt nanomólos koncentrációban gátolják az FLT3-ITD és

az FLT3-D835Y enzimeket, az FLT3wt vad típusú enzimen pedig nem hatnak, tehát szelektívek. Igen nagy jelentőségű az eredmény, miszerint a leghatékonyabb inhibitorok hatékonyan gátolják a FLT3-D835Y enzim aktivitását is. A quizartinibot is bevontuk a rekombináns enzim vizsgálatainkba, várakozásainknak megfelelően, az FLT3-D835Y mutáns enzimen az IC<sub>50</sub> értéke mérsékelt,  $1,33 \pm 0,28 \mu\text{M}$ . Ez az eredmény alátámasztja azt a felfedezést, miszerint a D835Y mutáció destabilizálja az FLT3 inaktív konformációját, így megakadályozza a quizartinib kötődését<sup>241</sup>. Ezzel a mechanizmussal is magyarázható a terápia-indukált szerzett rezisztencia kialakulása. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a lead molekuláink megnövekedett szelektivitással bírnak a quizartinibhez képest<sup>186</sup>.

A kötődési vizsgálatok és a kináz assay-k (FLT3wt, FLT3-ITD és FLT3-D835Y) eredményei alapján célul tűztük ki a biokémiailag igen hatékony és szelektív FLT3-ITD- és FLT3-D835Y-inhibitorok tumorelles hatásának vizsgálatát humán sejtes rendszerekben. A következő fókuszált panelt állítottuk össze: MV4-11 FLT3-függő (FLT3 fokozott expresszió), FLT3-ITD driver mutációt hordozó leukémia<sup>147</sup>, K562 és U937 FLT3-független leukémia<sup>242, 243</sup>, valamint HS-5 csontvelői stróma sejtek. A szintetizált szériából az **IX**-es számú bizonyult a leghatékonyabbnak. Drámaian csökkentette a sejtviabilitást az MV4-11 sejtvonalon, míg az FLT3-független K562 és U-937 leukémia sejtvonalakon a mért gátló hatás elenyésző volt, ahogy a HS-5 sejtvonalon is. Ez igen kedvező eredmény, hiszen sejtes vizsgálatban is sikerült a molekula szelektivitását kimutatni. Figyelembe véve azt, hogy a vad típusú FLT3 esszenciális a normál hematopoetikus sejtek proliferációjához, ez a szelektivitás azt sejteti, hogy a molekuláknak kedvezőbb lesz a mellékhatás profilja, hasonlóan a 2020-ban publikált friss eredmény szerint a CHMFL-FLT3-362 molekulához<sup>244</sup>. Az eredményeink összevethetőek Zarrinkar és munkatársai által közölt quizartinib és tandutinib kezelés során mért sejtes eredményekkel<sup>142</sup>. Sajnos FLT3-D835Y mutáns sejtvonala jelenleg kereskedelmi forgalomból nem beszerezhető, emiatt nem tudtuk validálni a gátlást az FLT3-D835Y mutációt hordozó sejtes rendszerben.

A Biofarmáciai Osztályozási Rendszer kritériumrendszere szerint a **III**-as vezér molekulát az eredmények alapján a II. osztályba sorolhatjuk, hasonlóan a **20**-as vezér molekulához.

A biokémiai kináz és a sejtes proliferáció-vizsgálatok eredményei, valamint a jobb oldhatóság és penetrációs értékek alapján a 4-izopropil-származék **III**-as lead vegyület szelektivitását 451 kinázt tartalmazó kötődési assay-ben (KINOMEscan®) vizsgáltuk. A kapott eredmények alapján elmondhatjuk, hogy 5 $\mu$ M-os inhibitor koncentráció mellett a legnagyobb kötődést (90% feletti értékek) az FLT3-kináz és bizonyos mutációi esetén mérték, bár kisebb mértékben kötődik a KIT-D816V és PDGFR $\beta$  család többi képviselőjéhez. A korábbi irodalmi adatok alapján egyértelmű, hogy az általunk azonosított **III**-as vegyület kimagasló szelektivitást mutat az eddig ismert FLT3-inhibitorokkal szemben.

Az AML-es betegekkel folytatott klinikai vizsgálatok során igen nagy kihívást jelent az egyik klinikai paraméter, a myeloszuppresszió (anémia, trombocitopénia). A klinikai vizsgálatokban résztvevő legtöbb AML-ben szenvedő beteg a betegségből adódóan myeloszuppresszált állapotban van. Mivel, a TKI-ok használatának egyik velejárója a csontvelő funkció szuppressziója, hiszen a TKI-ok a c-KIT-et is gátolják. A c-KIT esszenciális a normál eritropoezis kialakulásához és a megakariocita funkcióhoz<sup>165</sup>. A **III**-as lead molekulánk e szempont alapján is unikálisnak számít, hiszen rendkívül alacsony kötődési affinitást mutat c-KIT enzimhez.

A legtöbb kinazolin alapú kináz inhibitor ATP-kompetitív, ezért az volt a hipotézisünk, hogy a mi lead molekuláink is azok. Annak érdekében, hogy bizonyítani tudjuk a hipotézisünket, a lead molekuláink IC<sub>50</sub> értékeit megvizsgáltuk különböző ATP koncentráció mellett. A Cheng–Prusoff egyenlőség szerint, ha az inhibitorok ATP-kompetitív molekulák, akkor a növekvő szubsztrát (ATP) koncentráció csökkenteni fogja az inhibíció mértékét. A magasabb ATP koncentráció mellett mért magasabb IC<sub>50</sub> értékek demonstrálják, hogy a **III**, **VII**, **IX** lead molekulák ATP-kompetitív inhibitorok.

A gyógyszerjelölt farmakokinetikai sajátosságai a fejlesztés során fontos kritériumként szerepelnek, amennyiben kedvezőtlenek, az a fejlesztés befejezését is jelentheti. Nem közvetlenül az érpályába való adagolásnál a gyógyszerjelölt a véráramba kerüléshez leküzdi a szervezet külső és belső hámrétegeit. A hatékonyságot a felszívódásnak a mértéke és az üteme befolyásolja. A **III**-as lead esetében a mért orális biohasznosulás mérsékelt, ezért arra következtethetünk, hogy magas a „first pass” metabolizmus és/ vagy gyenge a gasztrointesztinális felszívódás. Mindemellett, a mért magas

plazmakoncentráció azt mutatja, hogy akár az orális adagolás is megfelelő lehet. A **III**-as lead molekula *in vivo* tumorelles hatást mutatott MV4-11 ITD mutáns AML egér xenograft modellben, hatékonyan csökkentette a tumortérfogatot és tumorsúlyt már 16 napos kezelést követően és jól tolerálható az állatok számára az alkalmazott dózisban. A sorafenib esetében leírták, hogy 10 mg/kg dózisban 12 napig tartó kezelés 90%-ban teljes regressziót eredményezett<sup>245</sup>. Korábbi eredmények azt mutatták, hogy 10 mg/kg dózisban 28 napig tartó quizartinib-kezelés teljes tumorregressziót eredményezett, sőt 60 nappal a kezelés befejezését követően sem növekedett a tumor<sup>142</sup>, míg a szunitinib esetében a regresszió üteme lassabb volt és mértéke is kisebb, a kezelés befejezését követően azonnal tumornövekedés történt<sup>147</sup>. A gilterinib esetében kifejezettebb, 80%-os tumortérfogat csökkenést írtak le napi 3mg/kg, és közel teljes tumorregressziót napi 6mg/kg hatóanyag adminisztrációja esetén<sup>246</sup>. Elmondható, hogy a **III**-as lead molekula effektív *in vivo* antitumor hatású AML xenograft állat modellben, reményeink szerint nagy hatékonyságot várhatunk tőle a klinikai vizsgálatokban is.

Összességében elmondható, hogy a **III**-as lead molekulánk az új generációs FLT3-inhibitorok egy olyan tagja, ami extrém szelektivitása mellett nagy hatékonyságot mutat *in vitro* és *in vivo* is az ITD-mutáns AML esetében. Reményeink szerint a molekulánk további fejlesztési folyamatok során eljutnak a klinikai vizsgálatokig, és lehetőséget teremtenek a kiújuló, a jelenlegi gyógyszerekre nem reagáló vagy már rezisztens AML betegségek kezelésére.

## 6 Következtetés

### 6.1 Következtetések a 4, 6-diszubsztituált pirimidin alapszerkezetű vegyületek esetében, azaz a CDK9 inhibitorok vizsgálata során született következtetések

1. Ígéretes lead molekulákat azonosítottunk és karakterizáltunk az újonnan szintetizált 4, 6-diszubsztituált pirimidin alapszerkezetű vegyületek között, melyek hatékonyan és szelektíven gátolják a CDK9-enzimet.
2. Az optimalizációs folyamat során azonosítottuk a **20**-as számú anyagot, amely a legszelektívebb CDK9-inhibitornak bizonyult a szériában.
3. A molekuláris modellezés is egyértelművé tette a **20**-as számú anyag interakcióját a CDK9-enzimmel.
4. A **20**-as számú származék jelentős antitumor hatást mutatott sejtes panelen.
5. Vizsgálataink demonstrálták, hogy a **20**-as lead molekula apoptózist indukál többek között az anti-apoptotikus Mcl-1 expressziójának gátlása útján.
6. A **20**-as vegyület a TRAIL-rezisztens sejteket is érzékenyíti a TRAIL-indukált apoptózisra *in vitro*.

## 6.2 Következtetések a sztiril-kinazolinok esetében, vagyis az FLT3 inhibitorokkal végzett vizsgálataink során megfogalmazott következtetések

1. Az újonnan szintetizált sztiril-kinazolin-származékok között olyan extrém szelektív inhibitorot azonosítottam (**III**-as vegyület), amely az eddig ismert hatóanyagoktól eltérően nem csak az FLT3-kináz aktiváló (ITD), de a rezisztenciát okozó (D835Y) mutáns változatát is képes gátolni *in vitro*.
2. A **III**-as hatóanyag szelektíven gátolta az FLT3-dependens MV4-11 ITD mutáns AML sejtvonal proliferációját.
3. A lead molekulák fiziológiás pH-n is jól oldódnak, valamint, a mesterséges membránon is hatékonyan átjutnak, így azt a következtetést vontuk le, hogy a sejtekbe passzív transzporttal is könnyen bejuthatnak.
4. A farmakokinetikai mérések és egér xenograft alapján állítjuk, hogy az általunk kiválasztott a **III**-as lead molekula, *in vivo* is hatékonyan gátolja az MV4-11 sejteket.

## 7 Összefoglalás

A CDK9 attraktív gyógyszer-célpontnak számít a virális fertőzések, a rák, a kardiális hipertrófia és a gyulladásos betegségek kezelésében is. Doktori munkám során új 4,6-diszubsztituált pirimidin-alapú inhibitorok vizsgálatát végeztem, hogy szelektív CDK9-inhibitorra azonosítsak. A biokémiai profil alapján azonosítottuk a **20**-as vegyületet, amely a leghatékonyabb és legszelektívebb CDK9-gátló szernek bizonyult, ezt megerősítette az *in silico* végzett dokkolás eredménye is. A tumoros sejtvonalakon végzett sejtproliferációs vizsgálataink szerint a **20**-as számú lead vegyület antitumor hatású vegyület. A **20**-as vegyülettel kezelt tumoros sejtvonalaknál az RNS-polimeráz II foszforilációjának dóziszfüggő csökkenését, valamint kaspázfüggő sejtelhalást tapasztaltunk, amely hatásért a CDK9-inhibíció felelős. ADME vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy a lead vegyület kedvező paraméterekkel rendelkezik. Tumoros sejtvonalakon végzett kísérleteink bizonyították, a **20**-as lead vegyületet és a h. r. TRAIL-t alkalmazó kombinációs terápia lehetőséget nyújthat hatékony daganatterápiára. Kutatásaink eredményeiből nemzetközi szabadalmi bejelentés készült<sup>185</sup>. A **20**-as vegyület jelenleg klinikai fejlesztés alatt áll. Az akut myeloid leukémiával diagnosztizált betegek esetében a betegség patogenezisében 20-30%-ban az FLT3-kináz aberráns aktivációi tehetőek felelőssé. Doktori munkám során vizsgáltam az extrém szelektív FLT3-gátló sztiril-kinazolin vegyületcsaládot. Jelen munkámban kináz assay-k alapján bizonyítottuk, hogy ennek a családnak a tagjai igen hatékony inhibitorai a D835Y-mutáns FLT3-kináznak is. A leghatékonyabb molekulák gátolták a sejtproliferációt és apoptózist indukáltak FLT3-ITD akut myeloid leukémia sejtekben és hatástalanoknak bizonyultak FLT3-independens leukémia és nem-leukémia sejtvonalakon. A **III**-as lead molekula kedvező ADME és farmakokinetikai paraméterekkel rendelkezik, valamint egér AML xenograftban szignifikánsan csökkentette a tumornövekedést. Az eredményeink arra engednek következtetni, hogy a kutatócsoportunk által szintetizált, azonosított és karakterizált vegyületek terápiás szerként használhatók majd a jövőben, különböző FLT3-ITD/ FLT3-TKD mutációt hordozó refrakter, vagy visszaeső AML betegek esetében. A szelektív FLT3-inhibitorokat célzó kutatásaink során szerzett eredményeim szerepelnek egy 2013-ban benyújtott szabadalmi bejelentésben<sup>186</sup>, illetve egy 2019. szeptemberében megjelent publikációban<sup>187</sup>.



