Novel and selective spiroindoline-based inhibitors of sky kinase

Vývoj nových inhibítorov Tyro3 so spiroindolínovou štruktúrou, ktoré sa viažu do aktívneho miesta ATP a vykazujú veľkú selektivitu vďaka naviazaniu sa do Ala571 vačku. Táto skupina inhibítorov preukazuje veľkú orálnu biodostupnosť v potkanoch vďaka nízkej absorpcii cez črevnú stenu.

Ochorenie koronárnych ciev je ochorenie postihujúce najmä oblasť USA, kde je príčinou mnohých úmrtí. Odhadovaných je 40 miliónov ľudí trpiacich trombózou v dôsledku arteriosklerózy alebo kardiovaskulárnych ochorení. Clopidogrel (Plavix) je podávaný ako priama liečba arteriálnej trombózy, ktorý je svojou účinnosťou limitovaný bez pridaného aspirínu. Organizmus približne jednej tretiny pacientov je rezistentný voči clopidogrelu a nedokáže ho metabolizovať. V prípade, že sa clopidogrel ireverzibilne viaže na krvné doštičky, nedochádza k ich zhlukovaniu, čo vyústi do vnútorného krvácania. Nedostatky aplikovanej liečby vedú k vývoju liečiv, ktoré sú bezpečnejšie, efektívnejšie a neviažu sa s krvnými doštičkami.

Ligand Gas6, proteín aktivujúci receptory rodiny TAM, patrí do skupiny K-závislých proteínov, a je najčastejšie spájaný s arteriálnou trombózou. Gas6 je významný regulátor cievnej homeostázy a jeho pôsobením dochádza k zhlukovaniu krvných doštičiek (vzniku trombov). Inhibícia Gas6 proteínu má za následok disfunkciu v zhlukovaní krvných doštičiek a pri pokusoch na myšiach pôsobí ako prevencia proti trombóze. Mechanizmus jeho pôsobenia je, že pôsobí ako zosilňovač, teda zvyšuje zhlukovanie krvných doštičiek. Všetky tri receptory, ktorých aktivitu reguluje Gas6, sú exprimované v ľudských a myšacích krvných doštičkách.

Keď s týmto pokusom vedci začali, nebola dostupná žiadna literatúra o selektívnych inhibítoroch Tyro3 TK receptoru. Štruktúra 1 sa ukázala ako s dobrou inhibičnou aktivitou IC50 = 1.04 mikromol. Vybrali spiroindolínový skelet na ďalšie SAR testy inhibície Tyro3 kvôli potenciálnej selektivite na členov rodiny HGFR TK receptorov.

Syntéza:

3,4-dihydro-1H-pyrido(3,4)indole s chránenou NH2 skupinou (Cbz) pôsobením NCS vedie k štruktúre 3 - racemickej zmesi 2-oxo-1,2-dihydro-1H-spiro(indole-3,3´pyroindolin) s chránenou NH2 skupinou (Cbz). Separáciou enantiomérov metódou chirálnej prep HPLC pripravili čisté S a R enantioméry (R nie sú uvedené). Hydrogenácia s Pd/C si vyžadovala zmeniť chrániacu skupinu Cbz za Boc pôsobením činidla Boc2O – štruktúra 4. Redukciou laktámu vzniká štruktúra 5 - Boc-1,2-dihydro-1H-spiro(indol-3.3´pyrolidine), ktorá sa spája s kyselinou 2-indolkarboxylovou a vzniká zlúčenina 7. Deprotekciou Boc chrániacej skupiny v mierne kyslom prostredí vzniká zlúčenina 8, ktorá po aminácii s rôznymi aldehydmi a ketónmi dáva štruktúry 9-26. Zlúčeniny 9.26 boli izolované ako mix diastereoizomérov na C stereogénnom centre.

