



BIULETYN
Wydziału Farmaceutycznego
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Biul. Wydz. Farm. WUM, 2010, 1, 1-12
<http://biuletynfarmacji.wum.edu.pl/>

ZASTOSOWANIE METOD OBLICZENIOWYCH DO WYZNACZANIA BUDOWY MODELI FARMAKOFOROWYCH RECEPTORÓW 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} ORAZ 5-HT₇

Anna Bielenica*, Jerzy Kossakowski

Katedra i Zakład Chemii Medycznej, I Wydział Lekarski,
Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Oczki 3, 02 007 Warszawa

*autorka korespondująca, tel./faks: +22 628 0679; e-mail: anna.bielenica@wum.edu.pl

Otrzymany 29.12.2009; zaakceptowany 28.01.2010; zamieszczony 23.03.2010

STRESZCZENIE

Prezentowana praca zawiera przegląd modeli farmakoforowych receptorów serotoninowych 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} oraz 5-HT₇, opisanych w czasie ostatniej dekady. Przedstawiono modele ligandów receptora 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A} wyznaczone metodami analizy konformacyjnej i trójwymiarowej analizy QSAR. Hipotezę oddziaływań ligand-receptor 5HT₇ uzupełniono o modele skonstruowane na podstawie struktury receptora. Opisy farmakoforów zostały poparte przykładami znanych aktywnych ligandów i grup związków wykorzystanych do wytworzenia modeli.

SŁOWA KLUCZOWE: modele farmakoforowe, ligandy arylopiiperazyńlowe, receptor 5-HT_{1A}, receptor 5-HT_{2A}, receptor 5-HT₇

ABSTRACT

COMPUTATIONAL METHODS IN DETERMINATION OF PHARMACOPHORE MODELS OF 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} AND 5-HT₇ RECEPTORS

The objective of this article is an overview of existing pharmacophore models for 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} and 5-HT₇ receptors, which have been described during the last decade. Models of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors, developed by conformational analysis and 3D QSAR methods are presented. Hypotheses of the ligand-5-HT₇ receptor interaction were complemented by models constructed on the basis of the receptor's structure. Various pharmacophore concepts are characterized by structures of known active ligands and sets of compounds used for the generation of models.

KEYWORDS: pharmacophore models, 5-HT_{1A} receptor, 5-HT_{2A} receptor, 5-HT₇ receptor

1. Wprowadzenie

Poszukiwanie nowych środków leczniczych jest jednym z największych wyzwań dla przemysłu farmaceutycznego. Wprowadzenie nowego leku na rynek trwa obecnie 7-12 lat, a koszty tego procesu szacuje się na około 1,2 mld dolarów [1]. 5 z 40 000 związków przetestowanych na zwierzętach dochodzi do etapu badań klinicznych na ludziach, i tylko jeden z nich zostaje składnikiem nowego leku [1]. Zastosowanie komputerowo wspomaganym metod projektowania leków, czyli projektowanie *in silico*, umożliwia znaczne obniżenie nakładów pieniężnych i skrócenie czasu trwania procesu.

Wprawdzie modelowanie molekularne obecnie nie pozwala na dokładne określenie aktywności biologicznej badanych związków, ale umożliwia wybór potencjalnych ligandów spośród znanych struktur oraz ich optymalizację pod kątem oddziaływania z receptorem. Techniki komputerowe znacznie zwiększają przewidywalność w zakresie toksyczności, reaktywności i właściwości fizykochemicznych badanego związku, minimalizując nakłady na badania na zwierzętach i syntezę chemiczną [2,3]. Jedynie najbar-

dziej obiecujące pochodne syntetyzuje się i poddaje się badaniom biologicznym.

Metodyka obliczeniowego projektowania leków obejmuje przeszukiwanie elektronicznych baz danych strukturalnych, dokowanie ligandów, projektowanie ligandu *de novo*, korzystanie z programów obliczających parametry geometryczne cząsteczek, modelowanie ilościowej zależności między strukturą związku a jego aktywnością oraz ostateczne wyznaczenie modelu farmakoforowego [4,5]. Wyznaczenie modelu polega na określeniu podstawowych elementów strukturalnych, niezbędnych do rozpoznania ligandu przez receptor i utworzenia stabilnego kompleksu aktywnego [6].

Przy topograficznym modelowaniu receptorów zakłada się, że ligandy łączą się z receptorem zawsze w ten sam sposób, przy czym konformacja ligandu pozostaje niezmienną. Wiadomo jednak, że przyłączenie ligandu wywołuje zmiany konformacyjne białka receptorowego [7].

Niniejszy przegląd literaturowy ma na celu przybliżenie znanych modeli farmakoforowych receptorów serotoninowych 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} i 5-HT₇.

2. Metody komputerowo wspomaganego projektowania leków

Zależnie od danych, którymi dysponuje się przystępując do projektowania leków, wyróżnić można dwa podstawowe sposoby postępowania [8,9]:

- projektowanie w oparciu o strukturę znanych ligandów, przy nieznannej strukturze receptora (co obejmuje wyznaczenie modelu farmakoforowego, metody QSAR, QSPR, CoMFA i CoMSIA);
- projektowanie w oparciu o znaną budowę przestrzenną białka receptorowego, oparte na dokończeniu.

Najkorzystniejszą sytuację stwarza znajomość zarówno grupy ligandów o zbadanej aktywności, jak i struktury przestrzennej danego receptora.

2.1. Generowanie modelu farmakoforowego

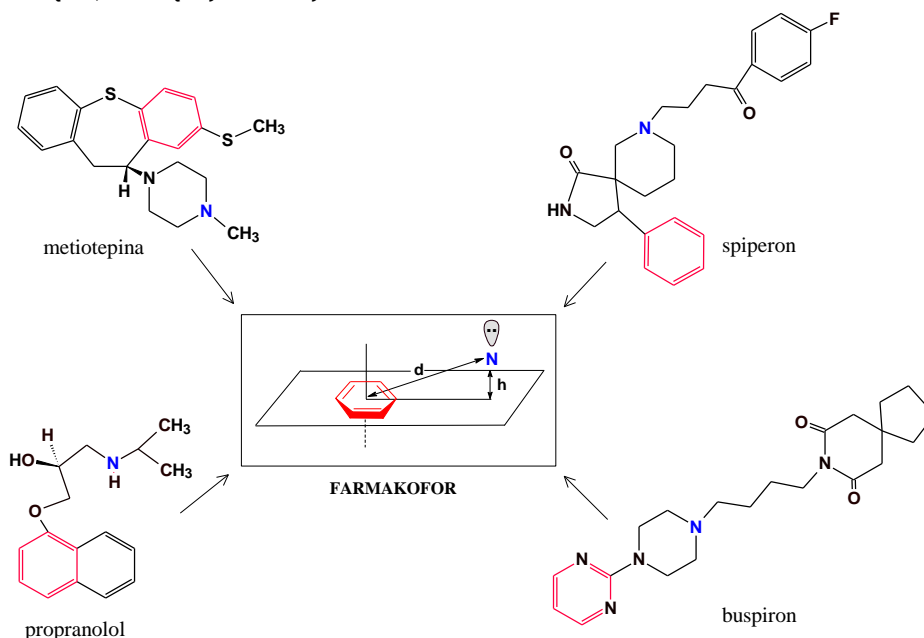
Według definicji IUPAC, farmakofor to zespół cech sterycznych i elektronowych koniecznych do osiągnięcia optymalnych oddziaływań supramolekularnych ze specyficzną strukturą biologiczną (receptorem), niezbędnych do wyzwolenia (lub zablokowania) jej biologicznej odpowiedzi. Farmakofor nie jest rzeczywistą cząsteczką i nie reprezentuje rzeczywistego zbioru grup funkcyjnych, stanowi czysto abstrakcyjne pojęcie bazujące na oddziaływaniach, głównie niekowalencyjnych, między grupą związków a daną strukturą białkową [8,10].

Według innej definicji, pojęcie farmakofora odnosi się do przestrzennej orientacji różnych grup funkcyjnych lub właściwości związku, niezbędnych do wywołania lub

zablokowania aktywności biologicznej [11]. Farmakofor zazwyczaj składa się z 3-4 elementów strukturalnych, takich jak pierścień aromatyczny, grupa hydroksylowa czy zasadowy atom azotu, rozmieszczonych względem siebie w ściśle określonych odległościach [5]. Klasyczny przykład definicji grupy farmakoforowej, wygenerowanej na podstawie znanych struktur różnych ligandów, przedstawiono na Ryc. 1.

