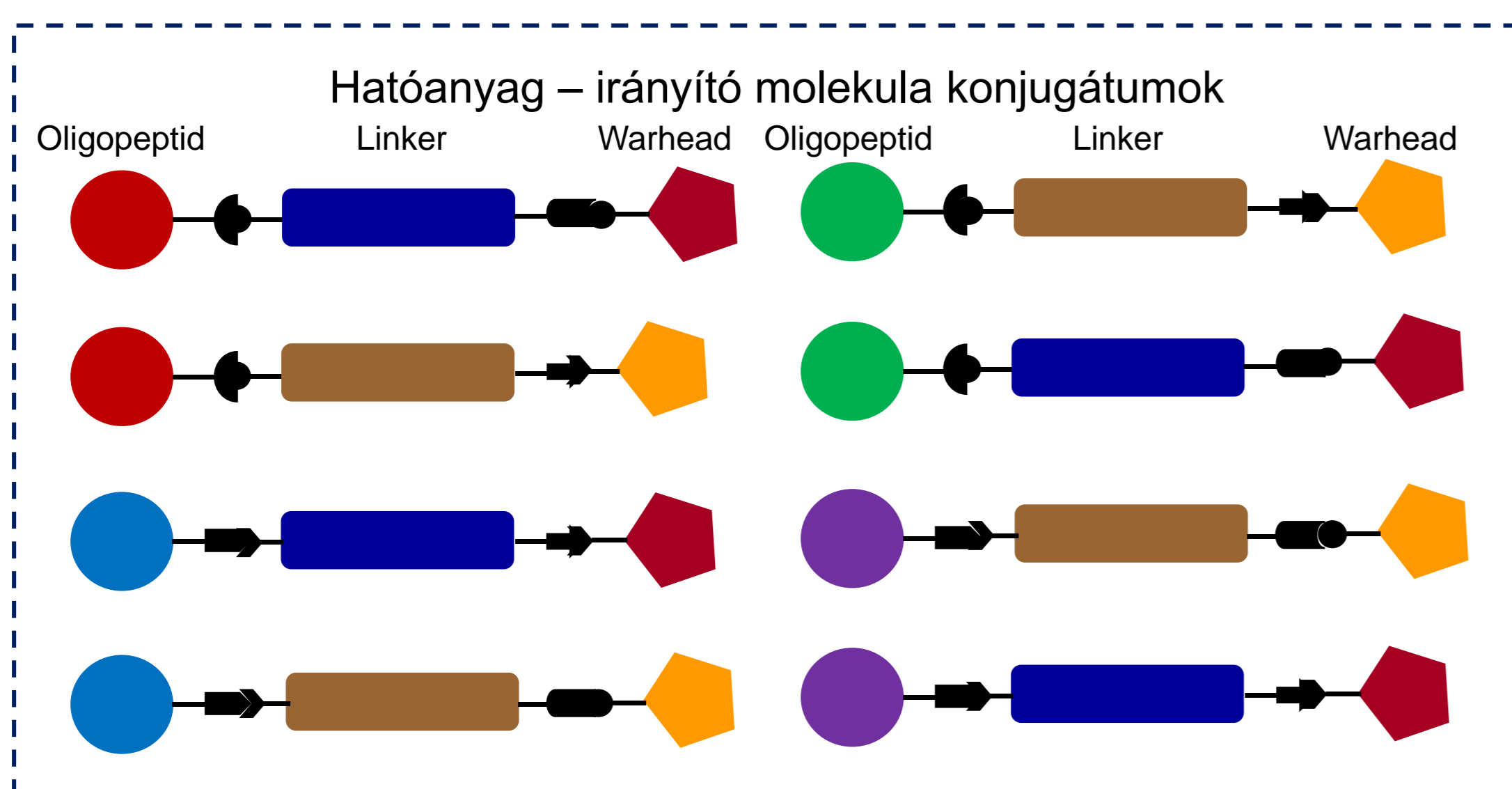


ÚJ, CÉLZÓ PEPTIDEKKEL KONJUGÁLHATÓ, APOPTÓZIST KIVÁLTÓ, UN. "WARHEAD" MOLEKULÁK TERVEZÉSE ÉS ELŐÁLLÍTÁSA TUMOROK SZELEKTÍV KEZELÉSÉRE

