

Bradykinin B1 receptor antagonisták kutatása fájdalom kezelésére

ÉLES János,* BOZÓ Éva, HORNOK Katalin, SZENTIRMAJ Éva, BEKE Gyula, BORZA István,
VÁGÓ István, HUSZÁR József, BÉNYEI Gyula, DOMÁNY György,
KESERŐ György Miklós és GREINER István

Richter Gedeon Nyrt. Gyömrői út 19-21. 1103 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

2001. május 2-án a Richter Gedeon Nyrt (RG) Gyógyszerkutató és Fejlesztésének (K+F) házi Tudományos Bizottsága elfogadta explorációs kutatási témaként az orálisan hatékony nem-peptid bradykinin B1 receptor antagonisták (B1R) krónikus gyulladásos fájdalom kezelésére benyújtott kutatási témajavaslatot. Továbbá a K+F perspektívát látott a megcélzott nem szteroid gyulladás gátlók (NSAIDok) és különösen a szelektív ciklooxygenáz-2 gátlók (COX-2) uralta terápiás terület meghódításában. Úgy ítélte meg, hogy a COX-2 gátlók hatékonyságával azonos, vagy annál hatékonyabb B1R antagonisták vegyületek kedvezőbb mellékhatás profiljal, új hatásmechanizmussal, jó eséllyel indulhatnak és lehetnek sikeresek a COX-2 gátlókat követő új generációs fájdalom- és gyulladás csökkentő terapeutikumok versenyében.

2. Tudományos háttér

A szervezet kinin-kallikrein rendszere prekursor kininogének, proteolitikus kallikrein enzimek, kinin peptidek (kallikrein hatására kininogénekből képződnek) és receptorok összességéből áll. A múlt század 80-as éveiben a kininek, mint biológiailag aktív peptidek még elsősorban értágító és ödémaképző (a test szöveteiben a sejtek között kóros folyadékmennyiség felszaporodást és ezzel duzzanatot okozó) hatásuk révén voltak ismertek. A 1990-es évektől megszorodó kutatási eredmények azt sugallták, hogy a kininek fontos mediátorai mind a kardiovaszkuláris homeosztázis, mind a gyulladás és nocicepció (fájdalomérzés) folyamatának. A kininek, proinflammatorikus mediátorként részt vesznek a gyulladás akut fázisára jellemző lokális vazodilatáció és fokozódó kapilláris permeabilitás révén kialakuló ödéma képződésben. Számos mediátor, prosztanoid és citokin felszabadításával, elősegítik a gyulladás szubakut, celluláris fázisában, a fehérvérsejtek és a fagocitáló sejtek infiltrációját. Továbbá szerepet játszanak a véredények körül található idegvégződésekben lokalizálódva a gyulladás krónikus proliferatív fázisában jelentkező szöveti degeneráció és fibrózissal járó erős fájdalom érzet kialakulásában.¹

A kininek hatásukat két, farmakológiai profilban és expressziós mintázatban is eltérő, G-fehérjéhez kapcsolt hét transzmembrán doménből álló receptoron (B1R és B2R) keresztül fejtik ki. A bradykinin B1 és B2 receptorokat kódoló gének számos fajban azonosításra kerültek. A B2 receptorok számos fiziológiai folyamat részvevőjeként a szervezetben

konstitutívan expresszálódnak. Ezzel ellentétben a B1 receptorok általában nincsenek jelen az egészséges szövetekben, csak patológiás körülmények között (szöveti sérülés, gyulladásos mediátorok, mint pl.: endotoxin, vagy citokinek mint pl.: IL1β vagy TNF α hatására) jelennek meg.²

A szöveti sérülések alkalmával felszabaduló kininek fontos szignalizációs szerepet töltenek be a kötőszöveti sérüléssel járó fájdalom és az azt követő gyulladásos folyamatok kialakulásában. A kinin receptorok autoregulációja figyelhető meg az akut és krónikus folyamatokban, míg a B2R a gyulladás és fájdalom kiváltásában, addig a B1R ezeknek a fenntartásában működik közre.³ Gyulladás során elsőként a bradykinin és kallidin folyamatok fel a szervezetben és B2 receptorhoz kötődve fejtik ki a hatásukat. Majd a BK és KD gyors metabolizálódása révén keletkező akut metabolitok (desArg⁹BK, desArg¹⁰DK), a B2R gyors deszenzitizációjával egy időben, a gyulladásos indukció hatására megjelenő Bradykinin B1 receptorokhoz kötődnek.^{4,5} Ilyen módon, míg a fájdalom akut fázisában a bradykinin B2 receptor kap szerepet, addig a krónikusban a B2R gyors deszenzitizációjával és endogén ligandjainak gyors eliminálódásával a B1 receptorok és azok agonistái jutnak szerephez. Mivel a B1 receptor deszenzitizációja a receptor internalizációja révén, épp úgy, mint a B1R ligandok disszociációja igen lassú, így biztosítják a krónikus gyulladás és hozzátársuló hiperlagézia fenntartását.^{6,7,8}

Összegezve, a B1R antagonisták szerepe a fájdalom közvetítésében lehet közvetlen perifériás hatás a B1R expresszáló receptorokon (konstitutív módon vagy indukció következtében), indirekt perifériás hatás más algogén mediátorok felszabadulásának gátlása révén, vagy centrális hatás a fájdalom gerincvelő hátsó szarvában történő transzmisszió blokkolása révén.⁹ Bízva a hatásmechanizmusban és a B1R antagonisták hatékonyságában, az esetleges mellékhatások csökkentése és elkerülése céljából kutatásunk a periférián hatékony B1R antagonisták kifejlesztésére irányult.

