



PHARMAROUND

Preklinický a klinický výzkum a vývoj léčiv

Dr. Kamil Paruch

Schering-Plough Research Institute, Kenilworth, NJ, USA
Ústav chemie, Masarykova univerzita, Brno

- *CDK inhibitor SCH 727965 (dinaciclib)*



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



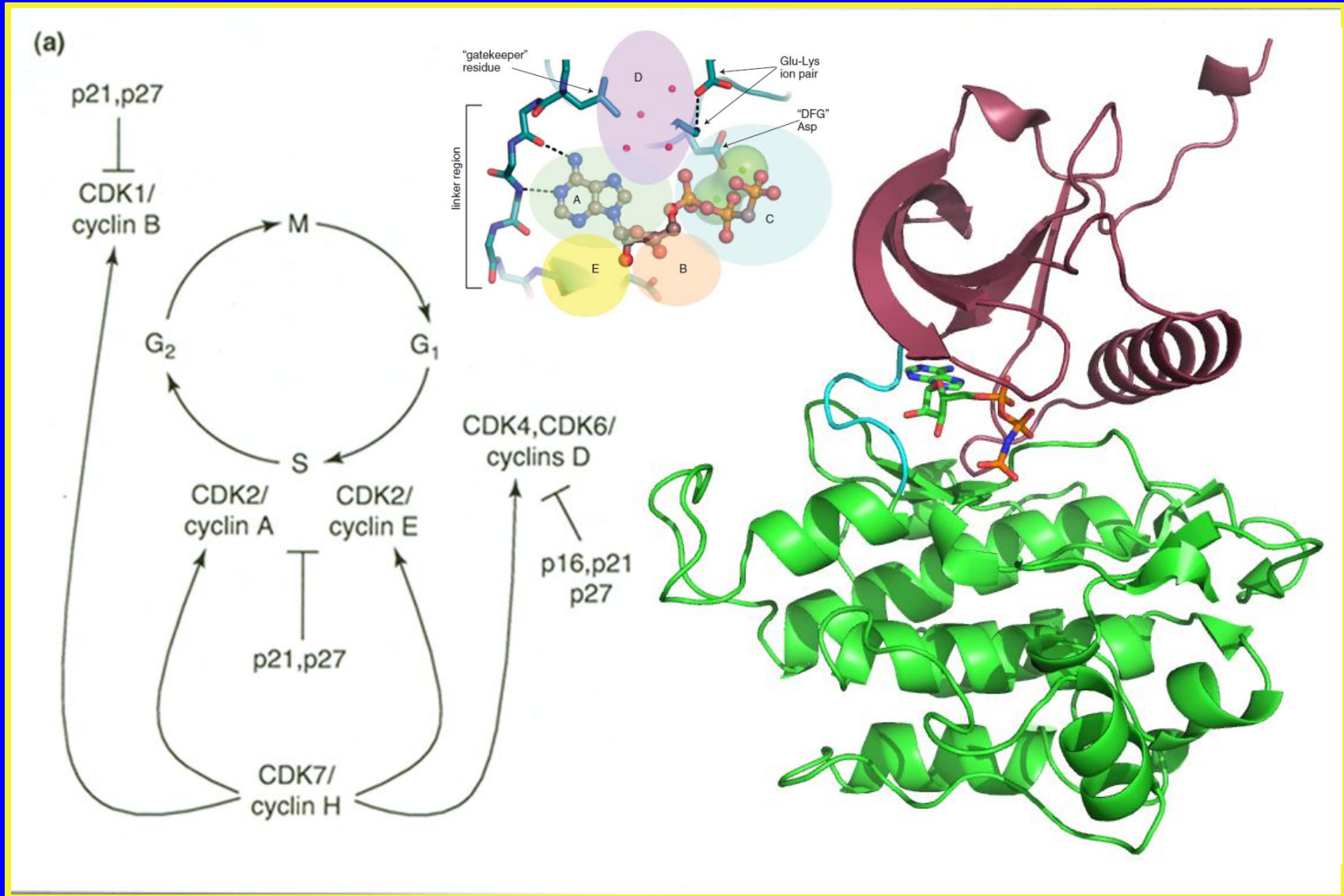
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Cyklin-dependentní (CDK) kinázy patří mezi klíčové regulátory buněčného cyklu



Proč by mohla být inhibice CDK terapeuticky atraktivní?

- eliminace funkce CDK1 a CDK2 (pomocí siRNA) způsobila:
 - **apoptózu v nádorových buňkách**
 - **reverzibilní inhibici růstu v normálních buňkách**

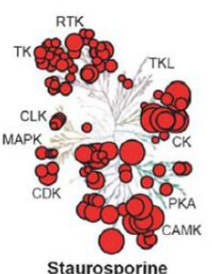
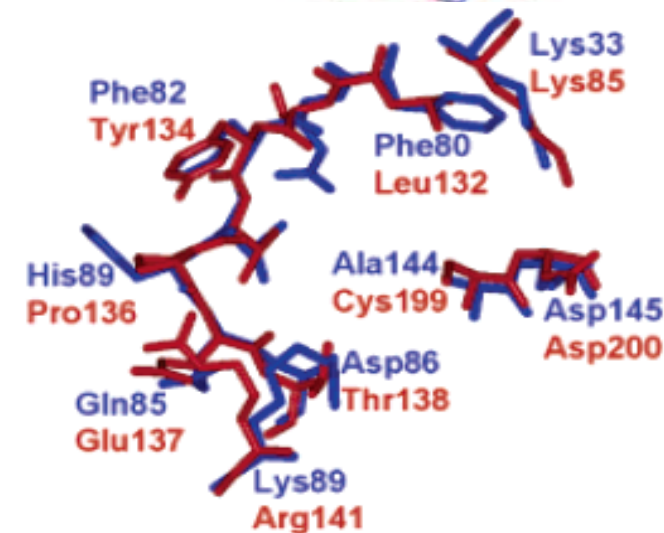
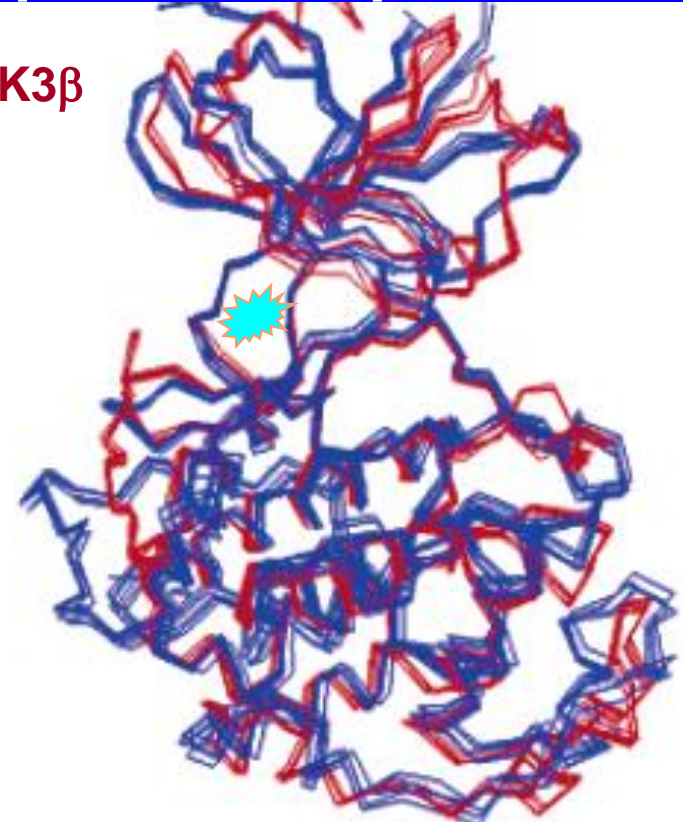
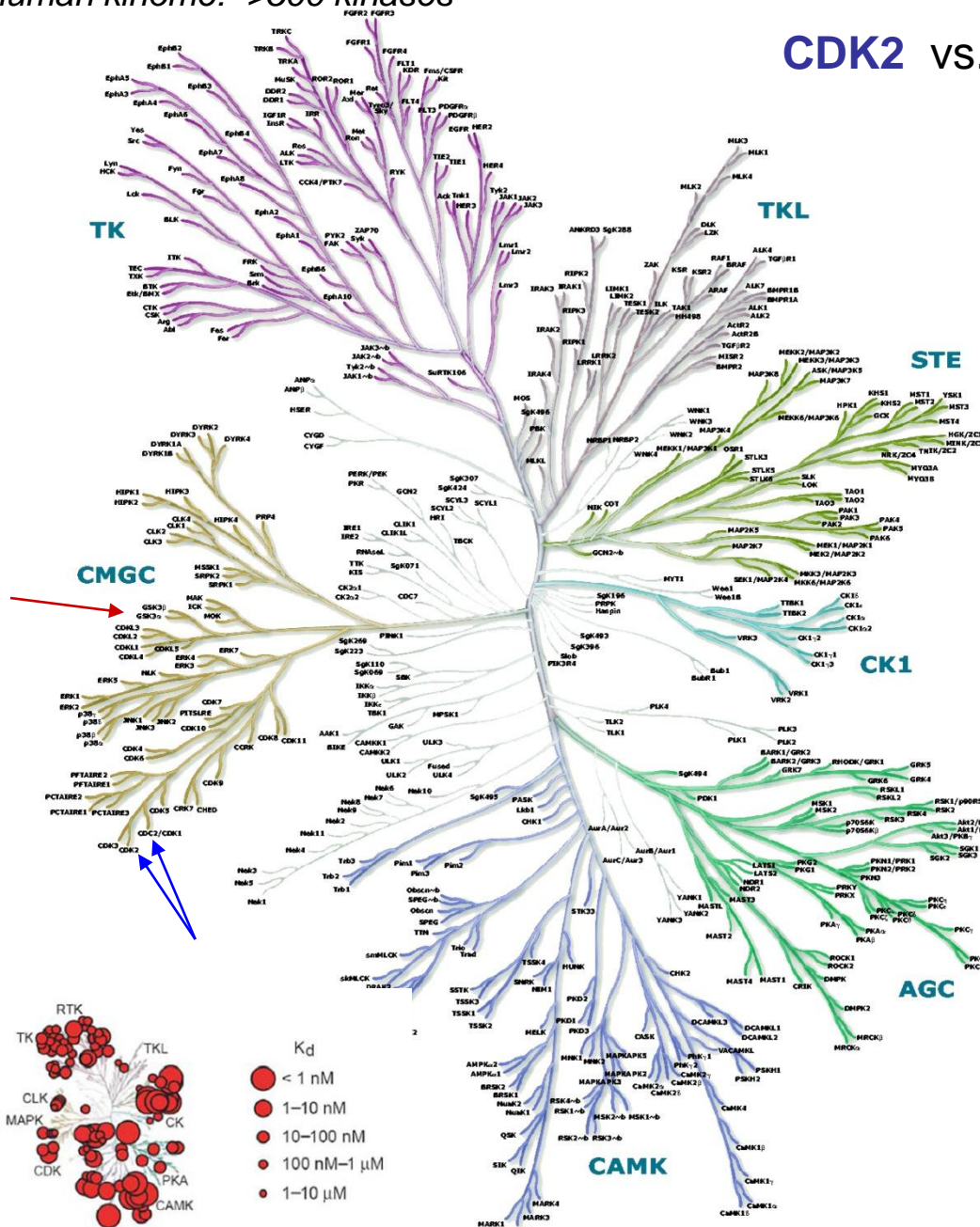
ale: odstranění proteinu (pomocí siRNA) nemusí dát stejnou odezvu jako jeho farmakologická inhibice (pomocí malých organických molekul)

