

**P36**

# **Aminometylenobisfosfoniany – nowe kierunki badań w leczeniu osteoporozy**

III Środkowo Europejski Kongres Osteoporozy i Osteoartrozy  
oraz XV Zjazd Polskiego Towarzystwa Osteoartrologii i Polskiej  
Fundacji Osteoporozy, Kraków 24-26.09.2009

## **Streszczenia:**

Ortopedia Traumatologia Rehabilitacja 2009, vol 11 (Suppl. 2),  
s:152-153.

**P36**

## **AMINOMETYLENOBISFOSFONIANY – NOWE KIERUNKI BADAŃ W LECZENIU OSTEOPOROZY**

**Dąbrowska E., Kafarski P.**

Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika  
Wrocławska  
Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław

**Słowa kluczowe:** osteoporoza, aminometylenobisfosfoniany

**Wstęp.** Bisfosfoniany stanowią ważną klasę związków chemicznych, które znalazły zastosowanie w leczeniu chorób związanych z upośledzeniem metabolizmu wapnia takich jak choroba Pageta, osteoporoza, szpiczak, osteoliza połączona z hiperkalcemią złośliwą, przerzuty nowotworów do kości, pierwotna nadczynność przytarczyc ponieważ wykazują duże powinowactwo do wapnia i dlatego odkładają się w kościach. Już ponad 25 lat minęło odkąd bisfosfoniany zostały użyte po raz pierwszy w leczeniu choroby Pageta. Od tego czasu stanowią najważniejszą grupę leków antyresorpcyjnych. Ulegają adsorpcji na kryształach hydroksyapatytu, co jest powodem ich długiego

okresu półtrwania w kościach. Nie opisano jednak w związku z tym żadnego długotrwałego, niepożądanego efektu. Działanie bisfosfonianów polega na inhibicji syntetazy pirofosforany farnezyłu. Na powierzchniach resorpcyjnych bisfosfoniany hamują czynność osteoklastów. Mimo iż dokładny molekularny mechanizm działania bisfosfonianów nie został w pełni poznany, sadzi się, że bisfosfoniany mogą bezpośrednio oddziaływać na dojrzałe osteoklasty hamując ich aktywność resorpcyjną na skutek zaburzeń w ich ultrastrukturze. Bisfosfoniany, oddziałując bezpośrednio na osteoklasty lub też pośrednio przez hamowanie osteoklastogenezy, nie tylko hamują resorpcję tkanki kostnej, lecz także działając na osteoblasty mogą pobudzać kościotworzenie przyspieszając apoptozę osteoklastów. Bisfosfoniny hamują proliferację i zmniejszają procent obumierania komórek makrofagowych w testach *in vitro*. Pokazano, że efekt działania aminometylenobisfosfonianów na komórki makrofagowe polega na indukcji apoptozy.

**Cel pracy.** Kwasy bisfosfonowe podzielono na dwie duże klasy – hydroksyaminobisfosfoniany i aminometylenobisfosfoniany. *N*-podstawione kwasy bisfosfonowe wykazują silne właściwości antypasożytnicze, a także posiadają wysoką aktywność herbicydową. Znany i szeroko stosowany jest lek antyosteoporotyczny najnowszej generacji należący do aminoetylenobisfosfonianów, - cykloheptyloaminobisfosfonian, skomercjalizowany jako inkadronian. Celem pracy jest synteza nowych *N*-modyfikowanych pochodnych kwasu aminometylenobisfosfonowego o ukierunkowanych właściwościach fizykochemicznych i aktywności biologicznej, analogów inkadronianu jako potencjalnych leków przeciw osteoporozie, a także badania nad aktywnością cytotoksyczną bisfosfonianów osteogennych wobec linii mysich komórek makrofagopodobnych (J774E). Mysia linia makrofagopodobna J774 używana do testu jest szeroko stosowana linią do zinterpretowania aktywności bisfosfonianów.

**Materiał.** Struktura przestrzenna łańcucha bocznego  $R_2$  wyznacza komórkowy wpływ bisfosfonianów, i ich względną skuteczność jako inhibitorów resorpcji kości. Działanie bisfosfonianów zależy między innymi od rodzaju rodników przy węglu kwasu bisfosfonowego, długości łańcuchów alifatycznych oraz podstawników w łańcuchach bocznych. Każdy bisfosfonian posiada swój własny profil aktywności, zdefiniowany przez

