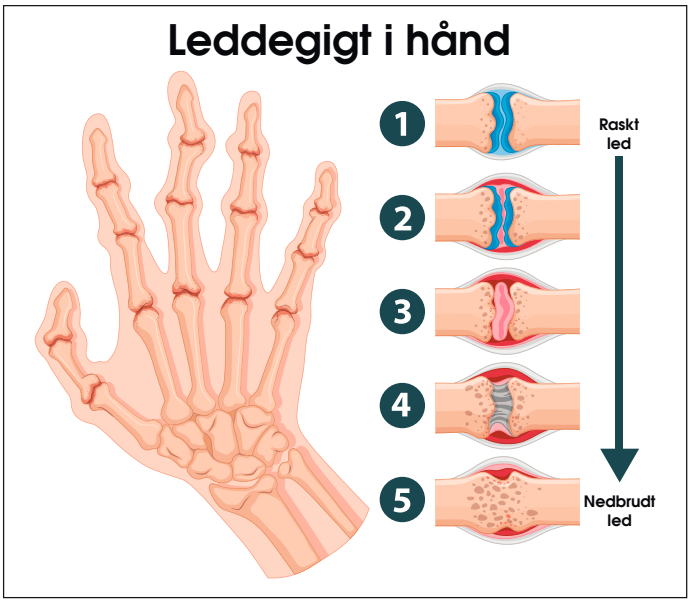
Prodrugs til forbedret behandling af leddegigt

Den medicinske behandling af leddegigt er forbundet med en række alvorlige bivirkninger. For at forbedre behandlingen arbejdes der derfor på at skabe ROS-følsomme prodrugs af MTX og AMT. Et arbejde, der har givet lovende resultater.

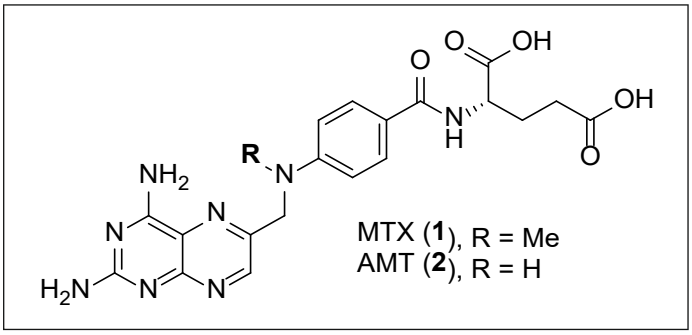
Af Nikolaj S. Andersen, Jorge Peiró Cadahía, Viola Previtali og Mads H. Clausen, Institut for Kemi, DTU

Leddegigt eller reumatoid artritis er en udbredt autoimmun sygdom, som rammer op mod 1% af befolkningen i vestlige lande. Sygdommen er primært kendetegnet ved kronisk ledbetændelse, der forårsager irreversibel destruktion af led og knogler, og er forbundet med tiltagende invalidering, systemiske komplikationer, tidlig død og socioøkonomiske udgifter [1,2]. På trods af intensiv forskning er årsagen til leddegigt endnu uklar, men lidelsen opstår ved, at kroppens eget immunforsvar fejlagtigt anser visse dele af leddene som værende fremmedartede. Immunforsvaret trænger derfor ind i leddene (primært de perifere), der hæver op og langsomt ødelægges indefra af immuncellerne. Den kroniske betændelsestilstand resulterer i smerte, nedsat bevægelighed og efterlader leddene forkrøblede i takt med, at brusk og knogle ødelægges, figur 1.



Figur 1. Nedbrydning af led er det mest almindelige kendetegn ved leddegigt og skyldes en kronisk betændelsestilstand i leddene. Illustration: Brgfx, Freepik.com, bearbejdet af Trine Plass.

Leddegigt kan ikke helbredes og kræver derfor livslang symptomatisk behandling med såkaldte *sygdomsmodificerende antireumatiske lægemidler*. Methotrexat (MTX) har siden 1980'erne været det foretrukne lægemiddel i symptomlindrende behandling af leddegigt. MTX blev oprindeligt udviklet til behandling af kræft tilbage i 1940'erne som en mindre giftig



