



AMIDOWE POCHODNE KWASU NIPEKOTYNOWEGO JAKO NOWE INHIBITORY PDE8 O POTENCJALNEJ AKTYWNOŚCI ANTYFIBROTYCZNEJ

Grażyna Chłoń-Rzepa¹, Krzysztof Kassa¹, Alicja Gawalska¹, Artur Świerczek², Krzysztof Pociecha², Natalia Kocot³, Katarzyna Wójcik-Pszczola³, Monika Kubacka⁴, Szczepan Mogiński⁴, Elżbieta Wyska²

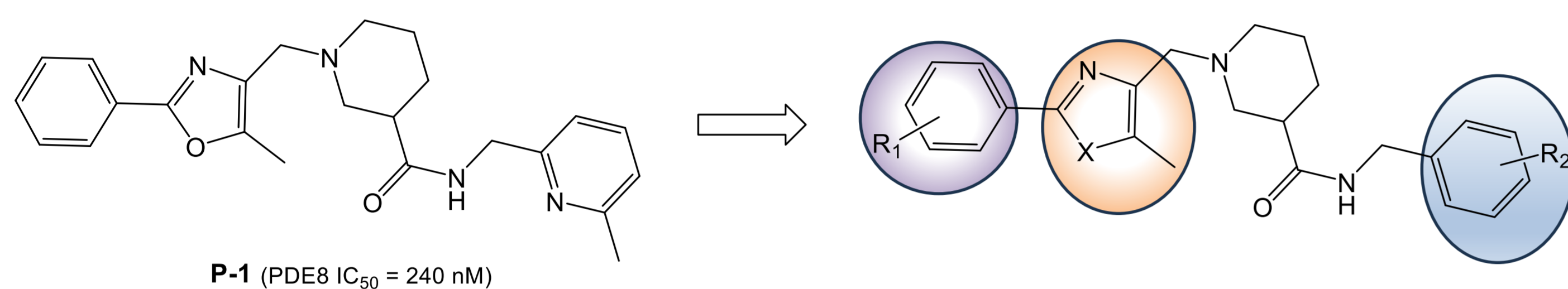
¹Katedra Chemii Farmaceutycznej, ²Katedra Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej, ³Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Katedra Farmakodynamiki, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, 30-688 Kraków, ul. Medyczna 9, Polska
grazyna.chlon-rzepa@uj.edu.pl

