

NOWE LIGANDY RECEPTORÓW 5-HT_{1A} Z OGRANICZONĄ SWOBODĄ KONFORMACYJNĄ

**Maria H. Paluchowska, Sijka Czarackiewa-
Minol, Andrzej Bojarski**

*Zakład Chemii Leków, Instytut Farmakologii PAN,
Kraków*

WPROWADZENIE

Wśród siedmiu klas receptorów serotoninowych (5-HT) najlepiej scharakteryzowanym podtypem są receptory 5-HT_{1A}. Związki z układem 1-arylopiperazyny stanowią najliczniejszą i szczegółowo przebadaną grupę ligandów tych receptorów. Ostatnio w miejsce tego fragmentu wprowadzony został również układ 1,2,3,4-tetrahydroizochinoliny (THIQ). Kilka istniejących modeli topograficznych opisuje główne oddziaływania ligand-receptor 5-HT_{1A}. I tak, związek chemiczny zostaje związany przez receptor 5-HT_{1A} wiązaniem jonowym pomiędzy resztą kwasu asparaginowego 116, a zasadowym atomem azotu liganda. Zlokalizowany w odpowiedniej odległości układ aromatyczny stabilizuje kompleks ligand-receptor. Ponadto, dodatkowe oddziaływania o charakterze lipofilowym, π - π elektronowym czy typu dipol-dipol sprzyjają trwałości kompleksu aktywnego i tym samym stanowią o powinowactwie związku do receptora.

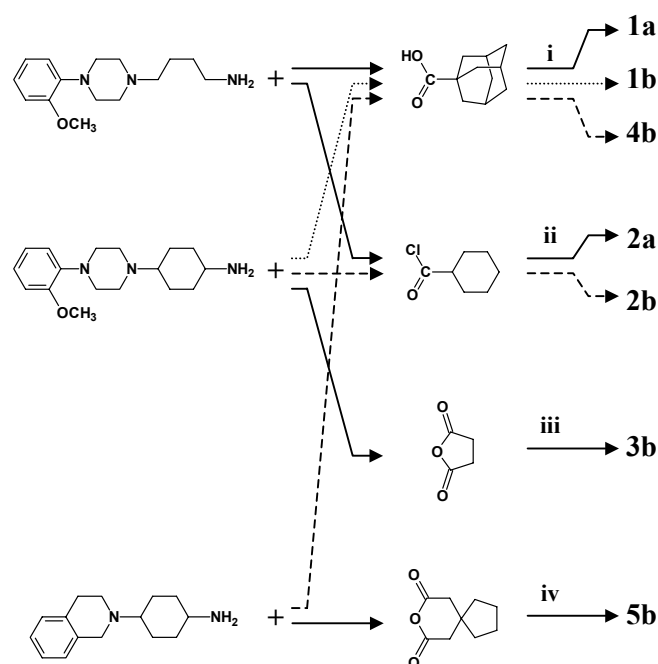
Większość arylopiperazynowych ligandów receptorów 5-HT_{1A} to związki o strukturze „liniowej”, które dzięki alifatycznemu łańcuchowi łączącemu dwa terminalne fragmenty posiadają dużą swobodę konformacyjną. Usztywnienie cząsteczki liganda ogranicza tą swobodę i ułatwia poznanie jego bioaktywnej konformacji.

Określenie bioaktywnej konformacji NAN-190, znanego antagonisty postsynaptycznych receptorów 5-HT_{1A}, z wykorzystaniem jego usztywnionych analogów zachęciło nas do rozszerzenia badań na inne ligandy tych receptorów. Zajęliśmy się tym razem aktywnymi związkami zawierającymi układ amidowy, bądź imidowy (Tabela 1, **1a** – **5a**). Trzy pierwsze zaliczyć można do arylopiperazyn, dwa następne są pochodnymi THIQ. Wszystkie wybrane ligandy zawierają tetrametylenowy mostek łączący dwa terminalne fragmenty. Sztywne analogi tych ligandów (związki **1b** – **5b**) zawierające w miejsce tego mostka 1,4-dipodstawiony pierścień cykloheksanu zostały otrzymane w wyniku wieloetapowej syntezy przedstawionej na schemacie. Kluczowym etapem było otrzymanie wyjściowych amin, których synteza została opisana wcześniej (Paluchowska M. H. et al., *J. Med. Chem.*, 1999, **42**, 4952). Struktura wszystkich usztywnionych analogów została udowodniona w oparciu o wysokorozdzielcze widma ¹H NMR (500 i 200 MHz). Analiza odpowiednich stałych sprzężeń potwierdziła, że w każdym przypadku otrzymano 1e,4e-dipodstawioną pochodną cykloheksanu.