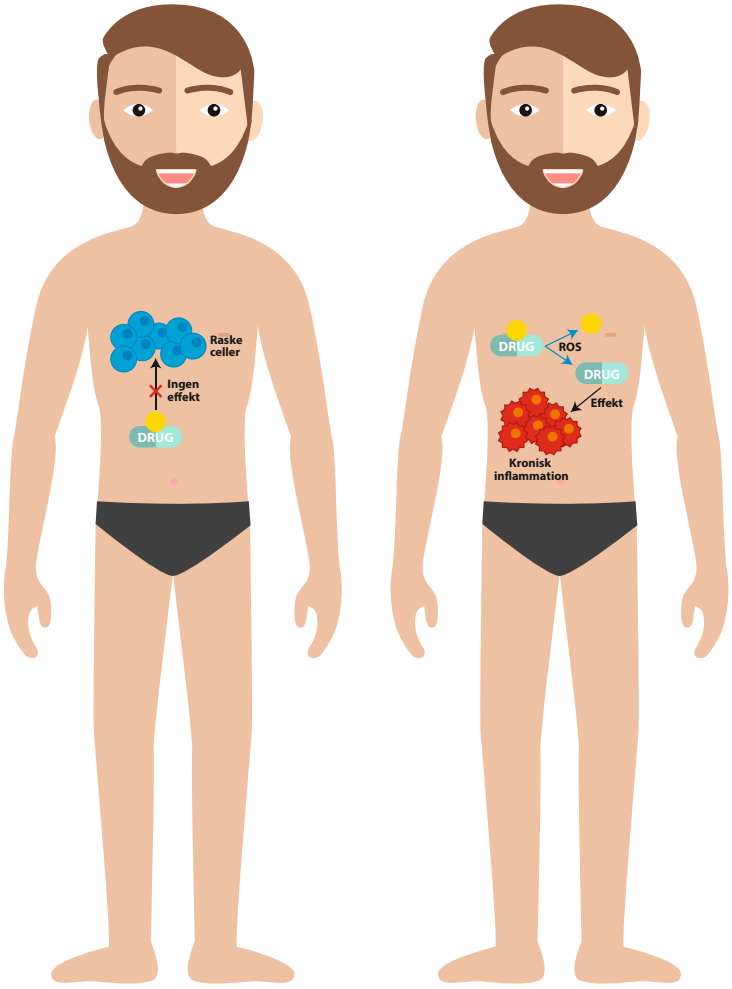
Figur 2. Methotrexat (MTX) og det nært beslægtede aminopterin (AMT) blev oprindeligt udviklet til behandling af kræft, men i små doser er MTX i dag blevet det foretrukne lægemiddel til behandling af leddegigt.

videreudvikling af aminopterin (AMT) - et af de første stoffer til brug i kemoterapi nogensinde, figur 2 [3]. I dag benyttes MTX stadig i kemoterapi (1.000-5.000 mg/uge), men det har i små doser (5-25 mg/uge) også vist sig at have en positiv effekt på den kroniske ledinflammation hos leddegigtpatienter.

Desværre er behandlingen af leddegigt stadig utilfredsstillende for mange patienter. MTX er forbundet med en lang række fremtrædende bivirkninger, særligt gastrointestinale, og stoffets effekt varierer meget fra patient til patient. Dette bevirker, at næsten halvdelen af patienterne må stoppe behandlingen inden for de første tre år [4]. Nyere bio-logiske lægemidler har vist lovende resultater i kombination med MTX, men disse er ekstremt dyre og er forbundet med yderligere bivirkninger [5].

Benyttede forkortelser

AMT	aminopterin
Cbz	carboxybenzyl
DIPEA	diisopropyletylamin
DMA	dimetylacetamid
DMAP	4-dimetylaminopyridin
DMF	dimetylformamid
Me	metyl
MTX	methotrexat
PMB	para-methoxybenzyl
PyBOP	(benzotriazol-1-yloxy) tripyrrolidinofosfonium hexafluorfosfat
ROS	reaktive oxygenspecier
TFA	trifluoreddikesyre



Figur 3. Simplificeret illustration af prodrug-konceptet. Det inaktive prodrug indtages, men udøver ingen effekt på kroppens raske celler, da det er maskeret. Først når prodrugget kommer i kontakt med forhøjede koncentrationer af ROS, f.eks. ved inflammation, aktiveres lægemidlet, som dermed primært frigives lokalt til det sygdomsramte område.
Illustration: Photoroyalty, Freepik.com, bearbejdet af Trine Plass.

Strategi

En måde at forbedre behandlingen af leddegigt på, er at få MTX til selektivt at udøve sin effekt lokalt ude i de sygdomsramte led, figur 3. I teorien bør effekten af MTX dermed forøges, mens uønskede bivirkninger i resten af kroppen mindskes. Et kendetegn ved kronisk inflammation, som potentielt kan udnyttes til dette, er et forhøjet niveau af reaktive oxygenspecier (ROS), særligt hydrogenperoxid - H_2O_2. I raske celler udfører meget lave koncentrationer af ROS vigtige fysiologiske roller som signalformidling, forsvar og biosyntese [6,7], men under kronisk inflammation, som i leddegigt, kan mængden af ROS øges 100-fold op til 1,0 mM og være en yderligere skadelig faktor mod det raske væv [8,9].