Grupa farmakoforowa może być również określona jako największy wspólny mianownik dla grupy aktywnych cząsteczek, uwzględniający akceptory i donory wiązania wodorowego, oddziaływania hydrofobowe, pierścienie aromatyczne, grupy dodatnio i ujemnie naładowane. Oddziaływania te reprezentują cechy chemiczne komplementarne do trójwymiarowej struktury receptora [1,12].

Generowanie grupy farmakoforowej wymaga znajomości jak największej liczby aktywnych ligandów i/lub budowy receptora. Istnieje kilka metod budowania farmakofora. Jedną z nich opiera się na analizie budowy chemicznej 3 lub 4 aktywnych związków, zawierających różne chemiczne struktury wyjściowe [13]. Inna wykorzystuje około 15 związków o zróżnicowanej strukturze chemicznej oraz wartości ich IC_{50} lub Ki_{50} , zawierające się w przedziale większym niż trzy rzędy wielkości. Ugrupowanie farmakoforowe może być również wygenerowane *de novo*, jeśli znana jest budowa miejsca wiązania ligandu w receptorze [1].



Ryc. 1. Dwupunktowy model farmakoforowy receptora 5-HT_{1A} według Hiberta i współpracowników (agonista: $d = 5,37 \text{ \AA}$, $h = 0,2 \text{ \AA}$; antagonist: $d = 5,6 \text{ \AA}$, $h = 1,6 \text{ \AA}$) [11,13].

2.2. Analiza QSAR i QSPR

QSAR (ang. *Quantitative Structure-Activity Relationship*), czyli badania ilościowej zależności między strukturą związku a jego działaniem, opierają się na założeniu, że

właściwości biologiczne leku są matematyczną funkcją jego parametrów fizykochemicznych (deskryptorów). Z kolei metody QSPR (ang. *Quantitative Structure-Property Relationship*) pozwalają na określenie jakościowej relacji między strukturą związku a jego właściwościami fizycznymi

(momentem dipolowym, temperaturą wrzenia itp.). Obie metody służą do przewidywania toksyczności związku, przy czym QSAR odnosi się do biologicznej aktywności potencjalnej substancji leczniczej, natomiast QSPR do jej właściwości biofizyczno-chemicznych.

W celu wyznaczenia zależności struktura - aktywność, wybiera się kilka spośród przyjętych deskryptorów, takich jak [14]:

- *strukturalne i topologiczne* (liczba atomów, masa cząsteczkowa, liczba pierścieni aromatycznych, liczba atomów wodoru i heteroatomów, ilość grup funkcyjnych, parametry steryczne Tafta E_s);
- *elektronowe* (ładunek całkowity, moment dipolowy, polaryzowalność, energia orbitali molekularnych HOMO i LUMO, stała Hammeta σ , współczynniki indukcyjne i rezonansowe);
- *geometryczne* (objętość molekularna, moment bezwładności, pole powierzchni);
- *termodynamiczne* (współczynnik podziału 1-oktanol : woda $\log P$, rozpuszczalność w wodzie $\log S$, hydrofobowość podstawników π_x , refraktywność molowa MR).

Podczas ustalania zależności aktywności związku od jego budowy pod uwagę bierze się pod uwagę najczęściej łatwo mierzalne parametry - hydrofobowość, właściwości elektronowe i steryczne [15,16]. Miarą hydrofobowości związku jest współczynnik podziału $\log P$, który koreluje ze zdolnością do przenikania przez błony biologiczne. Ma on duże znaczenie w przypadku leków działających na ośrodkowy układ nerwowy, dla których istotnym parametrem jest zdolność do przechodzenia przez barierę krew-mózg. Z kolei współczynniki π opisują hydrofobowość poszczególnych grup funkcyjnych. Parametr steryczny Tafta opisuje właściwości i rozmiar otoczenia molekularnego, w którym znajduje się dany podstawnik. Stała Hammeta jest miarą wpływu podstawnika na gęstość elektronową w pierścieniu aromatycznym.

Analiza QSAR nie bierze pod uwagę trójwymiarowej struktury cząsteczki ani jej chiralności. Jej głównym zadaniem jest wygenerowanie równania opisującego zależność aktywności biologicznej ligandów od wartości poszczególnych deskryptorów. Aktywność biologiczna związku może być przedstawiona w postaci K_i , IC_{50} , ED_{50} , EC_{50} lub K_m [17]. Analiza Hanscha, najpopularniejsza empiryczna metoda QSAR, to metoda wielokrotnej regresji liniowej wyrażona przez liniową kombinację od 3 do 12 deskryptorów. Równanie Hanscha pozwala przewidzieć aktywność związku jeszcze niezbadanego pod kątem aktywności farmakologicznej. Pozwala to zaplanować syntezę związków o najbardziej pożądanym właściwościach [12,14].

Stosuje się wiele komputerowo wspomaganym metod QSAR. Jedną z nich jest geometria odległości, która pozwala na wyszukanie farmakofora dla receptora o nieznanym budowie, jeśli znana jest mała grupa związków biologicznie czynnych. Natomiast inna metoda, stosowana przez Hopfingera, zwana analizą kształtu cząsteczkowego, umożliwia wyznaczenie aktywnych konformacji potencjalnego związku czynnego farmakologicznie oraz jego molekularnego kształtu podczas wiązania z receptorem [14].

2.3. Analiza CoMFA i CoMSIA

CoMFA (ang. *Comparative Molecular Field Analysis*) oraz CoMSIA (ang. *Comparative Molecular Similarity Index Analysis*) to metody trójwymiarowej analizy QSAR (3D QSAR). Podstawą analizy CoMFA jest założenie, że aktywność biologiczna związku jest funkcją ogólnego kształtu i wielkości cząsteczki oraz jej właściwości elektronowych [15]. CoMSIA jest rozszerzeniem metodologii CoMFA i pozwala na porównywanie struktur molekularnych związków o podobnych właściwościach, co umożliwia znalezienie ogólnych cech cząsteczki istotnych dla wiązania z receptorem [17,18].

W metodzie CoMFA do obliczenia pól sterycznych i elektrostatycznych wokół cząsteczki korzysta się z potencjałów Coulomba i Lennarda-Jonesa, natomiast analiza CoMSIA wykorzystuje do tych obliczeń funkcję Gaussa, podając dodatkowo wielkości pól hydrofobowych i wodorowych [19,20]. Obliczone wartości poszczególnych pól siłowych traktuje się następnie jako niezależne, choć silnie skorelowane ze sobą deskryptory.

Wynik analizy CoMFA można przedstawić w postaci kolorowej mapy konturowej otaczającej cząsteczkę, co pozwala na wizualną identyfikację obszarów odpowiedzialnych za uprzywilejowane i nieuprzywilejowane wiązania z receptorem [19,21]. Metoda wymaga, aby wszystkie analizowane związki były rozpatrywane w takich pozycjach i orientacjach, jakie przyjmują w miejscu wiążącym receptora. Osiąga się to poprzez dopasowanie każdej z nich do wspólnego farmakoforu [22].

3. Ligandy receptora 5-HT_{1A}

N-podstawione pochodne alkilo-1-arylopiiperazyn stanowią jedną z najważniejszych klas ligandów receptora 5-HT_{1A} [23,24,25,26]. W ostatnich latach ukazało się wiele prac poświęconych aktywności farmakologicznej tej grupy związków. Intensywne badania zależności struktura-aktywność dowodzą, że aktywność jest wynikiem obecności grupy arylowej przy atomie N₁ pierścienia piperazyny oraz łańcucha alkilowego [27,28,29] alkoksylogowego [30,31], alkenylogowego [32,33] lub układu cykloheksylogowego przy N₄ [34,35,36,37]. Niektórzy autorzy podkreślają również rolę końcowego hydrofobowego ugrupowania cyklicznego w stabilizacji kompleksu ligand-receptor poprzez oddziaływanie π - π oraz dipolowe [23,37,38,39]. Inne prace dowodzą natomiast, że ta część cząsteczki nie wpływa znacząco na powinowactwo i selektywność [40].

W Tabeli 1 przedstawiono przykładowe ligandy receptora 5-HT_{1A}, w tym analogi znanych leków przeciwdepresyjnych i przeciwlękowych, takich jak buspiron czy tandospiron, o strukturze giętkiej (związki I-VII) lub ograniczonej swobodzie konformacyjnej (VIII-IX).

