



**BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM
VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR OLÁH GYÖRGY DOKTORI
ISKOLA**

D-aminosav oxidáz inhibitorok tervezése és szintézise

Tézisfüzet

Szerző: Szilágyi Bence
Témavezető: Keserű György Miklós

Gyógyszerkémiai Kutatócsoport
Természettudományi Kutatóközpont
Magyar Tudományos Akadémia



2019

1. Bevezetés

A pszichotikus tüneteket 3 kategóriába sorolhatjuk: pozitív, negatív és kognitív. A pozitív tünetek közé tartoznak a téveszmék, zavaros gondolatok és hallucinációk, míg a negatív tünetek a normális emberi érzelmi reakciók hiányát foglalják magukba, valamint e tüneteken kívül a betegek tanulási és emlékezési problémákkal is rendelkeznek.

A pozitív tünetek jól reagálnak a gyógyszeres kezelésre, azonban a negatív és kognitív faktorokra kevésbé vannak hatással ezek a készítmények. Tanulmányok alapján a D-aminosav oxidáz enzim gátlása és D-szerin adagolása közvetett módon enyhítheti a negatív és kognitív tüneteket, ezért doktori munkám során olyan heterociklusos molekulák azonosítását, szintetizálását és tesztelését tűztem ki célul, amelyek D-aminosav oxidáz gátló tulajdonsággal rendelkeznek.

2. Irodalmi háttér

2.1. A D-aminosav oxidáz biológiája és szerkezete

A D-aminosav oxidáz enzim (DAAO) egy flavoprotein ami a semleges D-aminosavak oxidatív deaminálását katalizálja a megfelelő imino savvá, ami a víz jelenlétében a megfelelő α -keto karbonsavvá és ammóniává alakul, miközben a redukált FAD oxigén hatására visszaoxidálódik hidrogén-peroxid keletkezése közben.

Az emlősökben a DAAO három szervben található meg: az agyban, a vesékben és a májba. Az agyban a DAAO fő feladata az neurotranszmitterként funkcionáló D-szerint szintjének kontrollálása, ami az *N*-metil-D-aszpartát (NMDA) receptor koagonistájaként funkcionál. A DAAO leginkább a peroxiszómákban található, azonban az idegsejtekben ezeken kívül is előfordul. Megtalálható mind a neuronokban, mind a gliasejtekben.

Annak ellenére, hogy az emberi DAAO (hDAAO) jelenlétét már 1966-ban azonosították az agyban, a központi idegrendszerben betöltött szerepe egészen 1992-ig ismeretlen volt, amikor az analitikai módszerek fejlődésének köszönhetően sikerült szabad D-szerin jelenlétét igazolni patkány agyban.

Az enzim első kristályszerkezetét sertés veséből izolált DAAO felhasználásával határozták meg 1996-ban, majd később ezt elvégezték hDAAO felhasználásával is. Miután az enzimet lehetséges skizofrénias célpontként azonosították, jelentős figyelem irányult az enzim szerkezetének felderítésére és több mint egy tucat, vad típusú, ligandumot tartalmazó vagy szabad formában jelen lévő kísérleti enzimszerkezetet publikáltak és vettek fel az RCSB Protein Data Bankba.

A hDAAO negyedleges szerkezete két összekapcsolt doménből áll, egy FAD-kötő doménből, amelyet az 1-87, 140-195 és 286-347 oldalláncok alkotnak; és egy szubsztrátkötő doménből, amelyet a 88-139 és 196-285 oldalláncok alkotnak. A hDAAO elérhető 3D struktúráinak szuperpozíciója arra utal, hogy a fehérje konformációs rugalmassága általában alacsony. Három régióban van megnövekedett mobilitás, ezek közül az egyik az aktív centrum bejáratát fedő láncszakasz.

A hDAAO aktív helyét a pozitív töltésű Arg283, a hidrogénkötés-donor Tyr228 és a hidrogénkötés-akceptor Gly313 karbonil csoport, a rugalmas Tyr224 és számos hidrofób aminosav (Leu51, Leu215 és Ile230), valamint a FAD izoalloxazin-gyűrűje határolja körül.

2.2. DAAO szerepe a skizofréniában

Az aminosavak peptid és fehérje építőelemek, de fontos szerepet játszanak biokémiai szabályozókként, mint például autofágia szabályozók és neurotranszmitterek.^{1,2}

Az analitikai módszerek érzékenységének fejlesztése nagyban hozzájárult a D-aminosavak, például D-szerin, D-alanin és D-aszpartát kimutatásához emlősökben. Ugyanakkor a D-aminosavakat szintetizáló vagy metabolizáló enzimek jelenlétét is igazolták, amelyek lehetővé tették az aminosavak funkciójának azonosítását az endokrin- és az idegrendszerben.

A D-szerin az idegrendszerben és kisebb mértékben az endokrin rendszerben található meg. A központi idegrendszer D-szerinben gazdag régiói a striantum, agykéreg és a hippokampusz. A D-szerin a rágcsálók és az emberek agyában, középső agyában és gerincvelőjében is kimutatható.

A D-szerin koncentrációját a szerin racemáz (SR) és a DAAO szabályozza. Előállítását a SR végzi L-szerinből, míg lebontásában mind a SR, mind pedig a DAAO szerepet játszik. Ez utóbbi expressziója az emberi agyban egyaránt függ az életkorral és az agyi régiótól.

A D-szerin eloszlása a központi idegrendszerben nagyon hasonló az NMDA receptoréhoz. Az NMDA receptor aktiválásához mind glutamát, mind pedig D-szerin vagy glicin szükséges. A receptor befolyásolása súlyos hatással van a szinaptikus aktivitásra, a tanulásra és az emlékezetre.³ Az NMDA receptor diszfunkciójának szerepe van a skizofréria pozitív (pszichotikus), negatív és kognitív tüneteiben is.⁴ Genetikai vizsgálatok alapján kapcsolat van a skizofréria és a DAAO-nál, valamint annak regulátoránál (G72) fellépő single nukleotid polimorfizmus között.

