

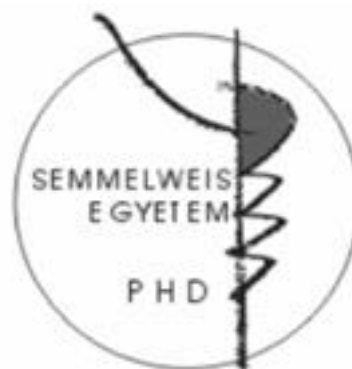
Pirido[2,3-*b*]pirazinok, mint tumorelles hatású
vegyületek, és aszimmetrikus kondenzációs
reakcióik izoméria viszonyai

Doktori tézisek

Dr. Kékesi László

Semmelweis Egyetem

Gyógyszertudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Majer Zsuzsa, egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Czompa Andrea, egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szökő Éva, egyetemi tanár, D.Sc.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Nyitrai József, egyetemi tanár, D.Sc.
Dr. Dombi György, egyetemi tanár, D.Sc.

Budapest
2014

1. Bevezetés

A modern rákkutatás egyik új irányzata, hogy a gyógyszeres kezeléssel a tumoros sejtpopuláció azon kis részhalmazát célozzuk, mely a hatékony kezelés után jelentkező problémaért, a daganat kiújulásáért felelős. A munkánk során célunk az volt, hogy olyan új hatóanyagmolekulákat állítsunk elő, amelyek daganatos betegségekben potenciálisan a rezisztenciát okozó sejteket is gátolni tudják, illetve elpusztítják. Ezt egy olyan fenotípusos előszűrő technikával közelítettük meg, melyben szerzett rezisztenciával rendelkező sejtvonalat gátló hatóanyagokat kerestünk. A megközelítés alapja az volt, hogy az érzékeny és rezisztens sejteket is gátló vegyületek rendelkezhetnek olyan hatásspektrummal, amely a megnövekedett rezisztenciával rendelkező rezisztenciát okozó sejtek gátlására is alkalmas lehet.

1.1. A célzott terápiák és a szerzett rezisztencia

A fejlett országokban jelenleg minden negyedik halálesetért a tumoros megbetegedések felelősek. A daganatok genomikai hibákra visszavezethető betegségek. Amikor egy normál sejt tumorsejtté alakul, több gén szintű változás és az irodalomban túlélési faktorként említett növekedési faktor

aktiváció következik be. A daganatterápia három fő ága a lokális sebészi és sugárterápia, illetve a szisztémás gyógyszeres kezelés, a kemoterápia. A citosztatikumok alkalmazhatóságát az adja, hogy hatásukat főként a gyorsan osztódó sejteken fejtik ki.

Ha a sejtek között vagy a sejten belül működő jeltovábbítási hálózatnak valamelyik eleme hibásan működik, a keletkező hamis jel egy jeltovábbítási kaszkádot indíthat el, ezzel a sejt patológiás működését, például kontrollálatlan sejtosztódást válthat ki. A daganatos betegségek jelentős részének hátterében jeltovábbítási problémák, pl. hamis túlélési, vagy proliferációs jelek állnak. A rendellenesen működő szabályzó elemek ellen fejlesztett hatóanyagok célzott terápiát tesznek lehetővé, hatékonyabbá téve ezzel a kezelést és csökkentve a lehetséges mellékhatások kockázatát. Ilyen túlélési faktorok jelátviteli útvonalait célzó, kis molekulájú tirozinkináz-gátlószer (TKI) a gefitinib, erlotinib, imatinib, dasatinib, lapatinib, sunitinib, sorafenib.

A gefitinib az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) tirozin kináz első szelektív gátlószere. Nem kissejtes tüdőkarinómában (NSCLC) a kezelés minden vonalában alkalmazzák olyan betegeken, akikben EGFR mutáció található. A gefitinibet az erlotinib EGFR-gátló szer követte.

