

HERRAMIENTAS PARA EL DISEÑO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y ANÁLISIS CUANTITATIVO DE RELACIÓN ESTRUCTURA QUÍMICA-BIORESPUESTA (Q.S.A.R.)

CURSO DE PROFUNDIZACIÓN PEDECIBA-QUÍMICA

NOVIEMBRE 2022

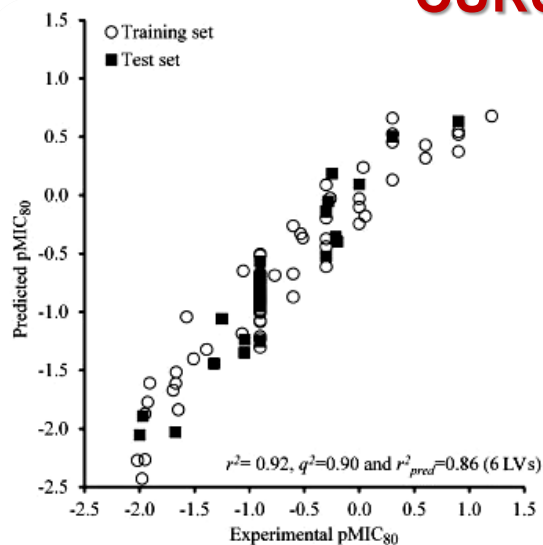
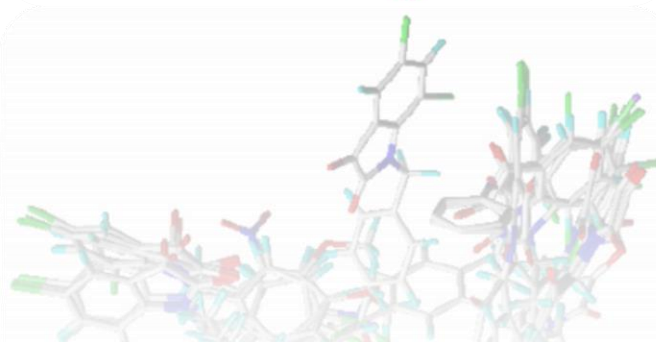
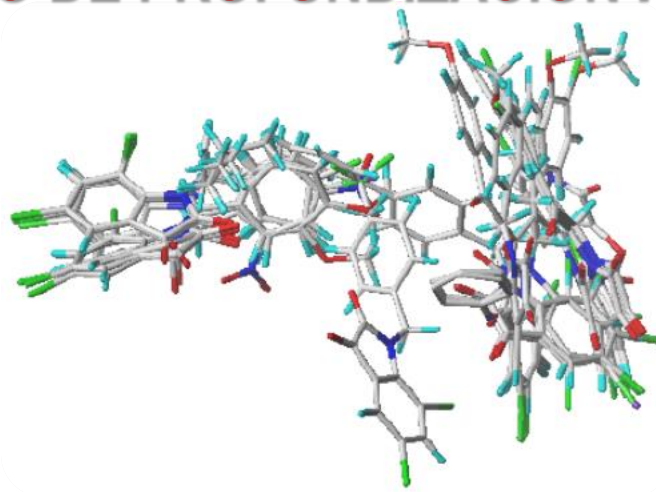
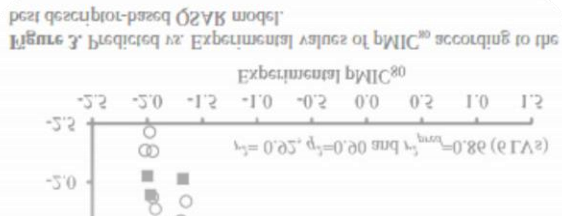


Figure 3. Predicted vs. Experimental values of pMIC₈₀ according to the best descriptor-based QSAR model.



Dr. Hugo Cerecetto
Dr. Marcos Couto

HERRAMIENTAS PARA EL DISEÑO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y ANÁLISIS CUANTITATIVO DE RELACIÓN ESTRUCTURA QUÍMICA-BIORESPUESTA (Q.S.A.R.)

PROGRAMA

1. HERRAMIENTAS PARA EL DISEÑO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS. Generalidades.

1.1. Propiedades tipo-fármaco.

1.2. Estrategias para integrar propiedades tipo-fármaco en el proceso de descubrimiento de agentes bioactivos.

1.3. Optimización química del líder: i) ¿Cómo mejorar la biodisponibilidad oral? ii) ¿Cómo controlar la estabilidad metabólica? iii) ¿Cómo controlar la estabilidad plasmática? iv) ¿Cómo mejorar la penetración de la barrera hematoencefálica? v) ¿Cómo evitar la inhibición/inducción de las CYPs? vi) ¿Cómo evitar la interacción con hERG? vii) ¿Cómo prevenir la toxicidad?

2. DISEÑO DE SERIES.

2.1. Métodos de optimización directa.

2.2. Métodos de exploración completa del campo estructural.

3. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE RELACIÓN ESTRUCTURA QUÍMICA-BIORESPUESTA.

Antecedentes S.A.R. y Q.S.A.R. Trabajos de Ferguson, Hansch y Kubinyi.

3.1. Parámetros Biológicos. Respuesta biológica a dosis fija y a dosis variable.

3.2. Descriptores Físicoquímicos.

3.2.1. Descriptores hidrofóbicos. Coeficiente de reparto, constante de Hansch (π).

Determinación experimental y teórica de la hidrofobicidad.

HERRAMIENTAS PARA EL DISEÑO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y ANÁLISIS CUANTITATIVO DE RELACIÓN ESTRUCTURA QUÍMICA-BIORESPUESTA (Q.S.A.R.)

PROGRAMA

1. HERRAMIENTAS PARA EL DISEÑO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS. Generalidades.

1.1. Propiedades tipo-fármaco.

1.2. Estrategias para integrar propiedades tipo-fármaco en el proceso de descubrimiento de agentes bioactivos.

1.3. Optimización química del líder: i) ¿Cómo mejorar la biodisponibilidad oral? ii) ¿Cómo controlar la estabilidad metabólica? iii) ¿Cómo controlar la estabilidad plasmática? iv) ¿Cómo mejorar la penetración de la barrera hematoencefálica? v) ¿Cómo evitar la inhibición/inducción de las CYPs? vi) ¿Cómo evitar la interacción con hERG? vii) ¿Cómo prevenir la toxicidad?

2. DISEÑO DE SERIES.

2.1. Métodos de optimización directa.

2.2. Métodos de exploración completa del campo estructural.

3. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE RELACIÓN ESTRUCTURA QUÍMICA-BIORESPUESTA.

Antecedentes S.A.R. y Q.S.A.R. Trabajos de Ferguson, Hansch y Kubinyi.

3.1. Parámetros Biológicos. Respuesta biológica a dosis fija y a dosis variable.

3.2. Descriptores Físicoquímicos.

3.2.1. Descriptores hidrofóbicos. Coeficiente de reparto, constante de Hansch (π).

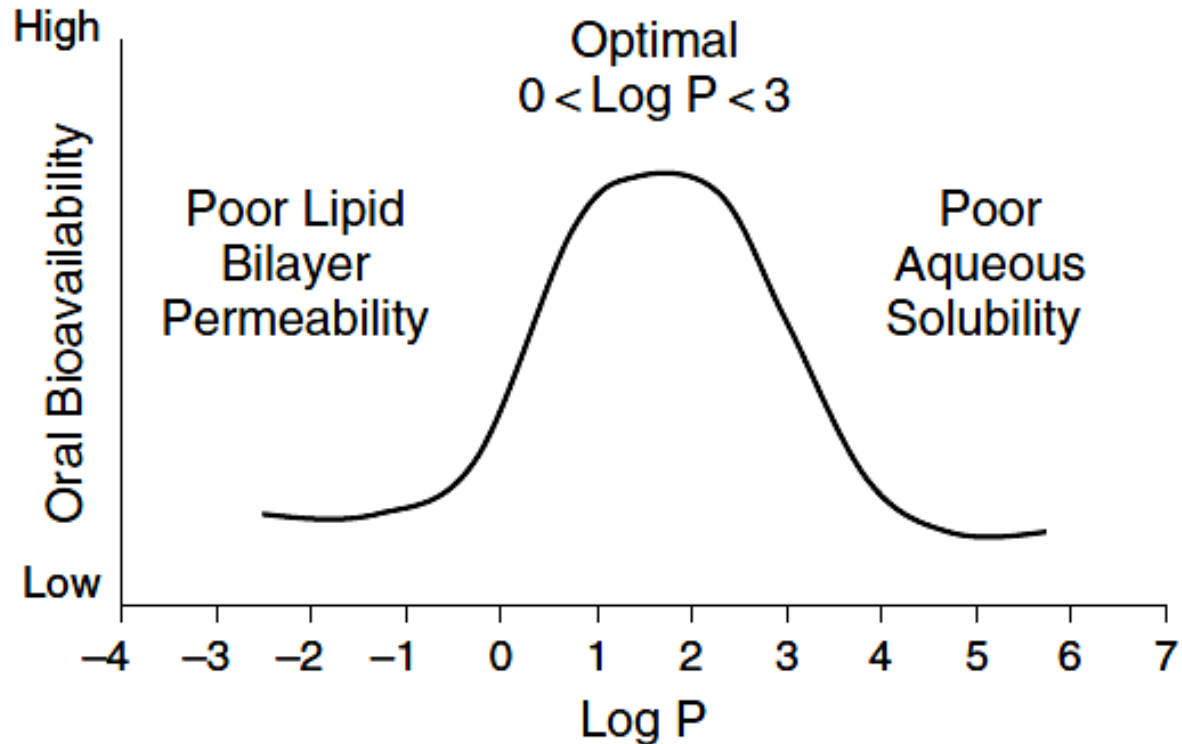
Determinación experimental y teórica de la hidrofobicidad.

1.3. OPTIMIZACIÓN QUÍMICA DEL LÍDER

i) ¿CÓMO MEJORAR LA BIODISPONIBILIDAD ORAL?

Una guía general para la óptima absorción GI, por permeabilidad por difusión pasiva, luego de la administración oral es que el compuesto posea un $\text{Log}P$ moderado (rango 0-3)

En este rango, hay un buen balance en la permeabilidad y la solubilidad

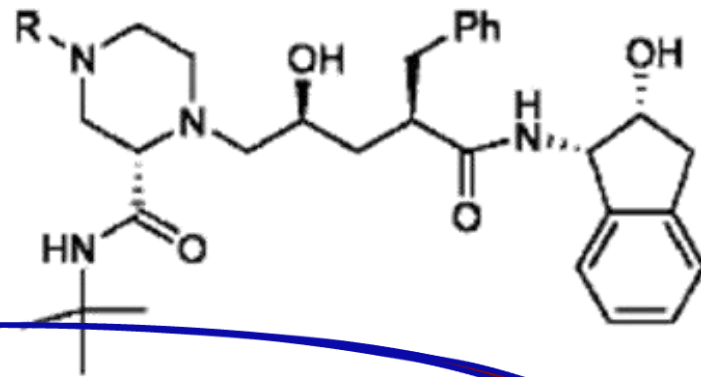


1.3. OPTIMIZACIÓN QUÍMICA DEL LÍDER

i) ¿CÓMO MEJORAR LA BIODISPONIBILIDAD ORAL?

Una guía general para la óptima absorción GI, por permeabilidad por difusión pasiva, luego de la administración oral es que el compuesto posea un $\text{Log}P$ moderado (rango 0-3)

En este rango, hay un buen balance en la permeabilidad y la solubilidad



La solubilidad también juega un rol relevante en la biodisponibilidad oral

#	R	C _{max} (uM)	Solubility (mg/mL) at pH 7.4	Log P
1	benzyloxycarbonyl	<0.10	<0.001	4.67
2	8-quinolinylsulfonyl	<0.10	<0.001	3.7
3	2,4-difluorophenylmethyl	0.73	0.0012	3.69
4	3-pyridylmethyl	11.4	0.07	2.92

1.3. OPTIMIZACIÓN QUÍMICA DEL LÍDER

i) ¿CÓMO MEJORAR LA BIODISPONIBILIDAD ORAL?

Otro aspecto, entonces, es tener en cuenta la solubilidad

En términos de estructura la solubilidad dependerá de:

- Forma y tamaño (masa molecular)
- pK_a
- Lipofilia
- Energía de red (MP, apilamiento cristalino)

Matemáticamente la dependencia es

$$\text{Log } S = 0.8 - \text{Log } P_{ow} - 0.01(\text{MP} - 25)$$

*la solubilidad **decrece** 10 veces si el LogP **crece** en 1 unidad y si el MP **crece** 100 °C*

1.3. OPTIMIZACIÓN QUÍMICA DEL LÍDER

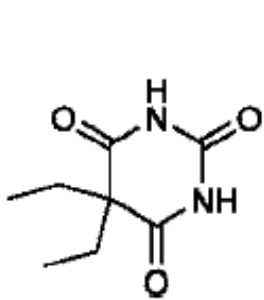
i) ¿CÓMO MEJORAR LA BIODISPONIBILIDAD ORAL?

Otro aspecto, entonces, es tener en cuenta la solubilidad

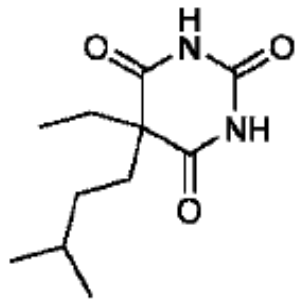
► Solubility at a Given pH is a Function of the Intrinsic Solubility of the Neutral Portion of Molecules and Solubility of the Ionized Portion of Molecules

	pK_a	Intrinsic Solubility (mg/mL)	Solubility @ pH 9 (mg/mL)
Barbital	7.9	7.0	95
Amobarbital	7.9	1.2	15
Naproxen	4.6	0.016	430
Phenytoin	8.3	0.02	0.12

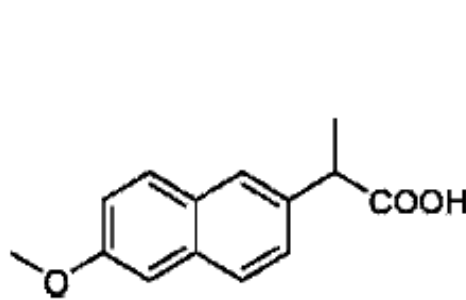
Solubilidad del compuesto en su forma neutra



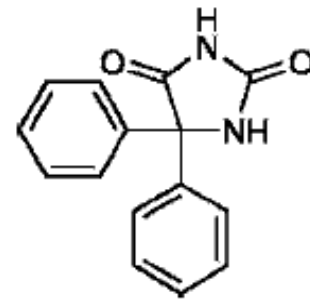
Barbital



Amobarbital



Naproxen

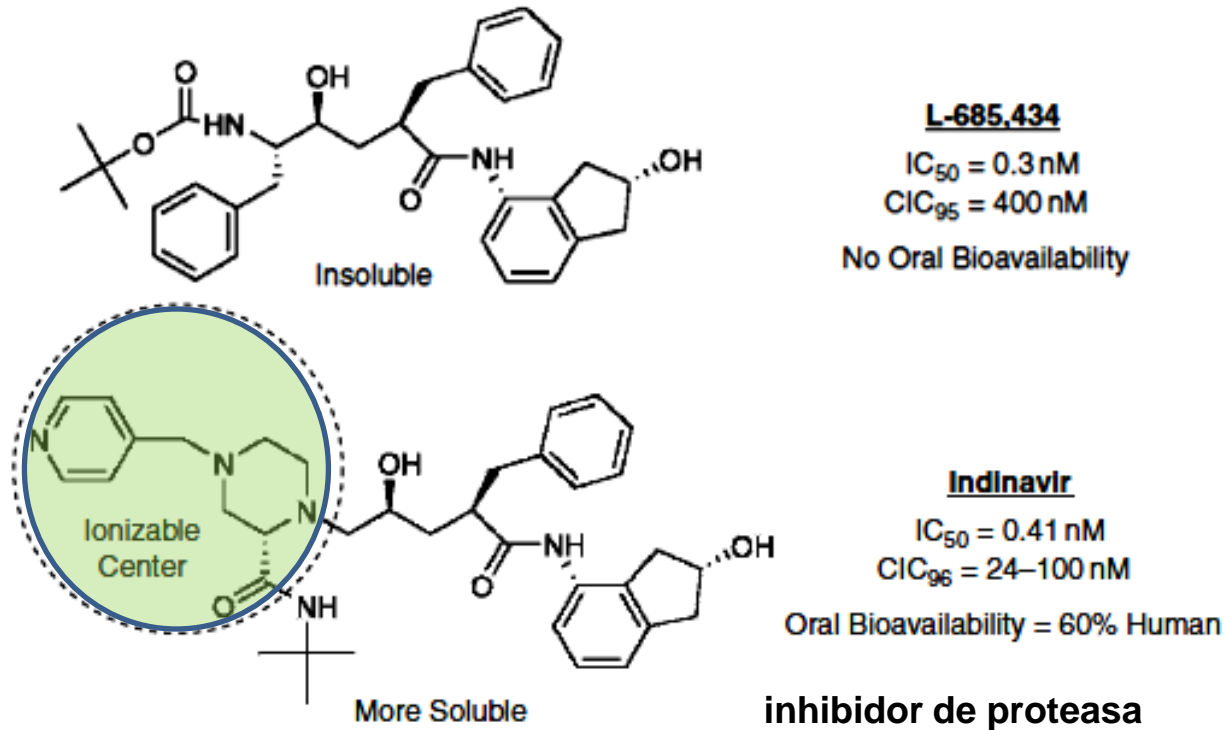


Phenytoin

1.3. OPTIMIZACIÓN QUÍMICA DEL LÍDER

i) ¿CÓMO MEJORAR LA BIODISPONIBILIDAD ORAL?

Otro aspecto, entonces, es tener en cuenta la solubilidad



las exigencias para solubilidad acuosa y permeabilidad de membranas generalmente se contraponen

1.3. OPTIMIZACIÓN QUÍMICA DEL LÍDER

i) ¿CÓMO MEJORAR LA BIODISPONIBILIDAD ORAL?

Otro aspecto, entonces, es tener en cuenta la solubilidad

$$\text{Log } S = 0.8 - \text{Log } P_{ow} - 0.01(\text{MP} - 25)$$



**Compuestos con cierta lipofilia
penetrarán bien en la bicapa lipídica**

*las exigencias para solubilidad acuosa y permeabilidad de
membranas generalmente se contraponen*

1.3. OPTIMIZACIÓN QUÍMICA DEL LÍDER

i) ¿CÓMO MEJORAR LA BIODISPONIBILIDAD ORAL?

Otro aspecto, entonces, es tener en cuenta la solubilidad

$$\text{Log } S = 0.8 - \text{Log } P_{ow} - 0.01(\text{MP} - 25)$$

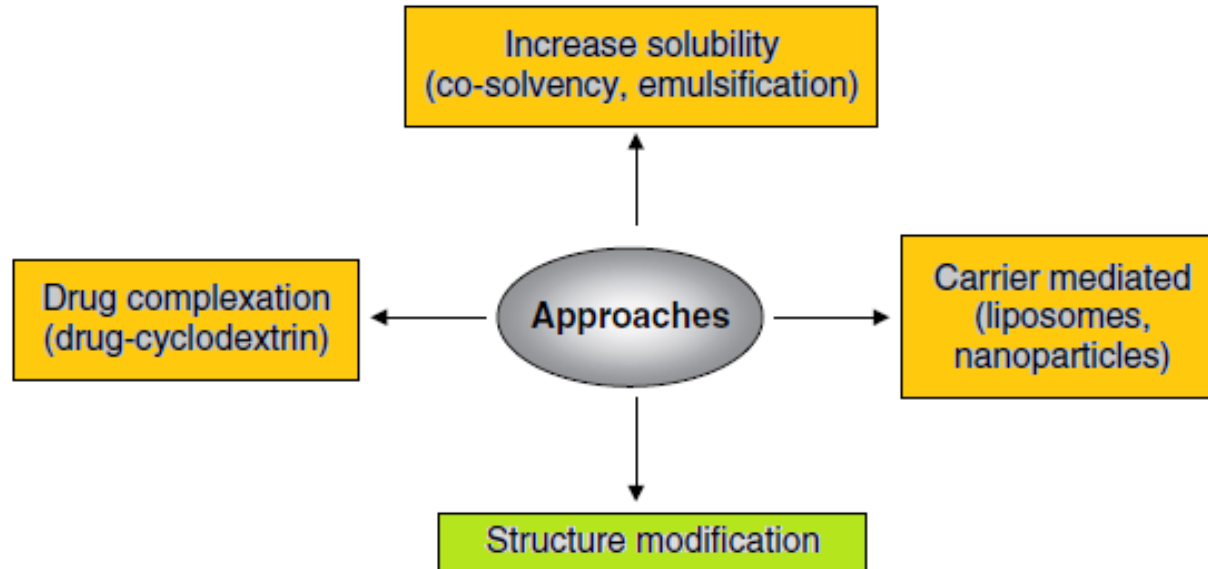
Sin embargo, la solubilidad de los compuestos se verá disminuída (signo negativo de la lipofilia en la igualdad)

Compuestos con cierta lipofilia penetrarán bien en la bicapa lipídica

las exigencias para solubilidad acuosa y permeabilidad de membranas generalmente se contraponen

1.3. OPTIMIZACIÓN QUÍMICA DEL LÍDER

i) ¿CÓMO MEJORAR LA BIODISPONIBILIDAD ORAL?



