

**ELJÁRÁS ÉS KÉSZÍTMÉNY p53 CSALÁDBA
TARTOZÓ FEHÉRJE KONFORMÁCIÓS
STABILITÁSÁNAK MEGŐRZÉSÉRE**

Kivonat

A találmány tárgya eljárás egy, a p53 családhoz tartozó humán fehérje mutáns formájában vad típusú aktivitásának elősegítésére, amely fehérje fiziológiás körülmények között funkcionális konformációjának megtartására való képtelensége miatt a fehérje egy vagy több funkcionális aktivitása legalább részben csökken, amelynek során

(a) a mutáns fehérjét egy olyan nem-peptid típusú vegyülettel érintkeztetik, amely fiziológiás körülmények között képes ezen mutáns fehérje egy vagy több doménjének megkötésére, és a funkcionális konformációjának stabilizálására, és

(b) biztosítják ezen stabilizált fehérje vad típusú aktivitásában résztvevő egy vagy több makromolekulával való kölcsönhatását.

A találmány kiterjed a szerves, nem peptid típusú vegyületként (I), (II), (III), (IV) vagy (V) általános képletű vegyületet, a képletekben

R^5 jelentése $-NR^{18}R^{18}$ általános képletű csoport;

R^6 jelentése

adott esetben helyettesített alkil-, alkenil- vagy fenilcsoport vagy alkoxics csoport; és

R^7 és R^8 jelentése azonosan vagy különbözően hidrogénatom,



- nitro-, alkoxicsoport vagy halogénatom;
- R^9 jelentése adott esetben helyettesített alkil-, cikloalkil- vagy fenilcsoport;
- R^{10} jelentése $-NR^{18}R^{19}$ általános képletű csoport, ahol
- R^{11} és R^{12} jelentése hidrogénatom, nitro-, alkoxicsoport vagy halogénatom;
- R^{13} jelentése $-NR^{18}R^{19}$ általános képletű csoport, ahol
- R^{14} és R^{15} jelentése hidrogénatom, nitro-, alkoxicsoport vagy halogénatom,
- R^{16} jelentése $-NR^{18}R^{19}$ általános képletű csoport, ahol
- R^{17} jelentése hidrogénatom, nitro-, alkoxicsoport vagy halogénatom és
- A és B jelentése szén- vagy nitrogénatom, alkalmazása ilyen vegyületet tartalmazó, rák kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmény előállítására is.

pell. a/b/a I - V képlet

ELJÁRÁS ÉS KÉSZÍTMÉNY p53 CSALÁDBA TARTOZÓ FEHÉRJE KONFORMÁCIÓS STABILITÁSÁNAK MEGŐRZÉSÉRE

A találmány rákos megbetegedés kezelésére alkalmas készítményekre vonatkozik. Közelebbről a találmány a p53 családhoz tartozó, tumor szupresszív hatású fehérjékkel kölcsönhatásba lépő és azok funkcionális konformációját stabilizáláló szerves nem-peptid típusú vegyületekre vonatkozik. A találmány szerinti készítmények különösen alkalmasak a betegek tumor szupresszív hatású fehérjéi mutáns formáinak stabilizálására, mivel ezen fehérjék funkcionális kapacitásának növelésével a rákos megbetegedés kezelhető. A találmány kiterjed az ilyen vegyületek szkrínelésére szolgáló eljárásra is.

Egy fehérje primer szerkezete az aminosavat felépítő blokkok meghatározott szekvenciája, amelyek egymáshoz kapcsolódva képezik a fehérje polipeptidláncát (láncait). Ezen polipeptidláncok viszont háromdimenziós szerkezetté rendeződnek. Manapság számos különböző betegségről feltételezik, hogy a sejtfehérje háromdimenziós szerkezetében jelentkező konformációs zavarból erednek [Thomas és munkatársai, *TIBS* 20, 456-459 (1995); Carrell és munkatársai, *Lancet* 350, 134-138 (1997)]. Például az Alzheimer-betegséget a béta-amiloid fehérje háromdimenziós szerkezetének felbomlása és ezt



követő aggregációja okozza, ami a sejtfunció károsodásához vezet. Hasonló módon a Creutzfeld-Jakob betegségről is feltételezik, hogy a betegséget annak etiológiai anyagai, a prionok okozzák egy, a normális prion fehérjék felbomlott szerkezetű prion fehérjékké történő átalakulását kiváltó láncreakció beindításával.

A fehérjék azért vehetnek fel abnormális konformációkat, mert szerkezetük önmagából adódóan érzékeny a felbomlásra, vagy mert olyan mutációik vannak, amelyek termodinamikailag destabilizálják a vad típusú fehérjével rokon mutáns fehérjét. A betegséghez vezető misz-szensz mutációk legfontosabb példája a tumoros megbetegedést szupresszáló p53 fehérje.

A vad típusú p53 funkciók, mint a sejt ciklusban a többszörös utakat koordináltan szabályzó transzkripciós regulátorok, az apoptózis és az angiogenezis. Úgy tűnik, hogy a sejtet érő stresszeket jelző sejten belüli utak mindegyike, úgy mint a DNS károsodása, a mitózis orsó szétválása és a hipoxia, a p53 fehérjén konvergál. A p53 aktivitás elvesztése az érintett sejtek szabályozatlan szaporodásához és tumoros növekedéshez vezethet. Habár a p53 aktivitás elvesztése önmagában kiválthatja vagy nem válthatja ki a sejtek rákos sejté történő átalakulását, sokkal gyakrabban észlelhető rákos megbetegedés p53 mutációt hordozó személyeknél. Valójában rák esetén a p53 mutánsok a leggyakoribb genetikai rendellenességek.

Az utóbbi időben két további fehérjét, a p73 és p63 fehérjét azonosították a p53 homológjaként [Kaelin, J. Natl.



Cancer Inst. 91, 594-598 (1999); Yang és munkatársai, Molecular Cell 2(3), 305-16 (1998) és Yoshikawa és munkatársai, Oncogene 18(22), 3415-21 (1999)]. A p51-et p40, p51, KET vagy p73L névvel is jelölik. Ezek a fehérjék nemcsak a p53-mal osztoznak aminosav szekvencia homológokon, de p53 értékes promótereket is aktiválhatnak, és apoptózist indukálhatnak. Úgy tűnik továbbá, hogy az ezen fehérjéket kódoló gének rokonságban állnak a p53-mal, mint annak elődei. Tehát a szakirodalomban ismert egy, a p53-mal rokon fehérjecsalád, amelynek funkciói hasonlóak, és rokon aminosavszekvenciákat tartalmaznak.

A p53 egy komplex makromolekula, amely három független funkcionális domént tartalmaz, ezek a következők: egy N-terminális, amely egy transzkripciós aktiváló domént tartalmaz (körülbelül 1-43 aminosav); egy középső rész, amely egy DNS kötő domént kódol (DBD) (körülbelül 100-300 aminosav); és egy C-terminális rész, amely oligomerizációs doménként szerepel (körülbelül 319-360 aminosav). A p53 DBD kristályszerkezete egy nagyjából gömbalakú, nagy béta-lemez-tartalmú globuláris doménre utal.

A p53 aktivitás nagy mértékben függ a fehérje funkcionális konformációt megőrző képességétől. A különböző rákokból származó tumorok analízise azt mutatja, hogy a DBD-ben gyakran következik be mutáció. Friedlander és munkatársai, J. Biol. Chem. 271, 25468-25478 (1996). Habár a leggyakoribb rákokban a p53 DNS kötő doménon belül nagy változatossággal fordulnak elő pont mutációk [Pavletich és munkatársai, Genes & Development 7, 2556-2575 (1993)], a p53 DBD-ben



egyres speciális helyzetű maradékoknál, amelyek forró helyek néven ismertek, a mutációk előfordulása szokatlanul nagy. A humán tumorokban a forró helyzetű mutációk némileg véletlenszerűen oszlanak el a DBD mentén. Karbamid hatására a p53 összes gyakran mutálódott formájának p53 DBD-i kevésbé stabilak, mint a vad típusú DBD (Bullock és munkatársai, lásd fentebb). Ezen túlmenően a p53 mutánsok gyakran asszociálódnak a sejtekben a hő sokk fehérjékkel, amiből arra lehet következtetni, hogy kevésbé képesek megőrizni természetes konformációjukat [Finlay és munkatársai, *Molecular and Cellular Biology* 8, 531-39 (1988)].

Azt találták, hogy a p53 C-terminális doménjével való kölcsönhatás aktiválja a p53 sejtciklust akadályozó tulajdonságait. Nevezetesen a C-terminálisra nézve specifikus p53 antitesteknek a ciklizálódó sejtekbe történő injektálásával azok ciklizációja megállítható [Mercer és munkatársai, *Proc. Nat. Acad. Sci.: USA* 79, 6309-6312 (1982)]. Részletesebb vizsgálatokban kimutatták, hogy a C-terminális domén szabályozza a DBD domén DNS kötő aktivitását. Például Hupp és munkatársai azt találták, hogy a Pab 421 monoklonális antitest, amely a p53 C-terminális domén 373-381 maradékaival lép kölcsönhatásba, képes növelni a p53 bizonyos mutáns formáinak DNS kötő aktivitását [Hupp és munkatársai, *Nucleic Acids Research*, 21, 3167-3174 (1993)]. Tehát Hupp és munkatársai azokra az antitestekre és fehérjékre fordították figyelmüket, amelyek a C-terminálison egy független negatív szabályzó domént semlegesítenek a p53 funkció visszaállítása céljából [Selivanova és munkatársai, *Nature Med.* 3, 632-638



(1997)]. Azonban az így visszaállított 273-as helyzetű mutánsok abban különböznek a többi közönséges mutánstól, hogy megőrzik nagy bázis DNS kötő aktivitásukat, és a vad típusú fehérjéhez hasonló termodinamikai stabilitási tulajdonságokat mutatnak [Bullock és munkatársai, Proc. Nat. Acad. Sci.: USA, 94, 14338-143421 (1997)].

A szakterületen működő más kutatók azt állítják, hogy a vad típusú p53 aktivitás megőrzésének leghatásosabb módja a mutáns p53 N-terminális doménjét megkötő vegyületek kutatása. Például Friedlander és munkatársai számos, a p53-on lévő meghatározott epitópokhoz kötődő monoklonális antitestet vizsgáltak meg a hőmérséklet érzékeny p53 mutánsok DNS kötő aktivitását elősegítő képességük szempontjából. [Friedlander és munkatársai, J. Biol. Chem. 271, 25468-25478 (1996)]. Amíg a PAb 421 C-terminálisra nézve specifikus antitest alacsony hőmérsékleten megőrzi a mutáns p53 DNS-sel szemben mutatott kötő funkcióját, az N-terminálisra nézve specifikus p53 antitest, és különösen a Pab1801 monoklonális antitest hatásosabban elősegíti a hőmérsékletérzékeny p53 mutáns DNS kötő aktivitását emelt hőmérsékleten. Ezen felismerés alapján Friedlander és munkatársai arra a következtetésre jutottak, hogy egy olyan kismolekula kifejlesztésével, amely az 1801 epitóp felismerő régióját utánozva az N-terminálisához kötődik, fokozható p53 mutánsban a vad típusú DNS kötő aktivitás. Megjegyezzük, hogy Friedlander és munkatársai kimutatták, hogy egy, a p53 fehérje középső részén (DBD domén) lévő epitópra nézve specifikus antitest nem gyakorol hatást a DNS kötő aktivitásra. Eredményeik értékelé-



se során Friedlander és munkatársai feltételezték, hogy egy fehérjében egy domén konformációja egy távoli domén alkalmazásával stabilizálódik. Bullock és munkatársai kimutatták, hogy egy gyakran előforduló p53 DNS kötő domén mutáns termodinamikai stabilitásában bekövetkező változás meglehetősen csekély, és azt találták, hogy a Friedlander és munkatársai által javasolt, a p53 kezelésére kifejlesztett kis molekula (azaz N-terminálisához kötődő molekula) kifejleszthető. [Bullock és munkatársai, 1997, lásd fentebb].

Egyéb, a rákellenes vegyületek azonosítására vonatkozó általánosabb megközelítések esetén a kismolekulák közvetlen tumorellenes aktivitásának, sejteken (például tumoros sejtvonalakon történő) vagy állatokon történő vizsgálatát helyezték előtérbe. Számos olyan kis molekulát írtak le, amelynek tumorellenes hatása feltételezhető. [Mazerska és munkatársai, *Anti-Cancer Drug Design* 5, 169-187 (1990); Su és munkatársai, *J. Med. Chem.* 38, 3226-3235 (1995); Nagy és munkatársai, *Anticancer Research* 16, 1915-1918 (1996); Wuonola és munkatársai, *Anticancer Research* 17, 3409-23 (1997)]. Mazerska és munkatársai egy sor nitro-9-aminoakridin-származékokat ismertettek, amelyben egy nitrocsoport az akridincsoporthoz kapcsolódik. Ezek tumorellenes hatását annak tulajdonították, hogy a DNS-hez képesek kötődni, és a láncok között kovalens térhálót hoznak létre. Su és munkatársai egy sor olyan 9-anilinoakridin-származékot ismertettek, amelyek az anilino és az akridin gyűrűrendszer különböző helyzeteiben helyettesítettek, ezeket topoizomeráz II inhibitoroként alkalmazták. Nagy és munkatársai rövid szén-



láncon át karbamid- vagy ftálimidocsoporthoz kapcsolódó, fenotiazinnal rokon vegyületek sorozatát írták le. Nagy és munkatársai feltételezték, hogy ezen vegyületesztály tumorrosejt-ellenes hatása abból ered, hogy képesek a kalciumcsatornákkal és kalmodulinnal kölcsönhatásba lépni. Wuonola és munkatársai (lásd fentebb) a Nagy és munkatársai által ismerttetett vegyületekhez hasonló szerkezetű fenotiazin-származékokat ismertettek.

Máig nem ismertek olyan kismolekulájú szerves nem-peptid típusú származékok, amelyek a p53 családba tartozó fehérjékkel kölcsönhatásba lépnek, és megőrzik vagy stabilizálják azok vad típusú aktivitását, például tumoros növekedést elnyomó hatását. Ezen vegyületek kutatását gátolta egy nagy teljesítményű szkrínelési eljárás vagy vizsgálat hiánya is.

Felismerve az olyan vegyületek azonosításának fontosságát, amelyek a termodinamikailag nem stabil fehérjék vagy humán betegségek következtében felbomlott szerkezetű fehérjék konformációs stabilizálására alkalmasak, továbbá egy olyan nagyteljesítményű vizsgálati rendszer hiányát, amelyben az ilyen vegyületek gyorsan azonosíthatók, jelen szerzők megvizsgálták az izolált p53 mutáns DNS kötő domén (DBD) *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokban, mint modell rendszerekben történő alkalmazását, amelyekben a p53 mutáns konformációját stabilizáló anyagok gyorsan azonosíthatók. A találmányunk szerinti megoldással gyors, megbízható és pontos eljárást biztosítunk olyan vegyületek objektív azonosítására, amelyek elősegítik a p53 családhoz tartozó fehérjék vad típusú aktivi-



tását, beleértve a humán gyógyszereket is.

Tehát a találmányunk szerinti megoldás elsődlegesen annak bemutatására alkalmas, hogy nem-peptid típusú szerves vegyületek egy, a p53 családhoz tartozó fehérjével kölcsönhatásba léphetnek, és elősegíthetik ennek vad típusú aktivitását. Fiziológias vagy közel fiziológias hőmérsékleten ezek a hatóanyagok a p53 vad típusú aktivitást nemcsak a mutáns p53 fehérjék körében, hanem vad típusú p53 fehérjék körében is elősegítik. Ezen vegyületek jelentős rákellenes gyógyszerek. Tehát a találmányunk szerinti megoldással és vegyületekkel egy, a p53 családhoz tartozó fehérje mutáns vagy vad típusú aktivitását magában foglaló rákos megbetegedés esetén tumorelles kezelés biztosítható.

Találmányunk egyik megvalósítási módja eljárást biztosít egy, a p53 családhoz tartozó humán fehérje mutáns formájában jelentkező vad típusú aktivitás elősegítésére, ahol a fehérje egy vagy több funkcionális aktivitását legalább részben károsítja, így a fehérje nem képes megőrizni funkcionális konformációját fiziológias körülmények között. A találmányunk szerinti eljárás a következő lépéseket foglalja magában: a mutáns fehérjét egy olyan szerves nem-peptid típusú vegyülettel érintkeztetjük, amely fiziológias körülmények között a mutáns fehérjében egy vagy több domén megkötésére és ennek funkcionális konformációjának stabilizálására képes, ezáltal lehetővé tesszük a stabilizált fehérje egy vagy több, a vad típusú aktivitásban részt vevő makromolekulával való kölcsönhatását. p53 családhoz tartozó humán fehérjék például a p53, a p63 és a p73. Egyik előnyös megvalósítási mód szerint



a szerves nem-peptid típusú vegyület p53-mal, még előnyösebben a p53 DNS kötő doménjével lép kölcsönhatásba.

Találmányunk egy másik megvalósítási módja szerint egy, a p53 családhoz tartozó, egy vagy több csökkent vad típusú aktivitást mutató mutáns fehérje expresszáldásával kapcsolatos betegségben szenvedő humán egyed kezelésére alkalmas gyógyszerkészítményt biztosítunk, ez olyan szerves nem-peptid típusú vegyületet tartalmaz, amely a mutáns fehérjében fiziológiás körülmények között egy vagy több domén kötésére, és ennek funkcionális konformációjának stabilizálására képes, ezáltal a stabilizált fehérje az egyedben kölcsönhatásba képes lépni egy vagy több, a vad típusú aktivitásban részt vevő makromolekulával.

Találmányunk egy további megvalósítási módja szerint rákos megbetegedésben szenvedő humán egyed kezelésére alkalmas gyógyszerkészítményt biztosítunk, ez olyan szerves nem-peptid típusú vegyületet tartalmaz, amely fiziológiás körülmények között egy, a p53 családhoz tartozó humán fehérje egy vagy több doménjének kötésére és ennek funkcionális konformációjának stabilizálására képes, ezáltal a stabilizált fehérje az egyedben kölcsönhatásba képes lépni a vad típusú aktivitásában részt vevő egy vagy több molekulával.

Találmányunk egy másik megvalósítási módja szerint a találmányunk szerinti megoldásban alkalmazható szerves nem-peptid típusú vegyületek olyan vegyületek lehetnek, amelyek egy hidrofób csoportot (például egy planáris poliklust) és egy kationos csoportot (előnyösen egy amint) tartalmaznak egy meghatározott hosszúságú összekötő csoport-



ton keresztül összekapcsolva.

Találmányunk egy előnyös megvalósítási módja szerint a találmányunk szerinti megoldásban alkalmazható szerves nem-peptid típusú vegyület (I), (II), (III), (IV) vagy (V) általános képletű vegyület, a képletekben

R^5 jelentése $-NR^{18}R^{18}$ általános képletű csoport, ahol

R^{18} jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil- vagy fenilcsoport, és

R^{19} jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil-, 3-10 szénatomos cikloalkil- vagy fenilcsoport, amely alkil-, cikloalkil- vagy fenilcsoport adott esetben hidroxil-, 3-8 szénatomos cikloheteroalkil-csoporttal, $-CONR^{18}(CH_2)_pNR^{20}R^{21}$, $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-(CH_2)_n-NR^{20}R^{21}$ vagy $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-(CH_2)_n-NR^{20}R^{21}$ általános képletű csoporttal helyettesített, ahol

p értéke 0 és 5 közötti szám,

m értéke 0 és 5 közötti szám,

n értéke 0 és 5 közötti szám,

R^{22} jelentése hidroxil- vagy 1-6 szénatomos alkilcsoport, és

R^{20} és R^{21} jelentése egymástól függetlenül

(a) hidrogénatom, 1-12 szénatomos alkil-, 3-12 szénatomos cikloalkil-, 3-10 szénatomos heterocikloalkil-, 6-10 szénatomos aril-, 5-9 szénatomos heteroaril-, (1-6 szénatomos alkil)(6-12 szénatomos aril)-csoport, ahol az említett csoportok előnyösen egy vagy több hidroxilcso-



porttal, halogénatommal, amino-, trifluormetil-, 1-6 szénatomos alkil-, 1-6 szénatomos alkoxi-, (1-6 szénatomos alkil)(3-10 szénatomos heterocikloalkil)- vagy (1-6 szénatomos alkil)(6-10 szénatomos aril)-csoporttal szubsztituálva vannak; vagy

(b) $-NR^{20}R^{21}$ együttes jelentése hidrogénatom, morfolin- vagy 4-(1-6 szénatomos alkil)piperazin-csoport;

R^6 jelentése

(a) 1-6 szénatomos alkil- vagy 2-8 szénatomos alkenil-csoport, amelyek mindegyike adott esetben egy vagy több fenilcsoporttal helyettesített, vagy

(b) halogénatommal helyettesített fenilcsoport vagy 1-6 szénatomos alkoxics csoport; és

R^7 és R^8 jelentése azonosan vagy különbözően hidrogénatom, nitro-, 1-6 szénatomos alkoxics csoport vagy halogénatom, mégpedig fluor-, klór- vagy brómatom;

ahol a (II) általános képletben

R^9 jelentése 1-6 szénatomos alkil-, 3-10 szénatomos cikloalkil- vagy fenilcsoport, amely alkil-, cikloalkil- vagy fenilcsoport adott esetben hidroxil-, 3-8 szénatomos cikloheteroalkil-csoporttal, $-CON$ képletű csoporttal, $R^{18}(CH_2)_pNR^{20}R^{21}$, $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-(CH_2)_n-NR^{21}R^{21}$ vagy $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-(CH_2)_n-NR^{20}R^{10}$ általános képletű csoporttal helyettesített, ahol

p értéke 0 és 5 közötti szám,

m értéke 0 és 5 közötti szám,

n értéke 0 és 5 közötti szám,

R^{22} jelentése hidroxil- vagy 1-6 szénatomos alkilcsoport,
és

R^{20} és R^{21} jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom,
1-12 szénatomos alkil-, 3-12 szénatomos cikloalkil-,
3-10 szénatomos heterocikloalkil-, 6-10 szénatomos
aril-, 5-9 szénatomos heteroaril-, (1-6 szénatomos
alkil)(6-12 szénatomos aril)-csoport, amely csoportok
adott esetben egy vagy több hidroxilcsoporttal, halo-
génatommal, amino-, trifluormetil-, 1-6 szénatomos
alkil-, 1-6 szénatomos alkoxi-, (1-6 szénatomos alkil)-
(3-10 szénatomos heterocikloalkil)-, (1-6 szénatomos
alkil)(5-9 szénatomos heteroaril)- vagy (1-6 szénato-
mos alkil)(6-10 szénatomos aril)-csoporttal helyette-
sítettek;

ahol a (III) általános képletben

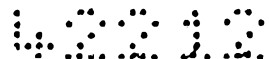
R^{10} jelentése $-N-R^{18}R^{19}$ általános képletű csoport, ahol

R^{18} jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil- vagy
fenilcsoport, és

R^{19} jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil-, 3-10
szénatomos cikloalkil- vagy fenilcsoport, amely alkil-,
cikloalkil- vagy fenilcsoport adott esetben hidroxil-,
3-8 szénatomos cikloheteroalkil-csoporttal,
 $-CONR^{18}(CH_2)_pNR^{20}R^{21}$, $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-(CH_2)_n-$
 $NR^{20}R^{21}$ vagy $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-(CH_2)_n-NR^{20}R^{21}$ általá-
nos képletű csoporttal helyettesített, ahol

p értéke 0 és 5 közötti szám,

m értéke 0 és 5 közötti szám,



n értéke 0 és 5 közötti szám,

R^{22} jelentése hidroxil- vagy 1-6 szénatomos alkil-csoport, és

R^{20} és R^{21} jelentése egymástól függetlenül

- (a) hidrogénatom, 1-12 szénatomos alkil-, 3-12 szénatomos cikloalkil-, 3-10 szénatomos heterocikloalkil-, 6-10 szénatomos aril-, 5-9 szénatomos heteroaril-, (1-6 szénatomos alkil)-(6-12 szénatomos aril)-csoport, ahol az említett csoportok előnyösen egy vagy több hidroxilcsoporttal, halogénatommal, amino-, trifluormetil-, 1-6 szénatomos alkil-, 1-6 szénatomos alkoxi-, (1-6 szénatomos alkil)-(3-10 szénatomos heterocikloalkil)- vagy (1-6 szénatomos alkil)-(6-10 szénatomos heteroaril)- vagy (1-6 szénatomos alkil)(6-10 szénatomos aril)-csoporttal helyettesítettek; vagy
- (b) $-NR^{20}R^{21}$ együttes jelentése hidrogénatom, morfolino- vagy 4-(1-6 szénatomos alkil)-piperazin-csoport;

és

A és B jelentése azonosan vagy különbözően szén- vagy nitrogénatom, és

R^{11} és R^{12} jelentése azonosan vagy különbözően hidrogénatom, nitro-, 1-6 szénatomos alkoxicsoport vagy halogénatom, mégpedig fluor-, klór- vagy bróm-atom;

ahol a (IV) általános képletben



R^{13} jelentése $-N-R^{18}R^{19}$ általános képletű csoport, ahol

R^{18} jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil- vagy fenilcsoport, és

R^{19} jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil-, 3-10 szénatomos cikloalkil- vagy fenilcsoport, ahol az alkil-, cikloalkil- vagy fenilcsoport adott esetben hidroxil-, 3-8 szénatomos cikloheteroalkil-csoporttal, $-CONR^{18}(CH_2)_pNR^{20}R^{21}$, $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-$, $-(CH_2)_n-NR^{20}R^{21}$ vagy $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-(CH_2)_n-$ $-NR^{20}R^{21}$ általános képletű csoporttal helyettesített, ahol

p értéke 0 és 5 közötti szám,

m értéke 0 és 5 közötti szám,

n értéke 0 és 5 közötti szám,

R^{22} jelentése hidroxil- vagy 1-6 szénatomos alkilcsoport,

és

R^{20} és R^{21} jelentése egymástól függetlenül

(a) hidrogénatom, 1-12 szénatomos alkil-, 3-12 szénatomos cikloalkil-, 3-10 szénatomos heterocikloalkil-, (1-6 szénatomos alkil)-(5-9 szénatomos heteroaril)-, 5-9 szénatomos heteroaril-, 6-10 szénatomos aril- vagy (1-6 szénatomos alkil)-(6-10 szénatomos aril)-csoport, amely csoportok adott esetben egy vagy több hidroxilcsoporttal, halogénatommal, amino-, trifluormetil-, 1-6 szénatomos alkil-, 1-6 szénatomos alkoxi-, (1-6 szénatomos alkil)-(3-10 szénatomos heterocikloalkil)-, (1-6 szénatomos alkil)-(5-9 szénatomos heteroaril)- vagy (1-6 szénatomos alkil)-(6-10 szénatomos

aril)-csoporttal helyettesítettek; vagy

(b) $-NR^{20}R^{21}$ általános képletű csoport együttes jelentése hidrogénatom, morfolin- vagy 4-(1-6 szénatomos alkil)-piperazin-csoport;

A és B jelentése azonosan vagy különbözően szén- vagy nitrogénatom; és

R^{14} és R^{15} jelentése azonosan vagy különbözően hidrogénatom, nitro-, 1-6 szénatomos alkoxicsoport vagy halogénatom, mégpedig fluor-, klór- vagy brómatom, és ahol

az (V) általános képletben

A jelentése szén- vagy nitrogénatom;

R^{16} jelentése $-NR^{18}R^{19}$ általános képletű csoport, ahol

R^{18} jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil- vagy fenilcsoport, és

R^{19} jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil-, 3-10 szénatomos cikloalkil- vagy fenilcsoport, amely alkil-, cikloalkil- vagy fenilcsoport adott esetben hidroxil-, 3-8 szénatomos cikloheteroalkil-csoporttal, $-CONR^{18}(CH_2)_pNR^{20}R^{21}$, $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-(CH_2)_n-NR^{20}R^{21}$ vagy $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-(CH_2)_n-NR^{20}R^{21}$ általános képletű csoporttal helyettesített, ahol

p értéke 0 és 5 közötti szám,

m értéke 0 és 5 közötti szám,

n értéke 0 és 5 közötti szám,

R^{22} jelentése hidroxil- vagy 1-6 szénatomos alkilcsoport;

R^{20} és R^{21} jelentése egymástól függetlenül

- (a) hidrogénatom, 1-12 szénatomos alkil-, 3-12 szénatomos cikloalkil-, 3-10 szénatomos heterocikloalkil-, 6-10 szénatomos aril-, 5-9 szénatomos heteroaril-, (1-6 szénatomos alkil)-(6-10 szénatomos aril)- vagy (1-6 szénatomos alkil)(5-9 szénatomos heteroaril)-csoport, ahol az említett csoportok adott esetben egy vagy több hidroxilcsoporttal, halogénatommal, amino-, trifluormetil-, 1-6 szénatomos alkil-, 1-6 szénatomos alkoxi-, (1-6 szénatomos alkil)-(3-10 szénatomos heterocikloalkil)- vagy (1-6 szénatomos alkil)-(6-9 szénatomos heteroaril)- vagy (1-6 szénatomos alkil)(6-10 szénatomos aril)-csoporttal helyettesített; vagy
- (b) $-NR^{20}R^{21}$ együttes jelentése hidrogénatom, morfolin- vagy 4-(1-6 szénatomos alkil)-piperazin-csoport;

és

R^{17} jelentése hidrogénatom, nitro-, 1-6 szénatomos alkoxicsoport vagy halogénatom, mégpedig fluor-, klór- vagy brómatom.