## 8 Summary

CDK9 is currently considered as an attractive drug target in the treatment of viral infections, cancer, cardiac hypertrophy or even inflammation. During my PhD our recent work was focused on the validation and biological evaluation of novel 4,6-disubstituted pyrimidine-based inhibitors aiming to identify a selective inhibitor of CDK9. Based on the biochemical profile, we identified compound **20**, which proved to be the most effective and selective CDK9 inhibitor, this result was confirmed also by the results of *in silico* docking. According to our cell proliferation studies on tumor cell lines, lead compound **20** is an antitumor compound. Treatment of cancer cell lines with lead compound **20** resulted in dose-dependent reduction of RNA-polymerase II phosphorylation and induction of caspase-dependent cell death, all of which are consistent with inhibition of CDK9. Based on ADME studies, we found the lead compound has favorable parameters. Experiments performed on tumor cell lines demonstrated that the combinatorial therapy of lead compound **20** and h. r. TRAIL may provide an opportunity for effective cancer therapy. The results of our research have been the subject of an international patent application<sup>185</sup>. Compound **20** is currently under clinical development. In patients diagnosed with acute myeloid leukemia, aberrant activations of FLT3-kinase are responsible for 20-30% of the pathogenesis of the disease. During my doctoral studies I investigated the highly selective FLT3-inhibitor styryl-quinazoline compound family. In my present work, we demonstrated by kinase assays that members of this family are also highly potent inhibitors of the D835Y-mutant FLT3-kinase. The most effective molecules inhibited cell proliferation and triggered apoptosis of FLT3-ITD acute myeloid leukemia cells and proved ineffective on FLT3-independent leukemic and non-leukemic cell lines. The lead compound **III** has favorable ADME and pharmacokinetic parameters and significantly reduced tumor growth in mouse AML xenograft. Our results suggest that the compounds synthesized, identified, and characterized by our research team may be used as therapeutic agents in the future for patients with refractory or relapsed AML carrying various FLT3-ITD/FLT3-TKD mutations. My results of our research on selective FLT3 inhibitors are included in a patent application filed in 2013<sup>186</sup> and a publication published in September 2019<sup>187</sup>.

## 9 Irodalomjegyzék

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136: E359-386.
2. Persano L, Zagoura D, Louisse J, Pistollato F. (2015) Role of environmental chemicals, processed food derivatives, and nutrients in the induction of carcinogenesis. *Stem Cells and Development*, 24: 2337-2352.
3. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 65: 87-108.
4. Globocan. (2020) 348-hungary-fact-sheets.pdf.
5. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, 298: 1912-1934.
6. Blume-Jensen P, Hunter T. (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411: 355-365.
7. Williams-Ashman HG, Kennedy EP. (1952) Oxidative phosphorylation catalyzed by cytoplasmic particles isolated from malignant tissues. *Cancer Research*, 12: 415-421.
8. Tsai C-J, Nussinov R. (2013) The molecular basis of targeting protein kinases in cancer therapeutics. *Seminars in Cancer Biology*, 23: 235-242.
9. Drake J, Lee J, Witte O. (2014) Clinical Targeting of Mutated and Wild-Type Protein Tyrosine Kinases in Cancer. *Molecular and cellular biology*, 34.
10. Molekuláris profilvizsgálatok a kezelési stratégiákban <https://elitmed.hu/kiadvanyaink/klinikai-onkologia/molekularis-profilvizsgalatok-a-kezelesi-strategiakban>.
11. Gosal G, Kochut KJ, Kannan N. (2011) ProKinO: An Ontology for Integrative Analysis of Protein Kinases in Cancer. *PLOS ONE*, 6: e28782.
12. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. (2013) Cancer Genome Landscapes. *Science*, 339: 1546-1558.
13. Cohen P. (2002) Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nature Reviews. Drug Discovery*, 1: 309-315.

14. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, Capdeville R, Talpaz M. (2001) Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *The New England Journal of Medicine*, 344: 1038-1042.
15. Vemurafenib: the first drug approved for BRAF -mutant cancer | *Nature Reviews Drug Discovery* <https://www.nature.com/articles/nrd3847>.
16. Burris HA. (2004) Dual kinase inhibition in the treatment of breast cancer: initial experience with the EGFR/ErbB-2 inhibitor lapatinib. *The Oncologist*, 9 Suppl 3: 10-15.
17. Capdeville R, Silberman S, Dimitrijevic S. (2002) Imatinib: the first 3 years. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 38 Suppl 5: S77-82.
18. Gan HK, Seruga B, Knox JJ. (2009) Sunitinib in solid tumors. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 18: 821-834.
19. Hahn O, Stadler W. (2006) Sorafenib. *Current Opinion in Oncology*, 18: 615-621.
20. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, Wilson R, Kris M, Varmus H. (2004) EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 13306-13311.
21. Graña X, De Luca A, Sang N, Fu Y, Claudio PP, Rosenblatt J, Morgan DO, Giordano A. (1994) PITALRE, a nuclear CDC2-related protein kinase that phosphorylates the retinoblastoma protein in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 3834-3838.
22. Bullrich F, MacLachlan TK, Sang N, Druck T, Veronese ML, Allen SL, Chiorazzi N, Koff A, Heubner K, Croce CM. (1995) Chromosomal mapping of members of the cdc2 family of protein kinases, cdk3, cdk6, PISSLRE, and PITALRE, and a cdk inhibitor, p27Kip1, to regions involved in human cancer. *Cancer Research*, 55: 1199-1205.
23. De Luca A, Esposito V, Baldi A, Claudio PP, Fu Y, Caputi M, Pisano MM, Baldi F, Giordano A. (1997) CDC2-related kinase PITALRE phosphorylates pRb

- exclusively on serine and is widely expressed in human tissues. *Journal of Cellular Physiology*, 172: 265-273.
24. Garriga J, Segura E, Mayol X, Grubmeyer C, Graña X. (1996) Phosphorylation site specificity of the CDC2-related kinase PITALRE. *Biochemical Journal*, 320: 983-989.
  25. de Falco G, Giordano A. (1998) CDK9 (PITALRE): a multifunctional cdc2-related kinase. *Journal of Cellular Physiology*, 177: 501-506.
  26. Yang X, Gold MO, Tang DN, Lewis DE, Aguilar-Cordova E, Rice AP, Herrmann CH. (1997) TAK, an HIV Tat-associated kinase, is a member of the cyclin-dependent family of protein kinases and is induced by activation of peripheral blood lymphocytes and differentiation of promonocytic cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 12331-12336.
  27. Zhu Y, Pe'ery T, Peng J, Ramanathan Y, Marshall N, Marshall T, Amendt B, Mathews MB, Price DH. (1997) Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 Tat transactivation in vitro. *Genes & Development*, 11: 2622-2632.
  28. Shore SM, Byers SA, Dent P, Price DH. (2005) Characterization of Cdk9(55) and differential regulation of two Cdk9 isoforms. *Gene*, 350: 51-58.
  29. Shore SM, Byers SA, Maury W, Price DH. (2003) Identification of a novel isoform of Cdk9. *Gene*, 307: 175-182.
  30. Corden JL. (1990) Tails of RNA polymerase II. *Trends in Biochemical Sciences*, 15: 383-387.
  31. Hirose Y, Manley JL. (2000) RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes & Development*, 14: 1415-1429.
  32. Dahmus ME. (1996) Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *The Journal of Biological Chemistry*, 271: 19009-19012.
  33. Spilianakis C, Kretsovali A, Agaloti T, Makatounakis T, Thanos D, Papamatheakis J. (2003) CIITA regulates transcription onset via Ser5-phosphorylation of RNA Pol II. *The EMBO journal*, 22: 5125-5136.

34. Trigon S, Serizawa H, Conaway JW, Conaway RC, Jackson SP, Morange M. (1998) Characterization of the residues phosphorylated in vitro by different C-terminal domain kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 273: 6769-6775.
35. Ho CK, Shuman S. (1999) Distinct roles for CTD Ser-2 and Ser-5 phosphorylation in the recruitment and allosteric activation of mammalian mRNA capping enzyme. *Molecular Cell*, 3: 405-411.
36. Lolli G. (2009) Binding to DNA of the RNA-polymerase II C-terminal domain allows discrimination between Cdk7 and Cdk9 phosphorylation. *Nucleic Acids Research*, 37: 1260-1268.
37. Medlin J, Scurry A, Taylor A, Zhang F, Peterlin BM, Murphy S. (2005) P-TEFb is not an essential elongation factor for the intronless human U2 snRNA and histone H2b genes. *The EMBO journal*, 24: 4154-4165.
38. Oelgeschläger T. (2002) Regulation of RNA polymerase II activity by CTD phosphorylation and cell cycle control. *Journal of Cellular Physiology*, 190: 160-169.
39. Dahlberg O, Shilkova O, Tang M, Holmqvist P-H, Mannervik M. (2015) P-TEFb, the super elongation complex and mediator regulate a subset of non-paused genes during early *Drosophila* embryo development. *PLoS genetics*, 11: e1004971.
40. Jonkers I, Kwak H, Lis JT. (2014) Genome-wide dynamics of Pol II elongation and its interplay with promoter proximal pausing, chromatin, and exons. *eLife*, 3: e02407.
41. Laitem C, Zaborowska J, Isa NF, Kufs J, Dienstbier M, Murphy S. (2015) CDK9 inhibitors define elongation checkpoints at both ends of RNA polymerase II-transcribed genes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22: 396-403.
42. Ping YH, Rana TM. (1999) Tat-associated kinase (P-TEFb): a component of transcription preinitiation and elongation complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 7399-7404.
43. Price DH. (2000) P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Molecular and Cellular Biology*, 20: 2629-2634.
44. Krystof V, Chamrád I, Jorda R, Kohoutek J. (2010) Pharmacological targeting of CDK9 in cardiac hypertrophy. *Medicinal Research Reviews*, 30: 646-666.