3.1. Modele farmakoforowe wyznaczone metodami analizy konformacyjnej

Receptor 5-HT_{1A} jest obecnie najlepiej poznany spośród receptorów serotoninowych z grupy 5-HT₁, ze względu na swoje kliniczne znaczenie w leczeniu stanów lękowych i depresji [44,45]. Opracowano wiele modeli farmakoforowych tego receptora.

Tabela 1. Ligandy receptora 5-HT_{1A} z grupy policyklicznych arylopiiperazyn.

Związek	Wzór strukturalny	Ki [nM]	Bibliografia
I (Buspiron)		16	26
II (Tandospiron)		25	26
III (Arypripazol)		4,2	41
IV		0,4	42
V		0,48	26
VI		40	26
VII		13,4	43

Pierwszy model zaproponowała grupa Hiberta, stosując graficzną metodę przybliżenia aktywnego analogu AAA (ang. *Active Analog Approach*) oraz procedurę dopasowania MultiFit, które opierały się na analizie konformacji ligandów należących do różnych klas związków chemicznych. W ten sposób powstał model dwupunktowy, bazujący na ogólnych cechach strukturalnych aktywnych ligandów z tej grupy, charakteryzujących się występowaniem pierścienia aromatycznego i zasadowego atomu azotu [46]. Buspiron, którego część pirymidynolopiperazynowa może przyjmować różne konformacje, posłużył do opisanego modelu zarówno dla agonisty, jak i antagonisty. Tłumaczy to, dlaczego w obrębie grupy arylopiiperazyn znaleźć można ligandy wykazujące cechy agonistyczne, częściowo agonistyczne oraz antagonistyczne. Model Hiberta jest najbardziej uniwersalnym modelem farmakoforowym receptora 5-HT_{1A}, wspólnym dla wszystkich klas ligandów.

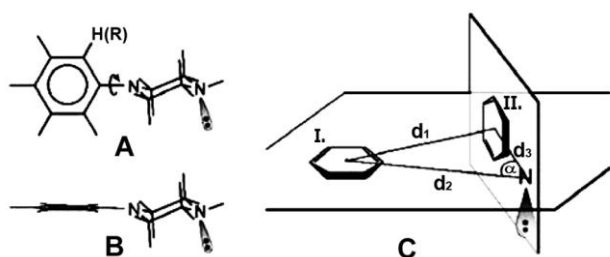
Rozszerzony model receptora 5-HT_{1A} opracował Mokrosz wraz ze współpracownikami, wprowadzając trzeci punkt: układ π -elektronowy [47]. Punkt ten odnosił się do alternatywnego sposobu nakładania *o*-podstawionych 1-

arylopiiperazyn, w którym wolna para elektronowa atomu azotu leży w płaszczyźnie pierścienia aromatycznego. W przypadku bardziej złożonych arylopiiperazyn, ich duża giętkość pozwalała na uzyskanie takich konformacji, w których wszystkie trzy punkty farmakofora były zajęte i końcowy fragment amidowy osiągał pozycję odpowiadającą pierścieniowi π -elektronowemu (Ryc. 2).

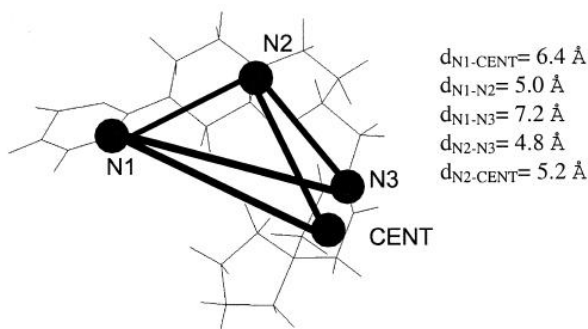
W trójpunktowym modelu topograficznym zespołu Chilmonczyka [48] opracowanym dla analogów buspironu, układ π -elektronowy został zastąpiony imidową grupą karbonylową. Zdaniem autorów, zdolność ligandu do przyjęcia konformacji zgiętej odgrywa kluczową rolę w wiązaniu z receptorem 5-HT_{1A}.

Zastosowanie metod symulacyjnych dynamiki molekularnej w ustalaniu modelu farmakoforowego przedstawił zespół Bronowskiej, wykorzystując analizę konformacyjną analogów buspironu [49]. Związki strukturalnie zgodne z przyjętym farmakoforem posiadały silnie zgięte łańcuch *n*-butylowy, przy czym pierścień piperazyny przyjmował konformację krzesłową lub skrzyżowaną. (Ryc. 3). W większości przypadków część pirymidynowa oraz łańcuch węglowodorowy znajdowały się w

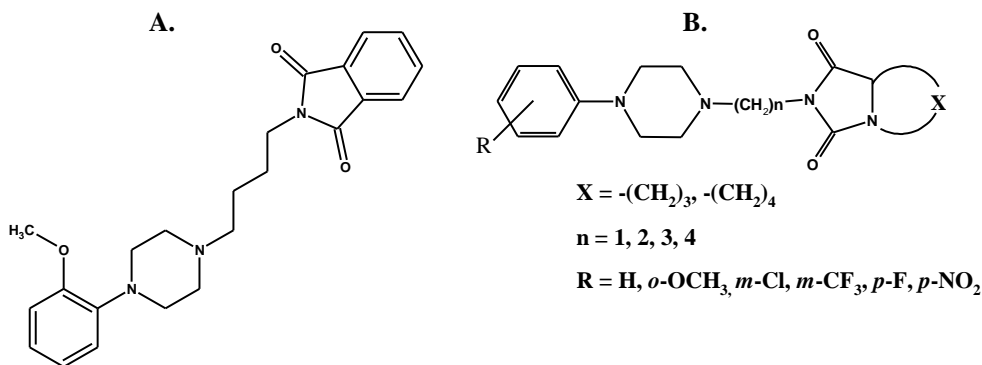
pozycji ekwatorialnej w stosunku do pierścienia piperazy-
ny.



Ryc. 2. Konformacje arylopiperazyn: (A) ortogonalna; (B) planarna; (C) model farmakoforowy Mokrosza i współpracowników ($d_1 = 4,3-6,6 \text{ \AA}$, $d_2 = 5,0-5,4 \text{ \AA}$; $d_3 = 7,1-9,1 \text{ \AA}$, $\alpha = 98,6^\circ$; I, II - układy π -elektronowe) [47].



Ryc. 3. Model farmakoforowy receptora 5-HT_{1A} według Bronowskiej i współpracowników [49].



Ryc. 4. Modelowe związki wykorzystane w analizie CoMFA przez zespoły Glennona [50] i Testy [52]: (A) NAN-190, oraz Lopez - Rodriguez [53]; (B) arylopiperazynylowe pochodne bicyklohydantoiny.

Grupa Testy poddała analizie szereg ligandów receptora 5-HT_{1A}, należących do pięciu klas związków chemicznych: pochodnych serotoniny, aminotetralin, arylopiperazyn, aryloksypropanoloamin i tetrahydropirydynyloindoli [52]. Autorzy uwzględnili nie tylko standardowe wartości pól sterycznych i elektrostatycznych, ale również potencjał liofilowości (MLP). Za związek modelowy wybrano zoptymalizowaną strukturę NAN-190 (rozciągnięty łańcuch węglowy, grupa aryłowa prostopadła do pierścienia piperazy). W rezultacie zaproponowany został ogólny model, wspólny dla kilku klas związków, określający regiony różnego typu oddziaływać w obrębie grup farmakoforowych (Ryc. 6).

3.2. Modele farmakoforowe wyznaczone metodami 3D QSAR

Oprócz metod analizy konformacyjnej, przy opracowywaniu modeli topograficznych korzysta się również z trójwymiarowej analizy QSAR, np. z metody CoMFA lub programów „Compass” i „Catalyst”. Ostatni z wymienionych jest obecnie najpowszechniej używany do generowania farmakoforów receptora 5-HT_{1A} [11].

Metodę CoMFA po raz pierwszy zastosowała grupa badaczy pod kierunkiem Glennona [50], wykorzystując do tego bazę 50 pochodnych arylopiperazy. Zostały one zaprojektowane na podstawie rentgenowskiej analizy strukturalnej NAN-190, jednoczesnego agonisty i antagonisty receptora 5-HT_{1A} (Ryc. 4) Wynikiem obliczeń było przedstawienie trójpunktowego modelu topograficznego, w którym uwzględniono pozycje pierścienia aromatycznego, obu atomów azotu piperazy oraz pierwszego atomu węgla łańcucha alifatycznego.