Weiss, W. A.; Taylor, S. T.; Shokat, K. M. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 739.

Selektivita organických inhibitorů – potenciální problém

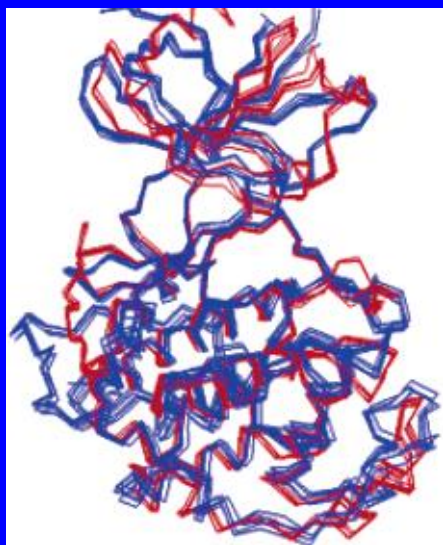
human kinome: >500 kinases

CDK2 vs. GSK3β

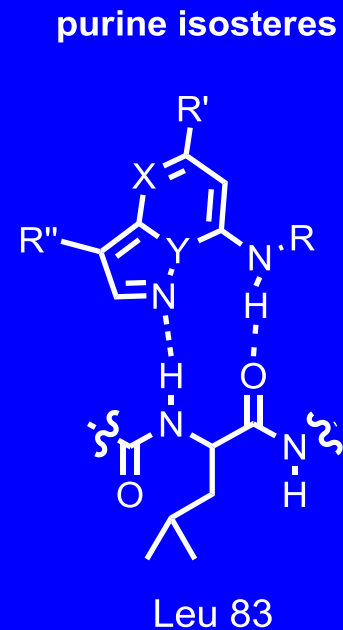
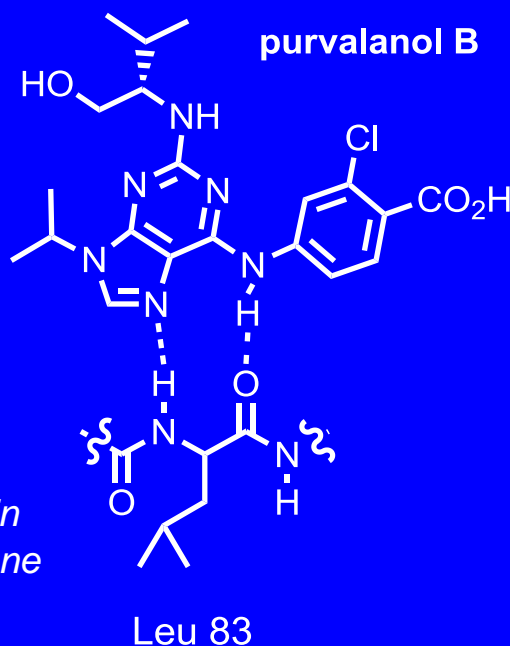


Identifikace výchozí sloučeniny (lead)

- molekulové modelování: dokování struktur do aktivního (ATP) místa kinázy; interakce s „páteří“ (backbone) proteinu vodíkovými vazbami

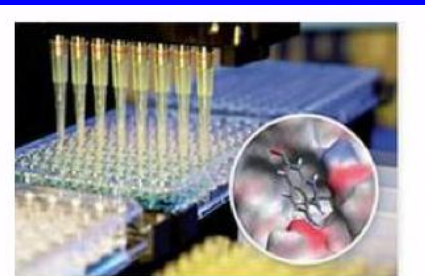
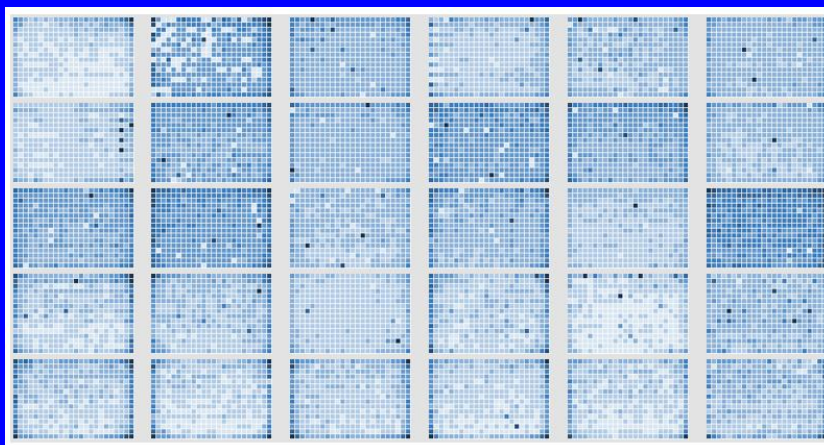
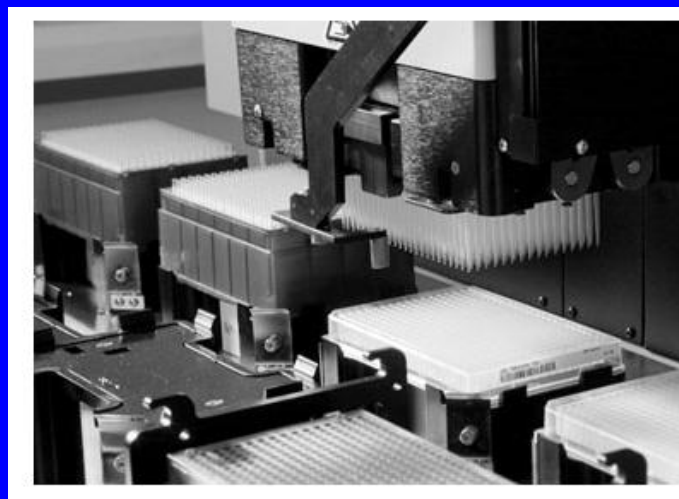


protein backbone



- indazoly – akceptovatelná aktivita *in vitro* ($IC_{50} < 50$ nM), ale inaktivní v buněčné eseji.
~0,03 mg/L

- vysokokapacitní (high-throughput) screening: stávající kolekce sloučenin (~1,5 mil.) plus menší série potenciálních purinových isosterů