For at forbedre behandling af leddegigt, har vi derfor arbejdet på at skabe ROS-følsomme prodrugs af MTX og AMT. Et prodrug er en inaktiv form af et lægemiddel, som først inde i kroppen aktiviseres enten kemisk eller enzymatisk til den aktive form [10]. Ved at maskere

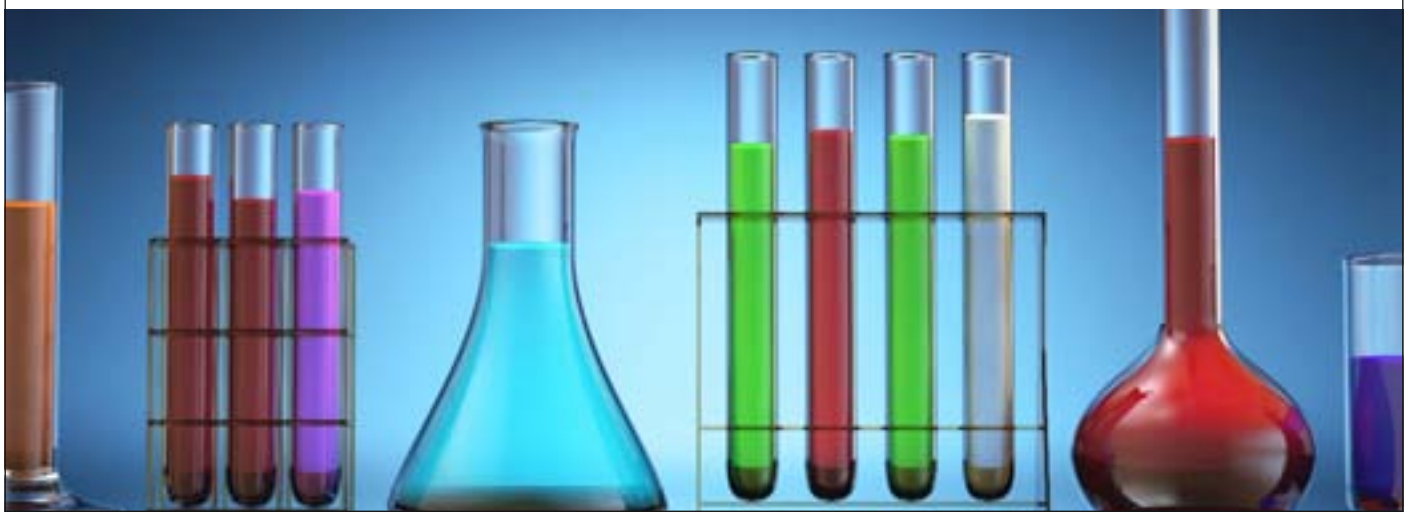
Dansk Laborant-Forening

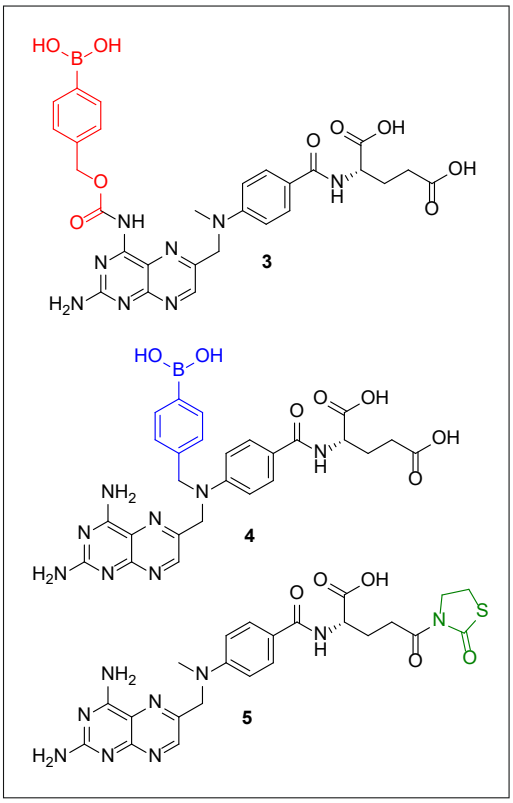
Kom og hils på din landsforening på LabDays 2018 12.-13. september i Øsknehallen

Vi står klar til en snak med dig om hvad der sker på din arbejdsplads, og de udfordringer du møder. Som altid er vi klar til at høre om de ønsker og forventninger du har til din landsforening. Det kan være om efteruddannelse, videreuddannelse, faglige aktiviteter, arbejdsmiljø eller hvad der fylder i dit arbejdsliv.

