

A pályázat keretében a Klinika II Fázisban lévő tumor- és neurogén gyulladás gátló TT-232 jelű szomatosztatin analógunk és új követő molekulái biológiai hatásának továbbfejlesztését, új támadáspontokon ható követő-molekulák előállítását, karakterizációját, és biológiai hatásvizsgálatát végeztük el. Ezen kívül megtörtént egy experimentális adatokra épülő farmakofor modell készítése és analízise, jeltovábbítási kaszkádot gátló molekulakönyvtárak előállítása, valamint új analitikai módszerek kifejlesztése és alkalmazása. Az elért eredményeket az alábbi felosztásban tárgyaljuk:

1. Molekula-tervezés szintetikus munkák:

- 1.1. TT-232 követőmolekulák
 - 1.1.1. Peptidek
 - 1.1.2. Peptidomimetikumok
- 1.2. Farmakofor model generálása

2. Biológiai vizsgálatok

- 2.1. Antiproliferatív hatás vizsgálata
 - 2.1.1. sejtproliferáció, apoptózis és mitózis vizsgálata
 - 2.1.2. In vivo tumorgátlás vizsgálata (xenograft)
- 2.1.3. Angiogenezis befolyásolása
- 2.2. Neurogén gyulladásgátlás
 - 2.2.1. Substance P gátlás
 - 2.2.2 In vivo vizsgálatok
- 2.3. Hatásmechanizmus vizsgálatok
 - 2.3.1. Kinázmérések, jeltovábbítás
 - 2.3.2. Capsaicin receptor mediálása

3. Analitikai vizsgálatok

- 3.1. HPLC módszerek alkalmazása
- 3.2. MEKC módszerek alkalmazása

1. Molekula-tervezés, szintetikus munkák.

1.1. TT-232 követőmolekulák

Fontossá vált a Klinika II vizsgálatokig eljutott aktív anyag követő molekuláinak a kifejlesztése, olyanoké amelyek megtartják a TT-232 előnyös biológiai tulajdonságait, viszont előnyösebb farmakokinetikai mutatókkal rendelkeznek pl. jobb oldhatóság, enzimrezisztencia. A natív szomatosztatinnak számos peptid és nem-peptid származékával végzett kísérletek világossá tették, hogy három szerkezeti egység képviseli a biológiai aktivitáshoz szükséges tulajdonságokat, ezek a bázikus, aromás és heteroaromás csoportok amelyeket a natív hormonban a lizin, tirozin és triptofán aminosavak oldalláncai képviselnek. Az új követőmolekulák tervezése során szisztematikusan változtattuk a TT-232 molekula szerkezetét, olyan származékok szintézisét tűztük ki célul, ahol a biológiai aktivitáshoz szükséges szerkezeti egységek egyre egyszerűbb molekulákban jelennek meg, ezáltal előállításuk egyszerűsödik, az alap struktúra variálhatósága megnő, a vegyületek fizikai-

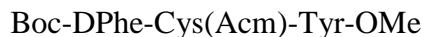
kémiai tulajdonságai előnyösen változnak. A TT-232 követőmolekulák 4 különböző csoportját terveztük meg és állítottuk elő.

TT-232

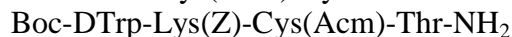


1.1.1. Fragmensek:

N-terminális:



C-terminális



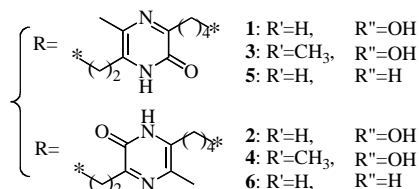
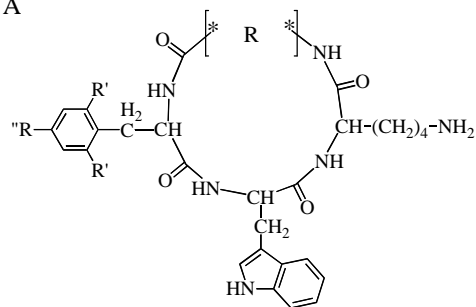
1.1.2. Ciklikus kis-peptidek:

Ezt a csoportot egyrészt olyan analógok alkotják amelyekben a -Phe-DTrp-Lys- vagy -Phe-DTrp-Nle- tripeptidet is tartalmazó hexa- vagy penta-peptidekbe ciklikus β-aminosavakat, ill. N-metilezett aminosavakat építettünk be. Másrészt olyan analógok ahol a -Phe-DTrp-Lys- tripeptidet közvetlenül egy pirazinon gyűrű zárja ciklusba (1.ábra A).

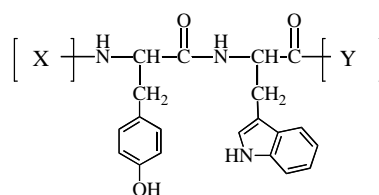
1.1.3. Dipeptid amidok:

Olyan dipeptid-amidok alkotják ezt a csoportot, melyeknek magja a -Tyr-D-Trp- dipeptid (1. ábra B).

