

UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM



AUTOREFERAT

Anna Maria Waszkielewicz

Wydział Farmaceutyczny
Katedra Chemii Organicznej
Zakład Chemii Bioorganicznej

Kraków 2017

Spis treści

1. Dane osobowe	4
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe.....	4
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	4
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311).....	5
a) Tytuł osiągnięcia naukowego:.....	5
b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:	5
5. Ogólna charakterystyka dorobku naukowego	7
6. Wprowadzenie	11
6.1. Wybrane metody badań bezpieczeństwa związków wykazujących aktywność na ośrodkowy układ nerwowy	17
7. Założenia i cel pracy.....	19
8. Prezentacja osiągnięć stanowiących podstawę habilitacji (wynikających z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311)).....	28
8.1. Wyniki badań i dyskusja	30
8.2. Podsumowanie osiągnięć stanowiących podstawę habilitacji.....	70
9. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze	75
9.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora	75
9.2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora.....	77
9.3. Plany naukowe w najbliższej perspektywie	83
10. Bibliografia.....	85

1. Dane osobowe

Imiona: Anna Maria
Nazwisko: Waszkielewicz

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

2008 Doktor nauk farmaceutycznych, specjalność: chemia leków
rozprawa doktorska pt.: „**Synteza i właściwości przeciwdrgawkowe w grupie niektórych pochodnych aminoalkanoli**”
promotor: dr hab. Henryk Marona
Katedra Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych
Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
w Krakowie

2003 Magister farmacji
studia magisterskie 1998-2003 - Wydział Farmaceutyczny CMUJ w Krakowie
praca magisterska pt. „**Modyfikacje chemiczne kwasu γ -hydroksymasłowego i ich znaczenie w farmacji**”
promotor: prof. dr hab. Jacek Bojarski
Katedra Chemii Organicznej, Wydział Farmaceutyczny CMUJ w Krakowie

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2014-obecnie adiunkt, Zakład Chemii Bioorganicznej, Katedra Chemii Organicznej, UJ CM

2010-2014 koordynator merytoryczny i wykonawca badań w projekcie „**Opracowanie innowacyjnej grupy związków o aktywności stabilizującej potencjał błony komórkowej**” POIG o budżecie 5 mln PLN, POIG 01.01.02-12-012/09,
Zakład Chemii Bioorganicznej, Katedra Chemii Organicznej, Wydział Farmaceutyczny UJ CM w Krakowie

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

Aroksyalkilo- oraz [2-(aroksy)etoksy]etylo pochodne chiralnych i achiralnych aminoalkanoli oraz piperazyny o potencjalnej aktywności ośrodkowej

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

- H1. Waszkielewicz A.M.*, Gunia A., Słoczyńska K., Marona H., 2011, Evaluation of Anticonvulsants for Possible use in Neuropathic Pain. *Curr. Med. Chem.* 18, 4344-4358. IF₂₀₁₁: 4,859, MNiSW: 40 *autor korespondujący**
- H2. Waszkielewicz A.M.*, Gunia A., Szkaradek N., Słoczyńska K., Krupińska S., Marona H., 2013, Ion channels as drug targets in central nervous system disorders, *Curr. Med. Chem.* 20(10), 1241-1285. IF₂₀₁₃: 3,715, MNiSW: 40 *autor korespondujący**
- H3. Waszkielewicz AM.*, Cegła M., Żesławska E., Nitek W., Słoczyńska K., Marona H., 2015, N-[(2,6-Dimethylphenoxy)alkyl]aminoalkanols - their physicochemical and anticonvulsant properties. *Bioorg. Med. Chem.* 23(15), 4197-4217. IF₂₀₁₅: 2,923, MNiSW: 30 *autor korespondujący**
- H4. Waszkielewicz A.M., Gunia A., Marona H., 2014, New derivatives of N-[(phenoxy)ethoxy]alkylaminoalkanols and their use for preparation of drugs. PCT/PL2014/050047, WO2015020545, *Europa* (Europejski Urząd Patentowy) Jagiellonian University in Krakow**
- H5. Waszkielewicz A.M.*, Gunia-Krzyżak A., Powroźnik B., Słoczyńska K., Pękała E., Walczak M., Bednarski M., Żesławska E., Nitek W., Marona H., 2016, Design, physico-chemical properties and biological evaluation of some new N-[(phenoxy)alkyl]- and N-{2-[2-**

(phenoxy)ethoxy]ethyl}aminoalkanols as anticonvulsant agents. *Bioorg. Med. Chem.* 24(8), 1793-1810. **IF₂₀₁₅: 2,923**, MNiSW: 25 ***autor korespondujący**

- H6.** Rapacz A., **Waszkielewicz A.M.***, Pańczyk K., Pytka K., Koczurkiewicz P., Piska K., Pękala E., Budziszewska B., Starek-Świechowicz B., Marona H., **2017, Design, synthesis and anticonvulsant-analgesic activity of new N-[(phenoxy)alkyl]- and N-[(phenoxy)ethoxyethyl]aminoalkanols.** *Med. Chem. Commun. in press*, DOI: 10.1039/c6md00537c. **IF₂₀₁₅: 2,319**, MNiSW: 25, ***autor korespondujący**
- H7.** **Waszkielewicz A.M.***, Słoczyńska K., Pękala E., Żmudzki P., Siwek A., Gryboś A., Marona H., **2016, Design, synthesis, and anticonvulsant activity of some derivatives of xanthone with aminoalkanol moieties.** *Chem. Biol. Drug Des.* 1-14. DOI:10.1111/cbdd.12842. **IF₂₀₁₅: 2,802**, MNiSW: 25, ***autor korespondujący**
- H8.** **Waszkielewicz A.M.***, Kubacka M., Pańczyk K., Mogilski S., Siwek A., Głuch-Lutwin M., Gryboś A., Filipek B., **2016, Synthesis and activity of newly designed aroxyalkyl or aroxyethoxyethyl derivatives of piperazine on the cardiovascular and the central nervous systems.** *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26, 5315-5321. **IF₂₀₁₅: 2,486**, MNiSW: 25, ***autor korespondujący**

5. Ogólna charakterystyka dorobku naukowego

W 1998 r. podjęłam studia na Wydziale Farmaceutycznym Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie na kierunku farmacja (specjalność farmacja apteczna). Tytuł zawodowy magistra farmacji uzyskałam w 2003 r. w oparciu o obronę pracy magisterskiej pt. **„Modyfikacje chemiczne kwasu γ -hydroksymasłowego i ich znaczenie w farmacji”** wykonanej pod kierunkiem Pana prof. dra hab. Jacka Bojarskiego w Katedrze Chemii Organicznej UJCM. Wyniki tej pracy zostały opublikowane w postaci publikacji przeglądowej w impaktowanym czasopiśmie (1), a sama praca zajęła pierwsze miejsce w wydziałowym konkursie prac magisterskich.

W 2003 r. zostałam przyjęta na studia doktoranckie na tym samym Wydziale, w Zakładzie Technologii Chemicznej Środków Leczniczych przy Katedrze Chemii Farmaceutycznej CMUJ, gdzie pod kierunkiem Pana **dra hab. Henryka Marony** realizowałam zadania badawcze. Skupiały się one na syntezie oraz badaniach fizykochemicznych nowych związków o różnokierunkowym profilu aktywności, w szczególności w obrębie ośrodkowego układu nerwowego (aktywność przeciwdrgawkowa i/lub przeciwbólowa w bólu neurogennym) a także w obrębie układu krążenia. Badania farmakologiczne odnoszące się do aktywności przeciwdrgawkowej były realizowane w ramach współpracy z amerykańskim Narodowym Instytutem Zdrowia (**NIH, National Institutes of Health**) w programie poszukiwania nowych leków przeciwpadaczkowych *Antiepileptic Drug Development Program*. Koordynatorem tej współpracy ze strony Wydziału Farmaceutycznego jest Pani prof. Katarzyna Kieć-Kononowicz, a ze strony NIH koordynatorem był Pan prof. James Stables. Rozpoczęłam również prace w zakresie badania bezpieczeństwa wybranych związków (badania mutagenności z zastosowaniem zmodyfikowanych genetycznie szczepów morskich bakterii *Vibrio harveyi* otrzymanych dzięki uprzejmości Pana prof. dra hab. Grzegorza Węgrzyna z Uniwersytetu Gdańskiego). W trakcie studiów doktoranckich w 2006 r. uzyskałam stypendium dla najlepszych doktorantów Uniwersytetu Jagiellońskiego **„Akademicka Innowacyjność dla Małopolski”** finansowane przez Europejski Fundusz Społeczny.

W 2008 r. byłam inicjatorem i wraz z Panem drem hab. Henrykiem Maroną oraz Panią prof. dr hab. Katarzyną Kieć-Kononowicz współautorem zgłoszenia patentowego pt. **„Pochodne fenoksyalkiloaminoalkanoli i ich zastosowania”**, złożonego do Urzędu

Patentowego Rzeczypospolitej Polskiej, obejmującego wyniki badań aktywności przeciwdrgawkowej w grupie pochodnych chiralnych lub achiralnych aminoalkanoli oraz aminokwasów. Pragnę zaznaczyć, że znacząca liczba aktywnych substancji w tym zgłoszeniu była uzyskana i przebadana w ramach mojej pracy doktorskiej. Stąd tematyka badawcza w zakresie poszukiwania nowych związków w grupie chiralnych lub achiralnych pochodnych aminoalkanoli stanowiła podstawę dalszych prac badawczych skupionych głównie w obrębie poszukiwania nowych związków działających przeciwdrgawkowo i przeciwbólowo w bólu neurogennym.

W roku **2008** uchwałą Rady Wydziału Farmaceutycznego UJ CM uzyskałam stopień doktora nauk farmaceutycznych (chemia leków) w oparciu o rozprawę doktorską pt. **„Synteza i właściwości przeciwdrgawkowe w grupie niektórych pochodnych aminoalkanoli”**. Mój dorobek naukowy obejmował 5 publikacji oryginalnych, 1 przeglądową i 1 zgłoszenie patentowe.

W latach **2008-2010** podjęłam pracę zawodową w firmie biotechnologicznej Selvita Sp. z o.o. w Krakowie, na stanowisku specjalista ds. projektów badawczych w dziale R&D. Moja praca wiązała się m.in. z komercjalizacją projektów rozwoju leków z polskich jednostek badawczych oraz kontynuacją badań dla tych projektów. Do tego celu uczestniczyłam w licznych szkoleniach np. z zakresu prowadzenia projektów dotyczących poszukiwania leków dla schorzeń w ośrodkowym układzie nerwowym (Londyn), dotyczących ochrony patentowej (Urząd Patentowy RP), czy zarządzania projektami (Berlin). Jednocześnie, za zgodą Pana dra hab. Henryka Marony kontynuowałam prace badawcze, a także byłam głównym inicjatorem i współautorem projektu badawczego zgłoszonego do Ministerstwa Rozwoju Regionalnego pt. **„Opracowanie innowacyjnej grupy związków o aktywności stabilizującej potencjał błony komórkowej”** POIG 01.01.02-12-012/09. Projekt ten opiewał na sumę 5.005.406 PLN i był realizowany w latach **2010-2014** w nowopowstałym Zakładzie Chemii Bioorganicznej przy Katedrze Chemii Organicznej UJCM pod kierownictwem Pana prof. dra hab. Henryka Marony. W ramach tego projektu realizowałam prace badawcze związane z projektowaniem i syntezą nowych pochodnych głównie w grupie chiralnych lub achiralnych aminoalkanoli oraz piperazyny, a także w zakresie syntezy i badań fizykochemicznych, w tym polimorfizmu kilku najbardziej aktywnych przeciwdrgawkowo związków. Należy nadmienić, że w ramach realizowanego projektu należało m.in. zsyntezować 2 związki najkorzystniejsze przeciwdrgawkowo w formie soli w ilości 250-300 g, które obok szerokiego panelu badań farmakologicznych w tym farmakokinetycznych były przedmiotem opracowania formulacji (kapsułki

z peletkami, minitabletki). Na czas realizacji projektu zostałam zatrudniona na stanowisku koordynatora merytorycznego, co wiązało się nie tylko z zadaniami badawczymi, ale także z takimi obowiązkami jak współpraca z innymi jednostkami naukowymi realizującymi projekt, prace administracyjne (np. zakupy aparatury czy odczynników w ramach przetargów oraz sprawozdania do Ministerstwa oraz Narodowego Centrum Badań i Rozwoju NCBiR), przygotowanie zgłoszeń patentowych czy też rozliczenie projektu. Pozyskane finansowanie pozwoliło też na wyposażenie laboratorium chemicznego, jak również biotechnologicznego w tutejszym Zakładzie, a także na znaczne rozszerzenie badań i ochronę patentową uzyskanych wyników (**2 zgłoszenia krajowe i 10 zgłoszeń zagranicznych**).

Od chwili ukończenia projektu (styczeń **2014 r.**) jestem zatrudniona na etacie **adiunkta** w Zakładzie Chemii Bioorganicznej przy Katedrze Chemii Organicznej UJ CM. Na skutek szeroko zakrojonych badań w zakresie poszukiwania mechanizmów aktywności związków najsilniej działających serotoninergicznie, moje zainteresowania badawcze uległy rozszerzeniu na inne aktywności w obrębie ośrodkowego układu nerwowego (np. przeciwdepresyjna, przeciwłękowa).

W trakcie realizacji wspomnianego projektu i obecnie uczestniczę w wypełnianiu **zadań dydaktycznych** Zakładu na tutejszym Wydziale. Prowadzę zajęcia zarówno dla studentów studiów magisterskich, jak i doktoranckich. Zajęcia prowadzone przeze mnie obejmują kierunki: Kosmetologia (przedmioty „**Chemia surowców kosmetycznych**”, „**Badania i rozwój innowacyjnych kosmetyków**”), Analityka Medyczna (przedmiot „**Chemia organiczna**”) oraz Farmacja (Przedmiot fakultatywny „**Wybrane zagadnienia z kosmetologii oraz chemii kosmetycznej**”). Tematyka prowadzonych przeze mnie zajęć obejmuje chemię związków organicznych i surowców kosmetycznych, innowacyjne rozwiązania w zakresie badań nad nowymi substancjami kosmetycznymi oraz zagadnienia związane z ochroną patentową i pozyskiwanie funduszy na prace badawcze (dla studentów studiów doktoranckich w ramach przedmiotu „**Metody aktywizacji studentów - metodyka pozyskiwania środków na badania naukowe**”). W trakcie realizacji projektu byłam i obecnie także jestem opiekunem prac magisterskich realizowanych na tutejszym Wydziale, a także opiekunem kół naukowych w Zakładzie Chemii Bioorganicznej UJ CM.

Dwukrotnie uzyskałam nagrodę Dziekana Wydziału Farmaceutycznego UJ CM za osiągnięcia naukowe. Jestem także laureatką II edycji konkursu dla kobiet nauki „Innowacja jest kobietą” Fundacji Kobiet Nauki, a także zdobyłam złoty medal na targach wynalazków INPEX w Pitsburgu w Stanach Zjednoczonych oraz srebrny medal na międzynarodowych targach wynalazków w Norymberdze (Ideen-Erfindungen-Neuheiten).

Mój aktualny całościowy dorobek naukowy obejmuje współautorstwo **48 publikacji** o łącznym współczynniku **Impact Factor 92,983 i 1029 pkt MNISW**, w tym dla **41 publikacji oryginalnych** IF=79,005 i 884 pkt MNiSW (w tym 6 prac w czasopismach krajowych nieposiadających Impact Factor) i dla **7 publikacji przeglądowych** IF=13,978 i 145 pkt MNiSW (w tym 2 prace w czasopismach krajowych nieposiadających Impact Factor).

Do tego należy wymienić współautorstwo w **44 komunikatach zjazdowych** obejmujące naukowe konferencje krajowe i międzynarodowe (w tym **4 wystąpienia ustne**) oraz **7 prezentacji wynalazku** na międzynarodowych targach firm farmaceutycznych (Madryt, Barcelona, Boston, Turyn, Norymberga, Chicago, Pittsburg). Należę do **zespołów redakcyjnych 2 czasopism** o tematyce chemii organicznej o zasięgu międzynarodowym: Jacobs Journal of Organic Chemistry oraz Organic Chemistry – Current Research.

Aktualnie realizuję **3 projekty badawcze** finansowane przez Narodowe Centrum Nauki: jestem **kierownikiem** jednego z tych projektów („**Poszukiwanie związków aktywnych w ośrodkowym układzie nerwowym**”, Narodowe Centrum Nauki, OPUS, UMO-2013/11/B/NZ7/04834). W jednym projekcie PRELUDIUM („**Synteza, ewaluacja aktywności przeciwdrgawkowej oraz analiza wpływu na ludzkie astrocyty w grupie pochodnych piperazyny i/lub aminoalkanoli w kontekście badania mechanizmów działania aktywnych przeciwdrgawkowo związków**” UMO-2015/17/N/NZ7/00966) dla młodych naukowców, jestem jego opiekunem naukowym i w jednym projekcie chemiczno-farmakologicznym SONATA („**Antagoniści receptora alfa1-adrenergicznego oraz 5-HT_{2A} serotoninergicznego o niechinazolinowej budowie i plejotropowych efektach jako nowa perspektywa leczenia nadciśnienia i zespołu metabolicznego**” UMO-2014/15/D/NZ7/01807) – wykonawcą części chemicznej.

6. Wprowadzenie

Schorzenia ośrodkowego układu nerwowego (OUN) są istotnym problemem dla społeczeństwa. Zaburzenia te wpływają nie tylko na odczucia pacjenta i jego zdrowie i jakość życia, czy możliwość realnego funkcjonowania, ale także na jego zachowanie i na jego otoczenie. Stąd schorzenia te determinują trudne położenie całych rodzin nie tylko od strony opieki zdrowotnej, ale także od strony społecznej i niejednokrotnie ekonomicznej, gdy chory wymaga stałej opieki.

Do szczególnie ważnych i trudnych w leczeniu schorzeń należą padaczka, depresja oraz zaburzenia lękowe, a także ból neuropatyczny. Każdą z tych jednostek chorobowych reprezentują złożone zespoły objawów, często manifestujących się różnymi podtypami, i w związku z powyższym z zasady odmiennie leczonych.

Występowanie depresji szacuje się na 20% społeczeństwa (2), bólu neuropatycznego – 6% (3), a padaczki – 1%, z czego 30% drgawek jest uznane za lekooporne (4). Wiadomo także, że schorzenia te mogą współwystępować. Dla przykładu, wśród chorych na padaczkę obserwuje się 2,4 razy większą zapadalność na migrenę niż wśród osób, które na nią nie cierpią. U 20-50% chorych na padaczkę występuje depresja (5-6). Powyższe statystyki nie uwzględniają szczególnej sytuacji pacjentów takich jak kobiety w ciąży czy dzieci, gdzie toksyczność leków, często łączonych (wprost nazywając to łączenie politerapią a często jest to wręcz polipragmazja), porównywana jest do ryzyka związanego z nieleczonymi drgawkami.

Schorzenia ośrodkowego układu nerwowego rzadko można rozpatrywać w kontekście pojedynczego miejsca uszkodzenia, czy pojedynczej etiopatogenezy. Tam, gdzie zależności receptorowe są poznane, jak np. w przypadku zaburzeń lękowych, racjonalnym jest projektowanie ligandów receptorów 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, czy D₂, mając na szczególnym względzie selektywność czy wręcz specyficzność oddziaływania na podtypy receptorów, dla uniknięcia działań niepożądanych płynących z wiązania innych, często podobnych receptorów. Jednocześnie, do mechanizmów działania leków może należeć także interakcja natury chemicznej, a nie receptorowej czy enzymatycznej, jak np. reakcja z adrenochromem (metabolitem tryptofanu) zaobserwowana w przypadku niektórych leków przeciwpsychotycznych (7).

W niektórych schorzeniach OUN, takich jak np. padaczka, prosta zależność zaburzenie-obraz kliniczny nie istnieje – można np. doszukiwać się zaburzenia równowagi pomiędzy neuroprzekaźnikami pobudzającymi i hamującymi, lub też stwierdzić iż ciało obce, np. guz lub blizna uciska na neurony stające się ogniskiem napadu padaczkowego. Niejednokrotnie drgawki mogą być wywołane toksynami, np. alkoholem etylowym czy ołowiem (także pikrotoksyną czy bikukuliną). Istnieją także drgawki psychomotoryczne, a więc wprost związane z trudną sytuacją życiową czy różnymi stanami emocjonalnymi pacjenta, a często ze stresującymi wydarzeniami życia codziennego. Drgawki mogą też być wywołane światłem oraz dźwiękiem, stąd jednorazowy atak drgawek nie stanowi podstawy do zdiagnozowania padaczki.

Powyższa sytuacja ma swoje odwzorowanie w sposobach poszukiwania leków skutecznych w stanach wywoływanych takimi bodźcami. W przypadku leczenia padaczki zdarza się bowiem, iż lek, który wykazuje stosunkowo dużą specyficzność dla pojedynczego receptora czy kanału jonowego (tzw. *clean pharmacophore*), nie jest wystarczająco skuteczny w eliminowaniu drgawek, gdyż rozwijające się ognisko padaczkowe oddziałuje według wielu różnych, często powiązanych ze sobą mechanizmów. Przykładem takiego leku jest lamotrygina, inhibitor kanałów sodowych oraz wapniowych, która stała się substancją wykorzystywaną w badaniach poszukiwania leków do indukowania drgawek opornych na lamotryginę u szczurów, co stanowi model padaczki lekoopornej (*LTG-resistant amygdala kindled rat*) (8).

Należy przy tym zauważyć, że patogeneza napadów padaczkowych jest bardzo złożona i nie do końca wyjaśniona. Utrudnia to racjonalne projektowanie struktur o przewidywanej znaczącej aktywności przeciwdrgawkowej. Jeśli dodać do tego trudność w wyjaśnianiu mechanizmów działania leków przeciwpadaczkowych i ich różnorodność strukturalną, najczęściej projektowanie nowych związków przeciwdrgawkowych oparte jest o modyfikacje strukturalne znanych leków bądź nowych związków o zdefiniowanej aktywności przeciwdrgawkowej.

W związku powyższym, poszukiwanie związków o potencjalnej aktywności przeciwdrgawkowej od wielu lat prowadzone jest poprzez badania przesiewowe (skrining, ang. *screening*) *in vivo*. Metoda ta opiera się o wywołanie u zwierzęcia stanu najbardziej zbliżonego do tego, w jakim znajduje się chory pacjent, i sprawdzeniu skuteczności

podawanego związku w zapobieganiu wystąpienia takiego stanu (drgawki) bądź też eliminacji tego stanu (ból neuropatyczny). Zwalidowana metoda wywołania takiego stanu nazywana jest zwierzęcym modelem i dopiero wyznaczenie ED₅₀ na kilku modelach może sugerować przesłanki, aby prowadzić poszerzone badania farmakologiczne dla danego związku.

Dotychczas wszystkie zarejestrowane leki przeciwdrgawkowe były przebadane w ramach amerykańskiego Programu Rozwoju Leków Przeciwpadaczkowych *Antiepileptic Drug Development Program* (ADD), realizowanego w *National Institutes of Neurological Disorders and Stroke* (NINDS), *National Institutes of Health* (NIH, Rockville, Stany Zjednoczone). Program ten powstał w latach 70-tych i przewidywał skринing dużej liczby związków do celu wyłonienia potencjalnych leków. Pierwszymi lekami w ten sposób badanymi były m.in. karbamazepina oraz kwas walproinowy.

Badania przesiewowe związków opierały się o zastosowanie 3 testów farmakologicznych (9):

- 1) **Test maksymalnego elektrowstrząsu** (ang. *Maximal Electroshock*, **MES**), gdzie u zwierzęcia drgawki wywoływane są prądem elektrycznym – model ten odpowiada napadom drgawek toniczno-klonicznych (typu *grand mal*). W przypadku stwierdzenia aktywności obserwuje się, w jakim czasie od podania związku jest ona największa (**TPE**, *time of peak effect* [h]) i w tym czasie wyznacza się dawkę skuteczną u 50% zwierząt **ED₅₀** (*effective dose*).
- 2) **Test pentetrazolowy** (ang. *Subcutaneous Metrazole*, **ScMet**, **PTZ**), gdzie u zwierzęcia drgawki wywoływane są bodźcem chemicznym poprzez podskórne podanie pentetrazolu) – model ten odpowiada napadom wyłączeń (typu *petit mal*).
- 3) **Badanie neurotoksyczności** (ang. *Rotarod*, **TOX**) weryfikujący działanie ogólnie definiowane jako neurotoksyczne. Test polega na postawieniu zwierzęcia na porowatym pręcie obracającym się z szybkością 6 obrotów/min. Jeżeli zwierzę utrzyma się na nim, uprzednio podany mu związek jest uznany za stosunkowo bezpieczny. W rzeczywistości test ten eliminuje także związki ogólnie toksyczne, zmiotczające mięśnie poprzecznie prążkowane oraz zaburzające motorykę. Jednocześnie należy mieć na uwadze, iż obserwacje zachowania zwierzęcia oraz dawka TD₅₀ odnosząca się do neurotoksyczności determinuje ocenę bezpieczeństwa związku mierzoną jako indeks terapeutyczny (*Protection Index*) $PI = TD_{50}/ED_{50}$, ale nie przewiduje ewentualnych obserwacji w klinice. Nieco bardziej czułą alternatywą dla testu rotarod jest test tzw. kominowy (*chimney test*).

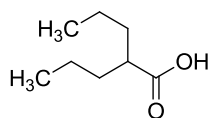
Wraz z wdrożeniem do lecznictwa około 20 leków zaobserwowano, iż ich profile aktywności farmakologicznej pokrywają się, przy czym drgawki lekooporne nadal obejmują 30% leczonej populacji. W związku z powyższym, program zmodyfikowano i na etapie skringingu dołączono test **6 Hz**, odpowiadający drgawkom psychomotorycznym oraz innym, również pochodzenia limbicznego; test ten jest wykonywany z zastosowaniem prądu o natężeniu 22 mA, 32 mA oraz 44 mA (10). Pierwszym lekiem aktywnym w teście 6 Hz i nieaktywnym w MES czy ScMet był lewetiracetam (10-11). Interesującym testem jest także model Fringsa wykorzystujący myszy podatne na drgawki wywoływane dźwiękiem (tzw. myszy Fringsa).

Warto przy tym nadmienić, że leki przeciwpadaczkowe są stosowane w dawkach znacznie przekraczających standardowe dawki leków stosowanych w innych zaburzeniach OUN, stąd typowe dawki w skringingu to u myszy po podaniu dootrzewnowym (*i.p.*) 30, 100 oraz 300 mg/kg masy ciała. Dla porównania, w badaniach aktywności przeciwlękowej stosuje się dawki 1,25-10 mg/kg u myszy, *i.p.* Ze względu na koszty, badania prowadzone są początkowo na myszach, a następnie do badań włączane są szczury. Ta sytuacja niesie za sobą także konieczność syntezy większych ilości związków, gdyż badane substancje są przekazywane do skringingu *in vivo* w ilości po około 0,5 g.

Leki przeciwpadaczkowe stanowią istotną grupę leków stosowanych w leczeniu bólu neuropatycznego (obok leków miejscowo znieczulających oraz trójcyklicznych leków przeciwdepresyjnych) (12). Stąd związki wykazujące istotną aktywność w teście MES są także badane w modelu bólu neurogennego – **teście formalinowym**, (myszy, *i.p.*), składającym się na 2 fazy bólu: fazę ostrą i fazę zapalną.

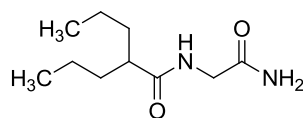
Wśród znanych leków optymalizowanych w kierunku profilu aktywności i bezpieczeństwa znajdują się najstarsze leki przeciwpadaczkowe takie jak karbamazepina czy też kwas walproinowy, których pochodne – odpowiednio octan eslikarbazepiny ((S)-likarbazepiny, eutomerycznego metabolitu okskarbazepiny) (13) oraz walroceamid (wcześniej walpromid, walnoktamid i in.) (14) – znajdują się w fazie badań klinicznych. Warto dodać, że zarówno karbamazepina, jak i kwas walproinowy, były modyfikowane z powodu działań niepożądanych – odpowiednio podwójnego widzenia oraz hepatotoksyczności (15). Układami farmakoforowymi typowymi dla aktywności

przeciwdrgawkowej i nadal modyfikowanymi są np. hydantoina (16), a także pirolidyno-2,5-dion (17).



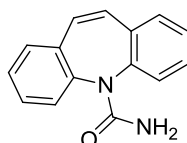
kwas walproinowy

MES ED_{50} =287 mg/kg (myszy, *i.p.*)
PI=1,68



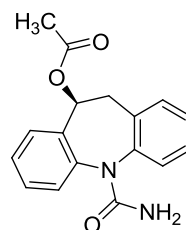
walrocemid

MES ED_{50} =151 mg/kg (myszy, *i.p.*)
PI=2,20



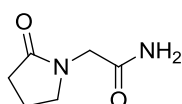
karbamazepina

MES ED_{50} =9,85 mg/kg (myszy, *i.p.*)
PI=4,82

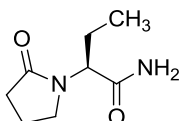


octan eslikarbazepiny

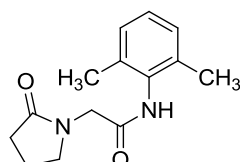
Aktywność przeciwdrgawkowa, zaobserwowana dla leku o innym wskazaniu niż padaczka, także może prowadzić do zarejestrowania takiego zastosowania. Wśród takich leków, do celu uzyskania działania specyficznego, ich układy farmakoforowe także są modyfikowane, co podnosi szanse na znalezienie związku o zupełnie nowym profilu działania. Jako przykład można wymienić w grupie leków nootropowych – piracetam aktywny w drgawkach mioklonicznych (18) czy nefiracetam także aktywny w teście MES (19), oraz jego pochodną – lek przeciwpadaczkowy – leweteracetam czy też spośród leków krążeniowych – propranolol (20), a także spośród pochodnych hormonów – neurosteroid i metabolit progesteronu allopregnanolon (21). Jego 3 β -metylowa pochodna – ganaxolon (22) – znajduje się obecnie w fazie badań klinicznych w kierunku leczenia drgawek (23).



piracetam



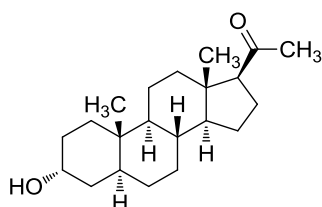
levetiracetam



nefiracetam

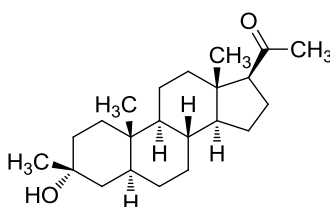
MES ED_{50} > 500 mg/kg (myszy, *i.p.*)
6 Hz ED_{50} = 19,4 mg/kg (myszy, *i.p.*)

MES ED_{50} = 27,2 mg/kg (myszy, *i.p.*)
PI = 9,2



allopregnanolon

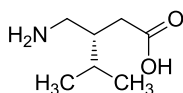
MES ED_{50} > 100 mg/kg (myszy, *i.p.*)
6 Hz ED_{50} = 14,2 mg/kg (myszy, *i.p.*)



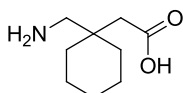
ganaksolon

MES ED_{50} = 29,7 mg/kg (myszy, *i.p.*)
PI = 1,12

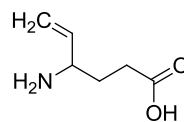
Żadne ugrupowanie nie gwarantuje bezpieczeństwa leku, nie można też zawyrokować, że którykolwiek farmakofor zawsze niesie za sobą konkretne działania niepożądane. Dla przykładu, spośród pochodnych GABA – pregabalina oraz gabapentyna są stosowane w drgawkach (a także w bólu neuropatycznym) i są uważane za skuteczne i stosunkowo bezpieczne, o czym świadczy fakt, iż są stosowane jako leki odniesienia w badaniach klinicznych. Z kolei zastosowanie wigabatryny, innej pochodnej GABA, jest ograniczone z powodu działania niepożądanego takiego jak zawężanie pola widzenia u pacjentów, co stanowi istotny aspekt w oszacowaniu ryzyka leczenia z zastosowaniem tego leku (24). Stąd każdorazowo dla związków wykazujących aktywność przeciwdrgawkową konieczne są dodatkowe badania bezpieczeństwa tych związków.



pregabalina



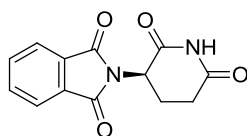
gabapentyna



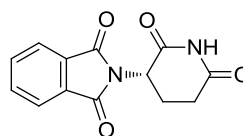
wigabatryna

6.1. Wybrane metody badań bezpieczeństwa związków wykazujących aktywność na ośrodkowy układ nerwowy

Badania bezpieczeństwa związków opracowywanych w kierunku zastosowania w leczeniu obejmują istotną i konieczną część całego procesu prac badawczych i rozwojowych nad nowymi lekami. Wyniki tych badań są wymagane przez instytucje rejestrujące leki takie jak Europejska Agencja ds. Leków EMA (*European Medicines Agency*) czy też Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków FDA (*Food and Drug Administration*). Szczególny przypadek konieczności takich badań występuje dla związków chiralnych. Tragiczne skutki wprowadzenia do leczenia w latach 50-tych ubiegłego stulecia talidomidu (związek racemiczny), sedatywnego i przeciwwymiotnego leku przeznaczonego także dla kobiet ciężarnych, polegające na zniekształceniach kończyn płodu (zjawisko fokomelii) (25) wywołały problem bezpieczeństwa leków i konieczność badań aktywności i bezpieczeństwa wszystkich możliwych stereoizomerów związków projektowanych do zastosowania w leczeniu. Późniejsze badania wykazały, że związkiem sedatywnym (eutomerem) jest izomer *R*, a czynnikiem teratogennym (mutagenem, distomerem) jest izomer *S*.



