**Dizajn, Syntéza a biologické vyhodnotenie série nových AXL TK inhibítorov**

Abstrakt:

Axl TK receptor sa v posledných rokoch ukázal ako nový potenciálny cieľ pre liečbu onkologických ochorení kvôli jeho nadmernej expresii v niekoľkých typoch rakovín, kde sa prejavuje najmä jeho schopnosť podporovať rast a metastázy tumorov. Na identifikáciu malej molekuly inhibítora Axl TK receptoru zostavila táto skupina vedcov homologický model jeho katalytickej oblasti pre praktické zobrazenie a identifikáciu na preukázanie afinity k Axl. Napočítané a na základe štruktúry navrhnuté dizajny tak vyústili do syntézy série 2,4,5-trisubstituovaných pyrimidínov, na ktorých je demonštrovaná možná inhibícia Axl in vitro (IC50-19 nM) a silno inhibovanému rastu niekoľkých pankreatických buniek.

Jadro:

Axl je receptor tyrozín kinázy, ktorý je zahrnutý do procesov ako je rast, diferenciácia, prežívanie a pohyblivosť v rôznych bunkách. Patrí do rodiny TAM TK receptorov, kde tiež patrí aj Mer a Tyro3. Táto rodina je podobná ostatným rodinám tyrozín kináz v tom, že obsahujú intracelulárnu doménu, prestupujú cez membránu, kde z vonkajšej strany obsahujú extracelulárnu doménu. Extracelulárna doména Axl (aj u zvyšných členov rodiny TAM) má jedinečné vlastnosti a štruktúrne prvky podobné molekulám na povrchu buniek, ktoré zabezpečujú adhéziu. Tieto molekuly pravdepodobne hrajú úlohu pri kontakte bunka vs. bunka, avšak tento jav nie je dodnes presne popísaný. Za spustenie signálnej dráhy (a teda za biologický efekt a dopad) je zdpovedný Gas6 ligand viažuci sa na Axl. Naviazanie tohto ligandu spôsobí receptorovú dimerizáciu a autofosforyláciu Axl, čo má následne vplyv na ďalšie signálne dráhy (Pi3K/AKT, MAPK, NF-kB).

V mnohých tumoroch bol Axl zaznamenaný v nadmernej expresii. Prvý krát bol objavený pri ochorení – chronická myeloídna leukémia (CML), aj keď nedávne štúdiá spájajú nadmernú expresiu Axl najmä s „pevnými“ tumormi – tumory prsníka, mozgu, pľúc, pankreasu, prostaty. Výskumy využívajúce genetické prostriedky alebo terapeutické prostriedky (malé molekuly, protilátky) demonštrovali jednoznačný anti-tumorový efekt pri inhibícii Axl na bunkových kultúrach a zvieratách (napr. výskum s monoklonálnou protilátkou viazanou na Axl ukázal zníženie rastu tumoru, inhibíviu angiogenézy a zvášenie citlivosti buniek na štandardnú terapiu).

Rôzne malé molekuly Axl inhibítorov (*!!najmä R428, obrázok 1*) preukázali inhibíciu angiogenézy a ukázali sa účinné pri redukovaní metastázy rakoviny v pečeni. Výskumami (shRNA) sa definitívne potvrdili možné terapeutické účinky, ktoré znížením expresie AXL by inhibovali bunkovú inváziu a migráciu.

Výskum ich natoľko priblížil k štruktúre Axl kinázových inhibítorov, že došlo aj k ďalšiemu spracovaniu a to k syntéze potenciálnych inhibítorov. Štruktúra katalytického miesta AXL ostáva nerozpustná, tak najprv zostavili homologický model aktívneho miesta na realizáciu docking experimentov. Okrem AXL boli použité aj tri ďalšie proteíny ako templáty (s rozpustnými kryštálovými štruktúrami): MER, c-Met a IGF-1R. Rôzne cross-docking experimenty využívajúce homológa AXL viedli k výberu vhodných štruktúr inhibítorov – 2,4,6-trisubstituované pyrimidíny 2,4-diamíny (obrázok 2, štruktúry 1,2) s aktivitami IC50 – 33 a 47 mikromolov v biochemickej eseji.