A



B

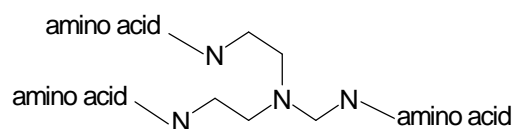


| | |
|-------------------|-------------------------------|
| 7: X=Boc, | Y=Lys(Z)-OFm |
| 8: X=Boc, | Y=Lys(Z)-OH |
| 9: X=H-, | Y=Lys(Z)-OH |
| 10/15: X=Boc-/H-, | Y=1-adamantylamide |
| 11/16: X=Boc-/H-, | Y=2-adamantylamide |
| 12/17: X=Boc-/H-, | Y=1-naphthylamide |
| 13/18: X=Boc-/H-, | Y=t-butylamide |
| 14/19: X=Boc-/H-, | Y=4-methylcoumarine-7-ylamide |
| 20: X=H-, | Y=OH |

1. Ábra: Ciklikus (A) és dipeptid amid (B) követőmolekulák szerkezete

1.1.4. Peptidomimetikumok

Olyan kis peptidomimetikumok alkotják ezt a csoportot, melyekben egy centrális mag, TAEA: [N-(CH₂-CH₂-NH-)₃] körül szimmetrikusan 3 azonos aminosav helyezkedik el (2. Ábra). A vegyületekben a különböző N-terminális és oldallánc- védettségű Ser, Lys, Glu, Tyr, és Trp aminosavak képviselik a bázikus, aromás és heteroaromás csoportokat.



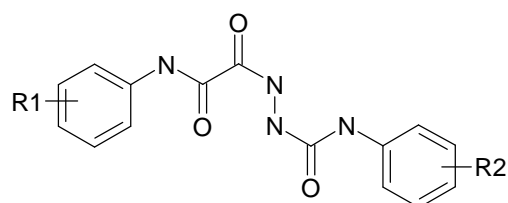
2. ábra: TAEA- származékok általános képlete

| No | Előállított TAEA származékok |
|----|-------------------------------------|
| 21 | [Boc-Lys(Z)] ₃ -TAEA |
| 22 | [H-Lys(Z)] ₃ -TAEA |
| 23 | [Boc-Lys(2-CIZ)] ₃ -TAEA |
| 24 | [H-Lys(2CIZ)] ₃ -TAEA |
| 25 | [Boc-Ser] ₃ -TAEA |
| 26 | [H-Ser] ₃ -TAEA |
| 27 | [Boc-Tyr(Bzl)] ₃ -TAEA |
| 28 | [H-Tyr(Bzl)] ₃ -TAEA |
| 29 | [Boc-D-Trp] ₃ -TAEA |
| 30 | [H-D-Trp] ₃ -TAEA |

1.2. Farmakofor model generálása

A jeltovábbítási kaszkádot gátló, célzott molekulakönyvtárak előállítása keretében kismolekulás quinoxaline- oxanoil- ill. oxindol-származékok szintézisét és biológiai vizsgálatát végeztük el. Az oxanoil-hidrazonok kedvező biológiai eredményei indokolták, hogy ezeknek a vegyületeknek a hatását tovább vizsgáljuk. Célunk kedvezőbb ADME paraméterekkel, kisebb toxicitással rendelkező vegyületek kiválasztása volt. Az oxanil-hidrazidok izocianátokkal képezhető szemikarbazid származékai (I. táblázat) sztérikusan és elektronikusan is hasonlóak az igéretesen hatékony oxanoil-hidrazonokhoz (II. táblázat).

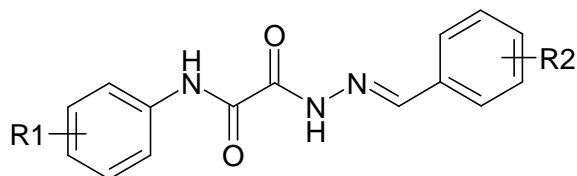
I. Táblázat. Szemikarbazid származékok szerkezete



| No | R1 | R2 |
|----|----------------|------------|
| 1 | 3,4-dimetil | 3-klór |
| 2 | 4-nitro | - |
| 3 | 4-nitro | 3-klór |
| 4 | 3,4-dimetil | naftil |
| 5 | 3-hidroxi | naftil |
| 6 | 3-nitro | naftil |
| 7 | 4-dimetilamino | naftil |
| 8 | 4-dimetilamino | 4-klór |
| 9 | 2-etoxi | 3-klór |
| 10 | 4-klór-3-metil | 3-klór |
| 11 | 3-nitro | 3,4-diklór |
| 12 | 4-etoxi | naftil |
| 13 | 4-klór-3-metil | 3,4-diklór |
| 14 | 3-hidroxi | 3-klór |

| | | |
|----|----------------|----------------|
| 15 | 4-dimetilamino | 3,4-diklór |
| 16 | 2-etoxi | naftil |
| 17 | 3-nitro | 3-triflórmetil |
| 18 | 2-metoxi | 3-klór |