DL-F/HK

Vel mødt på stand nr. 17





Figur 4. Tre eksempler på prodrugs med ROS-følsomme grupper: fenylborsyre med karbamat-linker (rød), uden linker (blå) og thiazolidinon (grøn). Prodrugs **3** og **5** er baseret på MTX, mens prodrug **4** frigiver det strukturelt og funktionelt lignende AMT.

lægemidlet med en ROS-følsom gruppe, vil dette prodrug i teorien ingen effekt have i kroppen, før det kommer i kontakt med det sygdomsramte væv, hvor lægemidlet aktiveres af ROS.

Med udgangspunkt i to ROS-følsomme grupper: fenylborsyre [11] (blev oprindeligt udviklet med henblik på anvendelse i cancer) og thiazolidinon [12], blev der udviklet to MTX-prodrugs og et prodrug baseret på AMT-designet, figur 4. I figur 5 ses en illustration af aktiveringsmekanismen for de to ROS-følsomme grupper.

Syntese og test af prodrugs

Prodrug **3** blev syntetiseret direkte fra MTX i fire trin, skema 1. Prodrugs **4** og **5** blev begge syntetiseret fra mindre byggeblokke (hhv. skema 2 og skema 3, på side 14).

I indledende studier viste alle stoffer god stabilitet både i vandig buffer (pH 7,4), simuleret mavesyreveæske, blodplasma og ved tilstedeværelse af oxidative leverenzymer. Allervigtigst kunne alle tre prodrugs også aktiveres selektivt ved tilsætning af H_2O_2 i sygdomsrelevante koncentrationer. Baseret på disse lovende indledende data blev stofferne taget videre til dyreforsøg med mus, hvor der findes en velafprøvet sygdomsmodel for leddegigt - *kollagen type-II induceret artritis*. I grupper af otte blev de gigtplagede mus over en 14 dages periode behandlet med henholdsvis MTX, AMT, fenylborsyre prodrugs **2** og **3**, thiazolidinon prodrug **4** samt en blank kontrol. Effekten af behandlingerne blev vurderet på to parametre: 1) en sygdomsscore baseret på mængden af hævelse i fodled og 2) musenes kropsvægt. Sygdomsscoren giver en vurdering af lægemidlets effekt på lindring af inflammationen, mens ændring af kropsvægt kan betyde dårlige tolerancer af stoffet på grund af kraftige bivirkninger.

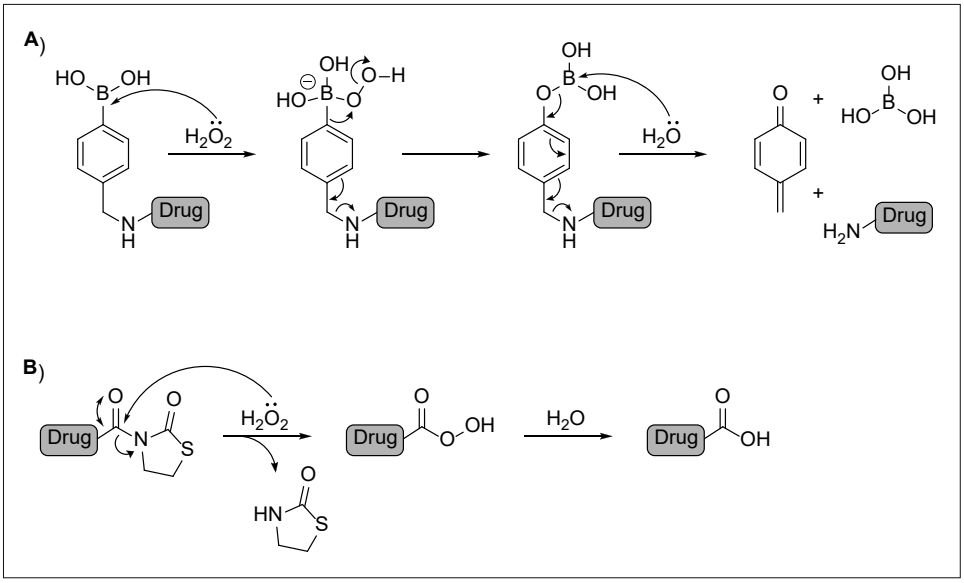
Resultaterne er vist i figur 6, side 14, og det ses, at alle tre prodrugs nedsætter sygdomsscoren signifikant. Prodrug **3** og **5** viser signifikant forbedring af musenes inflammation og virker sammenligneligt med det aktive stof MTX. Kigger man på udviklingen af kropsvægt virker de to prodrugs til at blive tolereret bedre end MTX hen mod slutningen af forsøget. Mus behandlet med et af disse to prodrugs udviser generelt en meget stabil kropsvægt, mens behandling med MTX medfører et vægttab halvvejs igennem forsøget.

Prodrug **4** viser også tilsvarende effektivitet som prodrug **3** og **5**, men kan ikke sammenlignes med AMT, da denne behandling måtte stoppes tidligt grundet for højt tab af kropsvægt. Dette bevidner dog en langt mere sikker profil af denne prodrug-strategi sammenlignet med det rene aktive stof. Det understreger også, hvorfor det mindre toksiske MTX hurtigt erstattede AMT.

