Jagiellonian University Medical College
Faculty of Pharmacy,
Department of Technology and Biotechnology of Drugs

Agnieszka Olejarz-Maciej

# Multidirectional activity of new histamine and adenosine receptor ligands

*Doctoral dissertation*

Supervisor: Professor Katarzyna Kieć-Kononowicz
Assistant Supervisor: Tadeusz Karcz, PhD

Kraków, 2023

# Abstract

**Multi-targeting ligands** are reported to be a promising approach for the treatment of diseases with complicated pathomechanism and many possible sites of therapeutic action. Histamine $H_3$ ($H_3R$) as well as adenosine $A_1$ ($A_1R$) and $A_{2A}$ ($A_{2A}R$) receptors antagonists were reported as promising for the treatment of neurodegenerative diseases. Monoamine oxidase B (MAO-B) inhibition is one of the therapeutic approaches for treatment of Parkinson Disease (PD) with rasagiline and safinamide present on the market. Multi-target ligands that combine the effect of MAO-B inhibition with the antagonism of $H_3R$ or $A_1$ and $A_{2A}R$ may play the role in the development of new drugs for Parkinson's Disease.

**Functional selectivity** or biased signalling is based on the theory, that any given ligand stabilizes a unique conformation in G-protein coupled receptor (GPCR) that is then capable of activating a unique pattern of G-protein-dependent and/or G-protein-independent signal transduction pathways. Functional selectivity offers many opportunities for use in the development of new drugs. Functionally selective ligands that act on the desired signal transduction pathway may have improved therapeutic activity or reduced side effects. On the other hand, the functional selectivity of GPCR ligands makes it necessary to study the effect of GPCR ligands on many possible signal transduction pathways in order to identify functionally selective ligands. Knowledge about the structure-activity relationship in group of ligands characterized by biased signalling can help to develop new structures, which would be capable of selective activation of considered intracellular pathways.

**Results**

In the dissertation I measured the effect of histamine **$H_3$** receptors ligands on the level of second messengers: cAMP and $Ca^{2+}$. Antagonist effect was proven for some of the ligands, elements of the structure that led to no antagonist effect in the particular pathway were found. **$H_4$** receptors ligands were tested for their influence on G-protein dependent cAMP level and β-arrestin signalling pathway. Functional selectivity was found among the group of $hH_4R$ ligands containing thiophene moiety. Structure-activity relationship (SAR) analysis gave the information for the further development of $H_4R$ ligands showing biased signalling properties.

Two groups of compounds (**$H_3R$** ligands, **$A_1AR$** and **$A_{2A}AR$** ligands) were tested for possible MAO-B inhibition. $hH_3R$ ligands inhibited MAO-B and were selective to MAO-B isoform (which is important because monoamine oxidase A (MAO-A) inhibition may lead to unwanted side-effects). I have found the group of compounds that provided good dual-target properties (for $hH_3R$ and MAO-B). In that group the most active for both targets was compound **DL-77** ($hH_3R$, $K_i$ = 37 nM; MAO-B, $IC_{50}$ = 19 nM).

Adenosine receptor's ligands from the group of xanthine derivatives was found to inhibit MAO-B. SAR analysis revealed that modifications leading to stronger MAO-B inhibitors were not profitable for $A_1$AR and $A_{2A}$AR affinity and vice versa. I found that compounds with tricyclic xanthine structure inhibited MAO-B isoform selectively. Representative from that group, compound **MZ-1504** presented balanced dual-target properties ($A_{2A}$AR, $K_i$ = 264 nM; MAO-B, $IC_{50}$ = 243 nM). Theophylline and theobromine derivatives with dopamine moiety presented better MAO-B inhibition than tricyclic xanthine derivatives, but were able to inhibit MAO-A, and their affinity for $A_1$AR and $A_{2A}$AR dropped. All theophylline derivatives and some aliphatic theobromine derivatives (up to 6 carbons in alkyl substituent) were able to inhibit MAO-B only partially. Theobromine derivatives with arylalkyl substituents fully inhibited MAO-B, with the most active inhibitor **Tb-1**: ($IC_{50}$ = 2.61 nM).

Reversibility and modality of MAO-B inhibition was tested for the most active representatives from both groups ($hH_3R$ ligands and adenosine receptors ligands) revealing reversible inhibition with mixed modality for all of them which was similar to reference **safinamide** tested in exact the same conditions.

Results about in-vitro activity of compounds, provided in the Dissertation, gave the insight about the SAR and will hopefully lead to development of new functional selective/multitarget ligands in the future.

# Streszczenie

**Ligandy wielocelowe** uważane są obecnie za jedną z bardziej obiecujących strategii w leczeniu chorób charakteryzujących się skomplikowanym patomechanizmem oraz wieloma możliwymi celami działania terapeutycznego. Zgodnie z aktualnymi doniesieniami naukowymi antagoniści receptorów histaminowych $H_3$ ($H_3R$) oraz adenozynowych $A_1$ ($A_1R$) i $A_{2A}$ ($A_{2A}R$) mogą mieć potencjalne zastosowanie w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych. Z kolei hamowanie monoaminooksydazy B (MAO-B) jest wykorzystywane w leczeniu choroby Parkinsona (PD) - inhibitory MAO-B (**rasagilina** i **safinamid**) dostępne są na rynku farmaceutycznym. Dlatego też ligandy wielocelowe, które łączą efekt hamowania MAO-B z antagonizmem $H_3R$ lub $A_1$ i $A_{2A}R$, mogą odegrać istotną rolę podczas opracowywania nowych leków na chorobę Parkinsona.

