***Druhý slide***: Krvné doštičky, trombocyty, platelety - u cicavcov predstavujú bezjadrové krvné telieska (nejde o pravé bunky) so schopnosťou priľnavosti (adhézie) a zhlukovania sa (agregácie), ktoré sa podieľajú na procesoch zástavy krvácania a zrážania krvi. V prípade vtákov a rýb ide o plnohodnotné bunky s veľkým jadrom.

Krvné doštičky sú stálou súčasťou krvi. V jednom mikrolitri (1 µl) krvi je ich okolo 200 – 400 tisíc. Pri poklese obsahu krvných doštičiek v krvi, pečeň produkuje hormón *trombopoetín*, ktorý stimuluje ich ďalšiu tvorbu – *trombopoézu*. Vzhľadom na to, že krvné doštičky nemajú jadro, nemôžu sa deliť samé. Vznikajú v kostnej dreni fragmentáciou cytoplazmy obrovských buniek *megakaryocytov*. Životnosť krvných doštičiek je 8 - 12 dní, potom zanikajú v slezine.

***Tretí slide:*** Funkcia doštičiek pri zrážaní krvi sa uskutočňuje v dvoch fázach: *primárna agregácia -* pri poranení cievy dochádza k obnaženiu kolagénu, ktorý je prítomný v medzibunkovej hmote cievneho tkaniva. Krvné doštičky sa na tento kolagén viažu a zároveň sú aktivované trombínom, ktorý vzniká pri zrážaní krvi, prípadne ADP, ktoré je uvoľňované ostatnými krvnými doštičkami. Aktivované trombocity viažu na seba fibrinogén, pričom menia svoj tvar, zhlukujú sa a vytvárajú doštičkovú zátku – *biely trombus*, *sekundárna agregácia* – doštičky sa rozpadajú, pričom uvoľňujú obsah svojich granúl. Týmto dochádza k spusteniu kaskády koagulačných procesov (resp. k uvoľneniu trombokinázy) na konci ktorej sa z fibrínogénu stáva nerozpustný fibrín, ktorý vytvorí sieť.  Táto sieť spevní masu rozpadnutých krvných doštičiek a na nich zachytených červených krviniek a následne vytvorí *červený trombus* - definitívnu krvnú zrazeninu.

***Štvrtý slide:*** *Trombóza* – predstavuje dej, pri ktorom dochádza ku zvýšenej koagulácii krvi a následne vzniku *trombu*. Trombóza v tepnách spôsobuje nedokrvenosť (ischémia) postihnutých oblastí, v žilách spôsobuje problémy s odtokom krvi, resp. spomaľuje jej prietok (venostáza). Trombóza môže byť spôsobená vplyvom viacerých faktorov: 1. poškodením intimy (tenká blana vystielajúca cievu) cievy (zápal, artérioskleróza...), 2. turbulentným prúdením, resp. spomalením prietoku krvi (nedoliehanie srdečných chlopní, dlhé sedenie, málo pohybu, dehydratácia, tehotenstvo...), 3. trombofilných stavov (narušenie rovnováhy pro/anti-koagulačných faktorov). Odtrhnutie trombov z cievnej steny môže viesť k embólií – porážka, infarkt, pľúcna embólia... Ako profylaxia slúži antikoagulačná liečba.

***Piaty slide:*** Liečivá ovplyvňujúce zrážanlivosť krvi sú dôležité z hľadiska liečby kardiovaskulárnych chorôb alebo výkonu určitých chirurgických zákrokov, pri ktorých hrozí zástava srdca alebo vytvorenie trombu. V súčasnosti používané liečivá ako napr. aspirin (inhibuje tromboxán), prípadne clopidogrel (Plavix) však so sebou nesú značné riziká vedľajších účinkov – dráždenia sliznice tráviaceho traktu alebo vnútorného krvácania. Vývoj nových a efektívnych antikoagulačných liečiv bez vedľajších účinkov preto v súčasnosti predstavuje zaujímavý medicínsky/farmaceutický cieľ.

Receptor Mer patrí do podrodiny tyrozín kinázových receptorov TAM (Tyro3, Axl, Mer) primárne aktivovaných endogénnym ligandom tzv. Gas6 (growth-arrest-specific-6). Zvyšujúca sa aktivita TK receptora Mer úzko súvisí s prebiehajúcim nádorovým rastom (onkogenézou). Tento jav bol pozorovaný v mnohých prípadoch rakovinových ochorení u ľudí. Aktuálny výskum však ukázal, že TK receptor Mer zohráva dôležitú úlohu pri regulácii aktivity makrofágogov a zhlukovania krvných doštičiek. Pokusy na myšiach ukázali, že inhibícia Mer receptora spôsobila výrazné zníženie zhlukovania krvných doštičiek, pričom však nedochádza ku nadmernému krvácaniu ani k narušeniu koagulačných parametrov.