Bertók Béla^a, Dormán György^b, Magyar Csaba^c, Kőhidai László^d, Láng Orsolya^d, Mező Gábor^e

^a ComInnex Zrt., 1031 Budapest, Záhony utca 7. ^b Innostudio Zrt., 1031 Budapest, Záhony utca 7. ^c Magyar Tudományos Akadémia Természettudományi Kutatóközpont Enzimológiai Intézet, 1117 Budapest, Magyar Tudósok Körútja 2. ^d Semmelweis Egyetem, 1085 Budapest, Üllői út 26. ^e Eötvös Loránd Tudomány Egyetem, MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport, 1117 Budapest Pázmány Péter stny 1/A. bela.bertok@cominnex.com

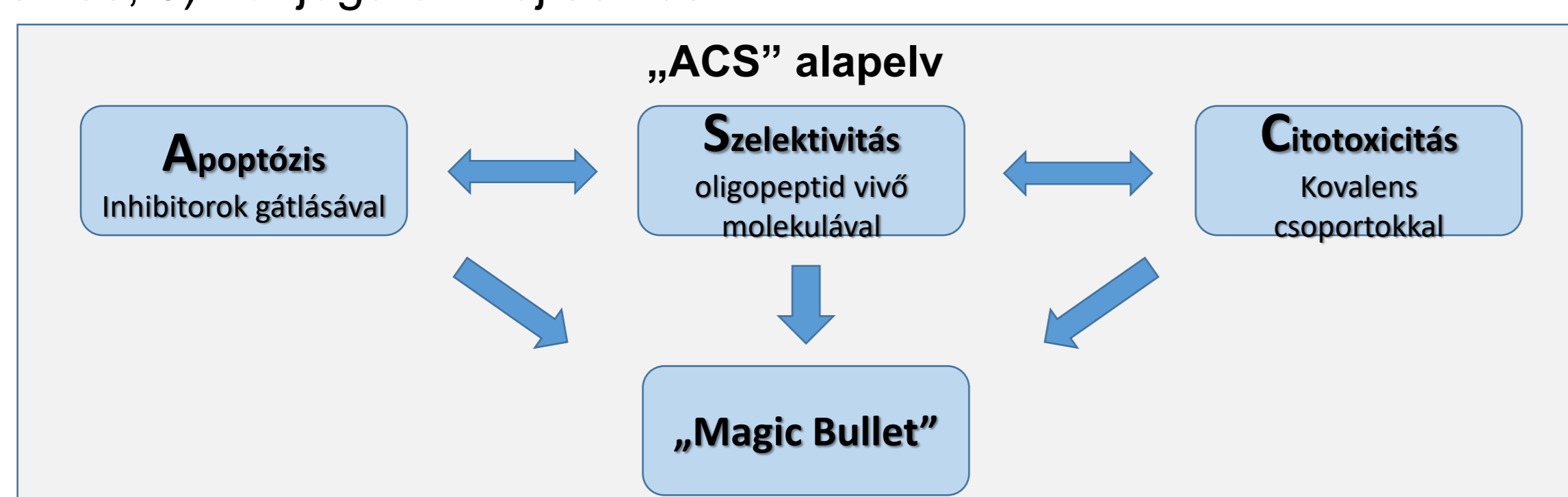
Bevezetés Magyarországon a második vezető halálok a rák. Annak ellenére, hogy egyes daganat fajtákra már vannak bevált gyógymódok, több típus változatlanul nem, vagy csak kis hatékonysággal kezelhető. A Nemzeti Kutatási és Fejlesztési Innovációs Hivatal által támogatott NVKP16-1-2016-0036 pályázat keretében kutatási konzorcium alakult¹, melynek célja ezekre a tumor típusokra új gyógyszerjelöltek kifejlesztése. A kemoterápiás kezelések egyik nagy problémája az alacsony szelektivitás és a nekrotikus folyamatok kiváltása, ami az elviselhetőség és a mellékhatások miatt is korlátot jelent a sikeres terápiaiban. Ebben jelentős áttörést hozhat az apoptózison alapuló célzott tumorterápia. A konzorcium célja olyan új hatóanyag-oligopeptid konjugátumok kifejlesztése, amelyek 3 egységből állnak: 1) anti-tumor hatóanyagok (warhead-ek): amelyek a tumor növekedést gátolják, 2) Linkerek (összekötő kapcsok vagy hidak): amik a hatóanyag adott helyen történő felszabadulásában játszanak szerepet, 3) Irányító molekulák (oligopeptidek): amik a receptor felismerésen és szelektív kötődésen keresztül célba juttatják az anyagot. Ezek kombinációjával eredeti, új generációs tumor gyógyszerek nyerhetők². (1. ábra)