Model ich viazania indikuje silné stérické zábrany medzi objemnými substituentami v polohe 6 na pyrrimidínovom kruhu a závasnou oblasťou (hinge region), gate keeperom a ostatnými substituentami nachádzajúcimi sa v hydrofóbnom vrecku AXL receptora. Tieto objavy viedli vedcov k upriameniu pozornosti na zlúčeniny, ktoré na pyrimidínovom kruhu majú naviazané malé hydrofóbne substituenty, ktoré sú prispôsobené Leu620 (gate keeper AMK). To viedlo k syntéze zlúčenín 3 a 4- ide o 5-metylpyrimidíny, ktoré vykazujú hodnoty IC50 2-6 mikromolov. Obe sady zlúčenín boli pripravené podľa schémy 1.

**Tabuľka 1**

**5** – s touto štruktúrou dosiahli výrazné zvýšenie aktivity IC50 (0.73 mikroM), pričom substituent Z2 obsahuje metylén medzi arylom a piperazínom, ktorý zvyšuje interakciu medzi N-metylpiperazínom a rozpustnou dostupnou časťou AXL kinázy. Štúdium tohto modelu prinieslo aj poznatky o tom, aký dôležitý je substituent v polohe 4 na pyrimidínovom kruhu. Ukázalo sa, že zasahuje hlboko do hydrofóbnej dutiny kinázy, čo viedlo k myšlienke podporiť silu väzby s týmto vačkom pripojením elektrón-odčerpávajúceho (akceptorného) substituenta/viacerých substituentov. Takéto substituenty pripojili na aryl, ktorý je v polohe 4 na pyrimidíne. Napriek tomu bolo prvých 8 štruktúr pripravených s elektrón-donornými substituentami na aryle.

**6** – došlo k zníženiu aktivity, aj keď šlo o pokus zachovať metylénovú skupinu pripojením Z3- metoxyetyl a zároveň nahradiť piperazín piperidínom

**7** – je aktivita pomerne vysoká (podľa očakávaní mala byť nižšia ako v 5), (podobne výsledky boli dosiahnuté keď došlo k nahradeniu 2-arylového kruhu za elektrónovo-bohatý pyridín), nahradenie metylénu za N-metylamín a N-metylpiperazín za N-metylpiperidín v štruktúre 7 (aktivita je 0.42 mikroM).

8 – mierne zvýšenie aktivity (oproti 5) bolo pozorované u tejto zlúčeniny, ktorá obsahuje len Cl naviazaný ako R3 substituent v meta polohe na 4-arylovom kruhu.

9 – takisto zvýšenie aktivity keď bol ako R3 substituent H a R2 substituent v para polohe CMe2CN (IC50 = 0.29 mikroM).

10 - Efekt prepajácej C-C väzby medzi pyrimidínom a arylom bol tiež skúmaný a to nahradením tejto C-C väzby éterom (O) , čo viedlo k zníženiu aktivity (1.40) a v zlúčenine 11 nahradili väzbu C-C amínom (NH) čo tiež viedlo k zníženej aktivite (62.7).

Všetky výsledky zhrnuté v tabuľke 1 potvrdili vopred predpokladané väzbové energie, ktorými potvrdili platnosť, že pripravený homológ je skutočne homologický s AXL.

Ďalšie úpravy začali prevádzať na R1 substituente naviazanom v polohe 5 na pyrimidínovom kruhu. V tejto polohe by totiž malo dôjsť k interakcii substituenta s gate keeperom Leu620 v AXL. Predpokladalo sa, že táto stredne veľká hydrofóbna aminokyselina bude interagovať o moc lepšie s veľkým hydrofóbnym substituentom ako s metylovou skupinou, ktorú používali pri testoch v tabuľke 1. Poslednú štruktúru 12 v tabuľke 1 upravili nahradením metylénovej skupiny cyklopropylom (pričom zvyšok štruktúry bol ten istý ako štruktúra 5), avšak došlo k poklesu aktivity (3.4 mikroM). Došlo aj k pokusu o syntézu aziridínového analógu štruktúry 5, avšak výsledky boli taktiež neúspešné.

