



UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM

---

# **AUTOREFERAT**

**KRZYSZTOF KAMIŃSKI**

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY  
KATEDRA CHEMII FARMACEUTYCZNEJ  
ZAKŁAD CHEMII LEKÓW

**KRAKÓW 2015**

# SPIS TREŚCI

<b>1. Ogólna charakterystyka dorobku naukowego .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Prezentacja osiągnięć stanowiących podstawę habilitacji.....</b>	<b>4</b>
2.1. Wykaz publikacji stanowiących podstawę habilitacji .....	5
2.2. Prezentacja wyników stanowiących podstawę habilitacji .....	7
2.2.1. Wprowadzenie.....	7
2.2.2. Charakterystyka problemu.....	9
2.2.3. Metody poszukiwania nowych leków przeciwpadaczkowych .....	10
2.2.4. Fragment pirolidyno-2,5-dionu w poszukiwaniu związków biologicznie aktywnych .....	13
2.2.5. Cel badań.....	14
2.2.6. Wyniki badań i dyskusja .....	16
2.2.7. Podsumowanie wyników badań stanowiących podstawę habilitacji.....	28
<b>3. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze.....</b>	<b>30</b>
3.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora .....	30
3.2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora.....	33
<b>4. Piśmiennictwo.....</b>	<b>38</b>

## 1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA DOROBKU NAUKOWEGO

W latach 1998-2003 studiowałem na Wydziale Farmaceutycznym Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Pracę magisterską pod tytułem „*Synteza oraz badanie właściwości lipofilowych połączeń z grupy 1,3-podstawionego pirolidyno-2,5-dionu o potencjalnym działaniu przeciwdrgawkowym*”, wykonałem pod kierunkiem dr Jolanty Obniskiej w Katedrze Chemii Farmaceutycznej CM-UJ, uzyskując, w 2003 roku, tytuł magistra farmacji. Studia ukończyłem w grupie 5% najlepszych absolwentów wydziału. Od października tego samego roku zostałem przyjęty na studia doktoranckie, które realizowałem pod opieką naukową prof. dr hab. Macieja Pawłowskiego. W 2006 r. zostałem zatrudniony na stanowisku asystenta w Katedrze Chemii Farmaceutycznej CM-UJ, a głównym obszarem moich zainteresowań było poszukiwanie nowych pochodnych pirolidyno-2,5-dionu działających w obrębie ośrodkowego układu nerwowego, ze szczególnym uwzględnieniem substancji o aktywności przeciwdrgawkowej. Prace te prowadziłem w zespole kierowanym przez dr hab. Jolantę Obniską. Zagadnienie to stanowiło zasadniczy kierunek badań ujętych w mojej rozprawie doktorskiej, a także znalazło 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 rozprawy doktorskiej pt. „*Badania chemiczno-farmakologiczne N-fenylaminowych pochodnych imidów kwasu bursztynowego o potencjalnej aktywności przeciwdrgawkowej*”, wykonanej pod kierunkiem dr hab. Jolanty Obniskiej. Rozprawa ta została wyróżniona decyzją Rady Wydziału UJ-CM, a także Nagrodą indywidualną pierwszego stopnia przyznaną przez Ministra Zdrowia 16 grudnia 2009 r. Na tym etapie rozwoju naukowego mój dorobek naukowy obejmował współautorstwo w 13 pracach oryginalnych o sumarycznym współczynniku *impact factor* (IF) równym 14,586.

Od 1 października 2009 r. jestem zatrudniony na stanowisku adiunkta w Zakładzie Chemii Leków Katedry Chemii Farmaceutycznej UJ-CM w Krakowie. Oprócz zasadniczego kierunku badawczego stanowiącego podstawę niniejszej habilitacji, tj. poszukiwania nowych substancji przeciwpadaczkowych, w ostatnich latach moje zainteresowania naukowe uległy znacznemu poszerzeniu i skupiły się na związkach o potencjalnej aktywności przeciwpyschotycznej, przeciwdepresyjnej, anksjolitycznej oraz prokognitywnej.

Obecnie, na mój dorobek naukowy składa się **36 prac oryginalnych**, opublikowanych w czasopismach znajdujących się na Liście Filadelfijskiej, **4 zgłoszenia patentowe** (2 polskie,

2 międzynarodowe) oraz **2 prace poglądowe**. Sumaryczny *impact factor* (IF) wynosi **66,834** punktacja MNiSW **747**, **liczba cytowań** wg *Web of Science* (na dzień 18.08.2015): **289** oraz **indeks Hirscha** wynoszący **11**. Wyniki prowadzonych przeze mnie badań prezentowałem w formie zaproszonego referenta na konferencjach zagranicznych i krajowych - 31<sup>st</sup> Camerino-Cyprus-Noordwijkerhout Symposium, Camerino, Włochy (19–23.05.2013 r.), III Księżyca Chemii Medycznej, Lublin (20–22.09.2010 r.), The Sixth Multidisciplinary Conference on Drug Research, Przemyśl, Krasiczyn (26–28.05.2008 r.). Jestem współautorem **47 doniesień zjazdowych** prezentowanych w formie plakatów i komunikatów ustnych na zagranicznych i krajowych konferencjach i sympozjach naukowych.

Aktualnie kieruję 1 projektem badawczym finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki (NCN 2012/05/D/NZ7/02328) pt. „*Poszukiwanie nowych substancji o różnicowanych właściwościach protekcyjnych w zwierzęcych modelach drgawek padaczkowych wśród amidowych pochodnych kwasu 1-(2,5-diokspiroolidyn-1-ylo)-octowego*”, a także uczestniczę (lub uczestniczyłem) jako wykonawca w realizacji innych projektów finansowanych ze środków NCN (2 projekty), NCBiR (2 projekty), PO IG (1 projekt), MNiSW (1 projekt) oraz KBN (1 projekt). Ponadto, w ramach działalności naukowej od 2006 roku byłem kierownikiem 7 projektów badawczych związanych z poszukiwaniem nowych leków przeciwpadaczkowych subsydiowanych ze środków UJ-CM.

## **2. PREZENTACJA OSIĄGNIĘĆ STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ HABILITACJI (ZGODNIE 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. NR 65, POZ. 595, Z PÓŹN. ZM.)**

Przedstawiony do oceny cykl publikacji składa się z sześciu oryginalnych prac naukowych opublikowanych w czasopiśmie z listy JCR w latach 2011–2015 i opisuje zwarte tematycznie badania z zakresu chemii medycznej zatytułowane: „*Nowe pochodne pirolidyno-2,5-dionu o strukturze hybrydowej w poszukiwaniach leków przeciwpadaczkowych*”. Zgodnie z analizą bibliometryczną sumaryczny współczynnik *impact factor* (IF) prezentowanego cyklu wynosi 17,073, a odpowiadająca mu punktacja MNiSW 170. We wszystkich pracach jestem autorem pierwszym i korespondującym.

## 2.1. WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ HABILITACJI

**H-1. Kamiński, K.;** Rzepka, S.; Obniska, J. Synthesis and anticonvulsant activity of new 1-[2-oxo-2-(4-phenylpiperazin-1-yl)ethyl]pyrrolidine-2,5-diones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5800–5803. (IF<sub>2011</sub>=**2,554**, Punktacja MNiSW: **30,000**)

**H-2. Kamiński, K.;** Obniska, J.; Wiklik, B.; Atamanyuk, D. Synthesis and anticonvulsant properties of new acetamide derivatives of phthalimide, and its saturated cyclohexane and norbornene analogs. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 4634–4641. (IF<sub>2011</sub>=**3,346**, Punktacja MNiSW: **35,000**)

**H-3. Kamiński, K.;** Zagaja, M.; Łuszczki, J.J.; Rapacz, A.; Andres-Mach, M.; Latacz, G.; Kieć-Kononowicz, K. Design, synthesis and anticonvulsant activity of new hybrid compounds derived from 2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)propanamides and 2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)butanamides. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 5274–5286. (IF<sub>2015</sub>=**5,447**, Punktacja MNiSW: **45,000**)

**H-4. Kamiński, K.;** Rapacz, A.; Łuszczki, J.J.; Latacz, G.; Obniska, J.; Kieć-Kononowicz, K.; Filipek, B. Design, synthesis and biological evaluation of new hybrid anticonvulsants derived from *N*-benzyl-2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)propanamide and 2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)butanamide derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 2548–2561. (IF<sub>2015</sub>=**2,793**, Punktacja MNiSW: **30,000**)

**H-5. Kamiński, K.;** Wiklik, B.; Obniska, J. Synthesis, anticonvulsant properties, and SAR analysis of differently substituted pyrrolidine-2,5-diones and piperidine-2,6-diones. *Arch. Pharm.* **2014**, *347*, 840–852. (IF<sub>2014</sub>=**1,531**, Punktacja MNiSW: **20,000**)

**H-6. Kamiński, K.;** Wiklik, B.; Obniska, J. Synthesis and anticonvulsant activity of new *N*-phenyl-2-(4-phenylpiperazin-1-yl)acetamide derivatives. *Med. Chem. Res.* **2015**, *24*, 3047–3061. (IF<sub>2015</sub>=**1,402**, Punktacja MNiSW: **10,000**)

Badania będące przedmiotem postępowania habilitacyjnego zostały wykonane w następujących ośrodkach:

1. Syntezę wszystkich substratów oraz połączeń finalnych opisanych w pracach **H-1 – H-6** przeprowadzono w Zakładzie Chemii Leków Katedry Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego UJ-CM w Krakowie,
2. Badania farmakologiczne *in vivo* (myszy, szczury) w pracach **H-1, H-2, H-5, H-6** w kierunku aktywności przeciwdrgawkowej, tj. test maksymalnego elektrowstrząsu (MES), test drgawek wywołanych podskórnym podaniem pentylenetetrazolu (*scPTZ*), test drgawek wywołanych prądem o niskiej częstotliwości 6 Hz oraz test obracającego się pręta (*rotarod*) będącego miarą neurotoksyczności ostrej wykonano w ramach amerykańskiego programu poszukiwania nowych leków przeciwpadaczkowych - *Anticonvulsant Drug Development Program* w Narodowym Instytucie Zdrowia (NIH, *National Institutes of Health*, Rockville Pike, Bethesda, MD, USA),
3. Badania farmakologiczne *in vivo* (myszy) w pracy **H-3** w kierunku aktywności przeciwdrgawkowej, tj. test MES, *scPTZ*, 6 Hz oraz test komina będący miarą neurotoksyczności ostrej wykonano w Samodzielnej Pracowni Analiz Izobolograficznych Instytutu Medycyny Wsi w Lublinie,
4. Badania farmakologiczne *in vivo* (myszy) w publikacji **H-4** w kierunku aktywności przeciwdrgawkowej, tj. test MES, *scPTZ* oraz test obracającego się pręta (*rotarod*) będącego miarą neurotoksyczności ostrej wykonano w Zakładzie Farmakodynamiki Katedry Farmakodynamiki Wydziału Farmaceutycznego UJ-CM w Krakowie,
5. Badania *in vitro* stabilności metabolicznej z wykorzystaniem ludzkich mikrosomów wątrobowych (HLMs, *Human Liver Microsomes*), ocenę wpływu substancji na funkcję izoformy CYP3A4 cytochromu P-450, działania antyproliferacyjnego i cytotoksycznego, opisane w pracach **H-3, H-4** przeprowadzono w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego UJ-CM w Krakowie,
6. Badania modelowania przemian metabolicznych *in silico* w pozycjach **H-3, H-4** z wykorzystaniem programu MetaSite 4.1.1 (Molecular Discovery Ltd.) wykonano w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego UJ-CM w Krakowie,
7. Badania *in vitro* prezentowane w publikacjach **H-3, H-6** w kierunku powinowactwa do napięciowo-zależnych kanałów sodowych i/lub wapniowych (typ L, N) wykonano komercyjnie w laboratoriach Cerep (Poitiers, Francja).

## 2.2. PREZENTACJA WYNIKÓW STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ HABILITACJI

### 2.2.1. WPROWADZENIE

Padaczka jest jednym z najczęstszych, przewlekłych schorzeń ośrodkowego układu nerwowego (OUN), dotykającym około 50 milionów ludzi na świecie.<sup>1-3</sup> Należy ona do chorób neurologicznych związanych z zaburzeniami pobudliwości i przewodnictwa neuronalnego. Przez wiele lat padaczkę uznawano za chorobę ludzi młodych, jednak ostatnie dane pokazują, iż wskaźnik zachorowalności wśród osób starszych ulega nieustannemu wzrostowi.<sup>4,5</sup> Główną przyczyną padaczki w tej grupie wiekowej są choroby naczyniowe i nowotwory mózgu, a także schorzenia neurodegeneracyjne, wśród których najważniejsze to choroba Alzheimer'a i Parkinson'a.<sup>6,7</sup> Padaczka w podeszłym wieku jest zatem przedmiotem wzrastającej uwagi, problemy związane z jej objawami, konieczność farmakoterapii, nabierają coraz większego znaczenia, szczególnie w aspekcie obserwowanych zmian demograficznych polegających na stopniowym starzeniu się społeczeństw krajów wysoko rozwiniętych.

Obecnie wyróżnia się około 40 postaci klinicznych napadów padaczkowych. Choroba ta, manifestująca się na tak wiele sposobów, jest ciągle przedmiotem badań elektrofizjologicznych, genetycznych, jak i klinicznych. Ich wyniki pozwalają na lepsze zrozumienie procesów powstawania zaburzeń na poziomie komórkowym, rzutują na skuteczniejszą diagnostykę typów napadów, w perspektywie dając możliwości bardziej racjonalnego leczenia i poprawy rokowań u pacjentów. Zgodnie z wytycznymi *International League Against Epilepsy*, wyładowania padaczkowe, występujące równocześnie w szerokim zakresie, w obu półkulach mózgowych, określa się mianem napadów uogólnionych. Jeżeli synchroniczne wyładowania grup neuronów są ograniczone do jednego miejsca, wówczas mamy do czynienia z tzw. napadami częściowymi, nazywanymi niekiedy ogniskowymi. Gdy w trakcie epizodu padaczkowego chory zachowuje świadomość, napady określa się jako proste, natomiast przy zaburzonej świadomości; jako złożone. Pojedyncze ognisko padaczkowe może być (w wielu przypadkach) przyczyną synchronicznej aktywacji całej kory mózgowej; napady takie określa się terminem napadów wtórnie uogólnionych.<sup>8</sup>

Farmakoterapia jest podstawową metodą postępowania leczniczego, a jej nadrzędnym celem jest uwolnienie chorego od występowania napadów. Leki przeciwpadaczkowe (LPP) działają objawowo, znosząc lub ograniczając liczbę epizodów, nie posiadają jednak zdolności hamowania procesu epileptogenezy; co oznacza, że nie eliminują zmian organicznych

w OUN, stanowiących podłoże schorzenia.<sup>9,10</sup> Leki przeciwpadaczkowe możemy podzielić na klasyczne tzw. pierwszej generacji, do których należą m.in.: karbamazepina, kwas walproinowy, fenytoina, fenobarbital, benzodiazepiny, etosuksymid oraz nowe tworzące drugą i trzecią generację, m.in: gabapentyna, okskarbazepina, lamotrygina, tiagabina, wigabatryna, topiramata, lewetyracetam, pregabalina, lakozamid. Terminem „nowe leki przeciwpadaczkowe” określa się preparaty wprowadzone do leczenia w latach 90-tych XX i na początku XXI wieku. Leki te charakteryzują się z reguły lepszą tolerancją oraz mniejszą częstotliwością występowania działań niepożądanych, posiadają korzystniejsze parametry farmakokinetyczne, wyrażające się, m.in. w szybkim, ilościowo znacznym (czasami całkowitym) wchłanianiu z przewodu pokarmowego, brakiem lub niewielkim stopniem wiązania się z białkami krwi, wydłużonym okresem biologicznego półtrwania, liniową farmakokinetyką; warunkującą nasilenie działania farmakologicznego proporcjonalne do dawki. W przypadku większości substancji, brak aktywnych metabolitów pozwala na uniknięcie działań toksycznych, szczególnie związanych z funkcją wątroby. Leki te nie wpływają lub wpływają w niewielkim stopniu na aktywność enzymów wątrobowych, przez co w sposób zasadniczy zostaje ograniczona możliwość wystąpienia interakcji lekowych.<sup>11</sup> Pod względem mechanizmów działania biologicznego wśród leków przeciwpadaczkowych wyróżniamy:

- modulatory kanałów jonowych; blokery kanałów sodowych, wapniowych oraz aktywatory kanałów potasowych,
- modulatory GABA; nasilające ośrodkowe efekty GABA-ergiczne,
- modulatory neurotransmisji pobudzającej; blokery receptorów dla aminokwasów pobudzających (NMDA i AMPA),
- związki o działaniu cholinomimetycznym (agoniści receptorów muskarynowych),
- ligandy receptorów glikoproteinowych SV2A,
- inhibitory anhidrazy węglanowej,
- antagonistów neuropeptydów Y<sub>1</sub> i Y<sub>5</sub> oraz modulatory neuropeptydu Y,
- niespecyficznych agonistów receptorów sprzężonych z białkiem G (GPCR),
- antagonistów receptorów kainowych.