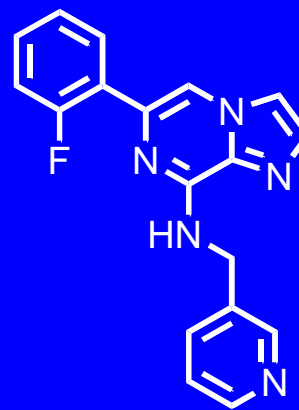
➤ nalezeny dvě třídy aktivních sloučenin



pyrazolo[1,5-a]pyrimidiny

Compound A

CDK2 IC₅₀ = 0.50 uM



imidazo[1,2-a]pyraziny

Compound B

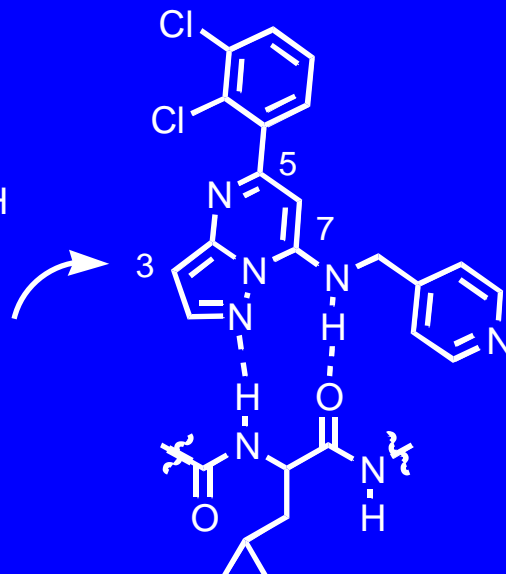
CDK2 IC₅₀ = 0.8 uM



Leu 83

Purvalanol B

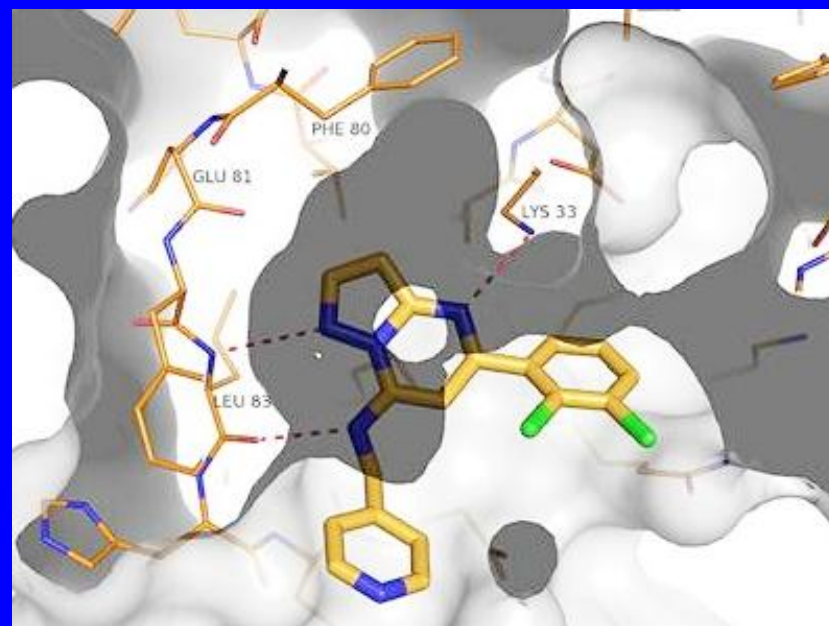
CDK2 IC₅₀ = 0.009 uM



Leu 83

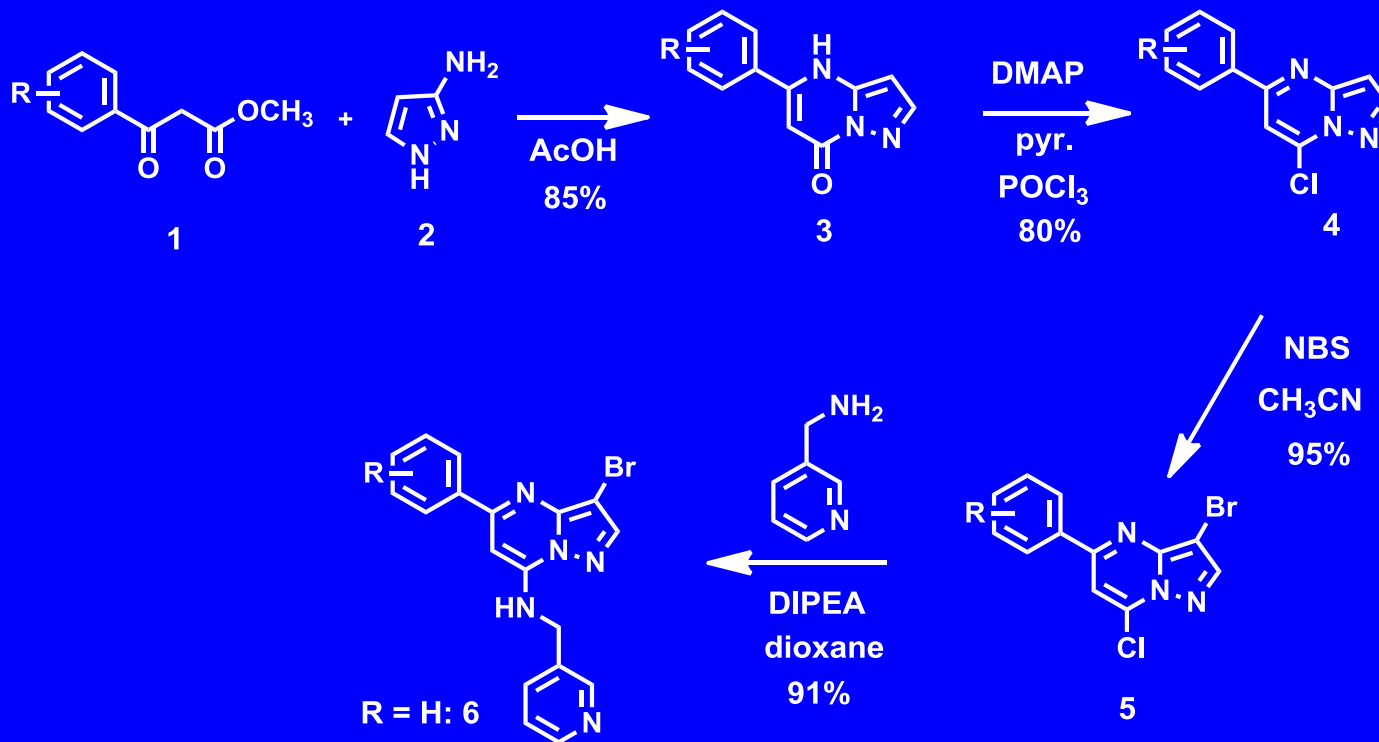
Compound A

CDK2 IC₅₀ = 0.50 uM



krystalová struktura: A v CDK2

Syntéza pyrazolo[1,5-a]pyrimidinů



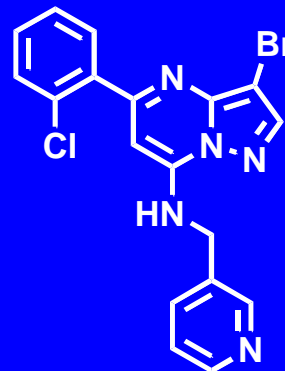
Substituce polohy 3: zvýšení aktivity



