



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
Wydział Farmaceutyczny
Katedra Chemii Farmaceutycznej
Zakład Chemii Leków

Tricykliczne pochodne 7-H-puryny jako
ligandy receptorowe i inhibitory enzymatyczne o działaniu psychotropowym

AGNIESZKA ZAGÓRSKA

Załącznik 2A do wniosku habilitacyjnego
AUTOREFERAT

Kraków 2016

Spis treści:

1. Dane osobowe i ogólna charakterystyka dorobku naukowego
2. Osiągnięcie naukowe zgłoszone do postępowania habilitacyjnego
 - 2.1. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego
 - 2.2. Prezentacja wyników stanowiących podstawę habilitacji
 - 2.2.1. Wprowadzenie
 - 2.2.2. Strategie poszukiwania nowych leków psychotropowych
 - 2.3. Cel badań
 - 2.4. Wyniki badań związanych z osiągnięciem naukowym w postępowaniu habilitacyjnym
 - 2.5. Podsumowanie wyników badań stanowiących osiągnięcie naukowe w postępowaniu habilitacyjnym
3. Pozostałe osiągnięcia naukowe
 - 3.1. Aktywność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora
 - 3.2. Aktywność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora
 - 3.3. Najbliższe plany naukowe
4. Piśmiennictwo

1. Dane osobowe

Agnieszka Zagórska

Zakład Chemii Leków, Katedra Chemii Farmaceutycznej UJCM w Krakowie, ul. Medyczna 9,
30-688 Kraków, e-mail: agnieszka.zagorska@uj.edu.pl, azagorsk@cm-uj.krakow.pl

Dyplomy i stopnie naukowe

1999 tytuł zawodowy magistra farmacji
2008 stopień doktora nauk farmaceutycznych

Przebieg zatrudnienia

od 01.10.1999 - asystent w Zakładzie Chemii Leków Katedry Chemii Farmaceutycznej UJ CM

31.07.2002-28.01.2003 - urlop macierzyński

od 1.10.2008 - adiunkt w Zakładzie Chemii Leków Katedry Chemii Farmaceutycznej UJ CM

9.12.2011-25.05.2012 - urlop macierzyński

Ogólna charakterystyka dorobku naukowego

Po zdaniu matury w V Liceum Ogólnokształcącym im. Augusta Witkowskiego w Krakowie w klasie o profilu matematyczno-fizycznym, rozpoczęłam studia na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM. Realizowany w czasie studiów farmaceutycznych kurs Chemii Leków, spowodował moje zainteresowanie zależnością pomiędzy strukturą związków, a ich aktywnością biologiczną. Po zaliczonym w terminie ‘zerowym’ egzaminie z przedmiotu, postanowiłam zrealizować pracę magisterską dotyczącą możliwości syntezy związków o potencjalnej aktywności biologicznej. Pracę magisterską zrealizowałam w Katedrze Chemii Farmaceutycznej UJ CM pod opieką naukową Prof. Alfreda Zejca i Dr Jolanty Obniskiej. Na bazie wyników z pracy pt. „Synteza nowych pochodnych piperidyno-2,5-dionu o spodziewanym działaniu przeciwdrgawkowym” powstały publikacje dotyczące aktywności przeciwdrgawkowej pochodnych piperidyno-2,5-dionu. Po zatrudnieniu w 1999 roku na etacie asystenta w Katedrze Chemii Farmaceutycznej UJ CM, moje prace badawcze związane były z tematyką poszukiwania substancji biologicznie aktywnych w grupie pochodnych teofiliny i dotyczyły syntezy chemicznej połączeń o potencjalnej aktywności m.in. krążeniowej i ośrodkowej. Prace te prowadziłam w zespole kierowanym przez Prof. Macieja Pawłowskiego. Zagadnienia dotyczące syntezy połączeń o aktywności ośrodkowej, ze szczególnym uwzględnieniem syntezy ligandów receptorów monoaminoergicznych o aktywności psychotropowej, stanowiły zasadniczy kierunek badań ujętych w mojej rozprawie doktorskiej, a także znalazły odzwierciedlenie w serii publikacji będących przedmiotem niniejszego postępowania habilitacyjnego.

Stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych w dyscyplinie chemia leków, został mi nadany uchwałą Rady Wydziału Farmaceutycznego UJ CM w Krakowie w roku 2008, na podstawie wyróżnionej rozprawy doktorskiej pt. „*Tricykliczne pochodne teofiliny z ugrupowaniami aryloalkilopiperazynowymi jako ligandy receptorów ośrodkowego układu nerwowego*”, wykonanej pod kierunkiem Prof. Macieja Pawłowskiego. Na tym etapie rozwoju naukowego, mój dorobek naukowy obejmował współautorstwo w **6 pracach oryginalnych** o sumarycznym współczynniku *impact factor* (IF) równym **5,7**.

Od 1 października 2008 r. jestem zatrudniona na stanowisku adiunkta w Zakładzie Chemii Leków Katedry Chemii Farmaceutycznej UJ CM w Krakowie. Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych, moja aktywność naukowa związana była głównie z projektowaniem, syntezą i badaniem właściwości fizykochemicznych, nowych, tricyklicznych pochodnych puryny, z różnymi ugrupowaniami, o przewidywanej aktywności psychotropowej. Równolegle, rozpoczęłam syntezę związków z innych grup chemicznych (pochodne pirolidonu, piperydonu, kwasu piperydyno-karboksyłowego, pochodne butyrofenonu) o potencjalnej aktywności psychotropowej.

Wyniki prowadzonych przeze mnie badań prezentowałam w formie 4 komunikatów ustnych na konferencjach krajowych i zagranicznych: XX Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego Katowice (25-28.09.2007 r.), The Sixth Multidisciplinary Conference on Drug Research – Przemysł (26-28.05.2008 r.), IV SEQT-GSK Summer School, Tres Cantos (Madrid) (25-27.06.2014), 1-st Central European Biomedical Congress, Budapeszt (16-20.06.2014). Jestem współautorem **35 doniesień zjazdowych** prezentowanych w formie posterów na krajowych i zagranicznych konferencjach naukowych.

Uczestniczę (lub uczestniczyłam) jako wykonawca w realizacji projektów finansowanych ze środków KBN (1projekt), NCBiR (1 projekt), oraz NCN (6 projektów). Ponadto, w ramach działalności naukowej, od 1999 roku byłam wykonawcą (4) i kierownikiem (4) projektów badawczych związanych z syntezą i analizą właściwości fizykochemicznych, nowych związków o aktywności biologicznej, subsydiowanych ze środków UJCM (Załącznik 4A, rozdział 1 „Udział w projektach badawczych”).

Aktualnie, mój całościowy dorobek naukowy obejmuje **20 publikacji oryginalnych**, w tym **16** opublikowanych w czasopismach z Listy Filadelfijskiej, **1 międzynarodowe zgłoszenie patentowe**, **8 prac poglądowych**, **4 prace popularno-naukowe**.

Sumaryczny *impact factor* (IF) wynosi **29,373** punktacja MNiSW **384**, **liczba cytowań wg Web of Science (na dzień 22.10.2016): 167** i **indeks Hirscha 8**.

2. Osiągnięcie naukowe zgłoszone do postępowania habilitacyjnego

Osiągnięcie naukowe wynikające 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.) zgłoszone do postępowania habilitacyjnego stanowi cykl 7 oryginalnych prac naukowych opublikowanych w czasopismach z listy JCR w latach 2009-2016 i opisuje zwarte tematycznie badania z zakresu chemii medycznej zatytułowane: „Tricykliczne pochodne 7-H-puryny jako ligandy receptorowe i inhibitory enzymatyczne o działaniu psychotropowym”.

Zgodnie z analizą bibliometryczną sumaryczny współczynnik *impact factor* (IF) prezentowanego cyklu wynosi **15,361**, a odpowiadająca mu punktacja MNiSW **145**. We wszystkich pracach jestem pierwszym autorem, w sześciu także autorem korespondencyjnym.

2.1. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

H1. Zagórska, A.; Jurczyk, S.; Pawłowski, M.; Dybała, M.; Nowak, G.; Tatarczyńska, E.; Nikiforuk, A.; Chojnacka-Wójcik, E. Synthesis and preliminary pharmacological evaluation of imidazo[2,1-f]purine-2,4-dione derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 2009, *44*, 4288-4296.

IF₂₀₀₉ = 3,269, Punktacja MNiSW: 20, (udział własny 75% w tym: koncepcja pracy, synteza związków, analiza widm, zebranie i opracowanie danych, napisanie tekstu)

H2. Zagórska, A.; Czopek, A.; Pawłowski, M.; Dybała, M.; Siwek, A.; Nowak, G. Serotonin transporter activity of imidazolidine-2,4-dione and imidazo[2,1-f]purine-2,4-dione derivatives in aspect of their acid-base properties. *Med. Chem. Res.* 2012, *21*, 3455-3459.

IF₂₀₁₂ = 1,612, Punktacja MNiSW: 15, (udział własny 75% w tym: koncepcja pracy, opracowanie metody analitycznej, zebranie i opracowanie danych, wykonanie obliczeń, napisanie tekstu)

H3. Zagórska, A.; Pawłowski, M.; Siwek, A.; Kazek, G.; Partyka, A.; Wróbel, D.; Jastrzębska-Więsek, M.; Wesołowska, A. Synthesis and pharmacological evaluation of novel tricyclic[2,1-f]theophylline derivatives. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 2013, *346*, 832-839.

(IF₂₀₁₃ = 1,396, Punktacja MNiSW: 20, (udział własny 60% w tym: koncepcja pracy, synteza związków, zebranie i opracowanie danych, napisanie tekstu)

H4. Zagórska, A.; Kołaczkowski, M.; Bucki, A.; Siwek, A.; Kazek, G.; Satała, G.; Bojarski, A.J.; Partyka, A.; Wesołowska, A. Pawłowski, M. Structure-activity relationships and molecular studies of novel arylpiperazinyalkyl purine-2,4-diones and purine-2,4,8-triones with antidepressant and anxiolytic-like activity. *Eur. J. Med. Chem.* 2015, *97*, 142-154.

(IF₂₀₁₅ = 3,902, Punktacja MNiSW: 40, (udział własny 65% w tym: koncepcja pracy, synteza związków, zebranie i opracowanie danych, napisanie tekstu)

H5. Zagórska, A.; Czopek, A.; Pełka, K.; Bajda, M.; Stanisław Wallis K.; Pawłowski, M. Reversed-phase high performance liquid chromatography study of lipophilicity of imidazo[2,1-*f*]theophylline derivatives. *Acta Pol. Pharm.* 2015, 72, 663-669.

(IF₂₀₁₅ = 0,877, Punktacja MNiSW: 15, (udział własny 65% w tym: koncepcja pracy, wykonanie analizy chromatograficznej, zebranie i opracowanie danych, wykonanie obliczeń, i napisanie tekstu)

H6. Zagórska, A.; Gryzło, B.; Satała, G.; Bojarski, A.J.; Głuch-Lutwin, M.; Mordyl, B.; Kazek, G.; Pawłowski, M. Receptor affinity and phosphodiesterases 4B and 10A activity of octahydro- and 6,7-dimethoxy-3,4-dihydro-isoquinolin-2(1*H*)-yl-alkyl derivatives of imidazo- and pyrimidino[2,1-*f*]purines. *Acta Pol. Pharm.* 2016, 73, 369-377.

(IF₂₀₁₆ = 0,877, Punktacja MNiSW: 15, (udział własny 75% w tym: koncepcja pracy, synteza związków, zebranie i opracowanie danych, napisanie tekstu)

H7. Zagórska, A.; Bucki, A.; Kołaczkowski, M.; Siwek, A.; Głuch-Lutwin, M.; Starowicz, G.; Kazek, G.; Partyka, A.; Wesołowska, A. Słoczynska, K.; Pękala, E.; Pawłowski, M. Synthesis and biological evaluation of 2-fluoro and 3-trifluoromethyl-phenyl-piperazinylalkyl derivatives of 1*H*-imidazo[2,1-*f*]purine-2,4(3*H*,8*H*)-dione as potential antidepressant agents. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2016, 29, 1-15. (IF₂₀₁₆ = 3,428, Punktacja MNiSW: 20, (udział własny 75% w tym: koncepcja pracy, synteza związków, wyznaczenie parametrów fizykochemicznych, zebranie i opracowanie danych, napisanie tekstu)

Łącznie: IF = 15,361; MNiSW = 145, średni udział własny 70%

Badania będące przedmiotem postępowania habilitacyjnego zostały wykonane w następujących zespołach:

1. Syntezę wszystkich substratów oraz związków finalnych opisanych w pracach **H1-7** przeprowadzono w Zakładzie Chemii Leków Katedry Chemii Farmaceutycznej UJ CM w Krakowie.
2. Badania właściwości kwasowo-zasadowych (praca **H2**) oraz lipofilowych (prace **H5, H7**) przeprowadzono w Zakładzie Chemii Leków Katedry Chemii Farmaceutycznej UJ CM w Krakowie.
3. Badania *in vitro* w zakresie powinowactwa receptorowego i aktywności SERT, zostały wykonane w Katedrach Farmakobiologii i Farmakodynamiki UJ CM (prace **H1-4, H6, H7**) oraz w Zakładzie Chemii Leków Instytutu Farmakologii Polskiej Akademii Nauk (IF PAN) w Krakowie (prace **H4, H6**).
4. Badania profilu funkcjonalnego *in vitro* zostały wykonane w Katedrach Farmakobiologii UJ CM i Farmakodynamiki UJ CM (prace **H3, H7**) oraz w firmie Cerep w Celle l'Evescault we Francji (praca **H4**).

5. Badania profilu funkcjonalnego *in vivo* zostały wykonane w Zakładzie Badań Nowych Leków IF PAN w Krakowie (praca **H1**) oraz w Zakładzie Farmacji Klinicznej UJ CM (praca **H3**).
6. Badania farmakologiczne *in vivo* zostały wykonane w Zakładzie Badań Nowych Leków IF PAN w Krakowie (praca **H1**) oraz w Zakładzie Farmacji Klinicznej UJ CM (prace **H3, H4, H7**).
7. Badania stabilności metabolicznej *in vitro* (praca **H7**) zostały wykonane w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej UJ CM.
8. Obliczenia statystyczne dotyczące analizy głównych składowych (PCA) zostały wykonane w Katedrze Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej UJ CM (praca **H5**).
9. Badania metodami modelowania molekularnego (prace **H4 i H7**) były prowadzone w Zakładzie Chemii Leków Katedry Chemii Farmaceutycznej UJ CM przy użyciu oprogramowania Small-Molecule Drug Discovery Suite (Schrödinger, Inc).

2.2. Prezentacja wyników stanowiących podstawę habilitacji

2.2.1. Wprowadzenie

Zdrowie psychiczne, wg definicji Światowej Organizacji Zdrowia (World Health Organization, WHO), stanowi integralną część zdrowia człowieka. Znajduje to odzwierciedlenie w definicji : „zdrowie to nie tylko całkowity brak choroby, czy kalectwa, ale także stan pełnego, fizycznego, umysłowego i społecznego dobrostanu (dobrego samopoczucia)”. W maju 2012 roku, 65 Światowe Zgromadzenie WHO, przyjęło uchwałę zobowiązującą kraje członkowskie do przyjęcia kompleksowej, skoordynowanej strategii, dotyczącej promocji profilaktyki i leczenia zaburzeń psychicznych, na szczeblach krajowych [1]. Na zdrowie psychiczne, podobnie jak inne aspekty zdrowia, może mieć wpływ szereg czynników społeczno-gospodarczych, do których można zaliczyć szybki rozwój cywilizacyjny, postępujące zagrożenie ubóstwem, bezrobocie, marginalizacja, narażenie na konflikty, klęski żywiołowe oraz globalny kryzys finansowy. Co więcej, w wyniku wydłużania się średniej długości życia, pojawiają się choroby związane z wiekiem (przewlekłe), którym towarzyszą stany lękowe lub depresyjne. Badania dotyczące osób z zaburzeniami psychicznymi, wskazują na występowanie w tej grupie, nieproporcjonalnie wyższych wskaźników niepełnosprawności oraz śmiertelności. Na przykład, u osób z ciężką depresją lub schizofrenią, szansa przedwczesnej śmierci jest o 40 do 60% większa niż w populacji ogólnej, z powodu fizycznych problemów zdrowotnych, które są często pozostawiane bez nadzoru. Kolejną przyczyną przedwczesnych zgonów są samobójstwa, szczególnie w grupie młodych ludzi. Olbrzymie koszty społeczne i ekonomiczne związane z przebiegiem zaburzeń psychicznych, są powodem, dla którego wciąż poszukuje się nowych metod farmakoterapii [2].

