



RIGA TECHNICAL  
UNIVERSITY

**Olga Bobiļeva**

## **HIDROKSIKARBONSKĀBJU RECEPTORU SINTĒTISKO LIGANDU PĒTĪJUMI**

Promocijas darba kopsavilkums

## **STUDIES OF SYNTHETIC LIGANDS OF HYDROXYCARBOXYLIC ACID RECEPTORS**

Summary of the Doctoral Thesis



RTU Press  
Riga 2019

RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE  
Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultāte  
Organiskās ķīmijas tehnoloģijas institūts  
Bioloģiski aktīvo savienojumu ķīmijas tehnoloģijas katedra

RIGA TECHNICAL UNIVERSITY  
Faculty of Materials Science and Applied Chemistry  
Institute of Technology of Organic Chemistry

**Olga BOBIĻEVA**

Doktora studiju programmas “Ķīmija” doktorante  
Doctoral Student of the Study Programme “Chemistry”

**HIDROKSIKARBONSKĀBJU RECEPTORU SINTĒTISKO  
LIGANDU PĒTĪJUMI**

**Promocijas darba kopsavilkums**

**STUDIES OF SYNTHETIC LIGANDS OF  
HYDROXYCARBOXYLIC ACID RECEPTORS**

**Summary of the Doctoral Thesis**

Zinātniskais vadītājs  
*Dr. chem.* EINĀRS LOŽA

Scientific supervisor  
*Dr. chem.* EINĀRS LOŽA

RTU Izdevniecība / RTU Press

Rīga 2019 / Riga 2019

Bobiļeva, O. Hidroksikarbonskābju receptoru sintētisko ligandu pētījumi. Promocijas darba kopsavilkums. Rīga: RTU Izdevniecība, 2019. 42 lpp.

Bobiļeva, O. Studies of Synthetic Ligands of Hydroxycarboxylic Acid Receptors. Summary of the Doctoral Thesis. Riga: RTU Press, 2019. 42 p.

Iespiests saskaņā ar promocijas padomes “RTU P-01” 2018. gada 5. decembra lēmumu, protokols Nr. 4.

Published in accordance with the decision of Promotion Council “RTU P-01” of 5 December 2018, Minutes No. 4.



**ISBN 978-9934-22-216-0 (print)**  
**978-9934-22-217-7 (pdf)**

# PROMOCIJAS DARBS IZVIRZĪTS ĶĪMIJAS ZINĀTŅU DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI RĪGAS TEHNISKAJĀ UNIVERSITĀTĒ

Promocijas darbs ķīmijas zinātņu doktora grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts 2019. gada 7. februārī Rīgas Tehniskās universitātes Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultātē, Paula Valdena ielā 3, 272. auditorijā.

## OFICIĀLIE RECENZENTI

Vadošais pētnieks *Dr. habil. chem.* Grigorijs Veinbergs,  
Latvijas Organiskās sintēzes institūts

Vadošais pētnieks *Dr. biol.* Kaspars Tārs,  
Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs

*Dr. chem.* Vilnis Liepiņš,  
Latvijas Zinātņu akadēmija

## APSTIPRINĀJUMS

Apstiprinu, ka esmu izstrādājusi šo promocijas darbu, kas iesniegts izskatīšanai Rīgas Tehniskajā universitātē ķīmijas zinātņu doktora grāda iegūšanai. Promocijas darbs zinātniskā grāda iegūšanai nav iesniegts nevienā citā universitātē.

Olga Bobiļeva ..... (paraksts)

Datums: .....

Promocijas darbs ir uzrakstīts latviešu valodā, tajā ir ievads, piecas nodaļas, secinājumi, literatūras saraksts, 78 attēli, 19 tabulu, kopā 161 lappuse. Literatūras sarakstā ir 159 nosaukumi.

# **DOCTORAL THESIS PROPOSED TO RIGA TECHNICAL UNIVERSITY FOR THE PROMOTION TO THE SCIENTIFIC DEGREE OF DOCTOR OF CHEMICAL SCIENCES**

To be granted the scientific degree of Doctor of Chemical Sciences, the present Doctoral Thesis has been submitted for the defence at the open meeting of RTU Promotion Council on 7 February 2019 at the Faculty of Materials Science and Applied Chemistry of Riga Technical University, 3 Paula Valdena Street, Room 272.

## **OFFICIAL REVIEWERS**

Principal Scientist Dr. habil. chem. Grigorijs Veinbergs  
Latvian Institute of Organic Synthesis

Principal Scientist Dr. biol. Kaspars Tārs  
Latvian Biomedical Research and Study Centre

Dr. chem. Vilnis Liepiņš  
Latvian Academy of Sciences

## **DECLARATION OF ACADEMIC INTEGRITY**

I hereby declare that the Doctoral Thesis submitted for the review to Riga Technical University for the promotion to the scientific degree of Doctor of Chemical Sciences is my own. I confirm that this Doctoral Thesis had not been submitted to any other university for the promotion to a scientific degree.

Olga Bobiļeva ..... (signature)

Date: .....

The Doctoral Thesis has been written in Latvian. It consists of an Introduction; 5 chapters; Conclusion; 78 figures; 19 tables; the total number of pages is 161. The Bibliography contains 159 titles.

## SATURS/CONTENT

SATURS/CONTENT.....	5
PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS.....	6
PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI.....	8
1. Akrilamidocikloheksēnkarbonskābi saturošie HCA2 ligandi .....	8
2. Fenilacetilēnu saturošie HCA2 ligandi un to modifikācijas.....	15
3. HCA2 ligandu karbonskābes daļas un amīda grupas modificēšana.....	19
SECINĀJUMI .....	22
GENERAL OVERVIEW OF THE THESIS .....	23
MAIN RESULTS .....	25
1. Acrylamidocyclohexene carboxylic acid derivatives as HCA2 ligands .....	25
2. Phenylacetylene containing HCA2 ligands and modifications .....	32
3. Modifications of amide group and carboxylic acid group of HCA2 ligands .....	36
CONCLUSIONS.....	39
PUBLIKĀCIJA/PUBLICATIONS .....	40
LITERATŪRAS SARAKSTS / REFERENCES.....	41

# PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS

## Problēmas aktualitāte

Kardiovaskulāro slimību ārstēšana ir viens no prioritāriem sabiedrības veselības uzlabošanas virzieniem, jo asinsrites sistēmas slimības ir galvenais nāves iemesls Eiropas Savienības valstīs<sup>1</sup>. Visbiežāk sastopamā hroniskā asinsvadu slimība ir ateroskleroze. Tās visu attīstības stadiju patoģenēzē ir dažāda veida iekaisumu procesi, kas ietekmē apolipoproteīnu izgulsnēšanos asinsvadu sienīņās. Aterosklerotiskais process sākas agrā jaunībā un progresē atkarībā no cilvēka dzīvesveida, iedzimtības un citiem faktoriem. Mūsdienās aterosklerozes medikamentozās terapijas galvenā taktika ir zema blīvuma lipoproteīnu koncentrācijas samazināšana asinsrites sistēmā. Šīm mērķim izmanto divu tipu preparātus – statīnus un fibrātus.<sup>2</sup> Pašlaik pasaulē notiek vairāku pretiekaisumu preparātu pārbaude aterosklerozes dzīvnieku modeļos un klīniskajos pētījumos<sup>3</sup>.

Hidroksikarbonskābju receptori (HCA1, HCA2 un HCA3) ir ar G-proteīnu saistītie receptori. HCA endogēnie ligandi ir uzturvielu metabolīti. HCA palīdz uzturēt homeostāzi, regulējot lipolīzes, iekaisuma un citus procesus. HCA2 agonistus – niacīnu un monometilfumarātu – izmanto aterosklerozes un multiplās sklerozes ārstēšanā<sup>4, 5</sup>. HCA2 ir ekspresēts tauksūnās un vairāku veidu imūnšūnās, tostarp arī makrofāgos un monocītos, kas piedalās aterosklerotiskā procesa attīstībā. HCA2 ligandi – 3-hidroksibutirāts, niacīns, butirāts un monometilfumarāts – aktivē receptoru un izraisa labvēlīgus efektus, saistītus ar iekaisuma samazināšanos, tostarp arī antiaterosklerotisku efektu<sup>6</sup>.

HCA2 kristāliskā struktūra nav zināma. Ar G-proteīnu saistītie receptori ir šūnas membrānas proteīni, un to kristalizēšana ir saistīta ar dažādām grūtībām. Izmantojot datormodelēšanu, ir iegūti vairāki HCA2 homoloģijas modeļi<sup>7-9</sup>. Bet tie ir stipri atkarīgi no izmantotās veidnes struktūras un ligandu veida. Receptora datormodeļi norāda uz dažādām receptora-liganda saistīšanas vietām, kas apgrūtina homoloģijas modeļu izmantošanas iespējas jaunu ligandu izstrādē, piemēram, virtuālajā skrīningā.

Ir zināmas vairākas HCA2 sintētisko agonistu klases, piemēram, pirazola, antranilskābes, ksantīna atvasinājumu un citas<sup>10-14</sup>. HCA2 ligandu meklējumos zinātnieki ir izmantojuši augstās caurlaidības savienojumu bibliotēku skrīningu vai zināmo HCA2 agonistu modificēšanu.

Uzskata, ka HCA2 agonistiem varētu būt terapeitiski nozīmīgs efekts aterosklerozes un citu ar iekaisumu saistītu slimību ārstēšanā, tādēļ jaunu aktīvu HCA2 agonistu pētījumi varētu dot būtisku ieguldījumu jaunu zāļvielu izveidē.

## Promocijas darba mērķis un uzdevumi

Pētījumu mērķis ir jaunu augstas afinitātes HCA2 agonistu izveide.

## Darba mērķa īstenošanai izvirzītie uzdevumi

- Iegūt receptora ligandu modeļvielas ar rotāciju un konformāciju veidošanas ierobežojošiem elementiem. Izpētīt ligandu struktūru kustīguma ietekmi uz savienojumu aktivitāti.

- Izveidot HCA2 ligandu farmakoforo modeli.
- Izpētīt HCA2 ligandu struktūras-aktivitātes likumsakarības.
- Izpētīt ligandu struktūrdaļu aizvietošanas iespējas ar iespējamiem bioizostēriem.

### **Zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti**

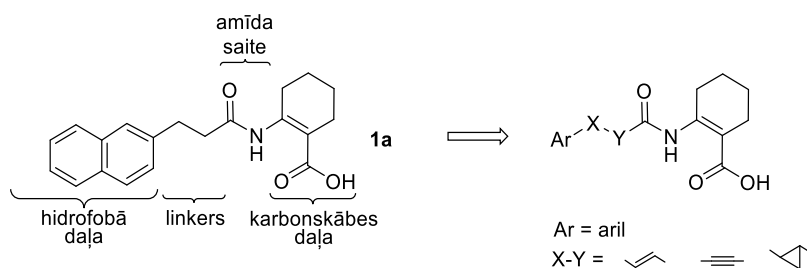
Pētījuma rezultātā ir iegūti jauni augstas afinitātes HCA2 agonisti. Ir izstrādātas (*E*)-2-(3-(arilakrilamido)cikloheks-1-ēn-1-karbonskābju, 2-(3-arilpropiolamido)cikloheks-1-ēn-1-karbonskābju un 2-(5-arilpent-4-īnamido)cikloheks-1-ēn-1-karbonskābju sintēzes metodes. Ir izveidots HCA2 ligandu farmakoforais modelis, kas tika izmantots ligandu aktivitātes izskaidrošanai. Izmantojot HCA2 ligandu farmakoforo modeli, ir atrastas līdzības starp dažādām HCA2 ligandu klasēm. Parādīts, ka cikloheksēnkarbonskābi saturošo HCA2 ligandu hidrofobajā daļā apjomīgus aromātiskus aizvietotājus var nomainīt ar fenilalkīna grupām. Antranilskābi saturošos HCA2 ligandos karbonskābes funkcionālo grupu var aizvietot ar tās bioizostēru – fosforskābi.



# PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI

## 1. Akrilamidocikloheksēnkarbonskābi saturošie HCA2 ligandi

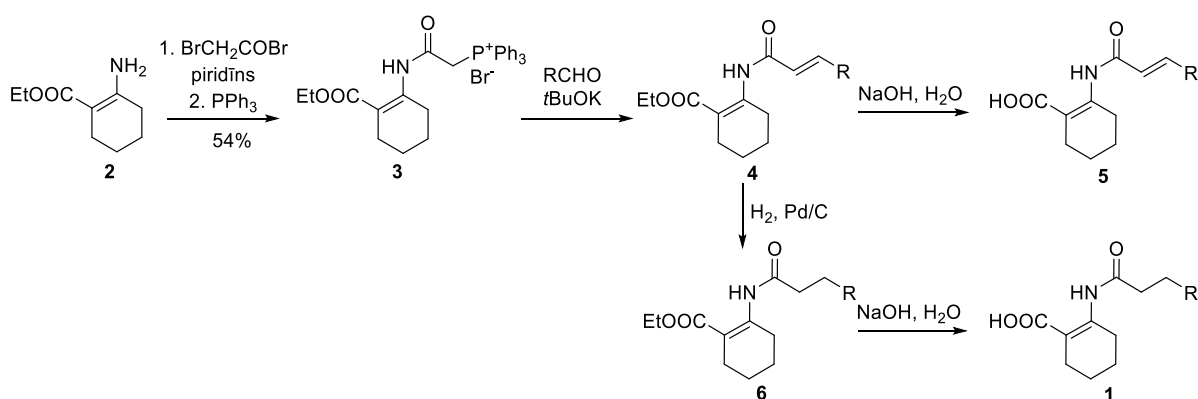
Darba sākuma etapā kā izejas savienojums tālākai modifikācijai tika izvēlēts *Merck* zinātnieku atklāts augstas afinitātes HCA2 agonists **1a**<sup>13</sup>. Mūsu pieejas pamatā jaunu savienojumu izveidē ir konformacionālās ierobežošanas koncepcija, saskaņā ar kuru, ievēdot struktūras **1a** karbonskābes un hidrofobās daļas savienošā linkerā rotāciju ierobežojošus elementus, varētu iegūt savienojumus ar augstāku aktivitāti un selektivitāti, ja kāda no jauniegūtās molekulas enerģētiski izdevīgām konformācijām sakristu ar receptoram nepieciešamo bioaktīvo konformāciju.



1. att. HCA2 agonista **1a** struktūra un tās konformacionālā ierobežošana.

Koncepcijas pārbaudei ieguvām dubultsaiti, trīskāršo saiti un ciklopropānu saturošus cikloheksēnkarbonskābes atvasinājumus, kā arī to analogus ar vienkāršo saiti.

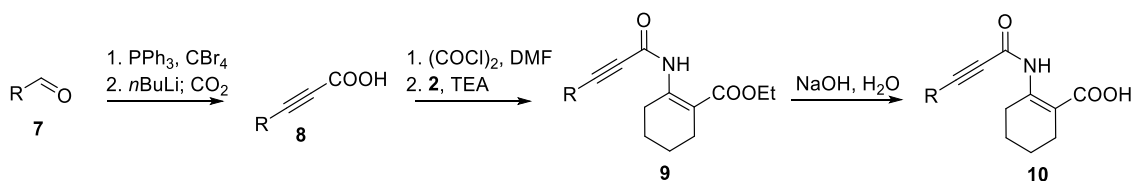
Mērķa molekulu **5**, kuru linkera daļa satur dubultsaiti, sintēzei izstrādājām vispārēju konverģentu sintēzes metodi, kuras pamatā ir Vitiga reakcija (2. att.). Šī sintēzes shēma ļauj iegūt mērķsavienojumus **5** no arilgrupas vai heterociklus saturošiem aldehīdiem, un šim mērķim izveidota oriģināla trifenilfosfonija bromīda atvasinājuma **3** divos soļos. Bez tam, noreducējot sintēzes intermediātu **4** dubultsaiti 10% Pd/C klātienē, pēc aizsarggrupu nošķelšanas ieguvām arī vienkāršo saiti saturošos savienojumus **1**.



2. att. Vispārīgā savienojumu **1** un **5** iegūšanas shēma.

Trīskāršās saites linkeru saturošo savienojumu **10** sintēzei no aldehīdiem **7** ieguvām arilpropiolskābes **8**, izmantojot Korija-Fuksa reakciju<sup>15</sup>. Apstrādājot karbonskābes **8** ar oksalilhlorīdu, ieguvām attiecīgo karbonskābju hlorīdus, kurus izmantojām vinilamīna **2**

acilēšanas reakcijā. Pēc acilatvasinājumu **9** esteru grupu bāziskās hidrolīzes ieguvām mērķsavienojumus **10** (3. att.).



3. att. Arilpropiolskābju atvasinājumu **10** iegūšanas shēma.

*Cis* un *trans* ciklopropāna linkeru saturošo savienojumu **11** un **12** sintēzē ciklopropāna grupas izveidei izmantojām no diazometāna ģenerēta karbēna reakcijas ar attiecīgiem *Z* vai *E*-alkēniem.