45. Shim EY, Walker AK, Shi Y, Blackwell TK. (2002) CDK-9/cyclin T (P-TEFb) is required in two postinitiation pathways for transcription in the *C. elegans* embryo. *Genes & Development*, 16: 2135-2146.
46. Schmerwitz UK, Sass G, Khandoga AG, Joore J, Mayer BA, Berberich N, Totzke F, Krombach F, Tiegs G, Zahler S, Vollmar AM, Fürst R. (2011) Flavopiridol protects against inflammation by attenuating leukocyte-endothelial interaction via inhibition of cyclin-dependent kinase 9. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31: 280-288.
47. Bark-Jones SJ, Webb HM, West MJ. (2006) EBV EBNA 2 stimulates CDK9-dependent transcription and RNA polymerase II phosphorylation on serine 5. *Oncogene*, 25: 1775-1785.
48. Durand LO, Roizman B. (2008) Role of cdk9 in the Optimization of Expression of the Genes Regulated by ICP22 of Herpes Simplex Virus 1. *Journal of Virology*, 82: 10591-10599.
49. Kapasi AJ, Clark CL, Tran K, Spector DH. (2009) Recruitment of cdk9 to the immediate-early viral transcriptosomes during human cytomegalovirus infection requires efficient binding to cyclin T1, a threshold level of IE2 86, and active transcription. *Journal of Virology*, 83: 5904-5917.
50. Tong W-G, Chen R, Plunkett W, Siegel D, Sinha R, Harvey RD, Badros AZ, Popplewell L, Coutre S, Fox JA, Mahadocon K, Chen T, Kegley P, Hoch U, Wierda WG. (2010) Phase I and pharmacologic study of SNS-032, a potent and selective Cdk2, 7, and 9 inhibitor, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28: 3015-3022.
51. Bellan C, De Falco G, Lazzi S, Micheli P, Vicidomini S, Schürfeld K, Amato T, Palumbo A, Bagella L, Sabattini E, Bartolommei S, Hummel M, Pileri S, Tosi P, Leoncini L, Giordano A. (2004) CDK9/CYCLIN T1 expression during normal lymphoid differentiation and malignant transformation. *The Journal of Pathology*, 203: 946-952.
52. De Falco G, Bellan C, D'Amuri A, Angeloni G, Leucci E, Giordano A, Leoncini L. (2005) Cdk9 regulates neural differentiation and its expression correlates with

- the differentiation grade of neuroblastoma and PNET tumors. *Cancer Biology & Therapy*, 4: 277-281.
53. Cosmic CDK9 Gene - COSMIC.  
<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=CDK9>.
  54. Poulsen A, William A, Blanchard S, Nagaraj H, Williams M, Wang H, Lee A, Sun E, Teo E-L, Tan E, Goh KC, Dymock B. (2013) Structure-based design of nitrogen-linked macrocyclic kinase inhibitors leading to the clinical candidate SB1317/TG02, a potent inhibitor of cyclin dependant kinases (CDKs), Janus kinase 2 (JAK2), and Fms-like tyrosine kinase-3 (FLT3). *Journal of Molecular Modeling*, 19: 119-130.
  55. Misra RN, Xiao H-y, Kim KS, Lu S, Han W-C, Barbosa SA, Hunt JT, Rawlins DB, Shan W, Ahmed SZ, Qian L, Chen B-C, Zhao R, Bednarz MS, Kellar KA, Mulheron JG, Batorsky R, Roongta U, Kamath A, Marathe P, Ranadive SA, Sack JS, Tokarski JS, Pavletich NP, Lee FYF, Webster KR, Kimball SD. (2004) N-(cycloalkylamino)acyl-2-aminothiazole inhibitors of cyclin-dependent kinase 2. N-[5-[[[5-(1,1-dimethylethyl)-2-oxazolyl]methyl]thio]-2-thiazolyl]-4-piperidinecarboxamide (BMS-387032), a highly efficacious and selective antitumor agent. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47: 1719-1728.
  56. Walsby E, Pratt G, Shao H, Abbas AY, Fischer PM, Bradshaw TD, Brennan P, Fegan C, Wang S, Pepper C. (2014) A novel Cdk9 inhibitor preferentially targets tumor cells and synergizes with fludarabine. *Oncotarget*, 5: 375-385.
  57. Tragara Pharmaceuticals, Inc. (2019) Phase 1 Dose-Escalation and Pharmacokinetic Study of TG02 Citrate in Patients With Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia and Small Lymphocytic Lymphoma ([clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov)).
  58. Lee's Pharmaceutical Limited (2020) Single-center, Dose Escalation, Open Phase I Clinical Study of Oral TG02 Capsule in the Treatment of Recurrent / Progressive High-grade Glioma Patients With Failed TMZ Treatment ([clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov)).
  59. Shao H, Shi S, Huang S, Hole AJ, Abbas AY, Baumli S, Liu X, Lam F, Foley DW, Fischer PM, Noble M, Endicott JA, Pepper C, Wang S. (2013) Substituted 4-(thiazol-5-yl)-2-(phenylamino)pyrimidines are highly active CDK9 inhibitors:

- synthesis, X-ray crystal structures, structure-activity relationship, and anticancer activities. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56: 640-659.
60. Polier G, Ding J, Konkimalla BV, Eick D, Ribeiro N, Köhler R, Giaisi M, Efferth T, Desaubry L, Krammer PH, Li-Weber M. (2011) Wogonin and related natural flavones are inhibitors of CDK9 that induce apoptosis in cancer cells by transcriptional suppression of Mcl-1. *Cell Death & Disease*, 2: e182.
  61. Hajdúch M, Havlíček L, Veselý J, Novotný R, Mihál V, Strnad M. (1999) Synthetic cyclin dependent kinase inhibitors. New generation of potent anti-cancer drugs. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 457: 341-353.
  62. Cyclacel Pharmaceuticals, Inc. (2011) A Phase IIb Randomized Study of Oral Seliciclib in Patients With Previously Treated Non-Small Cell Lung Cancer (clinicaltrials.gov).
  63. Agbottah E, de La Fuente C, Nekhai S, Barnett A, Gianella-Borradori A, Pumfery A, Kashanchi F. (2005) Antiviral activity of CYC202 in HIV-1-infected cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 3029-3042.
  64. Merck Sharp & Dohme Corp. (2017) A Phase 3 Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Dinaciclib or Ofatumumab in Subjects With Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia (clinicaltrials.gov).
  65. Cyclin-dependent kinase inhibitors as potential targeted anticancer agents | Request PDF ResearchGate.  
[https://www.researchgate.net/publication/24178896\\_Cyclin-dependent\\_kinase\\_inhibitors\\_as\\_potential\\_targeted\\_ant anticancer\\_agents](https://www.researchgate.net/publication/24178896_Cyclin-dependent_kinase_inhibitors_as_potential_targeted_ant anticancer_agents).
  66. Senderowicz AM, Sausville EA. (2000) Preclinical and clinical development of cyclin-dependent kinase modulators. *Journal of the National Cancer Institute*, 92: 376-387.
  67. Joshi KS, Rathos MJ, Joshi RD, Sivakumar M, Mascarenhas M, Kamble S, Lal B, Sharma S. (2007) In vitro antitumor properties of a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, P276-00. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6: 918-925.
  68. Bettayeb K, Tirado OM, Marionneau-Lambot S, Ferandin Y, Lozach O, Morris JC, Mateo-Lozano S, Drucekes P, Schächtele C, Kubbutat MHG, Liger F, Marquet B, Joseph B, Echalié A, Endicott JA, Notario V, Meijer L. (2007)



- Meriolins, a new class of cell death inducing kinase inhibitors with enhanced selectivity for cyclin-dependent kinases. *Cancer Research*, 67: 8325-8334.
69. Bach S, Knockaert M, Reinhardt J, Lozach O, Schmitt S, Baratte B, Koken M, Coburn SP, Tang L, Jiang T, Liang D-C, Galons H, Dierick J-F, Pinna LA, Meggio F, Totzke F, Schächtele C, Lerman AS, Carnero A, Wan Y, Gray N, Meijer L. (2005) Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 31208-31219.
  70. Chang YT, Gray NS, Rosania GR, Sutherlin DP, Kwon S, Norman TC, Sarohia R, Leost M, Meijer L, Schultz PG. (1999) Synthesis and application of functionally diverse 2,6,9-trisubstituted purine libraries as CDK inhibitors. *Chemistry & Biology*, 6: 361-375.
  71. De Azevedo WF, Mueller-Dieckmann HJ, Schulze-Gahmen U, Worland PJ, Sausville E, Kim SH. (1996) Structural basis for specificity and potency of a flavonoid inhibitor of human CDK2, a cell cycle kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 2735-2740.
  72. Parry D, Guzi T, Shanahan F, Davis N, Prabhavalkar D, Wiswell D, Seghezzi W, Paruch K, Dwyer MP, Doll R, Nomeir A, Windsor W, Fischmann T, Wang Y, Oft M, Chen T, Kirschmeier P, Lees EM. (2010) Dinaciclib (SCH 727965), a novel and potent cyclin-dependent kinase inhibitor. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9: 2344-2353.
  73. Wyatt PG, Woodhead AJ, Berdini V, Boulstridge JA, Carr MG, Cross DM, Davis DJ, Devine LA, Early TR, Feltell RE, Lewis EJ, McMenamin RL, Navarro EF, O'Brien MA, O'Reilly M, Reule M, Saxty G, Seavers LCA, Smith D-M, Squires MS, Trewartha G, Walker MT, Woolford AJ-A. (2008) Identification of N-(4-piperidinyl)-4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxamide (AT7519), a novel cyclin dependent kinase inhibitor using fragment-based X-ray crystallography and structure based drug design. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51: 4986-4999.
  74. Scholz A, Wagner K, Welzel M, Remlinger F, Wiedenmann B, Siemeister G, Rosewicz S, Detjen KM. (2009) The oral multitarget tumour growth inhibitor, ZK 304709, inhibits growth of pancreatic neuroendocrine tumours in an orthotopic mouse model. *Gut*, 58: 261-270.

75. Camidge DR, Smethurst D, Growcott J, Barrass NC, Foster JR, Febraro S, Swaisland H, Hughes A. (2007) A first-in-man phase I tolerability and pharmacokinetic study of the cyclin-dependent kinase-inhibitor AZD5438 in healthy male volunteers. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 60: 391-398.
76. Lücking U, Jautelat R, Krüger M, Brumby T, Lienau P, Schäfer M, Briem H, Schulze J, Hillisch A, Reichel A, Wengner AM, Siemeister G. (2013) The lab oddity prevails: discovery of pan-CDK inhibitor (R)-S-cyclopropyl-S-(4-{{4-{{(1R,2R)-2-hydroxy-1-methylpropyl}oxy}-5-(trifluoromethyl)pyrimidin-2-yl}amino}phenyl)sulfoximide (BAY 1000394) for the treatment of cancer. *ChemMedChem*, 8: 1067-1085.
77. Crump M, Hedley D, Phd S, Leber B, Wells R, Brandwein J, Buckstein R, Kassis J, Minden M, Matthews J, Robinson S, Turner R, McIntosh L, Eisenhauer E, Seymour L. (2010) A randomized phase I clinical and biologic study of two schedules of sorafenib in patients with myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia: A NCIC (National Cancer Institute of Canada) Clinical Trials Group Study. *Leukemia & lymphoma*, 51: 252-260.
78. Bible KC, Peethambaram PP, Oberg AL, Maples W, Groteluschen DL, Boente M, Burton JK, Gomez Dahl LC, Tibodeau JD, Isham CR, Maguire JL, Shridhar V, Kukla AK, Voll KJ, Mauer MJ, Colevas AD, Wright J, Doyle LA, Erlichman C. (2012) A Phase 2 Trial of Flavopiridol (Alvocidib) and Cisplatin in Platin-Resistant Ovarian and Primary Peritoneal Carcinoma: MC0261. *Gynecologic oncology*, 127: 55-62.
79. Lanasa MC, Andritsos L, Brown JR, Gabilove J, Caligaris F-C, Ghia P, Larson RA, Kipps TJ, Leblond V, Milligan DW, Janssens A, Johnson AJ, Heerema NA, Bühler A, Stilgenbauer S, Devin J, Hallek M, Byrd JC, Grever MR. (2015) Final Results of EFC6663: A Multicenter, International, Phase 2 Study of Alvocidib for Patients with Fludarabine-Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *Leukemia research*, 39: 495-500.
80. Hofmeister CC, Poi M, Bowers MA, Zhao W, Phelps MA, Benson DM, Kraut EH, Farag S, Efebera YA, Sexton J, Lin TS, Grever M, Byrd JC. (2014) A phase I trial of flavopiridol in relapsed multiple myeloma. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 73: 249-257.