A találmányunk szerinti megoldásban használható számos vegyület önmagában új, ezek a vegyületek találmányunk egy további megvalósítási módját képezik.

Találmányunk egy másik megvalósítási módját képezi a p53 családhoz tartozó vad típusú aktivitás elősegítésére al-

kalmas további vegyületek tervezésére vonatkozó eljárás. Az eljárás kiterjed a találmányunk szerinti hatóanyagok egyikének elmélet felállítására történő alkalmazására és az elméletet alátámasztó vizsgálandó vegyületek azonosítására, továbbá annak vizsgálatára, hogy a vizsgálandó vegyület elősegíti egy, a p53 családkhoz tartozó vegyület vad típusú aktivitását.

Találmányunk egy további megvalósítási módját képezi egy, a p53 családkhoz tartozó fehérje és egy olyan nem-peptid típusú vegyület között kialakuló komplex, amely a fehérjével kölcsönhatásba lépve elősegíti a fehérje vad típusú aktivitását.

Találmányunk egy további megvalósítási módját képezi a p53 családkhoz tartozó fehérje vad típusú aktivitását elősegítő vegyületek szkrínelése is. Egy előnyös megvalósítási mód szerint az eljárás során olyan vegyületeket vizsgálunk, amelyek a p53 DNS kötő doménnel (DBD) kölcsönhatásba lépnek, és meghatározzuk a vegyület jelenlétében a p53 DBD konformációját. Találmányunk kiterjed a p53 családkhoz tartozó teljes hosszúságú fehérjék és fehérjerészek szkrínelési eljárásban történő alkalmazására is. Egy különösen előnyös megvalósítási mód szerint a vizsgálati és mérési lépést egyidejűleg végezzük. Azokat a vegyületeket, amelyekről megállapítottuk, hogy képesek elősegíteni egy, a p53 családkhoz tartozó fehérje mutáns formájában jelentkező vad típusú aktivitását, adott esetben *in vivo* szkríneljük tumoros növekedést megállító vagy elnyomó képességüire nézve. Találmányunk egy további megvalósítási módját képezi a p53 DBD-vel speciális kölcsönhatásba lépő szerves nem-peptid típusú vegyületek szkríne-



lésével végzett hatóanyagkutatósi eljárás.

A találmányunk szerinti, egy, a p53 családkhoz tartozó mutáns vagy vad típusú fehérje vad típusú aktivitásának elősegítésére alkalmas vegyületek azonosítására vonatkozó találmányunk szerinti megoldás sikeressége azt mutatja, hogy a találmányunk szerinti eljárás széleskörűen alkalmazható hibás konformációjú vagy nem-stabil fehérjék által kiváltott betegségek csoportjának kezelésére alkalmazható hatóanyagok kutatására. Ilyen cél-fehérjék például a pp60^{src}, az ibikvitint aktiváló E1 enzim, a cisztás fibrózis membránon keresztüli vezetőképeség szabályzó, a hemoglobin, a prion fehérjék, a szerpinek és a béta-amiloid fehérjék.

A mellékelt ábrák közül az 1. ábrán konformáció-függő epitópok modulációja látható a p53 DBD-n, ahol a p53 DBD-t mikrotiter mérőhelyeken immobilizáljuk és emelt hőmérsékleten inkubáljuk; a melegített mérőhelyeken maradó mAb1620 epitópjának százalékos mennyiségét ELISA vizsgálattal határozzuk meg, összehasonlítva a jégen tartott kontroll mérőhelyekkel; az 1A ábrán 0,5 ng vad típusú p53 DBD-t inkubálunk, és az mAb1620 maradék epitópjának mennyiségét a nem melegített kontroll százalékában mutatjuk be, ahol a standard deviáció <10 %; az 1B ábrán az 1,25 ng FLAG-ra végződő p53 DBD-t immobilizálunk, 45 °C-ra melegítjük, és az anti-FLAG esetében a maradék epitópokat, az mAb1620-at és az mAb240-et a nem melegített kontroll százalékában mutatjuk be; az 1C ábrán 1,0 ng vad típusú és 143-as helyzetben mutatást tartalmazó p53 DBD-t, amely az mAb1620 epitópjával körülbelül azonos szintet mutat, 37 °C-on melegítünk, és az



epitóp stabilitását a nem melegített kontrollok százalékában mutatjuk be, ahol a hibasávok négy ismételt mérés standard deviációját jelentik;

a 2. ábrán az 1620 epitóp stabilizálása látható mutáns p53 DBD-n; a 2A ábrán az (X), (Y) és (Z) képletű vegyületek láthatók, amelyek elősegítik a p53 konformációjának stabilizálását; a 2B ábrán 1 ng vad típusú p53 DBD-t immobilizálunk 30 percig és 45 °C-on melegítjük a vegyületek vagy azonos koncentrációjú dimetil-szulfoxid hordozó jelenlétében; az mAb1620 visszamaradó epitópját a nem melegített kontroll százalékában mutatjuk be; a 2C ábrán olyan vad típusú és mutáns p53 DBD készítményeket immobilizálunk, amelyek epitópszintje közel azonos (10 %-on belül) az mAb1620-éval, és 30 percig 37 °C-on melegítjük a vegyület vagy a hordozó jelenlétében; az mAb1620 visszamaradó epitópját a nem melegített kontroll százalékában mutatjuk be, a hiba sávok négy ismételt mérés standard deviációi;

a 3. ábrán a p53 konformációs és transzkripciós aktivitásának modulációja látható p53 mutánst tartalmazó sejtekben; a 3A ábrán a H1299 transzfektánst, amely a 173-as helyzetben mutáns p53-at expresszálja, (X) képletű vegyülettel kezeljük 16,5 µg/ml koncentrációjú közegben, a sejtlizátumokat a teljes p53 fehérjében lévő kisebb variációkra normáljuk Western folt alkalmazásával pan p53 antitesttel, mAbDO-1-gyel, és ELISA vizsgálattal meghatározzuk azon p53 mennyiségét, amely hordozza az mAb1620 epitópját az 1620-pozitív p53 frakció növekedését a nem kezelt sejtekben lévő 1620-pozitív p53 frakciójának megfelelően korigáljuk; a 3B



ábrán a megfelelő H1299 transzfektáns luciferáz riporter génnel (H1299/riporter) vagy a riporter génnel és a 173-helyzetben mutánszt tartalmazó p53-mal (H1299/riporter + mutáns p53) kezeljük 16 órán át mikrotiter mérőhelyeken, és az olyan luciferáz riporter gén indukált expresszióját, amely a vad típusú p53 funkciót jelzi, a vegyület távollétében mutatott expresszió bázisszintjének megfelelően korrigáljuk, az értékek átlagosan négy ismételt mérést reprezentálnak;

a 4. ábrán a WAF1 expressziójának indukálása látható mutáns p53-at tartalmazó sejtekben, transzfektált mutáns p53 fehérjéket (173-as vagy 249-es helyzetben) expresszáló Saos-2 sejteket (X) képletű vegyülettel kezelünk 16,5 µg/ml koncentrációjú tenyészetben 16 órán át, a sejt-lizátumokat a teljes fehérjére normáljuk, és Western foltokon analizáljuk, mégpedig a folt felső részét mAbDO-1-gyel vizsgáljuk a teljes p53 esetén és ugyanezen folt alsó részét WAF1-re irányuló antitesttel vizsgáljuk;

az 5. ábrán a p53 konformációs stabilitásának és működésének elősegítése látható tumorokban; H1299/riporter + mutáns p53 sejtekből származó szubkután tumorokat hordozó egérnek egyetlen, 100 mg/kg (X) képletű vegyületet tartalmazó intraperitoneális injekciót adunk be, és két tumor lizátumot normálunk a Western foltok denzitometriás szkennelése alapján a teljes p53 tartalomra mAbDO-1-gyel, ELISA vizsgálattal meghatározzuk az mAb1620 epitópját hordozó p53 mennyiségét, és az 1620-pozitív p53 frakció növekedését a nem kezelt tumorokból származó lizátumokban lévő 1620-pozitív p53 frakciónak megfelelően korrigáljuk, továbbá a tumor lizátumok



Luciferáz expresszióját is analizáljuk a p53 transzkripció aktivitás növekedésének meghatározása céljából, ahol a luciferáz expressziót a fehérje koncentrációra normalizáljuk, és összehasonlítjuk a nem kezelt tumorokból származó lizátumokkal;

a 6. ábrán a mutáns p53-at expresszáló tumor xenograftok szupressziója látható, ahol az egereket tumoros sejtekkel beoltjuk, és a megadott módon X vegyületet vagy hordozót tartalmazó intraperitoneális injekcióval kezeljük, majd a vegyületeket 7 napig naponta egyszer (q.d.) vagy 12 órás időközönként (b.i.d.) adagoljuk, a hordozóval kezelt egerek 12 órás időközönként kapják az injekciókat, a tumor térfogatát a tumor átmérőjének két dimenzióban való mérésével határozzuk meg, és minden csoportban 5-7 egérre átlagoljuk, a pontozott vonalak a kezelés kezdetén meghatározott kezdeti tumortérfogatot jelentik.

A tumoros növekedést szupresszáló p53 géntermék funkciójának elvesztése szabályozatlan szaporodáshoz és/vagy a számos különböző típusú ráknál megfigyelt apoptózis elvesztéséhez vezet. Még ha a p53 mutációja nem is következik be egy rákos sejtben, a vad típusú p53 aktivitás elősegítése akkor is gátolhatja az ilyen sejtben a rákos fenotípust. A találmányunk szerinti megoldással elsőként mutatjuk be, hogy szerves nem-peptid típusú vegyületek képesek kölcsönhatásba lépni egy, a p53 családhoz tartozó fehérjével, és stabilizálni ezek funkcionális konformációját. Tehát ezek a vegyületek jól alkalmazhatók gyógyszerként az összes típusú rákos megbetegedés kezelésére.



Tehát találmányunk egyik megvalósítási módja szerint eljárást biztosítunk egy, a p53 családkhoz tartozó humán fehérje mutáns formája vad típusú aktivitásának elősegítésére, amely fehérjének egy vagy több funkcionális aktivitását legalább részben károsítja, hogy a fehérje fiziológiás körülmények között képtelen megtartani funkcionális konformációját. Az eljárás során a mutáns fehérjét egy olyan szerves nem-peptid típusú vegyülettel érintkeztetjük, amely fiziológiás körülmények között a mutáns fehérje egy vagy több doménjéhez képes kötődni és stabilizálni annak funkcionális konformációját, továbbá biztosítjuk a stabilizált fehérje egy vagy több, a vad típusú aktivitásban részt vevő makromolekulával való kölcsönhatását. A p53 családkhoz tartozó mutáns humán fehérje p53, p63 vagy p73 mutáns fehérje lehet. Egy előnyös megvalósítási mód szerint a szerves nem-peptid típusú vegyület a p53-mal, még előnyösebben a p53 DNS kötő doménjével lép kölcsönhatásba.

Találmányunk egy másik megvalósítási módja szerint egy, a p53 családkhoz tartozó olyan mutáns fehérje expresszációval kapcsolatos betegségben szenvedő humán egyedek kezelésére alkalmas gyógyszerkészítményt biztosítunk, amely mutáns fehérjének egy vagy több vad típusú aktivitása károsodott. A gyógyszerkészítmény olyan szerves nem-peptid típusú vegyületet tartalmaz, amely fiziológiás körülmények között a mutáns fehérje egy vagy több doménjéhez képes kötődni és stabilizálni annak funkcionális konformációját, ezáltal biztosítható a betegben a stabilizált fehérjének a vad típusú aktivitásban részt vevő egy vagy több makromolekulával való

kölcsönhatása.

Egy másik megvalósítási mód szerint rákos megbetegedésben szenvedő humán egyed kezelésére alkalmas gyógyszerkészítményt biztosítunk, amely egy olyan szerves nem-peptid típusú vegyületet tartalmaz, amely egy, a p53 családhoz tartozó humán fehérje egy vagy több doménjének fiziológias körülmények között történő megkötésére és annak funkcionális konformációjának stabilizálására képes, ezáltal biztosítható a fehérjének a vad típusú aktivitásában részt vevő egy vagy több makromolekulával való kölcsönhatása. A találmányunk szerinti megoldással stabilizált p53 családhoz tartozó humán fehérje vad típusú vagy mutáns fehérje lehet, például p53, p63 vagy p73.

Habár a p53 családhoz tartozó fehérjék egy sor különböző rákos megbetegedés esetén mutánsként jelennek meg, bizonyos rákokban vagy rákos sejttípusokban a p53 családhoz tartozó fehérje szerkezete vagy funkciója (a legtöbb vizsgálatot magán a p53-on végezzük) megváltozik még akkor is, ha a sejtek megőriznek egy vad típusú kódoló allélt. Például Kaelin fent említett 1999-ben publikált munkájában olyan, vírussal összefüggő rákos megbetegedéseket ismertetett, ahol egy vírusfehérje degradálja a p53 fehérjét, vagy a p53 például onkogének expresszási termékeinek hatására inaktiválódik vagy degradálódik. A p53 családhoz tartozó fehérjék sejtszabályzó folyamatokban játszott jelentős szerepét tekintve nyilvánvaló, hogy a találmányunk szerinti vegyületek nemmutáns p53 családtagok sejtekben lévő funkcionális konformációjának fiziológias körülmények között történő stabilizálására is al-



kalmasak, ahol ezen fehérjék élettartama és/vagy szerkezete és/vagy aktivitása normális. Tehát a találmányunk szerinti vegyületek olyan rákos megbetegedések kezelésére is alkalmasak, ahol a p53 fehérje és más hasonló fehérje működését alapvetően nem befolyásolja a rákos állapot. Továbbá a vegyületek rákmegelőző állapotú sejteket expresszáló szövetek kezelésére is alkalmazhatók, amelyeknél a rendellenesség még nem detektálható, mint abnormális p53 (vagy p53 családtag) működés, időtartam vagy szerkezet. Továbbá a rosszindulatú részekkel szomszédos vagy a testen egyéb módon rosszindulatú sejtekkel érintkezésbe kerülő egészséges sejtekben lévő p53 családhoz tartozó fehérjék stabilizálásával (például élettartamuk megnövelésével) a rákok terjedése megállítható. A találmányunk szerinti vegyületek ilyen célra is használhatók.

Találmányunk megvalósítása során a p53 családhoz tartozó fehérjét emlős p53, p63 vagy p73 fehérjeként vagy egy domént tartalmazó fehérjeként definiáljuk, ezek mindegyike legalább 50 %-ban, előnyösebben 80 %-ban olyan aminosav szekvenciát tartalmaz, amely az alábbiak közül eggyel vagy többel homológ: (1) transzkripciós aktiváláshoz szükséges N-terminális domén, (2) DNS kötő domén vagy (3) egy emlős p53, p63 vagy p73 oligomerizációs domén, ahol a homológját BLASTP v. 2.0 algoritmussal ismerjük fel (www.ncbi.nlm.nih.gov) [Altschul és munkatársai, *J. of Molec. Biol.*, 215, 403-410 (1990), „The BLAST Algorithm; Altschul és munkatársai, *Nuc. Acids Res.* 25, 3389-3402 (1997)] és W.U.-BLAST-2.0 (Washington University, St. Louis, MO, USA), és



ahol a fehérje legalább egy olyan funkciót bizonyít, amely a szakirodalomban a p53-ra, p63-ra vagy p73-ra jellemzőként azonosítanak (például p53-ra érzékeny promótereket aktiváló és apoptózist kiváltó képesség [Kaelin (1999); Yang és munkatársai (1998) és Yoshikawa és munkatársai (1999) fent említett munkái]). A BLAST, Smith-Waterman és FASTA algoritmus eljárások és ezek előnyeinek ismertetése a szakirodalomban megtalálható [Nicholas és munkatársai, "A Tutorial on Searching Sequence Databases and Sequence Scoring Methods" (1998) (www.psc.edu), továbbá az adott említett referenciák].

A p53 családhoz tartozó fehérjék vad típusú konformációját stabilizáló vegyületek olyan vegyületek, amelyek a p53 családhoz tartozó fehérjékkel kölcsönhatásba lépve elősegítik vagy megőrzik a fehérje vad típusú aktivitását, mint a DNS kötő aktivitás vagy bármilyen makromolekulával való kölcsönhatás kapacitása, ezáltal a p53 családhoz tartozó fehérje normális működését biztosítják. A p53 egyéb vad típusú aktivitása például a transzkripció aktiválással kapcsolatos aktivitás (például WAF1 indukálása), sejt ciklus megállítása vagy apoptózis kiváltása, azonban nem korlátozódnak ezekre.

Találmányunk egy további megvalósítási módját képezi a találmányunk szerinti vegyületek alkalmazása tumoros növekedés gátlására és/vagy rákos megbetegedés kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmények előállítására. A találmányunk szerinti megoldás különösen nagy előnye, hogy az itt ismertetett eljárások alkalmazásával azonosított vegyületekről nemcsak a vad típusú p53 DBD és a szkrínelésben használt



mutáns p53 DBD aktív konformációját stabilizálják, hanem más p53-mutánst és p53 DBD-t is. Ezért az így azonosított vegyületek széles körűen alkalmazhatók különböző rákos megbetegedések kezelésében.

Találmányunk kiterjed a p53 családhhoz tartozó fehérjék vad típusú konformációját elősegítő és a p53 családhhoz tartozó mutáns fehérjék vad típusú aktivitásának megőrzésére alkalmas vegyületek szkrínelésére alkalmas új eljárásokra is. A találmányunk szerinti eljárások alkalmazásával azonosított vegyületek olyan betegségek kezelésére használhatók, mint a p53 családhhoz tartozó fehérjék aktivitási rendellenességeivel kapcsolatos rákos megbetegedések.

A találmányunk szerinti eljárásokkal olyan vegyületek szkrínélhetők, amelyek a p53 családhhoz tartozó fehérjékkel közvetlen kölcsönhatásba lépnek. Ezekben az eljárásokban szkrínelés céljából a p53 családhhoz tartozó teljes hosszúságú (mutáns vagy vad típusú) fehérje, vagy legalább annak DBD-t és adott esetben az N-terminális és/vagy C-terminális doméneket tartalmazó deléciós származéka használható. Azonban találmányunk egy előnyös megvalósítási módja szerint a szkrínelésben a p53 családhhoz tartozó fehérje egy polipeptid fragmensét használjuk, amely csak a DBD-t tartalmazza az ép N- vagy C-terminális domének nélkül. Tehát ezen alkalmazás céljára "DNS kötő domén" vagy "DBD" kifejezésen a p53 családhhoz tartozó fehérjének csak az ép N- vagy C-terminális nélküli DBD-részét értjük – hacsak nincs másként feltüntetve. Ezek a DBD domének azonban a vizsgálat típusától függően (például FLAG epitóp vagy glutation-S-



transzferáz fehérje) heterológ polipeptidekkel lehetnek összekapcsolva. Továbbá a találmányunk szerinti eljárások és vegyületek alkalmazásával a p53 családhoz tartozó vad típusú és mutáns fehérje konformációs stabilitása növelhető és nem csupán a DNS kötődésre gyakorolt negatív szabályzó hatás szüntethető meg.

Találmányunk egyik megvalósítási módját az alábbi példákban ismertetjük, azonban találmányunkat nem kívánjuk az ezekben foglaltakra korlátozni. Találmányunkkal eljárást biztosítunk olyan vegyületek szkrínelésére, amelyek a p53 DBD-vel speciális kölcsönhatásba lépnek, és a p53 DBD konformációjának a teszt vegyület jelenlétében történő meghatározására. Adott esetben a p53 DBD egy p53 DBD mutáns. Azonban a vad típusú p53 DBD nagy mennyiségekben könnyebben túltermelődik. Habár a szkrínelési vizsgálatot egy sejt alapú formátumban végezhetjük, *in vitro* vizsgálatokban a legközvetlenebb és kívánatosabb a p53 DBD-t célbavevő vegyületekre specifikus nagy teljesítményű szkrínelés. A p53 DBD-vel szemben végzett első szkrínelésben azonosított vegyületek ép p53 (beleértve a p53 misz-szensz mutánsokat is) funkciójára gyakorolt hatása szempontjából további vizsgálatokat végezhetünk. Az ezen eljárások alkalmazásával azonosított vegyületek is találmányunk oltalmi körébe tartoznak.

A találmányunk szerinti vizsgálatok során a p53 családhoz tartozó fehérjék DNS kötő doménjével kölcsönhatásba lépő vegyületek körét úgy határozzuk meg, hogy azokat a vegyületeket, amelyek speciálisan a DBD-t, és nem a fehérje más részeit célozzák meg, nem vesszük számításba. Például

egy olyan vegyület, amely speciálisan a DBD-vel "lép kölcsönhatásba" vagy "arra hat" nem szükségképpen kötődik stabilan a DBD-hez (habár kötődhet); elegendő, ha a vegyület bizonyos hatást gyakorol a p53 családhoz tartozó fehérje ezen vegyület jelenlétében mutatott konformációjára. Tehát először a vegyületeket a DBD-vel való kölcsönhatásuk szempontjából szkrínéljük, majd megvizsgáljuk ezek konformációra gyakorolt hatását, vagy ezen két szkrínelési lépést egyidejűleg is végezhetjük a vegyület jelenlétében mutatott konformációs változást használva a DBD-vel való kölcsönhatás detektálására is.

A leírásban "specifikus kölcsönhatás" kifejezést a kötődés nem-specifikus formáinak kizárására használjuk, beleértve azokat a típusokat, amelyekről ismert, hogy hidrofób vegyületek és fehérjék között nem szelektív hidrofób kölcsönhatások útján következnek be. A specifikus kölcsönhatás kifejezés a találmányunk szerinti vegyületek tulajdonságainak azon vegyületekétől való megkülönböztetésére is használjuk, amelyek befolyásolják a fehérje termostabilitását a fő oldószer kémiai tulajdonságának megváltoztatásával. Ezek a vegyületek nem tartoznak találmányunk ezen megvalósítási módjának oltalmi körébe, ezért olyan hőstabilizáló szerepet töltenek be, mint a glicerin, trimetilamin-oxid és a deutériumtartalmú víz. A p53 családhoz tartozó fehérjékkel specifikus kölcsönhatásba lépő vegyületek sokkal kisebb koncentrációkban fognak hatást gyakorolni, mint a fő oldószerek vagy a nem-specifikus hidrofób kölcsönhatások. Például a glicerin 600 mmól/l koncentrációban hatásos. Azonban a p53 családhoz tartozó fehérjével

specifikus kölcsönhatásba lépő vegyületek hatása 1 mmól/l-nél, előnyösen 100 μmól/l-nél és még előnyösebben 10 μmól/l-nél kisebb vegyületkoncentrációnál megfigyelhető *in vitro* vagy sejt alapú vizsgálatokban.

Találmányunk ismertetése során általában az alábbi meghatározásokat alkalmazzuk, "Alkil" kifejezésen telített egy vegyértékű, egyenes vagy elágazó láncú vagy gyűrűs vagy ezek kombinációját tartalmazó szénhidrogén gyököt értünk – hacsak nincs másként feltüntetve. Hasonló módon "alkenil" és "alkinil" kifejezésen rendre legalább egy kettőskötést vagy legalább egy hármaskötést tartalmazó egyenes, elágazó vagy gyűrűs csoportot tartalmazó szénhidrogén gyököt értünk. Ezek a meghatározások arra az esetre is vonatkoznak, amikor az alkil-, alkenil- vagy alkinilcsoport egy másik csoporttal együtt van jelen, mint az alkoxics csoportban vagy az alkilaminban. "Alkoxi" kifejezésen -O-alkilcsoportot értünk, ahol az "alkil" kifejezés jelentése a fent megadott. "Halogénatom" kifejezésen fluor-, klór-, bróm- vagy jódatomot értünk – hacsak nincs másképp feltüntetve.

Az egyszerűség kedvéért az 1-10 szénatomos cikloalkilcsoport kifejezést akkor használjuk, amikor mind a cikloalkil-, mind a cikloalkenilcsoport nulla vagy adott esetben egy vagy több kettőskötést tartalmaz, ilyenek a ciklopropil-, ciklobutil-, ciklopentil-, ciklopentenil-, ciklohexil-, ciklohexenil-, 1,3-ciklohexadién, cikloheptil-, cikloheptenil-, biciklo[3.2.1]oktán-, norbornanil- és hasonló csoportok. A 3-10 szénatomos heterocikloalkil-csoport kifejezést a következőkre használjuk: pirrolidinil-, tetrahidrofuranil-, dihidrofuranil-,

tetrahidropiranil-, piranil-, tiopiranil-, aziridinil-, oxiranil-, metiléndioxil-, kromenil-, izoxazolidinil-, 1,3-oxazolidin-3-il-, izotiazolidinil-, 1,3-tiazolidin-3-il-, 1,2-pirazolidin-2-il-, 1,3-pirazolidin-1-il-, piperidinil-, tiomorfolinil-, 1,2-tetrahidrotiazin-2-il-, 1,3-tetrahidrotiazin-3-il-, tetrahidrotiadiazinil-, morfolinil-, 1,2-tetrahidrodiazin-2-il-, 1,3-tetrahidrodiazin-1-il-, tetrahidroazepidil-, piperazinil-, kromanil- vagy hasonló csoportok. A szakterületen járatos személy számára nyilvánvaló, hogy ezen 3-10 szénatomos heterocikloalkil gyűrűk egy szénatomon vagy egy sp^3 hibrid állapotú nitrogén heteroatomon keresztül kapcsolódnak.

5-9 szénatomos heteroarilcsoport kifejezésen furil-, tienil-, tiazolil-, pirazolil-, izotiazolil-, oxazolil-, izoxazolil-, pirrolil-, triazolil-, tetrazolil-, imidazolil-, 1,3,5-oxadiazolil-, 1,2,4-oxadiazolil-, 1,2,3-oxadiazolil-, 1,3,5-tiadiazolil-, 1,2,3-tiadiazolil-, 1,2,4-tiadiazolil-, piridil-, pirimidil-, pirazinil-, piridazinil-, 1,2,4-triazinil-, 1,2,3-triazinil-, 1,3,5-triazinil-, pirazolo[3,4-b]piridinil-, cinnolinil-, pteridinil-, purinil-, 6,7-dihidro-5H-[1]pirindinil-, benzo[b]tiofenil-, 5,6,7,8-tetrahidrokinolin-3-il-, benzoxazolil-, benzotiazolil-, benzizotiazolil-, benzizoxazolil-, benzimidazolil-, tianaftenil-, izotianaftenil-, benzofuranil-, izobenzofuranil-, izoindolil-, indolil-, indolizininil-, indazolil-, izokinolil-, kinolil-, ftalazinil-, kinoxalinil-, kinazolinil-, benzoxazinil- vagy hasonló csoportot értünk. A szakterületen járatos személy számára nyilvánvaló, hogy az 5-9 szénatomos heteroarilcsoport a szerkezet többi részéhez általában korlátozás nélkül (azaz egy szénatomon vagy egy sp^2 hibrid állapotú heteroatomon keresztül) kapcsolódik. Ha-

sonló módon a 6-10 szénatomos arilcsoport jellemzően fenil- vagy naftilcsoport.

Amikor az ábrákon egy kötés van feltüntetve, de ennek távolabbi végén elhelyezett csoport nincs azonosítva, ez általában metilcsoportot jelent. Ha egy kötés nincs feltüntetve, akkor abban a helyzetben hidrogénatom van, amennyiben a vegyérték lehetővé teszi, ahogy ez a szakirodalomban elfogadott. Például az R-O- jelölés R-O-CH₃ képletű vegyületet jelent.

A. A p53 családhoz tartozó A fehérje vad típusú aktivitását elősegítő találmányunk szerinti vegyületek

A találmányunk szerinti szerves nem-peptid típusú vegyületek bármilyen típusú vegyületek lehetnek, amelyek a p53 családhoz tartozó vad típusú vagy mutáns fehérjével érintkezve a fehérje vad típusú aktivitását elősegítik. Az előnyös vegyületek viszonylag kicsi (a jellemzően 50 kD és 150 kD közötti fehérjékkel összehasonlítva) szerves vegyületek. Találmányunk szerinti megoldással első alkalommal válik lehetővé ilyen nem-peptid vegyületek, közelebbről nem antitestek, és még közelebbről olyan vegyületek alkalmazása, amelyek a p53-mal speciálisan kölcsönhatásba lépnek, és ezáltal stabilizálják a p53 DBD vagy p53 fehérje vad típusú konformációját. A nem-peptid típusú szerves vegyületek számos okból különösen alkalmasak gyógyszerkészítményekként. Például a nem-peptid típusú vegyületek sokkal kevésbé immunogén tulajdonságúak, mint a peptidek, és könnyebben abszorbeálódnak a testben a nyálkahártya és más sejtrészek határán keresztül, továbbá kevésbé labilisak.

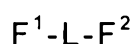
Találmányunk egyik megvalósítási módja szerint a találmányunk szerinti eljárásokkal azonosított vegyületeket olyan vegyületekként határozhatjuk meg, amelyek egy hidrofób csoportot (például planáris policiklust) és egy kationos csoportot (előnyösen egy amint) tartalmaznak egy meghatározott hosszúságú összekötőcsoporton keresztül egymáshoz kapcsolódva. Hidrofób helyzetben előnyösek a benzimidazol, benzokinolin, fenotiazin és a sztirilkinazolin.

Az aktív kationos csoportok szekunder és terciér aminok, például a dimetilamin, dietilamin, dietanolamin, metilamin, metilpiperazin és a morfolin, azonban nem korlátozódnak ezekre. Bizonyos nagyobb aminok ennek megfelelően hatásosabbak, amikor a fenotiazin hidrofób sorozatban vizsgáljuk, ennek megfelelően ilyen helyzetben a nagyobb aminok az előnyösek. Kationos helyzetben a pozitívan töltött csoportok hatásosak és előnyösek, ahogy ez az 1. táblázatban látható.

