

Novas Perspectivas para a Terapia Antiplaquetária: A Evolução dos Antagonistas do Receptor P2Y₁₂

New Perspectives for Antiplatelet Therapy: The Evolution of P2Y₁₂ Receptor Antagonists

Paula Nogueira da Silva,^a Maria Leticia de Castro Barbosa^{a,*} 

^aUniversidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Farmácia, Laboratório de Síntese Orgânica e Química Medicinal, Av. Carlos Chagas Filho 373, Centro de Ciências da Saúde, Bloco A subsolo, sala 34, Cidade Universitária, CEP: 21941-902, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

*E-mail: marialeticia@pharma.ufrj.br

Recebido: 17 de Novembro de 2020

Aceito: 2 de Março de 2021

Publicado online: 20 de Abril de 2021

The therapeutic arsenal of antiplatelet drugs available for clinical use has expanded significantly in recent decades. However, despite this, cardiovascular diseases associated with thromboembolic disorders still represent the main cause of mortality in Brazil and around the world. This panorama indicates the urgent demand for the development of more effective and safer novel therapeutic alternatives. In this context, P2Y₁₂ receptor antagonists stand out, once these drugs represent the first-choice treatment in the management of coronary artery disease and other cardiovascular disorders. This paper provides an historical overview of the evolution of these antagonists, starting from the first agents, following with the description of the development of P2Y₁₂ antagonists currently in clinical use, and finally reporting the most recent discovery of new structural patterns for modulation of this key therapeutic target. In addition to reviewing and updating the topic, this work provides a useful collection of structural information for further design of new chemical entities as P2Y₁₂ receptor antagonists.

Keywords: P2Y₁₂ receptor; antiplatelet; drugs; cardiovascular diseases.

1. Doenças Cardiovasculares: Um Grave Problema de Saúde Pública

Doenças cardiovasculares (DCV) associadas a desordens tromboembólicas representam a principal causa de mortalidade por doenças não transmissíveis na população mundial.¹

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou em 2015 que 17,5 milhões de pessoas morrem todos os anos vítimas de DCV, associadas principalmente à doença arterial coronariana (DAC) e acidentes vasculares cerebrais (AVC), totalizando aproximadamente 31 % das causas de óbito em nível global. De acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC), as DCV são a principal causa de mortalidade também no Brasil (Gráfico 1).

Segundo o Ministério da Saúde do Brasil, as DCV são responsáveis por aproximadamente 20 % dos óbitos da população com mais de 30 anos de idade, principalmente devido a infarto e AVC. Os principais fatores de risco para o aparecimento das DCV, bastante prevalentes na população brasileira, são obesidade, dislipidemia, consumo excessivo de álcool, sedentarismo e hipertensão, que, quando não controlada, está associada à ocorrência de lesões na aorta,

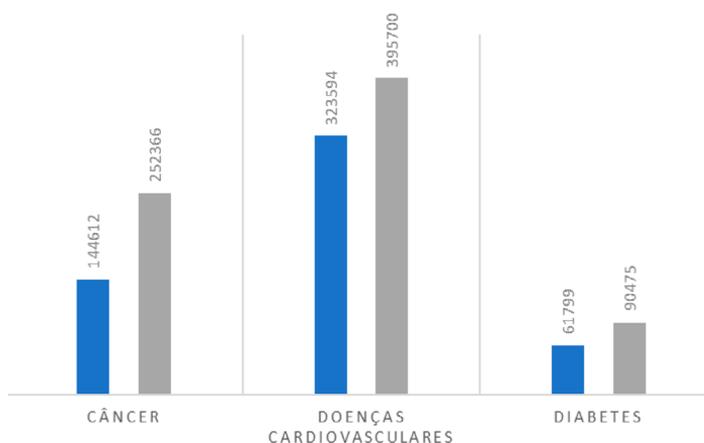


Gráfico 1. Principais causas de morte no Brasil relacionadas a doenças não transmissíveis nos anos 2000 (azul) e 2018 (cinza). Total de mortes em 2000 (1.038.222 pessoas) e 2018 (1.387.309 pessoas) (Sociedade Brasileira de Cardiologia – fonte: www.cardiometro.com.br/antiores.asp, acessado em 28 setembro 2020)

com sobrecarga cardíaca. A grande prevalência e a alta taxa de morbidade e mortalidade relacionadas às DCV determinaram que o Brasil figurasse entre os 10 países com maior índice de morte por DCV, acarretando um alto consumo de recursos financeiros em insumos e profissionais do Sistema Único de Saúde (SUS).²

2. A Hemostasia e a Patogênese das Doenças Tromboembólicas

A hemostasia refere-se ao processo fisiológico e dinâmico regulado de forma que permita tanto a interrupção da perda sanguínea e o reparo de um vaso lesado quanto a manutenção da fluidez e perfusão sanguínea dos órgãos vitais. As plaquetas são as principais responsáveis pela manutenção da hemostasia durante a lesão do endotélio vascular, atuando por meio de sua adesão ao endotélio, agregação, além da produção e secreção de mediadores deste processo. A função das plaquetas é regulada por três categorias de substâncias que são classificadas de acordo com o local de síntese e ação.^{3,4}

A primeira categoria consiste em sinalizadores produzidos fora das plaquetas que atuam através da interação com receptores presentes na membrana plaquetária, como, por exemplo, catecolaminas, colágeno, trombina (Figura 1) e prostaciclina. A segunda categoria é representada por agentes produzidos no interior das plaquetas, os quais atuam interagindo com receptores de membrana, como, por exemplo, o ADP (difosfato de adenosina; do inglês, *adenosine diphosphate*) (Figura 1), prostaglandina D₂, prostaglandina E₂, tromboxano A₂ (TXA₂) (Figura 1) e serotonina (5-HT). Já a terceira categoria inclui os agentes produzidos no interior das plaquetas, com ação dentro da própria plaqueta, como endoperóxidos de prostaglandina, nucleotídeos cíclicos, como o AMPc (monofosfato de adenosina cíclico;

do inglês, *cyclic adenosine monophosphate*) e GMPc (monofosfato de guanosina cíclico; do inglês, *cyclic guanosine monophosphate*) e íons de cálcio.^{3,4}

Os vasos sanguíneos são revestidos por uma camada de células endoteliais que apresentam um fenótipo anticoagulante, de forma que as plaquetas circulantes e os fatores de coagulação normalmente não se aderem de maneira considerável a essas células. Entretanto, na presença de uma lesão, ocorre a alteração do perfil para um fenótipo pró-coagulante. Desse modo, após a lesão vascular, as plaquetas se aderem às proteínas reativas das regiões subendoteliais do vaso sanguíneo, *e.g.* colágeno e o fator von Willebrand (FvW), e se agregam, resultando na formação do tampão hemostático primário.³

Após a adesão plaquetária inicial na matriz extracelular, o processo de reparação requer uma rápida resposta das plaquetas, orquestrada por diferentes mediadores autócrinos e parácrinos, incluindo o ADP, a trombina, epinefrina, 5-HT e o TXA₂. O TXA₂ atua como ativador plaquetário e potente vasoconstritor. Outros sinalizadores são secretados a partir dos grânulos plaquetários, dentre eles o ADP e a 5-HT. O ADP é um poderoso indutor da agregação plaquetária e a 5-HT estimula a agregação e a vasoconstrição. A ativação plaquetária, enfim, resulta em uma mudança conformacional no receptor membranar de glicoproteína IIb-IIIa (GPIIb/IIIa), possibilitando a sua interação com o fibrinogênio, que estabelece ligações cruzadas entre plaquetas adjacentes para reforço do agregado plaquetário (Figura 1). Na formação do tampão hemostático, a cascata de coagulação também tem papel de destaque, compreendendo um processo sequencial no qual os fatores de coagulação sanguínea interagem entre si e são, conseqüentemente, ativados, culminando na formação da rede de fibrina, que é o principal componente proteico do coágulo sanguíneo, sendo responsável por sua estabilização.³⁻⁶

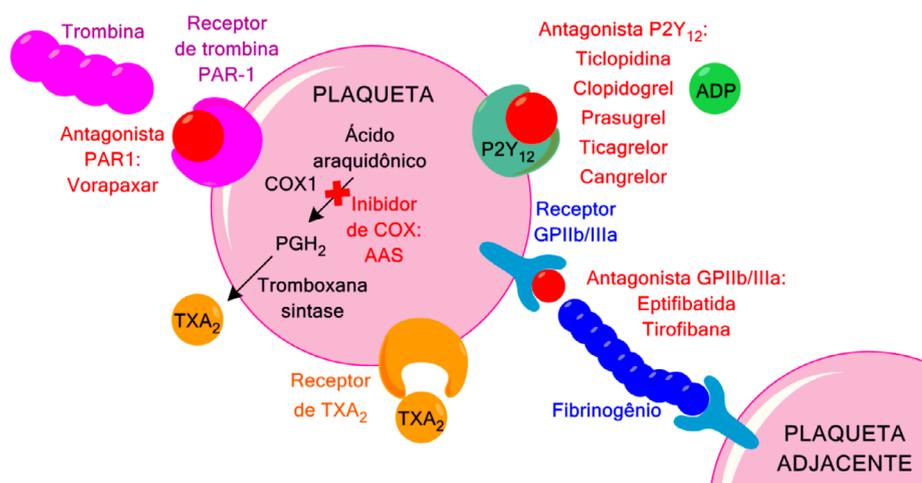


Figura 1. Alvos farmacológicos modulados pelos principais fármacos antiplaquetários em uso clínico. As principais classes de fármacos antiplaquetários estão destacadas em vermelho. ADP: difosfato de adenosina; AAS: Ácido acetilsalicílico; COX1: enzima ciclooxigenase 1; GPIIb/IIIa: receptor GPIIb/IIIa, ou α Ib β 3, responsável pela ligação cruzada entre plaquetas adjacentes mediada pelo fibrinogênio; PAR-1: receptor de trombina, envolvido na etapa de ativação plaquetária; PGH₂: prostaglandina H₂; P2Y: receptor purinérgico de ADP; TXA₂: tromboxano A₂

Estes eventos fisiológicos visando corrigir um vaso lesado são essenciais para a manutenção da vida e para a preservação da perfusão sanguínea para os demais tecidos e órgãos. Entretanto, os mecanismos envolvidos na formação de agregados plaquetários também podem ser danosos quando não controlados, resultando, por exemplo, em oclusão vascular, necrose de tecidos e infarto.⁷

A trombose é um processo desencadeado pela formação desregulada de um tampão hemostático, ou trombo, no interior dos vasos sanguíneos, culminando em diferentes distúrbios que compõem um amplo conjunto de DCV.^{4,7} De acordo com a localização do tampão hemostático formado, a trombose subdivide-se em arterial e venosa.⁴

O trombo arterial é constituído basicamente por agregado plaquetário, pobre em fibrina, conduzindo a processos de oclusão arterial que resultam no desenvolvimento de doenças graves como, por exemplo, necroses isquêmicas, isquemia distal dos membros ou órgãos vitais, DAC e infarto agudo do miocárdio (IAM) e AVC.⁶⁻⁹ A cardiopatia isquêmica e os AVC representam as principais complicações desencadeadas pela trombose arterial, sendo as principais causas de mortalidade mundial por doenças não transmissíveis.