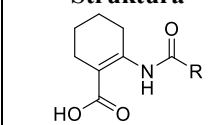
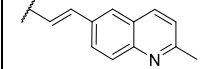
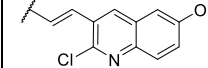
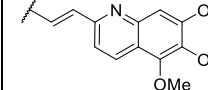
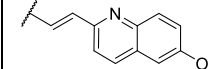
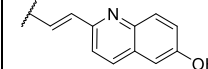
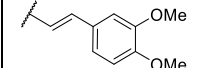
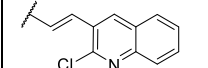
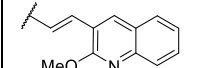
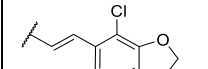
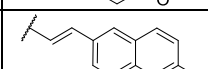
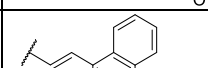
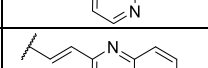
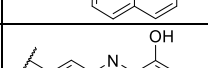
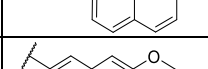
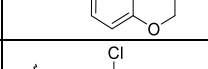
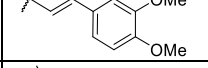
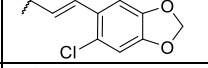
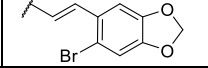
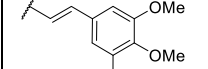

Savienojumu aktivitāte tika noteikta Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā (BMC), izmantojot funkcionālo cikliskā adenozinmonofosfāta (cAMP) testu. Kā references vielu izmantojām resintezētu cikloheksēnkarbonskābes atvasinājumu **1a**, kura literatūrā norādītā afinitāte ir 38 nM<sup>13</sup>. BMC noteiktā savienojuma **1a** funkcionālā aktivitāte cAMP testā ir 8,3 μM. Sintezēto savienojumu aktivitātes uz HCA2 ir parādītas 1. tabulā<sup>a</sup>.

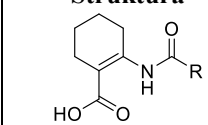
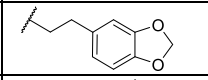
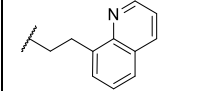
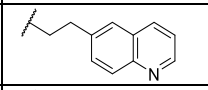
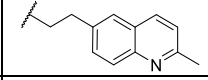
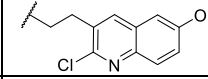
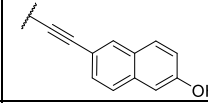
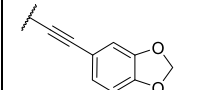
1. tabula

Cikloheksēnkarbonskābju atvasinājumu HCA aktivēšanas dati

N. p. k.	Savienojums	Struktūra	HCA2		HCA1	HCA3
			EC <sub>50</sub> ± SD, μM <sup>a</sup>	Inh., % <sup>b</sup>	Inh., % <sup>b</sup>	Inh., % <sup>b</sup>
1.	<b>1a</b>		8,3 ± 2,4		66 ± 4	41 ± 4
2.	<b>5a</b>		4,5 ± 1,2			14 ± 3
3.	<b>10a</b>		1,2 <sup>c</sup> 0,23 ± 0,10 <sup>d</sup>			
4.	<b>11</b>		12,5 ± 5		55 ± 15	40 ± 5
5.	<b>12</b>			34 ± 18	NA	NA
6.	<b>5b</b>		1,4 ± 0,1		NA	NA
7.	<b>5c</b>		5,8 ± 4,2		26 ± 7	NA
8.	<b>5d</b>			NA	54 ± 10	NA
9.	<b>5e</b>			68 ± 10	39 ± 19	24 ± 10

<sup>a</sup> Savienojumi **1b**, **5a,b,n-w** ir iegūti sadarbībā ar R. Bokalderi, V. Gailīti, I. Kaulu un M. Ikaunieku.

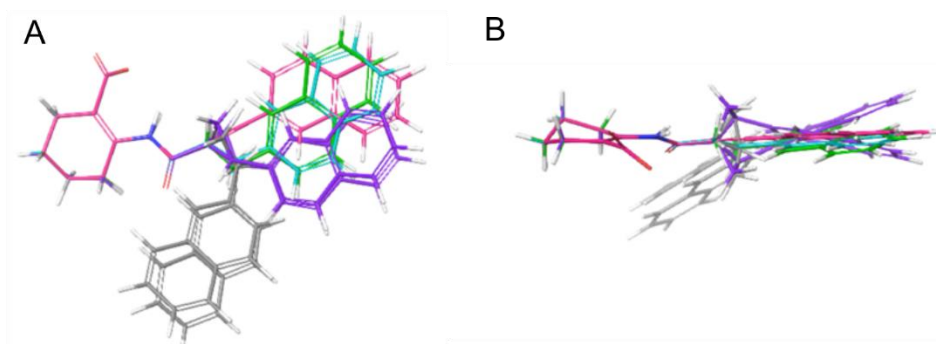
N. p. k.	Savienojums	Struktūra 	HCA2		HCA1	HCA3
			EC <sub>50</sub> ± SD, μM <sup>a</sup>	Inh., % <sup>b</sup>	Inh., % <sup>b</sup>	Inh., % <sup>b</sup>
10.	<b>5f</b>			NA	NA	NA
11.	<b>5g</b>		6,3 ± 4,1		NA	21 ± 7
12.	<b>5h</b>			53 ± 21	61 ± 8	38 ± 13
13.	<b>5i</b>			30 ± 7	32 ± 6	19 ± 2
14.	<b>5j</b>		0,5 <sup>c</sup> 0,35 ± 0,10 <sup>d</sup>			
15.	<b>5k</b>			51 ± 13	58 ± 6	31 ± 14
16.	<b>5l</b>		27,5 ± 3,5		52 ± 13	37 ± 13
17.	<b>5m</b>			59 ± 11	58 ± 11	27 ± 11
18.	<b>5n</b>			59 ± 5	51 ± 18	51 ± 3
19.	<b>5o</b>			NA	NA	26 ± 10
20.	<b>5p</b>			NA	NA	NA
21.	<b>5q</b>		4,1 ± 1,4		NA	NA
22.	<b>5r</b>			27 ± 13	NA	NA
23.	<b>5s</b>		6,8 ± 3,7		66 ± 16	NA
24.	<b>5t</b>		26,3 ± 4,5		48 ± 10	36 ± 22
25.	<b>5u</b>			17 ± 9	59 ± 6	34 ± 15
26.	<b>5v</b>			24 ± 7	54 ± 14	NA
27.	<b>5w</b>			23 ± 12	46 ± 3	NA
28.	<b>13</b>		3,6 ± 1,6		56 ± 10	NA
29.	<b>1b</b>		1,9 ± 0,9			26 ± 4

N. p. k.	Savienojums	Struktūra 	HCA2		HCA1	HCA3
			EC <sub>50</sub> ± SD, μM <sup>a</sup>	Inh., % <sup>b</sup>	Inh., % <sup>b</sup>	Inh., % <sup>b</sup>
30.	<b>1c</b>		51,6 ± 4,2		62 ± 3	28 ± 7
31.	<b>1d</b>			60 ± 6	55 ± 6	NA
32.	<b>1e</b>			70 ± 14	60 ± 15	26 ± 7
33.	<b>1f</b>		36,4 ± 11,2		54 ± 17	23 ± 6
34.	<b>1g</b>		4,1 ± 2,9		53 ± 7	24 ± 10
35.	<b>10b</b>		0,9 ± 0,5		NA	NA
36.	<b>10c</b>		1,7 ± 1,5 <sup>d</sup>			

- a – aprēķināts no vismaz trīs eksperimentu rezultātiem;  
b – cAMP inhibēšana, ja liganda koncentrācija ir 50 μM;  
c – viena mērījuma rezultāts;  
d – eksperimenti veikti bez BSA;  
NA – nav aktīva 50 μM koncentrācijā.

Savienojumiem ar naftalīn-2-il hidrofoho daļu novērojām, ka atkarībā no izmantotā linkera vielu efektīvā koncentrācija (EC<sub>50</sub>) HCA2 aktivēšanās testā samazinās rindā *cis*-ciklopropāns (**11**, 34 % 50 μM) << *trans*-ciklopropāns (**11**, 12,5 μM) < vienkāršā saite (**1a**, 8,3 μM) < dubultsaite (**5a**, 4,5 μM) < trīskāršā saite (**10a**, 1,2 μM), kas atbilst mūsu hipotēzei. Savietojot šo savienojumu enerģētiski izdevīgāko konformēru struktūras, kā vienādu elementu izvēloties cikloheksēnkarboksilāta daļu, var redzēt struktūru atšķirības telpā (4. att.). Trīskāršās saites linkeru saturošā struktūra **10a**, dubultsaiti saturošā struktūra **5a** un vienkāršās saites linkeru saturošā struktūra **1a** pārklājas un attiecīgi šie savienojumi ir aktīvāki, bet *trans*-ciklopropānu saturošā savienojuma **11** abi enantiomēri nedaudz iziet no plaknes un, kā redzams 4. attēlā A, atrodas zemāk par **1a**, kas varētu būt skaidrojums savienojuma **11** aktivitātes samazinājumam. Savukārt *cis*-ciklopropāna linkeru saturošā savienojuma **12** enantiomēru hidrofohā daļa vispār nepārklājas ar **1a**, **5a** un **10a** hidrofohajām daļām, un šis savienojums ir praktiski neaktīvs.

Novērotā likumsakarība, ka, ieviešot konformacionālās ierobežošanas elementus molekulā, tās aktivitāte palielinās, nav universāla un ir atkarīga no savienojumu hidrofohās daļas. Piemēram, benzodioksolu saturošiem savienojumiem aktivitāte līdz ar dubultsaites ieviešanu uzlabojas par kārtu (EC<sub>50</sub> **1c** – 51,6 μM, **5c** – 5,8 μM). 6-Hidroksinaftalīn-2-il aizvietotāju vai (2-hloro-6-metoksi)hinolīn-3-il aizvietotāju saturošiem savienojumiem aktivitātes praktiski nemainās (EC<sub>50</sub> savienojumam **1b** – 1,9 μM, **5b** – 1,4 μM, **10b** – 0,9 μM; EC<sub>50</sub> **1g** – 4,1 μM, **5g** – 6,3 μM). Savukārt 2-metilnaftalīn-6-il hidrofoho daļu saturošais savienojums ar dubultsaites linkeru **5f** ir neaktīvs, bet tās analogs ar vienkāršo saiti **1f** ir HCA2 ligands (EC<sub>50</sub> ir 36,4 μM).



4. att. Dažādu linkeru saturošo struktūru savietošana.  
**1a** – zaļš, **5a** – zils, **10a** – violets, **11** – rozā, **12** – pelēks.

Ligandu naftalīn-2-il grupu var nomainīt ar hinolīn-2-il grupu vai benzodioksolu, un šādas nomainīšanas rezultātā iegūtie savienojumi aktivitāti saglabā ( $EC_{50}$  hinolīn-2-il analogam **5q** – 4,1  $\mu\text{M}$ , benzodioksolam **5c** – 5,8  $\mu\text{M}$ ). Benzodioksolu var aizvietot ar par vienu metilēngrupu lielāku ciklu dihidrobenzodioksīnu kā vielai **5s**, jo attiecīgu savienojumu aktivitāte praktiski nemainās ( $EC_{50}$  **5s** – 6,8  $\mu\text{M}$ ). Formāli “atverot” dihidrobenzodioksīna ciklu, attiecīgais savienojums **5k** ar diviem metoksi aizvietotājiem ir jau vājš HCA2 agonists un 50  $\mu\text{M}$  koncentrācijā spēj samazināt cAMP līmeni tikai par 51 %. Mēģinājumi modulēt benzodioksola atvasinājuma **5c** aktivitāti, ievedot tā aromātiskajā ciklā halogēnus, līdzīgi kā tas ir hinolīn-2-il fragmentu saturošās struktūrās **5g,f**, parādīja, ka attiecīgie bromu un hloru saturošie analogi **5n,u,v** ir praktiski neaktīvi, toties 2-hlor-3,4-dimetoksi analoga **5t** gadījumā novēro jau būtisku liganda aktivitātes pieaugumu ( $EC_{50}$  26,3  $\mu\text{M}$ ).

Līdzīgi literatūrā minētajām likumsakarībām, arī mūsu sintezētajiem divkāršās saites linkeru saturošajiem hinolīn-2-il atvasinājumiem aktivitāti uzlabo hidroksilgrupa hidrofobajā daļā. Piemēram, 6-hidroksihinolīn-2-il aizvietotāju saturoša struktūra **5j** ( $EC_{50}$  0,5  $\mu\text{M}$ ) ir astoņas reizes aktīvāka par hinolīn-2-il saturošo savienojumu **5q** ( $EC_{50}$  4,1  $\mu\text{M}$ ). Tomēr hidroksilgrupas pievienošanas vieta ir būtiska, un aktivitātes palielināšanai tai ir svarīga hidroksilgrupas pozīcija pretēji linkeram, jo analogs **5r** ar hidroksilgrupu 8-pozīcijā zaudē aktivitāti. Metoksigrupa 6-pozīcijā stipri samazina aktivitāti, piemēram, savienojums ar 6-metoksinolīn-2-il **5i** ir neaktīvs. Bet arī šeit ir svarīga metoksi grupas pozīcija, jo savienojuma **5g**, kas arī satur metoksigrupu,  $EC_{50}$  ir tikai 6,3  $\mu\text{M}$ .

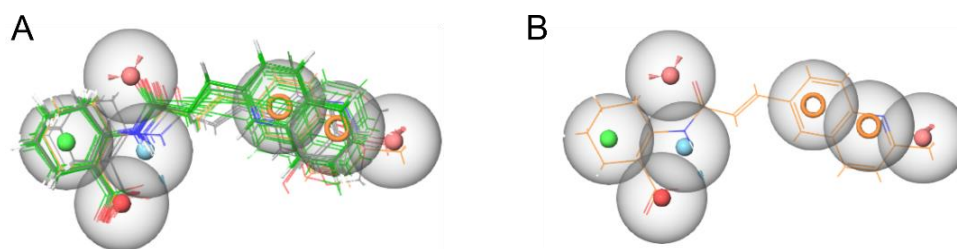
Interesanta ir struktūra **13**, kuras hidrofobajā daļā ir fenilacetilenil aizvietotājs, un šī savienojuma  $EC_{50}$  ir 3,6  $\mu\text{M}$ , kas ir salīdzināma ar 2-naftil saturošā savienojuma **5a** aktivitāti ( $EC_{50}$  4,5  $\mu\text{M}$ ). Tas ļauj secināt, ka, iespējams, liganda un receptora hidrofobo mijiedarbību veido galvenokārt hidrofobās daļas apgabals, kas atrodas attālinātā pozīcijā no linkera pievienošanas vietas, bet trīskāršās saites vietā mijiedarbība ar receptoru nav izteikta.

Lielākā daļa no iegūtajiem savienojumiem ir pārbaudīta arī uz HCA1 un HCA3. Visi mūsu sintezētie aktīvie savienojumi ir selektīvi pret HCA2, jo tie ir vai nu neaktīvi, vai arī ļoti vāji HCA1 un HCA3 agonisti. 50  $\mu\text{M}$  koncentrācijā HCA1 un HCA3 aktivēšana nepārsniedz 50–60 %, un vislielākā spēja aktivēt HCA1 (66 %) ir savienojumiem **1a** un **5s**. Selektivitāte pret HCA2 varētu būt nepieciešama gadījumā, ja vēlamais farmakoloģiskais efekts ir saistīts ar imūnsūnu aktivēšanu. Bet, ja ir nepieciešams aktivēt receptoru tauksūnās, iespējams, ka selektivitāte nav tik svarīga, jo visi trīs receptori ir ekspresēti adipocītos.

## HCA2 ligandu farmakoforais modelis

Izmantojot sintezēto savienojumu 3D struktūras un to aktivitātes, ar datorprogrammas *Schrödinger Small-Molecule Drug Discovery Suite*<sup>16</sup> izveidojām HCA2 ligandu farmakoforo modeli. Hidroksilgrupas klātie hidrofoajā naftalīn-2-il daļā uzlabo savienojuma aktivitāti, tāpēc automātiski izveidotais modelis ar labāko aprēķinātu vērtējumu tika papildināts ar papildus ūdeņraža saites akceptoru hidroksilgrupas vietā uz struktūras **10b** pamata. Modelim pievienojām izslēgto telpu čaulu un veicām manuālu modeļa hidrofoās daļas struktūrelementu pozīciju un deskriptoru maiņu, lai pēc iespējas vairāk aktīvu un mazāk neaktīvu savienojumu atbilstu modelim. Modeļa izveidē un pareizības pārbaudē ir izmantoti tikai mūsu sintezētie savienojumi. Tiem atšķiras tikai hidrofoālais apgabals un linkers, bet ligandu cikloheksēnkarbonskābes daļa visām struktūrām ir vienāda, tāpēc iegūtais modelis ir vairāk piemērots liganda hidrofoās daļas raksturošanai.