Találmányunk egy másik megvalósítási módja szerint a hidrofób és a kationos csoport között elhelyezkedő csoport előnyösen propilcsoport hosszúságú. A propilcsoport hosszúságánál rövidebb összekötőcsoport lényegében kevésbé hatásos az adott vizsgálati körülmények között, ahogy ez a 2. táblázatban látható. Ezért a körülbelül 3 és 5 közötti szénatom hosszúságú összekötő csoportok előnyösek, ezek 0,5 nm és 0,9 nm közötti (5-9 Å), előnyösebben 0,6 nm és 0,8 nm közötti (6-8 Å) hosszúságúak, habár a leghatásosabbak a propil-összekötőcsoport hosszúságú összekötőcsoportot [körülbelül

0,65 nm (6,5 Å)] tartalmazó vegyületek. Egy butil-összekötőcsoportnál hosszabb összekötőcsoport hatására a vegyület a vizsgálat meghatározott körülményei között kevésbé hatásos, mint egy butil-összekötőcsoport hosszúságú összekötőcsoportot tartalmazó ugyanezen vegyület, ahogy ez a 2. táblázatban látható. Még előnyösebben az elágazó láncú összekötő csoportok, amelyek megőrzik a megfelelő távolságot, ilyen összekötőcsoportok általában hatásosabbak, mint a lineáris összekötő csoportok, ha ezek megfelelnek a 0,5 nm és 0,9 nm (5-9 Å) közötti (optimálisan 0,65 nm, azaz 6,5 Å) hosszúságnak.

Tehát találmányunk egyik megvalósítási módja szerint a találmányunk szerinti vegyületek az



általános képlettel írhatók le, a képletben

F^1 jelentése (a), (b), (c), (d), (e) vagy (f) általános képletű csoport, ahol

R_1 , R_2 , R_3 jelentése azonosan vagy különbözően és egymástól függetlenül hidrogén- vagy halogénatom, metoxi- vagy nitrocsoport;

L jelentése egyenes láncú vagy elágazó láncú 0,5 nm és 0,9 nm közötti (5-9 Å) alkilcsoport; és

F^2 jelentése szekunder vagy terciér amin.

Találmányunk egy másik megvalósítási módja szerint a fenti képletben F^2 jelentése dimetil-amin, dietil-amin, dietanol-amin, metilpiperazin vagy morfolin. Például F^2 (g), (h), (i), (j), (k), (l), (m), (n), (o), (p), (q), (r), (s), (t) vagy (u) képletű csoport lehet, ahol R_4 jelentése $-O-CH_2-CH_3$ képletű csoport vagy



vagy hidrogénatom.

A találmányunk szerinti vegyületek kémiai szerkezete az (1) - (43) képlettel írható le, ezek közül az (1) - (14) képletű vegyületek akridin-származékok, a (15) - (28) képletű vegyületek kinazolin-származékok és a (29) - 43) képletű vegyületek fenotiazol-származékok. Ezek a vegyületek mindegyikéről kimutattuk, hogy jelentősen növelik a p53 konformációérzékeny epitópjának stabilitását legalább egy p53 mutáns DBD-ben közel fiziológiás hőmérsékleten.

A találmányunk szerinti megoldásban az (I), (II), (III), (IV) és (V) általános képlettel jellemezhető vegyületcsoportok előnyösek. Az (I) általános képletben

R^5 jelentése $-NR^{18}R^{18}$ általános képletű csoport, ahol

R^{18} jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil- vagy fenilcsoport, és

R^{19} jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil-, 3-10 szénatomos cikloalkil- vagy fenilcsoport, amely alkil-, cikloalkil- vagy fenilcsoport adott esetben hidroxil-, 3-8 szénatomos cikloheteroalkil-csoporttal, $-CONR^{18}(CH_2)_pNR^{20}R^{21}$, $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-$ $(CH_2)_n-NR^{20}R^{21}$ vagy $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-(CH_2)_n-NR^{20}R^{21}$ általános képletű csoporttal helyettesített, ahol

p értéke 0 és 5 közötti szám,

m értéke 0 és 5 közötti szám,

n értéke 0 és 5 közötti szám,

R^{22} jelentése hidroxil- vagy 1-6 szénatomos alkilcsoport, és

R^{20} és R^{21} jelentése egymástól függetlenül



- (a) hidrogénatom, 1-12 szénatomos alkil-, 3-12 szénatomos cikloalkil-, 3-10 szénatomos heterocikloalkil-, 6-10 szénatomos aril-, 5-9 szénatomos heteroaril-, (1-6 szénatomos alkil)(6-12 szénatomos aril)-csoport, ahol az említett csoportok előnyösen egy vagy több hidroxilcsoporttal, halogénatommal, amino-, trifluormetil-, 1-6 szénatomos alkil-, 1-6 szénatomos alkoxi-, (1-6 szénatomos alkil)(3-10 szénatomos heterocikloalkil)- vagy (1-6 szénatomos alkil)(6-10 szénatomos aril)-csoporttal szubsztituálva vannak; vagy
- (b) $-NR^{20}R^{21}$ együttes jelentése hidrogénatom, morfolin- vagy 4-(1-6 szénatomos alkil)piperazin-csoport;

R^6 jelentése

- (a) 1-6 szénatomos alkil- vagy 2-8 szénatomos alkenilcsoport, amelyek mindegyike adott esetben egy vagy több fenilcsoporttal helyettesített, vagy
- (b) halogénatommal helyettesített fenilcsoport vagy 1-6 szénatomos alkoxics csoport; és

R^7 és R^8 jelentése azonosan vagy különbözően hidrogénatom, nitro-, 1-6 szénatomos alkoxics csoport vagy halogénatom, mégpedig fluor-, klór- vagy brómatom;

(ahol) a (II) általános képletben

R^9 jelentése 1-6 szénatomos alkil-, 3-10 szénatomos cikloalkil- vagy fenilcsoport, amely alkil-, cikloalkil- vagy fenilcsoport adott esetben hidroxil-, 3-8 szénatomos cik-



loheteroalkil-csoporttal, -CON képletű csoporttal, $R^{18}(CH_2)_pNR^{20}R^{21}$, $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-(CH_2)_n-NR^{21}R^{21}$ vagy $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-(CH_2)_n-NR^{20}R^{10}$ általános képletű csoporttal helyettesített, ahol

p értéke 0 és 5 közötti szám,

m értéke 0 és 5 közötti szám,

n értéke 0 és 5 közötti szám,

R^{22} jelentése hidroxil- vagy 1-6 szénatomos alkilcsoport, és

R^{20} és R^{21} jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, 1-12 szénatomos alkil-, 3-12 szénatomos cikloalkil-, 3-10 szénatomos heterocikloalkil-, 6-10 szénatomos aril-, 5-9 szénatomos heteroaril-, (1-6 szénatomos alkil)(6-12 szénatomos aril)-csoport, amely csoportok adott esetben egy vagy több hidroxilcsoporttal, halogénatommal, amino-, trifluormetil-, 1-6 szénatomos alkil-, 1-6 szénatomos alkoxi-, (1-6 szénatomos alkil)-(3-10 szénatomos heterocikloalkil)-, (1-6 szénatomos alkil)(5-9 szénatomos heteroaril)- vagy (1-6 szénatomos alkil)(6-10 szénatomos aril)-csoporttal helyettesítettek;

a (III) általános képletben

R^{10} jelentése $-N-R^{18}R^{19}$ általános képletű csoport, ahol

R^{18} jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil- vagy fenilcsoport, és

R^{19} jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil-, 3-10 szénatomos cikloalkil- vagy fenilcsoport, amely alkil-, cikloalkil- vagy fenilcsoport adott esetben hidroxil-,



3-8 szénatomos cikloheteroalkil-csoporttal, $-\text{CONR}^{18}(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{20}\text{R}^{21}$, $-(\text{CH}_2)_p-(\text{CHR}^{22})_m-(\text{CH}_2)_n-\text{NR}^{20}\text{R}^{21}$ vagy $-(\text{CH}_2)_p-(\text{CHR}^{22})_m-(\text{CH}_2)_n-\text{NR}^{20}\text{R}^{21}$ általános képletű csoporttal helyettesített, ahol

p értéke 0 és 5 közötti szám,

m értéke 0 és 5 közötti szám,

n értéke 0 és 5 közötti szám,

R^{22} jelentése hidroxil- vagy 1-6 szénatomos alkil-csoport, és

R^{20} és R^{21} jelentése egymástól függetlenül

- (a) hidrogénatom, 1-12 szénatomos alkil-, 3-12 szénatomos cikloalkil-, 3-10 szénatomos heterocikloalkil-, 6-10 szénatomos aril-, 5-9 szénatomos heteroaril-, (1-6 szénatomos alkil)-(6-12 szénatomos aril)-csoport, ahol az említett csoportok előnyösen egy vagy több hidroxilcsoporttal, halogénatommal, amino-, trifluormetil-, 1-6 szénatomos alkil-, 1-6 szénatomos alkoxi-, (1-6 szénatomos alkil)-(3-10 szénatomos heterocikloalkil)- vagy (1-6 szénatomos alkil)-(6-10 szénatomos heteroaril)- vagy (1-6 szénatomos alkil)-(6-10 szénatomos aril)-csoporttal helyettesítettek; vagy
- (b) $-\text{NR}^{20}\text{R}^{21}$ együttes jelentése hidrogénatom, morfolino- vagy 4-(1-6 szénatomos alkil)-piperazin-csoport;

és

A és B jelentése azonosan vagy különbözően szén-



vagy nitrogénatom, és

R^{11} és R^{12} jelentése azonosan vagy különbözően hidrogénatom, nitro-, 1-6 szénatomos alkoxicsoport vagy halogénatom, mégpedig fluor-, klór- vagy bróm-atom;

ahol a (IV) általános képletben

R^{13} jelentése $-N-R^{18}R^{19}$ általános képletű csoport, ahol

R^{18} jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil- vagy fenilcsoport, és

R^{19} jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil-, 3-10 szénatomos cikloalkil- vagy fenilcsoport, ahol az alkil-, cikloalkil- vagy fenilcsoport adott esetben hidroxil-, 3-8 szénatomos cikloheteroalkil-csoporttal, $-CONR^{18}(CH_2)_pNR^{20}R^{21}$, $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-$, $-(CH_2)_n-NR^{20}R^{21}$ vagy $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-(CH_2)_n-NR^{20}R^{21}$ általános képletű csoporttal helyettesített, ahol

p értéke 0 és 5 közötti szám,

m értéke 0 és 5 közötti szám,

n értéke 0 és 5 közötti szám,

R^{22} jelentése hidroxil- vagy 1-6 szénatomos alkilcsoport,

és

R^{20} és R^{21} jelentése egymástól függetlenül

(a) hidrogénatom, 1-12 szénatomos alkil-, 3-12 szénatomos cikloalkil-, 3-10 szénatomos heterocikloalkil-, (1-6 szénatomos alkil)-(5-9 szénatomos heteroaril)-, 5-9 szénatomos heteroaril-, 6-10 szénatomos aril- vagy (1-6 szénatomos



alkil)-(6-10 szénatomos aril)-csoport, amely csoportok adott esetben egy vagy több hidroxilcsoporttal, halogénatommal, amino-, trifluormetil-, 1-6 szénatomos alkil-, 1-6 szénatomos alkoxi-, (1-6 szénatomos alkil)-(3-10 szénatomos heterocikloalkil)-, (1-6 szénatomos alkil)-(5-9 szénatomos heteroaril)- vagy (1-6 szénatomos alkil)-(6-10 szénatomos aril)-csoporttal helyettesítettek; vagy

(b) $-NR^{20}R^{21}$ általános képletű csoport együttes jelentése hidrogénatom, morfolin- vagy 4-(1-6 szénatomos alkil)-piperazin-csoport;

A és B jelentése azonosan vagy különbözően szén- vagy nitrogénatom; és

R^{14} és R^{15} jelentése azonosan vagy különbözően hidrogénatom, nitro-, 1-6 szénatomos alkoxicsoport vagy halogénatom, mégpedig fluor-, klór- vagy brómatom, és ahol

az (V) általános képletben

A jelentése szén- vagy nitrogénatom;

R^{16} jelentése $-NR^{18}R^{19}$ általános képletű csoport, ahol

R^{18} jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil- vagy fenilcsoport, és

R^{19} jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil-, 3-10 szénatomos cikloalkil- vagy fenilcsoport, amely alkil-, cikloalkil- vagy fenilcsoport adott esetben hidroxil-, 3-8 szénatomos cikloheteroalkil-csoporttal, $-CONR^{18}(CH_2)_pNR^{20}R^{21}$, $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-$ $(CH_2)_n-NR^{20}R^{21}$ vagy $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-(CH_2)_n-NR^{20}R^{21}$ általános képletű csoporttal helyettesített, ahol



p értéke 0 és 5 közötti szám,

m értéke 0 és 5 közötti szám,

n értéke 0 és 5 közötti szám,

R^{22} jelentése hidroxil- vagy 1-6 szénatomos alkilcsoport;

R^{20} és R^{21} jelentése egymástól függetlenül

(a) hidrogénatom, 1-12 szénatomos alkil-, 3-12 szénatomos cikloalkil-, 3-10 szénatomos heterocikloalkil-, 6-10 szénatomos aril-, 5-9 szénatomos heteroaril-, (1-6 szénatomos alkil)-(6-10 szénatomos aril)- vagy (1-6 szénatomos alkil)(5-9 szénatomos heteroaril)-csoport, ahol az említett csoportok adott esetben egy vagy több hidroxilcsoporttal, halogénatommal, amino-, trifluormetil-, 1-6 szénatomos alkil-, 1-6 szénatomos alkoxi-, (1-6 szénatomos alkil)-(3-10 szénatomos heterocikloalkil)- vagy (1-6 szénatomos alkil)-(6-9 szénatomos heteroaril)- vagy (1-6 szénatomos alkil)(6-10 szénatomos aril)-csoporttal helyettesített; vagy

(b) $-NR^{20}R^{21}$ együttes jelentése hidrogénatom, morfolin- vagy 4-(1-6 szénatomos alkil)-piperazin-csoport;

és

R^{17} jelentése hidrogénatom, nitro-, 1-6 szénatomos alkoxics csoport vagy halogénatom, mégpedig fluor-, klór- vagy brómatom.

Különösen előnyösek a

(1-benzil-piperidin-4-il)-(4-fenotiazin-10-il-propil)-amin

[(44) képletű vegyület]

[2-(4-klór-fenil)-etil]-(3-fenotiazin-10-il-propil)-amin

[(45) képletű vegyület]

(3-fenotiazin-10-il-propil)-tiokroman-4-il-amin

[(46) képletű vegyület]

[1-metil-3-(2,6,6-trimetil-ciklohex-2-enil)-allil]-(3-fenotiazin-10-il-propil)-amin [(47) képletű vegyület]

(7-etoxi-1,2,3,4-tetrahidro-naftalen-2-il)-(3-fenotiazin-10-il-propil)-amin [(48) képletű vegyület]

N'-(9-fluor-benzo[c]akridin-7-il)-N,N-dimetil-propán-1,3-diamin [(9) képletű vegyület]

N'-akridin-9-il-N,N-dimetil-propán-1,3-diamin [(50) képletű vegyület]

2-{4-[4-(benzo[g]kinolin-4-il-amino)-fenil]-piperazin-1-il}-etanol [(3) képletű vegyület]

N⁴-{2-[2-(4-bróm-fenil)-vinil]-7-klór-kinazolin-4-il}-N¹,N¹-diethyl-pentán-1,4-diamin [(51) képletű vegyület]

N-benzo[g]kinolin-5-il-N'-ciklohexil-propán-1,3-diamin [(52) képletű vegyület]

vagy a

2-[(2-hidroxi-etil)-(3-{2-[2-(4-metoxi-fenil)-vinil]-kinazolin-4-il-amino}-propil)-amino]-etanol [(53) képletű vegyület].

A találmányunk szerinti szerves nem-peptid típusú vegyületek szokásos eljárások alkalmazásával állíthatók elő.

A találmányunk szerinti eljárásokban alkalmazható ta-



lálmányunk szerinti vegyületek olyan vegyületek prodrugjait is magukban foglalják, amelyek elősegítik a p53 családkhoz tartozó fehérje vad típusú aktivitását. A prodrugok olyan vegyületek, amelyek egy emlősnek (különösen embernek) beadva jelentős és hatásos mennyiségben a hatásos molekulává alakulnak át.

A találmányunk szerinti vegyületek szabad savak, szabad bázisok vagy ezek gyógyászatilag hatásos sói formájában lehetnek. Ezek a sók könnyen előállíthatók a vegyület egy megfelelő savval végzett kezelésével. Ilyen savak például a szervetlen savak, mint a hidrogén-halogenidek (hidrogén-klorid, hidrogén-bromid és hasonló), kénsav, salétromsav, foszforsav és hasonló, továbbá a szerves savak, mint az ecetsav, propionsav, 2-oxopropionsav, propándisav, butándisav és hasonló, azonban találmányunk nem korlátozódik ezekre. Ezzel szemben a só alkálikus kezeléssel átalakítható a szabad bázissá.

B. Terápiás végpontok és dózisok.

A találmányunk szerinti eljárásokkal azonosított vegyületek nem stabil konformációjú vagy felbomlott szerkezetű fehérjékkel kapcsolatos betegségek kezelésére alkalmasak. A nem stabil konformációjú vagy felbomlott szerkezetű fehérjékkel kapcsolatos betegségek ismertek, ilyenek például a cisztás fibrózis (CFTR), Marfan szindróma (fibrillin), amiotrófiás laterális szklerózis (szuperoxid diszmutáz), skorbut (kollagén), juharszirup vizelet betegség (alfa-ketosav-dehidrogenáz komplex), hiányos csontképződés (I típusú prokollagén pro-



alfa), Creutzfeldt-Jakob-kór (prion), Alzheimer-kór (béta-amiloid), örökletes amiloidózis (lizozim), hályog (krisztallinok), örökletes hiperkolekterolémia (LDL receptor), α 1-antitripszin hiány, Tay-Sachs kór (béta-hexoszaminidáz), festékes szemideghártya-gyulladás (rodopszin) és leprechaunizmus (inzulin receptor). Természetesen az itt ismertett eljárások és vegyületek különösen alkalmasak rákok kezelésére és még alkalmasabbak mutáns p53 génekkel kapcsolatos rákok kezelésére.

A szakterületen járatos személy számára nyilvánvaló, hogy egy betegséggel és különösen egy rákos állapottal összefüggő nem-kívánt tünet (például fájdalom, érzékenység, testtömegcsökkenés és hasonlók) bármilyen érzékelhető enyhítése vagy megelőzése igen kívánatos a gyakorló orvos vagy a beteg szemszögéből. Továbbá a rákos állapotot tekintve a tumor tömegének vagy növekedési sebességének bármiféle csökkenése, továbbá a tumor hisztopatológiai képének javulása is igen kívánatos. Tehát a leírásban "kezelés", "terápiás alkalmazás" vagy "orvosi alkalmazás" kifejezésen az igényelt vegyületek bármelyikének és mindegyikének olyan alkalmazását értjük, amely egy betegség állapotát vagy annak tüneteit enyhítik vagy megelőzi, visszaszorítja, csökkenti vagy a betegség vagy egyéb nem-kívánt tünet fejlődését bármilyen módon megállítja.

A hatásos dózis és a kezelési előírás szokásos módon határozható meg laboratóriumi állatokon kis dózissal kezdve, majd a hatás vizsgálata közben a dózis növelésével és a dózis előírás szisztematikus változtatásával. Gyakran végeznek ál-



latokon, előnyösen emlősökön vizsgálatokat a biológiailag hatásos anyag testtömeg kg-onkénti legnagyobb tolerálható dózisának azaz az MTD-nek a meghatározására. A szakterületen járatos személy szokásos módon extrapolálja a szükséges dózisokat más fajokra – beleértve az embert is – a hatékonyságnak megfelelően és a toxicitás elkerülése céljából.

A hatékonyságra irányuló humán vizsgálatok megkezdése előtt egészséges egyedeken (I) fázisú klinikai vizsgálatokat végzünk a biztonságos dózis meghatározására. A kezelőorvos számos faktort vehet figyelembe az adott egyednél az optimális dózis meghatározásakor. Ezek közül elsődleges a toxicitás és a választott heterológ géntermék felezési ideje. További faktorok például a beteg mérete, a beteg életkora, a beteg általános állapota, a kezelendő rákos megbetegedés típusa, a betegség súlyossága, a beteg által szedett egyéb gyógyszerek, a géntermék *in vivo* aktivitása és hasonlók. A próbadózisokat az állatokon végzett vizsgálatok és az orvosi szakirodalom eredményei figyelembevételével kell megválasztani.

Az alábbiakban egy gyakorlati megvalósítási módon mutatjuk be, hogy a tumor növekedésének gátlására és/vagy visszaszorítására nagy mértékben hatásos a 200 mg/kg/nap dózis egy humán rákot hordozó állatmodellen vizsgálva. Ezen eredmény alapján az (X) képletű vegyület humán dózisa rák kezelése esetén jellemzően intravénás injekcióban vagy közvetlenül a tumor tömegébe vagy orálisan beadva az egyed állapotától függően 0,1 g/nap és 10 g/nap közötti mennyiség. A különböző hatékonysági és/vagy toxicitási szintű vegyületek



esetében ezek az értékek megfelelően változhatnak. Továbbá a dózisok beadhatók naponta két vagy több alkalommal.

A találmányunk szerinti eljárásokban alkalmazható vegyületek nyújtott vagy tartós beadásra is alkalmasak, továbbá lassan felszabaduló implantációs eszközként is formálhatók. Ilyen tartós felszabadulású készítmények például a biokompatibilis polimerek, mint a pol(tejsav), poli(tejsav-koglikolsav), metilcellulóz, hiarulonsav, kollagén és hasonlók. A hatóanyag a bejuttató hordozókban alkalmazott degradálható polimerek szerkezetét, megválasztását és alkalmazását számos publikációban ismertették [például Domb, A. és munkatársai, *Polymers for Advanced Technologies*, 3, 279-292 (1992)]. A készítményekben alkalmazható polimerek kiválasztására és alkalmazására vonatkozóan további kézikönyvek ismertek [Chasin, M. és Langer, R.; "Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems", 45, "Drugs and the Pharmaceutical Sciences", Dekker, M.; New York (1990) és US-P-5 573 528 amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás (Aebischer és munkatársai)].

A találmányunk szerinti megoldásban különösen *in vivo* alkalmazás esetén, nagy tisztaságú és esetlegesen káros szennyeződésektől lényegében mentes (például legalább "National Food" (NF) minőség, általában legalább analitikai minőség, előnyösen legalább gyógyszerészeti minőség) biokémiai komponensekre van szükség. Amennyiben egy adott anyagot használat előtt szintetizálunk, a szintézis vagy az ezt követő tisztítás eredményeképpen olyan terméket kell előállítani, amely előnyösen lényegében nem tartalmaz semmilyen,



az előállítási vagy tisztítási eljárás során használt toxikus anyagot.

Találmányunk egy másik megvalósítási módja szerint egy egyed rákos állapotának kezelésére alkalmas kitet vagy készletet biztosítunk a találmányunk szerinti eljárásban hatásosnak mutatkozott vegyületeket tartalmazó sterilen töltött fiola vagy ampulla formájában. Találmányunk egyik megvalósítási módja szerint a kit egy találmányunk szerinti vegyületet, például (Y), (X) vagy (Z) képletű vegyületet tartalmaz beadásra kész készítményben, egységdózisban vagy több dózist tartalmazó mennyiségben, amely készlet egy, a tartalmának rák kezelésére történő alkalmazására vonatkozó utasítást tartalmazó tájékoztatóval van ellátva. Egy másik változat szerint a készletben egy vegyületet tartalmazó sterilen töltött fiolát vagy ampullát biztosítunk.

C. Hatóanyag kutatási eljárás

A p53 családhoz és különösen egy p53 DBD-hez tartozó fehérjével kölcsönható és/vagy ennek vad típusú aktivitását befolyásoló vegyületet egyes vagy mindegyik szkrínelési lépése végrehajtható a vizsgálandó vegyületekre vonatkozó nagy teljesítményű vizsgálatban. A nagy teljesítményű szkrínelés a szakirodalomban jól ismert, és bármilyen számú formátumban elvégezhető. Jól alkalmazható formátumok például az ELISA szcintillációs közelítő eljárás, a kompetitív kötődési vizsgálat és a helyettesítő kötődési vizsgálat. A nagy számú vegyület szkríneléséhez szükséges időt jelentősen lecsökkentő laboratóriumi automatikus berendezések, beleértve a robot tech-



nológiát, a kereskedelemben beszerezhetők (például a Tecan, Scitec, Rosys, Mitsubishi, CRS Robotics, Fanuk és Beckman-Coulter Sagian cégektől). A vizsgálandó vegyületek azonosítása után (vagy azonosításukkal egyidejűleg) egy második szkrínelés is végezhető a vegyületek p53 családhoz tartozó fehérjék aktivitására gyakorolt, sejtekre kifejtett és/vagy *in vivo* hatásának meghatározására.

1. A találmányunk szerinti eljárásokkal és készítményekkel célba vett p53 családhoz tartozó fehérjék

A p53 az összes eukariotikus szervezetben mindenütt jelen van. Tehát a találmányunk szerinti eljárásokban és vegyületekben alkalmazható p53 fehérjék és p53 DBD-k bármilyen eukariotikus sejtekből származhatnak, például gombákból (mint a *Saccharomyces cerevisiae*), rovarokból (mint a *Drosophila*) vagy emlősökből (mint az egerek és/vagy humán sejtek), de előnyösen humán p53 fehérjéket alkalmazunk. További rokon szerkezetű és működésű emlős p53 homológokat azonosítottak, megemlíthetők például a p63 és p73, ilyen, a p53 családhoz tartozó fehérjék és például az ezeknek megfelelő DBD-k is, amelyek szintén használhatók a találmányunk szerinti eljárásokban és készítményekben. Ezen túlmenően azok a p53 családhoz tartozó (itt meghatározott) fehérjék is használhatók a találmányunk szerinti eljárásokban és készítményekben, amelyeket még nem derítettek fel.

Ahogy fentebb említettük, a p53 fehérje legalább három különböző domént tartalmaz: egy, az amino-terminálison elhelyezkedő transzkripciós aktiváló domént; a centrális DBD-t;

és egy, a karboxil-terminálison elhelyezkedő oligomerizációs domént. Ezen túlmenően a fehérje karboxil-terminálisán egy negatív szabályzó domén jelenik meg. A humán rákokkal kapcsolatos p53 misz-szensz mutációk legtöbbször a DBD-ben fordul elő. A találmányunk szerinti eljárások és vegyületek bármilyen misz-szensz mutáció konformációjának stabilizálására irányulhatnak. Különösen előnyös céljai a 175, 245, 248, 249, 273 és 282 maradék helyzetekben lévő mutációk esetén egy vagy több úgynevezett "forró helyet" tartalmazó mutáns p53-ok (az összes maradék helyzetet a humán p53 szekvenciára vonatkoztatva adjuk meg; az egyéb szervezetekből származó p53 fehérjék analóg maradék helyzetét könnyen meghatározhatjuk a humán szekvenciához igazoldó homológiával). További gyakori mutációk fordulnak elő a p53-ban a 132, 135, 138, 141, 143, 146, 151, 152, 154, 157, 158, 159, 163, 173, 176, 179, 186, 194, 196, 213, 220, 237, 238, 241, 242, 258, 266, 272, 278, 280, 281, 285 és 286 helyzetben; a találmányunk szerinti megoldás ezeket is megcélozza. Találmányunkat az alábbi előállítási példákban ismertetjük közelebbről, amelyekben a következő p53 fehérjék konformációs stabilizálását mutatjuk be: 143A, 173A, 175S, 241D, 249S és 273H.

A rákos megbetegedések a p53 fehérjékben, különösen a p53 fehérje DBD-jében lévő misz-szensz mutációkkal kapcsolatosak, ilyenek például a vastag- és végbél karcinóma, hólyag karcinóma, májsejt karcinóma, méh karcinóma, tüdő karcinóma, mell karcinóma, a fejen és a nyakon jelentkező pikkelyes sejt karcinóma, nyelőcső karcinóma, pajzsmirigy karcinóma és neurogén tumorok, mint az asztrocitóma,



ganglioblasztóma és neuroblasztóma, azonban nem korlátozódnak ezekre. A fenti és más rákos megbetegedések a találmányunk szerinti megoldással és vegyületekkel kezelhetők.

A p53 DBD körülbelül 100 - 300 aminosav-maradékot tartalmaz. A proteolízissel szemben rezisztens, a 102-től 292-ig terjedő maradékokat magában foglaló magról kimutatták, hogy elegendő DNS megkötésére, és a p53 DBD kristályszerkezetét 94-től 312-ig terjedő maradékokra megoldották [Cho és munkatársai, Science 265, 346 (1994); Friend, Science 265, 334 (1994)]. Tehát a találmányunk szerinti megoldásban a p53 DBD domén N-terminálisa az 50. és a 110. maradék között kezdődhet, és előnyösen valahol a 94. és 102. maradék között kezdődik. A p53 DBD C-terminálisa a 286. és a 340. maradék között ér véget, előnyösen a 292. és a 312. maradék között ér véget.