Primárnym cieľom autorov článku (z ktorého vychádza moja prezentácia) bol vývoj a syntéza zlúčenín, ktoré by prispeli k liečbe rakoviny. Podarilo sa im objaviť niekoľko nízkomolekulových Mer inhibítorov, ktoré však vykazovali veľmi nízku Mer selektivitu v rámci TAM podrodiny, tiež sa vyznačovali nízkou rozpustnosťou a slabou farmakokinetikou (1) – nevhodné na in vivo testy. Počas procesu optimalizácie vlastností 1. generácie Mer inhibítorov obsahujúcich pyrazolopyrimidínový kruh sa podarilo objaviť novú skupinu látok obsahujúcich pyrimidínový kruh, s vysokou selektivitou k receptoru Mer, inhibujúcich schopnosť zhlukovania krvných doštičiek – prevencia trombózy.

Porovnanie komplexov:

1 – inhibítor **1** je silno viazaný v adenínovom vrecku Mer receptora, vytvára tri vodíkové väzby, dve s hinge oblasťou (pyrimidínový N – Met674, aminobutylová NH – Pro672), ďalšiu medzi metylcyklohexylamino NH2 skupinou a Arg727, pyrazolový kruh neinteraguje – rigidifikácia.

2 – Pyrazolový kruh bol nahradený pseudokruhom stabilizovaným intramolekulovou vodíkovou väzbou. Mimikuje aktívnu konformáciu inhibítora **1**, pričom zachováva všetky tri dôležité vodíkové väzby spomínané v predošlom prípade, nedošlo k modifikácii žiadneho z pôvodných substituentov, nový pseudokruh je väčší a menej rigídny ako pôvodný pyrazol, zlúčeniny, ktoré ho obsahujú vykazujú významné zmeny vo fyzikálnych a konformačných vlastnostiach a tým pádom sa vyznačujú aj zreteľne odlišným kinázovým profilom (v rámci TAM) a farmakokinetikou.

***Šiesty slide:*** feasibilita, SAR, DIEA – N,N-diizoprpyletylamín (silná báza, slabý nukleofil), HATU - (1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluoro phosphate) (činidlo využívané pri amidových couplingoch, generuje aktivovaný ester z kyseliny alebo esteru, vyžaduje prítomnosť Hunigovej bázy).

***Siedmy slide:*** Na otestovanie hypotézy s pseudokruhom boli na začiatku pripravené štyri rôzne zlúčeniny. Ich Mer inhibičná schopnosť bola testovaná s využitím mikrofluidnej kapilárovej elektroforézy (s čipom) (MCE).

Porovnanie **2** a **3** – vodíková väzba udržujúca tvar kruhu, **4** a **5** – to isté, vypichnúť aktivitu pre Mer v porovnaní s Tyro3 a Axl, OH, NH2 na **NHR2** – obe takmer rovnako aktívne, primárna NH2 skupina na **NHR2** – spôsobuje neželanú hERG (gén kódujúci syntézu proteínu, ktorý predstavuje α-podjednotku draslíkového iónového kanála) aktivitu.

***Ôsmy slide:*** SAR so zameraním na pozíciu **R1** (**R2** a **R3** nemenné), **7**, **9** amidová NH skupina môže byť maximálne monosubstituovaná (oslabenie interakcií s hinge oblasťou), **8** vysoko aktívna (cyklický derivát aktívnejší – zameranie na neho) – jej ďalšie modifikácie sa na aktivite príliš neprejavili **10**, **11**, nahradenie N z **8** O, C tiež nepriniesli výrazné zvýšenie aktivity **12**, **13**, nahradenie piperidínového kruhu z 8 benzénovým kruhom – akceptory znižujú aktivitu, donory zachovávajú, tolerancia objemných skupín na benzéne – R1 interaguje s rozpúšťadlom, inzercia metylénu medzi amidovú NH a kruh – malé zmeny v aktivite, v prípade naviazania veľkej skupiny na benzénový kruh vzrástla aktivita, ale hlavne selektivita voči Mer (oproti ostatným TAM) **22**, **23** !!! – pri porovnaní s **2**.