Úgy gondoltuk, hogy a B1R antagonisták megoldást jelenthetnek szöveti sérülés valamint krónikus gyulladásos fájdalommal járó kórképek gyógyításában, mint rheumatoid arthritis,^{10,11} derékfájás, osteoarthritis illetve számos további betegség, pl.: diabetes szövödményeként fellépő hiperlagézia,¹² gyulladásos bél betegség,¹³ posztoperatív fájdalom, légúti gyulladásos megbetegedések,¹⁴ asthma, migrén, és daganatos fájdalom kezelésében.

* Tel.: 00 36 889 87 03; e-mail: j.eles@richter.hu

3. Explorációs kutatási feladatok

Az explorációs feladatok megoldása a gyógyszerfejlesztési követelmények megfogalmazása a primer teszt rendszer felállítását is eredményezte.

3.1. Elsődleges (primer) teszt rendszer

Elképzeléseink szerint a primer szűrési vizsgálatokban, amennyiben a vegyületek funkcionális teszten $> 50\%$ gátlást mutattak és $K_i < 200\text{nM}$ az értékük, úgy azonnal *in vitro* P450 screen vizsgálatra kerültek, párhuzamosan a funkcionális teszten történő IC_{50} meghatározással. Ezt követően Caco-2 permeabilitási teszten vizsgáltuk a vegyületek penetrációs készségét, majd funkcionális teszten B1/B2 szelektivitását illetve faj specifikusságát.

Idővel a primer teszt rendszer kibővült a B1R antagonistá vegyületek hERG csatorna gátlásának szűrésével is. A szív-kamrai és pitvari repolarizációt meghatározó legfontosabb ioncsatorna gátlását whole-cell patch clamp módszerrel teszteltük.

A projekt teszt-szűrőrendszerében a primer vizsgálataink sorrendiségét olyan formában alakítottuk ki, hogy a vegyészek minél gyorsabban kapjanak visszajelzést a vegyületek *in vitro* hatékonyságáról. Mivel a vegyületek *in vivo* hatékonyságának vizsgálata anyag- és időigényes folyamat, így a primer teszt rendszernek nagy átérésztőképességű tesztek sorozatából kellett állnia, hogy megszűrje a vegyületeket és leszűkítse a számukat.

3.2. Másodlagos (szekunder) teszt rendszer

Másodlagos teszt rendszer elemeként, a sejtes esszéek beállításával párhuzamosan kezdődött el az *in vivo* tesztek beállítása.¹⁵ A tesztek beállítása során minden esetben tesztelésre kerültek a versenytársak által publikált és a Richter által előállított „referencia” molekulák (Novartis, Sanofi, Bayer), ezen kívül a természetes peptid antagonisták (mint. pl.: DALBK, ([Leu⁵]des-Arg⁹-BK) és a megcélzott terápiás területen használt COX-2 gátló vegyületek. Mivel orálisan hatékony vegyület előállítása volt a cél, így a tesztekben a B1R antagonistákat minden esetben szájon át adagoltuk.

Patkányon a B1R agonistával (DABK) indukált talp ödéma,¹⁶ illetve komplett Freund adjuvánssal indukált (CFA)-indukált monoarthritis modell került beállításra, továbbá gyors szűrő vizsgálatként egér formalin tesztet használtunk.

Nyúlón, hasonlóan a patkányhoz, B1R agonistával indukált „target specifikus” módszerben teszteltük a vegyületek funkcionális, gyulladáscsökkentő hatását (IL 1b -val előérzékenyített LysDABK-val kiváltott ful ödéma modell), krónikus fájdalom tesztként pedig az irodalomban eddig nem leírt CFA-indukált monoarthritis tesztet állítottuk be.

Mivel a cél humán gyógyszer kifejlesztés volt, úgy gondoltuk, hogy humán B1 receptort konstitutíven, egér B1R pedig csak patológiás körülmények között expresszálló humán B1R overexpresszálló transzgen egér hosszú távon megoldást jelenthet a fajspecifikus problémáinkra. A francia Nucleis cég által kifejlesztett, „speedy mouse” technológiával létrehozott egerek valóban megoldást jelentettek azoknak

a vegyületeknek az *in vivo* vizsgálatában, melyek se patkányban, se nyúlban nem szóllaltak meg (lásd lejjebb). Ezekben az egerekben beállításra kerültek a CFA-indukált mechanikus allodnyia és hiperalgézia tesztek valamint a Sztreptozotocin indukált termális hiperalgézia modell.

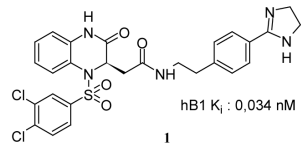
3.3. Harmadlagos (tercier) teszt rendszer

A harmadlagos tesztrendszerben kerültek meghatározásra a vegyület farmakokinetikai paraméterei, biológiai hasznosulása patkányon és kutyán, idegrendszeri mellékhatása (Irwin teszt, Rotarod, LMA) patkányon, kardiovaszkuláris mellékhatása (éber kutya, altatott nyúl, izolált Langendorff perfundált nyúl szív), ADME profilja (adszorpció (felszívódás), disztribúció (eloszlás), metabolizmus és elimináció (kiürülés)) és 4 napos patkány toxikológiai hatása.

4. Új gyógyszerjelölt molekula előállítása publikált molekula továbbfejlesztéseivel

Azonos hatásterületen és molekuláris célponttal rendszerint párhuzamosan futnak kutatási programok különböző K+F tevékenységet folytató gyógyszeripari vállalatoknál. Ennek termékeként elsősorban szabadalmi bejelentések, majd ezek publikus választ követően tudományos cikkek jelennek meg a szakfolyóiratokban. A szakirodalom folyamatos nyomon követésének segítségével és saját kutatásunk eredményeinek ötvözésével előnyösebb tulajdonságokkal bíró molekulákhoz juthatunk el.