"Termodinamikusan destabilizált p53 mutáns" olyan mutánst értünk, amely nem tartja meg a p53 egy vagy több funkcionális tulajdonságát, mint a DNS kötő tulajdonság fiziológiás hőmérsékleten (azaz 37 °C körüli hőmérsékleten), de alacsonyabb hőmérsékleten vagy más körülmények között visszanyeri ezen funkcióját (funkcióit). Például az összes gyakori mutáns *in vitro* körülmények között és alacsony hőmérsékleten megőrzi DNS kötő kapacitását [Friedlander és munkatársai (1996), lásd fentebb].

2. Vizsgálati típusok

a. Kötési vizsgálati típusok

A p53 családhoz tartozó fehérjék DBD-jéhez egyszerü-



en hozzákötődő vegyületek azonosítására használt vizsgálatok lényege, hogy a DBD fehérje és a vizsgált vegyület reakciókeverékét a két komponens kölcsönhatásának és kötődésének biztosításához szükséges körülmények között és ideig reagáltatjuk, ezáltal egy komplex képződik, amely a reakciókeverékből kinyerhető és/vagy azonosítható. Az alkalmazott DBD fajták a szkrínelési vizsgálat céljától függően változtathatók. Például egy meghatározott doménnel kölcsönhatásba lépő vegyületek kutatása esetén a kötő domént tartalmazó, a p53 családkhoz tartozó teljes hosszúságú fehérje, maga a DBD vagy egy fehérjével vagy polipeptiddel kapcsolt DBD-t tartalmazó fúziós fehérje is előnyösen használható a vizsgálati rendszerben (például jelzés, a képződő komplex izolálása és hasonlók). Az ezen eljárásban alkalmazható DBD-ből származó fehérjének a DBD legalább hat egymást követő aminosavát, előnyösen tíz egymást követő aminosavát, előnyösebben húsz egymást követő aminosavát, még előnyösebben harminc vagy ötven egymást követő aminosavát kell tartalmaznia.

A szkrínelési vizsgálat többféleképpen végezhető. Például az egyik ilyen vizsgálati eljárás szerint a DBD fehérjét, polipeptidet, peptidet vagy fúziós fehérjét vagy a vizsgált anyagot egy szilárd fázishoz rögzítjük, és a reakció végén detektáljuk a szilárd fázishoz rögzített DBD/vizsgált vegyület komplexet. Ezen eljárás egyik megvalósítási módja szerint a DBD reagenst egy szilárd felülethez rögzíthetjük, és a nem rögzített vizsgált vegyületet közvetlenül vagy közvetett módon jelezhetjük. A megfelelő jelzési rendszerek közül bármelyik alkalmazható, például radioaktív izotópok, mint a ^{125}I és ^{32}P



izotópok, enzimmel jelzett rendszerek, amelyek a szubsztráttal érintkezve detektálható kolorimetrikus jelet vagy fényt bocsátanak ki, továbbá fluorescens jelzések, azonban nem korlátozódnak ezekre. Az eljárás egy másik megvalósítási módja szerint a szilárd fázishoz rögzített DBD-t egy jelzett antitesttel alakítjuk komplex-szé. Ezután megvizsgáljuk a tesztvegyületnek a DBD/antitest komplex asszociációjára gyakorolt szétválasztó hatását.

A gyakorlatban szilárd fázisként szokásos módon mikrotiter lemezeket használhatunk. A rögzített komponenst nem kovalens vagy kovalens kötéssel immobilizálhatjuk. A nem kovalens rögzítést egyszerűen a felület fehérje-oldattal történő bevonásával és szárítással végezhetjük. Egyik változat szerint a fehérjének a szilárd felületen történő rögzítéséhez egy immobilizált antitestet, előnyösen egy, az immobilizálandó fehérjére nézve specifikus monoklonális antitestet használhatunk.

A vizsgálat elvégzése céljából a nem immobilizált komponenst a rögzített komponenst tartalmazó bevont felülethez adjuk. A reakció végbemenetele után az el nem reagált komponenst olyan körülmények között (például mosással) távolítjuk el, amelynél a képződő komplexek a szilárd felületen immobilizálva maradnak. A szilárd felülethez rögzített komplexeket többféle módon detektálhatjuk. Ha az immobilizálás előtt a komponenst előzőleg jelzéssel láttuk el, a felületen immobilizált jelzés detektálásával meghatározzuk a képződött komplexet. Ha az immobilizálás előtt a komponenst előzőleg nem látjuk el jelzéssel, a felülethez rögzített komplexek de-



tektálására indirekt jelzés alkalmazható, például az immobilizálást megelőzően a komponensre nézve specifikus jelzett antitestet alkalmazunk (az antitest viszont egy jelzett anti-Ig antitesttel lehet közvetlenül vagy közvetett módon jelezve).

Egy másik megvalósítási mód szerint a kötődés közvetlen vagy közvetett jelzés alkalmazása nélkül is detektálható, például egy olyan biofizikai tulajdonság vizsgálatával, amely kötődéskor megváltozik. Ilyen szkrínelésre különösen alkalmas szilárd hordozó rendszer a BIAcore 2000TM rendszer [beszerezhető a BIAcore Inc.-től (Piscataway, NJ)]. A BIAcoreTM berendezés (<http://www.biacore.com>) a felületi plazma rezonancia (SPR) optikai jelenségét használja a biospecifikus kölcsönhatások valódi időtartamú követésére. Az SPR hatás lényegében egy végtelenül kicsi elektromos mezőn alapul, amelyet egy fém és egy folyadék határfelületén kialakuló refrakciós index helyi változásai befolyásolnak. Egy üveg és egy karboximetil-dextrán mátrix között elhelyezett aranyfilmből készült szendvics-szerkezetből érzékelő chipet állítunk elő, ahol a mátrixhoz kémiaiilag kötjük a ligandumot vagy a vizsgálandó fehérjét. Ezt az érzékelő titert egy áramlási cellát alkotó fluidumtöltetre visszük fel, amelyen keresztül injektálhatjuk az analizálandó vegyületet. A ligandum és az analizálandó vegyület közötti kölcsönhatást az érzékelő chipen a csip felületéről visszaverődő polarizált fénysugár szögében bekövetkező változásként detektáljuk. Bármilyen, a chiphez kötődő tömeg befolyásolja az arany/dextrán rétegben az SPR-t. Az aranyrétegben kialakuló elektromos mező ezen változása kölcsönhatásba lép a visszavert fénysugárral, és a megkötött

anyag mennyiségével arányosan megváltoztatja a visszaverődési szöget. A visszavert fényt egy diódarendszeren detektáljuk, és egy válaszegységként (RU) kifejezett kötődési jellé alakítjuk át. Mivel a válasz közvetlenül arányos a megkötött tömeggel, megmérhetők a fehérje-fehérje kölcsönhatások kinetikus és egyensúlyi állandói.

Egyik változat szerint a reakciót folyadékfázisban is végezhetjük, a reakcióterméket elválasztjuk az el nem reagált komponensektől, és a komplexet detektáljuk.

b. A p53 családhoz tartozó fehérje konformációjának mérésére vonatkozó eljárás

A p53 fehérje konformációját számos különböző úton mérhetjük meg. Például a p53 DBD konformációjának meghatározására használhatunk antitesteket. Egy előnyös találmányunk szerinti eljárásban olyan monoklonális antitesteket használunk, amelyek specifikusak a p53 és/vagy p53 DBD aktív (például DNS kötő) vagy inaktív (termodinamikusan destabilizált vagy felbomlott vagy rendezetlen) konformációira. Például a mAb1620 felismeri a p53 DBD-n a p53 fehérje tumor szuppresszív hatásával szorosan összefüggő epitópot [Ball és munkatársai, *EMBO J.* 3, 1485-1491 (1984); Gamble és munkatársai, *Virology* 162, 452-458 (1988)]. Tehát az mAb1620 nem kötődik a p53 DBD-hez, amikor az inaktív konformációt vesz fel. Ezzel szemben mAb 240 által felismert epitóp akkor mutatkozik meg, amikor a p53 mutációban inaktiválódik vagy a vad típusú p53 denaturálódik [Bartek és munkatársai, *Oncogene* 5, 893-899 (1990); Stephen és munkatársai, *J. Mol.*

Biol. 225, 577-83 (1992)]. Egyéb ismert és még nem ismert konformáció-specifikus antitestek is használhatók a találmányunk szerinti eljárásban. Ezek az antitestek jól alkalmazhatók nagy teljesítményű szkrínelésben. Az antitestek, például a monoklonális antitestek előállítása a szakirodalomban jól ismert.

A p53 családhoz tartozó fehérje, például a p53 vagy p53 DBD konformációja meghatározható például színezék abszorpcióval, spektroszkópikus úton (például cirkuláris dikroizmussal vagy NMR spektroszkópiával), méretkizárásos kromatográfiával, ultracentrifugálással, specifikus DNS kötődéssel (például fiziológiás hőmérsékleten alacsony hőmérséklettel szemben) vagy specifikus fehérje kötődéssel (például az SV40 nagy méretű T antigén csak a vad típusú aktív konformációt köti meg, és az inaktív konformációt nem), azonban nem korlátozódnak ezekre.

Ahogy fentebb említettük, a gyakran előforduló p53 mutációk közül számos csak alacsonyabb hőmérsékleten köti meg a DNS-t, fiziológiás hőmérsékleten nem. Ezért a p53 családhoz tartozó fehérjék konformációja meghatározható azok teszt vegyületek jelenlétében mutatott hőmérsékletfüggősége alapján. A konformációt előnyösen fiziológiás hőmérsékleten (38 °C körüli hőmérsékleten), 20 °C és 50 °C közötti megfelelő tartományban és még előnyösebben 35 °C és 42 °C közötti tartományban vizsgáljuk. A célba vett fehérje konformációját az idő függvényében is mérhetjük, néhány perc és néhány óra közötti vagy még hosszabb ideig. Amikor a szkrínelésben vad típusú p53 fehérjét vagy p53 DBD-t hasz-



nálunk, a melegítést általában hosszabb ideig és magasabb hőmérsékleten végezzük, mint amikor egy mutáns p53 DBD-t használunk. A szakterületen járatos személy az itt ismertetett információ alapján egyszerűen meghatározhatja a megfelelő hőmérsékletet.

A fentiekén túlmenően egyidejűleg megvizsgálható a vegyület kötődése és a p53 családkhoz tartozó fehérje konformációjában bekövetkező bármilyen változás. Ebben a vizsgálatban a p53 családkhoz tartozó fehérje konformációjában a teszt vegyület jelenlétében bekövetkező változást találatként jegyezzük fel. Az alábbiakban olyan vegyületek nagy teljesítményű szkríneléssel történő vizsgálatára mutatunk be példát, amelyek a p53 DBD-vel kölcsönhatásba lépve konformációs változást okoznak. Az előzőekben ismertetett nagy teljesítményű szkrínelési eljárásokkal a találmányunk szerinti megoldásban alkalmazható vegyületek sorát tudtuk azonosítani. Fiziológias hőmérséklethez közeli hőmérsékleten ezek a vegyületek növelik az mAb1620 konformáció-érzékeny epitópjának stabilitását vad típusú és számos mutáns p53 fehérjéken. A vegyületek az alacsonyabb $\mu\text{mol/l}$ koncentráció-tartományban alkalmazva átmenetileg növelik az epitóp konformációs stabilitását az élő sejtekben, és elősegítik a mutáns p53 transzkripció aktiválását. Az alábbiakban részletesen ismertetjük egy szerves nem-peptid típusú vegyületnek a p53 konformációjára és működésére gyakorolt moduláló hatását mutáns p53-at tartalmazó tumorokat hordozó egereknek beadva, továbbá ezen vegyület természetes p53 mutánst tartalmazó humán tumoros xenograftok növekedésére gyakorolt jelen-

tős gátló hatását.

c. Sejteken és állatokon végzett vizsgálatok

A vizsgálandó vegyületeknek a fent ismertetett első szkrínelés alkalmazásával végzett azonosítása után általában sejteken és állatokon végzett vizsgálatokkal határozzuk meg a vizsgálandó vegyületek ilyen rendszerekre gyakorolt hatását. Ezeket a vizsgálatokat a p53 családkhoz tartozó fehérjét kódoló mutáns gént tartalmazó tumorokból származó sejtvonala-
kon vagy a p53 családkhoz tartozó mutáns fehérje expresszáálásának megfelelően manipulált sejtvonalakon vé-
gezhetjük. Megvizsgáljuk a vizsgálandó vegyületek p53 csa-
ládkhoz tartozó fehérjék egyik vagy összes vad típusú aktivitá-
sára gyakorolt hatását. Például a WAF1 vizsgálandó vegyület jelenlétében mutatott indukciója jelzi, ha a vegyület a specifi-
kus DNS kötő tulajdonságok elősegítésével megőrzi a mutáns p53-ban levő funkciót, és nem következik be válogatás nélküli kötődés. Bármilyen, a p53 vagy a p53 család egy másik tagja által történő gén felülszabályzás vagy alulszabályzás vizsgál-
ható. A p53 családkhoz tartozó fehérjék egyéb aktivitásai pél-
dául a szaporodás szupressziója és az apoptózis. A szaporo-
dás szupressziója könnyen vizsgálható mikroszkópikus úton szövet tenyésztett sejtekben vagy tenyésztett képződési vizs-
gálattal. Az apoptózis TUNEL megfestéssel vagy propidium-
jodid megfestéssel vagy áramlási citometriával mutatható ki.

A fentiekén túlmenően az állatmodellek a toxicitás és a vizsgálandó vegyület hatékonyságának szkrínelésére is alkal-
mazhatók. Például a p53 mutánst tartalmazó tumorok állatmo-

dellen indukálhatók, és a vizsgálandó vegyület beadható az állatnak. Meghatározható a toxicitás és a tumoros szaporodás vagy regresszió. Az alábbiakban ilyen szkrínelésre mutatunk be példát.

3. Szkrínelésre alkalmas vegyületforrások

A találmányunk szerinti eljárással szkrínélhető vegyületek például kis szerves molekulák, amelyek képesek bejutni a sejtbe, és befolyásolni egy, a p53 családhoz tartozó fehérje aktivitását, azonban találmányunk nem korlátozódik ezekre. Számos vegyületkönyvtár hozzáférhető a kereskedelemben (például Pharmacoopia, Arqule, Enzymed, Sigma, Aldrich, Maybridge, Trega és PanLabs). A p53 DBD-vel kölcsönhatásba lépő vegyületekként ismert vegyületkönyvtárak is szkrínélhetők, ilyenek a természetes termékek vagy a szintetikus vegyületek, továbbá a biológiailag aktív anyagok, beleértve a fehérjéket. Azonban a vegyületek előnyösen nem fehérjék és nem peptidek (ezen 3 aminosavat tartalmazó, peptid kötéssel összekapcsolt láncot értünk). Az antitestek olyan peptidek, amelyek immunoglobulinok vagy egy immunoglobulin antigént kötő fragmensei; azonban a vegyületek előnyösen nem is antitestek. A találmányunk szerinti eljárásokban alkalmazható vegyületek speciális osztályait és példáit mutatjuk be az alábbiakban.

Egy, a p53 családhoz tartozó fehérje vad típusú aktivitását elősegítő vegyület azonosítása után molekula modellezési technikát alkalmazhatunk a vegyület még hatásosabb változatainak tervezésére. Ilyen molekula modellező rendsze-

rek például a CHARM (Polygen Corporation, Waltham, MA) és a QUANTA programok (Molecular Simulations Inc., San Diego, CA). A CHARM az energia minimalizálásán és molekula dinamikai funkciókon alapul. A QUANTA a molekula szerkezeti felépítésén, grafikus modellezésén és analízisén alapul. A QUANTA interaktív felépítést, módosítást, megjelenítést és a molekulák egymás közötti viselkedésének analízisét teszi lehetővé.

Egy, a p53 családhoz tartozó fehérje vad típusú aktivitását elősegítő vegyület azonosítása után a vegyület például egy elmélet alátámasztására használható. Az alábbiakban részletesen bemutatjuk, hogy a legmegfelelőbb elmélet szerint egy planáris policiklusos hidrofób csoport egy poláros amintól körülbelül 0,5 nm és 0,9 nm közötti (5-9 Å), előnyösebben 0,6 nm és 0,8 nm (6-8 Å) közötti távolságra helyezkedik el. Ilyen hipotézist bármelyik találmányunk szerinti vegyület alapján felállíthatunk a Catalyst program (Molecular Simulations Inc., San Diego, CA) alkalmazásával. Továbbá a Catalyst program az elmélet megfelelő adatbázisokon, a Cambridge kis molekula adatbázison (Cambridge, England), továbbá más fent említett adatbázisokon való alkalmazásával további, találmányunk szerinti vegyületek azonosítására használhatók.

A találmányunk szerinti vegyületek hatásosabb változatok tervezésére is használhatók olyan modellező csomagok alkalmazásával, mint a Ludi, Insight II, C²-Minimizer and Affinity (Molecular Simulations Inc., San Diego, CA). Különösen előnyös modellező csomag a MacroModel (Columbia University, NY, NY).



A találmányunk szerinti vegyületek egy racionális kombinatorikai könyvtár kifejlesztésének alapjaként is használhatók. Az ilyen könyvtár további hatásos vegyületek szkrínelésére alkalmas. A kombinatorikai könyvtár tulajdonságai különböző faktoroktól függenek, mint egy, a könyvtár alapját képező előnyös találmányunk szerinti vegyületek közül kiválasztott vegyület, természetesen a találmányunk szerinti vegyületek egyedülálló adatokat biztosítanak olyan kombinatorikai tervező programok számára, mint a C²-QSAR (Molecular Simulations Inc., San Diego, CA).

Találmányunkat az alábbi példákban ismertetjük közelebbről, azonban találmányunkat nem kívánjuk az ezekben foglaltakra korlátozni.

1. példa

p53 DBD hőstabilizálási vizsgálat

Nagy teljesítményű vizsgálatot fejlesztettünk ki vad típusú p53 DBD alkalmazásával. A vizsgálat során gyógyhatású vegyületeket szkrínelünk, és azokat a vegyületeket, amelyek stabilizálják a DBD aktív konformációját, találatként jegyezzük fel.

A. Anyagok és eljárások

Hőstabilizálási vizsgálat: Vad típusú és mutáns p53 fehérjéből és FLAG-gal jelzett p53 DBD-ből rekombináns DBD-t (94-312-ig maradékok) állítunk elő [Pavletich és munkatársai, *Genes and Dev.* 7, 2556-2564 (1993); Bullock és munkatársai, 1997, lásd fentebb]. Mutáns fehérjeként a következőket hasz-



náljuk: 143A, 173A, 175S, 249S és 273H. Számos kis molekulájú szerves vegyületet használunk. A vegyületekből dimetilszulfidban oldva 10 mg/ml koncentrációjú törzsoldatokat állítunk elő, és felhasználás előtt hígítjuk. A fehérjét (0,25 nm és 1,0 ng mérőhelyenként) 25 mmól/l HEPES-t, 150 mmól/l kálium-kloridot, 10 mmól/l ditiotreitolt tartalmazó pH 6,8 kémhatású pufferrel hígítjuk, 50 µl-t helyezünk el Reacti-Bind mikrotiter lemezeken (Pierce), és 35 percig jégen tartjuk. A mérőhelyeket 25 mmól/l HEPES-t és 150 mmól/l kálium-kloridot tartalmazó, pH 6,8 kémhatású oldattal öblítjük, hozzáadjuk a vegyületet vagy a hígított dimetilszulfid hordozót, és a lemezeket a meghatározott hőmérsékleten inkubáljuk. Az inkubálás végén a mérőhelyeket jégre helyezzük, ELISA vizsgálatot végzünk, közben a lemezeket jégen tartjuk az epitópok további változásának elkerülésére. A mérőhelyeket 1 órán át hideg, 5 %-os lefölezött tejjel (Difco HEPES/KCl pufferben) blokkoljuk az első antitest hozzáadása után. mAb1620, mAb240 (Calbiochem) és monoklonális antitesteket és anti-FLAG M2 antitestet (Eastman Kodak Company) hígítunk 1:100 és 1:250 közötti arányban HEPES/KCl elegyben, és mérőhelyenként 100 µl-t helyezünk el 30 percre. A lemezeket hideg HEPES/KCl pufferben kétszer öblítjük, és további 30 percig torma-peroxidáz (HRP)-konjugált anti-egér IgG-vel (Boehringer Mannheim) inkubáljuk további 30 percig. A HRP jelet TMB előhívó (Pierce) alkalmazásával előhívjuk, és a jel optikai sűrűségét 450 nm-re beállított BioRad mikrolemezes leolvasóval olvassuk le.



B. Eredmények

A p53 DBD konformációjának termolabilitása: A mAb1620 által felismert epitóp konformációfüggő, és ennek p53-on való jelenléte nagy mértékben összefügg a fehérje tumor szuppresszív aktivitásával [Ball és munkatársai, 1984, lásd fentebb; Gamble és Milner, 1988, lásd fentebb]. Ezzel szemben az mAb240 által felismert epitóp egy lineáris epitóp, amelyet akkor használunk, amikor a p53-at mutációval inaktiváljuk, vagy amikor a vad típusú p53 denaturált [Bartek és munkatársai, *Oncogene* 5, 893-899 (1990); Stephen és Lane, *J. Mol. Biol.* 225, 577-583 (1992)]. A rekombináns humán p53 DBD (94-312-ig maradékok) *in vitro* aktívból inaktív konformációba alakul át, fokozatosan elvesztve az 1620 epitópot a 240-es epitóp akkumulálódása közben. Mikrotiter lemezeken tisztított p53 DBD-t immobilizálunk, megközelítőleg fiziológias hőmérsékletre melegítjük, és egy ELISA formátumban mAb1620-zal szondázzuk. Az 1620 epitóp a hőmérséklet és az idő függvényében elfogy, ahogy ez az 1A ábrán látható. Az 1620-as epitóp csökkenése kifejezetten összefügg a konformáció elvesztésével, mivel egy, a DBD-hez kötött FLAG epitóp teljesen stabil marad, ahogy ez az 1B ábrán látható. Továbbá az 1620-as epitóp a 240-es epitóp növekedésével összhangban csökken, ami azt igazolja, hogy az 1620-as epitóp csökkenése a p53 DBD-ben bekövetkező konformációs változására utal, és nem az immobilizált fehérje csökkenésére.

A vad típusú p53 DBD-n lévő 1620-as epitóp felezési ideje 23 °C-on körülbelül 35 perc, és magasabb hőmérsékleten



ez progresszíven csökken, például 45 °C-on 5 perc alá, ahogy ez az 1A ábrán látható. Ezzel párhuzamosan a gél eltolódási vizsgálatokban a p53 DBD DNS kötő kapacitása az oldat melegítésével csökken (adat nincs bemutatva). A vad típusú p53 DBD fehérjén lévő 1620-as epitóp felezési ideje 37 °C-on körülbelül 2-szerese a 143-as helyzetben mutáns DBD-nek, ahogy ez az 1C ábrán látható. Ez a felismerés összhangban van más mutánsok p53 fehérjék csökkent termodinamikai stabilitásával kapcsolatban korábban ismertettekkel, és azt bizonyítja, hogy az 1620-as epitóp a p53 DBD konformációjának kimutatására használható (Bullock és munkatársai, 1997, lásd fentebb).

A p53 konformációját stabilizáló vegyületek: ELISA vizsgálatot alkalmazunk az aktív p53 konformációt stabilizáló, és a mutáns fehérje vad típusú funkciójának jobb megőrzését elősegítő vegyületek azonosítására. Számos vegyület fiziológias hőmérsékleten szuppresszálja az mAb1620 epitópjának csökkenését, ahogy ez például a 2A ábrán látható. A vegyületek relatív hatásosságát titrálási kísérletekkel határozzuk meg az mAb1620 epitópjának 50 %-os stabilizálásához szükséges koncentráció meghatározásával. A hatásos vegyületek az epitópot dóziszfüggő módon stabilizálják, ahogy ez a 2B ábrán látható. A dimetilszulfid oldószer és a hatásos vegyületek számos analógja nem stabilizáló hatású, ahogy ez a 2B ábrán és az 1. és 2. táblázatban látható. A vegyületek a teljes hosszúságú vad típusú p53-at is hasonló módon stabilizálják, mint számos mutáns p53 fehérjéből származó DBD-t, (lásd a 2C ábrát, adat nincs bemutatva). A vegyület jelenlétében a

mutáns fehérjék olyan stabilak, mint a vad típusú fehérje a vegyület távollétében.

Bár a vegyületek megőrzik az mAb1620 epitópját, nem mentik meg az olyan p53-at, amely már elvesztette az epitópot. Például az mAb1620 reaktivitása nem nő, amikor a p53 DBD-t az (Y) képletű vegyület hozzáadását megelőzően melegítjük. Habár az epitóp csökkenési sebességét a vegyület jelenléte mérsékli, hosszú időn át végzett melegítés hatására az 1620-pozitív konformáció éppen úgy csökken. Továbbá úgy tűnik, hogy a vegyület nem kötődik irreverzibilisen a p53-hoz, mivel az (Y) képletű vegyület 37 °C-on végzett inkubálás előtt történő hozzáadása és kimosása nem akadályozza meg az epitóp csökkenését (adat nincs bemutatva). Ezek a felismerések összhangban vannak egy olyan modellel, ahol a p53 DBD és a vegyület kölcsönhatása képessé teszi a fehérjét az mAb1620 által felismert funkcionális konformáció stabilabb megőrzésére.

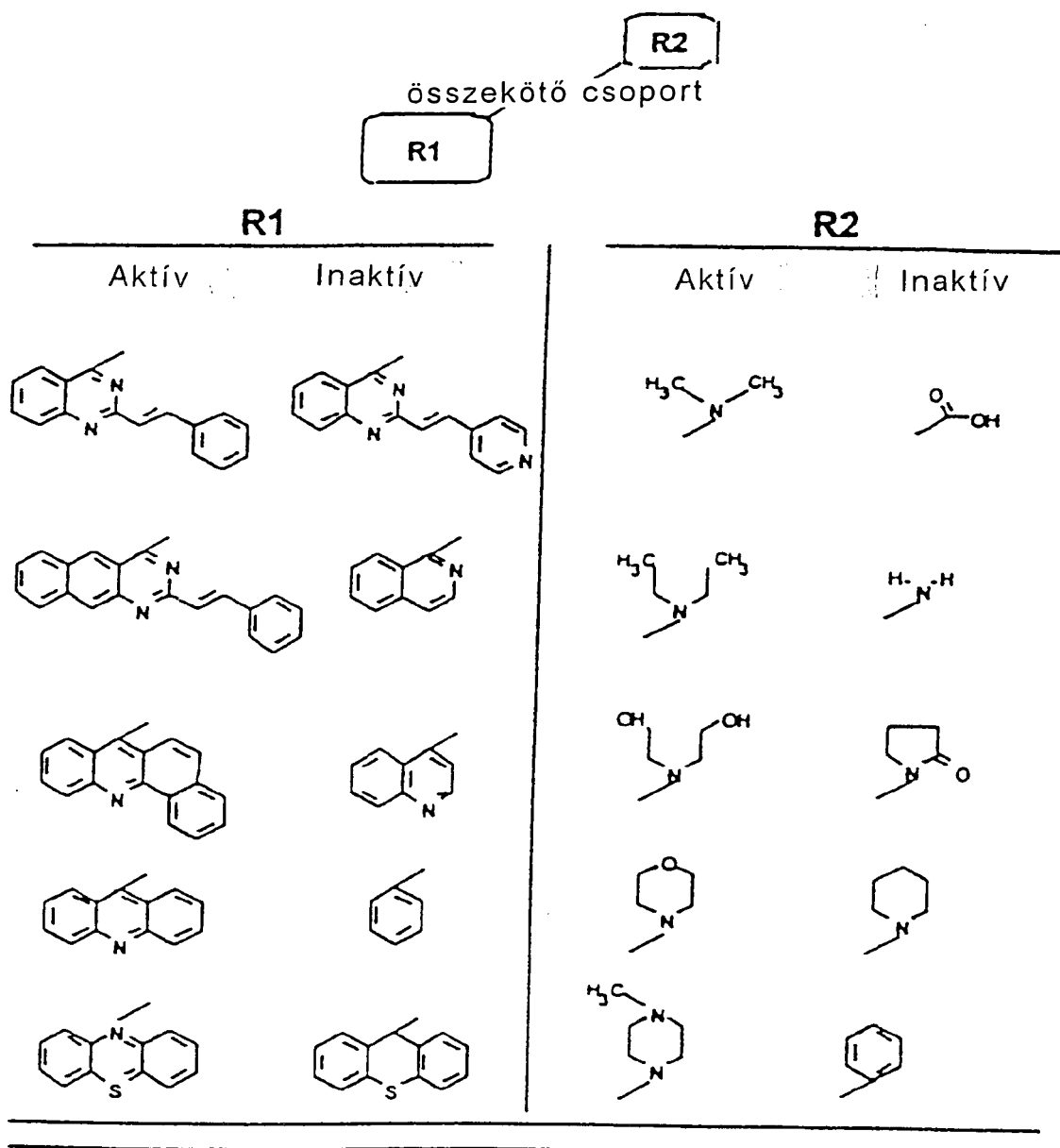
A hatásos vegyületek szerkezete: Az összes azonosított hatásos vegyület egy (planáris policiklusos) hidrofób csoportot és egy kationos csoportot (gyakran egy amin) tartalmaz egy speciális hosszúságú összekötő csoporton át összekapcsolva. A benzimidazol, benzokinolin, fenotiazin és sztirikinazolin a hidrofób (R1) helyzetben aktívak, ezzel szemben az ilyen csoportokban és az egyszerű biciklusos vagy monociklusos csoportokban végrehajtott kicsiny változások hatására a megadott vizsgálati körülmények között nem voltak aktívak, ahogy ez az 1. táblázatban látható. A vegyületek esetében "aktív" kifejezésen ebben a vizsgálatban azt értjük,



amikor két párba állított vegyület esetén 10-szeresnél nagyobb különbség van, ahogy ez az 1. táblázatban látható, az mAb1620 epitópjának 50 %-os stabilizálásához szükséges vegyületek mennyisége között. Tehát megjegyezzük, hogy a vizsgálatban egy vegyületet akkor nevezünk inaktívnak, ha viszonylag inaktív és nem akkor, ha abszolút értelemben inaktív. Ennek megfelelően aktív kationos csoportok (R2) például a dimetil-amin, dietil-amin, dietanol-amin, metil-amin, metil-piperazin és morfolin, ahogy ez az 1. táblázatban látható. Bizonyos nagyobb aminok ennek megfelelően aktívabbak, amikor a fenotiazin sorozatban vizsgáljuk. Negatívan töltött vagy töltetlen csoportok, mint a karboxil- vagy benzilcsoport az R2 helyzetben inaktívak ezen vizsgálatok szerint, ahogy ez az 1. táblázatban látható. Ebben a vizsgálatban az R1 és R2 csoportok közötti távolság szintén fontos a vegyület aktivitása szempontjából, mivel a propilcsoport hosszúságúnál rövidebb összekötő csoportok csökkentik a vegyület relatív aktivitását, ahogy ez a 2. táblázatban látható. A butil-összekötőcsoportok kissé kevésbé hatásosak, mint a propil-összekötőcsoportok, és a hosszabb összekötőcsoportok kevésbé hatásosnak mutatkoznak a vegyületekben ebben a vizsgálatban (lásd a 2. táblázatot, adat nincs bemutatva). A megfelelő távolságot megőrző elágazó összekötő csoportok általában aktívabbak, mint a megfelelő lineáris összekötő csoportok. Ezek az általános megfigyelések nem korlátozzák találmányunk oltalmi körét, de a találmány megvalósítása során jól használhatók a további molekulák tervezésében.