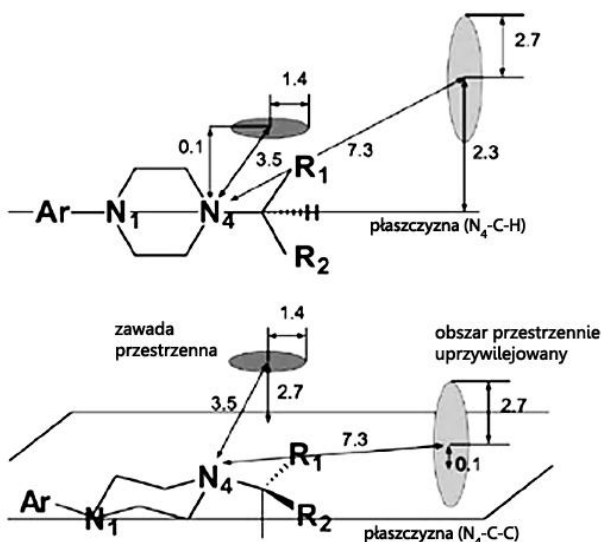
Van Steen wraz ze współpracownikami tworząc model farmakoforowy wykorzystali dane dotyczące zależności struktura - aktywność oraz wyniki analizy CoMFA dla dwóch grup heterobicyklicznych arylopiperazyn, zawierających różne podstawniki N₄-aryloalkilowe i N₄-alkilowe [51]. Pod uwagę wzięto jedynie całkowicie rozciągnięte konformacje. Różnice w aktywności związków względem receptora 5-HT_{1A} w 98 % przypisano czynnikom sterycznym. Stwierdzono, że obszar przestrzennie nieuprzywilejowany znajduje się w odległości 3,5 Å od atomu N₄ piperazy, natomiast obszar sterycznie korzystny dla oddziaływać z receptorem w odległości 7,3 Å (Ryc. 5).

Badając selektywność ligandów wobec receptorów 5-HT_{1A}/α₁ dla szeregu arylopiperazynowych pochodnych bicyklohydantoiny, grupa naukowców skupiona wokół Lopez-Rodriguez ustaliła czteropunktowy model CoMFA [53]. Otrzymana mapa konturowa potwierdzała wcześniejsze ustalenia badaczy dotyczące zależności struktura-aktywność [54]:

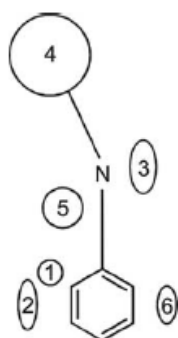
- podstawniki elektroujemne w pozycji *ortho* lub *meta* pierścienia fenyłowego zwiększają powinowactwo do receptora 5-HT_{1A};
- podstawniki w pozycji *para* (*p*-F i *p*-NO₂) mają wpływ negatywny;

- obszar zawady przestrzennej zlokalizowany wokół części hydantoinowej odpowiada za niskie powinowactwo wykazywane przez krótkołańcuchowe arylopiperazyny ($n = 1, 2$).

Do podobnych wniosków doszli ostatnio Weber i współpracownicy [55], stosując metody chemometryczne.



Ryc. 5. Graficzny opis pól sterycznych w modelu farmakoforowym zaproponowanym przez grupę van Steena [51].



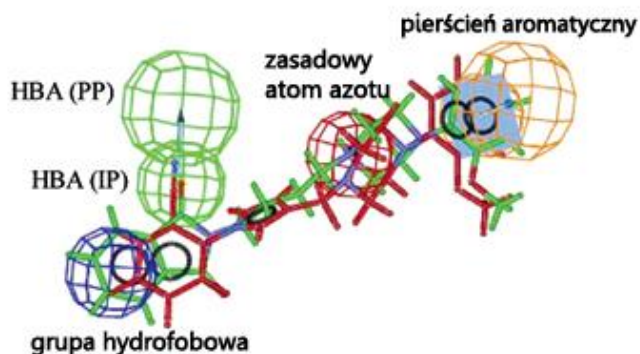
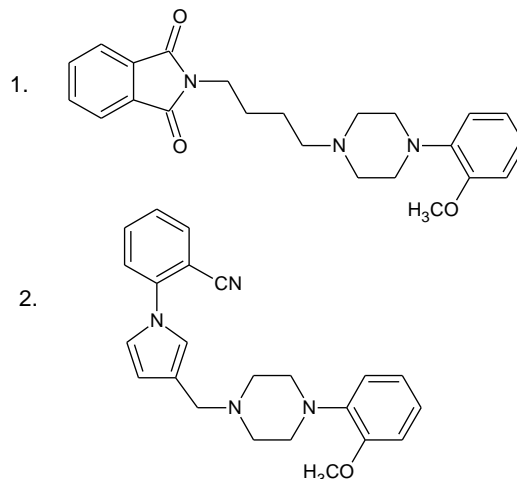
Ryc. 6. Model Testy i współpracowników [52]. Zaznaczono obszary: 1 - wysokiej gęstości elektronowej; 2 - oddziaływań sterycznych; 3 - zawady przestrzennej; 4 - oddziaływań elektrostatycznych i liofilowych; 5 - oddziaływań polarnych; 6 - niskiej gęstości elektronowej.

W 2002 roku zespół Orusa doniósł o zastosowaniu programu „Catalyst” dla grupy arylopiperazyńowych pochodnych benzotiofenu, będących antagonistami i częściowymi agonistami receptora 5-HT_{1A} [56]. Ustalono, że za różną wiązalność z receptorem odpowiadają:

- w przypadku antagonistów: podstawniki aryłowe, opisane jako obszary hydrofobowe (HYD) oraz grupa OH pochodnej benzotiofenu, która pełni rolę donora wiązań wodorowych (HBD);
- w przypadku częściowych agonistów, istotne znaczenie mają grupa aryłowa (AR) i akceptor wiązań wodorowych (HBA).

Podana hipoteza ma jednak ograniczone zastosowanie ze względu na niezbyt liczną grupę testowanych pochodnych i brak walidacji na innej grupie związków.

Program „Catalyst” wykorzystał także inny zespół badaczy [57], koncentrując się na selektywności długołańcuchowych arylopiperazyń wobec receptorów 5-HT_{1A}/5-HT₇. Zakładając, że ich bioaktywna konformacja przyjmuje postać liniową, farmakofor receptora 5-HT_{1A} ustalono na podstawie struktury NAN-190, w której łańcuch węglowodorowy był w pełni rozciągnięty [11] (Ryc. 7).



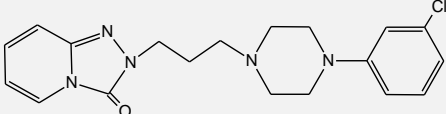
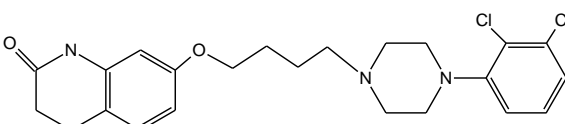
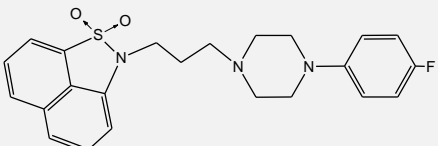
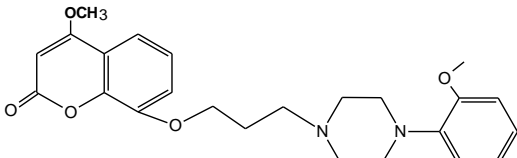
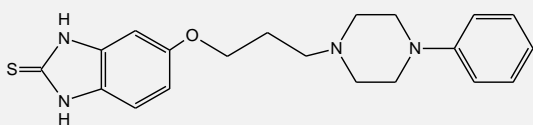
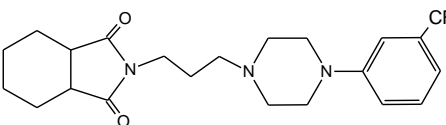
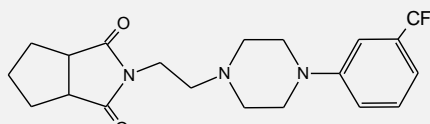
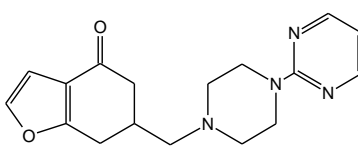
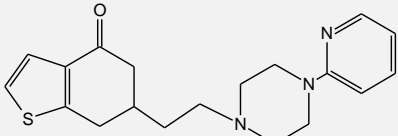
Ryc. 7. Schematyczna reprezentacja farmakofora receptora 5-HT_{1A} według Raulta i współpracowników [57], z zaznaczeniem struktur ligandów (1) i (2) mapowanych do modelu farmakoforowego. (HBA - akceptor wiązania wodorowego.)

