

OD 5-AZAPYRIMIDINOVÉ CHEMIE K THIADIAZOLŮM

Tento článek je součástí seriálu Ženy v české chemii

MARCELA KREČMEROVÁ

Ústav organické chemie a biochemie AVČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
marcela.krecmerova@uochb.cas.cz

Došlo 22.12.21, přijato 17.1.22.

Klíčová slova: 5-azacytidin, decitabin, acyklické nukleosidfosfonáty, antivirotika, thiadiazoly, katepsin K, kinasa glykogensyntasy 3 β , cystein-dependentní enzymy

• <https://doi.org/10.54779/chl20220152>

Obsah

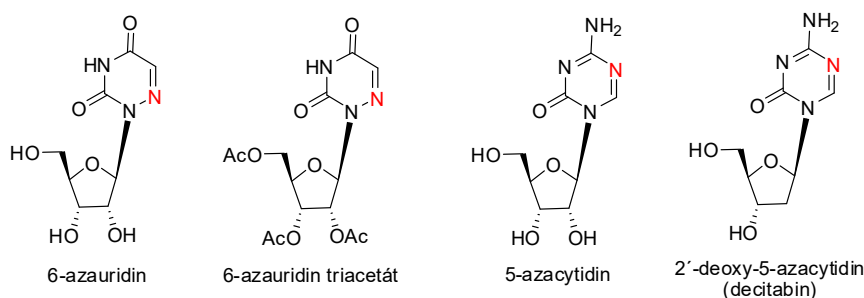
1. Úvod
2. Princip funkce 5-azacytosinových nukleosidů
3. Současné trendy ve výzkumu 5-azacytosinových nukleosidů
4. 5-Azacytosinové acyklické nukleosidfosfonáty
5. Od 5-azacytosinu k thiadiazolům
6. Závěr

1. Úvod

Chemie strukturně modifikovaných nukleosidů je nedílnou součástí vědecké historie Ústavu organické chemie a biochemie v Praze. Její prvopočátky spadají do konce 50. a začátku 60. let minulého století, a to především díky iniciativě tehdejšího ředitele ÚOCHB Františka Šorma a jeho intuici rozpoznat v nukleosidových antimetabolitech jejich budoucí terapeutický potenciál. Dalším impulsem pak byl nárůst poptávky farmaceutického průmyslu po nových biologicky aktivních látkách, především protinádorových. K prvním výsledkům patří syntézy triazinových analogů pyrimidinových nukleosidů, jako byl např. 6-azauridin¹ (Riboazauracil, obr. 1), látka s cytostatickou aktivitou, která byla v Československu krátce vyvíjena firmou Spofa jako možný lék na leukémii (ale jejíž vývoj byl nakonec zastaven z důvodu nedostatečné účinnosti) nebo 6-azauridin triacetát^{2,3}, látka účinná k léčbě lupénky. Tato látka se v USA prodávala až do roku 1976 pod názvem Azaribine, posléze však byl její prodej zastaven díky vedlejším účinkům tromboembolického charakteru u velmi malé skupiny pacientů. Příprava pyrimidinových nukleosidů s 5-aza- a 6-azamodifikací se stala tématem pro tehdejšího aspiranta a později vědeckého pracovníka Aloise Pískalu. Jeho průlomovým objevem byly syntézy cytidinových analogů 5-azacytidinu (AC)⁴ a 2'-deoxy-5-azacytidinu (decitabinu, DAC)⁵ (obr. 1). Nové vzorky byly nejprve testovány na antibakteriální aktivitu; tu se skutečně podařilo prokázat u 5-azacytidinu. Mnohem důležitější však byl objev jeho cytostatických účinků, speciálně anti-



RNDr. Marcela Krečmerová, CSc. absolvovala v letech 1978–1982 Střední průmyslovou školu chemickou v Praze v Křemencově ulici a v letech 1982–1987 Přírodovědeckou fakultu Univerzity Karlovy v Praze, obor organická chemie. Zde se v rámci diplomové práce specializovala na chemii cukrů v laboratoři prof. Miloslava Černého. V roce 1987 obhájila diplomovou práci zaměřenou na využití 1,6-anhydrohexos v syntéze nových nukleosidových analogů pod společným vedením prof. Černého a prof. Holého. Po obhajobě absolvovala roční postdoktorskou stáž na univerzitě v Osnabrücku, kde se pod vedením profesora Franka Seely věnovala přípravám 2'-deoxy- β -D-xylofuranosových nukleosidů a jejich využitím v oligonukleotidové syntéze. Od návratu do ČR až do současnosti pracuje jako vědecký pracovník v ÚOCHB, nejprve jako člen týmu nukleotidových analogů profesora Holého, v letech 2010–2015 vedla juniorskou vědeckou skupinu Nukleosidové a nukleotidové analogy pro biomedicínské aplikace. Jejím největším úspěchem byl vývoj nové třídy mimořádně účinných antivirotik proti DNA virům na bázi 5-azacytosinových acyklických nukleosidfosfonátů. V současné době pracuje v ÚOCHB jako člen týmu „Drug Discovery“ dr. Pavla Majera; hlavní oblastí jejího vědeckého zájmu jsou nukleosidy a nukleotidy, chemie organofosforečných sloučenin a vývoj prolékových forem biologicky aktivních látek nejrůznějších struktur za účelem zlepšení jejich farmakokinetických vlastností a umožnění jejich dalšího vývoje jako klinicky použitelných léčiv. Je autorkou 65 publikací v mezinárodních časopisech, dvou udělených patentů a několika podaných patentových přihlášek dosud nezveřejněných. Kromě značného pracovního nasazení úspěšně stíhá i péči o rodinu včetně čtyřnohého mazlíčka Rockyho.



Obr. 1. Struktury biologicky aktivních 6-aza- a 5-azapyrimidinových nukleosidů

leukemických. Tím začalo období nejen intenzivních biochemických výzkumů, ale také velmi náročných optimalizací syntetických postupů z důvodu nestability triazinového kruhu.

Na obě molekuly byly ihned podány patentové přihlášky a patenty dokonce licencovaly velké farmaceutické firmy (Bayer a Upjohn, později Bristol-Myers). Komplikace nastaly poté, co byl objeven 5-azacytidin jako přírodní antibiotikum produkované bakterií *Streptovercillium ladacanus*; jeho možnost patentové ochrany se tak zásadně ztížila (patentovat nelze přírodní látku, tam je možné patentovat pouze způsob syntézy).

Vzhledem ke komplikovanému způsobu přípravy byl prakticky veškerý materiál obou nukleosidů na preklinické a klinické testy (mnohačetgramové až kilogramové šarže) po dlouhá léta syntetizován v ÚOCHB vlastníma rukama Dr. Pískaly a jeho spolupracovníků. Bohužel jeho objevy byly učiněny v nepříteli vhodném době, a přestože obě látky po 40 letech výzkumu nakonec dospěly až ke klinickému schválení, jejich autor ani ústav z nich neměl nikdy žádný zisk. Na tom se podepsaly jak nevýhodné smlouvy s firmami nebo jejich nedodržení, tak především neznalost patentového práva a všeobecně špatná patentová politika tehdejší Československé akademie věd, která nijak nepřispívala k praktickému využití objevů učiněných na ústavech, a ústavy samotné do licenčních jednání nemohly zasahovat. Pohnutá historie vývoje obou léčiv v podmínkách socialistického Československa byla nedávno podrobně vylíčena v časopise *Vesmír*⁶.