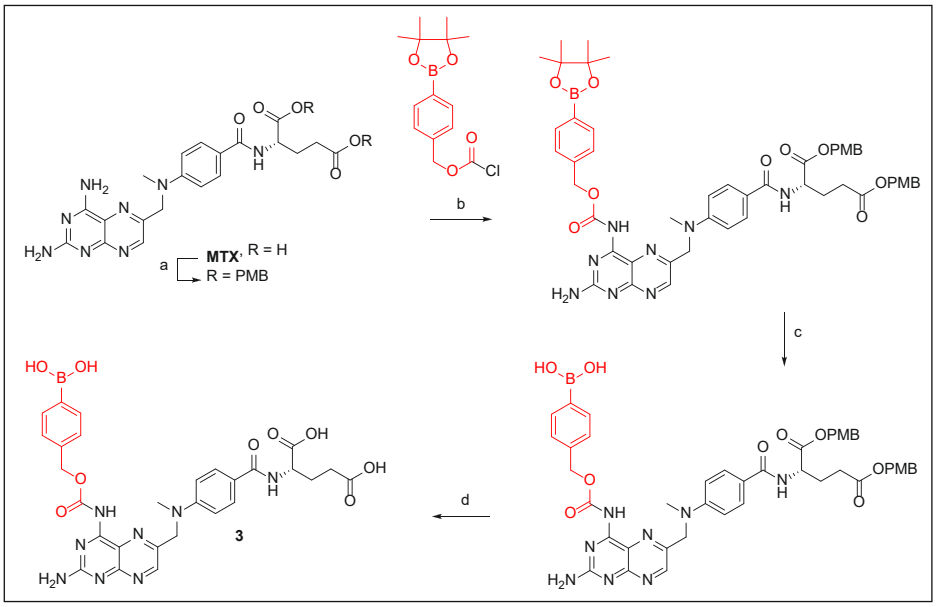
Konklusion og fremtidigt arbejde

Med håb om en forbedret behandling af leddegigt har vi udviklet en række prodrugs, der først aktiveres, når de ankommer til de sygdomsramte led. De indledende laboratorieforsøg viste lovende resultater for stoffernes stabilitet og selektive aktivering med H_2O_2. Stofferne blev derfor ført videre til dyreforsøg med mus, hvor de også har givet spændende resultater. Deres inflammationslindrende effekt var sammenlignelig med MTX, men analyse af musenes kropsvægt indikerer en bedre tolerance over for vores prodrugs. Dette var særligt tydeligt med AMT-prodrug **4**, der udviste en langt bedre tolerance sammenlignet med AMT.

Vi arbejder fortsat på at optimere egenskaberne af de syntetiserede MTX-prodrugs. Her er der primært tale om at indføre strukturelle ændringer af de forskellige reaktive grupper, samt hvordan de er bundet til MTX. Hermed er det muligt at



Figur 5. To eksempler på ROS-følsomme grupper og deres aktiveringsmekanismer baseret på H_2O_2: **A**) Fenylborsyre direkte forbundet til lægemidlet som i prodrug **4**. I prodrug **3** vil der i sidste trin af aktiveringsmekanismen også blive fraspaltet CO_2 fra karbamat-linkeren. **B**) Thiazolidinon. De frigivne restprodukter, her borsyre, quinonmethid og thiazolidinon må naturligvis ikke være cytotoksiske.



Skema 1. Syntese af fenylborsyre-baseret prodrug **3**[a]
[a] Reagenser og betingelser: (a) PMBCl, 1,1,3,3-tetrametylguanidin, CH_2Cl_2, 16 t (35%). (b) DIPEA, DMAP, CH_2Cl_2, 5 t (73%). (c) HCl i H_2O/MeCN, 20 t (31%). (d) 5% TFA i CH_2Cl_2, 30 min (54%).

ændre, hvor hurtigt et prodrug aktiveres og dermed forhåbentlig finjustere lægemidlets stabilitet, aktivitet og toksicitet.

