

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

Doktori tézisek

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

1 BEVEZETÉS

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. 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. 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. Ennek következtében a kinázok gyógyszercélpontokká váltak az elmúlt néhány évtizedben.

A CDK9 a ciklindependens-kinázok (CDK) közül a szerin/treonin-kinázok közé tartozik, aktivációjukhoz egy ún. ciklin alegységre is szükség van. A CDK9 a sejtnövekedés, sejt differenciáció, és a virális patogenezis genetikai programjaihoz szükséges RNS-ek szintézisét promotálja. 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 kaszkádon keresztül elindítja a p53-független apoptózist. Napjainkig több mint 20 CDK-inhibitor került különböző tumoros betegeknek fázis I. és II. vizsgálatokba. 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. A kezdetekben azt feltételezték, hogy a rezisztens tumorok esetén megoldást jelenthet a külső apoptotikus jelátviteli út aktiválása. A TRAIL szelektíven csak a tumoros sejtekben indít p53-független apoptózist, a normál sejtekben nem, fontos célponttá vált a gyógyszerkutatókban. Az FLT3 receptor ligandja az FLT3L citokin, mely a hematopoietikus progenitor sejtek, proliferációjában, túlélésében és differenciációjában játszik szerepet. Az FLT3-at érintő mutációk az AML betegségek 30%-ban fordulnak elő. A leggyakoribb FLT3 mutáció az internal tandem duplication elváltozás (ITD), az AML-ek negyedében van jelen, rossz prognózist jelez. A TKD-t érintő pontmutációk, amelyek a receptor aktivációs hurkát érintik, az összes AML-es megbetegedés 7%-ban, az ALL-ben 3%-ban fordul elő. A D835Y TKD pontmutáció megnövekedett protein aktivitást eredményez. Napjainkban minden AML-es páciens esetében

kötelező az FLT3 státuszának vizsgálata. Az FLT3 mutációk gyakori előfordulását, valamint prognosztikai értékét figyelembe véve az FLT3 potenciális terápiás célpontnak tekinthető AML-ban. A kezdeti első generációs FLT3-inhibitorok alkalmazása esetén tapasztalt toxicitás, szuboptimális farmakokinetikai eredmények, az off-target hatások után a klinikai vizsgálatok izgalmas eredményeket szültek.

2 CÉLKITŰZÉSEK

Célkitűzések a 4, 6-diszubsztituált pirimidin-alapszerkezetű vegyületek esetében.

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 kinázaktivitási tesztek optimalizálása és validálása.
2. Fehérjealapú biokémiai tesztek során azonosított találati molekulák hatékonyságának vizsgálata sejtes rendszerekben.
3. Biokémiai- és a sejtes tesztekben azonosított leghatékonyabb **20**-as lead vegyület szelektivitási profiljának a részletesebb meghatározása.
4. A **20**-as lead vegyület biológiai hatásmechanizmusának vizsgálata.
5. MCF7 sejtek érzékenyítése **20**-as vegyülettel CDK9-gátláson keresztül TRAIL-re.

Célkitűzések a sztiril-kinazolinok esetében.

1. Target-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. **III**-as lead vegyület szelektivitási profiljának a meghatározása.
4. MV4-11 FLT3 ITD-mutáns akut mieloid leukémia sejtvonalon a hatásmechanizmus vizsgálata.
5. Leghatékonyabb analógok gyógyszeryszerűség szempontjából fontos korai ADME paramétereinek meghatározása.
6. A lead molekula farmakokinetikai paramétereinek meghatározása és *in vivo* vizsgálata.