BADANIA IN VITRO

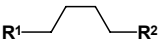
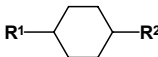
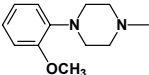
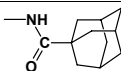
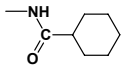
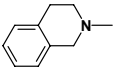
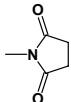
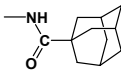
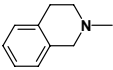
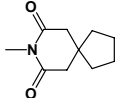
Wszystkie nowe związki (**1b** – **5b**) jak również związki **1a** i **2a** zostały poddane badaniom *in vitro*. Powinowactwo do receptorów 5-HT_{1A} (w mózgu szczura) badanych związków zostało określone na podstawie ich zdolności do wypierania [³H]-8-hydroksy-2-(di-*n*-propyloamino)tetraliny (patrz Tabela 1).

METODY OTRZYMANIA BADANYCH ZWIĄZKÓW



- i Ph₃P, NBS, Et₃N, w CH₂Cl₂, 0-25°C; wyd. 55–70%
- ii 20% r-r K₂CO₃ / CHCl₃, 25°C; wyd. 73–80%
- iii ksylen, temp. wrzenia; wyd. 52%
- iv pirydyna, temp. wrzenia; wyd. 11%

**TABELA 1. STRUKTURA BADANYCH ZWIĄZKÓW
I ICH STAŁE WIĄZANIA K_i DO RECEPTORA
5-HT_{1A}**

a:		b:	
Związek	R ¹	R ²	K _i ± SEM [nM]
1a			7 ± 1 ^a
1b			52 ± 2
2a			4.0 ± 0.2 ^b
2b			44 ± 5
3a			6.4 ± 0.3 ^c
3b			15 ± 3
4a			0.95 ± 0.04 ^d
4b			1354 ± 4
5a			5.0 ± 0.2 ^e
5b			2356 ± 156

^a 0.4 ± 0.03 wg Raghupathi R. K. et al., *J. Med. Chem.*, 1991, **34**, 2633-2638.

^b 0.6 ± 0.1 wg El-Bermawy M. et al., *Med. Chem. Res.*, 1992, **2**, 88-95.

^c Mokrosz M. J. et al., *Med. Chem. Res.*, 1994, **4**, 161-169.

^d Mokrosz M. J. et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 1999, **7**, 287-295.

^e Mokrosz M. J. et al., *J. Med. Chem.*, 1996, **39**, 1125-1129.

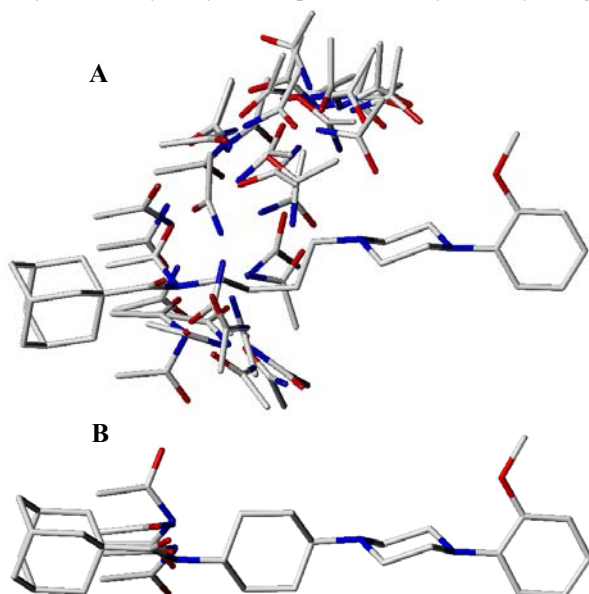
ANALIZA KONFORMACYJNA

Wszystkie 10 związków poddano analizie konformacyjnej przy pomocy procedury „Random Search” z pakietu Sybyl 6.6 (Tripos). W każdym przypadku zastosowano identyczny zestaw parametrów: max iteration – 1000; minimization method – conjugated gradient; max cycles – 500; energy cutoff – 3 kcal/mol; dla pozostałych parametrów użyto wartości domyślnych.

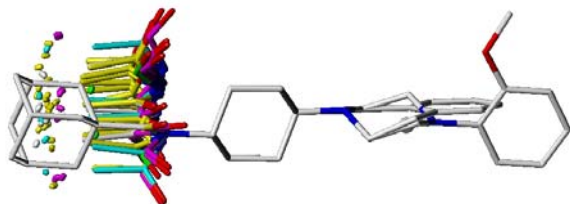
TABELA 2. WYNIKI ANALIZY KONFORMACYJNEJ ZWIĄZKÓW 1A – 5B

Zw.	Liczba wiązań rotacyjnych	Liczba konformacji	Zw.	Liczba wiązań rotacyjnych	Liczba konformacji
1a	6	40	1b	3	6
2a	6	74	2b	3	20*
3a	5	79	3b	2	2
4a	6	52	4b	3	5
5a	5	40	5b	2	8

* znacznie większa liczba konformacji związku **2b** w porównaniu z **1b** wynika z niesymetryczności podstawnika cykloheksylowego.