Bradykinin B1 antagonistá kutatásunk a Merck cég által korábbiakban publikált szerkezetből és homológia modellből indult el.¹⁷



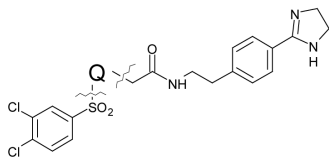
1. Ábra. Merck által publikált kinoxalinon¹⁷; hB1 K_i : humán Bradykinin B1 receptor kötődés.

Könnyen beazonosítható volt, hogy a publikált kinoxalinon (1. ábra) és versenytársaink hatékony molekulái egy arilszulfonamido acetamidból és egy ahhoz kapcsolódó bázikus oldalláncból épülnek fel. Előbbi a természetes peptid béta kanyar részét mimeli, míg utóbbi protonált formában egy aszparaginnal létesít kölcsönhatást a receptorba való bekötődése során.¹⁶

Kutatásunk során célul tűztük ki egy megfelelő hatékonyságot és gyógyszerzerűséget és nem utolsósorban szabadalmaztathatóságot biztosító arilszulfonamido-acetil amid azonosítást. Ehhez elsőként a Merck által alkalmazott oldalláncot választottuk megszintetizált molekuláink állandó építőköveként.

Nagyszámú molekula tesztelését követően a quinolinil acetamidokat találtuk a legígéretesebbnek, azonban a

megfelelő hatékonysággal bíró 1,2,3,4-tetrahidrokinolin-2-ilacetamid (**2**) és 1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-1-ilacetamid (**4**) is gyenge *in vitro* metabolikus stabilitással rendelkezett, gyors ürülést feltételezve a szerkezetből (2. ábra).¹⁸



	Q	hKi (nM)	Patkány CL _{int} (ml/min x g)	Humán
2		6,3	2,6	7,1
3		181	nd	nd
4		2,2	1,9	4,2

2. Ábra. Kinolinszármazékok (CL_{int}: ürülés sebessége).

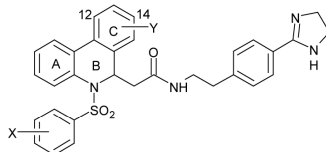
A továbbiakban a kiválasztott kinolinokhoz, mint állandó építőelemekhez kapcsolunk kevésbé flexibilis, kevesebb aromás gyűrűt tartalmazó nagyszámú bázikus oldalláncot azzal a céllal, hogy a hatékonyságot optimaljuk illetve vizsgáljuk az oldalláncok metabolikus stabilitásra kifejtett hatását. Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a kinolinok hibridizálásával előállított **5** fenantridinszármazék milyen hatással van a hatékonyságra és a metabolikus stabilitásra. Az előállított fenantridinszármazékok nagy hatékonyságról tettek tanúbizonyságot, azonban a metabolikus stabilitás továbbra is alacsony maradt (3. ábra).

A metabolizmus részletes vizsgálata során kiderült, hogy a fenantridin C gyűrűje és a dihidroimidazolin rész felelős az alacsony metabolikus stabilitásért.

Szisztematikus helyettesítéssel sikerült beazonosítani a 12-metoxiszármazékot melynek humán metabolikus stabilitása elérte az elvárt szintet, illetve az oldallánc *transz*-ciklohexiletilpirrolidinre történő cseréje vezetett **12** fenantridinszármazékhoz, melyet alkalmasnak találtunk *in vivo* vizsgálatok elvégzésére (4. ábra).

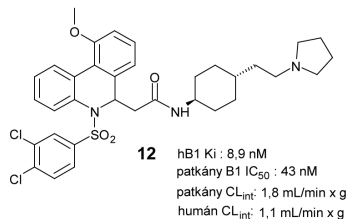
Továbbiakban CFA indukált patkány monoarthritis modellben vizsgáltuk legígéretesebb molekulánk fájdalomcsillapító hatását. Ebben a modellben **12** a Diclofenac-hoz és a Sanofi cég - klinikán is tesztelt - molekulájával hasonló mértékű hatékonyságot mutatott, azonban nagyságrendekkel

alacsonyabb dózissal sikerült ezt a farmkodinámiai hatást elérni (5. ábra). **12** végül preklinikai fejlesztésbe nem került, a továbbiakban ezt a molekulát a hatásmechanizmus további állapotmodelllemben történő alátámasztásához használtuk farmakológiai eszközként.



	X	Y	hB1Ki (nM)	patkány IC ₅₀ (nM)	patkány CL _{int} (ml/min x g)	humán
5	3,4-diCl	H	3,1	28	2,5	9,8
6	2,4,5-triMe	H	2,9	21	2,7	16,4
7	4-CH ₃	H	4,7	52	1,5	12,9
8	4-OCH ₃	H	15,5	81	4,8	14,5
9	3,4-diCl	14-F	1,2	45	1,6	5,5
10	3,4-diCl	12,14-diF	9,1	42	3,9	8,0
11	3,4-diCl	12-OMe	1,7	21	2,6	1,0

3. Ábra. Fenantridinszármazékok.



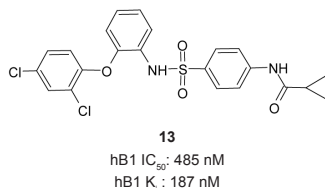
4. Ábra. Optimalt molekula.