Ezenkívül arról is beszámoltak, hogy a DAAO expressziója és enzimaktivitása megnövekedett skizofréria betegek poszt mortem agyszövetmintáiban az egészséges kontrollhoz képest,⁵ valamint a SR / DAAO arány csökkent, ami csökkent SR szintere és / vagy emelkedett DAAO szintre utal.

A fenti eredmények arra mutatnak rá, hogy a test D-szerin szintjének növelése jótékony hatással lehet a skizofréria kezelésére, de az optimális hatás elérése érdekében nagy dózisú D-szerin adagolásra van szükség, amelyet viszont a fellépő nefrotoxikus hatások miatt nem ajánlatosak. A nefrotoxicitás oka a DAAO által metabolizált D-szerin lebomlásával előállított

¹ Efeyan, A.; Comb, W.C.; Sabatini, D.M. Nutrient-sensing mechanisms and pathways. *Nature* **2015**, *517*, 302–310, doi:10.1038/nature14190

² McDonald, J.W.; Johnston, M. V Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **1990**, *15*, 41–70, doi:10.1016/0165-0173(90)90011-C

³ Mothet, J.-P.; Le Bail, M.; Billard, J.-M. Time and space profiling of NMDA receptor co-agonist functions. *J. Neurochem.* **2015**, *135*, 210–25, doi:10.1111/jnc.13204

⁴ Newcomer, J.W.; Krystal, J.H. NMDA receptor regulation of memory and behavior in humans. *Hippocampus* **2001**, *11*, 529–542, doi:10.1002/hipo.1069

⁵ Burnet, P.W.J.; Eastwood, S.L.; Bristow, G.C.; Godlewska, B.R.; Sikka, P.; Walker, M.; Harrison, P.J. D-amino acid oxidase activity and expression are increased in schizophrenia. *Mol. Psychiatry* **2008**, *13*, 658–60, doi:10.1038/mp.2008.47

hidrogén-peroxid. A D-szerin szint növelésének másik lehetséges módja a lebontásért felelős enzimaktivitás gátlása, ezáltal a D-szerin szint növelése és az NMDA jel helyreállítása.

2.3.2.3. DAAO inhibitorok, azok in vitro tulajdonságai és in vivo hatásai

Az emberi DAAO elsősorban olyan nagy aromás részeket tartalmazó D-aminosavakon aktív, mint a D-Tyr, D-Phe és D-Trp, amelyet kis, töltés nélküli D-aminosavak, például D-Ser, D-Ala és D-Pro követnek. Az ismert inhibitorok közül sok hasonló az endogén ligandumokhoz, amelyek kicsi és poláros vegyületek.

A DAAO inhibitorok fontos kötési motívumai közé tartozik egy negatívan töltött rész, ahol a ligandum két heteroatomja sóhidat képez az Arg283-mal, és egy sík, elektronban gazdag rész, amely a FAD kofaktor izoalloxazin-gyűrűjével párhuzamosan helyezkedik el, és így π - π kölcsönhatást alkot. További kölcsönhatások, amelyek hozzájárulnak néhány ligandum kötődéséhez, a hidrogénkötések a Gly313 gerincéhez és a Tyr228 oldalsó láncához, valamint egymásra ható kölcsönhatások a Tyr224-gyel. Érdemes megjegyezni, hogy a kötőzseb az Arg283 oldalán erősen poláris, míg az ellenkező oldalon túlnyomóan hidrofób.

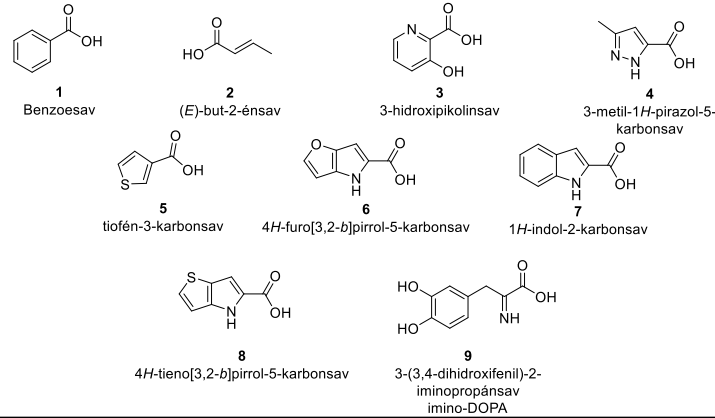
A DAAO aktív helyének tulajdonságai miatt (viszonylag kicsi és erősen poláros) fragmentum méretű molekulák DAAO inhibitorokként történő vizsgálata relevánsnak tűnt. A fragmens könyvtárakat kis méretű és alacsony bonyolultságú vegyületekből állítják elő. A vegyületeknek meg kell felelniük a következő kritériumoknak⁶:

- moláris tömeg kisebb mint 300 Da (vagy a nehéz atomok száma $8 \leq N_{\text{heavy}} \leq 22$),
- H-kötés donorok és akceptorok száma ≤ 3
- forgatható kötések száma ≤ 3
- $\log P_{\text{számított}} \leq 3$
- poláris molekulafelszín (PSA) korlátozott $\text{PSA} \leq 60 \text{ \AA}^2$.

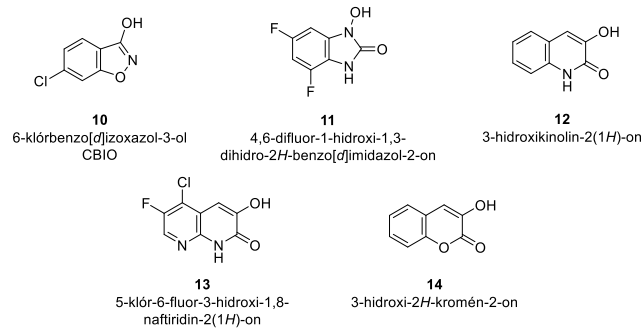
Az irodalomból ismert DAAO inhibitorok jelentős része megfelel ezeknek a feltételeknek, mindezekon túl a negatív töltést tartalmazó csoport típusa és a sík, elektronban gazdag molekularész alapján ezek az inhibitorok három különböző generációra oszthatók.

