

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET  
KEMIJSKI ODSJEK

LUCIJA HOK

KEMIJSKI SEMINAR 1

**UTJECAJ DEUTERACIJE NA FARMAKOLOŠKA SVOJSTVA  
LIJEKOVA**

(Pirali T, Serafini M, Cargnin S, Genazzani AA. Applications of Deuterium in Medicinal Chemistry. *J Med Chem*, 2019, 62, 5276–5297.)

Mentor: dr. sc. Robert Vianello

Zagreb, 9. lipnja 2020. godine

## SADRŽAJ

1. VODIKOV IZOTOP DEUTERIJ.....	2
2. FIZIKALNA OSNOVA PRIMARNOG KIE .....	3
3. SINTEZA SPOJEVA S DEUTERIJEM.....	4
4. PRIMJENA DEUTERIJA.....	4
5. PRIMJENA DEUTERIJA U RAZVOJU LIJEKOVA.....	5
5.1. OPTIMIZACIJA FARMAKOKINETIČKIH SVOJSTAVA .....	5
5.2. SMANJENJE TOKSIČNOSTI.....	10
5.3. POBOLJŠANJE BIOAKTIVACIJE .....	13
5.4. STABILIZACIJA STEREOIZOMERA.....	13
5.5. SPOJEVI DEUTERIJA U ISPITIVANJU MEHANIZMA DJELOVANJA .....	15
5.6. PET OBILJEŽIVAČI.....	16
5.7. RAZVOJ DEUTERIRANIH METABOLITA LIJEKOVA .....	17
5.8. RAZVOJ DEUTERIRANIH ENDOGENIH METABOLITA.....	17
5.8.1. SLUČAJ RT001 .....	17
5.8.2. SLUČAJ ALK-001 .....	18
5.9. SINTEZA NOVIH SPOJEVA DEUTERIJA .....	19
6. POTENCIJALNI PROBLEMI I MOGUĆNOSTI U RAZVOJU SPOJEVA S DEUTERIJEM .....	20
7. ZAKLJUČAK .....	21
8. POPIS LITERATURE.....	22

## 1. VODIKOV IZOTOP DEUTERIJ

U prirodi su prisutna dva stabilna vodikova izotopa. Najzastupljeniji je procij ( $^1\text{H}$  ili H) koji ima samo jedan proton u jezgri. Maseni udio procija u prirodnom uzorku vodika iznosi 99.98 %. Deuterij ( $^2\text{H}$  ili D) je drugi najzastupljeniji izotop vodika (0.0156 %) čija je jezgra građena od jednog protona i jednog neutrona.<sup>[1]</sup>

Prisutnost neutrona u jezgri deuterija odgovorna je za približno dvostruko povećanje mase u odnosu na procij što utječe na fizikalno-kemijska svojstva deuterija i njegovih spojeva. U usporedbi s procijem, deuterij ima manji molarni volumen (za  $0.140 \text{ cm}^3/\text{mol}$  po atomu) i manje je lipofilan ( $\Delta \log P_{\text{oct}} = -0.006$ ). Postepenom deuteracijom alkana proporcionalno se smanjuje lipofilnost što se očituje smanjenim afinitetom za hidrofobne površine. Osim lipofilnosti, uvođenjem deuterija mijenjaju se i  $pK_a$  vrijednosti spojeva u odnosu na njihove nedeuterirane analoge. Tako se inkorporacijom deuterija u spojeve s amino skupinom povećava njihova bazičnost na neaditivan način, ovisno o stereokemijskom položaju deuterija, dok se kiselost fenola i karboksilnih kiselina može smanjiti i do 0.031 pK jedinica po atomu deuterija.<sup>[2]</sup> Najznačajnija razlika između dvaju izotopa duljina je C–H tj. C–D veze. Naime, C–D veza čvršća je i kraća za  $0.005 \text{ \AA}$  što je čini stabilnijom prema oksidativnim procesima. Dvostruko veća masa deuterija dovodi do smanjenja vibracijske frekvencije istezanja C–D veze u odnosu na C–H vezu, i posljedično, do niže energije osnovnog stanja. Stoga, aktivacijska energija potrebna za kidanje C–D veze veća je od energije koju je potrebno utrošiti za kidanje C–H veze, a brzina reakcije je manja ( $k_H > k_D$ ).<sup>[3]</sup>

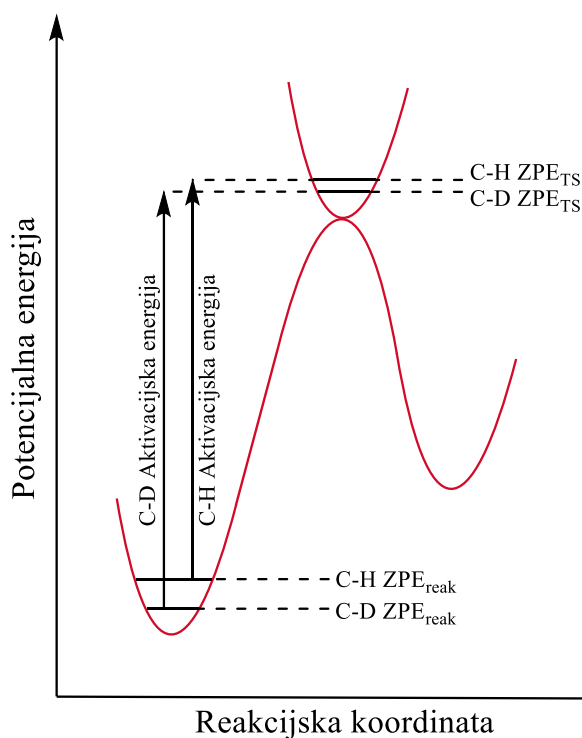
Razlike u stabilnosti molekula supstituiranih različitim izotopima mogu se opisati kinetičkim izotopnim efektom (KIE), tj. deuterijskim kinetičkim izotopnim efektom (DKIE) u slučaju supstitucije deuterijem. DKIE predstavlja omjer konstanti brzina reakcija s reaktantom koji sadrži procij i reaktantom koji sadrži deuterij ( $k_H/k_D$ ). Vrijednosti DKIE uobičajeno se kreću od 1, za reakcije kod kojih supstitucija deuterijem ne pokazuje efekt, do 7,<sup>[4]</sup> iako su zabilježene i veće vrijednosti ( $\text{KIE} = 16$ ).<sup>[5]</sup> Takav efekt gdje je omjer  $k_H/k_D$  veći od 1 naziva se normalnim KIE. Međutim, omjer  $k_H/k_D$  može biti i manji od 1, što se naziva inverznim KIE.<sup>[6,7]</sup>

Kako bi vrijednost DKIE kod višestupanjskih enzimskih reakcija bila značajna, nužno je da vodikov atom koji se zamjenjuje deuterijem sudjeluje u procesu koji određuje brzinu reakcije. KIE koji mjeri utjecaj supstitucije u vezi koja izravno sudjeluje u kemijskoj reakciji naziva se primarnim KIE, i obično je veći od sekundarnog KIE čije se vrijednosti kreću oko 1.1 – 1.2.<sup>[3]</sup> Sekundarni KIE opisuje utjecaj supstitucije na dijelu molekule koji ne sudjeluje izravno u procesu kidanja ili nastanka veze, a javlja se kao posljedica hiperkonjugacije ili promjene u hibridizaciji (npr.  $sp^3$  u  $sp^2$ ). U nekim kinetičkim modelima za objašnjenje sekundarnog ili izrazito velikog primarnog KIE koristi se fenomen tuneliranja. Taj kvantno-mehanički efekt javlja se zbog činjenice da valna funkcija subatomske čestice i lakih atoma kao što je vodik nije ograničena potencijalnom energijom barijere pa dolazi do prolaska čestice ili atoma kroz barijeru u sljedeći minimum. Zbog dvostruko veće mase deuterija u odnosu na vodikov atom, efekt tuneliranja može uzrokovati vrlo velike vrijednosti KIE ( $> 50$ ).<sup>[7]</sup> Enzim sojina lipooksigenaza-1 služi kao model za ispitivanje utjecaja oblika barijere na učinkovitost tuneliranja jer pokazuje vrijednost DKIE = 81 pri sobnoj temperaturi.<sup>[8]</sup>

## 2. FIZIKALNA OSNOVA PRIMARNOG KIE

Izotopni efekt posljedica je razlike u frekvencijama vibracijskih modova molekule koja nastaje kada se jedan izotop zamijeni drugim. Vibracijska frekvencija istezanja veze može se opisati klasičnom jednadžbom za istezanje opruge. Frekvencija je proporcionalna korijenu konstante sile, a obrnuto proporcionalna korijenu reducirane mase atoma koji sudjeluju u stvaranju veze (1). Zamjena vodikovog atoma deuterijem ima snažan utjecaj na reduciranu masu koja opisuje vezu između teškog atoma kao što je ugljikov i lakog atoma kao što je vodikov. Frekvencija istezanja veze s deuterijem manja je zahvaljujući većoj masi, zbog čega je i energija nulte točke (engl. *zero-point energy*, ZPE) za takvu vezu manja.

$$(1) \quad v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m_r}} \quad m_r = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$



Slika 1. Prikaz razlike u ZPE vrijednostima za reaktante i aktivirani kompleks u slučaju C–H i C–D veze

Za razumijevanje izotopnog utjecaja na kinetiku neke reakcije, potrebno je usporediti ZPE reaktanata s prijelaznim stanjem (slika 1). Za svaki vibracijski mod u reaktantu i aktiviranom kompleksu postoji razlika u ZPE u slučaju C–H i C–D veze. Međutim, promjene u vibracijama veza koje podliježu transformaciji tijekom reakcije najviše doprinose izotopnom efektu. Za definiranje normalnog ili inverznog KIE, potrebno je identificirati te vibracijske modove i razumjeti kako se njihove konstante sile mijenjaju tijekom reakcije. Ako je konstanta sile odgovarajućeg vibracijskog moda veća kod reaktanata nego kod aktiviranog kompleksa, zamjena vodika deuterijem više će smanjiti ZPE reaktanata nego aktiviranog kompleksa. To će dovesti do usporavanja reakcije u kojoj ta veza sudjeluje, a omjer  $k_H/k_D$  bit će veći od 1, što je najčešće ponašanje kod izotopne supstitucije.<sup>[7]</sup>

### 3. SINTEZA SPOJEVA S DEUTERIJEM

U sintezi spojeva s deuterijem koriste se dva osnovna pristupa: konvencionalna višestupanjska sinteza (tzv. *deuterated pool* sinteza) i izotopna izmjena.

Prvi pristup podrazumijeva nastanak željenog spoja iz deuterijem označenih gradivnih jedinica u više reakcijskih koraka. Ishodni spoj za sintezu deuteriranih reagensa je deuterirana voda dobivena Girdler-sulfidnim procesom. Najveći nedostatak ovog pristupa visoka je cijena deuteriranih reagensa u odnosu na njihove nedeuterirane analoge, ali taj je nedostatak balansiran činjenicom da *deuterated pool* sinteza osigurava potpunu regio- i kemo-selektivnost te gotovo 100 % efikasnost.<sup>[3]</sup>

U slučaju izotopne izmjene, deuterij se uvodi u ciljnu molekulu ili „kasni“ međuprodukt u sintezi upotrebom D<sub>2</sub>O ili D<sub>2</sub> plina na nekoliko načina: (i) reduktivnom deuteracijom, npr. hidrogeniranjem ili borhidridnom redukcijom; (ii) fotokatalitičkom deuteracijom; (iii) X/D (halogen–deuterij) izmjenom putem aromatskog dehalogeniranja te (iv) H/D (vodik–deuterij) izmjenom.<sup>[3]</sup> Iako često zahtijeva teške eksperimentalne uvjete, H/D izmjena je najkorišteniji način izotopne izmjene. Može se podijeliti na pH-ovisnu izmjenu s kiselobaznim katalizatorima<sup>[9]</sup> i H/D izmjenu s teškim metalima kao katalizatorima (npr. Pd, Pt, Rh)<sup>[10]</sup> koja se može odvijati u homogenim i u heterogenim sustavima.

