

# CNS kutatás egy nemzetközi cégnél – az elmúlt 15 év gyógyszerkémiai tapasztalatai

ÉLES János\*

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

A preklinikai és klinikai jelöltek magas kiesési rátája, amely ráadásul magas fejlesztési költséggel párosult, az ezredfordulón arra ösztönözte a gyógyszercégeket, hogy görcső alá vegyék ennek okait. Eközben a gyógyszerkémikusok feladata továbbra sem változott: a kutatási hipotézisek alátámasztására megfelelő *in vitro* hatékonyságú, ideális farmakokinetikával és farmakodinámiás tulajdonságokkal bíró molekulákat kell tervezzenek és előállítsanak.

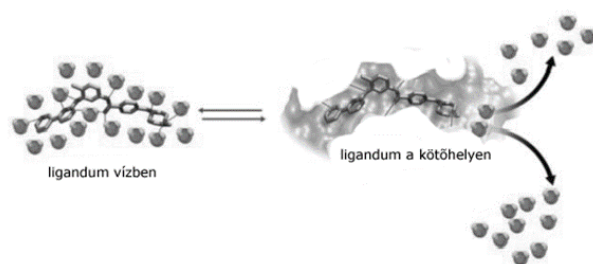
Az elmúlt 20 évben a vezérmolekulák kialakítása HTS (*High Throughput Screen*, nagyáteresztésű szűrés) alapú találatokból indult ki. Nagy volt az igény kevés lépéssel, egyszerű kémiai eljárásokkal optimálható vezérmolekulák azonosítására. „*Fail early, fail fast*” még ma is így szól a mantra, ami többek között hozzájárult a magas kiesési rátához. Több elemzés is rámutatott arra, hogy az ezredfordulóra erőteljesen megemelkedett a szabadalmaztatott gyógyszerjelölt molekulák molekulatömege és lipofilitása. Az irodalomban egyre többen a fizikokémiai paraméterek aggasztó inflálódásáról számoltak be, sőt ezt a jelenséget molekuláris elhízásnak vagy molekuláris obezitásnak is elnevezték. Lipinski ötös szabályának<sup>1</sup> (Ro5, *Rule of Five*, MW (*molecular weight*, molekulatömeg) <500; logP <5; HBD (*hydrogen bond donors*, hidrogén kötés donorok) <5; HBA (*hydrogen bond acceptors*, hidrogén kötés akceptorok) <5) megjelenése óta a gyógyszerkémikus társadalom egyre nagyobb hangsúlyt fektet a gyógyszerjelölt molekulák fizikokémiai tulajdonságaira. Későbbiekben több elemzés is rámutatott arra, hogy a Ro5 paraméterei mellett a molekulák töltött felülete (TPSA, *topological polar surface area*) és a rotáló kötések (RB, *rotatable bonds*) száma is fontos szerepet játszanak a vezérmolekula optimalizálás sikerességében. Ezen tulajdonságok – amellet, hogy a gyógyszerkémikusok fókuszába kerültek – fontos szerepet játszottak ADMET (*Absorption Distribution Metabolism Excretion Toxicology*) predikciós modellek építése során is.

A Pfizer CNS területen dolgozó kismolekulás gyógyszerkutatói 2010-ben rámutattak arra, hogy a fizikokémiai paraméterek együtt hatása jobban megjósolja egy molekula gyógyszerszerűségét – különös tekintettel a gyógyszerjelölt molekulák agyi penetrációjára –, mint az egyes paraméterek külön-külön történő szigorú számbavétele. Hat fizikokémiai paraméter (ClogP, ClogD, MW, TPSA, HBD, pK<sub>a</sub>) felhasználásával megalkották a CNS MPO<sup>2</sup> (*Central Nervous System Multiparameter Optimization*) multiparaméteres

előre jelző algoritmust, amely segítségével központi idegrendszerre ható molekulák gyógyszerszerűségét jósolják.