► Structure Modifications Strategies for Solubility Improvement

Structure modification

Add ionizable group

Reduce Log P

Add hydrogen bonding

Add polar group

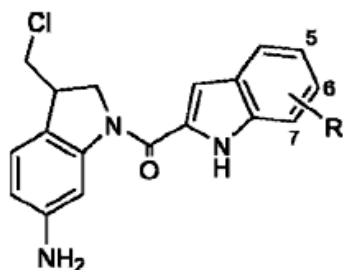
Reduce molecular weight

Out-of-plane substitution to reduce crystal packing

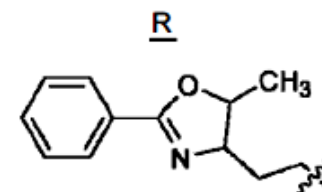
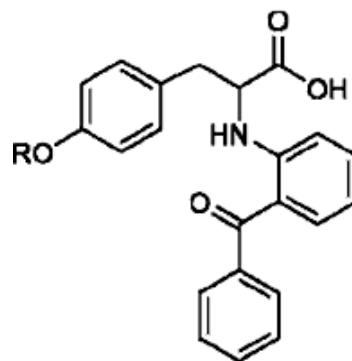
Construct a prodrug

1.3. OPTIMIZACIÓN QUÍMICA DEL LÍDER

i) ¿CÓMO MEJORAR LA BIODISPONIBILIDAD ORAL?

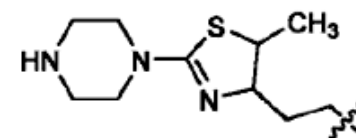


R	Solubility (μM)	IC50 (μM)		
		AA8	UV4	EMT6
5,6,7-triOMe	32	0.35	0.055	0.27
5-OMe	23	0.31	0.047	0.23
5-O(CH ₂) ₂ NMe ₂	700	0.16	0.044	0.12
5-OMe, 6-O(CH ₂) ₂ NMe ₂	>1200	0.22	0.039	0.11
5-OMe, 7-O(CH ₂) ₂ NMe ₂	47	0.14	0.029	0.09



Solubility (mg/mL)

SGF < 0.001
PB < 0.001



SGF > 10
PB = 0.025

PB, phosphate buffer (pH 7.4)

SGF, simulated gastric fluid (pH 1.2).

► Structure Modifications Strategies for Solubility Improvement

Structure modification

Add ionizable group
Reduce Log P
Add hydrogen bonding
Add polar group

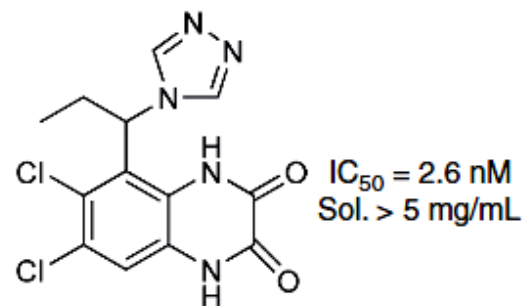
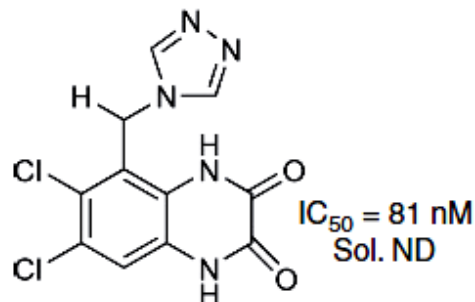
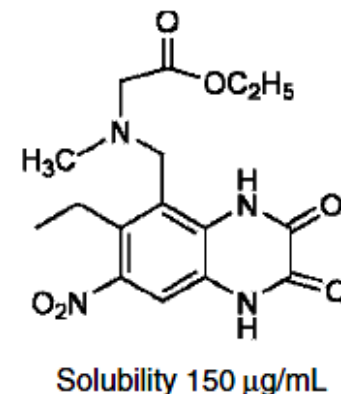
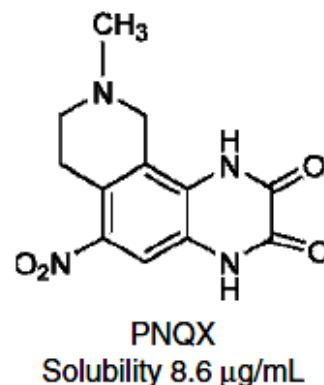
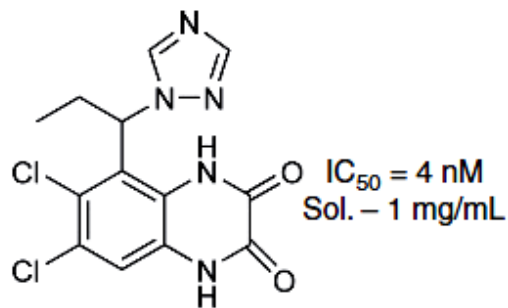
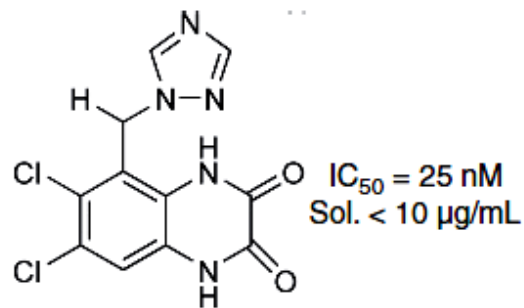
Reduce molecular weight

Out-of-plane substitution to reduce crystal packing

Construct a prodrug

1.3. OPTIMIZACIÓN QUÍMICA DEL LÍDER

i) ¿CÓMO MEJORAR LA BIODISPONIBILIDAD ORAL?



► Structure Modifications Strategies for Solubility

Improvement

Structure modification

Add ionizable group

Reduce Log P

Add hydrogen bonding

Add polar group

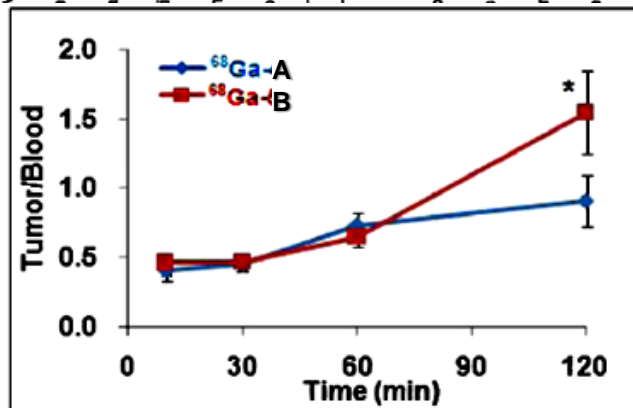
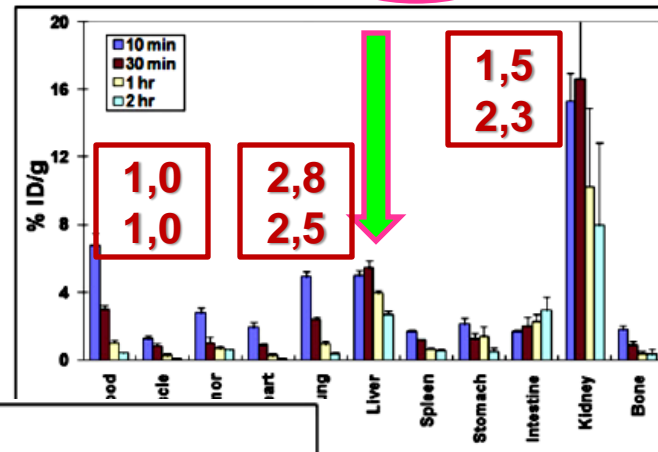
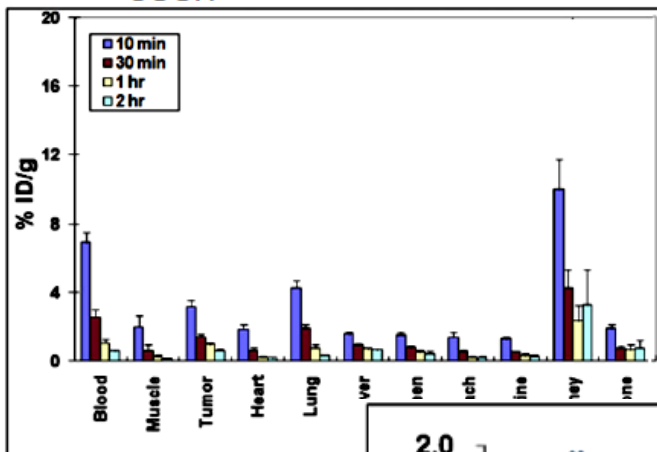
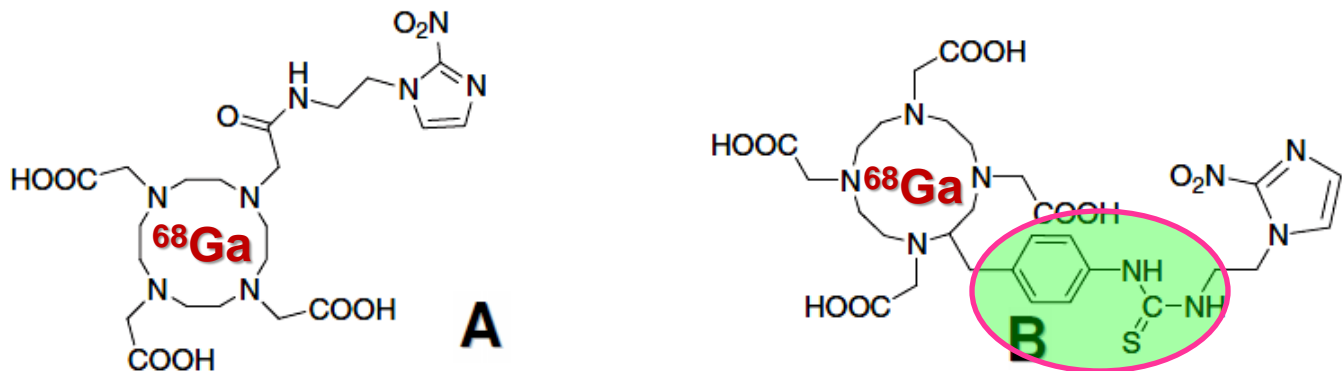
Reduce molecular weight

Out-of-plane substitution to reduce crystal packing

Construct a prodrug

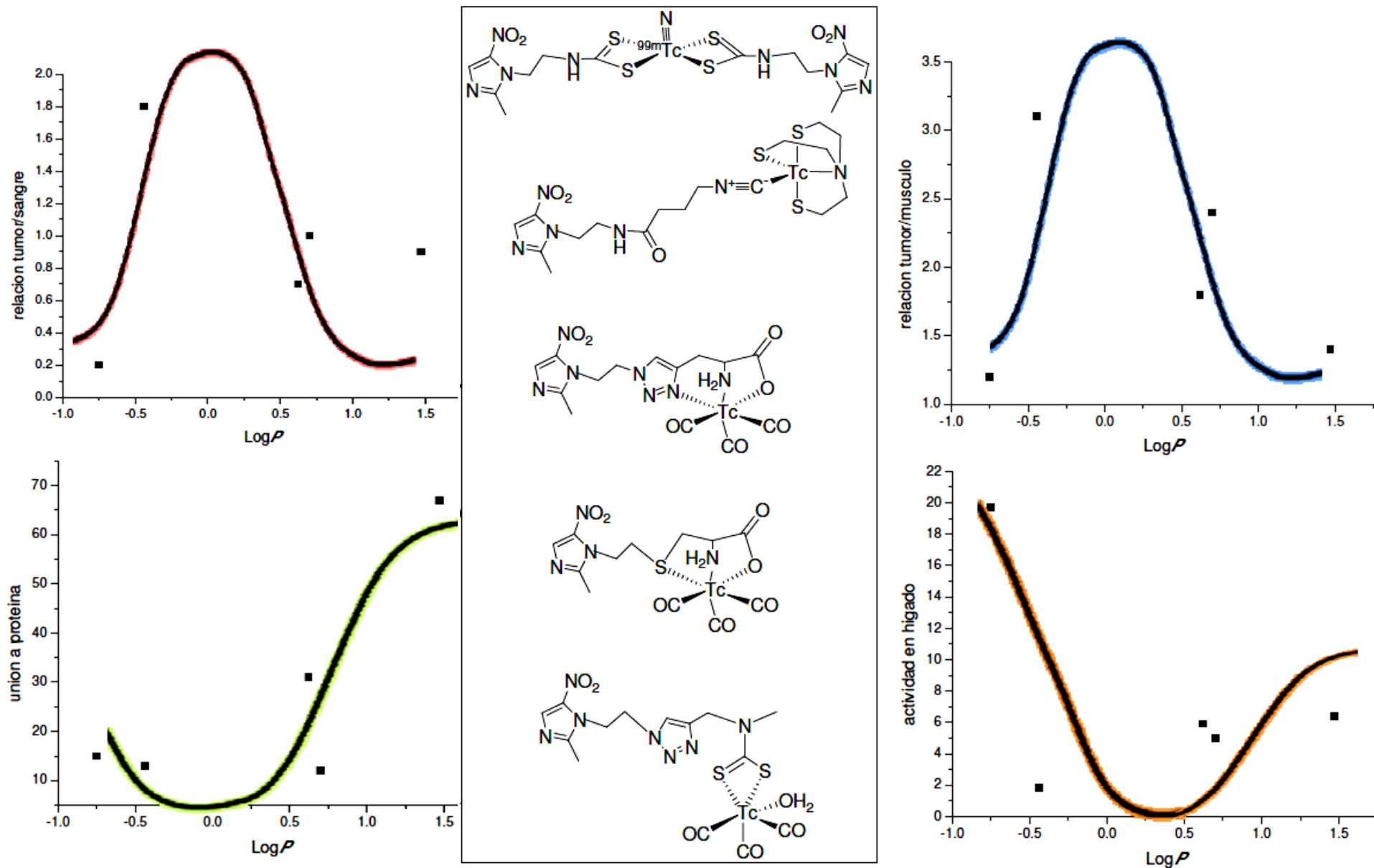
1.3. OPTIMIZACIÓN QUÍMICA DEL LÍDER

¿CÓMO SE MODIFICA LA BIODISTRIBUCIÓN CON LA LIPOFILIA?



1.3. OPTIMIZACIÓN QUÍMICA DEL LÍDER

¿CÓMO SE MODIFICA LA BIODISTRIBUCIÓN CON LA LIPOFILIA?



ii) ¿CÓMO MEJORAR EL INGRESO (LA PERMEABILIDAD)?

La mejor forma de mejorar la permeabilidad es a través de modificaciones estructurales más que por medio de formulaciones

► Strategies for Improving Permeability by Structural Modification

Structure modification strategy

Ionizable group to non-ionizable group

Add lipophilicity

Isosteric replacement of polar groups

Esterify carboxylic acid

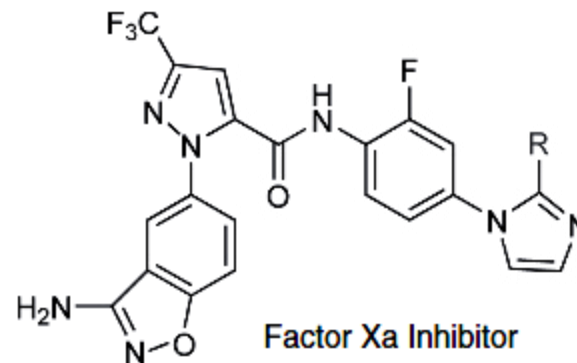
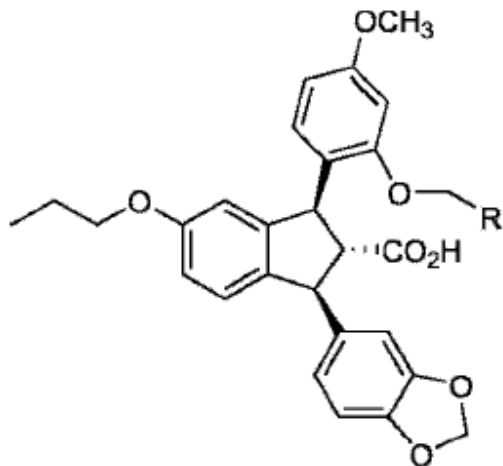
Reduce hydrogen bonding and polarity

Reduce size

Add nonpolar side chain

Prodrug

ii) ¿CÓMO MEJORAR EL INGRESO (LA PERMEABILIDAD)?



R	ETA, K _i (nM)	Caco-2 (cm/h)	% F (rat)
CO ₂ H	0.43	0.0075	4
CH ₂ OH	1.1	0.2045	66

R	FXa K _i (nM)	Caco-2 P _{app} (×10 ⁻⁶ cm/s)	CL (L/h/Kg)	T _{1/2} (h)	V _{dss} (L/Kg)	F (%)
CH ₂ NHMe	0.12	0.2	1.1	3.7	4.6	24
CH ₂ NMe ₂	0.19	5.6	1.1	3.4	5.3	84

► Strategies for Improving Permeability by Structural Modification

Structure modification strategy

Ionizable group to non-ionizable group

Add lipophilicity

Isosteric replacement of polar groups

Esterify carboxylic acid

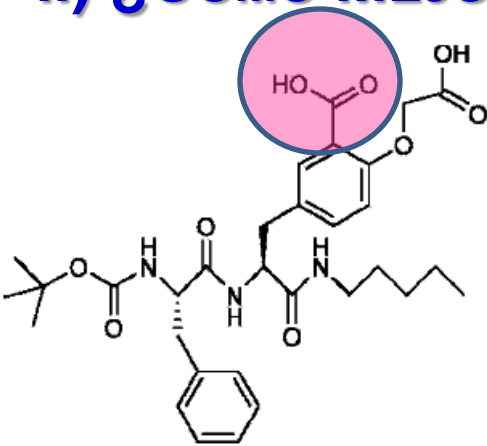
Reduce hydrogen bonding and polarity

Reduce size

Add nonpolar side chain

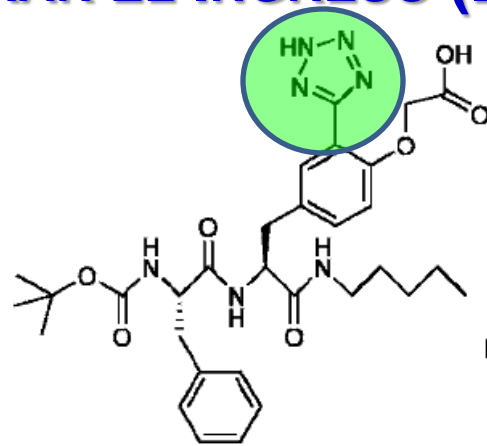
Prodrug

ii) ¿CÓMO MEJORAR EL INGRESO (LA PERMEABILIDAD)?



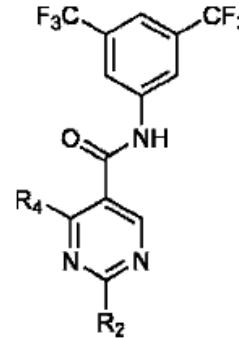
K_i (PTP1B) = 2 μ M

Caco-2 < 1×10^{-7} cm/s
No Cellular Activity



K_i (PTP1B) = 2 μ M

Caco-2 = 1.9×10^{-7} cm/s
Positive Cellular Activity



R4	R2	Caco-2 Permeability ($\times 10^{-7}$ cm/s, n=3, mean \pm SD)
CF ₃	Cl	11 \pm 4
H	Cl	61 \pm 7
CH ₃	Cl	62 \pm 6
CH ₂ CH ₃	Cl	58 \pm 9
CH ₂ CH ₂ CH ₃	Cl	31 \pm 9
CF ₂ CF ₃	Cl	9 \pm 9
Cl	Cl	31 \pm 6
Ph	Cl	9 \pm 7
CF ₃	F	19 \pm 6

► Strategies for Improving Permeability by Structural Modification

Structure modification strategy

Ionizable group to non-ionizable group

Add lipophilicity

Isosteric replacement of polar groups

Esterify carboxylic acid

Reduce hydrogen bonding and polarity

Reduce size

Add nonpolar side chain

Prodrug

ii) ¿CÓMO MEJORAR EL INGRESO (EVITAR EL EFLUJO, Pgp)?