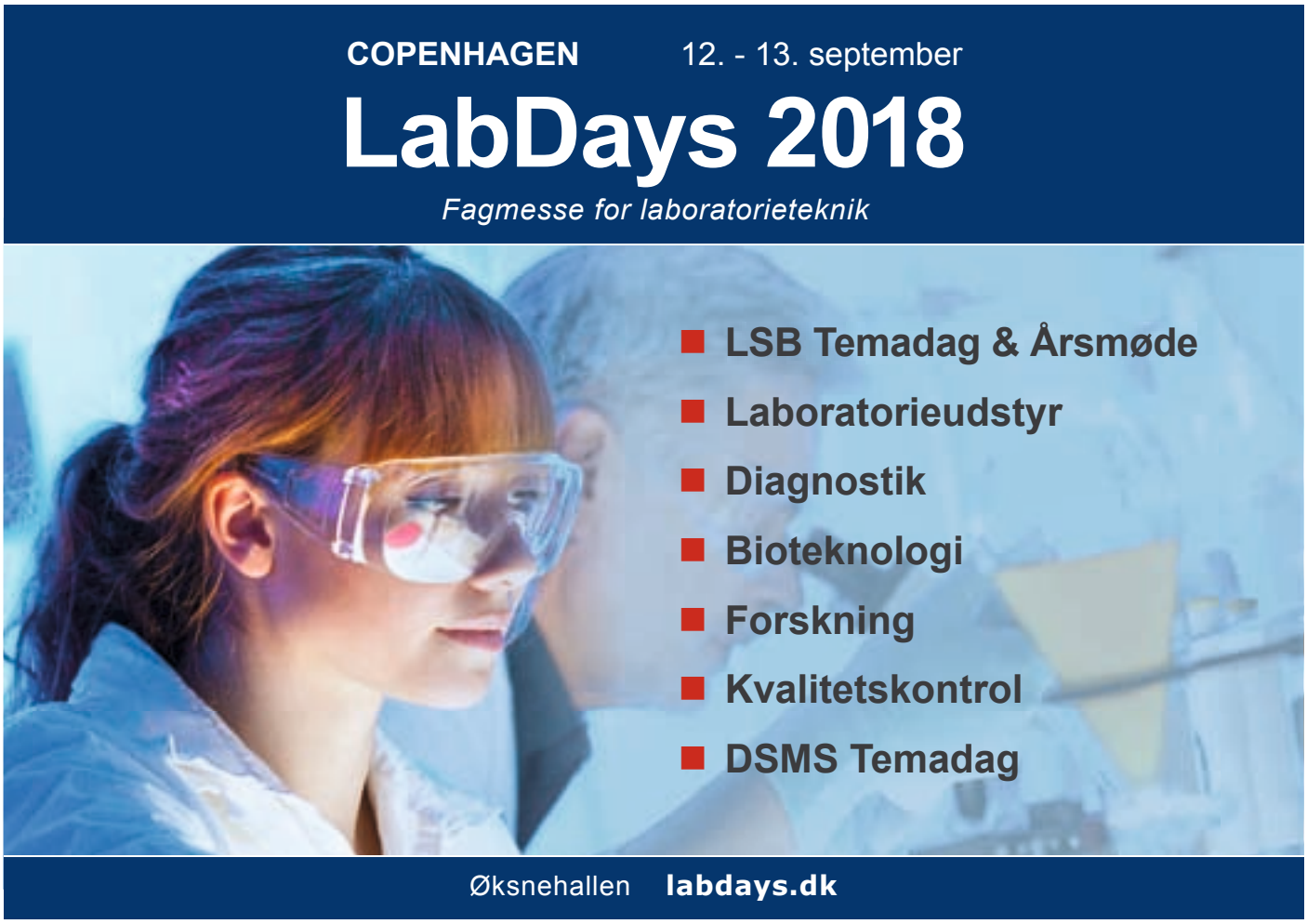
Derudover er der planer om at gentage museforsøgene ved forskellige doser. De viste resultater er for en enkelt dosis og for at finde den optimale dosis og dermed bedre påvise en forskel fra MTX, kræver det behandlinger ved forskellige doser. Endeligt planlægger vi også rotteforsøg for at sammenligne stoffernes egenskaber i forskellige dyremodeller.