Ki kell emelni, hogy multiparaméteres gondolkodásmódban továbbra is vezető szerepet tölt be a lipofilitás, mint mért fizikokémiai paraméter. A lipofilitás nem más, mint a hidrofóbicitás, a polaritás és az ionos jelleg összessége. Klasszikus módon pedig a ligandum oktanolban és vízben mért koncentráció hányadosának 10-es alapú logaritmusaként (logP) határozzuk meg. Nem nehéz belátni így, hogy a lipofilitás hatással van a felszívódásra és a farmakokinetikai paraméterekre, de ugyanakkor hatással bír a ligandum célfehérjéhez történő kötődésére is. A kötődési affinitást (K<sub>a</sub>) egyértelműen meghatározza a Gibbs szabadenergia változás (K<sub>a</sub>=e<sup>-ΔG/RT</sup>), amely egy entalpiikus és egy entrópikus változás összessége (ΔG = ΔH – TΔS). Utóbbiból következően kifejezetten nagy affinitást akkor érhetünk el, ha mindkettő kedvező módon változik a kötődés során.

A ligandum kötődése termodinamikai szempontból több lépéses folyamat<sup>3</sup>, amely magában foglalja a ligandum valamint a kötőhely konformációs átalakulását és deszolvatációját, majd ezt követően a ligandum-receptor komplex kialakulását (1. ábra).



1. ábra. A kötődés termodinamikája

A kötődés általában konformációs átrendeződéssel jár, mind a ligandum, mind a kötőhely esetében, így ez entalpia veszteséggel jár. A ligandum deszolvatációja a vízmolekulák újra szerveződésének következtében entrópia nyereséggel jár, míg a kötőhely esetében a távozó vizek között kialakuló kölcsönhatásoktól függően a folyamat lehet entalpiikus vagy entrópikus. A ligandum-receptor komplex kialakulása során az újonnan kialakuló kölcsönhatások entalpia nyereséget eredményeznek, ugyanakkor a molekulá-

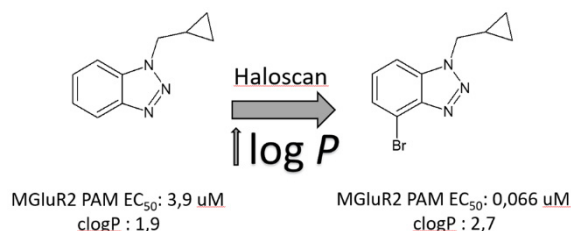
\* Tel.: +36 1 889 8703; e-mail: j.eles@richter.hu

ris felismerés csökkenti a kötőhely rotációs és translációs szabadsági fokát így ez entrópia veszteséggel jár. A felsorolt részfolyamatok entalpiikus és entrópikus komponensei határozzák meg, hogy a folyamatot végül az entrópia-, vagy entalpia-változás vezérli. Így az optimálás végeredményétől függően beszélhetünk dominánsan entalpiikus vagy entrópikus optimálásról.

Az entalpiikus optimálás jóval nehezebb feladat, ugyanis ha nem tökéletes a ligandum és a célfehérje között az illeszkedés, akkor az újonnan kialakuló hidrogén hidak és Van der Waals kölcsönhatások nem kompenzálják a molekula deszolvatációjának entalpia veszteségét. A tökéletes illeszkedéshez sok esetben királis molekulák szükségesek, amelyek szintézise, analitikája rendkívül erőforrás igényes, ráadásul 0,1 Å pontosságú tervezés ma nem lehetséges. Azonban az entalpiikusan optimált molekulák hatékonyabban, jobb a szelektivitásuk, valamint az ADMET és farmakokinetikai (PK) paramétereik is rendszerint jobbak. Ebben az esetben pedig a lipofilitás jellemzően csökken.