1. ábra

Cél A comInnex feladata a konzorciumon belül új, antiproliferatív hatású, várhatóan apoptózist kiváltó (warhead) molekulák tervezése és előállítása, melyek önmagukban vagy peptid-konjugátumok részeként alkalmasak lehetnek a célzott tumorterápiára.

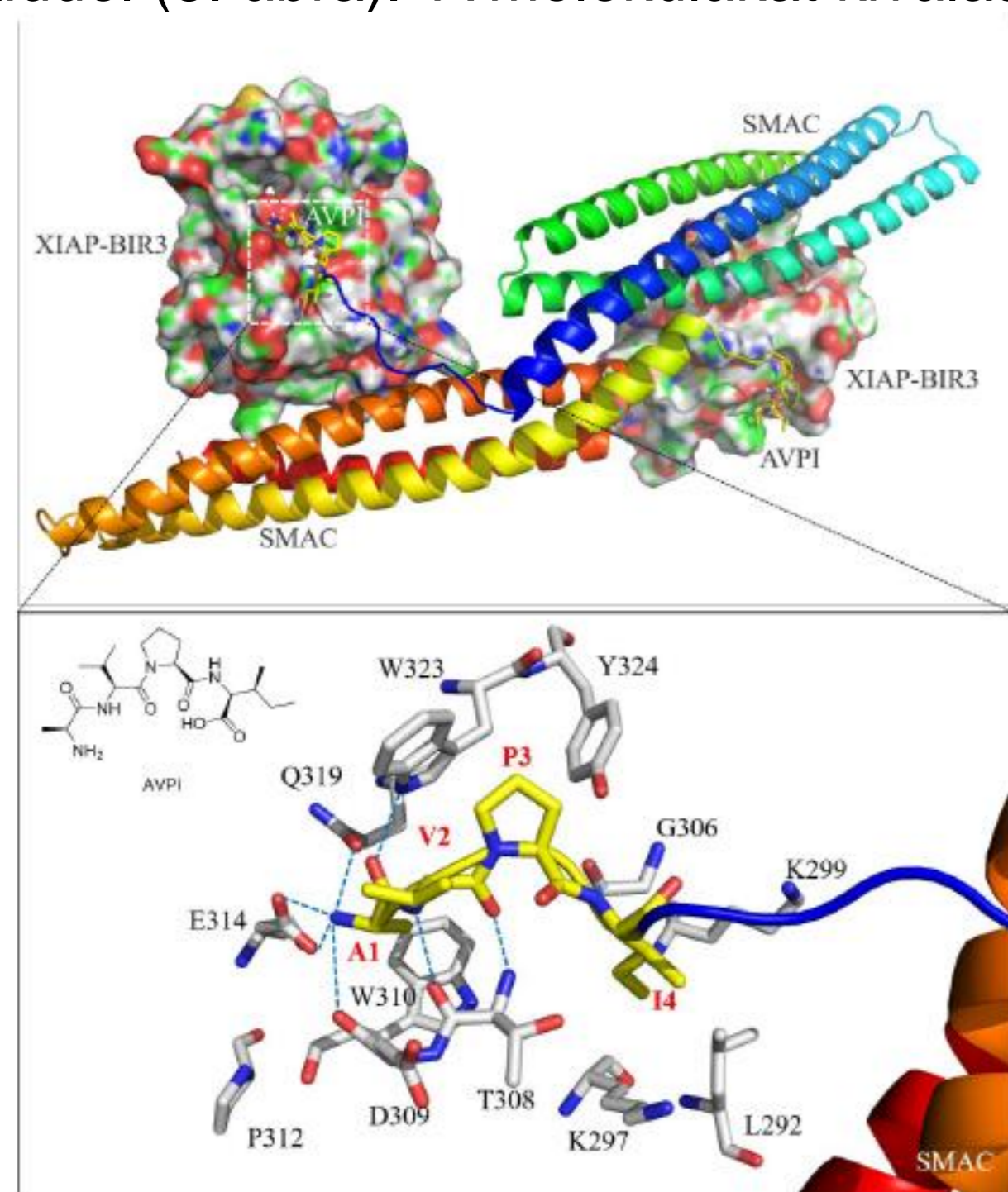
Stratégia hármass hatású „Magic Bullet” kifejlesztése. A rákos sejtekben jellemzően magas koncentrációban vannak jelen az apoptózist gátló fehérjék³. Emiatt a daganatok nem, vagy nehezen kezelhetők. Az apoptózis egy természetes folyamat amin keresztül a szervezet észrevétlenül eltávolítja és újrahasznosítja a hibás sejteket. A hatékony kezelés alapja az apoptotikus folyamat helyreállítása, aminek feltétele a megfelelő szelektivitás. Stratégiánk ennek megfelelően olyan molekulák előállítása, amelyek egyszerre három feltételt is teljesítenek: az apoptózis gátlást semlegesítik, citotoxikusak és vívő molekulákkal szelektíven célba juttathatók. Ez röviden az „ACS” alapelv teljesítéseként jellemezhető (2. ábra). A fejlesztési folyamatunk 3 fő lépést tartalmaz: 1) Diverz, potenciálisan citotoxikus könyvtárak szűrése rákos sejtvonalakon, 2) hit to lead fejlesztés, 3) konjugátum fejlesztés.