Supstitucija deuterijem može se provesti na različitim mjestima ishodne molekule, kao i na različitom broju položaja. Izotopolozi su molekularni entiteti koji se razlikuju samo u izotopnoj kompoziciji, tj. broju izotopnih supstitucija, npr. CD<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH i CD<sub>2</sub>HCH<sub>2</sub>OH. Ako izotopna supstitucija uključuje jednak broj izotopnih atoma, ali na različitim položajima unutar molekule, govorimo o izotopomerima. Izotopomeri mogu biti konstitucijski izomeri, npr. CD<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH i CD<sub>2</sub>HCDHOH ili stereoizomeri, npr. (R)- i (S)-CH<sub>3</sub>CHDOH ili (Z)- i (E)-CH<sub>3</sub>CH=CHD.<sup>[11]</sup>

### 4. PRIMJENA DEUTERIJA

Zbog jedinstvenih svojstava spojevi s deuterijem primjenjuju se u mnogim znanstvenim područjima od toksikologije, ekologije, kemije materijala i znanosti o hrani do proteomike, dijagnostike, farmakologije te istraživanja i razvoja lijekova. U usporedbi s drugim izotopima (npr. <sup>13</sup>C), označavanje deuterijem mnogo je jednostavnije, brže i jeftinije, a detekcija se provodi primjenom konvencionalne masene spektrometrije s vrlo visokom osjetljivošću.<sup>[12]</sup>

Spojevi s deuterijem koriste se kao otapala u NMR te kao interni standardi u masenoj spektroskopiji.<sup>[13]</sup> Također imaju važnu ulogu u rasvjetljavanju mehanizama organskih i enzimskih reakcija, a koriste se i za neradioaktivno obilježavanje u proteomici i metabolomici<sup>[12]</sup> te u proteinskoj kristalografiji i medicinskom oslikavanju.<sup>[14]</sup>

Najvažniji spoj deuterija je D<sub>2</sub>O ili „teška voda“ koja se razlikuje u fizikalnim svojstvima od „obične“ vode: temperatura leđišta joj je 3.82 °C, vrelišta 101.72 °C, a najveća gustoća (pri temperaturi 11.6 °C) iznosi 1106 kg/m<sup>3</sup>. Deuterirana voda proizvodi se u velikim količinama jer se, osim u organskoj sintezi, koristi i u nuklearnim reaktorima kao moderator neutrona.<sup>[13]</sup> U malim količinama prisutna je i u ljudskom organizmu u koncentraciji od približno 15 mg/kg. Kao normalna fiziološka sastavnica deuterirana voda smatra se netoksičnom za ljude i životinje sve dok je njezin udio manji od 20 % ukupne tjelesne vode.<sup>[15]</sup> O sigurnosti deuterirane vode svjedoči i činjenica da se razmatra njezina primjena u dijagnostici kao obilježivača (engl. *tracer*) u svrhu analize biomarkera za određivanje stupnja oštećenja mozga i leđne moždine.<sup>[16]</sup>

Uz prethodno navedene primjene, u posljednje vrijeme upotreba deuterija zauzima sve važnije mjesto u istraživanju i razvoju lijekova. Deuteracija se pokazala vrlo efikasnom strategijom poboljšanja farmakokinetičkih svojstava postojećih lijekova. Osim toga, uvođenje deuterija na točno određena mjesta u strukturi lijeka može imati pozitivan utjecaj na metabolizmom posredovanu toksičnost, smanjiti interakcije među lijekovima i poboljšati bioaktivaciju. Nadalje, pruža priliku za smanjenje doze supstancija koje djeluju kao pojačivači efikasnosti lijeka (tzv. *boosteri*), povećava stereokemijsku stabilnost što može biti značajno u slučaju različite efikasnosti/toksičnosti pojedinih izomera te omogućuje otkrivanje mehanizma djelovanja lijekova.<sup>[3]</sup>

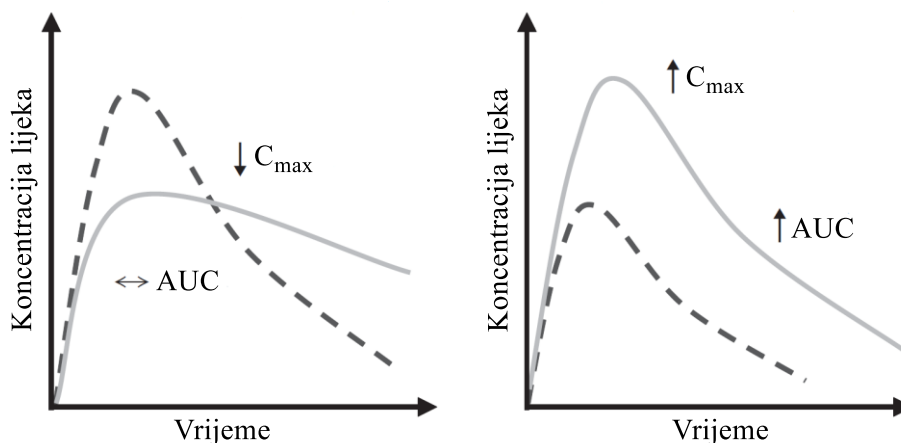
## 5. PRIMJENA DEUTERIJA U RAZVOJU LIJEKOVA

Supstitucija deuterijem u razvoju lijekova temelji se na općenitoj pretpostavci da kod lijekova koji se brzo metaboliziraju kidanjem C–H veze u koraku koji djelomično ili potpuno određuje brzinu reakcije, DKIE može usporiti enzimsku katalizu i povećati metaboličku stabilnost deuteriranog analoga. U konačnici, to može povoljno utjecati na režim doziranja u smislu smanjenja efikasne doze lijeka ili učestalosti primjene.

Većina se lipofilnih lijekova metabolizira putem citokrom P-450 enzima (CYP) koji kataliziraju oksidaciju uz kidanje C–H veze (npr. hidroksilacija aromatskog ili alifatskog ugljika). Supstitucija deuterijem mogla bi povoljno utjecati na kinetiku takvih metaboličkih reakcija, a kod reakcija kod kojih nema kidanja C–H veze, npr. epoksidacija dvostruke veze, oksigenacija i dealkilacija heteroatoma te *N*-hidroksilacija, kinetika ovisi samo o sekundarnom izotopnom efektu. Osim kod CYP enzima, uočen je efekt supstitucije deuterijem i na oksidacijske procese katalizirane drugim enzimima. Na primjer, aldehid oksidaza katalizira oksidaciju  $\alpha$ -ugljika u susjedstvu dušikovog atoma u heteroaromatskim prstenastim sustavima (npr. piridini, pirimidini, benzimidazoli) uz proces kidanja C–H veze koji određuje ukupnu brzinu reakcije.<sup>[3]</sup> Monoamino oksidaze (MAO-A i MAO-B) kataliziraju oksidaciju amino skupine uz nastajanje iminskog međuprodukta pri čemu kidanje  $\alpha$ -C–H veze supstrata predstavlja korak koji određuje ukupnu brzinu reakcije.<sup>[17]</sup> Kinetika tih reakcija također pokazuje ovisnost o supstituciji deuterijem. Ipak, zbog složene višestupanjske enzimске katalize stvarni izotopni efekt vrlo često je nepredvidiv, a povećanjem kompleksnosti sustava u kojima se mjeri, DKIE može biti maskiran drugim procesima rezultirajući neznatnim ili inverznim vrijednostima DKIE.<sup>[16]</sup>

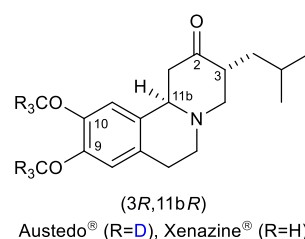
### 5.1. OPTIMIZACIJA FARMAKOKINETIČKIH SVOJSTAVA

Pozitivan utjecaj deuteracije na farmakokinetiku lijekova može se očitovati na dva načina. Na slici 2, lijevo je prikazan slučaj gdje je najvažniji efekt deuteracije smanjenje brzine sistemskog klirensa i povećanje biološkog vremena poluživota supstancije. Potencijalni pozitivni učinci takvog farmakokinetičkog profila su redukcija doze i zadržavanje opsega sistemske ekspozicije lijeku uz manju maksimalnu koncentraciju, što dovodi do smanjenja učestalosti nuspojave i povećanja efikasnosti lijeka. Desna slika ilustrira presistemske efekte deuteracije koji uključuju usporavanje metaboličkih procesa u stijenci crijeva i/ili jetri što rezultira povećanom bioraspoloživošću, tj. koncentracijom nemetaboliziranog lijeka u sistemskoj cirkulaciji raspoloživom za ostvarivanje biološkog učinka, uz nepromijenjenu brzinu sistemskog klirensa. Takav efekt deuteracije može povećati maksimalnu koncentraciju u krvi i dovesti do smanjenja doze lijeka. Također, gastrointestinalna iritacija kod peroralne primjene lijekova češće je povezana s direktnim topikalnim učinkom na želučanu sluznicu nego sa sistemskom koncentracijom lijeka, zbog čega ovakav profil može povećati podnošljivost peroralnih doziranih oblika.<sup>[18]</sup>



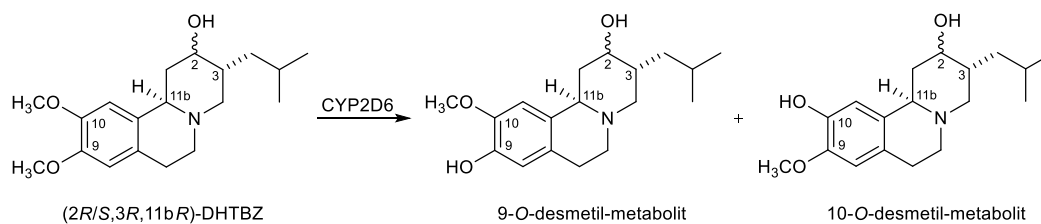
Slika 2. Prikaz utjecaja deuteracije na farmakokinetički profil; puna krivulja odnosi se na nedeuterirani, a isprekidana na deuterirani lijek<sup>[19]</sup>

Američka regulatorna Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) odobrila je 2017. godine registraciju deutetabenazina (Austedo<sup>®</sup>) – prvog, i do danas jedinog, deuteriranog lijeka na tržištu. Njegov nedeuterirani analog (slika 3), tetrabenazin (Xenazine<sup>®</sup>) na tržištu je od 2008. godine i koristi se za liječenje koreje povezane s Huntingtonovom bolešću.<sup>[16]</sup> Međutim, deuteracijom poboljšana farmakokinetika omogućila je proširenje opsega djelovanja deutetabenazina pa se, osim za Huntingtonovu bolest, koristi i u terapiji tardivne diskinezije, a ispituje se njegoa djelotvornost i u liječenju Touretteovog sindroma, disfagije povezane s Huntingtonovom bolešću te diskinezije kod djece oboljele od cerebralne paralize.<sup>[20]</sup> Mehanizam djelovanja spomenutih lijekova uključuje blokiranje vezikularnog monoaminskog transportera-2 (VMAT-2) za dopamin, serotonin, noradrenalin i histamin u mozgu što dovodi do smanjenog unosa monoamina u sinaptičke vezikule i deplecije monoaminskih zaliha iz živčanih završetaka.<sup>[21]</sup>