1) Introducir impedimento estérico a un grupo EDH-donor

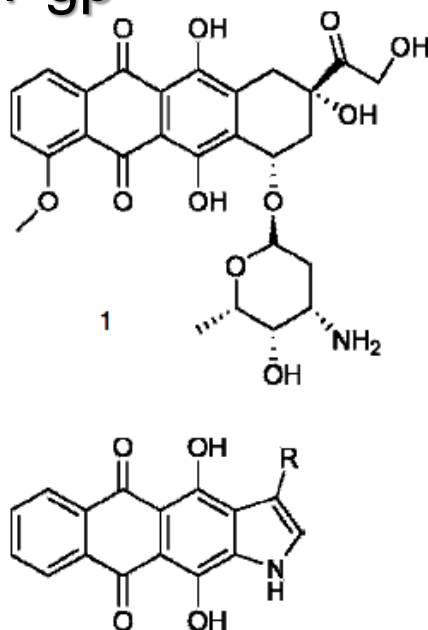
- Uniendo grupos voluminosos
- Metilando nitrógenos

2) Disminuir el potencial de un grupo EDH-aceptor

- Incorporándole próximo un grupo electrón-atrayente
- Reemplazando o removiendo el grupo EDH-aceptor

3) Adicionar un ácido fuerte

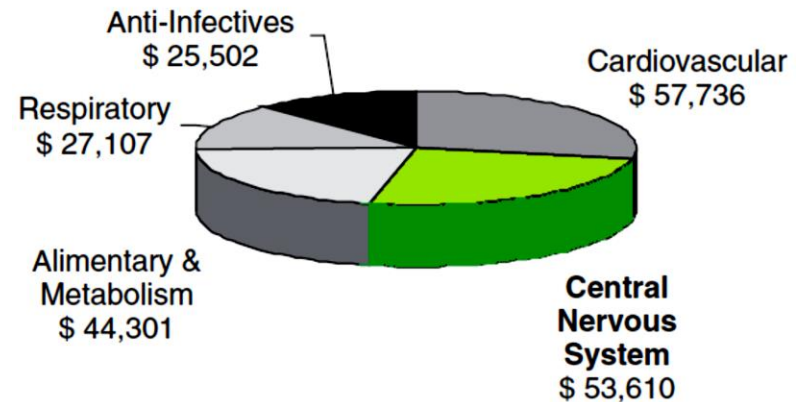
4) Modificar LogP para reducir la penetración en las capas lipídicas donde está Pgp



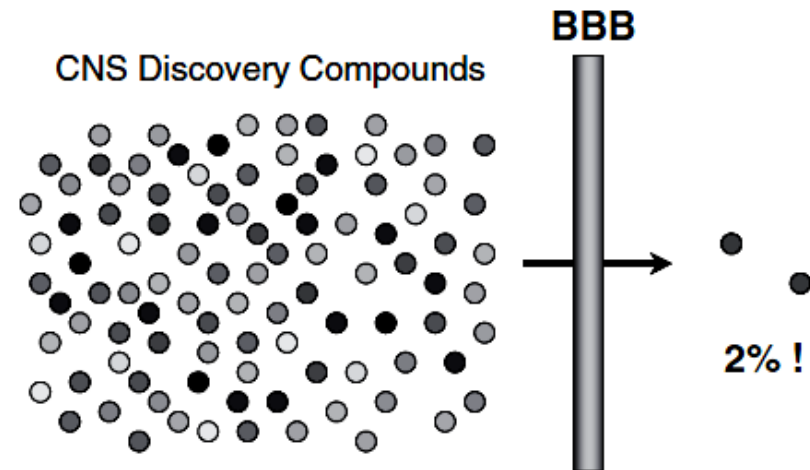
R	IC50 (uM) K562 (no Pgp)	IC50 (uM) K562i/S9 (with Pgp)	Pgp/no Pgp
1	0.2	1.5	8
CH ₂ NMe ₂	1.2	12.5	10
	1.2	1.2	1
	3.2	2.2	<1

ii) ¿CÓMO MEJORAR EL INGRESO (MEJORAR PENETRACIÓN BBB)?

El desarrollo farmacéutico para desórdenes del SNC es el segundo en las terapias, siguiendo las enfermedades cardiovasculares



La **BBB** excluye cerca del 98 % de potenciales agentes terapéuticos, siendo uno de los mayores desafíos en la terapia del SNC



ii) ¿CÓMO MEJORAR EL INGRESO (MEJORAR PENETRACIÓN BBB)?

Reglas

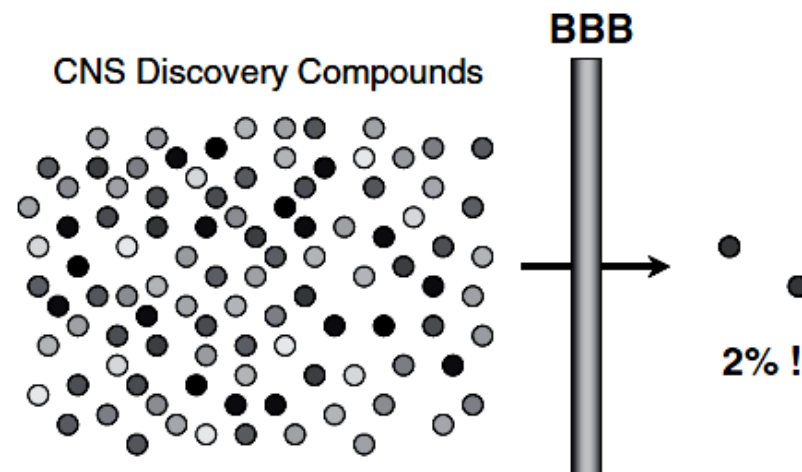
Pardridge

- ▶ H-bonds (total) < 8–10
- ▶ MW < 400–500
- ▶ No acids

Clark and Lobell et al.

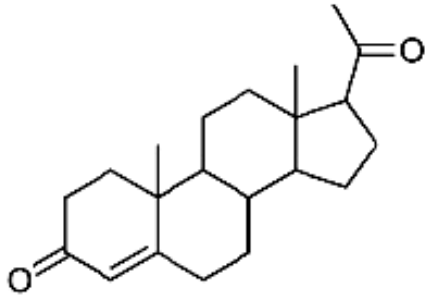
- ▶ $N + O < 6$
- ▶ $PSA < 60\text{--}70 \text{ \AA}^2$
- ▶ MW < 450
- ▶ $\text{Log } D = 1\text{--}3$
- ▶ $\text{ClogP} - (N + O) > 0$

La **BBB** excluye cerca del 98 % de potenciales agentes terapéuticos, siendo uno de los mayores desafíos en la terapia del SNC

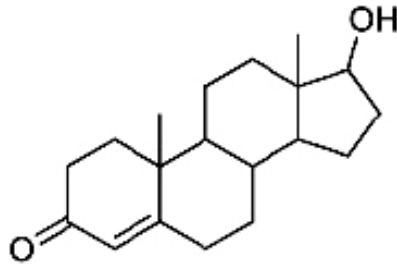


ii) ¿CÓMO MEJORAR EL INGRESO (MEJORAR PENETRACIÓN BBB)?

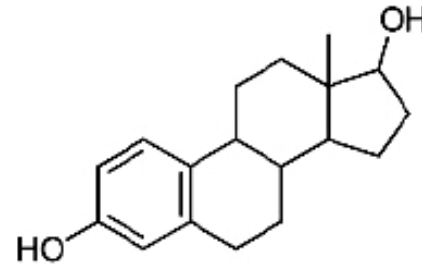
1. Reducir el total de grupos que establecen EDH



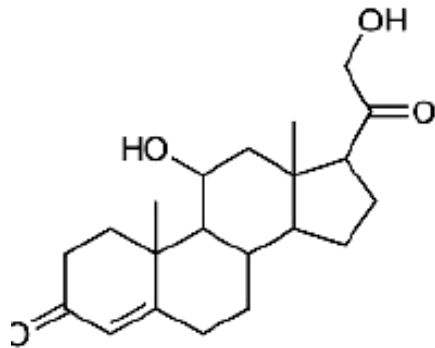
Progesterone N=2
Log PM^{1/2} = -2.9



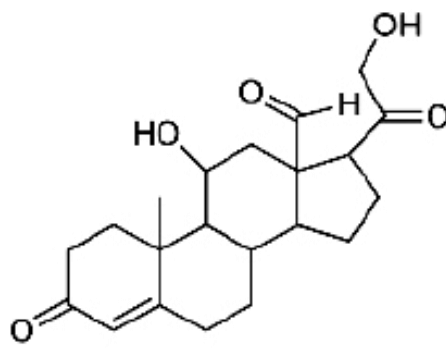
Testosterone N=3
Log PM^{1/2} = -2.8



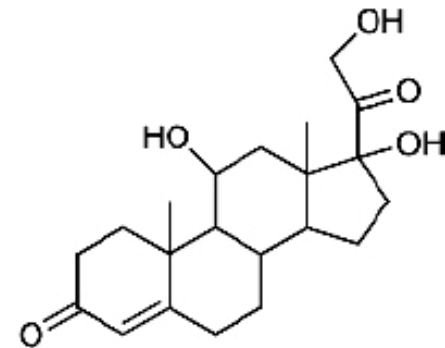
Estradiol N=4
Log PM^{1/2} = -3.0



Corticosterone N=6
Log PM^{1/2} = -3.4



Aldosterone N=7
Log PM^{1/2} = -4.6

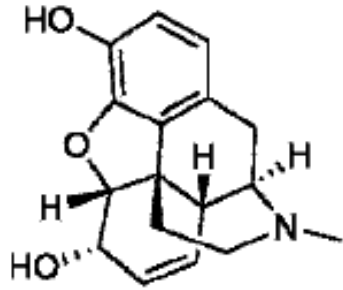


Cortisol N=8
Log PM^{1/2} = -5.0

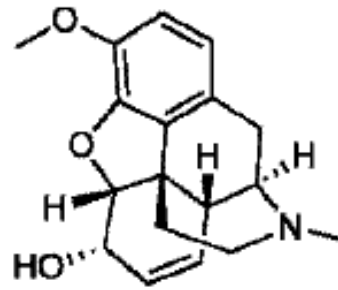
2. Reducir MW

ii) ¿CÓMO MEJORAR EL INGRESO (MEJORAR PENETRACIÓN BBB)?

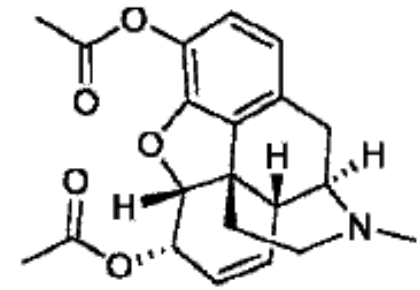
3. Incrementar la lipofilicidad



Morphine

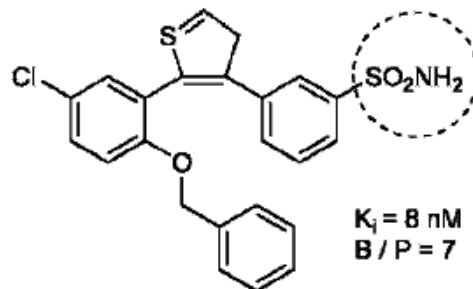
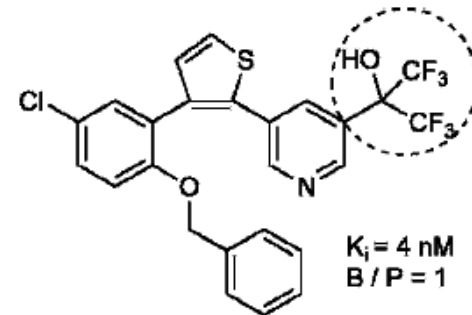
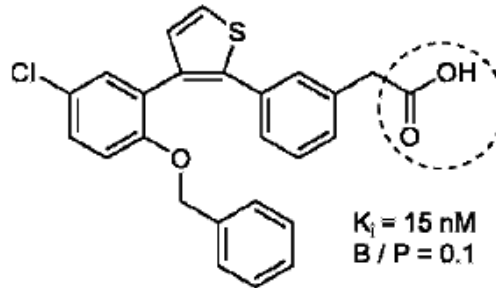


Codeine
10x ↑ BBB



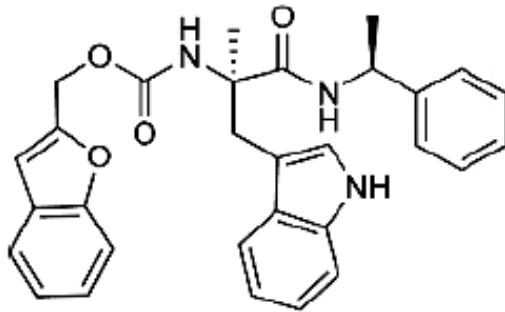
Heroin
100x ↑ BBB

4. Reemplazar grupos ácidos carboxílicos

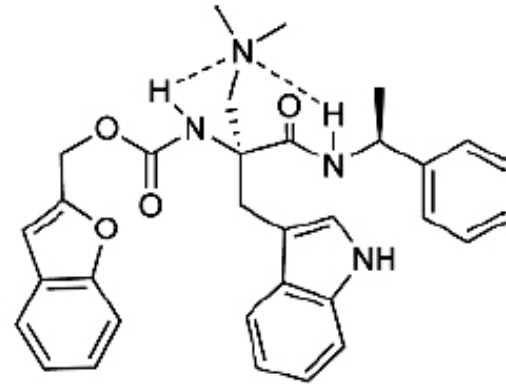


ii) ¿CÓMO MEJORAR EL INGRESO (MEJORAR PENETRACIÓN BBB)?

5. **Adicionar** un EDH intramolecular



IC₅₀ = 5.9 nM
Solubility < 2 µg/mL
Vehicle = 0.76 mg/mL
B/P = 0.6



IC₅₀ = 5.5 nM
Solubility = 0.7 mg/mL
Vehicle = 10 mg/mL
B/P = 6.0

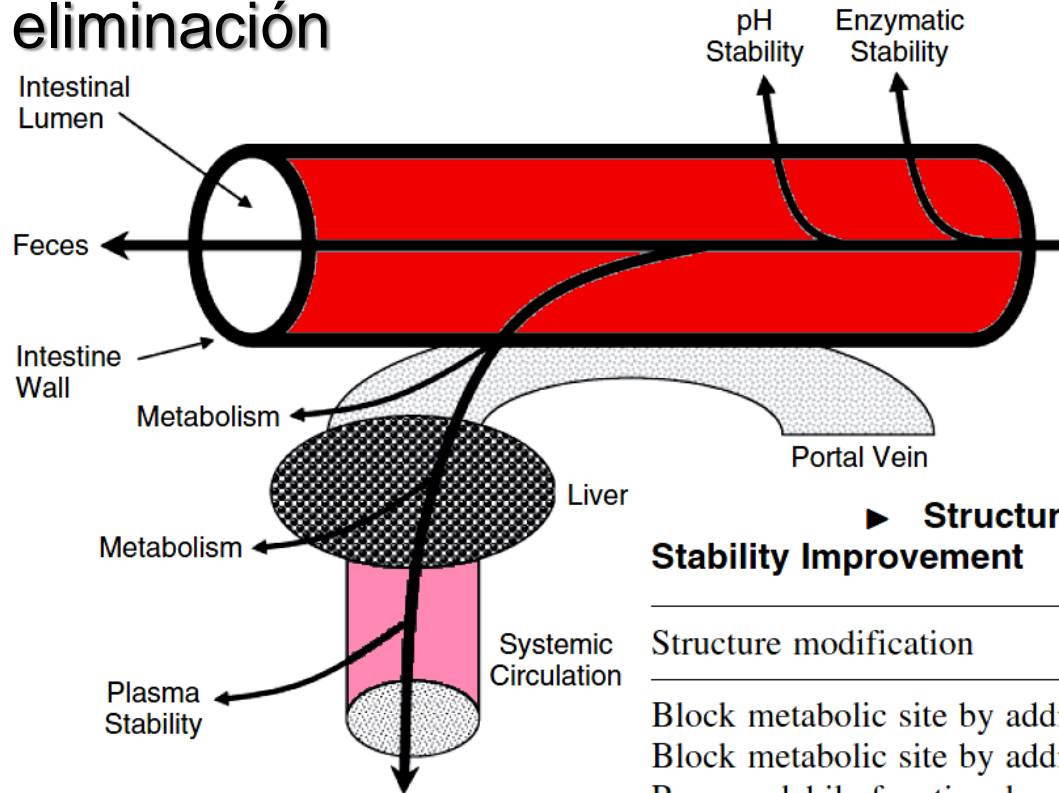
6. **Incorporar** subestructuras afines por los transportadores de membrana de ingreso.

LAT1 (large neutral amino acid transporter) incrementa el ingreso de L-dopa y gabapentina en cerebro, GLUT1 (glucose), MCT1 (monocarboxylic acids), CAT1 (cationic amino acids), CNT2 (nucleosides), etc.

iii) ¿CÓMO CONTROLAR LA ESTABILIDAD METABÓLICA?

Metabolismo

Es la modificación enzimática, principalmente en hígado y puede ocurrir en intestinos, de fármacos para incrementar su eliminación



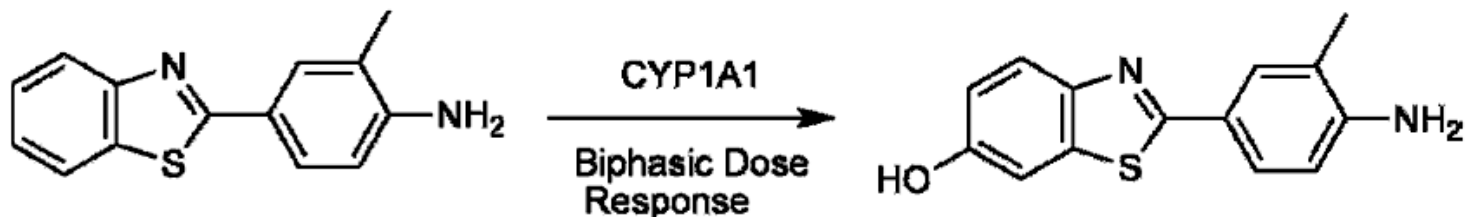
► Structure Modifications Strategies for Phase I Metabolic Stability Improvement

Structure modification

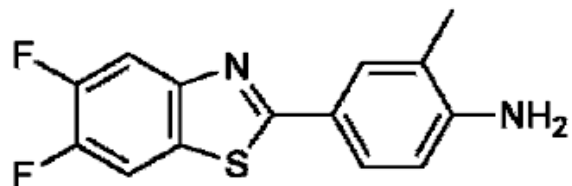
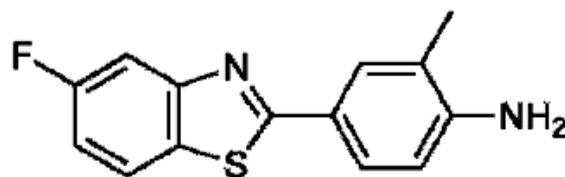
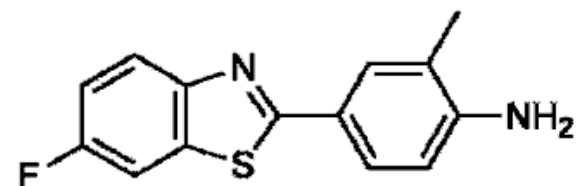
- Block metabolic site by adding fluorine
 - Block metabolic site by adding other blocking groups
 - Remove labile functional group
 - Cyclization
 - Change the ring size
 - Change chirality
 - Reduce lipophilicity
 - Replace unstable groups
-

iii) ¿CÓMO CONTROLAR LA ESTABILIDAD METABÓLICA DE FASE I?

1. Bloquear el sitio de metabolismo por **adición de un grupo fluoro** (u otro **halógeno**)



Fluorinated Analogies to Protect Labile Sites

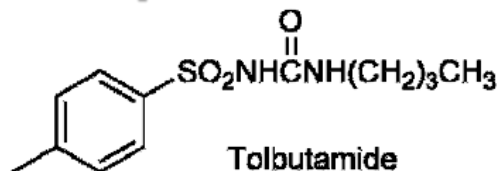


- Most potent
- No biphasic dose response

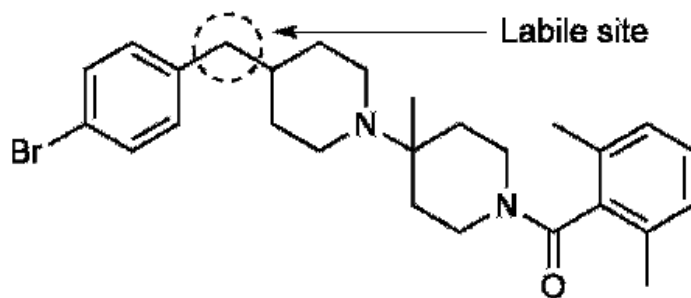
	<u>5-HT1A</u>	<u>CYP3A4</u>
	IC ₅₀ (μM)	t _{1/2} (min)
Hydroxylation Buspirone	0.025	4.6
	0.063	52.3

iii) ¿CÓMO CONTROLAR LA ESTABILIDAD METABÓLICA DE FASE I?