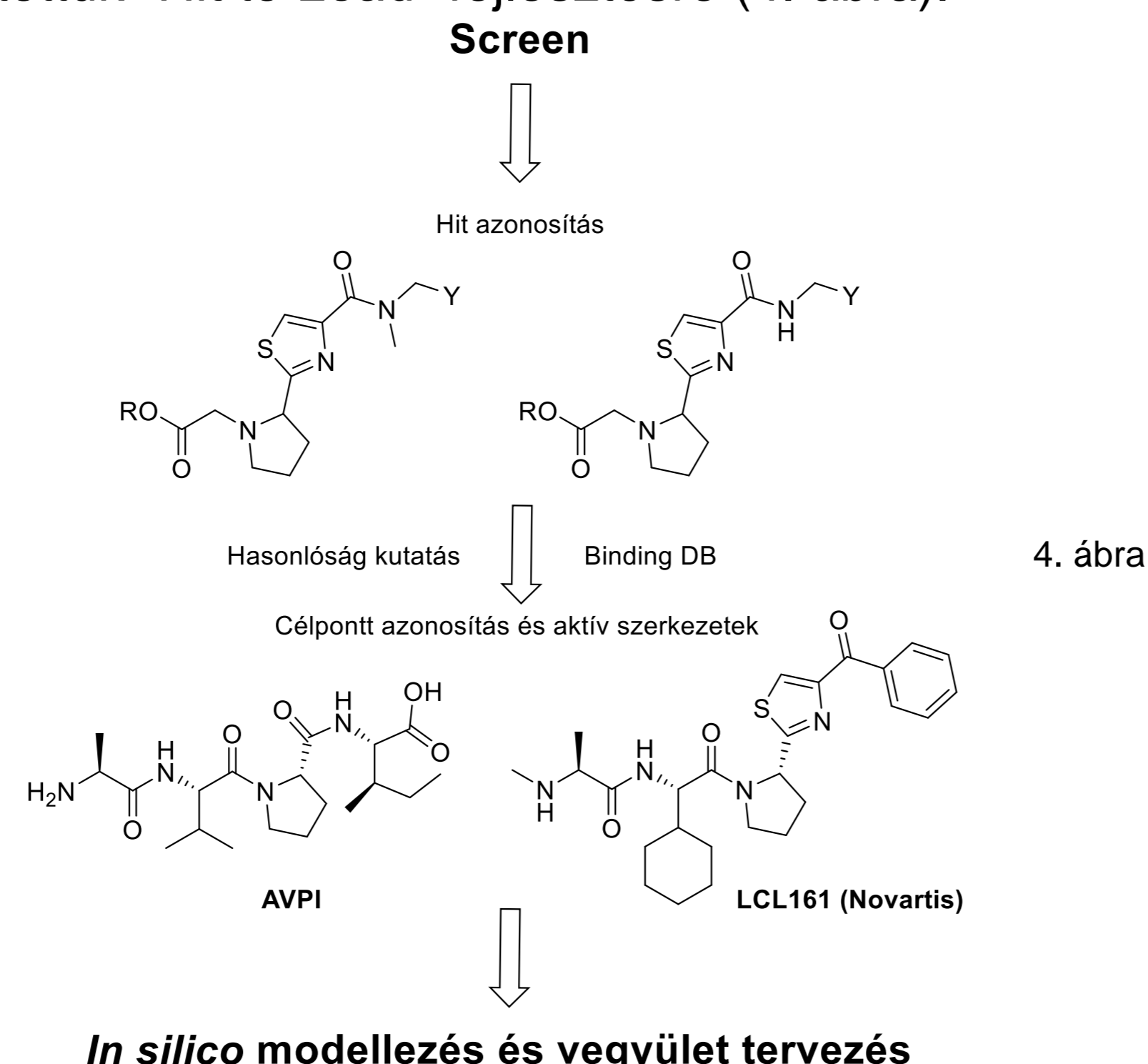
2. ábra

Diverz, potenciálisan citotoxikus könyvtárak in vitro szűrése, tumorspecifikus fehérjék azonosítása. 250 vegyület közül impedancia mérésen ill. AlamarBlue vitális festésen alapuló antiproliferációs tesztekben 6 molekulacsoport is hatást mutatott. Azokat, melyek több sejtvonalon (PANC1, A2058, Colo205, EBC1 ill. MiaPaCa), 10^{-4} mólós koncentrációban is aktívnak mutatkoztak tovább elemeztük. A hatásos vegyületek közül, biokémiai adatbázisok hasonlósági kutatása alapján, az egyik szerkezetnél valószínűsíthetően lehetett, hogy apoptózis kiváltásával az XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) célponton hat.

XIAP antagonisták. Az anti-apoptotikus fehérjék gátolják az aktiválódott kaspázokat. Ezek közül is az egyik legfontosabb az X-kromoszoma kapcsolt apoptózis-gátló fehérje (X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP vagy IAP). Az IAP v. XIAP antagonisták –mint pl. az SMAC (second mitochondria-derived activator of caspases)/DIABLO (direct IAP-binding protein with low pI)- az XIAP fehérjék közvetítette kaspáz gátlást függesztik fel⁴. Az elmúlt években 7 S₂MAC mimetikum kismolekulát fejlesztettek ki, amelyek közül több klinikai kipróbálása már elindult. Közülük a Novartis LCL161 molekulája a klinika fázis II. eredmények szerint igen ígéretes. Hit molekuláink nagy hasonlóságot mutattak a természetes S₂MAC kötő motívummal az AVPI tetrapeptiddel (3. ábra). A molekulákat kiválasztottuk „Hit to Lead” fejlesztésre (4. ábra).