Należy równocześnie podkreślić, że mechanizm działania niektórych substancji o wysokiej aktywności w badaniach *in vivo* nie został dotychczas w pełni wyjaśniony.<sup>12</sup> Aktualny stan wiedzy oraz perspektywy dotyczące farmakoterapii padaczki opisano w pracy przeglądowej, której jestem współautorem.<sup>13</sup>



## 2.2.2. CHARAKTERYSTYKA PROBLEMU

Pomimo niewątpliwego postępu nauk medycznych i farmaceutycznych oraz badań prowadzonych na całym świecie padaczka stanowi w dalszym ciągu duży problem terapeutyczny, a niekontrolowane napady padaczkowe w istotnym stopniu obniżają jakość życia pacjentów i możliwości ich codziennego funkcjonowania. Warto podkreślić, że mimo wprowadzenia do lecznictwa w ostatnim dziesięcioleciu wielu nowych leków stosowanych do leczenia padaczki, złożonych schematów postępowania terapeutycznego oraz zaawansowanych badań klinicznych „kandydatów” na nowoczesne preparaty, nadal nie znaleziono substancji, które byłyby wysoce skuteczne w monoterapii wielu typów napadów padaczkowych, nie wywołując przy tym nasilonych, znaczących objawów niepożądanych.

Obecnie, lecznictwo dysponuje dużą liczbą leków przeciwpadaczkowych, zarówno konwencjonalnych (klasycznych), stosowanych od wielu lat, jak i leków nowej generacji, których wprowadzenie jest wyrazem stałego, znaczącego postępu w zakresie możliwości farmakoterapii tego schorzenia.<sup>14-16</sup> Otrzymano wiele nowych, strukturalnie oryginalnych substancji leczniczych oraz wprowadzono do terapii nowoczesne postaci leków, wśród których szczególne znaczenie mają preparaty doustne o kontrolowanym uwalnianiu substancji aktywnej. Analiza skuteczności leków przeciwpadaczkowych pokazuje, że pełną remisję choroby udaje się osiągnąć u około 50% pacjentów po zastosowaniu pierwszego, wybranego leku. Blisko 30% chorych wymaga leczenia skojarzonego; dwoma lub trzema preparatami. Niemniej jednak, aż u 25% pacjentów tej grupy, nie uzyskuje się zadowalającej poprawy, mimo stosowania różnych kombinacji leków przeciwpadaczkowych,<sup>17</sup> a taką postać choroby określa się terminem padaczki lekoopornej. Uwzględniając dane z ośmiu największych rynków świata, cierpi na nią od 1,2 miliona do 1,8 miliona ludzi.<sup>12</sup> Poważną przyczyną niepowodzenia farmakoterapii są objawy niepożądane, towarzyszące przewlekłemu przyjmowaniu leków przeciwpadaczkowych.<sup>18,19</sup> Dobra tolerancja preparatu stanowi więc, niezmiernie ważną składową skutecznego postępowania farmakoterapeutycznego. Dowiedziono bowiem, że wśród chorych ze zdiagnozowaną padaczką, niepowodzenie leczenia jest częściej wynikiem występujących objawów niepożądanych, niż niskiej skuteczności leków.<sup>20</sup> Od dobrego leku przeciwpadaczkowego oczekuje się zatem, że będzie podwyższał próg drgawkowy, przy jednocześnie minimalnym wpływie na prawidłową pobudliwość neuronów, działał efektywnie w różnych postaciach padaczki, w tym przede wszystkim w padaczce lekoopornej, w dawkach skutecznych powodował możliwie jak

najmniejszą sedację, a przy długotrwałym stosowaniu, wywoływał jedynie niezbyt nasilone działania niepożądane.

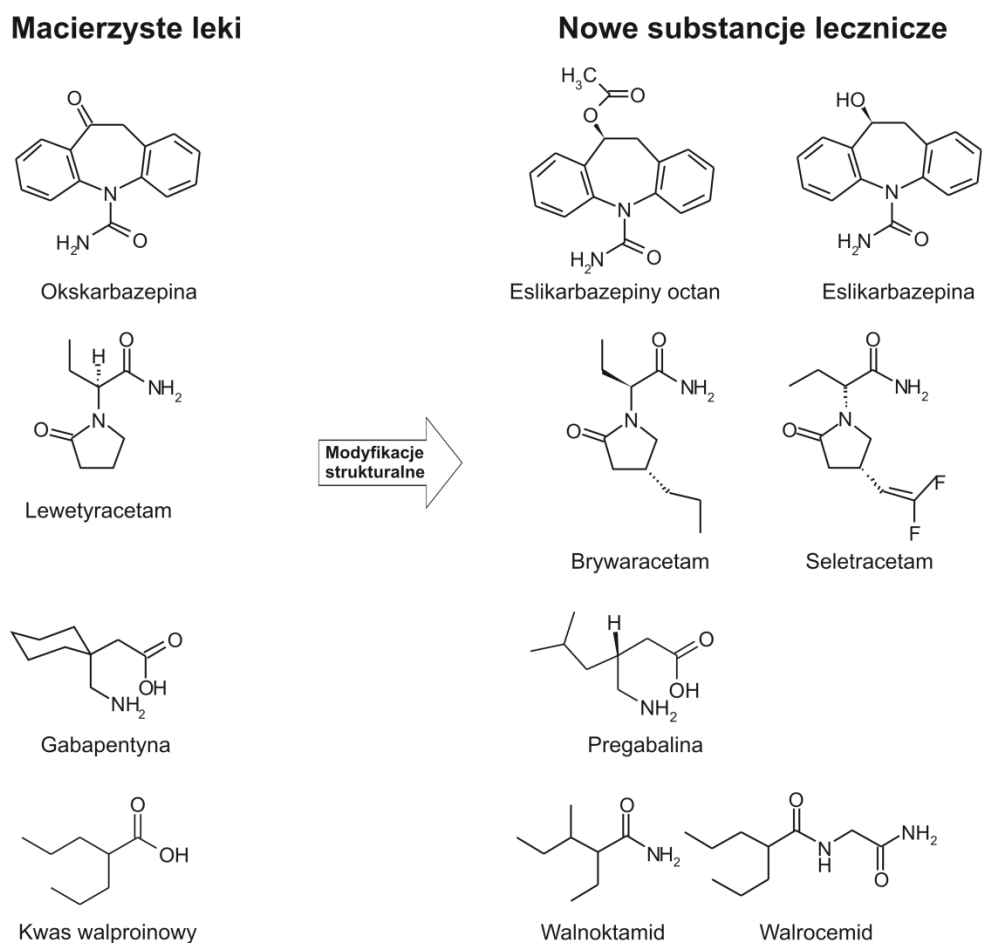
### **2.2.3. METODY POSZUKIWANIA NOWYCH LEKÓW PRZECIWPADACZKOWYCH**

Nie do końca poznana etiologia napadów padaczkowych oraz złożony, a w wielu przypadkach nieznany mechanizm działania leków przeciwpadaczkowych, utrudnia racjonalne metody otrzymywania nowych połączeń w oparciu o trójwymiarową strukturę celu biologicznego (ang. *structure-based drug design*). Dlatego też, w odróżnieniu od leków o ściśle zdefiniowanym mechanizmie działania biologicznego i z dobrze poznanym celem molekularnym, poszukiwanie kandydatów na nowe leki przeciwpadaczkowe jest bardziej złożone i wykorzystuje metodę projektowania opartego na podobieństwie do istniejących ligandów (ang. *ligand-based drug design*), metodę projektowania w oparciu o farmakofor (ang. *pharmacophore-based drug design*) oraz stosując do tego celu badania skryningowe w zwierzęcych modelach drgawek padaczkowych *in vivo* (ang. *screening approaches*).

#### **2.2.3.1. PROJEKTOWANIE OPARTE NA PODOBIENSTWIE DO ISTNIEJĄCYCH LIGANDÓW (*Ligand-based drug design*)**

Metoda ta polega na projektowaniu związków będących kandydatami na nowe leki przeciwpadaczkowe w oparciu o strukturę istniejących substancji leczniczych, charakteryzujących się dowiedzioną przydatnością kliniczną.<sup>21</sup> Istotą tego postępowania są modyfikacje chemiczne aktywnych połączeń, których zasadniczym celem jest otrzymanie związków charakteryzujących się wyższą skutecznością w zwierzęcych modelach drgawek padaczkowych i/lub mniejszą ilością efektów ubocznych w porównaniu do modelowych leków przeciwpadaczkowych. Warto podkreślić, że poprawa bezpieczeństwa może znajdować również wyraz w korzystniejszych parametrach farmakokinetycznych, co w szczególności dotyczy przemian metabolicznych, prowadzących w wielu przypadkach do toksycznych metabolitów lub interakcji międzylekowych. Metoda ta została wykorzystana z sukcesem w projektowaniu, a następnie syntezie, szeregu najnowszych połączeń, tworzących tzw. trzecią generację leków przeciwpadaczkowych, bądź substancji będących aktualnie w zaawansowanych fazach badań klinicznych, do których zaliczyć można m.in. eslikarbazepinę, brywaracetam, seletracetam, pregabalinę, walroceamid, oraz związek JZP-4.<sup>22-25</sup> Przykładowy

zakres modyfikacji chemicznych macierzystych leków oraz struktury najnowszych substancji przeciwpadaczkowych zilustrowano na **Ryc. 1**.



**Ryc. 1.** Modyfikacje strukturalne znanych leków przeciwpadaczkowych, prowadzące od uzyskania nowych substancji leczniczych.

### 2.2.3.2. PROJEKTOWANIE W OPARCIU O FARMAKOFOR (*Pharmacophore-based drug design*)

Analiza zależności struktura-aktywność (SAR), prowadzona dla większych serii aktywnych przeciwdrgawkowo związków, umożliwiła stworzenie modeli farmakoforowych, czyli zbioru elementów strukturalnych, pozostających w określonej relacji przestrzennej. Ich obecność w strukturach projektowanych substancji, przy zachowaniu danej organizacji w przestrzeni, warunkuje żadaną aktywność biologiczną. Dotychczasowe badania umożliwiły stworzenie szeregu układów farmakoforowych, dla substancji o aktywności przeciwdrgawkowej,<sup>26</sup> wśród których do najważniejszych należy zaliczyć relacje przestrzenne i elektronowe opisane dla serii pochodnych semikarbazonów,<sup>27,28</sup> kwasu 4-amino-

butanowego,<sup>29</sup> ftalimidu,<sup>30-32</sup> a także ogólnie - substancji aktywnych w modelu MES.<sup>33</sup> W badaniach tych zidentyfikowano również fragmenty strukturalne, których obecność w budowie chemicznej związku może decydować o aktywności lub nasilać efekt farmakologiczny.<sup>34-36</sup>

### **2.2.3.3. BADANIA SKRYNINGOWE W ZWIERZĘCYCH MODELACH DRGAWEK PADACZKOWYCH** *(Screening approaches)*

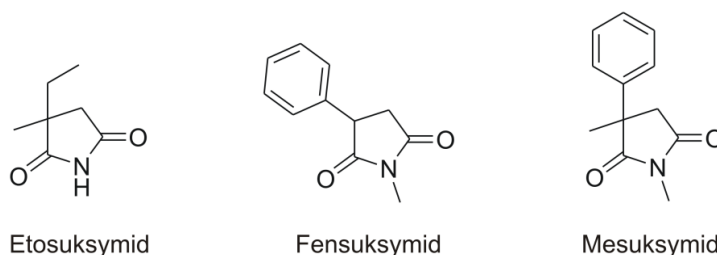
Próby uzyskania możliwie najlepszego modelu drgawek padaczkowych, zaowocowały opisaniem, według różnych doniesień, 50 a nawet 100 różnych sposobów ich wywoływania. W dotychczasowych badaniach, stworzono modele, zarówno napadów uogólnionych, jak i częściowych.<sup>37</sup>

Różnorodność dostępnych modeli drgawek padaczkowych, zmusiła ośrodki badawcze zajmujące się poszukiwaniem nowych leków przeciwpadaczkowych, do zastosowania algorytmu badań farmakologicznych, który maksymalnie zwiększa prawdopodobieństwo sukcesu i zidentyfikowania substancji będących kandydatami na nowe, skuteczne preparaty.<sup>38-40</sup> Dlatego do niedawna, najczęściej stosowanymi testami, określanymi mianem „złotego standardu” w poszukiwaniu nowych leków przeciwpadaczkowych, był test maksymalnego elektrowstrząsu (MES), który odpowiada ludzkim napadom toniczno-klonicznym oraz test drgawek chemicznych wywoływanych podskórnym podaniem pentylenotetrazolu (*sc*PTZ), będący modelem napadów mioklonicznych i nieświadomości (*absence*). W ostatnim okresie, coraz większe znaczenie przypisuje się modelowi drgawek wywołanych prądem o niskiej częstotliwości - 6 Hz. Test 6 Hz, będący alternatywnym testem wstrząsu elektrycznego, odpowiada ludzkim, lekoopornym napadom częściowym. Dodatkowo stwierdzono, że związki działające ochronnie w drgawkach 6 Hz, mogą zarazem charakteryzować się nowym, często nieznanym mechanizmem działania.<sup>41</sup> Dlatego też, test 6 Hz został niedawno włączony do wachlarza podstawowych badań *in vivo*, wykonywanych rutynowo dla kandydatów na leki przeciwpadaczkowe. Należy podkreślić, że mimo znacznego postępu w dziedzinie neurologii i biologii molekularnej, jaki dokonał się w ostatnich kilkudziesięciu latach, wszystkie nowe leki przeciwpadaczkowe zostały wprowadzone do leczenia w oparciu o aktywność przeciwdrgawkową stwierdzoną w modelach zwierzęcych. Jak wspomniano wcześniej, w przypadku tej grupy leków, znacznie mniejsze znaczenie posiada racjonalne projektowanie struktur w oparciu o cele molekularne, zaangażowane w patomechanizm napadów padaczkowych. Badania przesiewowe *in vivo*,

pozwalają ponadto na ocenę właściwości przeciwdrgawkowych związków organicznych należących do nowych klas chemicznych, o strukturze odbiegającej od znanych substancji leczniczych. Przykładem tego jest lakozamid, należący do grupy tzw. funkcjonalizowanych aminokwasów (ang. *functionalized amino acids*, FAAs), który został zatwierdzony do terapii dodatkowej napadów częściowych, bez lub z wtórnym uogólnieniem.<sup>42,43</sup>

#### 2.2.4. FRAGMENT PIROLIDYNO-2,5-DIONU W POSZUKIWANIU ZWIĄZKÓW BIOLOGICZNIE AKTYWNYCH

Współczesna chemia leków dysponuje ogromną liczbą układów heterocyklicznych, zróżnicowanych pod względem rodzaju heteroatomu, wielkości i ilości pierścieni oraz stopnia ich nasycenia. Pełnią one zwykle rolę fragmentu rdzeniowego, decydując o określonej aktywności biologicznej związku chemicznego. Jednym z szeroko eksplorowanych układów heterocyklicznych jest imid kwasu bursztynowego - pirolidyno-2,5-dion (sukcynimid), a główny powód zainteresowania tym układem wynika z jego małej masy cząsteczkowej, obecności fragmentów będących donorami lub akceptorami wiązań wodorowych oraz możliwości łatwego podstawienia pierścienia w pozycjach 1, 3 oraz 4 (w przypadku pochodnych dwupodstawionych). Imidowy atom azotu może zostać zmodyfikowany, m.in. na drodze alkilowania lub w wyniku reakcji cyklokondensacji odpowiedniego bezwodnika lub kwasu bursztynowego z pierwszorzędowymi aminami. Natomiast ugrupowanie metylenowe w sąsiedztwie grupy karbonylowej (pozycja 3), można podstawiać stosując odpowiednie substraty (aldehydy, ketony) w kilkietapowej syntezie pirolidyno-2,5-dionu, w której krytycznym etapem jest kondensacja Knoevenagla.<sup>44-46</sup> Innym sposobem modyfikacji, umożliwiającym wprowadzenie centrum zasadowego w pozycji 3, jest addycja drugorzędowych amin do wiązania podwójnego maleinimidu.<sup>47</sup> Z terapeutycznego punktu widzenia najważniejszymi pochodnymi pirolidyno-2,5-dionu są etosuksymid, fensuksymid oraz mesuksymid, należące do leków przeciwpadaczkowych (**Ryc. 2.**).



**Ryc. 2.** Leki przeciwpadaczkowe z grupy pochodnych pirolidyno-2,5-dionu.

Spośród powyższych substancji, znaczenie kliniczne posiada jedynie etosuksymid, który jest skuteczny w różnych postaciach padaczki uogólnionej z typowymi i nietypowymi napadami nieświadomości, oraz w młodzieńczych napadach mioklonicznych.<sup>48</sup> Należy podkreślić, że w badaniach *in vivo* na zwierzętach, etosuksymid był nieaktywny w teście MES, natomiast okazał się skuteczny w drgawkach *scPTZ*, które odpowiadają ludzkim napadom typu *absence*.<sup>40</sup>

Doniesienia literaturowe wskazują na duże zainteresowanie modyfikacjami układu pirolidyno-2,5-dionu, który stanowi integralną część budowy związków mogących działać w obrębie OUN (przeciwdepresyjnie, przeciwpowrotkowo, przeciwlękowo),<sup>49-53</sup> przeciwbakteryjnie,<sup>54-57</sup> przeciwnowotworowo,<sup>58-60</sup> antymutagennie,<sup>61</sup> przeciwzapalnie,<sup>62</sup> ale także substancji stosowanych jako promotory wchłaniania składników aktywnych preparatów stosowanych na skórę.<sup>63</sup>

Mimo niezwykle szerokiego spektrum aktywności farmakologicznej pochodnych sukcyminidu, w ostatnim czasie najbardziej intensywne badania prowadzone są w kierunku ich działania przeciwdrgawkowego. Prace te realizowane w ciągu kilkunastu lat w Katedrze Chemii Farmaceutycznej UJ-CM w Krakowie pozwoliły otrzymać bibliotekę kilku tysięcy pochodnych pirolidyno-2,5-dionu o zróżnicowanych właściwościach protekcyjnych w zwierzęcych modelach drgawek padaczkowych. Warto podkreślić, że wybrane związki, w odróżnieniu od strukturalnie bliskiego etosuksymidu, aktywnego w teście PTZ, działały skutecznie w teście MES, a niektóre dodatkowo w drgawkach 6 Hz (patrz punkt 3).