R-talidomid



S-talidomid

Aktualnie istnieje tendencja do wprowadzania do leczenia enancjomerów w miejsce racematów obecnych na rynku (np. (*S*)-omeprazol, (*S*)-citalopram (26)). W przypadku rejestrowania nowych leków chiralnych nawet w formie racematu, konieczne jest przebadanie każdego ze stereoizomerów pod kątem ich profilu farmakologicznego i bezpieczeństwa stosowania. Jest to także uzasadnione ze względu na np. możliwość zmniejszenia dawki leczniczej, poprawę efektywności, czy też minimalizowania działań toksycznych (w tym hepatotoksyczności, kardiotoxyczności, czy też działań embriopatycznych).

Zagadnienie bezpieczeństwa leków stanowi na tyle istotną część procesu rozwoju leku, że monitorowanie działań niepożądanych obejmuje IV fazę badań klinicznych. Z uwagi na względy humanitarne, a także kosztowność badań na zwierzętach, badania bezpieczeństwa włączane są do prac dotyczących potencjalnych leków już na etapie wstępnych badań farmakologicznych, co może skutkować wykluczeniem badanej substancji z ewentualności poszerzonych badań farmakologicznych. Należy nadmienić, że ocena ewentualnych

właściwości mutagennych czy też genotoksycznych jest jednym z wymogów stawianych przez wyżej wymienione agencje.

Dla oceny mutagenności aktualnie istnieje możliwość stosowania stosunkowo prostych i szybkich alternatywnych testów mikrobiologicznych (*in vitro*) wspomaganych także metodami komputerowymi (*in silico*). Jednym z uznanych referencyjnych i najczęściej stosowanych testów bakteryjnych jest test Ames, którego wyniki są w dużym procencie zgodne dla związków testowanych na zwierzętach. Szczepy wykorzystywane w tym teście to bakterie *Salmonella enterica* serowar *Typhimurium*, wykazujące różnego typu mutacje genów w operonie histydyny, co pozwala na wykrywanie mutagenów działających na drodze różnych rodzajów mutacji. Ponadto, dodanie w procedurze testu enzymów mikrosomalnych i NADPH pozwala na oznaczenie potencjału mutagennego nie tylko substancji, ale także jej metabolitów oksydacyjnych (27).

Obok wielu innych testów, do oceny mutagenności np. mutacji genowych (*Saccharomyces cerevisiae*), aberracji chromosomowych (komórki ssaków *in vitro*), jednym z nich jest test *Vibrio harveyi* wykorzystujący zmodyfikowane genetycznie szczepy morskiej bakterii *Vibrio harveyi*. Test ten został opracowany w Katedrze Biologii Molekularnej na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego przez Pana prof. dra hab. Grzegorza Węgrzyna i był wykorzystywany głównie w badaniach środowiskowych do oceny obecności mutagenów w wodzie morskiej (28-29). Test ten charakteryzuje się czułością porównywalną do testu Ames, a jego zaletą jest niepatogenność bakterii dla organizmu człowieka a także łatwość namnażania bakterii. Testy Ames oraz *Vibrio harveyi* zostały wykorzystane w moich badaniach dotyczących mutagenności wielu związków w tym w pracach **H3** i **H5**.

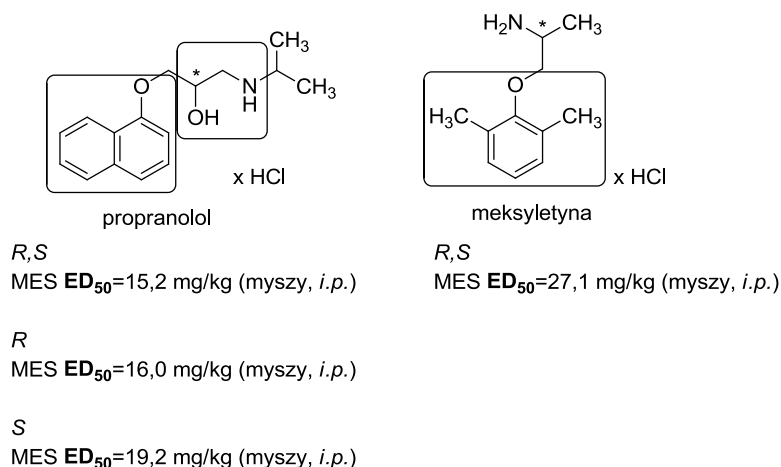
Ponadto w ramach innych badań bezpieczeństwa dokonano oceny cytotoksyczności związków z użyciem:

- a) komórek Hep G2 – badanie to jest stosowane z uwagi na hepatotoksyczność wielu leków, np. kwasu walproinowego (30) czy nawet pregabaliny (31) (**H6**),
- b) linii astrocytów CRL-2534, w związku z połączeniem tych komórek z neuronami i wzajemnym ich wpływem na siebie (32) (**H6**) a także
- c) komórek neuroblastoma SH-SY5Y w związku z wpływem tych związków na przekazywanie bodźców przez neurony (33) (**H6**).

Dla wybranych związków wykonano także badania stabilności metabolicznej z zastosowaniem enzymów mikrosomalnych mysich bądź szczurzych (prace **H5**, **H7**), dające wstępny obraz metabolizmu przed badaniami farmakokinetycznymi na zwierzętach (34).

7. Założenia i cel pracy

Przesłanką do poszukiwania związków o potencjalnej aktywności przeciwdrgawkowej w grupie pochodnych chiralnych lub achiralnych aminoalkanoli, jest stwierdzona aktywność hamująca drgawki u ludzi i zwierząt wśród znanych leków przeciwwarytmicznych takich jak **propranolol** czy **meksyletyna**. Obydwa leki stabilizują potencjał błony komórkowej i są aktywne w teście elektrycznym MES (35-36). Propranolol jest znanym blokerem kanałów β -adrenergicznych, a jednak jego mechanizmem działania przeciwdrgawkowego jest blokowanie kanałów sodowych. Z kolei meksyletyna jest nieselektywnym antagonistą kanałów sodowych (37).



Interesującą różnicą w aktywności ośrodkowej tych dwóch leków jest ich wpływ na próg drgawkowy, czyli pośrednio na podatność pacjenta na wywołanie drgawek. W badaniach na zwierzętach to działanie niepożądane mierzone jest albo jako napięcie elektryczne (ang. *current strength* CS_{50} [mV]) prądu w teście MEST (*maximum electroshock seizure threshold*), albo jako dawka pentetrazolu we wlewie ze stałą szybkością (ang. *timed intravenous infusion of metrazol ivMet*, [mg/kg], [min]) niezbędnego do wywołania drgawek. Meksyletyna obniża próg drgawkowy, powodując paradoksalne zwiększenie podatności na drgawki, z tego względu ten lek nie jest stosowany w padaczce. Z kolei propranolol podnosi próg drgawkowy i jest stosowany w niektórych drgawkach (36). Ta istotna różnica pomiędzy tymi aroksyalkilowymi pochodnymi amin powoduje konieczność badania analogicznych związków w kierunku wpływu na próg drgawkowy (ang. *seizure threshold*).

Na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM od 1996 r. prowadzona jest współpraca z wyżej wymienionym amerykańskim Narodowym Instytutem Zdrowia w ramach Programu Rozwoju Leków Przeciwpadaczkowych ADD. W ramach tego programu nowo zsyntezowane związki są wysyłane do badań skrinigowych *in vivo*. Koordynatorami tej współpracy ze strony UJCM jest Pani prof. dr hab. Katarzyna Kieć-Kononowicz, a ze strony NIH – Shamsi Raeissi, PhD.

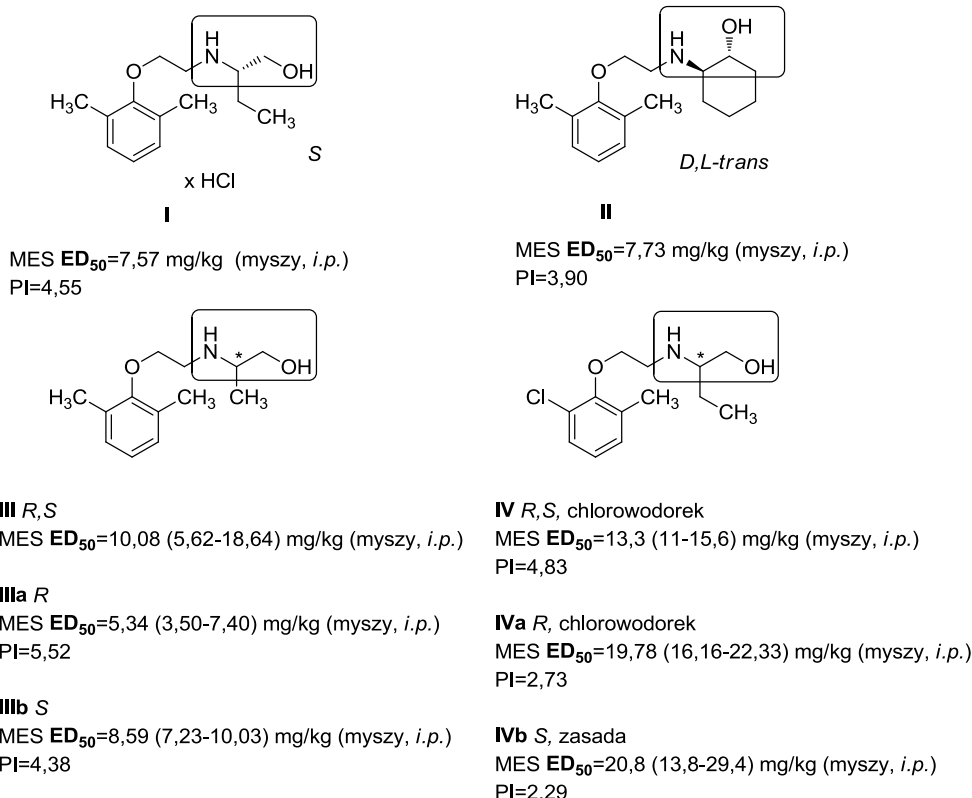
Dotychczas w ramach badań zależności struktura-aktywność przeciwdrgawkowa realizowanych wcześniej jak i w ramach projektów badawczych przez zespół badawczy (w tym z moim udziałem) w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej UJ CM, kierowanym przez Pana prof. dra hab. Henryka Maronę, wyselekcjonowano struktury wiodące spośród kilkuset odpowiednich aminoalkanolowych pochodnych 4-metylofenolu, ksylenolu, (38-40) 4-chloro-3-metylofenolu i 2-chloro-5-metylofenolu (41) oraz 4-chloro-2-metylofenolu (42), a także 2-chloro-6-metylofenolu (43-44).

Wyłonione spośród powyższych, najbardziej aktywne związki – struktury wiodące **I-IV** – to pochodne (2,6-dimetylofenoksy)etylowe **I-III** oraz pochodna (2-chloro-6-metylofenoksy)etylowa **IV**.

Istotnym jest fakt, że homologi trimetylenowe związków odniesienia (**I-IV**) wykazywały niższą aktywność i wyższą neurotoksyczność, z kolei amidowe analogi tych związków także były przedmiotem badań i wśród nich także wykazano aktywność przeciwdrgawkową, choć nieco słabszą (39, 44). Interesującym jest także to, że fragment ugrupowania aminoalkanolu w strukturach większości aktywnych związków stanowi pochodna aminoetanolu (kolaminy), będącego jak się wydaje istotnym fragmentem strukturalnym chiralnego aminoalkanolu. Analiza struktura-aktywność przeciwdrgawkowa wskazuje, że wprowadzenie achiralnego 3-aminopropanolu, 4-aminobutanolu czy 5-aminopentanolu znacznie obniżało aktywność, powodując różnice neurotoksyczności. Z kolei w przypadku analogów amidowych w tym zawierających ugrupowanie aminokwasowe obserwowano w większości znaczny spadek aktywności przeciwdrgawkowej (44-45).

Należy przy tym zwrócić uwagę, iż w przypadku związków chiralnych aktywnych przeciwdrgawkowo, konfiguracja absolutna aminoalkanolu odgrywa często istotną rolę, co potwierdza fakt, że chiralność w układach biologicznych ma duże znaczenie, zwłaszcza w przypadku oddziaływania np. z enzymem czy też receptorami, stanowiącymi również

struktury chiralne. Jednak nie jest jednoznaczne, jaką konfigurację należałoby założyć w przypadku projektowania nowych pochodnych. Można jedynie rozpocząć badania na związkach racemicznych, a w przypadku stwierdzenia aktywności, koniecznym staje się przebadanie obydwu enancjomerów, w tym pod kątem ich bezpieczeństwa, tak jak to zrobiono dla związków odniesienia, w uwzględnieniu form zasad i ich soli.



Pierwszy z nich – związek **I** to chlorowodorek (S)-(+)-2N-[2-(2,6-dimetylofenoksy)etylo]aminobutan-1-olu, który w porównaniu do racematu i enancjomeru *R* odznaczał się najbardziej korzystnymi parametrami farmakologicznymi w testach przeciwdrgawkowych. Związek **I** wykazuje nieistotne statystycznie niekorzystne obniżenie progu drgawkowego mierzone testem wlewu pentetrazolowego *ivMet*. Wstępne badania radioligandów wskazały na wiązanie z kanałami wapniowymi ($K_i=18 \mu\text{M}$) jako jeden z możliwych mechanizmów działania (38). Związek **II**: (D,L)-*trans*-2N-[2-(2,6-dimetylofenoksy)etylo]aminocykloheksan-1-ol wykazuje także aktywność w teście MES i także obniża próg drgawkowy mierzony testem *ivMet* (39, 46). Z kolei związek **IIIa**: (R)-(-)-2N-[2-(2,6-dimetylofenoksy)etylo]aminopropan-1-ol wykazuje najsilniejszą dotąd aktywność przeciwdrgawkową, przy czym w teście *ivMet* nie zaobserwowano istotnego statystycznie obniżenia progu drgawkowego (44). Ponadto, stwierdzono jego aktywność w drgawkach opornych na lamotryginę (w dawce 30 mg/kg, szczury, *i.p.*), w modelu 6 Hz dla drgawek

psychomotorycznych w 22mA ($ED_{50}=19,5$ mg/kg, myszy, *i.p.* oraz $ED_{50}=7,06$ mg/kg, samice myszy, *i.p.*), w 32 mA ($ED_{50}=30,90$ mg/kg, myszy, *i.p.*), i w 44 mA ($ED_{50}=30,02$ mg/kg, samice myszy, *i.p.*) a także w modelu drgawek wywołanych dźwiękiem ($ED_{50}=5,39$ mg/kg, myszy, *i.p.*). Związek ten był także przebadany w teście formalinowym w kierunku zweryfikowania aktywności w bólu neurogennym (w dawce równej ED_{50} w MES, 6 mg/kg, myszy, *i.p.*) i zaobserwowano aktywność zarówno w fazie ostrej, jak i w fazie zapalnej (44).

Związek **IV**: (R,S)-2N-[2-(2-chloro-6-metylofenoksy)etylo]aminobutan-1-ol i jego enancjomery **R IVa** i **S IVb** były otrzymane i badane pod kątem aktywności przeciwdrgawkowej w ramach mojej pracy doktorskiej. W teście MES **IV** wykazuje aktywność przeciwdrgawkową, którą ilościowo wyrażają $ED_{50}=13,3$ mg/kg, myszy, *i.p.*, $ED_{50}=5,69$ mg/kg, szczury, *i.p.* Z kolei enancjomery **R** i **S** (odpowiednio **IVa** i **IVb**) wykazują wyższe dawki aktywne w MES niż racemat – odpowiednio 19,78 i 20,8 mg/kg (myszy, *i.p.*). W modelu 6 Hz dla drgawek psychomotorycznych racemiczny **IV** wykazuje aktywność w 32 mA ($ED_{50}=29,4$ mg/kg, myszy, *i.p.*), w 44mA ($ED_{50}=35,15$ mg/kg, myszy, *i.p.*). W teście formalinowym w dawce 13,25 mg/kg wykazuje aktywność w fazie ostrej (myszy, *i.p.*). W modelu bólu neuropatycznego jakim jest podwiązanie nerwu kulszowego (*sciatic nerve ligation*) wykazuje istotną statystycznie aktywność w dawce równej ED_{50} w MES=6 mg/kg (szczury, *i.p.*).

Obydwa związki **IIIa** i **IV** były przedmiotem symulacji metabolizmu *in silico* (program MetaSite) oraz metabolizmu *in vitro* (cytochrom P₄₅₀: CYP-2D6, ludzka wątrobowa frakcja S9, mikrosomy mysie, szczurze oraz ludzkie, grzyby *Cunninghamella echinulata*, *C. elegans*, *C. blakesleeana*) – badania te były przedmiotem pracy doktorskiej Pani dr Pauliny Kubowicz-Kwaśny (Zakład Biochemii Farmaceutycznej UJ CM, pod kierunkiem Pani dr hab. Elżbiety Pękali, prof. UJ).

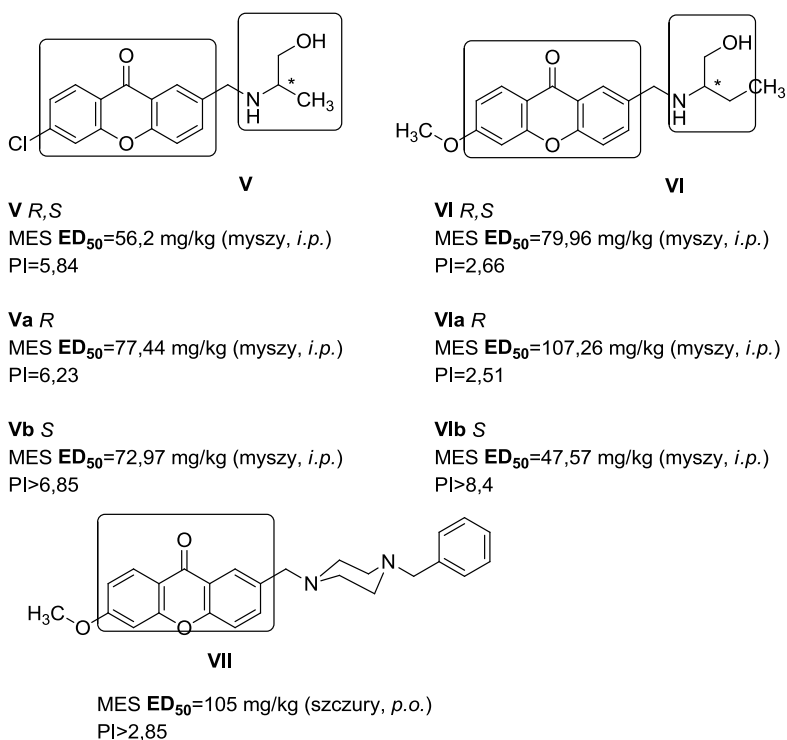
Warto zwrócić uwagę, że aktywność przeciwdrgawkowa związków odniesienia w wielu testach jest porównywalna lub przewyższa działaniem i bezpieczeństwem wiele leków przeciwpadaczkowych (np. walroceamid, ganaxolon, czy lewetiracetam, str. 14-15).

Dzięki środkom finansowym z projektu pt. „**Opracowanie innowacyjnej grupy związków o aktywności stabilizującej potencjał błony komórkowej**” POIG związki **IV**, **IVa-b** poddane zostały poszerzonym badaniom farmakologicznym, farmakokinetycznym a także formulacji (**IV**) (kapsułki z peletkami, minitabletki), a także wyjaśnianiu mechanizmu działania. Wykazano, że **IV** wiąże się z receptorami σ ($K_i=8,9 \cdot 10^{-8}$ M),

5-HT_{1A} ($K_i=1,3 \cdot 10^{-6}$ M), **5-HT_{2B}** ($K_i=2,4 \cdot 10^{-6}$ M) i **transporterem 5-HT** ($K_i=3,6 \cdot 10^{-6}$ M). Należy podkreślić, że m.in. dla badań porównawczych związki otrzymano w formie soli i należało powtórzyć niemal cały panel badań jak dla zasad. Dla celów badawczych zwłaszcza formulacji związek **IV** otrzymano w formie chlorowodorku w ilości około 300 g a prace w zakresie formulacji zrealizowano w Katedrze Technologii Postaci Leku i Biofarmacji UJ CM pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Renaty Jachowicz.

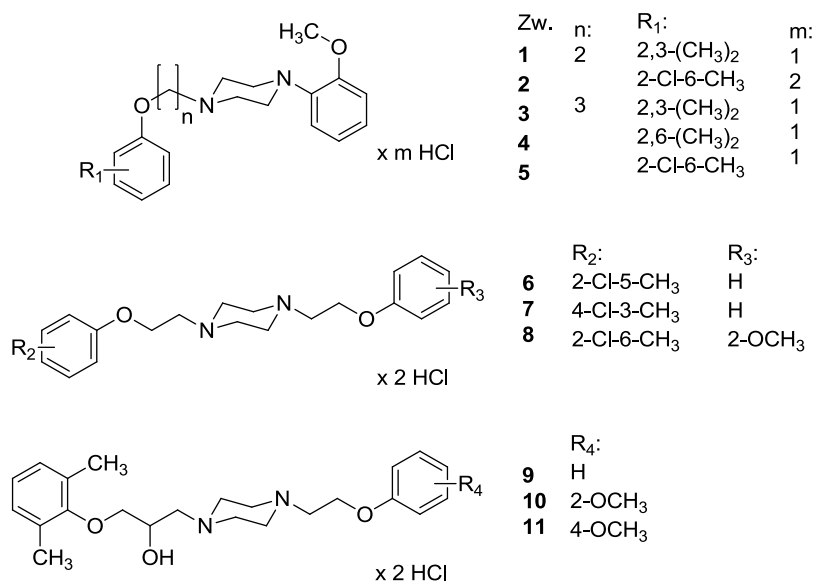
Przeprowadzone badania dla związków **IV** i jego enancjomerów **IVa** (*R*) i **IVb** (*S*) nie wykazały istotnych różnic w aktywności przeciwdrgawkowej pomiędzy racematem a enancjomerem *R*, natomiast enancjomer *S* odznacza się słabszym działaniem przeciwdrgawkowym. Neurotoksyczność racematu i obydwu enancjomerów jest porównywalna. Dlatego też do prac mających na celu umożliwienie wdrożenia, wybrano racemat **IV**, co na tym etapie badań ma głównie uzasadnienie ekonomiczne.

Wysoką aktywność przeciwdrgawkową odnotowano także w przypadku pochodnych ksantonu, zawierających ugrupowanie chiralnego aminoalkanolu **V** (47) oraz **VI** (48-49) i - co interesujące – także benzylopiperazyny **VII** (50). Ich dawki skuteczne w eliminowaniu drgawek w teście MES są wyższe w porównaniu do aktywnych dawek związków **I-IV**. Również w tym przypadku obserwuje się zależność między konfiguracją ugrupowania aminoalkanolowego a aktywnością przeciwdrgawkową, zwłaszcza w przypadku związków **VIa** i **VIb**.

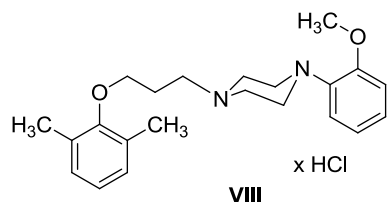


Przedstawione dane farmakologiczne dla najbardziej aktywnych przeciwdrgawkowo oraz w bólu neurogennym związków **I-IV** a także przeciwdrgawkowych **V-VII** stanowiły istotną przesłankę dla syntezy i badań nowych związków o spodziewanym ośrodkowym profilu farmakologicznym. Wyniki przeprowadzonych badań ujęto w pracach **H3-H8**. Większość moich zainteresowań skierowałam ku ugrupowaniom typowym dla **I-IV** (prace **H3-H6**), a publikacja **H7** stanowi dokumentację moich prac badawczych związanych z układem ksantonu obecnym w strukturach **V-VI**.

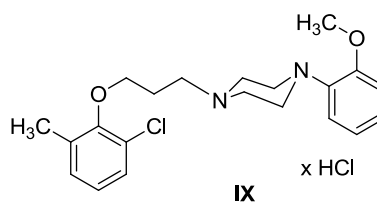
Interesującą przesłanką do kolejnych moich prac syntetycznych były wcześniejsze rezultaty badań w zakresie struktura-aktywność krążeniowa w grupie pochodnych 1,4-bis(fenoksyalkilo)- bądź 1-(fenoksyalkilo)-4-(fenoksyetylo)piperazyny. Badania te, prowadzone w zespole Pana prof. dra hab. Henryka Marony, we współpracy z Katedrą Farmakodynamiki UJ CM pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Barbary Filipek, pozwoliły na wyselekcjonowanie kilku związków o silnie zaznaczonej aktywności na układ sercowo-naczyniowy i o wysokim powinowactwie do receptorów α_1 (związki **2-5** stanowią antagonistów receptorów α_1). Rezultaty wstępnych badań były przedmiotem publikacji, w których jestem autorem korespondującym (51). Istotną przesłanką dla dalszych prac w grupie pochodnych fenylopiperazyny jest rezultat badań zarówno receptorowych, jak i funkcjonalnych, wskazujących na bardziej korzystną aktywność związków **1-5** w porównaniu do **6-11**, otrzymanych przeze mnie.



Z uwagi na podobieństwo receptorów α_1 i 5-HT_{1A} przebadano niektóre z wyżej wymienionych związków w kierunku powinowactwa do wybranych receptorów serotonergicznym oraz w testach behawioralnych na zwierzętach. Spośród powyższych związków **1-11** wyłoniono struktury wiodące **VIII** i **IX**, których charakterystykę farmakologiczną podano poniżej.



α_1 K_i =2,4 nM antagonist
 α_2 K_i =341 nM
 5-HT_{1A} K_i =0,7 nM antagonist
 agonista presynaptycznych rec. 5-HT_{1A}
 antagonist postsynaptycznych rec. 5-HT_{1A}
 5-HT_{2A} K_i =192 nM antagonist
 5-HT₃ K_i =5 924 nM
 5-HT₆ K_i =11 090 nM
 5-HT₇ K_i =26 nM

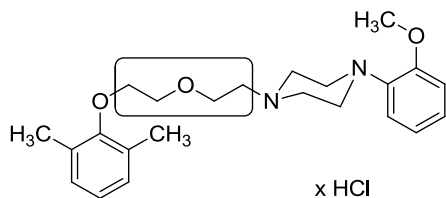


α_1 K_i =2,1 nM
 α_2 K_i =128 nM
 5-HT_{1A} K_i =0,5 nM antagonist
 agonista presynaptycznych rec. 5-HT_{1A}
 5-HT_{2A} K_i =138,5 nM antagonist
 5-HT₆ K_i =9617 nM
 5-HT₇ K_i =34 nM
 test zawieszania za ogon 2,5 mg/kg (myszy, *i.p.*)
 test wymuszonego pływania 10 mg/kg (myszy, *i.p.*)
 test 4 płytek 2,5 mg/kg (myszy, *i.p.*)

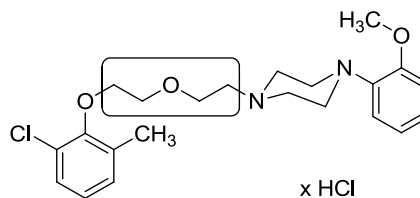
Obydwa związki **VIII** i **IX** charakteryzują się wiązaniem do receptorów adrenergicznych (w tym korzystną selektywnością względem α_1 w stosunku do α_2) i do receptorów serotonergicznym (5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₇), a także aktywnością stwierdzoną w badaniach funkcjonalnych przedstawioną powyżej, co może wskazywać zarówno na możliwość działania w obrębie ośrodkowego układu nerwowego, jak i układu sercowo-naczyniowego.

Zaobserwowano, że związek **IX** stanowiący chlorowoderek 1-[3-(2-chloro-6-metylofenoksyl)propyl]-4-(2-metoksyfenyl)piperazyny wykazuje aktywność potencjalnie przeciwdepresyjną (test zawieszania za ogon oraz test wymuszonego pływania) oraz potencjalnie przeciwłękową (test 4 płytek, myszy, *i.p.*). Poprzez stwierdzenie braku wpływu na ruchliwość myszy, potwierdzono specyficzność powyższych wyników (tzn. wykluczono działanie amfetaminopodobne). Związek **IX** także nie wykazywał neurotoksyczności oraz nie powodował zaburzeń motorycznych w teście rotarod i teście kominowym w dawkach, w których wykazywał aktywność (52). Wyniki tych badań były główną przesłanką do dalszych prac nad syntezą nowych związków z tej grupy, w tym w pracy **H8**.

W rezultacie podjętych przez mnie prac badawczych polegających na zastąpieniu łącznika alkilenowego zw. **VIII** i **IX** ugrupowaniem etoksyetylenowym, uzyskano korzystniejszy profil aktywności ośrodkowej pochodnych **X** i **XI**. Związki te także stanowiły struktury odniesienia do moich dalszych poszukiwań nowych bioaktywnych związków.



5-HT_{1A} K_i=41 nM
 5-HT_{2A} K_i=264 nM
 SERT K_i=3500 nM
 5-HT₇ K_i=156 nM
 α₁ K_i=23 nM
 D₂ K_i=219 nM
 α₂ brak powinowactwa
 β₁ brak powinowactwa
 test zawieszania za ogon:
 aktywność w 2,5 mg/kg (myszy, *i.p.*)
 rotarod TD₅₀=46,6 mg/kg (myszy, *i.p.*)
 test kominowy TD₅₀=22,4 mg/kg (myszy, *i.p.*)
 ruchliwość spontaniczna:
 ED₅₀=21,8 mg/kg (myszy, *i.p.*)



5-HT_{1A} K_i<1 nM
 5-HT_{2A} K_i=109 nM
 SERT K_i=529 nM
 5-HT₇ K_i=34 nM
 α₁ K_i=13 nM
 D₂ K_i=54 nM
 α₂ brak powinowactwa
 β₁ brak powinowactwa
 test zawieszania za ogon:
 aktywność w 2,5 mg/kg (myszy, *i.p.*)
 rotarod TD₅₀=53,2 mg/kg (myszy, *i.p.*)
 test kominowy TD₅₀=20,1 mg/kg (myszy, *i.p.*)
 ruchliwość spontaniczna:
 ED₅₀=17,5 mg/kg (myszy, *i.p.*)

We współpracy z Katedrą Farmakodynamiki UJ CM (Pani dr Karolina Pytką), dla związków **X-XI** stwierdzono działanie (53-54) :

- potencjalnie przeciwdepresyjne (test zawieszania za ogon, 2,5 mg/kg, myszy, *i.p.*)
- potwierdzenie specyficzności powyższego wyniku poprzez wykluczenie działania amfetaminopodobnego (wpływ na ruchliwość, myszy, *i.p.*) aż do dawki 8-krotnie wyższej niż najmniejsza dawka skuteczna potencjalnie przeciwdepresyjnie
- brak neurotoksyczności lub zaburzeń motorycznych (rotarod, test kominowy, myszy, *i.p.*) do dawki 8-krotnie wyższej niż najmniejsza skuteczna przeciwdepresyjnie.

W wyniku dalszych, poszerzonych badań farmakologicznych, działanie potencjalnie przeciwdepresyjne związku **XI** zbadano także na szczurach (z uwagi na różnice ekspresji genów niektórych receptorów pomiędzy gatunkami). Badania te potwierdziły działanie potencjalnie przeciwdepresyjne (myszy, 2,5 mg/kg dla **X** i 1,25 mg/kg dla **XI**, *i.p.*) i potencjalnie przeciwlękowe (myszy, szczury, dla **X** dawka 2,5 mg/kg, *i.p.*) (55).

Interesującym z punktu widzenia bezpieczeństwa tych związków jest fakt, że pomimo powinowactwa do receptorów α_1 związki te nie wykazują istotnego wpływu na układ krążenia (EKG, ciśnienie tętnicze po podaniu przewlekłym, szczury, *i.p.*) (56-57). Jednocześnie zaobserwowano korzystne działanie ochronne w modelu arytmii wywołanej adrenaliną (dawka 20 $\mu\text{g/kg}$, myszy, *i.v.*) (56). Korzystnym był fakt, iż związki te wykazały bezpieczeństwo (brak wpływu) pod kątem parametrów metabolicznych takich jak profil lipidowy, poziom glukozy we krwi oraz aktywność enzymów wątrobowych (57).