A trombose venosa, por sua vez, é caracterizada pelo desenvolvimento do trombo no interior das veias, o qual pode ser formado inclusive na ausência de dano vascular, como resultado de uma amplificação na ativação das proteínas da cascata de coagulação. Ocorre, então, a formação de coágulos venosos, ricos em fibrina, os quais contêm grande quantidade de eritrócitos retidos, podendo causar edema pronunciado e dor intensa. Segundo a SBC, fatores genéticos e ambientais estão intrinsecamente associados ao aumento nos riscos do desenvolvimento de tromboembolismo. A clássica tríade de risco de Virchow (estase sanguínea, lesão vascular e hipercoagulabilidade) reflete a importância da genética na patogênese das doenças tromboembólicas, sendo os fatores ambientais principalmente associados a procedimentos cirúrgicos e traumas. Trombose venosa profunda e embolismo pulmonar são usualmente referidos como tromboembolismo venoso, o qual representa a terceira principal causa de morte por DCV, depois do infarto do miocárdio e dos AVC.^{3,6}

Cabe ressaltar que, uma vez que a trombose arterial difere da trombose venosa, a terapia utilizada para o tratamento destas enfermidades é também distinta. A trombose arterial é usualmente tratada pelo emprego de fármacos antiplaquetários, enquanto a trombose venosa tem seu tratamento baseado em fármacos moduladores da cascata de coagulação, denominados anticoagulantes.⁶

3. Receptores Purinérgicos: Foco no Receptor P2Y₁₂

O ADP é um importante sinalizador fisiológico que tem papel vital na regulação da hemostasia. Atua também ampliando os efeitos de outros agentes endógenos, sendo considerado um importante mediador da função plaquetária.

Possui ação sobre três receptores purinérgicos, nomeados: P2Y₁, P2Y₁₂ e P2X₁.^{10,11}

Os receptores purinérgicos fazem parte de uma classe de receptores presentes em superfície de células que podem ser categorizados como: receptor de adenosina (receptor P1) ou receptor de nucleotídeos (receptor P2). A superfamília de receptores P2 é composta de duas subfamílias designadas P2X e P2Y, sendo a subfamília P2X acoplada a canais iônicos, incluindo sete subtipos (P2X₁-P2X₇), enquanto a subfamília P2Y é acoplada à proteína G e é composta por 8 subtipos (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄).¹¹⁻¹⁴

O agonismo do receptor P2Y₁ é responsável por causar uma rápida mudança na forma das plaquetas, acarretando uma agregação plaquetária inicial reversível, além de induzir a síntese de TXA₂ e consequente efeito pró-coagulante. De forma sinérgica, a ativação do receptor P2Y₁₂, em associação com o P2Y₁, é essencial para a progressão completa da ação plaquetária e para a agregação persistente. Deste modo, o bloqueio desses receptores ocasiona em uma significativa redução da agregação plaquetária induzida pelo ADP.¹²

O receptor P2Y₁ é distribuído por diversos tecidos, como o coração, vasos sanguíneos, tecido neural, testículos, próstata e ovários. A ativação da proteína G estimulatória (Gq) acoplada ao receptor P2Y₁ resulta na ativação da PLC (fosfolipase C; do inglês, *phospholipase C*), estimulando a geração de segundos mensageiros como o trifosfato de inositol (IP3) e o diacilglicerol (DAG). O IP3 mobiliza cálcio para o meio intracelular, enquanto o DAG ativa as isoformas da proteína cinase C, e essa ativação acarreta a mudança das formas das plaquetas e contribui para a agregação plaquetária e a geração de TXA₂, mediada pelo ADP.^{10,15,16}

O segundo receptor de ADP é o P2Y₁₂, que atua acoplado à proteína G inibitória (Gi) e apresenta grande similaridade com o receptor P2Y₁. Esse receptor é importante para a potencialização da ativação das plaquetas mediada por agentes fisiológicos, incluindo o colágeno, FvW e o TXA₂, e medeia a estabilização da agregação plaquetária induzida por trombina ou pelo próprio TXA₂. A ativação do receptor P2Y₁₂ pelo ADP libera a subunidade αi da proteína Gαi, acarretando a inibição da adenilato ciclase e reduzindo os níveis intracelulares de AMPc. Já a subunidade βy ativa a fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), que está envolvida na ativação do receptor GPIIb/IIIa, também denominado α_{IIb}β₃, o qual por sua vez é essencial para a agregação, permitindo a ligação cruzada entre plaquetas mediada por moléculas de fibrinogênio (Figura 1).^{10,15,17}

A distribuição tecidual do receptor P2Y₁₂ parece ser majoritária no cérebro e plaquetas, sendo considerada bem mais restrita quando comparada ao P2Y₁, embora já existam relatos da sua presença em leucócitos, células endoteliais, células musculares lisas de vasos sanguíneos e células dendríticas.^{12,18} Uma vez que o P2Y₁₂ é essencial para a ativação plaquetária persistente e para a formação de trombos, antagonistas potentes, seletivos e de ação periférica são empregados amplamente como fármacos antitrombóticos.^{15,18}

O terceiro receptor de ADP é o P2X₁, que é um canal iônico e a sua ativação acarreta o influxo de cálcio para o meio intracelular. A ativação desse receptor isoladamente não é capaz de estimular a agregação plaquetária, entretanto causa mudança na forma das plaquetas e auxilia na ativação mediada por outros agonistas.¹⁰

4. Fármacos antiplaquetários em uso clínico: a importância dos antagonistas do receptor P2Y₁₂

Os fármacos antiplaquetários são uma classe de medicamentos largamente utilizados no tratamento de transtornos cardiovasculares, principalmente abrangendo a modulação de receptores de adesão plaquetária específicos, *e.g.* GPIIb/IIIa; receptores acoplados à proteína G, *e.g.* PAR-1, P2Y₁₂; e suas respectivas vias de sinalização como alvos terapêuticos.¹⁹

O primeiro fármaco aprovado como antiplaquetário foi o ácido acetilsalicílico (AAS) (Aspirina®; **1**, Figuras 1 e 2), um anti-inflamatório não esteroideal (AINE) o qual passou a ser empregado clinicamente com esta nova finalidade antitrombótica a partir da década de 50, sendo ainda hoje indicado como a primeira opção para a prevenção primária do AVC. Além do efeito antitrombótico, esse fármaco apresenta propriedades indiretas relevantes nas DCV, incluindo a modulação de citocinas inflamatórias, radicais livres e fatores de crescimento. Após alguns anos, diversos estudos de farmacovigilância constataram que o uso crônico do AAS estava associado ao aumento dos riscos de lesões gastrointestinais, principalmente a hemorragia gástrica.^{4,7,20,21}

Este cenário estimulou a busca da indústria farmacêutica pelo desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento de DCV. Ao longo das décadas, foi desenvolvida uma nova classe de fármacos antiplaquetários, os antagonistas do receptor P2Y₁₂, sendo eles subclassificados a partir de três critérios principais: (i) administração oral e/ou intravenosa; (ii) pró-fármacos ou fármacos de ação direta; e (iii) antagonistas de ligação irreversível ou reversível.¹⁸

Os tienopiridínicos representam a primeira série de antagonistas P2Y₁₂ identificada. A ticlopidina (**2**; Ticlid®) foi desenvolvida em 1978, sendo o primeiro antagonista representante desta classe de fármacos aprovado pela agência regulatória americana *Food and Drug Administration* (FDA) em 1991. Em 1997, foi aprovado o seu análogo clopidogrel (**3**; Plavix®), mais potente e menos tóxico quando comparado ao seu antecessor (Figuras 1 e 2).²²

Após a era dos primeiros antagonistas do receptor P2Y₁₂, surgem os antagonistas do receptor de glicoproteína IIb-IIIa (GPIIb/IIIa), classe que demonstrou eficácia e benefício clínico em pacientes com ACS (síndrome coronariana aguda; do inglês, *acute coronary syndrome*). A eptifibatida (**4**, Integrilin®) foi aprovado pela FDA em 1998. Já em 1999, foi desenvolvida a tirofibana (**5**, Aggrastat®) (Figuras

1 e 2). No entanto, o emprego clínico destes antagonistas ainda é limitado devido ao maior risco hemorrágico quando comparados aos antagonistas P2Y₁₂, sendo estes indicados apenas para um pequeno grupo de pacientes de alto risco ou em fase de pré-tratamento.¹⁹

O surgimento de uma nova geração de tienopiridínicos é representado pelo prasugrel (**6**; Efficient/Efient®), o qual apresenta melhorias na potência, estabilidade metabólica e seletividade, além de menor variação interindividual, quando comparado aos seus antecessores, tendo sido aprovado em 2009. Posteriormente, em 2010, surge uma nova classe de antagonistas P2Y₁₂, desenvolvidos como análogos do ATP (trifosfato de adenosina; do inglês, *adenosine triphosphate*). O ticagrelor (**7**; Brilinta®) foi o primeiro representante desta classe ativo pela via oral, sendo aprovado em 2011. Já em 2015, o cangrelor (**9**; Kengreal®) foi o primeiro antagonista desenvolvido para administração pela via intravenosa (Figuras 1 e 2).^{12,18}

Mais recentemente, surgiu uma nova classe de fármacos antiplaquetários, representada pelos antagonistas do receptor ativado por protease 1 (PAR-1). Esta classe de antiplaquetários atua prevenindo a clivagem do domínio extracelular do receptor PAR-1 pela trombina, uma vez que a protease trombina também é responsável por induzir a ativação das plaquetas através da clivagem destes receptores. Estes fármacos não interferem, no entanto, nas demais funções da trombina na cascata de coagulação. Considera-se que os fármacos que atuam por este mecanismo de modulação da ativação plaquetária apresentam maior potência quando comparados aos moduladores das demais vias. Atualmente, existem dois antagonistas de PAR-1 com dados de ensaios clínicos disponíveis: vorapaxar (**8**, Zontivity®) (Figuras 1 e 2) e atopaxar.^{19,22}

O vorapaxar (**8**, Zontivity®) foi aprovado pela agência regulatória americana FDA em 2014 e pela *European Medicines Agency* (EMA) em 2015. Este fármaco foi aprovado pela FDA para redução de eventos tromboticos cardiovasculares em pacientes com histórico de IAM ou com Doença Arterial Periférica (DAP). Já a EMA aprovou a utilização desse medicamento para a redução de eventos tromboticos cardiovasculares em pacientes com histórico de IAM.²²

No contexto do tratamento de DCV, os agentes antiplaquetários são considerados úteis a curto e longo prazo para a prevenção e tratamento de diversas comorbidades cardíacas e complicações tromboticas. As terapias antiplaquetárias têm apresentado avanço significativo ao longo dos anos, sendo reportadas em diversos ensaios clínicos com significativa eficácia e segurança quando utilizadas em associação ou isoladamente. Atualmente, a terapia padrão para a DAC são os antiplaquetários clopidogrel (**3**; Plavix®) ou prasugrel (**6**; Efficient/Efient®) (Figura 1) associados ao AAS (**1**; Aspirina®). Esses medicamentos apresentam décadas de experiência clínica de uso, além de dados de segurança e eficácia aceitáveis, sendo amplamente úteis na