indywidualne właściwości łańcucha bocznego. Reakcja syntezy aminometylenobisfosfonianów polega na trzy-składnikowej reakcji kondensacji pomiędzy aminą I- lub II-rzędową, ortomrówczanem trietylowym i fosforynem dietylowym. Reakcja nie wymaga użycia silnie toksycznych reagentów. Surowe estry aminometylenobisfosfonianów poddaje się hydrolizie kwasem solnym otrzymując odpowiednie kwasy aminometylenobisfosfonowe. Badania skryningowe aktywności bisfosfonianów wykonano przy użyciu testu MTT, mierzącego zahamowanie proliferacji komórek docelowych w 72-godzinnej hodowli *in vitro*. W badaniach zastosowano mysia makrofagopodobną linię komórkową (J774E). Jako kontrolę zastosowano inkadronian w takich samych stężeniach jak badane związki. Wyniki doświadczeń w postaci ID50 (dawka powodująca zahamowanie proliferacji 50% populacji komórek nowotworowych) oraz procentu zahamowania proliferacji wyznaczono dla każdego związku. Wartości IC50 wyznaczono na podstawie trzech niezależnych eksperymentów.

**Wnioski.** Zsyntetyzowaliśmy ponad sto aminometylenobisfosfonianów o zróżnicowanej strukturze i zbadaliśmy ich aktywność antyproliferacyjną na mysich makrofagach (linia J774). W teście MTT wybrano związki o najwyższej aktywności. Aktywność wielu jest wyższa niż inkadronianu stosowanego jako związek referencyjny. Wiele aminometylenobisfosfonianów wykazywało aktywność zbliżoną do inkadronianu a, niektóre nie wykazywały aktywności niezbędnej do określenia wartości ID50 w zastosowanych stężeniach. Obecnie trwają badania wybranych bisfosfonianów na proces kościotworzenia u owiec.

**P36**

**AMINOMETHYLENEBISPHOSPHONATES – A NEW DIRECTION OF STUDIES ON TREATMENT OF OSTEOPOROSIS**

**Dąbrowska E., Kafarski P.**

Department of Bioorganic Chemistry, Faculty of Chemistry,  
Wrocław University of Technology  
Wybrzeże Wyspińskiego 27, 50-370 Wrocław

**Key words:** osteoporosis, aminomethylenebisphosphonates

**Introduction:** Bisphosphonates are an important class of drug molecules, used to treat osteoporosis, Paget's disease, and hypercalcemia due to malignancy because they are powerful inhibitors of bone resorption. More than 25 years have passed since bisphosphonates were first used to treat Paget's disease. During this time, bisphosphonates have become the most important class of antiresorptive drugs, not only for the treatment of Paget's disease, but also for other diseases that involve excessive osteoclast-mediated bone resorption, such as tumor-induced osteolysis and hypercalcemia and osteoporosis. They act by inhibiting the enzyme farnesyl diphosphate synthase. Despite this, the molecular mode of their action is still not clear. There is substantial evidence that BPs can have a direct effect on osteoclasts by mechanisms that may lead to osteoclast cell death by apoptosis. BPs can also inhibit proliferation and cause cell death in macrophages *in vitro*. There is shown that the toxic effect of BPs on macrophages is also due to the induction of apoptotic, rather than necrotic, cell death.

**Aim.** A subclass of bisphosphonates, derivatives of aminomethylenebisphosphonic acid, has been also described to exhibit promising antiparasitic and herbicidal activities. It is worth to note that a representative of the latest generation of antiosteoporotic drugs – cycloheptylaminoethylenebisphosphonate, discovered in the early 90-ies and commercialized as incadronate, also belongs to such modified aminomethylenebisphosphonic acids. The aim of our studies is synthesis the aminomethylenebisphosphonic acids, analogs of incadronate, as potential antiosteoporosis drugs. The aim of this studies is the preselection *in vitro* of BPs in the model cell line to choose potent compounds. The mouse macrophage-like cell line J774 used in this study is a convenient model to identify the activity of BPs.

**Material and methods.** Although the structure of the R2 side chain is the major determinant of antiresorptive potency, both phosphonate groups are also required for the drugs to be active. The simplest procedure for preparation of aminomethylenebisphosphonates relays on three-component reaction between primary or secondary amine, triethyl orthoformate and diethyl phosphite, followed by acid

hydrolysis. The *in vitro* cytotoxic effect of all agents was examined after 72-hours of exposure of the cultured cells to varying concentrations of the tested compounds, using the MTT assay. The *in vitro* results were presented in terms of inhibitory concentration 50% (IC<sub>50</sub>) values. The IC<sub>50</sub> is the concentration of tested agent, which inhibits the proliferation of 50% of the cancer cell population. Average IC<sub>50</sub> values for each preparation were calculated using data from three independent experiments.

**Conclusions.** We synthesized above hundred aminomethylenebisphosphonates with structural variety and tested their antiproliferative activity on the mouse macrophages cell line J774. We choose the most potent compounds selected in this examination. Its activity is higher than that of referential compound incadronate. Some compounds have the best profile of activity (inhibition of proliferation observed in dose-dependent manner). There are also many compounds with similar activity to that of incadronian. Now we are testing the most active compounds *in vivo*.