2. Bloquear el sitio de metabolismo por **adición** de otros **grupos bloqueantes**



Clearance = 0.22 mL/min/Kg
Half-Life = 5.9 hr



Ki
(nM)

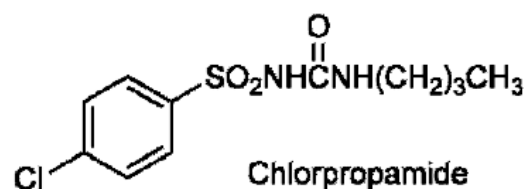
IC₅₀
(nM)

AUC (p.o.)
(h.µg/mL)

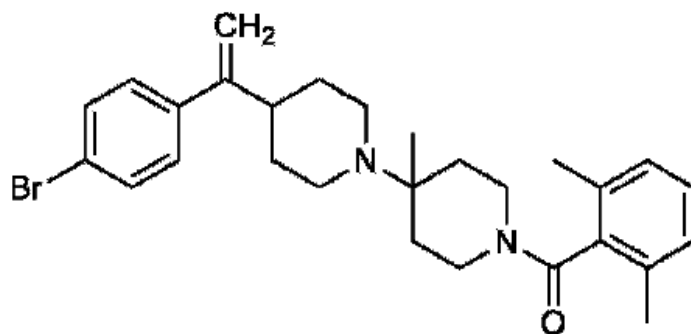
66

10

0.04



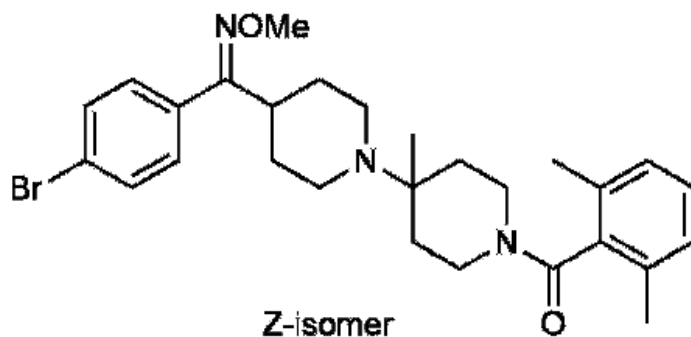
Clearance = 0.030 mL/min/Kg
Half-Life = 33 hr



8

1.0

0.59



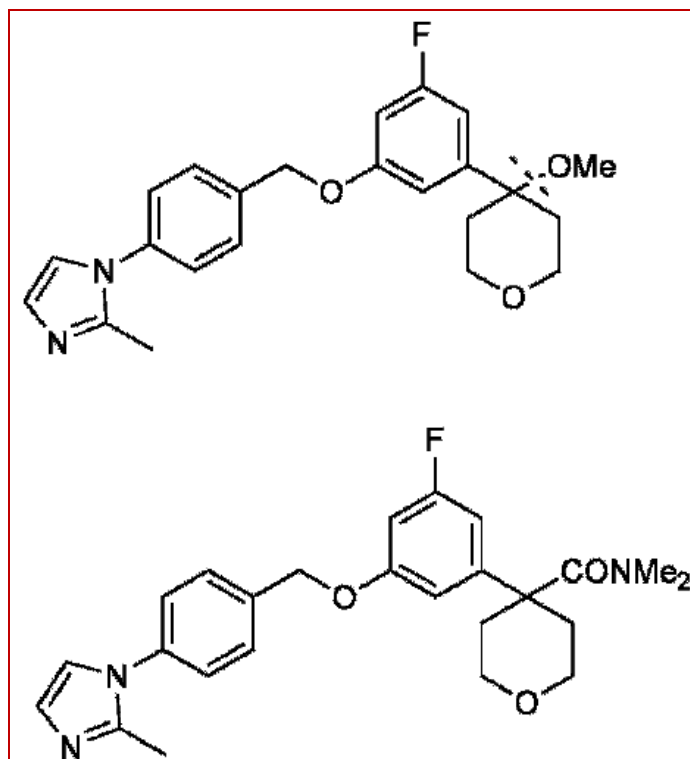
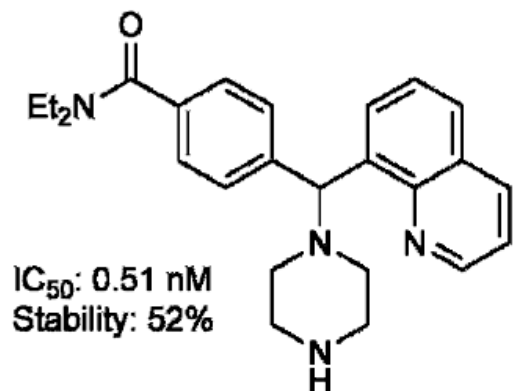
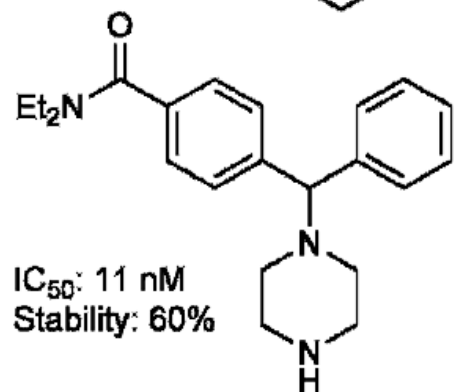
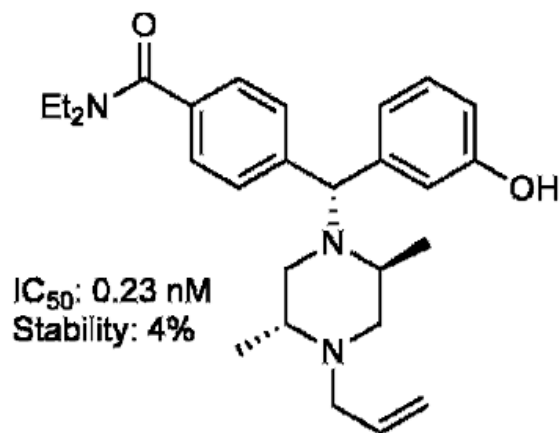
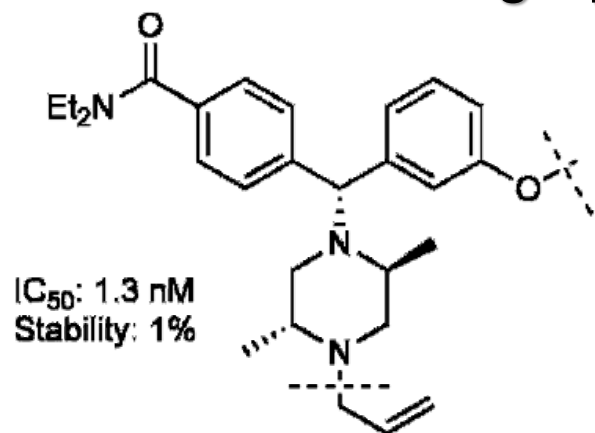
2

1.3

1.2

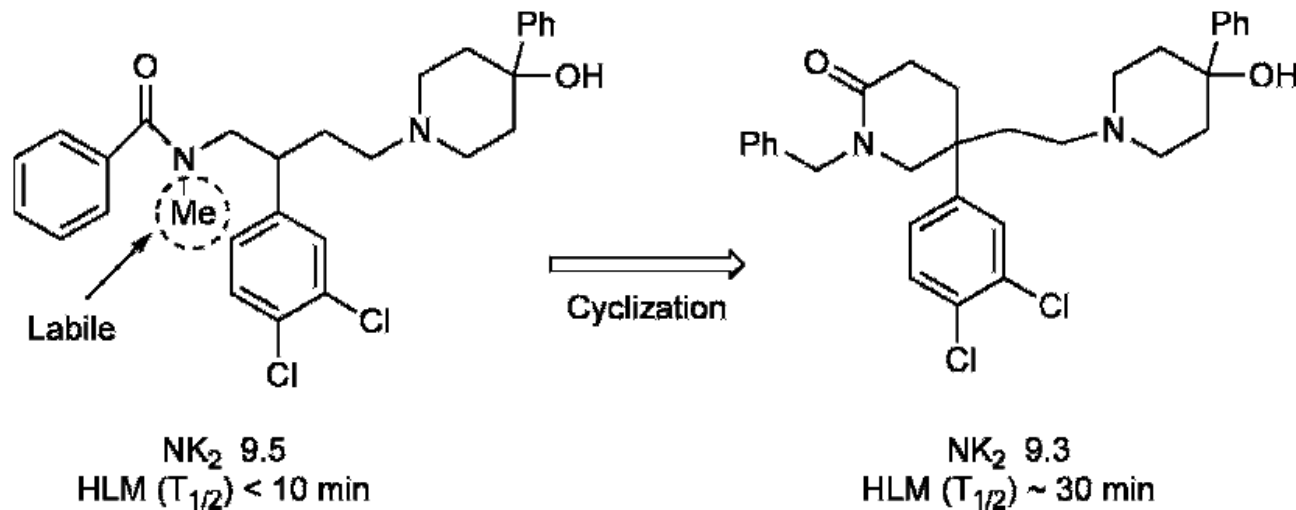
iii) ¿CÓMO CONTROLAR LA ESTABILIDAD METABÓLICA DE FASE I?

3. Remoción del grupo funcional lábil



iii) ¿CÓMO CONTROLAR LA ESTABILIDAD METABÓLICA DE FASE I?

4. Ciclación



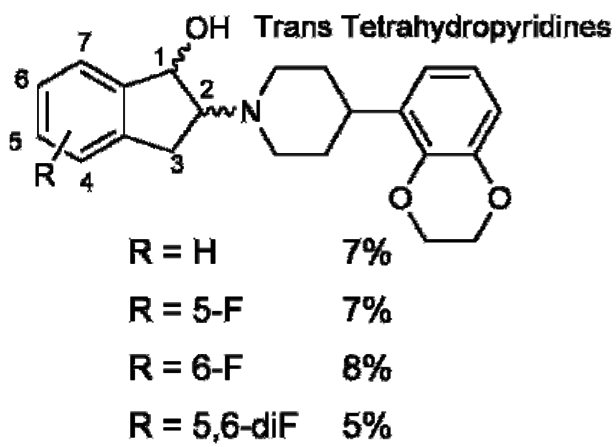
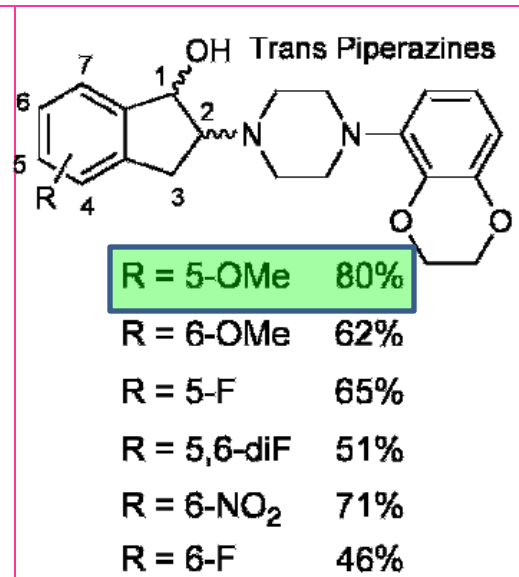
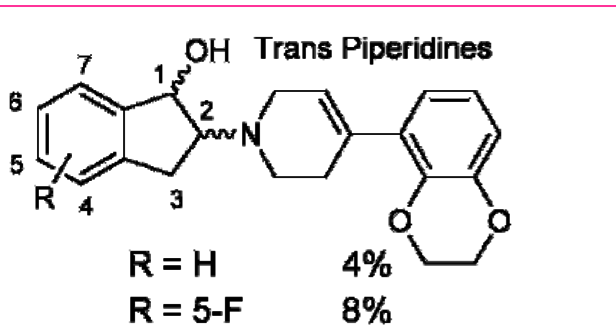
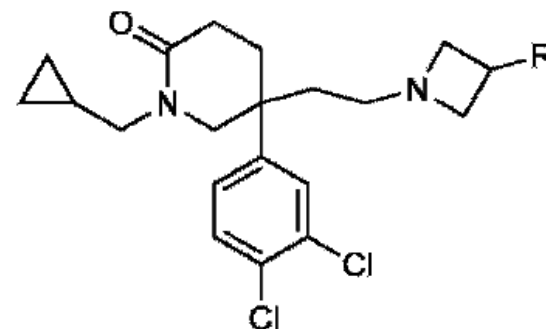
5. y 6. Cambiar el tamaño del ciclo o cambiar la quiralidad

Structure	Chirality	NK_2	$t_{1/2}$ (HLM)
	S+R	8.9	70
	S	9.0	14
	R	6.2	84
	S	9.9	<10
	S	8.1	120
	S+R	9.3	70

iii) ¿CÓMO CONTROLAR LA ESTABILIDAD METABÓLICA DE FASE I?

7. Reducir lipofilia

8. Reemplazar grupos inestables



	NK ₂	T _{1/2} (min)
	8.5	<10
	8.9	<120
	8.7	30

iii) ¿CÓMO CONTROLAR LA ESTABILIDAD METABÓLICA DE FASE II?

► Structure Modifications Strategies for Phase II Metabolic Stability Improvement

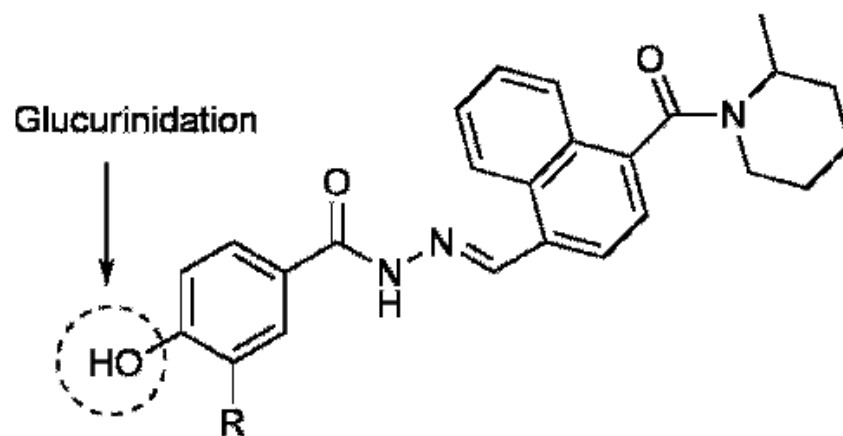
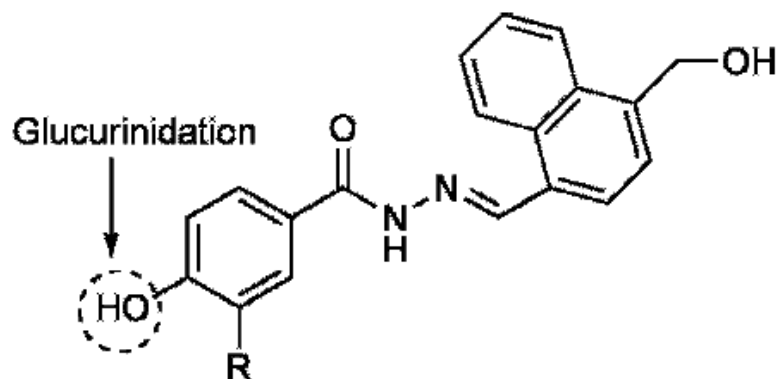
Structure modification

Introduce electron-withdrawing groups or steric hindrance

Change phenolic hydroxyl to cyclic urea or thiourea

Change phenolic hydroxyl to prodrug

1. Introducción de grupos **electron-atrayentes** o con **impedimento estérico**



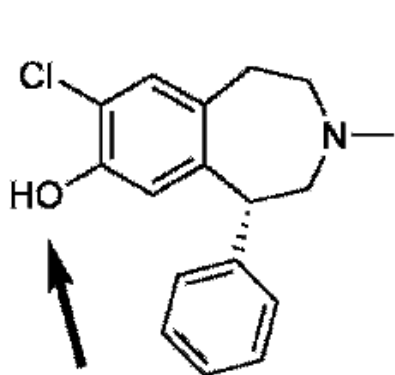
R	hGluR binding affinity (nM)	Metabolism Clearance (pmol/min/mg)
Cl	41	75
F	29	89
2,3-di-Cl	54	103
CN	30	37

R	hGluR binding affinity (nM)	Metabolism Clearance (pmol/min/mg)
Cl	8	267
CN	12	65

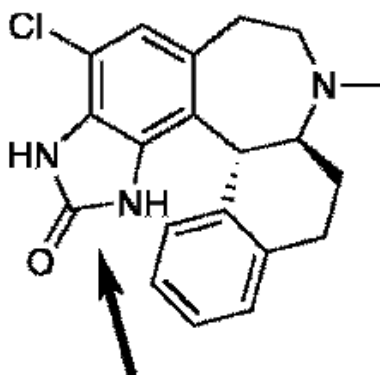
Nitrilo: grupo fuertemente electrón-atrayente

iii) ¿CÓMO CONTROLAR LA ESTABILIDAD METABÓLICA DE FASE II?

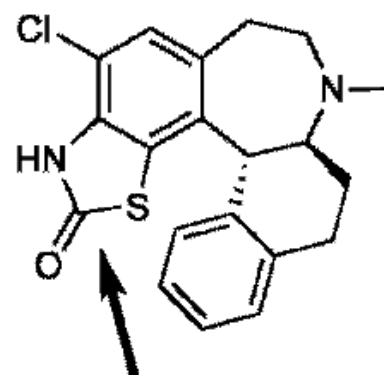
2. Cambio del hidroxilo fenólico por urea cíclica o tiourea



$K_i (D_1) = 1.2 \text{ nM}$
 $K_i (D_5) = 2.0 \text{ nM}$
 $\% F = 0.6\%$
 $AUC_{0-6h} = 0.16 \text{ h } \mu\text{g/mL}$

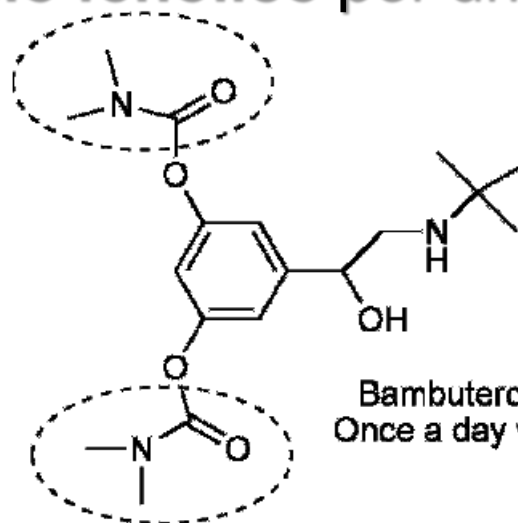


$K_i (D_1) = 7 \text{ nM}$
 $K_i (D_5) = 4.2 \text{ nM}$
 $\% F = 87\%$
 $AUC_{0-6h} = 5.9 \text{ h } \mu\text{g/mL}$



$K_i (D_1) = 2.1 \text{ nM}$
 $K_i (D_5) = 2.8 \text{ nM}$
 $\% F = \text{N/A}$
 $AUC_{0-6h} = 2.4 \text{ h } \mu\text{g/mL}$

3. Cambio del hidroxilo fenólico por un pro-fármaco



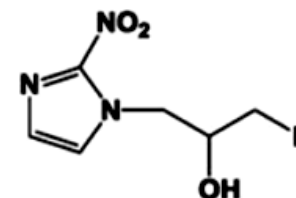
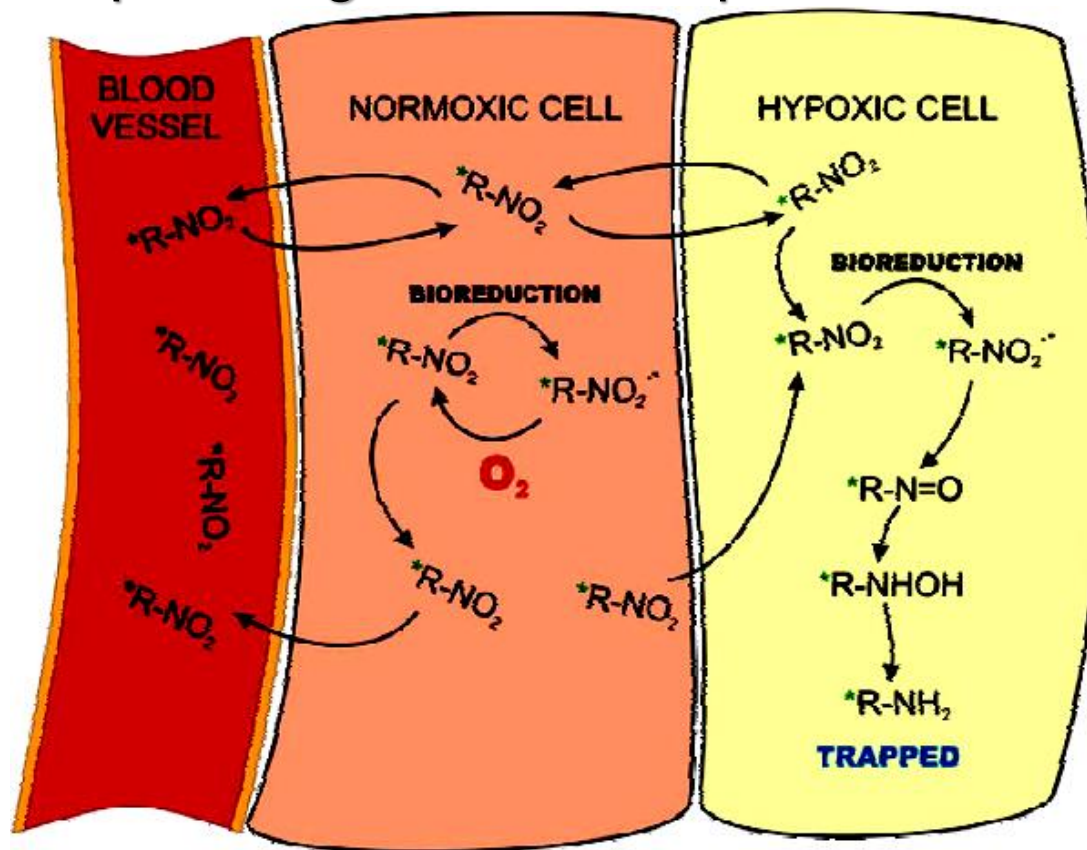
Bambuterol vs. Terbutalin
Once a day vs. 3 times a day