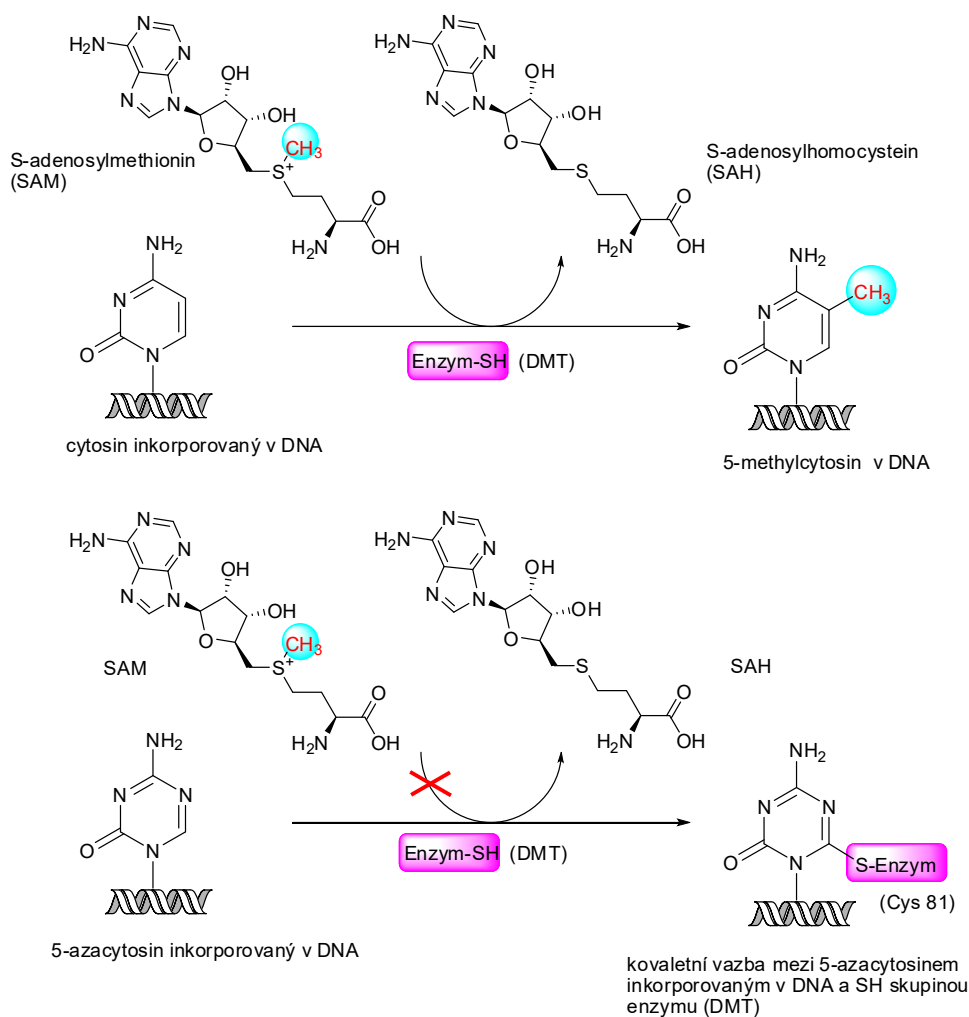
2. Princip funkce 5-azacytosinových nukleosidů

5-Azacytidin a decitabin jsou v buňce fosforylovány buněčnými kinasami na příslušné 5'-nukleosidtrifosfáty a inkorporovány do nukleových kyselin: 5-azacytidin do různých typů RNA a v menší míře také do DNA (cit.⁷), decitabin pouze do DNA (cit.⁸). Výsledkem je narušení kopírování nukleových kyselin, nefunkční ribozomy a omezená tvorba proteinů. V tomto smyslu se obě látky chovají jako klasická cytostatika. V klinických zkouškách se však ukázala řada nežádoucích vedlejších účinků spojených s nutností podávat obě léčiva ve vysokých dávkách.

Kromě toho u azacytidinu (ale ne u decitabinu) se vývoj dále zkomplikoval objevením karcinogenity u některých druhů hlodavců; ta se však u lidí nikdy neprokázala^{9,10}. Průlom ve vývoji nastal poté, co profesor Peter Jones se svou doktorandkou Shirley Taylor z Univerzity Jižní Kalifornie (USC, Los Angeles) objevili zcela nový mechanismus účinku, který je při nízkých koncentracích odlišný od běžných cytostatik. 5-Azacytidin a decitabin totiž fungují na epigenetickém principu jako inhibitory DNA methylací¹¹.

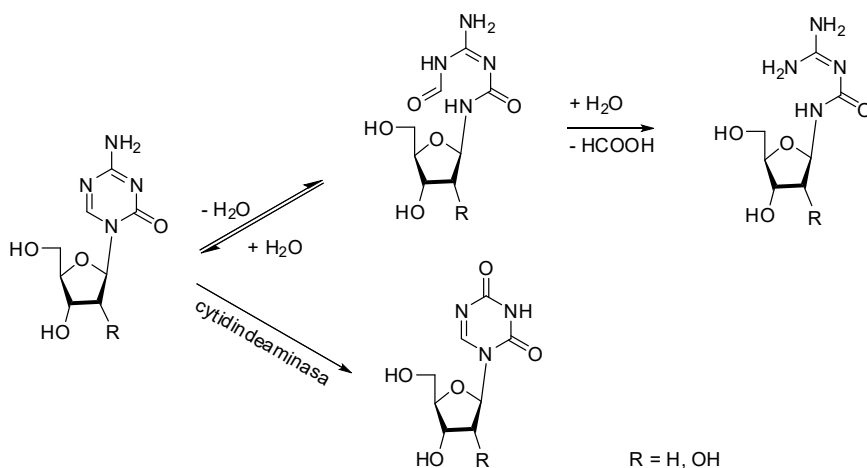
DNA je methylována enzymem DNA methyltransferasou v poloze 5 cytosinu; donorem methylu je *S*-adenosylmethionin. Inhibice těchto methylací spočívá v tom, že 5-azacytidin nebo decitabin inkorporované v DNA mají schopnost vytvořit kovalentní komplex protein-DNA díky interakci SH skupiny cysteinu v aktivním místě enzymu s 5,6-dvojnou vazbou azacytosinového kruhu (obr. 2). K DNA methylacím dochází téměř výhradně v oblasti zvýšeného výskytu CpG dinukleotidů, tzv. CpG ostrůvků, které jsou přítomny v promotorové oblasti přibližně 50 % genů. Právě abnormální hypermethylace promotorových regionů v CpG ostrůvcích byla u mnoha druhů malignit prokázána jako příčina utlumení funkce tumorsupresorových genů a rozvoje rakovinného bujení. Enzym DNA methyltransferasa a její inhibice se tak staly důležitým targetem ve vývoji nových antitumorových léčiv, která necílí na rakovinné buňky za účelem jejich zničení, jako je tomu u ostatních chemoterapeutik, ale místo toho umožňují zpětnou přeměnu maligní buněčné populace do stavu více méně normálních zdravých buněk¹². Po čtyřiceti letech od publikace prvních syntéz a mnoho let po expiraci původních patentů byly nakonec oba 5-azacytosinové nukleosidy schváleny FDA jako léčiva k terapii myelodysplastických syndromů pod názvy Vidaza[®] (5-azacytidin, schválen 2004) a Dacogen[®] (5-aza-2'-deoxycytidin, schválen 2006). Dalšími indikacemi pro jejich aplikaci jsou akutní myeloidní leukémie (Vidaza[®], Dacogen[®]) a chronická myelomonocytoová leukémie (Vidaza[®]).

