

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. M. Mossakowskiego PAN
Zakład Neuropeptydów

Jolanta Dyniewicz

**Synteza i badanie aktywności nowych
bifunkcyjnych peptydów: antagonistów
receptorów tachykininowych i agonistów
receptorów opioidowych**

Praca doktorska

Promotor: **prof. dr hab. Aleksandra Misicka-Kęsik**

Promotor 2009-2014: **prof. dr hab. Andrzej W. Lipkowski**

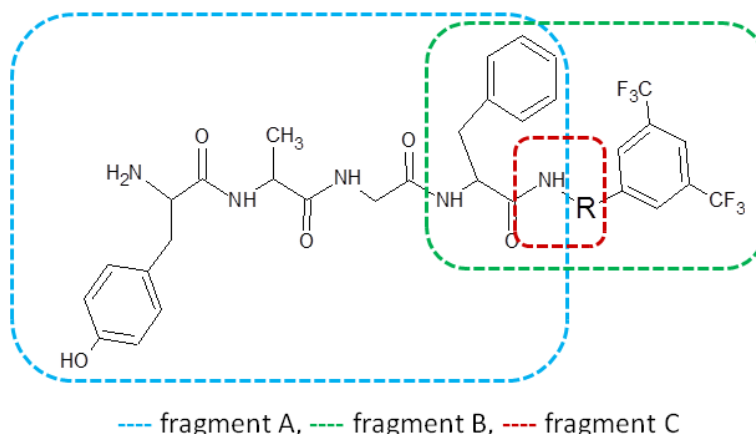


Warszawa 2015

Streszczenie

Receptory opioidowe i receptor tachykininowy, neurokininowy1 (NK1) odgrywają istotną rolę w przekazywaniu, modulowaniu i percepcji sygnału bólowego. Naturalnymi ligandami receptorów opioidowych są endogenne peptydy między innymi: endorfiny, enkefaliny, dynorfiny, endomorfiny. Natomiast najlepiej poznanym agonistą receptorów tachykininowych jest substancja P. Agoniści receptorów opioidowych (zarówno substancje egzo- jak i endogenne) oddziałują na receptor i hamują uwalnianie pronocyceptywnego neuroprzekaźnika substancji P. Natomiast antagonist receptor NK1 powoduje, że substancja P nie może związać się z odpowiednim receptorem postsynaptycznym w skutek czego bodziec bólowy nie dociera do wyższych pięter ośrodkowego układu nerwowego, co w efekcie wywołuje analgezję. Odkrycie mechanizmów wzajemnych powiązań pomiędzy tymi systemami pozwoliło na wyznaczenie nowego kierunku badań jakim są związki hybrydowe (bifunkcjonalne, biwalentne) o aktywności analgetycznej. Związki takie powinny oddziaływać zarówno z receptorami opioidowymi, jak i innymi receptorami wspomagającymi ich działanie (w przypadku mojej pracy są to antagoniści receptora NK1). Struktura farmakofora opioidowego w związkach hybrydowych często opiera się na sekwencji białiny (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NH-)₂. Ten analog enkefaliny wykazuje długotrwałą stabilność enzymatyczną, wysokie agonistyczne powinowactwo do receptorów opioidowych μ i δ , i przede wszystkim silne działanie analgetyczne. Natomiast wiele związków wykazujących własności antagonistyczne do receptora NK1 posiada pierścień aromatyczny podstawiony w pozycjach 3 i 5 grupami trifluorometylowymi (-3,5-(CF₃)₂Ph) (TFMP).

Celem niniejszej pracy doktorskiej było zaprojektowanie i zsyntetyzowanie nowych związków o charakterze hybrydowym, bifunkcjonalnych peptydów, wykazujących powinowactwo do receptorów opioidowych (μ i δ) i tachykininowego (NK1), a następnie zbadanie wpływu zmian w strukturze chemicznej otrzymanych hybryd na ich właściwości biologiczne. Poglądową strukturę zaprojektowanych

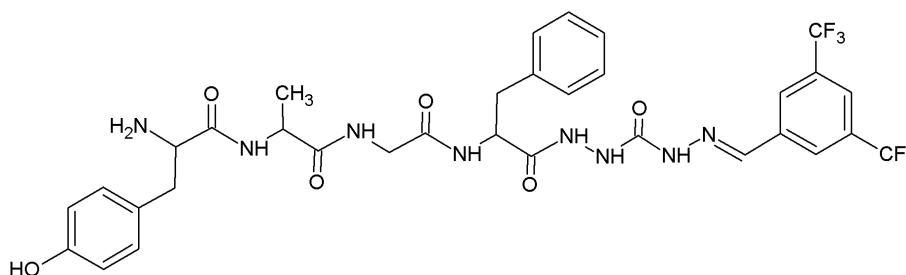


Rycina 1: Poglądowa struktura bifunkcyjnego peptydu zbudowanego z dwóch farmakoforów.