Korzystny profil aktywności przeciwdrgawkowej w testach przedklinicznych, otrzymanych wcześniej związków, w tym w ramach mojej rozprawy doktorskiej, stał się punktem wyjścia do kontynuowania szerokich badań chemiczno-farmakologicznych, których wyniki stanowią podstawę niniejszego postępowania habilitacyjnego.

### **2.2.5. CEL BADAŃ**

Celem farmakologicznym badań będących przedmiotem przedłożonego wniosku, jest otrzymanie substancji charakteryzujących się szerokim spektrum aktywności w zwierzęcych modelach drgawek padaczkowych tj. teście maksymalnego elektrowstrząsu (MES), teście drgawek wywołanych podskórnym podaniem pentylenetetrazolu (*scPTZ*) lub/i teście drgawek indukowanych prądem o niskiej częstotliwości - 6 Hz. Z punktu widzenia aktualnego stanu wiedzy, związki o takim profilu farmakologicznym są pożądanymi kandydatami na nowe leki

przeciwpadaczkowe o potencjalnej skuteczności w różnych typach padaczki u człowieka; padacze dużej toniczno-klonicznej, napadach nieświadomości (*absence*), a także (co najważniejsze) w padacze lekoopornej. Warto podkreślić, że otrzymanie leku przeciwpadaczkowego o wspomnianych właściwościach farmakologicznych może umożliwić zrezygnowanie z politerapii, częściej w przypadku padaczki, co w konsekwencji istotnie zmniejszy ryzyko potencjalnych interakcji lekowych. Ponadto, należy zaznaczyć, że zróżnicowane wskazania terapeutyczne wielu leków przeciwpadaczkowych,<sup>64</sup> stwarzają dodatkowo możliwość zidentyfikowania nowej klasy związków o potencjalnej przydatności w terapii schorzeń neurologicznych, m.in. bólu neuropatycznego i migreny. Z punktu widzenia chemii leków niezwykle istotnym celem prowadzonych badań, była systematyczna analiza zależności struktura-aktywność przeciwdrgawkowa w różnych seriach otrzymanych pochodnych, która umożliwiła zidentyfikowanie układów oraz fragmentów strukturalnych warunkujących aktywność biologiczną.

W wyniku prowadzonych prac syntetycznych otrzymano bibliotekę 151 zróżnicowanych strukturalnie związków. Prace badawcze podzielono na dwa zasadnicze kierunki dotyczące:

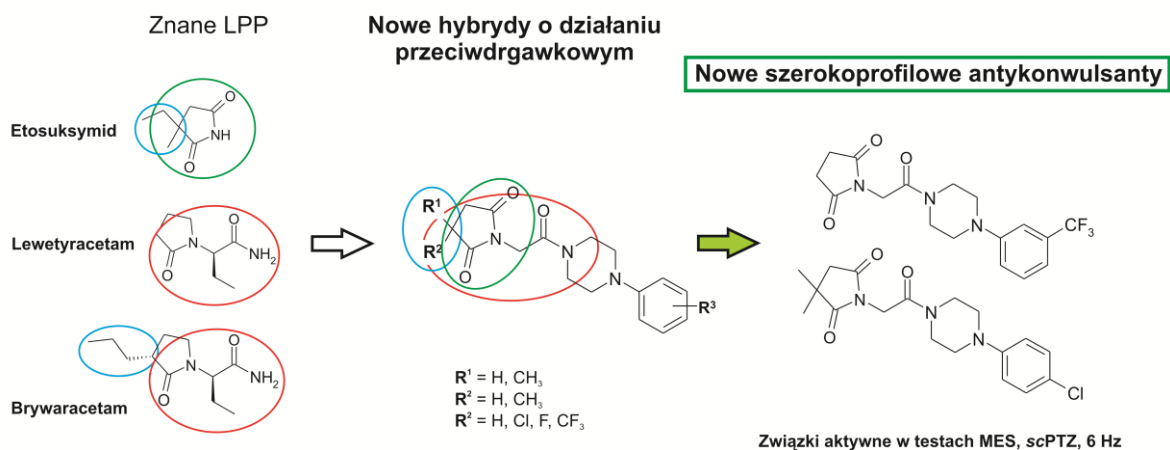
1. Zdefiniowania czynników strukturalnych warunkujących aktywność w testach MES, PTZ i/lub 6 Hz (**H-1–H-4**),
2. Zbadania roli układu pirolidyno-2,5-dionu dla aktywności przeciwdrgawkowej (**H-5**, **H-6**), a także wpływu sposobu przyłączenia pierścienia alicykilcznego do pierścienia imidowego, na efekt biologiczny (**H-5**).

Podstawowe narzędzia badawcze obejmowały:

- badania chemiczne - synteza organiczna, łącznie z metodami analitycznymi umożliwiającymi ocenę czystości oraz potwierdzenie struktury otrzymanych substancji,
- badania farmakologiczne *in vivo*, przesiewowe, a następnie ilościowe, dla najaktywniejszych pochodnych (wyznaczenie dawek efektywnych - ED<sub>50</sub> i toksycznych - TD<sub>50</sub> - dla 50% badanych zwierząt),
- badania farmakologiczne *in vitro* radioreceptorowe, stabilności metabolicznej, wpływu substancji na funkcję izoformy CYP3A4 cytochromu P-450, działania neuroprotekcijnego, cytotoksycznego i antyproliferacyjnego,
- badania *in silico* modelowania przemian metabolicznych.

## 2.2.6. WYNIKI BADAŃ I Dyskusja

**H-1. Kamiński, K.;** Rzepka, S.; Obniska, J. Synthesis and anticonvulsant activity of new 1-[2-oxo-2-(4-phenylpiperazin-1-yl)ethyl]pyrrolidine-2,5-diones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5800–5803. (IF<sub>2011</sub>=2,554, Punktacja MNiSW: **30,000**)



**Ryc. 3.** Modyfikacje strukturalne przeprowadzone w publikacji **H-1**.

Celem badań podjętych w publikacji **H-1** było otrzymanie związków aktywnych w trzech najważniejszych testach *in vivo*, identyfikujących kandydatów na nowe leki przeciwpadaczkowe tj. MES, PTZ oraz 6 Hz. Koncepcja zakładała, że obecność w jednej strukturze fragmentów leków aktywnych w drgawkach PTZ (etosuksymid), 6 Hz (lewetyracetam, brywaracetam) oraz ugrupowania fenylopiperazynowego, istotnego dla aktywności w teście MES, wśród opisanych wcześniej pochodnych pirolidyno-2,5-dionu,<sup>65–67</sup> pozwoli otrzymać związki charakteryzujące się działaniem ochronnym we wszystkich wymienionych modelach. Ogólną strukturę zaplanowanych połączeń przedstawiono na **Ryc. 3**.

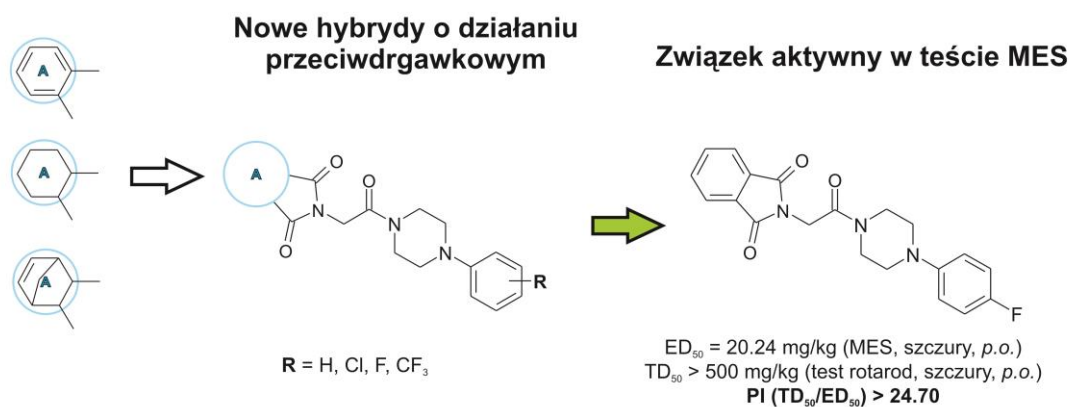
Efektom prac syntetycznych była seria 22 pochodnych 1-[2-okso-2-(4-fenylopiperazyn-1-yl)etylo]pirolidyno-2,5-dionu, w których funkcję amidową tworzyły ugrupowania fenylopiperazynowe z silnie elektroujemnymi atomami chloru, fluoru lub grupą trifluorometylową. Ich obecność okazała się szczególnie korzystna dla aktywności biologicznej w szeregu opisanych uprzednio *N*-zasad Mannich'a.<sup>65–67</sup> Związki syntetyzowano w wyniku kilkietapowego postępowania, którego ostatnim krokiem była reakcja amidowania, katalizowana karbonylodiimidazolem (CDI), używanym często jako tzw. *coupling reagent*



w syntezie peptydów.<sup>68</sup> Badania farmakologiczne *in vivo* zostały wykonane w Narodowym Instytucie Zdrowia (NIH, *National Institutes of Health*, Rockville Pike, Bethesda, MD, USA) w ramach amerykańskiego programu poszukiwania nowych leków przeciwpadaczkowych (*Anticonvulsant Drug Development Program*).

Wyniki, na myszach po podaniu dootrzewnowym (*i.p.*), pokazały, że 21 związków było aktywnych w teście MES (w dawkach 100 lub 300 mg/kg), wśród nich 8 pochodnych hamowało drgawki PTZ (w dawce 300 mg/kg), a 9 substancji działało efektywnie w teście 6 Hz (w dawce 100 mg/kg). Związki te były aktywne w głównej mierze w krótszych przedziałach czasowych tj. 0,5 h (testy MES, PTZ) oraz do godziny od podania w przypadku drgawek 6 Hz. W całej serii, 6 związków charakteryzowała aktywność we wszystkich testach, a najaktywniejsze okazały się 1-(2-okso-2-{4-[3-(trifluorometylo)fenylo]piperazyn-1-ylo}etylo)pirolidyno-2,5-dion oraz 1-{2-[4-(4-chlorofenylo)piperazyn-1-ylo]-2-oksoetylo}-3,3-dimetylo-pirolidyno-2,5-dion. W badaniach neurotoksyczności ostrej 10 pochodnych nie upośledzało koordynacji ruchowej myszy w teście obracającego się pręta (*rotarod*) po podaniu maksymalnej dawki 300 mg/kg. W testach na szczurach, 6 związków działało protekcyjnie w drgawkach MES, u co najmniej 50% zwierząt po podaniu dożołądkowym dawki 30 mg/kg, nie powodując jednocześnie efektów neurotoksycznych. Analiza SAR pokazała, że korzystny dla aktywności jest brak podstawienia w pozycji 3 pirolidyno-2,5-dionu lub wprowadzenie jednej, bądź dwóch grup metylowych, natomiast ich zastąpienie ugrupowaniami etylowymi prowadziło do osłabienia działania biologicznego. Rozpatrując fragment aminowy, uprzywilejowane okazały się fenylopiperazyny z atomami chloru lub fluoru w położeniu *para* lub grupą trifluorometylową w pozycji *meta*. Warto podkreślić, że koncepcja prezentowana w niniejszej publikacji okazała się słuszna i dała podstawę do projektowania związków hybrydowych, które zostały opisane w pracach **H-3** i **H-4**.

**H-2. Kamiński, K.;** Obniska, J.; Wiklik, B.; Atamanyuk, D. Synthesis and anticonvulsant properties of new acetamide derivatives of phthalimide, and its saturated cyclohexane and norbornene analogs. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 4634–4641. (IF<sub>2011</sub>=3,346, Punktacja MNiSW: 35,000)



**Ryc. 4.** Modyfikacje strukturalne przeprowadzone w publikacji **H-2**.

Główną przesłanką, braną pod uwagę w projektowaniu związków będących przedmiotem publikacji **H-2** (**Ryc. 4.**), były badania prowadzone przez Vamecq'a i wsp.,<sup>30–32</sup> w których udowodniona została farmakoforowa rola fragmentu ftalimidowego, szczególnie dla aktywności w drgawkach wywołanych prądem eklektycznym (MES). Dodatkowo, obecność pierścienia aromatycznego w pozycji 3 układu piperolidyno-2,5-dionu, okazała się istotna dla działania ochronnego w teście MES - w seriach opisanych wcześniej pochodnych sukcyminidu.<sup>69,70</sup> Mając na uwadze powyższe spostrzeżenia, w niniejszej pracy przeprowadzono syntezę piperazynamidów kwasu 2-(1,3-dioksoizoidolino-2-yl)-octowego, a także analogów, w których pierścień benzenowy fragmentu ftalimidu zastąpiono alicyklicznym cykloheksanem lub norbornenem (**Ryc. 4.**). Miało to na celu potwierdzenie farmakoforowego charakteru ftalimidu w prezentowanej grupie połączeń. Związki finalne otrzymano wykorzystując reakcję amidowania w obecności CDI, z zastosowaniem wyjściowych kwasów karboksylowych, tj. kwasu 2-(1,3-dioksoizoidolino-2-yl)-octowego, 2-(1,3-diokso-3a,4,5,6,7,7a-heksahydroizoidolino-2-yl)-octowego i (3,5-diokso-4-azatri-cyklo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]dek-8-en-4-yl)-octowego oraz różnie podstawionych pochodnych fenylo-piperazyny (H, Cl, F, CF<sub>3</sub>), benzylopiperazyny, hydroksyetylopiperazyny lub morfoliny.

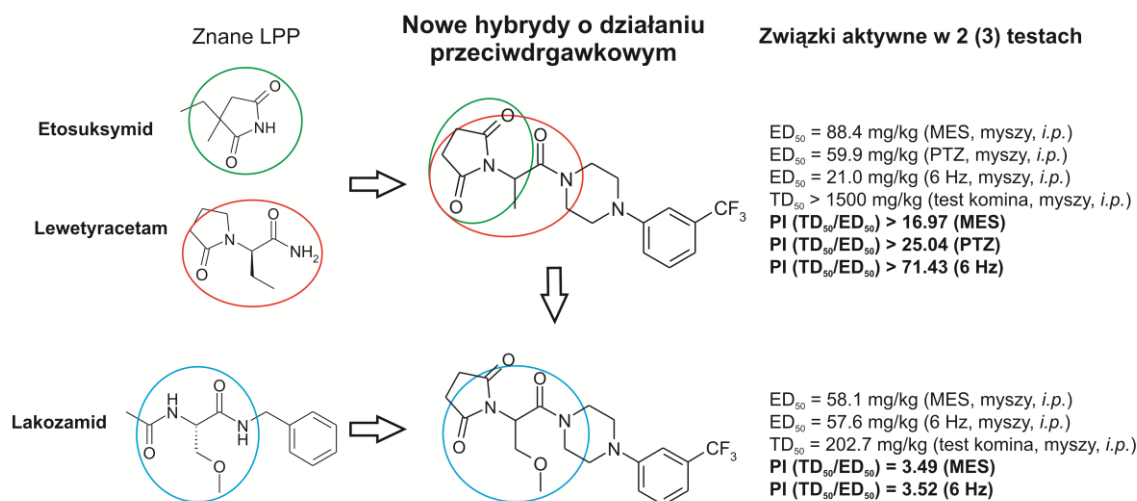
Przesiewowe badania farmakologiczne na myszach (*i.p.*) wykonano w Narodowym Instytucie Zdrowia (NIH, *National Institutes of Health*, Rockville Pike, Bethesda, MD, USA).

Wśród testowanych związków, 13 było aktywnych w drgawkach MES, w tym 1 w dawce 30 mg/kg, 10 w dawce 100 mg/kg, a 3 po podaniu dawki 300 mg/kg (w różnych przedziałach czasowych). Warto podkreślić, że tylko 3 substancje działały w modelu PTZ. Analiza SAR dowiodła, że do najaktywniejszych związków należały pochodne ftalimidowe, natomiast wprowadzenie w miejsce pierścienia benzenowego, fragmentu cykloheksanu lub norbornenu, spowodowało istotne obniżenie aktywności biologicznej. Z punktu widzenia fragmentu aminowego, najkorzystniejsze okazały się pochodne fenylopiiperazyny z atomem chloru lub fluoru w położeniu *para*. Należy podkreślić, że związki były w większości nietoksyczne w teście obracającego się pręta lub upośledzały koordynację ruchową zwierząt w najwyższej stosowanej dawce tj. 300 mg/kg (z wyjątkiem silnie neurotoksycznej pochodnej 2,3-dichloro-fenylopiiperazyny w serii analogów cykloheksanowych - 30 mg/kg).

Wśród badanych związków, najaktywniejszy okazał się 2-{2-[4-(4-fluorofenyl)piiperazyn-1-yl]-2-oksoetylo}izoindolino-1,3-dion, który charakteryzował się również silnym działaniem ochronnym w teście MES w badaniach na szczurach, wykazując 100% protekcji w czasie 2 h i 4 h po podaniu dożołądkowym (*p.o.*). Warto podkreślić, że we wspomnianych przedziałach czasowych był to efekt silniejszy w porównaniu do fenytoiny, będącej modelowym lekiem przeciwpadaczkowym aktywnym w teście MES. Potwierdziły to również późniejsze badania ilościowe (niepublikowane), w których otrzymana substancja była zarówno aktywniejsza, jak i posiadała korzystniejszy indeks ochronny (PI) w stosunku do fenytoiny ( $ED_{50} = 23,20$  mg/kg (MES);  $TD_{50} > 500$  (test *rotarod*);  $PI (TD_{50}/ED_{50}) > 21,60$  vs  $ED_{50} = 20,24$  mg/kg (MES);  $TD_{50} > 500$  (test *rotarod*);  $PI (TD_{50}/ED_{50}) > 24,70$ ).