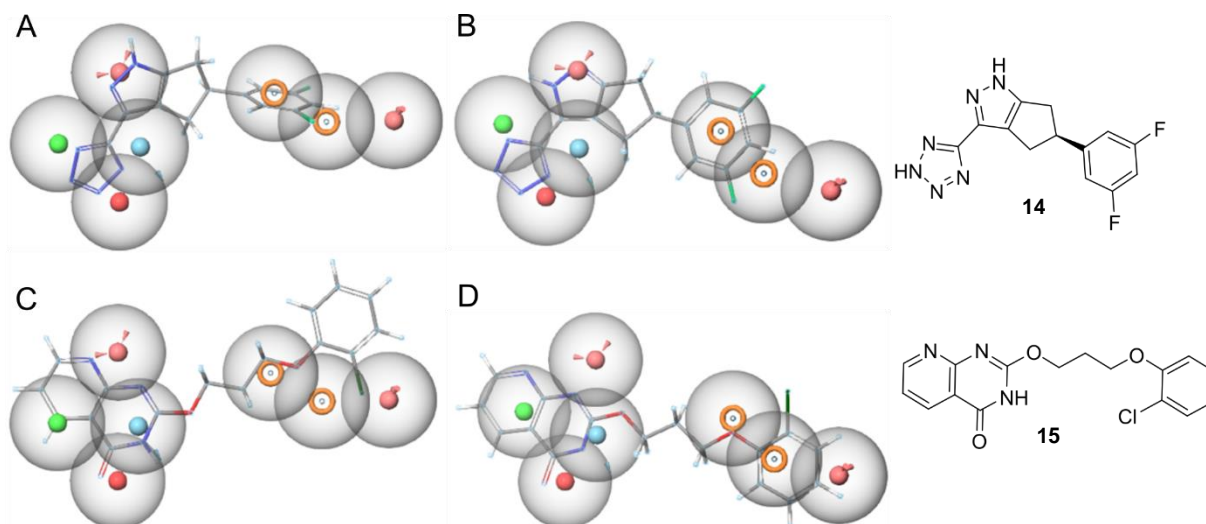
Šādā veidā izveidotais modelis ir parādīts 5. attēlā. Modelim ir septiņi farmakoforie apgabali AADHNRR, kur A ir ūdeņraža saites akceptors, D ir ūdeņraža saites donors, H – hidrofoālais apgabals, N – negatīvi lādēts elements, R – aromātiskais gredzens. Atbilstoši modelim, HCA2 ligands ir praktiski plakana struktūra ar garumu 15–17 Å. Pie nosacījuma, ka vismaz pieciem no septiņiem liganda farmakoforajiem apgabaliem ir jāsakrīt ar modeļa farmakoforajiem apgabaliem, modelim atbilst 18 struktūras no 1. tabulas (5. att. A); no tām 12 ir aktīvie savienojumi un viens – neaktīvs savienojums (**5f** – 5. att. B).



5. att. HCA2 ligandu farmakoforais modelis AADHNRR.

A – visi modelim atbilstošie ligandi; B – struktūras **5f** atbilstība modelim; aktīvie savienojumi ir zaļā krāsā, neaktīvie – oranžā; akceptors (A) – gaiši sarkans, donors (D) – zils, negatīvi lādēts elements (N) – sarkans, hidrofoālais elements (H) – zaļš, aromātiskais gredzens (R) – oranžs.

Izveidoto modeli izmantojām, lai atrastu līdzību starp dažādu HCA2 ligandu klašu savienojumiem. Izmantojot literatūrā minēto savienojumu skrīningu<sup>17</sup>, ir izdevies atrast līdzību starp antranilskābi vai cikloheksēnkarbonskābi saturošiem ligandiem un vairākiem piridopirimidona atvasinājumiem, kā arī bicikliskiem pirazoliem (6. att.).



6. att. HCA2 ligandu skrīningā iekļauto savienojumu **14** un **15** atrastā atbilstība farmakoforajam modelim.

A un C – metodē izmantotas 3D struktūras ar minimizētu enerģiju, un modelis ir bez izslēgtām telpām; B un D – struktūrām izveidoti jauni konformēri, un modelis ir ar izslēgtām telpām.

Iegūtos rezultātus var izmantot jaunu HCA2 ligandu dizainā. Farmakoforo modeļi var izmantot arī ligandu virtuālajā skrīningā.

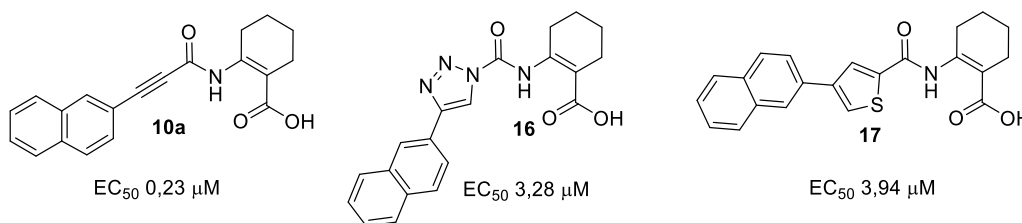
### HCA2 ligandu saistība ar plazmas proteīniem

No literatūras datiem ir zināms, ka antranilskābi saturošiem HCA2 ligandiem piemīt izteikta tendence saistīties ar plazmas proteīniem. Vērša seruma albumīns (BSA) ir plazmas proteīns, ko izmanto HCA2 ekspresējošo šūnu iegūšanā, kā arī cAMP testā buferšķīdumā. BMC veiktajos cAMP testos buferšķīdumā ir izmantota 2 % BSA piedeva. Lai novērtētu sintezēto savienojumu iespējamo saistīšanos ar cAMP testā klātesošo BSA, tika veikti aktivitātes noteikšanas eksperimenti, kuros analizējamās vielas **1g**, **5a**, **5c**, **10b**, **11** un **13** izturēja 5 % BSA šķīdumā 30–45 minūtes un tad veica cAMP testu. Savienojumu efektīvās koncentrācijas mainījās nebūtiski, tāpēc sākumā pieņēmām, ka pētāmo ligandu saistīšanās ar BSA ir nenozīmīga. Vēlāk BMC tika veikts cAMP noteikšanas tests, izmantojot BSA nesaturošu buferšķīdumu, un šī testa rezultāti atkarībā no pētāmās struktūras atšķīrās no 2 % BSA saturoša testa rezultātiem 2–55 reizes. Vislielākā atšķirība (35–55 reizes) ir savienojumiem ar vienkāršās saites linkeru. Bioloģiskās aktivitātes testu rezultātu izmaiņas ar un bez BSA piedevas ietekmē mūsu secinājumus par struktūras-aktivitātes likumsakarībām. 6-Hidroksinaftalīn-2-il atvasinājumu **1b**, **5b** un **10b** linkeru rindā vienkāršā saite – dubultsaite – trīskāršā saite visaugstākā savienojumu aktivitāte testā bez BSA ir novērojama vienkāršo saiti saturošai struktūrai **1b** ( $EC_{50}$  ir 0,04  $\mu$ M).

Ir zināms, ka karbonskābes ļoti labi saistās ar plazmas proteīniem, un, ņemot vērā to, ka mūsu sintezētie savienojumi ir karbonskābes, tālākos mūsu sintezēto ligandu funkcionālās aktivitātes noteikšanas eksperimentos ar cAMP testu ir izmantota metode bez BSA piedevas. Tālākā darbā vairāku mūsu sintezēto savienojumu aktivitātes BMC tika noteiktas, izmantojot arī radioligandu metodi – ar tritija izotopu iezīmētu niacīnu ( $[^3H]$ -niacīns).

## HCA2 ligandi ar heterociklu linkeru

Mūsu sintezēto potenciālo HCA2 ligandu linkeru ir aktivētas nepiesātinātas saites, kas fizioloģiskajā vidē var reaģēt ar bioloģiskajiem nukleofīliem, tāpēc tālākā perspektīvā tās nav vēlami zāļvielu elementi. Alternatīva dubultsaites linkeram varētu būt 5-locekļu heterocikls. No otras puses, daži HCA2 ligandi ar mūsu darbā līdzīgām struktūrām, kur linkers ir tiofēns, pirazols vai tiazols, un karbonskābes daļā ir antranilskābe, ir jau nosegti ar patentiem<sup>18</sup>, bet diemžēl nav publicēta šo savienojumu bioloģiskā aktivitāte. Lai pārbaudītu, vai linkera vietā heterociklu saturoši savienojumi varētu būt HCA2 agonisti, mēs ieguvām savienojumus ar triazola linkeru **16** un tiofēnu **17** (7. att.). Savienojumu EC<sub>50</sub> ir 3–4 μM, kas ir par kārtu lielāka nekā references savienojumam **10a**.

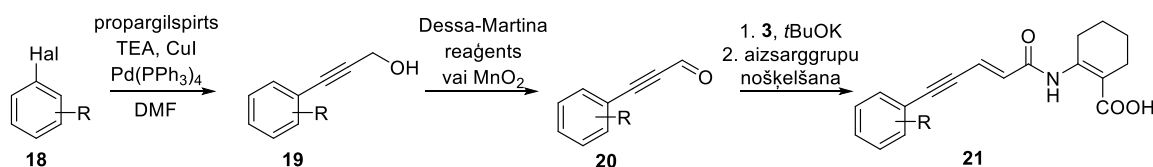


7. att. Heterociklus saturošo HCA2 ligandu aktivitātes, izmantojot metodi bez BSA.

Heterociklus saturošas struktūras ir patentētas, bez tam abu mūsu sintezēto heterociklu saturošo savienojumu šķīdība ir ievērojami sliktāka par savienojuma **10a** un to dubultsaites linkeru saturošo analogu šķīdību, tāpēc šis pētījuma virziens tālāk netika turpināts.

## 2. Fenilacetilēnu saturošie HCA2 ligandi un to modifikācijas

Mūsu uzmanību piesaistīja HCA2 ligands **13** ar fenilacetilēna grupu liganda hidrofobajā daļā. Struktūrai **13** ir mazs rotējošo saišu skaits, tāpēc tā nav kustīga un tās modifikācijas mēs izmantojām kā modeļvielas ligandu konformacionālās stabilitātes hipotēzes pārbaudei, kā arī jaunu HCA2 ligandu izstrādē. Mēs ieguvām savienojuma **13** analogus **21** ar hidroksilgrupām un halogēna atomiem dažādās pozīcijās (8. att.). Arilhalogenīdu **18** Sonogaširas reakcijā ar propargilspirtu ieguvām alkīnus **19**, kuru spirta grupas nooksidējām līdz aldehīdiem **20**. *E*-alkēnus ieguvām Vitiga reakcijā ar fosfonija bromīdu **3**.



8. att. Enīna funkciju saturošo savienojumu **21** iegūšanas shēma.

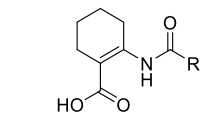
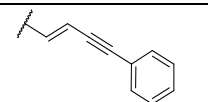
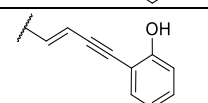
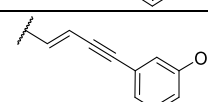
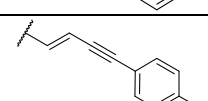
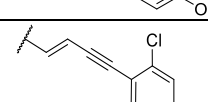
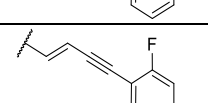
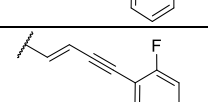
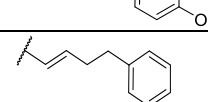
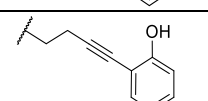
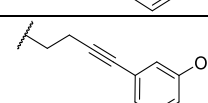
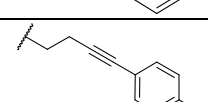
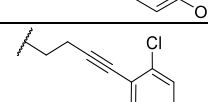
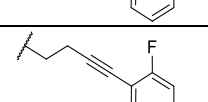
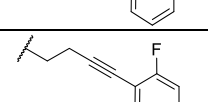
Visu savienojumu **21a-f** aktivitātes palielinājās gan funkcionālajā testā, gan niacīna izspiešanas testā salīdzinot ar neaizvietota savienojuma **13** aktivitāti (2. tabula). Ligandam ar *o*-hidroksilgrupu **21a** un *p*-hidroksilgrupu **21c** ir par kārtu augstāka afinitāte (IC<sub>50</sub> 0,037 μM un 0,025 μM) nekā *m*-analogam **21b** (IC<sub>50</sub> 0,38 μM), tāpēc tālāk pievērsām uzmanību *o*- un *p*-vietu modificēšanai, vispirms ievadot halogēnu atomus *o*-vietā. *o*-Hlor atvasinājums **21d** (EC<sub>50</sub>



0,27  $\mu\text{M}$ ) spēja aktivēt HCA2 līdzīgi kā *o*-hidroksi analogs **21a** ( $\text{EC}_{50}$  0,25  $\mu\text{M}$ ), turpretī *o*-fluor analoga **21e** aktivitāte samazinājās divas reizes ( $\text{EC}_{50}$  0,45  $\mu\text{M}$ ), taču tā afinitāte nedaudz uzlabojās ( $\text{IC}_{50}$  0,016  $\mu\text{M}$ ), tāpēc pieņemām, ka *o*-vietā var būt hlora vai fluora atoms.

2. tabula

Fenilacetilēnu saturošo savienojumu un to analogu aktivitātes dati

N. p. k.	Savienojums	Struktūra 	cAMP $\text{EC}_{50} \pm \text{SD}, \mu\text{M}^a$	RLB $\text{IC}_{50} \pm \text{SD}, \mu\text{M}^a$
1.	<b>13</b>		1,01 $\pm$ 0,59	0,33 $\pm$ 0,071
2.	<b>21a</b>		0,25 $\pm$ 0,11	0,037 $\pm$ 0,011
3.	<b>21b</b>		0,39 $\pm$ 0,16	0,380 $\pm$ 0,068
4.	<b>21c<sup>b</sup></b>		0,13 $\pm$ 0,02	0,025 $\pm$ 0,004
5.	<b>21d</b>		0,27 $\pm$ 0,14	0,088 $\pm$ 0,024
6.	<b>21e</b>		0,45 $\pm$ 0,15	0,016 $\pm$ 0,001
7.	<b>21f</b>		0,11 $\pm$ 0,06	0,330 $\pm$ 0,081
8.	<b>25</b>		19,6 $\pm$ 3,1	2,83 $\pm$ 0,93
9.	<b>24a</b>		0,72 $\pm$ 0,10	0,230 $\pm$ 0,089
10.	<b>24b</b>		2,98 $\pm$ 0,49	0,14 $\pm$ 0,09
11.	<b>24c</b>		0,16 $\pm$ 0,06	0,013 $\pm$ 0,006
12.	<b>24d</b>		0,19 $\pm$ 0,08	0,056 $\pm$ 0,017
13.	<b>24e</b>		0,36 $\pm$ 0,12	0,067 $\pm$ 0,009
14.	<b>24f</b>		0,08 $\pm$ 0,01	0,028 $\pm$ 0,002

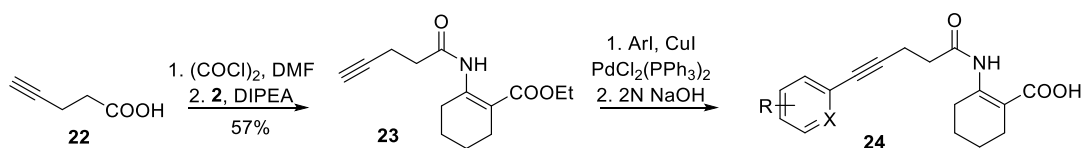
N. p. k.	Savienojums	Struktūra	cAMP EC <sub>50</sub> ± SD, μM <sup>a</sup>	RLB IC <sub>50</sub> ± SD, μM <sup>a</sup>
15.	<b>24g</b>		0,09 ± 0,02	0,076 ± 0,019
16.	<b>24h</b>		3,37 ± 1,39	0,67 ± 0,13
17.	<b>24i</b>		5,61 ± 1,10	3,62 ± 0,54
18.	<b>24j</b>		0,63 ± 0,09	0,29 ± 0,078
19.	<b>24k</b>		NA	
20.	<b>26a</b>		0,41 ± 0,14	0,040 ± 0,005
21.	<b>26b</b>		0,23 ± 0,12	0,032 ± 0,08
22.	<b>26c</b>		0,07 ± 0,01	0,021 ± 0,004
23.	<b>26d</b>		0,13 ± 0,06	0,075 ± 0,007
24.	<b>26e</b>		0,19 ± 0,04	0,28 ± 0,05
25.	<b>26f</b>		0,26 ± 0,09	0,058 ± 0,009

a – aprēķināts no vismaz no trīs eksperimentu rezultātiem;

b – savienojums **21c** ir iegūts sadarbībā ar *Dr. chem. M. Ikaunieku*;

NA – nav aktīva 50 μM koncentrācijā.