Entrópikus optimálás esetén nő a deszolvatációs entrópia nyereség, és tekintettel a molekulába beépített kötött szerkezeti elemekre, a molekula konformációs szabadsági fok vesztesége elenyésző is lehet. Ilyen esetben általában planáris, aromás szerkezetek egymáshoz illesztésével élünk, amelyre számos robosztus kémiai módszer létezik. Ez esetben azonban a fizikokémiai paraméterek inflálódásával és az oldékonyság drasztikus csökkenésével kell számolnunk.

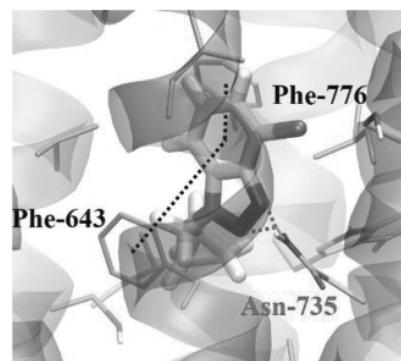
Míg általában a magasabb molekula tömegű HTS találatokból kiinduló vezérmolekula keresésénél a gyors entrópikus optimálás során rendre a fizikokémiai paraméterek túlzott inflálódásával kell számolnunk, addig az alacsony molekula tömegű (MW<300) fragmenseken alapuló vezérmolekula kutatás reményt ad arra, hogy az entrópikus optimálás megfelelő minőségű vezérmolekulákat eredményezzen. Az entrópikus optimálást eredményesen alkalmaztuk metabotróp glutamát receptor kettes (mGlu2) altípusára végrehajtott vezérmolekula fejlesztés<sup>4</sup> során (2. ábra).



2. ábra. Entrópikus optimálási lépés

A fragmens méretű benzotriazolszármazékon vándoroltatuk körbe a halogén atomokat és azt találtuk, hogy a víz 4-es pozíciójába beépített bróm atom két nagyságrenddel javította a hatékonyságot, míg a lipofilitás csak egy nagyságrendet emelkedett. A dokkolási modell alapján azt feltételezhetjük, hogy nem csak a molekula deszolvatációja,

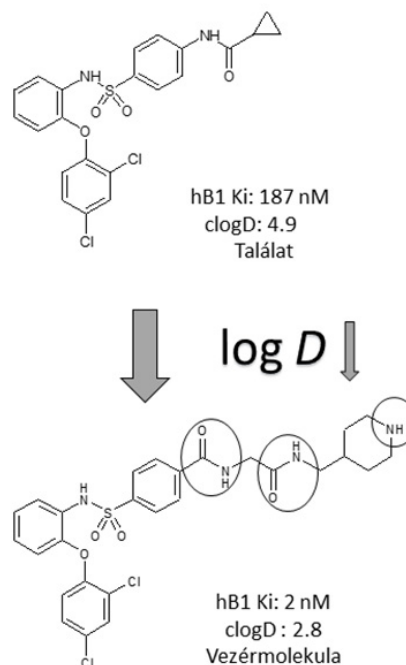
hanem a kötőhely deszolvatációja is entrópia nyereséggel járt ez esetben, és így sikerült egy két nagyságrenddel hatékonyabb molekulához eljutnunk (3. ábra).



3. ábra. mGlu2 pozitív allosztérikus modulátor (PAM) *in silico* dokkolás

Entalpiikus optimálást alkalmaztunk a bradykinin B1 receptor antagonistá molekulákat kutató projektünk során (4. ábra). A HTS során egy potens három aromás gyűrűt tartalmazó szulfonamidot sikerült azonosítanunk, de lipofilitása feszegette a gyógyszeryszerűség határait.

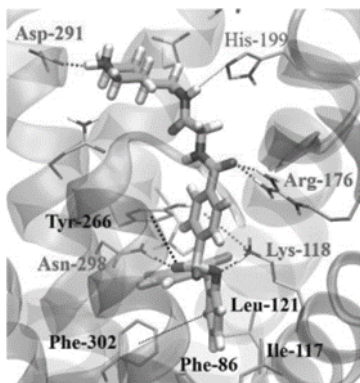
Ennek okán poláris építőelemek beépítésével kíséreltük meg a vezérmolekula-fejlesztést, remélve ettől azt, hogy sikerül értékes hidrogén hidak kötések kialakítanunk a ligandum és a receptor kötőhelye között.