Podsumowując, wyniki badań opisanych w publikacji **H-2**, dowiodły farmakoforowej roli fragmentu ftalimidowego, dla aktywności przeciwdrgawkowej w teście MES w tej serii połączeń.

**H-3. Kamiński, K.; Zagaja, M.; Łuszczki, J.J.; Rapacz, A.; Andres-Mach, M.; Latacz, G.; Kieć-Kononowicz, K.** Design, synthesis and anticonvulsant activity of new hybrid compounds derived from 2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)propanamides and 2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)butanamides. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 5274–5286. (IF<sub>2015</sub>=5,447, MSHE: 45,000)



**Ryc. 5.** Modyfikacje strukturalne przeprowadzone w publikacji **H-3**.

Główną przesłanką do podjęcia badań chemiczno-farmakologicznych opisanych w niniejszej publikacji, było szerokie spektrum aktywności biologicznej w testach MES, PTZ oraz 6 Hz, obserwowane dla związków opisanych w pracy **H-1**. Hipoteza badawcza zakładała, że obecność w strukturze planowanych połączeń, fragmentów leków aktywnych w teście maksymalnego wstrząsu elektrycznego (MES) - lakoamidu, w drgawkach pentylenetetrazolowych (*sc*PTZ) - etosuksymidu oraz wywołanych prądem elektrycznym o niskiej częstotliwości (6 Hz) - lewetyracetamu i lakoamidu, pozwoli uzyskać związki łączące wyżej wymienione właściwości farmakologiczne. Strukturę wybranych, aktywnych związków hybrydowych otrzymanych w publikacji **H-3** zilustrowano na **Ryc. 5**. Należy podkreślić, iż tematyka związana z poszukiwaniem leków hybrydowych, jest niezwykle aktualna i dotyczy zarówno substancji działających w obrębie OUN,<sup>71,72</sup> jak i związków o aktywności przeciwmalarycznej,<sup>73</sup> przeciwnowotworowej<sup>74,75</sup> oraz przeciwzapalnej.<sup>76</sup> Główną zaletą leków hybrydowych w porównaniu do preparatów konwencjonalnych jest zmniejszone ryzyko rozwoju lekooporności, co związane jest z łączeniem cząsteczek posiadających różne mechanizmy działania molekularnego.<sup>77</sup> Nie bez znaczenia wydaje się również fakt zmniejszenia liczby przyjmowanych leków, co wiąże się z redukcją możliwych

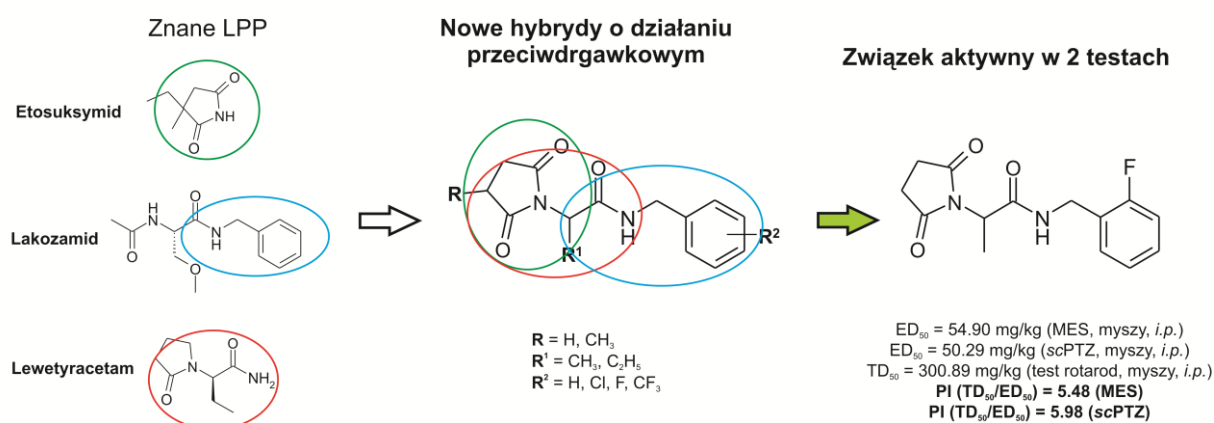
działań niepożądanych i ma przełożenie na lepsze stosowanie się pacjentów do zaplanowanego schematu farmakoterapii (tzw. *compliance*).

W badaniach chemicznych, otrzymano bibliotekę 27 amidowych pochodnych kwasu 2-(2,5-dioksopirolidyno-1-ylo)propanowego oraz 2-(2,5-dioksopirolidyno-1-ylo)butanowego, w których funkcję aminową tworzyły różnie podstawione pochodne fenylopiperazyny (H, Cl, F, CH<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>) lub morfolina. Badania farmakologiczne na myszach (*i.p.*) pokazały, że 4 substancje charakteryzowały się szerokim spektrum aktywności biologicznej, hamując drgawki we wszystkich testach tj. MES, PTZ i 6 Hz. Najsilniejsze właściwości przeciwdrgawkowe obserwowano dla 1-(1-okso-1-{4-[3-(trifluorometylo)fenylo]piperazyn-1-ylo}propan-2-ylo)pirolidyno-2,5-dionu (ED<sub>50</sub> MES = 88,4 mg/kg, ED<sub>50</sub> PTZ = 59,9 mg/kg, ED<sub>50</sub> 6 Hz = 21,0 mg/kg) 30 min. po podaniu. Co niezwykle istotne, związek ten nie upośledzał koordynacji ruchowej zwierząt w teście komina, będącego miarą neurotoksyczności ostrej, do dawki 1500 mg/kg (TD<sub>50</sub> >1500 mg/kg), co skutkowało niezwykle korzystnymi indeksami ochronnymi dla poszczególnych testów, PI >16,97, MES; >25,04, PTZ; >71,43, 6 Hz - lepszymi niż w przypadku modelowych leków przeciwpadaczkowych, badanych w tych samych warunkach - lakoamidu, lewetyracetamu, etosuksymidu i kwasu walproinowego. W badaniach *in vitro*, związek ten wiązał się z napięciowo-zależnym kanałem sodowym silniej niż karbamazepina, a także z kanałem wapniowym typu L mocniej w porównaniu do topiramatu. Warto podkreślić, że antagoniści kanałów wapniowych typu L posiadają udowodnioną aktywność przeciwdrgawkową, ale co ważniejsze hamują również proces epileptogenezy.<sup>78</sup>

Dalsze badania przedkliniczne wykazały, że substancja ta podlegała jedynie nieznacznemu metabolizmowi przez ludzkie enzymy mikrosomalne oraz okazała się bardzo słabym inhibitorem izoenzymu CYP3A4 cytochromu P-450. Powyższe dane czynią związek ciekawym kandydatem na nowy lek przeciwpadaczkowy oraz strukturą wiodącą do dalszych modyfikacji chemicznych. Szeroką aktywność przeciwdrgawkową w badaniach *in vivo* obserwowano również dla analogów 2-CF<sub>3</sub>, 3-Cl oraz homologu butanowego. Co istotne, zastąpienie fragmentu propanamidowego ugrupowaniem 3-metoksypropanamidowym, charakterystycznym dla lakoamidu, spowodowało nasilenie aktywności w drgawkach MES oraz jej osłabienie w testach PTZ i 6 Hz. Analiza SAR wykazała, że korzystniejsze właściwości farmakologiczne posiadają związki należące do serii pochodnych propanamidowych oraz substancje posiadające w budowie fenylopiperazynę z elektroujemnymi podstawnikami w pozycji 3 (szczególnie CF<sub>3</sub> i Cl).

Podsumowując, otrzymane wyniki opisane w publikacji **H-3**, w pełni potwierdzają słuszność postawionej hipotezy badawczej i czynią zasadnymi dalsze prace syntetyczne w grupie hybrydowych substancji o działaniu przeciwdrgawkowym, pochodnych piperidyno-2,5-dionu.

**H-4. Kamiński, K.;** Rapacz, A.; Łuszczki, J.J.; Latacz, G.; Obniska, J.; Kieć-Kononowicz, K.; Filipek, B. Design, synthesis and biological evaluation of new hybrid anticonvulsants derived from *N*-benzyl-2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)propanamide and 2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)butanamide derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 2548–2561. (IF<sub>2015</sub>=2,793, Punktacja MNiSW: **30,000**)



**Ryc. 6.** Modyfikacje strukturalne przeprowadzone w publikacji **H-4**.

Publikacja **H-4** stanowi kontynuację badań opisanych w pracach **H-1–H-3**, których celem było otrzymanie związków aktywnych w różnych modelach drgawek padaczkowych u zwierząt, a tym samym substancji potencjalnie skutecznych w wielu typach napadów padaczkowych u człowieka. Główna modyfikacja strukturalna, w porównaniu do związków opisanych w publikacji **H-3**, dotyczyła fragmentu aminowego tj. zamiany fenylopiiperazyny na benzyloaminę, co pozwoliło zbliżyć strukturę związków do budowy lakozamidu. Dodatkowo, przeprowadzono syntezę związków z grupą metylową w położeniu 3 piperidyno-2,5-dionu.

W badaniach chemicznych, otrzymano 3 serie pochodnych tworzących sumarycznie bibliotekę 33 oryginalnych substancji (**Ryc. 6.**). Jako substraty posłużyły otrzymane wcześniej kwasy 2-(2,5-dioxopiperidyno-1-yl)propanowy, 2-(3-metylo-2,5-dioxo-

pirolidyno-1-ylo)propanowy oraz 2-(2,5-dioksopirolidyno-1-ylo)butanowy. Reakcję amidowania prowadzono w suchym THF w obecności CDI, w temperaturze pokojowej, przez ok. 24 h.

Badania farmakologiczne *in vivo* pokazały, że 25 związków było aktywnych w co najmniej jednym teście drgawek padaczkowych (MES lub PTZ), 9 substancji działało efektywnie w obu testach, a spektrum ich aktywności biologicznej było uzależnione od budowy chemicznej. Tak więc, pochodne 2-(2,5-dioksopirolidyno-1-ylo)- i 2-(3-metylo-2,5-dioksopirolidyno-1-ylo)propanamidowe były aktywne przede wszystkim w teście MES, podczas gdy wprowadzenie fragmentu butanamidowego, rozszerzyło działanie również na drgawki PTZ. Mając na uwadze budowę ugrupowania amidowego, najkorzystniejsze okazały się pochodne niepodstawione oraz substancje z atomami chloru lub fluoru, szczególnie w położeniu *orto* lub *meta* pierścienia aromatycznego. Również wprowadzenie grupy trifluorometylowej w pozycji *para*, warunkowało efekt przeciwdrgawkowy, jednak jej obecność powodowała nasilenie efektów neurotoksycznych w teście obracającego się pręta (*rotarod*). Warto podkreślić, że w badaniach przesiewowych, żadna z substancji nie upośledzała koordynacji ruchowej myszy w dawce 100 mg/kg. Dalsza analiza SAR wykazała, że wprowadzenie grupy metylowej w pozycję 3 sukcyimidu, spowodowało osłabienie aktywności przeciwdrgawkowej. Wśród badanych związków, najaktywniejsze okazały się *N*-benzylo-2-(2,5-dioksopirolidyno-1-ylo)propanamid ( $ED_{50}$  MES = 67,65 mg/kg;  $ED_{50}$  PTZ = 42,83 mg/kg;  $TD_{50}$  (test *rotarod*) = 347,63 mg/kg; PI (MES) = 5,15; PI (PTZ) = 8,12), *N*-(2-fluorobenzyl)-2-(2,5-dioksopirolidyno-1-ylo)propanamid ( $ED_{50}$  MES = 54,90 mg/kg;  $ED_{50}$  PTZ = 50,29 mg/kg;  $TD_{50}$  (test *rotarod*) = 300,89 mg/kg; PI (MES) = 5,48; PI (PTZ) = 5,98) oraz *N*-(3-fluorobenzyl)-2-(2,5-dioksopirolidyno-1-ylo)butanamide ( $ED_{50}$  PTZ = 47,39 mg/kg;  $TD_{50}$  (test *rotarod*) = 326,78 mg/kg; PI (PTZ) = 6,98). Substancje te były znacznie bardziej aktywne od kwasu walproinowego i etosuksymidu, a także posiadały korzystniejszy profil bezpieczeństwa niż pozostałe, modelowe leki tj. karbamazepina i lakozamid.

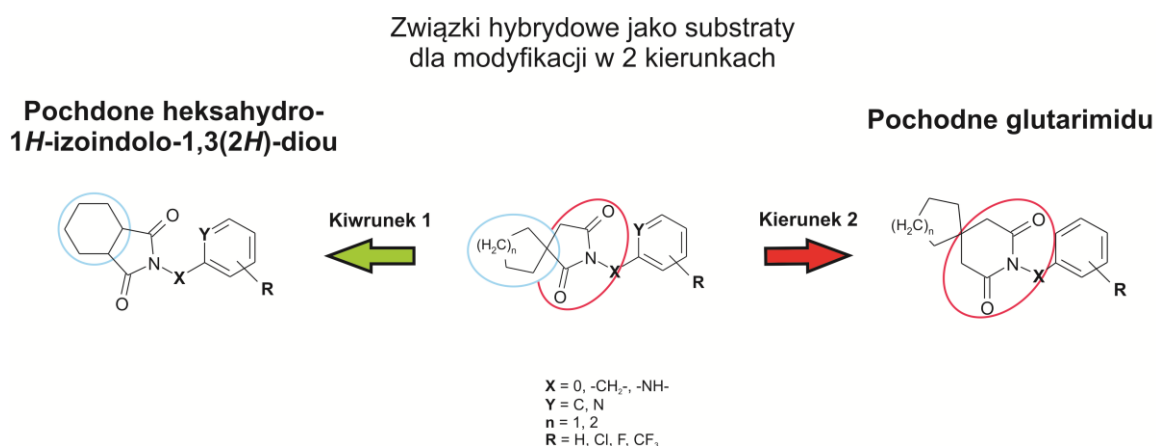
Badania *in vitro* przeprowadzone dla *N*-(2-fluorobenzyl)-2-(2,5-dioksopirolidyno-1-ylo)propanamidu, którego strukturę przedstawiono na **Ryc. 6.**, pokazały, że związek ten nie jest metabolizowany przez ludzkie enzymy mikrosomalne, nie ma wpływu na funkcję izoenzymu CYP3A4 cytochromu P-450 oraz jest pozbawiony działania antyproliferacyjnego (komórki HEK-293) i cytotoksycznego (komórki neuroblastoma IMR-32).

Warto dodać, że badania przeprowadzone w ostatnim czasie (niepublikowane), dla niepodstawionej pochodnej, *N*-benzylo-2-(2,5-dioksopirolidyno-1-ylo)propanamidu, ujawniły jej silne działanie ochronne w teście 6 Hz,  $ED_{50}$  = 17,8 mg/kg (*i.p.* myszy, 15 min. po

podaniu), co jest wynikiem porównywalnym do lewetyracetamu, będącego modelowym lekiem aktywnym w drgawkach sześćo-hercowych.

Podsumowując, wyniki opisane w publikacji **H-4** udowodniły, że zamiana fragmentu fenylopiiperazyny na benzyloaminowy, pozwoliła otrzymać związki o szerokich właściwościach ochronnych w zwierzęcych modelach drgawek padaczkowych, a ponadto odznaczających się niską neurotoksycznością ostrą w teście *rotarod*. Daje to silną podstawę do kontynuowania badań chemicznych, dotyczących dalszych modyfikacji funkcji amidowej.