⁶ Congreve, M.; Carr, R.; Murray, C.; Jhoti, H. A “rule of three” for fragment-based lead discovery? *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 876–7

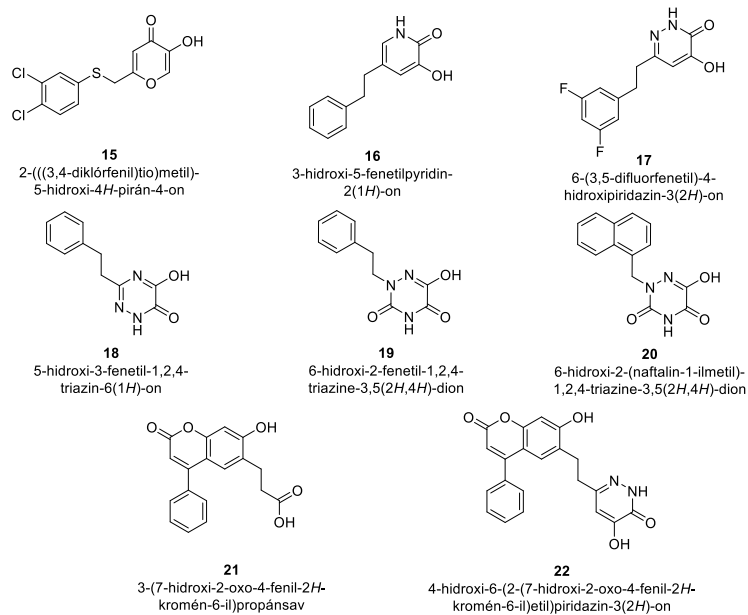
Class I



Class II



Class III



1. ábra Ismert D-aminosav oxidáz inhibitorokra

Az első generációs DAAO inhibitorok karbonsavak (1. ábra, **1-9**). Ezen vegyületek karboxilcsoportja kölcsönhatásba lép az Arg283-mal a katalitikus helyen ezáltal kialakítva a sóhidat. A molekulák tartalmaznak egy kis alifás vagy aromás csoportot is, amely lehet egyetlen gyűrű vagy kondenzált kettős gyűrű. Az aromás gyűrűk előnyösek ebben a helyzetben, mivel azok π - π kölcsönhatás képeznek a FAD kofaktor izoalloxazin gyűrűjével és a Tyr224 oldalsó

lánccával. Egy megfelelően elhelyezett hidrogénkötés-donor (**4, 6-9**) képes hidrogén kötést képezni a Gly313 karbonil csoportjával.⁷

A második generációs inhibitorok (1. ábra, **10-14**) karbonsav bioizoszterikus csoportot tartalmaznak, miközben megtartják a kondenzált kettős gyűrűs szerkezetet. A karbonsav bioizoszter csoportokat benzollal vagy más 6-tagú heterociklussal kondenzálva jó DAAO inhibitorokat kapunk. Bioizoszter csoportként 5- vagy 6-tagú heterociklusos vegyületeket alkalmaznak, amelyekben endo és exo helyzetű heteroatomok is találhatóak. Ezen vegyületekről általánosan elmondható, hogy a kondenzált gyűrű kis csoportokkal (F, Cl, Me) történő szubsztitúciója potenciálisan előnyös, míg a nagyobb csoportok jelenléte csökkenti az affinitást.⁷

A harmadik generációs inhibitorok (1. ábra, **15-22**) is ciklikus karbonsav bioizosztereken alapulnak, amelyeket egy flexibilis linker kapcsol össze egy nagyméretű, nem poláros molekulárral. Az ilyen típusú inhibitorok megtartják a korábbi inhibitorok alapvető kölcsönhatásait, nevezetesen az Arg283-at, Tyr228-at és a FAD izoalloxazin-gyűrűjét, és az izoalloxazin-gyűrű síkjára merőleges irányban terjednek ki. Ez a meghosszabbítás a Tyr224 maradék rugalmassága miatt lehetséges, amelyet először az imino-triptofánnal komplexált sertés DAAO röntgenszerkezetében figyeltek meg. A Tyr224 rugalmasságát kimutatták a hDAAO imino-DOPA-val (**9**), valamint a fenetil-szubsztituenseket tartalmazó inhibitorokkal alkotott komplexeiben is.⁷

3. Kísérleti módszerek

3.1. Általános információk

Az olvadáspontot OptiMelt SRS-en (Sunnyvale, CA, USA) határoztuk meg. Az NMR méréseket Varian NMR System 500 spektrométeren (Palo Alto, CA, USA) vagy Varian NMR System 300 spektrométeren (Palo Alto, CA, USA) végeztük, az ¹H és ¹³C-NMR spektrumokat 30°C-on mértük. megfelelő oldószer. Az ¹H és ¹³C kémiai eltolódásokat milliomodrészben (δ) fejezzük ki, a TMS vagy az oldószer maradékjelei alapján. A reakciókat Merck szilikagél 60 F₂₅₄ vékonyréteg-kromatográfiai lemezekon (Darmstadt, Németország) követjük nyomon. Az összes vegyszert és oldószert a megvásárolt minőségben használtuk. A HPLC-MS méréseket Shimadzu LC-MS-2020 eszközzel (Kiotó, Japán) végeztük, amely Reprospher 100 C18 (5 μ m, 100 \times 3 mm) oszloppal és pozitív-negatív kettős ionforrással (DUI \pm) van felszerelve, négyszög-tömeeggel. spektrométer 50-1000 m/z tartományban. A mintát gradiens elúcióval eluáljuk A eluálószer (0,1% hangyasav vízben) és B eluens (0,1% hangyasav acetonitrilben) alkalmazásával. Az áramlási sebességet 1,5 ml / percre állítottuk be. A kezdeti körülmény 0% B eluens volt, amelyet egy lineáris gradiens 100% B eluenshez követett 2 percre, 2–3,75 percre a 100% B eluens megmaradt, és 3,75–4,5 perccel vissza az eredeti állapothoz és 5 percre megmaradt. Az oszlop hőmérsékletét 30°C-on tartottuk, és az injektálási térfogat 1 μ l volt. A nagy felbontású tömegspektrometriás méréseket Q-TOF Premier tömegspektrométerrel (Milford, MA, USA) végeztük pozitív elektropray ionizációs módban.