Rysunek 1. Wyniki analizy konformacyjnej dla związku **1a** (A) oraz jego sztywnego analogu **1b** (B). Wszystkie konformacje zostały nałożone fragmentem *o*-OMe-fenylopiiperazynowym. Dla uproszczenia pokazano tylko po jednej konformacji, a w pozostałych (39 dla związku **1a** i 5 dla związku **1b** – patrz Tabela 2) zaznaczono tylko położenie wiązania amidowego.



Rysunek 2. Nałożenie wszystkich otrzymanych konformacji dla związków sztywnych **1b – 5b** (patrz Tabela 2). Związki **4b** i **5b** z układem THIQ nałożono na pochodne z *o*-OMe-fenylopiiperazyną przy pomocy zasadowego atomu azotu i sąsiadujących atomów węgla. Kropki po lewej stronie

obrazują położenie środka ciężkości układów hydrofobowych.

DYSKUSJA WYNIKÓW

1. Wprowadzenie pierścienia cykloheksanowego w miejsce giętkiego mostka teterametylenowego ogranicza zdecydowanie liczbę niskoenergetycznych konformacji (patrz Tabela 2). Dodatkowo, jak przedstawiono na rysunku 1B wszystkie dominujące konformacje sztywnego związku **1b** należą do rodziny „extended”, w której układ amidowy jak i podstawnik adamantylowy zajmują podobny, ograniczony fragment przestrzeni (kieszka hydrofobowa receptora). Analogicznie, w pozostałych usztywnionych związkach układy amidowe bądź imidowe oraz fragmenty cykloalkilowe mieszczą się w tym samym obszarze przestrzeni (Rysunek 2).
2. Usztywnienie struktury ligandów pochodnych *o*-OMe-fenylopiiperazyny, tj. związków **1a–3a** powoduje niewielkie osłabienie powinowactwa do receptorów 5-HT_{1A}, ale w dalszym ciągu sztywne analogi są silnymi ligandami tych receptorów (por. **1a** vs **1b**, **2a** vs **2b** i **3a** vs **3b**).
3. Analogiczna modyfikacja ligandów **4a** i **5a** z układem THIQ prowadzi do prawie całkowitego zaniku powinowactwa do receptorów 5-HT_{1A} (por. **4a** vs **4b** i **5a** vs **5b**). Bardzo silne powinowactwo do receptorów 5-HT_{1A} giętkich związków **4a** i **5a** można wyjaśnić tym, że związki z THIQ prawdopodobnie tworzą inny niż arylopiiperazyny kompleks z receptorem.
4. Zastąpienie w związku **1b** ($K_i = 52$ nM) fragmentu *o*-OMe-fenylopiiperazyny przez THIQ daje związek **4b**, pozbawiony powinowactwa do receptorów 5-HT_{1A} ($K_i = 1354$ nM). Jak wynika z nałożenia obu układów różnią się one ułożeniem w przestrzeni pierścieni aromatycznych we fragmentach heterocyklicznych. (Rysunek 2). Płaszczyzny tych pierścieni są prostopadłe.
5. Podstawienie w **1b** adamantylu przez cykloheksyl prowadzi do związku **2b**, o porównywalnym powinowactwie do receptorów 5-HT_{1A} ($K_i = 52$ i 44 nM, odpowiednio). Sugeruje to, że mimo dużej objętości kieszeni hydrofobowej receptora podstawnik cykloheksylowy jest wystarczający do silnej stabilizacji kompleksu aktywnego.
6. Zastąpienie fragmentu amidowego w tych związkach układem imidu kwasu bursztynowego daje związek **3b** o stałej wiązania $K_i = 15$ nM. Pozwala to wysnuć hipotezę, że w tym przypadku oddziaływania hydrofobowe zostały zastąpione dodatkowymi interakcjami w obrębie układu imidowego.

WNIOSKI

- Znalaziono nowe ligandy receptorów 5-HT_{1A} z grupy arylopiiperazyn o usztywnionej strukturze ($K_i = 15 – 52$ nM).
- Analiza konformacyjna pozwoliła określić miejsce obszaru oddziaływań hydrofobowych stabilizujących kompleks ligand–receptor 5-HT_{1A}.
- W dalszym etapie zostaną podjęte odpowiednie badania *in vivo*, które pomogą określić bioaktywne konformacje prezentowanych związków.