Izmantojot 9. attēlā redzamo shēmu, ieguvām savienojumus **24**, kas satur tikai trīskāršo saiti.

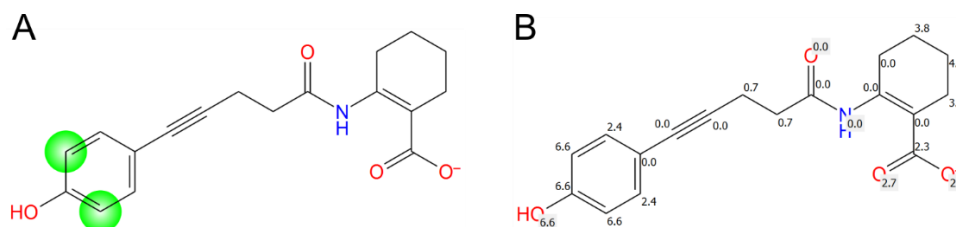


9. att. Fenilalkīnu saturošo savienojumu **24** iegūšanas shēma.

Savienojumi **24a-g** ir augstas afinitātes HCA2 agonisti (2. tabula). Praktiski visu savienojumu **24** aktivitāte un/vai afinitāte ir līdzīga to attiecīgo analoģu **21** aktivitātēm. Šāda linkera modifikācija uzlabo savienojuma stabilitāti *in vivo*, jo struktūra vairs nesatur aktīvētu nepiesātināto saiti. Visaktīvākie savienojumi šajā sērijā ir 2-fluor-4-hidroksi aizvietotāju saturošs **24f** un 2-hlor-4-hidroksi analogs **24g**. Interesanti, ka struktūra **25** (2. tabula, 8. rinda), kas nesatur trīskāršo saiti, bet satur dubultsaiti, zaudēja aktivitāti 19 reizes, salīdzinot ar to analoģu **13**. Šī struktūra atbilst izstrādātajam farmakoforajam modelim, tāpēc aktivitātes zudumu var izskaidrot ar struktūras kustīgumu.

Ieguvām arī *Merck* atrastā savienojuma MK-6892<sup>19</sup> analoģu **24h**, kas, tāpat kā MK-6892, satur hidroksipiridīnu liganda hidrofobajā daļā. Savienojuma **24h** aktivitāte ievērojami kritās (EC<sub>50</sub> 3,37 μM), salīdzinot ar hidroksifenil analoģa **24c** aktivitāti (EC<sub>50</sub> 0,16 μM).

Ir zināms, ka trīskāršā saite organismā var oksidēties ar citohroma P450 palīdzību, tāpēc, izmantojot datormodelēšanu, noticām savienojuma **24c** iespējamo metabolisko stabilitāti. Aprēķini parādīja, ka trīskāršā saite neatrodas tik tuvu (≤5 Å) P450 enzīma dzelzs atomam, lai viegli oksidētos. Kā redzams 10. attēlā, aprēķinātā metaboliski nestabilākā vieta molekulā ir aromātiskajā gredzenā.



10. att. Savienojuma **24c** metaboliskā stabilitāte.

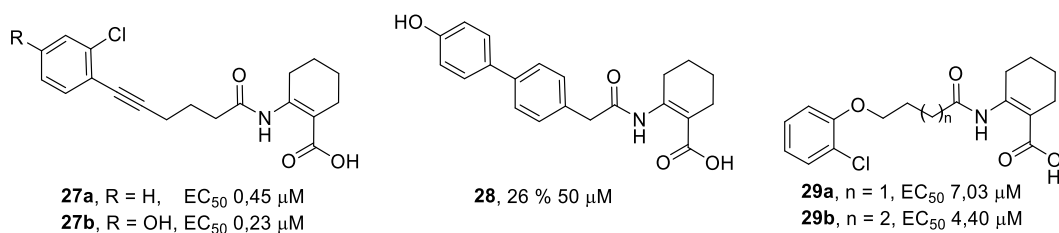
A – zaļā krāsā nestabilāka vieta; B – Fe–pieejamība, jo lielākā vērtība, jo augstāka pieejamība dzelzs atomam.

Literatūrā ir atrodami dati, ka dažreiz *p*-fluor aizvietotājs hidrofobajā daļā nemaina savienojumu aktivitāti, salīdzinot ar *p*-hidroksi analogiem<sup>20</sup>. Lai pārbaudītu *p*-fluor aizvietotāja ietekmi, ieguvām savienojumu **24j**. Tā aktivitāte samazinājās četras reizes, bet afinitāte – 22 reizes, salīdzinot ar *p*-hidroksi analoģu **24c**, tāpēc var secināt, ka šajā gadījumā fluora atoms nav hidroksilgrupas bioizostērs. Mēģinot atrast alternatīvu *p*-hidroksilgrupai, sintezējām fenilacetilēna atvasinājumu **24i** ar karbonskābi *p*-vietā, taču iegūtā savienojuma aktivitāte samazinājās jau 35 reizes. Ievadot *p*-hidroksigrupas vietā hidroksimetil aizvietotāju, ieguvām pavisam neaktīvu savienojumu **24k**.

*Merck* zinātnieku publikācijā ir aprakstīti daži cikloheksēnkarbonskābi saturoši HCA2 ligandi, kas vielas hidrofobajā apgabalā satur bifēnil sistēmu<sup>12</sup>. Lai pārbaudītu, vai trīskāršā saite mūsu gadījumā varētu darboties kā benzola cikla bioizostērs, ieguvām savienojumu **26a-f** bifēnil analoģus **26a-f**. Salīdzinot iegūto bifēnil savienojumu **26** un fenilacetilēnil grupu saturošo HCA2 agonistu **24** aktivitātes, var redzēt, ka bifēnil atvasinājumi **26a,c-e** ir 1,5–3 reizes aktīvāki par to analogiem **24a,c-e**. Izņēmums šajā sērijā ir *m*-hidroksigrupu saturošs atvasinājums **26b**, kas ir 13 reizes aktīvāks funkcionālajā testā (EC<sub>50</sub> 0,23 μM) par trīskāršo saiti saturošo analoģu **24b** (EC<sub>50</sub> 2,98 μM), un savienojuma **26b** afinitāte, salīdzinot ar vielu **24b**, uzlabojas četras reizes. Turpretī 2-fluor-4-hidroksi aizvietotājus saturoša bifēnilatvasinājuma **26f** aktivitāte un afinitāte samazinās 2–3 reizes (EC<sub>50</sub> 0,26 μM, IC<sub>50</sub> 0,058 μM), salīdzinot ar tā trīskāršās saites analoģa **24f** datiem (EC<sub>50</sub> 0,08 μM, IC<sub>50</sub> 0,028 μM).

Izmantojot iepriekš izstrādāto farmakoforo modeli, salīdzinājām savienojumu **24** un **26** struktūras. Bifenil sistēmas un fenilacetilēnu fragmentu pārklāšanās un salīdzināto savienojumu bioloģiskās aktivitātes dati liecina par to, ka trīskāršā saite savienojumos **24a-f** ir benzola gredzena bioizostērs.

Bifenilsistēmu saturošās struktūras **26** ir par apmēram 2 Å garākas nekā to attiecīgie fenilacetilēn analogi **24**. Lai izpētītu linkera garuma ietekmi uz savienojumu aktivitāti, tika iegūti divi augstas afinitātes HCA2 ligandu **24d** un **24g** analogi **27a** un **27b**, kas satur par vienu metilēngrupu garākus linkerus (11. att.). Iegūto savienojumu aktivitāte samazinājās 2,3–2,5 reizes, salīdzinot ar to analogu **24d,g** aktivitātēm. Līdz ar struktūras pagarināšanos rotējošo saišu daudzums, salīdzinot ar struktūrām **24d,g**, palielinās par vienu, tāpēc, iespējams, aktivitātes izmaiņas varētu izraisīt struktūru kustīguma palielināšanās.



11. att. HCA2 ligandu linkera modifikācijas.

Saīsinot bifenilsistēmu saturošam savienojumam **26c** linkera garumu par vienu metilēngrupu, tika iegūts tā analogs **28**. Izrādījās, ka šis savienojums ir praktiski neaktīvs, jo tas samazina cAMP līmeni tikai par 26 % 50 μM koncentrācijā (11. att.). Straujo aktivitātes zudumu varētu izskaidrot ar datormodelēšanas palīdzību – savietojot struktūras **26c** un **28**, noskaidrojām, ka to hidrofobie apgabali vispār nepārklājas un īsākā analoga **28** struktūras ģeometrijas dēļ tas neatbilst HCA2 ligandu farmakoforajam modelim.

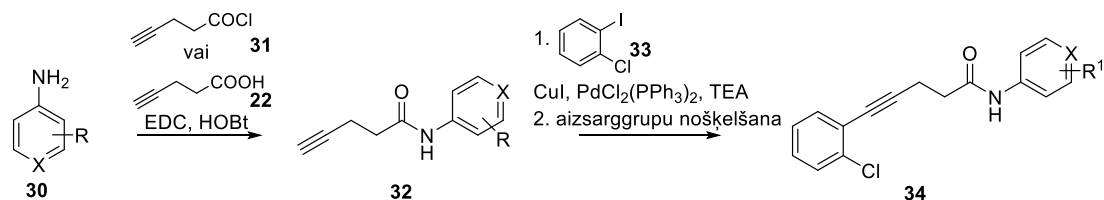
Izmantojot datormodelēšanā atrasto savienojuma **15** līdzību ar struktūru **24d**, ieguvām savienojumus **29a,b**, kas satur metilēnētera fragmentu trīskāršās saites vietā. Struktūrām **29a,b** ir vairāk kustīgu saišu nekā fenilacetilēnu saturošiem savienojumiem, līdz ar to palielinās struktūru iespējamo konformāciju skaits. Garāko linkeru saturošā savienojuma **29b** aktivitāte, salīdzinot ar savienojuma **24d** aktivitāti, samazinās 23 reizes, bet īsāko linkeru saturošā savienojuma **29a** – 37 reizes. Līdz ar to var secināt, ka HCA2 ligandos, aizvietojojot trīskāršo saiti ar metilēnētera fragmentu, molekula kļūst kustīgāka un tās aktivitāte samazinās.

### 3. HCA2 ligandu karbonskābes daļas un amīda grupas modificēšana

Salīdzinoši maz ir zināms par HCA2 ligandu analogiem, kuriem būtu modificēta karbonskābes daļa un amīda grupa. Veicot iepriekš iegūto HCA2 ligandu karbonskābes daļas modifikācijas, iegūtās struktūras–aktivitātes likumsakarības varētu dot ieskatu HCA2 ligandu farmakoforā modeļa karbonskābes daļā un palīdzēt izprast mijiedarbību starp ligandu un receptoru. Iepriekš novērojām cikloheksēnkarbonskābju saturošo HCA2 ligandu amīda saites šķelšanos hidrolītiskā vidē, tāpēc iespējama amīda saites aizvietošanas ieguvums varētu būt savienojumu stabilitātes uzlabošanās.

Ligandu karbonskābes daļas pētījumam ieguvām savienojuma **24d** analogus **34** ar modificētu karbonskābes daļu (12. att.). Amīda saites izveidei savienojumos **32** izmantojām

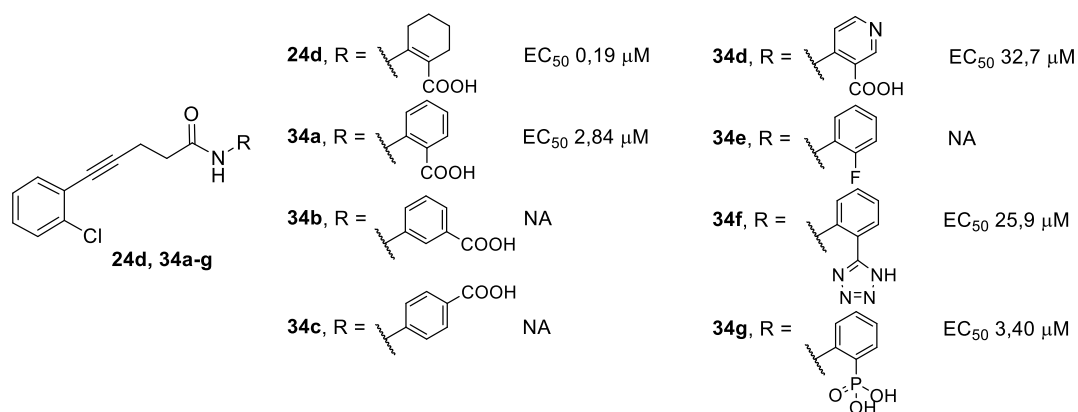
divas metodes – acilēšanas reakciju ar pent-4-īnskābes hlorīdu (**31**) vai karbonskābes **22** aktivēšanu ar EDC un HOBt reaģentu kombināciju. Izmantojot iepriekš izstrādāto metodi, veicām alkīnu **32** Sonogaširas reakcijas ar jodbenzolu **33**. Pēdējā solī vielām veicām aizsarggrupu nošķelšanu.



12. att. Savienojumu **34** iegūšana.

HCA2 ligandos cikloheksēnkarbonskābi var aizvietot ar antranilskābi, kas parasti gan nedaudz samazina aktivitāti, kaut arī dažos gadījumos aktivitātes izmaiņas ir nenozīmīgas. Sintezētā savienojuma **34a**, kur cikloheksēnkarbonskābes daļas vietā ir antranilskābe, aktivitāte gan samazinājās 15 reizes, salīdzinot ar to analogu **24d** (13. att.). Tomēr šo savienojumu ir ērti izmantot kā references vielu aktivitātes salīdzināšanai, veicot tālāku struktūras modificēšanu. Noskaidrojām, ka savienojumiem **34b,c**, kuros karbonskābes grupa atrodas attiecīgi meta un para pozīcijā pret acilamīda grupu, nav HCA2 aktivēšanas īpašību. Aizvietojo savienojuma **34a** orto karbonskābes grupu ar fluora atomu, kura elektronegativitātes dēļ tas arī varētu uzvesties kā ūdeņraža saites akceptors, ieguvām savienojumu **34e**, kas arī nav aktīvs.

Nikotīnskābe ir plaši zināms HCA2 ligands, tāpēc ieguvām HCA2 liganda **34a** analogu **34d**, kurā antranilskābe ir nomainīta pret nikotīnskābi, taču šī modifikācija izradījās neveiksmīga, jo savienojuma aktivitātes samazinājās 12 reizes.

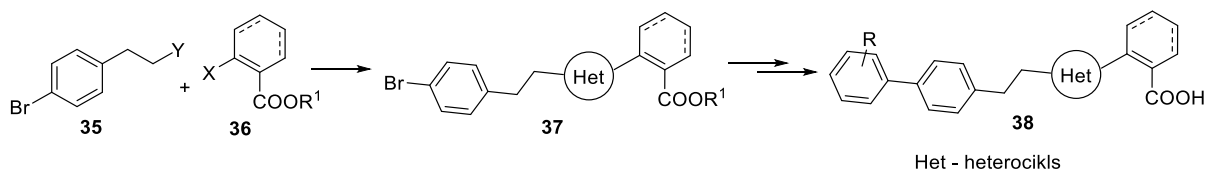


13. att. HCA2 ligandu karbonskābju daļas modifikācijas.

Ieguvām arī savienojuma **34a** analogus, kuros karbonskābe ir aizvietota ar to iespējamiem bioizostēriem – tetrazolu **34f** un fosforskābi **34g**. Tetrazolu saturoša savienojuma **34f** aktivitāte samazinājās deviņas reizes. Fosfonāta **34g** modifikācija izradījās veiksmīgāka, jo iegūtā savienojuma EC<sub>50</sub> ir 3,40 μM, un tā ir salīdzināma ar references savienojuma aktivitāti.

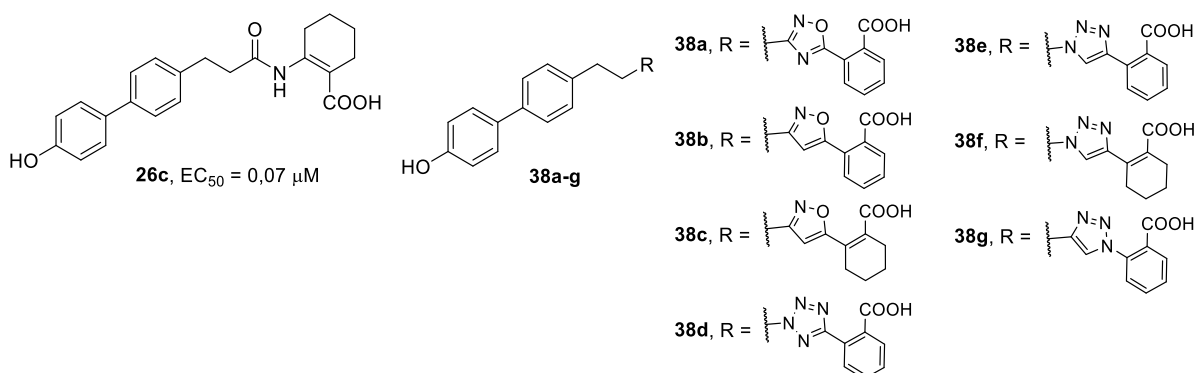
Nākamais solis HCA2 ligandu modificēšanā bija amīda grupas nomaiņa uz iespējamiem bioizostēriem. Amīdu aizvieto ar sulfonamīdu, tioamīdu, trifluoetilamīnu, oksetānamīnu, dažādiem heterocikliem utt.<sup>21–23</sup>. Analizējot iespējamo HCA2 ligandu struktūras ar amīda saites bioizostēriem, izmantojām datormodelēšanu.