1. táblázat



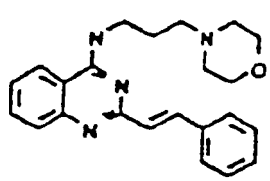
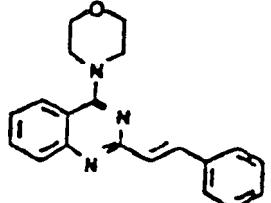
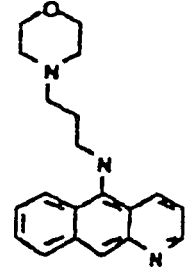
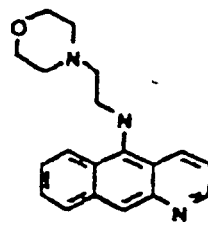
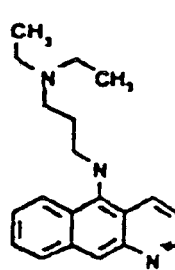
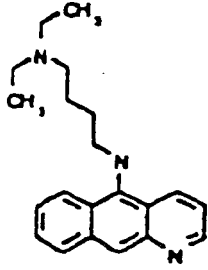
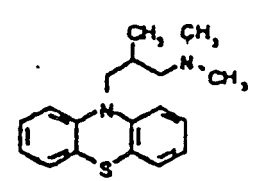
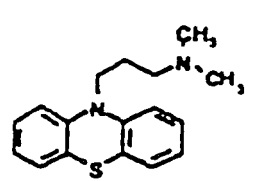
Az aktivitás függése a vegyület szerkezeti tulajdonságaitól



* Az aktív és inaktív kifejezés azt jelenti, hogy az egymáshoz tartozó vegyületepárok hatásossága közötti különbség több, mint 10-szeres. A relatív hatásosságot a titrálási vizsgálatokban az mAb1620 epitópja 50 %-os stabilizálásához szükséges vegyület mennyiségével határozzuk meg.

2. táblázat

Az aktivitás függése az R1 és R2 közötti távolságtól

| Vegyület  | SC50 (μM) | Vegyület  | SC50 (μM) |
|--|------------------------|--|------------------------|
|  | 36 |  | >300 |
|  | 120 |  | >300 |
|  | 50 |  | 120 |
|  | 38 |  | >300 |

* Az mAb 1620 epitópja 50 %-os megőrzéséhez szükséges vegyületkoncentráció 45 °C-on 30 percig melegített 0,5 ng p53 DBD esetén



C. Értékelés

Az eredmények azt mutatják, hogy a mutáns p53 funkció megőrzésére és a rákellenes kezelési eljárás kifejlesztésére alkalmas új stratégia elve bizonyított. A példában bemutatott eljárás az izolált DBD konformációs stabilitásának elősegítésére alkalmas első vegyületcsalád kutatására vonatkozik.

2. példa

p53 konformációjának meghatározása a sejtekben és tumorokban

Ebben és a további példákban olyan vegyület-prototípusokat mutatunk be, amelyek az alacsonyabb μM /l koncentrációtartományban alkalmazva megváltoztatják a mutáns p53-at az élő sejtekben és tumorokban, és szuppresszálják a természetesen mutálódó p53-at tartalmazó tumorok növekedését.

A. Anyagok és eljárások

Sejttenyészet: Az összes sejtvonalat az ATCC-től szerezzük be, és 10 % borjú embrió szérumot (Gibco BRL) tartalmazó közegben szaporítjuk.

A p53 konformációjának meghatározása: Körülbelül 1×10^7 H1299/riporter + mutáns p53 sejteket kezelünk egy éjszaka át, trisz-puffert tartalmazó hideg só-oldattal háromszor öblítjük, és 1,5 ml hipotóniás lízispufferrel lizáljuk, amely 20 mmól/l HEPES-t, 10 mmól/l nátrium-kloridot, 20 % glicerint, 0,2 mmól/l EDTA-t, 0,1 % Triton-X 100-at, 10 mmól/l



ditiotreitolt és proteáz inhibitorokat tartalmaz, kémhatása pH 7,4. A sejteket 2000 fordulat/perc értéken 5 percig 4 °C-on mikrocentrifuga csövekben üleptjük, és a mag extraktumokat a csapadék ugyanilyen 0,5 mmól/l nátrium-kloridot tartalmazó pufferben történő újra szuszpendálásával állítjuk elő. A tumor mintákat egy Dounce homogenizátorban homogenizáljuk a fenti, 0,5 mól/l nátrium-kloridot tartalmazó puffer háromszoros térfogatában. A lizátumokat 10 000 ford./perc értéken 10 percig 4 °C-on végzett centrifugálással tisztítjuk. A mag extraktumokat p53 tartalomra normalizáljuk, amelyet mAbDO-1 antitesttel határozunk meg Western foltok alkalmazásával, és a p53-at MaxiSorp F96 lemezek (Nunc) mérőhelyein helyezük el, amelyet előzőleg 0,05 mól/l karbonát-pufferben (pH 9,6) 1 µg/ml mAbDO-1 koncentrációjú oldattal vontunk be. A mérőhelyeket hideg PBS-sel mossuk, 3 órán át 4 °C-on blokkoljuk 4 %-s fölözött tej alkalmazásával PBS-ben, és fölözött tejben HRP-konjugált mAb1620 antitest alkalmazásával szondázzuk. Az antitestet 1 órán át jégen inkubáljuk, ezután a mérőhelyeket 0,05 % Tween 20-at tartalmazó PBS-sel háromszor mossuk, és a jel kifejllesztésére TMB szubsztrátumot használunk. A standard görbét eltolt hőmérsékletű (32 °C) H1299/riporter + mutáns p53 sejtekből való lizátum alkalmazásával határozzuk meg, amely sejtek nagy mennyiségű 1620-pozitív p53-at expresszálnak. A minták mennyisége a standard görbe lineáris tartományán belül van, és mindegyik mintában a teljes p53-ra, továbbá a kezeletlen lizátumokban az 1620-pozitív p53 frakcióra korrigáljuk.



B. Eredmények.

A konformáció stabilizálása a sejtekben: a vegyületek sejtkben lévő p53 1620-pozitív konformációt stabilizáló képességét kizárólag mutáns p53-at expresszáló élő sejteken vizsgáljuk. A p53 számára értéktelen H1299 sejteket tumoros eredetű mutáns p53-mal (173-as helyzet) transzfektáljuk, és nem konformáció-érzékeny p53 antitestet (mAbDO-1) használunk Western foltokban a bőséges mennyiségű mutáns fehérjét expresszáló klón szelektálására. Az mAb1620 epitópját hordozó p53 állandó alacsony szintjét a transzfektánsból származó extraktumban detektáljuk, ez megerősíti, hogy a p53 mutáns kis frakciója megőrzi az aktív konformációt [Chen és munkatársai, *Oncogene* 8, 2159-2166 (1993)]. Az (X) képletű vegyület alacsonyabb $\mu\text{mol/l}$ koncentrációtartományban alkalmazva körülbelül 5-szörösére növeli az 1620-pozitív p53 állandó állapotú frakcióját a sejtekben, ahogy ez a 3A ábrán látható. Kezelés után 4 vagy 6 órával érjük el a legnagyobb epitópszintet. A p53 teljes mennyisége változatlan az mAbDO-1-nek a fehérje amino-terminálisán elhelyezkedő nem konformáció-érzékeny epitóppal szemben mutatott reaktivitása alapján meghatározva.

C. Értékelés

Az eredmények azt mutatják, hogy a találmányunk szerinti eljárással azonosított konformáció stabilizáló hatású vegyületek képesek stabilizálni a p53 aktív konformációját az élő sejtekben. Azok a vegyületek, amelyek a tumorokban megőrzik a mutáns p53-at, a nem-funkcionális p53 teljes mennyi-



ségét vagy a mAb1620 epitópját hordozó p53 alcsoportot vehetik célba. Úgy tűnik, hogy az itt ismertetett vegyületek fő célja az újonnan szintetizált mutáns p53, amely még megőrzi aktív konformációját. Ennek megfelelően a vegyületek növelik az 1620-as epitóp fennmaradását, de képtelenek megőrizni az előzetesen *in vitro* melegítés következtében elvesztett 1620-as epitópot. Azok a vegyületek, amelyek növelik az aktív konformáció stabilitását az újonnan szintetizált p53-on, elősegítik a funkcionális p53 állandó szintjének idő-függő akkumulációját. Ezzel az elmélettel összhangban van a sejtekben az 1620-as epitóp maximális növekedésének elérésénél megfigyelt 4 órás késleltetés, ahogy ez a 3A ábrán látható.

3. példa

A p53 funkciójának megőrzése

A. Anyagok és eljárások

Transzaktivációs vizsgálat: A sejteket mutáns p53 fehérjéket (173A, 249S) kódoló expresszázó plazmidokkal és egy neomicin szelektálható markerrel transzfektáljuk DOTAP kationos lipid transzfektáló reagens (Boehringer Mannheim) vagy kalcium-foszfát alkalmazásával. A sejteket egy, a higromicin rezisztencia markert kódoló plazmiddal és egy olyan p53 reporter génnel is transzfektáljuk, amely a Herpes Sikplex vírus timidin-kináz gén promóter tartományában lévő p53 kötő szekvenciának megfelelő p53 kötő szekvencia négy kópiáját tartalmazza (a génbank S57428 hozzáférési számú timidin-kinázának 26-tól 58-ig terjedő alapszáma, amely a GCCTTGCCT szekvenciával kezdődik és a TGCCTTTTC szek-

venciával fejeződik be), amely a luciferáz gént vezető SV 40 bázis promóterrel szemben helyezkedik el. A megfelelő sejt párokat úgy állítjuk elő, hogy a sejtek egy klónját a reporter konstrukcióval, egy, a mutáns p53 expressziójának megfelelő további konstrukcióval transzfektáljuk. A transzfektált klónokat Hygromycin-t vagy G418-at tartalmazó közegben növesztjük. 96-mérőhelyes szövettenyésztő tálcákon (Costar) sejt monorétegeket kezelünk a vegyülettel, a luciferáz aktivitást egy szubsztrátum konverziós vizsgálattal (Promega) határozzuk meg, és Dynatech mikrolemezes luminométerrel mérjük.

WAF1 és p53 expressziója: A tenyésztett sejteket 21 órán át kezeljük, trisz-puffert tartalmazó hideg sóoldattal háromszor öblítjük, felkaparjuk és 10 000 fordulat/perc értéken 30 másodpercig üleptjük, majd 50 mmól/l HEPES-t, 0,1 % NP-40-et, 250 mmól/l nátrium-kloridot, 5 mmól/l EDTA-t, 50 mmól/l nátrium-fluoridot, 1 mmól/l DTT-t, 50 µg/ml aprotinint, 1 mg/ml Pefabloc-ot (Boehringer Mannheim) tartalmazó pH 7,5 kémhatású oldatban újra szuszpendáljuk. A fehérjekoncentrációt Bradford reagenssel (BioRad) határozzuk meg, és 5 µg és 10 µg közötti sejt lizátumot mérünk be 8 % és 16 % közötti gradiensű poliakrilamid/SDS géltre (Novex). A fehérjéket Immobilon P membránra (Millipore) visszük át Towbin-pufferban [Towbin és munkatársai, Proc. Nat. Acad. Sci.: USA 76, 4350 (1979)] 20 % metanollal. A membránokat 32,5 kDa és 47,5 kDa közötti molekulatömegű markerek között kettéosztjuk, és 1 órán át szobahőmérsékleten SuperBlock (Pierce) plusz 3 %



fölözött tej elegyében blokkoljuk. A folt alsó felét WAF1 expresszállásra szondázzuk EA10 monoklonális antitest klón (Calbiochem WAF1 Ab-1) alkalmazásával, és a folt felső felét a teljes p53 expresszióra szondázzuk mAbDO-1 (Calbiochem p53 Ab-6) alkalmazásával. A foltokat 1 órán át mossuk 0,1 % Tween 20-at tartalmazó trisz-szel pufferelt sóoldat háromszori cseréjével, majd hozzáadjuk a második antitestet, a HRP-vel konjugált anti-egér IgG-t. A sávokat Renaissance ECL (DuPont) alkalmazásával jelenítjük meg, és Hyperfilm ECL-en (Amersham Life Science) rögzítjük.

B. Eredmények

p53 funkció megőrzése a sejtekben: Annak meghatározása céljából, hogy a p53 konformációjának stabilizálása a vad típusú funkciók jobb megőrzését eredményezi-e, megvizsgáljuk a p53 szekvencia-specifikus transzkripciós aktivitását. H1299 sejteket transzfektálunk egy p53-indukáló luciferáz riporter génnel, és egy stabil klónt (H1299/riporter) mutáns p53-mal másodlagosan transzfektálunk olyan illeszkedő klón előállítására, amely mind a riporter gént, mind a 173-as helyzetben mutáns p53-at expresszállja (H1299/riporter + mutáns p53). A vegyületek növelik a mutáns p53 transzkripciós aktivitását a riporter gén indukciós mérések szerint, ahogy ez a 3B ábrán látható. Alacsony szintű transzkripciós aktiválást észlelünk a H1299/riporter sejtekben, ami a p53 homológ p73 jelenlétével hozható kapcsolatba (adat nincs bemutatva). Habár még nem bizonyítottuk, hogy ezek a vegyületek növelhetik a p73 aktivitását, a riporter gén indukcióban bekövetkező je-



lentős p53-függő növekedés arra utal, hogy a p53 ezen sejtek elsődleges célja. A riporter gén p53-függő aktiválása viszonylag kis koncentrációtartományban következik be, mivel a vegyületek hatásosságát nagyobb dózisban korlátozza a sejtek szétválása. A transzkripciós aktivitás növekedése a kezelés után 12-16 órával éri el a legmagasabb értéket (adat nincs bemutatva). Ez a megfigyelés összhangban van a funkcionális p53 konformáció stabilizálása után másodlagos eseményként bekövetkező riporter gén expresszióval, amely a kezelés után 4-6 órával történik.

Az (Y) képletű vegyület felülmúlja az (X) képletű vegyületet a riporter gén indukciós vizsgálatokban. Ez az (Y) képletű vegyület DNS károsodást és a p53 fehérje emelt szintjét magába foglaló másodlagos hatásának tulajdonítható, ahogy ez a 3B árbán látható. Az (X) képletű vegyülettel szemben az (Y) képletű vegyület növeli a teljes p53 fehérje szintet a sejt aktivitáshoz szükséges koncentrációban. Annak biztosítására, hogy a DNS károsodás nem egyedül felelős a p53 riporter gén (Y) képletű vegyület által kiváltott indukciójáért, megvizsgáljuk az adriamicin DNS károsító anyag hatását. Az adriamicin széles koncentrációtartományban (0,4 µg/ml és 40 µg/ml között) nem indukálja a riporter gént, annak ellenére, hogy mutáns p53 akkumulációt képes kiváltani a sejtekben (adat nincs bemutatva). Ezek az eredmények ezt mutatják, hogy a p53 konformációjának stabilizálása segíti a specifikus transzkripciós aktivitást, azonban ezek akkumulációja nem. Úgy tűnik, hogy az (X) vegyület, amely nem emeli a teljes p53 fehérje állandó állapotú szintjeit, őrzi meg egyedülálló módon

a p53 transzkripciós funkciót a konformációs stabilizálás folyamán.

Az (X) képletű vegyület a mutáns p53 jelenlétében felülszabályozza a WAF1-et, amely egy p53-ra érzékeny sejten belüli géntermék. p53-at nem expresszáló Saos-2 oszteoszarkóma sejteket transzfektálunk mutáns p53 expresszáló vektorokkal, és a két mutáns (173-as helyzetű vagy 249-es helyzetű) egyikét expresszáló klónokat izoláljuk. A klónok az eredeti Saos-2 sejtekkel összehasonlítva alacsonyabb WAF1 bázis szinteken expresszálnak, ami feltehetőleg arra mutat, hogy a gyorsabban növekvő klónokat választjuk ki. Ezeket a sejteket 16 órán át (X) képletű vegyülettel kezeljük, és az azonos mennyiségű fehérjét képviselő lizátumokat Western foltokon analizáljuk p53-ra és WAF1-re nézve. Azok a sejtek, amelyek a két mutáns p53 fehérje valamelyikét expresszálják, de az eredeti Saos-sejteket nem, kezelés közben magasabb WAF1 expressziós szinteket mutatnak, ahogy ez a 4. ábrán látható. A p53 fehérje teljes mennyisége ezekben a lizátumokban lényegében változatlan. Az adriamicin nem indukálja a WAF-1 expresszióját a Saos-2 sejtekben mutáns p53-mal, habár emeli a WAF-1 expresszióját U2OS sejtekben, ami vad típusú p53-at expresszál (adat nincs bemutatva).

C. Értékelés

Az itt ismertetett konformációt stabilizáló anyagok hatásmódját világosan megkülönböztetjük a szokásos citotoxikus anti-neoplasztikus anyagoknál megfigyelttől. A rák kemoterápiában használt citotoxikus anyagok általában hatástalanok a

mutáns p53-at tartalmazó sejtekben [Lowe és munkatársai, Nature 362, 847-849 (1993); O'Connor és munkatársai, Cancer Res. 57, 4285-4300 (1997)]. Ennek megfelelően az adriamicin DNS károsító hatású anyag vizsgálataink szerint nem őrzi meg a mutáns p53 transzkripciós aktivitását. A citotoxikus vegyületek a teljes p53 fehérje kifejezett indukciójával is jellemezhetők a normális és tumoros sejtekben. Az (X) képletű vegyület nem indukálja a teljes p53 fehérje szintet a sejtekben vagy a tumorokban. Mivel a p53 indukciója a sejten belüli DNS károsodás érzékeny mutatója, nem valószínű, hogy az (X) képletű vegyület a DNS-t károsíthatja a hatá-
sos koncentrációkban. Összefoglalva, vizsgálataink azt mutatják, hogy az 1620-pozitív konformáció stabilizálása és a mutáns p53 aktivitás funkciójának megőrzése egy, a DNS károsításától független mechanizmus útján mehet végbe.

Számos bizonyíték eleve kizárja a fehérje stabilizálására gyakorolt nem-specifikus hatást. A glicerin, amely a fehérje denaturációjának nem specifikus inhibitora és a fehérjemolekulák körül a víz helyettesítésével és erősebben hidrofób mikrokörnyezet kialakításával fejt ki hatását, 600 mmól/l koncentrációban képes megőrizni egy mutáns egér p53 fehérje nukleáris lokalizációját a sejtekben [Brown és munkatársai, J. Clin. Invest. 99, 1432-1444 (1997)]. Az (X) képletű vegyület ebben a vizsgálatban 0,03 mmól/l koncentrációban hatásos, ami egy, a vegyület és a p53 közötti specifikus kapcsolatot magában foglaló sokkal fontosabb kölcsönhatásra utal (adat nincs bemutatva). Ezen túlmenően az a megfigyelés, hogy az (X) képletű vegyület tenyészetben és *in vivo* más fehérjék



nagy feleslegének jelenlétében befolyásolni tudja a p53 konformációját (lásd alább), összhangban van a p53 szelektív felismerésével. Azonban a vegyület p53-mal való kölcsönhatásának természete nem teszi lehetővé a természetes fehérjeszerkezettel való szoros kötődést. Egy olyan kis fehérjemolekula alcsoporttal, amelyek átmeneti állapotban vannak, kialakuló szoros kölcsönhatás, blokkolhatja az aktív konformációtól való további deviációt vagy lehetővé teheti a természetes konformációhoz való visszatérést.

4. példa

Tumor növekedés vizsgálata

A. Anyagok és eljárások

Tumor növekedési vizsgálat: Tenyésztett sejteket öblítünk PBS-sel, és 1×10^6 A375.S2 vagy 5×10^6 DLD1 sejteket oltunk 90 %-os Matrigel-ben (Becton Dickinson) egy rétegben 20 g-os nőstény NU/NU-nuBR egerek jobb ágyékába (Charles River Laboratories). Az (X) képletű vegyületet intraperitoneálisan adjuk be 0,1 % Pluronic P-105-öt (BASF) tartalmazó sóoldatban. A tumor átmérőjét egy vastagságmérő alkalmazásával két dimenzióban megmérjük, és kiszámítjuk a tumor térfogatát [Euhus és munkatársai, J. Surg. Oncol. 31, 229-234 (1986)].

B. Eredmények

p53 *in vivo* moduláció: Az (X) képletű vegyület növeli a p53 frakció állandó állapotú szintjét, ami a mutáns p53-at tartalmazó sejtekben az mAb1620 epitópját mutatja. A vegyü-



letet 100 mg/kg mennyiségben intraperitoneálisan adjuk be H1299/riporter + mutáns p53 sejtek injektálásából származó szubkután tumorokat hordozó egereknek. Az állatokat a vegyület egyetlen dózisának beadása után leöljük, és meghatározzuk a teljes és 1620-pozitív p53 expressziót. A teljes p53 szintek mAbDO-1 tartalmú Western foltokon végzett meghatározás szerint változatlanok. A lizátumokat a teljes p53 tartalomban bekövetkező kis változásokra normáljuk, és ELISA vizsgálattal meghatározzuk az mAb1620 epitópjának expresszióját. Az epitóp a kezelés után 3-5 órán belül megnő, ahogy ez az 5. ábrán látható. Az *in vivo* válasz időbeli lefutása a tenyésztett sejtekéhez hasonló, ahogy ez a 3A ábrán látható.

A mutáns p53 funkciójának megőrzésére irányuló *in vivo* vizsgálat céljából megvizsgáljuk a luciferáz riporter gén expresszióját kezelt és kezeletlen állatokból származó tumorokban. A riporter gén legfeljebb 4,5-szörös indukcióját a beadás után 8 órával vizsgáljuk, ahogy ez az 5. ábrán látható. A konformációs és funkcionális válaszok közötti időbeli késleltetés a luciferáz transzkripciójának átalakításához és a fehérje akkumulációjához szükséges időtartamot mutatja. A vegyület legnagyobb plazmakoncentrációja egérben körülbelül 10 µg/ml, ami a riporter génnek a sejtekben való legnagyobb indukciójához szükséges érték alatt van (adat nem látható). Ezért a tenyésztett sejtekkel összehasonlítva a tumorokban a riporter gén indukciójának alacsonyabb szintje az optimálisnál kisebb érintkezésre vezethető vissza.

C. Értékelés

Az eredmények azt mutatják, hogy a konformációt stabilizáló vegyületek számos véletlenszerűen választott mutáns funkcióját megőrizhetik. Tehát a találmányunk szerinti eljárások és vegyületek széleskörűen alkalmazhatók különböző p53 mutánsok esetén. Például a DLD-1 sejtekben a 241-es helyzetű mutáció, amely egy kisebb DNS érintkezési helyet befolyásol, funkcionálisan kiegészíthető az (X) képletű vegyület stabilizáló hatásával. Ezért a p53 mutánsok nagy része, beleértve bizonyos, a DNS érintkezési helyein lévőket is, megőrizhetők az aktív konformáció stabilizálásával.

Az (X) képletű vegyület *in vivo* terápiás szelektivitást mutat, annak ellenére, hogy mind a vad típusú, mind a mutáns p53 konformációját *in vitro* stabilizálja. Ennek megfelelően a vegyület biztonságosnak tűnik, és nem észlelünk pusztulást 14 egymást követő napon 200 mg/kg/nap dózisban beadva (100 mg/kg b.i.d.) (adat nem látható). A szelektivitás a normális sejtekben a p53 nagyon alacsony állapotú szintjeinek tudható be, összehasonlítva a tumoros sejtekben lévő sokkal magasabb szintekkel [Lassus és munkatársai, EMBO J. 15, 4566-4573 (1996)]. A tumor-specifikus stressz, mint a DNS sérülések vagy oxigén vagy táplálék hiány, is beindíthatják a tumoros sejtekben a p53 előnyös apoptózis hatását [Chen és munkatársai, Genes and Dev. 10, 2438-2451 (1996)]. Ebben az esetben szinergikus tumorelles hatás érhető el a p53 stabilizáló vegyület és sugárterápia vagy genotoxikus kezelés kombinálásával.