Vegyület	Dózis (mg/kg. p.o.)	Gátlás (%)
12	0,03	19
	0,1	27
	0,3	54
SSR240612	1	6
	3	16
	10	30
	0,3	23
	Diclofenac	1
	3	35

5. Ábra. **12**-es vegyület és a referencia vegyületek analitikus hatásának vizsgálata CFA-indukált monoarthritis modellben, patkányon. A tesztben három nappal a CFA injekciót követően egyszeri orális adagolás mellett vizsgáltuk a gyulladt fájó lábizület funkcionális kapacitására gyakorolt anyaghatást. Statisztika: páratlan-teszt *p<0,005; **p<0,001

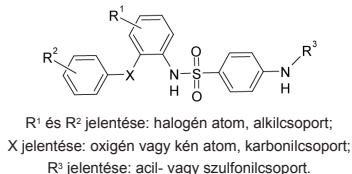
5. Új gyógyszerjelölt molekula előállítása vegyülettár szűréséből kiindulva

Előzőekben tárgyalt megközelítés mellett párhuzamosan kidolgoztunk egy robot technikára átülteshető sejtes szűresi rendszert (High Throughput Screening, HTS), melynek segítségével a Richter vegyülettár molekuláit szisztematikusan leteszteltük. Ennek eredményeképpen a kapott 102 validált találatot 8 csoportba lehetett sorolni. Ezek közül azokat, melyek a leghatékonyabbnak bizonyultak és megfelelő kémiai térrel (a módosításokkal kapott szerkezetek új, szabadalmaztatható vegyületeket eredményeznek) rendelkeztek, újra szintetizáltuk és részletes biológiai vizsgálatoknak vetettük alá. A találatok közül a **13** szulfanilamid származék mind kötődési, mind funkcionális teszten hatékony volt, megfelelő szabadalmaztatható kémiai térrel rendelkezett, így ezt a vegyületet választottuk vezérmolekulának (6. ábra).



6. Ábra. A HTS alapján választott vezérmolekula.

A szerkezet-hatás összefüggések felderítése érdekében kémiai programot dolgoztunk ki a vegyület különböző régióinak módosítására (7. ábra).

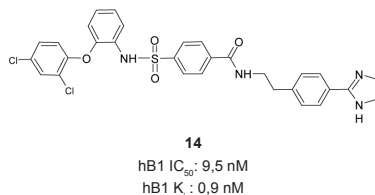


7. Ábra. A HTS alapján választott vezérmolekula tervezett kémiai módosításai.

A vezérmolekula módosításával kapott 74 vegyület zöme hatástalannak bizonyult, egy vegyület kivételével, mely csak abban különbözött a HTS találattól, hogy ciklopropil-karbonilcsoport helyett acetilcsoportot tartalmazott (B1 func. IC₅₀ 82 nM; B1 binding K_i 47,4 nM). Két kritikus tényezővel kellett azonban számolnunk: az egyik a vegyület metabolikus stabilitása, a másik pedig, hogy a humán receptoron hatékony anyag patkány receptoron gyenge hatást mutatott, így a beállított rágesáló teszteken nem tudtunk *in vivo* vizsgálatokat végezni. Nyúl receptoron viszont a humánál ugyan gyengébb, de a patkányhoz viszonyítva aktívabb volt a vegyület, ezért úgy döntöttünk, hogy nyúl *in vivo* modelleket állítunk be a további szintetizálendő vegyületek vizsgálatához (a későbbiekben is ezeket az *in vivo* tesztek alkalmaztuk). Ugyanebben az időben jelent meg a Merck-nek egy szabadalmi bejelentése, mely az

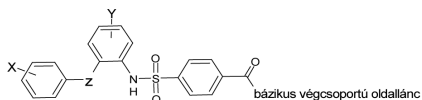
általunk előállított és tervezett molekulák teljes körét lefedte, így további származékokat ebben a vegyületszámban nem állítottunk elő.

Szerencsésnek volt mondható az a változtatás, amikor az acetamido csoportot megfordítottuk és az így kapott benzoészav származékokra a korábbiakban már használt bázikus oldalláncot kapcsoltunk. Az így kapott vegyület (**14**) mutatta az eddigi legjobb hatékonyságot (8. ábra). Ugyan ennek a molekulának nagy volt a molekulatömege, rossz az oldhatósága, gyenge a metabolikus stabilitása és meglehetősen lipofil volt, de ennek a környezetet ismét a szabadalmaztatható térbe esett, így ez a molekula lett a következő vezérmolekulánk.



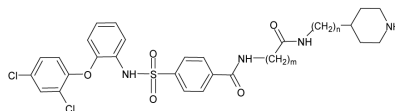
8. Ábra. A második vezérmolekula.

Célunk az volt, hogy a nanomoláris hatékonyság megőrzése mellett javítsuk a kedvezőtlen tulajdonságokon, mindezt elsősorban a bázikus oldalláncok változtatásával próbáltuk elérni (9. ábra).



9. Ábra. A második vezérmolekula optimalizálása.

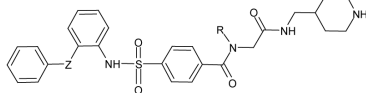
Vizsgáltuk a terminális fenoxicsoport helyettesíthetőségét, az oldallánc hosszának szerepét, különböző aminosavakat és bázikus aminosavakat építettünk be a molekulába (10. ábra).



	m	n	hB1 K _i (nM)
15	1	0	1.4
16	1	1	2.0
17	1	2	0.8
18	1	3	0.6
19	1	4	1.6
20	2	0	49.7
21	2	1	34.0
22	2	2	13.4

10. Ábra. A bázikus oldallánc hosszának szerepe a hatékonyságra.

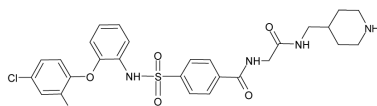
Azt találtuk, hogy azok a molekulák mutatják a legkedvezőbb hatékonyságot, melyek glicin linkert tartalmaznak (11. ábra).