Atención!!! EL METABOLISMO PUEDE INTERESAR

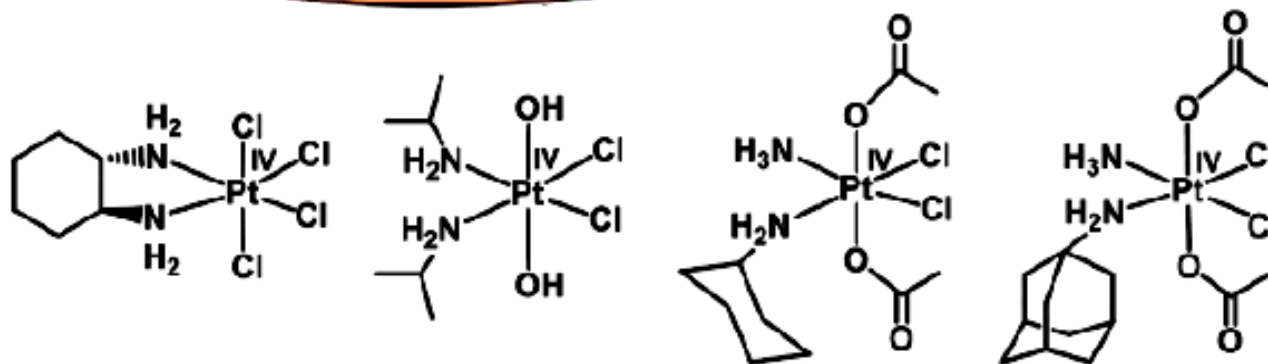
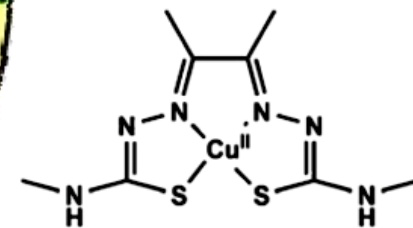
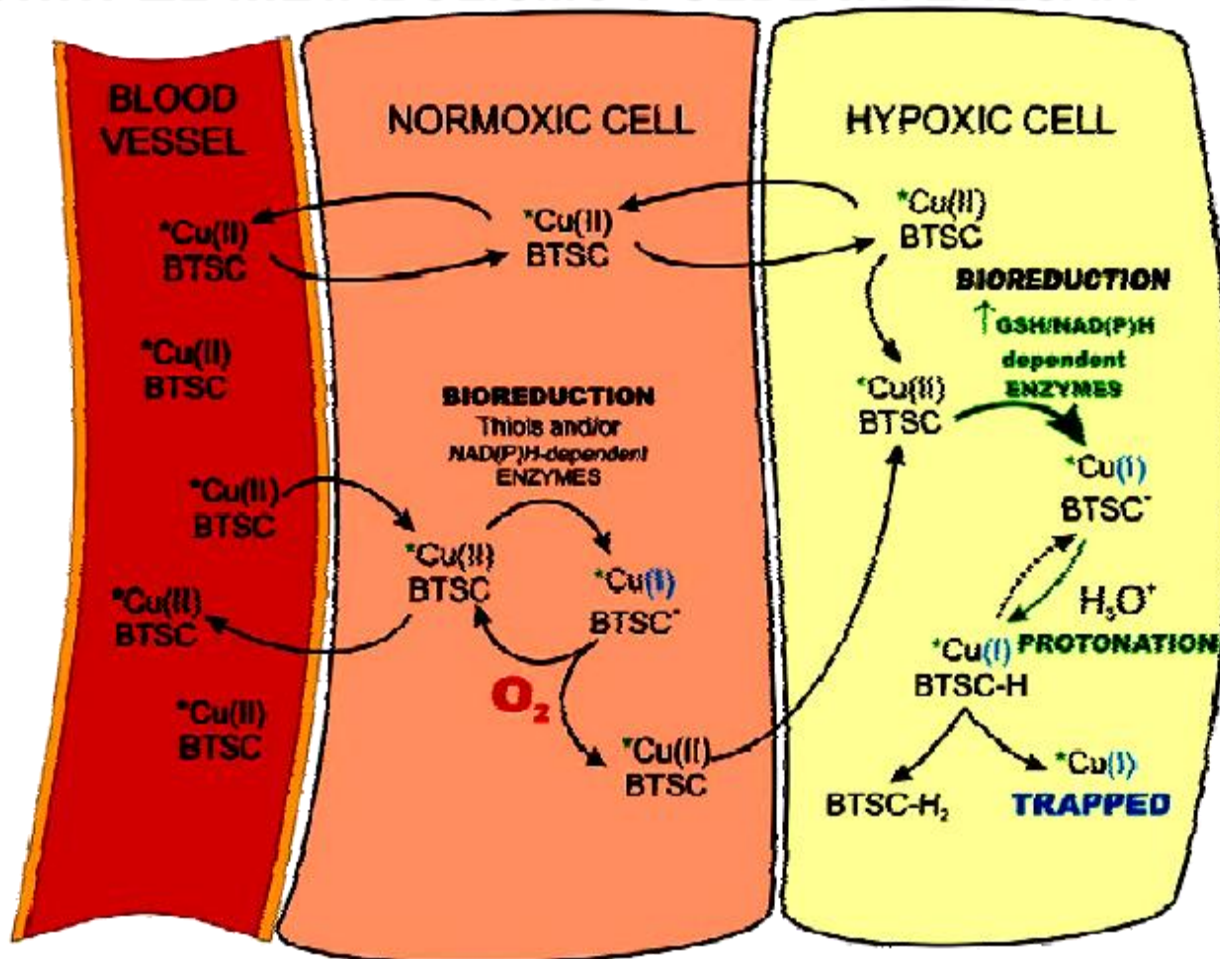
Como en el caso anterior (pro-fármacos) donde se libera un agente activo

Específicamente es de especial interés si:

- el metabolismo es tejido-específico
- se consigue que el agente activo quede confinado en el tejido de interés

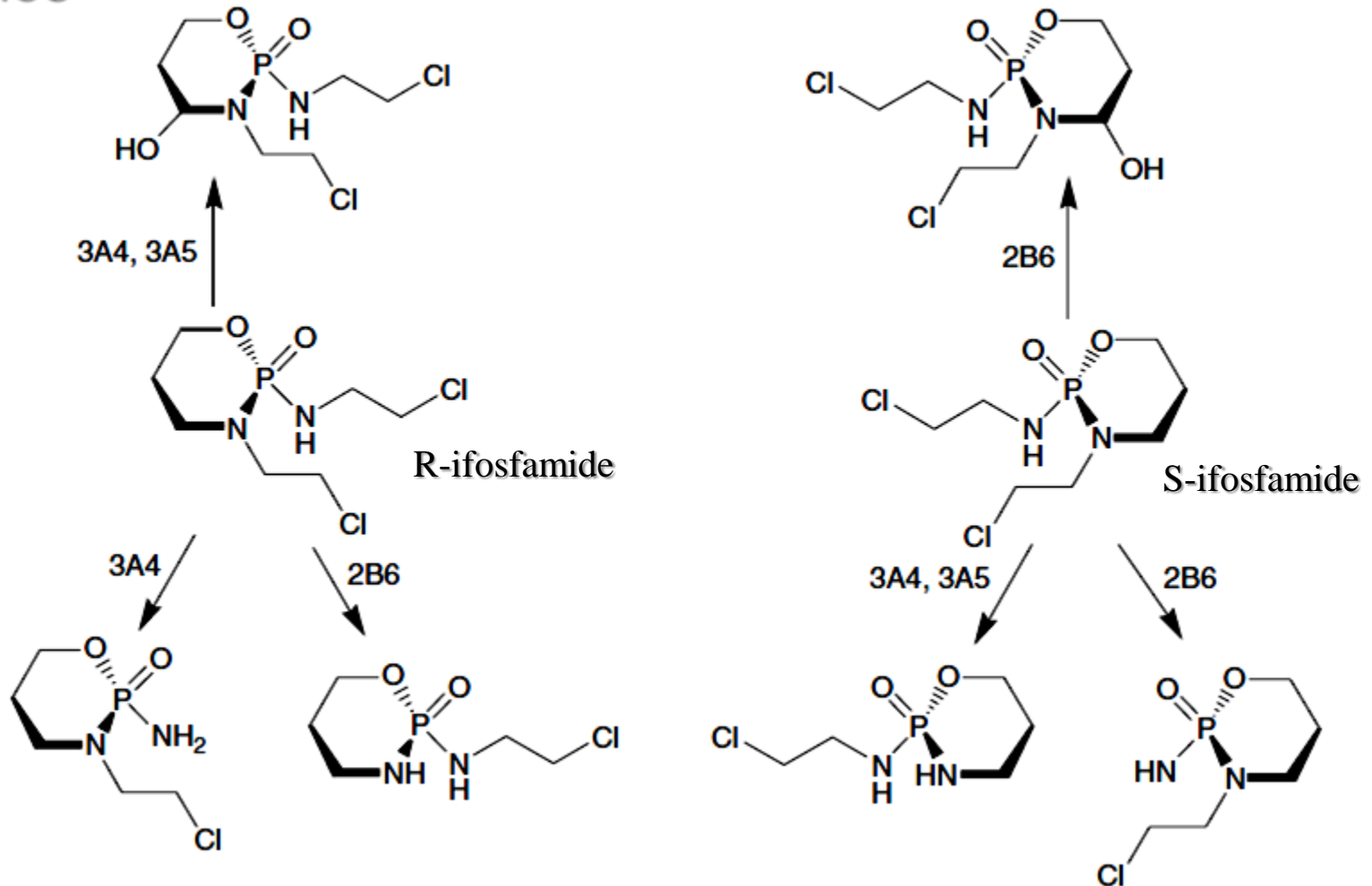


Atención!!! EL METABOLISMO PUEDE INTERESAR



EL EFECTO DE LA QUIRALIDAD EN LA ESTABILIDAD METABÓLICA

Los sistemas enzimáticos involucrados en el metabolismo son **quirales**, por ende es entendible que la quiralidad de los fármacos pueda jugar un papel en la estabilidad metabólica de los mismos



iv) ¿CÓMO CONTROLAR LA ESTABILIDAD PLASMÁTICA?

Los grupos funcionales susceptibles de la degradación plasmática son:

- Éster
- Amida
- Carbamato
- Lactama
- Lactona
- Sulfonamida

Los líderes que posean subestructuras peptídicas o peptidomiméticas deben chequearse en su estabilidad en plasma

► Structure Modifications Strategies for Plasma Stability Improvement

Structure modification

Substitute an amide for an ester

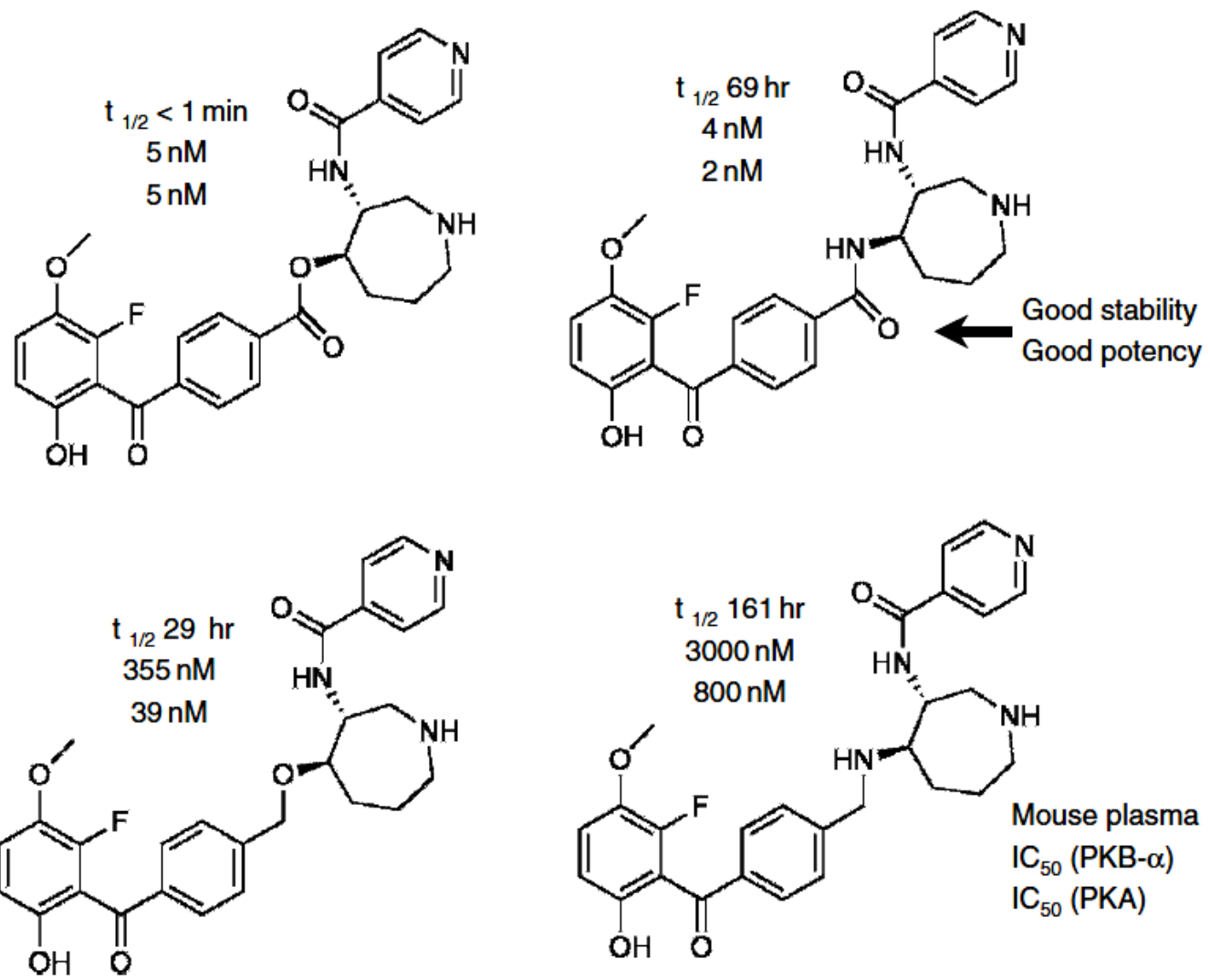
Increase steric hindrance

Add electron-withdrawing groups to decrease for antedrug

Eliminate the hydrolyzable group

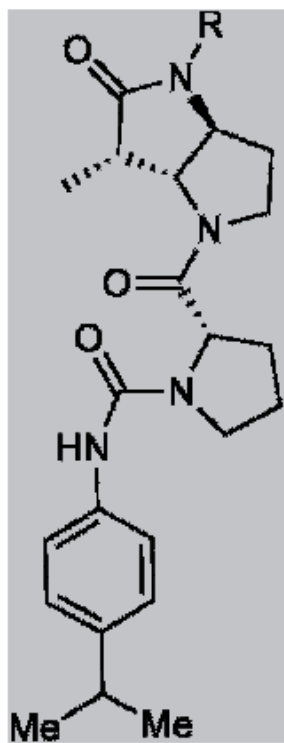
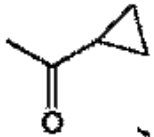
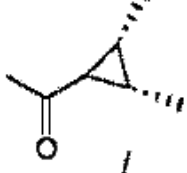
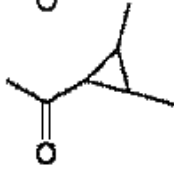
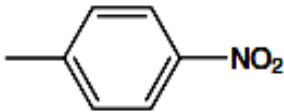
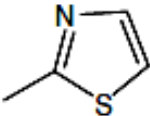
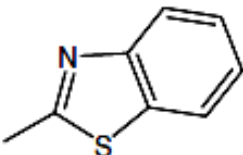
iv) ¿CÓMO CONTROLAR LA ESTABILIDAD PLASMÁTICA?

1. **Eliminar** el grupo hidrolizable
2. Sustituir un **éster** por una **amida** (u otro grupo **estable**)



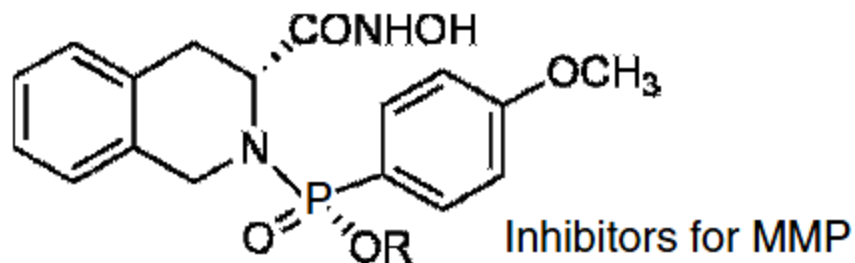
iv) ¿CÓMO CONTROLAR LA ESTABILIDAD PLASMÁTICA?

3. Incrementar el impedimento estérico

	R	Human Plasma Stability $t_{1/2}$ (h)	HCMV Protease IC50 (μM)	Ki (nM)
			0.5	0.2
		1.5	1.8	
		6	0.3	16
		>24	8.7	
		>24	1.5	446
		>24	0.18	10

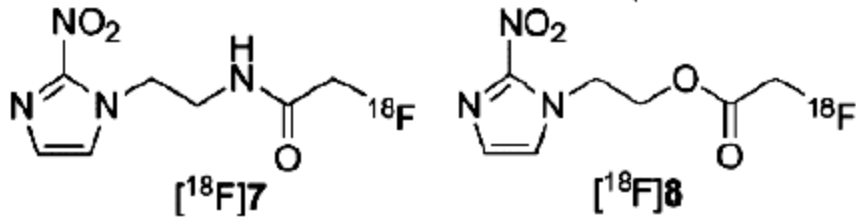
iv) ¿CÓMO CONTROLAR LA ESTABILIDAD PLASMÁTICA?

4. **Adicionar** un grupo electrón-dador

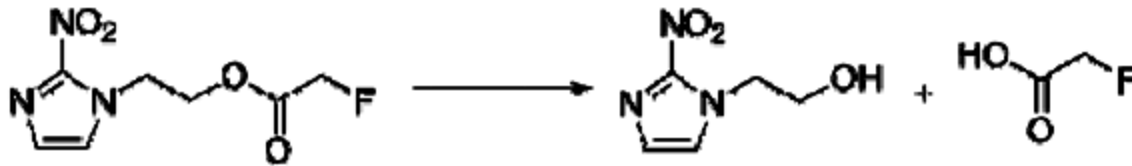


R	Human Plasma Stab. <u>%Remaining @ 60 min</u>	IC50 (μM)	
		<u>HB-EGF</u>	<u>AR</u>
Et	100	0.23	0.35
CH ₂ CH ₂ F	96	0.18	0.47
CH ₂ CHF ₂	0 ($t_{1/2} \sim 10$ min)	0.51	1.47
CH ₂ CF ₃	0 ($t_{1/2} < 1$ min)	0.73	0.95
CH ₂ CH ₂ CF ₃	99	0.31	0.97

Atención!!! EL METABOLISMO EN PLASMA PUEDE INTERESAR



	$[^{18}\text{F}]$ NEFA ($[^{18}\text{F}]7$)	$[^{18}\text{F}]$ NEFT ($[^{18}\text{F}]8$)	$[^{18}\text{F}]$ FMISO (1)
Tumor/blood	0.96	0.98	0.91
Tumor/liver	0.51	1.1	0.59
Tumor/muscle	1.14	1.41	1.74



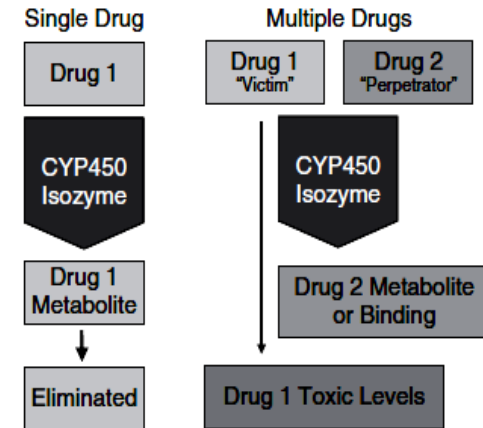
Hipótesis: las carboxilesterasas hidrolizan los enlaces lábiles y el $[^{18}\text{F}]$ -fluoroacetato generado, que tiene un rápido *clearance* de tejidos normales, permitirá mejores relaciones tumor/órgano no blanco

Zha, Z.; Zhu, L.; Liu, Y.; Du, F.; Gan, H.; Qiao, J.; Kung, H.F. Synthesis and evaluation of two novel 2-nitroimidazole derivatives as potential PET radioligands for tumor imaging. *Nucl. Med. Biol.*, 2011, 38, 501-508.

v) ¿CÓMO CONTROLAR LA INHIBICIÓN/INDUCCIÓN DE LAS CYPs?