A fenti ismertetés elegendő kitanítást nyújt ahhoz, hogy egy, a szakterületen járatos személy találmányunkat megvalósíthassa. Találmányunknak számos változata lehetséges, és a molekuláris biológia, gyógyászat és ezzel rokon területeken járatos szakember számára nyilvánvaló, hogy ezek a változatok is alábbi igénypontosorozatunk által meghatározott oltalmi körbe tartoznak.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás egy, a p53 családkhoz tartozó humán fehérje mutáns formája vad típusú aktivitásának elősegítésére, amely fehérje fiziológiás körülmények között funkcionális konformációjának megtartására való képtelensége miatt a fehérje egy vagy több funkcionális aktivitása legalább részben csökken, **azzal jellemezve, hogy**

(a) a mutáns fehérjét egy olyan nem-peptid típusú vegyülettel érintkeztetjük, amely fiziológiás körülmények között képes ezen mutáns fehérje egy vagy több doménjének megkötésére, és a funkcionális konformációjának stabilizálására, és

(b) biztosítjuk ezen stabilizált fehérje vad típusú aktivitásában résztvevő egy vagy több makromolekulával való kölcsönhatását.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve, hogy** p53, p63 vagy p73 fehérjét alkalmazunk.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve, hogy** p53 fehérjét alkalmazunk.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve, hogy** (I), (II), (III),(IV) vagy (V) általános képletű szerves nem-peptid típusú vegyületet használunk, ahol az (I) általános képletben

R^5 jelentése $-NR^{18}R^{18}$ általános képletű csoport, ahol

R^{18} jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil- vagy fenilcsoport, és



R^{19} jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil-, 3-10 szénatomos cikloalkil- vagy fenilcsoport, amely alkil-, cikloalkil- vagy fenilcsoport adott esetben hidroxil-, 3-8 szénatomos cikloheteroalkil-csoporttal, $-\text{CONR}^{18}(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{20}\text{R}^{21}$, $-(\text{CH}_2)_p-(\text{CHR}^{22})_m-$ $(\text{CH}_2)_n-\text{NR}^{20}\text{R}^{21}$ vagy $-(\text{CH}_2)_p-(\text{CHR}^{22})_m-(\text{CH}_2)_n-\text{NR}^{20}\text{R}^{21}$ általános képletű csoporttal helyettesített, ahol

p értéke 0 és 5 közötti szám,

m értéke 0 és 5 közötti szám,

n értéke 0 és 5 közötti szám,

R^{22} jelentése hidroxil- vagy 1-6 szénatomos alkilcsoport, és

R^{20} és R^{21} jelentése egymástól függetlenül

(a) hidrogénatom, 1-12 szénatomos alkil-, 3-12 szénatomos cikloalkil-, 3-10 szénatomos heterocikloalkil-, 6-10 szénatomos aril-, 5-9 szénatomos heteroaril-, (1-6 szénatomos alkil)(6-12 szénatomos aril)-csoport, ahol az említett csoportok előnyösen egy vagy több hidroxilcsoporttal, halogénatommal, amino-, trifluormetil-, 1-6 szénatomos alkil-, 1-6 szénatomos alkoxi-, (1-6 szénatomos alkil)(3-10 szénatomos heterocikloalkil)- vagy (1-6 szénatomos alkil)(6-10 szénatomos aril)-csoporttal szubsztituálva vannak; vagy

(b) $-\text{NR}^{20}\text{R}^{21}$ együttes jelentése hidrogénatom, morfolin- vagy 4-(1-6 szénatomos alkil)piperazin-csoport;



R⁶ jelentése

- (a) 1-6 szénatomos alkil- vagy 2-8 szénatomos alkenilcsoport, amelyek mindegyike adott esetben egy vagy több fenilcsoporttal helyettesített, vagy
- (b) halogénatommal helyettesített fenilcsoport vagy 1-6 szénatomos alkoxics csoport; és

R⁷ és R⁸ jelentése azonosan vagy különbözően hidrogénatom, nitro-, 1-6 szénatomos alkoxics csoport vagy halogénatom, mégpedig fluor-, klór- vagy brómatom; ahol a (II) általános képletben

R⁹ jelentése 1-6 szénatomos alkil-, 3-10 szénatomos cikloalkil- vagy fenilcsoport, amely alkil-, cikloalkil- vagy fenilcsoport adott esetben hidroxil-, 3-8 szénatomos cikloheteroalkil-csoporttal, -CON képletű csoporttal, R¹⁸(CH₂)_pNR²⁰R²¹, -(CH₂)_p-(CHR²²)_m-(CH₂)_n-NR²¹R²¹ vagy -(CH₂)_p-(CHR²²)_m-(CH₂)_n-NR²⁰R¹⁰ általános képletű csoporttal helyettesített, ahol

p értéke 0 és 5 közötti szám,

m értéke 0 és 5 közötti szám,

n értéke 0 és 5 közötti szám,

R²² jelentése hidroxil- vagy 1-6 szénatomos alkilcsoport, és

R²⁰ és R²¹ jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, 1-12 szénatomos alkil-, 3-12 szénatomos cikloalkil-, 3-10 szénatomos heterocikloalkil-, 6-10 szénatomos aril-, 5-9 szénatomos heteroaril-, (1-6 szénatomos alkil)(6-12 szénatomos aril)-csoport, amely csoportok adott esetben egy vagy több hidroxilcsoporttal, halo-



génatommal, amino-, trifluormetil-, 1-6 szénatomos alkil-, 1-6 szénatomos alkoxi-, (1-6 szénatomos alkil)-(3-10 szénatomos heterocikloalkil)-, (1-6 szénatomos alkil)(5-9 szénatomos heteroaril)- vagy (1-6 szénatomos alkil)(6-10 szénatomos aril)-csoporttal helyettesítettek;

ahol a (III) általános képletben

R^{10} jelentése $-N-R^{18}R^{19}$ általános képletű csoport, ahol

R^{18} jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil- vagy fenilcsoport, és

R^{19} jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil-, 3-10 szénatomos cikloalkil- vagy fenilcsoport, amely alkil-, cikloalkil- vagy fenilcsoport adott esetben hidroxil-, 3-8 szénatomos cikloheteroalkil-csoporttal, $-CONR^{18}(CH_2)_pNR^{20}R^{21}$, $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-(CH_2)_n-NR^{20}R^{21}$ vagy $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-(CH_2)_n-NR^{20}R^{21}$ általános képletű csoporttal helyettesített, ahol

p értéke 0 és 5 közötti szám,

m értéke 0 és 5 közötti szám,

n értéke 0 és 5 közötti szám,

R^{22} jelentése hidroxil- vagy 1-6 szénatomos alkil-csoport, és

R^{20} és R^{21} jelentése egymástól függetlenül

(a) hidrogénatom, 1-12 szénatomos alkil-, 3-12 szénatomos cikloalkil-, 3-10 szénatomos heterocikloalkil-, 6-10 szénatomos aril-, 5-9 szénatomos heteroaril-, (1-6 szénatomos alkil)-(6-12 szénatomos aril)-csoport, ahol az említett cso-

portok előnyösen egy vagy több hidroxilcsoporttal, halogénatommal, amino-, trifluormetil-, 1-6 szénatomos alkil-, 1-6 szénatomos alkoxi-, (1-6 szénatomos alkil)-(3-10 szénatomos heterocikloalkil)- vagy (1-6 szénatomos alkil)-(6-10 szénatomos heteroatil)- vagy (1-6 szénatomos alkil)(6-10 szénatomos aril)-csoporttal helyettesítettek; vagy

(b) $-NR^{20}R^{21}$ együttes jelentése hidrogénatom, morfolino- vagy 4-(1-6 szénatomos alkil)-piperazin-csoport;

és

A és B jelentése azonosan vagy különbözően szén- vagy nitrogénatom, és

R^{11} és R^{12} jelentése azonosan vagy különbözően hidrogénatom, nitro-, 1-6 szénatomos alkoxicsoport vagy halogénatom, mégpedig fluor-, klór- vagy bróm-atom;

ahol a (IV) általános képletben

R^{13} jelentése $-N-R^{18}R^{19}$ általános képletű csoport, ahol

R^{18} jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil- vagy fenilcsoport, és

R^{19} jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil-, 3-10 szénatomos cikloalkil- vagy fenilcsoport, ahol az alkil-, cikloalkil- vagy fenilcsoport adott esetben hidroxil-, 3-8 szénatomos cikloheteroalkil-csoporttal, $-CONR^{18}(CH_2)_pNR^{20}R^{21}$, $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-$, $-(CH_2)_n-NR^{20}R^{21}$ vagy $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-(CH_2)_n-$



$-NR^{20}R^{21}$ általános képletű csoporttal helyettesített,
ahol

p értéke 0 és 5 közötti szám,

m értéke 0 és 5 közötti szám,

n értéke 0 és 5 közötti szám,

R^{22} jelentése hidroxil- vagy 1-6 szénatomos alkilcsoport,

és

R^{20} és R^{21} jelentése egymástól függetlenül

(a) hidrogénatom, 1-12 szénatomos alkil-, 3-12 szénatomos cikloalkil-, 3-10 szénatomos heterocikloalkil-, (1-6 szénatomos alkil)-(5-9 szénatomos heteroaril)-, 5-9 szénatomos heteroaril-, 6-10 szénatomos aril- vagy (1-6 szénatomos alkil)-(6-10 szénatomos aril)-csoport, amely csoportok adott esetben egy vagy több hidroxilcsoporttal, halogénatommal, amino-, trifluormetil-, 1-6 szénatomos alkil-, 1-6 szénatomos alkoxi-, (1-6 szénatomos alkil)-(3-10 szénatomos heterocikloalkil)-, (1-6 szénatomos alkil)-(5-9 szénatomos heteroaril)- vagy (1-6 szénatomos alkil)-(6-10 szénatomos aril)-csoporttal helyettesítettek; vagy

(b) $-NR^{20}R^{21}$ általános képletű csoport együttes jelentése hidrogénatom, morfolin- vagy 4-(1-6 szénatomos alkil)-piperazin-csoport;

A és B jelentése azonosan vagy különbözően szén- vagy nitrogénatom; és

R^{14} és R^{15} jelentése azonosan vagy különbözően hidrogénatom, nitro-, 1-6 szénatomos alkoxicsoport vagy halogénatom, mégpedig fluor-, klór- vagy



brómatom, és ahol

az (V) általános képletben

A jelentése szén- vagy nitrogénatom;

R¹⁶ jelentése -NR¹⁸R¹⁹ általános képletű csoport, ahol

R¹⁸ jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil- vagy fenilcsoport, és

R¹⁹ jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil-, 3-10 szénatomos cikloalkil- vagy fenilcsoport, amely alkil-, cikloalkil- vagy fenilcsoport adott esetben hidroxil-, 3-8 szénatomos cikloheteroalkil-csoporttal, -CONR¹⁸(CH₂)_pNR²⁰R²¹, -(CH₂)_p-(CHR²²)_m-(CH₂)_n-NR²⁰R²¹ vagy -(CH₂)_p-(CHR²²)_m-(CH₂)_n-NR²⁰R²¹ általános képletű csoporttal helyettesített, ahol

p értéke 0 és 5 közötti szám,

m értéke 0 és 5 közötti szám,

n értéke 0 és 5 közötti szám,

R²² jelentése hidroxil- vagy 1-6 szénatomos alkilcsoport;

R²⁰ és R²¹ jelentése egymástól függetlenül

- (a) hidrogénatom, 1-12 szénatomos alkil-, 3-12 szénatomos cikloalkil-, 3-10 szénatomos heterocikloalkil-, 6-10 szénatomos aril-, 5-9 szénatomos heteroaril-, (1-6 szénatomos alkil)-(6-10 szénatomos aril)- vagy (1-6 szénatomos alkil)-(5-9 szénatomos heteroaril)-csoport, ahol az említett csoportok adott esetben egy vagy több hidroxilcsoporttal, halogénatommal, amino-, trifluormetil-, 1-6 szénatomos alkil-, 1-6 szénato-

mos alkoxi-, (1-6 szénatomos alkil)-(3-10 szénatomos heterocikloalkil)- vagy (1-6 szénatomos alkil)-(6-9 szénatomos heteroaril)- vagy (1-6 szénatomos alkil)(6-10 szénatomos aril)-csoporttal helyettesített; vagy

(b) $-NR^{20}R^{21}$ együttes jelentése hidrogénatom, morfolin- vagy 4-(1-6 szénatomos alkil)-piperazin-csoport;

és

R^{17} jelentése hidrogénatom, nitro-, 1-6 szénatomos alkoxicsoport vagy halogénatom, mégpedig fluor-, klór- vagy brómatom.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve, hogy** a szerves nem-peptid típusú vegyület humán p53 fehérje DNS kötő doménjének 94-312. maradékaihoz kötődik.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve, hogy** a p53 fehérje DNS kötő doménje a 143, 173, 175, 241 vagy 249 aminosav-maradék helyzetében miszensz mutációt tartalmaz.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve, hogy** az (a) és (b) lépéseket egyidejűleg hajtjuk végre.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve, hogy** az (a) és (b) lépéseket egymást követően hajtjuk végre.

9. (I), (II), (III), (IV) vagy (V) általános képletű vegyületek, ahol a képletben a helyettesítők jelentése a 4. igény-

pontban megadott, alkalmazása ilyen vegyületeket tartalmazó, egy, a p53 családhoz tartozó mutáns fehérje jelenlétével összefüggő betegségben szenvedő humán egyed kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmény előállítására, ahol a mutáns fehérje egy vagy több vad típusú aktivitása lecsökkent.

10. A 9. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a fehérje p53, p63 vagy p73 fehérje.

11. A 10. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a fehérje p53 fehérje.

12. A 10. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a szerves nem-peptid típusú vegyület a p53 humán fehérje DNS kötő doménjének 94-312. maradékaihoz kötődik.

13. A 12. igénypont szerinti alkalmazás, ahol p53 fehérje DNS kötő doménje a 143., 173., 175., 241. vagy 249. aminosav-maradék helyzetében misz-szensz mutációt tartalmaz.

14. A 9. igénypont szerinti alkalmazás, ahol (a) szerves nem-peptid típusú vegyület fiziológias körülmények között a mutáns fehérje egy vagy több doménjének kötési és funkcionális konformációját stabilizálja és (b) ezzel egyidejűleg a stabilizált fehérje az említett vad típusú aktivitásban résztvevő egy vagy több makromolekulával kölcsönhatásba lép.

15. A 9. igénypont szerinti alkalmazás, ahol (a) szerves nem-peptid típusú vegyület fiziológias körülmények között a mutáns fehérje egy vagy több doménjének kötési és funkcionális konformációját stabilizálja és (b) ezután a stabilizált fehérje az említett vad típusú aktivitásban résztvevő egy vagy



több makromolekulával kölcsönhatásba lép.

16. A 10. igénypont szerinti alkalmazás rákos megbetegedés kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmény előállítására.

17. (I), (II), (III), (IV) vagy (V) általános képletű vegyület, a képletben

R^5 jelentése $-NR^{18}R^{18}$ általános képletű csoport, ahol

R^{18} jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil- vagy fenilcsoport, és

R^{19} jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil-, 3-10 szénatomos cikloalkil- vagy fenilcsoport, amely alkil-, cikloalkil- vagy fenilcsoport adott esetben hidroxil-, 3-8 szénatomos cikloheteroalkil-csoporttal, $-CONR^{18}(CH_2)_pNR^{20}R^{21}$, $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-(CH_2)_n-NR^{20}R^{21}$ vagy $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-(CH_2)_n-NR^{20}R^{21}$ általános képletű csoporttal helyettesített, ahol

p értéke 0 és 5 közötti szám,

m értéke 0 és 5 közötti szám,

n értéke 0 és 5 közötti szám,

R^{22} jelentése hidroxil- vagy 1-6 szénatomos alkilcsoport, és

R^{20} és R^{21} jelentése egymástól függetlenül

(a) hidrogénatom, 1-12 szénatomos alkil-, 3-12 szénatomos cikloalkil-, 3-10 szénatomos heterocikloalkil-, 6-10 szénatomos aril-, 5-9 szénatomos heteroaril-, (1-6 szénatomos alkil)(6-12 szénatomos aril)-csoport, ahol az említett cso-

portok előnyösen egy vagy több hidroxilcsoporttal, halogénatommal, amino-, trifluormetil-, 1-6 szénatomos alkil-, 1-6 szénatomos alkoxi-, (1-6 szénatomos alkil)(3-10 szénatomos heterocikloalkil)- vagy (1-6 szénatomos alkil)(6-10 szénatomos aril)-csoporttal szubsztituálva vannak; vagy

(b) $-NR^{20}R^{21}$ együttes jelentése hidrogénatom, morfolin- vagy 4-(1-6 szénatomos alkil)piperazin-csoport;

R^6 jelentése

(a) 1-6 szénatomos alkil- vagy 2-8 szénatomos alkenilcsoport, amelyek mindegyike adott esetben egy vagy több fenilcsoporttal helyettesített, vagy

(b) halogénatommal helyettesített fenilcsoport vagy 1-6 szénatomos alkoxics csoport; és

R^7 és R^8 jelentése azonosan vagy különbözően hidrogénatom, nitro-, 1-6 szénatomos alkoxics csoport vagy halogénatom, mégpedig fluor-, klór- vagy brómatom; ahol a (II) általános képletben

R^9 jelentése 1-6 szénatomos alkil-, 3-10 szénatomos cikloalkil- vagy fenilcsoport, amely alkil-, cikloalkil- vagy fenilcsoport adott esetben hidroxil-, 3-8 szénatomos cikloheteroalkil-csoporttal, $-CON$ képletű csoporttal, $R^{18}(CH_2)_pNR^{20}R^{21}$, $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-(CH_2)_n-NR^{21}R^{21}$ vagy $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-(CH_2)_n-NR^{20}R^{10}$ általános képletű csoporttal helyettesített, ahol

p értéke 0 és 5 közötti szám,

m értéke 0 és 5 közötti szám,
n értéke 0 és 5 közötti szám,
 R^{22} jelentése hidroxil- vagy 1-6 szénatomos alkilcsoport,
és

R^{20} és R^{21} jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom,
1-12 szénatomos alkil-, 3-12 szénatomos cikloalkil-,
3-10 szénatomos heterocikloalkil-, 6-10 szénatomos
aril-, 5-9 szénatomos heteroaril-, (1-6 szénatomos
alkil)(6-12 szénatomos aril)-csoport, amely csoportok
adott esetben egy vagy több hidroxilcsoporttal, halo-
génatommal, amino-, trifluormetil-, 1-6 szénatomos
alkil-, 1-6 szénatomos alkoxi-, (1-6 szénatomos alkil)-
(3-10 szénatomos heterocikloalkil)-, (1-6 szénatomos
alkil)(5-9 szénatomos heteroaril)- vagy (1-6 szénato-
mos alkil)(6-10 szénatomos aril)-csoporttal helyette-
sítettek;

ahol a (III) általános képletben

R^{10} jelentése $-N-R^{18}R^{19}$ általános képletű csoport, ahol

R^{18} jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil- vagy
fenilcsoport, és

R^{19} jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil-, 3-10
szénatomos cikloalkil- vagy fenilcsoport, amely alkil-,
cikloalkil- vagy fenilcsoport adott esetben hidroxil-,
3-8 szénatomos cikloheteroalkil-csoporttal,
 $-CONR^{18}(CH_2)_pNR^{20}R^{21}$, $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-(CH_2)_n-$
 $NR^{20}R^{21}$ vagy $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-(CH_2)_n-NR^{20}R^{21}$ általá-
nos képletű csoporttal helyettesített, ahol

p értéke 0 és 5 közötti szám,



m értéke 0 és 5 közötti szám,

n értéke 0 és 5 közötti szám,

R^{22} jelentése hidroxil- vagy 1-6 szénatomos alkil-csoport, és

R^{20} és R^{21} jelentése egymástól függetlenül

(a) hidrogénatom, 1-12 szénatomos alkil-, 3-12 szénatomos cikloalkil-, 3-10 szénatomos heterocikloalkil-, 6-10 szénatomos aril-, 5-9 szénatomos heteroaril-, (1-6 szénatomos alkil)-(6-12 szénatomos aril)-csoport, ahol az említett csoportok előnyösen egy vagy több hidroxilcsoporttal, halogénatommal, amino-, trifluormetil-, 1-6 szénatomos alkil-, 1-6 szénatomos alkoxi-, (1-6 szénatomos alkil)-(3-10 szénatomos heterocikloalkil)- vagy (1-6 szénatomos alkil)-(6-10 szénatomos heteroaril)- vagy (1-6 szénatomos alkil)(6-10 szénatomos aril)-csoporttal helyettesítettek; vagy

(b) $-NR^{20}R^{21}$ együttes jelentése hidrogénatom, morfolino- vagy 4-(1-6 szénatomos alkil)-piperazin-csoport;

és

A és B jelentése azonosan vagy különbözően szén- vagy nitrogénatom, és

R^{11} és R^{12} jelentése azonosan vagy különbözően hidrogénatom, nitro-, 1-6 szénatomos alkoxicsoport vagy halogénatom, mégpedig fluor-, klór- vagy bróm-atom;



ahol a (IV) általános képletben

R^{13} jelentése $-N-R^{18}R^{19}$ általános képletű csoport, ahol

R^{18} jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil- vagy fenilcsoport, és

R^{19} jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil-, 3-10 szénatomos cikloalkil- vagy fenilcsoport, ahol az alkil-, cikloalkil- vagy fenilcsoport adott esetben hidroxil-, 3-8 szénatomos cikloheteroalkil-csoporttal, $-CONR^{18}(CH_2)_pNR^{20}R^{21}$, $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-$, $-(CH_2)_n-NR^{20}R^{21}$ vagy $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-(CH_2)_n-NR^{20}R^{21}$ általános képletű csoporttal helyettesített, ahol

p értéke 0 és 5 közötti szám,

m értéke 0 és 5 közötti szám,

n értéke 0 és 5 közötti szám,

R^{22} jelentése hidroxil- vagy 1-6 szénatomos alkilcsoport,

és

R^{20} és R^{21} jelentése egymástól függetlenül

(a) hidrogénatom, 1-12 szénatomos alkil-, 3-12 szénatomos cikloalkil-, 3-10 szénatomos heterocikloalkil-, (1-6 szénatomos alkil)-(5-9 szénatomos heteroaril)-, 5-9 szénatomos heteroaril-, 6-10 szénatomos aril- vagy (1-6 szénatomos alkil)-(6-10 szénatomos aril)-csoport, amely csoportok adott esetben egy vagy több hidroxilcsoporttal, halogénatommal, amino-, trifluormetil-, 1-6 szénatomos alkil-, 1-6 szénatomos alkoxi-, (1-6 szénatomos alkil)-(3-10 szénatomos heterocikloalkil)-, (1-6 szénatomos alkil)-(5-9 szénatomos



heteroaril)- vagy (1-6 szénatomos alkil)-(6-10 szénatomos aril)-csoporttal helyettesítettek; vagy

(b) $-NR^{20}R^{21}$ általános képletű csoport együttes jelentése hidrogénatom, morfolin- vagy 4-(1-6 szénatomos alkil)-piperazin-csoport;

A és B jelentése azonosan vagy különbözően szén- vagy nitrogénatom; és

R^{14} és R^{15} jelentése azonosan vagy különbözően hidrogénatom, nitro-, 1-6 szénatomos alkoxicsoport vagy halogénatom, mégpedig fluor-, klór- vagy brómatom, és ahol

az (V) általános képletben

A jelentése szén- vagy nitrogénatom;

R^{16} jelentése $-NR^{18}R^{19}$ általános képletű csoport, ahol

R^{18} jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil- vagy fenilcsoport, és

R^{19} jelentése hidrogénatom, 1-6 szénatomos alkil-, 3-10 szénatomos cikloalkil- vagy fenilcsoport, amely alkil-, cikloalkil- vagy fenilcsoport adott esetben hidroxil-, 3-8 szénatomos cikloheteroalkil-csoporttal, $-CONR^{18}(CH_2)_pNR^{20}R^{21}$, $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-(CH_2)_n-NR^{20}R^{21}$ vagy $-(CH_2)_p-(CHR^{22})_m-(CH_2)_n-NR^{20}R^{21}$ általános képletű csoporttal helyettesített, ahol

p értéke 0 és 5 közötti szám,

m értéke 0 és 5 közötti szám,

n értéke 0 és 5 közötti szám,

R^{22} jelentése hidroxil- vagy 1-6 szénatomos alkilcsoport;

R^{20} és R^{21} jelentése egymástól függetlenül

- (a) hidrogénatom, 1-12 szénatomos alkil-, 3-12 szénatomos cikloalkil-, 3-10 szénatomos heterocikloalkil-, 6-10 szénatomos aril-, 5-9 szénatomos heteroaril-, (1-6 szénatomos alkil)-(6-10 szénatomos aril)- vagy (1-6 szénatomos alkil)(5-9 szénatomos heteroaril)-csoport, ahol az említett csoportok adott esetben egy vagy több hidroxilcsoporttal, halogénatommal, amino-, trifluormetil-, 1-6 szénatomos alkil-, 1-6 szénatomos alkoxi-, (1-6 szénatomos alkil)-(3-10 szénatomos heterocikloalkil)- vagy (1-6 szénatomos alkil)-(6-9 szénatomos heteroaril)- vagy (1-6 szénatomos alkil)(6-10 szénatomos aril)-csoporttal helyettesített; vagy
- (b) $-NR^{20}R^{21}$ együttes jelentése hidrogénatom, morfolin- vagy 4-(1-6 szénatomos alkil)-piperazin-csoport;

és

R^{17} jelentése hidrogénatom, nitro-, 1-6 szénatomos alkoxics csoport vagy halogénatom, mégpedig fluor-, klór- vagy brómatom,

alkalmazása ilyen vegyületet tartalmazó, egy, a p53 családkhoz tartozó mutáns vad típusú aktivitásának elősegítésével rák kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmény előállítására.

18. A 17. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a fehérje p53, p63 vagy p73 fehérje.

19. A 17. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a fehérje

p53 fehérje.

20. A 17. igénypont szerinti alkalmazás a p53 humán fehérje DNS kötő doménjének 94-től 312-ig terjedő maradékaihoz kötődő szerves nem-peptid típusú vegyületet tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítására.

21. A 17. igénypont szerinti alkalmazás olyan szerves nem-peptid típusú vegyületet tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítására, amely által célba vett p53 családkhoz tartozó fehérje vad típusú.

22. A 17. igénypont szerinti alkalmazás olyan szerves nem-peptid típusú vegyületet tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítására, amely által célba vett p53 családkhoz tartozó fehérje egy allél variáns által kódolt mutáns.

23. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemelve, hogy** az alábbi szerves nem-peptid típusú vegyületek valamelyikét használjuk:

(44) képletű (1-benzil-piperidin-4-il)-(4-fenotiazin-10-il-propil)-amin

(45) képletű [2-(4-klór-fenil)-etil]-(3-fenotiazin-10-il-propil)-amin

(46) képletű (3-fenotiazin-10-il-propil)-tiokroman-4-il-amin

(47) képletű [1-metil-3-(2,6,6-trimetil-ciklohex-2-enil)-allil]-(3-fenotiazin-10-il-propil)-amin

(48) képletű (7-etoxi-1,2,3,4-tetrahidro-naftalen-2-il)-(3-fenotiazin-10-il-propil)-amin

(9) képletű N'-(9-fluor-benzo[c]akridin-7-il)-N,N-dimetilpropán-1,3-diamin

(50) képletű N'-akridin-9-il-N,N-dimetil-propán-1,3-diamin

(3) képletű 2-{4-[4-(benzo[g]kinolin-4-il-amino)-fenil]-piperazin-1-il}-etanol

(51) képletű N⁴-{2-[2-(4-bróm-fenil)-vinil]-7-klór-kinazolin-4-il}-N¹,N¹-diethyl-pentán-1,4-diamin

(52) képletű N-benzo[g]kinolin-5-il-N'-ciklohexil-propán-1,3-diamin

vagy

(53) képletű 2-[(2-hidroxi-etil)-(3-{2-[2-(4-metoxi-fenil)-vinil]-kinazolin-4-il-amino}-propil)-amino]-etanol.

24. A 17. igénypont szerinti alkalmazás szerves nem-peptid típusú vegyületeként a következők valamelyikét tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítására:

(44) képletű (1-benzil-piperidin-4-il)-(4-fenotiazin-10-il-propil)-amin

(45) képletű [2-(4-klór-fenil)-etil)-(3-fenotiazin-10-il-propil)-amin

(46) képletű (3-fenotiazin-10-il-propil)-tiokroman-4-il-amin

(47) képletű [1-metil-3-(2,6,6-trimetil-ciklohex-2-enil)-allil]-[3-fenotiazin-10-il-propil)-amin

(48) képletű (7-etoxi-1,2,3,4-tetrahidro-naftalen-2-il)-[3-fenotiazin-10-il-propil)-amin

(9) képletű N'-(9-fluor-benzo[c]akridin-7-il)-N,N-dimetil-propán-1,3-diamin

(50) képletű N'-akridin-9-il-N,N-dimetil-propán-1,3-diamin

(3) képletű 2-{4-[4-(benzo[g]kinolin-4-il-amino)-fenil]-piperazin-1-il}-etanol

(51) képletű N⁴-{2-[2-(4-bróm-fenil)-vinil]-7-klór-kinazolin-4-il}-N¹,N¹-dietil-pentán-1,4-diamin

(52) képletű N-benzo[g]kinolin-5-il-N'-ciklohexil-propán-1,3-diamin

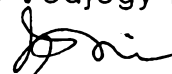
vagy

(53) képletű 2-[(2-hidroxi-etil)-(3-{2-[2-(4-metoxi-fenil)-vinil]-kinazolin-4-il-amino}-propil)-amino]-etanol.