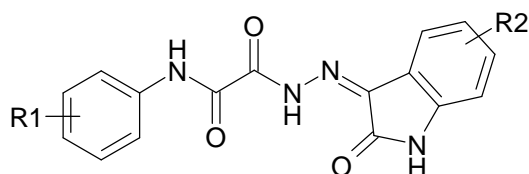
II Táblázat. Oxanoil-hidrazon származékok szerkezete



| No | R1 | R2 |
|----|----------------|------------------|
| 19 | 2-metoxi | 3,4-dihidroxi |
| 20 | 4-etoxi | 3-hidroxi |
| 21 | 2-etoxi | 3-hidroxi |
| 22 | 4-etoxi | 3,4-dihidroxi |
| 23 | 4-dimetilamino | 3,4-dihidroxi |
| 24 | 3-nitro | 3,4-dihidroxi |
| 25 | 2-etoxi | 3,4-dihidroxi |
| 26 | 3-hidroxi | 3,4-dihidroxi |
| 27 | 3,4-dimetil | 3,4-dihidroxi |
| 28 | 3-nitro | 2,3,4-trihidroxi |
| 29 | 3-bróm | 3-hidroxi |
| 30 | 3-bróm | 2,5-dihidroxi |
| 31 | 3-nitro | 3-hidroxi |
| 32 | 3-nitro | 2,5-dihidroxi |
| 33 | 3-bróm | 3,4-dihidroxi |
| 34 | 3-klór | 3-hidroxi |
| 35 | 3-klór | 2,5-dihidroxi |
| 36 | 3-klór | 3,4-dihidroxi |

Az oxindol származékai általában gyógyszer szerű hatást kölcsönöznek számos vegyülettípusnak különböző hatástani területeken. Összevetve az oxindolokkal kondenzált hidrazonok térszerkezetét a benzaldehidekből képzett oxanil-hidrazonokéval, megfigyelhető hogy az E-izomer molekulák gyakorlatilag fedésbe hozhatóak egymással. Mivel az oxindolok esetében a reakciókörülmények az E izomerek képződésének kedveznek, így lehetőség nyílt a sztereoizomerek hatásának vizsgálatára is. Tizenhét új oxindol származékot állítottunk elő, melyeket a III. táblázatban soroltunk fel. A vegyületek szerkezetét NMR spektroszkópiával és HPLC-MS spektroszkópiával igazoltuk.

III. Táblázat. Oxindol származékok szerkezete



| No | R1 | R2 |
|----|---------|-----------------|
| 37 | 3-bróm | 4,7-diklór |
| 38 | 3-nitro | 5-bróm |
| 39 | 3-klór | 4,7-diklór |
| 40 | 3-bróm | 4-klór |
| 41 | 3-bróm | 5-triflórmetoxi |
| 42 | 3-nitro | 5-triflórmetoxi |
| 43 | 3-bróm | 6-klór |
| 44 | 3-nitro | 4,6-diklór |
| 45 | 3-klór | - |
| 46 | 3-bróm | 5-klór |
| 47 | 3-bróm | - |
| 48 | 3-bróm | 5-bróm |
| 49 | 3-klór | 4,6-diklór |
| 50 | 3-klór | 6-klór |
| 51 | 3-klór | 4-klór |
| 52 | 3-nitro | 5-klór |
| 53 | 3-nitro | - |

Az eddigi vizsgálatok alapján 53 új vegyület közül 27 gátolta nanomoláris koncentrációban a neurogén gyulladás mediátorának, a P-anyagnak a felszabadulását. Az in vitro hatásos vegyületek közül gyulladásgátló hatást in vivo 11-nél vizsgáltunk. Ezek közül 5 vegyület további vizsgálatra érdemes neurogén gyulladásgátló hatást mutatott. Neuropáthiás fájdalom modellben a három leghatásosabb vegyület potens analgetikus hatást fejtett ki.

Referencia vegyület céljából előállítottunk több száz mg-os mennyiségben egy antagonista és egy agonista hatású, (phenylamino-oxálecetsav származék) kapszaicin receptoron ható vegyületet. Tovább folytattuk a heterociklusos kismolekulájú könyvtárak kifejlesztését új vegyülettípusokkal. Előállítottunk új quinazolin és benzotiofén származékokat is, melyek között igen erős tirozin kináz aktivitást gátló molekulák voltak, ezeknek a szelektivitás panelban történő összehasonlítása tervbe van véve.

2. Biológiai vizsgálatok

2.1 Antiproliferatív hatás vizsgálata

2.1.1 Sejtprolifерációi, apoptózis és mitózis vizsgálata

A vegyületeket A 431 epidermoid carcinoma, SW 480 human colon és KS (Kaposi sarcoma) sejtvonalakon vizsgáltuk. Mindhárom sejtvonal gyorsan növe, jól karakterizált modell proliferáció gátlás vizsgálatára. Az eredmények kvantitatív kiértékelésére az MTT tesztet

alkalmaztuk. Az egyes vegyületekkel történt kezelés hatására bekövetkezett sejtszám-változást a kezeletlen kontrolok sejtszámának (100%) százalékában adtuk meg. A mérésekben pozitív kontrolként cikloheximidet és TT-232-t alkalmaztunk. A vegyületeket rutinszerűen 10, 25 és 50 μM koncentrációkban vizsgáltuk, a leghatékonyabb vegyületek IC_{50} értékeinek meghatározásához 10 koncentrációt alkalmaztunk. Néhány vegyület A431 sejtvonalon mutatott hatását a IV. táblázat foglalja össze.