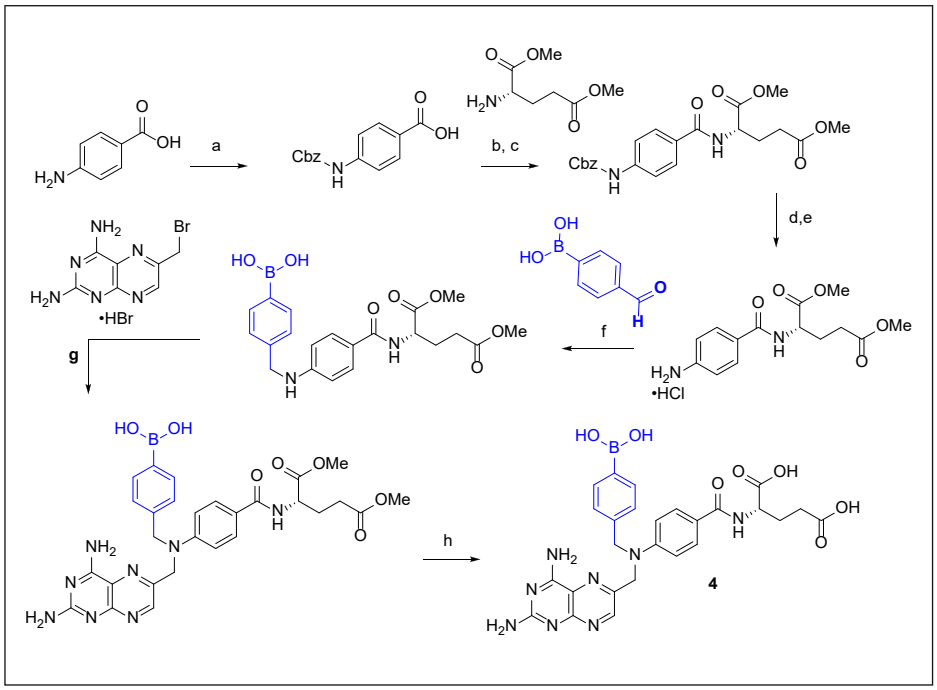
Videre læsning

Peiró Cadahía, J.; Bondebjerg, J.; Hansen, C. A.; Previtali, V.; Hansen, A. E.; Andresen, T. L.; Clausen, M. H. Synthesis and Evaluation of Hydrogen Peroxide Sensitive Prodrugs of Methotrexate and Aminopterin for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 3503–3515.
Andersen N.S.; Peiró Cadahía, J.; Previtali, V.; Bondebjerg, J.; Hansen, C.A.; Hansen, A.E.; Andresen, T.L.; Clausen, M.H. Methotrexate Prodrugs Sensitive to Reactive Oxygen Species for the Improved Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *in press*.

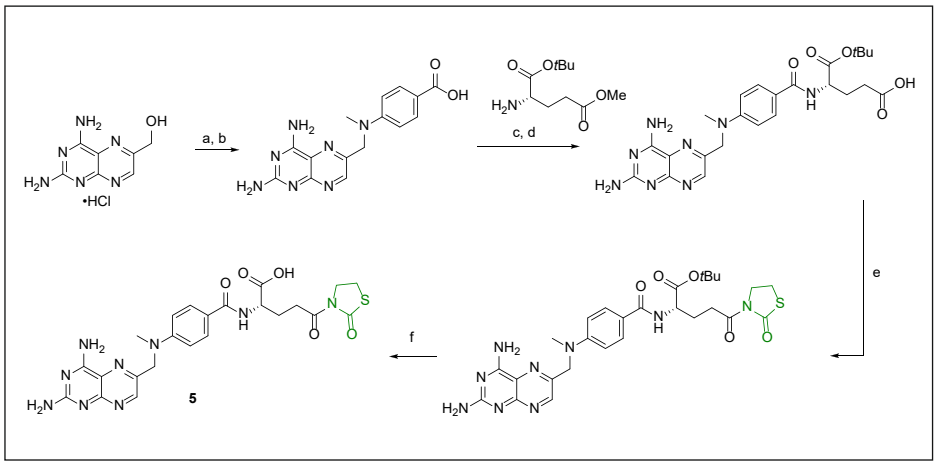
E-mail:
Mads H. Clausen: mhc@kemi.dtu.dk

Kilder
1. Smolen, J.S.; Aletaha, D.; McInnes, I.B. Rheumatoid Arthritis. Lancet 2016, 388, 2023-2038.