**H-5. Kamiński, K.; Wiklik, B.; Obniska, J.** Synthesis, anticonvulsant properties, and SAR analysis of differently substituted pyrrolidine-2,5-diones and piperidine-2,6-diones. *Arch. Pharm.* **2014**, *347*, 840–852. (IF<sub>2014</sub>= **1,531**, Punktacja MNiSW: **20,000**)



**Ryc. 7.** Modyfikacje strukturalne przeprowadzone w publikacji **H-5**.

Badania opisane w publikacji **H-5** dotyczące serii azaspirosukcynimidów pozwoliły na ocenę roli pierścienia pirolidyno-2,5-dionu jako fragmentu rdzeniowego, niezbędnego dla aktywności przeciwdrgawkowej. Dodatkowo, zbadano wpływ na aktywność biologiczną sposobu przyłączenia pierścienia alicyklicznego do sukcyimidu tj. poprzez atom węgla spiro lub przez dwa atomy węgla (pochodne heksahydro-1*H*-izoindolo-1,3(2*H*)-dionu). Realizując założenia przeprowadzono modyfikacje strukturalne w dwóch kierunkach, zilustrowanych na **Ryc. 7**. Pierwszy to otrzymanie pochodnych bicykliczne heksahydro-1*H*-izoindolo-1,3(2*H*)-dionu, z fragmentami: fenyłowym, benzyłowym, fenyloaminowym lub 2-pirydyłowym, których stopień zróżnicowania pozwolił na znaczne poszerzenie analizy SAR. Drugi kierunek polegał na syntezie analogów, w których układ sukcyimidu zamieniono na 6-członowy układ



glutarimidowy. Warto podkreślić, że punktem wyjścia dla tego typu modyfikacji były pochodne 2-azaspiro[4.4]nonano- oraz [4.5]dekano-1,3-dionu o potwierdzonej, we wcześniejszych badaniach, aktywności przeciwdrgawkowej.<sup>79-82</sup>

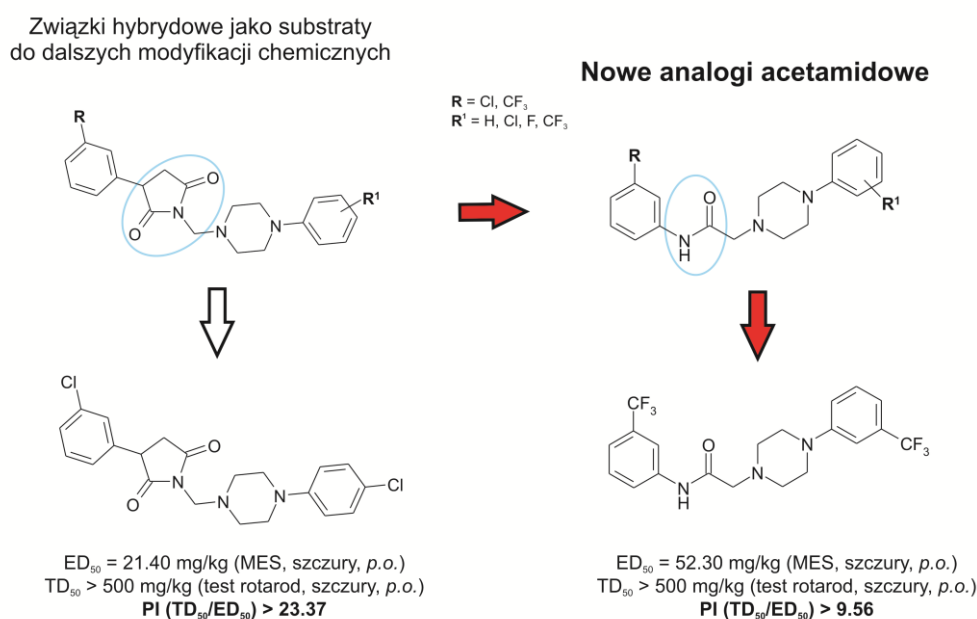
W pracach syntetycznych, w wyniku reakcji cyklokondensacji odpowiednich bezwodników kwasowych z aminami pierwszorzędowymi, otrzymano serię 22 związków, wśród których 10 to pochodne heksahydro-1*H*-izoindolo-1,3(2*H*)-dionu, a 12 to pochodne 3-azaspiro[5.5]undekano-2,4-dionu (azaspiroglutarimidu).

Wyniki wstępnych badań farmakologicznych, na myszach, po podaniu dootrzewnowym, pokazały, że 15 nowych związków było aktywnych w co najmniej jednym teście drgawek padaczkowych, natomiast 9 działało skutecznie w obu modelach - MES i PTZ (w dawkach 100 lub 300 mg/kg). Analiza SAR pokazała, że aktywność biologiczna była ściśle powiązana ze strukturą fragmentu imidowego. Najkorzystniejsze działanie wykazały pochodne heksahydro-1*H*-izoindolo-1,3(2*H*)-dionu, skutecznie (z kilkoma wyjątkami), w obu modelach drgawek. Jedynie 2 związki były pozbawione aktywności przeciwdrgawkowej. W serii tej, najaktywniejsze okazały się 2-feniloheksahydro-1*H*-izoindolo-1,3(2*H*)-dion oraz jego analog 3-chlorofenylowy, które hamowały drgawki MES i PTZ w dawce 100 mg/kg. Była to aktywność wyższa w porównaniu do referencyjnych leków przeciwpadaczkowych - etosuksymidu i kwasu walproinowego. Warto dodać, że pochodna 2-chlorofenylowa, oprócz aktywności w testach MES i PTZ, działała również ochronnie w modelu 6 Hz. Co ciekawe, wyniki *in vivo* pokazały, że zamiana fragmentu azaspirosukcynimidu na heksahydro-1*H*-izoindolo-1,3(2*H*)-dion, wśród pochodnych 2-fenylaminowych, spowodowała odwrócenie profilu aktywności - z głównie anty-MES na przeważająco anty-PTZ. Dodatkowo, pochodne te były znacznie mniej aktywne w stosunku do analogów fenylowych, benzyloowych oraz 2-pirydyloowych. W dalszych badaniach stwierdzono, że zamiana pierścienia sukcyimidowego na glutarimidowy, prowadzi do znacznego osłabienia aktywności przeciwdrgawkowej w odniesieniu do pochodnych azaspirosukcynimidu oraz heksahydro-1*H*-izoindolo-1,3(2*H*)-dionu. Należy również zaznaczyć, że 3-[(4-chlorofenilo)amino]-3-azaspiro[5.5]undekano-2,4-dion, mimo braku aktywności przeciwdrgawkowej, działał neuroprotekcynie na komórki hipokampa w uszkodzeniach indukowanych podaniem kwasu kainowego.

Podsumowując, stwierdzono, że z punktu widzenia profilu aktywności przeciwdrgawkowej, najkorzystniejszy okazał się układ heksahydro-1*H*-izoindolo-1,3(2*H*)-dionu. Potwierdzono również farmakoforowy charakter piroolidyno-2,5-dionu, jako fragmentu rdzeniowego związków o aktywności przeciwdrgawkowej. Ponadto, działanie neuro-

protekcyjne obserwowane w serii azaspiroglutarimidów, daje nadzieję na znalezienie, wśród zbliżonych strukturalnie związków, substancji skutecznych w leczeniu szeregu chorób neurodegeneracyjnych.

**H-6. Kamiński, K.; Wiklik, B.; Obniska, J. Synthesis and anticonvulsant activity of new *N*-phenyl-2-(4-phenylpiperazin-1-yl)acetamide derivatives. *Med. Chem. Res.* **2015**, *24*, 3047–3061. (IF<sub>2015</sub>=1,402, Punktacja MNiSW: 10,000)**



**Ryc. 8.** Modyfikacje strukturalne przeprowadzone w publikacji **H-6**.

Biorąc pod uwagę budowę chemiczną leków przeciwpadaczkowych, należących do pierwszej, drugiej i trzeciej generacji, można stwierdzić, że wiązanie amidowe występujące w formie łańcuchowej (egzocykliczne), bądź stanowiące fragment pierścienia (imidy, laktamy - endocykliczne), jest jednym z najważniejszych fragmentów farmakoforowych związków aktywnych przeciwdrgawkowo.<sup>83</sup> Obecność tych fragmentów jako wbudowanych w pierścień heterocykliczny, stanowi integralną część struktury takich substancji leczniczych jak etosuksymid, fenytoina, fenobarbital, lewetyracetam i jego nowszych analogów brywaracetamu oraz seletracetamu. Natomiast do najważniejszych leków, w których ugrupowanie amidowe jest częścią łańcucha, zaliczyć należy lakoamid, rufinamid, walpromid i jego pochodne walrociemid oraz walnoktamid.

Dotychczasowe badania nad zależnością pomiędzy strukturą i aktywnością przeciwdrgawkową (SAR), wśród pochodnych pirolidyno-2,5-dionu pokazały, że istotną rolę odgrywa obecność przy imidowym atomie azotu fragmentu 4-podstawionej piperazyny, połączonej z nim przy pomocy różnej długości łańcucha alkilenowego (łącznik), ze szczególną preferencją dla pochodnych metylenowych (*N*-zasady Mannich'a). Ponadto, szczególnie aktywne okazały się połączenia posiadające silnie elektroujemne atomy bromu, chloru lub ugrupowanie trifluorometylwe w podstawniku fenylovym w położeniu 3 pirolidyno-2,5-dionu, ale także w pierścieniu aromatycznym fragmentu fenylo-piperazynowego.<sup>84</sup> Mając na uwadze powyższe fakty, istotnym wydawało się zbadanie roli pierścienia sukcyimidowego dla aktywności pochodnych imidowych. W tym celu zaplanowano serię związków, w których układ pirolidyno-2,5-dionu zastąpiono łańcuchowym wiązaniem amidowym znajdującym się we fragmencie acetamidowym. Dodatkowo zachowany został łącznik metylenowy pomiędzy wiązaniem amidowym i pierścieniem piperazyny (**Ryc. 8**).

W badaniach chemicznych, w wyniku kilkietapowego postępowania syntetycznego, otrzymano serię 22 związków finalnych, należących do pochodnych *N*-(3-chlorofenilo)- oraz *N*-(3-trifluorometlofenilo)-acetamidu. Badania farmakologiczne na myszach (*i.p.*), pokazały że związki cechowała aktywność wyłącznie w teście MES, a działanie to było uzależnione przede wszystkim od rodzaju podstawnika w położeniu 3 we fragmencie anilidowym. Efekt ochronny obserwowano niemal wyłącznie dla pochodnych *N*-(3-trifluorometylofenilo)-acetamidu. W serii analogów 3-chlorofeniloacetamidowych, aktywne były jedynie związki z ugrupowaniem 4-metylopiperazynowym oraz morfoliną. Wyniki te mogą wskazywać na ważną rolę atomów fluoru dla aktywności przeciwdrgawkowej, którą stwierdzono również wcześniej, wśród zróżnicowanych strukturalnie pochodnych pirolidyno-2,5-dionu.<sup>80</sup> Porównanie danych farmakologicznych dla analogów acetamidowych i sukcyimidowych, wskazuje jednoznacznie, że zastąpienie pierścienia imidowego łańcuchowym wiązaniem amidowym, spowodowało osłabienie działania przeciwdrgawkowego. Co jednak ważne, pochodne acetamidowe były aktywne w teście MES, a niektóre związki również w modelu 6 Hz. Daje to nadzieję na znalezienie wśród tego typu połączeń, związków o ciekawym profilu aktywności przeciwdrgawkowej. Wśród otrzymanych związków, najaktywniejszy okazał się *N*-[3-(trifluorometylo)fenilo]-2-[4-[3-(trifluorometylo)fenilo]piperazyn-1-yl]acetamid z  $ED_{50} = 52,30$  mg/kg,  $TD_{50} > 500$  mg/kg i  $PI > 9,56$  (po dożołądkowym podaniu szczurom). W badaniach *in vitro*, substancja ta wiązała się umiarkowanie z napięciowo-zależnym kanałem sodowym, po zastosowaniu wysokiego

stężenia (500  $\mu$ M), co sugerować może inny mechanizm molekularny, odpowiedzialny za efekt przeciwdrgawkowy.

### **2.2.7. PODSUMOWANIE WYNIKÓW BADAŃ STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ HABILITACJI**

Prezentowany cykl publikacji (**H-1–H-6**), stanowi przykład kompleksowego postępowania w obszarze poszukiwania nowych leków przeciwpadaczkowych, na które składa się:

- projektowanie nowych związków w oparciu o struktury znanych substancji leczniczych, a także o wyniki badań własnych,
- wydajna synteza organiczna, wspomagana badaniami fizykochemicznymi, chromatograficznymi i spektralnymi - celem oceny czystości otrzymanych związków i potwierdzenia ich struktury chemicznej,
- badania *in vivo* w kierunku aktywności przeciwdrgawkowej (przesiewowe i poszerzone), zgodne z wytycznymi międzynarodowych programów poszukiwania nowych leków przeciwpadaczkowych,
- badania *in vitro*, których celem jest wyjaśnienie prawdopodobnego molekularnego mechanizmu działania aktywnych połączeń, ocena stabilności metabolicznej z wykorzystaniem ludzkich enzymów mikrosomalnych, działania cytotoksycznego i antyproliferacyjnego, a także zbadanie wpływu substancji na funkcję izoformy CYP3A4 cytochromu P-450, której indukcja lub inhibicja przez ksenobiotyki jest główną przyczyną metabolicznych interakcji lekowych,
- analiza struktura-aktywność przeciwdrgawkowa, która pozwala na zidentyfikowanie fragmentów strukturalnych pożądaných z punktu widzenia działania biologicznego, a jej wyniki umożliwią bardziej racjonalne projektowanie kandydatów na nowe leki przeciwpadaczkowe.

Przeprowadzone badania chemiczno-farmakologiczne oraz analiza zależności struktura-aktywność przeciwdrgawkowa, pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

- w seriach pochodnych (2,5-dioksopirolidyno-1-ylo)acetamidów (**H-1**, **H-2**), zakres aktywności uzależniony jest w głównej mierze od rodzaju podstawienia pierścienia sukcyimidu w położeniu 3. Wśród pochodnych ftalimidowych (**H-2**) dominowała

- aktywność w teście MES, podczas gdy pochodne niepodstawionego piperolidyno-2,5-dionu, bądź z jedną lub dwoma grupami metylowymi w pozycji 3, działały skutecznie w drgawkach MES, PTZ i/lub 6 Hz. Mając na uwadze fragment aminowy uprzywilejowane okazały się pochodne fenylopiperazyny z atomami chloru lub fluoru w położeniu *para* lub grupą trifluorometylową w pozycji *meta* pierścienia fenyłowego,
- badania w seriach piperazynamidowych pochodnych kwasów 2-(2,5-diokso-piperolidyno-1-ylo)propanowego oraz 2-(2,5-dioksopiperolidyno-1-ylo)butanowego (**H-3**), wykazały, że obecność fragmentu propanamidowego lub butanamidowego, powodowała nasilenie aktywności w drgawkach 6 Hz, będących, co istotne, modelem ludzkich, lekoopornych napadów częściowych. Wynikać to może ze zbliżenia ich struktury we fragmencie amidowym do lewetyracetamu, który charakteryzuje się silną aktywnością w drgawkach indukowanych prądem o niskiej częstotliwości. Warto zaznaczyć, iż modyfikacja ta pozwoliła (dodatkowo) na zachowanie wysokiej aktywności w testach MES i PTZ, przy czym korzystniejszym profilem aktywności odznaczały się pochodne propanamidowe. Zgodnie z przewidywaniami, analog 3-metoksypropanamidowy, ze względu na podobieństwo strukturalne do lakozamidu (aktywnego w teście MES), charakteryzował się silniejszym działaniem w teście maksymalnego elektrowstrząsu. W seriach tych, szczególnie korzystne okazały się fenylopiperazyny z grupą trifluorometylową lub atomem chloru w pozycji *meta* pierścienia fenyłowego. Wyniki badań opisanych w publikacji **H-3** w pełni potwierdziły słuszność projektowania hybrydowych substancji przeciwdrgawkowych,
  - szeroką aktywność w przedklinicznych modelach napadów padaczkowych (MES, PTZ), obserwowano również wśród pochodnych benzyloamidowych (**H-4**). Pochodne 2-(2,5-dioksopiperolidyno-1-ylo)- i 2-(3-metylo-2,5-dioksopiperolidyno-1-ylo)propanamidowe, były aktywne przede wszystkim w teście MES, podczas gdy 2-(2,5-dioksopiperolidyno-1-ylo)butanamidy również (lub jedynie) w drgawkach PTZ. Rozpatrując fragment benzyloaminowy, optymalną aktywność wykazują pochodne niepodstawione oraz związki z atomami chloru lub fluoru, szczególnie w położeniu *orto* lub *meta* pierścienia aromatycznego,
  - wyniki przedstawione w pracach **H-5** i **H-6**, dowiodły farmakoforowej roli pierścienia piperolidyno-2,5-dionu - jego zastąpienie piperidyno-2,6-dionem (glutarimidem) lub łańcuchowym wiązaniem amidowym, powodowało istotne obniżenie aktywności. Ponadto, wśród pochodnych z dodatkowym pierścieniem alicyklicznym przy układzie

sukcynimidowym (**H-5**), uprzywilejowane okazały się związki bicykliczne, należące do serii heksahydro-1*H*-izoindolo-1,3(2*H*)-dionów.

Reasumując, przeprowadzone badania i wynikające z nich wnioski dotyczące zależności struktura-aktywność pozwalają na bardziej racjonalne poszukiwanie kandydatów na nowe leki przeciwpadaczkowe, szczególnie wśród pochodnych pirolidyno-2,5-dionu. Potwierdzenie zasadności proponowanej struktury związków wg koncepcji hybrydowej jako preparatów o aktywności przeciwdrgawkowej, daje nadzieję na jej zastosowanie również w odniesieniu do innych chemotypów. Mając na uwadze powyższe dane, aktualnie prowadzone są prace chemiczno-farmakologiczne wśród *N*-fenylowych pochodnych amidów kwasów 2-(2,5-dioksopirolidyno-1-yl)propanowego i butanowego, analogów 3-metoksypropanamidowych oraz związków z wbudowaną fenyloalaniną, a wstępne wyniki farmakologiczne są bardzo obiecujące.

Mając na uwadze zróżnicowane wskazania terapeutyczne leków przeciwpadaczkowych,<sup>64</sup> a także mechanizm działania związków opisanych w niniejszym postępowaniu habilitacyjnym, będących ligandami napięciowo-zależnych kanałów sodowych i wapniowych, istnieje duże prawdopodobieństwo zidentyfikowania nowej klasy substancji, skutecznych w leczeniu innych schorzeń neurologicznych - migreny i bólu neuropatycznego.

