# Optimalizácia vlastností vysoko selektívnych Sky inhibítorov na báze 2,4-diaminopyrimidín-5-karbamidov

## Slide 1

Tyrozínkinázový receptor Sky (známy tiež pod označením TYRO3) patrí do tzv. TAM (TYRO3, Axl, Mer) podskupiny tyrozínkinázových receptorov, typicky interagujúcich s endogénnym ligandom Gas6 (growth arrest specific gene 6). Signalizácia prostredníctvom receptora Sky zohráva dôležitú úlohu v procesoch amplifikácie odozvy krvných doštičiek, zvyšovania intenzity ich agregácie (*primárna agregácia*) a sekrécie granúl (*sekundárna agregácia*).

## Slide 2

Je známe (autori sa odvolávajú na svoje predošlé články), že boli pripravené špecifické protilátky interagujúce so Sky receptorom, ktoré sú schopné inhibovať degranuláciu a agregáciu ľudských krvných doštičiek v rovnakej miere ako v prípade inhibície Gas6 ligandu. Efektivita pôsobenia týchto protilátok je tiež porovnateľná s účinkami clopidogrelu liečbe trombózy u myší, pričom nedochádza k významným zmenám v čase krvácania (bleeding time) (medicínsky test na overenie funkcie krvných doštičiek – krvácanie iniciované vpichom do prsta a následné meranie času jeho trvania). Využitie Sky inhibítorov preto predstavuje zaujímavý spôsob liečenia arteriálnej trombózy so zníženým nebezpečenstvom nadmerného krvácania.

## Slide 3

Počiatočné SAR-štúdie, ktoré boli uskutočnené na sérii 2,4-diaminopyrimidín-5-karbamidových derivátov ukázali, že vysoká kinázová aktivita sa dosahuje predovšetkým správnym umiestnením benzylamínového substituenta v polohe 2 na pyrimidínovom jadre do **Ala571 „podvrecka“** aktívneho miesta kinázy. Tieto štúdie však ukázali aj to, že testované zlúčeniny vykazovali vysokú rýchlosť metabolizácie a nízku orálnu biodostupnosť vďaka tzv. efektu prvotného priechodu (first pass metabolism) (ide o jav typický pre metabolizmus liečiv, pri ktorom dochádza k zníženiu koncentrácie liečiva ešte pred jeho vstúpením do systémového obehu, tento jav je spojený s procesmi vstrebávania látky v pečeni a v črevnej stene).

## Slide 4

Ďalšie SAR-štúdie boli uskutočnené s cieľom zvýšenia metabolickej stability spomínaných zlúčenín na báze 2,4-diaminopyrimidín-5-karbamidu. **Amidové analógy (4 - 12)** boli pripravené nasledujúcim spôsobom (Scheme 1). **Analógy** obsahujúce 3,5-dichlóranilínový substituent **(15 - 19)** boli pripravené takýmto spôsobom (Scheme 2).

## Slide 5

Pôvodné analógy **4** a **5** vykazovali vysokú rýchlosť **HLM** (Human Liver Microsomes – *in vitro* drug metabolism studies) a **RLM** (Rat Liver Microsomes – *in vitro* drug metabolism studies) metabolizmu. Na základe vizuálneho zhodnotenia sa predpokladalo, že citlivým miestom metabolizácie bude **elektrónovo bohatý benzylový kruh** analógu **4**. Nahradenie donornej MeO- skupiny akceptornou Cl- skupinou (analóg **5**) neprinieslo želaný efekt – problém bude niekde inde.

Identifikácia metabolitov pomocou LC-MS-MS (po inkubácii v ľudských mikrozómoch) ukázala, že primárnym metabolitom bol **produkt oxidatívnej hydroxylácie α-karbonylového uklíka v butyrolaktámovom kruhu**. Nahradenie tohto uhlíka kyslíkom v analógu **6** prinieslo síce výrazné zvýšenie aktivity inhibície Sky receptora, ale žiadne zlepšenie HLM/RLM stability.