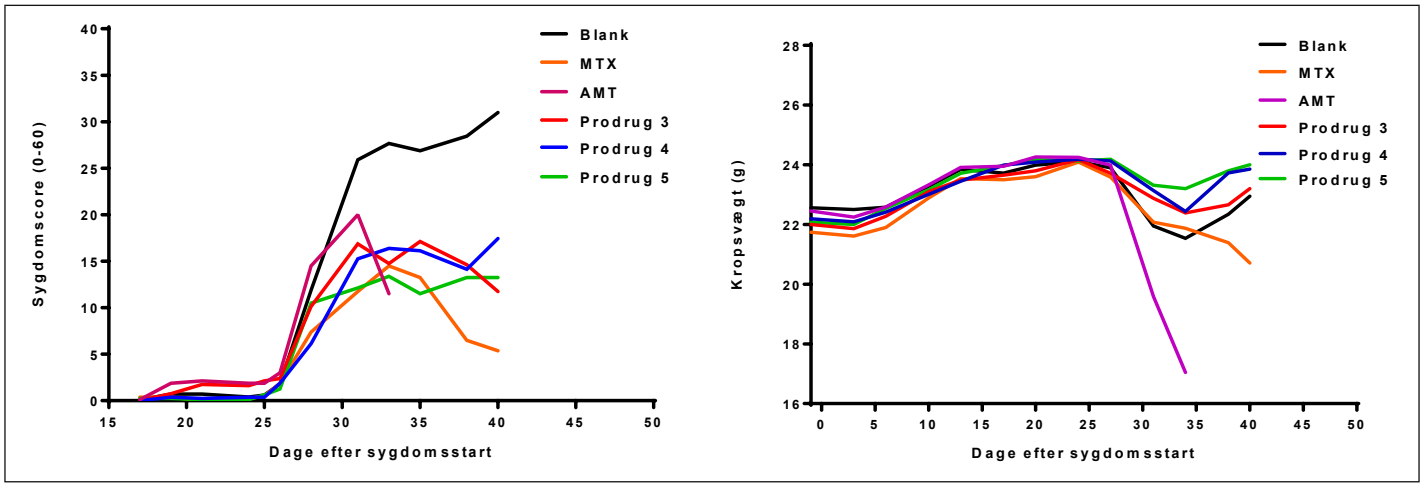


Skema 2. Syntese af AMT prodrug **4**[a]
[a] Reagenser og betingelser: (a) CbzCl, $NaHCO_3$, H_2O/dioxane, 2 t (89%). (b) $SOCl_2$, DMF, CH_2Cl_2, reflux, 24 t. (c) Et_3N, CH_2Cl_2, 2 t (>95%). (d) H_2, Pd/C, MeOH, 12 t. (e) HCl i Et_2O (>95%). (f) $NaBH_4$, MeOH, 24 t (67%). (g) DMA, 55°C, 3 dage (43%). (h) NaOH, H_2O, 5 min. (40%).



Skema 3. Syntese af thiazolidinon-baseret prodrug **5**[a]
[a] Reagenser og betingelser: (a) NaOH/H_2O, 80°C, 5 min. (b) PPh_3Br_2, DMA, 20 t, derefter 4-(methylamino)benzoesyre, DIPEA, 72 t (90%). (c) PyBOP, Et_3N, DMF, 16 t. (d) $Ba(OH)_2$, H_2O/EtOH, 16 t (79%). (e) thiazolidin-2-on, DCC, DMAP, DMF, 16 t (65%). (f) HCO_2H, 20 t (74%).

2. McInnes, I.B.; Schett, G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. N. Engl. J. Med. 2011, 365, 2205-2219.
3. Huennekens, F.M. The Methotrexate Story: A Paradigm for Development of Cancer Chemotherapeutic Agents. Adv. Enzyme Regul. 1994, 34, 397-419.
4. Bannwarth, B.; Péhourcq, F.; Schaeverbeke, T.; Dehais, J. Clinical Pharmacokinetics of Low-Dose Pulse Methotrexate in Rheumatoid Arthritis. Clin. Pharmacokinet. 1996, 30, 194-210.
5. Weinblatt, M.E. Methotrexate in Rheumatoid Arthritis: A Quarter Century of Development. Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc. 2013, 124, 16-25.
6. Stone, J.R.; Yang, S. Hydrogen Peroxide: A Signaling Messenger. Antioxid. Redox Signal. 2008, 8, 243-270.
7. Wittmann, C.; Chockley, P.; Singh, S.K.; Pase, L.; Lieschke, G.J.; Grabher, C. Hydrogen Peroxide in Inflammation: Messenger, Guide, and Assassin. Adv. Hematol. 2012, 2012, 1-6.
8. Wruck, C.J.; Fragoulis, A.; Gurzynski, A.; Brandenburg, L.-O.; Kan, Y.W.; Chan, K.; Hassenpflug, J.; Freitag-Wolf, S.; Varoga, D.; Lippross, S.; et al. Role of Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis: Insights from the Nrf2-Knockout Mice. Ann. Rheum. Dis. 2011, 70, 844-850.
9. Gustowski, M.; Kowalczyk, S. No Title. Acta Biochem. Pol. 2013, 1-16.
10. Rautio, J.; Kumpulainen, H.; Heimbach, T.; Oliyai, R.; Oh, D.; Järvinen, T.; Savolainen, J. Prodrugs: Design and Clinical Applications. Nat. Rev. Drug Discov. 2008, 7, 255-270.
11. Kuang, Y.; Balakrishnan, K.; Gandhi, V.; Peng, X. Hydrogen Peroxide Inducible DNA Cross-Linking Agents Targeted. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 19278-19281.
12. Perez, C.; Monserrat, J.-P.; Chen, Y.; Cohen, S.M. Exploring Hydrogen Peroxide Responsive Thiazolidinone-Based Prodrugs.



Figur 6. Data fra dyreforsøg med mus. Behandlingen af mus i grupper af otte blev startet på dag 27 efter sygdomsstart. Behandling med AMT blev stoppet tidligt på grund af for højt tab af kropsvægt. **Venstre**: Gennemsnitlig sygdomsscore baseret på hævelse af fodled på en skala fra 0-60. **Højre**: Gennemsnitlig kropsvægt af mus i de seks grupper.