### **3. POZOSTAŁE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE**

#### **3.1. DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWO-BADAWCZA PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA**

Moją działalność naukowo-badawczą w Katedrze Chemii Farmaceutycznej UJ-CM rozpocząłem od syntezy oraz analizy danych spektralnych wybranych związków należących do pochodnych 3-arylopirolidyno-2,5-dionu, 2-azaspiro[4.4]nonano- i [4.5]dekano-1,3-dionu, posiadających przy imidowym atomie azotu fragment 4-metylo- lub 4-fenylopiperazynowy, połączony z nim łańcuchem alkilenowym o różnej długości (1C–3C).<sup>70</sup> W dalszej kolejności oceniłem właściwości lipofilowe *N*-benzylowych- oraz *N*-[(4-arylopiperazyn-1-yl)alkilowych]- pochodnych 2-azaspiro[4.4]nonano- i [4.5]dekano-1,3-dionu,<sup>85,86</sup> metodą chromatografii cienkowsarstwowej w układzie faz odwróconych (RP-TLC). Otrzymane wyniki umożliwiły ocenę zależności struktura-lipofilowość, a także pokazały istotną statystycznie korelację między znormalizowanym chromatograficznym parametrem lipofilowości  $R_{M0}$  i aktywnością przeciwdrgawkową w obu seriach związków. Ponadto,

w badaniach tych porównano możliwość przewidywania lipofilowości przy zastosowaniu metody RP-TLC oraz metod obliczeniowych (moduł Prolog *P*, program Pallas). W efekcie stwierdzono, że metoda eksperymentalna jest znacznie bardziej precyzyjna i w odróżnieniu od metody obliczeniowej, różnicuje lipofilowość dla poszczególnych izomerów (*orto*, *meta* i *para*).

Moje dalsze badania skupiały się na poszukiwaniu nowych, aktywnych przeciwdrgawkowo związków w grupie różnie podstawionych *N*-benzylowych,<sup>80</sup> *N*-fenyloowych<sup>80</sup> oraz *N*-fenyloaminowych<sup>87</sup> pochodnych 2-azaspiro[4.4]nonano- i [4.5]dekano-1,3-dionu. Badania prowadzone w latach 2003–2006 były rezultatem realizacji grantu KBN, którego kierownikiem była wówczas dr Jolanta Obniska. W pierwszej kolejności, przeprowadziłem syntezę wybranych pochodnych *N*-benzylowych oraz *N*-fenylo-owych, posiadających przy pierścieniu aromatycznym silnie elektroujemne atomy fluoru lub ugrupowania trifluorometylowe<sup>80</sup>. Badania farmakologiczne *in vivo*, pod kątem działania przeciwdrgawkowego, pokazały, iż szereg związków charakteryzowało się silną aktywnością protekcyjną w testach MES i/lub *sc*PTZ, a najaktywniejsze okazały się pochodne 2-azaspiro[4.4]nonano-1,3-dionu z atomem fluoru w położeniu 2 lub 3 oraz grupą trifluorometylową w położeniu 2 fragmentu aromatycznego. Dowiedziona została korzystna rola atomów fluoru, dla aktywności biologicznej w tej serii połączeń.<sup>80</sup> Systematyczna dyskusja SAR, pokazała również, że skondensowanie pierścienia piperolidyno-2,5-dionu z układem norborenu, prowadziło do obniżenia aktywności przeciwdrgawkowej, co obserwowano wśród trójcyklicznych pochodnych *N*-benzylowych oraz *N*-fenyloowych.<sup>88</sup> W tym czasie uczestniczyłem również w syntezie wybranych połączeń w grupie *N*-(4-arylopiperazyno-1-yl)etylenowych- lub propylenowych- pochodnych 8-fenylo- oraz [7,8-f]benzo-2-azaspiro[4.5]dekano-1,3-dionu,<sup>89</sup> wśród których otrzymano szereg substancji o silnych właściwościach ochronnych w teście MES. Wyniki te pokazały, że obecność pierścienia aromatycznego w strukturze 2-azaspiro[4.5]dekano-1,3-dionu (szczególnie jako fragment tetrahydronaftalenu) oraz arylopiperazyny jako funkcji aminowej powoduje nasilenie aktywności w drgawkach indukowanych prądem elektrycznym (MES).<sup>89</sup>

Kontynuując badania chemiczne w grupie azaspirosukcynimidów, wprowadziłem w miejsce wspomnianych powyżej fragmentów - benzylowego lub fenyloowego w pozycji 1, ugrupowanie 2-pirydylowe z różnie usytuowaną grupą metylową.<sup>90</sup> Warto podkreślić, że pochodne te stanowiły wcześniej temat mojej pracy magisterskiej, którą realizowałem w Katedrze Chemii Farmaceutycznej UJ-CM. Badania farmakologiczne pokazały, że w serii tej, do najaktywniejszych substancji należały pochodne 2-azaspiro[4.5]dekano-1,3-dionu

z fragmentem 2-pirydylowym, w którym grupa metylowa znajdowała się w pozycji 3, 4 lub 6. Testy *in vitro*, wybranych, aktywnych związków dowiodły, że najbardziej prawdopodobny mechanizm działania przeciwdrgawkowego, związany jest z wpływem na napięciowo-zależne kanały wapniowe oraz funkcję receptora gabaergicznego - GABA<sub>A</sub>.<sup>90</sup> Opierając się na wynikach RP-TLC przedyskutowano zależność struktura-lipofilowość oraz udowodniono wpływ właściwości lipofilowych na aktywność biologiczną.<sup>90</sup>

Dalsza analiza SAR w serii pochodnych *N*-(piryd-2-ylo)pirolidyno-2,5-dionów wykazała, że zamiana fragmentu cykloalkilowego, połączonego z pierścieniem imidowym poprzez atom węgla spiro, na podstawnik cykloheksylowy o dużej swobodzie rotacyjnej lub jego usunięcie, skutkowało znacznym osłabieniem bądź całkowitą utratą aktywności przeciwdrgawkowej.<sup>91</sup> Warto podkreślić, że wprowadzenie dwóch podstawników alkilowych (metylowych lub etylowych) w pozycji 3 pirolidyno-2,5-dionu nasiliło działanie biologiczne.<sup>91</sup> Obserwacja ta została wykorzystana w projektowaniu związków będących podstawą mojej rozprawy doktorskiej.

Systematyczna analiza zależności struktura-aktywność przeciwdrgawkowa, w różnych seriach azaspirosukcynimidów wykazała, że wśród otrzymanych związków najaktywniejszy okazał się *N*-fenyloamino-2-azaspiro[4.4]nonano-1,3-dion, który był skuteczny w teście MES, u szczurów po podaniu dożołądkowym (ED<sub>50</sub> = 72,61 mg/kg, TD<sub>50</sub> > 250 mg/kg, PI > 3,44).<sup>79</sup> Otrzymane wyniki dały podstawę do poszukiwania nowych, aktywnych przeciwdrgawkowo substancji wśród *N*-fenyloaminowych pochodnych 2-azaspiro[4.4]nonano- i [4.5]dekano-1,3-dionu,<sup>81</sup> a także dalszych, wielokierunkowych modyfikacji chemicznych w tej grupie połączeń, co stanowiło tematykę mojej rozprawy doktorskiej.

W oparciu o uzyskane wyniki badań farmakologicznych stwierdzono, że obecność układu spiranowego jest niezbędna dla aktywności. Pochodne 2-azaspiro[4.4]nonano-1,3-dionu posiadały silniejsze działanie przeciwdrgawkowe niż analogi 2-azaspiro[4.5]dekano-1,3-dionu.<sup>81</sup> Związki należące do serii 3-cykloheksylo- oraz 3-fenylo-pirolidyno-2,5-dionów były pozbawione działania przeciwdrgawkowego.

Prowadząc dalszą analizę zależności struktura-aktywność zaobserwowano, że wprowadzenie w miejsce atomu węgla spiro, różnej długości podstawników alkilowych, powoduje znaczące nasilenie i rozszerzenie aktywności przeciwdrgawkowej w porównaniu do azaspirosukcynimidów. Związki tego typu były w większości aktywne w obu stosowanych testach MES i *sc*PTZ, podczas gdy w przypadku azaspirosukcynimidów przeważała aktywność w teście MES.<sup>92</sup> Podobną zależność obserwowano wśród pochodnych heksahydro-1*H*-izoindolo-1,3(2*H*)-dionu. Należy podkreślić, że w całej bibliotece związków,



najaktywniejsze okazały się 3,3-dimetylowe pochodne piperolidyno-2,5-dionu, wśród których *N*-fenyloamino-3,3-dimetylopirolidyno-2,5-dion z  $ED_{50} = 68,89$  mg/kg w teście MES (szczury, *p.o.*) oraz  $TD_{50} > 500$  mg/kg w teście obracającego się pręta (*rotarod*), działał silniej i jednocześnie powodował słabszą neurotoksyczność ostrą (w teście *rotarod*) w porównaniu do struktury wiodącej.<sup>92</sup> Aktywność przeciwdrgawkowa badanych połączeń była również zależna od rodzaju i położenia podstawników w pierścieniu aromatycznym. Do najaktywniejszych należały pochodne niepodstawione lub/i z silnie elektroujemnymi atomami chloru lub bromu.<sup>92</sup> Warto podkreślić, że wybrane połączenia działały ochronnie w teście drgawek sześćcio-hercowych (6 Hz), który identyfikuje związki skuteczne w terapii lekoopornych napadów limbicznych oraz w teście drgawek pilokarpinowych (PISP; *Pilocarpine Induced Status Prevention*), będących zwierzęcym modelem stanu padaczkowego. Na podstawie wyników badań radioreceptorowych stwierdzono, że najbardziej prawdopodobny mechanizm działania przeciwdrgawkowego polega na modulowaniu funkcji napięciowo-zależnych kanałów sodowych.

Badania lipofilowości, prowadzone metodami chromatografii cienkowarstwowej (RP-TLC) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (RP-HPLC) w układzie faz odwróconych, umożliwiły dyskusję zależności istniejących pomiędzy strukturą i lipofilowością, dodatkowo zaobserwowano również korelację pomiędzy właściwościami lipofilowymi i aktywnością przeciwdrgawkową badanych połączeń.<sup>92,93</sup>

Efektem mojej aktywności naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych było współautorstwo w **13** publikacjach oryginalnych (sumaryczny *impact factor* (IF) = **14,586**, punktacja MNiSW: **163**).

### **3.2. DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWO-BADAWCZA PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA**

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych moje zainteresowania naukowo-badawcze uległy znacznemu poszerzeniu, głównie za sprawą zaangażowania w projekty subsydiowane ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju oraz Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka.

Oprócz zasadniczego kierunku badawczego, stanowiącego podstawę habilitacji, tj. poszukiwania nowych substancji przeciwpadaczkowych, moje zainteresowania naukowe objęły poszukiwania preparatów o potencjalnej aktywności przeciwpyschotycznej, przeciwd depresyjnej, anksjolitycznych oraz prokognitywnej.

W ramach kontynuacji badań opisanych w rozprawie doktorskiej, otrzymano serię 2-azaspiro[4.5]dekano-1,3-dionów, 3-metylo- oraz 4-metylo-2-azaspiro[4.5]dekano-1,3-dionów, zawierających przy atomie azotu, zróżnicowane strukturalnie podstawniki - benzytowe, fenytowe, fenyloaminowe lub 2-pirydytowe.<sup>94</sup> Jednakże wprowadzone modyfikacje chemiczne skutkowały osłabieniem aktywności biologicznej w stosunku do otrzymanych wcześniej analogów.<sup>94</sup>

Mając na uwadze korzystne właściwości farmakologiczne opisanych wcześniej *N*-(4-arylopiperazyno-1-ylo)etylenowych- lub propylenowych- pochodnych 8-fenylo- oraz [7,8-f]benzo-2-azaspiro[4.5]dekano-1,3-dionu,<sup>89</sup> kolejne badania, w których uczestniczyłem jako członek zespołu kierowanego przez dr hab. Jolantę Obniską, dotyczyły analogów 3-fenylopirolidyno-2,5-dionu, w których część aminową stanowiły pochodne fenylopiperazyny, połączone z nim różnej długości łącznikiem alkilenowym.<sup>65,95</sup> Analiza SAR pokazała, że najaktywniejsze są *N*-zasady Mannich'a pochodne 3-(2-trifluorometylofenylo)-pirolidyno-2,5-dionu, wśród których najsilniejsze właściwości ochronne w teście MES wykazał *N*-[(4-fenylopiperazyn-1-ylo)-metylo]-3-(2-trifluorometylofenylo)-pirolidyno-2,5-dion z ED<sub>50</sub> = 20,78 mg/kg, TD<sub>50</sub> (test *rotarod*) > 250 mg/kg, PI > 24,1, po podaniu dożołądkowym szczurom.<sup>65</sup> Zamiana grupy trifluorometylowej na metylową, lub ich usunięcie, powodowało osłabienie lub utratę aktywności biologicznej. Podobną zależność obserwowano w wyniku przesunięcia grupy metylowej z pozycji 2 na 3.<sup>95</sup>

Moje dalsze prace dotyczące poszukiwania nowych substancji o aktywności przeciwdrgawkowej, prowadzone były w dwóch głównych kierunkach chemicznych. Pierwszy obejmował *N*-zasady Mannich'a, w których fragment rdzeniowy stanowił pirolidyno-2,5-dion, a funkcję aminową różne pochodne piperazyny, natomiast drugi, niezwykle ważny kierunek, dotyczył syntezy nowych amidowych pochodnych kwasów 2-(2,5-dioskopirolidyn-1-ylo)-etanowego, -propanowego oraz -butanowego o szerokiej aktywności w zwierzęcych modelach drgawek padaczkowych.

Badania w grupie *N*-zasad Mannich'a kontynuowałem jako wykonawca zadań syntetycznych w ramach grantu MNiSW N405 298536 (2009–2012), którego kierownikiem była dr hab. Jolanta Obniska, a także realizując projekty subsydiowane ze środków UJ-CM. W ramach prowadzonych prac otrzymano bibliotekę kilkuset nowych, zróżnicowanych strukturalnie związków, których wspólnym elementem była obecność pochodnych piperazyny lub morfoliny jako funkcji aminowej oraz obszaru aromatycznego w pozycji 3 pirolidyno-2,5-dionu. Prace te rozpoczęto w seriach 3-fenylopirolidyno-2,5-dinu z atomem chloru w pozycji 2, 3 lub 4 oraz pochodnymi fenylopiperazyny w części aminowej.<sup>66</sup> Analiza SAR pokazała, że

związki tego typu hamowały jedynie drgawki MES, a najkorzystniejsze właściwości farmakologiczne posiadały pochodne *meta*-chloro, w których fragment aminowy stanowiły 3-chlorofenylopiiperazyna ( $ED_{50} = 21,40$  mg/kg,  $TD_{50}$  (test *rotarod*)  $> 500$  mg/kg,  $PI > 23,37$ , szczury *p.o.*) lub 3-trifluorometylofenylopiiperazyna ( $ED_{50} = 28,83$  mg/kg,  $TD_{50}$  (test *rotarod*)  $= 152,80$  mg/kg,  $PI = 5,30$ , szczury *p.o.*). Należy podkreślić, że otrzymane wartości  $ED_{50}$  były porównywalne z fenytoiną ( $ED_{50} = 23,20$  mg/kg,  $TD_{50}$  (test *rotarod*)  $> 500$  mg/kg,  $PI > 21,60$ , szczury *p.o.*), będącą modelowym lekiem przeciwpadaczkowym, aktywnym w teście MES.<sup>66</sup> Obiecujące rezultaty otrzymano również wśród analogów opisanych wcześniej *N*-zasad Mannich'a, w których fragment fenylpiperazynowy zastąpiono morfoliną lub benzylopiiperazyną.<sup>96</sup> Modyfikacja ta spowodowała nieznaczne obniżenie aktywności w drgawkach MES, natomiast rozszerzyła działanie na drgawki pentylenetetrazolowe (PTZ). Dodatkowo 3-(2-chlorofenilo)-1-(morfolinometylo)-pirolidyno-2,5-dion działał efektywnie w teście 6 Hz ( $ED_{50} = 31,06$  mg/kg, myszy *i.p.*). W seriach tych wybrane połączenia charakteryzowały się również skutecznością w drgawkach wywołanych pilokarpiną u myszy (test PISP, *Pilocarpine Induced Status Prevention* model).<sup>96</sup>

Znaczną aktywność przeciwdrgawkową uzyskano w kolejnych seriach *N*-zasad Mannich'a wprowadzając w pozycji 3 pirolidyno-2,5-dionu ugrupowanie 2-bromofenyłowe lub 2-fluorofenyłowe.<sup>97</sup> Badania farmakologiczne pokazały, że szczególnie silnymi właściwościami przeciwdrgawkowymi charakteryzowały się pochodne 3-(2-bromofenilo)-pirolidyno-2,5-dionu, a najaktywniejsza substancja z  $ED_{50} = 7,40$  mg/kg (MES, szczury *p.o.*),  $TD_{50}$  (test *rotarod*, szczury *p.o.*)  $= 62,40$  mg/kg,  $PI = 8,43$ , zawierała w swojej strukturze jako fragment aminowy 4-fluorofenylopiiperazynę. Związek ten był znacznie bardziej efektywny w teście MES, porównując do modelowego leku - fenytoiny. Analogicznie jak w przypadku opisanych wcześniej pochodnych 3-chlorofenylopirolidyno-2,5-dionu, spektrum aktywności zależne było od budowy fragmentu aminowego.<sup>97</sup>