3 MÓDSZEREK

1. *In vitro* kináz assay - Fluoreszcencia polarizáción alapuló mérések - IMAF (Immobilized Metal Assay for Phosphochemicals)
2. High-Throughput kináz szelektivitási profil meghatározása (KINOMEscan™)
3. Lumineszcens sejtviabilitás vizsgálat
4. *In vitro* klonalitás vizsgálat
5. Apoptotikus DNS-fragmentáció meghatározása áramlásos citometriával
6. Apoptózis vizsgálata áramlási citométerrel Annexin V-FITC és propidium-jodid kettős jelölt sejteken
7. A sejtciklus vizsgálata áramlási citométerrel BrdU és propidium-jodid kettős jelöléssel
8. Kaszpáz-3/7 aktivitás mérése lumineszcens tálcateolvasóval
9. Kaszpáz-3/9 aktivitásmérés fluoreszcens tálcateolvasóval
10. Western-blot analízis
11. Egér xenograft modell
12. Farmakokinetikai vizsgálat
13. Kinetikai oldhatóság vizsgálat

14. Permeabilitás vizsgálat (PAMPA)

15. Dokkolás

4 EREDMÉNYEK

Eredmények a 4, 6-diszubsztituált pirimidin-alapszerkezetű vegyületek esetében.

A vegyületeket fluoreszcencia polarizáció alapú IMATM (Immobilized Metal Assay for Phosphochemicals) kináz assay-ben vizsgáltam. A legígéretesebb molekulák nanomólos koncentrációban gátolták a CDK9 enzimet és szelektívek CDK2- és a CDK4-enzimekkel szemben.

Proliferációs tesztekben vizsgáltuk a biokémiai kináz assay-k alapján a 4 leghatékonyabb származékot (**17**, **20**, **21** és **22**). Azt vizsgáltuk, hogy a kedvező biokémiai eredmények után a 21 tumoros sejtvonalból álló panelen is hatékonyak-e az inhibitoraink. A szériából a **20**-as számú bizonyult a leghatékonyabbnak. Drámaian csökkentette a sejtviabilitást minden sejtvonalon, a legtöbb esetben szubmikromoláris tartományban volt a meghatározott IC₅₀ érték.

A leghatékonyabbnak ítélt **20**-as vegyület szelektivitási profilját a DiscoverX cég az ún. KINOMEscan® kötődési assay-ben határozta meg. A kísérlet során 451 kinázon vizsgálták az anyag kötődését 1 μ M-os koncentrációban. Az eredmények alapján a **20**-as anyag a kinázoknak mindössze 1,5%-ához kötődött, első sorban a CDK9-hez.

A **20**-as vegyület bizonyult, a leghatékonyabb és legszelektívebb CDK9-gátlószernek, a sejtes hatást MCF7 sejteken vizsgáltuk. A **20**-as vegyülettel kezelt tumoros sejtvonalaknál az RNS-polimeráz II foszforilációjának dóziszfüggő csökkenését tapasztaltuk. Az RNSP-II gátlása is megfigyelhető, amelynek következményeként kimutattuk, az antiapoptotikus Mcl-1 protein és az Mdm-2 ubikvitin ligáz csökkent expresszióját, a tumor szuppresszor (p53) akkumulációját, valamint a CDK9 protein mennyiségének csökkenését is. A **20**-as vegyület gátolta a DNS-szintézist (S-fázis), magasabb koncentrációjú kezelőszer hatására, a G2/M fázisban akkumulálódtak a sejtek. U266 sejteket inkubáltunk **20**-as anyaggal, majd a CDK9-inhibíciót és különböző, az apoptózis folyamatában szerepet játszó proteinek expressziós szintjét vizsgáltuk. Az RNSP-II foszforilációs státusza konzisztens volt a korábbi, az MCF7 sejtvonalon végzett kísérleteink során kapott eredményekkel, amelyek szerint már 1 μ M koncentrációban is szignifikánsan csökkent a foszforilációs szint. A kezelés hatására megfigyelhető volt az Mcl-1 és a XIAP proteinek downregulációja, valamint a kaszpáz-3, -7 és -9 aktivációja és a PARP hasadása. A kaszpáz-3 és -9 aktiválódást fluorimetriás enzim-aktivitás mérőrendszerben is megvizsgáltuk, ahol dóziszfüggő kaszpázaktivitást detektáltunk. Tumoros sejtvonalakon végzett

kísérleteink bizonyították, a **20**-as lead vegyületet és a TRAIL-t alkalmazó kombinációs terápia lehetőséget nyújthat hatékony daganatterápiára. Kutatásaink eredményeiből nemzetközi szabadalmi bejelentés készült. A **20**-as vegyület jelenleg klinikai fejlesztés alatt áll.