Wprowadzenie

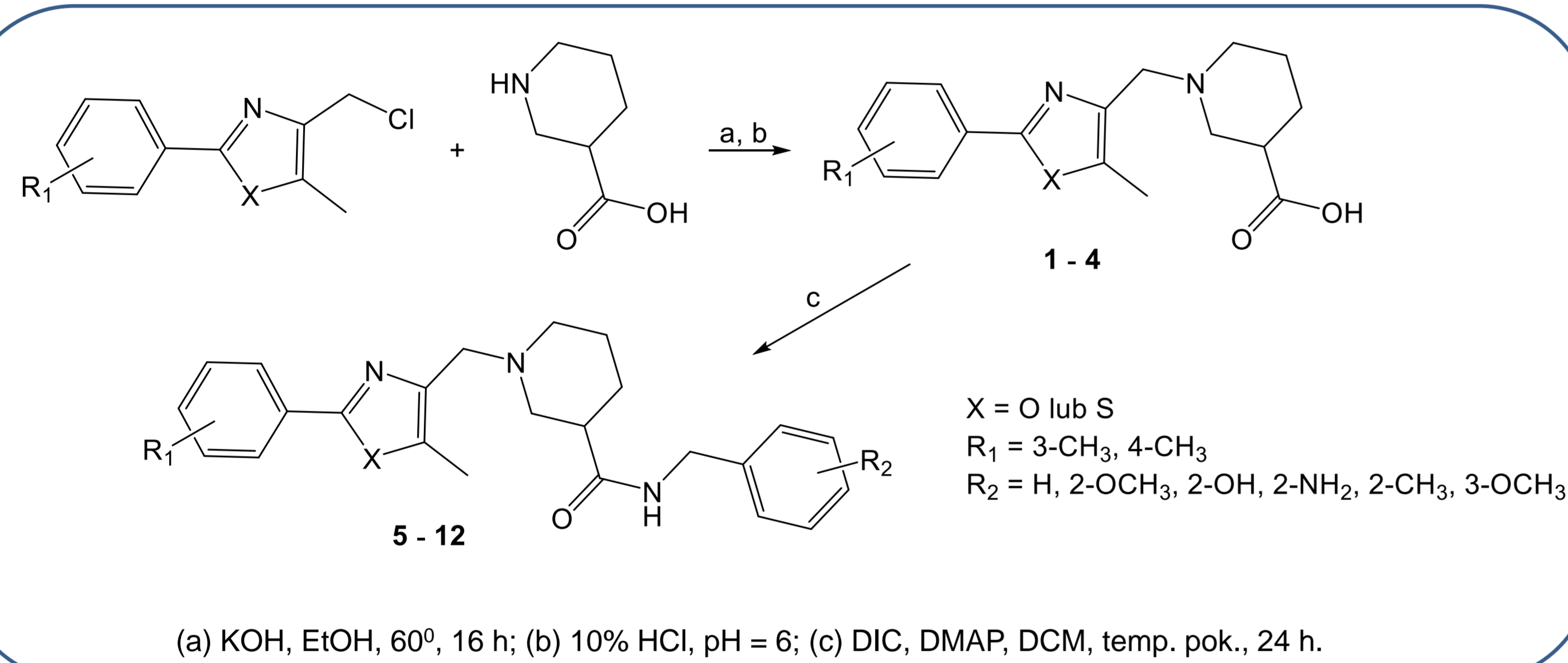
Włóknienie narządów (płuca, wątroba) prowadzące do upośledzenia ich funkcji jest konsekwencją przewlekłego procesu zapalnego. Zwiększony poziom mediatorów prozapalnych prowadzi do nasilenia syntezy białek macierzy pozakomórkowej, zwiększenia ilości fibroblastów i miofibroblastów oraz remodelingu i neoangiogenezy. Jak dotąd, nie ma skutecznych i specyficznych terapii antyfibrotycznych, stąd poszukiwanie nowych leków o tym mechanizmie działania jest szczególnie istotne. Spośród trzech cAMP specyficznych izoform fosfodiesterazy (PDE4, 7 i 8), PDE8 ma najsilniejsze powinowactwo do cAMP. Inhibitory PDE8 podnoszące poziom tego wewnątrzkomórkowego przekazywacza m.in. w płucach, mogą okazać się skuteczne w hamowaniu procesu włóknienia.

Cel badań

Zaprojektowano nowe, amidowe pochodne kwasu piperidyno-3-karboxylowego (kwasu nipekotynowego), zawierające układ arylookszazolu lub arylotiazolu w wyniku modyfikacji opisanego w literaturze związku **P-1** [1], jako nowych, selektywnych inhibitorów PDE8.



Synteza



Aktywność hamująca PDE8 *in vitro*

Dla nowych związków **5 - 12** oznaczono ich właściwości hamujące PDE8A z użyciem testu PDE-Glo™ (Promega) i ludzkiej, rekombinowanej PDE8A wykazującej ekspresję w komórkach Sf9. Wyniki przedstawione w tabeli 1 wskazują, że związki są silnymi inhibitorami PDE8A (IC₅₀ w zakresie 23 - 220 nM). W wyniku zaplanowanych modyfikacji uzyskano silniejsze inhibitory PDE8A, od opisanego w literaturze związku **P-1**.