4. Ligandy receptora 5-HT_{2A}

Łańcuchowe arylopiperazyny są powszechnie znane jako ligandy receptora 5-HT_{1A}, jednak wiele związków z tej grupy wykazuje również wysokie powinowactwo do receptorów 5-HT_{2A} (Tabela 2). Podobnie jak w przypadku receptora 5-HT_{1A}, na wiązalność do receptora wpływa długość linkera węglowodorowego oraz rodzaj podstawnika aryłowego przy atomie N₁ piperazyń.

W związku z tym, że agoniści i antagoniści receptorów serotoninowych 5-HT₂ mają zastosowanie w leczeniu schizofrenii, depresji, stanów lękowych, epilepsji oraz zaburzeń śnieżenia [44,45,58], trwają poszukiwania nowych selektywnych ligandów receptora 5-HT_{2A} [59,60,61,62].

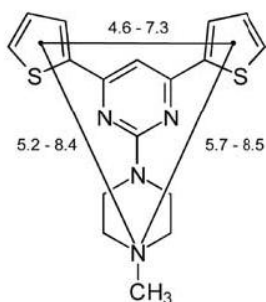
Tabela 2. Ligandy receptora 5-HT_{2A} z grupy policyklicznych arylopiperazyn.

Związek	Wzór strukturalny	Ki [nM]	Bibliografia
X (Trazodon)		78	23
XI (Arypripazol)		3,4	41
XII (Fananseryna, RP 62203)		0,37	58
XIII		3100	59
XIV		2,04	30
XV		36	63
XVI		47	63
XVII		< 5,0	62
XVIII		6,76	62

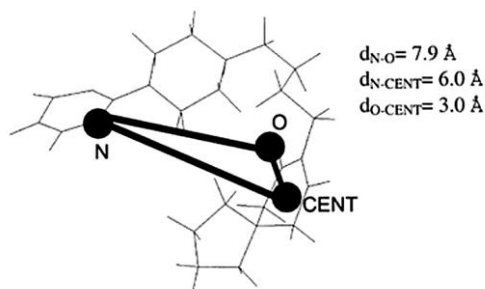
4.1. Modele farmakoforowe wyznaczone metodami analizy konformacyjnej

Pierwsze próby ustalenia cech związku odpowiedzialnych za wiązanie z receptorem 5-HT_{2A}, bazujące na strukturze (+)-LSD, zostały podjęte w 1991 roku przez grupy badawcze Glennona i Höltje [11]. Kolejny model opracowali kilka lat później Höltje i współpracownicy pochodnych 1-(2-pirymidynylo)piperazyny (Ryc. 8).

W roku 2001 [49] przedstawiono model farmakofora receptora 5-HT_{2A}, poddając analizie różne konformacje analogów buspironu. Łańcuch butylowy aktywnych ligandów, podobnie jak w przypadku ligandów receptora 5-HT_{1A} rozpatrywanych przez ten sam zespół, przyjmował głównie postać zgiętą (Ryc. 9).



Ryc. 8. Model farmakoforowy receptora 5-HT_{2A} według grupy Mokrosza [66].



Ryc. 9. Model farmakoforowy receptora 5-HT_{2A} według grupy Bronowskiej [49].

4.2. Modele farmakoforowe wyznaczone metodami 3D QSAR

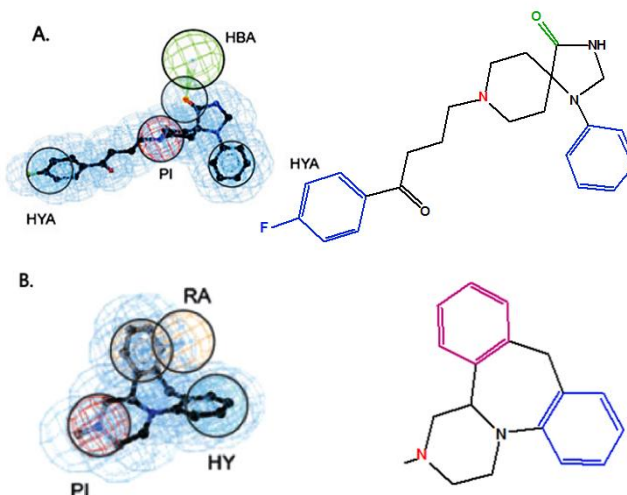
Dotychczas opublikowano niewiele prac opisujących zastosowanie metod 3D QSAR w przewidywaniu modeli farmakoforowych receptora 5-HT_{2A}. Ze względu na zróżnicowaną strukturę chemiczną antagonistów tego receptora, nie opracowano dotychczas uniwersalnego modelu topograficznego [58]. Przedstawiono dwie grupy modeli: czteropunktowy (klasy I) dla ligandów o budowie liniowej oraz trójczłonowy (klasy II) dla związków, w których środki pierścieni aromatycznych leżą w narożach trójkąta [67,68]. Model klasy I złożony jest z następujących punktów: protonowanego atomu azotu (PI), akceptora wiązania wodorowego (HBA) oraz dwóch miejsc oddziaływań hydrofobowych aromatycznych (HYA). Tę klasę reprezentuje spiperon, antagonist receptoru D₂ (K_i=0,1 nM) i 5-HT_{2A} (K_i=1 nM). W modelach II klasy, dla których wzorcem jest mianseryna, istotne dla wiązania z receptorem są jedynie trzy obszary: protonowanego atomu azotu (PI), oddziaływań hydrofobowych (HY) i pierścienia aromatycznego (RA) (Ryc. 10). Opisane modele są zgodne z wcześniejszymi założeniami innych badaczy [64].

Z danych literaturowych wynika, że powinowactwo do receptora 5-HT_{2A} jest najsilniejsze dla związków zawierających łańcuch propoksylowy lub propylowy [30,63]. Na zwiększenie powinowactwa wpływa także rodzaj podstawnika przy pierścieniu aromatycznym - najkorzystniejsze wartości K_i uzyskano dla podstawników *m*-CF₃, *m*-Cl, *o*-OCH₃ i naftylowego [30, 63, 69].

5. Ligandy receptora 5-HT₇

Z danych literaturowych wynika, że związki zawierające szkielet arylopiperazyny, które wykazują wysokie powinowactwo do receptora 5-HT₇, są często ligandami innych receptorów serotoniny (5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}) a także receptora α₁-adrenergicznego i dopaminergicznego

D₂ [32,37,70,71]. Jest to spowodowane bliskim podobieństwem struktury miejsc wiążących receptorów związanych z białkiem G. Stwierdzono, że receptory z grupy 5-HT₇ są związane z różnorodnymi schorzeniami ośrodkowego układu nerwowego, takimi jak schizofrenia, depresja, epilepsja, migrena, a także zaburzenia pracy serca [72,73]. W ostatnich latach ukazało się kilkanaście prac dotyczących badań nad nowymi, selektywnymi ligandami tego receptora [32,35,70,71,74-78] (Tabela 3).



Ryc. 10. Modele farmakoforowe receptora 5-HT_{2A} [67,68]: (A) czteropunktowy (wyznaczony na podstawie struktury spiperonu); (B) trójczłonowy (dla mianseryny). Opisano obszary: PI - protonowanego atomu azotu, HBA - akceptora wiązania wodorowego, HY - oddziaływań hydrofobowych, HYA - oddziaływań hydrofobowych aromatycznych, RA - pierścienia aromatycznego.