	R	Z	hB1 K_i (nM)
23	Me	O	220
24	H	O	24.4
25	H	C=O	2.53
26	H	S	15.7
27	H	NH	19.2

11. Ábra. A terminális fenoxycsoport helyett alkalmazható csoportok vizsgálata.

28 már azokat a szerkezeti elemeket tartalmazta, melyek elengedhetetlenül szükségesek a hatékonysághoz, ugyanakkor metabolikusan stabil és szelektív volt. További kihívást jelentett azonban 28 alacsony biohasznosulása (12. ábra).

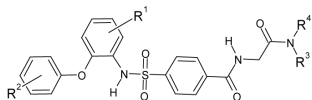


28

B1 funkcionális teszt	IC_{50} 3,3 nM (humán)
	IC_{50} 6,5 μ M (patkány)
	IC_{50} 28 nM (nyúl)
B1 receptor kötődés	K_i 2,0 nM
Metabolikus stabilitás	93/75/79% (hum/patkány/nyúl)
Biohasznosulás	0.38% (patkány)

12. Ábra. Optimált molekula a kulcs motívumokkal.

Ennek érdekében olyan kémiai programot dolgoztunk ki, melynek célja a vegyületek lipofilizálásának növelése volt (13. ábra).



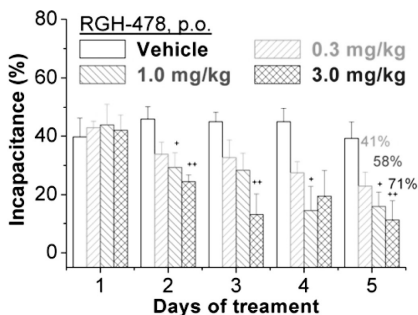
13. Ábra. A lipofilizálás finomhangolására összeállított kémiai program.

A következőkben egy kis vegyület könyvtárat állítottunk elő az általunk kidolgozott párhuzamos szintézis módszerrel, és így jutottunk el a program első fejlesztési jelöltjéhez.

Az fejlesztési jelölt összefoglaló jellemzése:

- Hatékony B1 antagonist (human B1 IC_{50} : 0.21 nM; patkány IC_{50} B1: 42 nM; nyúl IC_{50} B1: 0.34 nM).
- Szelektív (>3000-szeres B2-vel és 151 egyéb receptorral szemben).
- Metabolikusan stabil (human Fm 88 %, patkány Fm 99 %).

- Biohasznosulása: 31 % (patkány), 100 % (kutya); $t_{1/2}$: 1.5 óra patkány és 1.8 óra kutya.
- Nagyon hatékony szubakut- és krónikus FCA indukálta monoarthritis tesztben nyúl (14. ábra); a krónikus tesztben hatékonyabb, mint egy nem-steroid gyulladáscsökkentő (diclofenac) és egy COX-2 gátló (valdecoxib) és ugyanolyan hatékony, mint a Sanofi SSR-240612 jelű B1 antagonistája.
- Nincs kardiovaszkuláris mellékhatása kutyákban.
- Nincs központi idegrendszeri mellékhatása.
- Nem mutatgén.



14. Ábra. A fejlesztési jelölt analgetikus hatásának vizsgálata CFA-indukált monoarthritis tesztben, nyúl. A tesztben tizenegy nappal a CFA injekciót követően öt napon keresztül (Days of treatment) napi kétszeri adagolás mellett vizsgáltuk a fejlesztési jelölt gyulladt lábízület funkcionális kapacitására gyakorolt hatását (Incapacitance). Az ábrán a pre-dose értékek kerültek bemutatásra. Míg első napi adagolást követően még nem, a második naptól kezdődően már fenntartott analgetikus hatás volt megfigyelhető. Statisztika: páratlan t-teszt + $p < 0.005$; ++ $p < 0.001$

A kiválasztott vegyület féltüzei szintézisével (kg-os mennyiségek) párhuzamosan zajlottak a megfelelő formuláció kiválasztására irányuló kísérletek, a kioldódási és stabilitási valamint további biztonságossági és toxikológiai vizsgálatok. Csak alapos előkészítés után indulhatott a vegyület klinikai kipróbálása embereken, először egészséges önkénteseken (Fázis I vizsgálat), majd speciálisan kiválasztott betegpopuláción (Fázis II vizsgálat).

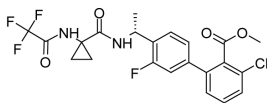
6. Követő molekula felfedezése

Figyelembe véve a preklinikai fejlesztésre kiválasztott molekulák magas kiesési rátáját, valamint a kérdéses kutatási téma művelése során összegyűjtött óriási mennyiségű belső tudást és tapasztalatot, a versenyképesség fenntartása érdekében nélkülözhetetlen egy vagy több azonos hatásmechanizmussal rendelkező követő molekula kidolgozása. A szerkezeti különbségekből fakadó eltérő farmakokinetikai és farmakodinámiai tulajdonságok növelik annak valószínűségét, hogy végül sikerül egy klinikailag biztonságos és hatékony molekulát kifejleszteni.