Tabela 1. Aktywność hamująca PDE8A dla związków **5 - 12**.

| Związek | X | R ₁ | R ₂ | PDE8A IC ₅₀ [nM] |
|------------------------|---|-------------------|--------------------|-----------------------------|
| 5 | O | 4-CH ₃ | H | 220,7 |
| 6 (GRAJ-568) | O | 4-CH ₃ | 2-OCH ₃ | 54,0 |
| 7 | O | 4-CH ₃ | 2-OH | 23,2 |
| 8 | O | 4-CH ₃ | 2-NH ₂ | 81,7 |
| 9 | O | 4-CH ₃ | 2-CH ₃ | 115,3 |
| 10 | O | 4-CH ₃ | 3-OCH ₃ | 184,1 |
| 11 | S | 4-CH ₃ | 2-OCH ₃ | 113,4 |
| 12 | S | 3-CH ₃ | 2-OCH ₃ | 109,5 |

Wartości IC₅₀ oceniano metodą regresji nieliniowej, stosując osiem steżeń analizowanych związków stosując trzykrotne powtórzenia.

Wnioski

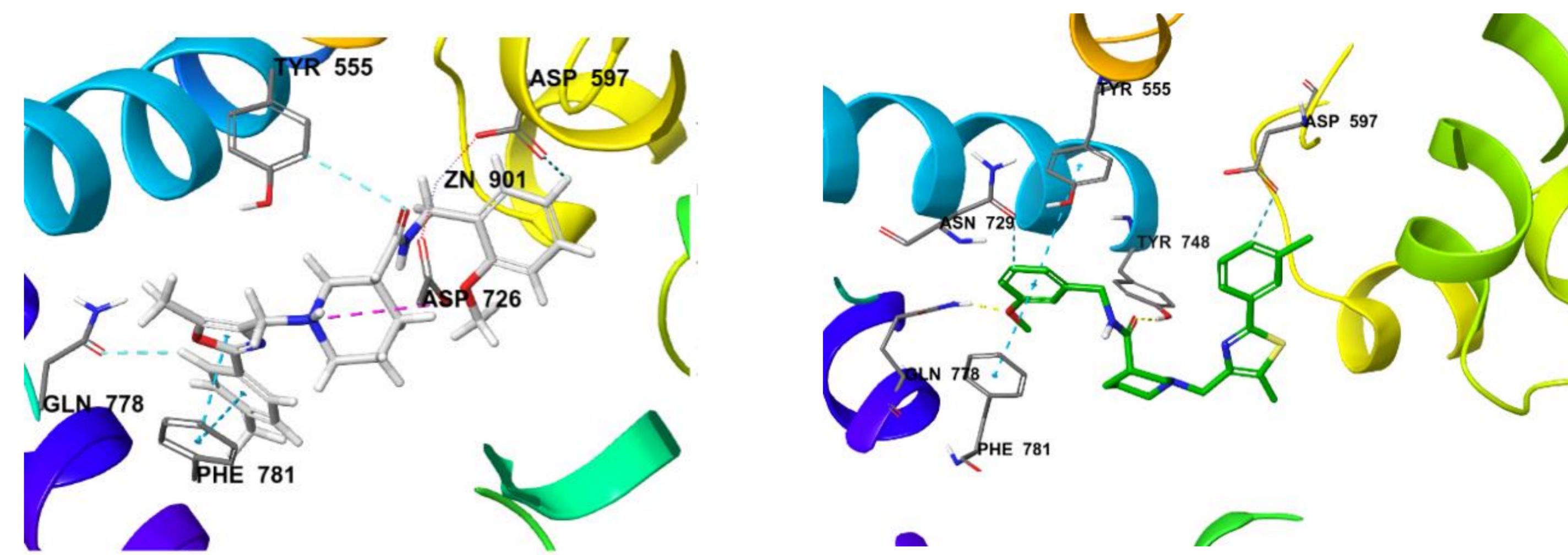
Przedstawiona klasa inhibitorów PDE8 wykazuje właściwości antyfibrotyczne na ludzkich fibroblastach płucnych oraz działanie bronchodylatoryjne i może mieć potencjalne zastosowanie w terapii przewlekłych, zapalnych chorób układu oddechowego, np. POChP, przebiegających z procesem włóknienia.