Compound A

CDK2 IC_{50} = 0.50 μ M

Thym. IC_{50} = 21 μ M



Compound A1

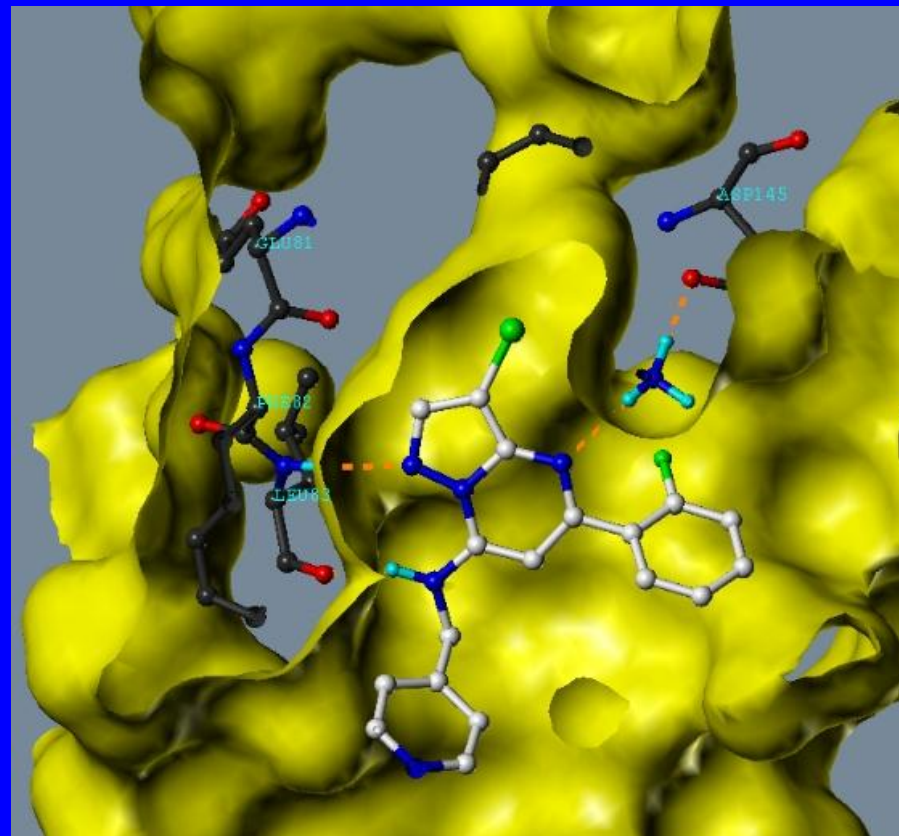
CDK2 IC_{50} = 0.003 μ M

Thym. IC_{50} = 0.48 μ M

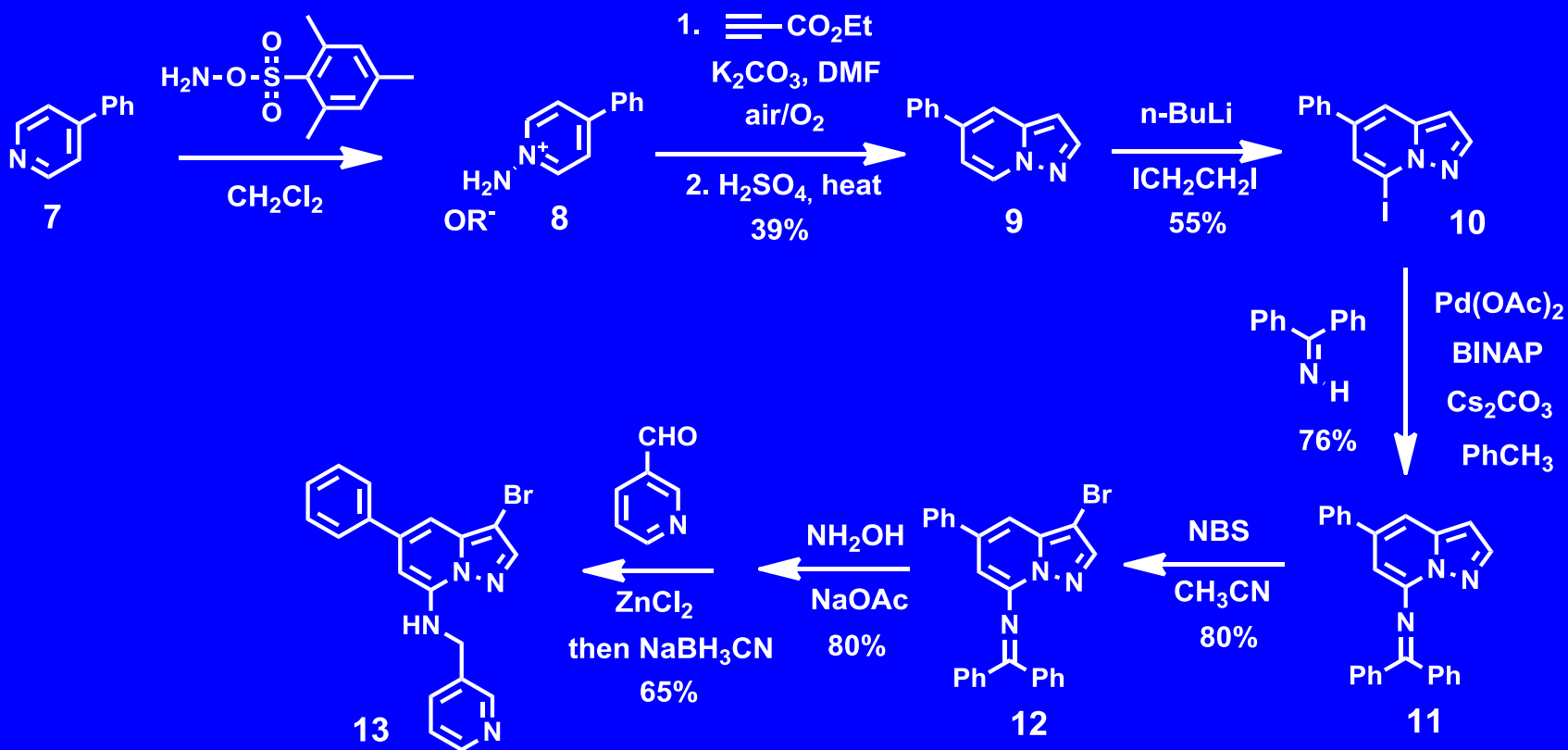
Následný postup: evaluace podobných heterocyklických motivů:



- různá schopnost interakce s proteinem pomocí vodíkových můstků?



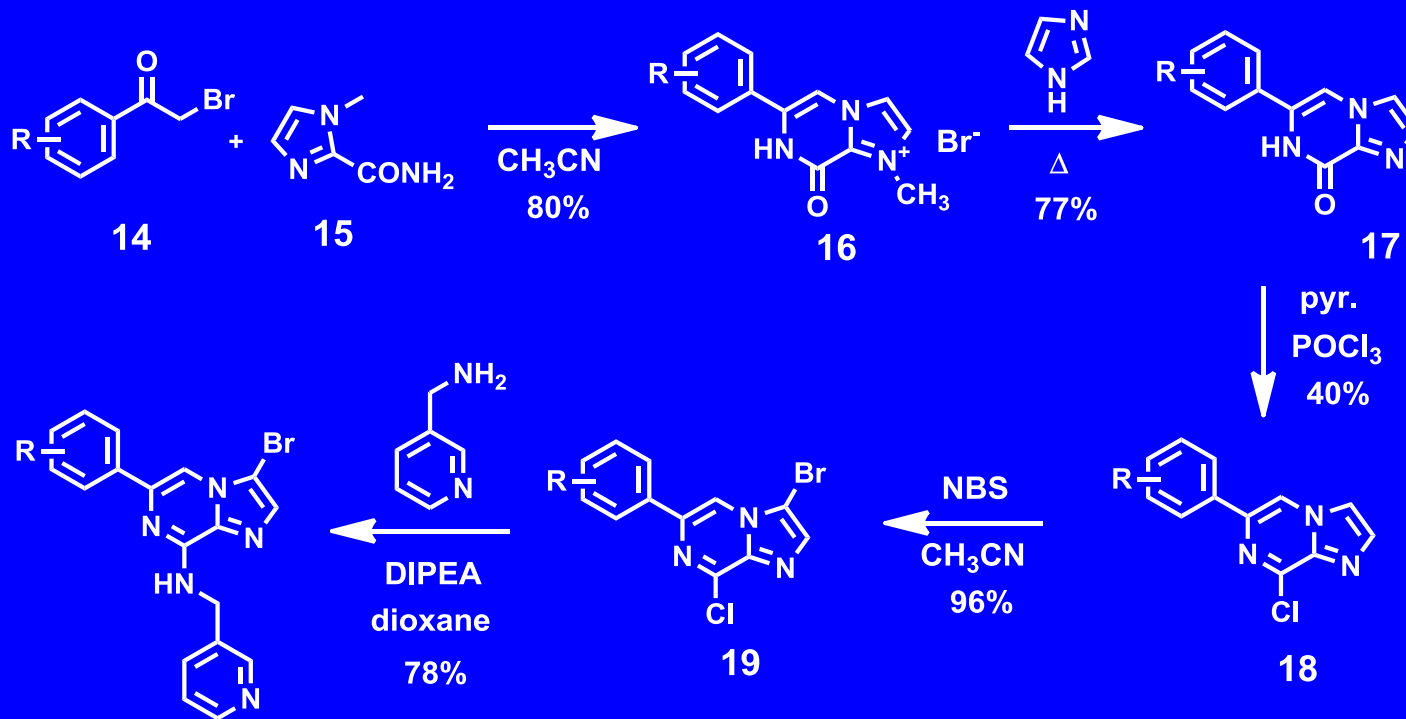
Syntéza pyrazolo[1,5-a]pyridinů



$\text{IC}_{50} = 1.87 \text{ uM}$

(pyrazolopyrimidine 6
 $\text{IC}_{50} = 0.011 \text{ uM}$
 thym. $\text{IC}_{50} = 0.39 \text{ uM}$)