IV. Táblázat TT-232 követőmolekulák hatása A431 carcinoma sejtek növekedésére, apoptózist indukáló és mitózist gátló hatása

| TT-232 követőmolekula | Proliferáció gátlás (%) | | | Apoptóziost keltő hatás | Mitózist gátló hatás |
|---------------------------------|-------------------------|------------------|------------------|-------------------------|----------------------|
| | 10 μM | 25 μM | 50 μM | | |
| TT-232 | 50 | 60 | 80 | | |
| cikloheximid | 40 | 70 | 80 | | |
| Boc-Tyr-D-Trp-1-Adamantil | 72 | 90 | 93 | erős | erős |
| Boc-Tyr-D-Trp-2-Adamantil | 26 | 43 | 95 | erős | erős |
| Boc-Tyr-D-Trp-1-naftil | 25 | 21 | 19 | | |
| Boc-Tyr-D-Trp-t-butil | 3 | 20 | 31 | | |
| H-Tyr-D-Trp-1-Adamantil | 19 | 52 | 91 | közepes | erős |
| H-Tyr-D-Trp-2-Adamantil | 30 | 76 | 88 | nem hat | nem hat |
| Boc-Tyr-D-Trp-ciklohexil | 18 | 20 | 39 | enyhe | erős |
| [Boc-Lys(Z)] ₃ -TAEA | 15 | 12 | 64 | nem hat | nem hat |
| [H-Lys(Z)] ₃ -TAEA | 11 | 6 | 57 | nem hat | enyhe |
| [Boc-D-Trp] ₃ -TAEA | 36 | 35 | 58 | erős | erős |
| c[Tyr-D-Trp-Lys-(EK-pirazinon)] | 27 | 30 | 21 | | |
| c[Tyr-D-Trp-Lys-(KE-pirazinon)] | 30 | 32 | 26 | | |

Hasonló proliferáció gátló hatásokat tapasztaltunk SW 480 sejtvonalon végzett kísérleteknél is. KS sejtvonalon azonban a legfigyelemreméltóbb hatást az N-terminális védett peptid Boc-D-Phe-Cys(Acm)-Tyr-OMe (SHA-2-22) mutatta, mely nem gátolta, hanem indukálta az endothel sejtek növekedését. 0.1 μM -ban 100 %-os, 1 μM -ban pedig 140 %-os sejtszámnövekedést eredményezett a kezeletlen sejtek számához viszonyítva (további eredményeket lásd 2.1.4) A TT-232 követőmolekulák sejtproliferációra kifejtett hatásáról összességében azt állapíthatjuk meg, hogy a különböző típusú molekulák közül, a dipeptid-amidok, ezen belül pedig a Boc-Tyr-D-Trp-1-Adamantil és Boc-Tyr-D-Trp-2-Adamantil voltak a TT-232-vel azonos hatékonyságúak a vizsgált sejtvonalakon. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy bizonyos kombinációkban mind a ciklus mind a bázikus oldallánc helyettesíthető a magas antiproliferatív hatás megtartása mellett. Ezeket az eredményeket publikáltuk.

Referencia vegyület céljából előállítottunk több száz mg-os mennyiségben egy antagonistá és egy agonista hatású, (phenylamino-oxálecetsav származék) kapszaicin receptoron ható vegyületet. Tovább folytattuk a heterociklusos kismolekulájú könyvtárak kifejlesztését új vegyülettípusokkal. Előállítottunk új quinazolin és benzotiofén származékokat is, melyek között igen erős tirozin kináz aktivitást gátló molekulák voltak, ezeknek a szelektivitás panelban történő összehasonlítása tervbe van véve.

2.1.2. A TT-232 molekula *in vivo* tumorgátló vizsgálata

A TT-232 *in vivo* antitumor hatékonyságát rágcsáló (S-180 sarcoma, P-388 leukémia, C-26 adenocarcinoma, MXT carcinoma) és humán (PC-3 prostate carcinoma, MDA-MB-231 és MCF-7 brest carcinoma, HT-29 colon carcinoma, HT-18 melanoma, HL-60 promyelotic leukémia) xenograftokon is megvizsgáltuk, különböző adminisztrációs utakat (i.v., i.p., s.c., és i.v. infuzio minipumpa alkalmazásával) is alkalmazva. A rágcsáló tumor modellekben (S-180 sarcoma és P-388 lymphoid leukémia) a kezelés, infúzióban történt adagolás mellett, 76-100 % tumortérfogat csökkenést eredményezett és a hosszú távú és a tumormentes túlélés a kezelt állatok között 20-60 % volt. A nagyon agresszív C-26 colon és az MXCT emlő karcinómák esetében a TT-232 kezelés 71-75 %-ban gátolta a tumor növekedését és 50%-al növelte a túlélést. A TT-232 hatása majdnem mindegyik tanulmányozott tumor modellben szignifikáns volt, és az i.v. adagolás, minipumpa alkalmazásával növelte a készítmény hatékonyságát. Ezek a kiterjedt *in vivo* vizsgálatok további bizonyítékát adták a TT-232 jelentős antitumor hatásának és komoly gyógyszerjelöltnek tumoros megbetegedések kezelésére.