Tieto neúspechy viedli k syntéze štruktúr ktoré obsahovali sulfonylovú skupinu umiestnenú tak, aby došlo k vytvoreniu väzieb s vysokou energiou a umiestnenú v takej vzdialenosti, ktorá si vyžaduje koordináciu s Mg2+ iónom (2.69 A).

Skúšali niekoľko pozícii pre umiestnenie sulfonylovej skupiny, až dospeli k štruktúre 13.

**13** – v polohe R1 sa nachádza Cl, prepojenie 4-arylu, konkrétne N-dimetylbenzénsulfónamidu sa realizuje cez NH skupinu. N-dimetylbenzénsulfónamid zasahuje do hydrofóbneho vačku. Táto štruktúra vykazuje veľmi dobré výsledky IC50 = 0.027 mikroM. Ďalšie štúdia tejto štruktúry viedli k výsledkom, že dusík na pyrimidíne sa viaže vodíkovými väzbami s Met623, ktorý sa nachádza v závesnej oblasti.

Obrázok 3 – ukazuje interakciu štruktúry 13 v aktivačnom mieste homológu AXL. Hydrofóbny elektrónakceptorný atóm Cl naviazaný v polohe R1 interaguje prednostne s Leu620 (gate keper), zatiaľ čo elektróndeficientný 4-aryl a N-dimetylsulfónamid sú zahrnuté do iónových interakcii (náboj vs. náboj) s lipofilnou strieškou beta ramien (GXGXG) v DFG oblasti AXL. Silná väzba sa tiež tvorí medzi Mg2+ iónom (ktorý je kritický pre aktivitu AXL) a elektrónovo-bohatou skupinou-sulfónamidom, čo pravdepodobne prispelo k zvýšeniu aktivity najviac.

**14** – dôležitosť sulfonamidovej skupiny sa ukázala v tejto štruktúre ako nie významná, pretože tu došlo k nahradeniu síry za uhlík a vytvoreniu N-dimetylamidovej skupiny a aktivita poklesla, ale nie významne. Bolo to spôsobené podobnou geometriou štruktúr 13 a 14, pretože dimetylový skelet sa zachoval a práve tieto dva metyly boli zahrnuté do van der Waalsových interakcii s DFG oblasťou a takisto zachovaním kyslíka, ktorý koordinoval atóm Mg2+.

Štruktúra 13 sa stala veľmi potenciálnou štruktúrou v biochemických esejách, výsledky jej aktivity pri pokusoch s bunkami dosahovali veľmi dobre výsledky aktivity, až 6 nM pri rakovine pankreasu (bunková línia PSN-1). Čo predstavuje snáď ešte väčší úspech je schopnosť štruktúry 13 zablokovať aktiváciu sprostredkovanú pripojením ligandu Gas6. PSN-1 serum bolo vyhladovené a následne stimulované ligandom Gas6 za prítomnosti zlúčeniny 13. Boli skúmané dva typy receptorov: fosfo-Akt (Ser673) a fosfo-AXL. Bunky boli z média zozbierané a podrobené analýze. Z grafu môžeme jednoznačne vidieť závislosť koncentrácie zlúčeniny 13 od jej pôsobenia (čím je vyššia koncentrácia zlúčeniny 13, tým je fosforylácia menšia). Z týchto výsledkov vyplýva, že zlúčenina 13 inhibuje cieľovú štruktúru AXL kinázu v nanomolárnych úrovniach v rakovinových bunkách. Hodnoty IC50 a EC50 zlúčeniny 13 na AXL sa nezhodujú (efektívna koncentrácia, je to hodnota ktorá meria účinnosť lieku, je to koncentrácia, v ktorej liek dosahuje polovicu maximálnej účinnosti) a preto boli antiproliferatívne účinky zlúčeniny 13 na bunky zhodnotené tak, že takýto úspoech skôr závisí od cieľa než od pôsobenia 13 priamo na AXL.