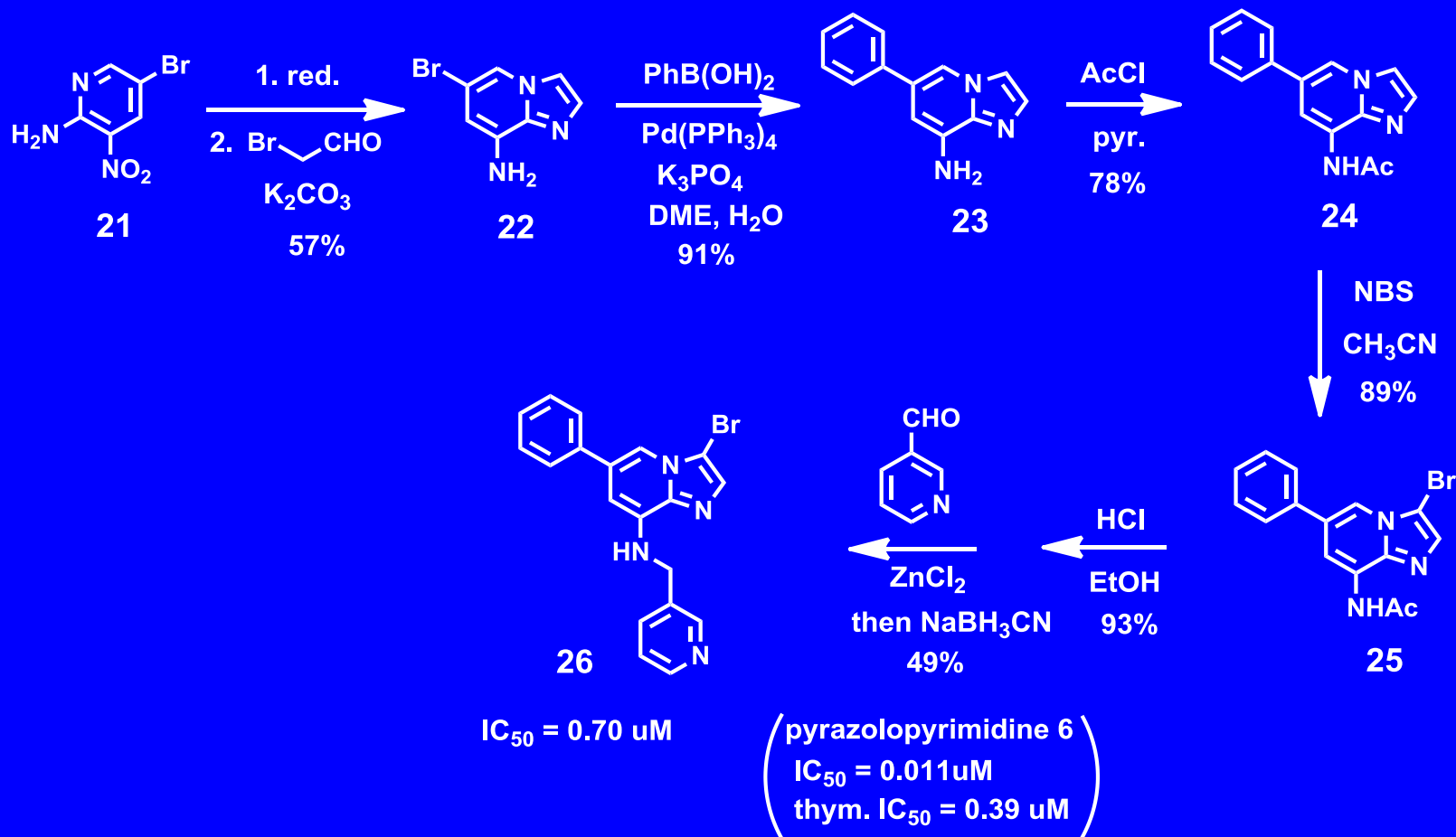
Syntéza imidazo[1,2-a]pyrazinů



R = H: **20**
 $\text{IC}_{50} = 0.44\mu\text{M}$
thym. $\text{IC}_{50} = 2.0\ \mu\text{M}$

(pyrazolopyrimidine **6**)
 $\text{IC}_{50} = 0.011\mu\text{M}$
thym. $\text{IC}_{50} = 0.39\ \mu\text{M}$

Syntéza imidazo[1,2-a]pyridinů



CDK2 aktivita testovaných heterocyklů



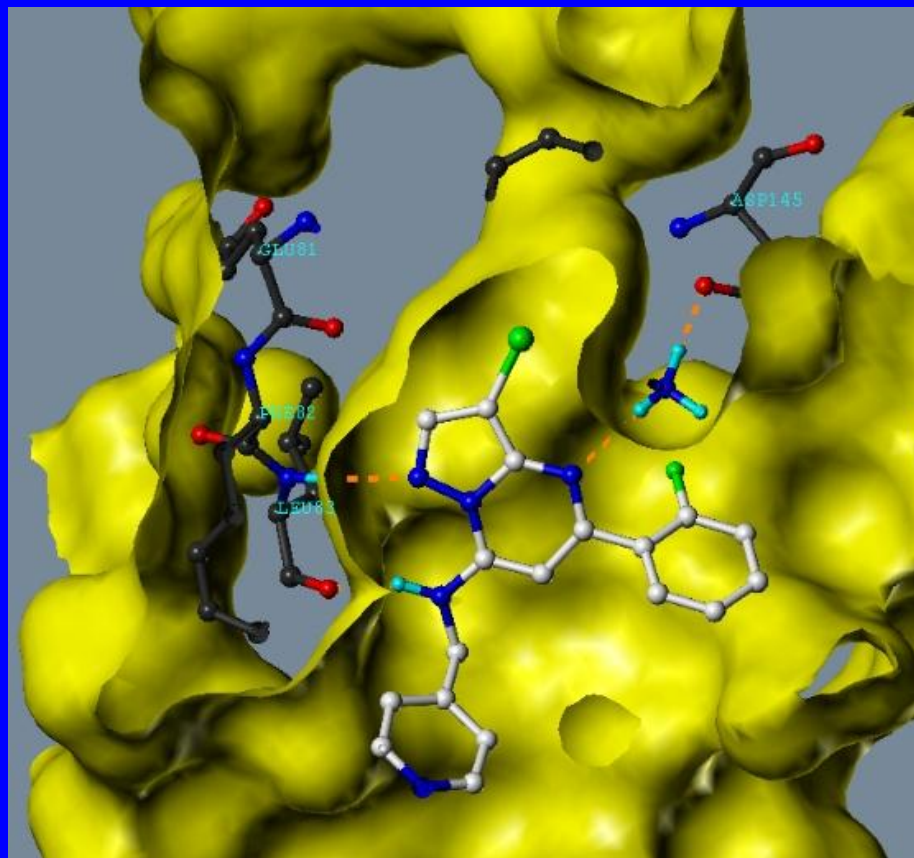
<



<



<<



➤ *vývoj detailnější ho SAR pyrazolo[1,5-a]pyrimidinů*

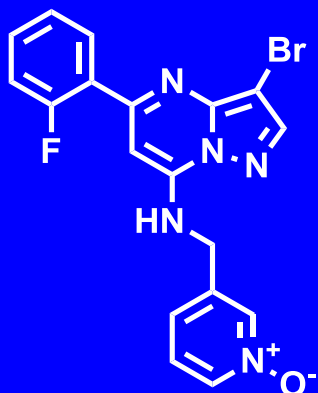
Potvrzení původního konceptu

Identifikace sloučeniny s akceptovatelnou aktivitou v buňkách?

Je možné dosáhnout terapeutického indexu?

Demonstrace aktivity *in vivo*?

Kandidát k testům in vivo



Compound 27

In Vitro IC₅₀'s (uM)

CDK2/E = 0.031

CDK2/A = 0.030

CDK1 = 0.045

CDK4 = 0.045

MAPK = 1.2

GSK3b = 0.15

3A4, 2D6, 2C9, 2C19 > 30 uM

In-Cell, thy uptake, A2780

IC₅₀ (10% FBS) = 0.16 uM

IC₉₀ (10% FBS) = 0.29 uM

hERG

Rb: 17% @ 1.5 uM

Rb: 44% @ 5 uM

VC: IC₅₀ = 3.2 uM

Mouse PK (IV/PO, 5 mpk)

AUC = 8.4 uM.hr

C_{max} = 5.8 uM

IV t_{1/2} = 2.4 hrs

(NOEL)

Rat PK (IV/PO, 5/10 mpk)

PO AUC = 34.5 uM.hr

C_{max} = 4.4 uM

IV t_{1/2} = 5.9 hrs

clearance = 18 mL/min/kg

(IV, PO NOEL)

Monkey PK (IV/PO, 1/5 mpk)

PO AUC = 29.9 uM.hr

C_{max} = 2.5 uM

IV t_{1/2} = 11.0 hrs

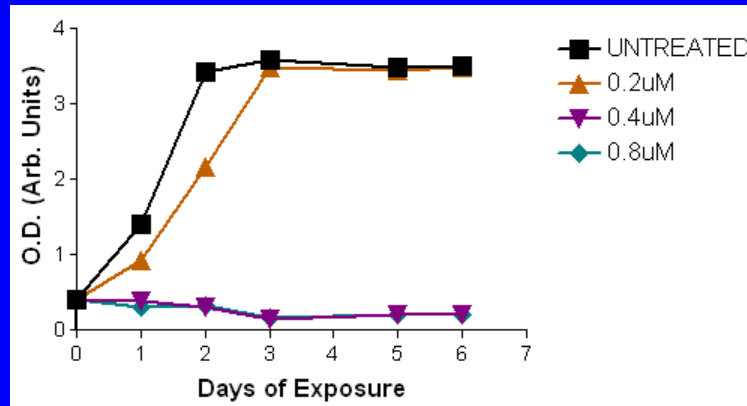
(IV: NOEL; PO: 2/3 diarrhea)

- účinnost *in vivo*: A2780 (ovarian): 96% I @ 40 mpk, qd; MiaPaCa (pancreatic): 77% I @ 40 mpk, qd.
- špatná rozpustnost – sloučeninu není možné dávkovat IV.