2.1.3. Angiogenezis indukálása

A TT-232 védett, N-terminális tripeptidjének [Boc-D-Phe-Cys(Acm)-Tyr-OMe (SHA-2-22)] a KS endothel sejteken mutatott jelentős sejtproliferációt indukáló hatása indokolta, hogy ezt az eredményt ne hagyjuk figyelmen kívül, hanem megvizsgáljuk, hogy a sejt szaporodását ilyen mértékben fokozó tulajdonsága együtt jár-e érképződést fokozó hatással is. Egy ilyen tulajdonságokkal rendelkező védett tripeptid gyógyászati jelentőség igen nagy lehet olyan kórképekben, ahol nem kielégítő az új erek képződése, pl. infarktus, isémia, szövet- és csont-sérülések, és ahol a klinikai gyakorlatban jelenleg csak az igen drága és gyorsan lebomló természetes faktorokkal próbálkoznak. Ennek eldöntésére, az Onkológiai Intézet kutatóival együttműködésben, a vegyület *in vivo* hatását az ún. mátrigél tesztben vizsgáltuk meg. A kísérletek során az egerekbe juttatott gélben vizsgáltuk hogy a kontroll állatokban képződött új erek száma hogyan viszonyul az angiogenezist indukáló természetes faktor (PDGF-BB) és az irodalomból e tulajdonságáról ismert kismolekulás L-mimosin és 3,4-dihidroxi-benzoát hatásához (V. Táblázat, 3. ábra).

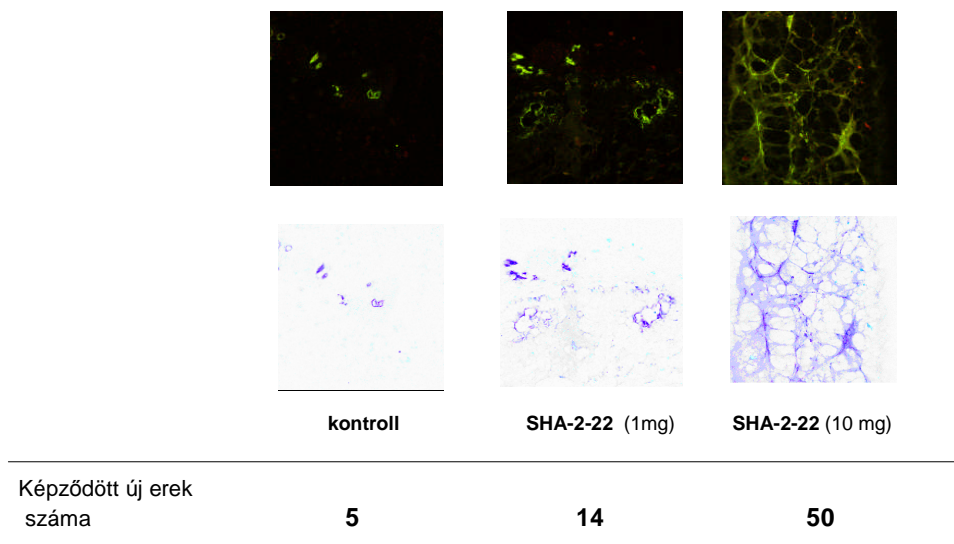
V. Táblázat. Angiogenezis *in vivo* indukálása egér „mátrigél teszt”-ben.

| Kontrol | Dózis mg/kg | Vérerek száma a vizsgált területen | Dózis mg/kg | Vérerek száma a vizsgált területen |
|---|------------------------|---|------------------------|---|
| Control | - | 5 | - | 5 |
| PDGF-BB | 20 ng/ml | 18 | | |
| L-mimosin | 660# | 48 | 66 | 10 |
| 3,4-Dihidroxi-benzoát | 180# | 28 | 18 | 0 |
| Boc-DPhe-Cys(Acm)-Tyr-OMe (SHA-2-22) | 10 | 50 | 1 | 14 |

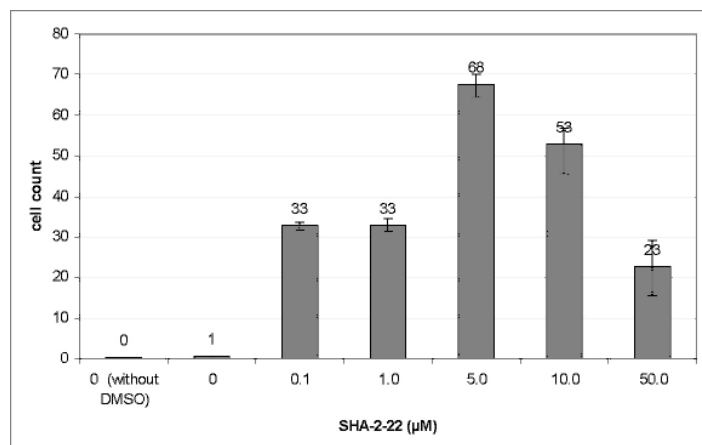
#irodalmi adatoknak megfelelő dózisosok

Látható az adatokból, hogy a TT-232 fragmens (SHA-2-22) nem csak az endotel sejtek számának növekedését eredményezte, hanem új erek képződését is előidézte élő állatban, 10 mg/kg-os dózisban 10-szer, 1 mg/kg dózisban pedig 3-szor annyi új ér képződött, mint a kontroll állatokban és ez az érték az SHA-2-22-vel kezelt állatokban volt a legnagyobb.