***Deviaty slide:*** SAR so zameraním na pozíciu **R2** (**R1** a **R3** nemenné, butylamino a morfolinosulfonylfenyl), porovnávame s **20**, **24** má podobnú aktivitu ako **20**, odstránenie NH2 skupiny dramaticky zníži aktivitu – dôjde k odstráneniu dôležitej vodíkovej väzby s Arg727, u sekundárnych amínov dôjde k zvýšeniu aktivity ale nie k jej úplnému obnoveniu, porovnanie S,R-pyrolidínamino skupín, **31** (4-N pyridín) a **32** (pyranylamino) sú menej aktívne ako 28 (piperidinylamino), **33** najmenej – netvorí pseudokruh.

***Desiaty slide:*** SAR so zameraním na pozíciu **R3** (**R1** a **R2** nemenné, trans hydroxycyklohexylamino a morfolinosulfonylfenyl), v prípade, že NH skupina na pozícii **R3** zostane nesubstituovaná, dochádza k enormnému zníženiu aktivity **34**, aktivita potom stúpa s rastúcim substituovaným reťazcom po 4 uhlíky **20**, potom začne aktivita opäť klesať **38**, na ďalších prípadoch je možno vidieť, že cyklopropyl je na konci reťazca tolerovaný **39**, no polárne skupiny nie **40**, **41**, vetvený alkyl **36** vs **42**, cyklohexyl, tetrahydropyranyl, fluorobenzyl postupne znižujú aktivitu, kompletne substituovaná aminoskupina kompletne zhasí inhibičnú aktivitu **46**, **47** – eliminovaná vodíková väzba s Pro672.

***Jedenásty slide:*** Charakterizácia väzbových interakcií nasyntetizovaných inhibítorov bola uskutočnená na základe röntgenovej analýzy krištáľov Mer v komplexe s **22** a **7**. Na slide možno vidieť akým spôsobom je pyrimidínový skelet uložený v adenínovom vrecku, pričom mimikuje interakcie (prirodzeného adenínu) s „hinge backbone“ (Pro672, Met674). Na rozdiel od komplexu Mer-**1**, hydroxylová skupina v pozícií R2 vytvára vodíkovú väzbu s Asp741 namiesto Arg727. Čo je ale najdôležitejšie, **gate-forming** zvyšok Ile260 nie je konzervovaný u všetkých členov TAM podrodiny...vyskytuje sa len v prípade Mer (Axl – metionín, Tyro3 - alanín). Táto skutočnosť je s najväčšou pravdepodobnosťou dôvodom vysokej selektivity v rámci TAM.

Ako ste si určite všimli, napriek tomu, že zlúčeniny 22 a 7 obe obsahujú identický základný skelet, hodnoty IC50 voči Mer sú diametrálne odlišné. Dôvody: amidový metyl v prípade 7 zabraňuje tvorbe vodíkovej väzby s Met674, zároveň zabraňuje aminopyridínovej skupine v správnej interakcií s Pro672 a Met674 (porušuje najvýhodnejšiu orientáciu molekuly v aktívnom mieste), R1 substituent interaguje predovšetkým s rozpúšťadlom, preto môže byť využitý na dodatočnú úpravu rozpustnosti alebo iných fyzikálnych či farmakokinetických vlastností zlúčeniny.

***Dvanásty slide:*** Na základe rozpustnosti, aktivity voči Mer receptoru a internej TAM selektivity bol ako „lead compound“ zvolený inhibítor **23**. Následne bol testovaný *in vivo* na myšiach a to orálnym aj intravenóznym podaním. Výsledky testov sú v tabuľke.

Cl\_obs: systemic clearance ako rýchlo telo zo seba vylúči nechcené zlúčeniny

%F: oral bioavailability

T1/2: terminal halflife

Tieto farmakokinetické vlastnosti sú dobré, ale zatiaľ nie ideálne. Budú sa ešte vylepšovať.

***Trinásty slide:*** Inhibičná aktivita zlúčeniny 23 bola testovaná na 30 ďalších kinázach (100 násobok dávky Mer IC50). Tento experiment poskytol všeobecný prehľad aktivity látky 23 predovšetkým voči tyrozín kinázam, no zahŕňal aj serínové alebo treonínové kinázy. Šesť tyrozín kináz bolo inhibovaných na viac ako 50 % v prítomnosti 430 nM 23, žiadna zo serínových alebo treonínových kináz nebola ovplyvnená.