Z uwagi na antagonizm receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT₇ obserwowany w badaniach funkcjonalnych dla związków **X** i **XI**, sprawdzono ich możliwość oddziaływania na uczenie się i pamięć. Związek **XI** wykazywał zarówno właściwości poprawiające pamięć, jak i niwelujące zaburzenia pamięci indukowane skopolaminą. Jednocześnie **XI** nie wykazywał niekorzystnego działania cholinolitycznego (58). Dodatkowo zaobserwowano, że po podawaniu tego związku przez 21 dni myszom (*i.p.*) i zaprzestaniu dawkowania na 24 h aktywność przeciwdepresyjna się utrzymuje, co jest także zbieżne z korzystną obserwacją wzrostu ilości serotoniny w hipokampie (58), co jest zbieżne z efektami obserwowanymi po stosowaniu leków przeciwdepresyjnych (np. citalopramu - selektywnego inhibitora wychwytu zwrotnego serotoniny) (59). Należy zwrócić uwagę, iż wśród leków przeciwdepresyjnych poprawa funkcji poznawczych jest pożądaną, choć bardzo rzadką cechą, wykazuje ją np. wortioksetyna znajdująca się w fazie badań klinicznych (60).

Związki **X** i **XI** były także przedmiotem badań bezpieczeństwa (61), gdzie nie tylko nie wykazały działania mutagennego (związki i ich metabolity), ale wykazały się działaniem antymutagennym (w teście Ames), przy braku działania antyoksydacyjnego (badanie z użyciem DPPH). W badaniu stabilności metabolicznej wyznaczono prawdopodobne metabolity związku **XI** (LC-MS/MS) powstałe w wyniku hydroksylacji bądź O-dealkilacji związku macierzystego oraz wyznaczono parametry takie jak $t_{0,5}=21,5$ min (zw. **XI**) i $Cl_{int}=80,5$ (dla imipraminy $Cl_{int}=125,5$ $\mu\text{L/mg/min}$). W oparciu o rezultaty testów bezpieczeństwa dla związku **XI** można stwierdzić iż jest on bezpieczny z punktu widzenia mutagenności, pomimo braku działania antyoksydacyjnego i nieco szybszego metabolizmu niż w przypadku imipraminy, gdyż jego metabolity także nie wykazują działania mutagennego.

Opisana grupa związków była na tyle interesująca pod względem działania ośrodkowego, że podjęto dalsze prace w zakresie poszukiwania nowych związków z grupy pochodnych piperazyny, a rezultatem badań jest praca **H8** włączona do cyklu prac stanowiących podstawę habilitacji.

8. Prezentacja osiągnięć stanowiących podstawę habilitacji (wynikających z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311))

Przedstawiony do oceny cykl prac składa się z dwóch prac przeglądowych **H1-H2**, jednego międzynarodowego zgłoszenia patentowego **H4** i pięciu oryginalnych publikacji naukowych **H3**, **H5-H8**, które opisują zwarte tematycznie badania z zakresu chemii medycznej. Przedstawiony cykl publikacji **H1-H3**, **H5-H8** był opublikowany w czasopiśmie z listy JCR w latach 2011-2017. W 6 publikacjach jestem pierwszym i korespondującym autorem, a w 1 jestem autorem korespondującym (**H6**). W zgłoszeniu patentowym **H4** jestem wiodącym twórcą.

Na przedstawione prace **H3-H8** składają się rezultaty prac badawczych odnoszących się do poszukiwania związków o działaniu ośrodkowym – przeciwdrgawkowym, przeciwbólowym w bólu neuropatycznym (**H1-H7**) oraz przeciwdepresyjnym (**H8**).

Praca **H1** stanowi przegląd aktualnych danych literaturowych odnoszący się do leków bądź związków przeciwdrgawkowych i ich właściwości przeciwbólowych w bólu neuropatycznym. Praca ta powstała w 2011 r., wkrótce po zgłoszeniu patentowym (44) dla wielu aktywnych przeciwdrgawkowo i/lub przeciwbólowo związków w tym otrzymanych przeze mnie, i koniecznym do dalszych badań było uzyskanie szeregu informacji odnośnie do badań ilościowych na zwierzętach w zakresie aktywności przeciwdrgawkowej i przeciwbólowej znanych leków bądź związków w badaniach klinicznych. Przegląd ten umożliwił też zaplanowanie m.in. badań aktywności przeciwbólowej dla związków, dla których uprzednio wykazano aktywność przeciwdrgawkową, a także porównanie uzyskanych wyników do znanych leków przeciwdrgawkowych bądź związków będących w fazie badań klinicznych.

Z kolei praca **H2** powstała na skutek uzyskania wstępnych wyników badań wskazujących na oddziaływanie związków działających ośrodkowo, także na drodze wiązania do receptorów, poprzez kanały jonowe. Przegląd ten wskazuje na istotny postęp w dziedzinie poznania podtypów tych kanałów i ich znaczenie dla profilu działania i bezpieczeństwa związków aktywnych w ośrodkowym układzie nerwowym. Jej przydatność uzasadniają pierwsze wyniki aktywności na kanały wapniowe dla związku odniesienia **I** (str. 21) a także

konieczność racjonalnego zaplanowania prac w ramach poszukiwania mechanizmów aktywności w pracach **H3** i **H5**.

Praca **H3** stanowi dokumentację wielu lat badań dla związków otrzymanych w zespole prof. dra hab. Henryka Marony, w tym z moim udziałem, w kierunku aktywności przeciwdrgawkowej. Obok badań syntetycznych i fizykochemicznych nowych związków w tym stanowiących przedmiot ochrony patentowej (44), przeprowadzono szereg dodatkowych badań farmakologicznych, a także dotyczących polimorfizmu dla najbardziej aktywnych związków czy też poszukiwania ich mechanizmu działania. W wyniku wprowadzenia łącznika etoksyetylenowego pomiędzy ugrupowaniem fenoksy a aminoalkanolem niektórych związków odniesienia, otrzymano i przebadano 23 związki o interesującym profilu farmakologicznym, które stały się przedmiotem europejskiego zgłoszenia patentowego **H4**, a dla wielu pochodnych wraz z dodatkowymi wynikami w tym poszukiwania mechanizmu działania czy badaniami farmakokinetycznymi publikacja **H5**. Z kolei praca **H6** stanowi kontynuację modyfikacji strukturalnych związków odniesienia **I-IV**. W ramach prac **H5-H6** spośród związków aktywnych w modelu padaczki *grand mal*, wyodrębniono substancje aktywne przeciwbólowo w bólu neurogennym.

Kierując się uprzednio stwierdzonymi właściwościami przeciwdrgawkowymi niektórych aminoalkanolowych pochodnych ksantonu (związki odniesienia **V-VI**, str. 24), podjęłam się także syntezy pochodnych aminoalkanoli zawierających resztę aroksylową wywodzącą się odpowiednio z 2-, 3- lub 4-hydroksyksantonu. Przebieg syntezy, właściwości fizykochemiczne i przeciwdrgawkowe oraz stabilność metaboliczna uzyskanych związków przedstawia publikacja **H7**. Mimo analogii strukturalnej otrzymanych związków ze strukturami odniesienia, badane związki nie cechowały się znaczącą aktywnością przeciwdrgawkową. Niestety, zaobserwowano, że nakłady pracy niezbędne do uzyskania półproduktów i finalnych pochodnych ksantonu o odpowiedniej czystości do podania *in vivo* i w ilości niezbędnej do skringu farmakologicznego (0,5 g), nie oddają w cyklu prac takich efektów farmakologicznych, jak w przypadku prostszych do zsyntezowania pochodnych fenoksyalkilo- czy *N*-[2-(fenoksyetoksy)etylo]aminoalkanoli.

Na podstawie wyników uzyskanych dla związków odniesienia **VIII-XI** (str. 25-26), wskazujących na powinowactwo do receptorów serotoninergicznych bądź transportera serotoniny, podjęłam prace związane z projektowaniem i syntezą związków o potencjalnej aktywności przeciwdepresyjnej z uwzględnieniem aktywności krążeniowej, ze względu na wykazane dla związków odniesienia **VIII-XI** działanie adrenolityczne, przeciwartmyczne przy braku obniżenia ciśnienia (51, 56-57) (**H8**).

8.1. Wyniki badań i dyskusja

H1. Waszkielewicz A.M.*, Gunia A., Słoczyńska K., Marona H. 2011, Evaluation of Anticonvulsants for Possible use in Neuropathic Pain. *Curr. Med. Chem.* 18: 4344-4358.

Przesłankami do powstania pracy **H1** były rezultaty prac syntetyczno-farmakologicznych, których celem było zdefiniowanie aktywności przeciwdrgawkowej i/lub przeciwbólowej (w bólu neuropatycznym) wielu związków z grupy aroksyalkilo- lub {2-[2-(aroksy)etoksy]etylo}aminoalkanoli, a także *N*-acylowych analogów tych związków oraz ich pochodnych aminokwasowych, z których wiele stanowiło przedmiot ochrony patentowej (44), mojej pracy doktorskiej (45), jak i zgłoszenia europejskiego **H3** czy publikacji (39-44), w tym objętych cyklem habilitacyjnym **H3, H5-H8**. Praca ta została opublikowana w 2011 r., a więc po zgłoszeniu patentowym i obronie mojej pracy doktorskiej, a przed cyklem prac **H3-H8**.

W dotychczasowych pracach uzyskano korzystne wyniki dotyczące właściwości zarówno przeciwdrgawkowych, jak i przeciwbólowych wielu aktywnych związków np. związki odniesienia **III-IV**, a później związek **22a** w pracy **H4** (str. 47), których aktywność jest porównywalna do znanych leków przeciwpadaczkowych. Z uwagi na to, iż wiele uzyskanych związków cechowało się aktywnością przeciwdrgawkową a także przeciwbólową w bólu neuropatycznym, a wiele z nich zostało poddanych szerokiemu panelowi badań farmakologicznych w tym poszukiwaniu mechanizmu działania, stąd zaistniała konieczność dogłębnego przestudiowania literatury odnoszącej się m.in. do patogenezы bólu neuropatycznego czy też aktywności przeciwbólowej leków lub związków o działaniu przeciwdrgawkowym na ból neuropatyczny.

W części wstępnej pracy omówiono mechanizmy działania leków stosowanych w bólu neuropatycznym, wśród których znajdują się także mechanizmy typowe dla antykonwulsantów (modulatory kanałów jonowych w tym sodowych, potasowych czy wapniowych, modulatory GABA, modulatory receptorów glutaminergicznych) oraz inne, niepowiązane z aktywnością przeciwdrgawkową (opioidy, miejscowe leczenie kapsaicyną).

Następnie omówiono podstawowe przyczyny bólu neuropatycznego, a także typowe badania farmakologiczne oceniające aktywność związków w tym schorzeniu: ścisłe podwiązanie nerwu rdzeniowego (SNL spinal nerve ligation, tight ligation of spinal nerve), luźne podwiązanie nerwu kulszowego (CCI *chronic constriction injury*, *loose ligation of sciatic nerve*), test streptozocynowy (wywołanie streptozocyną cukrzycy i wyodrębnienie zwierząt, u których wystąpił ból neurogeny). Jako dodatkowy test wymieniono test formalinowy, w którym wywoływany jest ból neurogeny bez neuropatii – test ten jest znacznie szybszy i mniej kosztowny, polega na wywołaniu uszkodzenia neuronu formaldehydem.

W dalszej części wstępu omówiono zjawiska i definicje związane z odczuwaniem bólu, dotyku oraz temperatury w bólu neuropatycznym – stąd podano definicje takich zjawisk jak allodynia (ból odczuwany pod wpływem bodźca nieuszkodzającego, na skutek zaburzenia neurologicznego), analgezja (zniesienie odczuwania bólu), anestezja (zniesienie czucia) hiperalgezja (zwiększona wrażliwość na ból), neuralgia (ataki ostrego bólu bez wyraźnego bodźca) a także parestezja (niewłaściwe odczuwanie bodźców bólowych). Spośród allodynii wyróżniono allodynię związaną z odczuwaniem zimna jako bólu oraz allodynię związaną z odczuwaniem dotyku jako bólu.

W następnej części pogrupowano leki oraz związki przeciwdrgawkowe pod względem mechanizmów działania, a przy każdym z nich obok wzoru umieszczono dawki aktywne w typowych modelach aktywności przeciwdrgawkowej (MES, 6 Hz), opisano w skrócie skuteczność kliniczną leku, a w następnym akapicie opisano analogiczne wielkości dotyczące aktywności przeciwbólowej (test CCI, SNL, formalinowy itp.) oraz aktywność przeciwbólową w klinice.

W ramach pracy **H1** leki zostały pogrupowane według poniższych mechanizmów działania:

- leki i związki oddziałujące na kanały jonowe (karbamazepina, okskarbazepina, lamotrygina, lakoamid, zonisamid, topiramata, pochodne bis-arylopirazolowe, gabapentyna, retigabina, pregabalina),
- leki GABA-ergiczne (pochodne kwasu walproinowego, tiagabina, wigabatryna),
- ligandy białka pęcherzyków synaptycznych SV2A (lewetiracetam, briwaracetam),

- ligandy receptorów glutaminergicznych (CNS-5161 (pochodna guanidyny), NS-1209 (pochodna izochinoliny), indantadol, tezampanel i NGX-426 (obecnie dasolampanel)).

W publikacji ujęto w postaci tabeli ED₅₀ testów farmakologicznych dotyczących aktywności przeciwdrgawkowej w różnych modelach drgawek oraz przeciwbólowej w różnych modelach bólu dla większości omawianych leków oraz związków.

W trakcie realizacji pracy **H1** zaobserwowano, że związki aktywne przeciwdrgawkowo są standardowo badane w kierunku aktywności przeciwbólowej. Typowo jako pierwszy test wybierany jest test formalinowy udzielający wstępnych informacji z zakresu aktywności w bólu neurogennym i dla niektórych leków czy związków, dla aktywności przeciwbólowej znajdowano ED₅₀ wyłącznie w teście formalinowym. Z dokonanego przeglądu można zauważyć, że znane leki przeciwdrgawkowe wykazują aktywność w bólu neurogennym z reguły w wyższych dawkach w stosunku do dawek aktywnych przeciwdrgawkowo. Jako przykład może posłużyć lamotrygina – aktywna w MES w dawce ED₅₀=1,26 mg/kg (szczury, *p.o.*) wykazuje aktywność w modelu SNL ED₅₀=12 mg/kg (szczury, *p.o.*). Innym przykładem jest pregabalina aktywna w MES z ED₅₀=1,8 mg/kg (szczury, *p.o.*), która wykazuje aktywność w modelu SNL ED₅₀=15,9 (szczury, *p.o.*).

W przypadku niektórych nowych związków o większej aktywności przeciwbólowej niż przeciwdrgawkowej, tak jak to ma miejsce w przypadku CNS-5161 i NGX-426, obserwuje się prowadzenie prac badawczych w kierunku leczenia bólu neuropatycznego, dla którego nie ma dotąd w leczeniu specyficznie działającego i dedykowanego do tego wskazania leku.

Wnioskiem płynącym z tej publikacji – oprócz licznych danych z zakresu mechanizmów aktywności i dawek aktywnych u zwierząt dla aktywności przeciwdrgawkowej i przeciwbólowej w bólu neurogennym – jest trudność w przewidzeniu jaka aktywność przeciwdrgawkowa czy przeciwbólowa będzie przeważać w przypadku projektowania nowych związków. Jednocześnie, co jest oczywiste, związki wykazujące przeważającą aktywność przeciwbólową są dalej badane w kierunku leczenia tego schorzenia. Z obserwacji danych dotyczących najnowszych leków bądź związków w badaniach klinicznych wywnioskowano, że obecnie rośnie prawdopodobieństwo rozdzielenia obydwu wskazań – padaczki i bólu neuropatycznego w przypadku projektowania nowych leków, tak jak

to zaobserwowano dla związków CNS-5161 i NGX-426. Warto przy tym nadmienić, iż wniosek ten znalazł swoje potwierdzenie w decyzji Amerykańskiego Urzędu Patentowego w sprawie naszego zgłoszenia (44), aby rozdzielić je na 2 osobne zgłoszenia patentowe, obejmujące osobno: związki wraz z aktywnością przeciwdrgawkową oraz na samą aktywność przeciwbólową jako osobny przedmiot własności intelektualnej i dopiero wtedy urząd przyznał 2 osobne patenty (62-63).

W oparciu o zebranie i omówienie danych literaturowych będących przedmiotem publikacji **H1** umożliwiono w dużym stopniu rzetelne zaprojektowanie przeze mnie badań aktywności przeciwbólowej, w tym badania testem formalinowym dla związków przeciwdrgawkowych w pracy **H4-H6** czy badania w teście CCI dla związku odniesienia **IV** (str. 21), a także analizę rezultatów badań w zakresie struktura-aktywność przeciwbólowa oraz przeciwdrgawkowa badanych związków.

H2. Waszkielewicz A.M.*, Gunia A., Szkaradek N., Słoczyńska K., Krupińska S., Marona H. **2013, Ion channels as drug targets in central nervous system disorders**, *Curr. Med. Chem.* 20(10): 1241-1285.

Załączona do cyklu habilitacyjnego praca **H2** jest wynikiem przeglądu literatury odnoszącego się do działania wielu leków ośrodkowych odznaczających się także oddziaływaniem na kanały jonowe.

Wiele związków spośród pochodnych aroksyalkilo- bądź {2-[2-(aroksy)etoksy]etylo}aminoalkanoli wykazywały aktywność przeciwdrgawkową (**H3-H7**) a także przeciwbólową w bólu neurogennym (**H4-H6**), natomiast spośród pochodnych 1-fenoksyalkilo- bądź 1-{2-[2-(fenoksy)etoksy]etylo}-4-fenylpiperazyny wyselekcjonowano związki wykazujące aktywność przeciwdepresyjną obok krążeniowej (**H8**).

Leki oraz związki aktywne w ośrodkowym układzie nerwowym rzadko oddziałują poprzez pojedynczy receptor. Zwykle aktywność ta dotyczy grupy receptorów, które często są bardzo podobne strukturalnie (jak np. α_1 i 5-HT_{1A}), ale także aktywność ta często pośrednio łączy się z działaniem kanałów jonowych, które stanowią punkt uchwytu leków działających ośrodkowo (np. GABA_A z kanałem Cl⁻), obwodowo, a także krążeniowo. Dlatego też celem było przeprowadzenie przeglądu literatury w zakresie aktualizacji wiedzy odnośnie do roli kanałów jonowych jako celów molekularnych oddziaływań związków biologicznie aktywnych.

Praca **H2** została zorganizowana pod względem typów kanałów – rozdziały pogrupowano w sposób następujący: kanały sodowe, kanały potasowe, kanały wapniowe, P2X (receptor dla ATP), NMDA (*N-methyl-D-aspartate*), ASIC (*acid-sensing ion channels*), TRP (*transient receptor potential*), GABA (*γ-aminobutyric acid*). W obrębie każdego rozdziału opisano lokalizację, strukturę oraz rolę każdego z kanałów jonowych z podziałem na podtypy, następnie opisano schorzenia, w których modyfikacja funkcjonowania danych kanałów jonowych ma zastosowanie. Przy każdym mechanizmie wyszczególniono leki mu odpowiadające, a w wielu przypadkach związki w fazie badań, wraz z podaniem struktur.

Dla przykładu, obecnie wyróżnia się 9 podtypów kanałów sodowych (Nav1.1-1.9). Do leków przeciwpadaczkowych blokujących te kanały należą np. karbamazepina (Nav1.3 EC₅₀=16 μM), kwas walproinowy (Nav1.2 IC₅₀=514 μM), wśród nowszych należy wymienić

lamotryginę ($\text{Na}_v1.2$ $\text{IC}_{50}=31,9 \mu\text{M}$) czy lakoamid, ale też związki w fazie badań takie jak np. pirazynowy analog lamotryginy JZP-4. Leki aktywne w bólu neurogennym hamujące aktywność kanałów sodowych to np. pochodna benzotiazolu riluzol ($\text{EC}_{50}=2 \mu\text{M}$). Wśród leków przeciwdrgawkowych oddziałujących na kanały potasowe należy wspomnieć retigabinę (K_v7) i jej pochodną ICA-27243 ($\text{K}_v7.2/7.3$ $\text{IC}_{50}=0,2 \mu\text{M}$). Wśród leków przeciwdrgawkowych hamujących aktywność kanałów wapniowych należy wyróżnić pregabalinę (Ca_v2), gabapentynę (Ca_v2) oraz etosuksymid (Ca_v3). Z kolei wśród leków przeciwpadaczkowych do antagonistów receptora NMDA stanowiącego receptor jonotropowy (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) należą remacemid oraz felbamat.

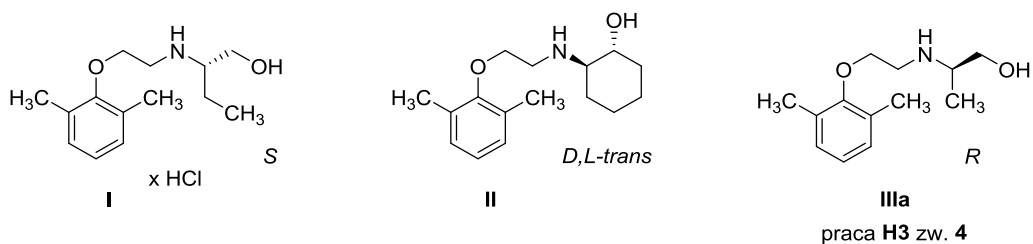
Wśród leków ośrodkowych hamujących receptory ASIC (kanały dla Na^+ , Ca^{2+} , K^+) znajdują się m.in. leki przeciwdepresyjne oraz przeciwdrgawkowe. Z kolei do najnowszych leków hamujących receptor GABA_A należy przeciwdrgawkowy SL651498 (pochodna pirydoindolu), czy sedatywnie działające pochodne triazolu MRK-409 i L-838417. Podsumowując, w wyniku pracy uzyskano przegląd dotyczący 69 leków lub związków w fazie badań działających ośrodkowo, których mechanizm aktywności obejmuje modulację aktywności kanałów jonowych.

Wnioskiem płynącym z publikacji do podejmowanych prac badawczych jest konieczność wykonania dużego panelu badań receptorowych dla najbardziej aktywnych związków, kwalifikujących się do dalszych badań, np. farmakokinetycznych, gdyż wykazane oddziaływanie receptorowe może implikować niespodziewany dotąd profil farmakologiczny bądź też udzielić ważnych informacji odnośnie do bezpieczeństwa stosowania tych związków.

Oprócz założonego celu w pracy zaobserwowano, że obecnie nastąpił istotny postęp w dziedzinie rozumienia etiopatogenezy licznych schorzeń ośrodkowego układu nerwowego, co może wpłynąć na projektowanie nowych związków o spodziewanej aktywności na schorzenia w obrębie ośrodkowego układu nerwowego, a dane uzyskane dla wielu leków posłużyły jako wartości referencyjne oceniające aktywność oraz bezpieczeństwo związków badanych pod względem mechanizmów działania w pracach **H3** i **H5**.

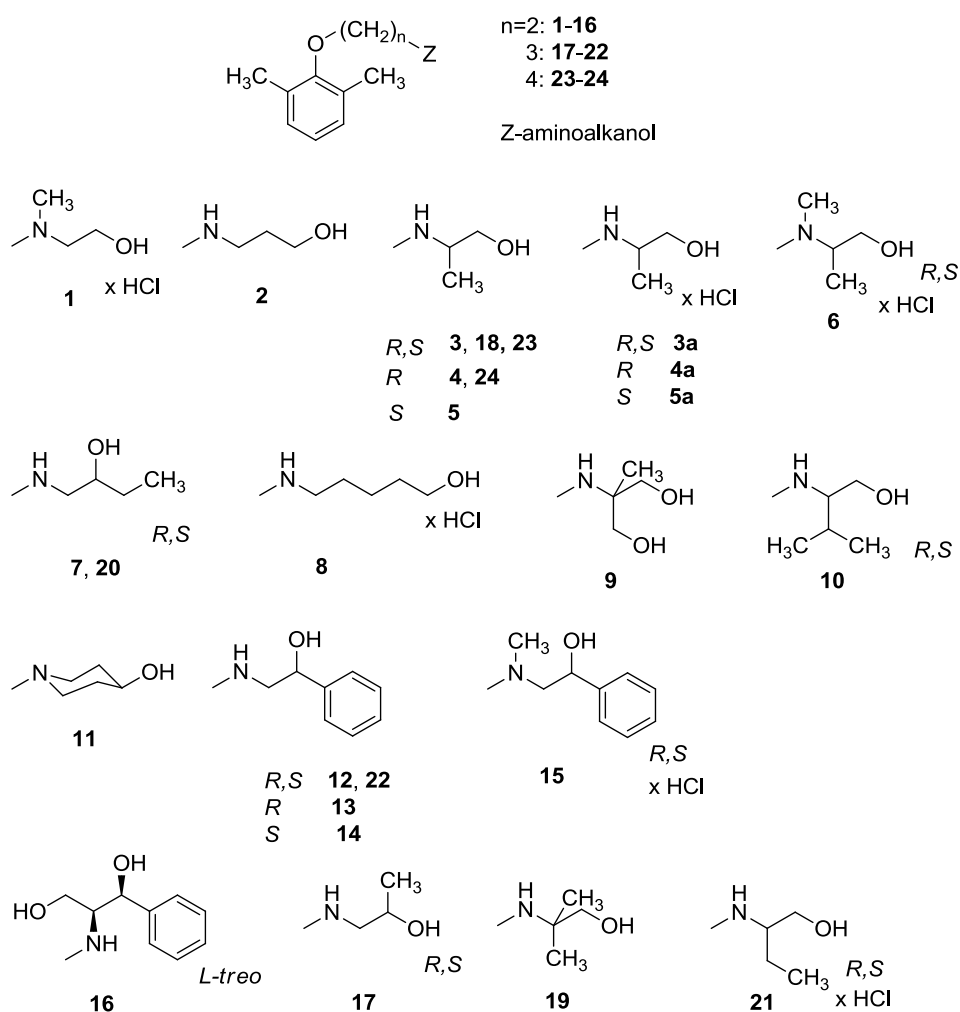
H3. Waszkielewicz AM.*, Cegła M., Żesławska E., Nitek W., Słoczyńska K., Marona H., 2015, N-[(2,6-Dimethylphenoxy)alkyl]aminoalkanols - their physicochemical and anticonvulsant properties. *Bioorg. Med. Chem.* 23(15): 4197-4217.

Praca **H3** dotyczy projektowania i syntezy 24 związków stanowiących (2,6-dimetylofenoksy)alkilowe pochodne aminoalkanoli oraz ich aktywności przeciwdrgawkowej. Siedem związków z tej publikacji było nowych, zaprojektowanych i otrzymanych w ramach koordynowanego przeze mnie projektu pt. „**Opracowanie innowacyjnej grupy związków o aktywności stabilizującej potencjał błony komórkowej**” (2010-2014) (związki **1-2, 11, 16, 18, 23-24**) (Ryc. 1), 16 związków z tej publikacji było przedmiotem przygotowanego uprzednio zgłoszenia patentowego z moim współautorstwem (związki **3-6, 8, 10, 12-15, 17-22**) (44), a 7 związków było przedmiotem publikacji dotyczącej ich właściwości lipofilowych i skringu aktywności przeciwdrgawkowej, także z moim współautorstwem (**7, 9, 12, 15, 17, 19-20**) (40).



Tytułowe związki stanowią homologi lub analogi związków odniesienia **I-IIIa** (str. 21) – pochodne ksilenolu (2,6-dimetylofenolu) oraz achiralnych i chiralnych aminoalkanoli w postaci racemicznej oraz – w przypadku uzyskania stosownej aktywności – enancjomerycznej. Łącznik pomiędzy ugrupowaniem ksilenoksy a aminoalkanołem stanowią ugrupowanie etylenowe (zw. **1-16**), trimetylenowe (**17-22**) lub tetrametylenowe (zw. **23-24**).

Ryc. 1 Struktury tytułowych związków w pracy **H3**.



Istotnym elementem pracy były obliczenia *in silico* parametrów lipofilowości związków z zastosowaniem oprogramowania ChemBioDraw Ultra 12.0. Podczas gdy pożądane wartości cLogP dla związków aktywnych w ośrodkowym układzie nerwowym wynoszą około 2-3 (64), spośród tytułowych związków większość znajduje się w pożądanym zakresie lub wykazuje nieznaczne odchylenie.

Synteza tytułowych związków obejmowała O-alkilowanie ksilenolu przy użyciu odpowiedniego chloroalkanolu (2-chloroetanol, 3-chloropropan-1-ol, 4-chlorobutan-1-ol), po czym produkty tych reakcji były poddane bromowaniu do odpowiednich bromopochodnych (lub otrzymane w formie tosylanu w przypadku ksylenoksyetylopochodnych), które z kolei poddawano aminolizie z zastosowaniem odpowiedniego aminoalkanolu.

Poza wynikami typowych badań fizykochemicznych potwierdzających tożsamość i odpowiednią czystość związków (^1H NMR, ^{13}C NMR, LC-MS), w pracy zamieszczono także badanie krystalograficzne potwierdzające konfigurację *R* dla związku **4a2**.

Otrzymane związki były przebadane farmakologicznie w ramach programu **ADD** w amerykańskim **Narodowym Instytucie Zdrowia** (9) w przesiewowych testach MES, ScMet, TOX w czasie 0,5 oraz 4,0 h po podaniu myszom (*i.p.*).

W publikacji zamieszczono także badania dotyczące związku odniesienia **III** (w pracy związek **3**) oraz **IIIa** (w pracy związek **4**) i **IIIb** (w pracy związek **5**) (str. 21). Związek **4**: (*R*)-2*N*-[2-(2,6-dimetylofenoksy)etylo]aminopropan-1-ol spośród tytułowych związków był także najbardziej aktywny.

W badaniach przesiewowych MES oraz 6 Hz wyznaczono czas od podania do największej aktywności TPE (wynoszący w większości przypadków 0,25 h) a następnie uzyskano ED_{50} na myszach dla związków **3**: (*R,S*)-2*N*-[2-(2,6-dimetylofenoksy)etylo]aminopropan-1-ol (10,08 mg/kg), **4**: (*R*)-2*N*-[2-(2,6-dimetylofenoksy)etylo]aminopropan-1-ol (5,34 mg/kg, *i.p.*), **4a2**: chlorowodorek (*R*)-2*N*-[2-(2,6-dimetylofenoksy)etylo]aminopropan-1-olu (22,28 mg/kg, *i.p.*), **5**: (*S*)-2*N*-[2-(2,6-dimetylofenoksy)etylo]aminopropan-1-ol (8,59 mg/kg, *i.p.*) a także nowych nie objętych zgłoszeniem patentowym: **11**: 2*N*-[2-(2,6-dimetylofenoksy)etylo]piperydyn-4-ol (17,31 mg/kg, *i.p.*) czy na szczurach dla związku **7**: (*R,S*)-1*N*-[2-(2,6-dimetylofenoksy)etylo]aminobutan-2-ol (34,86 mg/kg, *i.p.*) i dla **12**: (*R,S*)-2*N*-[2-(2,6-dimetylofenoksy)etylo]amino-1-fenyletan-1-ol (21,06, *p.o.*). Spośród powyższych pochodnych, wszystkie posiadają łącznik etylenowy przy ugrupowaniu ksilenolu, natomiast ugrupowanie aminoalkanolowe stanowią racemiczny 2-aminopropan-1-ol (**3**), jego enancjomery *R* (**4**) i *S* (**5**), (*R,S*)-1-aminobutan-2-ol (**7**), (*R,S*)-2-amino-1-fenyletan-1-ol (**12**), lub, co interesujące, cykliczny aminoalkanol – piperydyn-4-ol (**11**).

Z tej grupy związków nieobjętej zgłoszeniem patentowym obok wymienionej aktywności przeciwdrgawkowej w teście MES interesującą aktywność wykazał związek **11**: 2*N*-[2-(2,6-dimetylofenoksy)etylo]piperydyn-4-ol, podany w dawce 50 mg/kg (myszy, *i.p.*), który charakteryzował się aktywnością w teście 6 Hz u 75% zwierząt po 0,25 i po 0,5 h od podania, po czym aktywność ta zanikała. Sugeruje to działanie samego związku, a nie jego metabolitu. Obniżenie tej dawki do 25 mg/kg i badanie w teście MES przyniosło podobne rezultaty – aktywność u 50% zwierząt przez 0,5 h i następnie zanik aktywności. Związek ten

wykazywał neurotoksyczność dopiero od dawki 85 mg/kg. Czas TPE wyznaczony dla związku **11** to 0,25 h.