81. Jones JA, Rupert AS, Poi M, Phelps MA, Andritsos L, Baiocchi R, Benson DM, Blum KA, Christian B, Flynn J, Penza S, Porcu P, Grever MR, Byrd JC. (2014) Flavopiridol can be safely administered using a pharmacologically derived schedule and demonstrates activity in relapsed and refractory non-Hodgkin's lymphoma. *American Journal of Hematology*, 89: 19-24.
82. Maddocks K, Wei L, Rozewski D, Jiang Y, Zhao Y, Adusumilli M, Pierceall WE, Doykin C, Cardone MH, Jones JA, Flynn J, Andritsos LA, Grever MR, Byrd JC, Johnson AJ, Phelps MA, Blum KA. (2015) Reduced Occurrence of Tumor Flare with Flavopiridol Followed by Combined Flavopiridol and Lenalidomide in Patients with Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *American journal of hematology*, 90: 327-333.
83. Karp JE, Smith BD, Resar LS, Greer JM, Blackford A, Zhao M, Moton-Nelson D, Alino K, Levis MJ, Gore SD, Joseph B, Carraway H, McDevitt MA, Bagain L, Mackey K, Briel J, Doyle LA, Wright JJ, Rudek MA. (2011) Phase 1 and pharmacokinetic study of bolus-infusion flavopiridol followed by cytosine arabinoside and mitoxantrone for acute leukemias. *Blood*, 117: 3302-3310.
84. Mita MM, Joy AA, Mita A, Sankhala K, Jou Y-M, Zhang D, Statkevich P, Zhu Y, Yao S-L, Small K, Bannerji R, Shapiro CL. (2014) Randomized phase II trial of the cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib (MK-7965) versus capecitabine in patients with advanced breast cancer. *Clinical Breast Cancer*, 14: 169-176.
85. Stephenson JJ, Nemunaitis J, Joy AA, Martin JC, Jou Y-M, Zhang D, Statkevich P, Yao S-L, Zhu Y, Zhou H, Small K, Bannerji R, Edelman MJ. (2014) Randomized phase 2 study of the cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib (MK-7965) versus erlotinib in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 83: 219-223.
86. Gojo I, Sadowska M, Walker A, Feldman EJ, Iyer SP, Baer MR, Sausville EA, Lapidus RG, Zhang D, Zhu Y, Jou Y-M, Poon J, Small K, Bannerji R. (2013) Clinical and laboratory studies of the novel cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib (SCH 727965) in acute leukemias. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 72: 897-908.

87. Fabre C, Gobbi M, Ezzili C, Zoubir M, Sablin M-P, Small K, Im E, Shinwari N, Zhang D, Zhou H, Le Tourneau C. (2014) Clinical study of the novel cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib in combination with rituximab in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia patients. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 74: 1057-1064.
88. Kumar SK, LaPlant B, Chng WJ, Zonder J, Callander N, Fonseca R, Fruth B, Roy V, Erlichman C, Stewart AK, Consortium MP. (2015) Dinaciclib, a novel CDK inhibitor, demonstrates encouraging single-agent activity in patients with relapsed multiple myeloma. *Blood*, 125: 443-448.
89. Benson C, White J, Bono JD, O'Donnell A, Raynaud F, Cruickshank C, McGrath H, Walton M, Workman P, Kaye S, Cassidy J, Gianella-Borradori A, Judson I, Twelves C. (2007) A phase I trial of the selective oral cyclin-dependent kinase inhibitor seliciclib (CYC202; R-Roscovitine), administered twice daily for 7 days every 21 days. *British Journal of Cancer*, 96: 29-37.
90. Le Tourneau C, Faivre S, Laurence V, Delbaldo C, Vera K, Girre V, Chiao J, Armour S, Frame S, Green SR, Gianella-Borradori A, Diéras V, Raymond E. (2010) Phase I evaluation of seliciclib (R-roscovitine), a novel oral cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with advanced malignancies. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 46: 3243-3250.
91. Heath EI, Bible K, Martell RE, Adelman DC, Lorusso PM. (2008) A phase 1 study of SNS-032 (formerly BMS-387032), a potent inhibitor of cyclin-dependent kinases 2, 7 and 9 administered as a single oral dose and weekly infusion in patients with metastatic refractory solid tumors. *Investigational New Drugs*, 26: 59-65.
92. van der Biessen DAJ, Burger H, de Bruijn P, Lamers CHJ, Naus N, Loferer H, Wiemer EAC, Mathijssen RHJ, de Jonge MJA. (2014) Phase I study of RGB-286638, a novel, multitargeted cyclin-dependent kinase inhibitor in patients with solid tumors. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 20: 4776-4783.
93. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit VM. (1997) The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science (New York, N.Y.)*, 276: 111-113.

94. Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Timour MS, Gerhart MJ, Schooley KA, Smith CA, Goodwin RG, Rauch CT. (1997) TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *The EMBO journal*, 16: 5386-5397.
95. Dickens LS, Boyd RS, Jukes-Jones R, Hughes MA, Robinson GL, Fairall L, Schwabe JWR, Cain K, Macfarlane M. (2012) A death effector domain chain DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediating apoptotic cell death. *Molecular Cell*, 47: 291-305.
96. Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A. (2000) Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity*, 12: 611-620.
97. Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, Gazdar A, Blenis J, Arnott D, Ashkenazi A. (2001) Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 46639-46646.
98. Sprick MR, Rieser E, Stahl H, Grosse-Wilde A, Weigand MA, Walczak H. (2002) Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *The EMBO Journal*, 21: 4520-4530.
99. Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, Rauch CT, Juo P, Blenis J, Krammer PH, Walczak H. (2000) FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity*, 12: 599-609.
100. Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. (2001) Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 20633-20640.
101. Salvesen GS, Duckett CS. (2002) IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3: 401-410.
102. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. (1997) X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*, 388: 300-304.

103. Reed JC. (1995) Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Current Opinion in Oncology*, 7: 541-546.
104. Picarda G, Trichet V, Téletchéa S, Heymann D, Rédini F. (2012) TRAIL receptor signaling and therapeutic option in bone tumors: the trap of the bone microenvironment. *American journal of cancer research*, 2: 45-64.
105. Pommier Y, Sordet O, Antony S, Hayward RL, Kohn KW. (2004) Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene*, 23: 2934-2949.
106. Creaven PJ, Plager JE, Dupere S, Huben RP, Takita H, Mittelman A, Proefrock A. (1987) Phase I clinical trial of recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 20: 137-144.
107. Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T, Nagata S. (1993) Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature*, 364: 806-809.
108. Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtrey AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shahrokh Z, Schwall RH. (1999) Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *The Journal of Clinical Investigation*, 104: 155-162.
109. Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC, Lynch DH. (1999) Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nature Medicine*, 5: 157-163.
110. Micheau O, Shirley S, Dufour F. (2013) Death receptors as targets in cancer. *British Journal of Pharmacology*, 169: 1723-1744.
111. Todaro M, Lombardo Y, Francipane MG, Alea MP, Cammareri P, Iovino F, Di Stefano AB, Di Bernardo C, Agrusa A, Condorelli G, Walczak H, Stassi G. (2008) Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4. *Cell Death and Differentiation*, 15: 762-772.
112. Lemke J, von Karstedt S, Abd El Hay M, Conti A, Arce F, Montinaro A, Pappenfuss K, El-Bahrawy MA, Walczak H. (2014) Selective CDK9 inhibition

- overcomes TRAIL resistance by concomitant suppression of cFlip and Mcl-1. *Cell Death and Differentiation*, 21: 491-502.
113. Rosnet O, Buhring HJ, Marchetto S, Rappold I, Lavagna C, Sainty D, Arnoulet C, Chabannon C, Kanz L, Hannum C, Birnbaum D. (1996) Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia*, 10: 238-248.
  114. Rosnet O, Birnbaum D. (1993) Hematopoietic receptors of class III receptor-type tyrosine kinases. *Critical reviews in oncogenesis*, 4: 595-613.
  115. Scheijen B, Griffin JD. (2002) Tyrosine kinase oncogenes in normal hematopoiesis and hematological disease. *Oncogene*, 21: 3314-3333.
  116. Griffith J, Black J, Faerman C, Swenson L, Wynn M, Lu F, Lippke J, Saxena K. (2004) The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Molecular cell*, 13: 169-178.
  117. Brasel K, Escobar S, Anderberg R, de Vries P, Gruss HJ, Lyman SD. (1995) Expression of the flt3 receptor and its ligand on hematopoietic cells. *Leukemia*, 9: 1212-1218.
  118. deLapeyriere O, Naquet P, Planche J, Marchetto S, Rottapel R, Gambarelli D, Rosnet O, Birnbaum D. (1995) Expression of Flt3 tyrosine kinase receptor gene in mouse hematopoietic and nervous tissues. *Differentiation; research in biological diversity*, 58: 351-359.
  119. Turner AM, Lin NL, Issarachai S, Lyman SD, Broudy VC. (1996) FLT3 receptor expression on the surface of normal and malignant human hematopoietic cells. *Blood*, 88: 3383-3390.
  120. Meshinchi S, Appelbaum FR. (2009) Structural and functional alterations of FLT3 in acute myeloid leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15: 4263-4269.
  121. Stirewalt DL, Radich JP. (2003) The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nature reviews. Cancer*, 3: 650-665.
  122. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T, Misawa S. (1996) Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 10: 1911-1918.

123. Ozeki K, Kiyoi H, Hirose Y, Iwai M, Ninomiya M, Kodera Y, Miyawaki S, Kuriyama K, Shimazaki C, Akiyama H, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Ueda R, Ohno R, Emi N, Naoe T. (2004) Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. *Blood*, 103: 1901-1908.
124. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Saito H, Ueda R, Ohno R, Naoe T. (2001) Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*, 97: 2434-2439.
125. Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, Loffler H, Sauerland CM, Serve H, Buchner T, Haferlach T, Hiddemann W. (2002) Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood*, 100: 59-66.
126. Hubbard SR. (2004) Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5: 464-471.
127. Levis M, Small D. (2003) FLT3: ITDoes matter in leukemia. *Leukemia*, 17: 1738-1752.
128. Spiekermann K, Bagrintseva K, Schoch C, Haferlach T, Hiddemann W, Schnittger S. (2002) A new and recurrent activating length mutation in exon 20 of the FLT3 gene in acute myeloid leukemia. *Blood*, 100: 3423-3425.
129. Wang W, Wang X-Q, Xu X-P, Lin G-W. (2010) Prevalence and prognostic significance of FLT3 gene mutations in patients with acute leukaemia: analysis of patients from the Shanghai Leukaemia Co-operative Group. *The Journal of international medical research*, 38: 432-442.
130. Whitman SP, Ruppert AS, Radmacher MD, Mrozek K, Paschka P, Langer C, Baldus CD, Wen J, Racke F, Powell BL, Kolitz JE, Larson RA, Caligiuri MA, Marcucci G, Bloomfield CD. (2008) FLT3 D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression signature among



- younger adults with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking FLT3 internal tandem duplications. *Blood*, 111: 1552-1559.
131. Reindl C, Bagrintseva K, Vempati S, Schnittger S, Ellwart JW, Wenig K, Hopfner K-P, Hiddemann W, Spiekermann K. (2006) Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML. *Blood*, 107: 3700-3707.
  132. Stirewalt DL, Meshinchi S, Kussick SJ, Sheets KM, Pogossova-Agadjanyan E, Willman CL, Radich JP. (2004) Novel FLT3 point mutations within exon 14 found in patients with acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*, 124: 481-484.
  133. Vardiman J, Thiele J, Arber D, Brunning R, Borowitz M, Porwit A, Harris N, Beau M, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield C. (2009) Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellstrom-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 114: 937-951. *Blood*, 114: 937-951.
  134. Network CGAR, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, Robertson AG, Hoadley K, Triche TJ, Laird PW, Baty JD, Fulton LL, Fulton R, Heath SE, Kalicki-Veizer J, Kandoth C, Klco JM, Koboldt DC, Kanchi K-L, Kulkarni S, Lamprecht TL, Larson DE, Lin L, Lu C, McLellan MD, McMichael JF, Payton J, Schmidt H, Spencer DH, Tomasson MH, Wallis JW, Wartman LD, Watson MA, Welch J, Wendl MC, Ally A, Balasundaram M, Birol I, Butterfield Y, Chiu R, Chu A, Chuah E, Chun H-J, Corbett R, Dhalla N, Guin R, He A, Hirst C, Hirst M, Holt RA, Jones S, Karsan A, Lee D, Li HI, Marra MA, Mayo M, Moore RA, Mungall K, Parker J, Pleasance E, Plettner P, Schein J, Stoll D, Swanson L, Tam A, Thiessen N, Varhol R, Wye N, Zhao Y, Gabriel S, Getz G, Sougnez C, Zou L, Leiserson MDM, Vandin F, Wu H-T, Applebaum F, Baylin SB, Akbani R, Broom BM, Chen K, Motter TC, Nguyen K, Weinstein JN, Zhang N, Ferguson ML, Adams C, Black A, Bowen J, Gastier-Foster J, Grossman T, Lichtenberg T, Wise L, Davidsen T, Demchok JA, Shaw KRM, Sheth M, Sofia HJ, Yang L, Downing

