

**Synteza i charakterystyka farmakologiczna nowych analogów
o mieszanym powinowactwie do receptorów odpowiedzialnych za
modulację efektów bólowych**

Praca na stopień doktora nauk medycznych
wykonana w Zakładzie Chemii Biomolekularnej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Promotor

Prof. dr hab. n. med. Anna Janecka

Karol Wtorek

Łódź, 2023

I STRESZCZENIE

Ból towarzyszy ludzkości od zarania dziejów. Obecnie używane środki przeciwbólowe stosowane w łagodzeniu umiarkowanego bólu to głównie niesteroidowe leki przeciwzapalne, a przy silnym bólu opioidy. Opioidy, w tym morfina, pozostają najskuteczniejszymi lekami przeciwbólowymi, niestety długotrwałe ich przyjmowanie wiąże się z występowaniem niebezpiecznych efektów ubocznych, takich jak depresja oddechowa, uporczywe zaparcia, rozwój tolerancji i uzależnienia. Opioidowe leki przeciwbólowe wywierają swoje działanie farmakologiczne działając na cztery podtypy receptorów opioidowych, mu (μ) (MOR), delta (δ) (DOR), kappa (κ) (KOR) i receptor nocyceptyny (NOP). Ponadto wiadomo, że inne układy neuroprzekaźników, między innymi układ neurokininowy, są zaangażowane w modulację bólu.

W mojej pracy doktorskiej skoncentrowałem się na poszukiwaniu nowych ligandów, które modulują wyżej wymienione układy bólowe i wykazują lepszy profil działań terapeutycznych i mniej skutków ubocznych. Dysertacja składa się z czterech prac oryginalnych i dwóch artykułów przeglądowych.

W pierwszych dwóch pracach przedstawiłem badania nad nowymi analogami endomorfiny-2 (EM-2) oraz cyklopeptydu Tyr-c[D-Lys-Phe-Phe-Asp]NH₂, których celem były modyfikacje chemiczne w kluczowych dla wiązania analogów z receptorem MOR pozycjach. Zastąpienie 2',6'-dimetylotyrozyny w pozycji 1 EM-2 przez aminokwas zawierający atom chloru, 3'-chloro-2',6'-dimetylotyrozynę, zwiększyło powinowactwo otrzymanego peptydu [Dmt(3'-Cl)¹]EM-2 do MOR oraz zmniejszyło jego lipofilowość, co jest ważne w rozważaniach nad przechodzeniem peptydów przez barierę krew-mózg. Badania konformacyjne wskazały na istotny wpływ interakcji atomu chloru ligandu na stałą wiązania z receptorem, co tłumaczy eksperymentalnie zmierzone duże powinowactwo [Dmt(3'-Cl)¹]EM-2 do MOR.

Zastąpienie w cyklopeptydzie Tyr-c[D-Lys-Phe-Phe-Asp]NH₂ D-Lys przez (*R*)- lub (*S*)- β -Lys spowodowało znaczne zmniejszenie lub wręcz utratę powinowactwa otrzymanych analogów do receptora MOR, wskazując na istotny wpływ konfiguracji użytego β -aminokwasu. Badania konformacyjne wykazały, że w przypadku analogów zawierających β -aminokwas pierścienie aromatyczne dwóch reszt fenyloalaniny, odpowiedzialne za wysokie powinowactwo cyklopeptydu do MOR nie mogły pomieścić się w kieszeni receptora.

W drugiej części rozprawy zająłem się projektowaniem oraz badaniem powinowactwa, aktywności i działania przeciwbólowego peptydów hybrydowych, aktywujących jednocześnie dwa typy receptorów, MOR/NK1 oraz MOR/NOP.

Peptydy hybrydowe o profilu MOR/NK1 powstały poprzez połączenie agonisty receptora opioidowego Tyr-c[D-Lys-Phe-Phe-Asp]NH₂ z różnej długości fragmentami substancji P (agonisty NK1) lub spantidu II (antagonisty NK1). Wszystkie otrzymane hybrydy charakteryzowały się dużym, choć zmniejszonym w stosunku do fragmentu opioidowego, powinowactwem do MOR i KOR, natomiast wysokie powinowactwo do NK1 miały tylko związki zawierające 6-peptydowe fragmenty spantidu II lub SP i te hybrydy wybrałem do badań *in vivo*. W badaniach na myszach zarówno hybrydy typu MOR agonista/NK1 antagonistą jak i MOR agonista/NK1 agonista wywoływały silne działanie przeciwbólne w teście wicia, co wskazuje na synergistyczny efekt jednoczesnego aktywowania różnych receptorów zaangażowanych w modulację efektów bólowych. Najbardziej znaczącym wynikiem było wykazanie, że analogi typu agonista opioidowy/agonista lub antagonistą NK1 nie powodowały rozwoju tolerancji ani zaparć.

Druga seria hybryd obejmowała analogi o powinowactwie do klasycznych receptorów opioidowych oraz do receptora NOP. Fragmentem opioidowym, podobnie jak w poprzedniej serii, był cyklopeptyd Tyr-c[D-Lys-Phe-Phe-Asp]NH₂, natomiast fragmentem łączącym się z receptorem NOP był znany z literatury syntetyczny peptyd Ac-RYYRIK-NH₂. Oba fragmenty połączone były albo bezpośrednio, albo za pomocą łącznika Gly-Gly-Gly. Obie hybrydy wykazywały podobne jak macierzysty cyklopeptyd powinowactwo do receptorów MOR i KOR, ale tylko hybryda nie zawierająca łącznika triglicynowego aktywowała receptorNOP. Dlatego związek bez łącznika wybrałem do eksperymentów *in vivo*. Analog ten wykazywał w teście gorącej płytki silne, choć nieco słabsze niż EM-2, właściwości przeciwbólne. Dalsze badania potwierdziły, że w wywoływaniu efektu przeciwbólowego brały udział zarówno receptory opioidowe jak i NOP.

Podsumowując, ustalenia tego doktoratu poszerzają wiedzę na temat wpływu niebiałkowych aminokwasów na powinowactwo analogów do receptorów opioidowych oraz wpływu biwalentnych hybryd na interakcję z dwoma typami receptorów, na właściwości przeciwbólne i towarzyszące im efekty uboczne. Wyniki te mogą być pomocne w dalszych badaniach nad systemem opioidowym i bólem, które są prowadzone w różnych ośrodkach na świecie z nadzieją, że doprowadzą w przyszłości do identyfikacji skuteczniejszych i bezpieczniejszych leków opioidowych o szerszym spektrum terapeutycznym i znikomych skutkach ubocznych.

SUMMARY

Pain has accompanied humanity since the dawn of time. The currently used analgesics for the relief of moderate pain are mainly non-steroidal anti-inflammatory drugs, and for severe pain, opioids. Opioids, including morphine, remain the most effective analgesics, but unfortunately their long-term use is associated with dangerous side effects, such as respiratory depression, persistent constipation, development of tolerance and addiction. Opioid analgesics exert their pharmacological effects by acting on four subtypes of opioid receptors, mu (μ) (MOR), delta (δ) (DOR), kappa (κ) (KOR) and nociceptin receptors (NOP). In addition, other neurotransmitter systems, including the neurokinin system, are known to be involved in pain modulation.

In this Ph.D. thesis, I focused my scientific interests on the search for new ligands that could modulate the above-mentioned pain systems and show a better therapeutic action profile and fewer side effects. The dissertation consists of four original papers and two review articles.

In the first two papers, I presented research on new analogs of endomorphin-2 (EM-2) and the Tyr-c[D-Lys-Phe-Phe-Asp]NH₂ cyclopeptide, the aim of which were chemical modifications in key positions important for binding of analogs to the MOR receptor. Replacing 2',6'-dimethyltyrosine in position 1 of EM-2 by an amino acid containing a chlorine atom, 3'-chloro-2',6'-dimethyltyrosine, increased the affinity of the obtained peptide [Dmt(3'-Cl)¹]EM-2 to MOR and reduced its lipophilicity, which is important in the consideration of the passage of peptides through the blood-brain barrier. Conformation studies showed a significant influence of the chlorine atom of the ligand on the binding with the receptor, which explains the experimentally measured high affinity of [Dmt(3'-Cl)¹]EM-2 to MOR.

Replacing D-Lys in the cyclopeptide Tyr-c[D-Lys-Phe-Phe-Asp]NH₂ with (R)- or (S)- β -Lys caused a significant decrease or even loss of the affinity of the obtained analogs for the MOR receptor, indicating an important role of the configuration of the β -amino acid. Conformation studies have shown that in the case of analogs containing β -amino acid, the aromatic rings of two phenylalanine residues, responsible for high affinity for the MOR could not fit into the pocket of the receptor.

In the second part of the dissertation, I concentrated on the design of hybrid peptides that simultaneously activate two types of receptors, MOR/NK1 and MOR/NOP and studied their affinity, activity and analgesic effects. Hybrid peptides with the MOR/NK1 profile were obtained by combining the opioid receptor agonist Tyr-c[D-Lys-Phe-Phe-Asp]NH₂ with various length fragments of substance P (NK1 agonist) or spantide II (NK1 antagonist). All

obtained hybrids were characterized by high affinity to MOR and KOR, although lower compared to the opioid fragment, while only compounds containing hexapeptide fragments of spantide II or SP had high affinity to NK1, so I selected these hybrids for the *in vivo* studies. In experiments on mice, both MOR agonist/NK1 antagonist and MOR agonist/NK1 agonist hybrids produced potent analgesia in the writhing test, indicating a synergistic effect of simultaneous activation of different receptors involved in the modulation of pain effects. The most significant result was the demonstration that the opioid agonist/NK1 agonist or antagonist did not cause the development of tolerance or constipation.

The second series of hybrids included analogs with affinity for classical opioid receptors and for the NOP receptor. The opioid fragment, as in the previous series, was the Tyr-c[D-Lys-Phe-Phe-Asp]NH₂ cyclopeptide, while the fragment binding to the NOP receptor was the Ac-RYYRIK-NH₂ peptide, known from the literature. Both fragments were connected either directly or via a Gly-Gly-Gly linker. Both hybrids showed similar affinity for the MOR and KOR receptors as the parent cyclopeptide, but only the hybrid lacking the triglycine linker activated the NOP receptor. Therefore, I chose the compound without a linker for the *in vivo* experiments. This analog showed strong, although slightly weaker than EM-2, analgesic properties in the hot plate test. Further studies confirmed that both opioid and NOP receptors were involved in the mediation of the analgesic effect.

In conclusion, the findings of this PhD dissertation broaden our understanding of the impact of non-proteinogenic amino acids on the affinity of analogs for opioid receptors and of bivalent hybrids on interaction with two types of receptors, analgesic properties and accompanying side effects. These results may be helpful in further studies on the opioid system and pain, which are being conducted in various centers around the world, with the hope that in the future they will lead to the identification of more effective and safer opioid drugs with a wider therapeutic spectrum and negligible side effects.