Podobną aktywność wykazywał związek **23**: (*R,S*)-2*N*-[2-(2,6-dimetylofenoksy)butylo]aminopropan-1-ol) (TPE=0,5 h) stanowiący butylowy homolog (racemiczny) związku odniesienia **III**. Podanie 50 mg/kg w teście 6 Hz dało 75% skuteczności w zapobieganiu drgawkom, która zmniejsza się po 0,5 h do 66%, a po 1 h zanika. Sugeruje to aktywność związku w drgawkach psychomotorycznych. Natomiast w teście rotarod zaobserwowano neurotoksyczność po 0,5 h, a następnie po 4 h – po tym czasie wskazuje to na toksyczność nie samego związku, a jego metabolitu. Zastosowanie enancjomeru *R* – związku **24** – w dawce 30 mg/kg w teście 6 Hz nie przyniosło oczekiwanej aktywności, z kolei neurotoksyczność pojawiła się w wysokiej dawce 100 mg/kg.

Trimetylenowy racemiczny homolog związku odniesienia **III** – związek **18** wykazał w teście MES aktywność przeciwdrgawkową w dawce 30 mg/kg (myszy, *i.p.*) 0,5 h od podania, jednak w tej samej dawce związek ten wykazywał neurotoksyczność u 50% zwierząt w teście rotarod, co wykluczyło go z dalszych badań.

Podsumowując powyższe obserwacje, należy zauważyć, że zastosowanie dłuższego łącznika alkilenowego niż ugrupowanie etylenowe tj. trimetylenowego dla związków **17-22** i tetrametylenowego dla związków **23-24** stanowiących m.in. homologi homologi aktywnego przeciwdrgawkowo i przeciwbólowo związku odniesienia **III** nie przyniosło korzystniejszych rezultatów **I-IIIa**.

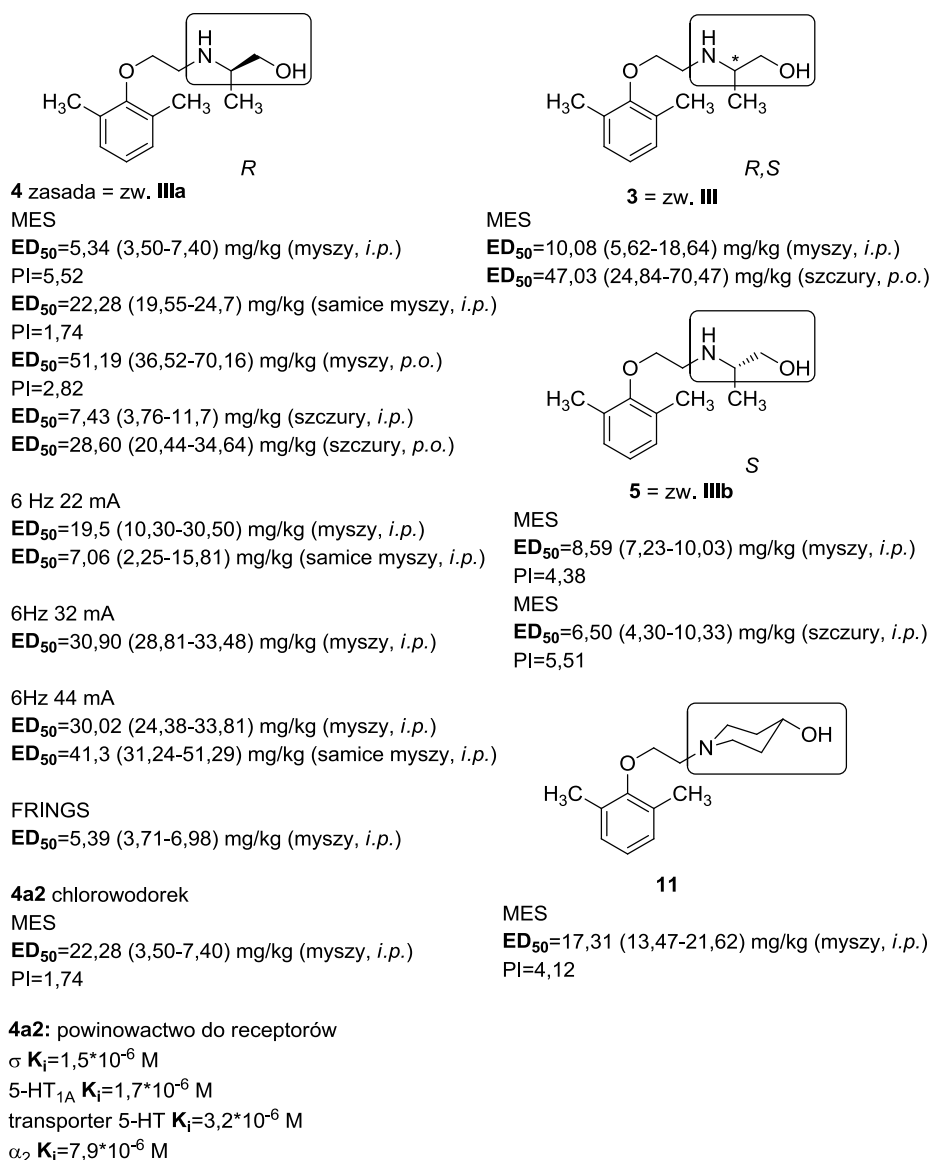
Dzięki środkom finansowym z w/w. grantu zaprojektowano i poddano poszerzonym badaniom farmakologicznym wiele związków w tym niektórych związków odniesienia **IIIa-IVa**, które dla potrzeb poszerzonych badań farmakologicznych i formulacji były otrzymane w ilości 250-300 g. Związek **IIIa** wykazał aktywność w testach 6 Hz z zastosowaniem różnego natężenia prądu elektrycznego (ED₅₀(22mA)=19,5 mg/kg, ED₅₀(32mA)=30,90 mg/kg, ED₅₀(44mA)=30,02 mg/kg, myszy, *i.p.*), co wskazuje na aktywność w drgawkach psychomotorycznych, a także w teście Fringsa wskazującym na możliwość zapobiegania drgawkom wywołanym dźwiękiem – ED₅₀=5,39 mg/kg (myszy, *i.p.*). W teście drgawek rozniecanych na hipokampie (*hippocampal kindling*) stwierdzono aktywność w dawce 60 mg/kg (szczury, *i.p.*), co także implikuje zastosowanie w drgawkach psychogennych.

Warto przy tym w testach MES czy 6 Hz zwrócić uwagę na zakresy dawek aktywności (przedział ufności wokół ED_{50}), które w przypadku samic myszy znacznie odbiegają od wyników standardowych badań (dla samców) lub te zakresy się nawet nie pokrywają (np. w teście MES, myszy, *i.p.* 3,50-7,40 względem 19,55-24,7 mg/kg), co sugeruje odmienny profil farmakologiczny, związany z płcią. Może to mieć związek z aktywnością przeciwdrgawkową allopregnanolonu (metabolitu żeńskiego hormonu płciowego – progesteronu, str. 15) $ED_{50}=14,2$ mg/kg w teście 6 Hz (32 mA, myszy, *i.p.*) (21). Związek **4** niestety wykazuje słabe, choć nieistotne statystycznie działanie prodrgawkowe stwierdzone przy pomocy testu *ivMet*.

Związek **4** został poddany także innym, nieobjętym zgłoszeniem patentowym badaniom farmakologicznym, np. testowi lamotryginowemu (szczury, *i.p.*), w którym wykazał aktywność u 60% zwierząt w dawce 30 mg/kg, co wskazuje na aktywność tego związku w drgawkach lekoopornych. Kolejnym testem był test pilokarpinowy (odpowiadający stanowi padaczkowemu u człowieka stanowiącemu zagrożenie życia), w którym pomimo braku aktywności wyznaczono $TD_{95}=64,99$ mg/kg (myszy, *i.p.*) czyli dawkę toksyczną u 95% zwierząt.

W ramach koordynowanego przeze mnie **projektu badawczego POIG 01.01.02-12-012/09** dokonano syntezy wielu nowych związków i badań ich aktywności przeciwdrgawkowej i tam, gdzie była ona zaobserwowana, **mechanizmu działania**, w tym związku **4** i jego chlorowodorku **4a2** (wraz z resyntezą). Tym samym, przeprowadzono poszukiwanie mechanizmu działania tego związku – został on określony poprzez badanie wpływu na **82 receptory**, kanały jonowe oraz transportery w stężeniu 100 μ M (najwyższe możliwe stężenie w np. wlewie dożylnym, wskazujące na bezpieczeństwo jednorazowego podania). Badanie wykonano w firmie Cerep (Francja). Stałe wiązania K_i wyznaczono dla tych tzw. „targetów”, z których związek wypiera przynajmniej 50% liganda. Zgodnie z powyższą metodyką, stwierdzono, iż **4a** wiąże się z receptorami σ ($K_i=1,5 \cdot 10^{-6}$ M), **5-HT_{1A}** ($K_i=1,7 \cdot 10^{-6}$ M) i α_2 ($K_i=7,9 \cdot 10^{-6}$ M) a także **transporterem 5-HT** ($K_i=3,2 \cdot 10^{-6}$ M). Powinowactwo do receptorów σ może być skorelowane z działaniem przeciwbólowym w neuropatiach, opisanym wcześniej w zgłoszeniu patentowym (44, 65). Z kolei mechanizm serotonergiczny może implikować działanie przeciwdepresyjne lub też może stanowić mechanizm działania przeciwdrgawkowego tego związku, podobnie jak to stwierdzono dla naluzotanu (66, 67).

Ryc. 2 Aktywność przeciwdrgawkowa i mechanizm działania wybranych związków w pracy H3.



Interesującym aspektem badań nad związkami **3**: (*R,S*)-, **4**: (*R*)- i **5**: (*S*)-2*N*-[2-(2,6-dimetylofenoksy)etylo]aminopropan-1-ol w ramach w/w. projektu i tej publikacji było zjawisko uzyskiwania różnych partii syntezy związku **4** w postaci chlorowodoru **4a** (w sumie w ilości 300 g) z różną temperaturą topnienia. Początkowo, związek **4a** był otrzymywany poprzez nasycanie związku **4** w roztworze acetonu gazowym chlorowodorem, i dla produktu odnotowano $T_f=107-109\text{ }^{\circ}\text{C}$ (z taką temperaturą dokonano zgłoszenia patentowego (44)). W trakcie realizacji syntezy większej ilości związku **4a**, po podwójnej krystalizacji dla próbek stwierdzono wyższą $T_f=115-117\text{ }^{\circ}\text{C}$, przy czym tożsamość związku także potwierdzono metodami spektralnymi. Odmianę o wyższej temperaturze uzyskiwano też w przypadku nasycania chlorowodorem roztworu zasady (**4**) w mieszaninie octan

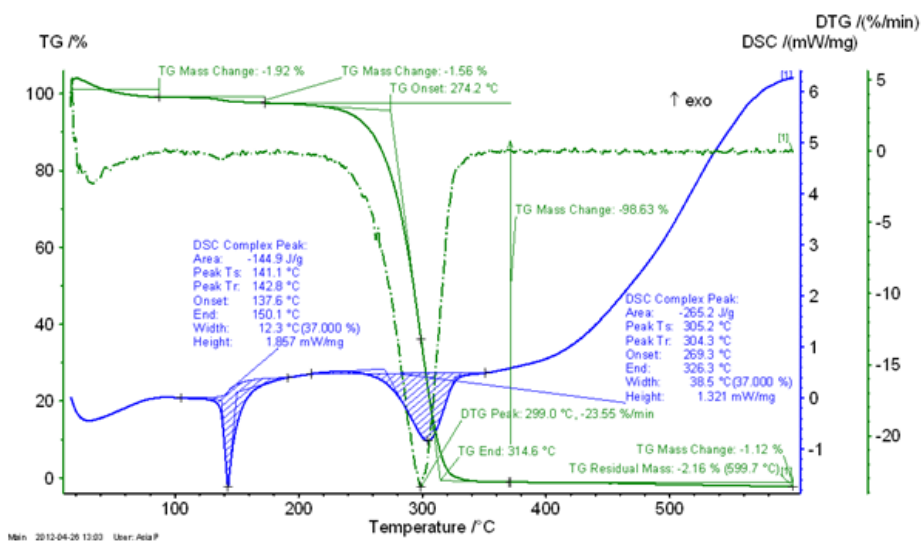
etylu/EtOH (4:1). Stąd oznaczono te odmiany **4a1**: $T_f=107-109^\circ\text{C}$ i **4a2**: $T_f=115-117^\circ\text{C}$. Ponadto, podczas dłuższego przechowywania związku **4a2** zaobserwowano, że po pewnym czasie wykazywał temperaturę taką jak **4a1** ($107-109^\circ\text{C}$). Podobne zjawisko zaobserwowano dla chlorowodoru enancjomeru S (**5a1**: $T_f=106-108^\circ\text{C}$ i **5a2**: $T_f=115-117^\circ\text{C}$).

Mając na uwadze możliwość występowania zjawiska polimorfizmu, mającego istotny wpływ na biodostępność związku (poprzez różnice w m.in. rozpuszczalności, trwałości czy higroskopijności), poddano związki **3a-5a** badaniom termicznym (Politechnika Krakowska). Inną możliwością braną pod uwagę był pseudopolimorfizm, polegający na występowaniu różnej ilości rozpuszczalnika w dwóch odmianach krystalicznych (solvatomorfy) – taki aspekt istotnie wpływałby na dawkowanie związku (68). Stosując metody różnicowej kalorymetrii skaningowej DSC (*ang. differential scanning calorimetry*) oraz termogravimetrii TG (*ang. thermogravimetry*) wstępnie zaobserwowano, że związki **3a-5a** rozpadają się w temperaturze około 300°C , co oznacza możliwość poddania ich obróbce termicznej (np. procesowi sterylizacji) w niższym niż ta, zakresie temperatur.

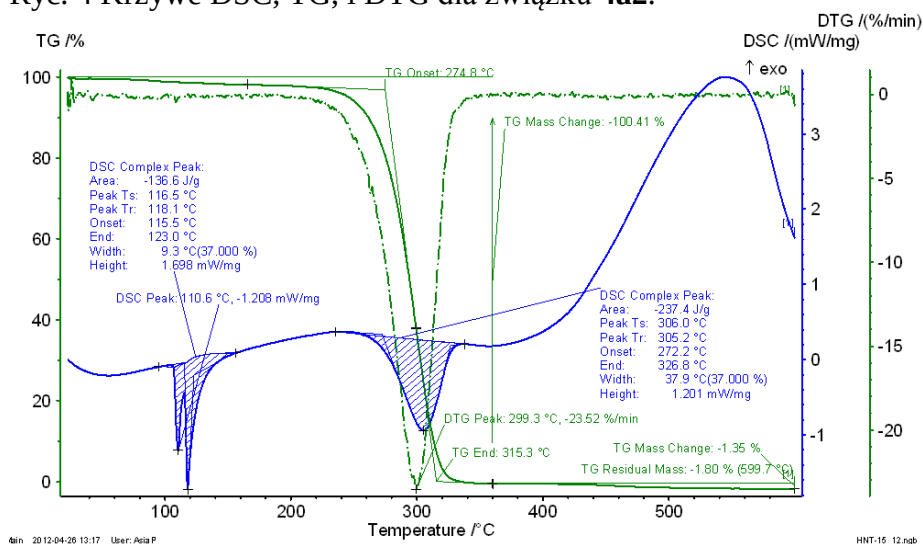
Dla odmian związku **4a1** i **4a2** (R) stosując TG stwierdzono brak zawartości wody w kryształach. Krzywe DSC uwiadcniają po dwa endotermiczne piki: w przypadku odmiany **4a1** w temperaturze $109,9^\circ\text{C}$ obserwuje się pik korelujący z temperaturą topnienia wyznaczoną za pomocą kriometru, natomiast drugi endotermiczny pik odpowiada przejściu substancji z odmiany **4a1** ($T_f=107-109^\circ\text{C}$) do **4a2** ($T_f = 115-117^\circ\text{C}$). Obserwacja ta wskazuje na polimorfizm.

W wyniku analizy TG dla obydwu odmian związku **5a1** i **5a2** stwierdzono niewielką zawartość wody (odpowiednio 1,68% i 5,5%) – obserwacja ta wskazuje, że związek powinien być przechowywany w suchych pojemnikach i pomieszczeniach. Na krzywej DSC zaobserwowano podobne do związku **4a** zjawisko 2 pików endotermicznych, spośród których jeden potwierdza wyznaczoną kriometrem temperaturę topnienia, a drugi wskazuje na przejście fazowe odmiany o niższej T_f do odmiany o wyższej T_f . Powyższego zjawiska nie stwierdzono dla związku **3a**. W pracy zamieszczono przykładowe wykresy dla **3a** i **4a2**, natomiast wykresy pozostałych odmian **4a1**, **5a1-5a2** zamieszczono w *Supplementary materials* dostępnych online <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2015.06.045>.

Ryc. 3 Krzywe DSC, TG, i DTG dla związku **3a**.



Ryc. 4 Krzywe DSC, TG, i DTG dla związku **4a2**.



W wyniku analizy krzywych TG i DSC stwierdzono, że związek **3a** (chlorowodorek związku **3**) występuje w jednej odmianie krystalicznej, a obydwa związki **4a** i **5a** (również odpowiednio chlorowodorki zw. **4** i **5**) mogą występować w odmianach polimorficznych (odpowiednio **4a1-4a2** i **5a1-5a2**).

W pracy zaprezentowano także wyniki testu Amesa celem sprawdzenia ewentualnej mutagenności związku **3a** (wykonane w Zakładzie Chemii Bioorganicznej UJ CM) oraz związku **4** (wykonane w NIH) – obydwa badania potwierdziły bezpieczeństwo obydwu związków w stężeniach odpowiednio do 160 µg/płytkę oraz 0,5 mM/L. Warto także

nadmienić, iż badania bezpieczeństwa tego związku były także prowadzone w teście *Vibrio harveyi* a wyniki były prezentowane w mojej pracy doktorskiej (45).

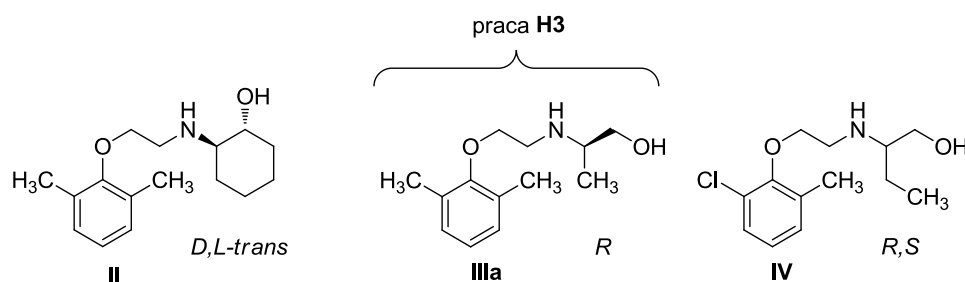
Podsumowując wyniki badań struktura-aktywność w pracy **H3**, zastąpienie ugrupowania etylenowego w związkach odniesienia ugrupowaniem trimetylenowym dla większości związków nie dało korzystnych rezultatów (obniżenie aktywności przeciwdrgawkowej, zwiększenie neurotoksyczności). Z kolei aktywność analogów tetrametylenowych obserwowana w testach MES i 6 Hz nie dorównywała związkowi odniesienia **IIIa**.

Obok wyraźnego wpływu konfiguracji w przypadku niektórych chiralnych aminoalkanoli zaobserwowano dość istotny wpływ struktury aminoalkanolu na aktywność przeciwdrgawkową, jak w przypadku analogów związku odniesienia **III**, jakimi są (2,6-dimetylofenoksy)etylo pochodne 1-aminobutan-2-olu (związek **7**), piperdyn-4-olu (związek **11**), 2-amino-1-fenyletan-1-olu (związek **12**). Związki te charakteryzowały się dość silnie zaznaczoną aktywnością przeciwdrgawkową w porównaniu do ich analogów, w których występowała komponenta aminoalkanolowa o prostym łańcuchu (np. 3-aminopropan-1-olu, 4-aminobutan-1-olu, czy też 5-aminopentan-1-olu).

Tym samym, rezultaty analizy struktura-aktywność w pracy **H3** były zachęcające do dalszych prac w zakresie projektowania i syntezy nowych związków, w szczególności z nowymi podstawnikami, w różnych położeniach ugrupowania fenoksy, a także z zastosowaniem odmiennego łącznika pomiędzy tym ugrupowaniem a aminoalkanołem.

H4. PCT/PL2014/050047, WO2015020545, Europa (Europejski Urząd Patentowy) New derivatives of N-[(phenoxy)ethoxy]alkylaminoalkanols and their use for preparation of drugs. Waszkielewicz A.M., Gunia A., Marona H. Jagiellonian University in Krakow

Celem badań, w wyniku których powstało zgłoszenie patentowe **H4**, było uzyskanie nowych analogów związków referencyjnych **I-IV** (str. 21) o spodziewanych korzystnych właściwościach farmakologicznych, poprzez wprowadzenie łącznika etoksyetylenowego pomiędzy ugrupowaniem fenoksy a aminoalkanolem, z jednoczesnym wprowadzeniem podstawników metylowych i/lub chlorowego do pierścienia aromatycznego w różnym położeniu. Projektowanie, synteza i badania związków ujętych w pracy stanowiły przedmiot koordynowanego przeze mnie grantu „Opracowanie innowacyjnej grupy związków o aktywności stabilizującej potencjał błony komórkowej” finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (2010- 2014).



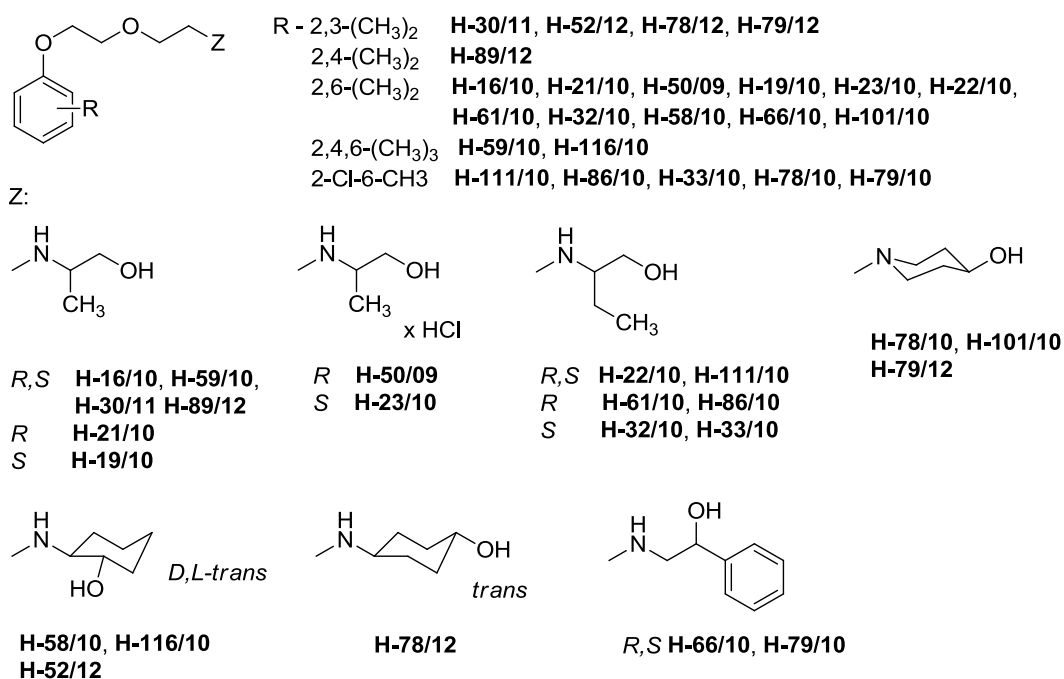
Realizując cele projektu, zmodyfikowano struktury odniesienia w kierunku sprawdzenia, jak zmiana łącznika pomiędzy ugrupowaniem fenoksy a aminoalkanolem z etylenowego na etoksyetylenowe wpłynie na aktywność przeciwdrgawkową takich pochodnych w porównaniu do związków odniesienia **I-IV**. Jednocześnie, podstawienie ugrupowania fenoksy należało ponownie sprawdzić dla podstawień 2,6-dimetylo lub 2-chloro-6-metylo w ugrupowaniu fenoksy, uznanych wcześniej za korzystne. Zgłoszenie obejmuje 23 nowe związki: 2,3-, 2,4-, 2,6-dimetylo, 2,4,6-trimetylo- oraz {2-[2-(2-chloro-6-metylofenoksy)etoksy]etylo}aminoalkanoole w formie zasad bądź chlorowodorków (Ryc. 5).

Synteza związków obejmowała aminolizę odpowiednich bromków 2-[2-(fenoksy)etoksy]etylowych z zastosowaniem chiralnego bądź achiralnego aminoalkanolu w obecności K_2CO_3 jako akceptora protonów w toluenie lub acetonie z dodatkiem TEBA. Dla otrzymania odpowiednich bromków 2-[2-(fenoksy)etoksy]etylowych opracowano metodę

dwuetapową, w której pierwszy polegał na *O*-alkilowaniu odpowiedniego fenolu przy udziale 2-(2-chloroetoksy)etanolu, a następnie poddaniu produktu bromowaniu (PBr₃).

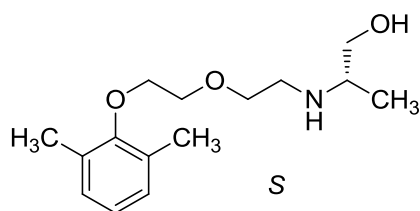
Do celów badawczych niektóre związki były również wydzielone w postaci chlorowodorków (aceton/HCl_{gaz}). W sumie otrzymano zwartą grupę [2-(fenoksy)etoksy]etylowych 23 pochodnych aminoalkanoli.

Ryc. 5 Struktury tytułowych związków w pracy **H4**



Otrzymane związki przebadano farmakologicznie w ramach programu **ADD w amerykańskim Narodowym Instytucie Zdrowia** (9) w przesiewowych testach MES, ScMet, TOX w czasie 0,5 oraz 4,0 h po podaniu myszom (*i.p.*). Następnie aktywne związki były przedmiotem testów MES i TOX na szczurach po podaniu *i.p.* oraz doustnym (*per os*, *p.o.*). Niektóre substancje były także przedmiotem badań w teście 6 Hz (myszy, *i.p.*), gdzie ich wpływ na możliwość wywołania drgawek prądem był obserwowany po 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 i 4 h po podaniu związku, w dawkach od 20 do 100 mg/kg. Jednocześnie, zbadano neurotoksyczność przy użyciu testu rotarod. Związkami o porównywalnej aktywności przeciwdrgawkowej do związków odniesienia w teście MES były (*R*)- oraz (*S*)-2*N*-{2-[2-(2,6-dimetylofenoksy)etoksy]etylo}aminopropan-1-ol, odpowiednio **H-50/09** (chlorowodorek) i **H-19/10**. Dla enancjomeru *S* wyznaczono ED₅₀=11,3 mg/kg (MES) (Ryc. 6) i TD₅₀ =39,24 (TOX), na myszach, *i.p.* Z kolei związek **H-50/09** został zakwalifikowany do badań w teście formalinowym i w tym badaniu w dawce 13 mg/kg wykazał istotną statystycznie aktywność przeciwbólową w fazie ostrej testu, co wskazuje na aktywność w bólu neurogennym.

Ryc. 6 Aktywność przeciwdrgawkowa wybranego związku w **H4**



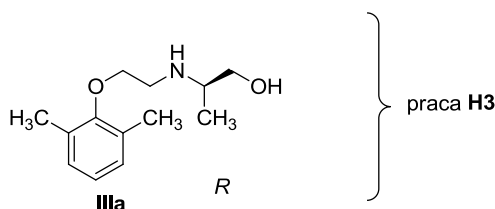
H-19/10 MES ED_{50} =11,3 (9,39-13,3) mg/kg, myszy, *i.p.*

Pozostałe związki, w tym podstawione 2,3-, 2,4-dimetylo- oraz 2,4,6-trimetylo- i 2-chloro-6-metylopo pochodne charakteryzowały się niższą aktywnością w teście MES w badaniach przesiewowych (myszy, *i.p.*) – były aktywne w dawkach 30 lub w 100 mg/kg, przy czym neurotoksyczność była obserwowana dla wielu z nich w 100 mg/kg. Spośród badanych związków, 2 z nich wykazały aktywność w badaniach MES na szczurach (*p.o.*): (*D,L*)-*trans*-2*N*-{2-[2-(2,6-dimetylofenoksy)etoksy]etylo}aminocykloheksan-1-ol stanowiący etoksyetylenowy analog związku odniesienia **II** i wykazujący 100% aktywność w dawce 100 mg/kg przy braku neurotoksyczności (myszy, *i.p.*) oraz (*R,S*)-2*N*-{2-[2-(2-chloro-6-metylofenoksy)etoksy]etylo}aminobutan-1-ol stanowiący etoksyetylenowy analog związku odniesienia **IV** i wykazujący aktywność w MES w 30 mg/kg (myszy, *i.p.*). Obydwa te związki nie przewyższyły swoimi właściwościami związków odniesienia. Natomiast, analogi etoksyetylenowe związku odniesienia **III**, zarówno enancjomer *R* (**H-50/09**) jak i *S* (**H-19/10**) opisane powyżej, wykazują korzystny profil, w tym aktywność przeciwdrgawkową w teście MES po podaniu *i.p.* szczurom trwającą 1 h, i były przedmiotem dalszych badań, m.in. mechanizmu działania czy badań farmakokinetycznych, zamieszczonych w pracy **H5**.

Zgłoszenie patentowe **H4** zawiera 3 zastrzeżenia, obejmujące wzór ogólny nowych pochodnych, listę związków najbardziej aktywnych oraz zastosowanie do leczenia schorzeń o etiologii neurologicznej, w szczególności obejmujących padaczkę i/lub ból.

H5. Waszkielewicz A.M.*, Gunia-Krzyżak A., Powroźnik B., Słoczyńska K., Pękala E., Walczak M., Bednarski M., Żesławska E., Nitek W., Marona H. **2016, Design, physico-chemical properties and biological evaluation of some new N-[(phenoxy)alkyl]- and N-{2-[2-(phenoxy)ethoxy]ethyl}aminoalkanols as anticonvulsant agents. *Bioorg. Med. Chem.* 24(8): 1793-1810.**

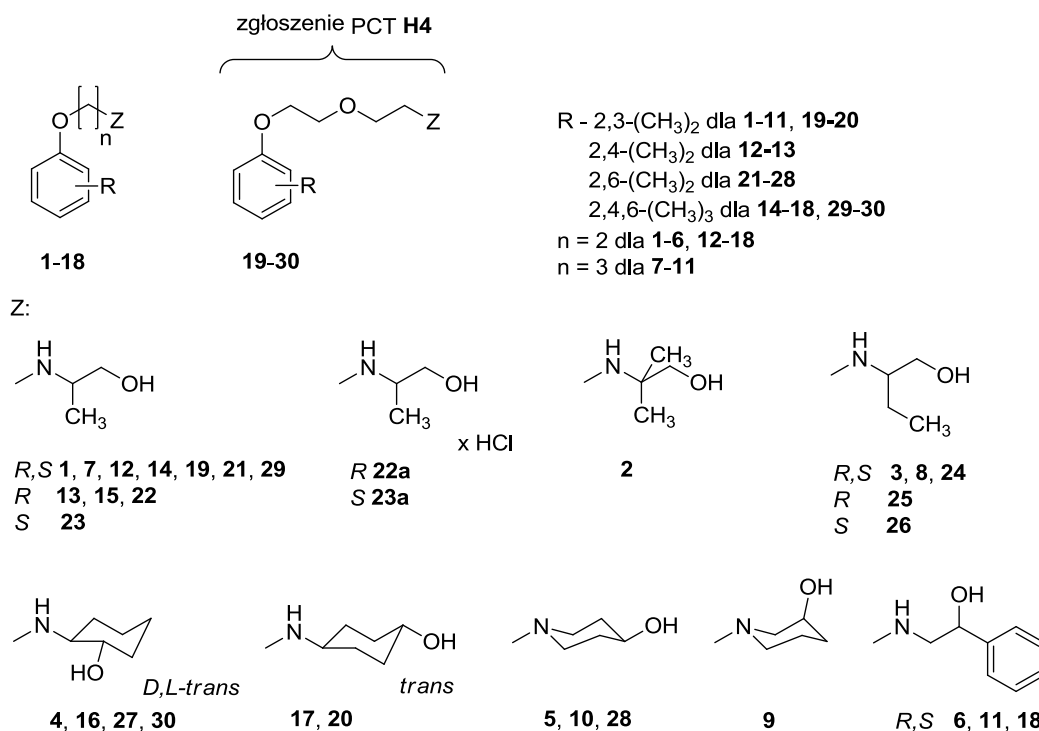
Publikacja **H5** obejmuje nowe związki **1-18**, natomiast substancje **19-30** stanowią przedmiot zgłoszenia **H4** wraz z dodatkowymi badaniami nieumieszczonymi w zgłoszeniu – badaniami krystalograficznymi, poszukiwaniem mechanizmu działania, badaniami bezpieczeństwa (badania mutagenności oraz stabilności metabolicznej, wpływu na kanały hERG) i badaniami farmakokinetycznymi (po podaniu dożylnym, dootrzewnowym i dożołądkowym).