4. ábra. Entalpiikus optimálási lépés

Két új polaritást növelő motívumot építettünk be és a már meglévő amid-kötést is megfordítottuk. Az optimálást támogató *in silico* dokkolási modell rámutatott arra, hogy ezzel a módosítással sikerült kialakítanunk két új hidrogén kötést, mindeközben a lipofilitást két nagyságrenddel csök-

kentettük. Az újonnan kialakult kötések közül az 291-es aszpartáttal kialakult kölcsönhatást véljük a legértékesebbnek, de a 176-os argininnel kialakult kötés is erősebbnek tekinthető, mint a találatként azonosított molekulában feltételezett kötés (5. ábra).



5. ábra. Bradykinin B1 antagonist *in silico* dokkolás

A gyógyszerkémikus az optimalizációk során a hatékonysági paraméterek optimalizálását a fizikokémiai paraméterek szigorú ellenőrzése mellett teszi. Ezt a folyamatot a ligandum hatékonysági metrikák alkalmazásával sokkal jobban lehet követni, mint egyszerűen a hatékonysági és a fizikokémiai adatok diszkrét elemzésével.

A metrikák arra mutatnak rá, hogy a molekula a strukturális elemeit milyen hatékonysággal használja a biológiai célponthoz történő kötődése során. A ligandum hatékonyság<sup>5</sup> (LE, *ligand efficiency*,  $LE = 1.4 \times pIC_{50}/HAC$ ) volt az első a metrikák közül, amely a molekulákat a nehéz atomokra eső kötési energiák alapján különböztette meg egymástól. Ezt a koncepciót kitágítva további metrikák jelentek meg figyelembe véve a molekulák lipofilitását, molekulatömegét, töltött felületét, illetve a fizikokémiai paraméterek különböző kombinációit. A metrikák közül az egyik legnagyobb népszerűségnek örvend a molekulák ligandum hatékonyság függő lipofilitása (LELP, *ligand-efficiency-dependent lipophilicity*  $LELP = \log P/LE$ )<sup>6</sup>, amely megmutatja, hogy mekkora lipofilitás növekménnyel fizetünk a ligandum hatékonyság javulásáért. Hasonló megfontolások alapján került bevezetésre, a talán még többet idézett lipofil ligandum hatékonyság (LLE, LipE, *lipophilic ligand efficiency*,  $LipE = LLE = pIC_{50} - \log D$ )<sup>7</sup>, amely a kötődési vagy funkcionális hatékonyság növekedésért lipofilitásban fizetett „árat” mutatja meg.

Miközben a gyógyszerkémikus társadalomban konszenzus alakult ki, miszerint a gyógyszerjelölt molekulák klinikai sikerét egyértelműen meghatározzák azok fizikokémiai paraméterei, ezzel párhuzamosan az is nyilvánvalóvá vált, hogy az elmúlt évtizedekben az  $sp^2$  szénatomokban gazdag planáris molekulák előállítására kihegyezett szintetikus eszközpark a gyógyszerkémikusokat aligha segítheti céljaik elérésében. Ellenben az új technológiák, mint a mikrohullámmal történő melegítés vagy az áramlásos kémia, eddig nem ismert, új kémiai szerkezetek felfedezéséhez vezetheti