Psychiatria klasyfikuje ponad 100 grup różnych zaburzeń, które występują w populacji z różnym nasileniem [3,4]. Największy odsetek chorych oraz problemy natury terapeutycznej, dotyczą zaburzeń afektywnych oraz schizofrenii. Zaburzenia afektywne są to choroby psychiczne przebiegające ze

zmianami emocjonalnymi, nastroju i napędu, mogące przybierać formy depresji lub przeciwstawianej jej manii z epizodami lękowymi. Schizofrenia jest przewlekłą chorobą z wielowarstwowymi zaburzeniami struktury osobowości, ze zmianami myślenia, odczuwania i postrzegania rzeczywistości. Leczenie farmakologiczne jest konieczne w przypadku, zarówno schizofrenii jak i chorób afektywnych, ze względu na wysokie ryzyko popełnienia samobójstwa przez chorego oraz niemożność normalnego funkcjonowania w społeczeństwie. Leki psychotropowe - stabilizujące nastrój i przeciwdepresyjne, dokonały w praktyce i teorii psychiatrii prawdziwej rewolucji. Po pierwsze, rozwój tej grupy leków dokonał się w powiązaniu z badaniem układów receptorowo-efektorowych oraz dróg biosyntezy i rozkładu neuroprzekaźników. Po drugie, mechanistyczna interpretacja skuteczności leków psychotropowych, ukierunkowała badania na przyczyny powstawania chorób psychicznych. Wnioski z dotychczasowych badań wskazały, że przyczyny i patofizjologia, zarówno chorób afektywnych jak i schizofrenii, są złożone i nie do końca poznane. Ocena skuteczności leków psychotropowych w warunkach klinicznych i powiązanie obserwowanych efektów z badaniami na poziomie komórkowym i molekularnym, doprowadziły do sformułowania teorii dotyczących przyczyn powstawania chorób afektywnych i schizofrenii [5-10].

Badania wskazują, że zaburzenia w komunikacji międzyneuronalnej w charakterystycznych obszarach mózgu, są jedną z głównych przyczyn powstawania w/w chorób. W komunikację międzyneuronalną są zaangażowane neuroprzekaźniki działające na powierzchni komórki, poprzez interakcję z odpowiednimi receptorami. W przypadku depresji i schizofrenii, za kluczowe uznaje się serotoninę (5-HT), dopaminę (D) i noradrenalinę (NA), działające poprzez wpływ na odpowiednie receptory, zlokalizowane głównie w obrębie struktur limbicznych mózgu. Receptory te wykazują duże spektrum zróżnicowania, co skutkuje uruchomieniem różnych, wewnątrzkomórkowych kaskad przekazywania sygnału, w zależności od klasy receptora. Zaburzenia depresyjne mogą być powodowane przez zmniejszoną dostępność monoamin, zwłaszcza noradrenaliny (NA) i serotoniny (5-HT) - (**teoria monoaminergiczna** [6]) lub też upośledzeniem mechanizmów odporności komórkowej, związanej z neurotroficznym czynnikiem pochodzenia mózgowego (ang. brain-derived neurotrophic factor, BDNF). Przypuszcza się, że BDNF bierze bezpośredni udział w naprawie uszkodzonych neuronów, lub w sposób pośredni, poprzez zwiększenie poziomu serotoniny [12]. **Zaburzenia transdukcji sygnału**, pomiędzy czynnikami transkrypcyjnymi, jest brane pod uwagę jako jeden z możliwych mechanizmów, leżących u podstawy zmniejszonej plastyczności i skrócenia czasu przeżycia neuronów w przebiegu depresji [12,13].

U prawie połowy chorych na depresję, występują **zaburzenia działania osi podwzgórze-przysadka-nadnercza** [6]. W warunkach fizjologicznych, organizm reaguje na stres uwolnieniem z podwzgórza czynnika uwalniającego kortykotropinę (corticotropin-releasing factor, CRF), który z kolei powoduje uwolnienie hormonu adrenokortykotropowego (ACTH) z przysadki [5]. Kortykotropina działa na nadnercza i powoduje uwolnienie glikokortykosterydów (głównie kortyzolu), które są hormonami efektorowymi w reakcji na stres. Działanie osi podwzgórze – przysadka – nadnercza jest regulowane

przez hipokamp oraz ciało migdałowate, które odpowiednio hamują lub aktywują oś. W warunkach długotrwałego, silnego stresu, podwyższony poziom kortyzolu może niekorzystnie wpływać na te obszary mózgu [6].

Schizofrenia, podobnie jak depresja i zaburzenia afektywne, jest schorzeniem, którego przyczyn do tej pory nie da się jednoznacznie wyjaśnić. Obecnie, uznane teorie opierają się na kompilacji wyników badań genetycznych, biochemicznych, neurofizjologicznych, neurologicznych, a nawet wirusologicznych [7-11]. Za główną przyczynę schizofrenii uważa się zaburzenia funkcjonowania neuroprzekazników, głównie dopaminy. Liczne badania dowodzą, że stan **hiper-dopaminergiczny** wiąże się z nasileniem objawów wytwórczych, a **hipo-dopaminergiczny** z występowaniem objawów ubytkowych. Upośledzenie funkcji poznawczych, towarzyszące schizofrenii, nie jest spowalniane przez leki przeciwpsychotyczne, które działają przez antagonizm wobec receptora D₂, co wywołuje w następstwie odhamowanie aktywności cykazy adenylnowej [9,14]. Odnotowano również, osłabioną czynność przedczołowych szlaków dopaminergicznych oraz nasiloną czynność mezolimbicznych dróg dopaminergicznych [13]. W stanach przewlekłych choroby zaobserwowano też **zaburzenia stężenia serotoniny**, którego spadek wiąże się ze stanami paranoidalnymi oraz innymi, ostrymi stanami [15].

Należy również wspomnieć o teoriach dotyczących regulacyjnego wpływu układu glutamatergicznego, cholinergicznego, gabaergicznego, katecholaminergicznego oraz prostaglandyn; na równowagę neuroprzekazników w OUN [15-17]. Interesująca jest także teoria chemicznej reakcji a nie blokady receptorowej w mechanizmie działania leków przeciwpsychotycznych [18,19]. W ostatnich latach, wykazano także udział kwasu moczowego i związanego z nim układu purynergicznego, w patogenezie i leczeniu chorób afektywnych. Koncepcja purynergiczna chorób afektywnych, zakłada m.in. istotną rolę patogenetyczną kwasu moczowego, receptorów adenozynowych P1 oraz receptorów nukleotydowych P2X oraz P2Y [20].

Podsumowując, obecnie nie ma farmakoterapii, która w sposób wystarczający ograniczałaby występowanie objawów depresji, zaburzeń lękowych i schizofrenii. Doświadczenia z badań klinicznych, w zakresie skuteczności i tolerancji potencjalnych leków psychotropowych, nie dają jednoznacznej odpowiedzi, jak wiele receptorów i/lub układów enzymatycznych, powinno być zaangażowanych w celu przeprowadzenia optymalnej, wielokierunkowej terapii [16,21,22]. Celowana modulacja kilku układów efektorowych powinna uwzględniać wyeliminowanie niekorzystnych efektów i włączenie dodatkowej, korzystnej aktywności receptorowej i/lub enzymatycznej. Wyniki badań przedklinicznych potwierdzają, że tego typu strategia może przynieść terapeutyczne korzyści w leczeniu schorzeń OUN o złożonej etiologii [23].

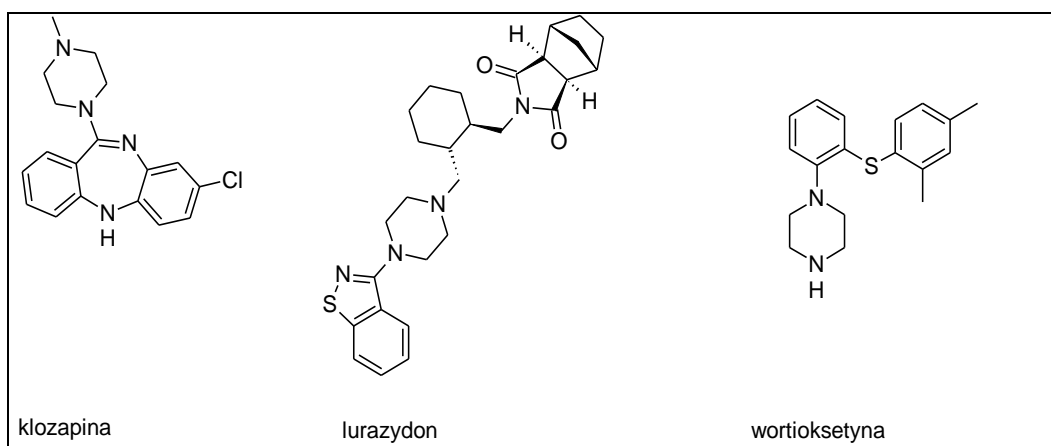
2.2.2. Strategie poszukiwania nowych leków psychotropowych

Zadaniem badań w zakresie chemii leków jest, w pierwszym etapie, zaprojektowanie struktury rokującej odpowiedni kierunek działania farmakologicznego. W ostatnich latach, w celu wyeliminowania przypadkowości odkryć, wprowadzono różnorodne metody badawcze, dla zracjonalizowania procesu

opracowania nowego leku (ang. *rational drug design*). Stosując komputerowe metody wspomaganie projektowania leków, w oparciu o podobieństwo do istniejących ligandów (*ligand-based drug design*) lub strukturę farmakofora (*pharmacophore-based drug design*), zakładano, że otrzymane związki będą charakteryzować się odpowiednią selektywnością, w myśl zasady „jeden związek - jeden cel biologiczny” (ang. *single-target agent*) [21,22]. Tego typu strategia okazała się skuteczna, ale tylko w przypadku chorób o prostej etiologii, gdzie cel biologiczny był wyraźnie określony (receptor, enzym) i dodatkowo, znana była struktura krystaliczna farmakofora [23]. Niestety, często na dalszych etapach badań okazywało się, że racjonalnie zaprojektowany lek lub kandydat na lek, oprócz oddziaływania z głównym celem biologicznym, oddziałuje także z innymi strukturami (ang. *off-targets*). Wykazano, że często jest to przyczyną działań niepożądanych lub wręcz obserwowanej toksyczności. Co więcej, związki o zdefiniowanym, selektywnym wpływie na jeden z celów biologicznych, mogą uruchomić jednocześnie kilka układów receptorowych lub enzymatycznych [24]. W stanach chorobowych, dodatkowo dochodzi do zaburzenia równowagi oraz sekwencji, w jakiej te procesy następują. W przypadku schorzeń psychiatrycznych, których etiologia jest złożona, regulowana jednocześnie przez kilka układów receptorowych lub enzymatycznych, tworzących niejednokrotnie rozległą siatkę połączeń, strategia selektywności nie sprawdziła się [25]. W konsekwencji, z punktu widzenia skuteczności terapii, usiłuje się oddziaływać na kilka celów biologicznych, poprzez stosowanie polipragmazji lub też przyjmowanie jednej postaci leku, która stanowi preparat złożony z kilku aktywnych substancji [24].

Chemia leków zaproponowała rozwiązanie, stawiając sobie za cel możliwość zaprojektowania związku, który w swojej strukturze zawiera elementy umożliwiające oddziaływanie z kilkoma celami biologicznymi, istotnymi z terapeutycznego punktu widzenia.

Taki przypadek określa się mianem „zaprojektowanej nieselektywności” lub „selektywnej nieselektywności” (ang. *designed nonselectivity* lub *selective nonselectivity*). Roth i współpracownicy [23] w pracy dotyczącej perspektyw w zakresie nowych metod poszukiwania leków skutecznych w leczeniu zaburzeń nastroju i schizofrenii, porównali takie substancje do tzw. „magicznej strzelby” (ang. *magic shotgun*) w analogii do terminu opisującego leki selektywne jako tzw. „magiczne pociski” (ang. *magic bullets*). Przykładem tego typu leków są atypowe neuroleptyki (**kłozapina**, olanzapina, kwetiapina, zyprasidon, **lurazydon**) oraz multimodalne leki przeciwdepresyjne (**wortioksetyna**, imipramina, agomelatyna) (Rys.1).

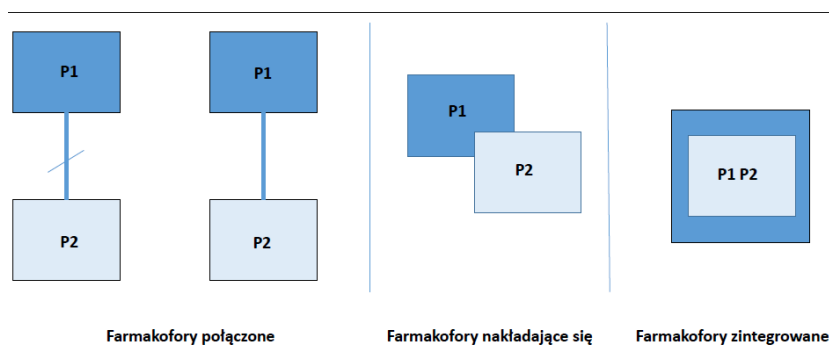


Rys. 1. Wzory strukturalne klozapiny, lurazydonu i wortioksetyny.

Dla koncepcji projektowania leków działających na wybrane cele biologiczne, w celu uzyskania synergii w oddziaływaniu, jednocześnie na różne układy biologiczne, utworzono kilka nazw. W literaturze przedmiotu stosuje się najczęściej takie określenia jak *designed multiple ligands* (DML), *multi-target-directed ligands*, *multiple-binding ligands*, *multifunctional drugs* [24-27]. W języku polskim funkcjonują tłumaczenia dosłowne np. zaprojektowany ligand wielokrotny lub ligand wielofunkcyjny, leki wielocelowe lub wielofunkcyjne.

Morphy i Rankovic, w pracy dotyczącej pozyskiwania ligandów wielofunkcyjnych, opisują dwie zasadnicze strategie; oparte na wiedzy i wykorzystujące badania przesiewowe [24]. Strategia oparta na wiedzy (*knowledge-based approach* lub *framework combination*), wykorzystuje fragmenty farmakoforów znanych ligandów, które zostają ze sobą w różnym stopniu zintegrowane.

Farmakofory, w cząsteczce liganda wielofunkcyjnego, mogą zostać połączone (zintegrowane) ze sobą w sposób umożliwiający ich późniejszy rozdział, mogą nakładać się wzajemnie - częściowo lub całkowicie, wskutek ich strukturalnego podobieństwa (Rys. 2).