Všetky uvedené analógy, ktoré podrobili SAR testom, sú S enantioméry, pretože R enantioméry vykazovali 10 menšiu aktivitu (výsledky testov R enantiomérov nie sú uvedené). Pri testoch SAR sa zamerali najmä na **kruh C**, pretože sa javil ako veľmi citlivou oblasťou na manipuláciou ovplyvňujúcou aktivitu vo veľkých skokoch čo i len pri malej zmene. Napr. v zlúčenine 1 je kruh C piperidín a zmenšením piperidínu za pyrolidín (zlúčenina 9), čo je o jeden uhlík menší heterocyklus – výsledok IC50 bol dvakrát lepší. Presunutím N atómu v C kruhu spôsobilo zmenu chirálneho centra a to vyústilo k 8krát horšiemu výsledku (zlúčenina 10). Nahradenie 5-Cl za 5-F na indolovom kruhu spôsobí dvojnásobné zlepšenie aktivity IC50 v zlúčenine 11, pričom až do štruktúry 17 zachovali F na indolovom kruhu. Menej aktívne sú štruktúry 12 a 13, ktoré majú C kruh buď ako štvorčlenný (12) alebo N-metyl-4-piperidín (13). Všetky ďalšie náhrady od pripojenia aromatického kruhu až po rôzne obmeny pripojeného piperidínového kruhu viedli k zníženiu aktivitiy IC50. Pipeiridín a pyrolidín sú teda pre aktivitu IC50 priaznivé. Obmena substituentov R2 za F alebo za elektróndonorné skupiny – metyl alebo metoxy skupina mali priaznivý vplyv na aktivitu (18, 19) a mali podobne dobré výsledky ako elektrónakceptorné halogény F a Cl. V R1 polohe zámenou H za elektróndonornú metoxy skupinu nebol viditeľný veľký vplyv tejto skupiny, zatiaľ čo elektrónakceptorné skupiny ako CN alebo karboxamid pôsobí škodlivo na aktivitu. Presun halogénov F a Cl z R2 polohy do R1 alebo R3 polohy dali podobné výsledky aktivít ako štruktúra 9. Najlepšia aktivita bola dosiahnutá v 25 a 26, kde došlo k pripojeniu metylovej skupiny do polohy 3 na piperidínový skelet v R4 polohe . Všetky štruktúry s preukázanou dobrou aktivitou IC50 (9, 24 a 26) znížili zhlukovanie krvných doštičiek pri testoch.

Tabuľka 2:

**ADME test-** skratka vo farmakokinetike a farmakológii pre „absorption, distribution, metabolism and excretion“ – absorpcia, distribúcia, metabolizmus a vylučovanie. Slúži na opis schopností/možností farmakozlúčenín v organizme. Tieto štyri kritéria ovplyvňujú správanie liekov v organizme, kinetiku liečív v tkanivách a celkove pôsobenie a prejav liečiv v organizme.

**c log P** – rozdeľovací koeficient, pomer koncentrácii neionizovanej látky medzi dvoma roztokmi. Na meranie rozdeľovacieho koeficientu ionizovateľných roztokov sa pH vodnej fázy nastaví tak, že je prevažne neionizovaná. Logaritmus pomeru koncentrácii neionizovaného roztoku v rozpúšťadle je log P. Je to známe aj ako miera lipofility.

**PAMPA assay** – paralel artifical membrane permeability assay – esej na umelej membráne, metóda, pri ktorej sa sleduje priepustnosť látok z donorového kompartmentu cez lipidovú umelú membránu do akcpetorného kompartmentu.

Biodostupnosť – vo farmakologii sa to označuje ako podiel podanej dávky nezmenenej látky, ktorá vstúpi do systémového obehu (jedna z hlavných farmakokinetických vlastností liečiv)

Všetky tri zlúčeniny boli podrobené testu ADME, aby boli preukázané ich možnosti a schopnosti ako liečiv a zložiek farmakokinetík v organizme. Log P (miera lipofility) bola nízka u 9 a 24 (čo bolo očakávané kvôli dvom N atómom). V dôsledku toho vykazovala 9 nízku celulárnu priepustnosť v membráne v PAMPA eseji – čiže cez membránu sa takmer vôbec nevedela dostať. 9 a 24 vykazujú miernu rozpstnosť vo vode a perfektnú stabilitu v mikrozóme (mikrozóm – malý útvar v cytoplazme, najčastejšie sa skladá z malých fragmentov ER s ribozómami). Obe štruktúry ale boli potenciálne inhibítory pre CYP2D6. Bola pozorovaná mierna biodostupnosť v potkanoch zlúčenín 9 a 24 (tabuľka 3). Mierna koncentrácia v plazme bola pozorovaná po tom, čo boli zlúčeniny podané orálne. Orálna biodostupnosť zlúčeniny 9 bola pravdepodobne limitovaná prechodom/absorpciou cez stenu čreva a metabolizmom prvého prechodu. Zaujímavé, že presunom jedného halogénu v štruktúre 24 došlo k lepšiemu výsledku (Cl=5 ml/min/kg) a nižšej úrovni distribúcie. Orálna biodostupnosť štruktúry 24 bude pravdepodobne tiež limitovaná absorpciou cez steny čreva.

Štruktúrne vylepšenie/vynovenie spiroindoline-2-karboxyindolovej kostry ako kinázového inhibítora bolo v nových možnostiach naviazania sa. 1 sa preukázala ako ATP kompetitívny inhibítor. Dokovacie štúdiá ukázali niekoľko možných spôsobov v ATP aktívnom mieste Tyro3 kinázy, ktoré boli znázornené X-ray kryštálovej štruktúre. Do aktívneho miesta znázornili naviazanú štruktúru 11 v myšacom Tyro3 kinázovej oblasti. Kryštálová štruktúra ukázala, že spiroindolínový skelet je orientovaný v ATP aktívnom mieste s fenylovým A´kruhom metylovou skupinou so zadnou stranou Ala571 ktorý leží pod Leu593 gatekeeperom.