Obě léčiva se aplikují ve formě infúzí, kdy infúzní roztok musí být připraven rozpuštěním pevné substance vždy bezprostředně před použitím. Důvodem je jejich chemická (hydrolytická) nestabilita, způsobená elektronovou deficiencí v poloze 6 triazinového kruhu, kdy snadno do-



Obr. 2. Methlace cytosinu v CpG ostrůvcích a její inhibice 5-azacytosinovými nukleosidy

jde k nukleofilnímu ataku, např. hydroxylovým iontem za současného otevření kruhu – nejprve na nestabilní formylkarbamoylguanidin, který pak následně odštěpí molekulu kyseliny mravenčí za vzniku příslušného karbamoylguanidinu (obr. 3). U decitabinu navíc kromě samotného štěpení kruhu dochází ještě k procesům anomerizace a byly pozorovány též rovnováhy mezi pyranosovou a furanosovou formou cukerné části¹³. Dalším významným prvkem nestability 5-azacytosinových léčiv je také enzymatická deaminace na 5-azauridin a 2'-deoxy-5-azauridin působením enzymu cytidindeaminasy. Díky enzymatické nestabilitě je počas rozpadu AC a DAC v lidské



Obr. 3. Chemická a enzymatická degradace 5-azacytosinových nukleosidů

plasmě cca 20 min, zatímco v *in vitro* podmínkách v různých pufrech jsou to řádově hodiny¹⁴.

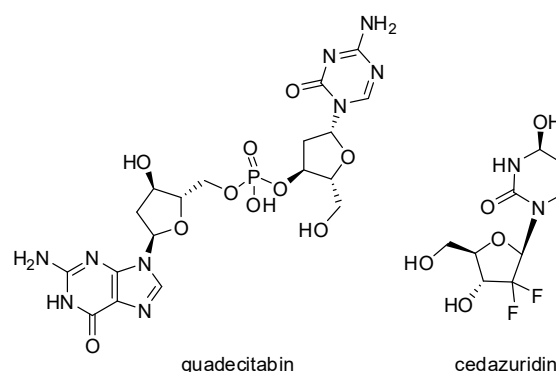
3. Současné trendy ve výzkumu 5-azacytosinových nukleosidů

Vzhledem k nestabilitě obou léčiv a s tím spojenými komplikacemi s aplikací pacientům a veškerou manipulací s nimi je hlavní snahou zvýšení jejich stability. Toho lze dosáhnout buď přípravou vhodných prolékových forem, které by uvolňovaly aktivní léčivo postupně a pokud možno až v místě působení, nebo omezením nežádoucí deaminace kombinací s inhibitory cytidindeaminasy. Vývojem stabilizovaných proléčiv decitabinu se v současné době intenzivně zabýváme i v našem týmu; připravené struktury a výsledky jsou však zatím předmětem patentové ochrany.

Nadějným klinickým kandidátem se jeví guadecitabin, dinukleotid decitabinu s 2'-deoxyguanosinem (obr. 4)¹⁵. Látka je rezistentní vůči cytidindeaminase a díky postupnému enzymatickému štěpení fosfodiesterové vazby je umožněno intracelulárně i extracelulárně postupné uvolňování decitabinu; výsledkem je tedy jeho prodloužené působení v organismu. Guadecitabin je v současné době ve fázi 3 klinických zkoušek zaměřených na myelodysplastický syndrom a akutní myeloidní leukémii. Kromě toho probíhají i klinické zkoušky jeho použití k léčbě pevných nádorů, většinou v kombinaci s imunoterapií¹⁶.

V oblasti syntézy inhibitorů cytidindeaminasy, které by mohly být aplikovány společně v kombinaci s 5-azacytidinem nebo decitabinem, je zatím neúspěšnější látkou cedazuridin, 2',2'-difluor-3,4,5,6-tetrahydrouridin (obr. 4)¹⁷. Jeho kombinace s decitabinem již prošla všemi fázemi klinických zkoušek a v červenci 2020 byla schválena FDA k léčbě myelodysplastických syndromů¹⁸. Léčivo se prodává pod názvem Inqovi® a jeho největším benefitem je tabletová léková forma a tudíž orální aplikace.

Poznání principů methylace a demethylace DNA v procesech vypínání a zpětné reaktivace genů vedlo k myšlence, zda by takto mohly být ovlivňovány i jiné než tumorsupresorové geny, což by rozšířilo použití demethylačních léčiv do dalších oblastí medicíny. Nedávné výzkumy na Univerzitě Johnse Hopkinse v Baltimoru prokázaly úlohu DNA methyloci v procesu utlumení genů zapojených do fungování imunitního systému, konkrétně do funkce regulačních T-buněk. To otevírá cestu k terapii některých obtížně léčitelných nebo dosud neléčitelných akutních zánětlivých procesů, jako je např. syndrom akutní dechové tísně (ARDS, acute respiratory distress syndrome). V *in vivo* experimentech s decitabinem bylo prokázáno, že tento inhibitor DNA methyltransferasy posiluje funkci regulačních T-buněk a zvyšuje jejich počet, což vede následně až k regeneraci zánětem poškozené plicní tkáně¹⁹. Souvislost mezi DNA methyloci a progresí ARDS byla prokázána i studii na dalších pracovištích a terapeuticky podobně jako decitabin zde fungoval i 5-azacytidin^{20,21}. ARDS se nejčastěji vyskytuje buď jako následek aspirace žaludečního obsahu či těžkého traumatu, nebo je vyvolán plicní infekcí, např. koronavirem SARS-



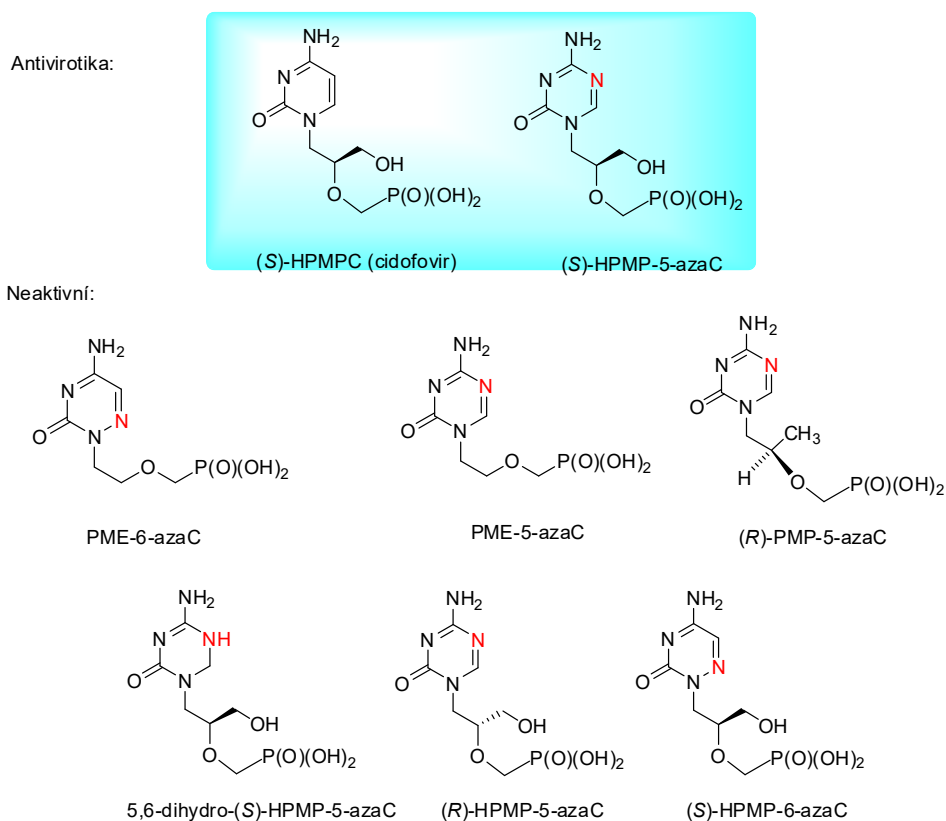
Obr. 4. Struktury guadecitabinu a cedazuridinu

CoV-2. Progrese choroby covid-19 do stadia ARDS patří k jejím nejtěžším komplikacím. V souvislosti s touto diagnózou probíhá v současné době klinický výzkum terapeutického využití demethylačních léčiv, konkrétně decitabinu²².