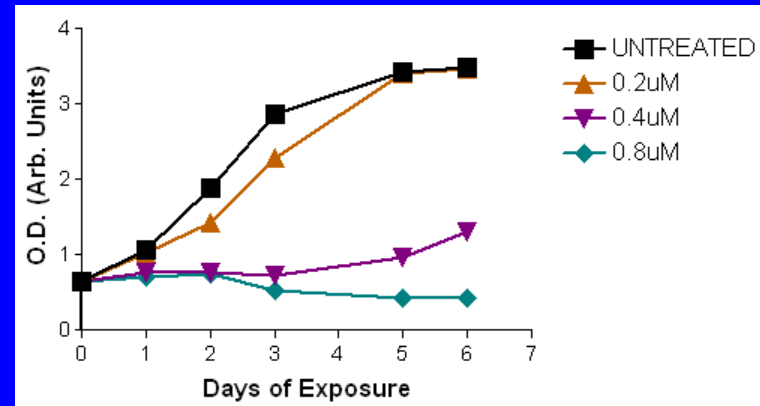
Aktivita v buňkách/terapeutický index

Compound 27: kontinuální expozice

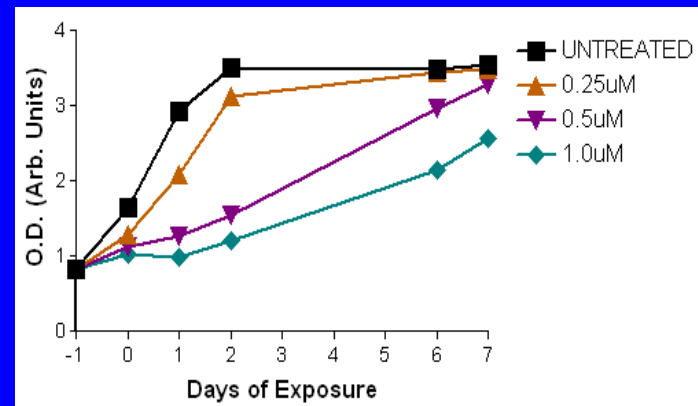
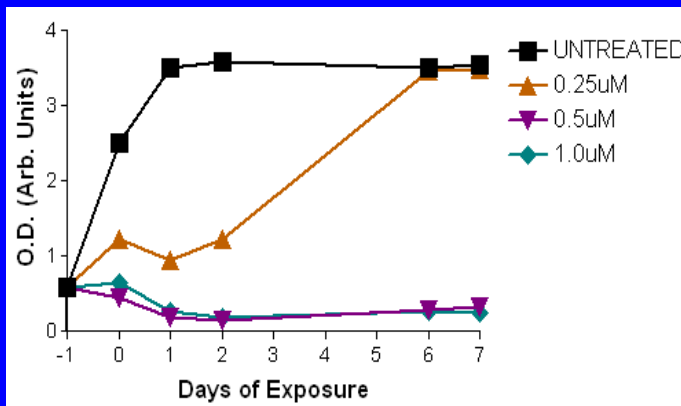
A2780 (nádor)



WS1 (normální)



Compound 27: pulzní expozice



- Buňky vystaveny rozpouštědлу, sloučenině při koncentracích IC_{50} , IC_{90} , $2 \times IC_{90}$ 24 h
- Sloučenina vymyta, buňky dále pozorovány

➤ buněčné kultury reagují odlišně

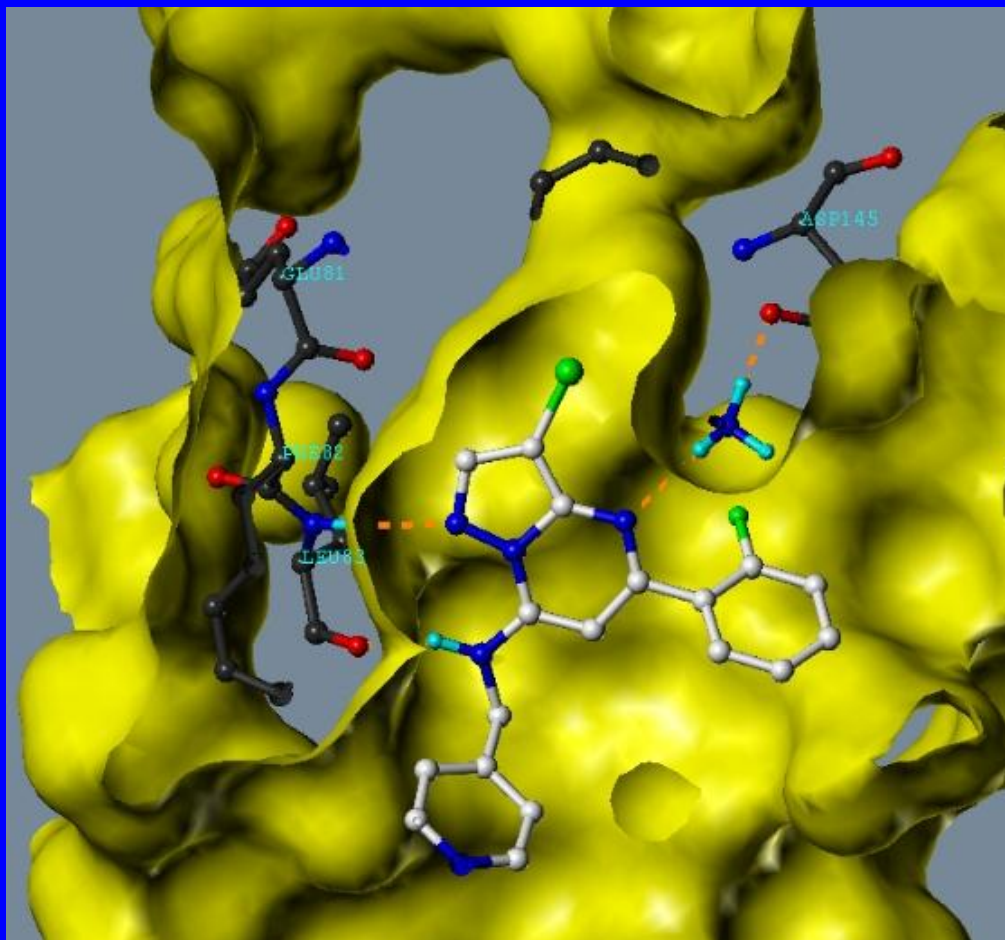
A2780
WS1



Apoptóza
Inhibice růstu

Další SAR

- celkem připraveno >8000 sloučenin



Pozice 3:

- poměrně malá hydrofobní kavita
- omezená možnost substituce.
- Br, Cl, ethyl optimální.

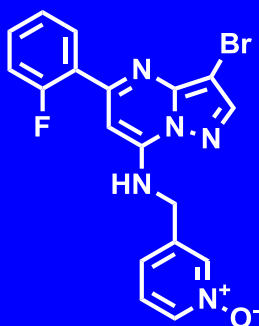
Pozice 5:

- Různé polární/nepolární skupiny tolerovány..
- Afinita k OH: možnost zlepšení aktivity.

Pozice 7:

- Otevřená (vodnému) prostředí; široká škála substituentů tolerována.
- Možnost ovlivnění fyzikálně-chemických vlastností (rozpuštnost apod.).

Sloučeniny s lepší aktivitou a PK profilem



Compound 27

CDK2/A IC_{50} = 0.030 μ M

Thy. IC_{50} = 0.16 μ M

Rat PK (IV/PO, 5/10 mpk)

PO AUC = 34.5 μ M.hr

IV $t_{1/2}$ = 5.9 hrs

Monkey PK (IV/PO, 1/5 mpk)

PO AUC = 29.9 μ M.hr

IV $t_{1/2}$ = 11.0 hrs



Compound 28

CDK2/A IC_{50} = 0.016 μ M

Thy. IC_{50} = 0.16 μ M

Rat PK (IV/PO, 5/10 mpk)

AUC = 28 μ M.hr

IV $t_{1/2}$ = 2.1 hr

Monkey PK (IV/PO, 2/10 mpk)

AUC = 71 μ M.hr

$t_{1/2}$ = 12 hrs



Compound 31

CDK2/A IC_{50} = 0.018 μ M

Thy. IC_{50} = 0.025 μ M

Rat PK (IV/PO, 2/10 mpk)