W pracy **H3** opisano wyniki badań farmakologicznych dla m.in. trimetylenowych homologów i analogów związków odniesienia **I-III** (str. 21), zawierających ugrupowanie 2,6-(CH₃)₂fenoksy. Z kolei celem pracy **H5** było otrzymanie nowych pochodnych odpowiednio fenoksyetylo- oraz fenoksypropyloaminoalkanoli, podstawionych w pierścieniu fenoksy 2,3-dimetylo, 2,6-dimetylo, oraz 2,4,6-trimetylo, (związki **1-18**, nieobjęte pracą **H4**). Związki te stanowią strukturalne analogi aktywnego przeciwdrgawkowo związku **III**, stąd interesującym było ich otrzymanie i przebadanie pod kątem aktywności przeciwdrgawkowej, nie tylko dla poszerzenia biblioteki związków czy znalezienia bardziej aktywnej substancji przeciwdrgawkowej, ale także dla analizy struktura-aktywność w tej grupie związków, z różnym podstawieniem grup metylowych w układzie fenoksy (Ryc. 7).

W pracy **H5** pochodne **19-30** zawierały ugrupowanie [2-(fenoksy)etoksy]etylowe, podstawione w pierścieniu fenoksy odpowiednio w położeniach 2,3-dimetylo, 2,6-dimetylo, oraz 2,4,6-trimetylo, które były przedmiotem także zgłoszenia **H4**. Publikacja **H5** nie zawiera właściwości pochodnych 2-chloro-6-metylowych zawartych w zgłoszeniu **H4**, z uwagi na dużą ilość wyników i trwających poszerzonych badań dla przedstawionych związków, co będzie przedmiotem ewentualnych prac wdrożeniowych bądź oddzielnej publikacji.

Ryc. 7 Struktury tytułowych związków w pracy **H5**



Synteza związków **1-18** obejmowała aminolizę odpowiednich bromków fenoksyetylowych lub -propylowych z zastosowaniem chiralnego bądź achiralnego aminoalkanolu w obecności K₂CO₃ w środowisku toluenu lub acetonu z dodatkiem katalitycznych ilości TEBA. Do celów badawczych niektóre związki były również wydzielone w postaci chlorowodorków (aceton/HCl_{gaz}).

Do celu potwierdzenia tożsamości i czystości tytułowych związków, w pracy zastosowano m.in. metody spektralne (¹H NMR, ¹³C NMR, IR, LC-MS). Dla potwierdzenia konfiguracji absolutnej związku **22a** wykonano dla niego badanie krystalograficzne, które potwierdziło konfigurację *R*. Ponadto, badanie czystości enancjomerycznej wykonane metodami chromatograficznymi dla najbardziej aktywnych związków tj. **22a** i **23** wskazało na nadmiar enancjomeryczny wynoszący w obydwu przypadkach 98%.

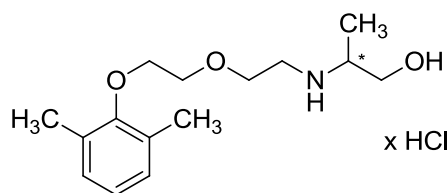
Otrzymane związki **1-30** przebadano farmakologicznie w ramach programu **ADD w amerykańskim Narodowym Instytucie Zdrowia** (9) w przesiewowych testach MES, ScMet, TOX w czasie 0,5 oraz 4,0 h po podaniu *i.p.* myszom. Następnie związki aktywne w MES przebadano na szczurach, *p.o.*

Analiza struktura-aktywność w badanej grupie związków pozwoliła na stwierdzenie, iż podstawienie grup metylowych w ugrupowaniu fenoksy w pozycjach 2,3 oraz 2,4 czy 2,4,6

istotnie zmniejszało aktywność w stosunku do związku odniesienia **III**, zarówno w teście MES, jak i 6 Hz (aktywność pojawia się dopiero w dawce 100 mg/kg, myszy, *i.p.*), z wyjątkiem związków, gdzie ugrupowanie aminoalkanolowe stanowiło piperydyn-3-ol. Podstawienie 2,4,6-trimetylo jest bardziej korzystne dla aktywności przeciwdrgawkowej niż 2,3-dimetylo- i 2,4-dimetylo-, jednak również takie związki nie przewyższają aktywnością związków podstawionych w pozycjach 2,6 podstawnikami metylowymi.

Najbardziej aktywny przeciwdrgawkowo spośród wszystkich związków okazał się związek **22a**: chlorowodorek (*R*)-2*N*-{2-[2-(2,6-dimetylofenoksy)etoksy]etylo}aminopropan-1-olu, którego właściwości przeciwbólowe opisano w zgłoszeniu **H4**. Należy przy tym nadmienić, iż przeprowadzono badania dla tej struktury zaczynając od formy racemicznej **21**, następnie otrzymano i przebadano enancjomery zasad **22** (*R*) i **23** (*S*), a także enancjomery w postaci chlorowodorków odpowiednio **22a** i **23a**.

Ryc. 8 Aktywność przeciwdrgawkowa wybranych związków w pracy **H5**



22a (*R*) MES ED_{50} =12,92 (8,49-19,01) mg/kg, myszy, *i.p.*

23 (*S*) MES ED_{50} =11,3 (9,39-13,3) mg/kg, myszy, *i.p.*

Analizując obserwowane podobieństwa strukturalne, związek **22a** stanowi etoksyetylenowy analog (w formie chlorowodorku) związku odniesienia **III**. Dzięki dodatkowym badaniom farmakologicznym wykraczającym poza zgłoszenie **H4**, możliwe stało się porównanie dawek ED_{50} obydwu związków **22a** (*R*) i **23a** (*S*) ze związkiem odniesienia **III**. Warto mieć na uwadze nie tylko samą dawkę, ale cały 95% przedział ufności dawek aktywnych 2,5-97,5% zwierząt. Przedziały te pokrywają się dla obydwu enancjomerów (dla **22a**: ED_{50} =12,92 (8,49-19,01) mg/kg, a dla **23**: ED_{50} =11,3 (9,39-13,3) mg/kg, co sugeruje podobny profil farmakologiczny i brak istotnych różnic w tej aktywności (Ryc. 8). Jednakże przedziały te nie pokrywają się z przedziałem ufności dawek aktywnych związku **IIIa** (3,50-7,40 mg/kg), co oznacza że związki **22a** i **23** mogą charakteryzować się odmiennym profilem farmakologicznym od związku **IIIa**.

Związki **22** (zasada) i **22a** (chlorowodorek) wykazywały identyczne właściwości w testach MES i TOX (myszy, *i.p.*) – aktywność była obserwowana w 10 mg/kg, a neurotoksyczność w 100 mg/kg. Następnie związki **22** (zasada), **23** (zasada) i **23a** (chlorowodorek) zostały przebadane w modelu drgawek psychomotorycznych w teście 6 Hz (myszy, *i.p.*) i w tym teście wykazywały aktywność odpowiednio w dawkach 50, 40 oraz 30 mg/kg, przy czym aktywność ta była obserwowana w czasie – trwała 1 godzinę, następnie zanikała po 2 h i pojawiała się ponownie 4 h po podaniu związku. Obserwacja ta sugeruje prawdopodobną aktywność metabolitu. Odmienne właściwości w teście MES były obserwowane na szczurach (*i.p.*) w czasie 4 h dla związków **23** (zasada) i **23a** (chlorowodorek). Obydwa związki wykazywały 100% aktywność w MES 0,25 h od podania, która zmniejszała się z czasem i zanikała po 2 h. Związki te nie wykazywały neurotoksyczności (*rotarod*) przez cały czas obserwacji, co oznacza, że ani związki **23** i **23a**, ani ich metabolity nie są neurotoksyczne.

W nawiązaniu do powyższej obserwacji na myszach, postanowiono przebadać związki **22a** (chlorowodorek) i **23** (zasadę) pod kątem stabilności metabolicznej, co stanowi dodatkowe badanie poza zgłoszeniem **H4**. Do tego typu badania dla serii związków dołącza się standardowo podobny strukturalnie, ale nieaktywny związek, celem uzyskania dodatkowych informacji z zakresu przebiegu metabolizmu bądź też struktur metabolitów aktywnych. Do tego celu wybrano związek **29**: (*R,S*)-2*N*-{2-[2-(2,4,6-trimetylofenoksy)etoksy]etylo}aminopropan-1-ol, stanowiący homolog badanych związków. W badaniu zastosowano mysie mikrosomy wątrobowe. Wyznaczono masy najbardziej prawdopodobnych metabolitów. Zaobserwowano, że $t_{0,5}$ jest korzystniejsze niż dla imipraminy i podobne dla fentanylu stanowiących leki odniesienia, czyli można stwierdzić, że związki **22a** i **23** są stosunkowo stabilne metabolicznie. Związek **29** wykazał w tym badaniu okres półtrwania $t_{0,5}$ (136 min.) ponad trzykrotnie większy od **22a** i **23** (po 36 min. każdy), co sugeruje, że brak dodatkowego podstawnika metylowego w położeniu 4 pierścienia fenoksy w związkach **22a** i **23** predystynuje do reakcji metabolicznej w tym położeniu.

W ramach programu **ADD** związki **22a** i **23** przebadano także w modelu stanu padaczkowego (test drgawek wywołanych pilokarpiną, myszy, *i.p.*) i w tym teście zaobserwowano aktywność obydwu związków odpowiednio w dawkach 100 i 30 mg/kg, co sugeruje możliwość przerwania stanu padaczkowego u człowieka.

Podobnie jak dla związku **IIIa**, związki **22a** i **23a** w ramach koordynowanego przeze mnie projektu „Opracowanie innowacyjnej grupy związków o aktywności stabilizującej potencjał błony komórkowej” poddano badaniom mechanizmu działania na 80 receptorach, kanałach jonowych oraz transporterach, i w stężeniu 100 μ M zaobserwowano ponad 50% wiązania w przypadku **22a** z rec. 5-HT_{1A}, 5-HT_{2B}, σ , kanał Na⁺, transporter noradrenaliny, oraz transporter 5-HT. Kolejnym etapem, wymagającym dalszych nakładów finansowych, będzie wyznaczenie stałej wiązania K_i dla wiązania tych tzw. targetów. Tym niemniej, warto zwrócić uwagę na bardzo podobny profil powinowactwa tych związków do związku odniesienia **III** – w tak wysokim stężeniu różnice można zaobserwować w słabszym wiązaniu receptorów α_1 i α_2 (wyniki dla **22a** i **23a** poniżej 45%, podczas gdy wiązanie przez związek odniesienia **IIIa** do tych receptorów wynosiło odpowiednio 70 i 73%). Ta obserwacja wskazuje na możliwość uzyskania większego bezpieczeństwa związków **22a** i **23a** pod kątem ich działania na układ krążenia, a także może potwierdzać obserwacje *in vivo*, że skoro istnieją różnice w profilach receptorowych, to oczywistą jest różnica w profilach farmakologicznym pomiędzy **22a-23** i związkiem odniesienia **III**.

Związek **22a** wybrany jako bardziej korzystny spośród obydwu enancjomerów, w pracy **H5** poddano badaniu wpływu na kanały hERG (w stężeniu 10⁻⁴ M wybranym jako optymalne do tego typu badań) i w tym badaniu wykazał on jedynie 3,6% wiązania, co oznacza wynik ujemny. Stąd można wstępnie wywnioskować, że związek **22a** jest bezpieczny z punktu widzenia działania arytmogennego.

W publikacji **H5** wykonano także inne badania bezpieczeństwa, wykraczające ponad zgłoszenie **H4** – w tym test *Vibrio harveyi* w kierunku działania pro- oraz antymutagennego, w których obydwa związki **22a** i **23** okazały się niemutagenne. Jako ostatnie badanie dla najbardziej obiecującego związku **22a** przeprowadzono badania farmakokinetyczne na myszach po podaniu dożylnym *i.v.*, dożołądkowym *p.o.* oraz dootrzewnowym *i.p.* Zaobserwowano, że biodostępność po podaniu *i.p.* jest niewiele wyższa (6,78%) niż po podaniu *p.o.* (2,98%), co wskazuje, iż związek **22a** jest metabolizowany w większym stopniu przez wątrobę niż przez jelito cienkie. Wysoka aktywność związku u myszy wskazuje na istotny udział metabolitu aktywnego w mechanizmie działania przeciwdrgawkowego związku **22a**, kompensując niską biodostępność tego związku.

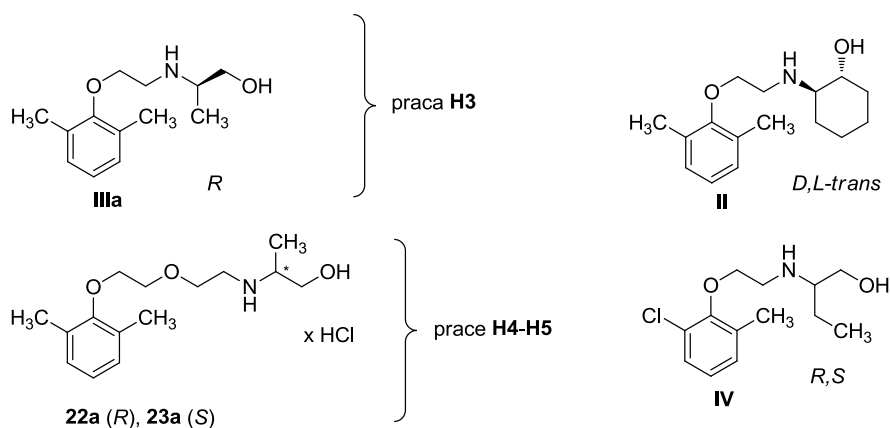
Podsumowując, w pracy **H5** przedstawiono syntezę i badania 18 nowych związków, a także dodatkowe badania nie objęte zgłoszeniem **H4** dla pochodnych etoksyetylenowych **19-30**, spośród których wyselekcjonowano związki wykazujące korzystne działanie przeciwdrgawkowe, porównywalne ze związkami odniesienia **I-IV**. Najbardziej aktywne związki poddano dalszym badaniom w tym ilościowym (ED_{50}) i dla nich wyznaczono najbardziej prawdopodobny mechanizm działania, farmakokinetykę i bezpieczeństwo (mutagenność, arytmogenność). Jednocześnie, wykazano korzystny wpływ łącznika etoksyetylenowego z punktu widzenia aktywności przeciwdrgawkowej oraz przeciwbólowej w bólu neurogennym.

H6. Rapacz A., **Waszkielewicz A.M.***, Pańczyk K., Pytka K., Koczurkiewicz P., Piska K., Pękała E., Budziszewska B., Starek-Świechowicz B., Marona H. **2017 Design, synthesis and anticonvulsant-analgesic activity of new N-[(phenoxy)alkyl]- and N-[(phenoxy)ethoxyethyl]aminoalkanols.** *Med. Chem. Commun.* DOI: 10.1039/c6md00537c.

Kierując się wieloma korzystnymi wynikami badań aktywności przeciwdrgawkowej i przeciwbólowej wielu związków ujętych w pracach **H3-H5**, celem pracy **H6** była kontynuacja tych badań dla dokonania pełnej analizy w badanej grupie związków. Z dotychczasowych ustaleń wynika, że obok łącznika alkilenowego i położenia podstawników w ugrupowaniu fenoksy istotną rolę dla aktywności przeciwdrgawkowej i/lub przeciwbólowej ma ugrupowanie aminoalkanolu.

Praca **H6** powstała w ramach kierowanego przeze mnie grantu pt. „**Poszukiwanie związków aktywnych w ośrodkowym układzie nerwowym**” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (2015-2017).

Poszukując związków w grupie pochodnych aminoalkanoli o aktywności przeciwdrgawkowej i/lub przeciwbólowej zaplanowano syntezę nowych analogów lub homologów aktywnych przeciwdrgawkowo związków opisanych w pracach **H3-H5**, w tym związku odniesienia **IIIa** a także **IV** (str. 21).

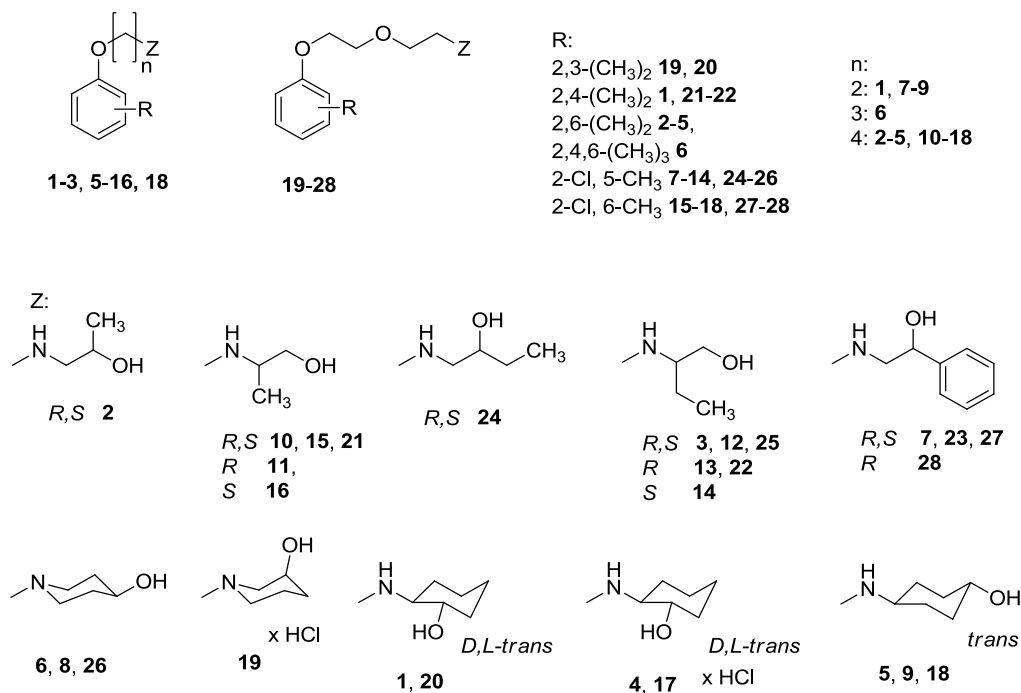


Projektując nowe pochodne zaplanowano różne podstawienia ugrupowania fenoksy (2,3-, 2,4-, 2,6-dimetylo, 2,4,6-trimetylo-, 2-chloro-5-metylo-, 2-chloro-6-metylo-). Spośród podstawników aminoalkanolowych wybrano dotychczas najbardziej korzystne 2-aminopropan-1-ol, 1-aminopropan-2-ol, 2-aminobutan-1-ol, 1-aminobutan-2-ol, piperdyn-3-ol, *trans*-2-aminocykloheksan-1-ol, 2-amino-1-fenyletan-1-ol jako racematy, a w przypadku zaobserwowania aktywności związków racemicznych – enancjomery, a także *trans*-4-

aminocykloheksan-1-ol oraz piperydyn-4-ol. Łącznik pomiędzy powyższymi ugrupowaniami stanowił 2-4 jednostki metylenowe, a w przypadku związków **19-28** zawierał on również tlen, tworząc ugrupowanie eterowe (łącznik etoksyetylenowy, podobnie jak w pracach **H4-H5**).

Do celów optymalizacji projektowanych związków zastosowano metody obliczeniowe z użyciem oprogramowania Molinspiration (69), przewidującego właściwości cząsteczki mające wpływ na możliwość biernego przenikania przez błony biologiczne: minus logarytm współczynnika podziału n-oktanol-woda: miLogP (lipofilowość), masa molowa i topologiczne pole polarnej powierzchni (*topological polar surface area*) TPSA [$\text{\AA}^2$]. Zgodnie z wytycznymi literaturowymi, dla związków aktywnych w ośrodkowym układzie nerwowym miLogP powinien wynosić 2-3 (64). Dla związków podawanych doustnie wartość TPSA powinna być niższa niż $120 \text{ \AA}^2$ i dla związków mających przeniknąć przez barierę krew-mózg niższa niż $60\text{-}70 \text{ \AA}^2$ (70). Wszystkie zaprojektowane struktury spełniały literaturowe kryteria dla związków podawanych doustnie i potencjalnie aktywnych na ośrodkowy układ nerwowy.

Ryc. 9 Struktury tytułowych związków w pracy **H6**



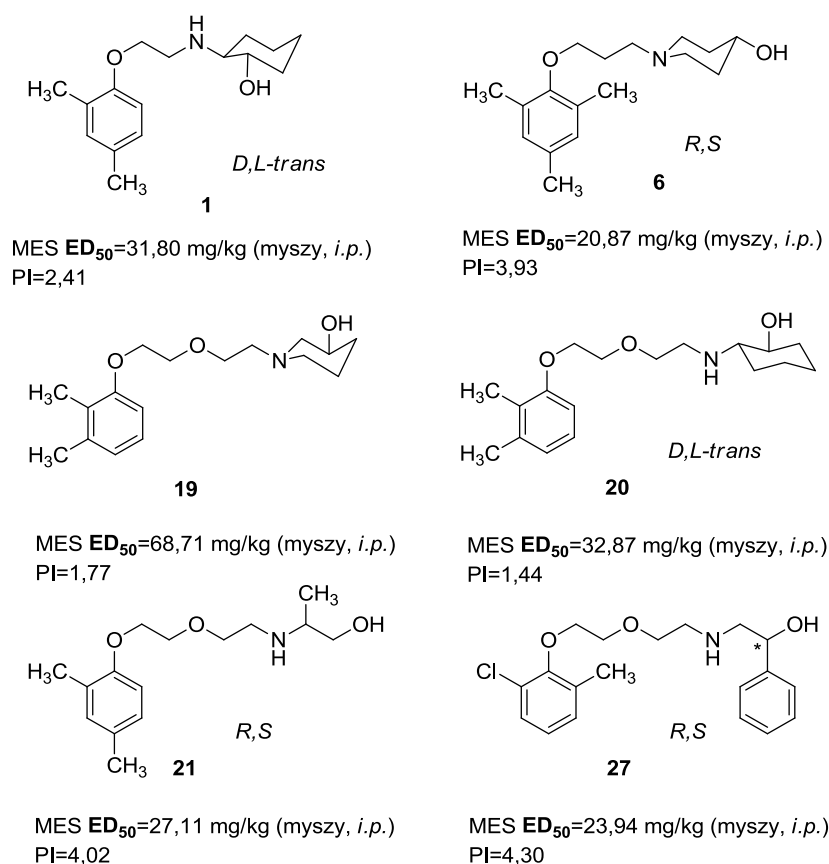
Synteza związków **1-18** obejmowała aminolizę odpowiednich bromków fenoksyetylowych, -propylowych lub -butylowych, a w przypadku związków **19-28** – odpowiednich bromków 2-[2-(fenoksy)etoksy]etylowych. Reakcję prowadzono w środowisku toluenu wobec K_2CO_3 lub stosując DMF z dodatkiem TEA.

Wyjściowe halogenki były otrzymywane na trzech drogach: przez O-alkilowanie odpowiedniego fenolu przy użyciu odpowiedniego chloroalkanolu, a następnie bromowanie produktu przy użyciu PBr_3 lub też stosując odpowiedni dibromoalkan. Ta druga metoda, mimo że ekonomicznie bardziej uzasadniona, przebiegała z mniejszą wydajnością i czystością. Alternatywnie zastosowano O-alkilowanie przy użyciu bromochloropochodnej alkanu ($\text{Cl}-(\text{CH}_2)_n\text{-Br}$), otrzymując odpowiedni chlorek fenoksyalkilu, jednak produkt był zanieczyszczony bis-pochodną stanowiącą uboczny produkt reakcji. W przypadku aminolizy tych halogenków konieczne było oczyszczanie produktów na kolumnie chromatograficznej ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$), co nie było konieczne, jeżeli stosowano dwuetapową metodę otrzymywania halogenków, stosując odpowiedni chloroalkanol do reakcji O-alkilowania odpowiedniego fenolu, a następnie bromując produkt przy pomocy PBr_3 . Tożsamość i czystość otrzymanych związków **1-28** (Ryc. 9) potwierdzono metodami spektralnymi (^1H NMR, ^{13}C NMR, IR, LC-MS).

Badania farmakologiczne zostały przeprowadzone w ramach realizowanego projektu w Katedrze Farmakodynamiki na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM. Otrzymane związki, podobnie jak w pracach **H3-H5**, były poddane skriningowi w teście MES, PTZ i TOX.

Spośród nowych 28 tytułowych związków, 10 odznaczało się znaczącą aktywnością przeciwdrgawkową w teście MES (myszy, *i.p.*), dla których przeprowadzono badania ilościowe, wyznaczając ED_{50} i TD_{50} . Spośród nich wybrano 6 związków (**1, 6, 19, 20, 21, 27**, struktury przedstawia Ryc. 10), dla których zaobserwowano najbardziej korzystne ED_{50} , TD_{50} oraz PI, a następnie przeprowadzono badanie wpływu na próg drgawkowy CS_{50} w teście MEST. W tym badaniu związki **19** i **27** w sposób istotny podnosiły próg drgawkowy, co wskazuje na zmniejszanie podatności organizmu na bodźce drgawkotwórcze. Te same 6 związków zostało przebadanych w kierunku aktywności przeciwbólowej w teście formalinowym (myszy, *i.p.*), po czym związki **1, 19, 20** i **21** wykazały istotną statystycznie aktywność w fazie zapalnej testu (w dawkach równych ED_{50} w MES), co wskazuje na aktywność przeciwbólową i przeciwzapalną.

Ryc. 10 Aktywność przeciwdrgawkowa wybranych związków w pracy H6



Związki **1**, **6**, **19**, **20**, **21** i **27** wykazujące najbardziej korzystne parametry farmakologiczne poddano dalszym badaniom w kierunku oceny ich bezpieczeństwa. Jednym z takich testów było badanie wpływu na aktywność spontaniczną myszy (*spontaneous activity*), gdzie związki **21** i **27** wykazały wpływ na tę aktywność (w dawkach równych ED_{50} w MES), co wskazuje na możliwość działania sedacyjnego w przypadku ewentualnego ich stosowania. Takie zjawisko mogłoby być uznane za korzystne tylko w niektórych przypadkach, np. drgawek psychogennych. Wykonano także test kominowy celem zweryfikowania neurotoksyczności w tych samych dawkach, przy czym żaden związek nie wykazał takiego działania, stąd wydają się być bezpieczne pod względem neurotoksyczności. Związki **1**, **6**, **19** i **21** poddano także badaniom cytotoxyczności z użyciem komórek: astrocytów CRL-2534, neuroblastoma SH-SY5Y oraz hepatocytów Hep G2 (z uwagi na hepatotoksyczność, często występującą wśród leków przeciwpadaczkowych np. dla kwasu walproinowego). W powyższych testach wykazano bezpieczeństwo wszystkich badanych związków.

Z uwagi na uzyskane wyniki aktywności przeciwdrgawkowej w teście MES oraz przeciwbólowej w teście formalinowym, oraz badań bezpieczeństwa (wpływ na aktywność spontaniczną, neurotoksyczność, działanie prodrgawkowe), za najbardziej obiecujący związek uznano **19**: *N*-{2-[2-(2,3-dimetylofenoksy)etoksy]etylo}piperydyn-3-ol, aktywny w teście MES oraz korzystnie podnoszący próg drgawkowy w teście MEST, aktywny w bólu neurogennym (w fazie zapalnej) w dawce równej ED₅₀ w MES. Związek ten okazał się bezpieczny z punktu widzenia cytotoksyczności, hepatotoksyczności, neurotoksyczności oraz wpływu na aktywność spontaniczną, w zastosowanych badaniach bezpieczeństwa. Związek ten poddano także symulacji metabolizmu *in silico* z zastosowaniem programu MetaSite i określono jego najbardziej prawdopodobne metabolity.

Struktura najbardziej obiecującego związku **19** jest odmienna od dotychczasowych obserwacji wspólnych dla związków odniesienia **I-IV**: ugrupowanie fenoksy jest podstawione w położeniach 2,3 (grupami metylowymi), cykliczny aminoalkanol (piperydyn-3-ol) zawierający III-rzędową grupę aminową w przeciwieństwie do II-rzędowych grup aminowych w związkach odniesienia **I-IV** czy **22a** (praca **H5**). Związek **19** będący pochodną piperydyn-3-olu jest analogiem związku **6** stanowiącego (2,4,6-trimetylofenoksy)propylową pochodną piperydyn-4-olu, który wykazuje aktywność przeciwdrgawkową w MES ED₅₀=20,87 mg/kg (myszy, *i.p.*), jednak bez działania przeciwbólowego. Należy zaznaczyć, że w związku **19** łącznik pomiędzy ugrupowaniami fenoksy oraz aminoalkanolem stanowi ugrupowanie etoksyetylenowe. Jego wprowadzenie potwierdziło wcześniejsze wyniki badań dla wielu związków w pracach **H4-H5**, że przynosi korzystne efekty w postaci silnie zaznaczonej aktywności przeciwdrgawkowej i/lub przeciwbólowej.

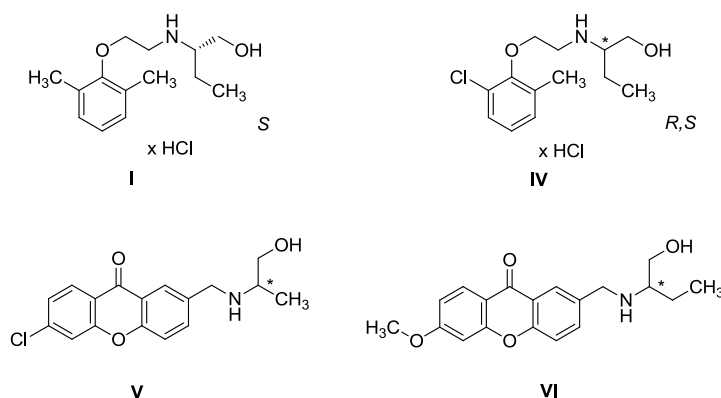
Korzystnym działaniem przeciwdrgawkowym w teście MES w badaniach ilościowych (ED₅₀=31,80 mg/kg, myszy, *i.p.*) odznaczał się także związek **1**: (*D,L*)-*trans*-2*N*-[2-(2,4-dimetylofenoksy)etylo]aminocykloheksan-1-ol stanowiący izomer konstytucyjny związku odniesienia **II**, zawierający podstawniki metylowe w położeniach 2,4 pierścienia aromatycznego. Z kolei związek **21** stanowiący 2,4-dimetylowy analog związku najbardziej aktywnego w pracy **H5** (**22a**) okazał się również aktywny przeciwdrgawkowo z ubocznym działaniem sedacyjnym. Związek **6** stanowi homolog związku **11** z pracy **H3** i związki te są przykładem analogów, w których zmiany strukturalne nie powodują istotnych zmian w aktywności, a także neurotoksyczności. Ich wartości ED₅₀ są porównywalne (odpowiednio ED₅₀= 20,87 mg/kg i 17,31 mg/kg, MES, myszy, *i.p.*).

W oparciu o rezultaty badań ujętych w pracy **H6**, można przyjąć, że dla aktywności przeciwdrgawkowej i/lub przeciwbólowej testowanych związków istotny jest nie tylko odpowiedni fragment aminoalkanolu, ale także długość łańcucha alkilenowego bądź etoksyetylenowego stanowiącego łącznik ugrupowania fenoksy z aminoalkanolem. Zauważono też różnice aktywności w przypadku izomerów konstytucyjnych, w których podstawniki metylowe znajdują się np. w położeniu 2,3-, 2,4- 2,5- czy też 2,6- – związki te wykazują zarówno zróżnicowaną aktywność, jak i neurotoksyczność. Interesującym jest to, że wiele związków zawierających łącznik etoksyetylenowy wykazuje korzystny profil farmakologiczny. Na tej podstawie można potwierdzić znamieny wpływ wszystkich omawianych elementów strukturalnych związków aktywnych: rodzaju i położenia podstawników w pierścieniu aromatycznym, rodzaju aminoalkanolu, a także długości i rodzaju łącznika znajdującego się pomiędzy tymi ugrupowaniami.

Na podstawie analizy struktura-aktywność przeciwdrgawkowa i/lub przeciwbólowa w badanej grupie związków i bardzo korzystne wyniki badań ich aktywności ośrodkowej, można stwierdzić, że w tej grupie związków istnieje duża szansa na znalezienie nowych potencjalnych kandydatów na lek przeciwpadaczkowy i/lub przeciwbólowy, gdyż spośród 28 tytułowych związków 10 wykazuje korzystne parametry farmakologiczne (ED_{50} , TD_{50}) a badania bezpieczeństwa dla aktywnych związków potwierdziły brak ich cytotoksyczności (w tym hepatotoksyczności czy neurotoksyczności).