Slika 3. Strukture deutetabenazina (Austedo<sup>®</sup>) i tetrabenazina (Xenazine<sup>®</sup>)

Nakon oralne administracije lijeka u obliku racemata, tijekom prvog prolaska kroz jetru karbonilne reduktaze brzo i ekstenzivno metaboliziraju karbonilnu skupinu do diastereomernih alkohola. Loša oralna bioraspodjelivost (5 – 10 %) uočena je i kod deuteriranog oblika lijeka što upućuje na zaključak da ishodne nemetabolizirane supstancije ne pridonose značajno efikasnosti lijeka *in vivo*. Zbog različitog afiniteta za VMAT-2, cirkulirajući diastereomerni metaboliti ne pokazuju jednaku biološku aktivnost. Iz aktivnog enantiomera (3*R*,11*bR*) nastaje aktivni metabolit dihidrotetabenazin (DHTBZ), pri čemu oba enantiomerna oblika pokazuju biološku aktivnost [(2*R*,3*R*,11*bR*)-DHTBZ i (2*S*,3*R*,11*bR*)-DHTBZ]. Aktivni metaboliti podliježu daljnjem procesu demetilacije na položajima 9 ili 10 uz CYP2D6 enzim, pri čemu dolazi do smanjenja biološke aktivnosti (slika 4). Deuteracija metilnih skupina na tim položajima usporava metabolizam aktivnih supstancija što im omogućuje dugotrajnije djelovanje.<sup>[16]</sup>

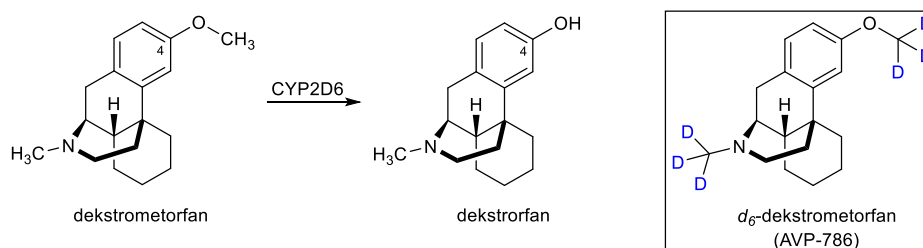


Slika 4. Metabolizam tetrabenazina djelovanjem CYP2D6 enzima

U kombinaciji s inovativnom tehnologijom kontroliranog otpuštanja lijeka iz formulacije, deuteracija tetrabenazina omogućuje rjeđe doziranje lijeka, poboljšava podnošljivost i smanjuje potrebu za genotipizacijom CYP2D6 enzima zbog mogućeg polimorfizma kod različitih pacijenata, poboljšavajući pritom cjelokupni farmakološki profil.<sup>[21]</sup>

U 3. fazi kliničkih ispitivanja za indicaciju agitacije kod Alzheimerove bolesti trenutno se nalazi fiksna kombinacija *d*<sub>6</sub>-dekstrometorfana i kinidina (AVP-786). Ova kombinacija predstavlja *deuterijski switch*<sup>1</sup> za prethodno registrirani lijek Neudextu<sup>®</sup> koji se koristi u terapiji pseudobulbarnog efekta, stanja karakteriziranog nekontroliranim, iznenadnim i čestim epizodama smijanja i/ili plakanja.<sup>[16]</sup>

Dekstrometorfan se *in vivo* brzo demetilira na položaju 4 djelovanjem CYP2D6 enzima (slika 5), a nepredvidiva i varijabilna bioraspodjelivost kod različitih pacijenata uvjetovana je genetskim polimorfizmom tog enzima. Nastali aktivni *O*-desmetil metabolit dekstrometorfana podliježe brzom glukuronidaciji do kompleksa koji ne može prijeći krvno-moždanu barijeru i izlučuje se urinom. Kinidin djeluje kao *booster* dekstrometorfana – inhibicijom CYP2D6 enzima usporava nastanak dekstrometorfana, a time i njegov brzi metabolizam u neaktivni glukuronid, što povećava plazmatsku koncentraciju dekstrometorfana i unos u središnji živčani sustav gdje ostvaruje biološki učinak. Dekstrometorfan blokira NMDA (engl. *N-methyl-D-aspartate*) receptor, inhibira ponovnu pohranu serotonina i noradrenalina te antagonizira djelovanje nikotinskih kolinergičkih receptora.<sup>[22]</sup>



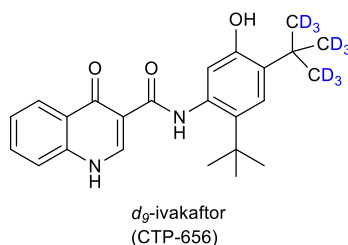
Slika 5. Metabolizam dekstrometorfana i struktura *d*<sub>6</sub>-dekstrometorfana (AVP-786)

Deuteracijom *O*- i *N*-metilnih skupina postiže se sličan učinak kao i dodatkom kinidina – usporavanje metabolizma i povećanje vremena poluživota dekstrometorfana. To dovodi do smanjenja potrebne doze kinidina za postizanje ekvivalentnog učinka, čime se smanjuje mogućnost nastanka opasnih nuspojava, kao što su produljenje QT-intervalu i nastanak ventrikularne tahikardije *torsade de pointes*.<sup>[22]</sup>

<sup>1</sup> *Deuterijski switch* je postupak razvoja deuteriranog oblika postojećeg lijeka s ciljem poboljšanja njegovih farmakoloških svojstava.

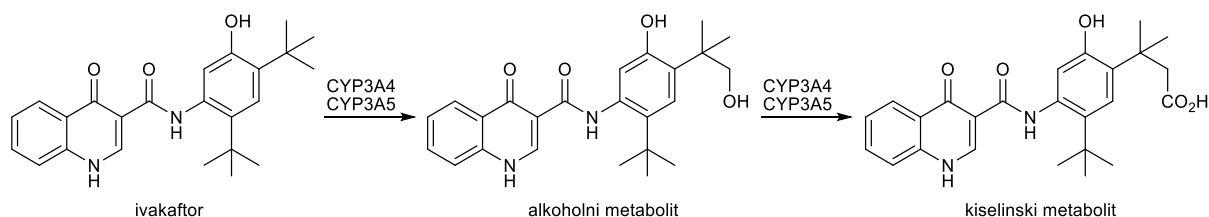


Cistična fibroza je genetska bolest koja se javlja kao posljedica mutacije cističnog fibroznog transmembranskog regulacijskog gena provodljivosti. Navedeni gen kodira za CFTR protein čija je uloga održavanje ionske homeostaze i mukusne hidratacije neophodne za adekvatnu funkciju epitelnih stanica. Ivakaftor je prvi lijek na tržištu odobren za liječenje cistične fibroze koji djeluje na način da mijenja aktivnost CFTR kloridnog kanala, a njegov se deuterirani analog CTP-656 klinički ispituje za istu indikaciju (slika 6).<sup>[3,16]</sup>



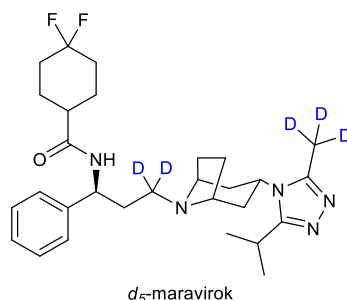
Slika 6. Struktura  $d_9$ -ivakaftora (CTP-656)

Ivakaftor se oksidira djelovanjem CYP3A enzima na jednoj od *tert*-butilnih skupina formirajući primarni alkohol i karboksilnu kiselinu kao glavne cirkulirajuće metabolite (slika 7). U usporedbi s ishodnim lijekom nastali metaboliti pokazuju slabiji biološki odgovor, a deuteracijom ciljane *tert*-butilne skupine dolazi do povećanja ekspozicije lijeku više od tri puta, dok se vrijeme poluživota poveća s 11 h na 15 h. Smanjenje klirensa, produljenje vremena poluživota i povećanje plazmatske koncentracije, omogućuju smanjenje intervala doziranja deuteriranog lijeka uz istu početnu dozu.<sup>[16]</sup>



Slika 7. Metabolizam ivakaftora do slabije aktivnih metabolita

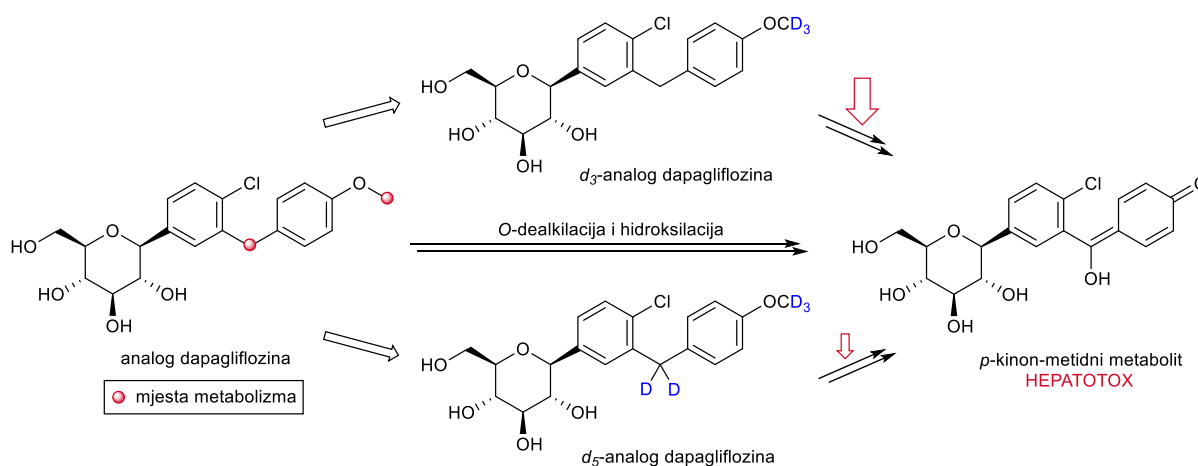
Jedan od razloga zbog kojega efekt deuteracije nije uvijek predvidiv mogućnost je da inkorporacija deuterija uspješno reducira metabolizam na supstituiranom položaju, ali enzimsku aktivnost usmjeri na neki drugi dio molekule. Takav učinak supstitucije deuterijem naziva se „metaboličkim preokretom“ (engl. *metabolic switch*). Ilustrativan primjer tog efekta je deuteracija maraviroka, negativnog alosteričkog modulatora CCR5 receptora koji se koristi u terapiji infekcije HIV-om. Deuteracija metilne skupine na triazolu usmjerava metabolizam prema *N*-dealkilaciji i paradoksalno ubrzava *in vitro* mikrosomalni klirens. U tom slučaju, nužna je deuteracija na oba položaja koji podliježu metabolizmu kako bi se značajno smanjio metabolizam u mikrosomima ( $t_{1/2, D} = 97.2$  min,  $t_{1/2, H} = 45.5$  min) (slika 8).<sup>[3]</sup>



Slika 8. Struktura  $d_3$ -maraviroka

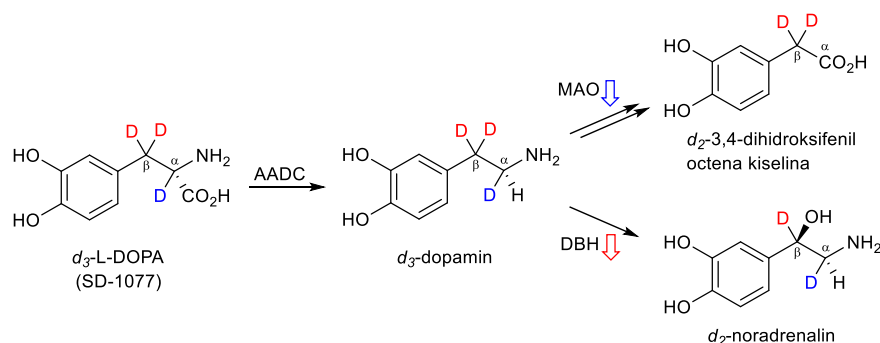
U slučajevima kada molekula posjeduje više potencijalnih oksidacijskih mjesta, moguća strategija razvoja deuteriranih lijekova je inicijalna perdeuteracija svih položaja, a nakon detaljnog proučavanja farmakokinetike *in vivo* i lociranja položaja osjetljivih na deuteraciju (engl. *soft-spot*), slijedi selektivna zamjena deuterija vodikom.