- JR, Eley G. (2013) Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 368: 2059-2074.
135. RYDAPT (midostaurin) capsules, for oral use. 20.
136. Arber DA, Borowitz MJ, Cessna M, Etzell J, Foucar K, Hasserjian RP, Rizzo JD, Theil K, Wang SA, Smith AT, Rumble RB, Thomas NE, Vardiman JW. (2017) Initial Diagnostic Workup of Acute Leukemia: Guideline From the College of American Pathologists and the American Society of Hematology. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 141: 1342-1393.
137. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Larson RA, Levine RL, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz M, Sierra J, Tallman MS, Tien H-F, Wei AH, Löwenberg B, Bloomfield CD. (2017) Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*, 129: 424-447.
138. Kindler T, Lipka DB, Fischer T. (2010) FLT3 as a therapeutic target in AML: still challenging after all these years. *Blood*, 116: 5089-5102.
139. Sternberg DW, Licht JD. (2005) Therapeutic intervention in leukemias that express the activated fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3): opportunities and challenges. *Current Opinion in Hematology*, 12: 7-13.
140. Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, Galinsky I, Estey E, Nimer SD, Grandin W, Lebwohl D, Wang Y, Cohen P, Fox EA, Neuberg D, Clark J, Gilliland DG, Griffin JD. (2005) Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood*, 105: 54-60.
141. Weisberg E, Boulton C, Kelly LM, Manley P, Fabbro D, Meyer T, Gilliland DG, Griffin JD. (2002) Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Cancer Cell*, 1: 433-443.
142. Zarrinkar PP, Gunawardane RN, Cramer MD, Gardner MF, Brigham D, Belli B, Karaman MW, Pratz KW, Pallares G, Chao Q, Sprankle KG, Patel HK, Levis M, Armstrong RC, James J, Bhagwat SS. (2009) AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, 114: 2984-2992.

143. Kelly LM, Yu J-C, Boulton CL, Apatira M, Li J, Sullivan CM, Williams I, Amaral SM, Curley DP, Duclos N, Neuberg D, Scarborough RM, Pandey A, Hollenbach S, Abe K, Lokker NA, Gilliland DG, Giese NA. (2002) CT53518, a novel selective FLT3 antagonist for the treatment of acute myelogenous leukemia (AML). *Cancer cell*, 1: 421-432.
144. DeAngelo DJ, Stone RM, Heaney ML, Nimer SD, Paquette RL, Klisovic RB, Caligiuri MA, Cooper MR, Lecerf J-M, Karol MD, Sheng S, Holford N, Curtin PT, Druker BJ, Heinrich MC. (2006) Phase 1 clinical results with tandutinib (MLN518), a novel FLT3 antagonist, in patients with acute myelogenous leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Blood*, 108: 3674-3681.
145. Fathi A, Levis M. (2011) FLT3 inhibitors: a story of the old and the new. *Current opinion in hematology*, 18: 71-76.
146. Anastassiadis T, Deacon SW, Devarajan K, Ma H, Peterson JR. (2011) Comprehensive assay of kinase catalytic activity reveals features of kinase inhibitor selectivity. *Nature biotechnology*, 29: 1039-1045.
147. O'Farrell A-M, Abrams TJ, Yuen HA, Ngai TJ, Louie SG, Yee KWH, Wong LM, Hong W, Lee LB, Town A, Smolich BD, Manning WC, Murray LJ, Heinrich MC, Cherrington JM. (2003) SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. *Blood*, 101: 3597-3605.
148. Research CfDEa. (2019) FDA approves sunitinib malate for adjuvant treatment of renal cell carcinoma. FDA.
149. Borthakur G, Kantarjian H, Ravandi F, Zhang W, Konopleva M, Wright JJ, Faderl S, Verstovsek S, Mathews S, Andreeff M, Cortes JE. (2011) Phase I study of sorafenib in patients with refractory or relapsed acute leukemias. *Haematologica*, 96: 62-68.
150. Pratz KW, Cho E, Levis MJ, Karp JE, Gore SD, McDevitt M, Stine A, Zhao M, Baker SD, Carducci MA, Wright JJ, Rudek MA, Smith BD. (2010) A pharmacodynamic study of sorafenib in patients with relapsed and refractory acute leukemias. *Leukemia*, 24: 1437-1444.
151. Zhang W, Konopleva M, Shi Y-x, McQueen T, Harris D, Ling X, Estrov Z, Quintás-Cardama A, Small D, Cortes J, Andreeff M. (2008) Mutant FLT3: a

- direct target of sorafenib in acute myelogenous leukemia. *Journal of the National Cancer Institute*, 100: 184-198.
152. Al-Kali A, Cortes J, Faderl S, Jones D, Abril C, Pierce S, Brandt M, Kantarjian H, Ravandi F. (2011) Patterns of Molecular Response to and Relapse After Combination of Sorafenib, Idarubicin, and Cytarabine in Patients With FLT3 Mutant Acute Myeloid Leukemia. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*, 11: 361-366.
  153. Konig H, Levis M. (2015) Targeting FLT3 to treat leukemia. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 19: 37-54.
  154. Ravandi F, Alattar ML, Grunwald MR, Rudek MA, Rajkhowa T, Richie MA, Pierce S, Daver N, Garcia-Manero G, Faderl S, Nazha A, Konopleva M, Borthakur G, Burger J, Kadia T, Deltasala S, Andreeff M, Cortes J, Kantarjian H, Levis M. (2013) Phase 2 study of azacytidine plus sorafenib in patients with acute myeloid leukemia and FLT-3 internal tandem duplication mutation. *Blood*, 121: 4655-4662.
  155. Levis M, Allebach J, Tse K-F, Zheng R, Baldwin BR, Smith BD, Jones-Bolin S, Ruggeri B, Dionne C, Small D. (2002) A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood*, 99: 3885-3891.
  156. Smith BD, Levis M, Beran M, Giles F, Kantarjian H, Berg K, Murphy KM, Dausess T, Allebach J, Small D. (2004) Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*, 103: 3669-3676.
  157. Fischer T, Stone RM, Deangelo DJ, Galinsky I, Estey E, Lanza C, Fox E, Ehninger G, Feldman EJ, Schiller GJ, Klimek VM, Nimer SD, Gilliland DG, Dutreix C, Huntsman-Labed A, Virkus J, Giles FJ. (2010) Phase IIB trial of oral Midostaurin (PKC412), the FMS-like tyrosine kinase 3 receptor (FLT3) and multi-targeted kinase inhibitor, in patients with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome with either wild-type or mutated FLT3. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28: 4339-4345.
  158. Cooper BW, Kindwall-Keller TL, Craig MD, Creger RJ, Hamadani M, Tse WW, Lazarus HM. (2015) A phase I study of midostaurin and azacitidine in relapsed

- and elderly AML patients. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*, 15: 428-432.e422.
159. Cortes JE, Kantarjian H, Foran JM, Ghirdaladze D, Zodelava M, Borthakur G, Gammon G, Trone D, Armstrong RC, James J, Levis M. (2013) Phase I study of quizartinib administered daily to patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia irrespective of FMS-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplication status. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 31: 3681-3687.
160. Levis M, Ravandi F, Wang ES, Baer MR, Perl A, Coutre S, Erba H, Stuart RK, Baccarani M, Cripe LD, Tallman MS, Meloni G, Godley LA, Langston AA, Amadori S, Lewis ID, Nagler A, Stone R, Yee K, Advani A, Douer D, Wiktor-Jedrzejczak W, Juliusson G, Litzow MR, Petersdorf S, Sanz M, Kantarjian HM, Sato T, Tremmel L, Bensen-Kennedy DM, Small D, Smith BD. (2011) Results from a randomized trial of salvage chemotherapy followed by lestaurtinib for patients with FLT3 mutant AML in first relapse. *Blood*, 117: 3294-3301.
161. Levis MJ, Perl AE, Dombret H, Döhner H, Steffen B, Rousselot P, Martinelli G, Estey EH, Burnett AK, Gammon G, Trone D, Leo E, Cortes JE. (2012) Final Results of a Phase 2 Open-Label, Monotherapy Efficacy and Safety Study of Quizartinib (AC220) in Patients with FLT3-ITD Positive or Negative Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia After Second-Line Chemotherapy or Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Blood*, 120: 673-673.
162. Heidel F, Solem FK, Breitenbuecher F, Lipka DB, Kasper S, Thiede MH, Brandts C, Serve H, Roesel J, Giles F, Feldman E, Ehninger G, Schiller GJ, Nimer S, Stone RM, Wang Y, Kindler T, Cohen PS, Huber C, Fischer T. (2006) Clinical resistance to the kinase inhibitor PKC412 in acute myeloid leukemia by mutation of Asn-676 in the FLT3 tyrosine kinase domain. *Blood*, 107: 293-300.
163. Smith CC, Wang Q, Chin C-S, Salerno S, Damon LE, Levis MJ, Perl AE, Travers KJ, Wang S, Hunt JP, Zarrinkar PP, Schadt EE, Kasarskis A, Kuriyan J, Shah NP. (2012) Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia. *Nature*, 485: 260-263.
164. Swaminathan M, Kantarjian HM, Daver N, Borthakur G, Ohanian M, Kadia T, DiNardo CD, Jain N, Estrov Z, Ferrajoli A, Garcia-Manero G, Konopleva M,

- Andreeff M, Pemmaraju N, Jabbour EJ, Wierda WG, Ravandi F, Pinsoy MR, Cortes JE. (2017) The Combination of Quizartinib with Azacitidine or Low Dose Cytarabine Is Highly Active in Patients (Pts) with FLT3-ITD Mutated Myeloid Leukemias: Interim Report of a Phase I/II Trial. *Blood*, 130: 723-723.
165. Broudy VC. (1997) Stem Cell Factor and Hematopoiesis. *Blood*, 90: 1345-1364.
166. Search of: NCT02074839 - List Results - ClinicalTrials.gov  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=NCT02074839&cntry=&state=&city=&dist=>.
167. Galanis A, Ma H, Rajkhowa T, Ramachandran A, Small D, Cortes J, Levis M. (2014) Crenolanib is a potent inhibitor of FLT3 with activity against resistance-conferring point mutants. *Blood*, 123: 94-100.
168. Zimmerman EI, Turner DC, Buaboonnam J, Hu S, Orwick S, Roberts MS, Janke LJ, Ramachandran A, Stewart CF, Inaba H, Baker SD. (2013) Crenolanib is active against models of drug-resistant FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia. *Blood*, 122: 3607-3615.
169. Smith CC, Lasater EA, Lin KC, Wang Q, McCreery MQ, Stewart WK, Damon LE, Perl AE, Jeschke GR, Sugita M, Carroll M, Kogan SC, Kuriyan J, Shah NP. (2014) Crenolanib is a selective type I pan-FLT3 inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111: 5319-5324.
170. Arog Pharmaceuticals, Inc. (2019) A Safety and Tolerability Trial of Crenolanib and Chemotherapy With Cytarabine and Anthracyclines in Patients With Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia With FLT3 Activating Mutations (clinicaltrials.gov).
171. Arog Pharmaceuticals, Inc. (2019) Pilot Study of Crenolanib Combined With Standard Salvage Chemotherapy in Subjects With Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia (clinicaltrials.gov).
172. Enzyme - IMAP Assays Molecular Devices.  
<https://www.moleculardevices.com/products/assay-kits/enzyme/imap-assays>.
173. Fabian MA, Biggs WH, Treiber DK, Atteridge CE, Azimioara MD, Benedetti MG, Carter TA, Ciceri P, Edeen PT, Floyd M, Ford JM, Galvin M, Gerlach JL, Grotzfeld RM, Herrgard S, Insko DE, Insko MA, Lai AG, Lélías J-M, Mehta SA, Milanov ZV, Velasco AM, Wodicka LM, Patel HK, Zarrinkar PP, Lockhart DJ.