Eredmények a sztiril-kinazolinok esetében.

A fókuszált sztiril-kinazolin alapszerkezetű vegyületeket vizsgáltam, fluoreszcencia polarizáció alapú IMAP™ kináz assay-ben. A biokémiai kináz assay-k eredményei alapján elmondhatjuk, hogy a leghatékonyabbnak ítélt inhibitorok, egyaránt nanomólos koncentrációban gátolják az FLT3-ITD és az FLT3-D835Y enzimeket, az FLT3wt vad típusú enzimen pedig nem hatnak, tehát szelektívek. A kináz assay-k (FLT3wt, FLT3-ITD és FLT3-D835Y) eredményei alapján célul tűztük ki a biokémiailag igen hatékony és szelektív inhibitorok tumorelles hatását vizsgálataát leukémia és nem leukémia humán sejtes rendszerekben. A hatóanyagok (**I-XIII.**) drámaian csökkentették a sejtviabilitást az FLT3-ITD mutációt hordozó MV4-11 sejtvonalon. Az FLT3-független K562 és U-937 leukémia sejtvonalakon a mért gátló hatás elenyésző volt, ahogy a HS-5 csontvelői stróma sejtvonalon is.

A vegyületek oldhatóságát két pH-értéken mértük HPLC-vel. A **III**-as vegyület fiziológias pH-n elfogadható oldhatóságot mutatott. A vizsgált vegyületek többsége jó penetrációs értéket mutatott, így arra a következtetésre jutunk, hogy ezeknek a származékoknak egy része passzív diffúzióval képes áthaladni a sejtmembránon. A korai preklinikai fejlesztéshez nem szükséges a vegyületek formulázása. A jobb oldhatóság és penetrációs értékek alapján a **III**-as lead vegyület szeletivitását kötődési assay-ben (KINOMEscan™) vizsgáltuk.

Mivel reprodukálható antiproliferatív hatást tudtunk kimutatni a **III**-as, **VII**-es és **IX**-es lead esetén az MV4-11 sejtvonal esetében, szerettük volna a hatásmechanizmust részletesebben vizsgálni. Az apoptózist Annexin V-FITC és propidium-jodid kettős jelölést követően vizsgáltuk. A sejteket növekvő koncentrációban kezeltük a vegyületekkel (**III. VII. IX.**), majd koncentrációfüggő indukált apoptózist muattunk ki. Az apoptotikus jelátviteli útban a kaszpáz-3 a kulcs effektor kaszpáz, így a Caspase-Glo® 3/7 Assay-t használtuk, hogy meghatározhassuk a kezelésekk indukálta kaszpáz-3/7 aktivitást. A hatás a szunitinib indukálta hatáshoz volt mérhető, így igazolta, hogy a lead molekulák dóziszfüggő apoptózist indukálnak az MV4-11 sejtvonalon.

A **III**-as számú molekulának kedvező a farmakokinetikai profilja. SCID egereket szubkután beoltottunk MV4-11 AML sejtekkel. Az inokulációt követő 19. naptól az állatokat intraperitoneálisan kezeltük 17 mg/kg dózisban a **III**-as számú molekulával 16 napon keresztül. A kontrollhoz képest a **III**-as vegyülettel kezelt állatokban a tumor térfogata 48%-kal, a tumor súlya 49%-kal kisebb maradt. Az eredmények alapján arra következtetünk, hogy a **III**-as vegyület hatékonyan gátolta a tumornövekedést, ebben a dózisban nem toxikus.

5 KÖVETKEZTETÉSEK

Következtetések a 4, 6-diszubsztituált pirimidin-alapszerkezetű vegyületek esetében.

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, mely 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 CDK9-gátláson keresztül a TRAIL-rezisztens MCF7 sejteket érzékenyíti a TRAIL-indukált apoptózisra *in vitro*.

Következtetések a sztiril-kinazolinok esetében.

1. Az újonnan szintetizált sztiril-kinazolin-származékok között olyan extrém szelektív inhibitort azonosítottam (**III**-as vegyület), amely az eddig ismert hatóanyagoktól eltérően nem csak az FLT3-kináz aktiváló (ITD), de 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.