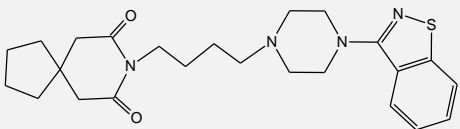
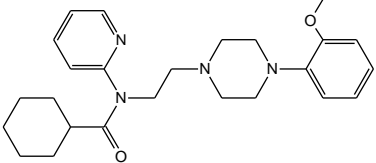
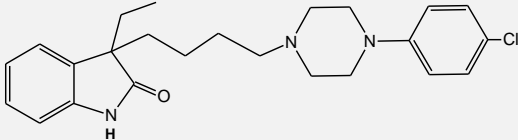
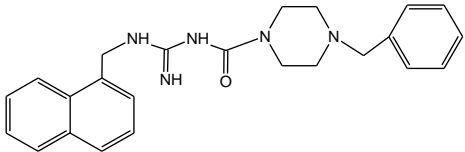
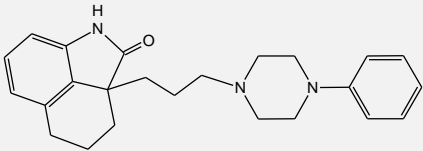
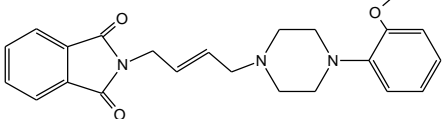
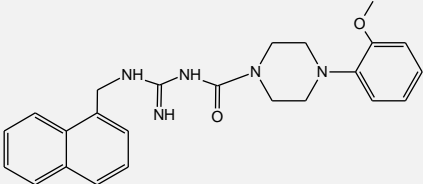
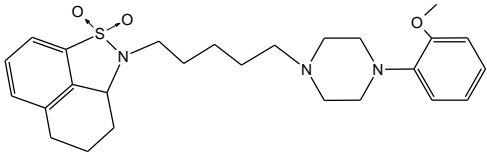
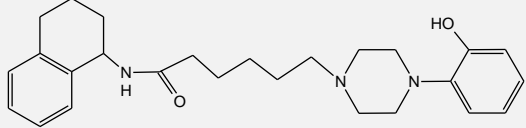
5.1. Modele farmakoforowe wyznaczone metodami 3D QSAR

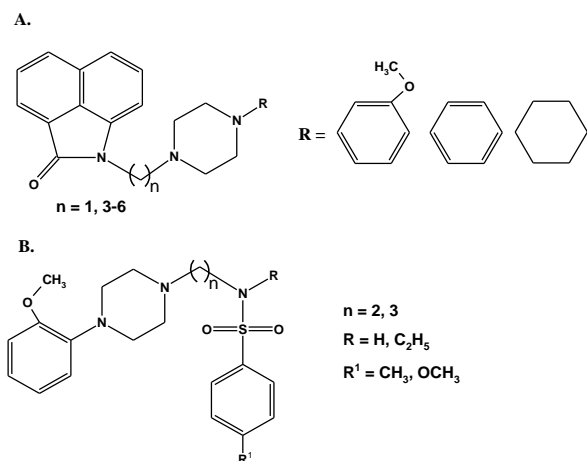
Pierwszą hipotezę dotyczącą oddziaływania ligandów z receptorem serotoninowym 5-HT₇ wysunęła w 2000 roku grupa naukowców skupiona wokół Lopez-Rodriguez [75]. Korzystając z oprogramowania „Catalyst”, autorzy analizowali szereg dostępnych w literaturze antagonistów (Ryc. 11A). Po optymalizacji ustalono [76], że dla wiązania z receptorem niezbędna jest obecność pięciu elementów strukturalnych: dodatnio naładowanego atomu azotu (PI), trzech obszarów hydrofobowych (HYD) oraz grupy będącej akceptorem wiązań wodorowych (HBA) (Ryc. 12A). Zaobserwowano, że w przypadku antagonistów:

- optymalna długość łańcucha węglowego wynosi 4 lub 5 jednostek;
- protonowany atom N₄ piperazyny odgrywa znaczącą rolę w wiązaniu z receptorem, oddziałując z nim elektrostatycznie;
- hydrofobowy region HYD3 musi mieć charakter aromatyczny.

Intensywne badania CoMFA nad topografią receptora 5-HT₇ podjęli również Vermeulen i współpracownicy [74,80]. Przedstawiony przez nich model agonisty określał odległości między dwoma obszarami oddziaływań hydrofobowych (płaskich pierścieni aromatycznych), regionem dodatnio naładowanym a miejscem wiązania wodorowego, którego akceptorem jest atom tlenu grupy karbonylowej (Ryc. 12B).

Tabela 3. Ligandy receptora 5-HT₇ z grupy policyklicznych arylopiperazyn.

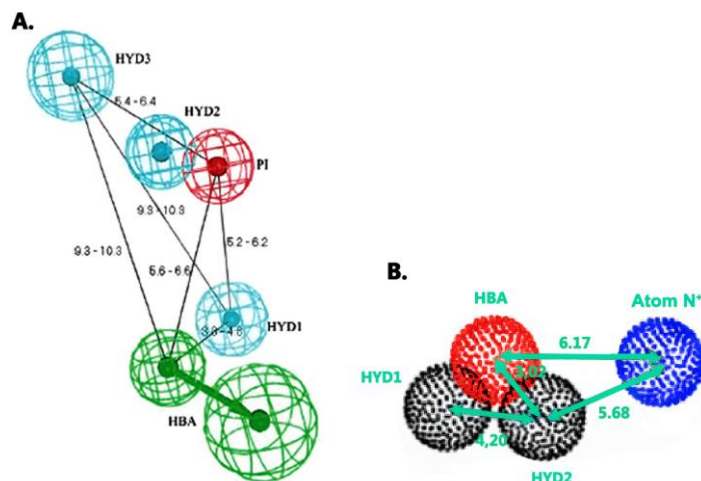
Związek	Wzór strukturalny	Ki [nM]	Bibliografia
XIX (Tiospiron)		9,2	79
XX (WAY-100635)		6,8	80
XXI		0,38	78
XXII		1,4	79
XXIII		8,3	75
XXIV		36	32
XXV		6,0	79
XXVI		6,6	75
XXVII		7,94	81



Ryc. 11. Przykładowe N-podstawione arylopierezyny mapowane przez zespoły Lopez-Rodriguez [76] (A) oraz Vermeulena [80] (B) do modeli farmakoforowych receptora 5-HT₇, w celu wyznaczenia korelacji struktura-aktywność.

5.2. Modele farmakoforowe wyznaczone na podstawie struktury receptora

Wkładem polskich naukowców w badania nad farmakoforem receptora 5-HT₇ są ostatnio opublikowane modele oparte na wynikach dokowania aktywnych ligandów [81]. Autorzy przedstawili dwie hipotezy antagonistycznego wiązania z receptorem: jedną dotyczącą ogólnych cech powinowactwa do receptora, drugą - opisującą warunki selektywności ligandu (Ryc. 13). Warunkiem wystąpienia powinowactwa jest obecność przynajmniej trzech z sześciu następujących cech strukturalnych: atomu azotu w postaci sprotonowanej (PI), trzech obszarów hydrofobowych/aromatycznych (HYD/AR1-3) oraz dwóch ugrupowań będących akceptorami wiązania wodorowego (HBA1,2). Natomiast selektywność jest wynikiem wystąpienia silnych oddziaływań elektrostatycznych (PI) i π - elektronowych (AR1), wspólnych dla wszystkich selektywnych antagoni-

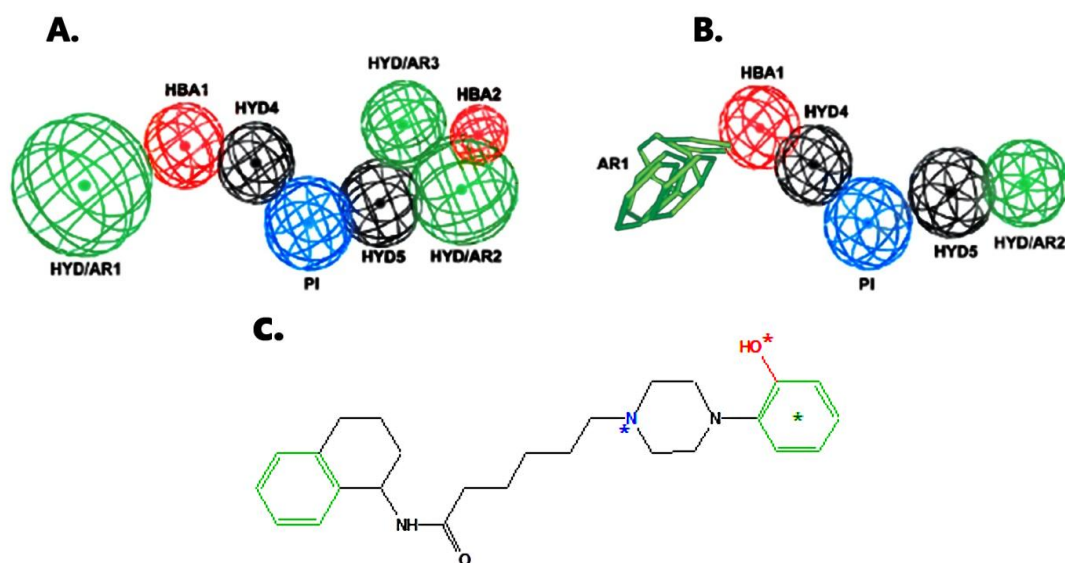


Ryc. 12. Schematy modeli farmakoforowych receptora 5-HT₇ dla: (A) agonisty według Lopez-Rodriguez [76] i (B) antagonisty zaproponowany przez Vermeulena i współ.[80].

stów, oraz dodatkowo jednego z trzech wiązań: HBA1 albo HYD/AR2.