- (2005) A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nature Biotechnology*, 23: 329-336.
174. Mihalik R, Uher F, Pocsik É É, Berczi L, Benczur M, Kopper L. (1996) Detection of Drug-induced Apoptosis by Flow Cytometry after Alkaline Extraction of Ethanol Fixed Cells. *Pathology oncology research: POR*, 2: 78-83.
175. Krystof V, Cankar P, Frysová I, Slouka J, Kontopidis G, Dzubák P, Hajdúch M, Srovnal J, de Azevedo WF, Orság M, Paprskárová M, Rolcík J, Látr A, Fischer PM, Strnad M. (2006) 4-arylazo-3,5-diamino-1H-pyrazole CDK inhibitors: SAR study, crystal structure in complex with CDK2, selectivity, and cellular effects. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49: 6500-6509.
176. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Xie S. (2010) PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Computer methods and programs in biomedicine*, 99: 306-314.
177. Schrödinger Announces the Release of Suite 2009 | Schrödinger  
<https://www.schrodinger.com/jp/news/schr%C3%B6dinger-announces-release-suite-2009>.
178. Albert TK, Rigault C, Eickhoff J, Baumgart K, Antrecht C, Klebl B, Mittler G, Meisterernst M. (2014) Characterization of molecular and cellular functions of the cyclin-dependent kinase CDK9 using a novel specific inhibitor. *British Journal of Pharmacology*, 171: 55-68.
179. Flørenes VA, Maelandsmo GM, Forus A, Andreassen A, Myklebost O, Fodstad O. (1994) MDM2 gene amplification and transcript levels in human sarcomas: relationship to TP53 gene status. *Journal of the National Cancer Institute*, 86: 1297-1302.
180. Sionov RV, Haupt Y. (1999) The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene*, 18: 6145-6157.
181. Ferenc B. (2015) Tumorellenes hatású kinázgátló vegyületek előállítására és vizsgálatára.
182. Cosmic FLT3 Gene - COSMIC.  
<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=FLT3>.
183. flt3[gene] - ClinVar - NCBI  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=flt3%5Bgene%5D>.

184. FLT3 - My Cancer Genome  
<https://www.mycancergenome.org/content/gene/flt3/>.
185. Greff, Z., Varga, Z., Kéri, G., Németh, G., Örfi, L., and Szántai Kis, C. (2011). 4-Phenylamino-Pyrimidine Derivatives Having Protein Kinase Inhibitor Activity.
186. Baska F, Keri G, Orfi L, Banhegyi P, Kekesi L, Zsakai L, Sipos A., Szantai-Kis C, Dobos J, and Blaauwen TD. (2015) Styryl quinazoline derivatives as pharmaceutically active agents.
187. Baska F, Sipos A, Örfi Z, Nemes Z, Dobos J, Szántai-Kis C, Szabó E, Szénási G, Dézsi L, Hamar P, Cserepes MT, Tóvári J, Garamvölgyi R, Krekó M, Örfi L. (2019) Discovery and development of extreme selective inhibitors of the ITD and D835Y mutant FLT3 kinases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 184: 111710.
188. Cho RW, Clarke MF. (2008) Recent advances in cancer stem cells. *Current Opinion in Genetics & Development*, 18: 48-53.
189. Zhang M, Behbod F, Atkinson RL, Landis MD, Kittrell F, Edwards D, Medina D, Tsimelzon A, Hilsenbeck S, Green JE, Michalowska AM, Rosen JM. (2008) Identification of tumor-initiating cells in a p53-null mouse model of breast cancer. *Cancer Research*, 68: 4674-4682.
190. Zhou B-BS, Zhang H, Damelin M, Geles KG, Grindley JC, Dirks PB. (2009) Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8: 806-823.
191. Swinney DC, Anthony J. (2011) How were new medicines discovered? *Nature Reviews Drug Discovery*, 10: 507-519.
192. Butcher, E.C. (2007) Can Cell Systems Biology Rescue Drug Discovery? In *Systems Biology Ernst Schering Research Foundation Workshop.*, P. Bringmann, E. C. Butcher, G. Parry, and B. Weiss, eds. (Springer), pp. 153–172.
193. Bhadriraju K, Chen CS. (2002) Engineering cellular microenvironments to improve cell-based drug testing. *Drug Discovery Today*, 7: 612-620.
194. Kunkel EJ, Dea M, Ebens A, Hytopoulos E, Melrose J, Nguyen D, Ota KS, Plavec I, Wang Y, Watson SR, Butcher EC, Berg EL. (2004) An integrative biology approach for analysis of drug action in models of human vascular inflammation.



- FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 18: 1279-1281.
195. Kohoutek J, Blazek D. (2012) Cyclin K goes with Cdk12 and Cdk13. *Cell Division*, 7: 12.
  196. Malumbres M, Barbacid M. (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews. Cancer*, 9: 153-166.
  197. Satyanarayana A, Kaldis P. (2009) Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene*, 28: 2925-2939.
  198. Klebl BM, Choidas A. (2006) CDK9/cyclin T1: a host cell target for antiretroviral therapy. *Future Virology*, 1: 317-330.
  199. Asghar U, Witkiewicz AK, Turner NC, Knudsen ES. (2015) The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 14: 130-146.
  200. Guha M. (2012) Cyclin-dependent kinase inhibitors move into Phase III. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 11: 892-894.
  201. Liu N, Fang H, Li Y, Xu W. (2009) Recent research in selective cyclin-dependent kinase 4 inhibitors for anti-cancer treatment. *Current Medicinal Chemistry*, 16: 4869-4888.
  202. Gábor N. Foszfor tartalmú CDK9 kinázgátló vegyületek előállítás. 150.
  203. László DŐ. Molnár Balázsné dr. Czudor Zsófia. 148.
  204. Czudor Z, Balogh M, Bánhegyi P, Boros S, Breza N, Dobos J, Fábíán M, Horváth Z, Illyés E, Markó P, Sipos A, Szántai-Kis C, Szokol B, Órfi L. (2018) Novel compounds with potent CDK9 inhibitory activity for the treatment of myeloma. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 28: 769-773.
  205. Németh G, Greff Z, Sipos A, Varga Z, Székely R, Sebestyén M, Jászay Z, Béni S, Nemes Z, Pirat J-L, Volle J-N, Virieux D, Gyuris Á, Kelemenics K, Ay E, Minarovits J, Szathmary S, Kéri G, Orfi L. (2014) Synthesis and evaluation of phosphorus containing, specific CDK9/CycT1 inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57: 3939-3965.
  206. Németh G, Varga Z, Greff Z, Bencze G, Sipos A, Szántai-Kis C, Baska F, Gyuris A, Kelemenics K, Szathmáry Z, Minarovits J, Kéri G, Orfi L. (2011) Novel,

- selective CDK9 inhibitors for the treatment of HIV infection. *Current Medicinal Chemistry*, 18: 342-358.
207. Davis MI, Hunt JP, Herrgard S, Ciceri P, Wodicka LM, Pallares G, Hocker M, Treiber DK, Zarrinkar PP. (2011) Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nature Biotechnology*, 29: 1046-1051.
208. Madeddu L, Legros N, Devleeschouwer N, Bosman C, Piccart MJ, Leclercq G. (1988) Estrogen receptor status and estradiol sensitivity of MCF-7 cells in exponential growth phase. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 24: 385-390.
209. Mitra P, Yang R-M, Sutton J, Ramsay RG, Gonda TJ. (2016) CDK9 inhibitors selectively target estrogen receptor-positive breast cancer cells through combined inhibition of MYB and MCL-1 expression. *Oncotarget*, 7: 9069-9083.
210. Ganuza M, Sáiz-Ladera C, Cañamero M, Gómez G, Schneider R, Blasco MA, Pisano D, Paramio JM, Santamaría D, Barbacid M. (2012) Genetic inactivation of Cdk7 leads to cell cycle arrest and induces premature aging due to adult stem cell exhaustion. *The EMBO journal*, 31: 2498-2510.
211. Böskén CA, Farnung L, Hintermair C, Merzel Schachter M, Vogel-Bachmayr K, Blazek D, Anand K, Fisher RP, Eick D, Geyer M. (2014) The structure and substrate specificity of human Cdk12/Cyclin K. *Nature Communications*, 5: 3505.
212. Lam LT, Pickeral OK, Peng AC, Rosenwald A, Hurt EM, Giltneane JM, Averett LM, Zhao H, Davis RE, Sathyamoorthy M, Wahl LM, Harris ED, Mikovits JA, Monks AP, Hollingshead MG, Sausville EA, Staudt LM. (2001) Genomic-scale measurement of mRNA turnover and the mechanisms of action of the anti-cancer drug flavopiridol. *Genome Biology*, 2: RESEARCH0041.
213. Demidenko ZN, Blagosklonny MV. (2004) Flavopiridol induces p53 via initial inhibition of Mdm2 and p21 and, independently of p53, sensitizes apoptosis-reluctant cells to tumor necrosis factor. *Cancer Research*, 64: 3653-3660.
214. MacCallum DE, Melville J, Frame S, Watt K, Anderson S, Gianella-Borradori A, Lane DP, Green SR. (2005) Seliciclib (CYC202, R-Roscovotine) induces cell death in multiple myeloma cells by inhibition of RNA polymerase II-dependent transcription and down-regulation of Mcl-1. *Cancer Research*, 65: 5399-5407.

215. David-Pfeuty Trs. (1999) Potent inhibitors of cyclin-dependent kinase 2 induce nuclear accumulation of wild-type p53 and nucleolar fragmentation in human untransformed and tumor-derived cells. *Oncogene*, 18: 7409-7422.
216. Shapiro GI, Koestner DA, Matranga CB, Rollins BJ. (1999) Flavopiridol induces cell cycle arrest and p53-independent apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 5: 2925-2938.
217. Lu W, Chen L, Peng Y, Chen J. (2001) Activation of p53 by roscovitine-mediated suppression of MDM2 expression. *Oncogene*, 20: 3206-3216.
218. O'Hagan HM, Ljungman M. (2004) Nuclear accumulation of p53 following inhibition of transcription is not due to diminished levels of MDM2. *Oncogene*, 23: 5505-5512.
219. Blagosklonny MV, Darzynkiewicz Z, Figg WD. (2002) Flavopiridol inversely affects p21(WAF1/CIP1) and p53 and protects p21-sensitive cells from paclitaxel. *Cancer Biology & Therapy*, 1: 420-425.
220. Štětková M, Growková K, Fojtík P, Valčíková B, Palušová V, Verlande A, Jorda R, Kryštof V, Hejret V, Alexiou P, Rotrekl V, Uldrijan S. (2020) CDK9 activity is critical for maintaining MDM4 overexpression in tumor cells. *Cell Death & Disease*, 11: 1-14.
221. Baumli S, Lolli G, Lowe ED, Troiani S, Rusconi L, Bullock AN, Debreczeni JE, Knapp S, Johnson LN. (2008) The structure of P-TEFb (CDK9/cyclin T1), its complex with flavopiridol and regulation by phosphorylation. *The EMBO journal*, 27: 1907-1918.
222. Li Q, Price JP, Byers SA, Cheng D, Peng J, Price DH. (2005) Analysis of the large inactive P-TEFb complex indicates that it contains one 7SK molecule, a dimer of HEXIM1 or HEXIM2, and two P-TEFb molecules containing Cdk9 phosphorylated at threonine 186. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 28819-28826.
223. Ramakrishnan R, Rice AP. (2012) Cdk9 T-loop Phosphorylation is Regulated by the Calcium Signaling Pathway. *Journal of cellular physiology*, 227: 609-617.
224. Sherr CJ. (2004) Principles of Tumor Suppression. *Cell*, 116: 235-246.