Az EGFR gátlószerek hatékonyak az érzékenyítő mutációt hordozó NSCLC sejteken, de nem hatékonyak a vad típusú EGFR-t tartalmazókon. Az EGFR TKI-okat széles körűen alkalmazzák NSCLC-ben. Az EGFR aktiváló mutációit tartalmazó daganatok jól reagálnak ezekre a szerekre. Irodalomból és a klinikai gyakorlatból egyaránt ismert probléma a hatékony gefitinib vagy erlotinib kezelés utáni visszaesés, avagy a szerzett rezisztencia. Ez sokféle mechanizmussal megtörténhet. A betegek 50-60 %-ában ez a rezisztencia az EGFR-ben történő T790M úgynevezett „gatekeeper” mutációjával valósul meg. Az egyik, rezisztenciához kapcsolódóan gyakran vizsgált sejtvonal a humán NSCLC PC9 sejtvonal.

A szerzett rezisztencia hátterében az a jelenség állhat, hogy a tumorsejtek egy kis hányada mindig túléli a kezelést, és ezért rezisztens kiújulást vagy áttétet okozhat. Ezen sejtek több daganatos átalakuláshoz szükséges túlélési faktort fejeznek ki (expresszálnak), és védettebbek, mint a terápiára érzékeny tumorsejtek, ami a teljes gyógyuláshoz vezető terápiát meghiúsítja. Ezáltal alkalmazkodhatnak és túlélhetik még a sugárterápiát vagy a kemoterápiát, megfelelő körülmények között kiújulást okozva. Ha a daganatsejt populációnak meghatározott mutációja vagy génamplifikációja van, az első

generációs tumor nagy része a meghatározó (driving force) mutációt célzó gátló hatóanyagokkal eltávolítható. Ezt követően azonban egy második generációs populáció nőhet ki, amelyet egy eddig nem gátolt jelátviteli út vezérel. Ezeket a jeleket együtt, egyszerre kell gátolnunk, hogy eltávolítsuk az első kezelésre rezisztens sejteket. Mivel a normál szöveti sejtek nem függenek ezektől a jelektől, szelektív módon túlélhetik a kezelést.

1.2. A rezisztenciáért felelős, tumor-iniciáló sejtek (daganat őssejtek)

A kemoterápiás kezelés során jelenleg a probléma általában nem csak a hatóanyagra adott elsődleges válasz hiányában van, hanem jelentős problémát okoz a hatékony kezelés utáni visszaesés vagy a tumor kiújulása, amiben az úgynevezett tumor-iniciáló sejteknek (TIS; tumor-initiating cells) kritikus szerepet tulajdonítanak. Az irodalom tumor őssejteknek (cancer stem cells; CSCs), vagy rezisztenciáért felelős sejteknek is említi őket. A klinikai fejlesztés során a tumort legnagyobb mértékben csökkentő szereket részesítették előnyben. Ez a módszer azonban figyelmen kívül hagyja, hogy ezeket a kezeléseket leginkább épp a tumor-iniciáló sejtek élik túl. Ezek a daganatsejtek tumorképződést indítanak, iniciálnak,

azáltal, hogy önmegújításon és elköteleződésen mennek keresztül, hasonlóképpen, mint a normál őssejtek. Az így keletkező gyorsan osztódó, érett daganatsejtek nem rendelkeznek ezekkel a tulajdonságokkal. Jellemzőjük az önmegújítás, nem pedig a magas a proliferációs képesség.

Az érett daganatsejtekkel ellentétben ezen sejteknek magas a kolonizáló képességük. Immunszupprimált egerekbe emberi daganatszövetből származó sejtszuspenziót injektálva ezen sejtek nagyobb arányban képesek a kolonizációra illetve tumorképzésre.

A 90-es évek közepén John Dick és munkatársai beazonosítottak egy lehetséges daganatőssejt hierarchiát, ami követte a normál haematopoetikus őssejt hierarchiáját.