⁷ Szilágyi B, Ferenczy GG, Keserű GM. Drug discovery strategies and the preclinical development of D-amino-acid oxidase inhibitors as antipsychotic therapies. Expert Opin. Drug Discov. 2018;13:973–982.

3.2. Biológiai mérések

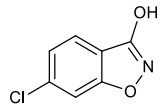
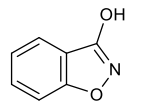
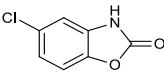
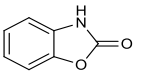
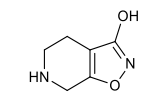
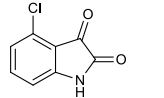
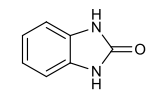
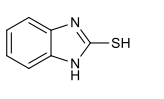
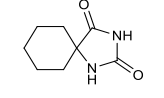
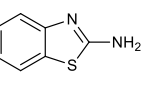
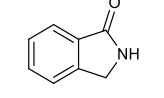
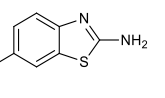
D-2-amino-4-(2-aminofenil)-4-oxobutánsavat (D-KYN) használtunk a D-aminosav-oxidáz aktivitás mérésére az alábbiakban ismertetett protokoll alapján. Emberi DAAO-t (TargetEx Ltd-től vásárolt (Dunakeszi, Magyarország)) használtunk a mérésekhez. A puffer 20 mM TRIS-HCl-ot és 100 mM NaCl-ot tartalmazott. A flavin adenin-dinukleotidot (FAD - a Sigma-Aldrich-től (St. Louise, MO az USA-ban) vásárolt) is alkalmaztunk a vizsgálatban. A vegyületeket eredetileg DMSO-ban oldottuk, és a mért mintákat pufferoldattal hígítottuk (a végső DMSO koncentráció mindig 5% alatt volt). A kevert oldatot 37 ° C-on 1 órán át inkubáltuk. Az enzimatis reakció után ZnCl₂-ot oldatot adtunk hozzá és vortexben kevertük. Az egyponos méréseket 20 µM-os inhibitor-koncentráció mellett hajtottuk végre, az IC₅₀ mérésekhez az inhibitorokat 5 nM, 50 nM, 500 nM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 50 µM koncentrációban alkalmaztuk. A méréseket egy Citation3 cell imaging multi-mode microplate readerrel (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) végeztük 364 mérőhelyes lemezekkel. Az alkalmazott hullámhosszak 340 nm és 396 nm voltak.

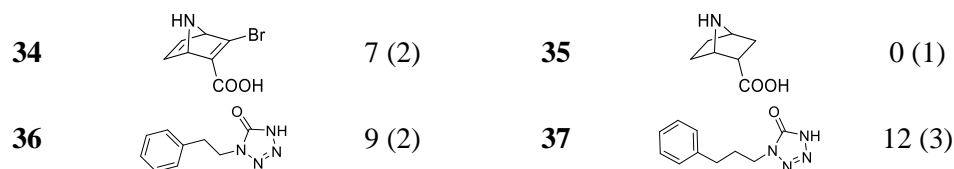
4. Eredmények

4.1. A katalitikus zsebbe beférő fragmensek

Mint korábban említettük, a fragmensek DAAO inhibitor-ként való tesztelése logikusnak tűnt, így új DAAO aktív szerkezetek azonosítása érdekében első lépésként fragmentum méretű [6+5] típusú kondenzált és spiro-heterociklusos vegyületek, valamint néhány alkil láncsal kapcsolt benzol és heterociklusos vegyület virtuális szűrését végeztük el. A magas dokkolási pontszámú vegyületeket megvásároltuk vagy szintetizáltuk és *in vitro* teszteltük (1. táblázat).

1. táblázat DAAO inhibitor-ként vizsgált vegyületek

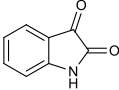
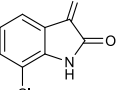
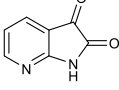
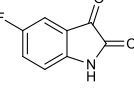
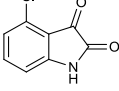
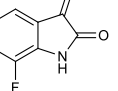
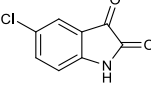
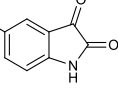
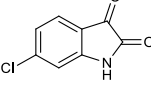
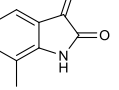
Vegyület	Szerkezet	Inhibíció % 20µM- ban ^a	Vegyület	Szerkezet	Inhibíció % 20µM- ban ^a
10 (CBIO)		114 (3)	23 (BIO)		101 (2)
24		0 (2)	25		26 (1)
26		0 (1)	27		46 (6)
28		0 (2)	29		1 (0)
30		-1 (1)	31		0(0)
32		26 (1)	33		-4 (4)



^a a méréseket két párhuzamosban végeztük; a százalékos szórás értékek zárójelben vannak feltüntetve

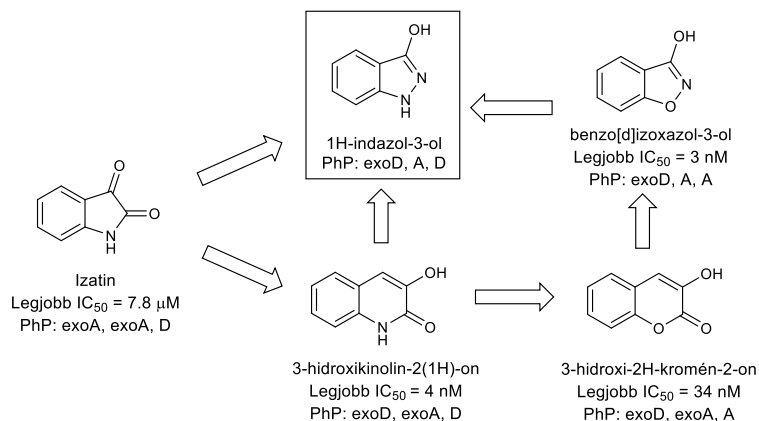
A különböző alapvázú vegyületek közül a **27**-es izatin származék mutatta a legnagyobb aktivitást, így a következő lépésben különféle származékokat vizsgáltunk, amelyek kereskedelmi forgalomban elérhetőek voltak. (2. táblázat)

2. táblázat Izatin analógok gátlási értékei

Vegyület	Szerkezet	IC_{50} [μM] vagy inhibíciós % 20 μM -ban ^a	Vegyület	Szerkezet	IC_{50} [μM] vagy inhibíciós % 20 μM -ban ^a
46		19% (1)	50		7.87(7)
47		0% (1)	51		49% (7)
27		46% (6)	52		12% (2)
48		13% (2)	53		8% (3)
49		-1% (1)	54		13.1(20)

^a a méréseket két párhuzamosban végeztük; a százalékos szórás értékek zárójelben vannak feltüntetve

Ezen vegyületek közül az **50** és **54** mutattak észlelhető aktivitást, de az alacsony mikromólos gátlási értékeik nem indokolták a további optimalizálást.