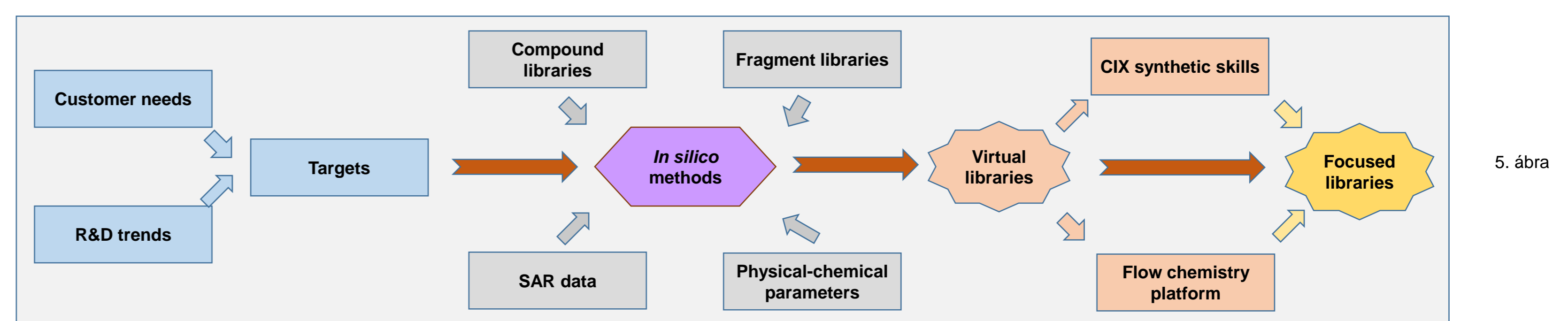


3. ábra



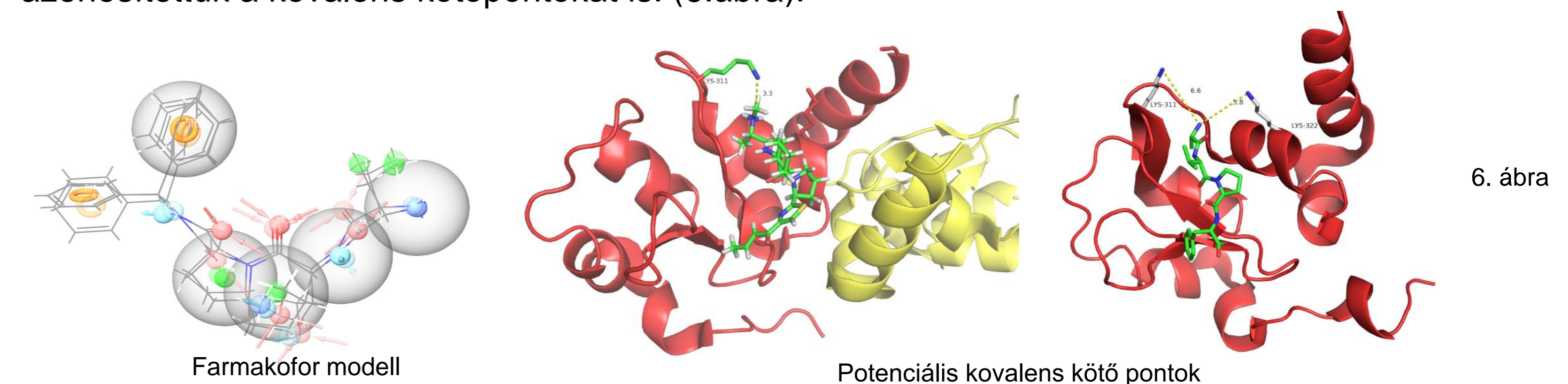
4. ábra

Fókuszált könyvtár tervezése. ComInnex Zrt. az új molekulák, molekulakönyvtárak tervezésének és kémiai szintézisének specialistája. Ehhez a legújabb *in silico* modellezési, szűrési és tervezési módszereket alkalmazza. A tervezés folyamatát az 5. ábra mutatja.



5. ábra

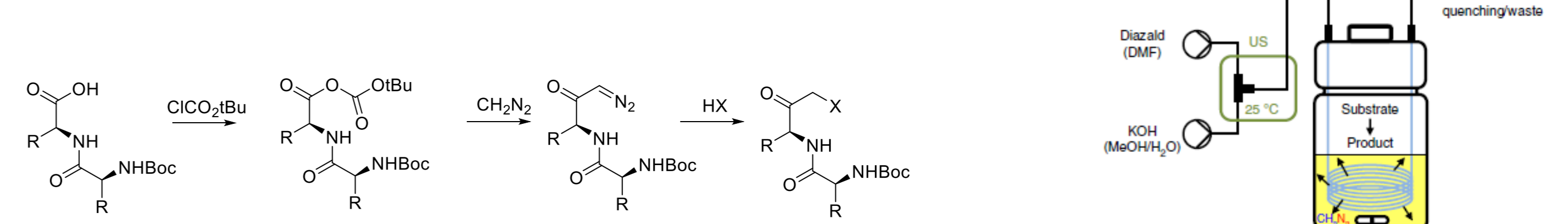
In-silico modellezés és szűrés. A potenciális XIAP antagonistá molekulákat Glide SP és Induced Fit Docking (IFD) módszerekkel, Schrödinger Small-Molecule Drug Discovery Suite program csomagot alkalmazva a PDB 4HY0 szerkezetbe dokkoltuk. IFD számítások segítségével először optimalizáltuk a kötőhely szerkezetét, majd MM/GBSA kötési szabadentalpia számításokat végeztünk a receptor-ligand komplexeken. A kapott értékek alapján a legjobb illeszkedést mutató vegyületeket, továbbá pozitív kontrollként az LCL161 molekulát és negatív kontrollként néhány nem illeszkedő vegyületet is előállítottunk, majd teszteltünk. Az eredmények és a számítások jól korreláltak (1. Táblázat). A molekulák elhelyezkedése és a receptor szerkezetére alapján azonosítottuk a kovalens kötőpontokat is. (6. ábra).