Ďalší predpoklad bol taký, že po zablokovaní pôvodného primárneho miesta metabolizácie sa stali dominantnými alternatívne metabolizačné miesta. Vzhľadom na to, že butyrolaktámový kruh, po naviazaní inhibítora do aktívneho miesta, trčí do rozpúšťadla, v analýze mikrozomálnej stability sa pokračovalo jeho nehradením inou polárnou solubilizačnou skupinou. Aby boli udržané hodnoty **cLogP čo najnižšie** (koeficient oktanol/voda, vysoké hodnoty = vysoká lipofilita = nízka absorbcia a permeabilita), ďalšie SAR-štúdie na amidovom reťazci boli uskutočnené na analógoch obsahujúcich 2-metoxybenzylovú skupinu na 2. pozícii pyrimidínového kruhu.

Butyrolaktámový kruh bol ďalej nahradený **hydroxylovou skupinou** v analógu **7**. Táto zmena priniesla zvýšenie Sky inhibičnej aktivity, avšak nijako neovplyvnila HLM stabilitu látky a navyše spôsobila zníženie rozpustnosti (vo vode) a bunkovej permeability. Podobný efekt malo zavedenie **acetamidovej skupiny** v analógu **8**.

Dramatické zvýšenie HLM stability prinieslo zavedenie skupiny obsahujúcej **kyslý tetrazol** (analóg **9**). Okrem toho došlo aj k miernemu zvýšeniu RLM stability, rozpustnosti vo vode a permeability. Bohužiaľ, došlo aj k asi trojnásobnému zníženiu Sky inhibičnej aktivity a k značnému zvýšeniu intenzity viazania **dofetilidu** (liečivo využívané na udržanie správneho srdcového rytmu, prevencia pred arytmiami - fibriláciou a flutterom, blokácia určitého draslíkového kanálu). **Obrázok dofetilidu.**

Zvýšenie HLM stability možno dosiahnuť aj zavedeným **bázických amínových skupín** do amidového reťazca. Analóg obsahujúci N,N-dimetyl-4-aminobutylový reťazec **10** vykazoval zhodnú Sky inhibičnú aktivitu, 2,9-násobné zvýšenie HLM aktivity a výbornú rozpustnosť vo vode. Analóg **11** obsahujúci 1-metylpyperidín-4-yl amínovú skupinu tiež vykazoval zhodnú Sky aktivitu, dobrú rozpustnosť vo vode, dvojnásobné zvýšenie HLM stability a zvýšenie RLM stability.

Ako už bolo pozorované, nahradenie 2-metoxybenzylovej skupiny 2,5-dichlórbenzylovou skupinou v analógu **12** spôsobilo zníženie HLM stability, rozpustnosti aj permeability. Tento jav bol pozorovaný pravdepodobne v dôsledku zvýšenej lipofility 2,5-dichlórbenzylovou skupiny. Napriek všetkému, analóg **12** vykázal **doteraz najlepšiu RLM stabilitu**.

## Slide 6

Zvýšenie RLM stability zlúčenín **11** a **12** sa prejavilo na 41 % a 32 % orálnej biodostupnosti u potkanov **(Table 2)**, čo predstavuje značné zlepšenie oproti pôvodným analógom. Zlúčeniny **11** a **12** navyše vykazujú aj výrazné zvýšenie funkčnej aktivity pri P-selektínových testoch (P-selektínové testy detekujú expresiu P-selektínu na povrchu krvných doštičiek – biomarker pre ich aktiváciu) a tiež pri testoch zameraných na intenzitu agregácie krvných doštičiek.

## Slide 7

Vzhľadom na fakt, že sa zvýšenie RLM stability priamo odzrkadlilo na zvýšení orálnej biodostupnosti, autori článku sa potom zamerali na zlepšenie HLM stability, od ktorej očakávali, že sa prejaví na **„druggability“** (viazanie liečiva na je biologický cieľ s terapeutickým benefitom pre pacienta). Vzhľadom na to, že pokusy o zvýšenie HLM stability prostredníctvom blokovania metabolizácie amidového vedľajšieho reťazca boli sprevádzané zvyšovaním lipofility zlúčenín, autori článku sa rozhodli tento jav eliminovať **zavádzaním polárnych substituentov na 4-amino skupinu**, ktorá sa viaže v oblasti **viazania ribózy v ATP-väzbovom mieste** (aktívnom mieste) (**Table 3**).