A leukémiában kimutatott hierarchikus szerveződés mintájára hasonló modelleket vizsgáltak szolid tumorokban is, TIS-ekkel a hierarchia tetején. (emlőtumor, agydaganat, vastagbélrák, melanóma, hasnyálmirigy-, prosztatata-, petefészek-, máj-, tüdő-, gyomorrák, fej-, nyak rák, mesenchymalis sejtek).

A tumor-iniciáló sejtek azonosítására több marker alkalmazása ismeretes. Ilyen markerek: CD133 glikoprotein, CD44 antigén, aldehyd dehidrogenáz-1 (ALDH1) enzim, ABCB1 és ABCG2 transzporterek, BMI1 onkogén.

A citotoxikus ágensek vagy ionizáló sugárzás hatásossága gyakran a belső vagy szerzett rezisztencia függvénye. A TIS-ek rezisztenciáját szabályozó jelátviteli utak terápiás célpontul szolgálhatnak. Az irodalomban eddig leírt önreprodukáló jelátviteli utak közé tartoznak: Wnt, Hedgehog útvonal, Notch útvonal, BMI1, PTEN, BMP, TGF- β . A sejtfelszíni markerek (CD133⁺) alapján kiválogatott rezisztenciát okozó sejtek Akt kináz gátlásának hatására nagyobb érzékenységet mutatnak, csökken a migrációs és inváziós készségük és ezek sejtek proliferációja és túlélése az Akt kináz aktivációjához köthető.

2. Célkitűzések

A munka során új, szabadalmaztatható gyógyszerhatóanyag-molekulák előállításán dolgoztunk. Célunk az volt, hogy olyan szerkezeteket találjunk, amelyek daganatos betegségekben potenciálisan rezisztenciát okozó sejteket is gátolnak. Ezt egy olyan előszűrő technikával közelítettük meg, melyben szerzett rezisztenciával rendelkező sejtvonalat gátló hatóanyagokat kerestünk. Néhány ígéretes molekulát a rezisztencia-okozó sejtek gátlásának modellezésére használt klonalitás tesztben vizsgáltunk.

Előállítottuk a hatékonynak bizonyuló pirido[2,3-*b*]pirazin alapszerkezet számos származékát. A szintézis során az alapszerkezet két féle regioizomerjének keletkezésére van mód. Célunk volt a kívánt, biológiai hatással rendelkező származék szerkezetének igazolása, és a reakció szelektivitásának optimalizálása.

3. Módszerek

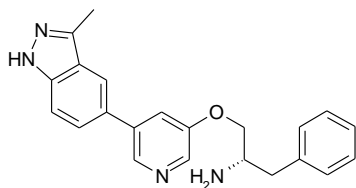
3.1. Biológiai módszerek

Az előszűrés során *in vitro* modellben szerzett rezisztenciával rendelkező sejtvonalat gátló hatóanyagokat kerestünk. Olyan anyagokat tehát, melyek nem csupán erlotinib-érzékeny, de az erlotinib rezisztenciáért felelős, szerzett EGFR mutációt tartalmazó NSCLC sejtvonalon is hatnak. Fenotípusos szűrés során PC9 sejtvonalat és PC9-ER erlotinib-rezisztens variánsát használtuk.

3.2. Az Akt1 kinázgátló hatású referenciaanyagok előállítása

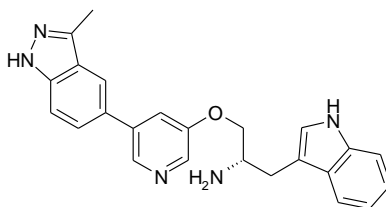
Vegyülettárunk részeként, referencia anyagnak, előállítottam három, irodalomból már ismert kinázgátló hatású vegyületet. A vegyületeket ismert Akt1 kinázgátló hatásuk miatt választottuk ki. Az A-674563 (1), A-443654 (2) 2,3,7-

tri(2-tienil)pirido[2,3-*b*]pirazint (3) vegyületeket (1. ábra) irodalmi módszer alapján állítottam elő.