związków hybrydowych przedstawiono na rycinie 1. Podstawą dla fragmentu A odpowiedzialnego za wiązanie z receptorami opioidowymi był fragment: bifaliny, endomorfiny₂ (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂) lub deltorfiny (Tyr-D-Ala-Phe-Asp-Val-Val-Gly-NH₂). Na C-końcu peptydów umieszczono fragment zbudowany z pierścienia aromatycznego podstawionego dwoma grupami trifluorometylowymi w pozycji 3 i 5 (TFMP), który razem z pierścieniem aromatycznym fragmentu opioidowego będzie odpowiedzialny za wiązanie z receptorami NK1 (fragment B). Obydwa fragmenty łączono za pomocą kilku typów łącznika, będących pochodnymi hydrazyny (fragment C). Syntezę peptydów przeprowadzono w roztworze przy wykorzystaniu odczynników sprzęgających takich jak: DCC (*N,N'*-dicykloheksylokarbodiimid), HOSu (*N*-hydroksysukcynoimid) w obecności TMG (1,1,3,3-tetrametyloguanidyna) w dimetyloformamidzie (DMF). Związki hybrydowe oczyszczano z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych (RP-HPLC) i kolumnowej chromatografii cieczowej. Produkty kolejnych reakcji analizowano przy pomocy metod: spektrometrii mas (ESI-MS) i analitycznego RP-HPLC. Ostateczne związki analizowano również za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR).

Otrzymane związki zbadano pod kątem ich aktywności biologicznej zarówno w testach *in vitro* jak i *in vivo*. Powinowactwo związków hybrydowych do receptorów opioidowych μ i δ , i do receptora tachykininowego NK1 zbadano wykorzystując metodę kompetycyjnego wiązania radioligandów (radioligand binding assay). W badaniu wykorzystano μ , δ i NK1, specyficzne radioligandy odpowiednio [³H]

DAMGO, [^3H] DELT II i [^3H] substancja P oraz homogenat pozyskany z mózgu szczura. Radioaktywność mierzono w liczniku scyntylacyjnym. W ramach pracy otrzymano 13 związków o charakterze hybrydowym. Dla każdego ze związków wyznaczono wartości IC_{50} za pomocą testu kompetycyjnego wiązania radioligandów. Wszystkie hybrydy wykazywały niższe lub wyższe powinowactwo do receptorów opioidowych μ i δ , natomiast tylko jeden ze związków wykazał wysokie powinowactwo do receptora NK1. Najwyższe powinowactwo do receptorów opioidowych wykazały związki zbudowane z fragmentu bifaliny (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-). Jeden z tych związków, zawierający łącznik karbazonowy (-NH-NH-C(=O)-NH-N=CH-), wykazał jednocześnie wysokie powinowactwo do receptora NK1 (JZ055, rycina 2). Dzięki takiemu łącznikowi hybryda JZ055 posiada zdolność wiązania się zarówno z receptorami opioidowymi jak i NK1. Jednym z założeń struktural-



Rycina 2: Struktura hybrydy JZ055.

nych zaprojektowanych związków było, że pierścień TFMP i pierścień aromatyczny fenyloalaniny z fragmentu opioidowego będą razem pełniły rolę farmakofora neorokininowego¹. Jak jednak wykazano w tej pracy, aby spełnić to założenie istotne jest dobranie odpowiedniego łącznika pomiędzy grupami aktywnymi. Wydaje się, że dużą rolę odgrywa dystans pomiędzy fragmentem opioidowym, a pierścieniem TFMP, stanowiący fragment o powinowactwie do receptora NK1. Spośród przebadanych połączeń tylko łącznik karbazonowy (-NH-NH-C(=O)-NH-N=CH-) spełnia ten warunek. W celu sprawdzenia właściwości analgetycznych otrzymanych związków wykazujących najwyższe powinowactwo do receptorów opioidowych, przeprowadzono testy *in vivo*, w modelu zwierzęcym bólu ostrego. Efekt antynocyceptywny badano przed i po podaniu hybrydy w czasie 5, 15, 30, 60 i 120 min od momentu podania. Jeden ze związków (JZ031) badano w teście cofania łapy i w teście cofania ogona po podaniu dożylnym myszom C57BL6. Po podaniu dożylnym hybryda JZ031 wykazywała właściwości antynocyceptywne zarówno w teście cofania ogona jak i teście cofania łapy. Wyniki tego drugiego testu mogą świadczyć