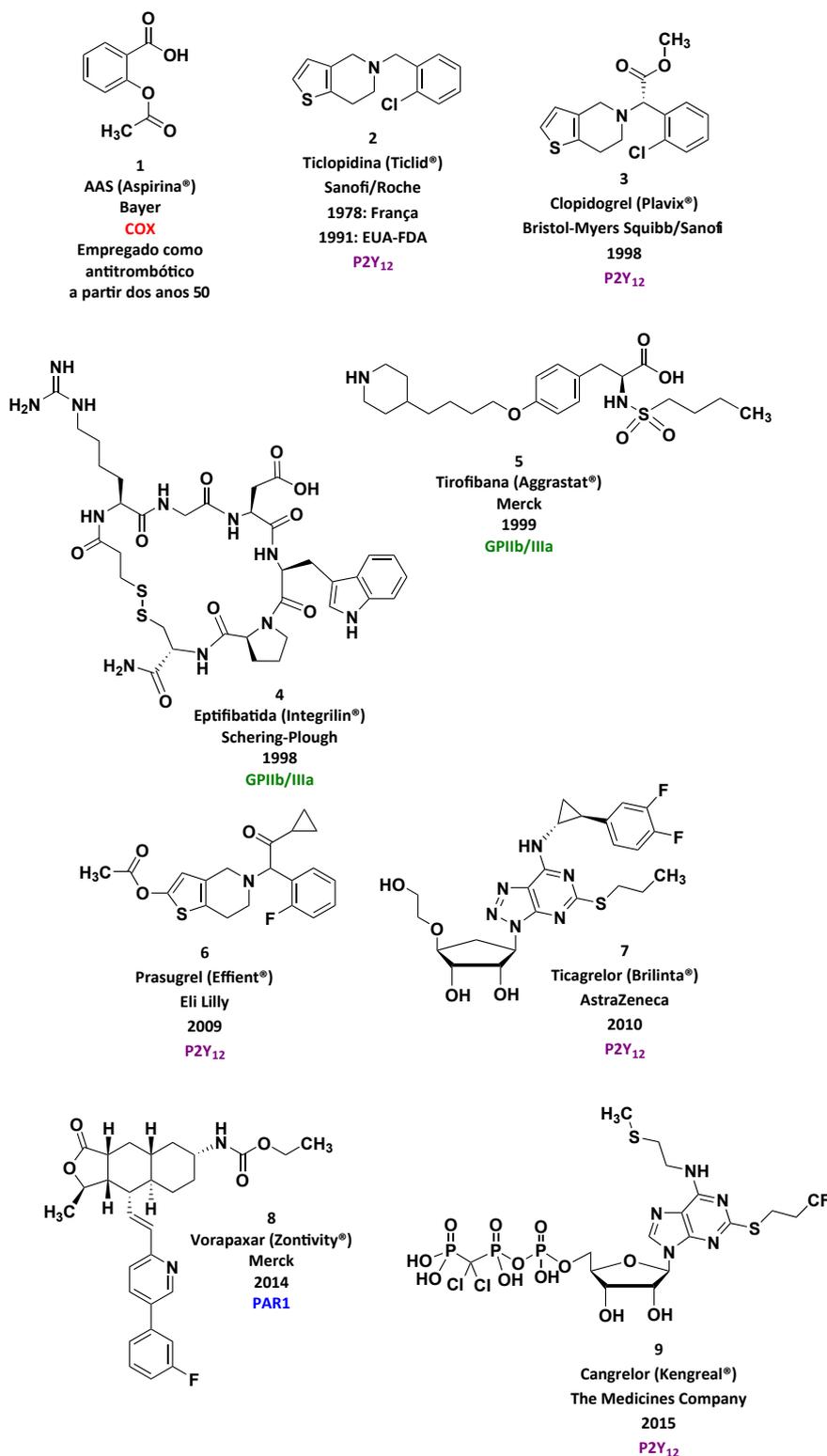


Figura 2. Principais fármacos antiplaquetários já aprovados para uso clínico no tratamento de doenças cardiovasculares e seus respectivos alvos farmacológicos

prática clínica na redução dos riscos de infarto e AVC, a despeito de não serem totalmente isentos de riscos.^{12,23}

Apesar do fármaco **3** continuar sendo reconhecido como tratamento padrão para DCV, este antagonista apresenta limitações, dentre elas a ampla variabilidade interindividual associada ao metabolismo do fármaco, devido principalmente

à alta incidência de polimorfismo em enzimas da família do citocromo P450 (CYP450) e à incidência de interações medicamentosas, resultando em redução da eficácia em 1/3 dos pacientes tratados. Dessa forma, a busca por novos fármacos antitrombóticos com propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas otimizadas e com menor variação

interindividual é de extrema relevância para a identificação de alternativas terapêuticas mais seguras e eficazes.^{4,21,24}

4.1. Antagonistas Irreversíveis do Receptor P2Y₁₂: Tienopiridínicos

Os tienopiridínicos são uma família de pró-fármacos antagonistas irreversíveis do receptor P2Y₁₂, necessitando, portanto, da ativação por enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos para a obtenção de seus metabólitos ativos. Esta classe de fármacos antiplaquetários inclui a ticlopidina (**2**), o clopidogrel (**3**) e o prasugrel (**6**) (Figuras 1 e 2).²⁵

O mecanismo de ação desses fármacos consiste no bloqueio da interação do ADP com o receptor P2Y₁₂. Após a conversão metabólica, ocorre a formação de um

metabólito ativo contendo o grupamento tiol livre, que permite a formação de ligação covalente com as cisteínas (Cys-97 e Cys-175) do receptor P2Y₁₂ (Figuras 3, 4 e 5). Como consequência, não há ativação da PI3K e o receptor de superfície GPIIb/IIIa não realiza interações com o fibrinogênio, culminando na inibição da agregação plaquetária (Figuras 1 e 2).^{20,21,26}

4.1.1. Ticlopidina

A aplicabilidade da classe dos tienopiridínicos para o tratamento de DCV foi descoberta ao acaso por pesquisadores franceses na década de 70. Inicialmente, os pesquisadores propuseram uma nova série de derivados tienopiridínicos, baseada em substâncias desta classe

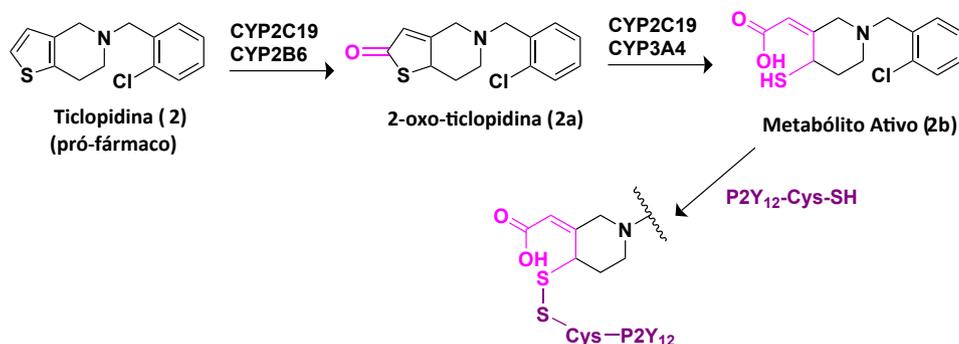


Figura 3. Conversão enzimática da ticlopidina (**2**) ao seu metabólito ativo (**2b**) pelas enzimas do sistema oxidativo CYP450

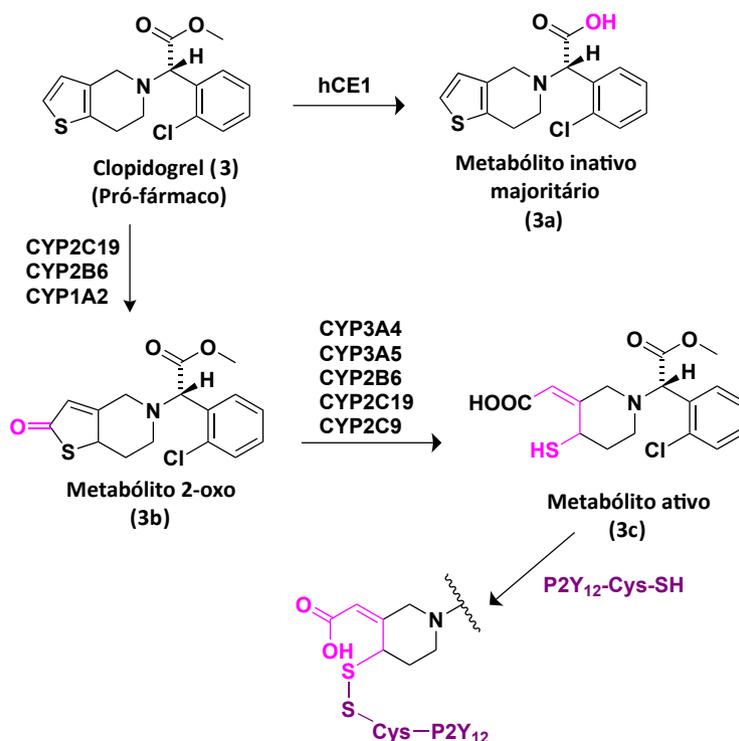


Figura 4. Metabolismo do fármaco clopidogrel (**3**): a maior parte do fármaco é hidrolisada ao metabólito inativo **3a** pela carboxilesterase 1 (hCE1). O percentual remanescente pode, então, ser convertido ao metabólito 2-oxo-clopidogrel **3b**, e posteriormente ao metabólito ativo **3c**

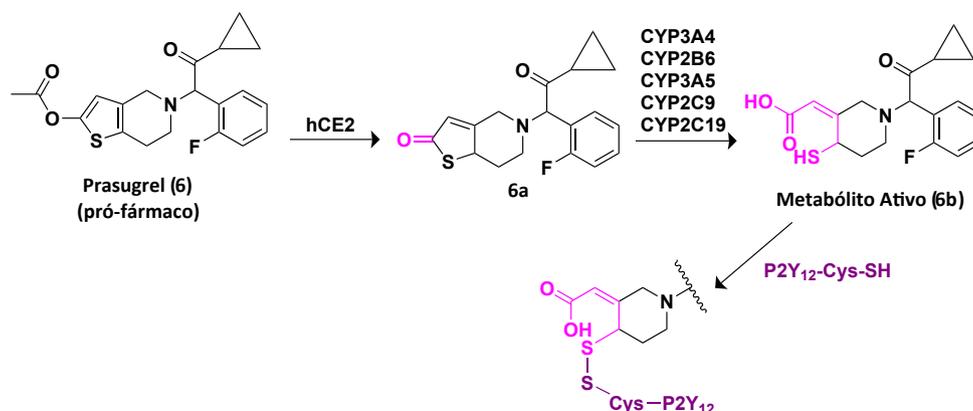


Figura 5. Metabolismo do fármaco prasugrel (**6**), o qual é hidrolisado pela enzima intestinal carboxilesterase 2 (hCE2), fornecendo a forma intermediária tiolactona (**6a**), que, por sua vez, é convertida pelas isoenzimas do sistema CYP450 ao metabólito ativo (**6b**), responsável pela interação irreversível com o receptor P2Y₁₂.

química previamente descritas com propriedades anti-inflamatórias e analgésicas. Entretanto, testes em murinos revelaram que os novos análogos propostos falharam em exercer os efeitos biológicos esperados. No entanto, a observação perspicaz dos farmacologistas envolvidos no projeto permitiu a identificação das propriedades antiplaquetárias durante a avaliação farmacológica desta nova série de derivados, destacando-se a ticlopidina (2; Ticlid®) como o análogo mais potente. Este análogo passou a ser utilizado clinicamente na França a partir de 1978 em pacientes submetidos a procedimentos associados ao risco de trombose, como a hemodiálise e as cirurgias cardíacas com circulação extracorpórea.²⁶

Estudos clínicos subsequentes demonstraram a eficácia do fármaco **2** em outros pacientes com risco de eventos trombóticos, *e.g.* pacientes com histórico de DAC isquêmica e AVC. Consequentemente, a ticlopidina (**2**) foi o primeiro antagonista do receptor P2Y₁₂ aprovado para uso clínico no tratamento e prevenção de diferentes DCV, recebendo em outubro de 1991 a aprovação pela agência regulatória norte-americana FDA (Figuras 1 e 2).²⁶