Dapagliflozin, inhibitor natrij-glukoza transportnog proteina-2 (SGLT-2), koristi se u terapiji dijabetesa tipa 2. Metabolizam dapagliflozima uključuje *O*-dealkilaciju i hidroksilaciju pri čemu nastaje hepatotoksični *p*-kinon-metidni metabolit. S ciljem povećanja metaboličke stabilnosti deuteracija je provedena na dva načina: (i) deuterirana su oba položaja koja podliježu metaboličkim promjenama ( $d_5$ -analog dapagliflozina); (ii) deuterirana je samo metoksi skupina na benzenskom prstenu ( $d_3$ -analog dapagliflozina) (slika 9). Uočeno je da selektivna deuteracija metoksi skupine značajnije doprinosi metaboličkoj stabilnosti nego perdeuteracija svih metaboličkih mjesta ( $t_{1/2,d3} = 6.34$  h,  $t_{1/2,d5} = 5.66$  h).<sup>[3]</sup>



Slika 9. Metabolizam dapagliflozina i strukture njegovih  $d_3$ - i  $d_5$ -deuteriranih analoga

Razvoj SD-1077 ( $d_3$ -L-DOPA, deulevodopa) pokazuje kako reakcije katalizirane monoamino oksidazama (MAO) i dopamin  $\beta$ -hidroksilazom (DBH) također mogu biti afektirane izotopnom supstitucijom. Nakon dekarboksilacije uz dekarboksilazu aromatskih L-amino kiselina (engl. *aromatic L-amino acid decarboxylase*, AADC), metabolizam  $d_3$ -dopamina može se regulirati deuteracijom. Inkorporacijom deuterija na  $\alpha$ -ugljikov atom usporava se MAO aktivnost i formiranje  $d_2$ -3,4-dihidroksifenil octene kiseline, dok deuterij na  $\beta$ -ugljiku smanjuje DBH funkciju i nastanak  $d_2$ -noradrenalina (slika 10).<sup>[3]</sup>



Slika 10. Prikaz utjecaja deuteracije na metabolizam levodope

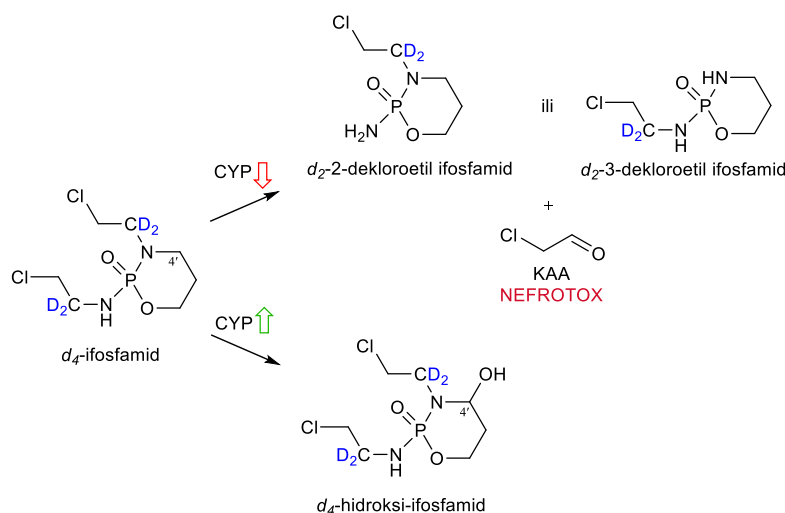
Levodopa se kao prekursor dopamina koristi u terapiji Parkinsonove bolesti gdje razaranje dopaminergičkih neurona u supstanciji nigri uzrokuje depleciju dopaminskih zaliha i narušava mogućnost kontrole složene motorike. Međutim, dugotrajna primjena levodope zbog razvijanja tolerancije zahtijeva učestalije doziranje što za posljedicu ima stimulaciju dopaminskih receptora na pulsativan način (tzv. ON-OFF fenomen). Kao posljedica oscilacija levodope u plazmi i nekontinuirane dopaminergičke stimulacije, dolazi do motoričkih fluktuacija i epizoda diskinezije.<sup>[23]</sup>

U prekliničkim studijama potvrđeno je da je  $d_3$ -L-DOPA potentniji lijek od ishodne levodope, pri čemu je procijenjeno da ekvipotentna doza deulevodope iznosi 60 % doze levodope. Osim toga, uočeno je i smanjenje levodopom uzrokovanih diskinezija zbog prolongacije ON perioda.<sup>[23]</sup> U fazi I kliničkih ispitivanja kombinacije SD-1077/karbidopa u odnosu na L-DOPA/karbidopa potvrđena je usporediva periferna farmakokinetika deulevodope u odnosu na levodopu i sigurnost nakon primjene jedne dnevne doze.<sup>[24]</sup>

## 5.2. SMANJENJE TOKSIČNOSTI

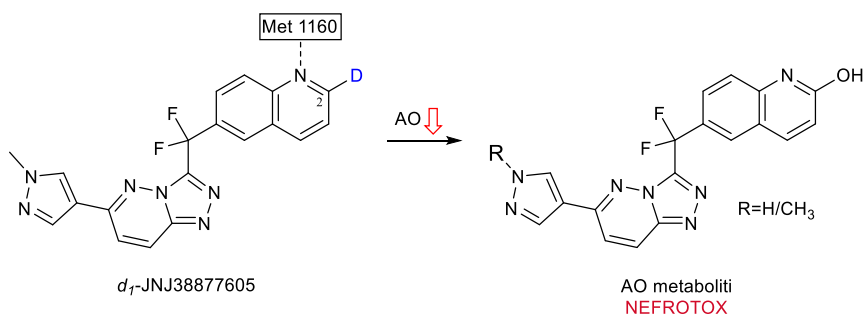
Neovisno o farmakokinetičkim parametrima, deuteracija ključnih mjesta u molekuli može reducirati formiranje neželjenih, a poboljšati nastanak aktivnih metabolita. Taj se fenomen naziva „metaboličkim skretanjem“ (engl. *metabolic shunting*).

Ifosfamid je citostatik koji se koristi u terapiji leukemije, limfoma, sarkoma i solidnih tumora. Aktivacija u jetri započinje hidroksilacijom na položaju 4' djelovanjem CYP enzima, a daljnjom neenzimskom pregradnjom nastaje citotoksični alkilirajući agens koji dehalogeniranjem prelazi u aziridinijev ion. Aziridinijevi ioni su jaki elektrofilni koji stvaraju kovalentne veze s dušičnim bazama i sprječavaju replikaciju i transkripciju DNA. Osim hidroksilacije koja je prvi korak u aktivaciji ifosfamida, CYP enzimi kataliziraju i *N*-dekloroetilaciju do kloroacetaldehida (KAA) i 2-/3-dekloroetil metabolita odgovornih za nefrotoksični učinak ifosfamida (slika 11). Supstitucija deuterijem na  $\alpha$  i  $\alpha'$  ugljikovim atomima u molekuli ifosfamida rezultira smanjenjem *N*-dekloroetilacije u korist hidroksilacije na položaju 4' u usporedbi s nedeuteriranom molekulom. Deuteracijom potaknuto „metaboličko skretanje“ može poboljšati terapijski indeks ovog kemoterapeutika.<sup>[25]</sup>



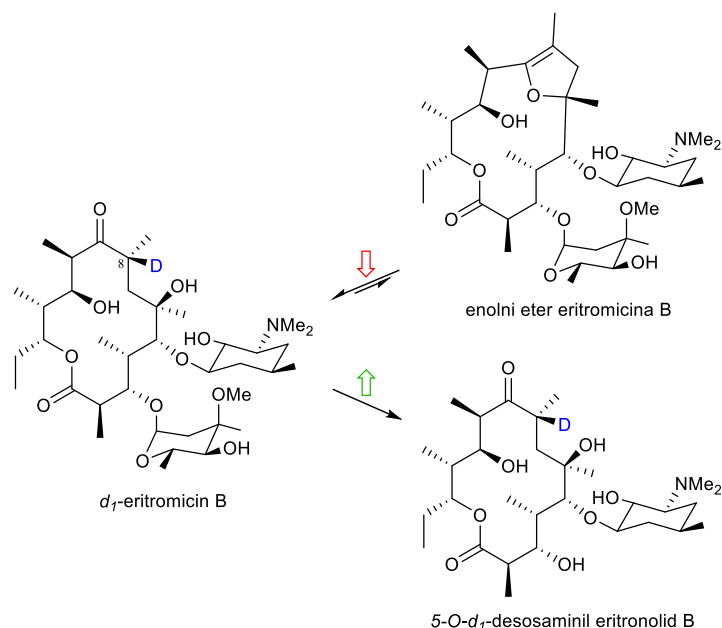
Slika 11. Prikaz utjecaja deuteracije na metabolizam ifosfamida

Ciljana deuteracija dovela je do smanjenja renalne toksičnosti i kod eksperimentalnog citostatika JNJ38877605 koji se ispituje zbog inhibitornog učinka na c-Met tirozin kinazu. JNJ38877605 se metabolizira aldehyd oksidazama (AO) do slabo topljivih nefrotoksičnih metabolita. Deuteracija na položaju 2 kinolinskog prstena rezultira zadržavanjem biološke aktivnosti uz povećanje metaboličke stabilnosti (slika 12). Osim redukcije toksičnih metabolita, uočeno je povećanje površine ispod krivulje (AUC) 1.88 puta i  $C_{max}$  1.56 puta u odnosu na nedeuterirani analog, što može dovesti do povećanja efikasnosti i potentnosti lijeka. Zanimljivo je napomenuti da druge supstitucije na istom položaju kinolinskog prstena, npr. atomom fluora, nisu moguće jer sterički ometaju nastanak vodikove veze dušika iz prstena s metioninom 1160 iz c-Met tirozin kinaze, što je ključno za biološki učinak.<sup>[3]</sup>



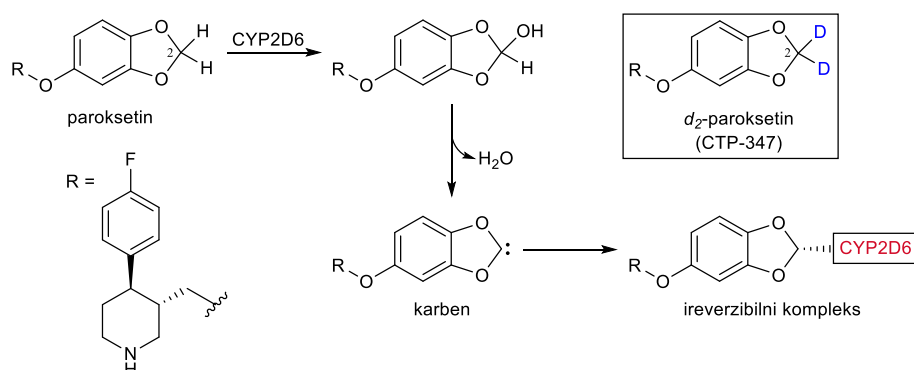
Slika 12. Prikaz utjecaja deuteracije na metabolizam eksperimentalnog citostatika JNJ38877605