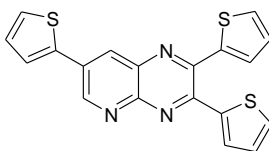
A-674563

1



A-443654

2

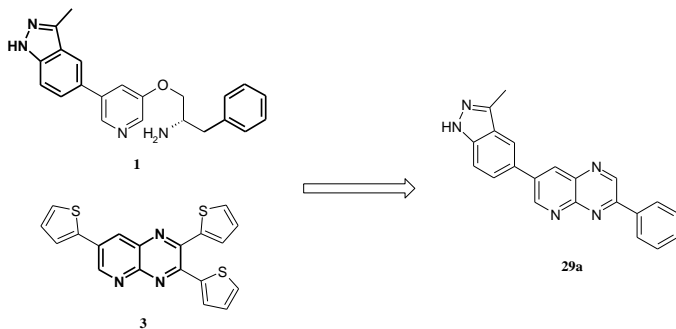


3

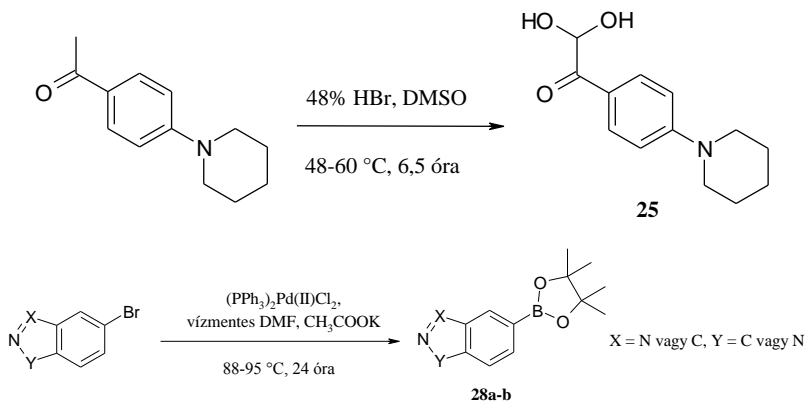
1. ábra. Akt1 kinázgátló hatású referenciaanyagok

3.3. Az ismert anyagok szerkezetének kombinálása új származékok tervezéséhez, és fókuszált vegyülettár előállítása az új szerkezet köré

Az **1** és a **3** vegyület szerkezetét kombinálva új típusú vegyületet terveztem (**29a**) (2. ábra). Ezen szerkezet szubsztituenseit változtatva fókuszált vegyülettárat állítottam elő (3. ábra).



2. ábra. Új szerkezet származtatása ismert Akt kinázgátló anyagok szerkezetéből.



II. 3-as helyzetű fenil-csoport cseréje heteroaromás-gyűrűkre, illetve szubsztituált fenil-csoportra; továbbá lehet szubsztituátlan a 3-as pozíció;

III. 7-es helyzetű metilindazol gyűrű helyettesítése más aromás és heteroaromás gyűrűkkel.

Az alapszerkezetet a felsorolt pontokon módosítva vizsgáltuk annak hatását a biológiai eredményekre. A legjobb hatású származékokat kiválasztottam, és ezek szerkezetét vettem alapul a következő módosításhoz. Ilyen iterációs ciklusokon keresztül jutottam a leghatékonyabb származékokhoz.

4. Eredmények

4.1. PC9, PC9-ER sejtek osztódásának gátlása

Az erlotinib EC_{50} értéke az általunk használt rendszerben $0,005 \mu\text{M}$ volt a PC9 sejtvonalon és $5,65 \mu\text{M}$ PC9-ER sejtvonalon. Meghatároztuk továbbá a két referencia vegyület EC_{50} értékét (A-674563: PC9 - $0,91 \mu\text{M}$, PC9-ER - $5,65 \mu\text{M}$; **3**: PC9- $>30 \mu\text{M}$, PC9-ER - $15,64 \mu\text{M}$).