Modelowanie molekularne

Badania modelowania molekularnego przeprowadzono dla reprezentatywnych związków **6** i **12** przy użyciu procedury Induced Fit Docking (IFD). Związki wykazały specyficzny sposób wiązania charakterystyczny dla inhibitorów PDE8A.

W przypadku związku **6** atom tlenu ugrupowania oksazolowego tworzy wiązanie wodorowe z łańcuchem bocznym Gln778, z kolei karbonylowy atom tlenu nawiązuje oddziaływania wodorowe z Tyr748, natomiast pierścienie układu arylookszazolu tworzą oddziaływania aromatyczne z Phe781.

Związek **12** zawierający ugrupowanie tiazolu wiąże się w inny sposób niż pochodna oksazolowa, nawiązuje oddziaływania wodorowe pomiędzy atomem tlenu grupy metoksylowej i Gln778. Wiązanie wodorowe karbonylowego atomu tlenu z Tyr748 jest analogiczne jak dla pochodnej oksazolowej.



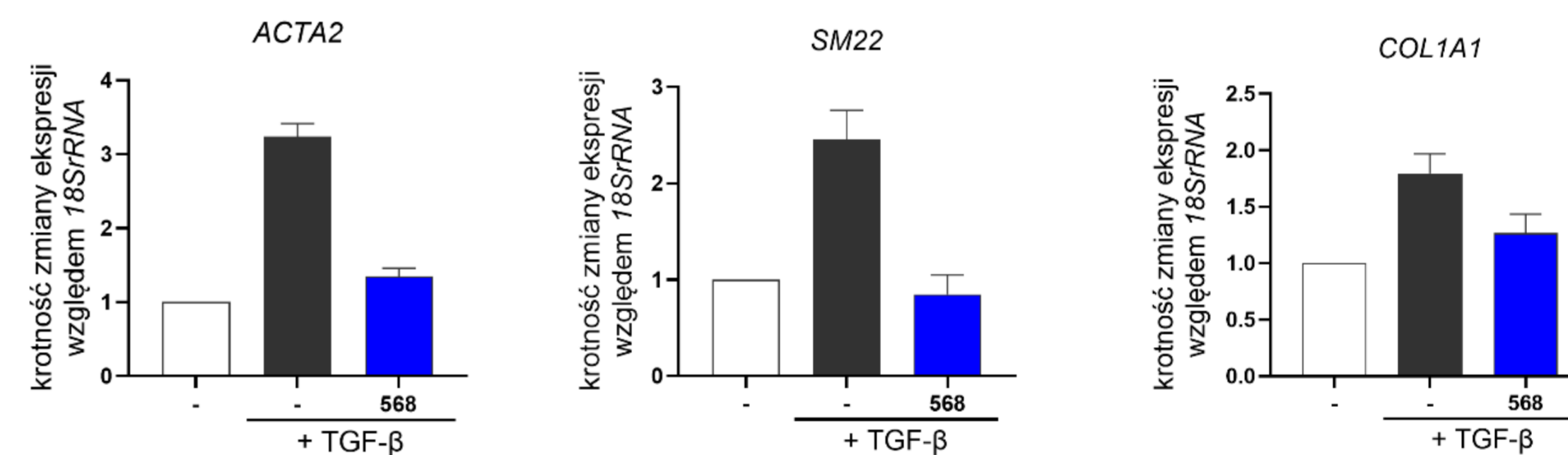
Związek 6

Związek 12