3. Ábra. Angiogenesis *In vivo* stimulálása Boc-D-Phe-Cys(Acm)-Tyr-OMe (SHA-2-22) vegyülettel, mátrigél modellben



Elkészítettük a Boc-D-Phe-Cys(Acm)-Tyr-OMe fluoreszcenncel jelölt származékát is (FITC-SHA-2-22), hogy tanulmányozzuk a sejtmembránnal való kölcsönhatását, ill sejtbejutását. *In vitro* a fluoreszcenncel jelzett vegyület nagymértékben akkumulálódott a KS endothel sejtek felszínén, míg *in vivo* látható volt a mátrigélben képződött új erek felszínén. Ezek száma a kontrollban 5 volt, a FITC-SHA-2-22-vel kezelt gélben 14.6, míg az FITC-SHA-2-22 és PDGF-BB együtt adagolásakor szinergizmust tapasztaltunk, az új erek száma 27.9 volt. Kooperációban spanyol partnerekkel micro-kapszulázott SHA-2-22 készült, amelyről német partnerek kimutatták, hogy BCE sejtekben angiogenezist indukáltak. További megerősítése volt a vegyület hatékonyságának, hogy *in vivo* aorta ring modellben, amelyet szintén német kutatók végeztek el, SHA-2-22 kezelés hatására új vérerek képződtek (4.ábra).



4. Ábra. Angiogenesis *in vivo* stimulálása SHA-2-22-vel aorta ring modelben.

2.2 Neurogén gyulladás gátlása

Az 1.1 pontban ismertetett, a TT-232 molekulából levezethető védett-, ciklikus- és dipeptidok, valamint a peptidomimetikumok neurogén gyulladásra kifejtett hatását először *in vitro* a substance P felszabadulására kifejtett gátló hatásukkal vizsgáltuk,(CGRP?) majd a leghatékonyabb vegyületek *in vivo* vizsgálatát is elvégeztük különböző adagolási módokat alkalmazva.

2.2.1. Substance P gátlás mérése:

A vegyületek hatását *in vitro* patkány tracheán, a substance P felszabadulás gátlásával mértük. A patkányokat kivéztettük, a nyelőcsövüket eltávolítottuk, majd 60 percen át 37° C hőmérsékleten, 7,2-es pH-jú oxigénezett Krebs-oldat áramába helyeztük, majd az oldatot 3x 8 percre kicseréltük. A vizsgált vegyületeket 500 nm koncentrációban a második és harmadik frakcióba helyeztük. A P anyag koncentrációját RIA módszerrel határoztuk meg. A vizsgálatok során leghatékonyabbnak talált vegyületek szerkezetét és biológiai hatását a VI. táblázat foglalja össze.

VI. Táblázat. A substance P felszabadulásának gátlása patkány trachea modellben

| Szerkezet | P (%)* |
|--|----------------|
| TT-232 | 37 |
| <i>I. Fragmensek</i> | |
| Boc-D-Trp-Lys(2ClZ)-Cys(Acm)-Thr-NH ₂ | 37 |
| Boc-D-Phe-Cys(Acm)-Tyr-OMe | 29.4 |
| <i>II. Ciklikus peptidek</i> | |
| c[Phe-D-Trp-Lys-(KE-pyrazinone)] | 43.2 |
| c[Phe-D-Trp-Lys-(EK-pyrazinone)] | 52.3 |
| c[Tyr-D-Trp-Lys-(KE-pyrazinone)] | 48.2 |
| c[Tyr-D-Trp-Lys-(EK-pyrazinone)] | 18.6 |
| <i>III. Dipeptid amidok</i> | |
| Boc-Tyr-D-Trp-1-adamantylamide | 67 |
| H-Tyr-D-Trp-1-adamantylamide | 32 |
| Boc-Tyr-D-Trp-cyclohexylamide | 90 |
| <i>IV. Peptidomimetikumok</i> | |
| [Boc-Lys(Z)] ₃ -TAEA | 53.9 |
| [H-Lys(Z)] ₃ -TAEA | 100 |

| | |
|----------------------------------|------|
| [Z-Glu(OtBu)] ₃ -TAEA | 89 |
| [Boc-Ser] ₃ -TAEA | 26.5 |
| [H-Ser] ₃ -TAEA | 7.4 |

*P anyag felszabadulásának gátlása a kontrollhoz (nem kezelt minta) viszonyítva

Látható a táblázatból, hogy mind a négy típusú vegyületben találhatóak igen hatékony, a P anyag felszabadulását akár teljes mértékben is gátló molekulák. A leghatékonyabb molekulákat a TAEA származékok és a dipeptid-amidok között találtuk. Ezek az új peptidszármazékok az eddig előállított TT-232 követő molekuláknál nagyobb gátlást mutatnak. A Boc-Tyr-D-Trp-1-adamantilamid 67%-ban, a [Z-Glu(OtBu)]₃-TAEA 89%-ban, a Boc-Tyr-D-Trp-cyclohexylamid 90%-ban, a [Boc-Lys(Z)]₃-TAEA 54 %-ban, a [Lys(Z)]₃-TAEA pedig 100%-ban gátolta a substance P felszabadulását. A [Boc-Lys(Z)]₃-TAEA molekula a calcitonin gene-related peptide (CGRP) felszabadulását 45 %-ban gátolta. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy nem szükséges a biológiai hatásért felelős funkciók csoportok mindegyikének (aromás, heteroaromás, bázikus) szerepelnie az aktív molekulában, két csoport jelenléte (aromás-heteroaromás, ill. aromás-bázikus) is igen aktív strukturát eredményez. A leghatékonyabb vegyületek *in vivo* hatását is megvizsgáltuk akut neurogén gyulladás gátlására.