Deuterirani oblik eritromicina B nalazi se u ranoj fazi ispitivanja utjecaja deuteracije na toksičnost. U kiselim uvjetima, npr. u želucu nakon peroralne primjene, iz eritromicina B nastaje 6,9-enolni eter uz gubitak protona na položaju 8. Enolni eter ne posjeduje antibakterijsku aktivnost i uzrokuje nuspojave povezane s motilitetom crijeva. Inkorporacija deuterija na položaj 8 značajno reducira formiranje neželjenog metabolita bez negativnog učinka na antibakterijsku aktivnost (slika 13). Hidrolizom šećerne jedinice kladinoze nastaje manje aktivan, ali netoksičan metabolit desosaminil eritronolid. Efekt deuteracije na gastrointestinalne nuspojave *in vivo* nije ispitano.<sup>[26]</sup>



Slika 13. Prikaz utjecaja deuteracije na metabolizam eritromicina B

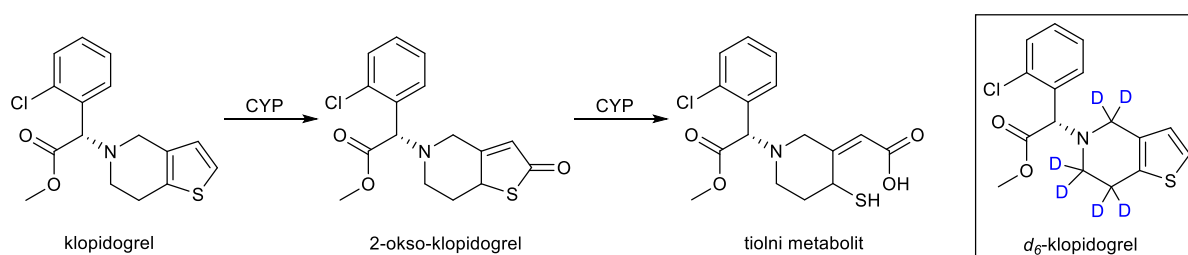
Ciljana deuteracija može se iskoristiti za smanjenje interakcija među lijekovima. Jedan od najkorištenijih antidepresiva – paroksetin – djeluje kao CYP2D6 inhibitor zbog čega ulazi u interakcije s mnogim lijekovima koji se metaboliziraju putem tog enzima. Prvi korak u metabolizmu paroksetina oksidacija je metilendioksi ugljikovog atoma na položaju 2 (slika 14). Dehidratacijom tog metabolita nastaje karben koji se ireverzibilno veže na CYP2D6 inhibirajući pritom njegovu enzimsku funkciju. Inkorporacijom dva deuterijeva atoma ( $d_2$ -paroksetin, CTP-347) na ključno mjesto metabolizma dolazi do smanjenja inaktivacije CYP2D6 enzima *in vitro* i *in vivo* i ubrzanja metabolizma paroksetina što se očituje kraćim  $t_{1/2}$  vrijednostima. Ipak, uočeno je da ne dolazi do promjene u afinitetu vezanja na farmakološku metu paroksetina (serotoninški transporter) i da je očuvana efikasnost inhibicije ponovne pohrane serotonina na animalnom modelu u usporedbi s nedeuteriranim lijekom. Redukcija inhibicije CYP2D6 enzima dovodi do smanjene mogućnosti interakcija s drugim lijekovima, što je potvrđeno istovremenom primjenom drugih supstrata: *in vitro* tamoksifena i *in vivo* dekstrometorfana – kao selektivnih proba CYP2D6 aktivnosti.<sup>[27]</sup>



Slika 14. Metabolizam paroksetina i struktura njegovog  $d_2$ -deuteriranog analoga

### 5.3. POBOLJŠANJE BIOAKTIVACIJE

Klopidogrel je antitrombotik koji inhibicijom receptora za adenzin difosfat (ADP) sprječava agregaciju trombocita. Djeluje kao prolijek koji u jetri podliježe ekstenzivnom metabolizmu uz razne CYP enzime do aktivnog metabolita. Prvi korak je oksidacija na položaju 2 pri čemu nastaje neaktivni 2-okso-klopidogrel, a tek razgradnjom tiofenskog prstena nastaje aktivni tiolni metabolit (slika 15). Zbog složenog metabolizma primjena klopidogrela često je povezana s kliničkom varijabilnošću i visokim stupnjem rezistencije na terapiju, čemu pridonosi i oksidacija u neaktivnom dijelu molekule (piperidinski prsten). Perdeuteracija piperidinske podjedinice poboljšava aktivaciju *in vitro* (postotak bioaktivacije: klopidogrel = 14.5 %, *d*<sub>6</sub>-klopidogrel = 19.3 %) i dovodi do jačeg inhibitornog učinka na ADP-om posredovanu agregaciju trombocita u animalnom modelu. Ovaj primjer pokazuje kako deuteracija ciljanih mjesta na prolijeku može biti efikasna strategija za poboljšanje bioaktivacije.<sup>[28]</sup>

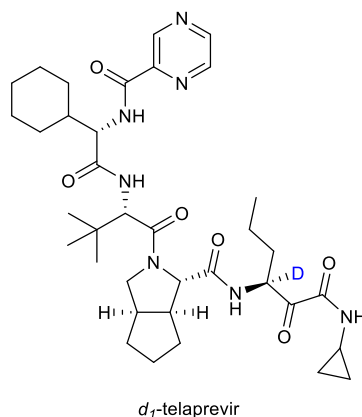


Slika 15. Metabolizam klopidogrela i struktura njegovog *d*<sub>6</sub>-deuteriranog analoga

### 5.4. STABILIZACIJA STEREOIZOMERA

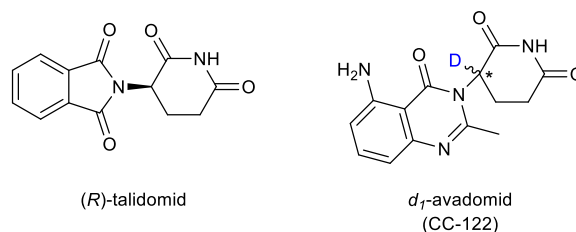
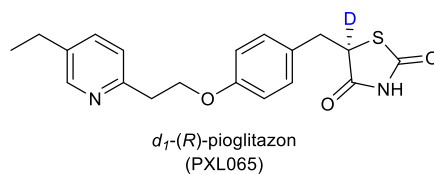
U posljednje vrijeme sve važnije mjesto u farmaceutskoj industriji zauzima ispitivanje farmakološke i toksikološke aktivnosti pojedinih enantiomera, s ciljem definiranja doprinosa svakog enantiomera željenom odnosno neželjenom učinku racemata (tzv. eudizmički omjer). Farmakološki aktivniji enantiomer naziva se eutomerom, a onaj manje aktivan ili više toksičan distomerom. „Kiralni preokret“ (engl. *chiral switch*) je postupak transformiranja ishodnog racemičnog lijeka u njegov aktivni enantiomer. Farmaceutskoj kompaniji koja je razvila postupak pripreve eutomera i njegove formulacije osigurana su patentna prava i novo generičko ime lijeka.<sup>[29,30]</sup> Iako je na farmaceutskom tržištu prisutan sve veći broj kiralno čistih spojeva, kod nekih je lijekova *kiralni switch* onemogućen zbog brze interkonverzije stereoizomera *in vitro* i/ili *in vivo*. Supstitucijom kiselog protona deuterijem na kiralnom centru stereoizomera može se značajno usporiti gubitak vodika što predstavlja dobru strategiju stabilizacije kemijski nestabilnih stereoizomera (tzv. „deuterijem omogućen kiralni preokret“, engl. *deuterium enabled chiral switching*).

Ovakav pristup stereokemijskoj stabilizaciji prvi put je pokazan na primjeru telaprevira – inhibitora NS3-4A proteaze virusa hepatitisa C. Kiralni centar u susjedstvu  $\alpha$ -ketoamida podložan je epimerizaciji putem keto-enolne tautomerije pri bazičnim pH uvjetima. (*S*)-enantiomer prelazi u približno 30 puta manje aktivan (*R*)-enantiomer. Selektivnom inkorporacijom deuterija na mjesto vodika u kiralnom centru smanjuje se brzina enantiomerizacije (DKIE = 4 – 7) i povećava *in vitro* i *in vivo* stereokemijska stabilnost (slika 16).<sup>[3]</sup>

Slika 16. Struktura  $d_1$ -telaprevira

Najpoznatiji i najtragičniji primjer koji govori o važnosti stereokemije u farmaciji je lijek talidomid. Talidomid se koristio kao antiemetik u trudnoći, a povučen je s tržišta zbog teratogenog učinka koji se pripisuje (*S*)-enantiomeru, dok se (*R*)-talidomid smatra sigurnim i zaslužnim za sedativno djelovanje (slika 17). Talidomidska katastrofa ne bi bila izbjegnuta da se u terapiji primjenjivao čisti (*R*)-enantiomer jer u organizmu dolazi do brze racemizacije katalizirane bazičnim medijem i serumskim albuminom.<sup>[31]</sup> Deuteracija kiralnog centra pokazala se djelomično efikasnom strategijom jer dovodi do povećanja stabilnosti (*R*)- $d_1$ -talidomida pet puta u odnosu na nedeuterirani enantiomer. Biološka karakterizacija deuteriranog oblika nije provedena.<sup>[3]</sup>

Zbog važnosti u terapiji karcinoma i upalnih bolesti, utjecaj supstitucije deuterijem na stereokemijsku stabilnost ispitan je i kod derivata talidomida – avadomida (CC-122) (slika 17). Racemizacija se događa na kiralnom centru na položaju 3 glutarimidne skupine, a uočeno je da (–)-enantiomer djeluje kao antitumorski agens, dok (+)-enantiomer ne pokazuje biološku aktivnost. Deuteracijom kiralnog centra značajno je povećana stabilnost oba enantiomera, uz minimalan postotak D/H izmjene i međusobne interkonverzije enantiomera *in vivo*.<sup>[32]</sup>

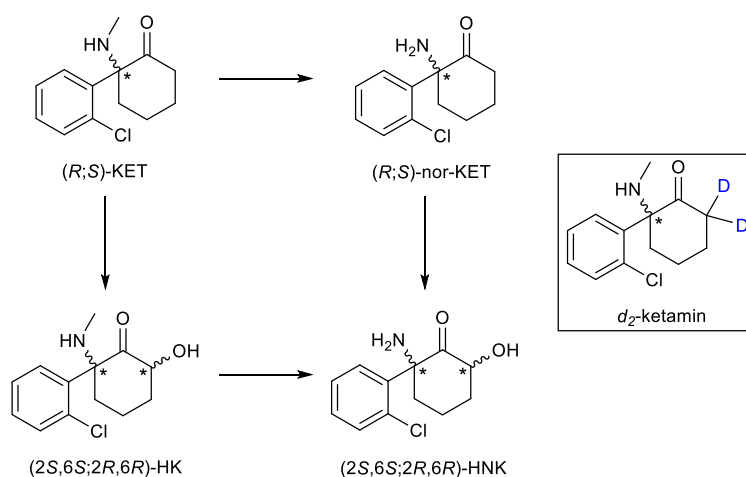
Slika 17. Struktura (*R*)-talidomida i  $d_1$ -avadomida (CC-122)Slika 18. Struktura  $d_1$ -(*R*)-pioglitazona (PXL065)

Pioglitazon je antidiijabetik koji djeluje kao agonist PPAR $\gamma$  unutarstaničnih receptora (engl. *peroxisome proliferator-activated- $\gamma$  receptors*). Enantiomeri pioglitazona posjeduju različita farmakološka svojstva. (*S*)-enantiomer je PPAR $\gamma$  agonist, što se povezuje i s neželjenim pojavama povećanja mase, retencije tekućine, edema te kongestivnog zatajenja srca. Preklinička ispitivanja pokazuju da (*R*)-enantiomer ne uzrokuje takve nuspojave, nego modulira mitohondrijsku funkciju i posjeduje protuupalni učinak povezan s inhibicijom mitohondrijskog transportera za piruvat. PXL065 je deuterijem-stabilizirani (*R*)-enantiomer pioglitazona koji se klinički ispituje za liječenje adrenomijeloneuropatije i nealkoholnog steatohepatitisa (slika 18). Deuteracija na položaju 5 usporava racemizaciju enantiomera, a klinički rezultati pokazuju superiorniji terapijski indeks u usporedbi s pioglitazonom.<sup>[16]</sup>

### 5.5. SPOJEVI DEUTERIJA U ISPITIVANJU MEHANIZMA DJELOVANJA

Deuteracija može biti korisna eksperimentalna strategija u osvjetljavanju mehanizma djelovanja lijekova, npr. ispitivanjem doprinosa nekog od metabolita ukupnom biološkom učinku.