Rys.2. Strategia łączenia farmakoforów P1 i P2. Opracowano na podstawie [26]

W przypadku ligandów o wyraźnie oddzielonych grupach farmakoforowych, stosowane łączniki mogą być, w warunkach metabolizmu ustrojowego, trwałe lub podlegać procesom metabolicznym. Do trwałych łączników zalicza się łańcuchy alkilenowe lub fragmenty arylove. Ligandy, częściowo nakładające się, można traktować jako hybrydy dwóch układów farmakoforowych, natomiast w przypadku ligandów wysoko zintegrowanych, elementy farmakoforów nakładają się na siebie całkowicie. Należy jednak wyraźnie podkreślić, że wszystkie opisane strategie, można stosować w przypadku, gdy znana jest struktura celu biologicznego, a co za tym idzie precyzyjnie określone są elementy farmakofora [26].

Odkryta przeszło 50 lat temu klozapina (Rys. 1), nadal uważana jest za „złoty standard” w leczeniu odpornej na inne leki schizofrenii, z powodu większej skuteczności klinicznej i braku ubocznych efektów ze strony układu pozapiramidowego. Klozapina wykazuje szeroki profil receptorowy aktywności farmakologicznej i wysokie powinowactwo ($K_i < 10$ nM) do szeregu receptorów serotoninowych (5-HT_{1A}, 5-HT_{2C}, 5-HT₆, 5-HT₇), dopaminowych (D₁-D₄), muskarynowych (M₁-M₅), adrenergicznych (α_1 , α_2) i histaminowych (H₁) [28]. Melzer i współpracownicy, jako cechę atypowości neuroleptyka, przyjęli wyższą wartość powinowactwa do receptorów 5-HT_{2A} w porównaniu do D₂, co ich zdaniem tłumaczy zwiększoną skuteczność i zmniejszone nasilenie występowania objawów pozapiramidowych [29]. Dodatkowo, istotny wydaje się profil receptorowej aktywności funkcjonalnej, który w tym wypadku dotyczy antagonistycznego wpływu na receptory, zarówno serotoninowe jak i dopaminowych. Dalsze badania nad grupą atypowych neuroleptyków, wskazały kolejne receptory, które wykazują duże znaczenie w ich klinicznym działaniu. I tak, skuteczność klozapiny w terapii lęku, depresji, zburzeń poznawczych i objawów negatywnych w schizofrenii, powiązano z częściowym agonizmem wobec receptorów 5-HT_{1A}. Agoniści receptora 5-HT_{1A} mogą dodatkowo nasilać aktywność antypsychotyczną antagonistów dopaminergicznych i jednocześnie zapobiegać występowaniu objawów pozapiramidowych, będących wynikiem blokady receptorów D₂ w prążkowie [29]. Klozapina, powoduje również zwiększenie uwalniania dopaminy i noradrenaliny w korze przedczołowej, względem podkorowych obszarów, co może odpowiadać za skuteczność w leczeniu negatywnych symptomów i poznawczych zaburzeń w schizofrenii. Dotychczasowe wyniki badań sugerują, że unikalna skuteczność farmakologiczna klozapiny, jest wynikiem jej aktywności wieloreceptorowej (ang. *multi-receptor targeting*) [30].

Wortiooksetyna (Rys. 1) jest nowym lekiem przeciwdepresyjnym, o złożonym (multimodalnym), monoaminergicznym mechanizmie działania. Koncepcja tego typu związków powstała w wyniku obserwacji, że związki hamujące wychwyt zwrotny monoamin zwiększają stężenie serotoniny i/lub noradrenaliny w synapsach ośrodkowego układu nerwowego (OUN), co prowadzi do stymulacji szerokiej gamy receptorów dla serotoniny i noradrenaliny [31,32]. Wyniki badań na modelach zwierzęcych depresji wskazują, że aktywacja receptorów np. 5-HT_{2A}, 5-HT₃ czy 5-HT₇, może być niekorzystna, co prowadzi do wniosku, że w ramach terapii depresji, korzystnie jest je blokować [33,34] natomiast stymulować postsynaptyczne receptory 5-HT_{1A} [32,35]. Badania *in vitro* i *in vivo*

potwierdziły, że wortioksetyna jest silnym i względnie selektywnym inhibitorem wychwytu zwrotnego serotoniny. Lek, w stężeniach zbliżonych do tych potrzebnych do blokowania wychwytu zwrotnego serotoniny, jest antagonistą receptorów 5-HT₃ (3,7 nM) i 5-HT₇ (19 nM) oraz agonistą 5-HT_{1A} (15 nM). Powinowactwo do receptorów 5-HT_{1B} i 5-HT_{1D} jest słabsze, ale nie wyklucza się, że również przyczynia się do efektów klinicznych. W badaniach klinicznych, wortioksetyna wykazywała działanie przeciwdepresyjne porównywalne do efektów duloksetyny i wenlafaksyny, natomiast w porównaniu do innych leków jest lepiej tolerowana [36].

Lurazydon (dawniej znany jako SM-13496) jest pochodną azapironu (Rys. 1), wykazującą właściwości przeciwpsychotyczne i przeciwdepresyjne, potwierdzone w modelach przedklinicznych oraz w randomizowanych badaniach klinicznych [37,38]. Obecnie jest zarejestrowanym, nowym lekiem przeciwpsychotycznym drugiej generacji, przeznaczonym do leczenia schizofrenii (w USA i Europie) oraz do leczenia depresji, w przebiegu choroby afektywnej dwubiegunowej (w USA). Lurazydon wiąże się silnie z receptorami dopaminowymi D₂, serotoninowymi 5-HT_{2A}, 5-HT₇, 5-HT_{1A}, a także z receptorami adrenergicznymi α_{2C}. Powinowactwo do kilku innych receptorów dopaminowych, serotoninowych i noradrenergicznych, określono jako słabe, natomiast powinowactwo do receptorów histaminowych H₁ i cholinergicznym receptorów muskarynowych, było pomijalne [38]. Badania *in vitro* wykazały unikalny profil aktywności farmakologicznej tego leku, który obejmuje blokowanie receptorów dopaminowych D₂, serotoninowych 5-HT_{2A} i 5-HT₇, oraz właściwości częściowego agonisty wobec receptorów serotoninowych 5-HT_{1A} [39-41].

2.3. Cel badań

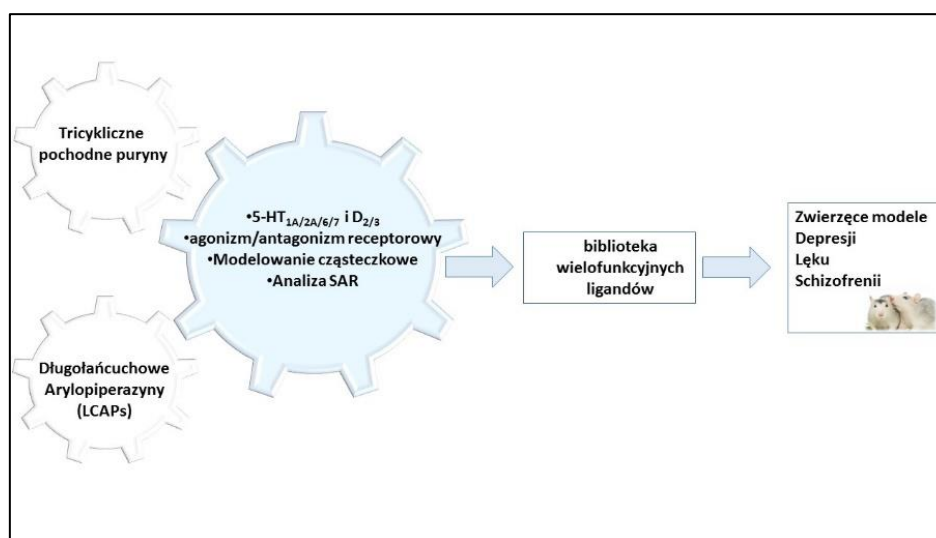
Współczesne strategie w poszukiwaniu nowych leków o działaniu przeciwdepresyjnym, przeciwlękowym i antypsychotycznym, opierają się na poszukiwaniu związków o zaplanowanej nieselektywności, w oparciu o dodanie do działania monoaminergicznego, innych efektów farmakologicznych [42].

Celem badań będących przedmiotem osiągnięcia habilitacyjnego, była, w pierwszym etapie, **synteza biblioteki wielofunkcyjnych ligandów, głównie receptorów monoaminergicznym, w oparciu o struktury znanych farmakoforów**. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy, związki o takim profilu działania farmakologicznego, powinny wykazywać aktywność psychotropową w zwierzęcych modelach depresji, lęku i schizofrenii. Struktury nowych, wielofunkcyjnych ligandów, zaprojektowano w oparciu o dwa farmakofory; 1-arylopiperazynę oraz puryno-2,4-dion. Projektowanie struktur nowych związków, ich synteza oraz badania fizykochemiczne będące, przedmiotem habilitacji, stanowią kontynuację i poszerzenie zainteresowań rozpoczętych w ramach pracy doktorskiej.

Pochodne 1-arylopiperazyny są grupą ligandów, kilku różnych systemów neuroprzebieżnikowych w obrębie OUN, m. in. serotoniny, dopaminowej i adrenergicznej. Modyfikacja, polegająca na wprowadzeniu w położenie N-4 długich, giętkich łańcuchów węglowych (2-5 węglowych) oraz końcowego fragmentu o budowie amidowej lub imidowej, prowadzi do długołańcuchowych pochodnych arylopiperazyn (ang. *Long-Chain Arylpiperazines*, LCAPs). Intensywne badania nad wpływem modyfikacji strukturalnych w obrębie LCAPs, polegających na wprowadzeniu różnego rodzaju podstawników do pierścienia fenylowego arylopiperazyny, na powinowactwo i selektywność do poszczególnych typów i podtypów receptorów serotoniny, pozwoliły na dokładne określenie tego sposobu podstawienia, natomiast rola terminalnego fragmentu, nie jest do końca poznana. Przyjmuje się, że terminalny fragment cyklicznego amidu/imidu ma wpływ stabilizacyjny na tworzący się kompleks ligand-receptor, oraz agonizm/antagonizm receptorowy [43-52].

Heterocykliczny układ puryno-2,4-dionu, występuje w teofilinie oraz lekach będących jej modyfikacjami strukturalnymi (diprofilina, nikotynian ksantynolu, bamifilina). Wielokierunkowy mechanizm działania farmakologicznego teofiliny i jej pochodnych, stanowił punkt wyjścia dla prowadzenia modyfikacji strukturalnych, w celu uzyskania związków o ukierunkowanym wpływie biologicznym. Kombinacja różnych podstawników, w siedmiu różnych pozycjach pierścienia puryny, prowadzi do związków działających bardziej selektywnie na różne szlaki biochemiczne [53]. Jedną z metod modyfikacji układu puryny, jest anelowanie (z ang. *annelation* - opasanie pierścieniem) czyli cyklokondensacja lub heterocyklizacja na już istniejącym układzie karbo- lub hetero-cyklicznym. W układzie puryny, dodatkowy, trzeci pierścień, można dobudować w pięciu lokalizacjach. Do tej pory otrzymane, tricykliczne pochodne puryny charakteryzują się ukierunkowanym działaniem farmakologicznym. Wśród nich wyróżnić można grupę antagonistów receptorów adenozynowych [54-58] oraz inhibitorów fosfodiesterazy (PDE) [59,60]. Prowadzone w Katedrze Chemii Farmaceutycznej UJ CM badania wykazały, że dobudowanie w położenie 7, 8 teofiliny układów sześć- lub siedmio-członowych, zmienia w sposób zasadniczy, profil działania ośrodkowego tych związków w porównaniu z aktywnością macierzystej metyloksantyny [61-65]. Badania w tej grupie połączeń wykazały, że rodzaj podstawnika oraz odległość pomiędzy resztą arylopiperazynową i/lub alkiloaminową, wprowadzonymi do układu tricyklicznego, ma decydujące znaczenie dla możliwości wiązania związków z receptorem 5-HT_{1A} i adenozynowym A₁ [63,65]. Pochodne ω-alkilo-1-arylopiperazynowe, laktamowe i Nielaktamowe, zawierające pirymidynopurynę lub 1,3-diazepinopurynę, z resztą benzyłową lub arylopiperazynoalkilową; w testach farmakologicznych *in vitro* i *in vivo*, wykazywały postsynaptyczny antagonizm wobec receptora 5-HT_{1A}, podczas gdy ich pirymido-piperazynowe analogi zakwalifikowano jako częściowych agonistów tego receptora [61,62]. Badania farmakologiczne na zwierzętach, wykazały znaczącą aktywność sedatywną, analgetyczną i hipotermizującą tricyklicznych pochodnych teofiliny [61-65].

Dlatego też, podejmując projektowanie nowych struktur, byłam zainteresowana określeniem **wplywu budowy tricyklicznego układu puryny** (pięcio- lub sześćo-członowy) na możliwość uzyskania związków o multireceptorowej aktywności, w grupie pochodnych LCAPs. Postanowiłam zbadać **wplyw podstawienia w tricyklicznej purynie**, na obserwowany profil aktywności receptorowej. Uzupełnienie stanowi analiza **wplywu typu połączenia układu purynowego** z ugrupowaniem LCAPs (amidowe, imidowe). W dalszym etapie badań, będących przedmiotem habilitacji, postanowiłam **doświadczalnie zbadać właściwości fizykochemiczne** nowych związków, w celu określenia ich lekopodobieństwa w zakresie kryteriów Lipińskiego. Badania miały na celu określenie deskryptorów strukturalnych, decydujących o obserwowanym profilu aktywności receptorowej w grupie badanych pochodnych (Rys. 3).



Rys.3. Strategia i narzędzia badawcze, badań będących podstawą habilitacji

Do realizacji pracy zastosowano następujące narzędzia badawcze:

- Badania chemiczne – synteza organiczna połączona z metodami analitycznymi dla potwierdzenia struktury otrzymanych związków oraz określenia ich czystości.

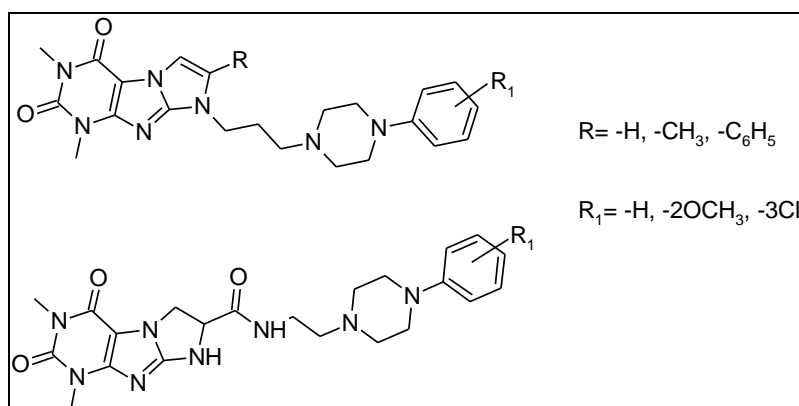
Do układów imidazo[2,1-*f*]puryno-2,6-dionu lub pirymido[2,1-*f*]puryno-2,4,8-trionu, zaplanowano wprowadzenie w położenie N8, długołańcuchowych arylopiperazyn lub bicyklicznych pochodnych amin, które warunkują powinowactwo do receptorów 5-HT_{1A} i/lub 5-HT₇. Pochodne imidazo- lub pirymido-[2,1-*f*]puryno-2,6-dionu otrzymano w wyniku kilkuetapowych syntez, zgodnie z opracowaną metodyką. Pierwszy etap polegał na syntezie substratów do reakcji cyklokondensacji: 7-ketonylowych pochodnych 8-bromoteofiliny oraz arylopiperazynoalkiloamin; substratów do reakcji cyklokondensacji, prowadzącej do pochodnych [2,1-*f*]puryno-2,4,8(1*H*,3*H*,9*H*)-trionu. Odpowiednie pochodne arylopiperazynoalkiloaminowe otrzymano wg zmodyfikowanej metody Gabriela, poprzez hydrazynolizę odpowiednich pochodnych alkiloftalimidowych. Drugi etap, to uzyskanie zaplanowanych związków, pochodnych arylo- lub bicyklo-piperazynowych, imidazo[2,1-*f*]teofiliny oraz [2,1-*f*]puryno-2,4,8(1*H*,3*H*,9*H*)-trionu, na drodze reakcji alkilowania lub cyklokondensacji.