2.2.2. Akut neurogén gyulladás gátlása

Az *in vivo* mérések során Wistar-patkányok hátsó lábát akut módon denerváltuk, majd 1 %-os mustárolaj / paraffin oldat helyi alkalmazásával gyulladást idéztünk elő. A mustárolaj ebben a koncentrációban szelektíven stimulálja a kapszaicinre érzékeny érzőideg-végződéseket, ennek hatására neuropeptidok szabadulnak fel, melyek neurogén gyulladást (vazodilatációt, plazmaprotein-extravazációt) idéznek elő. A extravazáció mértékét Evans-kék szivárgási módszerrel mértük. A vegyületeket DMSO-ban oldottuk, majd fiziológiás oldattal hígítottuk és i.p. vagy p.o. adagoltuk 100 µg/kg koncentrációban. Az *in vitro* vizsgálatokban igen hatékonyak bizonyult vegyületek közül 5 vegyület i.p. 40-50 %-ban gátolta az akut neurogén gyulladást, két anyag p.o. adagolva is megőrizte gátló hatását. Ezeket az eredményt a 2. táblázat foglalja össze.

VII. Táblázat Akut neurogén gyulladás gátlása patkányban

| Szerkezet | Gátlás (%) | |
|----------------------------------|------------|------------------|
| | i.p. | p.o. |
| Kontroll | 0 | 0 |
| [Boc-Lys(Z)] ₃ -TAEA | 50 | 30 |
| Boc-Tyr-D-Trp-cyclohexylamide | 55 | 30 |
| [Z-Glu(OtBu)] ₃ -TAEA | 50 | nincs hatás |
| [Boc-D-Trp] ₃ -TAEA | 45 | nem szignifikáns |
| Boc-Tyr-D-Trp-1-adamantilamid | 40 | nem vizsgált |

Ezen vegyületek mindkét típusára magyar és nemzetközi szabadalmi bejelentést nyújtottunk be, melyben mind a szerkezetüket, mind neurogén gyulladásgátló hatásukat védjük. A bejelentésben szereplő vegyületekkel megkezdtük a lehetséges gyógyszerjelöltek kiválasztását szolgáló további kísérleteket. Történtek újabb sejtvonalakon *in vivo* toxikológiai,

és *in vitro* farmakokinetikai vizsgálatok Az összegyűlt adatok alapján 4 molekulát választottunk ki további vizsgálatokra {Boc-Tyr-D-Trp-cyclohexylamid, Boc-Tyr-D-Trp-1-adamantylamid, [Boc-Lys(Z)]₃-TAEA, [Z-Glu(OtBu)]₃-TAEA} és elkezdtük g-os tételekben történő gyártásukat egy preklinikai dosszié összeállításához szükséges *in vitro* és *in vivo* kísérletek anyagszükségletének fedezésére.

2.3 Hatásmechanizmus vizsgálatok

2.3.1. Kináz-mérések, jeltovábbítás

Projektjeinkben nagyon hangsúlyos szerepű a kinázmérés. Számos betegségben validált target és központi jelentőségű egy-egy kináz molekula. Egy olyan mérési platformot állítottunk be, amely alkalmas nagy hatékonysággal, non-radioaktív módon és megbízhatóan kinázméréseket végezni. Az IMAP mérés rendelkezik ezekkel a tulajdonságokkal sőt antitest-független módon lehet felhasználni méréseinkhez. Ez a rendszer fluoreszcencia polarizációt mér, amely jól reprodukálható. Ez idáig több specifikus kinázra optimalizáltunk kináz assayt így. pl. a protein kináz D-re, IGFR-re és Akt enzimre. Ezekhez a mérésekhez szükség van rekombináns aktív kinázra, illetve fluoreszcens jelzésű szubsztrát peptidre, ezeket vagy saját laborunkban állítottunk elő vagy megvásároltuk.

Az IMAP fluoreszcens tesztelési rendszerünk rutinszerű működtetése során több kináz inhibitorának kifejlesztését végeztük el. A korábban már beállított és robosztusan működő PKD mérésünkben eljutottunk olyan szelektált hit molekulákig amelyek alapját képezhetik egy potenciális lead molekula kifejlesztéséhez.

Az IMAP fluoreszcens primer biológiai mérésekben kapott hitmolekulák vizsgálatával folytattuk munkánkat. A kapott relatíve nagyszámú (körülbelül 5 %-nyi) hitmolekula halmazunkat karakterizáltuk. A biológiai karakterizálás során meghatároztuk IC₅₀ értéküket, a kémiai karakterizáció során elemeztük a molekulák szerkezeti alkalmasságát szabadalmaztatáshoz. A továbbiakban ezeket a szelektált hitmolekulákat kell kináz szelektivitás panelban összehasonlítaniuk illetve *in vivo* kísérleti modelleket előkészíteniük további vizsgálatukhoz.