o zdolności przechodzenia przez hybrydę bariery krew-mózg. Działanie analgetyczne czterech związków (JZ031, JZ043, JZ055, JZ057) badano po podaniu podopajęczynówkowym na szczurach stada Wistar w teście cofania ogona. Wszystkie zbadane hybrydy wykazywały właściwości analgetyczne. Najwyższy do osiągnięcia możliwy efekt, osiągnęła hybryda JZ055, co jest konsekwencją wykazywania powinowactwa tej hybrydy zarówno do receptorów opioidowych μ i δ , i receptora tachykininowego NK1. Zbadano również wpływ otrzymanych związków na żywotność komórek nowotworowych ludzkiego czerniaka linii Mew155. W tym celu posłużono się aparatem NucleoCounter NC-100 (ChemoMetec), którego działanie oparte jest na mikroskopii fluorescencyjnej. Kilka z otrzymanych związków hybrydowych wykazywało właściwości przeciwnowotworowe, jednak otrzymane wyniki nie są wystarczające do wyjaśnienia czy związki te działają przez receptory opioidowe czy receptor neurokininowy1. Otrzymane wyniki wskazują, że metoda tworzenia związków bifunkcyjnych i wiedza odnośnie wymagań strukturalnych niezbędnych dla osiągnięcia pożądanej aktywności biologicznej pozwala na projektowanie nowych aktywnych związków o określonych właściwościach, jednak dopiero badania zależności aktywności biologicznej od struktury chemicznej pozwalają na określenie wymogów strukturalnych i selekcję związków aktywnych.

Abstract

Opioid and tachykinin (NK1) receptors play an important role in the transduction, modulation and perception of pain signal. Endogenous peptides such as: endorphin, enkephalin, dynorphin, endomorphin are natural ligands of opioid receptors. Whereas substance P is the best known natural agonist of tachykinin receptors. Opioid agonist (both egzo- and endogenous) interact with receptors and inhibit the release of pronociceptive neurotransmitter, substance P. NK1 receptor antagonists cause that substance P cannot bind with proper postsynaptic receptors and pain signal does not reach the upper level of central nervous system, in effect induces analgesia. The discovery of the mechanism of such interrelationships between these two systems allowed the discovery of a new research direction which are hybrid compounds (bifunctional, bivalent) with analgesic activity. These kind of compounds should interact with both opioid and with other receptors which are involved in this activity (in my thesis antagonists of NK1 receptor). Opioid pharmacophore structure in hybrid compounds are often based on biphalin sequence (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NH-)₂. This enkephalin analog exhibit long lasting enzymatic stability and high agonist affinity to opioid receptors μ and δ , and strong analgesic activity. A lot of compounds which possess in the structure aromatic ring substituted in 3 and 5 positions by trifluoromethyl groups (-3,5-(CF₃)₂Ph) (TFMP) exhibit high affinity to tachykinin receptor NK1. The goal of this PhD thesis was design and synthesis new compounds with hybrid character, bifunctional peptides, which exhibit affinity to opioid (μ and δ) and NK1 receptors, and afterwards study of influence of change in chemical structure on biological activity. Illustrative structure of design hybrid compounds is presented below in figure1. The structure fragment of biphalin, endomorphin2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂) and dynorphin (Tyr-D-Ala-Phe-Asp-Val-Val-Gly-NH₂) were the base of structure of fragment A which is responsible for binding to opioid receptors. C-terminus of peptide fragment was modified by aromatic ring with two trifluoromethyl groups in position 3 and 5, which together with aromatic ring of opioid fragment should be

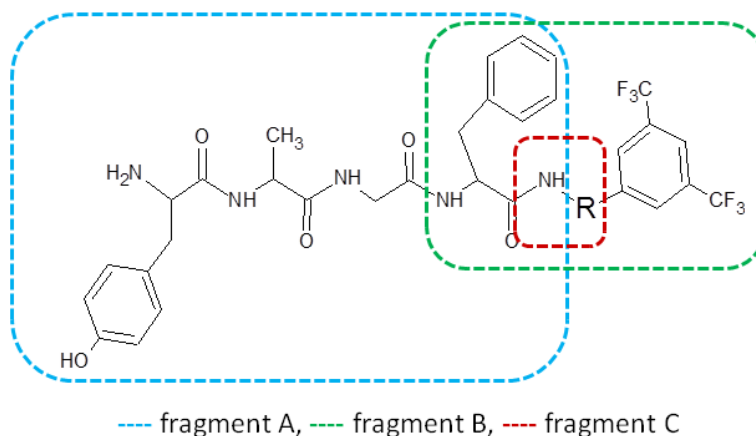


Figure 3: Illustrative structure of designed in this thesis hybrid compounds, composed of two pharmacophores.