HCA2 ligandu analoģu, kuros amīda funkcionālā grupa ir nomainīta ar iespējamu bioizostēru heterociklu, iegūšanas stratēģijas pamatā izvēlējamies heterocikla izveidi no diviem būvblokiem – liganda linkera daļas **35** un liganda karbonskābes daļas **36** (14. att.). Mūsu sintēzes shēmā linkera daļa satur arilbromīda grupu, kuru tālāk bijām paredzējuši izmantot C-C sametināšanas reakcijās un iegūt savienojumus ar dažādiem aizvietotājiem R liganda hidrofobajā daļā.



14. att. Heterociklu saturošo HCA2 ligandu **38** sintēzes stratēģija.

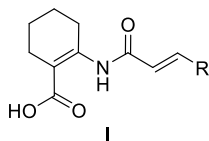
Izmantojot šo shēmu, ieguvām tetrazolu, 1,2,4-oksadiazolu, izoksazolu un 1,2,3-triazolu saturošos savienojumus **38a-g** (15. att.). Diemžēl neviens no tiem neuzrādīja HCA2 aktivēšanas īpašības. Salīdzinot jaunās, heterociklus saturošās struktūras **38a-g** un to atbilstību farmakoforajām modeļim ar savienojuma **26c** struktūru, secinājām, ka aktivitātes trūkuma iespējamie iemesli varētu būt arī jauno struktūru kopējais garums, heterocikla telpiskais izmērs un farmakoforā elektrona donora elementa trūkums.



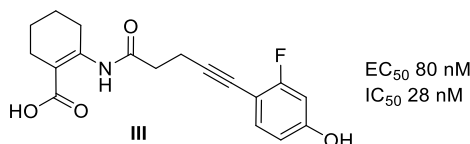
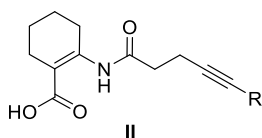
15. att. HCA2 ligandu amīda grupas modifikācijas.

## SECINĀJUMI

1. Iegūtās (*E*)-2-(3-(arilakrilamido)cikloheks-1-ēn-1-karbonskābes **I** ir selektīvākas pret HCA2, salīdzinot ar HCA1 un HCA3.



2. Balstoties uz (*E*)-2-(3-(arilakrilamido)cikloheks-1-ēn-1-karbonskābes sērijā **I** atrastajām struktūras-aktivitātes likumsakarībām, atrasti tādi jauni struktūrfragmenti kā hinolīns, benzodioksols un fenilacetilēns, ko var izmantot ligandu hidrofobās daļas dizainā, aizstājot literatūrā zināmo naftalīna grupu.
3. Ir novērojama tendence, ka iegūto HCA2 agonistu aktivitāte ir augstāka, ja savienojuma struktūrai ir ierobežotas dažādu konformāciju veidošanas iespējas.
4. Cikloheksēnkarbonskābi saturošiem HCA2 ligandiem piemīt saistība ar vērša seruma albumīnu, kas ietekmē pētāmo ligandu aktivitātes cAMP funkcionālajā testā.
5. Iegūtajā 2-(5-arilpent-4-īnamido)cikloheks-1-ēn-1-karbonskābju **II** sērijā ir atrasti augstas afinitātes HCA2 agonisti (piemēram, savienojums **III**).



6. Antranilskābi saturošos HCA2 ligandos karbonskābi var aizvietot ar tās bioizostēru – fosforskābi.
7. Amīda grupa cikloheksēnkarbonskābi un antranilskābi saturošos HCA2 ligandos ir svarīga struktūrdaļa, ko nevar aizvietot ar tādiem heterocikliem kā tetrazols, 1,2,4-oksadiazols, izoksazols un 1,2,3-triazols.

# GENERAL OVERVIEW OF THE THESIS

## Introduction

One of the priorities for improving public health is the treatment of cardiovascular diseases, since blood circulatory diseases are the main mortality cause in the European Union.<sup>1</sup> Atherosclerosis is the most common chronic vascular disease. Inflammation is a common underlying factor during all phases of atherosclerotic process that leads to accumulation of apolipoproteins within the arterial walls. The atherosclerotic process starts in early childhood and its progress is influenced by lifestyle, genetic and other factors. The main approach of the medical treatment of atherosclerosis is to decrease low-density lipoproteins concentration in blood. Statins and fibrates are used for this purpose<sup>2</sup>. Nowadays a number of anti-inflammatory therapies for atherosclerosis are studied using animal models and in clinical trials<sup>3</sup>.

Hydroxycarboxylic acid receptors (HCA1, HCA2 and HCA3) are G-protein coupled receptors. Endogenous ligands of HCA are metabolic intermediates. HCA help to maintain homeostasis by regulating lipolysis, immune and other processes. HCA2 agonists niacin and monomethylfumarate are used to treat atherosclerosis and multiple sclerosis<sup>4,5</sup>. HCA2 is expressed on adipocytes and immune cells including macrophages and monocytes which are participating in the development of the atherosclerotic process. HCA2 ligands, i.e. 3-hydroxybutyrate, niacin, butyrate and monomethylfumarate activate the receptor resulting in anti-inflammatory effects including anti-atherogenic effect<sup>4</sup>.

The crystal structure of HCA2 is unknown. G-protein coupled receptors are cell membrane proteins, the crystallization and the solving of their crystal structures are challenging. Several homology models of HCA2 are described in literature<sup>5-7</sup>. But they are dependent on the template and ligand type being used. Homology models indicate different ligand binding sites in the receptor, which makes difficult their use in the virtual ligand screening.

Several classes of HCA2 synthetic agonists are known, such as pyrazole, anthranilic acids, xanthine derivatives and others<sup>8-12</sup>. HCA2 ligands were developed based on the leads identified in high throughput screening or using modifications of previously known HCA2 ligands.

HCA2 may be an important target for the treatment of atherosclerosis and other inflammatory diseases, therefore, there is a need to develop new active HCA2 agonists.

## Aims and objectives

The aim of the Doctoral Thesis is to obtain high affinity HCA2 agonists.

The following tasks have been set to achieve the aim.

- To obtain models of HCA2 ligands using conformational restriction approach. To analyze the flexibility influence on the activity of compounds.
- To develop a pharmacophore model of HCA2 ligands.
- To analyze structure-activity relationships of HCA2 ligands.
- To study possible replacement of structural motifs of HCA2 ligands with bioisosteres.



### **Scientific novelty and main results**

Methods for the preparation of hydroxycarboxylic acid receptor 2 agonists (*E*)-2-(3-(arylacrylamido)cyclohex-1-enecarboxylic acids, 2-(3-arylpropiolamido)cyclohex-1-enecarboxylic acids and 2-(5-arylpent-4-ynamido)cyclohex-1-enecarboxylic acids have been elaborated. New high affinity HCA2 agonists are developed. Using created pharmacophore model of HCA2 ligands, similarities between different classes of HCA2 ligands are found. It is shown that large aromatic substituents at the hydrophobic part of the cyclohexene carboxylic acid containing HCA2 ligand can be replaced by phenylalkyne moiety. The carboxylic acid group can be substituted by phosphonic acid in the anthranilic acid containing HCA2 ligands.

# MAIN RESULTS

## 1. Acrylamidocyclohexene carboxylic acid derivatives as HCA2 ligands

*Merck* scientists developed a series of cyclohexene carboxylic acid derivatives as high affinity HCA2 agonists<sup>11</sup>, from which we selected structure **1a** for further modifications (Fig. 1) the design of new compounds was based on conformational restriction approach. According to our hypothesis, the introduction of a rigid linker between hydrophobic moiety and amide bond of the structure could help to obtain a more active and selective compound if the energetically favorable conformation of the new compound matches the receptor required bioactive conformation.

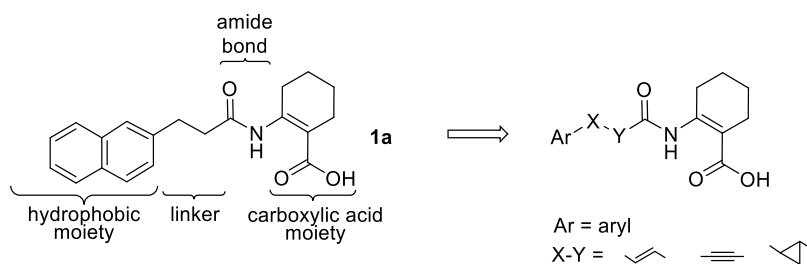


Fig. 1. The structure and conformational restriction of HCA2 agonist **1a**.

To prove the hypothesis, we obtained a series of compounds with double bond, triple bond, 1,2-cyclopropane linker and single bond analogs. We have developed a general method of synthesis of *E*-alkene containing compounds **5** based on Wittig reaction (Fig. 2). This method allows obtaining the desired compounds in two steps from the corresponding aryl or heterocyclic aldehydes and triphenylphosphonium bromide **3**. Compounds **1** with a single bond linker were synthesized via Pd-catalyzed hydrogenation from alkene **4** and subsequent basic hydrolysis.

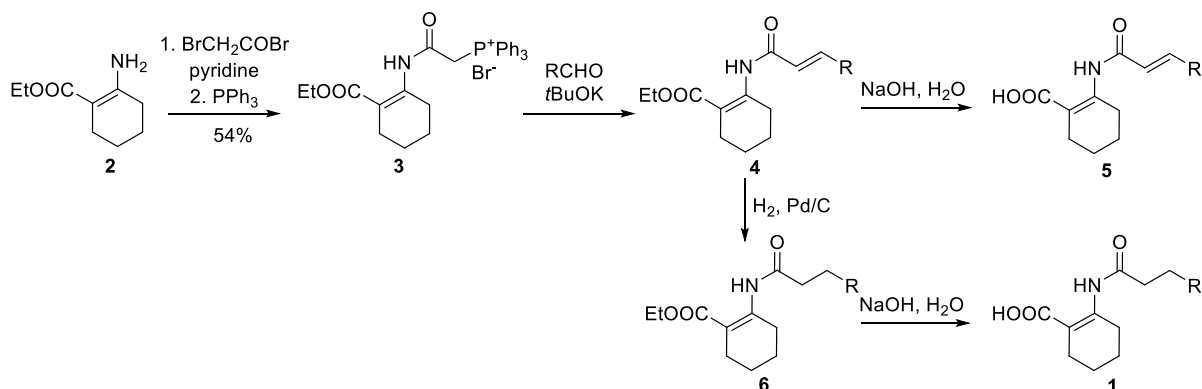


Fig. 2. General approach to the synthesis of compounds **1** and **5**.

Triple bond containing compounds **10** were synthesized from aldehydes **7**. First, aldehydes **7** were converted to arylpropionic acids **8** in Corey-Fuchs reaction<sup>13</sup>, then carboxylic acids were converted into the corresponding acyl chlorides using oxalyl chloride and the acylation of vinylamine **2** was performed. The hydrolysis reaction yielded compounds **10** (Fig. 3). In the synthesis of *cis* and *trans* cyclopropane linker containing compounds **11** and **12**, and

cyclopropane was obtained from diazomethane generated carbene and corresponding *E* or *Z*-alkene.

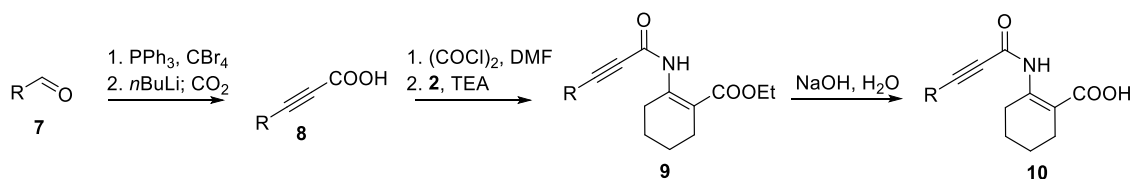


Fig. 3. Synthesis of arylpropionic acids **10**.

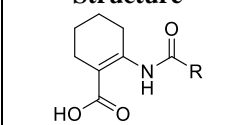
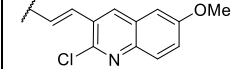
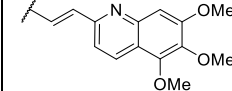
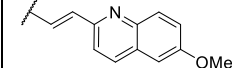
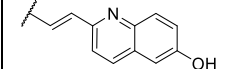
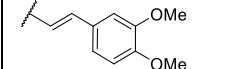
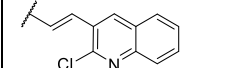
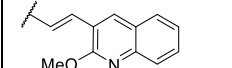
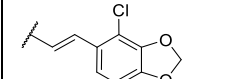
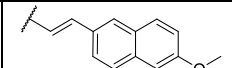
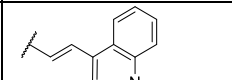
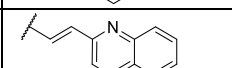
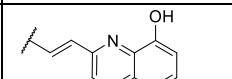
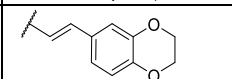
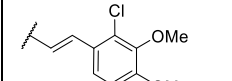
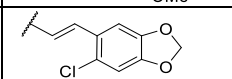
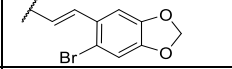
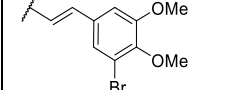
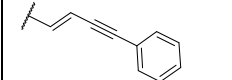
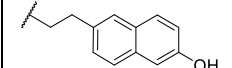
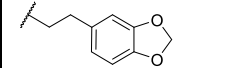
The biological activity tests were performed in Latvian Biomedical Research and Study Centre using functional cAMP assay. Synthesized cyclohexene carboxylic acid derivative **1a** was employed as a reference compound. The reported affinity of **1a** is 38 nM<sup>11</sup>. In our cAMP assay **1a** showed EC<sub>50</sub> 8.3 μM. The activity of synthesized compounds on HCA1, HCA2 and HCA3 is summarized in Table 1<sup>a</sup>.

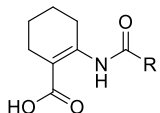
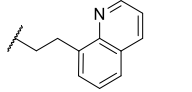
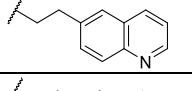
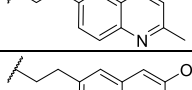
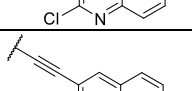
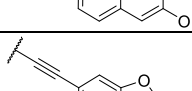
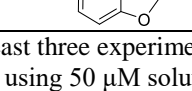
Table 1

Activity of cyclohexene carboxylic acid derivatives in cAMP assay

Entry	Compound	Structure	HCA2		HCA1	HCA3
			EC <sub>50</sub> ± SD, μM <sup>a</sup>	Inh., % <sup>b</sup>	Inh., % <sup>b</sup>	Inh., % <sup>b</sup>
1	<b>1a</b>		8.3 ± 2.4		66 ± 4	41 ± 4
2	<b>5a</b>		4.5 ± 1.2			14 ± 3
3	<b>10a</b>		1.2 <sup>c</sup> 0.23 ± 0.10 <sup>d</sup>			
4	<b>11</b>		12.5 ± 5		55 ± 15	40 ± 5
5	<b>12</b>			34 ± 18	NA	NA
6	<b>5b</b>		1.4 ± 0.1		NA	NA
7	<b>5c</b>		5.8 ± 4.2		26 ± 7	NA
8	<b>5d</b>			NA	54 ± 10	NA
9	<b>5e</b>			68 ± 10	39 ± 19	24 ± 10
10	<b>5f</b>			NA	NA	NA

<sup>a</sup> Compounds **1b**, **5a**, **b**, **n-w** were prepared in collaboration with R. Bokaldere, V. Gailīte, I. Kaula and M. Ikaunieks.