4. 5-Azacytosinové acyklické nukleosidfosfonáty

Nezbytnou podmínkou k tomu, aby se látka jako anti-metabolit mohla účastnit enzymových reakcí, je její fosforylace. Přímá aplikace fosfátů však není možná díky jejich nestabilitě. S řešením tohoto problému přišel v 80. letech 20. století Antonín Holý, když mezi molekulu nukleosidového analogu a fosfátovou skupinu vložil methylenový můstek. Tím byla započata etapa syntéz nové třídy nukleotidových analogů, tzv. acyklických nukleosidfosfonátů (ANP), látek s mimořádným spektrem biologických aktivit – převážně protivirových, ale také cytostatických, antiparazitálních nebo imunomodulačních. Některé z nich se již řadu let používají jako účinná virostatika: cidofovir (schválen k léčbě cytomegalovirové retinitidy u pacientů s AIDS, ale off-label používán k léčbě mnoha dalších těžkých DNA virových infekcí), adefovir (k léčbě hepatitidy B) a především tenofovir, látka schválená k léčbě HIV a hepatitidy B. Právě tenofovir a jeho kombinované preparáty s dalšími anti-HIV látkami mají největší podíl na tom, že se původní smrtelná hrozba nemocí AIDS postupem let stala běžně řešitelným chronickým problémem, s kterým lze při dodržení léčby vést více méně normální život. Tématice ANP, jejich účinkům a budoucím perspektivám se věnuje celá řada přehledných článků, např.^{23–25}. Co se týče struktury alifatického řetězce těchto antivirálních ANP, jedná se o tři základní typy: HPMP deriváty, tj. (*S*)-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]deriváty (např. HPMP, cidofovir), PME deriváty, tj. 2-(fosfonomethoxy)ethylderiváty (např. PME, adefovir) a PMP deriváty, tj. (*R*)-2-(fosfonomethoxy)propylderiváty (např. PMP, tenofovir) (obr. 5).

V průběhu více než tří dekad byly syntetizovány stovky nejruznějších struktur ANP s modifikacemi jak v alifatické, tak v heterocyklické části. Jednou z takových modi-



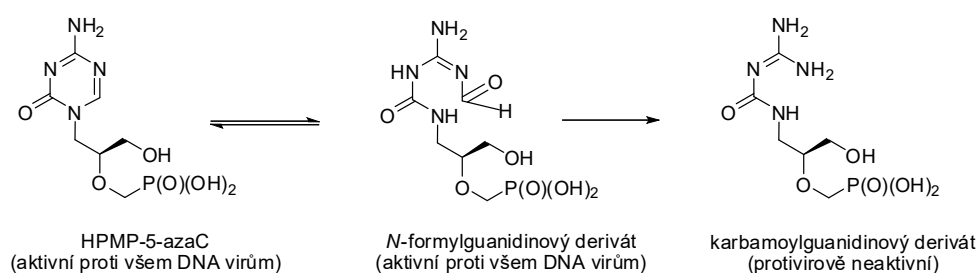
Obr. 5. Struktury antivirotik cidofoviru a jeho 5-azacytosinového analogu (S)-HPMP-5-azaC a dalších acyklických nukleosidfosfátů s 5-aza- a 6-azacytosinovou bází

fikací byly syntézy ANP s triazinovými bázemi, tj. 5-aza- a 6-azacytosinem. Zatímco u 6-azacytosinových derivátů biologická aktivita nebyla nalezena, u 5-azacytosinových derivátů bylo možno očekávat jak účinky demethylační, podobně jako u nukleosidů, tak protivirové, v analogii s ANP s cytosinovou bází. Demethylační účinky se nakonec neprokázaly, ale u 5-azacytosinového analogu cidofoviru, (S)-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]-5-azacytosinu (HPMP-5-azaC), byla pozorována velmi vysoká aktivita a selektivita vůči širokému spektru DNA virů, včetně různých typů herpesvirů (HSV-1, HSV-2, VZV, HCMV a HHV-6), adenoviru (Ad2) a poxvirů (virus vakcinie). V porovnání s cidofovirem byla protivirová aktivita HPMP-5-azaC buď srovnatelná (HSV-1, HSV-2 a virus vakcinie), nebo až několikanásobně vyšší (VZV, HCMV, HHV-6 a Ad2). Vedle toho však HPMP-5-azaC vykazoval na buněčných kulturách výrazně nižší cytotoxicitu, takže jeho index selektivity (poměr CC_{50} k EC_{50}) byl vůči těmto virům ve výsledku 2–15krát vyšší než klinicky používaný cidofovir ((S)-HPMPC)^{26,27}.

Na rozdíl od cidofoviru má HPMP-5-azaC komplikovanější metabolický profil a podobně jako ostatní *N*-1 substituované 5-azacytosinové deriváty (ribosid, 2'-deoxyribosid, arabinosid) podléhá v alkalickém prostředí štěpení triazinového kruhu (obr. 6)²⁸. Prvním krokem je reverzibilní otevření kruhu na *N*-formylguanidinový derivát, který je

však ještě schopen zpětné cyklizace na původní formu. Tato hydrolytická reakce je pomalá a dosahuje rovnováhy v rámci několika dní. *N*-formylguanidinový derivát vykazoval aktivity proti DNA virům s hodnotami EC_{50} podobnými jako u původní sloučeniny, HPMP-5-azaC. Nicméně, reverzibilní otevření kruhu je doprovázeno následnou ireverzibilní deformylací intermediárního formylderivátu za vzniku 2-[[*(2S)*-3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]-karbamoylguanidinu, který je konečným produktem tohoto hydrolytického rozkladu a je protivirově neaktivní^{26–28}.

Co se týče metabolického profilu, HPMP-5-azaC je v buňce fosforylován na monofosfát a difosfát, a to s 60krát vyšší rychlostí ve srovnání s cidofovirem, zatímco jeho senzitivita ke katabolické deaminaci je (oproti nukleosidům decitabinu a 5-azacytidinu) jen velmi nízká. HPMP-5-azaC difosfát se účinně inkorporuje do buněčné DNA, přičemž rychlost této inkorporace je 45krát vyšší oproti cidofoviru. Celkově lze konstatovat, že i přes nevýhodu chemické nestability triazinového kruhu má HPMP-5-azaC dostatečně přijatelný metabolický profil pro další preklinický, případně klinický vývoj²⁹. Vyšší protivirová účinnost spolu s rychlým rozkladem na netoxický karbamoylguanidinový derivát může dokonce představovat oproti cidofoviru i jistou výhodu z hlediska nižší nefrotoxicity (nefrotoxicita cidofoviru stále zůstává u řady indikací limitujícím faktorem).