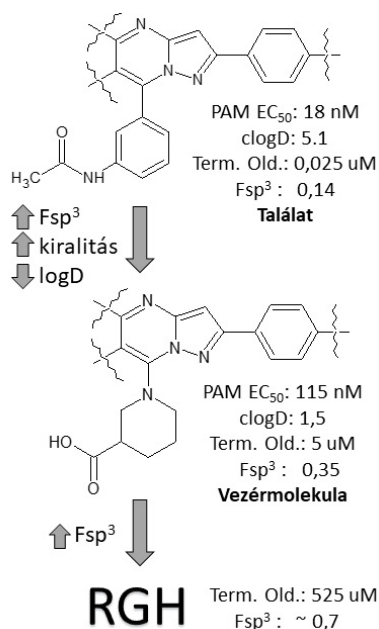
el a kutatókat<sup>8</sup>. Ugyanakkor az aromás rendszerek helyett telített  $sp^3$  szénatomok alkalmazása szintén kézenfekvő módszer lehet a kiaknázzható kémiai tér növelésére<sup>9</sup>. Utóbbi megközelítéssel az előállított molekulák nagyobb hasonlóságot mutatnak a természetes anyagokkal, amelyekből kiindulva a korábbiakban számos komplex szerkezetű gyógyszermolekulát állítottunk elő. Az  $sp^3$  szénatomok számának növelése lehetőséget teremt hatékonyabb fehérje-ligandum kölcsönhatás kialakítására, ezzel javítva a hatékonyságot és szelektivitást. Az aromaticitás csökkentése az oldékonyságot egyértelműen javítja. Ennek okán bevezetésre került a molekulák komplexitását leíró  $Fsp^3$ <sup>8</sup>, amely az összetett fizikokémiai metrikákat kiegészítve teljes képet ad a gyógyszerjelölt molekulák minőségéről.

Kimondható, hogy a leírtak alapján a szájon át adható, agyi felszívódással is rendelkező molekulák tervezéséhez és az optimalizációs folyamatok nyomon követéséhez ma már nagyrészt kidolgozott elméleti támogatás áll a gyógyszerkémikusok rendelkezésére. Az is világosan látható, hogy a célok eléréséhez – sokszor természetes anyagokhoz hasonló – magas komplexitású gyógyszerjelölt molekulákra van szükség. Ez sok esetben akár több kiralitás centrumot és kevés aromás gyűrűt tartalmazó vegyületek szintézisével valósítható meg. Királis molekulák szintézise viszont még ma is nehezen képzelhető el a klasszikus rezolválási módszerek (leginkább a diasztereomer sóképzés) alkalmazása nélkül, ugyanakkor egyre nagyobb figyelmet kapnak a királis organokatalitikus metodikák is, és végül, de nem utolsósorban, ki kell hangsúlyozni az egyre nagyobb teret nyerő enzimkatalizált reakciókat. Technológiai szempontból a jövőben az áramlásos kémiai módszerek térnyerésével számolhatunk, hiszen amellett, hogy ennek segítségével kiszélesedett paraméter térrel dolgozhatunk, ez a magas biztonsági kockázatú reakciók és az egyre nagyobb figyelmet kivívó fotokémiai reakciók ipari megvalósításának is a színtere lehet.

A Richterben 2008-ban indított GABAb projektben pozitív allosztérikus modulátor (PAM) molekulákat kívántunk azonosítani. A HTS találatokat nem találtuk fejleszthetőnek tekintettel arra, hogy az azonosított mikromólos hatékonyságú találatok lipofilitása magas volt. Versenytársaink által azonosított és publikált szerkezetek is hasonlóan előnytelen tulajdonságokkal rendelkeztek, rendre planáris, magas lipofilitású és szinte oldhatatlan molekulákat azonosítottak találatként. Részletes szerkezeti információk hiányában néhány azonosított szerkezetből arra következtethettünk, hogy az allosztérikus kötőhelyen kevés hidrogén hidas kötés kialakítására van lehetőség, így feltehetően a publikált molekulák kötődésének hajtóereje a deszolvatáció. A célfehérjéről szerkezeti információk nem álltak rendelkezésre, így a már korábban szintetizált vegyületek segítségével építettünk *in silico* farmakofór modellt, melynek segítségével 122 különbözően szubsztituált, zömében aromás heterociklust állítottunk elő. Az előállított molekulák között számos szubmikromólos hatékonyságú molekulát azonosítottunk, de az általában alacsony  $sp^3$  hányad okán, nem meglepő módon sok esetben szinte oldhatatlan molekulákat kap-