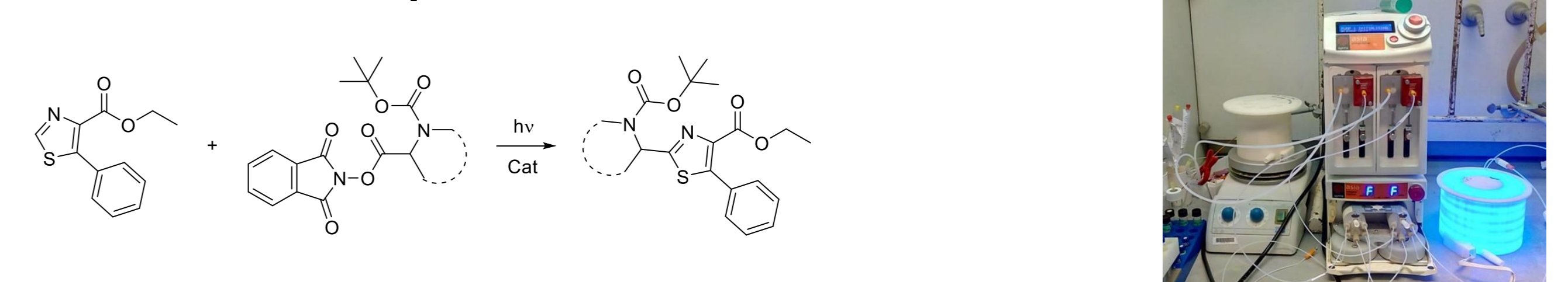
6. ábra

Szintézis Az alapstruktúrát eredeti, új módszerekkel több ponton is változtattuk, ami alapján új vegyületeket állítottunk elő.

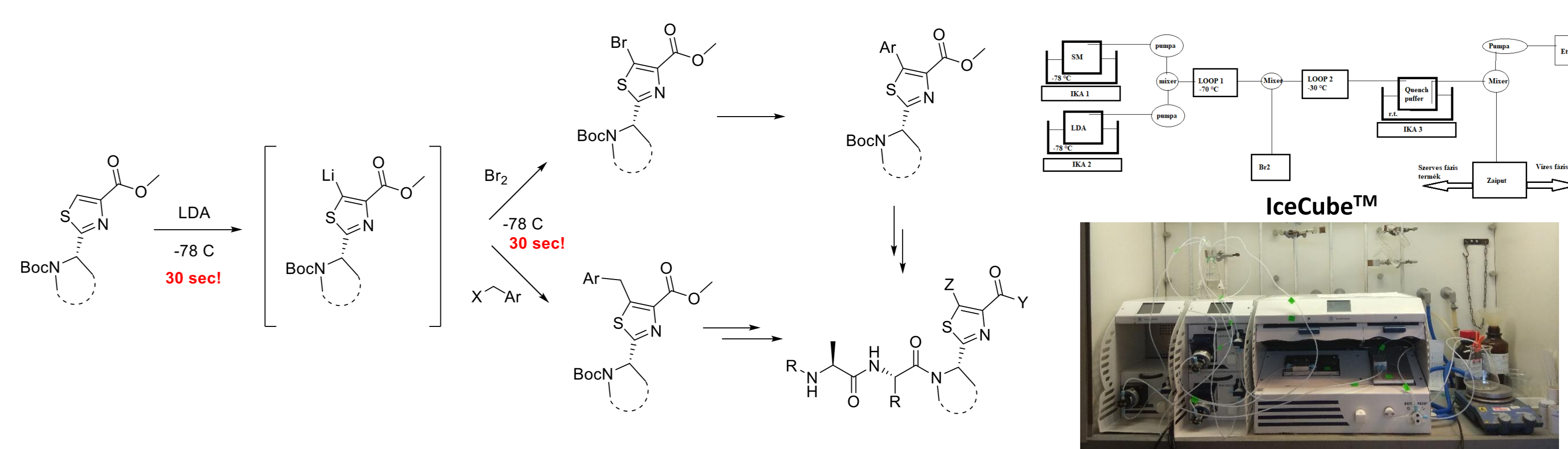
Peptid lánc homológizálás áramlós reaktorban⁵



Tiazol derivatizálás a C-2 pozícióban fotoredox reakcióval⁵



Tiazol derivatizálás a C-5 pozícióban áramlós reaktorban



Eredmények Kifejlesztett lead molekulánk és izomerjei a referencia LCL161 vegyülethez képest gyorsabban hatnak és legalább háromszor hatékonyabbak (1. Táblázat).

