

## PROGRESS REPORT, NN 126968, 2021

### Novel butyrylcholinesterase reactivators for the pseudocatalytic inactivation of organophosphates.

### (Új butirilcholinesteráz reaktivátorok organofoszfátok pszeudo-katalitikus inaktiválása céljából).

#### Introduction

Both pralidoxime and obidoxime are still the gold standards of oxime antidotes for the reactivation of inhibited cholinesterase enzymes in organophosphate poisoning. However, its efficacy is not satisfactory. Kuca et al (Department of Chemistry, University of Hradec Kralove, Czech Republic) have synthesized a large number of pyridinium aldoximes (PyAls) to replace and improve the application of pralidoxime. An international cooperation was formed to study these newly discovered effective compounds. Our part in this cooperation was to study *in vivo* pharmacokinetics. Our preliminary studies were done using both Wistar rats and Beagle dogs when the *in vivo* pharmacokinetics of K-203 was carried out and reported.

#### Results

A high-throughput, cost-effective HPLC-UV (high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection) determination method was elaborated, validated and used for the quantitative determination of bispyridinium aldoxime cholinesterase reactivators following their *in vivo* treatments on rats.

*In vivo* pharmacokinetic studies were performed using all the target compounds (K-117; K-127; K-203; K-269; K-347; K-867; K-868; K-870; K-1557; K-1558, as well as, KR-26352; KR-26354).

K-117 (bis-aldoximes) and K-127 (mono-aldoxime-mono-acid-amide) showed similar pharmacokinetics. Their serum levels were nearly proportional to the dose given in the range of 0.1 through 10.0  $\mu\text{mol}$ .

K-269 and K-347 are relatively apolar pyridinium aldoximes, they have an extremely short stay in rats' bodies. K-269 is an oxygen-bridged bis-pyridinium mono-aldoxime, while the second „aldoxime-like” substituent has an extra amino group. Their limited solubility does not make it possible to increase their dose over 10  $\mu\text{mol}$  i.m. This dose-dependence (between 0.1 through 10  $\mu\text{mol}$  i.m.) showed that serum concentration was practically proportionally increasing with the dose. Time-dependent pharmacokinetics of K-269 show that almost 10% of its serum concentration penetrates through BBB. K-347 was the single mono-pyridinium compound, therefore it was the less polar (most apolar with a logP of -1.89). It has a short  $t_{1/2}$ , such as 30 minutes. Contrary to bis-pyridinium compounds, the elimination of -K347 takes place through the liver (liver concentration was about one half of that of kidneys).

K-867, K-868 and K-870 are chlorine-substituted derivatives of K-203.(bis-pyridinium mono-aldoximes). A 30  $\mu\text{mol}$  dose was injected from

each compound for comparison. K-203 gives an early maximum of its serum concentration (at 15 min following i.m. injection), while chlorine-substituted derivatives extended the high serum concentration for 60 min.

When K-870 was injected in a high dose (100  $\mu\text{mol}$ , i.m), its serum level went over 100  $\mu\text{mol/liter}$ .

K-1557 and K-1558 are bis-pyridinium mono aldoximes with relatively large hydrophobic substituents on the pyridinium ring. They give relatively long maximum serum levels.

*In silico* and *in vitro* models were applied to simulate the reactivation potency of K-456 and K-733. Concentration versus activity shows a nearly linear curve.

Binding sites were also modelled for K-456 and K-733 using paraoxone-toxicated molecules. Results have been published.

K-1557; K-1558 and KR-26352; KR-26354 compounds have alkyl-substituents, they are not subjected to metabolism. Their elimination is done by the kidneys, partially by glomerular filtration and partially by tubular secretion. When the molecular size is increased, glomerular filtration is essentially decreased (sometimes to zero). This is the reason why their elimination is slowed down so much – that the substitution makes the preparation retard: a drug with preparation – drug with

extended elimination. Publication of the pharmacokinetics of K-1557; K-1558, KR-26352 and KR-26354 is waiting for the consent of Prof. Musilek, who synthesized these compounds. However, their pharmacokinetics do not give any surprise compared to that of the chloride substituted pyridinium aldoximes (K-867, K-868 and K-870)

## **Conclusions**

The pharmacokinetics of pyridinium aldoximes can be determined using *in vivo* experiments on rats, and HPLC determination of the PyAl content. Their level should be increased, as at least over 1 mmol/liter concentration is required for the effective regeneration of the BuChE enzyme, and our experiments indicated just over 100  $\mu\text{mol/liter}$  when we gave the maximum dose (100  $\mu\text{mol}$ ) i.m. The solubility of these PyAls should be increased to improve effectivity. An increased drug level in the serum will be the rate-limiting step for discovering well-usable PyAls. Retard-type compounds can be done attaching further substituent (either alkyl or halogen) on the pyridinium ring.

Huba Kalász, Ph.D.

Principal Investigator

---

Kalász, H., Karvaly, G., Musilek, K., Kuca, K., Young-Sik, J., Malawska, B., Adeghate, E., Nurulain, S.M., Szepesy, J., Zelles, T., Tekes, K. Dose-dependent tissue distribution of K-117, a bis-pyridinium aldoxime. in rats. *The Open Medicinal Chemistry Journal*, **2019**, *13*, 1-6.