A bejelentő helyett
a meghatalmazott

DANUBIA

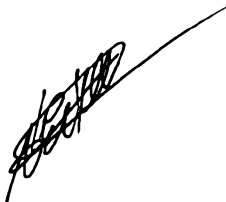
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

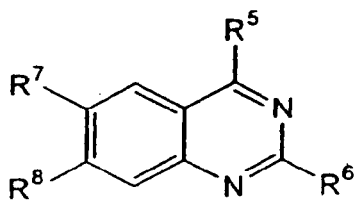


Dr. Fehérvári Flóra
szabadalmi ügyvivő

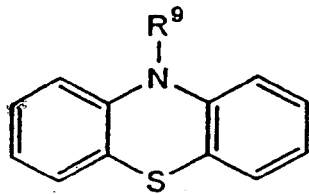
98
16

114 oldal

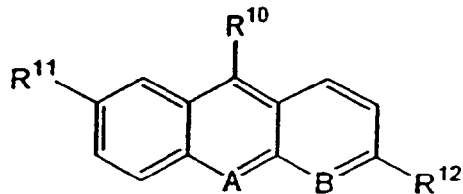




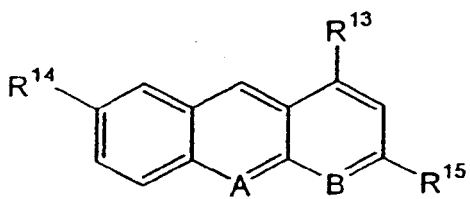
(I)



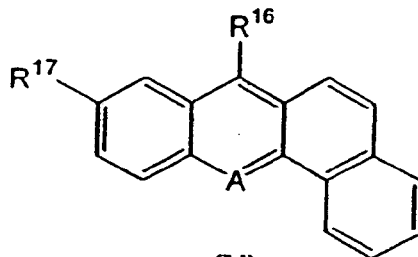
(II)



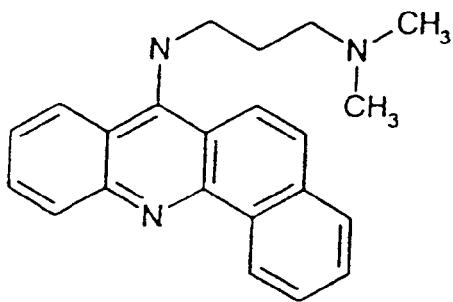
(III)



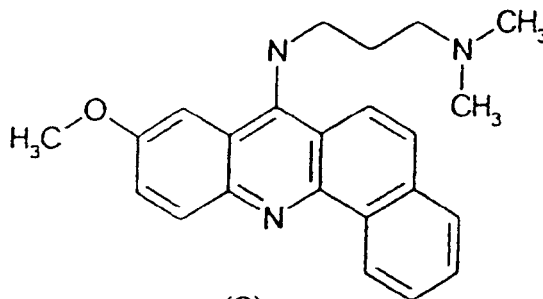
(IV)



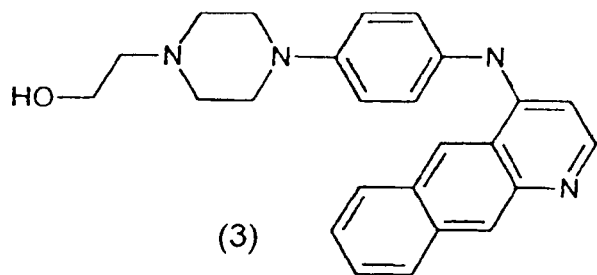
(V)



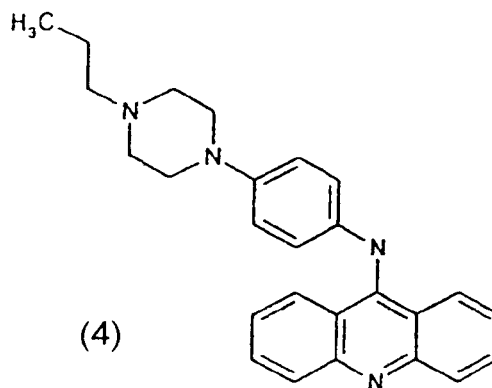
(1)



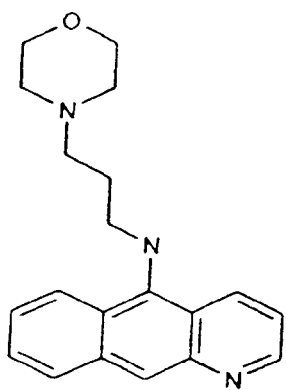
(2)



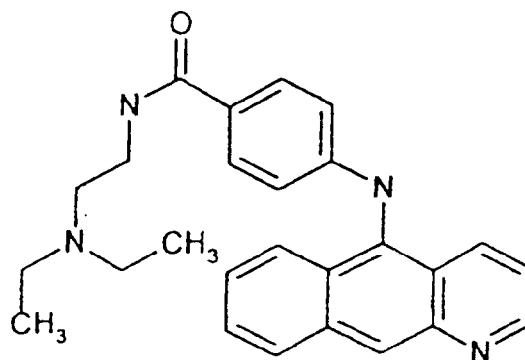
(3)



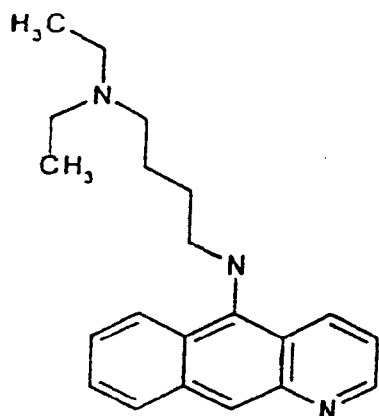
(4)



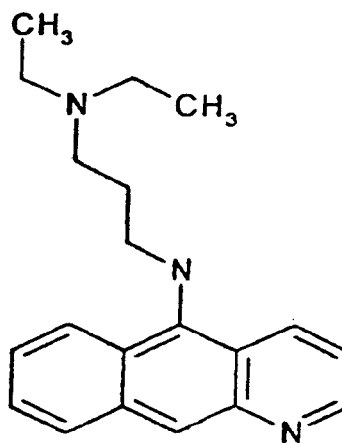
(5)



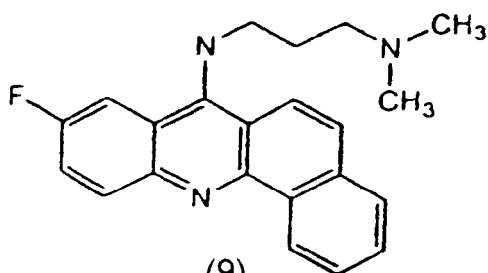
(6)



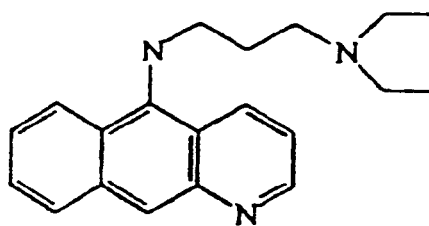
(7)



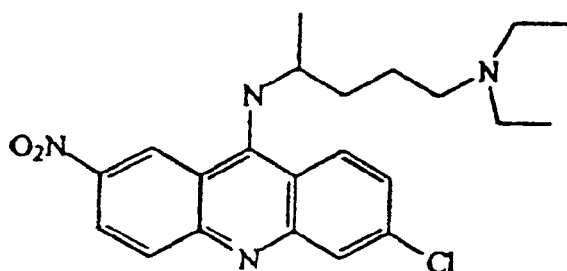
(8)



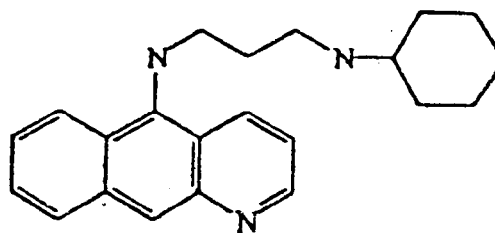
(9)



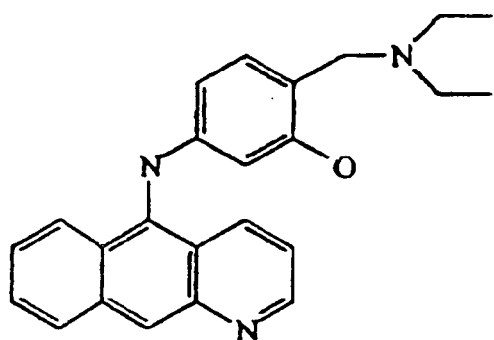
(10)



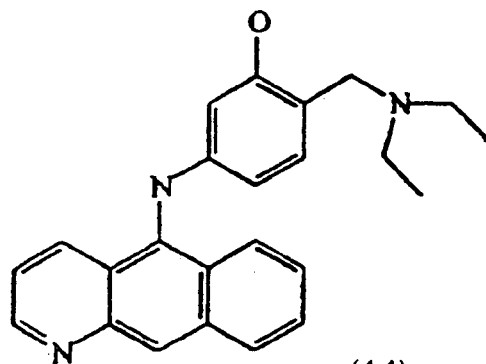
(11)



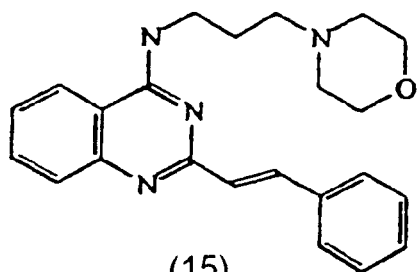
(12)



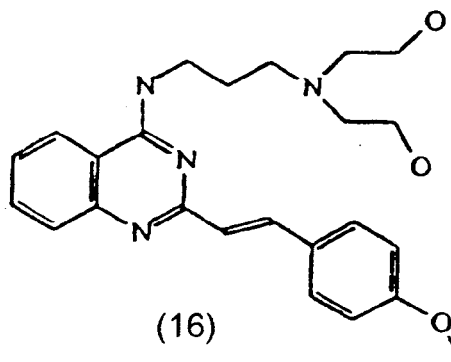
(13)



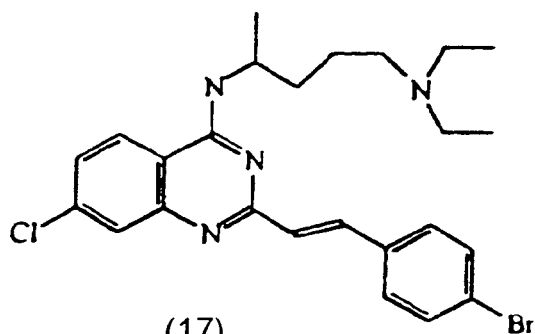
(14)



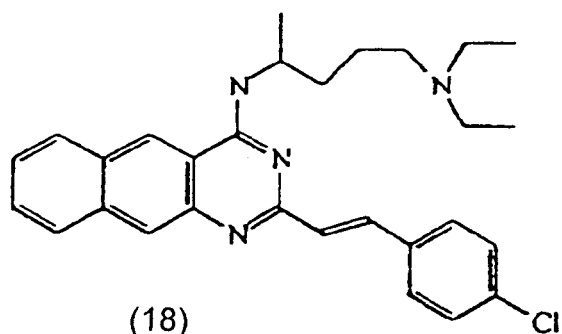
(15)



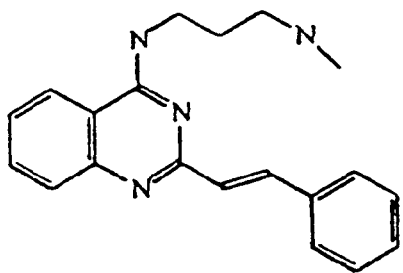
(16)



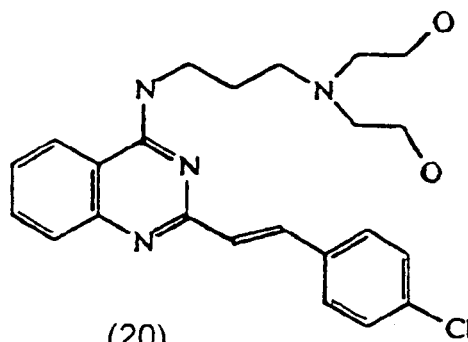
(17)



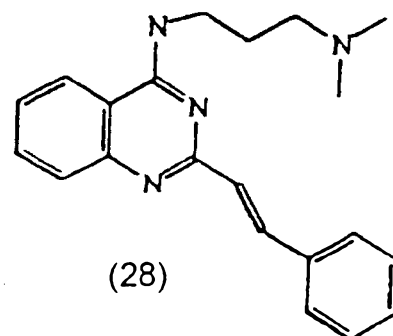
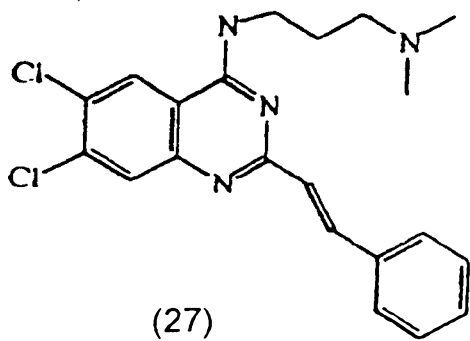
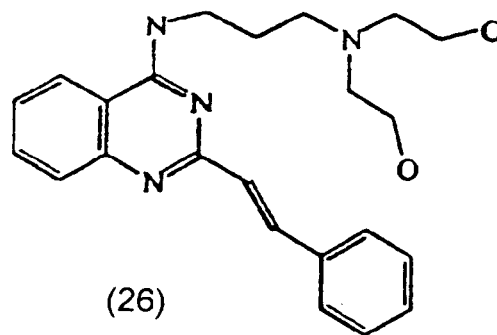
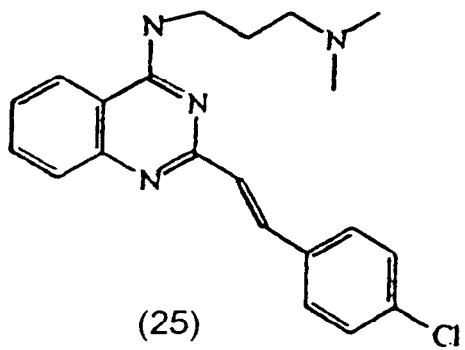
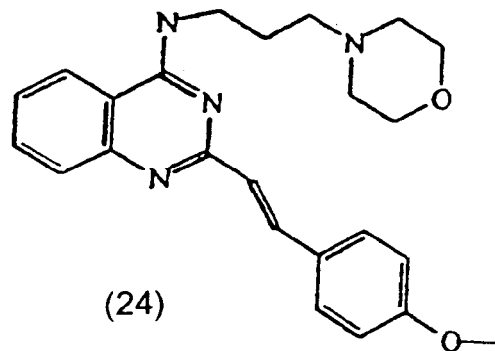
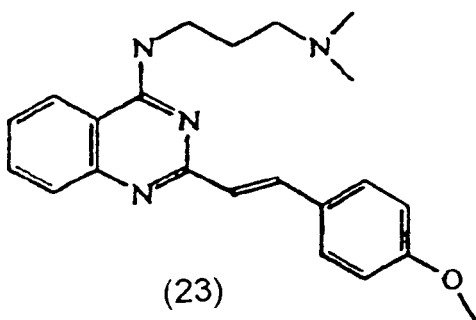
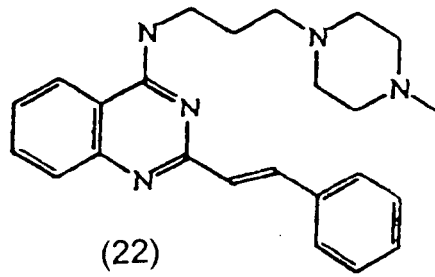
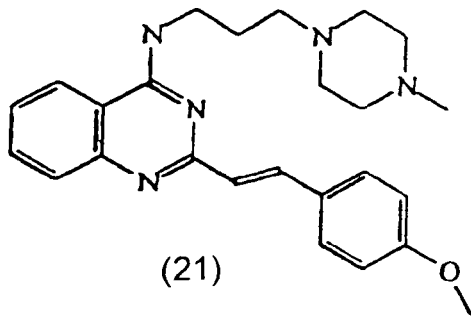
(18)

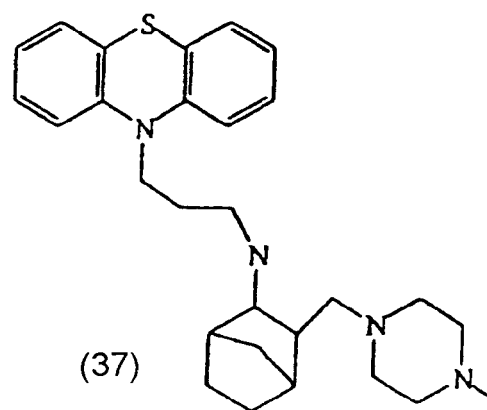
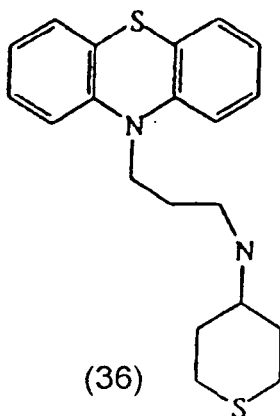
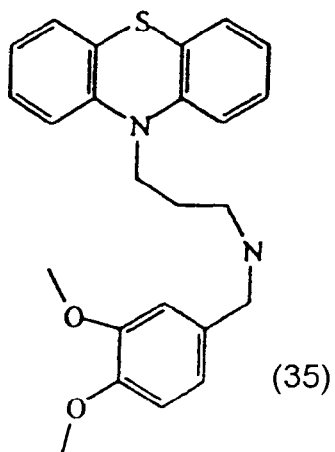
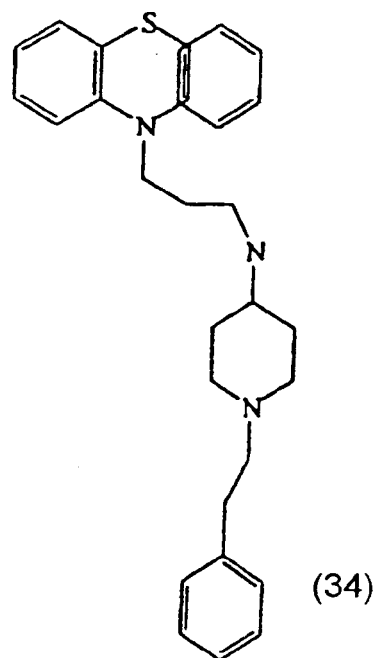
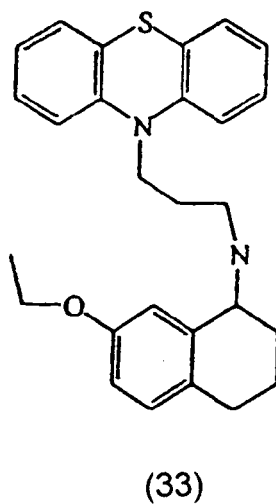
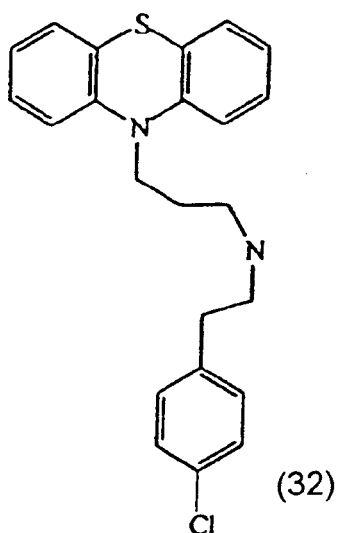
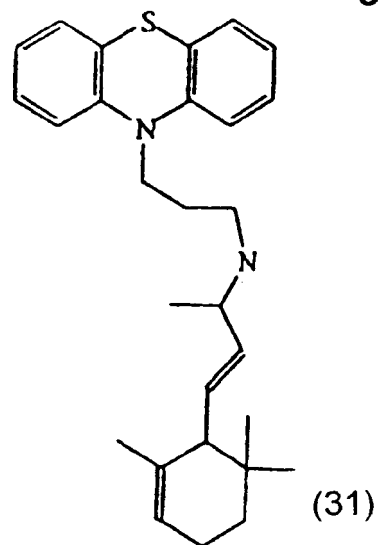
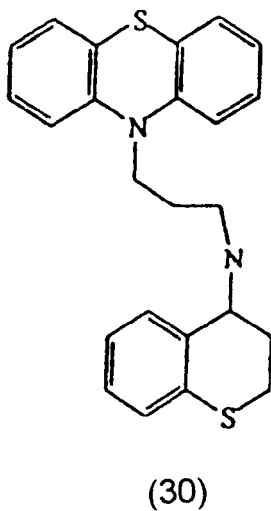
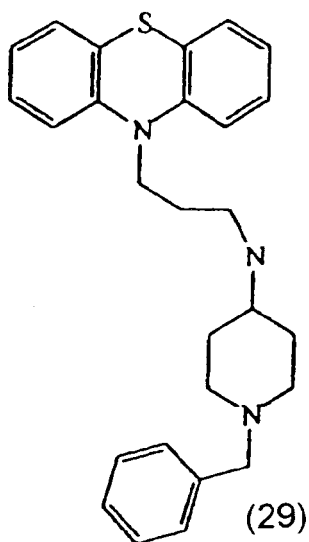


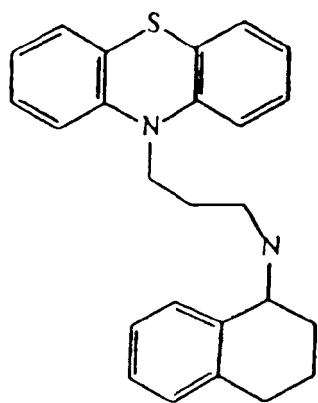
(19)



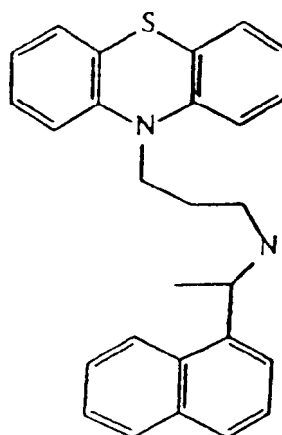
(20)



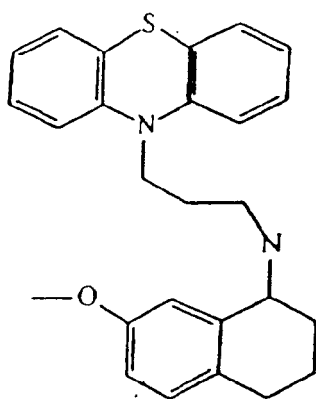




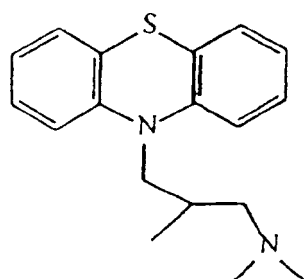
(38)



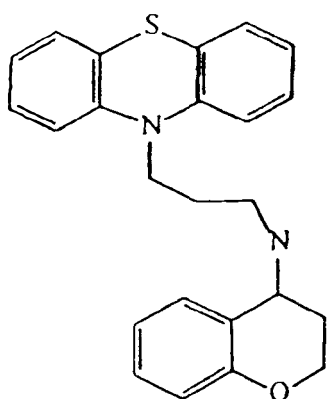
(39)



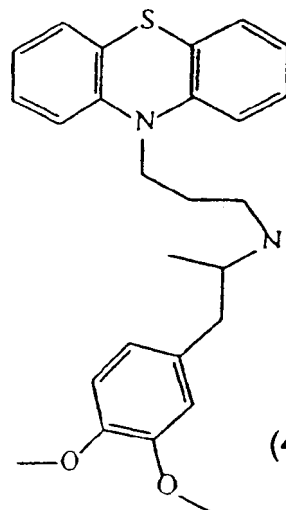
(40)



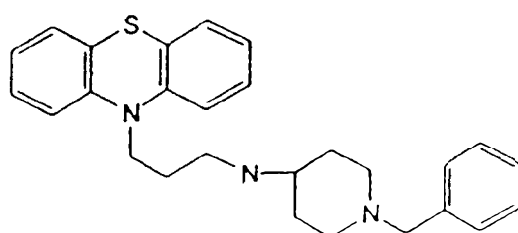
(41)



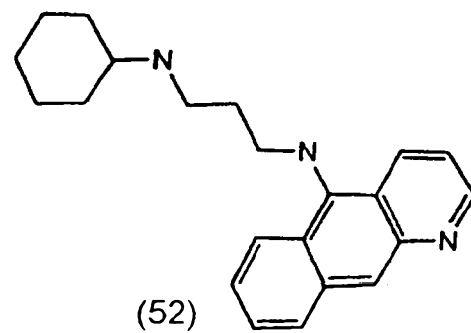
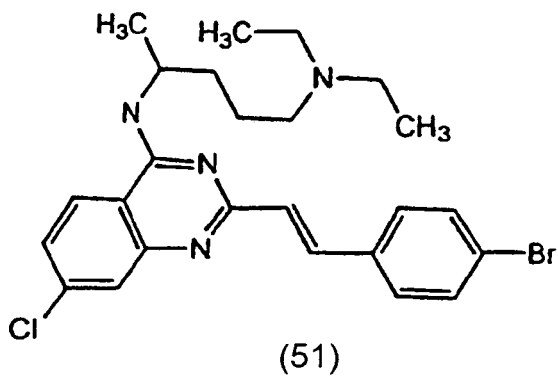
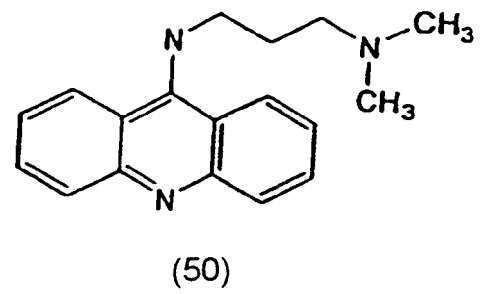
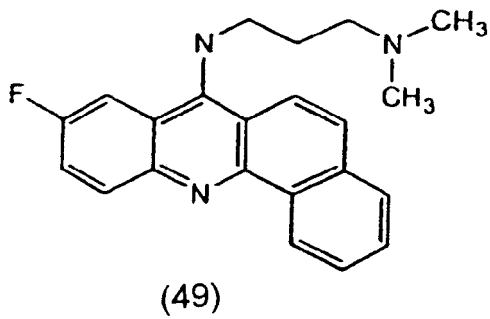
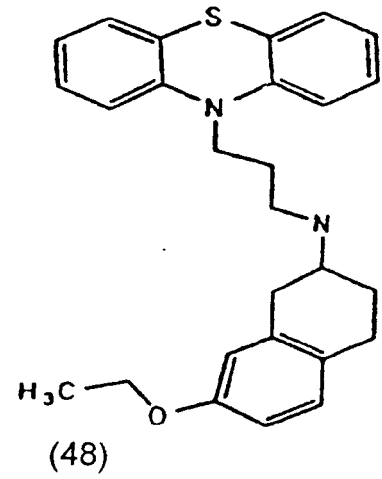
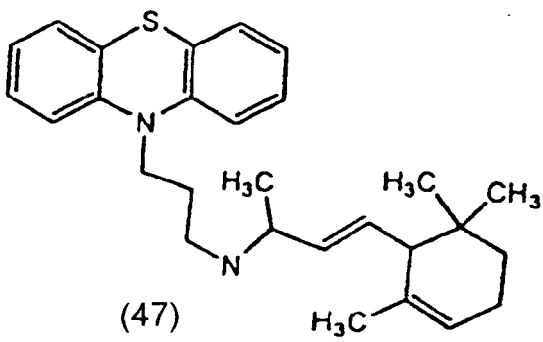
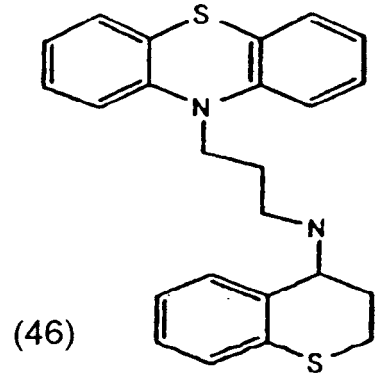
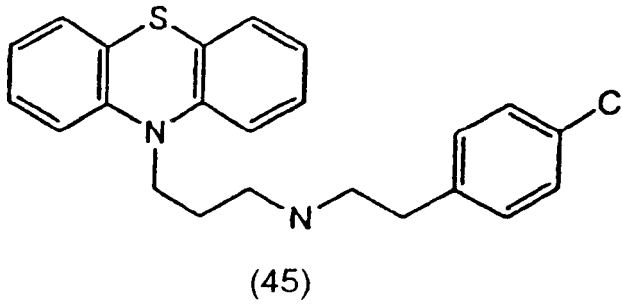
(42)

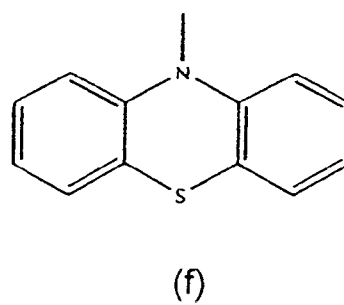
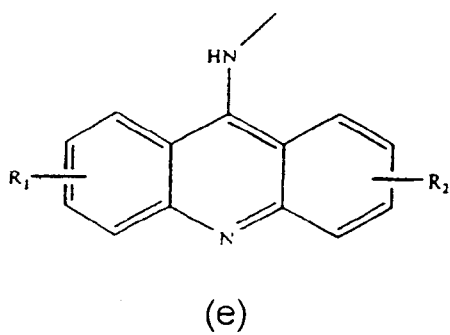
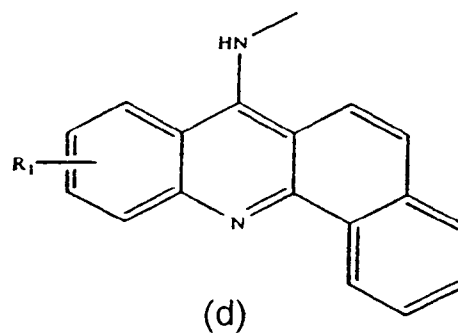
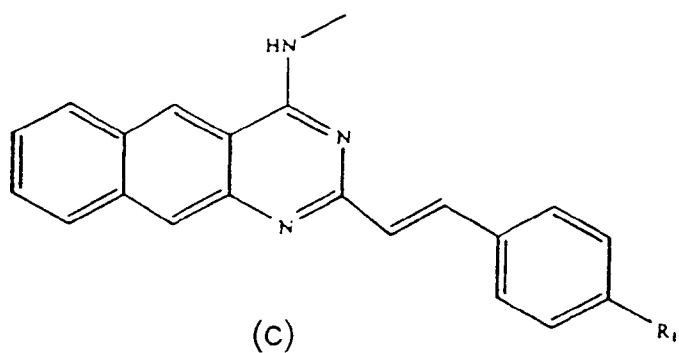
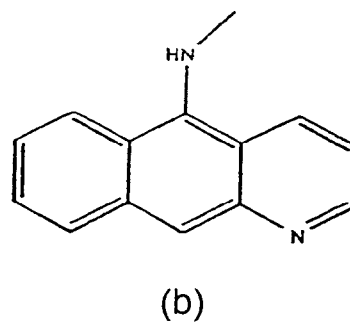
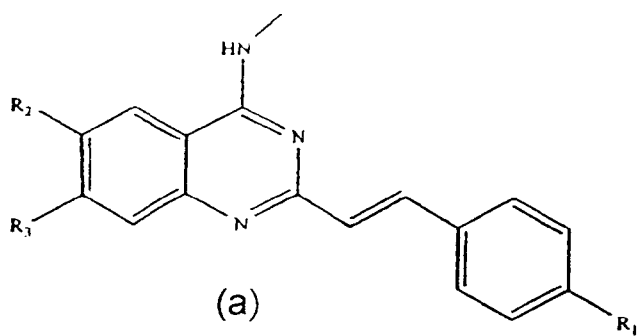
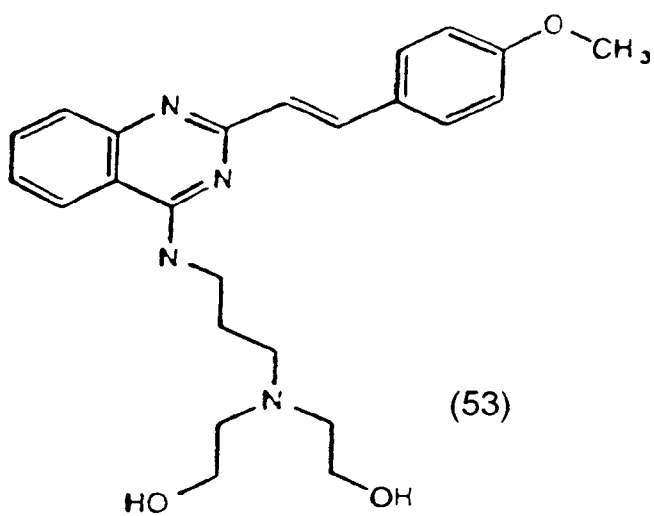