A legjobb hatású vegyület 2-es helyzetben szubsztituátlan, 3-as helyzetben 2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il csoportot, 7-es helyzetben pedig 1*H*-indol-5-il csoportot tartalmaz (**33m**, EC_{50} PC9: $0,09 \mu\text{M}$; PC9-ER: $0,15 \mu\text{M}$).

Szerkezet-hatás összefüggés

A biológiai hatásért felelős szerkezeti elemek:

a) a pirido[2,3-*b*]pirazin alapváz 2-es pozíciója szubsztituátlan;

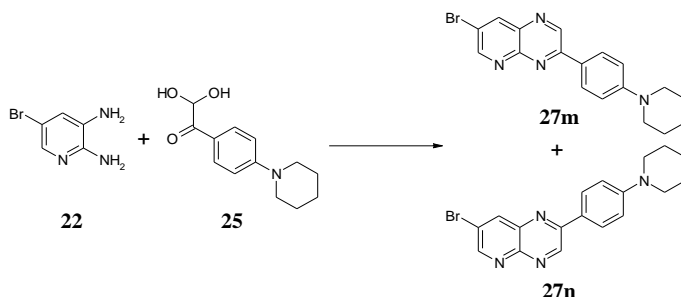
b) 7-es helyzetben lévő szubsztituens 4-indolil, 5-indolil vagy 5-indazolil heteroaromás gyűrű, aminek az 1-es pozícióban lévő nitrogénje szubsztituátlan, tehát a megfelelő pozícióban lévő NH esszenciális;

c) a 3-as pozícióban a vizsgáltak közül a legjobb hatással a **33m** vegyületben található 2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il-csoport rendelkezik. A 3-as helyzet szubsztituátlanlansága és a vízdoldhatóság javítása céljából a 3-fenil-csoportra bevitt oldalláncok rontottak a hatáson.

4.2. A kondenzációs reakció regioizomériájának vizsgálata, szelektivitásának optimalizálása és a regioizomerek azonosítása

A felállított szerkezet-hatás összefüggésből kiderült, hogy a hatást jelentősen befolyásolja, hogy a pirido[2,3-*b*]pirazin alapváz pirazin gyűrűje 2-es, 3-as vagy mindkét pozícióban szubsztituált-e. A reakciókörülményeket úgy optimalizáltuk, hogy szelektíven a kívánt izomer keletkezzen.

A **22** diamin- és **25** dioxo-vegyület kondenzációjában a keletkező két izomer (7-bróm-2- vagy 3-[4-(piperidin-1-il)fenil]pirido[2,3-*b*]pirazin) katalizátor nélkül, szobahőmérsékleten összemérhető mennyiségben keletkezett (4. ábra), így az ezek arányát befolyásoló tényezők szignifikánsan vizsgálhatóak voltak. Az izoméria viszonyokat LCMS mérés segítségével követtük.



4. ábra. A vizsgált kondenzációban két féle regioizomer keletkezésére van lehetőség.

A hőmérséklet hatása a regio szelektivitásra

Az oldatban végzett reakciók szokásosan alkalmazott reakcióhőmérséklet-tartományában végeztem a vizsgálatokat: -25 °C, 0 °C, szobahőmérséklet (22 °C), 70 °C és 120 °C. A szelektivitás a hőmérséklet csökkentésével nőtt.

70 és 120 °C-on bomlástermékek megjelenése volt tapasztalható. Analitikai vizsgálatok alapján kiderül, hogy **25**

kiindulási anyag bomlásterméke (2,5 óra, 70 °C) a 4-(piperidin-1-il)benzoesav (**39**) volt.

Szobahőmérsékleten a reakció teljes lejátszódása előtt a kondenzáció vízeliminációt megelőző köztiterméke volt azonosítható a kromatogramon.