A ticlopidina (**2**) é um pró-fármaco, administrado por via oral, e metabolizado em duas etapas por meio do sistema oxidativo citocromo P450 (CYP450) para a obtenção do seu metabólito ativo. As isoenzimas CYP2C19 e CYP2B6 são majoritariamente responsáveis pela conversão hepática do pró-fármaco à forma intermediária tiolactona **2a**, nomeada 2-oxoticlopidina. Posteriormente, as isoenzimas CYP2C19 e CYP3A4 estão majoritariamente envolvidas na sua conversão ao metabólito ativo **2b** (Figura 3).^{1,24,27}

Embora o fármaco **2** tenha sido inicialmente descrito como um agente mais eficiente do que o AAS (**1**; Aspirina®) na prevenção do AVC, após alguns anos de uso clínico foram relatados efeitos adversos graves, como a agranulocitose, a neutropenia, a trombocitopenia púrpura, a severa toxicidade para a medula óssea, além da incidência de náuseas e vômitos em alguns pacientes tratados. Essas manifestações são bastante recorrentes e relatadas usualmente durante os três primeiros meses de tratamento, demonstrando a necessidade do acompanhamento do paciente e o desenvolvimento de análogos mais seguros.^{15,20,21,28}

4.1.2. Clopidogrel

Diversos derivados da ticlopidina (**2**) foram desenvolvidos buscando uma alternativa que garantisse maior segurança para os pacientes. Os esforços de pesquisa culminaram na identificação do análogo estrutural clopidogrel (**3**), obtido a partir da inserção do grupamento acetato de metila no carbono benzílico de **2**. Esta modificação estrutural resultou na introdução de um carbono assimétrico, sendo o (*S*)-clopidogrel o enantiômero mais potente (*i.e.* o eutômero deste fármaco).²⁰

O clopidogrel (**3**) atua como um pró-fármaco tienopiridínico de segunda geração, cujo metabólito ativo também interage de forma irreversível com o receptor P2Y₁₂ (Figuras 1 e 2).⁹ Após a sua administração pela via oral, aproximadamente 85 % do pró-fármaco **3** é hidrolisado por esterases ao seu metabólito inativo **3a** e os 15 % remanescentes permanecem disponíveis para serem metabolizados pelas isoenzimas do sistema CYP450 à forma ativa **3c** (Figura 4). A ativação metabólica do fármaco **3** resulta na abertura do anel tienopiridínico, formando o grupamento tiol livre e hábil para interagir de forma covalente e irreversível com resíduos de cisteína presentes no receptor P2Y₁₂ através da formação de pontes dissulfeto.^{24,29,30}

No final do ano de 1997, o clopidogrel (**3**; Plavix®) foi aprovado pela FDA, sendo introduzido no mercado norte americano em 1998 para uso no tratamento da síndrome coronariana aguda e na prevenção da trombose. Esse fármaco é mais seguro, bem tolerado e com melhor perfil farmacocinético e farmacodinâmico quando comparado à ticlopidina (**2**). É reportado que a utilização desse fármaco em longo prazo é responsável pela efetividade em reduzir os riscos de acidente vascular isquêmico, infarto do miocárdio, entre outras complicações decorrentes das DCV.^{1,24,31}

Apesar disso, este fármaco apresenta limitações. Primeiramente, considerando que o mesmo requer duas etapas de ativação metabólica envolvendo as isoenzimas hepáticas do sistema CYP450, o tempo para início da sua ação é lento, variando entre 6 e 8 horas. Por outro lado, a irreversibilidade do bloqueio no receptor-alvo resulta em elevado tempo para a reversão do efeito antiplaquetário e esse intervalo de tempo tem variação interindividual, o que

pode acarretar o aumento dos riscos do desenvolvimento de hemorragias, justificando sua inaplicabilidade em quadros agudos e traumas, além de não ser indicado para pacientes que serão submetidos a cirurgias de emergência.^{9,15,31}

Cabe destacar também que, em cerca de 1/3 dos pacientes submetidos ao tratamento com clopidogrel (**3**), observa-se falta ou redução da eficácia clínica. A variação na eficácia clínica está relacionada aos fatores de variabilidade interindividual na resposta terapêutica, os quais são divididos em quatro categorias: ambientais, celulares, clínicos e genéticos.⁹

Na categoria de efeitos genéticos, destaca-se o polimorfismo nas isoenzimas do CYP450 que são responsáveis pela conversão ao metabólito ativo, principalmente referente a alterações na isoenzima CYP2C19.^{9,20,32}

Além disso, as interações fármaco-fármaco são comuns durante a utilização deste medicamento, principalmente relacionadas à associação a outros fármacos metabolizados pelas isoenzimas do sistema CYP450 envolvidas no metabolismo de **3**, podendo ser citados os medicamentos da classe de inibidores da bomba de próton de primeira e segunda geração, os inibidores de canais de cálcio, as estatinas e fármacos antianginosos, como a ranolazina.^{9,20,32,33}

Buscando superar o perfil farmacodinâmico e farmacocinético do clopidogrel (**3**), novos antagonistas do P2Y₁₂ têm sido desenvolvidos visando uma menor variabilidade interindividual, além de um início e um término de ação mais breves.⁹

Cabe ressaltar também que o polimorfismo nos genes codificadores de transportadores de efluxo, como a glicoproteína P presente no intestino, pode culminar na geração de resistência ao tratamento, sendo a absorção oral deste fármaco limitada em determinados pacientes.⁹

4.1.3. Prasugrel

O prasugrel (**6**; Efficent/Efient®), aprovado pela FDA em 2009, pertence à terceira geração de antiplaquetários tienopiridínicos, sendo também um pró-fármaco, o qual, por sua vez, requer apenas uma etapa de conversão hepática

dependente de CYP450 para originar o metabólito ativo **6b** (Figura 5)^{1,24}. Apresenta mecanismo de ação similar ao fármaco **3**, ou seja, o metabólito **6b** forma ligação covalente com o P2Y₁₂ pela formação de pontes dissulfeto, causando um bloqueio irreversível da ligação do ADP. Entretanto, sua ação é mais rápida e os efeitos do bloqueio da agregação plaquetária são mais consistentes.^{9,32}

Após a administração por via oral, o fármaco **6** é hidrolisado pela enzima intestinal carboxilesterase 2 (hCE2), fornecendo a forma intermediária tiolactona (**6a**), a qual é convertida majoritariamente pelas isoenzimas CYP3A4 e CYP2B6 ao metabólito ativo (**6b**), responsável pela interação com as cisteínas (Cys-97 e Cys-175) do receptor P2Y₁₂.¹⁷

A ação antiplaquetária exercida pelo fármaco **6** é mais rápida e pronunciada quando comparada ao clopidogrel (**3**), fato este justificado pela absorção oral mais efetiva e por uma maior biodisponibilidade do metabólito ativo **6b**. Entretanto, esse medicamento está associado a um elevado risco de ocorrência de hemorragias. Três grupos específicos de pacientes apresentam risco mais elevado de desenvolver eventos adversos hemorrágicos: pacientes com histórico prévio de AVC ou acidente isquêmico transitório; pessoas com menos que 60 kg; e idosos com 75 anos ou mais, sendo requerido o acompanhamento constante da função plaquetária durante o tratamento.³⁴

4.1.4. Tipidogrel

O tipidogrel (**10**) é um candidato a fármaco em testes pré-clínicos. Esse derivado demonstrou propriedades físico-químicas adequadas para administração oral, baixa toxicidade e rápido início de ação. É especulado que o composto **10** apresente metabolismo semelhante ao do prasugrel (**6**), ou seja, sendo hidrolisado pela hCE2 para fornecer a forma intermediária tiolactona (**10a**), que, pela ação das isoenzimas do CYP450, é convertida ao metabólito ativo (**10b**) (Figura 6). Após a realização de testes de inibição da agregação plaquetária *in vivo* em modelos animais murinos, foi constatado que esse candidato a fármaco apresenta efeito superior a ticlopidina (**2**) e semelhante ao clopidogrel (**3**).²⁹

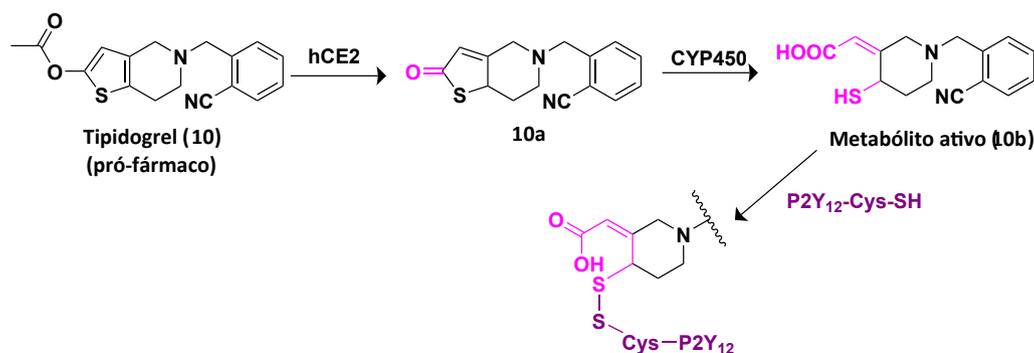


Figura 6. Representação do metabolismo proposto para o candidato a fármaco tipidogrel (**10**) para a obtenção de seu metabólito ativo (**10b**) *in vivo* após administração por via oral

4.1.5. Vicagrel

O Vicagrel (**11**) foi planejado a partir do metabólito tiolactona **3b** do clopidogrel (Figura 7), com a proposta de substituir a primeira etapa de ativação metabólica do fármaco **3**, de natureza oxidativa (Figura 4), por uma etapa de hidrólise pelas carboxilesterases, em analogia ao metabolismo descrito para o fármaco prasugrel (**6**) (Figura 5). Atualmente, esse derivado **11** segue em ensaios clínicos de fase II na China, uma vez que apresentou potência semelhante ao prasugrel (**6**) e maior que o clopidogrel (**3**) nos ensaios pré-clínicos. Quando comparado ao clopidogrel (**3**), apresentou diversas vantagens na etapa de estudos pré-clínicos em modelos animais, dentre elas: menor variação interindividual relacionada ao polimorfismo da isoenzima CYP2C19; eficácia em baixa dose, minimizando o risco de toxicidade associada; e rápido início de ação, relacionado ao mecanismo de ativação metabólica (Figura 7).³⁵⁻³⁷

Os primeiros dados clínicos com pequena amostra de pacientes (n = 67) compararam o vicagrel (**11**) ao clopidogrel (**3**). Este estudo reportou que o novo agente antiplaquetário demonstrou eficácia, segurança, tolerabilidade adequada e maior potência que o protótipo **3**.³⁷

4.2. Novos antagonistas do receptor P2Y₁₂ planejados como análogos do trifosfato de adenosina

Embora os fármacos tienopiridínicos sejam amplamente empregados na clínica no tratamento e prevenção de DCV, limitações associadas à ocorrência de variações interindividuais, risco de hemorragia e o longo tempo para a interrupção do efeito destes fármacos, fruto da interação irreversível com o receptor P2Y₁₂, indicam a relevância da

busca por novas classes de antagonistas reversíveis deste receptor-alvo.²⁰

O ATP (**12**) é um antagonista natural do receptor P2Y₁₂, atuando como um fraco inibidor da agregação plaquetária induzida por ADP. Baseando-se nessa premissa, pesquisadores dedicaram-se ao desenvolvimento de análogos estruturais deste nucleotídeo, sendo o ticagrelor (**7**) e o cangrelor (**9**) os representantes dessa classe de fármacos antitrombóticos.^{9,10,20}