- Badania farmakologiczne *in vitro* – radioreceptorowe, najpierw przesiewowe potem ilościowe, w celu wyznaczenia stałych wiązania do receptorów, aktywności enzymatycznej pod kątem zdolności związków do inhibicji fosfodiesteraz, oraz oceny profilu funkcjonalnej aktywności dla najaktywniejszych związków.
- Badania farmakologiczne *in vivo* – określanie profilu funkcjonalnej aktywności oraz aktywności w zwierzęcych modelach depresji, lęku i schizofrenii.
- Badania właściwości fizykochemicznych – doświadczalne wyznaczanie parametrów określających właściwości kwasowo-zasadowe (pK_a) oraz lipofilowe zsyntetyzowanych związków ($\log P$).
- Badania *in silico* – modelowanie oddziaływań z receptorami dla wyselekcjonowanych związków.
- Badania stabilności metabolicznej przy zastosowaniu modelu ludzkich mikrosomów.

2.4. Wyniki badań związanych z osiągnięciem naukowym w postępowaniu habilitacyjnym

H1. Zagórska, A.; Jurczyk, S.; Pawłowski, M.; Dybała, M.; Nowak, G.; Tatarczyńska, E.; Nikiforuk, A.; Chojnacka-Wójcik, E. Synthesis and preliminary pharmacological evaluation of imidazo[2,1-*f*]purine-2,4-dione derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 4288-4296. (IF₂₀₀₉ = **3,269**, Punktacja MNiSW: 20)

Celem niniejszej pracy była synteza i ocena aktywności biologicznej, zaprojektowanych pochodnych LCAPs, w których część terminalną stanowił układ imidazo[2,1-*f*]purino-2,4-dionu. Układ ten był modyfikowany poprzez a) nasycenie wiązania w położeniu 6,7; b) wprowadzenie dodatkowego podstawnika w położenie 7 (metyl, fenyl). W celu określenia dalszych zależności pomiędzy strukturą a obserwowaną aktywnością receptorową, farmakofor LCAPs został przyłączony do tricyklicznego układu, poprzez wiązanie amidowe o strukturze endo- lub egzo-cyklicznej (seria pochodnych N-8-arylopiperazylo-propylo-1,3-dimetylo-(1*H*,8*H*)-imidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-dionu i amidowych pochodnych kwasu 1,3-dimetylo-6,7-dihydroimidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-(1*H*,3*H*)-diono-7-karboksyłowego (Rys. 4)



Rys.4. Seria pochodnych N-8-arylopiperazylo-propylo-1,3-dimetylo-(1*H*,8*H*)-imidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-dionu i amidowych pochodnych kwasu 1,3-dimetylo-6,7-dihydroimidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-(1*H*,3*H*)-diono-7-karboksyłowego

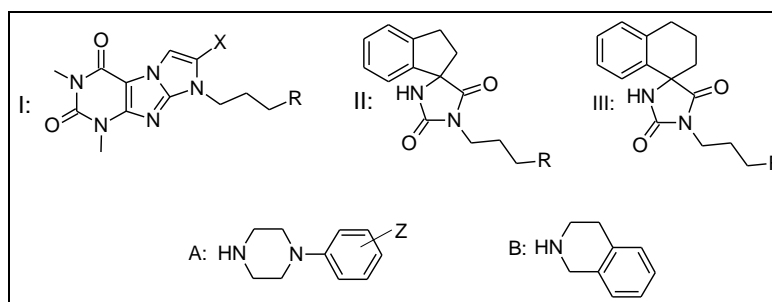
Badania powinowactwa receptorowego wykazały, że pochodne N-8-arylopiperazylo-propylo-1,3-dimetylo-(1*H*,8*H*)-imidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-dionu są ligandami receptorów 5-HT_{1A} (K_i w zakresie 5,6-96,5 nM), wykazują brak powinowactwa do receptorów 5-HT_{2A} oraz charakteryzują się niską lub bardzo niską aktywnością (K_i od 143 do 839,0 nM) lub jej brakiem, do receptorów D₂. Pochodne kwasu 1,3-dimetylo-6,7-dihydroimidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-(1*H*,3*H*)-diono-7-karboksyłowego wykazywały brak powinowactwa do receptorów wszystkich badanych podtypów. Wyselekcjonowane, do dalszych badań na zwierzętach, związki zostały zakwalifikowane jako częściowi lub pełni agoniści receptora 5-HT_{1A}. W przeprowadzonych testach, jeden ze związków 8-[3-(N4-fenyl)-piperazyn-N1-ylo-propylo]-1,3-dimetylo-(1*H*,8*H*)-imidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-dion był aktywny w teście czterech płytek (właściwości anksjolityczne), chociaż jego aktywność była słabsza jeśli chodzi o siłę działania i dawki aktywne, w porównaniu z lekiem referencyjnym, którym był

diazepam. Dalsze eksperymenty wykazały aktywność przeciwdepresyjną omawianego związku, oraz 8-[3-(N4-2-metoksyfenylo)piperazyn-N1-ylo-propylo]-1,3-dimetylo-(1H,8H)-imidazo[2,1-f]puryno-2,4-dionu, w teście wymuszonego pływania. Oba związki, podobnie jak typowy lek przeciwdepresyjny (imipramina), powodowały skrócenie czasu bezruchu myszy o wartości porównywalne do wywoływanych podaniem imipraminy.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że dla dalszych poszukiwań związków o aktywności psychotropowej, korzystne wydają się połączenia oparte o modyfikacje układu imidazo[2,1-f]puryno-2,4-dionu na końcu terminalnym długołańcuchowej arylopiperazyny.

H2. Zagórska, A.; Czopek, A.; Pawłowski, M.; Dybała, M.; Siwek, A.; Nowak, G. Serotonin transporter activity of imidazolidine-2,4-dione and imidazo[2,1-f]purine-2,4-dione derivatives in aspect of their acid-base properties. *Med. Chem. Res.* **2012**, *21*, 3455-3459. (IF₂₀₁₂ = **1,612**, Punktacja MNiSW: 15)

Właściwości kwasowo-zasadowe substancji leczniczych, wpływają na procesy farmakokinetyczne i determinują, między innymi, transport cząsteczek leku. Transporter serotoniny (5-HTT, SERT) kończy działanie synaptyczne serotoniny (5-HT) poprzez jej wychwyt zwrotny do zakończeń presynaptycznych, dzięki symportowi z jonami Na⁺ i Cl⁻. W warunkach fizjologicznych, wychwyt serotoniny w mniejszym stopniu zależy od gradientu stężeń, natomiast uzależniony jest od formy jonowej substratu [66]. Badania dowiodły, że dysocjacja protonu z 5-HT jest niezbędna dla transportu przez 5-HTT, między innymi w związku z rolą wymiennicza 5-HT⁺/H⁺ w transporcie błonowym. Na tej podstawie obecnie przyjmuje się, że forma kationowa serotoniny jest preferowana przez 5-HTT [67]. Celem badań było doświadczalne wyznaczenie pK_a, przy zastosowaniu metody miareczkowania potencjometrycznego, dla 22 pochodnych LCAPs, w których terminalny fragment stanowią pochodne imidazo[2,1-f]puryno-2,4-dionu, w porównaniu z analogami o strukturze imidazolidyno-2,4-dionu (Rys. 5).



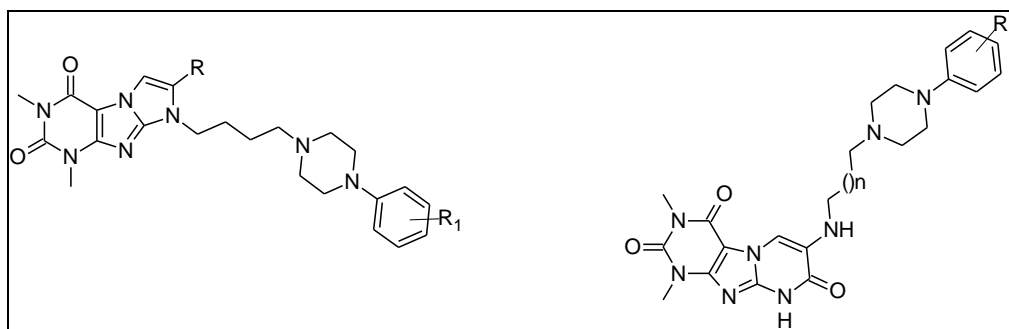
Rys.5. Pochodne imidazo[2,1-f]puryno-2,4-dionu oraz imidazolidyno-2,4-dionu

Badane związki wykazywały wysokie lub bardzo wysokie powinowactwo do receptorów 5-HT_{1A} oraz zmienne powinowactwo do receptorów 5-HT_{2A} i D₂. Badania podjęłam w celu ustalenia, jak budowa terminalnego fragmentu LCAPs wpływa na powinowactwo do SERT oraz właściwości kwasowo-zasadowe. Przesłanką do podjęcia tego typu badań, był fakt, iż dostępne programy, które *in silico* dokonują predykcji parametrów fizykochemicznych, nie różnicując wartości pK_a; dla bliskich analogów strukturalnych.

Badania farmakologiczne związków uzupełniono o określenie powinowactwa do transportera serotoniny. Wartości powinowactwa do SERT były wyższe dla pochodnych imidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-dionu z podstawnikami 2,3-dichloro- lub 3-chloro-fenylopiperazynowym (pK_i w przedziale 7,25-7,53). Pozostałe związki wykazywały umiarkowane, niskie lub brak powinowactwa do SERT. Opracowałam doświadczalne warunki dla wyznaczenia pK_a, przy zastosowaniu metody miareczkowania potencjometrycznego. Wyznaczone wartości pK_a były w zakresie od 7,55 do 11,08 i należy podkreślić, że eksperyment pozwolił na zróżnicowanie właściwości kwasowo-zasadowych bliskich analogów strukturalnych, czego nie udało się programom komputerowym. W przeprowadzonej analizie ilościowej (QSAR), stwierdzono korelację liniową między powinowactwem dla SERT (pK_i) i eksperymentalnymi wartościami pK_a, w grupie pochodnych imidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-dionu, przy czym współczynnik determinacji był umiarkowany (R² = 0,48). Podsumowując, badania pozwoliły na identyfikację dwóch, dualnych ligandów (SERT i 5-HT_{1A}) w grupie pochodnych imidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-dionu. Dodatkowo wykazano, że to właściwości kwasowo-zasadowe imidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-dionu mogą, w znaczący sposób, determinować obserwowane efekty w zakresie powinowactwa do SERT.

H3. Zagórska, A.; Pawłowski, M.; Siwek, A.; Kazek, G.; Partyka, A.; Wróbel, D.; Jastrzębska-Więsek, M.; Wesołowska, A. Synthesis and pharmacological evaluation of novel tricyclic[2,1-*f*]theophylline derivatives. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2013**, *346*, 832-839. (IF₂₀₁₃ = **1,396**, Punktacja MNiSW: 20)

Kontynuując badania w grupie tricyklicznych pochodnych teofiliny, zaprojektowałam i zsyntetyzowałam, dwie serie pochodnych opartych na strukturze imidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-dionu i pirymido[2,1-*f*]puryno-2,4,8-trionu (Rys. 6).



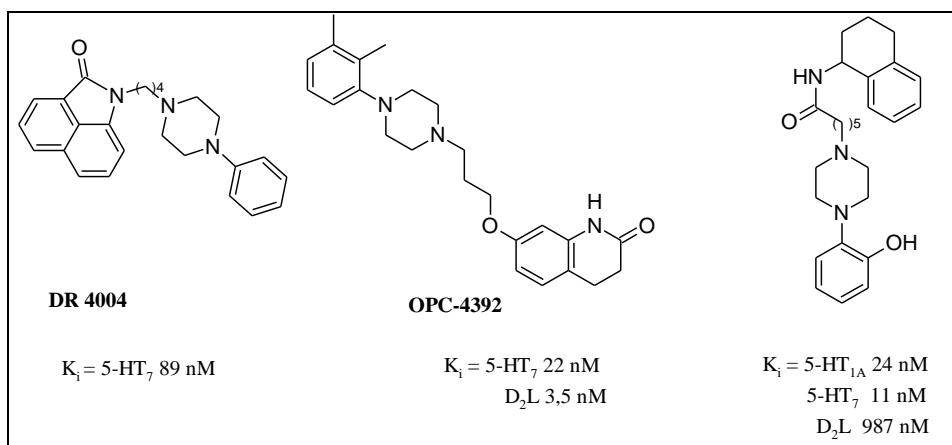
Rys.6. Pochodne imidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-dionu i pirymido[2,1-*f*]puryno-2,4,8-trionu

W tym przypadku była zainteresowana, jak budowa terminalnego fragmentu LCAPs, opartego na strukturze tricyklicznej pochodnej puryny, może wpłynąć na obserwowany profil aktywności receptorowej w zakresie powinowactwa i funkcji. Układ pirymido[2,1-*f*]-puryno-2,4,8-trionu wybrałam ze względu na wyniki wcześniejszych badań, które wykazały, że funkcjonalna aktywność pochodnych tego układu w jest podobna do aktywności ipsapironu - agonizm presynaptycznych i częściowy agonizm postsynaptycznych, receptorów 5-HT_{1A}. Ze względu na spodziewaną, wieloreceptorową aktywność nowych związków, zostały one poddane wstępnym, przesiewowym badaniom powinowactwa, do szerokiej grupy receptorów serotonergicznym (5-HT_{1A}, 5-HT₂, 5-HT₆, 5-HT₇), dopaminergicznym (D₂, D₃), i α₁-adrenergicznym. W kolejnym etapie, wyselekcjonowałam związki do określenia stałej wiązania oraz w dalszym etapie do badania aktywności funkcjonalnej wobec receptorów 5-HT_{1A}, 5-HT₂ i D₂, w warunkach testów *in vivo*.

Wyniki badania powinowactwa wykazały, że wszystkie pochodne LCAPs, których terminalny fragment oparty jest na strukturze 1,3-dimetylo-(1*H*,8*H*)-imidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-dionu, są silnymi ligandami receptorów 5-HT_{1A} (K_i w zakresie 0,5-52,2nM) i wykazują brak powinowactwa do receptorów 5-HT_{2A}. Związki zawierające podstawnik w położeniu 7 układu 1,3-dimetylo-(1*H*,8*H*)-imidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-dionu, charakteryzowały się wieloreceptorową aktywnością, gdyż oprócz powinowactwa do receptorów 5-HT_{1A}, wykazywały aktywność wobec receptorów 5-HT₇ i niskie powinowactwo do receptorów D₂. W przypadku pochodnych pirymido[2,1-*f*]puryno-2,4,8-(1*H*,3*H*,9*H*)-trionu, tylko jeden ze związków wykazywał powinowactwo do wszystkich receptorów, przy czym nie zaobserwowano wysokiej selektywności wobec określonego podtypu. Wybrane do badań związki o strukturze 8-[4-(N4-3'-chlorofenylo)-piperazyn-N1-ylo-butylo]-1,3-dimetylo-(1*H*,8*H*)-imidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-dionu i 7-metylo-8-[4-(N4-2'-metoksyfenylo)-piperazyn-N1-ylo-butylo]-1,3-dimetylo-(1*H*,8*H*)-imidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-dionu charakteryzują się, podobnie jak atypowe leki przeciwpsychotyczne - presynaptycznym agonizmem wobec receptorów 5-HT_{1A} oraz antagonizmem wobec postsynaptycznych receptorów 5-HT_{1A}. W przypadku aktywności 5-HT_{2A} i D₂ receptorowej, związki wywierały działanie antagonistyczne. Profil aktywności receptorowej jak i funkcjonalnej omawianych związków można porównać do zyprazydonu. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że dla dalszych poszukiwań związków o aktywności psychotropowej, korzystne wydają się połączenia oparte o modyfikacje w położeniu 7 układu imidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-dionu.