Bolo zistené, že zavedením **bázického amínu do 4-aminokruhu** dochádza k zvýšeniu Sky inhibičnej aktivity (zlúčeniny **13** a **14**) a tiež k zvýšeniu HLM stability. Prítomnosť bázického amínu s tiež prejaví na zvýšení rozpustnosti vo vode, ale spôsobí aj drastické zníženie bunkovej permeability. Analóg **13** navyše nevykazuje žiadnu orálnu biodostupnosť u potkanov, pravdepodobne kvôli nízkej absorpčnej schopnosti cez črevnú stenu. Autori článku sa preto okrem ďalšieho zvyšovania metabolickej stability zamerali aj na **zvyšovanie bunkovej permeability**.

Po ďalších testoch autori zistili, že **benzylový metylén aminoreťazca** v polohe 2 predstavuje potenciálne **miesto metabolizácie**. Nahradením 2-aminobenzylovej skupiny 2-anilínovou skupinou, konkrétne 3,5-dichlóranilínovou (analóg **15**) skupinou dochádza k výraznému zvýšeniu Sky inhibičnej aktivity a HLM/RLM stability. Zároveň však, zavedenie spomínanej skupiny neprinieslo výrazné zlepšenie bunkovej permeability.

Ďalším krokom bolo nahradenie bázickej aminoskupiny **neutrálnou polárnou skupinou** – 4-aminotetrahydropyranylom (analóg **16**). Výsledkom bola takmer rovnaká Sky inhibičná aktivita, priemerná HLM stabilita a stále slabá bunková permeabilita.

Zavedenie reťazca obsahujúceho **cyklický amid** (analóg **17**) zapríčinilo dobrú Sky inhibičnú aktivitu a dobrú HLM stabilitu, ale opäť nepohlo zlepšiť bunkovú permeabilitu.

Až **zavedenie reťazca obsahujúceho OH- skupinu** okrem Sky inhibičnej aktivity a HLM stability zlepšilo aj hodnoty bunkovej permeability (analógy **18**, **19**). Analóg **19** tiež vykázal dobrú rozpustnosť vo vode a bol vybratý pre ďalšie farmakokinetické testy. Tieto žiaľ ukázali zvýšenie in vivo vylučovania (clearance) nedetekovateľné hodnoty látky **19** v plazme po orálnom užití potkanom (**Table 2**).

Napriek tomu, že sa prostredníctvom SAR analýz podarilo zvýšiť Sky inhibičnú aktivitu, HLM/RLM metabolickú stabilitu a rozpustnosť vo vode zavedením polárnych skupín do 4-aminoreťazca, prítomnosť týchto skupín spôsobila aj zníženie bunkovej permeability a tým pádom aj orálnej biodostupnosti. Okrem toho nedošlo ani k výraznému zvýšeniu aktivity v testoch aktivácie krvných doštičiek. Čo sa týka P-selektínových testov, najlepšie výsledky dosiahli analógy **15**, **17** a **18**. Zaujímavosťou je tvrdenie autorov, že analóg **15** dosiahol takú vynikajúcu aktivitu preto, lebo v skutočnosti pravdepodobne dosahuje vyššiu schopnosť bunkovej permeability ako predikoval PAMPA test.