Esses fármacos apresentam diversos benefícios quando comparados aos tienopiridínicos, incluindo o fato de que não são pró-fármacos, ou seja, não dependem de uma etapa de ativação metabólica para exercerem o efeito farmacológico, o que resulta em rápido início de ação; e a sua interação reversível com receptor, que permite uma redução do tempo necessário para cessar o efeito terapêutico após a interrupção do tratamento.³⁸

4.2.1. Ticagrelor

O ticagrelor (**7**; Brilinta®), um antagonista reversível do receptor P2Y₁₂ ativo por via oral, foi desenvolvido como um análogo estrutural do ATP (**12**). Durante o seu desenvolvimento, os estudos iniciais de SAR (Relação Estrutura-Atividade; do inglês *Structure-Activity Relationship*) apontaram para diversas otimizações estruturais a partir do nucleotídeo **12**, que culminaram na identificação do protótipo **13** (Figura 8), compreendendo: *i*) a substituição da cadeia de fosfato do ATP, lábil ao metabolismo pela ação das nucleotidasas, pelo grupamento éter de **13** (R-OCH₂CH₂OH); *ii*) a inserção do ciclopentil em substituição à unidade de ribose, também visando o incremento da estabilidade metabólica; *iii*) a substituição do núcleo purina pela triazolopirimidina,

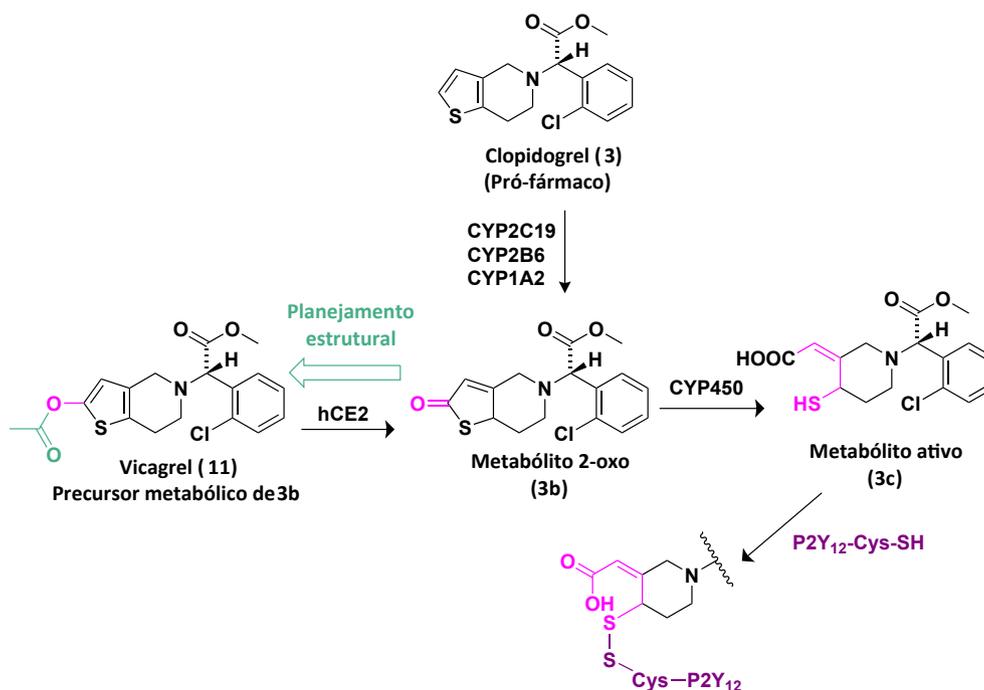


Figura 7. Planejamento do candidato a fármaco vicagrel (**11**) a partir da estrutura do metabólito tiolactona **3b** do clopidogrel (**3**)

acarretando o aumento da potência em comparação ao ATP (**12**); *iv*) e o incremento da afinidade pelo receptor P2Y₁₂ devido à introdução de grupamentos nas posições 2 e 6 do anel pirimidínico de **13**, respectivamente, S-propil e fenil-ciclopropilamina.²⁰

Posteriormente, o ticagrelor (**7**) foi identificado como um análogo otimizado do protótipo **13**, por meio da inserção de dois substituintes flúor na fenil-ciclopropilamina, preservando o efeito farmacológico e garantindo uma maior estabilidade frente ao metabolismo oxidativo, uma vez que o análogo **13** era passível de hidroxilação na fenila (Figura 8).²⁰ Desta maneira, o derivado **7** foi selecionado para a etapa de ensaios clínicos, apresentando eficácia terapêutica adequada e uma otimização em relação clopidogrel (**3**), estando associado a um menor risco de morte por acidentes vasculares.^{20,39}

O fármaco **7** foi o primeiro antagonista reversível e seletivo de P2Y₁₂, ativo por via oral, a ser aprovado para uso clínico, sendo licenciado pela EMA em dezembro de 2010 e pela FDA em julho de 2011. Atualmente, este fármaco é empregado mundialmente na prevenção de complicações trombóticas em pacientes com síndrome coronária aguda ou histórico de infarto do miocárdio.^{9,17} É um modulador alostérico do receptor P2Y₁₂, atuando por ligação em sítio de reconhecimento diferente do local em que o ADP interage. Esse fármaco age modulando a estrutura do receptor e convertendo-o a sua forma inativa. Sua ação de bloqueio da agregação plaquetária é reversível e dose dependente e não necessita de bioativação pelo metabolismo hepático.^{4,17}

O fármaco **7** apresenta meia vida ($t_{1/2}$) de 12 horas e seu início e término de ação são mais rápidos em comparação ao clopidogrel (**3**), sendo a sua inibição plaquetária mais pronunciada.^{9,24} Um dos efeitos adversos mais comumente relatado pelos pacientes submetidos à terapia medicamentosa

com o ticagrelor (**7**) é a dispneia, a qual é possivelmente justificada pelo desenvolvimento de trombocitopenia e o consequente aumento da retenção de líquidos. Outros efeitos adversos descritos incluem vasodilatação coronariana, inibição da resposta inflamatória em condições de estresse, efeitos dromotrópico e cronotrópico negativos, redução da filtração glomerular, casos de arritmias e aumento dos níveis de creatinina e ácido úrico. Apesar desses efeitos, o uso clínico deste fármaco está associado a uma redução significativa da mortalidade de pacientes com ACS.^{4,10,40}

Dentre os fármacos antiplaquetários disponíveis, o ticagrelor (**7**) ainda é o que apresenta maior benefício na redução da mortalidade dos pacientes e, além disso, sua aplicação terapêutica demonstra que, quando comparado à classe dos tienopiridínicos, o fármaco **7** está associado a um menor risco de ocorrência de hemorragias.³⁹

As principais interações medicamentosas são provenientes do seu uso concomitante com medicamentos inibidores da CYP3A4, como o cetoconazol e o diltiazem, acarretando o aumento dos níveis plasmáticos de **7**. Já a rifampicina é um indutor da CYP3A4, e consequentemente, ocasiona a redução dos níveis plasmáticos deste fármaco.¹¹

4.2.2. Cangrelor

O fármaco cangrelor (**9**; Kengreal®) também foi desenvolvido após modificações sequenciais na molécula do ATP (**12**). Inicialmente, os pesquisadores propuseram a inserção do grupamento S-propil na posição C2 da adenina e a inserção dos átomos de cloro na subunidade trifosfato, visando reduzir a instabilidade metabólica frente à rápida desfosforilação enzimática, resultando na obtenção do derivado **14** (Figura 9). Após ser submetido a estudos *in vivo*, o candidato a fármaco **14** demonstrou curta duração

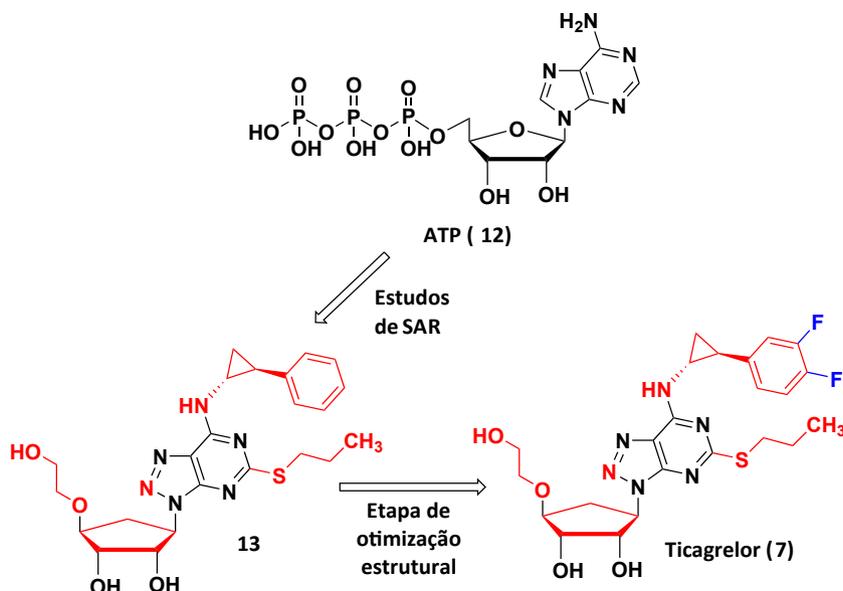


Figura 8. Planejamento estrutural do fármaco ticagrelor (**7**) por meio de modificações estruturais sequenciais na molécula do antagonista endógeno ATP (**12**)

de ação, com meia-vida ($t_{1/2}$) de aproximadamente dois minutos em humanos, recuperando-se a função plaquetária normal em aproximadamente 15 minutos. Posteriormente, com a inserção dos grupamentos alquilamina na posição C6 da adenina, além dos átomos de flúor ao grupamento S-propril, observou-se o aumento na afinidade pelo receptor $P2Y_{12}$ quando comparado ao protótipo **14**, originando o fármaco cangrelor (**9**), com alta potência e seletividade quando comparado a sua série congênere.^{12,20}

O cangrelor (**9**) é um fármaco intravenoso de ação reversível com alta seletividade pelo receptor-alvo $P2Y_{12}$, o qual não necessita de ativação metabólica para exercer o seu efeito antagonista.^{3,9} Suas características farmacocinéticas e farmacodinâmicas incluem: rápido início de ação; bloqueio eficaz da agregação plaquetária (>90 %); efeito dose dependente; e rápido término de ação, devido a sua meia-vida extremamente curta ($t_{1/2}$ igual a 2,5 minutos), associada à rápida desativação pelas nucleotidases plasmáticas.²⁴

Após desfosforilação pelas nucleotidases, origina seu primeiro e principal metabólito, significativamente menos potente que o fármaco **9**. Todos os outros metabólitos são farmacologicamente inativos, sendo excretados predominantemente pela via biliar, com aproximadamente 15 % excretado pela urina.³⁴

Devido ao seu perfil farmacocinético peculiar, o uso do cangrelor (**9**) é recomendado para eventos cardiovasculares agudos, quando são requeridos um rápido início de ação e um efeito antiplaquetário transiente, com um mínimo risco de hemorragia, sendo este fármaco indicado para pacientes que serão submetidos à cirurgia ou outros procedimentos invasivos, visando à prevenção de possíveis complicações associadas à formação de trombos.⁹ Sua principal utilidade é em intervenções coronarianas percutâneas, aplicação para qual recebeu aprovação da FDA em junho de 2015.²⁰