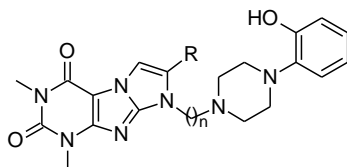
H4. Zagórska, A.; Kołaczkowski, M.; Bucki, A.; Siwek, A.; Kazek, G.; Satała, G.; Bojarski, A.J.; Partyka, A.; Wesołowska, A. Pawłowski, M. Structure-activity relationships and molecular studies of novel arylpiperazinylalkyl purine-2,4-diones and purine-2,4,8-triones with antidepressant and anxiolytic-like activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 97, 142-154. (IF₂₀₁₅ = 3,902, Punktacja MNiSW: 40)

Mając na uwadze wyniki poprzednich badań, w kolejnej pracy zaprojektowałam struktury i opracowałam metodę syntezy dwóch serii pochodnych LCAPs opartych na strukturze imidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-dionu i pirymido[2,1-*f*]puryno-2,4,8-trionu. Celem podjętych badań było określenie roli dodatkowego ugrupowania w pozycji 7 imidazo[2,1-*f*]puryny, na obserwowane powinowactwo do receptorów i profil aktywności farmakologicznej pochodnych tych układów. Układ pirymido[2,1-*f*]puryno-2,4,8-trionu jako endocykliczny amid (laktam), może być traktowany jako analog z układem laktamowym, obecnym w grupie ligandów o wysokim powinowactwie do receptorów 5-HT₇, pochodnych związku DR4004 [49] (Rys.7).

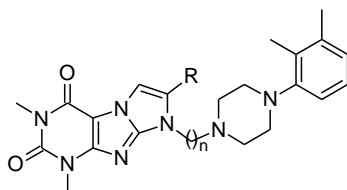


Rys.7. Struktury wybranych ligandów o multireceptorowym profilu aktywności

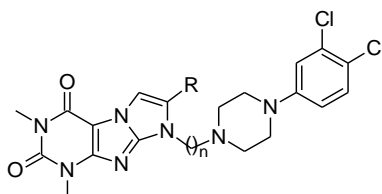
Wyniki przeprowadzonych badań powinowactwa receptorowego pozwoliły na zidentyfikowanie, wśród pochodnych LCAPs opartych na strukturze imidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-dionu i pirymido[2,1-*f*]puryno-2,4,8-trionu, ligandów o wysoki powinowactwie do receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT₇, związków o mieszanej aktywności wobec tych receptorów oraz wykazujących aktywność wobec receptorów D₂. Związki zawierające strukturę puryno-2,4-dionu wykazywały wyższe wartości powinowactwa do wszystkich omawianych podtypów receptorów, w porównaniu do pochodnych puryno-2,4,8-trionu. Pełne spektrum aktywności receptorowej zaobserwowano dla związków z podstawnikiem w pozycji 7 układu imidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-dionu. W celu wyjaśnienia znaczenia tego typu modyfikacji strukturalnej, przeprowadzono dokowanie wyselekcjonowanych związków do modeli receptora 5-HT_{1A}, i 5-HT₇. Wyniki modelowania molekularnego udowodniły, że podstawnik w położeniu 7 układu imidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-dionu ma decydujący wpływ na wartości powinowactwa i przede wszystkim selektywność, wobec podtypu 5-HT_{1A} i 5-HT₇ (Rys.8).



R	n	K _i [nM]		
		5-HT _{1A}	5-HT ₇	D ₂
-C ₆ H ₅	4	6	30	4
-C ₆ H ₅	5	9	43	24



R	n	K _i [nM]			
		5-HT _{1A}	5-HT ₆	5-HT ₇	D ₂
-CH ₃	4	<1	510	381	27



R	n	K _i [nM]			
		5-HT _{1A}	5-HT ₆	5-HT ₇	D ₂
-CH ₃	5	22	405	111	59

Rys.8. Ligandy z grupy pochodnych imidazo[2,1-f]puryno-2,4-dionu [H4]

Przeprowadzone, wstępne badania farmakologiczne *in vivo* wybranych pochodnych imidazo[2,1-f]puryno-2,4-dionu, określiły ich aktywność przeciwłękową i przeciwdepresyjną. Związki te, w dawkach aktywnych przeciwdepresyjnie i przeciwłękowo, podobnie jak leki referencyjne (imipramina i diazepam), nie wpływały na aktywność spontaniczną u myszy, w czasie obserwacji przeprowadzonej w przebiegu testu wymuszonego pływania (FST).

Podsumowując, wyniki przeprowadzonych badań, a szczególnie modelowania molekularnego, udowodniły, że dla poszukiwania związków o aktywności psychotropowej, wśród pochodnych LCAPs z terminalnym fragmentem opartym na strukturze puryny, obecność podstawnika w położeniu 7 układu imidazo[2,1-f]puryno-2,4-dionu jest wyraźnie preferowana.

H5. Zagórska, A.; Czopek, A.; Pełka, K.; Bajda, M.; Stanisław Wallis K.; Pawłowski, M. Reversed-phase high performance liquid chromatography study of lipophilicity of imidazo[2,1-*f*]theophylline derivatives. *Acta Pol. Pharm.* **2015**, 72, 663-669. (IF₂₀₁₅ = **0,877**, Punktacja MNiSW: 15)

Kontynuując badania w grupie tricyklicznych pochodnych teofiliny, w kolejnym etapie badań postanowiłam wyznaczyć doświadczalnie współczynnik podziału $\log P$, który jest miarą właściwości lipofilowych, dla pochodnych imidazo[2,1-*f*]teofiliny z podstawnikiem LCAPs, porównanego do izosterycznych pochodnych z układem tetrahydroizochinolinowym w miejsce arylopiiperazyny. Różnice w obserwowanym profilu aktywności farmakologicznej badanych związków, w porównaniu do teofiliny, można tłumaczyć właściwościami fizykochemicznymi w zakresie parametrów określających właściwości hydro-lipofilowe. Wyznaczenie, metodą doświadczalną, współczynnika będącego miarą lipofilowości, pozwoliło na zastosowanie metody analizy korelacyjnej (PCA) zależności nie tylko korelacji liniowej, pomiędzy parametrami doświadczalnymi i obliczonymi, ale także dla parametrów fizykochemicznych determinujących dyfuzję bierną, przenikanie przez barierę krew mózg, absorpcję bierną, wiązanie z białkami osocza. Badania tego typu pozwalają na przeprowadzenie ilościowej zależności pomiędzy strukturą związków a ich aktywnością farmakologiczną (QSAR).

Doświadczalnie, opracowałam warunki wyznaczenia parametru $\log k_0$, przy zastosowaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej z układem odwróconych faz (RP₁₈-HPLC). Analizując wpływ budowy chemicznej badanych związków na ich właściwości lipofilowe, rozpatrywano wpływ trzech elementów - długości łańcucha alkilowego łączącego atom azotu w położeniu N8 układu tricyklicznego z atomem azotu 4-arylopiiperazyny; rodzaju podstawnika w fragmencie 4-arylopiiperazyny lub izosterycznego układu THIQ; obecności i rodzaju podstawnika w położeniu 7 imidazo[2,1-*f*]teofiliny. Badania wykazały, że długość łącznika pomiędzy LCAPs/THIQ a układem imidazo[2,1-*f*]teofiliny nie ma znaczącego wpływu na lipofilowość, podobnie jak rodzaj podstawnika w pierścieniu fenylowym układu arylopiiperazyny. Decydujący wpływ na wyznaczone parametry lipofilowości wydaje się mieć obecność i rodzaj podstawnika w położeniu 7 imidazo[2,1-*f*]teofiliny. Wyznaczone doświadczalnie wartości $\log k_0$ dla długołańcuchowych THIQ pochodnych imidazo[2,1-*f*]teofiliny, były niższe w porównaniu z analogami zawierającymi LCAPs, co może tłumaczyć, obserwowany brak aktywności wobec receptora 5-HT_{1A} pochodnych imidazo[2,1-*f*]teofiliny z podstawnikiem THIQ.

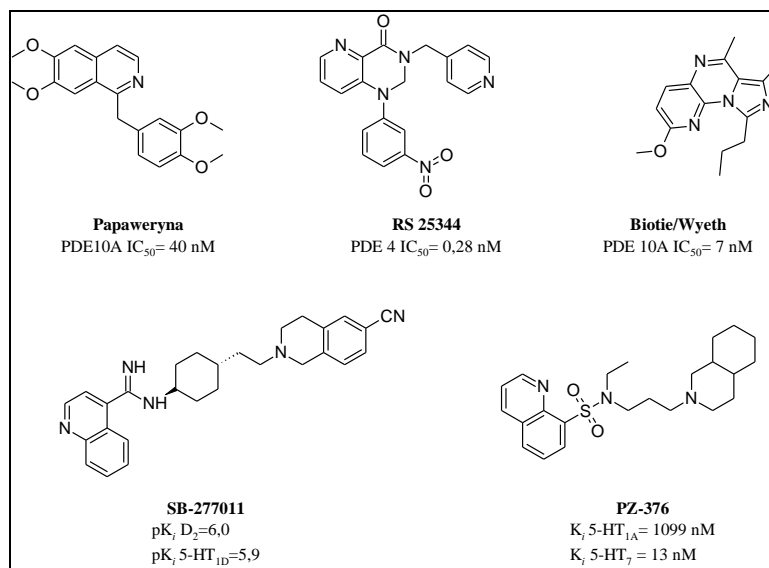
Podsumowując, analiza PCA wykazała, że w przypadku określania właściwości lipofilowych dla pochodnych imidazo[2,1-*f*]teofiliny, żadna metoda obliczeniowa nie daje wysokiej korelacji z danymi doświadczalnymi. Wydaje się, że w przypadku grupy omawianych połączeń, niezbędne jest zastosowanie metod doświadczalnych. Analiza korelacyjna parametrów ADME wykazała, że właściwości lipofilowe wyrażone przez $\log k_0$, są wysoce skorelowane ze stopniem przenikania związków przez barierę krew mózg ($\log BBB$).

H6. Zagórska, A.; Gryzłó, B.; Satała, G.; Bojarski, A.J.; Głuch-Lutwin, M.; Mordyl, B.; Kazek, G.; Pawłowski, M. Receptor affinity and phosphodiesterases 4B and 10A activity of octahydro- and 6,7-dimethoxy-3,4-dihydro-isoquinolin-2(1*H*)-yl-alkyl derivatives of imidazo- and pyrimidino[2,1-*f*]purines. *Acta Pol. Pharm.* **2016**, *73*, 369-377. (IF₂₀₁₆ = **0,877**, Punktacja MNiSW: 15)

Publikacja **H6** stanowi kontynuację badań chemiczno-farmakologicznych w grupie triheterocyklicznych układów imidazo[2,1-*f*]puryno-2,6-dionu i pirymido[2,1-*f*]puryno-2,4,8-trionu. Główną przesłanką do podjęcia dalszych badań był fakt, że LCAPs pochodne imidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-dionu, były ligandami o znaczącym powinowactwie do receptorów monoaminoergicznych, sprzężonych z białkiem G (GPCRs). Receptory tej licznej rodziny, wchodzi w interakcję z heterodimerskimi białkami regulatorowymi wiążącymi GTP (białko G). Aktywacja jednej z podjednostek tego białka (G α), prowadzi do aktywacji enzymów syntetyzujących wtórne przekaźniki (second messengers). Do grupy podstawowych, wtórych przekaźników, zaliczamy cykliczny adenozy-no-3',5'-monofosforan (cAMP) i guanozy-no-3',5'-monofosforan (cGMP). Lokalizacja, czas działania i stężenia cyklicznych nukleotydów w określonych obszarach subkomórkowych, decydują o dalszym przenoszeniu sygnału chemicznego, regulują jego siłę i specyficzność. Największą rolę, na poziomie przekaźnictwa 5-HT/D/NA, w zaburzeniach psychicznych, wydają się odgrywać szlaki związane z pobudzeniem komórki docelowej, odpowiedzialne głównie za zwiększenie poziomu cAMP [14].

Zwiększenie poziomu cAMP może dokonywać się także poprzez inhibicję izoenzymów odpowiedzialnych za jego rozkład - fosfodiesteraz (PDE). Z badań przeprowadzonych nad fosfodiesterazami PDE4 i PDE10 wynika, że ze względu na ich występowanie w rejonach mózgu kojarzonych z miejscem działania leków psychotropowych, ich inhibitory mogą mieć potencjalne znaczenie terapeutyczne [68,69]. Teofilina i teobromina to naturalne i nieselektywne inhibitory fosfodiesteraz, natomiast selektywne inhibitory PDE4 i PDE10A należą także do pochodnych ksantyny, lub są oparte na strukturze związku RS 25344 lub pochodnych papaweryny (Ryc. 9).

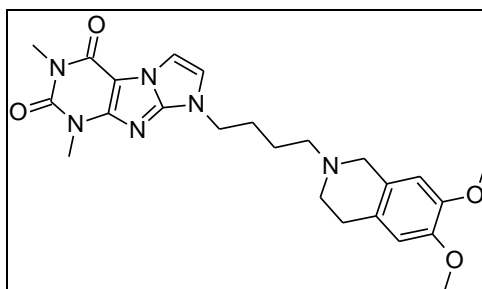
Biorąc pod uwagę powyższe, zaprojektowałam i zsyntetyzowałam pochodne triheterocyklicznych układów imidazo[2,1-*f*]puryno-2,6-dionu i pirymido[2,1-*f*]puryno-2,4,8-trionu, do których, poprzez łącznik alkilenowy, wprowadzono (w miejsce ugrupowania arylopipezynowego) podstawniki o budowie bicyklicznej, zawierające izosteryczny do arylopipezynowego układ izochinoliny. Wybrano pochodne oktahydroizochinoliny i 6,7-dimetoksy-3,4-dihydroizochinoliny, ze względu na występowanie tego typu ugrupowań w strukturach inhibitorów PDE4 i PDE10A i w związkach o aktywności receptorowej, takich jak papaweryna, SB- 277011, PZ-376 (Rys.9).



Rys.9. Struktury inhibitorów PDE4, PDE10 oraz ligandów o aktywności receptorowej

Zsyntetyzowane związki badano w kierunku ich powinowactwa względem receptorów 5-HT_{1A}, 5-HT₆, 5-HT₇ i D₂ oraz hamowania wybranych podtypów fosfodiesteraz PDE4B i PDE10A. Analiza zależności pomiędzy strukturą a aktywnością farmakologiczną, w omawianej grupie związków, wykazała, że wprowadzenie w miejsce ugrupowania arylopiperazynowego, podstawników o budowie bicyklicznej, spowodowało znaczny spadek powinowactwa receptorowego. Aktywność związków była zmienna, w zależności od podtypu receptora. W przypadku podtypu 5-HT_{1A} wartości K_i były w przedziale od 9 do 1399 nM, obserwowano brak aktywności wobec receptorów 5-HT₆ i 5-HT₇ oraz z wyjątkiem dwóch związków niskie powinowactwo do receptorów D₂. Wszystkie otrzymane związki były badane w kierunku zdolności do inhibicji PDE4B i PDE10A; w tych samych zakresach stężeń, w jakich wykazywały aktywność receptorową. W badanych seriach tylko dwa związki wykazywały zdolność do inhibicji PDE. Dla 8-(4-(6,7-dimetoksy-3,4-dihydroizochinolino-2(1H)-butylo)1,3-dimetylo-1H-imidazo[2,1-f]puryno-2,4-(3H,8H)-dionu, w początkowym stężeniu (10⁻⁴M) obserwowano 15% hamowanie PDE4B i 34% hamowanie PDE10A. W analogicznych warunkach 9-(5-(6,7-dimetoksy-3,4-dihydroizochinolino-2(1H)-ylo)-pentylo)-1,3-dimetylo-pirymido[2,1-f]puryno-2,4,8(1H,3H,9H)-trion hamował izoenzymy PDE odpowiednio w 14% i 52%. Warto zauważyć, że związki te były silniejszymi inhibitorami enzymatycznymi niż teofilina, która była nieaktywna w warunkach testu. Wyniki badań, sugerują wpływ wprowadzenia 6,7-dimetoksy-3,4-dihydro-izochinolino-alkilowego na aktywność enzymatyczną, szczególnie wobec PDE10A.