AUC = 15 μ M.hr

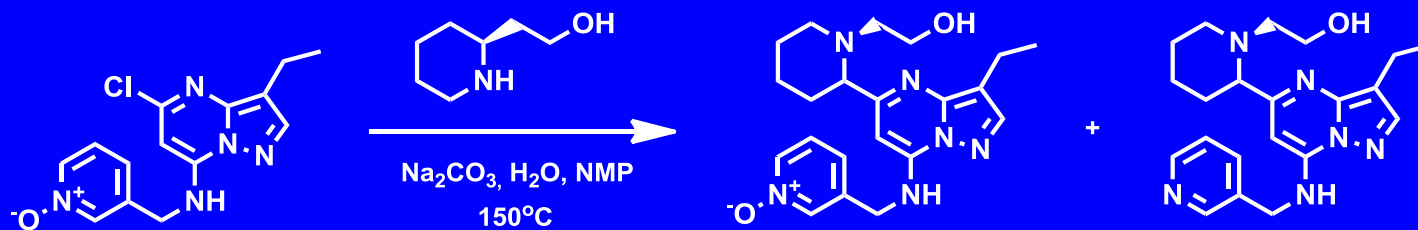
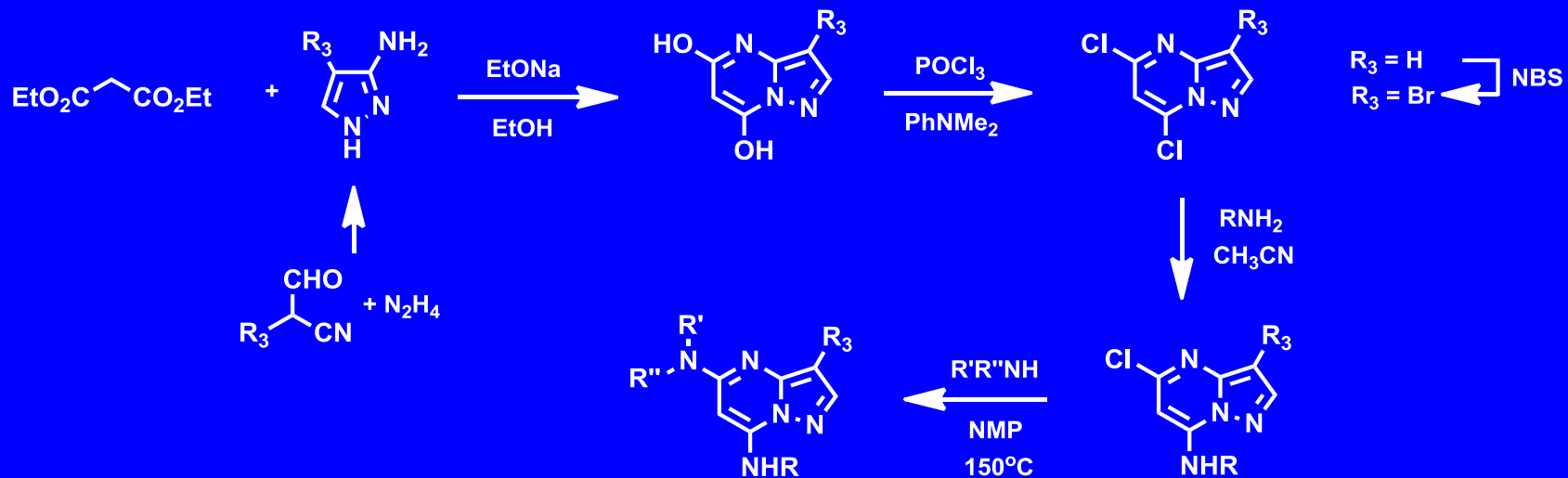
IV $t_{1/2}$ = 3.6 hr

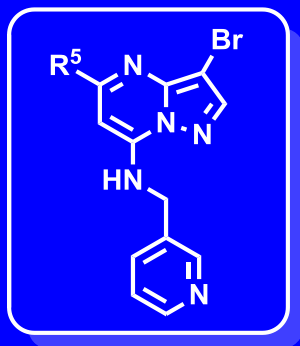
Monkey PK (IV/PO, 0.5/1 mpk)

AUC = 10 μ M.hr

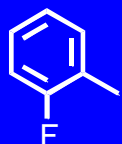
$t_{1/2}$ = 12 hrs

C-N (O,S) substitute na pozici 5



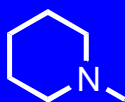


Pozice 5: substituce aminoalkoholy



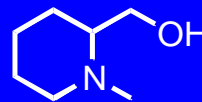
Compound 60

CDK2 IC_{50} = 0.011 μ M
Thy. IC_{50} = 0.48 μ M



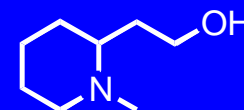
Compound 61

CDK2 IC_{50} = 0.063 μ M
Thy. IC_{50} = 2.5 μ M



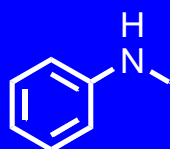
Compound 62

CDK2 IC_{50} = 0.027 μ M
Thy. IC_{50} = 0.26 μ M



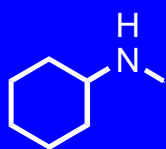
Compound 63

CDK2 IC_{50} = 0.0004 μ M
Thy. IC_{50} = 0.006 μ M



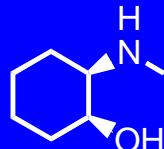
Compound 64

CDK2 IC_{50} = 0.063 μ M
Thy. IC_{50} = 1.1 μ M



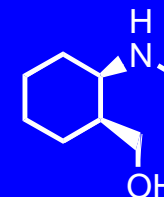
Compound 65

CDK2 IC_{50} = 0.018 μ M
Thy. IC_{50} = 0.85 μ M



Compound 66

CDK2 IC_{50} = 0.006 μ M
Thy. IC_{50} = 0.2 μ M



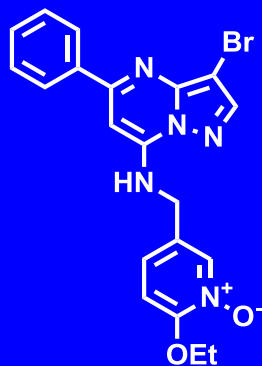
Compound 67

CDK2 IC_{50} = 0.0003 μ M
Thy. IC_{50} = 0.002 μ M

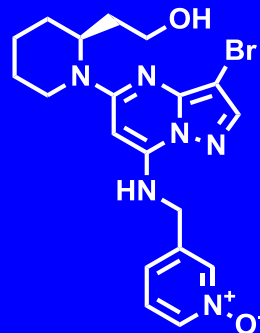
- zavedení aminoalkoholů: zlepšení aktivity a rozpustnosti, zhoršení metabolické stability a PK profilu.

Jaký je optimální profil našeho CDK inhibitoru?

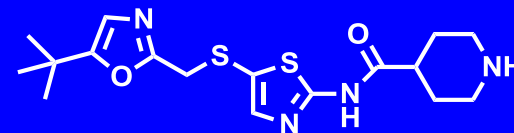
- Dvě odlišné série:
 - např. **Compound 31**: akceptovatelná aktivita v buňkách, velmi dobrý PK
 - např. **Compound 73A**: velmi aktivní, rychle se metabolizují a vylučují z těla
- Porovnání se „standardními“ CDK inhibitory:
 - **BMS-387032**: průměrná aktivita, rychlé odbourávání
 - **Flavopiridol**: průměrná aktivita, rychlé odbourávání



Compound 31



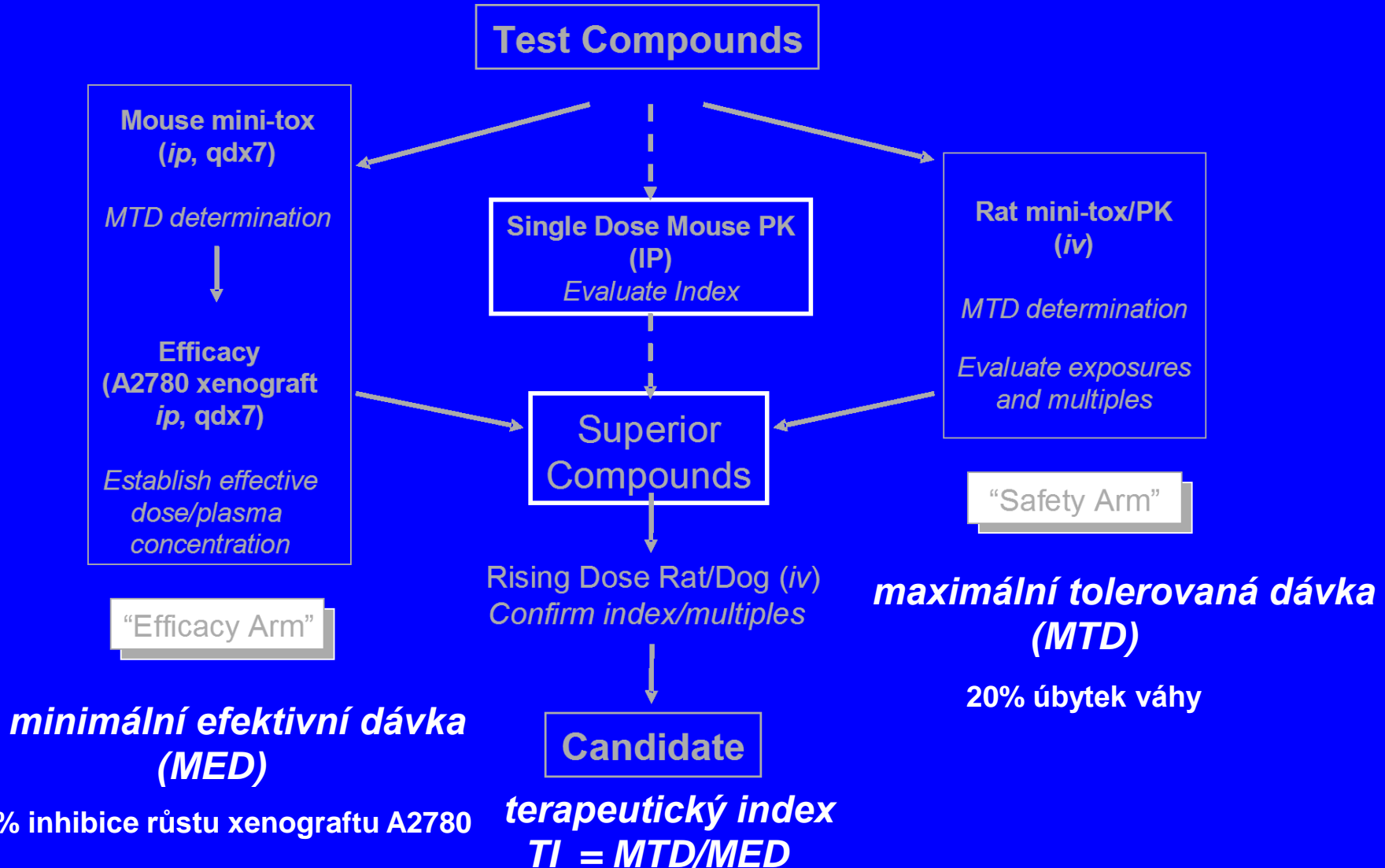
Compound 73A



BMS-387032

In vivo screening

- cíl: identifikace sloučeniny s optimálním profilem
- výstup: terapeutická účinnost při koncentracích nižších než je maximální tolerovaná dávka (MTD)



Parametry jednotlivých sloučenin

Structure	Compound #	CDK2 (CDK1) IC ₅₀ [uM]	In-Cell IC ₅₀ [uM]	mouse IP MTD [mpk]	MED* (%I) →TI**	AUC (uM.hr)	Cmax (uM)
	31	0.018 (0.12)	0.025	5	<5 mpk (68%) → 1-2	10 @ 5 mpk	9 @ 5 mpk
	73A	0.001 (0.008)	0.003	20	<4 mpk (73%) → ~5	1.4 @ 5 mpk	6 @ 5 mpk
	BMS-387032	0.011 (0.068)	0.039	50	25 mpk (58%) → 2-3	6 @ 20 mpk	8 @ 20 mpk

flavopiridol

< 1

- Aminoalkoholová série (vysoká aktivita, krátký t_{1/2}) vykazuje nejlepší terapeutický index.