4.3. Novos padrões estruturais identificados como antagonistas do receptor $P2Y_{12}$

Apesar do arsenal de medicamentos antiplaquetários disponíveis no mercado (Figuras 1 e 2), o desenvolvimento de novos protótipos com perfil farmacoterapêutico otimizado permanece atraindo esforços dos químicos medicinais na área acadêmica e na indústria farmacêutica. Diversos projetos de pesquisa têm investido na busca por novos antagonistas do receptor $P2Y_{12}$, principalmente focando nas seguintes melhorias em relação às alternativas clínicas atualmente disponíveis: biodisponibilidade oral otimizada; maior segurança e tolerância, com menor incidência de efeitos adversos; ação direta sobre o alvo terapêutico, ou seja, efeito independente de processos de biotransformação mediados pelas enzimas do sistema CYP450, evitando possíveis variações de resposta interindividual; mínimas interações com outros fármacos, visando à redução dos possíveis eventos adversos e toxicidade; rápidos início e término de ação; ligação reversível, reduzindo os riscos de indução de quadros hemorrágicos.^{20,41}

No início do século XXI, antagonistas reversíveis deste receptor-alvo foram identificados em projetos de pesquisa baseados em estratégias de triagem robotizada *in vitro*, do inglês *high-throughput screening* (HTS), empregando bibliotecas químicas de diferentes empresas farmacêuticas.²⁰

4.3.1. Acil-sulfonamidas: AZD1283

No início dos anos 2000, a farmacêutica AstraZeneca realizou uma triagem robotizada em sua biblioteca química visando a identificação de novos antagonistas do receptor $P2Y_{12}$ com padrão estrutural inédito. A partir dessa abordagem, foi então identificada uma nova série de piridino-piperazinil-ureias com potência antagonista na faixa submicromolar. Esta nova série, representada pelo protótipo **15**, apresentava como principais limitações

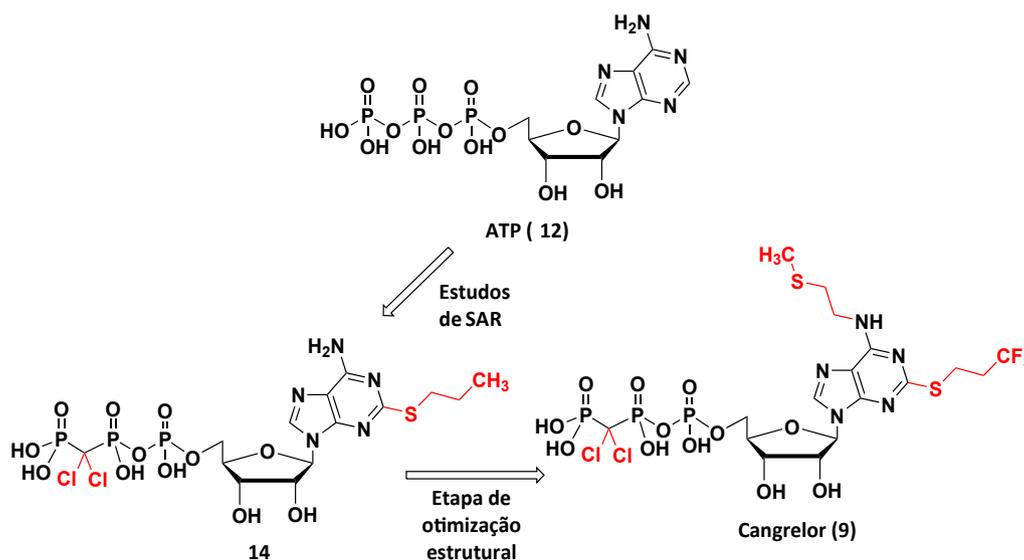


Figura 9. Planejamento estrutural do fármaco cangrelor (**9**) por meio de modificações estruturais sequenciais na molécula do antagonista endógeno ATP (**12**)

a sua instabilidade metabólica, atribuída à fragilidade dos grupamentos éster e ureia frente à hidrólise *in vivo*, e a sua baixa solubilidade aquosa. Desta maneira, um estudo de SAR foi realizado visando à otimização da afinidade, redução da labilidade metabólica e incremento da solubilidade. No entanto, os resultados indicaram que diversas modificações propostas no padrão de substituição do anel piridínico foram deletérias para o efeito antagonista (Figura 10). Em particular, a funcionalidade éster na posição 3, em combinação com um substituinte como Cl ou CN na posição 5, além do grupamento N-H livre da ureia e da presença do anel aromático (benzil, fenil ou naftil), foram descritos como essenciais para a afinidade e potência antagonista. Todas as tentativas realizadas neste estágio na busca por uma alternativa para o grupamento éster foram frustradas.^{20,42}

Sendo assim, foram priorizadas modificações na subunidade ureia, preservando-se, no entanto, o grupamento N-H livre. As modificações estruturais realizadas compreenderam a inserção da função sulfonamida e a troca da piperazina por piperidina, originando o análogo AZD1283 (**16**), o qual contém uma metila como substituinte na posição 2 do anel piridínico. A introdução da sulfonamida resultou em incremento da afinidade e da solubilidade aquosa e a retirada da função ureia permitiu um modesto incremento da estabilidade metabólica sem prejuízo à afinidade. Os novos derivados obtidos, incluindo **16**, apresentaram biodisponibilidade oral parcial e efeito antiplaquetário significativo em estudos pré-clínicos, motivando o encaminhamento do protótipo AZD1283 (**16**) para a etapa de ensaios clínicos.²⁰

No entanto, a instabilidade metabólica ainda presente na função éster e a permeação limitada durante a absorção acarretaram a necessidade de exposição a altas doses desse derivado para a observação do efeito terapêutico esperado. Apesar de o desenvolvimento do AZD1283 (**16**) ter sido descontinuado, este protótipo tem sido largamente utilizado como substância de referência em diversos estudos voltados para a identificação de novos antagonistas.²⁰ Isso ocorre pois o protótipo **16** foi o primeiro antagonista a

ser cocristalizado com o receptor-alvo P2Y₁₂, conforme descrito por Zhang e colaboradores em 2014.⁴³ A estrutura cristalográfica obtida indicou que o receptor assume uma conformação distinta quando ligado ao AZD1283 (**16**), um antagonista competitivo reversível, em comparação com a conformação assumida pelo mesmo receptor complexado a um agonista, fornecendo informações estruturais cruciais para o planejamento de novos moduladores deste alvo terapêutico.¹²

4.3.2. Quinazolino-2,4-dionas: Elinogrel

O candidato a fármaco elinogrel (**17**) pertence à classe das quinazolino-2,4-dionas e é um antagonista de P2Y₁₂ potente e seletivo, atuando como um modulador reversível e competitivo deste alvo (Figura 11). A identificação deste novo padrão estrutural também teve origem em um projeto de triagem robotizada por HTS realizado pela empresa Portola Pharmaceuticals. O protótipo **17** apresenta adequada biodisponibilidade tanto quando administrado pela via oral quanto pela via intravenosa.¹²

Quando submetido aos ensaios pré-clínicos, o composto **17** apresentou maior potência inibitória frente à agregação plaquetária quando comparado ao clopidogrel (**3**), rápidos início e término de ação, com meia-vida ($t_{1/2}$) de 50 minutos quando administrado pela via intravenosa e de 11-12 horas pela via oral. Esses resultados encorajaram o prosseguimento aos ensaios clínicos. O desenvolvimento deste candidato a fármaco foi comprado pela farmacêutica Novartis em 2009, durante os ensaios clínicos de fase II. No entanto, antes do início dos ensaios clínicos de fase III, em 2012, a Novartis comunicou a descontinuação do desenvolvimento, fato esse possivelmente justificado pelos seguintes efeitos adversos: toxicidade hepática e dispneia.^{7,8,17,20,24,44}

4.3.3. Piperazinil-carbamatos

O protótipo BX667 (**18**), descrito pela empresa farmacêutica Berlex, pertence à classe dos derivados piperazinil-glutamatos e origina *in vivo* o seu metabólito

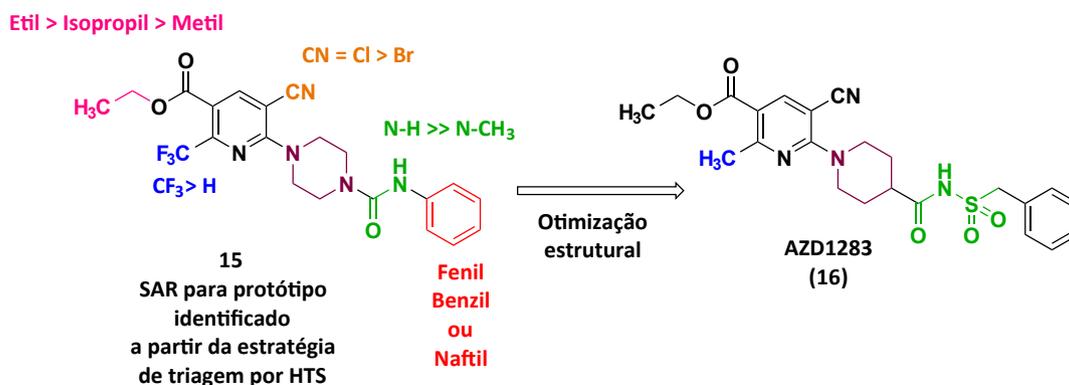


Figura 10. Planejamento estrutural do candidato a fármaco AZD1283 (**16**) por meio de modificações estruturais sequenciais na molécula do protótipo **15**, identificado a partir da estratégia de triagem robotizada

de nitrogênio na posição *para* do anel piridínico resulta no aumento da afinidade de ligação ao receptor P2Y₁₂. Após os estudos de SAR, foi proposto que a substituição na posição 4 da piperidina apresenta influência positiva sobre a atividade farmacológica dos novos derivados, uma vez que permite modular tanto a potência quanto as propriedades farmacocinéticas dos derivados da série. Dentre a nova série congênere então descrita, os análogos **21** (K_i = 2,1; CI₅₀ = 0,36 nM) e **22** (K_i = 2,8; CI₅₀ = 0,65 nM) (Figura 12) se destacaram como os mais potentes. Além disso, foi observada adequada biodisponibilidade nas espécies testadas (ratos e cachorros), de modo que a potência, a seletividade, segurança e o perfil farmacocinético indicaram que esses dois protótipos deveriam ser encaminhados para estudos adicionais.^{20,45,46}

Mais recentemente, o derivado pirimidínico selatogrel (ACT-246475; **23**) foi descrito pela empresa suíça Idorsia Pharmaceuticals como um antagonista potente, altamente seletivo e reversível do receptor P2Y₁₂.^{12,47,48} Este candidato a fármaco foi avaliado em ensaios clínicos de fase I e II,⁴⁷⁻⁴⁹ apresentando resultados terapêuticos encorajadores para o seguimento à fase de ensaios clínicos de fase III. A administração subcutânea de **23** em pacientes com IAM foi segura e induziu efeito inibitório potente, rápido e dose-dependente da agregação plaquetária.⁴⁸ Ademais, devido à limitação farmacocinética para a utilização de **23** por via oral, uma vez que o grupamento fosfonato, por ser polar e ionizável, limita a capacidade de permeação deste protótipo por difusão passiva durante a etapa de absorção, o pró-fármaco éster ACT-281959 (**24**) foi desenvolvido como uma alternativa para a administração pela via oral (Figura 12).^{12,47,48}