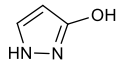
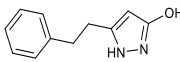
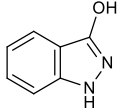
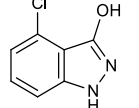
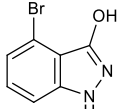
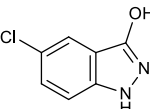
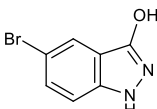
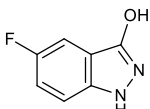
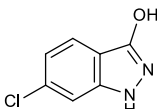
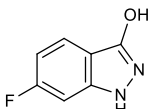
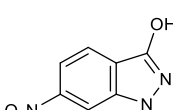
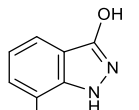


2. ábra Az 1H-indazol-3-ol vázhoz vezető tervezési paradigma

Ezen inhibitorok (2. ábra) farmakofór csoportjainak elemzése ígéretes alapvázhhoz, az 1*H*-indazol-3-olhoz vezetett. Az 1*H*-indazol-3-ol esetében a farmakofór tartalmaz endo helyzetű H-kötés-donort (NH), endo helyzetű H-kötés-akceptort (N) és egy exo helyzetű H-kötés-donort (OH). Ez a váz nagyon hasonló a benzo[d]izoxazol-3-olhoz, de különbség van a heteroatom szerepében a heterociklusos gyűrű 1. helyzetében. Ennek a heteroatomnak a változtatása kedvezőnek tűnt, mivel a hasonló különbséggel rendelkező [6+6] tagú inhibitorok esetében a H-donort tartalmazó származék IC₅₀ értéke a tizede volt az NH-csoport és a Gly313 közötti extra H-kötés miatt.

Ebből kifolyólag kísérleti munkánk célja az 1*H*-indazol-3-ol váz szubsztituált változatainak vizsgálata volt. Számos 1*H*-indazol-3-ol származékot készítettünk és teszteltünk DAAO inhibitoroként erre a célra (3. táblázat).

3. táblázat Az 1*H*-indazol-3-ol fragmensek DAAO gátló hatása.

Vegyület	Szerkezet	IC ₅₀ [μ M] vagy inhibíciós % 20 μ M-ban ^a	Vegyület	Szerkezet	IC ₅₀ [μ M] vagy inhibíciós % 20 μ M-ban ^a
57		0% (0)	60		66% (2)
61		nem mérhető ^b	62		19% (8)
63		34% (0)	64		nem mérhető ^b
65		nem mérhető ^b	66		nem mérhető ^b
67		0,15 (13)	68		0,12 (42)
69		1,20 (25)	70		10,1 (13)

^a a méréseket két párhuzamosban végeztük; a százalékos szórás értékek zárójelben vannak feltüntetve

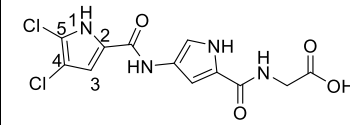
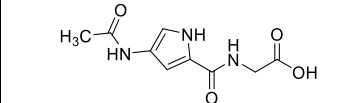
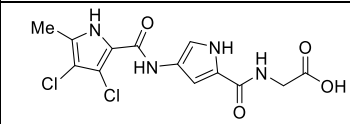
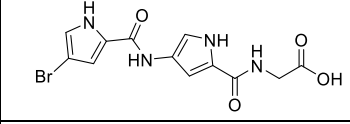
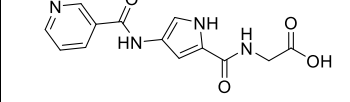
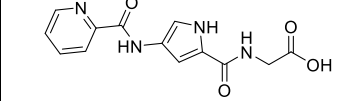
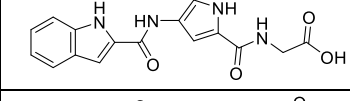
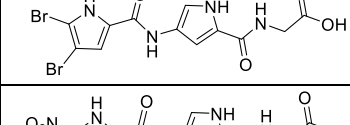
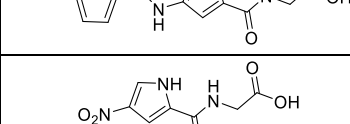
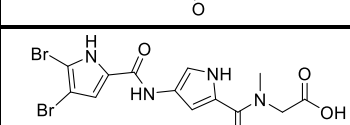
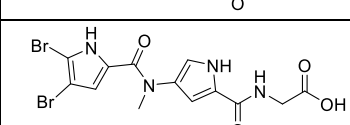

^b erős autofluoreszcencia

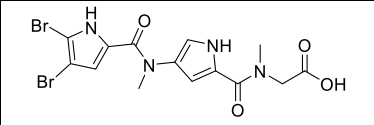
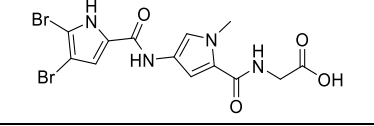
Bár a heterociklus önmagában (**57**) nem mutatott aktivitást, mind a **60**-as fenetil-származék, mind pedig a benzo-kondenzált származékok aktívnak bizonyultak. Az 1*H*-indazol-3-ol különböző származékai közül a 6-os és 7-es pozícióban módosított vegyületek szignifikáns aktivitást mutattak, a 6-klór és a 6-fluor nanomólos gátlási értékkel rendelkezett.