## Slide 8

Redukcia polárneho povrchu zlúčenín (polar surface area) a zníženie počtu bázických aminoskupín a potenciálnych HBD skupín prostredníctvom nahradenia amidového reťazca malým heterocyklom alebo neutrálnym atómom by mali viesť k zvýšeniu bunkovej permeability a následne aj k ďalšiemu zvýšeniu funkčnej aktivity a orálnej biodostupnosti (**Table 4**). Na základe ďalších SAR dát (ktoré ale nie sú uvedené v tomto článku) sa autori rozhodli nahradiť amidový reťazec **3-metylizooxazolom**, zatiaľ čo v polohe 4 nechali bázický amín. Analógy **20** a **21** sa ukázali ako aktívne Sky inhibítory a tiež vykazovali dobrú funkčnú aktivitu v P-selektínových testoch. Žiaľ obidva nové analógy vykazovali aj zníženú HLM/RLM stabilitu, značnú intenzitu viazania na dofetilid a inhibíciu **CYP2D6** (inak cytochróm P450 2D6 – jeden z najdôležitejších enzýmov podieľajúcich sa metabolizme xenobiotík – je zodpovedný za elimináciu asi 25 % klinicky využívaných liečiv). Ďalšou zaujímavosťou je, že aj doteraz najaktívnejší inhibítor **21** s redukovaným polárnym povrchom vykazuje v PAMPA teste veľmi slabú bunkovú permeabilitu.

Aby sa zabránilo viazaniu na dofetilid a inhibícii CYP2D6 a tiež aby došlo k zvýšeniu bunkovej permeability, bázický amín v polohe 4 bol nahradený **3-amino-4-hydroxytetrahydrofuránovým** zvyškom (ako v prípade analógu **19**) a amidový reťazec bol nahradený **3-pyridylovým kruhom**. Zistilo sa, že táto substitúcia (analóg **22**) sa úspešne prejavila vysokou intenzitou Sky inhibície, zvýšením HLM/RLM stability, zvýšením rozpustnosti vo vode a dobrou PAMPA permeabilitou. Analóg **22** však stále vykazoval inhibíciu CYP2D6 a inhibíciu viazania dofetilidu.

Zmena 3-pyridylového kruhu za 4-fluórfenylový kruh (analóg **23**) mala za následok zníženie CYP2D6 a dofetilidovej inhibície, ale žiaľ aj zníženie Sky inhibičnej aktivity.

Nakoniec autori zistili, že najefektívnejšie sa prejavilo nehradenie amidového reťazca brómom (analóg **24**), ktoré sa prejavilo účinnou Sky inhibíciou, uspokojivou P-selektínovou inhibíciou, dobrou HLM/RLM stabilitou a nízkou intenzitou inhibície CYP2D6 a viazania na dofetilid. Nízke hodnoty rozpustnosti vo vode a nízka PAMPA permeabilita však aj u tejto zlúčeniny indikujú zlú orálnu biodostupnosť.

## Slide 9

Len tabuľka...

## Slide 10

Záver:

Zlepšenie TLM stability 2,4-diaminopyrimidín-5-karbamidových inhibítorov možno dosiahnuť modifikáciou amidového reťazca v polohe 5.

Z toho vyplývajúca príprava analógov **11** a **12**, ktoré sa vyznačovali dobrou RLM stabilitou a biodostupnosťou u laboratórnych potkanov.

Vzhľadom na potrebu budúcej „druggability“ potreba zvýšenia HLM stability. Toto bolo dosiahnuté nahradením benzylamínového substituenta v polohe 2 anilínovou skupinou.

Následné zvýšenie intenzity Sky inhibície bolo dosiahnuté naviazaním polárnych bázických prípadne nebázických skupín na aminoskupinu v polohe 4, ktorá zabezpečuje interakciu s oblasťou viazania ribózy v ATP väzbovom mieste. Takéto modifikácie však znižujú bunkovú permeabilitu analógov.

Amidový reťazec v polohe 5 môže byť nahradený aj malým heterocyklom alebo atómom napr. brómom. Výsledkom je udržanie dobrej Sky inhibičnej aktivity a funkčnej P-selektínovej aktivity. Analóg **24** vykázal najlepší profil Sky inhibície, metabolickej stability, CYP2D6 inhibície a inhibície viazania dofetilidu. Vzhľadom na nízku rozpustnosť vo vode a nízku bunkovú permeabilitu od analógu **24** sa stále očakáva len nízka orálna biodostupnosť.

**11** a **12** sa budú ešte zaoberať v in vitro a in vivo štúdiách...ďalšie zlepšovanie vlastností...