4.3.4. Pirazolo-benzamidas

Pesquisadores da farmacêutica Sanofi também investiram na triagem robotizada por HTS buscando identificar um novo padrão estrutural para o antagonismo do receptor P2Y₁₂. A triagem resultou na identificação do ligante **25**,

com afinidade na faixa de concentração micromolar (K_i = 1,54 μM). Os estudos de SAR e otimização estrutural resultaram na identificação do candidato a fármaco indólico SAR216471 (**26**) (Figura 13), com afinidade otimizada na faixa de concentração nanomolar (K_i = 17 nM)⁵⁰. Limitações referentes à labilidade metabólica foram solucionadas por meio da substituição do grupamento éster pela cetona, que não é substrato para a ação das esterases. Ademais, a inserção do grupamento metilpiperazina permitiu o aumento da solubilidade aquosa do derivado **26**, aumentando, consequentemente, a sua biodisponibilidade oral. O núcleo piridazínico de **26** permitiu a redução do risco de ocorrência de mutagenicidade após exposição a esta substância em comparação com o análogo correspondente contendo uma fenila como anel central. Por sua vez, a adição do núcleo 4-cloro-indólico em **26** permitiu o equilíbrio ótimo entre o aumento da afinidade e o incremento da estabilidade metabólica frente ao metabolismo oxidativo.^{20,50}

SAR216471 (**26**), então, foi descrito como um antagonista reversível do receptor-alvo P2Y₁₂ potente e altamente seletivo, apresentando efeito antitrombótico pronunciado e dose-dependente, após administração por via oral, nos modelos animais estudados.^{12,50-52}

4.3.5. Antraquinonas

O corante RB2 (**27**, do inglês, *reactive blue 2*), da classe química das antraquinonas, foi previamente descrito como um antagonista do receptor P2Y₁₂, motivando a busca por novos análogos antraquinônicos sintéticos otimizados. Desta feita, por meio do emprego da estratégia de simplificação molecular a partir da estrutura do corante **27**, seguida de trocas bioisostéricas, conforme destacado na Figura 14, foram identificados novos análogos com potente efeito antagonista, atuando como moduladores competitivos e reversíveis do receptor-alvo P2Y₁₂, dentre os quais se destacaram os derivados PSB-0739 (**28**), PSB-0702 (**29**) e **30**, com afinidades na faixa de concentração nanomolar (Figura 14).^{12,51,52}

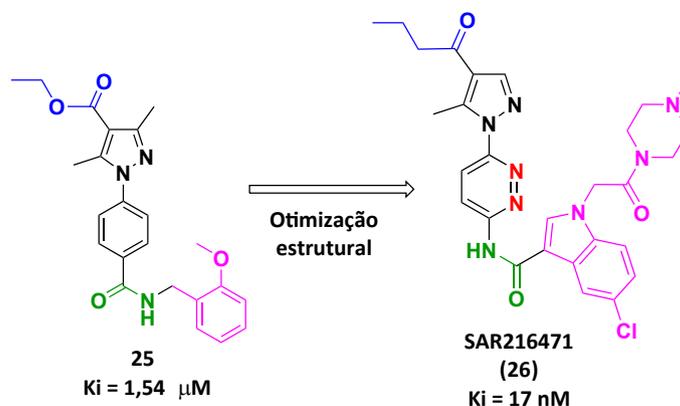


Figura 13. Planejamento estrutural do candidato a fármaco SAR216471 (**26**) por meio de modificações estruturais sequenciais na molécula do protótipo **25**, identificado a partir da estratégia de triagem robotizada (HTS).

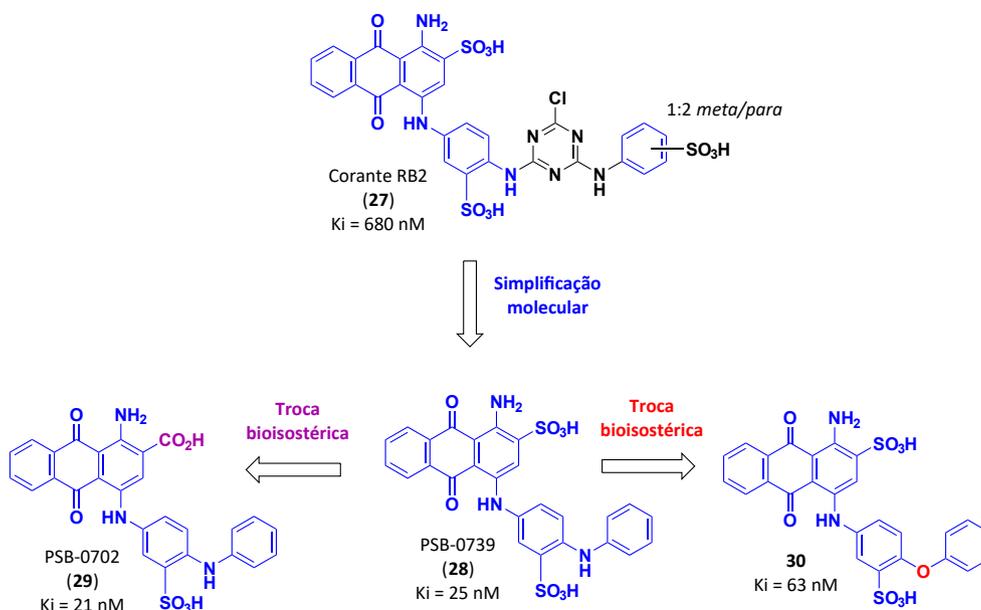


Figura 14. Planejamento estrutural dos protótipos antraquinônicos (28-30) por meio de modificações estruturais sequenciais na molécula do corante RB2 (27), previamente descrito como antagonista do receptor P2Y₁₂

5. Considerações Finais

As DCV representam a principal causa de mortalidade por doenças não-transmissíveis no Brasil, além de serem altamente custosas ao SUS e à previdência social, haja vista os elevados gastos com medicamentos, exames, intervenções clínicas, internações e a alta incidência de complicações incapacitantes dessas enfermidades.

Neste contexto, destacam-se os antiplaquetários antagonistas do receptor P2Y₁₂, fármacos de primeira escolha no manejo da DAC e de outras DCV. Esta revisão oferece um apanhado histórico da evolução destes antagonistas, desde os primeiros representantes da classe, identificados ainda na década de 70, passando pelo desenvolvimento dos fármacos atualmente em uso clínico, e descrevendo a descoberta mais recente de novos padrões estruturais para modulação desse importante alvo terapêutico.

Cabe destacar que a tradicional associação medicamentosa de antagonistas irreversíveis do receptor P2Y₁₂, como o clopidogrel (Plavix®) ou o prasugrel (Efficient/Efient®), com o AAS (Aspirina®) é, ainda nos dias de hoje, amplamente empregada na prática clínica, permitindo substancial redução dos riscos de infarto e AVC. O uso destes medicamentos apresenta como vantagens o acesso ao tratamento, uma vez que compreende substâncias de baixa complexidade estrutural, facilitando sua obtenção em larga escala a um preço acessível, além da ampla experiência clínica ao longo de décadas, garantindo informações robustas sobre os riscos associados e sobre a necessidade de monitoramento dos pacientes.

No entanto, os antagonistas irreversíveis atualmente em uso clínico não são isentos de limitações, destacando-

se a variação interindividual na resposta ao tratamento, o longo tempo necessário para o início e para a interrupção do efeito antitrombótico e o risco de ocorrência de eventos hemorrágicos, o que demonstra a clara necessidade do desenvolvimento de alternativas terapêuticas mais eficazes e seguras.

Cabe mencionar que, com o aumento da expectativa de vida da população, a prevalência mundial das DCV tende a aumentar. O arsenal terapêutico atualmente disponível evidentemente não se mostra suficiente para controlar o avanço exponencial destas doenças e suas complicações, de modo que as projeções para o futuro ainda permanecem alarmantes.

Este panorama preocupante impulsionou a busca por novos fármacos antiplaquetários nas últimas décadas, com diversos candidatos a fármacos aprovados ou avaliados em ensaios clínicos. Neste contexto, destacou-se a hipótese de que os antagonistas reversíveis do receptor P2Y₁₂ que não dependessem de bioativação para exercerem o efeito farmacológico apresentariam diversos benefícios quando comparados aos antagonistas tienopiridínicos, incluindo um início de ação mais rápido, uma redução do tempo necessário para cessar o efeito terapêutico após a interrupção do tratamento e um menor risco de ocorrência de hemorragias.

Apesar dos esforços científicos dispensados, até o momento apenas dois antagonistas reversíveis do receptor P2Y₁₂ estão disponíveis para uso clínico, o ticagrelor (Brilinta®) e o cangrelor (Kengreal®), sendo o cangrelor um fármaco intravenoso de ação curta, que, devido ao seu perfil farmacocinético peculiar, é indicado apenas em procedimentos invasivos, visando à prevenção de possíveis complicações.

Por sua vez, o uso clínico do ticagrelor resulta em redução significativa da mortalidade de pacientes com DAC. Além disso, quando comparado à classe dos tienopiridínicos, este fármaco apresenta menor risco de indução de hemorragia. Apesar disso, o ticagrelor está associado a uma série de eventos adversos, sendo o mais frequente deles a dispneia, além de outros, como os efeitos dromotrópico e cronotrópico negativos, redução da filtração glomerular, casos de arritmias e aumento dos níveis de creatinina e ácido úrico.

Neste contexto, a corrida por alternativas terapêuticas mais eficazes e seguras permanece atraindo esforços dos pesquisadores na área acadêmica e na indústria farmacêutica, visando principalmente o desenvolvimento de fármacos com adequada biodisponibilidade oral, segurança e eficácia, efeito direto e reversível sobre o alvo terapêutico, mínimas interações com outros fármacos e rápido início e término de ação. O presente artigo, além da revisão e atualização do tema, fornece um apanhado útil para o futuro planejamento de novas entidades químicas idealizadas como antagonistas do receptor P2Y₁₂.

Agradecimentos

As autoras agradecem à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (FF-UFRJ) e às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERJ.