A tesztvegyületek pK_a értékei általában 7 és 8 között vannak, ami arra utal, hogy a vizsgálat pH-ján legalább részleges deprotonálódás következik be. Egyes vegyületek esetében az erős autofluoreszcencia tulajdonságuk miatt az általunk használt mérési módszerrel nem

Annak érdekében, hogy feltárjuk a poláris interakciós hálózat hatását, különös tekintettel az NH-csoportok szerepére, metil csoportokat vittünk be a két amid nitrogén atomjához és a közepső pirrol gyűrű nitrogénjéhez (**99,102,103,109**). Az *N*-metilezés befolyásolja a vegyületek H-kötési képességét, a kitöltött helyet és az általuk előnyben részesített konformációt is.

4. táblázat DAAO inhibitor aktivitása a tervezett lineáris open-lid vegyületeknek

Vegyület	Szerkezet	% INH 20 μM -ban ^a	IC ₅₀ [μM] ^a
71		100 (0) %	5,2 (11)
83		39 (0) %	-
84		100 (0) %	8,8 (26)
85		100 (0) %	6,7 (27)
86		45 (2) %	-
87		18 (2)%	-
88		8 (1) %	-
89		100 (0) %	0,39 (5,1)
90		33 (8) %	-
91		35 (4) %	-
99		100 (0) %	0,49 (12)
102		0 (8) %	-

103		0 (3) %	-
109		32 (1) %	-

^a a méréseket két párhuzamosban végeztük; a százalékos szórás értékek zárójelben vannak feltüntetve

A 4. táblázat adatai azt mutatják, hogy minden aktív vegyület tartalmaz terminális, nagy térkitöltésű szubsztituenszt tartalmazó pirrol gyűrűt. A szubsztituálatlan piridin csoporttal (**86**, **87**) vagy a terminális pirrollal (**83**, **88**, **91**) nem rendelkező vegyületek alacsony gátlási értéket mutatnak. Dokkolt helyzetük vizsgálatakor megfigyeltük a sóhíd jelenlétét a karboxilát-csoport és az Arg283 között, ám a vegyületek nem képesek más, a nagy affinitású DAAO inhibitorokra jellemző kölcsönhatásokat kialakítani. Nem észlelhető a FAD izoalloxazin-gyűrűje és a ligandumok közepső része között kialakuló kedvező kölcsönhatás.

A sorozatban a legjobb aktivitással a **89** és a **99** rendelkezett. Mindkét származék bróm szubsztituenseket tartalmaz a terminális pirrolgyűrűn. Figyelemre méltó, hogy a **85**-ös vegyület, amely a 4-es helyzetben egyetlen Br szubsztituenszt tartalmaz, és az 5. helyén szubsztituálatlan, kisebb aktivitású, mint a 4,5-helyzetekben diszubsztituált **89**-es vegyület. A szubsztituens fontosságát az 5-ös helyzetben mégjobban szemlélteti a **71**-es (IC₅₀=5,2 μM) és a **84**-es (IC₅₀=8,7 μM) vegyület, amelyek a 5-Cl és a 5-metil szubsztituenseket tartalmaznak. A bróm szubsztituenszt tartalmazó származékok aktivitásának tízszeres növekedése annak tulajdonítható, hogy Br térkitöltése egyfelől nagyobb, mint akár a Cl, akár a Me csoportoké, másrészt képes halogénkötést képezni a Ser223 karbonil csoportjával.

A láncközi pirrol gyűrű metilezése jelentős aktivitásvesztéshez vezetett (hasonlítsa össze a **89** és a **109** vegyületet). Ez a metilcsoport megakadályozza a H-kötés képződését a Gly313-mal, és a dokkolási pózok szerint szterikus ütközést okoz a fehérje vázával. A molekulák karboxil csoportot tartalmazó végéhez közeli amid nitrogén metilezése nem befolyásolja az aktivitást a **89** és a **99** vegyület összehasonlítása alapján. A dokkolásos vizsgálatok azt sugallják, hogy ez az amid képes mind cisz-, mind transzkonformációt felvenni anélkül, hogy jelentősen befolyásolná a terminálisan szubsztituált pirrol helyzetét. A transz amid konformáció a kedvezményezett a **89**-es vegyületnél, míg cisz konformáció a metil-amid (**99**) származéknak.

A pirrol gyűrűk közötti amid csoport a predikciók alapján cisz konformációjú. Ennek eredményeként egy csavart alakú molekulát lehet feltételezni a nyitott állású lid által határolt kötőzsebbe. A szekunder cisz amid jelenléte figyelemre méltó, ugyanis az amidok a transz konformációt preferálják mind proteinek¹¹, mind pedig kis molekulák¹² esetében. Mindazonáltal vannak olyan példák, amelyekben a ligandumok cisz-amid-konformációval kötődnek a fehérjékhez (PDB: 1HTG, 1AJ6, 1YBH), ami azt mutatja, hogy az intermolekuláris

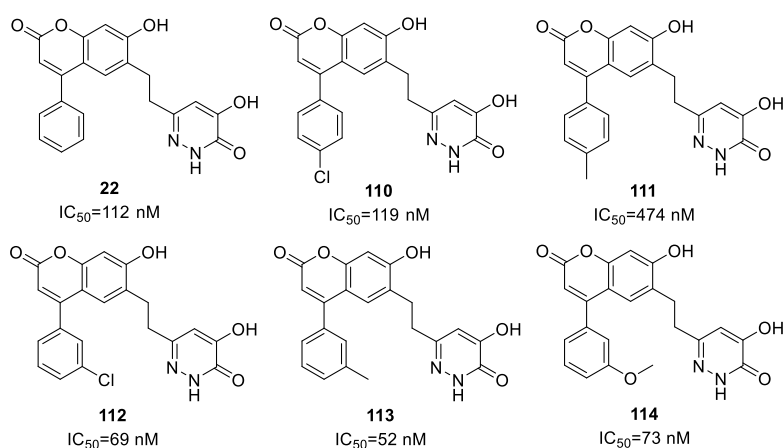
¹¹ Weiss, M.S.; Jabs, A.; Hilgenfeld, R. Peptide bonds revisited. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 676, doi:10.1038/1368