Ketamin je primarno registriran na tržištu kao kratkodjelujući anestetik, ali nedavno je uočeno da subhalucionogena doza ketamina posjeduje antidepresivni učinak koji je vidljiv 4 h nakon intravenske primjene, a traje 1-2 tjedna. Kako bi se ispitao mehanizam djelovanja i doprinos pojedinih metabolita biološkom učinku, u mozgu štakora praćene su razine ketamina (KET) i njegovih metabolita: (*2S,6S;2R,6R*)-hidroksiketamina (HK), norketamina (nor-KET) i (*2S,6S;2R,6R*)-hidroksinorketamina (HNK) (slika 19). Ispostavilo se da je najvažniji metabolit, pronađen u većim koncentracijama u plazmi i mozgu, (*2S,6S;2R,6R*)-hidroksinorketamin, kojemu se pridaje antidepresivni učinak. Kako bi se potvrdila hipoteza, sintetiziran je deuterirani ketamin (*d*<sub>2</sub>-ketamin), slabije podložan metaboličkim procesima. Deuteracija nije utjecala na razinu ketamina u mozgu, ali uočeno je smanjenje pozitivnog biološkog učinka, čime je potvrđeno da je (*2S,6S;2R,6R*)-hidroksinorketamin odgovoran za antidepresivno djelovanje.<sup>[3]</sup>



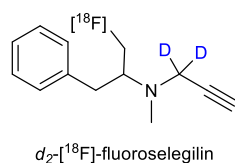
Slika 19. Metabolizam ketamina i struktura njegovog *d*<sub>2</sub>-deuteriranog analoga



## 5.6. PET OBILJEŽIVAČI

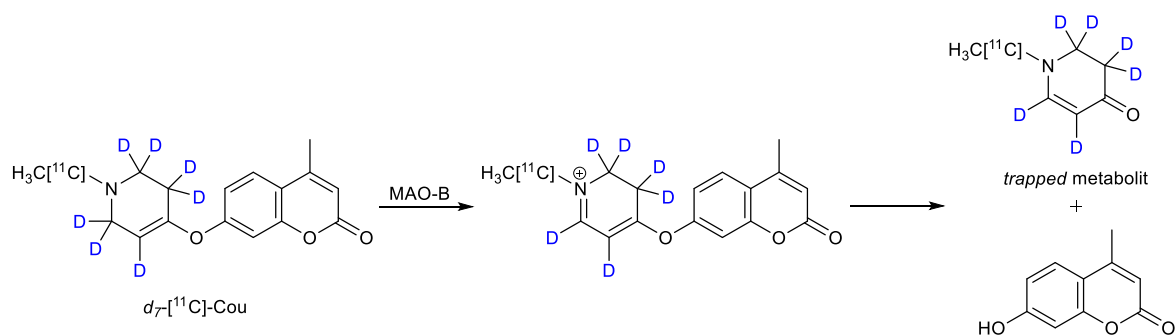
*Deuterijski switch* zauzima sve važnije mjesto u području PET (engl. *positron emission tomography*) obilježavanja s velikim potencijalom primjene u detekciji biokemijskih promjena povezanih s bolešću ili kao biomarkeri tijekom razvoja potencijalnih lijekova. Razvoj PET obilježivača je zahtjevan proces koji ovisi o mnogim fizikalno-kemijskim i farmakološkim faktorima među kojima je metabolizam od velikog značaja. Jedan od zahtjeva za uspješne PET obilježivače je brzi klirens, ali ne prebrzi kako bi bilo omogućeno njihovo praćenje u organizmu. Ciljana deuteracija predstavlja održivo rješenje za optimizaciju *in vivo* ponašanja ishodnog radionuklida.

Monoamino oksidaza-B (MAO-B) ključni je enzim u patogenezi upalnih procesa odgovornih za nastanak neurodegenerativnih poremećaja kao što su Alzheimerova i Parkinsonova bolest. Ciljana deuteracija može poboljšati svojstva ishodnih radionuklida koji se koriste kao biomarkeri neurodegeneracije.  $d_2$ - $[^{18}\text{F}]$ -Fluoroselegilin je radio-označeni MAO-B inhibitor koji se koristi kao molekularni biomarker za kvantifikaciju enzimske aktivnosti u mozgu (slika 20). Njegov se nedeuterirani analog veže prebrzo i ireverzibilno na enzim, zbog čega je distribucija u tkiva određena protokom krvi, a ne razinom MAO-B enzima. Budući da kidanje C–H veze u propargilamino skupini inhibitora predstavlja korak koji određuje brzinu zadržavanja radioliganda u mozgu, supstitucija vodika deuterijem usporava reakciju što povećava osjetljivost metode za praćenje enzimske aktivnosti.<sup>[3]</sup>



Slika 20. Struktura  $d_2$ - $[^{18}\text{F}]$ -fluorosegilina

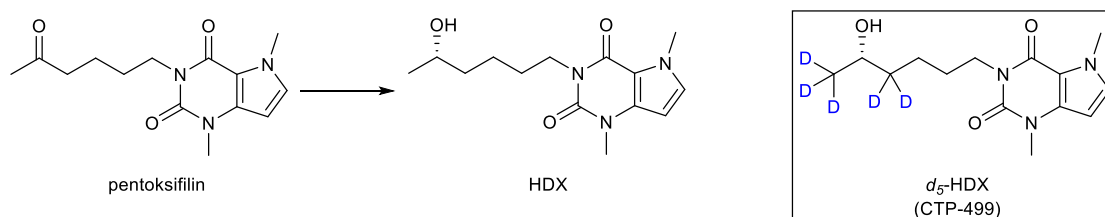
Deuteracija ne mora uvijek biti uspješna strategija poboljšanja *in vivo* ponašanja nedeuteriranih analoga. Primjer tome je  $d_7$ - $[^{11}\text{C}]$ -Cou koji se koristi kao metabolički *trapping* agens. Prvi korak u metabolizmu  $[^{11}\text{C}]$ -Cou je MAO-B katalizirana oksidacija, nakon čega slijedi brza hidroliza do metabolita koji ne može prijeći krvno-moždanu barijeru i ostaje „zarobljen“ u mozgu (engl. *trapped*) (slika 21). To otežava razlučivanje između regija u mozgu s visokom i niskom razinom MAO aktivnosti. Inkorporacija deuterija na tetrahidropiridinski prsten ne utječe značajno na brzinu oksidacije i „zarobljavanja“ metabolita u mozgu, unatoč tome što literatura predviđa visoke vrijednosti DKIE izmjerene na strukturno sličnim sustavima (DKIE = 3.55). Moguće objašnjenje je da drugi najznačajniji korak u određivanju ukupne brzine metabolizma – hidroliza – maskira izotopni efekt što za posljedicu ima slab utjecaj deuteracije na ponašanje obilježivača.<sup>[3]</sup>



Slika 21. Metabolizam  $d_7$ - $[^{11}\text{C}]$ -Cou PET obilježivača

## 5.7. RAZVOJ DEUTERIRANIH METABOLITA LIJEKOVA

Pentoksifilin je sintetski ksantinski derivat koji djeluje kao kompetitivni neselektivni inhibitor fosfodiesteraze. Zbog učinka na viskoznost krvi, koristi se za liječenje poremećaja arterijske cirkulacije u ekstremitetima koji su posljedica ateroskleroze, dijabetesa i vazospazama. Osim toga, uočeni su mnogi drugi pozitivni učinci pentoksifilina kao što su protuupalno, antiproliferativno, imunomodulatorno i antifibrotično djelovanje, što ga čini dobrim lijekom za tretiranje kronične bubrežne bolesti. Za renoprotektivno djelovanje odgovoran je 5-hidroksi metabolit pentoksifilina (HDX) (slika 22). S ciljem povećanja stabilnosti aktivnog metabolita pet vodikovih atoma na položajima 4 i 6 heksilnog lanca zamijenjeni su deuterijem. Preklinička ispitivanja  $d_5$ -HDX (CTP-499) sugeriraju da deuterirani oblik metabolita pokazuje slične pozitivne učinke kao i HDX, a inicijalna klinička ispitivanja upućuju na sigurnost i brzu apsorpciju s niskom interindividualnom varijabilnošću.<sup>[3]</sup>



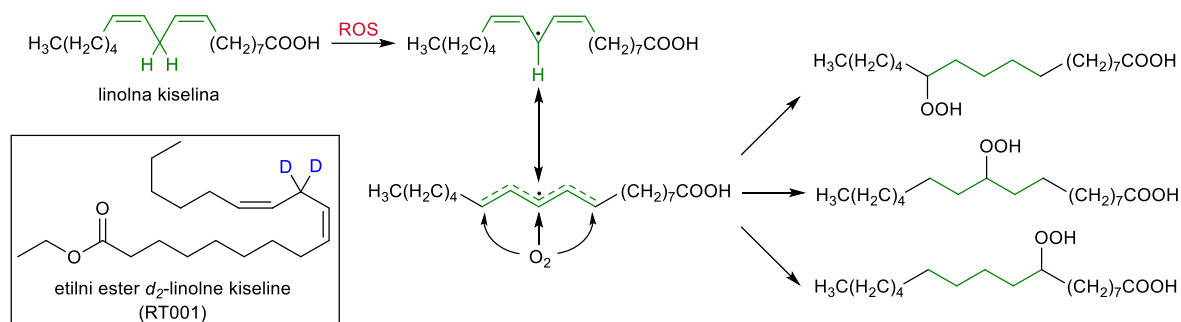
Slika 22. Metabolizam pentoksifilina i struktura aktivnog metabolita  $d_5$ -HDX (CTP-499)