Inhibición de Citocromo P450

- Como ya se mencionó puede llevar a retirar o restringir el uso de un fármaco de la clínica



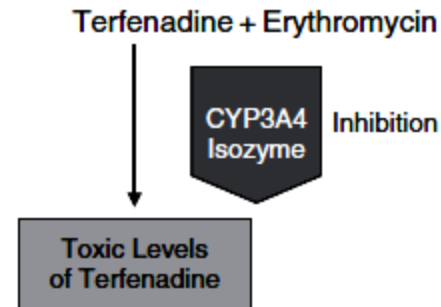
Structure Modification Strategies to Reduce CYP Inhibition

Structure Modification Strategy

Decrease the lipophilicity ($\text{Log } D_{7.4}$) of the molecule

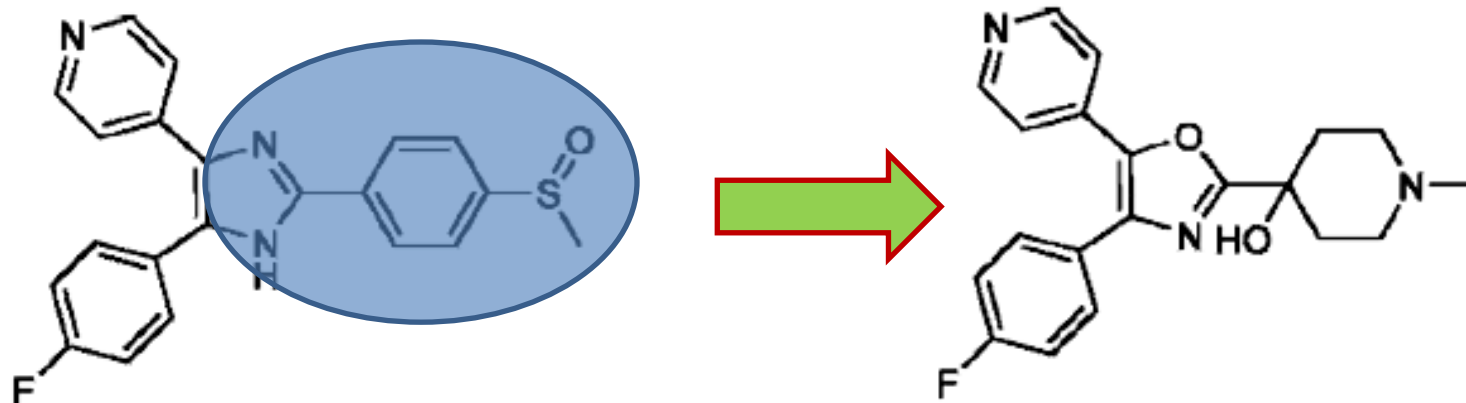
Add steric hindrance to the heterocycle para to the nitrogen

Add an electronic substitution (e.g., halogen) that reduces the $\text{p}K_a$ of the nitrogen



v) ¿CÓMO CONTROLAR LA INHIBICIÓN/INDUCCIÓN DE LAS CYPs?

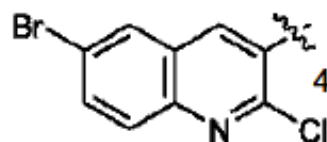
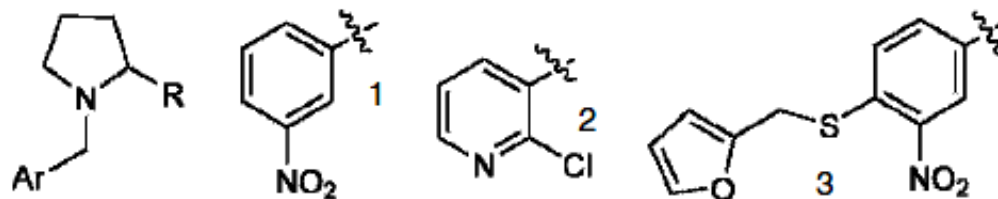
Ejemplos



p38 α IC₅₀ = 0.45 μ M
 COX-1 IC₅₀ = 5 μ M (nonselective)
 3A4 IC₅₀ < 2 μ M
 2D6 IC₅₀ > 100 μ M
 2C9 IC₅₀ < 2 μ M
 1A2 IC₅₀ = 4 μ M

p. 38 Map kinase inhibitor

p38 α IC₅₀ = 0.35 μ M
 COX-1 IC₅₀ > 100 μ M
 3A4 IC₅₀ = 100 μ M
 2D6 IC₅₀ = 22 μ M
 2C9 IC₅₀ > 100 μ M
 1A2 IC₅₀ > 100 μ M

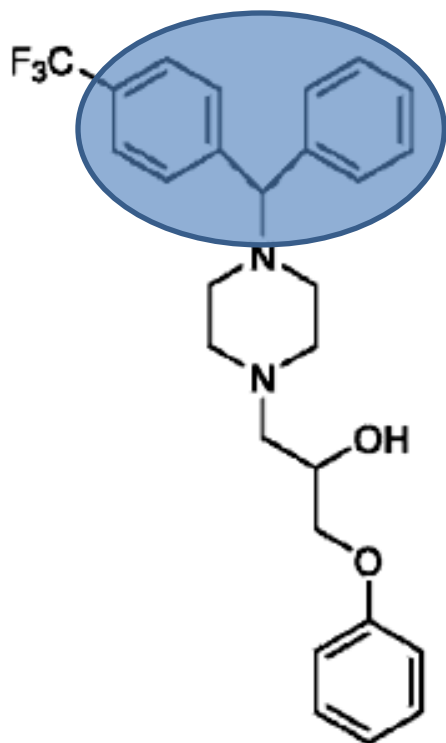


Compd	GPCR IC ₅₀ (uM)	CYP2D6 IC ₅₀ (uM)	Selectivity Ratio
1	0.33	<0.05	<0.15
2	0.22	0.02	0.09
3	0.22	2.2	10
4	0.19	22	116

G-protein-coupled receptor (GPCR) target

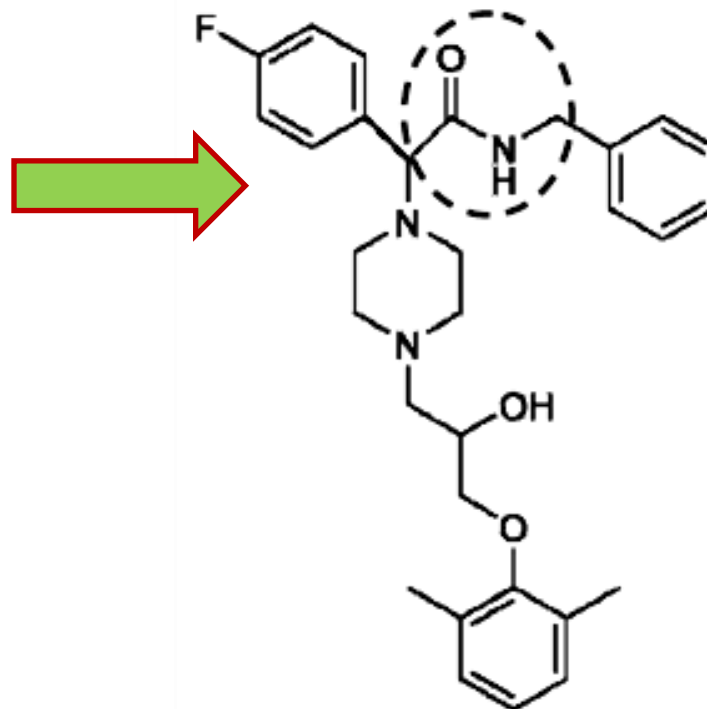
v) ¿CÓMO CONTROLAR LA INHIBICIÓN/INDUCCIÓN DE LAS CYPs?

Ejemplos



IC₅₀ = 893 nM
CYP2D6 (% Inhib. @ 2 μM) = 87%

sodium channel-blocking activity

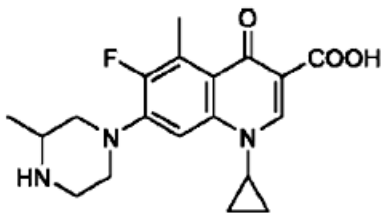


IC₅₀ = 149 nM
CYP2D6 (%Inhib@ 2 μM) = 20%

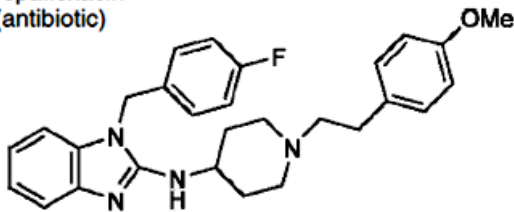
v) ¿CÓMO EVITAR LA INTERACCIÓN CON hERG?

- hERG (“*human ether-a-go-go related gene*”) es el gen que codifica para un canal cardíaco iónico de potasio
- Si el canal es bloqueado, se inicia un mecanismo que puede conducir a arritmias cardíacas
- Por lo que ciertos compuestos bloquean este sistema e inducirán arritmia cardíaca
- El margen de seguridad para hERG está definido por $IC_{50}/C_{max, no\ unida} > 30$

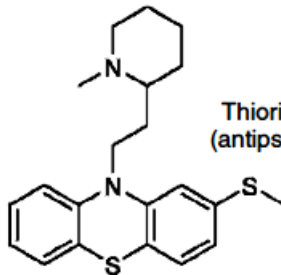
**RETIRADAS DEL
MERCADO POR
PROBLEMAS CON hERG**



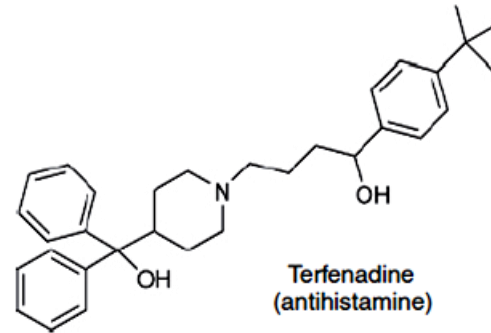
Grepafloxacin
(antibiotic)



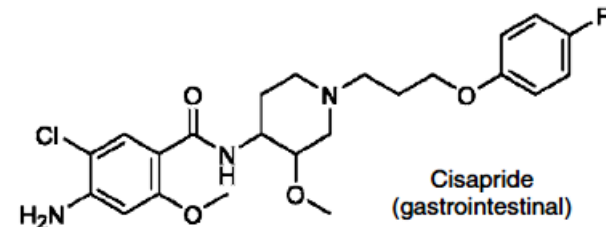
Astemizole
(antihistamine)



Thioridazine
(antipsychotic)



Terfenadine
(antihistamine)



Cisapride
(gastrointestinal)

v) ¿CÓMO EVITAR LA INTERACCIÓN CON hERG?

Structure Modifications to Reduce hERG Blocking

Structure Modification Strategy

Reduce the pK_a (basicity) of the amine

Reduce the lipophilicity and number of substructures in the binding region

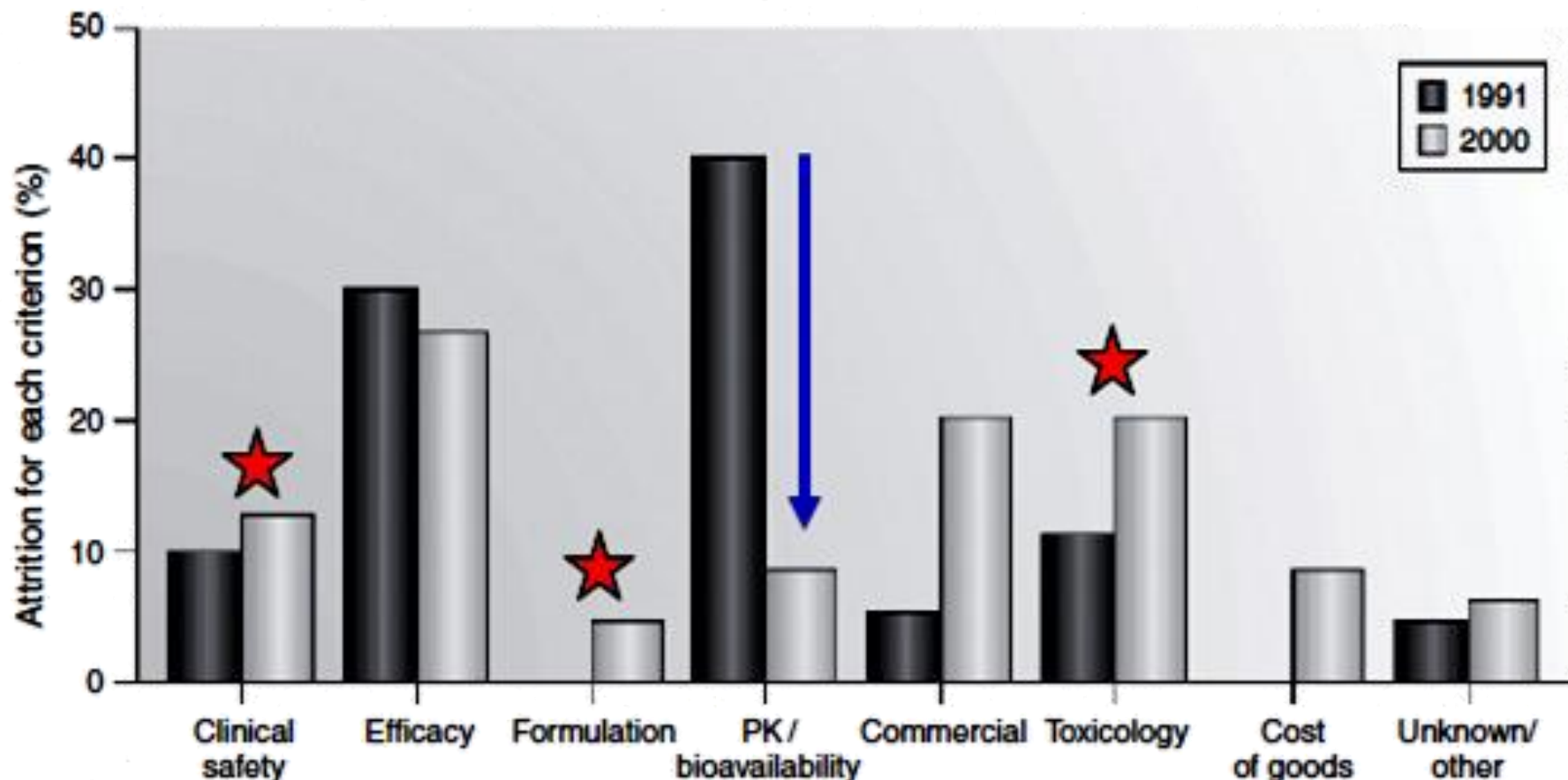
Add acid moiety

Add oxygen H-bond acceptors

Rigidify linkers

vi) ¿CÓMO PREVENIR LA TOXICIDAD?

- La toxicidad sigue siendo una de las causas importantes para retirar un compuesto en la etapa de desarrollo de fármacos



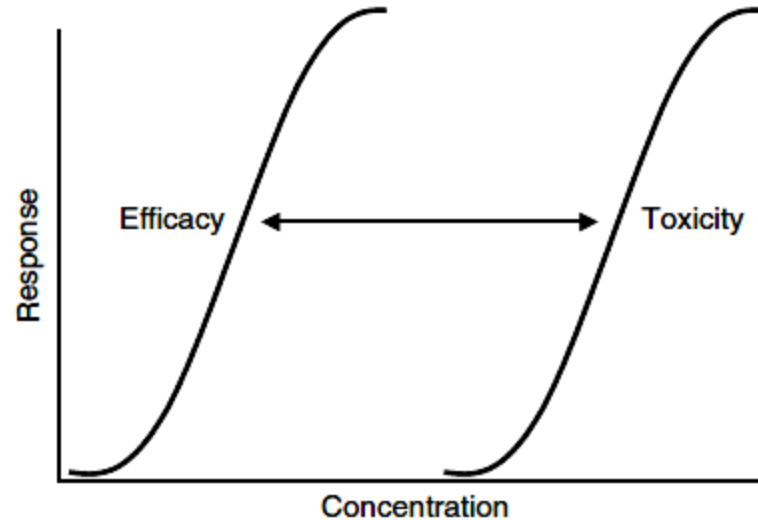
Between 1991 and 2000, development attrition due to pharmacokinetics (PK) and bioavailability was greatly reduced. Toxicology, clinical safety, and formulation remain significant drug-like property issues.

vi) ¿CÓMO PREVENIR LA TOXICIDAD?

- La toxicidad sigue siendo una de las causas importantes para retirar un compuesto en la etapa de desarrollo de fármacos
- Los principales hechos tóxicos son
 - carcinogenicidad*
 - teratogenicidad*
 - toxicidad reproductiva*
 - citotoxicidad*
 - fosfolipidosis*
- Los mecanismos tóxicos incluyen: metabolitos reactivos, inducción de genes, mutagenicidad, estrés oxidativo y respuesta autoinmune

vi) ¿CÓMO PREVENIR LA TOXICIDAD?

- La **ventana de seguridad** es el rango de concentración entre respuesta eficaz y respuesta tóxica



Es importante maximizar la ventana de seguridad (índice terapéutico) para un candidato a fármaco

vi) ¿CÓMO PREVENIR LA TOXICIDAD?

Etapas para mejorar la seguridad

1. **Evitar** subestructuras que son **conocidas por inducir respuestas tóxicas**

Durante la selección del líder, los compuestos que contengan subestructuras potencialmente tóxicas pueden recibir menor prioridad

Partial List of Substructures that may Initiate Toxicity and Their Proposed Reactive Metabolites

Substructure	Proposed reactive metabolite
Aromatic amine	Hydroxyl amine, nitroso, quinone-imine (oxidative stress)
Hydroxyl amine	Nitroso (oxidative stress)
Aromatic nitro	Nitroso (oxidative stress)
Nitroso	Nitroso, diazonium ions (oxidative stress)
Alkyl halide	Acylhalide
Polycyclic aromatic	Epoxide
α,β -Unsaturated aldehyde	Michael acceptor
Carboxylic acid	Acyl glucuronide
Nitrogen-containing aromatic	Nitrenium
Bromo aromatic	Epoxide
Thiophene	S-oxide, epoxide
Hydrazine	Diazene, diazonium, carbenium ion
Hydroquinones	<i>p</i> -Benzoquinone
<i>o</i> - or <i>p</i> -Alkylphenols	<i>o</i> - or <i>p</i> -Quinone methide
Quinone	Quinone (oxidative stress)
Azo	Nitrenium
Furans	α,β -Unsaturated dicarbonyl
Pyrrole	Pyrrole oxide
Acetamide	Radical (oxidative stress)
Nitrogen mustard	Aziridium ions
Ethynyl	Ketene
Nitrosamine	Carbenium ion
Polyhalogenated	Radicals, carbene
Thioamide	Thiourea
Vinyl	Epoxide
Aliphatic amines	Iminium ion
Phenol	Quinone
Arylacetic, arylpropionic acids	
Imidazole	
Medium-chain fatty acids	

vi) ¿CÓMO PREVENIR LA TOXICIDAD?