Dalsze prace badawcze w grupie *N*-zasad Mannich'a pochodnych pirolidyno-2,5-dionu polegały na wprowadzeniu w pozycji 3, dwóch podstawników fenylowych i/lub alifatycznych (grupa metylowa lub etylowa).<sup>98-100</sup> Aktywności przeciwdrgawkowa w powyższych seriach, zależała ściśle od podstawników w położeniu 3 pierścienia sukcyimidu, a także rodzaju podstawienia we fragmencie piperazynowym. Generalnie, w otrzymanych seriach, pochodne 3,3-difenylpirolidyno-2,5-dionu działały protekcyjnie w drgawkach MES, natomiast zastąpienie dwóch podstawników aromatycznych, grupami alifatycznymi - etylową i metylową, powodowało znaczne osłabienie lub utratę aktywności biologicznej.<sup>98,99</sup> Ciekawą zależność zaobserwowano w przypadku pochodnych 3-fenilo-3-metylopirolidyno-2,5-dionu,

które były aktywne jedynie w teście MES lub zarówno MES jak i PTZ w zależności od budowy fragmentu aminowego.<sup>100</sup> Do najaktywniejszych związków zaliczono pochodne 3-fenyl-3-metylopirolidyno-2,5-dionu, odpowiednio z ugrupowaniem 4-fluorofenyl-piperazynowym ( $ED_{50} = 7,78$  mg/kg (MES, szczury *p.o.*),  $TD_{50}$  (test *rotarod*, szczury *p.o.*) = 65,59 mg/kg,  $PI = 8,43$ ) lub 3,4-dichlorofenylpiperazynowym ( $ED_{50} = 15,11$  mg/kg (MES, szczury *p.o.*),  $TD_{50}$  (test *rotarod*, szczury *p.o.*) = 167,59 mg/kg,  $PI = 11,09$ ).<sup>100</sup> Z przeprowadzonych badań *in vitro* (dla wybranych związków), wynika, że najbardziej prawdopodobny mechanizm działania związany jest z wpływem na napięciowo-zależne kanały sodowe. Niektóre substancje charakteryzowały się również działaniem antymutagennym.<sup>99,100</sup> Poszerzone badania farmakologiczne, prowadzone dla kilkunastu, związków należących zarówno do 3-monopodstawionych, jak i 3,3-dipodstawionych pochodnych pirolidyno-2,5-dionu wykazały, że połączenia te charakteryzują się silnymi właściwościami antynocyceptywanymi w bólu indukowanym formaliną.<sup>101</sup> Wybrane substancje okazały się również ligandami receptorów serotoninowych 5-HT<sub>1A</sub> lub/i 5-HT<sub>7</sub>.<sup>102,103</sup>

Dalsze badania chemiczne wśród *N*-zasad Mannich'a kontynuowano wprowadzając w pozycji 3 pirolidyno-2,5-dionu, dwupierścieniowy układ tetrahydronaftalenu, połączony z nim poprzez atomem węgla spiro.<sup>67</sup> Wśród [7,8-f]benzo-2-azaspiro[4.5]dekano-1,3-dionów, najaktywniejsza okazała się pochodna 3-trifluorometylofenylpiperazyny z  $ED_{50} = 9,0$  mg/kg (MES, szczury *p.o.*),  $TD_{50} > 250$  mg/kg (test *rotarod*, *p.o.* szczury) i  $PI > 27,78$ , której mechanizm działania wynikał z oddziaływania na napięciowo-zależne kanały sodowe.<sup>67</sup> Otrzymane zasady Mannich'a były aktywne przede wszystkim w teście MES, a działanie to było bardziej efektywne niż opisane wcześniej dla homologów etylenowych i propylenowych.<sup>89</sup> Należy pokreślić, że zamiana pierścienia sukcyimidu na hydantoinę, spowodowała istotne nasilenie aktywności w teście MES, co przeanalizowano w seriach [7,8-f]benzo-1,3-diazaspiro[4.5]dekano-2,4-dionów oraz 5-cyklopropylo-5-fenyl-imidazolidno-2,4-dionów.<sup>104,105</sup>

Tematem przewodnim drugiego kierunku moich badań, stanowiącego jedno z osiągnięć habilitacji, było uzyskanie substancji o szerokiej aktywności przeciwdrgawkowej w zwierzęcych modelach drgawek, tj. teście MES, PTZ i/lub 6-Hz.

Prace syntetyczne prowadziłem w seriach amidowych pochodnych kwasów 2-(2,5-diokspiroolidyn-1-yl)-etanowego, -propanowego lub -butanowego, w których funkcję aminową stanowiły pochodne fenylpiperazyny lub benzyloaminy. Struktury proponowanych związków hybrydowych, zostały zaprojektowane łącząc w jednej cząsteczce fragmenty

chemiczne leków aktywnych w różnych typach zwierzęcych napadów drgawkowych. Potwierdzeniem słuszności koncepcji hybrydowych leków przeciwpadaczkowych było przyznanie grantu NCN 2012/05/D/NZ7/02328 pt. „*Poszukiwanie nowych substancji o zróżnicowanych właściwościach protekcyjnych w zwierzęcych modelach drgawek padaczkowych, wśród amidowych pochodnych kwasu 1-(2,5-dioksopirolidyn-1-yl)-octowego*”, którego jestem kierownikiem. Realizowana tematyka jest na tyle aktualna i interesująca, że zostałem zaproszony przez organizatorów konferencji (31<sup>st</sup> Camerino-Cyprus-Noordwijkerhout Symposium), odbywającej się w dniach 19–23.05.2013 r. na Uniwersytecie w Camerino (Włochy), do wygłoszenia wykładu prezentującego założenia ww. koncepcji. Należy podkreślić, że konferencja ta ma wieloletnią historię w corocznych spotkaniach, zapoczątkowanych w Noordwijkerhout przez *Medicinal Chemistry Division of the Royal Netherlands Chemical Society* w 1977 r., w których uczestniczą pracownicy naukowcy uczelni oraz przedstawiciele wielu firm farmaceutycznych z całego świata.

Wyniki badań farmakologicznych potwierdziły, iż proponowany fragment rdzeniowy, pozwala na uzyskanie połączeń o szerokiej aktywności w zwierzęcych modelach drgawek padaczkowych, a ponadto charakteryzujących się słabą neurotoksycznością ostrą. Szczegóły opisano w Rozdziale 2.2.

Wyrazem moich zainteresowań substancjami działającymi na ośrodkowe przewodnictwo dopaminergiczne i serotonergiczne, był udział w projekcie współfinansowanym ze środków NCBiR pt. „*Opracowanie innowacyjnego leku stosowanego w terapii schorzeń ośrodkowego układu nerwowego (OUN) schizofrenii, depresji i lęku, badania przedkliniczne*”. Projekt realizowano we współpracy z firmą farmaceutyczną Adamed Sp. z o.o. (Pieńków) oraz Instytutem Psychiatrii i Neurologii w Warszawie. W badaniach tych byłem wykonawcą zadań syntetycznych, co warto podkreślić jedynym, twórcą 46 ze 162 (28,40%) substancji zastrzeżonych w zgłoszeniach patentowych WO 2013/001498 oraz P.395468, łącznie z najaktywniejszą pochodną otrzymaną w projekcie - **AD\_N01**. Właściwości farmakologiczne wspomnianej substancji są aktualnie prezentowane na licznych międzynarodowych spotkaniach, poświęconych badaniom R&D kandydatów na nowe leki.

Zdobyte doświadczenie skutkowało zaangażowaniem mojej osoby do realizacji zadań syntetycznych w projekcie pt. „*Antagoniści receptora 5-HT<sub>6</sub>: Nowoczesne leki przeciwpsychotyczne o dodatkowym działaniu prokognitywnym*”. Projekt był realizowany w kooperacji z Instytutem Farmakologii PAN w Krakowie, a jego rezultatem są dwa zgłoszenia patentowe, międzynarodowe PCT/PL2014/000072 oraz polskie - P.413429.

Aktualnie, jako wykonawca zadań syntetycznych uczestniczę w projekcie pt. „Nowa nieamyloidowa terapia zaburzeń poznawczych”, który uzyskał dofinansowanie NCBiR w ramach Programu Badań Stosowanych (PBS). Badania te są realizowane przez konsorcjum naukowo-biznesowe złożone z Uniwersytetu Jagiellońskiego - Collegium Medicum (lider konsorcjum), Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie (IF PAN) oraz firmy farmaceutycznej Celon Pharma S.A. (Łomianki / Kiełpin).

Podsumowując, efektem mojej aktywności naukowo-badawczej po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych, było współautorstwo w **23** publikacjach oryginalnych (sumaryczny *impact factor* (IF) = **52,248**, punktacja MNiSW: **576**).



#### 4. PIŚMIENNICTWO

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/> (WHO, Epilepsy).
2. Chang, B.S.; Lowenstein, D.H. Epilepsy, *N. Eng. J. Med.* **2003**, *349*, 1257–1266.
3. Stafstrom, C.E. Epilepsy: a review of selected clinical syndromes and advances in basic science. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2006**, *26*, 983–1004.
4. Craig, I.; Tallis, R.; General practice management of adult-onset epilepsy analyzed. *Care Elderly* **1991**, *3*, 69–72.
5. Hauser, W.A. Seizure disorders: the changes with age. *Epilepsia* **1992**, *33* (suppl. 4) 6–14.
6. Granger, N.; Convers, P.; Beauchet, O.; Imler, D.; Viallon, A.; Laurent, B.; Michel, D. First epileptic seizure in the elderly: electroclinical and etiological data in 341 patients. *Rev. Neurol. (Paris)* **2002**, *158*, 1088–1095.
7. Cloyd, J.; Hauser, W.; Towne A., Ramsay R., Mattson R., Gilliam F., Walczak T.: Epidemiological and medical aspects of epilepsy in the elderly. *Epilepsy Res.* **2006**, *68* (suppl. 1), 39–48.
8. Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H.K.; Schafer-Korting, M. *Farmakologia i Toksykologia*. Wydawnictwo medyczne Urban & Partner, Wrocław **2001**.
9. Sasa, A. New frontier in epilepsy: Novel antiepileptogenic drugs. *J. Pharmacol. Sci.* **2006**, *100*, 487–494.
10. Brodie, M.J. Antiepileptic drug therapy the story so far. *Seizure*, **2010**, *19*, 650–655.

11. Perucca, E. Marketed new antiepileptic drugs: are they better than old-generation agents? *Ther. Drug Monit.* **2002**, *24*, 74–80.
12. Pipeline Insight: Epilepsy © Datamonitor (Published 10/2006).
13. Kamiński, K.; Zajdel, P.; Wesołowska, A.; Obniska, J.; Pawłowski, M. Leki przeciwpadaczkowe - stan aktualny i perspektywy farmakoterapii. *Czasopismo Aptekarskie* **2011**, *12*, 57–73.
14. Schachter, S.C. Currently available antiepileptic drugs. *Neurotherapeutics* **2007**, *4*, 4–11.
15. Łuszczki, J.J. Third-generation antiepileptic drugs: mechanisms of action, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacol. Rep.* **2009**, *61*, 197–216.
16. Serrano, E.; Kanner, A.M. Recent treatment advances and novel therapeutic approaches in epilepsy. *F1000Prime Rep.* **2015**, *7*, 61 (doi:10.12703/P7-61).
17. Picot, M.C.; Baldy-Moulinier, M.; Dauris, J.P.; Dujols, P.; Crespel, A. The prevalence of epilepsy and pharmaco-resistant epilepsy in adults: A population-based study in a western European country. *Epilepsia* **2008**, *49*, 1230–1238.
18. Cramer, J.A.; Mintzer, S.; Wheless, J.; Mattson, R.H. Adverse effects of antiepileptic drugs: a brief overview of important issues. *Expert. Rev. Neurother.* **2010**, *10*, 885–891.
19. Perucca, P.; Gilliam, F.G. Adverse effects of antiepileptic drugs. *Lancet Neurol.* **2012**, *11*, 792–802.
20. Sander, J.W.; Walker, M. *CONNECT Pharma's Development Staff Epilepsy: Therapeutic advances and Commercial opportunities*. 1st ed. Oxford. CONNECT Pharma Ltd. **1997**.
21. Khan, H.N.; Kulsoom, S.; Rashid, H. Ligand based pharmacophore model development for the identification of novel antiepileptic compounds. *Epilepsy Res.* **2012**, *98*, 62–71.
22. Bialer, M.; Johannessen, S.I.; Levy, R.H.; Perucca, E.; Tomson, T. White, H.S. Progress report on new antiepileptic drugs: A summary of the Twelfth Eilat Conference (EILAT XII). *Epilepsy Res.* **2015**, *111*, 85–141.
23. Bialer, M.; Johannessen, S.I.; Levy, R.H.; Perucca, E.; Tomson, T. White, H.S. Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the Eleventh Eilat Conference (EILAT XI). *Epilepsy Res.* **2013**, *103*, 2–30.
24. Bialer, M.; Johannessen, S.I.; Levy, R.H.; Perucca, E.; Tomson, T. White, H.S. Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the Tenth Eilat Conference (EILAT X). *Epilepsy Res.* **2010**, *92*, 89–124.
25. Bialer, M.; Johannessen, S.I.; Kupferberg, H.J.; Levy, R.H.; Perucca, E.; Tomson, T. Progress report on new antiepileptic drugs: A summary of the Eighth Eilat Conference (EILAT VIII). *Epilepsy Res.* **2007**, *73*, 1–52.
26. Malawska, B. Application of pharmacophore models for the design and synthesis of new anticonvulsant drugs. *Mini Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 341–348.
27. Dimmock, J.R.; Puthucode, R.N.; Smith, J.M.; Hetherington, M.; Quail, J.W.; Pugazhenti, U.; Lechler, T.; Stables, J.P. (Aryloxy)aryl semicarbazones and related compounds: A novel class of anticonvulsant agents possessing high activity in the maximal electroshock screen. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3984–3997.

28. Yogeewari, P.; Sriram, D.; Thirumurugan, R.; Raghavendran, J.V.; Sudhan, K.; Pavana, R.K.; Stables, J. Discovery of *N*-(2,6-dimethylphenyl)-substituted semicarbazones as anticonvulsants: Hybrid Pharmacophore-Based Design. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6202–6211.
29. Yogeewari, P.; Ragavendran, J.V.; Sriram, D.; Nageswari, Y.; Kavya, R.; Sreevatsan, N.; Vanitha, K.; Stables, J. Discovery of 4-aminobutyric acid derivatives possessing anticonvulsant and antinociceptive activities: A Hybrid Pharmacophore Approach. *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 2459–2467.
30. Bailleux, V.; Vallee, L.; Nuyts, J.P.; Vamecq, J. Synthesis and anticonvulsant activity of some *N*-phenylphthalimides. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 1817–1821.
31. Vamecq, J.; Lambert, D.; Poupaert, J. H.; Masereel, B.; Stables, J.P. Anticonvulsant activity and interactions with neuronal voltage-dependent sodium channel of analogues of ameltolide. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3307–3313.
32. Vamecq, J.; Bac, P.; Herrenknecht, C.; Maurois, P.; Delcourt, P.; Stables, J.P. Synthesis and anticonvulsant and neurotoxic properties of substituted *N*-phenyl derivatives of the phthalimide pharmacophore. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1311–1319.
33. Wong, M.G.; Defina, J.A.; Andrews, P.R. Conformational analysis of clinically active anticonvulsant drugs. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 562–572.
34. Tasso, S.M.; Bruno-Blanch, L.E.; Moon, S.C.; Estiu, G.L. Pharmacophore searching and QSAR analysis in the design of anticonvulsant drugs. *J. Mol. Struct.* **2000**, *504*, 229–240.
35. Estrada, E.; Peña, A. In silico studies for the rational discovery of anticonvulsant compounds. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 2755–2770.
36. Bruno-Blanch, L.; Gálvez, J.; Garcia-Domenach, R. Topological virtual screening: a way to find new anticonvulsant drugs from chemical diversity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2749–2754.
37. Turski, W.A. Modele drgawek padaczkowych. Padaczka - mechanizmy i farmakoterapia. XV Zimowa szkoła Instytutu Farmakologii PAN, Mogilany, **1998**, 35–44.
38. Löscher, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure* **2011**, *20*, 359–368.
39. Castel-Branco, M.M.; Alves, G.L.; Figueiredo, I.V.; Falcão, A.C.; Caramona, M.M. The maximal electroshock seizure (MES) model in the preclinical assessment of potential new antiepileptic drugs. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **2009**, *31*, 101–106.
40. White, S.H.; Woodhead, J.H.; Wilcox, K.S.; Stables, J.P.; Kupferberg, H.J.; Wolf, H.H. Discovery and preclinical development of antiepileptic drugs. In *Antiepileptic Drugs*, 5th ed.; Levy, R.H.; Mattson, R.H.; Meldrum, B.S.; Perucca E., Eds.; Lippincott: Philadelphia, PA, **2002**.
41. Barton, M.E.; Klein, B.D.; Wolf, H.H.; White, H.S. Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy. *Epilepsy Res.* **2001**, *47*, 217–227.
42. Lattanzi, S.; Cagnetti, C.; Foschi, N.; Provinciali, L.; Silvestrini, M. Lacosamide monotherapy for partial onset seizures. *Seizure* **2015**, *27*, 71–74.
43. <http://www.ucb.com/our-products/product-list/cns/vimpat>
44. Smith, P.A.S.; Horowitz, J.P. A Synthesis for unsymmetrically substituted succinic acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 3418–3419.