## 5.8. RAZVOJ DEUTERIRANIH ENDOGENIH METABOLITA

### 5.8.1. SLUČAJ RT001

Linolna kiselina je najzastupljenija polinezasićena masna kiselina (engl. *polyunsaturated fatty acid*, PUFA) u ljudskom organizmu čija je uloga modifikacija svojstava staničnih membrana. Lanac od 18 ugljikovih atoma sadrži bis-alil metilensku skupinu ( $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ ) čije su C–H veze podložne reakcijskim procesima s reaktivnim kisikovim specijama (engl. *reactive oxygen species*, ROS). U odsutnosti antioksidansa, prijenosom vodikovog atoma s određenog mjesta na bis-alil metilenskoj skupini na reaktivnu kisikovu speciju, nastaju rezonantno stabilizirani slobodni radikali (slika 23). Slobodni radikali mogu reagirati s molekulskim kisikom i započeti lanac reakcija lipidne peroksidacije. Posljedice tih procesa su narušavanje fluidnosti membrane i oksidativna oštećenja biomolekula kao što su proteini i DNA putem poprečnog povezivanja s visoko reaktivnim spojevima.<sup>[33]</sup> Dvostruka deuteracija etilnog estera linolne kiseline na položaju 11 stabilizira bis-alil metilenski dio molekule i usporava propagaciju lipidne peroksidacije. Zbog obećavajućih *in vitro* i *in vivo* rezultata na smanjenje lipidne peroksidacije, etilni ester 11,11- $d_2$ -linolne kiseline ispituje se u neurološkim degenerativnim poremećajima gdje slobodni radikali imaju ključnu ulogu u etiologiji bolesti.<sup>[3]</sup>

Friedreichova ataksija (FA) je autosomalni recesivni poremećaj uzrokovan niskim razinama proteina frataksina. Frataksin je mitohondrijski protein koji ima vrlo važnu ulogu u homeostazi željeza i biogenezi Fe-S klastera relevantnih u mitohondrijskom respiratornom lancu. Njegov nedostatak dovodi do nakupljanja željeza u mitohondriju i oksidativnog stresa što u konačnici može uzrokovati smrt stanice. Bolest je klinički karakterizirana progresivnom ataksijom povezanom s arefleksijom, dizartrijom, skoliozom, gubitkom osjeta vibracije i propriocepcije, kardiomiopatijom i povećanim rizikom nastanka dijabetesa. Na tržištu ne postoji lijek odobren za terapiju FA.<sup>[34]</sup>



Slika 23. Mehanizam inicijacije lipidne peroksidacije i struktura etilnog estera 11,11-*d*<sub>2</sub>-linolne kiseline (RT001)

Etilni ester 11,11-*d*<sub>2</sub>-linolne kiseline (RT001) trenutno se nalazi u kliničkom ispitivanju za liječenje FA kao *orphan drug*<sup>2</sup>. Preliminarni rezultati upućuju na sigurnost, prihvatljivu podnošljivost i efikasnost u poboljšanju motoričkih sposobnosti pacijenata.<sup>[35]</sup>

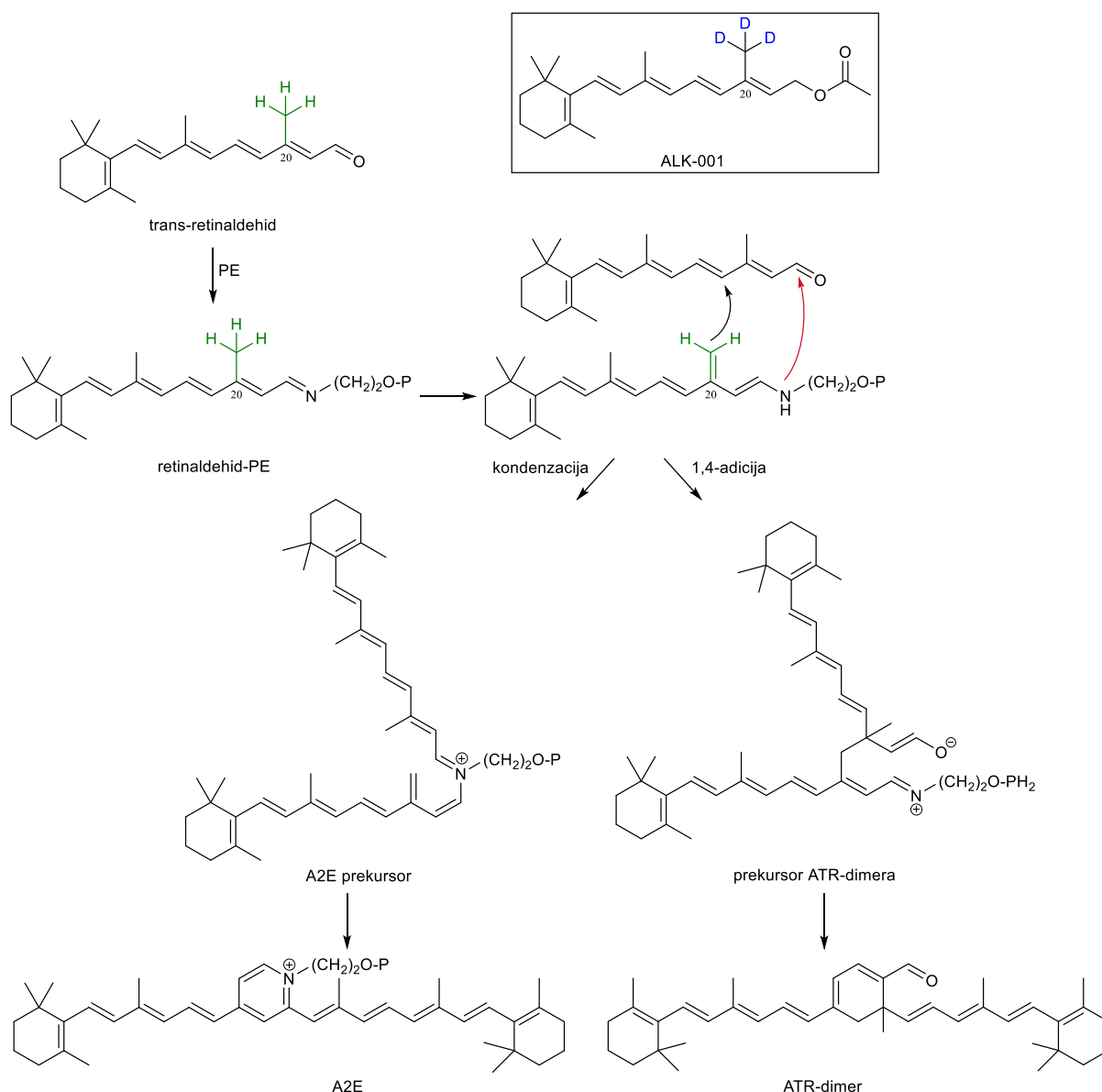
### 5.8.2. SLUČAJ ALK-001

Stargardtova bolest, poznata kao juvenilna makularna degeneracija, najčešći je oblik autosomalne recesivne makularne distrofije čiji se simptomi pojavljuju već u pubertetu, a s vremenom se pogoršavaju do potpunog i ireverzibilnog gubitka vida. Bolest dovodi do makularne atrofije i progresivnog gubitka fotoreceptorske funkcije. Kao i u slučaju Friedreichove ataksije, na tržištu ne postoji lijek za liječenje Stargardtove bolesti.<sup>[3,16]</sup>

Stargardtova bolest je posljedica mutacija na genu za ABCA4 protein (engl. *ATP-binding cassette*) – transmembranske flipaze eksprimirane u retinalnim fotoreceptorima, čija je uloga transport retinaldehid fosfatidiletanolamina (PE) s luminalne na vanjsku stranu membrane stanice čime se osigurava fotoreceptorska homeostaza. Prvi korak u patogenezi makularne distrofije reakcija je između retinaldehida i fosfatidiletanolamina (PE) pri čemu nastaje Schiffova baza retinaldehid-PE (slika 24). U slučaju nefunkcionalnog ABCA4 transportera, Schiffova baza reagira s drugom molekulom retinaldehida uz kidanje C–H veze na položaju 20 formirajući pritom dimere vitamina A *N*-retiniliden-*N*-retiniletanolamin (A2E) i trans-retinaldehid dimer (ATR). Nastali dimeri imaju ključnu ulogu u stvaranju retinalnog pigmenta lipofuscina, čija akumulacija dovodi do makularne degeneracije.<sup>[36]</sup>

Budući da je kidanje C–H veze na položaju 20 ključni korak u procesu dimerizacije, napravljena je supstitucija vodikovih atoma deuterijem na istom položaju s ciljem sporijeg nastanka dimera vitamina A. Preklinička ispitivanja *d*<sub>3</sub>-vitamina A (ALK-001) na animalnim modelima pokazuju obećavajuće rezultate u smanjenju brzine nastanka dimera vitamina A i biogeneze lipofuscina.<sup>[36]</sup> Klinička ispitivanja ALK-001 su u tijeku.

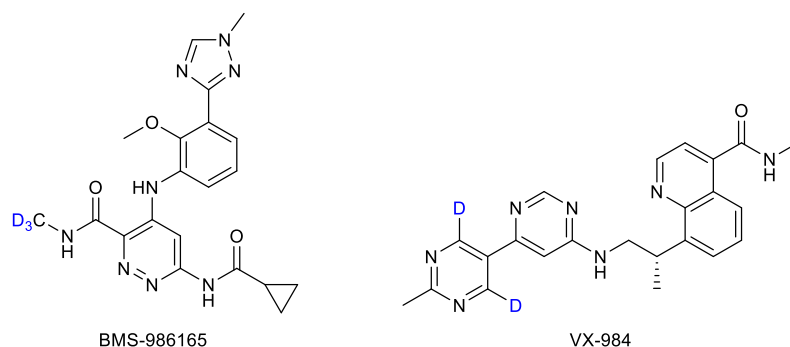
<sup>2</sup> *Orphan drug* je lijek koji se koristi za liječenje teških i rijetkih bolesti s incidencijom pojavljivanja u manje od 10 000 slučajeva u Europi i 200 000 u SAD-u.



Slika 24. Mehanizam nastanka dimera vitamina A i struktura  $d_3$ -vitamina A (ALK-001)

## 5.9. SINTEZA NOVIH SPOJEVA DEUTERIJA

Osim u poboljšanju svojstava postojećih lijekova, inkorporacija deuterija može se provoditi i u ranom stadiju sinteze bioaktivnih spojeva koji nemaju postojećih nedeuteriranih analoga na tržištu. Primjer tome su eksperimentalni lijekovi BMS-986165 i VX-984 prikazani na slici 25. BMS-986165 djeluje kao potentni i selektivni alosterički inhibitor tirozin kinaze 2, a blokira i signalizaciju putem IL-12, IL-23 i interferona tipa I. Klinički se ispituje za indikaciju psorijaze, a u prekliničkim studijama pokazao je pozitivno djelovanje i na sistemski eritemski lupus i upalnu bolest crijeva. VX-984 je inhibitor DNA-ovisne protein kinaze, a ispituje se za liječenje rekurentnog ili metastatskog karcinoma endometrija. Deuteracija je poslužila kao efikasna strategija za usporavanje AO-katalizirane razgradnje lijeka.<sup>[3,16]</sup>



Slika 25. Strukture eksperimentalnih lijekova BMS-986165 i VX-984

## 6. POTENCIJALNI PROBLEMI I MOGUĆNOSTI U RAZVOJU SPOJEVA S DEUTERIJEM

Potencijalni problemi i mogućnosti s kojima se mogu susresti farmaceutske kompanije prilikom razvoja deuteriranih lijekova su: (i) rizici povezani uz intelektualno vlasništvo, (ii) troškovi razvoja i proizvodnje te (iii) različiti regulatorni putovi za stavljanje lijeka na tržište.