A preklinikai fejlesztési jelölt kiválasztását követően a követő molekulával szemben többek között követelményként támasztottuk, hogy az fejleszthetőség tekintetében

előnyösebb, analitikus profil szempontjából pedig szélesebb spektrummal rendelkező vegyület kell, hogy legyen. A követő projekt tevékenységének gyűjtőpontjában a korábbi fejlesztésre kiválasztott molekulától szabadalmilag független, új kémiai szerkezet tervezése és szintézise állt. A kémiai kiindulópont megtalálása érdekében többféle stratégiát alkalmaztunk:

- a Richter vegyülettár újonnan előállított illetve vásárolt vegyületeit vizsgáltuk B1 hatásra nagy áteresztőképességű (HTS) *in vitro* tesztben,
- kereskedelmi forgalomban kapható vegyületekből célzott adatbázist építettünk és humán B1 receptor homológiamodellel virtuális szűrésnek vetettük alá, valamint
- a Merck gyógyszergyár MK-0686 számú B1 antagonistá gyógyszerjelölt molekuláján (29, 15. ábra) alapváz-módosítást (scaffold-hopping) hajtottunk végre, hogy így a szabadalmazhatóság feltételeinek megfelelő és remélhetőleg hatékony saját vezérmolekulához jussunk. A következőkben ezen utóbbi megközelítést mutatjuk be részletesebben.



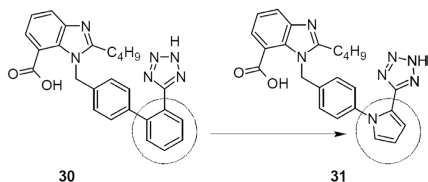
29

MK-0686

15. Ábra. MK-0686 a Merck cég B1 antagonistá klinikai jelöltje.

A jelentős számú versenytárs molekula közül az MK-0686 viszonylag alacsony molekulatömegével, a bázikus oldallánc és a szulfonamid molekularész hiányával, valamint deklaráltan agyi penetrációs tulajdonságával emelkedett ki. Utóbbi tulajdonság eredményeképp a centrális B1 receptorok modulációja feltehetően szélesebb fájdalomcsillapító profilal rendelkező vegyületeket eredményez. Ugyanakkor az MK-0686 hátrányos tulajdonságai között ismert volt, hogy szubsztátuma és indukálója egyes CYP izoenzimeknek.

Bifenil-származékok gyógyszerkémiai irodalmának áttekintésekor találoztunk Xu és munkatársai¹⁹ tevékenységével, akik angiotenzin receptor (AT₁) blokkoló vegyületek esetében sikerrel helyettesítették bifenil-metilamin-származékok tetrazolt hordozó fenil gyűrűjét (30, kötődési IC₅₀ 550nM) pirrol gyűrűvel (31, IC₅₀ 6,9nM; 16. ábra).

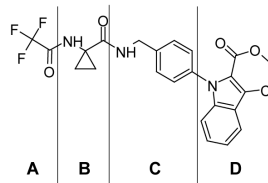


30

31

16. Ábra. Irodalmi példa sikeres fenil-pirrol bioiszter cseréje angiotenzin receptor (AT₁) blokkoló.

A fenti analógiából kiindulva és figyelembe véve a pirrol gyűrűt tartalmazó vegyületek CYP izoenzimekkel szemben gyakran megmutatózó gátló hatását, valamint a monohalogénezett pirrolszármazékok szintetikus hozzáférhetőségével kapcsolatos nehézségeket, az MK-0686 klór-benzoészter részletét 2-metoxikarbonil-3-klór-indol-1-íl szerkezeti elemre cseréltük. Nagy örömrünkre az így kapott, egyszerűsített benzilamin linkert tartalmazó vegyület (32, 17. ábra.) magas humán B1 receptor affinitást mutatott (humán B1 receptor affinitás K_i = 10.1 nM; MK-0686 K_i = 2,4 nM), így megfelelő kiindulópontot jelentett az optimalizációhoz.



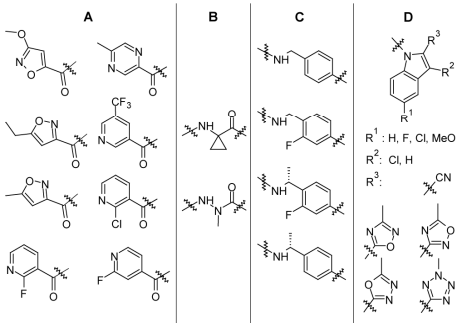
32

17. Ábra. A követő program vezérmolekulája.

A molekula elsőként kezelendő problémája a megkívántnál alacsonyabb metabolikus stabilitása volt (humán/patkány 48%/23% maradék vizsgált vegyület; kritérium: 70%/60%), melyet feltételezésünk szerint elsősorban az észtercsoport jelenléte okozott. Ezért különböző észter-bioisztereket építettünk be a molekulába a metoxikarbonilcsoport helyére. Az így kapott vegyületsorozat egyes tagjai már metabolikusan stabilak voltak és *in vitro* penetrációs tesztekben a követelményeknek megfelelő eredményt adtak, így lehetővé vált egy vezérmolekula kiválasztása (szerkezeti képlet nélkül). A vezérmolekulát körülvevő kémiai tér benépesítéséhez a leghatékonyabb eszköznek a párhuzamos szintézis ígérkezett. Ennek előkészítéseként a molekulacsalád előállítására alkalmazott konvergens szintézist négy kiinduló szintetikus elemnek (17. ábra. A, B, C, D) megfelelő szintetikus ekvivalensek készletét hagyományos szintézissel és kereskedelmi forgalomban kapható vegyületek beszerzésével feltöltöttük. A szerkezeti változtatásokra a receptor affinitás szempontjából leginkább érzékeny középső régiót (B, C) érintő módosítások esetén egy-egy példát előállítottunk és a mért humán B1 receptor affinitási értékek alapján döntöttünk az adott építőelem felhasználásáról. Ezt követően az összegyűjtött A, B, C, és D elemekből egy 2800 molekulát tartalmazó virtuális könyvtárt építettünk, melyet *in silico* módszerrel (számolt fiziko-kémiai paraméterek, oldhatóság és penetráció predikció) és szintetikus hozzáférhetőség (idő- és költségkorlátok alkalmazása) szempontjából előszűrtünk. Az ezt követő szintetikus kampányban végül 234 vegyület készült el, melyeket egy célszerűen megválasztott *in vitro* teszt-sorozaton megvizsgáltunk. Az egyes tesztek és kritériumok, valamint az azokat teljesítő molekulák száma a következő volt:

- humán B1 funkcionális gátlás > 50% (tesztvegyület koncentráció: 30nM): 121 vegyület
- humán B1 receptor kötődési K_i < 10 nM: 90 vegyület

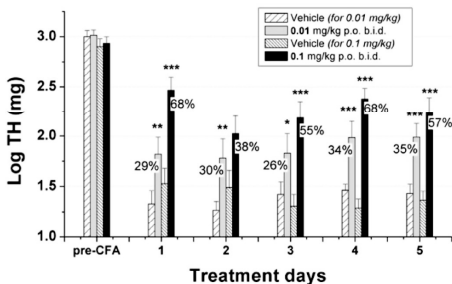
- humán B1 funkcionális gátlás $IC_{50} < 10$ nM: 83 vegyület
- metabolikus stabilitás, maradék vizsgált vegyület $> 70/60\%$ (humán/patkány): 51 vegyület
- penetráció Caco-2 sejteken, $P_{app} > 10 \times 10^{-6}$ $1/cm^2$, $PDR < 4: 29$ vegyület.



18. Ábra. A vezérmolekula optimalizálása során az elsődleges *in vitro* tesztekben sikeresen szereplő 29 molekula építőelemei.

A 29 vegyület a 18. ábrán látható szerkezeti elemekből épült fel.

A további vizsgálatokat (többek között CYP enzim gátlás és indukció, hERG gátlás vizsgálata, patkány farmakokinetika, fájdalomcsillapító hatás humán B1 receptort overexpresszáló transzgen egéren, valamint kardiovaszkuláris biztonsági vizsgálat) két vegyület élte túl és került további vizsgálatokra. Az összesített vizsgálati eredmények elemzését követően további preklinikai vizsgálatokat már az újabb fejlesztésre kijelölt molekulával végeztük. (szerkezeti képlet nélkül, M₁ 565, hB1 receptor kötődési K_d 2,4 nM, funkcionális IC₅₀ 0,5 nM, biohasznosíthatóság patkányban 47%). A 19. ábrán látható, hogy az újabb jelölt tolerancia fellépése nélkül, eredményesen csökkentette a fájdalmat hB1 receptort overexpresszáló transzgen egéren CFA által kiváltott gyulladáshoz fájdalom teszt modellben.



19. Ábra. A követő fejlesztési jelölt analgetikus hatása CFA-indukált mechanikus allodynia tesztben B1R-t overexpresszáló transzgen egéren ismételt adagolás mellett. Maximum fájdalomküszöb változása (Log TH; Átlag± szórás) a kezelési napok függvényében (Treatment days). Statisztika: 2-utas ANOVA/Tukey teszt * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetüket fejezik ki a Richter Gedeon Nyrt. Bradykinin B1 programjában dolgozó alább felsorolt minden kutatójának és közreműködőjének: Balogh György Tibornak, Balázs Ottiliának, Boros Andrásnak, Buckle Dereck-nek, Bugovics Gyulának, Dallosné Szvetlanának, Dezső Péternek, Farkas Sándornak, Fodor Lászlónak, Galgóczy Kornélnak, Gullerné Ladós Zsuzsannának, Halász Attilának, Háda Viktornak, Heilinger Évának, Héjjas Krisztinának, Horváth Csillának, Horváth Irénnek, Hodosceek Barbarának, Karsai Editnek, Kiss Róbertnek, Könczöl Árpádnak, Kis-Varga Ágnesnek, Kolok Sándornak, Komlódi Zsoltnak, Kósa Jánosnak, Krajcsovic Zoltánnak, Likó Istvánnak, Linke Nikolettnek, Makó Évának, Magdó Ildikónak, Molnár Lászlónak, Nagy Józsefnek, Orosz Szabolcsnak, Papp Andrea Mártának, Perényi Zsoltnak, Polgár Timeának, Rónai Andrásnak, Selényi Györgynek, Schmidt Évának, Stark Holger-nek, Szalai K. Katalinnak, Szántay Csabának, Szondiné Kordás Krisztinának, Tar Miklósnak, Tarcsay Akosnak, Tamawa Istvánnak, Tóth Szilviának, Trafikánt Gábornak, Vastag Mónikának, Visegrády Andrásnak és Tony Ainsworth-nek.