Podsumowując, badania w tej grupie pozwoliły na identyfikację dwóch ligandów receptora 5-HT_{1A} o wysokiej aktywności i dwóch inhibitorów PDE10A o niskiej aktywności. Wstępne badania wykazały, że związek o strukturze 8-(4-(6,7-dimetoksy-3,4-dihydroizochinolino-2-butylo)-1,3-dimetylo-imidazo[2,1-f]puryno-2,4-dionu (Rys.10) może być traktowany jako struktura wiodąca dla dalszych modyfikacji chemicznych, w celu uzyskania ligandów wielofunkcyjnych o podwójnym mechanizmie działania - receptorowym i enzymatycznym.



Rys.10. 8-(4-(6,7-dimetoksy-3,4-dihydroizochinolino-2-butyl)-1,3-dimetylo-imidazo[2,1-f]puryno-2,4-dion

H7. Zagórska, A.; Bucki, A.; Kołaczkowski, M.; Siwek, A.; Głuch-Lutwin, M.; Starowicz, G.; Kazek, G.; Partyka, A.; Wesołowska, A. Słoczyńska, K.; Pękala, E.; Pawłowski, M. Synthesis and biological evaluation of 2-fluoro and 3-trifluoromethyl-phenyl-piperazynylalkyl derivatives of 1*H*-imidazo[2,1-*f*]purine-2,4(3*H*,8*H*)-dione as potential antidepressant agents. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2016**, Jun 29, 1-15. (IF₂₀₁₆ = **3,428**, Punktacja MNiSW: 20)

W omawianej pracy, zaprojektowałam i zsyntetyzowałam dwie serie 2-fluoro- i 3-trifluorometylo-fenylopiiperazyno-alkilowych pochodnych imidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-(3*H*,8*H*)-dionu. Postanowiłam sprawdzić, jak unikalne właściwości fluoru, takie jak wysoka elektroujemność, mały rozmiar atomu i bardzo niska polarność, mogą wpłynąć na obserwowany profil aktywności farmakologicznej tricyklicznych pochodnych teofiliny.

Wprowadzenie atomu fluoru może znacznie zwiększyć stabilność metaboliczną związków, ich przenikanie przez błony komórkowe. Zmodyfikowane w ten sposób właściwości fizykochemiczne mogą zaowocować zwiększoną selektywnością względem wybranego celu biologicznego. W chemii leków, atom fluoru stanowi izosteryczny zamiennik grupy hydroksylowej, ponieważ długość wiązania C-F jest zbliżona do długości wiązania C-O, przez co organizmy nie są w stanie odróżnić podstawionego fluorem związku od jego prekursora [70]. Fluorowane pochodne tworzą pierwszą (spiperon, haloperidol, droperydol) i drugą (rysperydon, sertindol, paliperydon, iloperidon) generację leków przeciwpsychotycznych, także leków przeciwdepresyjnych z grupy selektywnych inhibitorów wychwytu zwrotnego serotoniny (SSRI) – fluoksetyna, fluwoksamina, paroksetyna, citalopram.

Przeprowadzone badania, nad grupą nowych związków, dotyczyły określenia wpływu atomu fluoru na obserwowane powinowactwo i selektywność wobec receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT₇, zdolności do hamowania PDE4B i PDE10A, i co za tym idzie wywołania efektów psychotropowych, obserwowanych w testach farmakologicznych *in vivo*. W celu określenia właściwości fizykochemicznych omawianych związków, zastosowałam micelarny rozdział elektrokinetyczny (MEKC), do wyznaczenia lipofilowości. Do oceny stabilności metabolicznej, wykorzystano mikrosomy ludzkiej wątroby. Analizę zależności pomiędzy strukturą a aktywnością, w grupie omawianych związków, uzupełniono o badania

metodami modelowania cząsteczkowego. Wyselekcjonowane na podstawie wyników badań *in vitro* związki zostały poddane wstępnym badaniom farmakologicznym *in vivo*.

Wszystkie badane związki charakteryzowało wysokie powinowactwo do receptorów 5-HT_{1A} i dla niektórych, siła wiązania była porównywalna do serotoniny ($K_i = 0,133$ nM). Należy podkreślić, że pochodne 3-CF₃-fenylo-piperazynyloalkilowe były bardziej aktywne niż ich analogi podstawione fluorem w położeniu 2. W przypadku receptorów 5-HT₇ zaobserwowano pełne spektrum aktywności - od braku powinowactwa, poprzez umiarkowane (K_i od 20 do 152 nM), do wysokiego ($K_i < 20$ nM). Analiza zależności struktura-aktywność wykazała, że w przypadku tego receptora, pochodne z podstawnikiem 3-CF₃ generalnie mają wyższe powinowactwo, a związek o wyższej aktywności ($K_i = 1$ nM), należy do tej grupy. Wprowadzenie silnie elektroujemnego atomu fluoru, do arylopiperazynowych pochodnych imidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-dionu, nie spowodowało zmiany ich aktywności enzymatycznej; związki, podobnie jak teofilina, słabo hamowały PDE4B i PDE10A.

Paluchowska i współpracownicy [46] badali aktywność funkcjonalną do receptorów 5-HT_{1A}, serii 1-podstawionch 4-(4-arylopiperazyn-1-ylo) pochodnych cykloheksanu z różnymi terminalnymi fragmentami opartymi na strukturze amidu lub cyklicznego imidu i ich „giętkich”, tetrametylenowych analogów. Badania wykazały, że „sztywne” ligandy z podstawnikiem 2-OCH₃ w reszcie arylovej i cyklicznym imidem, zachowują się jak antagoniści receptora 5-HT_{1A} [46]. Niepodstawione w pierścieniu fenylowym pochodne, podobnie jak ich 3-Cl lub 3-CF₃ podstawione analogi, były częściowymi lub pełnymi agonistami omawianego receptora [46]. W przypadku analizy profilu funkcjonalnego wobec receptorów 5-HT_{1A}; dla 2-fluoro- i 3-trifluorometylo- fenylopiperazyno-butylowych pochodnych imidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-(3*H*,8*H*)-dionu, zaobserwowano odwrócenie profilu receptorowego - ligandy z grupy 3-CF₃ podstawionych wykazywały właściwości antagonistyczne w stosunku do receptora 5-HT_{1A} [H7]. Co ciekawe, w grupie analogów 2-F podstawionych, tylko jeden związek wykazywał zdolność do blokowania receptora 5-HT_{1A}, co może sugerować, że w przypadku arylopiperazynowych pochodnych imidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-dionu, to nie tylko cechy związane z podstawieniem ugrupowania arylopiperazynowego decydują o właściwościach antagonistycznych, ale także podstawienie w pozycji 7 układu imidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-dionu [H7].

Zastosowanie metody MECK pozwoliło na przedstawienie charakterystyki fizykochemicznej bioaktywnych cząsteczek i porównanie ich do zaleceń "reguły pięciu", która definiuje, między innymi, zakres log*P* dla dobrego wchłaniania jelitowego i przenikania do mózgu [71]. Uzyskane wartości log*P*, dla części związków, były w zakresach "reguły pięciu" [H7]. W następnym etapie, zbadano stabilność metaboliczną wybranych związków, w celu zaklasyfikowania ich do dalszych badań. Należy podkreślić, iż w tej grupie pochodnych, tego typu badanie raportowano w literaturze po raz pierwszy. Wyniki badań pozwoliły na wskazanie jednego ze związków, jako najbardziej stabilnego metabolicznie. Wstępne badania *in vivo*, dla wybranego związku 8-(5-(4-(2-fluorofenylo)piperazyn-1-ylo)pentyl)-1,3,7-trimetylo-1*H*-imidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-(3*H*,8*H*)-dionu, wykazały jego aktywność przeciwdepresyjną w teście FST u myszy [H7]. Ponadto, zaobserwowano, że nasilenie jego aktywności przeciwłękowej,

w dawce 2,5 mg/kg, jest większe niż w przypadku związku odniesienia (diazepam). Badania zostały uzupełnione o modelowanie molekularne, w celu wskazania istotnych oddziaływań pomiędzy strukturą aktywnego liganda a miejscami wiążącymi w obrębie receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT₇ [H7].

Podsumowując, rezultaty badań opisanych w publikacji H7, wykazały, że fluorowane pochodne arylopiiperazynoalkilowe imidazo[2,1-*f*]puryn-2,4-dionu, jako ligandy wielofunkcyjne, mogą mieć istotne znaczenie dla dalszych modyfikacji strukturalnych związków o potencjalnym działaniu przeciwdepresyjnym i/lub przeciwłękowym.

2.5. Podsumowanie wyników badań stanowiących osiągnięcie naukowe w postępowaniu habilitacyjnym

W wyniku przeprowadzonych badań stanowiących podstawę habilitacji, otrzymano bibliotekę 90 zróżnicowanych strukturalnie ligandów receptorów 5-HT- i D₂-receptorowych i blokerów enzymatycznych, które badano w kierunku zdefiniowania elementów w strukturze tricyklicznego układu puryny, decydujących o właściwościach fizykochemicznych cząsteczek oraz związanej z nimi aktywności farmakologicznej. Prezentowany cykl publikacji (H1-H7) stanowi przykład planowego, kompleksowego postępowania w zakresie poszukiwania nowych pochodnych 7-H-puryny o potencjalnej aktywności psychotropowej.

Przeprowadzone zadania badawcze dotyczyły, w pierwszym etapie, zaprojektowania struktury nowych związków w oparciu o farmakofory znanych ligandów i wyniki badań własnych. Zaprojektowane związki otrzymano w wyniku opracowanej w tym celu i zoptymalizowanej, klasycznej, wieloetapowej syntezy w roztworze, obejmującej elementy techniki syntezy kombinatorycznej i syntezy równoległej, w uzasadnionych przypadkach wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym. W dalszym etapie, przeprowadzono badania chromatograficzne i spektralne dla oceny czystości otrzymanych związków i potwierdzenia ich struktury chemicznej. Następnie, wykonano badania właściwości fizykochemicznych nowych związków, ze szczególnym uwzględnieniem parametrów istotnych dla procesów farmakokinetycznych. Badania *in vitro* w kierunku aktywności receptorowej i enzymatycznej, także profilu funkcjonalnej aktywności receptorowej, pozwoliły na rozstrzygnięcie o potencjalnej przydatności nowych związków jako leków OUN. Badania uzupełniono o analizę stabilności metabolicznej z wykorzystaniem enzymów ludzkich. Kolejny etap, dotyczył przedklinicznych badań *in vivo*, w zakresie oceny przeciwdepresyjnego, przeciwpyschotycznego i/lub przeciwłękowego działania wyselekcjonowanych związków. Badania retrospektywne metodami modelowania cząsteczkowego dotyczące analizy sposobu wiązania aktywnych ligandów do receptora, pozwoliło na uzupełnienie danych dotyczących określenia zależności pomiędzy strukturą związków i ich aktywnością oraz na zidentyfikowanie fragmentów strukturalnych niezbędnych dla wystąpienia oczekiwanej aktywności farmakologicznej.

Przeprowadzone, multidyscyplinarne badania, pozwoliły na weryfikację hipotezy badawczej, dotyczącej celowości tworzenia wielofunkcyjnych ligandów o działaniu psychotropowym, w oparciu o struktury 1-arylopiperazyny i tricyklicznych pochodnych puryny.

Na podstawie przeprowadzonych badań można sformułować następujące wnioski:

1. Połączenie dwóch układów farmakoforowych – 1-arylopiperazyny i tricyklicznych pochodnych puryny, poprzez łącznik alkilenowy, prowadzi do uzyskania, zarówno wysoce aktywnych i selektywnych ligandów receptorów monoaminergicznych (5-HT i D₂), jak i do związków o wieloreceptorowym profilu aktywności.
2. Uzyskane ligandy receptorowe wykazywały zróżnicowany profil funkcjonalny (ago/antagonistyczny) w stosunku do receptorów 5-HT_{1A}, 5-HT₇ i D₂.
3. W grupie badanych związków, dla uzyskania ligandów wielofunkcyjnych, w strukturze związków występuje wyraźna preferencja obecności układu imidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-dionu *versus* układ pirymido[2,1-*f*]puryno-2,4,8-trionu.
4. Analiza struktura-aktywność receptorowa wykazała, że w przypadku pochodnych LCAPs z terminalnym fragmentem opartym na strukturze imidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-dionu istotna jest obecność w strukturze anelowanego do układu 7-H-puryny pierścienia, wiązania nienasyconego w położeniu 6,7 lub tricyklicznego układu oraz podstawnika w położeniu 7.
5. Wykazano, że dla pochodnych LCAPs z terminalnym fragmentem, opartym na strukturze puryny, właściwości kwasowo-zasadowe tego fragmentu, mogą w znaczący sposób determinować obserwowane efekty w zakresie powinowactwa do SERT. Podstawnik w położeniu 7 układu imidazo[2,1-*f*]teofiliny ma decydujący wpływ na parametry lipofilowości.
6. Wstępne badania wykazały, że związek o strukturze 8-(4-(6,7-dimetoksy-3,4-dihydroizochinolono-2-butylo)-1,3-dimetylo-imidazo[2,1-*f*]puryno-2,4-dionu, może być związkiem wiodącym (lead structure) dla dalszych modyfikacji strukturalnych, w celu uzyskania ligandów wielofunkcyjnych o podwójnym mechanizmie działania - receptorowym i enzymatycznym.
7. Wszystkie wyselekcjonowane do przedklinicznych badań behawioralnych, ligandy receptorowe z komponentą blokera izoenzymów PDE, wykazywały właściwości przeciwlękowe, przeciwdepresyjne i/lub przeciwpowrotne.

Uzyskane informacje mają istotne znaczenie dla poszerzenia wiedzy w zakresie racjonalnego poszukiwania kandydatów na leki psychotropowe w oparciu o ligandy receptorowe mające aktywność blokera enzymatycznego. Potwierdzenie zasadności hipotezy w dalszych badaniach na przykładzie innych chemotypów, może w przyszłości pozwolić na zastosowanie takiej kombinacji, w celu uzyskania nowych leków, skutecznych w terapii schorzeń psychiatrycznych.