0 °C-on a szelektivitás nőtt, de a reakciósebesség jelentősen csökkent. Tovább csökkentve a hőmérsékletet, -25 °C-on a reakció 60 nap után gyakorlatilag megállt.

A sav-bázis katalízis hatása a regio szelektivitásra

A sav és bázis katalízis szelektivitásra gyakorolt hatását DMF oldatban vizsgáltam. 10 % DBU a **25** dioxo-vegyület részleges bomlását okozta. A korábban beazonosított **39** bomlástermék mellett az oxo(4-piperidin-1-ilfenil)ecetsav (**40**) megjelent.

Öt ekvivalens ecetsav a **27m:27n** izomer arányt 58:42-ről 70:30-ra változtatta. Ezután az oldószert lecserélve a reakciót ecetsavban végeztem. Még magasabb szelektivitás volt elérhető erősebb sav – TFE oldószerként való használatkor. Nem csak a szelektivitás volt növelhető a savas oldószerek alkalmazásával, de a reakcióidő is lecsökkent. A DMF-fel hígított THE oldószerben a szelektivitás csökkent.

Az előbbiek értelmében az alacsonyabb hőmérséklet növeli a szelektivitást, ezért vizsgáltam az izomerek arányát TFE-ben, 0 °C-on. **27m:27n** 98:2-nek adódott.

A regioizomerek azonosítása

A regioizomerek jellemzése HPLC retenciós idejükkal és az NMR spektrumaikkal történt. Tömegspektrometriás fragmenseikben és az UV spektrumaikban nem mutatkozott szignifikáns különbség. **27m** izomer szerkezetét röntgen kristallográfiával is bizonyítottuk.

4.3. Klonalitás vizsgálat

Hét vegyületet, melyek mind a PC9, mind a PC9-ER sejtvonalakon jó hatást mutattak, klonalitás tesztben vizsgáltuk HCC827 EGRF mutációt tartalmazó sejtvonalon. Kontrollként a gefitinibet használtuk. A mérés eredményeképpen azt találtuk, hogy a kontrollként használt, klinikumban alkalmazott EGFR gátló gefitinibhez képest (23,08 %) a **33r** (4,14 %) és **33a** (3,32 %) vegyületek közel egy nagyságrenddel kevesebb túlélő, klónképzésre alkalmas, rezisztens sejtet eredményeztek a kezelés után.

4.4. Az előállított származékok Akt1, EGFR kináz-gátlása és kináz-gátló profilja

A két tumoros sejtvonal EGFR mutáns sejtvonal volt, a kiindulási molekulánk pedig két Akt1 gátló hatású vegyület származéka. Néhány fontosabb vegyületet megvizsgáltunk vad típusú, L858R és L858R/T790M mutáns EGFR biokémiai tesztekben, Akt1 kinázon, továbbá a **33a** vegyület széles körű kináz profilja is fel lett tárva. A rezisztenssé váló sejtek gátlásának hatásmechanizmusa nem ezen enzimek gátlásán keresztül valósul meg. A hatásmechanizmus felderítése további kutatási munkát igényel.

5. Következtetések

Az értekezésben bemutatott eredmények alapján a következő megállapításokat tehetjük:

1. Előállítottam az A-674563, az A-443654 jelű Akt1-gátló hatású anyagot, a 2,3,7-tri(2-tienil)pirido[2,3-*b*]pirazin Akt-gátló hatású anyagot, és ezek szerkezetének kombinálásából a 7-(3-metil-1*H*-indazol-5-il)-3-fenilpirido[2,3-*b*]pirazint. Ennek szubsztituenseit az alapgyűrű 2, 3 és 7 pozícióiban változtattam. A szintetikus munka során előállítottam összesen hatvanhárom darab új molekulát.