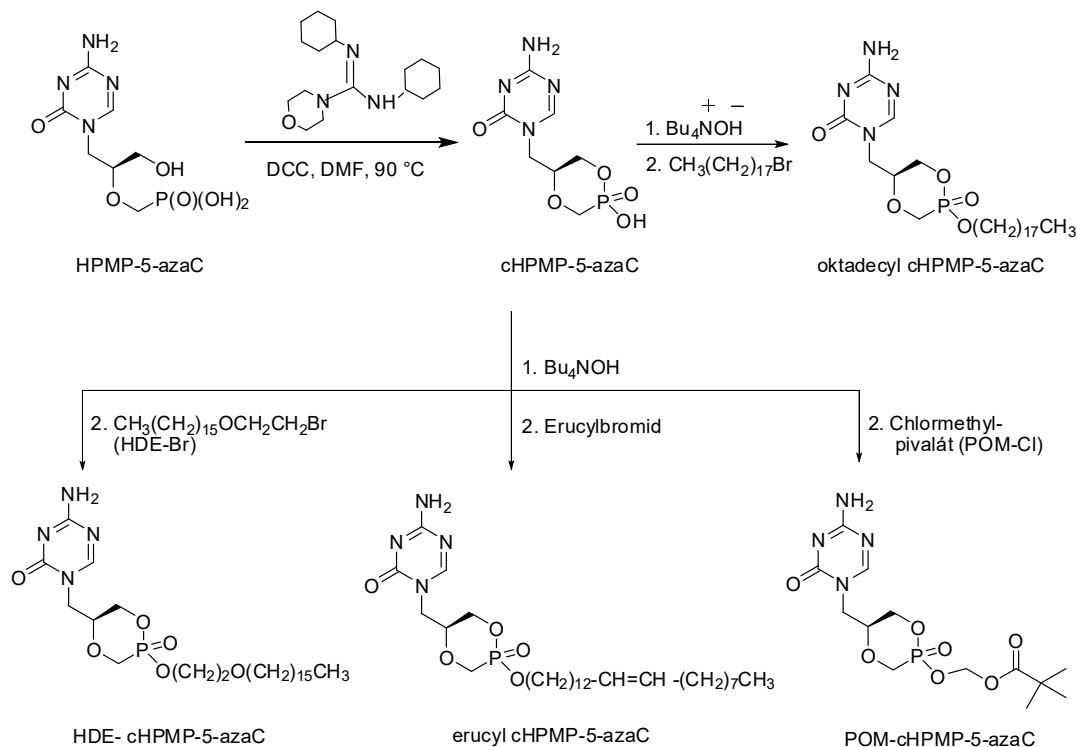


Obr. 6. Průběh hydrolytického rozkladu HPMP-5-azaC v alkalickém prostředí

HPMP-5-azaC, podobně jako ostatní acyklické nukleosidfosfonáty, je polární sloučenina s omezenou propustností do buňky a minimální orální biodostupností. To bylo důvodem k jeho transformaci na různé typy méně polárních proléčiv, konkrétně cyklického 1-(*S*)-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]-5-azacytosinu (cHPMP-5-azaC) a jeho esterů: hexadecyloxyethyl- (HDE), erucyl- pivaloyloxymethyl- (POM) a oktadecylesteru³⁰. Cyklizace HPMP-5-azaC reakcí s dicyklohexylkarbodiimidem (DCC) v přítomnosti *N,N*-dicyklohexyl-4-morfolinokarboxamidinu a následná esterifikace příslušnými alkylhalogenidy je znázorněna na obr. 7.

Nejlepší terapeutický potenciál vykazoval HDE ester (*S*)-cHPMP-5-azaC se zcela mimořádnými hodnotami

aktivit proti veškerým DNA virům, avšak s minimální toxicitou (terapeutický index v hodnotách řádově od několika set až po několik desítek tisíc). Aktivita hodné dalšího výzkumu se týká především lidského cytomegaloviru (HCMV), poxvirů, papilomavirů (HPV), adenovirů a polyomavirů. U polyomavirových infekcí např. dosud neexistuje žádný FDA schválený léčebný preparát. HPMP-5-azaC a jeho profarmaka již prošly rozsáhlým výzkumem v *in vivo* podmínkách, a to s velmi pozitivními výsledky. K dalším fázím vývoje, především klinickým zkouškám, by bylo potřeba najít vhodného partnera z farmaceutického průmyslu, což se však dosud nepodařilo.

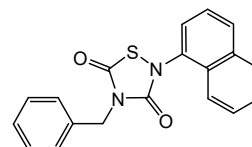


Obr. 7. Cyklizace HPMP-5-azaC a syntéza esterů cyklického HPMP-5-azaC jako proléčiv