6. Wnioski

Techniki komputerowe znacznie podnoszą efektywność poszukiwania nowych substancji leczniczych, są to jednak metody wciąż rozwijane i obciążone ograniczeniami. Wynika to zarówno z uproszczeń algorytmów obliczeniowych, jak i z faktu, że receptor może posiadać więcej niż jedno miejsce aktywne, może też być akceptorem kilku różnych ligandów czy też dla jednego centrum aktywności możliwych jest kilka grup farmakoforowych. Ponadto programy komputerowe wykonują obliczenia dla stanu podstawowego, który podczas wiązania z receptorem może ulec wzbudzeniu [1].



Ryc. 13. Modele farmakoforowe receptora 5-HT₇: (A) hipotetyczny model „aktywności” ligandów; (B) hipotetyczny model „selektywności” ligandów; (C) struktura jednego z nieselektywnych antagonistów [81].

WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI

AAA	metoda przybliżenia aktywnego analogu (ang. Active Analog Approach)
AR, Ar	grupa aromatyczna
CoMFA	porównawcza analiza pól cząsteczkowych (ang. Comparative Molecular Field Analysis)
CoMSIA	porównawcza analiza wskaźników cząsteczkowego podobieństwa (ang. Comparative Molecular Similarity Index Analysis)
3D QSAR	trójwymiarowa analiza QSAR
EC50	efektywne stężenie u 50% badanych osobników (ang. Effective Concentration)
ED50	dawka efektywna dla 50% badanych osobników (ang. Effective Dose)
HBA	akceptor wiązania wodorowego (ang. Hydrogen Bond Acceptor)
HBD	donor wiązania wodorowego (ang. Hydrogen Bond Donor)
5-HT	5-hydroksytryptamina; serotonina; receptor serotoninowy
HYA, HYD, HY	grupy hydrofobowe (aromatyczne lub alifatyczne)
IC50	połowa maksymalnego stężenia hamującego (ang. Inhibitory Concentration)
IUPAC	Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej (ang. International Union of Pure and Applied Chemistry)
Ki (Ki50)	stała inhibicji (ang. Inhibitor Constant)
Km	stała Michaelisa (ang. Michaelis Constant)
LogD7,4	wartość logP wyznaczona w roztworze o pH=7,4
LogP	współczynnik podziału oktanol/woda; lipofilowość
LogS	rozpuszczalność w wodzie
MLP	potencjał lipofilowości (ang. Molecular Lipophilicity Potential)
MR	refraktywność molowa (ang. Molar Refractivity)
PI	grupa zdolna do dodatniej jonizacji (zasadowy atom azotu)
QSAR	ilościowa zależność między strukturą związku a jego aktywnością (ang. Quantitative Structure - Activity Relationship)
QSPR	ilościowa zależność między strukturą związku a jego właściwościami (ang. Quantitative Structure - Property Relationship)

BIBLIOGRAFIA

- Kapetanovic I.M., Chem. Biol. Interact. 2008, 171, 165
- Oprea T.I., Molecules 2002, 7, 51
- Tetko I.V., Mini Rev. Med. Chem. 2003, 3, 809
- Veselovsky A.V., Ivanov A.S., Curr. Drug Targets Infect. Disord. 2003, 3, 33
- Ekins S., Mestres J., Testa B., Br. J. Pharm. 2007, 152, 21
- Guner O. F., Curr. Top. Med. Chem. 2002, 2, 1321
- Sylte I., Bronowska A., Dahl S.G., Europ. J. Pharm., 2001, 416, 33
- Ooms F., Curr. Med. Chem. 2000, 7, 141
- Schneidman-Duhovny D., Nussinov R., Wolfson H.J., Curr. Med. Chem. 2004, 11, 91
- Wermuth C.G., Ganellini C.R., Lindbergh P., Mitscher A., Pure Appl. Chem., 1998, 70, 1129
- Bojarski A., Curr. Top. Med. Chem., 2006, 6, 2005
- http://www.chem.uw.edu.pl/studia/w_mono_sf/
- Hibert M.F., McDermott I., Middlemiss D.N., Mir A.K., Fozard J.R., Eur. J. Med. Chem. 1989, 24, 31
- Silverman R.B., Chemia organiczna w projektowaniu leków, WNT, Warszawa, 2007
- Patrick G.L., Chemia medyczna. Podstawowe zagadnienia, WNT, Warszawa, 2003
- Tetko I.V., Tanchuk V.Y., Kasheva T.N., Villa A.E., J. Chem. Inf. Comput. Sci. 2001, 41, 246
- Maciejewska D., Zotek T., Herold F., J. Mol. Graph. Model., 2006, 25, 353
- Tripos Bookshelf - materiały informacyjne firmy Tripos; www.tripos.com
- Kim K. H., Greco G. Novellino E., Persp. Drug Disc. Des., 1998, 12, 257
- Efremov R.G., Chugunov A.O., Pyrkov T.V., Priestle J.P., Arseniev A.S., Jacoby E., Curr. Med. Chem., 2007, 14, 393
- Kubinyi H., Encyclopedia of Computational Chemistry, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK, 1998
- http://www.icm.edu.pl/kdm/Projektowanie_lek%C3%B3w
- Oh J.S., Ha H.-J., Chi D.Y., Lee H.K., Curr. Med. Chem. 2001, 8, 999
- López-Rodríguez M.L., Ayala D., Benhamú B., Morcillo M.J., Viso A., Curr. Med. Chem. 2002, 9, 443
- Pessoa-Mahana H., Araya-Maturana R., Saitz C.B., Pessoa-Mahana D.C. Mini Rev. Med. Chem. 2003, 3, 77
- Caliendo G., Santagada V., Perissutti E., Fiorino F., Curr. Med. Chem. 2005, 12, 1721
- Kowalski P., Kowalska T., Mokrosz M.J., Bojarski A.J., Charakchieva-Minol S., Molecules 2001, 6, 784
- Tandon M., O'Donnell M.M., Porte A., Vensel D., Yang D., Palma R., Beresford A., Ashwell M.A., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2004, 14, 1709
- Kotackowski M., Zajdel P., Fhid O., Duszyńska B., Tatarczyńska E., Pawtowski M., Pharmacol. Rep., 2005, 57, 229
- Tomić M., Ignjatović D., Tovilović G., Andić D., Roglić G., Kostić-Rajačić S., Bioorg. Med. Chem. Lett., 2007, 17, 5749
- Bojarski A.J., Kuran B., Kossakowski J., Koziol A., Jagietto-Wójciewicz E., Chodkowska A., Eur. J. Med. Chem. 2009, 44, 152
- Bojarski A. J., Duszyńska B., Kotackowski M., Kowalski P., Kowalska T., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2004, 14, 5863
- Penjišević J., Šukalović V., Andrić D., Kostić-Rajačić S., Šoškić V., Roglić G., Arch. Pharm. Chem. Life Sci. 2007, 340, 456
- Mattson R.J., Catt J.D., Sloan Ch.P., Gao Q., Carter R.B., Gentile A., Mahle C.D., Matos F.F., McGovern R., Vander-Maelen C.P., Yocca F.D., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2003, 13, 285
- Bojarski A.J., Paluchowska M., Duszyńska B., Kłodzińska A., Tatarczyńska E., Chojnacka-Wójcik E., Bioorg. Med. Chem. 2005, 13, 2293
- Paluchowska M., Bugno R., Charakchieva-Minol S., Bojarski A.J., Tatarczyńska E., Chojnacka-Wójcik E., Arch. Pharm. Life Sci. 2006, 339, 498
- Bojarski A.J., Paluchowska M.H., Duszyńska B., Bugno R., Kłodzińska A., Tatarczyńska E., Chojnacka-Wójcik E., Bioorg. Med. Chem. 2006, 14, 1391
- Lopez-Rodriguez M.L., Morcill M.J., Fernandez E., Porras E., Orensanz L., Beneytez M.E., Manzaneres J., Fuentes J.A., J. Med. Chem. 2001, 44, 186
- Goldbech O.A., Dahl O., Peter N.E., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2004, 12, 1551
- Lopez-Rodriguez M.L., Ayala D., Viso A., Benhamu B., De la Pradilla R.F., Zarzaa F., Ramos J.A., Bioorg. Med. Chem. 2004, 12, 1551
- Stark A., Jordan S., Allers K.A., Bertekap R.L., Chen R., Kannan T.M., Molski T.F., Yocca F.D., Sharp T., Kikuchi T., Burris K.D., Psychopharmacology 2007, 190, 373
- Zlatović M.V., Šukalović V.V., Kostić-Rajačić S., Andić D.B., Roglić GM, J. Serb. Chem. Soc., 2006, 71, 1125
- Andić D., Tovilović G., Roglić G., Šoškić V., Tomić M., Kostić-Rajačić S., J. Serb. Chem. Soc., 2007, 72, 747
- Jones B.J., Blackburn T.P., Pharm. Biochem. Behav. 2002, 71, 555
- Hoyer D., Hannon J.P., Martin G.R., Pharm. Biochem. Behav. 2002, 71, 533