A kutatócsoportunk által kifejlesztett, számos biológiai tesztünkben specifikusan és hatékonyan működő molekulánk, a TT-232 jelű szomatosztatin analóg jelátviteli mechanizmusát vizsgáltuk. Sikeresen igazoltuk, hogy a TT-232 jelátvitelében a piruvat kináz M2 izoenzime egy fontos target molekula, amelynek szerepe lehet a TT-232 által indukált kaszpázmentes apoptózis folyamatában.

2.3.2. Capsaicin receptor mediálása

A neurogen gyulladást gátló somatostatin analog TT232 követő molekulák hatásmechanizmusával kapcsolatban meg kívántuk vizsgálni, hogy ezek a peptidok befolyásolják-e a neurogen gyulladás szabályozásában fontos szerepet játszó másik mechanizmust a Capsaicin receptor által mediált hatást is.

Ugyanakkor a Capsaicin jeltovábbítási mechanizmusa gátlása céljából előállított kináz gátlók között egy sorozat Capsaicin agonistának tekinthető molekulát is előállítottunk ezért néhány reprezentatív anyag esetében ezen anyagok Capsaicin receptor aktiváló hatását is megvizsgáltuk. Ennek során Szolcsányi professzorék 5 anyagunk hatását vizsgálták Capsaicin receptor aktivációra, és nem találtak szignifikáns antagonist hatást, tehát ezek az anyagok nem a Capsaicin receptor mediálásával fejtik ki neurogen gyulladást gátló hatásukat. Ezek után a hatóanyag fejlesztésünket a szomatosztatin receptor mediált hatásra koncentráltuk.

3. Analitikai vizsgálatok

Elvégeztük lipofilitás kísérleti vizsgálatára, izomerek elválasztására alkalmas módszerek (nagynyomású folyadékkromatográfiás (HPLC) és micelláris elektrokinetikai kromatográfiás (MEKC) módszerek kidolgozását és gyakorlati alkalmazását.

3.1 HPLC

Felállítottunk és alkalmaztuk a laboratóriumunkban egy gyors és megbízható RP-HPLC módszert amely alkalmas egy könyvtár tagjainak kromatográfiás paramétereit folyamatosan meghatározni, valamint a CLOGP értékek számítását is elvégezzük. Ezzel a módszerrel 2 különböző könyvtár tagjait (21 különböző polaritású izokromanon, valamint 24 benzilidén cikloalkanon) jellemeztük kísérletileg meghatározott retenciós idővel és computer segítségével számított lipofilitási adatokkal, valamint elvégeztük a TT-232 molekula peptidomimetikus követő molekuláinak (TAEA-származékok) lipofilitási karakterizálását is.

A kifejlesztett RP-HPLC módszer, egítségével izokromanonok E és Z-izomerjeit különítettük el. Ennek a jelentőségét az adja meg, hogy biológiailag csak az egyik izomer (E: 2,4-dimetoxi-fenil származék) aktív. Igen erős tumorgátló hatású vegyület ($IC_{50}:0.27 \mu M$), bebizonyítottuk, hogy hatását erős apoptózis indukálás útján váltja ki. Hasonló kémiai szerkezettel rendelkező, 38 auron és tioauron származék elválasztása és lipofilitásának karakterizálása is megtörtént mind tradicionális fordított fázisú C8 oszlopon mind immobilizált mesterséges membrán (IAM) oszlopon. Ezen belül az IAM oszlop hatékonyabb volt az izomer auron-tioauron vegyületek elválasztásában, így lipofilitásuk megkülönböztetésében is.

Aril-metil tetralonok körében HPLC módszerrel sikerült meghatároznunk azt az optimális lipofilitási tartományt (a vizsgált molekulák körében), ahol az előállított molekulák nagy valószínűséggel jó antiproliferatív hatást mutatnak

3.2. MEKC

Fordított fázisú HPLC, illetve micelláris elektrokinetikai módszereket alkalmaztunk különböző molekulakönyvtárak tagjai lipofilitásának jellemzésére, összehasonlítására. Aril-metil tetralonok körében HPLC módszerrel sikerült meghatároznunk azt az optimális lipofilitási tartományt (a vizsgált molekulák körében), ahol az előállított molekulák nagy valószínűséggel jó antiproliferatív hatást mutatnak.

Micelláris elektrokinetikai kromatográfiában megfelelően összeválogatott, ismert lipofilitású molekulák (tesztelegy) felhasználásával módszert dolgoztunk ki az állófázisok jellemzésére, összehasonlítására.

Elvégeztük a laboratóriumunkban kidolgozott fázistartózkodási idők gyakorlati alkalmazhatóságának vizsgálatát. Bizonyítottuk, hogy a micelláris fázistartózkodási idő, mint kísérletileg meghatározható paraméter alkalmazásával jellemezni, illetve összehasonlítani tudjuk a micelláris elektrokinetikai kromatográfiában alkalmazott különböző kémiai jellegű pszeudo-stacionáris fázisok metilén szelektivitását. Az elemzést a leggyakrabban alkalmazott NaDS megosztófázison túl más kationos és anionos pszeudostacionaris fázisokra terjesztettük ki.