**Selektywność funkcjonalna** (ang.: functional selectivity, biased signalling) zakłada, że w przypadku receptora związanego z białkiem G (GPCR) każdy przyłączający się ligand stabilizuje unikalną konformację w receptorze. Taka unikalna konformacja GPCR aktywuje następnie unikalny układ szlaków wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału, w tym szlaków zależnych i niezależnych od białka G. Poprzez działanie na pożądany szlak transdukcji sygnału selektywność funkcjonalna ligandów potencjalnie stwarza wiele korzyści w procesie opracowywania nowych leków. Mogą one wykazywać aktywność terapeutyczną lub zmniejszone skutki uboczne. Z drugiej strony, w celu poznania mechanizmów działania selektywnie funkcjonalnych ligandów GPCR konieczna jest ocena ich wpływu na wiele różnych szlaków transdukcji sygnału. Znajomość zależności struktura-aktywność (SAR) ligandów selektywnych funkcjonalnie może pomóc w opracowaniu nowych struktur o korzystniejszych właściwościach.

**Wyniki**

W pracy zbadany został wpływ ligandów receptorów histaminowych $H_3$ na poziom wtórnych przekaźników: cAMP i $Ca^{2+}$. Dla części ligandów udało się potwierdzić działanie antagonistyczne. Wytypowano także elementy struktury, które prowadziły do braku aktywności antagonistycznej w szlaku zależnym od $Ca^{2+}$. Ligandy receptorów $H_4$ badano pod kątem ich wpływu na zależny od białka G poziom cAMP i szlak sygnałowy β-arestyny. Stwierdzono selektywność funkcjonalną wśród ligandów $h$$H_4R$ zawierających ugrupowanie tiofenowe. Analiza SAR dostarczyła informacji potrzebnych do dalszego rozwoju badań nad ligandami $H_4R$ wykazującymi selektywność funkcjonalną.

Dwie grupy związków (ligandy $H_3R$, ligandy $A_1AR$ i $A_{2A}AR$) zbadano pod kątem możliwego hamowania MAO-B. Ligandy $h$$H_3R$ hamowały MAO-B i były selektywne względem tej izoformy (co

jest korzystne z powodu potencjalnych działań niepożądanych związanych z hamowaniem drugiej izoformy - monoaminooksydazy A (MAO-A)). W wyniku badań wyodrębniono grupę związków, które wykazywały dobrą aktywność wobec obu pożądanych celów (*h*$H_3$R oraz MAO-B). Z kolei w tej grupie związek **DL-77** wykazywał najsilniejszą aktywność (*h*$H_3$R, $K_i$ = 37 nM; MAO-B, $IC_{50}$ = 19 nM).

Aktywność hamująca wobec MAO-B została potwierdzona dla ligandów receptorów adenozynowych z grupy pochodnych ksantyny. Analiza SAR wykazała, że modyfikacje prowadzące do polepszenia inhibicji MAO-B prowadziły do spadku powinowactwa wobec $A_1$AR oraz $A_{2A}$AR, i odwrotnie. Dla związków o strukturze trójpierścieniowej ksantyny potwierdzono aktywność hamującą wobec MAO-B i brak aktywności wobec MAO-A. Związek **MZ-1504**, (reprezentujący trójpierścieniowe ksantyny) wykazywał korzystne, zbalansowane właściwości wobec obu celów ($A_{2A}$AR, $K_i$ = 264 nM; MAO-B, $IC_{50}$ = 243 nM). Pochodne teofiliny i teobrominy z ugrupowaniem dopaminowym wykazywały lepsze hamowanie MAO-B niż ksantyny trójpierścieniowe, ale były z kolei zdolne do hamowania MAO-A oraz charakteryzowały się niskim powinowactwem do $A_1$AR i $A_{2A}$AR. Wszystkie pochodne teofiliny oraz niektóre alifatyczne pochodne teobrominy (do sześciu atomów węgla w podstawniku alkilowym) były zdolne tylko częściowo do hamowania MAO-B. Pochodne teobrominy z podstawnikami aryloalkilowymi całkowicie hamowały MAO-B. Najaktywniejszym inhibitorem w tej grupie był **Tb-1**: ($IC_{50}$ = 2,61 nM).

Zbadana została odwracalność i modalność hamowania MAO-B u najaktywniejszych przedstawicieli obu grup związków (ligandy *h*$H_3$R i ligandy receptorów adenozynowych). Wszystkie przebadane związki wykazały odwracalną inhibicję i mieszaną modalność hamowania MAO-B. W tych samych warunkach podobne właściwości zostały potwierdzone wobec referencyjnego **safinamidu**.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki dotyczące aktywności związków in vitro dały istotny wgląd w zależność struktura-aktywność. Powinny też przyczynić się do opracowania nowych selektywnych funkcjonalnie oraz wielocelowych ligandów.