Tekes, K., Karvaly, G., Nurulain, S., Kuca, K., Musilek, K., Adeghate, E., Jung, Y.S., Kalász, H.: Pharmacokinetics of K117 and K127, two novel antidote candidates to treat Tabun poisoning. *Chem. Biol. Interact.*, 310, 5-8 (2019).

Iqbal, A., Malik, S., Nurulain, S.M., Musilek, K., Kuca, K., Kalasz, H., Fatmi, M.Q.: Reactivation potency of two novel oximes (K456 and K733) against paraoxon-inhibited acetyl and butyrylcholinesterase: *In silico* and *in vitro* models. *Chem. Biol. Interact.* 310, 55-59 (2019).

Kalász, H., Karvaly, G., Szimrók, F., Szabó, D., Milánkovits, M., Kuca, K., Keglevich, A., Darvas, F., Tekes, K.: Analysis and peculiar pharmacokinetics of K347, a potential antidote in organophosphate poisonings. *The Open Medicinal Chemistry Journal*, 14, 99-107 (2020).

Kalász, H., Szimrók, Z., Karvaly, G., Adeghate, J., Tekes, K.: Pharmacokinetics of two chlorine-substituted bis-pyridinium mono-aldoximes with regenerating effect on butyrylcholinesterase. *Molecules*, 25, 1250-1259 (2020).

Karvaly, G.B., Tekes, K., Szimrók, Z., Fűrész, J., Kuca, K., Kalász, H.: A fieldable, high-throughput, cost-efficient high performance liquid chromatography-ultraviolet detection (HPLC-UV) method for the quantitation of bispyridinium quaternary aldoxime cholinesterase reactivators in blood. *Acta Chromatographica*, 33, 134-144 (2021).

## Bevezetés

Jelenleg is pralidoxim és obodoxim használatos az organofoszfát mérgezéseknél történő kolinészteráz enzim-bénítés kezelésére, ezek hatásossága azonban nem megfelelő. Kamil Kuca professzor és munkatársai a Hradec Kralove Egyetem Kémiai Intézetében számos piridinium-aldoxim származékot (PAld) szintetizáltak, hogy a pralidoximnál hatásosabb gyógyszert nyerjenek. Nemzetközi kooperációban történik ezeknek a vegyületeknek a vizsgálata, mi az u.n. *in vivo* farmakokinetikát végezzük. Kísérletes munkánk Wistar patkány, esetenként Beagle kutya felhasználásával történik, hasonlóan a közelmúltban a K-203 vegyülettel végzett és publikált munkánkhoz hasonlóan történik.

## Eredmények

Patkányok i.m. kezelését követően nagyhatékonyságú HPLC-UV módszerrel végeztük a PAld szintjének meghatározását szérumban, agyban, cerebroszpinális folyadékban, májban, vesében, szemben, herében, esetenként hallójáratban is. Vizsgálataink során K-117, K-127, K-203, K-269, K-347, K-867, K-868, K-870, K-1557, K-1558, KR-26352 és KR-26354 szerkezetbeni sorsát vizsgáltuk.

A bis-aldoxim K-117 és mono-aldoxim-savamid K-127 szerkezetbeni sorsa nagyon hasonló volt. Szérum szintjük a dózissal arányos volt, 0,1 és 10 mikromol/dózis között.

A K-269 (oxigán-tartalmú híd van jelen a két piridinium-gyűrű között) és a K-347 ((extra amino-csoportot tartalmaz) relative apoláros PAld-ok, nagyon rövid ideig vannak jelen a patkány szervezetében.

Oldékonyságuk limitált, azaz maximum i.m. dózisuk 10 mikromol/patkány. A K-269 dózisának mintegy 10%-a bejutott az agyba. A K-347 csak egy piridinium részt tartalmaz, így kevésbé poláris vegyület. Ellentétben a többi PAld vegyülettel, a májban metabolizálódik.

Három PAld (K-867, K-868 és K-870) klór szubsztituenst tartalmaz. Összehasonlítva az „alap” K-203-mal,  $t_{1/2}$  értékük jelentősen megnőtt. K-870 esetében 100  $\mu\text{mol}$  i.m, azaz nagy dózisa magas szérum koncentrációt, azaz 100  $\mu\text{mol/liter}$ - eredményez.

A K-1557 és K-1558 bis-piridinium-mono-aldoximok, melyek további hidrofób szubsztituenst is tartalmaznak a KR-26352 és KR-26354 vegyületekhez hasonlóan. Relative hosszán vannak jelen a szérumban,

hiszen nem metabolizálódnak, és glomeruláris szűréssel való eliminációjuk méretüknél fogva gátolt lehet. Kísérleteink azt mutatják, hogy „retard” vegyület a molekula méretének növelésével (is) előállítható. Ezt, az általunk jelent kutatási vizsgálatok során felfedezett jelenséget mutatják a klorid származékok, azaz K-867, K-868 és K-870 is. A jelenség publikációja a cseh kollegák (különösen Prof. Musilek) beleegyezésétől függ.

### **Az eredmények megbeszélése, konklúziók**

A piridium aldoximok farmakokinetik jellemzői patkány modellen , *in vivo* körülmények között HPLC módszerrel jól vizsgálhatók. A butiril-kolinészteráz megfelelő regenerálásához minimum 100  $\mu\text{mol}$  i.m. dózis szükséges, melyet egyes anyagok oldhatósága korlátozhat. Amennyiben retard hatóanyagot akarunk előállítani, az „alap” PAld vázra további szubsztituenst (alkil- vagy halogén) lehet/kell tenni.,