46. Hibert M. F., Gittos M. W., Middlemiss D. N., Mir A. K., Fozard J. R., *J. Med. Chem.* 1988, 31, 1087
47. Mokrosz M. J., Duszyńska B., Bojarski A. J., Mokrosz J. L., *Bioorg. Med. Chem.* 1995, 3, 533
48. Chilmonczyk Z., Szelejewska-Wozniakowska A., Cybulski J., Cybulski M., Kozioł A. E., Gdaniec M., *Arch. Pharm.(Weinheim)* 1997, 330, 146
49. Bronowska A., Leś A., Chilmonczyk Z., Filipek S., Edvardsen Ø., Østensen R., *Bioorg. Med. Chem.* 2001, 9, 881
50. Glennon, R.A., *Drug Dev. Res.* 1992, 26, 251
51. Van Steen B. J., van Wijngaarden I., Tulp M. T., Soudijn W., *J. Med. Chem.* 1994, 37, 2761
52. Gaillard P., Carrupt P. A., Testa B., Schambel P., *J. Med. Chem.* 1996, 39, 126
53. Lopez-Rodriguez, M. L., Rosado M. L., Benhamu B., Morcillo M. J., Fernandez E., Schaper K. J., *J. Med. Chem.* 1997, 40, 1648
54. Rodriguez, M. L., Rosado M. L., Benhamu B., Morcillo M. J., Sanz A. M., Orensanz L., Beneitez M. E., Fuentes J. A., Manzanares J., *J. Med. Chem.* 1996, 39, 4439
55. Weber K.C., da Silva A.B.F., *Eur. J. Med. Chem.* 2008, 43, 364
56. Orus L., Perez-Silanes S., Oficialdegui A. M., Martinez-Esparza J., Del Castillo J. C., Mourelle M., Langer T., Guccione S., Donzella G., Kroat E. M., Poptodorov K., Lasheras B., Ballaz S., Hervias I., Tordera R., Del Rio J., Monge A., *J. Med. Chem.* 2002, 45, 4128
57. Lepailleur A., Bureau R., Paillet-Loilier M., Fabis F., Saettel N., Lemaitre S., Dauphin F., Lesnard A., Lancelot J. C., Rault S., *J. Chem. Inf. Model.* 2005, 45, 1075
58. Westkaemper R. B., Glennon R. A., *Curr. Top. Med. Chem.* 2002, 2, 575
59. Gonzalez-Gomez J.C., Santana L., Uriarte E., Brea J., Villazon M., Loza M.I., De Luca M., Rivas M.E., Montenegro G.Y., Fontenla J.A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, 13, 175
60. Zajdel P., Subra G., Bojarski A.J., Duszyńska B., Tatarczyńska E., Nikiforuk A., Chojnacka-Wójcik E., Pawłowski M., Martinez J., *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15, 2907
61. Paluchowska M.H., Bugno R., Bojarski A.J., Charakchieva-Minol S., Duszyńska B., Tatarczyńska E., Kłodzińska A., Stachowicz K., Chojnacka-Wójcik E., *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13, 1195
62. Brea J., Rodrigo J., Carrieri A., Sanz F., Cadavid M.I., Enguix M.J., Villazón M., Mengod G., Yolanda Caro, Masaguer Ch.F., Raviña E., Centeno N.B., Carotti A., Loza M.I., *J. Med. Chem.* 2002, 45, 54
63. Obniska J., Kołaczkowski M., Bojarski A.J., Duszyńska B., *Eur. J. Med. Chem.* 2006, 11, 874
64. Holtje H. D., Jendretzki U. K., *Pharm. Pharmacol. Lett.* 1992, 1, 89
65. Andersen K., Liljefors T., Gundertofte K., Perregaard J., Bogeso K. P., *J. Med. Chem.* 1994, 37, 950
66. Mokrosz J. L., Strekowski L., Duszyńska B., Harden D. B., Mokrosz M. J., Bojarski A. J., *Pharmazie* 1994, 49, 801
67. Rowley M., Bristow L. J., Hutson P. H., *J. Med. Chem.* 2001, 44, 477
68. Klabunde T., Evers A., *Chembiochem.* 2005, 6, 876
69. Obniska J., Kołaczkowski M., Charakchieva-Minol S., Nędza K., Dybała M., Bojarski A.J., *Pharmacol. Rep.*, 2005, 57, 336
70. Yong H. N., Sung H. H., Jung H. L., Woo-Kyu P., Du-Jong B., Hun Y. K., Yong S. Ch., Hyunah Ch., Ae N. P., *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, 16, 2570
71. Juhee Y., Eun A. Y., Ji-Yeon K., Ae N. P., Hyewhon R., Woo-Kyu P., Yang K.J., Hea-Young P.Ch., *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 5405
72. Mnie-Filali O., Lambás-Señas L., Zimmer L., Haddjeri N., *Drug News Perspect.* 2007, 20, 613
73. Pittalà V., Salerno L., Modica M., Siracusa M.A., Romeo G., *Mini Rev. Med. Chem.* 2007, 7, 945
74. Vermeulen E. S., Schmidt A. W., Sprouse J. S., Wikstrom H. V., Grol C. J., *J. Med. Chem.* 2003, 46, 5365
75. Lopez-Rodriguez M. L.; Porras, E.; Benhamu, B.; Ramos, J. A.; Morcillo, M. J.; Lavandera, J. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2000, 10, 1097
76. Lopez-Rodriguez M. L., Porras E., Morcillo M. J., Benhamu B., Soto L. J., Lavandera J. L., Ramos J. A., Olivella M., Campillo M., Pardo L., *J. Med. Chem.* 2003, 46, 5638
77. Hagan J.J., Price G.W., Jeffrey P., Deeks N.J., Stean T., Piper D., Smith M.I., Upton N. Medhurst A.D., Middlemiss D.N., Riley G.J., Lovell P.J., Bromidge S.M., Thomas D.R., *Br. J. Pharmacol.* 2000, 130, 539
78. Volk B., Barkóczy J., Hegedus E., Udvari S., Gacsályi I., Mezei T., Pallagi K., Kompagne H., Lévy G., Egyed A., Hársing L.G. Jr, Spedding M., Simig G., *J. Med. Chem.* 2008, 51, 2522
79. Leopoldo M., *Curr. Med. Chem.* 2004, 11, 629
80. Vermeulen E. S., van Smeden M., Schmidt A. W., Sprouse J. S., Wikstrom H. V., Grol C. J., *J. Med. Chem.* 2004, 47, 5451
81. Kołaczkowski M., Nowak M., Pawłowski M., Bojarski A.J. *J. Med. Chem.* 2006, 49, 6732