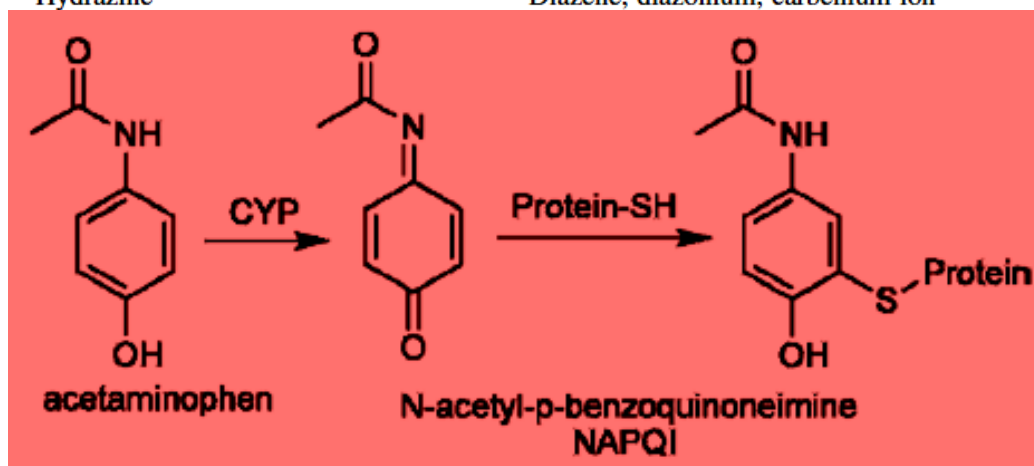
Etapas para mejorar la seguridad

1. **Evitar** subestructuras que son **conocidas por inducir respuestas tóxicas**

Durante la selección del líder, los compuestos que contengan subestructuras potencialmente tóxicas pueden recibir menor prioridad

Partial List of Substructures that may Initiate Toxicity and Their Proposed Reactive Metabolites

Substructure	Proposed reactive metabolite
Aromatic amine	Hydroxyl amine, nitroso, quinone-imine (oxidative stress)
Hydroxyl amine	Nitroso (oxidative stress)
Aromatic nitro	Nitroso (oxidative stress)
Nitroso	Nitroso, diazonium ions (oxidative stress)
Alkyl halide	Acyhalide
Polycyclic aromatic	Epoxide
α,β -Unsaturated aldehyde	Michael acceptor
Carboxylic acid	Acyl glucuronide
Nitrogen-containing aromatic	Nitrenium
Bromo aromatic	Epoxide
Thiophene	S-oxide, epoxide
Hydrazine	Diazene, diazonium, carbenium ion



Phenol

Quinone

Arylacetic, arylpropionic acids

Imidazole

Medium-chain fatty acids

vi) ¿CÓMO PREVENIR LA TOXICIDAD?

Etapas para mejorar la seguridad

2. En las primeras modificaciones sintéticas del líder se **debe remover** cualquier subestructura **potencialmente tóxica**
3. En las primeras modificaciones sintéticas del líder **no se debe adicionar** cualquier subestructura **potencialmente tóxica**. Sólo es aceptable si es resultado de una exploración SAR
4. **Realizar ensayos *in vitro*** de búsqueda de metabolitos reactivos para los compuestos potencialmente tóxicos
5. Los datos de potencial tóxico del punto anterior deben ser investigados para **elucidar la estructura de los metabolitos o intermedios “atrapados”**
6. **Utilizar la estructura de los metabolitos para reducir** la bioactivación metabólica en futuros compuestos

vi) ¿CÓMO PREVENIR LA TOXICIDAD?

¿Qué estudios se deben hacer?

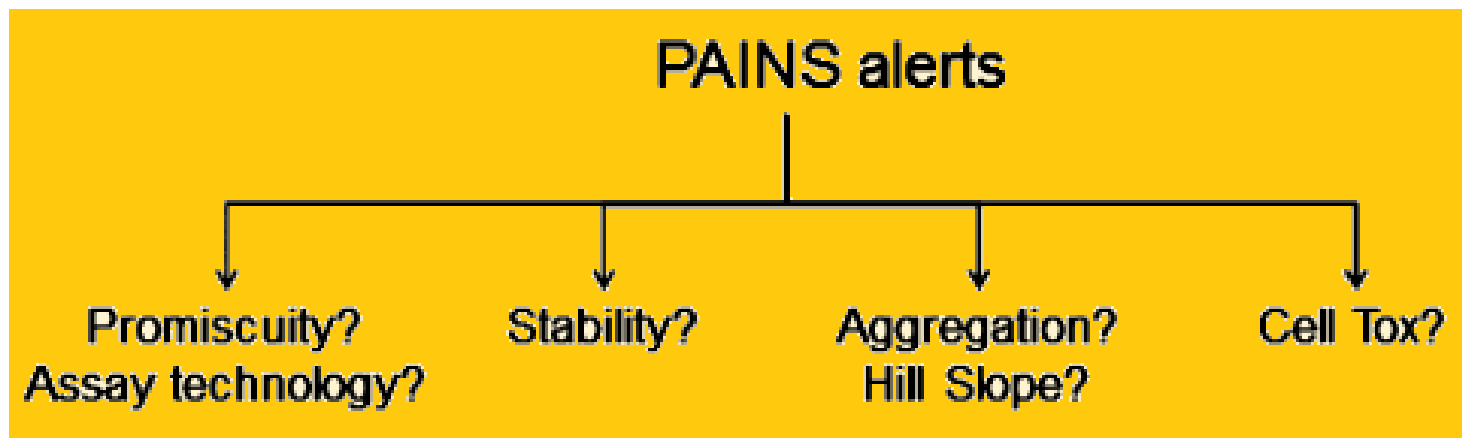
Algunos de los ensayos recomendados por las agencias son:

- Mutagenicidad (*in vitro*)
- Clastogenicidad
- Toxicidad aguda (LD₅₀)
- Toxicidad sub-aguda (LD₅₀)
- Toxicidad crónica (LD₅₀)
- Teratogenicidad

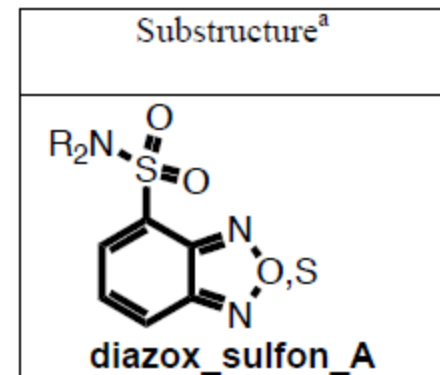
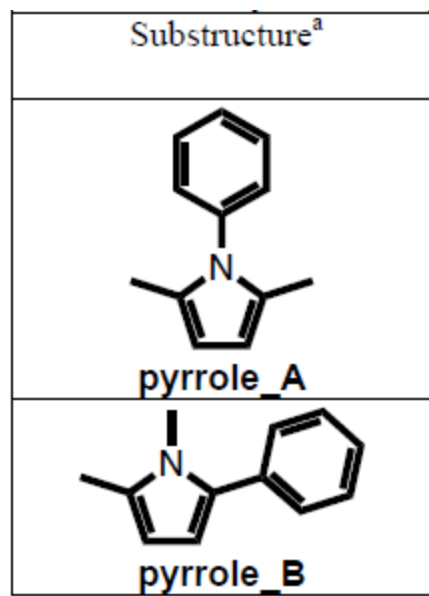
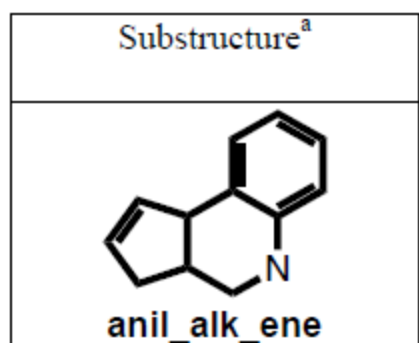
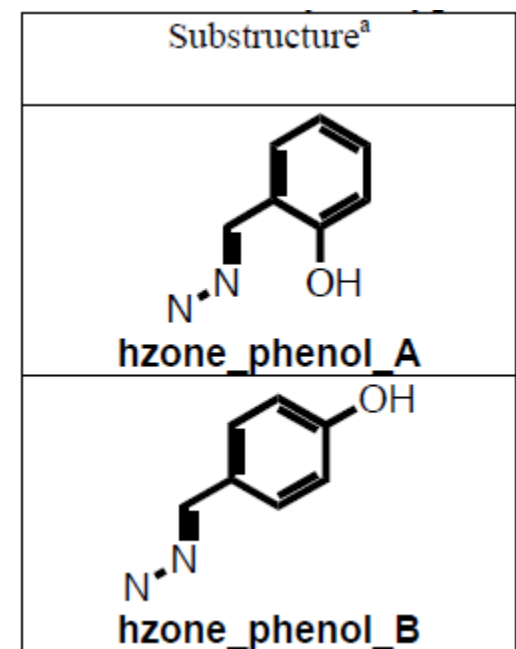
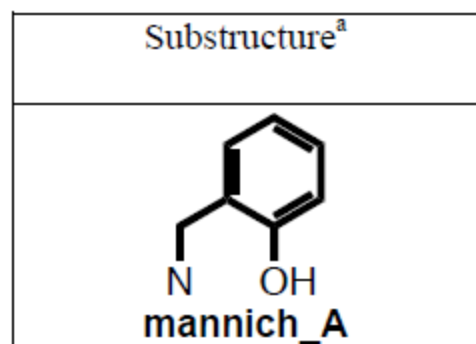
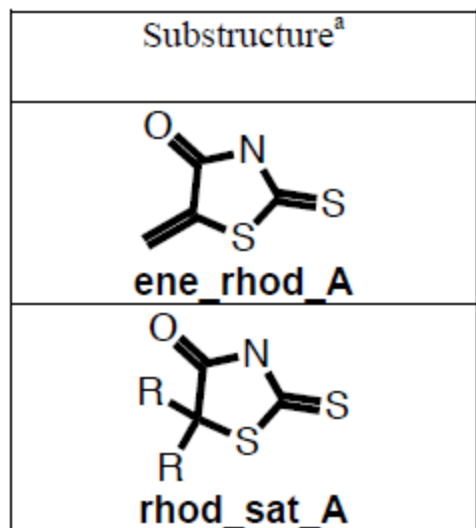
vii) CUIDADO CON LOS PAINS!!

J. Baell y G. Holloway en 2003 comenzaron a evidenciar que ciertos compuestos promovían interferencias en ensayos biológicos *in vitro* (HTS) generando **falsos positivos**

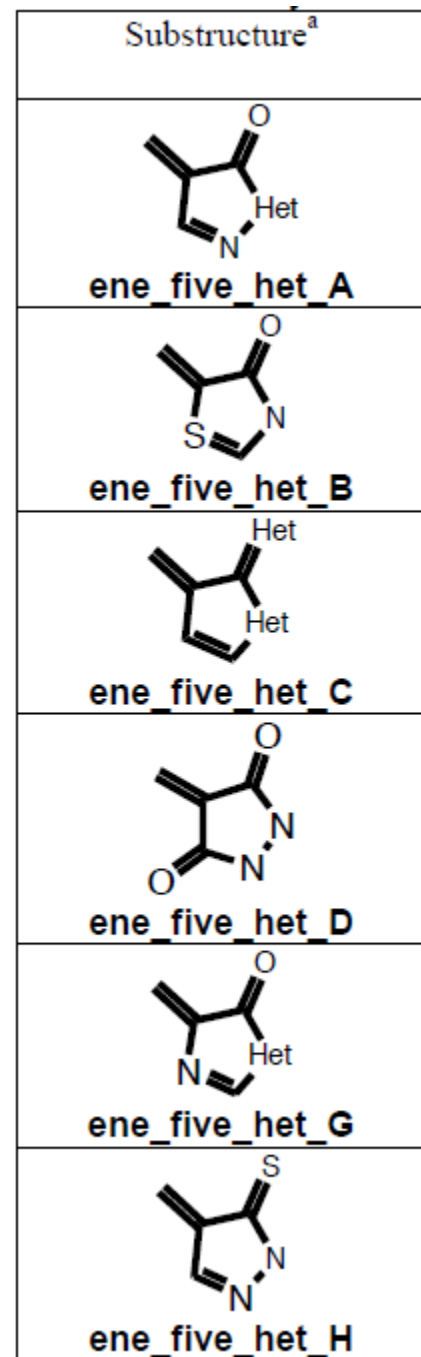
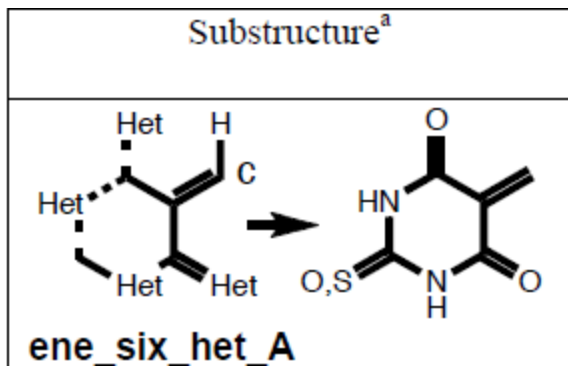
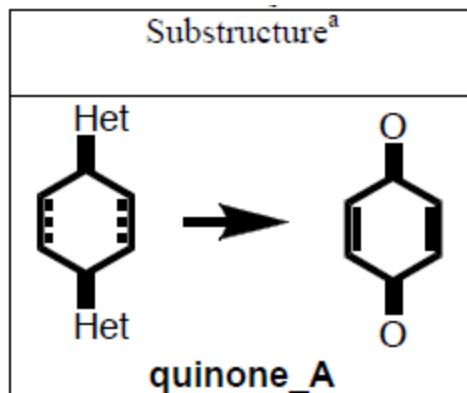
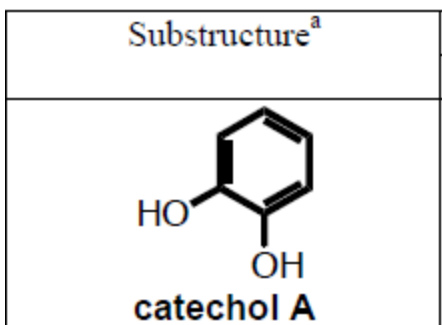
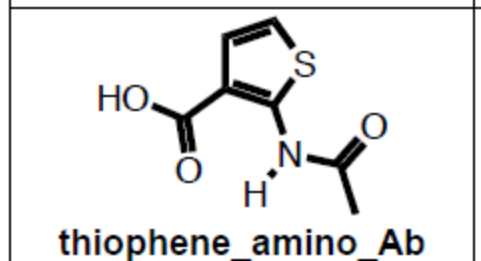
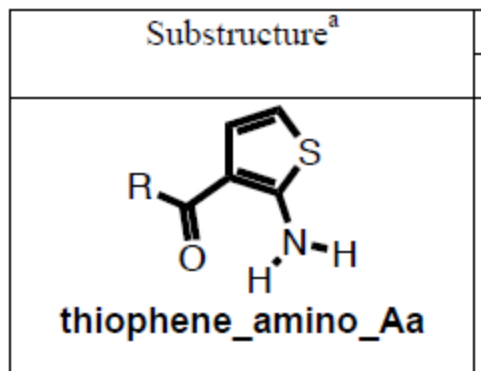
Los definieron como **PAINS** (**Pan-Assay Interference Compounds**)



vii) CUIDADO CON LOS PAINS!!

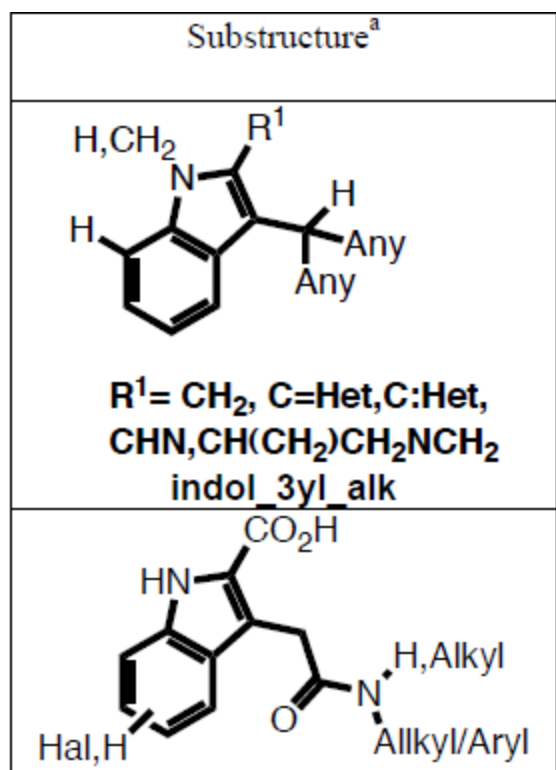
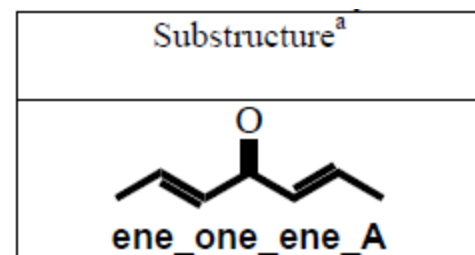
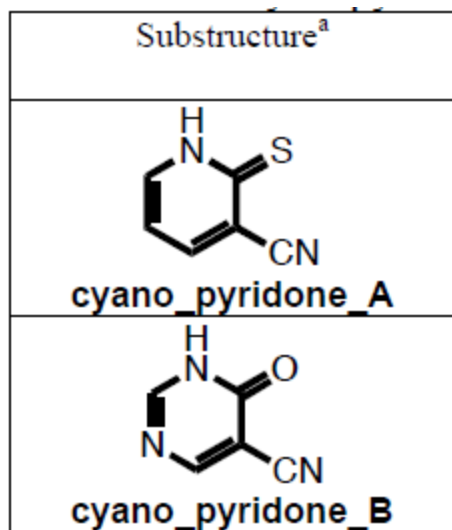
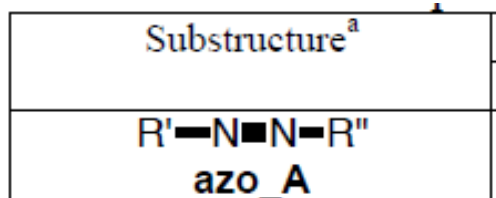


vii) CUIDADO CON LOS PAINS!!



vii) CUIDADO CON LOS PAINS!!

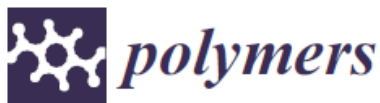
PAINS PUTATIVOS



■ Medicinal Chemistry & Drug Discovery





Selective Hypoxia-Cytotoxin 7-Fluoro-2-Aminophenazine 5,10-Dioxide: Toward “Candidate-to-Drug” Stage in the Drug-Development Pipeline

Belén Dávila^{+, [a]}, Carina Sánchez^{+, [a]}, Marcelo Fernández^[b], Hugo Cerecetto^{*, [a, c]},
Nicole Lecot^{*, [a, d]}, Pablo Cabral^[c], Romina Glisoni^[e] and Mercedes González^[a]

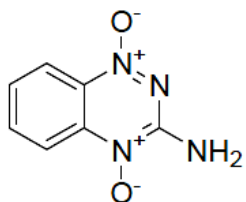


Article

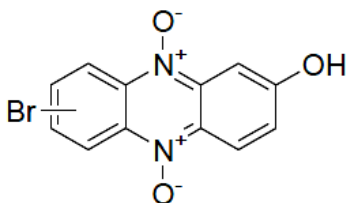
Development and Evaluation of 2-Amino-7-Fluorophenazine 5,10-Dioxide Polymeric Micelles as Antitumoral Agents for 4T1 Breast Cancer

Nicole Lecot^{1,2,*} , Belén Dávila², Carina Sánchez², Marcelo Fernández³, Mercedes González², Pablo Cabral¹ ,
Hugo Cerecetto^{1,2}  and Romina Glisoni^{4,5,*} 

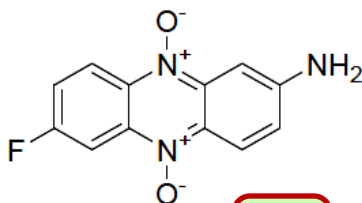
EJEMPLOS NUESTROS



P_{V79} (μM) = 30.0



P_{V79} (μM) = 10.0



P_{V79} (μM) = 2.5

1	Absorption/Distribution				Metabolism	Toxicity			LogS ^j	
	HIA ^a	Caco-2 ^b	P-gp inh/subs ^c	OCT2 inh ^d	CYP inh/subs ^e	hERG ^f	Mut ^g	Mic ^h		Carc ⁱ
1	(+)	(+)	(-)	(-)	CYP4501A2 inh	(-)	(+)	(+)	(-)	-3.478

^a Human intestinal absorption. If the compound has the HIA% more than 30 %, it is labeled as (+) [20]; ^b Caco-2 permeability. If the compound has the Caco-2 permeability value $\geq 8 \times 10^{-6}$ cm/s, it is labeled as high Caco-2 permeability (+) [21]; ^c P-glycoprotein inhibition or substrate [22,23]. Non-inhibition or ability to be substrate is labeled as (-); ^d Renal organic cation transporter (OCT2) inhibition [24]. Non-inhibition is labeled as (-); ^e Ability to be substrate or inhibit Cytochrome P450 isoenzymes (CYP450 2C9, CYP450 2D6, CYP450 3A4, CYP450 1A2, and CYP 2C19) [25]. It is shown the predicted isoform-CYP that the compound potentially inhibits; ^f Human ether-a-go-go-related gene (hERG) inhibition [26,27]. Non-inhibition is labeled as (-); ^g *In vitro* mutagenicity according to Ames test. If the compound is mutagenic, it is labeled as (+) [28]; ^h *In vivo* genotoxicity. If the compound produces *in vivo* micronucleus, it is labeled as (+) [29]; ⁱ Potential as carcinogen. Non-carcinogen is labeled as (-) [30]; ^j Aqueous solubility [31].