Registracija *de novo* sintetiziranih spojeva s deuterijem ne razlikuje se u odnosu na nedeuterirane molekule, međutim *deuterijski switch* predstavlja znatno kompleksniji slučaj s gledišta intelektualnog vlasništva. Različiti ishodi patentnih prijava ovise prije svega o učinku deuteracije na svojstva nedeuteriranih spojeva, što znači da je moguće zaštititi deuterirani lijek kao intelektualno vlasništvo ako priloženi podaci dokazuju značajno poboljšanje postojećeg lijeka. Budući da se deuteracija tek nedavno pojavila u farmaceutskoj praksi i postala predmetom rasprava, ne začuđuje činjenica se farmaceutske kompanije prilikom patentnih prijava novih kemijskih entiteta sve češće odlučuju za zaštitu i njihovih deuteriranih analoga.<sup>[37]</sup>

Veća cijena deuteriranih reagensa može biti još jedan nedostatak u korištenju deuterija prilikom razvoja lijekova. Ipak, procjenjuje se da ukupan trošak proizvodnje takvih lijekova ne bi trebao biti znatno veći u odnosu na nedeuterirane lijekove jer se reagensi dobivaju iz deuterirane vode čija je cijena relativno prihvatljiva, a kupovina veće količine sirovina dodatno snižava cijenu. Osim toga, *deuterijski switch* može dovesti do smanjenja ekvipotentne doze aktivne supstancije u formulaciji što također može sniziti trošak sveukupne proizvodnje. Ipak, u mnogim slučajevima redukcija doze ne smanjuje cijenu jer se većina deuteriranih lijekova razvija kao terapija rijetkih bolesti (engl. *orphan drugs*) ili za indikacije gdje troškovi proizvodnje ne definiraju cijenu konačnog proizvoda.<sup>[3,15]</sup>

Regulatorne agencije koriste različite pristupe kako bi stimulirale razvoj određenih skupina lijekova, primjerice onih koji predstavljaju jedinu potencijalnu terapiju za određenu bolest ili lijekova koji pokazuju značajan napredak u odnosu na postojeću terapiju. Primjeri takvih pristupa, tj. oznaka prilikom registracije lijekova su: ubrzani postupak (engl. *fast track*), oznaka lijekova za liječenje rijetkih i teških bolesti (engl. *orphan drug*) te osobito poboljšana terapija (engl. *breakthrough therapy*).<sup>[38]</sup> Tako je deutetabenazin (SD-809) za vrijeme trajanja kliničkih ispitivanja imao oznake *orphan drug* i *breakthrough therapy*, a brži dolazak na tržište omogućio mu je 505(b)(2) regulatorni put kojim su izbjegnuta nepotrebna ponavljanja određenih nekliničkih i sigurnosnih studija referirajući se na kompletnu prijavu tetabenazina. Kombinacija dekstrometorfana i kinidina (AVP-786) nalazi se u fazi III kliničkih ispitivanja s *fast track* oznakom, a RT001 se ispituje kao *orphan drug*.<sup>[16,39]</sup>

## 7. ZAKLJUČAK

Primjena deuterija u istraživanju lijekova privlači sve veći interes farmaceutskih kompanija, a odnedavno je i dodatno motivirana činjenicom da je FDA odobrila prvi deuterirani lijek Austedo® (deutetrabenazin) za liječenje Huntingtonove bolesti. Deutaracija se pokazala vrlo efikasnom strategijom u poboljšanju cjelokupnog farmakološkog profila postojećih lijekova s pozitivnim učinkom na farmakokinetiku, režim doziranja, metabolizmom posredovanu toksičnost, bioaktivaciju, stereokemijsku nestabilnost te interakcije među istovremeno primijenjenim lijekovima. Unatoč činjenici da bioizosterička zamjena vodika deuterijem može biti zahtjevan i izazovan zadatak, velika količina dostupnog znanja o razvoju deuteriranih lijekova predstavlja temelj za buduće primjene deuterija u farmaceutskoj industriji.

## 8. POPIS LITERATURE

- [1] Rosman KJR, Taylor PDP. Isotopic compositions of the elements 1997 (Technical Report). *Pure Appl Chem*, 1998, 70, 217–235.
- [2] Meanwell NA. Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design. *J Med Chem*, 2011, 54, 2529–2591.
- [3] Pirali T, Serafini M, Cargini S, Genazzani AA. Applications of Deuterium in Medicinal Chemistry. *J Med Chem*, 2019, 62, 5276–5297.
- [4] Bell RP. Livingside Lecture. Recent advances in the study of kinetic hydrogen isotope effects. *Chem Soc Rev*, 1974, 3, 513–544.
- [5] Westheimer FH. The magnitude of the primary kinetic isotope effect for compounds of hydrogen and deuterium. *Chem Rev*, 1961, 61, 265–273.
- [6] Ling KH, Hanzlik RP. Deuterium isotope effects on toluene metabolism. Product release as a rate-limiting step in cytochrome P-450 catalysis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 160, 844–849.
- [7] Anslyn EV, Dougherty DA. Modern physical organic chemistry. *University science books*, 2006.
- [8] Knapp MJ, Rickert K, Klinman JP. Temperature-dependent isotope effects in soybean lipoxygenase-1: correlating hydrogen tunneling with protein dynamics. *J Am Chem Soc*, 2002, 124, 3865–3874.
- [9] Thulasiram HV, Phan RM, Rivera SB, Poulter CD. Synthesis of deuterium-labeled derivatives of dimethylallyl diphosphate. *J Org Chem*, 2006, 71, 1739–1741.
- [10] Modutlwa N, Maegawa T, Monguchi Y, Sajiki H. Synthesis of deuterium-labelled drugs by hydrogen–deuterium (H–D) exchange using heterogeneous catalysis. *J Label Compd Radiopharm*, 2010, 53, 686–692.
- [11] Czeskis B, Elmore CS, Haight A, Hesk D, Maxwell BD, Miller SA, Raglione T, Schildknecht K, Traverse JF, Wang P. Deuterated active pharmaceutical ingredients: A science-based proposal for synthesis, analysis, and control. Part 1: Framing the problem. *J Label Comp Radiopharm*, 2019, 62, 690–694.
- [12] Atzrodt J, Derdau V, Kerr WJ, Reid M. Deuterium- and Tritium-Labelled Compounds: Applications in the Life Sciences. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, 57, 1758–1784.
- [13] Yang J. Deuterium Discovery and Applications in Organic Chemistry. *Elsevier*, 2016.
- [14] Gant TG. Using deuterium in drug discovery: leaving the label in the drug. *J Med Chem*, 2014, 57, 3595–3611.
- [15] Russak EM, Bednarczyk EM. Impact of Deuterium Substitution on the Pharmacokinetics of Pharmaceuticals. *Ann Pharmacother*, 2019, 53, 211–216.
- [16] Liu JF, Harbeson SL, Brummel CL, Tung R, Silverman R, Doller D. Chapter Fourteen - A Decade of Deuteration in Medicinal Chemistry. *Annu Rep Med Chem*, 2017, 50, 519–542.

- [17] Vianello R, Repič M, Mavri J. How are Biogenic Amines Metabolized by Monoamine Oxidases? *Eur J Org Chem*, 2012, 36, 7057–7065.
- [18] Tung R. The development of deuterium-containing drugs. *Innov Pharm Technol*, 2010, 32, 24–28.
- [19] Harbeson SL, Tung RD. Deuterium Medicinal Chemistry: A New Approach to Drug Discovery and Development. *Med Chem News*, 2014, 24, 8–22.
- [20] SD-809, <https://clinicaltrials.gov>, pristupljeno 17. 4. 2020.
- [21] Dean M, Sung VW. Review of deutetrabenazine: a novel treatment for chorea associated with Huntington's disease. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12, 313–319.
- [22] Garay RP, Grossberg GT. AVP-786 for the treatment of agitation in dementia of the Alzheimer's type. *Expert Opin Investig Drugs*, 2017, 26, 121–132.
- [23] Malmlöf T, Rylander D, Alken RG, Schneider F, Svensson TH, Cenci MA, Schilström B. Deuterium substitutions in the L-DOPA molecule improve its anti-akinetiic potency without increasing dyskinesias. *Exp Neurol*, 2010, 225, 408–415.
- [24] Schneider F, Erisson L, Beygi H, Bradbury M, Cohen-Barak O, Grachev ID, Guzy S, Loupe PS, Levi M, McDonald M, Savola JM, Papapetropoulos S, Tracewell WG, Velinova M, Spiegelstein O. Pharmacokinetics, metabolism and safety of deuterated L-DOPA (SD-1077)/carbidopa compared to L-DOPA/carbidopa following single oral dose administration in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol*, 2018, 84, 2422–2432.
- [25] Calinski DM, Zhang H, Ludeman S, Dolan ME, Hollenberg PF. Hydroxylation and N-dechloroethylation of ifosfamide and deuterated ifosfamide by the human cytochrome p450s and their commonly occurring polymorphisms. *Drug Metab Dispos*, 2015, 43, 1084–1090.
- [26] Bhadra PB, Hassanzadeh A, Arsic B, Allison DG, Morris GA, Barber J. Enhancement of the properties of a drug by monodeuteriation: reduction of acid-catalysed formation of a gut-motilide enol ether from 8-deuterio-erythromycin B. *Org Biomol Chem*, 2016, 14, 6289–6296.
- [27] Uttamsingh V, Gallegos R, Liu JF, Harbeson SL, Bridson GW, Cheng C, Wells DS, Graham PB, Zelle R, Tung R. Altering metabolic profiles of drugs by precision deuteration: reducing mechanism-based inhibition of CYP2D6 by paroxetine. *J Pharmacol Exp Ther*, 2015, 354, 43–54.
- [28] Zhu Y, Zhou J, Jiao B. Deuterated clopidogrel analogues as a new generation of antiplatelet agents. *ACS Med Chem Lett*, 2013, 4, 349–352.
- [29] Peepliwala AK, Bagadea SB, Bondea CG. A Review: Stereochemical consideration and eudismic ratio in chiral drug development. *J Biomed Sci and Res*, 2010, 2, 29–45.
- [30] Nguyen LA, He H, Pham-Huy C. Chiral Drugs: An Overview. *Int J Biomed Sci*, 2006, 2, 85–100.
- [31] Teo SK, Colburn WA, Tracewell WG, Kook KA, Stirling DI, Jaworsky MS, Scheffler MA, Thomas SD, Laskin OL. Clinical pharmacokinetics of thalidomide. *Clin Pharmacokinet*, 2004, 43, 311–327.



- [32] Jacques V, Czarnik AW, Judge TM, Van der Ploeg LH, DeWitt SH. Differentiation of antiinflammatory and antitumorigenic properties of stabilized enantiomers of thalidomide analogs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112, 1471–1479.
- [33] Yin H, Xu L, Porter NA. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev*, 2011, 111, 5944–5972.
- [34] Selvadurai LP, Harding IH, Corben LA, Georgiou-Karistianis N. Cerebral abnormalities in Friedreich ataxia: A review. *Neurosci Biobehav Rev*, 2018, 84, 394–406.
- [35] Zesiewicz T, Heerinckx F, De Jager R, Omidvar O, Kilpatrick M, Shaw J, Shchepinov MS. Randomized, clinical trial of RT001: early signals of efficacy in Friedreich's ataxia. *Mov Disord*, 2018, 33, 1000–1005.
- [36] Kaufman Y, Ma L, Washington I. Deuterium enrichment of vitamin A at the C20 position slows the formation of detrimental vitamin A dimers in wild-type rodents. *J Biol Chem*, 2011, 286, 7958–7965.
- [37] Timmins GS. Deuterated drugs: where are we now? *Expert Opin Ther Pat*, 2014, 24, 1067–1075.
- [38] Development & Approval Process, <https://www.fda.gov/drugs/development-approval-process-drugs>, pristupljeno 20. 4. 2020.
- [39] Tung RD. Deuterium medicinal chemistry comes of age. *Future Med Chem*, 2016, 8, 491–494.