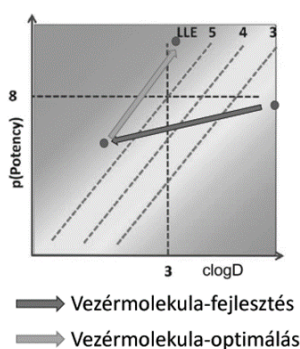


tunk. Végül a tovább finomított *in silico* farmakofór modell alapján kiválasztott és előállított molekulát már nanomólos hatékonyság mellett szerény termodinamikai oldékonyság is jellemezte. Ebben molekulában a pirazolo-pirimidin aromás heterociklushoz közvetlenül két további aromás fenil gyűrű kapcsolódott. A vezérmolekula-fejlesztés során kvázi *scaffold-hopping* megközelítéssel sikerült a molekula planaritását megtörni, hovatovább egy királis helyzetben lévő karboxil-csoport beépítésével közel négy nagyságrenddel csökkentettük a lipofilitást és ezzel párhuzamban két nagyságrenddel növeltük a termodinamikai oldékonyságot (6. ábra; iparjogvédelmi okok miatt csak részszerkezeteket mutatunk be). A kiválasztott vezérmolekulában a gyógyszeryszerűség szignifikáns javulásának viszont a hatékonyság egy nagyságrenddel történő csökkenése volt az ára. A vezérmolekula optimalizálás során a gyógyszeryszerűség megtartása mellett a hatékonyság javítása volt a célunk.



6. ábra. GABAB PAM optimalizáció

Az optimalizálás során az aromás gyűrűk további csökkentése és ezzel párhuzamban az  $sp^3$  hányad további növelése mellett sikerült eljutnunk a projekt első gyógyszerjelölt molekulájához (RGH).



7. ábra. GABAB PAM optimalizáció – grafikus elemzés

A grafikus ábrázolás (7. ábra) segítségével jól szemléltethető, hogy a vezérmolekula-fejlesztés (*Hit to Lead*) során a gyógyszeryszerűség nagyságrendekkel történő javítását hajtottuk végre, míg a vezérmolekula-optimalizálás (*Lead optimalizálás*) során a már elért lipofil ligandum hatékonyság (LLE) megtartása mellett sikerült a hatékonyságot nanomólos nagyságrendre növelni.

Végezetül ki kell emelni, hogy a hagyományos fehérje célpontokat és modulációkat, sok esetben új fehérje-fehérje kölcsönhatáson, vagy a már említett allosztérikus moduláción alapuló megközelítések fogják felváltani. Ennek következménye, hogy a már jól megismert fizikokémiai téren kívül eső területeket is fel kell térképezni. Ennek a kihívásnak való megfelelés azonban továbbra is a molekulák komplexitásának emelésével lesz kezelhető, miközben a szintetizált molekulák paramétereit továbbra is úgy kell egyensúlyban tartani, hogy klinikai vizsgálatokra alkalmas farmakokinetikájú és farmakodinámiai hatással bíró gyógyszerjelölt molekulákat azonosítsunk.