Aktywność antyfibrotyczna *in vitro*

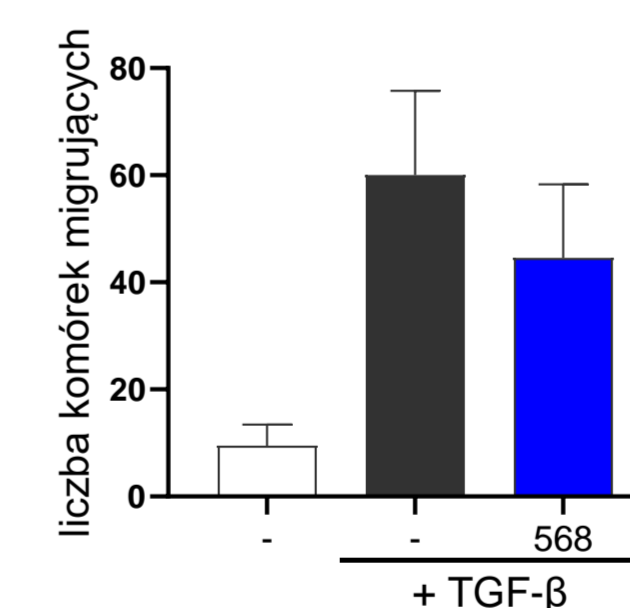
Dla wybranego inhibitora **6** (GRAJ-568) zostały zbadane właściwości antyfibrotyczne z wykorzystaniem stymulowanych TGF-β ludzkich fibroblastów płucnych. Uzyskane wyniki (Ryc. 1 - 3) wskazują, że związek ten:

➢ hamuje indukowaną TGF-β ekspresję genów profibrotycznych w ludzkich fibroblastach płuc.



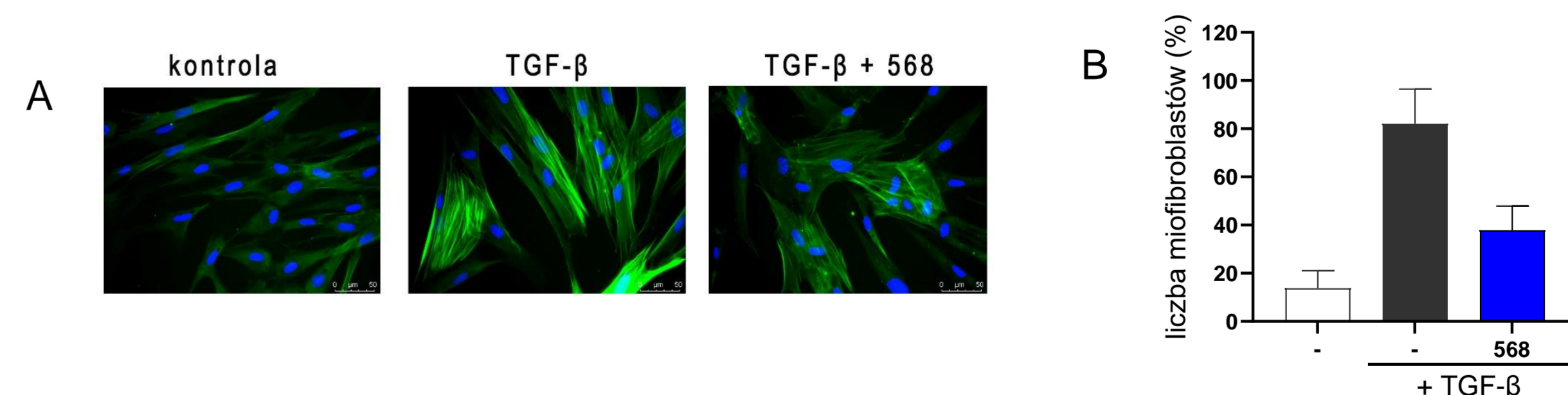
Rycina 1. Wpływ GRAJ-568 na indukowaną TGF-β ekspresję genów profibrotycznych w ludzkich fibroblastach płuc. Komórki MRC-5 inkubowano wstępnie przez 1 godzinę z testowanymi związkami (5 μM), a następnie stymulowano TGF-β (5 ng/ml) przez 24 godziny. Przeprowadzono qPCR w celu określenia poziomów transkryptów ACTA2 (A), SM22 (B) i COL1A1 (C) w porównaniu z genem metabolizmu podstawowego 18S rRNA. Każdy słupek reprezentuje średnią (±SD). Próbkę analizowano trzykrotnie w dwóch powtórzeniach.