Entry	Compound	Structure 	HCA2		HCA1	HCA3
			EC <sub>50</sub> ± SD, μM <sup>a</sup>	Inh., % <sup>b</sup>	Inh., % <sup>b</sup>	Inh., % <sup>b</sup>
11	<b>5g</b>		6.3 ± 4.1		NA	21 ± 7
12	<b>5h</b>			53 ± 21	61 ± 8	38 ± 13
13	<b>5i</b>			30 ± 7	32 ± 6	19 ± 2
14	<b>5j</b>		0.5 <sup>c</sup> 0.35 ± 0.10 <sup>d</sup>			
15	<b>5k</b>			51 ± 13	58 ± 6	31 ± 14
16	<b>5l</b>		27.5 ± 3.5		52 ± 13	37 ± 13
17	<b>5m</b>			59 ± 11	58 ± 11	27 ± 11
18	<b>5n</b>			59 ± 5	51 ± 18	51 ± 3
19	<b>5o</b>			NA	NA	26 ± 10
20	<b>5p</b>			NA	NA	NA
21	<b>5q</b>		4.1 ± 1.4		NA	NA
22	<b>5r</b>			27 ± 13	NA	NA
23	<b>5s</b>		6.8 ± 3.7		66 ± 16	NA
24	<b>5t</b>		26.3 ± 4.5		48 ± 10	36 ± 22
25	<b>5u</b>			17 ± 9	59 ± 6	34 ± 15
26	<b>5v</b>			24 ± 7	54 ± 14	NA
27	<b>5w</b>			23 ± 12	46 ± 3	NA
28	<b>13</b>		3.6 ± 1.6		56 ± 10	NA
29	<b>1b</b>		1.9 ± 0.9			26 ± 4
30	<b>1c</b>		51.6 ± 4.2		62 ± 3	28 ± 7

Entry	Compound	Structure 	HCA2		HCA1	HCA3
			EC <sub>50</sub> ± SD, μM <sup>a</sup>	Inh., % <sup>b</sup>	Inh., % <sup>b</sup>	Inh., % <sup>b</sup>
31	<b>1d</b>			60 ± 6	55 ± 6	NA
32	<b>1e</b>			70 ± 14	60 ± 15	26 ± 7
33	<b>1f</b>		36.4 ± 11.2		54 ± 17	23 ± 6
34	<b>1g</b>		4.1 ± 2.9		53 ± 7	24 ± 10
35	<b>10b</b>		0.9 ± 0.5		NA	NA
36	<b>10c</b>		1.7 ± 1.5 <sup>d</sup>			

a calculated from at least three experiments;

b inhibition of cAMP using 50 μM solution of the tested compound;

c one experiment;

d experiment without BSA;

NA not active at 50 μM concentration.

The effective concentration of compounds bearing naphthalene-2-yl hydrophobic moiety decreases in row *cis*-cyclopropane (**11**, 34 % 50 μM) << *trans*-cyclopropane (**11**, 12.5 μM) < single bond (**1a**, 8.3 μM) < double bond (**5a**, 4.5 μM) < triple bond (**10a**, 1.2 μM), corresponding to our hypothesis. We performed the superposition of energetically favorable conformers of these compounds with cyclohexene carboxylate as a common fragment (Fig. 4). Triple bond containing structure **10a**, double bond containing **5a**, and single bond containing structure **1a** overlapped and, respectively, these compounds are more active. Both enantiomers of *trans*-cyclopropane linker bearing structure **11** are slightly out of plane, which can explain the decrease of the activity. Hydrophobic moieties of both enantiomers of *cis*-cyclopropane containing naphthalene derivative **12** did not overlap with **10a**, **5a** or **1a** hydrophobic moieties, and compound **12** is practically inactive.

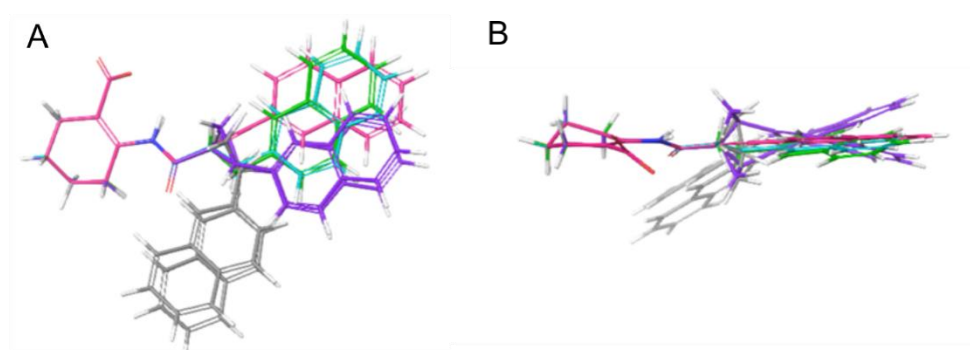


Fig. 4. Superposition of compounds with different linkers.

**1a** – green; **5a** – blue; **10a** – purple; **11** – pink; **12** – gray.

The observed pattern that conformational restriction increases the activity of the compound is not general and it is strongly dependent on hydrophobic part of the ligand. We observed a 10-fold increase of the activity of benzodioxole derivative with double bond linker **5c** comparing to single bond analog **1c** ( $EC_{50}$  **1c** – 51.6  $\mu$ M, **5c** – 5.8  $\mu$ M). The activity of compounds with 6-hydroxynaphthalene-2-yl group or (2-chloro-6-methoxy)quinolin-3-yl group with the replacement of linker remains practically similar ( $EC_{50}$  **1b** – 1.9  $\mu$ M, **5b** – 1.4  $\mu$ M, **10b** – 0.9  $\mu$ M, **1g**– 4.1  $\mu$ M, **5g** – 6.3  $\mu$ M). Surprisingly, the compound with 2-methylnaphthalene-6-yl hydrophobic moiety and double bond **5f** is inactive, but its single bond analog **1f** showed HCA2 activation properties ( $EC_{50}$  36.4  $\mu$ M).

We established that naphthalene-2-yl group in the hydrophobic part of the ligand can be replaced with quinolin-2-yl, benzodioxole or dihydrobenzodioxine with practically no change in the activity ( $EC_{50}$  of quinolin-2-yl analog **5q** – 4.1  $\mu$ M, benzodioxole **5c** – 5.8  $\mu$ M, dihydrobenzodioxine **5s** – 6.8  $\mu$ M). We observed a significant loss of activity of compound **5k** with 3,4-dimethoxyphenyl hydrophobic group. We tried to introduce halogen atoms in the hydrophobic moiety of benzodioxole **5c** similar to quinolin-2-yl derivatives **5g,f**, but these modifications were unsuccessful – bromine and chlorine containing compounds **5n,u,v** are practically inactive. On the other hand, similar introduction of chlorine in inactive structure **5k** resulted in increase of the activity, thus 2-chloro-3,4-dimethoxy analog **5t** showed  $EC_{50}$  26.3  $\mu$ M.

The introduction of hydroxyl group substituent in the hydrophobic moiety of quinolin-2-yl derivative with double bond resulted in increase of activity. 6-Hydroxyquinoline-2-yl derivative **5j** ( $EC_{50}$  0.5  $\mu$ M) is 8-fold more active than quinolin-2-yl analog **5q** ( $EC_{50}$  4.1  $\mu$ M). A similar tendency has been described in literature for naphthalene-2-yl derivatives. The position of hydroxyl group opposite the linker is important. For example, compound **5r** bearing hydroxyl group at 8-position is practically inactive. Methoxy group at 6-position increases the activity, for example, 6-methoxy-quinoline-2-yl derivative **5i** is inactive, but also in this case the position of substituent is important. Thus, methoxy group bearing compound **5g** shows  $EC_{50}$  6.3  $\mu$ M.

Intriguingly, the structure **13** bearing phenylacetylene in the hydrophobic part of the ligand showed  $EC_{50}$  3.6  $\mu$ M, which is similar to naphthalene-2-yl derivative **5a** activity ( $EC_{50}$  4.5  $\mu$ M). It can be concluded that the hydrophobic interaction between the receptor and ligand may predominantly be formed by hydrophobic moiety area, which is remote from linker, but the interaction of the site close to the linker or a triple bond as in the case of compound **13** is weak.

Most of the synthesized compounds were also tested on HCA1 and HCA3. All of them are selective on HCA2, as they showed no activity on HCA1 and HCA3 or the activity was negligible. At 50  $\mu$ M concentration of the ligand, the activation of HCA1 or HCA3 does not exceed 50–60 %. Compounds **1a** and **5s** gave the highest activity towards HCA1 (66 %). The selectivity is required if the desired pharmacological effect is associated with the activation of immune cells. However, if it is necessary to activate the receptor in adipocytes, the selectivity probably is not an issue since all three receptors are expressed on adipocytes.

### Pharmacophore model of HCA2 ligands

We developed the pharmacophore model of HCA2 ligands using *Schrödinger Small-Molecule Drug Discovery Suite*<sup>14</sup> and our synthesized ligands. According to our previous

observation that hydroxyl group at the hydrophobic moiety of the ligand increases the activity, the automatically generated pharmacophore model with the best result score was supplemented with an additional hydrogen bond acceptor element using structure **10b** as a template. The excluded volume shell was added to the model. The position and descriptors of the pharmacophores of hydrophobic site were manually modified to achieve maximum active ligands and minimum inactive compounds to match the created model. In the pharmacophore model design and ligand screening, we used only our synthesized compounds. Since only hydrophobic moiety of our HCA2 ligands is diverse, but linker and carboxylic acid structural parts are similar or the same for all structures, the created pharmacophore model is more suitable for the characterization of the hydrophobic site of the ligand.

The created model consists of 7 pharmacophores – AADHNRR, where A is a hydrogen bond acceptor, D is a hydrogen bond donor, H is a hydrophobic element, N – a negative charge, and R – a ring (Fig. 5). According to the model, HCA2 ligand is a practically flat structure with 15–17 Å length. With the requirement that 5 of 7 ligand pharmacophores should match the model, 18 synthesized compounds from Table 1 fit the model (Fig. 5, A), including 12 active and only one inactive derivative (**5f**, Fig. 5, B).

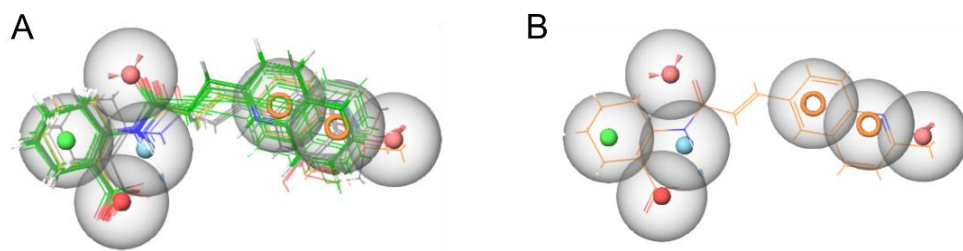


Fig. 5. Pharmacophore model of HCA2 ligands.

A – all matching ligands; B – **5f**; active compounds are shown in green, inactive – orange; acceptor (A) – bright red; donor (D) – blue; negative charge (N) – red; hydrophobic element (H) – green; ring (R) – orange.

The pharmacophore model was utilized to find the similarities between synthesized cyclohexene carboxylic acid HCA2 ligands and other classes of HCA2 ligands. The screening of the compounds described in literature<sup>17</sup> showed that some pyridopyrimidones and bicyclic pyrazoles fit the created model, for example compounds **14** and **15** (Fig. 6).

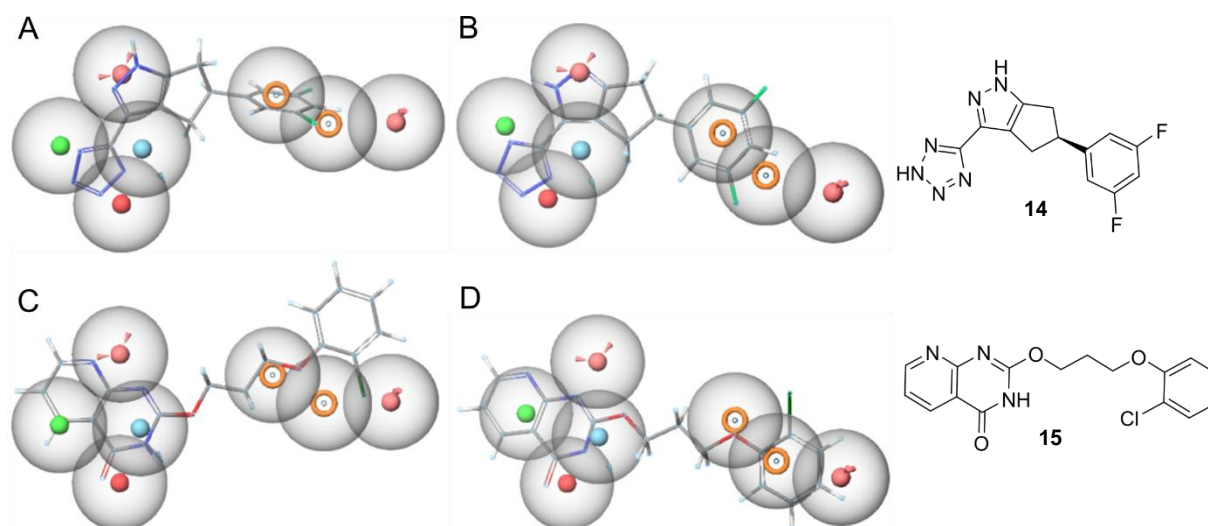


Fig. 6. Representative example of HCA2 ligand screening result.

A and C – low-energy conformers were implemented in the screening, model without excluded volume shell;  
 B and D – new conformers were created, model with excluded volume shell.

The results of the screening can be used in the design of new HCA2 ligands. The pharmacophore model can find application in virtual ligand screening as well.

### Plasma protein binding of HCA2 ligands

Previous studies have emphasized that anthranilic acid containing HCA2 ligands have tendency to bind to plasma proteins. Bovine serum albumin (BSA) is a plasma protein used in cAMP assay buffer and in the preparation of cells expressing HCA. BSA (2 %) was implemented in the above-mentioned functional cAMP assays to establish activity of our synthesized compounds. To evaluate the binding to BSA in cooperation with BMC, cAMP assay with additional preincubation of compounds in 5 % BSA for 30–45 min was performed for ligands **1g**, **5a**, **5c**, **10b**, **11** and **13**. We did not observe significant differences in the cAMP level inhibition between the experiments with or without additional incubation and it was concluded that binding to BSA is insignificant. In the following cAMP experiments without addition of BSA we have observed 2 to 55-fold activity shift. The most significant 35 to 55-fold difference was found for the compounds with a single bond linker. Functional activity shift in the presence of BSA affects our conclusions on structure-activity relationships. For example, in a series of 6-hydroxynaphthalene-2-yl hydrophobic moiety bearing ligands **1b**, **5b** and **10b** the most active compound is single bond analog **1b** with  $EC_{50}$  0.04  $\mu$ M.

Since it is known that carboxylic acids strongly bind to plasma proteins, and all our synthesized HCA2 ligands are carboxylic acids, functional assays in the following experiments were performed without the BSA additive. Radioactive ligand binding assay (RLB) using  $^3$ H-niacin was used as well.

### HCA2 ligands with heterocyclic linkers

The linkers of previously described HCA2 ligands are activated unsaturated bonds, which can react with biological nucleophiles in physiological environment. Since Michael acceptors are not preferable elements of druglike compounds, possible alternative for a double bond linker



is 5-membered heterocycle. Several HCA2 ligands with thiophene, pyrazole or thiazole linkers and anthranilic acid in the carboxylic acid moiety similar to our compounds are covered by patent.<sup>18</sup> Unfortunately, the biological activity of such analogs has not been reported. We have synthesized compounds with triazole linker **16** and thiophene **17** (Fig. 7) to establish the structure-activity relationship. The EC<sub>50</sub> of compounds **16** and **17** is 3–4 μM, which is 10-fold higher than the activity of reference compound **10a**.

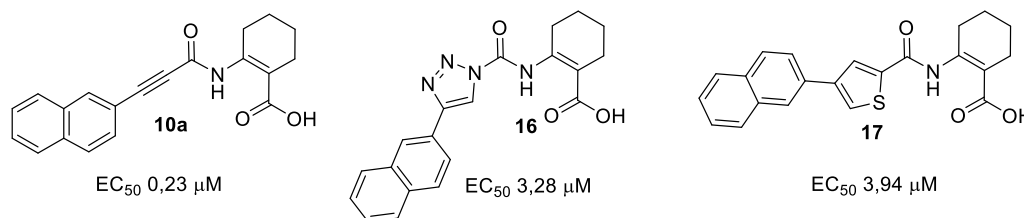


Fig. 7. HCA2 ligands with heterocyclic linkers, cAMP assay without BSA.

As heterocycles containing structures are covered by patent, and synthesized compounds **16** and **17** are poorly soluble in water or organic solvents, this research direction was cancelled.

## 2. Phenylacetylene containing HCA2 ligands and modifications

We have focused our attention on relatively simple HCA2 ligand **13** containing a phenylacetylene group attached to the *E* double bond. Structure **13** has a small number of rotatable bonds, thus it is conformationally stable. We have used analogs of structure **13** as a model to prove conformational restriction hypothesis and to design new HCA2 agonists. We obtained compounds **21** with hydroxyl groups and halogens at different positions using the Sonogashira reaction – Wittig reaction sequence (Fig. 8). First, aryl halides **18** gave alkynes **19** in reaction with propargyl alcohol, and then alcohol group was oxidized to obtain aldehydes **20**. Corresponding *E*-alkenes were synthesized using Wittig reaction with the above-mentioned phosphonium bromide **3**.