2. A vegyületek biológiai hatásossága alapján — erlotinib-érzékeny és -rezisztens PC9 sejtek gátlása — öt fejlesztési ciklusban határoztam meg szerkezet-hatás összefüggést. A hatásért felelős szerkezeti feltételek: a) a pirido[2,3-*b*]pirazin alapváz 2-es pozíciójában hidrogénatom legyen; b) a 3-es pozícióban lévő szubsztituensek közül a legjobb hatással a 2,3-dihidro-1,4-benzodioxinil rendelkezik a vizsgáltak közül; c) a 7-es pozícióban a nitrogén tartalmú, 4' és 5'-ös helyzetben kapcsolódó, 1'-es helyzetben szubsztituálatlan, [5+6] tagú heterociklusos gyűrűk (indol, indazol) voltak hatásosak.
3. Vízoldhatóság javítása céljából bázikus oldallánccal rendelkező származékot is előállítottam, ám ezek némileg csökkentették a vegyületek hatásosságát. Az alifás amint tartalmazó származékok vízoldhatósága javult a **31n** kiindulási vegyülethez képest.
4. A regioizomereket eredményező kondenzációs lépésben a jobb biológiai hatású izomer köztiterméke szelektíven előállítható 0 °C-os, TFE-s oldatban. A savas közeg a szelektivitás mellett a reakció sebességét is növeli. A regioizomerek szerkezetét NMR és röntgenkristallográfiával egyértelműen igazoltunk

5. A legjobb hatású vegyület **33m** vegyület nagyságrendileg ugyanolyan mértékben gátolta az erlotinib-érzékeny sejtvonalat, mint az erlotinib, de az erlotinib-rezisztens sejtvonalat több, mint 30-szoros mértékben. Ez alapján kijelenthetjük, hogy sikerült olyan anyagot találnunk, amely az erlotinib-érzékeny és az erlotinibre-rezisztensé váló sejtvonalak gátlására egyaránt alkalmas.
6. Klonalitás tesztben azt vizsgáltuk, hogy a szerzett rezisztenciával rendelkező sejteket gátló anyagok milyen mértékben képesek gátolni a HCC827, EGFR mutációt tartalmazó sejteket. A legjobb anyagok a gefitinibhez képest közel egy nagyságrenddel hatásosabbnak bizonyultak a klónképző sejtek számának visszaszorítására.

A doktori munkám során feltárt szerkezet-hatás összefüggés, a molekulák biológiai hatékonysága és a szintézis során problémaként fellépő regioszelektivitás optimalizálása lehetővé teszi, hogy ezen szubmikromólos gátlószerkezetek ígéretes lehetőséget nyújtsanak új tumorellenes gyógyszerek kifejlesztéséhez.

6. Saját publikációk jegyzéke

Kékesi L, Sipos A, Németh G, Pató J, Kéri Gy, Órfi L. Pyridopyrazines as anticancer agents. WO2014106763 számú nemzetközi szabadalmi bejelentés. (2014 Január 7.)

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. *Bioorg Med Chem Lett*, 23(22): 6152-6155. doi szám: 10.1016/j.bmcl.2013.09.005.

Kékesi L, Dancsó A, Illyés E, Boros S, Pató J, Greff Z, Németh G, Garamvölgyi R, Baska F, Órfi L, Kéri Gy. (2014) Preparation of pyrido[2,3-*b*]pyrazine ring system via regioselective condensation reaction. *Lett in Org Chem*, 11(9): 651-656. doi szám: 10.2174/1570178611666140606205028.

Baska F, Szabadkai I, Sipos A, Breza N, Szántai-Kis Cs, Kékesi L., Garamvölgyi R, Nemes Z., Baska F, Neumann L, Torka R, Ullrich A, Kéri Gy, Órfi L. (2014) Pharmacophore and binding analysis of known and novel B-RAF kinase inhibitors. *Curr Med Chem*, 21(17): 1938-1965. doi szám: 10.2174/0929867321666140304152606.