responsible for binding to NK1 receptor (fragment B). These two fragments were connected by several kinds of linker which are derivative of hydrazine (fragment C). Peptides synthesis was carried out in solution with using coupling reagents such as: DCC (*N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide), HOSu (*N*-hydroxysuccinimide) in presence of TMG (1,1,3,3-tetramethylguanidine) in dimethylformamide (DMF). Hybrid compounds were purified with the use of reverse phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and column liquid chromatography. Products of reactions were analyzed with using mass spectrometry (ESI-MS) and with analytical RP-HPLC methods. Finally products were also analyzed with using nuclear magnetic resonance (NMR) method. Biological activity of obtained compounds was studied in both *in vitro* and *in vivo* tests. Affinity of hybrid compounds to opioid μ and δ , and to tachykinin NK1 receptors were tested with using competitive radioligand binding assay. Specific radioligands: [^3H]DAMGO, [^3H]DELT II and [^3H] substance P and homogenate obtained from rats brain were used. Radioactivity was measured in scintillation counter. Thirteen hybrid compounds were obtained. In competitive radioligand binding assay value of IC_{50} were determined for every compound. All hybrids exhibit lower or higher affinity to opioid receptors, whereas only one compound exhibit high affinity to NK1 receptor. The highest affinity to opioid receptors show compounds which were built from biphalin fragment (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-). One of these containing carbazone linker (-NH-NH-C(=O)-NH-N=CH-) exhibit high affinity to NK1 receptor also (JZ055, figure 2). The presence of this linker improves the ability to bind hybrid JZ055

to both opioid and NK1 receptors. Objective of this study was to demonstrate

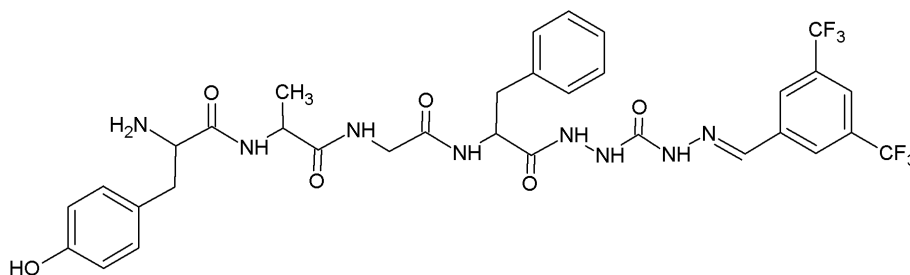


Figure 4: Structure of compound JZ055.

that the TMFP ring and the aromatic ring of phenylalanine of the opioid peptide fragment, would together act as neurokinin1 pharmacophore. However, as it was show, in order to realize this assumption a proper linker between the active groups, is essential. It seems that important role is played by distance between the opioid fragment and the ring TFMP, which is a fragment having affinity to the NK1 receptor. Only carbazone (-NH-NH-C(=O)-NH-N=CH-) linker fulfills this requirement. In order to verify the analgesic properties of compounds which possess the highest affinity to opioid receptors, were tested in in vivo animal model of acute pain. Antinociceptive effect was measured before and after administration in 5, 15, 30, 60 and 120 minutes. One of the obtained compounds (JZ031) was tested after intravenous administration on mice C57BL6 in plantar and tail-flick tests. After intravenous administration hybrid JZ031 exhibit analgesic activity in both plantar and tail-flick tests. Analgesic activity after intravenous administration in plantar test could indicate that the hybrid compound possess ability to cross blood-brain barrier. Analgesic activity of four compounds was tested on Wistar rats after intrathecal administration in tail-flick test (JZ031, JZ043, JZ055, JZ057). All tested hybrids exhibit analgesic activity. The highest maximal possible effect was achieved by JZ055 hybrid. It was a consequence that this hybrid exhibit affinity to opioid μ and δ and to tachykinin NK1 receptors. Effect of the compounds on the viability of cancer cells lines was also tested. To realize this goal NucleoCounter NC-100 (ChemoMetec) was applied, which uses fluorescence microscopy. Several hybrid compounds exhibit anticancer properties but these results do not allow to explain if compounds acts by opioid or neurokinin1 receptors. The method of creating of bifunctional compounds and knowledge about the structural necessary requirements to achieve the desired biological activity allows to design of new active compounds with specific properties but only study of chemical structure-

biological activity relationship allow determining the structural requirements and selection of active compounds.