225. Haider C, Grubinger M, Řezníčková E, Weiss TS, Rotheneder H, Miklos W, Berger W, Jorda R, Zatloukal M, Gucký T, Strnad M, Kryštof V, Mikulits W. (2013) Novel Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases Combat Hepatocellular Carcinoma without Inducing Chemoresistance. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12: 1947-1957.
226. Chen R, Keating MJ, Gandhi V, Plunkett W. (2005) Transcription inhibition by flavopiridol: mechanism of chronic lymphocytic leukemia cell death. *Blood*, 106: 2513-2519.
227. Chen R, Wierda WG, Chubb S, Hawtin RE, Fox JA, Keating MJ, Gandhi V, Plunkett W. (2009) Mechanism of action of SNS-032, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 113: 4637-4645.
228. Conroy A, Stockett DE, Walker D, Arkin MR, Hoch U, Fox JA, Hawtin RE. (2009) SNS-032 is a potent and selective CDK 2, 7 and 9 inhibitor that drives target modulation in patient samples. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 64: 723-732.
229. Manohar SM, Rathos MJ, Sonawane V, Rao SV, Joshi KS. (2011) Cyclin-dependent kinase inhibitor, P276-00 induces apoptosis in multiple myeloma cells by inhibition of Cdk9-T1 and RNA polymerase II-dependent transcription. *Leukemia Research*, 35: 821-830.
230. McMillin DW, Delmore J, Negri J, Buon L, Jacobs HM, Laubach J, Jakubikova J, Ooi M, Hayden P, Schlossman R, Munshi NC, Lengauer C, Richardson PG, Anderson KC, Mitsiades CS. (2011) Molecular and cellular effects of multi-targeted cyclin-dependent kinase inhibition in myeloma: biological and clinical implications. *British Journal of Haematology*, 152: 420-432.
231. Booher RN, Hatch H, Dolinski BM, Nguyen T, Harmonay L, Al-Assaad A-S, Ayers M, Nebozhyn M, Loboda A, Hirsch HA, Zhang T, Shi B, Merkel CE, Angagaw MH, Wang Y, Long BJ, Lennon XQ, Miselis N, Pucci V, Monahan JW, Lee J, Kondic AG, Im EK, Mauro D, Blanchard R, Gilliland G, Fawell SE, Zawel L, Schuller AG, Strack P. (2014) MCL1 and BCL-xL Levels in Solid Tumors Are Predictive of Dinaciclib-Induced Apoptosis. *PLOS ONE*, 9: e108371.
232. Shao H, Shi S, Foley DW, Lam F, Abbas AY, Liu X, Huang S, Jiang X, Baharin N, Fischer PM, Wang S. (2013) Synthesis, structure-activity relationship and

- biological evaluation of 2,4,5-trisubstituted pyrimidine CDK inhibitors as potential anti-tumour agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 70: 447-455.
233. Ding J, Polier G, Köhler R, Giaisi M, Krammer PH, Li-Weber M. (2012) Wogonin and related natural flavones overcome tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) protein resistance of tumors by down-regulation of c-FLIP protein and up-regulation of TRAIL receptor 2 expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 287: 641-649.
234. Ke C, Hou H, Li J, Su K, Huang C, Lin Y, Lu Z, Du Z, Tan W, Yuan Z. (2020) Extracellular Vesicle Delivery of TRAIL Eradicates Resistant Tumor Growth in Combination with CDK Inhibition by Dinaciclib. *Cancers*, 12: 1157.
235. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. (1995) A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research*, 12: 413-420.
236. Hauss DJ. (2007) Oral lipid-based formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59: 667-676.
237. Grunwald MR, Levis MJ. (2013) FLT3 inhibitors for acute myeloid leukemia: a review of their efficacy and mechanisms of resistance. *International journal of hematology*, 97: 683-694.
238. Drexler HG. (1996) Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. *Leukemia*, 10: 588-599.
239. Fletcher GC, Brokx RD, Denny TA, Hembrough TA, Plum SM, Fogler WE, Sidor CF, Bray MR. (2011) ENMD-2076 is an orally active kinase inhibitor with antiangiogenic and antiproliferative mechanisms of action. *Molecular cancer therapeutics*, 10: 126-137.
240. Foster BA, Coffey HA, Morin MJ, Rastinejad F. (1999) Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science (New York, N.Y.)*, 286: 2507-2510.
241. Zorn JA, Wang Q, Fujimura E, Barros T, Kuriyan J. (2015) Crystal structure of the FLT3 kinase domain bound to the inhibitor Quizartinib (AC220). *PloS one*, 10: e0121177.

242. Pallis M, Seedhouse C, Grundy M, Russell N. (2003) Flow cytometric measurement of phosphorylated STAT5 in AML: lack of specific association with FLT3 internal tandem duplications. *Leukemia research*, 27: 803-805.
243. Yee KWH, O'Farrell AM, Smolich BD, Cherrington JM, McMahon G, Wait CL, McGreevey LS, Griffith DJ, Heinrich MC. (2002) SU5416 and SU5614 inhibit kinase activity of wild-type and mutant FLT3 receptor tyrosine kinase. *Blood*, 100: 2941-2949.
244. Wang A, Hu C, Chen C, Liang X, Wang B, Zou F, Yu K, Li F, Liu Q, Qi Z, Wang J, Wang W, Wang L, Weisberg EL, Wang W, Li L, Ge J, Xia R, Liu J, Liu Q. (2020) Selectively targeting FLT3-ITD mutants over FLT3-wt by a novel inhibitor for acute myeloid leukemia. *Haematologica*.
245. Auclair D, Miller D, Yatsula V, Pickett W, Carter C, Chang Y, Zhang X, Wilkie D, Burd A, Shi H, Rocks S, Gedrich R, Abriola L, Vasavada H, Lynch M, Dumas J, Trail PA, Wilhelm SM. (2007) Antitumor activity of sorafenib in FLT3-driven leukemic cells. *Leukemia*, 21: 439-445.
246. Mori M, Kaneko N, Ueno Y, Yamada M, Tanaka R, Saito R, Shimada I, Mori K, Kuromitsu S. (2017) Gilteritinib, a FLT3/AXL inhibitor, shows antileukemic activity in mouse models of FLT3 mutated acute myeloid leukemia. *Investigational New Drugs*, 35: 556-565.

## 10 Publikációs jegyzék

### 10.1 Disszertációhoz kapcsolódó publikációk jegyzéke

Baska F, Sipos A, Örfi Z, Nemes Z, Dobos J, Szántai-Kis C, Szabó E, Szénási G, Dézsi L, Hamar P, Cserepes MT, Tóvári J, Garamvölgyi R, Krekó M, Örfi L. (2019) Discovery and development of extreme selective inhibitors of the ITD and D835Y mutant FLT3 kinases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 184: 111710. (IF: 5.572)

Czudor Z, Balogh M, Bánhegyi P, Boros S, Breza N, Dobos J, Fábián M, Horváth Z, Illyés E, Markó P, Sipos A, Szántai-Kis C, Szokol B, Örfi L. (2018) Novel compounds with potent CDK9 inhibitory activity for the treatment of myeloma. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 28: 769-773. (IF: 2.442)

Németh G, Greff Z, Sipos A, Varga Z, Székely R, Sebestyén M, Jászay Z, Béni S, Nemes Z, Pirat J-L, Volle J-N, Virieux D, Gyuris Á, Kelemenics K, Ay E, Minarovits J, Szathmáry S, Kéri G, Orfi L. (2014) Synthesis and evaluation of phosphorus containing, specific CDK9/CycT1 inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57: 3939-3965. (IF: 5.447)

Németh G, Varga Z, Greff Z, Bencze G, Sipos A, Szántai-Kis C, Baska F, Gyuris A, Kelemenics K, Szathmáry Z, Minarovits J, Kéri G, Orfi L. (2011) Novel, selective CDK9 inhibitors for the treatment of HIV infection. *Current Medicinal Chemistry*, 18: 342-358. (IF: 4.859)

Greff Z, Varga Z, Kéri G, Németh G, Örfi L, and Szántai-Kis C. (2015) 4-phenylamino-pyrimidine derivatives having protein kinase inhibitor activity. WO/2011/077171

Baska F, Keri G, Orfi L, Banhegyi P, Kekesi L, Zsakai L, Sipos A, Szantai-Kis C, Dobos J, and Blaauwen TD. (2015) Styryl quinazoline derivatives as pharmaceutically active agents. WO/2015/019121

## 10.2 Disszertációtól független publikációk jegyzéke

Zsákai L, Sipos A, Dobos J, Erős D, Szántai-Kis C, Bánhegyi P, Pató J, Órfi L, Matula Z, Mikala G, Kéri G, Peták I, Vályi-Nagy I. (2019) Targeted drug combination therapy design based on driver genes. *Oncotarget*, 10: 5255-5266. (IF: 0)

Garamvölgyi R, Dobos J, Sipos A, Boros S, Illyés E, Baska F, Kékesi L, Szabadkai I, Szántai-Kis C, Kéri G, 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. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 108: 623-643. (IF: 4.833)

Sipos A, Pató J, Székely R, Hartkoorn RC, Kékesi L, Órfi L, Szántai-Kis C, Mikušová K, Svetlíková Z, Korduláková J, Nagaraja V, Godbole AA, Bush N, Collin F, Maxwell A, Cole ST, Kéri G. (2015) Lead selection and characterization of antitubercular compounds using the Nested Chemical Library. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 95 Suppl 1: S200-206. (IF 2.790)

Baska F, Szabadkai I, Sipos A, Breza N, Szántai-Kis C, Kékesi L, Garamvölgyi R, Nemes Z, Baska F, Neumann L, Torka R, Ullrich A, Kéri G, Orfi L. (2014) Pharmacophore and binding analysis of known and novel B-RAF kinase inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 21: 1938-1955. (IF: 3.894)

Kékesi L, Sipos A, Németh G, Pató J, Breza N, Baska F, Órfi L, Kéri G. (2013) Synthesis and biological evaluation of novel pyrido[2,3-b]pyrazines inhibiting both erlotinib-sensitive and erlotinib-resistant cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23: 6152-6155. (IF: 2.448)



## 11 Köszönetnyilvánítás

Hálásan köszönöm Dr. Órfi Lászlónak a Vichem Kémiai Kutató Kft. Ügyvezető igazgatójának, témavezetőmnek első sorban azt, hogy lehetővé tette számomra a magas színvonalú FLT3 témájú kutatómunkába való bekapcsolódásomat, hogy tanácsokkal látott el disszertációm megírása során és hogy odafigyeléssel átnézte, javította a dolgozatomat és emberileg is támogatott az évek során.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Kéri Györgynek, néhai témavezetőmnek, hogy lehetővé tette, hogy a hallgatója legyek, kutatásaimhoz stabil háttérrel biztosított.

Őszintén köszönöm Dr. Németh Gábor volt vegyész kollégámnak, hogy a CDK9 antivirális hatóanyagfejlesztés témájú kutatási projekteken együtt dolgozhattunk, a kutatáshoz való hozzáállása, tudományos szemlélete meghatározó volt számomra.

Köszönet illeti Varga Zoltán volt vegyész kollégámat, aki a 4, 6-diszubsztituált pirimidin alapszerkezetű CDK9 gátló vegyületeket szintetizálta.

Külön köszönöm Dr. Szántai-Kis Csabának, a Vichem Kémiai Kutató Kft. biológia részlegvezetőjének, hogy a biokémiai mérések optimalizációjában segített. Hálás köszönet illeti Őt, hogy fordulhattam hozzá szakmai segítségért a disszertációm írása közben is.

Köszönöm Dr. Illyés Eszternek és Boros Sándornak a vegyületek analitikai vizsgálatait és a kiértékeléseket.

Dr. Órfi Zoltán az áramlási citometriás, valamint a kaspáz-3/7 aktivitás vizsgálatot végezte az FLT3 gátló vegyületek témájában, hálásan köszönöm a munkáját.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet volt igazgatóinak Prof. Dr. Bánhegyi Gábornak és Prof. Dr. Mandl Józsefnek, hogy helyet biztosítottak az intézetben a munkám elvégzésére.

Dr. Dancsó Andrásnak és Dr. Kövesdi Istvánnak köszönöm, hogy lehetőséget biztosítottak Dr. Baska Ferenc számára, hogy az EGIS Gyógyszergyárban a molekula-modellezést elvégezhesse.

Köszönöm Dr. Tóvári Józsefnek és kutatócsoportjának az *in vivo* kísérletek kivitelezését. Nagyon köszönöm Dr. Baska Ferenc volt gyógyszerész kollégámnak, aki az FLT3-gátló

vegyületeket szintetizálta, *in silico* dokkolásokat végezte, átnézte a dolgozatom kémiai részét és rengeteg hasznos tanácsot adott közös munkánk és a disszertáció megírása során. A hosszú évek alatt igaz Barátra leltem személyében.