¹² Brameld, K.A.; Kuhn, B.; Reuter, D.C.; Stahl, M. Small molecule conformational preferences derived from crystal structure data. A medicinal chemistry focused analysis. *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, *48*, 1–24, doi:10.1021/ci7002494

kölcsönhatások képesek kompenzálni az amid-transz-cisz transzformáció miatti energianövekedést. A szekunder amidok tercier amiddá alakítása növeli a cisz-konformáció hajlamát. Ezért az amid metilezése, amelyről feltételezhetően átveszi a cisz-konformációt, képes lehet növelni az aktivitást a cisz-konformáció elfogadásának megkönnyítésével. A metilezés másik hatása azonban a molekula terigényének növekedése. A **102** és **103** vegyületek dokkolása azt mutatja, hogy ez a metilcsoport közel van a 48-63 aminosav szakasz által kialakított hurokhoz. Ennek a szterikus ütközésnek a **102**-re és a **103**-ra gyakorolt hatását nem lehetett előre jelezni, mivel ennek a huroknak a konformációja vagy változó (lásd pl. PDB 3ZNQ és 4QFC kódot), vagy részben hiányzik (3CUK és 4QFD) a rendelkezésre álló kristályszerkezetekben, amely szerkezeti rugalmasságra utal. A pirrol gyűrűk között amid metilezésével az aktivitás teljes elvesztése volt tapasztalható, (hasonlítsuk össze a **89** és a **99** vegyületet a **102** és **103** vegyülettel) ami azt sugallja, hogy ez a hurok nem képes olyan konformációt kialakítani, amely lehetővé teszi a metilezett amidcsoport elhelyezését.

4.2.2. L alakú vegyületek

Kutatócsoportunkban korábbi tanulmányok során azt vizsgáltuk, hogy a **22**-es vegyület aromás részének helyettesítése hogyan befolyásolja az aktivitást. Megállapítottuk, hogy a fenilcsoport a 3-as és 4-es pozícióban (4. ábra) történő szubsztitúciója az aktivitás enyhe javulását eredményezi, ezen vegyületek (**22,110-114**) IC_{50} értékei 52 és 474 nM között voltak.



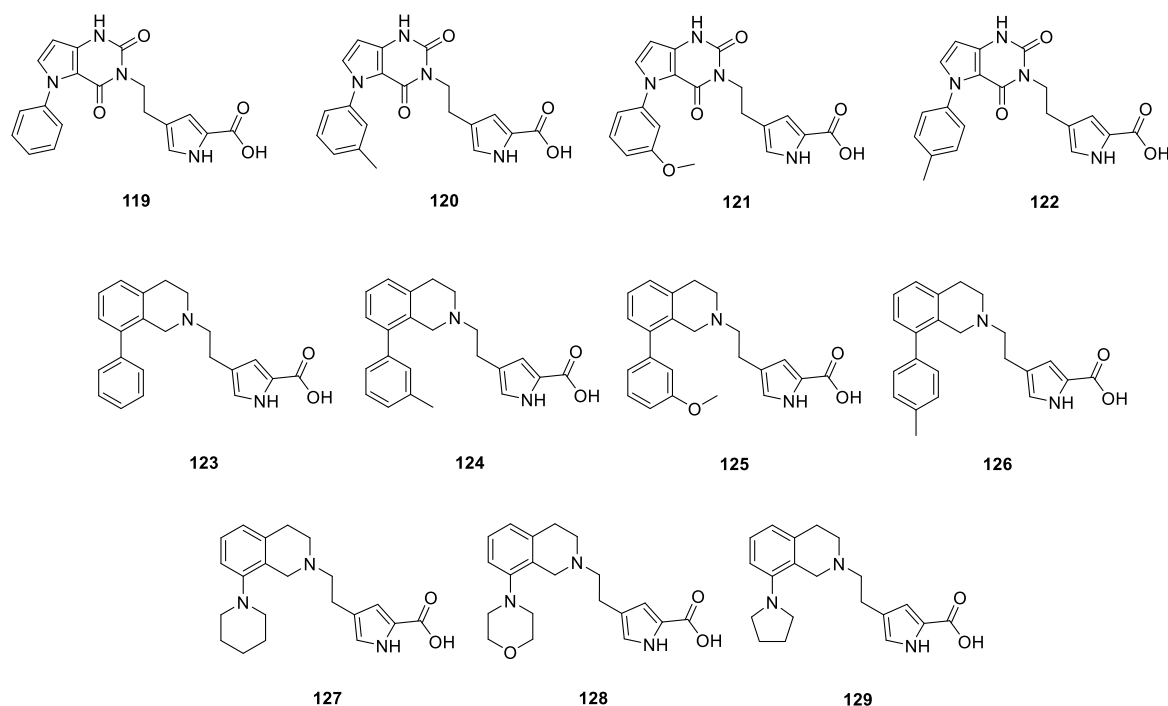
4. ábra A **22**-es vegyület aromás részen mono-szubsztituált származékai

Az eredmények alapján olyan új vegyületeket terveztünk, amelyek a **22**-es vegyület származékainál látható helyzetben tartalmazzák a megfelelő szubsztituenseket.

Munkánk során mi a linker részre helyeztük a hangsúlyt. Az eredeti linkerből kiindulva kiválasztottuk az 1,5-dihidro-2*H*-pirrolo[3,2-*d*]pirimidin-2,4(3*H*)-dion és 1,2,3,4-tetrahidroizokinolin vázakat, amelyek alakja és lehetséges szubsztitúciós mintázata hasonló lehet.

Az aktív centrumhoz való koordinálódás eléréséhez az eredeti vegyületben alkalmazott piridazin gyűrű lett volna a legjobb választás, azonban nem sikerült megfelelő származékot

előállítani a kapcsolási reakcióhoz. Ezért úgy döntöttünk, hogy egy ismert savas inhibitor (pirrol-2-karbonsavat) kapcsolunk a molekulához.