45. Miller, C.A.; Long L.M. Anticonvulsants. I. An investigation of *N*-R- $\alpha$ -R1- $\alpha$ -phenylsuccinimides. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 4895–4898.
46. Le Moal, H. Recherches dans la série des diacides  $\alpha,\alpha$ -disubstitués et de leurs derives. Étude physico-chimique de la structure de quelques diacides organiques  $\alpha$ - et  $\alpha,\alpha$ -disubstitués. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1956**, *1*, 418–424.
47. Correa, R.; Cechinel Filho, A.V.; Rosa, P.W.; Isolani Pereira, C.; Schlemper, V.; Nunes, R.J. Synthesis of new succinimides and sulphonated derivatives with analgesic action in mice. *Pharm. Sci.* **1997**, *3*, 67–71.
48. Manning, P.A.; Richards, D.A.; Bowery, N.G. Pharmacology of absence epilepsy. *Trends in Pharmacol. Sci.* **2003**, *24*, 542–549.
49. Wróbel, M.Z.; Chodkowski, A.; Herold, F.; Gomółka, A.; Kleps, J.; Mazurek, A.P.; Pluciński, F.; Mazurek, A.; Nowak, G.; Siwek, A.; Stachowicz, K.; Sławińska, A.; Wolak, M.; Szewczyk, B.; Satała, G.; Bojarski, A.J.; Turło, J. Synthesis and biological evaluation of novel pyrrolidine-2,5-dione derivatives as potential antidepressant agents. Part 1. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *63*, 484–500.
50. Zajdel, P.; Subra, G.; Verdie, P.; Bojarski, A.J.; Duszyńska, B.; Basista, K.; Obniska, J.; Martinez, J.; Pawłowski, M. The influence of an ethylene spacer on the 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptor affinity of arylpiperazine derivatives of amides with *N*-acylated amino acids and 3-differently substituted pyrrolidine-2,5-diones. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 800–808.
51. Zajdel, P.; Subra, G.; Bojarski, A.J.; Duszyńska, B.; Tatarczyńska, E.; Nikiforuk, A.; Chojnacka-Wójcik, E.; Pawłowski, M.; Martinez, J. Novel class of arylpiperazines containing *N*-acylated amino acids: Their synthesis, 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> receptor affinity, and in vivo pharmacological evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2907–2919.
52. Bojarski, A.J.; Paluchowska, M.H.; Duszyńska, B.; Bugno, R.; Kłodzińska, A.; Tatarczyńska, E.; Chojnacka-Wójcik, E. Structure-intrinsic activity relationship studies in the group of 1-imido/amido substituted 4-(4-arylpiperazin-1-yl)cyclohexane derivatives; new, potent 5-HT<sub>1A</sub> receptor agents with anxiolytic-like activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 1391–402.
53. Bojarski, A.J.; Duszyńska, B.; Kołaczkowski, M.; Kowalski, P.; Kowalska, T. The impact of spacer structure on 5-HT<sub>7</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptor affinity in the group of long-chain arylpiperazine ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5863–5866.
54. Karthikeyan, K.; Sivakumar, P.M.; Doble, M.; Perumal, P.T. Synthesis, antibacterial activity evaluation and QSAR studies of novel dispiropyrrolidines. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 3446–3452.
55. Matviuk, T.; Rodriguez, F.; Saffon, N.; Mallet-Ladeira, S.; Gorichko, M.; de Jesus Lopes Ribeiro A.L.; Pasca M.R.; Lherbet, C.; Voitenko, Z.; Baltas, M. Design, chemical synthesis of 3-(9H-fluoren-9-yl)pyrrolidine-2,5-dione derivatives and biological activity against enoyl-ACP reductase (InhA) and Mycobacterium tuberculosis. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *70*, 37–48.
56. Matviuk, T.; Mori, G.; Lherbet, C.; Rodriguez, F.; Pasca, M.R.; Gorichko, M.; Guidetti, B.; Voitenko, Z.; Baltas, M. Synthesis of 3-heteryl substituted pyrrolidine-2,5-diones via catalytic Michael reaction and evaluation of their inhibitory activity against InhA and Mycobacterium tuberculosis. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *71*, 46–52.

57. Daly, M.J.; Jones, G.W.; Nicholls, P.J.; Smith, H.J.; Rowlands, M.G.; Bunnett, M.A. Synthesis and biochemical evaluation of analogues of aminoglutethimide based on phenylpyrrolidine-2,5-dione. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 520–523.
58. Whomsley, R.; Dahneem, A.Y.; Nicholls, P.J.; Smith, H.J.; Ahmadi, M.; Khalaf, L.F. 1-Pentyl-3-(4-aminophenyl)pyrrolidine-2,5-dione, a selective aromatase inhibitor: in vivo studies. *J. Enzyme Inhib.* **1993**, *7*, 137–145.
59. Ahmed, S.; Smith, J.H.; Nicholls, P.J.; Whomsley, R.; Cariuk, P. Synthesis and biological evaluation of novel pyrrolidine-2,5-dione inhibitors as potential anti-tumour agents. *Drug. Des. Discov.* **1995**, *12*, 275–287.
60. Maftai, C.V.; Fodor, E.; Jones, P.G.; Franz, M.H.; Kelter, G.; Fiebig, H.; Neda, I. Synthesis and characterization of novel bioactive 1,2,4-oxadiazole natural product analogs bearing the *N*-phenylmaleimide and *N*-phenylsuccinimide moieties. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 2202–2215.
61. Pękala, E.; Liana, P.; Kubowicz, P.; Powroźnik, B.; Obniska, J.; Chlebek, I.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, G. Evaluation of mutagenic and antimutagenic properties of new derivatives of pyrrolidine-2,5-dione with anti-epileptic activity, by use of the *Vibrio harveyi* mutagenicity test. *Mutat. Res.* **2013**, *758*, 18–22.
62. Chien, S.C.; Chen, M.L.; Kuo, H.T.; Tsai, Y.C.; Lin, B.F.; Kuo, Y.H. Anti-inflammatory activities of new succinic and maleic derivatives from the fruiting body of *Antrodia camphorate*. *J. Agric. Food. Chem.* **2008**, *27*, 7017–7022.
63. Godavarthy, S.S.; Yerramsetty, K.M.; Rachakonda, V.K.; Neely, B.J.; Madihally, S.V.; Robinson, R.L. Jr.; Gasem, K.A. Design of improved permeation enhancers for transdermal drug delivery. *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*, 4085–4099.
64. Spina, E.; Perugi, G. Antiepileptic drugs: indications other than epilepsy. *Epileptic Disord.* **2004**, *6*, 57–75.
65. Obniska, J.; Kamiński, K.; Skrzyńska, D.; Pichór, J. Synthesis and anticonvulsant activity of new *N*-[(4-arylpiperazin-1-yl)-alkyl] derivatives of 3-phenyl pyrrolidine-2,5-dione. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 2224–2233.
66. Obniska, J.; Kopytko, M.; Zagórska, A.; Chlebek, I.; Kamiński, K. Synthesis and anticonvulsant properties of new Mannich bases derived from 3-aryl-pyrrolidine-2,5-diones. *Arch. Pharm.* **2010**, *343*, 333–341.
67. Obniska, J.; Byrtus, H.; Kamiński, K.; Pawłowski, M.; Szczesio, M.; Karolak-Wojciechowska, J. Design, synthesis and anticonvulsant properties of new *N*-Mannich bases derived from spirosuccinimides and spirohydantoin. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 6134–6142.
68. So-Yeop, H.; Young-Ah, K. Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447–2467.
69. Obniska, J.; Zagórska, A. Synthesis and anticonvulsant properties of new *N*-[(4-arylpiperazin-1-yl)-methyl] derivatives of 3-aryl pyrrolidine-2,5-dione and 2-azaspiro[4.4]nonane-1,3-dione. *II Farmaco*, **2001**, *58*, 1227–1234.
70. Obniska, J.; Jurczyk, S.; Zejc, A.; Kamiński, K.; Taterczyńska, E.; Stachowicz, K. Anticonvulsant properties of *N*-(4-methylpiperazin-1-yl)- and *N*-[3-(4-methyl-piperazin-1-yl)propyl] derivatives of 3-aryl- and 3-spirocycloalkyl-pyrrolidine-2,5-dione. *Pharmacol. Rep.* **2005**, *57*, 170–175.

71. Dias, K.S., Viegas, C. Multi-target directed drugs: A modern approach for design of new drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Neuropharmacol.* **2014**, *12*, 239–255.
72. Fernández-Bachiller, M.I.; Pérez, C.; González-Muñoz, G.C.; Conde, S.; López, M.G.; Villarroya, M.; García, A.G.; Rodríguez-Franco, M.I. Novel tacrine-8-hydroxyquinoline hybrids as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease, with neuroprotective, cholinergic, antioxidant, and copper-complexing properties. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4927–4937.
73. Muregi, F.W.; Ishih, A. Next-generation antimalarial drugs: Hybrid molecules as a new strategy in drug design. *Drug Dev. Res.* **2010**, *71*, 20–32.
74. Tang, C.; Li, C.; Zhang, S.; Hu, Z.; Wu, J.; Dong, C.; Huang, J.; Zhou, H.B. Novel bioactive hybrid compound dual targeting estrogen receptor and histone deacetylase for the treatment of breast cancer. *J. Med. Chem.* **2015**, *11*, 4550–4572.
75. Gediya, L.K.; Njar, V.C. Promise and challenges in drug discovery and development of hybrid anticancer drugs. *Expert Opin. Drug Discov.* **2009**, *4*, 1099–1111.
76. Shenvi, S.; Kiran, K.R.; Kumar, K.; Diwakar, L.; Reddy, G.C. Synthesis and biological evaluation of boswellic acid-NSAID hybrid molecules as anti-inflammatory and anti-arthritic agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *98*, 170–178.
77. Morphy, R.; Rankovic, Z. Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6523–6543.
78. Kulak, W.; Sobaniec, W.; Wojtal, K.; Czuczwar, S.J. Calcium modulation in epilepsy. *Pol. J. Pharmacol.* **2004**, *56*, 29–41.
79. Obniska, J.; Dzierżawska-Majewska, A.; Zagórska, A.; Zajdel, P.; Karolak-Wojciechowska, J. Synthesis, physicochemical and anticonvulsant properties of *N*-benzyl and *N*-aminophenyl derivatives of 2-azaspiro[4.4]nonane and [4.5]decane-1,3-dione. Part I. *Il Farmaco* **2005**, *60*, 529–539.
80. Obniska, J.; Kamiński, K.; Zagórska, A.; Dzierżawska-Majewska, A.; Karolak-Wojciechowska, J. Synthesis and anticonvulsant activity of new fluorinated *N*-phenyl- and *N*-benzyl-2-azaspiro[4.4]nonane- and [4.5]decane-1,3-dione derivatives. Part III. *J. Fluor. Chem.* **2006**, *127*, 417–425.
81. Kamiński K., Obniska J., Dybała M. Synthesis, physicochemical and anticonvulsant properties of new *N*-phenylamino derivatives of 2-azaspiro[4.4]nonane and [4.5]decane-1,3-diones. Part V. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 53–61.
82. Obniska, J.; Kamiński, K.; Chlebek, I. Synthesis and anticonvulsant activity of new spirosuccinimides differently substituted at the imide nitrogen atom. *Acta Polon. Pharm.* **2009**, *66*, 663–669.
83. Bialer, M. Chemical properties of antiepileptic drugs (AEDs). *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 887–895.
84. Obniska, J.; Kopytko, M.; Zagórska, A.; Chlebek, I.; Kamiński, K. Synthesis and anticonvulsant properties of new Mannich bases derived from 3-aryl-pyrrolidine-2,5-diones. Part 1. *Arch. Pharm.* **2010**, *343*, 333–341.
85. Obniska, J.; Kamiński, K. Relationships between the lipophilicity and anticonvulsant activity of *N*-benzyl-2-azaspiro[4.4]nonane and [4.5]decane-1,3-dione derivatives. *J. Planar Chromatogr.* **2005**, *18*, 240–243.

86. Obniska, J.; Kamiński, K. RPTLC determination of the lipophilicity of some new *N*-[(4-arylpiperazin-1-yl)alkyl] spirosuccinimides. *J. Planar Chromatogr.* **2005**, *18*, 384–387.
87. Obniska, J.; Kamiński, K. Synthesis and anticonvulsant properties of new *N*-phenylamino derivatives of 2-azaspiro[4.4]nonane, 2-azaspiro[4.5]decane-1,3-dione and 3-cyclohexylpyrrolidine-2,5-dione. Part IV. *Acta Polon. Pharm.* **2006**, *63*, 101–108.
88. Obniska, J.; Lesyk, R.; Atamanyuk, D.; Kamiński, K. Synthesis and anticonvulsant activity of a series of *N*-substituted bicyclo[2.2.1]hept-5-ene-2,3-dicarboximides. *Acta Polon. Pharm.* **2005**, *62*, 213–219.
89. Obniska, J.; Kamiński, K.; Tatarczyńska, E. Impact of aromatic substitution on the anticonvulsant activity of new *N*-(4-arylpiperazin-1-yl)-alkyl-2-azaspiro[4.5]decane-1,3-dione derivatives. *Pharmacol. Rep.* **2006**, *58*, 207–214.
90. Kamiński, K.; Obniska, J.; Zagórska, A.; Maciąg, D. Synthesis, physicochemical and anticonvulsant properties of new *N*-(pyridine-2-yl) derivatives of 2-azaspiro[4.4]nonane and [4.5]decane-1,3-dione. Part II. *Arch. Pharm.* **2006**, *339*, 255–261.
91. Kamiński, K.; Obniska, J. Synthesis and anticonvulsant properties of new 1-(pyridinyl)-3-substituted pyrrolidine-2,5-dione derivatives. *Acta Polon. Pharm.* **2008**, *65*, 457–465.
92. Kamiński, K.; Obniska, J. Design, synthesis and anticonvulsant activity of *N*-phenylamino derivatives of 3,3-dialkyl-pyrrolidine-2,5-diones and hexahydro-isoindole-1,3-diones. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 4921–4931.
93. Obniska, J.; Kamiński, K. Lipophilicity characterization of new *N*-phenylamino-azaspiranes as potential anticonvulsant agents. *Biomed. Chromatogr.* **2006**, *20*, 1185–1191.
94. Obniska, J.; Kamiński, K.; Chlebek, I. Synthesis and anticonvulsant activity of new spirosuccinimides differently substituted at the imide nitrogen atom. *Acta Polon. Pharm.* **2009**, *66*, 663–669.
95. Obniska, J.; Chlebek, I.; Pichór, J.; Kopytko, M.; Kamiński, K. Synthesis, physicochemical and anticonvulsant properties of new *N*-[(4-arylpiperazin-1-yl)-alkyl]-3-phenyl and 3-(3-methylphenyl)-pyrrolidine-2,5-diones. *Acta Polon. Pharm.* **2009**, *66*, 639–647.
96. Kamiński, K.; Obniska, J.; Chlebek, I.; Wiklik, B.; Rzepka, S. Design, synthesis and anticonvulsant properties of new *N*-Mannich bases derived from 3-phenylpyrrolidine-2,5-diones. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 6821–6830.
97. Obniska, J.; Rzepka, S.; Kamiński, K. Synthesis and anticonvulsant activity of new *N*-Mannich bases derived from 3-(2-fluorophenyl)- and 3-(2-bromophenyl)-pyrrolidine-2,5-diones. Part II. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 4872–4880.
98. Obniska, J.; Chlebek, I.; Kamiński, K. Synthesis and anticonvulsant properties of new Mannich bases derived from 3,3-disubstituted pyrrolidine-2,5-diones. Part IV. *Arch. Pharm.* **2012**, *345*, 713–722.
99. Obniska, J.; Chlebek, I.; Kamiński, K.; Karolak-Wojciechowska, J. Synthesis and anticonvulsant properties of new *N*-Mannich bases derived from 3,3-diphenyl- and 3-ethyl-3-methyl-pyrrolidine-2,5-diones. Part III. *Arch. Pharm.* **2013**, *346*, 71–82.
100. Kamiński, K.; Obniska, J.; Chlebek, I.; Liana, P.; Pękala, E. Synthesis and biological properties of new *N*-Mannich bases derived from 3-methyl-3-phenyl- and 3,3-dimethyl-succinimides. Part V. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *66*, 12–21.

101. Obniska, J.; Sałat, K.; Librowski, T.; Kamiński, K.; Lipkowska, A.; Wiklik, B.; Rybka, S.; Rapacz, A. Antinociceptive properties of *N*-Mannich bases derived from 3-substituted pyrrolidine-2,5-dione in the formalin model of persistent pain in mice. *Pharmacol. Rep.* **2015**, *67*, 63–68.
102. Obniska, J.; Chlebek, I.; Kamiński, K.; Bojarski, A.J.; Satała, G. Anticonvulsant activity and 5-HT<sub>1A</sub>/5-HT<sub>7</sub> receptors affinity of piperazine derivatives of 3,3-diphenyl- and 3,3-dimethyl-succinimides. *Lett. Drug. Des. Discov.* **2013**, *10*, 173–182.
103. Obniska, J.; Chlebek, I.; Kamiński, K.; Bojarski, A.J.; Satała, G. Synthesis, anticonvulsant activity and 5-HT<sub>1A</sub>/5-HT<sub>7</sub> receptors affinity of 1-[(4-arylpiperazin-1-yl)-propyl]-succinimides. *Pharmacol. Rep.* **2012**, *64*, 326–335.
104. Byrtus, H.; Obniska, J.; Czopek, A.; Kamiński, K.; Pawłowski, M. Synthesis and anticonvulsant activity of new *N*-Mannich bases derived from 5-cyclopropyl-5-phenyl- and 5-cyclopropyl-5-(4-chlorophenyl)-imidazolidine-2,4-diones. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *10*, 6149–6156.
105. Byrtus, H.; Obniska, J.; Czopek, A.; Kamiński, K. Synthesis and anticonvulsant activity of new *N*-Mannich bases derived from 5-cyclopropyl-5-phenyl-hydantoins. *Arch. Pharm.* **2011**, *344*, 231–241.