H7. Waszkielewicz A.M.*, Słoczyńska K., Pękala E., Żmudzki P., Siwek A., Gryboś A., Marona H. 2016, **Design, synthesis, and anticonvulsant activity of some derivatives of xanthone with aminoalkanol moieties.** *Chem. Biol. Drug Des.* 1-14. DOI:10.1111/cbdd.12842.

Praca **H7** stanowi kontynuację badań z zakresu poszukiwania nowych związków o działaniu przeciwdrgawkowym, tym razem w grupie odpowiednich 2-, 3- lub 4-ksantonoksyalkilopochodnych chiralnych bądź achiralnych aminoalkanoli. Przesłanką dla zainteresowania się tą grupą związków były z jednej strony wcześniejsze korzystne rezultaty badań przeciwdrgawkowych przy niskiej neurotoksyczności w grupie odpowiednich 2-ksantonometylopochodnych aminoalkanoli (związki odniesienia **V-VI**, str. 24), z drugiej zaś interesujące było sprawdzenie wpływu wprowadzenia łącznika oksyalkilowego w związkach **8-17** na aktywność przeciwdrgawkową w porównaniu do związków odniesienia **V-VI**, a także wpływu układu ksantonu na aktywność w porównaniu do związków odniesienia **I-IV**.

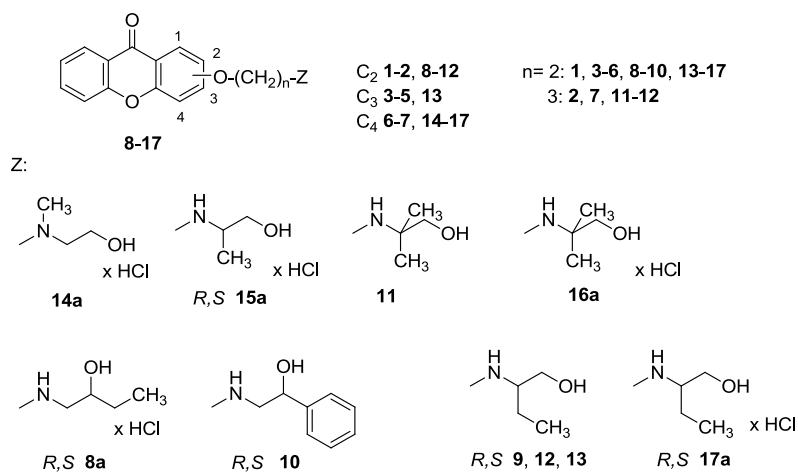


Podobnie jak w pracy **H6**, istotną częścią wstępnych badań było przewidywanie *in silico* parametrów fizykochemicznych dla projektowanych struktur. W tym celu zastosowano oprogramowanie Molinspiration (69), po czym stwierdzono, że wszystkie zaprojektowane związki spełniały literaturowe kryteria (miLogP, TPSA, objętość cząsteczki) dla związków podawanych doustnie, potencjalnie aktywnych na ośrodkowy układ nerwowy. Dodatkowo obliczono LogP z zastosowaniem oprogramowania ChemBioDraw i uzyskano podobne wyniki.

Dla zrealizowania celu badawczego w pracy zsyntezowano 10 nowych ksantonoksyalkilowych pochodnych achiralnych lub chiralnych/racemicznych aminoalkanoli, w tym 5 związków, w których układ ksantonu podstawiony jest w położeniu 2 (związki **8a-12**), 1 związek - w położeniu 3 (związek **13**) i 4 związki - w położeniu 4 (związki **14a-17a**)

(Ryc. 11). Ponadto, do celów badawczych otrzymano 6 związków w postaci chlorowodorków (**8a-9a, 14a-17a**) ($\text{HCl}_{\text{gaz}}/\text{EtOH}$).

Ryc. 11 Struktury tytułowych związków w pracy **H7**

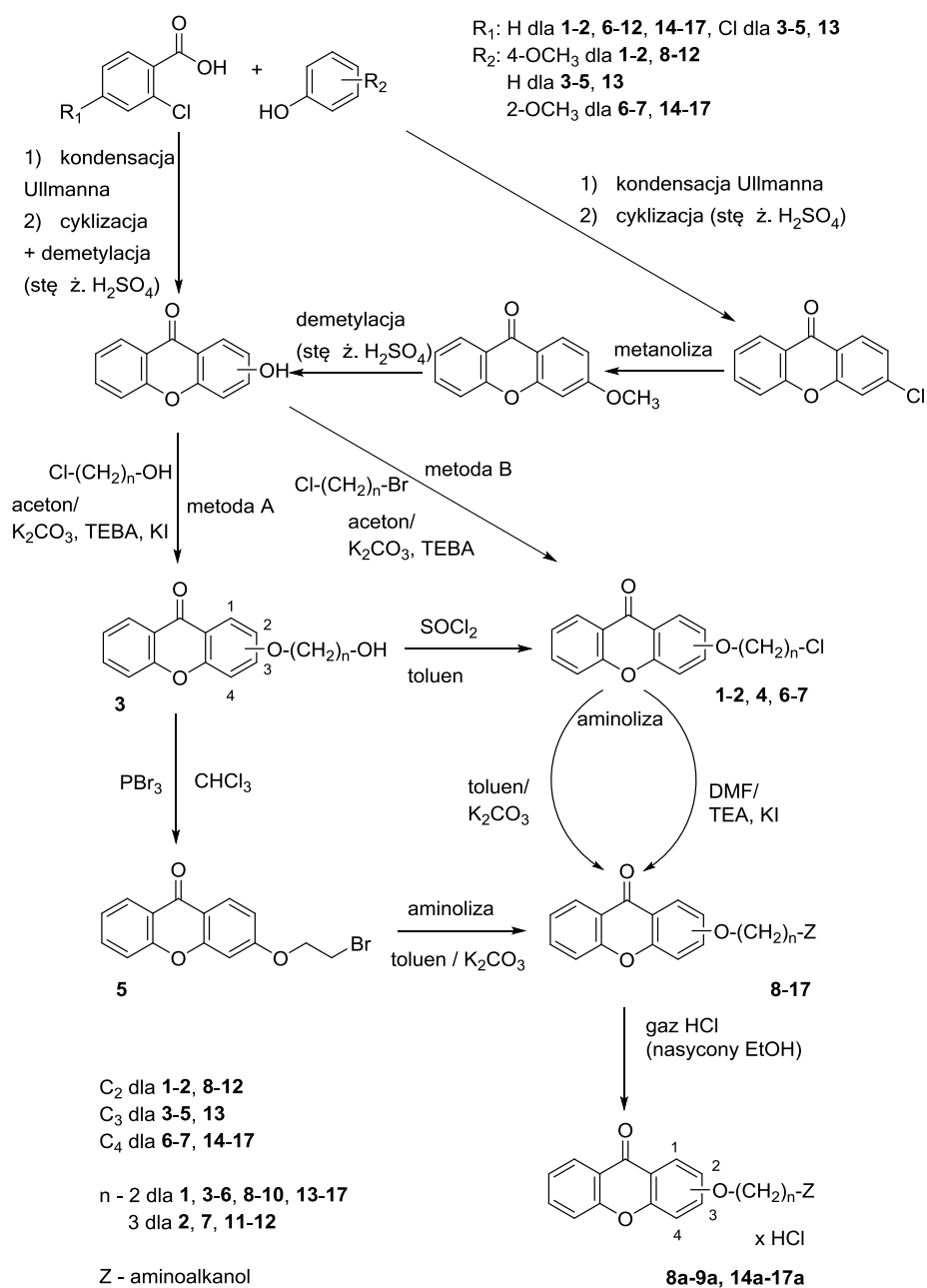


Związki **8-17** otrzymano na drodze aminolizy odpowiednio podstawionych chlorków ksantonoksyalkilowych (w toluenie, w obecności K_2CO_3 lub w DMF w obecności TEA, KI). W pracy dodatkowo dla celów porównawczych (wydajność, czystość) dla otrzymania związku **13** zastosowano jako czynnik alkilujący bromek 3-ksantonoksyetylowy.

Odpowiednie halogenki ksantonoksyalkilowe uzyskano poprzez O-alkilowanie 2-, 3- lub 4-hydroksyksantonu z użyciem 2-chloroetanolu, 3-chloropropanolu (aceton, TEBA, KI). 2-Hydroksyalkoksyłowe pochodne ksantonu poddano chlorowaniu (SOCl_2) lub bromowaniu (PBr_3) dla uzyskania wyżej wymienionych czynników alkilujących aminoalkanoli (**1-2,4-7**).

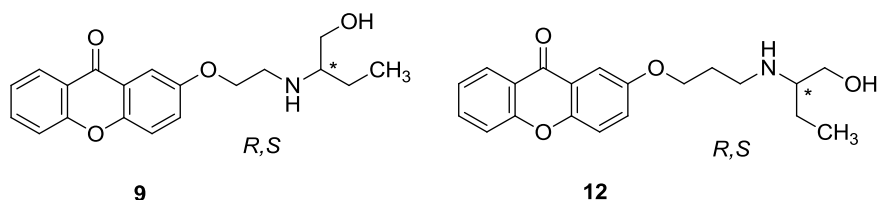
Odpowiedni 2-, 3- lub 4-hydroksyksanton otrzymano w procedurze opracowanej w Zakładzie Chemii Bioorganicznej pod kierunkiem prof. dra hab. Henryka Marony, z zastosowaniem tzw. metody kondensacji Ullmanna, i poddawano reakcji O-alkilowania odpowiednim chloroalkanolem a następnie podstawiano chlorem grupę OH (SOCl_2) (**metoda A**). Dla optymalizacji wydajności procesu prowadzono też reakcję O-alkilowania odpowiedniego hydroksyksantonu, stosując 1-bromo-2-chloroetan lub 1-bromo-3-chloropropan (aceton, K_2CO_3 , TEBA, KI) (**metoda B**). Niestety w przypadku metody B czystość uzyskanych produktów okazała się niezadowalająca w porównaniu do wcześniej opisaną dwuetapową metody pozyskiwania tego typu związków.

Ryc. 12 Metody otrzymywania tytułowych związków w pracy **H7**



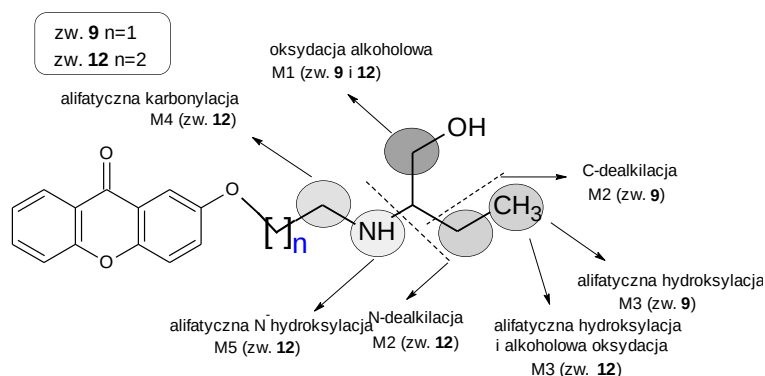
W trakcie prac syntetycznych odnotowano znaczną różnicę T_f dla jednego z półproduktów tj. 3-(2-hydroksyetykso)-9H-ksanten-9-on (związek **3**) w stosunku do literaturowej T_f (o około 70 °C). Związek ten poddany chlorowaniu (SOCl₂) czy też bromowaniu (PBr₃) tworzył odpowiedni halogenek (o wysokim stopniu czystości w LC-MS odpowiednio 100% i 96,78%). Aminoliza tych związków z zastosowaniem aminoalkanolu dawała produkt o identycznych parametrach, co poza danymi fizykochemicznymi (LC-MS 100%, ¹H NMR, ¹³C NMR) również dowodzi o właściwej strukturze uzyskanego związku.

Otrzymane związki **8a**, **9-13**, **14a-17a** przebadano farmakologicznie w ramach programu **ADD** w amerykańskim **Narodowym Instytucie Zdrowia** (9) w przesiewowych testach MES, ScMet, TOX w czasie 0,5 oraz 4,0 h po podaniu *i.p.* myszom. Interesującym rezultatem badań jest zróżnicowana aktywność (bądź jej brak) testowanych związków (MES, myszy, *i.p.*) w zakresie dawek 30-300 mg/kg. Najsilniej zaznaczoną aktywność przeciwdrgawkową wykazały związki **9** i **12**, które w dawce 100 mg/kg wykazywały 100% działanie protekcyjne, 0,5 h od momentu podania. Dla związków **9** i **12** to ochronne działanie utrzymywało się na podobnym poziomie (odpowiednio 100 i 75%) po 4 h i - co ciekawe – neurotoksyczność w tym czasie malała. Interesującą obserwację odnotowano dla związku **13**, strukturalnego analogu związku **9**, który charakteryzuje się słabym działaniem przeciwdrgawkowym, ale w porównaniu do związku **9** nie jest neurotoksyczny.



Następnie związki aktywne w MES przebadano na szczurach, *p.o.* W tym badaniu okazało się, że związki **9** i **12** – odpowiednio *(R,S)*-2-{2-[(1-hydroksybutan-2-ylo)amino]etoksy}-9*H*-ksanten-9-on oraz *(R,S)*-2-{3-[(1-hydroksybutan-2-ylo)amino]propoksy}-9*H*-ksanten-9-on – wykazują aktywność odpowiednio po 2 lub 4 h od podania. Ta obserwacja sugeruje działanie metabolitu, a nie substancji podanej zwierzęciu. Wobec tego, dla obydwu związków przeprowadzono symulację metabolizmu *in silico* (oprogramowanie MetaSite), a następnie badanie stabilności metabolicznej i wyznaczenie metabolitów z zastosowaniem szczurzych mikrosomów oraz metod LC-MS/MS (Ryc. 13).

Ryc. 13 Wyniki badań metabolizmu *in vitro* związków **9** i **12** w pracy **H7**



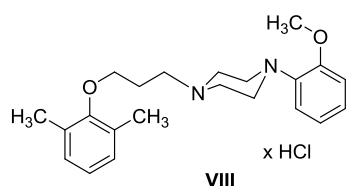
Związek **12** przebadano także w teście pilokarpinowym (program **ADD** w **Narodowym Instytucie Zdrowia**, Stany Zjednoczone) stanowiącym mysi model stanu padaczkowego (*i.p.*) i w tym teście zaobserwowano aktywność w dawce 100 mg/kg po 4 h oraz w dawce 300 mg/kg po 0,25 h od podania związku, co wskazuje na możliwość przerywania stanu padaczkowego.

Mając na uwadze powinowactwo związków **IIIa** i **IV** do receptorów serotoninergicznych, przeprowadzono wstępne badania powinowactwa związków **8a**, **9** i **12** do receptorów 5-HT_{1A}, 5-HT₆ i 5-HT₇, największe powinowactwo do 5-HT_{1A} zaobserwowano dla **8a** ($K_i=3,2 \cdot 10^{-7}$ M), związek **9** wykazywał K_i (5-HT_{1A})= $6,59 \cdot 10^{-7}$ M, co pod względem powinowactwa do receptorów 5-HT_{1A} przewyższa związki odniesienia (zw. **IIIa** K_i (5-HT_{1A})= $1,7 \cdot 10^{-6}$ M, zw. **IV** K_i (5-HT_{1A})= $1,3 \cdot 10^{-6}$ M).

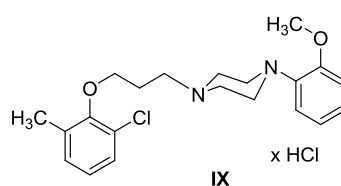
Reasumując, spośród wszystkich uzyskanych pochodnych ksantonu przebadanych przeciwdrgawkowo, najbardziej aktywne okazały się pochodne podstawione w pozycji C2, pochodne (*R,S*)-2-aminobutan-1-olu, a łącznik pomiędzy tymi ugrupowaniami stanowiło ugrupowanie oksyetylenowe lub oksytrimetylenowe. Jednocześnie, porównując wyniki farmakologiczne najbardziej aktywnych związków **9** i **12** ze związkami odniesienia **I**, **IV-VI** (str. 21-23), można stwierdzić, że zastosowanie odpowiedniego układu ksantonoksyalkilowego w miejsce odpowiedniego układu fenoksyalkilowego (**I**, **IV**) czy też ksantonometylowego (**V-VI**), na tym etapie badań nie jest korzystne z punktu widzenia potencjalnej aktywności przeciwdrgawkowej. Jednocześnie, niewykluczone jest, że planowanie badania na większej grupie związków w tym enancjomerów pozwoli na wyselekcjonowanie związków o aktywności przeciwdrgawkowej co najmniej porównywalnej do związków odniesienia.

H8. Waszkielewicz A.M.*, Kubacka M., Pańczyk K., Mogilski S., Siwek A., Głuch-Lutwin M., Gryboś A., Filipek B. 2016, Synthesis and activity of newly designed aroxyalkyl or aroxyethoxyethyl derivatives of piperazine on the cardiovascular and the central nervous systems. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26: 5315-5321.

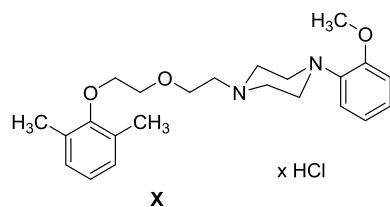
Z uwagi na korzystne właściwości w tym profil adrenergiczny i serotoninericzny związków odniesienia **VIII-XI** (str. 25-26), podjęto dalsze prace z zakresu projektowania i syntezy nowych związków – uwzględniając możliwość uzyskania aktywności ośrodkowej i/lub ewentualnie aktywności adrenolitycznej, krążeniowej. Celem pracy była synteza i badania farmakologiczne nowych związków stanowiących homologi bądź analogi związków **VIII-XI** (54) zawierające układ *N*-fenylopiperazyny lub *N*-(2-metoksyfenylo)piperazyny. Interesujący był przy tym zarówno wpływ podstawników w ugrupowaniu fenoksy, jak i łącznika pomiędzy tym ugrupowaniem a piperazyną na parametry farmakologiczne nowych związków w porównaniu do związków odniesienia. Na podstawie wyników badań farmakologicznych dla **VIII-XI** istniały przesłanki, iż możliwe będzie uzyskanie selektywnych związków pod względem aktywności ośrodkowej lub krążeniowej. Interesująca była przy tym rola łącznika alkilenowego bądź etoksyetylenowego i pochodnej piperazyny dla obserwowanych aktywności.



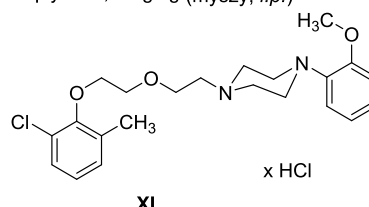
α_1 $K_i=2,4$ nM antagonist
 α_2 $K_i=341$ nM
 5-HT_{1A} $K_i=0,7$ nM antagonist
 agonista presynaptycznych rec. 5-HT_{1A}
 antagonist postsynaptycznych rec. 5-HT_{1A}



α_1 $K_i=2,1$ nM
 α_2 $K_i=128$ nM
 5-HT_{1A} $K_i=0,5$ nM antagonist
 agonista presynaptycznych rec. 5-HT_{1A}
 test zawieszania za ogon 2,5 mg/kg (myszy, *i.p.*)
 test wymuszonego pływania 10 mg/kg (myszy, *i.p.*)
 test 4 płytek 2,5 mg/kg (myszy, *i.p.*)



5-HT_{1A} $K_i=41$ nM
 α_1 $K_i=23$ nM
 α_2 brak powinowactwa
 β_1 brak powinowactwa
 test zawieszania za ogon:
 aktywność w 2,5 mg/kg (myszy, *i.p.*)
 ruchliwość spontaniczna:
 ED₅₀=21,8 mg/kg (myszy, *i.p.*)



5-HT_{1A} $K_i<1$ nM
 α_1 $K_i=13$ nM
 α_2 brak powinowactwa
 β_1 brak powinowactwa
 test zawieszania za ogon:
 aktywność w 2,5 mg/kg (myszy, *i.p.*)
 ruchliwość spontaniczna:
 ED₅₀=17,5 mg/kg (myszy, *i.p.*)

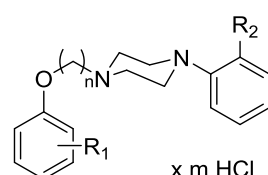
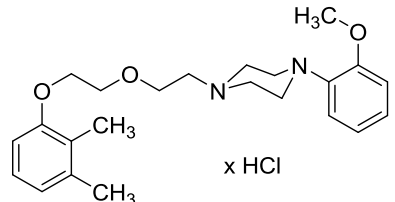
W pracy **H8** uzyskano nowe pochodne fenoksyalkilo- (**1-4**) lub *N*-{2-[2-(fenoksy)etoksy]etylo}piperazyny (**5**), zawierających ugrupowanie fenyłowe bądź 2-metoksyfenylowe, w formie chlorowodorków.

Istotną częścią pracy było przewidywanie *in silico* właściwości fizykochemicznych związków (oprogramowanie Molinspiration), w których tak jak w pracach **H3**, **H6-H7** obliczono takie parametry jak miLogP czy TPSA, mające znaczenie w procesie przenikania związków przez błony biologiczne (istotne przy podaniu doustnym czy przy przenikaniu barierę krew-mózg). Jedynie związek **4** wykazywał dopuszczalne 1 odchylenie od reguły Lipinskiego (masa cząsteczkowa >500 g/M), co nie wykluczało go z dalszych badań.

Do celu potwierdzenia tożsamości i czystości tytułowych związków, w pracy zastosowano metody spektralne (¹H NMR, ¹³C NMR, IR, LC-MS). Na podstawie decyzji wydawcy, część metodyki pracy poza syntezą i danymi fizykochemicznymi związków, zawarta jest w pliku *Supplementary materials*, dostępnym online: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.09.037>.

Związki **1-5** były otrzymane poprzez aminolizę odpowiednich bromków fenoksyalkilowych (dla **1-4**) bądź bromku 2-[2-(2,3-dimetylofenoksy)etoksy]etyłowego (dla **5**) w toluenie wobec K₂CO₃ i były wydzielane w postaci chlorowodorków poprzez nasycanie roztworów zasad gazowym chlorowodorem (aceton/EtOH). Bromki (2,3-dimetylofenoksy)etyłowy i -propylowy były otrzymane według wcześniej opisanych procedur tj. poprzez *O*-alkilowanie 2,3-dimetylofenolu przy pomocy 2-chloroetanolu bądź 3-chloropropan-1-olu (K₂CO₃, TEBA, aceton), a następnie bromowanie produktu (PBr₃). Z kolei bromki 2,6-dimetylo- oraz (2-chloro-6-metylofenoksy)butylowe uzyskano stosując jednoetapową metodę *O*-alkilowania odpowiedniego fenolu 1,4-dibromobutanem (wobec NaOH). Bromek 2-[2-(2,3-dimetylofenoksy)etoksy]etyłowy otrzymano uprzednio poprzez *O*-alkilowanie 2,3-dimetylofenolu 2-(2-chloroetoksy)etanolem w acetonie wobec K₂CO₃ i TEBA i podstawienie grupy OH atomem bromu przy udziale PBr₃.

Ryc. 14 Struktury tytułowych związków i powinowactwo do wybranych receptorów w pracy **H8**

związek	n	R ₁	R ₂	m	K _i [nM]		
					α ₁	α ₂	5-HT _{1A}
	2	2,3-(CH ₃) ₂	H	2	159	289	12,3
	3	2,3-(CH ₃) ₂	H	2	33	810	5,4
	4	2,6-(CH ₃) ₂	OCH ₃	1	23,5	370,5	2,0
	4	2-Cl-6-CH ₃	H	2	59,6	506	4,0
					28,5	893	5,0

Analogicznie jak związki odniesienia, które wykazywały powinowactwo zarówno do receptorów adrenergicznych jak i serotonergiczych, badane związki **1-5** poddano badaniom radioreceptorowym w kierunku powinowactwa do receptorów α₁, α₂, β₁ i 5-HT_{1A}. Wszystkie badane związki wykazują nanomolarne wartości stałych wiązania do receptorów α₁ oraz 5-HT_{1A} oraz korzystnie znacznie słabsze wiązanie do receptorów α₂, ponadto nie wiążą się z receptorami β₁ aż do stężenia 50 μM (Ryc. 14).

Związki **1-5** były przedmiotem badań *ex vivo* i *in vivo* w Katedrze Farmakodynamiki UJ CM pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Barbary Filipek (Pani dr Monika Kubacka). Badania funkcjonalne (dotyczące antagonizmu) receptorów α₁ dla tych związków były realizowane z zastosowaniem aorty szczura, poprzez obserwacje zahamowania skurczów indukowanych noradrenaliną. Wszystkie badane związki wykazywały antagonizm względem tych receptorów, jednak obserwacje krzywych badań funkcjonalnych wskazywały na interakcje tych związków także z innymi receptorami obecnymi w aorcie. Inną możliwością braną pod uwagę jest powolne oddysocjowywanie związku od receptora lub też allosteryczna modyfikacja receptora.

Następnie wszystkie badane związki oceniono pod kątem obniżania ciśnienia tętniczego krwi po podaniu dożylnym *i.v.* (szczury), rozpoczynając od dawki 1 mg/kg, a następnie obniżając ją do zaniku aktywności hipotensyjnej. Najsilniej działającym hipotensyjnie związkiem okazał się związek **3**: chlorowodorek 1-[(2,6-dimetylofenoksy)butylo]-4-(2-metoksyfenylo)piperazyny obniżający ciśnienie skurczowe w dawce 0,1 mg/kg 30 i 60 min. po podaniu związku. Związek ten także przebadano pod kątem odpowiedzi na różne bodźce takie jak adrenalina, noradrenalina oraz metoksamina. Profil uzyskanych wyników odpowiedzi na te bodźce potwierdza obserwacje z badań

radioreceptorowych, że związek **3** jest znacznie bardziej selektywny względem receptorów α_1 niż α_2 .

Związek **3** jest homologiem butylowym związku odniesienia **VIII** (pochodna trimetylenowa, str. 26) oraz tetrametylenowym analogiem związku odniesienia **X** (pochodna etoksyetylenowa, str. 26). Związek **3** podobnie do związku **VIII** wykazuje antagonizm względem receptorów adrenergicznych oraz powinowactwo do receptorów 5-HT_{1A}. Z punktu widzenia powinowactwa do receptorów α_1 , α_2 i 5-HT_{1A} można zauważyć, że profil wiązania do tych receptorów jest bardzo podobny, związki **3** i **VIII** nieznacznie różnią się powinowactwem względem α_2 , natomiast różnią się od związku **X** (zw. **3** K_i=370 nM, zw. **VIII** K_i=341 nM, zw. **X** brak powinowactwa). Natomiast aktywność hipotensyjna *in vivo* obserwowana dla związku **3** bez wyraźnej aktywności ośrodkowej, w porównaniu do aktywności przeciwdepresyjnej np. związku **X** jest zaskakująca i dowodzi istotnego wpływu łącznika pomiędzy ugrupowaniem ksilenoksy a *N*-(2-metoksyfenylo)piperazyną. Tym bardziej, że związek **X** nie wykazuje działania hipotensyjnego (str. 26) (56-57).

Nieco słabiej działającym od związku **3**, ale również istotnie aktywnym okazał się związek **4**: dichlorowodorek 1-[4-(2-chloro-6-metylofenoksy)butylo]-4-fenylopiiperazyny, który w dawce 0,5 mg/kg obniżał istotnie ciśnienie krwi 60 min. od podania.

Podsumowując analizę struktura-aktywność hipotensyjna, należy zwrócić uwagę, iż obydwa najbardziej aktywne związki **3** i **4** obniżające ciśnienie krwi zawierają podstawniki w położeniach 2,6 (podstawienie dimetylowe bądź chlor i metyl) a łącznik pomiędzy ugrupowaniem fenoksy oraz piperazyną stanowi ugrupowanie tetrametylenowe. Z kolei ugrupowanie fenylopiiperazynowe w przypadku związku **3** zawiera podstawnik 2-OCH₃, w przeciwieństwie do związku **4**. Wskazuje to, iż mimo powyższej aktywności hipotensyjnej obydwu związków obecność grupy metoksylowej jest korzystniejsza w tym przypadku z uwagi na nieco silniejsze działanie w porównaniu do związku **4**.

W związku z zaobserwowanym silnym powinowactwem związków **1-5** do receptora 5-HT_{1A} celem było sprawdzenie ich aktywności ośrodkowej (przeciwdepresyjnej) i do tego celu zastosowano test wymuszonego pływania (test Porsolta, myszy, *i.p.*). Spośród badanych związków, **4**: dichlorowodorek 1-[4-(2-chloro-6-metylofenoksy)butylo]-4-fenylopiiperazyny i **5**: chlorowodorek 1-{2-[2-(2,3-dimetylofenoksy)etoksy]etylo}-4-(2-metoksyfenylo)piperazyny wykazały istotną statystycznie aktywność przeciwdepresyjną

odpowiednio w dawkach 10 mg/kg lub 5 mg/kg (w porównaniu do imipraminy wykazującej aktywność w dawce 10 mg/kg). Z uwagi na konieczność zweryfikowania, czy aktywność ta jest specyficzna i nie odnosi się do działania psychostymulującego, przeprowadzono dodatkowe badanie wpływu związków **4** i **5** na ruchliwość spontaniczną myszy w dawkach aktywnych przeciwdepresyjnie (*i.p.*) i to badanie potwierdziło specyficzność działania przeciwdepresyjnego (brak działania amfetaminopodobnego).

Związek **4** stanowi analog związków odniesienia **IX** i **XI**, zawierający ugrupowanie fenylopiperazynowe (bez 2-OCH₃) i łącznik tetrametylenowy i wykazuje podobną aktywność przeciwdepresyjną w stosunku do związku **IX** (test wymuszonego pływania). Dowodzi to, iż ugrupowanie 2-OCH₃ nie jest konieczne dla uzyskania aktywności przeciwdepresyjnej w tej grupie związków.

Z kolei związek **5** stanowi izomer konstytucyjny związku **X**, zawierający podstawniki metylowe w położeniach 2,3 a nie 2,6 (jak to jest w zw. **X**). Jego powinowactwo do receptora 5-HT_{1A} jest 8-krotnie większe ($K_i=5$ nM) niż związku dla zw. **X** ($K_i=41$ nM), aktywność ośrodkowa (przeciwdepresyjna) mierzona testem wymuszonego pływania (zw. **5**) lub testem zawieszania za ogon (zw. **X**) jest porównywalna (dla zw. **5** w 5 mg/kg, dla zw. **X** w 2,5 mg/kg, w odmiennych testach). To porównanie dowodzi, iż wpływ położenia podstawników metylowych w ugrupowaniu fenoksy na aktywność przeciwdepresyjną w tej grupie związków jest niewielki.

Na podstawie dokonanych obserwacji można wnioskować, iż w badanej grupie można wyselekcjonować związki o specyficznym działaniu ośrodkowym (przeciwdepresyjnym), czy także hipotensyjnym, realizując przyjętą metodykę badań. Jednocześnie, jak wskazują zaprezentowane wyniki, istnieją przesłanki do prowadzenia dalszych badań na większej grupie związków, dokonując sukcesywnego rozdzielenia pochodnych fenylopiperazyny na osobno wskazania schorzeń ośrodkowych oraz krążeniowych.

8.2. Podsumowanie osiągnięć stanowiących podstawę habilitacji

Przedstawiony do oceny cykl prac otwierają dwie prace przeglądowe **H1-H2**, dostarczające danych porównawczych z zakresu aktywnych przeciwdrgawkowo lub przeciwbólowo dawek, mechanizmów działania leków (i związków w fazie badań) na ośrodkowy układ nerwowy (w tym stałych wiązania do receptorów/kanałów jonowych), w tym w zakresie szczególnie interesującej mnie aktywności przeciwdrgawkowej, przeciwbólowej w bólu neuropatycznym **H1-H2** a także przeciwdepresyjnej **H2**. Ze względu na fakt, iż neurony wykazują aktywność elektryczną i ta aktywność w schorzeniach ośrodkowego układu nerwowego jest zaburzona – dokonano przeglądu literatury w zakresie możliwych mechanizmów działania na kanały jonowe (w tym także pośrednio przez np. receptory GABA_A, ASIC, czy TRP) (**H2**).

Przestudiowanie obszernej literatury z tego obszaru wiedzy stanowiło ważny punkt wyjścia dla projektowania stosownych kierunków badań syntetycznych, fizykochemicznych, a szczególnie farmakologicznych, a także w zakresie ich bezpieczeństwa czy też stabilności metabolicznej.

W strategii poszukiwania nowych związków o spodziewanym działaniu ośrodkowym w pracach **H3-H8** skupiono się głównie na optymalizacji wcześniej otrzymanych struktur wiodących **I-VI** (str. 21-22) oraz **VIII-XI** (str. 25-26), dla których wykonano szeroki zakres badań farmakologicznych i bezpieczeństwa, a dla wybranych związków badań formulacji i biodostępności.