Referências Bibliográficas

- Jung, J. H.; Tantry, U. S.; Gurbel, P. A.; Jeong, Y. H.; Current antiplatelet treatment strategy in patients with diabetes mellitus. *Diabetes e Metabolism Journal* **2015**, *39*, 95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mansur, A. P.; Favarato, D.; Tendências da Taxa de Mortalidade por Doenças Cardiovasculares no Brasil, 1980-2012. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia* **2016**, *99*, 755. [[CrossRef](#)]
- Katzung, B. G.; Masters, S. B.; Trevor, A. J.; *Farmacologia Básica e Clínica*, 12a ed., AMGH: Porto Alegre, 2014.
- Mega, J. L.; Simon, T.; Pharmacology of antithrombotic drugs: an assessment of oral antiplatelet and anticoagulant treatments. *Lancet* **2015**, *386*, 281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Giossi, A.; Pezzini, A.; Zotto, E. D.; Volonghi, I.; Costa, P.; Ferrari, D.; Padovini, A.; Advantages in antiplatelet therapy for stroke prevention: the new P2Y₁₂ antagonists. *Currents Drugs Targets* **2010**, *11*, 380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mackaman, N.; Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature* **2008**, *451*, 914. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Montoliu, A. T.; Jover, E.; Rivera, J.; Valdés, M.; Angiolillo, D. J.; Marín, F.; New perspectives in antiplatelet therapy. *Current Medicinal Chemistry* **2012**, *19*, 406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ungerer, M.; Munch, G.; Novel antiplatelet drugs in clinical development. *Thrombosis and Haemostasis* **2013**, *110*, 868. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sabouret, P.; Tailed-Sartral, M.; New antiplatelet agents in the treatment of acute coronary syndromes. *Archives of cardiovascular disease* **2014**, *107*, 178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Murugappan, S.; Kunapuli, S. P.; The role of ADP receptors in platelet function. *Frontiers in Bioscience* **2006**, *11*, 1977. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Nawarskas, J. J.; Clark, S. M.; Ticagrelor a novel reversible oral antiplatelet agent. *Cardiology in Review* **2011**, *19*, 95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Baqi, Y.; Müller, C. E.; Antithrombotic P2Y₁₂ receptor antagonists: recent developments in drug discovery. *Drug Discovery Today* **2019**, *24*, 1, 325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Douglass, J. G.; Patel, R. I.; Yerkxa, B. R.; Shaver, S. R.; Watson, P. S.; Bednarski, K.; Plourde, R.; Redick, C. C.; Brubaker, K.; Jones, A. C.; Boyer, J. L.; Lipophilic modifications to dinucleoside polyphosphates and nucleotides that confer antagonist properties at the platelet P2Y₁₂ receptor. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51*, 1007. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zhan, C.; Yang, J.; Dong, X. C.; Wang, Y. L.; Molecular modeling of purinergic receptor P2Y₁₂ and interaction with its antagonist. *Elsevier* **2007**, *26*, 20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gachet, C.; P2Y₁₂ receptors in platelets and other hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Purinergic Signalling* **2012**, *8*, 609. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wang, T. C.; Qiao, J. X.; Clark, C. G.; Jua, J.; Price, L. A.; Wu, Q.; Chang, M.; Zheng, J.; Huang, C. S.; Everlot, G.; Schumacher, W. A.; Wong, P. C.; Seiffert, D. A.; Stewart, A. B.; Bostwick, J. S.; Crain, E. J.; Watson, C. A.; Rhexuss, R.; Wexler, R. R.; Lam, P. Y. S.; Discovery of diarylurea P2Y₁ antagonists with improved aqueous solubility. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *23*, 3329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fayaz, S. M. A.; Rajanikant, G. K.; A critical appraisal of the functional evolution of P2Y₁₂ antagonists as antiplatelet drugs. *Current Pharmaceutical Design* **2012**, *18*, 1625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gasecka, A.; Konwerski, M.; Pordzik, J.; Soplińska, A.; Filipiak, K. J.; Siller-Matula, J. M.; Postula, M.; Switching between P2Y₁₂ antagonists – From bench to bedside. *Vascular Pharmacology* **2019**, *115*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jamasbi, J.; Ayabe, K.; Goto, S.; Nieswandt, B.; Peter, K.; Siess, W.; Platelet receptors as therapeutic targets: Past, present and future. *Thrombosis and Haemostasis* **2017**, *117*, 1249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zetterberg, F.; Svensson, P.; State of affairs: Design and structure-activity relationships of reversible P2Y₁₂ receptor antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2016**, *26*, 2739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lukasik, M.; Owecki, M. K.; Efficacy of antiplatelet treatment in stroke prevention: past, present, and future. *Drug development research* **2013**, *74*, 428. [[CrossRef](#)]
- Howard, P.; Boucher, M.; Kaunelis, D.; Em *CADTH Issues in Emerging Health Technologies*. Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health: Ottawa, 2016, cap. 148. [[Link](#)]
- Schiling, U.; Dingemans, J.; Ufer, M.; Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Approved and Investigational P2Y₁₂ Receptor Antagonists. *Clinical Pharmacokinetics* **2020**, *59*, 545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Vivas, D.; Angiolillo, D. J.; Platelet P2Y₁₂ receptor inhibition an update on clinical drug development. *American Journal Cardiovascular Drugs* **2010**, *10*, 217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Remko, M.; Remková, A.; Broer, R.; A comparative study of molecular structure, pKa, lipophilicity, solubility, absorption and polar surface area of some antiplatelet drugs. *Internacional Journal of Molecular Sciences* **2016**, *17*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Maffrand, J. P.; The story of clopidogrel and its predecessor, ticlopidine: Could these major antiplatelet and antithrombotic drugs be discovered and developed today? *Comptes Rendus Chimie* **2012**, *15*, 237. [[CrossRef](#)]
27. Shantu, S. B.; Anderson, R. A.; Sagan, E.; Hassan, N.; Pinder, A, G.; Rogers, S. C.; Morris, K.; James, P. E.; Direct formation of thienopyridine-derived nitrosothiols – just add nitrite! *European Journal of Pharmacology* **2011**, *670*, 534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Aragam, K. G.; Bhatt, D. L.; Antiplatelet therapy in acute coronary syndromes. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutic* **2011**, *16*, 24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Zhi, S.; Xia, G.; Liu, Y.; Tao, Z.; Chen, L.; Liu, D.; Synthesis of the alkylated active metabolite of tipidogrel. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2015**, *25*, 1718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Fabre, J. E.; Gurney, M. E.; Limitations of current therapies to prevent thrombosis: a need for novel strategies. *Molecular BioSystem* **2010**, *6*, 305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Sabatine, M. S.; Mega, J. L.; Pharmacogenomics of antiplatelet drugs. *Hematology the American Society of Hematology Education Program* **2014**, *1*, 343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Varon, D.; Spectre, G.; Antiplatelet agents. *Hematology* **2009**, *1*, 267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Pelliccia, F.; Rollini, F.; Marazzi, G.; Greco, C.; Gaudio, C.; Angiolillo, D. J.; Drug-drug interactions between clopidogrel and novel cardiovascular drugs. *European Journal of Pharmacology* **2015**, *765*, 332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Waite, L. H.; Phan, Y. L.; Spinler, S. A.; Cangrelor: a novel intravenous antiplatelet agent with a questionable future. *Pharmacotherapy* **2014**, *34*, 1061. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Shan, J.; Zhang, B.; Zhu, Y.; Jiao, B.; Zheng, W.; Qi, X.; Gong, Y.; Yuan, F.; Lv, F.; Sun, H.; Overcoming clopidogrel resistance: discovery of vicagrel as a highly potent and orally bioavailable antiplatelet agent. *American Chemical Society* **2012**, *55*, 3342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Jiang, J.; Chen, X.; Zhong, D.; Arylacetamide Deacetylase Is Involved in Vicagrel Bioactivation in Humans. *Frontiers in Pharmacology* **2017**, *8*, 846. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Li, H.; Chen, H.; Chen, W.; Xu, H.; Yuan, F.; Yang, M.; Sun, H.; Yang, J.; Liu, Y.; Lai, X.; Gong, Y.; Liu, X.; Li, Y.; Sheng, L.; Liu, C.; Li, X.; Platelet inhibitory activity, tolerability, and safety of vicagrel, a novel thienopyridine P2Y12 inhibitor. *Medicine* **2020**, *99*, e18683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Story, R. F.; Biology and pharmacology of the platelet P2Y12 receptor. *Current Pharmaceutical Design* **2006**, *12*, 1255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Birkland, K.; Parra, D.; Rosentstein, R.; Antiplatelet therapy in acute coronary syndromes: focus on ticagrelor. *Journal Blood of Medicine* **2010**, *1*, 197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Dutta, S.; Ticagrelor, a novel drug choice to antiplatelet therapy in acute coronary syndrome. *Advanced Journal of Pharmacie and Life Science Research* **2016**, *4*, 1. [[Link](#)]
41. Thomas, M. R.; Storey, R. F.; The future of P2Y12 receptor antagonists. *Platelet* **2015**, *26*, 392 [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Bach, P.; Bostöm, J.; Brickmann, K.; Gienzen, J. J. J.; Hovland, R.; Petersson, A. U.; Ray, A.; Zetterberg, F.; A novel series of piperazinyl-pyridine ureas as antagonists of the purinergic P2Y12 receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21*, 2877. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Zhang, K.; Zhang, J.; Gao, Z.; Zhang, D.; Zhu, L.; Han, G. W.; Moss, S. M.; Paoletta, S.; Kiselev, E.; Lu, W.; Fenalti, G.; Zhang, W.; Müller, C. E.; Yang, H.; Jiang, H.; Cherezov, V.; Katritch, V.; Jacobson, K. A.; Stevens, R. C.; Wu, B.; Zhao, Q.; Structure of the human P2Y12 receptor in complex with an antithrombotic drug. *Nature* **2014**, *509*, 115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Serebruany, V. L.; Sibbing, D.; Dinicolantonio, J. J.; Dyspnea and reversibility of antiplatelet agents: ticagrelor, elinogrel, cangrelor and beyond. *Cardiology* **2014**, *127*, 20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Parlow, J. J.; Burney, M. W.; Case, B. L.; Girard, T. J.; Hall, K. A.; Harris, P. K.; Hiebsch, R. R.; Huff, R. M.; Lachance, R. M.; Mischke, D. A.; Rapp, S. R.; Woerndle, R. S.; Ennis, M. D.; Part II: Piperazinyl-glutamate-pyridines as potent orally bioavailable P2Y12 antagonists for inhibition of platelet aggregation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20*, 1388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Hao, M.; Li, Y.; Wang, Y.; Yan, Y.; Zhang, S.; Combined 3D-QSAR, molecular docking, and molecular dynamics study on piperazinyl-glutamate-pyridines/pyrimidines as potent P2Y12 antagonists for inhibition of platelet aggregation. *American Chemical Society* **2011**, *51*, 2560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Baldoni, D.; Bruderer, S.; Krause, A.; Gutierrez, M.; Gueret, P.; Astruc, B.; Dingemans, J.; A New Reversible and Potent P2Y12 Receptor Antagonist (ACT-246475): Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics in a First-in-Man Trial. *Clinical Drug Investigation* **2014**, *34*, 807. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Caroff, E.; Hubler, F.; Meyer, E.; Renneberg, D.; Gnerre, C.; Treiber, A.; Rey, M.; Hess, P.; Steiner, B.; Hilpert, K.; Riederer, M. A.; 4-((R)-2-[[6-((S)-3-Methoxypropylidino-1-yl)-2-phenylpyrimidine-4-carbonyl]amino]-3-phosphonopropionyl) piperazine-1-carboxylic Acid Butyl Ester (ACT-246475) and Its Prodrug (ACT-281959), a Novel P2Y12 Receptor Antagonist with a Wider Therapeutic Window in the Rat Than Clopidogrel. *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *58*, 9133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Sinnaeve, P.; Fahrni, G.; Schelfaut, D.; Spirito, A.; Mueller, C.; Frenoux, J. M.; Hmissi, A.; Bernaud, C.; Ufer, M.; Moccetti, T.; Atar, S.; Valgimigli, M.; Subcutaneous Selatogrel Inhibits Platelet Aggregation in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology* **2020**, *75*, 2588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Boldron, C.; Besse, A.; Bordes, M. F.; Yvon, S. T. X.; Gau, B.; Badorc, A.; Rousseaux, T.; Barré, G.; Meneyrol, J.; Zech, G.; Nazare, M.; Fossey, V.; Pflieger, A. M.; Bonnet-Lignon, S.; Millet, L.; Briot, C.; Dol, F.; Héroult, J. P.; Savi, P.; Lassalle, G.; Delesque, N.; Herbert, J. M.; Bono, F.; N-[6-(4-Butanoyl-5-methyl-1H-pyrazol-1-yl)pyridazin-3-yl]-5-chloro-1-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)-2-oxoethyl]-1H-indole-3-carboxamide (SAR216471), a Novel Intravenous and Oral, Reversible, and Directly Acting P2Y12 Antagonist. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *57*, 7293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

51. Delesque-Touchard, N.; Pflieger, A. M.; Bonnet-Lignon, S.; Millet, L.; Salel, V.; Boldron, C.; Lassalle, G.; Herbert, J. M.; Savi, P.; Bono, F.; SAR216471, an alternative to the use of currently available P2Y₁₂ receptor inhibitors? *Thrombosis Research* **2014**, *134*, 693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Hoffmann, K.; Baqi, Y.; Morena, M. S.; Glänzel, M.; Müller, C. E.; Kügelgen, I.; Interaction of New, Very Potent Non-Nucleotide Antagonists with Arg256 of the Human Platelet P2Y₁₂ Receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2009**, *331*, 2, 648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]