3. Pozostałe osiągnięcia naukowe

3.1. Aktywność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Realizowany w czasie studiów farmaceutycznych, kurs chemii leków na Wydziale Farmaceutycznym UJCM, spowodował moje zainteresowanie zależnością pomiędzy strukturą związków a ich aktywnością biologiczną. Zainteresowania rozwijałam w ramach pracy magisterskiej, zrealizowanej w Katedrze Chemii Farmaceutycznej UJ CM pod opieką naukową Prof. Alfreda Zejca i Dr Jolanty Obniskiej. Praca dotyczyła syntezy związków o potencjalnym działaniu przeciwdrgawkowym w grupie pochodnych imidów kwasu bursztynowego, zawierających ugrupowanie metylenopiperazynowe przy atomie azotu imidowego (zasady Schiffa) oraz pierścień cyklopentanu w położeniu 3 układu pirolidyno-2,5-dionu połączony poprzez węgiel spiro (seria I), lub podstawnik 2-chlorofenyłowy (seria II). Przeprowadziłam syntezę, analizę danych spektralnych związków, z których seria II, w badaniach w ramach programu poszukiwania nowych leków przeciwpadaczkowych Amerykańskiego Narodowego Instytutu Zdrowia (Bethesda), wykazała działanie ochronne wobec drgawek wywołanych prądem elektrycznym. Na bazie wyników uzyskanych w pracy magisterskiej powstały publikacje (**D1 – D5**), dotyczące aktywności przeciwdrgawkowej pochodnych pirolidyno-2,5-dionu. Po zatrudnieniu na etacie asystenta w Katedrze Chemii Farmaceutycznej UJ CM moje prace badawcze związane były z tematyką poszukiwania substancji biologicznie aktywnych w grupie pochodnych teofiliny i dotyczyły syntezy chemicznej połączeń o potencjalnej aktywności, m.in. krążeniowej i ośrodkowej.

Synteza połączeń o spodziewanym działaniu na układ krążenia, dotyczyła niektórych analogów znanych inhibitorów konwertazy angiotensynowej (IKA) w grupie pochodnych proliny[2,1-f]teofiliny. Istotą problemu było opracowanie optymalnych warunków reakcji acylacji atomu azotu proliny skondensowanego z układem teofiliny, przy zastosowaniu chlorków kwasów chlorooctowego, i chlorobutanowego. W wyniku przeprowadzonych badań, wykazałam poprzez analizę widm korelacyjnych, iż mimo zastosowania różnych wariantów prowadzenia reakcji preferowana jest reakcja alkilacji, niż acylacji [załącznik 3A, rozdział 2.4, S3]. Drugim nurtem moich badań było poszukiwanie związków o potencjalnej aktywności farmakologicznej w grupie hydroksy-, alkanolo- i dialkiloamidowych pochodnych kwasu pirymido-8-ono[2,1-f]teofilino-9-alkilo-karboksyłowego oraz morfolino i dialkiloamidowych pochodnych imidazo[2,1-f]teofiliny. Badane związki wywierały różnicowany wpływ na ciśnienie krwi i EKG [**D6**]. W związku z rozwojem obszaru badań, jakim było poszukiwanie ligandów receptorów serotoninowych, zostałam włączona w przygotowanie grantu KBN 2P05F04226, realizowanego w latach 2004-2006 o temacie „Pochodne aryloalkilopiperazyn z mono- i tri-heterocyklicznym układem azolowym, o potencjalnym działaniu przeciwlękowym i/lub przeciwdepresyjnym oraz neuroleptycznym”. Mój wkład pracy polegał na syntezie chemicznej, złożonych pochodnych arylopiperazynowych o działaniu ośrodkowym, w szczególności ligandów receptorów serotoninowych typu 5-HT_{1A} i/lub 5-HT_{2A}. Tematyka ta była przedmiotem badań w ramach pracy doktorskiej, którą obroniłam z wyróżnieniem, pod kierunkiem prof. Macieja Pawłowskiego. Tytuł

pracy „Tricykliczne pochodne teofiliny z ugrupowaniami aryloalkilopiperazynowymi jako ligandy receptorów ośrodkowego układu nerwowego”. Praca stanowi początek moich badań nad tricyklicznymi pochodnymi teofiliny o aktywności ośrodkowej. Jej rezultaty pozwoliły na wyciągnięcie wniosków ogólnych, dotyczących zależności struktura-aktywność receptorowa i profil działania farmakologicznego w porównaniu z klasycznymi metyloksantynami. W tamtym okresie, nawiązałam współpracę naukową z Zakładem Badań Nowych Leków IF PAN, kierowanym przez prof. dr hab. Ewę Chojnacką-Wójcik oraz z Pracownią Spektroskopii NMR Katedry Chemii Organicznej UJ CM.

Efektom mojej aktywności naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych, było współautorstwo w 6 publikacjach oryginalnych (sumaryczny IF = 5,7; punktacja MNiSW: 41).

3.2. Aktywność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych, moja aktywność naukowa związana była głównie z projektowaniem, syntezą i badaniem właściwości fizykochemicznych, nowych, tricyklicznych pochodnych puryny, z ugrupowaniami o zróżnicowanej strukturze i przewidywanej aktywności psychotropowej (załącznik 4A). Równolegle, rozpoczęłam syntezę związków z różnych grup chemicznych (pochodne pirolidonu, piperydonu, kwasu piperydynowego, pochodnych butyrofenonu) o potencjalnej aktywności w ww. kierunku. Moja działalność naukowa uległa znacznemu poszerzeniu, głównie za sprawą zaangażowania w projekty subsydiowane ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz Narodowego Centrum Badań i Rozwoju.

W latach 2008-2011, w ramach projektu „Opracowanie innowacyjnego leku stosowanego w terapii schorzeń ośrodkowego układu nerwowego (OUN) – schizofrenii, depresji, lęku”, dofinansowanego przez NCBiR w ramach programu Inicjatywa Technologiczna I, projekt nr KB/88/12655/IT1-C/U/08, byłam wykonawcą zadań syntetycznych. Projekt realizowano we współpracy z firmą farmaceutyczną Adamed Sp. z o.o. (Pieńków), Instytutem Psychiatrii i Neurologii w Warszawie i Politechniką Krakowską. Wśród zsyntetyzowanych z moim udziałem związków, znalazło się 5 substancji zastrzeżonych w zgłoszeniu patentowych WO 2013/001498, którego jestem współtwórcą.

W latach 2009-2012 byłam wykonawcą części zadań syntetycznych w ramach grantu MNiSW pt. „Poszukiwanie nowych związków biologicznie aktywnych o potencjalnym działaniu psychotropowym w grupie ligandów receptorów monoaminergicznych” Nr NN405 378437 (kierownik Prof. Maciej Pawłowski). W wyniku realizacji programu, syntetyzowałam bibliotekę 20 pochodnych LCAPs połączonych z układem pirymido[2,1-f]puryno-2,4,8-(1H,3H,9H)-trionu. Z serii tej, jeden ze związków wykazywał powinowactwo do receptorów monoaminergicznych, przy czym nie zaobserwowano wysokiej selektywności wobec określonych podtypów receptora 5-HT i D.

W latach 2011-2013 byłam zaangażowana jako wykonawca zadań syntetycznych w ramach grantu MNiSW pt. „Poszukiwanie związków biologicznie aktywnych wśród ligandów receptorów serotoninowych, szczególnie 5-HT₇ i dopaminowych, o potencjalnym działaniu psychotropowym”

UMO-2011/01/B/NZ4/00695 (kierownik Prof. Anna Wesołowska). W wyniku realizacji programu, została przebadana *in vivo*, biblioteka związków, dla których część wyników badań farmakologicznych znajduje się w publikacji **H4, D2 i D4**.

Zasadniczy nurt moich badań stanowiących podstawę habilitacji, został zrealizowany dzięki uzyskaniu, realizacji w latach 2013-2016 grantu MNiSW, NCN nr UMO-2012/07/B/NZ7/01173). pt. "Synteza i właściwości farmakologiczne mono-, di- i tri-heterocyklicznych pochodnych azolowych, jako kombinowanych ligandów receptorowych i inhibitorów fosfodiesteraz, o potencjalnym działaniu psychotropowym" (**H4,H6,H7**) (kierownik Prof. Maciej Pawłowski). W granicie tym pełniłam funkcję wykonawcy zadania dotyczącego syntezy i resyntezy związków. Do moich zadań należało opracowanie metod badawczych dla czterech serii związków z różnych grup chemicznych. Następnie, koordynowałam prace badawcze obejmujące syntezę, w tym raportowanie roczne i przygotowanie związków do badań *in vitro*. Przeprowadzałam szczegółową interpretację wyników badań oraz kwalifikację wybranych związków chemicznych do kolejnych etapów, w tym do resyntezy i badań *in vivo*. Szeroki zakres obowiązków spowodował znaczne poszerzenie mojej wiedzy i kompetencji.

Zdobyte doświadczenie w zakresie syntezy związków z różnych grup chemicznych, pozwoliły mi na udział w charakterze wykonawcy syntezy (w latach 2012-2015), w granicie NCN nr UMO-2011/03/B/NZ7/00635, pt. „Częściowi agoniści receptorów alfa-2-adrenergicznych jako nowa perspektywa skutecznego i bezpiecznego zmniejszania masy ciała” (kierownik Dr Magdalena Kotańska). Zaplanowane do syntezy związki; pochodne guanidyny i guanabenzu, obecnie stanowią przedmiot zgłoszenia innowacji w ramach Centrum Transferu Technologii UJ (CITTRU).

Podsumowując, efektem mojej aktywności naukowo-badawczej po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych, było współautorstwo w **14 pracach oryginalnych** opublikowanych w czasopiśmie z Listy Filadelfijskiej (sumaryczny IF = **23,673**, punktacja MNiSW: **286**).

3.3. Najbliższe plany naukowe

Wyniki wcześniejszych badań, pozwoliły na rozszerzenie koncepcji ligandów kombinowanych, jako związków o potencjalnej aktywności na różne cele biologiczne. Inhibitory PDE są nowym celem terapeutycznym dla różnych schorzeń o podłożu immunologicznym, takich jak przewlekły stan zapalny, choroby neurodegeneracyjne, stwardnienie rozsiane, urazy rdzenia kręgowego i choroba Parkinsona. Celem moich nowych badań jest opracowanie metod syntezy pochodnych triazyno[3,4-f]puryno-6,8-dionu z podstawnikami (arylowymi, arylopiperazynowymi), których struktura stanowić będzie cykliczne analogi znanych inhibitorów PDE4 i/lub PDE7. Badania te stanowią integralną część projektu NCN, zakwalifikowanego do finansowania i realizacji od lipca 2015 pt. „Nowe dualne inhibitory PDE4 i PDE7 w grupie pochodnych puryny i deazapuryny - perspektywa dla terapii chorób o podłożu autoimmunologicznym” UMO-2014/15/B/NZ7/00885 (kierownik Prof. Maciej Pawłowski).

Doświadczenie zdobyte w czasie realizacji zróżnicowanych pod względem tematycznym programów naukowych zaowocowało sformułowaniem własnej koncepcji nowych związków wielofunkcyjnych,

które poprzez jednoczesne hamowanie fosfodiesterazy 10A (PDE10A) oraz interakcję z wybranymi receptorami serotonergicznymi (5-HT_{1A}/5-HT₇) i dopaminergicznymi D₂ - mogą korzystnie wpływać na poprawę funkcji poznawczych w przebiegu terapii depresji, stanów lękowych oraz schizofrenii. Zaplanowane w ramach projektu badania zależności pomiędzy strukturą związków i aktywnością farmakologiczną, mają na celu weryfikację, na poziomie molekularnym, hipotezy zakładającej, że wprowadzenie podstawnika arylo-piperazynowego do cząsteczki selektywnego inhibitora PDE10A, związku PQ-10, spowoduje rozszerzenie oddziaływania tego typu połączeń na grupę wybranych, monoaminergicznych receptorów (5-HT_{1A}/5-HT₇ i D₂). Określenie zależności pomiędzy strukturą badanych związków a zaobserwowanym profilem aktywności farmakologicznej (powinowactwo receptorowe, aktywność wobec enzymów), pozwoli na poszerzenie stanu wiedzy na temat roli receptorowych i receptorowo niezależnych mechanizmów przekazywania sygnału, w regulacji funkcji poznawczych w przebiegu depresji, stanów lękowych oraz schizofrenii. Upośledzenie funkcji poznawczych, towarzyszące schizofrenii, nie jest spowalniane przez leki przeciwpsychotyczne, które działają w oparciu o antagonizm wobec receptora D₂, co wywołuje w następstwie odhamowanie aktywności cykazy adenylanowej. Ze względu na fakt, iż w mózgu lokalizacja receptorów D₂ jest komplementarna z obecnością PDE10A, wydaje się, że hamowanie PDE10A może spowodować efekty podobne funkcjonalne do blokady receptorów D₂. Stwierdzono obecność PDE10A w korze przedczołowej, gdzie upośledzenie transmisji cAMP jest odpowiedzialne za osłabienie procesów poznawczych. Jeden z selektywnych inhibitorów PDE10A - związek PQ-10, badano w teście rozpoznawania nowych obiektów, z indukowanym przez podanie skopolaminy i związku MK-801 deficytem pamięci. W dawce 0,3 mg/kg związek PQ-10 wywoływał odwrócenie objawów indukowanych zarówno przez skopolaminę jak i MK-801. Potwierdza to pogląd, że inhibitory PDE10A mogą być odpowiednimi kandydatami na leki, zdolne do poprawy funkcji poznawczych. Z powyższych względów zajęłam się syntezą zróżnicowanych strukturalnie analogów związku PQ-10, jako wielofunkcyjnych ligandów, dających możliwości poprawy funkcji poznawczych w zwierzęcych modelach depresji, lęku i schizofrenii.

Obecnie, jestem również wykonawcą w projekcie pt. „Synteza i badania farmakologiczne nowych pochodnych benzizoksazolopropylolidyny jako wielofunkcyjnych ligandów o potencjalnych właściwościach prokognitywnych i przeciwpsychotycznych”, nr 2014/15/D/NZ7/01789 (kierownik Dr Monika Marcinkowska), gdzie zajmuje się resyntezą aktywnych farmakologicznie związków.