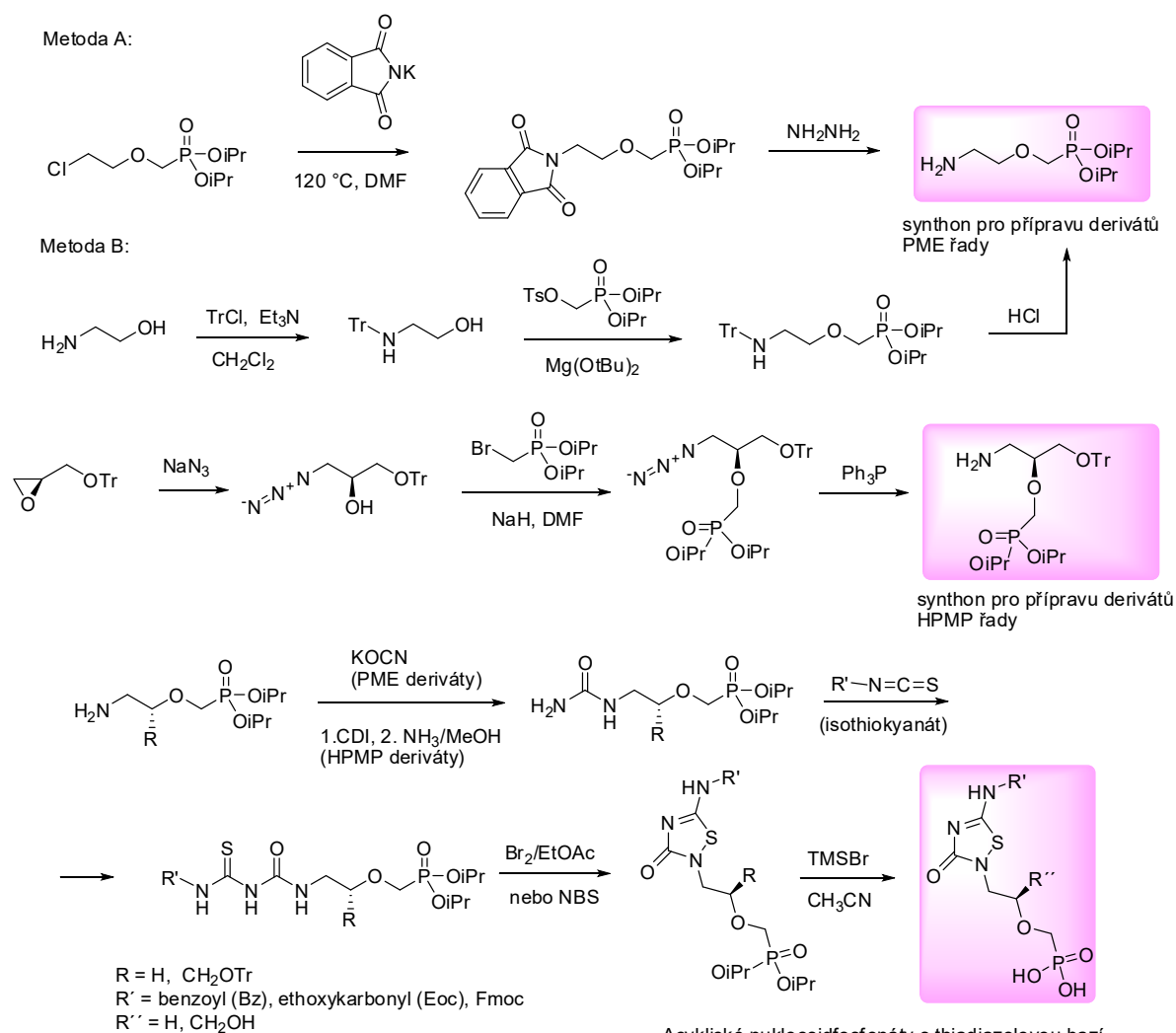
5. Od 5-azacytosinu k thiadiazolům

Jak již bylo vysvětleno, princip funkce 5-azacytosinových nukleosidů spočívá v interakci 5-azacytosinové báze s SH skupinou cysteinu v aktivním místě enzymu, v tomto konkrétním případě DNA methyltransferasy. Cystein dependentních enzymů obecně existuje celá řada a hrají významné role v řadě patologických procesů. Jako příklad lze uvést proteasy typu katepsinů nebo kinasu glykogensynthasy 3 β (GSK-3 β), což je klíčový enzym metabolismu glykogenu^{31,32}. Cílená inhibice těchto enzymů může být terapeutickým řešením mnoha zdravotních problémů. Významnými inhibitory jsou thiadiazolové sloučeniny, především deriváty 1,2,4-thiadiazolidin-3,5-dionu (TDZD), přičemž jako kandidát na léčivo byl identifikován 4-benzyl-2-(1-naftyl)-1,2,4-thiadiazolidin-3,5-dion (tideglusib), který je inhibítoem enzymu GSK-3 β (obr. 8). Akumulace GSK-3 β v rakovinových buňkách aktivuje na-

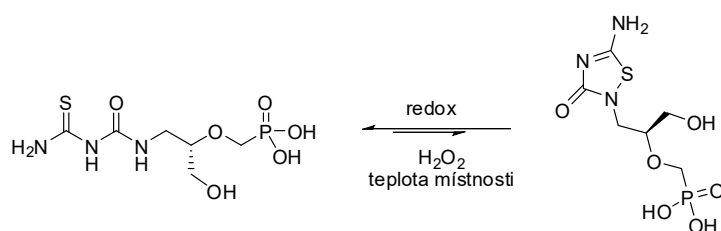
vázání transkripčního faktoru NF- κ B na cílové genové promotory a stimuluje jejich další transkripční aktivitu, což vede k progresi rakovinného bujení a vytváření rezistence k chemoterapeutickým léčivům^{31,32}. Vzhledem ke schopnosti regulovat genovou expresi je pravděpodobné, že tideglusib může fungovat epigeneticky. Enzym GSK-3 β hraje také klíčovou roli v procesech spojených s Alzheimerovou chorobou a dalšími neurodegenerativními problémy. V současnosti probíhají klinické studie tideglusibu ve fázi II pro léčbu Alzheimerovy choroby³³ a myotonické



Obr. 8. Tideglusib – inhibitor kinasy glykogensynthasy 3 β



Obr. 9. Ukázka syntéz acyklických nukleosidfosfonátů s thiadiazolovou bází



Obr. 10. Rovnováha mezi lineární a cyklickou formou volných ANP s 1,2,4-thiadiazol-3(2H)-onovou bází

muskulární dystrofie³⁴.

U cysteinových katepsinů a možnosti jejich inhibice thiadiazolovými deriváty jsme se v našem týmu zaměřili na katepsin K. Ten je exprimován převážně v osteoklastech a působí degradaci proteinových složek kostní hmoty včetně kolagenu, což hraje kritickou roli v procesu kostní resorpce a vzniku osteoporózy³⁵. Některé z inhibitorů CatK jsou již studovány v klinických zkouškách^{36,37}. Jejich interakce s cysteinovou SH skupinou v aktivním centru je zprostředkována přítomnou keto skupinou nebo nitrilem; inhibitory CatK na bázi 1,2,4-thiadiazolů byly poprvé popsány až v naší skupině³⁸.

Je evidentní, že 1,2,4-thiadiazolový skelet nese značný terapeutický potenciál a syntéza a screening nových struktur je nanejvýš žádoucí. V našem týmu nukleosidové chemie jsme se zaměřili na deriváty 5-amino-1,2,4-thiadiazol-3(2H)-onu, což je struktura, na kterou lze pohlížet dle některých studií také jako na sirnou imitaci cytosinu, v níž je $-\text{CH}=\text{CH}-$ skupina mezi pozicemi 5 a 6 pyrimidinového kruhu nahrazena bivalentní sírou^{39,40}. 5-Amino-1,2,4-thiadiazol-3(2H)-on je považován za bioisosterní s cytosinem vzhledem k podobným elektronickým a prostorovým vlastnostem $-\text{CH}=\text{CH}-$ skupiny cytosinu a bivalentní síry^{39,40}. Možnost této bioisosterie nás inspirovala k syntézám nukleotidových analogů, v nichž by byla cytosinová složka nahrazena 5-amino-1,2,4-thiadiazol-3(2H)-onem. Jedná se o sloučeniny, v nichž by tato báze byla připojena např. k 2-(fosfonomethoxy)ethylovému (PME) nebo 3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propylovému (HPMP) řetězci, analogicky jako je tomu u acyklických nukleosidfosfonátů (ANP). Přípravy takovýchto látek byly poměrně komplikované (některé „papírově“ naplánované deriváty se nepodařilo vůbec připravit); na druhou stranu přinesly do thiadiazolové chemie množství nových poznatků. Ukázkou takovýchto syntéz představuje obr. 9. V obou případech, jak u PME, tak u HPMP řady byl nejprve syntetizován acyklický synthon s fosfonátovou částí a koncovou aminoskupinou, na níž byl poté vystavěn thiadiazolový cyklus³⁸.

Překvapivě se ukázalo, že pouze N^5 -substituované 1,2,4-thiadiazol-3(2H)-onové analogy ANP jsou dostatečně stabilní a schopné izolace ve formě volných fosfonových kyselin; deriváty s volnou thiadiazolovou bází mohly být izolovány pouze ve formě fosfonátových esterů. Pokusy o deprotektaci báze u volných fosfonátů skončily vždy otevřením thiadiazolového kruhu, přičemž zpětná oxidační cyklizace na thiadiazolový derivát už nebyla možná.

Redox charakter S-N vazby jsme studovali pomocí ³¹P NMR spektroskopie, kdy se ukázalo, že mezi lineární a cyklickou formou se vždy vytvoří rovnováha, kterou už nelze dále ovlivnit množstvím oxidačního činidla (obr. 10). Pokud je aminoskupina v poloze 5 1,2,4-thiadiazol-3(2H)-onového kruhu chráněná, není zřejmě možná tautomerie S-N vazby a stabilita thiadiazolového kruhu je proto mnohem vyšší³⁸.