Vegyület forma és izomer	Teszt ID	PANC-1 - xCELLigence SP (Hasnyálmirigy)			A2058 (Melanoma)			EBC1 (Tüdő)			Colo205	MiaPaCa (Hasnyálmirigy)	MdaMb231 (Emió)	Modell kötődés* (kcal/mol)
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	72 h	72 h		
LCL161 bázis (SSS)	C14-49	5.40 E-5	7.95 E-5	5.85 E-5										
LCL161 xHCl (SSS)	C16-6	1 E-4	1 E-4	6.75 E-5	9.9 E-5	5.9 E-5	5.2 E-5	> 10 ⁻⁶ M	8.4 E-5	5.4 E-5			-83.19	
LCL161 bázis (SSS)	C110-1			4.02 E-5			3.96 E-5				3.94 E-5	1.68 E-5		
CIX C16-7 xHCl (RS,SS)	C16-7	3.2 E-5	3.7 E-5	3.1 E-5	1.8 E-5	2.1 E-5	1.4 E-5	2.95 E-5	2.5 E-5	2.5 E-5				
CIX C16-7bázis (RS,SS)	C19-4			2.57 E-5			0.9 E-5		0.77 E-5	0.74 E-5	0.88 E-5	0.15 E-5		
CIX C16-7 2xTFA (RS,SS)	C110-2			1.43 E-5			1.39 E-5		1.47 E-5	1.47 E-5	0.65 E-5			
CIX C16-7 2xTFA (SSS)	C110-3			1.17 E-5			1.46 E-5			1.33 E-5	0.62 E-5		-88.85	
CIX C16-7 2xTFA (RSS)	C110-4			2.32 E-5			1.18 E-5			1.19 E-5	1.03 E-5			

1. Táblázat C16-7 Lead vegyület különböző formáinak és izomerjeinek IC50 értékei a standard LCL161 különböző formáinak mérési eredményeivel összehasonlítva Flow Cytometriás és AlamarBlue tesztekben

Konklúzió és kitekintés A reprezentatív új lead vegyületünk (warhead) a viabilitási és citotoxicitási tesztek (Flow Cytometry és AlamarBlue mérések) alapján több nehezen kezelhető rákos sejtvonalon is apoptózist váltott ki, a tumor proliferációt gátolta. Tumor gátlásban kifejtett hatása és a modell eredményei korrelálnak. Az új molekula alkalmas lehet önmagában (monovalent) vagy kombinációban (bivalent) rákgyógyszerek kifejlesztésére. A ComInnex által kidolgozott és bevezetett tervezési és molekulafejlesztési rendszer igazolta alkalmasságát új célzott könyvtárak tervezésére és előállítására. A fejlesztést a molekula oligopeptid konjugáció irányában folytatjuk.

Irodalom: 1) https://pak.elte.hu/NVVKP_16-2016-0036_2; Mező, G.; Manea, M. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2010, 7, 79-96; 3) Fox, J. L.; MacFarlane, M. *Br. J. Cancer* 2016, 115(1), 5-11.3.; 4) Cong, Hui, et al. *J. Med. Chem.* (2019). DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b01668. 5) G. Sipos et al., Poster presentation, Flow Chemistry Europe 2019, 26th – 27th February 2019, Cambridge, UK;

* Kapcsolat: bela.bertok@cominnex.com

Köszönettel tartozunk a Nemzeti Kutatási és Fejlesztési Innovációs Hivatalnak az NVKP16-1-2016-0036 pályázat keretében projekthez nyújtott támogatásért. Külön köszönetünket fejezzük a Chemicro Kft.-nek a rendelkezésünkre bocsátott Schrödinger szoftverekért.