4. Piśmiennictwo:

1. WHA 65.4 z http://www.who.int/mental_health/mhgap/2_11_2012_Saxena.pdf
2. Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Koretz D, Merikangas KR, Rush AJ, Walters Wang PS. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA* **2003**;289:3095-105.
3. <http://apps.who.int/classifications/icd11>
4. <http://psychiatria.mp.pl/choroby/show.html?id=78549>
5. Mutschler E. i wsp. *Farmakologia i toksykologia*. MedPharm Polska 2010.
6. Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron* **2002**;34:13-25.
7. Freedman R. Schizophrenia. *N Engl J Med* **2003**;349:1738-1749.
8. Ross C.A, Margolis RL, Reading SAJ, Pletnikov M, Coyle JT. Neurobiology of schizophrenia. *Neuron* **2006**;52:139-153.
9. Dunlop BW, Nemeroff CB. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Arch Gen Psychiatry* **2007**;64:327-337.
10. Šagud M, Mihaljevic-Peles A, Begic D, Vuksan-Cusa B, Kramaric M, Zivkovic M i wsp. Antipsychotics as antidepressants: what is the mechanism? *Psychiatria Danubina* **2011**;23(3):302-307.
11. Wysokiński A, Gruszczyński W. Rola genów Disrupted-In-Schizophrenia (DISC1 i DISC2) w schizofrenii-aktualny stan wiedzy. *Postępy Psychiatrii i Neurologii*. **2008**;17(4):385-390.
12. Duman R.S. Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry* **1999**;46:1181-1191.
13. Páez-Pereda M. New drug targets in the signaling pathways activated by antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. **2005**;29:1010-1016.
14. Halene TB, Siegel SJ. PDE inhibitors in psychiatry – future options for dementia, depression and schizophrenia? *Drug Discovery Today* **2007**;12(19-20):870-878.
15. Burris KD, Molski TF, Xu C, Ryan E, Tottori K, Kikuchi T, Yocca FD, Molinoff PB. Aripiprazole, a novel antipsychotic, is a high-affinity partial agonist at human dopamine D2 receptors *J Pharmacol Exp Ther* **2002**;302 (1):381-389.
16. Alderton W, Karran E, Ward S. Current and future perspectives in psychiatric drug discovery; *Drug news perspect* **2009**; 22(6):360-364.
17. Miyamoto S, Miyake N, Jarskog LF, Fleischhacker WW, Lieberman JA. Pharmacological treatment of schizophrenia: a critical review of the pharmacology and clinical effects of current and future therapeutic agents. *Mol Psychiatry* **2012**;17:1206-1227.
18. Miller CL. On the mechanism of action of antipsychotic drugs: a chemical reaction not receptor blockade. *Curr Drug Discov Technol* **2013**;10:195-208.
19. Miller CL. The chemical interaction between adrenochrome, three different classes of antipsychotic drugs and metabolites of the kynurenine pathway. *Eur Neuropsychopharmacol* **2015**;25:435-40.
20. Malewska MK, Jasińska A, Rybakowski J. The therapeutic effects of lithium in the context of the purinergic theory of affective disorders. *Farmakoterapia w Psychiatrii i Neurologii* **2016**;32(2):97-109.
21. Hopkins AL. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. *Nat Chem Biol* **2008**;4:682-690.
22. Rydzewski RM. Real world drug discovery: a chemist's guide to biotech and pharmaceutical research. Elsevier, Amsterdam **2008**.
23. Roth BL, Sheffler DJ, Kroeze WK. Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat Rev Drug Discov* **2004**;3:353-359.
24. Morphy R. Selective multitargeted drugs. W: *Polypharmacology in drug discovery*, red.: J.U. Peters. John Wiley & Sons, Hoboken **2012**, 247-262.
25. Morphy R, Kay C, Rankovic Z. From magic bullets to designed multiple ligands. *Drug Discov Today* **2004**;9:641-651.
26. Morphy R, Rankovic Z. Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. *J Med Chem* **2005**;48:6523-6543.
27. Morphy R, Rankovic Z. The physicochemical challenges of designing multiple ligands. *J Med Chem* **2006**;49:4961-4970.
28. Baune BT. New developments in the management of major depressive disorder and generalized anxiety disorder: role of quetiapine. *Neuropsychiatr Dis Treat* **2008**;4(6):1181-1191.
29. Meltzer HY, Matsubara S, Lee JC. Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D1, D2 and Serotonin2 pKi values. *J Pharmacol Exp Ther* **1989**;251:238-246.
30. Miyamoto S, Miyake N, Jarskog LF, Fleischhacker WW, Lieberman JA. Pharmacological treatment of schizophrenia: a critical review of the pharmacology and clinical effects of current and future therapeutic agents. *Mol Psychiatry* **2012**;17(12):1206-27

31. Schatzberg AF, Nemeroff CB. *Textbook of Psychopharmacology*. 4th ed., The American Psychiatric Publishing, Inc., Washington, **2009**.
32. Katona CL, Katona CP. New generation multi-modal antidepressants: focus on vortioxetine for major depressive disorder. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* **2014**;10:349-354.
33. Ramamoorthy R, Radhakrishnan M, Borah M. Antidepressant-like effects of serotonin type-3 antagonist, ondansetron: an investigation in behaviour-based rodent models. *Behav Pharmacol* **2008**;19:29-40.
34. Sarkisyan G, Roberts AJ, Hedlund PB. The 5-HT₇ receptor as a mediator and modulator of antidepressant-like behavior. *Behav Brain Res* **2010**;209:99-108.
35. Stenkorona P, Halldin C, Lundberg J. 5-HTT and 5-HT_{1A} receptor occupancy of the novel substance vortioxetine (Lu AA21004). A PET study in control subjects. *Eur Neuropsychopharmacol* **2013**;23:1190-1198.
36. Bieńkowski P, Świącicki Ł. Selektynie czy multimodalnie? Rozwój inhibitorów wychwytu zwrotnego serotoniny na przykładzie wortioksetyny. *Farmakoterapia w Psychiatrii i Neurologii*, **2014**;2:61-67.
37. Wang SM, Han C, Lee SJ, Patkar AA, Masand PS. i wsp. *Asenapine, blonanserine, iloperidone, lurasidone and sertindole: distinctive clinical characteristics of 5 novel atypical antipsychotics*. *Clin. Neuropharmacol.* **2013**; 36:223-238.
38. Sumiyoshi T. Antipsychotic treatments; focus on lurasidone. *Front. Pharmacol.* **2013**; 4: 102 .
39. George M, Amrutheshwar R, Rajkumar RP, Kattimani S, Dkhar SA. Newer antipsychotics and upcoming molecules for schizophrenia. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2013**; 69:1497-1509.
40. Hopkins CR. ACS Chemical Neuroscience molecule spotlight on Latuda (Lurasidone; SM-13,496). *ACS Chem. Neurosci.* **2011**;2:58-59.
41. Bieńkowski P, Dudek D, Samochowiec J. W kierunku lepiej zaplanowanej nieselektywności: rola receptorów 5-HT₇ w działaniu leku przeciwpsychotycznego II generacji - lurasydonu. *Psychiatria Polska* **2015**; 49(2):243-253.
42. Richelson E. Multi-modality: a new approach for treatment of major depressive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* **2013**;16:1433-1442.
43. Canale V, Guzik P, Kurczab R, Verdine P, Satała G, Kubica B, Pawłowski M, Martinez J, Subra G, Bojarski AJ, Zajdel P. Solid-supported synthesis, molecular modeling, and biological activity of long-chain arylpiperazine derivatives with cyclic amino acid amide fragments as 5-HT₇ and 5-HT_{1A} receptor ligands. *Eur J Med Chem* **2014**;78:10-22.
44. Kowalski P, Mitka M, Jaśkowska J, Duszyńska B, Bojarski AJ. New arylpiperazines with flexible versus partly constrained linker as serotonin 5-HT_{1A}/5-HT₇ receptor ligands. *Arch Pharm* **2013**;346:339-348.
45. Zajdel P, Marciniak K, Maślankiewicz A, Satała G, Duszyńska B, Bojarski AJ, Partyka A, Jastrzębska-Więsek M, Wróbel D, Wesołowska A, Pawłowski M. Quinoline- and isoquinoline-sulfonamide derivatives of LCAP as potent CNS multi-receptor-5-HT_{1A}/5-HT_{2A}/5-HT₇ and D₂/D₃/D₄-agents: The synthesis and pharmacological evaluation. *Bioorg Med Chem* **2012**;20:1545-1556.
46. Paluchowska MH, Bugno R, Tatarczyńska E, Nikiforuk A, Lenda T, Chojnacka-Wojcik E. The influence of modifications in imide fragment structure on 5-HT₇(1A) and 5-HT₇ receptor affinity and in vivo pharmacological properties of some new 1-(m-trifluoromethylphenyl)piperazines. *Bioorg Med Chem* **2007**;15:7116-7125.
47. Lacivita E, De Giorgio P, Patarnello D, Niso M, Colabufo NA, Berardi F, Perrone R, Satała G, Duszyńska B, Bojarski AJ, Leopoldo M. Towards metabolically stable 5-HT₇ receptor ligands: a study on 1-arylpiperazine derivatives and related isosters. *Exp Brain Res* **2013**;230:569-582.
48. Lacivita E, Patarnello D, Stroth N, Caroli A, Niso M, Contino M, De Giorgio P, Di Pilato P, Colabufo NA, Berardi F, Perrone R, Svenningsson P, Hedlund PB, Leopoldo M. Investigations on the 1-(2-Biphenyl)piperazine Motif: Identification of New Potent and Selective Ligands for the Serotonin₇ (5-HT₇) Receptor with Agonist or Antagonist Action in Vitro or ex Vivo. *J Med Chem* **2012**;55:6375-6380.
49. Volk B, Gacsályi I, Pallagi K, Poszvácz L, Gyönös I, Szabó E, Bakó T, Spedding M, Simig G, Szénási G. Optimization of (Arylpiperazinylbutyl)oxindoles Exhibiting Selective 5-HT₇ Receptor Antagonist Activity. *J Med Chem* **2011**;54:6657-6669
50. Medina RA, Sallander J, Benhamu B, Porrás E, Campillo M, Pardo L, Lopez-Rodriguez ML. Synthesis of New Serotonin 5-HT₇ Receptor Ligands. Determinants of 5-HT₇/5-HT_{1A} Receptor Selectivity. *J Med Chem* **2009**;52:2384-2392.
51. Vermeulen ES, van Smeden M, Schmidt AW, Sprouse JS, Wikström HV, Grol CJ. Novel 5-HT₇ Receptor Inverse Agonists. Synthesis and Molecular Modeling of Arylpiperazine- and 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline-Based Arylsulfonamides *J Med Chem* **2004**;47:5451-5466.
52. Perrone R, Berardi F, Colabufo NA, Lacivita E, Leopoldo M, Tortorella V. Synthesis and Structure-Affinity Relationships of 1-[ω-(4-Aryl-1-piperazinyl)alkyl]-1-aryl Ketones as 5-HT₇ Receptor Ligands. *J Med Chem* **2003**;46:646-649.

53. Legraverend, M.; Grierson, D. S. The purines: potent and versatile small molecule inhibitors and modulators of key biological targets. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**;14:3987-4006.
54. Drabczyńska, A.; Schumacher, B.; Müller, C. E.; Karolak-Wojciechowska, J.; Michalak, B.; Pękala, E.; Kieć-Kononowicz, K. Impact of the aryl substituent kind and distance from pyrimido[2,1-f]purindiones on the adenosine receptor selectivity and antagonistic properties. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**;38:397-402.
55. Suzuki, F.; Shimada, J.; Nonaka, H.; Ishii, A.; Shiozaki, S.; Ichikawa, S.; Ono, E. 7,8-Dihydro-8-ethyl-2-(3-noradamantyl)-4-propyl-1*H*-imidazo[2,1-*i*]purin-5(4*H*)-one: potent and water soluble adenosine A₁ antagonist. *J. Med. Chem.* **1992**;35:3578-3581.
56. Ozola, V.; Thorand, M.; Diekmann, M.; Qurishi, R.; Schumacher, B.; Jacobson, K. A.; Müller, C. E. 2-Phenylimidazo[2,1-*i*]purin-5-ones: structure-activity relationships and characterization of potent and selective inverse agonists at human A₃ adenosine receptors. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**;11:347-356.
57. Baraldi, P. G.; Preti, D.; Tabrizi, M. A.; Fruttallo, F.; Romagnoli, R.; Zaid, N. A.; Moorman, A. R.; Merighi, S.; Varani, K.; Borea, P. A. New pyrrolo[2,1-*f*]purine-2,4-dione and imidazo[2,1-*f*]-2,4-dione derivatives as potent and selective human A₃ adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2005**;48:4697-4701.
58. Baraldi, P. G.; Nasser, A. Z.; Fruttarolo, F.; Tabrizi, M. A.; Nunez, M. del C.; Spalluto, G.; Romagnoli, R. A synthetic approach for preparation of rigid analogs of 1,3-dipropyl-7-methyl-8-aryl/heteroarylstyryl xanthines. *Synthesis.* **2001**;5:773-775.
59. Ahn, H.-S.; Bercovici, A.; Boykow, G.; Bronnenkant, A.; Chackalamannil, S.; Chow, J.; Cleven, R.; Cook, J.; Czarniecki, M.; Domalski, K.; Fawzi, A.; Green, M.; Gündes, A.; Ho, G.; Laudicina, M.; Lindo, N.; Ma, K.; Manna, M.; McKittrick, B.; Mirzai, B.; Nechuta, T.; Neustadt, B.; Puchalski, C.; Pula, K.; Silverman, L.; Smith, E.; Stamford, A.; Tedesco, R. P.; Tsai, H.; Tulshian, D.; Vaccaro, H.; Watkins, R. W.; Weng, X.; Witkowski, J. T.; Xia, X.; Zhang, H. Potent tetracyclic guanine inhibitors of PDE1 and PDE5 cyclic guanosine monophosphate phosphodiesterases with oral antihypertensive activity. *J. Med. Chem.* **1997**;40:2196-2210.
60. Boyle, C. D.; Xu, R.; Asberom, T.; Chackalamannil, S.; Clader, J. W.; Greenlee, W. J.; Guzik, H.; Hu, Y.; Hu, Z.; Lankin, C. M.; Pissarnitski, D. A.; Stamford, A. W.; Wang, Y.; Skell, J.; Kurowski, S.; Vemulapalli, S.; Palamanda, J.; Chintala, M.; Wu, P.; Myers, J.; Wang, P. Optimization of purine based PDE1/PDE5 inhibitors to a potent and selective PDE5 inhibitor for the treatment of male ED. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**;11:347-356.
61. Pawłowski, M.; Drabczyńska, A.; Gorczyca, M.; Malec, D.; Modzelewski, J. Synthesis and preliminary pharmacological assessment of novel 9-substituted pyrimidino[2,1-*f*]purines. *Pol. J. Pharmacol.* **1991**;43:61-70.
62. Pawłowski, M.; Katlabi, J.; Drabczyńska, A.; Duszyńska, B.; Charakchieva-Minol, S.; Dereń-Wesołek, A.; Tatarczyńska, E.; Chojnacka-Wójcik, E.; Mokrosz, M. J.; Bojarski, A. J. New 9- or 10-arylpiperazinoalkyl substituted pyrimido- or diazepino[2,1-*f*]purines with partial or full 5-HT_{1A} agonistic activity. *Eur. J. Med. Chem.* **1999**;34:167-175.
63. Pawłowski, M.; Drabczyńska, A.; Katlabi, J.; Gorczyca, M.; Malec, D.; Modzelewski, J. Synthesis and CNS activity of tricyclic theophylline derivatives. 8-substituted imidazo[2,1-*f*]theophyllines. *Eur. J. Med. Chem.* **1999**;34:1085-1091.
64. Kołaczkowski, M.; Zajdel, P.; Fhid, O.; Duszyńska, B.; Tatarczyńska, E.; Pawłowski, M. Synthesis and 5-HT_{1A}/5-HT_{2A} activity of some butyl analogs in the group of phenylpiperazine alkyl pyrimido[2,1-*f*]theophyllines. *Pharmacol. Rep.* **2005**;57:229-235.
65. Jurczyk, S.; Kołaczkowski, M.; Maryniak, E.; Zajdel, P.; Pawłowski, M.; Tatarczyńska, E.; Kłodzińska, A.; Chojnacka-Wójcik, E.; Bojarski, A. J.; Charakchieva-Minol, S.; Duszyńska, B.; Nowak, G.; Maciąg, D. New arylpiperazine 5-HT_{1A} receptor ligands containing the pyrimido[2,1-*f*]purine fragment: synthesis, in vitro, and in vivo pharmacological evaluation. *J. Med. Chem.* **2004**;47:2659-2666.
66. Rudnick, G.; Kirk, K.L.; Fishkes, H.; Schuldiner, S. Zwitterionic and anionic forms of serotonin analog as transport substrates. *J Biol Chem.* **1989**;264(25):14865-14868.
67. Forrest, L.R.; Tavoulari, S.; Zhang, Y.W.; Rudnick, G.; Honig, B. Identification of chloride ion binding site in Na⁺/Cl⁻ dependent transporters. *PNAS*, **2007**;104(31):12761-12766.
68. O'Donnell, J. M.; Zhang, H. T. Antidepressant effects of inhibitors of cAMP phosphodiesterase (PDE4). *Trends Pharmacol Sci.* **2004** Mar;25(3):158-63.
69. Chappie, T.A.; Helal, C.J.; Hou, X. Current landscape of phosphodiesterase 10A (PDE10A) inhibition. *J Med Chem.* **2012** 13;55(17):7299-331.
70. Hagmann W.K. The many roles for fluorine in medicinal chemistry. *J. Med. Chem* **2008**;51:4359-4369.
71. Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997** 23:3-25