Őszinte hálával tartozom Dr. Dobos Juditnak, hogy energiát és időt nem sajnálva a dolgozatomat véleményezte, motivált és mind elméleti, mind gyakorlati kérdésekben is hasznos tanácsokkal látott el.

Köszönöm közvetlen kollégáimnak Dr. Bencze Gyulának, Dr. Borbély Gábornak, Breza Nórának, Németh Beatrixnak, Dr. Székely Edina Ritának az évek alatt biztosított vidám hangulatot, segítőkészséget.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Miria Ricchettinek, hogy elindított ezen a pályán.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném kifejezni köszönetemet Kisfiának és Családomnak, hogy mindvégig mellettem álltak az évek során.

## Függelék

**13. táblázat: Az 1-181. (továbbá I-XIII. a publikáció számozását követő elnevezés, a könnyebb követhetőség miatt) anyagok FLT3-D835Y enzimre gyakorolt biológiai hatása.** Az inhibíció mértékét a 10  $\mu\text{M}$  anyagkoncentrációban mért százalékos gátlás és a meghatározott  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) értékek mutatják. Az eredmények átlagértékek és szórás adatokkal együtt vannak feltüntetve. Minden egyes  $\text{IC}_{50}$  értéket legalább 3 független kísérlet eredményei alapján határoztuk meg. Az anyagok szerkezetei a VCC azonosítószám alapján fellelhetők. Az ND (not determined) jelölés esetén a molekula az 1 pontos (10  $\mu\text{M}$ ) mérés esetén nem érte el a 75%-os gátlóértéket, ezért  $\text{IC}_{50}$  mérésre nem került kiválasztásra

VCC-ID	disszertáció ID	FLT3-D835Y 10 $\mu\text{M}$ (inh%)	FLT3-D835Y $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	SD
VCC868837	CP-31398	82	2,97	0,83
VCC553231	szunitinib	93	0,03	0,03
VCC149726	tandutinib		6,66	2,57
VCC957727	quizartinib	76	1,53	0,91
VCC843218	1	59	7,87	2,07
VCC599460	2	91	1,01	0,22
VCC037829	3	63	ND	ND
VCC066952	4	76	ND	ND
VCC473354	5	64	ND	ND
VCC883227	6	79	1,71	0,29
VCC423492	7	86	0,48	0,11
VCC430361	8	88	0,76	0,46
VCC430361	9	68	ND	ND
VCC033513	10	-8	ND	ND
VCC804409	11	-3	ND	ND
VCC350485	12 (XIII.)	81	1,07	0
VCC647772	13	34	ND	ND
VCC170116	14	-13	ND	ND
VCC612359	15	84	0,59	0,16
VCC247875	16	80	2	0,32
VCC338749	17	55	ND	ND
VCC249772	18	79	1,89	0,83

VCC764380	19	42	ND	ND
VCC376116	20 (V.)	85	0,79	0,01
VCC998933	21	80	0,75	0,08
VCC465259	22	86	0,55	0,06
VCC811647	23	76	2,17	0,43
VCC811647	24	35	ND	ND
VCC367174	25	34	ND	ND
VCC233538	26	44	ND	ND
VCC673429	27	-11	ND	ND
VCC149726	28	46	ND	ND
VCC792433	29	-8	ND	ND
VCC167409	30	1	ND	ND
VCC602169	31	-6	ND	ND
VCC420638	32	38	ND	ND
VCC210346	33	24	ND	ND
VCC210346	34	61	ND	ND
VCC357006	35	18	ND	ND
VCC174957	36	8	ND	ND
VCC340963	37	45	ND	ND
VCC340963	38	30	ND	ND
VCC450822	39	17	ND	ND
VCC416150	40	48	ND	ND
VCC514728	41	23	ND	ND
VCC361541	42	-3	ND	ND
VCC139726	43	-9	ND	ND
VCC877069	44	-11	ND	ND
VCC733676	45	24	ND	ND
VCC747453	46	10	ND	ND
VCC856931	47	-3	ND	ND
VCC223919	48	13	ND	ND
VCC494971	49	31	ND	ND
VCC754844	50	18	ND	ND
VCC377865	51	-8	ND	ND
VCC745076	52	2	ND	ND
VCC892866	53	-5	ND	ND
VCC103259	54	28	ND	ND
VCC509440	55	18	ND	ND
VCC124485	56	3	ND	ND
VCC770850	57	76	2,71	1,47
VCC808705	58	58	ND	ND
VCC567984	59	86	0,64	0,33

VCC799616	60	76	2,18	0,22
VCC633724	61	70	ND	ND
VCC469537	62	58	ND	ND
VCC586980	63	86	0,52	0,1
VCC016886	64	75	ND	ND
VCC647195	65	54	ND	ND
VCC027215	66	15	ND	ND
VCC828392	67	-7	ND	ND
VCC238603	68	15	ND	ND
VCC243206	69	1	ND	ND
VCC485702	70 (I.)	88	0,56	0,18
VCC923166	71	84	0,49	0,15
VCC682781	72	73	ND	ND
VCC592718	73	76	2,33	0,17
VCC847492	74	55	ND	ND
VCC484898	75	-7	ND	ND
VCC225205	76	1	ND	ND
VCC938609	77	86	0,02	0,01
VCC692043	78	60	ND	ND
VCC028429	80	86	0,72	0,12
VCC858945	81	85	1,36	0,24
VCC333676	82	64	ND	ND
VCC675228	83	60	ND	ND
VCC628026	84	90	0,98	0,15
VCC794245	85	56	ND	ND
VCC490798	86	88	0,38	0,11
VCC412896	87	91	0,1	0,01
VCC412896	88	80	1,13	0,3
VCC483395	89	90	0,58	0,13
VCC701055	90	75	ND	ND
VCC743494	91	72	ND	ND
VCC986749	92 (II.)	86	0,34	0,15
VCC303034	93	69	ND	ND
VCC081216	94	-11	ND	ND
VCC850225	95	51	ND	ND
VCC567093	96	88	0,67	0,1
VCC999590	97	74	ND	ND
VCC221857	980	39	ND	ND
VCC475326	991	24	ND	ND
VCC856308	100	14	ND	ND
VCC426864	101	18	ND	ND

VCC174234	102	88	0,44	0,1
VCC601549	103	76	1,37	0,32
VCC217510	104 (III.)	90	0,12	0,04
VCC344049	105	88	0,46	0,33
VCC111081	106	81	0,79	0,16
VCC636112	107	76	1,58	0,05
VCC721842	108	86	0,16	0,01
VCC438330	109	82	0,52	0,04
VCC452995	110	68	ND	ND
VCC760121	111	58	ND	ND
VCC815919	112	90	0,29	0,12
VCC284066	113	82	1,73	0,84
VCC864272	114	86	0,58	0,14
VCC447194	115	74	ND	ND
VCC957333	116	86	0,37	0,06
VCC904227	117 (VI.)	93	0,1	0,01
VCC557574	118	52	ND	ND
VCC569727	119	85	1,26	0,2
VCC224375	120	6	ND	ND
VCC497138	121	5	ND	ND
VCC789102	122	-1	ND	ND
VCC342365	123	3	ND	ND
VCC845862	124	11	ND	ND
VCC278213	125	-13	ND	ND
VCC795363	126	84	0,59	0,09
VCC627638	127	1	ND	ND
VCC282750	128 (IV.)	88	0,15	0,02
VCC957727	129	76	0,81	0,11
VCC772069	130	31	ND	ND
VCC328332	131	18	ND	ND
VCC211167	132	86	0,48	0,19
VCC137482	133	80	1,81	0,8
VCC515162	134 (VII.)	92	0,08	0,03
VCC115373	135	85	0,7	0,15
VCC492193	136	84	0,59	0,41
VCC501244	137 (XI.)	89	0,19	0,07
VCC145108	138 (XII.)	83	0,24	0,01
VCC788082	139 (VIII.)	90	0,2	0,02
VCC151908	140	86	0,37	0,01
VCC997912	141 (IX.)	90	0,03	0
VCC319860	142 (X.)	86	0,07	0

VCC559319	143	72	ND	ND
VCC844935	144	17	ND	ND
VCC830055	145	12	ND	ND
VCC844006	146	-11	ND	ND
VCC532968	147	48	6,48	0,94
VCC119091	148	-10	ND	ND
VCC203810	149	21	ND	ND
VCC017574	150	35	ND	ND
VCC219102	151	33	ND	ND
VCC170674	152	50	8,67	0,16
VCC926177	153	61	ND	ND
VCC918099	154	82	1,49	0,52
VCC834062	155	27	ND	ND
VCC142277	156	86	0	0
VCC910188	157	66	1,34	0,14
VCC681036	158	56	7,56	0,07
VCC654314	159	43	ND	ND
VCC004104	160	88	0,07	0,02
VCC911242	161	88	0,11	0,02
VCC585203	162	25	ND	ND
VCC344783	163	74	ND	ND
VCC606376	164	69	ND	ND
VCC075472	165	7	ND	ND
VCC738026	166	17	ND	ND
VCC114464	167	48	ND	ND
VCC380969	168	33	ND	ND
VCC698438	169	62	ND	ND
VCC307163	170	ND	ND	ND
VCC117500	171	ND	ND	ND
VCC076063	172	ND	0,3	0,01
VCC760219	173	ND	0,43	0,03
VCC934835	174	ND	2,16	0
VCC350543	175	ND	4,72	0,51
VCC778874	176	ND	5,78	0,39
VCC509993	177	ND	1,23	0,04
VCC318701	178	ND	1,45	0,33
VCC872633	179	ND	1,21	0,1
VCC398144	180	8	ND	ND
VCC664955	181	8	ND	ND

**14. táblázat: CPD III kezelés során mért testsúlyváltozás.** Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztunk a testúlyváltozás összehasonlítására a kezelés első és utolsó napján a kontroll és a kezelt csoportokra. A kezelés előtt (19. nap) a medián súly a kontroll csoportban 30,40 g volt, míg a kezelendő csoportban 31,70 g volt.  $U=51,5$ ;  $Z=-0,591$ ;  $p=0.554$  (2-szárnyú); a hatás nagysága ( $r=0,053$ ). A kezelés után (35. nap) a testúlyokat csökkentettük a tumorok súlyával. A medián a kontroll csoportban 31,428 g, míg a kezelt csoportban 30,231 g volt;  $U=31$ ;  $Z=-1,937$ ;  $p=0.053$  (2-szárnyú); a hatás nagysága ( $r=0,011$ ) is. Ezek alapján azt állíthatjuk, hogy nincs szignifikáns különbség a kontroll és a kezelt állatok testsúlya között.

állat szám a	kontroll csoport				III-as vegyület kezelt csoport			
	állat súlya a tumor inoculációt követő 19. napon [g]	állat súlya a tumor inoculációt követő 35. napon [g]	tumor súlya a tumor inoculációt követő 35. napon [g]	állat súlya a tumor inoculációt követő 35. napon a tumor súlya nélkül [g]	állat súlya a tumor inoculációt követő 19. napon [g]	állat súlya a tumor inoculációt követő 35. napon [g]	tumor súlya a tumor inoculációt követő 35. napon [g]	állat súlya a tumor inoculációt követő 35. napon a tumor súlya nélkül [g]
1	29,80	32,90	1,33	31,13	30,60	29,60	0,45	29,15
2	33,50	34,50	0,66	34,16	31,80	31,50	0,80	30,70
3	30,40	31,50	1,03	31,43	32,50	33,30	1,43	31,87
4	30,40	32,30	1,38	31,78	32,30	31,80	0,68	31,11
5	31,30	31,40	1,06	32,36	27,40	28,40	0,56	27,84
6	32,80	34,60	1,54	34,34	31,10	29,50	0,64	28,86
7	26,20	28,20	1,45	27,65	33,50	33,00	0,58	32,42
8	29,80	31,50	1,15	30,95	26,30	26,50	0,69	25,81
9	33,20	36,80	2,62	35,82	31,70	31,60	1,01	30,59
10	27,90	29,70	1,38	29,28	32,10	31,50	1,27	30,23
11	28,40	30,70	1,83	30,23	29,40	29,50	0,50	29,01