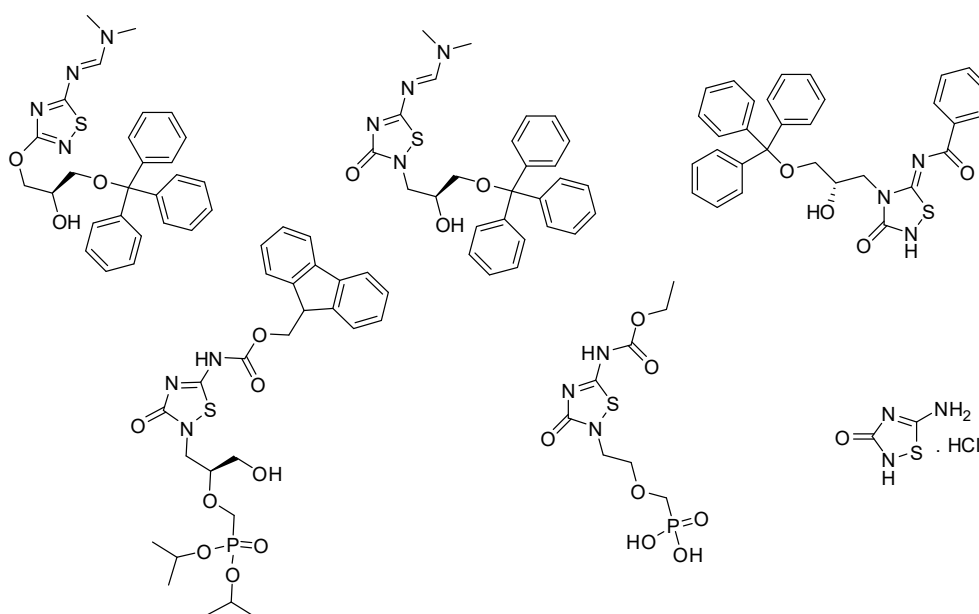
V připravené sérii 5-amino-1,2,4-thiadiazol-3(2H)-onových derivátů se podařilo identifikovat několik struktur s inhibiční aktivitou vůči lidskému CatK s hodnotami IC_{50} v nízkomikromolárním rozsahu³⁸. Mezi tyto aktivní látky patří: volná báze 5-amino-1,2,4-thiadiazol-3(2H)-on, acyklické deriváty chráněné v poloze N^5 a nesoucí 2-hydroxy-3-trityloxypropylové uskupení a deriváty s HPMP a PME uspořádáním substituované v poloze N^5 (obr. 11). Ze strukturně aktivních studií je zřejmé, že ke zvýšení inhibiční aktivity přispívá esterifikace fosfonátové funkce (na rozdíl od volných fosfonových kyselin), absence polární OH skupiny v řetězci (PME deriváty jsou účinnější inhibitory než HPMP) a substituce N^5 polohy, nejlépe objemnou Fmoc skupinou.

Některé nově připravené thiadiazolové deriváty vykazovaly též inhibiční aktivitu vůči GSK-3 β s hodnotami IC_{50} řádově podobnými tideglusibu, avšak s nižší cytotoxicitou včetně cytotoxicity vůči zdravým buňkám (studováno na lidských kožních fibroblastech). Ve většině případů se jedná o stejnou skupinu látek, která vykazovala i inhibiční aktivitu vůči CatK (obr. 12).

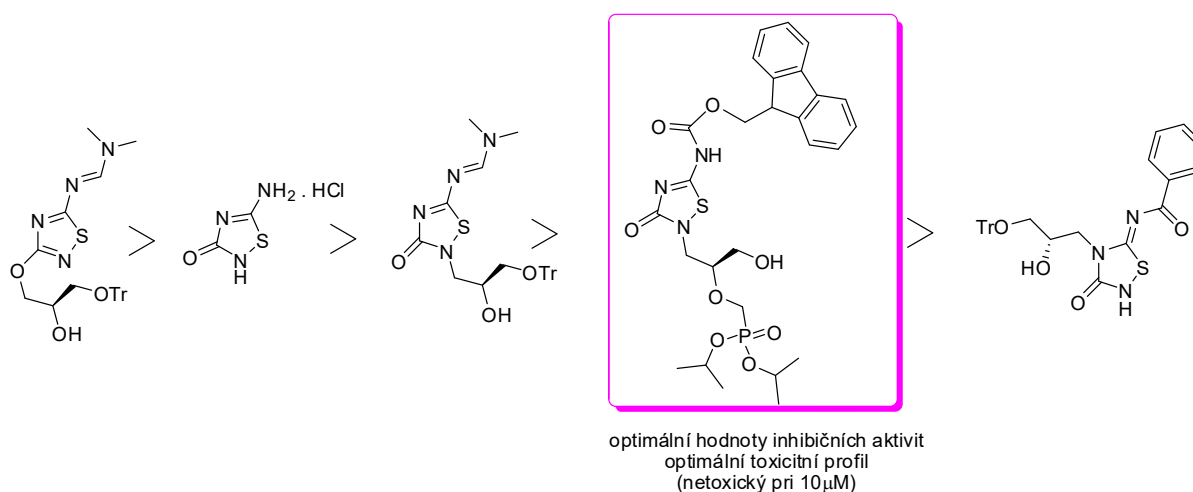
Žádný z připravených derivátů nevykazoval protivirovou aktivitu v analogii s acyklickými nukleosidfosfonáty ani inhibiční aktivitu vůči DNA methyltransferase v analogii s 5-azacytosinovými nukleosidy.

6. Závěr

Cílem této práce bylo vyzdvihnout význam 5-azacytosinových sloučenin v medicíně i klinické praxi a ukázat nové trendy v této oblasti, zejména co se týče stabilizovaných analogů 5-azacytidinu a decitabinu a vývoje 5-azacytosinových virostatik typu acyklických nukleosidfosfonátů. Pochopení mechanismu účinku látek na strukturální úrovni, v našem případě princip interakce cysteinové SH skupiny s nukleofilní složkou molekuly nukleosidového analogu (5-azacytosinu nebo thiadiazolové báze) je cestou k racionálnímu designu a cílené syntéze nových biologicky aktivních látek. Nově připravené thi-



Obr. 11. Struktury s inhibiční aktivitou vůči katepsinu K

Obr. 12. Struktury s inhibiční aktivitou vůči oběma enzymům, katepsinu K a GSK-3 β , seřazené podle hodnot inhibiční aktivity vůči katepsinu K

adiazolové acyklické analogy nukleosidů vykazují významné hodnoty inhibičních aktivit vůči dvěma studovaným cystein-dependentním enzymům katepsinu K a kinase glykogen synthasy 3 β .

Vypracováno s finanční podporou Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky v rámci projektu Český národní uzel Evropské infrastruktury pro translační medicínu EATRIS-CZ, grant č. LM2018133.

Seznam zkratk

AC	5-azacytidin (5-azacytidine)
ANP	acyklické nukleosidfosfonáty (acyclic nucleoside phosphonates)
ARDS	syndrom akutní dechové tísně (acute respiratory distress syndrom)
CatK	katepsin K (Cathepsin K)
DAC	decitabin (decitabine)
DMT	DNA methyltransferasa (DNA methyl transferase)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)

GSK-3 β	kinasa glykogensynthasy 3 β (glycogen synthase kinase 3 β),	17. Ferraris D. a 12 spoluautorů: <i>J. Med. Chem.</i> 57, 2582 (2014).
HCMV	lidský cytomegalovirus (human cytomegalovirus)	18. https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=cedazuridine , staženo 15. 12. 2021.
HHV-6	lidský herpesvirus typu 6 (human herpes virus type 6)	19. Singer B. D. a 12 spoluautorů: <i>Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.</i> 52, 641 (2015).
HDE	2-(hexadecyloxy)ethyl	20. Huang X. a 11 spoluautorů: <i>Biomed. Pharmacother.</i> 84, 447 (2016).
HPMP	(S)-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]	21. Zhang S., Wu Z., Xie J., Yang Y., Wang L., Qiu H.: <i>J. Transl. Med.</i> 17, 345 (2019).
HPMP-5-azaC	(S)-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]-5-azacytosin (S)-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]-5-azacytosine	22. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04482621 , staženo 15. 12. 2021.
HPMPC	(S)-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]cytosin (S)-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]cytosine	23. De Clercq E.: <i>Biochem. Pharmacol.</i> 82, 99 (2011).
HSV-1	herpes simplex virus typu 1 (herpes simplex virus type 1)	24. De Clercq E.: <i>Med. Res. Rev.</i> 33, 1278 (2013).
HSV-2	herpes simplex virus typu 2 (herpes simplex virus type 2)	25. De Clercq E.: <i>Collect. Czech Chem. Commun.</i> 76, 829 (2011).
PME	(fosfonomethoxy)ethyl (fosfonomethoxy)ethyl	26. Krečmerová M., Holý A., Pískala A., Masojídková M., Andrei G., Naesens L., Neyts J., Balzarini J., De Clercq E., Snoeck R.: <i>J. Med. Chem.</i> 50, 1069 (2007).
PMP	(fosfonomethoxy)propyl (fosfonomethoxy)propyl	27. Krečmerová M., Otmar M.: <i>Future Med. Chem.</i> 4, 991 (2012).
TDZD	1,2,4-thiadiazolidin-3,5-dion (1,2,4-thiadiazolidin-3,5-dione)	28. Dračínský M., Krečmerová M., Holý A.: <i>Bioorg. Med. Chem.</i> 16, 6778 (2008).
VZV	Varicella zoster virus	29. Naesens L., Andrei G., Votruba I., Krečmerová M., Holý A., Neyts J., DeClercq E., Snoeck R.: <i>Biochem. Pharmacol.</i> 76, 997 (2008).