6 SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertáció témájában megjelent közlemények.

1. Baska F, **Sipos A**, Órfi Z, Nemes Z, Dobos J, Szántai-Kis C, Szabó E, Szénási G, Dézsi L, Hamar P, Cserepes MT, Tóvári J, Garamvölgyi R, Krekó M, Órfi L. Discovery and development of extreme selective inhibitors of the ITD and D835Y mutant FLT3 kinases. *Eur J Med Chem.* 2019 Dec 15;184:111710. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.111710. Epub 2019 Oct 5. PMID: 31614258. (IF: 5,202)
2. 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. Novel compounds with potent CDK9 inhibitory activity for the treatment of myeloma. *Bioorg Med Chem Lett.* 2018 Feb 15;28(4):769-773. doi: 10.1016/j.bmcl.2018.01.002. Epub 2018 Jan 2. PMID: 29329658. (IF: 2,448)
3. Németh G, Varga Z, Greff Z, Bencze G, **Sipos A**, Szántai-Kis C, Baska F, Gyuris A, Kelemenics K, Szathmáry Z, Minárovits J, Kéri G, Orfi L. Novel, selective CDK9 inhibitors for the treatment of HIV

infection. *Curr Med Chem*. 2011;18(3):342-58. doi: 10.2174/092986711794839188. PMID: 21143121. (3,894)

4. Németh G, Greff Z, **Sipos A**, Varga Z, Székely R, Sebestyén M, Jászay Z, Béni S, Nemes Z, Pirat JL, Volle JN, Virieux D, Gyuris Á, Kelemenics K, Ay E, Minarovits J, Szathmary S, Kéri G, Orfi L. Synthesis and evaluation of phosphorus containing, specific CDK9/CycT1 inhibitors. *J Med Chem*. 2014 May 22;20(10):3939-65. doi: 10.1021/jm401742r. Epub 2014 May 2. PMID: 24742150. (IF: 6,054)

A disszertáció témájában benyújtott szabadalom:

1. Baska F, Kéri Gy, Órfi L, Bánhegyi P, Kékesi L, Zsákai L, **Sipos A**, Szántai-Kis Cs, Dobos J, den Blaauwen T. Styryl quinazoline derivatives as pharmaceutically active agents. WO/2015/019121

Disszertációtól független publikációk jegyzéke.

1. 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. Targeted drug combination therapy design based on driver genes. *Oncotarget*. 2019 Sep 3;10(51):5255-5266. doi: 10.18632/oncotarget.26985. PMID: 31523388; PMCID: PMC6731102. (IF: 0)
2. Garamvölgyi R, Dobos J, **Sipos A**, Boros S, Illyés E, Baska F, Kékesi L, Szabadkai I, Szántai-Kis C, Kéri G, Órfi L. Design and synthesis of new imidazo[1,2-a]pyridine and imidazo[1,2-a]pyrazine derivatives with antiproliferative activity against melanoma cells. *Eur J Med Chem*. 2016 Jan 27;108:623-643. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.12.001. Epub 2015 Dec 12. PMID: 26724730. (IF: 4,833)
3. **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. Lead selection and characterization of antitubercular compounds using the Nested Chemical Library. *Tuberculosis (Edinb)*.

2015 Jun;95 Suppl 1:S200-6. doi:
10.1016/j.tube.2015.02.028. Epub 2015 Feb 28. PMID:
25801335. (IF: 2,79)

4. 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. Pharmacophore and binding analysis of known and novel B-RAF kinase inhibitors. *Curr Med Chem*. 2014 Jun;21(17):1938-55. doi: 10.2174/0929867321666140304152606. PMID: 24606495. (IF: 3,894)

5. Kékesi L, **Sipos A**, Németh G, Pató J, Breza N, Baska F, Örfi L, Kéri G. Synthesis and biological evaluation of novel pyrido[2,3-b]pyrazines inhibiting both erlotinib-sensitive and erlotinib-resistant cell lines. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013 Nov 15;23(22):6152-5. doi: 10.1016/j.bmcl.2013.09.005. Epub 2013 Sep 8. PMID: 24095095. (IF: 2,448)