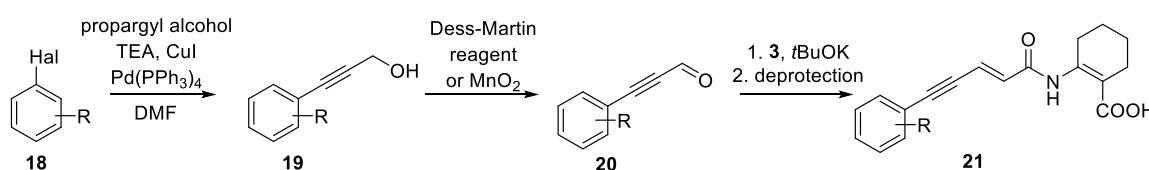
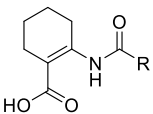
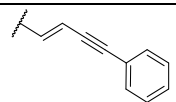
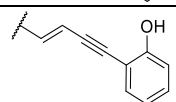
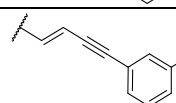
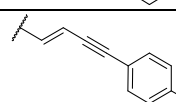
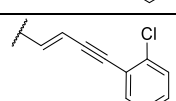
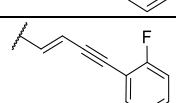
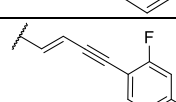
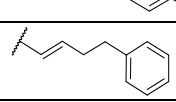
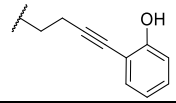
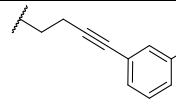
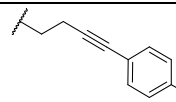
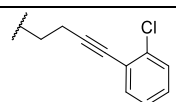
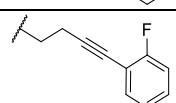
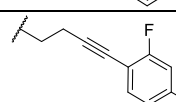
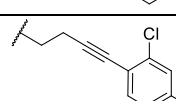


Fig. 8. Synthesis of enyne containing compounds **21**.

The introduction of hydroxyl groups and halides improved activity both in functional and radioligand binding assays comparing with activity of non-substituted compound **13** (Table 2). Ligands **21a** and **21a** bearing *o*- or *p*-hydroxyl group have higher affinity (IC<sub>50</sub> 0.037 μM and 0.025 μM) than *m*-analog **21b** (IC<sub>50</sub> 0.38 μM), therefore we have modified *o*- and *p*-positions of phenyl group. *o*-Chloro derivative **21d** showed similar activity to *o*-hydroxyl analog **21a** (EC<sub>50</sub> 0.27 μM and 0.25 μM). *o*-Fluoro substituent in compound **21e** gave 2-fold decrease of activity (EC<sub>50</sub> 0.45 μM), but the affinity of compound **21e** increased slightly (IC<sub>50</sub> 0.016 μM), so we concluded that chlorine or fluorine atom can be at the *o*-position.

Table 2

## Activity of phenylacetylene derivatives and their analogs

Entry	Compound	Structure 	cAMP EC <sub>50</sub> ± SD, μM <sup>a</sup>	RLB IC <sub>50</sub> ± SD, μM <sup>a</sup>
1	13		1.01 ± 0.59	0.33 ± 0.071
2	21a		0.25 ± 0.11	0.037 ± 0.011
3	21b		0.39 ± 0.16	0.380 ± 0.068
4	21c <sup>b</sup>		0.13 ± 0.02	0.025 ± 0.004
5	21d		0.27 ± 0.14	0.088 ± 0.024
6	21e		0.45 ± 0.15	0.016 ± 0.001
7	21f		0.11 ± 0.06	0.330 ± 0.081
8	25		19.6 ± 3.1	2.83 ± 0.93
9	24a		0.72 ± 0.10	0.230 ± 0.089
10	24b		2.98 ± 0.49	0.14 ± 0.09
11	24c		0.16 ± 0.06	0.013 ± 0.006
12	24d		0.19 ± 0.08	0.056 ± 0.017
13	24e		0.36 ± 0.12	0.067 ± 0.009
14	24f		0.08 ± 0.01	0.028 ± 0.002
15	24g		0.09 ± 0.02	0.076 ± 0.019

Entry	Compound	Structure	cAMP EC <sub>50</sub> ± SD, μM <sup>a</sup>	RLB IC <sub>50</sub> ± SD, μM <sup>a</sup>
16	<b>24h</b>		3.37 ± 1.39	0.67 ± 0.13
17	<b>24i</b>		5.61 ± 1.10	3.62 ± 0.54
18	<b>24j</b>		0.63 ± 0.09	0.29 ± 0.078
19	<b>24k</b>		NA	
20	<b>26a</b>		0.41 ± 0.14	0.040 ± 0.005
21	<b>26b</b>		0.23 ± 0.12	0.032 ± 0.080
22	<b>26c</b>		0.07 ± 0.01	0.021 ± 0.004
23	<b>26d</b>		0.13 ± 0.06	0.075 ± 0.007
24	<b>26e</b>		0.19 ± 0.04	0.28 ± 0.05
25	<b>26f</b>		0.26 ± 0.09	0.058 ± 0.009

a calculated from at least three experiments;  
b prepared in collaboration with Dr. chem. M. Ikaunieks;  
NA not active at 50 μM concentration.

Compounds **24** were synthesized from alkyne **23** using Sonogashira reaction with appropriate aryl iodides (Fig. 9).

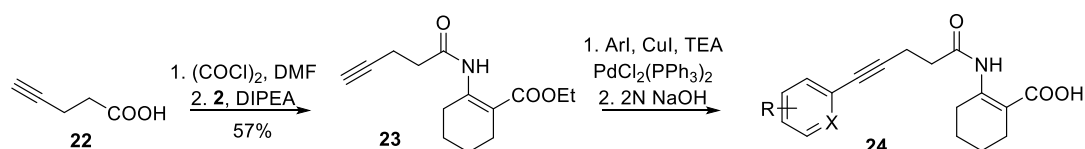


Fig. 9. Synthesis of phenylalkyne derivative **24**.

Compounds **24a-g** are high affinity HCA2 agonists (Table 2). Practically in all cases the activity and/or affinity of compounds **24** is similar to the activity of enyne function containing

compounds **21**. This modification of the linker improves the stability of the compound *in vivo* since structures **24** do not contain an activated unsaturated bond. The most potent compounds in the series are 2-fluoro-4-hydroxyl substituent containing **24f** and 2-chloro-4-hydroxyl analog **24g**. Interestingly, structure **25** (Table 2, Row 8), which contains only double bond lost activity by 19-fold, comparing with the analog **13**. Since structure **20** fits the developed pharmacophore model, the activity loss can be explained by the conformational flexibility of the structure.

We synthesized compound **24h** with hydroxypyridine hydrophobic moiety, which is the analog of the *Merck* developed ligand MK-6892<sup>19</sup>. Surprisingly, the activity of compound **24h** dropped ( $EC_{50}$  3.37  $\mu$ M) comparing to the activity of analog **24c** ( $EC_{50}$  0.16  $\mu$ M).

It has been mentioned in the literature that *p*-hydroxyl substituent in the hydrophobic part of the HCA2 ligand can be replaced with fluorine with no change in activity<sup>20</sup>. To analyze the possibility of this replacement, we have obtained compound **24j**. *p*-Fluoro substituent gave 4-fold loss of the activity and 22-fold loss of the affinity. It can be concluded that in this case fluorine is not a bioisostere of the hydroxyl group. With the purpose to modify *p*-hydroxyl group we have obtained phenylacetylene derivative **24i** with carboxylic acid at *p*-position as well as hydroxymethyl derivative **24k**, but these modifications were unsuccessful.

It is known that the triple bond can be oxidized in biological systems by cytochrome P450. We have established the metabolic stability of the phenylacetylene derivative **24c** using molecular modeling. Our calculations showed that in the case of structure **24c** the triple bond is not close enough ( $\leq 5$  Å) to enzyme P450 iron atom. As it is shown in Fig. 10 A, the most unstable part of the molecule is aromatic part, showed in green.

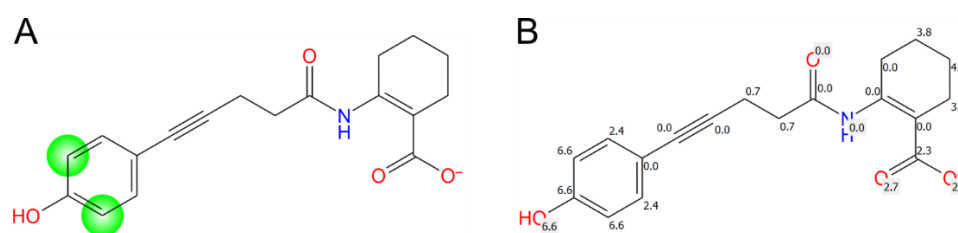


Fig. 10. The metabolic stability of compound **24c**.

A – the most unstable atoms are showed in green; B – Fe-availability, highest score means highest availability.

*Merck* scientists developed cyclohexene carboxylic acid containing HCA2 ligands with biphenyl system as a hydrophobic moiety<sup>12</sup>. We have obtained compounds **26a-f** as analogs of structures **24a-f** replacing the triple bond with benzene ring to prove that triple bond acts as benzene bioisostere. Biphenyl derivatives **26a,c-e** are 1.5 to 3-fold more active than triple bond analogs **24a,c-e** in cAMP functional assay. Compound **26b** is an exception in this series since it showed 13-fold higher activity ( $EC_{50}$  0.23  $\mu$ M) than analog **24b** ( $EC_{50}$  2.98  $\mu$ M), the affinity of compound **26b** improved 4-fold. On the contrary, the activity and affinity of 2-fluor-4-hydroxyl groups containing biphenyl compound **26f** decreased 2 to 3-fold ( $EC_{50}$  0.26  $\mu$ M,  $IC_{50}$  0.058  $\mu$ M) comparing with the activity of analog **24f** ( $EC_{50}$  0.08  $\mu$ M,  $IC_{50}$  0.028  $\mu$ M). The molecular modeling revealed that hydrophobic parts of biphenyl structures **26** and of triple bond analogs **24** are overlapping. Summing up the biological activity data and the result of modeling, it can be concluded that the triple bond in compounds **24** is benzene bioisostere.

Biphenyl derivatives **26** are about 2 Å longer than the phenylacetylene analogs **24**. With the purpose to investigate the influence of linker length on the activity of the compounds, we

obtained compounds **27a,b** with extra methylene group which are analogs of high affinity HCA2 ligands **24d** and **24g** (Fig. 11). The activity and affinity of new compounds decreased 2.3 to 2.5-fold comparing with the compounds **24d,g**. With the extension of the structure, the number of rotatable bonds increased by one comparing with structures **24d,g**. Therefore, decrease in activity can be caused by flexibility of the structure.

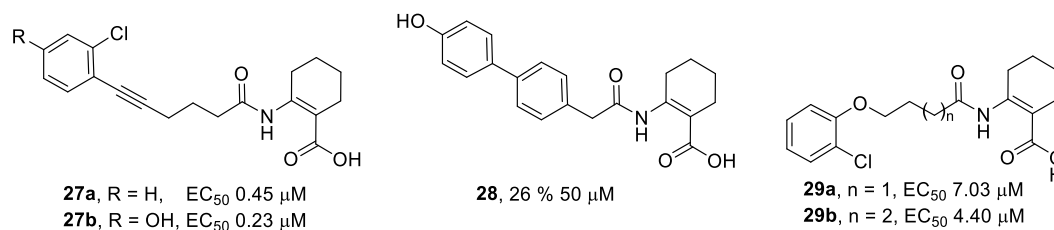


Fig. 11. Linker modifications of the HCA2 ligands.

By shortening the linker of structure **26c** by one methylene group, we have obtained analog **28**. This compound is very weak HCA2 agonist since it decreases cAMP level by only 26 % at 50  $\mu$ M concentration (Fig. 11). This rapid activity shift could be explained by molecular modeling. Superimposition of structures **26c** and **28** showed that the hydrophobic moieties of structures do not overlap. The analog **28** with short linker does not fit the pharmacophore model due to geometry of the structure.

Applying pharmacophore modeling, we have found the similarities between pyridopyrimidone **15** and structure **24d**. We used these findings to design new compounds **29a,b**, which contain methylene ether group instead of triple bond. The new structures are more flexible than their analog **24d**. The activity of compound **29d** with longer linker decreased 23-fold, and the activity of compound **29a** with shorter linker decreased 37-fold (Fig. 11). It can be concluded that by replacing the triple bond with methylene ether fragment the obtained structure is more flexible and more conformations are possible, so the activity of compound decreases.

### 3. Modifications of amide group and carboxylic acid group of HCA2 ligands

Relatively little is known about modifications of the amide group or carboxylic group of HCA2 ligands. Structure-activity relationships of analogs of previously developed HCA2 ligands with modifications in the carboxylic acid part could give additional information about the pharmacophore model and could help to understand interactions between the receptor and carboxylic acid moiety of the ligand. We have previously observed hydrolytic degradation of the amide bond of cyclohexene carboxylic acid derivatives, so potential benefit of the amide group replacement could be stability improvement of the compounds.

To study carboxylic acid part of HCA2 ligands, we have obtained a series of compounds **34** as analogs of agonist **24d**. For the amide bond formation in compounds **34** two methods have been used – the acylation reaction of anilines **30** with pent-4-ynoyl chloride (**31**) or pent-4-ynoic acid (**22**) activation by EDC and HOBt reagent combination. Sonogashira reaction of alkyne **32** and iodobenzene **33** was performed using the previously developed method. The last step was cleavage of protection groups (Fig. 12).

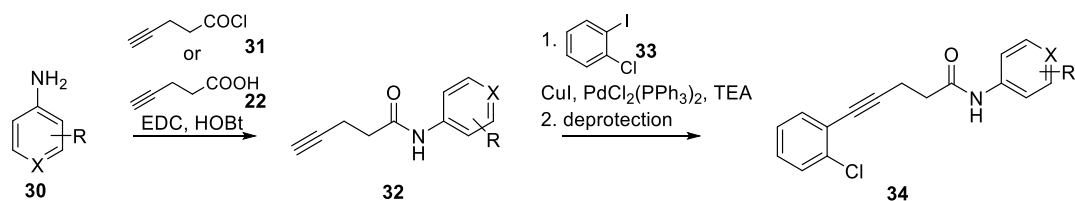


Fig. 12. Synthesis of compounds **34**.

Cyclohexene carboxylic acid in HCA2 ligands usually can be replaced with anthranilic acid leading to some decrease of activity, sometimes activity shift is insignificant. In our case anthranilic acid analog **34a** gave 15-fold decrease in activity comparing to cyclohexene containing compound **24d** (Fig. 13). Nevertheless this compound can be used as a reference to compare activities of further modified structures. Benzoic acid derivatives **34b,c**, where carboxylic acid group is located at *ortho* or *para* position relatively to amide group, are completely inactive. We have replaced carboxylic acid group also with fluorine, since fluorine can behave as hydrogen bond acceptor pharmacophore, but the obtained compound **34e** is inactive.

Nicotinic acid is a widely known HCA2 ligand, so we have synthesized compound **34d** – an analog of compound **34a** in which benzoic acid is replaced by nicotinic acid. Unfortunately, this modification was unsuccessful as the activity dropped 12-fold (Fig. 13).

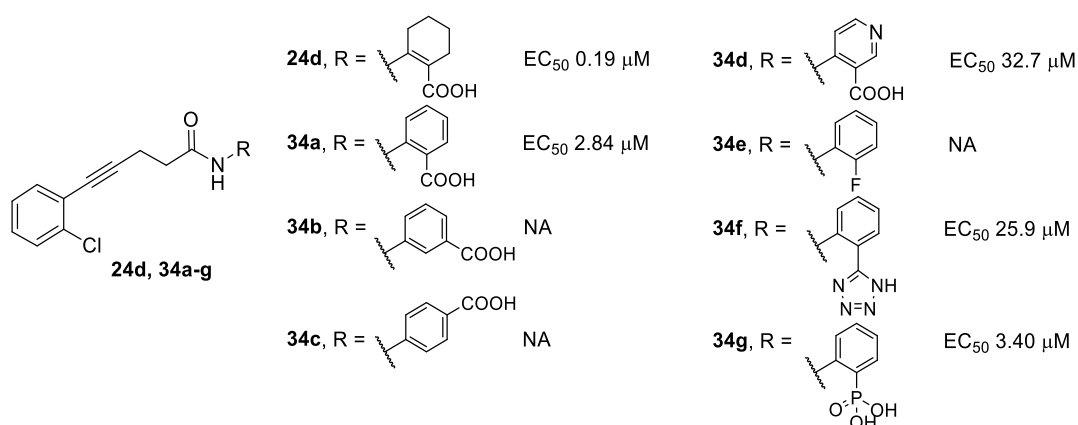


Fig. 13. Modifications of the carboxylic acid part of the HCA2 ligands.