LITERATURA

- Šorm F., Keilová H.: *Experientia* 14, 215 (1958).
- Šorm F., Škoda J.: *Collect. Czech. Chem. Commun. Engl. Edn.* 21, 487 (1956).
- Deneau D. G., Farber E. M.: *Dermatologica* 151, 158 (1975).
- Pískala A., Šorm F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 29, 2060 (1964).
- Pliml J., Šorm F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 29, 2576 (1964).
- Vrtiška O.: *Vesmír* 97, 598 (2018).
- Veselý J., Čihák A.: *Pharm. Ther.* 2, 813 (1978).
- Veselý J., Čihák A.: *Cancer Res.* 37, 3684 (1977).
- Carr B. I., Reilly J. G., Smith S. S.: *Carcinogenesis* 5, 1583 (1984).
- Carr B. I., Rahbar S., Asmeron Y., Riggs A., Winberg C. D.: *Br. J. Cancer* 57, 395 (1988).
- Jones P. A., Taylor S. M.: *Nucleic Acids Res.* 9, 2933 (1981).
- Yang X., Lay F., Han H., Jones P. A.: *Trends Pharmacol. Sci.* 31, 536 (2010).
- Krečmerová M., Otmar M.: *Future Med. Chem.* 4, 991 (2012).
- Mahfouz R. Z. a 15 spoluautorů: *Clin. Cancer Res.* 19, 938 (2013).
- Daher-Reyes G. S., Merchan B. M., Yee K. W. L.: *Expert Opin. Investig. Drugs* 28, 835 (2019).
- <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=guadecitabine>, staženo 15. 12. 2021.
- Ferraris D. a 12 spoluautorů: *J. Med. Chem.* 57, 2582 (2014).
- <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=cedazuridine>, staženo 15. 12. 2021.
- Singer B. D. a 12 spoluautorů: *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 52, 641 (2015).
- Huang X. a 11 spoluautorů: *Biomed. Pharmacother.* 84, 447 (2016).
- Zhang S., Wu Z., Xie J., Yang Y., Wang L., Qiu H.: *J. Transl. Med.* 17, 345 (2019).
- <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04482621>, staženo 15. 12. 2021.
- De Clercq E.: *Biochem. Pharmacol.* 82, 99 (2011).
- De Clercq E.: *Med. Res. Rev.* 33, 1278 (2013).
- De Clercq E.: *Collect. Czech Chem. Commun.* 76, 829 (2011).
- Krečmerová M., Holý A., Pískala A., Masojídková M., Andrei G., Naesens L., Neyts J., Balzarini J., De Clercq E., Snoeck R.: *J. Med. Chem.* 50, 1069 (2007).
- Krečmerová M., Otmar M.: *Future Med. Chem.* 4, 991 (2012).
- Dračínský M., Krečmerová M., Holý A.: *Bioorg. Med. Chem.* 16, 6778 (2008).
- Naesens L., Andrei G., Votruba I., Krečmerová M., Holý A., Neyts J., DeClercq E., Snoeck R.: *Biochem. Pharmacol.* 76, 997 (2008).
- Krečmerová M., Holý A., Pohl R., Masojídková M., Andrei G., Naesens L., Neyts J., Balzarini J., De Clercq E., Snoeck R.: *J. Med. Chem.* 50, 5765 (2007).
- Walz A., Ugolkov A., Chandra S., Kozikowski A., Carneiro B. A., O'Halloran T. V., Giles F. J., Billadeau D. D., Mazar A.P.: *Clin. Cancer Res.* 23, 1891 (2017).
- Aguilar-Morante D., Morales-Garcia J. A., Sanz-SanCristobal M., Garcia-Cabezas M. A., Santos A., Perez-Castillo A.: *PLoS One* 5, e13879 (2010).
- Lovestone S. a 10 spoluautorů: *J. Alzheimers Dis.* 45, 75 (2015).
- <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03692312>, staženo 15. 12. 2021.
- Lu J., Wang M., Wang Z., Fu Z., Lu A., Zhang G.: *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 33, 890 (2018).
- Drake M. T., Clarke B. L., Oursler M. J., Khosla S.: *Endocr. Rev.* 38, 325 (2017).
- Mukherje K., Chattopadhyay N.: *Biochem. Pharmacol.* 117, 10 (2016).
- Pomeislová A., Otmar M., Rubešová P., Benýšek J., Matoušová M., Mertlíková-Kaiserová H., Pohl R., Poštová Slavětínská L., Pomeisl K., Krečmerová M.: *Bioorg. Med. Chem.* 32, e115998 (2021).
- Párkányi C., Yuan H. L., Cho N. S., Jaw J.-H. J., Woodhouse T. E., Aung T. L.: *J. Heterocycl. Chem.* 26, 1331 (1989).
- Li Y., Geng J., Liu Y., Yu S., Zhao G.: *ChemMedChem* 8, 27 (2013).

M. Krečmerová (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences, Prague*): **From 5-Azapyrimidine Chemistry to Thiadiazoles**

The review is devoted to 5-aza- and 6-azapyrimidine nucleosides with emphasis on antileukemic agents 5-azacytidine and 2'-deoxy-5-azacytidine (decitabine), mechanism of their action as inhibitors of DNA methylations in tumour suppressor genes and current trends in the search for their stabilized analogues. A significant contribution to 5-azacytosine chemistry is synthesis of 5-azacytosine acyclic nucleosides phosphonates and their prodrugs, identified as potent and selective anti-DNA viral agents. Application of 5-amino-1,2,4-thiadiazol-3-(2H)-one moiety to acyclic nucleoside analogues was inspired by hypothesis that this heterocyclic base could work as a cytosine mimic and, moreover, the reactive N-S bond could be able to attack strong nucleophiles such as the cysteine thiol group of enzymes (similarly as 5-azacytosine). A series of prepared 1,2,4-thiadiazole derivatives provided several inhibitors of Cathepsin K and glycogen synthase kinase 3 β effective in the low micromolar range.

Keywords: 5-azacytidine, decitabine, acyclic nucleoside phosphonates, antivirals, thiadiazoles, cathepsin K, glycogen synthase kinase 3 β , cystein-dependent enzymes

- Krečmerová M.: Chem. Listy 116, 152–162 (2022).
- <https://doi.org/10.54779/chl20220152>

Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic within the program the Czech National Node to the European Infrastructure for Translational Medicine EATRIS-CZ, grant No. LM2018133.