

Małgorzata Góra

Synteza i badania chemiczno-farmakologiczne nowych pochodnych 1,3-podstawionego pirolidyno-2,5-dionu o potencjalnej aktywności przeciwdrgawkowej

We wstępie pracy omówiono kierunki poszukiwania nowych leków przeciwpadaczkowych, przedstawiono również najnowsze leki wprowadzone do leczenia w ostatnich trzech dekadach oraz związki o aktywności przeciwdrgawkowej, będące w badaniach klinicznych.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było otrzymanie serii nowych pochodnych, w których podstawowym układem jest 1,3-podstawiony-pirolidyno-2,5-dion. Główne modyfikacje strukturalne dotyczyły podstawnika w położeniu-3 pirolidyno-2,5-dionu, łącznika pomiędzy tym układem a różnie podstawioną arylopiperazyną, a także zastąpienie arylopiperazyny – morfoliną, w celu zbadania wpływu tych zmian na aktywność przeciwdrgawkową. Oprócz analizy aktywności przeciwdrgawkowej dla wybranych związków przeprowadzono badanie aktywności przeciwbólowej, następnie wykonano badania *in vitro* radioreceptorowe i działania hepatotoksycznego, a także oszacowano właściwości fizykochemiczne *in silico*.

W części eksperymentalnej opisano kilkustopniową syntezę zaplanowanych pochodnych, w wyniku której otrzymano siedem serii związków, co stanowiło pięćdziesiąt jeden nowych pochodnych. Struktury otrzymanych związków potwierdzono analizą widm rezonansu magnetycznego ^1H NMR, ^{13}C NMR oraz analizą widm spektrometrii mas MS. Czystość i jednorodność sprawdzono przy użyciu metod chromatografii cienkowarstwowej (TLC) i chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas (LC/MS).

Wszystkie otrzymane związki zostały przekazane do Katedry Farmakodynamiki UJ CM w celu wykonania wstępnych badań farmakologicznych w kierunku aktywności przeciwdrgawkowej. Wstępny *screening* obejmował badania *in vivo* na myszach – test maksymalnego wstrząsu elektrycznego (MES), test drgawek psychomotorycznych 6 Hz i test drgawek wywołanych podskórnym podaniem kardiazolu (*sc*PTZ, wykonany dla wybranych struktur) oraz badanie neurotoksyczności (NT) w teście obracającego się pręta (*rotarod*).

Otrzymane wyniki badań farmakologicznych wykazały, że szesnaście z badanych związków charakteryzowało się istotną statystycznie aktywnością przeciwdrgawkową. Związki te aktywne były głównie w teście drgawek wywołanych prądem elektrycznym 6 Hz, część także

w teście MES. Następnie dla tych związków wykonano badania ilościowe na myszach, najaktywniejszy okazał się związek **2g** 3-(benzo[*b*]tiofen-2-yl)-1-(2-morfolinopropyl)-pirolidyno-2,5-dion (MES test: ED₅₀ = 24,10 mg/kg, 6 Hz test: ED₅₀ = 30,85 mg/kg), który wykazał kilkukrotnie mniejszą wartość dawki efektywnej (ED₅₀) niż kwas walproinowy (testy MES i 6 Hz) i etosuksymid (test 6 Hz) oraz kilkukrotnie korzystniejszą wartość indeksu terapeutycznego (PI) niż wyżej wymienione leki referencyjne.

Wybranych dziewięć związków zostało również przebadanych pod kątem aktywności przeciwbólowej w testach gorącej płytki, formalinowym i przeciągania. Najaktywniejsze w tych testach okazały się związki: **3a** – 3-benzhydrylo-1-{2-[4-(3-trifluorometylofenylo)piperazyn-1-yl]-2-oksoetylo}-pirolidyno-2,5-dion, oraz **7f** – chlorowodorek 1-{3-[4-(3,4-dichlorofenylo)piperazyn-1-yl]propyl}-3-(3-metylotiofen-2-yl)-pirolidyno-2,5-dionu, które aktywne były w dwóch zastosowanych testach w dawce 30 mg/kg.

Dla wybranych aktywnych związków w celu ustalenia prawdopodobnego mechanizmu działania wykonano badania radioreceptorowe powinowactwa do kanałów sodowych, wapniowych, receptorów GABA_A i TRPV1, a także do transporterów GABA (GAT). Uzyskane wyniki wykazały, że w aktywność przeciwdrgawkową i przeciwbólową niektórych związków mogą być zaangażowane napięciowo zależne kanały sodowe, w mniejszym stopniu kanały wapniowe, a także receptory TRPV1.

Najaktywniejsze związki poddano również ocenie właściwości fizykochemicznych w oparciu o reguły Lipińskiego i Vebera, korzystając z internetowego narzędzia SwissAdme, analiza ta wykazała, że większość nowo zsyntetyzowanych związków jest zgodna ze wszystkimi kryteriami tych reguł.

Aktywne pochodne zostały także poddane ocenie właściwości hepatotoksycznych w teście PrestoBlue z wykorzystaniem linii komórkowych HepG2, który wykazał, że badane pochodne nie indukowały hepatotoksyczności.

Podsumowując, niniejsza praca doktorska pozwoliła na identyfikację nowych, interesujących związków, które stanowią podstawę do kontynuowania badań nad optymalizacją struktury pochodnych pirolidyno-2,5-dionu o aktywności przeciwdrgawkowej, a także na wyciągnięcie cennych wniosków dotyczących zależności pomiędzy budową chemiczną a aktywnością biologiczną (SAR) analizowanych połączeń.

The introduction of the doctoral thesis discusses the search for new antiepileptic drugs and presents third-generation anticonvulsants, introduced into treatment in the last three decades and compounds that are in clinical trials.

The aim of the doctoral thesis was to obtain series of new derivatives of 1,3-substituted-pyrrolidine-2,5-dione. The main structural modifications concerned the different substituents in the position-3 of the pyrrolidine-2,5-dione ring, the type of the linker between the pyrrolidine-2,5-dione ring and variously substituted arylpiperazine, and the replacement of arylpiperazine with morpholine in order to assess their effect on anticonvulsant activity. For the selected compounds the study of analgesic activity, followed by *in vitro* radioreceptor and hepatotoxicity tests, and the physicochemical properties *in silico* were assessed.

In the experimental part of the thesis, a multi-step synthesis of designed derivatives was described, as a result of which seven series of compounds were obtained, which constituted fifty-one new derivatives. The structures of the obtained compounds were confirmed by spectral analysis (¹H NMR, ¹³C NMR, LC/MS). Their purity and homogeneity were checked by thin layer chromatography (TLC) and liquid chromatography with mass spectrometry (LC/MS).

All the obtained final compounds were tested in preliminary pharmacological tests for anticonvulsant activity, which were performed in the Department of Pharmacodynamics UJ CM. The initial screening includes *in vivo* tests in mice – maximal electroshock seizure test (MES), psychomotor seizure test (6 Hz) and subcutaneous pentylenetetrazole test (scPTZ, performed for the selected structures) and rotarod test for acute neurological toxicity (NT).

The obtained results showed that sixteen of the tested compounds were active, mainly in the 6 Hz test, some of them also in the MES test. For these sixteen active compounds quantitative tests were performed in mice, among them, the most active compound was **2g** 3-(benzo[*b*]thiophen-2-yl)-1-(2-morpholinopropyl)-pyrrolidine-2,5-dione (ED₅₀ = 24,10 mg/kg in MES test, ED₅₀ = 30,85 mg/kg in 6 Hz test), which showed several fold lower ED₅₀ value than valproic acid (MES and 6 Hz tests) and ethosuximide (6 Hz test) and several fold more beneficial therapeutic index (PI) value than the reference drugs mentioned above.

The selected nine compounds were also tested for analgesic activity in the hot plate, formalin and writhing tests, the most active compounds in these tests were **3a** 3-benzhydryl-1-{2-[4-(3-trifluoromethylphenyl)piperazin-1-yl]-2-oxoethyl}-pyrrolidine-2,5-dione and **7f** – 1-{3-[4-(3,4-dichlorophenyl)piperazin-1-yl]propyl}-3-(3-methylthiophen-2-yl)-pyrrolidine-2,5-dione hydrochloride, which were active in the two used tests at the dose of 30 mg/kg.

In order to determine the possible mechanism of action, for the selected active compounds, radioreceptor affinity studies were performed for sodium and calcium channels,

GABA_A and TRPV1 receptors, as well as for the GABA transporters (GAT). The obtained results showed that voltage-dependent sodium channels, and to a lesser extent calcium channels, as well as TRPV1 receptors may be involved in the anticonvulsant and analgesic activity of some active compounds.

The most active compounds were also characterized physicochemically, based on the Lipiński and Veber rules, using the SwissAdme online tool. The analysis showed that majority of the tested compounds were comply with all the criteria of these rules.

The active derivatives were also examined in the PrestoBlue test using the HepG2 cell lines, which showed that these compounds do not induce hepatotoxicity.

Concluding, in the presented doctoral thesis, the identification of the new, interesting compounds, which constitute the basis for continuing studies on the optimization of the structure of pyrrolidine-2,5-dione derivatives with anticonvulsant activity was performed. The relationship between chemical structure and biological activity (SAR) of the final compounds, was also determined.