Preto sa rozhodli skúmať iné kinázy za pôsobenia zlúčeniny 13, Keďže je pyrimidínový skelet u inhibítorov kináz veľmi častý, nie je čudné, že sa tento inhibítor ukázal ako nie príliš selektívny na AXL. Testovaných tak bolo 75 kináz, pričom 13 vykazovala u 11 kináz viac ako 50 % účinnosť inhibície. Silná aktivita sa ukázala pri pôsobení na MER, TYRO3, Ser/Thr a Tyr kinázy ako súAurora A a B, JAK2, ALK, ABL1 a CHEK1.

Veľké úspechy boli dosiahnuté najmä pri pôsobení na Aurora A aj B (3.0 a 12.4 nM), za sprievodného javu veľkej antiproliferácie v štúdiách prevedených na bunkách. Tieto bnky obsahovali receptory Aurora A a B, čo zaručilo vždy veľkú inhibíciu a antoproliferáciu. Rozdiely medzi ATP väzbovým miestom AXL a Aurory sú nepatrné. Gate keper je identický, DFG je v konformácii in a jediné čo vedie k zmene k poklesu aktivity u AXL je rozpustnosť väzbového miesta zlúčeniny 13. Takže ďalšie pokusy o optimalizáciu tohto kritického miesta viedli k zameraniu sa na aminokyselinový zvyšok v gate keeperi a jeho interakcii so zlúčeninou 13 (u AXL je to hydrofóbny prolín a u Aurory je to kyslý Glu).

Potrebovali viac lipofilný elektrónakceptorný substituent v polohe 5 na pyrimidíne na zlepšenie viazania sa k AXL a zároveň destabilizáciu závesného priestoru na Aurore. Na tieto účely zostrojili analógy zlúčenín 13 a 14, ale všetky vykazovali horšiu aktivitu zo stérických dôvodov s Leu620 alebo z dôvodu zrušenia jednej vodíkovej väzby v závesnej oblasti.

Ich ďalší výskum upriamil pozornosť na rozdiely v hydrofóbnych vačkoch kináz. Preferované hydrofóbne interakcie u AXL medzi 4-arylovou skupinou a Leu542 zo strany B-ramien formujú h&ydrofóbny vačok. Posilnenie tejto interakcie môže viesť k upevneniu hydrofóbneho kontaktu medzi inhibítorom a DFG oblasťou kinázy, zahŕňajúc malé konformačné zmeny, ktoré by zmenšili vzdialenosť medzi 4-arylom a beta-ramenami, ktoré tvoria striešku hydrofóbneho vačku. Pre tento účel je N-dimetylová skupina v **13** a **14** nahradená lipofilnou skupinou pyrolidinom a N-cycklopropylovou skupinou (štruktúry **18-20**). Táto zmena viedla vždy k zlepšeniu aktivít u všetkých štruktúr ale neviedla k zníženiu aktivity na Aurore. Štruktúry **21-25** menia elektrón-akceptorné skupiny na 4-aryle: fluór bol v pohode ale nezlepšoval aktivitu ani selektivitu, Cl vykazoval zníženie aktivít. Metylácia amínového prepojenia tiež vyústila k zníženiu aktivity kvôli konformačnej zmene. Štruktúry **15, 16, 26 a 27** majú arylový kruh priamo pripojený k pyrimidínu, aktivity boli ok ale nedošlo k zníženiu aktivity u Aurory (dokonca došlo k vyvolaniu väčšej aktivity).

Záver, podarilo sa im pripraviť sériu potenciálnych inhibítorov AXL kinázy s 5.Cl pyrimidínovým kruhom a arylsulfonamidom v polohe 4 a pyrimidíne. Pyrimidínový kruh bol vybraný na základe testov silico screening a testy boli prevádzané na homológu AXL. Niekoľko štruktúr inhibítorov preukázalo priaznivé výsledky testov SAR, v biochemických testoch a pri testoch s PSN-1 pankreatickými rakovinovými bunkami. Žiaľ pri testoch došlo k inhibícii nie len AXL receptoru ale aj iných kináz. Úprava selektivity a zároveň držanie inhibičnej aktivity nebolo doposiaľ v ich silách uskutočniť.