Table 1. Predicted drug-like properties of phenazine dioxide 1.

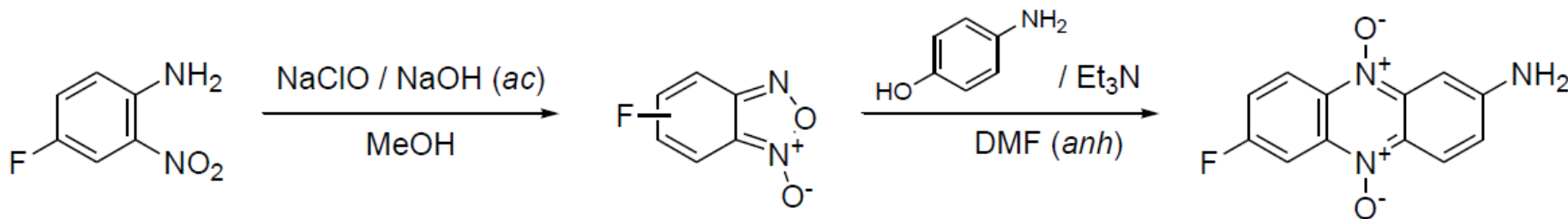


Figure 2. Synthetic two-steps procedure used to prepare 1 in a scale up to 3 g.

- Formulación para la mejora de la solubilidad
- Determinación experimental de: mutagenicidad y clastogenicidad

EJEMPLOS NUESTROS

LogS ^a		saline:Tween 80 micelles loaded with 1						
in water	in saline:Tween 80	t (h)	T (°C)	Peak 1		Peak 2		PDI ^d
				D_h (nm) ^b	%	D_h (nm) ^c	%	
-3.07	-2.17	0	25	9.0±0.2	28±2	632.1±60	72±2	0.570±0.123
			37	9.5±0.1	57±2	498.3±75.4	43±2	0.430±0.030
		24	25	9.3±0.2	57±2	686.7±56.2	43±2	0.614±0.120
			37	9.7±0.3	74±2	337.5±89.9	26±2	0.438±0.117
1-free saline:Tween 80 micelles								
		24	25	16.5±0.9	85±4	264.0±59.6	15±4	0.367±0.009
			37	16.2±0.5	85±2	235.6±66.2	15±2	0.342±0.003

^a Determined experimentally at 25 °C; ^b population of smaller size; ^c population of larger size; ^d Polydispersity index.

Table 2. Properties, determined by DLS, of 1-formulation developed herein.

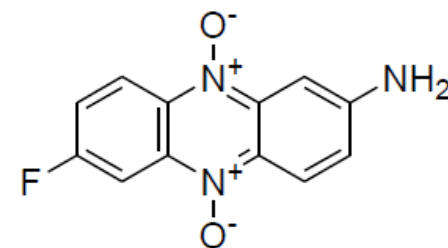
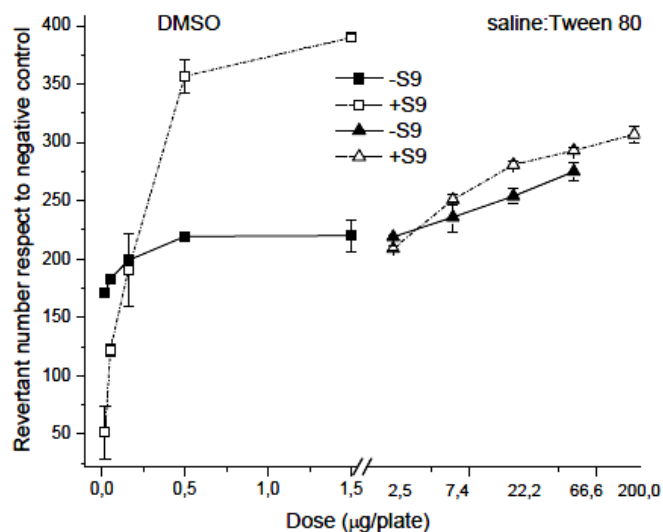


Figure 3. Number of revertants, respect to negative control, of *Salmonella typhimurium* strains incubated with 1 at different doses, in different vehicles and in the absence (-S9) and presence (+S9) of metabolic activation.

EJEMPLOS NUESTROS

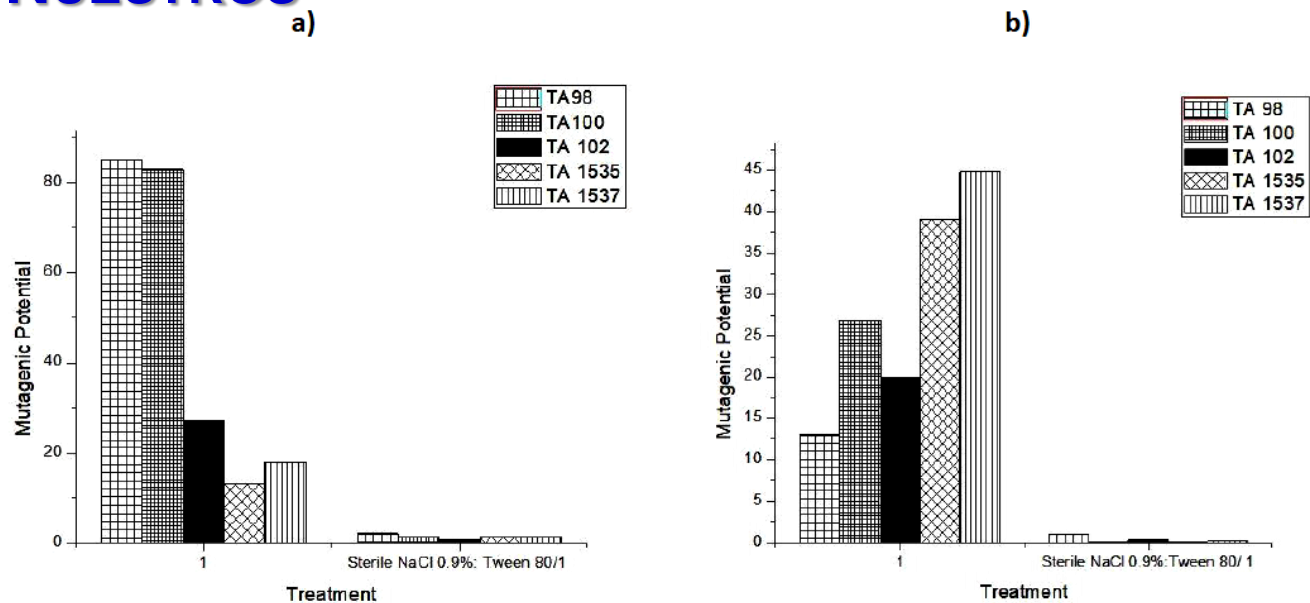


Figure 4. Mutagenic potential of 1 in DMSO and in saline:Tween 80 a) without S9 and b) with S9 activation.

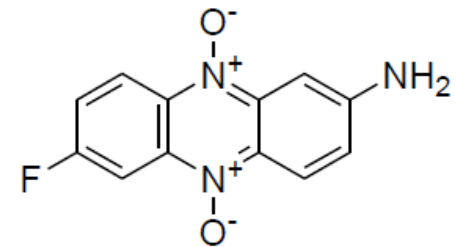
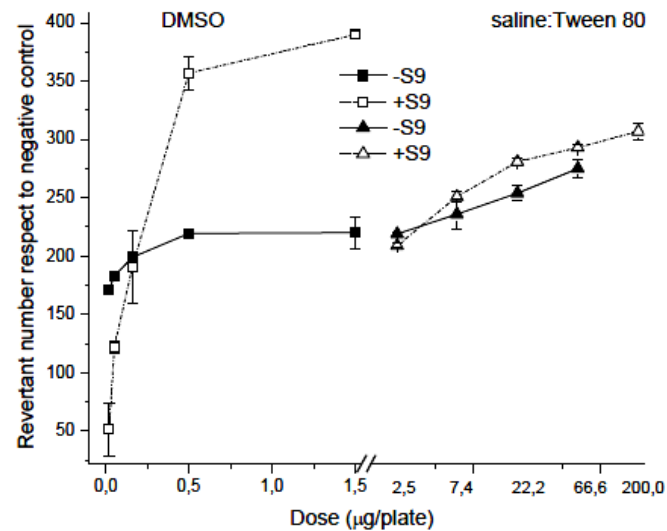


Figure 3. Number of revertants, respect to negative control, of *Salmonella typhimurium* strains incubated with 1 at different doses, in different vehicles and in the absence (-S9) and presence (+S9) of metabolic activation.



ELSEVIER



CrossMark

Liposomal encapsulation masks genotoxicity of a chemotherapeutic agent in regulatory toxicology assessments

Jenolyn F. Alexander, BTech, MS, David Aguirre-Villarreal¹, Biana Godin, MPharm, PhD*

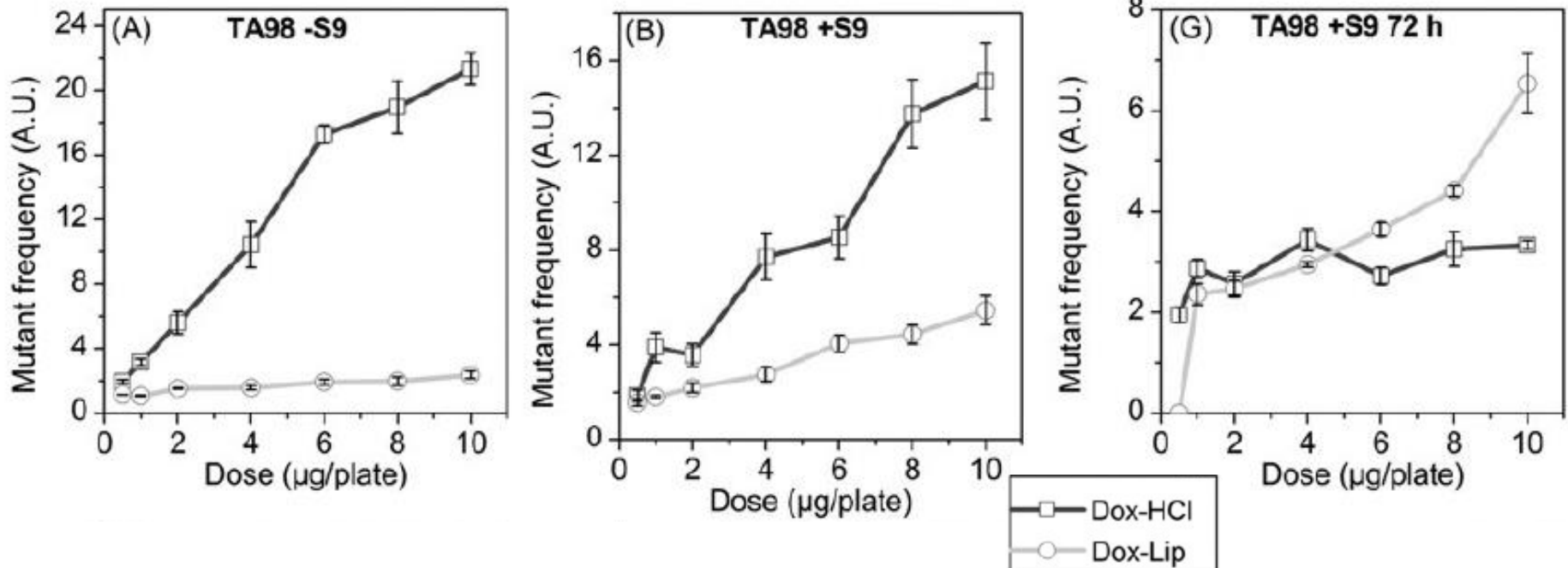


Figure 1. Mutagenicity of Dox-HCl and Dox-Lip as assessed by the Ames assay. (A-F) Mutant frequency of Dox-HCl and Dox-Lip expressed by *Salmonella typhimurium* strains - TA98, TA102 and TA1537, in the absence (-S9) and presence (+S9) of metabolic activation, normalized to spontaneous revertants. (G) Mutant frequency expressed by TA98 when Dox-Lip was treated with metabolic enzymes for 72 h prior to the assay. (H and I) Stability of Dox-HCl and its release kinetics in PBS and S9 mix over time (mean \pm SEM, * $p \leq 0.05$).

EJEMPLOS NUESTROS

Treatment	PCE/NCE	% MN
1-formulation (2 mg/kg bw)	0.47±0.04 ⁽⁺⁺⁾ , ^(**)	2.43±0.36 ^(**) , ^(^^)
1-formulation (200 mg/kg bw)	0.23±0.07 ^(**) , ^(^)	2.37±0.52 ^(**) , ^(^)
positive control (cyclophosphamide, 100 mg.kg bw)	0.45±0.07 ^(**)	1.50±0.05 ^(**)
negative control (sterile physiological saline:Tween 80 (4:1, v/v))	0.96±0.01	0.35±0.07

⁽⁺⁺⁾ Different to 1-formulation at 200 mg/kg bw ($p < 0.01$); ^(**) Different respect to negative control ($p < 0.01$); ^(^^) Different respect to positive control ($p < 0.01$); ^(^) Different respect to positive control ($p < 0.05$).

Table 3. Micronucleus assay results.

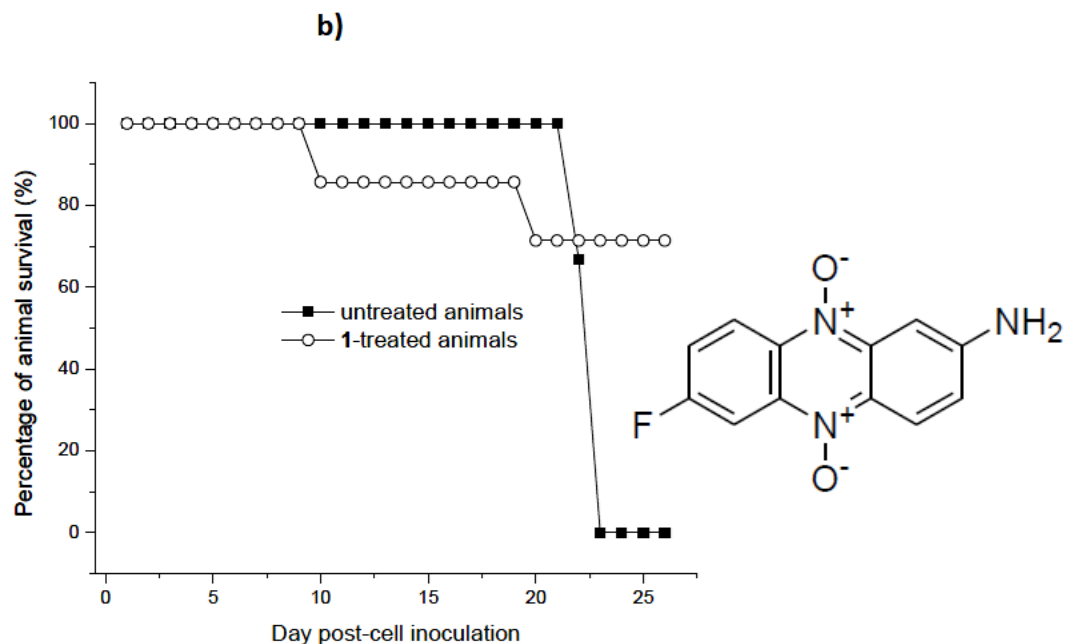
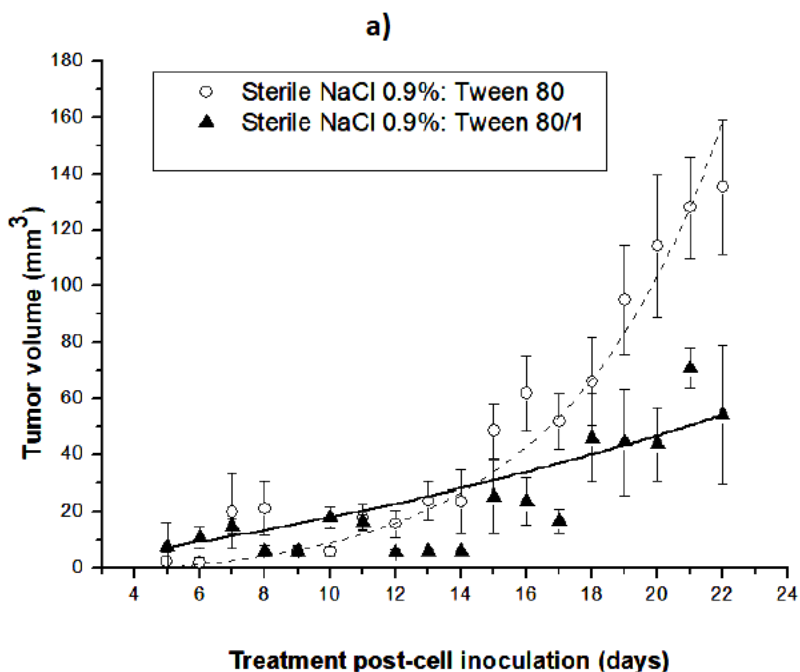


Figure 5. *In vivo* proof of concept. a) Evolution of tumoral sizes in the different treatments. Arrows indicate day of intraperitoneal administrations (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$). b) Animal survival in the different treatments.**

Article

Multi-Anti-Parasitic Activity of Arylidene Ketones and Thiazolidene Hydrazines against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp.

Guzmán Álvarez ^{1,*}, Cintya Perdomo ¹, Cathia Coronel ², Elena Aguilera ³, Javier Varela ³, Gonzalo Aparicio ^{4,5}, Flavio R. Zolessi ^{4,5}, Nallely Cabrera ⁶, Celeste Vega ², Miriam Rolón ², Antonieta Rojas de Arias ², Ruy Pérez-Montfort ⁶, Hugo Cerecetto ³ and Mercedes González ³

Figure 7. Dose-response effect of GAT1033 on the curvature of the tail. Incubation concentrations were 0–300 μ M for 72 h (illustrated with the brown triangle). The picture at the bottom shows a non-treated embryo at the same developmental stage.

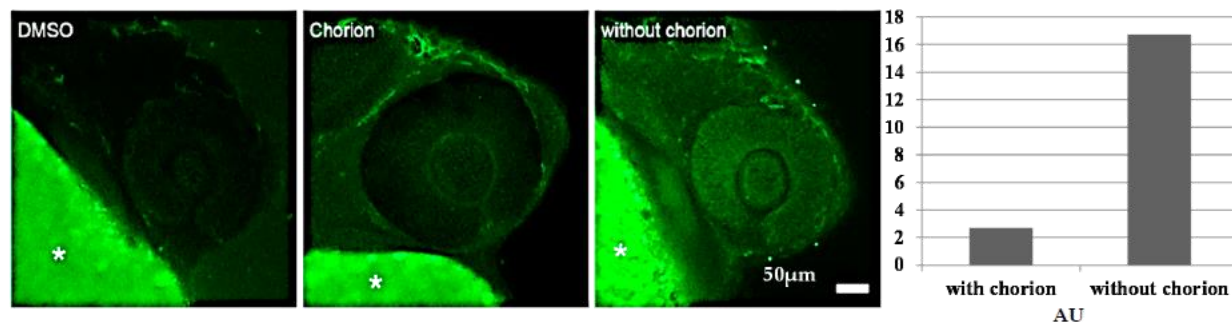
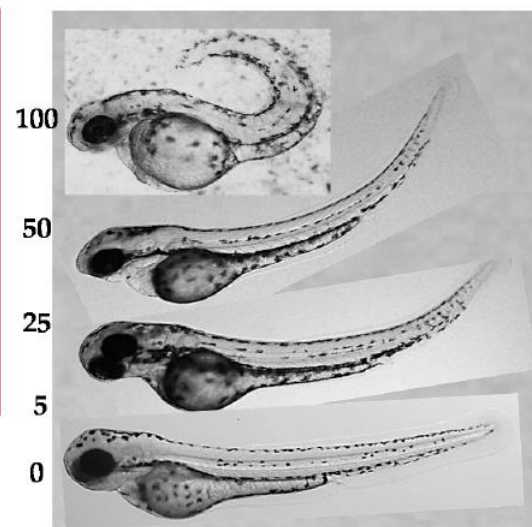


Figure 8. Differential distribution of GAT1033 in embryos with and without chorion. The microscopy images on the left show the eye and parts of the yolk of 24-hpf zebrafish embryos. The intrinsic fluorescence of the compound was revealed using a laser scanning confocal microscope, after 18 h of incubation. The yolk (marked with *) shows a strong autofluorescence under these imaging conditions. The graph on the right shows the quantitation of fluorescence intensity (in arbitrary units AU) in treated embryos with and without chorion.