5. ábra A tervezett, új linker egységet tartalmazó vegyületek

Az elkészített új vegyületeket (**119-122**; 5. ábra) a KYNA enzim gátlási vizsgálatban teszteltük, de sajnos nem mutattak gátló hatást 20 μM koncentrációban. Ha ezeket a vegyületeket összehasonlítjuk a **22** és **110-114** DAAO inhibitorokkal és az irodalomból ismert pirrol-2-karbonsavat tartalmazó inhibitorokkal, akkor ez arra utal, hogy a **119-122** molekulák linker része az ami az aktivitást teljes elvesztését okozhatja. A **22**-es vegyület 7-hidroxi-2*H*-kromén-2-on részének cseréje megváltoztatja a linker kölcsönhatásait, emellett módosítja mind a savas fejcsoport, mind a függő aromás molekularész kilépési vektorát a **119-122** vegyületekben. H-kötés jelenléte a **119-122**-es DAAO-komplexekben a Gln53-nel rendkívül valószínű, nem feltételezhető, hogy a Tyr224-gyel kialakul a víz által közvetített H-kötés. Talán még ennél is fontosabb, hogy a függő aromás csoportnak eltérő az orientációja a **119-122**-ben, ami felelős lehet a csökkent aktivitásért. Ez a csoport a **110-114** származékoknál a rugalmas hurok felé mutat, amelyet a 218–224 aminosavak képeznek, és előfordulhat, hogy az új vegyületek nem hoznak létre előnyös kölcsönhatásokat a hurokkal. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a linker jelentősen hozzájárul az inhibitorok DAAO aktivitáshoz, mind az enzimmel való kölcsönhatása során, mind pedig a függő aromás rész megfelelő irányítása során.

5. Tézispontok

1. Azonosítottam olyan 1*H*-indazol-3-ol szerkezettel rendelkező, nanomólos gátlási értékkel rendelkező vegyületeket, amelyeknek enzimkinetikai és titrálási kalorimetriás vizsgálatain túl, elvégeztük a protonáltsági és tautomer viszonyok feltérképezését, valamint metabolikus stabilitási és membrán permeabilitás vizsgálatokat követően *in vivo* hatékonyságukat is igazoltuk. [P1, P2]
2. Szintetizáltam olyan, a DAAO inhibitorokra jellemzően poláris végű, lineáris vegyületeket, amelyek nanomólos gátlási értékkel rendelkeznek, valamint az előállított származékok vizsgálatával feltérképeztem a vegyületcsaládra jellemző szerkezet-hatás összefüggéseket. [P3]
3. Előállítottam olyan ismert DAAO inhibitorból származtatható vegyületeket, amelyek a legtöbb ismert inhibitorral ellentétben kölcsönhatásba lépnek a kötőzsebet határoló 218-224-es hurokkal. Az így nyert információk hasznosak lehetnek olyan új vegyületek tervezésében, amelyek előnyösebb fizikai-kémiai tulajdonságokkal és ADME profillal rendelkeznek. [P4]

6. Alkalmazás

Az 1*H*-indazol-3-olt új DAAO inhibitoroként történő azonosításával egy új farmakofór csoportot sikerült felfedezni, amely az újonnan előállított vegyületek esetében lehetséges karbonsav bioizoszter csoportjaként működhet.

A enzim open-lid konformációhoz kötődő újonnan azonosított inhibitorok szintetikus értéke mellett a szerkezet-hatás összefüggés során kapott eredmények elősegíthetik az új vegyületek azonosítását és tervezését.

7. Publikációk

7.1. A tézishoz kötődő publikációk:

P1. Szilágyi B, Kovács P, Ferenczy GG, et al. Discovery of isatin and 1*H*-indazol-3-ol derivatives as D-amino acid oxidase (DAAO) inhibitors. *Bioorganic Med. Chem.* 2018;26:1579–1587. DOI: 10.1016/j.bmc.2018.02.004; IF: 2.881 ; I(FI):2(1)

P2. Orgován Z, Ferenczy GG, Szilágyi B, et al. Validation of tautomeric and protomeric binding modes by free energy calculations. A case study for the structure based optimization of D-amino acid oxidase inhibitors. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 2018;32:331–345. DOI: 10.1007/s10822-018-0097-y; IF:2.356 ; I(FI):4(1)

P3. Szilágyi B, Skok Ž, Rácz A, et al. Discovery of D-amino acid oxidase inhibitors based on virtual screening against the lid-open enzyme conformation. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2018;28:1693–1698. DOI: 10.1016/j.bmcl.2018.04.048; IF:2.442 ; I(FI):1(1)

P4. Szilágyi B, Hargitai C, Kelemen ÁA, et al. Synthesis and Biochemical Evaluation of Lid-Open D-Amino Acid Oxidase Inhibitors. *Molecules.* 2019;24:290. DOI: 10.3390/molecules24020290; IF: 3.060 (2018); I(FI):0(0)

P5. Szilágyi B, Ferenczy GG, Keserű GM. Drug discovery strategies and the preclinical development of D-amino-acid oxidase inhibitors as antipsychotic therapies. *Expert Opin. Drug Discov.* 2018;13:973–982. DOI: 10.1080/17460441.2018.1524459; IF:4.421 ; I(FI):1(1)

7.2. Egyéb publikációk:

Polyák M, Varga G, Szilágyi B, et al. Synthesis, enzyme kinetics and computational evaluation of *N*-(β -D-glucopyranosyl) oxadiazolecarboxamides as glycogen phosphorylase inhibitors. *Bioorganic Med. Chem.* 2013;21:5738–5747. DOI: 10.1016/j.bmc.2013.07.024; IF: 2.951; I(FD):11(3)

7.3. Előadások:

1. MTA TTK Szerves Kémiai Szeminárium, 2016. június 17.; D-aminosav oxidáz inhibitorok szintézise - Szilágyi Bence, Ferenczy György, Keserű György
2. MTA Alkaloid- és Flavonoidkémiai Munkabizottsági ülés, 2018. április 13.; D-aminosav oxidáz enzimgátló molekulák szintézise és vizsgálata - Szilágyi Bence, Ferenczy György, Keserű György
3. MTA Heterociklusos és Elemorganikus Kémiai Munkabizottsági ülés, 2018. május 07.; D-aminosav oxidáz enzimgátló molekulák szintézise és vizsgálata - Szilágyi Bence, Ferenczy György, Keserű György, Janez Ilaš