➢ zmniejsza indukowaną TGF-β migrację ludzkich fibroblastów płuc.



Rycina 2. Wpływ GRAJ-568 na indukowaną TGF-β migrację ludzkich fibroblastów płuc. Migrację MRC-5 w odpowiedzi na TGF-β (5 ng/ml) określono za pomocą testu Transwell po 24 godzinach inkubacji z testowanymi związkami (5 μM). Migrujące komórki wybarwiono fioletem kryształowym i zliczono w losowo wybranych polach widzenia. Każdy słupek reprezentuje średnią (±SD). Eksperyment przeprowadzono trzykrotnie.

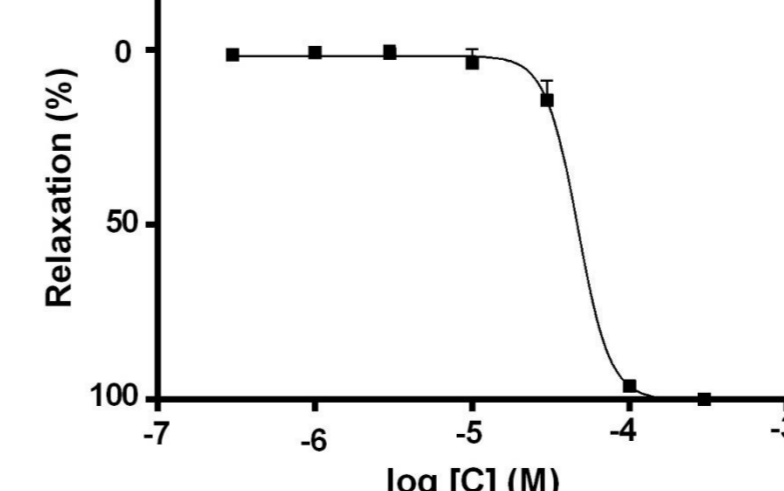
➢ łagodzi indukowane TGF-β przejście ludzkich fibroblastów płuc w miofibroblasty.



Rycina 3. Wpływ GRAJ-568 na indukowaną TGF-β liczbę miofibroblastów w populacji ludzkich fibroblastów płuc. Komórki MRC-5 inkubowano wstępnie przez 1 godzinę z testowanymi związkami (5 μM), a następnie stymulowano TGF-β (5 ng/ml) przez 24 godziny. α-SMA uwiidoczono w komórkach MRC-5 za pomocą barwienia immunocytochemicznego (A). Miofibroblasty (komórki pozytywne ze względu na obecność α-SMA) zliczono w 20 losowo wybranych polach widzenia i wyrażono jako odsetek całej populacji komórek MRC-5 (B). Każdy słupek reprezentuje średnią (±SD).

Działanie bronchodylatoryjne

Związek **6** (GRAJ-568) wykazał efekt relaksacyjny w modelu izolowanej tchawicy szczura poddanej kurczącemu działaniu karbacholu (1 μM).



| Związek | IC ₅₀ μM ± SEM | Maksymalna relaksacja (%) ± SEM |
|------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| 6 (GRAJ-568) | 47,02 ± 4,86 | 96,29 ± 0,26 |

Rycina 4. Efekt relaksacyjny związku **6** (GRAJ-568) w modelu izolowanej tchawicy szczura poddanej kurczącemu działaniu karbacholu (1 μM). Dane wyliczone z czterech eksperymentów.

Podziękowanie:

Praca była finansowana z badań statutowych UJCM, projekt nr N42/DBS/000377