Identifikace SCH 727965

Structure	Compound #	CDK2 (CDK1) IC ₅₀ [uM]	In-Cell IC ₅₀ [uM]	mouse IP MTD [mpk]	MED* (%I) → TI	AUC (uM.hr)	Cmax (uM)
	73A	0.001 (0.008)	0.003	20	<4 mpk (73%) → ~5	1.4 @ 5 mpk	6 @ 5 mpk
	SCH 727965	0.001 (0.006)	0.004	60	3 mpk** (48%) → >10	1.4 @ 5 mpk	2 @ 5 mpk



vs.



- *in vivo* diferenciace sloučenin s prakticky identickým *in vitro* profilem

SCH 727965 (dinaciclib)



In Vitro

A/CDK2 IC₅₀ = 0.001 μ M
B/CDK1 IC₅₀ = 0.004 μ M
p35/CDK5 IC₅₀ = 0.001 μ M

D/CDK4 IC₅₀ = 0.1 μ M
H/CDK7 IC₅₀ = 0.07 μ M
GSK3b IC₅₀ = 0.78 μ M
MAPK IC₅₀ = 4.1 μ M

UBI Kinase Profiler – **SELEKTIVNÍ**

PanLabs – OK

GPCR – OK

CYP – OK

hERG (VC) – 5% @ 1 μ M (OK)

In Cell

IC₅₀ (A2780) = **0.004 μ M**

Marker IC₅₀ (phospho-Rb) = ~0.01 μ M

Apoptóza po 2 h = 0.025 μ M (BMS-387032 = 1 μ M)

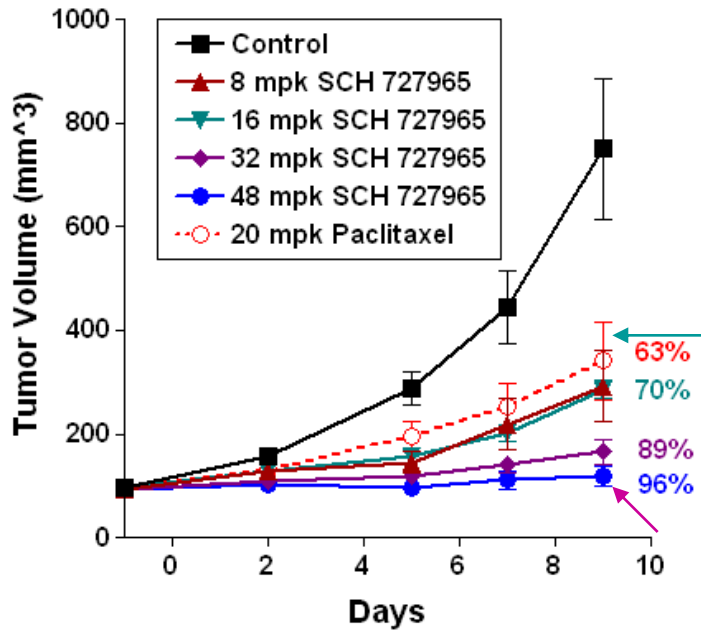
Testován v 106 buněčných liniích:

Linie nádorových buněk - apoptóza

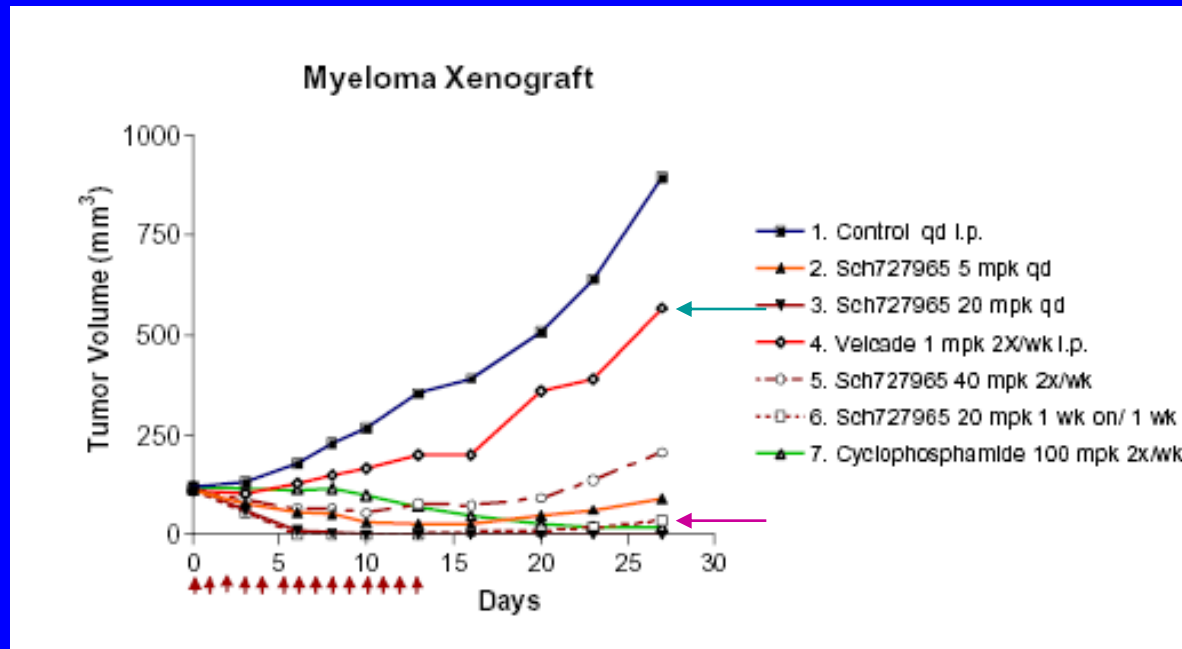
Normální buňky (WS-1) - reverzibilní zastavení buněčného cyklu

SCH 727965 je aktivní in vivo při dávkách < MTD

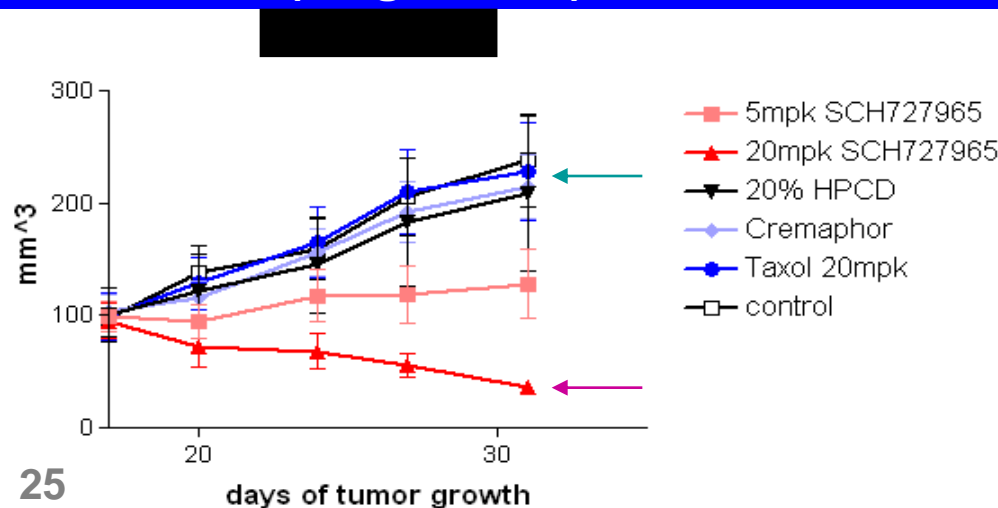
A2780 (ovarian cancer)



RPMI 8226 (multiple myeloma)



A549 (lung cancer)



- model použit pro preklinickou progresi léku Velcade
- kompletní vyléčení ve skupině s dávkou 20 mpk

- kompletní vyléčení ve skupině s dávkou 20 mpk
- žádný efekt na červené krvinky a krevní destičky
- mírné reverzibilní snížení počtu bílých krvinek



PHARMAROUND

The End



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