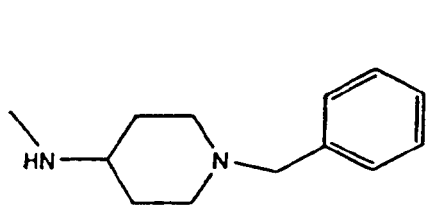
(43)



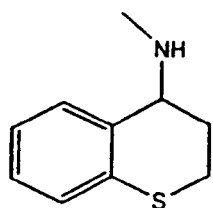
(44)



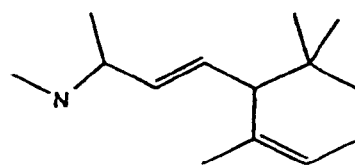




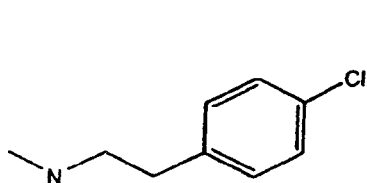
(g)



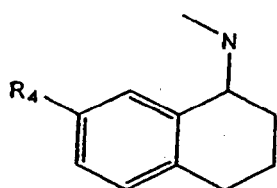
(h)



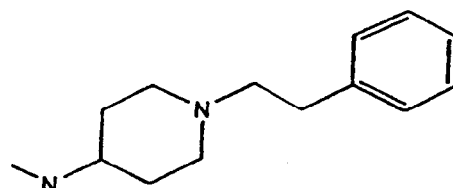
(i)



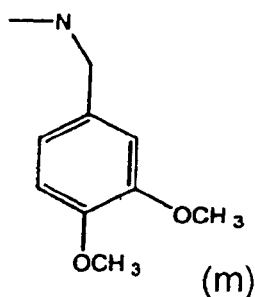
(j)



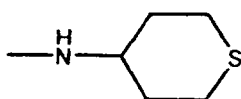
(k)



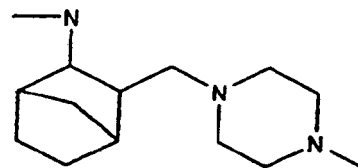
(l)



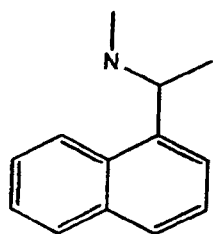
(m)



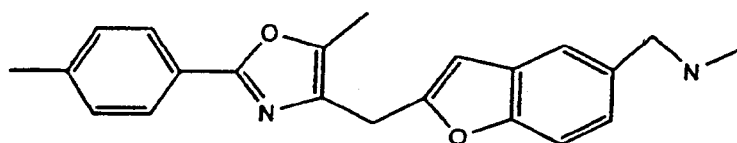
(n)



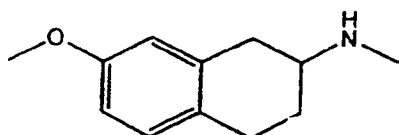
(o)



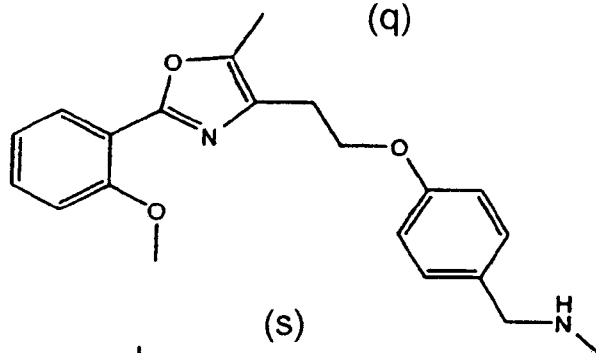
(p)



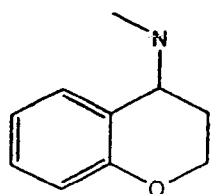
(q)



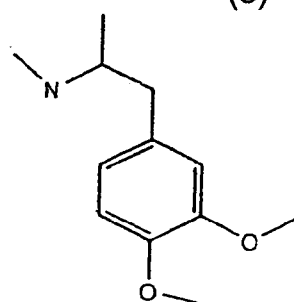
(r)



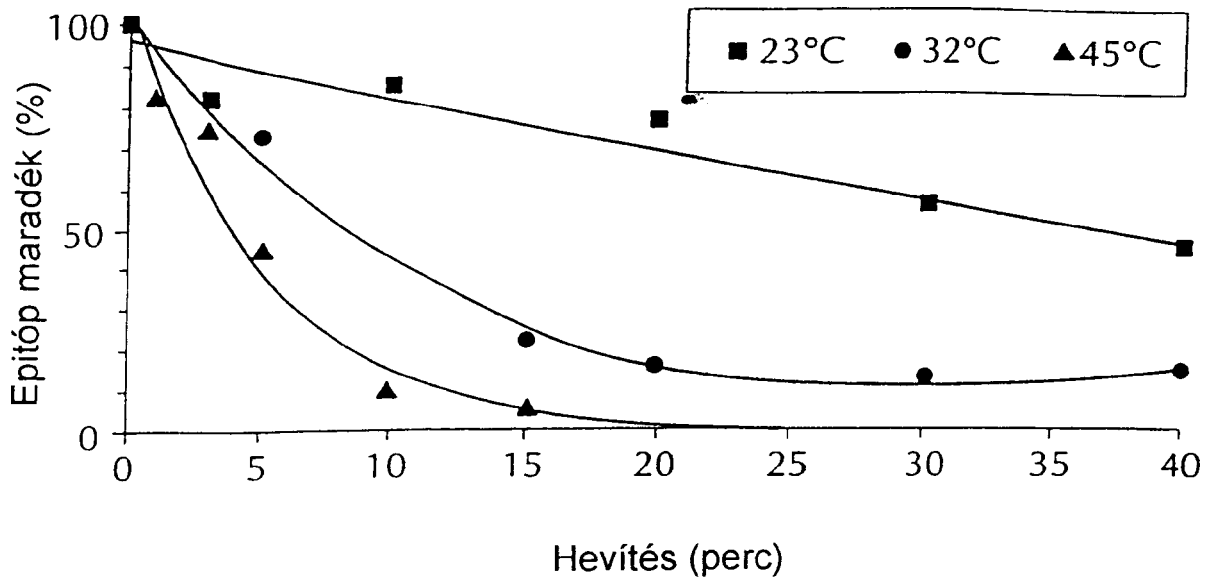
(s)



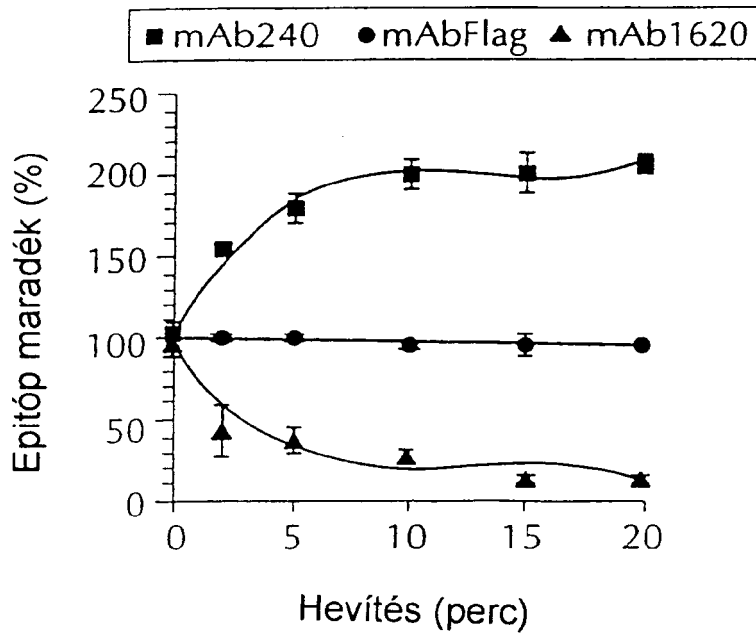
(t)



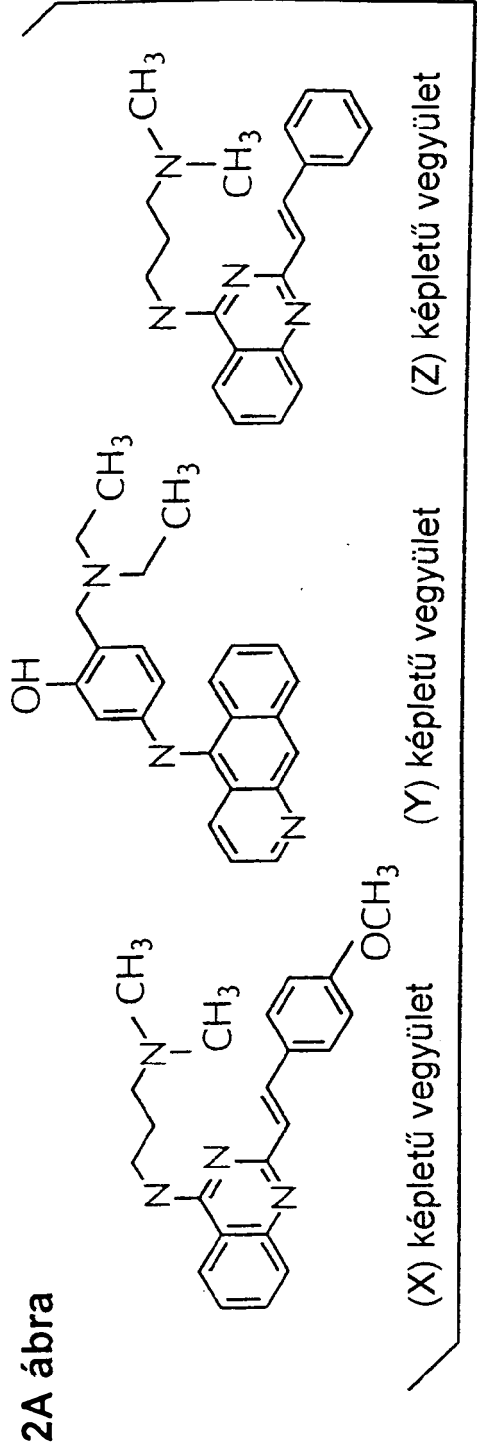
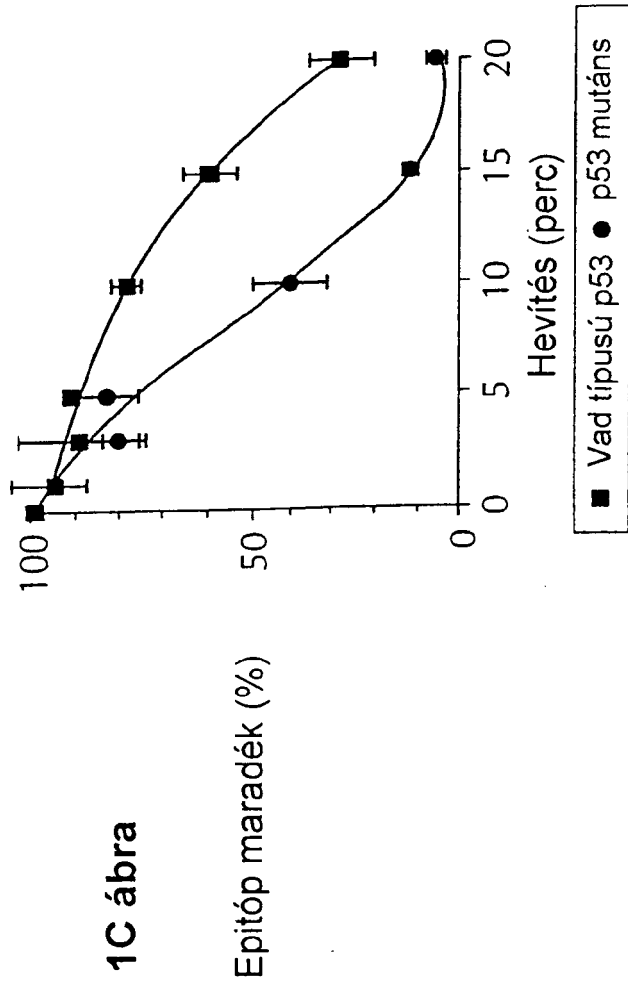
(u)

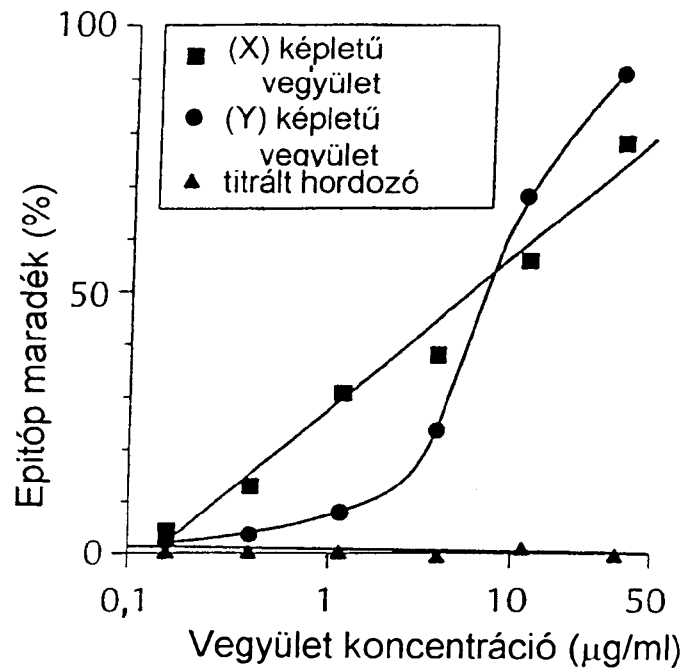


1A ábra

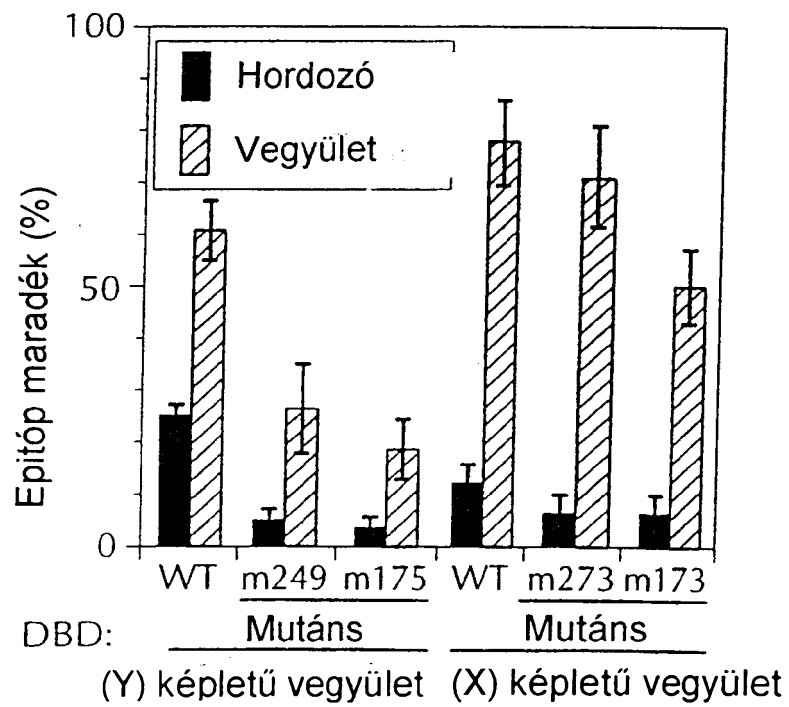


1B ábra



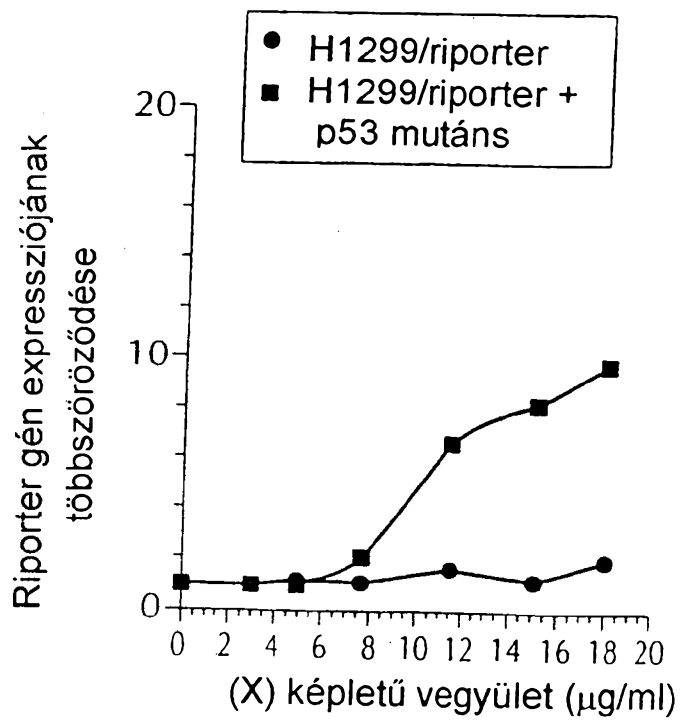
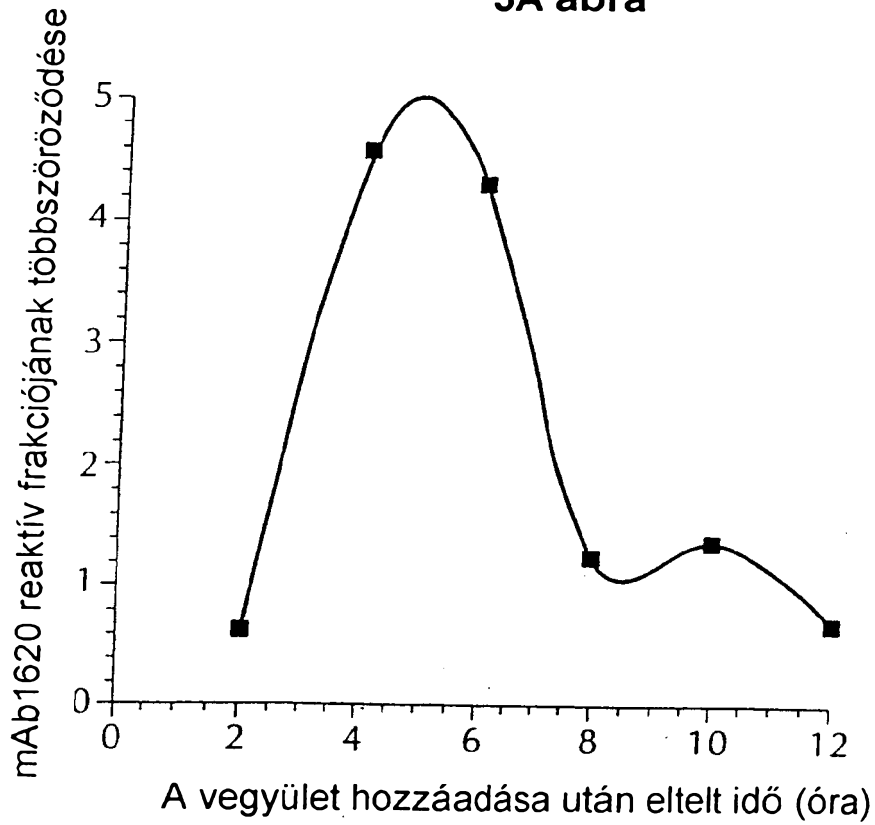


2B ábra

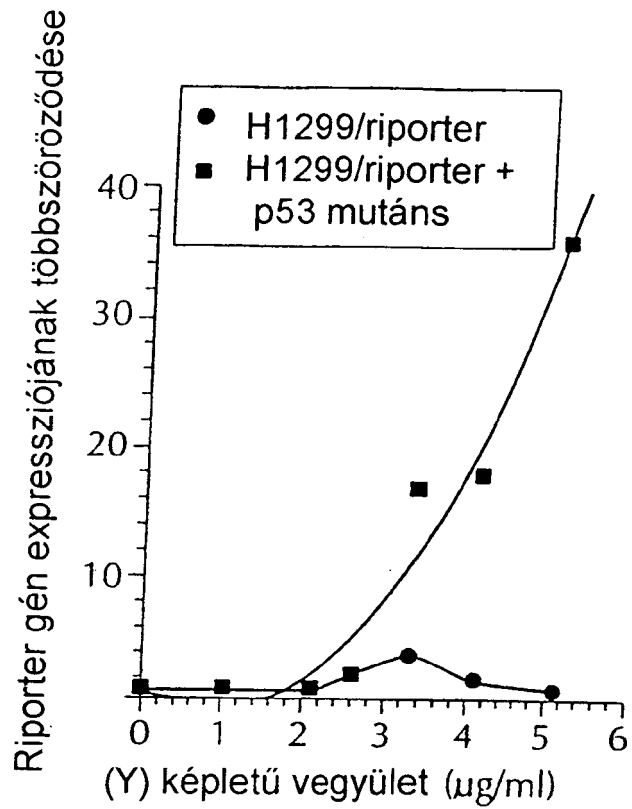


2C ábra

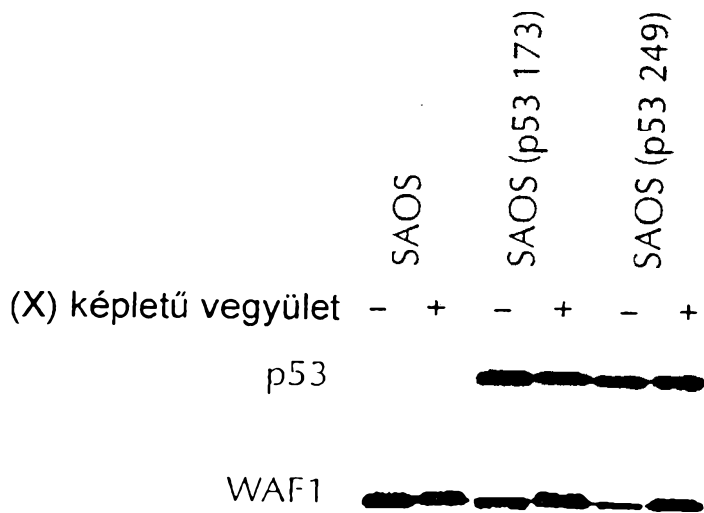
3A ábra



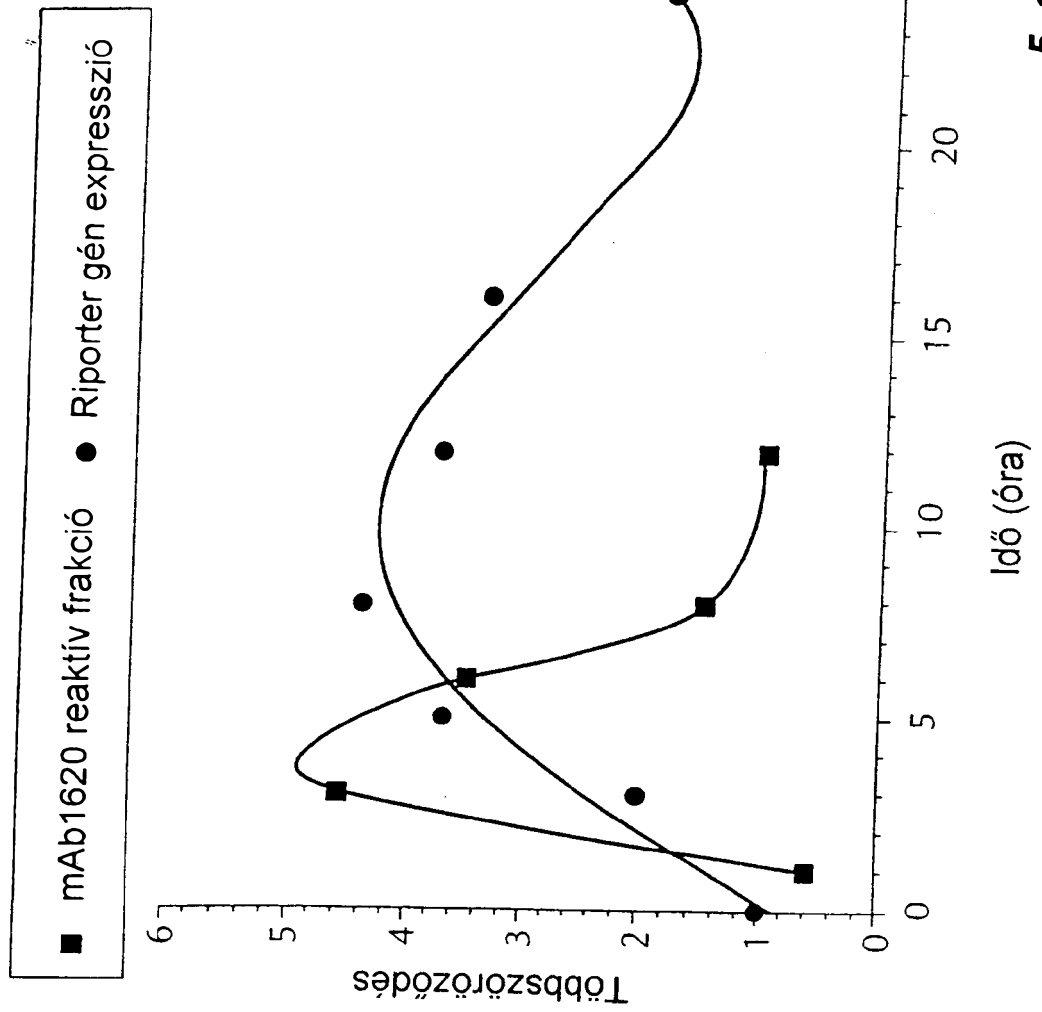
3B ábra



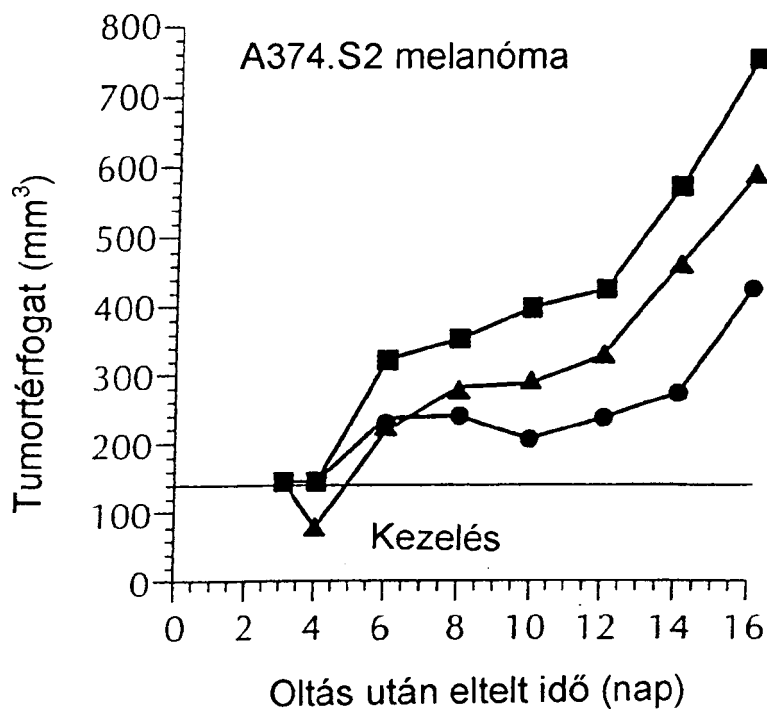
3C ábra



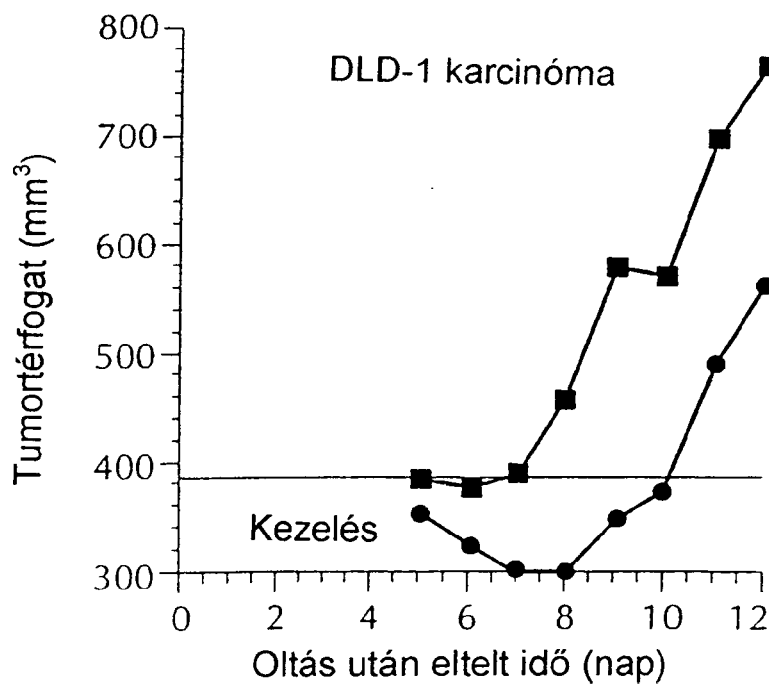
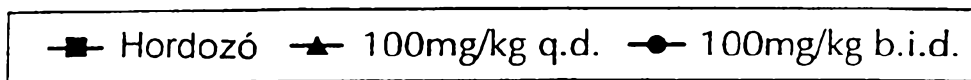
4. ábra



5. ábra



6A ábra



6B ábra