We have obtained tetrazole **34f** and phosphonic acid derivative **34g** as bioisosteric analogs of anthranilic acid **34a**. The activity of tetrazole decreased 9-fold comparing to compound **34a**. Phosphonic acid bioisostere modification was successful and compound **34g** showed EC<sub>50</sub> 3.40 μM, which is similar to the activity of reference compound **34a** (Fig. 13).

Next step in HCA2 ligand modifying was the replacement of amide group with possible bioisosteres. It is known that amide bioisosteres are sulfonamide, trifluorethylamine, aminooxatane, different heterocycles, etc.<sup>21–23</sup>. To analyze possible HCA2 analogs with amide group bioisosteres, we have applied molecular modeling.

To obtain analog of HCA2 agonist **26c**, we have chosen synthetic strategy based on the heterocycle construction from two building blocks – ligand linker component **35** and carboxylic acid containing block **36** (Fig. 14). In this scheme, linker block **35** contains an aryl bromide

group, which could be implemented in C-C coupling reaction to obtain ligands with different R substituents in the hydrophobic moiety.

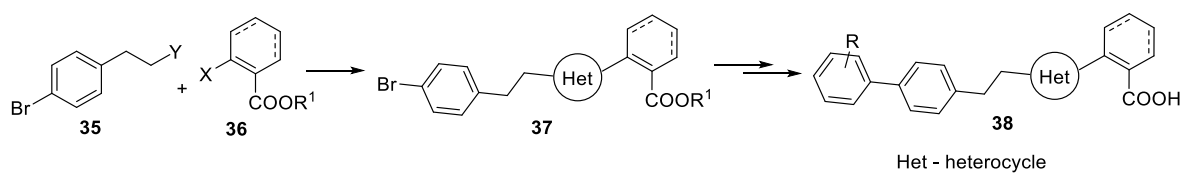


Fig. 14. Synthetic strategy toward heterocycles **38**.

Using this synthetic strategy we have obtained tetrazole, 1,2,4-oxadiazole, isoxazole, 1,2,3-triazole derivatives **38a-g** as analogs of high affinity HCA2 agonist **26c** (Fig. 15). However, these compounds did not show activity on HCA2. We have compared the new heterocyclic compounds **38** with structure **26c** using superposition of the structures and pharmacophore modeling and concluded that possible reasons for the lack of activity could be the length of the new compounds, the size of the heterocycle, or the lack of pharmacophore electron donor element.

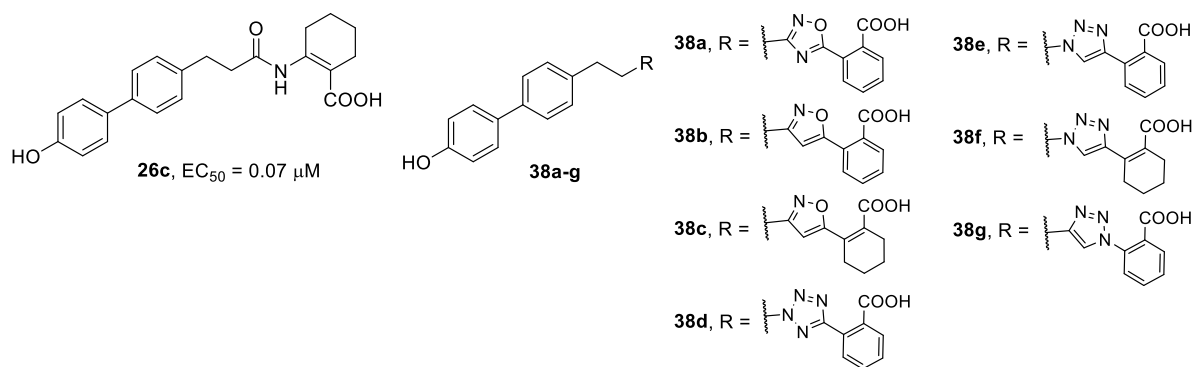
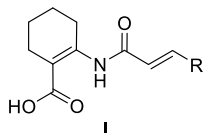


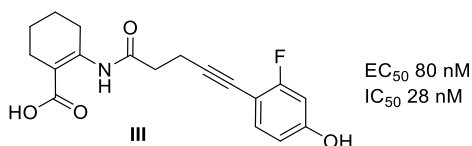
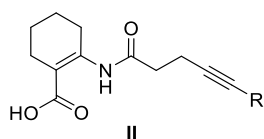
Fig. 15. Modification of amide group of HCA2 ligands.

## CONCLUSIONS

1. The synthesized (*E*)-2-(3-(arylacrylamido)cyclohex-1-ene-1-carboxylic acids **I** are more selective against HCA2 compared to HCA1 and HCA3.



2. Based on the structure-activity relationships found in the series of (*E*)-2-(3-(arylacrylamido)cyclohex-1-ene-1-carboxylic acids **I**, new structural fragments for the hydrophobic part of the ligand such as quinoline, benzodioxole, and phenylacetylene were found, which can be used as replacement for the known naphthalene group.
3. The activity of prepared HCA2 agonists tends to be higher if the structure of the ligand has restricted conformations.
4. Cyclohexene carboxylic acid containing HCA2 ligands bind to bovine serum albumin that affects the results of cAMP functional assays.
5. In the series of 2-(5-arylpent-4-ynamido)cyclohex-1-en-1-carboxylic acids **II**, high affinity HCA2 agonists have been found, for example compound **III**.



6. The carboxylic acid group can be replaced with phosphonic acid in the anthranilic acid containing HCA2 ligands.
7. The amide group in HCA2 ligands is an important structural motif that cannot be replaced with tetrazole, 1,2,4-oxadiazole, isoxazole or 1,2,3-triazole.



## PUBLIKĀCIJAS/PUBLICATIONS

### Zinātniskās publikācijas / Scientific publications

1. Bobileva, O., Ikaunieks, M., Duburs, G., Mandrika, I., Petrovska, R., Klovinš, J., Loza, E. Synthesis and evaluation of (*E*)-2-(5-phenylpent-2-en-4-ynamido)cyclohex-1-ene-1-carboxylate derivatives as HCA2 receptor agonists. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, 25 (16), 4314–4329.
2. Bobileva, O., Bokaldere, R., Gailite, V., Kaula, I., Ikaunieks, M., Duburs, G., Petrovska, R., Mandrika, I., Klovinš, J., Loza, E. Synthesis and evaluation of (*E*)-2-(acrylamido)cyclohex-1-enecarboxylic acid derivatives as HCA1, HCA2, and HCA3 receptor agonists. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22 (14), 3654–3669.

### Patents/Patent:

1. Loža, E., Bobileva, O., Bokaldere, R., Gailite, V., Kaula, I., Ikaunieks, M., Mandrika, I., Petrovska, R., Klovinš, J., Duburs, G., Bisenieks, E. 3'-Aril un heterilaizvietotās 2-akrilamidocikloheksēnkarbonskābes kā hidroksikarbonskābju receptoru saimes (HCA2) jauna ligandu grupa. LV14982 B, 2015.

### Darba rezultāti prezentēti šādās konferencēs / Results of the Thesis were presented in the following conferences:

1. Bobileva, O., Ikaunieks, M., Mandrika, I., Petrovska, R., Loza, E. Phenylacetylene containing cyclohex-1-enecarboxylic acid derivatives as HCA2 agonists. *53<sup>rd</sup> International Conference on Medicinal Chemistry*, July 5–7, **2017**, Toulouse, France. Abstract booklet p. 229.
2. Bobileva, O., Ikaunieks, M., Duburs, G., Petrovska, R., Mandrika, I., Klovinš, J., Loza, E. 2-Amidocyclohex-1-ene carboxylic acid derivatives as Hydroxy-carboxylic acid receptors agonists. *Drug Discovery Conference*, August 27–29, **2015**, Riga, Latvia. Abstract booklet p. 89.
3. Loža, E., Bobileva O. (*E*)-2-(Acrylamido)cyclohex-1-enecarboxylic acid derivatives – novel group of hydroxy-carboxylic acid receptor ligands. *Drug Discovery Conference*, August 27–29, **2015**, Riga, Latvia. Abstract booklet p. 68.
4. Bobileva, O., Bokaldere, R., Gailite, V., Kaula, I., Ikaunieks, M., Duburs, G., Petrovska, R., Mandrika, I., Klovinš, J., Loza, E. Novel derivatives of 2-amidocyclohex-1-ene carboxylic acid as HCA1, HCA2, and HCA3 receptor agonists. *GLISTEN Budapest 2014 Conference*, October 2–4, **2014**, Budapest, Hungary. Abstract booklet p. 57, ISBN: 978-963-7067-27-3

## LITERATŪRAS SARAKSTS / REFERENCES

1. Statistika par nāves cēloņiem – Eurostat. [http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Causes\\_of\\_death\\_statistics/lv](http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Causes_of_death_statistics/lv) (lapa skatīta 6.02.2018.).
2. Ērglis, A. *Kardiovaskulāro Slimību (KVS) Profilakses Vadlīnijas*; Rīga, 2007.
3. Bäck, M.; Hansson, G. K. Anti-Inflammatory Therapies for Atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol.* **2015**, *12* (4), 199–211.
4. Drugs@FDA: FDA Approved Drug Products. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&applno=076378> (lapa skatīta 5.09.2017.).
5. Linker, R. A.; Haghikia, A. Dimethyl Fumarate in Multiple Sclerosis: Latest Developments, Evidence and Place in Therapy. *Ther. Adv. Chronic Dis.* **2016**, *7* (4), 198–207.
6. Graff, E. C.; Fang, H.; Wanders, D.; Judd, R. L. Anti-Inflammatory Effects of the Hydroxycarboxylic Acid Receptor 2. *Metabolism.* **2016**, *65* (2), 102–113.
7. Tunaru, S.; Lattig, J.; Kero, J.; Krause, G.; Offermanns, S. Characterization of Determinants of Ligand Binding to the Nicotinic Acid Receptor GPR109A (HM74A/PUMA-G). *Mol. Pharmacol.* **2005**, *68* (5), 1271–1280.
8. Deng, Q.; Frie, J. L.; Marley, D. M.; Beresis, R. T.; Ren, N.; Cai, T. Q.; Taggart, A. K. P.; Cheng, K.; Carballo-Jane, E.; Wang, J.; Tong, X.; Waters, M. G.; Tata, J. R.; Colletti, S. L. Molecular Modeling Aided Design of Nicotinic Acid Receptor GPR109A Agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (18), 4963–4967.
9. Yang, F.; Zhang, Y.; Huang, J.; Cao, H. Homology Modelling of G-Coupled Protein Receptor 109A and Docking Simulation with Pyrazole Agonists. *Jisuanji Yu Yingyong Huaxue* **2016**, *33* (5), 569–574.
10. Imbriglio, J. E.; Chang, S.; Liang, R.; Raghavan, S.; Schmidt, D.; Smenton, A.; Tria, S.; Schrader, T. O.; Jung, J.-K.; Esser, C.; Taggart, A. K. P.; Cheng, K.; Carballo-jane, E.; Waters, M. G.; Tata, J. R.; Colletti, S. L. GPR109a Agonists. Part 1: 5-Alkyl and 5-Aryl-Pyrazole – Tetrazoles as Agonists of the Human Orphan G-Protein Coupled Receptor GPR109a. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (8), 2121–2124.
11. Palani, A.; Rao, A. U.; Chen, X.; Huang, X.; Su, J.; Tang, H.; Huang, Y.; Qin, J.; Xiao, D.; Degrado, S.; Sofolarides, M.; Zhu, X.; Liu, Z.; McKittrick, B.; Zhou, W.; Aslanian, R.; Greenlee, W. J.; Senior, M.; Cheewatrakoolpong, B.; Zhang, H.; Farley, C.; Cook, J.; Kurowski, S.; Li, Q.; van Heek, M.; Wang, G.; Hsieh, Y.; Li, F.; Greenfeder, S.; Chintala, M. Discovery of SCH 900271, a Potent Nicotinic Acid Receptor Agonist for the Treatment of Dyslipidemia. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3* (1), 63–68.
12. Shen, H. C.; Ding, F.-X.; Luell, S.; Forrest, M. J.; Carballo-Jane, E.; Wu, K. K.; Wu, T.-J.; Cheng, K.; Wilsie, L. C.; Krsmanovic, M. L.; Taggart, A. K.; Ren, N.; Cai, T.-Q.; Deng, Q.; Chen, Q.; Wang, J.; Wolff, M. S.; Tong, X.; Holt, T. G.; Waters, M. G.; Hammond, M. L.; Tata, J. R.; Colletti, S. L. Discovery of Biaryl Anthranilides as Full Agonists for the High Affinity Niacin Receptor. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (25), 6303–6306.
13. Raghavan, S.; Tria, G. S.; Shen, H. C.; Ding, F. X.; Taggart, A. K.; Ren, N.; Wilsie, L. C.; Krsmanovic, M. L.; Holt, T. G.; Wolff, M. S.; Waters, M. G.; Hammond, M. L.; Tata, J. R.; Colletti, S. L. Tetrahydro Anthranilic Acid as a Surrogate for Anthranilic Acid: Application to the Discovery of Potent Niacin Receptor Agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (11), 3163–3167.
14. Shen, H. C.; Ding, F.-X.; Raghavan, S.; Deng, Q.; Luell, S.; Forrest, M. J.; Carballo-Jane, E.; Wilsie, L. C.; Krsmanovic, M. L.; Taggart, A. K.; Wu, K. K.; Wu, T.-J.; Cheng, K.; Ren, N.; Cai, T.-Q.; Chen, Q.; Wang, J.; Wolff, M. S.; Tong, X.; Holt, T. G.; Waters,

- M. G.; Hammond, M. L.; Tata, J. R.; Colletti, S. L. Discovery of a Biaryl Cyclohexene Carboxylic Acid (MK-6892): A Potent and Selective High Affinity Niacin Receptor Full Agonist with Reduced Flushing Profiles in Animals as a Preclinical Candidate. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (6), 2666–2670.
15. Das, J. P.; Roy, U. K.; Roy, S. Synthesis of Alkynyl and Vinyl Selenides via Selenodecarboxylation of Arylpropionic and Cinnamic Acids. *Organometallics* **2005**, *24* (25), 6136–6140.
  16. Small-Molecule Drug Discovery Suite 2016-4. Schrödinger, LLC, New York, NY. 2016.
  17. Bento, A. P.; Gaulton, A.; Hersey, A.; Bellis, L. J.; Chambers, J.; Davies, M.; Krüger, F. A.; Light, Y.; Mak, L.; McGlinchey, S.; Nowotka, M.; Papadatos, G.; Santos, R.; Overington, J. P. The ChEMBL Bioactivity Database: An Update. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42* (D1), D1083–D1090.
  18. Colletti, S. L.; Imbriglio, J. E.; Beresis, R. T.; Frie, J. L. Niacin Receptor Agonists, Compositions Containing Such Compounds and Methods of Treatment. WO2007035478 (A2), 2006.
  19. Shen, H. C.; Ding, F.-X. X.; Raghavan, S.; Deng, Q.; Luell, S.; Forrest, M. J.; Carballo-Jane, E.; Wilsie, L. C.; Krsmanovic, M. L.; Taggart, A. K.; Wu, K. K.; Wu, T.-J. J.; Cheng, K.; Ren, N. N.; Cai, T.-Q. Q.; Chen, Q.; Wang, J.; Wolff, M. S.; Tong, X.; Holt, T. G.; Waters, M. G.; Hammond, M. L.; Tata, J. R.; Colletti, S. L. Discovery of a Biaryl Cyclohexene Carboxylic Acid (MK-6892): A Potent and Selective High Affinity Niacin Receptor Full Agonist with Reduced Flushing Profiles in Animals as a Preclinical Candidate. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (6), 2666–2670.
  20. Imbriglio, J. E.; Dirocco, D.; Bodner, R.; Raghavan, S.; Chen, W.; Marley, D.; Esser, C.; Holt, T. G.; Wolff, M. S.; Taggart, A. K. P.; Waters, M. G.; Tata, J. R.; Colletti, S. L. The Discovery of High Affinity Agonists of GPR109a with Reduced Serum Shift and Improved ADME Properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (9), 2721–2724.
  21. Patani, G. A.; LaVoie, E. J. Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design. *Chem. Rev.* **1996**, *96* (8), 3147–3176.
  22. Ciapetti, P.; Giethlen, B. In *The practice of medicinal chemistry*; Wermuth, C. G., Ed.; 3<sup>rd</sup> Edition, Academic Press, Elsevier Ltd.: London, UK, **2008**, p. 290.
  23. Polyák, M.; Varga, G.; Szilágyi, B.; Juhász, L.; Docsa, T.; Gergely, P.; Begum, J.; Hayes, J. M.; Somsák, L. Synthesis, Enzyme Kinetics and Computational Evaluation of N-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl) Oxadiazolecarboxamides as Glycogen Phosphorylase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21* (18), 5738–5747.