Projektowanie związków biologicznie aktywnych poparto metodami obliczeniowymi *in silico* dla znanych parametrów mających wpływ na przenikanie związków przez błony biologiczne (topologiczne pole polarnej powierzchni TPSA, lipofilowość logP, objętość związku, masa cząsteczkowa) a także powinowactwo do tkanki mózgowej (lipofilowość) – zastosowano oprogramowanie Molinspiration oraz ChemBioDraw.

Rezultatem przeprowadzonych prac badawczych stanowiących podstawę habilitacji dokonano syntezy wielu nowych związków (103) stanowiących odpowiednie homologi lub analogi związków wiodących. Zadania badawcze dotyczyły zaprojektowania kolejnych nowych związków w grupie pochodnych aroksyalkilo a następnie 2-[2-(aroksy)etoksy]etylo pochodnych chiralnych i achiralnych aminoalkanoli. W oparciu o analizę struktura-aktywność

przeciwdrgawkowa i/lub przeciwbólowa struktur substancji, których właściwości są opisane kolejno w pracach **H3-H7**. Dla otrzymania wszystkich związków podjęto próby optymalizacji warunków syntezy półproduktów i końcowych związków, a także wykonano pełny panel badań potwierdzających ich strukturę (LC-MS, ^1H NMR, ^{13}C NMR, i/lub IR), a ich czystość w badaniach chromatograficznych. Dla wielu z nich przeprowadzono badania czystości optycznej a także krystalograficzne potwierdzające konfigurację odpowiednich struktur enancjomerycznych.

Dla kilku aktywnych związków, które w trakcie syntezy tworzyły odmiany poli- bądź pseudopolimorficzne wykonano badania stosując technikę różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC), co w niektórych przypadkach potwierdziło polimorfizm, a trwałość termiczną tych związków określono metodą termograwimetrii (TG) (**H3**).

Dla wybranych najbardziej aktywnych przeciwdrgawkowo i przeciwbólowo związków dokonano prób określenia ich mechanizmu działania poprzez badania radioreceptorowe (82 receptory w tym α_{1-2} , β_{1-2} , M_{1-5} , $D_{1-4.4}$, 5-HT $_{1A-7}$, opioidowe δ , κ , μ a także nieopiodowe σ , kanały jonowe w tym Na^+ , K^+ , Ca^{2+} a także transportery w tym serotoniny, noradrenaliny oraz dopaminy) (**H3**, **H5**). W przypadku związków z grupy pochodnych *N*-fenoksyalkilo- i *N*-{2-[2-(fenoksy)etoksy]etylo}piperazyny obok ustalenia powinowactwa do receptorów adrenergicznych α_1 , α_2 , serotoninowego 5-HT $_{1A}$, zostały wykonane funkcjonalne badania farmakologiczne *ex vivo* oraz badania *in vivo* celem ustalenia ich aktywności przeciwdepresyjnej i krążeniowej (**H8**).

Dla wybranych aktywnych przeciwdrgawkowo związków wykonane zostały również badania farmakokinetyczne w zakresie ich biodostępności, w różnych drogach podania (*i.p.*, *p.o.* względem *i.v.*). Ważnym elementem prac badawczych było określenie dla większości związków ich bezpieczeństwa (tj. mutagenności bądź antymutagenności) w teście Amesa i/lub *Vibrio harveyi*, a także ich ewentualnej neurotoksyczności (w tym *in vivo* rotarod, test kominowy, badanie wpływu na aktywność spontaniczną), cytotoksyczności (astrocyty CRL-2534, neuroblastoma SH-SY5Y) w tym hepatotoksyczności (Hep G2) często obserwowanej w grupie niektórych leków przeciwpadaczkowych.

Dla wybranych związków najbardziej aktywnych zostały wykonane dodatkowe badania bezpieczeństwa jak ustalenie wpływu na aktywność spontaniczną (test aktywności spontanicznej, myszy) czy test kominowy odnoszący się do ich ewentualnej neurotoksyczności.

Stosując program MetaSite dokonano symulacji metabolizmu *in silico* aktywnych struktur, a dla kilku wybranych aktywnych struktur przeprowadzono badania *in vitro* stabilności metabolicznej na odpowiednio mysich lub szczurzych mikrosomach wątrobowych (prace **H3** i **H5**).

Wyniki przeprowadzonych multidyscyplinarnych badań związków z grupy aroksyalkilo- oraz (2-aroksyetoksy)etylo pochodnych aminoalkanoli i piperazyny o potencjalnym działaniu ośrodkowym pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

1. W grupie badanych *N*-[(2,6-dimetylofenoksy)alkilo]aminoalkanoli (**H3**) istotnym dla aktywności przeciwdrgawkowej i przeciwbólowej jest obecność odpowiedniego aminoalkanolu, w tym enancjomerycznych struktur, a także łącznika alkilenowego. Rezultaty badań farmakologicznych wybranych związków w formie zasad i soli (chlorowodorów) potwierdzają ich porównywalną skuteczność w protekcji drgawek w większości wykonywanych testów. Istotnym elementem w przypadku niektórych związków badanych w formie soli jest stwierdzona możliwość powstawania odmian polimorficznych, co ma znaczenie m.in. w badaniach biodostępności.
2. Analiza struktura-aktywność w grupie związków objętych pracami **H4-H5** wykazała, że wprowadzenie łącznika etoksyetylenowego w grupie fenoksyalkilo oraz 2-(fenoksyetoksy)etylo pochodnych aminoalkanoli daje pozytywny efekt wyrażający się porównywalną do związków odniesienia skutecznością w różnych modelach drgawek, a także w teście aktywności przeciwbólowej w bólu neurogennym.
3. Wprowadzenie podstawników metylowych w położenia 2,3-dimetylo, 2,4-dimetylo bądź 2,4,6-trimetylo do struktur fenoksyetylo- bądź (3-fenoksypropylo)aminoalkanoli nie jest korzystne dla ich aktywności przeciwdrgawkowej w porównaniu do struktur odniesienia **I-III** (str. 21) (**H4-H5**).
4. Wprowadzenie do układu fenoksy podstawników metylowych oraz chloru i grupy metylowej w różnych położeniach powoduje zróżnicowaną aktywność badanych związków, zależną m.in. od rodzaju aminoalkanolu i łącznika alkilenowego czy etoksyetylenowego. Ważnym jest to, że (2-chloro-6-metylofenoksy)butylowy (związek **15**) homolog jednego z najbardziej aktywnych przeciwdrgawkowo i przeciwbólowo związków odniesienia **IV** (str. 21) ze względu na stosunkowo

niski indeks terapeutyczny nie został zakwalifikowany do poszerzonych badań farmakologicznych. Świadczy to o dużej trudności w projektowaniu aktywnych przeciwdrgawkowo i przeciwbólowo związków w tej grupie pochodnych. Jednocześnie, spośród 28 zbadanych i aktywnych związków nie stwierdzono ich toksycznego działania w szerokim panelu badań bezpieczeństwa (testy cytotoksyczności, hepatotoksyczności oraz neurotoksyczności) (**H6**).

5. Zastąpienie benzenu ugrupowaniem ksantonu z łącznikiem oksyetylenowym lub oksytrimetylenowym w różnych położeniach tego układu połączonych z m.in. aminoalkanolami obecnymi w strukturach odniesienia **I-IV** (str. 21) i **V-VI** (str. 25-26) nie przyniosło spodziewanych efektów pod względem aktywności przeciwdrgawkowej spośród podstawień w układzie ksantonu w położeniach C-2, C-3 i C-4, przy czym najbardziej aktywne pochodne były podstawione w położeniu C-2 (**H7**).
6. Wstępne badania związków stanowiących odpowiednie analogi bądź homologi związków odniesienia (**H8**) wskazują na ich bardzo wysokie powinowactwo do receptorów serotonergicznych 5-HT_{1A} oraz wysokie powinowactwo zarówno do receptorów adrenergicznych α_1 i α_2 (jednak z mniejszą selektywnością do α_1 względem α_2 niż związki odniesienia), ponadto związki te cechuje antagonizm względem receptorów α_1 . Fenylopiperazynowe bądź (2-metoksyfenylo)piperazynowe analogi lub homologi związków odniesienia **VIII-XI** z łącznikiem etylenowym, tri- bądź tetrametylenowym a także etoksyetylenowym cechuje aktywność przeciwdepresyjna i/lub hipotensyjna. Związek **3** w tej grupie jest tetrametylenowym homologiem związku odniesienia **VIII** (zawierającego łącznik trimetylenowy). Badania wykazały, że związek **3** wykazuje aktywność krążeniową w przeciwieństwie do związków odniesienia **VIII** i **X**, a także w przeciwieństwie do związków odniesienia nie wykazuje aktywności ośrodkowej. Dowodzi to istotności rodzaju i długości łącznika pomiędzy ugrupowaniem ksylenoksy a (2-metoksyfenylo)piperazyną. Jednak, co ciekawe, takich zależności nie zaobserwowano w przypadku analogu 2-chloro-6-metylowego związku **3** - związku **4** z łącznikiem tetrametylenowym stanowiącego homolog związku odniesienia **IX** i tetrametylenowy analog związku odniesienia **XI**.
7. Wprowadzenie podstawników metylowych w położenie 2,3 w porównaniu do izomerycznego związku odniesienia **X** nie zmienia profilu jego aktywności

ośrodkowej i krążeniowej, tak jak to zaobserwowano w przypadku znacznego osłabienia siły działania przeciwdrgawkowego izomerów konstytucyjnych zawierających podstawniki 2,6-(CH₃)₂, 2,3-(CH₃)₂ lub 2,4-(CH₃)₂ w grupie pochodnych aminoalkanoli.

Dotychczasowe wyniki badań farmakologicznych i w zakresie analizy struktura-aktywność znacznej biblioteki związków przebadanych w wielu zwierzęcych modelach drgawek, testów aktywności przeciwbólowej czy też aktywności przeciwdepresyjnej, w tym badań ilościowych i funkcjonalnych, a także oceniających ich bezpieczeństwo, potwierdzają jak się wydaje zasadność dalszych badań, w tym badań toksyczności przewlekłej dla wybranych związków, a także syntezy nowych analogów oraz homologów najbardziej aktywnych związków.

9. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze

9.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Moją działalność naukowo-badawczą rozpoczęłam w 2003 r. wraz z pracą magisterską pt. „**Modyfikacje kwasu γ -hydroksymasłowego i ich znaczenie w farmacji**”, wykonaną pod kierunkiem Pana prof. dra hab. Jacka Bojarskiego w Katedrze Chemii Organicznej na Wydziale Farmaceutycznym CMUJ. Była to praca przeglądowa dotycząca kwasu γ -hydroksymasłowego, jego funkcji jako substancji endogennej w ośrodkowym układzie nerwowym oraz jako leku m.in. na narkolepsję, a także właściwości pochodnych tego kwasu mających różne zastosowania (badawcze, toksykologiczne, lecznicze) i roli tych substancji. Wyniki tej pracy zostały opublikowane w postaci publikacji przeglądowej (1) w impaktowanym czasopiśmie, a sama praca zajęła pierwsze miejsce w wydziałowym konkursie prac magisterskich. W tym okresie miałam możliwość zapoznać się z publikacjami i kierunkiem prac badawczych dra hab. Henryka Marony, skupiających się m.in. na poszukiwaniu związków o działaniu ośrodkowym (przeciwdrgawkowym, a także przeciwbólowym).

Pragnąc kontynuować pracę naukową, w tym samym roku podjęłam studia doktoranckie na Wydziale Farmaceutycznym, w Zakładzie Technologii Chemicznej Środków Leczniczych przy Katedrze Chemii Farmaceutycznej CMUJ, pod kierunkiem Pana dra hab. Henryka Marony, którego prace badawcze ukierunkowane były m.in. na poszukiwania związków o działaniu ośrodkowym.

Moje prace badawcze dotyczyły poszukiwania związków aktywnych ośrodkowo lub krążeniowo w grupie pochodnych aroksyalkilo- bądź aroksyacetyloamin, w których komponentę aminową stanowiły m.in. aminoalkanol oraz pochodne piperazyny. W tym okresie zapoznałam się z procedurami stosowanymi w syntezie tego typu związków, jak i interpretacji wyników badań farmakologicznych testowanych związków, czy też analizą danych spektralnych (w tym ^1H NMR i ^{13}C NMR) potwierdzających założoną strukturę związków. Korzystne wyniki badań przeciwdrgawkowych związków otrzymanych wcześniej przez Pana dra hab. Henryka Maronę (zw. odniesienia **I-III**, str. 22) stanowiły istotną przesłankę do podjęcia poszukiwania nowych związków o działaniu przeciwdrgawkowym w grupie ich analogów strukturalnych: 2-chloro-5-metylo-, 4-chloro-3-metylo-, 4-chloro-2-metylo-, 2-chloro-6-metylo- bądź 2,5-dimetylo- pochodnych (fenoksyetylo)aminoalkanoli,

a także ich niektórych fenoksyacetylowych analogów, bądź odpowiednich fenoksypropylowych homologów (41-42, 71). Warto zaznaczyć, iż w grupie fenoksyacetamidowych struktur przeprowadzona była synteza obok amidoalkanolowych również odpowiednich *N*-fenoksyacetylopochodnych aminokwasów (*D,L*, *D* lub *L*) m.in. jako potencjalnych metabolitów (45).

Jedną z grup badanych związków o potencjalnym działaniu ośrodkowym była synteza i badania w grupie 4-(benzyloksy)benzoilo- i [4-(benzyloksy)benzylo]aminoalkanoli w tym optycznie czynnych, w kierunku aktywności przeciwdrgawkowej (72). Podjęcie zadań syntezy tych związków a także produktów wyjściowych wiązało się z opracowaniem warunków optymalizacji metod syntezy. Stąd np. w przypadku syntezy związków o charakterze amin stosowano tradycyjne metody *N*-alkilowania obok alternatywnych metod jak redukcja struktur amidowych stosując LiAlH_4 . Dla otrzymania *N*-acylowych pochodnych stosowano metodę mieszanych bezwodników bądź z użyciem chlorków kwasowych w środowisku dwufazowym (toluen/ H_2O). Badania aktywności przeciwdrgawkowej i przeciwbólowej prowadzone były w ramach współpracy z amerykańskim **Narodowym Instytutem Zdrowia** (NIH, Bethesda) a badania spektralne z Pracownią Spektroskopii NMR Wydziału Chemii UJ (dr Edward Szneler), oraz Pracownią Spektroskopii Magnetycznego Rezonansu Jądrowego Katedry Chemii Organicznej UJ CM (dr hab. Marek Cegła, dr Marek Żylewski).

Rezultaty badań m.in. syntetycznych, fizykochemicznych, farmakologicznych wielu z powyższych związków były przedmiotem publikacji (72) a także mojej pracy doktorskiej pt. „**Synteza i właściwości w grupie niektórych pochodnych aminoalkanoli**” obronionej w 2008 r. na tutejszym Wydziale.

W ramach prowadzonych badań otrzymano wiele nowych związków o silnie zaznaczonej i porównywalnej do leków przeciwpadaczkowych aktywności przeciwdrgawkowej w tym o możliwym zastosowaniu w padaczce lekoopornej, a także działających przeciwbólowo (np. zw. **IV** str. 22). Dla wszystkich otrzymanych i najbardziej aktywnych związków dokonałam oznaczenia lipofilowości metodami *in silico* (Pallas, CAChe, HyperChem) oraz stosując metodę chromatograficzną RP-TLC. Ponadto, w ramach prac dokonano oceny właściwości mutagennych kilku związków w alternatywnym do testu Amesa teście *Vibrio harveyi* stosowanym obok testu Amesa w projektach badawczych do chwili obecnej w tutejszym Zakładzie.

Jednym z najważniejszych osiągnięć moich prac badawczych było włączenie dużej grupy syntezowanych przeze mnie związków o działaniu przeciwdrgawkowym

oraz przeciwbólowym w bólu neurogennym, obok m.in. wcześniej otrzymanych w tutejszym Zakładzie (w tym referencyjnego **III** str. 22) do przygotowanego przeze mnie zgłoszenia patentowego, którego obok Pana dra hab. Henryka Marony i Pani prof. dr hab. Katarzyny Kieć-Kononowicz jestem współautorem (43).

Trzy publikacje, których jestem współautorem, dotyczyły badań prowadzonych w Zakładzie. Jedno z nich odnosi się do właściwości antymykobakteryjnych w grupie pochodnych ksantonu (73), natomiast pozostałe do właściwości antyoksydacyjnych pochodnych 1-(fenoksyetylo)-4-(2-metoksyfeylo)piperazyny (74) a także Vita-Glukanu (75).

Efektem mojej aktywności naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora było współautorstwo w 1 przeglądowej **D1** z listy **Journal Citation Reports (IF₂₀₀₅=0,947)**, 5 publikacjach oryginalnych **D2-D6** i oraz w 1 zgłoszeniu patentowym. Sumaryczna punktacja **MNiSW** wynosiła 32.

9.2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

W roku **2008** uchwałą Rady Wydziału Farmaceutycznego UJ CM uzyskałam stopień doktora nauk farmaceutycznych (chemia leków) w oparciu o rozprawę doktorską pt. **„Synteza i właściwości przeciwdrgawkowe w grupie niektórych pochodnych aminoalkanoli”**.

W latach **2008-2010** podjęłam pracę zawodową w firmie biotechnologicznej Selvita Sp. z o.o. w Krakowie, na stanowisku specjalista ds. projektów badawczych. Moja praca wiązała się m.in. z komercjalizacją projektów rozwoju leków z polskich jednostek badawczych oraz kontynuacją badań dla tych projektów. Do tego celu uczestniczyłam w licznych szkoleniach np. z zakresu prowadzenia projektów dotyczących poszukiwania leków dla schorzeń w ośrodkowym układzie nerwowym (Londyn), dotyczących ochrony patentowej (Urząd Patentowy RP), czy zarządzania projektami badawczymi (TrayssPrime, Berlin). Jednocześnie, za zgodą Pana dra hab. Henryka Marony kontynuowałam prace badawcze w grupie pochodnych aminoalkanoli, stąd współautorstwo w publikacji dotyczącej m.in. korelacji pomiędzy lipofilowością a aktywnością przeciwdrgawkową, a także korelacją między chromatograficznym współczynnikiem lipofilowości oznaczanym techniką RP-TLC a logP za pomocą programów komputerowych (40). Równolegle kontynuowałam syntezę i badania fizykochemiczne w grupie pochodnych 1,4-dipodstawnej piperazyny

o potencjalnym działaniu krążeniowym. Spośród kilkunastu prezentowanych w publikacji związków, 6 zostało otrzymanych przeze mnie, których struktury (6-11) zostały przedstawione w autoreferacie (str. 24) (51-52). Niestety związki te z wyłączeniem związku **10** wykazywały dużo słabsze powinowactwo do receptorów adrenergicznych w porównaniu do związków 1-5 (str. 24). Spośród nich związek **10** był przedmiotem poszerzonych badań funkcjonalnych dotyczących agonizmu bądź antagonizmu względem badanych receptorów. Dla tego związku wykazano, że stanowi antagonistę receptorów α_1 i β_1 porównywalnie do karwedilolu i że dodatkowo wykazuje działanie rozszerzające naczynia krwionośne, co jest związane nie tylko z mechanizmem adrenolitycznym, ale również związek ten rozszerza naczynia poprzez mechanizm związany ze śródbłonkowym przekazywaniem NO-cGMP. Właściwości takie mogłyby być wykorzystane do zapobiegania i leczenia schorzeń w obrębie układu krążenia takich jak nadciśnienie tętnicze oraz miażdżycy naczyń (76).

W roku 2009 przetłumaczyłam uprzednio przygotowane zgłoszenie i zgodnie z procedurą *Patent Cooperation Treaty* PCT zostało to zgłoszenie złożone do Europejskiego Urzędu Patentowego (44). Jednocześnie podjęłam zadania związane z przygotowaniem projektu badawczego we współpracy z pracownikami Zakładu w tym prof. drem hab. Henrykiem Maroną oraz pracownikami innych jednostek badawczych na tutejszym Wydziale tj. Katedrą Chemii Nieorganicznej i Analitycznej (ś.p. prof. dr hab. Jan Krzek, dr hab. Urszula Hubicka), Katedrą Chemii Organicznej (prof. dr hab. Marek Cegła), Katedrą Farmakodynamiki (prof. dr hab. Barbara Filipek), Zakładem Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej (ś.p. prof. dr hab. Joanna Szymura-Oleksiak, dr hab. Elżbieta Wyska, prof. UJ), Katedrą Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych (dr hab. Elżbieta Pękala) a także z Katedrą Technologii Postaci Leku i Biofarmacji (prof. dr hab. Renata Jachowicz). Projekt pt. **„Opracowanie innowacyjnej grupy związków o aktywności stabilizującej potencjał błony komórkowej”** zgłoszony do Ministerstwa Rozwoju Regionalnego RP uzyskał akceptację i w latach 2010-2014 był realizowany w nowopowstałym Zakładzie Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej UJCM pod kierownictwem prof. dra hab. Henryka Marony. Jego budżet wynosił 5 005 406 PLN. W tym okresie zostałam zatrudniona na stanowisku koordynatora merytorycznego projektu i wykonawcy części chemicznej. Do moich zadań obok badawczych należał szereg czynności koordynujących kierunki badań a także stronę administracyjną (przygotowanie np. raportów do NCBiR oraz prezentowanie na zewnątrz wyników badań i współpraca z rzecznikami patentowymi w zakresie patentowania. Pragnę podkreślić, że jednym z wymogów projektu było włączenie studentów

wykonujących prace magisterskie w badania z zakresu projektu, a także prace doktorskie związane z tematyką badawczą. W sumie zrealizowano 20 prac magisterskich i 5 prac doktorskich.

Obligatoryjnym w ramach projektu było również złożenie zgłoszeń patentowych, z których 1 dotyczy *N*-{2-[2-(fenoksy)etoksy]alkilo}aminoalkanoli (77), natomiast drugie zgłoszenie patentowe dotyczy alkanoloamidowych pochodnych kwasu cynamonowego i ich właściwości przeciwdrgawkowych (78), następnie zgłoszenia te zostały złożone również w języku angielskim do Europejskiego Urzędu Patentowego (EPO) zgodnie z międzynarodowym traktatem *Patent Cooperation Treaty* PCT (79-80). Pierwsze z nich jest ujęte w cyklu publikacji habilitacyjnych (**H4**) (79). Ponadto, dokonano zgłoszeń zagranicznych zgodnie z procedurą PCT do 9 krajów dla zgłoszenia (43-44), spośród których dotychczas przyznano nam 7 patentów: w Europie (patent zwalidowany w: Belgii, Szwajcarii, Niemczech, Danii, Hiszpanii, Francji, Wielkiej Brytanii, Węgrzech, Włoszech, Holandii, Szwecji, Turcji), Rosji, Japonii, Kanadzie, Korei oraz 2 w USA (1 na struktury i zastosowanie w leczeniu padaczki oraz 1 na zastosowanie do uśmierzania bólu szczególnie w bólu neurogennym).

W ramach projektu zsyntezowano ponad 100 nowych związków w grupie chiralnych i achiralnych pochodnych aminoalkanoli. Ponadto znacznie poszerzono zakres badań farmakologicznych, w tym farmakokinetycznych, ale też biochemicznych oraz dotyczących formulacji badanych związków (**IIIa** i **IV** str. 22) zawartych w zgłoszeniach patentowych polskich (43-44, 77-78) oraz europejskich (79-80). Warto nadmienić, że w ramach projektu należało zsyntezować chlorowodorki związków najbardziej aktywnych przeciwdrgawkowo **IIIa** i **IV** (str. 22) (np. do celu podania dożylnego) w ilości 250-300 g, które obok szerokiego panelu badań farmakologicznych i bezpieczeństwa były przedmiotem formulacji (kapsułki z peletkami, minitabletki). Właściwości farmakologiczne wielu aktywnych związków a także wyniki badań polimorfizmu objęte są pracą **H3** w cyklu habilitacyjnym.

Należy podkreślić, iż dla niektórych związków objętych zagranicznymi patentami trwają dalsze prace badawcze dotyczące m.in. ich bezpieczeństwa i są przedmiotem i troską naszych starań wdrożeniowych.

W ramach projektu „**Poszukiwanie związków aktywnych w ośrodkowym układzie nerwowym**” (NCN OPUS) badania prowadzono również w grupie amidoalkanolowych pochodnych kwasu cynamonowego a także niektórych ich aminowych analogów. Wyniki tych badań przedstawiają publikacje w impaktowanych czasopismach naukowych (81-85) a także przygotowano 1 pracę przeglądową z tego zakresu (86).

Rezultatem badań realizowanych z moim udziałem czy to z zakresu syntezy oraz resyntezy i badań strukturalnych związków, analizy danych farmakologicznych a także w przygotowaniu lub współuczestniczeniu w redakcji manuskryptu jest wiele publikacji (39-40, 42, 46, 71) odnoszących się głównie do *N*-aroksyalkilo bądź *N*-aroksyacetylo pochodnych alkanoloamin, w tym optycznie czynnych. Nie byłoby ich gdyby nie współpraca z innymi jednostkami badawczymi, których pracownicy naukowci mają często wiodącą rolę w tych pracach. Do nich należą wyniki badań farmakologicznych, aspekty stereoizomerii związków chiralnych, korelacji lipofilowość-aktywność przeciwdrgawkowa czy też związków z grupy niektórych pochodnych trans- i cis- racemicznych i enancjomerycznych pochodnych 2-amino-1-cykloheksanolu (39-40, 46).

Wiele publikacji poświęconych jest badaniom bezpieczeństwa aktywnych związków. Tego typu badania realizowałam w ramach pracy doktorskiej (test *Vibrio harveyi*) (45) a następnie koordynując projekty badawcze wśród współpracowników inicjowałam określone zadania badawcze, w tym dotyczące badań muta- lub antymutagenności związków zarówno z grupy pochodnych aminoalkanoli, piperazyny, jak i ksantonu. Rezultatem tych badań są publikacje (61, 87) i praca przeglądowa (88) zamieszczone w specjalistycznych, impaktowanych czasopismach, a także praca doktorska Pani dr Beaty Powroźnik (Zakład Biochemii Farmaceutycznej UJ CM, pod kierunkiem Pani dr Elżbiety Pękali, prof. UJ) (89) obejmująca badania mutagenności i genotoksyczności. Częściowe rezultaty tych badań zamieszczono w pracy **H5**.

Ważnym punktem mojej pracy był współudział w syntezie i resyntezie oraz badań fizykochemicznych związków z grupy pochodnych piperazyny. Niektóre z nich w tym otrzymane przeze mnie związki odniesienia **X** i **XI** (str. 26) były przedmiotem pracy doktorskiej (53) oraz publikacji, w których opisano ich właściwości przeciwdepresyjne na zwierzętach wraz z potwierdzeniem specyficzności działania (54), przeciwlękowe na zwierzętach (55). Ponadto wykazano iż nie wykazują działania hipotensyjnego pomimo wiązania do receptorów adrenergicznych oraz wykazano ich aktywność przeciwartmicyzną

w arytmii wywołanej adrenaliną (56, 57). Stwierdzono ich wiązanie do receptorów serotoninerdycznych 5-HT_{1A} i w mniejszym stopniu do 5-HT_{2A}. Wykluczono też potencjalne niekorzystne działanie cholinolityczne (58) oraz wykazano korzystny wpływ na procesy kognitywne (59, 61) porównywalne do wortioksetyny. Moje prace w tej grupie związków obrazuje także włączona do habilitacyjnego cyklu praca **H8**.

Badania, które były i są prowadzone w tutejszym Zakładzie w ramach projektu badawczego pt. „**Poszukiwanie związków aktywnych w ośrodkowym układzie nerwowym**” finansowanego z NCN (OPUS) pozwoliły na badania wielu zarówno wcześniej otrzymanych jak i nowych związków pod kątem ich potencjalnego działania serotoninerdycznego i/lub adrenergicznego. Badane związki cechowały się wysokim powinowactwem zarówno do receptorów adrenergicznych, serotoninerdycznych a także dopaminergicznych w stężeniach nanomolowych, wykazując działanie ośrodkowe (przeciwdepresyjne, przeciwlękowe lub przeciwdrgawkowe) lub na układ krążenia. Jednym z istotnych elementów prowadzonych przeze mnie prac w ramach wspomnianego projektu jest stwierdzenie aktywności ośrodkowej (przeciwlękowej) niektórych piperazynowych pochodnych ugrupowania ksantonu, przy czym badania związków pod kątem ich aktywności przeciwdrgawkowej, przeciwbólowej, przeciwlękowej, przeciwdepresyjnej (48, 50, 90-93) prowadzone były we współpracy z Katedrą Farmakodynamiki UJ CM.

Mając na względzie udokumentowaną rolę układu serotoninerdycznego w epilepsji i bólu neuropatycznym byłam inicjatorem i współautorem pracy przeglądowej odnoszącej się do tej tematyki. Wydało się to tym uzasadnione, że wiele z badanych przez nas związków o aktywności przeciwdrgawkowej i/lub przeciwbólowej cechowało się wpływem na układ serotoninerdyczny. Rezultatem podjętej pracy jest publikacja w wysoko impaktowanym czasopiśmie (94), w której co istotne 2 pierwszych autorów to studentki farmacji wykonujące w tutejszym Zakładzie prace magisterskie.

Wiele z dotychczas otrzymanych związków o aktywności krążeniowej było również przedmiotem publikacji dotyczącej ich wpływu na parametry reologiczne krwinek czerwonych (95) czy też pod kątem działania przeciwnowotworowego (96). Zainteresowanie tym ostatnim kierunkiem badań skłoniło mnie do podjęcia starań celem nawiązania współpracy pomiędzy amerykańskim **National Cancer Institute** NCI a Uniwersytetem Jagiellońskim Collegium Medicum (koordynuję tę współpracę) w ramach sieci rozwoju

leków przeciwnowotworowych Developmental Therapeutics Program. Aktualnie w ramach tej umowy zostało przesłanych do wstępnych badań kilkanaście nowych związków m.in. w grupie pochodnych ksantonu.

Z uwagi na kształcenie studentów na tutejszym Wydziale na kierunku kosmetologia celowym wydawało się być napisanie prac odnoszących się do zagadnień dotyczących aspektów kosmetycznych. Stąd 3 publikacje (dotyczące kosmetycznych zastosowań kolagenu, zaburzeń pigmentacji oraz środków promieniochronnych) poglądowe poświęcone tej tematyce, w których jestem współautorem (97-99), a jedna publikacja w impaktowanym czasopiśmie odnosi się do symulacji metabolizmu skórnych retinoidów z zastosowaniem metod *in silico* (program MetaSite) (100).

Badania z zakresu modelowania *in silico* metabolizmu kilku najbardziej aktywnych związków zostały uzupełnione badaniami *in vitro*, przy czym czynnikami metabolizującymi były: cytochrom P₄₅₀: CYP-2D6, ludzka wątrobowa frakcja S9, mikrosomy mysie, szczurze i ludzkie, grzyby *Cunninghamella echinulata*, *C. elegans*, *C. blakesleeana*. Wyniki tych badań były przedmiotem obronionej w zeszłym roku pracy doktorskiej Pani dr Pauliny Kubowicz-Kwaśny (Zakład Biochemii Farmaceutycznej UJ CM, pod kierunkiem Pani dr hab. Elżbiety Pękali, prof. UJ) (101).

Aktualnie realizuję **3 projekty badawcze**. Obok kierowania projektem „**Poszukiwanie związków aktywnych w ośrodkowym układzie nerwowym**”, (NCN, OPUS), jestem współwykonawcą grantu kierowanego przez Panią dr Monikę Kubacką (Katedra Farmakodynamiki UJ CM) pt. „**Antagoniści receptora alfa1-adrenergicznego oraz 5-HT_{2A} serotoninergicznego o niechinazolinowej budowie i plejotropowych efektach jako nowa perspektywa leczenia nadciśnienia i zespołu metabolicznego**” a także jestem opiekunem naukowym grantu Pani mgr Katarzyny Pańczyk z naszego Zakładu („**Synteza, ewaluacja aktywności przeciwdrgawkowej oraz analiza wpływu na ludzkie astrocyty w grupie pochodnych piperazyny i/lub aminoalkanoli w kontekście badania mechanizmów działania aktywnych przeciwdrgawkowo związków**” (NCN, Preludium).

Mój całociowy dorobek naukowy obejmuje współautorstwo **48 publikacji** o łącznym współczynniku **Impact Factor 92,983 i 1029 pkt MNiSW**, w tym dla **41 publikacji oryginalnych IF=79,005 i 884 pkt MNiSW** (w tym 6 prac w czasopismach krajowych nieposiadających Impact Factor) i dla **7 publikacji przeglądowych IF=13,978 i 145 pkt**

MNiSW (w tym 2 prace w czasopismach krajowych nieposiadających Impact Factor). **Indeks Hirscha** tych prac wynosi **8**, a **liczba cytowań 202**.

Przed doktoratem dorobek ten obejmował **6 publikacji**: 1 przeglądowej **D1** z listy **Journal Citation Reports** ($IF_{2005}=0,947$), 5 publikacjach oryginalnych **D2-D6** w nieimpaktowanym czasopiśmie krajowym. Sumaryczna punktacja **MNiSW** wynosiła **32**. Należy dodać do tego współautorstwo w **1 polskim zgłoszeniu patentowym**, współautorstwo w **5 komunikatach zjazdowych** obejmujących naukowe konferencje krajowe i międzynarodowe.