## Hivatkozások

- Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, 23, 3-25. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1)
- Wager, T. T.; Hou, X.; Verhoest, P. R.; Villalobos, A. *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, 1, 435-449. <https://doi.org/10.1021/cn100008c>
- Ferenczy, G. G.; Keserü, Gy. M. *Drug Discov Today* **2010**, 15, 919-932. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.08.013>
- Szabó, Gy., Túrós, Gy. I., Kolok, S., Vastag, M., Sánta, Zs., Dékány, M., Lévy, Gy. I., Greiner, I., Natsumi, M., Tatsuya, W., Keserü, Gy. M. *J. Med. Chem.* **2019**, 62, 234-276. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00161>
- Hopkins, A. I., Groom, C. R., Alex, A.: *Drug Discov. Today* **2004**, 9, 430-431. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03069-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03069-7)
- Keserü, Gy. M., Makara, G. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2009**, 8, 203-212. <https://doi.org/10.1038/nrd2796>
- Leeson, P. D., Springthorpe, B., *Nat. Rev. Drug Disc.* **2007**, 6(11), 881-890. <https://doi.org/10.1038/nrd2445>
- Boström, J., Brown, D.G., Young, R. J., Keserü, Gy. M. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2018**, 17, 709-727. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.116>
- Lovering, F., Bikker, J., Humblér, C. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 6752-6756. <https://doi.org/10.1021/jm901241c>

**CNS research at a multinational pharmaceutical company – lessons learned in the past 15 years, current methodologies in medicinal chemistry**

The high cost of drug discovery combined with high attrition rates of preclinical and clinical candidates has prompted the pharmaceutical community to take action to improve the quality of development candidates. It was hypothesized that the shift to high throughput synthetic practices could be a factor that may predispose the molecules to fail.

More than twenty years have passed since the seminal paper by Lipinski was published wherein the rule of five (Ro5) hypothesized the increase of the likelihood of a compound being orally active by having calculated properties and descriptors similar to oral drugs. The medicinal chemists have become increasingly aware of the value of tracking calculated physical properties. The optimization of physical properties is fundamental to successful drug discovery. Aqueous solubility is a desirable property to have in a drug molecule, facilitating delivery to the pharmacological target. The hydrophobicity (the commonly used synonym of lipophilicity) of a compound is a measure of the preference of the compound to reside in lipid over an aqueous environment; this has an implied inverse link to aqueous solubility, and is fundamental to many other interactions vital to achieve a potent and selective pharmacological action. An estimation of lipophilicity is perhaps the key descriptor in the design of potential drug molecules; it is fundamental to establishing structure-property relationships and to the many predictive models of pharmacokinetic parameters used in medicinal chemistry.

Beside lipophilicity of the compound quality literature has focused on ligand efficiency metrics which quantify binding affinity per unit of physical property. The most widely used ligand efficiency metrics are calculated in a simple way. Among a number of measures proposed ligand efficiency (LE), lipophilic ligand efficiency (LLE) and lipophilicity dependent ligand efficiency

(LELP) have attracted the most attention. Monitoring ligand efficiency metrics during the optimization phases can highlight the price paid in physicochemical properties when modulating binding affinity. Applying ligand efficiency analyses has a practical utility in guiding lead optimization towards a clinical candidate.

Guidelines of thermodynamics-driven optimization have been published as well, which suggest discriminating between entropy-driven and enthalpy-driven optimizations. How structural modification will affect the enthalpy or entropy of the binding is difficult, but there are some general trends. Introduction of new polar interactions between the ligand and the target binding site is usually associated with lower lipophilicity and improvements in binding enthalpy. Contrary, during entropy-driven optimization the increased size and lipophilicity generate improvements in affinity. Putatively the entropy-driven approach contributes to the well documented inflation of physicochemical properties in the optimization campaigns. Nevertheless, it can be concluded that thermodynamically balanced strategies could serve better outcome in compound quality.

Over the past few years, the degree of aromaticity of molecules has been increasingly used to show how an excess of aromatic character is likely to lead to undesired physicochemical properties. Over the past decade diversity oriented synthesis has evolved with the aim to prepare architecturally more complex molecules with high fraction of  $sp^3$  carbon atoms (Fsp3). The rationale behind this is that these molecules are more natural-like and more amenable to explore additional areas of chemical space. We demonstrated in an example that complexity (high Fsp3) and the presence of chiral center contributed to the transition of a lead compound to clinical testing.