Hivatkozások

- Ahluwalia, A. and Perretti, M. *TIPS*. **1999**, *20*, 100-104.
- Marceau, F. and Regoli, D. *Nature Reviews*, **2004**, *3*, 845-852.
- Phagoo, S.B.; Poole, S. and Leeb-Lundberg, L.M. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56*, 325-333.
- Marceau F.; Hess, J.F. and Bachvarov, D.R. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 357-386.
- Calixto, J.B.; Cabrini, D.A.; Ferreira, J. and Campos, M.M. *Pain*, **2000**, *87*, 1-5
- Dray, A.J. and Perkins, M.N. *TINS* **1993**, *16*, 99-104.
- Dray, A.J. *Can J. Physiol. Pharmacol.* **1997**, *75*, 704-712.
- Couture, R.; Harrison, M.; Vianna, R.M. and Cloutier, F. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *429*, 161-176.
- Mason, G.S.; Cumberbatch, M.J.; Hill, R.G. and Rupnik, N.M. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2002**, *80*, 264-268.
- Bhoola, K.D.; Figueroa, C.D. and Worthy, K. *Pharmacol. Rev.* **1992**, *44*, 1-80.
- Cassim, B.; Shaw, O.M.; Mazur, M.; Misso, N.L.; Naran, A.; Langlands, D.R.; Thompson, P.J. and Bhoola, K.D. *Rheumatology*, **2009**, *48*, 490-495.
- Gabra, H.B. and Sirots, P. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, *457*, 115-124.
- Marceau, F. and Regoli, D. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *154*, 1163-1165.
- Phagoo, S.B.; Reddi, K.; Anderson, K.D.; Leeb-Lundberg, L.M. and Warburton, D. *JPET* **2001**, *298*, 77-85.
- A projekt in vivo vizsgálataira a munkahelyi állatjóléti bizottság engedélyével a hatályos állatvédelmi törvények és rendeletek betartásával került sor. Feljebb, a kutatás szempontjából döntőfontosságú in vivo tesztek kerültek felsorolásra.
- Campos, M.M. and Calixto, J.B., *Br. J. Pharmacol.* **1995**, *114*, 1005-1013.
- (a) Su, D. S.; Markowitz, M. K.; DiPardo, R. M.; Murphy, K. L.; Harrell, C. M.; O'Malley, S. S.; Ransom, R. W.; Chang, R. S. L.; Ha, S.; Hess, F. J.; Pettibone, D. J.; Mason, G. S.; Boyce, S.; Freidinger R. M.; Bock, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7516. (b) Ha, S. N.; Hey, P. J.; Ransom, R. W.; Harrell, C. M. Jr.; Murphy, K. L.; Chang, R.; Chen, T. B.; Su, D. S.; Markowitz, M. K.; Bock, M. G.; Freidinger, R.M.; Hess, F. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *331*, 159.

18. Éles, J., Beke, Gy., Vágó, I., Bozó, É., Huszár, J., Tarcsay, Á., Kolok, S., Schmidt, É., Vastag, M., Hornok, K., Farkas, S., Domány, GY., Keserü, Gy.M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 3095-3099.
19. Xu, J. Y., Zeng, Y., Ran, Q., Wei, Z., Bi, Y., He, Q.H., Wang, Q. J., Hu, S., Zhang, J., Tang, M. Y., Hua, W. Y., Wu, M. X. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2921-2926.

Bradykinin B1 receptor antagonist research for the treatment of pain

Bradykinin B1 receptors, expressed in peripheral tissues following injury, mediate the effects of kinins provoking a number of acute and chronic inflammatory pathways resulting in pain, edema and vasodilatation. Studies support the hypothesis that the antagonists of these receptors will be effective anti-inflammatory drugs treating rheumatoid arthritis, osteoarthritis, inflammatory bowel disease and other inflammation related diseases.

In this article medicinal chemistry strategies providing a pharmacological tool and a preclinical development candidate with excellent *in vivo* activity, as well as a drug candidate under phase II clinical trials are presented, starting from competitors' bradykinin B1R antagonists and a high throughput screening hit.

At the beginning of the project a screening cascade was implemented to facilitate the identification of functionally active antagonists selectively binding to the B1 receptor with good ADME properties, suitable for *in vivo* animal studies. The latter consisted of mouse formalin test, complete Freund's Adjuvant (CFA) induced monoarthritis pain test in rats, lysDABK induced ear edema test and CFA-induced chronic monoarthritis test in rabbits, in accordance with the species specificity of the individual compounds.

The first approach started from a B1 receptor antagonist structure, with quinoxalinone central core and subnanomolar affinity, published by Merck and was supported by an in-house built homology model. The essential structural features assuring the peptidomimetic spatial arrangement of pharmacophores were retained but the central core and the basic side chain was modified to obtain patentable compounds with improved drug-like properties. The main issue to be faced during optimization was

the high human metabolic clearance which could be overcome by applying appropriate substitution on ring C of the phenanthridine scaffold in the best compound containing a unique saturated basic amine side chain. Compound **12** dose dependently alleviated the CFA-induced joint pain in rats with effectiveness in a lower dose range than the reference compounds and henceforth was used as a pharmacological tool in animal models.

Subsequently a HTS campaign was carried out which resulted in the identification of an acylamino sulfonamide derivative hit with sub-micromolar B1 receptor antagonist activity. In the extensive optimization program a major breakthrough came when the carboxamide bond was reversed and different basic amine side chains were attached to the benzoic acid derivative so obtained, to enable the selection of a lead compound. Further optimization comprised the incorporation of amino-acid and saturated ring building blocks into the side chain and the change in aromatic ring substitution pattern to improve physicochemical properties and metabolic stability as well as maintain nanomolar efficacy. The application of parallel synthesis resulted in the identification of the first preclinical candidate, a selective, metabolically stable and safe B1 receptor antagonist molecule (no structure given) which is highly effective in animal models of inflammatory pain.

At this point of the project a follow up program was launched based on scaffold hopping of MK-0686, a non-basic, brain-penetrant B1 receptor antagonist, developed by Merck. The novel hit structure obtained by the replacement of the terminal phenyl group of the competitor compound with an indole ring had high B1 receptor affinity but low metabolic stability, which was attributed to the vulnerability of the ester group attached to the indole moiety. The introduction of a number of ester bioisosteres improved ADME properties and permitted the selection of a lead compound (no structure given). In order to populate the chemical space around the lead a virtual library, consisting of 2800 structures, was generated and 234 molecules were synthesized following prioritization. Funneling of the compounds through the complete *in vitro* and *in vivo* screening cascade led to the nomination of the back-up preclinical development candidate (no structure given) which had an analgesic effect in a repeat-dose study in the CFA induced plantar allodynia pain model in B1R overexpressing transgenic mice with no development of tolerance.