Mój dorobek naukowy **po doktoracie** obejmuje współautorstwo **42 publikacji** o łącznym współczynniku **Impact Factor 92,036** i **997 pkt MNiSW**, w tym dla **36 publikacji oryginalnych** $IF=79,005$ i 857 pkt MNiSW i dla **6 publikacji przeglądowych** $IF=13,031$ i 137 pkt MNiSW) (w tym w 2 pracach przeglądowych w czasopismach krajowych nieposiadających Impact Factor).

Dorobek naukowy po doktoracie z wyłączeniem prac ujętych w cyklu habilitacyjnym **H1-H3** i **H5-H8** obejmuje **IF=70,009**, punktacja **MNiSW 787** (w tym 37 prac oryginalnych i 4 prace przeglądowe).

Należy dodać do tego współautorstwo w **13 zgłoszeniach patentowych** (w tym 2 polskie i 11 zagranicznych), **10 patentach** (w tym 3 krajowe i 7 zagranicznych), współautorstwo w **39 komunikatach zjazdowych** obejmujących naukowe konferencje krajowe i międzynarodowe w tym **4 wystąpienia ustne**

9.3. Plany naukowe w najbliższej perspektywie

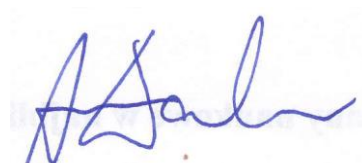
Rezultaty wcześniejszych, a także aktualnie prowadzonych badań w ramach wcześniej wymienionych grantów badawczych, są jak się wydaje zachęcające do dalszych prac związanych z poszukiwaniem nowych homologów i/lub analogów najbardziej aktywnych związków. Trwają również badania związków o zdefiniowanej aktywności przeciwdrgawkowej, przeciwbólowej czy krążeniowej na inne aktywności w obrębie ośrodkowego układu nerwowego (przeciwłękowe, prokognitywne). Podstawą tych ostatnich planów są korzystne rezultaty badań związków, które wykazywały aktywność przeciwdrgawkową czy też krążeniową, a w wyniku poszerzonych badań charakteryzują się wysokim powinowactwem do receptorów np. serotoninerгіcznych czy dopaminergicznymi,

co skutkowało wieloma publikacjami opisującymi ich właściwości przeciwdepresyjne, czy też przeciwlękowe.

Obok badań syntetycznych wspomaganych modelowaniem *in silico* i fizykochemicznych realizowane są badania we współpracy z kilkoma jednostkami wydziałowymi i pozawydziałowymi. Są to wstępne i poszerzone badania farmakologiczne w tym funkcjonalne oraz biochemiczne (np. stabilności metabolicznej) czy też bezpieczeństwa (test Ames i test *Vibrio harveyi*) a także działań neurotoksycznych na mysich i ludzkich astrocytach. Obok w/w. badań planujemy dla najbardziej aktywnych związków przeprowadzić ich biotransformację w modelu mikrobiologicznym stosując m.in. grzyby *Cunninghamella echinulata* czy *Candida albicans*). Aktualnie przygotowywane są 2 interdyscyplinarne publikacje chemiczno-farmakologiczne odnoszące się do właściwości ośrodkowych (przeciwdepresyjnych, przeciwlękowych), w tym także badań bezpieczeństwa i stabilności metabolicznej.

Obok prac badawczych zaplanowanych w ramach projektu jednym z bardzo ważnych zagadnień jest pozyskanie środków na badania toksyczności przewlekłej dla 2 związków objętych ochroną patentową w wielu krajach (m.in. USA, Rosja, Japonia), co w przypadku korzystnych wyników pozwoliłoby na przejście do fazy badań klinicznych.

Jednocześnie pragnę poinformować, że w chwili obecnej toczą się rozmowy m.in. z moim udziałem i przedstawicieli Centrum Transferu Technologii CITTRU Uniwersytetu Jagiellońskiego z odpowiednimi firmami odnośnie do ewentualnej komercjalizacji patentu.



10. Bibliografia

- (1) Waszkielewicz, A.; Bojarski, J., **2004**, Gamma-hydrobutyric acid (GHB) and its chemical modifications: a review of the GHBergic system. *Pol. J. Pharmacol.* 56, 43-49.
- (2) Kessler, R. C.; Berglund, P.; Demler, O.; Jin, R.; Merikangas, K. R.; Walters, E. E., **2005**, Lifetime Prevalence and Age-of-Onset Distributions of. *Arch. Gen. Psychiatry.*, 62, 593-602.
- (3) Taylor, R. S., **2006**, Epidemiology of refractory neuropathic pain. *Pain Pract.*, 6, 22–26.
- (4) Sridharan, R., **2002**, Epidemiology of epilepsy. *Curr. Sci.*, 82, 664-670.
- (5) Rogawski, M. A.; Löscher, W., **2004**, The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat. Rev. Neurosci.*, 5, 553-564.
- (6) Silberstein, S. D., **2001**, Shared mechanisms and comorbidities in neurologic and psychiatric disorders. *Headache*, 41 S1, S11-17.
- (7) Miller, C. L., **2013**, On the mechanism of action of antipsychotic drugs: a chemical reaction not receptor blockade. *Curr. Drug Discov. Technol.*, 10, 195-208.
- (8) Large, C. H.; Sokal, D. M.; Nehlig, A.; Gunthorpe, M. J.; Sankar, R.; Crean, C. S.; Vanlandingham, K. E.; White, H. S., **2012**, The spectrum of anticonvulsant efficacy of retigabine (ezogabine) in animal models: Implications for clinical use. *Epilepsia*, 53, 425-436.
- (9) Stables, J. P.; Kupferberg, H. J., **1997**, The NIH Anticonvulsant Drug Development (ADD) Program: preclinical anticonvulsant screening project. In *Molecular and Cellular Targets for Anti-epileptic Drugs*; Avanzini, G.; Regesta, P.; Tanganelli, A.; Avoli, M., Eds.; John Libbey & Company Ltd: London; Vol. 23129, pp. 191-198.
- (10) Barton, M. E.; Klein, B. D.; Wolf, H. H.; White, H. S., **2001**, Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy. *Epilepsy Res.*, 47, 217-227.
- (11) Rowley, N. M.; White, H. S., **2010**, Comparative anticonvulsant efficacy in the corneal kindled mouse model of partial epilepsy: Correlation with other seizure and epilepsy models. *Epilepsy Res.*, 92, 163-169.
- (12) Finnerup, N. B.; Otto, M.; McQuay, H. J.; Jensen, T. S.; Sindrup, S. H., **2005**, Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal. *Pain*, 118, 289-305.
- (13) Bialer, M.; White, H. S., **2010**, Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 68-82.
- (14) Isoherranen, N.; Woodhead, J. H.; White, H. S.; Bialer, M., **2001**, Anticonvulsant profile of valproic acid (TV1901): a new antiepileptic drug. *Epilepsia*, 42, 831-836.
- (15) Bialer, M., **2006**, New antiepileptic drugs that are second generation to existing antiepileptic drugs. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 15, 637-647.
- (16) Czopek, A.; Byrtus, H.; Zagórska, A.; Siwek, A.; Kazek, G.; Bednarski, M.; Sapa, J.; Pawłowski, M., **2016**, Design, synthesis, anticonvulsant, and antiarrhythmic properties of novel N-Mannich base and amide derivatives of β -tetralinohydantoin. *Pharmacol. Reports*, 68, 886-893.
- (17) Obniska, J.; Rapacz, A.; Rybka, S.; Powroźnik, B.; Pekala, E.; Filippek, B.; Żmudzki, P.; Kamiński, K., **2015**, Design, synthesis and biological activity of new amides derived from 3-methyl-3-phenyl-2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yl-acetic acid. *Eur. J. Med. Chem.*, 102, 14-25.
- (18) Koskiniemi, M.; Van Vleymen, B.; Hakamies, L.; Lamusuo, S.; Taalas, J., **1998**,

- Piracetam relieves symptoms in progressive myoclonus epilepsy: a multicentre, randomised, double blind, crossover study comparing the efficacy and safety of three dosages of oral piracetam with placebo. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 64, 344-348.
- (19) Kitano, Y.; Komiyama, C.; Makino, M.; Takasuna, K.; Satoh, H.; Aoki, T.; Kinoshita, M.; Takazawa, A.; Yamauchi, T.; Sakurada, S., **2005**, Anticonvulsant and neuroprotective effects of the novel nootropic agent nefiracetam on kainic acid-induced seizures in rats. *Brain Res.*, 1057, 168-176.
 - (20) de Oliveira, G.; Borges, M., **1994**, Propranolol Action in Chronically Unstable Generalized Epilepsy. *Am. J. Ther.*, 1, 38-41.
 - (21) Kaminski, R. M.; Livingood, M. R.; Rogawski, M. A., **2004**, Allopregnanolone analogs that positively modulate GABA receptors protect against partial seizures induced by 6-Hz electrical stimulation in mice. *Epilepsia*, 45, 864-867.
 - (22) Bialer, M.; Johannessen, S. I.; Levy, R. H.; Perucca, E.; Tomson, T.; White, H. S., **2010**, Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the Tenth Eilat Conference (EILAT X). *Epilepsy Res.*, 92, 89-124.
 - (23) Doodipala, S. R.; Rogawski, M., **2012**, Neurosteroids — Endogenous Regulators of Seizure Susceptibility and Role in the Treatment of Epilepsy. In *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*; Jeffrey L. Noebels, Massimo Avoli, Michael Rogawski, Richard W. Olsen, A. V. D.-E., Ed.; National Center for Biotechnology Information: Bethesda (MD), pp. 1-23.
 - (24) Sergott, R. C.; Johnson, C. A.; Laxer, K. D.; Wechsler, R. T.; Cherny, K.; Whittle, J.; Feng, G.; Lee, D.; Isojarvi, J., **2016**, Retinal structure and function in vigabatrin-treated adult patients with refractory complex partial seizures. *Epilepsia*, 57, 1634-1642.
 - (25) Vargesson, N., **2015**, Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms. *Birth Defects Res. Part C*, 105, 140-156.
 - (26) Spindelegger, C.; Lanzenberger, R.; Wadsak, W.; Mien, L. K.; Stein, P.; Mitterhauser, M.; Moser, U.; Holik, A.; Pezawas, L.; Kletter, K.; Kasper, S., **2009**, Influence of escitalopram treatment on 5-HT_{1A} receptor binding in limbic regions in patients with anxiety disorders. *Mol. Psychiatry*, 14, 1040-1050.
 - (27) Mortelmans, K.; Zeiger, E., **2000**, The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.*, 455, 29-60.
 - (28) Podgórska, B.; Pazdro, K.; Wegrzyn, G., **2007**, The use of the *Vibrio harveyi* luminescence mutagenicity assay as a rapid test for preliminary assessment of mutagenic pollution of marine sediments. *J. Appl. Genet.*, 48, 409-12.
 - (29) Podgórska, B.; Chec, E.; Ulanowska, K.; Wegrzyn, G., **2005**, Optimisation of the microbiological mutagenicity assay based on genetically modified *Vibrio harveyi* strains. *J. Appl. Genet.*, 46, 241-246.
 - (30) Schmid, M. M.; Freudenmann, R. W.; Keller, F.; Connemann, B. J.; Hiemke, C.; Gahr, M.; Kratzer, W.; Fuchs, M.; Schönfeldt-Lecuona, C., **2013**, Non-fatal and fatal liver failure associated with valproic acid. *Pharmacopsychiatry* 46, 63-68.
 - (31) Sendra, J. M.; Junyent, T. T.; Pellicer, M. J. R., **2011**, Pregabalin-induced hepatotoxicity. *Ann. Pharmacother.*, 45, 32.
 - (32) Cloix, J.-F.; Hévor, T., **2009**, Epilepsy, regulation of brain energy metabolism and neurotransmission. *Curr. Med. Chem.*, 16, 841-853.
 - (33) Takahashi, T.; Maruyama, W.; Deng, Y.; Dostert, P.; Nakahara, D.; Niwa, T.; Ohta, S.; Naoi, M., **1997**, Cytotoxicity of endogenous isoquinolines to human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J. Neural Transm.*, 104, 59-66.
 - (34) Singh, J. K.; Solanki, A.; Shirsath, V. S., **2012**, Comparative in-vitro Intrinsic Clearance of Imipramine in Multiple Species Liver Microsomes: Human, Rat, Mouse and Dog. *J. Drug. Metab. Toxicol.*, 3, 1-6.

- (35) Alexander, G. J.; Kopeloff, L. M.; Alexander, R. B.; Chatterjee, N., **1986**, Mexiletine: biphasic action on convulsive seizures in rodents. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 8, 231-235.
- (36) Fischer, W., **2002**, Anticonvulsant profile and mechanism of action of propranolol and its two enantiomers. *Seizure J. Br. Epilepsy Assoc.*, 11, 285-302.
- (37) Borowicz, K. K.; Banach, M., **2014**, Antiarrhythmic drugs and epilepsy. *Pharmacol. Reports*, 66, 545-551.
- (38) Marona, H.; Antkiewicz-Michaluk, L., **1998**, Synthesis and anticonvulsant activity of 1,2-aminoalkanol derivatives. *Acta Pol. Pharm.* 55, 487-498.
- (39) Pękala, E.; Waszkielewicz, A. M.; Szneler, E.; Walczak, M.; Marona, H., **2011**, Synthesis and anticonvulsant activity of trans- and cis-2-(2,6-dimethylphenoxy)-N-(2- or 4-hydroxycyclohexyl)acetamides and their amine analogs. *Bioorg. Med. Chem.*, 19, 6927-6934.
- (40) Waszkielewicz, A.; Szkaradek, N.; Pękala, E.; Galzarano, F.; Marona, H., **2010**, The study of the lipophilicity of some aminoalkanol derivatives with anticonvulsant activity. *Biomed. Chromatogr.*, 24, 1365-1372.
- (41) Marona, H.; Waszkielewicz, A. M.; Szneler, E., **2005**, Preliminary evaluation of anticonvulsant activity of some aroxyacetamides and aroxyethylamines. *Acta Pol. Pharm.*, 62, 345-353.
- (42) Waszkielewicz, A. M.; Szneler, E.; Cegła, M.; Marona, H., **2013**, Synthesis and Evaluation of Anticonvulsant Activity of Some N-[(4-Chlor-2-methylphenoxy)ethyl]- and N-[(4-Chlor-2-methylphenoxy)acetyl]aminoalkanols. *Lett. Drug Des. Discov.*, 10, 34-42.
- (43) Marona, H.; Waszkielewicz, A. M.; Kieć-Kononowicz, K., Pochodne fenoksyalkiloaminoalkanoli i ich zastosowania. PL 212489 B1, **2008**, Uniwersytet Jagielloński,
- (44) Marona, H.; Waszkielewicz, A.; Kieć-Kononowicz, K., Derivatives of Aminoalkanols, Method of Obtaining of Aminoalkanols and Their Use. *PCT/PL2009/000004*, WO 2009/093916A3, **2009**, Jagiellonian University.
- (45) Waszkielewicz, A. M., **2008**, Synteza i właściwości przeciwdrgawkowe w grupie niektórych pochodnych aminoalkanoli. Rozprawa doktorska. Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum.
- (46) Walczak, M.; Pękala, E.; Waszkielewicz, A. M.; Marona, H., **2014**, Simultaneous LC/ESI-MS Separation for the Enantioseparation of Some New Anticonvulsant Drugs. *Chirality*, 26, 144-149.
- (47) Marona, H.; Pękala, E.; Antkiewicz-Michaluk, L.; Walczak, M.; Szneler, E., **2008**, Anticonvulsant activity of some xanthone derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 7234-7244.
- (48) Szkaradek, N.; Gunia, A.; Waszkielewicz, A. M.; Antkiewicz-Michaluk, L.; Cegła, M.; Szneler, E.; Marona, H., **2013**, Anticonvulsant evaluation of aminoalkanol derivatives of 2- and 4-methylxanthone. *Bioorg. Med. Chem.*, 21, 1190-1198.
- (49) Marona, H., **1998**, Synthesis and anticonvulsant effects of some aminoalkanolic derivatives of xanthone. *Pharmazie*, 53, 672-676.
- (50) Waszkielewicz, A. M.; Gunia, A.; Szkaradek, N.; Pytka, K.; Siwek, A.; Satała, G.; Bojarski, A. J.; Szneler, E.; Marona, H., **2013**, Synthesis and evaluation of pharmacological properties of some new xanthone derivatives with piperazine moiety. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 23, 4419-4423.
- (51) Marona, H.; Kubacka, M.; Filipek, B.; Siwek, A.; Dybała, M.; Szneler, E.; Pocięcha, T.; Gunia, A.; Waszkielewicz, A. M., **2011**, Synthesis, α -adrenoceptors affinity and α 1-adrenoceptor antagonistic properties of some 1,4-substituted piperazine derivatives.

- Pharmazie*, 66, 733-739.
- (52) Kubacka, M.; Mogilski, S.; Bednarski, M.; Nowi, L.; Dudek, M.; Siwek, A.; Waszkielewicz, A. M.; Marona, H.; Satała, G.; Bojarski, A.; Filipek, B.; Pytka, K., **2016**, Antidepressant-like activity of aroxyalkyl derivatives of 2-methoxyphenylpiperazine and evidence for the involvement of serotonin receptor subtypes in their mechanism of action. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 141, 28-41.
 - (53) Pytka, K., **2012**, Potencjalna aktywność przeciwdepresyjna w grupie pochodnych piperazyny. Rozprawa doktorska. Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum.
 - (54) Waszkielewicz, A. M.; Pytka, K.; Rapacz, A.; Welna, E.; Jarzyna, M.; Satała, G.; Bojarski, A.; Sapa, J.; Żmudzki, P.; Filipek, B.; Marona, H., **2014**, Synthesis and Evaluation of Antidepressant-like Activity of Some 4-Substituted 1-(2-methoxyphenyl)Piperazine Derivatives. *Chem. Biol. Drug Des.*, 85, 326-335.
 - (55) Pytka, K.; Partyka, A.; Jastrzębska-Więsek, M.; Siwek, A.; Głuch-Lutwin, M.; Mordyl, B.; Kazek, G.; Rapacz, A.; Olczyk, A.; Gałuszka, A.; Błachuta, M.; Waszkielewicz, A.; Marona, H.; Sapa, J.; Filipek, B.; Wesołowska, A., **2015**, Antidepressant-new dual 5-HT_{1A} and 5-HT₇ antagonists in animal models. *PLoS One* 10, 1-24.
 - (56) Pytka, K.; Lustyk, K.; Żmudzka, E.; Kotańska, M.; Siwek, A.; Zygmunt, M.; Dziedziczak, A.; Śniecikowska, J.; Olczyk, A.; Gałuszka, A.; Śmieja, J.; Waszkielewicz, A. M.; Marona, H.; Filipek, B.; Sapa, J.; Mogilski, S., **2016**, Chemically Homogenous Compounds with Antagonistic Properties at All α 1-Adrenoceptor Subtypes but not β 1-Adrenoceptor Attenuate Adrenaline-Induced Arrhythmia in Rats. *Front. Pharmacol.*, 7, 1-14.
 - (57) Pytka, K.; Głuch-Lutwin, M.; Knutelska, J.; Jakubczyk, M.; Waszkielewicz, A.; Kotańska, M., **2016**, HBK-14 and HBK-15 Do Not Influence Blood Pressure, Lipid Profile, Glucose Level, or Liver Enzymes Activity after Chronic Treatment in Rats. *PLoS One*, 11, e0165495.
 - (58) Pytka, K.; Gawlik, K.; Pawlica-Gosiewska, D.; Witalis, J.; Waszkielewicz, A., **2016**, HBK-14 and HBK-15 with antidepressant-like and/or memory-enhancing properties increase serotonin levels in the hippocampus after chronic treatment in mice. *Metab. Brain Dis.*, 2-11.
 - (59) Wegener, G.; Bandpey, Z.; Heiberg, I. L.; Mørk, A.; Rosenberg, R., **2003**, Increased extracellular serotonin level in rat hippocampus induced by chronic citalopram is augmented by subchronic lithium: neurochemical and behavioural studies in the rat. *Psychopharmacology (Berl.)*, 166, 188-194.
 - (60) McIntyre, R. S.; Harrison, J.; Loft, H.; Jacobson, W.; Olsen, C. K., **2016**, The Effects of Vortioxetine on Cognitive Function in Patients with Major Depressive Disorder (MDD): a Meta-Analysis of Three Randomized Controlled Trials. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 19, 1-9.
 - (61) Słoczyńska, K.; Pańczyk, K.; Waszkielewicz, A. M.; Marona, H.; Pekala, E., **2016**, In vitro mutagenic, antimutagenic, and antioxidant activities evaluation and biotransformation of some bioactive 4-substituted 1-(2-methoxyphenyl)piperazine derivatives. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 30, 593-601.
 - (62) Marona, H.; Waszkielewicz, A. M.; Kieć-Kononowicz, K. Derivatives of aminoalkanols, method of obtaining of aminoalkanols and their use. US 8, 633,251 B2, **2014**.
 - (63) Marona, H.; Waszkielewicz, A. M.; Kieć-Kononowicz, K. Derivatives of aminoalkanols, method of obtaining of aminoalkanols and their use. US 8,841,347 B2, **2014**.
 - (64) Hansch, C.; Björkroth, J.; Leo, A., **1987**, Hydrophobicity and central nervous system agents : on the principle of minimal hydrophobicity in drug design. *J. Pharm. Sci.*, 76,

- 663-687.
- (65) Zamanillo, D.; Romero, L.; Merlos, M.; Vela, J. M., **2013**, Sigma 1 receptor: a new therapeutic target for pain. *Eur. J. Pharmacol.*, 716, 78-93.
 - (66) de Paulis, T., **2007**, Drug evaluation: PRX-00023, a selective 5-HT_{1A} receptor agonist for depression. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 8, 78-86.
 - (67) Bialer, M.; Johannessen, S. I.; Levy, R. H.; Perucca, E.; Tomson, T.; White, H. S., **2015**, Progress report on new antiepileptic drugs: A summary of the Twelfth Eilat Conference (EILAT XII). *Epilepsy Res.*, 111, 85-141.
 - (68) Giron, D., **1986**, Applications of thermal analysis in the pharmaceutical industry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 4, 755-770.
 - (69) <http://www.molinspiration.com/services/properties.html>.
 - (70) Daniel, F. V.; Stephen, R. J.; Cheng, H.; Smith, B. R.; Keith, W. W.; Kenneth, D. K.; Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D.; Daniel, F. V.; Stephen, R. J.; Cheng, H.; Smith, B. R.; Keith, W. W.; Kenneth, D. K., **2002**, Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.*, 45, 2615-2623.
 - (71) Waszkielewicz, A. M.; Gunia-Krzyżak, A.; Cegła, M., **2015**, Synthesis and Evaluation of Anticonvulsant Activity of N-(2,5-Dimethylphenoxy)- and N-[(2,3,5-Trimethylphenoxy)alkyl]aminoalkanols. *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.*, 72, 89-99.
 - (72) Waszkielewicz A.M., Marona H., Cegła M., **2007**, Synthesis and preliminary evaluation of anticonvulsant activity of some 4-(benzyloxy)benzoyl- and 4-(benzyloxy)benzylaminoalkanol derivatives. *Acta Pol. Pharm.- Drug Res.* 64, 147-157.
 - (73) Szkaradek, N.; Stachura, K.; Waszkielewicz, A.; Cegła M.; Szneler, E.; Marona, H., **2008**, Synthesis and Antimycobacterial Assay of Some Xanthone Derivatives. *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.*, 65, 21-28.
 - (74) Pietrzycka, A.; Stępniewski, M.; Waszkielewicz, A. M.; Marona, H., **2006**, Preliminary evaluation of antioxidant activity of some 1-(phenoxyethyl)-piperazine derivatives. *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* 63, 19-24.
 - (75) Pietrzycka, A.; Stępniewski, M.; Waszkielewicz, A. M.; Marona, H.; Krzyżanowska, A.; Kłosowska, K.; Solarz, O., **2006**, Effect of Vita Glucan on some antioxidant parameters of the human blood. In vitro study. *Acta Pol. Pharm.* 63, 547-551.
 - (76) Kubacka, M.; Mogilski, S.; Bednarski, M.; Rażny, K.; Sapa, J.; Waszkielewicz, A. M.; Marona, H.; Filipek, B., **2014**, The Nitric Oxide/Soluble Cyclic Guanylate/Cyclic Guanosine Monophosphate Pathway is Involved in the Cardiovascular Effects of a Novel α 1- and β -Adrenoceptor Antagonist. *Pharmacology*, 94, 287-295.
 - (77) Waszkielewicz, A. M.; Gunia, A.; Marona, H. Nowe pochodne N-[(fenoksy)etoksy]alkiloaminoalkanoli oraz ich zastosowanie do wytwarzania leków. P.405040, Uniwersytet Jagielloński **2013**.
 - (78) Gunia, A.; Waszkielewicz, A. M.; Marona, H. Nowe alkanoloamidowe pochodne kwasu cynamonowego oraz zastosowanie alkanoloamidowych pochodnych kwasu cynamonowego do wytwarzania leków. P.401500, Uniwersytet Jagielloński **2012**.
 - (79) Waszkielewicz, A. M.; Gunia, A.; Marona, H. New derivatives of N-[(phenoxy)ethoxy]alkylaminoalkanols and their use for preparation of drugs. WO 2015020545 A2, **2013**.
 - (80) Gunia, A.; Waszkielewicz, A. M.; Marona, H. New alkanolamide derivatives of cinnamic acid and use of alkanolamide derivatives of cinnamic acid for preparation of drugs. WO2014073994 **2014**.
 - (81) Gunia, A.; Waszkielewicz, A.; Cegła, M.; Marona, H., **2012**, Preliminary Evaluation of Anticonvulsant Activity of Some Aminoalkanol and Amino Acid Cinnamic Acid Derivatives. *Lett. Drug Des. Discov.*, 9, 37-43.

- (82) Gunia-Krzyżak, A.; Waszkielewicz, A. M.; Karolina, S.; Borczuch-Kostańska, M.; Cegła, M.; Satała, G.; Bojarski, A.; Marona, H., **2014**, Synthesis and anticonvulsant activity of N-(trans)-3-phenylprop-2-en-1-yl (cinnamyl) derivatives of aminoalkanols. *Lett. Drug Des. Discov.*, 11, 1040-1052.
- (83) Gunia-Krzyżak, A.; Żesławska, E.; Śloczyńska, K.; Koczurkiewicz, P.; Nitek, W.; Żelaszczyk, D.; Szkaradek, N.; Waszkielewicz, A. M.; Pękala, E.; Marona, H., **2016**, Anticonvulsant activity, crystal structures, and preliminary safety evaluation of N-trans-cinnamoyl derivatives of selected (un)modified aminoalkanols. *Eur. J. Med. Chem.* 107, 26-37.
- (84) Gunia-Krzyżak, A.; Pytka, K.; Śloczyńska, K.; Waszkielewicz, A. M.; Satała, G.; Bojarski, A. J.; Sapa, J.; Filipek, B.; Cegła, M.; Pękala, E.; Marona, H., **2016**, Preliminary Evaluation of Central Nervous System Activity of (E)-N-2-Methyl-3-phenylprop-2-enyl ((E)-N- α -methylcinnamyl) Derivatives of Selected Aminoalkanols. *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.*, 73, 345-357.
- (85) Gunia-Krzyżak, A.; Żelaszczyk, D.; Rapacz, A.; Żesławska, E.; Waszkielewicz, A. M.; Pańczyk, K.; Śloczyńska, K.; Pękala, E.; Nitek, W.; Filipek, B.; Marona, H., **2017**, Structure-anticonvulsant activity studies in the group of (E)-N-cinnamoyl aminoalkanols derivatives monosubstituted in phenyl ring with 4-Cl, 4-CH₃ or 2-CH₃. *Bioorg. Med. Chem.*, 25, 471-482.
- (86) Gunia-Krzyżak, A.; Pańczyk, K.; Waszkielewicz, A. M.; Marona, H., **2015**, Cinnamamide derivatives for central and peripheral nervous system disorders - a review of structure-activity relationships. *ChemMedChem*, 10, 1302–1325.
- (87) Śloczyńska, K.; Waszkielewicz, A. M.; Marona, H., **2014**, Preliminary assessment of mutagenic and anti-mutagenic potential of some aminoalkanolic derivatives of xanthone by use of the *Vibrio harveyi* assay. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 768, 8-13.
- (88) Śloczyńska, K.; Powroźnik, B.; Pękala, E.; Waszkielewicz, A. M., **2014**, Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. *J. Appl. Genet.*, 55, 273-285.
- (89) Powroźnik, B. Ocena mutagenności i antymutagenności związków o zdefiniowanej aktywności biologicznej z wykorzystaniem testów alternatywnych. Rozprawa doktorska. Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, **2016**.
- (90) Pytka, K.; Walczak, M.; Kij, A.; Rapacz, A.; Siwek, A.; Kazek, G.; Olczyk, A.; Gałuszka, A.; Waszkielewicz, A.; Marona, H.; Sapa, J.; Filipek, B., **2015**, The antidepressant-like activity of 6-methoxy-2-[4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl]-9H-xanthen-9-one involves serotonergic 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A/C} receptors activation. *Eur. J. Pharmacol.*, 764, 537-546.
- (91) Pytka, K.; Rapacz, A.; Zygmunt, M.; Olczyk, A.; Waszkielewicz, A.; Sapa, J.; Filipek, B., **2015**, Antidepressant-like activity of a new piperazine derivative of xanthone in the forced swim test in mice: The involvement of serotonergic system. *Pharmacol. Reports*, 67, 160-165.
- (92) Pytka, K.; Zmudzka, E.; Lustyk, K.; Rapacz, A.; Olczyk, A.; Gałuszka, A.; Waszkielewicz, A.; Marona, H.; Sapa, J.; Barbara, F., **2016**, The antidepressant-and anxiolytic-like activities of new xanthone derivative with piperazine moiety in behavioral tests in mice. *Indian J. Pharmacol.*, 48, 286.
- (93) Pytka, K.; Kazek, G.; Siwek, A.; Mordyl, B.; Gluch-Lutwin, M.; Rapacz, A.; Olczyk, A.; Gałuszka, A.; Waszkielewicz, A.; Marona, H.; Sapa, J.; Filipek, B.; Zygmunt, M., **2016**, HBK-7 - A new xanthone derivative and a 5-HT_{1A} receptor antagonist with antidepressant-like properties. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 146-147, 35–43.
- (94) Pańczyk, K.; Gołda, S.; Waszkielewicz, A.; Gunia-Krzyżak, A.; Marona, H., **2015**,

- Serotonergic System and Its Role in Epilepsy and Neuropathic Pain Treatment: A Review Based on Receptor Ligands. *Curr. Pharm. Des.*, 21, 1723-1740.
- (95) Kózka, M.; Słoczyńska, K.; Szkaradek, N.; Waszkielewicz, A.; Pękala, E.; Marona, H., **2016**, Effect of some newly synthesized xanthone and piperazine derivatives with cardiovascular activity on rheology of human erythrocytes in vitro. *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, DOI: 10.3233/CH-16001A.
 - (96) Szkaradek, N.; Sypniewski, D.; Waszkielewicz, A.; Gunia-Krzyżak, A.; Galilejczyk, A.; Gałka, S.; Marona, H.; Bednarek, I., **2016**, Synthesis and in vitro evaluation of the anticancer potential of new aminoalkanol derivatives of xanthone. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 16, 1587-1604.
 - (97) Żelaszczyk, D.; Waszkielewicz, A.; Marona, H., **2012**, Kolagen-struktura oraz zastosowanie w kosmetologii i medycynie estetycznej. *Estetologia Med. i Kosmetologia*, 2, 14-20.
 - (98) Pańczyk, K.; Waszkielewicz, A.; Marona, H., **2014**, Zaburzenia hiperpigmentacyjne skóry oraz farmakologiczne metody ich leczenia. *Farm. Pol.* 70, 327-335.
 - (99) Popiół, J.; Gunia-Krzyżak, A.; Żelaszczyk, D.; Waszkielewicz, A., **2016**, Wykorzystanie metod in vitro w badaniach kosmetyków promieniochronnych. *Polish J. Cosmetol.*, 19, 90-97.
 - (100) Słoczyńska, K.; Gunia-Krzyżak, A.; Żelaszczyk, D.; Waszkielewicz, A. M.; Marona, H., **2015**, Skin metabolism established with the use of MetaSite for selected retinoids employed in topical and systemic treatment of various skin disorders and found in cosmeceuticals. *Acta Biochim. Pol.*, 62, 201-206.
 - (101) Kubowicz-Kwaśny, P. **2016**, Modelowanie metodami *in vitro* metabolizmu wyselekcjonowanych związków o zdefiniowanej aktywności w ośrodkowym układzie nerwowym. Rozprawa doktorska. Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum.