

AGNIESZKA JANKOWSKA

“Novel Anilide and Benzylamide Derivatives as 5-HT_{1A}/5-HT₇ Receptor Ligands and Phosphodiesterase Type 4 and 7 Inhibitors with Potential Procognitive and Antidepressant Activity”

ABSTRACT

The increasing global prevalence of dementia, the alarming rise in issues related to mental health in society, and the resulting frequent comorbidities of cognitive and depressive disorders have prompted the search for procognitive and antidepressant drugs as one of the leading research topics worldwide. However, the treatment of memory and mood disorders with selectively acting drugs, involving a receptor or an enzymatic mechanism of action, is not sufficiently effective. Hence, other therapeutic strategies are being investigated, including the design of multifunctional ligands, *i.e.*, molecules capable of interacting with several selected molecular targets.

The aim of the present thesis was to design and synthesize novel anilide and benzylamide derivatives of long-chain cyclic amines as multifunctional ligands of serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors as well as phosphodiesterase (PDE) 4 and 7 inhibitors with potential procognitive and antidepressant properties.

Potential multitarget-directed ligands of series **A–D** were designed by structural modifications of the hybrid molecule **H-1**, obtained through a molecular hybridization strategy, supported by molecular modeling studies and drug-likeness analysis.

A library of 90 designed anilide and benzylamide derivatives was obtained by a 3-step synthesis consisting of *N*-alkylation, alkaline hydrolysis, and indirect condensation reaction. Additionally, a 2-step method using a microwave synthesizer was developed for the preparation of the selected compounds. The final products were converted to hydrochlorides. The purity of the obtained intermediates and final products was verified by the UPLC/MS technique, and their identity was confirmed by UPLC/MS, ¹H NMR, ¹³C NMR, and elemental analysis.

All the synthesized amide derivatives **33–122** were screened *in vitro* to determine their affinity for the 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors and their inhibitory activity against PDE4B and PDE7A. The tested compounds were characterized as potent, moderate, or weak 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors ligands. Many of them showed features of PDE4B and/or PDE7A inhibitors. On the basis of the obtained *in vitro* results, structure–activity relationship studies were performed, and the influence of the amine fragment, the length of the aliphatic linker, and the

mode of amide group substitution on the pharmacological profile of the investigated compounds was determined.

The most potent 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors ligands were subsequently evaluated *in vitro* for their intrinsic activity. Functional tests enabled to select potent 5-HT_{1A} receptor antagonists with various antagonistic properties toward the 5-HT₇ receptor.

Additionally, *in vitro* bioavailability and metabolic stability studies were performed for the most potent 5-HT_{1A}/5-HT₇ receptor antagonists with inhibitory activity against PDE4B and/or PDE7A. The ability of the selected compounds to cross the biological membrane through the physical property of diffusion was assessed in the parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA). On the basis of the obtained values of the P_e coefficient, the evaluated derivatives were classified as high-permeable compounds. Biotransformation studies using rat liver microsomes enabled to select anilide derivatives with high metabolic stability. Moreover, the effect of the mode of benzene ring substitution in the amide fragment on the susceptibility of the investigated anilides to the processes of phase I biotransformation was analyzed.

From the results of *in vitro* studies, including binding data for 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors, functional profile, PDE4B and PDE7A inhibitory activity, and ADME parameters, the most promising anilide derivatives **48**, **72**, and **91** were subjected to animal tests to assess their procognitive and antidepressant properties. All the 3 evaluated compounds reversed MK-801-induced memory impairment in the rat novel object recognition test. Moreover, compounds **48**, **72**, and **91** showed antidepressant activity as they reduced the immobility time of rats in the forced swimming test.

In the last stage of the research, the neuroprotective effects of compounds **48**, **72**, and **84** were demonstrated *in vitro*. The representative anilide derivatives reduced the level of reactive oxygen species in SH-SY5Y cells treated with H₂O₂.

The results of the present research suggest that the simultaneous interaction with 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors and inhibition of PDE4B and/or PDE7A may be a promising strategy for the treatment of cognitive and depressive disorders typical of neurodegenerative and mental diseases.

STRESZCZENIE

Wzrost rozpowszechnienia demencji, alarmujące dane dotyczące kondycji psychicznej społeczeństwa oraz częste współwystępowanie zaburzeń poznawczych i depresyjnych powodują, że poszukiwanie leków o działaniu prokognitywnym i przeciwdepresyjnym należy do wiodących kierunków badawczych na całym świecie. Terapia zaburzeń pamięci i nastroju z użyciem leków o selektywnym mechanizmie działania, receptorowym lub enzymatycznym, nie jest wystarczająco skuteczna. Z tego powodu opracowywane są inne strategie leczenia, w tym projektowanie ligandów wielofunkcyjnych, czyli cząsteczek zdolnych do oddziaływania z kilkoma wybranymi celami molekularnymi.

Celem pracy doktorskiej było zaprojektowanie i synteza nowych anilidowych oraz benzyloamidowych pochodnych długołańcuchowych amin cyklicznych jako wielofunkcyjnych ligandów receptorów serotoninowych 5-HT_{1A} i 5-HT₇ oraz inhibitorów fosfodiesterazy (PDE) 4 i 7 o potencjalnej aktywności prokognitywnej i przeciwdepresyjnej.

Potencjalne ligandy wielofunkcyjne serii **A–D** zaprojektowano poprzez modyfikacje strukturalne związku **H-1**, uzyskanego w oparciu o strategię hybrydyzacji molekularnej, wspomaganą badaniami modelowania molekularnego i analizą lekopodobieństwa.

Bibliotekę 90 zaprojektowanych pochodnych anilidowych oraz benzyloamidowych otrzymano w wyniku 3-etapowej syntezy, obejmującej kolejno reakcję *N*-alkilacji, hydrolizy alkalicznej i kondensacji pośredniej. Do syntezy wybranych związków opracowano także metodę 2-etapową z użyciem syntetyzatora mikrofalowego. Produkty finalne przeprowadzono w chlorowodorki. Czystość otrzymanych produktów pośrednich i finalnych potwierdzono za pomocą techniki UPLC/MS, a ich tożsamość z użyciem UPLC/MS, ¹H NMR, ¹³C NMR i analizy elementarnej.

Wszystkie zsyntetyzowane pochodne amidowe **33–122** poddano przesiewowym testom *in vitro*, w celu wyznaczenia powinowactwa do receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT₇ oraz zdolności hamowania PDE4B i PDE7A. Badane związki wykazały cechy ligandów receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT₇ o wysokim, umiarkowanym lub niskim powinowactwie. Wiele z nich wykazało cechy inhibitorów PDE4B i/lub PDE7A. Ponadto, określono zależność struktura–aktywność w badanych seriach związków, analizując wpływ fragmentu aminowego, długości łącznika alifatycznego i sposobu podstawienia grupy amidowej na profil farmakologiczny otrzymanych związków.

Testy funkcjonalne *in vitro*, przeprowadzone dla najsilniejszych ligandów receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT₇ z badanych serii związków, pozwoliły na wyselekcjonowanie silnych

antagonistów receptora 5-HT_{1A} o zróżnicowanych właściwościach antagonistycznych wobec receptora 5-HT₇.

Dla najsilniejszych antagonistów receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT₇ o aktywności hamującej wobec PDE4B i/lub PDE7A przeprowadzono badania biodostępności i stabilności metabolicznej metodami *in vitro*. Zdolność wybranych związków do przechodzenia przez błonę biologiczną na zasadzie fizycznego zjawiska dyfuzji została oceniona w teście PAMPA. Uzyskane wartości współczynnika P_e klasyfikowały analizowane pochodne jako związki o wysokiej przenikalności po podaniu doustnym. Badania biotransformacji z wykorzystaniem szczurzych mikrosomów wątrobowych pozwoliły na wyselekcjonowanie związków o wysokiej stabilności metabolicznej. Przedstawiono też wpływ sposobu podstawienia pierścienia benzenu we fragmencie amidowym na podatność badanych anilidów na procesy I fazy biotransformacji.

Na podstawie otrzymanych wyników badań farmakologicznych *in vitro*, tj. oceny powinowactwa receptorowego, profilu funkcjonalnego, hamowania PDE4B i PDE7A oraz parametrów ADME, najbardziej obiecujące pochodne anilidowe **48**, **72** i **91** poddano testom na zwierzętach w celu oceny ich właściwości prokognitywnych i przeciwdepresyjnych. Wszystkie badane związki odwracały zaburzenia pamięci indukowane podaniem MK-801 w teście rozpoznawania nowego obiektu u szczurów. Związki **48**, **72** i **91** wykazały również właściwości przeciwdepresyjne, istotnie skracając czas bezruchu szczurów w teście wymuszonego pływania.

W ostatnim etapie badań, wykazano właściwości neuroprotektoryjne związków **48**, **72** i **84** przy użyciu metody *in vitro*. Reprezentatywne pochodne anilidowe zmniejszały poziom reaktywnych form tlenu w komórkach SH-SY5Y poddanych działaniu H₂O₂.

Przedstawione wyniki badań sugerują, że jednoczesna interakcja z receptorami 5-HT_{1A} i 5-HT₇ oraz hamowanie PDE4B i/lub PDE7A może stanowić obiecującą strategię leczenia zaburzeń poznawczych i depresyjnych, występujących w przebiegu schorzeń neurodegeneracyjnych i psychicznych.